

## *Saccharomyces cerevisiae*에서 *Absidia zychae*의 Carboxypeptidase Z cDNA의 발현과 특성

이병로<sup>1</sup> · 김종화\*

우석대학교 식품공학과, <sup>1</sup>동경농공대학교 응용생물학과

### Expression of Carboxypeptidase Z cDNA from *Absidia zychae* in *Saccharomyces cerevisiae* and its characteristics

Byung-Rho Lee<sup>1</sup> and Jong Hwa Kim\*

Department of Food Science and Technology, Woosuk University, Chonbuk 565-800, Korea

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Biology and Microbial Chemistry, Tokyo University of  
Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183, Japan

**Abstract** — Carboxypeptidase Z(CPZ) cDNA of *Absidia zychae* was expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. The expressed CPZ(YCPZ) was secreted about 30 mg/l into the medium and has a little higher molecular weight than the wild type CPZ in SDS-PAGE. By the result of N-terminal amino acid sequencing, YCPZ has additional 15 amino acids residues in N-terminus of CPZ. But YCPZ shows no difference with CPZ in enzyme activity and substrate specificity. For the identification of processing mechanism of YCPZ, 36-Arg was changed to 36-Thr by site specific mutagenesis. Mutant YCPZ does not processed at 36-Thr. It was, therefore, concluded that the YCPZ was processed by KEX2. According to endo F treatment, high amount of carbohydrate was N-glycosylated in YCPZ.

Serine carboxypeptidase (EC 3.4.16.1)는 단백질이나 펩티드의 C-말단으로부터 순차적으로 아미노산을 유리하는 exo 형의 효소로 활성중심에 Ser, Asp, His 잔기를 가지고 있으며 산성영역에서 활성을 나타낸다. Serine carboxypeptidase (CPase)는 곰팡이, 식물, 동물세포 등에 널리 분포해 있다(1).

현재까지 CPase의 아미노산 배열이 보고된 것은 효모의 CPase Y(2), 보리의 CPase(3), II(4), III(5), 밀 CPase II(6), III(7), 쌀 CPase III(8), 그리고 *Absidia zychae* CPase Z(CPZ)(9) 등이 있으며 최근에는 밀 CPase II의 입체구조가 밝혀져 CPase의 구조와 활성과의 관계를 밝히는데 많은 정보를 제공해 주고 있다(10, 11). 우리는 집합균류인 *Absidia zychae*에서 CPZ를 발견하여 성질을 조사했고, CPZ를 code 하는 염색체 유전자 *scpZ*를 클로닝하여 그 구조를 밝힌 바 있다(9).

특히 CPZ는 carboxypeptidase의 활성 이외에도 C-

말단으로부터 암모니아를 유리하는 amidase 활성과 아미노산아미드를 유리하는 carboxyamidase 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 또 CPase는 펩티드의 경우 C-말단서열이 Pro, Gly, Asp, Arg인 경우를 포함하여 대부분의 아미노산을 유리할 수 있는 것으로 알려져 있어 매우 유용한 효소로 판단되고 있다(12). 이와같은 특성으로 인하여 CPZ는 펩티드나 단백질의 C-말단 서열결정, 쓴맛 펩티드의 분해, 염증 펩티드의 분해, 펩티드 합성 및 C-말단 아미노산 표지 등에 응용될 가능성이 높은 것으로 간주되고 있다. 이러한 광범위한 기질특이성에 관한 연구를 보다 효율적으로 수행하기 위해서는, CPZ의 구조와 활성과의 관계를 규명하고 효소의 비활성의 향상, 안정성의 증대, 기질특이성의 변경, pH 의존성의 변경 등 다양한 형태로 성질을 개량하여야 할 것이다. 이러한 연구를 수행하기 위하여 우선 CPZ 유전자의 조작이 가능하고, 안정하게 발현이 되며 숙주세포의 CPZ와는 무관한 발현 체계를 구축하는 것이 매우 중요하다.

본 논문에서는 *Saccharomyces cerevisiae*에서 CPZ의 cDNA를 발현하고 그 특성에 대하여 검토하였다.

**Key words:** Carboxypeptidase Z, *Saccharomyces cerevisiae*, *Absidia zychae*, KEX2, processing, glycosylation, cDNA, site specific mutagenesis

\*Corresponding author

재료 및 방법

사용균주 및 Plasmid

효모숙주는 *trp1* 결손주인 *Saccharomyces cerevisiae* YHP250(a, *ura3-52*, *lys2-801<sup>amber</sup>*, *ade2-101<sup>ochre</sup>*, *trp1-Δ1*, *his3-Δ200*, *leu2-Δ1*)를 사용하였으며(13) 발현 vector로써는 Yamamoto 등(14)이 개발한 GPD (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) promoter 와 PGK (3-phosphoglycerate kinase) terminator를 가지고 있으며 *trp1* 선택 marker를 가진 YEP형 pG-3를 사용하였다.

재조합 plasmid pGWCPZ는 개시 codon ATG로부터 시작하는 CPZ cDNA(Fig. 1)를 pG-3에 연결하여 작성하였다.

효모에서 발현된 CPZ(YCPZ)의 생산

형질전환은 Lithium acetate 법(15)을 사용하였으며 선별배지로는 YMM 최소배지(Yeast nitrogen base without amino acids 0.67%, dextrose 2%, adenine sulfate 20 µg/l, uracil 20 µg/l, L-histidine-HCl 20 µg/l, L-leucine 30 µg/l, L-lysine-HCl 30 µg/l, agar 2%)를 사용하였다.

형질전환된 효모는 YMM 액체배지에서 전배양한 다음 세포를 YPD 배지(Yeast extract 1%, Bacto-peptone 2%, Dextrose 2%)에 접종하여 30°C, 130 rpm 조건에서 배양하였다.

Western blot

Western blot는 Towbin의 방법(16)에 따라 수행하

|                   |            |            |            |             |            |             |            |                    |             |
|-------------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|--------------------|-------------|
| 10                | 20         | 30         | 40         | 50          | 60         | 70          | 80         | 90                 | 100         |
| <u>ATG</u> TTGGAA | AAAGAGCATT | GACAAGCTTA | CTCGTAACTC | TTGGCGTGGC  | TTTGGTATGT | GCTCCGGTGA  | CAGTACAGGC | TCATCCCATG         | TCGCATGTTT  |
| 110               | 120        | 130        | 140        | 150         | 160        | 170         | 180        | 190                | 200         |
| TGAGAAGACA        | AGATGGCAAC | GACACATCCT | CTGGCAATAC | AACACAGCTC  | AAGTATACCT | CTCCAAAACCT | CTGTGATCCA | GATGTCAAGC         | AGTATTCCGG  |
| 210               | 220        | 230        | 240        | 250         | 260        | 270         | 280        | 290                | 300         |
| ATACTTGGAT        | GCTGCCAATG | ATGAACACTA | CTTTTCTGG  | TTCTTTGAAA  | GCAAAAATGA | TCCAAAGAAT  | GACCCTTTAA | CCATCTGGCT         | TAATGGTGGT  |
| 310               | 320        | 330        | 340        | 350         | 360        | 370         | 380        | 390                | 400         |
| CCGGGTTGTT        | CCAGTCTGAT | TGGTCTATGG | GAAGAATTGG | GACCCTGTCA  | ACAAAACGGC | TCTGCCAATC  | CACACAGCTG | GCATCATTCA         | AGCAACATGC  |
| 410               | 420        | 430        | 440        | 450         | 460        | 470         | 480        | 490                | 500         |
| TTTTCTTTGA        | CCAGCCAGAT | GGTGTAGGAT | TTTCATATGG | CAAGCAAACC  | GTTTCCACAA | CTGAGGATGC  | AGCTGAACGT | GCTTGGACAT         | TCTTGCAGC   |
| 510               | 520        | 530        | 540        | 550         | 560        | 570         | 580        | 590                | 600         |
| TTTCTATGAA        | ACATTCCCCC | AGTATAGCAA | ACTTGATGTG | CATTACITTTG | GAGAGTCATA | TGGTGGTCAT  | TATATTCCAG | GATTCCGAAG         | TCATGTCTGTG |
| 610               | 620        | 630        | 640        | 650         | 660        | 670         | 680        | 690                | 700         |
| GATATGAACA        | AAAAGGTGCA | ATCAGGAGAA | GAGAAGGGTG | TAGTTGTACC  | GCTAAAGTCT | ATTGGTGTGCG | GTAATGGCTT | TATCGATGCT         | GTAATCCAAT  |
| 710               | 720        | 730        | 740        | 750         | 760        | 770         | 780        | 790                | 800         |
| ACAAATCATA        | CCCAAAGATG | ACCTGCCATT | CTACATACCC | AGCTGTACTT  | TCTGAAGAAG | AATGTGACAA  | GATGCAGCAG | ATTTATGAGA         | ATGACTGCAA  |
| 810               | 820        | 830        | 840        | 850         | 860        | 870         | 880        | 890                | 900         |
| GCCTGCTGCT        | GAACAATGTG | CCGAGAGTGA | TGAAGATAGC | GACTGTGTTA  | ATGCCAACCA | ACAATGTGGA  | CAAATCGAAG | GCATTTATGC         | CCAGTCAGGT  |
| 910               | 920        | 930        | 940        | 950         | 960        | 970         | 980        | 990                | 1000        |
| TATAGCTTTT        | ATGATATCCG | ACAACAAGGC | GATGATACCG | CACATCCTTT  | CGTTGATGAA | TAAACAAGG   | CATCGGTCAT | CAAAGAAGTT         | GGTCCAAGAG  |
| 1010              | 1020       | 1030       | 1040       | 1050        | 1060       | 1070        | 1080       | 1090               | 1100        |
| GACACTTTTC        | CATGTGCTCT | GATTCTGTGG | GTACTGCTTT | TGCACAGACT  | GGTGATGGTG | CTCGATCCTA  | TATCCCTGCT | GTGGAAAAGC         | TCTTGAAGGA  |
| 1110              | 1120       | 1130       | 1140       | 1150        | 1160       | 1170        | 1180       | 1190               | 1200        |
| AGGTATCCCT        | GTGCTTATCT | ATGTAGGAGA | TGCCGATGTC | ATTTGCAACT  | GGTATGGCAA | CCTAGATGTT  | GCAGACTCTC | TAAAATGGGA         | TGGAAGCGAC  |
| 1210              | 1220       | 1230       | 1240       | 1250        | 1260       | 1270        | 1280       | 1290               | 1300        |
| GCGTTTAGCA        | AAACAAGTT  | GGAAGCTTGG | AAAGCTGACG | GCAAAGAAGT  | CGGCCAATTC | AGATCTGCTG  | ATAAACTTAC | CTTTGTTCGT         | GTCTATGAAG  |
| 1310              | 1320       | 1330       | 1340       | 1350        | 1360       | 1370        | 1380       | 1390               | 1400        |
| CTGGTCATGA        | AGTGCCTATG | TATCAACCAG | AAGCAGCATT | GAGCATGTTT  | CAGACATGGA | TCAGTGGCAA  | ATCATTGGT  | <u>TAA</u> ATCAGTC | CTTCTGTATA  |
| 1410              | 1420       | 1430       |            |             |            |             |            |                    |             |
| CTTGATATGA        | TAATGTAATA | AAGGAC     |            |             |            |             |            |                    |             |

Fig. 1. Nucleotide sequence of CPZ cDNA.

The underlined sequence indicates the 5' lacking region of cloned cDNA. Which was amplified from genomic DNA by PCR and joined to cloned cDNA. The initiation and termination codons are enclosed in boxes.

였다. SDS-PAGE로 분리한 단백질을 nitrocellulose 막에 전사하였고 CPZ에 대한 토끼 항혈청 및 peroxidase를 결합시킨 2차 항체에 의하여 nitrocellulose 막에 전사된 CPZ 단백질을 인식하였다.

#### 부위 특이적 변위

Site-directed mutagenesis는 Kunkel 법(17)에 따라 수행하였다. Primer로써는 36번 Arg을 Thr으로 바꾸기 위하여 oligonucleotide (5'-GTTGCCATCTTG-TGTTCTCAAACA-3')를 합성하여 사용하였고 변이 여부를 sequencing에 의하여 확인하였다.

#### N-말단 아미노산 배열 결정

Sample 조제는 Matsudaira의 방법(18)에 따라 수행하였다. SDS-PAGE(10%) 상에 분리된 단백질은 PVDF 막에 전사하고 0.1% amidoblack에 염색한 다음 YCPZ band 부분을 절단하여 ABI 477A Protein Sequencer(Applied Biosystems)를 이용하여 N-말단 아미노산 배열을 결정하는데 사용하였다.

#### 당쇄 검정

부분정제한 효소액을 0.1M sodium acetate 완충용액(pH 6.0)에 투석한 다음 1 unit의 endo F(endo- $\beta$ -N-acetyl-glucoaminidase)를 첨가하고 30°C에서 2시간 반응하여 당쇄를 절단하였다. EndoF를 처리한 YCPZ를 SDS-PAGE에 의해 전개한 후 Western blot에 의해 검정하였다.

#### 효소활성 측정

Carboxypeptidase의 활성은 Ichishima 법(22)에 의해 Z-Gly-Tyr 가수분해 산물을 ninhydrin 발색반응으로 측정하였다.

### 결과 및 고찰

클론된 CPZ의 cDNA 염기서열을 결정한 결과 개시코돈 ATG로부터 51bp가 결여되어 signal 아미노산 배열의 일부가 결손되어 있었다. 이 cDNA를 효모에 발현시키기 위하여, CPZ를 code 하는 염색체 유전자(*scpZ*)(9)로부터 primer CPZ-Eco (5'-ACGAATTCA-TGTTTGGAAAAGAGCAT-3')와 primer CPZ-C(5'-CTGCTTGACATCTGGATC-3')를 사용하여 PCR(19)에 의한 결손부분 증폭 DNA를 얻었다. 이 증폭 DNA의 염기서열을 확인한 다음 클론된 signal 아미노산이 결손된 cDNA에 연결하여 완전한 cDNA(wcDNA)를 제조하였고 이 wcDNA를 *S. cerevisiae*에 발

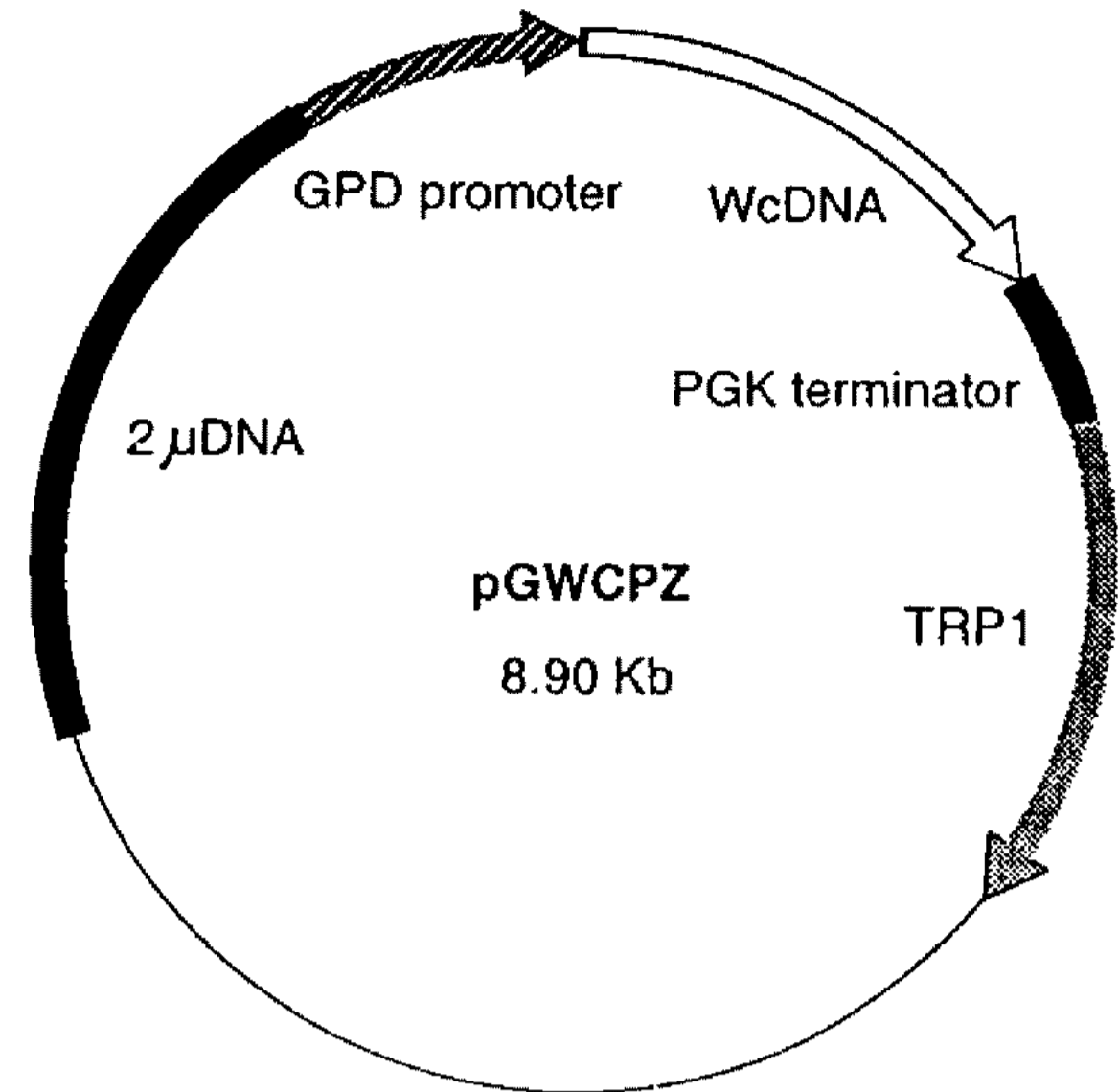


Fig. 2. Structure of plasmid pGWCPZ.

Which was constructed for CPZ expression in yeast *S. cerevisiae*. WcDNA is the cDNA of carboxypeptidase Z.

현하는데 이용하였다. 이때 사용된 CPZ를 code 하는 cDNA의 염기서열은 Fig. 1과 같고 밀줄친 51bp 부위가 PCR을 통하여 증폭된 DNA 서열에 해당된다.

PCR에 의하여 보완된 wcDNA는 *S. cerevisiae*의 발현 vector pG-3의 GPD promoter와 PGK terminator 사이에 연결하여 재조합 plasmid를 작성하였다. 제조된 재조합 plasmid는 8.9 kb이고 pGWCPZ라 명명하였으며 그 구조는 Fig. 2와 같다. 이 재조합 plasmid는 효모의 2 $\mu$  DNA와 대장균의 pUC18 DNA를 포함하고 있으므로 효모와 대장균 내에서 동시에 증식할 수 있으며 *trp1* 유전자를 가지고 있기 때문에 *trp* 배지에서 형질전환체 효모의 선별이 가능하다. 형질전환체에서 CPZ cDNA는 GPD promoter 지배 하에 있으므로 constitutive 하게 발현한다.

형질전환된 *S. cerevisiae*에서 발현된 YCPZ는 YPD 배지상에서 세포외로 분비되었으며 배양 3일 후에는 8 nkat/ml의 효소 활성을 나타내었다(Fig. 3). 이는 효소 단백질로 환산할 경우 약 30 mg/l의 효소량에 상당하는 것으로 CPZ의 효과적인 발현체계로 판단되었다.

형질전환된 *S. cerevisiae*에서 발현되는 YCDZ의 발현 양상을 알아보기 위하여 세포외 분비물을 농축하고 SDS-PAGE와 Western blot에 의하여 확인하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 CPZ의 wcDNA를 함유하고 있지 않은 pG-3의 형질전환체에서는 YCPZ가 발현되지 않았지만(lane 2) pGWCPZ의 형질전환체에서는 YCPZ가 검출되었다(lane 3). 이것은 CPZ wcDNA가

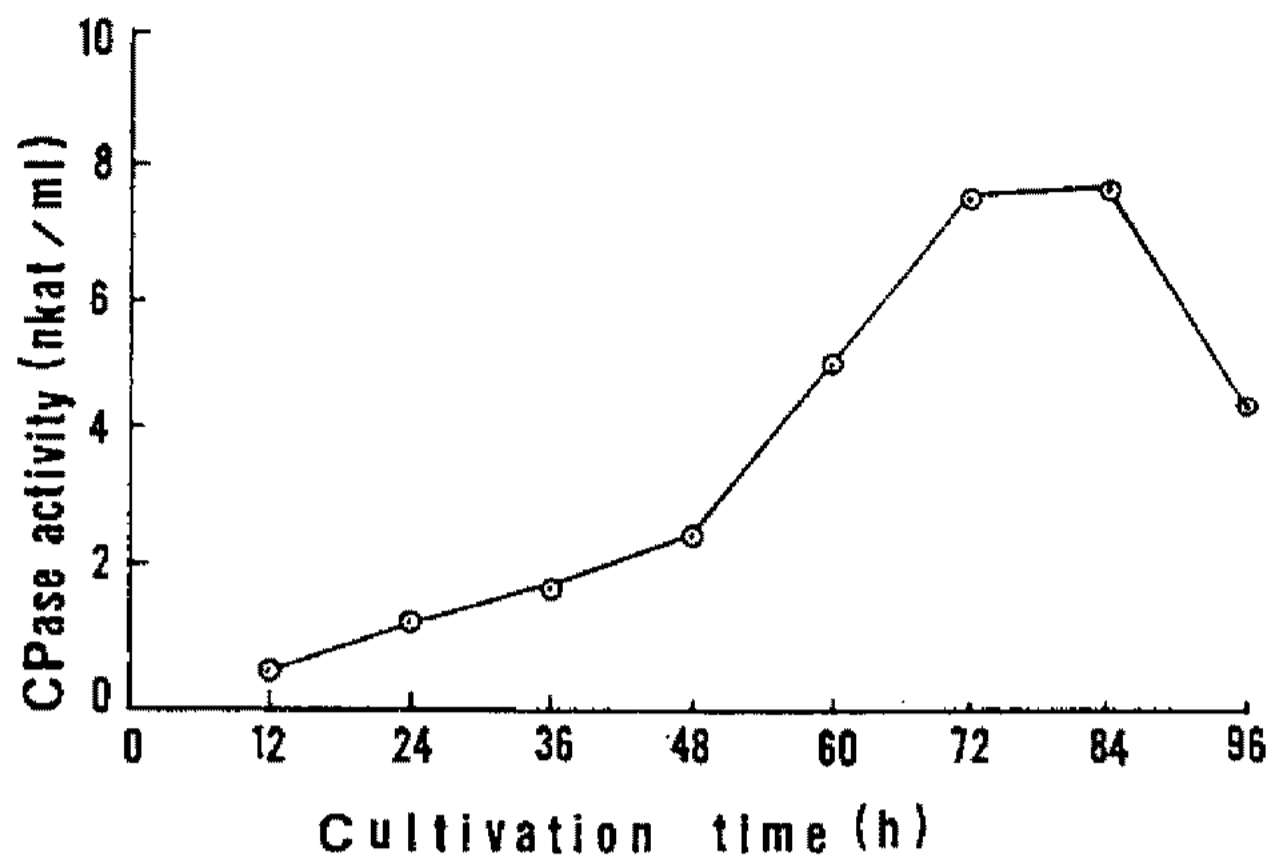


Fig. 3. Production of YCPZ secreted from yeast *S. cerevisiae* harboring pGWCPZ.

Yeast *S. cerevisiae* harboring pGWCPZ was cultured at 120 rpm in YPD media for 72 h at 30°C. Enzyme activity was assayed by the method of Ichishima(22).

GPD promoter에 의하여 조절을 받으면서 발현이 정상적으로 되고 있음을 보여주고 있다.

대개의 경우 효모에서 발현되는 단백질은 high mannose type의 다량의 당쇄가 Asn에 부가되는 것으로 알려져 있다. 본 연구의 발현 체계에서도 YCPZ에 부가된 당쇄를 검정하기 위한 방법으로 YCPZ에 endo F를 처리하여 SDS-PAGE 상에서 endo F를 처리하지 않은 YCPZ와 이동도를 비교하였다. Fig. 4-A의 lane 3에서 나타난 것처럼 YCPZ는 고분자 부분에 여러개의 smear 한 band가 나타나지만 endo F를 처리하게 되면 lane 4에서 보는 바와 같이 분자량 48,000 부근에 band가 수렴하게 되었다. 이는 YCPZ에 다량의 당쇄가 다양한 형태로 부가된 것을 의미한다.

당쇄의 부가는 Fig. 5에 나타난 CPZ의 아미노산 배열에서 예상해 본다면 Asn 40, Asn 46, Asn 119가 N-linked 당쇄 부가부위로서 추측된다. 특히 이 예상되는 결과는 YCPZ의 N-말단 아미노산 배열을 결정할 때 Asn 40과 Asn 46은 잔기결정을 할 수 없었던 것으로 미루어 보아 이 아미노산에 당쇄가 부가되었기 때문일 것으로 판단된다. 또 *Absidia zychae*가 생산하는 CPZ의 mature protein(Asn 40과 Asn 46을 가지고 있지 않음)도 endo F 처리에 의하여 분자량이 약 40% 감소하는 것으로 확인되었으므로 Asn 119에도 당쇄가 부가되는 것으로 생각된다(20).

Fig. 4에서 보는 바와 같이 endo F 처리된 YCPZ (Lane 4)는 endo F 처리된 CPZ(lane 5)보다 분자량이 약간 큰 것으로 나타났다. 두 효소의 차이를 규명하기 위하여 N-말단 아미노산 배열을 결정해 본 결과 번역후 변형과정의 차이에 의하여 생긴 결과임을 알 수 있었다. 즉, YCPZ의 N-말단 아미노산 배열은 Glu-

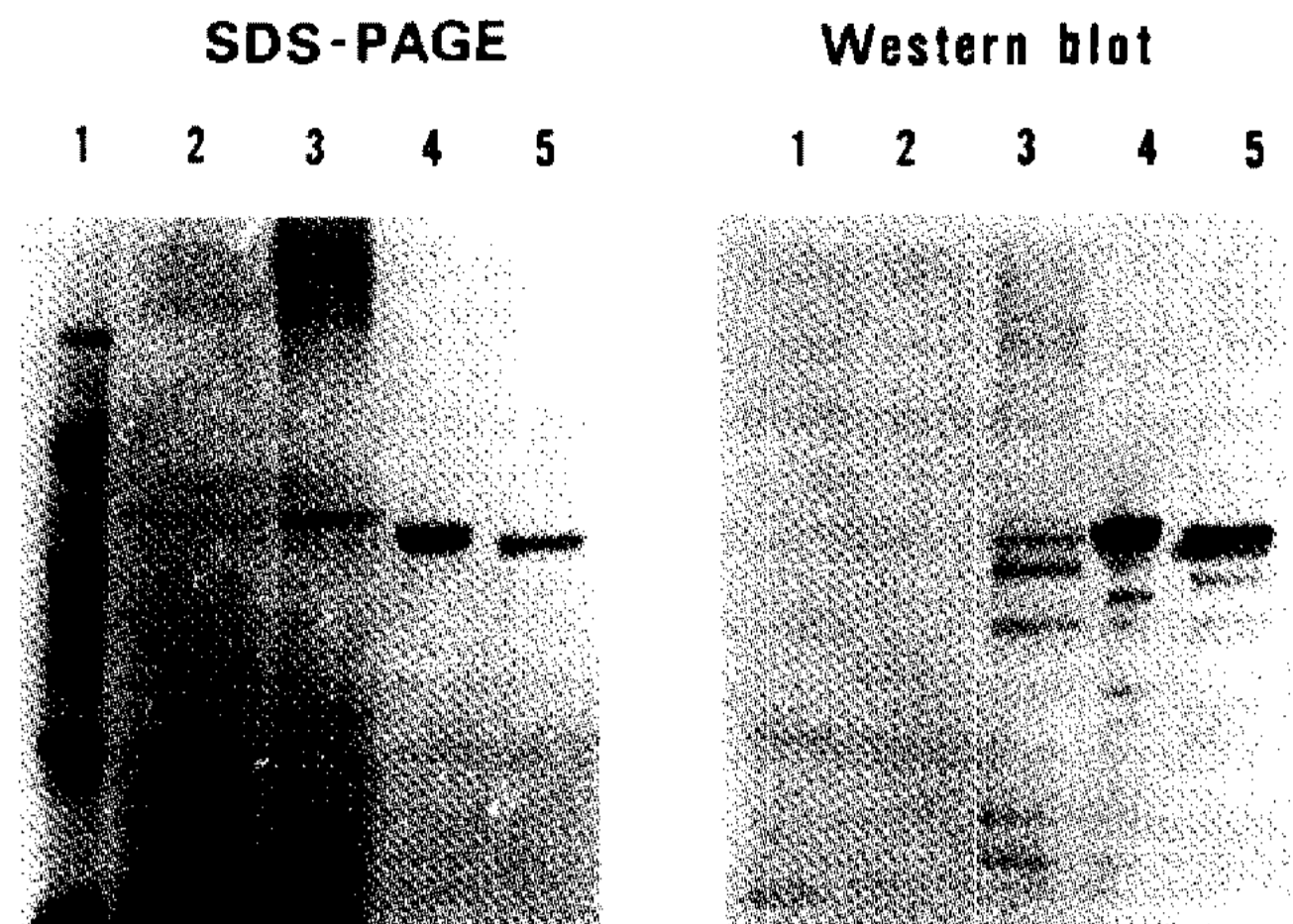


Fig. 4. SDS-PAGE and Western blot analysis of YCPZ secreted from yeast *S. cerevisiae*.

Yeast *S. cerevisiae* harboring pG-3 (lane 2) and pGWCPZ (lane 3) were cultured at 120 rpm in YPD media for 72 h at 30°C. Culture filtrates were concentrated and analyzed by SDS-PAGE (A) and Western blot (B). lane 1, marker; lane 3, about 1 µg YCPZ; lane 4, about 1 µg of purified YCPZ (endo F treated); lane 5, about 0.8 µg of purified CPZ (endo F treated).

Asp-Gly-X-Asp-Thr-Ser-Ser-Gly-X-이었으며 염기서열을 통하여 추론된 아미노산 서열과 비교할 경우, CPZ보다 N-말단 아미노산이 15잔기 더 긴 구조를 하고 있음을 알 수 있다. CPZ의 경우는 N-말단 서열 결정 결과에 의하면 51번 Lys의 carboxyl 쪽에 절단이 일어나는 것으로 알려져 있으나(12), YCPZ의 경우 효모에서의 processing은 -Arg<sup>35</sup>-Arg<sup>36</sup>- 의 36번 Arg의 carboxyl 쪽이 절단되었으므로 *Absidia zychae*와는 달리 효모의 KEX2에 의하여 processing 된 것으로 판단된다. 이 KEX2 processing 부위의 36번 Arg을 Thr으로 site-directed mutagenesis에 의하여 치환시킨 변이효소는 KEX2의 processing을 받지 않아 N-말단 배열이 His-Pro-Met-Ser-His-Val-Leu- 이었으므로 Fig. 5의 화살표 부위에서 절단이 일어남을 알 수 있었다. 이는 signal 배열이 절단된 후의 아미노산 배열과 일치하였으며 이 변이효소도 역시 효소활성을 잃지 않았고 SDS-PAGE 상의 이동도는 YCPZ보다 약간 늦었다(Data not shown).

N-말단 부위에 15개의 부가된 아미노산을 가지고 있으며 Asn 40과 Asn 46에 고도로 당쇄가 부가된 것으로 판명된 YCPZ와 *Absidia zychae*의 CPZ의 효소특성을 비교하기 위하여 여러가지 종류의 기질을 사용하여 활성을 비교함으로써 기질특이성을 조사해 보았다. Table 1에서 보이는 바와 같이 YCPZ에 부가되는 다량의 당쇄 및 15개의 부가된 N-말단 배열은 효소활성 및 기질특이성에 차이를 보이지 않았다. 이

```

      10          20          Y 30          40          50          60
MFGKRALTSL LVTLGVALVC APVTVQAHPM SHVLRRODGN DTSSGNTTQL KYTSPKLCDP
      70          80          90          100          110          120
DVKQYSGYLD AANDEHYFFW FFESKNDPKN DPLTIWLNGG PGCSSLIGLW EELGPCQONG
      130          140          150          160          170          180
SANPHSWHHS SNMLFFDQPD GVGFSYGKQT VSTTEDAAER AWTFLQAFYE TFPQYSKLDV
      190          200          210          220          230          240
HYFGESYGGH YIPGFASHVV DMNKKVQSGE EKGVVVPLKS IGVGNFIDA VIQYKSYPKM
      250          260          270          280          290          300
TCHSTYPAVL SEEECDKMQQ IYENDCKPAA EQCAESDEDS DCVNANQOCG QIEGIYAQSG
      310          320          330          340          350          360
YSFYDIRQQG DDTPHPFVDE LNKASVIKEV GARGHFSMCS DSVGTAFAQT GDGARSYIPA
      370          380          390          400          410          420
VEKLLKEGIP VLIYVGDADV ICNWYGNLDV ADSLKWDGSD AFSKTKLEAW KADGKEVGGQF
      430          440          450          460
RSADKLTfVR VYEAGHEVPM YQPEAALSMF QTWISGKSFG
    
```

Fig. 5. Deduced amino acid sequence of CPZ.

The arrow headmark indicate the signal sequence cleavage site which was determined by N-terminal sequencing of R36T mutant enzyme. The single and doublelined sequences indicate the N-termini of YCPZ secreted from yeast and of CPZ produced by *Absidia zychae*, respectively. The closed circles indicate the position of potential N-linked glycosylation. Asparagine residues within the N-terminal sequence of YCPZ were not detectable in the sequencing of protein using the ABI 477A protein Sequencer.

Table 1. Relative rate of hydrolysis of small N-acyl-peptides by CPZ and YCPZ.

| Peptide    | Relative activity |       |
|------------|-------------------|-------|
|            | CPZ               | YCPZ  |
| Z-Glu-Phe  | 1,000             | 1,000 |
| Z-Leu-Tyr  | 848               | 859   |
| Z-Ala-Glu  | 32                | 37    |
| Bz-Glu-Lys | 7                 | 8     |
| Z-Gly-Phe  | 3                 | 3     |

The rate of hydrolysis of Z-Glu-Tyr is arbitrarily taken to be 1,000. The enzyme are reacted with the 0.5 mM substrates at pH 4.5.

사실은 N-말단에 첨가된 아미노산이나 Asn에 부가된 당쇄가 효소의 활성에는 별 다른 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

형질전환되지 않은 숙주효모의 액포에는 CPase Y가 존재하는 것으로 알려져 있으나(2) CPase Y는 균체밖으로 분비되지 않고 균체밖에서는 CPase Y 활성은 전혀 검출되지 않으므로 효모를 이용하여 CPZ의 CDNA를 발현하는 것은 CPZ의 특성규명에 매우 유용한 발현체계로 생각된다. 본 연구에 의하여 구축된 발현 체계를 효율적으로 이용한다면 앞으로

CPZ 효소의 구조와 기능과의 관계 해석, 효소 비활성의 증대, 안정성의 향상, 기질특이성의 개량, pH 의존성의 변경 등 각종 단백질 공학적 연구를 위하여 효모에서의 CPZ 발현 분비는 유용할 것으로 판단된다.

### 요 약

*Absidia zychae*가 생산하는 carboxypeptidase Z (CPZ)를 code 하는 cDNA를 *Saccharomyces cerevisiae*에 발현시켰다. *S. cerevisiae*에서 발현된 CPZ (YCPZ)는 균체외로 약 30 mg/l 분비되었으며, 발현 단백질(YCPZ)은 SDS-PAGE 상에서 CPZ의 분자량보다 약간 큰 것으로 나타났다. N-말단 아미노산 서열을 결정한 결과 YCPZ는 CPZ보다 N-말단이 15잔기 더 긴 구조를 하고 있었다. 그러나 YCPZ는 기질 특이성과 효소활성에서 CPZ와 차이를 나타내지 않았다. 부위특이 돌연변이에 의하여 36번 Arg를 Thr으로 변형하여 YCPZ의 발현 양상을 관찰한 결과, 36번 Thr에 processing을 받지 않는 것으로 보아 YCPZ는 KEX2의 작용을 받아 processing이 일어남을 알 수 있었다. 또 YCPZ는 endo F를 처리한 결과 다량의 N-연결 당쇄가 Asn에 부가되어 있음을 알 수 있었다.

## 참고문헌

1. Breddam, K. 1986. Serine carboxypeptidases. A review. *Carlsberg Res. Commun.* **51**: 83-128.
2. Valls, L.A., Hunter, C.P., Rothman, J.H. and Stevens, T.H. 1987. Protein sorting in yeast: The localization determinant of yeast vacuolar carboxypeptidase Y resides in the propeptide. *Cell* **48**: 887-897.
3. Sorensen, S.B., Breddam, K. and Svendsen, I. 1986. Primary structure of carboxypeptidase I from malted barley. *Carlsberg Res. Commun.* **51**: 475-485.
4. Sorensen, S.B., Svendsen, I. and Breddam, K. 1987. Primary structure of carboxypeptidase II from malted barley. *Carlsberg Res. Commun.* **52**: 285-295.
5. Sorensen, S.B., Svendsen, I. and Breddam, K. 1989. Primary structure of carboxypeptidase III from malted barley. *Carlsberg Res. Commun.* **54**: 193-202.
6. Breddam, K., Sorensen, S.B. and Svendsen, I. 1987. Primary structure and enzymatic properties of carboxypeptidase II from wheat bran. *Carlsberg Res. Commun.* **52**: 297-311.
7. Baulcombe, D.C., Barker, R.F. and Jarvis, M.G. 1987. A gibberellin-responsive wheat gene has homology to yeast carboxypeptidase Y. *J. Biol. Chem.* **262**: 13726-13735.
8. Washio, K. and Ishikawa, K. 1992. Structure and expression during the germination of rice seeds of the gene for a carboxypeptidase. *Plant Mol. Biol.* **19**: 631-640.
9. Lee, B.R., Takeuchi, M. and Kobayashi, Y. 1994. Molecular cloning and sequence analysis of the *scpZ* gene encoding serine carboxypeptidase of *Absidia zychae*. *Curr. Genet.* in print.
10. Liao, D.I. and Remington, S.J. 1990. Structure of wheat serine carboxypeptidase II at 3.5-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **265**: 6528-6531.
11. Liao, D.I., Breddam, K., Sweet R.M., Bullock, T. and Remington, S.T. 1992. Refined atomic model of wheat serine carboxypeptidase II at 2.2-Å resolution. *Biochemistry* **31**: 9796-9812.
12. Lee, B.R., Takeuchi, M. and Kobayashi, Y. 1993. Purification and characterization of serine carboxypeptidases from *Absidia zychae*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 618-622.
13. Sikorski, R.S. and Hieter, P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strain designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19-27.
14. Schena, M., Picard, D. and Yamamoto, K.R. 1991. Vectors for constitutive and inducible gene expression in yeast. *Methods in Enzymology* **194**: 389-398.
15. Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.
16. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 4350-4354.
17. Kunkel, T.A. 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 488-492.
18. Matsudaira, P. 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262**: 10035-10038.
19. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffler, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
20. Lee, B.R. and Ahn, B.Y. 1993. Multiple forms of serine-type carboxypeptidase produced by *Absidia zychae*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **8**: 405-408.
21. Thomas, G., Thorne, B.A., Thomas, L., Allen, R. G., Hruby, D.E., Fuller, R. and Thorner, J. 1988. Yeast KEX2 endopeptidase correctly cleaves a neuroendocrine prohormone in mammalian cells. *Science* **241**: 226-230.
22. Ichishima, E. 1972. Purification and characterization of a new type of acid carboxypeptidase from *Aspergillus*. *Biochim. Biophys. Acta* **258**: 274-288.

(Received 29 November 1994)