

Achrobacter Protease I (API)의 기질특이성의 전환

임성일 · 최 청^{1*}

한국식품개발연구원 생물공학연구부, ¹영남대학교 식품가공학과

초록 : Lysine 특이적 serine protease인 *Achromobacter protease* I(API)의 기질특이성을 결정하는 아미노산 잔기가 225위치에 존재한다는 가정하에 이 잔기에 변이를 도입하여 기질특이성의 변화 유무를 조사하였다. 그리고 pro-API이 자기촉매적으로 소화될 수 있도록 Lys(-1) 또는 다른 아미노산 잔기로 치환하였다. 그러나 예상과는 달리 제작된 모든 변이체는 발현되지 않았거나 불활성전구체로서 발현되었다. 이 결과로부터 225위치의 잔기는 API의 maturation 과정에 있어 lysylendopeptidase 활성에 중요한 역할을 담당하고 있으나 API의 기질특이성은 225위치 잔기의 특성에 한정되지 않을 가능성이 시사되었다.(1996년 11월 15일 접수, 1997년 3월 31일 수리)

서 론

Serine protease의 기질인식기작은 protease의 생리적 역할은 물론이고 기능발현의 물리화학적 기초를 이해하는데 매우 중요함에도 불구하고 아직 완전히 밝혀지지 않았다. 즉 arginine과 lysine에 특이적인 trypsin에서는 포유류기원의 효소 및 미생물기원의 *Streptomyces griseus* protease, *S. fradiae* protease, *S. erythraeus* protease의 입체구조가 밝혀져 많은 단백질 공학적 연구가 시험되고 있으나 천연의 촉매기능에 손상을 입히지 않고 기질특이성을 전환시키는데 아직 성공한 바가 없다. 더욱이 엄격한 기질특이성을 가진 효소, 즉 한 종류의 아미노산에 대하여 특이적으로 작용하는 serine protease에 있어서도 동일하다.

효소의 기질특이성 전환연구는 지금까지 구조, 기능, 촉매기작이 밝혀져온 serine protease에 있어 활발히 진행되어 왔다. Trypsin에 있어 lysine 또는 arginine으로의 특이성 증강¹⁾ 및 chymotrypsin 형으로기질특이성을 전환시키기 위해 기질결합 pocket을 구성하는 아미노산 잔기가 치환되었다.^{2,3)} 그 결과, 대부분의 변이체는 본래의 효소활성이 상실되거나 저하되었다. 한편, Subtilisin의 넓은 기질특이성의 축소⁴⁾ 및 확대,⁵⁾ α -lytic protease의 기질특이성의 확대,⁶⁾ trypsin 기질특이성의 chymotrypsin 형으로의 전환⁷⁾ 등과 같이 유사한 기질특이성을 가진 효소로의 전환은 성공된 바 있다. 그러나 지금까지 한 종류의 아미노산까지 제한한 기질특이성을 가진 효소로의 전환은 성공한 예가 없다. API은 lysine에 대한 엄격한 특이성과 trypsin 보다 높은 촉매활성⁸⁾을 갖고 있기 때문에 기능에 관여하는 아미노산 잔기의 변화가 소규모 일지라도 효소의 기능저하가 일어나기 쉬운 것을 고려한다면 기질특이성 전환실험에 있어 대상 효소로서 적합할 것으로 생각된다.

본 연구의 목적은 효소의 기질특이성을 전환하는데 있어

실험설계의 기초가 되는 정보를 얻기 위한 것이다. 이를 위하여 먼저 API의 기질결합 pocket의 입체구조가 trypsin과 동일하다는 것을 전제로 API의 기질결합부위의 아미노산 잔기를 추정하고 이들 아미노산에 변이를 도입하여 trypsin형의 기질식별능의 부가 가능성을 검토하였다. 또한 API이 methionine 측사에 대해 매우 약하지만 친화성을 갖고 있다는 예로부터 기질특이성 결정기에 소수성잔기를 도입함으로써 methionine에 특이적인 효소로의 전환 가능성 및 기질특이성 결정기에 정전하(Lys)를 도입하여 산성아미노산에 특이적인 효소로의 전환 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

API 변이체의 제작

발현 vector pKK233-2에 도입된 API유전자로 부터 목적 아미노산 잔기를 code하는 영역을 함유한 유전자 fragment를 제한효소인 *EcoRI*과 *PstI*로 추출한 후, M13mp 18에 도입하였으며, 이것을 변이체 제작의 template로서 변이 DNA를 제작하였고, 발현 vector에 재도입함으로써 변이체 발현 vector를 제작하였다(Fig. 1). Asp225의 변이에는 각각 oligonucleotide 5'-CGAACCCGGSNNGGTCA-CGCC-3'과 5'-GCCGTACTGSNNGCTGCGGTT-3'을 사용하였다. S 및 N은 각각 등량의 C, G 및 A, G, C, T의 혼합물을 나타낸다. 이러한 방법으로 제작한 변이체는 [D225L], [D225N], [D225K], [D225G], [D225M]이다. Val 188, Ser214, Lys-1의 변이는 다음과 같은 합성 oligonucleotide를 이용하여 제작하였다. 변이를 도입한 codon은 하선으로 표시하였다.

[V188D]; 5'-CGGCTCGGTGTGCGCCGCCGA-3'
[S214G]; 5'-CCTGCAGCTCCGCGGGCCGCC-3'
[K-1M]; 5'-CGACACGCCCATCTCGCCGGA-3'

찾는말 : lysine 특이적 serine protease, 기질특이성, pro-API, 자기촉매적 활성화

*연락처자

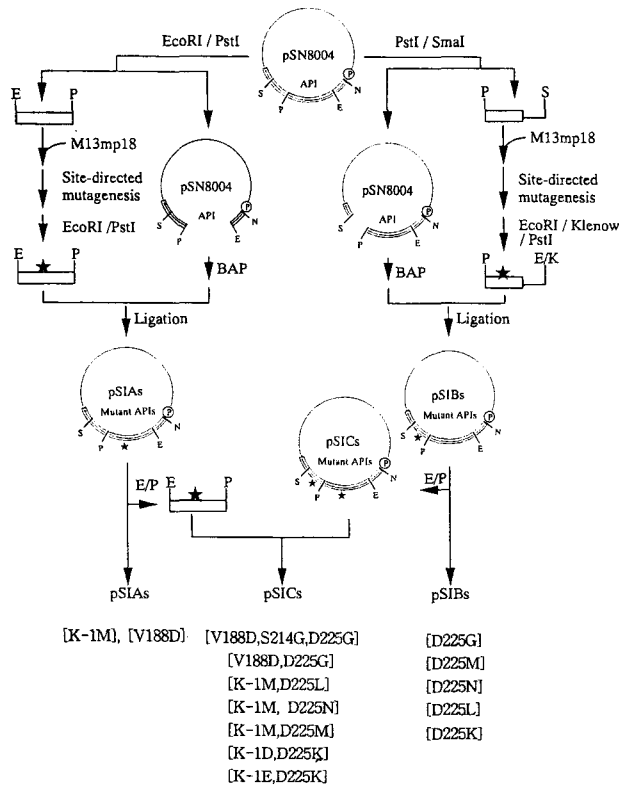


Fig. 1. Scheme for site-directed mutagenesis. Plasmid pSN8004 with the API gene was digested with *EcoRI-PstI* or *PstI-SmaI*. The *EcoRI-PstI* or *PstI-SmaI* fragments were cloned into M13mp18 phage for site-directed mutagenesis. The fragments with mutant were ligated into the corresponding sites of pSN8004, resulting in seven plasmids of pSIAs and pSIBs. The plasmids of pSIAs with single or double mutant were digested with *EcoRI-PstI*. The obtained fragments were ligated into the corresponding sites of pSIBs with mutant, resulting in seven plasmids of pSICs. E, *EcoRI*; K, *Klenow*; P, *PstI*; S, *SmaI*; N, *NcoI*; BAP, bacterial alkaline phosphatase; P, the *trc* promoter.

[K-1D]; 5'-CGACACGCCATCCTCGCCGGA-3'

[K-1E]; 5'-CGACACGCCTTCCTCGCCGGC-3'

변이체 발현 vector로 형질전환된 대장균(JA221)으로 각 변이체를 발현시켰다. 188, 214, -1위치의 변이를 함유한 2중 및 3중변이체 유전자는 먼저 목적 아미노산 잔기를 code하고 있는 DNA fragment (*PstI*, *SmaI*)를 M13mp18에 도입하고 또한 그 fragment를 225위치에 변이를 도입한 발현 vector에 재도입함으로써 제작하였다. 제작한 변이유전자는 다음의 14종의 유전자이다. [D225M], [D225L], [D225N], [D225K], [V188D,D225G], [V188D,S214G,D225G], [V188D], [K-1D], [K-1M], [K-1M,D225M], [K-1M,D225L], [K-1M,D225N], [K-1D,D225K], [K-1E,D225K]

그 밖의 재료 및 방법은 전보⁹⁾와 동일하다.

결과 및 고찰

API S₁-pocket의 trypsin형으로의 변환

저자는 전보⁹⁾에서 API의 lysine에 대한 기질특이성을 결

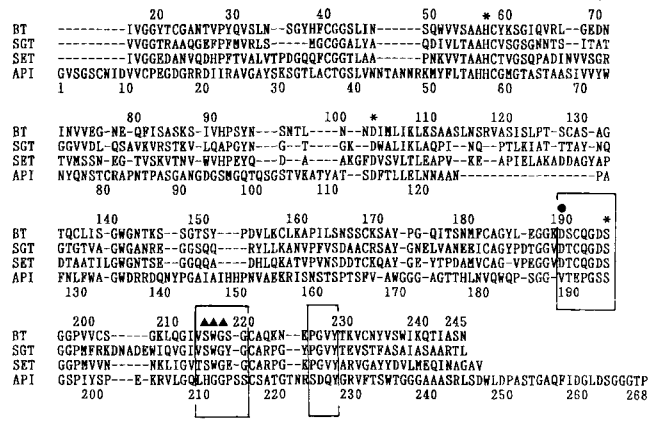


Fig. 2. Sequence alignment of bovine trypsin (BT), *Streptomyces griseus* trypsin (SGT), *Streptomyces erythraeus* trypsin (SET) and *Achromacter protease I* (API). The numberings shown above and below the alignment are based on those of chymotrypsinogen A and mature API, respectively. Asterisks indicate the amino acid residues constituting the catalytic triad of BT. The primary substrate specificity determinant and subsites S₁, S₂ and S₃ of BT are marked with a dot and triangles, respectively. The residues composing the S₁-pocket of BT are boxed.

정하는 잔기로서 Asp225를 시사한 바 있다. API과 trypsin과의 일차구조 비교(Fig. 2)해 보면 API의 Asp225는 trypsin의 Gly(226)에, Val188은 trypsin의 기질특이성 결정기인 Asp(189)에 대응하는 위치에 배치되는 것으로 추측되었다(Fig. 3). 만약 trypsin과 마찬가지로 API의 S₁ 결합 subsite에도 내부에 부전하를 갖는 pocket이 형성되어 있으며 정전하를 가진 기질의 측사가 S₁-pocket에 결합한다고 가정할 경우, API의 부전하는 pocket의 저부에 존재하는 것이 아니라 분자표면에서 가까운 위치[trypsin에는 Gly(226)이 존재한다]에 존재할 것으로 추정된다. 바꾸어 말하면 Asp225와 Asp(189)의 위치적 차이에 의해 API의 pocket이 알아지므로서 측사가 짧은 lysine은 결합할 수 있으나 측사가 긴 arginine은 결합할 수 없어 API은 lysine에 특이적으로 작용한다고 생각된다. 여기서 API의 lysine 특이성을 결정하는 중요잔기 Asp225를 시작으로 S₁-pocket을 구성하는 것으로 추정되는 Val188, Ser214에 변이를 도입하여 trypsin형 구조로 전환 시킴으로써 trypsin형 API 변이체의 제작을 시도하였다.

변이체 [D225G]의 제작

Asp225를 glycine으로 치환한 [D225G]에서는 periplasm 분획에서 45 kD의 proform에 상당하는 밴드가 검출되었으나 30 kD의 성숙체는 검출되지 않았다(Fig. 4). Western blotting에 의한 밴드의 농도로부터 45 kD 단백질의 발현량은 recombinant API(API DNA의 269번 arginine (AAC)에 stop codon (TAA)를 도입한 것으로 효소 활성 및 성질은 native API과 동일)의 경우에 비교해 극히 적은 양이며 periplasm 분획으로 Boc-Val-Leu-Lys-MCA를 이용하여 효소활성을 측정된 결과 활성은 검출되지 않았다. 45 kD 단백질을 동정하기 위해 N말단 아미노산배열

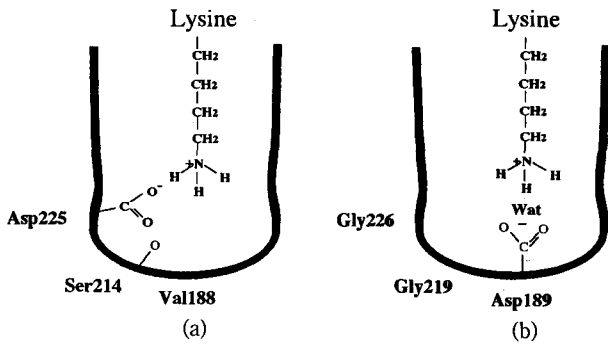


Fig. 3. Putative model of bindings between API and lysine (a) and between trypsin and arginine (b) in the substrate binding pocket(S-pocket).

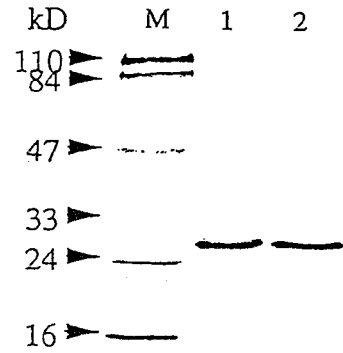


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified V188D mutant. Lane 1, native API; lane 2, V188D; M, molecular weight.

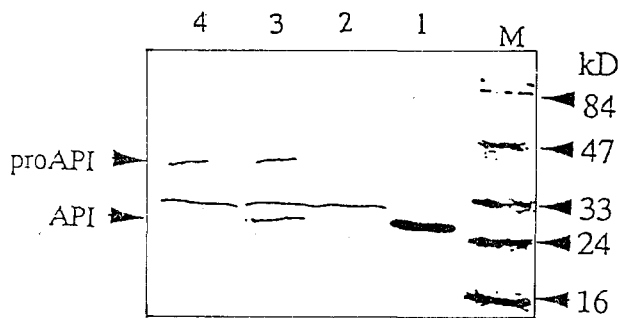


Fig. 4. Western blot analysis of periplasmic protein from *E. coli* transformed by an expression vector bearing native or mutated API gene. Lane 1, API from *A. lyticus*; lane 2, without any API genes; lane 3, with the V188D gene; lane 4, with the D225G gene; M, molecular weight markers.

을 분석한 결과, Ala-Pro-Ala-Ser-Arg-Pro-Ala-Ala-Phe-Asp인 것으로 나타났다. 이것은 API 유전자로부터 예측되는 아미노산배열의 -185번에서 -176번까지의 배열에 해당하는 것으로서 45 kD 단백질은 proform임이 확인되었다.

변이체 [V188D,D225G] 및 [V188D,S214G,D225G]의 제작

Pro-API 변이체의 활성화에는 API 자신의 효소활성이 필요하다는 보고¹³⁾에 따라 trypsin형의 부전하 [Asp(189)]를 도입한 2중변이체 [V188D,D225G] 및 Ser214를 trypsin형의 Gly(219)로 치환한 3중변이체 [V188D, S214G, D225G]를 디자인하여 이들 변이체 API 유전자의 발현을 시도하였다. 상법에 따라 형질전환한 대장균을 배양하고 그 periplasm 분획을 SDS-PAGE 후 western blotting하여 변이체의 발현을 확인하였다. 그 결과 어떤 경우에도 API 항체와 특이적으로 반응하는 밴드는 검출되지 않았으며 균체 단백질에 있어서도 동일한 방법으로 조사하였으나 45 kD의 단백질도 30 kD의 단백질도 검출되지 않았다.

변이체 [V188D]의 제작 및 효소적 성질

API의 Val188에 aspartic acid를 도입한 변이체 [V188D]에서는 30 kD와 45 kD의 2가지 분자가 검출되었다(Fig. 4). 30 kD의 단백질은 활성체인 API 변이체 [V188D]로 추

Table 1. Amino acid compositions of native and mutated API (Residues/mol)

Amino acid	[V188D]	API*
Aspartic acid	30.9(31)	30
Threonine	24.0(24)	22
Serine	31.4(31)	32
Glutamic acid	15.5(16)	14
Proline	12.6(13)	14
Glycine	36.8(37)	36
Alanine	28.0(28)	28
Valine	13.3(13)	14
Methionine	2.8(3)	3
Isoleucine	8.6(9)	9
Leucine	13.4(13)	13
Tyrosine	7.9(8)	8
Phenylalanine	7.1(7)	7
Lysine	5.1(5)	5
Histidine	6.0(6)	6
Arginine	11.9(12)	12

*Numbers are based on the amino acid sequence of API.

정되므로 상법에 따라 ovomucoid를 regand로한 affinity chromatography와 gel filtration-HPLC로서 정제하였다. 정제된 단백질은 SDS-PAGE에서 단일밴드로 나타났으며 (Fig. 5), 아미노산 조성분석에서는 이론치와 일치하였다 (Table 1).

[V188D]의 효소적 성질을 조사하기 위해 Boc-Val-Leu-Lys-MCA을 기질로 동력학적 정수를 구한 결과는 Table 2와 같다. [V188D]의 촉매활성은 Km의 14배 증가와 kcat의 1/4 감소로 인하여 API의 1/55로 감소하였다. S-3-(trimethylamino)propylate lysozyme을 기질로 하여 기질 특이성을 조사한 결과(Fig. 6). 분리된 peptide map는 API 소화물과 일치하였으나 API의 1/55의 활성을 갖고 있기 때문에 lysozyme의 N말단 Lys1-Val2는 절단되지 않고 P1의 N말단에 Lys1이 결합된 Lys1+P1이 분리되었다. 또한 lysozyme의 Lys96-Lys97의 peptide 결합 또한 절단되지 않고 P3의 C말단에 Lys97이 결합된 P3+Lys97이 분리되었다. 한편, [V188D]의 arginyl결합에 대한 친화성의 유무를 화학합성기질인 Boc-Val-Pro-Arg-MCA와 Boc-Gln-Ala-Arg-MCA로 조사하였으나 이들 기질에 대한 pep-

Table 2. Kinetic constants of API and V188D for hydrolysis Boc-Val-Leu-Lys-MCA

Enzyme	K_m (μM)	k_{cat} (sec^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{sec}^{-1}$)
API	2.5	82.0	33
[V188D]	36.0	22.4	0.6

Enzyme activity was assayed in 0.2 M Tris-HCl at pH 9.0 and 37°C.

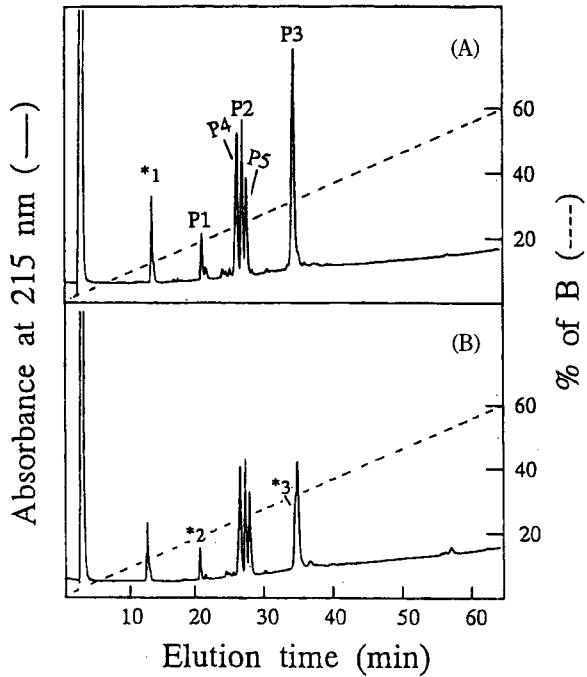


Fig. 6. Separation of peptides obtained by digestion of S-3-(trimethyl amino) propylated lysozyme with native API(A) and V188D mutant(B). Added 2% formic acid, the digestion(1.3 nmol) were applied to an C18 Bondasphere column(3.9×150 mm) and eluted with a linear gradient of 0~60% 2-propanol/acetonitrile(7/3, v/v) in 0.1% trifluoroacetic acid for 1h at a flow rate 1 ml/min. A, digestion with native API; B, with V188D. P1, Val2-Lys13; P2, Arg14-Lys33; P3, Phe34-Lys96; P4, Ile98-Lys116; P5, Gly117-Leu 129; *1, no peptide peak; *2, Lys1-Lys13; *3, Phe34-Lys97.

tidase 활성은 검출되지 않았다.

API의 Asp225에 대응하는 trypsin 잔기인 Asp(189)를 glutamic acid로 치환하였을 경우 lysine 기질에 대한 촉매활성이 10^3 배로 감소하였다는 보고¹⁾가 있다. 이 결과는 API의 Asp225의 경우와 동일한 것으로서 양 효소의 기질특이성 결정기는 S_1 -pocket 내의 위치는 다르지만 유사한 기능성을 갖는다고 생각된다. 여기서 Asp(189)에 대응하는 API의 위치(188위)에 Asp를, 225위치에 Gly를 도입하여 trypsin형 효소로의 변환을 시도하였지만 이 2중변이체가 발현되지 않아 필요한 정보를 얻을 수 없었다. 그 대응으로 조제한 변이체 [V188D]에 대해서 arginine 특이성의 부여를 조사하였으나 기대한 활성은 검출되지 않았고 본래의 lysine 특이적인 효소활성이 저하될 뿐이었다(1/55). K_m 의 대폭적인 증가(14배)를 생각해 보면 새롭게 도입한 산성기가 Asp225 및 부근의 잔기의 배치에 어떠한 영향을 미친 결과로 생각된다. 산성기의 교체라는 관점에서 의거한 2중변이체는 trypsin의 경

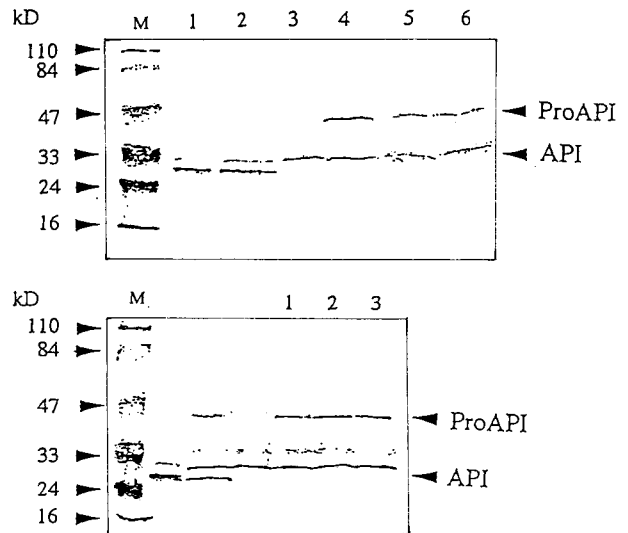


Fig. 7. Western blot analysis of periplasmic protein from *E. coli* transformed by an expression vector bearing single(A) or double mutated API gene(B). (A) lane 1, API from *A. lyticus*; lane 2, with the wild-type API gene; lane 3, without any API genes; lane 4, with the D225M gene; lane 5, with the D225L gene; lane 6, with the D225N gene. (B) lane 1, with the K-1M,D225M gene; lane 2, K-1M,D225L gene; lane 3, K-1M, D225N gene; M, molecular weight markers.

우에는 발현에 성공해 결정구조가 밝혀져있다.¹⁰⁾ 그 결과를 보면 rat trypsin의 [D(189)G], G(226)D는 native trypsin과 비교해 2중변이체의 lysine 기질에 대한 k_{cat} 는 0.15배 감소하고 K_m 은 54배 증가하여 k_{cat}/K_m 이 3×10^3 배 저하되었다. 이 변이체의 전반적인 입체구조는 native와 동일하지만 새롭게 도입한 Asp(226)의 carboxyl기는 Asp(189)와 동일한 위치에 존재하지 않음으로서 그 미묘한 구조의 차이가 큰 활성의 차로서 나타났다고 생각된다.

225위치에 변이의 도입

API의 lysine 특이성의 발현에는 Asp225가 결정적인 역할을 담당하고 있다는 것이 밝혀져 225위치에 Asp외의 아미노산 잔기를 도입하여 lysine 이외의 아미노산에 특이성을 가진 효소로의 전환을 시도하였다. 변이체로서는 methionine 특이성을 부여하기 위해 전보에서 디자인한 [D225L], [D225N]과 새롭게 디자인한 [D225M]을 그리고 aspartic acid 특이성을 부여하기 위해 반대전하를 가진 lysine을 225번위치에 도입한 [D225K]를 디자인 하였다. 이들 변이체를 code하고 있는 DNA를 제작하여 대장균을 이용해 발현시켰다. 그러나 어떠한 변이체에서도 periplasm 분획에서 기대한 peptidase 활성이 검출되지 않았으며 western blotting에서는 45 kD의 단백질만이 검출되었다(Fig. 7, 8). 이 proform을 자기촉매적으로 활성화시키기 위해 propeptide와 성숙체를 연결하는 -1위의 아미노산 잔기를 목적하는 기질특이성에 대응할 수 있도록 2중변이체를 디자인하였다. 예를들면 methionine에 특이적인 효소로 전환시킬 경우, propeptide와 성숙체의 연결부위가 Met-Gly배열을 갖도록 변이를 도입하였다. 이와 같은 원칙에 준하여 5종의 2중변이체, [K-1M,D225N], [K-1M,D225M],

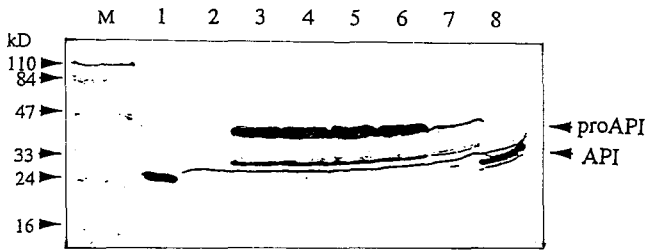


Fig. 8. Western blot analysis of periplasmic protein from *E. coli* transformed by an expression vector bearing wild-type or mutated API gene. Lane 1, API from *A. lyticus*; lane 2, without any API genes; lane 3, with the K-1D, D225K gene; lane 4, with the K-1D, D225K gene (at 37°C, 8 hr); lane 5, with the K-1E, D225K gene; lane 6, with the K-1E, D225K (at 37°C, 8 hr); lane 7, with the D 225K gene; lane 8, with the wild-type API gene; M, molecular weight markers.

[K-1M, D225L], [K-1D, D225K], [K-1E, D225K] 및 참고 변이체로서 [K-1M]을 디자인하였다.

이들 변이체 유전자를 도입한 plasmid로 대장균을 형질전환시키고 periplasm 분획을 SDS-PAGE 한 후 western blotting을 한 결과(Fig. 7, 8) 5종의 2중변이체는 45 kD의 단백질만이 검출되었다. [K-1D, D225K], [K-1E, D225K]의 periplasm 분획물을 37°C에서 maturation을 시도하였으나 성숙체로 전환되지 않았다(Fig. 8). 또한 [K-1M, D225N], [K-1M, D225M], [K-1M, D225L]의 periplasm 분획물의 methionylendopeptidase 활성을 MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Met-MCA 합성기질로서 측정하였으나 검출되지 않았다.

[K-1M]의 periplasm 분획에서는 45 kD의 밴드가 검출되었으나(Fig. 9), Boc-Val-Leu-Lys-MCA로서 활성을 측정한 결과, lysylendopeptidase 활성이 검출되었고 37°C에서의 1시간 처리로서 30 kD의 단백질로 전환되었다(Fig. 9). 활성화 처리한 periplasm 분획의 lysylendopeptidase의 활성은 동일한 조건에서 처리한 rAPI의 약 1/2이었다. 그러나 methionylendopeptidase 활성을 MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Met-MCA를 기질로 조사하였으나 활성이 검출되지 않았다. [K-1M] 변이체의 효소적 성질을 조사하기 위해 상법에 따라 정제한 후 SDS-PAGE 한 결과 단일밴드로 나타나 정제품임을 확인되었다(Fig. 9). Met-Gly의 연결부위가 자기소화에 의한 processing인가를 조사하기 위하여 N말단 아미노산배열을 분석하였다. N말단배열은 Ala-Ala-Ser-Gly-Glu-Met-Gly-Val-Ser-Gly-Ser와 Ser-Gly-Glu-Met-Gly-Val이었다. 이 배열은 propeptide와 성숙체의 연결부위를 함유한 -6번에서 +5번까지와 -4번에서 +2번까지의 배열에 해당한다. 즉 정제품은 N말단이 다른 2종류의 단백질 혼합물로서 propeptide 부분의 -7번과 -5번의 Ala-X결합이 가수분해되었다는 것을 의미한다. 이 결과로부터 45 kD의 [K-1M]은 자기촉매적으로 활성화된 것으로 판단되어 Boc-Ala-Ala-Ala-MCA를 기질로 [K-1M]의 alanylendopeptidase 활성을 측정하였다. 그러나 기대된 활성이 검출되지 않음으로서 [K-1M]의 45kD proform의 processing은 자기촉매에 의한 것이 아님이 밝혀졌다.

225위치의 변이도입실험은 변이체가 조제되었을 때만이

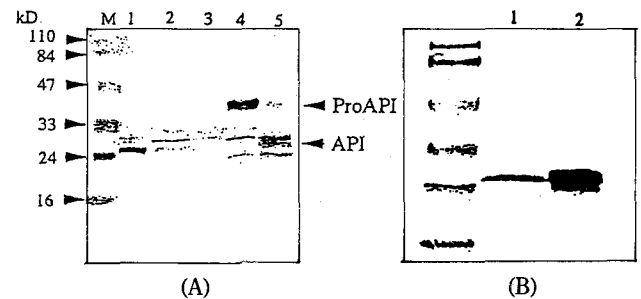


Fig. 9. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the K-1M mutant gene in transformed *E. coli*. A, western blot analysis of the periplasmic protein. Lane 1, API from *A. lyticus*; lane 2, with the wild-type API gene; lane 3, without any API gene; lane 4, with the K-1M gene; lane 5, the protein incubated at 37°C for 30 min. B, SDS-PAGE of purified protein. Component was stained with Coomassie Brilliant Blue. Lane 1, API from *A. lyticus*; lane 2, K-1M; M, molecular weight markers.

가능한 것으로 특이성의 변환이라는 목적은 달성되지 않았다. 변이를 도입한 유전자의 발현이 진행되지 않은 이유는 아직 불분명하다. 또한 periplasm 분획이나 세포질내에 proform이 검출된 경우에도 이들 propeptide-mature 효소의 결합부위(-1위와 +1위 사이의 peptide 결합)를 분해시켜 성숙체로 전환시키는 것이 기술적으로 곤란하였다. 따라서 S1-pocket의 적당한 아미노산잔기와 -1위 잔기의 쌍방에 변이를 도입한 2중변이체의 maturation에 관해서는 신중히 취급하여야 할 것으로 생각된다. 각종 변이체의 대장균을 이용한 발현실험에서 pro-API의 활성화과정이나 processing에 관한 흥미로운 사실이 발견되었다. 즉 [K-1M]은 2종의 성숙체로서 발현되었으며 이 성숙체는 API과 동일한 효소성질을 갖고 있으나 Ala-X결합을 분해하는 활성이 없어 이 alanyl결합은 대장균 유래의 효소에 의해 분해된 것으로 생각된다. 대장균에는 수종의 막결합성의 효소가 존재하고 하고 있으며,¹¹⁾ 이들 효소가 상기의 processing에 관여하고 있을 가능성이 시사되었다.

결국 본 연구에서 API의 기질특이성 결정기로 시사된 Asp225에 적당한 아미노산을 도입하여 기질특이성의 전환을 시도하였으나 성공하지 못했다. 그러나 이 결과로부터 API의 기질결합 pocket은 기질특이성이 넓으며 기질결합부위의 변이도입에 의해서도 활성을 유지하는 subtilisin, α -lytic protease, trypsin과는 달리 lysine 기질만을 결합할 수 있는 매우 복잡한 구조를 하고 있으며 API의 기질특이성은 225위치 잔기의 특성에 의해 한정되지 않는 것으로 생각된다. 본 실험에서 사용된 아미노산 치환체는 trypsin family의 입체구조를 바탕으로한 일차구조의 비교를 토대로 디자인된 것으로서 특이성이 전환되지 않은 원인은 불충분한 구조정보에 있다고 생각되며 API의 특이성을 전환시키기 위해서는 API의 입체구조를 바탕으로한 보다 많은 디자인과 검정이 필요한 것으로 나타났다.

본 연구의 최종단계에서 공동연구자인 일본 오사카대학 단백질연구소 Kitagawa 박사에게 의해 native API과 API-TLCK 복합체의 입체구조가 밝혀졌다.¹²⁾ 그 결과에 의하면

API의 active site의 입체구조는 trypsin과 거의 유사한 구조로서 API의 Asp225는 trypsin의 Asp(189)가 pocket의 최저부에 존재한다는 것과는 달리 pocket의 벽부분에 위치하고 있어 기질 lysine의 ϵ -어미노기와 직접 상호작용하고 있다. 그리고 본 실험에서 최초 예상한 바와 같이 API의 Asp225와 Val188은 각각 trypsin의 Gly(226)과 Asp(189)에 상당하는 위치에 배치되어 있음이 밝혀졌다. 또한 새로운 사실로서 기질 lysine은 API의 기질결합 pocket 내에서 Asp225와 정전기적 상호작용할 뿐만 아니라 pocket 구성 아미노산과 수소결합이 가능한 위치에 존재한다는 사실이 밝혀졌다. 우리는 API의 복잡한 기질특이성 발현 메커니즘을 해명하기 위해 이들 수소결합이 API의 효소활성에 미치는 영향에 관한 연구를 수행중에 있다.

참 고 문 헌

1. Evin, L. B., J. R. Vasquez and C. S. Craik (1990) Substrate specificity of trypsin investigated by using a genetic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 6659-6663.
2. Graf, L., C. S. Craik, A. Patty, S. Rocznik, R. J. Fletterick and W. J. Rutter (1987) Selective alteration of substrate specificity by replacement of aspartic acid-189 with lysine in the binding pocket of trypsin. *Biochemistry*, **26**, 2616-2623.
3. Graf, L., A. Jancso, L. Szilagyi, G. Hegyi, K. Pinter, G. Naray-Szabo, J. Hepp, K. Medzihradzky and W. J. Rutter (1988) Electrostatic complementarity in the substrate binding pocket of trypsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 4961-4965.
4. Wells, J. A., B. C. Cuningham, T. P. Graycar and D. A. Estell (1987) Recruitment of substrate-specificity properties from one enzyme into a related one by protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 5167-5171.
5. Estell, D. A., T. P. Graycar, J. V. Miller, D. B. Powers, J. P. Burnier, P. N. Ng and J. A. Wells (1986) Probing steric and hydrophobic effects on enzyme-substrate interactions by protein engineering. *Science*, **233**, 659-663.
6. Bone, R., J. L. Silen and D. A. Agard (1989) Structural plasticity broadens the specificity of an engineered protease. *Nature*, **339**, 191-195.
7. Hedstrom, L., S. Farr-Jones, C. A. Kettner and W. J. Rutter (1994) Converting trypsin to chymotrypsin : Ground-state binding does not determine substrate specificity. *Biochemistry*, **33**, 8764-8769.
8. Tsunasawa, S., T. Masaki, M. Hirose, M. Soejima and F. Sakiyama (1989) The primary structure and structural characteristics of *Achromobacter lyticus* protease I, a lysine-specific serine protease. *J. Biol. Chem.*, **264**, 3832-3829.
9. 임성일, 권오진, 최청 (1997) *Achromobacter* protease I의 기질특이성의 결정기의 동정과 변이체 [D225E]의 ornithine 기질에 대한 촉매활성. *한국농화학회지*, **40**, 189-195.
10. Perona, J. J., C. A. Tsu, M. E. McGrath, C. S. Craik and R. J. Fletterick (1993) Relocating a negative charge in the binding pocket of trypsin. *J. Mol. Biol.*, **230**, 934-949.
11. Date, T. and W. Wickner (1981) Isolation of the *Escherichia coli* leader peptidase gene and effects of leader peptidase overproduction *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 6106-6110.
12. Kitagawa, Y., K. Sashi, Y. Matsuura, S. Norioka, T. Masaki and F. Sakiyama (manuscript in preparation) Three-dimensional structures of *Achromobacter* protease I and its derivative alkylated with TLCK.

Alteration of Substrate Specificity of *Achromobacter* Protease I (API)

Seong-Il Lim and Cheong Choi^{1*} (*Korea Food Research Institute; ¹Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyungsan 713-749, Korea*)

Abstract : Assuming that Asp225 is the substrate specificity determinant of *Achromobacter* protease I (API) which is lysine-specific serine protease, the 225th residue was substituted for other amino acids with a hope that the substrate specificity of a mutant API is altered. Furthermore, to mature proform of mutant API autocatalytically, Lys(-1) was also replaced by Met, Asp, or Glu. However, all the mutants were not expressed, or accumulated as inactive precursor proteins. This result implicates that Asp225 plays a critical role in restricted substrate specificity as a lysylendopeptidase but the substrate specificity of API is not determined only by the nature of residue 225.

Key words : lysine specific serine protease, substrate specificity, proform, autocatalytic activation

*Corresponding author