

트립토판 합성효소의 β반응속도에 미치는 일가양이온의 영향

김 일 · 신혜자¹ · 임운기* · 김한도*

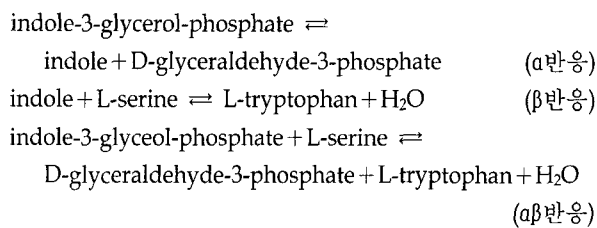
부산대학교 자연과학대학 분자생물학과, ¹동서대학교 응용공학부 환경공학전공

Received October 27, 2003 / Accepted November 4, 2003

Effects of Monovalent Cations on the β Reaction Kinetics of Tryptophan Synthase. Eel Kim, Hae Ja Shin¹, Woon Ki Lim* and Han Do Kim*. *Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 609-735, Republic of Korea, ¹Environmental Engineering Major, Division of Applied Engineering, Dongseo University, Busan 617-716, Republic of Korea* – Effects of monovalent cations were examined on the fast β reaction of αD56N and αD56G mutant tryptophan synthase. Reaction rates for the production and degradation of intermediates in the reaction were changed in the presence of cations. The mutant proteins showed different reaction rates from those of wild-type protein, and additional changes occurred in the presence of cations. The results showed that monovalent cations and αD56 are important in allosteric properties of this protein.

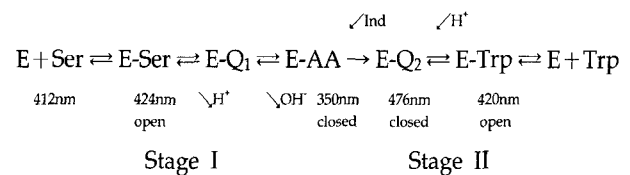
Key words – allosterism, mutant protein, cation.

트립토판 합성효소는 기질이 터널이동을 하는 독특한 이소조절성(allosterism)을 보여주고 있다[3]. 이 효소는 2개의 β소단위체(43,500 달톤)가 중앙에 결합되어 있고, 그 양쪽으로 각각 1개씩의 α소단위체(28,600달톤)가 결합되어 있다[3,4]. α소단위체(α subunit)는 indole-3-glycerolphosphate (IGP)로부터 인돌(indole)을 형성할 수 있다(α반응). 이렇게 형성된 인돌은 α소단위체와 β소단위체 간에 존재하는 25~30 Å 길이의 터널 구조를 통해 β소단위체로 이동한다[3-4,8]. β소단위체는 세린(L-serine)과 터널을 통해 이동된 인돌로부터 트립토판을 합성한다(β반응)[4,8]. αβ 복합체에 의한 전체반응을 αβ반응이라 한다. 다음은 이들 반응 화학식이다.



β소단위체에서 일어나는 β반응에서는 여러 단계의 화학 중간산물이 생성된다[3,4]. 이들은 기질의 하나인 세린과 결합하여 aminoacrylate (A-A)를 형성하는 I단계와 E(A-A)에 α반응의 산물인 인돌이 결합하여 트립토판을 형성하는 II단계로 나눈다[3,4]. β소단위체의 조효소인 PLP (pyridoxal 5-phosphate)는 87번 아미노산 리신과 결합하여 internal aldimine을 형성한다. 세린이 있게 되면 리신을 대체하여 external aldimine을 형성하고 이는 quinonoid를 거쳐 A-A로 주로 존재하게 된다.

인돌이 운반되어 들어오면, 다른 quinonoid를 거쳐 트립토판의 external aldimine이 만들어지며 이것이 떨어져 나가면서, 다시 금 첫단계로 효소는 되돌아가게 된다[3,4]. 이를 각 화합물의 최대 흡광도파장과 함께 화학반응식으로 요약하면 다음과 같다.



이러한 반응단계에서 이소조절성에 있어 αAsp56, βAs-305, βArg141, βLys167번 잔기간의 염다리 결합(salt bridge)과 일가 양이온(monovalent cation, MVC)이 중요한 역할을 담당한다[4,8]. Na⁺, K⁺, NH₄⁺ 등의 일가 양이온들은 β소단위체에 결합하며[8], 이소조절 리간드인 GP (DL-α-glycerol 3-phosphate)는 α단위체에 결합한다[8]. 이 연구들에는 주로 *Salmonella typhimurium*의 효소를 사용하였다.

본 실험에서는 대장균의 트립토판 합성효소 α소단위체 56 잔기인 아스팔산이 글리신으로 치환된 D56G, 또는 아스파라긴으로 치환된 D56N 단백질을 이용하여 I단계와 II단계에 미치는 일가 양이온들의 역할을 알아보았다[4,8]. Na⁺, K⁺, 그리고 NH₄⁺를 처리하였을 때 생성되는 각각의 중간반응생성물의 분포를 살펴보고 이들이 이 효소활성에서의 역할을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

효소와 시약

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

*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

박테리아 균주 및 플라스미드

대장균 균주 RB797 (*F' lacI^f proL8/arg Nal^r Rif^r recA sup lac proXIII*)는 야생종 또는 돌연변이 *trpA* 유전자와 정상적인 *trpB* 유전자를 포함한 플라스미드[5]를 갖고 있다. 야생종과 D56E, D56G 그리고 D56N 돌연변이 트립토판 중합효소 α 소단위체의 *trpA* gene은 암피실린에 저항성을 보이는 β-lactamase 유전자를 플라스미드에 가지고 있다. *trpA* 유전자를 포함하고 있는 플라스미드 ptactrpA는 단백질의 대량발현 과정에 사용하였다. *trpA* 유전자는 D-젓당에 의해 대량발현이 유도되는 *tac* 전사조절인자를 가지고 있다.

단백질의 과량 발현 및 분리

야생형 및 돌연변이 단백질들은 대장균 RB797에서 발현하고 분리하였다. 야생형 및 잔기치환 단백질들을 과량 발현시키고 분리한 방법은 이미 보고된 방법에 따랐다[7]. 황산암모늄((NH₄)₂SO₄) 침전법과 이온크로마토그래피 HPLC로 분리하였다[7]. 정제된 단백질의 순도는 SDS-PAGE을 실시하여 Coomassie Brilliant Blue R로 염색하여 확인하였다. 순수 정제된 야생형의 α소단위체의 농도는 E^{1%}_{278nm} = 4.4, β소단위체의 경우 E^{1%}_{278nm} = 6.5를 사용하여 결정하였다[6]. 잔기치환 단백질의 경우에는 야생형을 표준으로 microbiuret 방법을 사용하였다.

빠른 β반응 속도 측정

단백질 용액(10 μM)을 40 mM 세린 또는 0.5 mM 인돌린 용액을 stopped flow로 섞어주고 형광의 변화를 측정하였다. 사용된 용액은 모두 50 mM TEA buffer (pH 7.8)용액이었다. 일가 양이온의 영향은 100 mM NaCl, 100 mM KCl 또는 50 mM NH₄Cl [4,8]을 양쪽 용액에 첨가하여 조사하였다.

결과 및 고찰

야생종 단백질의 I과 II단계에서의 중간생성물에 미치는 일가 양이온의 영향

먼저 야생종(wild type) 효소의 빠른 β반응 성질을 측정하였다(Fig. 1). 40 mM 세린을 첨가하면 0.01 초내에 형광세기가 최대치로 증가하며, 그 이후로는 감소하는 것을 알 수 있다(Fig. 1A). 각각의 변화는 internal aldimine의 생성과 분해를 나타낸다[3-4,8-9]. 일가 양이온이 있으면 생성과 분해반응에서 모두 반응속도와 촉매능이 달라지는 것을 알 수 있다[4,8]. II단계 반응을 살펴보기 위해 40 mM 세린과 0.5 mM 인돌린의 유사체인 인돌린(indoline)을 처리하였다(Fig. 1B). II단계의 중간산물 중 특히 quinonoid의 생성과 분해를 알 수 있으며[8], 형광 증가와 감소가 각각 이에 해당한다. 마찬가지로 일가 양이온에 의해 반응이 영향을 받고 있음을 알 수 있다. 두 경우 3가지 일가 양이온은 생성 및 분해 속도를 촉진시켰다. 그러나, 최대 생성된 중간생성물의 양을 나타내는 형광의 최대 세기를

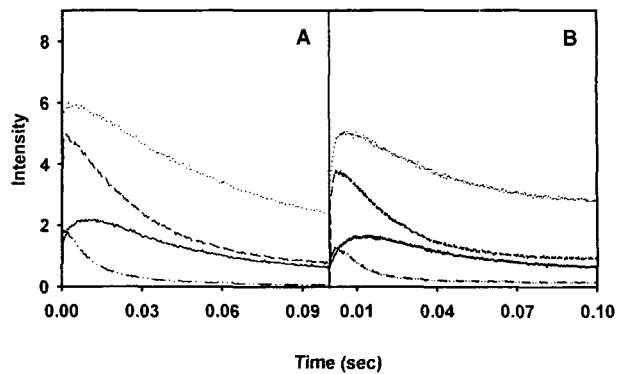


Fig. 1. Effect of monovalent cations on the fast kinetics of stage I and total β reaction of wild-type tryptophan synthase. The reactions were initiated by mixing the protein solution with the solution containing 40 mM L-serine (A) or 40 mM L-serine plus 0.5 mM indoline (B). The reactions were performed by monitoring the fluorescence intensity around 410 nm without any monovalent cation (-) or with the addition of 100 mM NaCl (···), 100 mM KCl (---), and 50 mM NH₄Cl (-·-·-).

살펴보면, Na⁺와 K⁺는 2-3배로 증가시킨 반면, NH₄⁺는 약간 떨어졌음을 볼 수 있다[9].

잔기치환 단백질의 반응에 미치는 일가 양이온의 영향

β반응의 효소활성이 야생종의 23%를 가지고 있는 D56N에 대해 조사하였다(Fig. 2). 이 잔기치환체는 세린이 첨가되면 0.03초가 되어야 최대치에 도달되고 이후의 감소속도도 야생형에 비해 매우 느리게 진행됨을 알 수 있다. II단계의 경우에

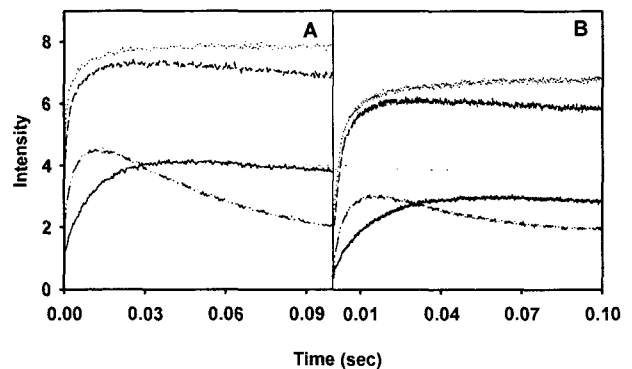


Fig. 2. Effect of monovalent cations on the fast kinetics of stage I and total β reaction of D56N mutant tryptophan synthase. The reactions were performed as described in Fig. 1, except that D56N mutant protein was used here instead of wild-type one. The reactions were performed by monitoring the fluorescence intensity around 410 nm without any monovalent cation (-) or with the addition of 100 mM NaCl (···), 100 mM KCl(---), and 50 mM NH₄Cl (-·-·-). (A) 40 mM L-serine, (B) 40 mM L-serine plus 0.5 mM indoline.

서도 마찬가지로 반응 패턴을 보여주고 있다. 3가지 일가 양이온은 생성속도를 촉진시켰다. 그러나, 분해속도는 Na^+ 와 K^+ 는 큰 변화가 없는 반면, NH_4^+ 는 더욱 촉진시켰다[9]. 형광의 최대 세기를 살펴보면, Na^+ 와 K^+ 는 약 2배정도로 증가시킨 반면, NH_4^+ 는 거의 비슷한 정도였다.

D56G은 음전하를 띠는 야생종의 56번 아스파산이 전하를 띄지 않고 크기도 작은 글리신으로 치환된 것으로 효소활성은 β 반응의 경우 야생종에 비해 1.6%정도에 불과한 값을 보여주는 것으로 알려져 있다[1,2]. I, II단계중간생성물의 생성 속도는 D56N과 거의 비슷하나 분해속도는 더욱 느린 패턴을 보여주고 있다(Fig. 3). 일가양이온의 영향도 비슷한 패턴을 보여주고 있으나, 형광의 세기를 살펴보면 D56N에 비해서는 그 증가 정도가 약한 것을 알 수 있다. D56N에서와 마찬가지로 그래프의 기울기 또한 전반적으로 낮아서 생성된 다량의 중간산물이 다음의 형태로 빨리 전환되지 못하고 있는 것으로 보이며 그 정도는 D56N에 비해서도 훨씬 느린 것으로 생각된다[1,2]. 이들 역시 $\text{NH}_4^+ < \text{K}^+ < \text{Na}^+$ 의 순서로 형광세기가 증가하며 생성된 중간산물의 변화 속도를 알 수 있는 그래프의 기울기 역시 활성이 높은 야생종이나 D56N에 비해 훨씬 낮을 것으로 보아 생성된 중간산물의 변환 또한 가장 느리게 진행되는 것으로 보인다[8,9].

본 연구에서는 D56G와 D56N 잔기 치환된 대장균의 트립토판 중합효소를 대상으로 β 반응의 I단계와 II단계에 미치는 일가 양이온들의 역할을 알아보았다. 본 결과는 대장균의 트립토판 중합효소에 있어서도 α 소단위체 56잔기가 이소조절성에 관여하고 있음을 보여주고 있다[4,8]. Na^+ , K^+ , 그리고 NH_4^+

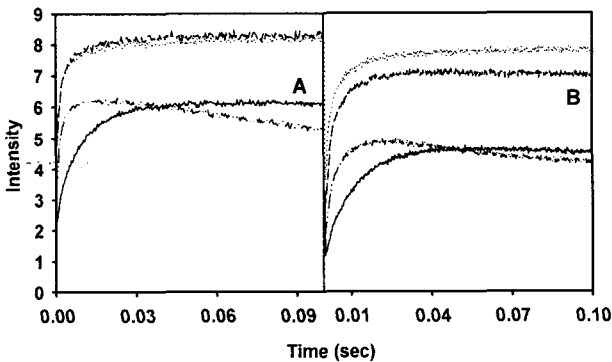


Fig. 3. Effect of monovalent cations on the fast kinetics of stage I and total β reaction of D56G mutant tryptophan synthase.

The reactions were performed as described in Fig. 1, except that D56G mutant protein was used here instead of wild-type. The reactions were performed by monitoring the fluorescence intensity around 410 nm without any monovalent cation (-) or with the addition of 100 mM NaCl (···), 100 mM KCl(---), and 50 mM NH_4Cl (-·-·). (A) 40 mM L-serine, (B) 40 mM L-serine plus 0.5 mM indoline.

를 처리하였을 때 생성되는 중간반응생성물의 속도와 분해 속도가 달라지는 것으로 보아 대장균의 효소에서도 이들 양이온들이 이소조절 리간드역할을 수행하는 것을 알 수 있다.

요 약

대장균 트립토판 합성효소의 β 반응의 빠른 속도 반응에 일가 양이온의 영향을 D56N과 D56G 잔기치환체를 대상으로 조사하였다. 일가 양이온을 처리하였을 때 생성되는 중간반응생성물의 생성과 분해 속도가 영향을 받았다. 56번 자리 잔기치환체도 야생형에 비해 반응의 중간산물의 생성과 분해에 있어 모두 느린 속도를 보여주고 있다. 이들 잔기 치환체에 미치는 일가 양이온의 영향 또한 달라졌다. 이 결과는 대장균의 효소에서도 56번잔기가 이소조절에 관여하고 있고, 이 과정에서 일가 양이온들이 이소조절 리간드역할을 수행하는 것을 보여준다.

참 고 문 헌

- Ahmed, S. A., S. B. Ruvinov, A. M. Kayastha and E. W. Miles. 1991. Mechanism of mutual activation of the tryptophan synthase α and β subunits. Analysis of the reaction specificity and substrate-induced inactivation of active site and tunnel mutants of the β subunit. *J. Biol. Chem.* **266**, 21548-21557.
- Dunn, M. F., E. Woehl, D. Ferrari, U. Banik, L.-H. Yang and E. W. Miles. 2000. In Martinez-Carrion, M. (ed), *Biochemistry of Vitamin B₆ and PLP*, Birkhauser Verlag, New York.
- Fan, Y. Y., P. McPhie and E. W. Miles. 2000. Exchange of K^+ or Cs^+ for Na^+ induces local and long-range changes in the three-dimensional structure of the tryptophan synthase $\alpha_2\beta_2$ complex. *Biochemistry* **39**, 4692-4703.
- Hyde, C. C., S. A. Ahmed, E. A. Padlan, E. W. Miles and D. R. Davies. 1988. Three-dimensional structure of the tryptophan synthase $\alpha_2\beta_2$ multienzyme complex from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **263**, 17857-17871.
- Kawasaki, H., R. Bauerle, G. Zon, S. A. Ahmed and E. W. Miles. 1987. Site-specific mutagenesis of the α subunit of tryptophan synthase from *Salmonella typhimurium*. Changing arginine 179 to leucine alters the reciprocal transmission of substrate-induced conformational changes between the α and β_2 subunits. *J. Biol. Chem.* **262**, 10678- 10683.
- Miles, E. W., R. Bauerle and S. A. Ahmed. 1987. Tryptophan synthase from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. pp.398-414, In *Methods Enzymol.* Vol. **142**, Academic Press Inc., New York.
- 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.
- Rhee, S., K. D. Parris, S. A. Ahmed, E. W. Miles and D.

- R. Davies. 1996. Exchange of K^+ or Cs^+ for Na^+ induces local and long-range changes in the three-dimensional structure of the tryptophan synthase $\alpha_2\beta_2$ complex. *Biochemistry* **35**, 4211-4221.
9. Yang, X.-J. and E. W. Miles. 1993. A novel intersubunit repair mechanism in the tryptophan synthase $\alpha_2\beta_2$ complex. Critical role of the β subunit lysine 167 in intersubunit communication. *J. Biol. Chem.* **268**, 22269-22272.
10. Yang, X.-J., S. B. Ruvinov and E. W. Miles. 1992. Overexpression and purification of the separate tryptophan synthase α and β subunits from *Salmonella typhimurium*. *Protein Expression Purif.* **3**, 347-354.