

트립토판 중합효소 α 소단위 잔기 치환체 Pro⁹⁶→Leu의 구조 변화에 영향을 미치는 139 및 258 잔기의 치환 효과

이주연 · 정재갑 · 신혜자¹ · 임운기*

부산대학교 자연과학대학 분자생물학과

¹동서대학교 응용공학부 환경공학전공

Effect of Substituted Residue 139 and 258 on Structural Changes of Mutant Tryptophan Synthase Pro⁹⁶→Leu α -Subunit

Joo Youn Lee, Jae Kap Jeong, Hae-Ja Shin¹ and Woon Ki Lim*

Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University,
Busan 609-735, Republic of Korea

¹Environmental Engineering Major, Division of Applied Engineering, Dongseo University,
Busan, 617-716, Republic of Korea

Abstract

Enzymatic activities and fluorescence spectroscopic properties of the double mutant proteins P96L/F139W, P96L/F258W and a triple mutant protein P96L/F139W/F258W of tryptophan synthase α subunit from *Escherichia coli* was examined to study tertiary and local structure changes around the tryptophan residues. The enzymatic activities of P96L/F139W and P96L/F258W were similar, but P96L/F139W/F258W had lower activity, as compared to wild type. The fluorescence intensities of double mutant, P96L/F139W and P96L/F258W, were decreased but that of a triple mutant, P96L/F139W/F258W, was increased when compared to wild type. The sum of the maximum fluorescence intensity (fluorescence intensity at the λ_{max}) for the double mutant proteins was not equal to the intensity seen in the triple mutant protein. The enzymatic activity and fluorescence data indicate that the replacement of Pro⁹⁶→Leu might affect on the stability of helix 8 and the loop located between strand 4 and helix 4. The result suggests that the tertiary structure of triple mutant (P96L/F139W/F258W), being different from wild type, might have more compact residual structure at the vicinity of 139 and 258.

Key words – Tryptophan synthase α subunit, mutant

서 론

트립토판 중합효소 알파 소단위체(분자량=28,600Da)는

(α/β)₈ barrel 구조로 알파나선구조 5개와 베타 병풍구조 6개로 이루어진 1-188 잔기의 N-domain과 3개의 알파나선 구조와 2개의 베타병풍구조로 구성된 189-286 잔기의 C-domain으로 이루어져 있다. 트립토판 생합성에서 α 반응은 indole 3-glycerol phosphate를 indole과 D-glyceraldehyde 3-phosphate로 분해하며, prosthetic group이나 이황화결합

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 82-51-510-2289, Fax : 82-51-513-9258
E-mail : wklim@pusan.ac.kr

트립토판 중합효소 α 소단위 잔기 치환체 Pro⁹⁶→Leu의 구조 변화에 영향을 미치는 139 및 258 잔기의 치환 효과

를 가지고 있지 않아 folding 연구에 좋은 재료가 되고 있다 [5,6,12,13].

알파 소단위체의 4번 베타구조와 4번 알파 구조 사이에 있는 loop의 두 번째 자리인 139번과 8번 알파나선구조의 열한 번째 자리에 위치한 258번 페닐알라닌을 트립토판으로 각기 치환하여 치환된 잔기가 트립토판 중합효소 α 소단위체의 전체적인 구조에 미치는 영향이 보고되었다[3]. 구조형성시 139번과 258번의 트립토판은 각각 $\alpha 1$ 과 $\alpha 2$ domain의 리포터로 사용 가능하다고 제안된바 있다[3].

알파 소단위체는 대장균내에서 유전공학적인 방법으로 과량 발현시켰을 때 수용성인 상태로 발현되나, 96번 잔기가 프롤린에서 류신으로 치환되었을 때 (P96L) 단백질이 inclusion body (응집체)로 대부분 존재한다[11]. P96L에 F139W와 F258W를 각각 이중 치환한 P96L/F139W, P96L/F258W와 삼중 치환한 P96L/F139W/F258W는 모두 수용성인 형태로 발현되었다.

본 실험에서는 트립토판 잔기 치환체의 형광을 이용하여 돌연변이체, P96L/F139W, P96L/F258W와 P96L/F139W/F258W의 트립토판 주변 환경에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

박테리아 균주, 파아지, 플라스미드

대장균 균주 RB797 (*F' lacI^f proL8/arg Nal^r Rif^r recA sup lac proXIII*)는 돌연변이 단백질들을 발현하는데 사용하였다. *trpA* 유전자를 포함하고 있는 플라스미드 pAMK-M13는 단백질의 과생산 과정에 사용하였다[14]. *trpA* 유전자는 D-락토오스에 의해 과발현이 유도되는 *tac* 전사조절인자를 가지고 있다[14].

효소와 시약

모든 시약은 순도가 높은 것을 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다.

단백질의 과생산 및 분리방법

야생형 및 돌연변이 단백질들은 대장균 RB797에서 과생산하고 분리하였다[11]. 단백질의 과생산은 plasmid를 가진 대장균을 20ml TYS (1% bactoTrypton, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)배지에서 약 16시간 배양한 후, 이를 1L 새로운

TYS배지로 옮겨 600nm에서 흡광도가 약 0.4~0.6가 될 때 최종농도가 1%가 되게 락토오스를 첨가하여 induction을 시키고 24시간을 더 배양하였다. 이렇게 배양된 대장균은 원심분리(6,000 rpm에서 10분)하여 수확(harvest)한 후 10mM KPO₄ (pH 7.8), 5mM EDTA, 0.2mM PMSF, 0.2mM DTT 100ml에 대장균을 현탁하고 원심분리하여 용액을 제거하는 방법을 2회 반복하여 여분의 배지성분을 제거하였다. 수확된 대장균은 같은 용액 15ml에 다시 현탁시켜 초음파 파쇄기를 사용하여 깎 후 원심분리(15,000 rpm에서 20분)로 침전물을 제거하고 단백질 추출액을 얻었다. 단백질 추출액은 황산암모늄((NH₄)₂SO₄) 35-50% 포화(100% 포화; 70g/100 ml) 농도에서 침전된 분획을 얻어 이를 이온크로마토그래피로 순수분리하였다. 이온크로마토그래피는 Protein-PakTM DEAE 5PW(WATERS사) 컬럼을 사용하여 HPLC(High Performance Liquid Chromatography, WATERS사)로 분리하였다[14]. 이 때사용된 완충용액은 5mM EDTA, 0.2mM PMSF, 0.2mM DTT가 포함된 KPO₄(pH 7.8)이며, KPO₄(pH 7.8) 농도를 10mM에서 500mM로 증가시켜 용출시켰다. 순수 정제된 단백질 분획의 순도는 SDS-전기영동을 실시하여 Coomassie Brilliant Blue R로 염색하여 확인하였다.

단백질의 농도결정

단백질 추출물의 단백질 농도는 microbiuret 방법을 사용하여 결정하였다[10]. 순수 정제된 야생형의 α 소단위체와 β_2 소단위체의 농도는 흡광계수를 사용하여 결정하였다. 이때 α 소단위체의 경우에는 $E^{1\%}_{278nm} = 4.4$ 를, β_2 소단위체의 경우에는 $E^{1\%}_{278nm} = 6.5$ 를 사용하였다[14]. 잔기가 치환된 돌연변이 단백질의 경우에는 야생형과 비교하여 microbiuret 방법을 사용하여 결정하였다.

효소 활성도 측정

트립토판 $\alpha_2\beta_2$ 중합효소의 β_2 소단위체 특이 반응(β 반응)은 α 소단위체를 물비로 β 에 비해 5배 이상 첨가한 조건으로 Kirschner등의 방법으로 측정하였다[9].

Fluorescence Spectroscopy

형광은 Hitachi사의 모델 F-4500 fluorescence spectrophotometer를 사용 295nm에서 여기시키고 300nm에서 410nm 파장대의 형광 방출을 측정하였다.

결과 및 고찰

P96L/F139W, P96L/F258W 및 P96L/F139W/F258W 치환체의 효소 활성도

대장균의 트립토판 중합효소 α 소단위체에서 96번 프롤린을 류신으로 치환시킨 P96L은 생체 내에서 응집체로 발견된다[11]. 139번 자리와 258번 자리의 페닐알라닌을 각각 트립토판으로 치환한 F139W와 F258W를 이중 치환 혹은 삼중 치환시킨 P96L/F139W, P96L/F258W와 P96L/F139W/F258W 각각은 생체 내에서 용해성 단백질로 발견된다(Fig. 1).

트립토판 중합효소의 각 소단위체의 효소반응(α 반응과 β 반응)은 두 소단위체가 결합하였을 때 야기되는 구조적인 변화로 인하여 각각의 활성도가 훨씬 증가된다[8]. Table 1은 야생형과 잔기가 치환된 α 소단위체들을 정제한 후 β_2 소단위체와 결합시켜 β 반응을 측정할 것이다. F139W와 F258W는 이미 보고된 바와 같이 야생형과 비슷한 효소 활성도를 보여주고 있다[3]. P96L/F139W와 P96L/F258W는 β 반응의 활성도가 야생형과 같고, P96L/F139W/F258W의 경우 야생형에 비해 약 40% 낮게 나타났다. P96L의 경우 매우 낮은 활성도를 가지는 것으로 보고되었다[11]. 그러나 139번과 258번 잔기의 추가 치환으로 그 활성도가 증가한 것으로 보아 139번과 258번 자리의 치환이 구조적인 변화를 유발한 것으로 보인다. 139번과 258번을 동시에 치환시킨

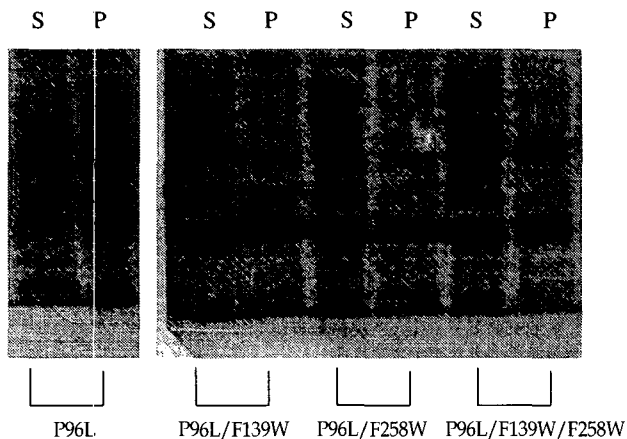


Fig. 1. The Production levels of the soluble and insoluble proteins in the cells. The cells cultured for 24h were estimated by using a SDS-polyacrylamide gel electrophoresis on a 13% polyacrylamide gel. S; supernatant, P; pellet

Table 1. Relative activities of wild-type and mutant tryptophan synthase α Subunits

Tryptophan synthase	Relative Specific Activities (%) ^a
Wild-Type	100
F139W	92 ± 2
F258W	96 ± 8
P96L/F139W	102 ± 4
P96L/F258W	97 ± 7
P96L/F139W/F258W	61 ± 9

Enzymatic activities were measured by stimulating catalytic activities of α subunit in β reaction (indole+serine → tryptophan + H₂O)

^aRelative specific activities are determined by comparing with the activity of wild type protein.

경우 활성이 감소하였는데 이것은 동시에 두 잔기가 치환된 경우는 알파 소단위체의 전체구조를 많이 변형시킨 것으로 생각된다.

P96L/F139W, P96L/F258W 및 P96L/F139W/F258W 치환체의 분광학적 성질

단백질의 형광은 티로신과 트립토판 같은 방향족 잔기에 의해서 나타나는데 이를 둘러싸고 있는 분자환경에 의해 영향을 받음으로 3차 구조 변화 척도로 쓰여지고 있다[15]. 야생형의 트립토판 중합효소 알파 소단위체는 트립토판을 함유하지 않아 형광 성질은 주로 티로신에 의한 것이나 P96L/F139W와 P96L/F258W는 각각 하나의 트립토판을 그리고 P96L/F139W/F258W는 두 개의 트립토판을 가진다. 이들의 트립토판 형광을 이용하여 단백질들의 3차 구조와 리포트로 사용되는 트립토판 잔기 주변 환경을 조사하였다.

Fig. 2에서 변성제인 요소가 없는 native 상태의 P96L/F139W, P96L/F258W와 P96L/F139W/F258W는 각각 328 nm, 330nm, 그리고 338nm에서 최고의 형광값을 가지며 농도가 150 μ g/ml 일 때 상대적 형광 세기는 각각 88, 107,과 1680이다. P96L/F139W와 P96L/F139W/F258W는 F139W와 F139W/F258W와 같은 파장에서 최고 형광값을 가지나 [3] P96L/F258W는 F258W에 비해 10nm 정도 낮은 파장으로 이동하였다. 8M 요소가 존재하는 unfolded상태에서는 P96L/F139W, P96L/F258W 와 P96L/F139W/F258W 모두 형광의 세기가 감소하며 최고 형광값 파장이 오른쪽으로 이동하여 약 350nm 근처에서 최고 형광값을 가지는데 이는

트립토판 중합효소 α 소단위 잔기 치환체 Pro⁹⁶→Leu의 구조 변화에 영향을 미치는 139 및 258 잔기의 치환 효과

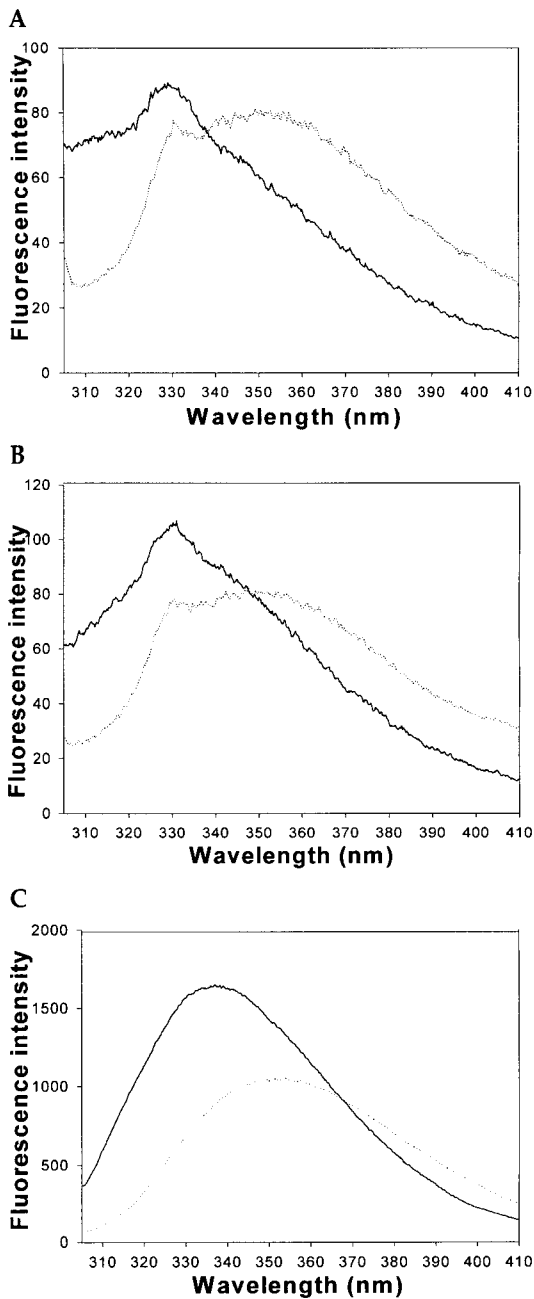


Fig. 2. Fluorescence spectra, the relative fluorescence intensities for native form (absence urea) and unfolded form (with 8M urea) of mutant proteins. Changes in the intrinsic Trp fluorescence, P96L/F139W (A), P96L/F258W (B), and P96L/F139W/F258W (C) α subunits are shown. The protein in 10mM potassium phosphate buffer (pH 7.8) containing 1mM β -mercaptoethanol was added in absence (solid line) or presence of 8M urea (dashed line), and incubated for 10~12h at 25 °C. All protein concentrations were 150 μ g/ml and the excitation wavelength was 295nm.

free L-Tryptophan의 최고 형광값 나타나는 위치와 유사한 것으로 보아 용매에 트립토판 잔기가 완전히 노출되었다고 보여진다. 트립토판 잔기는 주변에 소수성 잔기가 많이 존재 할 때나 용매와 접촉이 되지 않을 때 높은 형광값을 가진다. 이 실험에서 P96L/F139W, P96L/F258W은 각각 F139W와 F258W에 비하여 2배와 5배 형광이 감소하였다. 이것은 3번 베타 구조의 프롤린 96번이 루이신으로 치환됨에 따라 4번 베타 구조와 3번 알파구조 사이의 loop이 더 많이 용매에 노출되었던 것을 의미하고 8번 알파구조가 불안정해진 것을 의미한다. 그러나 P96L/F139W/F258W가 F139W/F258W보다 두배 정도 높은 형광값을 내는 것으로 보아 P96L/F139W/F258W의 F139W와 F258W 잔기 주변은 F139W/F258W에 비해 소수성 잔기가 조밀한 형태로 구성되어있었다고 생각된다. 이상의 결과에서 3번 베타 구조의 96번 프롤린 잔기의 루이신으로 치환은 4번 베타 구조와 4번 알파구조 사이의 loop과 8번 알파구조를 불안정하게 하나 두 잔기를 동시에 치환하면 야생형의 구조와는 다른 안정한 구조가 형성된다고 생각된다.

요 약

대장균 트립토판 중합효소(tryptophan synthase) α 소단위체의 96번, 139번 과 258번 자리를 돌연변이 시킨 이중 돌연변이체 P96L/F139W, P96L/F258W와 삼중 돌연변이체 P96L/F139W/F258W의 효소 활성도와 형광 분광계를 이용한 분광학적 성질을 조사하였다. 이중 돌연변이체의 효소 활성도는 야생형과 유사하나 삼중 돌연변이체는 40% 감소된 활성도를 가진다. P96L/F139W 와 P96L/F258W의 형광 세기는 야생형에 비해 감소하였으나 P96L/F139W/F258W는 야생형에 비해 증가하였다. 효소 활성도와 형광 결과는 96번의 치환이 8번 알파구조와 4번 베타 구조와 4번 알파구조 사이의 loop의 안정성에 영향을 준 것을 나타낸다. 이 결과로부터 P96L/F139W/F258W는 야생형과 다른 3차구조를 가지나 139번과 258번 주위는 더 조밀한 구조를 가지고 있다는 것을 보여준다.

참 고 문 헌

1. Adachi, O., L. D. Kohn and E. W. Miles. 1974. A rapid

- method for preparing crystalline β_2 subunit of tryptophan synthase of *Escherichia coli* in high yield. *J. Biol. Chem.* **249**, 7756-7763.
2. Choi, S. G. and J. K. Hardman. 1995. Unfolding properties of tryptophan-containing alpha-subunits of the *Escherichia coli* tryptophan synthase. *J. Biol. Chem.* **270**, 28177-28182.
 3. Choi, S. G., S. E. O'Donnell, K. D. Sarken and J. K. Hardman. 1995. Tryptophan-containing alpha-subunits of the *Escherichia coli* tryptophan synthase Enzymatic and urea stability properties. *J. Biol. Chem.* **270**, 17712-17715.
 4. Faeder, E. J. and G. G. Hammes. 1970. Kinetic studies of tryptophan synthase. Interaction of substrates with β subunit. *Biochemistry* **9**, 4043-4049.
 5. Higgins, W., T. Fairwell and E. W. Miles. 1979. An active proteolytic derivative of the alpha subunit of tryptophan synthase. Identification of the site of cleavage and characterization of the fragment. *Biochemistry* **22**, 4827-4835.
 6. Hyde, C. C., S. A. Ahmed, E. A. Padlan, E. W. Miles and D. R. Davies. 1988. Three-dimensional structure of the tryptophan synthase $\alpha_2\beta_2$ multienzyme complex from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **267**, 17857-17871.
 7. Hurle, M. R., C. R. Tweedy and C. R. Matthews. 1986. Synergism in folding of a double mutant of the α subunit of tryptophan synthase. *Biochemistry* **25**, 6356-6360.
 8. Kayastha, A. M., U. Sawa, S. Nagata and E. W. Miles. 1990. Site-directed mutagenesis of the β subunit of tryptophan synthase from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **266**, 7618-7825.
 9. Kirschner, K., R. L. Wiskocil, M. Foehn and L. Rezeau. 1975. The tryptophan synthase from *Escherichia coli*. An improved purification procedure for the alpha-subunit and binding studies with substrate analogues. *Eur. J. Biochem.* **60**, 513-523.
 10. Leggett-Bailey, J. 1962. *Techniques in Protein Chemistry* p249, Elsevier Scientific Publishing Co. Inc., New York.
 11. Lim, W. K., H. J. Shin, D. L. Milton and J. K. Hardman. 1991. Relative activities and stabilities of mutant *Escherichia coli* tryptophan synthase alpha subunits. *J. Bacteriol.* **173**, 1886-1893.
 12. Miles, E. W., K. Yutani and K. Ogasahara. 1982. Guanidine hydrochloride induced unfolding of the alpha subunit of tryptophan synthase and of the two alpha proteolytic fragments : evidence for stepwise unfolding of the two alpha domains. *Biochemistry* **21**, 2586-2592.
 13. Milton, D. L., M. L. Napier, R. W. Muers and J. K. Hardman. 1986. *In vitro* mutagenesis and overexpression of the *Escherichia coli* trpA gene and the partial characterization of the resultant tryptophan synthase mutant alpha subunits. *J. Biol. Chem.* **261**, 16604-16615.
 14. Sarker, K. D. and J. K. Hardman, 1995. Affinities of phosphorylated substrates for the *E. coli* tryptophan synthase alpha-subunit: roles of Ser-235 and helix-8' dipole. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **21**, 130-139.
 15. Wetzel, R. 1992. In vivo pathways of degradation and strategies for protein stabilization. *Stability of Protein Pharmaceuticals* **3**, 43-48.

(Received June 20, 2002; Accepted July 16, 2002)