

## *Haemophilus influenzae*의 Acetohydroxyacid Synthase Catalytic Subunit 재조합 단백질 발현 및 특성

노경미 · 최경재 · 박준식<sup>1</sup> · 윤문영\*

한양대학교 자연과학대학 화학과, <sup>1</sup>전자부품연구원

Acetohydroxylacid synthase (E.C. 2.2.1.6., AHAS)는 박테리아, 곰팡이, 식물 등에서 필수 아미노산 중 세 가지 아미노산(Val, Leu, Ile)의 생합성에 관여하는 효소 중 하나이다. *Haemophilus influenzae*에 대한 AHAS의 효소 특성을 규명하기 위하여 *H. influenzae*의 AHAS catalytic subunit 유전자(TIGR access code HI2585)를 pET28a 발현 벡터에 삽입시켰고, 대장균 BL21(DE3)에서 C-말단에 일련의 histidine을 갖는 재조합 단백질로 발현시켰고, Histidine-tag affinity chromatography 및 gel filtration chromatography를 이용하여 단일 단백질로 정제하였다. 정제하여 얻은 단백질은 최대 15 mg/ml까지 농축이 가능하였다. 정제된 단백질의 분자량은 SDS-PAGE 전기영동법을 이용하여 약 63.9 kDa의 분자량을 확인하였다. AHAS 효소 활성은 discontinuous colorimetric assay 방법을 이용하여 측정하였다. *H. influenzae* AHAS catalytic subunit의 specific activity는 3.22 U/mg 이었다. 또한 AHAS의 최적 활성 온도와 pH는 각각 37°C와 pH 7.5이었다. AHAS 효소 활성은 buffer의 종류에 따라 차이가 있었으며, 유기용매가 증가함에 따라 효소 활성도 감소하였다.

**Key words** □ acetohydroxyacid synthase, characterization, *Haemophilus influenzae*, purification

Acetohydroxyl acid synthase (AHAS)는 미생물, 곰팡이, 식물 등에서 결가지 사슬 아미노산(BCAA)인 Val, Leu, 그리고 Ile의 생합성 과정에 있어서 첫 번째로 관여하는 효소이다(1, 3). AHAS는 2분자의 pyruvate와 반응하여 valine과 leucine을 생성하거나 1분자의 pyruvate와 2-ketobutyrate와 반응하여 isoleucine을 생성한다(3). 박테리아 AHAS는 약 63 kDa의 분자량을 가지는 catalytic subunits와 약 17 kDa의 분자량을 가지는 regulatory subunits가 heterotetramer로 구성되어있다(3, 4, 7, 8). Catalytic subunits는 그 자체만으로 AHAS의 활성을 나타내며, regulatory subunits는 효소활성을 활성화 시키며, feedback inhibition에 관여하고 있다. AHAS가 효소 활성을 가지기 위하여 보조인자로서 FAD, ThDP (thiamine diphosphate),  $Mg^{2+}$ 를 필요로 한다(1, 3, 6). AHAS는 식물이나 미생물에 존재하는 것과는 달리 동물에서는 찾을 수 없다. 식물에 존재하는 AHAS를 저해하는 여러 종류의 제초제에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 하지만 병원균 AHAS에 대한 저해제 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 비록 병원균 AHAS의 활성 억제로 병원균 내에서 BCAA 합성이 저해되어도, 숙주세포로부터 이러한 아미노산을 흡수할 수 있다는 점에서, 병원균 AHAS 저해제가 항생제의 역할을 수행할 수 없다고 생각되었기 때문이다. 하지만 최근 연구에 따르면, 결핵균에서 BCAA 영양요구변이주가 숙주동물에서 성장이 억제됨이 알려졌다으며, 식물의 제초제로 알려진 sulfonylurea가 *in vitro*에서

결핵균 성장 억제를 보였다(9). 또한 결핵균 AHAS에 대한 새로운 계열의 저해제도 항결핵 작용이 보고되어졌다. 이러한 사실로부터, 병원균 AHAS는 새로운 항생제 표적 단백질로서 받아들일 수 있다. 따라서 본 연구에서는 병원균 박테리아인 *Haemophilus influenzae*로부터 AHAS의 catalytic subunit를 재조합 단백질로 대장균에서 발현 및 정제하였으며, 최적 효소 활성조건에 대한 실험을 수행하였다. 이러한 연구는 나아가 항생제 표적 단백질로서의 연구 및 저해제 개발에 있어 중요한 정보를 제공하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### AHAS 발현 플라스미드 구축

*Haemophilus influenzae* Rd (KW20균주)의 genomic DNA를 주형으로 사용하고, acetohydroxyacid synthase catalytic subunit에 해당하는 유전자(TIGR locus HI1585)에 특이적인 primer를 이용하여 PCR 방법으로 해당 유전자(1.7 kb)를 증폭하였다. 사용한 primer 서열은 다음과 같다. 5'-CAT GCC ATG GGC AAG AAG TTA TCT GGC GCA GAG-3', 5'-CCG CTC GAG GTT TGT CTC CTC TTG AGG TTT-3'. 밑줄은 각각 *NcoI*과 *XhoI* 제한효소 자리를 나타낸다. 증폭된 DNA는 pET28a (Novagen, USA) 벡터의 *NcoI/XhoI* 제한효소자리에 삽입시켰다. 발현된 단백질은 C말단에 hexa-histidine tag이 있는 융합 단백질로 발현된다.

#### AHAS 재조합 단백질의 발현

구축된 AHAS 발현 플라스미드를 대장균 숙주 세포인

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-2-2220-0959, Fax: 82-2-2299-0762  
E-mail: myyoon@hanyang.ac.kr

BL21(DE3)에 형질전환 시킨 후, LB배지(0.1 mg/ml kanamycin 포함)에서 37°C 온도로 배양하였다. OD600 흡광도가 0.7에 도달하면, 0.4 mM의 isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 첨가하고, 18°C에서 하루 동안 배양하였다. 대장균을 원심분리(4,000 × g, 10 min)로 회수한 후, PBS 용액으로 세척하고, -80°C에서 1일 보관하였다.

### AHAS 재조합 단백질의 정제

냉동 보관한 대장균을 해동시킨 후, 완충용액-A (50 mM sodium phosphate, pH 7.4, 0.5 M NaCl)에 완전 현탁시켰다. 현탁용액에 1 mM의 PMSF, 0.5 mg/ml lysozyme, 0.5%(v/v) Triton X-100, 20 mM imidazole를 첨가한 후, 실온에서 30분간 배양하여 대장균 세포벽을 용해시켰다. 반응 후 0°C로 냉각하고, 초음파 파쇄기를 이용하여 용출된 핵산을 파쇄시켰다. 현탁액으로부터 원심분리(23,000 × g, 20 min, 4°C)를 이용하여 상층액을 분리하였다. Ni<sup>2+</sup>-charged HiTrap chelating HP 컬럼(5 ml, Amersham, USA)을 20 mM의 imidazole이 포함된 완충용액-A로 평형화시킨 후, 위에서 준비한 상층액을 column에 통과시켰다. 이어 40 mM의 imidazole이 포함된 완충용액-A (150 ml)으로 column을 세척한 후, 완충용액-A에 imidazole 농도 기울기법 (40-500 mM, 총 50 ml)을 이용하여 컬럼에 결합된 AHAS 단백질을 용출시켰다. 용출된 단백질은 완충용액-B (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 5 mM EDTA)에서 밤새 투석한 후, 투석한 단백질을 용액을 Amicon Stirred Ultrafiltration Cells을 이용하여 농축하였다. Superdex 200 resin (180 ml, Amersham, USA)을 column (35 cm)에 채우고 FPLC (ACTA Purifier, Amersham, USA)에 연결하였다. Column을 완충용액-B로 평형화시키고, 농축한 단백질을 column에 주입하고, 완충용액-B를 1 ml/min 속도로 흘려주어, 흡광도 280 nm와 460 nm에서 동시에 흡수하는 영역의 용출액을 분리하였다. 분리해 낸 단백질은 농축 후, 12% SDS-PAGE를 사용하여 확인하였다.

### 단백질 정량

단백질 정량은 595 nm에서 Bradford reagent (Bio-Rad, Hercules, USA)의 방법인 Bradford assay를 통하여 결정하였다.

### 효소 활성 측정

*H. influenzae*의 AHAS의 활성측정을 위해서 정제한 AHAS를 discontinuous assay 방법을 통하여 활성 측정을 하였다(3). 37°C에서 30분 동안 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)와 3가지 보조인자(50  $\mu$ M FAD, 1 mM ThDP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>), 기질로서 200 mM pyruvate를 사용하여 0.4  $\mu$ g의 AHAS와 30분 동안 반응시킨 후 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하여 65°C 15분 동안 종결 반응을 시켜 주었다. 0.5% creatine과 5%  $\alpha$ -naphthol을 사용하여 65°C에서 15분 동안 반응시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 525 nm에서 측정하였다. 1 Unit ( $\mu$ mol/min)는 위에서 기술한 assay 조건하에서 1분당 1  $\mu$ mol의 acetolactate를 생성하는데 필요한 효소량으로 정의한다.

### 최적 활성조건 및 용매효과

AHAS의 최적 온도를 결정하기 위하여 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 3가지 보조인자, 200 mM pyruvate를 섞어 준비한다. 이렇게 준비한 기질용액과 0.4  $\mu$ g의 단백질을 혼합한 것을 10°C, 27°C, 37°C, 50°C, 55°C의 온도 변화에서 각각 30분씩 반응을 시킨 후 spectrophotometer로 AHAS의 흡광도 변화를 측정하였다.

AHAS의 최적 pH 측정시, pH 5.0에서는 2-(N-morpholino) ethane-sulfonic acid (MES) buffer, pH 6.0-8.0까지는 N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES) buffer 그리고 pH 9.0에서는 2-(N-cyclohexylamino) ethanesulfonic acid (CHES) buffer를 각각 준비하였다. 기질용액과 각각의 100 mM buffer를 혼합하고 0.4  $\mu$ g의 단백질을 넣어 30분간 반응시켜 준 뒤 흡광도 변화를 측정하였다. 또한 AHAS 활성에 buffer가 미치는 영향을 알아보기 위하여 같은 pH 7.6의 Tris buffer, HEPES buffer 그리고 pH 7.6의 Sodium phosphate buffer를 이용하여 기질용액과 혼합하여 준비한 뒤 단백질과 30분 동안 반응시켜 준 뒤 흡광도를 측정하였다.

그리고 혼합 기질용액에 DMSO, acetone 그리고 ethanol을 각각 0%, 2%, 5%, 10% 씩 첨가하여 준비하고 이 혼합용액에 단백질을 30분 동안 반응시켜 흡광도의 변화를 측정하여 효소 활성의 변화를 살펴보았다.

## 결 과

### AHAS 정제

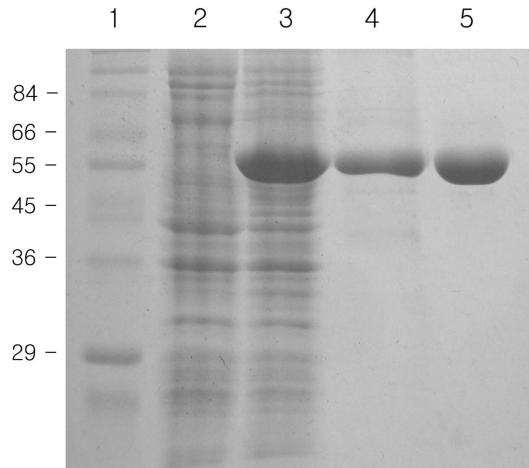
100  $\mu$ g/ml kanamycin이 포함된 LB배지에서 과발현된 균체를 초음파 파쇄처리를 하여 조효소액을 만들고, 이것을 Nickel-charged HiTrap chelating HP column과 superdex 200을 사용하여 단백질 정제를 하였다. Specific activity는 3.22 unit/mg으로 이는 *E. coli*의 AHAS와 비슷하였다. 또한 12% SDS-PAGE로 63.9 kDa에서 AHAS가 분리되었음을 확인하였고 이것의 정제 정도를 확인하였다(Fig. 1). 또한 이 효소를 최대 15 mg/ml까지 농축하였다.

### AHAS 활성의 최적 온도

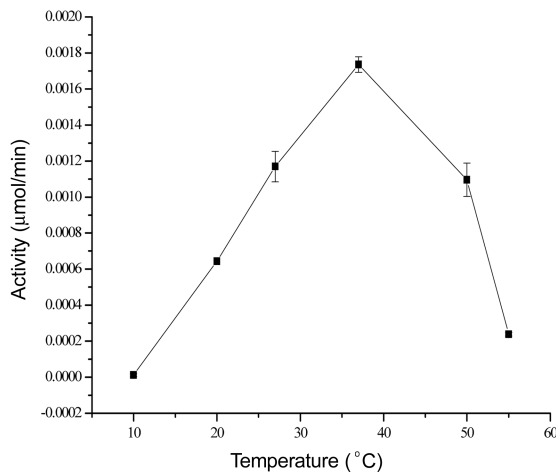
*H. influenzae*의 AHAS 활성에 미치는 반응온도를 알아보기 위하여 각각의 온도에서 정제한 단백질을 반응시켰다. 그 중 37°C에서 최적의 활성을 나타내었고, 범위를 벗어나게 되면 32% 이상 99%까지 단백질의 활성이 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 2).

### AHAS 활성 최적 pH

pH가 활성에 미치는 영향과 최적 pH를 알아보기 위하여 pH 5.0-6.0 범위는 MES, pH 6.0-8.0 범위에는 HEPES를 pH 8.0-9.0 범위에는 CHES buffer를 사용하였다. 다른 AHAS에서와 비슷하게 *H. influenzae*의 AHAS의 활성이 pH 7.5에서 가장 높은 활성을 나타내었고, pH 7.5-8.0사이에서는 단백질의 활성이 유지되는 것으로 확인되었다. 하지만 pH가 그 이상의 범위를 벗어나게 되



**Fig. 1.** SDS-PAGE analysis of the stages of the purification of the AHAS III large subunits on 12% polyacrylamide gels. Lane 1, Molecular weight markers; Lane 2 and 3, protein before induction with 0.4 mM IPTG and after induction respectively; Lane 4, AHAS from the elution fraction of Ni-NTA column; Lane 5, AHAS from the elution fraction of gel filtration.



**Fig. 2.** Activity of AHAS in *H. influenzae*. The enzyme reaction was carried out at optimal condition after preincubation of the enzyme solution at various temperatures for 30 min.

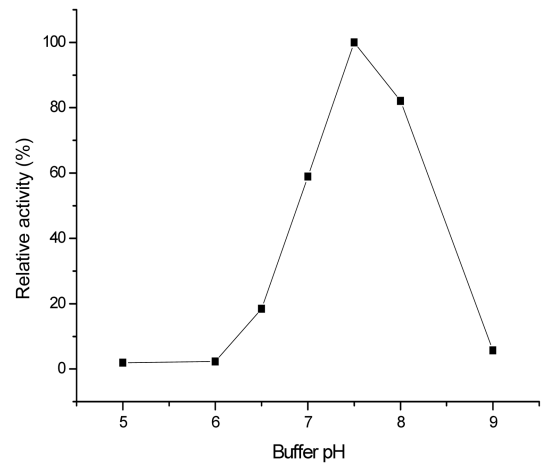
면 최대 98% 이상의 현저한 활성 감소를 보였다(Fig. 3).

#### Buffer의 영향

각 다른 세 가지 buffer를 사용하였을 때 AHAS의 활성변화를 살펴보았다. 동일한 조건(pH 7.5) 하에서 buffer 종류에 대하여 활성 차이를 확인하였다(Table 1). Tris buffer보다는 HEPES buffer가 이 AHAS에 대한 활성도가 높았고, sodium phosphate buffer가 AHAS에서 가장 좋은 활성을 보였다.

#### 유기용매의 효과

AHAS의 활성에 다른 유기용매가 어떠한 영향을 미치는지 알



**Fig. 3.** Effect of pH on activity of AHAS in *H. influenzae*.

**Table 1.** Effect of buffer on activity of AHAS in *H. influenzae*

Buffer	Activity (μmol/min)
Tris-HCl	$1.02 \times 10^{-4}$
HEPES	$2.57 \times 10^{-4}$
Sodium phosphate	$3.78 \times 10^{-4}$

**Table 2.** Effect of solvent on activity of AHAS in *H. influenzae*

Solvent	Activity (%) <sup>a</sup>			
	10%	5%	2%	0%
Ethanol	31.6	75.7	84.4	100
DMSO	55.4	74.6	88.6	100
Acetone	58.0	69.4	82.5	100

<sup>a</sup>) It shows the activity which it follows in the ratio where the solvent is included. When the solvent does not exist, the activity is 100%.

아보기 위해 ethanol, DMSO 그리고 acetone을 첨가하여 실험을 하였다. 그 결과 용매의 종류에는 상관없이 용매가 첨가된 비율이 높아질수록 활성이 억제되는 것을 확인하였다. 10% 이상이 포함될 경우 50% 정도의 활성을 나타내었다(Table 2).

#### 고 찰

본 실험에서 *H. influenzae*에서 AHAS catalytic subunits을 *E. coli*에서 발현시켰고 이를 정제하였다. 재조합 단백질은 다른 박테리아의 AHAS catalytic subunit과 비슷한 크기인 63.9 kDa의 분자량을 가졌다. 정제한 단백질은 최대 15 mg/ml까지 농축할 수 있을 정도의 용해도를 가졌다. AHAS의 specific activity는 3.22 unit/mg으로 다른 AHAS III와 비슷한 경향을 보였다. 정제한 AHAS를 이용하여 최대 활성을 가질 수 있는 여러 조건을 확인하였다. 37°C에서 가장 높은 활성을 나타내었고, 10°C이하에서는 단백질의 활성을 나타내지 못했으며 55°C이상에서는 높은

온도로 인하여 단백질의 활성을 잃어버렸다. 단백질 활성에 최적의 pH를 확인하기 위하여 MES, HEPES와 CHES buffer를 사용하였다. pH 7.5에서 가장 높은 활성을 보였고 이는 다른 AHAS의 최적 pH와 비슷한 경향을 나타내었다. 최적 pH범위를 벗어나게 되면 급격히 단백질의 활성이 줄어드는 것을 확인하였다. 확인한 pH조건 하에서 sodium phosphate, HEPES 그리고 Tris buffer를 각각 사용하였을 때 단백질의 활성은 sodium phosphate buffer에서 최대 활성을 나타내었다. 또한 최대 활성을 가지는 조건 하에서 다른 용매 즉, ethanol, DMSO과 acetone이 첨가되었을 때의 활성변화 정도를 확인하였는데 AHAS의 활성이 최대 55%의 활성 감소를 보여 유기용매가 첨가 될 경우 종류에 상관없이 활성 감소를 보였다.

본 연구에서는 *H. influenzae*의 AHAS catalytic subunit의 몇가지 효소 특성을 조사하였다. 이러한 효소에 대한 연구는 앞으로 AHAS 특이적 저해제 개발에 있어 기초적인 정보를 제공할 수 있다고 본다. 또한 *H. influenzae* AHAS 단백질을 고순도로 대량 정제할 수 있기 때문에 앞으로 AHAS inhibitor screening 및 inhibitor-protein 구조 연구에 활용될 수 있다고 본다.

### 감사의 말

본 연구는 2006년 한국학술진흥재단의 기초연구과제지원에 의해 이루어진 것임(KRF-2006-311-C00402).

### 참고문헌

1. Chang, A.K. and R.G. Duggleby. 1997. Expression, purification and characterization of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase. *Biochem. J.* 327, 161-169.
2. Grimmingert, H. and H.E. Umbarger. 1979. Acetohydroxy Acid Synthase I of *Escherichia coli*: Purification and Properties. *J. Bacteriol.* 137, 846-853.
3. Pang, S.S. and R.G. Duggleby. 1999. Expression, purification, characterization, and reconstitution of the large and small subunits of yeast acetohydroxyacid synthase. *Biochemistry.* 38, 5222-5231.
4. Sella, C., O. Weinstock, Z. Barak, and D.M. Chipman. 1993. Subunit association in acetohydroxy acid synthase isozyme III. *J. Bacteriol.* 175, 5339-5343.
5. Singh, B.K., M.A. Stidham, and D.L. Shaner. 1988. Assay of acetohydroxyacid synthase. *Anal. Biochem.* 171, 173-179.
6. Vinogradov, V., M. Vyazmensky, S. Engel, I. Belenky, A. Kaplun, O. Kryukov, Z. Barak, and D.M. Chipman. 2006. Acetohydroxyacid synthase isozyme I from *Escherichia coli* has unique catalytic and regulatory properties. *Biochim. Biophys. Acta.* 1760, 356-363.
7. Vyazmensky, M., C. Sella, Z. Barak, and D.M. Chipman. 1996. Isolation and characterization of subunits of acetohydroxy acid synthase isozyme III and reconstitution of the holoenzyme. *Biochemistry.* 35, 10339-10346.
8. Weinstock, O., C. Sella, D.M. Chipman, and Z. Barak. 1992. Properties of subcloned subunits of bacterial acetohydroxy acid synthases. *J. Bacteriol.* 174, 5560-5566.
9. Zohar, Y., M. Einav, D.M. Chipman, and Z. Barak. 2003. Acetohydroxyacid synthase from *Mycobacterium avium* and its inhibition by sulfonylureas and imidazolinones. *Biochim. Biophys. Acta.* 1649, 97-105.

(Received November 9, 2006/Accepted January 16, 2007)

### ABSTRACT : Purification and Characterization of Recombinant Acetohydroxyacid Synthase Catalytic Subunit in *Haemophilus influenzae*

Kyoung Mi Noh, Kyoung-Jae Choi, Joon-Shik Park<sup>1</sup>, and Moon-Young Yoon\*

(Department of Chemistry, College of Natural Science, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea, <sup>1</sup>NANO Mechatronics Research Center, Korea Electronics Technology Institute, Gyeonggi-do 463-816, Korea)

Acetohydroxyacid synthase (E.C. 2.2.1.6., AHAS) is the enzyme that catalyses the first step in the synthesis of the branched-chain amino acids valine, leucine and isoleucine. The AHAS gene (TIGR access code H12585) from *Haemophilus influenzae* was cloned into the bacterial expression vector pET-28a and expressed in the *Escherichia coli* strain BL21(DE3). The expressed enzyme was purified by Ni<sup>2+</sup>-charged HiTrap chelating HP column. The purified enzyme appears as a single band on SDS-PAGE with a molecular mass of about 63.9 kDa. The enzyme exhibits absolute dependence on the three cofactors FAD, MgCl<sub>2</sub> and thiamine diphosphate for activity. Specific activity of purified enzyme has 3.22 unit/mg and optimum activity in the pH 7.5 at 37°C. This enzyme activity has an effect on the buffer. When comparing the enzyme activity against the organic solvent, it followed in type and the difference it is but even from the aqueous solution where the organic solvent is included with the fact that the enzyme activity is maintained.