

Staggered Extension Process를 통해 제조한 보리 알파아밀라제 Chimera 효소의 특성

김태집^{1*} · 최승호¹ · 장명운¹ · 박정미¹ · Birte Svensson²

¹충북대학교 식품공학과, ²Department of Systems Biology, Technical University of Denmark

Enzymatic Properties of Barley α -Amylase Chimeric Enzymes Produced by Staggered Extension Process. Kim, Tae-Jip^{1*}, Seung-Ho Choi¹, Myoung-Uoon Jang¹, Jung-Mi Park¹, and Birte Svensson².

¹Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea,

²Department of Systems Biology, Technical University of Denmark, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark – Barley

malt produces two different α -amylase isozymes (AMY1 and AMY2), which share up to 80% of amino acid sequence identity with each other. However, their enzymatic properties differ remarkably. In this study, five chimeric enzymes between AMY1 and 2 were constructed by staggered extension process (StEP) technique, and their enzymatic properties were characterized. According to the results, chimeric AMY-D2, D8, and E12 showed the mixed or intermediate types of calcium-dependent activity between AMY1 and 2. Meanwhile, only AMY-E10 chimera could be significantly inhibited by barley α -amylase/subtilisin inhibitor (BASI) protein. Chimera AMY-C6 showed the same calcium-dependency as AMY1, while AMY-E10 was closely similar to AMY2. As a result, it can be proposed that some amino acid residues in the region II, III, and IV of barley α -amylases can play very important roles in the interaction with BASI, and those in III, V, VI, and VII may partly affect on the calcium-dependent activity.

Key words: Barley α -amylase isozymes, staggered extension process(StEP), chimeric enzymes, calcium-dependent activity, *Pichia pastoris*

서 론

보리 맥아에서 발견된 두 종류의 알파아밀라제(α -amylase; EC 3.2.1.1) 동질효소 AMY1 및 AMY2는 80%에 달하는 높은 아미노산 서열 상동성을 보이지만, 효소활성, pH 안정성, 등전점(pI) 등의 물리·화학적 특성이 서로 크게 다르다 [3, 11, 18]. 일반적으로 동물, 식물 등의 진핵세포 및 각종 세균류 등의 원핵세포에 널리 분포하는 알파아밀라제는 전분의 효소적 액화공정에서 핵심적인 효소로 사용되는 등 그 활용도가 매우 높아 산업적으로도 많은 관심을 끌고 있다[5].

특히 본 연구에서 사용된 보리 아밀라제 동질효소 중 낮은 등전점(4.7~4.9)을 가지는 AMY1의 경우, 1 mM 이하의 낮은 칼슘이온 농도에서 최대의 가수분해 활성을 나타내는 반면, AMY2 효소(등전점 5.9~6.1)는 15~20 mM의 칼슘 조건에서 최대의 활성을 보이므로, 이들 간의 상호 비교를 통해 전분 액화효소로 널리 알려진 아밀라제의 칼슘이온 의존성을 규명할 수 있을 것으로 기대한다. 또한 보리에서 유래한 아밀라제-저해 단백질의 일종인 barley α -amylase/sub-

tilisin inhibitor(BASI)[20]는 AMY2 효소에만 특이적으로 결합하여 전분 분해활성을 저해하므로[10, 14], 단백질 상호작용에서 구조·기능의 상관관계를 연구하는데 매우 유용한 모델시스템이 될 수 있다.

Juge 등[8]은 *Saccharomyces cerevisiae*의 yeast hybrid 시스템을 활용하여 보리 아밀라제 동질효소의 chimera 효소를 제조하고 그 특성을 확인하고자 시도하였으나, 얻어진 chimera 효소의 종류가 매우 제한적이었으므로, 효율적인 분석이 이루어지지 못했다. 그 외에도 특정 아미노산 잔기의 돌연변이를 통한 특성의 변화를 관찰하는 연구[1, 13, 17]들이 시도되었으나, 두 동질효소 간의 전체적인 효소특성 변화를 비교하기에는 한계가 있었다.

특히 이처럼 1차 구조의 상동성이 높은 유전자 간의 연관성을 연구하기 위하여 최신 유전자조작 기술을 활용한 다각적인 접근이 시도 되고 있는데, 특히 Stemmer[19]가 DNA shuffling 기술을 처음 보고한 이후, 유전자를 효율적으로 조합하기 위해 staggered extension process(StEP)[24], degenerate oligonucleotide gene shuffling(DOGS)[6] 등의 다양한 분자진화(molecular evolution)적 기술이 개발되었다. 본 연구에서는 보리 아밀라제 동질효소 간의 높은 상동성을 고려하여 StEP 법을 사용해 다양한 chimera 효소들을 제조하고, 그 효소특성을 조사하였다.

*Corresponding author

Tel: 82-43-261-3354, Fax: 82-43-271-4412

E-mail: tjkim@cnu.ac.kr

또한 이들 효소는 대장균에서 거의 발현되지 않고, 효모의 일종인 *Pichia* 균주에서 비교적 발현도가 높은 것으로 알려졌다[7, 23], 본 연구에서는 각 동질효소의 1차 및 3차 구조의 상동성을 기반으로 총 5종의 chimera 효소들을 제조하였으며, *P. pastoris* 균에서 대량발현 및 분리·정제 한 후에 이들 돌연변이 효소의 칼슘이온 의존성 등을 비교하여 동질효소 상호 간의 차이를 유발하는 주요 인자에 대한 정보를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

연구에 사용된 일반 시약류 및 미생물 배양용 배지는 각각 Sigma-Aldrich(USA)와 Duchefa Biochemie(Netherlands)로부터 구입하여 사용하였다. 유전자 조작을 위한 제한효소는 Takara Biomedical(Japan)에서 구입하였으며, 각종 primer는 Bioneer(Korea)로부터 합성하였다. 기질특이성 분석을 위해 사용한 insoluble blue starch(IFS)는 Amersham Biosciences(USA)에서 구입하였으며, 단백질 정량분석은 BCA™ protein assay kit(Pierce Biotechnology, USA)를 이용하였다. 보리 유래의 아밀라제-저해 단백질인 BASI는 덴마크의 칼스버그 연구소(Carlsberg Laboratory)에서 정제된 형태로 제공 받아 사용하였다.

알파아밀라제 chimera 효소의 제조

보리 아밀라제 유전자를 대량발현하기 위하여, AMY1 및 AMY2 유전자를 포함하는 각각의 cDNA 클론 pBAL7과 pBAH15[21]를 주형으로 하여 PCR을 실시하였다. AMY1

효소 유전자의 증폭을 위해서는 AMYN(5'-TTTGGATCC ATGGGGAAGAACGGC-3')과 AMY1C(5'-TTTGAATTC AGTGCAGACTTCAGCTCC-3') 프라이머를 사용하였고, AMY2 효소 유전자의 경우 AMYN 및 AMY2C(5'-AAA GAATTCATATTTCTCCCAAACGGCTTAGTC-3') 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 우선 95°C에서 5분간 가열하여 DNA를 분리시킨 후, 다시 짧은 시간의 유전자 증폭반응(94°C에서 30초, 55°C 5초)을 80회 반복하여 준비된 프라이머가 서로 다른 플라스미드 주형에 교대로 결합, 증폭 및 분리 과정을 반복할 수 있도록 조절하였다. 증폭된 약 1.3 kb의 보리 아밀라제 유전자는 *Bam*HI와 *Eco*RI 제한효소로 처리한 후, pPIC3K 발현벡터(Invitrogen, USA)에 삽입하고 *E. coli* MC1061로 형질전환하여 재조합 플라스미드를 얻었다. 이 중 96개의 재조합 플라스미드를 임의로 선정하여 염기서열을 결정하였으며, 그 서열을 비교하여 총 5종의 chimera를 선발하였다. 이처럼 제조된 플라스미드를 *Bgl*II로 절단하여 선형으로 만든 후에 electroporation(2000 V, 25 mF, 200 Ω; GenePulser II, Bio-Rad, USA)법을 이용하여 *P. pastoris* GS115 세포 내로 형질전환 하였다. 올바른 재조합 효모는 histidine을 포함하지 않은 MMS(1.34% Yeast Nitrogen Base, 0.4 mg/mL D-biotin, 0.5% methanol, 1% starch, Invitrogen, USA) 배지 상에서 전분 가수분해 활성이 높은 클론 위주로 선발하였다.

알파아밀라제 효소의 발현 및 정제

Invitrogen사의 프로토콜에 따라 재조합 *Pichia*균주를 BMMY 배지(1.34% YNB, 0.4 mg/mL D-biotin, 0.5% methanol, 1% yeast extract, 2% peptone, 0.1 M potassium

	1	10	20	30	40	50	60
AMY1	HQVLFQGFN	WESWKQSGG	WYNMMGK	VDDIAAAGV	THVWLP	PPPSHSV	SVSNEGYP
		**	**		*	*	***
AMY2	HQVLFQGFN	WESWKHNGG	WYNFLMGK	VDDIAAAGI	THVWLP	PASQSV	VAEQGYMP
							**
	70	80	90	100	110	120	
AMY1	DASKYGNAA	ELKSLIGAL	HGKGVQAI	ADIVINHR	CADYKDS	RGIYCI	FEFGGTS
	***		*	*	*	*	*
AMY2	DASKYGNKA	QLKSLIGAL	HGKGVKAI	ADIVINHR	TAEHKD	GRGIYCI	FEFGGTP
							DA
	130	140	150	160	170	180	
AMY1	PHMICRDD	TKYSDGT	ANLDTG	ADFAAAP	IDHLNDR	VQRELK	EWLLWLK
	**	*	*	*	*	*	*
AMY2	PHMICRDDR	PYADGT	GNPDTG	ADFAAAP	IDHLNLR	VQKELV	EWNWLNK
							ADIGFDG
	190	200	210	220	230	240	
AMY1	FARGYSP	EMAKVY	IDGTS	PSLAVA	EVVDN	MATGGD	GKPNYDQ
	*	***	*	***	*	***	*
AMY2	FAKGSAD	VAKIYID	RSEPSF	AVAEIWT	SLAYGG	DGKPNL	NQDQHRQ
							ELVNWV
	250	260	270	280	290	300	
AMY1	SAGMVFDF	TTKGI	LNAAVE	GELWRL	IDPQK	APGVMG	WPAKAVT
	*	***	*		****	**	
AMY2	PAT-TFDF	TTKGI	LNVAVE	GELWRL	RGTDG	KAPGM	IGWPAK
							AVTFVD
	310	320	330	340	350	360	
AMY1	FPSDKVM	QGYAYI	LTHPGI	PCIFYD	HFFNW	GFKDQI	AAALVA
	*		*	*	*	*	*
AMY2	FPSDRVM	QGYAYI	LTHPGT	PCIFYD	HFFWGL	KKEIDR	LVSVR
							TRRHG
	370	380	390	400	410		
AMY1	GDAYVAE	IDGKV	VVVKIG	SRYD	VGAVI	PAGFVT	SAHGND
	*	*	*	*	*	*	*
AMY2	ADLYLAE	IDGKV	VIVKLG	PRYD	VGNLIP	GGFKV	AAHGND
							YAVWEKI

Fig. 1. Comparison of the primary structures of barley α-amylase isozymes, AMY1 and AMY2. The amino acid residues not identical between isozymes were indicated by the asterisks (*) between amino acid sequences.

phosphate, pH 6.0)에 접종하고, 30°C에서 120시간 동안 진탕 배양한 후, 원심분리하여 균체를 제거하고 상층액을 회수하였다. 회수한 조효소액을 β -cyclodextrin sepharose(Amersham) 컬럼에 통과시킨 후, 25 mM CaCl₂와 200 mM NaCl을 함유한 20 mM sodium acetate buffer로 세척하고, 8 mM의 β -cyclodextrin을 함유한 동일 buffer를 흘리면서 효소를 회수 하였다. 최종적으로 1 mM CaCl₂을 함유한 20 mM MES[2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid] buffer(pH 6.7)에 대해 투석하여 정제된 효소를 얻었으며, 이후의 실험에 사용하였다.

알파아밀라제 효소의 활성 측정

Insoluble blue starch(IFS)에 대한 효소활성은 Matsui 등 [12]의 방법에 따라 측정하였다. 최적반응액(20 mM sodium acetate, 5 mM CaCl₂, pH 5.5)에 12.5 mg/mL의 농도로 IFS를 섞어 기질용액을 제조하였다. 500 μ L의 기질용액, 최적반응액 350 μ L에 적절히 희석한 효소액 150 μ L를 섞고 37°C에서 15분간 반응시킨 후, 250 μ L의 0.5 M NaOH를 첨가하여 반응을 종료하였다. 반응액을 12,000xg에서 10분간 원심분리하여 고형분을 제거하고, 상층액 300 μ L을 취하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 효소의 활성 1 unit은 주어진 조건에서 1분 동안 흡광도 값을 1 만큼 증가시키는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

알파아밀라제 효소의 등전점(pI) 측정

Isoelectric focusing(IEF) 분석을 위해 fast protein liquid chromatography(FPLC, Amersham Biosciences) 시스템과 PhastGel(pI 4.0~6.5, Amersham)을 사용하였다. 전기영동 후, IEF gel을 2%의 soluble potato starch를 함유한 기질용액에 넣고, 30°C에서 30분 이상 충분히 반응시킨 다음, 요오드 발색반응으로 gel 상에서 효소 단백질의 위치를 확인하여 각 효소의 등전점을 결정하였다.

알파아밀라제에 대한 BASI의 저해활성 측정

보리 아밀라제 효소와 BASI 단백질을 적절한 비율로 섞고, 37°C의 최적 반응조건(40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM CaCl₂, 0.05% bovine serum albumin)에서 15분간 미리 반응시킨 후, Nielsen[14] 및 Bønsager 등[4]의 방법에 따라 BIAcore 3000(BIAcore, Sweden)을 이용한 SPR(Surface Plasmon Resonance) 분석 및 chimera 효소와 BASI 간의 저해활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

StEP법에 의한 보리 알파아밀라제 chimera 효소의 제조

서론에서 언급한 바와 같이, 보리에서 유래한 알파아밀라제 AMY1과 AMY2는 각각 414개와 403개의 아미노산으로

이루어진 동질효소로서 약 80%의 높은 아미노산 서열 상동성에도 불구하고, 각각의 효소적 특성은 매우 다르다[3, 12, 16]. 따라서 본 연구에서는 각 동질효소의 효소적 특성을 유발하는 주요 아미노산 잔기에 대한 정보를 제공하기 위해 두 가지 동질효소의 일부분이 조합된 다양한 형태의 chimera 효소를 제조하였다.

우선 StEP 기술[24]에 의한 chimera 효소의 제조를 위해, AMY1 및 AMY2 유전자를 각각 동일한 양으로 섞고 이를 주형으로 PCR 증폭하였다. 단, 일반 PCR과 달리, 중합효소에 의한 증폭시간을 5초 이하로 짧게 반복하여, 두 유전자 주형 간의 교차 증폭이 가능하도록 진행하였다. 증폭된 각각의 chimera 유전자를 pPIC3K 발현벡터 내에 삽입하고, 대장균 내로 형질전환하였다. 얻어진 형질전환체 중 임의로 96종을 선택하여 각각의 염기서열을 확인한 결과, StEP기술에 의해 80% 이상의 클론에 성공적으로 돌연변이가 도입되었음을 확인하였다.

본 연구에서 제조한 각 chimera 효소의 1차 구조와 선행 연구[2]에서 이미 보고한 chimera 효소들을 상호 비교한 후, 칼슘이온 의존성 및 BASI에 의한 저해효과를 확인하기에 적합한 5종의 chimera 효소를 최종적으로 선발하였다(Table 1). 선발된 각 chimera 효소 유전자가 포함된 *P. pastoris*-*E. coli* shuttle vector(pPIC3K)의 플라스미드를 *Pichia* 세포 내로 형질전환하여 원하는 재조합 효모를 얻었다(Fig. 2). 실험 방법에서 제시한 바와 같이 재조합 효모를 액체배양하여 각각의 chimera 효소들을 순수 정제한 후에 효소활성을 측정하여 상호 비교하였다.

Chimera 효소의 등전점 결정

동질효소인 AMY1과 AMY2는 등전점의 차이에 의해 쉽게 구별되는데, AMY1은 4.7~4.9의 낮은 등전점을 가지는 반면, AMY2는 5.9~6.1의 높은 등전점을 가진다[3, 11, 18]. 본 연구에서는 정제된 각 chimera 효소를 IEF 전기영동법의

Table 1. Primary structures of various barley α -amylase chimeras used in this study.

Chimeras	Primary structures of chimeras in detail ¹
AMY11112 ²	I(1~318) : II(319~403)
AMY12221 ²	I(1~90) : II(91~318) : I(319~414)
AMY-C6	I(1~205) : II(206~239) : I(240~318) : II(319~403)
AMY-D2	I(1~239) : II(240~264) : I(265~318) : II(319~403)
AMY-D8	I(1~160) : II(161~205) : I(206~318) : II(319~403)
AMY-E10	I(1~90) : II(91~239) : I(240~295) : II(296~318) : I(319~414)
AMY-E12	I(1~264) : II(265~318) : I(319~414)

¹Roman numbers, I and II, indicate the amino acid residues from AMY1 and AMY2, respectively. Numbers in parentheses correspond to the amino acid residues of AMYs.

²Both reference chimera amylases were previously reported by Bozonnet *et al.* [2].

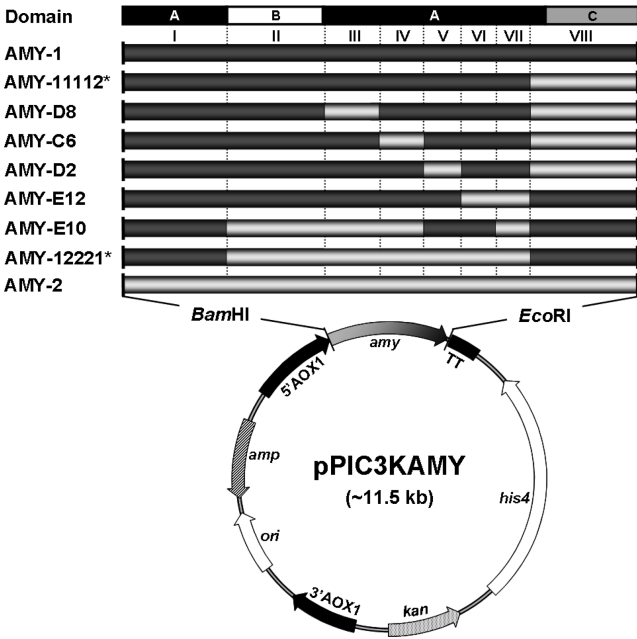


Fig. 2. Construction of barley α -amylase chimeric enzymes by using StEP technique. Domain A, B, and C correspond to those found in three-dimensional structures. PCR-amplified AMY gene derivatives were cloned between *Bam*HI and *Eco*RI restriction enzyme sites of pPIC3K. Chimeras shown with asterisks (*) were previously reported by Bozonnet *et al.* [2] and compared with mutants newly constructed in this study.

로 분리하여 각각의 등전점을 확인하였다(Fig. 3). 아밀라제 효소들은 gel 상에서 각각 1~3개의 밴드가 관찰되었으며, 이는 효소의 post-translational modification에 의해 다양한 형태의 동질효소가 발현되기 때문으로 예상하였다. 이들 서로 다른 밴드의 동질효소 간에 효소활성의 차이가 존재할 수 있으나, 본 연구에서는 종합적인 효소특성과 활성을 위주로 상

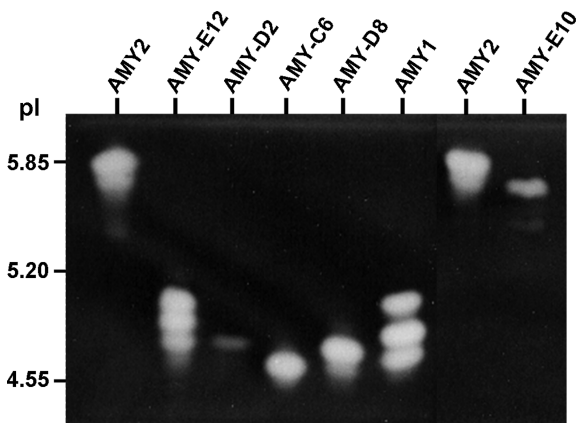


Fig. 3. Determination of isoelectric point (pI) of barley α -amylase chimeras by isoelectric focusing (IEF) and activity staining toward 2% soluble starch substrate. The IEF separation was performed by using Fast Protein Liquid Chromatography system with PhastGel (pI 4~6.5).

호 비교하였다. 그 결과, AMY1은 4.8~5.1, AMY2의 경우는 약 5.8의 등전점을 나타내어 예상한 값과 유사하였으며, 나머지 chimera 효소들의 경우에는 AMY-E10만이 AMY2와 유사한 약 5.8의 등전점을 나타내었고, 나머지 효소들은 약 4.8~5.1의 등전점 분포를 보여 AMY1에 가까운 특성을 보였다. 결과적으로 입체구조 상의 domain B 부분을 포함하는 제 II 부위가 높은 등전점의 형성에 매우 중요한 역할을 담당하는 것으로 판단하였다.

Chimera 효소에 대한 BASI의 저해효과

약 80% 이상의 높은 아미노산 서열 상동성을 가지고 단백질의 입체구조 또한 매우 유사한 두 가지 동질효소[9, 15] 중, AMY2만이 아밀라제-저해 단백질인 BASI[22]와 결합하며, 그로 인해 효소의 활성이 저해된다[14, 16]. 따라서 본 연구에서 얻어진 각종 chimera 효소들에 대한 BASI의 저해효과를 SPR과 효소활성 측정법에 의해 분석하였다. 결과적으로 AMY-E10만이 약 0.51 nM의 K_i 값을 나타내어, BASI와 결합이 가능함을 확인하였으나, 다른 chimera 효소들은 BASI에 의해 거의 저해되지 않았다.

Bozonnet 등[2]에 의해 보고된 AMY2와 chimera 효소인 AMY12221 효소의 K_i 값이 약 0.28 및 0.44 nM 수준임을 감안할 때, 상대적으로 AMY-E10에 대한 BASI의 저해효과는 다소 감소하였음을 알 수 있었다. 이상의 결과를 종합하면, wild-type AMY2의 BASI 결합특성에는 제 II부위가 가장 중요한 역할을 담당하지만, 그 외에 제 I, V, VI, VII부위도 BASI와의 단백질-단백질 상호작용의 강도에 부분적인 영향을 미침을 확인하였다. 다만 이러한 상호작용에서 단백질의 전체적인 구조가 매우 중요하므로 핵심 아미노산 잔기에 대한 독립적인 연구가 추가로 진행되어야 할 것이다.

CaCl₂ 농도에 따른 아밀라제 활성의 변화

CaCl₂의 첨가량을 0.1 mM에서 50 mM까지 증가시키며, 각 chimera 효소의 insoluble blue starch 기질에 대한 가수분해 활성을 측정하였다. AMY1은 0.1 mM의 칼슘이온 농도에서 최대의 활성을 보였으며, AMY2의 경우는 15 mM 농도에서 가장 높은 활성을 나타내었고, 20 mM 이상의 CaCl₂이 존재할 경우 모든 아밀라제 효소들의 활성은 급격히 감소하였다(Fig. 4).

특히 AMY-C6는 0.5 mM의 칼슘이온 농도에서 최대 활성을 나타내어 유일하게 AMY1과 유사한 특성을 보였고, AMY-E10은 10 mM농도에서 최대 활성을 보여 AMY2 형태에 가까운 chimera 효소로 판단하였다. 한편, 그 외의 chimera 효소들은 최적 칼슘이온 농도가 5.0~7.5 mM에 해당하여, AMY1과 AMY2의 중간적인 특성의 효소로 나타났지만, 0.1 mM의 낮은 칼슘 농도에서의 상대적 활성이 AMY1의 78~91%에 달하여 AMY2 보다는 오히려 AMY1에 가까운 특성을 보였다.

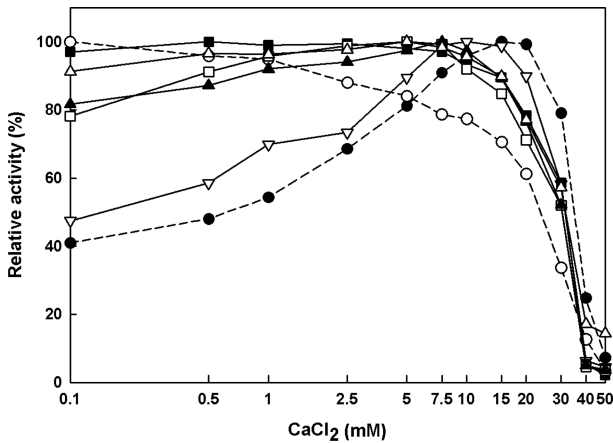


Fig. 4. Calcium-dependent activity of AMY1, AMY2, and their chimeras on insoluble blue starch substrate. Relative activity of AMYs was compared with increase of CaCl₂ concentration. The calcium ion concentration at X-axis is demonstrated by using the logarithmic scale. ○, AMY1; ■, AMY-C6; △, AMY-D2; ▲, AMY-E12; □, AMY-D8; ▽, AMY-E10; ●, AMY2.

Chimera 효소의 특성 비교 및 고찰

본 연구에서는 AMY1 및 AMY2 효소의 특성 차이를 보다 명확히 비교하기 위해, 기존 연구에서 주로 사용하던 최적 칼슘이온 농도의 차이 외에도 0.1 mM 이하의 낮은 칼슘이온 농도에서의 상대적인 효소활성 차이를 새로운 구별의 기준으로 도입하였으며, 이러한 다양한 기준을 함께 반영한 분석 결과를 Table 2에 종합적으로 정리하였다.

*Pichia*에서 발현된 보리 아밀라제의 단위 단백질 당 효소 활성(비활성)은 AMY2가 2,387 U/mg으로 가장 높았고, AMY-D2가 861 U/mg으로 가장 낮았으며, 전체적으로 chimera 효소들은 AMY2와 비교하여 약 2~53% 수준의 가수분해 활성을 나타내었다. AMY-E10과 E12 chimera의 경우, 단순히 최적 활성을 나타내는 CaCl₂의 농도만으로 분류하면 10.0와 7.5 mM로 AMY2와 유사한 칼슘 의존도를 보

였지만, 0.1 mM의 낮은 칼슘이온 농도에서의 활성은 AMY1 대비 약 47%와 82%로 크게 차이를 알 수 있다. 따라서 AMY-E12는 두 동질효소의 중간형 효소이며, AMY-E10은 BASI와도 결합할 뿐 아니라 칼슘 의존성 또한 AMY2와 매우 유사한 chimera라고 할 수 있다.

이상의 결과를 요약하면, AMY1의 제 IV 또는 VIII 부위는 효소의 칼슘 의존성에 큰 영향을 미치지 못하며, 제 III, V, VI 및 VII부위의 치환은 AMY1의 칼슘의존성을 중간형 태로 변화시키는데 기여함을 확인하였다. 또한 BASI와의 결합을 위해서는 AMY2의 제 II, III, IV부위가 중요하며, 구조 상에서 이들 부위가 상호 보완적인 역할을 담당하는 것으로 예상된다. 물론, 이들 두 가지 동질효소의 특성을 좌우하는 핵심 잔기를 보다 명확히 규명하기 위해서는 더욱 세밀하고 다양한 chimera 효소의 제조 및 선별이 필요하지만, 현재까지 보리 아밀라제 효소는 대장균 내에서의 발현도가 극히 낮고, 또 효모에서 발현할 경우 분자진화 기술의 핵심인 대량 선별과정에서 기술적으로 어려움이 있다. 따라서 본 연구팀에서는 이를 해결하기 위한 대장균 발현시스템 개발 등을 지속적으로 진행 중이며, 향후 이를 기반으로 아밀라제 효소의 특성에 대한 비교·분석이 가능해 지면, 핵심 잔기의 역할 및 구조와의 상관관계를 규명할 수 있을 것으로 기대한다.

요 약

보리 맥아로부터 발견된 서로 다른 알파아밀라제 동질효소(AMY1, AMY2)는 80%에 달하는 높은 아미노산 서열의 상동성을 보이지만, 효소적 특성은 서로 매우 다르다. 따라서 본 연구에서는 staggered extension process(StEP) 기술을 이용하여 AMY1과 AMY2 유전자가 조합된 5종의 chimera 효소를 제조하고, 각각의 특성을 비교하여 총 8개 부위(I~VIII)의 영향을 확인하였다. 결과적으로, AMY-D2, D8,

Table 2. Comparison and categorization of various barley α -amylase chimeric enzymes on the basis of their enzymatic characteristics.

Chimeras	Specific activity (U/mg) ¹	Optimal CaCl ₂ (mM)	Relative activity (%) at 0.1 mM CaCl ₂	pI	Type ²
AMY1	1493	0.1	100.0	4.8~5.1	I
AMY11112 ³	1260	0.5	99.4	4.7	I
AMY-C6	1009	0.5	97.0	4.8	I
AMY-D2	861	5.0	91.2	4.9	M
AMY-D8	3333	5.0	78.2	4.9	M
AMY-E10	1824	10.0	47.4	5.7	II
AMY-E12	1429	7.5	81.6	4.9~5.1	M
AMY12221 ³	1536	15.0	34.8	5.8	II
AMY2	2387	15.0	41.0	5.8	II

¹Specific activity of chimeras was determined by using insoluble blue starch assay in the presence of 5 mM of CaCl₂.

²All chimeras are categorized into three different groups of I (AMY1-type), II (AMY2-type), and M (mixed type between AMY1 and 2).

³Both reference chimera amylases were previously reported by Bozonnet *et al.* [2].

E12 chimera 효소의 경우, AMY1과 AMY2의 중간적 칼슘 의존성을 보였으며, BASI(barley α -amylase/subtilisin inhibitor) 단백질에 의한 저해효과는 AMY-E10 효소에서만 관찰되었다. 한편 AMY-C6의 경우, AMY1과 유사한 효소특성을 보였으며, AMY-E10은 AMY2 형태의 칼슘의존성을 나타내었다. 따라서 보리 아밀라제의 제 II, III, IV부위가 BASI와의 상호작용에 중요한 역할을 담당하며, 제 III, V, VI, VII부위는 칼슘의존성에 부분적인 영향을 미치는 것으로 판단하였다.

감사의 글

SPR 분석에 도움을 준 Carlsberg Laboratory의 Peter K. Nielsen박사에게 감사의 뜻을 전합니다. 이 논문은 2005년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(KRF-2005-521-F00055) 결과입니다.

REFERENCES

- Bak-Jensen, K. S., G. André, T. E. Gottschalk, G. Paës, V. Tran, and B. Svensson. 2004. Tyrosine 105 and threonine 212 at outermost substrate binding subsites -6 and +4 control substrate specificity, oligosaccharide cleavage patterns, and multiple binding modes of barley α -amylase 1. *J. Biol. Chem.* **279**: 10093-10102.
- Bozonnet, S., T. J. Kim, B. C. Bønsager, B. Kramhøft, P. K. Nielsen, K. S. Bak-Jensen, and B. Svensson. 2003. Engineering of barley α -amylase. *Biocatal. Biotransfor.* **21**: 209-214.
- Bush, D. S., L. Sticher, R. Van Huystee, D. Wagner, and R. L. Jones. 1989. The calcium requirement for stability and enzymatic activity of two isoforms of barley aleuron α -amylase. *J. Biol. Chem.* **264**: 19392-19398.
- Bønsager, B. C., M. Prætorius-Ibba, P. K. Nielsen, and B. Svensson. 2003. Purification and characterization of the beta-trefoil fold protein barley alpha-amylase/subtilisin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **30**: 185-193.
- Davies, G. and B. Henrissat. 1995. Structure and mechanism of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**: 853-859.
- Gibbs, M. D., K. M. H. Nevalainen, and P. L. Bergquist. 2001. Degenerate oligonucleotide gene shuffling (DOGS): a method for enhancing the frequency of recombination with family shuffling. *Gene* **271**: 13-20.
- Juge, N., J. S. Andersen, D. Tull, P. Roepstorff, and B. Svensson. 1996. Overexpression, purification, and characterization of recombinant barley α -amylases 1 and 2 secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **8**: 204-214.
- Juge, N., M. Sogaard, J. C. Chaix, M. F. Martin-Eauclaire, B. Svensson, G. Marchis-Mouren, and X. J. Guo. 1993. Comparison of barley malt α -amylase isozyme 1 and 2: Construction of cDNA hybrids by *in vivo* recombination, characterization and expression in yeast. *Gene* **130**: 159-166.
- Kadziola, A., J. Abe, B. Svensson, and R. Haser. 1994. Crystal and molecular structure of barley α -amylase. *J. Mol. Biol.* **239**: 104-121.
- Kadziola, A., M. Sogaard, B. Svensson, and R. Haser. 1998. Molecular structure of an α -amylase-inhibitor complex: implications for starch binding and catalysis. *J. Mol. Biol.* **278**: 205-217.
- Knox, C. A. P., B. Sonthayanon, G. R. Chandra, and S. Muthukrishnan. 1987. Structure and organization of two divergent α -amylase genes from barley. *Plant Mol. Biol.* **9**: 3-17.
- Matsui, I. and B. Svensson. 1997. Improved activity and modulated action pattern obtained by random mutagenesis at the fourth β - α loop involved in substrate binding to the catalytic (β/α)₈-barrel domain of barley α -amylase 1. *J. Biol. Chem.* **272**: 22456-22463.
- Mori, H., K. S. Bak-Jensen, and B. Svensson. 2002. Barley α -amylase Met53 situated at the high-affinity subsite -2 belongs to a substrate binding motif in the β - α loop 2 of the catalytic (β/α)₈-barrel and is critical for activity and substrate specificity. *Eur. J. Biochem.* **269**: 5377-5390.
- Nielsen, P. K., B. C. Bønsager, C. R. Berland, B. W. Sigurskjold, and B. Svensson. 2003. Kinetics and energetics of the binding between α -amylase/subtilisin inhibitor and barley α -amylase 2 analyzed by surface plasmon resonance and isothermal titration calorimetry. *Biochemistry* **42**: 1478-1487.
- Robert, X., R. Haser, T. E. Gottschalk, F. Ratajczak, H. Driguez, B. Svensson, and N. Aghajari. 2003. The structure of barley α -amylase isozyme 1 reveals a novel role of domain C in substrate recognition and binding: a pair of sugar tongs. *Structure* **11**: 973-984.
- Rodenburg, K. W., F. Vallée, N. Juge, N. Aghajari, X. J. Guo, R. Haser, and B. Svensson. 2000. Specific inhibition of barley α -amylase 2 by barley α -amylase/subtilisin inhibitor depends on charge interactions and can be conferred isozyme 1 by mutation. *Eur. J. Biochem.* **267**: 1019-1029.
- Rodenburg, K. W., N. Juge, X. J. Guo, M. Sogaard, J. C. Chaix, and B. Svensson. 1994. Domain B protruding at the third β strand of the α/β barrel in barley α -amylase confers distinct isozyme-specific properties. *Eur. J. Biochem.* **221**: 277-284.
- Rogers, J. C. and C. Milliman. 1983. Isolation and sequence analysis of a barley α -amylase cDNA clone. *J. Biol. Chem.* **258**: 8169-8174.
- Stemmer, W. P. 1994. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* **370**: 389-391.
- Svendsen, I., J. Hejgaard, and J. Mundy. 1986. Complete amino acid sequence of the α -amylase inhibitor of endogenous α -amylase and subtilisin. *FEBS Lett.* **167**: 210-214.
- Sogaard, M. and B. Svensson. 1990. Expression of cDNAs

- encoding barley α -amylase 1 and 2 in yeast and characterization of the secreted proteins. *Gene* **94**: 173-179.
22. Vallée, F., A. Kadziola, Y. Bourne, M. Juy, K. W. Rodenburg, R. Haser, and B. Svensson. 1998. Barley α -amylase bound to its endogenous protein inhibitor BASI: Crystal structure of the complex at 1.9 Å resolution. *Structure* **6**: 649-659.
23. Yuk, J. B., S. H. Choi, T. H. Lee, M. U. Jang, J. M. Park, A. R. Yi, B. Svensson, and T. J. Kim. 2008. Effect of calcium ion concentration on starch hydrolysis of barley α -amylase isozymes. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 730-734.
24. Zhao, H., L. Giver, Z. Shao, J. A. Affholter, and F. H. Arnold. 1998. Molecular evolution by staggered extension process (StEP) *in vitro* recombination. *Nat. Biotechnol.* **16**: 258-261.

(Received March 2, 2010/Accepted April 20, 2010)