

조효소를 함유하지 않는 효모의 Homocysteine 분해효소, Cystathionine β -Synthase의 생화학적 특성

지광환* · 조현남 · 양선아¹ · 이인선¹

금오공과대학교 자연과학부 응용화학전공, ¹계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터

Biochemical Characteristics for the Cofactor Free Mutant of Yeast Homocysteine Catalyzing Enzyme, Cystathionine β -Synthase. Jhee, Kwang-Hwan*, Hyun-Nam Cho, Seun-Ah Yang¹, and In-Seun Lee¹.

Dept. of Applied Chemistry, Kumoh National Institute of Technology, Gumi 730-701, Korea, ¹The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Mutations in the cystathionine β -synthase (CBS) gene cause homocystinuria, the most frequent inherited disorder in sulfur metabolism. CBS is the unique enzyme using both heme and pyridoxal 5-phosphate (PLP) for activity. Among the reported 140 mutations, one of the most common disease-causing alterations in human CBS is G307S mutation. To investigate the pathogenic mechanism of G307S by spectroscopic methods, we engineered the full length and the truncated G247S mutation of yeast CBS that is corresponding mutation to human G307S. Yeast CBS does not contain heme and thus gives a merit to study the spectroscopic properties. The UV-visible spectra of the purified full length and the truncated G247S yeast CBSs showed the total absence of PLP in the protein. The absence of PLP in G247S mutation was also confirmed by the PLP-cyanide adduct formation experiment, which was conducted by the incubation of the purified enzyme with KCN. The adducts were detected using a circular dichroism (CD) and a spectrofluorimeter. Radio isotope activity assay of full length and truncated G247S proteins also gave no activity. Our yeast G247S mutation data suggested that G307S might make the distortion of the active site so that cofactor PLP and substrate can not fit inside the active site. Our yeast CBS study addressed the reason why the G307S mutation in human CBS makes the enzyme inactive that consequently leads to severe clinical phenotype.

Key words: Homocysteine, Cystathionine β -synthase, Mutant, PLP

서 론

1964년 homocystinuria라고 하는 유전병이 미국 국립보건연구원(NIH)의 과학자들에 의해 보고되었다[16]. 이 유전병은 cystathionine β -synthase(CBS)에 이상이 생겨 체내에 homocysteine이 축적되는 병인데 중추신경계 장애로 인한 시각장애, 정신지체, 비정상적 골격 구조를 보이는 특징이 있었다. 이 병은 발견된 지 30여 년 간 그저 희귀한 유전병의 하나로서만 인식되어 큰 주목을 끌지 못 하였으나, 최근 homocysteine이 심장질환과 동맥경화 등 순환기 장애의 중요한 위험인자로 작용한다는 의학적, 생물 화학적 연구결과가 발표되면서 주목을 받고 있다[17, 20]. 그리고, CBS 유전자에 이상이 없는 일반인들도 노화와 더불어 homocysteine의 혈중농도가 증가함이 밝혀지고 있다[9, 13]. 또한 homocysteine이 Alzheimer disease의 위험인자라는 학설도

제기되어 중요한 건강 시사문제로 인식되기 시작하였다[18].

L-Homocysteine은 황을 함유한 아미노산으로 L-methionine과 L-cysteine의 대사 과정 중에 체내에서 필연적으로 생성되는 아미노산이다. 인체는 유해한 L-homocysteine을 L-methionine으로 재 메틸화 (re-methylation) 시키거나 L-serine과 중합하여 L-cystathionine으로 transsulfuration 시킴으로써 homocysteine의 유해성을 감소시키고 있다. 낮은 homocysteine 농도에서는 re-methylation 반응이 우세하나 homocysteine의 농도가 높은 경우에는 CBS의 역할이 중요해진다(Fig. 1). 이는 CBS의 활성저하가 유전병의 원인이 되는 사실로부터도 알 수 있다[8].

이렇게 homocysteine의 유해성이 알려짐에 따라 이의 분해과정에 대한 연구, CBS에 관한 연구도 활발히 전개되고 있다. 현재 140여가지가 넘는 CBS의 돌연변이가 발견되었고, 각 돌연변이에 대한 clinical phenotype도 보고되었다[10, 12]. 보고된 돌연변이 중에서도 G307S 돌연변이가 많은 비율을 차지하고 있다[5]. 따라서 본 연구에서는 G307S 돌연변이에 대한 연구를 인간과 상동성이 높은 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*) 기원의 효소를 이용하여 수행하

*Corresponding author

Tel: 82-54-478-7825, Fax: 82-54-478-7710

E-mail: khjhee@kumoh.ac.kr

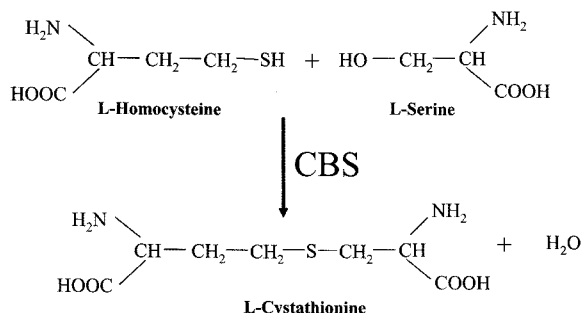


Fig. 1. Reaction scheme catalyzed by cystathionine β-synthase.

고자 한다[11, 19]. 인간 CBS와 효모 CBS는 단백질의 1차 구조를 BLASTP 2.2.17을 이용한 alignment의 결과 62%의 상동성을 보이고 특히 본 연구를 수행한 활성중심 G307(인간)과 G247(효모)간의 상동성은 93%로써 특히 높으므로 (Fig. 2), 인간 CBS의 G307에 해당하는 효모 CBS의 G247을 serine으로 치환한 효모 유래의 G247S 돌연변이 효소를 이용하여 인간CBS의 병변 현상의 원인을 효소화학적으로 규명하고자 한다. 한편 인간의 CBS는 조효소로써 heme과 pyridoxal 5' phosphate (PLP, 비타민 B₆)를 함유하고 있는 반면에, 효모의 CBS는 조효소로써 PLP만을 가지고 있어 heme의 분광학적 간섭을 받지 않아 메커니즘 연구에 많이 사용되는 지표인 PLP 만의 분광학적 특성을 파악할 수 있어 CBS의 조효소인 PLP와 기질의 결합 정도, 중간체의 형성, 생성물의 형성 등 효소반응 메커니즘 연구에 각종 분광학적 연구에 적합하다[6].

한편 인간 CBS는 총 551개의 아미노산으로 이루어져 있으며 N 말단에 heme 결합부위(1번-55번)가 있고 119번 아미노산인 lysine 잔기가 조효소 PLP와 결합하고 있다. 그리고 441번 아미노산 부위에서 proteolysis가 일어나 C 말단 부위가 잘라지는 경향이 있다[7]. 그리고 잘라진 (truncated) 효소는 전체 효소보다 약 2-3배의 강한 활성을 보인다. 따라서 아미노산 1-441번까지의 부위를 N 말단 도메인 (N-

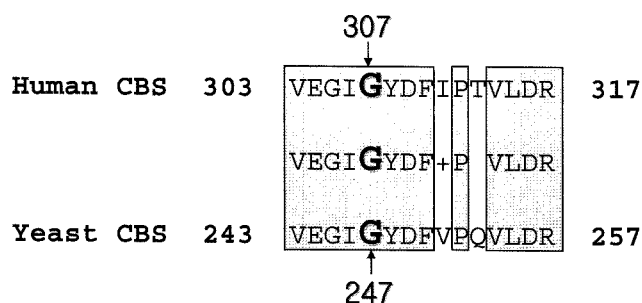


Fig. 2. Homology between human CBS and yeast CBS. Numbers indicated the start amino acids and final amino acids that were compared. Shadow box indicated the identical amino acids. Symbol as '+' represents the similar amino acid for isoleucine and valine. Glycine residues for G307 of human and G247 of yeast are indicated and represented as bigger fonts.

terminal domain) 또는 촉매부위 (catalytic domain)로 표현하고 442-551번까지의 부위를 C 말단 도메인 (C-terminal domain) 또는 억제부위 (inhibitory domain)로 표현하고 있다. 또한 S-adenosyl methionine(SAM)이 C 말단 도메인에 결합하여 CBS의 활성을 높이고 있다. 이와 같이 인간 CBS는 heme과 PLP를 조효소로 사용하고 자체적으로 hinge site를 가지고 있으며 또한 SAM에 의해서 활성을 조절되는 다중 조절형 allosteric 효소이다[15]. 따라서 효소의 각각의 돌연변이는 직접 또는 간접적으로 3차 구조의 변형을 수반하여 결과적으로 C-terminal, heme, PLP, SAM의 결합방식과 역할에 영향을 미쳐 효소의 역할과 기능에 영향을 줄 수 있을 것이다. 그런데 효모의 CBS의 경우에는 총 507개의 아미노산으로 이루어져 있어 인간 CBS보다 44개의 아미노산이 적는데 이는 인간 CBS가 가지고 있는 heme 결합부위가 존재하지 않기 때문으로 보여지며[14], 효모 CBS는 53번의 lysine 잔기가 PLP와 결합하고 있다. 그리고 354번 잔기에서 점차적으로 proteolysis가 발생하였다[7]. SAM에 의한 활성조절 작용은 없었다[7]. 결과적으로 인간과 효모 CBS의 차이점은 효모 CBS에는 heme이 존재하지 않으며 C 말단에 SAM 결합자리가 존재하지 않는다는 점이다. 인간 CBS와 비교하면 효모 CBS는 다소 단순한 효소이지만, 단백질 1차 구조에서 높은 상동성을 보이며, 같은 조효소 PLP를 사용하고 있으며 유사한 기질특이성과 유사한 반응메커니즘을 공유하는 것으로 볼 때 효모 CBS는 인간 CBS의 연구에 매우 유용하고 또한 heme이 없으므로 유용한 분광학적 정보를 얻는데 매우 요긴한 효소이다[8]. 본 연구에서는 인간 CBS의 G307잔기에 해당하는 효모의 G247 자리를 serine으로 치환한 full-length 효모 CBS (F-CBS)와 354잔기 부분에서 C 말단 도메인을 제거한 truncated 효소 CBS (T-CBS)에 대하여 분광학적 정보와 활성 정도 그리고 조효소의 존재 유무 등을 살펴보고자 한다. 그리고 보고된 인간 CBS의 3차 구조를 참조하여 실제 인체에서의 clinical phenotype 와 G307의 3차 구조상의 위치와 비교 분석하여 효소화학적 데이터와 병의 정도 (seriousness)와의 상관관계를 알아보려고 한다. 본 연구는 CBS의 변이로 인한 유전병의 발병 메커니즘을 이해하고 파악하여 궁극적으로는 CBS의 활성중대를 통한 homocystinuria의 유전병 치료제의 개발에 있다.

재료 및 방법

실험재료

L-cystathionine, L-serine, PLP, L-homocysteine thiolactone, SAM은 Sigma에서 구입하였다. L-[U-¹⁴C]Serine (160 mCi/mmol)은 NEN Life Science에서 구입하였다. Gigapite는 개량된 hydroxylapatite인데, 일본의 Seikagaku에서 구입하였다. L-Homocysteine은 L-homocysteine thiolactone에서 보고된 방법으로 제조하여 사용하였다[3]. L-Homocysteine은

사용하기 전에 만들었으며, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)의 412 nm에서의 흡광계수 $13,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 를 사용하여 정량 하였다[4]. 정제 시 사용한 Buffer B는 50 mM의 Na/bicine에 1 mM의 EDTA와 1 mM의 DTT를 함유한 pH 7.8인 buffer이고 Buffer K는 인산buffer에 1 mM의 EDTA와 1 mM의 DTT를 함유한 pH 7.5인 buffer 이다.

효모 G247S 변이백터의 제조

야생형 과 변이형의 효모의 CBS는 보고된 방법을 기준으로 작성하였다[6, 7]. 야생형의 경우 full length CBS (F-CBS)는 pF-SEC를, truncated CBS(T-CBS)의 경우에는 pF-SEC를 사용하였다. G247S 작성은 PCR을 이용하여 수행하였으며 quick change site-directed mutagenesis kit 와 pfu DNA polymerase (Stratagene)를 사용하였다. 사용한 primer는 다음과 같다. Forward primer, 5'-GTTGAGGGTATTCTTATGATTTTGTCC-3'; Reverse primer, 5'-GGAACA-AAATCATAAGAAATACCCTCAAC-3'. G247S-F 작성 시에는 pF-SEC를 template로 사용하였고 G247S-T 작성 시에는 pT-SEC를 template로 사용하였다. 본 plasmid를 함유한 *E.coli* 는 구입가능하며, pF-SEC는 ATCC No. 87791, pT-SEC는 ATCC No. 87792 이다.

과발현과 CBS(야생형과 변이형) 단백질의 정제

야생형의 단백질의 발현과 정제는 보고된 방법을 사용하였다[6, 7]. G247S의 발현은 보고된 방법과 동일하게 수행하였고 G247S-F와 G247S-T 변이효소의 정제 역시 보고된 방법과 같은 방법을 사용하였다[6, 7].

효소활성측정

효소활성 측정은 세가지 방법으로 하였다. 첫째 방법은 방사선 동위원소 C^{14} 을 L-serine의 탄소원자에 universal하게 라벨 시킨 기질을 이용하여 효소 반응시킨 뒤 형성된 L-cystathionine을 TLC를 이용하여 분리시킨 뒤 Phosphor-Imager를 이용하여 정량하였다[6]. 1 unit는 37°C에서 한 시간 동안 반응시켜 1 mmol의 L-cystathionine을 형성하는 활성으로 정의하였다. 기질의 농도는 L-serine과 L-homocysteine을 5 mM씩 사용하였다. 둘째 방법은 황화수소(H_2S)를 측정하는 방법이다. CBS는 β -mercaptoethanol과 L-cysteine과의 반응으로 S-hydroxyethyl-L-cysteine과 황화수소가 형성되므로, 이 황화수소를 lead acetate와 반응시켜 생성된 lead sulfide (PbS)는 침전을 형성하므로, UV-visible 분광광도계의 390 nm에서의 흡광도를 측정한다[2, 7]. 이 경우에는 β -mercaptoethanol과 L-cysteine을 각각 30 mM을 사용하였으며, lead acetate는 0.4 mM을 사용하였다. 세 번째 방법은 lead sulfide (PbS)의 형성을 Native-PAGE gel상에서 lead acetate와 반응시킴으로써 gel 상에서 측정하는 방법이다[2].

조효소 PLP 함량 측정

조효소 PLP의 함량은 Adams의 방법을 사용하였다[1]. 간단히 살펴보면 CBS효소를 5 mM의 인산buffer (pH 7.5)에 투석한 후, 11%의 trichloroacetic acid와 50°C에서 15분 반응시킨 후, 다시 1.8 mM의 KCN과 50°C에서 25분간 반응시킨다. 형성된 pyridoxal-P-CN는 excitation 파장 325 nm와 emission 파장 420 nm에서 측정하였다. PLP에 대한 해리 상수는 다음의 식으로 계산하였다.

$$Y = Y_{\max}[X]/K_d + [X]$$

여기서, Y는 효소활성을 X는 PLP의 농도를 나타낸다. PLP의 농도는 0.1 N NaOH 용액에서의 388 nm에서의 PLP의 흡광계수인 $e = 6.55 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 이용하여 계산하였다.

분광분석법

UV-visible 흡수스펙트럼은 Hewlett Packard 8453-diode array 스펙트럼을 사용하였다. 측정 중 큐벳 홀더를 25°C로 항상 유지할 수 있는 Peltier 시스템을 사용하였다. CD 스펙트럼은 Jasco J-175을 사용하였다.

결과 및 고찰

효모의 야생형 CBS와 G247S단백질의 정제

효모의 야생형의 full length CBS (WT-F)와 truncated CBS (WT-T)는 보고된 방법으로 IPTG로 induction 시켜서 정제하였고 약 50%의 수율로 SDS-PAGE 상에서 순수하게 정제 하였다(data not shown). 효모의 G247S-F와 G247S-T의 경우, 야생형과 같은 정도로 과발현하였고 야생형 단백질의 정제와 같은 과정으로 SDS-PAGE 상에서 단일피크를 보이도록 정제하였다(Fig. 3). CBS의 정제 시에는 유안침전과 농축, column chromatography등 여러 과정을 거치는데 각 단계에서의 단백질의 존재유무는 SDS-PAGE를 통하여 단백질의 순도와 존재유무를 육안으로 확인하고 또 효소활성을 측정하게 된다. 효소활성 측정방법 1의 경우는 방사선 동위원소를 사용하므로 세심한 실험조작이 필요하고 TLC를 수행한 후, TLC판의 건조와 최소 12시간 이상의 radiography의 시간을 필요로 하므로 상대적으로 간편한 방법인 측정방법 2, 즉 황화수소의 형성을 lead acetate를 사용하여 측정하는 방법을 사용하였다. 그러나 돌연변이 단백질 G247S-F와 G247S-T의 경우에는 방법 1과 방법 2 모두에서 활성이 검출되지 않았으므로 정제과정은 전적으로 SDS-PAGE에 의존하여 수행되었다. 다행히도 야생형 CBS의 정제방법이 잘 보고 되어 있으며 G247S-F와 G247S-T의 다량발현으로 인하여 정제 시의 각 단계에서 큰 어려움 없이 정제를 수행할 수 있었다. 그리고 정제된 G247S-F는 예상한 단백질 크기인 56 kDa를 보였고, G247S-T의 경우 역시 예상대로 39 kDa의

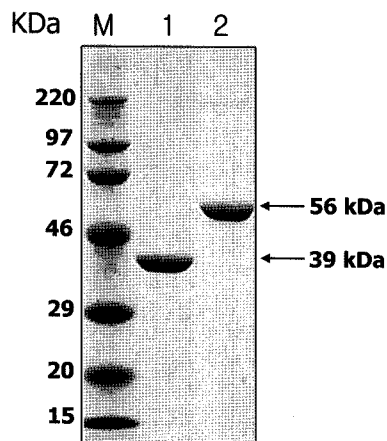


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of the purified yeast G247S proteins. Lanes; M, molecular mass standards (molecular mass in kDa in parentheses) myosin (220), phosphorylase b (97), bovine serum albumin (72), ovalbumin (46), carbonic anhydrase (29), β -lactoglobulin (20), and lysozyme (15). 1, purified truncated form of G247S (G247S-T), indicating 39 kDa; 2, purified full length form of G247S (G247S-F), indicating 56 kDa. Yeast CBS mutants, G247S-F and G247S-T were purified from host cell *E.coli* XL-1 blue harboring mutated pF-SEC and pT-SEC. Each enzyme was purified using DEAE-Sephacel, Gigapite, and Butyl-Sepharose column chromatography. About 10 mg of protein was applied per lane.

기를 보였다(Fig. 3). 그리고 SDS-PAGE 상에서의 단백질이 정확히 CBS 단백질을 확인하기 위하여 Fig. 3의 샘플의 N 말단순서를 Perkin-Elmer사의 protein sequencer를 이용하여 확인한 바 56 kDa과 39 kDa의 양 샘플 모두 M-T-K-S-E를 나타내었는데 이는 CBS의 N 말단의 다섯 아미노산의 순서와 일치하므로 정제된 단백질이 CBS임이 확인되었다.

효모 G247S의 spectrum data

순수 정제된 야생형 CBS (WT-F)와 G247S (G247S-F)의 UV-visible 흡광도를 조사하였다. 야생형의 경우에는 보고된 바와 같이 280 nm와 412 nm에서 피크를 나타내었다. 280 nm의 피크는 단백질을 나타내고 412 nm의 피크는 CBS의 활성부위에 있는 lysine 잔기와 결합하고 있는 조효소 PLP의 존재를 나타내고 있다. 그리고 그 비율이 280 nm : 412 nm = 1 : 0.152를 나타내었다(Fig. 4). 이는 보고된 수치 1 : 0.16과 매우 근사치를 나타내고 있으며 Fig. 3의 SDS-PAGE의 결과와 더불어 CBS가 매우 순수함을 나타내고 있다. 280 nm에서의 WT-F의 $A_{280}^{0.1\%}$ 값이 0.94이므로[7], Fig. 3의 단백질의 농도는 정확히 1 mg/ml이 된다. 그리고 WT-T의 경우는 WT-F의 흡수스펙트럼과 동일하였다(data not shown). 반면 G247S-F의 경우에는 280 nm의 피크는 0.86으로 야생형의 apo-enzyme의 경우와 정확히 일치하였다[7]. 즉 G247S는 PLP를 함유하고 있지 않으며 야생형 CBS와는 다르게 412 nm에서 피크가 전혀 보이지 않았는데 이는 G247S-F가 조효소인 PLP를 전혀 함유하고 있지 않다는 증거이다. 이는

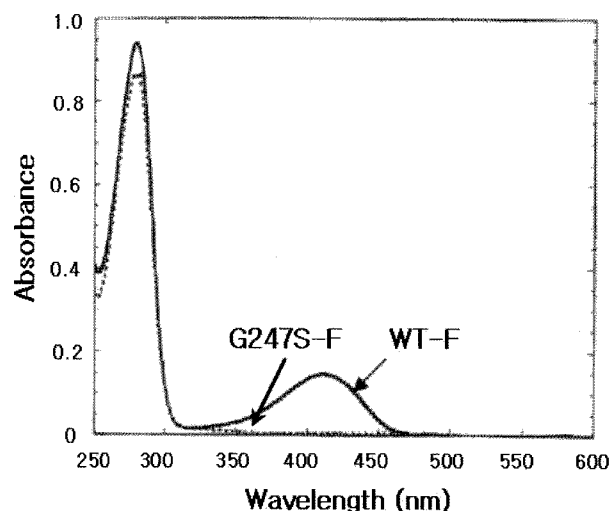


Fig. 4. Absorption spectra of yeast CBS. Data exhibit the full length form of wild-type (WT-F, bold line) and full length form of G247S (G247S-F, dashed line). Each protein concentration was approximately 1 mg/ml in buffer B. All spectra were taken at 25°C.

왜 G247S가 전혀 활성을 보이지 않았는지에 대한 이유이기도 하였다. L-homocysteine과 L-serine과의 반응에서 L-cystathionine을 형성하는 반응이거나, β -mercaptoethanol과 L-cysteine과의 반응으로 S-hydroxyethyl-L-cysteine과 황화수소가 형성되는 반응이든 모두 PLP가 없으면 불가능하기 때문에 G247S는 촉매할 수 있는 반응이 없게 되는 것이다. G247S-T의 CBS의 경우에도 흡수스펙트럼을 측정하였으나 G247S-F의 CBS와 동일하였다(data not shown). 그리고 효소에 기질인 L-serine을 넣어도 흡수스펙트럼에 영향이 없었다. 이는 G247S-F가 기질과 결합하지 않음을 나타내고 있다. 야생형의 경우에는 aminoacrylate 중간체의 형성으로 인하여 460 nm 부근으로 흡수극대치가 이동한다[6].

효모의 WT-F와 WT-T, G247S-F와 G247S-T의 CD spectrum을 측정하였다. CD spectrum으로써 조효소, PLP의 함량을 알 수 있다[6]. 야생형의 CBS는 WT-F와 WT-T 모두 412 nm 부근에서 (+)의 CD를 나타내지만 G247S-F와 G247S-T는 412 nm에서 CD를 보이지 않고 있다(Fig. 5). 이는 UV-visible 흡수스펙트럼과 같은 결과로써 G247S 변이는 G247S-F와 G247S-T 모두 PLP를 함유하고 있지 않다는 결과이다. 그리고 효소에 기질인 L-serine을 넣어도 CD spectrum에 아무 영향이 없었는데 이는 G247S 변이 단백질이 기질과 전혀 반응을 하지 않음을 나타내고 있다. 야생형의 경우에는 중간체의 형성으로 인하여 460 nm 부근에서 (-)의 CD를 보인다[6]. 그리고 야생형의 apo 단백질 역시 412 nm에서 CD를 보이지 않는다[6].

PLP 함량과 PLP와의 친화력 측정

G247S의 UV-visible과 CD spectrum의 결과를 보면

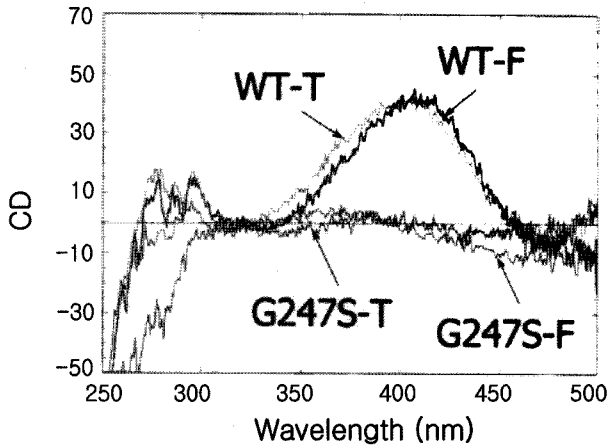


Fig. 5. Circular Dichroism spectra of yeast CBS. Spectra exhibit the full length form of wild-type (WT-F), truncated form of wild-type (WT-T), full length form of mutant G247S (G247S-F), and truncated form of mutant G247S (G247S-T). Each protein concentration was 1 mg/ml in buffer K. All CD spectra were taken at 25°C.

G247S-F와 G247S-T 모두 PLP가 전혀 존재하지 않음을 알 수 있다. 그러나 이는 스펙트럼의 결과이고 실제 PLP의 함량을 측정하여 보았다. G247S 단백질을 trichloroacetic acid를 이용하여 완전히 변성시켜 단백질 내부에 존재하는 PLP를 완전히 노출시킨 후 KCN과 반응시키면 PLP-CN의 복합체가 얻어지고 이 화합물은 excitation 파장 325 nm와 emission 파장 420 nm에서 형광스펙트럼을 나타내므로 단백질 내에 존재하는 PLP의 양을 정량할 수 있다. 정량방법은 PLP의 흡광계수를 이용하여 계산하였다. WT-F와 WT-T는 각각 0.98과 0.96의 값을 보였는데 이는 단백질 한 분자당 PLP가 0.98과 0.96개를 가지고 있다는 것으로 단백질과 PLP가 거의 1:1로 존재한다는 증거이다. 그러나 G247S-F와 G247-T의 경우에는 각각 0.01과 0.02로 거의 PLP가 검출되지 않았다. 한편 효소활성 측정방법 2를 이용하여 WT-F와 WT-T의 apo 효소에 PLP의 농도를 증가시키며 활성을 측정하여 단백질과 PLP의 결합상수 (association constant), K_d 값을 측정하였더니 WT-F의 경우는 0.8 μ M, WT-T의 경우에는 0.7 μ M을 나타내었다. 그러나 G247S의 경우에는 G247S-F와 G247S-T 모두 과량의 PLP를 반응액에 넣어주어도 (2 mM, 야생형 사용량의 약 2,500배) 효소활성 1과 효소활성 2 모두에서 활성이 검출되지 않았다. 즉 G247S 돌연변이가 단백질은 PLP와는 농도에 관계없이 결합하지 않음을 알 수 있었다.

CBS 효소 활성

CBS 효소활성은 세 가지 방법으로 측정하였다. L-Homocysteine과 탄소원자가 C^{14} 으로 라벨된 L-serine을 기질로 하여 효소와 반응시킨 후 TLC을 통해서 생성된 C^{14} 이 라벨된 L-cystathionine과 C^{14} 으로 라벨된 남은 기질인 L-

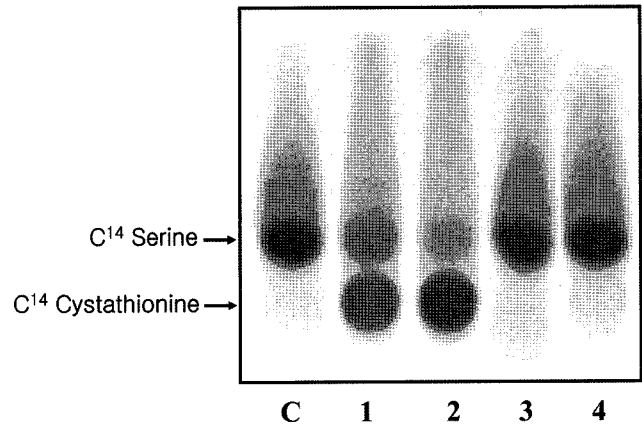


Fig. 6. CBS activity assay. The reaction mixture, which contained 200 mM Tris-HCl, pH 8.6, 20 mM PLP, 0.25 mg/ml bovine serum albumin, 5 mM L-[14 C]serine (800 cpm/nmol), and CBS (0.02-0.1 mg) in 18 ml, was preincubated for 5 min at 37°C. The reaction was initiated by adding 2 ml of 5 mM L-homocysteine and was terminated after 10 min by adding 5 ml of 50% trichloroacetic acid. Reaction mixture was centrifuged for 3 min, and 5 ml of supernatant was applied to a cellulose thin layer chromatography plate (Kodak). The product, L-[14 C] cystathionine, was separated from L-[14 C] serine by ascending thin layer chromatography in 2-propanol/formic acid/ H_2O (80/6/20, v/v). Radioactivity of the product was determined by PhosphorImager (Molecular Dynamics) and the data was analyzed by AlphaImager HP software. The lanes are: C, L-[14 C] serine without CBS; 1, reaction with wild-type (WT-F); 2, reaction with truncated form of wild-type (WT-T); 3, reaction with full length form of mutant G247S (G247S-F); and 4, reaction with truncated form of mutant G247S (G247S-T).

serine을 분리한 후 PhosphorImager로 L-cystathionine을 정량 하였다(Fig. 6). 이때 반응하지 않은 L-homocysteine은 방사선 동위원소가 함유되어 있지 않아 PhosphorImager에 나타나지 않는다. 분리된 spot를 AlphaImager HP 소프트웨어를 사용하여 형성된 L-cystathionine의 값을 보면 효소를 사용하지 않은 control의 경우와 G247S-F, G247S-T는 활성이 전혀 보이지 않았고, WT-F와 WT-T의 경우에는 각각 420 unit와 780 unit를 보였는데 이는 기존의 보고된 값과 유사 하였다[7]. CBS활성측정의 둘째 방법인 β -mercaptoethanol과 L-cysteine과의 반응으로 S-hydroxyethyl-L-cysteine과 같이 형성되는 황화수소 (H_2S)를 측정하는 방법이다. 이 활성에서도 G247S-F와 G247S-T는 전혀 활성을 보이지 않았다. 또한 다량의 단백질을 Native-PAGE gel상에서 Pb-acetate와 반응시킴으로써 효소 활성을 측정하는 방법에서도 G247S-F와 G247S-T는 전혀 활성을 보이지 않았다(data not shown). 또한 어떠한 활성측정 방법에 있어서도, 고농도의 PLP가 존재 하더라도 (2 mM까지 사용함) 활성의 전혀 감지되지 않았다. 이는 G247S에 상응하는 인간의 G307S의 돌연변이를 가지는 homocystinuria 환자의 경우, PLP의 투약에도 전혀 환자의 병세가 호전되지 않는 것을 설명이 가능

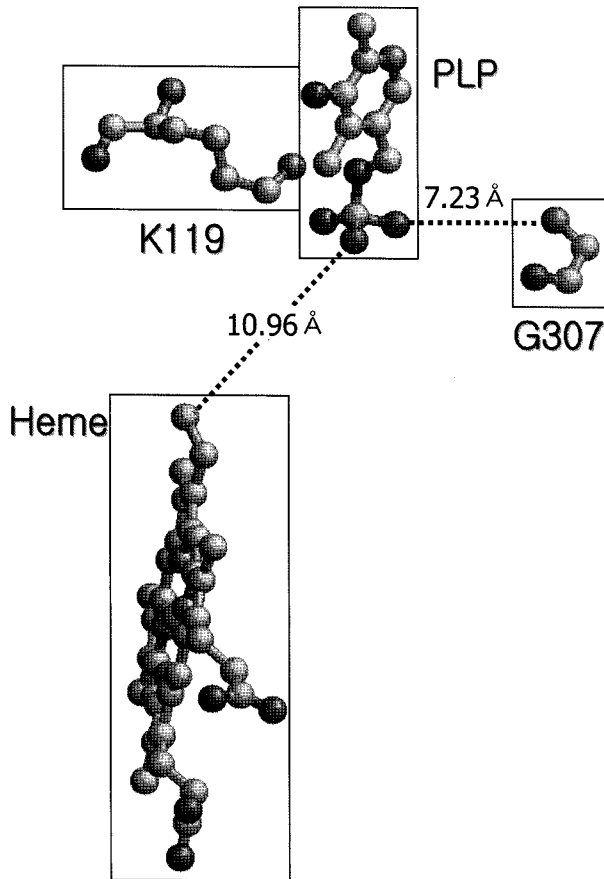


Fig. 7. Active site and G307 position in 3D structure of human CBS. Rasmol software was used and the human CBS 3-D coordination was from PDB code 1JBQ, human CBS[14]. Heme, PLP and active site lysine119 was represented. The distance between G307 residue and PLP was 7.2Å.

하게 하는 부분이다. 그리고 인간의 G307S의 경우에도 효소 활성이 전혀 검출되지 않았다(unpublished data). 또한 인간의 G307S 돌연변이는 효모에서의 complementation 실험 결과 전혀 효모의 CBS를 대체하지 못하였다[19]. 효소활성에 관한 여러 결과들을 종합하면 인간의 G307S와 효모의 G247S는 거의 유사한 생화학적 성질을 보이는 것을 알 수 있고 G247S의 연구로 인하여 분광학적인 연구가 가능하였고 PLP의 부재가 실험의 원인임을 밝힐 수 있었다.

인간 CBS의 G307의 3차 구조의 해석

인간의 야생형 CBS의 3차 구조를 Rasmol 소프트웨어를 통하여 활성중심인 PLP와 lysine119과 G307의 위치를 살펴 보았다. PLP와 lysine119의 ϵ 아미노 그룹은 서로 Schiff's base를 통하여 결합하고 있으며 N 말단에 위치한 heme group은 PLP에서 약 11Å정도 떨어져 있음을 알 수 있다. G307은 활성중심인 PLP에서 약 7.2Å정도 떨어져 있으나 G307S가 PLP결합력이 전혀 없는 것으로 보아 R group이 수소원자로 되어있는 glycine과 비교해서 상대적으로 큰 R

group을 가진 serine으로 변이가 일어나서 PLP가 활성중심에 끼어 들어갈 수 없는 구조로 되었다고 생각된다. 또한 기질과의 결합에도 영향을 미칠 수 있다고 생각되는데, 이 또한 변이로 인한 bulky group이 기질의 결합부위의 통로를 직간접적으로 방해할 수 있다고 보여진다. 다소간 거리를 두고 있는 부위의 변이가 기질결합에 큰 영향을 줄 수 있으며 G307은 loop에 위치하므로 3차 구조의 변화에 민감하게 작용할 확률도 높다. 이와 같은 여러 가지 가능한 영향은 결국 인간 CBS의 G307S의 3차 구조를 해석하여 얻어야 할 것이고 효모의 CBS의 3차 구조는 아직 밝혀지지 않았으므로 효모의 야생형 CBS와 G347S 변이의 3차 구조를 밝히면 인간과 효모 사이의 3차 구조의 변화와 또한 변이의 영향 등을 자세히 알 수 있으리라 생각되어 현재 효모의 CBS의 결정을 얻기 위한 연구를 진행 중에 있다.

요 약

본 연구에서는 최근 심혈관 순환계의 새로운 위험인자로 등장한 homocysteine을 생체 내에서 전환시키는 효소인 cystathionine β -synthase의 돌연변이에 관한 연구를 수행하였다. 인간의 cystathionine β -synthase에 돌연변이가 생기면 그 효소활성에 문제가 발생하여 homocysteine이 생체에 축적되어 부작용을 일으키는 homocystinuria라는 유전병이 생기게 되는데 여러 돌연변이 중 G307이 serine으로 치환된 돌연변이가 많은 비중을 차지한다. 한편 인간의 cystathionine β -synthase는 heme을 prosthetic group로 가지고 있어서 여러 스펙트럼 연구에 장애가 있으나, 같은 기능을 갖고 인간의 cystathionine β -synthase와 높은 상동성을 가지는 효모 유래의 cystathionine β -synthase는 heme을 포함하고 있지 않아 스펙트럼 연구에 용이한 점을 이용하여 인간의 G307에 해당하는 G247의 부위를 serine으로 치환, 정제하여 그 생화학적 특성을 살펴보았다. 효모의 G247S는 C 말단이 잘린 truncated form 과 전체단백질이 모두 함유된 full length form의 두 가지를 이용하여 실험하였다. 두 돌연변이 단백질 모두에서 기질로써 L-homocysteine과 L-serine을 이용한 방사선 동위원소 C^{14} 을 사용하여 활성을 측정할 때 활성이 전혀 검출되지 않았으며 β -mercaptoethanol 과 L-cysteine을 기질로 이용한 방법에서도 황화수소를 검출할 수 없었다. 또한 UV-visible spectrum과 CD spectrum에서도 PLP의 특이적인 흡수지대인 410 nm에서의 흡수를 전혀 검출할 수 없었다. 또한 PLP의 검출방법인 KCN과의 incubation 실험에서도 PLP를 검출할 수 없었다. 보고된 인간 cystathionine β -synthase의 결정3차 구조를 분석하여 본 바, G307은 조효소 PLP의 근방에 위치하여 bulky한 R group인 serine으로 치환될 경우 효소와 PLP의 결합을 극도로 저지하여 활성을 저지하는 것으로 생각된다. G247S를 고농도의 PLP와 incubation하여도 활성이 회복되지 않으며 단백질로의 PLP의

incorporation이 관찰되지 않았다. 이는 인간의 G307S환자가 PLP를 투여하여도 병세의 호전이 없는 이유를 설명하고 있다. 결론적으로 G307S 돌연변이에 기인한 homocystinuria 환자는 CBS의 활성이 전무하며 PLP의 투여에도 효과가 없음을 효모를 이용한 본 연구에서 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 금오공과대학교 학술연구비에서 (2004-104-091) 지원 받았으므로 감사 드립니다.

REFERENCES

- Adams, E. 1979. Fluorometric determination of pyridoxal phosphate in enzymes. *Method. Enzymol.* **62**: 407-410.
- Chen, X., K. H. Jhee, and W. D. Kruger. 2004. Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine β-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. *J. Biol. Chem.* **279**: 52082-52086.
- Drummond, J. T., J. Jarrett, J. C. Gonzalez, S. Huang, and R. G. Matthews. 1995. Characterization of nonradioactive assays for cobalamin-dependent and cobalamin-independent methionine synthase enzymes. *Anal. Biochem.* **228**: 323-239.
- Ellman, G. L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**: 70-77.
- Gallagher, P. M., P. Ward, S. Tan, E. Naughten, J. P. Kraus, G. C. Sellar, D. J. McConnell, I. Graham, and A. S. Whitehead. 1995. High frequency (71%) of cystathionine β-synthase mutation G307S in Irish homocystinuria patients. *Hum. Mutat.* **6**: 177-180.
- Jhee, K. H., P. McPhie, and E. W. Miles. 2000. Yeast cystathionine β-synthase is a pyridoxal phosphate enzyme but, unlike the human enzyme, is not a heme protein. *J. Biol. Chem.* **275**: 11541-11544.
- Jhee, K. H., P. McPhie, and E. W. Miles. 2000. Domain architecture of the heme independent yeast cystathionine β-synthase provides insights into mechanisms of catalysis and regulation. *Biochemistry.* **39**: 10548-10556.
- Jhee, K. H. and W. D. Kruger. 2005. The role of cystathionine β-synthase in homocysteine metabolism. *Antioxid. Redox. Signal.* **7**: 813-822.
- Kim, J., M. K. Park, E. Kim, C. Han, S. A. Jo, and I. Jo. 2007. Plasma homocysteine is associated with the risk of mild cognitive impairment in an elderly Korean population. *J. Nutr.* **137**: 2093-2097.
- Kraus, J. P., M. Janosik, V. Kozich, R. Mandell, V. Shih, M. P. Sperandio, G. Sebastio, R. de Franchis, G. Andria, L. A. Kluijtmans, H. Blom, G. H. Boers, R. B. Gordon, P. Kamoun, M. Y. Tsai, W. D. Kruger, H. G. Koch, T. Ohura, and M. Gaustadnes. 1999. Cystathionine β-synthase mutations in homocystinuria. *Hum. Mutat.* **13**: 362-375.
- Kruger, W. D. and D. R. Cox. 1994. A yeast system for expression of human cystathionine β-synthase: structural and functional conservation of the human and yeast genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 6614-6618.
- Kruger, W. D., L. Wang, K. H. Jhee, R. H. Singh, and L. J. Elsas 2nd. 2003. Cystathionine β-synthase deficiency in Georgia (USA): correlation of clinical and biochemical phenotype with genotype. *Hum. Mutat.* **22**: 434-441.
- Linnebank, M., A. Homberger, R. Junker, U. Nowak-Goettl, E. Harms, and H. G. Koch. 2001. High prevalence of the I278T mutation of the human cystathionine beta-synthase detected by a novel screening application. *Thromb. Haemost.* **85**: 986-988.
- Meier, M., M. Janosik, V. Kery, J. P. Kraus, and P. Burkhard. 2001. Structure of human cystathionine β-synthase: a unique pyridoxal 5'-phosphate-dependent heme protein. *J. EMBO.* **20**: 3910-3916.
- Miles, E. W. and J. P. Kraus. 2004. Cystathionine β-synthase: structure, function, regulation, and location of homocystinuria-causing mutations. *J. Biol. Chem.* **279**: 29871-29874.
- Mudd, A. H., J. D. Finkelstein, and F. Irreverre. 1964. Homocystinuria: an enzymatic defect. *Science.* **143**: 1443-1445.
- Pezzini, A., E. Del Zotto, and A. Padovani. 2007. Homocysteine and cerebral ischemia: pathogenic and therapeutical implications. *Curr. Med. Chem.* **14**: 249-263.
- Seshadri, S., A. Beiser, J. Selhub, P. F. Jacques, I. H. Rosenberg, R. B. D'Agostino, P. W. Wilson, and P. A. Wolf. 2002. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **346**: 476-483.
- Shan, X. and W. D. Kruger. 1998. Correction of disease-causing CBS mutations in yeast. *Nat. Genet.* **19**: 91-93.
- Wierzbicki, A. S. 2007. Homocysteine and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Diab. Vasc. Dis. Res.* **4**: 143-150.

(Received Aug. 3, 2007/Accepted Sep. 9, 2007)