

## *Clostridium histolyticum*의 collagenase 특성

鄭 昌敏<sup>1\*</sup>, 松下 治<sup>1</sup>, 姜 國熙<sup>2</sup>, 岡部昭延<sup>1</sup>,

(<sup>1</sup>香川醫科大學 微生物學, <sup>2</sup>성균관대학교 식품생명자원학)

### 1. 서론

가스 괴사는, 복부 외과 수술 후 및 정형 외과 영역등에 있어서, 오늘날 중요한 질환으로 인식되어지는것 중에 하나이다. 이 질환은 초기 감염후에 뒤따라서 주변 결합조직의 급격한 파괴가 일어나, 감염을 급속히 진행시킨다. *Clostridium perfringens* 및 *Clostridium histolyticum* 등의 가스 괴사 균균이 생산하는 collagenase는, 이 과정에 관여하는 중요한 독소로 알려져 있다. Collagenase는 일반적인 protease와는 다르게, 삼중 나선 구조를 갖고 있고, 물에 불용성인 콜라겐을 분해한다. 그 중에서도 *C. histolyticum*의 collagenase에 대해서는 지금까지 많은 생화학적 연구가 되어왔지만, 유전학적 수법의 도입이 지연되어, 분자질량 조차도 명확히 되어있지 않았다(1). 그래서 본 효소에 의해 물에 불용성인 기질에 대한 고차 구조의 인식 및 분해 기구를 분자 레벨에서 이해하고, 여기서 얻어진 구조의 생물학적 지견을 배경으로 collagenase의 병원 인자로서의 역할을 명백히 할 목적으로 본 연구를 했다.

### 2. 방법과 결과

#### a) 일차 구조의 결정과 domain 구조의 예측

주요한 가스 괴사 기인균인 *C. perfringens*의 배양 상등액에서 단일의 collagenase 정제 효소를 얻음과 동시에, 그의 구조 유전자(*colA*)를 클론화해 염기 배열을 결정했다. *colA*에는 prepropeptide에 효소의 N-말단 배열이 코드하고 있다. 절단 부위의 바로 상류에는 기질과 유사한 아미노산 배열이 존재하고 있어, autoprocessing의 가능성이 예상된다(2). 그러나, 한 종류의 효소의 일차 구조로부터 구조 활성 상관에 관해 이해하기에는 불충분하였다.

그래서, 여러 종류의 collagenase를 산생하는 *C. histolyticum*에서 2종류의 collagenase를 부분 정제해, 각 효소의 구조 유전자 (*colG*, *colH*)의 염기 배열을 결정했다. ColH의 부분 정제품 중에는, 물에 불용성인 콜라겐을 분해할 수 있는 116-kDa 효소와, 수용성인 gelatine만을 분해하는 98-kDa 효소가 공존하고 있다(Fig. 1).

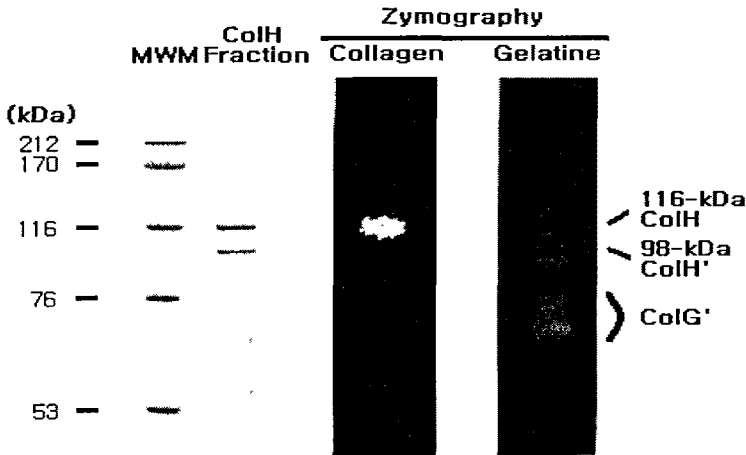


Fig. 1 SDS-PAGE of the ColH partial purification product and zymography

양자의 N-말단 배열이 동일한 점과 peptide mapping이 일치한 점, southern hybridization에서 단일 밴드가 검출되어진 것으로 부터 하나의 *colH* 유전자에서 116-kDa 효소가 만들어진 후, C-말단 부분이 제거되어 98-kDa 효소가 생성된 것으로 추측된다.

ColG, ColH의 예상 아미노산 배열을 ColA와 비교해 보면, 이것들의 효소는 삼중의 segment (S1, S2, S3)에 의해서 구성되어 있고, N-말단측의 S1에 금속 protease의 공통인 motif (HEXXH)가 존재하면서, S2, S3에는 segment의 중복이 나타나고, 그 패턴은 각각의 효소에서 다른 패턴을 나타내었다 (Fig. 2).

이상과 같이 S1은 촉매 domain을 구성하는 영역, C말단 단편은 물에 불용

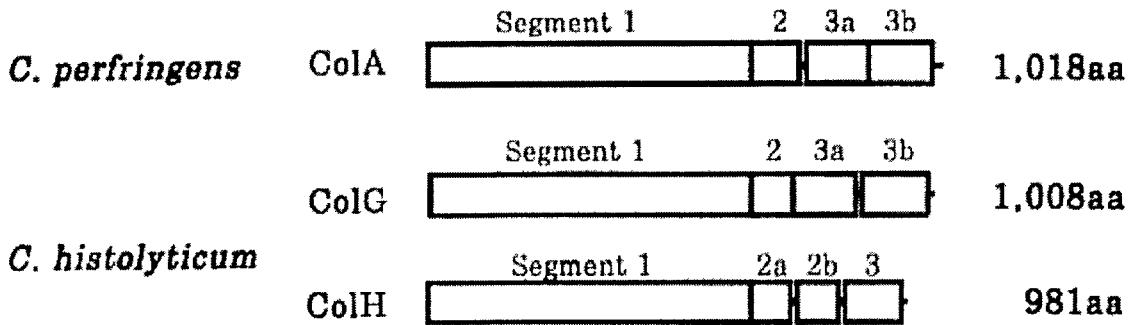


Fig.2 Segment structure of the clostridial collagenases

성인 기질에의 accessibility를 지배하는 영역인것으로 생각된다 (3).

#### b) 촉매 domain의 해석

domain구조의 해석에는, 여러 종류의 재조합 효소를 생산해서 그의 활성을 측정할 필요가 있다. 그런 이유로 대장균과 고초균의 shuttle vector를 이용해서 재조합 효소 생산계를 확립해, 재조합 고초균의 배양 상등액에서 mg레벨의 야생형의 정제된 효소(rColH)를 얻었다. rColH를 native인 효소와 비교한 결과, N말단에 여분의 10아미노산 잔기를 갖고 있지만 MAS에 의한 분자 질량 측정결과, C말단은 동일한 것으로 추측되었고, 효소의 성상도 잘 보존되어 있었다 (4).

*colH*유전자의 3'말단부터 여러가지의 결실 변이를 도입한 결과, 결실이 S1에 달했을때 효소 활성이 소실되었다. 재조합 고초균계를 이용한 야생형 효소와 S1만으로 되어있는 변이 효소를 생산하고 그 활성을 비교했다 (Table 1).

Table 1. Deleted mutation of C-terminal in recombinant collagenase and specific activity (units/pmol enzyme)

enzyme	Pz-peptidase	collagenase
rColH	0.0859 ± 0.0036	0.164 ± 0.006
rColH'(S1)	0.123 ± 0.006	0.00857 ± 0.00154



Table 2. Zn content and specific activity of mutant enzyme

Enzyme	Zn content	Specific activity
H+1	↓	↓
E+2	→	↓
H+5	↓	↓
N+25	→	→
E+32	→	↓
E+33	↓	↓
E+37	→	↓

### c) 기질 결합domain의 해석

S1 단독 변이 효소의 물에 불용성인 콜라겐에 대한 활성은, 야생형에 비해 현저하게 저하되었다(Table 1). 물에 불용성인 기질에 대한 결합능의 차이가 활성에 영향을 미치는 것으로 보아, 각 효소와 물에 불용성인 기질을 섞어서, 반응후의 상청을 SDS-PAGE에서 관찰했다(Fig. 4).

rColH는 collagen에 결합했지만, rColH'(S1)은 결합하지 않았기 때문에, C말단 (S2 및 S3)은 기질의 결합에 필요하다.

이 단편에 의한 기능성 domain의 형성을 분명히 할 목적으로 재조합 대장균을 이용하여 이 영역을 GST융합 단백질로서 생산해, 그의 collagen 결합능을 조사했다(Fig. 5).

S2b+S3은 전장의 효소와 동등한 결합능을 갖고 있고, S3 단독에서도 유의한 결합이 관찰되었지만 S2에서의 결합은 나타나지 않았다. 그러므로 C말단 영역은 collagen 결합 domain (CBD)을 형성하며 S3이 그의 core라고 생각된다.

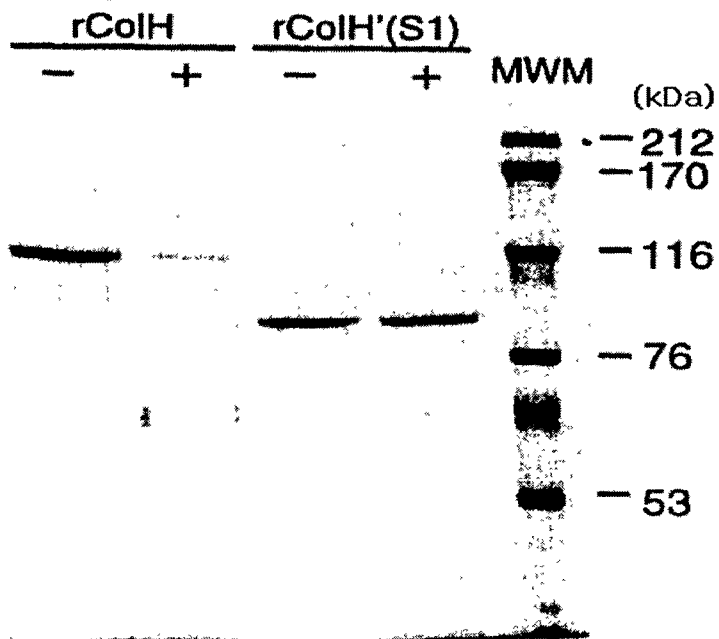


Fig. 4 Binding of the water insoluble collagen

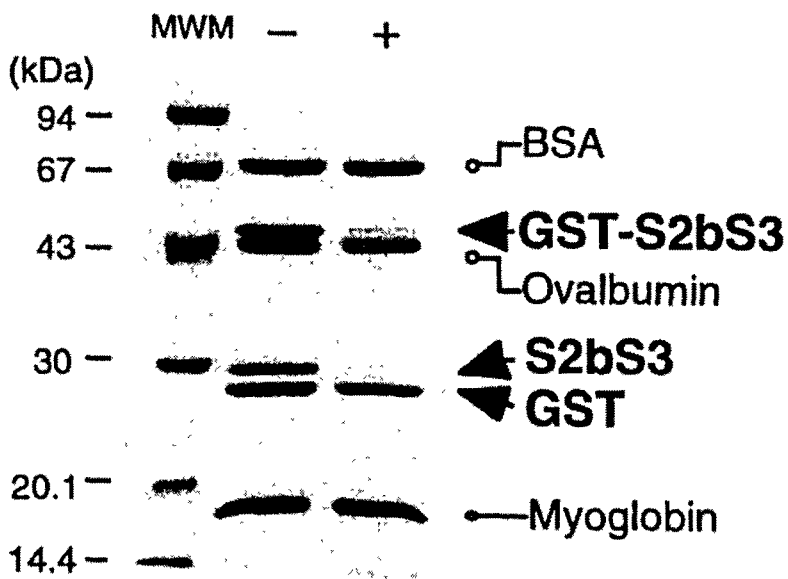


Fig. 5 Binding of the water Insoluble collagen

### 3. 고찰

앞으로, CBD의 부위 특이적 돌연 변이에 의한 해석 및 X선 회석에 의한 구조 결정을 행함과 동시에, 동물 실험을 이용하여 여러 종의 *colA* 변이가 *C. perfringens*의 병원성에 미치는 영향을 검토할 예정이다.

### 참고 문헌

1. Worthington Biochemical Corporation. 1988. Worthington manual; enzymes, related biochemicals. C. C. Worthington (ed.) pp. 93-101
2. Matsushira, O., Yoshihara, K., Katayama, S., Minami, J., and Okabe, A. 1994. Purification and characterization of *Clostridium perfringens* 120-kDa collagenase and nucleotide sequence of corresponding gene. J. bacteriol. **176**; 149-156.
3. Yoshihara, K., Matsushira, O., Minami, J., and Okabe, A. 1994. Cloning and nucleotide sequence analysis of the *colH* gene from *Clostridium histolyticum* encoding a collagenase and a gelatinase. J. bacteriol. **176**; 6489-6496.
4. Jung, C. M., Matsushira, O., Katayama, S., Minami, J., Oohira, I., and Okabe, A. 1996. Expression of the *colH* gene from *Clostridium histolyticum* collagenase in *Bacillus subtilis* and its application to enzyme purification. Microbiol. Immunol. **40**; 923-929.
5. Matsushira, O., Jung, C. M., Minami, J., Katayama, S., Nishi, N., and Okabe, A. 1988. A study of the collagen-binding domain of a 116-kDa *Clostridium histolyticum* collagenase. J. Biol. Chem. **273**; 3643-3648.