

Artemia franciscana cyst의 세포내 산성 Protease

최학선 · 최경희 · 류태형[†]

부산대학교 자연과학대학 생물학과

Characterization of Cytosol Acid Protease from Dormant Cyst of *Artemia franciscana*

Hack-Sun Choi, Kyong-Hee Choi and Tae-Hyong Rhew[†]

Department of biology, College of Natural Science, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

A thiol protease has been isolated and partially purified from encysted brine shrimp *Artemia franciscana* using a four-step procedure (filtration, salting out, gel filtration and ion exchange chromatography). The optimum pH of the enzyme for caseinolytic activity was appeared to be 3.0, and the enzymatic activity was stable up to pH 6.0 but lost completely at the pH higher than 8.0. The optimal temperature of the enzyme was appeared to be 35°C, and ninety percent of the enzyme activity was lost at 45°C. Various metal ions, e.g., zinc, copper, iron, inhibited the enzyme activity; however, heavy metal chelator, e.g., EDTA, stimulated the enzyme activity. The protease was concluded to be a member of the thiol group protease, since it was inhibited by thiol protease inhibitors and iodoacetate. The protease was also concluded to be a acid protease based on the optimum pH.

Key words : Acid Cyst Protease, *Artemia franciscana*, Thiol Protease, Iodoacetate

서 론

Artemia (brine shrimp)는 분자 발생 연구에 많이 이용되는 초파리와 같은 분류 군인 절족동물로서, 다른 진핵생물들과 비교할때 배양이 단순하고, 특히 cyst에서 nauplii로 전환하는 기간이 매우 짧으며, 대량의 개체 공급이 용이하기 때문에 발생 연구에 이상적이다.

*Artemia*가 dormant embryo로부터 developing embryo로 전환되기 위해서는 세포내 pH가 중요한 인자로 작용한

다는 사실과¹⁾, pH상승과 발생과정사이에 밀접한 관계(예 : phospho fructokinases)가 있음이 보고되어 있고, 아직 정확한 기작은 모르지만 이런 발생 과정에서 산성 protease가 관련된다고 생각되어지고 있다²⁾. 연구되어온 대부분의 단백질 분해 효소는 주로 동물 조직³⁾이나, 미생물 기원 효소^{4,5)}이고 무척추 동물 protease로는 주로 crab 및 기타 소수의 개체에만 연구되었었다. 그 중에서도 *Artemia*에 대하여는 생리 연구가 거의 되어있지 않았고, 특히 이들 효소에 대한 분자생물학적 연구는 극히 미미한 상태일뿐더

[†] Corresponding author

러, 이 효소의 gene cloning에 대해서는 보고된 바가 없다.

Protease의 일반적인 기능을 요약하면 첫째, 정상 단백질을 turnover시키고, 둘째 비정상 단백질의 제거에 작용하며, 셋째 조절 단백질의 절단작용을하고, 넷째 발생에 필요한 lipovitellin의 분해 작용 등을 한다⁶⁾. 지금까지 발표된 cyst *Artemia protease*는 3종류로 나타나는데, 첫째가 세포질성 protease, 둘째는 lipovitellin관련 protease이고, 셋째는 lysosomal protease가 그것들이다^{7,8)}. 그 중에서 특히 세포질성 protease와 lysosomal protease에 대해서는 논란이 많으므로 지속적인 연구로 확실한 결론이 요구된다^{9,10)}. 이들 효소에 대해서 이제까지 문헌에 나타난 바로는 주로 *Artemia salina*나 *Artemia sp.* 등에 연구가 집중되어 있을 뿐이며, *Artemia franciscana*의 cyst protease에 대한 연구는 없었고, 더욱이 발생 연구에 있어서는 cyst protease가 *Artemia*생리 연구에 중요한 지표가 되리라 생각된다. 따라서 본 연구에서는 *Artemia franciscana*의 세포내 산성 protease를 분리 정제하여 그 효소의 생화학적 성질을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

Artemia cyst는 Sanfrancisco bay brand(INVE AQUACULTURE, INC.)로써 밀봉된 상태에서 구입하여, 4°C 냉장고에서 장기 보관하면서 실험할 때마다 20g씩 분리하여 사용하였다.

조효소(crude enzyme)의 조제

추출용 완충액(20mM Tris-HCl(pH 7.0), 5mM MgCl₂)과 *Artemia* cyst를 막자 사발에 넣어서 파쇄하였다. 파쇄한 용액을 cheesecloth로 여과한 다음, 원심 분리(12,000rpm, 20분, 4°C)하여 상등액을 회수하여서, 이 용액을 조효소액으로 사용하였다(위의 전 과정을 4°C에서 실시하였다).

효소 활성 측정

Protease의 활성은 Anson법을 다소 변형하여⁴⁾ 측정하였으며, 효소의 기질로는 0.6% Hammarsten Casein 용액(0.02M lactic acid pH 3.0) 1ml 과 완충액(glycine-HCl buffer, pH 3.0) 1ml에 조효소액 0.2ml를 첨가하여 35°C 항

온 수조에서 30분간 반응시켰다. 여기에 0.44M Trichloroacetic acid 용액 2ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음, 20분간 37°C에서 보관했다가 5,000×g에서 5분간 원심 분리하여 침전물을 제거하고 상등액 1ml을 회수하였다. 이 상등액에 0.55M Na₂CO₃ 5ml를 첨가한 후에 2배로 희석한 phenol reagent(Hayashi제품) 1ml을 가하여 잘 혼합한 후, 20분간 37°C 항온 수조에서 발색 반응을 시킨한 후에 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 동시에 blank test를 하여서, sample의 A₆₆₀을 비교하여 그 차이로서 활성을 측정하였다. Protease활성의 1 Unit는 35°C에서 1분간 1μg의 tyrosine을 생성하는 효소의 양으로 정하였다.

단백질 정량

효소 정제 과정 중의 단백질 농도는 280nm에서의 흡광도(A₂₈₀)로 나타내었다.

Protease의 정제

조효소액에 40%농도(243g/L)가 되도록 황산암모늄을 첨가하여 1시간 동안 교반, 포화시킨 후에 냉동 원심분리(15,000×g, 4°C, 20분)하여 상등액을 회수하고, 그상등액에 60%농도(132g/L)의 황산암모늄을 첨가하여 1시간 교반, 포화시키고 냉동 원심분리후 침전물을 회수하여 그 침전물에 소량의 15mM 인산완충액(pH 7.0)을 가하여 녹였다. 용액으로부터 염을 제거하기 위해 PD-10 column(Pharmacia제품)을 사용하였다. 염이 제거된 효소액을 Sephadex G-200 column(2.5×60cm)에 흡착시킨 후, 15mM 인산완충액(pH 7.0)으로 유출시켰다. 유출 속도는 20ml/hr로 하였으며, 4ml씩 분획하여 효소 활성과 단백질량을 측정하여서 효소 활성이 있는 분획만 모아서 DEAE-Sephadex A-50 column(2.5×25cm)에 다시 흡착시킨 후, 동일 완충액으로 용출시켜 비흡착 단백질을 제거하였다. 흡착된 단백질을 용출시키기 위해서 완충액의 KCl농도를 25mM-700mM로하여 linear gradient를 걸어 흡착된 단백질을 용출시켰다. 이때 유속은 25ml/hr로 하였으며, 분획당 4ml로 하였다.

Protease의 생화학적성질 조사

pH안정성을 조사하기 위하여 효소 용액을 pH 3-10까지의 범위에서 각 pH별로 20°C에서 30분간 방치한 후에

35°C에서 30분간 반응시켜서 잔존 활성을 측정하였다. 열안정성을 조사하기 위해서는 20-80°C 온도 범위에서 정제 효소를 각 온도별로 20분 동안 열처리한 후 35°C에서 30분간 반응시켜서 잔존 효소 활성을 측정하였다. 최적 pH를 측정하기 위해 여러 pH 조건에서 효소 활성을 측정하였고, 이 효소의 최적 온도를 측정하기 위해 여러가지 온도에서 효소 활성을 측정하였다.

Protease 저해제 분석

Protease 활성에 대한 저해제의 영향을 보기 위해 다음과 같은 저해제를 사용하여 저해활성을 측정하였다: Antipain (50ug/ml), Aprotinin (2ug/ml), Bestatin (50ug/ml), Chymostatin (50ug/ml), E-64 (10ug/ml), EDTA (0.5mg/ml), Leupeptin (5ug/ml), Peabloc (1mg/ml), Pepstatin (0.75ug/ml), Phosphoramidon (300ug/ml), Iodoacetic acid (5mM). 그리고 최종 농도 1mM의 금속을 이용하여 상온에서 30분간 방치하여 각종 금속에 대한 효소 저해 활성을 (35°C에서 30분간 반응) 조사하였다.

결과 및 고찰

Cyst Acid Protease의 정제

조효소액에 황산암모늄을 첨가하여 침전시킨 결과 40-60% 황산암모늄 범위의 침전물에서 protease의 활성의 역가가 확인되었으며 비활성도는 1.37이었다. 이 효소를 분리하여 15mM potassium phosphate 완충액 (pH 7.0)으로 평형화시킨 Sephadex G-200에 흡착시킨 후 gel chromatography한 결과 Fig.1과 같이 나타났으며 그중 분획 NO. 26-40부위에서 protease 활성이 확인되었고 비활성도는 12.81이었다. 이 활성 부분을 15mM potassium phosphate 완충액 (pH 7.0)으로 평형화시킨 DEAE-Sephadex A-50에 다시 흡착시켜서 효소를 elution시켰다 (Fig. 2). 25 mM로부터 700mM까지의 KCl 농도구배로 흡착된 단백질을 용출시킨 결과 0.4M에서 0.6M KCl 농도부분 (분획 NO 50-70)에서 protease 활성이 나타났다. Protease 정제 과정별 효소 역가는 Table 1에 나타난 바와 같이 최종 DEAE-Sephadex A-50 정제후에는 homogenate에 비하여 14배 증가하였다. Artemia는 적색 색소가 풍부하여 정제할 때 이것을 제거하는 것이 효소 정제의 관건이다. 다른 연구팀들

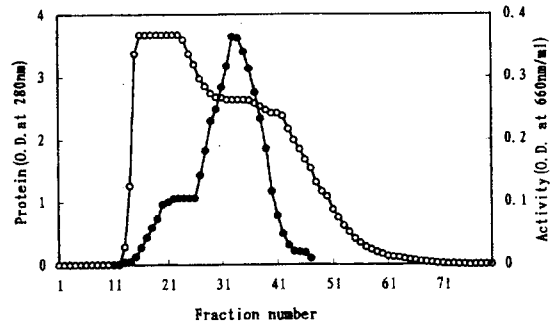


Fig. 1. Elution pattern of Acid protease from Sephadex G-200 column.

The enzyme solution was applied onto a column of Sephadex G-200 equilibrated with 15mM potassium phosphate buffer (pH 7.0).

The protein was eluted from the column with the same buffer.

Column size: 2.5×60cm, flow rate: 20ml/hr, fraction volume: 4ml, absorbance at 280nm:

○-○, protease activity: ●-●.

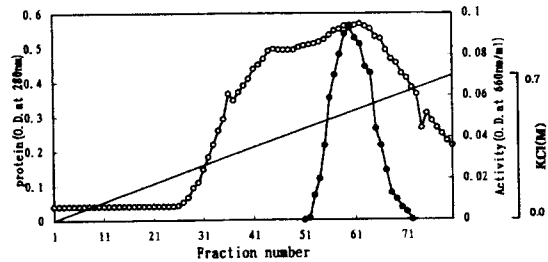


Fig. 2. Elution pattern of Acid protease from DEAE-Sephadex A-50 column.

The enzyme solution was applied onto a column of DEAE-Sephadex A-50 equilibrated with 15 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0). After the column was washed with a same buffer. The enzyme was eluted from the column with a linear gradient of NaCl (25mM-700mM) in 15mM potassium phosphate buffer (pH 7.0).

Column size: 2.5×25cm, flow rate: 25ml/hr, fraction volume: 4ml, absorbance at 280nm:

○-○, protease activity: ●-●.

Table 1. Summary of purification procedure of cyst acid protease

Purification step	Volume (ml)	Total protein (O.D.280nm)	Total Activity (Unit)	Specific Activity (Unit/O.D280nm)	Yield (%)
Homogenate	120	5333	4216	0.97	100
40-60% (NH ₄) ₂ SO ₄	16	1482	2033	1.37	48
Sephadex G-200	54	134	1716	12.81	41
DEAE-Sephadex A-50	35	22	300	13.64	7

의 보고(Warner and Shridhar, 1985)에 의하면 일차적으로 이온교환 수지를 사용하면 효과적으로 이 효소가 정제된다고 하였지만 본 실험에서는 이온교환수지 처리 과정에서 많은 효소 실활을 유도하여 효과적인 정제가 되지 못하였다. 따라서 이온교환 수지가 아닌 gel filtration을 우선적으로 실시하였다. 그 결과 색소(분획 NO. 16-26)가 효과적으로 제거되었다. 결과보고는 않았지만 고농도염(0.8 M 이상)이 존재하면 효소가 실활되는 경우가 발생하였었다.

부분 정제된 Acid Protease의 특성

부분정제된 acid protease의 최적 pH를 조사한 결과 반응 최적pH는 3.0이며(Fig. 3), 따라서 전형적인 산성 protease인 것으로 판단되었다. 이 효소의 경우 특이한 것은 최적 pH와 pH안정범위가 틀리다는 점이다. 이런 특이한 현상은 이효소가 발생상에 변이를 추진하는 기능을 하는 효소이므로 기능후에 조속히 효소활성이 사라지기 위한 것이 아닌가

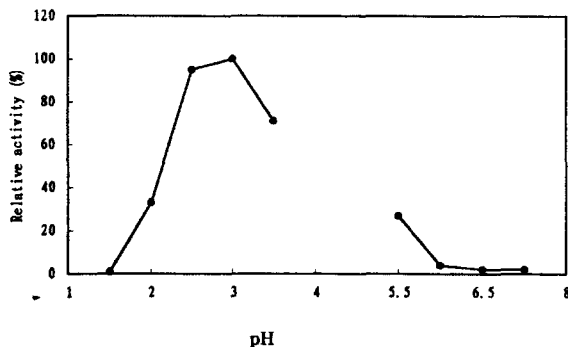


Fig. 3. Effect of pH on enzyme activity
Casein was dissolved in 0.1M sodium citrate buffer of various pH buffer. Enzyme activity from pH 3.5 to pH 5.5 could not be assayed because of coagulating of casein.

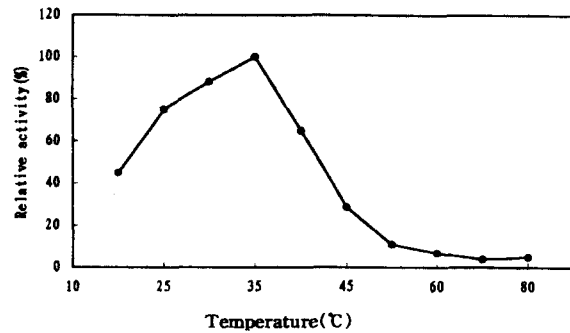


Fig. 4. Effect of temperature on enzyme activity
The reaction was carried out at various temperature for 20 min.

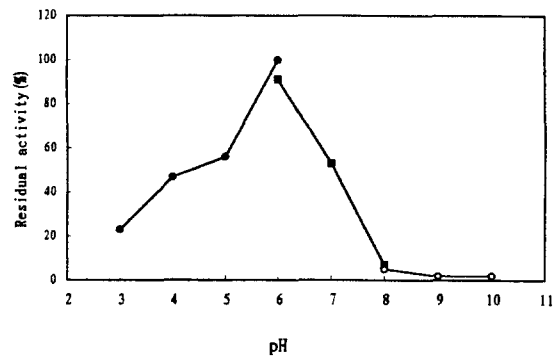


Fig. 5. Effect of pH on the stability of cyst acid protease
The enzyme was incubated at each pH at 20°C for 30min, and the remaining activity was measured at pH 3.0.
●-● : citrate buffer, -■- : potassium phosphate buffer, -○- : Tris-HCl buffer.

추측된다. 이 acid protease의 최적온도는 35°C부근 이었고 (Fig. 4), pH안정성은 Fig. 5와 같이 나타났으며 특히 pH 8.0이상일 때 효소활성이 거의 실활 되었다. 그리고 pH 6.0 일 때 효소가 가장 안정하였다. 이 효소의 경우 이온교환을 실시하여 효소를 정제할 때는, 효소가 이온 강도와 pH변화에 민감하여 효소활성이 실활되는 경우가 많으므로, 정제할 때 pH조절에 특별히 유의하여야 했다. 열안정성을 측정 한 결과 45°C에서 90%가 효소 활성의 실활을 보였고, 60°C이상의 온도에서는 거의 대부분의 효소가 실활되었다 (Fig. 6). 기존의 보고에서 나타난 *Artemia* acid protease와 비슷한 효소학적 특징을 가지고 있었지만, 최적 pH만은 다소 낮은 특징을 나타내었다. 특히 다른 동물, 식물, 미생물 기원 acid protease들과 비교할 때에 온도와 pH변화에서 불안정하여 다른 protease들보다 효소활성의 실활이 많은 편이었다.

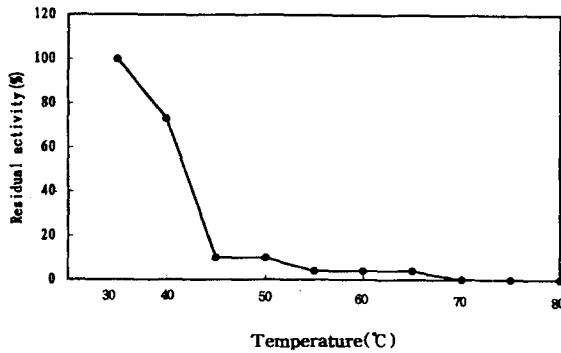


Fig. 6. Effect of temperature on the cyst acid protease. The enzyme was incubated at each temperature at pH3.0 for 20min, and the remaining activity was assayed at 35°C.

효소 활성에 대한 금속 이온과 저해제의 영향

정제한 효소액을 다양한 금속 이온과 반응시킨 후 효소 활성을 측정 한 결과, Table 2에 정리된바와같은 결과를 얻었다. 각종 금속의 이온 농도를 1mM로하여 그 영향을 측정하였때, FeCl₃ · 6H₂O, CuCl₂ · 2H₂O, ZnSO₄ · 7H₂O 등은 효소 활성을 저하시켰으며, 특히 CuCl₂ · 2H₂O가 가장 크게 이 효소를 저해하였다(Table 2). 이 결과는 Cu⁺가 cyst acid protease의 효과적인 저해 금속이라는 문헌

상의 보고와 일치하였다²⁾.

Table 2. Effect of metal ions on the enzyme activity

Reagents(1mM)	Relative activity(%)*
None	100
CaCl ₂	100
NaCl	95
MgCl ₂ · 6H ₂ O	102
KCl	97
CoCl ₂ · 6H ₂ O	102
MnCl ₂ · 4H ₂ O	101
FeCl ₃ · 6H ₂ O	78
CuCl ₂ · 2H ₂ O	51
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	72

*, The enzyme was incubated at room temperature for 30min with the assigned metal ion before the addition of substrate. The remaining activity was measured at pH 3.0, 35°C for 30min.

Table 3. Effect of various protease inhibitors on *Artemia* acid Protease

Treatment	Concentration	Relative activity (%)*
Control(None)		100
Antipain	50ug/ml	9
Aprotinin	2ug/ml	55
Bestatin	50ug/ml	98
Chymostatin	50ug/ml	11
E-64	10ug/ml	23
EDTA	0.5mg/ml	109
Leupeptin	5ug/ml	21
Pefabloc SC	1mg/ml	91
Pepstatin	0.75ug/ml	88
Phosphoramidon	300ug/ml	90
Iodoacetate	5mM	60

*, The enzyme was incubated at room temperature for 30min with the assigned inhibitor before the addition of substrate. The remaining activity was measured at pH3.0, 35°C for 30min

금속이온 외에 *Artemia* cytosol protease의 특성을 조사하기 위해, 여러 가지 저해제를 첨가하여 그 영향을 검토하였다(Table 3). 그중에 Metalloprotease저해제인 EDTA는 오히려 Acid protease의 효소 활성을 증가시켰지만, thiol protease저해제인 leupeptin, antipain, chymostatin, E-64, iodoacetate등은 효과적으로 효소활성을 저해시켰다. 그러나 Carboxyl protease 저해제인 pepstatin는 본 효소에 큰 영향을 주지 못하였다(Table 3). 이러한 결과로 판단할 때 본 효소는 thiol protease로 판단되며, 특히 비 peptide계열인 iodoacetate에 의하여 저해받는 것으로 볼 때, 이 효소가 thiol protease라는 것을 확신할 수 있었다. 문헌보고²⁾에 나타난 바로는, 이들 효소가 serine protease inhibitor(aprotinin)에 의해 저해활성을 받지 않는 것으로 보고되어있었지만, 본 실험에서는 aprotinin에 의하여 활성저해가 나타남으로서, serine protease inhibitor에 의한 효과에 대해서는 문헌과 상이한 효과를 보여주었다.

요 약

*Artemia franciscana*의 cyst에서 protease를 정제하기 위해 세포를 파쇄하여 원심 분리한 후 상등액을 회수하였다. 그상등액에 40-60% 황산암모늄을 첨가하여 침전시켜서 염을 제거한 후, Sephadex G-200 및 DEAE-Sephadex A-50 column chromatography를 하여 정제한 후 본 효소의 특성을 조사한바 그 특성은 아래와 같았다.

정제 과정을 거치는 동안, 비활성은 13.64배 증가하였고, 수율은 7%였다. 그리고 이효소는 pH 6에서는 안정하였으나, pH 8이상에서는 대부분의 활성이 실활 되었고, 최적 pH는 3.0이었다. 따라서 이 효소는 전형적인 산성 protease로 판정되었다. 본 효소는 60°C이상의 온도에서 대부분 실활 되었고, 최적 활성 반응 온도는 35°C였다. 금속 이온의 영향을 알아본 결과, Cu^{++} , Zn^{++} , Fe^{++} 가 효소의 활성을 저해하였고, 중금속 chelator인 EDTA는 반대로 효소 활성을 증가시켰다.

단백질분해효소에 특이적인 저해제를 첨가하여 실험한 결과 thiol protease inhibitor인 antipain, chymostatin, leupeptin, E-64, iodoacetate등에 효과적으로 효소활성이 저해받으므로 본 효소는 acid thiol protease라 판정했다.

감사의 글

이 연구는 부산 대학교 학술 연구 조성 연구 조성비(발전 기금 1995-1996년) 지원에 의하여 수행되었다.

참 고 문 헌

1. Busa, W. W., Crowe, J. H. and Matson, G. B. : Intracellular pH and the metabolic status of dormant and developing *Artemia* embryos, *Biochim. Biophys. Acta.*, **216**, 711(1992).
2. Warner, A. H. and Shridhar, V. : Purification and characterization of a cytosol protease from dormant cyst of the brine shrimp *Artemia*, *J. Biol. Chem.*, **260**, 7008(1985).
3. Tanaka, K., Ikegaki, N. and Ichihara, A. : Purification and characterization of hemoglobin-hydrolyzing acidic thiol protease induced by leupeptin in rat liver, *J. Biol. Chem.*, **259**, 5937(1984).
4. Lee, T. H. : Properties and functions of intracellular acid protease II in *Rhodotorula glutinis*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **12**, 111(1984).
5. Kim, Y. M. and Lee, H. S. : Purification and Characterization of an Intracellular Protease from *Pseudomonas carboxydohydrogena*, *Kor. J. Microbiol.*, **29**, 167(1991).
6. Courcelles, D. C. and Kondo, M. : Lipovitellin from crustacean, *Artemia salina*, *J. Biol. Chem.*, **255**, 6727(1980).
7. Naggainis, P. A. and Warner, A. H. : Evidence for the presence of an acid protease and protease inhibitors in dormant embryos of *Artemia salina*, *Dev. Biol.*, **68**, 259(1979).
8. Perona, R. and Vallejo, C. G. : The lysosomal proteinase of *Artemia* : purification and characterization, *Eur. J. Biochem.*, **124**, 357(1982).
9. Olalla, A., Osuna, C., Sebastian, J. and Sillero, M. A. : Purification and properties of three proteases from the larvae of the brine shrimp *Artemia salina*, *Biochim. Biophys. Acta.*, **523**, 181(1978).
10. Osuna, C., Olalla, A., Sillero, A., Sillero, G. and Sebastian, J. : Induction of multiple proteases during the early larval development of *Artemia salina*, *Dev. Biol.*, **61**, 94(1977).
11. Beynon, R. J. and Bond, J. S. *Proteolytic enzyme : a practical approach*, pp. 83-104, IRL Press(1989).