

*Absidia zychnae*가 생산하는 Serine-type Carboxypeptidase의 다양성

이 병 로 · *안 병 용
동경 농공대학교 응용 생물학과
*이리 농공전문대학 식품공업과

Multiple Forms of Serine-type Carboxypeptidase Produced by *Absidia zychnae*

Byung-Rho Lee and Byung-Yong Ahn*

Laboratory of Molecular Biology and Microbial Chemistry,
Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183, Japan

*Department of Food Engineering, Iri Nat'l College of Agriculture and Technology

ABSTRACT

Absidia zychnae NRIC 1199 produced two forms of carboxypeptidase(CPZ-1 and CPZ-2) which were distinguished in their isoelectric points but had almost identical properties(1). The amino acid sequences for the N-terminal of both enzymes were the same(Tyr-Thr-Ser-Pro-Lys-Leu-Xaa-Asp-Pro-Asp-Val) and any significant difference was not observed between amino acid compositions of the two enzymes. The Ouchterlony double diffusion technique using antibody raised against the CPZ-2 protein demonstrated a good cross-reaction between CPZ-1 and CPZ-2. Genomic Southern analysis showed only one gene encoding CPZ in the genome of *Absidia zychnae*. However, a significant difference between two enzymes was observed on peptide map using *Staphylococcus aureus* V8 protease, distinguishable only one band, indicating that multiple forms of CPZ are caused by post-translational modification, such as deamidation.

서 론

*Aspergillus niger*는 두 종류의 Glucoamylase G1, G2를 생산한다. G1, G2는 최적 pH, 온도 안정성, N말단 아미노산, 아미노산 조성이 똑 같으나(2), G1, G2는 당함량에 차이를 나타내며(3, 4) 당함량이 많은 G1만이 생전분 분해활성을 나타내므로 *Aspergillus niger* Glucoamylase의 다양성은 당쇄에 의한 것으로 알려져 있다(5).

한편 *Aspergillus sojae* Serine proteinase는 등전점이 높은 분자종으로부터 등전점이 낮은 분자종으로 변환하는 것이 보고되어 있다(6). 이 등전점이 다른

효소들은 촉매 효율에 차이가 인정되지만 분자량, N말단 및 C말단 아미노산이 같기 때문에 이 다양성은 deamidation에 의한 것으로 —島는 고찰했다(6).

최근 Groenen 등은 소 안구의 α B-crystallin에서 Asn 146이 deamidation에 의해 Asp으로 변환되었으며, 이는 나이에 의존함을 밝혀 deamidation이 노화에 관계있음을 시사하였다(7).

우리는 접합균류인 *Absidia zychnae*가 생산하는 serine carboxypeptidase Z-1, Z-2(CPZ-1, CPZ-2)를 조사한 결과 두 효소는 분자량, 기질특이성, 비활성, 촉매효율 등에 차이를 나타내지 않았으나 등전점만이 달라 deamidation에 의한 분자변환이 예

상되었다(1).

본 논문에서는 CPZ-1, CPZ-2의 구조적 차이를 규명함으로써 두 효소가 하나의 유전자로부터 전사 번역되어, CPZ-2로부터 deamidation에 의해 CPZ-1으로 분자종이 변한다는 것을 시사하였다.

실험재료 및 방법

N말단 아미노산 배열 결정

Applied Biosystems사의 477A Protein Sequencer를 사용하여 고도 정제된 CPZ-1, CPZ-2의 N말단 아미노산 배열을 결정하였다.

항혈청 작성

항원으로써 CPZ-2 1ml(약 1mg)를 Freund's complete adjuvant(FCA) 1ml과 혼합하여 유향한 다음 토끼의 등가죽 밑에 소량씩 전면에서 걸쳐 주사했다. 추가면역은 15일 후 CPZ-2 1ml을 똑같은 요령으로 주사했으며, 추가면역 16일 후 2번째 추가면역을 실시했다. 이때는 FCA를 사용하지 않고 CPZ-2 1ml를 토끼귀의 정맥에 주사했다. 4일 후 심장 채혈을 한 다음 혈액을 실온에 1시간, 4°C에서 하룻밤 보존하여 혈반을 응축시킨 뒤 원심분리에 의하여 혈청을 얻었다.

이중 면역 확산법

PBS(10mM sodium phosphate buffer(pH 7.2), 0.15M NaCl)에 Difco Noble Agar 1%를 용해시킨 한천 plate를 만들어 1cm 간격으로 직경 3mm의 well을 만들었다. 중앙에는 항혈청 6 μ l, 가장자리에는 각 효소 표준 6 μ l를 넣어, 4°C에서 24시간 확산시켜 침강선의 형태를 관찰하였다.

당쇄 검정

효소의 당 함량은 페놀-황산법(8)에 의해 측정하였다. 또 Endo F(Endo- β -N-acetyl-glucosaminidase)(9) 0.5unit를 CPZ-1, CPZ-2에 작용시켜 SDS-PAGE에서의 이동도를 조사하였다.

V8 protease에 의한 peptide map

10 μ g/50 μ l 농도의 CPZ-1, CPZ-2를 각각 4°C에서 0.1M phosphate buffer(pH 8.0)에 대하여 20시간 투석한 후, 8M 요소액에 대하여 15시간, 2M 요소액에 대하여 15시간 투석시킨 변성 효소에 *Staphylococcus aureus* V8 protease 0.5 μ g을 첨가하여 30°C에서 30분간 처리하였다. V8 protease에 의한

부분 분해물을 16%의 SDS-PAGE에 의하여 분리하였다.

결과 및 고찰

CPZ-1, CPZ-2의 아미노산 조성을 Table 1에 나타냈다. 두 효소의 아미노산 조성은 거의 일치했다. CPZ-1의 N말단 아미노산 배열을 29잔기까지, CPZ-2의 N말단 아미노산 배열을 11잔기까지 결정하여 Fig. 1에 나타냈다.

두 효소의 N말단 아미노산 배열은 완전히 일치했다. 다음은 두 효소의 면역학적 상동성에 대하여 조사하여 Fig. 2에 나타냈다. CPZ-1, CPZ-2의 침강선은 완전히 융합함을 보여 두 효소는 서로 공통 항원을 가지고 있다는 것을 알 수 있었다. 두 효소의 당함량에 대하여 페놀-황산법으로 조사한 결과 두 효소는 약 3-4%의 당쇄를 가진 당단백질이라는 것을 알았다. 또 두 효소를 Endo F 처리에 의해 당쇄를 제거한 두 효소는 Endo F 처리하지 않을 때보다

Table 1. Amino acid compositions of CPZ-1 and CPZ-2.

Amino acid	CPZ-1	CPZ-2
	Composition ratio (mole-%)	Composition ratio (mole-%)
Asp + Asn	12.27	12.40
Thr	4.01	4.02
Ser	8.32	8.22
Glu + Gln	13.50	13.47
Gly	9.48	9.38
Ala	7.59	7.52
Val	6.30	6.37
Met	1.75	1.62
Ile	3.70	3.73
Leu	5.40	5.68
Tyr	5.57	5.64
Phe	5.53	5.46
Lys	6.25	6.28
His	3.04	2.92
Arg	2.45	2.38
Pro	4.94	4.92

The values of analysis of two hydrolysates were obtained after 24 h of hydrolysis in 2ml of 5.7 N HCl containing 5 μ l 2-mercaptoethanol and 2 drops of 5% phenol at 110°C.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CPZ-1	Tyr	Thr	Ser	Pro	Lys	Leu	Xaa	Asp	Pro	ASp
CPZ-2	Tyr	Thr	Ser	Pro	Lys	Leu	Xaa	Asp	Pro	ASp
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
CPZ-1	Val	Lys	Gln	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Leu	Asp	Ala
CPZ-2	Val									
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
CPZ-1	Ala	Asn	Asp	Glu	His	Tyr	Phe	Phe	Trp	

Fig. 1. Comparison of N-terminal amino acid sequences of CPZ-1 and CPZ-2.

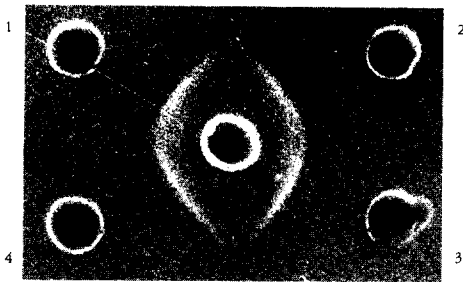


Fig. 2. Immunodiffusion cross-reactivity of antiserum raised against CPZ-2 and serine-type carboxypeptidases from *Absidia zycahae*. Center well contained antiserum of CPZ-2 and outer wells contained the following: 1 and 3, CPZ-1; 2 and 4, CPZ-2.

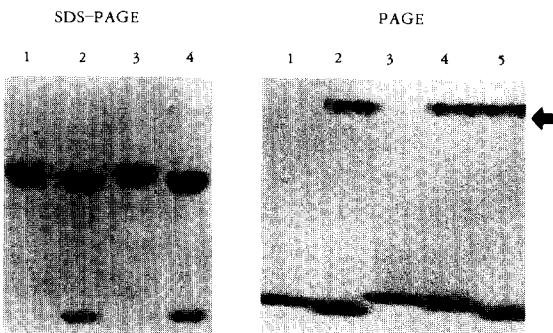


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of CPZ-1 and CPZ-2 digested with Endo F. The arrows indicate the Endo F. lane 1, CPZ-1; lane 3, CPZ-2; lane 2 and 5, CPZ-1 digested with Endo F; lane 4, CPZ-2 digested with Endo F.

SDS-PAGE 상에서 이동도가 약간 빨랐다(Fig. 3). 분자량이 약 2000 정도 작아진 것으로 보아 당함량은 약 4%로 산정된다. 그러나 당쇄를 제거해도 SDS-PAGE 상에서나 PAGE 상에 두 효소의 차이점은 인정되지 않았다. 이상의 결과는 CPZ-1과 CPZ-2는 구조적으로 거의 일치한다는 것을 나타낸다.

우리는 이미 CPZ-2를 code하는 cDNA와 genomic DNA를 clone화하여 염기배열을 결정하였다(10). cDNA를 probe로 하는 genomic Southern blot의 결과를 Fig. 4에 나타냈다.

cDNA를 절단하지 못하는 *Bam*H I, *Sal* I, *Pst* I, *Eco*R I 제한효소 중에서 *Bam*H I 소화에서는 8kb, *Eco*R I 소화에서는 3.3kb 부근에 1개의 band가 검출되었다. 이는 CPZ-2의 유전자가 하나밖에 없고 그에 유사한 유전자도 존재하지 않는다는 것을 나타낸다.

CPZ-1과 CPZ-2는 등전점에서만 차이를 나타내므로 deamidation을 조사하기 위하여 peptide의 Glu의 carboxyl기 쪽을 절단하지만 Gln의 carboxyl기 쪽은 절단하지 못하는 V8 protease를 이용하여 peptide map를 작성하였다(Fig. 5). V8 protease에 의한 두 효소의 부분 분해산물의 band는 거의 같았지만, CPZ-2에는 존재하나 CPZ-1에는 존재하지 않는 1개의 band가 인정되었다.

CPZ-1과 CPZ-2는 등전점이 각각 4.5, 4.65로

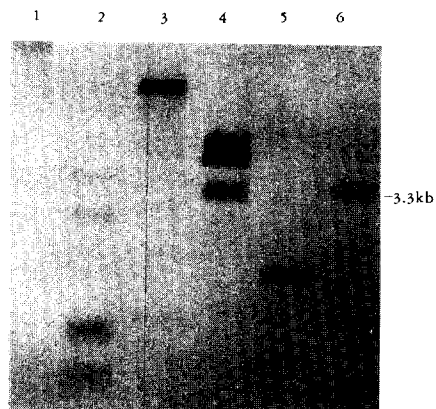


Fig. 4. Southern hybridization of genomic DNA using the digoxigenin labeled cDNA as a probe. Genomic DNA was digested with the following restriction enzymes: lane 1, undigested; lane 2, with *Hind*III; lane 3, with *Bam*H I; lane 4, with *Sal* I; lane 5, with *Pst* I; lane 6, with *Eco*R I.

요 약

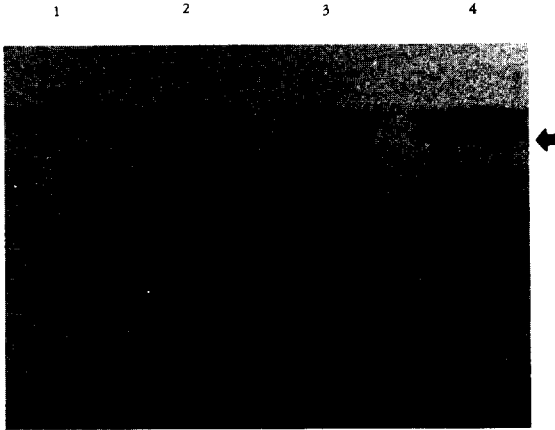


Fig. 5. SDS-PAGE of partially digested CPZ-1 and CPZ-2 with V8 protease from *Staphylococcus aureus*. lane 1, CPZ-1; lane 2, CPZ-2; lane 3, partially digested CPZ-1; lane 4, partially digested CPZ-2.

서로 다르지만 분자량, 안정성, 기질특이성, 촉매효율, carboxyamidase 활성, amidase 활성, 저해제의 영향 등 거의 모든 성질이 일치하고(1), 또한 N 말단 아미노산 배열, 아미노산 조성, 번역학적 성질, 당함량에서도 차이를 나타내지 않았으며, CPZ-2를 code하는 유전자와 유사한 유전자는 존재하지 않는다는 이러한 결과들은 두 효소가 원래 하나의 유전자로부터 전사, 번역되었음을 강하게 시사해 준다.

V8 protease에 의한 peptide map의 결과, CPZ-1에 없는 한 band가 CPZ-2에는 존재하는 것은, deamidation의 위치가 그 fragment 안에 존재하기 때문에 해석된다. 즉 CPZ-1의 경우 Gln 혹은 Asn이 deamidation에 의해 Glu 혹은 Asp으로 변환되기 때문에 V8 protease에 의하여 분해되어 band로써 나타나지 않았지만, CPZ-2의 경우는 Gln 혹은 Asn이 그대로 존재하기 때문에 이곳이 V8 protease에 의하여 절단되지 않고 band로써 나타난 것이다. 이는 CPZ-1의 등전점이 CPZ-2보다 약간 낮은 것과 잘 일치한다.

여기서 우리는 CPZ-1과 CPZ-2의 다양성이 post-translational modification이며 deamidation에 의한다는 것을 밝힌다.

Absidia zychnae NRIC 1199가 생산하는 두 종류의 serine-type carboxypeptidase CPZ-1, CPZ-2는 등전점만이 다르고 거의 모든 성질이 유사하다. 두 효소의 N말단 아미노산 배열은 Tyr-Thr-Ser-Pro-Lys-Leu-Xaa-Asp-Pro-Asp-Val로 똑 같았고 아미노산 조성에 있어서도 차이를 발견할 수 없었다. CPZ-2 protein에 대한 항체를 사용하여 조사 한 면역학적 성질도 두 효소간에 완전히 융합함을 나타냈다. Genomic Southern hybridization의 결과 CPZ를 code하는 유전자는 단 하나밖에 없다는 것을 나타냈다. 그러나 *Staphylococcus aureus* V8 protease에 의한 두 효소의 peptide map에서 하나의 중요한 차이점을 발견했다. 이러한 결과들에 의하여 CPZ의 다양성은 유전자의 전사 번역 후 deamidation과 같은 단백질의 수식에 의한 것임을 밝힌다.

참고 문헌

1. B. R. Lee, M. Takeuchi and Y. Kobayashi (1993), *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 618-622.
2. J. H. Pazur and T. Ando(1959), *J. Biol. Chem.*, **234**, 1966.
3. J. H. Pazur, K. Kleppe and A. Cepur(1965), *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**, 351.
4. J. H. Pazur, B. Liu, S. Pyke and C. R. Baumrucker(1987), *J. Prot. Chem.*, **6**, 517.
5. S. Ueda(1981), *Trends Biochem. Sci.*, **6**, 89.
6. E. Ichishima, S. Hanzawa, M. Watanabe and M. Takeuchi(1986), *Curr. Microbiol.*, **13**, 231.
7. P. J. T. A. Groemen, M. J. P. van Dongen, C. E. M. Voorter, H. Bloemendal and W. W. de Jong(1993), *FEBS Lett.*, **322**, 69.
8. M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith(1956), *Anal. Chem.*, **28**, 350.
9. K. Tamamoto, S. Kadowaki, K. Takegawa, H. Kumagai and T. Tochikura(1986), *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 421.
10. B. R. Lee, M. Takeuchi and Y. Kobayashi (1993), *Curr. Genet.*, Submitted.