

Bacillus pseudomycoides로 부터 분리된 alanine racemase 유전자의 cysteine 치환 및 생화학적 특성

강한철* · 윤상홍 · 이창묵 · 구본성
농촌진흥청 국립농업과학원 기능성물질개발과

Biochemical Characterization of Cysteine(-) Mutant Alanine Racemase from Bacillus pseudomycoides

Han-Chul Kang*, Sang-Hong Yoon, Chang-Muk Lee, and Bon-Sung Koo

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

Received September 14, 2010; Accepted November 3, 2010

A gene encoding an alanine racemase in *B. pseudomycoides* was cloned and one (Cys316) or both of two cysteines (Cys316 and Cys365) was (were) substituted with alanine. The cysteine (-) alanine racemases were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) using a pET-21 vector. The expressed enzymes were purified through affinity chromatography using 6xHis ligand. The purified enzymes all showed major one bands by SDS-PAGE analysis, corresponding to 46 kDa. The cysteine (-) alanine racemases as well as the wild type enzyme showed alanine racemase activities, indicating that the enzyme is an alanine racemase and the cysteines in the enzyme may not be involved in the catalysis and/or substrate binding. Thermal stabilities of Cys (-) alanine racemases decreased considerably and half-lives were 26 (wild type), 21 (C316A) and 18 min (C316-365A), respectively at 60°C pH 8.0, suggesting that cysteine is considerably contributive to the thermal stability of the alanine racemase.

Key words: alanine racemase, *Bacillus pseudomycoides*, cysteine(-) mutant

서 론

일반적으로 cysteine은 생물체내에서 상당히 많은 종류의 sulfur oxidation 상태를 이룬다. 이러한 예로서 thiols, thiolates, thiyl radicals, disulfides, sulfenic, sulfinic, 및 sulfonic acids, disulfide-s-oxides 및 selenodisulfides 등의 형태로 펩타이드 또는 단백질에서 여러 기능을 수행해낸다. 각각의 cysteine 또는 유도체들은 단백질들의 stability, redox, metal 결합, nucleophilicity 및 효소 반응 등 여러가지 생화학 특성을 나타내게 된다[Niroshini 등, 2003]. Cysteine의 SH 그룹은 세포외에서는 비교적 쉽게 산화가 되고 생체내에서는 글루타치온 등의 항산화 물질에 의해서 산화가 방지된다. 단백질에서 cysteine은 sulfhydryl group이 노출되는 free residual cysteine 또는 산화된 형태인 cystine(disulfide bridge)으로 존재한다. Sulfhydryl

group의 화학 반응성은 pKa(약 8.0)와 연관이 되며 일반적으로 산화 또는 환원 반응을 일으키는 반응성이 낮다[Wood 등, 2003]. 그러나 deprotonation 된 상태(thiolate, RS⁻)에서는 보다 nucleophile하여 protonation된 상태(R-SH) 보다 oxidant에 더 빨리 반응한다. Reactive 형태의 cysteine(RS⁻)은 매우 불안정하며 sulfur 원자는 +6과 -2 사이에서 redox transition 상태로 변할 수 있다[Jacob 등, 2003].

Cysteine의 성질과 관련하여 free residual cysteine이 단백질의 안정성을 떨어뜨린다는 여러 보고가 있다. *Clostridium symbiosum*의 glutamate dehydrogenase[Hamza 등, 2007]와 *Drosophila*의 acetylcholinesterase[Fremaux 등, 2002]의 경우에 free residual cysteine을 제거한 결과 단백질의 열 안정성이 증대되었으며 *E. coli* chorismatylase[Holden 등, 2002]와 bovine serum albumin의 경우에서도 free residual cysteine이 aggregation을 촉진 시키는 것으로 알려졌다[Militello 등, 2003]. *Xenopus laevis*의 superoxide dismutase는 단백질 dimer 사이에 존재하는 free residual cysteine에 의해 안정성이 감소 되었다[Patti 등, 2000]. 한편 이와 반대로 Nagano 등[1999]은 단백질의 통계 분석을 통하여 free residual cysteine은 hydrophilic한

*Corresponding author
Phone: +82-31-299-1694; Fax:+82-31-299-1672
E-mail: hckang09@korea.kr

성질보다는 hydrophobic 성질을 나타내어 Met, Trp, Tyr 등과 더불어 hydrophobic cluster를 이루는 경우가 많다고 보고하였다. 이와 비슷한 논리로 *Aspergillus saitoi*의 1,2- α -mannosidase [Takara 등, 2005] 및 *Neocallimastix patriciarum*의 xalanase [You 등, 2010] 등의 경우 free residual cysteine이 hydrophobic interaction을 형성하여 단백질의 안정화에 기여한다는 보고를 한 바가 있다.

결론적으로 cysteine이 S-S 결합을 형성할 경우에는 이미 널리 알려진 바와 같이 단백질의 안정화에 기여할 수 있다[for review, Netto 등, 2007]. 그러나 S-S 결합에 관여하지 않는 free residual cysteine은 단백질의 산화와 관련되어 aggregation 및 기타 불안정을 촉진시킬 수도 있고 반대로 hydrophobic interaction을 통하여 단백질의 안정화에 기여할 수도 있다. 따라서 free residual cysteine이 단백질의 안정화에 미치는 역할에 대하여는 지속적인 연구가 필요하다. Cysteine이 단백질의 3차원 구조의 안정성 등에 미치는 영향 등의 자료는 단백질의 구조 이해는 물론 단백질의 안정화 증대를 위한 단백질 공학 기술 개발의 기초 자료로 사용할 수도 있다.

NCBI의 data bank 자료에 의하면 *B. pseudomycooides*의 alanine racemase는 cysteine을 두 개만 갖고 있다. 따라서 두개만의 cysteine을 변형시킬 경우 3차원 구조에 미치는 영향도 적을 것으로 추측된다. 따라서 본 실험에서는 *B. pseudomycooides*의 alanine racemase를 모델로 cysteine이 단백질의 안정화에 미치는 영향을 중점적으로 실험하였다. 이 외에도 cysteine을 다른 아미노산으로 치환시킬 경우 이 부위가 효소 활성부위로 작용하는지에 대한 여부도 밝혀낼 수 있는 부차적인 효과까지도 있다. 따라서 *B. pseudomycooides*의 alanine racemase에 존재하는 두개의 cysteine을 치환시켜 발현시킨 다음 정제하여 단백질의 안정화 변화 및 활성부위를 중심으로 연구한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건. 본 실험에 사용된 *B. pseudomycooides* (KACC 12098)는 Korean Agricultural Culture Collection (KACC)에서 분양을 받았다. 균주는 beef extract 1.0 g/L, yeast extract 2.0 g/L, peptone 5.0 g/L 및 NaCl 5.0 g/L로 제조된 배지를 이용하여 배양하였다. *E. coli*는 tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L 및 NaCl 10 g/L으로 조성된 배지에 적당한 농도의 항생제를 투여하여 배양하였다. *E. coli* DH5 α 는 *Bacillus*로부터 분리한 alanine racemase 유전자의 cloning에 이용되었으며 단백질의 발현은 T7 RNA polymerase 유전자를 보유하고 있는 *E. coli* BL21(DE3)를 이용하였다.

Alanine racemase 유전자의 cloning. *B. pseudomycooides*는 30°C에서 150 rpm의 조건으로 24시간 동안 진탕 배양한 후 회수하여 전체의 genomic DNA를 분리하였다. Alanine racemase 유전자(*Abr*)는 NCBI 유전자은행(NCBI accession number, ZP004151017NC, GI228991111)을 참조하여 본 실험에 사용하였다. PCR의 방법으로 alanine racemase 유전자를 분리하기 위하여 sense primer로서 5'-atgagttcgagatatggaaga-3'를 그리고

antisense primer로서 5'-ttgtttcttaatatattcac aac-3'를 이용하였다. 증폭되는 유전자는 발현벡터에서 6xHis 재조합 단백질을 만들기 위하여 stop codon을 제거하도록 프라이머를 구성하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 3분 동안 denaturation, 55°C에서 1분 동안 annealing, 72°C에서 1분 30초 동안 amplification의 과정을 25회 반복하여 수행하였다. 여기에서 얻어진 PCR 산물을 template로 사용하여 N-terminal의 시작 부위에 *NdeI* (adaptor)을 부착하기 위한 2차 PCR을 시도하였다. 이때 sense primer로서 5'-catatgagttcgagatatgga-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 transformation 시켰다. Transformation된 *E. coli*는 ampicillin (100 μ g/mL), isopropyl β -D-thiogalacto-pyranoside (IPTG; 0.5 mM) 및 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside(75 μ g/mL)를 함유하는 고체 배지에서 배양하였다. Alanine racemase 유전자를 함유하는 벡터는 상업용 plasmid 분리 kit(DyneBio, Daejeon, Korea)를 사용하여 분리한 후 DNA sequence 분석을 하였다. 목적 유전자의 삽입이 확인된 벡터는 cysteine 치환을 위한 template로 이용하였다.

Site-directed mutagenesis. Cys316 및 Cys365을 alanine으로 바꾸어주기 위한 site-directed mutagenesis를 시도하였다. Cys316을 Ala으로 치환시키기 위한 primer는 다음과 같으며 mutation된 유전자는 C316A로 명명하였다. Sense primer; 5-tcttggcgctgtgctatggaccagttaa-3, antisense primer; 5-ttaactggctccat agcaacgcgccaaga-3. Site-directed mutagenesis를 위한 PCR은 94°C에서 30초 동안 denaturation, 55°C에서 1분 동안 annealing, 68°C에서 10분 동안 amplification의 과정을 12회 반복하여 수행하였다. Wild type의 alanine racemase를 그대로 갖고 있는 plasmid 및 C316A를 함유한 plasmid들은 *E. coli* DH5 α 에 삽입하여 배양하고 plasmid를 추출하였다. Cys316과 365 두개 모두를 치환하기 위하여 C316A template를 이용하여 C365를 Ala으로 바꾸어 주는 site-directed mutagenesis를 다시 시도하였다. 이때 C365를 Ala으로 치환하기 위하여 sense primer로서 5-ctatgagttcgagttatgctatgctagatcgaa-3을 antisense primer로서 5-ttcgatctagca tagcagtcacttcatag-3을 사용하였다. PCR 및 plasmid 분리는 같은 방식으로 수행하였으며 여기에서 얻어진 유전자는 C316-365A로 명명하였다. 유전자의 치환은 모두 DNA sequence 방법에 의하여 확인하였다.

발현벡터의 구성, 단백질발현 및 추출. 목적하는 유전자가 삽입된 pGEM-Teasy는 *NdeI* 및 *SalI*으로 분해시키고 삽입 유전자를 분리한 다음 역시 같은 제한효소들로 분해시킨 pET-21(a) 운반체에 결합시켰다. 이렇게 만들어진 plasmid는 pET-21-*abr*(wild type), pET-21-*abr*(C316A), 및 pET-21-*abr*(C316-365A)으로 각각 명명하였다. 목적 유전자들이 삽입된 발현벡터들은 *E. coli* BL21(DE3) 세포에 transformation 시킨 후 ampicillin 함유 LB-agar 배지에서 배양하였다. 선발된 colony는 같은 액체 배지에서 A_{600nm}가 0.5가량 될 때까지 배양한 후 충분한 양의 단백질을 얻기 위해 200 mL의 배지에 접종하였다. 두 시간의 추가 배양 이후 1 mM의 IPTG를 첨가하고 25°C에서 100

rpm의 조건으로 단백질을 발현시켰다. 배양된 균체는 원심분리에 의해 회수한 후 완충용액 A(20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 500 mM NaCl, 및 5 mM imidazole)로 씻어냈다. 세포들은 같은 완충액으로 현탁시킨 후 초음파의 방법으로 파쇄 시키고 원심분리(10,000 g, 10 분)의 방법에 의해 상등액을 회수하였다.

친화크로마토그래피에 의한 alanine racemase의 분리. 25 mL의 완충액 A에 녹인 조단백질은 Ni(II)이온으로 charge시킨 His·Bind Resin column(1×10 cm)에 통과시켰다. 컬럼은 완충용액 B(20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 500 mM NaCl, 및 80 mM imidazol)로 씻어냈고 이어서 resin에 결합된 단백질들은 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 회수 하였다. Alanine racemase를 함유하는 단백질 분획은 효소 활성도를 측정하여 확인하였다. 효소 활성도를 갖는 단백질 분획들은 완충용액 C(20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl 및 2 mM EDTA)를 이용하여 4°C에서 12시간 동안 투석시켰다. 이 중에서 효소 활성도가 가장 높은 분획을 이용하여 전기영동 분석 및 각종 생화학 실험을 수행하였다.

Alanine racemase의 효소활성 측정. 효소 활성도를 측정하기 위한 효소 반응은 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 30 mM의 L 또는 D-alanine, 20 μM의 PLP 용액을 이용하였다. 효소 반응은 효소를 첨가하며 시작하였고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 열처리에 의하여 효소반응을 중단시켰다. 이어 얼음에 채워서 냉각시킨 후 원심분리에 의해 침전물을 버렸다. 생성된 D형의 아미노산은 D-amino acid oxidase와 lactate dehydrogenase를 이용하고 L형의 아미노산은 L-alanine dehydrogenase를 이용하여 정량 하였다[Ju 등 2005]. 기질 특이성 실험에서는 여러 종류의 L형 또는 D형의 아미노산을 기질로 사용 하고 pH 8.0의 조건에서 효소 반응을 시켰으며 나머지 효소 반응 조건은 상기의 표준 효소활성 측정법과 동일하였다. 효소 활성도 1 unit은 1분 동안에 1 μmol의 alanine racemase 반응 산물을 생산하는 효소의 양으로 정의하였다.

Thiol specific reagent의 처리. N-ethylmaleimide(NEM)는 K-phosphate (pH 7.0, 50 mM)에 용해시킨 후 즉시 이용하였다. 분리된 단백질 용액에 NEM을 최종 농도 3.0 mM까지 투여한 다음 암흑의 조건으로 25°C에서 20분간 incubation 시킨 후 즉시 효소 활성도를 측정하였다. Dithiothreitol의 경우도 같은 방법으로 효소 용액에 처리한 후 효소 활성도를 측정하였다.

열안정성 및 pH 안정성. Alanine racemase의 열안정성을 실험하기 위하여 분리된 효소를 각각 pH 6.0(Na-phosphate buffer, 50 mM), 7.0 및 8.0(Tris-Cl, 50 mM)에 각각 용해 시켰다. 이어서 60°C의 열처리를 가하며 5분의 간격으로 일정량의 시료를 취하여 4°C에 보관하였다. 시료 채취가 모두 끝난 후 모아진 시료들을 표준 효소활성도 측정의 조건으로 활성도를 측정하였다. pH 변화가 효소의 안정성에 미치는 영향을 실험하기 위하여 분리된 효소 분획을 서로 다른 완충용액에 용해시켰다. pH 5.0-7.0은 Na-phosphate buffer를 pH 8.0-11.0은 Tris-Cl을 사용하였다. 이렇게 서로 다른 완충용액에 녹인 시료는 실내온도(약 25°C)에서 4시간 가량 보존한 후 표준 활성도

측정법으로 pH 8.0에서 잔여 활성도를 측정하였다.

기타 분석 방법. 단백질 농도는 Bradford [1976]의 방법에 준했으며 표준 단백질로 bovine serum albumin을 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 발색하였다.

결과 및 고찰

Alanine racemase의 *E. coli* 내에서의 발현 및 단백질 분리. 발현 벡터에 삽입된 wild 및 cysteine(-) mutant의 alanine racemase 유전자들은 숙주세포로서 *E. coli* BL21(DE3)를 이용하여 단백질을 과량으로 발현시켰다. 일반적인 *E. coli*의 배양조건인 37°C의 조건으로 200 rpm으로 배양하여 조단백질을 추출하고 효소활성도를 측정한 결과 응집체(inclusion body)가 생성되는 것으로 판단되었다. 따라서 균체는 25°C의 조건에서 100 rpm의 속도로 비교적 천천히 배양하였으며 이러한 조건에서 용해성 단백질을 얻을 수 있었다. 용해성 alanine racemase의 순수분리는 단백질에 재조합 형태로 부착된 6개의 histidine 잔기의 도움으로 친화크로마토그래피에 의하여 비교적 쉽게 분리되었다. 분리된 단백질 분획중에서 효소 활성도가 가장 높은 분획들을 β-mercaptoethanol로 처리한 다음 전기영동을 시도하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 wild type, C316A, 및 C316-365A 모두 주요 단일 밴드를 나타내었고 분자량은 약 46 kD으로 나타났다.

Cysteine(-) mutant의 alanine racemase activity. Cysteine을 치환시킨 alanine racemase가 여전히 효소 활성도를 보이는지 여부에 대한 실험을 실시하였다. Table 1에서 보는 바와 같

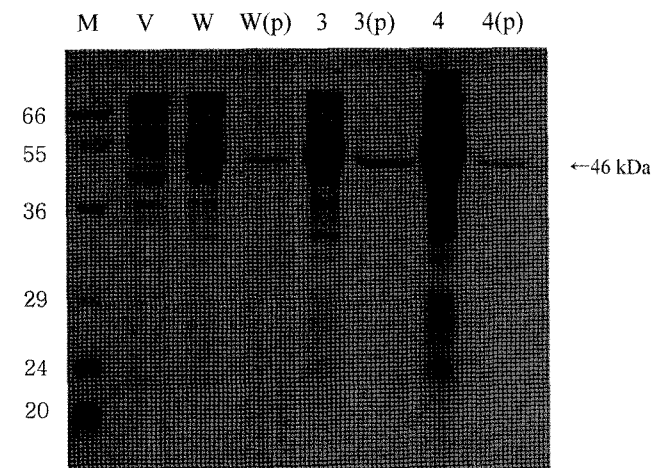


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of wild type or Cysteine(-) mutant alanine racemases from *B. pseudomycoides*. Lane M, molecular mass markers; lane V, crude extract from *E. coli* BL21(DE3) harbouring pET-21 vector without insert gene(i.e., vector control); lane W, crude extract from *E. coli* BL21(DE3) transformed with pET-21-*alr* (i.e., wild type); lane W(p), purified fraction from the sample of lane W; lane 3, crude extract from the *E. coli* transformed with pET-21-*alr*(C316A); lane 3(p), purified fraction from the sample of lane 3; lane 4, crude extract from the *E. coli* transformed with pET-21-*alr*(C316-365A); lane 4(p), purified fraction from the sample of lane 4.

Table 1. Purification of wild and cysteine(-) mutant alanine racemases of *B. pseudomycoloides* by affinity chromatography

	Specific activity (unit/mg protein)	
	Crude extract	Purified fraction
Wild type	1.7	15.6
C316A	2.0	16.2
C316-365A	1.4	13.9

Note: purified fraction은 효소 활성도가 가장 높은 분획을 이용하였다.

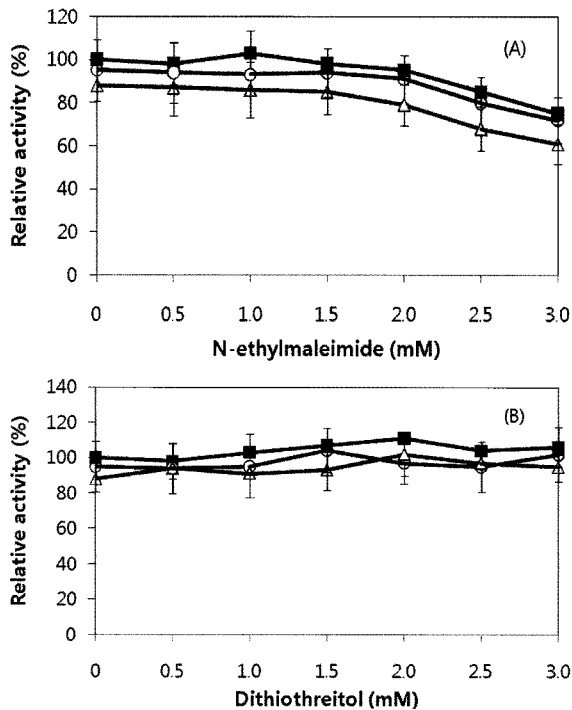


Fig. 2. Alanine racemase activities after treatment with NEM or dithiothreitol. Alanine racemases of wild type (■-), C316A (○-) or C316-365A (△-) were treated with NEM (A) or dithiothreitol (B), then residual activities were tested. One hundred activity was 14.4 unit/mg protein.

이 wild type의 효소활성도는 15.6 unit/mg protein을 나타내며 반하여 C316A와 C316-365A는 각각 16.2 및 13.9 unit/mg protein의 효소활성도를 보여주었다. 이러한 활성도는 야생형에 비하여 cysteine(-) mutant 들이 각각 103.8 및 89.1%의 효소활성도를 나타내는 것이다. Wild type에 비하여 효소활성도에서 큰 차이가 없는 것으로 보아 cysteine이 active site에 관련되지 않는 것으로 추측된다.

한편 Smyth 등(1964)에 의해 NEM이 단백질의 cysteine에 특이하게 결합한다는 사실이 밝혀진 후 cysteine이 효소활성부위로 작용하는지에 관한 실험을 할 때 NEM을 사용하는 방법이 많이 이용되었다. 따라서 alanine racemase에 NEM 또는 NEM과는 반대로 thiol을 환원시키는 dithiothreitol을 각각 처리한 다음 효소 활성도를 측정하였다(Fig. 2). 그림에서 보는 바와 같이 NEM을 2.0 mM까지 처리할 경우 효소 활성도는 wild 및 mutant type 모두 큰 변화가 없으며 무처리 대비 각각 95, 84, 및 89%의 효소활성도를 나타내었다. 그러나 NEM의 농도가 2.0 mM 이상일 경우 효소 활성도가 상당히 떨어지고 있다.

Table 2. Comparison of substrate specificities between wild and cysteine(-) mutant alanine racemases from *B. pseudomycoloides*

Amino acids	Relative activity (%)		
	Wild type	C316A	C316-365A
L-alanine	100.0	100.0	100.0
D-alanine	78.1	69.8	70.2
L-serine	3.5	3.2	6.7
D-serine	2.6	0.9	2.6

Note: Other amino acids (L or D form), Lys, Arg, Leu, Asn, Met, Gln, Cys, Val, Glu, Pro, Tyr, Trp, Phe, His, and Ile, showed no detectable activity of racemase. One hundred percent activity was equivalent to 13.6, 14.2 and 11.4 unit/mg protein, respectively.

일반적으로 NEM은 cysteine과의 결합이외에도 amine에 반응할 수가 있다[Smyth 등, 1960]. 따라서 NEM이 고농도로 존재할 때 효소활성도가 떨어지는 것은 이러한 side-effect와 관련되는 것으로 생각된다. 한편 dithiothreitol을 처리하였을 때 wild type의 경우 최대 활성도가 2.0 mM 처리에서 대조구 대비 11%만 올라갔을 뿐이다. 따라서 dithiothreitol에 의해서 효소활성도가 실질적으로 상승한 것으로는 판단되지 않는다. 한편 fungus의 일종인 *Tolypocladium niveum*에서 분리된 alanine racemase의 경우 thiol 환원제인 glutathione, mercaptoethanol 또는 dithiothreitol 등에 의하여 효소활성도가 상승하는 것으로 보고되었고[Hoffmann 등, 1994] *Lactobacillus fermenti*에서 분리된 효소는 β -mercaptoethanol에 의해서는 효소 활성도가 상승하지만 dithiothreitol에 의해서는 감소되는 것으로 보고되었다 [Johnston 등, 1969]. 그러나 이들 단백질의 cysteine이 active site에 관련 되는지의 여부는 이들의 연구결과에서 밝혀내지 못했다. 일반적으로 protein의 surface에 존재하는 cysteine에 의해서 단백질이 비교적 쉽게 aggregation 될 수 있으며 cysteine의 thiol 환원제인 dithiothreitol 또는 β -mercaptoethanol 등에 의해 단백질의 용해도가 증대될 수 있다[Review; Wang 등, 2005; Visschers 등, 2005]. 따라서 본 실험에서의 효소활성도의 경미한 증대는 이러한 thiol specific agent의 효과와 관련되는 것으로 생각된다.

대부분의 bacteria의 alanine racemase는 세포 성장을 위해 지속적으로 발현이 되는 것으로 알려져 왔다[Saito 등, 2007; Zhang 등, 2007]. 바로 이 효소가 peptidoglycan이 세포벽 구성에 필요한 D형의 아미노산을 생합성 하는데 필요한 점에 착안하여 bacteria의 살균제 제조를 위한 성장저해제 표적 단백질로 연구되어 왔다. 따라서 이러한 항균제 표적으로 사용하기 위해서는 효소의 활성부위를 정확히 파악하는 것이 무엇보다도 중요하다. 결론적으로 본 실험 결과를 종합하면 alanine racemase에서 cysteine이 효소의 기질 결합 또는 활성부위에 관여되지 않는 것으로 판단된다.

기질 특이성 실험. 분리된 단백질을 서로 다른 아미노산을 기질로 하여 효소 반응을 시킨 후 효소 활성도를 비교하여 보았다(Table 2). 최대의 효소 활성도는 L-alanine을 사용하였을 때 나타났으며 표준 효소활성도 측정의 방법에서 13.6 unit/mg protein를 나타내었다. 이러한 효소 활성도는 다른 아미노산보다 차이가 크게 나타나고 있어 본 실험에서 분리한 효소가

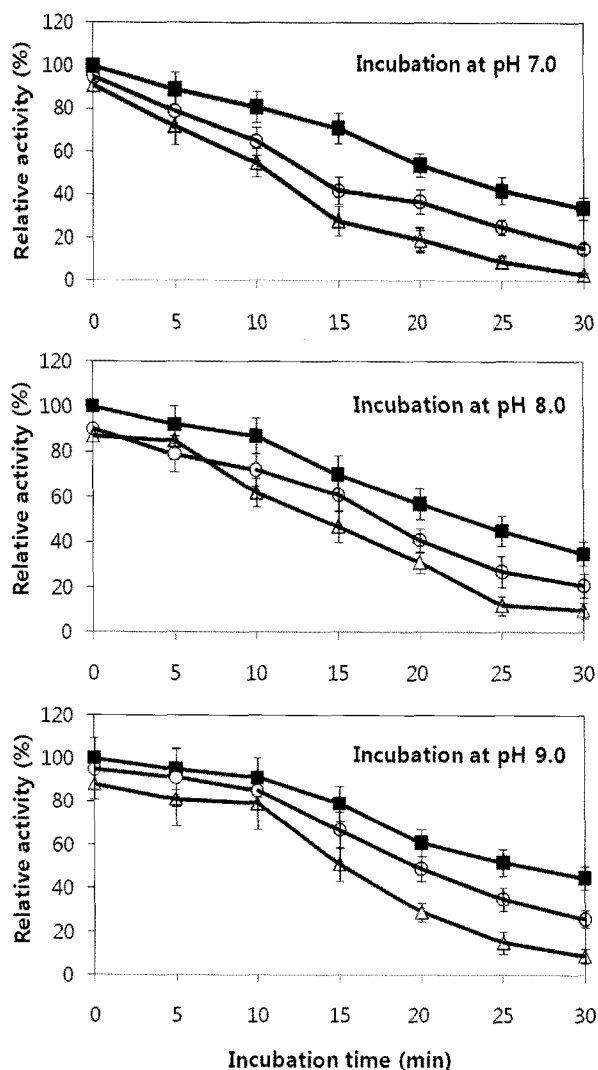


Fig. 3. Thermal stability of the wild type and Cysteine(-) alanine racemases from *B. pseudomycoloides*. The alanine racemases of wild type (■), C316A (○), and C316-365A (△) were heat-treated at 60°C under different pHs. Residual activities were measured under standard assay condition. Maximum activities of wild type at each pH were considered as 100% equivalent to 14.5, 16.3, and 12.4 unit/mg protein, respectively.

alanine racemase 임을 확인할 수 있었다. 한편 L-serine에 대하여는 L-alanine 대비 3.5% 가량의 효소 활성도를 나타내었다. 다른 아미노산인 L-lysine, L-arginine, L-leucine, L-asparagine, L-methionine, L-glutamine, L-serine, L-cysteine, L-valine, L-glutamic acid, L-proline, L-tyrosine, L-tryptophan, L-phenylalanine, L-histidine, L-isoleucine 등에 대하여는 측정 가능한 효소 활성도가 나타나지 않았다. 따라서 cysteine의 치환이 기질의 특이성 변화에 영향을 미치지 않는다는 사실을 알 수 있었다.

Cysteine(-) alanine racemase의 열 안정성. Cysteine 치환 효과가 alanine racemase의 열안정성에 미치는 효과는 일정한 온도를 여러 시간 동안 처리 하는 방법(Fig. 3)과 서로 다른 온도를 일정시간 동안 처리하는 방법(Fig. 4)의 두가지 방식으로 실험하였다. 전자의 방법에 있어서 wild type 및 Cysteine(-) mutant 모두에 대하여 각각 pH 7.0, 8.0 및 9.0의 서로 다른

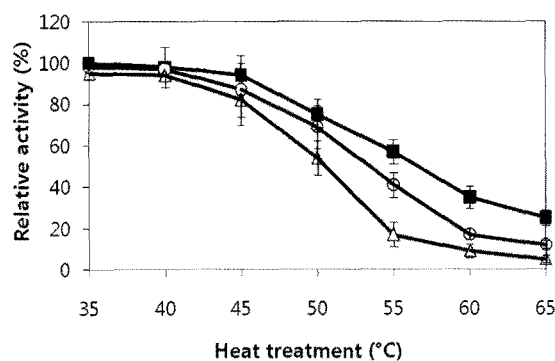


Fig. 4. Thermal stability of the wild type and cysteine(-) alanine racemase from *B. pseudomycoloides*. The alanine racemase of wild type (■), C316A (○), and C316-365A (△) were suspended in Tris-Cl (pH 8.0) comprising 5% glycerol. After heat treatment at different temperature for 20 min, residual activities were measured under standard assay condition. Maximum activity of wild type was considered as 100% equivalent to 13.8 unit/mg protein.

Table 3. Half lives of wild and Cys(-) mutant alanine racemases at 60°C, which were suspended in different buffers. These data were calculated from the results of Fig. 3.

pH	Half-lives (min)		
	Wild type	C316A	C316-365A
pH 7.0	22	14	13
pH 8.0	26	21	18
pH 9.0	23	18	16

조건에서 실험하였다. 서로 다른 pH 모두의 조건에서 cysteine(-) mutant의 alanine racemase는 wild type 보다 열 안정성이 모두 떨어졌다. 본 실험 조건에서 초기 활성도에 비하여 잔여활성도가 절반으로 떨어지는 시간을 half-life(min)으로 정의하여 Fig. 3의 결과를 다시 계산한 결과가 Table 3과 같다. Wild type alanine racemase의 경우 열 안정성은 pH 8.0의 조건에서 활성도 반감시간이 26분으로 가장 길었다. 그러나 이 조건에서 C316A 및 C316-365A mutant 효소의 경우 활성도 반감시간이 각각 21 및 18 분으로 wild type 에 비하여 각각 19% 및 31% 가량 더 짧아졌다. 따라서 cysteine의 치환에 의하여 효소의 열안정성이 상당히 떨어졌다는 사실을 알 수 있었다.

한편 고온의 온도를 일정시간 계속 처리하면 단백질의 aggregation 현상에 의하여 효소 활성도가 변화될 수도 있다. 따라서 Fig. 4의 경우는 고온에서 발생할 수도 있는 단백질간의 응집현상을 최소로 하기 위하여 glycerol 5%를 sample에 첨가한 다음 서로 다른 온도를 처리하여 효소 활성도를 측정하였다. Glycerol이 존재하는 조건에서도 cysteine(-)의 alanine racemase들의 효소 활성도가 wild type 보다 더 떨어지고 있다는 사실을 알 수 있었다. 본 실험조건에서 효소활성도가 절반으로 떨어지는 온도가 wild type의 경우 57°C인 반면에 C316-365A의 경우는 51°C를 나타냈으며 60°C의 열처리 조건에서 잔여활성도는 각각 35 및 9%를 나타내었다. 이러한 실험 조건에서도 cysteine(-) alanine racemase의 열안정성이 보다 더 떨어진다는 사실을 알 수 있었다.

*E. coli*의 tryptophan synthase[Hiraga 등, 1996] 및 aspartate

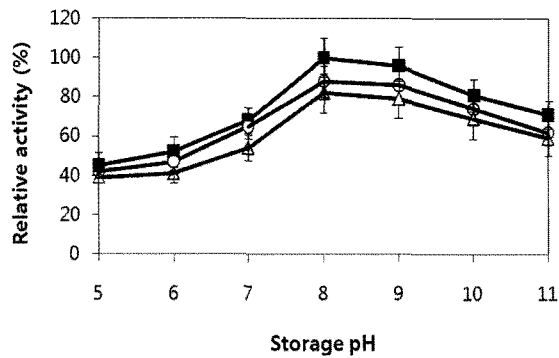


Fig. 5. pH stability of the wild type and cysteine(-) mutant alanine racemases of *B. pseudomycolides*. The wild type (■-), C316A (-○-), and C316-365A (-△-) alanine racemase preparations were suspended in different buffers for 4 h and residual activities were measured under the standard assay condition. The enzyme activity of wild type stored at pH 8.0 was considered as 100% activity which was equivalent to 12.1 unit/mg protein. Each point represents the average of three experiments.

aminotransferase [Gloss 등, 1992], bovine betalactoglobulin [Burova, 등, 1998]의 단백질에서도 free residual cysteine이 단백질의 열 안정화에 기여한다는 보고를 한 바가 있다. 그러나 *Xenopus laevis*의 superoxide dismutase[Bonaccorsi 등, 2000] 및 bovine superoxide dismutase[McRee 등, 1990]등은 단백질의 외부에 노출된 free residual cysteine이 단백질의 열안정성을 떨어뜨린다고 보고하였다. 이와 같이 cysteine이 열안정성에 있어서 서로 반대의 작용을 하고 있는 결과 등이 보고된 사실에 비추어 볼 때 단백질의 3차원 구조와 연관시켜서 보다 지속적으로 연구할 필요가 있다고 생각된다.

Cysteine(-) alanine racemase의 pH 안정성. 서로 다른 pH 조건이 wild type 및 Cysteine(-) mutant alanine racemase들의 안정성 변화에 미치는 실험을 한 결과가 Fig. 5와 같다. Wild type의 alanine racemase의 경우 pH 8.0를 처리하였을 때 잔여 활성도가 가장 높아 12.1 unit/mg protein의 효소 활성도를 나타내었다. C316A 및 C316-365A mutant의 alanine racemase 들도 pH 8.0을 처리하였을 때 최적의 잔여 활성도를 보여 여전히 pH 8.0에서 효소가 안정한 상태를 유지하는 것을 알 수 있었다. pH 7.0의 처리에서는 pH 8.0의 처리에 비하여 활성도가 각각 68(wild type), 73(C316A) 및 65% (C316-365A)를 보여 활성도가 많이 떨어지고 있다. 그러나 wild type과 mutant간에는 큰 차이를 나타내지 않고 있다. 전체적으로 볼 때 wild type과 cysteine(-) type의 alanine racemase는 pH 안정성이 비슷한 성질을 보이는 것으로 판단된다. 따라서 cysteine 치환 mutation이 alalanin racemase의 pH 안정성에는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

초 록

*B. pseudomycolides*로 부터 alanine racemase 유전자를 분리한 다음 이 효소에 존재하는 두개의 cysteine을 하나(C316A) 또는 두개 모두(C316-365A) alanine으로 치환시켰다. 치환된 alanine racemase는 pET-21 운반체에 삽입한 다음 숙주세포로서 *E.*

coli BL21(DE3)를 이용하여 발현시켰다. 발현된 단백질은 6XHis이 결합된 affinity chromatography를 이용하여 분리하였으며 SDS-PAGE 분석에서 모두 약 46 kDa의 주요 단일밴드를 나타내었다. Cysteine(-) 변이체의 alanine racemase가 모두 활성도를 보여 cysteine이 catalytic 또는 binding site에 관여하지 않는 것으로 추정되었다. 변이체 효소들은 wild type에 비하여 열 안정성이 모두 떨어져 60°C pH 8.0에서의 활성도 반감시간이 각각 26(wild type), 21(C316A) 18분(C316-365A)을 나타내었다. 이러한 결과는 cysteine이 열안정화에 상당히 기여함을 알 수 있었다. 그러나 pH 변화에 대한 안정성은 큰 차이가 없었다.

Key words: alanine racemase, *Bacillus pseudomycolides*, cysteine(-) mutant

Acknowledgments This work was supported by National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, KOREA (Grant No. PJ006643).

참고문헌

- 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.
- Bonaccorsi DP, Carri MT, Gabbianelli R, Volpem C, Giartosiom A, Rotilio G, Battistoni A (2000) A free cysteine residue at the dimer interface decreases conformational stability of *Xenopus laevis* copper, zinc superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* **377**, 284-289.
- Burova TV, Choiset Y, Tran V and Haertle T (1998) Role of free Cys121 in stabilization of bovine betalactoglobulin B. *Protein Eng* **11**, 1065-1073.
- Fremaux I, Mazeret S, Brisson-Lougarre A, Arnaud M, Ladurantie C, Fournier D (2002) Improvement of *Drosophila* acetylcholinesterase stability by elimination of a free cysteine. *BMC Biochem* **3**, 21-27.
- Gloss LM, Planas A, and Kirsch JF (1992) Contribution to catalysis and stability of the five cysteines in *Escherichia coli* aspartate aminotransferase: preparation and properties of a cysteine-free enzyme. *Biochemistry* **31**, 32-39.
- Hamza MA and Engel PC (2007) Enhancing long-term thermal stability in mesophilic glutamate dehydrogenase *Clostridium symbiosum* by eliminating cysteine residues. *Enzyme Microb Tech* **41**, 706-710.
- Hiraga K, and Yutani K (1996) Study of cysteine residues in the alpha subunit of *Escherichia coli* tryptophan synthase I. Role in conformational stability. *Protein Eng* **9**, 425-431.
- Hoffmann K, Schneider E, Klein H and Zocher R (1994) Purification and characterization of eukaryotic alanine racemase acting as key enzyme in cyclosporine biosynthesis. *J Biol Chem* **269**, 12710-12714.
- Holden MJ, Mayhew MP, Gallagher DT, Vilker VL (2002) Chorismate lyase: kinetics and engineering for stability. *Biochim Biophys Acta* **1594**, 160-167.
- Jacob C, Giles GI, Giles NM, Sies H (2003) Sulfur and selenium:

- the role of oxidation state in protein structure and function. *Angew. Chem., Int. ed.* **42**, 4742-4758.
- Johnston M and Diven WF (1969) Studies on amino acid racemases. *J Biol Chem* **244**, 5414-5420.
- Ju J, Yokoigawa K, Misono H, and Ohnishi K (2005) Cloning of alanine racemase genes from *Pseudomonas fluorescens* strains and oligomerization states of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng* **100**, 409-417.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- McRee DE, Redford SM, Getzoff ED, Lepock JR, Hallewell RA and Tainer JA (1990) Changes in crystallographic structure and thermostability of a Cu, Zn superoxide dismutase mutant resulting from the removal of a buried cysteine. *J Biol Chem* **265**, 14234-14241.
- Militello V, Vetri V, Leone M (2003) Conformational changes involved in thermal aggregation processes of bovine serum albumin. *Biophys Chem* **105**, 133-141.
- Nagano N, Ota M, Nishikawa K (1999) Strong hydrophobic nature of cysteine residues in proteins. *FEBS Lett* **458**, 69-71.
- Netto LES, Oliveira MA, Monteiro G, Demasi APD, Cussiol JRR, Discola KF, Demasi M, Silva GM, Alves SV, Faria VG, Horta BB (2007) Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. *Comp Biochem Physiol C* **146**, 180-193.
- Niroshini MG, Gregory IG, Claus J (2003) Multiple roles of cysteine in biocatalysis. *Biochem Biophys Res Commun* **300**, 1-4.
- Patti MC, Carri MT, Gabbianelli R, Gai R, Volpe C, Giartosio A, Rotilio G, and Battistoni A (2000) A free residual cysteine residue at the dimer interface decreases conformational stability of *Xenopus laevis* copper, zinc superoxide dismutase. *Arc Biochem Biophys* **377**, 284-289.
- Saito M, Nishimura K, Hasegawa Y, Shinohara T, Wakabayashi S, Kurihara T, Ishizuka M, and Nagata Y (2007) Alanine racemase from *Helicobacter pylori* NCTC11637. *Life Sci* **80**, 788-794.
- Smyth DG, Nagamatsu A, and Fruton JS (1960) Some reactions of N-ethylmaleimide. *J Am Chem Soc* **82**, 4600-4604.
- Smyth DG, Blumenfeld OO, and Konigsberg W (1964) Reactions of N-ethylmaleimide with peptides and amino acids. *Biochem J* **91**, 589-564.
- Takara Y, Yoshida T and Ichishima E (2005) A single free cysteine residue and disulfide bond contribute to the thermostability of *Aspergillus saitoi* 1,2- α -mannosidase. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**, 2101-2108.
- You C, Huang Q, Xue H, Lu H (2010) Potential hydrophobic interaction between two cysteines in interior hydrophobic region improves thermostability of a family 11 xylanase from *Neocallimastix patriciarum*. *Biotechnol Bioeng* **1**, 861-870.
- Visschers RW, Jongh H (2005) Disulphide bond formation in food protein aggregation and gelatin. *Biotechnol Adv* **23**, 75-80.
- Wang W (2005) Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *Int J Pharm* **289**, 1-30.
- Wood ZA, Poole LB, Karplus PA (2003) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* **300**, 650-653.
- Zhang X, Jantama K, Moore JC, Shannugam KT, and Ingram LO (2007) Production of L-alanine by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**, 355-366.