

서양고추냉이 Peroxidase의 염기성 Isozyme의 아미노산 배열에 관한 연구

이진영 · 방병호

서울보건전문대학 식품영양과

Amino Acid Sequence Studies of Basic Isozyme of Horseradish Peroxidase

Jin-Young Lee, Byung-Ho Bang

Dept. of Food & Nutrition, Seoul Health Junior College

Abstract

The amino acid sequence of basic isozyme E5 of Horseradish Peroxidase(HRP E5) was determined by protein sequencing. HRP E5 consisted about 300 residues, and has a molecular weight of approximately $36,000 \pm 500$ dalton. The protein was rich in aspartic acid (14%), arginine(13%), and leucine(11%). The primary structure of HRP E5 was established by sequencing its tryptic(T_1 - T_{19}) and lysylendopeptic(A_1 - A_3) peptides. The sequence homology between HRP E5 and HRP C(neutral isozyme of horseradish peroxidase) is found to be more than 66%. The highest concentration of identical residues are found on residues 29~56, 90~123, and 155~173, but relatively low on 174~271.

Key word : horseradish, peroxidase, primary structure

서 론

서양고추냉이 peroxidase(Horseradish Peroxidase, HRP)는 30개 이상의 다양한 isozyme으로 존재하며¹⁾, 이는 크게 산성(isozyme A), 중성(isozyme B, C), 염기성(isozyme D, E)의 3개의 isozyme군으로 분류하고 있다^{2, 3)}. 또한 이들 isozyme들은 다시 몇 개의 주요 component로 분류되어, 산성 isozyme A는 3개, 중성 isozyme C는 5개의 서로 다른 component로 구성됨이 밝혀져 있고^{3, 4)} Aibara들⁵⁾은 염기성 isozyme E는 CM-sephadex column chromatography로 서로 다른 6개의 isozyme으로 분리 정제할 수 있으며 각각의 isozyme에 대한 특성을 보고하고 있다. Peroxidase는 과산화효소로서 heme을 중심으로 산화 환원작용에 관여하는 중요한 heme protein으로서⁶⁾, 이러한 효소작용의 기작을 밝히기 위

해서는 무엇보다도 그 효소구조를 명백히 해야 할 필요가 있으며, 각기 기원이 다른 peroxidase의 구조에 관한 연구가 다수 보고되고 있다^{7~11)}. 서양고추냉이 Peroxidase의 1차구조는 Welinder 및 Fujimaki등⁷⁾에 의해 중성 isozyme의 구조가 이미 밝혀져 있으나 염기성 isozyme에 관한 보고는 아직 얻어지지 않았다. 한편, 중성 isozyme은 당함량이 많고 결정화에 어려움이 많아 그 고차구조를 밝히는 데는 어려움이 있는 것으로 알려져 있으며 Aibara등⁵⁾의 보고에 따르면 염기성 isozyme중에서 E5 성분이 구조해석에 적절한 결정이 형성된다고 한다. 이에, 본 연구에서는 서양고추냉이 염기성 isozyme E5(HRPE5)의 구조와 기능기작의 이해를 높이기 위해 trypsin과 lysylendo-peptidase로 소화하고 얻어진 peptide단편을 분리, 정제하여 그 아미노산의 조성 및 아미노산 배열을 분석하여 중성 isozyme C(HRP C)⁷⁾의 결과와 비교, 분석하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

Trypsin(type III, TPCK처리용)과 Achromobacter protease I(lysylendopeptidase)는 Sigma사에서 구입하여 사용하였다. 서양고추냉이 peroxidase의 염기성 isozyme E5(HRP E5)는 Aibara등⁵⁾에 의해 분리 정제되어 ammonium sulfate로 결정화한 것을 사용하여, Fig. 1과 같은 순서로 1차구조분석을 하였다.

2. 분자량의 결정

분자량은 Schachman과 Edelsten¹²⁾의 방법을 따른 침용평형법(sedimentation equilibrium)에 의해 photoelectric scanner를 접속한 Hitachi UCA-1A analytical ultracentrifuge를 사용하여 측정 산출하였다. HRP E5 용액은 0.1M sodium phosphate buffer(0.2M sodium chloride 포함, pH 7.0)로 평형화한 Sephadex G-25 column을 통과시킨 후, 20℃에서 13,000 rpm으로 435 nm에서 측정되었고, 아미노산 조성으로 산출한 partial specific volume은 0.734 ml/g으로 계산하였다.

3. 효소분해에 의한 polypeptide의 단편화

미변성 단백질은 자신의 고차구조로 인해 단백질 분해효소에 의한 분해를 받기 힘들므로 효소분해에 앞서

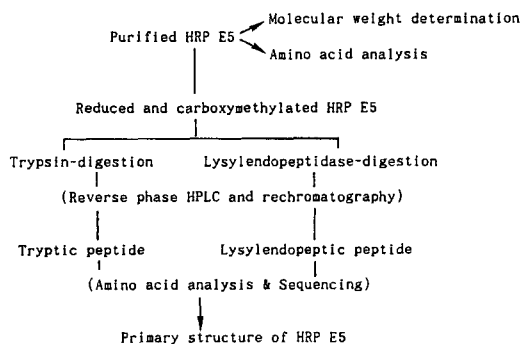


Fig 1. Strategy for sequence determination of HRP E5.

기질 단백질을 mercaptoethanol로 환원시키고, carboxymethylation하였다¹³⁾. Trypsin 분해는 0.1M Tris-HCl buffer, pH 8.2로 30℃에서 6시간동안 반응시켰는데, 이때의 효소 기질의 비율은 1:50이었다. Achromobacter protease I (lysylendopeptidase)에 의한 분해는 같은 조건에서 24시간 반응시켰으며 효소 기질의 비율은 1:160이었다. 반응이 끝난 peptide혼합반응액은 각각 Cosmosil 5C₁₈-300 column을 장착한 RP-HPLC(0.1% TFA /0-60% acetonitrile gradients)로 분리 정제하였다.

4. 아미노산 분석

아미노산 분석은 Hitachi 835 아미노산 분석기를 사용하였고, 분석에 사용한 sample은 진공상태로 6M HCl로 110℃에서 각각 24시간, 48시간, 72시간 반응시키고, 혹은 3M mercaptoethane sulfonic acid로 110℃에서 48시간 반응시켰으며, cysteine잔기는 performic acid oxidation하여 cysteic acid로 처리한 후 분석하였다.

5. Peptide의 아미노산 배열분석

아미노산 배열은 120A PTH 분석기가 장착된 Applied Biosystems Model 477A Sequencer로 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 분자량의 측정

침용평형법으로 측정 산출한 HRP E5의 분자량은 $36,100 \pm 500$ dalton으로 Aibara등⁵⁾이 보고한 결과와 거의 일치하나, Welinder⁷⁾가 보고한 중성 isozyme HRP C의 분자량 41,600dalton보다는 다소 적은 수치이다.

2. HRP E5의 아미노산 조성

HRP E5의 아미노산 분석 결과는 Table 1에서 보는 바와 같이 총 아미노산의 수는 300 잔기이며, 그 중 Aspartic acid(14%), Leucine(11%)과 Arginine(13%)이 풍부하게 존재 하였으며, 나머지 아미노산은 고른 분포를 보이고 있다. 또한 Welinder⁷⁾가 보고

Table 1. Amino acid composition of the HRP E5 and HRP C⁷⁾

Amino acid	HRP E5			HRP C ⁷⁾
	Wt amino acid (g)/100g	Mol/mol	Integer	Integer
Aspartic acid	14.3	38.9	39	48
Threonine	6.8	21.6	22	25
Serine	6.7	23.6	24	25
Glutamic acid	6.5	16.1	16	20
Proline	5.6	18.4	18	17
Glycine	3.9	18.7	19	17
Alanine	5.9	23.9	24	23
Valine	5.8	18.1	18	17
Methionine	1.4	2.8	3	4
Cysteine	4.2	9.1	9	8
Isoleucine	4.7	13.1	13	13
Leucine	11.9	32.7	33	35
Tyrosine	3.0	5.9	6	5
Phenylalanine	8.6	18.9	19	20
Lysine	5.3	7.0	7	6
Histidine	1.3	2.9	3	3
Tryptophan	0.6	0.7	1	1
Arginine	12.5	26.3	26	21
Total			300	308

* Cysteine content was determined as cysteic acid after performic acid oxidation. Tryptophan content was determined by analysis after 3M mercaptoethane sulfonid acid hydrolysis.

한 중성 isozyme HRP C의 아미노산 분석결과보다는 총잔기수에서 8잔기 적으나 aspartic acid, glutamic acid와 arginine을 제외하고는 매우 유사한 결과를 보인다.

3. Peptide의 아미노산 조성고 배열

아미노산의 배열을 분석하기 위해 정제된 HRP E5는 trypsin으로 분해되었고 아미노산 분석의 결과로부터 arginine 26잔기와 lysine 7잔기를 확인하였으므로 34개의 단편화된 peptide를 기대할 수 있다. Fig. 2에서 나타내는 바와 같이 각각의 peptide를 Cosmosil 5C₁₈-300 column으로 분별하고, 그 중 32개의 peptide를 재정제하여 분석 가능한 것으로 판단되는 19개의 peptide를 얻었다. 얻어진 19개의 tryptic peptide의 아미노산 조성고 그 배열을 분석한 결과는 각각 Table 2와 Table 3에서 보는 바와 같다. HRP E5는

overlapping peptide의 배열을 분석하기 위해 lyslendopeptidase로 분해되어 Fig. 3에서 나타나는 바와 같이 6개의 단편화된 peptide를 얻어 다시 3개의 peptide로 재정제, 단리하여 아미노산 분석고 그 배열을 분석한 결과는 Table 4, Table 5와 같다. Table 3과 Table 5에서 얻어진 peptide단편의 아미노산 배열 결과를 HRP C의 것과 비교하여 전체 HRP E5의 배열을 추적한 결과는 N-말단의 9잔기를 포함한 총 20잔기가 완결되지 못한 306잔기로서 Table 6에 표시하였다. 이는 총 아미노산 잔기를 306잔기로 하였을 때 HRP E5와 HRP C의 isozyme간에는 66% 이상의 높은 상동성을 나타낸다. 특히, 29~56, 90~123, 155~173잔기에서 높은 상동성을 보이는 반면, 174~271에서는 낮게 나타난다. 이러한 유사한 아미노산의 배열고 잔기수에도 불구하고 분자량이 중성 isozyme HRP C가 크게 나타나는 것은 당 함유량의 차

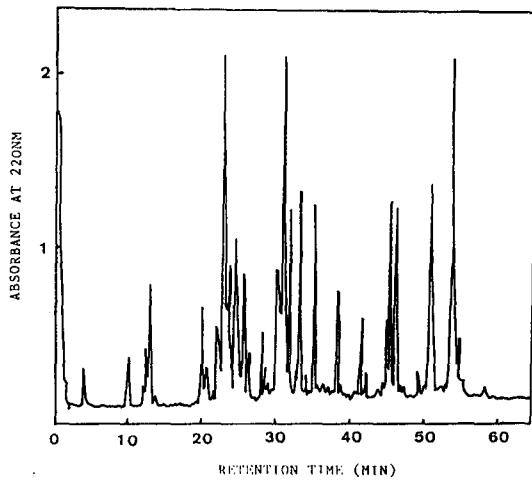


Fig 2. HPLC elution profile of a tryptic digest of HRP E5. Elution was achieved with a linear acetonitrile gradient(0~60%) in 0.1%(v/v) TFA on a cosmosil 5C₁₈-300 column.

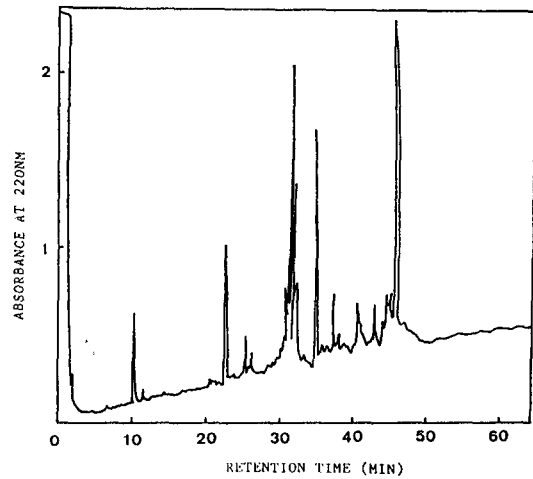


Fig 3. HPLC elution profile of a lysylendopeptidic digest of HRP E5. Elution was achieved with a linear acetonitrile gradient(0~60%) in 0.1%(v/v) TFA on a cosmosil 5C₁₈-300 column.

Table 2. Amino acid compositions of tryptic peptides of HRP E5

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈	T ₉	T ₁₀	T ₁₁	T ₁₂	T ₁₃	T ₁₄	T ₁₅	T ₁₆	T ₁₇	T ₁₈	T ₁₉
Aspartic acid	1	0	0	0	3	2	0	1	3	2	1	1	3	6	8	3	2	3	1
Threonine	0	1	0	0	0	1	1	2	1	1	0	1	1	2	4	2	1	2	2
Serine	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	1	2	1	0	2	3	2	5
Glutamic acid	0	1	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	1	3	0	2	1
Proline	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	3	1	2	0	2	2
Glycine	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	4	1	2	2	1	0	3
Alanine	0	1	0	0	3	0	1	0	0	1	0	0	3	1	0	1	3	4	3
Valine	2	0	0	0	1	1	1	0	2	0	1	1	2	0	3	1	0	1	3
Methionine	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Cysteine	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
Isoleucine	0	0	0	0	0	1	0	2	1	1	0	2	0	0	0	2	1	0	3
Leucine	0	1	0	1	0	0	1	0	1	2	1	0	3	3	2	4	1	4	4
Tyrosine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0	0	0
Phenylalanine	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	2	1	2	1	3	1	3	4	0
Lysine	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Histidine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0
Tryptophan	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Arginine	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1
Residue	5	5	4	5	10	7	7	15	12	13	9	11	24	22	27	25	17	26	30

* Cysteine content was determined as cysteic acid after performic acid oxidation. Tryptophan content was determined by analysis after 3M mercaptoethane sulfonic acid hydrolysis.

Table 3. Amino acid sequence of tryptic peptides of HRP E5

T ₁	Val-Val-Asn-Ser-Arg
T ₂	Thr-Ala-Leu-Glu-Arg
T ₃	Ala-Cys-Pro-Arg
T ₄	Arg-Leu-Cys-Pro-Arg
T ₅	Asp-Ala-Ala-Pro-Asn-Val-Asn-Ser-Ala-Arg
T ₆	Gly-Phe-Asn-Val-Ile-Asp-Arg
T ₇	Cys-Leu-Phe-Val-Thr-Ala-Arg
T ₈	Met-Gly-Asn-Leu-Arg-Pro-Leu-Thr-Gly-Thr-Gln-Gly-Glu-Ile-Arg
T ₉	Asn-Val-Ile-Val-Asp-Glu-Leu-Gln-Thr-Asp-Pro-Arg
T ₁₀	Gly-Cys-Asp-Ala-Ser-Ile-Leu-Leu-Asp-Thr-Ser-Lys
T ₁₁	Leu-His-Phe-His-Asp-Cys-Phe-Val-Arg
T ₁₂	Thr-Cys-Pro-Ser-Val-Phe-Asn-Ile-Ile-Lys
T ₁₃	Ala-Phe-Ala-Asp-Val-Gly-Leu-Asn-Arg-Pro-Ser-Asp-Leu-Val-Ala-Leu-Ser-Gly-Gly-His-Thr-Phe-Gly-Arg
T ₁₄	Tyr-Asn-Phe-Asn-Gly-Thr-Asn-Arg-Pro-Asp-Pro-Thr-Leu-Asn-Prl-Ser-Tyr-Leu-Ala-Asp-Leu-Arg
T ₁₅	Asn-Gly-Asn-Gly-Thr-Val-Leu-Val-Asn-Phe-Asp-Val-met-Thr-Pro-Asn-Thr-Phe-Asp-Asn-Gln-Phe-Tyr-Thr-Asn-Leu-Arg
T ₁₆	Gly-Leu-Ile-Gln-Ser-Asp-Gln-Glu-Leu-Phe-Ser-Thr-Pro-Gly-Ala-Asp-Thr-Ile-Pro-Leu-Val-Asn-Leu-Tyr
T ₁₇	Ser-Ser-Asn-Thr-Leu-Ser-Phe-Phe-Gly-Ala-Phe-Ala-Asp-Ala-Met-Ile-Arg
T ₁₈	Arg-Asp-Ser-Val-Glu-Ala-Phe-Phe-Asp-Leu-Ala-Asn-Thr-Ala-Leu-Pro-Ser-Pro-Phe-Phe-Thr-Leu-Ala-Gln-Leu-Lys
T ₁₉	Thr-Val-Ser-Cys-Ala-Asp-Ile-Leu-Thr-Ile-Ala-Ser-Gln-Ile-Ser-Val-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Trp-Ala-Val-Pro-Leu-Gly-Arg

Table 4. Amino acid compositions of lysylendopeptic peptides of HRP E5

	A ₁	A ₂	A ₃
Aspartic acid	0	5	4
Threonine	1	0	1
Serine	1	1	1
Glutamic acid	1	1	2
Proline	0	1	0
Glycine	0	0	0
Alanine	0	3	2
Valine	0	2	3
Methionine	0	1	0
Cysteine	0	0	1
Isoleucine	0	1	3
Leucine	0	0	3
Tyrosine	0	0	0
Phenylalanine	1	1	2
Lysine	1	0	2
Histidine	0	0	0
Tryptophan	0	0	0
Arginine	1	2	3
Residue	6	18	27

* Cysteine content was determined as cysteic acid after performic acid oxidation. Tryptophan content was determined by analysis after 3M mercaptoethane sulfonic acid hydrolysis.

Table 5. Amino acid sequence of lysylendopeptic peptides

A ₁	Ser-Phe-Arg-Thr-Glu-Lys
A ₂	Asp-Ala-Ala-Pro-Asn-Val-Ser-Ala-Arg-Gly-Phe-Asn-Val-Ile-Asp-Arg-Met-Lys
A ₃	Asn-Val-Ile-Val-Asp-Glu-Leu-Gln-Thr-Asp-Pro-Arg-Ile-Ala-Ala-Ser-Ile-Leu-Arg-Leu-His-Phe-His-Asp-Cys-Phe-Val-Arg

이에서 기인하는 것으로 해석할 수 있다. 이후, 완결되지 못한 20잔기는 N-terminal 분석과 다른 특이성을 가진 protease의 사용으로 완전한 아미노산 배열을 밝힐 수 있을 것으로 보인다.

참고문헌

1. Hoyle, M. C. : *Plant Physiol.*, 60, 787 (1977)
2. Paul, K. G. : *Acta Chem. Scand.*, 12, 1312 (1958)

Table 6. Amino acid sequences and alignments of HRP E5 and HRP C⁷⁾

HRP E5	TCPSVFNI IKNVIVDELQTDPRIAASILRLHFHDCFVRCGDASILLDTSKSFRTEK
HRP C	ZLTPTFYDNSCPNVSNI VRDTIVNELRSDPRIAASILRLHFHDCFVNGCDASILLDNTTSFRTEK
HRP E5	DAAPNVNSARGFNVIDRMKTALERACPRTVSCADILTIASQISVLLSGGPSWAVPLGRRDSVEAF
HRP C	DAFGNANSARGFPVIDRMKAAVESACPRTVSCADLLTIAAQSVTLAGGPSWRVPLGRRDSLQAF
HRP E5	FDLANTALPSPFFTLAQLK AFADVGLNRPDLVALSGGHTFGR CLFVTAR YNFNGTNRDPD
HRP C	LDLANANLPAPFFTLPQLKDSFRNVGLNRSSDLVALSGGHTFGKNQCRFIMDRLYNFSNTGLPDP
HRP E5	TLNPSYLADLRLRCPRNGNGTVLVNFDVMTPTNFDNQFYTNLR GLIQSDQELFSTPGA DTI
HRP C	TLNTTYLQTLRGLCPLNGNLSALVDFDLRTPTIFDNKYVNVLEEQGLIQSDQELFSSPNATDTI
HRP E5	PLVNLYSSNTLSFFGAFADAMIRMGNLRPLTGTQGEIR VVNSR
HRP C	PLVRSFANSTQTFNFAFVEAMDRMGNITPLTGTQGGIIRLNCRVVNSNS

3. Shannon, L. M., Kay, E. & Lew, J. Y. : *J. Biol. Chem.*, **241**, 2166 (1966)

4. Aibara, S., Yamashita, H., Mori, E., Kato, M. & Morita Y. : *J. Biochem.*, **92**, 532 (1982)

5. Aibara, S., Kobayashi, T. & Morita, Y. : *J. Biochem.*, **90**, 489 (1981)

6. Welinder, K. G., Smillie, L. B. & Schonbaum, G. R. : *Canadian J. Biochem.*, **50**, 44 (1971)

7. Welinder, K. G. : *Eur. J. Biochem.*, **96**, 483 (1979)

8. Mazza, G. & Welinder, K. G. : *Eur. J. Biochem.*, **108**, 481 (1980)

9. Welinder, K. G. : *Eur. J. Biochem.*, **151**, 497 (1985)

10. Morita, Y., Yamashita, H., Mikami, B., Iwamoto, H., Aibara, S., Terada, M. & Minami, J. : *J. Biochem.*, **103**, 693 (1988)

11. Fujiyama, K., Takemura, H., Shibayama, S., Kobayashi, K., Choi, J. K., Shinmyo, A., Takano, M., Yamada, Y. & Okada, M. : *Eur. J. Biochem.*, **173**, 681 (1988)

12. Schachman, H. K. & Edelman, S. J. : *Methods Enzymol.*, **27**, 3 (1973)

13. 日本生化学会, 生化学实验讲座 : 蛋白質の化学II (1次構造の決定法), 212 (1978)

(1995년 3월 15일 수리)