

*Bacillus Subtilis*로부터 포스파티드산 인산가수분해 효소의 정제

朴喜堂 · 崔明彦*

서울대학교 화학과, 분자촉매 연구센터

(1998. 4. 11 접수)

Purification of Phosphatidate Phosphohydrolase from *Bacillus Subtilis*

Heeseob Park and Myung-Un Choi*

Department of Chemistry and Center for Molecular Catalysis,

Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received April 11, 1998)

Phosphatidate phosphohydrolase(PAP)(EC. 3.1.3.4)는 phosphatidate(PA)의 인산에스테르 결합을 가수 분해시켜 diacylglycerol(DAG)과 인산으로 나눈다. 이 효소는 세포 신호 전달 과정에 관여하는 PA를 DAG로 변환 시킴으로써 그 중요성이 부각되고 있다.¹ 즉 phospholipase D(PLD)에 의해 생성된 PA 신호를 또 다른 신호인 DAG로 바꾸어줌으로써 PLD-PAP 계열 신호 전달 과정의 조절 단계에 관여 하는 것으로 알려졌다.² PA는 몇 세포에서 강력한 세포핵 분열 촉진 효과를 가지고 있으며, 이와 더불어 neutrophils의 respiratory burst를 자극하고³ monoacylglycerol acyltransferase를 활성화시키고 있다.⁴ 그 외 phospholipase C- γ 와 Ras⁵등도 활성화시킨다. PAP 또는 PLC에 의해 생성된 DAG는 DNA 합성 유도,⁷ oocyte maturation,⁸ fibroblast의 형태 변형⁹등을 유발시키는 것으로 밝혀지고 있다.

PAP는 자연계에 널리 분포되어 있는 것으로 알려져 있으며 주로 동물계에서 정제가 시도되고 있다. 현재 그 기능에 따라 두 형태의 PAP가 알려져 있다. PAP-1은 glycerolipid의 대사에 관여하는 것으로 Mg²⁺이온에 의존하며 N-ethylmaleimide에 의해 강력히 저해된다. 주로 세포액이나 소포체에 존재하는 것으로 알려져있다. PAP-2는 세포 신호에 관여하는 것으로 추정되며 세포막에 존재하며 Mg²⁺와 N-ethylmaleimide의 영향을 받지 않는다.¹ 쥐 뇌와 다른 조직에 널리 두 형태의 PAP가 함께 존재하며 효소의 양은 조직에 따라 변하고 있다. 뇌와 지방조직에는 PAP-1이

많은 반면 PAP-2는 비교적 고르게 분포 되어 있다.¹⁰ 효모에서도 세포막에 부착된 PAP가 비교적 상세히 연구되어 있다.^{11,12}

현재 원핵 세포에서는 PAP의 존재가 아직 분명하지 않다. 그람-음성인 대장균의 경우 phosphoglyceride의 합성이 CDP-diacylglycerol을 통하여 이루어지며 대사적으로 DAG가 검출되지 않는 것으로 보아 PAP의 존재가 의심스럽다. 그람-양성인 바실러스의 경우 DAG를 포함하여 중성 지질이 존재하므로 PAP의 존재 가능성이 추정되나 이에 대한 연구는 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 바실러스 균주의 세포액 내 PAP 특성을 연구하기 위해 그 정제 방법의 수립을 시도하였다.

수확한 pellet 상태의 *B. subtilis*균 12 g을 1 mM EDTA, 0.3 M sucrose, 10 mM 2-mercaptoethanol과 100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride를 포함한 50 mM Tris-maleate(pH 7.0) 50 mL에서 세포 파쇄기로 파쇄 한 후 25,000×g에서 10분간 원심분리하여 세포 찌꺼기를 제거하였다. 이 세포 상층액을 다시 100,000×g에서 1시간 원심 분리하여 세포액과 소포체 분획으로 나누었다. 이 들 세포 분획의 PAP를 각각 검토했던 결과 PAP의 활성이 비슷한 양(5:5)으로 존재함을 확인하였다. 이 결과는 효모의 3:7과 비교하면 바실러스는 세포액에 더 많은 PAP가 있는 것으로 보인다.¹¹ 세포액을 효소원으로 활성 측정의 최적 조건을 검토한 결과 30°C에서 30분간 그리고 1,200×g까지 PAP의 활성이 직선 관계를 유지하는 것으로

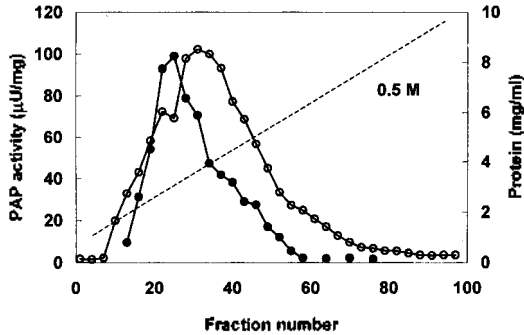


Fig. 1. DEAE-cellulose chromatography of *Bacillus subtilis* cytosolic PAP. Fractions of 5.4 mL were eluted with 0-0.5 M NaCl linear gradient. ●, PAP activity; ○, protein concentration.

나타났다.

PAP의 정제는 우선 세포액 분획 150 mL를 1 mM $MgCl_2$, 5 mM 2-mercaptoethanol, 20% glycerol을 포함한 10 mM Tris-maleate(pH 7.5)에서 하룻밤 투석한 후, 같은 완충 용액으로 평형시킨 DEAE-cellulose 50 mL에 흡착시켰다. 그리고 0.5 M NaCl을 이용해 직선 농도 기울기로 용출시켰다. 이 때 한 분획은 5.4 mL였으며 이 양을 용출시키는 데는 대략 15분 걸렸다. PAP 활성과 단백질 분획수가 빗겨나가 원래 상층액과 비교하면 약 3배의 정제 효과가 있었으며 회수율은 62%였다(Fig. 1). 여기서 얻은 PAP 활성 분획(#19-#34) 87 mL에 ammonium sulfate 12.4 g을 첨가하여 1 M이 되게 한 후 phenyl-Sepharose 4 mL에 흡착시키고 염이 없는 완충 용액으로 1.85 mL/8 min 속도로 용출시켰다(Fig. 2). 그 결과 specific activity가 23번 분획에서 약 2.5배 가량 증가하였

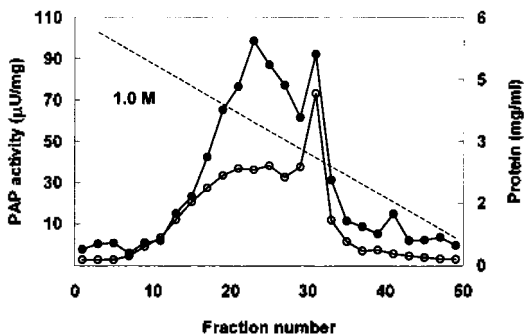


Fig. 2. Phenyl Sepharose chromatography of *Bacillus subtilis* cytosolic PAP. Fractions of 1.85 mL were eluted with 1.0-0 M ammonium sulfate linear gradient. ●, PAP activity; ○, protein concentration.

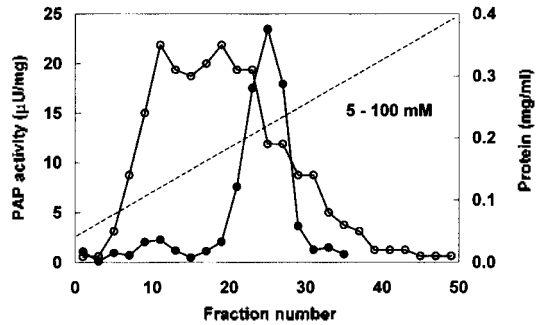


Fig. 3. Hydroxyapatite chromatography of *Bacillus subtilis* cytosolic PAP. Fractions of 3.0 mL were eluted with 5-100 mM phosphate linear gradient. ●, PAP activity; ○, protein concentration.

다. 31번 분획의 PAP 분우리는 단백질과 함께 쏟아져 나온 것으로 specific activity는 비교적 적게 나왔다. 여기서는 전체 PAP의 약 90%가 회수된 것으로 보였다. 세 번째 정제과정은 hydroxyapatite column으로 글리세롤 없이 1 mM $MgCl_2$ 와 5 mM 2-mercaptoethanol을 포함하는 5 mM KH_2PO_4 (pH 7.5)로 phenyl Sepharose 분획 19-31 사이 24 mL를 투석한 후 6.7 mL column에 흡착시켰다. PAP 용출은 3.0 mL/12 min의 속도로 phosphate 5-100 mM 직선 기울기로 하였다(Fig. 3). 이 때 specific activity는 상당히 증가해 125 $\mu U/mg$ 으로 나타났다. 그리고 전체 PAP 회수율이 이 경우 130%로 계산되었다. 아마도 이 정제 단계에서 PAP 활성에 큰 변화를 일으키는 어떤 요인이 관여되어 있을 것으로 보이나 확인할 수 없었다. PAP 활성이 가장 높은 분획 23과 25사이 9 mL를 ultrafree-CL filter를 이용해 0.5 mL로 농축시킨 후, 네 번째로 Sephacryl S-300 column(1.2 \times 45 cm)에 넣었다. 이 column은 50 mM Tris-maleate pH 7.5, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM 2-mercaptoethanol과 30 mM NaCl로 용출하였다. 용출 속도는 9.6 mL/hr로 1 mL씩 60분획을 받았다. Fig. 4에서 보듯이 Sephacryl S-300에서 PAP 분우리가 분획 45를 전후해서 검출되었으며 단백질 분우리는 분획 37-38에서 나타나 효율적인 분리가 이루어졌음을 보여주고 있다. 이 때 specific activity는 4,324 $\mu U/mg$ 으로 크게 증가하였으나 전체 회수율은 비교적 낮아 30% 정도를 나타냈다. 여기서 얻어진 PAP 분우리를 10% SDS-PAGE한 결과 주요 단일 띠로 얻을 수 있었다(Fig. 5).

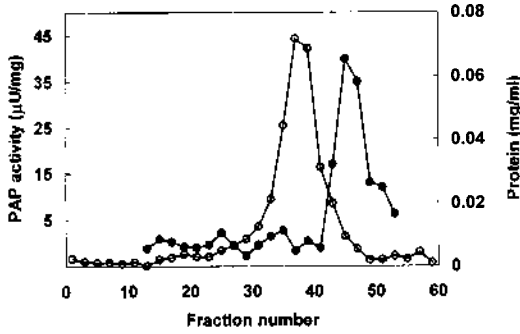


Fig. 4. Sephacryl S-300 chromatography of *Bacillus subtilis* cytosolic PAP obtained from the hydroxyapatite column of Fig. 3. ●, PAP activity; ○, protein concentration.

바실러스 PAP의 분자량은 대략 90 kDa로 추정되었으며 세포액에 존재하는 것과 Mg²⁺의존으로 이루어 보아 아마도 다른 효소원에서 분리된 PAP-1과 비교될 수 있을 것 같다. 효소의 경우 45 kDa와 104 kDa 두 종류가 알려져 있으나 104 kDa는 91 kDa를 거쳐 45 kDa로 분해되는 것으로 밝혀졌다.¹³ 이러한 점을 감안하면 현 단계에서 분자량만 가지고 어떤 의미있는 결론을 내리기는 쉽지 않다. 쥐 간의 PAP-2의 경우도 51-53 kDa 형태가 분리되었으나 뇌에서는 86 kDa가 western blot 분석에서 검출되기도 했

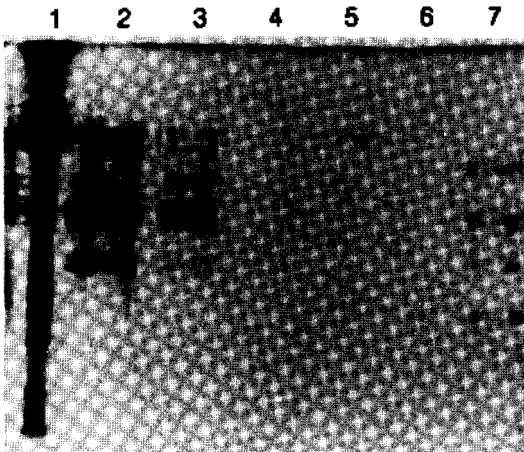


Fig. 5. SDS-PAGE of purified *Bacillus subtilis* cytosolic PAP. Lane 1, fraction #23 of phenyl sepharose column; Lane 2 and 3, fraction #39 of sephacryl S-300 column (lane 3 was 3(dilution of lane 2)); Lane 4 and 6, empty wells; Lane 5, fraction #46 of Sephacryl S-300 column; Lane 7, protein molecular weight marker (from top to bottom: 66 kDa, 48 kDa, 29 kDa, and 18.4 kDa).

다.¹⁴ 현재 체계적인 바실러스 PAP의 특성은 검토되지 않았으나 정제가 SDS-PAGE상에서 단일 띠로 나타날 정도로 이루어졌기 때문에 원핵세포 PAP의 특성을 밝힐 수 있는 토대가 마련되었다고 하겠다.

실 험

재 료. [γ -³²P]ATP는 Dupont NEN에서 구입하였다. DEAE-cellulose, phenyl Sepharose, Sephacryl S-300, 1,2-dioleoyl-sn-glycerol, 1,2-dioleoyl phosphatidic acid, dithiothreitol, cardiolipin, Tris-maleate, ATP, MgCl₂ 등은 Sigma 회사로부터 구입하였다. Hydroxyapatite Bio-Gel은 Bio-Rad 제품이고, TLC plate(silica gel 60 F-50)는 Merck사 제이며, diacylglycerol kinase는 Calbiochem에서 구입하였다. 그 외 일반 시약이나 유기용매는 시약급을 구입하여 사용하였다.

세포 배양. *Bacillus subtilis*(KCTC #1324)는 생명공학 연구소 유전자 은행으로부터 분양 받아 LB 배양액에서 씨앗배양하여 stationary phase에서 5 mL씩 나누어 -70°C에서 보관하였다. 대량 배양은 5 L 발효조를 사용하여 37°C에서 약 12시간 배양하여 균을 수확하였다. 5 L 배양 시약 25 g(젖은 무게)의 *B. subtilis*가 얻어졌으며 침전물 상태로 -70°C에서 보관하였다.

방사성 PA 합성. PAP 기질 PA는 diacylglycerol에 [³²P] phosphate group을 효소적으로 결합시켜 제조했다.¹⁵ 총 반응액 100 μl에 2 mM diacylglycerol, 100 μCi [γ -³²P]ATP를 포함한 ATP, 144 mU diacylglycerol kinase(*E. coli*), 50 mM imidazole buffer (pH 6.6), 2 mM dithiothreitol과 1 mM cardiolipin을 넣고 25°C에서 30분간 반응시켰다. 반응은 Folch 용액(CHCl₃:CH₃OH=2:1 v/v)을 넣어 멈추고 chloroform으로 생성된 PA를 추출하였다. 생성된 PA는 TLC로 정제하였으며 산성 전개 용액(chloroform:methanol:acetone:acetic acid:water=200:40:80:40:20)을 사용하였다. 순수한 PA의 수득율은 대개 40-50% 정도였으며 0.1 mM PA와 섞어 최종 2 × 10⁵ dpm/20 μl로 조절하여 PAP 활성측정에 사용하였다.

PAP 활성 측정. PAP 활성은 Martin 등의 방법¹⁶을 개조하여 측정하였다. 반응 혼합액에는 50 mM Tris-maleate(pH 7.5), 100 μl 효소원과 0.1 mM PA (2 × 10⁵ dpm)를 넣어 30°C에서 20분간 반응시켰다.

반응 종결은 Folch 용액으로 했으며 chloroform과 $MgCl_2$ 로 생성 물질인 인산을 PA와 분리하고 물로 포화된 ether로 3번 씻어준 후 수용액 층의 방사성 인산을 섬광계수기로 읽었다. 효소 활성 단위 1 unit은 1분간 가수 분해된 micromole의 PA를 기준으로 하였다.

본 논문은 1995년도 한국 학술진흥재단의 자유공모과제 연구비에 의해 연구되었으며 논문작성에 도움을 준 강병호에게 감사합니다.

인 용 문 헌

1. Brindley, D. N.; Waggoner, D. W. *Chem. Phys. Lipids* **1996**, *80*, 57.
2. Martin, A.; Gomez-Munoz, A.; Duffy, P. A.; Brindley, D. N. *Signal-activated phospholipases*; M. Liscovitch, Ed.; Landes Co. Austin, TX, U.S.A. 1994; p 164.
3. Rossi, F.; Grzeskowiack, M.; Della Bianca, V.; Calzetti, F.; Gandini, G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *168*, 327.
4. Bhat, B. G.; Wang, P.; Coleman, R. A. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 13178.
5. Jones, G. A.; Carpenter, G. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 20850.
6. Tsai, M.-H.; Yu, C.-L.; Stacey, D. W. *Science* **1990**, *250*, 985.
7. Billah, M. M.; Authes, J. C. *J. Biochem.* **1990**, *269*, 291.
8. Carnero, A.; Lacañal, J. C. *J. Cell Biol.* **1993**, *52*, 448.
9. Ha, K.-S.; Exton, J. H. *J. Cell Biol.* **1993**, *123*, 1796.
10. Fleming, I. N.; Yeaman, S. J. *Biochim. Biophys. Acta.* **1995**, *1254*, 168.
11. Lin, Y.-P.; Carman, G. M. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 8645.
12. Quinlan, J. J.; Nickels, J. T. Jr.; Wu, W.-I.; Lim, Y.-P.; Broach, J. R.; Carman, G. M. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 18020.
13. Morlock, K. R.; McLaughlin, J. J.; Lin, Y.-P.; Carman, G. M. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 3593.
14. Waggoner, D. W.; Martin, A.; Dewald, J.; Gomez-Munoz, A.; Brindley, D. N. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 19429.
15. Limatola, C.; Schaap, D.; Moolenaar, W. H.; Blitterswijk, W. J. *J. Biochem.* **1994**, *304*, 1008.
16. Martin, A.; Gomez-Munz, A.; Jama, Z.; Brindley, D. N. *Methods Enzymol.* **1991**, *197*, 563.