

## Achromobacter Protease I (API)의 기질특이성 결정기의 동정과 변이체[D225E]의 Ornithine 기질에 대한 촉매활성

임성일 · 권오진<sup>1</sup> · 최 청<sup>2\*</sup>

한국식품개발연구원 생물공학연구부, <sup>1</sup>한국원자력연구소 방사선식품공학연구실,  
<sup>2</sup>영남대학교 식품가공학과

**초록 :** 부위특이적 변이체작을 통하여 *Achromobacter protease I* (API)의 lysine에 대한 특이성의 구조적 근거를 조사하였다. Lysine 특이성을 결정하는 결정기로서 예상되는 잔기중의 하나인 Glu190을 glutamine, aspartic acid, leucine으로 치환하였을 경우, 전구체단백질은 lysine 특이성을 가진 완전한 활성효소로서 발현되어 자기촉매적으로 processing 되었다. 다른 하나의 잔기인 Asp225을 asparagine, leucine으로 치환한 변이체에서는 불활성 전구체인 pro-API으로서 발현되었으나, 변이체 [D225E]의 경우는 서서히 자기촉매적으로 maturation 되었다. 성숙체인 변이체 [D225E]의 lysylendopeptidase 활성은 wild-type API의 0.25%이었으며, 이 활성의 감소는 기질 lysine과 효소와의 친화력 감소가 주 원인이었다. 이러한 결과로부터 Asp225가 lysylendopeptidase의 엄격한 기질 특이성에 결정적인 역할을 담당한다는 것이 시사되었다. 한편, 변이체 [D225E]는 ornithine 기질에 대해서 효소활성이 검출되지 않았다. 이 변이체의 촉매잔기인 Ser194가 native API과 마찬가지로 DFP, PMSF와 근본적으로 동일한 반응성이 있는 것으로 나타나 225번 위치의 methylene 1 unit 더 긴 측사는 subsite P1의 methylene 1 unit 짧은 측사에 의해 보상되지 않는다는 것을 알 수 있었다.(1996년 11월 15일 접수, 1997년 3월 31일 수리)

### 서 론

*Achromobacter protease I* (API) (E.C.3.4.21.50)은 토양 균 *Achromobacter lyticus* M 497-1이 분비하는 포유류형 serine protease로서 Lys-Pro의 peptide 결합을 포함한 lysyl결합을 특이적으로 가수분해하는 효소이다.<sup>1)</sup> 이 기질 특이성뿐 만 아니라 trypsin보다 몇 배 높은 가수분해 활성, 알칼리 영역에 넓은 최적 pH, 4M 요소나 0.1% SDS의 존재 하에서 활성을 유지하는 등의 특성을 갖고 있어 API은 단백질의 일차구조를 해석하는데 있어 최초의 peptide chain의 단편화에 이용되고 있으며 기본적인 성질은 arginine에 대한 친화성을 갖고 있지 않다는 것을 제외하고는 trypsin과 거의 비슷하다.

API은 이미 유전자가 크로닝되어 염기배열이 결정되어 있다.<sup>2)</sup> 그 결과에 의하면 API은 653 잔기의 preproform으로서 합성되는데 N말단에 20개 잔기의 signal peptide와 185개 잔기의 propeptide 그리고 C말단에 180개 잔기의 extention peptide로 구성되어 있다. 또한 propeptide와 성숙체의 결합부위 배열은 Lys-Gly로서 API은 자기소화에 의해 활성화되는 것으로 시사된 바 있다. 실제로 API 유전자의 발현을 대장균을 숙주로서 행할 경우, 448개 잔기로 이루어진 효소가 유전자산물로서 대장균의 periplasm에서 생성된다. 또한, API의 일차구조 역시 밝혀져 있다. API의 일차구조를 유사한 기능을 가진 trypsin과 비교해 보면 그 상동성은 16%로서 매우 낮음에도 불구하고 촉매부위 부근

의 배열은 아주 유사하여 활성부위 구조가 비슷할 것으로 예상된다. 그러나 기질결합부위에서 결정적인 차이를 발견할 수 있다. 즉 API에서는 trypsin의 기질특이성을 결정하는 잔기인 Asp(189)에 상응하는 위치에 산성아미노산 잔기가 존재하지 않는다. Tsunasawa 등<sup>3)</sup>은 양효소의 일차구조 비교로 부터 API의 기질특이성에 관여하는 잔기가 Glu 190\*\*과 Asp225 중의 하나일 것으로 예측한 바 있다. 그리고, 기질결합 subsite를 구성하는 아미노산 잔기(Ser214-Trp215-Gly216)도 보존되어 있지 않다. 그러나 기질결합 API의 subsite S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>은 아미노산의 종류는 trypsin과 다르지만 His210-Gly211-Gly212임이 합성 peptide를 이용한 subsite mapping으로부터 밝혀졌다.<sup>3)</sup>

이와 같이, 이미 일차구조와 염기배열이 밝혀져 있는 유일한 lysine 특이적 효소인 API은 염기성 아미노산에 대한 엄격한 특이성 발현 메커니즘의 해명에 있어 적합한 효소가 될 수 있다.

Bovine trypsin과 pancreatic trypsin inhibitor<sup>4)</sup> 혹은 benzamidine과의 복합체,<sup>5)</sup> rat trypsin과 이들 2종류의 저해제 혹은 amyloide  $\beta$ -protein precursor inhibitor domain과의 복합체<sup>6)</sup>의 결정구조로 부터 S<sub>1</sub>-pocket (subsite 1위치에 존재하는 기질결합 pocket)의 최저부에 위치하고 있는 Asp(189)\*가 기질인 lysine이나 arginine의 측사와 결합하고 있다는 것이 밝혀졌다. 즉, Asp(189)의 부전하는 arginine은 직접적으로, lysine은 물분자를 중개로 간접적으로 정전기적 상호작용과 수소결합에 의해 결합되

찾는말 : *Achromobacter protease I* (API), lysylendopeptidase, 부위특이적 변이, 기질특이성  
\*연락처자

어 있다. 이 산성기를 glutamic acid 혹은 중성아미노산 잔기로 치환하였을 경우, 현저한 불활성화가 일어나,<sup>7b)</sup> Asp (189)가 trypsin의 기질특이성 결정기임이 밝혀졌다. 여기서 lysyl결합만을 선택적으로 가수분해하는 API이 일차구조의 상동성이 낮은 trypsin과 동일한 기작으로 작용할 것인가의 여부는 흥미로운 것이다.

본 연구에서는 API의 기질특이성 결정기로 예상된 잔기 Glu190\*\*과 Asp225에 변이를 도입하여 기질특이성에 대한 기여를 조사하였으며, 그 결과를 바탕으로 API의 225위치 [trypsin(226)에 해당]에 변이를 도입하여 기질인 lysine 보다 측사가 methylene 1 unit 짧은 ornithin에 특이적인 효소로의 치환 가능성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

Oligonucleotide는 DNA 자동합성장치(ABI, Model 380B)를 이용하여 고상 phosphamide법<sup>9)</sup>으로 합성하였다. 모든 제한효소와 T4 DNA ligase, T4 DNA polymerase, 7-deaza sequencing kit는 Takara Shuzo Co.로부터 구입하였다. *In vitro* mutagenesis system (version 2), <sup>32</sup>P로 라벨된 deoxynucleotide는 Amersham Corp.로부터, Bacto-tryptone, Bacto-yeast는 Sanraku Inc., hen egg white ovomucoid는 Seikagaku Corp., Boc-Val-Leu-Lys-MCA는 Peptide Institute Inc.(Japan), PVDF막(polyvinylidene difluoride membrane)은 Millipore Corp.로부터 구입하였다.

### 균체

Plasmid의 조제는 *Escherichia coli* 균주 JM109(*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*,  $\Delta$ (*lac-proAB*)/F'*[traD36, proAB<sup>+</sup>, lacF<sup>+</sup>, lacZ $\Delta$ M15]*)를 사용하였으며, API 유전자의 발현에는 JA221(*hsdR*, *trpE5*, *leuB6*, *lacY*, *recA1*)/F'*lacF<sup>+</sup>, lac<sup>+</sup>, pro<sup>+</sup>*)을, mutagenesis에는 TG1(*supE*, *hsd $\Delta$ 5*, *thi*,  $\Delta$ (*lac-proAB*)/F'*[traD36, proAB<sup>+</sup>, lacF<sup>+</sup>, lacZ $\Delta$ M15]*)를 사용하였다.

### 변이체 API의 제작

발현 vector pKK233-2에 도입된 API 유전자로부터 목적 아미노산 잔기를 code하는 영역을 함유한 유전자를 제한효소인 EcoRI와 PstI로 추출한 후, M13mp18에 도입하였으며, 이것을 변이체제작의 template로서 변이유전자를 제작하였고, 발현 vector에 재도입함으로써 변이체 발현 vector를 제작하였다. Glu190, Asp225의 변이에는 각각 oligonucleotide 5'-CGAACCCGGSNNGGTCACGCC-3'과 5'-GCCGTACTGSNNGCTGC GGTT-3'을 사용하였다. S 및 N은 각각 등량의 C, G 및 A, G, C, T의 혼합물이다. 이러한 방법으로 제작한 변이체는 [E190Q]\*\*\*, [E190D], [E190L]과 [D225L], [D225N], [D225E]이다.

### 변이 API 유전자의 발현

Recombinant API(rAPI)(native API과 잔기수와 효소적 성질이 동일한 것으로서 이 후 모두 API이라 칭한다) 혹은 변이 API 유전자의 발현은 trc promoter을 갖고 있는 발현 vector(pKK233-2)를 사용하였다.<sup>9)</sup> 변이유전자로 형질전환된 대장균(JA221)을 100  $\mu$ g/ml의 ampicillin을 함유한 L-broth배지에서 25°C, 24시간 배양하였다. 유전자산물물은 침투 압 shock법으로 periplasm 분획을 추출하여 분획하였다.<sup>11)</sup>

### 유전자산물의 Western Blotting

SDS-PAGE와 western blot는 각각 Laemmli<sup>10)</sup>와 Towbin의 방법<sup>12)</sup>에 준하였다. 이때 stacking gel, separating gel의 농도는 각각 4.5%, 12.5%이었다. 시료는 자기소화에 의한 분해를 막기위해 periplasm 분획(API 또는 변이체)에 등용량의 100%의 formic acid를 가하여 실온에서 5분간 방치하여 조제하였다. Western blot는 SDS-PAGE 후 blotting 장치로 PVDF막으로 전기전사하여 일차항체(anti-API-rabbit sera)를 사용하여 항원항체반응한 후 발색시켰다.

### API 변이체의 정제

Lysylendopeptidase 활성을 갖는 API 변이체의 정제는 ovomucoid를 regand로 한 affinity chromatography와 gel filtration-HPLC로 행하였다. 배양액 1.5 l로부터 얻은 periplasm 분획을 10 mM Tris-HCl (pH 9.0)로 평형화한 DEAE-cellulose column(2.6×37 cm)에 통과시켜, 비흡착 활성부분을 분획하여, 50 mM Tris-HCl(pH 8.0)에 투석한 다음 ovomucoid-Sepharose 4B column(hen egg ovomucoid, 0.3 mmol wet gel; 1.3×3.6 cm, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0으로 평형화)(Fig. 1)에 통과시켜 흡착시킨 다음 50 mM Tris-HCl(pH 8.0)과 증류수로 연속 세척하였다. 이때 흡착부분은 10 mM ammonium acetate(pH 3.0)로 용출하여, 희석 ammonia water로 중화시킨 후 Milli Q에 대하여 투석하여 동결건조하였다. 그 다음 0.1 mM ammonium acetate(pH 6.8)에 용해시키고 Cosmosil column (7.5×600 mm)을 이용해 gel filtration-HPLC[0.1 mM ammonium acetate (pH 6.8), 유속 0.8 ml/min](Fig. 2)를 행하여 30kD의 단백질을 분획하고 50  $\mu$ l씩 분주하여 -80°C에서 보존하였다.

### 아미노산 조성분석과 N말단 아미노산 배열분석

아미노산 조성분석은 Hitachi L8500S 자동아미노산분석기로 행하였다. 이때 가수분해는 2회 증류한 5.7N HCl(2% phenol함유)을 사용하여, 감압밀봉한 시험관으로 110°C, 24시간 행하였다. 아미노산 배열분석은 Applied Biosystem Co.의 477A형 protein sequencer로 행하였다. PTH-아미노산의 동정은 on line화된 PTH-아미노산분석계(120A)를 이용하여, 단일용매용출계로 행하였다.

### Kinetic parameters

합성기질을 5~10 mM이 되도록 1% N,N-dimethylformamide(DMF)(v/v)을 함유한 0.2M Tris-HCl(pH 9.0)

에 용해시켜 기질용액으로 하였다. 기질용액과 효소용액의 용질농도는 아미노산 조성분석에 의해 결정하였다. 2.0 ml의 0.2M Tris-HCl(pH 9.0)과 0.5 ml의 기질용액을 혼합하여(기질농도는 효소반응용액 중에서 Km값의 약 0.2에서 5배가 되도록 조절하였다), 37°C에서 5분간 처리하였다. 이 혼합액(1.95 ml)을 cuvette에 넣고 효소용액 50 μl를 가하여 급속히 각반한 후 형광강도의 증가를 측정하였다. 형광강도는 Hitachi 형광분광계 F4000을 이용하여 굴기파장 380 nm, 측정파장 440 nm에서 측정하였으며 이때 합성기질의 7-amino-4-methylcoumarin(AMC) 농도는 ε<sub>343</sub> 16000을 이용하여 결정하였다. 반응초기반응속도는 기록된 형광강도의 경시변화곡선의 초기부분의 기울기로 부터 1.1

nM AMC/ΔI(ΔI는 형광강도의 증가분을 나타냄)의 환산치를 이용해 결정하였다. 동력학정수(Km, kcat, kcat/Km)는 Lineweaver-Burk의 식에 준하여 계산하였으며 Lysyl-endopeptidase의 촉매활성은 3회 측정하여 오차 10% 이내의 값의 평균값으로 계산하였다.

API 변이체에 의한 기질소화물의 peptide mapping

*V. parahaemolyticus* hemolysin 또는 S-3-(trimethyl-amino)propylate lysozyme(3nmol)의 API 혹은 API 변이체에 의한 소화는 0.2M Tris-HCl(pH 9.0) 중, 효소:기질=1:100(mol/mol)로 37°C, 6시간 행하였다. 소화물은 0.1% trifluoroacetic acid(TFA)로 평균화한 C18μBondasphere column(3.9×150 mm)을 이용해 함수유기용매[0.08% TFA를 함유한 2-propanol:aceto nitrile=7:3 (v/v)]를 0~60%의 직선농도구배로 전개하여 peptide를 분리하였다.

결과 및 고찰

API 변이체의 발현계

Native API 유전자는 653개 잔기의 아미노산을 code하고 있지만 C말단부분의 180개 잔기는 API의 효소활성에는 필수적인 것이 아니다. API 변이체의 발현계에서 이 C말단부를 제거한 API 유전자를 이용하기 위해 269번의 asparagine에 대응하는 codon에 stop codon(TAA)를 도입한 짧은 API 유전자(이하 rAPI 유전자)를 제작하였다. 단소화한 API 유전자를 발현 vector에 도입하고 대장균에 형질전환시켜 25°C에서 배양하였다. Periplasm에 분비된 유전자산물을 SDS-PAGE한 결과, API 유전자산물은 pre-pro peptide가 제거된 성숙체로서 검출되었다(Fig. 3). 이 periplasm 분획을 정제하였으며 천연 API과의 동일성을 조사하기 위하여 SDS-PAGE와 아미노산 조성분석, N말단 아미노산 배열분석을 행하였다. 30 kD의 정제품은 균일한 것으로서(Fig. 3), 아미노산 조성은 이론치와 일치하였으며(Table 1), N말단배열은 Gly-Val-Ser-Glt-Ser-Asn-Ile-Asp-Val-

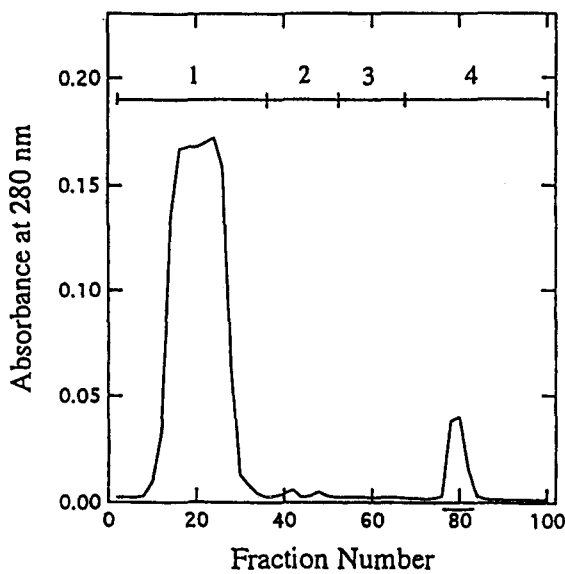


Fig. 1. Affinity chromatography of mutated API on ovomucoid-sepharose 4B column. 1, 0.05 M Tris-HCl (pH 8.0); 2, 0.05 M Tris-HCl (pH 8.0) containing 0.5 M NaCl; 3, distilled water; 4, 0.01 M ammonium acetate (pH 3.0); —, active fractions.

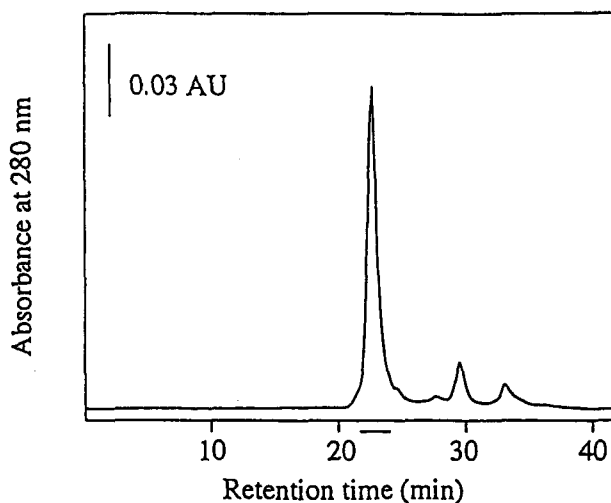


Fig. 2. Purification of mutated API by gel filtration HPLC. The chromatography was performed on COSMOSIL column (7.5×600 mm) with 0.1 M ammonium acetate (pH 6.8) at a flow rate of 0.8 ml/min. —, active fractions.

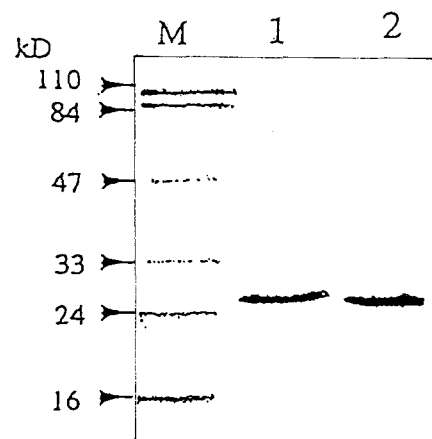


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of native API and recombinant API. Lane 1, native API; lane 2, recombinant API; M, molecular weight markers.

Table 1. Amino acid compositions of native API and recombinant API (Residues/mol)

Amino acid	Native API	rAPI	API*
Aspartic acid	30.4 (30)	30.8 (31)	30
Threonine	22.3 (22)	22.0 (22)	24
Serine	29.6 (30)	27.9 (28)	32
Glutamic acid	16.5 (17)	16.4 (16)	14
Proline	12.2 (12)	15.1 (15)	14
Glycine	37.3 (37)	36.4 (36)	36
Alanine	28.0 (28)	28.0 (28)	28
Valine	13.3 (13)	14.2 (14)	14
Methionine	2.5 (3)	2.6 (3)	3
Isoleucine	8.6 (9)	8.8 (9)	9
Leucine	13.1 (13)	13.2 (13)	13
Tyrosine	7.9 (8)	7.5 (8)	8
Phenylalanine	7.1 (7)	7.1 (7)	7
Lysine	5.1 (5)	4.8 (5)	5
Histidine	6.0 (6)	6.0 (6)	6
Arginine	11.4 (11)	11.7 (12)	12

\*Numbers are based on the amino acid sequence of API.

Val-Pro-Glu-Gly-Asp로서 API과 동일하였다. 더욱이 합성 기질인 Boc-Val-Leu-Lys-MCA를 사용하여 lysylendopeptidase 활성(Table 2)을, S-3-(trimethyl amino)propylated lysozyme을 이용하여 기질특이성(Fig. 4)를 조사한 결과 API과의 차이는 없었다. 이러한 결과로부터 C말단 연장부분(180개 잔기)를 제거한 recombinant API(rAPI) 유전자를 이용한 API의 발현계가 성숙체 API의 조제에 유용하다는 것이 확인되었다.

API 변이유전자의 발현은 변이유전자를 API 유전자를 함유한 plasmid에 재도입하여 API과 동일한 방법으로 대장균을 이용해 발현시켰다. API 변이체의 생성은 periplasm 분획을 SDS-PAGE한 후 API 항체를 이용한 western blot로 확인하였다. Periplasm 분획에 활성 API 변이체가 검출된 경우에는 API의 경우와 동일한 방법으로 변이체를 정제하여 화학적·효소적 동정을 행하였다.

기질특이성 결정기의 동정

Trypsin의 경우, S<sub>1</sub>-pocket내에 존재하는 Asp(189)가 기질 arginine 또는 lysine과 결합하는 잔기로서 기질특이성 결정기임이 밝혀진 바 있다. API에 있어서는 trypsin과의 일차구조 비교로부터 Asp(189)에 상당하는 위치에 부전하는 존재하지 않고 valine이 존재한다. 만약 API의 S<sub>1</sub>-pocket 구조가 bovine trypsin과 유사하다고 가정할 경우, Glu 190또는 Asp225는 active site 부근에 위치하고 trypsin의 Asp(189) 대신에 lysine특이성을 결정지을 것으로 예측되었다. API의 lysine에 대한 특이성을 해명하기 위하여 190번과 225번 위치에 변이를 도입하여 lysine 특이성을 결정짓는 아미노산 잔기를 동정하였다.

먼저 Glu190의 부전하를 제거하거나 측사의 길이를 짧게 하고 소수성 측사로 치환하기 위하여 변이체 [E190Q], [E190D], [E190L]을 제작하였으며 변이유전자로 형질전환된 E. coli로 3개의 변이체를 합성하였다. 이들 변이체에 대하

Table 2. Kinetic constants of native and recombinant API for hydrolysis Boc-Val-Leu-Lys-MCA

Enzyme	K <sub>m</sub> (μM)	k <sub>cat</sub> (sec <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (μM <sup>-1</sup> ·sec <sup>-1</sup> )
Native	2.1	93	44
rAPI	2.5	82	33

Enzyme activity was assayed in 0.2 M Tris-HCl at pH 9.0 and 37°C.

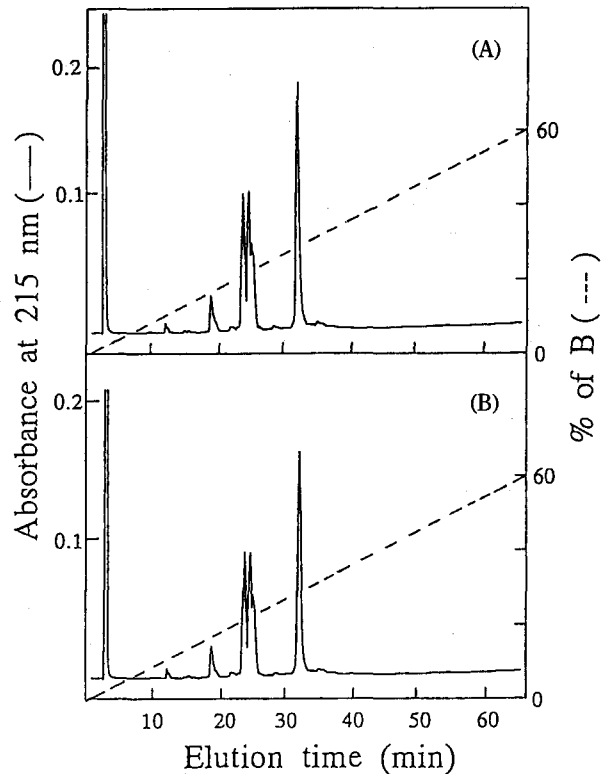


Fig. 4. Separation of peptides obtained by digestion of S-3-(trimethyl amino)propylated lysozyme with native API (A) and recombinant API (B).

여 합성기질 Boc-Val-Leu-Lys-MCA를 사용하여 lysylendopeptidase 활성을 측정된 결과, 190위치에 부전하의 존재 여부에 관계없이 periplasm 분획에서 명확히 검출되어 Glu190은 API의 효소활성에 있어 중요한 잔기가 아님이 시사되었다. 한편, Asp225 역시 Glu190과 유사한 방법으로 asparagine, glutamic acid, leucine으로 치환하였다. 형질전환된 E. coli의 periplasm 분획을 SDS-PAGE한 결과(Fig. 5), 단지 45 kD의 불활성 단백질만이 [D225N], [D225L]에서 검출되었고 [225E]의 경우는 45 kD와 30 kD에서 밴드가 검출되었다. Lysylendopeptidase 활성에 있어서는 [D225E]만이 periplasm에서 아주 낮은 정도로 검출되었다. 그러나 37°C에서 30분간 처리한 결과, 그 활성이 약 3배로 증가하였다. [D225N], [D225L]의 경우는 동일한 처리 후에도 활성이 검출되지 않았다. 이러한 결과로부터 225위치의 부전하는 API의 lysylendopeptidase 활성에 필수적임을 시사되었다.

치환 아미노산 잔기의 확인

부위특이적 변이제작에 의해 치환된 염기는 DNA 배열분

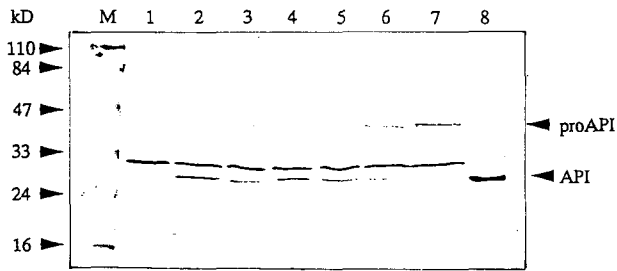


Fig. 5. Western blot analysis of periplasmic proteins from *E. coli* transformed by an expression vector bearing native or mutated API gene. Lane 1, without any API genes; lane 2, with the rAPI gene; lane 3, with the E190Q gene; lane 4, with the E190D gene; lane 5, with the E190L; lane 6, with the D225E gene; lane 7, with the D225N gene; lane 8, API from *A. lyticus*; M, molecular weight markers.

Table 3. Amino acid compositions of mutated API (Residues/mol)

Amino acid	[E190D]	[E190Q]	[E190L]	[D225E]	API <sup>a</sup>
Aspartic acid	30.5 (31)	29.0 (29)	30.2 (30)	29.3 (29)	30
Threonine <sup>b</sup>	24.2 (24)	23.7 (24)	23.7 (24)	24.2 (24)	24
Serine <sup>b</sup>	31.6 (32)	31.0 (31)	32.3 (32)	30.9 (31)	32
Glutamic acid	13.8 (14)	14.5 (15)	14.9 (15)	15.7 (16)	14
Proline	14.8 (15)	14.5 (15)	14.6 (15)	13.8 (14)	14
Glycine	35.6 (36)	34.6 (35)	36.2 (36)	36.2 (36)	36
Alanine	28.0 (28)	28.0 (28)	28.0 (28)	28.0 (28)	28
Valine <sup>c</sup>	12.9 (13)	12.9 (13)	13.3 (13)	14.0 (14)	14
Methionine	2.3 (2)	2.0 (2)	2.1 (2)	2.8 (3)	3
Isoleucine <sup>c</sup>	7.8 (8)	8.4 (8)	7.3 (7)	7.8 (8)	9
Leucine	12.8 (13)	13.1 (13)	13.5 (14)	13.0 (13)	13
Tyrosine	8.6 (9)	8.7 (9)	8.2 (8)	7.7 (8)	8
Phenylalanine	6.7 (7)	6.9 (7)	7.0 (7)	6.8 (7)	7
Lysine	5.0 (5)	5.0 (5)	5.2 (5)	5.2 (5)	5
Histidine	6.0 (6)	6.0 (6)	6.0 (6)	5.9 (6)	6
Arginine	11.5 (12)	11.5 (12)	11.7 (12)	12.0 (12)	12

<sup>a</sup>Numbers are based on the amino acid sequence of API. <sup>b</sup>Extrapolated to zero hour. <sup>c</sup>For 72 hr hydrolyzate.

적으로 확인하였으나(data not shown), 이들 변이 API 유전자의 발현산물이 순수정제되었는지의 여부를 확인하기 위하여 정제효소의 N말단 아미노산 배열과 아미노산 조성을 분석하였다. Lysylendopeptidase 활성을 갖는 [E190Q], [E190L], [E190D] 및 [D225E]를 상법에 따라 정제하였으며 이들 변이체의 N말단 아미노산 배열은 Gly-Val-Ser-Gly-Ser-(X\*)-Asn-Ile-Asp-Val-Val로 X(DNA 염기배열 결과에 의하면 cysteine에 해당하며 cysteine은 아미노산 배열분석시 파괴되어 검출되지 않는다)를 제외하고는 API과 동일한 것으로서 순수정제 되었음이 확인되었다. 한편 이들 변이체의 아미노산 조성분석에서는 기술적인 제한으로 전 아미노산의 완전한 정량에는 이르지 못하였으나 치환된 아미노산에서는 예상된 정량값과 유사한 변화가 있는 것으로 확인되었다(Table 3).

**API 변이체의 효소적 성질**

API 변이체의 기질특이성은 lysozyme을 기질로하여 검토하였다. [E190Q], [E190D], [E190L] 및 [D225E]의 peptide map는 API과 완전 동일한 것으로서 lysine에 대한 특

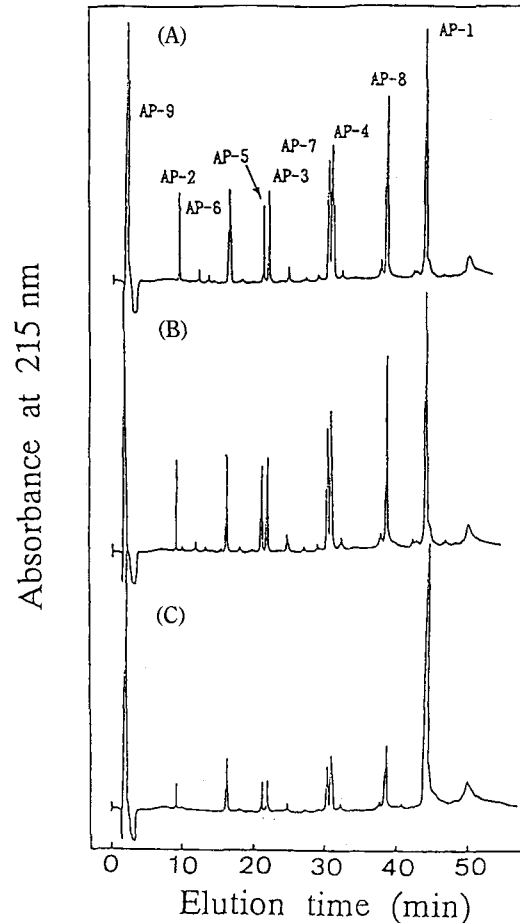


Fig. 6. Separation of peptides obtained by digestion of *V. parahaemolyticus* hemolysin with native and mutated API. Added 2% formic acid, the digestion (1.3 nmol) were applied to an C18 Bondasphere column (3.9×150 mm) and eluted with a linear gradient of 0-60% 2-propanol/acetonitrile(7/3, v/v) in 0.1% trifluoroacetic acid for 1h at a flow rate 1ml/min. A, digestion with native API; B, with mutants (E190Q, E190D, E190L); C, with D225E. AP-2, Arg46-Lys50; AP-3, Asp51-Lys64; AP-4, Trp65-Lys77; AP-5, Asp78-Lys88; AP-6, His89-Lys97; AP-7, Ser98-Lys124; AP-8, Met 125-Lys162; AP-9, His163-Gln165. AP-1 is a mixture of the NH<sub>2</sub>-terminal peptide containing 45 residues and the intact hemolysin.

이성에는 변화가 없었다(Fig. 6). Boc-Val-Leu-Lys-MCA를 기질로 한 동력학적 정수를 구한 결과(Table 4)에서는 API과 비교해 [E190Q], [E190L]의 *K<sub>m</sub>*, *k<sub>cat</sub>*, *k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>*는 약간의 차이는 있으나 거의 같은 효소활성을 나타내었다. [E190D]의 경우는 *k<sub>cat</sub>*의 변화는 적었으나 *K<sub>m</sub>*가 3배 증가하여 *k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>*이 약 1/4로 감소하였다. 따라서 190위치의 부전하의 제거는 API의 활성에는 영향을 미치지 않으므로서 Glu190은 기질특이성을 결정하는 주요잔기가 아님이 확인되었다. 한편, [D225E]의 경우는 *k<sub>cat</sub>*의 감소(API의 1/3) 보다도 *K<sub>m</sub>*의 증가(API의 140배)에 의해 *k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>*가 API의 1/400로 저하되었다. 이 활성의 저하는 225번에서의 부전하의 위치가 lysine 측사와의 정전기적 상호작용에 매우 중요하다는 것을 시사한다. API의 Asp225에 상당하는 잔기인 trypsin의 Asp(189)를 glutamic acid로 치환하였을 경우, lysine을 기질로 사용하였을 때 *k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>*이 10<sup>3</sup>배 감

Table 4. Kinetic constants of native and mutated APIs for hydrolysis Boc-Val-Leu-Lys-MCA

Mutant	Km (μM)	kcat (sec <sup>-1</sup> )	kcat/Km (μM <sup>-1</sup> ·sec <sup>-1</sup> )	Main Product
Native	2.1	93	44	Mature
E190Q	3.8	84	22	Mature
E190D	7.4	88	12	Mature
E190L	2.1	74	35	Mature
D225E	295	31	0.11	Proform and Mature
D225N	-	-	-	Proform
D225L	-	-	-	Proform

Enzyme activity was assayed in 0.2 M Tris-HCl at pH 9.0 and 37°C.

Table 5. Kinetic constants of API for lysine and ornithine substrate

Substrate	Km(μM)	kcat(sec <sup>-1</sup> )	kcat/Km(μM <sup>-1</sup> ·sec <sup>-1</sup> )
Boc-Ala-Ala-Lys-MCA	2.8	98	2.2×10 <sup>1</sup>
Boc-Ala-Ala-Orn-MCA	230	1.6	6.8×10 <sup>-3</sup>

Enzyme activity was assayed in 0.1 M Tris-HCl at pH 9.0 and 37°C.

Table 6. Inhibition of native API and D225E mutant by TLCK, DFP and PMSF

	TLCK		DFP		PMSF
	Ki (M)	k <sub>2</sub> (sec <sup>-1</sup> )	k <sub>2</sub> /Ki (M <sup>-1</sup> ·sec <sup>-1</sup> )	k <sub>2</sub> (M <sup>-1</sup> ·sec <sup>-1</sup> )	k <sub>2</sub> (M <sup>-1</sup> ·sec <sup>-1</sup> )
Native	4.6×10 <sup>-6</sup>	1.4×10 <sup>-2</sup>	3040	0.52	0.80
D225E	8.3×10 <sup>-5</sup>	4.0×10 <sup>-3</sup>	48	0.18	1.04

Each reaction was carried out in 0.1 M Tris-HCl at pH 6.9 and 37°C using Ac-Lys-p-NA as a substrate. Ac, actonitrile; p-NA, *para*-nitroanilide.

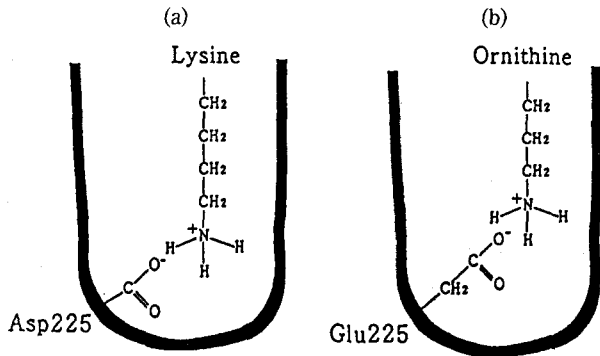


Fig. 7. Putative model of binding between native API and lysine(a) and between D225E mutant and ornithine (b) in the S<sub>1</sub>-pocket.

소하였다는 보고가 있다.<sup>13)</sup> 이것은 API의 Asp225의 경우와 동일한 것으로서 양효소의 기질특이성 결정기의 위치는 다르지만 유사한 기능성을 갖고 있음이 밝혀졌다.

Ornithine 기질에 대한 [D225E]의 촉매활성

API의 lysine 특이성 결정기를 aspartic acid 보다도 측사가 methylene 1 unit 더 긴 glutamic acid로 치환한 변이체 [D225E]가 여전히 lysylendopeptidase 활성을 보유하고 있다는 것은 흥미로운 사실이다. 만약 S<sub>1</sub>-pocket 내의 carboxylate ion과 lysine 기질의 proton화 된 ε-amino기와의 정전기적 상호작용이 기질특이성을 결정한다면 기질결합부위에서 subsite P<sub>1</sub> 측사의 methylene 1 unit의 단축은 Asp 225의 연장된 측사에 의해 보상될 수 있기 때문에 D225E는 lysine 기질보다도 ornithine 기질과 상호작용하기 쉬울 것으로 예상되었다(Fig. 7). 이 변이체의 기능성을 조사하기 위하여 ornithine 기질에 대한 촉매활성을 시험하였다.

합성 ornithine에 대한 API과 [D225E]의 촉매작용에 대한 감수성을 조사한 결과(Table 5), API은 ornithyl결합 보다도 훨씬 빠르게 lysyl결합을 절단하였다. Ornithine 기질에 대한 이러한 활성의 감소는 아마도 subsite P<sub>1</sub> 측사에 있어 정전하의 위치변화에 의한 것으로 생각된다. 한편 [D225E]의 ornithylendopeptidase와 lysylendopeptidase 활성을 조사하였다. 그 결과 lysine 기질에 대한 촉매활성은 API의 1/400이었으나(Table 4), ornithine 기질에 대한 활성은 검출되지 않았다(data not shown). 이러한 결과로 부

터 Asp225의 부전하는 API의 S<sub>1</sub>-pocket에서 lysine 측사와 결합하기 쉽도록 정위치하고 있으나 Glu225의 부전하는 API에서와 같은 정위치에는 배치하고지 않을 가능성이 시사되었다. 이와 같이, S<sub>1</sub>-pocket내의 부전하의 위치는 API의 활성발현에 극히 중요하다는 것이 밝혀졌다.

Asp225의 glutamic acid로의 치환이 catalytic triad의 기능에 미치는 영향

[D225E]의 catalytic triad의 기능성을 조사하기 위해 저해제인 N<sup>ε</sup>-tosyl-L-lysyl chloromethyl ketone (TLCK : lysine의 ε-아미노기가 기질특이성 결정기의 부전하와 정전기적 상호작용에 의하여 결합한 후, chloro기가 촉매잔기인 His과 반응하여 효소활성을 저해)과 diisopropyl fluorophosphate (DFP : fluoride기가 촉매잔기인 Ser과 반응하여 효소활성을 저해), phenol methane sulfonyl fluoride(PMSF : fluoride기가 촉매잔기인 Ser과 반응하여 효소활성을 저해)에 의한 저해반응을 조사하였다(Table 6). [D225E]의 TLCK에 의한 반응성은 예상대로 API에 비해 1.6%로 감소되었다. 이것은 이 변이체의 lysylendopeptidase 활성의 높은 감소와 일치하는 결과이다. 한편, DFP에 의한 반응성은 API에 비해 [D225E]가 35%의 수준으로 다소 감소하였으나 PMSF의 경우 약간 증가한 것으로 나타나 API과 [D225E]의 촉매잔기 Ser194와 DFP와 PMSF의 fluoride와의 반응에 의한 활성의 저해는 동일한 것으로 판단된다. 이것은 촉매잔기인 Ser194의 hydroxyl기의 반응성이 [D225E]와 API이 근본적으로 같다는 것을 의미한다. 따라서, [D225E]의 동력학적 정수와 저해실험을 통해 Asp225의 glutamic acid로의 치환은 근본적으로 기질과의 결합에 영향을 미치나 catalytic triad에는 영향을 미치지 않는다는 것이 밝혀졌다. 그러나, [D225E]의 DFP와 PMSF 사이의 반응성의 차이는 아직 불분명한 것으로 앞으로 풀어야 할 과제라 생각된다. [D225E]가 ornithine에 특이적인 효소가 아니라는 사실은 기질결합 pocket과 기질과의 결합이 225번 위치의 아미노산 잔기와 P1 아미노산 잔기와의 정전기적 상호작용

만에 의해서 지배되지 않으며, API의 제한된 lysine 특이성의 발현에는 보다 복잡한 메카니즘이 S<sub>1</sub>-pocket내에 존재할 가능성이 시사되었다.

\*: Trypsin에 대한 아미노산의 잔기번호는 chymotrypsinogen의 잔기번호를 사용하였다.

\*\* : API에 대한 아미노산의 잔기번호는 그 자체의 잔기번호를 사용하였다.

\*\*\*: API변이체의 표기법...API변이체를 [원래의 아미노산, 잔기번호, 치환한 아미노산]의 순으로 기술하였다. 예를 들면 190위치의 glutamic acid (E)를 glutamine (Q)

## 참고 문헌

1. Tsunasawa, S., T. Masaki, M. Hirose, M. Soejima and F. Sakiyama (1989) The primary structure and structural characteristics of *Achromobacter lyticus* protease I, a lysine-specific serine protease. *J. Biol. Chem.*, **264**, 3832-3829.
2. Ohara, T., K. Makino, H. Shinagawa, A. Nakata, S. Norioka and F. Sakiyama (1989) Cloning nucleotide sequence, and expression of *Achromobacter* protease I gene. *J. Biol. Chem.*, **264**, 20625-20631.
3. 葛城鳴門, 有動洋, 崎山文夫 (1991) 第42回蛋白質構造討論會要旨集, 45.
4. Huber, R., D. W. Kukla, P. Schwanger, K. Bartels, J. Deisenhofer and W. Steigemann (1974) Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.*, **89**, 73-101.
5. Bode, W., J. Walter, R. Huber, H. R. Wenzel and H. Tschesche (1984) The refined 2.2-Å (0.22-nm) X-ray crystal structure of the ternary complex formed by bovine trypsinogen, valine-valine and the Arg15 analogue of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Eur. J. Biochem.*, **144**, 185-190.
6. Perona, J. J., C. A. Tsu, C. S. Craik and R. J. Fletterick (1993) Crystal structures of rat anionic trypsin complexed with the protein inhibitors APPI and BPTI. *J. Mol. Biol.*, **230**, 919-933.
7. Graf, L., C. S. Craik, A. Patty, S. Rocznik, R. J. Fletterick and W. J. Rutter (1987) Selective alteration of substrate specificity by replacement of aspartic acid-189 with lysine in the binding pocket of trypsin. *Biochemistry*, **26**, 2616-2623.
8. Graf, L., A. Jancso, G. Szilagyi, K. Pinter, G. Naray-Szabo, J. Hepp, K. Medzihradzky and W. J. Rutter (1988) Electrostatic complementarity in the substrate binding pocket of trypsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 4961-4965.
9. Caruthers, M. H. (1985) Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses. *Science*, **230**, 281-285.
10. Kreil, G. (1981) *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 317-348.
11. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
12. Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 4350-4354.
13. Evin, L. B., J. R. Vasquez and C. S. Craik (1990) Substrate specificity of trypsin investigated by using a genetic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 6659-6663.

### Identification of Substrate Specificity Determinant of *Achromobacter* Protease I (API) and Catalytic Activity of Mutant D225E for Ornithine Substrate

Seong-Il Lim, Oh-Jin Kwon<sup>1</sup> and Cheong Choi<sup>2\*</sup> (*Korea Food Research Institute; <sup>1</sup>Department of Food Irradiation, Korea Atomic Energy Research Institute; <sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyungson 713-749, Korea*)

**Abstract :** The structural basis of lysine specificity of *Achromobacter* protease I (API) was investigated by means of site-directed mutagenesis. The precursor protein in which Glu190, one of the two candidates for determining lysine specificity, was substituted by glutamine, aspartic acid or leucine was processed autocatalytically to attain full protease activity with lysine specificity. The substitution of the other candidate, Asp225, for asparagine or leucine produced no mature active forms of pro-API. The precursor protein of the mutant D225E slowly matured autocatalytically. The lysylendopeptidase activity of the mature D225E was 0.25% of that of native API, and this reduced activity is mainly due to a decrease in the affinity of the enzyme for lysine. These results suggest that Asp225 plays a critical role in restricted substrate specificity as a lysylendopeptidase. However, D225E exhibited no measurable activity for synthetic ornithine substrate. Since the hydroxyl group of Ser194 in this mutant retained essentially the same reactivity to DFP or PMSF as that in native API, it can be noted that a methylene unit longer side chain of residue 225 is not compensated by a methylene unit shorter side chain at subsite P1 in the bound substrate.

**Key words :** *Achromobacter* protease I (API), lysylendopeptidase, site-directed mutagenesis, substrate specificity

\*Corresponding author