

트립토판 합성효소 잔기 치환체의 효소성질 결함에 대한 분석

김 일 · 신혜자¹ · 김한도* · 임운기*

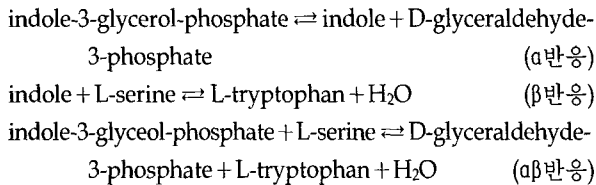
부산대학교 자연과학대학 분자생물학과, ¹동서대학교 응용공학부 환경공학전공

Received October 27, 2003 / Accepted February 5, 2004

Analysis of Mutant Tryptophan Synthases with Defective Enzymatic Properties. Eel Kim, Hae Ja Shin¹, Han Do Kim* 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 – The mutant tryptophan synthases at α Asp⁵⁶ have low catalytic activities. The enzymes were treated with α and β subunit-specific ligands in the presence of L-serine and indoline. It was shown that the cations resulted in changes of absorbance patterns among the proteins, while glycerophosphate showed similar pattern of absorbance. The glycerophosphate binds to the active site of α subunit so that α Asp⁵⁶ may not be involved in the allosteric control with the active site of α subunit occupied by substrate. The results suggest that α Asp⁵⁶ may play a role in the step of a series of reaction occurring without bound substrates in the active site of α subunit.

Key words – catalytic activity, glycerophosphate, ligand.

트립토판 합성효소는 기질의 채널이동이 일어나는 매우 드문 예이다[1]. 전체적인 구조는 두 개의 β 소단위체가 결합되어 있고, 양쪽으로 1개씩의 α 소단위체가 결합되어 있는 $\alpha_2\beta_2$ 구조이다[5]. α 소단위체와 β 소단위체간에는 25~30 Å 되는 터널구조가 있으며 α 소단위체와 β 소단위체의 활성자리가 서로 25 Å 떨어져 있다[1,3]. 이 효소에 의해 일어나는 반응은 다음과 같다[2].



α 소단위체에서 생성된 인돌(indole)은 터널구조물을 통과하여 β 소단위체로 이동하여 이곳에서 세린(serine)과 반응하여 트립토판을 만들어내게 된다[1-3]. I단계에서 생성된 aminoacrylate가 α 소단위체에서 터널을 통해 전달되어진 인돌과 결합하여 트립토판이 만들어지는 II단계 반응이 일어난다[2].

본 연구에서는 β 반응에 심한 결함이 있는 D56N와 D56G 잔기치환체를 대상으로 β 반응 II단계에 Na^+ , K^+ 그리고 NH_4^+ 등의 일가 양이온들과 α 소단위체의 특이 리간드인 glycerophosphate의 영향을 조사하여 그 연관성을 조사하였다[6-8].

재료 및 방법

박테리아 균주 및 플라스미드

야생종 또는 돌연변이 *trpA*와 *trpB* 유전자를 포함한 플라스미드 *ptactrpA*를 대장균 균주 RB797 (*F' lacI^f proL8/arg Nal^r Rif^r recA sup lac proXIII*)에 형질전환하여 이로부터 단백질을 과량 발현하였다[5,9].

효소와 시약

모든 시약은 순도가 높은 것(ultrapure)을 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다.

단백질의 대량생산 및 분리방법

야생형 및 잔기치환 단백질들을 대량 발현시키고 분리한 방법은 이미 보고된 방법에 따랐다[5]. 황산암모늄 ((NH_4)₂SO₄) 침전법과 이온크로마토그래피 HPLC로 분리하였다[4]. 정제된 단백질의 순도는 SDS-PAGE를 실시하여 Coomassie Brilliant Blue R로 염색하여 확인하였다. 순수 정제된 야생형의 α 소단위체의 농도는 $E^{1\%}_{278\text{nm}} = 4.4$, β 소단위체의 경우 $E^{1\%}_{278\text{nm}} = 6.5$ 를 사용하여 결정하였다[2,3]. 잔기치환 단백질의 경우에는 야생형을 표준으로 microbiuret 방법 [9]을 사용하였다.

분광광도 측정

50 mM TEA buffer를 사용하여 200~820 nm의 범위에서 흡광도를 분광광도계(Varian 4E)로 측정하였다. 단백질의 농도는 30 μM 를 사용하였으며 TEA 50 mM (pH 7.8), indoline 4.5 mM, L-Ser 40 mM, NaCl 100 mM, KCl 100 mM, NH₄Cl 50 mM, 그리고 DL- α -glycerol 3-phosphate (GP) 100 mM의 농도에서 관찰하였다. 각 데이터는 550 nm의 값을 기준으로 보정하였다.

*Corresponding authors (W. K. Lim) Tel : +82-51-510-2289, Fax : +82-51-513-9258, E-mail : wklim@pusan.ac.kr
(H. D. Kim) Tel : +82-51-510-2276, Fax : +82-51-513-9258, E-mail : hdkim@pusan.ac.kr

결과 및 고찰

중간생성물에 대한 리간드의 영향

트립토판 합성효소의 기질채널이동은 이소조절 (allosterism) 방법으로 조절되어진다[1]. 이소조절은 열린 구조와 닫힌 구조간의 상호변환을 조절하는 βAsp^{305} , βArg^{141} , βLys^{167} 등과 αAsp^{56} 사이의 염다리(salt bridge)와 일가 양이온 결합 등에 의해 전달되는 것으로 알려져 있다[1-3]. βAsp^{305} 는 기질인 세린의 hydroxyl기와 반응하는 자리이기도 하다. 이소조절 리간드인 일가 양이온이나 GP (DL- α -glycerol 3-phosphate)는 56번 잔기의 치환으로 인한 돌연변이 단백질에서 그 활성의 복귀에 관여한다[1].

세린과 인돌이 있게 되면 II단계 반응이 일어나게 된다[1, 2]. 그러나, 세린과 인돌이 있는 반응에서는 최종 산물인 트립토판이 생성되어 효소로부터 떨어져 나오게 됨으로 리간드의 효과를 보기가 힘들다. 본 실험에서는 중간산물의 생성과 분해반응을 추적할 수 있도록 인돌의 유사체인 인돌린을 첨가하였다[3]. 이 상태에서는 470 nm 근처에서 높은 흡광도를 갖는 quinonoid 종류들이 생성되는데 Fig. 1에서도 비슷한 결과를 보여주고 있다. 야생종과 돌연변이 단백질 D56E, D56G, 그리고 D56N의 경우 흡광도에서 유사한 패턴을 보여주지만 활성이 낮은 D56G와 D56N의 경우가 야생종이나 이와 비슷한 활성을 갖는 D56E보다는 높은 흡광도를 보였다.

일가 양이온의 효과를 살펴보았다(Fig. 2). Na^+ 를 처리한 경우, 야생종과 D56E 단백질은 470 nm 근처에서 흡광도가 증가하는 데, 마찬가지로 D56G와 D56N의 경우도 비슷한 정도로 증가했다. K^+ 와 NH_4^+ 를 처리한 경우는 D56E와 D56N이 큰 증가를 보이는 반면, D56G와 D56N은 증가가 그렇게

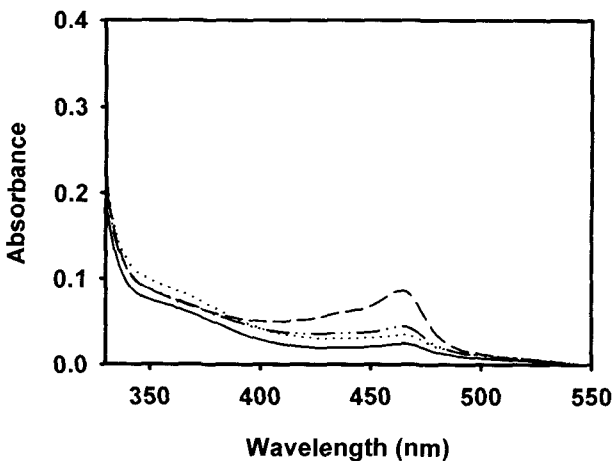


Fig. 1. Absorbance of the wild-type and mutant proteins in the presence of L-serine and indoline. The wild type (-), D56E (· · ·), D56G (---), and D56N (- · - ·) proteins in 50 mM TEA buffer (pH 7.8) were measured for their absorbance in the presence of 40 mM L-serine and 4.5 mM indoline (indole analog).+

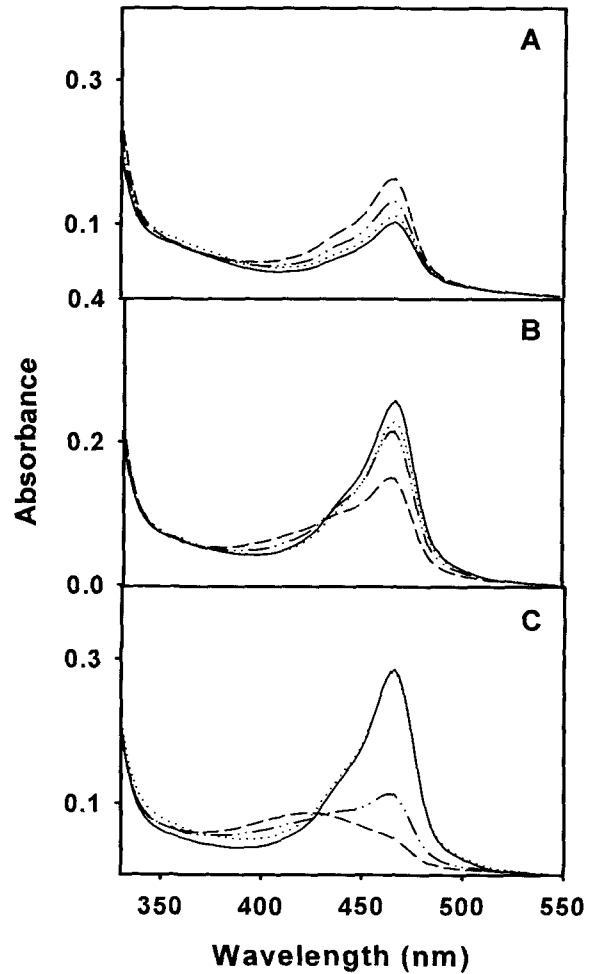


Fig. 2. Effect of monovalent cations on the absorbance spectrum of proteins in the presence of L-serine and indoline. Absorbance of the wild type (-), D56E (· · ·), D56G (---), and D56N (- · - ·) proteins were measured from 360 to 550 nm in the presence of 40 mM L-serine and 4.5 mM indoline. To see effects of the monovalent cations, 100 mM Na^+ (A), 100 mM K^+ (B) or 50 mM NH_4^+ (C) was added.

크지 않아 오히려 야생종과 D56N의 수치가 더 크게 나타나고 있다.

이 결과는 일가 양이온이 II단계 반응에서의 이소조절에 관여하고 있음을 보여주며, 이 때 Na^+ 보다 K^+ 와 NH_4^+ 가 더 크게 작용하고 있음을 보여준다. 또한, α 소단위체의 56번 잔기 돌연변이로 나타나는 효소활성도의 결함은 일가 양이온들이 관여하는 이소조절기작단계에서 관여하고 있음을 알 수 있다.

α 소단위체에 결합하는 리간드인 GP를 처리하였을 때, 야생종과 돌연변이 단백질 4가지 모두 비슷한 양상의 흡광도를 보여주고 있다(Fig. 3). 이것은 GP의 결합으로 이 반응단계의 결합이 어느 정도 회복되었음을 나타낸다[10]. α 소단위체

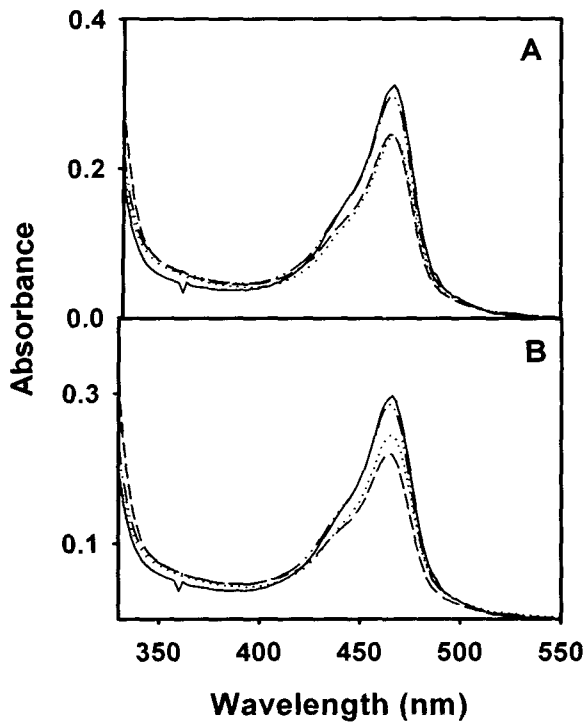


Fig. 3. Effect of glycerophosphate on absorbance. Absorbance of the wild type (-), D56E (···), D56G (---), and D56N (-·-·) proteins were measured from 360 to 550 nm in the presence of L-serine and indoline. 100 mM DL- α -glycerol 3-phosphate (GP)(A) or GP and Na⁺ (B) was added additionally.

의 활성부위에 기질이 남아있는 상태에서는 α Asp⁵⁶가 이 반응 단계에서는 역할이 크게 없음을 나타낸다. 즉, 이 조건이 아닌 상태에서의 결합이 있음을 시사해 주고 있다. GP와 Na⁺를 동시에 처리하여도 비슷한 결과가 나타났다. glycerophosphate는 모두 비슷한 양상의 흡광도를 보여주고 있다.

β 반응은 9개의 연속적인 반응에 의해 복잡하게 진행된다. 이 중에 일부단계에서만 α 소단위체에 기질이 붙어있는 것으로 알려져 있다[2]. α 소단위체의 기질 유사체인 GP의 영향이 56번 잔기 치환체에서는 별로 없어 보인다. 이는 기질이 α 소단위체에 붙어 있는 단계에서는 56번 잔기가 α 와 β 소단위체 간의 이소조절에 별 역할이 없음을 시사한다. 잔기 56번의 역할은 α 소단위체로부터 기질이 떨어진 이후에 일어나는 반응 단계에서 결합에 기인하는 것으로 추정된다.

요 약

α 소단위체 56번 잔기가 치환된 돌연변이 (D56E/G/N) 트립토판 합성효소의 효소활성도는 매우 낮다. 이러한 돌연변이 효소에 α 와 β 소단위체 특이 리간드를 처리하여 그 영향을 조사하였다. 양이온은 야생종과 잔기치환체에 다른 흡광도

를 보여주었다. 반면, glycerophosphate는 모두 비슷한 양상의 흡광도를 보여주고 있다. glycerophosphate는 α 소단위체의 활성부위에 결합함으로써 α 소단위체에 기질이 결합된 반응 단계에서는 56번 잔기가 α 와 β 소단위체간의 이소조절에 관여하지 않고 있음을 시사한다. 따라서, 잔기 56번 치환 효소는 α 소단위체로부터 기질이 떨어진 이후에 일어나는 반응 단계에 결합이 있는 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

1. Brozovic, P. S., Y. Sawa, C. C. Hyde, E. W. Miles and M. F. Dunn. 1992. Evidence that mutations in a loop region of the α -subunit inhibit the transition from an open to a closed conformation in the tryptophan synthase holoenzyme complex. *J. Biol. Chem.* **267**, 13028-13038.
2. Fan, Y. Y., P. McPhie and E. W. Miles. 2000. Regulation of tryptophan synthase by temperature, monovalent cations, and an allosteric ligand. Evidence from Arrhenius plots, absorption spectra, and primary kinetic isotope effects. *Biochemistry* **39**, 4692-4703.
3. 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.* **263**, 17857-17871.
4. Miles, E. W. and P. McPhie. 1974. Evidence for a rate-determining proton abstraction in the serine deaminase reaction of the β_2 subunit of tryptophan synthase. *J. Biol. Chem.* **249**, 2852-2857.
5. Pan, P., E. Woehl and M. F. Dunn. 1997. Protein architecture, dynamics and allostery in tryptophan synthase channeling. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 22-27.
6. Rhee, S., E. W. Miles, A. Mozzarelli and D. R. Davies. 1998. Cryocrystallography and microspectrophotometry of a mutant (α D60N) tryptophan synthase $\alpha_2\beta_2$ complex reveals allosteric roles of α Asp60. *Biochemistry* **37**, 10653-10659.
7. Rhee, S., E. W. Miles and D. R. Davies. 1998. Loop closure and intersubunit communication in tryptophan synthase. *J. Biol. Chem.* **273**, 8553-8555.
8. Rhee, S., K. D. Parris, S. A. Ahmed, E. W. Miles and D. R. Davies. 1996. Exchange of K⁺ or Cs⁺ for Na⁺ induces local and long-range changes in the three-dimensional structure of the tryptophan synthase $\alpha_2\beta_2$ complex. *Biochemistry* **35**, 4211-4221.
9. Schneider, T. R., E. Gerhardt, M. Lee, P.-H. Liang, K. S. Anderson and I. Schlichting. 1998. Loop closure and intersubunit communication in tryptophan synthase. *Biochemistry* **37**, 5394-5406.
10. Yang, X.-J. and E. W. Miles. 1993. A novel intersubunit repair mechanism in the tryptophan synthase $\alpha_2\beta_2$ complex. Critical role of the β subunit lysine 167 in intersubunit communication. *J. Biol. Chem.* **268**, 22269-22272.