

*Pleurotus ostreatus*에서 분리된 Glyoxalase I의 특성

김성태 · 양갑석 · 석영재 · 허원기 · 강사육*

서울대학교 자연과학대학 미생물학과, 서울대학교 분자미생물학연구소

*Pleurotus ostreatus*로부터 glyoxalase I (S-lactoyl-glutathione methylglyoxal lyase, EC 4.4.1.5) 이 S-hexylglutathione affinity chromatography, Sephadex G-150 gel permeation chromatography, DEAE-sepharose A-50 CL-6B ion exchange chromatography를 통해 순수 분리되었다. 이 결과, 전체 활성도의 21.7%를 수확하였으며, 분리 배수는 2,294 배 이었다. Gel filtration chromatography로 측정할 효소의 분자량은 34 kDa이며, SDS-PAGE 결과 본 효소는 분자량 17 kDa인 동일한 소단위체 두개로 구성된 이합체라고 생각된다. Methylglyoxal과 phenylglyoxal에 대한 K_m 값은 각각 0.39 mM 과 0.22 mM 이며 L-xylosone과 hydroxypyruvaldehyde에 대해서도 강한 친화력을 보여주고, pH 6.5~7.5, 35~45°C에서 활성도가 가장 높았다. 이 효소의 반응 과정을 핵자기공명분광법으로 분석한 결과, 분자내의 양성자 전달과정이 뚜렷이 관찰되었다.

KEY WORDS □ glyoxalase I, L-xylosone, hydroxypyruvaldehyde, intramolecular proton transfer, *Pleurotus ostreatus*

1913년 발견된 glyoxalase 시스템은 환원형 glutathione을 보조인자로 사용하여 methylglyoxal을 lactate로 전환시키는 것으로 알려져왔다. 이 시스템은 glyoxalase I과 glyoxalase II로 구성되어 있는데, glyoxalase I (S-lactoyl-glutathione methylglyoxal lyase, EC 4.4.1.5)는 methylglyoxal과 환원형 glutathione의 비효소적 반응으로 형성된 hemimercaptal에 작용하여 thiolester인 S-D-lactoylglutathione을 생성한다. 생성된 thiolester는 glyoxalase II에 의해 가수분해되어 D-lactate와 환원형 glutathione이 생성된다. Glyoxalase I은 rat liver (10), pig erythrocyte (2), human erythrocyte (3), sheep liver (23), *Saccharomyces cerevisiae* (8), *Aspergillus niger* (13), *Pseudomonas putida* (19), 그리고 monkey intestinal mucosa (4)에서 분리되었다.

Glyoxalase I은 지금까지 조사된 모든 생물체에서 발견되며 생체의 대사 활동에서 기본적인 중요한 역할을 할 것이라고 생각하고 있으며, 그동안 이 효소의 생물학적인 역할의 규명에 많은 노력들이 기울여져 왔다. Enterobacteria (6) 등에서 dihydroxyacetone phosphate에서 methylglyoxal을 생성하는 methylglyoxal synthase가 발견되었다. 이 효소와 glyoxalase I에 의해 triose phosphate를 pyruvate로 바꾸는 nonphosphorylated glycolytic bypass가 형성되어 해당 과정이 조절된다고 보고된 바 있다. Gillespie (11)는 S-D-lactoylglutathione의 농도에 따라 anti-IgE-induced histamine release와 microtubule assembly가 조절되며 S-D-lactoylglutathione의 농도는 glyoxalase I에 의해 조절된다고

주장하였다. *Rhodospirillum*에서는 tetrapyrrol 합성의 조절에 glyoxalase I이 관여하며 heme의 생합성에 glyoxalase I이 관여할 것이라는 보고가 있다 (9). 그러나 위에 제시된 역할들은 일부에 국한된 기능들이고 glyoxalase I의 역할에 대한 일반적인 설명을 위해서는 미흡하다고 하겠다.

Szent-Grörgyi (21)는 retine-promine theory를 발표하였는데, 이는 세포 분열이 성장을 억제하는 retine과 성장을 촉진하는 promine에 의해 조절된다는 가설이다. Szent-Györgyi는 retine으로 α -ketoaldehyde를, promine으로 glyoxalase I을 제시하였다. α -ketoaldehyde는 친전자체로서 세포 성장을 억제하는 것으로 알려져왔으며, glyoxalase I은 이러한 cytotoxin을 비독소화시키는 것으로 생각된다 (24).

한편, ascorbate의 대사 경로는 아직 밝혀지지 않았으며 다만 식물에서 ascorbate oxidase (17)와 동물에서 dopamine- β -hydroxylase (22)에 의해 ascorbate가 dehydroascorbate로 산화된다고 보고된 바 있다. Dehydroascorbate는 2,3-diketo-L-gulonic acid로 가수분해 되고 이것이 탈탄산 작용에 의해 L-xylonic acid와 L-lyxonic acid로 산화되는 것으로 보고되었다 (14). L-Xylonic acid는 lactonase나 비효소적 반응으로 L-xylono- γ -lactone으로 전환되는 것으로 생각된다. 또한 proton decoupled ^{13}C -NMR에 의해 ascorbate의 비효소적 반응으로 L-xylosone과 erythroascorbate가 생성되는 것이 밝혀졌다 (15). 이와 같은 사실을 종합하여 Kang (16)은 α -ketoaldehyde와 γ -lactone 화합물로 구성되는 생체내 L-ascorbate의 이화 과정을 제안하였다.

본 논문에서는 *Pleurotus ostreatus*에서 glyoxalase I을 순수 분리하여 ascorbate의 이화과정 중에 생기는 것으로 생각되는 L-xylosone과 hydroxypyruvaldehyde에 대한 반응성과 ascorbate의 이화과정과의 관계를 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양 과정

본 실험에서 사용한 균주는 한국 산림 조합 연합회에서 분양받은 *Pleurotus ostreatus* (Strain No. 2)로서, potato dextrose agar slant에 접종, 4°C에서 보관하였으며, 4주 간격으로 계대 배양하였다. 균체를 얻기 위한 배지로는 malt 배지 (1 l 수용액에 dextrose 10 g, malt extract 20 g, yeast extract 5 g, peptone 5 g)를 사용하였다. Malt 배지에서 7일간 배양한 균체를 omni-mixer (Du Pont Instrument No. 17047)로 분쇄하여 새 malt 배지에 전체 부피의 1%를 접종한 후 27°C에서 7일간 진탕 배양하였다.

효소 활성도의 측정과 단백질 정량

Glyoxalase I의 활성도는 Racker (18)의 방법을 사용하였다. 반응 용액은 0.1 M 인산 완충 용액, pH 7.0 인산 완충용액에 3 mM methylglyoxal, 3 mM 환원형 glutathione을 녹여 사용하였으며, 효소 시료 20~30 μ l을 첨가한 후 25°C에서 240 nm에서의 1분간 흡광도의 변화를 측정하였다. 1분간 1 μ mol S-D-lactoylglutathione을 생성하는 효소의 양을 1 unit으로 정하였고 모든 흡광도는 Shimadzu UV-265 spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. 단백질 정량은 Bradford (5) 법을 사용하였으며, 표준 단백질로는 bovine serum albumin (Sigma Chemical Co.)을 사용하였다.

효소의 정제

대량으로 배양한 균체를 0.1 M 인산 완충 용액, pH 7.0으로 5번 이상 세척하였다. 이에 산화 알미늄을 섞어 omni-mixer (Du Pont Instrument, No. 17047)로 균체를 분쇄하였다. 다음 8,000 \times g에서 30분간 원심 분리하여 상등액을 조효소로 사용하였다.

조효소 용액에 아세톤을 65% 되게 처리한 후 8,000 \times g, 0°C에서 15분간 원심 분리하였다. 이때 얻어진 침전물을 10 mM 인산 완충 용액, pH 7.0에 녹여 동일한 완충 용액으로 4°C에서 24시간 투석시킨 후 원심 분리하여 상등액을 얻었다.

10 mM 인산 완충 용액, pH 7.0 (0.2 M NaCl 포함)으로 평형시킨 column (2.5 \times 3 cm)에 효소 시료를 얹고 600 ml의 동일 완충 용액으로 용출시킨 후 같은 완충 용액에 3 mM S-hexylglutathione과 10 mM reduced glutathione을 녹인 용액으로 용출시켰다. 용출 속도는 25 ml/h이고 5 ml/씩 분획하였다.

20 mM 인산 완충 용액, pH 7.0으로 평형시킨 column (2.8 \times 100 cm)에 효소 시료를 얹고 동일한

완충 용액으로 용출시켰다. 용출 속도는 10 ml/h이고 7 ml/씩 분획하였다.

10 mM 인산 완충 용액으로 평형 시킨 column (2 \times 10 cm)에 시료를 얹고 250 ml의 완충 용액으로 용출한 후 다시 같은 완충 용액에서 0~0.25 M NaCl의 일정 농도 기울기로 용출시켰다. 용출 속도는 25 ml/h이고 6 ml/씩 분획하였다.

SDS-discontinuous polyacrylamide gel 전기 영동

Davis (7)의 방법을 변형하여 discontinuous buffer system, gel system, 그리고 tris-glycine (pH 8.3) 완충용액을 채택하였다. Acrylamide의 농도는 stacking gel과 resolving gel이 각각 3.75와 12.5%가 되게 하고 전압은 stacking gel과 resolving gel이 각각 80과 160 V가 되게 하였다. 시료는 62.5 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 6.8), 2% sodium dodecyl sulfate, 5% 2-mercaptoethanol에 녹여 100°C에서 5분간 중탕하여 사용하였다. 표준 단백질로는 glutamate dehydrogenase (55.4 kDa), aldolase (39.2 kDa), triose phosphate isomerase (26.6 kDa) 그리고 lysozyme (14.3 kDa) (이상 Boehringer Mannheim Biochemica)을 사용하였다.

젤 여과 크로마토그래피에 의한 효소의 분자량 측정

Sephadex G-150 (Pharmacia Fine Chemicals)을 column (3 \times 100 cm)에 충전하여 20 mM 인산 완충 용액, pH 7.0으로 평형시킨 후 blue dextran (2,000 kDa), β -amylase (200 kDa), alcohol dehydrogenase (150 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), 그리고 cytochrome C (12.4 kDa)를 동일 완충 용액 10 ml에 녹여 얹은 후 용출시켰다. 용출 속도는 9 ml/h이며 4.3 ml/씩 분획하였다.

효소 활성도에 대한 온도와 pH의 영향

효소 활성도에 대한 온도의 영향을 조사하기 위하여 20°C에서 60°C까지 5°C 간격으로 활성도를 조사하였다. 효소 반응의 활성화 에너지는 Arrhenius 공식으로 구하였다. 효소 활성도에 대한 pH의 영향을 조사하기 위하여 pH 2.0~6.5에서는 20 mM 인산-시트르산 완충 용액을, pH 6.0~8.0에서는 20 mM 인산 완충 용액을, pH 7.5~9.5에서는 20 mM Tris-HCl 완충 용액을 사용하여 효소의 활성도를 측정하였다.

자외선 분광계에 의한 효소 반응의 분석

Methylglyoxal, phenylglyoxal, L-xylosone, 그리고 hydroxypyruvaldehyde의 효소 반응을 자외선 분광계로 측정하였다. 0.1 M pH 7.0 인산 완충 용액에 기질과 효소를 넣고 25°C에서 methylglyoxal과 phenylglyoxal은 2분 간격으로, L-xylosone과 hydroxypyruvaldehyde는 5분 간격으로 자외선 스펙트럼을 얻었다.

K_m 값 측정

K_m 값을 구하기 위하여 methylglyoxal과 phenyl-

Table 1. Purification scheme of glyoxalase I from *Pleurotus ostreatus*.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Recovery (%)	Purification (-fold)
Crude extract	4547.21	1573.3	0.35	100	1
Acetone precipitation	905.24	1396.8	1.54	88.8	4.5
S-Hexylglutathione chromatography	4.69	1087.2	231.7	69.1	669.6
Sephadex G-150 chromatography	1.43	601.0	421.3	38.2	1217.6
DEAE A-50 CL-6B chromatography	0.43	341.4	793.8	21.7	2294.2

glyoxal의 범위는 0.1~3 mM로 하였고 환원형 glutathione은 3 mM로 고정하였다. α -Ketoaldehyde와 환원형 glutathione간의 비효소적 반응에 의해 생긴 기질인 hemimercaptal의 농도는 해리상수를 이용하여 계산하였다. Methylglyoxal의 K_{dis} 는 3 mM이며 phenylglyoxal의 K_{dis} 는 0.6 mM이다.

L-Xylosone와 hydroxypyruvaldehyde의 합성 및 정량

L-Xylosone의 합성은 Salomon (20)의 방법을 수정 보완하여 사용하였다. L-Xylose 4.0 g (Sigma)을 증류수 17 ml에 녹인 후, cupric acetate, monohydrate 17.0 g (Wako)과 methanol 250 ml (Merck)을 넣어 methanol의 비등점에서 30분간 리플럭스 시켰다. 이 용액을 0.45 μ m glass filter로 걸러 침전된 cupric oxide를 제거하였다. 이 여과액을 Dowex 50 X8-H⁺ 양이온 교환 수지 (20X220 cm)를 통과시켜 남은 구리 이온을 제거하였다. 여기서 얻은 용액은 acetate와, 반응중에 생긴 유기산을 제거하기 위하여 질소 대기하에서 진공상태로 40°C를 유지하며 증발시켜 5 ml 정도로 농축된 용액을 Dowex I-HCO₃⁻ 음이온 교환 수지 (30X15 cm)에 얹어 증류수로 용출했다. 용출액을 분획 수집기로 모아서 3~4 방울을 2.0 N HCl에 포화시킨 2,4-dinitrophenylhydrazine 용액과 반응시켜 침전된 부분만 모았다.

Hydroxypyruvaldehyde의 합성은 L-xylose 대신 dihydroxyacetone (Sigma)을 사용하며 그다음 과정은 L-xylosone의 합성과 같다. L-Xylosone과 hydroxypyruvaldehyde의 정량은 Alexander와 Boyer (1)의 방법을 수정하여 사용하였다. pH 3.0으로 조정된 6.7 mM semicarbazide-HCl 용액에 5 μ l의 시료를 넣고 60°C에서 60분간 반응시킨 후 286 nm의 흡광도를 측정하였다. 표준 시약으로는 0.1~1.0 mM methylglyoxal 용액을 사용하였다.

¹H-NMR spectroscopy에 의한 효소 반응 산물의 분석

Methylglyoxal (40%, Sigma) 10 ml를 증류수 100 ml와 diethylether 200 ml에 섞고 약 2시간 흔들어 주고 위의 용액을 잠시 놓아 두면 두 층으로 분리되는데 이중 상층액만을 얻었다. 이 용액에 sodium sulfate, anhydrous를 넣어 물을 제거한 후 이것을 rotary evaporator (30°C)로 농축시켰다. 1.0 M pD

**Fig. 1.** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of glyoxalase I.

As molecular-mass standards, glutamate dehydrogenase (55.6 kDa), aldolase (39.2 kDa), triosephosphate isomerase (26.6 kDa) and lysozyme (14.3 kDa) were used.

5.4 deuterated acetate buffer에 위에서 분리한 0.2 M methylglyoxal과 0.5 M 환원형 glutathione을 녹인 후 효소 30 units을 넣고 25°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이것을 냉동 건조시킨 후 D₂O에 녹여 분석에 이용하였다. NMR 기종은 VXR-200 (200.1 MHz)이며 내부 표준 물질로는 3-(trimethylsilyl)-propansulfonate, sodium salt를 사용하였다. 물의 HOD signal은 homogated decoupling으로 억제하였고 acquisition time은 4s이었다.

결 과

Glyoxalase I의 분리

조효소 용액을 황산 암모늄 처리, S-hexylglutathione 친화 크로마토그래피, Sephadex G-150 젤 크로마토그래피, 그리고 DEAE-Sepharose A-50 이

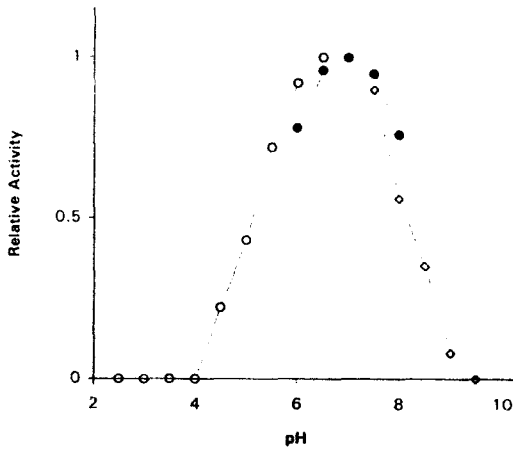


Fig. 2. Optimal pH of glyoxalase I. Symbols: pH 2.5~5.5, 10 mM phosphate-citrate buffer (○); pH 6.0~8.0, 10 mM phosphate buffer (●); and pH 8.5~9.5, 10 mM Tris/HCl buffer (◇).

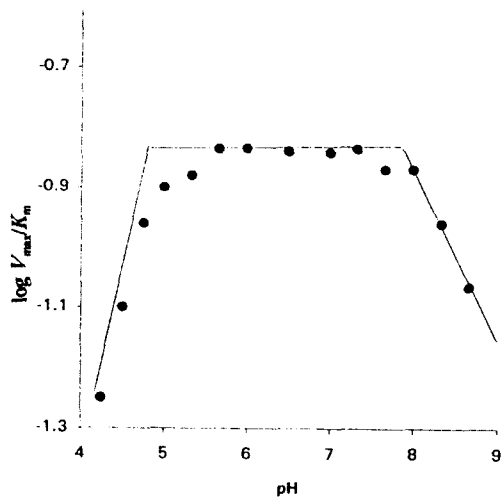


Fig. 3. Dixon and Webb plot of glyoxalase I for the hemimercaptal of methylglyoxal and glutathione.

은 교환 크로마토그래피를 수행한 결과, 21.7% 수율에 specific activity가 2,294배 증가하였다 (Table 1). 분리한 효소를 SDS-polyacrylamide gel 상에서 전기영동을 한 결과 단일 밴드로 나타났다 (Fig. 1).

분자량

젤 여과 크로마토그래피상에서 효소의 분자량을 측정하였다. 표준 단백질의 V_e/V_o (V_e : 용출 부피, V_o : void 부피) 값을 분자량의 상용 대수값에 대하여

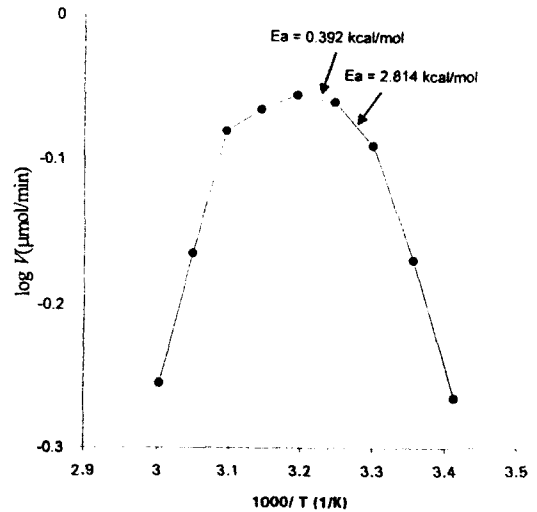


Fig. 4. Arrhenius plot of glyoxalase I.

회귀 분석하여 효소의 분자량을 측정된 결과 약 34,000으로 추정되었다. 또 이 효소를 SDS-discontinuous polyacrylamide gel 전기 영동한 결과 분자량이 약 17,000으로 추정되었다. 따라서 본 효소는 2개의 동일한 소단위체로 구성된 이합체인 것으로 판명되었다.

효소 활성도에 대한 pH와 온도의 영향

Methylglyoxal을 기질로 하여 여러 pH 조건에서 효소의 활성도를 구하였다. 그 결과 pH 6.5~7.5에서 최고의 활성을 나타냈으며 pH 4.0 이하와 pH 9.5 이상에서는 활성을 나타내지 않았다 (Fig. 2). Dixon and Webb plot에 의해 pH에 따라 $\log V_{max}/K_m$ 을 plotting한 결과, 이 효소의 활성에 중요한 역할을 하는 아미노산기는 pK_a가 약 4.8과 7.8 정도로 추정된다 (Fig. 3). 환원형 glutathione의 pK_a 값은 각각 pK_a' 2.12, pK_a' 3.53, pK_a' 8.66, pK_a' 9.12 이므로 pK_a 4.8과 pK_a 7.8의 아미노산기는 환원형 glutathione에 의한 것이라기 보다는 효소에 의한 것이라고 할 수 있다. 온도에 따른 효소의 활성도를 측정된 결과 40°C에서 최고의 활성도를 나타냈으며, Arrhenius 공식에 의해 활성화 에너지 (Ea)를 구한 결과 20~25°C에서 7.755 kcal/mol, 25~30°C에서 6.107 kcal/mol, 30~35°C에서 2.814 kcal/mol, 35~40°C에서 0.392 kcal/mol 이었다 (Fig. 4).

자외선 분광계에 의한 효소 반응의 분석

Methylglyoxal, phenylglyoxal, L-xylosone, 그리고 hydroxypyruvaldehyde의 효소 반응을 자외선 분광계로 측정된 결과 methylglyoxal, L-xylosone, 그리고 hydroxypyruvaldehyde는 각각 약 240, 234, 230 nm에서 최고의 흡광도를 나타내는 thiolester가 형성되는 것이, phenylglyoxal의 경우는 251 nm에

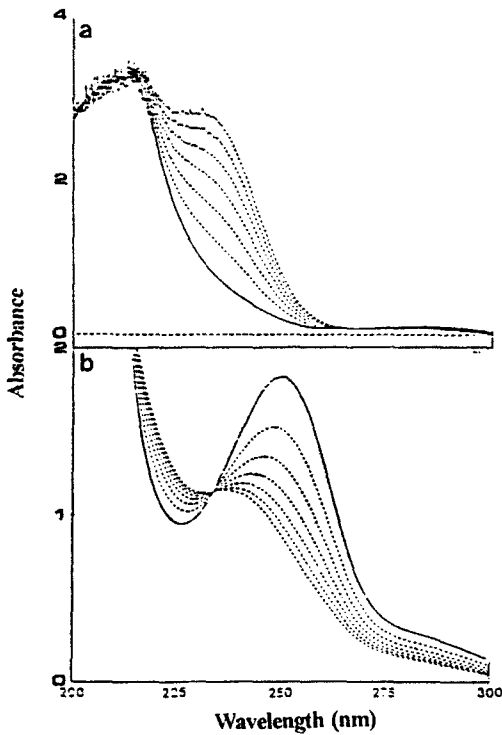


Fig. 5. Time dependent changes of UV spectra reaction mixture of glyoxalase I and methylglyoxal-glutathione (a), and phenylglyoxal-glutathione (b). Scanning interval is 5 min.

서 최고의 흡광도를 갖는 hemimercaptal이 감소되는 것이 관찰되었다. (Fig. 5, 6). *P. ostreatus*에서는 α -ketoaldehyde의 산화 과정에 관여하는 효소들인 α -ketoaldehyde dehydrogenase와 glyoxalase 시스템 중 glyoxalase 시스템만이 존재하며 따라서 L-xylosone과 hydroxypyruvaldehyde는 glyoxalase 시스템에 의해서 대사되는 것으로 생각된다.

K_m 값의 측정

Methylglyoxal에 대해 K_m 이 0.39 mM, 그리고 phenylglyoxal에 대해서는 K_m 이 0.22 mM이었다. 대부분의 glyoxalase I처럼 본 효소는 methylglyoxal 보다 phenylglyoxal에 대해 더 큰 친화도를 보였다.

1H -NMR spectroscopy에 의한 반응 생성물의 분석

Glyoxalase I과 methylglyoxal-glutathione adduct와의 반응은 enediol-proton transfer 과정을 통해 thioester인 S-D-lactoylglutathione을 형성한다(12). Hemimercaptal spectrum에서 나타난 5.58과 5.51 ppm의 두개의 peaks는 lactoyl C3의 proton에 의한 것이며 *r,s*-racemer의 peaks로 생각된다 (Table 2). 이 proton peaks는 효소 반응 후 proton이 lactoyl C2로 전달되는 과정에서 용매의 D^+ ion과 교환되어 사라지게 된다. Lactoyl CH_3 의 proton peak는 반응 전에는 2.30 ppm에서 관찰되는데 반응 후 lactoyl C3의 proton이 lactoyl C2로 이동하면서 0.93 ppm upfield로 이동하며 lactoyl C2의 proton 때문에 두개의 peaks로 분리된다. 반응전 2.95 ppm에서 관찰되는 cysteinyl C_2H_2 의 peak는 반응후 3.46과 3.18

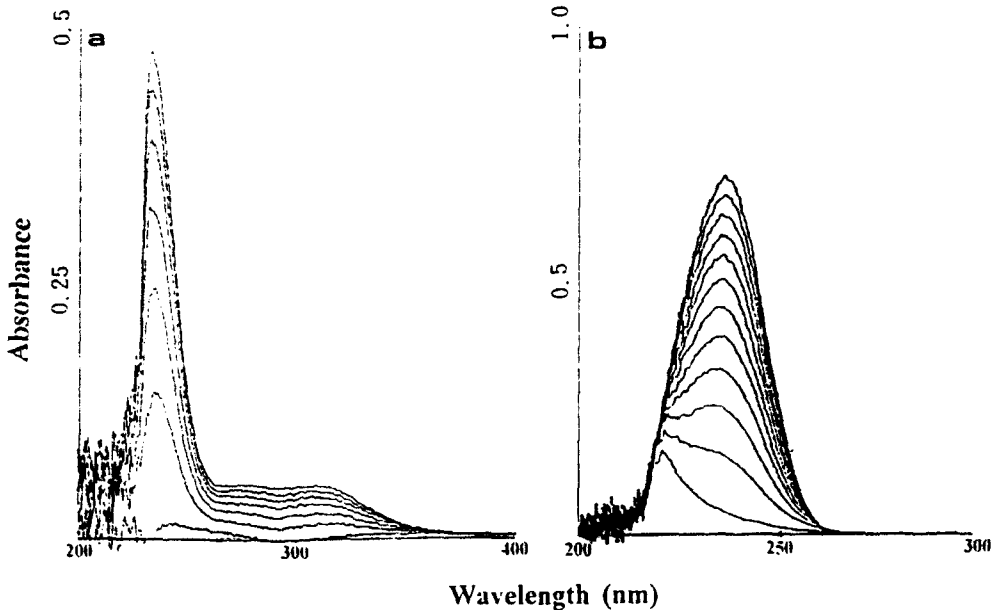


Fig. 6. Time dependent changes of UV spectra reaction mixture of glyoxalase I and L-xylosone-glutathione (a), and hydroxypyruvaldehyde-glutathione (b). Scanning interval is 5 min.

Table 2. Assignment of ¹H-NMR spectrum of hemimercaptal of methylglyoxal and reduced glutathione.

Amino acid resonance	Chemical shifts (ppm from TMS-PS ^a)
Cystenyl (C _α H)	4.57
Cystenyl (C _β H)	2.95
Lactoyl (CHOD)	5.58, 5.51
Glycyl (C _α H)	3.79
Glutamyl (C _γ H)	2.54
Glutamyl (C _β H)	2.16
Lactoyl (CH)	2.30

^a 3-(Trimethylsilyl)-propanesulfonate, sodium salt.

ppm에서 C_βH_A peak와 C_βH_B peak로 분리되는데 이는 반응 후 cystenyl C_β 주위의 구조적 이유에 의해 두개의 proton이 다른 자기적 환경에 처하기 때문이다 (16). 따라서, *P. ostreatus*에서 분리된 glyoxalase I은 glyoxalase I의 일반적인 반응 기작인 intramolecular proton transfer 과정을 통해 thiolester를 형성하는 것을 알 수 있다.

고 찰

*P. ostreatus*에서 분리한 glyoxalase I의 분자량은 34 kDa이며 두개의 subunits으로 구성되어 있다. 이것은 *S. cerevisiae* (8), *A. niger* (13) 그리고 *P. putida* (19) 등의 원핵 또는 진핵 미생물에서 분리한 glyoxalase I이 monomer로 이루어진 것과는 차이를 보이며 오히려 mammals의 glyoxalase I (2, 3, 10, 23)과 유사하다. Glyoxalase I은 상당히 넓은 기질 특이성을 보이며 methylglyoxal 보다 phenylglyoxal에 대해 더 높은 친화도를 보이는 것은 α-ketoaldehyde의 소수성이 증가할수록 K_m 값이 작아진다는 사실 (6)과 일치한다. Methylglyoxal에 대한 본 효소의 K_m 값은 0.39 mM이며 미생물의 0.53~3.5 mM과 mammals의 0.078~0.19 mM의 중간 정도의 친화도를 가진다. pH에 따른 log V_{max}/K_m을 plot한 결과 효소의 활성화에 중요한 amino acid residues의 pK_a 값은 4.8과 7.8로 나타났다. Yeast glyoxalase I의 경우 기질의 종류에 따라 pK_a 4.7~5.2와 pK_a 8.4~8.7의 amino acid residues가 효소의 기질 친화도에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 (9), 본 효소의 경우 첫번째 pK_a 4.8은 yeast glyoxalase I과 유사하나 두번째 pK_a 7.8은 yeast에 비해 산성의 값을 갖는다. Methylglyoxal-reduced glutathione hemimercaptal과 glyoxalase I의 반응을 ¹H-NMR로 분석한 결과, 이 반응은 enediol-proton transfer 과정에 의해 이루어짐을 알 수 있었다.

α-Ketoaldehyde인 L-xylosone과 hydroxypruv-

Table 3. Assignment of ¹H-NMR spectrum of enzymic product.

Amino acid resonance	Chemical shifts (ppm from TMS-PS ^a)
Cystenyl (C _α H)	4.61
Lactoyl (CH)	4.42
Glycyl (C _α H)	3.78
Cystenyl (C _β H _A)	3.46
Cystenyl (C _β H _B)	3.18
Glutamyl (C _γ H)	2.54
Glutamyl (C _β H)	2.16
Lactoyl (CH)	1.37

^a 3-(Trimethylsilyl)-propanesulfonate, sodium salt.

aldehyde는 L-ascorbate의 이화과정 중에 생기는 중간 산물로 생각되고 있으며 (15, 16), UV-visible spectroscopy로 본 효소와 L-xylosone 그리고 hydroxypruv-알데하이드와의 반응성을 조사하였으며 234 nm와 230 nm에서 최고의 흡광도를 갖는 thiolester가 생성되는 것이 관찰되었다. 이는 glyoxalase I이 L-ascorbate의 이화과정에 참여한다는 새로운 사실을 시사해 주는 것이라 하겠다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터 (서울대학교 분자미생물학연구센터) 연구비로 수행되었음.

참 고 문 헌

- Alexander, N.M. and J.L. Boyer, 1971. A rapid assay for the glyoxalase enzyme system. *Anal. Biochem.* **41**, 29-38.
- Arronson, A.C. and B. Mannervik, 1977. Purification and characterization of glyoxalase I from pig erythrocytes by affinity chromatography. *J. Biochem.* **165**, 503-509.
- Arronson, A.C., G. Tibbelin, and B. Mannervik, 1979. Purification of glyoxalase I from human RBC by use of affinity chromatography and separation of three isoenzymes. *Anal. Biochem.* **92**, 390-394.
- Baskaru, S., 1987. Purification and active site modification studies on glyoxalase I from monkey intestinal mucosa. *Biochim. Biophys. Acta.* **913**, 377-385.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Cooper, R.A., 1984. Metabolism of methylglyoxal in microorganism. *Ann. Rev. Microbiol.* **38**, 49-68.
- Davis, B.J., 1964. Disc electrophoresis: Method

- and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
8. Douglas, K.T., 1986. Yeast glyoxalase I. *Int. J. Biochem.* **18**, 143-154.
 9. Douglas, K.T. and J. Ghoth-Sharif, 1983. pH dependence of the inhibition of yeast glyoxalase I by porphyrins. *Biochim. Biophys. Acta.* **748**, 184-193.
 10. Elango, N., S. Janaki, and A.R. Rao, 1978. Two affinity chromatography methods for the purification of glyoxalase I from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **83**, 1388-1395.
 11. Gillespie, E., 1979. Effects of S-lactoylglutathione on histamine release from human leukocytes. *Nature* **277**, 135-137.
 12. Hall, S.S, A.M. Doweiko, and F. Jordan, 1976. Glyoxalase I enzyme studies. 2. Nuclear magnetic resonance evidence for an enediol-proton transfer mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 7460-7461.
 13. Inoue, Y., H.I. Rhee, K. Watanabe, K. Murata, and A. Kimura, 1987. Metabolism of 2-ketoaldehydes in mold: Purification and characterization of glyoxalase I from *Aspergillus niger*. *J. Biochem.* **102**, 583-589.
 14. Kanfer, J., G. Ashwell, and J.J. Burns, 1960. Formation of L-lyxonic and L-xylonic acids from L-ascorbic acid in rat kidney. *J. Biol. Chem.* **235**, 2518-2521.
 15. Kang, S.-O., H. Sapper, and W. Lohman, 1982. The oxidative degradation of L-ascorbic acid via an α -ketoaldehyde. *Z. Naturforsch.* **37**, 1064-1069.
 16. Kang, S.-O., 1985. A possible enzymatic catabolism of L-ascorbic acid via α -ketoaldehydes. *Kor. J. Microbiol.* **23**, 302-308.
 17. Nakamura, T., N. Makino, and Y. Ogura, 1968. Purification and properties of ascorbate oxidase from cucumber. *J. Biochem.* **64**, 189-195.
 18. Racker, E., 1951. The mechanism of action of glyoxalase I. *J. Biol. Chem.* **190**, 685-96.
 19. Rhee, H.I., 1987. Metabolism of 2-ketoaldehydes in bacteria: Oxidative conversion of methylglyoxal to pyruvate by an enzyme from *Pseudomonas putida*. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 1059-1066.
 20. Salomon, L.L., J.J. Burns, and C.G. King, 1952. Synthesis of L-ascorbic-1-C¹⁴-acid from D-sorbitol. *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 5162.
 21. Szent-Györgyi, A., 1960. An introduction to a submolecular biology. Academic Press, p. 125.
 22. Taylor, K.B., 1974. Dopamine β -hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **249**, 454-458.
 23. Uotila, L. and Koivusalo, M., 1975. Purification and properties of glyoxalase I from sheep liver. *Eur. J. Biochem.* **52**, 493-503.
 24. White, J.S., 1982. Inhibitory effects of methylglyoxal on DNA, RNA, and protein synthesis in cultured guinea pig keratocytes. *Chem. Biol. Interaction.* **38**, 339-347.

(Received June 17, 1994)

(Accepted July 8, 1994)

ABSTRACT: Purification and Characterization of Glyoxalase I from *Pleurotus ostreatus*

Kim, Seong-Tae, Kap-Seok Yang, Yeong-Jae Seok, Won-Ki Huh, and Sa-Ouk Kang* (Department of Microbiology, College of Natural Sciences, and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

Glyoxalase I was purified 2,294-fold from *Pleurotus ostreatus* by S-hexylglutathione affinity chromatography, Sephadex G-150 gel filtration chromatography and DEAE-sepharose A-50 CL-6B ion exchange chromatography with an overall yield of 21.7%. The molecular mass determined by gel filtration was found to be approx. 34 kDa. SDS-PAGE revealed that the enzyme consists of two identical subunits with a molecular mass of approx. 17 kDa. The K_m values of this enzyme for methylglyoxal and phenylglyoxal were 0.39 mM and 0.22 mM, respectively. And this enzyme had a strong affinity for L-xylulose and hydroxypyruvaldehyde. The enzyme showed its optimal activity at pH 6.5~7.5 and at 40°C. ¹H-NMR spectroscopic analysis of enzymic reaction showed that this enzyme catalyzes intramolecular proton transfer.