

Overexpression and Activity Analysis of Cystathionine  $\gamma$ -Lyase Responsible for the Biogenesis of H<sub>2</sub>S NeurotransmitterKyoung-Ran Kim<sup>1†</sup>, Hae-Jung Byun<sup>1†</sup>, Hyun-Nam Cho<sup>1</sup>, Jung-Hyun Kim<sup>1</sup>, Seun-Ah Yang<sup>2</sup> and Kwang-Hwan Jhee<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Department of Applied chemistry, Kumoh National Institute of Technology, Gumi 730-701, Korea<sup>2</sup>The Center for Traditional Microorganism Resources (TMR), Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Received November 19, 2010 / Accepted January 3, 2010

There is a growing recognition of the significance of H<sub>2</sub>S as a biological signaling molecule involved in vascular and nervous system functions. In mammals, two enzymes in the transsulfuration pathway, cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS) and cystathionine  $\gamma$ -lyase (CGL), are believed to be chiefly responsible for H<sub>2</sub>S biogenesis. Genetic inborn error of CGL leads to human genetic disease, cystathioninuria, by accumulating cystathionine in the body. This disease is secondarily associated with a wide range of diseases including diabetes insipidus and Down's syndrome. Although the human CGL (hCGL) overexpression is essential for the investigation of its function, structure, reaction specificity, substrate specificity, and protein-protein interactions, there is no clear report concerning optimum overexpression conditions. In this study, we report a detailed analysis of the overexpression conditions of the hCGL using a bacterial system. Maximum overexpression was obtained in conditions of low culture temperature after inducer addition, performing low aeration during overexpression, and using a low concentration inducer (0.1 mM, IPTG) for induction. Expressed hCGL was purified by His-tag affinity column chromatography and confirmed by Western blot using hCGL antibody and enzyme activity analysis. We also report that the His tag with TEV site attached protein exhibits 76% activity for  $\alpha$ - $\gamma$  elimination reaction with L-cystathionine and 88% for  $\alpha$ - $\beta$  elimination reaction with L-cysteine compared to those of wild type hCGL, respectively. His tag with TEV site attached protein also exhibits a 420 nm absorption maximum, which is attributed to the binding cofactor, pyridoxal 5'-phosphate (PLP).

**Key words** : Overexpression, cystathionine  $\gamma$ -lyase, cystathioninuria, homocysteine, cysteine

## 서 론

황화수소(H<sub>2</sub>S)는 달걀 썩은 냄새를 가지고 있는 생체 내 독성가스로 알려져 있다. 그러나 최근 생리학, 질병관련 분야에서 중요한 역할을 하는 nitric oxide (NO), carbon monoxide (CO)와 함께 가스 형태의 신경전달물질로 그 중요성이 부각되고 있다[11]. 최근 보고에 따르면, H<sub>2</sub>S는 포유동물의 뇌에서 신경조절물질로서의 중요한 역할을 한다[9]. H<sub>2</sub>S의 다른 중요한 생리활성으로는 평활근의 이완제 기능[24], 포유동물의 뇌에서 발생하는 질병과의 연관성[5] 등이 있는데 특히 Alzheimer's disease 환자들의 뇌에서는 정상인들의 뇌에 비해서 낮은 수준의 H<sub>2</sub>S가 관찰되어[6] Alzheimer's disease와의 관계가 주목 받고 있다. 따라서, 생체 내에서 H<sub>2</sub>S를 생성할 수 있는 단백질의 발현과 조절이 새로운 주목을 받고 있다.

황 함유 아미노산의 황 전이 반응 경로에서 homocysteine은

L-methionine에서 L-cysteine으로의 전환 경로의 중간체이고, 이 transsulfuration과정에서 cystathionine  $\gamma$ -lyase (CGL)와 cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS)가 필수적인 역할을 한다. CBS가 homocysteine을 L-cystathionine으로 전환시키고, CGL은 L-cystathionine을 분해하여 L-cysteine,  $\alpha$ -ketobutyrate, 그리고 암모니아를 생성하며[24], 이 때 생성되는 L-cysteine은 CGL에 의해서  $\alpha$ ,  $\beta$ -elimination 되어 pyruvate, H<sub>2</sub>S 그리고 암모니아로 분해된다[7,21](Fig. 1). 이 때, 두 효소가 H<sub>2</sub>S를 형성하기 위해서는 pyridoxal 5'-phosphate (PLP)를 보조효소로 필요로 한다. PLP의 결핍은 두 효소의 활성 저하를 초래하고, 이는 곧 homocysteine의 농도증가로 이어져 심혈관 질환을 유발하게 된다[14]. 최근 마우스의 연구에 따르면 CGL을 결핍시켰을 때, 고혈압이 유발되었다는 보고가 있다[24]. CGL에 의해 발생하는 H<sub>2</sub>S가 혈관 이완인자로서 혈압을 조절하는데 중요한 역할을 함을 의미한다[1,13]. 이렇게 심혈관 질환의 위험인자로 알려져 있는 homocysteine의 대사에 CGL이 관여함으로써 CGL과 CBS는 H<sub>2</sub>S의 생성과 homocysteine 대사의 양면에서 중요한 효소로 인식되고 있다[3,15].

그 중 CGL의 결핍에 의해 야기되는 선천성 유전질환인

**\*Corresponding author**

Tel : +82-54-478-7837, Fax : +82-54-478-7710

E-mail : khjhee@kumoh.ac.kr

†Co-first author (Both authors contributed equally to this work)

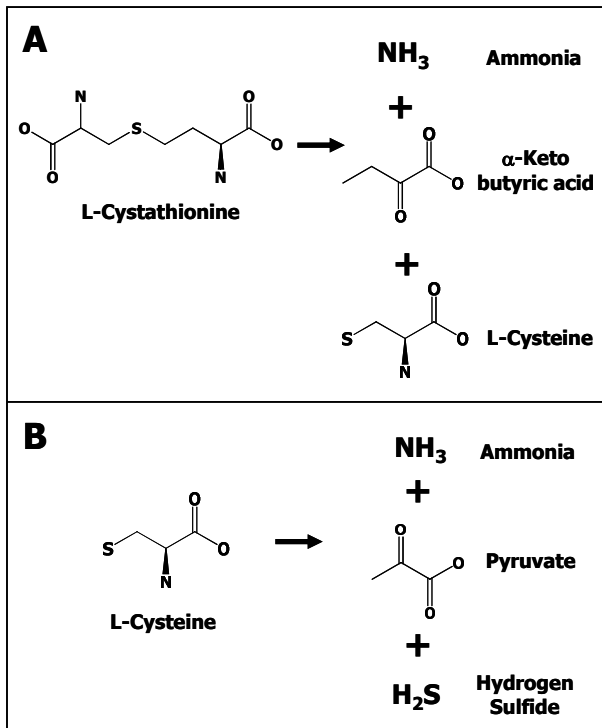


Fig. 1. Human CGL (hCGL) reaction scheme. hCGL catalyzes the conversion of L-cystathionine to L-cysteine, α-keto-butyrate and ammonia through α, γ-elimination reaction (A), and hCGL also catalyzes L-cysteine into pyruvate, NH<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>S through α, β-elimination reaction (B).

cystathioninuria는 선천적인 상염색체 열성 유전자질환으로 조직 내 cystathionine의 농도 증가를 초래한다[10]. 환자의 1/3정도에서 정신 발달과 지능장애, 빈혈, 혈소판 감소, 말단 비대증 등을 수반한다는 보고가 있으나[10] 아직도 연구가 미흡한 유전병의 하나이다.

이렇게 생체에서 CGL이 중요한 역할을 함에도 불구하고 CGL에 관한 연구는 많이 부족한 현실이고, 특히 단백질화학 연구의 기초라고 할 수 있는 과발현 방법에 대한 논문이 부재한 상태이다. 생체 내에서 중요한 역할을 담당하는 효소는 기질특이성, 반응특이성, 다른 단백질과의 상호작용, 기타 연구를 수행함에 있어 다량의 단백질을 얻는 것이 매우 중요한 만큼 과발현 조건을 검색 확립하는 것은 추후의 연구에 매우 중요하다고 할 수 있다. 비록 최근 CGL의 3차원 입체구조가 밝혀지긴 했으나[18] 여전히 과발현에 대한 자세한 보고가 부재한 실정이다. 따라서 본 논문에서는 박테리아를 이용한 인간의 CGL 과발현 조건을 상세히 검토하여 최적의 과발현 조건을 확립하고자 하였다. 또한 과발현 후 정제를 간편히 하기 위해 N 말단에 부착시킨 히스티딘 잔기와 단백질 분해효소부위(TEV protease site, ENLYFQG)를 함유한 human CGL (His-TEV-hCGL)과 야생형 hCGL간의 기질특이성과 상대적 반응효소 활성의 특성을 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

배지 제조에 사용한 tryptone, yeast-extract는 Difco (USA)의 제품을 이용하였고, NaCl과 glycerol은 Daejung (KOREA)에서 구입하였다. Kanamycin과 IPTG (isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside), 3-methyl-2-benzothiazoline (MBTH)는 Nakalai Tesque (Japan)의 제품을 사용하였고, 활성 측정 시 사용한 L-cystathionine, L-cysteine, β-mercaptoethanol, PLP, 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)는 Sigma (USA)에서 구입하였다. Western blot에 사용한 anti-hCGL rabbit antibody는 Proteintech Group, Inc. (USA)에서, anti-rabbit goat antibody는 Bio-Rad Laboratories (USA)에서 구입하였다. 균의 파쇄는 Fisher Scientific (Korea)의 ultrasonic dismembrator를, UV-visible 흡수 스펙 트럼 Agilent 8453은 Agilent Technologies (USA) 제품을 사용하였다.

### Plasmid 및 형질전환

본 연구에서는 *E.coli* BL21 (DE3)을 cloning의 숙주세포로 사용하였고, plasmid는 T7 promoter와 lac operator, kanamycin 내성유전자로 연결된 pNIC-28-BsaI을 스웨덴 그룹(Dr. Sivaraman)에서 보내 준 것을 사용하였다[18]. *E.coli* BL21의 형질 전환은 CaCl<sub>2</sub> 방법으로 만든 competent cell을 이용하였으며, 선별된 유전자 재조합 형질전환체를 kanamycin (50 μg/ml)이 첨가된 TB (Terrific Broth)에서 37°C, 210 rpm을 유지하여 12시간 진탕배양을 하였다. 형질전환 균은 40% glycerol을 함유한 3X LB (Luria-Bertani) 배지에 현탁하여 -70°C에 보존하였다.

### 배양 조건

*E.coli* BL21 숙주세포 및 재조합 균주 BL21/pNIC-28-BsaI의 배양은 TB (1.2% tryptone, 2.4% yeast extract, 0.4% glycerol)를 사용하였다. 50 ml conical tube에 50 μg/ml의 kanamycin을 함유한 7.5 ml, 20 ml, 37.5 ml의 TB를 첨가하여 배양에 사용하였으며 세포성장 측정은 UV-visible spectrometry를 이용하여, 600 nm에서의 optical density가 0.1, 1.0, 2.0 인 경우에 IPTG를 첨가한 후(0.01 mM, 0.1 mM, 1.0 mM) 18°C, 37°C에서 배양하였다. 이 때 210 rpm 조건을 유지하여 진탕배양 (SH-802F, Korea)하였다.

### 단백질 정량과 Western blot

단백질 정량은 Bradford 방법에 의해 UV-visible 흡수 스펙 트럼을 이용하여 595 nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 표준 시료는 bovine serum albumin (BSA)을 사용하였다. 그리고 발현된hCGL을 SDS-PAGE로 분리한 후 PVDF membrane에 전기적으로 이행시킨 후 anti-hCGL rabbit antibody 및 an-

ti-rabbit goat antibody를 각각 1, 2차 항체로 사용하여 Western blot을 수행하였다.

#### Gel documentation을 이용한 단백질 발현양의 정량화

발현된 단백질의 비율을 정량화 하기 위하여 gel documentation (Alpha Innotech, USA)을 사용하였다. Staining한 SDS-PAGE에서 각 lane에 발현된 단백질의 총 면적을 100%로 하였다. 그리고 47 kDa의 위치에서 과발현된 His-TEV-hCGL 단백질의 면적을 구하여, 총 면적에 대한 비율로 표시하였다.

#### Native PAGE를 이용한 H<sub>2</sub>S 활성 측정

hCGL은 L-cystathionine을 기질로 하여 L-cysteine,  $\alpha$ -ketobutyrate과 암모니아를 생성하는 반응을 촉매 하는 것으로 알려져 있으나, free sulphhydryl group을 갖는 화합물들 사이의 분해 결합 반응도 촉매 할 수 있다[4]. 따라서 본 실험에서는 색 변화를 통해 반응 여부를 알 수 있는 비교적 간단한 방법으로 hCGL의 활성을 확인하였다. 즉, 단백질 전기영동을 마친 8% native PAGE 젤을 황화수소를 생성할 수 있는 단백질의 활성 기질인 L-cysteine과  $\beta$ -mercaptoethanol을 각각 20 mM, 10 mM 포함하는 KPB 완충용액(최종농도 50 mM, pH 8.0)에 0.4 mM의 Pb-acetate와 20  $\mu$ M의 PLP를 포함한 용액에 담가 37°C에서 약 5분간 반응하며 검은 침전의 형성 여부를 관찰하였다.

#### His-TEV-hCGL과 hCGL 단백질의 정제

His-TEV-hCGL을 과발현 시킨 균체는 lysis buffer (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10 mM imidazole, 0.5 mM tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP), EDTA-free protease inhibitor, 20  $\mu$ M PLP, pH 7.9)에 현탁하고, 30분간(pulse: 5 min on, 1 min off) 초음파 분쇄(80% amplitude)를 하였고, 20분간 8,000 rpm에서 원심분리하여 crude extract를 제조하였다. His-TEV-hCGL의 정제는 Hi-Trap chelating nickel column (Novagen, Germany)을 이용한 affinity chromatography를 이용하였다. 용출 분획들은 centricon tube (Millipore, 30 kDa molecular weight cut-off)를 이용하여 농축하였고, TEV protease의 활성 buffer [50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT), 20  $\mu$ M PLP]로 희석과 농축을 3회 반복하여 탈염 및 buffer 교환을 하였다.

N-말단의 히스티딘 잔기의 제거, 즉 hCGL의 정제는 TEV protease (Invitrogen, USA)를 첨가하여 21°C에서 4시간 반응시킨 후, Hi-Trap chelating nickel column에 용액을 흘려 흡착시키고, wash buffer (0.5 M NaCl, 60 mM imidazole, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9)로 hCGL을 용출시켰다. 용출 분획들은 centricon tube를 이용하여 탈염 및 buffer (50 mM KPB, pH 7.9, 0.1 mM TCEP, 20  $\mu$ M PLP) 교환을 하여 야생형 hCGL을 얻었다.

#### L-Cystathionine의 $\alpha$ , $\gamma$ -elimination 활성측정

히스티딘 잔기와 TEV site를 포함한 hCGL과 야생형 hCGL의  $\alpha$ ,  $\gamma$ -elimination 활성은 L-cystathionine으로부터 생성되는 cysteine을 thiol group 검출에 사용하는 Ellman's reagent [5, 5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB]를 이용하여 측정하였다[19]. 효소반응은 0.1 M KPB (pH 8.0)에 20  $\mu$ M PLP와 L-cystathionine의 농도(0, 0.05, 0.25, 0.5, 1.5, 2, 3, 4 mM)를 변화시켜 첨가 하였고, 이 혼합액에 각각 7  $\mu$ g의 효소를 가하여 37°C에서 5분간 반응시켰다. 반응 종결을 위해 5% TCA를 처리하고 반응액을 12,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하였다. 상층액을 DTNB 측정 용액과 상온에서 5분간 반응시킨 후 UV-visible 흡수 스펙트럼을 이용하여 412 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 cysteine의 농도를 측정하였다. 기질인 L-cystathionine의 농도 변화에 따른 최고 반응속도 ( $V_{max}$ )와  $K_m$  값을 측정하였다.

#### L-Cysteine의 $\alpha$ , $\beta$ -elimination 활성측정

히스티딘 잔기와 TEV site를 포함한 hCGL과 야생형 hCGL의  $\alpha$ ,  $\beta$ -elimination 활성 비교는 L-cysteine으로부터 생성되는 pyruvate을 MBTH (3-methyl-2-benzothiazolone-hydrazone) 측정방법을 통해 확인하였다[17]. 효소반응은 0.1 M KPB (pH 8.0)에 20  $\mu$ M PLP와 기질인 L-cysteine의 농도(0, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 mM)를 변화시켜 첨가한 혼합액에 각각 7  $\mu$ g의 효소를 가하여 37°C에서 5분간 반응시켰고, 5% TCA를 첨가하여 반응을 종결시키고, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 취하였다. 반응액과 MBTH 용액은 50°C에서 40분간 반응시킨 후 시료의 안정화를 위하여 25°C에서 30분간 방치하였다. MBTH 반응액은 UV-visible 흡수 스펙트럼을 이용하여 324 nm에서의 흡광도로부터 생성된 pyruvate의 농도를 측정하여 기질 농도에 따른 최고 반응속도( $V_{max}$ )와  $K_m$  값을 측정하였다.

#### 통계

모든 실험은 3-5회 반복 시행되었으며, 결과는 평균 $\pm$ SEM 또는 SD로 나타냈으며, 두 그룹 사이의 유의 차는 unpaired Student's *t*-test에 의하여  $p < 0.05$  수준에서 검정하였다.

#### 결과 및 고찰

##### *E. coli* 숙주 세포를 이용한 hCGL 단백질의 대량발현

단백질의 과발현 시 inclusion body를 형성하거나 단백질 가수분해 효소에 의해 분해되기도 한다[16,20]. 이러한 경우에는 과발현된 재조합 단백질의 대부분이 비수용성 집합체 (aggregate)를 형성함으로써 생활활성을 나타내지 못하는 등의 문제점이 있다. 또 과발현을 위해 특정 프로모터를 사용하지 않고 온도변화를 이용한 경우에는[2] 지나치게 높은 온도로

인해 숙주 내의 heat shock protein과 원치 않는 protease 등이 동시에 발현 되어 목적 단백질의 안정성에 영향을 주는 문제점이 있다. 이렇게, 과발현 시 발생할 수 있는 문제점을 고려하여 본 연구에서는 생성된 inclusion body의 비율을 관찰하기 위하여 세포 파쇄 후, 원심 하기 전의 시료를 crude extract라고 명명하고 원심 한 후의 상층액 시료를 supernatant로 명명하여 실험하였다. 따라서 원심 전의 시료(crude extract)에서 나타나는 His-TEV-hCGL은 수용성과 불용성의 합이 될 것이고, 원심 후의 상층액 시료(supernatant)에서 나타나는 His-TEV-hCGL은 수용성 단백질을 검출하게 된다.

온도에 따른 hCGL 발현량은 0.1 mM의 inducer (IPTG)의 첨가 후 18°C와 37°C에서 배양하여 얻은 supernatant를 SDS-PAGE에서 확인하였다(Fig. 2A). hCGL은 본래 44.4 kDa의 subunit 분자량을 가지고 있지만, 본 실험에 사용된 벡터에서는 hCGL유전자의 N말단 부위에 His<sub>6</sub> tag와 TEV protease cleavage site를 포함한 22개의 아미노산이 첨가되어 있어 47 kDa의 분자량을 가지고 있다[15]. 배양온도의 변화에 따른 결과, 각 lane에서 발현된 전체 단백질 양을 100%로 하였을 때,

47 kDa의 위치에서 18°C의 경우 20.8% (Fig. 2A, lane 3), 37°C의 경우 5.2% (Fig. 2A, lane 4)로, 37°C에 비해 18°C에서 4배 가량 높은 비율로 발현된 것을 확인할 수 있었고, crude extract는 18°C의 경우 16.7% (Fig. 2A, lane 5), 37°C의 경우 15.0% (Fig. 2A, lane 6)의 비율로 발현 되었다. 저온에서 보다 고온에서 전체 단백질은 많이 발현 되었지만, hCGL 단백질의 발현된 양만을 비교 해보면 고온이 아닌 저온에서 발현이 잘 된 것을 확인할 수 있다. 또한 고온에서의 단백질들 간에 응집이 활발히 일어나 crude extract의 경우 많은 양의 inclusion body가 생성된 것을 관찰할 수 있었다. 전체 발현된 단백질 양을 기준으로 하여, 18°C와 37°C에서의 supernatant와 crude extract의 발현 비율을 수치화하여 Table 1에 나타내었다.

Fig. 2B는 IPTG 농도에 따른 hCGL 발현을 나타낸 것이다. IPTG를 첨가하지 않은 control (Fig. 2B, lane 3)과 비교해 보았을 때 0.01 mM (Fig. 2B, lane 4), 0.1 mM (Fig. 2B, lane 5), 1.0 mM (Fig. 2B, lane 6)에서 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 균의 양도 각각 순서대로 0.3 g, 0.225 g, 0.3 g로 비슷한 양으로 성장하는 것을 확인하였다(Table 1). IPTG는 lac operator에서

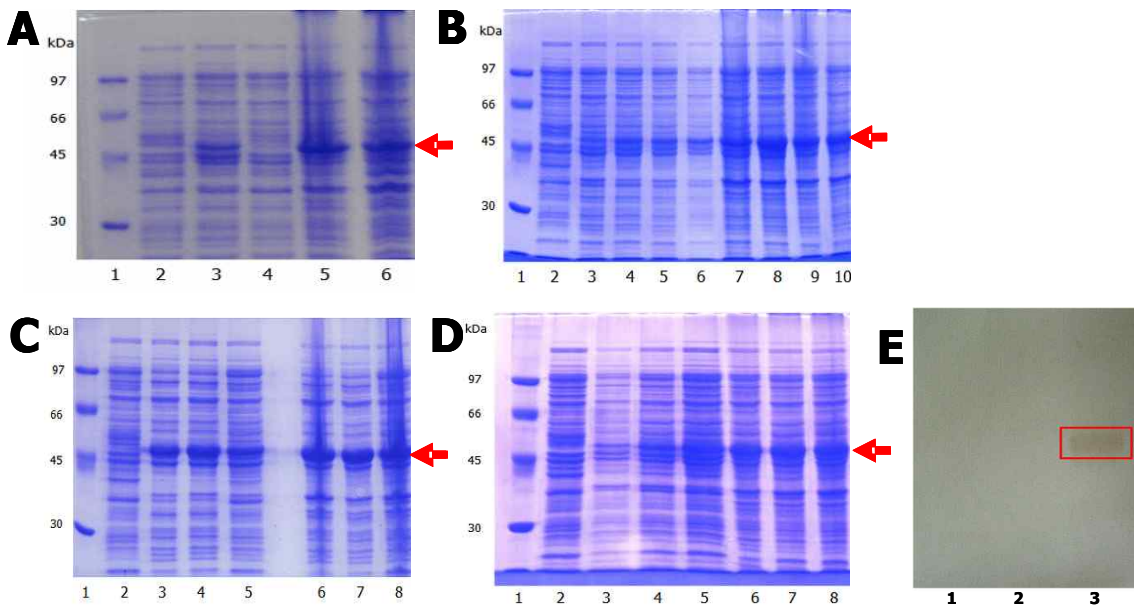


Fig. 2. Identification of expressed soluble and insoluble His-TEV-hCGL protein at various conditions by SDS-PAGE and Western blot analysis were shown. Effect of culturing temperatures (A), IPTG concentrations (B), induction times (C), aerations (D), Arrow indicates the position of molecular weight at 47 kDa. Each lane represents the samples as follows; Low molecular size marker (A-E, lane 1); *E. coli* BL21 competent cell (A-E, lane 2), supernatant of His-TEV-hCGL incubated at 18°C (A, lane 3) and 37°C (A, lane 4); crude extract of His-TEV-hCGL incubated at 18°C (A, lane 5) and 37°C (A, lane 6); supernatant of His-TEV-hCGL incubated without IPTG (B, lane 3) and induced by IPTG at 0.01 mM (B, lane 4), 0.1 mM (B, lane 5), 1.0 mM (B, lane 6); crude extract of His-TEV-hCGL incubated without IPTG (B, lane 7) and induced by IPTG at 0.01 mM (B, lane 8), 0.1 mM (B, lane 9), 1.0 mM (B, lane 10); supernatant of His-TEV-hCGL induced at 0.1 (C, lane 3), 1.0 (C, lane 4), 2.0 (C, lane 5) at OD 600; crude extract of His-TEV-hCGL induced at 0.1 (C, lane 6), 1.0 (C, lane 7), 2.0 (C, lane 8) at OD 600; supernatant of His-TEV-hCGL incubated using medium volume of 15% (D, lane 3), 40% (D, lane 4), 75% (D, lane 5); crude extract of His-TEV-hCGL incubated using medium volume of 15% (D, lane 6), 40% (D, lane 7), 75% (D, lane 8); Immunostaining of purified hCGL was shown (E, lane 3). Marker (E, lane 1) and supernatant of competent cell were also shown (E, lane 2).

Table 1. The effects of His-TEV-hCGL overexpression by culturing temperatures, IPTG concentrations, induction times and aerations that analyzed by gel documentation system

Factor	Condition	Supernatant (%) <sup>a</sup>	Crude extract (%) <sup>b</sup>
Culturing temperature (°C)	18	20.8	16.7
	37	5.2	15.0
Used IPTG concentration (mM)	0	19.8	16.2
	0.01	24.7	19.2
	0.1	26.1	21.9
	1.0	24.3	19.8
	0.1	33.2	26.0
Induction time (OD <sub>600</sub> ) <sup>c</sup>	1.0	39.8	31.1
	2.0	30.8	23.0
	15	7.3	8.8
Aeration (%) <sup>d</sup>	45	15.9	11.1
	75	12.3	16.1

<sup>a</sup>Relative percentage of expressed His-TEV-hCGL against total protein on SDS-PAGE in supernatant

<sup>b</sup>Relative percentage of expressed His-TEV-hCGL against total protein on SDS-PAGE in crude extract

<sup>c</sup>IPTG addition timing at the indicated values at OD 600.

<sup>d</sup>Aeration was controlled by different medium volume per flask total volume.

lactose와 같은 역할을 하면서 inhibitor와 결합하여 지속적인 단백질 발현을 유도시켜, 결과 단백질 대량생산에 사용되는 유도체와는 상관없이 대량 발현이 가능할 것으로 추측된다.

600 nm에서의 O.D 값이 각각 0.1, 1, 2를 나타냈을 때, IPTG를 첨가하여, 즉, induction time에 변화를 주어 hCGL의 발현 양을 확인하였다. 초음파로 파쇄 후 상층액을 Bradford법으로 595 nm에서 정량 하였을 때, O.D 값이 0.1일 때 inducer인 IPTG를 첨가한 경우 7.44 µg/µl, 1.0에서의 경우 8.11 µg/µl, 2.0에서의 경우 12.40 µg/µl로 가장 후자의 경우에 상층액의 단백질 양이 많이 측정되었다. 하지만 Fig. 2C와 같이 hCGL 단백질은 0.1, 1, 2의 경우 세 가지 조건에서 41.4% (Fig. 2C, lane 3), 39.8% (Fig. 2C, lane 4), 30.8% (Fig. 2C, lane 5)로 비슷하게 발현 된 것을 확인 할 수 있었다. 또한 생성된 inclusion body의 양도 26.0% (Fig. 2C, lane 6), 31.0% (Fig. 2C, lane 7), 23.0% (Fig. 2C, lane 8)로 비슷한 결과로 발현된 것을 알 수 있었다(Table 1). 즉, 전체 단백질에 대한 hCGL 단백질의 비율이 각각의 조건에서 비슷하였다.

Aeration에 따른 발현양은 보고된 논문을 참조하였다[8]. Shaking incubator의 rpm을 210으로 고정 시킨 후, 배지의 양을 조절하여 측정하였다. 배지의 양을 배양용기 부피의 15%, 40%, 75%로 했을 때 균의 wet weight는 각각 순서대로 0.3 g, 0.25 g, 0.3 g이었으며, SDS-PAGE 결과 각 조건에서의 supernatant는 15%의 경우 7.3% (Fig. 2D, lane 3), 40%의 경우 15.9% (Fig. 2D, lane 4), 75%의 경우 12.3% (Fig. 2D, lane 5)로 나타났고, crude extract의 결과 8.8% (Fig. 2D, lane 6), 11.1% (Fig. 2D, lane 7), 16.1% (Fig. 2D, lane 8)으로 유사한 값의 inclusion body를 형성하였다(Table 1). 배지의 볼륨을 15%로

하여 배양하였을 때 높은 aeration으로 인하여 많은 균들이 배양되었지만 hCGL 단백질의 발현만을 고려해 보면 오히려 수득이 적었다. 즉, aeration의 정도가 낮을수록 목적 단백질인 hCGL의 가용성 과발현에 적합함을 알 수 있다.

#### Western blot analysis

목적 단백질의 발현 여부를 항원-항체 반응을 통해 확인 하였다. 2차 항체(anti-rabbit goat antibody)의 결합 여부를 확인하기 위해 사용한 발색 시약 3,3'-Diamino benzidine (DAB)를 단백질이 transfer된 membrane과 반응시켜 band의 형성을 관찰하였다(Fig. 2E). Immunostaining을 통해 여러 단백질 중에서 형질전환 하여 과발현 된 *E.coli* BL21의 밴드만을 검출할 수 있었다(Fig. 2E, lane 3).

#### 과발현 용액의 hCGL의 활성 측정 결과

H<sub>2</sub>S를 생성시키는 단백질인 hCGL은 보조소로 PLP (pyridoxal 5' phosphate, 비타민 B<sub>6</sub>)를 함유하고 있다[15]. 보조소로 PLP를 사용하는 효소는 PLP의 화학적 특성을 이용하여 반응 특이성을 보이고 있다[12]. 즉, 친핵성 기질로 cysteine과 β-mercaptoethanol을 이용하면 부산물로 H<sub>2</sub>S를 발생시킬 수 있다. 생성된 H<sub>2</sub>S기체는 Pb-acetate와의 반응을 통해 검은 침전인 Pb-S (lead sulfide)를 형성하게 된다[24].

활성검출 용액과 반응한 native PAGE의 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Control과 비교하였을 때 모든 lane의 일정한 위치에서 검은 침전의 형성을 관찰할 수 있었고, 0.1 mM의 IPTG 첨가 후 37°C에서 배양한 경우(Fig. 3, lane 6) 단백질 대부분이 inclusion body로 형성되어 활성이 없음을 확인 할 수

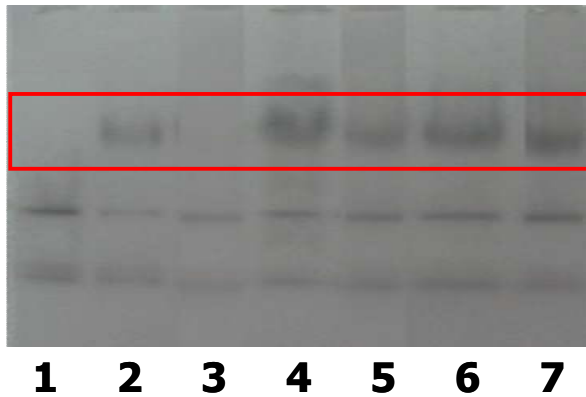


Fig. 3. H<sub>2</sub>S forming activity analysis on native PAGE by hCGL using 2-mercaptoethanol and L-cysteine as substrates. Each lane represents as follows; *E. coli* BL21 competent cell (lane 1); supernatant of hCGL incubated at 18°C (lane 2), 37°C (lane 3); supernatant of hCGL induced by 1.0 mM (lane 4) and 0.01 mM (lane 5) IPTG concentration; supernatant of hCGL induced at 2.0 (lane 6), 1.0 (lane 7) that measured at the OD 600; Square shows the area of separated hCGL.

있었다. 또한, His-TEV-hCGL는 기질과의 반응에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었으며, His-TEV-hCGL이 cysteine을 분해하여 H<sub>2</sub>S 기체를 만드는 것을 확인할 수 있었다. 단 control를 포함한 모든 lane에 존재하는 hCGL의 아래 두 개의band는 과발현에 사용한 *E. coli*유래의 cysteine 대사 관련 단백질인 cysteine synthetase일 가능성이 높다고 사료된다[22,23].

His-TEV-hCGL과 hCGL의 정제와 UV-Visible 흡광도

His-TEV-hCGL 과 hCGL의 정제과정은 SDS-PAGE로 확인하였다. His-TEV-hCGL은 47 kDa의 분자량을(Fig. 4A, lane 3), hCGL은 44.4 kDa의 크기를 보이고 있다(Fig. 4A, lane 4). His-TEV-hCGL의 UV-visible 흡수 스펙트럼 관찰 결과, 단

백질 내의 tyrosine과 tryptophan에 의한 280 nm에서의 흡광과 결합 보조인자인 PLP 간의 Schiff base 결합으로 인한 427 nm에서의 흡광의 비가 약 1:5.5로 나타났다(Fig. 4B). 이는 통상적으로 약 1:7의 비율을 가지는 문헌의 값[12]과 유사한 값을 나타내었다. 이는 His-TEV-hCGL도 보조소 PLP를 야생형과 같이 함유하고 있다는 증거가 된다.

L-Cystathionine 의 α, γ-elimination 활성측정

히스티딘 잔기와 TEV site를 포함한hCGL과 야생형 hCGL의 L-cystathionine 농도에 따른 반응 속도를 측정하였다(Fig. 5A, B). SigmaPlot의 Enzyme kinetics 프로그램을 이용하여 최대 반응속도( $V_{max}$ ) 및  $K_m$  값을 구하였고, 이를 통해  $K_{cat}$  및  $K_{cat}/K_m$  값들을 계산하여 Table 2에 나타내었다. 히스티딘 잔기와 TEV site를 포함한 hCGL은 야생형 hCGL에 비해  $K_m$  값은 유사 하지만 반응 최대속도가 24% 정도 낮은 값을 보였다. 히스티딘 잔기와 TEV site를 포함하고 있는 hCGL의 H<sub>2</sub>S 생성 활성이 있었고, 본 실험 결과를 통해 히스티딘 잔기와 TEV site가 hCGL과 L-cystathionine간의 α, γ-elimination 반응에 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인 하였으며, 촉매효율( $K_{cat}/K_m$ ) 정도가 야생형에 비해 76% 수준임을 확인하였다.

L-Cysteine의 α, β-elimination 활성측정

L-cysteine의 농도에 따른 히스티딘 잔기와 TEV site를 포함한 hCGL과 야생형 hCGL의 반응 속도를 측정하였고(Fig. 5C, D), Michaelis 상수 값들을 Table 2에 나타내었다. His-TEV-hCGL의 α, β-elimination 촉매 효율은 야생형 hCGL과 비교해 88% 수준으로 큰 차이를 보이지 않음을 확인하였다. His-TEV-hCGL 과 야생형 hCGL의 기질들에 대한 활성 비교를 통하여 활성의 정도가 유사함을 확인 하였고, 이는 손쉽게 정제가 가능한 히스티딘 잔기를 제거하지 않은 hCGL을 야생형 hCGL 대신 실험에 사용할 수 있음을 시사한다.

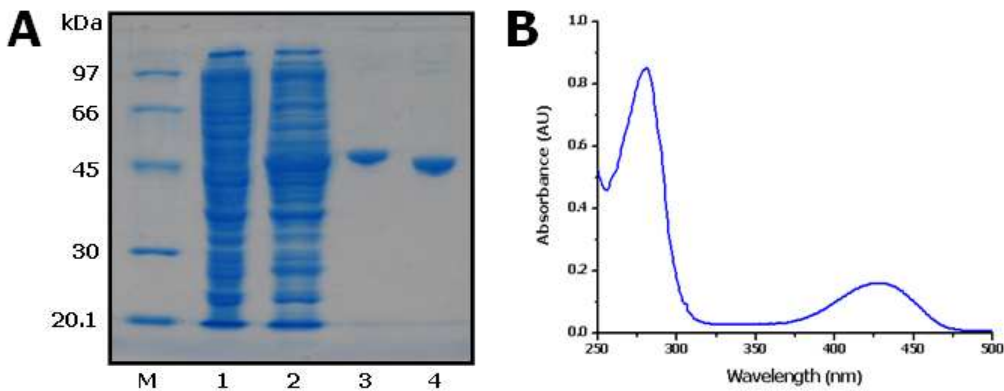


Fig. 4. SDS-PAGE for the purification steps for His-TEV-hCGL and hCGL (A) and UV visible absorption spectra of purified His-TEV-hCGL (B). Each lane of A indicated as follows; lane M, molecular marker; lane 1, supernatant of competent cell; lane 2, supernatant of overexpressed cell; lane 3, purified His-TEV-hCGL; lane 4, purified hCGL.

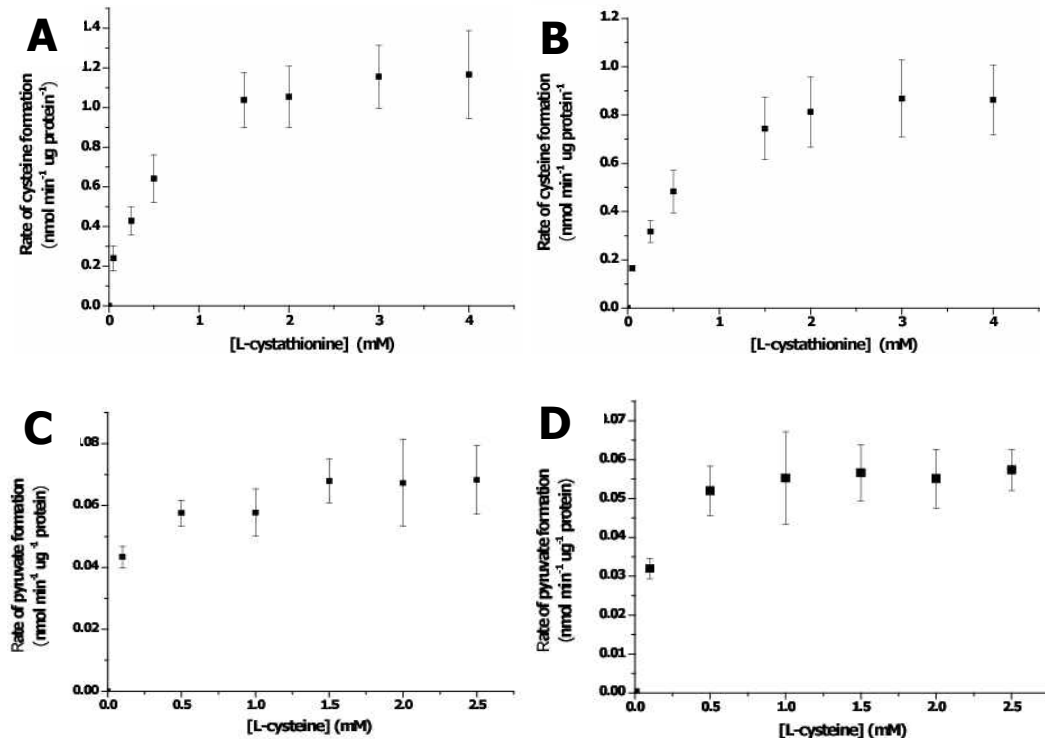


Fig. 5. Kinetics of L-cysteine formation from L-cystathionine by wild type hCGL (A), His-TEV-hCGL (B) and pyruvate formation from L-cysteine by wild type hCGL (C), His-TEV-hCGL (D). Each data point represents the mean $\pm$ S.D. of at least three independent experiments.

Table 2. Comparison of kinetic parameters of His-TEV-hCGL and wild type hCGL using L-cystathionine or L-cysteine as a substrate

Substrate	Enzyme	Assay method	$V_{max}$ (nmol min <sup>-1</sup> $\mu$ g <sup>-1</sup> protein)	$K_m$ (mM)	$K_{cat}$ (S <sup>-1</sup> )	$K_{cat}/K_m$ (S <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )
L-cystathionine	His <sub>6</sub> -TEV-hCGL	DTNB assay	0.870	0.440	0.680	1.550
	Wild type hCGL		1.170	0.420	0.860	2.050
L-cysteine	His <sub>6</sub> -TEV-hCGL	MBTH assay	0.056	0.097	0.044	0.450
	Wild type hCGL		0.065	0.095	0.048	0.510

### 감사의 글

본 연구는 금오공과대학교 학술연구비에 의하여 연구된 논문이므로 이에 감사합니다.

### References

- Boehning, D. and S. H. Snyder. 2003. Novel neural modulators. *Annu. Rev. Neurosci.* **26**, 105-131.
- Chauhan, V., A. Singh, S. M. Waheed, S. Singh, and R. Bhatnagar. 2001. Constitutive expression of protective antigen gene of *Bacillus anthracis* in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 308-315.
- Chen, X., K. H. Jhee, and W. D. Kruger. 2004. Production of the neuromodulator H<sub>2</sub>S by cystathionine beta-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. *J. Biol. Chem.* **279**, 52082-52086.
- Cho, H. N., L. Fan, D. C. Yoo, S. A. Yang, I. S. Lee, J. H. Kim, H. H. Baek, and K. H. Jhee. 2008. The MALDI-TOF MS determination of yeast proteins producing H<sub>2</sub>S. *Korean J. Biotechnol. Bioen.* **23**, 425-430.
- Eto, K. and H. Kimura. 2002. The production of hydrogen sulfide is regulated by testosterone and S-adenosyl-L-methionine in mouse brain. *J. Neurochem.* **83**, 80-86.
- Eto, K., T. Asada, K. Arima, T. Makifuchi, and H. Kimura. 2002. Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 1485-1488.
- Kamoun, P. 2004. H<sub>2</sub>S, a new neuromodulator. *Med. Sci.* **20**, 697-700.
- Kato, Y. and Y. Asano. 2003. High-level expression of a nov-

- el FMN-dependent heme-containing lyase, phenylacetaldoxime dehydratase of *Bacillus* sp. Strain OxB-1, in heterologous hosts. *Protein Expression and Purification* **28**, 131-139.
9. Kimura, H. 2002. Hydrogen sulfide as a neuromodulator. *Mol. Neurobiol.* **26**, 13-19.
  10. Kraus, J. P., J. Hasek, V. Kozich, R. Collard, S. Venezia, B. Janosikova, J. Wang, S. P. Stabler, R. H. Allen, C. Jakobs, C. T. Finn, Y. H. Chien, W. L. Hwu, R. A. Hegele, and S. H. Mudd. 2009. Cystathionine gamma-lyase: clinical, metabolic, genetic, and structural studies. *Mol. Genet. Metab.* **97**, 250-259.
  11. Moore, P. K., M. Bhatia, S. Moochhala. 2003. Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future? *Trans. Pharmacol. Sci.* **24**, 609-611.
  12. Nagasawa, T., H. Kanzaki, and H. Yamada. 1984. Cystathionine gamma-lyase of *streptomyces phaeochromogenes*. *J. Biol. Chem.* **259**, 10393-10403.
  13. Ndisang, J. F., H. E. Tabien and R. Wang. 2004. Carbon monoxide and hypertension. *J. Hypertens.* **22**, 1057-1074.
  14. Perla-Kajan, J., T. Twardowski, and H. Jakubowski. 2002. Mechanism of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids.* **32**, 516-572.
  15. Singh, S., D. Padovani, R. A. Leslie, T. Chiku, and R. Banerjee. 2009. Relative Contributions of cystathionine beta-synthase and gamma-cystathionase to H<sub>2</sub>S biogenesis via alternative trans-sulfuration reactions. *J. Biol. Chem.* **284**, 22457-22466.
  16. Singh, S. M. and A. K. Panda. 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.* **99**, 303-310.
  17. Soda, K. 1968. Microdetermination of D-amino acids and D-amino acid oxidase activity with 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Anal. Biochem.* **25**, 228-235.
  18. Sun, Q., R. Collins, S. Huang, L. Holmberg-Schiavone, G. S. Anand, C. H. Tan, S. Van-Den-Berg, L. W. Deng, P. K. Moore, T. Karlberg, and J. Sivaraman. 2009. Structural basis for the inhibition mechanism of human cystathionine gamma-lyase, an enzyme responsible for the production of H<sub>2</sub>S. *J. Biol. Chem.* **284**, 3076-3085.
  19. Uren, J. R. 1987. Cystathionine beta-lyase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **143**, 483-486.
  20. Ventura, S. and A. Villaverde. 2006. Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol.* **24**, 179-185.
  21. Wang, R. 2002. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.* **16**, 1792-1798.
  22. White, R. H. 1983. An evaluation of the *in vivo* metabolism of cysteine in *Escherichia coli* using stable isotopes. *Biomed Mass Spectrom* **12**, 660-664.
  23. White, R. H. 1982. Metabolism of L-[sulfane-34S]thiocystine by *Escherichia coli*. *Biochem.* **18**, 4271-4275.
  24. Yang, G., L. Wu, B. Jiang, W. Yang, J. Qi, K. Cao, Q. Meng, A. K. Mustafa, W. Mu, S. Zhang, S. H. Snyder, and R. Wang. 2008. H<sub>2</sub>S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science* **322**, 587-590.

### 초록 : 새로운 신경전달물질 H<sub>2</sub>S 발생 효소, cystathionine $\gamma$ -lyase의 대량발현 조건과 활성측정

김경란<sup>1\*</sup> · 변혜정<sup>1\*</sup> · 조현남<sup>1</sup> · 김정현<sup>1</sup> · 양선아<sup>2</sup> · 지광환<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>금오공과대학교 응용화학과, <sup>2</sup>계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구(TMR) 센터)

질병과 밀접한 관계가 있는 hCGL 단백질의 경우 대량 배양 시 유도체를 사용하지 않아도 발현이 되는 점과 유전자 측면에서 조작이 쉬운 *E.coli*를 이용하여도 발현이 된다는 점에 있어서 중요한 이점을 가지고 있다. 본 연구에서는 배양되는 온도와 발현에 관련 있는 유도체의 농도, 600 nm에서의 균 성장 정도에 따른 유도체의 첨가 그리고 배지의 양을 조절하면서 유입되는 aeration의 조건으로 hCGL 단백질 발현의 최적의 조건 확립을 목적으로 하였다. 또 각 발생하는 inclusion body의 양을 측정하면서 보다 많은 가용성 단백질을 발현시키는 조건을 확립하고자 하였다. hCGL 단백질은 저온에서 보다 많은 양의 단백질이 발현되며 inhibitor의 억제를 담당하는 유도체의 농도와는 상관없이 발현이 되었다. 또한 균의 성장 정도에 따라 유도체의 첨가시기를 달리 하였을 때, 발현 비율에 차이는 있었으나 전체적인 단백질 양과 비교해 보면, 이는 hCGL 발현에 큰 영향을 미치지 않는다. 배지의 양을 달리하여 살펴본 aeration에 따른 hCGL 발현 정도는 배지의 부피가 15%일 때 높은 aeration으로 균의 양은 많았으나 목적 단백질인 hCGL의 발현은 aeration이 되지 않는 조건에서 더 잘되는 것을 확인하였다. 그리고 His-TEV-hCGL의 활성은 야생형 hCGL의 활성을 기준으로 하였을 때, L-cystathionine을 기질로 하였을 경우 76%, L-cysteine을 기질로 하였을 경우 88% 수준으로 유사한 활성을 나타내었고, 이는 손쉽게 정제 가능한 His-TEV-hCGL을 야생형을 대신하여 사용할 수 있음을 시사한다. 또한 His-TEV-hCGL이 야생형 hCGL과 같이, 427 nm에서 흡광을 가지는 것으로 보아 보조효소PLP를 포함하고 있음을 알 수 있었다. 이로써 homocysteine 대사 연구에 필수적인 hCGL 효소를 다량 얻는 방법을 확립하고, 관련 연구에 기여하리라 사료된다.