

## *Thermus thermophilus* HJ6 유래 내열성 laccase의 유전자 클로닝 및 효소학적 특성

이소영<sup>1</sup>, 정영훈<sup>2</sup>, 서민호<sup>2</sup>, 전승종<sup>1,2\*</sup>

### Gene Cloning and Enzymatic Properties of Thermostable Laccase from *Thermus thermophilus* HJ6

So-Young Lee<sup>1</sup>, Young-Hoon Jung<sup>2</sup>, Min-Ho Seo<sup>2</sup>, and Sung-Jong Jeon<sup>1,2\*</sup>

접수: 2012년 8월 11일 / 게재승인: 2012년 8월 27일  
© 2012 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** The gene encoding *Thermus thermophilus* HJ6 laccase (*Tt*-laccase) was cloned, sequenced, and comprised of 1,389 nucleotides encoding a protein (462 amino acids) with a predicted molecular mass of 51,049 Da. The deduced amino acid sequence of *Tt*-laccase showed 99.7% and 44.3% identities to the *Thermus thermophilus* HB27 laccase and *Synechococcus* sp. RS9917 laccase, respectively. *Tt*-laccase gene was expressed as a fusion protein with six histidine residues in *E. coli* Rosetta-gami (DE3) cells, and the recombinant protein was purified to homogeneity. UV-Vis spectrum analysis revealed that the enzyme has copper atoms, a type I Cu(II) and a type III binuclear Cu(II). The optimum pH for the oxidation of guaiacol was 5.0 and the optimum temperature was 90°C. The half-life of heat inactivation was about 120 min at 90°C. The enzyme reaction was inhibited by sodium azide, L-cystein, EDTA, dithiothreitol, tropolone, and kojic acid. The enzyme oxidized various known laccase substrates, its lowest  $K_m$  value being for 4-hydroxyindole, highest  $k_{cat}$  value for syringaldazine, and highest  $k_{cat}/K_m$  for guaiacol.

**Keywords:** Laccase, *Thermus thermophilus*, thermostability, copper

#### 1. 서론

Laccase (EC 1.10.3.2)는 구리를 함유하는 multicopper oxidase의 일종으로 대부분 3가지 cupredoxine-type domain으로 구성된 비슷한 구조를 가진다. 이들 효소는 monophenols, polyphenols, methoxy-substituted phenols, aromatic amines, lignin을 포함하는 많은 페놀 화합물들을 산화시키므로 다양한 기질 특이성을 가진다 [1-4]. 대부분의 laccase는 3개의 구리이온을 함유하며 단백질 구조 내에 3가지 (type-1, type-2, type-3)의 구리결합자리를 가지고 있다. 효소반응에서 기질의 산화반응은 type-1 구리에 의해 촉매 되어 전자는 trinuclear cluster (1개의 type-2 copper와 2개의 type-3 copper로 구성)를 따라 이동하고, 산소분자의 환원과 물 분자의 방출을 동반하게 된다. 이런 전자이동 메커니즘을 바탕으로 laccase는 monomer의 교차연결, polymer의 분해 및 방향족 화합물의 개월에 관여한다. 이와 같이 laccase는 다양한 기질 특이성뿐만 아니라 폭넓은 반응 능력 때문에 염료 탈색 [5], 펄프 표백 [6], 생물학적 환경 정화 [7], 폴리머 합성 [8], 바이오센서 [9] 및 바이오 연료전지 [10] 등의 여러 분야에서 활용되고 있다.

Laccase는 곰팡이 [11,12], 식물 [13], 곤충 [14] 및 세균 [15,16]에서 다양하게 분포하고 있지만 고등생물에서는 발견되지 않는 것으로 알려져 있다. 생명공학적인 적용에는 곰팡이 유래의 laccase가 주로 사용되었고 [17], 최근 다양한 세균의 전체 게놈분석이 빠르게 진행됨에 따라 세균 유래

<sup>1</sup>동의대학교 바이오물질제어학과

<sup>1</sup>Department of Biomaterial Control (BK21 program), Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

<sup>2</sup>동의대학교 생명공학과

<sup>2</sup>Department of Biotechnology & Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Tel: +82-51-890-2278, Fax: +82-51-890-2632

e-mail: jeon.sj@deu.ac.kr

laccase에 대한 연구도 활발하게 이루어지고 있다. 세균 유래 laccase는 유전학적 도구와 생물공학적 공정이 잘 확립되어 있고, 특히 고온성 세균 유래 laccase는 거친 산업적 환경에서 효소의 안정성을 유지할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 현재, 고온성 세균 중에서는 *Thermus thermophilus* HB27 유래 laccase [18]와 *Aquifex aeolicus* 유래 metallo-oxidase [19]의 특성이 밝혀졌고, 각각 92°C와 75°C의 높은 최적반응온도를 가지는 것으로 나타났다.

본 연구에서는 높은 온도에서 안정성과 활성을 가지는 laccase를 생산하기 위하여 온천수에서 분리한 고온성 세균 *Thermus thermophilus* HJ6으로부터 laccase를 암호화하는 유전자를 클로닝하고 염기서열을 분석하였다. 또한 pET-21a 벡터시스템을 이용하여 대장균에서 재조합 *Tt*-laccase를 생산 및 정제하고 효소학적 특성을 분석 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 유전자 클로닝 및 발현 vector 구축

*T. thermophilus* HJ6 균주는 이전에 보고한 것과 같은 방법으로 배양하였고 [20], 염색체는 GeneAll GENEx Genomic kit (GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 추출하였다. *Tt*-laccase 유전자를 클로닝 하기 위하여 게놈 염기서열이 밝혀진 *T. thermophilus* HB27의 laccase 유전자 (TTC1370) 염기서열을 바탕으로, 각각 개시코돈의 상류와 종결코돈의 하류에 해당하는 두가지 primer (Primer 1: 5'-TTCCCCTCTAGCCTAAAGAGC-3', primer 2: 5'-CCTCGTGCCGGGAAGGAAGCC-3')를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. PCR은 Pfu DNA polymerase (INTRON Biotech., Korea)를 사용하여 약 1.43 kb의 DNA 단편을 증폭하였고 Topo blunt vector (Enzymomics, Korea)에 클로닝한 후 pLAC1으로 명명하였다. 클로닝 된 DNA 단편의 염기서열은 ABI Prism 3700 genetic analyzer (Perkin-Elmer Applied Biosystems, USA)를 사용하여 분석하였다.

발현벡터 pET-21a에 *Tt*-laccase 유전자를 클로닝하기 위하여 pLAC1을 주형으로 Primer 3 (5'-GGAATTCATATGCTGGCGCGCAGGAGCTT-3', 밑줄은 *Nde* I 부위)과 Primer 4 (5'-CCGCTCGAGACCCACTTCGAGGACTCCCA-3', 밑줄은 *Xho* I 부위)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 1.40 kb의 DNA 단편을 *Nde* I과 *Xho* I으로 절단 한 후 같은 효소로 절단한 pET-21a 벡터에 연결하고 *E. coli* DH5α에 형질전환 하였다. 그 결과 구축된 plasmid를 pET-LAC1으로 명명하였고, 여기서 발현된 *Tt*-laccase는 단백질의 C-말단 쪽에 His-tag가 부착된 융합 단백질의 형태로 생산되었다.

### 2.2. 효소 생산 및 정제

*Tt*-laccase 발현벡터 pET-LAC1을 *E. coli* Rosetta-gami (DE3)에 형질전환한 후 50 µg/mL의 ampicillin과 kanamycin을 첨가한 LB 배지 (tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L)에서 37°C로 16시간 동안 전배양 하였다. 전배양액을 새로운 배지에 접종한 후, 흡광도 ( $A_{600}$ ) 값이 0.5가 되었을

때 isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 0.5 mM 농도로 첨가하고 37°C에서 5시간 유도배양 하였다. 배양된 균체를 원심분리하여 집균하고 buffer A (20 mM sodium phosphate, pH 6.0, 500 mM NaCl, 0.1 mM CuSO<sub>4</sub>)에 녹인 다음 초음파로 파쇄하였다. 초음파 파쇄 후 세포 추출물을 70°C에서 20분간 열처리한 후 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 상등액은 ÄKTAprime (GE Healthcare)을 이용하여 니켈이 chelating된 HisTrap HP column (GE Healthcare)에 로딩한 후 0~500 mM의 imidazol로 농도구배를 주어 결합된 단백질을 용출하였다. 용출된 희분은 laccase 활성을 측정하여 활성이 있는 희분을 모아 buffer B (20 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.1 mM CuSO<sub>4</sub>)로 투석하였다. 투석액은 buffer B로 평형화시킨 HiTrap Q column (GE Healthcare)에 로딩한 후 0~1.0 M의 NaCl로 농도구배를 주어 결합된 단백질을 용출하였다. 용출된 희분 중에서 활성이 있는 희분을 모아 Amicon (Milipore) filter로 농축한 다음 buffer C (20 mM sodium acetate, pH 5.0)로 투석하였다. 단백질의 정제도는 SDS-PAGE (10% acrylamide gel)을 통하여 확인하였고, 전기영동 밴드는 coomassie brilliant blue를 사용하여 염색하였다.

### 2.3. UV-visible 흡수 스펙트럼 측정

재조합 *Tt*-laccase의 UV-visible 흡수 스펙트럼은 20 mM sodium acetate (pH 5.0)에서 UV/VIS spectrophotometer (Optizen 2120UV, Mecasys, Korea)를 사용하여 측정하였다.

### 2.4. 효소활성측정

Laccase 활성은 정제된 효소를 0.1 mM CuSO<sub>4</sub>를 포함하는 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)에서 1 mM guaiacol을 기질로 하여 75°C에서 10분간 반응한 후 흡광도 470 nm에서 측정하였다. 효소의 pH 의존성은 50 mM sodium acetate (pH 4.0~5.5), 50 mM sodium phosphate (pH 5.5~7.0), 50 mM Tris-HCl (7.0~8.5), 50 mM glycine-NaOH (8.5~10.0)의 buffer를 사용하여 측정하였고, 온도 의존성은 50 mM sodium acetate (pH 5.0) buffer를 사용하여 40~100°C 범위에서 측정하였다. 효소의 kinetic 값은 다양한 기질 (2,2'-azino bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS), guaiacol, 4-hydroxyindole, 4-methylcatechol, catechol, syringaldazine)을 사용하여 75°C에서 측정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. *Tt*-laccase 유전자의 클로닝 및 염기서열분석

*T. thermophilus* HJ6 유래의 laccase를 암호화하는 유전자를 클로닝 하기 위하여, 이미 게놈 염기서열이 밝혀진 *T. thermophilus* HB27의 laccase 유전자 염기서열을 바탕으로 primer를 설계하고, PCR 기법을 이용하여 laccase를 암호화 하는 것으로 예상되는 유전자를 클로닝 하였다. 클로닝 된 유전자의 open reading frame (ORF)는 1,389 bp의 길이로 462 아미노산을 암호화하고 있었다. 예상된 분자량은 51,049 Dalton이고, 등전점은 8.91 이었다. Fig. 1에서는 클

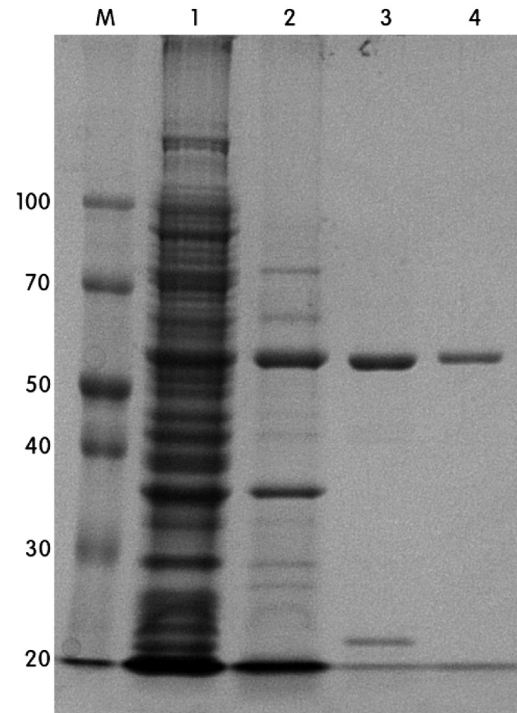
로닝 된 유전자로부터 예상되는 아미노산 서열과 상동성을 가지는 단백질을 대상으로 alignment를 작성하였다. 클로닝 된 유전자는 *T. thermophilus* HB27 유래의 laccase (NCBI Accession No. TTC1370)와 가장 높은 상동성 (99.7% identity) 을 나타내었고, *Lyngbya* sp. PCC8106 laccase (NCBI Accession No. ZP01621366)와 *Synechococcus* sp. RS9917 laccase (NCBI Accession No. ZP01081498)와는 각각 50.4%와 44.3%의 identity를 나타냈다. 이와 같은 생물정보학 분석을 통하여 *T. thermophilus* HJ6의 염색체로부터 클로닝 한 유전자는 laccase를 암호화하는 것으로 예상되었다. 이 유전자는 NCBI 염기서열 데이터베이스에 새로운 laccase 유전자로 등록하였다 (GeneBank Accession No. AFN86157).

HJ6	MLARRSFLQAAAG-----SLVGLLARAQ-----GPSFPEPKVVRSGGGLSLKLSATPT	49
HB27	MLARRSFLQAAAG-----SLVGLLARAQ-----GPSFPEPKVVRSGGGLSLKLSATPT	49
Lyngbya	M INRRKFI TLTST---STASAI LL TQCVSN---SIKAKSSNSVTQSSVGNLLDVLDEASF	54
Synecho	--NRRSFLAL TAGGAAASAGLLGGHLSRAGQVSPVMSQPVVRSQQG-AL I L DLVAQET	57
	*:*:* : : : : : * : *	
HJ6	PLALAGQRATLL TYGGSFPGPTLVRPRDVTVRL TLENRLPEPTNLHWHGLP I SP--KVDD	107
HB27	PLALAGQRATLL TYGGSFPGPTLVRPRDVTVRL TLENRLPEPTNLHWHGLP I SP--KVDD	107
Lyngbya	QVN I AGKKAKLLSYNGQ I PGPRLKAKPGDQTVRI NFNKLPQPTNLHYHGLH I PPTGNADN	114
Synecho	RI T I PGTAGRAL TYNGLLPGPVLEFNAGDDVK I QLHNRLNQPNTLHYHGLHVSPEGNADN	117
	: : *	
HJ6	PFLE I PPGESWTYEFVAVPK-ELAGTFWYHPHLHGRVAPQLFAGLLGALVVESSLDA I PEL	166
HB27	PFLE I PPGESWTYEFVAVPK-ELAGTFWYHPHLHGRVAPQLFAGLLGALVVESSLDA I PEL	166
Lyngbya	VFLK I QPGESFTYEF TLPKNHPSGTFWYHPHLHGLVAEQVFGGLAGLL I VRGELDE I PEI	174
Synecho	VFLSVQPGASQSYFQ I PDDHPAGLFYYPHHPHHTVSDQVFGGLGAL I VRGELDR I PEV	177
	** : *	
HJ6	REAEHLLVLDKDALGGRRPAPHPTMDMNGKEGDLV VNGALRPTLVAQK-ATLRLRL	225
HB27	REAEHLLVLDKDALGGRRPAPHPTMDMNGKEGDLV VNGALRPTLVAQK-ATLRLRL	225
Lyngbya	QAAEEQF I VLKDFALNRNANFGHMG I MLGREGELLTVNGELNPNFS I PQGGLLRLR I L	234
Synecho	QSAQEELVFLKDLPADRQ-----PGMGGAMLGREGSVLTVNGQVNT I EAPAGLLRLRLV	233
	: : *	
HJ6	NASNARYRRLAQDHPLYL I AADGGFLEEPLVSELLLLAPGERAEVLVRLRKE-GRFLLQ	284
HB27	NASNARYRRLAQDHPLYL I AADGGFLEEPLVSELLLLAPGERAEVLVRLRKE-GRFLLQ	284
Lyngbya	NASTSRFYRLKEEHPHLYL I ATDGGSI SEPVLESEVLLTPGERVE I LVRGEREPGQYRL	294
Synecho	NGSNARFWRALALEGQRLLHL I ATDGGAL EQPLA I EDLLLVPGARADVLVQ I SPTGGQFRLR	293
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
HJ6	ALPYDRGAMGMMDMGG-----MAHAMPGQPSRPETLLYL I APKNPKPLPLPKALSPFPT	338
HB27	ALPYDRGAMGMMDMGG-----MAHAMPGQPSRPETLLYL I APKNPKPLPLPKALSPFPT	338
Lyngbya	NLPYDRTGMMGGMMGGMMGGMMGNRSNTINTSQTALTYNNRVETLPLPKQL I TVPE	354
Synecho	NRSYNRVG---RRMMG-----MRRMVASSQGEET I AT I QTHGTTTPVALPRELL I QP	343
	. * : * . . . * . . . . . : * : : : : : : : * : * : * : * : * : *	
HJ6	LPAPVTRRLVLTEDMAAR---FF I NGQVFDHRRVDLKGGAQTVVEVVENQGDMDHPF	395
HB27	LPAPVTRRLVLTEDMAAR---FF I NGQVFDHRRVDLKGGAQTVVEVVENQGDMDHPF	395
Lyngbya	LPQAQTRRLTLNHGMAPGMGMVFL I NGQPFEMGNPDVVKLNT I EDWE I ANTGMTDHPF	414
Synecho	LNNPVRTTRFVNMHGMAPSMMGMFL I NGQPYDHR I DTRVRLGD I EEWDLVNTGVDHHPF	403
	* . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
HJ6	HLHVHPFQVLSVGGRRFPYRANKDVNLIKAGEVARLLVPLREK-GRTVFHCH I VEHEDRG	454
HB27	HLHVHPFQVLSVGGRRFPYRANKDVNLIKAGEVARLLVPLREK-GRTVFHCH I VEHEDRG	454
Lyngbya	HLHVNDQV I SRDNKPEPYRANKDVTLLVRRGEVVR I R I PFKDFPGKTVYHCH I LDHEDLG	474
Synecho	HLHVNPQV I SRNGEPERLLANRDVLLVRAGETVVRVTRQFDFSGRSVYHCH I LDHEDLG	463
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
HJ6	MMGVLEVG- 462	
HB27	MMGVLEVG- 462	
Lyngbya	MMATLE I QA 483	
Synecho	MMGNLL I EA 472	
	** , * :	

**Fig. 1.** Alignment of the deduced amino acid sequence of *Tt*-laccase with its homologues. The primary sequences of laccases from several organisms were aligned with Clustal W (1.83). HJ6, *T. thermophilus* HJ6; HB27, *T. thermophilus* HB27 (TTC1370); Lyngbya, *Lyngbya* sp. PCC8106 (ZP01621366); Synecho, *Synechococcus* sp. RS9917 (ZP01081498). An asterisk (\*) denotes that residues at that position are exactly same. A colon (:) indicates that residues at that position are very similar. A dot (.) indicates that residues are more or less similar.

**3.2. E. coli로부터 재조합 Tt-laccase의 생산**

His-tag 유전자를 포함하는 pET-21a 벡터시스템을 이용하여 *T. thermophilus* HJ6 laccase (*Tt*-laccase) 유전자를 클로닝 하고 pET-LAC1으로 명명하였다. 여기서 효소 생산을 위한 숙주 균주로는 *E. coli* Rosetta-gami (DE3)를 사용하였다. *Tt*-laccase 유전자에는 대장균에서 잘 사용되지 않는 rare codon을 다수 가지고 있기 때문에 rare tRNA 합성효소가 보강된 Rosetta-gami 균주를 사용하였다. Plasmid pET-LAC1을 사용하여 *E. coli* Rosetta-gami (DE3)를 형질전환 하였고, 37°C에서 배양하여 흡광도 (A<sub>600</sub>) 값이 0.5~0.6에 도달하였을 때 IPTG를 첨가하여 단백질 생산을 유도하였다. 배양한 세포를 초음파로 파쇄하고 초음파 상등액을 70°C에서 20분간 열처리한 후, 재료 및 방법에서 서술한 바와 같이 정제하고 SDS-PAGE 상에서 단일 밴드를 확인하였다 (Fig. 2, lane 4). 이렇게 정제된 *Tt*-laccase는 효소의 특성 분석에 사용하였다.



**Fig. 2.** Purification of *Tt*-laccase. M, molecular mass marker; lane 1, crude extract induced cells; lane 2, supernatant of crude extract after heat treatment at 70°C for 20 min; lane 3, HisTrap column peak fractions; lane 4, HiTrap Q column peak fractions. The gel was stained with coomassie brilliant blue.

**3.3. Tt-laccase의 UV-visible 흡수 스펙트럼**

Laccase는 일반적으로 구리를 함유하기 때문에 파란색을 나타낸다. 정제된 *Tt*-laccase의 UV-visible 흡수 스펙트럼을 측정된 결과, 본 효소는 type I 또는 blue copper center에 상응하는 605 nm에서 peak을 보였고, type III binuclear copper center에 상응하는 330 nm 근처에서 상승하는 peak 형태를 나타내었다 (Fig. 3). 이와 같은 흡수 스펙트럼의 결과는 다른 laccase에서도 공통적인 특징으로 알려져 있다.

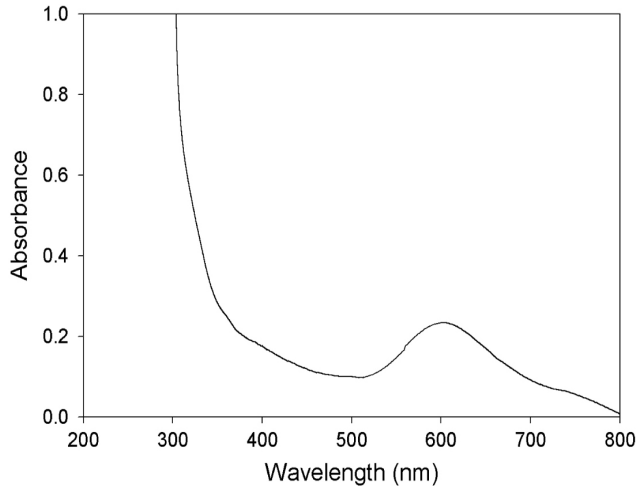


Fig 3. UV-visible absorption spectrum of *Tt*-laccase.

### 3.4. *Tt*-laccase의 생화학적 특징

*Tt*-laccase의 pH 의존성은 pH 4~10의 범위에서 overlapping buffer를 사용하여 측정하였다. Guaiacol을 기질로 사용하여 75°C에서 10분간 반응하고 활성을 측정한 결과, 본 효소의 최적 pH는 5.0을 나타내었다 (Fig. 4(a)). *Tt*-laccase의 온도 의존성은 50 mM sodium acetate (pH 5.0) buffer를 사용하여 40~100°C의 범위에서 활성을 측정한 결과, 90°C에서 가장 높은 활성을 보였다 (Fig. 4(b)). 따라서 본 효소는 *T. thermophilus* HJ6 균주의 최적생육온도인 80°C 보다 더 높은 온도에서 최적효소활성을 가지는 것으로 나타났다. 또한, 본 효소는 80°C에서 2시간 동안 열처리한 후에 82%의 활성을 유지하였고, 90°C에서는 2시간 만에 활성의 반감기를 나타내어 매우 높은 내열성을 가지는 것으로 확인 되었다 (Fig. 4(c)). 구리농도에 대한 효소 활성의 의존성은 0.0001~1 mM CuSO<sub>4</sub>의 범위에서 guaiacol을 기질로 사용하여 75°C에서 10분간 반응하여 활성을 측정하였다. 그 결과 구리농도 의존성은 S자 형태였고, 최대 활성에 대한 midpoint는 69 μM로 나타났다 (Fig. 5). 이와 같은 본 효소의 생화학적 특징은 *T. thermophilus* HB27 유래 laccase [18]의 최적 온도 (92°C, 최적 pH (4.5~5.5) 및 구리농도 의존성 (midpoint 30.4 μM) 과 거의 유사한 것으로 나타났다.

*Tt*-laccase의 기질 특이성을 검토하기 위하여 다양한 페놀 및 비페놀 화합물에 대하여 75°C에서 활성을 측정하였다. 효소 활성과 기질 농도와의 관계를 나타내는 kinetic 값은 EZ-Fit program의 Michaelis-Menten 식 [21]을 이용하여 계산하였다 (Table 1). 본 효소는 4-hydroxyindole에 대해 가장 높은 친화도를 나타내었고, syringaldazine에 대해서는 가장 높은 분자촉매상수 ( $k_{cat}$ )를 나타냈다. 또한 효소의 촉매 효율 ( $k_{cat}/K_m$ )은 guaiacol이 가장 높은 값을 나타내어, 본 효소의 가장 효과적인 기질인 것을 알 수 있었다. 본 효소의 kinetic 결과는 *T. thermophilus* HB27 유래 laccase의 kinetic 값 (syringaldazine에 대한  $K_m = 1.88$  mM,  $k_{cat} = 6.47$  s<sup>-1</sup>)과 유사하였다[18]. 그러나 방선균인 *Streptomyces lavendulae* 유래 laccase의 kinetic 값 (syringaldazine에 대한  $K_m = 0.043$  mM,  $k_{cat} = 10.9$  s<sup>-1</sup>) [22]과 곰팡이인 *Cerrena unicolor*

유래 laccase의 kinetic 값 (syringaldazine에 대한  $K_m = 0.019$  mM,  $k_{cat} = 35.2$  s<sup>-1</sup>) [23]을 비교하면, *Tt*-laccase는 높은  $K_m$  값과 낮은  $k_{cat}$  값을 나타내어 효소의 촉매효율이 비교적 낮은 것으로 확인 되었다.

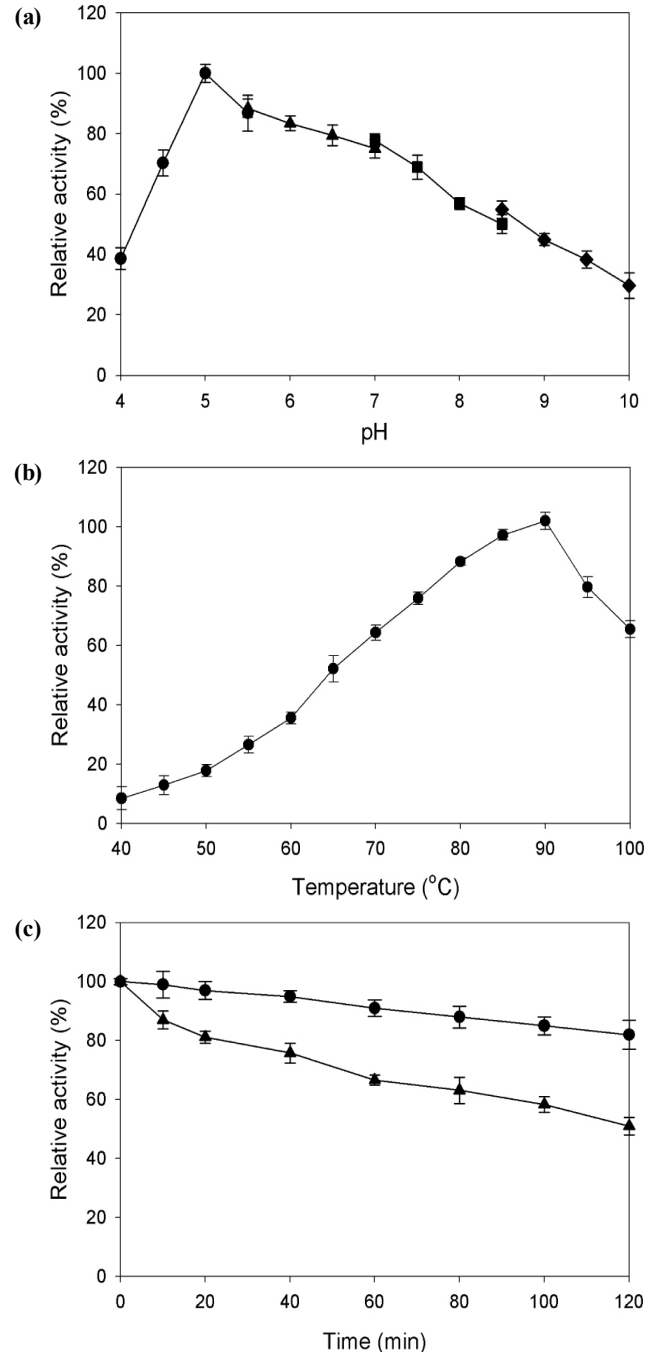
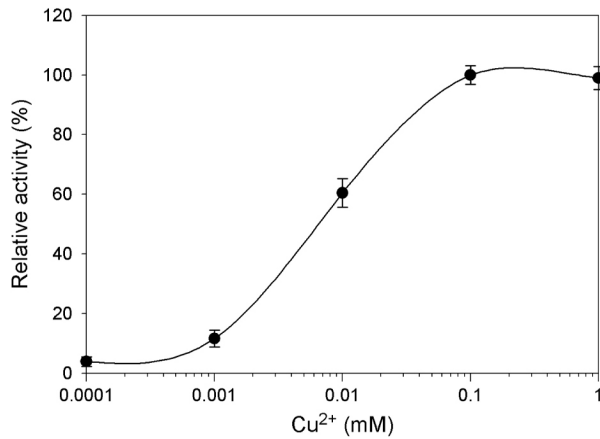


Fig. 4. Effects of pH and temperature on the activity and thermostability of *Tt*-laccase. (a) pH dependence of activity. circles, 50 mM sodium acetate; triangles, 50 mM sodium phosphate; squares, 50 mM Tris-HCl; diamonds, 50 mM glycine-NaOH. (b) Temperature dependence of activity. (c) Enzyme (1.2 μM *Tt*-laccase in 50 mM sodium acetate (pH 5.0) and 0.1 mM CuSO<sub>4</sub>) was incubated for various lengths of time at 80°C (circles) and 90°C (triangles), and the residual activity of samples were measured at 75°C and pH 5.0.

**Table 1.** Substrate specificity of *Tt*-laccase

Substrate	$\epsilon_{\max}$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	Wavelength (nm)	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $mM^{-1}s^{-1}$ )
ABTS	36000	420	1.24	5.39	4.35
Guaiacol	12000	470	0.25	4.29	17.16
4-Hydroxyindole	2685	615	0.22	3.12	14.18
4-Methylcatechol	2091	420	0.63	2.21	3.50
Catechol	2211	450	0.62	2.63	4.24
Syringaldazine	65000	530	2.31	9.06	3.92



**Fig. 5.** Copper dependence on the activity of *Tt*-laccase.

**3.5. *Tt*-laccase의 활성에 대한 금속이온 및 저해제의 효과**  
본 효소의 활성에 대한 금속이온 및 inhibitor의 효과를 알아보기 위해 다양한 금속이온 및 저해제의 존재 하에서 guaiacol을 기질로 사용하여 75°C에서 효소 활성을 측정하였다. Multicopper oxidases (MCOs)의 경우  $Cu^+$  뿐만 아니라  $Fe^{2+}$ 와  $Mn^{2+}$ 의 존재 하에서도 높은 활성을 나타내는 것으로 알려져 있지만 [24], 본 효소에 관해서는 오직  $Cu^+$ 에 대해서만 효소 활성을 나타내어 MCO와는 다른 전형적인 laccase의 특징을 보였다 (Table 2).

**Table 2.** Effect of metal ions on the activity of *Tt*-laccase

Metal ion	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None	1	11.6
$CuSO_4$	1	100.0
$CuCl_2$	1	97.8
$NiCl_2$	1	11.9
$CaCl_2$	1	12.7
$MgCl_2$	1	13.1
$MnCl_2$	1	13.4
$BaCl_2$	1	13.3
$ZnCl_2$	1	6.0
$CoCl_2$	1	14.1
$FeCl_2$	1	21.6

*Tt*-laccase의 효소활성은 sodium azide, L-cystein, EDTA, dithiothreitol, tropolone 및 kojic acid의 존재 하에서 90% 이상 저해 되었다 (Table 3). 반면, 2-mercaptoethanol와 acetylacetone은 다른 compound와 비교하여 상대적으로 낮

은 저해 효과를 나타내었다. 저해제 중에서 sodium azide는 0.1 mM의 낮은 농도에서도 강한 저해효과를 나타내었고, azide는 단백질 구조 안에 존재하는 구리 원자와 결합하여 전자의 이동을 방해했을 것으로 예상된다. 또한 Nagai등에 의해 보고된 바와 같이 [25], 본 효소에 대한 L-cystein과 dithiothreitol의 강력한 활성 저해는 효소활성부위의 구리원자와 thiol 화합물간의 배위결합이 원인이 것으로 생각된다.

**Table 3.** Effects of inhibitors on the activity of *Tt*-laccase

Compound	Concentration (mM)	Inhibition (%)
Sodium azide	0.1	93
SDS	1	88
2-Mercaptoethanol	1	63
L-Cystein	1	99
EDTA	1	100
Dithiothreitol	1	95
Tropolone	1	99
p-Coumaric acid	1	86
Kojic acid	1	92
Acetylacetone	1	46

**4. 결론**

고온성 세균 *Thermus thermophilus* HJ6로부터 *Tt*-laccase 유전자를 클로닝하고 염기 서열을 분석한 결과, ORF는 1389개의 뉴클레오타이드로 구성되고 462개의 아미노산을 암호화하여 예상되는 단백질의 분자량은 51,049 Da을 나타내었다. 아미노산 서열을 바탕으로 상동성을 분석한 결과, *Thermus thermophilus* HB27 유래 laccase와 99.7%, *Synechococcus* sp. RS9917 유래 laccase와 44.3%의 identity를 나타내었다. *Tt*-laccase는 *E. coli* Rosetta-gami (DE3) 세포에서 His-tag과의 융합 단백질로 발현 되었고, 열처리, HisTrap 및 HiTrap Q column을 이용하여 순수 정제하였다. UV-Vis spectrum 분석에서 정제된 효소는 type I Cu (II)과 type III binuclear Cu (II) 형태의 구리원자를 포함하는 것으로 확인 되었다. 재조합 *Tt*-laccase는 guaiacol의 산화활성에 대한 최적 pH와 온도가 각각 5.0과 90°C이었고, 활성의 반감기는 90°C에서 120분으로 확인되어 높은 내열성을 가지는 것으로 확인되었다. 본 효소의 활성은 sodium azide, L-cystein, EDTA, dithiothreitol, tropolone 및 kojic acid에 의해 강하게 저해되었다. Kinetic 분석에서 본 효소는 4-hydroxyindole에 대해 가장 높은 기질 친화도를 나타내었고, syringaldazine에 대해서는 가장 높은 촉매상수 ( $k_{cat}$ )을 보였으며, 촉매 효율 ( $k_{cat}/K_m$ )은 guaiacol이 가장 높은 것으로 나타났다.

**감사**

이 논문은 2012년도 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행되었으며 (2012-

0007573), 이 연구에 참여한 이소영은 2단계 BK21 사업의 지원을 받았습니다.

## References

- Höfer, C. and D. Schlosser (1999) Novel enzymatic oxidation of Mn<sup>2+</sup> to Mn<sup>3+</sup> catalyzed by a fungal laccase. *FEBS Lett.* 451: 186-190.
- Larrondo, L. F., L. Salas, F. Melo, R. Vicuña, and D. Cullen (2003) A novel extracellular multicopper oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* with ferroxidase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6257-6263.
- Sánchez-Sutil, M. C., N. Gómez-Santos, A. Moraleda-Muñoz, L. O. Martins, J. Pérez, and J. Muñoz-Dorado (2007) Differential expression of the three multicopper oxidases from *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 189: 4887-4898.
- Thurston, C. F. (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140: 19-26.
- Claus, H., G. Faber, and H. König (2002) Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 672-678.
- Palonen, H. and L. Viikari (2004) Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnol. Bioeng.* 86: 550-557.
- Murugesan, K. (2003) Bioremediation of paper and pulp mill effluents. *Indian J. Exp. Biol.* 41: 1239-1248.
- Huttermann, A., C. Mai, and A. Kharazipour (2001) Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 387-394.
- Peter, M. G. and U. Wollenberger (1997) Phenol-oxidizing enzymes: mechanisms and applications in biosensors. *EXS.* 80: 63-82.
- Liu, X., M. Gillespie, A. D. Ozel, E. Dikici, S. Daunert, and L. G. Bachas (2011) Electrochemical properties and temperature dependence of a recombinant laccase from *Thermus thermophilus*. *Anal. Bioanal. Chem.* 399: 361-366.
- Baldrian, P. (2006) Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 215-242.
- Dantán-González, E., O. Vite-Vallejo, C. Martínez-Anaya, et al. (2008) Production of two novel laccase isoforms by a thermotolerant strain of *Pycnoporus sanguineus* isolated from an oil-polluted tropical habitat. *Int. Microbiol.* 11: 163-169.
- Mayer, A. M. (1987) Polyphenol oxidases in plants-Recent progress. *Phytochemistry* 26: 11-20.
- Dittmer, N. T., R. J. Suderman, H. Jiang, Y. C. Zhu, M. J. Gorman, K. J. Kramer, and M. R. Kanost (2004) Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 29-41.
- Arias, M. E., M. Arenas, J. Rodríguez, J. Soliveri, A. S. Ball, and M. Hernández (2003) Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1953-1958.
- Martins, L. O., C. M. Soares, M. M. Pereira, M. Teixeira, T. Costa, G. H. Jones, and A. O. Henriques (2002) Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J. Biol. Chem.* 277: 18849-18859.
- Alexandre, G. and I. B. Zhulin (2000) Laccases are widespread in bacteria. *Trends Biotechnol.* 18: 41-42.
- Miyazaki, K. (2005) A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles* 9: 415-25.
- Fernandes, A. T., C. M. Soares, M. M. Pereira, R. Huber, G. Grass, and L. O. Martins (2007) A robust metallo-oxidase from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *FEBS J.* 274: 2683-2694.
- Gu, N. Y., J. L. Kim, H. J. Kim, D. J. You, H. W. Kim, and S. J. Jeon (2009) Gene cloning and enzymatic properties of hyperthermostable  $\beta$ -glycosidase from *Thermus thermophilus* HJ6. *J. Biosci. Bioeng.* 107: 21-26.
- Perrella, F. W. (1988) EZ-FIT: a practical curve-fitting microcomputer program for the analysis of enzyme kinetic data on IBM-PC compatible computers. *Anal. Biochem.* 174: 437-447.
- Suzuki, T., K. Endo, M. Ito, H. Tsujibo, K. Miyamoto, and Y. Inamori (2003) A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Biosci Biotechnol Biochem.* 67: 2167-2175.
- D'Souza-Ticlo, D., D. Sharma, and C. Raghukumar (2009) A thermostable metal-tolerant laccase with bioremediation potential from a marine-derived fungus. *Mar Biotechnol (NY)*. 11: 725-737.
- Stoj, C. S. and D. J. Kosman (2005) *Copper proteins: oxidases*. In Encyclopedia of Inorganic Chemistry, Vol. II, 2nd edn. (King RB, ed.), pp. 1134-1159. John Wiley and Sons, NY, USA.
- Nagai, M., T. Sato, H. Watanabe, K. Saito, M. Kawata, and H. Enei (2002) Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 327-335.