

고도 호열성균 *Thermus caldophilus* 의 Adenylate Kinase 의 성질

기우경* · 太田 隆久¹

경상대학교 식품공학과, ¹동경대학 농학부

Characteristics of Adenylate Kinase from Extreme Thermophile *Thermus caldophilus* GK-24

Ki, Woo-Kyung* and Takahisa Ohta¹

Department of Food Sci. & Tech., Gyeongsang National Univ. Jinju 660-300, Korea

¹Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, The Univ. of Tokyo, Japan

A thermostable adenylate kinase isolated from the sonic extracts of *Thermus caldophilus* cells revealed higher substrate-specificity to the nucleoside monophosphate than to the nucleoside triphosphate. A p1, p5-di(adenosine-5') pentaphosphate was acted as a competitive inhibitor to the various substrates. Various divalent cations were activated the enzyme activity following orders: Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Ba²⁺, and Fe²⁺. The enzyme activity was not affected by the sulfurhydryl reagent, p-chloromeric uribenzoic acid and activated by addition of the sodium chloride or phosphoenol pyruvate to the reaction mixture.

Adenylate kinase 는 생체내의 ATP, AMP, ADP 의 평형에 관련되는 효소로서 (1), 고등 진핵생물의 경우 mitochondria 나 근육형 효소 등 (2-4)으로 많은 연구가 되어 왔으나, 같은 진핵생물이지만 제빵용 효소의 경우 동위효소가 발견되지 않고 있다. 또한 Noda(1)는 효모의 adenylate kinase 는 oligomer 의 단백질로 추측하였으나 그 후 Yasuno 등(5, 6)에 의하여 monomer 의 효소로 밝혀졌다. 세균 adenylate kinase 에 관한 연구는 최근 정제기술의 향상에 의해 *Esherichia coli* (7, 8), *Mycobacterium marinum* (9), *Mycobacterium leprae* (10), *Paracoccus denitrificans* (19) 등에서 연구된 바 있으나 정제된 효소의 양이 적어 상세한 연구는 이루어지지 않고 있다. 이에 본 보에서는 전보(11)에 이어 고온에서 서식하는 *Thermus caldophilus* 의 여러 효소학적 특성에 대해 보고한다.

재료 및 방법

효소활성 측정법

Key words: Adenylate kinase, *Thermus caldophilus*

*Corresponding author

측정법 1: 기질이 adenosine monophosphate 와 adenosine triphosphate 혹은 adenosine diphosphate 일 경우 pyruvate kinase 또는 lactate dehydrogenase 의 반응에 영향을 미치지 않을 경우에서의 효소활성 측정은 전보(11)와 같이 pyruvate kinase (4 units)와 lactate dehydrogenase (10 units)를 이용한 coupling enzyme 반응, 즉 adenosine monophosphate + adenosine triphosphate → 2 adenosine diphosphate 반응에서 2 mM 의 adenosine diphosphate 가 생성되는 것을 이용하여 1 초간에 생성되는 adenosine diphosphate 의 양을 효소활성 1 Katal 로 나타내었다.

측정법 2: 기질이 adenosine monophosphate 와 adenosine triphosphate, adenosine diphosphate 가 아닌 경우와 금속이온의 영향을 검사할 경우는 (¹⁴C) adenosine monophosphate 혹은 (¹⁴C) adenosine diphosphate 를 측정하였다. Radio isotope (이하 RI 라 표시한다) 분석은 (¹⁴C) adenosine monophosphate 혹은 (¹⁴C) adenosine triphosphate 를 0.1~0.4 μCi 를 사용하였으며 50°C에서 반응시키고 polyethyleneimmuno-cellulose 로 전개시킨 후 전보(11)와 같은 방법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

기질 특이성

Thermus 효소의 기질 특이성은 Table 1에서 보는 바와 같이 다른 기원 효소와 같이 nucleoside monophosphate에 대해서는 높은 기질 특이성을 보여준데 반하여 nucleoside triphosphate에는 넓은 기질 특이성을 보여 주었다. Nucleoside-monophosphate에서는 dAMP만이 50% 활성을 나타내었다. 그외 ITP, GTP, UTP에 대해서도 10~13%의 활성을 보여주었다. 이 결과는 *E. coli*(14)의 경우와 같은 경향을 보였으나 *Vibrio notriengenus*(15) 및 *Thiobacillus novellus*(18)와는 다른 결과를 나타내었다.

2가 금속이온의 영향

본 효소활성이 2가 금속이온에 대한 영향을 조사한 결과는 Table 2에서와 같이 Mg^{2+} 에 있어서는 높은 활성을 보였으며, Co^{2+} 는 Mg^{2+} 에 비하여 90%의 활성을 보였다. 그외 Ca^{2+} 는 75%, Mn^{2+} 은 70% 등 높은 활성치를 나타내었다. 또한 반응액 중에 금속이온을 첨가하지 않았을 경우는 18% 활성을 보여주었다. 25mM EDTA를 가할 때는 활성은 나타나지 않았다. 반응온도를 80°C로 할 경우 2가 금속이온을 첨가하지 않을시의 활성은 Mg^{2+} 첨가시에 비하여 18%의 활성밖에 보여주지 않았다. 이것은 효소가 금속이온 혹은 ATP 금속이온 복합체에 대하여 강한 친화력을 가지는 것으로 생각된다. 세균의 균체 효소로서 금속이온 요구성을 조사한 *Thiobacillus novellus*(18)와 같이 Mg^{2+} 이외의 다른 2가 양이온 요구성이 있는지 여부는 세균효소가 Mg^{2+} 이외의 어떠한 2가 양이온을 효소반응에 영향을 미치는지 또는 *Thermus caldophilus*의 adenylate kinase가 진핵생물의 mitochondria 기원의 adenylate kinase와 더 유사성이 있는지, 근육기원 adenyle kinase와 더 가까운지 판단하기 곤란하나 Co^{2+} 에 대한 높은 활성을 가지는 것은 효모, 소의 심장 mitochondria(1)와 간장에서 유래된 효소(12)와 같은 경향을 나타내었다. 본 효소가 Ca^{2+} 에 높은 활성을 가지는 것은 동물 근육 효소에서 여러 방법으로(19, 20) 확인한 효소-기질-금속염의 결합 형태로 해석된다. 이는 근육 효소보다 mitochondria 효소에 가까운 성질이였다.

Adenosine monophosphate에 의한 저해

일반적으로 adenylate kinase는 고농도의 AMP나 $MgATP$ 에 대하여 길항적으로 저해한다고 보고되고 있

Table 1. Substrate specificity of adenylate kinase from *Thermus caldophilus* GK-24 and other bacteria.

¹⁴ C labeled	unlabeled	Relative activity (%)			
		<i>Thermus caldophilus</i>	<i>E. coli</i> (13)	<i>Vibrio natrigens</i> (12)	<i>Thiobacillus neapolitans</i> (10)
AMP	ATP	100	100	100	100
AMP	dATP	75.2	150	44.5	—
AMP	CTP	24.4	20	—	0
AMP	UTP	10.7	16	—	—
AMP	ITP	12.5	12	0	0
AMP	GTP	12.3	7	0	0
ATP	dAMP	50	200	45.9	—
ATP	CMP	0	0	0	0
ATP	UMP	0	0	0	0
ATP	IMP	0	0	0	0

The reaction mixture contained 1 mM AMP, 1 mM ATP, 70 mM Tris-HCl buffer, 0.8 μ Ci nucleotide and 0.17 μ g enzyme per ml of various nucleotide triphosphates. 1.7 μ g of enzyme was added in the reaction with GMP, CMP or IMP.

Table 2. Effect of divalent cations on the reaction of adenylate kinase.

Metal ions	Relative activity (%)	
	<i>Thermus</i>	<i>Thiobacillus</i> (10)
Mg^{2+}	100	100
Co^{2+}	90.3	46
Ca^{2+}	74.5	—
Mn^{2+}	69.8	26
Fe^{2+}	22.3	—
Sn^{2+}	24.2	—
Ba^{2+}	38.5	—
Ni^{2+}	38.5	—
not added	18.5	20

The activities were measured at 50°C by radiochemical method. The reaction mixture contained 1 mM metal chloride, 1 mM AMP, 1 mM ATP, 70 mM Tris-HCl buffer, 0.8 μ Ci AMP.

다(20, 25). 본 효소의 경우 Fig. 1에서와 같이 고농도의 AMP는 강한 저해를 나타내었지만 $MgATP$ 에 관해서는 저해를 나타내지 않았다.

반면 ADP 및 $MgADP$ 가 기질일 경우 AMP는

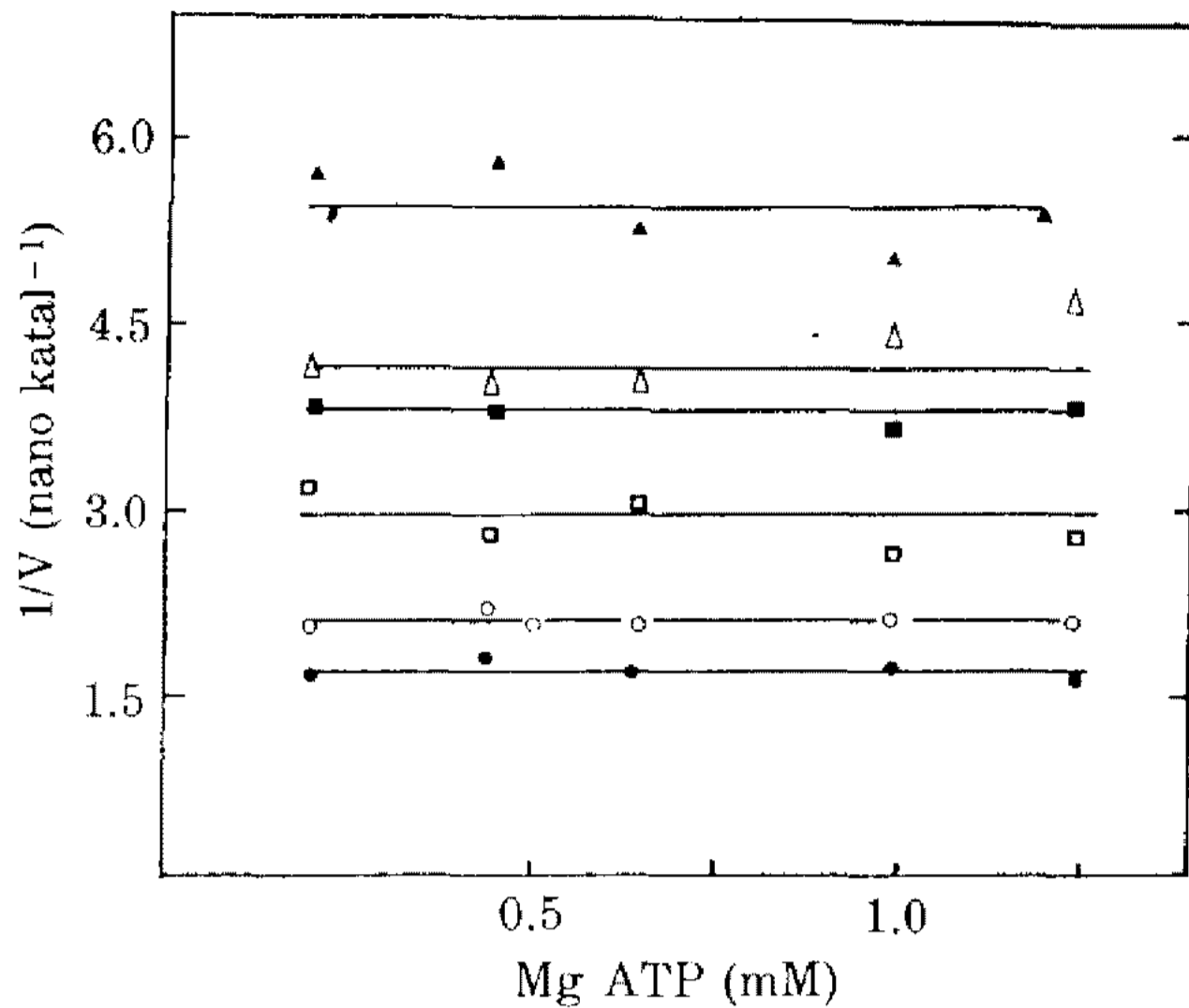


Fig. 1. Substrate inhibition by AMP in the reaction of ADP production.

Concentrations of AMP were as follows 5 mM (▲); 3 mM (△); 2 mM (□); 1 mM (■); 0.5 mM (○); 0.19 mM (●).

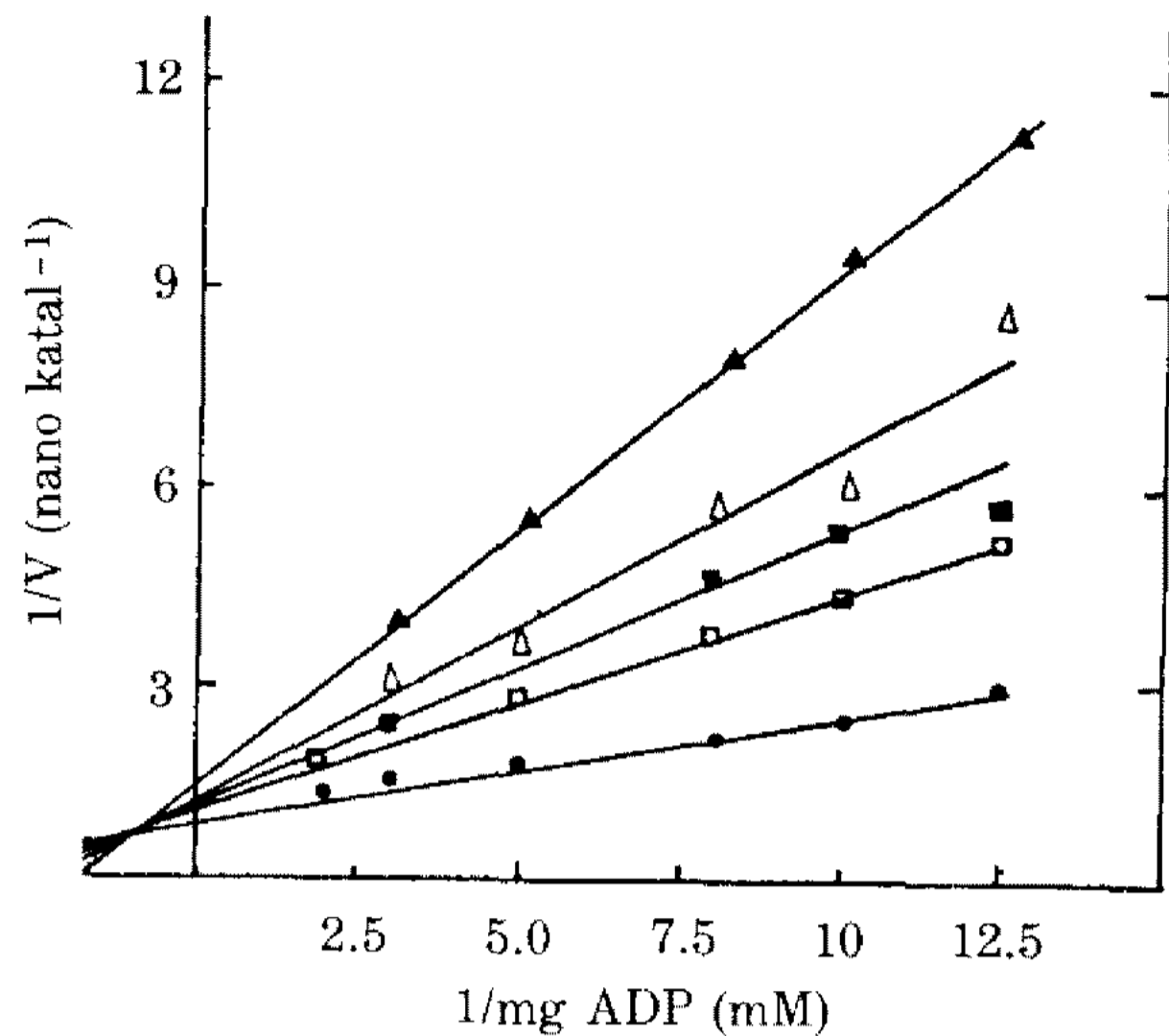


Fig. 3. ADP inhibition of adenylate kinase in AMP production.

The ATP concentration was kept constant at 0.1 mM. The concentrations of AMP were 0.6 mM (▲); 0.45 mM (△); 0.3 mM (■); 0.23 mM (□); not added (●).

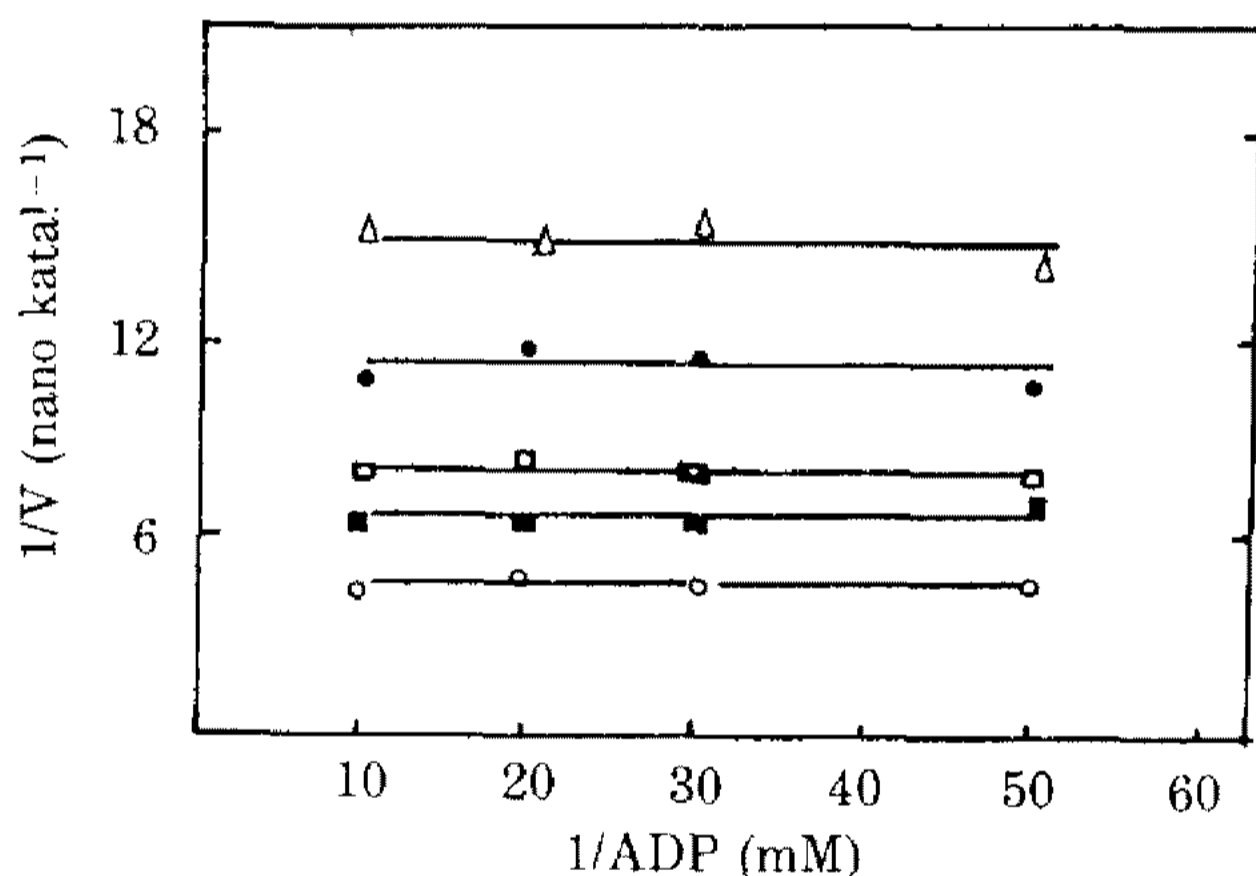


Fig. 2. AMP inhibition of adenylate kinase in ADP production.

The Mg-AMP concentration was kept constant at 2 mM. The concentration of AMP were 0.6 mM (△); 0.4 mM (●) and 0.1 mM (■) without AMP (○).

MgADP에 대하여 부분적인 길항적($K_i=6.7$ mM), ADP에 대해서 ADP 농도에 의존하지 않는 저해를 나타내었다(Fig. 2, 3).

지금까지 보고된 adenylate kinase가 고농도의 AMP에 MgATP 및 MgADP에 대하여 길항적으로 AMP가 MgATP 결합부위에 약하게 작용하여 결합한다고 설명되어져 왔다(1, 13, 15). 따라서 본 효소에 있어서는 다른 AMP 결합부위의 존재를 예측하였다.

P',P⁵-di(adenosine-5')pentaphosphate(이하 AP₅A로 표시)에 의한 저해(24)

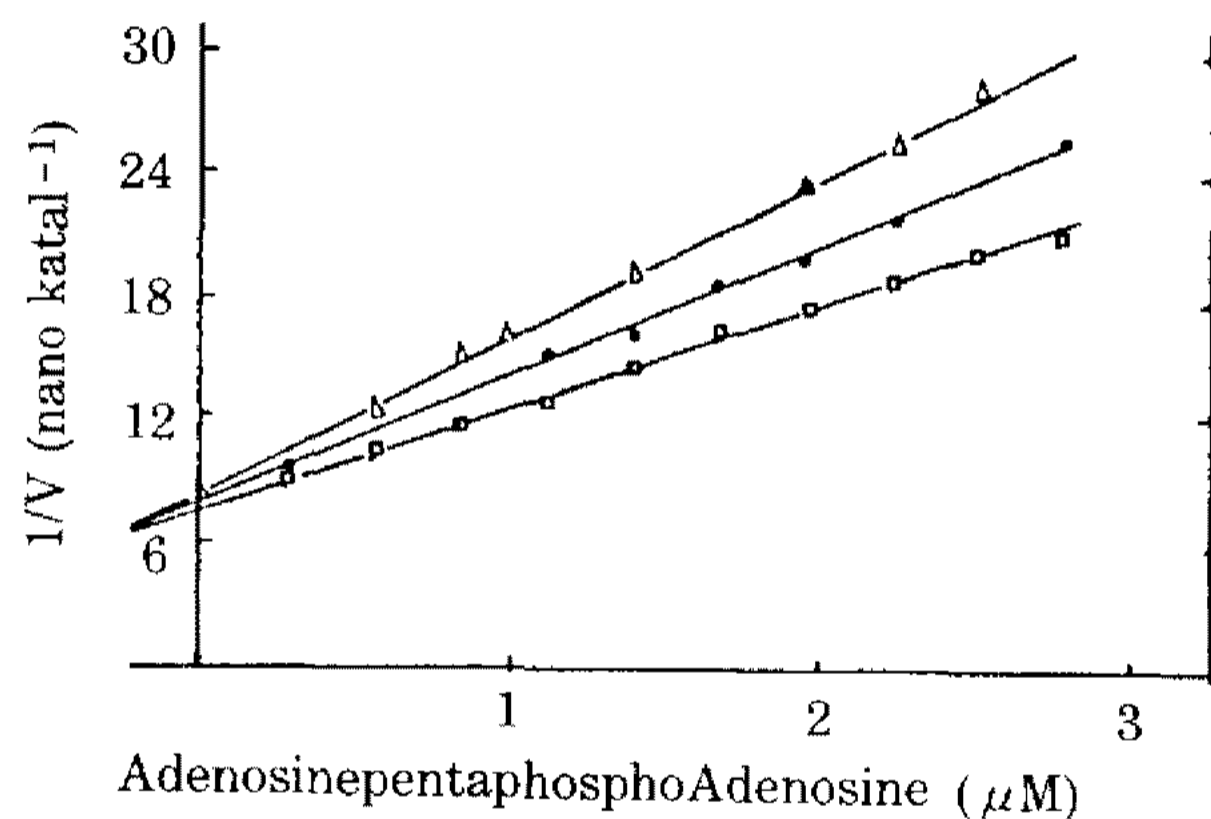


Fig. 4. Inhibition of adenylate kinase activity by p1, p5-di(adenosine-5')pentaphosphate in ADP production.

The ATP concentration was kept constant at 1 mM. The concentration of AMP were 0.08 mM (□); 0.1 mM (●); 0.12 mM (△).

AP₅A는 Fig. 4~6에서와 같이 실험한 모든 기질에 대하여 길항적인 저해를 나타내었으며, 그 저해상수는 ATP을 기질로 사용했을시 0.15 μM AMP; 0.65 μM, ADP; 0.65 μM로 각각 나타났다. 저해상수는 근육형 효소(1, 21)의 경우보다는 높았으며, 일반적인 mitochondria형 효소보다는 낮았다. *Staphylococcus aureus* 305A의 효소는 *E. coli* HRE 600의 효소보다 약 70 배로 AP₅A에 대하여 감수성이 있다는 보고(22)을 생각해 보면 세균효소의 AP₅A에 대한 감수성은 진핵생물과는 크게 다른 성질을 가지고 있다고 사료된다.

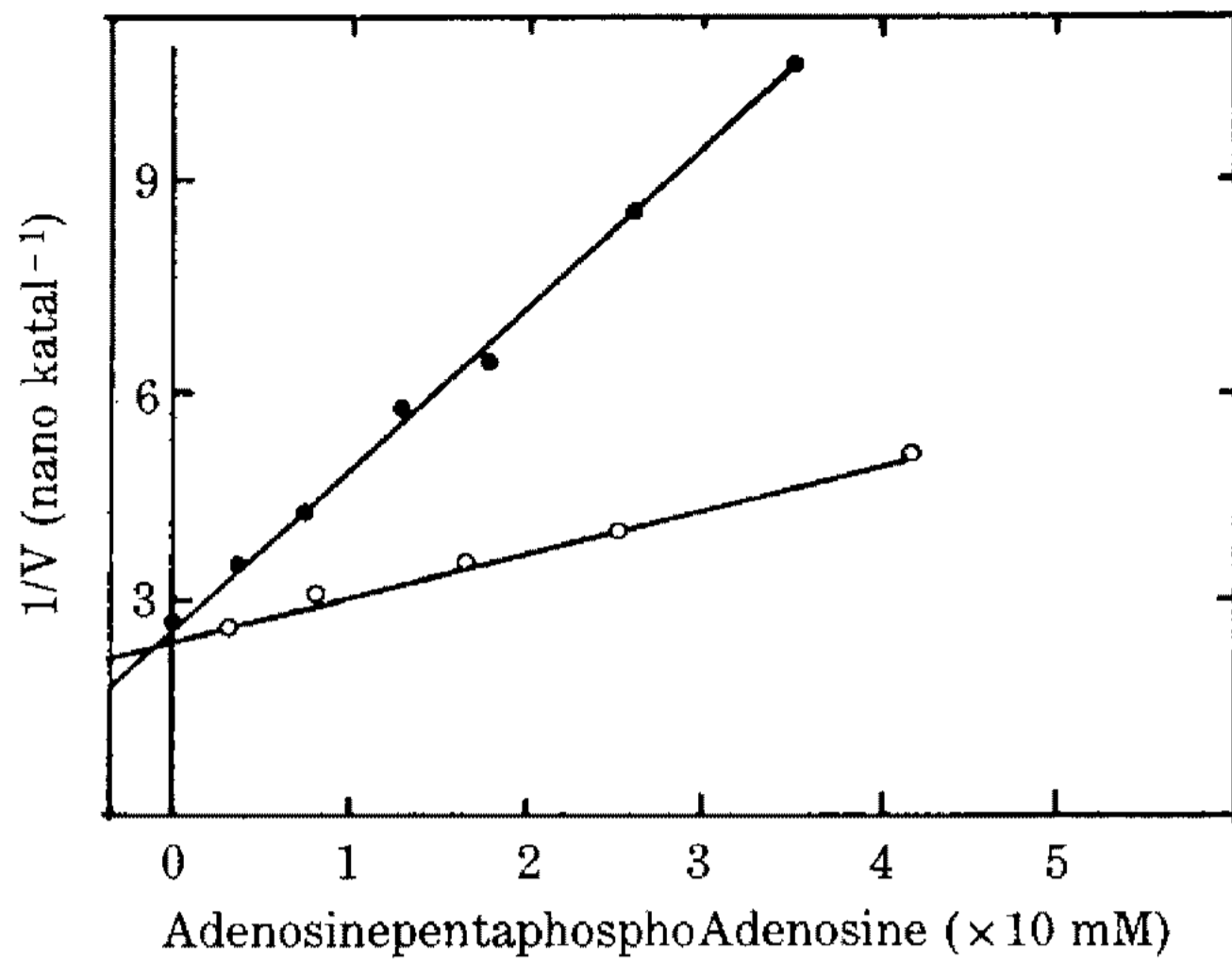


Fig. 5. Inhibition of adenylate kinase activity by p1, p5-di(adenosine-5')pentaphosphate in ADP production. The concentrations of ATP were as follows: 0.5 mM (○—○); 0.2 mM (●—●).

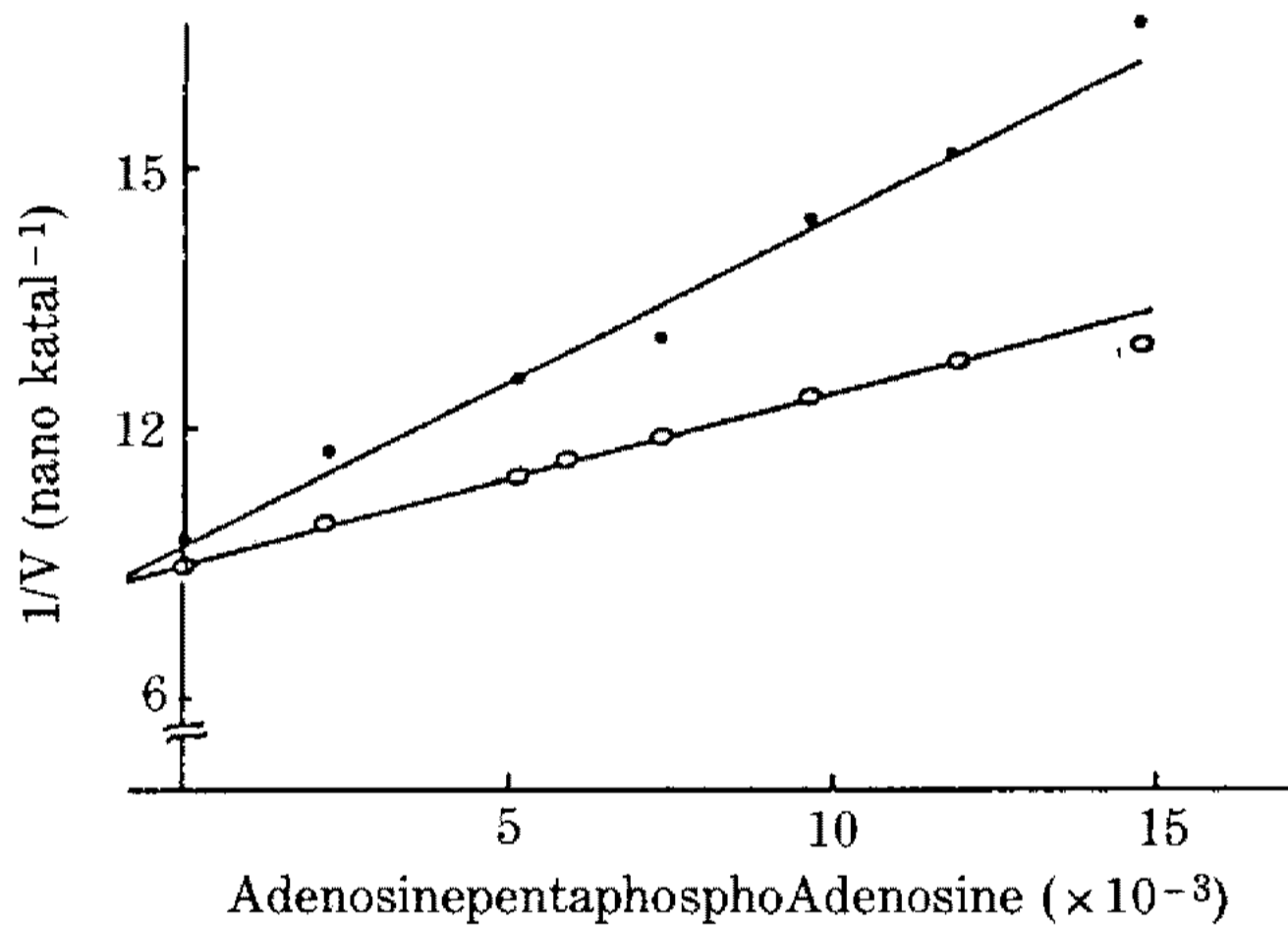


Fig. 6. Inhibition of adenylate kinase activity by p1, p5-di(adenosine-5')pentaphosphate in the production of ADP and ATP. The ADP concentrations were as follows: 1 mM (○—○); 2 mM (●—●).

Sulfurhydryl 시약의 영향

Thermus 효소는 각각 1mM MgCl₂, AgNO₃, IC H₂COOH, parachloromucibenzonate 을 50°C에서 1시간 처리하여도 효소의 활성을 잃지 않았다. SH 시약에 의한 효소의 실활은 동물효소 분류에 중요하지만 세균의 경우 *Rhodospirillum rubium* (22), *Vibrio natriegenus* (25), *Thiobacillus novellus* (18)에서는 SH에 대하여 감수성이 있었고 *Pseudomonas* (26)군에서는 SH 시약에 대하여 비감수성이었다고 보고되었다. 즉 세균효소의 경우는 동물효소의 분류기준에 맞지 않는다고 사료된다.

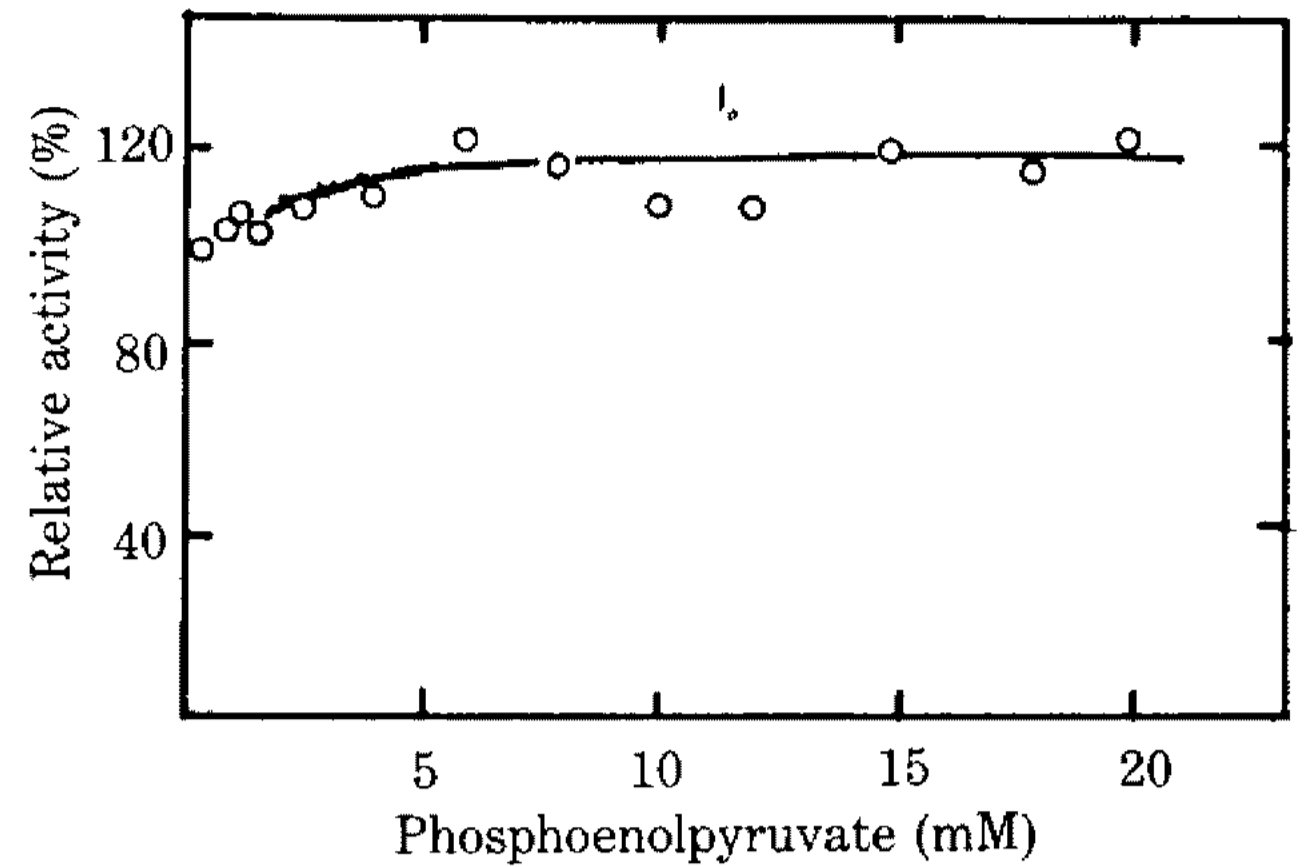


Fig. 7. Effect of phosphoenol pyruvate on the adenylate kinase activity

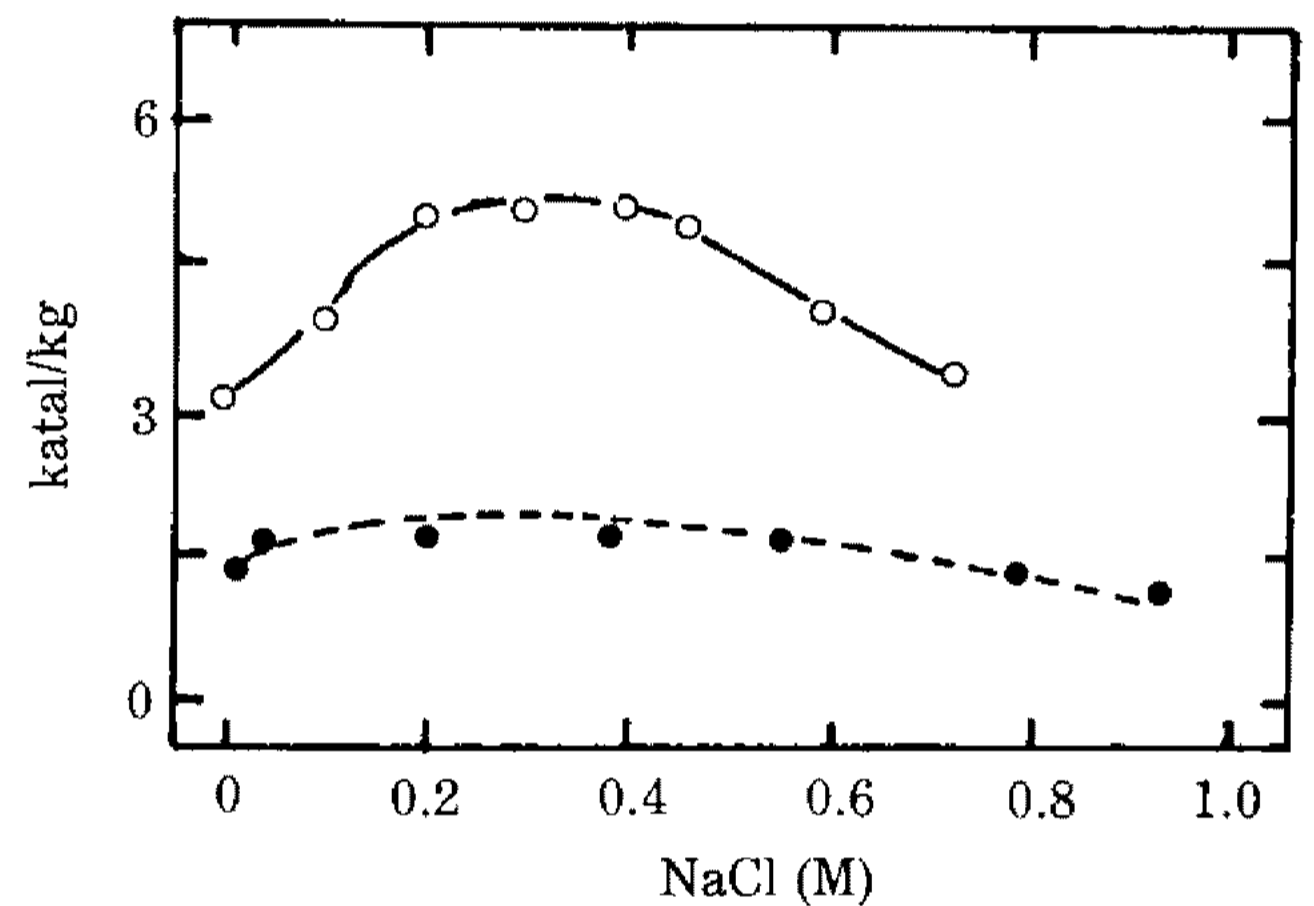


Fig. 8. Effect of NaCl on the adenylate kinase activity. Forward reaction (ADP formation), ○—○; reverse reaction (AMP and ATP formation), ●—●. All the substrate was prepared with KOH insted of NaOH.

Phosphoenol pyruvate(이하 PEP로 표시) 및 기타 대사중간물의 영향

PEP는 동물기원 효소 중 mitochondria형 효소에 대하여 저해제로서 작용한다는 보고가 있지만(27,5), 본 효소의 경우 오히려 약 20%의 높은 효소활성을 나타내었다(Fig.7). PEP에 대한 현재까지 연구에서는 활성화가 보고되지 않았기 때문에 이것이 본 효소의 특성이므로 생각된다. *Thiobacillus novellus* (18) 효소의 경우 PEP 1.0mM에 대하여 30% 저해를 받았고 glucose-6-phosphate (K_i=0.06 mM), CoA (0.3 mM에서 30%), acetyl-CoA (0.3 mM에서 40%), 3-phosphoglycorate (1 mM에서 27%)로 저해를 받는다는 보고가 있는데 비해서 본 효소의 경우는 acetyl CoA (1 mM), glucose-6-phosphate (3 mM), CoA (1.5 mM), 3-phosphoglycorate (1 mM)에서는 전혀 저해를 받지 않았다.

NaCl의 영향

본 *Thermus* 효소는 정반응(ADP 생성반응)은 0.2~0.5M NaCl에 의하여 크게 활성화가 일어났다. 또 역반응에 있어서는 약간 활성화되었다(Fig. 8). 이와 같은 활성화는 KCl에서는 나타나지 않았다. NaCl에 의한 활성화는 효모 효소(14) 및 소 심장 mitochondria 효소(5)에서도 보고된 바가 있다.

요 약

내열성 *Thermus caldophilus*로부터 정제된 내열성의 adenylate kinase는 nucleoside monophosphate에 대해 nucleotide triphosphate보다 높은 기질 특이성을 보여 주었다. P',P⁵-di(adenosine-5')pentaphosphate는 여러 기질에 있어 *Thermus*의 adenylate kinase에 대해 경쟁적 저해제로서 작용하였다. Mg²⁺ 이외 여러 가지 2가 양이온은 Ca²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺, Fe²⁺ 순위로 효소활성에 필요하였으며, 효소활성은 p-chloromucuribenzoic acid와 같은 sulfurhydryl 시약에 저해되지 않았으며, 식염이나 phosphoenolpyruvate을 반응액에 첨가하였을 때 활성화되었다.

참고문헌

- Noda, L.: In the enzymes (Boyer, P.D. ed), Vol. 8, 279 (1973).
- Frank, R., M. Trosin, A.G. Tomasselli, L. Noda, S.R. Krauth and R.H. Schirmer: *Eur. J. Biochem.*, **154**, 205 (1986).
- Maker, H.S., C. Weiss and T.S. Brannan: *Neuropharmacology.*, **25**, 25 (1986).
- Kupriyanov, V.V., J.A. Ferretti and R.S. Balaban: *Biochem. Biophys. ACTA.* **869**, 107 (1986).
- Yasuzo, I.T.T., A.G. Tomasselli and L. Noda: *Eur. J. Biochem.* **105**, 85 (1980).
- Tomasselli, A.G., E. Mast, W. Janes and E. Schiltz: *Eur. J. Biochem.* **155**, 111 (1986).
- Brune, M., R. Schumann and F. Wittinghofer: *Nucleic Acid. Res.* **13**, 7139 (1985).
- Monnot, M., A.M. Gilles, I. Saint-Girons, S. Michelson, O. Barzu and S. Femandjian: *J. Biol. Chem.* **26**, 2502 (1987).
- Prem, T.D., D.N. Barry and T. Kunio: *Biochem. Biophys. ACTA.* **869**, 350 (1986).
- Lee, Y.N. and M.J. Colston: *J. Gen. Microbiol.* **132**, 561 (1986).
- 기우경, 太田 隆久: 산업미생물학회지, **16**(5), 393(1988).
- Morrison, J.F. and E. Heyde: *Anna. Rev. Biochem.* **41**, 29 (1972).
- Pai, E.F., W. Sachsenheimer, R.H. Schirmer and G.E. Schulz: *J. Mol. Biol. Biol.* **114**, 37 (1977).
- Holmes, R.K. and M.F. Singer: *J. Biol. Chem.* **248**, 2014 (1973).
- Mckellar, I.R.C., A.M. Charles and B.J. Butler: *Arch. Microbiol.* **124**, 275 (1980).
- Martin, K., P. Meinard, G. Naj and K. Martin: *FEB* **244**(2), 427 (1989).
- Peterspurgin, A.G. Tomasselli and S. Emile: *Eur. J. Biochem.* **179**, 621 (1984).
- Mazzotta, M.Y. and E.J. Johnson: *Biochem. Biophys. Acta.* **321**, 512 (1973).
- Dunaway-Mariano, D. and W.W. Cheland: *Biochem.* **19**, 1506 (1980).
- Reed, G.H. and M. Cohn: *J. Biol. Chem.* **245**, 6547 (1970).
- Font, B. and D.C. Gautheron: *Biophys. Acta.* **611**, 299 (1980).
- Yang, H.S and M.C. Archer: *Experimentia.* **34**, 702 (1978).
- Brune, M., R. Schumann and F. Wittinghofer: *Nucleic Acid. Res.* **13**, 7139 (1985).
- Muller, C.W. and G.E. Schulz: *J. Mol. Biol.* **202**, 909 (1988).
- Ramotar, K and M.A. Pickard: *Ca. J. Microbiol.* **27**, 1053 (1981).
- Terai, H.T.: *Biochem. J.* **75**, 1027 (1987).
- Hamada, M. and S.A. Kuby: *Arch. Biochem. Biophys. Acta.* **190**, 772 (1978).
- Lafayette, H. Noda: The enzymes (Academic Press) 79 (1973).
- Spurgin, A.G. Tomasselli and S. Emile: *Eur. J. Biochem.* **179**, 621 (1989).

(Received May 12, 1990)