

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae*로 부터 aspartate aminotransferase 유전자의 분리 및 생화학 특성

강한철* · 윤상홍 · 이창묵

농촌진흥청, 국립농업과학원, 기능성물질개발과

Cloning and Biochemical Characterization of Aspartate Aminotransferase from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Han-Chul Kang*, Sang-Hong Yoon, and Chang-Mook Lee

Department of Functional Bio-material, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

Received July 21, 2009; Accepted September 2, 2009

The gene encoding a putative aspartate aminotransferase in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) was cloned using PCR technique. The gene was ligated with pET-21(a) vector containing His6 tag and expressed in *E. coli* BL21(DE3). Affinity purification of the recombinant aspartate aminotransferase with Ni-NTA resin resulted in one band by SDS-PAGE analysis. The purified enzyme showed a molecular weight of 43 kDa, as expected. The enzyme was the most active toward L-aspartate as an amino donor, indicating that the purified enzyme is one of aspartate aminotransferases exist in Xoo. Optimal activity of the enzyme was observed at around pH 7.5 and stability was much higher at alkaline pH rather than acidic pH values. The enzyme was considerably activated by the presence of manganese ion, showing about 157% of control activity at 1.0 mM.

Key words: aspartate aminotransferase, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

서 론

Aspartate aminotransferase(EC 2.6.1.1; Asp-AT)는 aspartate malate shuttle 및 비필수 아미노산 대사에 관여하는 중요한 효소 중의 하나이다. Asp-AT는 효소 반응의 필수 cofactor인 pyridoxal 5'-phosphate의 도움으로 aspartate와 ketoglutarate 사이의 transamination을 가역적으로 촉매하여 glutamate와 oxaloacetate를 생성하며 결과적으로 carbon과 nitrogen flux의 조절에 중요한 작용을 한다.

Asp-AT는 prokaryotic 및 eukaryotic 생물체에서 여러 세포내 소기관에서 존재하고 있으며 현재까지 두가지 종류의 Asp-AT가 mammalian 기관에서 발견되고 있는데 하나는 cytosol에서 다른 하나는 mitochondria에서 발견되고 있다[Obaru 등, 1986;

Juretic 등, 1990]. 식물체의 경우는 cytosol과 mitochondria 이외에도 plastid, glyoxysome, 및 peroxisome 등에서도 asp-AT가 발견되고 있다[Givan 등, 1980; Ireland 등, 1985; Stephens 등, 1998; Wilkie 등, 1998]. 각종 bacteria, fungi 및 효모 등의 미생물에서 Asp-AT가 꾸준히 연구되어 왔다[Bartsch 등, 1996; Verleur 등, 1997; Nobe 등, 1998; Birolo 등, 2000; 2002; Kim 등, 2003; Hwang 등, 2005].

한편으로 amino acid aminotransferase는 산업적으로 아미노산을 생산하는 경우에도 사용되며 화학적인 방법으로 생산하는 경우 보다 여러 장점을 갖는 경우가 많다[Hwang 등, 2005]. Aminotransferase를 이용한 아미노산 생산은 cofactor가 필요 없으며 또한 상당히 높은 enantioselectivity 및 regioselectivity 특성을 보이는 경우가 많은 장점을 보이고 있다[Taylor 등, 1998]. 더욱이 화학 합성 원료를 싫어하는 소비자들의 욕구와도 일치되어 앞으로 아미노산 생산에 이러한 효소들이 상당히 많이 이용될 것으로 예상되고 있다[Hwang 등, 2005]. 이러한 장점들 때문에 aminotransferase 들은 산업적인 측면에서 아미노산 이외에도 키랄 아미민, 아미노 알코올, 아미노 당류 등의 아미노산 유도체 생산에도 이용되어 오고 있다[Patel 등, 2000; Ager 등, 2001; Stewart 등, 2001]. 한편 다른 aminotransferase와 마찬가지로 asp-AT의 경우도 산업적으로 많이 활

*Corresponding author

Phone: +82-31-299-1694; Fax: +82-31-299-1672

E-mail: hckang09@korea.kr

Abbreviations: Asp-AT, aspartate aminotransferase; IPTG, isopropyl β-D-thiogalactopyranoside; pET-21-asp-AT, pET-21(a) plasmid inserted with aspartate aminotransferase

doi:10.3839/jabc.2009.019

용되고 있으며 L-phenylalanine은 asp-AT와 phosphoenolpyruvate 및 carboxykinase를 조합하여 phenylpyruvate 로부터 생산되고 있다[Chao 등, 1999]. L-aspartic acid는 이미 잘 알려진 감미료의 일종인 aspartame 제조 이외에도 herbicide의 일종인 phosphinothricin 및 gulfosinate의 생산[Bartsch 등, 1996]에도 이용될 수 있으며 D-aspartate에 의한 asp-AT의 3차원 구조 변화에 근거하여[Kochkina 등, 1995] 항균제 개발의 목표 단백질이 될 수도 있다. 따라서 L-aspartic acid를 포함하여 각종 아미노산 생산 시장이 증가하고 있는 만큼 aminotransferase에 보다 많은 관심을 보이고 있다.

아미노산 대사관련 기작의 폭넓은 이해 이외에도 산업적인 이용 가능성을 확대하기 위해서도 Asp-AT에 대한 지속적인 연구가 필요하다. aminotransferase 들을 보다 폭넓게 이용하기 위해서는 여러 효소 자원으로부터 생산되는 효소마다 각종 기질에 대한 특이성 및 생화학 특성 등의 정보가 계속 축적되어야 효과적으로 이용할 수 있다. Wu 등(1998)은 *E.coli*에서 분리한 aromatic aminotransferase 및 phenylalanine aminotransferase의 기질 특이성을 site directed mutagenesis 방법으로 넓게 확장시킨 바 있으며 반대로 Cho 등(2004)은 Asp-AT의 기질 특이성을 보다 좁게 만든 적도 있을 정도로 기질 특이성은 중요하다. 따라서 단백질 공학 등을 이용하여 효소의 기질 특이성을 변화시켜 산업적으로 목적하는 바의 적절한 효소를 생합성하기 위하여서는 Asp-AT 등 분리된 효소에 대한 기질 특이성 등의 정확한 정보가 계속 축적되어야 한다.

본 연구에서는 산업적인 효소자원으로 널리 활용되면서도 다른 aminotransferase에 비해서 상대적으로 정보가 부족한 Asp-AT를 연구 대상으로 하였다. 따라서 Xoo로부터 NCBI 유전자 은행의 자료를 바탕으로 Asp-AT 유전자를 분리하고 발현시켜 얻어진 생화학 특성을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

X. oryzae 및 배양조건. Xoo(KACC 10331)는 Korean Agricultural Culture Collection(KACC)에서 분양을 받았으며 sucrose 5 g/L, yeast extract 10 g/L, peptone 5 g/L, 및 Luria-Bertani miller(LB)[Sambrook 등, 1989] 5 g/L으로 조성된 배지에서 배양하였다. *E. coli* DH5 α 는 Xoo로부터 분리한 Asp-AT 후보 유전자의 클로닝에 이용되었으며 T7 RNA polymerase 유전자를 보유하고 있는 *E. coli* BL21(DE3)는 분리된 유전자의 발현에 이용되었다. *E. coli* 균주들은 적당한 농도의 항생제를 함유하는 LB 배지[Sambrook 등, 1989]를 이용하여 배양하였다.

Asp-AT 유전자의 클로닝. Xoo 균주는 28°C에서 150 rpm의 속도로 36시간 동안 진탕 배양한 후 원심분리에 의해 회수하였다. 전체의 genomic DNA는 상업적인 유전자 분리 kit(Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 분리하였으며 -20°C에 보존하면서 실험에 사용하였다. Xoo로부터의 asp-AT 후보 유전자는 NCBI 유전자은행(NCBI accession number, NC 006834; gene ID, 3262455)을 참조하여 선정하였다. Asp-AT 유전자를 polymerase chain reaction(PCR)로 분리하기 위하여 sense

primer로서 5'-atg tgt cct agg tca tgg tgg ttt atc-3'를 그리고 antisense primer로서 5'-caa tgc cga caa ccc acg cgc aat ccg-3'를 이용하였다. 증폭되는 유전자는 발현벡터에서 His-6 재조합 단백질을 만들기 위하여 stop codon을 제거하도록 primer를 디자인 하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 3분 동안 denaturation, 55°C에서 1분 동안 annealing, 72°C에서 1분 30초 동안 amplification의 과정을 30회 반복하여 수행하였다. 증폭된 유전자를 pET-21(a) 발현 벡터에 삽입시키기 위하여 N-terminal의 시작 부위에 *Nde* I을 부착하기 위한 2차 PCR을 시도하였으며 이때 sense primer로서 5'-cat atg tgt cct agg tca tgg tgg ttt-3'를 이용하였고 antisense primer는 1차 PCR에서와 같은 primer를 사용하였으며 PCR 조건도 같았다.

이렇게 얻어진 PCR 산물은 분리하여 pGEM-T Easy vector(Promega, CA, USA)에 결합시킨 다음에 *E. coli* DH5 α 세포에 열충격의 방법으로 삽입시켰다. 형질전환된 대장균은 ampicillin(100 μ g/mL), isopropyl β -D-thiogalactopyranoside(IPTG; 0.5 mM) 및 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside (75 μ g/mL)를 함유하는 LB agar 배지에서 37°C 조건으로 24시간 동안 배양하였다. Asp-AT 유전자를 함유하는 벡터는 상업용 plasmid 분리 kit(DyneBio, Daejeon, Korea)을 사용하여 분리한 후 PCR 방법 및 DNA sequence 분석에 의하여 목적 유전자의 삽입을 확인하였다. Asp-AT 유전자가 삽입된 pGEM-T easy vector는 *Nde* I 및 *Sal* I로 분해를 시켜 삽입 유전자를 추출한 후 역시 같은 제한효소들로 절단시킨 pET-21(a)에 결합시켰다. 이렇게 만들어진 발현벡터는 pET-21-asp-AT로 명명하였다.

Asp-AT의 발현 및 조단백질 추출. pET-21-asp-AT는 *E. coli* BL21(DE3) 세포에 형질전환시킨 후 ampicillin 함유 LB-agar 배지에서 배양하였다. 선발된 colony는 같은 액체 배지에서 A_{600nm}가 0.5가량 될 때까지 배양한 후 충분한 양의 Asp-AT를 얻기 위해 200 mL의 배지에 접종하였다. 다섯 시간의 추가 배양 이후 1 mM의 IPTG를 첨가하고 25°C에서 50 rpm의 조건으로 12시간 동안 배양하였다.

배양된 균체는 원심분리에 의해 회수한 후 완충용액 A(20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 500 mM NaCl, and 5 mM imidazole)로 씻어냈다. 세포들은 같은 완충액으로 현탁시킨 후 초음파의 방법으로 파쇄시키고 원심분리(10,000 \times g 10분)의 방법에 의해 상등액을 회수하였다.

Asp-AT의 친화 크로마토그래피 분리. 50 mL의 완충액 A에 녹인 조단백질은 Ni(II) 이온으로 charge 되고 같은 완충액으로 충전시킨 HisBind Resin column(1 \times 10 cm)에 통과시켰다. 컬럼은 완충용액 B(20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 500 mM NaCl, 및 80 mM imidazole)로 씻어냈고 이어서 resion에 결합된 단백질은 추출용 완충용액(50 mM Tris-HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 및 50-1000 mM imidazole linear gradient)을 이용하여 0.5 mL/min의 비교적 느린 속도로 용출시키며 단백질 분획을 회수하였다. Asp-AT를 함유하는 단백질 분획은 즉시 asp-AT 활성도를 측정하여 추적하였다. Asp-AT로 모아진 단백질 분획들은 완충용액 C(20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 20% glycerol, and 2 mM EDTA)를 이용하여 4°C에서 12시간 동안

투석시켰다. 이 중에서 asp-AT 활성도가 가장 높은 분획을 이용하여 전기영동 분석 및 각종 생화학 실험을 수행하였다.

Asp-AT의 효소활성 측정. Asp-AT 효소는 5 mM L-aspartate, 4 mM α -ketoglutarate, 150 μ M NADH 및 0.4 μ M MDH(9.0 U/mL, 효소 반응용액 부피대비)를 함유하는 Tris-HCl(pH 8.0, 500 μ L) 용액에서 활성도를 측정하였다. 효소 반응은 분리된 효소를 첨가함으로써 시작하였고 37°C에서 20분간의 반응 이후 NADH의 산화에 따른 340 nm의 감소를 측정하였다. 1 unit의 효소 활성도는 1 mmol/min의 효소 반응물을 만들어내는 효소의 양으로 정의하였다.

효소의 안정화도 및 활성도에 미치는 pH의 영향. 효소 반응에 미치는 pH 효과에 있어서 pH 4.0-5.5은 50 mM의 citrate phosphate를 사용하였고 pH 5.5-7.0 및 pH 7.0-9.0은 각각 같은 농도의 potassium phosphate 및 Tris-HCl 완충용액을 사용하였다. 이와 같이 효소 반응을 위한 완충용액만 다르게 한 후 효소 반응은 상기와 같이 표준 효소반응 측정법으로 활성도를 측정하였다. pH 변화가 효소의 안정성에 미치는 영향을 실험하기 위하여 분리된 효소 분획(50 μ L)을 서로 다른 완충액에 녹였으며 이때 사용된 완충액의 pH 범위는 3.0에서 10.0까지였다. pH 3.0에서 5.0까지는 citrate phosphate를 pH 6.0에서 7.0까지는 potassium 완충액을 그리고 pH 8.0에서 10.0까지는 Tris-HCl 완충액을 사용하였다. 이렇게 서로 다른 완충액에 녹인 효소는 실온(약 25°C)에서 충분한 시간인 8시간 동안 보존하였다. 잔여 활성도를 측정하기 위하여 30 μ L를 회수한 후 Tris-HCl(pH 8.0, 500 μ L)에 다시 녹여 앞에서 기술한 표준 효소 측정 방법에 의해 Asp-AT 활성도를 측정하였다.

효소활성의 최적 온도 및 열안정성. Asp-AT 활성에 미치는 온도 효과를 실험하기 위하여 20°C에서 50°C까지 서로 다른 온도에서 효소 반응을 시킨 후 표준 효소 활성도 측정법으로 잔여 활성도를 측정하였다. 한편 효소의 열 안정성을 실험하기 위하여 효소액을 1.5 mL tube에 넣은 후 55°C 또는 70°C의 수조에 보존하였다. 열처리된 효소액은 5분의 간격으로 일정량씩 회수하여 최종적으로 모든 효소가 회수 될 때까지 모두 4°C에 보존하였다. 열처리 때문에 변성되어 침전된 단백질 분획들은 원심분리의 방법에 의하여 제거하고 상등액만을 수집하여 표준 효소활성도 측정법으로 잔여 효소 활성도를 조사하였다.

기타 분석 방법. 단백질 농도는 Bradford[1976]의 방법에 준했으며 표준 단백질로 bovine serum albumin 을 사용하였다. 전기영동(SDS-PAGE)은 Laemmli[1970]의 방법에 따라서 5%의 stacking gel과 12.5%의 resolving gel을 사용하였고 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 단백질을 염색하였다.

결과 및 고찰

Asp-AT의 E.coli 내에서의 발현 및 단백질 분리. 발현 벡터에 삽입된 asp-AT로부터 보다 충분한 양의 단백질을 확보하기 위하여 E. coli BL21(DE3)에서 일반적인 배양조건인 200 rpm, 37°C에서 배양하며 IPTG를 이용하여 단백질을 과량 발현시켰다. 그러나 Asp-AT의 과량 발현 이후 기계적인 파쇄, 초음파 처리, 상업적인 kit를 이용한 세포벽 용해 등 여러 가지 방

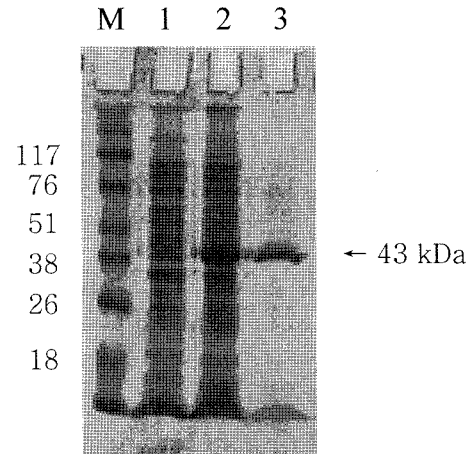


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of the aspartate aminotransferase originated from *X. oryzae*. Lane M, Molecular mass markers; lane 1, crude extract from *E. coli* BL21(DE3) harboring pET-21 without insert gene (i.e., vector control); lane 2, crude extract from *E. coli* BL21(DE3) transformed with pET-21-asp-AT; lane 3, the Asp-AT purified by affinity chromatography using the Ni-charged HisBind Resin.

법으로 조단백질을 추출한 결과 효소 활성도가 어느 경우에서든지 0.05 U/mg protein 이하로 측정되어 inclusion body가 생성되는 것으로 판단되었다. 따라서 균체는 24°C의 조건에서 50 rpm의 속도로 균주를 배양하였으며 이러한 조건에서 용해성 단백질을 얻어냈다. 용해성 Asp-AT의 순수 분리는 단백질에 재조합 형태로 부착된 6개의 histidine 잔기의 도움으로 affinity chromatography로 비교적 쉽게 분리되었다. 초음파 처리에 의한 세포 파쇄법으로 얻은 조단백질(specific activity; 0.13 U/mg protein)을 사용하여 친화 크로마토그래피로 분리한 Asp-AT (specific activity; 49 U/mg protein)는 약 370배 가량의 specific activity 증진 효과를 나타내었다.

Affinity chromatography 를 통하여 효소 활성도가 가장 높은 분획을 환원제인 β -mercaptoethanol 을 처리하여 전기영동을 시도하였으며 약 43 kDa의 단일 밴드를 나타내고 있다(Fig. 1). 또한 같은 band가 Asp-AT 유전자가 삽입된 경우와 그렇지 않은 경우의 조단백질에서 분명하게 비교되어 43 kDa의 밴드가 삽입된 Asp-AT 유전자의 발현 단백질을 알 수 있었다. 이러한 분자량은 Asp-AT의 ORF로부터 유추한 분자량과 상당히 근접한 것으로 보아 단백질 구조가 monomer로 형성된 것으로 추정된다. 한편 식물체의 Asp-AT는 이보다 훨씬 큰 80-155 kDa 정도의 Asp-AT가 보고되고 있어[Ryan 등, 1972; Turano 등, 1990; Taniguchi 등, 1995] Xoo의 효소와 분자량에서 큰 차이를 보이고 있다. Fungus의 일종인 *Phanerochaete chrysosporium*에서 분리한 두 종류의 Asp-AT의 경우 110 및 160 kDa의 분자량을 보여[Pireaux 등, 1995] 본 실험에서 분리한 효소와 역시 큰 차이를 나타내고 있다. *Bacillus*에서 분리된 Asp-AT의 경우는 분자량은 42 kDa으로[Sung 등, 1990] Xoo의 효소와 분자량은 거의 비슷하나 dimer 형태로 존재하는 점이 다르다. 현재까지 보고된 여러 Asp-AT 들은 대부분 dimer의 형태를 보이는 경우가 많았다. 그러나 콩과의 *Glycine max* 종자에서 분리한 Asp-AT는 monomer의 구조에 분자량 약 42 kDa

Table 1. Activity of purified asp-AT for different amino acids with a ketoglutarate as an amino acceptor. Asp-AT activity was assayed in the presence of different substrates and assayed under standard assay condition

| Amino donor | Relative activity (%) |
|-----------------|-----------------------|
| L-Aspartate | 100.0 |
| L-Cysteine | 21.8 |
| L-Leucine | 18.4 |
| L-Methionine | 9.7 |
| L-Threonine | 9.5 |
| L-Glutamic acid | 10.4 |
| L-Proline | 4.9 |
| Glycine | 3.9 |
| L-Valine | 7.1 |
| L-Phenylalanine | <1.0 |
| L-Tyrosine | <1.0 |
| L-Tryptophan | <1.0 |
| L-Isoleucine | 4.5 |
| L-Glutamine | 2.9 |
| L-Serine | 3.2 |
| L-Arginine | 2.8 |
| L-Lysine | 5.1 |

을 나타내고 있으며[Stephens 등, 1998] *Lerishmania mexicana*에서 분리된 Asp-AT의 경우도 45 kDa의 분자량에 monomer 구조를 이루고 있어[Vernal 등, 1998] 본 실험에서 분리한 Xoo의 효소와 상당히 비슷한 결과를 보여주고 있다. 결론적으로 Asp-AT의 분자량 및 subunit 형태가 생물체의 종에 따라 큰 차이를 나타내고 있는 것으로 판단된다.

기질 특이성 실험. 분리된 단백질의 기질 특이성을 시험하기 위하여 Asp-AT를 서로 다른 L형 아미노산을 기질로 하여 효소 반응을 시킨 후 효소 활성도를 비교하여 보았다(Table 1). 최대의 효소 활성도는 L-aspartate를 사용하였을 때 나타났으며 다른 아미노산보다 효소 활성도의 차이가 크게 나타나고 있어 본 실험에서 분리한 효소가 Asp-AT임을 확인할 수 있었다. L-leucine 또는 L-cysteine에 대하여서도 어느 정도의 효소활성을 나타내어 대조구 대비 18.4 및 14.6%의 효소 활성도를 각각 나타내고 있다. 분리된 효소는 L-phenylalanine, L-tyrosine 및 L-tryptophan 등 방향족 아미노산에 대하여서는 매우 낮은 효소 활성도를 나타내었는데 이와 같은 결과는 *Bacillus*에서 분리한 효소[Sung 등, 1990]와 비슷한 결과를 보이고 있다. 한편 *Leishmania mexicana*에서 분리한 효소는 광범위한 기질 특이성을 나타내고 phenylalanine 및 tryptophan에 대하여 상당한 효소 활성도를 나타내[Vernal 등, 1998] Xoo의 효소와 다른 결과를 보이고 있다. 일반적으로 미생물에서 분리한 aminotransferase는 광범위한 효소 활성을 보이는 경우가 많은 것으로 알려지고 있으나[Review, Hwang 등, 2005] 본 실험에서 분리한 Asp-AT는 비교적 좁은 범위의 기질 특이성을 나타내고 있다. 한편 본 실험에서 분리한 Asp-AT와 마찬가지로 *Bacillus*의 asp-AT도 L-aspartate 이외에도 L-cysteine에도 상당한 효소 반응을 보이고 있어 본 실험과 비슷한 결과를 보여주고 있다[Sung 등, 1990].

최적 pH 및 pH 안정성. Asp-AT의 활성도에 미치는 pH 효

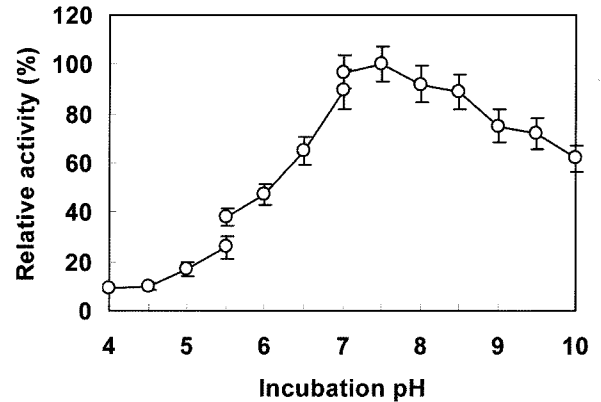


Fig. 2. pH effect on the asp-AT activity of *X. oryzae*. The reaction mixture consisted of Tris-HCl (pH 7.0, 100), 5 mM L-aspartate, 4 mM α -ketoglutarate, 150 μ M NADH, 0.4 μ M MDH (9.0 U/mL of assay volume) and appropriate amount of the purified enzyme. Maximum activity was considered as 100% activity, equivalent to 45.3 μ g protein. Each point represents the average of three experiments.

과를 시험하기 위하여 pH 4.0에서 9.0까지의 서로 다른 pH 조건에서 효소 활성도를 측정하였다(Fig. 2). 최적 활성도는 pH 7.5 근처에서 나타났으며 pH 10.0의 조건에서도 여전히 최대 활성도의 62%를 보였다. 약산성인 pH 6.0에서는 47%의 효소 활성도를 나타내었고 pH 4.0에서는 매우 낮은 효소 활성도를 나타내고 있다. 이와 같이 전체적으로 볼 때 산성 pH 보다는 약 알칼리성 pH 조건에서 보다 높은 효소 활성도를 나타내었으며 이러한 결과는 일부 *Bacillus*의 Asp-AT와 비슷한 결과를 보이고 있다[Sung 등, 1990]. 또한 fungus의 일종인 *Leptosphaeria michotii*의 Asp-AT는 pH 7.5 근처에서 최적 활성을 나타내는 것으로 보고되어[Romestant 등, 1989] 본 실험에서 분리한 asp-AT와 상당히 일치된 특성을 나타내고 있다. 한편 식물체의 콩과 종류인 *glycine max*의 Asp-AT의 경우는 상당히 알칼리 조건인 pH 8.5-10.5 정도에서 최적 활성도를 나타내는 것으로 보고된 바가 있다[Stephens 등 1998]. 한편 일부의 Asp-AT는 매우 적은 범위의 최적 pH 범위를 나타내어[Reynold 등, 1981; Griffith 등, 1989; Turano 등, 1990; Yagi 등, 1993] 비교적 넓은 범위의 최적 pH를 나타내는 *X.oryzae*의 asp-AT와 비교되고 있다.

Asp-AT의 안정성에 미치는 pH의 효과를 여러 pH 범위에서 조사하였는데 비교적 충분한 시간인 8시간 동안의 처리 이후 표준 효소 활성도 측정법으로 활성도를 조사한 결과가 Fig. 3과 같다. Asp-AT의 잔여 활성도는 전반적으로 산성 pH 보다는 알칼리성 pH에서 상당히 높게 나오고 있다. pH 8.0에서 Asp-AT가 가장 안정한 것으로 나타나고 있으며 pH 10.0에서도 최대 활성도의 81%가 나오고 있다. 그렇지만 pH 5.0으로 처리한 경우에는 최대 활성도의 48% 가량만이 나타나고 있다. 이렇게 알칼리 조건에서의 우수한 효소 안정성은 Xoo로부터 분리한 Asp-AT가 알칼리 조건이 요구되는 효소 반응에서 사용하기에 적합할 것으로 추측되고 있다.

최적 온도 및 열 안정성. 분리된 Asp-AT의 최적 효소 활성 온도를 시험하기 위하여 표준 효소 활성도 측정 조건에서 온도만 다르게 효소 활성을 측정하였다(Fig. 4). Asp-AT는 35°C에

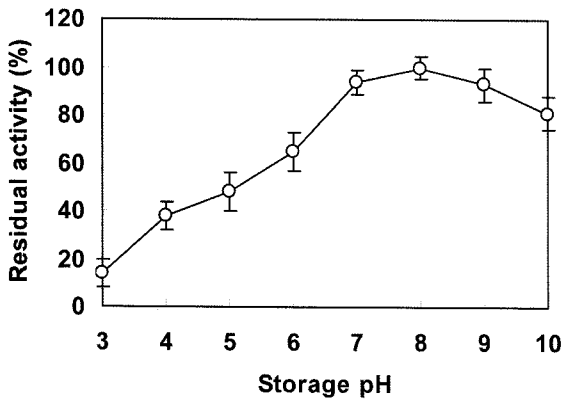


Fig. 3. pH stability of the purified asp-AT. The Asp-AT preparation was suspended in different buffers having pH ranges from 3.0 to 10.0; 50 mM citrate phosphate buffer for pH 3.0-5.0, potassium phosphate buffer for pH 6.0-7.0, and Tris-HCl buffer for pH 8.0-10.0. After 4 h standing, an aliquot was withdrawn, and the Asp-AT activity was measured at pH 8.0 under the standard assay condition. Maximum activity, at pH 8.0, was considered as 100% activity equivalent to 37.9 units/mg protein. Each point represents the average of three experiments.

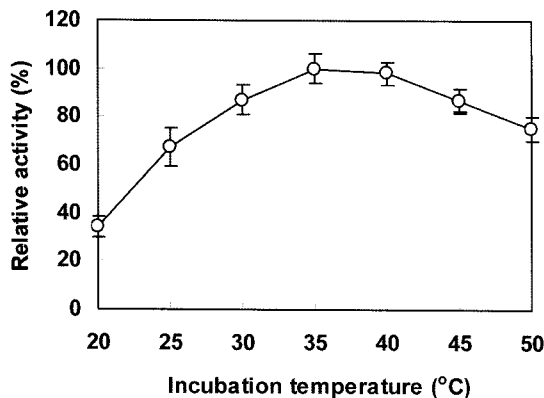


Fig. 4. Effect of temperature on the asp-AT activity of *X. oryzae*. The Asp-AT activity was measured at different temperatures under the standard assay condition. The maximum activity was observed at 35°C, thus this activity was considered as 100% activity, which was equivalent to 36.4 U/mg protein. Each point represents the average of three experiments.

서 최적 활성도를 나타내었고 비교적 넓은 범위의 온도에서 상당히 높은 효소 활성도를 나타내었다. 최적 온도보다 훨씬 높은 50°C의 온도 조건에서도 최대 활성도의 약 75%의 효소 활성도를 나타내었으며 25°C의 온도 조건에서는 약 65%의 효소 활성도를 나타내었다. 분리된 효소의 열 안정성은 효소를 55°C 또는 70°C에 일정시간 동안 보존한 다음 잔여 활성도를 측정하는 방법으로 실험하였다(Fig. 5). 20분 동안의 열처리 이후 55°C 및 70°C의 온도 처리에 대한 잔여 활성도는 각각 78% 및 64%의 활성도를 나타내었다. 그러나 30분 동안의 열처리 이후에는 각각 55 및 34%의 잔여 활성도를 나타내었다.

Asp-AT의 활성도에 미치는 양이온 효과. Asp-AT에 대하여 여러 종류의 2가 양이온(0.2 및 1.0 mM) 존재하에서 효소 활성도를 측정된 결과는 Table 2와 같다. 여러 2가 양이온 중에서 Mn²⁺은 효소활성을 상당히 높이는 효과를 나타내었는데 대조구에 비하여 125 및 157%(각각 0.2 및 1.0 mM)의 효소 활성도

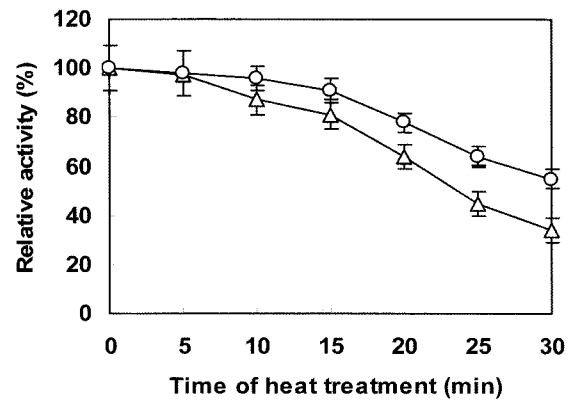


Fig. 5. Heat stability of the asp-AT from *X. oryzae*. The enzyme preparations were heat-treated at 55 (-○-) or 70°C (-△-), and each aliquot was withdrawn at an interval of 5 min. The residual activity was then assayed under the standard assay condition. The initial activity (the activity without heat treatment) was considered as 100% activity, which was equivalent to 35.0 U/mg protein. Each point represents the average of three experiments.

Table 2. Effect of divalent cations on the activity of the purified asp-AT. The enzyme reaction mixtures were added with divalent cations and assay was performed under standard assay condition

| | Relative activity (%) | |
|------------------|-----------------------|---------------|
| | 0.2 mM | 0.2 mM 1.0 mM |
| Control | 100 | 100 |
| Ca ²⁺ | 105 | 114 |
| Co ²⁺ | 78 | 67 |
| Mg ²⁺ | 124 | 132 |
| Mn ²⁺ | 125 | 157 |
| Zn ²⁺ | 97 | 78 |
| Cu ²⁺ | 84 | 74 |

를 나타내었다. Mg²⁺ 이온도 어느 정도의 효소 활성 촉진 현상을 나타내었으며 Co²⁺, Zn²⁺ 또는 Cu²⁺ 이온은 오히려 효소 활성을 억제하는 현상을 나타내었다. Mn²⁺에 의한 효소 활성촉진은 *Hyalomma dromedarii*[Mohamed 등, 2001] 및 *Lupinus albus*[Martins 등, 2002]에서 분리한 asp-AT와 같은 결과를 나타내고 있다. 한편 *Ruditapes philippinarum*의 효소는 Cu²⁺ 이온에 의해 저해 받지 않아서[Blasco 등, 1999] 본 실험에 사용된 Xoo의 Asp-AT와 상반된 결과를 나타내고 있다.

초 록

Xoo로부터 aspartate aminotransferase로 추정되는 유전자를 분리한 다음 발현시켜 생화학 특성을 조사하였다. 분리된 유전자는 His6 pET-21(a) 운반체에 삽입시켰으며 *E. coli* BL21(DE3)에서 발현시켰다. 재조합된 Asp-AT는 affinity chromatography를 이용하여 분리하였으며 SDS-PAGE 분석에서 43 kDa의 단일 밴드를 나타내었다. 분리된 효소는 amino donor로서 L-aspartate에 대하여 효소활성도가 가장 높았고, L-leucine 및 L-cysteine에 대하여도 상당한 활성도를 나타내었다. 효소의 최적 pH는 약 7.5 근처에서 나타났고 효소의 안정성은 산성조건 보다는 알칼리 조건에서 훨씬 높았다. 최적 온도는 약

35-40°C로 나타났고 55°C에서 20분간 열처리한 이후의 잔여 활성도는 약 78%로 나타났다. 여러 중금속 중에서 망간 이온에 의해 효소활성이 촉진되었다.

Key words: *aspartate aminotransferase*, *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*

참고문헌

- Ager DJ and Fotheringham IG (2001) Methods for the synthesis of unnatural amino acids. *Curr Opin Drug Discov* **4**, 800-807.
- Birolò L, Piazz FD, Pucci P, and Marino G (2002) Structural characterization of the M partly folded intermediate of wild type and P138A aspartate aminotransferase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**, 17428-17437.
- Birolò L, Tutino L, Fontanella B, Gerday C, Mainolfi K, Pascarella S, Sannia G, Vinci F, and Marino G (2000) Aspartate aminotransferase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125. *Eur J Biochem* **267**, 2790-2802.
- Blasco J and Puppo J (1999) Effect of heavy metals (Cu, Cd and Pb) on aspartate and alanine aminotransferase in *Ruditapes philippinarum*. *Comp Biochem Physiol C* **122**, 253-263.
- Bartsch K, Schneider R, and Schulz A (1996) Stereospecific production of the herbicide phosphinothricin (gulfosinate); Purification of aspartate transaminase from *Bacillus stearothermophilus*, cloning of the corresponding gene, aspC and application in a coupled transaminase process. *Appl Environ Microbiol* **62**, 3794-3799.
- Bradford MM (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Chao YP, Lai ZJ, Chen P, and Chern JT (1999) Enhanced conversion rate of L-phenylalanine by coupling reactions of aminotransferases and phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Escherichia coli* K-12. *Biotechnol Prog* **15**, 453-458.
- Givan CV (1980) Aminotransferases in higher plants. In *The Biochemistry of Plants Vol. 5*, Stumpf PK and Conn EE (eds.), pp. 329-357. Academic Press, New York, NY, U.S.A.
- Griffith SM and Vance CP (1989) Aspartate aminotransferase in alfalfa root nodules: purification and partial characterization. *Plant Physiol* **90**, 1622-1629.
- Hwang BY, Cho BK, Yun HD, Koteswar K, and Kim BG (2005) Revisit of aminotransferase in the genomic era and its application to biocatalysis. *J Mol Catal* **37**, 47-55.
- Ireland RJ and Joy KW (1985) Plant transaminases. In *Transaminases*, Christen P and Metzler DE (eds.), pp. 376-384. Wiley, New York, NY, U.S.A.
- Juretic N, Mattes U, Ziak M, Christen P, and Jaussi R (1990) Structure of the genes of two homologous intracellularly heterotropic isoenzymes: Cytosolic and mitochondrial aspartate aminotransferase of chicken. *Eur J Biochem* **192**, 119-126.
- Kim HY, NaKaoka M, Yagi M, Ashida H, Hamada K, Shibata H, and Sawa Y (2003) Cloning, structural analysis and expression of the gene encoding aspartate aminotransferase from the thermophilic cyanobacterium *Phoromidium lapideum*. *J Biosci Bioeng* **4**, 421-424.
- Kochkina VM, Korolev SV, and Kuzin AP (1995) Alteration of coenzyme conformation in the complex of aspartate aminotransferase with D-aspartate. *Mol Biol* **29**, 694-696.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Martins MLL, Mourato MPF, and Mendonca APA (2002) Characterization of aspartate aminotransferase isoenzymes from Leaves of *Lupinus albus* L. cv *Estoril*. *Biochem Mol Biol* **35**, 220-227.
- Mohamed TM (2001) Purification and characterization of aspartate aminotransferase from developing embryos of the camel tick *Hyalomma dromedarii*. *Exp Appl Acaro* **25**, 231-244.
- Nobe Y, Kawaguchi SI, Ura H, Nakai T, Hirotsu K, Kato R, and Kuramitsu S (1998) The novel substrate recognition mechanism utilized by aspartate aminotransferase of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* HB8. *J Biol Chem* **273**, 29554-29564.
- Obaru K, Nomiyama H, Shimada K, Nagashima F, and Morino Y (1986) Cloning and sequence analysis of mRNA for mouse aspartate aminotransferase isoenzymes. *J Biol Chem* **261**, 16976-16983.
- Patel RN (2000) Microbial/enzymatic synthesis of chiral drug intermediates. *Adv Appl Microbiol* **47**, 33-78.
- Pireaux JC, Hayani W, Chalot M, Botton B, and Dizengremel P (1995) Mitochondria in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*; purification and evidence for a mitochondria isoform of aspartate aminotransferase. *Exp Mycol* **19**, 91-100.
- Reynolds PHS, Boland MJ, and Farnden KJF (1981) Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules: partial purification and properties of the aspartate aminotransferases from lupine nodules. *Arch Biochem Biophys* **209**, 524-533.
- Ryan E, Bodley F, and Fottrell PF (1972) Purification and characterization of aspartate aminotransferase from soybean root nodules and *Rhizobium japonicum*. *Phytochemistry* **11**, 957-963.
- Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T (1989) In *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, (2nd ed.) Cold Spring Harbor laboratory Press, Boston, MA, U.S.A.
- Stewart JD (2001) Dehydrogenase and transaminases in asymmetric synthesis. *Curr Opin Chem Biol* **5**, 120-129.
- Taylor PP, Pantaleone DP, Senkpeil RF, and Fotheringham IG (1998) Novel biosynthetic approaches to the production of unnatural amino acids using transaminases. *Trends Biotechnol* **16**, 412-418.
- Stephens AS, Gebhardt JS, Matthews BF, and Wadsworth GJ (1998) Purification and preliminary characterization of the soybean glyoxysomal aspartate aminotransferase isozyme. *Plant Sci* **139**, 233-242.
- Sung MH, Tanizawa K, Tanaka H, Kuramitsu S, Kagamiyama H, and Soda K (1990) Purification and characterization of thermostable aspartate aminotransferase from a thermophilic *Bacillus* species. *J Bacteriol.* **172**, 1345-1351.
- Turano FJ, Wilson WJ, and Matthews BF (1990) Purification and characterization of aspartate aminotransferase isoenzymes from carrot suspension culture. *Plant Physiol* **92**, 587-594.
- Verleur N, Elgersma Y, Roermund CWT, Tabak HF, Bartsch K,

- Schneider R, and Schulz A (1996) Stereospecific production of the herbicide phosphinothricin (glufosinate): Purification of aspartate transaminase from *Bacillus stearothermophilus*, cloning of the corresponding gene, aspC and application in a coupled transaminase process. *Appl Environ Microbiol* **62**, 3794-3799.
- Vernal J, Cazzulo JJ, and Nowicki C (1998) Isolation and partial characterization of a broad specificity aminotransferase from *Leishmania Mexicana* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* **96**, 83-92.
- Wilkie SE and Warren MJ (1998) Recombinant expression, purification, and characterization of three isoenzymes of aspartate aminotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Exp Pur* **12**, 381-389.
- Wu SP, Liu C, Hwang TS, Chen JT, and Tsai H (1998) Improving the catalytic activity of phenylalanine aminotransferase of *Escherichia coli* by site specific mutation. *NY Acad Sci* **864**, 561-564.
- Yagi T, Sako M, Moriuti S, Shounaka M, Masaki K, and Yamamoto S (1993) Purification and characterization of asmpartate aminotransferase isoenzymes from Rice Bran. *Biosci Biotechnol Biochem* **57**, 2074-2080.