

진화적 유연관계 분석을 통한 *Aspergillus niger* LK의 Epoxide Hydrolase의 특성분석

이 은 열 · 이 수 정 · 이 지 원 · † 김 희 숙
경성대학교 공과대학 식품공학과
(접수 : 2003. 10. 19., 게재승인 : 2004. 2. 26.)

Molecular Characterization of Epoxide Hydrolase from *Aspergillus niger* LK using Phylogenetic Analysis

Eun Yeol Lee, Soo Jung Lee, Ji Won Lee, and Hee Sook Kim†
Department of Food Science and Technology, Kyungsoo University, Pusan 608-736, Korea
(Received : 2003. 10. 19., Accepted : 2004. 2. 26.)

A gene coding for epoxide hydrolase (EH) of *Aspergillus niger* LK, a fungus possessing the enantioselective hydrolysis activity for racemic epoxides, was characterized by phylogenetic analysis. The deduced protein of *A. niger* LK epoxide hydrolase shares significant sequence similarity with several bacterial EHs and mammalian microsomal EHs (mEH) and belongs to the α/β hydrolase fold family. EH from *A. niger* LK had 90.6% identity with 3D crystal structure of Iqo7 in Protein Data Bank. Sequence comparison with other source EHs suggested that Asp¹⁹², Asp³⁴⁸ and His³⁷⁴ constituted the catalytic triad. Based on the multiple sequence comparison of the functional and structural domain sequence, the phylogenetic tree between relevant epoxide hydrolases from various species were reconstructed by using Neighbor-Joining method. Genetic distances were so far as 1.841~2.682 but characteristic oxyanion hole and catalytic triad were highly conserved, which means they have diverged from a common ancestor.

Key Words : *Aspergillus niger*, enantioselective hydrolysis, epoxide hydrolase, phylogenetic analysis

서 론

Epoxide hydrolase(EH, EC 3.3.2.3)는 에폭사이드 기질을 diol로 가수분해시키는 효소로서 다양한 원핵세포나 진핵세포에서 발견되고 있다(1-3). EH에 대한 연구는 초기에는 주로 포유동물에서 외인성 항생물질이나 내인성 기질로부터 유도되는 세포독성 및 유전자독성의 epoxide들을 수용액상에 잘 용해되는 diol로 만들어 해독화시키는 과정에서의 EH 역할 규명에 대한 연구가 많이 진행되었다. 특히, 사람에게 있어 EH 유전자의 돌연변이는 약물에 대한 해독력이 없어지고 신장에서의 독성 물질 배설이 저해되어 세포 괴사, 암세포 발생 등이 유발된다는 보고가 있다(4). 식물에서는 EH가 면역체계의

성분을 생합성하는데 관여하는 것으로 알려졌으며, 곤충의 EH는 juvenile hormone esterase와 함께 juvenile hormone을 분해하는데 관여하는 것으로 보고되고 있다. 동물 유래의 EH에는 soluble EH 또는 cytosolic EH라고 불리우는 sEH와 microsomal EH인 mEH 등 두 가지 type이 있으며, 식물성 및 박테리아 등에서 발견된 EH들은 sEH 특성을 가지고 있고, 곤충의 juvenile hormone-specific EH (JHEH)는 mEH 특성을 가지는 것으로 보고되어 있다(5).

박테리아, 효모 및 곰팡이 등의 미생물 유래의 EH는 세포 내에서 epoxide 기질을 분해하여 energy 대사에 이용하는 기능이 있는 것으로 알려져 있다. 미생물 유래의 EH는 라세믹 에폭사이드 기질로부터 (R) 또는 (S)-이성질체 중 한 가지 광학이성질체만을 입체선택적으로 diol로 가수분해시켜 제거시키고 나머지 이성질체만을 남겨 광학적으로 순수한 에폭사이드를 제조하는 공정에 이용할 수 있는 효소로 평가되고 있어 최근 많은 연구의 대상이 되고 있다(6). 일반적으로 광학활성 에폭사이드는 반응성이 우수하여 친전자성반응, 친핵성반응, 산·염기반응, 산화·환원반응 등 다양한 반응을 시킬 수 있

† Corresponding Author : Department of Food Science and Technology, College of Engineering, Kyungsoo University, Pusan 608-736, Korea

Tel : +82-51-620-4713, Fax : +82-51-622-4986
E-mail : hskim@star.ksu.ac.kr

으며, 광학활성 의약품, 농약 및 기능성 식품 합성용 중간체로 널리 사용되는 고부가가치 광학활성 중간체이다(7). 특히, EH는 NADH 등과 같은 보조인자 (cofactor)가 필요 없으며, 발현 유도 없이 효소가 발현되며, 비교적 안정된 구조를 가지고 있어 상업적으로 유용한 효소이며, EH 활성을 이용한 광학활성 에폭사이드 중간체 제조 기술의 상업화가 기대되고 있다(8).

EH에 대한 생화학 및 분자생물학 관련 최근 연구 결과와 EH의 3차원 구조 및 반응 기작에 대한 연구로부터 얻어진 결과를 응용하여 site-directed mutagenesis를 통해 EH의 활성을 높이거나, 기질 선택성을 변화시킨 연구결과들이 보고되었다(9, 10). 한 예로, mEH의 촉매활성 부위에 charge relay를 위해 존재하는 glutamic acid를 aspartic acid로 변경시켜 V_{max} 를 10배 이상 향상시켰다고 하였으며 *Agrobacterium radiobacter* EH의 tyrosine residue를 phenylalanine으로 치환시켜 enantiomeric ratio (E) 값을 2~5배 정도 증가시킨 결과도 보고된 바 있다. 따라서 EH에 대한 3차원 구조 해석을 기반으로 촉매 활성점에 대한 rational design을 통해 촉매 활성도 및 기질 선택성을 증가시키거나 또는 기질 선택성을 변경시킬 수 있다. 이러한 연구 개발은 상업적으로 유용한 광학활성 에폭사이드를 생산하기 위한 tailor-made형 생촉매 제작이 가능할 것이다. 본 논문에서는 고기능성 EH 생촉매 개발을 위한 생물정보학적 접근을 위하여 본 연구실에서 신규로 분리한 방향족 에폭사이드 기질에 대한 입체선택성이 우수한 *Aspergillus niger* LK의 EH 유전자(11)를 중심으로 EH 단백질의 입체구조학적 비교·분류, 입체구조의 유사성, 보존영역 분석, 진화적 유연관계를 분석하였다.

재료 및 방법

EH 단백질의 입체구조학적 비교·분류

미지 단백질의 입체구조를 비교·분류하기 위하여 사용되는 정보가 Protein DataBank (PDB)(12)에 수록되어 있는 16,000 여종의 단백질 입체구조 정보이다. 단백질 입체구조에 준한 단백질의 비교·분류방법에는 여러 가지가 있으나(13), 본 연구에서는 2차 구조의 공간배치를 기준으로 한 유사성 검색방법인 계층적 분류를 사용하는 website인 SCOP (structural classification of protein)(14)에서 검색하였다. 또한 진화계통수를 작성하기 위한 multiple sequence alignment (MSA)를 하기 위해서 먼저 Protein DataBank (PDB)에 3D 입체구조가 등록되어 있는 단백질들 중에서 MAXHOM(15)을 이용한 maximum homology를 검색을 행하였다.

EH에 보존된 Domain 특성 분석

SWISS-PROT과 TrEMBL(16)에 등록된 단백질의 아미노산 서열로부터 자동적으로 상동영역을 발견하고 즉시 family를 분류하여 구축된 단백질 domain database인 ProDom(17)으로부터 여러 생물종의 epoxide hydrolase 단백질에 보존되는 domain들을 검색하였다.

EH의 진화적 유연관계 분석

본 실험실에서 분리한 *A. niger* LK의 EH를 비롯하여 실험

결과들로 확인된 단백질이 등록되어 있는 Swiss-Prot 및 TrEMBL의 database에 있는 단백질들을 대상으로 하여 비교하였다. 먼저 PredictProtein server(18)에 *A. niger* LK의 EH 아미노산 서열을 넣어 domain 검색 (ProDom domain search), motif 검색 (Prosite motif search), 단백질의 상동성 검색 (Psi-Blast alignment), maximal homology 검색 (MAXHOM alignment) 및 2차 입체구조 예측 (PHD prediction) 등을 행하였다. PredictProtein server로부터 얻은 EH 단백질에 대한 여러 가지 정보를 토대로 하여 domain의 입체구조가 유지되도록 domain끼리 multiple alignment를 행한 다음 나머지 서열들을 alignment하였다. 이러한 결과들로부터 계통수작성을 위하여 BLOSUM62를 사용하여 단백질 진화거리를 계산하였으며, 계통수 복원은 NJ법을 이용하였다.

결과 및 고찰

A. niger 유래의 EH 단백질의 입체구조학적 비교·분류

Nitrostyrene oxide 등 방향족 epoxide 기질에 대하여 입체선택성 가수분해 활성이 우수한 *A. niger* LK의 total RNA로부터 RT-PCR 방법으로 cDNA를 얻고 EH에 특이적인 primer들을 이용하여 EH를 cloning하고 ANEH-LK라 하였다. ANEH-LK 유전자의 DNA 염기서열에 대한 상동성을 검색해 본 결과 Arand 등(9)이 *A. niger* LCP521 균주로부터 cloning한 EH 유전자 (GenBank accession No. AJ238460)와 86%의 염기서열 상동성을 가지고 있음을 알 수 있었다. 그러나 GenBank에 등록되어 있는 다른 종 유래의 EH들, 즉 박테리아, 효모, 조파리, 생쥐 및 사람 등 다른 생물종 유래의 EH 유전자들과는 거의 염기서열 상동성을 찾아볼 수 없었다. 한편, *A. niger* LK의 EH 단백질(aa 398)에 대하여 아미노산 서열 상동성을 검색한 결과 DNA 서열검색 때와는 달리 GenBank Database에 수록되어 있는 *A. niger* (Accession No. CAB59813)와는 89% identity 및 96%의 homology sequence를 가지는 것을 비롯하여 Table 1과 같이 진핵세포 (25~42% identity, 45~60% homology)나 박테리아 (29~33% identity, 49~51% homology) 등 다른 종 유래의 EH 단백질의 아미노산 서열과도 낮은 상동성을 가지는 것으로 나타났다.

A. niger LK의 EH 단백질 입체구조를 분류하기 위해서 SCOP를 통하여 구조인식을 행한 결과는 Table 1에서와 같이 alpha/beta(α/β) protein이라는 class에 속하며 117 종류의 fold 중 α/β hydrolase fold에 속한다. α/β hydrolase fold는 아주 먼 진화거리를 가지면서 다른 catalytic function을 가진 많은 가수분해효소들이 가지는 공통구조로 공통조상으로부터 진화되었으며 catalytic residue가 보존되어 있다. 또한 α/β hydrolase fold를 가진 α/β hydrolase들에는 acetylcholinesterase-like family, carboxylesterase family, serine carboxypeptidase family 등 여러 가수분해 효소들이 포함되어 있으며 그 중에서 EH는 epoxide를 가수분해하여 수용성인 diol로 만드는 활성을 가지는 EH family에 속하였다. EH에는 진핵세포의 microsomal EH type인 EPHX1 (HYEP) 및 soluble EH type인 EPHX2 (HYES)와 미생물의 EH 등 여러 종류가 보고되어 있으나 SCOP에서는 X-ray 회절법에 의한 결정학적 구조가 등

록된 bacterial EH로 분류되어 있었다.

Table 1. Structural classification of *A. niger* LK epoxide hydrolase from SCOP server

Lineage	Classification	Structural Specify	
Root	SCOP		11 Classes
Class	Alpha and beta proteins(a/b)	Mainly parallel beta sheets (beta-alpha-beta units)	117 Folds
Fold	alpha/beta-hydrolase	Core: 3 layers, a/b/a mixed beta-sheet of 8 strands, order 12345678, strand 2 is antiparallel to the rest	1 Superfamily
Super family	alpha/beta-hydrolase	many members have left-handed crossover connection between strand 8 and additional strand 9	23 Families
Family	Epoxide hydrolase	Mammalian epoxide hydrolases(1) Bacterial epoxide hydrolase(2)	3 Proteins
Protein	Bacterial epoxide hydrolase	Agrobacterium radiobacter epoxide hydrolase <i>Aspergillus niger</i> epoxide hydrolase	2 Proteins
Species	<i>Aspergillus niger</i>	PDB entry domain 1qo7a, 1qo7b	

지난 10여년 동안 다양한 EH 유전자들이 동물, 식물, 박테리아들로부터 cloning되었고, 또한 그들의 밝혀진 3차원 구조를 보면 대부분이 α/β hydrolase-fold enzyme에 속하는 것으로 알려져 있어 이들 family의 다른 효소들과는 amino acid 서열 유사성은 매우 낮고 단지 α/β hydrolase fold domain에 서만 유사성을 보이고 있다. 예를 들어 포유동물의 sEH와 mEH를 비교하면 이들 두 효소 사이에는 어느 계통관계도 나타나지 않으며, sEH는 mEH와는 달리 오히려 박테리아 근원 효소인 haloalkane dehalogenase와 의미 있는 유사성을 보이는데(19), α/β hydrolase-fold domain에서만은 sEH 및 mEH 모두 유사성을 보일 뿐만 아니라 그 domain 중에서도 특히 catalytic triad를 구성하는 nucleophile motif sequence, aspartic acid 및 histamine만은 반드시 보존되고 있어 공통조상으로부터 진화되었음을 보여준다. 위에서 언급한 EH들은 α/β hydrolase fold family에 속하는 효소들로서 구조상으로는 반응기전상으로 비슷하다. 그러나 leukotriene A₄ hydrolase(20), cholesterol EH(21) 및 limonene-1,2-epoxide hydrolase(22) 등은 다른 class로 분류된다.

입체구조의 유사성

유전자나 단백질의 유전학적 상관관계를 연구하기 위해서는 먼저 여러 종류의 염기서열 또는 아미노산서열을 multiple alignment하는 것이 요구되며 전체 길이를 비교하는 global multiple alignment를 할 수 있는 CLUSTALW program이 많이 쓰인다. 그러나 단백질의 전체 길이의 아미노산 서열이 골고루 상동성을 나타내는 것이 아니라 특별히 보존되는 영역들이 있으므로 유전자나 단백질의 비교·분류·진화를 연구하는 데에는 기능을 가진 보존영역을 먼저 검색하는 것도 좋은 방법일 것이다. 특히 *A. niger*의 EH와 같이 다른 종들의 EH와 상동성이 낮은 경우에는 단백질들 간의 전체 아미노산 서열을 곧 바로 alignment하는 CLUSTALW program을 사용하는 것보다는 먼저 그 단백질의 2차 입체구조를 예측한 다음 아미노산 서열 alignment와 함께 입체구조 alignment도 조합한다면 더 정확한 유전학적 상관관계 연구가 될 것이다. 기능적으로 공통성이 있는 단백질 간에는 공통서열영역들이

존재한다는 많은 연구들이 있으며, 하나의 보존영역 즉 하나의 domain은 하나의 기능에 대응하는 경우가 많다. 그러므로 어떤 단백질을 비교·분류하기 위하여 어떤 domain들이 보존되어 있으며 어떤 입체구조와 유사성이 있는지에 대하여 먼저 검색하는 것이 순서일 것이다.

A. niger LK의 EH는 다른 종들의 EH 단백질과는 상동성이 낮기 때문에 진화계통수를 작성하기 위한 multiple sequence alignment(MSA)를 하기 위해서 먼저 Protein DataBank(PDB)에 3D 입체구조가 등록되어 있는 단백질들 중에서 MAXHOM(15)을 이용한 maximum homology를 검색을 행한 결과 4종류의 mammalian microsomal EH와 담배잎나방의 juvenile hormone-specific EH (MANSE)가 입체적 유사성이 있는 것으로 검색되었으나 상동성은 25~32% identity 및 34~47% similarity로 아주 낮은 편이었다. 이 MSA 결과를 가지고 Neighbor-Joining method(NJ method)로 진화계통수를 작성한 결과는 Fig. 1과 같았다. 포유동물인 생쥐, 집쥐, 토끼 및 사람 사이의 EH 진화거리는 0.058~0.207로 가까웠으나 포유동물의 EH와 담배잎나방의 JHEH와는 1.155~1.223으로 멀었으며 곰팡이인 *A. niger*의 EH와 담배잎나방의 JHEH와의 진화거리는 2.242로 포유동물의 HYEP와의 진화거리 1.889~1.919보다 커서 가장 먼 유연관계를 가진 것으로 나타났다.

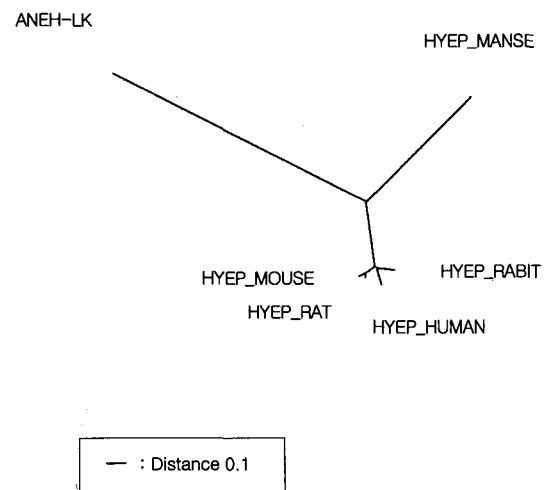


Figure 1. Phylogenetic relationship between *A. niger* LK epoxide hydrolase enzyme with another EHs based on the multiple sequence comparison from MAXHOM. Phylogenetic tree were obtained by using Neighbor-Joining method version 3.573c. Protein distance matrix were made from BLOSUM62. Abbreviations are SwissPort entry names. HYEP : microsomal epoxide hydrolase, MANSE : *Manduca sexta*.

EH에 보존된 Domain 특성 분석

SWISS-PROT과 TrEMBL에 등록된 단백질의 아미노산서열로부터 자동적으로 상동영역을 발견하고 즉시 family를 분류하여 구축된 단백질 domain database인 ProDom(16)으로부터 여러 생물종의 epoxide hydrolase 단백질에 보존되는 domain들을 검색한 결과는 Table 2 및 Fig. 2와 같았다. Table 2에서와 같이 PD327790, PD006780, PD113028 및 PD234034 domain은 microsomal EH의 활성화에 특이적인 영역임을 알 수

있으며, PD363858 domain은 esterase, lipase, peptidase 등 active site에 serine을 가지는 효소들에서 발견되는 영역이다. 또한 PD036710 domain은 α/β hydrolase fold를 가진 많은 가수분해 효소들에서 발견되는 domain으로 Swiss-Prot database에 등록된 단백질 중 20종의 proline iminopeptidase (PIP, EC 3.4.11.5), 6종의 non-heme chloroperoxidase (PRXC, EC 1.11.1.10) 및 human, mouse, rat 3종의 cytosolic EH (HYES, EC 3.3.2.3)에서 보존되는 영역이었다.

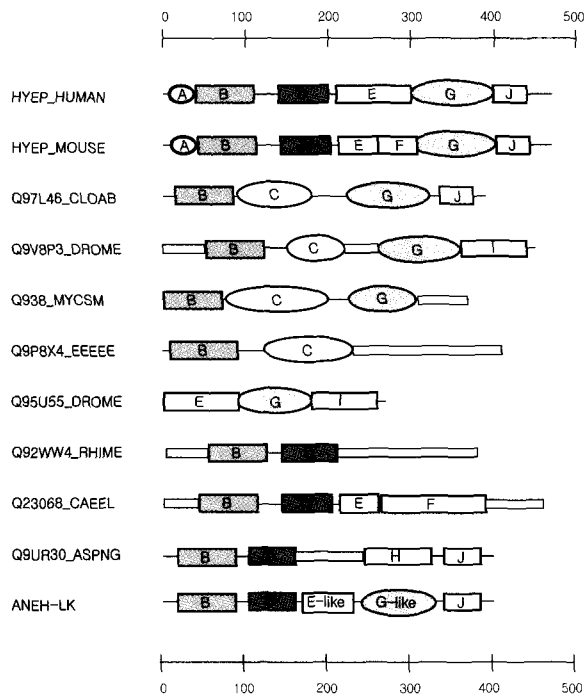


Figure 2. Graphic view of domains found in epoxide hydrolases of various origins. Symbols and abbreviations are same as Table 2.

Table 2. Domains found in epoxide hydrolase proteins of *A. niger* and various organism

ProDom Entry	Symbol	Proteins having consensus sequences	Most frequent protein name (No. of organism) ¹	InterPro name
PD327790	A	6	HYEP ² (4)	Epoxide hydrolase
PD006781	B	22	HYEP(5)	Epoxide hydrolase
PD036710	C	847	PIP(20) PRXC(6) HYES(3)	Alpha/beta hydrolase fold Esterase/lipase/thioesterase Alpha/beta hydrolase
PD363858	D	14	HYEP(4)	Esterase/lipase/thioesterase Epoxide hydrolase
PD113028	E	10	HYEP(4)	Epoxide hydrolase
PD580744	F	5	HYEP(3)	Alpha/beta hydrolase fold
PD005810	G	4	HYEP(3)	Alpha/beta hydrolase fold
PD489158	H	2		
PD469158	I	5	HYEP(1)	Alpha/beta hydrolase fold Epoxide hydrolase
PD234034	J	13	HYEP(5)	Epoxide hydrolase

¹ : Numbers in parenthesis indicate the numbers of consensus sequences which have protein names found in Swiss-Prot and TrEMBL.

² : Abbreviations used include : HYEP, microsomal epoxide hydrolase (gene, EPHX1 or EPH-1); PIP, proline iminopeptidase (gene, PIP or PAP); PRXC, none-heme chloroperoxidase (gene, CPO); HYES, soluble epoxide hydrolase (gene, EPHX2 or EPH-2).

A. niger EH 단백질과 상동성을 보이는 다른 생물종의 EH와 비교 분석하기 위하여 여러 생물종의 EH가 가지는 domain들을 Fig. 2에 나타내었다. *D. melanogaster* juvenile hormone-specific EH1 유전자의 transcription시의 mRNA의 intron의 splicing이 일어나지 않은 채로 단백질 발현이 된 JHEH1 (Q95U55_DROME)을 제외하고는 모든 EH에는 B영역 (PD006781)이 보존되어 있었다. Mammalian cytosolic EH (sEH)는 보존 domain이 완전히 다르기 때문에 여기서는 비교하지 않았다. *R. glutinis*의 EH는 B영역과 C영역이 보존되어 있었으며 뒷부분의 open bar 영역은 E, G 및 I 영역과 높은 상동성을 보이지만 완전한 보존은 되어 있지 않은 영역이다. *R. meliloti*의 경우는 B 및 D영역 외에 C-terminal에 보존되는 domain은 발견되지 않았다.

Protein DataBank에 등록되어 있는 *A. niger*의 EH (ASPNG)의 경우 Fig. 2에서와 같이 B, D, H 및 J영역과 가운데 open bar (ProDom에는 PD546896으로 되어 있음)의 domain들을 가지고 있으나 PD546896 domain은 아직은 *A. niger*에서만 발견된 sequence로 PD113028 (E영역) domain이 완전히 보존되지는 않았지만 높은 상동성을 나타내고 있으며 또한 PD486775 domain 역시 yeast인 *X. dendrorhous* (PHARH)의 EH와 ASPNG에서만 발견된 sequence로 PD005810 (G영역)과 높은 상동성을 보이고 있었다. 앞으로 PD546896 및 PD486775 domain을 가지는 단백질들이 보고될 지는 모르나 현재 알려져 있는 여러 생물종들의 epoxide hydrolase를 비교·분석하기 위해서는 기능이 알려져 있고 consensus sequence가 보존되어 있는 domain과 비교하는 것이 타당할 것이라 생각된다. 그러므로 PD546896과 PD486775 domain보다는 PD113028과 PD005810 domain 즉 E-like 및 G-like domain으로 alignment를 하여 다른 생물종의 EH들과의 유연 관계를 살펴보고자 하였다.

A. niger LK의 EH의 진화적 유연관계

먼저 PredictProtein server(18)에 *A. niger* LK의 EH 아미노산 서열을 넣어 domain 검색 (ProDom domain search), motif 검색 (Prosite motif search), 단백질의 상동성 검색 (Psi-Blast alignment), maximal homology 검색 (MAXHOM alignment), 2차 입체구조 예측 (PHD prediction) 등을 행하여 얻은 EH 단백질에 대한 여러 가지 정보를 토대로 하여 domain의 입체구조가 유지되도록 domain끼리 multiple alignment를 행한 다음 나머지 서열들을 alignment한 결과는 Fig. 3과 같았다. *A. niger* LK의 EH 단백질의 16-87까지의 잔기부분에 PD006781 domain (B영역)이, 108-159 잔기부분에는 PD363858 domain (D영역)이, 336-381 잔기부분에는 PD234034 domain (J영역)이 완전히 보존되어 있었다. Fig. 3에서와 같이 PD363858 domain 내에 diol을 생성하기 위하여 oxyanion hole을 구성하는 HGXP motif (***)가 모든 생물종의 EH에 보존되어 있었다. 그러나 176-264 잔기부분은 PD113028 domain의 consensus sequence와는 33% identity를 가지고 있으며 다른 생물종 EH들의 PD113028 domain에 보존되어 온 5L, 6M, 8R, 9L, 10G, 17Q, 18G, 19G, 20D, 21W, 22G, 35P, 42H, 44N, 45M들은 *A. niger* LK의 EH에서도 그대로 보존되어 있으며, 그 외의 아미노산 잔기들이 서로 비슷한 성질의 아미노산들로 치환되어 있어 단백질활성이 유지되는 것을 알 수 있다. 그러나 *A. niger* EH의 경우 Fig. 3에서와 보는 바와 같이 다른 생물종에서는 보존되었던 잔기들 중 7L→K, 8R→D, 22W→I, 45M→L로 성질이 유사하지 않은 아미노산으로 치환되었으므로 이들 잔기들은 EH활성에 치명적이 아닌 잔기들로 생각할 수 있을 것이다. 그러나 α/β hydrolase fold family에 속하는 대부분의 가수분해효소에 공통으로 보존되는 nucleophile motif sequence인 sm-x-nu-sm-sm (sm은 small amino acid, x는 any amino acid, nu는 nucleophile)는 GGDIGS로 유지되어 있었으며 192 위치의 aspartic acid가 nucleophile로 작용하였다. PD113028-like domain 내에 존재하는 348 위치의 aspartic acid 및 PD234034 domain 내에 존재하는 374 위치의 histamine이 보존되어 nucleophile motif의 aspartic acid와 함께 catalytic triad로서 작용함을 확인할 수 있었다. 다른 생물종의 EH에서는 348 위치의 aspartic acid 대신 glutamic acid가 catalytic triad로 작용하기도 하지만 Visser등(5)은 glutamic acid보다도 aspartic acid로 치환되었을 때 효소활성이 높다고 하였다.

A. niger LK의 EH의 251-327 잔기부분은 PD005810-like domain (G-like 영역)이다. *A. niger*를 제외한 14개의 EH 아미노산 서열로부터 추출된 PD005810 domain을 보면 39F, 43Q, 47P, 58P, 60G, 62A, 65I, 67E, 69F, 96L, 102Y, 105T, 115Y 잔기들이 잘 보존되어 있었으며 그 외의 많은 아미노산들이 성질이 비슷한 아미노산으로 치환되어 있음을 알 수 있었다. 그러나 *A. niger* LK의 EH의 경우, 251-327 잔기부분을 PD005810 domain과 비교분석해 보면 39Y, 47P, 58P, 67E, 102Y, 105T는 보존되어 있으며, 60G→A, 62A→L, 65I→V, 69F→Y 등으로 성질이 비슷한 아미노산으로 치환되어 보존되고 있으나 43Q→H, 96L→P, 115Y→A 등으로 성질이 아주 다른 아미노산으로 치환된 잔기들도 있었다. 그리고 그 외의 잔기들은 입체구조를 유지하기 위하여 성질이 유사한

아미노산들로 치환되어 보존되어 있음을 알 수 있었다(45T/S, 46R/K, 49T/S, 54L/G, 64W/Y, 68K/R, 74D/N, 93D/E, 99I/V/L, 110T/S).

위의 결과들을 토대로 하여 15종의 EH 단백질들의 아미노산 서열을 multiple alignment를 행하고 계통수 작성을 위하여 BLOSUM62를 사용하여 단백질 진화거리를 계산하고 NJ법에 의하여 복원한 계통수는 Fig. 4와 같았다. ANEH-GB (*A. niger* LCP521 strain)와 ANEH-LK의 진화거리는 0.108로 가장 가까웠으나 집쥐와 생쥐 EH사이의 진화거리 0.578(Fig. 2)보다 멀어 같은 *A. niger*이면서도 EH의 아미노산 서열에 많은 변화가 있었음을 보여 준다. *A. niger*의 ANEH는 다른 생물종 유래의 EH와 비교하였을 때 활성에 관여하는 domain들의 완전보존영역들과 상동성을 가질 뿐이었으며 진화거리로 볼 때 *S. aurantiaca* 및 *C. acetobutylicum*의 EH1과 1.841 및 1.942로 다른 생물종에 비하여 박테리아 EH와 그레도 가장 가까웠지만 곤충들의 JHEH1 (DROME 및 MANSE)과는 2.652 및 2.682로 가장 먼 유연관계를 나타냄을 알 수 있었다.

EH의 단백질 특성분석 및 진화적 유연관계 분석의 유용성

Nitrostyrene oxide 등 방향족 epoxide 기질에 대하여 입체선택성이 우수한 *A. niger* LK 유래의 epoxide hydrolase 유전자 (ANEH-LK)에 대하여 단백질의 입체구조학적 비교·분류, 입체구조의 유사성, 보존 영역 분석, 진화적 유연관계를 분석하였다. *A. niger* LK의 EH는 Arand 등(9)이 보고한 *A. niger*의 soluble EH의 아미노산 서열과는 86% identity와 96%의 homology를 가지고 있으며 Swiss-Model에서 예측한 바에 의하면 1q07의 3D 구조와 비교하여 90.6% 같았다. 또한 사람, 쥐 등 EH와 비교해 보면 ANEH-LK는 cytosolic EH보다는 microsomal EH와 더 유사성이 높았다. 또한 GenBank 또는 SwissProt/TrEMBL 등에 등록되어 있는 다른 종류의 epoxide hydrolase들과 비교하면 포유동물의 mEH, 효모의 EH1 및 곤충의 JHEH 등보다는 *S. aurantiaca* 및 *C. acetobutylicum* 등 박테리아 유래의 EH와 가까운 관계라고 할 수 있으나 Fig. 4에서와 같이 진화거리가 아주 멀어 효소활성에 필요한 domain들만 보존되어 있음을 알 수 있었다.

Leukotriene A₄ hydrolase, cholesterol 또 및 limonene-1, 2-epoxide hydrolase 등을 제외한 대부분의 EH는 α/β hydrolase fold family에 속한다. *A. radiobacter* sEH, 식물의 sEH 및 mammalian sEH 등 soluble EH는 N-terminal 부분은 haloacid dehalogenase-like (HAD-like) superfamily에 속하며 (19) C-terminal 부분은 α/β hydrolase superfamily에 속한다 (19). Soluble EH와는 달리 microsomal EH는 N-terminal 부분의 HAD-like family가 가지는 PD036710 domain 대신 PD006781 domain 및 PD363858 domain을 가지고 있어 sEH와 mEH 사이에는 α/β hydrolase fold domain만이 상동성을 가지고 있다. Arand 등은 *A. niger*로부터 분리한 soluble EH는 EH활성이 cytosolic fraction에 있었지만 microsomal EH와 가까운 계통관계를 가진다고 하였으며 soluble한 이유는 cytosolic EH와는 달리 mEH이면서 N-terminal 부분의 막결합 부분의 아미노산 서열이 부족했기 때문이라고 하였다(9). 또한

Visser 등(5)은 *X. dendrohous* EH 단백질이 411개의 아미노산으로 되어 있어 대부분의 mammalian EH들 (aa 455)이나 곤충의 juvenile hormone-specific EH들 (aa 462)에 비하여 N-terminal이 짧으며 대부분의 mEH는 N-terminal 부분이 소포체의 막에 anchor되어 있으며, *X. dendrohous* EH 활성이 microsomal fraction에서 발견되는 것으로 보아 막에 결합되어 있을 것이라고 추정하였다.

EH는 α/β hydrolase fold family에서 epoxide hydrolase protein으로 분류되어 있으며 대부분의 가수분해효소에 공통으로 보존되는 nucleophile motif sequence인 sm-x-nu-x-sm-sm (sm: small aa, x: any aa, nu: nucleophile)은 GGDIGS로 유지되어 있어 그 중 192 위치의 aspartic acid (D)가 nucleophile (Nu)로 작용하였으며 348 위치의 acidic amino acid에는 aspartic acid가, 374 위치에는 histamine이 catalytic triad로서

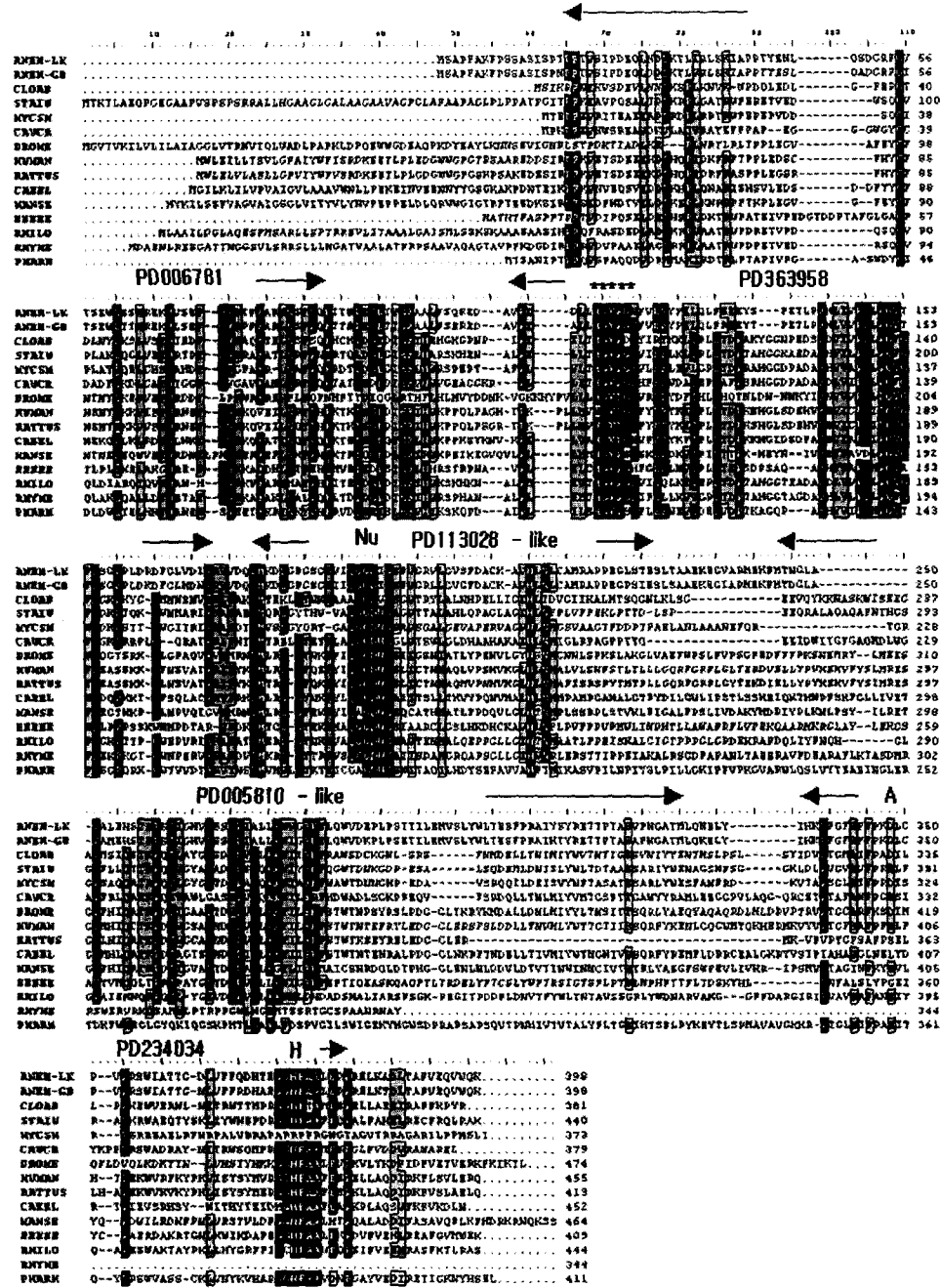


Figure 3. Comparison of amino acid sequences of epoxide hydrolase protein of *A. niger* LK with those of several organism extracted from SwissProt/TrEMBL for reconstruction of phylogenetic tree. The result of MSA are displayed in single letter abbreviation after alignment for maximal identity using BioEdit program based on conserved domain search as shown Fig. 3. Conserved domain regions are represented with arrows. The residues that form the catalytic triad are indicated by Nu(nucleophile), A(acidic residue) and H(histidine). The amino sequences corresponding to the HGXP motif are indicated by *****. Conserved amino acid residues are boxed in dark shaded and above 70% consensus amino acid residues are boxed in pale shaded.

작용하고 있었다. 또한 epoxide를 diol로 만들기 위하여 필요한 oxyanion hole은 HGXP motif sequence로 구성되어 있었으며 sEH 들 역시 HGXP motif sequence를 가지고 있었다. Catalytic triad중 348 위치의 aspartic acid는 glutamic acid로 치환되어 있는 경우도 많은데 *Agrobacterium radiobacter*, *S. aurantiaca*, *C. crescentus* 등 미생물의 EH(23), 식물의 sEH들(24)이나 동물의 sEH(25)은 aspartic acid를 가지고 있었고, *C. acetobutylicum*, *M. smegmatis* 등 미생물의 EH(26, 27), *X. dendrohous*의 EH(5), *D. melanogaster*의 JHEH1(28) 및 동물의 mEH(29)들은 glutamic acid를 가지고 있었다. Arand 등은 rat의 mEH에서 catalytic triad의 A에 해당하는 Glu⁴⁰⁴를 Asp로 치환하므로써 가수분해활성을 10배 정도 올릴 수 있었다고 보고하였다(9). 위와 같은 연구들로 미루어 볼 때, *A. niger*의 348위치에 Glu 대신 Asp가 있어 EH활성이 높은 것으로 추정할 수 있다. Catalytic domain에 보존된 아미노산들을 치환하여 단백질의 입체구조 및 substrate specificity 등을 비교하고 연구함으로써 더욱 활성이 있고 기질특이성이 높은 단백질을 개발하는데 좋은 정보를 얻을 수 있을 것이다.

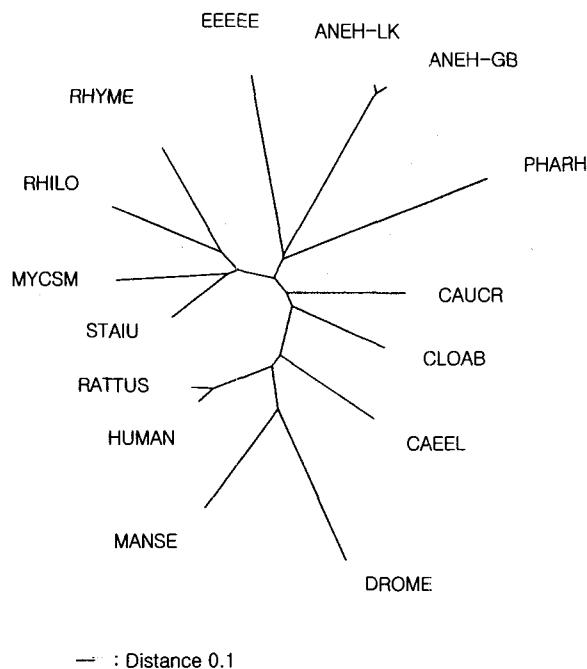


Figure 4. Phylogenetic relationship between epoxide hydrolase enzyme from various species. Based on the multiple sequence comparison of the functional and structural domain sequence (shown in Fig. 3), phylogenetic tree were obtained by using Neighbor-Joining method version 3.573c. Protein distance matrix were made from BLOSUM62.

요 약

Racemic epoxide에 대한 입체선택적 가수분해능을 가지고 있는 곰팡이, *Aspergillus niger* LK로부터 epoxide hydrolase (EH, EC 3.3.2.3) 유전자의 진화적 유연관계 분석을 행하였다. *A. niger* LK의 EH 염기서열로부터 유추한 EH 단백질 아미노산 서열은 여러 박테리아의 EH들 및 포유동물의

microsomal EH들과 유의적인 유사성을 가지고 있었으며 α/β hydrolase fold family에 속하였다. *A. niger* LK의 EH 단백질의 입체구조예측은 Protein Data Bank에 수록된 lqo7의 3D 결정구조와 90.6% identity를 가지는 것으로 나타났으며 다른 EH들의 아미노산 서열비교를 행한 결과 Asp¹⁹², Asp³⁴⁸ 및 His³⁷⁴이 catalytic triad를 구성하고 있는 것으로 추정되었다. 여러 생물종의 EH서열을 기능적 및 구조적 domain 서열을 기초로 하여 multiple sequence alignment를 행하고 Neighbor-Joining/UPGMA method를 이용하여 계통수를 복원한 결과 다른 생물종들의 EH와의 진화거리는 서로 1.841~2.682로 멀었으나 EH의 기능을 가지기 위한 oxyanion hole 및 α/β hydrolase fold family의 catalytic triad는 잘 보존되고 있어 공통상으로부터 진화되어 왔음을 알 수 있었다.

감 사

이수정 및 이지원은 경성대학교 대학원생으로 BB21 장학금을 수혜하였음에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Archelas, A. and R. Furstoss (2001), Synthetic applications of epoxide hydrolases, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 112-119.
2. Steinreiber, A. and K. Faber (2001), Microbial epoxide hydrolases for preparative biotransformations, *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 552-558.
3. Weijers, C. A. G. M. and J. A. M. de Bont (1999), Epoxide hydrolases from yeasts and other sources: versatile tools in biocatalysis, *J. Mol. Catal. B: Enz.* **6**, 199-214.
4. Park, J. Y., S. P. Schantz, and P. Lazarus (2003), Epoxide hydrolase genotype and oralaryngeal cancer risk: interaction with GSTM1 genotype, *Oral Oncol.* **39**, 483-490.
5. Visser, H., J. A. M. de Bont, and J. C. Verdoes (1999), Isolation and characterization of the epoxide hydrolase encoding gene from *Xanthophyllomyces dendrohous*, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5459-5463.
6. Lee, E. Y. (2002), Epoxide hydrolase-catalyzed hydrolytic kinetic resolution for the production of chiral epoxides, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 321-325.
7. Besse, P. and H. Veschambre (1994), Chemical and biological synthesis of chiral epoxides, *Tetrahedron* **50**, 8885-8927.
8. de Vries, E. J. and D. B. Janssen (2003), Biocatalytic conversion of epoxides, *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 1-7.
9. Arand, M., H. Hemmer, H. Durk, J. Baratti, A. Archelas, R. Furstoss, and F. Oesch (1999), Cloning and molecular characterization of a soluble epoxide hydrolase from *Aspergillus niger* that is related to mammalian microsomal epoxide hydrolase, *Biochem. J.* **344**, 273-280.
10. Rink, R., J. H. L. Spelberg, R. J. Pieters, J. Kingma, M. Nardini, R. M. Kellogg, B. W. Dijkstra, and D. B. Janssen (1999), Mutation of tyrosine residues involved in the alkylation half reaction of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 results in improved enantioselectivity, *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 7417-7418.
11. Lee, E. Y. and H. S. Kim (2001), Cloning and molecular characterization of epoxide hydrolase from *Aspergillus niger* LK, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 562-567.
12. <http://www.rcsb.org/pdb>
13. Kidera, A. (2001), Knowing similarity in protein 3D structure,

- Protein, Nucleic acid, Enzyme* **46**, 2198-2204.
14. <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/index.html>
 15. Sander, C. and R. Schneider (1991), Database of homology-derived structures and the structural meaning of sequence alignment, *Proteins* **9**, 56-68.
 16. <http://us.expasy.org>
 17. <http://prodes.toulouse.inra.fr/prodom/current/html/home.php>
 18. <http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/>
 19. Arand, M., D. F. Grant, J. K. Beetham, T. Friedberg, F. Oesch, and B. D. Hammock (1994), Sequence similarity of mammalian epoxide hydrolases to the bacterial haloalkane dehalogenase and other related proteins. Implication for the potential catalytic mechanism of enzymatic epoxide hydrolysis, *FEBS Lett.* **338**, 251-256.
 20. Funk, C. D., O. Radmark, J. Y. Fu, T. Matsumoto, H. Jornvall, T. Shimizu, and B. Samuelsson (1987), Molecular cloning and amino acid sequence of leukotriene A₄ hydrolase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6677-6681.
 21. Watabe, T., M. Kanai, M. Isobe, and N. Ozawa (1981), The hepatic microsomal biotransformation of Δ^5 -steroids to 5 α , 6 β -glycols via α - and β -dioxides, *J. Biol. Chem.* **256**, 2900-2907.
 22. van der Werf, M. J., K. M. Overkamp, and J. A. M. de Bont (1998), Limonene-1,2-epoxide hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14 belongs to a novel class of epoxide hydrolases, *J. Bacteriol.* **180**, 5052-5057.
 23. Rink, R., M. Fennema, M. Smids, U. Dehmel, and D. B. Janssen (1997), Primary structure and catalytic mechanism of the epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* ADS1, *J. Biol. Chem.* **272**, 14650-14657.
 24. Arahira, M., V. H. Nong, K. Udaka, and C. Fukazawa (2000), Purification, molecular cloning and ethylene-inducible expression of a soluble-type epoxide hydrolase from soybean, *Eur. J. Biochem.* **267**, 2649-2657.
 25. Beetham, J. K., T. Tian, and B. D. Hammock (1993), cDNA cloning and expression of a soluble epoxide hydrolase from human liver, *Arch. Biochem. Biophys.* **305**, 197-201.
 26. Nolling, J., G. Breton, M. V. Omelchenko, K. S. Markarova, Q. Zeng, R. Gibson, H. M. Lee, J. Dubois, D. Qiu, J. Hitti, Y. I. Wolf, R. L. Tatusov, F. Sabathe, L. Doucette-Stamm, P. Soucaille, M. J. Daly, G. N. Bennett, E. V. Koonin, and D. R. Smith (2001) Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*, *J. Bacteriol.* **183**, 4823-4838.
 27. Derbyshire, K. M., L. M. Parsons, and J. DeVost (2001), Putative epoxide hydrolase. Direct submitted to the EMBL/GenBank/DBJ database (entry AAL17927.1).
 28. Adams M. D., S. E. Celniker, R. A. Holt, C. A. Evans, J. D. Gocayne, P. G. Amanatides, S. E. Scherer, P. W. Li, R. A. Hoskins, and R. F. Galle (2000), The genome sequence of *Drosophila melanogaster*, *Science* **287**, 2185-2195.
 29. Skoda, R. C., A. Demierre, O. W. McBride, F. J. Gonzalez, and U. A. Meyer (1988) Human microsomal xenobiotic epoxide hydrolase. Complementary DNA sequence, complementary DNA-directed expression in COS-1 cells, and chromosomal localization, *J. Biol. Chem.* **263**, 1549-1554.