

## *Pichia pastoris*에서 발현된 보리 알파아밀라제 Chimera 효소들의 특성

김태집<sup>1\*</sup> · 육정빈<sup>1</sup> · 최승호<sup>1</sup> · 장명운<sup>1</sup> · Birte Svensson<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>충북대학교 식품공학과, <sup>2</sup>Department of Systems Biology, Technical University of Denmark

### Characterization of Barley $\alpha$ -Amylase Chimeric Enzymes Expressed in *Pichia pastoris*

Tae-Jip Kim<sup>1\*</sup>, Jeong-Bin Yuk<sup>1</sup>, Seung-Ho Choi<sup>1</sup>, Myoung-Uoon Jang<sup>1</sup>, and Birte Svensson<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Systems Biology, Technical University of Denmark, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark

(Received February 24, 2010/Accepted March 10, 2010)

Two different  $\alpha$ -amylase isozymes (AMY1 and AMY2) found in barley malt share up to 80% of amino acid sequence identity with each other, but their enzymatic properties differ remarkably. AMY1 shows the highest activity at low concentration of calcium ion, while AMY2 is highly active at high calcium concentration. Meanwhile, BASI (Barley  $\alpha$ -Amylase/Subtilisin Inhibitor) protein specifically inhibits only AMY2. In the present study, three separate regions in AMY genes (I, II, and III) were assigned on the basis of restriction enzyme sites and four kinds of chimeric amylases have been obtained by swapping a part of regions with each other. Each chimera gene was successfully over-expressed in *Pichia pastoris*. From the results of enzymatic characterization, both AMY211 and AMY122 showed the mixed or intermediate type of calcium-dependent activity between AMY1 and 2. Meanwhile, only AMY221 chimera could be significantly inhibited by BASI protein. As a result, it can be proposed that some amino acid residues in the region I and II, except region III, of barley  $\alpha$ -amylases play very important roles in calcium-dependency and interaction with BASI.

**Keywords:** barley  $\alpha$ -amylase isozymes, calcium-dependent activity, chimeric enzymes, *P. pastoris*

알파아밀라제( $\alpha$ -Amylase; EC 3.2.1.1)는 Glycoside Hydrolase (GH) Family 13그룹에 속하는 가수분해 효소로서 전분, 글리코젠 등 고분자 탄수화물 중합체 내부의  $\alpha$ -(1,4)-결합을 무작위로 분해하여 주로 glucose, maltose 등의 소당류로 전환하므로, 세포 외부로부터 탄소원의 적절한 공급을 위해 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(3). 이들 효소는 세균, 곰팡이 등의 미생물 외에도 동물, 식물 등 대부분의 생물체에서 널리 발견되며, 산업적으로도 전분의 효소적 액화공정에서 핵심 효소로 이용되는 등 그 중요성이 매우 크다.

*Aspergillus niger*가 생산하는 알파아밀라제(Taka-amylase)의 입체구조가 밝혀진 이후(10), 지금까지 다양한 미생물 및 진핵세포 유래 효소의 구조와 특성에 대한 연구가 진행되었다. 한편 Rogers (15)와 Knox (8) 등은 보리에서 두 종류의 서로 다른 알파아밀라제 동질효소인 AMY1과 AMY2를 발견하여

그 효소적 특성을 보고하였으며, 이들 동질효소는 약 80%의 높은 아미노산 서열의 상동성을 보이지만, 등전점(pI), 효소활성, pH 안정성 등의 효소적 특성은 서로 크게 달라 알파아밀라제 효소 연구자들로부터 관심의 대상이 되어 왔다(1, 2, 9, 11, 14). 특히 전분당 산업에서 널리 사용되는 미생물 또는 곰팡이 유래 알파아밀라제 효소의 경우, 칼슘이온에 의해 그 활성과 내열성이 비약적으로 향상될 수 있는데, 본 연구에서 사용된 보리 알파아밀라제의 경우도 칼슘이온 농도에 따라 서로 다른 효소활성의 변화가 유발되므로, 이들 동질효소의 칼슘이온 의존도에 대한 심도 깊은 연구를 통해 알파아밀라제의 구조와 기능의 상관관계를 규명할 수 있을 것으로 기대한다.

이를 위해 Juge 등(5)은 *Saccharomyces cerevisiae*의 yeast hybrid 시스템을 활용하여 보리 알파아밀라제 동질효소의 chimera 효소를 제조하고 그 특성을 확인하고자 시도하였으나, 얻어진 chimera 효소의 종류가 매우 제한적이어서 효율적인 분석이 어려웠다. 또한 이들 효소는 대장균에서 거의 발현되지 않으며 효모의 일종인 *Pichia* 균주에서 발현도가 가장 높은 것으로 보

\* For correspondence. (T.J. Kim) E-mail: tjkim@cbnu.ac.kr; Tel: +82-43-261-3354; Fax: +82-43-271-4412 (B. Svensson) E-mail: bis@bio.dtu.dk; Tel: +45-4525-2740; Fax: +45-4588-6307

고 되었다(4, 18). 본 연구에서는 각 동질효소의 1차 및 3차 구조의 상동성을 기반으로 조합한 총 4종의 chimera 효소들을 추가로 제조하였으며, *P. pastoris* 균에서 대량발현 및 분리·정제한 후에 이들 돌연변이 효소의 칼슘이온 의존성 등을 비교하여 동질효소 상호 간의 차이를 유발하는 주요 인자에 대한 정보를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 시약

연구에 사용된 일반 시약류 및 미생물 배양용 배지는 각각 Sigma-Aldrich (USA)와 Duchefa Biochemie (Netherlands)로부터 구입하여 사용하였다. 유전자 조작을 위한 제한효소는 TaKaRa Biomedical (Japan)에서 구입하였으며, 각종 프라이머는 Bioneer (Korea)로부터 합성하였다. 기질특이성 분석을 위해 사용한 insoluble blue starch (IBS)는 Amersham Biosciences (Sweden)에서 구입하였으며, 단백질 정량분석은 BCA™ Protein Assay kit (Pierce Biotechnology, USA)를 이용하였다. 보리 유래의 알파아밀라제 저해 단백질인 BASI (Barley  $\alpha$ -Amylase/Subtilisin Inhibitor)는 덴마크의 칼스버그 연구소(Carlsberg Laboratory)에서 정제된 형태로 제공 받아 사용하였다.

### 알파아밀라제 chimera 효소의 제조

보리 알파아밀라제 유전자를 대량발현하기 위하여, AMY1 및 AMY2 유전자를 각각 포함하는 cDNA 클론 pBAL7과 pBAH15 (16)를 주형으로 하여 PCR을 실시하였다. AMY1 효소 유전자의 증폭을 위해서는 AMYN (5'-TTTGGATCCATGGGGAA GAACGGC-3')과 AMY1C (5'-TTTGAATTCAGTGCAGAC TTCAGCTCC-3') 프라이머를 사용하였고, AMY2 효소 유전자의 경우 AMYN 및 AMY2C (5'-AAAGAATTCATATTTTC TCCCAAACGGCTTAGTC-3') 프라이머를 사용하여 증폭하였다. PCR로 증폭된 약 1.3 kb의 보리 알파아밀라제 유전자는 *Bam*HI 과 *Eco*RI 제한효소로 처리한 후, pPIC3K 벡터(Invitrogen, USA)에 삽입하고 *E. coli* MC1061로 형질전환 하여 재조합 플라스미드를 얻었다. 각 재조합 플라스미드 내에 공통적으로 존재하는 *Bam*HI, *Sac*I, *Nsi*I, *Eco*RI 제한효소 위치를 이용하여 특정 DNA 단편을 상호 치환한 다양한 조합의 chimera 유전자를 제조하였다. 이처럼 제조된 pPIC3KAMY1 등 각각의 플라스미드는 *Bg*III로 절단하여 선형화한 후에 electroporation (2000V, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ ; GenePulser II, Bio-Rad, USA)법을 사용하여 *Pichia pastoris* GS115 세포 내로 형질전환 하였다. 올바른 재조합 효모는 histidine을 포함하지 않은 MMS (1.34% Yeast Nitrogen Base, 0.4  $\mu$ g/ml D-biotin, 0.5% methanol, 1% soluble starch, Invitrogen) 배지 상에서 전분 가수분해 활성이 높은 클론 위주로 선별하였다.

### 알파아밀라제 효소의 발현 및 정제

Invitrogen 사의 프로토콜에 따라 재조합 *Pichia* 균주를 BMMY 배지(1.34% YNB, 0.4  $\mu$ g/ml D-biotin, 0.5% methanol, 1%

yeast extract, 2% peptone, 0.1 M potassium phosphate, pH 6.0)에 접종하고, 30°C에서 120시간 동안 진탕배양한 후, 원심 분리하여 균체를 제거하고 상층액을 회수하였다. 회수한 조효소액을  $\beta$ -cyclodextrin sepharose (Amersham) 컬럼에 통과시킨 후, 25 mM CaCl<sub>2</sub>와 200 mM NaCl을 함유한 20 mM sodium acetate buffer로 세척하고, 8 mM의  $\beta$ -cyclodextrin을 포함한 동일 buffer를 흘리면서 효소를 회수하였다. 최종적으로 1 mM CaCl<sub>2</sub>을 함유한 20 mM MES buffer (pH 6.7)에 대해 투석하여 정제된 효소를 얻었으며, 이후의 실험에 사용하였다.

### 알파아밀라제 효소의 활성 측정

Insoluble blue starch (IBS)에 대한 효소활성은 Matsui 등 (9)의 방법에 따라 측정하였다. 반응용액(20 mM sodium acetate, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 5.5)에 12.5 mg/ml의 농도로 IBS를 섞어 기질용액을 제조하였다. 500  $\mu$ l의 기질용액, 최적반응용액 350  $\mu$ l에 적절히 희석한 효소액 150  $\mu$ l를 섞고 37°C에서 15분간 반응시킨 후, 250  $\mu$ l의 0.5 M NaOH를 첨가하여 반응을 종료하였다. 반응액을 12,000 $\times$ g에서 10분간 원심분리하여 고형분을 제거하고, 상층액 300  $\mu$ l을 취하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 효소의 활성 1 unit은 주어진 조건 하에서 1분 동안 흡광도 값을 1 만큼 증가시키는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

### 알파아밀라제 효소의 등전점(pI) 측정

Isoelectric focusing (IEF) 분석을 위해 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC, Amersham Biosciences) 시스템에서, PhastGel (pI 4.0-6.5, Amersham)을 이용하여 각 효소의 등전점을 결정하였다. 전기영동 후 IEF gel을 2%의 soluble potato starch를 함유한 기질용액에 넣고, 30°C에서 30분 이상 충분히 반응시킨 다음, 요오드 발색반응으로 gel 상에서 효소 단백질의 위치를 확인하였다.

### 알파아밀라제에 대한 BASI의 저해활성 측정

보리 알파아밀라제 효소와 BASI 단백질을 적절한 비율로 섞고, 37°C의 반응용액(40 mM Tris-HCl; pH 8.0, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05% bovine serum albumin)에서 15분간 미리 반응시킨 후, Nielsen 등(12)의 방법에 따라 BIAcore 3000 (BIAcore, Sweden)을 이용한 SPR (Surface Plasmon Resonance) 분석으로 chimera 효소와 BASI 간의 결합 정도를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 보리 알파아밀라제 chimera 효소의 제조

보리에서 유래한 알파아밀라제 AMY1과 AMY2는 각각 414개와 403개의 아미노산으로 이루어진 동질효소로서 약 80%의 아미노산 서열 상동성에도 불구하고, 그 효소적 특성이 매우 상이하다(9). 기존 연구에서 확인된 두 동질효소의 특성 차이를 Table 1에 요약하였다. 약 4.7-4.9의 낮은 등전점을 가지는 AMY1 효소는 약 0.2 mM의 CaCl<sub>2</sub> 농도에서 최대 활성

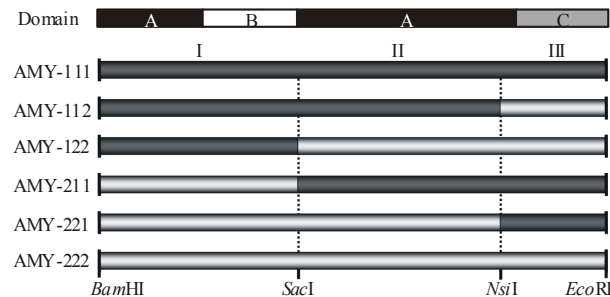
**Table 1.** Differences of enzymatic properties between barley  $\alpha$ -amylase isozymes 1 and 2

	AMY1	AMY2
Total amino acid residues	414	403
Isoelectric point (pI)	4.7-4.9	5.9-6.1
Optimal Ca <sup>2+</sup> concentration	0.2 mM	15 mM
Inhibition by BASI	no	yes
Stability at pH 3.5	stable	unstable
Expression from barley	low	high
Expression from yeasts	high	low

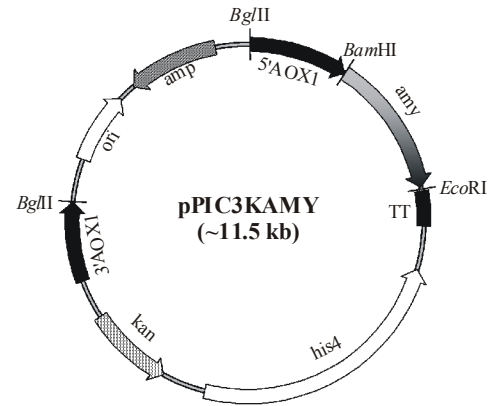
을 나타내고, pH 3.5의 산성 조건에서도 안정적인 반면, AMY2는 약 5.9-6.1의 등전점을 가지고, 15 mM의 높은 CaCl<sub>2</sub> 농도 하에서 가장 높은 활성을 보이며, 산성 조건에서 효소의 안정성이 급격히 감소하므로 서로 구별된다. 또한 보리에서와 달리, 효모에서는 오히려 AMY1이 더 높은 농도로 발현된다(4, 18).

따라서 본 연구에서는 각 동질효소 간의 효소적 특성의 차이를 유발하는 주요 단백질 부위를 규명하기 위하여 두 가지 동질효소에 모두 존재하는 *SacI* 및 *NsiI* 제한효소의 위치를 기준으로 전체를 I (AMY1을 기준으로 할 때, His1~Glu160), II (Leu161~Cys321), III (Ile322~Ser414)의 세 부분으로 나누었다. 이를 토대로 AMY1 및 AMY2 wild-type 효소 외에 각각의 특정 부위가 상호 치환된 형태의 chimera 효소 4종을 추가로 제작하고, 각 chimera 효소를 AMY112, 122, 211, 221로 명명하였다(Fig. 1). 특히 제 I 부위에는 보리 아밀라제의 입체구조 상에서 발견된 domain-B 부분이 포함되었고, 마지막의 제 III 부위에는 카복시-말단 영역이 포함되어 각 chimera 효소의 특성분석을 통해 각각의 역할을 확인할 수 있도록 제조하였다.

각각의 chimera 효소 유전자를 *P. pastoris*와 *E. coli* 간의 shuttle vector인 pPIC3K로 옮겨 발현용 플라스미드를 제조한 후 (Fig. 2), *Pichia* 세포 내로 형질전환 하여 염색체 유전자 내로 삽입된 재조합 효모를 얻었다. 실험 방법에서 제시한 바와 같이 재조합 효모를 배양하여 목적하는 chimera 효소들을 순수



**Fig. 1.** Scheme for the construction of chimeric enzymes by swapping fragments between barley  $\alpha$ -amylase isozymes 1 and 2. Using the restriction enzyme sites, *SacI* and *NsiI*, DNA fragment I, II, and III were alternatively swapped between AMY1 and AMY2. Domain A, B, and C correspond to those found in three-dimensional structures of barley amylase isozymes. For the consistency in nomenclature with other chimeras, wild-type AMY1 and 2 are also designated as AMY111 and 222, respectively.

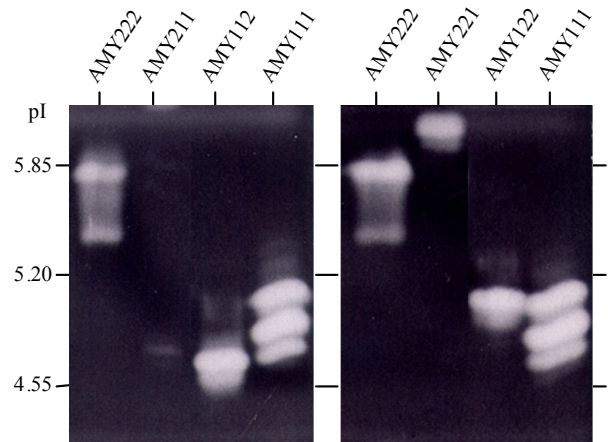


**Fig. 2.** Cloning of each wild-type or chimeric barley  $\alpha$ -amylase gene into a *P. pastoris*-*E. coli* shuttle vector. PCR-amplified AMY gene derivatives were cloned between *Bam*HI and *Eco*RI restriction enzyme sites of pPIC3K. Both 5'- and 3'-AOX1 indicate the part of homologous regions in alcohol oxidase (AOX) in *P. pastoris*. Gene abbreviations are as follows; amp, ampicillin-resistant gene; kan, kanamycin-resistant gene; ori, replication origin in *E. coli*; his4, histidinol dehydrogenase gene; TT, transcriptional terminator.

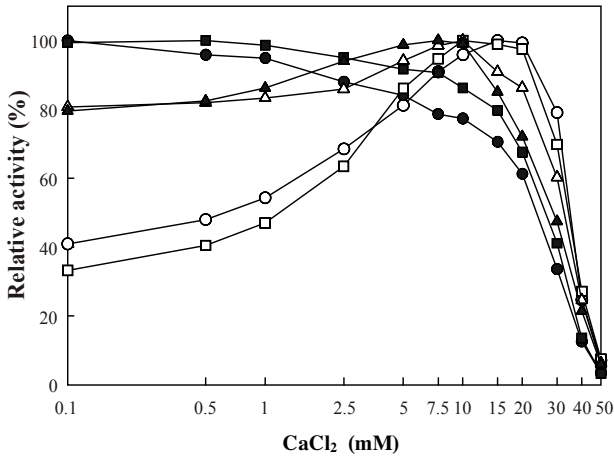
정제한 후에 각각의 효소활성을 측정하여 상호 비교하였다.

**Chimera 효소의 등전점 결정**

일반적으로 AMY1과 AMY2는 등전점의 차이에 의해 쉽게 구별되며, AMY1의 경우 약 4.7-4.9의 낮은 등전점을 가지는 반면, AMY2는 약 5.9-6.1의 상대적으로 높은 등전점을 가지는 것으로 알려졌다. 본 연구에서는 정제된 각 chimera 효소를 IEF 전기영동법으로 분리하여 각각의 등전점을 확인하였다 (Fig. 3). 각 아밀라제 효소들은 gel 상에서 1-3개의 밴드를 형성하였는데, 이는 효모의 post-translational modification에 의해 다양한 동질효소 형태가 관찰된 것으로 예상하였다. 이들 서로 다른 밴드의 동질효소 간에 효소활성의 차이가 존재할 수



**Fig. 3.** Determination of isoelectric point (pI) of barley  $\alpha$ -amylase chimeras by isoelectric focusing (IEF) and activity staining toward 2% soluble starch substrate. The IEF separation was performed by using Fast Protein Liquid Chromatography system with PhastGel (pI 4-6.5).



**Fig. 4.** Calcium-dependent activity of AMY1, AMY2, and their chimeras on insoluble blue starch substrate. Relative activity of AMYs was compared with increase of CaCl<sub>2</sub> concentration. The calcium ion concentration at X-axis is demonstrated by using the logarithmic scale. (●) AMY111; (■) AMY112; (△) AMY122; (▲) AMY211; (□) AMY221; (○) AMY222.

있으나, 본 연구에서는 종합적인 효소특성과 활성을 위주로 상호 비교하였다. 그 결과, AMY1은 4.8-5.1, AMY2의 경우는 약 5.8의 등전점을 나타내어 예상한 값과 유사하였으나, 나머지 chimera 효소들의 경우에는 약 4.7-6.1의 다양한 등전점 분포를 보였다. 그러나, 제 III 부위가 상호 치환된 AMY112의 경우 AMY1 보다 낮은 약 4.7의 등전점을 보인 반면, AMY221은 약 6.1의 높은 등전점을 가지는 것으로 나타나서 이들 카복시-말단 부위의 아미노산 잔기들은 오히려 기존 wild-type 보리 아밀라제의 등전점 형성과 상반된 결과를 보였다.

**Chimera 효소에 대한 BASI의 저해효과**

보리에서 유래한 단백질 형태의 아밀라제-저해제인 BASI (17)의 경우, AMY2 효소만을 특이적으로 저해하는 것으로 알려져 있다. 약 80% 이상의 아미노산 서열 상동성과 매우 유사한 입체구조를 가지는 두 동질효소(6, 7, 13)에서 이처럼 상이한 저해효과가 관찰되는 것은 매우 이해적이다. 따라서 본 연구에서 얻어진 각종 chimera 효소들에 대한 BASI의 저해효과를 분석하였다. 결과적으로 AMY221의 경우에는 약 0.36 nM의 K<sub>i</sub> 값을 나타내어 BASI에 의한 저해효과가 확인 되었으나,

나머지 chimera 효소들은 BASI와 전혀 결합하지 못하는 것으로 나타났다. AMY2의 K<sub>i</sub> 값이 약 0.28 nM 수준임을 감안하면, 카복시-말단 부위의 AMY1 치환에 의해 BASI와의 결합력이 다소 감소하였으나, 다른 chimera 효소와 달리 BASI와의 결합이 가능함을 알 수 있었다. 따라서 BASI와의 결합에 관여하는 핵심 잔기의 대부분이 제 I 부위와 제 II 부위에 걸쳐 분포하는 것으로 예상하였다.

**CaCl<sub>2</sub> 농도에 따른 효소 활성의 변화**

CaCl<sub>2</sub>의 첨가량을 0.1 mM에서 50 mM까지 증가시키며, 각 chimera 효소의 insoluble blue starch 기질에 대한 가수분해 활성을 측정하였다. 본 연구 결과에 따르면 AMY1은 0.1 mM의 칼슘이온 농도에서 최대의 활성을 보였으며, AMY2의 경우는 15 mM 농도에서 가장 높은 활성을 나타내었고, 20 mM 이상의 CaCl<sub>2</sub> 존재 하에서 모든 아밀라제 효소들의 활성이 급격히 감소함을 알 수 있었다(Fig. 4). 한편 AMY112의 경우는 0.5 mM의 칼슘이온 농도에서 최대 활성을 나타내어 AMY1과 유사한 형태를 보였고, AMY122과 AMY221의 경우에는 10 mM 농도에서 최대 활성을 보여 AMY2 형태에 가까운 chimera 효소로 판단하였다. 반면, AMY211의 경우는 최적 칼슘이온 농도가 약 7.5 mM이므로, AMY1과 AMY2의 중간적 특성의 효소인 것으로 나타났다.

**Chimera 효소의 특성 비교 및 고찰**

각종 chimera 효소들의 특성 분석 결과에 근거한 각 치환 부위의 역할 비교를 위해서는 AMY1 및 AMY2 효소의 특성 차이에 대한 보다 명확한 정의가 요구된다. 따라서 본 연구에서는 기존 연구에서 주로 사용하던 최적 칼슘이온 농도의 차이 외에도 0.1 mM 이하의 낮은 칼슘이온 농도 하에서의 상대적인 효소활성 차이를 또 하나의 중요한 구별기준으로 제시하였다. 즉, AMY1과 AMY2는 최적 칼슘농도의 차이 외에도 낮은 농도의 칼슘이온 하에서의 활성 차이가 매우 크다는 점을 고려한 것이다. 이러한 다양한 기준들을 적절히 반영하여 분석한 결과를 Table 2에 정리하였다.

*Pichia*에서 발현된 보리 아밀라제 효소의 단위 단백질 당 활성(비활성)은 칼슘농도 5 mM을 기준으로 볼 때, AMY2가 2,387 U/mg으로 가장 높았으며, AMY211이 44 U/mg으로 가

**Table 2.** Comparison and categorization of various barley α-amylase chimeric enzymes on the basis of their enzymatic characteristics

Chimeras	Specific activity (U/mg) <sup>a</sup>	Optimal CaCl <sub>2</sub> (mM)	Relative activity (%) at 0.1 mM CaCl <sub>2</sub>	pI	Type <sup>b</sup>
AMY111	1493 (1775)	0.1	100.0	4.8-5.1	I
AMY112	1260 (1374)	0.5	99.4	4.7	I
AMY122	1042 (1107)	10.0	80.7	5.1	M
AMY211	44 (45)	7.5	79.6	4.8	M
AMY221	1038 (1206)	10.0	33.3	6.1	II
AMY222	2387 (2940)	15.0	41.0	5.8	II

<sup>a</sup> Specific activity of chimeras was determined by using insoluble blue starch assay with 5 mM of CaCl<sub>2</sub>. Each value in parenthesis corresponds to the specific activity of each chimera at optimal calcium concentration.

<sup>b</sup> All chimeras are categorized into three different groups of I (AMY1-type), II (AMY2-type), and M (mixed type between AMY1 and 2).

장 낮은 활성을 보였다. 대부분의 chimera 효소들은 AMY2와 비교하여 약 43-53% 수준의 가수분해 활성을 나타내었지만, AMY211는 2% 정도로 매우 낮았다. 돌연변이 효소의 활성은 크게 감소하는 것이 일반적이며, 특히 chimera 효소의 경우 구조적인 변화가 수반될 수 있기 때문이라 생각한다.

이들 chimera 효소의 특성을 단순히 최적 활성을 보이는  $\text{CaCl}_2$ 의 농도만으로 분류하면, AMY122는 AMY2와 유사한 칼슘 의존도를 나타내지만, 저농도인 0.1 mM 칼슘이온 농도에서의 활성에 대해서는 AMY1 대비 약 81% 수준으로 AMY2의 41%에 비해 크게 높음을 알 수 있다. 또한 AMY211의 경우는 최적 농도가 7.5 mM로 높은 편이지만, 동시에 낮은 농도의 칼슘 조건에서 AMY1 활성의 약 80% 수준을 유지하는 것으로 보아 AMY1 및 AMY2의 중간형(또는 혼합형) 효소로 분류할 수 있다.

이상의 결과를 종합적으로 요약하면, 보리 아밀라제의 카복시-말단을 포함한 제 III 부위는 효소의 칼슘 의존도에 큰 영향을 미치지 못하며, 등전점은 특정 부위의 아미노산 잔기에 의해 결정되지 않음을 확인하였다. Kadziola 등(6)은 입체구조 연구를 통해 3개 분자의 칼슘이온이 AMY2와 결합함을 발견하고, 이들 이온과 상호작용이 가능한 Asn91, Asp138, Ala141, Asp148 등의 아미노산 잔기가 B-domain에 위치한다고 보고하였다. 본 연구의 chimera 효소의 특성 분석 결과, 선행 구조연구의 결과(6)와 유사하게 B-domain을 포함하는 제 I 부위가 칼슘 의존도에 매우 중요함을 실험적으로 확인할 수 있었다. 그러나, 예상과 달리 제 I 부위의 치환만으로는 각 효소의 칼슘 의존도가 완전히 전환되지 않았으며, 대신 낮은 농도의  $\text{CaCl}_2$  조건에서의 활성이 AMY1과 2의 중간적인 성격으로 변화됨을 확인하였다. 따라서 기존에 알려진 잔기들 외에 또 다른 잔기들이 칼슘 의존도에 영향을 미칠 것으로 예상할 수 있었고, 앞으로 이들 두 가지 동질효소의 대표적인 특성을 좌우하는 핵심 잔기를 정확히 규명하기 위해서는 보다 세부적이고 다양한 chimera 효소의 제조 및 효소특성의 비교·분석을 통해 그 역할을 규명하는 후속 연구가 필요하며, 이를 기반으로 향후 산업적으로 중요한 전분 가수분해 효소의 구조와 기능의 상관관계를 밝히는데 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 기대한다.

## 적요

보리 맥아로부터 발견된 서로 다른 알파아밀라제 동질효소 (AMY1, AMY2)는 80%에 달하는 높은 아미노산 서열의 상동성을 보이지만, 두 효소의 특성은 서로 달라 AMY1 효소는 낮은 농도의 칼슘 조건에서 최대 활성을 보이는 반면, AMY2 효소는 높은 칼슘이온 농도에서 높은 활성을 나타낸다. 또한 BASI (Barley  $\alpha$ -Amylase/Subtilisin Inhibitor) 단백질은 AMY2 효소만을 특이적으로 저해한다. 따라서 본 연구에서는 AMY1과 AMY2 효소의 유전자들 I, II, III의 세 부위로 나눈 후, 제한효소 처리에 의해 일부 부위를 상호 치환한 4종의 chimera 효소를 추가로 제조하고, *Pichia pastoris* 균주에서 대량 발현하였다. 이들 효소의 특성을 비교한 결과, 제 I 부위만이 상호

치환된 AMY211 및 AMY122 효소의 경우, AMY1과 AMY2의 중간적 칼슘 의존성을 나타내었으며, BASI에 의한 저해효과는 AMY2의 제 I, II 부위를 포함하는 AMY221 효소에서만 관찰되었다. 따라서 보리 아밀라제의 제 I 부위 및 제 II 부위에 존재하는 아미노산 잔기들이 칼슘 의존성 및 BASI와의 결합에 중요한 역할을 담당하는 반면 제 III 부위는 이들 효소의 활성 차이에 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

## 감사의 말

SPR 분석에 도움을 준 Carlsberg Laboratory의 Peter K. Nielsen 박사에게 감사 드립니다. 이 논문은 2005년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(KRF-2005-521-F00055) 결과입니다.

## 참고문헌

- Bak-Jensen, K.S., G. André, T.E. Gottschalk, G. Paës, V. Tran, and B. Svensson. 2004. Tyrosine 105 and threonine 212 at outermost substrate binding subsites -6 and +4 control substrate specificity, oligosaccharide cleavage patterns, and multiple binding modes of barley  $\alpha$ -amylase 1. *J. Biol. Chem.* 279, 10093-10102.
- Bush, D.S., L. Sticher, R. Van Huystee, D. Wagner, and R.L. Jones. 1989. The calcium requirement for stability and enzymatic activity of two isoforms of barley aleuron  $\alpha$ -amylase. *J. Biol. Chem.* 264, 19392-19398.
- Davies, G. and B. Henrissat. 1995. Structure and mechanism of glycosyl hydrolases. *Structure* 3, 853-859.
- Juge, N., J.S. Andersen, D. Tull, P. Roepstorff, and B. Svensson. 1996. Overexpression, purification, and characterization of recombinant barley  $\alpha$ -amylases 1 and 2 secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 8, 204-214.
- Juge, N., M. Sogaard, J.C. Chaix, M.F. Martin-Eauclaire, B. Svensson, G. Marchis-Mouren, and X.J. Guo. 1993. Comparison of barley malt  $\alpha$ -amylase isozyme 1 and 2: Construction of cDNA hybrids by *in vivo* recombination, characterization and expression in yeast. *Gene* 130, 159-166.
- Kadziola, A., J. Abe, B. Svensson, and R. Haser. 1994. Crystal and molecular structure of barley  $\alpha$ -amylase. *J. Mol. Biol.* 239, 104-121.
- Kadziola, A., M. Sogaard, B. Svensson, and R. Haser. 1998. Molecular structure of an  $\alpha$ -amylase-inhibitor complex: implications for starch binding and catalysis. *J. Mol. Biol.* 278, 205-217.
- Knox, C.A.P., B. Sonthayanon, G.R. Chandra, and S. Muthukrishnan. 1987. Structure and organization of two divergent  $\alpha$ -amylase genes from barley. *Plant Mol. Biol.* 9, 3-17.
- Matsui, I. and B. Svensson. 1997. Improved activity and modulated action pattern obtained by random mutagenesis at the fourth  $\beta$ - $\alpha$  loop involved in substrate binding to the catalytic ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel domain of barley  $\alpha$ -amylase 1. *J. Biol. Chem.* 272, 22456-22463.
- Matsuura, Y., M. Kusuniki, W. Harada, and M. Kakudo. 1984. Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *J. Biochem.* 95, 697-702.
- Mori, H., K.S. Bak-Jensen, and B. Svensson. 2002. Barley  $\alpha$ -amylase Met53 situated at the high-affinity subsite -2 belongs to a substrate binding motif in the  $\beta$ - $\alpha$  loop 2 of the catalytic ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel and is critical for activity and substrate specificity. *Eur.*

- J. Biochem.* 269, 5377-5390.
12. Nielsen, P.K., B.C. Bønsager, C.R. Berland, B.W. Sigurskjold, and B. Svensson. 2003. Kinetics and energetics of the binding between  $\alpha$ -amylase/subtilisin inhibitor and barley  $\alpha$ -amylase 2 analyzed by surface plasmon resonance and isothermal titration calorimetry. *Biochemistry* 42, 1478-1487.
  13. Robert, X., R. Haser, T.E. Gottschalk, F. Ratajczak, H. Driguez, B. Svensson, and N. Aghajari. 2003. The structure of barley  $\alpha$ -amylase isozyme 1 reveals a novel role of domain C in substrate recognition and binding: a pair of sugar tongs. *Structure* 11, 973-984.
  14. Rodenburg, K.W., N. Juge, X.J. Guo, M. Sogaard, J.C. Chaix, and B. Svensson. 1994. Domain B protruding at the third  $\beta$  strand of the  $\alpha/\beta$  barrel in barley  $\alpha$ -amylase confers distinct isozyme-specific properties. *Eur. J. Biochem.* 221, 277-284.
  15. Rogers, J.C. and C. Milliman. 1983. Isolation and sequence analysis of a barley  $\alpha$ -amylase cDNA clone. *J. Biol. Chem.* 258, 8169-8174.
  16. Sogaard, M. and B. Svensson. 1990. Expression of cDNAs encoding barley  $\alpha$ -amylase 1 and 2 in yeast and characterization of the secreted proteins. *Gene* 94, 173-179.
  17. Vallée, F., A. Kadziola, Y. Bourne, M. Juy, K.W. Rodenburg, R. Haser, and B. Svensson. 1998. Barley  $\alpha$ -amylase bound to its endogenous protein inhibitor BASI: Crystal structure of the complex at 1.9 Å resolution. *Structure* 6, 649-659.
  18. Yuk, J.B., S.H. Choi, T.H. Lee, M.U. Jang, J.M. Park, A.R. Yi, B. Svensson, and T.J. Kim. 2008. Effect of calcium ion concentration on starch hydrolysis of barley  $\alpha$ -amylase isozymes. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 730-734.