

택사(*Alismatis Rhizoma*)로부터 트립신 저해제의 정제와 특성 규명 및 이와 결합하는 단백질, 10-Formyltetrahydrofolate Dehydrogenase에 관한 연구

김지만 · 박종옥* · 신영희#

경성대학교 약학대학, *경성대학교 화학과

(Received January 9, 2008; Revised February 4, 2008)

Purification and Characterization of Trypsin Inhibitor from *Alismatis Rhizoma* and its Binding Protein, 10-Formyltetrahydrofolate Dehydrogenase

Ji-Man Kim, Jong-Ok Park* and Young-Hee Shin#

College of Pharmacy, *Department of Chemistry, College of Science, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea

Abstract — *Alismatis Rhizoma* has been used as diuretics and antiphlogistics in the Chinese oriental medicine. A trypsin inhibitor was isolated from *Alismatis Rhizoma* using DEAE ion exchange column, trypsin affinity column, and FPLC chromatography, and its activity and characteristics were studied. The purified *Alismatis Rhizoma* trypsin inhibitor (ARTI) was estimated to be about 22 kDa. The sequence determination on N-terminal amino acid residues and 84 amino acid residues has been completed, yet no homology has been found with trypsin inhibitors reported at NCBI. ARTI did not show inhibitory activities on chymotrypsin and elastase, however it exhibited a significant inhibitory activity on bovine trypsin, and formed a complex with rat liver 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase.

Keywords □ *Alismatis Rhizoma* trypsin inhibitor (ARTI), partial amino acid sequence, ARTI-affinity column, 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase (FDH)

생체내의 여러 생명 현상은 많은 종류의 serine protease에 의하여 조절되고 있으며,¹⁾ 이들 serine protease의 효소활성을 선택적으로 조절하는 serine protease 저해제는 혈액응고, 염증반응, 감염증 등에 치료제로 이용될 수 있는 가능성을 가지고 있다. 현재 이러한 중증 감염증에 임상적으로 널리 사용되고 있는 serine protease 저해제는 aprotinin, gabexate mesilate, ulinastatin, nafamostat mesilate 등이 있다.²⁻⁶⁾ Matsumoto 등은 kinin generation cascade에 관여하는 여러 가지 식물기원 serine protease 저해제에 관하여 보고하였으며,⁷⁾ 이 중 kallikrein 저해능이 가장 큰 soybean 트립신 저해제에 관한 연구가 현재 활발히 진행 중이다.⁸⁻¹¹⁾

택사(*Alismatis Rhizoma*, Alismataceae)는 식물로서 예로부터 이수(利水), 삼습(滲濕), 설열(泄熱) 효능이 있어 이뇨제(利尿劑), 소종제(消腫劑), 설사제(泄瀉劑)로 이용되며¹²⁾ 택사탕, 보기건중탕, 오령산, 저령탕 등에 배합되어 사용된다. 또한 최근에는 항

보체활성 및 세포독성에 관한 활성도 보고되고 있다.^{13,14)}

본 연구는 전통 한방 약재로 사용되어 온 택사로부터 trypsin inhibitor를 분리 정제하여 그 특성을 규명하고, 또한 택사유래의 트립신 저해제(ARTI)를 이용하여 트립신 저해제의 새로운 활성을 검색하고자 하였다. 우선 생체 내에서의 생리학적 역할을 알아보기 위하여 흰쥐의 간 추출물을 ARTI-affinity column으로 처리한 결과 여러 개의 단백질과 결합하는 것을 알 수 있었으며, 이들 단백질 중 하나를 분리 정제한 결과 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase(FDH)¹⁵⁻¹⁷⁾임을 확인하였다.

실험 방법

시약 및 기기

실험에 사용한 택사는 한약상에서 구입하여 사용하였으며, DEAE cellulose, soybean trypsin inhibitor(SBTI), chymotrypsin, trypsin, α_1 -antitrypsin, elastase, kallikrein, N_α -benzoyl-dl-arginine *p*-nitroanilide(BAPNA), Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, 2-mercaptoethanol, 등은 Sigma Chemical Co.

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 051-620-4886 (팩스) 051-620-4804
(E-mail) yhshin@ks.ac.kr

(St. Louis, MO, USA)에서, Complete protease Inhibitor cocktail은 Roche(Mannheim, Germany), HRP labelled Anti-rabbit IgG, Western lightingTM chemiluminescence reagent는 Perkin Elmer life science(St. Albany, MO, USA)에서 N-Benzoyl-L-arginine-4-methyl-coumarine-7-amide(Bz-Arg-MCA), Suc-Ala-Pro-Ala-MCA, Z-Phe-Arg-MCA, Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA는 Peptide Institute(Osaka, Japan), CNBr-activated sepharose 4B는 Pharmacia(Uppsala, Sweden)에서 각각 구입하여 사용하였다. 그 외 시약은 특급시약을 사용하였다. 실험에 사용한 기구로는 UV-VIS spectrophotometer(Shimadzu UV-1601), spectrofluorometer(Jasco FP-750), electrophoresis system(Biorad, Mini-protean IICell), Ultrafiltration system(Amicon 8200), FPLC system(Pharmacia GP 250 plus), Ultracentrifuge(Hitachi, himac CP 100 α), Homogenizer(Polytron, PT10-35) 등을 사용하였다.

Trypsin affinity column의 제조¹⁸⁾

1 mM HCl로 활성화한 CNBr activated sepharose 4B에 coupling buffer(0.1 M NaHCO₃ containing 0.5 M NaCl, pH 8.3)에 녹인 trypsin을 가하여 실온에서 1시간 반응 후 blocking buffer(0.1 M Tris-HCl, pH 8.0)로 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 이 후에 0.5 M NaCl이 함유된 acetate buffer(0.1 M, pH 4.0)와 0.5 M NaCl이 함유된 Tris-HCl buffer(0.1 M, pH 8.0)로 차례로 각각 3회 세척하여 trypsin affinity column을 만들었다.

ARTI affinity column의 제조

Trypsin affinity column의 제조와 동일한 방법으로 ARTI affinity column을 만들었다. 제조 후 trypsin을 결합시켜 활성을 확인하였다.

ARTI의 정제

ARTI의 분리, 정제는 기 보고된 방법¹⁹⁾을 변형하여 정제하였다. 이를 간단히 설명하면 텍사 100 g을 분말로 하여 Tris-HCl (25 mM, pH 7.4) 1 l를 가한 다음 4°C에서 16시간 동안 교반하였다. 이 용액을 20,000 \times 에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 추출물로 사용하였다. 이 추출물을 80% 포화 황산 암모늄 용액으로 단백질을 침전시킨 후 투석하여 탈염하였다. 이를 인산염 완충액(50 mM, pH 7.4)으로 평형시킨 DEAE ion exchange column(2.5 \times 50 cm)에 가한 후 0.5 M NaCl로 용출시켰다. 용출 후 BAPNA 법에 따라 활성이 있는 분획만을 모아 Tris-HCl(25 mM, pH 7.4)로 평형시킨 trypsin affinity column(1.5 \times 20 cm)에 가하여 citrate 완충액(25 mM, pH 3.0)으로 용출시켰다. 이를 다시 1.7 M 황산 암모늄을 함유한 인산염 완충액(50 mM, pH

7.4)으로 평형시킨 FPLC Butyl toyopearl column에 가한 후 인산염 완충액(50 mM, pH 7.4)으로 용출시켜 순수한 trypsin inhibitor(ARTI)를 얻어 실험에 사용하였다.

SDS-PAGE 전기영동

Laemmli method에 의하여 수행하였다.²⁰⁾ 즉, 검체와 동량의 2 \times loading buffer를 가하여 90°C에서 5분간 열처리하고, 12%의 SDS-gel에 가하여 running buffer에서 25 mA의 일정 전류 하에서 전개하였다. 환원 조건에서는 7.5% 2-mercaptoethanol을 가하여 환원시킨 후 위와 동일하게 열처리하여 전기영동을 하였다. 전기영동이 완료된 gel은 coomassie brilliant blue R-250 염색용액으로 15분 정도 염색한 후, 탈색용액을 수 차례 교환해 가며 6시간 정도 탈색시킨 다음, 표준 단백질과 비교하여 단백질의 크기 및 순도를 확인하였다.

ARTI의 저해활성 측정

Inhibition concentration 50%(IC₅₀)의 측정⁸⁾ - 분리 정제한 ARTI의 트립신 저해활성을 측정하기 위해 (Bz-Arg-MCA) 기질로 사용하여 반응시 나타나는 형광의 세기를 측정하여 계산하였다. 검체 50 μ l 취했을 때 최종 농도가 각각 5, 2, 1, 0.6, 0.2 및 0.1 μ g이 되도록 희석하여 각각에 트립신(25 μ g/ml) 40 μ l를 첨가하고 37°C에서 10분간 incubation시킨 후, 기질액으로 dimethyl sulfoxide에 용해한 5 mM Bz-Arg-MCA 10 μ l를 첨가하고 다시 37°C에서 10분간 incubation시킨 후 17% 초산을 가하여 반응을 중지시킨다. 생성된 7-amino-4-methyl coumarine(AMC)을 여기파장 380 nm, 발광파장 460 nm에서 형광세기를 측정하여 트립신의 활성을 50% 억제하는 농도(IC₅₀)를 구하였다.

각종 protease에 대한 ARTI의 저해도 측정²¹⁾ - Serine protease인 chymotrypsin, elastase에 대해 ARTI의 저해정도를 측정하기 위해 기질로 Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA, Suc-Ala-Pro-Ala-MCA를 각각 사용하여 실험하였다. 50 mM Tris-HCl(containing 20 mM CaCl₂) 400 μ l에 trypsin, chymotrypsin, elastase 각각 50 μ l와 ARTI 40 μ l를 가하고 37°C에서 10분간 incubation시킨다. 여기에 각각의 기질액을 10 μ l 가하고 다시 37°C에서 10분간 incubation시킨 후 17% 초산으로 반응을 중지시킨다. 생성된 AMC을 여기파장 380 nm, 발광파장 460 nm에서 형광세기를 측정하여 사용한 각각의 효소 활성을 50% 억제하는 농도(IC₅₀)를 구하였다.

ARTI의 아미노산 서열결정¹⁸⁾

정제된 ARTI를 환원 조건에서 12% SDS-PAGE에 적용하였다. 이 때 얻어진 ARTI의 band를 Polyvinylidene difluoride membrane(PVDF membrane, Millipore)에 blotting 하여 자동

아미노산 서열분석기로 Edman degradation 법에 의해 N-말단 아미노산 서열을 결정하였다. 또한 분리 정제한 ARTI를 Fullmer의 방법²²⁾에 따라 환원 반응 후 alkylation 하여 생성된 alkylated ARTI를 lyslendopeptidase로 가수분해한 다음 C18-reverse phase HPLC로 각각의 펩타이드를 분리하여, 이를 자동 아미노산 서열분석기로 부분 아미노산 서열을 결정하였다.

Rat's liver 추출물의 조제

SD계 환귀를 CO₂ gas로 치사시킨 후 250 mM Sucrose, 10 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM dithiothreitol이 포함된 Tris-HCl buffer(25 mM, pH 7.4) 로 충분히 관류한 후 간을 적출 하였다. 즉시 polytron homogenizer를 이용하여 분쇄한 후 30,000×g에서 30분 간 원심분리하여 침전물을 제거하였고 다시 80,000×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 상등액을 취하였다. 모든 조건은 4°C에서 수행하였다.

Liver 내에서 ARTI와 선택적으로 결합하는 성분의 검색

ARTI의 새로운 활성을 검색하기 위해서 Tris-HCl(25 mM, pH 7.4)로 평형시킨 ARTI affinity column(1.5×5 cm)에 간 추출물을 가하고 0.3 M NaCl을 포함하는 25 mM Tris-HCl로 용출하였다. 용출 후 12% SDS-PAGE를 수행하여 선택적으로 결합한 단백질을 확인하였고, 자동아미노산 서열분석기를 이용하여 분석하였다. 즉 얻어진 밴드를 polyvinylidene difluoride membrane (PVDF membrane, Millipore)에 blotting 하여 자동 아미노산 서열분석기로 Edman degradation 법에 의해 N-말단 아미노산 서열을 결정하였다. 또한 정제된 FDH를 reduction, alkylation 시켜 lyslendopeptidase를 가해 13시간 동안 반응시켜 가수분해하고, C18-reverse phase HPLC로 각각의 펩타이드를 분리하여

이를 자동 아미노산 서열분석기로 부분 아미노산 서열을 결정하였다.

실험결과 및 고찰

ARTI의 분리 및 정제

택사로부터 ARTI를 DEAE ion exchange chromatography (Fig. 1), trypsin affinity chromatography(Fig. 2), butyl toyopearl FPLC(Fig. 3) 등을 행하여 차례로 분리, 정제하였으며, 전기영동 결과 하나의 band가 나타나 순수하게 정제되었음을 알 수 있었다. 또한 ARTI의 분자량은 아미노산 조성 분석 및 전기영동 결

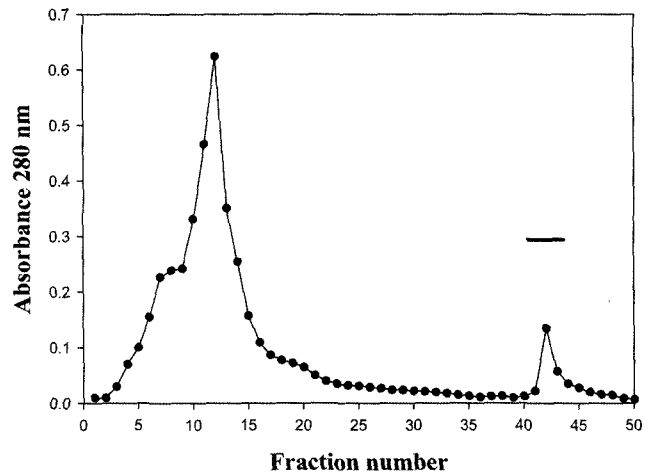


Fig. 2 - Elution pattern of *Alismatis Rhizoma* trypsin inhibitor from trypsin affinity column (1.5×20 cm). The fractions with black bars were collected and used for the next purification. ●, protein (absorbance at 280 nm).

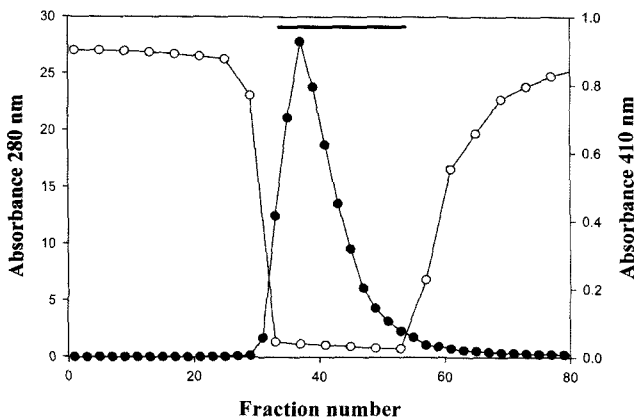


Fig. 1 - Elution pattern of *Alismatis Rhizoma* trypsin inhibitor from DEAE-cellose (2.5×50 cm). Fractions showing inhibitory activity against trypsin were pooled. ●, protein (absorbance at 280 nm), ○, protease activity (absorbance at 410 nm).

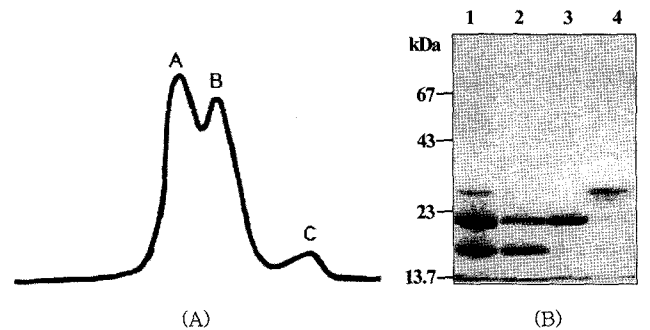


Fig. 3 - (A) Elution pattern of *Alismatis Rhizoma* trypsin inhibitors from butyl toyopearl FPLC. Elution was performed with the 50 mM phosphate buffer solution at flow rate 0.4 ml/min. (B) 12% SDS-PAGE of purification process of trypsin inhibitor from Butyl toyopearl FPLC. Lane 1, Trypsin affinity column eluate, lane 2, butyl toyopearl FPLC fraction A, lane 3, butyl toyopearl FPLC fraction B, lane 4, butyl toyopearl FPLC fraction C.

과를 종합해 볼 때 Fig. 3의 (B)에서 보는 바와 같이 약 22 KDa의 monomer인 것을 알 수 있다.

각종 protease에 대한 ARTI의 저해도 측정

여러 종류의 serine protease, 즉 trypsin, chymotrypsin, elastase, kallikrein에 대해 ARTI의 저해정도를 측정하기 위해 기질로 N-benzoyl-L-arginine-MCA, Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA, Suc-Ala-Pro-Ala-MCA, Z-Phe-Arg-MCA를 각각 사용하여 실험한 결과는 Table I과 같다. ARTI는 본 실험에 사용한 serine protease 중에서 trypsin 만을 특이적으로 저해하는 것으로 나타났다.

아미노산 서열 분석 및 Homology

ARTI의 N-말단 아미노산 서열은 1-EAVVDTNGDKIHTGSIH-

Table I - Inhibitory activity of ARTI against several serine proteases

Protease (1 µg/ml)	Substrate	IC ₅₀ (µg/ml)
Trypsin	Bz-Arg-MCA	1.93
Chymotrypsin	Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	>50
Elastase	Suc-Ala-Pro-Ala-MCA	>50
Kallikrein	Z-Phe-Arg-MCA	>50

Table II - Putative amino acid sequence of ARTI

Amino acid sequence	
N-terminal partial sequence	EAVVDTNGDKIHTGSIHDVT
peak 5	IHTGSIHDVITYRIRPGPGIGFRGGLGRSPIK
peak 6	LPGVWTIGNVVNEGQTSFQPIIATQK
peak 12	YIYEGPETFFPGEPIQFD
peak 12	YIYEGPETFFPGEPIQFD

Table III - Putative amino acid composition of ARTI

Amino acid	mol %	ARTI ^a
Asp/Asn	8.5	17
Glu/Gln	13.4	27
Ser	8.4	17
Gly	11.4	23
His	1.7	3
Arg	4.9	10
Thr	4.8	10
Ala	5.3	11
Pro	8.4	17
Tyr	3.8	7
Val	5.4	10
Met	1.8	3
Pec	0.7	1
Ile	4.3	8
Leu	7.8	16
Phe	3.4	6
Lys	5.8	12
Total	100	198

^aThe units are residues per molecule.

DVT-20 이었으며, 부분 아미노산 서열로는 LPGVWTIGNVVNE-GQTSFQPIIATQK, YIYEGPETFFPGEPIQFD, 21-YRIRPGPGI GFRGGLGRSPIK-41 등이었다. 그러나 이러한 서열로는 현재까지 보고된 trypsin inhibitor와는 유의성 있는 homology를 찾을 수 없었다(Table II).

아미노산 조성

아미노산 조성으로부터 계산된 ARTI의 분자량은 24,960이었다. 또한 ARTI의 총 아미노산 개수는 약 198개로 추정되었으며, 아직은 ARTI가 어떤 type 즉, BBI 또는 Kunitz type 트립신 저해제인지 알 수 없었다(Table III).

Liver 내에서 ARTI에 선택적으로 결합되는 성분의 검색

ARTI의 새로운 활성을 검색하기 위해 ARTI affinity column 에 간추출물을 가하여 분리한 후 얻어진 여러개의 밴드중 약 98 KDa에 해당되는 밴드를 분리하여 부분 아미노산 서열을 측정한 결과 N-말단아미노산 서열은 1-MKIAVIGQSLFGQEVY-16, 부분 아미노산 서열은 438-TYNTINPTDGSVICQVSL-455, 736-IGNPLERDTNHGPNHEA-753 으로 FDH임을 알 수 있었다. (Fig. 4, Table IV). FDH는 특이하게도 serine protease의 active site인 His, Asp, Ser 아미노산 중 His와 Asp의 잔기가 conserve 되어 있고,^{23,24} 그로 인해서 FDH의 active site의 3차 구조가 serine protease와 매우 유사한 구조를 가질 것이라는 가설이 주장되고 있다.²⁵ 본 연구에서는 생체내 존재하는 FDH가 ARTI와 결합한다는 것을 알 수 있었으므로 생체내에서의 이들의 역할에 대한 연구가 요망된다.

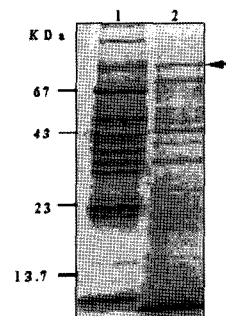


Fig. 4 - 12% SDS-PAGE of rat's liver protein attached ARTI affinity column (1.5×5 cm). Lane 1, rat's liver extract, lane 2, ARTI coupled sepharose 4B eluate. ◀, 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase (FDH).

Table IV - Partial sequence of purified FDH

FDH	Amino acid sequence
N-terminal	1-MKIAVIGQSLFGQEVY-16
partial sequence	438-TYNTINPTDGSVICQVSL-455 736-IGNPLERDTNHGPNHEA-753

결 론

본 연구에서는 한방 약재로 이용되고 있는 택사로부터 트립신 저해제를 순수 분리 정제하여 그 특성을 살펴 보고하고자 하였다. 분리 정제한 ARTI의 활성을 알아보기 위해 MCA-substrate를 이용하여 IC₅₀을 측정 한 결과 trypsin 1 µg에 대한 50% 저해 농도는 약 1.93 µg이라는 것을 알 수 있었다. 아미노산 조성분석 결과 분자량이 약 24,960 정도였으며, cysteine과 tryptophane의 정확한 개수를 알 수 없었으므로 ARTI가 어떤 type에 속하는 트립신 저해제인지 알기 어려웠다. 아미노산 서열을 분석한 결과 ARTI의 N-말단 아미노산 서열은 1-EAVVDTNGDKIHGTGS IHDVT-20 이었으며, 부분 아미노산 서열은 LPGVWTIGNVVNE-GQTSFQPIIATQK, YIYEGPETFPGEPIQFD, 21-YRIRPGPG-IGFRGGLGRSPIK-41 등이었다. 하지만 이러한 서열로는 미국 국립생물정보센터(NCBI)의 data base에서 현재까지 보고된 트립신 저해제와 유의성 있는 homology를 찾을 수 없었다.

또한 ARTI는 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase(FDH)와 선택적으로 결합한다는 사실을 알 수 있었으며, ARTI-FDH의 complex 형성에 대한 현상 및 이들의 생리학적 성질에 대하여 더 많은 연구가 필요하다.

감사의 말씀

아미노산 서열결정 및 아미노산 분석실험을 도와주신 부산대학교 이복률 교수에게 감사드린다. 이 논문은 2005학년도 경성대학교 학술연구비지원에 의하여 연구되었음.

문 헌

- Barrett, A. J., Rawlings, N. D. and Woessner, J. F. : Hand book of proteolytic enzymes. Academic press, Inc., London (1998).
- Hayashi, O. : Protease and protease inhibitor, Medical view, Tokyo, Japan (1993).
- Colasanti, M., Persichini, T., Venturini, G., Menegati, E., Lauro, G. M. and Ascenzi, P. : Effect of gabexate mesylate, a drug for serine protease mediated diseases, on the nitric oxide pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 456 (1998).
- Iwama, H., Nakane, M., Ohmori, S., Kaneko, T., Kato, M., Watanabe, K. and Okuaki, A. : Nafamostat mesilate, a kallikrein inhibitor, prevents pain on injection with propofol. *Br. J. Anaesth.* **81**, 963 (1998).
- Ooka, T., Hatano, Y., Yamamoto, M., Ogawa, K. and Saika, S. : Protective effects of human urinary trypsin inhibitor against trypsin-induced relaxation in rat aorta. *Crit. Care. Med.* **24**, 1903 (1996).
- Wolfram, B. and Robert, H. : Natural proteinase inhibitors and their interaction with proteinase. *Eur. J. Biochem.* **204**, 433 (1992).
- Matsumoto, K., Yamamoto, T., Kamata, R. and Maeda, H. : Enhancement of vascular permeability upon serratal infection: activation of Hageman factor-kallikrein-kinin cascade. *Adv. Exp. Med. Biol.* **198**, 71 (1987).
- Shin, Y. H., Kojima, Y., Otagiri, M. and Maeda, H. : Conjugation of succinylated gelatin to soybean trypsin inhibitor. *Bioactive Compatible Polymers* **11**, 3 (1996).
- Shin, Y. H., Akaike, T., Khan, M. H., Sakada, Y. and Maeda, H. : Futher evidence of bradykinin involvement in septic shock: reduction of kinin production *in vivo* and improved survival in rats by use of polymer tailored SBTI with longer t_{1/2}. *Immunopharmacology* **33**, 369 (1996).
- Maeda, H., Shin, Y. H., Akaike, T. and Yoshida, M. : Septic shock: prevention by NO-scavenger (PTIO) and by kinin inhibitor. *Shock*, Elsevier Science B.V. 43-52 (1996).
- Kinoshita, C., Shin, Y. H., Akaike, T. and Maeda, H. : Effect of succinylated gelatin conjugated soybean trypsin inhibitor (SBTI) against hypotension and septic shock. *Drug Delivery System* **12**, 335 (1997).
- Namba, T. : The encyclopedia of Wakan-Yaku with color picture Vol. 1. Osaka Japan, Hoikusha Co., Ltd., pp. 99-101 (1993).
- Matsuda, H., Tomohiro, N., Yoshikawa, M. and Kubo, M. : Anti-complementary activities of methanol extract and terpene components from *Alismatis Rhizoma*. *Biol. Pharm. Bull.* **21**, 1317 (1998).
- Lee, S. M., Kho, Y. H., Min, B. S., Kim, J. H., Na, M. K., Kang, S. J., Maeng, H. Y. and Bae, K. H. : Cytotoxic triterpenoids from *Alismatis Rhizoma*. *Arch. Pharm. Res.* **24**, 524 (2001).
- Kim, S. D., Park, G. H., Joo, W. A., Paik, W. K., Cook, R. J. and Williams, K. R. : Identification of protein-arginine N-methyltransferase as 10-formyl tetrahydrofolate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **273**, 27374 (1998).
- Schirch, D., Villa, E., Maras, B., Barras, D. and Schirch, V. : Domain structure and function of 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **269**, 24728 (1994).
- Krupenko, S. A., Wagner, C. and Cook, R. J. : Domain structure of rat 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase. resolution of the amino-terminal domain as 10-Formyltetrahydrofolate hydrolase. *J. Biol. Chem.* **272**, 10273 (1997).
- Moon, S. E. and Shin, Y. H. : Characterization and pharmacological effect of mungbean trypsin inhibitor. *Kor. J. Life Sci.* **12**, 528 (2002).
- Park, J. O. and Lee, I. S. : Purification and characterization of trypsin inhibitor from *Alismatis Rhizoma*. *Kor. J. Life Sci.* **12**, 151 (2002).
- Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680

- (1970)
- 21) Koo, S. H., Choi, Y. L., Choi, S. K., Shin, Y. H., Kim, B. G. and Lee, B. L. : Purification and characterization of serine protease inhibitors from *Dolichos lablab* seeds; Prevention effects on pseudomonal elastase-induced septic hypotension. *J. Biochem.* **33**, 112 (2000).
- 22) Fullmer, C. S. : Identification of cysteine-containing peptides in protein digests by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **142**, 336 (1985).
- 23) Krupenko, S. A. and Wagner, C. : Aspartate 142 involved in both hydrolase and dehydrogenase catalytic centers of 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **274**, 35777 (1999).
- 24) Krupenko, S. A., Vlasov, A. P. and Wagner, C. : On the role of conserved histidine 106 in 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase catalysis. *J. Biol. Chem.* **276**, 24030 (2001).
- 25) Krupenko, S. A., Wagner, C. and Cook, R. J. : Domain structure of Rat 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **272**, 10273 (1997).