

Peptide Synthetase의 활성 Adenylate 형성 Domain의 발현

김연옥 · 김기영¹ · 이 성² · 이영행 · 유병수*

원광대학교 자연과학대학 화학과, ¹원광대학교 의과대학 병리학실, ²한서대학교 식품 생물공학과

Expression of an Active Adenylate Forming Domain of Peptide Synthetase. Yoen-Ok Kim, Ki-Young Kim¹, Seong Lee², Young-Haeng Lee and Byung-Soo Yu*. Department of Chemistry, Wonkwang University, Iksan City, Chonbuk 570-749, Korea, ¹Department of Medicine, Wonkwang University, Iksan City, Chonbuk 570-749, Korea, ²Department of Food and Biotechnology, Hanseo University, Seosan, Chungnam 356-080, Korea - The plasmid pK8 was constructed to verify the existence of an adenylate domain in peptide synthetase by using pGC12. 1.2 kb fragment, coding tyrocidine synthetase 1 (123 kDa) was deleted, and 79.6 kDa one was expressed in *Escherichia coli* XL1-blue. The truncated multienzyme activated phenylalanine and substrate analogues with comparable kinetics as the over expressed synthetase. ATP-[³²P]PPi exchange reaction was measured for the enzyme assay.

Multienzyme family에 속하는 peptide synthetase는 여러가지 약효를 가진 천연물질생성에 관여하고 있다. 그 대표적인 것으로 임상에서 많이 사용되고 있는 antibiotics(gramicidin S, tyrocidine, penicillins), immunomodulator(cyclosporin), extracellular surfactants(surfactin) 및 siderophores(enterobactin, ferrichrome) 등을 예로 들 수 있으며 이들의 생합성과정은 ribosome을 거치지 않고 효소에 의해 생합성됨이 규명되었다(1-3). Peptide들의 구성형태에는 linear peptide, cyclic peptides, peptidolacton 및 depsipeptides 등이 multienzyme에 의해 생합성되며, 이 물질의 특성중 하나는 ribosome을 통해 생합성된 peptide에서 볼 수 없는 진귀한 아미노산(N-methylation, hydroxylation, epimerization, cyclization) 등을 포함하고 있어 관심을 모으고 있다. 대부분의 peptide synthetase들이 Bacilli에서 정제되었으며, 이 효소들의 부분적인 mechanism 및 특성에 대한 조사 결과는 Kleinkauf and von Doehren 논문들에 잘 소개되어 있으며 그 대표적인 것으로는 tyrocidin synthetase와 gramicidin S synthetase를 들 수 있겠다(4).

Decapeptide인 tyrocidine은 *Bacillus brevis* ATCC 8185에 의해 생합성되며 Gramicidin S 역시 *Bacillus brevis* ATCC 9999에 의해 생성되는데 이때 5개의 아미노산(D-Phe-Pro-Val-Orn-Leu)으로 형성된 pentapeptide 2개가 head and tail condensation을 통해 cycle을 이루며 이 과정들은 ribosome을 통하지 않고 효소에 의해 생합성 된다. 위와 같은 non-ribosomal-system에 의한 peptide 생합성의 원리는 대략 아래와 같이 알려져 있다(5).

Lipmann의 non-ribosomal-system model에서는 다음과 같이 가정하였다. Protein matrix에는 일정한 간격을 두고 "Activation spots"들이 배치되어 있으며, 이 "Acti-

vation spots"에 아미노산과 ATP가 반응하여 활성화된 아미노산, aminoacyladenylate가 형성된 후 protein-matrix의 cysteine 잔기에 있는 SH-group에 결합하여 thioester를 형성하는데 이 과정을 "Thio-template-mechanism"이라고 한다. 이때 aminoacylthioester는 fatty acid synthetase의 경우처럼 4'-phosphopantethein이 "swinging arm"과 같이 protein-matrix의 활성 자리에 붙어 있으면서 생촉매작용에 관여한다고 알려져 있다(6). 이와 같은 원리에 의해 Gramicidin S가 합성되는데 이때 두개의 multienzyme, 즉 gramicidin S synthetase 1(GS1)과 gramicidin S synthetase 2(GS2)가 필요하다. GS1은 126 kDa의 분자량으로(7) L-phenylalanin 기질을 1 molecule의 ATP와 반응시켜 L-phenylalanyl-adenylate로 활성화시킨 후 thioester를 형성하여 L-Phe를 D-Phe로 epimerization을 시킨다. 511 kDa 크기의 GS2(8)에는 4개의 아미노산 proline, valine, ornithine 및 leucine이 활성화되며 AMP가 효소로부터 분열되면서 aminoacylthioester가 이루어진다. 이렇게 효소활성부위에 thioester를 이루며 부착되어 있는 아미노산들이 생체활성물질인 peptide로 합성되는 경로는 GS1에 부착되어 있는 L-phe가 D-phe로 epimerization이 이루어지면서 GS2에 있는 L-pro와 연결되어 dipeptide를 형성하면서 합성이 시작된다고 가정하고 있다. 이와같이 pentapeptide D-phe-pro-val-orn-leu이 합성된 후 GS2의 waiting position에서 대기하다가 위의 방법으로 또 하나의 pentapeptide가 합성되면 이 두개의 peptide들은 head and tail condensation을 이루면서 10개의 아미노산으로 cycle을 구성하게 된다. 또한 이 Gramicidin S가 효소로부터 분열되는 데는 29.1 kDa 크기의 thioesterase와 비슷한 protein 구조를 가지고 있으며 gramicidin S synthetase operon (grs-operon)에 GS1과 GS2의 유전자 앞에 자리잡고 있는 grsT가 관계된다고 가정하고 있다. Schlumbohm *et al.*(9)은 4'-phosphopantetheine cofactor가 효소의 활성부위에

*Corresponding author.

Key words: Peptide synthetase, nonribosomal biosynthesis, tyrocidine synthetase

부착되어 있는 곳을 규명하기 위해 GS2에 radioactive affinity labeling 방법으로 처리한 후 BrCN과 proteinase로 분해하여 아미노산 서열후 LGG(H,D)SL을 확인하였고, Stein *et al.*(4)은 MS를 통한 실험에서 cofactor가 LGG(D,H)SL motif의 Serine 잔기에 부착되어 있음을 규명하였다. 본 연구에서는 tyrocidine synthetase 1 유전자의 motif-I에서 motif-O까지 결실(deletion)시킨 후 *Escherichia coli*에 발현시켜 효소 활성을 측정하였으며, multienzyme의 adenylate 형성시 필요한 domain에 대해 기술하겠다.

재료 및 방법

재료

DNA restriction endonuclease 및 T4 ligase는 Gibco BRL에서 구입되었으며 [³²P]-PPi DuPont ¹⁴C-labeled L-Phenylalanine은 Amersham/Buchler의 제품이었고 ATP 및 dithioerythritol(DTE)들은 Sigma에서 구입되었다.

박테리아 균주 및 배양조건

Enzyme expression과 plasmid 증식을 위해 *Escherichia coli* XL1-blue(10)가 사용되었고 recombinant plasmid가 형질전환이 된 후 50 µg/ml ampicillin을 포함하고 있는 Luria-Bertani medium에서 배양되었다.

Plasmid의 정제

pBT2에는 3.5 kb의 HincII DNA fragment(tycA)를 보유하고 있으며 tyrocidine synthetase1의 정보를 가지고 있다(11). pGC12는 pUC18의 derivat로 tycA가 삽입되어 있으며 lac-promotor에 의해 *E. coli*에 발현되었다. Plasmid DNA는 Birnboim과 Doly가 개발한 alkali method에 의해 분리되었다(12).

DNA 조작

Digestions, ligation 및 그외의 DNA manipulation은 Sambrook *et al.*의 방법을 사용하였다(13).

형질전환 및 선택

Mandel and Higa에 의한 방법으로 plasmid가 Competent *E. coli* XL1-blue에 형질전환이 되었으며 50 µg/ml ampicillin으로 발체되었다(14).

효소 정제

모든 과정들은 0~4°C에서 수행되었다. 원심분리기에 의해 수확된 세포는 3배의 100 mM Tris/HCl pH 7.5에 현탁 되었고 이 Tris/HCl buffer에 10 mM dithioerythritol(DTE), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10%(v/v) glycerol, 2 mM MgSO₄, 2 µg/ml DNase, 300 µg/ml lysozyme이 포함되어 있다. Suspension은 1시간 동안 저온후

초음파를 이용해 분해되었다. 25분간의 16,000 rpm 원심분리를 한 후 cell debris를 분리시켰으며 supernatant에 0, 1% polyethylenimin(PEI)을 첨가하고 30분간 저온후 10분간 18,000 rpm에서 다시 원심분리를 하였다. 전체농도의 60%가 될 때까지 (NH₄)₂SO₄를 가하면서 1 시간동안 저온 후 원심분리를 시켰다. 원심분리 된 pellet는 소량의 buffer A(50 mM Tris, pH 7.5, 1 mM DTE, 0, 1 mM EDTA, 10% Glycerol, 150 mM NaCl)에 용해시킨 후 Sephacryl S 300 HR column(Pharmacia)을 걸어 buffer A를 이용해 분리시켰다. ATP-[³²P]PPi로 activity가 확인된 fraction들을 모아 buffer A에 dialysis 시킨후 DEAE-Sephacryl CL-6B column(Pharmacia)를 이용하여 0~400 mM NaCl을 첨가한 buffer로 elution 시켰다. 효소의 활성을 가진 fraction들을 1M의 NaCl을 함유한 Buffer B(50 mM Tris, pH 7.5, 1 mM DTE, 0.1 mM EDTA)에 모은 후 Phenyl-Sepharose CL-4B column(Pharmacia)에서 NaCl 함량을 1M에서 0M까지 내리면서 buffer B로 분리 정제 하였다.

SDS-PAGE

Leammler 방법에 따라 7%의 SDS-PAGE가 수행되었고 전기영동이 끝난 gel들은 coomassie brilliant를 이용해 염색되었다(15).

Western blot

Western blot analysis는 Towbin *et al.* 방법이 이용되었다(16).

효소의 활성측정

ATP-[³²P]PPi exchange는 Pavela-Vrancic의 방법으로 측정되었으며, 이때 70 µl의 전체 용적에서 50 mM Tris-HCl 용액은 pH 7.4, 0.14 mM MgSO₄, 0.07 mM EDTA, 1 mM DTE, 0.07 mM PPi, 0.1 µCi [³²P]PPi 및 1.4 mM D-Phenylalanine을 포함하고 있으며 효소를 첨가시키면서 37°C에서 30분간 반응시켰다(16, 17).

결과 및 고찰

Peptide synthetase 유전자 tycA의 결실 및 발현을 위한 plasmid pK8 설계와 발현된 효소의 정제

3261 bp를 coding하는 tycA gene 중 C-terminal 부위에 있는 I-motif에서 O-motif에 속한 1170 bp가 결실되었다. 이때 pGC12는 Fig. 1과 같이 3종류의 제한효소 HindIII, BamHI 및 PstI로 절단하여 2.7 kb(BamHI/HindIII), 1.5 kb(PstI/HindIII), 1.17 kb(HindIII/HindIII) 및 0.8 kb(BamHI/HindIII)의 pGC12 DNA 단편들을 구할 수 있으며 pUC18은 2종류의 제한효소 BamHI과 PstI를 이용해 2.7 kb DNA 단편을 구하였다. 1.5 kb(PstI/HindIII)와 0.8 kb(BamHI/HindIII)의 pGC12 DNA 단편과

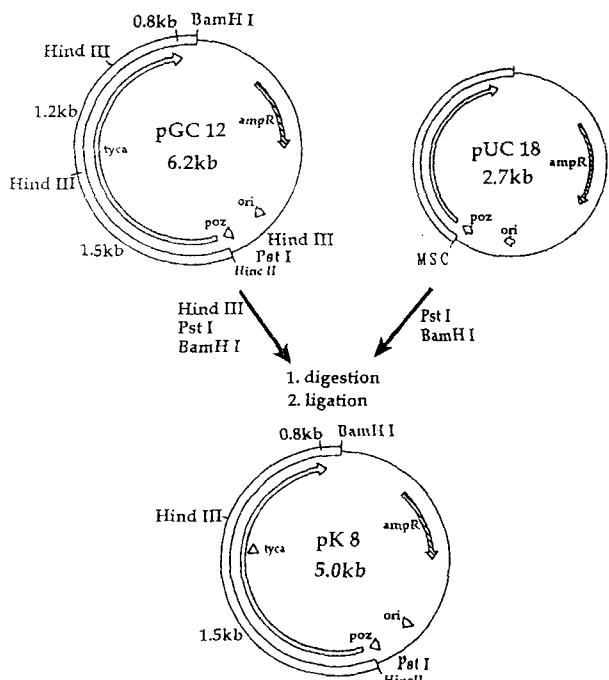


Fig. 1. Construction of recombinant plasmid pK8.

2.7 kb(BamHI/PstI)의 pUC18 단편들을 0.7%의 Agarose gel에서 전기영동법을 사용해 분리 정제한 후 T4 DNA ligase로 연결시킨 후 *Escherichia coli* XL1-blue에 형질 전환을 시켰다. 위의 plasmid를 pK8이라 칭했으며 이 pK8에는 tyrocidine synthetase 1에서 Leu482에서 Lys 872까지 결실된 유전자 Δ tycA가 삽입되어 있다. Δ tycA는 lac-promoter에 의해 XL1-blue에서 79.6 kDa으로 over expression이 되었다. 또한 이 protein은 polyclonal antibody tyrocidine synthetase 1(TY1)에 의해 결실된 효소(Δ Ty1)임을 규명하였다. Over expression이 된 이 효소 중 약 80%는 inclusion body를 형성하였고 나머지 20%는 60%의 ammonium sulfate에 침전시킨 후 Sephacryl S 300 Gel filtration을 거쳐 DEAE CL-6B anion-exchange chromatography 및 Phenylsepharose hydrophobic interaction chromatography를 통해 정제되었다 (Fig. 2).

***E. coli*에 발현시킨 결실효소 Δ TY1의 활성 측정과 substrate analogues가 Δ TY1에 미치는 영향**

Peptide 항생제인 tyrocidine은 3개의 multienzyme tyrocidine synthetase 1, 2 및 3(Ty1, Ty2, Ty3)에 의해 생합성 되는데, 이때 tyrocidine synthetase 1은 기질 L-phenylalanine과 1 molecule의 ATP와 반응하여 L-phenylalanine-adenylate로 활성화 시킨 후 thioester를 형성한다. 123 kDa의 tyrocidine synthetase 1(Ty1)이 79.6 kDa(Δ Ty1)로 결실되어 *E. coli*에 발현되었다. 이 protein의 adenylate 형성시 필요한 domain을 규명하기 위해

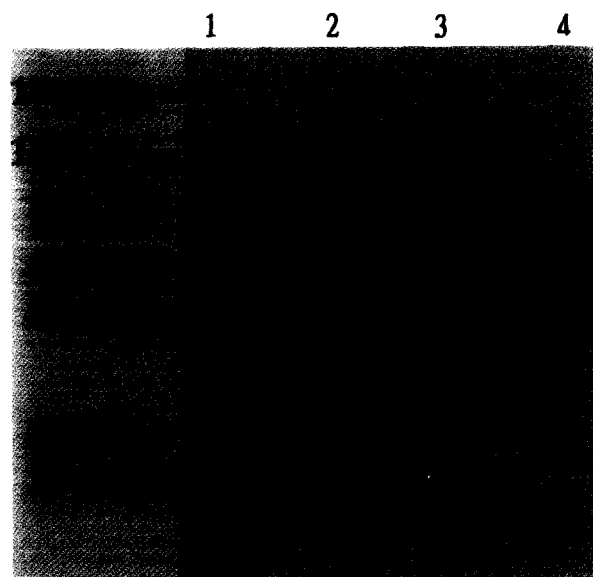


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of the truncated tyrocidine synthetase 1 summarizing purification.

1, crude extract; 2, after purification by gel-filtration on Sephacryl S-300; 3, after anion-exchange on DEAE-Sepharose; 4, after chromatography on phenyl-Sepharose (7% SDS-PAGE)

Table 1. ATP-[³²P]PPi exchange activity of the truncated tyrocidine synthetase 1 in the presence of various amino acids and phenylalanine analogues

Amino acid	Relative Activity (%)
L-Phenylalanine	100
3-(2'-Thienyl)-L-alanine	95
D-Phenylalanine	86
P-Fluoro-phenyl-L-alanine	77
L-Phenylserine	47
L-Tyrosine	16
L-Methionine	5

ATP-[³²P]PPi exchange를 응용한 enzyme assay 방법을 사용하여 효소활성을 측정하였다. 이때 Δ TY1 효소는 예측한대로 thioester를 형성하지 않았으며, 이 결과는 Stein 등이 발표한 motif J(LGGDSI)가 Co-factor 4'-phosphopantethein의 부착 부위임을 규명해 주고 있다(3). L-phenylalanine을 기질로 한 adenylate 형성시 turnover number는 *Bacillus brevis* ATCC 8185에서 정제된 wild type 효소 Ty1은 Kcat 2.57S⁻¹이고 *E. coli*에 발현된 recombinant 효소 Ty1은 wild type 효소보다 약 4.5배나 활성이 저조한 Kcat 0.57S⁻¹가 Pfeifer et al.에 의해 발표되었으며(19), 본 연구에서 설계된 mutant 효소 Δ Ty1은 Kcat가 0.4S⁻¹로 측정되었다. 그러므로 adenylate 형성 과정에서 *E. coli*에 발현된 두효소의 활성이 비슷함이

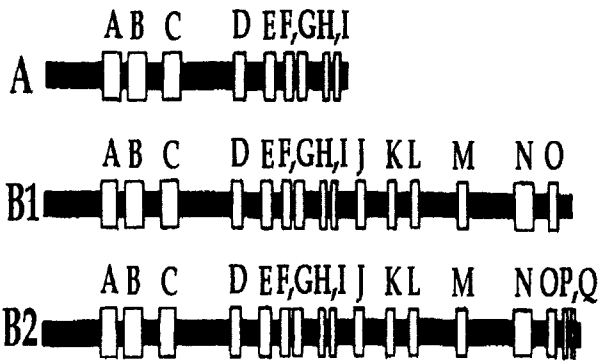


Fig. 3. Organization of adenylate forming enzymes. (A) Acetyl-CoA synthetase; (B1) peptide synthetase; (B2) Peptide synthetase with epimerizing function. The boxed motifs of peptide synthetases represent the following core sequences: A, LTXXELXXXAXXLXR; B, AVXXAXAXYVXIDXXXYPXER; C, YTSGTTGXPKG; D, IXXYGYXT; E, GELXIXGXXVAR; F, RLYRTGDL; G, IEYLGRXDXXQVIKIRXXXRIELGEIE; H, LXXYMVP; I, LTXXGKLRKAL; J, LGXSIXAI; K, YPSVXXQXRMYL; L, LXXXHDXX; M, XXHHXXVDVSWXIL; N, VXXEGHGRE; O, TVGWFTXXXPXXL; P, PXXGXGY; Q, VXFNYLG

증명되었고, 또한 이 결과는 결실된 tyrocidine 합성효소 부위인 motif-I에서 motif-O까지는 아미노산을 adenylylate로 활성화하는 과정에서 필수적인 부위가 아님을 나타내고 있다. 기질 특이성을 조사하기 위해 기질 L-phenylalanine과 유사기질을 사용해 ΔTy1 효소의 활성 상태를 측정 하였으며 이때 L-phenylalanine을 기질로 했을 때의 효소의 활성을 100%로 정하였다. 유사 기질을 사용했을 때 Table 1에서와 같이 효소의 활성이 크게 감소되는 것으로 보아 결실된 효소가 기질 특이성을 보존하고 있음을 잘 나타내고 있다.

von Doehren 등(18)은 현재까지 DNA sequencing이 완료된 peptide 합성효소유전자들을 비교분석한 결과 GS 1-gene과 GS2-gene 사이에 homologous region들이 확인되었고, 그 외에 ACV synthetase gene 및 tyrocidin synthetase gene에서도 상동부위들이 증명되었다. 위와 같은 상동부위들은 모든 peptide synthetase 유전자가 공통적으로 보유하고 있으며 약 600~700개의 아미노산으로 이루어져 있고 여러개의 motif(Box A-Q)들이 있어 효소활성시 이 motif들의 역할에 관심을 모으고 있다(Fig. 3).

요 약

본 연구에서는 tyrocidine synthetase 1(tycA)를 motif-I에서 motif-O까지 결실시킨후 *E. coli*에 발현시켜 효소의 activity를 측정한 결과 motif-I에서 motif-O까지는 aminoadenylylate 형성 과정에 필수적인 부위가 아님을 규명하였다. 이 결과는 *in vitro* 실험을 통해 발표된 효소의

AMP binding(C-motif) Adenine binding(E-motif) 및 ATP binding(F-motif) 대한 연구를 뒷받침 할 수 있는 좋은 결과로 사료되고 있다.

위와같은 연구들을 통해 생체활성물질을 생성하는 multienzyme을 보다 더 잘 이해할 수 있으며 또한 이 합성효소들의 유전자 조작에 의한 새로운 효소 디자인 및 설계에 유용한 자료가 될 것이고, 아울러 위의 방법들을 응용할 경우 신물질을 개발할 수 있는 하나의 좋은 방법이 될 것이다.

감사의 말

한국과학재단 지정 의약자원연구센터의 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kleinkauf, H. and H. von Doehren. 1982. *Trends in Antibiotic Research*, Pp. 220-232. Japan Antibiotics Research Association, Tokyo.
2. Vater, J. 1990. *Biochemistry of Peptide Antibiotics*, Pp. 33-35. In H. Kleinkauf, and H. von Doehren (ed.). de Gruyter, Berlin.
3. Stein, T., J. Vater, V. Kruft, B. Wittmann-Liebold, P. Franke, M. Panoco, R. McDowell, and H. Morris. 1994. Detection of 4'-phosphopantetheine at the thioester binding site for L-valin of gramicidin S synthetase 2. *FEBS Lett.* **340**: 39-44.
4. Kleinkauf, H. and H. von Doehren. 1982. *Biosynthesis and Functions*. de Gruyter, Berlin.
5. Lipmann, F. 1973. Attempts to map a process evolution of peptide biosynthesis. *Science* **173**: 875-884.
6. Kleinkauf, H., W. Gevers, R. Roskoski, and F. Lipmann. 1970. Enzyme-bound phosphopantetheine in tyrocidine biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **68**: 2069-2072.
7. Kraetzschmar, J., M. Krause, and M.A. Marahiel. 1989. Gramicidin biosynthesis operon containing the structural genes grs A and grs B an open reading frame encoding protein homologous to fatty acid thioesterases. *J. Bacteriol.* **171**: 5422-5429.
8. Turgay, K., M. Krause, and M.A. Marahiel, 1992. Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate forming enzymes. *Mol. Microbiol.* **6**: 529-546.
9. Schlumbohm, W. 1987. Ph. D. Thesis, Technical University Berlin.
10. Bullock, W.O., J.M. Fernandez, and J.M. Short. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
11. Weckermann, R., R. Fuerbass, and M.A. Marahiel. 1988. Complete nucleotide sequence of the tycA gene coding the tyrocidine synthetase 1 from *Bacillus brevis*. *Nucleic Acids Res.* **16**: 11841.
12. Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline

- extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
13. Sambrook, J., Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
 14. Mandel, M. and A. Higa. 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 159-162.
 15. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
 16. Towbin, H., T. Stakelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.
 17. Pavela-Vrancic, M., H. van Liempt, E. Pfeifer, W. Freist, and H. von Doehren. 1994. Nucleotide binding by multienzyme peptide synthetase. *Eur. J. Biochem.* **220**: 535-542.
 18. Pavela-Vrancic, M., E. Pfeifer, W. Schroeder, H. von Doehren and H. Kleinkauf. 1994. Identification of the ATP binding site in tyrocidine synthetase I by selective modification with fluorescein 5'-isothiocyanat. *J. Biol. Chem.* **269**: 14962-14966.
 19. Pfeifer, E., M. Pavela-Vrancic, H. von Doehren, and H. Kleinkauf. 1995. Characterization of tyrocidine synthetase I (TY1): Requirement of posttranslational modification for peptide biosynthesis. *Biochemistry* **34**: 7450-7459.
 20. Dieckmann, R., Y.-O. Lee, H. van Liempt, H. von Doehren, and H. Kleinkauf. 1995. Expression of an active adenylate-forming domain of peptide synthetases corresponding to acyl-CoA-synthetases. *FEBS Lett.* **357**: 212-216.

(Received 25 September 1995)