

Streptomyces phospholipase D의 정제를 위한 면역친화 크로마토그래피의 개발

박인선 · 김영아 · 정수진 · 엄태봉*

전북대학교 자연과학대학 생물학과

*Streptomyces somaliensis*가 생산하는 phospholipase D (PLD)를 정제하기 위하여 펩티드 항체 결합 면역 친화 크로마토그래피용 칼럼을 개발하였다. 단백질 구조 예측 프로그램과 *Streptomyces* PLD X-선 결정구조를 참조하여, *S. somaliensis* PLD의 1차 구조로부터 항원특성이 높고 표면에 위치하는 것으로 예상된 5종류의 펩티드들을 epitope로 선정한 뒤, 이에 대한 항체로 면역친화 크로마토그래피용 칼럼을 제작하였다. 배양 농축액을 칼럼에 통과시켜 정제한 활성 분획을 SDS-PAGE 및 Western blot 결과, 칼럼 종류에 따라 순수한 PLD 또는 35 kDa의 단백질 불순물만을 포함하는 PLD 정제 분획을 보여 면역친화 칼럼의 높은 항원결합 특이성을 보여주었다. 그러나 수용액 상에서 PLD 자체의 구조적 불안정성 때문에 정제 후 PLD의 특이적 활성 및 정제 수율은 낮았다.

Key words □ immunoaffinity, phospholipase D, purification, *Streptomyces*

Phospholipase D (PLD, EC 3.1.4.4)는 인지질의 phosphodiester 결합을 끊어 phosphatidic acid와 알코올로 전환하는 효소이다. 또한, 일부 PLD들은 가수분해 특성 이외에 다른 알코올들을 phosphatidic acid에 결합시키는 인지질 전이 활성(phosphatidyl-X + Y-OH → phosphatidyl-Y + X-OH)도 가지고 있는데, 이 반응을 통해 phosphatidylcholine (PC)로 부터 phosphatidylserine, phosphatidylinositol, phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine 등과 같은 값비싼 기능성 인지질이 생산된다.

그러나 대부분의 생물체에서 PLD의 생리적 기능은 세포 신호 전달에 관련되어 있기 때문에, 세포에서 생산량은 매우 낮고, 그 분해 역시 빨라 상업적으로 이용할 수 없다. 산업적 잠재성이 있는 PLD가 되기 위해서는 1) 단위 배양액 당 효소 생산량이 높아야 하고, 2) 식품용도로 허용된 기질 용해 용매들인 hexane, ethylacetate, diethylether, butylacetate 하에서 효소의 반응 안정성이 높으며, 3) 인지질의 전환 효율이 높아야 한다. 한편, *S. antibioticus* (9), *S. cinnamomeus* (13), *S. acidimyceticus* (5), *S. halstedii* (6), *S. septatus* (7), *S. chromofuscus* (17)와 분류가 확실치 않은 *Streptomyces* (12)들은 PLD를 세포외로 다량 분비한다는 것이 보고되어 있다. 그러나 이들이 생산하는 세포외 PLD의 양은 균 종류에 따라 다르기 때문에 PLD 생산 균주의 분리 방법 개발은 산업적으로 중요하다. 이를 위해 *Streptomyces* PLD에서 잘 보존된 펩티드 영역을 합성하여 그에 대한 한 펩티드 항체를 조제한 뒤, ELISA 방법으로 토양에 존재하는 *Streptomyces* 균들 중 PLD 생산 균주들을 선발하였다(16). 이들

가운데, *S. somaliensis*로 동정된 균주의 PLD가 butylacetate의 용매하에서 48 hr 반응 후 인지질 전환 효율이 가장 높았고(90-92%), Bennett's medium에서 72 hr의 배양 동안 색소를 생산하지 않았으며, 배양액의 효소 활성이 약 1-2 U/ml로 높아 상업적 잠재성이 있는 것으로 판단되었다(1).

효소의 정제는 정제 단계들을 가능한 한 단축하면서도 높은 수율로 고순도의 효소를 얻는 것이 바람직하다. 현재까지 *Streptomyces* PLD 정제는 Sephadex, hydroxyapatite, phenyl Sepharose 등의 칼럼을 이용한 일반 크로마토그래피 방법들(7, 13)이 보고된 바 있지만 다단계 정제과정이 요구되기 때문에 시간이 많이 걸리고 PLD들의 최종 수율이 낮아지는 단점이 있었다. 이에 인지질 전환 효율이 특히 높았던 *S. somaliensis*의 PLD 정제를 단순화하기 위하여 전보(1)에서 보고된 유전자 서열로부터 epitope로 적합한 부위를 택하여 펩티드들을 합성하고, 이들에 대한 항체로 친화성과 선택성이 높은 면역 항체 크로마토그래피를 제작하였다. 이 방법은 *Streptomyces*가 생산하는 PLD를 선택적으로 정제하기 위한 최초의 시도가 될 것이다.

재료 및 방법

PLD 생산 균 및 배양

전주 근교 토양에서 분리한 *S. somaliensis*는 Bennett 배양액(10)에서 30°C, 72 hr 동안 교반 배양(280 rpm) 하였다.

면역친화 크로마토그래피용 펩티드의 설계

현재까지 유일하게 보고된 *Streptomyces* sp. PMF PLD의 X-ray 결정 구조(12)를 항체용 펩티드 제작에 참고하기 위하여 CLUSTALW program (15)을 사용, PMF와 *S. somaliensis* PLD

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 063-270-3439, Fax: 063-270-3362
E-mail: tbuhm@chonbuk.ac.kr

유전자간의 1차 구조를 비교하였다. 각각, 506개 및 505개로 구성된 두 PLD간의 단백질 서열 유사성은 서열 일치 81.62%, 강한 유사도 7.71%, 약한 유사도 6.92%, 비유사서열 3.75%로 1차 구조의 높은 유사성을 보였기 때문에, *Streptomyces* sp. PMF PLD의 X-ray 결정 구조로부터 *S. somaliensis* PLD의 2차 및 3차 구조를 추론하는 것이 적절하다고 판단하였다. 먼저 Cn3D viewer를 통해 *Streptomyces* sp. PMF PLD의 X-ray 결정 구조 중 표면 노출의 가능성이 높은 turn과 loop 구조들 중에서, 적어도 6-7개 이상의 연속한 아미노산 서열이 친수성 특성을 가지며 2차 구조를 연결하는 위치에 존재하는 영역들을 탐색하였다. 즉, 1차 구조내의 α -helix와 β -conformation을 형성하는 영역은 배제하였으며, 이들 2차 구조를 연결하는 loop구조이면서 친수성기가 높은 지역들을 조사하였다. 다음으로 PMF PLD의 1차 구조에 대응하는 *S. somaliensis* PLD의 서열 위치를 찾아 같은 특성을 나타낼 것으로 예상한 epitope들을 선정하였다. 그러나 *S. somaliensis* PLD와 약 80%의 단백질 서열 일치도를 나타낸 결정 구조에만 의존해서 펩티드를 선정할 수는 없었기 때문에 이들 펩티드가 epitope로서 적절한 지 검증할 필요가 있었다. *S. somaliensis* PLD의 1차 구조에서 단백질 2차 구조 예측 프로그램인 PHD (14), Jpred (3), 단백질 서열 내 최적 항원 위치를 예측하는 antigenic 프로그램(11), 표면에 위치할 확률 예측법(4)을 사용하여 항원 형성이 잘 되고, 표면에 위치하면서 loop를 구성하는 것으로 추정되는 펩티드 위치를 찾은 뒤 결정구조 분석으로부터 선정한 epitope들과 비교하였다. 이러한 분석으로부터 최종적으로 5종류의 epitope들을 선정한 뒤, 합성하였다(Table 1).

펩티드 합성 및 conjugation

설계한 펩티드의 N-말단은 conjugation을 위해 cysteine residue를 첨가하였다. 합성 후 각 펩티드는 HPLC로 정제하고 LC-MASS로 그 분자량을 확인하였다. Conjugation은 활성화한 keyhole limpet hemocyanin (KLH)와 증류수/DMSO에 녹인 펩티드를 섞고 50 mM EDTA가 함유된 Na-phosphate buffer (pH 7.5)를 첨가 후 2 hr 반응시켰다. Ellman 시약과 SDS-PAGE를 이용 conjugation 여부를 확인한 후 Sephadex G-25 column에서 conjugate를 정제하였다.

펩티드 항체의 제조 및 정제

KLH와 conjugate된 펩티드는 New Zealand white rabbit에 주사하고 2차 및 3차 면역을 거친 뒤, 채혈 및 원심분리하여 혈장

을 분리하였다. 미리 phosphate-buffered saline (PBS)으로 평형화시킨 Protein A column (Econo-Pac Protein cartridge, Bio-Rad, USA)에 PBS로 10배 희석시킨 혈장을 넣고 같은 완충액으로 충분히 세척 후, 0.1 M glycine-HCl (pH 2.5)로 immunoglobulin G (IgG) 만을 분리하였다. 각 IgG는 SDS-PAGE결과 두 band 만을 보여 순수하게 정제되었음을 확인하였고, ELISA에서 정제항체의 합성 펩티드들에 대한 titer는 각각 1×10^5 수준이었다.

면역친화 크로마토그래피용 담체 제작

1 ml의 활성화된 N-hydroxysuccinimide (NHS) Sepharose (10 μ mol NHS/ml)에 한외여과로 농축한 IgG들을 각각 1 hr 동안 반응시켰다. NHS Sepharose에 항체의 결합 효율(100 \times 담체에 결합된 항체 함량/반응시킨 항체 함량)은 45-62%이었고 담체 ml 당 약 3.4-5.4 mg의 IgG가 결합하였다(Table 2).

면역친화 크로마토그래피에 의한 PLD 정제

*S. somaliensis*의 배양액을 70% ammonium sulfate로 침전한 후 원심분리하고 침전물을 증류수에 녹였다. 투석막에서 탈염 후 면역 항체 칼럼(0.75 \times 2.5 cm)에서 약 30 분간 평형화시켰다. 증류수로 칼럼을 충분히 세척한 뒤 0.1 M glycine-HCl 완충액(pH 2.5)으로 방출되는 PLD 활성 분획을 모으고 정제도는 SDS-PAGE로 확인하였다.

정제 PLD의 Western blot

Western blot은 1차 항체를 1×10^{-3} 로 희석 후 사용하였으며 2차 항체 처리 후 horse radish peroxidase로 발색하였다.

효소 활성 측정 및 단백질 정량

PLD 가수분해 활성은 choline oxidase-peroxidase 방법(8)의 변형으로, 반응 후 PLD 불활성화를 위해 EDTA를 첨가하는 대신 100°C에서 5 분간 가열하였다. 가수분해 활성 1 unit는 상기 반응 조건에서 분당 1 μ mol의 염화콜린을 방출하는 효소의 양으로 정의하였다. 단백질은 Bradford 법(2)에 따라 BSA를 표준 단백질로 하여 정량하였다.

결과 및 고찰

면역친화 칼럼의 PLD 결합능력

PLD 결합능력이 높은 면역친화 칼럼을 선정하기 위하여 담체인

Table 1. Amino acid sequence of synthetic peptides^a of *Streptomyces somaliensis* phospholipase D expected as suitable epitopes from protein structural prediction programs and X-ray crystal information

Epitope	Amino acid sequence of synthetic peptide	Predicted structure	Residue number
PLD1	CPDKTNADRDTVN-NH ₂	loop	99-112
PLD2	CNSWKGDYLDTSHPV-NH ₂	$\beta \rightarrow \beta$ loop	183-196
PLD3	CRSSPGATWADGKPY-NH ₂	$\beta \rightarrow \beta$ loop	423-436
PLD4	CLALVTGDQKKA-NH ₂	loop	399-409
PLD5	CDPANRGAVGSGGYSQIKS-NH ₂	$\beta \rightarrow \alpha$ loop	370-387

^aFor conjugation with keyhole limpet hemocyanin, a cysteine residue was added to the N-terminal of epitopes.

Affi-Gel Hz Hydrazide (Bio-Rad, Hercules, USA), vinylsulfone-activated agarose (Sigma, St. Louis, USA), EAH-Sepharose (Amersham, Uppsala, Sweden), ECH-Sepharose (Amersham), NHS-Sepharose (Amersham), epoxy-activated Sepharose (Amersham)에 antiPLD3 IgG를 결합시켜 칼럼들을 제작하고 PLD 활성을 비교하였다. 이들 중 항체 결합용 담체로서 NHS-Sepharose가 가장 우수하였다. 이에 NHS-Sepharose에 각 펩티드 항체를 결합시켜 면역친화 칼럼을 제조하였고, 이들 중 antiPLD4 IgG-Sepharose에서 PLD의 최대 결합능력을 조사하였다. 0.6-3.2 mg의 단백질을 함유하는 배양 농축액을 1 ml column에 각각 주입하여 평형화한 뒤 세척하고 0.1 M glycine-HCl 완충용액(pH 2.5)으로 PLD를 용출하였다. PLD함유 배양 농축액의 농도를 높여 칼럼에 주입함에 따라 용출된 PLD의 양은 최대 약 60 µg 까지 증가하였다(Fig. 1). 이는 1 ml 칼럼에 결합된 총 3.4 mg의 IgG 항체 중 1.8% (w/w)가 PLD와 항원-항체 반응할 수 있음을 의미한다(Table 2).

면역친화 크로마토그래피에 의한 PLD정제

배양 상등액의 유산 농축액을 탈염시킨 후 각 면역친화 칼럼에서 정제한 결과는 Table 3에 요약되었고, antiPLD3 IgG-Sepharose에서 PLD 정제 크로마토그램은 Fig. 2와 같다. 다른 칼럼을 사용했을 시에도 Fig. 2와 비슷한 크로마토그램을 보였다. 각 칼럼에서 PLD 회수율은 7-11% 범위였고 정제도는 0.8-1.6으로

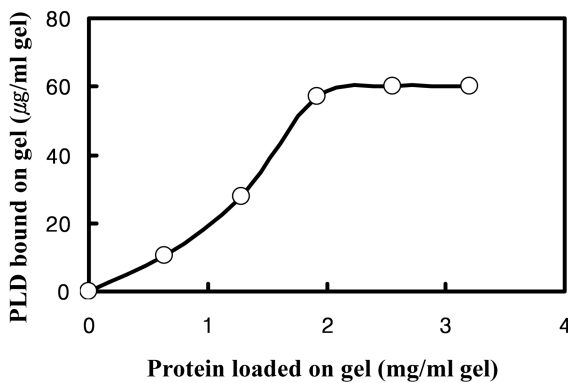


Fig. 1. Binding capacity of *Streptomyces somaliensis* phospholipase D on the immunoaffinity gel as a function of concentration of protein loaded on the antiPLD4 IgG-Sepharose.

Table 2. Coupling efficiency of antipeptide antibodies on NHS-activated Sepharose

Immunoaffinity matrix	Bound IgG mg/ml gel	Coupling efficiency %
antiPLD1 IgG-Sepharose	4.6	56
antiPLD2 IgG-Sepharose	4.7	52
antiPLD3 IgG-Sepharose	4.0	62
antiPLD4 IgG-Sepharose	3.4	45
antiPLD5 IgG-Sepharose	5.4	58

로 예외적으로 낮게 나타났다. 낮은 정제도가 면역친화 칼럼 자체의 문제인지 정제 효소의 불안정성 때문인지 확인하기 위하여 정제 후 분획을 SDS-PAGE와 Western blot을 실시하였다. SDS-PAGE 결과 antiPLD1 IgG-Sepharose 및 antiPLD3 IgG-Sepharose에서 정제 후 활성 분획은 *S. somaliensis* PLD 분자량(MW 53,635)에 일치하는 분자량 약 55 kDa의 위치에서 단일 band를 나타냈으며, Western blot결과 이 band는 PLD 단백질임을 나타냈다(Fig. 3). 한편, AntiPLD2, 4, 5 칼럼에서 정제시 SDS-PAGE상에서 55 kDa의 PLD band 이외 분자량 약 35 kDa의 band가 나타났기 때문에 antiPLD1 및 3 칼럼에 비해 이들 칼럼들의 기질 선택성은 떨어지는 것으로 보인다. 분자량 35 kDa 크기의 단백질은 *S. somaliensis* 배양액 중 가장 많이 생산되는 단백질이었으며 Western blot에서는 나타나지 않아 적어도 PLD의 분해 조각은 아닌 것으로 판단되었다. 이 결과들로부터 정제 분획의 PLD 활성이 낮은 이유가 적어도 면역친화 칼럼의 제작상 문제는 아닌 것으로 판단되었다. 배양 농축액을 한 종류 칼럼만을 통과시켜 거의 단일 PLD band를 얻는 것은 일반 크로마토그래피 정제로는 거의 기대할 수 없다. 그러나 antiPLD1 및 3의 경우와 같이 한번의 칼럼 통과 후 PLD가 단일 band 수준으로 정제된 것을 볼 때, *Streptomyces* PLD의 1, 2, 3차 단백질 구조 정보를 이용한 실험 디자인과 면역친화 칼럼의 제조 방법은 적절했다고 판단되었다.

정제 단백질의 높은 순도에도 불구하고 낮은 효소 활성을 보이는 이유가 효소 자체의 불안정성 때문이 아닌지 조사하였다. 예비 실험 결과 *S. somaliensis* PLD는 배양 상등액 상태로 4°C의 장기간 저온저장동안 활성이 잘 유지되었지만 일단 일반 크로마토그래피에서 정제를 진행하자 그 활성이 급격히 감소했다. 즉, Q-, SP-, CM-, DEAE-Sepharose의 이온교환수지 칼럼, octyl-,

Table 3. Purification summary of phospholipase D from *Streptomyces somaliensis*^a

Purification	Volume (ml)	Total activity (units)	Protein (µg)	Specific activity (units/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Culture supernatant	6.70	6.70	308.2	21.7	100.0	1.0
Ammonium sulfate	5.40	1.91	113.4	16.9	28.7	0.8
antiPLD1 Sepharose	0.55	0.48	14.3	33.6	7.2	1.6
antiPLD2 Sepharose	0.60	0.53	24.0	22.1	8.0	1.0
antiPLD3 Sepharose	0.50	0.75	26.5	28.3	11.2	1.3
antiPLD4 Sepharose	0.65	0.65	22.7	28.6	9.7	1.3
antiPLD5 Sepharose	0.92	0.58	32.2	17.4	8.7	0.8

^aDialyzed solution (5.4 ml) of the ammonium sulfate precipitate was loaded on each antiPLD IgG-Sepharose column.

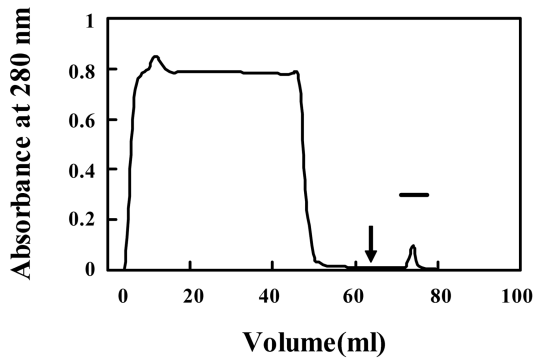


Fig. 2. A typical chromatogram of *Streptomyces somaliensis* phospholipase D on antiPLD3 IgG-Sepharose. Arrow represent elution start of 0.2 M glycine-HCl buffer, pH 2.5 and bar represent purified phospholipase D.

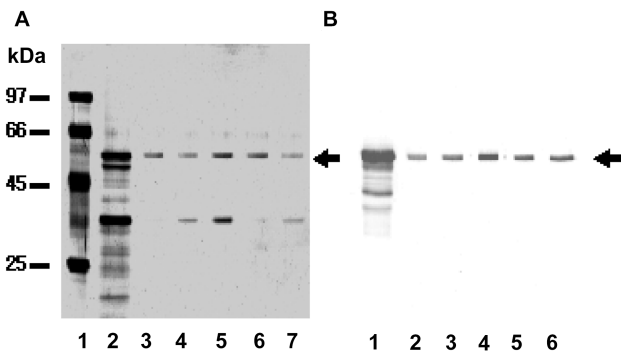


Fig. 3. (A) SDS-PAGE of *Streptomyces somaliensis* phospholipase D purified by immunoaffinity chromatography on anti-peptide IgG-Sepharose and (B) its Western blot diagram. (A) Molecular weights of protein markers in lane 1 are indicated to the left: lane 2, ammonium sulfate precipitate of culture supernatant; lanes 3 to 7, phospholipase D after chromatography on antiPLD1 IgG-Sepharose to antiPLD5 IgG-Sepharose, respectively. (B) lane 1, ammonium sulfate precipitate of culture supernatant; lanes 2 to 6, phospholipase D after chromatography on antiPLD1 IgG-Sepharose to antiPLD5 IgG-Sepharose, respectively.

phenyl-, butyl-Sepharose의 소수성 결합 칼럼, HPLC 겔 여과 칼럼, hydroxyapatite 흡착 칼럼, prep gel 전기영동의 정제 방법으로 pH 및 염 농도조절, 여러 종류의 protease inhibitor를 첨가하면서 정제를 시도했지만 PLD가 담체에 전혀 결합하지 않든지, 또는 정제 후 PLD 활성이 거의 실패 되었다. 이러한 현상은 면역항체 칼럼에 의한 정제 과정에서 나타났는데, 면역항체 칼럼에서 용출 후 정제 PLD 분획은 시간이 지남에 따라 활성 손실과 함께 탁해지는 것이 관측되었다. 효소 용출 시, Glycine-HCl 완충액의 강한 산성(pH 2.5) 때문에 생길 수 있는 단백질 변성을 고려하여 PLD 활성분획을 1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)로 미리 중화하였기 때문에 이 활성 손실은 pH 영향 때문이라고 생각할 수 없다. 또한, 배양액에 존재할 수 있는 proteases의 작용을 고려하여 protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim,

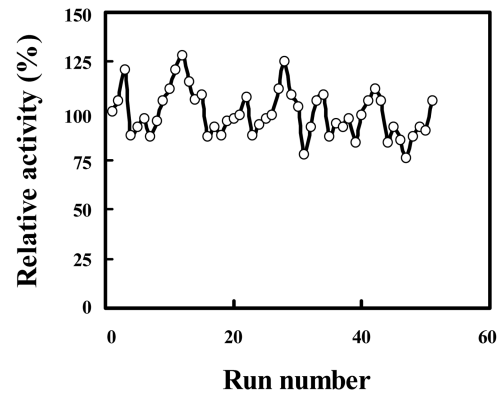


Fig. 4. Performance of the antiPLD3 IgG-Sepharose column during chromatographic runs. After each consecutive run, the 1 ml column was washed with about 30 ml of distilled water at a flow rate of 1 ml for the next run.

Germany)들을 배양 농축액, 칼럼 세척 및 용출 완충액에 첨가하였기 때문에 PLD의 proteases에 의한 분해 가능성도 배제되었다. 정제 수용액 중의 PLD를 안정시키기 위한 방법으로 여러 농도에서 Tween, Triton X, octylglucoside, Nonidet P40의 비이온 계면활성제 및 CHAPS, SDS의 이온 계면활성제들의 효과를 조사하였지만 미미한 효과이거나 오히려 활성 저해를 보였다. 또한, 단백질 안정제인 sucrose, maltose, glycerol의 첨가시 PLD 활성 보존 효과는 뚜렷하지 않았다. 이러한 결과들로부터 *Streptomyces* 배양액 중의 어떤 물질이 PLD를 구조적으로 안정시키는 역할을 하리라 추정된다. 즉, 정제 후 용액의 탁해짐과 함께 PLD 활성이 급격하게 감소되는 현상으로부터 예상되는 가정은 정제 과정에서 이 물질이 제거됨으로써 PLD의 구조가 불안정해지고 그 결과 PLD 분자들끼리 응집될 가능성이다. 현재, PLD의 활성 유지와 회복을 위한 여러 첨가제들의 효과를 조사하고 있다.

반복 사용에 따른 칼럼의 PLD 결합능력

칼럼의 반복 사용은 효소의 경제적인 정제를 위해 중요한 요소이다. 면역항체 칼럼은 리간드로서 단백질인 IgG가 사용되는 점과 pH 2.5의 강한 산성에서 PLD를 용출해야 하기 때문에 IgG의 변성 가능성을 고려해야 할 필요가 있다. 면역친화 칼럼의 반복 사용에 따른 PLD의 결합 및 용출 변화를 보기 위하여 antiPLD3 IgG-Sepharose에서 52번의 반복 정제를 수행하였는데 Fig. 4의 결과는 반복된 정제 과정 후에도 칼럼의 정제 능력이 잘 유지되고 있음을 보여주었다. 매회 정제마다 약 $\pm 10\%$ 의 활성 변화가 보였지만 이는 칼럼 결합능력의 감소가 아니라 칼럼으로부터 용출되는 PLD 분획의 수집량 차이 때문으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단 지역대학우수과학자지원사업(과제 번호:D00282) 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. 정수진, 이선희, 엄태봉. 2004. *Streptomyces somaliensis*가 생산하는 세포외 phospholipase D의 유전자 서열분석과 transphosphatidylolation활성 특성. 미생물학회지 40, 211-216.
2. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
3. Cuff, J.A., M.E. Clamp, A.S. Siddiqui, M. Finlay, and G.J. Barton. 1998. Jpred: A Consensus Secondary Structure Prediction Server. *Bioinformatics* 14, 892-893.
4. Emini, E.A., J.V. Hughes, D.S. Perlow, and J. Boger. 1985. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J. Virol.* 55, 836-839.
5. Hasegawa, M. and N. Ota. 1992. Production of phospholipase D-K. *Japan Patent*. JP1992088981-A.
6. Hatanaka, T., M. Kubota-Akizawa, T. Negish, and T. Hagishita. 2002. Study on thermostability of phospholipase D from *Streptomyces* sp. *Biochim. Biophys. Acta* 1598, 156-164.
7. Hatanaka, T., T. Negish, M. Kubota-Akizawa, and T. Hagishita. 2002. Purification, characterization, cloning and sequencing of phospholipase D from *Streptomyces septatus* TH-2. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 233-241.
8. Imamura, S. and Y. Horiuti. 1978. Enzymatic determination of phospholipase D activity with choline oxidase. *J. Biochem.* 83, 677-680.
9. Iwasaki, Y., H. Nakano, and T. Yamane. 1994. Phospholipase D from *Streptomyces antibioticus*: cloning, sequencing, expression, and relationship to other phospholipases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 290-299.
10. Jone, K.L. 1949. Fresh isolation of *Actinomycetes* in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *J. Bacteriol.* 57, 141-145.
11. Kolaskar, A.S. and P.C. Tongaonkar. 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.* 276, 172-174.
12. Leiros, I., F. Secundo, C. Zambonelli, S. Servi, and E. Hough. 2000. The first crystal structure of a phospholipase D. *Structure* 8, 655-667.
13. Ogino, C., Y. Negi, T. Matsumiya, K. Nakaoka, A. Kondo, S. Kuroda, S. Tokuyama, S. Kikkawa, T. Yamane, and H. Fukuda. 1999. Purification, characterization, and sequence determination of phospholipase D secreted by *Streptoverticillium cinnamomeum*. *J. Biochem.* 125, 263-269.
14. Rost, B. 1996. PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile based neural networks. *Method Enzymol.* 266, 525-539.
15. Thompson J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
16. Uhm, T.B. and S.H. Lee. 2003. A peptide antibody for rapid screening of *Streptomyces* species producing phospholipase D. *Biotechnol. Lett.* 25, 883-886.
17. Yang, H. and M.F. Roberts. 2002. Cloning, overexpression, and characterization of a bacterial Ca^{2+} -dependent phospholipase D. *Protein Sci.* 11, 2958-2968.

(Received October 27, 2006/Accepted November 27, 2006)

ABSTRACT : Purification of *Streptomyces* Phospholipase D by Immunoaffinity Chromatography using Peptide Antibodies

In Sun Park, Young Ah Kim, SuJin Jeong, and Tai-Boong Uhm* (Division of Biological Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea)

An immunoaffinity chromatography for the specific binding of *Streptomyces somaliensis* phospholipase D (PLD) that is considered as an industrially potential enzyme was developed. By using the protein structure prediction programs and the X-ray crystal structure of a *Streptomyces* PLD, 5 different epitopes with high antigenicity that are predicted to locate on the surface of the *S. somaliensis* PLD were selected and then synthesized for the preparation of antipeptide antibodies. Each purified rabbit IgG was coupled with NHS-activated Sepharose to prepare the immunoaffinity resins. After one-step purification of the culture concentrate on the antipeptide IgG-coupled Sepharose column, SDS-PAGE and the Western blot analysis of the purified samples showed that purification of PLD on the affinity columns was satisfactory, indicating that the peptide design using the structural information of *Streptomyces* PLDs was rational. However, the purified PLD in the solution aggregated rapidly, which resulted in poor specific activity and low purification yield.