트립토판 합성효소의 이소조절성에 미치는 리간드

김 일 · 신혜자[1] · 임운기* · 김한도*

부산대학교 자연과학대학 분자생물학과, [1]동서대학교 응용공학부 환경공학전공

Received October 27, 2003 / Accepted November 4, 2003

Effects of Ligands on the Allosteric Property of Tryptophan Synthase. Eel Kim, Hae Ja Shin[1], Woon Ki Lim* and Han Do Kim*, *Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 609-735, Republic of Korea, [1]Environmental Engineering Major, Division of Applied Engineering, Dongseo University, Busan 617-716, Republic of Korea* – Various ligands function as regulators in the allosteric control of tryptophan synthase. Effects of the monovalent cations and glycerophosphate on the mutant tryptophan synthases were examined in the presence of L-serine. The results showed that these compounds might play roles in the allosteric control of the proteins.

Key words – allosteric effect, glycerophosphate, L-serine.

효소의 구조적 변화는 기질 결합과 효소의 활성에 중요하다[1,6]. 박테리아의 트립토판 합성효소(tryptophan synthase)는 $\alpha_2\beta_2$ 다단위체 단백질이며[7], 소단위체에서 일어나는 각각의 반응을 α반응과 β반응이라 하고 이들의 전체반응인 αβ반응이라 하며, 화학반응식은 아래와 같다.

indole-3-glycerol-phosphate ⇄
indole + D-glyceraldehyde-3-phosphate (α반응)

indole + L-serine ⇄ L-tryptophan + H_2O (β반응)

indole-3-glyceol-phosphate + L-serine ⇄
D-glyceraldehyde-3-phosphate + L-tryptophan + H_2O (αβ반응)

α와 β소단위체가 결합하여 $\alpha_2\beta_2$ 복합체를 형성하면[6] α반응과 β반응의 속도와 각각의 반응들에 대한 기질 친화도가 증가하게 되는데[1] α반응의 경우 indole-3-glycerol-phosphate (InGP)에 대한 k_{cat} 값이 0.005 sec^{-1}에서 0.480 sec^{-1}로 100배 정도 증가하며 β반응의 경우도 β 소단위체 단독의 경우 indole에 대한 k_{cat} 값이 0.23 sec^{-1}에서 9.54 sec^{-1}로 40배 정도 증가하게 된다[1]. 또한, $\alpha_2\beta_2$ 복합체에서 각각의 소단위에 리간드(ligand)가 결합하게 되면[6,7] 다른 소단위체의 효소활성도 성질에 영향을 미치며, 분광광도 특성에도 영향을 미치게 된다.

이러한 차이들은 정상적인 $\alpha_2\beta_2$ 복합체의 형성동안에 일어나게 되며 X 선 구조결정학연구로 트립토판 중합효소의 α 소단위체와 β 소단위체의 활성자리가 서로 25 Å 떨어져 있으며 이들은 25~30 Å 되는 tunnel 구조에 의해 연결되어 있다는 것이 밝혀졌다[6-8].

본 실험은 야생종과 돌연변이 α소단위체를 사용하여 α소단위체와 β소단위체간에 일어나는 구조적 전달에 관한 성질을 리간드로 조사하고자 하였다.

*Corresponding authors (W. K. Lim) Tel : +82-51-510-2289, Fax : +82-51-513-9258, E-mail : wklim@pusan.ac.kr
(H. D. Kim) Tel : +82-51-510-2276, Fax : +82-51-513-9258, E-mail : hdkim@pusan.ac.kr

재료 및 방법

박테리아 균주 및 플라스미드

대장균 균주 RB797 (*F' lacI^q proL8/arg Nal^r Rif^r recA sup lac proXIII*)는 단백질의 과량발현에 사용하였다[10]. 야생종 또는 돌연변이 *trpA* 유전자와 정상적인 *trpB* 유전자가 포함한 플라스미드 ptactrpA를 이 균주에 형질전환하여 발현시켰다.

효소와 시약

모든 시약은 순도가 높은 것(ultra pure)을 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다.

단백질의 과량 발현 및 분리방법

야생형 및 잔기치환 단백질들을 과량 발현시키고, 이의 분리는 이미 보고된 방법으로 하였다[5]. 황산암모늄($(NH_4)_2SO_4$) 침전법과 이온크로마토그래피 *HPLC*를 사용하였다[4]. 정제된 단백질의 순도는 SDS-PAGE을 실시하여 Coomassie Brilliant Blue R로 염색하여 확인하였다. 순수 정제된 야생형의 α 소단위체의 농도는 $E^{1\%}_{278nm}$ = 4.4, β 소단위체의 경우 $E^{1\%}_{278nm}$ = 6.5를 사용하여 결정하였다[2,3]. 잔기치환 단백질의 경우에는 야생형을 표준으로 microbiuret 방법[7]을 사용하였다.

분광광도계 측정

50 mM TEA 완충용액(pH 7.8)을 사용하여 200~820 nm에서 Varian 4E 분광광도계로 측정하였다. 단백질의 농도는 30 μM로 사용하였으며, L-Ser 40 mM, NaCl 100 mM, KCl 100 mM, NH_4Cl 50 mM, 그리고 DL-α-glycerol 3-phosphate (GP) 100 mM를 첨가하여 그 영향을 측정하였다. 550 nm의 값을 기준으로 보정하였다.

결과 및 고찰

β반응에 미치는 리간드의 영향

*Salmonella typhimurium*의 트립토판 합성효소를 대상으로 한 결정구조학과 생화학적 연구로 일가 양이온과 α소단위체의 56번 잔기인 아스팔산과 β소단위체의 167번 리신간의 염다리(salt bridge)가 이소조절성에 중요한 기능을 한다고 밝혀졌다[6-7,9]. 여기서는 대장균의 동종효소를 대상으로 그 효과를 살펴보았다. 단백질 자체는 야생종이나 잔기 치환체인 D56E/G/N 모두 유사한 흡광도 양상을 보여 준다(Fig. 1A). 412 nm에서 최대 흡광도 파장을 나타내는 데 이것은 단백질의 87번 리신과 조효소 PLP와의 결합체인 internal aldimine의 존재를 나타낸다. 세린이 첨가되면 aminoacrylate가 주로 형성되어 350 nm에서 최대 흡광도를 나타내게 된다(Fig. 1B). 야생종과 활성이 유사한 D56E의 경우 야생형의 단백질과 비슷하나, 활성도가 낮은 D56G의 경우는 여전히 424 nm에서 높은 흡광도를 보여주고 있고, D56N의 경우도 어느 정도는 412 nm에서의 흡광도가 남아있다. 이는 internal aldimine과 aminoacrylate 사이에 형성되는 external aldimine일 가능성이 높다[1,6-7]. 이 결과는 잔기 치환체가 야생형 단백질과는 달리 다른 중간구조체가 보다 더 안정화되어 있음을 나타낸다.

다음으로 β소단위체의 리간드로 알려져 있는 일가 양이온의 영향을 살펴보았다(Fig. 2). Na^+를 처리하면, 야생종과 D56E은 거의 변화가 없는 반해, D56G와 D56N는 424 nm에서 흡광도가 매우 크게 증가하며, 350 nm의 흡광도는 매우 감소한다[6-8]. K^+가 첨가된 경우, Na^+가 첨가된 경우와 유사하다. NH_4^+가 첨가된 경우, 일가 양이온이 없을 때와 흡사한 흡광도 양상을 보여준다.

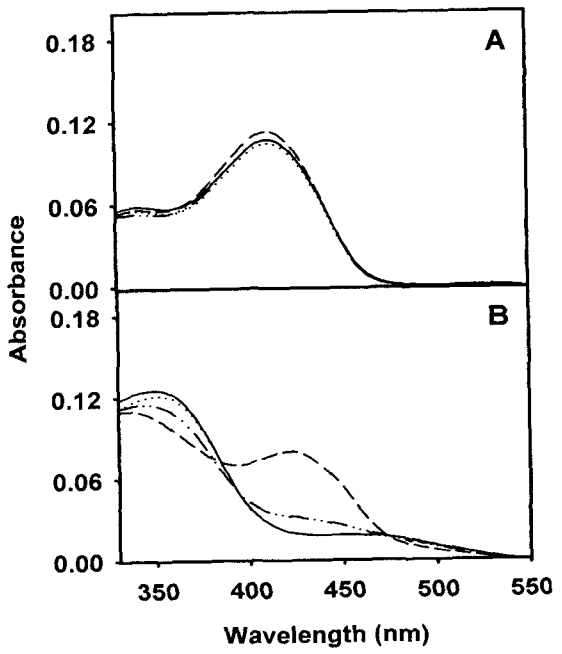

Fig. 1. Effects of L-serine on the absorbance spectrum of the wild-type and mutant proteins.
The wild type (-), D56E (···), D56G (---), and D56N (··· -) proteins were scanned from 360 to 550 nm for absorbance in the absence (A) or presence of L-serine (B).

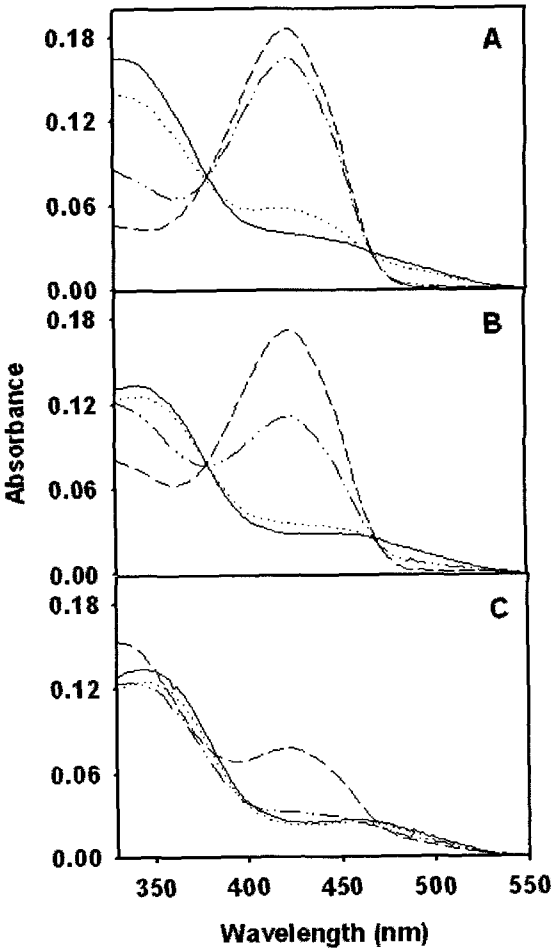

Fig. 2. Effect of the monovalent cations on the absorbance spectrum of proteins in the presence of L-serine.
Absorbance of the wild type (-), D56E (···), D56G (---), and D56N (-·· -) proteins were measured from 360 to 550 nm in the presence of L-serine. To see effects of the monovalent cations, 100 mM Na^+ (A), 100 mM K^+ (B) or 50 mM NH_4^+ (C) was added.

이번에는 α소단위체의 이소조절성 리간드인 glycerophosphate를 처리하였다(Fig. 3). 야생종과 D56E의 흡광도는 서로 비슷하였다. D56G와 D56N는 424 nm에서는 리간드가 없을 때와 비슷한 형태였지만, 350 nm에서는 차이를 보여주고 있다[6-8].

야생종의 경우 56번 잔기의 아스팔산은 음전하를 띄고 있으며 비슷한 활성도를 갖는 D56E의 경우는 글루탐산으로 치환된 것인데 이 역시 음전하를 가지고 있다. 이에 반해 글리신으로 치환된 D56G와 아스파라긴으로 치환된 D56N의 경우는 전하가 변화된 상태이다.

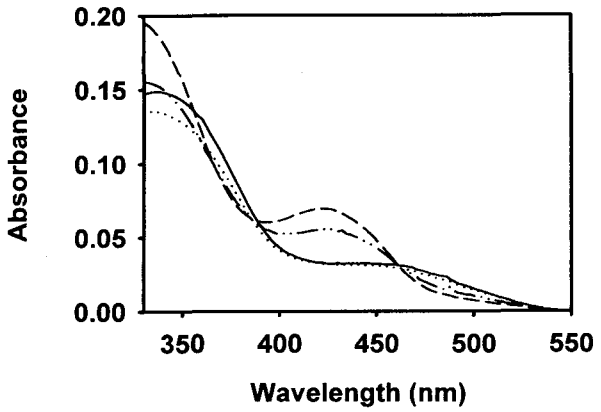

Fig. 3. Effect of glycerophosphate on the absorbance spectrum of proteins with L-serine.
Absorbance of the wild type (-), D56E (···), D56G (---), and D56N (-·· -) proteins were measured from 360 to 550 nm in the presence of L-serine and 100 mM D,L-α- glycerol 3-phosphate (GP).

$$E+Ser \rightleftarrows E\text{-}Ser \rightleftarrows E\text{-}Q_1 \rightleftarrows E\text{-}AA \xrightarrow[\swarrow H^+]{\swarrow Ind} E\text{-}Q_2 \rightleftarrows E\text{-}Trp \rightleftarrows E+Trp$$

412nm 424nm (open) ↘H^+ ↘OH^- 350nm (closed) 476nm (closed) 420nm (open)

Stage I Stage II

염다리에 관여하는 56번 잔기를 치환시킨 D56E, D56G, 그리고 D56N에 몇몇 일가 양이온들과 GP를 처리한 본 실험에서 이들 양이온들이 $\alpha_2\beta_2$ 복합체의 활성적인 닫힌구조(closed form)의 안정화에 상호작용을 하는 것으로 생각된다[1,9].

Na^+와 K^+는 β 소단위체의 동일한 곳에 결합되나 그 후의 반응은 서로 다르다. 즉 Na^+가 존재하는 경우 βAsp^{305}의 carboxylate가 βLys167의 ε-amino group과 함께 염다리를 형성하게 되지만, K^+가 존재하는 경우 βAsp^{305}의 carboxylate가 변화된 형태가 되며, βLys^{167}의 ε-amino group도 7Å 정도 움직이게 되어 αAsp^{56}의 carboxylate와 접하고 있는 소단위체를 가로질러 염다리를 형성하게 된다 [1]. βLys^{167}이나 αAsp^{56}에 돌연변이가 발생한 트립토판 합성효소의 경우, Na^+, K^+ 또는 NH_4^+가 존재할 때 더 높은 효소활성을 보인다고 밝혀졌다. 그러나 지금까지의 실험에서 424nm에서의 E-Ser 복합체의 양이 D56G와 D56N에 다량으로 존재하는 것으로 보아 기존의 보고와는 다소 차이를 보여준다.

요 약

트립토판 합성효소의 이소조절성에 작용하는 리간드가 알려져 있다. β반응의 기질인 세린만이 있는 조건에서 일가 양이온과온과 glycerophosphate의 리간드효과를 잔기치환체를 사용하여 조사하였다. 이들 리간드가 이 효소의 이소조절성에 관여하고 있음을 보여주고 있다.

참 고 문 헌

1. Fan, Y. Y., P. McPhie and E. W. Miles. 2000. Regulation of tryptophan synthase by temperature, monovalent cations, and an allosteric ligand. Evidence from Arrhenius plots, absorption spectra, and primary kinetic isotope effects. *Biochemistry* **39**, 4692-4703.
2. Kanzaki, H., P. McPhie and E. W. Miles. 1991. Effect of single amino acid substitutions at positions 49 and 60 on the thermal unfolding of the tryptophan synthase alpha subunit from *Salmonella typhimurium*. *Arch. Biochem. Biophys.* **284**, 174-180.
3. Miles, E. W., R. Bauerle and S. A. Ahmed. 1987. Tryptophan synthase from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Methods Enzymol.* **142**, 398-414.
4. Miles, E. W., H. Kawasaki, S. A. Ahmed, H. Morita and S. Nagata. 1989. The β subunit of tryptophan synthase. Clarification of the roles of histidine 86, lysine 87, arginine 148, cysteine 170, and cysteine 230. *J. Biol. Chem.* **264**, 6280-6287.
5. Pan, P., E. Woehl and M. F. Dunn. 1997. Protein architecture, dynamics and allostery in tryptophan synthase channeling. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 22-27.
6. Rhee, S., E. W. Miles and D. R. Davies. 1998. Cryo-crystallography of a true substrate, indole-3-glycerol phosphate, bound to a mutant (αD60N) tryptophan synthase $\alpha_2\beta_2$ complex reveals the correct orientation of active site αGlu49. *J. Biol. Chem.* **273**, 8553-8555.
7. Rhee, S., K. D. Parris, C. C. Hyde, S. A. Ahmed, E. W. Miles and D. R. Davies. 1997. Crystal structures of a mutant (β K87T) tryptophan synthase $\alpha_2\beta_2$ complex with ligands bound to the active sites of the α- and β-subunits reveal ligand-induced conformational changes. Biochemistry **36**, 7664-7680.
8. Rowlett, R., L.-H. Yang, S. A. Ahmed, P. McPhie, K.-H. Jhee and E. W. Miles. 1998. Mutations in the contact region between the α and β subunits of tryptophan synthase alter subunit interaction and intersubunit communication. Biochemistry **37**, 2961-2968.
9. Ruvinov, S. B., S. A. Ahmed, P. McPhie and E. W. Miles. 1995. Monovalent cations partially repair a conformational defect in a mutant tryptophan synthase $\alpha_2\beta_2$ complex (β E109A). *J. Biol. Chem.* **270**, 17333-17338.
10. Yang, L.-H., S. A. Ahmed and E. W. Miles. 1996. PCR mutagenesis and overexpression of tryptophan synthase from *Salmonella typhimurium*: on the roles of β_2 subunit Lys-382. *Protein Expression Purif.* **8**, 126-136.