

*Aspergillus nidulans*에서 분리된 키틴 탈아세틸화 효소활성에 영향을 미치는 아미노산 잔기 분석

김종일* · 송다현

서울여자대학교 자연과학대학 식품·미생물공학과

Analysis of Amino Acid Residues Involved in Activities of Chitin Deacetylase of *Aspergillus nidulans*

Jong-Il Kim* and Da Hyun Song

Department of Food and Microbial Technology, College of Natural Science, Seoul Women's University,
Seoul 139-774, Republic of Korea

(Received September 27, 2011 / Accepted November 29, 2011)

Native chitin deacetylase of *Aspergillus nidulans* was purified to apparent homogeneity by a combination of phenyl-Sepharose and Q-Sepharose column chromatography. In order to analyze the amino acid residues involved in the enzyme activity, the enzyme was chemically modified with chemical agent, which selectively reacted with the specific amino acid residue on the protein. When the enzyme was chemically modified with diethylpyrocarbonate, which specifically reacted with histidine residues on the protein, the activity was eliminated. The chitin deacetylase, chemically modified with 100 μ M modifier at the residue of arginine or tyrosine, has shown to have decreased activities. It was shown that the modification at aspartic acid or glutamic acid did not affect the enzyme activity to a greater extent, which would not implicate that acid amino residues were directly involved in catalytic reaction and would affect on the global structures of the proteins. This results demonstrated that histidine and tyrosine residues of enzyme would participate in an important function of the chitin deacetylase activity.

Keywords: active residues, chitin deacetylase, coupled enzyme assay, site-specific chemical modification

키틴(chitin)은 2-acetamido-D-glucose가 β 1 \rightarrow 4 결합된 분지되지 않은 중합체이며, 곰팡이의 세포벽에 널리 존재하며 실모양의 중합체 구조를 하며, 탈아세틸화된 키토산은 글루코사민의 단위체가 β 1 \rightarrow 4 결합된 중합체이며, 식물에 병을 일으키는 *Fusarium solani*, *Puccinia striiformis*, *Fusarium oxysporum* 등의 곰팡이의 세포벽 표면에 존재하는 세포벽 구성성분이다 (3). 키틴 탈아세틸화 효소(chitin deacetylase, CDa)는 키틴의 N-아세틸-D-글루코사민(glucosamine) 잔기의 탈아세틸화 반응에 관여하여 키토산으로 전환을 촉매하는 효소이며(Fig. 1) 곰팡이 *Mucor rouxii*에서 처음 확인되었으며 부분 정제되었다 (1). 또한 키틴 탈아세틸화 효소활성은 *Colletotrichum lindemuthianum* (4)과 *Colletotrichum lagenarium*이 감염된 오이의 잎에서 활성이 발견되었으나(9) 전기영동에서 균질적으로 순수 분리되지는 않았다. 세포외 키틴 탈아세틸화 효소는

*Aspergillus nidulans*의 자연적인 자가분해 과정에서 활성이 탐지되며 *A. nidulans* 배양액의 자가분해산물에 존재하는 endo-chitinase와 β -N-acetylglucosaminidase 효소가 같이 연합 작용하여 세포벽 키틴에 작용한다는 보고가 있다(7, 8). 이번 연구에서 chitin deacetylase를 장기간 배양한 *A. nidulans*의 자가분해 배양액으로부터 순수 분리하였으며 효소 활성분석을 하여 그 특성을 알기 위해 효소의 활성에 관련된 아미노산의 잔기의 특성을 분석하였다. 이를 위해 기질의 결합 및 효소활성에 관련된 아미노산을 분석하기 위해 특정 아미노산 잔기와 반응하는 수식제를 사용하여 효소를 화학 수식한 다음 그 활성을 분석하여 효소의 특정 아미노산 잔기가 효소반응 활성에 대한 영향을 분석하였다. 효소 단백질의 화학 수식을 통한 효소활성 분석은 효소 화학반응에 관련되고 필수적인 아미노산 잔기를 확인하는 방법을 제공하는 중요한 기술법이다. 특이적 화학 수식제에 의해 효소활성에 직접 관련된 아미노산 잔기가 변형되면 효소활성의 상실을 일으키게 된다. 단백질의 폴리펩타이드 중추요소(backbone)에 결합되어 있는 각 아미노산의

* For correspondence. E-mail: jikim@swu.ac.kr; Tel.: +82-2-970-5638; Fax: +82-2-970-5977

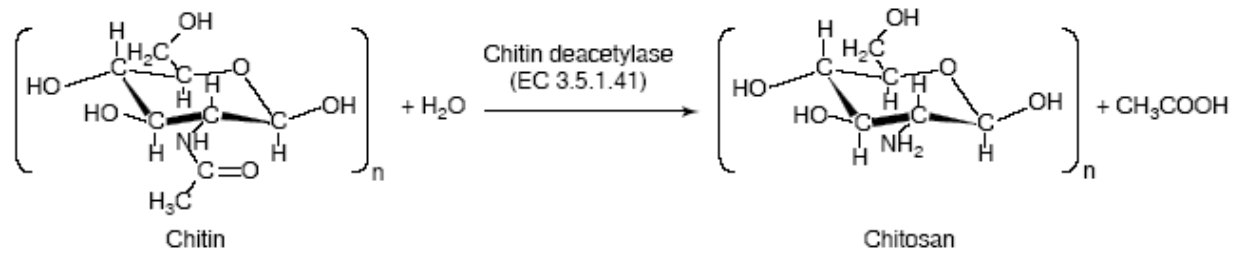


Fig. 1. The catalytic action of chitin deacetylases; chitin is deacetylated by the enzyme chitin deacetylase to form chitosan and acetate.

장기의 기능기(functional group)가 효소 물리화학적 촉매반응에 직접 관여하므로 화학 수식제를 당량비적인 농도보다 낮은 양을 사용하여 효소단백질을 화학 수식하면 효소활성의 감소를 화학수식제의 농도로 적정할 수 있다.

재료 및 방법

*A. nidulans*는 potato-dextrose 한천배지에서 보존하였으며, 실험의 접종을 위해서는 CM 배지에서 배양하였다. CM 배지의 구성은 1% glucose, 0.15% yeast extract, 0.15% casein hydrolysate, 1×vitamin 용액, 1×minimal salt 용액 및 0.5% chitin을 포함하였다. 1×vitamin 용액은 100×vitamin 보관용액을 만들어 희석하여 사용하였다. 100×vitamin 보관용액은 riboflavin 50 mg, *p*-aminobenzoic acid 250 mg, pyridoxine-HCl 250 mg, biotin 2 mg, ascorbic acid 250 mg, folic acid 250 mg, thiamine 250 mg 및 nicotinic acid 50 mg을 탈이온수 500 ml에 녹여 만들어 냉장 보관하였다. 1×minimal salt 용액은 50×보관용액을 만들어 희석하여 사용하였다. 50×보관용액은 NaNO₃ 15.2 g, MgSO₄ 2.6 g, KH₂PO₄ 15.2 g, KCl 2.6 g, ZnCl₂ 40 mg, (NH₄)₂MoO₇ 0.4 g, MnCl₂ 1 mg, CuSO₄ 3 mg 및 FeSO₄ 1 mg을 탈이온수 100 ml에 녹여 만들어 냉장 보관하였다. CM 액체배지(200 ml)에 배양하기 위해 CM 한천배지에서 배양한 곰팡이를 포자 10⁶/ml을 포함하는 2 ml의 포자현탁액을 접종하여 30°C에서 20일간 배양하였다.

효소의 정제

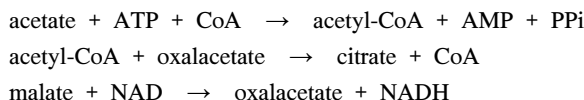
효소 조출물을 분리하는 과정들은 4°C에서 수행하였다. 30°C에서 20일간 배양한 자가분해가 일어난 배양액을 8,000×g로 30분간 원심 분리하여 균사체(mycelium)를 배양액으로부터 분리하였다. 자가 분해액이 포함된 상등액에 30% 포화 되게 황산 암모늄을 첨가하고 30분간 거품이 발생하지 않도록 천천히 저어주었다. 25,000×g로 30분간 원심 분리하여 침전된 단백질을 수확하였다. 침전된 단백질을 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액에 잘 녹이고 투석 탕에 넣어 4°C에서 1.5 M 황산 암모늄이 포함된 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액에 18시간 동안 완충용액을 3회 바꾸어 가며 투석하였다. 투석한 황산 암모늄 분획물에 대해 phenyl-Sepharose 크로마토그래피를 실시하였다. Phenyl-Sepharose (2.5×6 cm) column

은 1.5 M (NH₄)₂SO₄이 포함된 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액으로 2 ml/min의 유속으로 column을 충분히 평형화시켰다. 단백질 분획물을 150 ml/h의 유속으로 장전한 후 동일 완충용액으로 결합되지 않는 단백질이 완전히 제거되도록 흘러주었다. 수지에 결합된 단백질을 1.5-0 M 황산 암모늄 농도 구배를 걸어 2 ml/min의 유속으로 총 200 ml 흘리면서 분획들을 모아 다음 과정에 이용하였다. 효소활성도를 측정하여 활성이 높은 0.3-0 M 황산 암모늄이 포함된 완충용액에서 용출된 분획을 모았다. 모은 분획을 황산 암모늄을 50% 포화 되도록 황산 암모늄을 첨가하여 25,000×g로 30분간 원심 분리하여 단백질을 침전시킨 다음 25 mM Tris-HCl, pH 7.5 완충용액에 현탁한 다음 25 mM Tris-HCl, pH 7.5 완충용액에 하룻밤 동안 투석하였다. 투석한 단백질 용액을 25 mM Tris-HCl, pH 7.5 완충용액에 평형된 Q-Sepharose column (2.5×4 cm)에 주입하고 0 M, 0.1 M, 0.3 M, 0.5 M 및 0.7 M NaCl이 포함된 25 mM Tris-HCl, pH 7.5 완충용액으로 계단식 용출방법을 사용하여 탈아세틸화 효소를 분리하였다. 효소 활성을 50%가 되도록 황산 암모늄을 포화시켜 위의 방법으로 침전시킨 후 최소부피의 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액에 현탁하였다.

효소 활성 측정

키틴 탈아세틸화 효소의 활성은 효소의 작용으로 방출되는 acetate의 양을 측정하여 분석하였다. 이 분석방법은 키틴 탈아세틸화 효소의 활성을 생성물의 양을 coupled enzyme assay 방법으로 측정함으로써 확증되어진다. 표준 반응 혼합물(0.2 ml)은 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 기질로써 0.5 mM penta-N-acetylchitopentaose, 그리고 효소로 이루어 졌다. 효소반응은 37°C에서 실행하였으며, 반응 후 끓는 물에서 1분간 방치하여 반응을 중지하고 혼합물을 4°C에서 15분간 14,000×g로 원심분리 하였다. Acetate의 양을 정량하기 위해 EnzytecTM 제품인 acetate 정량 kit를 사용하여 coupled enzyme assay 반응을 실시하였다(2). 짝결합 반응효소(coupled enzyme assay) 반응 혼합물(0.5 ml)은 ATP (최종농도 1.6 mg/ml), coenzyme A (최종농도 0.17 mg/ml), NAD (최종농도 0.8 mg/ml), malate dehydrogenase (최종농도 15 U/ml), citrate synthase (최종농도 4 U/ml), acetyl CoA synthetase (최종농도 0.3 U/ml), 탈아세틸화 효소반응물(0.2 ml)로 구성되어 있으며,

25°C에서 15분간 실시하여 반응액의 흡광도를 340 nm에서 측정하였다. 생성된 NADH의 정량은 흡광도 계수 $\epsilon_{340} = 6.31 / \text{mmol} \cdot \text{cm}$ 을 사용하여 계산하였다. 아세트산의 표준검정 곡선은 Na-acetate를 사용하여 측정치와 비교분석하였다. 짝결합 반응효소계를 위한 효소반응물의 구성은 다음과 같다.



효소의 화학수식

키틴 탈아세틸화 효소의 아미노산 잔기의 화학수식은 Lundblad 방법에 따라 실행하였다(5). 효소단백질의 아미노산 잔기를 수식하기 위해 정제된 효소와 표시된 농도의 화학 수식제를 첨가하여 수식반응을 하고, 반응하지 않은 화학 수식제를 반응혼합물에서 제거하기 위해 탈염용 Sephadex G-10 컬럼(1×1.5 cm)을 이용하여 2,500×g로 원심 분리하여 수식된 효소단백질만 포함된 효소용액을 얻었다. 히스티딘 잔기 수식은 50 mM sodium acetate (pH 6.0) 완충용액에서 diethylpyrocarbonate (DEPC)를 첨가하여 25°C에서 60분간 반응을 실시하였다. 카르복실 잔기의 수식은 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimide-*p*-toluenesulfonate (CCDT)를 50 mM HEPES 완충용액(pH 7.5)에 첨가하여 20°C에서 60분간 어두운 곳에서 반응을 실시하였다. 시스테인 잔기의 수식은 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액에서 효소단백질 용액과 함께 iodoacetamide를 25°C에서 20분간 반응하여 수식반응을 하였다. 아르기닌 잔기의 수식은 50 mM HEPES (pH 7.5) 완충용액에서 phenylglyoxal을 농도를 달리하여 첨가하여 상온에서 1시간 반응하였다. 타이로신 잔기의 수식반응은 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액에서 농도를 달리하여 tetranitromethane을 혼합하여 상온에서 1시간 수식반응을 진행하였다. 화학 수식된 효소의 잔여활성은, 화학 수식제를 첨가하지 않은 앞의 반응으로 얻은 효소용액을 대조구로 비교하여 기질을 첨가하여 30분간 37°C에서 반응하여 효소 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

효소단백질 정제

제한된 영양물질이 공급되는 조건에서의 20일 기간 동안의 *A. nidulans* 곰팡이 배양은 자가 분해되는 과정을 거친다. 이 과정에서 방출되는 또는 세포외 효소들이 포함된 자가 분해액(auto lysate)으로부터 키틴 탈아세틸화 효소를 분리하였다. 염의 용해도에 따른 분류로 황산암모늄을 처리하여 0-30%, 30-50%, 50-70%, 70-90% 포화용액에서의 단백질 침전물 분획을 시도하였다. Penta-N-acetylchitopentaose를 기질로 하였을 때 탈아세틸화 효소의 활성이 황산암모늄 30% 포화용액에 침전된 단백질분획과 황산암모늄 30-50% 포화용액에 침전된 단백질 분획에서 존재하였으며, 30% 분획에서 상대적인 비율로 0.9, 50% 분획에서는 0.7로 존재하여 더 많은 활성이 있는

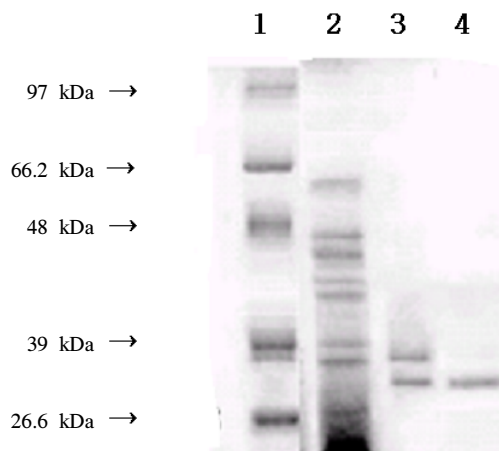


Fig. 2. Analysis by SDS-PAGE of CDa during purification steps. The electrophoresis was performed using 10% gel. Lanes: 1, molecular weight markers (phosphorylase B, 97 kDa; bovine serum albumin, 66.2 kDa; porcine fumarase, 48 kDa; aldolase, 39 kDa; triose phosphate isomerase, 26.6 kDa); 2, protein fractions from ammonium sulfate precipitation; 3, proteins obtained from hydrophobic interaction chromatography in phenyl-sepharose; 4, proteins obtained from an ion exchange chromatography in Q-sepharose.

30% 분획을 다음의 순수분리 과정에 시료로 이용하였다. 소수성 상호작용의 친화도에 따른 결합방식의 차이에 따른 분리인 phenyl-Sepharose 컬럼 크로마토그래피에서의 분리양식은 친수성인 성격을 가진 단백질들은 상대적으로 높은 농도의 황산암모늄을 포함하는 완충용액에서 용출되지만 목표로 하는 *A. nidulans* 키틴 탈아세틸화 효소는 0.3 혹은 0 M의 황산암모늄이 포함된 완충용액에서 용출되는 것으로 보아 소수성인 아미노산이 표면에 상대적으로 많이 노출되어 있는 것으로 판단된다. Phenyl-Sepharose 컬럼 크로마토그래피에서 활성이 있는 분획을 단백질의 전하분포에 따른 분리방법인 음이온교환 크로마토그래피로 분류하였을 때 *A. nidulans* 키틴 탈아세틸화 효소는 상대적으로 높은 농도의 NaCl이 포함된 완충용액에서 용출되었다. 효소활성은 0.5 M NaCl 분획에서 존재하였으며 이것은 키틴 탈아세틸화 효소에 상대적으로 많은 양의 음이온을 가지는 아미노산의 잔기가 분포한다는 것을 의미한다. SDS-PAGE 결과는 약 29 kDa의 분자량을 가지는 하나의 단백질 band만이 순수하게 분리 되었다는 것을 나타내었다(Fig. 2). 정제된 단백질 band를 MALDI-TOF MS를 이용하여 peptide의 질량 지문검사(peptide mass fingerprinting)를 한 후 이 정보를 가지고 data base와 비교 분석하여 표적 단백질을 동정하여 *A. nidulans* 키틴 탈아세틸화 효소 단백질의 아미노산 서열을 검색 회수하였다. 그 결과 정제된 단백질은 247개의 아미노산으로 이루어졌으며 N 말단의 아미노산 서열은(Fig. 3) $^1\text{MLFPNVPGVASLLSLFAATLILN}^{23}$ 으로 나타났으며 산성 아미노산인 Asp와 Glu의 함량이 약 11%로 보통의 단백질에서의 일반 평균 함량보다 높은 비율로 존재하였다. 친핵성 촉매기로 작용할 수 있는 히스티딘은 10개 존재하며 타이로신의

1	MLFPNVP	GVA	SLLSLFA	ATL	ILNTQAL	AIN	TIANLTDR	QRP	RVS	GLY	IHH	50
51	CYVPGV	VALT	FDDGPYI	YTEE	LLDILAQ	YGA	KATFFVN	GHN	LAGNE	WLI	QIR	100
101	VVNEG	HQLAS	HTWGHT	DLTV	LSYDQIV	DQM	TRLESA	FFVAS	VGVVP	TYM	RRP	150
151	PYLAAN	DYVL	GVMAEL	GYHV	IGASVD	TKDY	ENDHPD	LIGRS	VAKFN	QELD	Q	200
201	GGTIVL	SHDI	HEQTVR	TLTH	IMLEEV	YERG	LQPTTV	GGCL	GDDAW	YR		247

Fig. 3. Amino acid sequences of chitin deacetylase of *A. nidulans*.

함량은 12개로 높은 비율의 함량으로 나타났다.

현재까지 보고된 키틴 탈아세틸화 효소의 활성측정은 효소반응물의 생성물에 대한 착색 반응으로 FeCl_3 를 사용하는 비색정량법(colorimetric assay) (6)과 방사능 동위원소 H^3 이 표지된 아세트산이 결합된 키틴 당을 제조하여 기질로 사용하는 방사능법(radiometric assay) (1, 10)이 사용되었으나, 비색법에서는 착색반응에서 생성되는 침전물을 여과해야 하며, 방사능법에서는 방사능기질과 방출된 방사능 아세트산을 분리해야 하며 방사선량을 측정해야하는 불편함과 부정확성이 포함되어 있다. 이번 연구에서 적용된 효소활성 측정법은 키틴 탈아세틸화 효소에 의해 생성된 유리 아세트산을 또 다른 효소를 짝결합 반응(coupled enzyme assay)을 연결시켜 분광흡도계로 측정이 용이한 생성물로 당량비적으로 전환시켜 분석하였다. 키틴 탈아세틸화 효소에 의해 생성된 생성물인 하나의 아세트산은 짝결합 반응으로 하나의 NADH가 당량비적으로 생성된다. 이 방법을 사용하면 탈아세틸화 반응물에 짝결합 반응효소계를 첨가하여 탈아세틸화 효소반응을 실시하면 연속적인 시간에서 측정이 가능하여 반응속도론적인 분석이 용이해질 수 있다.

화학수식에 의한 효소활성변화

특이적인 아미노산 잔기에만 반응하는 화학수식 시약에 의하여, 효소활성에 관여하는 아미노산 잔기를 화학 수식한 다

음 효소활성을 측정함으로써 *A. nidulans* 키틴 탈아세틸화 효소의 활성에 관여하는 아미노산 잔기를 분석하였다. 각 물질들의 농도에 의한 저해정도를 분석하기 위해 화학수식제의 농도를 달리하여 CDa 효소(1 μM)를 화학적 수식을 한 다음 반응하지 않은 수식제를 제거하고 수식된 효소단백질을 기질과 함께 반응하여 수식되지 않은 효소단백질의 반응을 대조구로 하여 비교 분석하였다. 히스티딘에 특이적으로 반응하는 diethylpyrocarbonate에 의해서 수식된 효소는 높은 정도의 저해양상을 나타냈다(Fig. 4). 1 μM DEPC에 의해 화학 수식된 CDa의 활성은 화학수식 되지 않은 효소에 비하여 60%의 활성이 상실 되었으며, 4 μM DEPC는 CDa의 활성을 완전히 제거된 상태의 화학 수식을 유도하였다. 이것은 CDa 효소 단백질에서의 histidine 잔기는 DEPC에 의해 화학수식이 되고, 이러한 수식이 되는 잔기는 기질과의 결합 및 화학반응이 진행되는 부위에 위치한다는 것을 의미한다. 활성부위의 히스티딘 잔기는 친핵성의 반응성을 가져 화학 수식제에 의해 매우 활발하게 반응하여 5 μM DEPC에 의해 효소의 활성이 완전히 상실되었다. 아스파르트산 및 글루탐산의 카르복실($-\text{COOH}$)기에 반응하는 carbodiimide에 의해 화학 수식된 효소는 0.1 mM 농도로 화학수식 하였을 때는 활성이 상대적으로 약하게 30% 저해되었으며(Fig. 5), 0.4 mM로 처리한 수식 된 효소는 약 40%가 저해 되었고 그 이상의 농도로 수식하여도 더 이상의

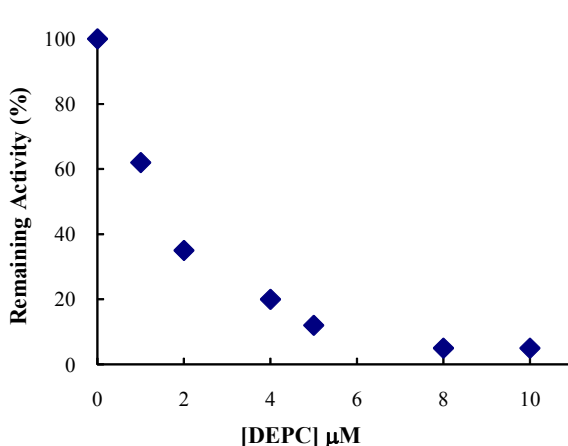


Fig. 4. Effect of concentration of the modifier for histidine residues. Purified CDa was prereacted with DEPC at 37°C for 20 min, and the residual activity was assayed in standard reaction mixtures at 37°C for 20 min.

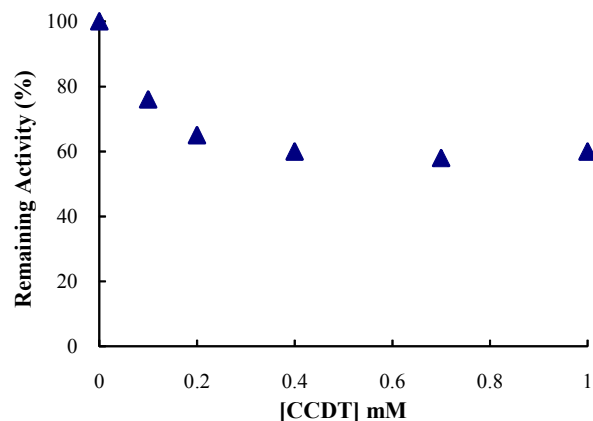


Fig. 5. Effect of concentration of the modifier for the residues of asparic or glutamic acid on the residual activity of INOS. Purified CDa was preincubated with CCDT at 20°C for 1 h, and the residual activity was assayed in standard reaction mixtures at 37°C for 20 min.

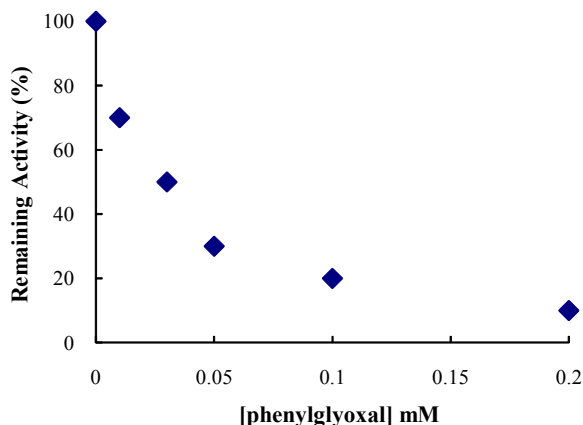


Fig. 6. Effect of concentration of the modifier for arginine residues on the protein. Purified CDa was preincubated with phenylglyoxal at room temperature for 60 min, and the residual activity was assayed in standard reaction mixtures at 37°C for 20 min.

저해 정도는 증가하지 않았고 저해효과가 포화되는 현상을 보였다. 아르기닌 잔기에 특이적으로 반응하는 phenylglyoxal에 의해 화학 수식된 효소는 효소활성이 감소되었으며, 20 μ M 수식제의 농도로 수식된 효소의 저해정도는 20-30%로 나타났다(Fig. 6). 더 많은 양의 화학 수식제를 사용하였을 때는 사용한 양에 일차적으로 비례하는, 수식되어진 효소의 결과로 활성이 감소하는, 저해정도를 나타내었다. 0.1 mM에 의해 수식된 효소의 활성은 80% 상실된 저해양상을 보였다. 시스템인 잔기와 특이적으로 반응하는 iodoacetamide에 의해 화학수식된 CDa는 0.1 mM로 화학수식 하였을 때는 40% 저해되었으며, 0.4 mM로 처리한 수식된 효소는 잔존활성이 30%로 유지되어 약 70%가 저해 되었고 1 mM 수식제와 반응한 효소는 80-90%의 효소활성이 억제 되었다(Fig. 7). 히드록실 반

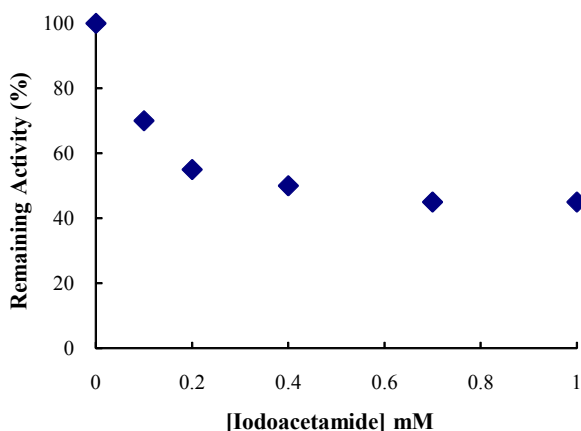


Fig. 7. Effect of concentration of the modifier for cysteine residues on the protein. Purified CDa was preincubated with iodoacetamide at 25°C for 20 min, and the residual activity was assayed in standard reaction mixtures at 37°C for 20 min.

응기가 있는 타이로신 잔기의 수식에서는 0.1 mM 수식제에 의해 수식된 1 μ M의 효소단백질은 수식되지 않은 효소단백질의 70%의 활성을 나타내었으며, 점점 더 높은 농도의 tetranitromethane에 의해 수식되면 더 많은 활성의 감소를 나타내었다.

1 mM tetranitromethane에 의해 수식된 1 μ M의 효소단백질은 효소활성의 완전한 소실이 되는 결과를 보였다(Fig. 8). 기질(1 mM)과 효소단백질이 함께 존재할 때 tetranitromethane에 의해 수식된 효소의 잔여 활성은 40-50%를 유지하였다(자료 미제시). 이것은 기질이 효소활성 부위에 결합함으로써 tetranitromethane의 수식을 방해하여 수식에 의한 활성 감소를 보호하는 것을 나타낸다. 이상의 결과로 본 효소의 활성에 히스티딘과 타이로신이 결정적으로 역할을 하며, 양전하를 가진 아르기닌 잔기도 중요한 역할을 담당하는 것으로 추정된다. 트립토판 잔기는 기능기의 역할에서 실제적인 효소반응에서의 화학적 단계보다는 활성부위의 입체적인 구조를 형성하는데 기여하는 것으로 추측된다(자료 미제시). 산성아미노산(Asp 및 Glu)의 잔기들도 효소반응의 전체과정에서의, 만일 화학 수식되면 효소반응이 저해되는, 단계에 관여되어 역할을 담당하는 것으로 판단된다.

Penta-N-acetylchitopentaose를 기질로 사용하여 분석하였을 때 최적 반응조건은 pH 8로 나타났으며, 더 높은 pH에서는 활성이 급속히 감소되었다(자료 미제시). 효소의 타이로신 및 아르기닌 잔기가 효소반응에 중요한 역할을 하는 효소는 pH 10 부근에서 효소활성의 변화가 극적으로 변화되는 일반적인 특성을 보이는데, 이를 가정으로 하였을 때, 타이로신 잔기의 일반적인 pKa가 10 부근이므로 타이로신 잔기가 효소활성에 필요한 반응에 관여하는 것으로 추론된다. *A. nidulans* CDa의 경우 활성부위에 타이로신 잔기가 위치하여 효소의 화학반응에 큰 영향을 미치는 것으로 판단된다. 산성 반응기를 가진 아스파르트산 혹은 글루탐산의 경우 활성부위에서 큰 역할을 담당하지 않거나 혹은 활성부위가 아닌 다른 곳에 위치한다

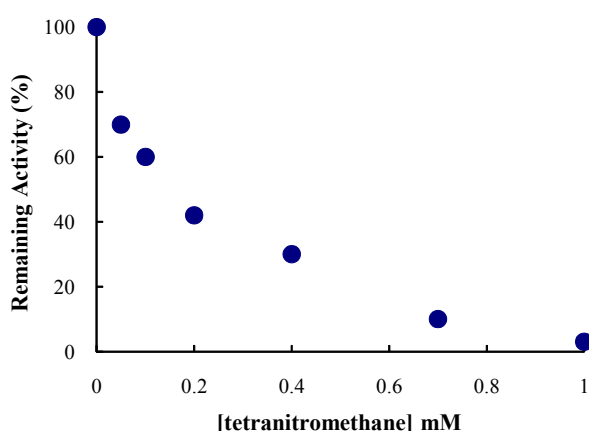


Fig. 8. Effect of concentration of the modifier for tyrosine residues on the protein. Purified CDa was preincubated with tetranitromethane at room temperature for 60 min, and the residual activity was assayed in standard reaction mixtures at 37°C for 20 min.

잔기보다 반응성이 낮아서 화학 수식하려면 보다 높은 농도의 화학 수식제가 필요한 것으로 판단된다. 화학수식반응에서 수식제는 특이한 아미노산과 반응하지만 활성부위에 있는 아미노산 잔기 만에 특이적으로 반응하지 않기 때문에 활성부위에 위치하지 않은 아미노산 잔기와도 반응한다. 화학 수식제에 의해 수식된 효소의 잔기 몰수와 활성에 관여한다고 판단되는 잔기의 몰수 비율은 사용한 효소의 양($1 \mu\text{M}$)과의 당량비적인 활성의 감소로 측정되어질 수 있다. 히스티딘의 경우 수식제에 반응한 것은 당량비적으로 4개의 잔기가 효소활성에 영향을 미치는 잔기로 관여하는 것으로 추정되며 이중 반응성이 강한 것은 3개로(asymptote in Fig. 4), 활성부위 또는 활성부위에 가까운 곳에 위치하며 이 잔기가 수식되면 효소활성이 제거될 정도로 변화를 유도하였을 것으로 판단된다.

적요

A. nidulans chitin deacetylase를 자가분해 용액으로부터 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피와 이온 교환 컬럼 크로마토그래피를 통해 순수 분리하였다. 효소 활성에 관여하는 아미노산을 분석하기 위해 효소 단백질과 특정 아미노산 잔기에 작용하는 화학 수식제를 반응시켜 효소를 화학 수식하였다. histidine 잔기가 화학 수식된 효소는 효소활성을 100% 상실하였으며, arginine의 잔기 혹은 tyrosine 잔기는 $100 \mu\text{M}$ 보다 높은 농도의 수식제로 화학수식 되었을 때 효소활성이 감소하였다. Aspartic acid 혹은 glutamic acid의 carboxyl group 잔기의 화학수식은 효소활성의 상대적으로 작은감소를 나타냈다. 이것은 산성 아미노산의 잔기가 화학 촉매 반응에 직접 관여하지 않았거나 혹은 산성 아미노산 잔기는 효소단백질의 전반적인 구조에 영향을 미친다는 것을 추론할 수 있다. 이러한 결과는 효소 단백질의 촉매활성에 histidine, tyrosine 및 arginine 잔기가 중요한 역할을 담당하는 것을 의미한다.

감사의 말

이 논문은 2010학년도 서울여자대학교 자연과학연구소의 학술연구비에 의하여 연구된 것임.

참고문헌

1. Araki, Y. and E. Ito. 1975. A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*. *Eur. J. Biochem.* 55, 71-78.
2. Beutler, H.O. 1964. Coupled enzyme assay. Methods of enzymatic analysis, p. 639-645. 3rd ed. In H.U. Bergmeyer.
3. Hadwiger, L.A., J.M. Beckman, and M.J. Adams. 1981. Localization of fungal components in the pea-*Fusarium* interaction detected immunochemically with anti-chitosan and anti-fungal cell wall antisera. *Plant Physiol.* 67, 170-175.
4. Kauss, H. and B. Bauch. 1988. Chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Methods Enzymol.* 161, 518-523.
5. Lundblad, R.L. 1995. Techniques in protein chemical modification. CRC Press, Ann Arbor., USA.
6. Martinou, A., D. Kafetzopoulos, and V. Bouriotis. 1995. Chitin deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation processes. *Carbohydrate Res.* 273, 235-242.
7. Reyes, F., J. Calatayud, and M.J. Martinez. 1989. Endochitinase from *Aspergillus nidulans* implicated in the autolysis of its cell wall. *FEMS Microbiol. Lett.* 60, 119-124.
8. Reyes, F., J. Calatayud, C. Vazquez, and M.J. Martinez. 1989. β -N-Acetylglucosaminidase from *Aspergillus nidulans* which degrades chitin oligomers during autolysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 65, 83-88.
9. Siegrist, J. and H. Kauss. 1990. Chitin deacetylase in cucumber leaves infected by *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36, 267-275.
10. Tsigos, I. and V. Bouriotis. 1995. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *J. Biol. Chem.* 270, 26286-26291.