

## *Bacillus subtilis* 유래 Glycerol-3-phosphate Cytidylyltransferase의 화학적 수식

박 영 서\*

경원대학교 공과대학 식품생물공학과

**Chemical Modification of Glycerol-3-phosphate Cytidylyltransferase from *Bacillus subtilis*.** Young Seo Park\*. Department of Food and Bioengineering, College of Engineering, Kyungwon University, Sungnam 461-701, Korea - Glycerol-3-phosphate cytidylyltransferase from *Bacillus subtilis* was modified with various chemical modifiers to determine the active sites of the enzyme. Treatment of the enzyme with group-specific reagents diethylpyrocarbonate, *N*-bromosuccinimide, or carbodiimide resulted in complete loss of enzyme activity, which shows histidine, tryptophan, and glutamic acid or aspartic acid residues are at or near the active site. In each case, inactivation followed pseudo first-order kinetics. Inclusion of glycerol-3-phosphate and/or CTP prevented the inactivation, indicating the presence of tryptophan and glutamic acid or aspartic acid residues at the substrate binding site. Analysis of kinetics of inactivation showed that the loss of enzyme activity was due to modification of a two histidine residues, single tryptophan residue, and two glutamic acid or aspartic acid residues.

Teichoic acid는 대부분의 Gram 양성 세균의 세포벽을 이루는 주성분으로서, phosphodiester 결합을 이루는 당잔기 또는 polyol을 포함하는 음이온성 중합체이다(1, 2). 대표적인 Gram 양성 세균인 *Bacillus subtilis*에서 세포벽의 teichoic acid는 glycerol phosphate의 중합체로 되어 있는데 이 glycerol phosphate의 중합체를 생합성하는 대부분의 유전자는 *tagABC*와 *tagDEF*라는 두 개의 operon 내에 존재한다(3). *tagDEF* operon의 첫 번째 유전자인 *tagD*는 glycerol-3-phosphate cytidylyltransferase (GCTase)를 생합성하는데 이 효소는 CTP와 glycerol-3-phosphate를 기질로 사용하여 CDP-glycerol과 pyrophosphate를 형성한다 (4). 이때 CDP-glycerol은 glycerol phosphate 중합체의 생합성시 glycerol phosphate의 공여물질로 작용한다. GCTase는 cytidylyltransferase 효소계에 속하는 효소로서 이 효소계에는 GCTase를 비롯하여 고등동물에서 phosphatidylcholine의 생합성에 관여하는 CDP-choline pathway의 조절효소로 알려진 CTP:phosphocholine cytidylyltransferase (CCTase)가 포함된다(5-7). GCTase의 아미노산 배열을 *Saccharomyces cerevisiae* 또는 rat 유래의 CCTase와 비교하였을 때 GCTase의 약 25%의 아미노산이 보존적임을 알 수 있었고 이들 보존적 아미노산들은 CCTase의 활성부위라고 생각되어지는 부위에 위치하여 있다 (8).

이러한 사실로부터 이들 보존적 아미노산들이 효소의 활성에 관여하거나 또는 기질을 인식하는 부위일 것이라 추측되어 진다.

Cytidylyltransferase 효소계에 포함되는 효소들은 효소의 대량정제의 어려움 때문에 아직까지 그 활성부위, 또는 기질인식부위등 그 효소학적 연구가 거의 이루어지지 않고 있다 (9). 최근에 GCTase가 *Escherichia coli*에서 대량 발현 정제됨에 따라 이 효소를 cytidylyltransferase 효소계의 구조와 기능의 상관관계를 연구하는 모델 시스템으로 사용할 수 있게 되었다(10).

따라서 본 연구에서는 화학수식제를 사용하여 정제 GCTase의 특정 아미노산 잔기를 불활성화시킨 후 그 효소활성도를 측정하여 효소의 활성부위를 규명하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 정제효소

GCTase의 정제를 위하여 사용된 균주는 *B. subtilis* 유래의 0.4 kb GCTase 유전자가 삽입된 plasmid pET-11a에 의해 형질전환된 *E. coli* HMS174(DE3)pLysS 재조합균주 (10)이며 1 mM IPTG를 배지에 첨가하여 GCTase를 발현시켰다. 효소는 전보(10)와 동일한 방법으로 DEAE-Sepharose CL-6B, Sephadex G-100, blue Sepharose CL-6B를 사용하여 정제하였고 SDS-polyacrylamide gel 전기영동에 의하여 정제도를 확인하였다.

\*Corresponding author

Tel. 82-342-750-5378, Fax. 82-342-750-5378

E-mail: chanhop@chollian.dacom.co.kr

Key words: Glycerol-3-phosphate Cytidylyltransferase, Chemical modification, *Bacillus subtilis*, Active site

### GCTase의 활성 측정

GCTase의 활성은 전보 (10)에서와 같이 CCTase의 활성측정법을 변형하여 측정하였다. 반응용액으로는 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM CTP, 4 mM L-[U-<sup>14</sup>C]glycerol-3-phosphate (0.25 Ci/mol)를 사용하였고 약 60 ng의 효소를 첨가하여 최종용액의 부피가 50 μl가 되도록 하였다. 37°C에서 10분 간 반응시킨 후 10% (w/v) trichloroacetic acid를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 0.5 ml의 10 mg/ml charcoal을 반응액에 첨가하여 얼음에서 30분간 정치시킨 후 0.5 ml의 증류수로 charcoal을 원심분리에 의하여 3차례 세척하였다. 세척된 charcoal을 0.5 ml의 acetic acid로 현탁한 후 5 ml의 scintillation 용액을 첨가하여 scintillation counting을 행하였다. 효소활성 1 unit는 분당 생성된 CDP-glycerol의 mol 수로 정의하였다.

### 화학수식제의 처리

화학수식제에 의한 효소활성의 저해도를 알아보기 위하여 특정 아미노산 잔기에 선택적으로 작용하는 여러가지 화학수식제를 효소반응용액에 각각 20 mM 씩 첨가한 후 효소의 잔존활성을 측정하였다. 정제된 GCTase를 0.01 unit 사용하고 cysteine 잔기를 수식하기 위해서는 iodoacetic acid, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), N-ethylmaleimide, *p*-chloromercuribenzoic acid를, lysine 잔기를 수식하기 위해서는 pyridoxal-5'-phosphate, acetic anhydride, 2,4,6-trinitrobenzene-1-sulfonic acid를, histidine 잔기를 수식하기 위해서는 diethylpyrocarbonate를, arginine 잔기를 수식하기 위해서는 phenylglyoxal, 2,3-butanedione을, tryptophan 잔기를 수식하기 위해서는 N-bromosuccinimide를, glutamic

acid 또는 aspartic acid를 수식하기 위해서는 carbodiimide를 각각 20 mM을 첨가한 후 37°C에서 20분 동안 방치한 다음 GCTase의 잔존활성을 측정하였고 화학수식제의 작용은 화학수식제를 사용하지 않은 효소활성의 상대 %로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 화학수식제에 의한 영향

여러 가지 화학수식제를 효소용액에 첨가하고 효소활성을 측정한 결과 Table 1에 나타낸 바와 같이 여러가지 화학수식제 중에서 histidine 잔기에 선택적으로 작용하는 diethylpyrocarbonate (DEPC), tryptophan에 선택적으로 작용하는 N-bromosuccinimide (NBS), 그리고 glutamic acid 또는 aspartic acid 잔기에 작용하는 carbodiimide 만이 효소활성을 완전히 저해하였다. 한편 cysteine, lysine 또는 arginine에 작용하는 수식제들은 효소활성을 부분적으로 저해시킴을 알 수 있었다. 이 결과로부터 GCTase에는 histidine, tryptophan, glutamic acid 또는 aspartic acid 잔기가 효소의 활성중심 구조 형성에 관여하리라 추정되었다.

### 기질에 의한 효소의 보호효과

화학수식제에 의한 효소활성 저해시 반응용액에 기질을 첨가하여 효소에 기질을 결합시킴으로써 효소활성이 첨가 기질에 의해 화학수식제의 저해반응으로부터 보호되는지를 확인함으로써 화학수식제가 효소의 기질결합 부위에 직접 작용하는 것인가를 확인할 수 있다. 효소활성을 완전 저해시킨 DEPC, NBS 그리고 carbodiimide를 사용하여 효소를 수식할 때 기질인 glycerol-3-phos-

**Table 1. Effect of chemical modifier on the GCTase activity**

Chemical modifier (20 mM)	Relative activity (%)
Cys modifying	
Iodoacetic acid	50
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)	58
N-Ethylmaleimide	51
<i>p</i> -Chloromercuribenzoic acid	80
Lys modifying	
Pyridoxal-5'-phosphate	71
Acetic anhydride	72
2,4,6-Trinitrobenzene-1-sulfonic acid	97
His modifying	
Diethylpyrocarbonate	0
Arg modifying	
Phenylglyoxal	90
2,3-Butanedione	65
Trp modifying	
N-Bromosuccinimide	0
Glu and Asp modifying	
Carbodiimide	0

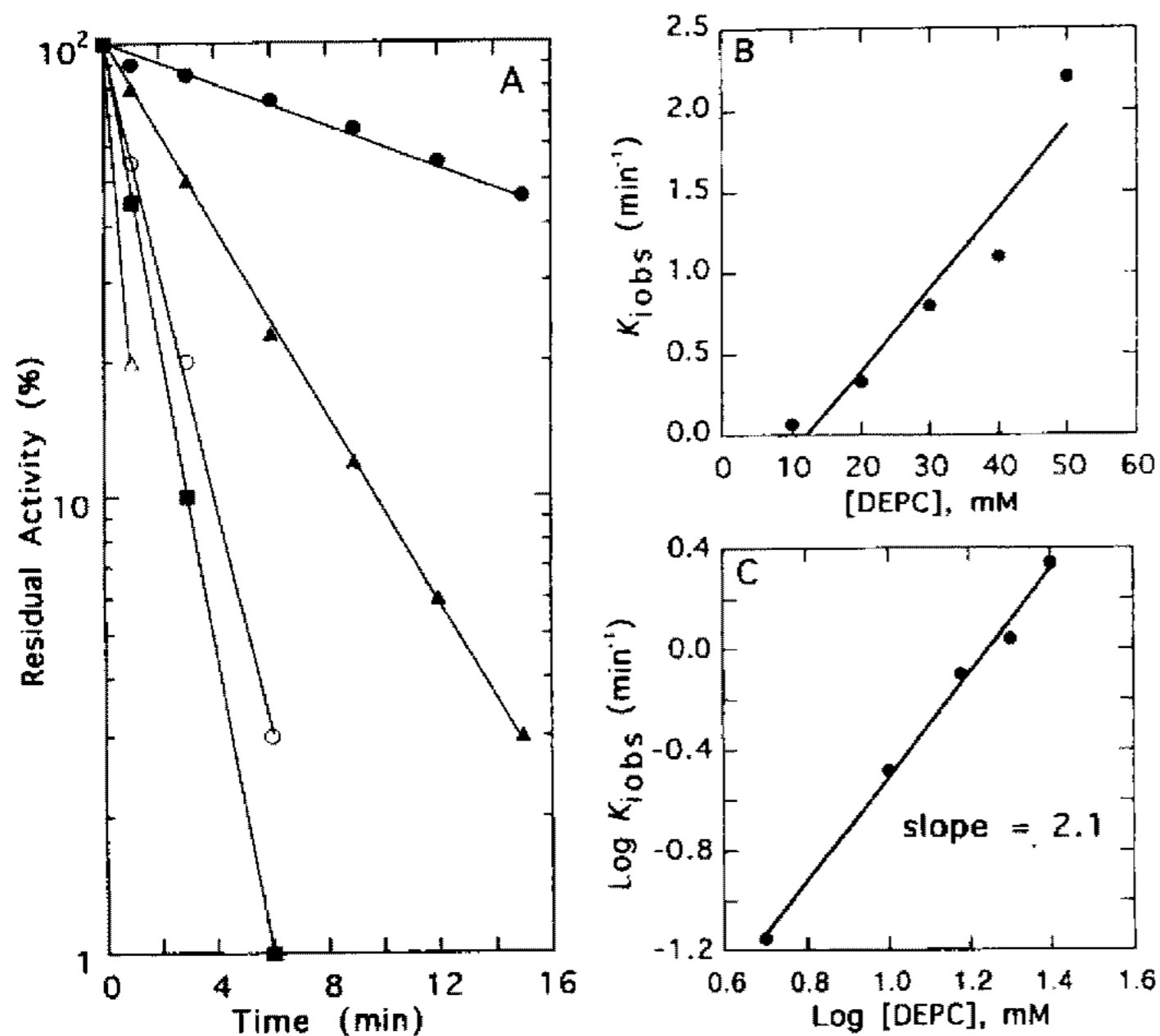
**Table 2. Protection of GCTase with substrates against reaction with the modifying reagents**

Reaction conditions	Remaining activity (%)
Control	100
+8 mM Glycerol-3-phosphate	100
+1 mM CTP	100
Diethylpyrocarbonate (20 mM)	0
+8 mM Glycerol-3-phosphate	0
+1 mM CTP	0
+8 mM Glycerol-3-phosphate/1 mM CTP	0
N-Bromosuccinimide (0.36 mM)	0
+8 mM Glycerol-3-phosphate	91
+1 mM CTP	2
+8 mM Glycerol-3-phosphate/1 mM CTP	95
Carbodiimide (20 mM)	0
+8 mM Glycerol-3-phosphate	5
+1 mM CTP	64
+8 mM Glycerol-3-phosphate/1 mM CTP	92

phate, CTP 단독 또는 glycerol-3-phosphate와 CTP를 동시에 효소용액에 첨가하여 보호한 후 효소의 잔존활성을 측정하였다(Table 2). DEPC를 사용하여 효소를 불활성화시켰을 때 기질의 첨가가 효소의 불활성화를 방지하지 못하였다. 이는 histidine 잔기가 기질 인식부위가 아닌 촉매활성부위임을 보여주는 것이다. NBS에 의한 효소저해시 glycerol-3-phosphate 단독 또는 glycerol-3-phosphate와 CTP 동시 첨가시 효소활성이 보호되었는데 이로부터 tryptophan은 glycerol-3-phosphate의 인식부위 내지 결합부위임을 알 수 있었다. 또한 carbodiimide에 의한 효소저해시 CTP 단독 또는 glycerol-3-phosphate와 CTP 동시 첨가시 효소활성이 보호되었는데 이는 glutamic acid 또는 aspartic acid 잔기가 CTP의 인식부위임을 암시한다.

### DEPC에 의한 효소활성저해

효소를 여러 가지 농도의 DEPC와 반응하였을 때 시간이 지남에 따라 효소활성이 소실됨을 알 수 있었고 효소 소실율은 DEPC의 농도에 따라 pseudo first-order kinetics의 양상을 나타내었다(Fig. 1A). DEPC의 농도와 inhibition rate  $K_i$ 와의 관계를 도식화하였을 때 Fig. 1B와 같이 직선관계를 보여주었는데 이는 DEPC에 의한 효소의 수식이 단순 이분자반응임을 나타낸다(11). 이 수식반응의 second-order rate constant는  $50.3 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 로 계



**Fig. 1. The inactivation of GCTase with diethylpyrocarbonate.** A: Purified enzyme in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 was incubated with 10 (●), 20 (▲), 30 (○), 40 (■), and 50 (△) mM of the reagent. Samples were removed as a function of time and the residual enzyme activity was determined. B: Determination of the second-order rate constant of inactivation. C: Apparent order of reaction with respect to reagent concentration.

산되었다. DEPC와 반응하는 histidine 잔기의 수를 결정하기 위하여 실험과정을 다음과 같이 표시하였다(12, 13).



여기서 GCTase-DEPC<sub>n</sub>은 DEPC에 의해 수식된 효소를 나타내고  $n$ 은 효소를 불활성화하는데 필요한 histidine 잔기와 반응하는 DEPC의 mol 수를 나타낸다. 실험 속도는 다음과 같이 표시할 수 있다.

$$-d[\text{GCTase}]/dt = K_i[\text{GCTase}][\text{DEPC}]^n \quad (2)$$

만일  $[\text{DEPC}] \gg [\text{GCTase}]$ 라면 윗 식은 다음과 같이 적분할 수 있다.

$$\log K_{i\text{obs}} = n \log[\text{DEPC}] + \log K_i \quad (3)$$

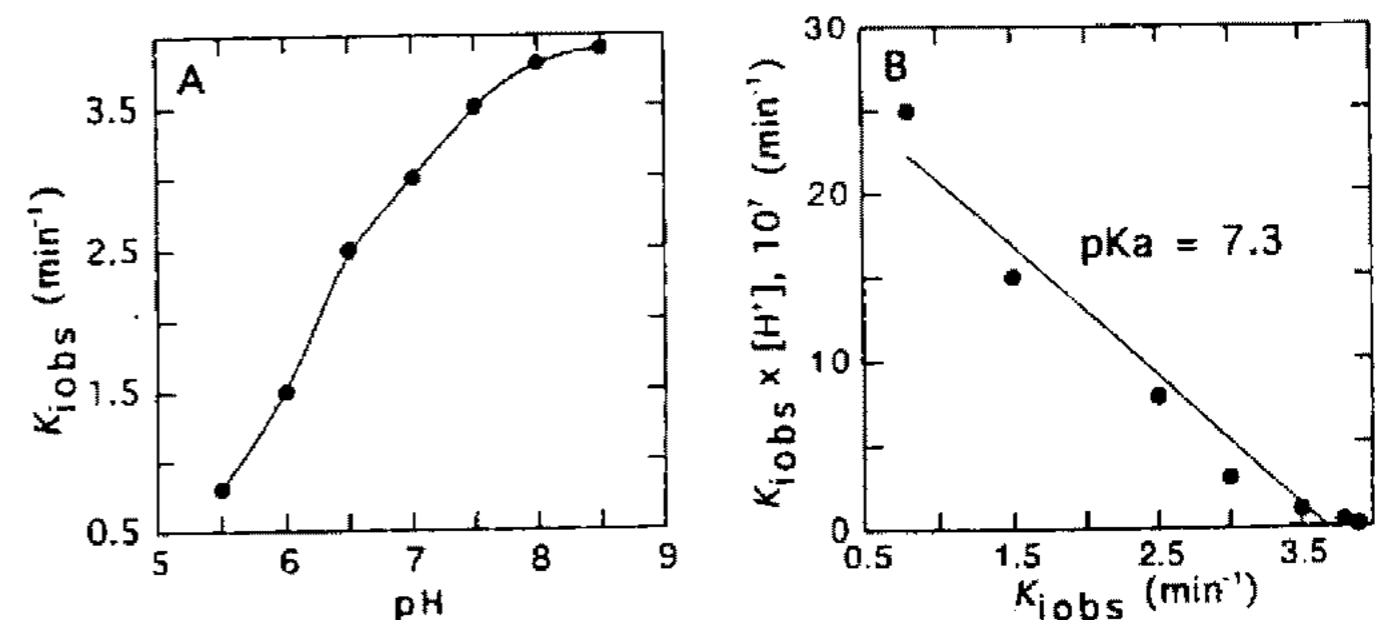
따라서  $\log K_{i\text{obs}}$ 와  $\log[\text{DEPC}]$ 와의 관계를 도식화하면 그 직선의 기울기로  $n$  값을 알 수 있다.  $\log K_{i\text{obs}}$ 와  $\log[\text{DEPC}]$ 와의 관계를 도식화한 것을 Fig. 1C에 나타내었는데 이 직선의 기울기  $n=2.1$ 로부터 2개의 histidine 잔기가 효소활성에 요구되는 것을 알 수 있었다.

### DEPC에 의한 효소불활성화의 pH 의존성

DEPC는 양성자화되지 않은 아미노산 만을 수식하기 때문에 DEPC에 의한 효소불활성화의 pH 의존성을 조사함으로써 수식화된 잔기의 성질을 알 수 있다. Fig. 2A에 나타난 바와 같이 DEPC에 의한 효소의 불활성화는 pH가 증가함에 따라 증가함으로 이론적 곡선식은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

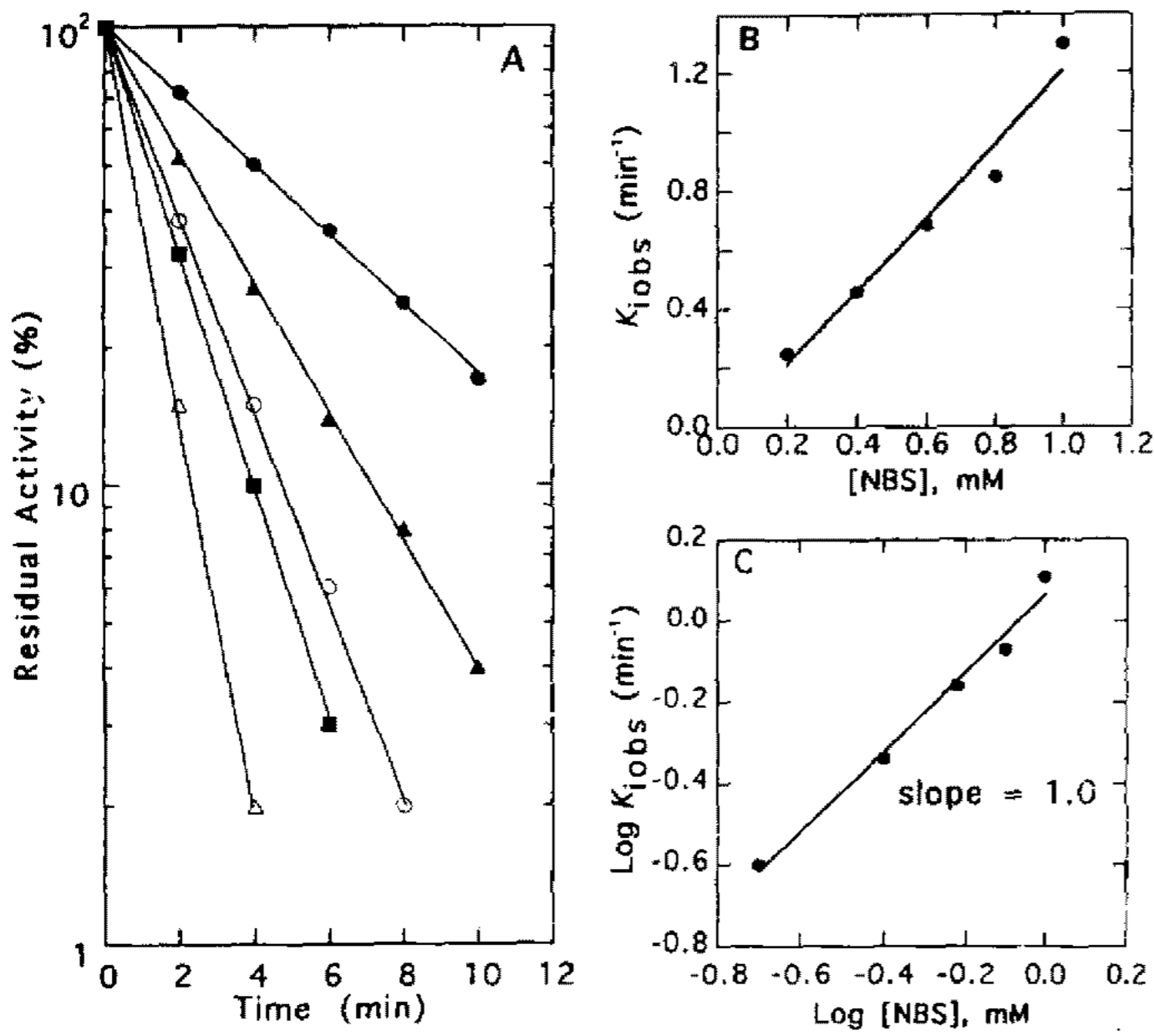
$$K_i = \frac{K_i}{1 + [\text{H}^+]/K_a} \quad (4)$$

이를 직선식으로 다시 표현하면 다음과 같다.



**Fig. 2. The pH dependence of inactivation rate of GCTase by diethylpyrocarbonate.**

A: GCTase was incubated with 50 mM DEPC in 50 mM phosphate buffer at various pH values between 5.5 and 8.5. Pseudo first-order rate constants were determined from the slopes of semi logarithmic plots of time-dependent loss in enzyme activity and plotted against pH. B: The experimentally determined pseudo first-order rate constants were plotted using Equation 4.



**Fig. 3. The inactivation of GCTase with N-bromosuccinimide.** A: Purified enzyme in 50 mM sodium acetate pH 5.5 was incubated with 0.2 (●), 0.4 (▲), 0.6 (○), 0.8 (■), and 1.0 (△) mM of the reagent. Samples were removed as a function of time and the residual enzyme activity was determined. B: Determination of the second-order rate constant of inactivation. C: Apparent order of reaction with respect to reagent concentration.

$$K_i[H^+] = K_a(K_i)_{max} - K_i K_i \quad (5)$$

여기서  $K_a$ 는 반응 잔기의 해리상수이고  $(K_i)_{max}$ 는 양성자화 되지 않은 반응잔기의 pseudo first-order rate constant이다(13). 따라서  $K_i(H^+)$ 와  $K_i$ 와의 관계를 도식화함으로써  $(K_i)_{max}$ 와  $pK_a$  값을 얻을 수 있는데(Fig. 2B) 이로부터  $(K_i)_{max}=3.7$ ,  $pK_a=7.3$ 으로 계산되었다.  $pK_a$  값이 7.3이라는 결과로부터 효소의 불활성화는 histidine 잔기의 수식때문이라는 것을 확인할 수 있었다.

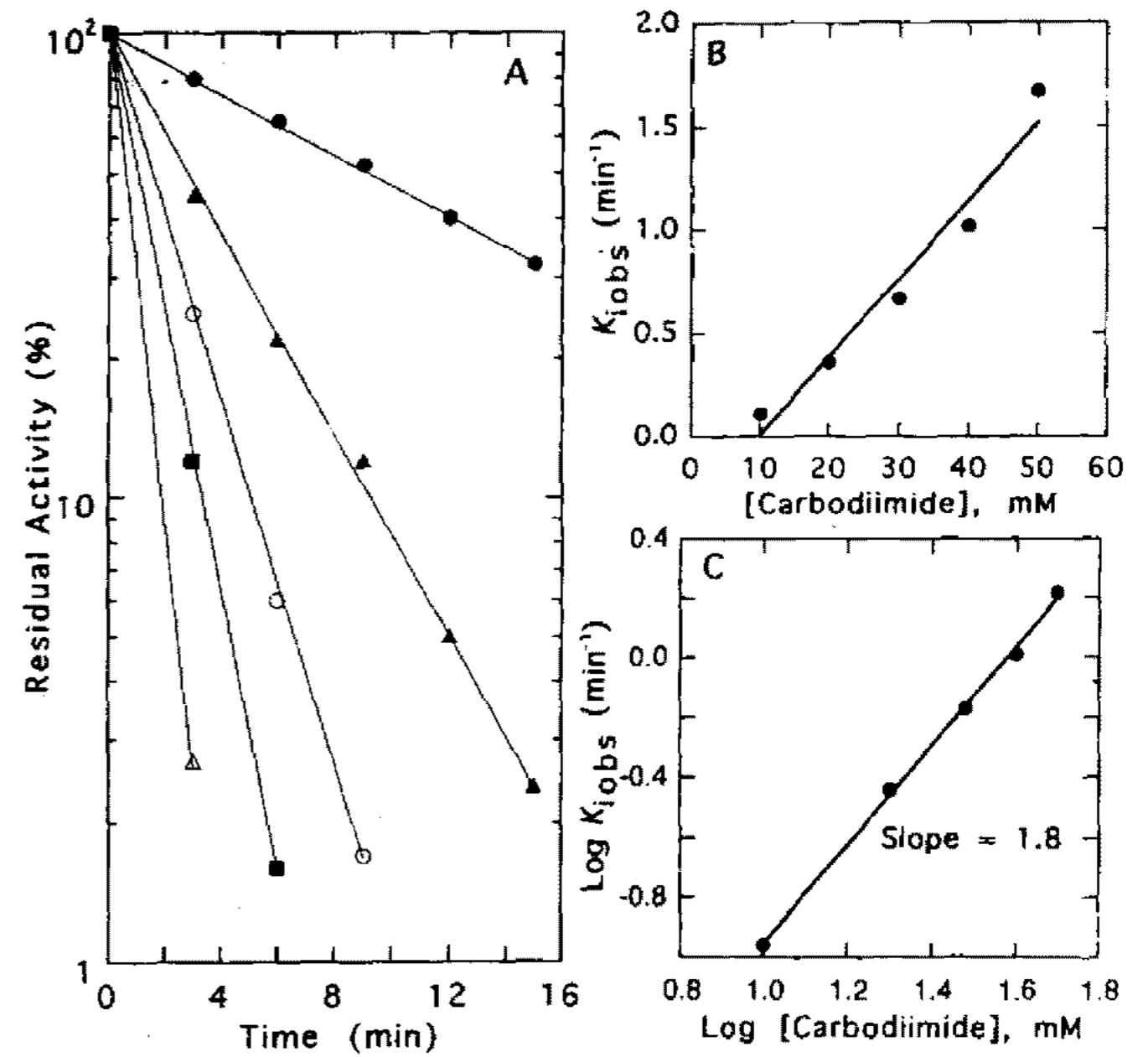
**NBS에 의한 효소활성저해**

NBS는 매우 선택적으로 tryptophan을 수식한다(14, 15). Fig. 3A에 나타난 바와 같이 여러 가지 농도의 NBS를 효소와 반응시켰을 때 시간에 따라 효소활성이 저해됨을 보여주었고 저해형식은 pseudo first-order kinetics임을 알 수 있었다. NBS에 의한 second-order rate constant는 Fig. 3B로부터  $1.2 \times 10^3 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 로 계산되었다.

$\log K_{i,obs}$ 와  $\log [NBS]$ 와의 관계 (Fig. 3C)로부터 NBS의 농도에 대한 반응차수는 1.0으로 확인되었는데 이로부터 효소 1 subunit 당 1 mol의 NBS가 반응함을 알 수 있었다.

**Carbodiimide에 의한 효소활성저해**

효소를 여러 가지 농도의 carbodiimide와 반응하였을 때 시간이 지남에 따라 효소활성이 소실됨을 알 수 있었



**Fig. 4. The inactivation of GCTase with carbodiimide.** A: Purified enzyme in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 was incubated with 10 (●), 20 (▲), 30 (○), 40 (■), and 50 (△) mM of the reagent. Samples were removed as a function of time and the residual enzyme activity was determined. B: Determination of the second-order rate constant of inactivation. C: Apparent order of reaction with respect to reagent concentration.

고 효소실활은 DEPC의 농도에 따라 pseudo first-order kinetics의 형태를 나타내었다(Fig. 4A). Carbodiimide에 의한 second-order rate constant는 Fig. 4B로부터  $37.8 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 로 계산되었다.  $\log K_{i,obs}$ 와  $\log [Carbodiimide]$ 와의 관계(Fig. 4C)로부터 carbodiimide의 농도에 대한 반응차수는 1.8로 확인되었는데 이로부터 효소당 2 mol의 carbodiimide가 반응함을 알 수 있었다.

GCTase의 아미노산 배열을 *Saccharomyces cerevisiae*와 rat CCTase의 아미노산 배열과 정렬하여 비교하였을 때 (10) 3개의 histidine 잔기가 보존적이었고 GCTase 내에 존재하는 3개의 tryptophan 잔기중 1개의 tryptophan 잔기가 보존적이었다. 또한 다수의 glutamic acid와 aspartic acid 잔기가 보존적이었는데 본 연구의 결과로부터 이들 보존적 아미노산 잔기들 중에서 2개의 histidine, 1개의 tryptophan, 그리고 2개의 glutamic acid 또는 aspartic acid 잔기가 효소활성 중심 또는 기질결합부위를 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 특정 아미노산에 선택적으로 작용하는 화학수식제를 사용하여 GCTase의 활성 중심부위를 간접적으로 확인하였는데 보다 직접적으로 효소활성부위를 결정하기 위해서는 결정화된 효소를 사용한 X선 회절법 연구가 이루어져야 한다고 사료된다.

**요 약**

*Bacillus subtilis* 유래의 glycerol-3-phosphate cytidyl-



yltransferase의 효소활성부위를 조사하기 위하여 화학수식제를 사용하여 효소활성의 저해도를 측정하였다. 여러 가지 화학수식제 중에서 diethylpyrocarbonate, *N*-bromosuccinimide, carbodiimide가 효소활성을 완전히 저해시켜 histidine, tryptophan, glutamic acid 또는 aspartic acid 잔기가 GCTase의 효소활성 또는 기질결합부위에 관여하리라 추측되었다. 기질첨가에 의한 효소활성 보호실험을 통하여 tryptophan 잔기는 glycerol-3-phosphate의 결합부위, glutamic acid 또는 aspartic acid 잔기는 CTP의 결합부위라 판단되었다. 효소실험은 수식제의 첨가농도에 따라 pseudo first-order kinetics 양식을 보여주었고, 효소실험속도의 분석에 의해 효소활성에는 2개의 histidine, 1개의 tryptophan, 2개의 glutamic acid 또는 aspartic acid가 관여하는 것으로 나타났다.

### 참고문헌

- Baddiley, J. 1972. Teichoic acids in cell walls and membranes of bacteria. *Essays Biochem.* **8**: 35-77.
- Heptinstall, S., A. R. Archibald, and J. Baddiley. 1970. Teichoic acids and membrane function in bacteria. *Nature.* **225**: 519-521.
- Mauel, C., M. Young and D. Karamata. 1991. Genes concerned with synthesis of poly(glycerol phosphate), the essential teichoic acid in *Bacillus subtilis* strain 168, are organized in two divergent transcription units. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 929-941.
- Pooley, H. M., F.-X. Abellan, and D. Karamata. 1991. A conditional-lethal mutant of *Bacillus subtilis* 168 with a thermosensitive glycerol-3-phosphate cytidylyltransferase, an enzyme specific for the synthesis of the major wall teichoic acid. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 921-928.
- Kent, C. 1990. Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis. *Prog. Lipid Res.* **29**: 87-105.
- Tijburg, L. B. M., M. J. H. Geelen, and L. M. G. Van Golde. 1989. Regulation of the biosynthesis of triacylglycerol, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in the liver. *Biochim. Biophys. Acta.* **1004**: 1-19.
- J. S. Sanghera and D. E. Vance. 1989. CTP: phosphocholine cytidylyltransferase is a substrate for cAMP-dependent protein kinase *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **264**: 1215-1223.
- Kalmer, G. B., R. J. Kar, A. Lachance, R. Aebersold, and R. B. Cornell. 1990. Cloning and expression of rat liver CTP:phosphocholine cytidylyltransferase: an amphipatic protein that controls phosphatidylcholine synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 6029-6033.
- Feldman, D. A. and P. A. Weinhold. 1987. CTP:phosphorylcholine cytidylyltransferase from rat liver *J. Biol. Chem.* **262**: 9075-9081.
- Park, Y. S., T. D. Switzer, J. E. Dixon, and C. Kent. 1993. Expression, purification, and characterization of CTP: glycerol-3-phosphate cytidylyltransferase from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **268**: 16648-16654.
- Church, F. C., R. L. Lundblad, and C. M. Noyes. 1985. Modification of histidines in human prothrombin. Effect on the interaction of fibrinogen with thrombin from diethyl pyrocarbonate-modified prothrombin. *J. Biol. Chem.* **260**: 4936-4940.
- Blanke, S. R and L. P. Hager. 1990. Chemical modification of chloroperoxidase with diethylpyrocarbonate. Evidence for the presence of an essential histidine residue. *J. Biol. Chem.* **265**: 12454-12461.
- Takeuchi, M., N. Asano, Y. Kameda, and K. Matsui. 1986. Chemical modification by diethylpyrocarbonate of an essential histidine residue in 3-ketovalidoxylamine A C-N lyase. *J. Biochem.* **99**: 1571-1577.
- Spande, T. F. and B. Witkop. 1965. Chemical evidence for the involvement of tryptophan in the interaction of trypsin with the inhibitor from beef pancreas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **21**: 131-134.
- Spande, T. F., N. M. Green, and B. Witkop. 1966. The reactivity toward *N*-bromosuccinimide of tryptophan in enzymes, zymogens, and inhibited enzymes. *Biochem.* **5**: 1926-1933.

(Received 25 September 1996)