

*Escherichia coli*에 존재하는 ATP-의존성 Clp 효소의 안정성 및 특성

김승호 · Michael R. Maurizi¹

한국과학기술연구원 유진공학연구소 단백질화학실 ¹미국 국립보건원 암연구소

계면활성제 특히 Triton X-100의 첨가에 의해 ATP-의존성 효소의 subunit인 Clp P의 안정도를 높이고, 염의 첨가에 의한 효소활성의 유지정도와 Clp P효소에 대한 생화학적 성질을 조사하였다. Clp A가 가지고 있는 ATPase활성을 나타내기 위하여서는 Clp P의 단백질분해 효소활성이 요구되며 Clp효소의 다량체형성을 조사한 결과 ATP가 존재하지 않을 경우에는 Clp A와 Clp P효소가 각각 용출하였으며 ATP 및 Mg를 첨가하였을 때에는 complex를 형성하여 분자량이 600,000이상으로서 Clp P효소는 Hexamer로서 효소활성을 나타내며 Clp A와 Clp P의 다량체형성이 요구되고 형성시에 ATP가 관여하고 있는 것으로 나타났다.

KEY WORDS □ ATP-dependent protease, *E. coli*.

세포 내에서 비정상적으로 형성된 단백질이나 불필요한 펩타이드는 세포 내에 존재하는 단백질 분해 효소에 의하여 분해되는 대사과정을 거치게 되는데 활성을 나타내기 위한 에너지원으로 ATP를 필요로 하는 이러한 분해효소는 원핵이나 진핵세포 내의 단백질 순환에 중요한 역할을 담당하고 있다(3, 4). ATP-의존성 분해효소 중 *Ti*라고도 불리는(5, 6) Clp 효소(Caseinolytic protease: Clp)가 세포 내에서 단백질들을 분해하는데 관여한다는 사실이 *E. coli*에서 처음 발견된 이후(1, 9) 많은 연구가 수행되고 있는데, Clp효소는 Clp A와 Clp P의 2가지 subunit가 서로 결합하여 효소활성을 나타낸다(7). 분자량이 83,000 daltones으로 ATPase 활성을 가지고 있는 Clp A는 *E. coli*의 유전자 지도상에서 19 min에 위치하며 Clp A의 변이체는 canavanine을 함유하는 단백질의 분해에 작용한다고 보고되었으며(8), 여러 원핵생물이나 진핵생물의 조직에서도 발견되었다(2). ATP-의존성 효소의 또 다른 subunit인 Clp P는 *E. coli*의 지도상에서 10 min에 위치하는 것으로 또 다른 ATP-의존성 효소로서 알려진 Lon효소와 가까운 위치에 존재하고 있으나, 분자량이 23,000 정도로 여러 세포에 넓게 분포되어 있으며 식물의 chloroplast에도 존재한다고 알려져 있다(10). Serine계 단백질분해효소의 저해제로서 잘 알려져 있는 diisopropylfluorophosphate(DFP)에 의해 Clp P의 casein에 대한 단백질 분해능력이 상실되며(5), Clp A가 존재하지 않는 상태에서 Clp P만으로도 fluorogenic 펩타이드결합이 분해된다는 결과와 함께 serine계열의 효소로 알려지고 있다(10, 11). 그러나 이러한 ATP-의존성 분해효소인 Clp P는 실온에서 매우 불안정하여 반감기가 짧아 세포 밖에서의 생화학적 특성을 연구

하는데 많은 어려움이 따르고 있다. 따라서 본 연구에서는 이러한 단백질 분해효소인 Clp P의 안정도를 높이는 조건을 조사하고, Clp P효소 활성면의 몇 가지 생화학적 특성을 재검토하였다.

재료 및 방법

재료

Tris-HCl은 Bethesda Research Laboratories에서 공급받았으며, Mono Q, Mono S, DEAE sephacel은 Pharmacia 회사 제품, Bio-Gel TSK-DEAE-5PW 및 TSK 250 컬럼은 Bio Rad 회사 제품을 사용하였으며 그 밖의 여러 시약들은 특급품을 구입하여 사용하였다.

Clp P의 분리정제

본 실험을 하기 위하여 활성을 갖는 Clp P(P효소)의 정제는 Maurizi 방법(10)에 따라 P효소가 발현되는 *E. coli*를 Luria broth를 이용하여 600 nm에서의 흡광도가 2.0되게 배양시킨 다음 사용할 때까지 -70°C에서 보관하였다. 완충액 B용액(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol, 10%(v/v) glycerol) 100 ml에 *E. coli* 30g을 현탁시킨 다음, French Press를 이용하여 20,000 psi에서 세포를 파괴시켜 얻어진 용액을 30,000×g에서 30분간 원심분리하였다. 원심분리하여 얻어진 수용액에 0.16% (w/v)되도록 polyethyleneimine을 넣어준 다음 20분간 방치하였다. 원심분리하여 얻어진 침전물을 완충액 B용액으로 다시 녹인 다음 phosphocellulose, DEAE-sephacel, Mono Q, Mono S 컬럼을 이용하여 순수하게 분리정제 하였으며, SDS 전기영동으로 확인한 다음 실험에 사용하였다. DFP를 처리한 P효

소는 FPLC에 의하여 순수하게 분리된 P효소 nmol당 [³H]DFP를 1 nmol 정도되도록 넣어주고 실온에서 3시간 동안 방치한 다음 미리 냉각시킨 아세톤을 넣어 P효소를 침전시켰다. 침전된 P효소를 0.2 M KCl이 함유된 완충액 B용액으로 다시 녹인 다음 Bio Gel P-10으로 겔여과를 통하여 얻어진 분획 중에서 DFP-P효소를 SDS 전기영동으로 확인하고 소실된 Clp P의 단백질 분해능력을 분석한 후 실험에 사용하였다.

Clp A의 분리 정제

Clp A(A효소)의 분리정제는 P효소의 분리정제시 사용된 것과 유사한 방법인 Katayama 방법(7)에 따라 phosphocellulose와 DEAE-5PW column(7.5×75 mm)을 이용하여 분리 정제하고 SDS 전기영동법으로 확인하고 ATPase활성능력을 측정한 후 실험에 사용하였다.

효소 활성 측정

Clp 효소활성 측정은 Katayama 방법(7)에 따라 casein 분해능력으로 측정하였다. 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM MgCl₂의 용액에 24 μg(약 60,000 cpm에 해당)의 [methyl-³H]methyl casein과 4 mM ATP를 넣은 후 용액에 P효소를 일정량 넣어준 즉시 A효소를 일정량 넣어준 다음, 효소활성 측정용액을 최종부피 0.5 ml이 되도록 가하여 37°C에서 60분간 방치시켰다. 반응이 끝난 후 반응액에 50% trichloroacetic acid(TCA)를 60 μl를 넣어 반응을 종료시킨 후, carrier로서 1%(w/v) bovine serum albumin을 40 μl 넣어준 다음 원심분리하여 얻어진 상등액 중 0.5 ml를 취하였다. Aquasol 10 ml에 반응 종료된 상등액 0.5 ml를 넣어 scintillation counter(Beckman model LS 3801)로 측정하였다. ATPase 활성측정은 casein 분해측정시 사용한 용액(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM MgCl₂)에 50 μg의 methylated casein과 1.6 mM [γ -³²P]ATP(specific activity 200 dpm/pmol에 해당)를 넣고 P 및 A효소를 일정량 첨가한 후 37°C에서 10분, 혹은 30분간 방치하였다. 반응 후 미리 냉각시켜둔 TCA가 10% 되도록 넣어 반응을 종료시키고 얻어진 침전물은 TCA와 아세톤으로 잘 세척한 후 SDS 전기영동과 scintillation counter를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

Clp P의 안정성

P효소에 Table 1에 표시되어 있는 물질들을 각각 첨가하고 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 방치 후 잔존하는 P효소의 효소활성을 측정하기 위하여 방치한 용액에 충분한 활성을 나타내도록 A효소를 첨가한 후 ³H-casein의 분해능력을 측정하고 결과 Triton X-100이나 NP-40와 같은 계면활성제의 농도 변화를 5%까지 증가시켰을 경우에도 P효소의 casein 분해활성은 거의 그대로 유지되었으나 그 외의 경우는 casein에 대한 효소활성이 감소하거나 소멸되었다

Table 1. Effect of various reagents on the Clp P proteolytic activity.

reagent	concentration in reaction mixture	% activity
ATP, Mg	4 mM, 25 mM	100
Mg	25 mM	40
Triton X-100	0.1%	112
NP-40	0.1%	101
Acrylamide	0.1%	67
KCl	0.2 M	66
DNA	0.1 μg	0
tRNA	0.1 μg	0

Assays were carried out as described in material and methods.

The activities seen with ATP and Mg were expressed at 100%.

(Table 1). 결과는 보이지 아니하였으나 Table 1에 나타나 있는 물질과 polyguanylic uridylic acid을 각각 첨가하고 방치한 후 SDS 전기영동한 결과, 이들 물질에 의하여 P효소활성의 변화에 따르는 band의 소멸이나 감소현상은 관찰되지 않았다. P효소의 분리정제 과정에 있어 0.1%의 Triton X-100의 첨가로 P효소의 정제 수율이 증가되었으며, Triton X-100이 함유되지 않았을 경우에는 시간이 지남에 따라 즉시 활성이 소멸되었다. 한편 P효소에 0.1%의 Triton X-100이 포함되어 있는 경우에는 실온에서 하루밤을 방치한 후에 활성을 측정해 본 결과에서 Clp효소의 활성을 상당량 보유하고 있었다. Triton X-100과 NP-40에 의하여 P효소의 실온에서의 안정성을 증가시킬 수 있었으나, 이러한 계면활성제가 ATP-의존성 효소에 대하여 어떠한 메커니즘에 의하여 P효소의 활성을 유지하도록 하는지(혹은 안정성을 높이는지) 앞으로 연구되어야할 과제이다. P효소가 활성을 나타내기 위해서는 A효소에 먼저 ATP가 결합하고 여기에 필요하면 A효소와 P효소의 결합이 형성되는 과정에 ATP가 A효소에 결합하기 위한 기본구조가 유지되어야 한다. 또한 P효소와 A효소가 결합함으로써 효소활성이 더욱 크게 발현되고있는 과정에서(8), Triton X-100와 같은 계면활성제가 P효소 자체의 다량체 형성을 위한 삼차원적인 구조변화를 야기하고, 그 결과 A효소에 ATP가 결합되도록 A효소의 구조적 변화나 분해효과를 높여줌으로서 Clp의 효소활성을 유지시켜 준다고 생각된다.

염의 효과

효소액에 여러가지 염을 첨가하여 P효소활성을 측정 한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. P효소는 Na⁺, K⁺, Li⁺과 같은 이온성 염에서는 0.1M 농도까지 효소 활성이 증가되었으며 그 이상의 농도에서는 농도가 증가함에 따라 효소활성이 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 이온의 효소활성에 미치는 영향을 나타내었다. 이러한 이온의 효소활성에 미치는 영향을 달리 potassium acetate에 의해서는 0.4M 농도까지 증가시켰을 경우에도 다른 염의 효과에 비하여 P효소활

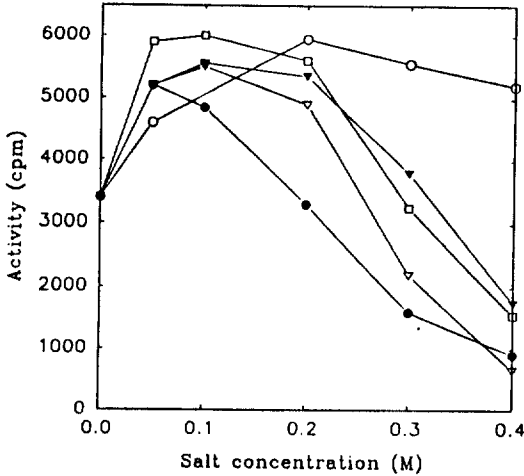


Fig. 1. Effect of salt on Proteolysis activity of Clp protease. Standard assay solutions(50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 25 mM MgCl₂, 4 mM ATP) containing 24 µg of casein and Clp protease (Clp A and Clp P) were incubated for 10 min at 26°C with varying amounts of salt as potassium acetate (○), sodium chloride (▼), potassium chloride (□), potassium sulfate (●) and lithium chloride (▽).

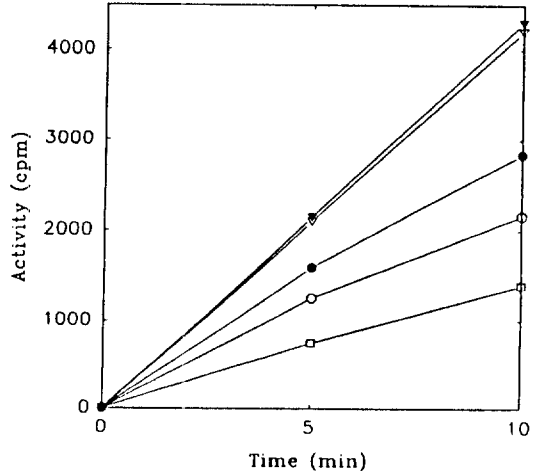


Fig. 2. Effect of Clp P proteolytic activity on the ATPase activity of Clp A. ATPase activity was determined by incubating the purified Clp A, Clp P, and 4 mM ATP in buffer B. Active Clp P(1 µg) was mixed with different amount (5 and 10 times of Clp A) DFP-inactivated Clp P and assayed for casein degradation in the presence of limiting Clp A. ▼, Clp A alone; ▽, Clp A and Clp P; ●, Clp A and Clp P with 5 times DFP-Clp P; ○, Clp A and Clp P with 10 times DFP-Clp P; □, Clp A and DFP-Clp P.

성은 그대로 유지되었다. Cl⁻이온의 경우 0.2 M 농도까지는 효소활성을 유지시키나 SO₄²⁻ 이온에 의해서는 P효소 자체의 효소활성은 약간 증가하는 현상을 보였으나 결과적으로 점점 효소활성이 소멸되는 경향을 나타내어 0.2 M 이상의 농도에서는 Clp 효소활성에 대한 안정도를 높이지 못함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 효소활성을 나타내기 위하여는 P효소의 다량체가 형성되어야 하고 여기에 염의 존재가 요구됨을 나타내는 것이나 높은 염의 농도에서는 P효소의 다량체형성에 부정적인 영향을 미치거나 효소의 구조변화로 P효소의 효소활성을 감소시키는 것으로 생각된다.

ATPase활성에 대한 P효소의 영향

A효소의 ATPase 활성에 대한 P효소의 영향을 측정한 결과, ATPase 활성은 A효소만 존재하였을 경우와 A효소에 최소량의 P효소를 첨가하였을 경우에도 거의 동일하게 나타났다. A효소가 ATPase활성을 나타내는 데에 있어 P효소의 영향을 알아보기 위하여, P효소를 DFP로 처리하여 P효소에 존재하는 단백질 분해활성을 제거하고 A효소의 ATPase활성을 분석한 결과, A효소에 대해 DFP 처리한 P효소의 첨가량이 증가함에 따라 오히려 A효소의 ATPase활성이 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 2). 이러한 결과는 A효소가 ATPase활성을 가지기 위하여는 ATP 뿐만 아니라 P효소의 단백질 분해능력도 요구함을 제시한다. 그러나 A효소에 DFP를 처리한 P효소만을 첨가하

였을 경우에 나타난 ATPase활성은 DFP에 의하여 완전히 활성을 상실하지 않고 남아있는 P효소의 단백질 분해활성에 의한 것으로 추정된다.

Clp효소의 다량체 형성

일정량의 P효소와 A효소에 의해 각각 형성되는 다량체를 분석하기 위하여, 고속액체크로마토그래피(HPLC) 겔여과용 TSK 250겔침을 이용하여 얻어진 각각의 분획에 대한 P 및 A효소활성을 측정하였다. Fig. 3과 4에서 보여주는 바와 같이 ATP를 첨가함에 따라 casein에 대한 P효소의 활성 및 A효소의 ATPase활성이 증가하는 것으로 Clp효소에 대한 용출위치를 확인할 수 있었으며 용출위치에 따라 분자량을 측정한 결과는 Fig. 5에 요약하였다. P효소의 다량체의 용출위치는 ATP 존재에 따라 표준물질의 용출위치와 비교하였을 경우 약 150,000 정도이었으며, A효소의 경우 ATP가 존재하지 않을 경우 80,000과 100,000의 사이에서 용출되었다. HPLC 용출액에 ATP와 Mg이온을 첨가한 후 용출시켰을 경우 A효소는 거의 void volume에서 용출되어 300,000보다 클 것으로 생각되며 subunit의 분자량을 83,000으로 고려하였을 경우 3 혹은 4개의 다량체를 형성하는 것으로 계산되었다. ATP가 존재하지 않고 P 및 A효소를 혼합하여 겔여과하였을 때는 A와 P효소는 각각 서로 다른 용출위치에서 용출되었지만 용출액에

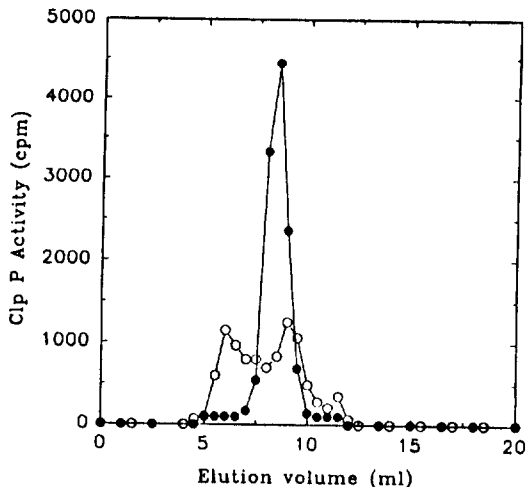


Fig. 3. Gel filtration of Clp P with Clp A and ATP. The multimer size of Clp P was determined by gel filtration on a TSK 250 column (7.8×300). Fractions of 1 ml were collected at a flow rate of 1 ml/min by buffer B with 0.2 M KCl. Elution of the components from the column was determined by assaying the ATP-dependent proteolysis in the presence of ATP (●) and of Clp A with ATP (○).

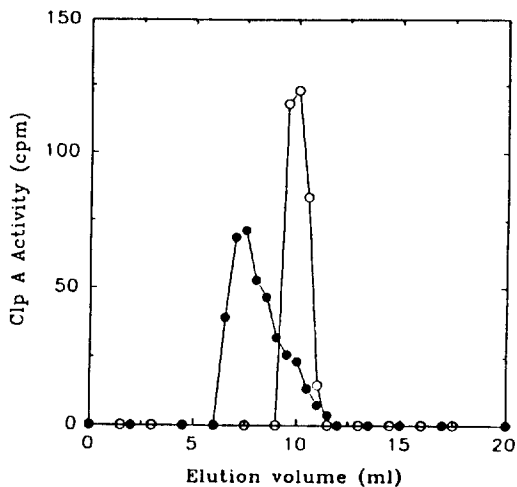


Fig. 4. Gel filtration of Clp A with Clp P and ATP. The multimer size of Clp A was determined by gel filtration on a TSK 250 column. The condition of HPLC was the same as described in Fig. 3. Elution of the components from the column was determined by assaying the Clp A activity in the presence (○) and absence of ATP (●).

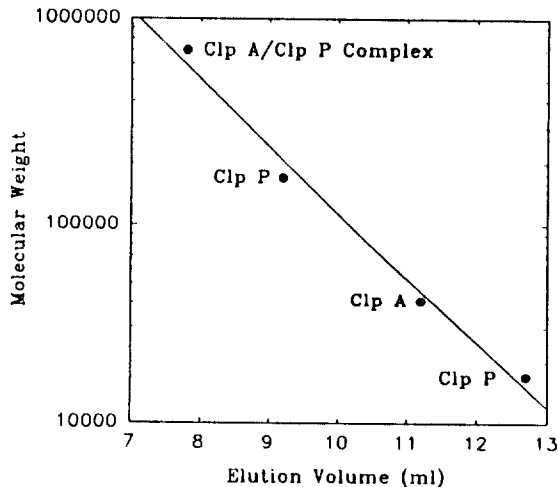


Fig. 5. Elution positions of Clp A and Clp P. The native size of Clp A and Clp P were determined by Fig. 3 and 4. The peaks of the activity eluted from the column were indicated by closed circle. Markers used were catalase (240,000), IgG (158,000), ovalbumin (44,000) and myoglobulin (17,000).

ATP와 Mg이온을 첨가하였을 경우 P효소의 용출위치도 A효소와 비슷하게 300,000 정도로 나타났다. Clp 효소의 casein에 대한 P효소와 A효소의 분해활성을 specific activity로서 분석한 결과, P효소는 hexamer로 활성 complex를 형성하는 것으로 계산되었다. 그러나 A효소와 P효소의 중합체는 A효소만의 다량체보다는 작을 것으로 추측된다.

사 사

본 연구는 미국 국립보건원의 암연구소에서 수행된 것임.

참 고 문 헌

1. Goldberg, A.L., Swamy, K.H.S., Chung, C.H. and Larimore, F.S., 1983. Proteases of *Escherichia coli*. *Methods in Enzymol.* **80**, 680-702.
2. Gottesman, S., Squires, C., Pichersky, E., Carrington, M., Hobbs, M., Mattick, J.S., Dalrymple, B., Kuramitsu, H., Shiroza, T., Foster, T., Clark, W. P., Ross, B., Squires, C., and Maurizi, M.R., 1990. Conservation of the regulatory subunit for the Clp ATP-dependent protease in prokaryotes and eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **87**, 3513-3517.
3. Hough, R., Pratt, G. and Rechsteiner, M., 1987. Purification of two high molecular weight

- proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* **262**, 8303-8313.
4. Hershko, A., 1990. Ubiquitin-mediated protein degradation. *J. Biol. Chem.* **263**, 15237-15240.
 5. Hwang, B.J., Park, W.J., Chung, C.H. and Goldberg, A.L., 1987. Escherichia coli contains a soluble ATP-dependent protease(Ti) distinct from protease La. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 5550-5554.
 6. Hwang, B.J., Woo, K.M., Goldberg, A.L. and Chung, C.H., 1988. Protease Ti, a new ATP-dependent Protease in E. coli contains protein activated ATPase and Proteolytic function in distinct subunits. *J. Biol. Chem.* **263**, 8727-8734.
 7. Katayama, Y., Gottesman, S. and Maurizi, M.R., 1987. A Multiple-component, ATP-dependent Protease from Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **262**, 4477-4485.
 8. Katayama, Y., Gottesman, S., Pumphrey, J., Rudikoff, S., Clark, W. P. and Maurizi, M.R., 1988. The Two-component, ATP-dependent Clp
 9. Miller, C., 1987. Protein degradation and proteolytic modification, in: Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology (Neidhardt, F.C., ed) Vol. 1, pp. 680-691, American Society for Microbiology, Washington, DC.
 10. Maurizi, M.R., Clark, W.P., Kim, S.H., Gottesman, S., 1990. Clp P Represents a Unique Family of Serine Proteases. *J. Biol. Chem.* **265**, 12546-12552.
 11. Woo, K.M., Chung, W.J., Ha, D.B., Goldberg, A. L. and Chung, C.H., 1989. Protease Ti from Escherichia coli requires ATP hydrolysis for protein breakdown but not for hydrolysis of small peptides. *J. Biol. Chem.* **264**, 2088-2091.

(Received November 12, 1992)

(Accepted December 9, 1992)

ABSTRACT: Stability and Characterization of the ATP-dependent Clp Protease from *Escherichia coli*

Kim, Seung-Ho and Michael R. Maurizi¹ (Laboratory of Protein Chemistry, Genetic Engineering Research Institute, KIST, Korea., ¹National Cancer Institute, National Institutes of Health, U.S.A.)

The ATP-dependent protease, Clp P from *Escherichia coli* has been increase the stability with or without detergent as Triton X-100 and NP-40 in the Clp P. The Clp P proteolytic activity was remained to 0.1 M salt by Na⁻, K⁺, Li⁺ but was inhibited by SO₄²⁻. An active ATPase site in Clp A is required for ATP-dependent proteolysis by Clp protease as analysis of ATPase activity of Clp A with Clp P treated by diisopropylfluorophosphate. When Clp A and Clp P are mixed and applied to a gel filtration column in the absence of ATP, they emerge independently of each other. However, inclusion of ATP and Mg causes Clp P to appear with Clp A in a complex with over 300,000 molecular weight. The calculations suggest that the two components are present in the active complex in the ratio of 1 hexamer of Clp P to 1 dimer or trimer of Clp A.