

돼지 신장의 Angiotensin I Converting Enzyme cDNA 클로닝

윤장호 · 윤주억 · 홍광원*

동국대학교 식품공학과

Cloning of Pig Kidney cDNA Encoding an Angiotensin I Converting Enzyme

Jang-Ho Yoon, Joo-Ok Yoon and Kwang-Won Hong*

Department of Food Science and Technology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

Received October 30, 2006; Accepted November 30, 2006

Angiotensin converting enzyme (ACE) is a zinc-containing dipeptidase widely distributed in mammalian tissues and is thought to play a significant role in blood pressure regulation by hydrolyzing angiotensin I to the potent vasoconstrictor, angiotensin II. Recently, the presence of ACE in pig ovary was reported and the ACE from pig kidney was isolated and characterized. However no nucleotide sequence of the ACE gene from pig is yet known. We report here the cloning of the ACE cDNA from pig kidney by using the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. The complete amino acid sequence deduced from the cDNA contains 1309 residues with a molecular mass of 150 kDa, beginning with a signal peptide of 33 amino acids. Amino acid sequence analysis showed that pig kidney ACE is also probably anchored by a short transmembrane domain located near the C-terminus. This protein contains a tandem duplication of the two homologous amino acid peptidase domain. Each of these two domains bears a putative metal-binding site (His-Glu-Met-Gly-His) identified in mammalian somatic ACE. The alignment of pig ACE amino acid sequence with human, rabbit, and mouse reveals that both two domains have been highly conserved during evolution.

Key words: pig kidney, cDNA cloning, angiotensin-converting enzyme (ACE), dipeptidyl carboxypeptidase

서 론

세계보건기구(WHO)에 따르면 2020년까지 심혈관계 질환이 인류를 죽임으로 이끄는 주요 원인이 될 것이라 예견한 바 있다.¹⁾ 심근경색, 뇌혈관질환 그리고 뇌졸중 등 심혈관계 질환의 주요 원인은 고혈압으로 알려져 있다. 따라서 혈압 상승과 관련한 angiotensin I converting enzyme(EC 3.4.15.1; ACE)의 저해를 통한 renin-angiotensin system의 조절이 심혈관계질환 치료에 중요한 전략이 되고 있다.^{2,4)}

Renin-angiotensin system은 혈압의 항상성을 유지시키는 중요한 생리적 기작중 하나로 알려져 있다. 항상성은 두 효소 renin과 ACE의 연차적인 반응에 의해 일어나고 있다. 혈액내의 angiotensinogen이 신장에서 분비된 renin의 특이적 분해를 받아서 불활성형인 angiotensin I(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu)으로 전환되고 이어서 ACE가 불활성 angiotensin I의

C-말단에서 디펩티드인 His-Leu을 절단하여 직접적으로 강한 혈압상승 작용을 일으키는 활성형의 octapeptide인 angiotensin II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe)로 전환시키며, 이 angiotensin II는 여러 과정을 거쳐 adrenal로부터 sodium-retaining steroid hormone인 aldosterone의 생성을 유발시켜서 체내 나트륨을 지연시키므로 신장에서 강한 혈압 상승을 일으키게 된다.^{3,5)} ACE는 또 혈관 이완작용을 하는 혈압 강하 물질인 bradykinin (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg)을 분해하여 불활성화 시킴으로서 결과적으로 혈압을 상승시킨다.⁶⁾

이처럼 혈압조절에 관여하는 ACE는 dipeptidyl carboxypeptidase로서 Zn²⁺을 함유한 당단백질이고 isozyme으로서 endothelial과 testicular isozyme이 있다.^{7,8)} endothelial isozyme은 매우 유사한 두개의 domain으로 구성되어 있으며 각각 catalytic site 추정부위를 지니고 있는 반면 작은 크기의 testicular isozyme은 endothelial isozyme의 C-말단 domain에 해당하며 하나의 catalytic site 만을 가지고 있다. 이들은 대부분 세포막에 걸쳐 있으며 C-말단 부근에 위치한 일련의 소수성 폴리펩티드들이 막을 관통하여 매달려 있고 N-glycosylation이 광범위하게 분포되어 있으며 testicular isozyme은 O-glycosylation 되어 있기도

*Corresponding author
Phone: +82-2-2260-3369; Fax: 82-2-2285-3988
E-mail: hkwon@dongguk.edu

하다.^{9,10} 이 효소는 또한 혈장 또는 대뇌신경조직 그 밖의 다른 체액에서 soluble 형태로 존재하기도 하며^{11,12} 기질 특이성이 다양하여 hypertension 뿐만 아니라 immunity, reproduction, 그리고 neuroprocesses와 같은 여러 생리적 과정에 연관되어 있다. 현재는 ACE에 대한 강력한 저해제들이 많이 개발되어 고혈압 치료에 성공적으로 이용되어 오고 있다.^{9,13}

지금까지 human을 비롯하여 rabbit, mouse, rat의 ACE 염기서열이 알려져 있다.^{14,17} Human의 경우는 단일 폴리펩티드 사슬로 이루어진 endothelial ACE와 testicular ACE가 알려져 있으며 testicular ACE의 아미노산 서열은 endothelial ACE의 C-말단 부위와 동일한 것으로 밝혀졌다.^{10,14} 최근 돼지 난자에서 ACE 활성이 알려지고 신장의 ACE 단백질이 분리 정제되어 그 생화학적 특성이 보고 된 바 있으나 아직 돼지의 어떤 ACE 염기서열도 알려지지는 않았다.¹⁸ 따라서 본 연구에서는 돼지의 신장에서 total mRNA를 분리한 다음 RT-PCR을 이용하여 ACE cDNA를 합성하고 그 염기서열을 결정하여 기존에 밝혀진 다른 동물의 ACE 염기서열과 비교하였다.

재료 및 방법

재료. 본 실험에서 사용한 돼지의 신장은 가락동 축산시장에서 생후 1년 된 돼지의 신장을 도축 즉시 드라이아이스를 이용하여 급속동결 시킨 후 -80°C의 냉동고에 보관하며 시료로 이용하였다. cDNA synthesis kit는 Takara Co.의 제품을 이용하였다. 기타 모든 시약은 분자생물학용 특급 시약을 사용하였다.

RNA 분리 및 primer 제작. 시료를 막자사발에 5g 정도 넣고 액화질소를 넣어가며 막자로 미세하게 마쇄시킨 다음, total RNA는 AGTC(acid guanidium thiocyanate) 법¹⁹에 따라 분리하였다.

ACE cDNA 클로닝을 위한 5'-end primer, 3'-end primer 및 internal primer들의 염기서열은 이미 발표된 다른 종의 ACE 염기서열들을 비교하여 degenerated primer를 합성하였다(Table 1). 예상되는 ACE cDNA의 크기가 4 kb로 한번의 PCR로 얻기에는 합성에 어려움이 있어 여러 작은 단편의 DNA로 증폭시키고 연결하고자 내부의 잘 보존된 염기서열을 이용하여 internal primer를 합성하였다.

cDNA 합성 및 subcloning. cDNA synthesis kit를 사용하여 돼지의 신장에서 추출한 total RNA로부터 cDNA를 합성하였

다. total RNA 4 μ l(2-4 μ g)을 0.5 ml tube에 넣고 65°C 10분간 처리한 후 반응 mixture [AMV Reverse Transcriptase(10 U/ μ l) 2 μ l, RTase buffer 4 μ l, dNTP(ea 10 mM) 2 μ l, RNase inhibitor(40 U/ μ l) 1 μ l, DEPC 처리한 멸균수 5 μ l, DTT 1 μ l, oligo d(T)₁₈(10 pmol/ μ l) 2 μ l]와 섞는다. 42°C에서 1시간 incubation한 후 즉시 ice 에 2분간 넣어 반응을 정지시킨다. 합성된 cDNA 혼합물로부터 ACE DNA 단편을 증폭시키기 위한 PCR 반응조건은 다음과 같다. Taq DNA polymerase (5 U/ μ l) 0.5 μ l, 10 \times PCR buffer 5 μ l, 25 mM dNTP mixture(2.5 mM each) 8.0 μ l template cDNA, degenerated primers 10 pmol 에 멸균수를 첨가하여 전체 50 μ l로 하였다. 혼합액을 95°C에서 1분간 반응시킨 후, 95°C 30초 (denaturation), 55°C 30초 (annealing), 72°C 2분(polymerization)의 순환과정을 35 cycle 반복하고 마지막으로 72°C 5분을 행하였다.

여러 primer들을 조합하여 합성된 8개의 ACE DNA 단편들을 pTOPO vector에 각각 ligation 시킨 후 *E. coli* DH5 α 에 형질전환 하였다. *E. coli*에서 plasmid DNA의 분리과 정제는 alkali lysis 방법을 사용하였다.²⁰

염기서열 분석. 염기서열 분석은 APB사의 SEQ 4 \times 4 personal sequencing system을 이용하였다. Sequencing 반응은 Thermo Sequenase Cy5.5 Dye Termination Cycle Sequencing Kit를 사용하였다. 각 plasmid에 클론된 ACE DNA 단편들의 염기서열을 모두 결정한 다음 그 서열들을 중복하여 돼지 신장의 ACE cDNA의 최종 염기서열을 결정하였다. 앞서 구성한 recombinant plasmid에 삽입된 ACE DNA 단편들을 서로 직접 연결시키기 위해 Webcutter 2.0 프로그램을 이용하여 전체 염기서열에 대한 제한효소의 restriction map을 구하였다(data not shown). Pig kidney ACE와 기존에 발표된 다른 종과의 상동성을 분석하기 위해 Clustal W 프로그램²¹을 이용하여 protein multiple sequence alignment를 시행하였다.

대장균에서 과발현. 전체 cDNA가 cloning된 pTPI2 plasmid를 *E. coli* NovaBlue에 도입시키고 LB 액체배지에서 배양하여 A₆₀₀이 약 0.8이 되었을 때 최종농도 0.5 mM이 되도록 IPTG를 첨가하였다. A₆₀₀이 약 1.0이 되었을 때 배양을 중단시킨 후 4,000 \times g로 20분간 원심분리하여 균을 모은 뒤 500 μ l의 sonication buffer[10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 10 mM of MgCl₂, 5 mM DTT, 10% glycerol, 2 mM β -mercaptoethanol]에 다시 녹였다. 균현탁액 10 ml를 4°C에서 30% pulse cycle로 30초간

Table 1. Degenerate primer sequences used for the synthesis of the pig ACE cDNA

Primer Name	Oligonucleotide Sequence (5'-3' direction)	Position
P1	ACATAATGGGGCCGCCYCSGGCCRSCGGG	N-terminal
P2	CGGGATCCTTAGGAGTGCTBAGCTCCACCTC	C-terminal
P3	GAGTACAACAAGATCCTGTTGGATATGG	2224-2251
P4	CCATRTCCARCAGGATCTKGTGTGACTC	2251-2224
P5	GGATCAAGCAGTGTACCACC	2921-2940
P6	GGTGGTACTGCTTGATCC	2940-2921
P7	AGCCMCTTACTCTGAACCTSCATGCCT	752-778
P8	AGGCATGSAGGTTTCAGGTAGAGKGGCT	778-752

Mixed bases in degenerate primer were represented by the following symbols; Y, C and T; R, A and G; M, A and C; S, G and C; K, G and T; B, C, G and T. (P odd.: forward primer, P even.: reverse primer)

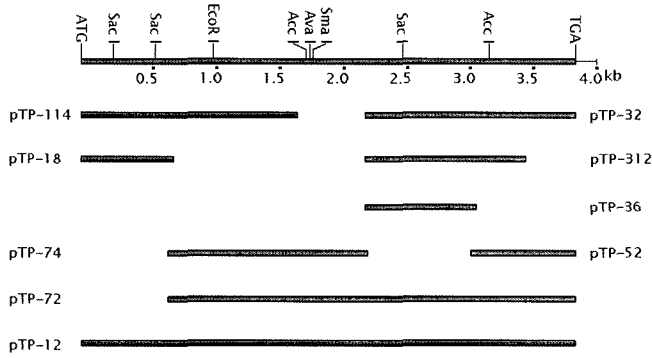


Fig. 1. Strategy for constructing the nucleotide sequence for kidney ACE from overlapping cDNA clones. The individual clones used in this construction are shown beneath a physical map depicting restriction sites within the sequence. Clones are represented as labeled bars with arrows indicating direction and extent of sequencing reactions.

ultrasonication 처리를 한 다음 total protein extract를 loading dye와 1:1로 혼합하여 3분간 가열 후 8% sodiumdodesylsulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 수행하여 과 발현된 단백질의 크기를 확인하였다.

결과 및 고찰

돼지 신장 ACE cDNA의 클로닝. 돼지의 신장으로부터 total RNA를 분리 정제한 다음 RT-PCR로 cDNA를 만들고 degenerate primer 및 internal primer를 이용하여 모두 8개의 ACE DNA 단편(0.7, 0.77, 1.0, 1.1, 1.3, 1.5, 1.7 및 3.2 kb)을 얻었다. 이 단편들을 pTOPO vector에 클로닝하여 각각 pTP-36, pTP-18, pTP-52, pTP-312, pTP-114, pTP-74, pTP-32 및 pTP-72 plasmid를 구성하였다(Fig. 1). 이 8종의 plasmid에 클론된 ACE DNA 단편들의 염기서열을 모두 결정하였다. 부분적으로 클로닝된 ACE DNA 단편을 연결하기 위하여 ACE gene의 5'-말단 부위를 포함하는 pTP-114 plasmid를 제한효소 Xho I 과 BstP I 으로 절단하여 1.2 kb의 DNA 단편을 정제하였다. 또한 ACE gene의 3'-말단부위를 포함하는 pTP-72 plasmid를 역시 동일한 제한효소로 처리한 후 이 1.2 kb DNA 단편을 접합시켜 약 4 kb의 전체 ACE 유전자를 포함하는 pTP-12 plasmid를 구성하였다(Fig. 1). 이 접합과정에서 전체 ACE gene의 5'-말단과 3'-말단 부위를 제외하고는 내부의 연결부위중 degenerate primer 염기서열이 포함된 부분은 제거되었다.

염기서열 및 아미노산서열의 분석. 염기서열 분석 결과 돼지 신장의 ACE cDNA는 3930개의 염기로 구성되어 있으며 (GenBank accession number: EF121312) 모두 1309개의 아미노산을 암호화하고 있는 것으로 나타났다(Fig. 2). 돼지 신장 ACE는 단일 폴리펩티드 사슬로 구성되어 있으며 등전점은 6.03, 분자량은 150 kDa에 해당하는 것으로 계산되었다. Human의 경우 endothelial ACE는 1306개의 아미노산 잔기로 이루어진 단일 폴리펩티드 사슬로 분자량은 146.6 kDa이고, human의 testicular ACE는 732개의 아미노산 잔기로 이루어진 80 kDa의 isozyme으로 밝혀졌다.^{10,14)} 토끼의 폐에서 추출한 endothelial

```

MGAAPGRRWPWPLLLPLLLMLLLFPPLPVALALDSALQPGNFTADEAGAEDFAQSFNS
SEQVLFQSTAAWAHDNTNITEENARRQEEAALISQEFSEVWGQKAKALYDPIWQNFTSRT
PRRIIGVVRTLGSANLPGKRQQYNLSNMTRIYSTARVCFPNKATATCWSDPELTNILA
TSRSYTLLEYAWEGWHNAAGIPLKPLYQDFTALSNEAYKQDGFSDTGAYWRSLYDSPTFT
EDLERLYHQLEPLYLNLHAYVRRALHRQYGDREINLRGPIPAHLLGNMWAQSWNNIYDMV
VFPFGKPSLDVTSAMVQKGNVTHMFRVAEEFFTSGLGLPMPPEFWAESMLEKPSDRREV
VCHASAWDFYNRKDFRIKQCTQVTIDQLSTVHHEMGMVQYLLQYKDRHVSRRRANPGFPH
EAIGDVLALSVSPTAHLHKLGLLDHVTSDWESDINYLKMALEKIAFLPFYGLVDQWRWG
VFSGRTPPSLYNDWYLRTKYQGVCPVVRNETHFDAGAKYHVENVTPIRYFVFSFILQ
FQFHQALCKEAGHQGLHQCIDIYQSTRAGAKLRAVLQAGFSRPPQEVKMDMVGSGALDAQ
PLLDYFPQVPTQWLEEQNRSGDILGWPEYQWRPMPDNYPEGIDLVSDAEAEASKFVEEYD
RRSQVVLNEYAEANWDYNTNITAEGSKRVLEKSTQMANHTVKYGIWARKFDVANIQNFTL
KRMIKKIQDLERAAALPFKELEEYNIQLLDMETAYSVASVCHANSTCLQLEPDLTNLMATS
RSYEELLWAWKGRDKVGRALLPYFPKYVELTNKAARLNGYEDGGDAWRAAYEMPFLEQE
LEQLFQELQPLYLNLHAYVRRALHHYGPHEINLEGPPIPAHLLGNMWAQTSWNSIYDLVVP
FPSASKMDASEAMINQGWTPQRMFKEADNFFTSGLGLPMPPEFWNKSMLEKPTDGREVVC
HASAWDFNFKDFRIKQCTTVNMDLVVAHHEMGMVQYLLQYKDRHVSRRRANPGFPH
IGDVLVLSVSTPKHLRSINLLKSEDDGYEEDINFLMKMALDKVAFPFVSYLVQDQWRWF
DRSITKENYQEWWSLRLKYQGLCPPVARSQDGFDPGAKFHISSVPIRYFVFSFIIQFQ
FHEALCQAAGHKGPLHKCDIYQSKEAGRRALADAMKLGSKPWPEAMQLITGQPNVSASAM
MTYFKPLLDLWLVTEGRHGEKLGWPQYSWTPNSARLEGSFAGTGRVNFGLNLEEQQARV
GQWVLLFLGVTLVATMGLTQRLFSIRHQILRRTRHRGQFGSEVELRHS
    
```

Fig. 2. Deduced amino acid sequence of pig kidney ACE cDNA. The HEXXH motif is typed in bold as is the putative metal binding site. The putative N-terminal signal sequence and the C-terminal anchor are indicated by italics. Both shaded regions represent the amino acid sequences corresponding to the N-domain and C-domain of ACE, respectively.

Table 2. Chart comparing the amino acid (AA) and nucleotide sequences of human, mouse, and rabbit angiotensin converting enzymes

Amino acid	cDNA	Porcine	Human	Mouse	Rabbit
Porcine			82	82	83
Human		82		83	82
Mouse		82	82		82
Rabbit		84	81	84	

ACE는 1306개의 아미노산 잔기로 되어있고 분자량은 146.6 kDa이며, testicular ACE의 경우는 732잔기의 아미노산으로 구성된 84 kDa임이 알려졌다.¹⁵⁾ 한편 mouse의 kidney ACE는 분자량이 147.4 kDa이고 1312개의 아미노산으로 구성되어 있으며¹⁶⁾ rat에서는 1313개 아미노산으로 구성된 분자량 150.9 kDa의 ACE가 알려져 있다.¹⁷⁾ 이와 같이 기존의 알려진 human, mouse, rabbit 등의 서열과 돼지 신장 ACE의 염기서열과 deduced 아미노산 서열을 비교분석하기 위하여 Clustal W program을 이용하여 multiple sequence alignment를 시행하고 그 결과를 Table 2에 정리하였다.

돼지 신장 ACE의 cDNA 염기서열과 아미노산서열은 비교한 서열들과 각각 82-83% 및 81-84%의 유사성을 나타냈다. 또한 돼지 신장 ACE는 비교한 서열 중 rabbit의 염기서열과는 83%, rabbit의 아미노산 서열과는 84%로 가장 높은 유사성을 보였다.

ACE의 경우 membrane anchored protein 이므로 세포막을 통과하고 C-말단 부위가 세포막에 바깥쪽으로 걸려진 부위가 있다.²⁰⁾ 그러므로 돼지 신장의 ACE에서 이러한 부위들을 조사하기 위해 TMHMM(CBS, Denmark) 프로그램을 사용하여 분



Fig. 3. Partial protein sequence alignment of the deduced amino acid sequence from pig, human, chimpanzee, rat and rabbit. *O. cuniculus* (Rabbit); *R. norvegicus* (Rat); *H. sapiens* (Human); *P. troglodytes* (Chimpanzee); *S. domesticus* (Pig); Identity (*); Strongly similar (:); Weakly similar (.)

석하였다. 그 결과 N 말단의 앞쪽 33개의 소수성 아미노산 잔기들은 signal peptide로 보이며 C-말단의 뒤쪽 20개의 소수성 아미노산 잔기들은 세포막에 anchor되는 부위로 보여진다(Fig. 2).

또한 endothelial ACE는 매우 유사한 두개의 domain으로 구성되어 있으며 각각의 domain은 zinc metallopeptidase의 활성 부위(His-Glu-Xaa-Xaa-His)에 해당하는 putative catalytic site (His-Glu-Met-Gly-His)를 지닌 것으로 알려져 있다.¹⁴⁾ 돼지 신장의 ACE의 경우도 BLAST 프로그램을 통해 매우 동일한 2개의 domain으로 구성되어 있고 각각 독립적인 putative catalytic site를 갖는다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 돼지 신장의 ACE 동일 분자내에 두 N domain과 C domain 사이의 구조적 유사성을 Clustal W 프로그램으로 분석한 결과 81%의 유사성을 보였으며 다른 종과의 아미노산 비교에서와 마찬가지로 putative active site 부위에서는 95%의 높은 유사성을 보였다(Fig. 3). 이러한 결과는 다른 endothelial ACE와 마찬가지로 돼지 신장의 ACE 역시 두 domain이 duplication되어 구성되고 그 활성부위가 잘 보존되어 있음을 나타낸다고 볼 수 있다.

대장균에서 ACE의 과발현. 돼지 신장의 ACE가 대장균에서 잘 발현되는지 확인하기 위하여 전체 cDNA가 클로닝된 pTP12 plasmid를 *E. coli* NovaBlue에 도입하였다. 형질전환체가 대수기에 도달했을 때 IPTG를 최종농도 0.5 mM이 되도록 첨가하여 ACE protein을 과발현시켰다. 과발현시킨 형질전환체의 total protein extracts를 SDS-polyacrylamide gel에서 확인한 결과 IPTG를 처리하지 않은 형질전환체에 비해 새로이 생성된 약 150 kDa의 protein band를 확인할 수 있었다(Fig. 4).

과발현시킨 형질전환체의 protein extracts에서 ACE 효소활성을 측정하였으나 예상한대로 효소활성은 나타나지 않았다(data not shown). Human endothelial ACE의 경우 아미노산 서열에서 추정하는 분자량은 146.6 kDa이나 실제로는 170 kDa의 단일 분자 형태로 만들어 진다. 허파의 ACE 효소는 fucose, mannose, N-acetylglucosamine, galactose 그리고 sialic acid 등을 포함하여 약 30%의 당을 함유하고 있다.²²⁾ 일반적으로 진

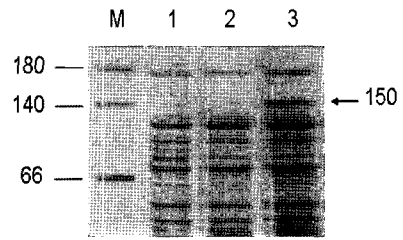


Fig. 4. Overexpression of pig kidney ACE in *E. coli* NovaBlue. Sonically disrupted cell lysates were loaded in 10 % of SDS-PAGE gel. Arrow indicated the induced ACE in pig kidney gene. Lane M, protein size marker; lane 1, *E. coli* NovaBlue; lane 2, *E. coli* NovaBlue/pTP12 without induction; lane 3, *E. coli* NovaBlue/pTP12 with 0.5 mM IPTG induction.

핵생명체에서 단백질에 당 잔기의 첨가로 인한 변형은 단백질의 구조나 활성에 큰 영향을 미칠 수 있다. 그러므로 돼지 신장의 ACE는 효소활성을 나타내는데 glycosylation이 필요한 것으로 추정되며 대장균은 이러한 glycosylation 능력이 없으므로 돼지의 ACE를 활성을 갖는 형태로 합성하지 못한 것으로 볼 수도 있다. 또한 돼지 신장의 ACE는 C-말단부위에 소수성 영역을 가지고 있어 과발현시에 folding이 제대로 일어나지 않아 inclusion body를 형성함으로써 효소활성을 나타내지 못했을 가능성도 배제할 수 없는 것으로 보인다.

초 록

포유류의 조직에 널리 분포되어 있으며 혈압 조절에 중요한 역할을 하는 Angiotensin-converting enzyme(ACE)은 아연을 함유하는 dipeptidase로서 angiotensin I을 가수분해하여 강력한 혈압상승제인 angiotensin II를 생성하는 효소이다. 최근에 돼지의 난소에서 ACE 활성이 측정되었으며, 돼지의 신장에서 ACE 단백질이 분리되어 그 특성이 알려졌다. 그러나 돼지의 어떠한 ACE DNA 염기서열도 아직까지 보고 된 바는 없다. 그러므로 본 연구에서 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용하여 돼지의 신장 ACE cDNA를 클로닝하고 그 염기서열을 분석하였다. ACE cDNA는 1309개의 아미노산으로 구성되어 있으며 그 분자량은 150 kDa이다. 염기서열로부터 유추한 아미노산의 서열을 분석한 결과, N 말단의 33개 아미노산이 signal peptide 역할을 하는 것으로 보이며, C 말단 근처의 짧은 transmembrane 영역은 세포막에 anchor 역할을 하는 것으로 보인다. 돼지 신장의 ACE에서 두 개의 매우 유사한 amino acid peptidase domain은 tandem duplication 되어 있으며, 각각의 domain은 다른 포유류의 체세포 ACE들과 마찬가지로 putative metal-binding site(His-Glu-Met-Gly-His)를 하나씩 가지고 있는 것으로 나타났다. 돼지 신장 ACE 서열과 인간, 토끼, 쥐 등과 같은 포유류의 ACE 아미노산 서열들과의 상동성 비교는 진화과정 중 두 domain이 매우 잘 보존되어 있음을 보여주고 있다.

Key words: 돼지 신장, cDNA cloning, angiotensin-converting enzyme (ACE), dipeptidyl carboxypeptidase.

감사의 글

이 연구는 동국대학교 교내 연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

- Baudin, B. (2002) New aspects on angiotensin-converting enzyme: from gene to disease. *Clin. Chem. Lab. Med.* **40**, 256-265.
- Cushman, D. W. and Cheung, H. S. (1971) Concentration of angiotensin I converting enzyme on tissues of rat. *Biochem. Biophys. Acta* **250**, 261-265.
- Skegges, L. T., Dorer, F. E., Kahn, J. R., Lentz, K. E. and Levine, M. (1976) The Biochemistry of the Renin-Angiotensin System and Its Role in Hypertension. *Am. J. Med.* **60**, 737-748.
- Vallotton, M. B. (1987) The renin-angiotensin system. *Trends Pharmac. Sci.* **8**, 69-74.
- Erdos, E. G. (1990) Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the year: Lewis K. Dahl memorial lecture. *Hypertension*. **16**, 363-370.
- Soffer, R. L. (1981) In *Biochemical Regulation of Blood Pressure*. John Wiley and Sons, New York.
- Conell, M. J., Williams, T. A., Lamango, N. S., Dacid, C., Corvoal, P., Soubrier, F., Hoheisel, J., Lehrachm H., and Isaac, R. E. (1995) Cloning and Expression of an Evolutionary Conserved Single-domain Angiotensin Converting Enzyme from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **270**, 13613-13619.
- Kumar, R. S., Thekkumkara, T. J. and Sen, C. G. (1991) The mRNA encoding the two angiotensin converting isozymes are transcribed from the same gene by a tissue-specific choice of alternative transcription initiation sites. *J. Biol. Chem.* **266**, 3854-3862.
- Ehlers, M. R. and Riordan, J. F. (1989) Angiotensin converting enzyme: new concepts concerning its biological role. *Proc. Biochemistry*. **28**, 5311-5318.
- Lattion, A. L., Soubrier, F., Allegrini, J., Hubert, C., Corvoal, P. and Alhenc-Gelas, F. (1989) The testicular transcript of the angiotensin converting enzyme encodes for the ancestral, non-duplicated form of the enzyme. *FEBS Lett.* **252**, 99-104.
- Lanzillo, J. J., Stevens, J., Dasarsthy, Y., Yotsumoto, H. and Fanburg, B. L., (1985) Angiotensin converting enzyme from human tissues. Physicochemical, catalytic, and immunological properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 14938-14944.
- Costerousse, O., Allegrini, J., Lopez, M., and Alhenc-Gelas, F. (1993) Angiotensin I converting enzyme in human circulating mononuclear cells. Genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem. J.* **290**, 33-40.
- Kenny, A. J. and Hooper, N. M. (1991) In *Degradation of Bioactive Substances: Peptidases involved in the metabolism of inactive peptides*. CRC Press, Florida.
- Ehlers, M. R. W., Chen, Y. N-P., and Riordan, J. F. (1989) Molecular cloning of human testicular angiotensin converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial ACE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7741-7745.
- Kumar, R. S., Kusari, J., Roy, S. N., Soffer, R. L. and Sen, G. C. (1989) Structure of testicular angiotensin converting enzyme. A segmental mosaic isozyme. *J. Biol. Chem.* **264**, 16754-16758.
- Soubrier, F., Wei, L., Hubert, C., Clauser, E., Alhenc-Gelas, F., and Corvoal, P. (1993) Molecular biology of the angiotensin converting enzyme: Structure-function. Gene polymorphism and clinical implications. *J. Hypertens.* **11**, 599-604.
- Koike, G., Krieger, J. E., Jacob, H. J., Mukoyama, M., Pratt, R. E. and Dzau, V. J. (1994) Angiotensin converting enzyme and genetic hypertension: cloning of rat cDNAs and characterization of the enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**, 380-386.
- Matsui H. and Takahashi T. (2002) Presence of angiotensin-converting enzyme in follicular fluids of porcine ovaries and its possible involvement in the intrafollicular breakdown of bradykinin. *Mol. Reprod. Dev.* **62**, 99-105.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **18**, 5294-5299.
- Erdos, E. G. and Skidgel, R. A. (1987) The angiotensin I converting enzyme. *Lab. Invest.* **56**, 345-348.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. **22**, 4673-4680.
- Patchett, A. A. and Cordes, E. H. (1985) The design and properties of N-carboxyalkyldipeptide inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Adv. Enzym.* **57**, 1-84.