

Bacillus stearothermophilus Peptidyl Prolyl *cis-trans* Isomerase의 정제 및 유전자 분석

김 동 주

大阪大學 應用生物工學科

Purification and Gene Analysis of Peptidyl Prolyl *cis-trans* Isomerase from *Bacillus stearothermophilus*

Dong-Ju Kim

Dept. of Biotechnology, Faculty of Engineering, Osaka University, Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

Abstract

The peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase, EC 5.2.1.8) from *Bacillus stearothermophilus* was extracted from the cells treated with by lysozyme. PPIase was purified from the cell extracts by heat treatment, ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography and finally gel filtration, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE). The molecular weight of the purified PPIase was estimated as 18kDa by SDS-PAGE. The 39 amino acid residues from the N-terminus were determined by the protein sequencer. The enzyme showed the optimum pH at 8.0 and was stable at the range of pH 7.0~8.0. The enzyme was considerably stable after heat treatment at 60°C for 30minutes, and the enzyme was quite stable up to 65°C. The presence of the PPIase in the refolding solution accelerated the isomerization rate of the assay peptide.

PPIase gene of *Bacillus stearothermophilus* was screened from a genomic library by plaque hybridization using the A-1 primer as a probe. A PPIase positive plaque contained a 3.0kb insert of the chromosomal DNA. A 3.0kb fragment was subcloned into pUC18, resulting pPI-40. A DNA fragment encoding the N-terminal portion of the PPIase in pPI-40 was amplified by polymerase chain reaction(PCR) method using the A-1 and B-2 primers.

The amplified fragment was cloned into the *Sma* I site of pUC18 and recombinant plasmid was designated as pSN-18. The nucleotide sequence of 167bp fragment was determined. The deduced amino acid sequence of PPIase was completely matched with the determined N-terminal amino acid sequence of PPIase *B. stearothermophilus*.

Key words : PPIase purification, protein folding, gene cloning, PCR.

서 론

단백질 고차구조(folding) 형성에는 합성된 폴리펩타이드의 열역학적인 법칙에 따라, 자발적으로 일어나는 과정이라고 믿어 왔었다. 시험관내에서의 변성 단백질의 재구성(refolding)에서는, unfolding된 폴리펩

타이드 사이에서 회합이 일어나기 쉬우며, folding 반응 도중에 침전하게 되면 folding 반응 효율이 악화되기도 한다. 그리고 folding 반응 속도가 정체되는 단계로 인하여 folding을 완료시키기까지 장시간을 필요로 하는 경우가 많다¹⁾. 일반적으로, 시험관내에서 일어나는 단백질의 folding은 세포내에서 일어나는 것에

† Corresponding author : Dong-Ju Kim

비해 비효율적이고 반응속도가 지체된다. 세포내에서 일어나는 이러한 문제점은 unfolding 상태의 불안정한 folding 중간체를 일시적으로 트레프(trap)하여 불필요한 회합을 억제하면서 적절한 시기에 단백질의 folding을 증가하는 샤페론(chaperon), PPIase 등의 보조 인자가 작용하고 있다고 생각할 수 있다^{2,4)}.

Peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase)의 경우, 세포내에서 단백질 folding에 관여한다는 직접적인 증거는 PPIase가 시험관 내에서 folding 반응 속도를 촉진하는 효율이 아주 높다는 것이다. 예를 들면 RNase T1을 기질로 하여, 단백질 folding 속도를 조사한 결과, 대장균 유래의 PPIase는 세포내에 존재한다고 생각할 수 있는 정도의 효소 농도에서와 비존재 하에서의 folding 반응 속도를 조사한 결과 수 백배 정도의 가속 효과를 나타냈다⁵⁻⁷⁾. 이러한 가속화 속도는 세포내에서 1시간 이상 요구하는 folding 반응 속도를, PPIase에 의해서 folding 반응 속도를 수초 동안에 완료시킨다.

PPIase로서 최초로 단리된 것은 돼지의 신장유래의 효소이다⁸⁾. 단리된 PPIase는 163개의 아미노산 잔기로 형성된 분자량은 18 kDa이었다. 이 단백질의 일차 구조 해석결과, 소의 흉선으로부터 단리된 면역 억제제인 cyclosporin A (CsA)의 결합 단백질인 cycophilin과 동일한 아미노산 배열로 되어 있는 것을 발견했다⁸⁾.

돼지 신장 유래의 PPIase는 CsA 결합에 의해서 PPIase의 활성은 완전히 저해되었다^{2,8)}. 그리고 RNase T1을 기질로 하여 PPIase의 folding 촉진 효과와 cyclosporin A (CsA)에 의해서 저해 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 CsA의 면역억제 효과 및 그 외의 효과는 PPIase 활성의 저해에 의한 결과가 아닌가 하는 가설을 제안했다^{2,8)}.

RNase T1의 경우, 그 folding 반응은 천연 단백질 중에서 100% *cis*형으로 존재하는 두개의 proline 잔기인 Pro³⁹와 Pro⁵⁵의 이성화 반응에 의해서 규정되어진다. RNase T1의 refolding 과정에 있어서는 “매우 빠른 반응” 후에, “intermediate” 계속하여 “very slow”라고 하는 반응 과정이 존재한다^{7,9-11)}. 전자는, Ser⁵⁴-Pro⁵⁵ 펩타이드 결합의 *trans-cis* 이성화에 대응하며, 후자는 Tyr³⁸-Pro³⁹는 *trans-cis* 이성화에 관여하고 있다고 추정된다^{7,10)}.

CsA의 결합 단백질이 PPIase라는 것이 분명하게 밝혀진 이후, 또 다른 면역 억제제인 FK506의 결합 단백질도 또한 PPIase 활성을 갖는 것으로 나타났다^{12,13)}. 면역 담당 세포에 대한 효과에 있어서, CsA, FK506는 T 세포가 항원 자극을 받아서 림포카인 유전자의 활성화가 일어날 때까지의 세포내의 정보전달 과정 내에서,

전사레벨을 저해한다고 생각할 수 있다¹⁴⁻¹⁸⁾.

본 연구에서는 호열균 *Bacillus stearothermophilus* 유래의 내열성 효소 PPIase의 정제와 화학적 성질 및 유전자 단리에 관하여 조사하였다.

재료와 방법

1. 호열균 배지조성과 배양조건

*B. stearothermophilus*은 L-broth (Trypton 10g, yeast extract 5g, NaCl 5g/L, pH 7.3) 에서 배양했다²⁰⁾. 고체배지로 사용시에는 LB 배지에 1.5%가 되도록 agar를 첨가했다. 배양 조건은 55°C, 회전속도 200rpm으로 배양하였다. 균체 농도는 OD₆₆₀에서 측정하여 대수 증식기까지 배양한 후 집균, 효소 정제용 시료로서 -80°C에 동결 보존하였다.

2. 효소활성 측정법

기질로서는 합성 펩타이드 N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide(pAN)과 기질 이성체 분해에는 chymotrypsin을 이용하여 PPIase활성을 측정하였다. 활성 측정 방법은 2ml의 완충용액(0.035M HEPES/2-mercaptoethanol, pH 7.8)에 50 μ l의 합성기질(1.68mM), 20 μ l의 chymotrypsin(0.76mM), PPIase(200nM)을 첨가한 후, 10°C에서 *cis-trans* 촉진 효과를 흡광도 390nm로 측정하였다.

3. 효소정제 과정

1) 이온교환 크로마토그래피

DEAE-sepharose CL-6B 이온교환 칼럼(2.5 × 10cm)을 정제 완충액(10mM Tris-HCl, pH 7.8)으로 평형화한 후, 시료액을 충전하여 4°C에서 크로마토그래피를 이행하였다. 동일 완충용액 500ml로 비흡착 분획을 용출한 후, NaCl 농도구배(0~0.5M)를 전량 500ml로 하여, 각 분획을 5ml씩 취했다. 0~0.1M의 NaCl 농도구배로 얻어진 활성분획을 농축 투석 후, 다시 동일 방법으로 이온교환크로마토그래피를 하였다.

2) Gel-filtration

이온교환 크로마토그래피의 활성분획 시료를 농축하여 Sephadex G-75 칼럼(1.5 × 90cm)에 넣은 다음 (apply), 각 분획을 3ml씩 분취하였다. 그리고 이 활성분획 시료를 최종적으로 Superose TM-12 (FPLC)로 정제하였다.

4. SDS-PAGE

단백질 전기영동은 Laemmli의 법²⁷⁾으로 하였으며, SDS-PAGE는 단백질의 분자량 및 정제 단백질의 순도 결정에 이용되었다. 전기영동 후 coomassie brilliant blue R-250(CBB)으로 염색하였다. 분자량 마커는 electrophoresis calibration kit (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)를 이용하였다.

5. 아미노산 배열결정

PPIase N-말단 아미노산 배열의 분석은 자동 Edman 분석법에 의해서 이행하였으며, 분해에는 기상식 아미노산 sequencer(Applied Biosystem, 473A)을 사용하였다. Phenylthiohydantion 유도제로 된 아미노산을 액체크로마토 그래피로 해석하였다.

6. 올리고뉴클레오타이드 합성

Edman법으로 결정된 호열균 유래의 PPIase N-말단 아미노산 39 잔기로부터 Ala-Lys-Lys-Gly-Tyr-Ile-Leu-Met 영역을 선택하여 이 아미노산에 대응하는 혼합 뉴클레오타이드(primer) 5'-GCNAAP_nAAp_nGGNTAP_n-ATP_nCTTATG-3'와 클론화 되어진 원핵, 진핵세포 유래의 PPIase 1차 아미노산 배열로부터 상동 영역의 신축성을 고려하여 Gly-Gly-Gln-Ile-Met-Phe-Gly-Pro-Ile-Val-Arg-His-Phe 펩타이드에 대응하는 혼합 뉴클레오타이드(primer) 5'-NCCNCCP_nTGP_n(orT)ATCATP_nAA-NCCNGGP_n(orT)ATNACNCGPuTGPuAA-3' 2개의 primer A-1과 B-2를 디자인한 후, Gene Assembler Plus synthesizer (Pharmacia LKB Biotechnology)의해서 합성하였다.

7. 유전자 Library

*B. stearothermophilus*의 염색체 DNA 조제는 Harris-Warrick법에 따라서 이행했다. 조제한 DNA 0.5 μ g을 *Sau3* A1로 부분 소화한 후에 λ EMBL3의 *Bam* HI 부위에 삽입했다. Genomic library를 구축하기 위하여 재조합 DNA는 Gigapack system (Stratagene Inc., California, USA)를 이용하여 packaged 했다. 그리고, 구축한 library로부터 약 1×10^4 recombinants(재조합체)를 얻었다.

8. 유전자 조작과 Southern 분석

균주 및 플라스미드는 내열성 PPIase를 생산하는 *B. stearothermophilus*은 유전자 공여체로서 사용했다. 벡터 pUC19¹⁹⁾는 재조합 플라스미드 구축에 사용하였고, 제한효소 처리는 플라스미드 DNA(0.5~1 μ g)을 함유

한 반응액 40 μ l에 각 제한효소 5 단위를 첨가하여, 37°C에서 2시간 처리했다. Probe DNA(primers)는 T4 DNA polymerase를 이용하여 [α -³²P] dCTP (Pharmacia, Sweden)로 표식하였다. 그리고 plaque 혼성화(hybridization)으로 얻어진 각 양성클론에 삽입된 DNA 단편을 확인한 후, 플라스미드 pUC18¹⁹⁾에 서브클로닝하여¹⁸⁾ Southern 분석으로 유전자 위치를 결정하였다²⁶⁾.

9. 형질전환

대장균 형질전환 숙주균으로는 *E. coli* JM109을 사용하였다. CaCl₂ 법에 의하여 competent 세포를 조제하였다²¹⁾. 플라스미드 DNA 조제의 방법^{22,23)}에 의해서 이행하였으며, 필요에 따라 CsCl₂를 첨가하여 냉각 초고속 원심분리기에 의해서 조제하였다.

10. Polymerase Chain Reaction(PCR)

PCR 반응은²⁵⁾ 호열균 *B. stearothermophilus* 염색체 DNA (1 μ g), primers (0.5pmol), 2.5unit의 Vent DNA polymerase (Beverly, MA, USA), dNTPS (200 μ M), 100 μ l의 PCR 완충용액을 첨가하여, denaturation, annealing, extension 순서에 의하여 목적하는 DNA는 program temperature control system (PC-700)에 의하여 증폭하였다.

11. 유전자 염기배열 결정

DNA 염기배열 결정은 SEQUENCE 키트를 사용하여 dideoxy 법²⁴⁾에 의하여 이행하였다. 한줄선 DNA의 조제는 M13 mp18,19²³⁾을 이용했다. 그리고 염기배열 결정시 dGTP를 뉴클레오타이드 어날러그(analog)인 dITP로 치환하여 DNA의 이차구조에 의해서 형성되는 불투명한 밴드를 완전히 저해시켰다. 적당한 제한효소 부위가 비존재하에서는 Exo/Mung bean으로 DNA 단편을 축소화하여, 염기배열을 결정했다.

결과 및 고찰

1. 호열균 *B. stearothermophilus* 유래의 PPIase 정제

PPIase의 정제를 위해, 55°C L-broth에서 배양한 *B. stearothermophilus* 균체(100g wet weight)을 500ml의 완충용액(0.1M Tris-HCl, pH 7.8, 5mM 2-mercaptoethanol)으로 세정, 현탁한 다음, 2g의 lysozyme을 첨가하여 37°C에서 30분간 처리하였다.

초음파 처리로 균체를 파쇄, 원심분리(1,500rpm, 30

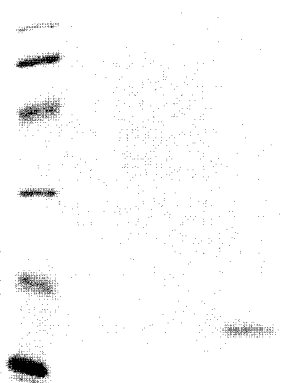


Fig. 1. SDS-PAGE of PPIase from *B. stearrowthermophilus*. Lane M, molecular weight standards; lane 1, sample (2 μ g) filtration(FPLC). Molecular weight markers from top to bottom; rabbit muscle phosphorylase (94 kDa), bovine serum albumin(67kDa), egg white ovalbumin (43kDa), bovine carbonic anhydrase(30kDa), soy bean trypsin inhibitor(20kDa), lysozym(14.3kDa). Protein bands were stained with silver stain.

분, 4 $^{\circ}$ C)하여 조효소 시료를 얻었다. 이 시료에 40%의 황산암모늄을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에 24시간 방치한 다음, 원심분리(1,500rpm, 30분, 4 $^{\circ}$ C)하여 얻어진 시료를, 재차 60%의 황산암모늄을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 방치하였다. 동일 조건으로 원심분리하여 얻어진 침전물을 정제 완충용액(10mM Tris-HCl, pH 7.8)으로 용해하여, 동일 용액으로 투석하였다. 그리고 조효소 시료는 DEAE-Sephadex CL-6B로 정제한 후, 활성분획을 농축하여 Sephadex G-75, Superose TM-12 (FPLC)로 겔-여과로 정제하였다(Table. 1). 이 과정에서 용출된 효소 활성 분획을 SDS-PAGE로 확인한 결과 분자량 18kDa 부근에 단일 밴드로 정제된 PPIase가 검출되었다(Fig. 1).

2. PPIase의 pH 특성 및 열안정

정제한 본 효소의 분자량은 SDS-PAGE 방법에 따르면 18kDa이었다. 이 효소에 기질을 첨가하지 않고 각각의 온도에서 30분간 처리한 후, 10 $^{\circ}$ C에서 활성을 측정하였다. 그리고 열안정성에 관하여 조사한 결과 60 $^{\circ}$ C에서 100% 활성, 65 $^{\circ}$ C에서 50% 이상의 활성을 갖는 내열성 효소임을 확인하였다(Fig. 2). 또한 본 효소는 pH 7.5~8.0의 범위에 안정한 상태를 유지하였으며, 최적 pH는 8.0이었다(Fig. 3). 그리고 산성측에서는 거의 효소활성을 나타내지 않은 것이 특징으로 나타났다.

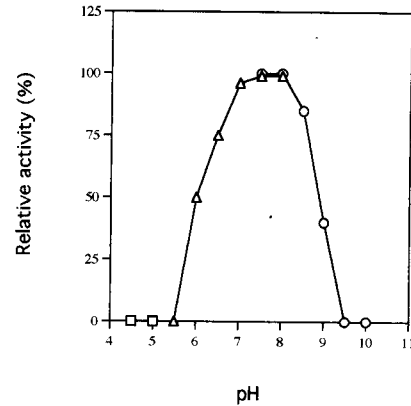


Fig. 2. Effect of pH on the enzyme activity. The reaction mixture (500 μ l), consisting of 200 μ l of 60 mM potassium phosphate buffer(pH 5.5~7.5) and 60mM Tris HCl buffer(pH 7.0~9.0), 300 μ l of the enzyme solution(200nM), was incubated at various pHs at 37 for 30min and the residual activity was assayed. The highest activity is denoted at 100 %. Symbols; \square , pH 4.0~5.5; \triangle , pH 5.5~7.5; \circ , pH 7.0~9.0

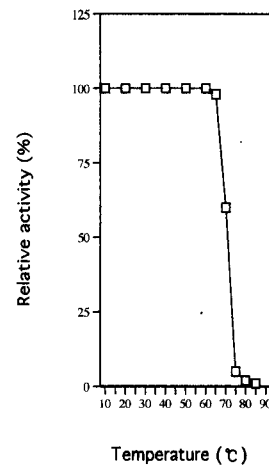


Fig. 3. Effect of temperature on PPIase stability. The reaction mixture (500 μ l), consisting of 400 μ l 50mM Tris HCl buffer(pH 8.0) and 100 μ l of the enzyme solution, was incubated at various temperature for 30min and the remaining activity were assayed with pNA as a substrate. The highest activity is denoted at 100%.

3. PPIase에 의한 변성 단백질의 재구성(refolding)

변성 단백질의 접힘반응(folding)에 의한 PPIase의 촉진 효과에 관해서는, 천연 단백질 중의 100% *cis* 형으로 존재하는 RNase T1(기질)을 이용하여, 단백질 재접힘(refolding) 반응을 조사했다. 요소로 변성시킨

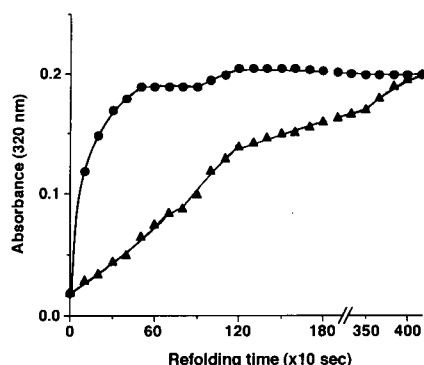


Fig. 4. The catalytic effect of PPIase on slow protein folding of RNase T1. The refolding of RNase T1 in the absence(▲) and 200nM presence (●) of PPIase. Refolding conditions were performed by a 40-fold dilution of unfolded protein(RNase T1). The refolding of RNase T1 was monitored by the increase in spectrophotometer at 320nm.

RNase T1의 재접힘(refolding)반응은, 먼저 Ser⁵⁴-Pro⁵⁵ 펩타이드 결합의 trans에서 cis로 이성화가 일어나고, 재차 Tyr³⁸-Pro³⁹ 펩타이드 결합이 trans에서 cis로 이성화가 일어난다. 이들은 시간 변화에 따라 600 sec와 1,200 sec 부근에서 2단계 반응이 일어나게 된다. 이 기질의 반응 특징을 이용하여, 정제한 호열균유래의 PPIase와 RNase T1(기질)을 반응시킨 결과 이 2단계의 반응을 촉진하는 것을 확인하였다(Fig. 4).

4. PPIase N-말단 아미노산 영역에서의 Primer 제작

호열균 *B. stearothermophilus* 배양세포에서 얻어진 조효소 시료를 이온교환 크로마토그래피, gel filtration (FPLC)로 정제한 PPIase 단백질을 Edman 법으로 N-말단 아미노산 39 잔기를 결정하였다²⁸⁾. 결정한 N-말단 아미노산 39 잔기는; Lys-Ala-Lys-Gly-Tyr-Ile-Leu-Met-Glu-Asn-Gly-Gly-Lys-Ile-Glu-Phe-Glu-Leu-Phe-Pro-Asn-Glu-Ala-Pro-Val-Thr-Val-Ala-Asn-Phe-Glu-Lys-Leu-Ala-Asn-Glu-Gly-Phe-Tyr.

그리고 PPIase N-말단 아미노산 배열로부터 24mer의 primer(재료 및 방법; A-1)의 합성, 클론화된 대장균 PPIase (periplasm: PPI a, cytoplasm: PPI b) 아미노산 배열⁶⁾과 N-말단에서 높은 상동성이 높게 보존되어 있는 영역을 선택하여 24mer의 올리고뉴클레오타이드 (primer)를 합성하였다(재료 및 방법 6 ; B-2).

5. 유전자 단리

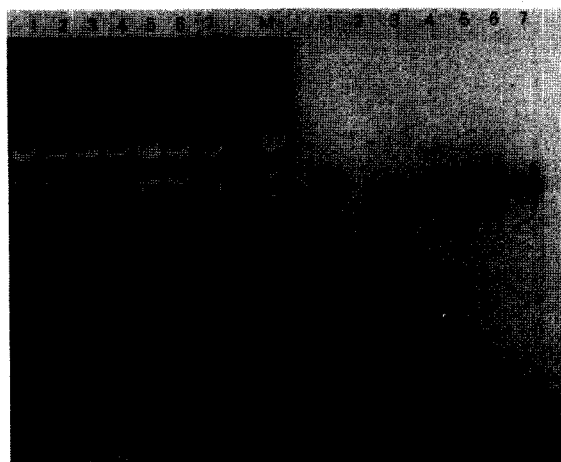


Fig. 5. Southern hybridization of phages clones digested with Hind III. (A) Agarose gel electrophoresis. (B) Southern hybridized pattern from pannel A. Lane M, λ DNA digested with Hind III; lanes 1~7 the phage DNA prepared from positive clones.

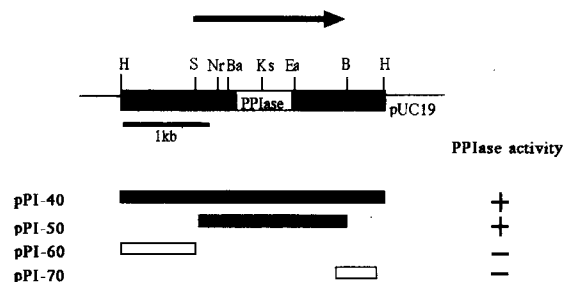


Fig. 6. Restriction edonuclease cleavage map of plasmid pPI-40 and its derivatives and the activity of PPIase production. The black region indicates the DNA from *B. stearothermophilus*. Abbreviations used are as follows; B, Bam HI; H, Hind III; S, Sma I ; Nr, Nar I; Br, Bal I ; Ks, Kas I; Ea, Rag I; + and - indicate PPIase activity in cell free extract of *E. coli* harboring the plasmid. The arrow indicates the coding region of the PPIase gene.

호열균 염색체 DNA를 Sau 3AI으로 부분 분해하여, λEMBL4 파지벡터 Bam HI 부위에 연결하여 약 1 × 10⁴의 염색체 유전자 라이브러리를 구축하였다. Probe DNA는 FPLC로 정제한 PPIase 단백질 아미노산 배열로부터 합성한 올리고뉴클레오타이드²³⁾로 표지한 DNA)를 사용하여, plaque hybridization으로 PPIase유전자를 스크린하였다.

이 결과, 최종적으로 취득한 양성 plaque로부터 DNA를 정제하여, 제한효소 Hind III로 분해한 후,

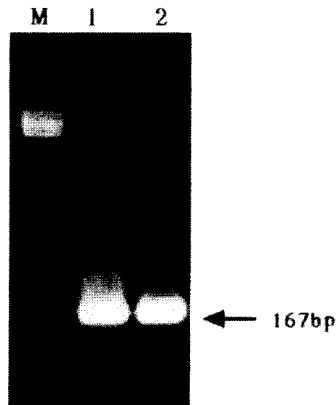


Fig. 7. Construction of the recombinant plasmid pSN-18. DNA fragment(167 bp) encoding the N-terminal portion of the PPIase gene was amplified by PCR(primers; A-1, B-2). The amplified fragment was cloned into the *Sma* I site of pUC 18 and the recombinant plasmid was designated as pSN-18. Lane M, molecular weight markers are ladder DNA; lane 1,2(pSN-18). Agarose electrophoresis: for each sample, 5 μ l from a total 50 μ l reaction was run on a 1.50% agarose gel at 75V for 1 hours. The minigel was then stained in ethidium bromide (0.5 μ g/ml), and DNA was visualized under UV.

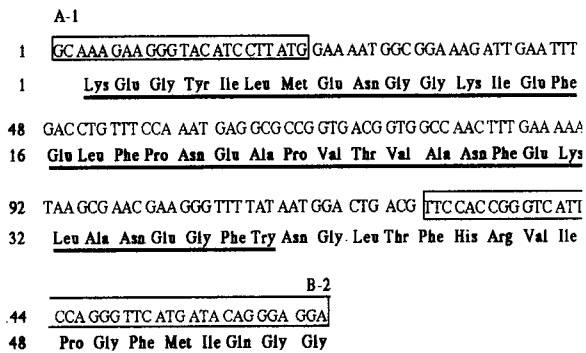


Fig. 8. DNA sequence of the gene encoding PPIase from *B. stearrowthermophilus*. The deduced amino acid sequence is denoted below the nucleotide sequence in the standard. The N-terminal amino acid sequence of the PPIase determined by Edman degradation is underlined. Primers A-1 and B-2 indicate PCR primers used for the amplification of the N-terminal gene.

Southern 분석 결과, 약 3.0kb, 7.0kb에서 하이브리다이징한 밴드를 취득하였다(Fig. 5). 그리고, 약 3.0kb에서 하이브리다이징한 DNA 단편을 아거로스 겔로부터 회수 정제하여, pUC18, 19의 *Hind* III 부위에 서브클로닝하여 구축한 재조합 plasmid를 pPI-40으로 명명하였다.

그리고 제한효소 지도를 작성한 후, Southern 분석으로 PPIase 유전자 위치를 결정하였다(Fig. 6).

6. N-말단영역 PCR 클로닝

pPI-40으로부터 조제한 plasmid DNA를 *Hind* III 3.0k 단편을 아거로스겔로부터 회수하여, PPIase N-terminal로부터 합성한 primer A-1(재료와 방법, Fig. 8)과 원핵, 진핵세포로부터 클론화 되어진 PPIase 아미노산 배열로 구축한 primer B-2(재료와 방법 6, Fig. 8)을 이용하여 PCR법에 의하여 DNA를 증폭하였다. 그 결과 각 primer 사이에서 예상되는 180bp DNA(실제 염기배열의 결과 167bp)가 증폭되었다. PCR 법에 의하여 증폭되어진 180bp DNA 단편을 pUC18, 19의 *Sma* I 부위에 클로닝하여 재조합 플라스미드를 pSN-18으로 명명하였다(Fig. 7). 또한 180bp 단편을 ³²P로 표지하여, 클로닝한 3.0kb 단편(pPI-40)을 동일한 방법으로 Southern 분석 결과 3.0kb 단편과 강하게 하이브리다이징하였다.

7. PPIase의 염기배열 결정

호열균 PPIase N-말단 아미노산 배열을 코드하는 영역을 PCR법으로 증폭하여 얻어진 180bp DNA 단편을 M13mp18, 19의 *Sma* I 부위에 서브클로닝하여, 염기배열을 결정하였다. 염기배열의 유전정보로부터 해석한 결과, DNA 단편은 167bp로 형성되어져 있었으며, 번역 개시코돈인 Met과 종지코돈이 결여된, 165bp의 55 아미노산 잔기를 코드하는 open reading frame(ORF)이 연속되어 있었다(Fig. 8). 그리고 Lys으로 시작하여 Gly으로 형성되어진 이 배열안에는 Edman 분해로 결정한 *B. stearrowthermophilus* 유래의 PPIase N-말단 아미노산 배열(결과 및 고찰 4, Fig. 8)이 완전이 일치하고 있었으며, DNA 단편 증폭에 사용한 각각의 primer(A-1, B-2) 배열이 완전하게 보존되어 있었다(Fig. 8). PCR법에 의해서 증폭되어진 DNA 단편의 ORF은 PPIase의 구조유전자 1/3영역을 코드하는 완전한 PPIase 유전자의 일부 영역임을 확인하였다.

요 약

호열균 *B. stearrowthermophilus*으로부터 단백질 고차구조 형성을 촉진하는 내열성 PPIase를 정제하기 위해, 이 균체를 대량으로 배양 집균, 파쇄하여 효소활성을 측정하였다. 효소의 활성측정은 N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide(pAN)를 기질로 사용하였다. chymotrypsin은 기질 이성체(*cis-trans* 형)의 한쪽(*trans*)만을 특이적으로 분해하는 반응을 이용하여 PPIase 활성

을 측정하였다. 호열균 추출시료로 부터 효소활성을 확인한 후, DEAE-sepharose CL-6B, Sephadex G-75로 정제 후, 최종적으로 Superose TM-12 (FPLC) gel-필트레이션으로 분자량 18kDa의 본 효소를 정제하였다. 정제한 효소의 화학적 특징을 조사한 결과 pH 7.5~8.0사이에 안정하였으며, 최적 pH는 8.0으로 나타났다. 그리고 65°C에 30분간 열처리 후, 효소활성을 측정한 결과 50% 이상의 잔존 활성을 갖는 내열성 효소임을 확인하였다. 정제 단백질의 N-말단 아미노산 분석은 Edman 분해법으로 39 아미노산 잔기를 결정하였다. 그리고 PPIase의 재구성(refolding) 반응은, 요소로 변성시킨 기질 RNase 1을 이용하여 이 단백질의 재구성(refolding) 실험을 조사한 결과, PPIase는 변성 기질 RNase 1의 재구성(refolding)을 촉진하는데 높은 효과를 가지고 있었다.

호열균 유전자 라이브러리로부터 PPIase 유전자 약 3kb을 클로닝하였다. 재조합 플라스미드 pPI-40에서 프라이머(A-1, B-2)를 이용하여 PPIase N-말단을 코딩하는 유전자를 PCR법으로 증폭하여, 염기배열을 결정 한 결과 증폭된 단편은 165염기로 형성된 55 아미노산 잔기를 코딩하는 open reading frame(ORF)가 연속되고 있었다. 그리고 Edman법으로 결정한 PPIase의 39아미노산 잔기가 이 배열내에 완전히 보존되어 있었다. 이 결과로부터 이 ORF는 PPIase 구조 유전자의 1/3에 해당하는 단편임을 확인하였다.

참고문헌

- Brandts, J. F. and Lin, L. L. : Proline isomerization studied with proteolytic isomerase. *Methods in Enzymology*, **131**, 107~127 (1986).
- Fischer, G., Bang, H. and Mech, C. C. : Nachweis einer enzym katalyse fur die cis-trans isomerisierung der peptidebindung in prolinhaligen peptiden. *Biochim. Acta.*, **10**, 1101~1111 (1984).
- Ellis, R. A. and Van der vies, S. M. : Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 321~347 (1991).
- Craig, E. A., Gimbill, B. D. and Nelson, R. J. : Heat shock protein : molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.*, **57**, 402~414 (1993).
- Schonbrunner, E. R., Mayer, S., Troschug, M., Fischer, G. and Takahasi, N. : Cyclophilins from different species. *J. Biol. Chem.*, **266**, 3630~3635 (1991).
- Hayano, T., Takahasi, N., Kato, S., Maki, N. and Suzuki, M. : Two distinct forms of peptidyl prolyl-cis-trans-isomerase are expressed separately in periplasmic and cytoplasmic compartments of *Escherichia coli* cells. *Biochemistry*, **30**, 3041~3048 (1991).
- Schonbrunner, E. R., Mayer, S., Troschug, M., Fischer, G. and Takahasi, N. : Cyclophilins from different species. *J. Biol. Chem.*, **266**, 3630~3635 (1991).
- Takahasi, N., Hayano, T. and Suzuki, M. : Peptidyl prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin : A binding protein cyclophilin. *Nature*, **337**, 473~475 (1989).
- Heinemann, U. and Saenger, W. : Specific protein nucleic recognition in ribonucleas T1-2' guanylic and complex : an X-ray study. *Nature*, **299**, 27~31 (1982).
- Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U. and Schmid, F. X. : Folding of ribonuclease T1. 2. kinetic models for the folding and unfolding reaction. *Biochemistry*, **29**, 3062~3070 (1990).
- Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U. and Schmid, F. X. : Folding of ribonuclease T1. 1. existence of multiple unfolded states created by proline isomerization. *Biochemistry*, **29**, 3053~3061 (1990).
- Siekierka, J. J., Wiederrecht, G., Grulich, H., Boulton, D., Hung, S. H. Y., Cryan, J., Hodres, P. J. and Sigal, N. H. : The cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 is both a uniqueness and highly conserved peptidyl cis-trans isomerase. *J. Biol. Chem.*, **264**, 21011~21015 (1990).
- Harding, M. W., Galat, A., Uehling, D. E. and Schreiber, S. L. : A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans isomerase. *Nature*, **341**, 755~760 (1989).
- Heander, B., Keller, R., Hiestand, P. C., Kocher, H. P., Wegman, G. and Movva, N. R. : Yeast cyclophilin : isolation and characterization of the protein, cDNA and gene. *Gene*, **83**, 39~46 (1989).
- Emmel, E. A., Verweij, C. L., Durand, D. B. and Higgins, K. M., Lacy, E., Crabtree, G. R. : Cyclosporin a specifically inhibits function of nuclease protein involved in t cell activation. *Science*, **246**, 1617~1620 (1989).
- Schreiber, S. : Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science*, **251**, 283~287 (1991).
- Friedman, J. and Weissman, I. : Two cytoplasmic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin: one in the presence and one in the absence of CsA. *Cell*, **66**, 799~806 (1991).
- Gething, M. J. and Sambrook, J. : Protein folding in the cell. *Nature*, **355**, 33~45 (1992).
- Yanish-perron, C., Vieira, J. and Messing, J. : Improved M13 phage cloning vectors and host strains : nucleotide sequences of the M13 mp and pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103~119 (1985).
- Zang, M., Nakai, H. and Imanaka, T. : Useful host-vector systems in *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Environ.*

- Microbiol.*, **54**, 3162~3164 (1988).
21. Hanahan, D. : Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Biol.*, **166**, 557~580 (1983).
 22. Birnboim, H. C. and Doly, J. : A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513~1523 (1979).
 23. Vieirai, J. and Messing, J.: Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.*, **153**, 3~11 (1979).
 24. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463~5467 (1977).
 25. Saiki, R. K., Gelgand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R. G., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. : Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487~491 (1988).
 26. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. : Molecular cloning 2ed ed: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1982).
 27. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680~685 (1970).
-
- (2002년 2월 25일 접수)