# 대장균 세포내 단백질 분해효소, Protease Pi의 정제와 특성

이영섭 · 곽태환 · 임정빈* · 정진하
서울대학교 자연과학대학 동물학과, *미생물학과

# Isolation and Properties of Protease Pi in *Escherichia coli*

**Lee, Y.S., T.H. Kwak, *J.B. Yim, and C.H. Chung**
*Department of Zoology, *Department of Microbiology, Seoul National University*

**Abstract:** A periplasmic endoprotease, named protease Pi, was purified to homogeneity from *Escherichia coli* by conventional procedure with insulin as substrate. This enzyme degrades insulin and glucagon to trichloroacetic acid-soluble meterials, but shows little or no hydrolysis of bovine serum albumin, casein or globin. Its molecular weight was 110,000 when determined by gel filtration on Sephacryl S-300 and was 105,000 when estimated by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. Thus, it appears to be single polypeptide. This enzyme is metalloprotease, since it is completely inhibited by o-phenanthroline and can be activated by addition of divalent metal cations, such as $Mg^{2+}$ and $Co^{2+}$. It is distinct from protease Ci, a cytoplasmic insulin degrading enzyme, since protease Pi is localized to the periplasm.

Since protease Pi selectively degrades GTP cyclohydrolase I, it appears to play a role in the regulation of pteridine biosynthesis.

**Key Words:** periplasmic endoprotease, *E. coli*.

대장균에 있어서 단백질 분해작용에 대한 조절과 선택성에 대해서 중요성이 점차 인식되면서, 최근에 들어서는 세포질에 존재하거나 (Goldberg *et al.*, 1982), 막에 연관된 단백질 분해효소(Pacaud, 1982; Regnier, 1981) 들이 보고되었다. 이러한 효소들은 돌연변이등에 의해 생성되는 비정상적인 단백질이나, 여러 영양물질의 고갈로 인해 증가되는 정상적인 세포 단백질을 분해하는데 작용할 것이라고 알려졌다 (Goldberg and St. John, 1976; St. John *et al.*, 1978; St. John and Goldberg, 1980; Voellmy and Goldberg, 1980). 뿐만아니라, 단백질 분해효소들이 막 단백질이나 분비 단백질의 processing단계(Chang *et al.*, 1978; Davis and Tai, 1980; Novak *et al.*, 1986; Wickner, 1979), colicin의 분해(Bowles and Konisky, 1981), viral morphogenesis (Mount, 1980), 그리고 phage cI repressor와 같은 조절 단백질의 선택적 비활성화(Mount, 1980; Robert *et al.*, 1978)에도 관여하는 것으로 알려지고 있다.

근래에 들어서 대장균 세포내 단백질 분해작용을 담당하는 분해효소들의 보다 체계적인 연구가 시작되어서 Goldberg(1982) 등은 대장균의 soluble extract으로부터 서로 다른 8개의 단백질 분해효소가 존재함을 밝히었다. 이들중 6개(protease Do, Re, Mi, Fa, So and La)들은 casein이나 globin을 가수분해하는 serine protease (Swamy *et al.*, 1981; Chung and Goldberg, 1983)이며, 특히 protease La는 효소활성을 위해 $Mg^{2+}$와 ATP를 필요로 하며

본 연구는 1985년도 문교부 기초과학육성연구비의 지원에 의한 것임

(Charette *et al.*, 1981; Chung and Goldberg, 1981, 1982; Chung *et al.*, 1983; Larimore *et al.*, 1982), 비정상적인 단백질 분해작용에 rate-limiting step에 관여하는 것으로 나타났다 (Kowit and Goldberg, 1977). 또 다른 2개 (protease Pi and Ci)는 insulin과 "auto $\alpha$"를 가수분해하는 metalloprotease라고 보고되었다 (Chung and Ha, 1984).

따라서, 세포내 분해작용에 대한 정확한 기작이나 일련의 과정에 있어 각 단계에 관여하는 효소에 대해 보다 정확히 알기 위해서는 대장균 세포에 존재하는 단백질 분해효소를 각각 순수 정제하고, 또 그들의 생화학적인 연구가 선행되어야 하므로, 본 연구는 대장균 세포의 8개 분해효소중 periplasm에 위치하는 protease Pi를 정제하여 그 효소의 생화학적 특성과 세포내 작용에 대해 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 재료

대장균 K12 (NF172) 균주를 LB 배지로 37℃에서 late log phase까지 배양한 뒤 수확하여 −70℃에 보관하였다. $Na^{125}I$와 $^3H$-formaldehyde는 New England Nuclear, Hydroxylapatite는 Bio-Rad Laboratories, DEAE-cellulose (DE52)와 CM-cellulose (CM52)는 Whatman, 그리고 그외의 대부분 시약들은 Sigma 로부터 구입하였다.

단백질 분해효소의 기질로 쓰이는 insulin은 chloramine T (Greenwood *et al.*, 1963)를 이용하여 iodination하고, casein, bovine serum albumin, globin등은 $^3H$-formaldehyde을 이용하여 reductive methylation방법 (Rice and Means, 1971)에 따라 방사능을 표지하였다.

### 활성도 측정

단백질 분해효소의 활성도는 방사능이 표지된 3$\mu$g의 insulin (7,000cpm/$\mu$g), 정제 각 단계에서 얻어진 적당량의 분획 및 50mM Tris−HCl (pH 8.0), 5mM $MgCl_2$를 함께 넣어서 1시간 동안 37℃에서 반응시킨 다음, trichloroacetic acid와 carrier로 bovine serum albumin을 최종 농도가 각각 10% 및 3%되도록 넣어서 반응을 중단시킨다. 그리고 4℃에서 10분간 방치한 후, 5분간 원심분리 (5,000×g)하여 acid-soluble 상징액의 방사능을 Liquid Scintillation Counter로 측정하였다 (Goldberg *et al.*, 1982).

단백질의 정량은 Lowry (1951) 방법이나 Bradford의 dye-binding assay (1976) 방법에 따라 측정하였다.

### 특성분석

Protease Pi의 native 분자량은 50mM Tris-HCl (pH 7.8), 5mM $MgCl_2$, 50mM NaCl 로 씻어준 Sephacryl S-300 (1.3×70 cm) column에 의한 gel filtration으로 측정하였고, subunit size는 7.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis에 의한 Laemmli (1970)의 방법에 따라 행하였다.

또한 방사능이 표지된 여러가지 단백질들을 기질로 하여, 정제된 protease Pi에 의한 기질 특이성을 조사하였고, 방사능이 표지되지 않은 intact insulin, insulin A 및 B chain을 이용하여 cleavage specificity를 알아보았다 (Chung and Ha, 1984).

### Crude Extract 준비

대장균 세포의 crude extract는 Goldberg *et al.*, (1982)의 방법에 따라 행하였다. −70℃에 보관하던 세포들을 (200 g) 300 m*l*의 10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 5 mM $MgCl_2$에 현탁시킨 뒤 French press (14,000 psi)로 세포를 깬 다음, 30,000×g에 한 시간 원심분리하고 다시 상징액을 150,000×g로 두 시간 초원심분리 하여서 얻은 상징액을 대장균 세포의 crude extract로 실험에 사용하였다.

### *E. coli* 단백질 분해효소들의 정제

대장균 세포내 존재하는 8개의 단백질 분해효소들 중 protease Do는 Swamy 등 (1983), protease Re는 Park등 (1986), protease Mi는 Goldberg등 (1982), protease So는 Chung and Goldberg (1983), 그리고 protease La는 Chung and Goldberg (1981)의 방법에 따라 부분정제하거나 순수분리하여 사용하였다.

### GTP cyclohydrolase I의 정제

대장균 B 균주로부터의 GTP cyclohydro-

lase I의 정제 및 활성도 측정은 Yim and Brown (1976)의 방법에 따라 행하였다. 얼린 대장균 250g에 500 ml의 0.2 M Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액을 넣고 녹인 뒤, 여기에 lysozyme 0.25g과 DNase I 25mg을 넣고 37℃에서 20분간 반응시켰다. 이것을 15,000×g에서 한 시간동안 원심분리하여 상징액을 얻은 뒤 ammonium sulfate를 넣어서 35%에서 50%까지의 분획을 취하고 50mM potassium phosphate (pH 7.0) 용액에 녹여 5mM EDTA가 첨가된 동일 완충용액에서 16시간 투석시켰다. 이것을 같은 완충용액으로 평형된 Sephadex G-200 column (3.8×100 cm)에 loading하여 효소 활성이 높은 분획들을 모아 GTP-sepharose affinity gel (5 ml)에 통과시키었다. 0.3M KCl이 첨가된 25 mM potassium phosphate (pH 7.0), 2.5 mM EDTA 완충용액 150 ml로 씻어주고, 다시 KCl이 없는 동일용액 50 ml로 씻어주었다. GTP (0.25 mg/ml)를 넣은 같은 용액 20 ml로 용출하여 활성도가 높은 분획들을 모아 즉시 사용하거나, PEG (MW 20,000)로 농축시켜 25 mM potassium phosphate (pH 7.0) 완충용액으로 투석하여 보관하였다.

## 결 과

### 정제과정

대장균 세포 (NF172)로부터 얻은 crude extract (10,390 mg)을 10mM Tris-HCl (pH 7.8), 5mM $MgCl_2$에 투석시킨 다음, DEAE-cellulose (5×28 cm)에 loading한 뒤 50 mM NaCl이 포함된 동일 완충용액으로 용출시켜서, 효소 활성이 높은 분획을 Amicon PM10 membrane으로 농축시켰다. 농축된 분획을 10mM sodium acetate (pH 5.2), 2.5 mM $MgCl_2$에 6시간 투석시킨 뒤 동일 완충용액으로 씻어준 CM-cellulose (1.5×8 cm) column에 loading하였다. 이 column에 붙은 단백질들을 0-0.3 M NaCl의 gradient로 3 ml씩의 분획을 받아서 효소 활성을 측정해 보니 40 mM에서 용출됨을 알았다. 이 분획들을 모아 10 mM potassium phosphate (pH 7.4) 용액에 투석시킨 뒤, phosphocellulose (1×7 cm) chromatography를 해본 결과 protease Pi는 binding되지 않는 것으로 나타났다. 상기의 column에 binding되는 단백질들을 제거한 뒤 동일 완충용액으로 씻어준 hydroxylapatite (1×5 cm) column에 loading 하여 10-150 mM phosphate gradient로 용출시켜 효소 활성을 측정하였다. 효소 활성이 높은 분획을 다시 second DEAE-cellulose column (1×2 cm)에 loading하여 0-50 mM NaCl gradient로 0.5 ml씩의 분획들을 받았다. 각 분획에 존재하는 효소 활성도를 측정하고, SDS-전기영동에 의한 단백질의 측정 결과는 Fig. 1과 같이 나타났다. 단일 단백질 띠가 존재하는 곳에만 효소 활성도가 나타나는 것으로 보아, protease Pi가 순수분리되었음을 보여준다. 따라서 순수한 protease Pi분획들을 모아 농축시킨 다음 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 5 mM $MgCl_2$, 20% glycerol에 투석시킨 뒤 -20℃에 보관하였다가, 이 효소의 특성분석에 사용하였다. 각 정제단계를 Table 1에 요약하였는데 대장균 세포 내에는 insulin을 가수분해시키는 다른 단백질 분해효소 (protease Ci) (Chung and Ha, 1984; Swamy and Goldberg, 1982)가 존재하므로 protease Pi에 대한 specific activity, recovery를 first DEAE-cellulose 단계 이후부터 산출해 내었다.

### 분자량

정제된 protease Pi의 native 분자량을 알기

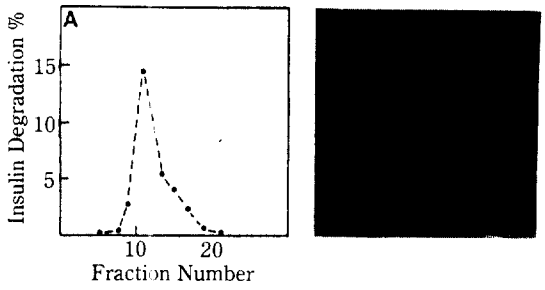


**Fig. 1.** *Second DEAE-cellulose chromatography and SDS-PAGE of protease Pi.* (A) Profile of insulin-degrading activity. Preparation of reaction mixtures and incubations were performed as described in Materials and Methods. (B) Electrophoretic pattern of high insulin-degrading fractions in 10% polyacrylamide gel.

**Table 1.** *Summary of purification.*

| Step | Protein (mg) | Total activity (U)* | Specific activity (U/mg) | Recovery (%) | Purification fold |
|---|---|---|---|---|---|
| Crude extract | 10,390 | -** | - | - | - |
| First DEAE-cellulose | 130.2 | 1497 | 11.5 | 100 | 1 |
| CM-cellulose | 15.1 | 1351 | 89.5 | 90 | 7.8 |
| Phosphocellulose | 13.7 | 924 | 192.5 | 62 | 16.7 |
| Hydroxylapatite | 0.45 | 432 | 983 | 29 | 85.5 |
| Second DEAE-cellulose | 0.10 | 156 | 1569 | 10 | 136 |

Determination of insulin-degrading activity at each steps was carried out under linear assay conditions as described in the Materials and Methods.
*One unit was defined as 1 $\mu$g of insulin hydrolyzed per mg protein per h.
**Not estimatable (see text).

위해서 Sephacryl S-300 column (1.3×70 cm)에 gel filtration을 해 본 결과 약 110,000 dalton으로 나타났다 (Fig. 2A). 또한 subunit의 size를 알기위해 SDS-전기영동을 해보면 Fig. 2B와 같이 약 105,000 dalton으로 나온 것으로 보아 protease Pi는 하나의 polypeptide로 구성되어 있음을 알 수 있었다.

### 저해제의 영향

단백질 분해효소 저해제들을 순수분리한 protease Pi와 37℃에서 15분간 preincubation 시킨 뒤, 방사능이 표지된 insulin을 가수분해하는 효소 활성을 측정해 본 결과는 Table 2와 같다. 표에서 보는 바와 같이 metal ion을 chelate하는 o-phenanthroline, EDTA에 의해서는 효소 활성도가 완전 저해되었으나, serine protease inhibitor인 DFP나 PMSF, sulfhydryl group reagent인 iodoacetamide, N-ethylmaleimide에 영향을 받지 않는 것으로 보아 정제된 protease Pi는 metalloprotease임을 알 수 있었다.

이러한 metalloprotease인 protease Pi를 EDTA로 inactivate시킨 뒤 여러 divalent metal ion에 의한 효소 활성의 reactivation 효과를 보면 Table 3에서와 같이 $Mg^{2+}$, $Co^{2+}$에 의해 활성화 되지만 $Zn^{2+}$에 의해 효소 활성이 현저히 저해되는 것으로 나타났다.

### 기질 특이성

Protease Pi 정제과정에서 기질로 쓰인 insu-

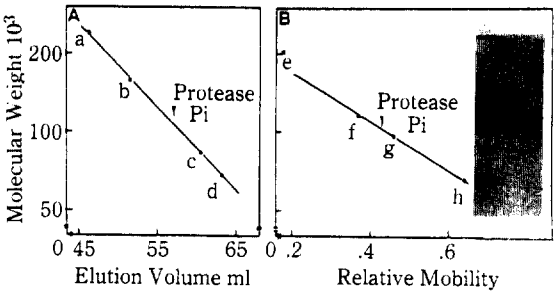


**Fig. 2.** *Determination of the molecular weight of protease Pi.* (A) Estimation of native size. The elution of marker proteins was monitored by their absorbance at 280 nm, which was plotted against their molecular weight. Marker proteins used were: a, catalase (Mr of 240,000); b, aldolase (Mr of 158,000); c, alkaline phosphatase (Mr of 82,000); d, BSA (Mr of 68,000). (B) Estimation of subunit size. Marker proteins used were: e, myosin (Mr of 205,000); f, $\beta$-galactosidase (Mr of 116,000); g, phosphorylase b (Mr of 97,000); h, BSA (Mr of 68,000).

**Table 2.** *Effects by various protease specific inhibitors on Protease. Pi.*

| Addition | Concentration (mM) | % Activity |
|---|---|---|
| None | 0 | 100 |
| Ethylenediaminetetracetic acid | 1 | 54 |
| o-Phenanthroline | 1 | 5 |
| Phenylmethylsulfonylfluoride | 1 | 97 |
| Iodoacetamide | 1 | 92 |
| N-Ethylmaleimide | 1 | 102 |
| Dithiothreiotol | 1 | 47 |
| p-Hydroxymercuribenzoate | 1 | 10 |
| N-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone | 1 | 95 |
| N-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone | 1 | 105 |

Protease Pi was dialyzed against 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) for 6 h during which period the dialysis buffer was changed every 2 h. Reaction mixture containing the indicated inhibitors were incubated for 10 min at 37℃ before the addition of $^{125}$I-insulin. When metal chelating agents were tested, the $MgCl_2$ was omitted. Insulin hydrolysis in the absence of an inhibitor is expressed as 100% activity.

**Table 3.** *Effects of divalent metal ions on protease Pi.*

| Cation | Concentration (mM) | % Activity |
|---|---|---|
| None | – | 100 |
| $MgCl_2$ | 0.1 | 100 |
| | 1 | 113 |
| | 5 | 143 |
| $CaCl_2$ | 0.1 | 100 |
| | 1 | 112 |
| | 5 | 105 |
| $MnCl_2$ | 0.1 | 105 |
| | 1 | 98 |
| $ZnCl_2$ | 0.1 | 63 |
| | 1 | 14 |
| $CoCl_2$ | 0.1 | 96 |
| | 1 | 139 |

lin 이외에 다른 단백질 기질에 대한 효소 활성을 조사해 본 결과 glucagon도 가수분해하는 것으로 나타났으나, casein이나 bovine serum albumin 등 다른 단백질들은 가수분해 시키지 않는 것으로 나타났다(Table 4).

또한 protease Pi에 의한 insulin의 cleavage site를 알아보기 위하여 반응 혼합용액에 기질로 쓰인 $^{125}$I-insulin과 함께 방사능이 표지되지 않은 intact insulin, insulin A chain 혹은 insulin B chain을 각각 첨가하면서 효소 활성도를 측정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 $^{125}$I-insulin에 대한 효소 활성이 모두 억제되는 것으로 보아 insulin A, B 두 chain 모두에

**Table 4.** *Degradation of various proteins by protease Pi.*

| Substrate | Concentration($\mu$g) | % Hydrolysis |
|---|---|---|
| Casein | 25 | 2.38 |
| Bovine serum albumin | 25 | 0.00 |
| Denatured bovine serum albumin | 25 | 0.36 |
| Globin | 25 | 0.70 |
| Glucagon | 25 | 44.69 |
| Insulin | 5 | 35.38 |
| Growth hormone | 12.5 | 0.47 |
| Denatured growth hormone | 1 | 0.00 |

Concentrations indicated are the amounts of protein substrates.

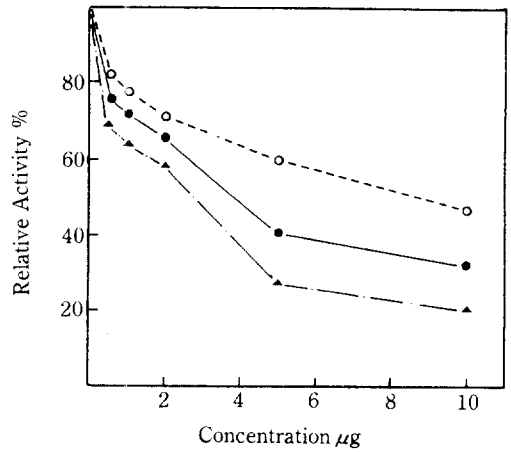


**Fig. 3.** *Effect of unlabeled insulin, insulin A and B chains on the degradation of $^{125}$I-insulin by protease Pi.* Reaction mixture contained 3 $\mu$g of $^{125}$I-insulin, and various amounts of unlabeled intact insulin (▲), insulin A chain(○), or B chain(●). The proteolysis occured in the absence of added unlabeled proteins was expressed as 100% activity.

protease Pi에 대한 specific cleavage site가 존재함을 나타내었다.

**GTP cyclohydrolase I의 선택적 분해**

GTP cyclohydrolase I은 folic acid의 전구물질인 pteridine의 생합성 과정의 첫 단계에 작용하는 효소로써, folic acid의 생합성의 일련의 과정을 조절한다고 알려졌다(Burg and Brown, 1968; Yim and Brown, 1976). 따라서, pteridine 합성이 GTP cyclohydrolase I의 turnover에 의해서도 조절될 수 있는지를 조사하기 위해서, $^{125}$I로 방사능이 표지된 순수한 GTP cyclohydrolase I를 기질로 하여 protease Pi 및 부분 또는 순수 정제한 대장균 세포에 존재하는 다른 단백질 분해효소들(protease Do, Re, Mi, So and La)을 각기 처리하여 보았다. Table 5에서 보는 바와 같이, GTP cyclohydrolase I은 protease Pi에 의해 선택적으로 분해됨을 알 수 있었다.

## 고 찰

대장균으로부터 metalloprotease의 일종인 protease Pi를 insulin을 기질로 하여 순수 분리하였다. 이 효소는 periplasm에 위치하기에

**Table 5.** *Selective degradation of GTP cyclohydrolase I by the purified protease Pi.*

| Protease (amount used) | % Hydrolysis |
|---|---|
| Crude extract (100 μg) | 7.2 |
| Protease Do ( 5 μg) | 4.2 |
| Protease Re ( 5 μg) | 0.0 |
| Protease Mi ( 10 μg) | 5.8 |
| Protease So ( 5 μg) | 7.0 |
| Protease La ( 5 μg) | 3.4 |
| Protease Pi ( 1 μg) | 63.8 |

Assays were performed by incubation of 0.5 μg of $^{125}$I-GTP cyclohydrolase and various amount of purified protease in *E. coli* at 37℃ for 1 hr. Trypsin (2 μg) degrades approximately 65% of the protein under the same condition.

(Swamy and Goldberg, 1982) 세포질에 존재하는 insulin 분해효소인 protease Ci (Chung and Ha, 1984; Goldberg *et al.*, 1982) 와는 다르다. 뿐만 아니라, protease Pi는 o-phenanthroline, EDTA에 의해 저해되지만, protease Ci는 o-phenanthroline에 의해서만 저해되는 차이점을 보인다. Insulin의 cleavage site에 있어서도 protease Ci는 insulin A chain을 분해시키지 않는 것으로 나타났으나(Chung and Ha, 1984), protease Pi는 insulin A 및 B chain의 농도 증가에 따라 효소 활성이 억제되는 것으로 보아 두 chain 모두 specific cleavage site가 있는 것으로 나타났다(Fig. 3). 대장균 세포내에 존재하는 또 다른 단백질 분해효소들은 (Protease Do, Re, Mi, Fa, So, and La) (Goldberg *et al.*, 1982) insulin을 가수분해 시키지 못하고, casein이나 globin을 분해하는 serine protease이기에 정제된 Protease Pi와는 다른 효소임을 알 수 있었다.

그러나 Cheng and Zipser (1979)에 의해 "auto α"를 기질로 하여 분리한 protease Ⅲ와 비교해 보면, 분자량(110,000 dalton)이나 저해제에 의한 효소 활성의 억제효과(o-phenanthroline, EDTA, DTT)에서 매우 유사한 점으로 보아 protease Pi와 동일한 단백질 분해효소라고 여겨진다. 하지만 EDTA에 의해 inactivate된 protease Ⅲ는 $Zn^{2+}$에 의하여 다시 활성화되고, $Mg^{2+}$ 및 $Ca^{2+}$에 의해 별다른 영향을 받지 않은 반면 protease Pi는 $Zn^{2+}$에 의해 효소 활성이 현저히 저해되었고, $Mg^{2+}$ 및 $Co^{2+}$에 의해 활성화되는 효과를 나타내었다(Table 3). 이 점을 고려해 보면, 서로 다른 효소로 생각될 수도 있지만, 두 분해효소의 활성도 측정시 기질("auto α" and insulin)의 차이가 있기 때문에 앞으로 두 효소를 순수 분리하여 세포 내에서의 생리적 기능이나 antibody specificity등을 알아 봄으로써 동일한 효소 유무를 확인해 보아야 할 것이다.

현재 protease Pi의 세포내 정확한 기작이나 작용에 대해서는 알려진 바 없지만, 대장균 세포에서 GTP로부터 pteridine compound의 생합성 경로에 중요한 역할을 하는 GTP cyclohydrolase Ⅰ를 선택적으로 가수분해하는 것으로 나타났다(Table 5). 이는 pteridine compound들이 protease Pi에 의해 GTP cyclohydrolase Ⅰ를 분해하여 조절됨을 시사해 준다고 볼 수 있다. 대장균 뿐아니라, *Drosophila*에서도 이 pteridine들이 cofactor나 colored pigment등 중요한 기능을 가지는 것으로 알려지고 있다(Dorsett *et al.*, 1982; Weisberg and O'Donnell, 1986). 아직까지 초파리에서 insulin 분해효소나 이와 유사한 단백질 분해효소의 보고는 없으나, 앞으로 존재유무를 확인하고 종 간의 유연관계도 살펴보아야 할 것이다. 그러나 periplasm에 위치하는 protease Pi가 세포질에 존재하는 GTP cyclohydrolase Ⅰ를 어떻게 인지하여 선택적으로 분해하는지 문제점이 남아 있고, 세포질에서 합성된 protease Pi가 막을 통과하여 periplasm으로 이동하는 processing 단계와의 연관성과 아울러 좀 더 연구를 해보아야 할 것이다.

## 요 약

대장균 세포로부터 insulin을 기질로 하여 protease Pi를 순수 분리하였다. 이 효소는 insulin과 glucagon을 가

수분해 하지만 casein, globin, bovine serum albumin은 분해되지 않는 것으로 나타났다. Sephacryl S-300에 의한 native 분자량(110,000)이나 sodium dodecyl sulfate-전기영동(105,000)에서 같은 점으로 보아 단일 polypeptide로 구성되어 있음을 알 수 있었다.

o-phenanthroline이나 EDTA에 의해 효소활성이 저해되고, $Mg^{2+}$와 $Co^{2+}$와 같은 divalent metal ion에 의해 활성이 증가되는 것으로 보아 protease Pi는 metalloprotease의 일종임을 알았다. 이 효소는 periplasm에 위치하기에 세포질에 존재하는 protease Ci와는 다르며, GTP cyclohydrolase I를 선택적으로 분해시키는 것으로 보아 pteridine 생합성 경로의 조절에 어떤 역할을 할 것이라고 여겨진다.

## REFERENCES


1. Berg, A.W., and G.H. Brown, 1968. The biosynthesis of folic acid. *J. Biol. Chem.* **243:** 2349-2358.
2. Bowels, L.K. and J. Brown, 1981. Cleavage of colicin Ia by the *Escherichia coli* K12 outer membrane is not mediated by the colicin Ia receptor. *J. Bacteriol.* **145:** 668-671.
3. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72:** 248-254.
4. Chang, C.N., G. Blobell and P. Model, 1978. Detection of prokaryotic signal peptidase in an *Escherichia coli* membrane fraction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. **75:** 361-365.
5. Charette, M.F., G.W. Henderson and A. Markovitz, 1981. ATP-dependent protease activity of the *lon* (capR) protein of *Escherichia coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. **78:** 4728-4732.
6. Cheng, Y.E. and D. Zipser, 1979. Purification and characterization of protease III from *Escherichia coli. J. Biol. Chem.* **254:** 4698-2706.
7. Chung, C.H. and A.L. Goldberg, 1981. The product of the *lon* (capR) gene in *Escherichia coli* is the ATP-dependent protease, protease La. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. **78:** 4931-4935.
8. Chung. Ch.H. and A.L. Goldberg, 1982. DNA stimulates ATP-dependent proteolysis and protein-dependent ATPase activity of protease La from *Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. **79:** 795-799.
9. Chung, C.H. and A.L. Goldberg, 1983. Purification and characterization of protease So, a cytoplasmic serine protease in *Escherichia coli. J. Bacteriol.* **154:** 231-238.
10. Chung, C.H. and D.B. Ha, 1984. Isolation and properties of a cytoplasmic metalloendoprotease in *Escherichia coli. Korean J. Zool.* **27:** 199-212.
11. Chung, C.H., L. Waxman and A.L. Goldberg, 1983. Studies on the protein encoded by the *lon* mutation, *capR9,* in *Escherichia coli. J. Biol. Chem.* **258:** 215-221.
12. Davis, D.B. and P.C. Tai, 1980. The mechanism of protein secretion across membranes. *Nature* (London) **283:** 433-438.
13. Dorsett, D., J.M. Flanagan, and K.B. Jacobson, 1982. Biosynthesis, nonenzymatic synthesis, and purification of the intermediate in synthesis of sepiapterin in *Drosophila. Biochemistry* **16:** 3892-3905.
14. Goldberg, A.L. and A.C. St. John, 1976. Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. Part II. *Ann. Rev. Biochem.* **45:** 747-803.
15. Goldberg, A.L., K.H.S. Swamy, C.H. Chung and F.S. Larimore, 1982. Proteases in *Escherichia coli. Methods Enzymol.* **80:** 680-702.
16. Greenwood, F.C., W.M. Hunter and J.S. Glover, 1963. The preparation of $^{131}$I-labeled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* **89:** 114-123.
17. Kowit, J.D. and A.L. Goldberg, 1977. Intermediate steps in the degradation of a specific abnormal protein in *Escherichia coli J. Biol. Chem.* **252:** 8350-8357.
18. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage $T_4$. *Nature* (London) **227:**

680-685.

19. Larimore, F.S., L. Waxman and A.L. Goldberg, 1982. Studies of the ATP-dependent proteolytic enzyme, protease La, from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **257:** 4187-4195.
20. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193:** 265-275.
21. Mount, D.W., 1980. The genetics of protein degradation in bacteria. *Ann. Rev. Genet.* **14:** 270-310.
22. Novak, P., P.H. Ray, and I.K. Dev, 1986. Localization and purification of two enzymes from *Escherichia coli* capable of hydrolyzing a signal peptide. *J. Biol. Chem.* **261:** 420-427.
23. Pacaud, M., 1982. Purification and characterization of two novel proteolytic enzymes in membranes of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **257:** 4333-4339.
24. Park, J.H., Y.S. Lee, and C.H. Chung, 1986. in press.
25. Regnier, P., 1981. The purification of protease IV of *E. coli* and the demonstration that it is an endoproteolytic enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **99:** 1369-1376.
26. Rice, R.H. and G.E. Means, 1971. Radioactive labeling of proteins in vitro. *J. Biol. Chem.* **246:** 831-832.
27. Roberts, J.W., C.W. Roberts and N.L. Craig, 1978. *Escherichia coli recA* gene product inactivates phage repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. **75:** 4714-4718.
28. St. John, A.C. and A.L. Goldberg, 1980. Effects of starvation for potassium and other inorganicions on proteins degradation and ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **143:** 1223-1233.
29. ST. John, A.C., K. Conklin, E. Rosenthal and A.L. Goldberg, 1978. Further evidence for the involvement of charged tRNA and guanosine tetraphosphate in the control of protein degradation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **253:** 3945-2951.
30. Swamy, K.H.S. and A.L. Goldberg, 1981. *Escherichia coli* contains eight soluble proteolytic activities, one of which is ATP-dependent. *Nature* (London) **292:** 652-654.
31. Swamy, K.H.S. and A.L. Goldberg, 1982. Subcellular distribution of various proteases in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **149:** 1027-1033.
32. Swamy, K.H.S., C.H. Chung and A.L. Goldberg, 1983. Isolation and characterization of protease Do from *Escherichia coli*, a large serine protease containing multiple subunits. *Arch. Biochem. Biophys.* **224:** 543-554.
33. Voellmy, R. and A.L. Goldberg, 1980. Guanosine-5′-diphosphate-3′-diphosphate (ppGpp) and the regulation of protein breakdown in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **255:** 1008-1014.
34. Weisberg, E.P. and J.M. O'Donnell, 1986. Purification and characterization of GTP cyclohydrolase I from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **261:** 1453-1458.
35. Wickner, W., 1979. The assembly of proteins into biological membranes; the membrane trigger hypothesis. *Ann. Rev. Biochem.* **48:** 23-45.
36. Yim, J.J. and G.M. Brown, 1976. Characteristics of GTP cyclohydroase I purified from *E. coli*, *J. Biol. Chem.*, **251:** 5087-5094.

**(Received May. 15, 1986)**