

*Pichia pastoris*에서 생산된 인체 췌장 α -아밀레이스 동질효소의 촉매활성에 대한 염소이온의 영향

김민규 · 김영완*
고려대학교 식품생명공학과

Effect of chloride ions on the catalytic properties of human pancreatic α -amylase isozyme produced in *Pichia pastoris*

Min-Gyu Kim and Young-Wan Kim*

Department of Food and Biotechnology, Korea University

Abstract The *AMY2B* gene, encoding human pancreatic α -amylase isozyme (HPA II), was expressed in *Pichia pastoris*, and the effects of chloride ions on HPA II activity toward starch substrates were investigated. As seen with chloride ion-dependent α -amylases-including HPA I, the isozyme of HPA II-chloride ions increased enzyme activity and shifted the optimal pH to an alkaline pH. The activity enhancement by chloride was more significant at pH 8 than that at pH 6, suggesting that the protonation state of the general acid/base catalyst of HPA II was important for the hydrolysis of starches at an alkaline pH because of the increase in its pK_a by chloride ions. The turnover values for cereal starches as the substrates markedly increased in the presence of chloride by up to 7.2-fold, whereas that for soluble starch increased by only 1.7-fold. Chloride inhibited substrate hydrolysis at high substrate concentrations, with K_i values ranging from 6 to 15 mg/mL.

Keywords: human pancreatic α -amylase, isozyme, chloride ion, kinetics, substrate inhibition

서 론

α -아밀레이스(α -amylase, EC 3.2.1.1)는 녹말의 α -1,4-당사슬 결합을 분해하는 효소이며, 미생물, 식물 및 동물 등 자연계에서 광범위하게 발견되고 있다. α -아밀레이스는 식이를 통해 섭취된 전분/녹말의 효소적 분해를 담당하는 주요 소화효소이며, 인체 췌장에서 분비되는 α -아밀레이스(human pancreatic α -amylase, HPA)의 작용은 식후 혈당 증가와 밀접한 관계가 있으며(1,2), 이러한 이유로 HPA에 대한 억제제와 HPA에 의해 느리게 분해되는 저항녹말의 개발은 기능성 식품 및/과 제약 산업에서의 중요한 관심 분야이다(3,4).

HPA에 대한 연구는 단백질 구조학적 분석과 변이체 효소에 대한 반응속도론적 분석 등 광범위하게 진행되었다(5-8). HPA는 당-효소 공유결합 중간체(covalent glycosyl-enzyme intermediate)의 형성을 거치는 이중치환 메커니즘(double displacement mechanism)을 통해 기질을 가수분해함으로써 기질의 아노머(anomer) 중심과 가수분해산물의 아노머 중심의 입체화구조가 동일하도록 유지되는 유지형 글리코시데이스(retaining glycosidase)에 속한다(9,10). 미생물 유래의 α -아밀레이스와는 달리 HPA를 포함하여 고등생물 유래의 α -아밀레이스들은 염소이온을 보조인자(cofactor)로 사

용하며, 농도의존적으로 활성화되며, 최적 pH가 염기 쪽으로 이동한다고 보고되어 있다(11-13). HPA I에 대한 구조 분석과 변이체 효소에 대한 활성분석을 통해 염소이온 결합자리를 구성하는 아미노산 잔기들이 결정되었으며, 염소이온 의존적인 α -아밀레이스들에 상호보존 되어있다(5,7).

HPA는 *AMY2A*와 *AMY2B*로 명명된 2개의 유전자로부터 발현되는 각각 HPA I과 HPA II로 명명된 2종류의 동질효소(isozyme)가 존재한다(14-16). *AMY2B* 유전자에서 발현되는 HPA II는 511개의 아미노산 잔기로 구성되어 있으며, HPA I과 동일하게 염소이온 의존적 α -아밀레이스로서 염소이온 결합자리를 구성하는 아미노산 잔기들(HPA I의 R195, N298, 및 R337)이 HPA II에도 보존되어 있으며, 전체적으로 HPA I과는 단지 6개의 아미노산 잔기만이 다르다. HPA I에 대한 광범위한 연구와 달리 동질효소인 HPA II의 경우 야생형(wild type) 효소와 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 재조합 효소를 이용한 기본적인 특성화에 대해서만 연구만이 진행되었을 뿐(17,18), 염소이온 의존적 효소 활성화와 천연의 기질인 녹말 가수분해 활성에 대해서는 연구가 진행된 바 없다. 본 연구의 목적은 재조합 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)를 이용하여 HPA 동질효소 중 하나인 HPA II를 재조합 효소로 생산하고, 염소 이온에 따른 녹말 분해 활성의 변화를 살펴봄으로써 천연 기질에 대한 HPA II의 효소적 특성에 관한 정보를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

AMY2B 유전자 클로닝

AMY2B 유전자(GenBank NM_020978)가 클로닝된 플라스미드

*Corresponding author: Young-Wan Kim, Department of Food and Biotechnology, Korea University, Sejong, 30019, Korea
Tel: +82-44-860-1436
Fax: +82-44-860-1586
E-mail: ywankim@korea.ac.kr
Received June 1, 2016; revised June 26, 2016;
accepted June 27, 2016

클론 SC113058을 OriGene Technologies, Inc. (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. *AMY2B* 유전자를 증폭하기 위하여 플라즈미드 SC113058를 주형으로 사용하였으며, 두 개의 합성 프라이머 HPA-Pm-fw (5'-GGGTCTGCACGTGGCAGTATCCCCA AATACA-3')와 HPA-Sa-rv (5'-TTAAGTCGACCAATTTAGATTCA GCATGAAT-3')을 이용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 DNA 조각을 *Pml*I과 *Sal*I로 절단한 후, 같은 제한효소로 절단한 pPICZ α (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 라이게이션하였다. 라이게이션 반응액을 *Escherichia coli* TOP10 [F' {*proAB*, *lacI*^r, *lacZ* Δ M15, *Tn10* (Tet^r)} *mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), ϕ 80*lacZ* Δ M15, *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*, Δ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(Str^r), *endA1*, *mupG* λ]에 형질전환 한 후, 제오신(zeocin)이 25 μ g/mL 함유된 LB 고체배지(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1.5% agar)에 도말하여 항생제 내성 형질전환체를 선발하였다. 선발된 형질전환체를 배양 후 QIAGEN plasmid miniprep kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA)를 이용하여 플라즈미드를 회수한 후 제한효소 처리를 통해 재조합 플라즈미드 pPICZ α -HPAII를 선발하였다.

재조합 플라즈미드 pPICZ α -HPAII 제작

재조합 플라즈미드 pPICZ α -HPAII를 Lin-Cereghino 등의 방법에 따라서 *P. pastoris* GS115에 형질전환 하였다(19). 형질전환 액을 제오신(250 μ g/mL)가 함유된 YPD 고체배지(1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 1 M sorbitol, 2% agar)에 도말하여 항생제 내성을 보이는 형질전환체를 1차로 선발하였다. 형질전환체를 30 mL 살균수에 현탁한 후, 현탁액 1 mL를 PCR 주형으로 사용하였고, HPA II 유전자의 삽입을 확인하기 위하여 알파인자프라이머(α -factor primer, 5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3')와 HPA II 유전자에 결합하는 HPA-seq-rev2 (5'-TTATGTCTCCAGGCCACA-3')을 이용하여 700 bp 크기의 PCR 산물이 증폭되는 형질전환체를 선발하였다.

재조합 *P. pastoris*를 이용한 재조합 HPAII 생산과 정제

*P. pastoris*를 이용한 HPA II 생산은 Invitrogen에서 제공하는 EasySelect™ *Pichia* Expression Kit 매뉴얼을 참고하여 실시하였다. 재조합 단백질 생산을 위해서 BMGY 배지 [1% yeast extract, 2% peptone, 1.34% Yeast Nitrogen Base with ammonium sulfate and without amino acids (YNB), 4×10^{-5} % biotin, 1% glycerol in 100 mM potassium phosphate, pH 6.0]와 BMMY 배지 (1% yeast extract, 2% peptone, 1.34% YNB, 4×10^{-5} % biotin, 0.5% methanol in 100 mM potassium phosphate, pH 6.0)를 사용하였다. 재조합 플라즈미드 pPICZ α -HPAII가 형질전환된 *P. pastoris*를 2 mL의 BMGY 배지에 접종한 후, 30°C, 280 rpm에서 600 nm에서의 OD값이 2 이상이 될 때까지 배양하였다. 배양액을 3,000×g, 5 분간 원심분리하여 균체를 회수한 후, BMMY 배지를 이용하여 OD값이 1.0이 되도록 현탁하고, 현탁액 1 mL을 10 mL BMMY 배지에 접종하였다. 30°C, 280 rpm에서 60시간 배양하면서 매 24시간 마다 100% 메탄올(methanol)을 50 μ L (최종농도 0.5%)를 넣어주었다. 원심분리를 통해 배양상등액을 회수한 후 His-Trap® 컬럼(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)이 장착된 AKTA prime™ plus (GE Healthcare)를 이용하여 Ni-NTA 친화성 크로마토그래피를 실시하여 정제하였다(20).

HPA II 활성 측정

HPA II의 활성 측정을 위하여 구리-비신코니네이트(copper-

bicinchoninate) 방법을 수정하여 효소활성을 측정하였다. 1% 가용성 녹말 용액 50 μ L와 100 mM 완충용액 40 μ L를 혼합한 후 10 μ L의 희석된 효소액을 넣고 10분간 30에서 반응하였다. 500 μ L의 구리-비신코니네이트 용액을 첨가하여 반응을 정지시키고, 증류수 400 μ L를 첨가한 후 80°C에서 30분간 반응하여 발색시켰다. 상온에서 15분간 냉각한 후 200 μ L씩 microplate에 분주하고 plate reader (VersaMax™, Molecular device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 엷당을 표준물질로 하여 사용하여 제작한 표준곡선을 이용하여 환원당 양을 측정하였다.

HPA II 활성에 대한 온도, pH와 염소 이온의 영향

온도에 따른 HPAII 활성 변화를 관찰하기 위하여 인산소듐 완충용액(sodium phosphate buffer, pH 6.0) 조건에서 온도를 20°C에서 60°C 범위에서 효소 활성을 측정하였다. 완충용액 종류에 따른 HPA II의 활성을 측정하기 위하여 아세트산소듐 완충용액(sodium acetate buffer, pH 4.0-6.0), 인산소듐 완충용액(pH 6.0-8.0), 글리신-수산화소듐 완충용액(glycine-NaOH buffer, pH 9.0-10.0)을 사용하였다. 염소이온이 효소활성에 미치는 영향을 관찰하기 위해서 염화소듐(NaCl)을 0, 1, 2, 5, 및 10 mM을 반응액에 첨가한 후 각 인산소듐 완충용액(pH 6.0-8.0)에서의 효소 활성을 측정하였다.

HPA II 활성의 반응속도론적 분석

다양한 녹말 및 염소이온 존재 여부에 따른 HPA II의 활성에 대한 반응속도론적 분석(kinetic analysis)을 위하여 호화시킨 녹말을 기질로 하여 0.1-5.0 mg/mL의 범위에서 효소 활성을 측정하였다. 1% 가용성 녹말과 곡류 녹말 용액 500 μ L와 100 mM 완충용액 400 μ L를 혼합한 후 100 μ L의 희석된 효소액을 넣고 30에서 반응하면서 3, 6, 및 10분 마다 100 μ L의 반응액을 취한 후 500 μ L의 구리-비신코니네이트 용액을 첨가하여 반응을 정지시키고, 증류수 400 μ L를 첨가한 후 80에서 30분간 반응하여 발색시켰다. 각 시간대에 생성된 환원당 양을 바탕으로 직선회귀를 통해 각 기질 농도에서의 반응속도를 측정하고, 측정된 반응속도 결과값을 미하엘리스-멘텐(Michaelis-Menten) 식에 대입한 후 SigmaPlot 프로그램(Systat Software, Chicago, IL, USA)을 이용한 비선형 회귀방법으로 반응속도 상수를 결정하였다. 기질 저해/억제가 나타나는 경우 Haldane 식(22)을 이용하여 반응속도 상수(k_{cat} 및 K_M)와 억제 상수(K_i)를 결정하였다.

$$v = \frac{k_{cat}[S]}{K_M + [S] + \frac{[S]^2}{K_i}}$$

결과 및 고찰

아밀레이스 활성 우수 *P. pastoris* 형질전환체 선발

복수의 *AMY2B* 유전자가 삽입된 형질전환체를 선발하기 위하여 형질전환체 선발 시 사용된 농도(0.25 mg/mL) 보다 고농도의 제오신(1 mg/mL)이 함유된 고체배지에 배양하여 자라는 형질전환체를 선발하였다. 고농도의 제오신 배지에서 자란 *P. pastoris*를 24시간 배양한 경우 배양 상등액의 효소활성이 0.09 U/mL인 반면, 저농도의 제오신 배지에서 자란 형질전환체는 0.04 U/mL의 효소활성이 검출되었다. 따라서 최종 선발된 재조합 *P. pastoris*는 두 개의 *AMY2B* 유전자가 삽입되었을 것으로 예상하였으며, 선

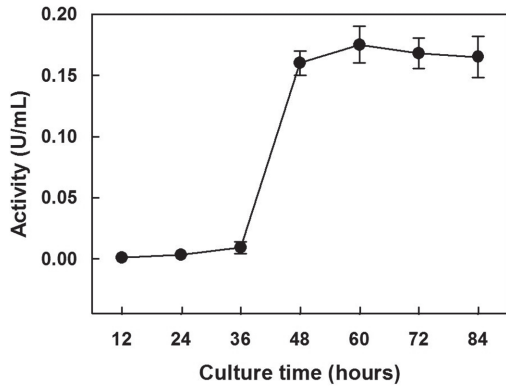


Fig. 1. Time course analysis of production of HPA II in *P. pastoris*.

발된 형질전환체를 이후 HPA II를 생산하는데 사용하였다.

재조합 HPA II 생산과 정제

최적 배양 시간을 결정하기 위하여 배양 후, 12시간 간격으로 시료를 취하여 배양 상층액 내 효소 활성을 측정하였다. 그 결과 36시간까지는 효소활성이 거의 검출되지 않았으나, 48시간 이후로 급격히 효소 생산성이 늘어난 후 60시간에서 최대 효소활성을 나타내었으며 이후로는 오히려 효소활성이 감소하였다(Fig. 1). 상기 결과로부터 60시간을 최적 배양 시간으로 결정하였다. 총 1 리터 배양액으로부터 1,890 U의 효소가 생산되었으며, Ni-NTA 친화성 크로마토그래피를 통해 약 40%의 수율로 정제되었으며 총 1.8 mg의 정제된 효소를 정제하였다. 정제된 HPA II의 비효소 활성은 409 U/mg으로 결정되었으며, 비효소활성에 근거하여 *P. pastoris*를 이용한 재조합 HPA II의 생산성은 배양액 1L당 4.5 mg이었다.

염소 이온에 의한 가용성 녹말에 대한 HPA II의 활성과 최적 pH 변화

가용성 녹말을 기질로 한 활성 측정 결과 최적 온도는 40°C이었으며, 최적 pH는 pH6.5이었다(Fig. 2). 염소이온의 영향을 살펴 보기 위해서 NaCl을 농도 별로 첨가한 결과 최적온도는 염소이온의 증가에 따른 변화가 없었으나(Data not shown), 효소활성의 경우 염소이온의 농도 10 mM까지 농도 의존적으로 증가한 후

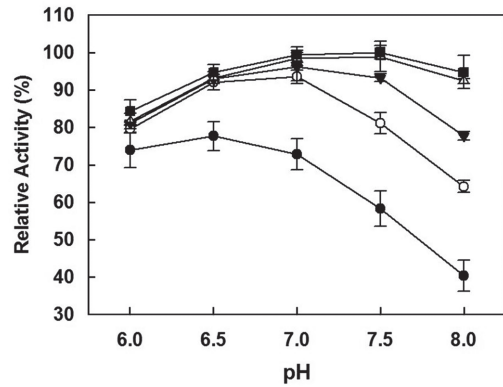


Fig. 3. Effect of chloride ion on HPA II activity. The reactions were conducted in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0-0H 8.0) at 30°C with 0, 1, 2, 5, and 10 mM NaCl. The relative activities were calculated on the basis of the activity at pH 7.5 in the presence of 10 mM NaCl. Closed circles, open circles, closed triangles, open boxes and closed boxes represent the reactions with 0, 1, 2, 5, and 10 mM NaCl, respectively.

(Fig. 3), 그 이상에서는 거의 변화가 나타나지 않았다. 이러한 경향은 HPA I에서도 유사한 결과를 나타내었다(5). Numao 등은 발색단을 가지는 합성기질인 2-클로로-4-나이트로페닐- α -말토트리오시드(2-chloro-4-nitrophenyl- α -maltotriose, CNP-G3)를 이용한 분석에서 HPA I의 k_{cat}/K_M 값이 100 mM NaCl 조건까지 증가된다고 보고하였다(5). 최적 pH의 경우 HPA II는 0 mM NaCl 조건에서는 pH 6.5이었던 최적 pH가 염소이온의 농도가 증가할 수록 염기성 영역으로 이동하였으며, 10 mM에서는 pH 7.5가 최적 pH로 측정되었다(Fig. 3). 염소이온 첨가에 따른 최적 pH의 염기성 pH 영역으로의 이동현상은 염소이온 의존형 α -아밀레이스의 일반적인 특성으로 보고되고 있다(7,23).

CNP-G3를 기질로 사용한 HPA I의 경우 염소이온의 첨가에 따라 pH의 이동(pH 7.0에서 pH 7.5로 이동)과 더불어서 전반적인 pH영역(pH 6-8)에서 효소활성 증대가 나타났다(7). 반면 녹말을 기질로 분석한 본 실험에서는 pH 6에서는 거의 활성의 증대가 없었으나, pH 8에서의 효소활성 증대가 크게 나타났다(Fig. 3). Numao 등은 염소 이온 존재에 따른 최적 pH의 증가가 염소 이온의 존재에 따른 산/염기 촉매 잔기의 pK_a 값의 증가 때문으로 설명하였다(7). 따라서 2-클로로-4-나이트로페놀(2-chloro-4-nitrophenol)

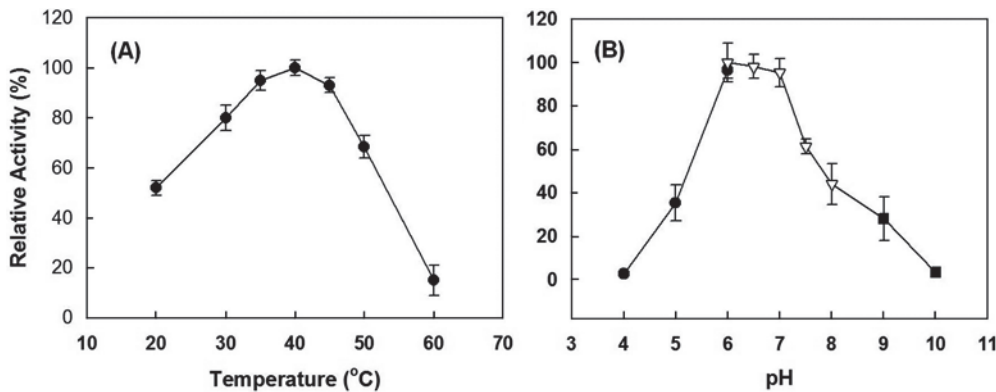


Fig. 2. Effect of temperature and pH on HPA II activity. (A) The profile of activity over temperature. The reactions were conducted in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), (B) The profile of activity of pH. The reactions were conducted at 30°C. Closed circles, open triangles, and closed boxes represent the reactions in 100 mM sodium acetate buffer (pH 4-pH 6), 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0-pH 8.0), and 100 mM glycine-NaOH buffer (pH 9.0-pH 10.0), respectively.

Table 1. Effect of salts and EDTA on HPA II activity^a

| Additives | Relative activity (%) | Additives | Relative activity (%) |
|-------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|
| None | 100±0.8 | MnCl ₂ | 69.8±0.6 |
| NiSO ₄ | 82.5±1.0 | CaCl ₂ | 117.0±1.4 |
| CuSO ₄ | 82.3±1.5 | KCl | 112.3±2.1 |
| FeSO ₄ | 98.0±1.1 | NaCl | 112.4±0.6 |
| MgSO ₄ | 100.9±1.7 | EDTA | 65.8±0.3 |

^aThe reactions were conducted in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.5% soluble starch as the substrate at 30°C.

mol)과 같은 좋은 이탈기(leaving group)을 가지는 CNP-G3의 경우 산/염기 촉매 잔기의 프로톤화(protonation) 정도에 덜 민감하므로 염소이온 존재 하에서 전반적인 pH 영역에서 효소 활성이 증가한 반면, 전분을 기질로 하는 경우 pH에 따른 산/염기 촉매 잔기의 프로톤화 정도가 효소 활성에 중요한 영향을 미침으로써 산성 pH 영역(pH 6)에서는 효소 활성이 차이가 없었으며, 염기성 pH 영역(pH 8)에서는 효소 활성이 크게 증가한 것으로 보인다.

염이 효소 활성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 1 mM 염 존재 하에서 효소 활성을 측정하였다(Table 1). 그 결과 염소를 포함하지 않는 염에 의해서는 활성의 변화가 없었으며, 니켈 및 구리 이온을 포함하는 염에 의한 활성 억제가 관찰되었다. 반면 염소이온을 포함하는 염에 의해서는 활성이 증가하였으나, 염화망가니스(MnCl₂)의 경우 염소 이온이 존재함에도 불구하고 효소 활성이 70% 수준으로 감소하는 것으로 봐서 망가니스 이온에 의해

서 효소 활성이 억제되는 것으로 판단된다. 일반적으로 α -아밀레이스는 칼슘이온을 조효소로 이용하며 효소 활성뿐만 아니라 구조적 안정성을 유지하는데 있어서 중요한 역할을 수행한다(24,25). HPA I의 경우 미생물 유래 α -아밀레이스들이 가지는 칼슘 결합 자리에 해당하는 아미노산 잔기(Asn100, Arg158, Asp167, 및 His201)를 가지고 있음이 보고되었다(26). HPA II 역시 동일한 잔기로 구성된 칼슘 결합 자리를 가지고 있으나, NaCl과 염화포타슘(KCl)과 비교해서 염화칼슘(CaCl₂) 존재 시 효소 활성이 크게 증가하지 않았으며(Table 1), 내열성 역시 크게 다르지 않았다(data not shown). 그러나 EDTA에 의해서 HPA II의 효소 활성이 감소하는 것을 감안하면(Fig. 3), 정제과정에서 HPA II의 칼슘 결합 부위에 이미 칼슘이 결합되어 있기 때문인 것으로 판단하였다.

곡류 녹말에 대한 HPA II의 기질 특이성

식품으로부터 섭취되는 곡류 녹말에 대한 HPA II의 기질 특이성을 알아보기 위해서 다양한 곡류 녹말과 약 55% 아밀로오스를 함유하는 고아밀로스 녹말(Hylon-V, Ingredion Korea Inc., Incheon, Korea)을 기질로 하여 효소 활성에 대한 반응속도론적 분석(kinetic analysis)을 실시하였다. 염소이온 부재 시 곡류 녹말을 기질로 사용한 경우 전형적인 포화 반응속도 유형(saturation kinetics mode)을 나타내었으나(Fig. 4A), 가용성 녹말의 경우 고농도의 기질 조건에서 활성이 저해되는 기질 억제 반응속도 유형(substrate inhibition kinetics mode)을 나타내었다(Fig. 4B). 흥미롭게 염소이온이 존재할 경우 곡류 녹말에 대해서도 고농도의 기질 조건에서 기질 억제 반응속도 유형이 관찰되었다(Fig. 4C). 가용성 녹말의 경우 역시 염소이온을 첨가하였을 때 기질에 의한

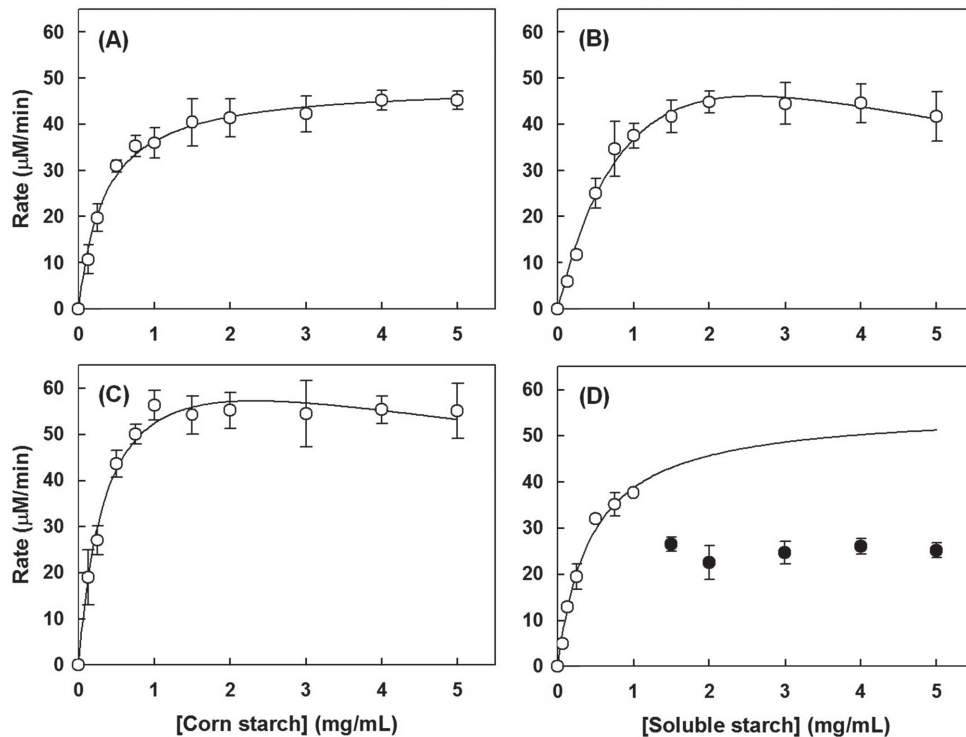


Fig. 4. Kinetics of hydrolysis of starches catalyzed by HPA II. The kinetic modes for cereal starches were similar to those for corn starch. Kinetics results for corn starch were shown as the representatives in this figure. (A) Dependence of rate on corn starch concentration without chloride. (B) Dependence of rate on soluble starch concentration without chloride. (C) Dependence of rate on corn starch concentration with 10 mM NaCl; (D) Dependence of rate on soluble starch concentration with 10 mM NaCl. Due to the abnormal substrate inhibition mode at high substrate concentrations (closed circles), only the rates at low substrate concentrations (open circles) were fitted to the Michaelis-Menten equation.

Table 2. Kinetic parameters of HPA II in the presence or absence of NaCl^a

| Additives | Starch substrates | k_{cat} (sec ⁻¹) | K_m (mg/mL) | k_{cat}/K_m (s ⁻¹ /mg · mL ⁻¹) | K_i (mg/mL) | Kinetics mode |
|------------|-----------------------------|--------------------------------|---------------|---|-----------------|----------------------|
| No NaCl | Soluble starch | 460.8±87.1 | 1.41±0.40 | 326.8 | 4.68±1.81 | Substrate inhibition |
| | Waxy corn | 233.5±10.0 | 1.14±0.13 | 204.8 | - ^b | Saturation |
| | Potato | 240.6±7.5 | 0.66±0.07 | 364.5 | - | Saturation |
| | Corn | 233.2±4.8 | 0.33±0.03 | 706.6 | - | Saturation |
| | Hylon V | 210.5±4.7 | 0.65±0.05 | 323.8 | - | Saturation |
| 10 mM NaCl | Soluble starch ^c | 795.3±68.1 | 0.44±0.09 | 1807 | ND ^d | Substrate inhibition |
| | Waxy corn | 1303±209 | 0.87±0.21 | 1498 | 6.95±2.58 | Substrate inhibition |
| | Potato | 1728±273 | 1.10±0.24 | 1571 | 5.96±1.95 | Substrate inhibition |
| | Corn | 1082±100 | 0.37±0.07 | 2925 | 14.23±5.45 | Substrate inhibition |
| | Hylon V | 1287±88 | 0.87±0.09 | 1480 | 11.29±2.39 | Substrate inhibition |

^aThe reactions were conducted in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.5% a substrate at 30°C.

^bNot detected

^cThe kinetic parameters were obtained by fitting the reaction rates at the substrate concentrations ranging from 0.0625 to 1 mg/mL.

^dNot determined

활성 억제제가 보다 강하게 나타났다. 하지만 일반적인 기질 억제 양상과 다르게 기질 농도가 1 mg/mL를 넘어서면서 크게 감소한 후, 이후로는 속도가 유지되는 특이한 경향을 나타내었다(Fig. 4D).

염소이온 존재 시 가용성 녹말을 기질로 사용한 실험 결과 값은 기질 억제 반응속도 식에 맞지 않았기 때문에 억제 상수(K_i) 값을 결정하지 못하고 저농도 구간에서의 반응속도 값만을 이용하여 반응속도 상수만을 구하였으며, 이외의 기질에 대해서는 반응속도 유형에 따른 반응 속도식을 이용하여 반응속도상수와 억제 상수를 구하였다(Table 2). 반응속도상수를 비교하면 염소이온에 따른 곡류 녹말에 대한 K_m 값의 변화는 거의 없었으나, 특이하게 가용성 녹말의 경우 염소 이온이 존재할 때 K_m 값(0.44 mg/mL)이 염소이온이 없을 때 K_m 값(1.41 mg/mL)의 30% 수준으로 크게 감소하여 기질에 대한 친화도가 높아졌음을 알 수 있었다. 전환수(turnover number, k_{cat})의 경우 곡류 녹말에 대한 값은 염소이온이 존재함에 따라 4.6-7.2배 증가하였으나, 가용성 녹말에 대한 k_{cat} 값의 증가는 1.7배에 불과하였다. 촉매 효율(catalytic efficiency, k_{cat}/K_m)을 기반으로 기질에 대한 특이성을 살펴보면 옥수수 녹말에 대한 기질특이성이 염소이온의 존재여부와 상관없이 가장 우수하였다. 가용성 녹말에 대한 촉매 효율과 비교해서 다른 곡류 기질의 촉매 효율은 유사하거나 낮은 반면, 옥수수 녹말에 대한 촉매 효율은 염소이온 부재 시 2.16배, 염소이온 존재 시 1.62배 큰 값을 나타내었으며, 이는 다른 기질에 비해 상대적으로 낮은 K_m 값(염소이온 존재 혹은 부재 시 각각 0.33 및 0.37 mM)에 기인한 것이다.

염소이온이 존재할 경우 고농도의 기질 조건에서 기질에 의한 효소 활성 억제 정도가 증가하는 경향을 나타내었다. 앞서 서술한 바와 같이 염소이온이 존재할 때 가용성 녹말에 대한 K_i 값은 결정할 수 없었으나, 기질 농도가 1 mg/mL와 2 mg/mL일 때의 반응속도를 비교하면 가장 높은 기질 억제 경향을 나타내었다(Fig. 4D). 또한 염소 이온이 존재할 경우 곡류 녹말에 대한 기질 저해 경향이 나타났으며 K_i 값은 6-15 mg/mL 수준이었다(Table 2). 고농도 기질 조건에서 활성 억제가 일어나는 이유는 기질과 효소의 결합이 비활성형 결합(noncatalytic binding), 즉 기질이 촉매 반응이 일어날 수 있도록 -1 서브사이트(subsite)와 +1 서브사이트에 걸쳐 결합하지 않고 + 서브사이트 혹은 - 서브사이트에만 결합함으로써 기질과 효소의 활성형 결합을 경쟁적으로 억제하기 때문이다(27). 염소이온의 존재 하에서 기질억제 양상이 심화

되는 이유는 효소의 활성 증대로 인해 고농도 기질 조건에서 녹말보다 사슬의 길이가 짧은 말토올리고당이 반응 초반에 다량 생성되면서 효소와 말토올리고당 간의 비활성형 결합이 촉진되기 때문일 것으로 추측된다.

요 약

HPA는 식품으로 섭취되는 녹말을 분해하는데 있어서 매우 중요한 역할을 수행하는 효소이기 때문에 HPA 효소 활성의 억제는 당뇨와 비만과 같은 질환의 예방과 치료에 있어서 의미를 가진다. 따라서 HPA는 당뇨병 치료와 비만 예방을 위한 새로운 식·의약품 소재 개발을 위한 주요 타겟 효소 중 하나이며, 새로운 소재의 개발을 위해서는 HPA의 반응 메커니즘을 비롯하여 천연 기질 분해 특성에 대한 이해가 반드시 필요하다. 본 연구에서는 HPA의 동질효소 중 연구가 거의 진행되지 않은 HPA II에 대한 효소 특성화를 진행하고자 *P. pastoris* 시스템을 이용하여 재조합 HPA II를 생산하였으며, 녹말 분해와 관련된 효소적 특성을 분석하였다.

HPA II는 10 mM NaCl까지 농도 의존적으로 효소활성이 증가하였으며, 최적 활성을 위한 pH는 0 mM NaCl 조건에서 pH 6.5이었으나 10 mM NaCl 조건에서 pH 7.5로 이동하는 특성을 보였으며, 이는 HPA I을 포함하는 염소이온 의존형 아밀레이스가 나타내는 전형적인 특징이다. 염소이온 존재 시 최적 pH가 염기성 pH 영역으로 이동하는 것은 염소 이온과 효소의 결합에 의해 HPA II의 산/염기 촉매 잔기의 pK_a 값이 커진다는 것을 의미하며, 염소이온을 첨가하였을 때 녹말에 대한 가수분해 활성의 증대 정도가 산성 pH 영역보다 염기성 pH 영역에서 두드러지게 나타났다는 점이 이를 뒷받침하였다. 반응속도론적 분석 결과에 따르면 염소이온 존재 시 효소활성의 증대는 대부분 전환수(turnover number)의 증대에 의한 것으로 나타났으며, 가용성 녹말 보다 곡류 녹말에 대한 전환수의 증대가 크게 나타났다. 염소이온은 활성의 증대뿐만 아니라 고농도의 기질 조건에서 기질에 의한 효소 활성 억제 양상을 심화시키는 것으로 나타났다. 결론적으로 HPA II의 특징은 HPA I과 거의 유사한 경향을 나타내었으며, 염소이온 첨가여부에 따른 HPA II의 가수분해 활성 결과를 바탕으로 향후 HPA에 대한 곡류 녹말 가수분해 활성 억제제 개발을 위한 연구를 추진할 계획이다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동기술개발사업(PJ011241022016)와 한국연구재단의 일반연구자지원사업(2013R1A1A2061215)의 지원을 받아 수행하였으며 이에 감사드립니다.

References

- Jenkins DJ, Taylor RH, Goff DV, Fielden H, Misiewicz JJ, Sarson DL, Bloom SR, Alberti KG. Scope and specificity of acarbose in slowing carbohydrate absorption in man. *Diabetes* 30: 951-954 (1981)
- Rachmani R, Bar-Dayyan Y, Ronen Z, Levi Z, Slavachevsky I, Ravid M. The effect of acarbose on insulin resistance in obese hypertensive subjects with normal glucose tolerance: a randomized controlled study. *Diabetes Obes. Metab.* 6: 63-68 (2004)
- Tarling CA, Woods K, Zhang R, Brastianos HC, Brayer GD, Andersen RJ, Withers SG. The search for novel human pancreatic α -amylase inhibitors: High-throughput screening of terrestrial and marine natural product extracts. *Chembiochem* 9: 433-438 (2008)
- Lee BH, Yan L, Phillips RJ, Reuhs BL, Jones K, Rose DR, Nichols BL, Quezada-Calvillo R, Yoo SH, Hamaker BR. Enzyme-synthesized highly branched maltodextrins have slow glucose generation at the mucosal α -glucosidase level and are slowly digestible in vivo. *PLoS One* 8: e59745 (2013)
- Maurus R, Begum A, Kuo HH, Racaza A, Numao S, Andersen C, Tams JW, Vind J, Overall CM, Withers SG, Brayer GD. Structural and mechanistic studies of chloride induced activation of human pancreatic α -amylase. *Protein Sci.* 14: 743-755 (2005)
- Rydberg EH, Li C, Maurus R, Overall CM, Brayer GD, Withers SG. Mechanistic analyses of catalysis in human pancreatic α -amylase: Detailed kinetic and structural studies of mutants of three conserved carboxylic acids. *Biochemistry* 41: 4492-4502 (2002)
- Numao S, Maurus R, Sidhu G, Wang Y, Overall CM, Brayer GD, Withers SG. Probing the role of the chloride ion in the mechanism of human pancreatic α -amylase. *Biochemistry* 41: 215-225 (2002)
- Maurus R, Begum A, Williams LK, Fredriksen JR, Zhang R, Withers SG, Brayer GD. Alternative catalytic anions differentially modulate human α -amylase activity and specificity. *Biochemistry* 47: 3332-3344 (2008)
- Zechele DL, Withers SG. Dissection of nucleophilic and acid-base catalysis in glycosidases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5: 643-649 (2001)
- Vocadlo DJ, Davies GJ, Laine R, Withers SG. Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature* 412: 835-838 (2001)
- Aghajari N, Feller G, Gerday C, Haser R. Structural basis of α -amylase activation by chloride. *Protein Sci.* 11: 1435-1441 (2002)
- D'Amico S, Gerday C, Feller G. Structural similarities and evolutionary relationships in chloride-dependent α -amylases. *Gene* 253: 95-105 (2000)
- Cipolla A, Delbrassine F, Da Lage JL, Feller G. Temperature adaptations in psychrophilic, mesophilic and thermophilic chloride-dependent α -amylases. *Biochimie* 94: 1943-1950 (2012)
- Nishide T, Nakamura Y, Emi M, Yamamoto T, Ogawa M, Mori T, Matsubara K. Primary structure of human salivary α -amylase gene. *Gene* 41: 299-304 (1986)
- Horii A, Emi M, Tomita N, Nishide T, Ogawa M, Mori T, Matsubara K. Primary structure of human pancreatic α -amylase gene; Its comparison with human salivary α -amylase gene. *Gene* 60: 57-64 (1987)
- Tomita N, Horii A, Doi S, Yokouchi H, Shiosaki K, Higashiyama M, Matsuura N, Ogawa M, Mori T, Matsubara K. A novel type of human α -amylase produced in lung carcinoid tumor. *Gene* 76: 11-18 (1989)
- Ferey-Roux G, Perrier J, Forest E, Marchis-Mouren G, Puigserver A, Santimone M. The human pancreatic α -amylase isoforms: isolation, structural studies and kinetics of inhibition by acarbose. *Biochim. Biophys. Acta* 1388: 10-20 (1998)
- Shiosaki K, Takata K, Omichi K, Tomita N, Horii A, Ogawa M, Matsubara K. Identification of a novel α -amylase by expression of a newly cloned human *amy3* cDNA in yeast. *Gene* 89: 253-258 (1990)
- Lin-Cereghino J, Wong WW, Xiong S, Giang W, Luong LT, Vu J, Johnson SD, Lin-Cereghino GP. Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechniques* 38: 44-48 (2005)
- Lee JI, Kim YW. Characterization of amine oxidases from *Arthrobacter aureescens* and application for determination of biogenic amines. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29: 673-682 (2013)
- Fox JD, Robyt JF. Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. *Anal. Biochem.* 195: 93-96 (1991)
- Haldane JBS. *Enzymes*. Longmans, Green and Co., London, England (1930)
- Feller G, Bussy O, Houssier C, Gerday C. Structural and functional aspects of chloride binding to *Alteromonas haloplanctis* α -amylase. *J. Biol. Chem.* 271: 23836-23841 (1996)
- Declerck N, Machius M, Wiegand G, Huber R, Gaillardin C. Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis* α -amylase. *J. Mol. Biol.* 301: 1041-1057 (2000)
- Machius M, Declerck N, Huber R, Wiegand G. Activation of *Bacillus licheniformis* α -amylase through a disorder→order transition of the substrate-binding site mediated by a calcium-sodium-calcium metal triad. *Structure* 6: 281-292 (1998)
- Brayer GD, Luo Y, Withers SG. The structure of human pancreatic α -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Sci.* 4: 1730-1742 (1995)
- Reed MC, Lieb A, Nijhout HF. The biological significance of substrate inhibition: A mechanism with diverse functions. *Bioessays* 32: 422-429 (2010)