Journal of Radiation Industry 1 (1) : 61~65 (2007)

방사성 동위원소 ^{14}C를 이용한 *S*-아데노실메티오닌 탈탄산효소의 활성 측정

고 경 철 · 박 상 현* · Y. Kamio[1]

한국원자력연구원 방사선과학연구소 방사선생명공학연구센터,
[1]토호쿠대학교 농학연구과 생물산업창성과학전공

Measurement of Activity for *S*-Adenosylmethionine Decarboxylase Using Radioisotope ^{14}C

Kyong-Cheol Ko, Sang Hyun Park* and Yoshiyuku Kamio[1]

Radiation Research Center for Biotechnology, Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea
[1]Division of Bioscience and Biotechnology for Future Bioindustries, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

Abstract − Polyamines are essential for normal cell growth and have important physiological function. They are polycationic compounds that are present in all biological materials. Also, they have been implicated in a wide variety of biological reactions. Generally, putrescine and spermidine are contained high amount in prokaryote, but spermidine and spermine are in eukaryote, respectively. However, *S. ruminantium* cells contain the polyamins such as spermidine and spermine. Addition of an aminopropyl group to putrescine conducts to the synthesis of spermidine. Aminopropyl group is derived from the dcSAM, a decarboxylation of *S*-adenosylmethionine, through action of S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC). We suggested that *S. ruminantium* has a different pathway compare with prokaryote for polyamine synthesis. Assay for SAMDC activity was used ^{14}C labeled substrate. Key enzyme in the biosynthesis of polyamines, SAMDC, was purified from *S. ruminantium* and characterized. The enzyme was purified about 1,259-fold to electrophoretic homogeneity with a specific activity of 1.89×10^{-5} kat kg^{-1} of protein.

Key words : Polyamine, *S*-Adenosylmethionine Decarboxylase, *Selenomonas ruminantium*

서 론

폴리아민(polyamine)은 모든 생체 내에 존재하며 아미노기를 2개 이상 가지고 있는 저분자의 지방족 아민류의 총칭이다. 대표적인 것으로는 푸트레신, 스페르미딘, 스페르민이 있다. 통상, 원핵세포에는 푸트레신과 스페르미딘이, 진핵세포에는 스페르미딘과 스페르민이 많이 함유되어있다. 이러한 폴리아민은 생체 내에서 일어나는 역할에 관하여 분자레벨에서의 연구가 이루어지고 있으며, 핵산 및 단백질합성의 촉진작용 및 효소활성의 조절작용을 하며, 세포의 성장 및 발생 · 분화와 밀접한

* Corresponding author: Sang Hyun Park, Tel. +82-63-570-3370, Fax. +82-63-570-3371, E-mail. parksh@kaeri.re.kr

관계를 가지고 있는 것이 명백해지고 있다(Tabor and Tabor 1984; Tabor and Tabor 1985; Pegg 1988). 또한, 암세포에 있어서 푸트레신과 스페르미딘의 양이 증가하는 것으로부터 의학 및 약학분야에서의 연구도 성황을 이루고 있으며, 폴리아민 대사길항제 및 구조유의체를 항암제로 개발하려는 시도가 행해지고 있다.

카다베린은 푸트레신과 같이 단순한 폴리아민의 일종으로 동물세포에는 그다지 검출되지 않고, 원핵세포에 있어서는 산성조건에서 유도적으로 합성되어 세포외로 분비된다는 사실로부터 단순히 pH 조절에 관여하는 물질이라 생각하여 다른 폴리아민에 비해 그다지 연구가 되지 않았다. 그런데, 그람음성의 편성혐기성세균인 셀레노모나스 루미난티움(*Selenomonas ruminantium*)의 펩티도글리칸에 카다베린이 공유결합되여 존재하는 것이 발견되었다(Kamio *et al*. 1981). 게다가 수년간 카다베린 및 이것을 합성하는 리신 탈탄산효소(LDC)를 둘러싼 새로운 발견이 보고되면서 단순한 pH 조절인자의 인식을 초월하는 특이한 생리기능이 주목되기 시작하였다. 여기서 셀레노모나스 루미난티움의 리신 탈탄산효소는 엄밀하게 조절되고 있지만, 동물세포에 있어서는 푸트레신을 합성하는 오르니틴 탈탄산효소(ODC)과 함께 스페르미딘 및 스페르민의 합성에 관여하는 *S*-아데노실메티오닌 탈탄산효소(SAMDC)도 활성 및 발현에 대해 엄격하게 조절을 받고 있다. *S*-아데노실메티오닌 탈탄산효소는 *S*-아데노실메티오닌(SAM)에서 탈탄산화된 *S*-아데노실메티오닌(dcSAM)을 합성하는 반응을 촉매하는 효소이다. 탈탄산화된 *S*-아데노실메티오닌(dcSAM)는 스페르미딘과 스페르민이 생합성되도록 각각 푸트레신과 스페르미딘에 공여체를 제공한다(Fig. 1). 본 연구는 폴리아민 생합성의 핵심효소인 *S*-아데노실메티오닌 탈탄산효소를 셀레노모나스 루미난티움의 정제와 특성에 관한 것이다.

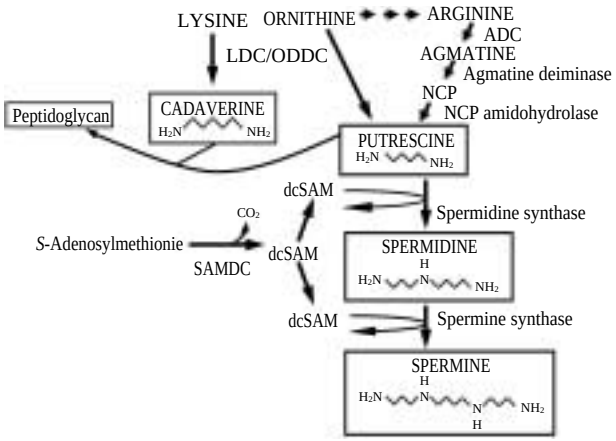

Fig. 1. Pathway for the biosynthesis of polyamine in *S. ruminantium*. NCP, N-Carbamoylputrescine; LDC/ODC, Lysine (Ornithine) Decarboxylase; ADC, Arginine Decarboxylase; SAMDC, S-Adenosylmethionine Decarboxylase; dcSAM, decarboxylated SAM

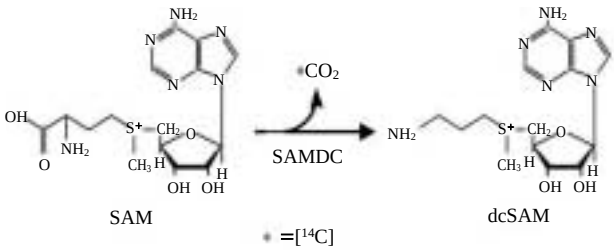

Fig. 2. Enzyme reaction of the SAMDC in *S. ruminantium.*

재료 및 방법

1. *Selenomonas ruminantium*의 배양

본 실험에는 *S. runinantium* subsp. *lactilytica* (Kanegasaki and Takahashi 1967; Kanegasaki and Takahashi 1968)를 사용하였다. 본 균의 배양에는 환원제를 첨가한 혐기도가 높은 배지의 조제가 필요하다. 배지는 trypticase-yeast extract-lactate medium (TYL medium)과 trypticase-yeast extract-glucose medium (TYG medium)을 이용하였다. TYL 배지에서 전배양한 균주를 15 l TYG배지에 접종하여 혐기조건 하에서 본배양하였다.

2. 조효소액의 조제

셀레노모나스 루미난티움을 목적의 $O.D._{660}$까지 배양한 후 집균하여, 0.1 mM pyridoxal-5′-phosphate (PLP), 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)가 함유된 약 2.3배의 50 mM 인산칼륨(pH 7.2)에 현탁한다. 현탁액은 French pressure cell press을 이용하여 1,200 kg cm^{-2}로 세포를 파쇄한다. 4°C, 8,000 × g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 확보하였고, 5분간 중탕한 후 다시 원심분리하여 조효소액을 조제하였다.

3. *S*-아데노실메티오닌 탈탄산효소의 활성 측정

방사성 동위원소 ^{14}C가 표지된 *S*-아데노실-L-[카르복실-^{14}C] 메티오닌([^{14}C]SAM)을 이용한 *S*-아데노실메티오닌 탈탄산효소 활성측정 방법을 Figs. 2, 3에 나타내었다.

효소활성도에서 1 katal은 37°C, pH 7.4에서 최종농도 5 μM의 S-아데노실-L-메티오닌과 2.1 μM S-아데노실-L-[카르복실-^{14}C] 메티오닌을 기질로 하여 효소반응를 시

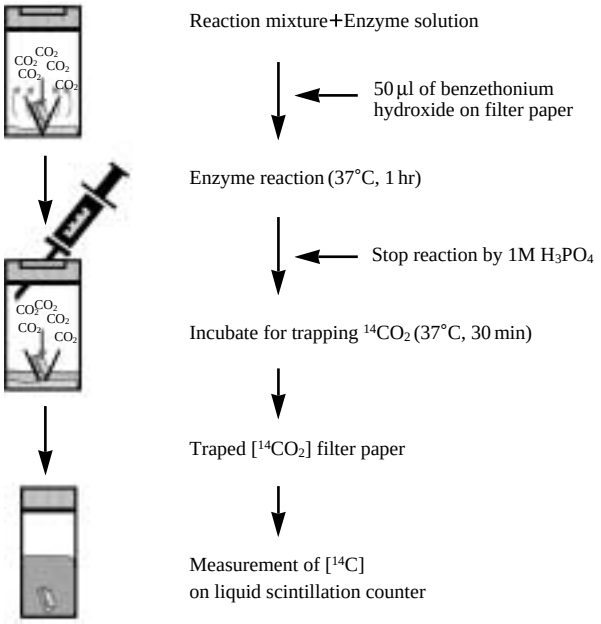

Fig. 3. Composition of the reaction mixture and assay of SAMDC activity. SAMDC activity was assayed at 37°C for 60 min by the liberation of $^{14}CO_2$ from *S*-adenosyl-$_L$-methionine (final 20 µM) and *S*-adenosyl-$_L$-[carboxyl-^{14}C] methionine (final 2.1 µM) as substrate. One katal for enzyme activity was defined as the amount of enzyme catalyzing the formation of 1 mol $^{14}CO_2$ per 1 sec. Specific activity was expressed as kat kg^{-1} protein

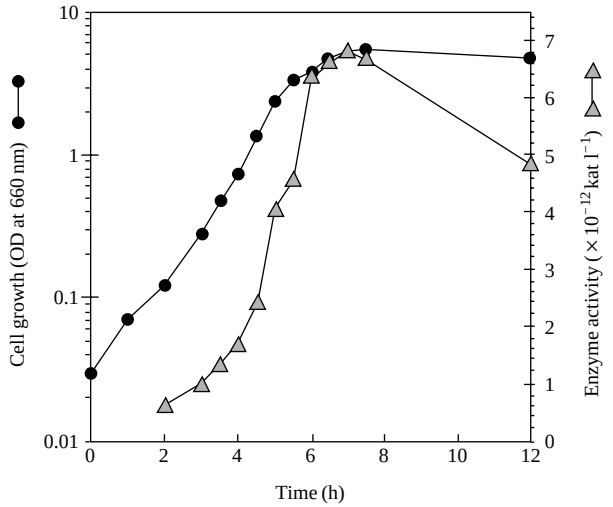

Fig. 4. Fluctuation in SAMDC activity during growth of *S. ruminantium.*

켰을 때, 1초간에 $^{14}CO_2$를 1 mol 생성하는 효소량이다.

4. *S*-아데노실메티오닌 탈탄산효소의 정제

조제된 조효소액을 TSKgel DEAE-650M 컬럼 (TOSOH, Tokyo)을 이용하여 비흡착된 효소액를 확보하였고, 소수성 컬럼을 이용한 크로마토그래피를 하고자 최종농도 1.8 M 황산암모늄을 첨가하여 염석을 행하였다. TSKgel phenyl-5PW 컬럼 21.5 by 150 mm; TOSOH, Tokyo)을 이용하여 황산암모늄 농도구배에 의한 용출을 하여, 0.65 ~ 0.8 M 항산암모늄 농도에서 활성효소액을 검출하였다. 이것을 5 mM 인산나트륨 버퍼에 투석을 한 후, Hydroxylapatite 컬럼 (100 ~ 350 mesh, Nacalai Tesque, INC., JAPAN)을 통하여 크로마토그래피를 통해 정제순도를 높였다. 최종적으로 다시 소수성 컬럼인 TSKgel phenyl-5PW 컬럼을 통하여 *S*-아데노실메티오닌 탈탄산효소를 최종 정제하였다.

결과 및 고찰

Fig. 4는 셀레노모나스 루미난티움의 생육주기에서 *S*-아데노실메티오닌 탈탄산효소의 활성경향을 보여준다. 생육 시간별로 조제된 각 조효소의 효소활성도를 측정하였다. 생육시간 약 7시간인 O.D.$_{660}$=4.2인 대수기 후기 또는 정지기 초기에 총활성도가 가장 높은 약 6.8 × 10^{-12} katal l^{-1}를 나타내었다. 따라서, 셀레노모나스 루미난티움의 *S*-아데노실메티오닌 탈탄산효소를 정제함에 있어서 생육주기 중 이 시기를 선택하여 행하였다.

15 l TYG배지에서 배양한 균주의 조효소액 조제과정을 거친 후, 효소활성도를 측정해 본 결과 비활성도 1.5 × 10^{-8} katal kg^{-1}과 총활성도 1.12 × 10^{-10} katal을 나타내었다. 이후, 이온크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피, hydroxylapatite 컬럼 등을 이용한 최종 정제단계의 효소활성도는 비활성도 1.89 × 10^{-5} katal kg^{-1}과 총활성도 5.1 × 10^{-12} katal을 나타내었고, 1,259배로 정제되었다.

정제된 *S*-아데노실메티오닌 탈탄산효소는 SDS-PAGE 분석에서 약 26 kDa의 분자량을 나타내었다 (data not shown). 그리고, TSKgel G3000SW (TOSOH, Tokyo)를 이용한 겔여과 크로마토그래피의 결과 SDS-PAGE 분석과 마찬가지로 약 26 kDa의 분자량을 나타내는 바, 본 *S*-아데노실메티오닌 탈탄산효소은 분자량 26 kDa의 단량체 단백질임을 알 수 있다.

정제된 효소의 효소반응속도는 Lineweaver-Burk plot에 의하여 K_m=12.5 µM, V_{max}=0.83 nmol min^{-1} µg^{-1}의 값을 얻었다. 셀레노모나스 루미난티움의 *S*-아데노실메티오닌 탈탄산효소는 세포 내에서 빠른 속도로 대사조절에 관여하고 있음을 간적접으로 확인할 수 있었다.

S-아데노실메티오닌 탈탄산효소의 특성을 측정하는 과정에서 효소활성도가 PLP 의존성임을 확인하였다. 조

효소인 PLP를 최종농도 1 mM이 되도록 효소활성을 측정한 결과 약 10배 이상의 효소활성도가 증가하였다.

결 론

본 연구는 혐기성 세균인 셀레노모나스 루미난티움에서 폴리아민의 생합성에 관여하는 중요한 키효소인 *S*-아데노실메티오닌 탈탄산효소의 정제 및 특성에 관한 연구를 하고자 실시하였다. 효소활성도의 측정을 위하여 방사성 동위원소 ^{14}C가 표지된 기질을 이용하였다.

특성화를 분석하는 과정에서 셀레노모나스 루미난티움의 *S*-아데노실메티오닌 탈탄산효소는 PLP-의존성 탈탄산효소임을 확인하였다. 일반적인 탈탄산효소에 PLP가 기여함은 알려져 있으나, 지금까지 *S*-아데노실메티오닌 탈탄산효소에서는 PLP-의존성이 존재하지 않았다. 현재까지 *S*-아데노실메티오닌 탈탄산효소에서는 pyruvoyl형으로만 존재한다고 보고되어지고 있는 것이다. 이러한 pyruvoyl형 *S*-아데노실메티오닌 탈탄산효소는 전구체에서 세린 아미노산의 앞에서 자기촉매에 의하여 효소가 α-와 β-서브유닛으로 나누어지고, α-서브유닛의 카르보닐기와 기질인 SAM의 아미노기가 쉬프 베이스(shiff base)를 형성함으로써 효소활성이 이루어진다(Fig. 5) (van Poelje and Snell 1990).

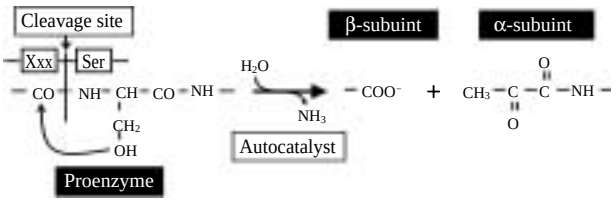

Fig. 5. Model of cleavage of pyruvoyl-dependent SAMDC and linkage region with SAM.

새로운 PLP형 셀레노모나스 루미난티움 S-아데노실메티오닌 탈탄산효소는 Fig. 6과 같이 효소활성을 추론할 수 있다. 효소의 세린 아미노산 부위와 PLP의 카르보닐기가 쉬프 베이스를 형성하고, 기질인 SAM과의 또 다른 쉬프 베이스를 재형성하여 효소의 활성을 나타낸다고 추정할 수 있다(Fig. 6).

폴리아민은 생체 내에서 핵산 및 단백질합성의 촉진작용 및 효소활성의 조절작용 등의 중요한 생리적 역할을 할 뿐만 아니라, 암세포에 과발현됨으로써 발암에 커다란 영향을 끼친다고 알려져 있다. 따라서, 본 연구 결과는 폴리아민 생합성의 중요한 핵심효소인 *S*-아데노실메티오닌 탈탄산효소의 발현조절이 가능하여 항암제의 역할이 기대되는 대사길항제 등의 개발에 중요한 기초

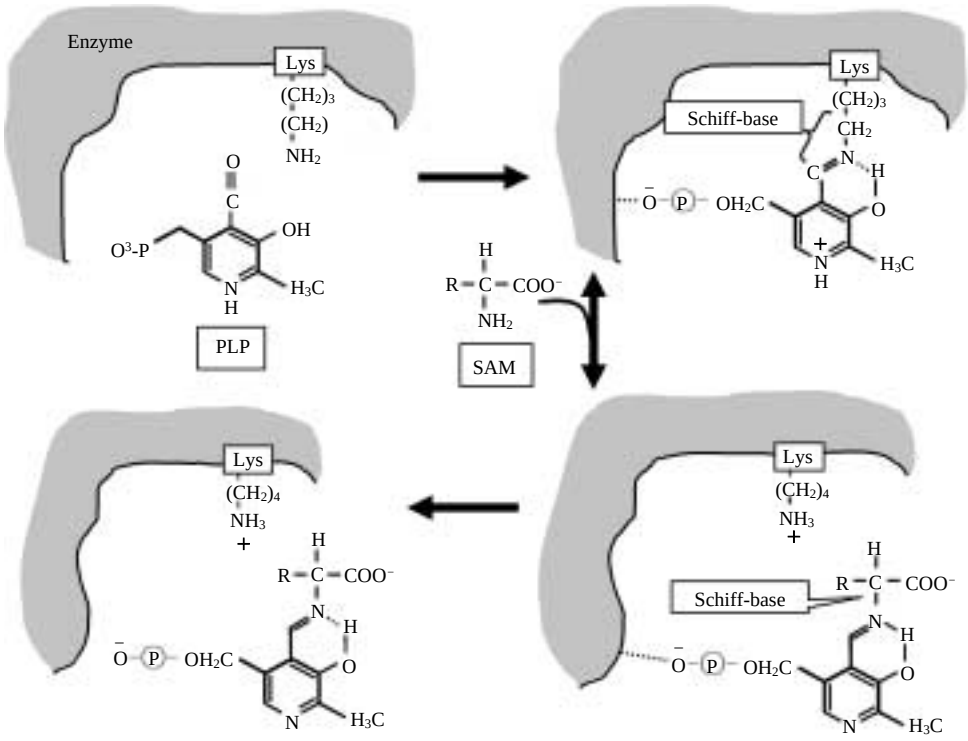

Fig. 6. Proposed constitution of schiff-base with PLP and substrate in *S. ruminantium.*

연구자료로 쓰일 것이다.

적 요

폴리아민은 정상적인 세포의 성장과 중요한 생리적 기능을 한다. 또한, 이들은 모든 생물학적 물질에 존재하는 다중양이온 화합물이며, 다양한 종류의 생물학적 반응에 영향을 끼쳐왔다. 일반적으로, 푸트레신과 스페르미딘은 원핵생물에 많은 함유량이 포함되어지는 반면, 스페르미딘과 스페르민은 진핵생물에 함유량이 많다. 그런데, 셀레노모나스 루미난티움은 원핵생물임에도 불구하고 스페르미딘과 스페리민의 함량이 높아 진핵생물의 특성을 보인다. 스페르미딘은 푸트레신에 아미노프로필기가 부가되면서 스페르미딘이 된다. 이 아미노프로필기는 *S*-아데노실메티오닌 탈탄산효소(SAMDC)의 활성에 의하여 탈탄산화된 *S*-아데노실메티오닌(dcSAM)에서 도입된 것이다. 우리는 셀레노모나스 루미난티움이 일반적인 원핵생물과 비교하여 상이한 폴리아민 생합성 경로임을 제안한다. *S*-아데노실메티오닌 탈탄산효소의 활성은 ^{14}C이 표지된 기질을 이용하여 측정하였다. 본 연구에서는 셀레노모나스 루미난티움에서 폴리아민 생합성의 핵심효소 *S*-아데노실메티오닌 탈탄산효소를 정제하였으며 그 특성을 분석하였다. 이 효소를 1,259배로 정제하였으며 이때의 비활성도는 1.89×10^{-5} kat kg^{-1}로 나타났다.

사 사

이 연구는 과학기술부에서 시행하는 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

Kamio Y, Itoh Y and Terawaki Y. 1981. Chemical structure of peptidoglycan in Selenomonas ruminantium: cadaverine links covalently to the D-glutamic acid residue of peptidoglycan. *J. Bacteriol*. **146**:49-53.

Kamio Y, Itoh Y, Terawaki Y and Kusano T. 1981. Cadaverine is covalently linked to peptidoglycan in *Selenomonas ruminantium*. *J. Bacteriol*. **145**:122-128.

Kanegasaki S and Takahashi H. 1967. Function of growth factors for rumen microorganisms. I. Nutritional characteristics of *Selenomonas ruminantium*. *J. Bacteriol*. **93**(1):456-463.

Kamio Y, PöSö H, Terawaki Y and Paulin L. 1986. Cadaverine covalently linked to a peptidoglycan is an essential constituent of the peptidoglycan necessary for the normal growth in *Selenomonas ruminantium*. *J. Biol. Chem.* **261**:6585-6589.

Kanegasaki S and Takahashi H. 1968. Function of growth factors for rumen microorganisms. II. Metabolic fate of incorporated fatty acids in *Selenomonas ruminantium*. *Biochim. Biophys. Acta*. **152**(1):40-9.

Pegg AE. 1988. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer Res.* **42**(4):759-774.

Pegg AE, Xiong H, Feith DJ and Shantz LM. 1998. *S*-adenosylmethionine decarboxylase: structure, function and regulation by polyamines. *Biochem. Soc. Trans*. **26**(4):580-586

Tabor CW and Tabor H. 1984. Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* **53**:749-790.

Tabor CW and Tabor H. 1985. Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev*. **49**(1):81-99.

Takatsuka Y, Onoda M, Sugiyama T, Muramoto, K, Tomita T and Kamio Y. 1999. Novel characteristics of *S. ruminantium* lysine decarboxylase capable of decarboxylating both L-lysine and L-ornithine. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **63**: 1063-1060.

Takatsuka Y, Yamaguchi Y, Ono M and Kamio Y. 2000. Gene cloning and molecular characterization of lysine decarboxylase from *Selenomonas ruminantium* delineate its evolutionary relationship to ornithine decarboxylases from eukaryotes. *J. Bacteriol.* **182**(23):6732-6741.

van Poelje PD and Snell EE. 1990. Pyruvoyl-dependent enzyme. *Annu. Rev. Biochem*. **59**:29-59.

Yamaguchi Y, Takatsuka Y and Kamio Y. 2002. Identification of a 22-kDa protein required for the degradation of *S. ruminantium* lysine decarboxylase by ATP-dependent protease. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **66**(6):1431-1434

Manuscript Received: April 9, 2007
Revision Accepted: June 15, 2007