

*Bacillus amyloliquefaciens*에서 분리된 단백질 가수분해 효소의 화학적 수식에 의한 저해양상 분석

김 종 일

서울여자대학교 식품·미생물공학 전공

Bacillus amyloliquefaciens psychrotrophic strain이 분비하는 세포 외 단백질 가수분해효소를 정제하여, endopeptidase 활성에 관한 특성을 분석하였다. Protease SE910로 명명된 효소는 단백질 내부의 leucine에 연결된 peptide 결합만을 가수분해하는 endopeptidase로 작용한다. 효소를 특이한 아미노산 잔기에 작용하는 화학수식제와 반응하였을 때 효소의 활성부위에 관여하는 아미노산 잔기가 수식되었을 때는 효소활성이 저해를 받는다. 본 효소는 serine을 수식하는 PMSF에 의해 endopeptidase 활성이 완전히 저해되었으며, 카르복실 기능기를 수식하는 화학수식제에 의해 저해되었고, lysine을 화학수식하는 PLP에 의해서는 큰 영향을 받지 않았다. 이것은 본 효소의 endopeptidase 활성에 serine과 aspartic acid 잔기가 관여하는 것을 의미한다. 구조적으로 leucine을 포함하는 유도체인 bestatin은 효소의 endopeptidase 활성을 경쟁적으로 저해하였다.

Key words : *Bacillus amyloliquefaciens*, chemical modification, endopeptidase, serine protease.

서 론

단백질 가수분해 효소는 단백질의 총체적인 가수분해를 촉매하는 효소이다. 이런 단백질 가수분해 효소는 효소의 활성부위에 있는 기능기(functional group)에 따라 serine protease S, aspartic proteases, cysteine proteases와 metalloproteases 4 분류로 나뉘어진다(1). 산업적으로 이용되는 대부분의 단백질 가수분해효소는 중성 및 알칼리 단백질 가수분해효소이며, *Bacillus* 속에 속하는 미생물에 의해 생성된다. *Bacillus subtilis*는 수종의 serine 및 metalloprotease를 세포 외로 분비하며, 이들은 모두 signal peptide를 포함하는 전구물질로 처음에 생합성된 다음 단백질 합성 후 과정을 통해 processing되어 세포 바깥으로 나간다(9). 많은 수의 bacteria 중성 단백질 가수분해효소는 좁은 범위의 pH에서(pH 5-8) 활성을 가지고 상대적으로 낮은 열 적응도를 가지며, 가수분해 반응에서 중급의 반응속도를 보이기 때문에 bacteria 중성 단백질 가수분해효소는 가수분해된 food protein을 제조할 때 쓴맛을 적게 생성하게 되므로, 빠른 반응을 보이는 동물성 단백질 가수분해효소보다 식품산업에서 보다 유용하게 이용된다. 또한 낮은 열 적응도는 food hydrolysate의 가공과정에서 가수분해의 정도를 적게 함으로써 효소의 반응도를 쉽게 조절할 수 있는 장점이 있다. 세균의 중성 protease는 기질 선택성에서 소수성 아미노산에 높은 친화도를 갖는 것이 그 특징이다. 세균의 알칼리 단백질 가수분해효소는 알칼리 pH (pH 10)에서 높은 활성을 가지며, 넓은 범위의 기질 특이성을 보이며, 이들의 최적

반응 온도는 60°C 부근인 것이 특징적이다. 이러한 특징으로 인해 세제산업에 세균성 알칼리 단백질 가수분해효소들이 적합하게 이용되고 있다(2).

본 연구에서는 냉수 어종인 무지개 송어(rainbow trout)의 장내 균총에서 분리한 *Bacillus amyloliquefaciens* S94에서 순수 분리된 casein 및 gelatin을 가수분해하는, protease SE910로 명명된, 단백질 가수분해효소의 endopeptidase 활성에 관련된 특성을 분석하였다. 이를 위해 기질의 결합 및 효소활성에 관련된 아미노산을 분석하기 위해 특정 아미노산 잔기와 반응하는 수식제를 사용하여 효소를 화학수식한 다음 그 활성을 분석하여 효소의 특정 아미노산 잔기가 효소반응 활성에 대한 영향을 분석하였다.

재료 및 방법

효소의 정제

단백질 가수분해효소는 San 등 (7)의 방법으로 *B. amyloliquefaciens* S94를 1% casein이 포함된 영양배지에 접종하여 30°C에서 20시간 배양한 배양액으로부터 ammonium sulfate 분획침전(60-80%), QAE-Sephadex 크로마토그래피, SP-Sephadex 크로마토그래피와 Sephacryl S-100 크로마토그래피 방법을 사용하여 순수 분리하였다. 순수 분리하는 동안의 단백질 가수분해효소의 역가는 azocasein을 기질로 사용하여 분석하였다.

protease 활성 측정

단백질 가수분해효소 활성은 Son 등 (8)의 방법으로 측정하였다. 표준 반응혼합물의 조성은 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 기질(0.2 mM N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilide)과 효소로 이루어

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-2-970-5638, Fax: 82-2-970-5977
E-mail: jikim@swu.ac.kr

졌으며, 이 혼합물을 37°C에서 반응하였다. 효소반응은 전 배양된 효소반응물에 기질을 첨가하여 반응을 시작하였다. 30분 처리하여 같은 부피의 10% TCA를 가하여 반응을 종결하고 얼음에 10분간 방치하고 침전된 단백질은 12,000×g에서 3분간 원심 분리하여 제거하였다. 0.1 M NaOH를 가해 중화시킨 다음 상등액의 흡광도를 405 nm에서 측정하였다. 합성기질에 대한 가수분해 활성은 방출된 p-nitroanilide의 양을, 405 nm에서의 흡광계수 $\epsilon_{405} = 9,620 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 를 이용하여 측정하였다. 효소활성 측정과 효소활성에 미치는 인자에 관한 실험은 3번 반복한 평균값을 상대값으로 나타내었다.

저해제에 의한 효소활성 억제

정제된 단백질 가수분해효소 활성에 대한 저해제의 효과를 분석하기 위해 효소반응 표준혼합물에 표시된 농도의 저해제를 첨가하여 반응을 실시하였다. serine 계열 단백질 가수분해효소의 기능성 억제제인 PMSF와 구조적으로 leucine을 포함하는 기질의 구조 유사물인 bestatin, [(2S,3R)-3-amino-2-hydroxy-4-phenyl-butanoyl]-L-leucine을 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액 37°C에서 5분간 전 배양 한 효소반응물에 0.2 mM 합성기질과 함께 첨가하거나 (bestatin의 경우), 5분간의 효소반응 후 첨가하여(PMSF의 경우) 효소저해반응을 시작하고 30분 더 반응하여 반응용액의 A_{405} 를 측정하여 효소활성에 대한 효과를 비교 분석하였다.

효소의 화학수식

B. amyloliquefaciens S94의 protease의 아미노산 잔기의 화학수식은 Lundblad (4)에 따라 실행하였다. 효소단백질의 아미노산 잔기를 수식하기 위해 정제된 protease와 표시된 농도의 화학 수식제를 첨가하여 수식반응을 하고, 반응하지 않은 화학 수식제를 반응혼합물에서 제거하기 위해 탈염용 BioGel P-6 DG 컬럼(1×1.5 cm)을 이용하여 2,500×g로 원심 분리하여 수식된 효소단백질만 포함된 효소용액을 얻었다. Serine 잔기의 수식은 PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)를 50 mM Tris-HCl(pH 7.0) 완충용액에 첨가하여 37°C에서 20분간 수식반응을 실시하였다. Lysine 잔기의 수식은 일정 양의 효소가 포함된 50 mM MOPS 완충용액(pH 6.8)에 pyridoxal-5-phosphate를 첨가하여 37°C에서 20분간 어두운 곳에서 반응을 실시하였다. Carboxyl 잔기(aspartic acid 혹은 glutamic acid)의 수식은 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimide-metho-p-toluenesulfonate를 50 mM HEPES 완충용액(pH 7.5)에 첨가하여 20°C에서 60분간 어두운 곳에서 반응을 실시하였다. Histidine 잔기 수식은 50 mM sodium acetate (pH 6.0) 완충용액에서 diethylpyrocarbonate를 첨가하여 25°C에서 60분간 반응을 실시하였다. 화학 수식된 효소의 잔여활성은, 화학 수식제를 첨가하지 않은 앞의 반응으로 얻은 효소용액을 대조구로 비교하여 0.2 mM 기질을 첨가하여 30 분간 37°C에서 반응하여 효소 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

정제된 protease SE910는 azocasein을 기질로 사용하여 분석하

였을 때 최적반응조건은 45°C, pH 10이며, 합성기질인 N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilide를 사용한 효소반응에서는 45°C, pH 8-9로 보고 되었으며, 23 kDa의 분자량을 가지는 하나의 하위 단위체로 이루어진 상태로 효소 촉매작용을 하는 것으로 보고 되었다(7). 단백질 가수분해효소의 기질 특이성은 효소에 의해 절단되는 펩티드 결합에 연결되어 있는 카르복실 혹은 아미노 그룹 쪽의 아미노산으로 특정화된다. Protease SE910는 특이적으로 leucine의 카르복실에 연결된 펩티드 결합만을 가수분해하였다. N-말단에 위치한 peptide 결합은 protease SE910에 의해 가수 분해 되지 않았다(8). 이 결과가 제시하는 것은 protease SE910는 exopeptidase 활성인 aminopeptidase로 작용하지 않고, 오직 endopeptidase로 작용한다고 추정할 수 있다.

효소저해제의 영향

단백질 가수분해효소의 기능성 분류를 위해 일반적으로 알려진 단백질 가수분해효소 활성의 저해제에 대한 영향을 최종농도가 1 mM 되게, 0.2 mM 기질의 첨가로 시작된 5분간의 효소반응물에, 첨가하여 효소활성을 측정된 결과를 Table 1에 나타내었다. 본 효소는 serine 단백질 가수분해효소의 저해제인 PMSF에 의해 효소활성이 완전히 저해되었으며, acidic (aspartic 혹은 glutamic) 단백질 가수분해효소의 특이적 저해제인 E-64, cysteine 단백질 가수분해효소 저해제인 pepstatin 및 금속 요구성 단백질 가수분해효소의 저해제인 EDTA에 의해서 약 20% 저해되었다 (Table 1). 이것은 효소의 serine 잔기가 효소의 화학적 활성에 관여하는 것을 의미하며, 활성부위에 있는 기능기에 따른 단백질 가수분해효소의 분류에서 protease SE910는 serine 단백질 가수분해효소에 속한다는 것을 제시한다. Serine 단백질 가수분해효소에는 세균 기원의 subtilisin 계열, 동물 기원의 chymotrypsin과 trypsin 계열 등으로 분류되는데, protease SE910는 chymotrypsin계열 저해제인 tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone(TPCK)과 trypsin 계열 저해제인 tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK)에 의해서 효소활성에 별다른 영향을 받지 않았으므로(7), protease SE910는 trypsin 및 chymotrypsin계열이 아닌 subtilisin계열의 serine protease에 속한다. Leucine peptidase 저해제인 bestatin의 영향을 분석하였을 때 bestatin (0.1 mM)의 첨가는 효소활성의 90%를 저해하였으며, 농도를 달리하여 저해양상을 분석하였을

Table 1. Effect of protease inhibitors on the endopeptidase activity

Inhibitor (1mM)	Inhibitor class	Relative activity (%)
none		100
PMSF	serine protease	0
E-64	cysteine protease	88
Pepstatin	aspartic protease	92
EDTA	metalloprotease	80

Preincubation of enzyme with substrate (0.2 mM) at 37°C for 5 min was followed by addition of inhibitor (1 mM). Activity was assayed by further incubation of the reaction mixtures for 30 min as described in "Experimental Methods".

때 bestatin은 본 효소에 대해 경쟁적 저해제로 작용하였다(Fig. 1). Dixon 분석을 통한 bestatin의 저해상수(Ki) 수치는 450 μM 으로 나타났다. bestatin의 다른 leucine peptidase에 대한 Ki 값은 1-500 μM 범위로 나타난다(3). 이상의 결과들은 기질 특이성면에서 protease SE910은 leucine endopeptidase로 분류된다. 기능성 잔기로 따른 분류에서 동물성 및 박테리아 기원의 leucine peptidase는 촉매반응에 금속이온이 필요한 metalloprotease로 보고되었다(3, 10). 기질 특이성에 의한 분류 특성은, 단백질 가수분해 효소 subtilisin은 가수 분해되는 펩타이드 결합에 연결된 아미노산이 전하를 띠지 않은 비교적 크기가 큰 잔기를 가진 아미노산들에 작용하는 넓은 범위의 기질 특이성을 보인다(3). 반면 protease SE910은 기질의 P1 부위에 phenylalanine, tyrosine, alanine, valine 및 arginine을 함유하는 합성기질은 가수분해 되지 않았고(8), 오직 내부의 루신의 펩티드 결합을 분해하는 좁은 범위의 기질 특이성을 가진, subtilisin과는 다른 독특한 serine 단백질 가수분해효소의 특성을 가지고 있다.

화학수식에 의한 효소활성변화

효소 단백질의 전체구조에는 큰 영향을 미치지 않고, 특이적인 아미노산 잔기에만 반응하는 화학수식 시약에 의하여, 상대적으로 반응성이 큰 활성부위의 아미노산 잔기를 화학 수식한 다음 효소활성을 측정함으로써 *B. amyloliquefaciens* S94의 leucine endopeptidase의 활성부위에 관여하는 아미노산 잔기를 분석하고자 했다. 각 물질들의 농도에 의한 저해정도를 분석하기 위해 화학수식제의 농도를 달리하여 단백질 가수분해 효소를 화학적 수식을 한 다음 반응하지 않은 수식제를 제거하고 수식된 효소단백질을 0.2 mM 기질과 함께 반응하여 수식되지 않은 효소단백질의 반응을 대조구로 하여 비교 분석하였다. Serine의 히드록실(-OH)기에 특이적으로 반응하는 PMSF에 의해 수식된 본 효소는 활성이 완전히 저해되었으며, 기질(0.5 mM)과 효소단백질이 함께 존재할 때 PMSF에 의해 수식된 효소의 잔여 활성은 40-50%를 유지하였다(Fig. 2). 이것은 기질이 효소활성 부위에 결합함으로써

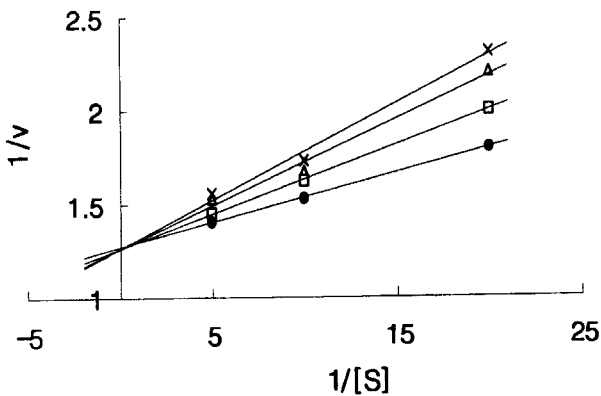


Fig. 1. Inhibitory effects of bestatin on the endopeptidase activity. The enzyme activities were assayed in the presence of bestatin (×: 0.5 mM, △: 0.2 mM, □: 0.1 mM, ●: 0 mM) under standard conditions.

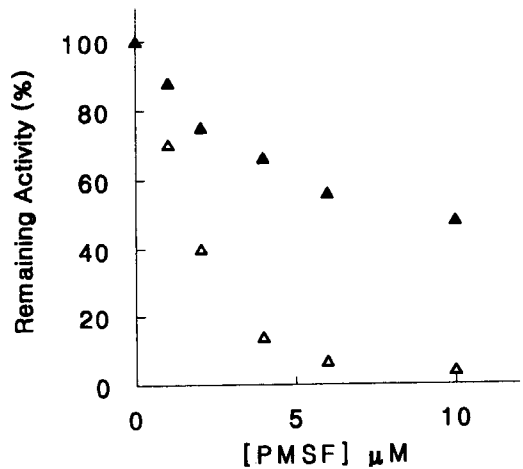


Fig. 2. Effect of PMSF concentrations on the activity of modified enzyme. The reactions of modification of serine residue were carried out in the presence (▲) and in the absence (△) of substrates at the indicated concentrations of modifier.

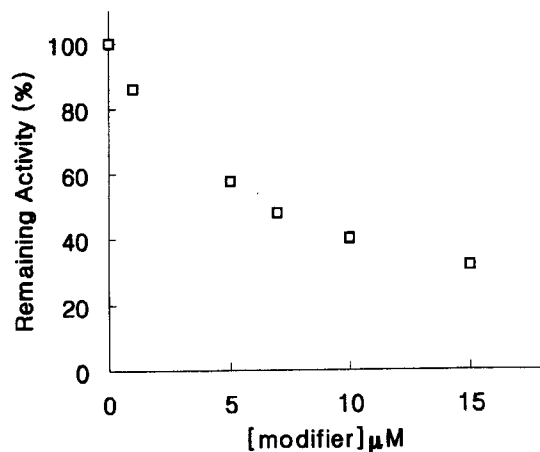


Fig. 3. Modification of carboxyl group (Asp and Glu) in the enzyme. Purified enzyme (0.2 μM) was preincubated with the modifier at the indicated concentrations at 20°C for 1 hr. The remaining activity of modified enzyme was assayed under standard conditions.

써 PMSF의 수식을 방해하여 수식에 의한 활성 감소를 보호하였다(Fig. 2). Aspartic acid 및 glutamic acid의 카복실(-COOH)기에 반응하는 carbodiimide에 의해 화학 수식된 효소는 활성이 60-70% 저해되었으며(Fig. 3), lysine에 특이적으로 반응하는 pyridoxal-5-phosphate (PLP)에 의해 화학 수식된 효소는 효소활성이 상대적으로 약하게 저해되었으며, 20 μM PLP의 농도로 수식된 효소의 저해정도는 15-20%로 나타났다(Fig. 4). Histidine에 특이적으로 반응하는 diethylpyrocarbonate에 의해서 수식된 효소는 높은 정도의 저해양상을 나타냈다(결과 미제시). 이상의 결과로 본 효소의 활성에 serine이 결정적으로 역할을 하며, 산성아미노산(Asp 및 Glu)과 histidine이 중요한 역할을 담당하는 것으로 추정된다. 이러한 것들은 serine 단백질 가수분해효소의 화학 측

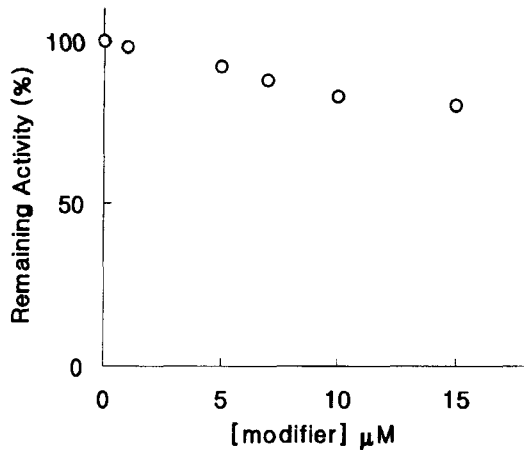


Fig. 4. Modification of lysine in the enzyme.

매작용에 직접적으로 관여하는, 전하 릴레이 시스템을 구성하는 aspartic acid, histidine 및 serine으로 구성된 화학적 활성부위의 공통된 특성을 보여준다. Azocasein을 기질로 사용하여 분석하였을 때 최적 반응조건은 pH 10으로 나타났다(7). 효소의 lysine 잔기가 효소반응에 중요한 역할을 하는 효소는 pH 10 부근에서 효소활성의 변화가 극적으로 변화되는 일반적인 특성을 보이는데, 이를 가정으로 하였을 때, lysine 잔기가 화학 수식된 protease SE910은 활성이 완전히 혹은 의미 있는 정도로 제거되어야 한다. 그러나 protease SE910의 경우 lysine 잔기는 활성부위에 위치하지 않아 효소의 화학반응에 큰 영향을 미치지 않거나 혹은 활성부위의 lysine 잔기가 다른 곳에 위치한 lysine 잔기보다 반응성이 낮아서 화학 수식하려면 보다 높은 농도의 화학 수식제가 필요한 것으로 판단된다. 화학 수식반응에서 수식제는 특이한 아미노산과 반응하지만 활성부위에 있는 아미노산 잔기 만에 특이적으로 반응하지 않기 때문에 활성부위에 위치하지 않은 아미노산 잔기라도 반응한다. 화학 수식제에 의해 수식화된 효소의 잔기 몰수와 활성부위에 관여한다고 판단되는 잔기의 몰수 비율은 사용한 효소의 양(2 μM)과의 당량비적인 활성의 감소로 측정되어 질 수 있다. Serine의 경우 수식제에 반응한 것은 5개의 잔기로 추정되며 이중 반응성이 강한 것은 1.4 (asymptote in Fig. 2)개로 활성부위 또는 활성부위에 가까운 곳에 위치하며 이 잔기는 효소를 불활성화 시킬 정도로 구조적인 변화를 유도하였을 것으로 판단된다. Acidic 아미노산 잔기의 경우 3-4개 잔기의 화학 수식이 효소활성을 감소하게 된다고 판단된다. 보다 정밀한 분석을 위해서는 arginine에 작용하는 phenylglyoxal, tyrosine의 phenol기를 산화시키는 *N*-bromosuccinimide (NBS), cysteine의 -SH기에 작용하는 *p*-chloromercuribenzoic acid (pCMB) 등의 화학 수식에 의한 결과가 첨가되고 이 효소의 유전자가 클론닝되어 site-directed mutagenesis를 통한 분석과 단백질의 3차 구조가 결정되어 많은 자료가 축적되면 가능 할 것으로 판단된다.

화학수식제에 의한 저해양상

효소의 활성발현에 PMSF가 강하게 저해하므로 이 물질의 농

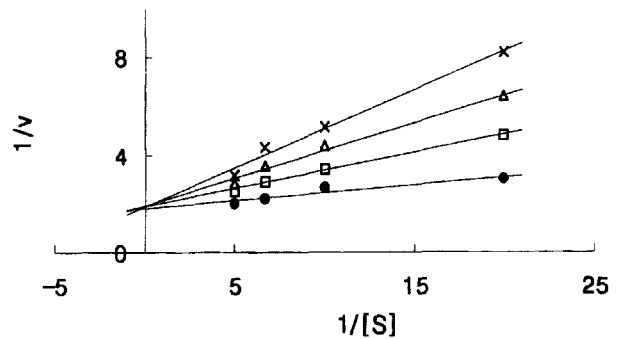


Fig. 5. Inhibitory effects of PMSF on the endopeptidase activity. Lineweaver-Burk plot for the hydrolysis of substrate was determined in the presence of PMSF. Enzyme was preincubated with substrate (0.2 mM) at 37°C for 5 min prior to the addition of PMSF. (x: 0.1 mM, Δ : 0.05 mM, \square : 0.01 mM, \bullet : 0 mM)

도에 의한 저해양상을 검토하기 위해 *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu-*p*-nitroanilide를 기질로 하여 서로 농도를 달리하여 효소활성을 측정하여 Lineweaver-Burk의 방법에 따라 plot하여 Fig. 5에 나타내었다. 효소반응물(pH 7.0)에 표시된 농도의 기질과 효소를 5 분간 반응한 후 PMSF를 첨가하여 저해반응을 시작하여 잔여 활성을 측정하였다. PMSF의 농도가 증가할수록 저해정도가 높게 나타났으며, 효소반응의 최대속도(V_{max})값은 변하지 않고, 기질에 대한 Michaelis 상수(K_m)값이 변화되므로 PMSF는 효소에 대해 경쟁적 저해제로 작용하였다. 이는 저해제가 효소에 위치한 기질의 결합부위에 기질과 경쟁적으로 결합할 수 있는 것으로 PMSF가 기질결합부위 혹은 활성부위에 관여하는 serine 잔기와 반응하기 때문인 것으로 판단된다. 본 효소에 대한 PMSF의 저해상수(K_i) 값은 20 μM 로 계산되었다.

감사의 말

이 논문은 2003년 서울여자대학교 교내 연구비 지원으로 이루어졌으며 연구비지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Beynon, R.J. and J.S. Bond. 1989. Proteolytic enzymes. IRL Press, Oxford.
2. Fiechter, A. 1986. Microbial proteinases, p. 29. In Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology. Wiley-liss press.
3. Gonzales, T. and J. Robert-Baudroy. 1996. Bacterial aminopeptidase : properties and functions. *FEMS Microbiol. Rev.* 18, 319-344.
4. Lundblad, R.L. 1995. Techniques in protein chemical modification. CRC Press, Boca Raton, Florida.
5. Park, J.M., S.W. Park, T.S. Seo, J. Kim, and D.S. Yu. 1999. Analysis of active site of cytidine deaminase from *Bacillus subtilis* ED213 by chemical modification. *Kor. J. Microbiol.* 35, 133-138.
6. Rao, M.B., A.M., Tanksale, M.S., Ghatge and V.V. Deshoande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 597-635.

7. Son, E.S. and J.I. Kim. 2002. Purification and characterization of caseinolytic extracellular protease from *Bacillus amyloliquefaciens* S94. *J. Microbiol.* 40, 26-32.
8. Son, E.S. and J.I. Kim. 2003. Multicatalytic alkaline serine protease from the psychrotrophic *Bacillus*. *J. Microbiol.* 41, 58-62.
9. Wandersman, C. 1989. Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases. *Mol. Microbiol.* 3, 1825-1831.
10. Windle, H.J. and D. Kelleher. 1997. Identification and characterization of a metalloprotease activity from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immunol.* 65, 3132- 3137.

(Received October 6, 2003/ Accepted November 24, 2003)

ABSTRACT: Characterization of Endopeptidase of *Bacillus amyloliquefaciens* S94 by Chemical Modification

Jong-Il Kim (Department of Food and Microbial Technology, Seoul Women's University 126 kongnung 2-dong, Nowon-Gu, Seoul 139-774, Korea)

An extracellular protease of *Bacillus amyloliquefaciens* S94 was purified to apparent homogeneity. The enzyme activity was strongly inhibited by general inhibitor for serine protease, PMSF, suggesting that the enzyme is a serine protease. The purified enzyme activity was inhibited by leucine peptidase inhibitor, bestatin, suggesting that the enzyme is a leucine endopeptidase. When the enzyme was chemically modified with PMSF, which specifically reacted with serine residue on the enzyme, the activity was eliminated. The endopeptidase activity was inhibited by the modifier which chemically modified carboxyl group of aspartate and glutamate. PLP, which would modify lysine residue, did not affect the endopeptidase activity to a greater extent. This demonstrates that serine and aspartate (or glutamate) residues of enzyme would participate in a important function of the endopeptidase activity.