

## I269S와 I224S 이중변이 알코올 탈수소효소의 특성

류지원 · 이강만\*

이화여자대학교 약학대학

(Received September 25, 1997)

### The Characteristics of I269S and I224S Double Mutant Horse Liver Alcohol Dehydrogenase

Ji Won Ryu and Kang Man Lee\*

College of Pharmacy, Ewha Womans University, 11-1 Daehyundong, Seodaemun-gu, Seoul, Korea, 120-750

**Abstract**—Ile-224 in I269S mutant horse liver alcohol dehydrogenase isoenzyme S (HLADH-S) was mutated to serine by site-directed mutagenesis in order to study the role of the residue in coenzyme binding to the enzyme. The specific activity of the I269S & I224S mutant enzyme to ethanol was increased 6-fold and all Michaelis constants ( $K_m$ ,  $K_b$ ,  $K_p$  and  $K_q$ ) were larger than those for the wild-type and I269S enzyme. The substitution decreased the affinity to coenzymes and increased the specific activity of the enzyme. The mutant enzyme showed the highest catalytic efficiency for octanol among the primary alcohols. But it didn't have activities on retinoids and 5 $\beta$ -cholanolic acid-3-one. From these results, it was confirmed that the hydrophobic interaction of Ile-224 residue with coenzyme was related to coenzyme affinity in ADH reaction. The substitution also affected the substrate affinities to the enzyme.

**Keywords** □ I269S & I224S, double mutant, HLADH isoenzyme S.

말의 간에서 분리된 알코올 탈수소효소(Horse liver alcohol dehydrogenase: HLADH)는 효소(apoenzyme), 효소-조효소 복합체(binary complex), 효소-조효소-기질 또는 저해제 복합체(ternary complex) 등의 X-선 회절 자료에 의한 3차 구조가 보고되었으며<sup>1-7)</sup> 최근에는 'E'와 'S'형 이성효소의 유전자가 클로닝되었다.<sup>8)</sup> 'S'형의 HLADH는 스테로이드성 알코올과 케톤을 기질로 이용할 수 있는 효소이며 이에 비하여 'E'형의 HLADH는 스테로이드성 알코올과 케톤을 기질로 이용할 수 없는 효소로 알려져 있다. 생체내의 'S'형 이성효소의 존재와 두 종류 이성효소의 넓은 기질 특이성과 관련하여 다양한 생체내의 알코올 및 알데하이드의 전환에 있어서 알코올 탈수소효소의 역할을 규명하기 위한 많은 연구들이 진행되고 있다.<sup>9-18)</sup>

저자들은 스테로이드성 기질을 전환하는 능력이 있는 'S'형의 HLADH 효소의 클로닝된 유전자를 이용하여 효소의 활성 부위에서 조효소 NAD<sup>+</sup>의 결합 부위에 존재하는 것으로 알려진 소수성 아미노산 잔기인 269번 이소루신을, 효모의 상응하는 아미노산 잔기인 극성을 띠는 세린으로 위치특이적변이 방법을 통해 치환한 변이 효소에 관한 연구를 실시하였을 때 효소의 비활성이 77배까지 증가됨을 보고한 바 있다.<sup>19)</sup> 이러한 반응성의 향상은 조효소의 효소로부터의 이탈속도의 증가에 기인함을 알 수 있었다. 또한 다양한 기질에 대한 활성을 조사한 결과, 변이 효소가 특히 5 $\beta$ -cholanolic acid-3-one과 5 $\beta$ -androstane-3,17-dione의 스테로이드성 기질과 레티놀/레티날에 대한 활성증가를 나타냄을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 증가된 활성을 지니는 'S'형 I269S 변이 효소의 또다른 조효소 부착 부위의 아미노산 잔기인 224번 이소루신을 세린으로 위치특이적 변이 방법을 통하여 변화시키고 변이 효소를 얻은 다음

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-360-3041 (팩스) 02-360-3051

효소의 활성, 반응속도, 반응 생성물 또는 기질 유사체에 의한 저해와 기질 특이성에 관하여 실험하여, 야생형 효소, I269S 변이 효소와 비교 분석함으로써 224번 이소루신 아미노산 잔기의 효소 활성에의 역할을 검토하였다.

### 실험 재료 및 방법

**균주** - 위치특이적변이와 DNA 염기서열 결정을 위한 template DNA를 얻기 위해 pBPP/I269S HLADH-S phagemid를 지니는 *E. coli* XL1-Blue를, 변이된 'S'형 HLADH 유전자를 형질전환시키기 위한 숙주로 *E. coli* XL1-Blue competent cell(Stratagene)을 사용하였다.

**효소 및 조효소** - 야생형 효소 또는 변이 'S'형 HLADH는 각각의 플라스미드를 지니는 *E. coli* XL1-Blue를 배양하여 분리, 정제하여 사용하였다. 효소 활성 측정과 효소 반응속도론적 연구에 사용한 조효소로는  $\text{NAD}^+$  free acid(Grade III, Sigma Chemical Co.)와 NADH(Grade III, Sigma Chemical Co.)를 사용하였다.

**배지** - Double-stranded template DNA를 얻기 위한 실험에서 pBPP/I269S HLADH-S phagemid를 지니는 *E. coli* XL1-Blue의 배양에는 엠펜실린(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )과 테트라사이클린(12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 포함하는 LB배지(1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.0)를, 형질전환 균주의 선별을 위한 배양에는 엠펜실린(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 테트라사이클린(12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 메치실린(80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 포함하는 LB 고체배지를 사용하였다. HLADH 분리를 위한 종배양에는 엠펜실린(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )과 테트라사이클린(12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 포함하는 LB배지를, 본배양에는 엠펜실린(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 포함하는 LB배지를 사용하였다.

**시약** - 변이를 위한 primer로서 5'-GGG/GTG/

224  
GAC/GGC/AAC/AAA/GA-3'(20-mer)와 벡터  
AC

상의 엠펜실린 저항성 유전자상에 존재하는 제한 효소 *ScaI* 부위를 *MluI* 부위로 변화시키는 5'-GAC/TTG/GTT/GAC/GCG/TCA/CCA/GTC/ACA/G-3'(28-mer)는 한국표준과학연구원 기초과학연구지원센터에 의뢰하여 합성하였다. 위치특이적변이는 Stratagene

의 Chameleon™ Double-Stranded Site-Directed Mutagenesis Kit을, DNA 염기서열 결정에는 USB Sequenase System을 사용하였다. DEAE-Sepharose CL-6B, S-Sepharose Fast Flow와 Sephadex G-50, SDS-PAGE에 사용한 표준 단백질 size marker는 Sigma Chemical Co. 제품을, 단백질 정량에 사용한 단백질 정량용액은 Bio-Rad(Bradford reagent) 제품을 사용하였다. 기질로 사용한 95% 에탄올(Ducksan Pharmaceutical Co.)과 아세트알데하이드(Fluka), 기타 알코올성 기질(특급 또는 1급)은 사용시에 증류하여 사용하였다. 5 $\beta$ -Androstane-3, 17-dione은 Steraloids INC., 기타 스테로이드성 기질과 레티노이드 기질은 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였다. 효소의 유도제로서 IPTG와 조효소  $\text{NAD}^+$ 와 NADH, 기질 유사체인 2,2,2-trifluoroethanol(TFE) 역시 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였다. 기질 유사체인 heptafluorobutanol(HFB)은 Aldrich 제품을 사용하였다. DNA 염기서열 결정을 위한  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-dATP는 Amersham의 Redivue® 제품을 사용하였으며 기타 실험에 사용한 모든 시약은 특급 또는 1급 제품을 사용하였다.

**'S'형 HLADH 유전자의 위치특이적변이** - 'S'형 HLADH가 포함되어 있는 *E. coli* XL1-Blue 집락을 엠펜실린(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )과 테트라사이클린(25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 포함하고 있는 3 ml LB배지에 접종하여 37°C, 240 rpm에서 하룻밤 배양하여 얻은 배양액을 Plasmid mini boiling prep. 방법을 실시함으로써 double-strand template DNA를 분리 정제하였다. 얻어진 DNA를 0.8% agarose gel 상에서 전기영동시켜 정제 정도를 확인하고 UV-spectrophotometer로 DNA를 정량하였다. 위치특이적변이는 Stratagene Chameleon™ Double-Stranded Mutagenesis Kit을 사용하여 unique site elimination method<sup>20)</sup>에 따라 실시하였다. 최종적으로 얻은 각각의 집락에 대하여 double-stranded DNA를 분리하여 dideoxy chain termination method<sup>21)</sup>에 따라 DNA 염기서열을 결정함으로써 변이 균주를 선별하였다.

**'S'형 HLADH 효소의 분리 및 정제**<sup>8)</sup> - 플라스미드를 포함하는 *E. coli* XL1-Blue를 엠펜실린(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )과 테트라사이클린(12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 포함하고 있는 50 ml LB배지에 접종하여 종배양(37°C, 210 rpm, 15시간)하고, 배양액 36 ml를 엠펜실린(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을

포함하고 있는 4.5 L LB배지에 접종하여 진탕배양 (30°C, 220 rpm)하여  $A_{600}$ 이 약 0.8이 되었을 때(7~8 시간) 200 mg/ml IPTG를 최종 농도 0.2 mM이 되도록 첨가한 후 다시 진탕배양 (30°C, 220 rpm, 약 20 시간)하였다. 세포를 원심분리(GS-3 rotor, 6,500 rpm, 10분, 4°C)하고 완충액(5 mM sodium phosphate, pH 7.8, 0.25 mM EDTA)으로 세척하여 모았으며, -70°C에 보관하였다가 S'형 HLADH의 분리에 사용하였다. 효소의 분리 정제는 sonication, protamine sulfate precipitation, 1차 DEAE-Sephrose column chromatography, S-Sepharose Fast Flow column chromatography, Sephadex G-50 column chromatography, 2차 DEAE-Sephrose column chromatography, ultrafiltration concentration 순서를 통하여 수행하였다. 분리된 효소 용액의 정제 정도를 확인하기 위하여 Laemmli<sup>22)</sup>의 방법에 따라 12% SDS-PAGE를 실시하였다.

**효소 활성 측정** - 효소 활성 측정액 1 ml에 대하여 1.35 mg의  $NAD^+$  free acid를 용해하고 25°C에서 평형시켰다. 효소 활성 측정액 980  $\mu$ l 또는 990  $\mu$ l를 cuvette에 취한 다음 20  $\mu$ l 또는 10  $\mu$ l의 효소액 또는 세포 추출액을 adder mixer를 이용하여 가하여 340 nm에서 NADH 생성에 따른 시간별 흡광도 변화량을 측정하고<sup>23)</sup> 다음 식에 의해 효소 활성을 계산하였다: 효소 활성(Units/ml) = ( $\Delta A_{340}/\text{min} \times \text{회석 배수}$ )  $\div$  ( $6.22 \times \text{가해진 효소 용액의 부피 ml}$ ). 이때 사용하는 효소 활성 측정액은 증류수 500 ml에 대해  $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$  19.62 g, semicarbazide  $\cdot$  HCl 0.429 g, glycine 0.746 g, 95% 에탄올 17.1 ml를 가해 용해한 후 pH 9.0으로 맞추어 4°C에 보관하였고 활성 측정시에는 상등액만 취하여 사용하였다.

**단백질 정량과 비활성 측정** - 효소 분리 과정 중 각 단계의 시료들의 단백질 양은 Bio-Rad 단백질 정량 용액을 이용하여 측정하였다. 단백질 정량 용액 200  $\mu$ l을 sample solution 800  $\mu$ l에 가해 섞은 뒤 15분간 방치한 후  $A_{595}$ 를 측정하여 bovine serum albumin으로 작성한 표준 검량곡선으로부터 단백질 양을 계산하였다. 효소 활성 측정액에 의해 구한 활성(U/ml)과 단백질 농도(mg/ml)로부터 비활성(U/mg)을 계산하였다.

**초기 반응속도 연구** - 효소의 조효소와 기질에 대한 Michaelis 상수를 구하였다. 반응은 0.25 mM EDTA를 포함하는 pH 8.0의 33 mM sodium phosphate 완충액

을 사용하였으며 정반응에 대하여는 형광광도계를, 역반응에 대하여는 UV 분광광도계를 사용하였다. 정반응(에탄올의 산화)의 경우, 0.5 ml 형광광도계용 cuvette (path length=0.5 cm)에 25°C로 온도 평형시켜 둔 완충액, 조효소와 기질을 각각의 농도로 첨가한 후 효소 용액을 가하여 잘 혼합한 다음 340 nm excitation, 460 nm emission 조건하에서 형광의 시간에 따른 변화를 측정하여 초기 반응속도를 구하였다. 역반응(아세트알데하이드의 환원)의 경우, 1 ml cuvette(path length=1 cm)에 25°C로 온도 평형시켜 둔 완충액, 조효소와 기질을 각각의 농도로 첨가한 후 효소 용액을 가하여 340 nm에서의 흡광도 변화를 측정하여 초기 반응속도를 구하였다. 각각의 방법으로 구한 초기 반응속도( $\Delta F/\text{min}$  또는  $\Delta A_{340}/\text{min}$ )를 HYPER program을 이용한 computer fitting을 실시하여  $K_m$  및  $V_{max}$  값을 구하였다.

**반응 생성물에 의한 저해 연구** - 반응은 25°C에서 온도 평형시켜 둔 0.25 mM EDTA를 포함하는 pH 8.0의 33 mM sodium phosphate 완충액에 조효소, 기질, 저해제 용액을 혼합하고 효소 용액을 가하여 340 nm에서의 흡광도 변화를 측정하여 구한 초기 반응속도를 COMP, NONCOMP, UNCOMP program을 이용한 computer fitting을 실시함으로써 저해상수( $K_{ii}$  또는  $K_{is}$ )를 구하였다.

**기질 유사체에 의한 저해 연구** - 83 mM Potassium phosphate, 40 mM potassium chloride(pH 7.3), 0.25 mM EDTA를 함유하는 완충액을 사용하였다. 저해제로 기질 유사체인 트리플루오로에탄올(TFE)과 헵타플루오로부탄올(HFB)을 사용하여 반응 생성물에 의한 저해 연구와 동일한 방법으로 실험하였다. 각각의 저해제에 의한 효소의 저해형태와 저해상수( $K_i$ )를 구하였다.

**일가 알코올에 대한 기질 특이성** - 83 mM Potassium phosphate, 40 mM potassium chloride(pH 7.3), 0.25 mM EDTA를 함유하는 완충액을 사용하여 2 mM  $NAD^+$  농도에서 분광광도계를 이용하여 에탄올, 프로판올, 부탄올, 펜탄올, 헥산올, 헵탄올, 옥탄올, 노난올, 데칸올, 사이클로헥산올, 벤질알코올 등의 기질에 대한 효소 활성을 측정하였다. 이로부터 각각의 알코올에 대한  $K_m$  값과  $V_{max}/K_m$  값을 구하였다.

**스테로이드성 기질에 대한 활성 측정과 초기 반응속도 연구** - 완충액으로는 0.25 mM EDTA를 포함하는 pH 8.0의 33 mM sodium phosphate 용액을 사용하

였고 기질의 용해성을 증가시키기 위하여 0.3% 메탄올을 첨가하여 사용하였으며 0.2 mM NADH의 존재 하에서 25°C에서 초기 반응속도를 측정하고  $K_m$ ,  $V_{max}/K_m$ 을 구하였다.

#### 레티노이드에 대한 활성 측정<sup>16</sup>과 초기 반응속도 연구

All-trans-retinol, all-trans-retinal에 대한 변이 효소의 활성을 0.1 M sodium phosphate, 40 mM sodium chloride, 0.02% Tween 80을 포함하는 완충액 (pH 7.5)에 조효소로  $NAD^+$  (4 mM) 또는 NADH (0.77 mM)를 첨가하고 25°C에서 생성 또는 감소되는 레티날에 의한 400 nm에서의 흡광도 변화를 측정함으로써 초기 반응속도를 측정하였다. 또한 레티날의 환원 시험에서는 1 mm path length의 cuvette를 사용하였다. 초기 반응속도 실험 결과들로부터  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $V_{max}/K_m$ 을 구하여 야생형 효소, I269S의 효소와 비교하였다.

### 결과 및 고찰

**I269S 'S'형 HLADH 유전자의 위치 특이적 변이** - 변이를 실시한 DNA를 *E. coli* XL1-Blue에 형질 전환시켜 최종적으로 형성된 20여개의 집락들로부터 double-stranded pBPP/HLADH-S를 분리하여 Sanger의 dideoxy chain termination 방법으로 DNA 염기 서열을 결정하였을 때 224번 이소루신 코돈(ATC)이 세린에 상응하는 코돈(AGC)으로 변화된 것을 확인하였으며 269번 코돈이 세린임도 확인할 수 있었다(Fig. 1).

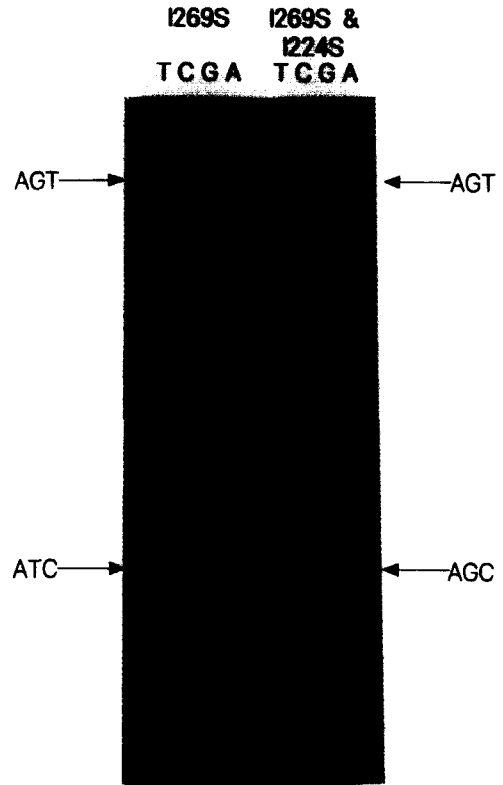


Fig. 1—Confirmation of site-directed mutagenesis in HLADH-S gene at the site 269 and 224 residue from isoleucine (ATT and ATC) to serine (AGT and AGC).

**'S'형 HLADH 효소의 분리 및 정제** - 세포추출액조제, 1차 DEAE-Sephacrose, S-Sephacrose, Sepha-

Table I—Purification table of wild-type (I269) and mutant (I269S and I269S & I224S) HLADH-S proteins

Purification Step	Type of Enzyme	U/ml	mg/ml	U/mg	Yield (%)	Purification Fold	Total Units	Total mg
Protamine Sulfate	I269	0.56	14.3	0.039	100	1	33.6	858
	I269S	37.8	14.3	0.265	100	1	2268	858
	269S & I224S	4.34	17.5	0.248	100	1	225.7	910
DEAE-Sephacrose	I269	0.41	2.80	0.14	84.4	3.6	28.35	196
	I269S	24.5	1.83	13.4	81.0	5.1	1838	137.3
	I269S & I224S	2.41	2.80	0.861	91.8	3.5	207.3	240.8
S-Sephacrose	I269	0.11	0.11	0.96	39.3	24.6	13.2	13.2
	I269S	9.5	0.18	52.5	41.9	19.8	950	18.0
	I269S & I224S	0.87	0.104	8.37	46.2	33.5	104.3	12.5
Sephadex G-50	I269	0.31	0.32	0.96	28.6	24.6	9.61	9.92
	I269S	47	0.85	58.8	36.3	22.2	823	14.88
	I269S & I224S	1.86	0.288	6.46	30.5	26.0	68.8	10.7
DEAE-Sephacrose	I269	0.16	0.12	1.36	27.6	34.9	9.28	6.96
	I269S	29.3	0.44	66.6	33.2	25.1	753	11.31
	I269S & I224S	1.01	0.126	8.02	31.8	32.3	71.7	8.9

dex G-50, 2차 DEAE-Sephrose column chromatography를 통하여 효소 단백질을 정제한 결과는 Table I과 같았다. I269S & I224S 변이 효소의 각 분리 정제 과정에서의 정제 정도와 수율은 야생형 효소와 비교하여 거의 유사하였으나 효소 활성 측정액을 이용한 활성 측정 조건하에서의 비활성은 야생형 효소가 1.36 U/mg, I269S 변이 효소는 66.6 U/mg를 나타낸 반면, I269S & I224S 변이 효소는 8.0 U/mg로 야생형 효소에 비하여는 6배 증가하였으나 I269S에 비하여는 약 8배정도 활성이 감소되었다.

**초기 반응 속도 연구** - Table II에서 보는 바와 같이 I269S & I224S 변이 효소의  $K_m$  값은  $NAD^+$ , 에탄올, 아세트알데하이드, NADH에 대해 I269S 변이 효소와 비교하면 각각 2.3, 3.9, 0.6, 7.2배가, 야생형 효소와 비교하면 157, 248, 12, 77배 증가되었다. 이로부터 정반응(에탄올의 산화)이 역반응(아세트알데하이드의 환원)보다 큰 영향을 받은 것을 알 수 있었다. 에탄올에 대한 turnover number는 야생형 효소에 비해 5.2배가 증가되었으나 I269S 변이 효소에 비해서는 0.68배로 약간의 감소를 보였다. 아세트알데하이드에 대한 tur-

nover number는 야생형 효소에 비하여 1.5배가 증가되었고, I269S 변이 효소보다는 0.38배로 감소되었다.

'S'형과 'E'형의 두 가지 이성효소의 chimeric mutant인 E/D115A, ESE, ESS, S/K366E 변이 효소에 대한 결과<sup>24, 25)</sup>와 비교할 때, 본 변이 효소의 경우 다른 어느 효소보다도 정반응에 대한 효과가 현저하였다. 그 중에서 가장 유사한 변이 효소는 ESE로서 'E'형 HLADH의 374개의 아미노산 잔기들 중에서 80~118번 아미노산 잔기를 'S'형의 것으로 치환한 chimeric enzyme으로서 기질과 NADH에 대한  $K_m$ 값의 증가 정도가 I269S & I224S 보다 컸지만  $NAD^+$ 에 대한  $K_m$ 값의 변화가 ESE의 경우는 'E'형과 큰 차이가 없으나 I269S & I224S의 경우는 'E'형 보다 444배까지 증가되었다. 결국 'E'형과 'S'형의 서로 상이한 아미노산 잔기인 94, 101, 110, 175 잔기보다는 269번과 224번의 이소루신이  $NAD^+$ 에 대한 친화성에 있어서 중요한 역할을 하고 있음을 유추할 수 있다. 또한 HLADH보다 효모 ADH의 turnover number가 정반응과 역반응에서 각각 46배, 16배 더 큰 것은 조효소에 대한  $K_m$  값이 효모 ADH에서 훨씬 큰 현상과 연관될 것으로 생

**Table II** — Kinetic constants for the wild-type and the mutant (I269S and I269S & I224S) horse liver alcohol dehydrogenase. Kinetic constants were determined in initial velocity and product inhibition studies at 25°C in 33 mM sodium phosphate (pH 8.0) containing 0.25 mM EDTA

Constants <sup>a</sup>	E <sup>b</sup>	S <sup>c</sup>	ScADH <sup>f</sup>	I269S <sup>e</sup>	I269S/S	I269S & I224S	I269S & I224S/S	I269S & I224S/I269S
$K_a$ , $\mu$ M	3.9	11	160	737	67	1730	157	2.3
$K_b$ , mM	0.35	4.8	21	304	63	1190	248	3.9
$K_p$ , mM	0.40	24	0.74	468	20	280	12	0.60
$K_q$ , $\mu$ M	5.8	7.3	95	78	11	560	77	7.2
$K_{ia}$ , $\mu$ M	27	62	950	126	3	3724	60	30
$K_{ib}$ , mM	27	74	120	638	9	227	3	0.36
$K_{ip}$ , mM	0.52	d	1.5	11	d	76.2	d	6.9
$K_{iq}$ , $\mu$ M	0.50	1.5	31	29	19	429	286	15
$K_p K_{iq} / K_q$ , mM	0.034	0.3	0.21	172	537	214.5	715	1.2
$V_1$ , $S^{-1}$	3.5	1.5	360	22	15	7.8	5.2	0.68
$V_2$ , $S^{-1}$	47	73	1800	297	4	111.4	1.5	0.38
$V_1 / K_a$ , $mM^{-1}S^{-1}$	10	0.31	17	0.07	0.2	0.006	0.019	0.086
$V_2 / K_p$ , $mM^{-1}S^{-1}$	120	3.0	2400	0.63	0.2	0.340	0.11	0.54

<sup>a</sup>  $K_a$ ,  $K_b$ ,  $K_p$ , and  $K_q$  are the Michaelis constants for  $NAD^+$ , ethanol, acetaldehyde, and NADH, respectively.  $K_i$  values are product inhibition constants.  $V_1$  is the turnover number for ethanol oxidation and  $V_2$  is the turnover number for acetaldehyde reduction. Kinetic constants were determined in initial velocity studies with a spectrophotometer (reverse reaction) or spectrofluorometer (forward reaction). In initial velocity studies, the concentrations of substrate and coenzyme were varied.  $K_i$  values were determined from product inhibition studies using spectrophotometer. The concentration of ethanol was fixed while the concentrations of  $NAD^+$  and NADH were varied for the inhibition studies.

<sup>b</sup> 'E' type HLADH isoenzyme data from Dworschack and Plapp (1977).<sup>26)</sup>

<sup>c</sup> 'S' type HLADH isoenzyme data from Park and Plapp (1992).<sup>25)</sup> <sup>d</sup> Undefined.

<sup>e</sup> I269S HLADH-S mutant data from Ryu and Lee.<sup>19)</sup> <sup>f</sup> *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase data from Gould and Plapp (1990).<sup>28)</sup>

**Table III**—Product and dead-end inhibition studies of mutant I269S & I224S horse liver alcohol dehydrogenase. Product inhibition studies were performed at 25°C in 33 mM sodium phosphate (pH 8.0) containing 0.25 mM EDTA. Dead-end inhibition studies were at 25°C in 83 mM potassium phosphate (pH 7.3) containing 0.25 mM EDTA and 40 mM KCl

Substrate		Inhibitor	K <sub>m</sub> mM	K <sub>i</sub> <sup>a</sup> mM	K <sub>i</sub> <sup>b</sup> mM	V S <sup>-1</sup>	pattern <sup>c</sup>
Fixed	Varied						
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (2 M)	NAD <sup>+</sup> (1~3 mM)	NADH (0~0.4 mM)	10.3	0.429		20.0	C
CH <sub>3</sub> CHO (0.5 M)	NADH (0.1~0.5 mM)	NAD <sup>+</sup> (0~2.8 mM)	1.1	3.7		221.5	C
NAD <sup>+</sup> (10 mM)	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (0.4~0.9 mM)	CH <sub>3</sub> CHO (0~50 mM)	2412	76.2		11.5	C
NADH (1 mM)	CH <sub>3</sub> CHO (75~250 mM)	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (0~1700 mM)	530	1917	750	201.4	NC
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (2 M)	NAD <sup>+</sup> (1~3 mM)	TFE <sup>d</sup> (0~75 mM)	21.1		10.0	14.0	UC
NAD <sup>+</sup> (10 mM)	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (600~1000 mM)	TFE <sup>d</sup> (0~20 mM)	5500	38.7		13.2	C
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (2 M)	NAD <sup>+</sup> (1~3 mM)	HFB <sup>e</sup> (0~6.4 mM)	12.6		1.0	8.4	UC
NAD <sup>+</sup> (10 mM)	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (600~1000 mM)	HFB <sup>e</sup> (0~400 μM)	4900	0.7		11.5	C

<sup>a</sup> Slope inhibition constant

<sup>b</sup> Intercept inhibition constant

<sup>c</sup> C, competitive inhibition; UC, uncompetitive inhibition; NC, noncompetitive inhibition

<sup>d</sup> Trifluoroethanol

<sup>e</sup> Heptafluorobutanol

각되므로 I269S & I224S의 비활성 및 turnover number의 증가도 조효소의 부착 및 이탈 과정에서의 속도 변화가 반응속도에 영향을 미치기 때문으로 생각할 수 있다.

**반응 생성물에 의한 저해 연구** - 변이 효소의 반응 기전을 조사하기 위하여 에탄올과 아세트알데하이드에 대한 생성물에 의한 저해 실험을 실시한 결과에서 I269S & I224S 변이 효소는 조효소와 아세트알데하이드에 대하여는 경쟁적 저해를, 에탄올에 대하여는 무경쟁적 저해 유형을 나타내었다(Table III). 'S'형의 HLADH의 반응 기전에 대하여는 서로 다른 2가지 보고가 있는데 Dworschack과 Plapp(1977)은 반응 생성물에 의한 저해 연구 결과 Ordered Bi Bi 기전<sup>26)</sup>으로 Ryzewski과 Pietruszko(1980)은 비대칭성-정반응은 random 기전, 역반응은 compulsory ordered bi bi-반응 기전<sup>24, 27)</sup>을 보이는 것으로 보고하고 있다. 본 실험의 결과는 Park과 Plapp(1992)의 보고의 야생형 효소 유형과 동일하였으므로 I269S 변이 효소<sup>19)</sup>와 마찬가지로 I269S & I224S 효소도 Ordered Bi Bi 반응 기전에 의하여 작용하는 것으로 결론을 내릴 수 있었다. 이상의 결과로부터 I269S & I224S 변이 효소의 turnover number에 있어서의 증가는 조효소의 효소-조효소 복합체에 대한 친화성의 감소에 기인함을 알 수 있었다.

**기질 유사체에 의한 저해 연구** - TFE과 HFB를 사용한 기질 유사체에 의한 저해 실험의 결과는 Table III과 같았다. 2가지 기질 유사체 모두 조효소 NAD<sup>+</sup>에

대하여는 비경쟁적 저해유형을, 기질인 에탄올에 대하여는 경쟁적 저해 유형을 나타내었고, TFE의 저해 상수가 HFB의 저해 상수보다 55배정도 큰 것으로 나타났다. TFE과 HFB에 대하여 변이 효소가 야생형 효소보다는 각각 79배, 167배, I269S 변이 효소보다는 3배, 5배정도 결합 능력이 감소되었음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 I269S & I224S 변이 효소가 야생형 효소와 같이 Ordered Bi Bi 반응 기전을 따름을 제시하며 224번 위치에서의 변이가 조효소 결합력뿐만 아니라 기질의 결합력에도 영향을 끼침을 말해 주고 있다.

**일가 알코올에 대한 기질 특이성** - 변이 효소에 대하여 다양한 크기의 일가 알코올들과, 사이클로헥산을, 벤질알코올에 대한 기질 특이성을 시험한 결과는 Table IV와 같았다. 9가지 일가 알코올에 대한 turnover number는 야생형 효소에 비하여 2배~13배까지 증가하였고, I269S 변이 효소에 비하여 2~4.5배 정도로 감소하였다. K<sub>m</sub>값은 야생형 효소보다 9배~102배까지 증가되었고, I269S의 경우보다는 에탄올과 프로판올, 펜탄올에 대하여 2배정도 증가되었다. 기타 길이가 긴 옥탄올, 노난올, 데칸올에 대하여는 다소 감소되었다. 결과적으로 catalytic efficiency(V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>)는 모든 일가 알코올의 경우에 있어서 야생형 효소의 1.4~23.2배 감소하여서 I269S 변이 효소의 경우와 차이를 보였다. 기타 사이클로헥산을, 벤질알코올에 대하여 변이 효소는 야생형 효소와 유사한 turnover number를 지니지만 K<sub>m</sub>값은 각각 14.8배, 61배 증가되어 V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>은 그만큼 감소되었다. 또한 I269S 효소와 비교해 볼 때는 V<sub>max</sub>/

**Table IV** — Substrate specificities of the wild-type and the mutant horse liver alcohol dehydrogenase

Substrate	V (S <sup>-1</sup> )				K <sub>m</sub> (mM)				V/K <sub>m</sub> (mM <sup>-1</sup> S <sup>-1</sup> )			
	E <sup>a</sup>	S	I269S	I269S & I224S	E	S	I269S	I269S & I224S	E	S	I269S	I269S & I224S
Ethanol	5.8	2.2	14	4.2	0.54	58	505	858	11	0.038	0.027	0.0049
Propanol	5.8	2.0	22	8.7	0.17	2.8	137	285	35	0.72	0.16	0.031
Butanol	4.9	1.7	28	6.2	0.13	0.26	15	13.1	39	6.5	1.8	0.47
Pentanol	5.3	1.3	22	6.1	0.14	0.10	1.3	2.9	37	12.8	17	2.10
Hexanol	3.7	0.78	21	4.7	0.056	0.07	0.59	0.89	65	12.0	36	5.28
Heptanol	-	0.79	7.85	3.5	-	0.021	0.17	0.19	-	38	46	18.42
Octanol	-	0.43	8.53	2.7	-	0.008	0.20	0.13	-	51	43	20.77
Nonanol	-	0.20	5.53	2.5	-	0.012	0.37	0.20	-	17	15	12.50
Decanol	-	0.15	3.85	1.8	-	0.012	0.92	0.21	-	33	4.18	8.57
Cyclohexanol	-	1.19	5.45	1.6	-	4.67	33.3	69.2	-	0.25	0.16	0.023
Benzyl alcohol	-	1.85	6.77	2.0	-	0.146	4.78	8.91	-	13	1.42	0.22
Retinol	-	0.016	0.70	na	-	nd	2.52	na	-	nd	0.28	na
Retinal	-	0.0625	1.06	na	-	0.025	0.037	na	-	2.5	29	na
5β-Cholanic acid-3-one	-	0.92	1.70	na	-	0.097	0.04	na	-	9.4	43	na
5β-Androstane-3,17-dione	-	2.20	4.13	1.5	-	0.140	0.071	0.104	-	16	58	13.42

nd: not determined, na: no activity, <sup>a</sup>: 'E' type HLADH data from Dworschack and Plapp (1977)<sup>26</sup>, S: 'S' type HLADH, I269S: I269S mutant HLADH-S, I269S & I224S: I269S and I224S double mutant HLADH-S

K<sub>m</sub>가 7배정도 감소되었다. 실험한 일가 알코올 중에서 옥탄올이 가장 높은 V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub> 값을 보여 가장 좋은 기질로 생각되었다. 위의 결과들로부터 일가 알코올에 대한 turnover number의 증가는 조효소에 대한 증가된 K<sub>m</sub>에 기인하며, 기질에 대한 K<sub>m</sub>의 증가 정도가 turnover number의 증가 정도보다 매우 크므로 9가지 일가 알코올의 모든 경우에서 V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>이 감소된 것으로 생각된다. 이러한 기질에 대한 친화성 감소는 앞의 TFE과 HFB를 사용한 저해 실험에서 확인한 결과와 일치한다. 특히 I269S & I224S 변이 효소는 I269S 효소와 유사하게 short chain alcohol(탄소수 2, 3, 4)과 방향족 알코올(벤질알코올)에 대한 catalytic efficiency에 보다 큰 영향을 보였다.

**스테로이드성 및 레티노이드 기질에 대한 활성 측정과 초기 반응 속도 연구** - 스테로이드성 기질과 all-trans-retinol과 all-trans-retinal을 사용하여 초기 반응속도 실험을 하여 얻은 V<sub>max</sub>, K<sub>m</sub> 및 V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>의 값은 Table IV에서 볼 수 있다. Turnover number를 비교해 볼 때 I269S & I224S 변이 효소는 5β-cholanic acid-3-one에 대하여 활성을 나타내지 않았으며, 5β-androstane-3,17-dione에 대하여 K<sub>m</sub>값과 turnover number가 야생형 효소와 유사하였다. 이로부터 I269S & I224S 변이 효소는 17번 탄소에 측쇄의 치환기를 가지지 않은 스테로이드 기질만 기질로 이용할 수 있다는 점에서 I269S 변이 효소와 차이를 나타내었으

므로 I269S & I224S의 변이는 스테로이드 모핵의 17번 탄소에 긴 측쇄의 치환기를 지니는 기질의 효소에의 결합을 방해하는 구조적 변화를 유발하는 것으로 생각되었다. 또한 변이 효소가 레티노이드를 전환할 수 있는 능력을 완전히 상실하였다는 점도 I269S 변이 효소와는 다른 점이었다. 이상의 실험 결과는 224번 위치의 이소루신은 X-선 회절 자료에 의한 3차 구조에서 제시된 바와 같이 조효소의 친화성에 크게 영향을 주는 아미노산 잔기임을 증명해 준다. 한편 기질 유사체에 의한 저해 연구의 결과와 스테로이드 및 레티노이드 기질에 대한 효소 활성의 변화에서 볼 수 있듯이 조효소 부착 부위의 아미노산 잔기의 변화가 기질의 친화성에 관련되는 기질 부착 부위의 3차 구조에도 영향을 야기함을 추정하게 한다.

## 결론

'S'형 HLADH의 269번과 224번 이소루신 잔기를 세린으로 위치 특이적으로 변이시켜 얻은 이중 변이 효소에 대하여 효소 초기 반응 속도, 반응 생성물에 의한 저해, 기질 유사체에 의한 저해, 기질 특이성에 관하여 실험하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 비활성은 야생형 효소, I269S 변이 효소, I269S & I224S 변이 효소가 각각 1.36 U/mg, 66.6 U/mg, 8.0 U/mg이었다.

2. I269S & I224S 변이 효소의  $K_m$  값은  $NAD^+$ , 에탄올, 아세트알데하이드,  $NADH$ 에 대해 I269S 변이 효소와 비교하면 각각 2.3, 3.9, 0.6, 7.2배가, 야생형 효소와 비교하면 157, 248, 12, 77배 증가되었다.

3. 반응 생성물에 의한 저해 실험 결과 I269S & I224S 변이 효소는 조효소와 아세트알 데하이드에 대하여는 경쟁적 저해를 에탄올에 대하여는 무경쟁적 저해 유형을 나타내었다.

4. I269S & I224S 변이 효소는 2가지 기질 유사체 (TFE과 HFB) 모두에서 조효소  $NAD^+$ 에 대하여는 비경쟁적 저해 유형을, 기질인 에탄올에 대하여는 경쟁적 저해 유형을 나타내었고 TFE의 저해 상수가 HFB의 저해 상수보다 55배정도 큰 것으로 나타났다.

5. 모든 일가 알코올, 사이클로헥산을, 벤질알코올에 대한 catalytic efficiency가 I269S & I224S 변이 효소에서 감소되었고 short chain alcohol(탄소수 2, 3, 4) 과 벤질알코올에서 보다 큰 변화를 보였다.

6.  $5\beta$ -androstane-3,17-dione에 대하여 야생형 효소와 유사한 활성을 보였으나, 기타 스테로이드와 레티노이드에 대하여는 활성이 관찰되지 않았다.

이상의 실험 결과로부터 'S'형 HLADH의 224번 이소루신 잔기는 269번 잔기와 함께 조효소, 특히  $NAD^+$ 의 부착, 이탈에 크게 영향을 미치는 아미노산 잔기임을 알 수 있었고, 조효소 부착 부위의 아미노산 잔기의 변화가 기질의 친화성에 관련되는 기질 부착 부위의 3차 구조에도 영향을 야기함을 추정하게 하였다.

### 감사의 말씀

본 연구는 1995년도 교육부 학술 연구 조성비(유전공학 연구비) 지원에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다. 또한 pBPP/HLADH-S phagemid를 함유하는 *E. coli* 균주를 분양해 주신 아이와 대학교의 B. V. Plapp 교수께 감사드립니다.

### 문헌

- Wratten, C. C. and Cleland, W. W. : Product inhibition studies on yeast and liver alcohol dehydrogenase, *Biochemistry*, **2**, 935 (1963).
- Dickinson, F. M. and Dickenson, C. J. : Specificities and configurations of ternary complexes of yeast and liver alcohol dehydrogenase, *J. Biochem.*, **171**, 629 (1967).
- Eklund, H., Plapp, B. V., Samama, J. P. and Brändén, C. I. : Binding of substrate in a ternary complex of horse liver alcohol dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **257**, 14349 (1982).
- Eklund, H., Nordstrom, B., Zeppezauer, E., Soderlund, G., Ohlsson, I., Boiwe, T., Soderberg, B. O., Tapia, O., Brändén, C. I. and Akeson, A. : Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.4 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **102**, 27 (1976).
- Eklund, H., Brändén, C. I. : Structural difference between apo and holoenzyme of horse liver alcohol dehydrogenase, *J. Biochem.*, **254**, 3456 (1979).
- Eklund, H., Samama, J. P., Wallen, L., Brändén, C. I., Akeson, A. and Jones, T. A. : Structure of triclinic ternary complex of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.9 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **146**, 561 (1981).
- Ramaswamy, S., Eklund, H. and Plapp, B. V. : Structures of horse liver alcohol dehydrogenase complexed with  $NAD^+$  and substituted benzyl alcohols, *Biochemistry*, **33**, 5230 (1994).
- Park, D. H. and Plapp, B. V. : Isoenzymes of horse liver alcohol dehydrogenase active on ethanol and steroids: cDNA cloning, expression and comparison of active sites, *J. Biol. Chem.*, **266**, 13296 (1991).
- Mirna, Z., Mario, H. F., and Gregg, D. : Genomic structure and expression of the ADH 7 gene encoding human class IV alcohol dehydrogenase, the form most efficient for retinol metabolism *in vitro*, *J. Biol. Chem.*, **270**(9), 4305 (1995).
- Yang, C. F., and Brush, E. J. A. : Spectrophotometric assay for  $\alpha$ -ketoaldehydes using horse liver alcohol dehydrogenase, *Anal. Biochem.*, **214**, 124 (1993).
- Mezey, E., and Potter, J. J. : Separation and partial characterization of multiple forms of rat liver alcohol dehydrogenase, *Arch. Biochem. Biophysics*, **225**(2), 787 (1983).
- Akihiko, O., and Kyuichiro, O. : Physiological function and kinetic mechanism of human liver



- alcohol dehydrogenase as 5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ , 26 $\alpha$ -tetrol dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **258**(5), 2899 (1983).
- 13) Koivusalo, M. K., Baumann, M. B., and Uotila, L. : Evidence for the identity of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase, *FEBS Letters*, **257**(1), 105 (1989).
  - 14) Estonius, M., Höög, J. O., Danielsson, O., Jörnvall, H. : Residues specific for class III alcohol dehydrogenase site-directed mutagenesis of the human enzyme, *Biochemistry*, **33**, 15080 (1994).
  - 15) Juliá, P., Farrés, J., Parés, X. : Characterization of three isoenzymes of rat alcohol dehydrogenase: tissue distribution and physical and enzymatic properties, *Eur. J. Biochem.*, **162**, 179 (1987).
  - 16) Parés, X., Juliá, P. : Isoenzymes of alcohol dehydrogenase in retinoid metabolism, *Method. Enzymol.*, **189**, 436 (1990).
  - 17) Boleda, M. D., Saubi, N., Farrés, J., and Parés, X. : Physiological substrates for rat alcohol dehydrogenase classes: aldehydes of lipid peroxidation,  $\omega$ -hydroxy fatty acids and retinoids, *Arch. Biochem. Biophysics*, **307**(1), 85 (1993).
  - 18) Kedisshvili, N. Y., Bosron, W. F., Stone, C. L., Hurley, T. D., Peggs, C. F., Thomasson, H. R., Popov, K. M., Carr, L. G., Edenberg, H. J., and Li, T. K. : Expression and kinetic characterization of recombinant human stomach alcohol dehydrogenase: active-site amino acid sequence explains substrate specificity compared with liver isoenzymes, *J. Biol. Chem.*, **270**(8), 3625 (1995).
  - 19) Ryu, J. W. and Lee, K. M. : I269S mutation in horse liver alcohol dehydrogenase S isoenzyme and its reactivity for steroids and retinoids, *Arch. Pharm. Res.*, **20**(2), 115 (1997).
  - 20) Deng, W. P., and Nickoloff, J. A. : Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site, *Anal. Biochem.* **200**, 81 (1992).
  - 21) Sanger, F., Niklen, S. and Coulson, A. R. : DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463 (1977).
  - 22) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680 (1970).
  - 23) Plapp, B. V. : Enhancement of the activity of horse liver alcohol dehydrogenase by modification of amino groups at the active sites, *J. Biol. Chem.*, **245**, 1727 (1970).
  - 24) Park, D. H. : Structure and function of isoenzyme of horse liver alcohol dehydrogenase, The University of Iowa, PH. D. THESIS (1991).
  - 25) Park, D. H. and Plapp, B. P. : Interconversion of E and S isoenzyme of horse liver alcohol dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **267**, 5527 (1992).
  - 26) Dworschack, R. T., and Plapp, B. V. : Kinetics of native and activated isoenzymes of horse liver alcohol dehydrogenase, *Biochemistry*, **16**, 111 (1977).
  - 27) Ryzewski, C. N., and Pietruszko, R. : Kinetic mechanism of horse liver alcohol dehydrogenase SS, *Biochemistry*, **19**, 4843 (1980).
  - 28) Gould, R. M. and Plapp, B. V. : Substitution of arginine for histidine-47 in the coenzyme binding site of yeast alcohol dehydrogenase I, *Biochemistry*, **29**, 5463 (1990).