

진균과 식물의 Phenylalanine Ammonia-lyase 그리고 세균의 Histidine Ammonia-lyase 간의 면역학적 관계 분석

현민우 · 윤여홍 · 서동연 · 한지혜 · 김성환*

단국대학교 미생물학과 및 기초과학연구소

Immunological Relationships among Fungal and Plant Phenylalanine Ammonia-lyases and Bacterial Histidine Ammonia-lyase

Min Woo Hyun, Yeo Hong Yun, Dong Yeon Suh, Ji Hae Han and Seong Hwan Kim*

Department of Microbiology and Institute of Basic Sciences, Dankook University, Cheonan, Chungnam 330-714, Korea

(Received 1, November 2011., 1st Revised 4, November 2011., Accepted 7, November 2011)

ABSTRACT: Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) from the maize pathogen *Ustilago maydis* was analysed immunologically to obtain insights into the structural relationships between plant PAL and fungal PAL and between PAL and histidine ammonia-lyase (HAL). Cross-reactivity was found among all the PAL proteins from different species tested, using antibodies raised against both plant and fungal PALs. Both anti-Alfalfa and anti-popular PAL antibodies strongly recognized plant PALs but only weakly recognized fungal PALs. Antibodies raised against *U. maydis* PAL only weakly recognized the *Rhodotorula glutinis* yeast PAL. The anti-*U. maydis* PAL antibodies showed low affinity for the plant PALs but they bound strongly to *Pseudomonas* bacterial HAL. Significant cross-reactivity between the two plant PAL antibodies and the bacterial HAL was also observed. Both the anti-*Ustilago* PAL and the anti-popular PAL antibodies displayed similar enzyme inhibition patterns, including moderate inhibition of bacterial HAL activity. However, the bacterial HAL antibody inhibited only *Ustilago* PAL. The PAL and HAL antibodies tested showed no inhibition against yeast PAL. This is first report on the immunological relationships between PAL and HAL.

KEYWORDS: Histidine ammonia-lyase, Immunological relationships, Phenylalanine ammonia-lyase, *Ustilago maydis*.

서 론

L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL, EC 4.3.1.5)는 L-phenylalanine에서 암모니아기를 해리시키고 *trans*-cinnamic acid로 생성물을 만드는 효소이다. Koukol과 Conn (1961)에 의해 보리에서 발견된 이후 다양한 식물에서 생화학 및 분자생물학적 연구가 많이 이루어져왔다. 이 효소는 상처, 화학물질, 미생물 침입, 자외선 등에 의해 스트레스를 받았을 때 활성이 증가하는 것으로 알려져 있으며 식물의 분화, 발달, 성장에 관여하는 것으로 매우 중요한 효소이다 (Jones, 1984). 대사적으로는 shikimic acid 경로를 통해 생성된 phenylalanine을 리그닌, 슈베린, 플라보노이드, 안토시아닌, 탄닌, 파이토알렉신 등 매우 다양한 phenylpropane 계 2차 대사물질을 만드는 대사의 초기에 작용하는 효소이다 (Hahlbrock와 Scheel, 1989). 식물에 비하여 곰팡이에 있어서는 PAL에 대한 연구가 매우 미진하여 몇몇 곰팡이 종에 한정된 연구보고만 있는 실정이다 (Schomburg and Salzmann, 1990). 이에 따라 식물의 PAL과 곰팡이의 PAL에 대한 기능적 유사성에 대한 연구도

매우 미진하며 생화학적 특성과 분자생물학적 특성 또한 비교연구가 부족하다. Hyun 등 (2011)은 지금 보고된 식물과 곰팡이 PAL에 대한 특성 비교를 총설보고를 통하여 문헌적 정리를 하였으며 최근 유전체 연구로 여러 곰팡이 종에 PAL 유전자가 존재함을 밝히면서 앞으로 기능 연구에 대한 필요성을 피력하였다. 그러나 아직까지 이 효소는 포유동물에서 보고된 사례가 없으며 유전체 분석이 이루어진 포유동물에서도 PAL 유사 염기서열은 존재하지 않는 것으로 알려져 있다.

Histidine ammonia-lyase (HAL, EC 4.3.1.3)는 L-histidine에서 암모니아를 해리시키고 *trans*-urocanic acid를 생성하는 효소이다. L-histidine은 이화작용에 의해 최종 L-glutamic acid로 대사되는데 이 대사에 있어서 첫 단계가 바로 HAL에 의해 이루어진다. HAL은 세균과 포유동물에 일반적으로 존재하는 것으로 알려져 있는데 HAL 활성은 일부 진균 (Hollman and Dekker, 1971; Polkinghome and Hynes, 1982)과 식물 (Ruis and Kindl, 1970 and 1971; Kamel and Maksoud, 1978)에서도 보고된바 있다. 세균에 있어서 HAL은 histidine을 탄소원이나 질소원으로 이용 가능하게 한다.

포유동물에 있어서 HAL은 조직발달과 호르몬 조절, 그

*Corresponding author <E-mail : piceae@naver.com>

리고 조직 특이적으로 활성을 제어하도록 하는 복잡한 조절 기작에 의해 통제되는 것으로 알려져 있다 (Feigelson, 1973; Lamartiniere, 1979; Armstrong and Feigelson, 1980).

PAL과 HAL은 amonia-lyases 중에서 유일하게 효소의 활성부위에 dehydroalanine (DHA) residue (Hanson and Havar, 1970; Hodgins, 1971; Consevage and Phillips, 1985)을 지니고 있는 것으로 알려져 있다. 최근 활성부위의 dehydroalanine (DHA) residue는 serine에서 유래한다고 *Pseudomonas putida* HAL (Hernandez *et al.*, 1993; Hernandez and Phillips, 1994; Langer *et al.*, 1994)과 쥐의 HAL (Taylor and McInnes, 1994), 파슬리 PAL (Schuster and Retey, 1994), 포플러 PAL (McKegney *et al.*, 1996) 등의 연구에서 밝혀졌다. 그 결과 기능적 유사성, 효소활성부위에 DHA의 존재, 단백질서열에 어느 정도 수준의 보존된 서열의 존재 등에 기반하여 오늘날의 PAL과 HAL 유전자는 오래전 공통조상으로부터 유래하였을 것이라는 학계의 의견이 있어 왔다.

지금까지 계속해서 더 많은 PAL과 HAL에 대한 유전자가 클로닝되었고 활성기작 (Schuster and Retey, 1995)과 coding sequences의 비교 (Wu *et al.*, 1992)를 통해 이 두 효소 관계에 대한 연구가 이루어져 왔지만 아직까지 효소활성 부위 형성과정 및 여러 단위체의 결합에 의한 활성 구조가 지니는 중요성 등을 포함한 이 두 효소의 관계에 대한 정보가 부족한 실정이다. 이에 대하여 본 연구에서는 PAL과 HAL에 대한 구조적 특성을 좀 더 이해하기 위하여 곰팡이 PAL과 식물 PAL 그리고 세균 HAL을 대상으로 면역학적 방법을 사용하여 공통적인 특성을 살펴보았다.

재료 및 방법

곰팡이 균주 배양 및 시약

Ustilago maydis 518 균주는 PDA와 potato dextrose broth (Difco)에 키우면서 유지 하였고 PAL 효소활성 유도를 위해서는 액체의 complete medium (CM) (Holliday, 1974)에 접종하고 Tryptophan 0.3 mM을 첨가하여 30°C에서 250 rpm으로 진탕 배양하였다(Kim *et al.*, 1996). *Rhodospiridium toruloides* UBC75-0941은 malt extract medium에 접종하여 30°C에서 250 rpm으로 진탕 배양하였다. Alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit antibody, SDS-PAGE molecular markers, BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate-toluidine salt)/NBT(-nitro blue tetrazolium chloride)는 Bio-Rad사 (Mississauga, Canada)로부터 구입하였다. Westran PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane은 Schleicher & Schuell (Keene, U.S.A.) 제품을 사용하였고 항체 조제에 사용한 Freund's adjuvant를 비롯한 기타 시약은 Sigma사로부터 구입하였다.

PAL 과 HAL의 단백질 및 항체 조제

부분적으로 정제된 *Pseudomonas fluorescens* HAL, potato

PAL 등은 Sigma사로부터 구입하였다. 구입한 *P. fluorescens* HAL은 7.5% native PAGE gel에 전기영동하여 더 정제 분리한 후 효소부위 밴드 gel(약 100 ug 단백질)을 잘라내고 살균된 2.0 ml microtube 안에서 소량의 0.02 mM PBS buffer pH. 7.0를 넣고 플라스틱 mini-pestle로 마쇄 후 헤밀톤 주시기안에서 Freund's adjuvant와 혼합하여 여러 차례 잘 섞은 후 2주 간격으로 2차례 토끼에 주사하여 polyclonal 항체를 준비하였다. 면역 항체를 얻기 전 preimmune 항체를 얻었으며 이를 대조 항체시료로 사용하였다. *U. maydis* PAL과 *Rhodospiridium toruloides* PAL은 (NH₄)₂SO₄ precipitation, DEAE ion-exchange chromatography, Bio-Gel A-0.5 m filtration 등을 통하여 Kim 등(1996)의 방법에 따라 부분적으로 정제하였다. Poplar PAL은 baculovirus에 발현시킨 후 Pharmacia FPLC Mono-Q column을 이용하여 분리한 단백질(McKegney *et al.*, 1996)을 B. E. Ellis (University of British Columbia, Canada)로부터 제공받았다. 준비된 *U. maydis* PAL과 poplar PAL은 앞서와 같은 방법으로 New Zealand White 토끼에 주사하여 polyclonal 항체를 준비하였다. Alfalfa PAL과 *Pseudomonas putida* HAL에 대한 polyclonal 항체는 R. A. Dixon (The Samuel Robert Noble Foundation, Ardmore, USA)와 A. T. Phillips (Pennsylvania State University, University Park, USA)로부터 각각 제공받았다.

Western blots 분석 및 효소 활성 측정

Immuno-blotting 분석은 기본적으로 Current Protocols in Molecular Biology에 서술된 방법에 따라 진행하였다 (Asubel *et al.*, 1995). 동일량(10 ug)의 각 부분 정제한 PAL과 HAL 단백질을 Bio-Rad mini-gel system을 이용하여 4개의 7.5% native PAGE gel에 전기영동 후 2개의 gel은 Coomassie blue를 이용한 단백질 염색과 분리된 단백질 밴드의 효소 활성측정에 사용하고 나머지 2개의 gel은 PVDF membrane에 blotting 하였다. Blotting 된 PAL과 HAL 단백질은 준비된 여러 PAL 항체와 HAL 항체를 이용하여 항원-항체 반응을 시킨 후 alkaline phosphatase-conjugated secondary antibodies를 표지시키고 나서 NBT/BCIP solution으로 반응 부위를 발색하였다 (Young and Davis, 1983). PAL 효소의 활성은 L-[U-¹⁴C]-phenylalanine을 기질로 이용한 방사성 방법(Bernard and Ellis, 1991)으로 측정하였고 HAL 효소의 활성은 L-histidine을 기질로 이용하여 spectrophotometer로 측정하는 방법(Rechler and Tabor, 1969)을 사용하였다. 단백질 양은 bovine serum albumin을 표준단백질 시료로 사용하여 Bio-Rad dye binding reagent로 측정하였다 (Bradford 1976).

생물정보학적 분석

본 실험에 사용한 곰팡이 PAL, 식물 PAL, 그리고 세균과 동물의 HAL 단백질 서열은 GenBank(www.ncbi.nlm.nih.gov/

genbank/) 데이터베이스로부터 다운받아서 사용하였다. 데이터베이스 접근번호는 AEJ15404(*Pseudomonas putida* S16 HAL), AAA26769(*Streptomyces griseus* HAL), ABM08515(*Arthrobacter aureescens* TC1 HAL), AAH96099 (*Homo sapiens* HAL), P21213(*Rattus norvegicus* HAL), AAL09388(*Ustilago maydis* PAL), P27990(Alfalfa PAL), P31425(Potato PAL), EGU13302(*Rhodotorula glutinis* ATCC 204091 PAL), XP_001826366(*Aspergillus oryzae* RIB40 PAL), EFQ33521(*Glomerella graminicola* M1.001 PAL), A84889(*Pinus taeda* PAL)이다. PAL과 HAL 간의 아미노산 서열의 유사성 분석은 EMBL(www.ebi.ac.uk/embl/) 데이터베이스에서 multiple sequence alignment 프로그램인 Clustal W를 이용하여 분석하였다. 아미노산 서열에 있어서 친수성과 소수성에 대한 hydrophilic site 분석은 ExPasy ProtScale(http://web.expasy.org/protscale/) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

PAL과 HAL 간의 면역학적 관계 분석

면역학적 관계를 조사하기 위해 준비된 곰팡이의 *Ustilago maydis* PAL, *Rhodospiridium toruloides* PAL, 식물의 포플라 PAL, 감자 PAL 그리고 *Pseudomonas fluorescens* 세균의 HAL을 함유하고 있는 단백질시료를 미리 native PAGE로 분리한 결과는 Fig. 1과 같다. 포플라 PAL은 순수 정제된 시료를 전개하였기에 단일밴드로 나타나고 다른 시료들은 부분적으로 정제하거나 순수 정제하지 않은 상업적으로 판매되는 시료를 사용하였기에 여러 개의 band가 나타났다. 특히 상업적으로 구입한 감자의 PAL은 상당히 degradation이 일어난 것으로 보여 진다. 나타난 밴드 중 PAL과 HAL 효소의 정확한 위치를 확인하기 위하여 동일한 조건으로 동시에 전개한 같은 크기의 PAGE gel에서 PAL의 경우 320 KD 크기

부분의 band들을 잘라내고 HAL 시료의 경우 220 KD 부분의 band들을 잘라내어 PAL과 HAL 효소의 활성을 각각 측정된 다음 가장 활성이 높은 밴드의 위치를 Fig. 1에 화살표로 표시하였다.

Fig. 1과 동일한 조건으로 동시에 전개한 PAGE gel로부터 PDMF membrane에 blotting한 PAL과 HAL에 대하여 *U. maydis* PAL 항체, 포플라 PAL 항체, 알팔파 PAL 항체, *P. fluorescens* HAL 항체, *P. putida* HAL 항체를 probe로 하여 각각 항원-항체 반응을 통한 PAL과 HAL간의 상호인식(cross-reactivity) 여부를 조사한 결과는 Fig. 2에 제시하였다. *U. maydis* PAL 항체는 *U. maydis* PAL을 가장 잘 인식하였으나 효모성 곰팡이인 *R. toruloides*의 PAL과 식물인 알팔파 및 감자의 PAL은 매우 약하게 인식하였다(Fig. 2A). 그러나 놀랍게도 세균인 *P. fluorescens* HAL을 강하게 인식하였다(Fig. 2A). 나무인 포플라의 PAL 항체는 포플라 PAL을 매우 강하게 인식하였고 감자의 PAL도 잘 인식하였다(Fig. 2B). 그러나 곰팡이 *U. maydis*와 *R. toruloides*의 PAL은 매우 약하게 인식하였다. 놀랍게도 포플라의 PAL 항체 또한 세균인 *P. fluorescens* HAL을 강하게 인식하였다(Fig. 2B). 알팔파 PAL 항체는 포플라와 감자 PAL을 모두 강하게 인식하였으나 2종의 곰팡이 PAL은 매우 약하게 인식하였다(Fig. 2C). 그러나 알팔파 PAL 항체 또한 포플라 PAL 항체나 *U. maydis* PAL 항체 보다는 약하지만 세균인 *P. fluorescens* HAL을 인식하였다(Fig. 2C). 이상의 결과를 보면 *U. maydis* 곰팡이 PAL 항체는 식물의 PAL과 효모성균의 PAL을 강하게 인식하지 못함에도 불구하고 세균의 HAL을 매우 강하게 인식하는 특성을 지니고 있음을 알 수 있다. 2가지 식물의 PAL 항체는 서로 상당히 유사한 인식 패턴을 보여 서로간의 특성이 곰팡이와 달리 유사함을 알 수 있었다. 그리고 공통으로 진균을 강하게 인식하지 못 함으로서 진균의 PAL과 식물의 PAL이 면역학적으로 상이함을 알 수 있었다. 그러나 세균의 HAL을 강하게 인식하는 특성을 지니고 있음은 곰팡이 PAL과 식물의 PAL이 면역학적으로 세균의 HAL과 유사한 구조적 특성이 있음을 추론하게 한다.

이에 반하여 2종의 서로 다른 세균인 *P. fluorescens*와 *P. putida*의 HAL 항체를 probe로 상호인식 정도를 조사하였을 때, *P. fluorescens* HAL과 *P. putida*의 HAL 모두 *U. maydis*, *R. toruloides*, 포플라, 감자 등의 PAL을 전혀 인식하지 못하고 자신들의 HAL만 강하게 인식하였다(Fig. 2D-E). *P. putida*의 HAL 항체의 경우는 *U. maydis*, PAL과 *R. toruloides* PAL이 분리된 lane에서 native PAL 크기보다 작은 크기에서 일부 밴드들을 인식하였는데(Fig. 2E), 이는 polyclonal 항체가 나타낼 수 있는 비특이적 반응의 결과로 볼 수 있다. 그러나 이들 곰팡이의 native PAL이 일부 degradation된 단백질 부분이 인식 되었을 가능성도 배제할 수 없다. 왜냐하면 *U. maydis* PAL 효소를 비롯한 대부분의 식물의 PAL 단백질은 동일한 크기의 4개의 단위체(subunit)으로 구성된 homotetramer(Kim et al., 1996)로서 쉽게

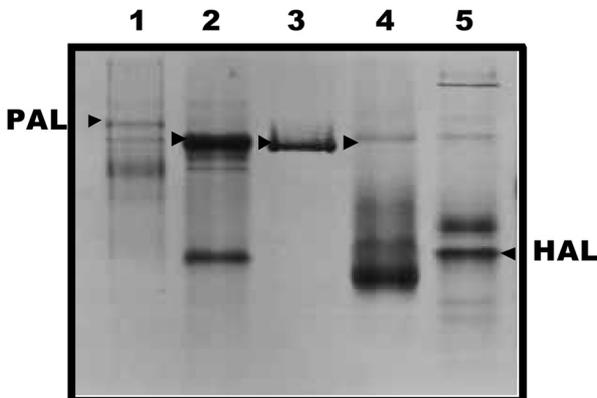


Fig. 1. Native PAGE of fungal PAL, plant PAL, and bacterial HAL. Lanes 1: *Ustilago maydis* PAL, 2: *Rhodospiridium toruloides* PAL, poplar PAL, 4: potato PAL, 5: *Pseudomonas fluorescens* HAL.

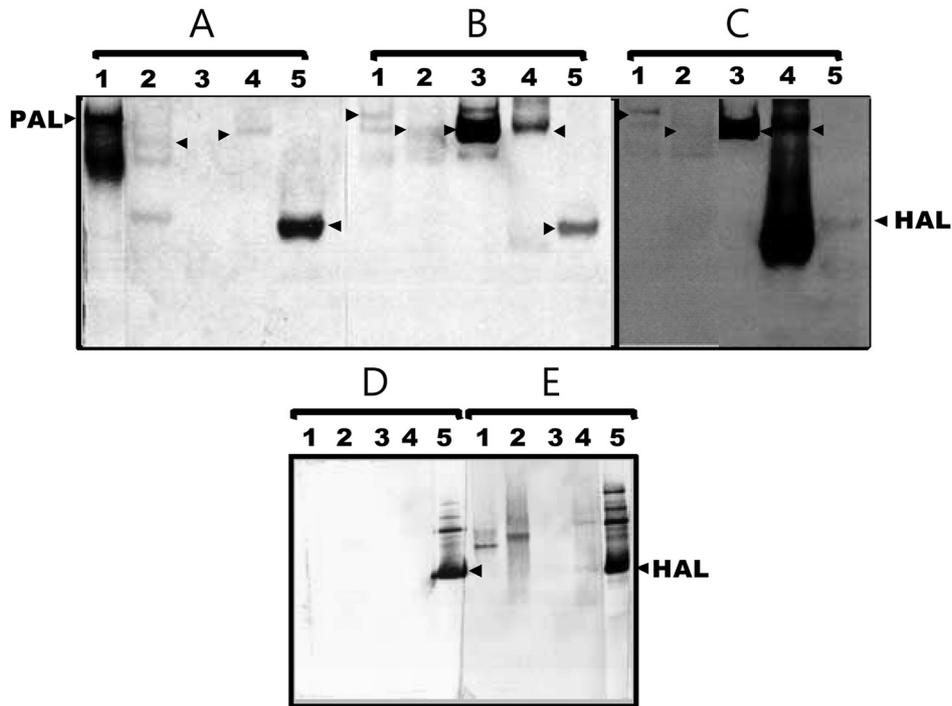


Fig. 2. Western blot of fungal PAL, plant PAL, and bacterial HAL using polyclonal antibodies raised against *Ustilago maydis* PAL(A), poplar PAL (B), alfalfa PAL (C), *Pseudomonas fluorescens* HAL, and *Pseudomonas putida* HAL. Lanes 1: *Ustilago maydis* PAL, 2: *Rhodosporidium toruloides* PAL, poplar PAL, 4: potato PAL, 5: *Pseudomonas fluorescens* HAL.

degradation 되는 labile 한 효소이기 때문이다. 따라서 만일 degradation이 일어났다면 왜 *P. putida*의 HAL 항체가 4개의 subunit으로 구성된 native PAL은 인식 못하나 부서진 PAL은 인식하였는가 하는 의문을 가질 수 있는데 이는 아마도 PAL과 HAL의 서로 다른 단백질 크기에서 기인 할 수 있을 것 같다. PAL의 단위체 단백질 크기는 보통 700여개의 아미노산으로 구성되는 반면 HAL 단백질은 500여개의 아미노산으로 구성되기 때문에 크기가 작은 HAL 단백질로 만든 HAL 항체는 크기가 큰 PAL에는 있으나 HAL에는 없는 아미노산 부위는 인식하지 못 할 것이나 PAL에서 구조적으로 유사한 부위가 존재하면 그 부위만을 인식 할 수 있을 것이다. 그러나 HAL과 구조적으로 유사한 부위가 native PAL에서는 단백질 folding으로 인하여 구조적으로 인식하기 어려울 수 있으며, 특히 단백질 4차 구조상 내부 쪽이나 돌출되지 않은 부위에 존재하면 이 또한 인식하기 어려울 것이다. 이런 경우 native PAL이 degradation 되면 단백질의 folding이 풀리면서 구조적으로 감추어져 있던 유사한 부위가 노출되어 HAL 항체에 인식될 가능성이 있다고 사료된다. 역으로 왜 PAL 항체는 HAL을 공통으로 잘 인식하는 것인지 생각해 본다면 PAL의 크기가 HAL 보다 크기 때문에 PAL과 HAL에 구조적으로 유사한 부분이 존재한다면 PAL의 항체는 HAL의 유사부위를 포함하여 항체를 형성하였을 것임으로 HAL을 좀 더 인식하기 쉬웠을 것으로 사료된다. 구조적으로 유사한 부분으로서는 PAL과 HAL의 효소활성 부위에 Ala-Ser-Gly

triad를 포함하는 여러 개의 유사 아미노산으로 구성된 PAL/HAL signature motif가 알려져 있다 (Pilbak *et al.*, 2006).

Protein 유사도 및 Hydrophilicity 비교

PAL과 HAL간에 단백질 유사도를 조사하기 위하여 단백질 염기서열을 교차 비교하였다 (Table 1). 식물의 PAL인 소나무, 포플라, 감자, 알팔파 간에는 서열 유사도가 최저 63%에서 최고 85% 까지 존재하였다. 곰팡이 PAL간에는 최저 33%에서 최고 42% 정도의 유사도를 보였다. 식물의 PAL과 곰팡이 PAL간의 유사도는 최저 27%에서 최고 31% 수준으로서 서열 유사도가 높지 않았다. 이는 어쩌면 Fig. 2에서의 결과에서 보듯이 식물 PAL 항체가 곰팡이의 PAL을 강하게 못하고 곰팡이 PAL 항체도 식물의 PAL을 강하게 인식 못한 결과가 나오는데 기여하지 않을까 하는 생각이 든다.

한편 HAL의 경우를 살펴보면 세균의 HAL간에 서열 유사도는 38%에서 68% 범위의 유사도를 보여 PAL에 비하여 중간 유사도 범위의 편차가 컸다. 포유동물의 경우는 사람과 쥐의 HAL의 경우 98%에 이르는 높은 서열유사도를 보였다. 본 연구에서는 포유동물의 HAL을 비교하지 않았기에 향후 세균의 HAL과 동물의 HAL이 면역학적으로 어떤 관계에 있을지 조사가 필요하다.

PAL과 HAL간의 단백질 서열의 유사도를 살펴보면 식물의 PAL과 세균의 HAL간의 유사도는 24%에서 26% 수준으로 낮은 수준이었다. 곰팡이의 PAL과 세균의 HAL간의 유사도

Table 1. Comparison of protein sequence identity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and histidine ammonia-lyase (HAL) among different organisms

	Plants				Fungi				Bacteria			Mammals
	Alfalfa PAL	Pine PAL	Popula PAL	Potato PAL	Ao PAL	Gg PAL	Rg PAL	Um PAL	Aa HAL	Pp HAL	Sg HAL	Human HAL
Pine PAL	63											
Popula PAL	85	63										
Potato PAL	78	62	81									
Ao PAL	30	29	28	29								
Gg PAL	30	31	31	30	42							
Rg PAL	32	28	32	31	37	34						
Um PAL	27	27	27	27	37	33	38					
Aa HAL	25	27	26	24	23	23	23	24				
Pp HAL	26	25	25	25	25	23	26	25	39			
Sg HAL	26	27	26	26	24	25	26	26	68	38		
Human HAL	19	19	19	19	18	19	19	19	37	42	38	
Rat HAL	19	19	19	19	17	19	19	19	37	42	37	

Numbers indicate the percentages of protein sequence identity. Sequences were analyzed based on inferred amino acid sequences from cDNAs encoding the enzymes, using ClustalW2 program. Ao PAL: *Aspergillus oryzae* RIB40, Gg PAL: *Glomerella graminicola* M1.001, Rg PAL: *Rhodotorula glutinis* ATCC 204091, Um PAL: *Ustilago maydis*, Aa HAL: *Arthrobacter aureus* TC1, Pp HAL: *Pseudomonas putida* S16, Sg HAL: *Streptomyces griseus*.

도 23%에서 26% 수준으로 식물에서 보여준 수준과 비슷한 수준 이었다. 식물의 PAL과 곰팡이의 PAL은 모두 동물의 HAL에 대하여 19% 수준의 서열 유사도를 보였다. 이는 식물과 곰팡이의 PAL이 동물의 HAL 보다는 세균의 HAL과 더 유사하다는 것을 나타낸다. 진화적으로 동물이 식물이나 곰팡이에 더 가까운데 PAL과 HAL 효소의 유사성은 식물과 곰팡이가 세균에 더 가깝다는 사실은 매우 흥미롭다. 따라서 ammonia-lyase의 진화적 관계가 기능적 유사성을 지닌 PAL과 HAL에서는 어떠한 방향으로 진화가 이루어져 왔는지 차 후 연구가 더 진행되어야 할 것이다.

구조적으로 상이하고 유사한 부위에 대한 비교정보를 좀 더 얻고자 Fig. 1에 사용한 PAL과 HAL 단백질의 유전자로부터 기대되는 아미노산 서열을 대상으로 hydrophilicity 분석을 수행하여 비교하였다. 500여개의 아미노산을 지니는 *P. fluorescens*와 *P. putida*의 HAL은 비슷한 hydrophilicity profile을 보였으며 N-terminal과 가까운 부위에서 가장 높은 hydrophilic site가 존재하였다 (Fig. 3A-B). 이에 반해 700여개의 아미노산을 지니는 *U. maydis*, PAL과 *R. toruloides* PAL은 C-terminal과 가까운 곳에서 가장 높은 hydrophilic site가 존재하였다 (Fig. 3C-D). 식물 PAL의 경우는 포플라와 알팔파 PAL이 곰팡이들처럼 C-terminal과 가까운 곳에서 가장 높은 hydrophilic site가 존재하였고 서로 유사한 profile을 보였다 (Fig. 3F-G). 그러나 감자 PAL은 포플라 PAL이나 알팔파 PAL과는 좀 상이한 자리에서 가장 높은 hydrophilic

site가 존재하였다 (Fig. 3-F). 이상의 hydrophilicity 결과를 보면 구조적으로 곰팡이와 식물의 PAL은 사뭇 유사함을 발견할 수 있다. 가장 높은 hydrophilic site 자리의 비교에서는 세균의 HAL이 곰팡이와 식물의 PAL과는 다른 hydrophilicity profiles을 보임을 알 수 있다. 그러나 전반적인 hydrophilicity profile을 살펴보면 여러 군데에서 면역항체 형성에 관여할 수 있는 antigenic site로서 작용할 수 있는 hydrophilic한 peaks가 PAL과 HAL에 존재함을 볼 수가 있다. 이러한 peak를 보면 비록 hydrophilic score 값에 다소 차이가 있지만 N-terminal에 가까운 쪽에서 유사한 peak들을 볼 수 있다. C-terminal 쪽에서는 PAL이 HAL 보다 약 160개 정도의 아미노산수가 많으므로 이 둘 효소 간에 구조적 차이가 있음을 확실히 알 수 있다. 최근에 Calabrese 등(2004)은 PAL에 대한 crystal structure 연구에서 이 C-terminal 부분의 160개 아미노산은 PAL 단백질의 기본 folding에는 벗어나서 외부로 길게 뻗어져 나와 있는 것으로 보고하였다. 이러한 구조적 특성이 PAL의 면역학적 특성에는 어떠한 영향을 줄지는 흥미로운 의문으로 이 또한 향후 좀 더 연구가 되어야 할 것 같다. 그리고 최근 형질전환 연구가 가능한 여러 곰팡이 종에서 PAL 유전자가 존재함이 밝혀져 있는 바 (Hyun *et al.*, 2011), 곰팡이의 PAL 효소 유전자 결실 돌연변이체에 식물의 PAL 유전자를 삽입하여 돌연변이체의 기능회복 여부를 검증하면 본 면역학적 연구를 뒷받침할 수 있는 효소의 기능적 보존연구가 가능할 것으로 사료된다.

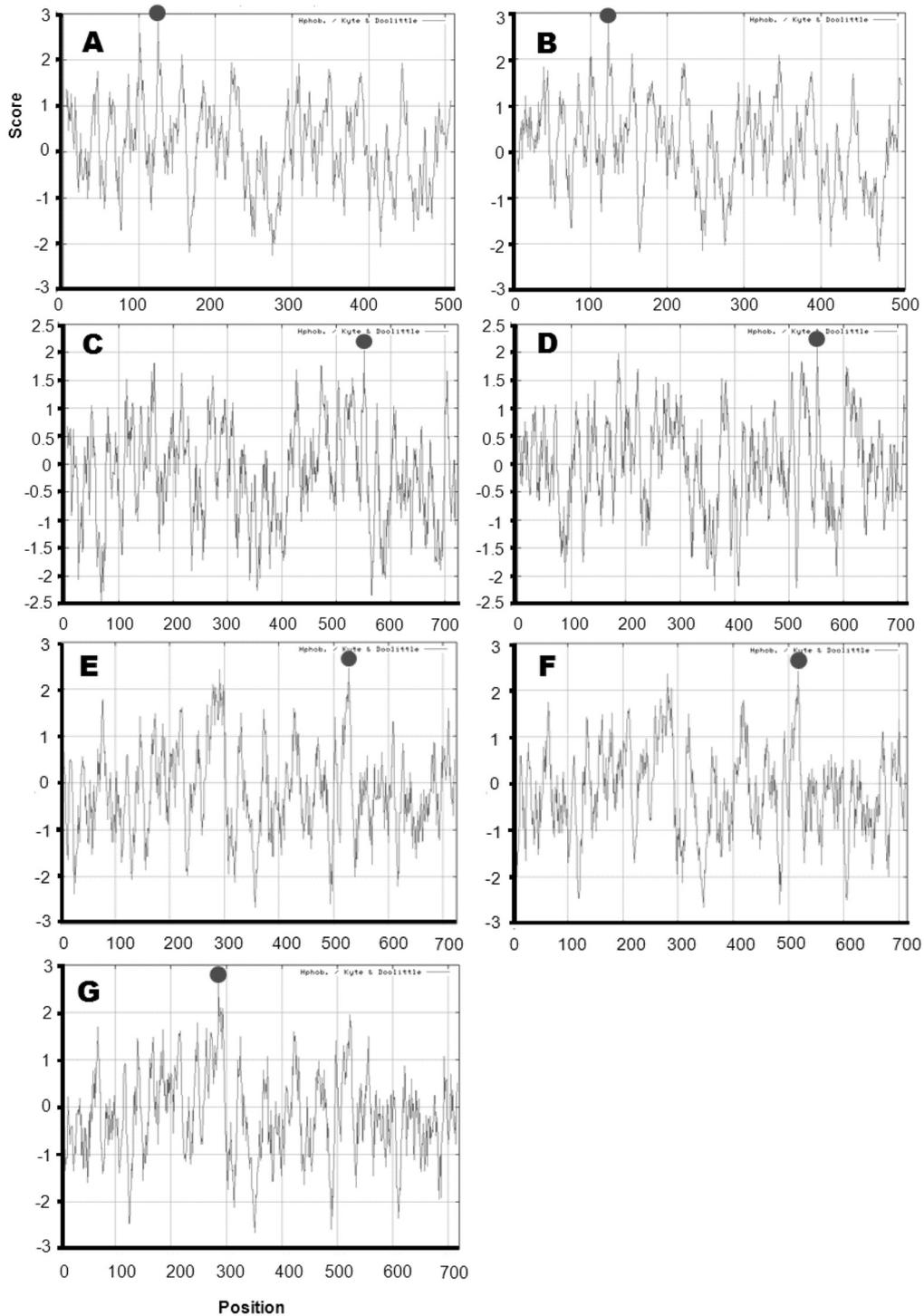


Fig. 3. Hydrophilicity profiles of PALs and HALs from different organisms. A: *Pseudomonas fluorescens* HAL, B: *P. putida* HAL, C: *Ustilago maydis* PAL, D: *Rhodosporidium toruloides* PAL, E: Alfalfa PAL, F: Poplar PAL, G: Potato PAL. Positives values indicate hydrophilic regions. Black colored dot(●) indicates the most hydrophilic amino acid residues.

적요

진균의 phenylalanine ammonia-lyase(PAL)와 식물의 PAL간 그리고 PAL과 histidine ammonia-lyase (HAL)간의 구조적

특성 관계에 대한 이해를 얻기 위해 옥수수병원균인 깎부기균(*Ustilago maydis*)의 PAL에 대한 면역학적 분석을 수행하였다. 진균의 PAL 항체와 식물의 PAL 항체를 이용하여 분석하였을 때 실험한 모든 종의 PAL 간에 교차반응이 나타났

다. 알팔파 PAL 항체와 포플라 PAL 항체 모두 식물 PAL은 강하게 인식하였으나 진균의 PAL은 약하게 인식하였다. *U. maydis* PAL은 *Rhodotorula glutinis* 효모의 PAL만 약하게 인식하였다. *U. maydis* PAL은 식물의 PAL에 대해서 낮은 친화성을 보였으나 *Pseudomonas* 세균의 HAL에 대해서는 강한친화성을 보였다. 2종의 식물 PAL 항체를 또한 *Pseudomonas* 세균의 HAL에 대해 강한 친화성을 보였다. 진균과 식물의 PAL 항체는 PAL 효소의 활성 저해를 나타냈으며 세균의 HAL 효소의 활성에 대해서도 중도적 저해를 나타냈다. 세균의 HAL 항체는 식물과 효모와 *Ustilago* PAL 중에 *Ustilago* PAL 활성만 저해하였다. 식물의 PAL과 진균의 PAL 모두 효모의 PAL 활성은 저해하지 못했다. 본 연구는 PAL과 HAL간에 면역학적 관계가 있음을 처음으로 보고한다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2006-331-F00005).

참고문헌

Armstrong, E. G and Feigelson, M. 1980. Effects of hypophysectomy and triiodothyronine on *de novo* biosynthesis, catalytic activity, and estrogen induction of rat liver histidase. *J. Biol. Chem.* 255:7199-7203.

Asubel, F. M., Brent, B., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. 1995. Current protocols in molecular biology. John Wiley Inc. New York.

Bernards, M. A. and Ellis, B. E. 1991. Phenylalanine ammonia-lyase from tomato cell cultures inoculated with *Verticillium albo-atrum*. *Plant Physiol.* 97:1494-1500.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Calabrese, J. C. Jordan, D. B., Boodhoo, A., Sariaslani, S and Vannelli, T. 2004. Crystal structure of phenylalanine ammonia lyase: multiple helix dipoles implicated in catalysis. *Biochem.* 43:11403-11416.

Conseavage, M. W. and Phillips, A. T. 1985. Presence and quantity of dehydroalanine in histidine ammonia-lyase from *Pseudomonas putida*. *Biochem.* 24:301-308.

Feigelson, M. 1973. Multihormonal regulation of hepatic histidase during postnatal development. *Enzyme* 15:169-197.

Hahlbrock, K. and Scheel, D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:347-369.

Hanson, K.R. and Havar, E.A. 1970. L-Phenylalanine ammonia-lyase. IV. Evidence that the prosthetic group contains a dehydroalanyl residue and mechanism of action. *Arch. Biochem. Biophys.* 141:1-17.

Hodgins, D. S. 1971. Yeast phenylalanine ammonia-lyase: purification, properties, and the identification of catalytically essential dehydroalanine. *J. Biol. Chem.* 246:2977-2985.

Hernandez, D. and Phillips, A. T. 1994. Ser-143 is an essential

active site residue in histidine ammonia-lyase of *Pseudomonas putida*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 201:1443-1438.

Hernandez, D., Stroh, J. G. and Phillips, A. T. 1993. Identification of Ser¹⁴³ as the site of modification on the active site of histidine ammonia-lyase. *Arch. Biochem. Biophys.* 307:126-132.

Holloman, W. K. and Dekker, C. A. 1971. Control by cesium and intermediates of the citric acid cycle of extracellular ribonuclease and other enzymes involved in the assimilation of nitrogen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68:2241-2245.

Hyun, M. W., Yun, Y. H., Kim, J. Y. and Kim, S. H. 2011. Fungal and plant phenylalanine Ammonia-lyase. *Mycobiol.* (in press).

Jones, D. H. 1984. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction and its role in plant development. *Phytochem.* 23:1349-1359.

Kamel, M. Y. and Maksoud, S. A. 1978. Co-factor requirements and factors affecting L-histidine ammonia-lyase activity in *Vicia faba*. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 88:255-262.

Kim, S. H., Kronstad, J. W. and Ellis, B. E. 1996. Purification and characterization of phenylalanine ammonia-lyase from *Ustilago maydis*. *Phytochem.* 34:351-357.

Koukol, J. and Conn, E. E. 1961. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J. Biol. Chem.* 236:2692-2698.

Lamartiniere, C. A. 1979. Neonatal estrogen treatment alters sexual differentiation of hepatic histidase. *Endocrinol.* 105:1031-1035.

Langer, M., Reck, G., Reed, J. and Retey, J. 1994. Identification of serine-143 as the most likely precursor of dehydroalanine in the active site of histidine ammonia-lyase. A study of the overexpressed enzyme by site-directed mutagenesis. *Biochem.* 33:6462-6467.

McKegney, G. R., Butland, S. L., Theilmann, D. and Ellis, B. E. 1996. Expression of poplar phenylalanine ammonia-lyase in insect cell cultures. *Phytochem.* 41:1259-1263.

Pilbak, S., Tomin, A., Retey, J. and Poppe L. 2006. The essential tyrosine-containing loop conformation and the role of the C-terminal multi-helix region in eukaryotic phenylalanine ammonia-lyases. *FEBS J.* 273:1004-1019.

Polkinghorne, M. A. and Hynes, M. J. 1982. L-Histidine utilization in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* :931-940.

Rechler, M. M. and Tabor, H. 1969. The purification and characterization of L-histidine ammonia-lyase. *J. Biol. Chem.* 244:551-559.

Ruis, H. and Kindl, H. 1970. Distribution of ammonia-lyases in organelles of castor bean endosperm. *Hoppe-Seyler's Physiol. Chem.* 351:1425-1427.

Ruis, H. and Kindl, H. 1971. Formation of α,β -unsaturated carboxylic acids from amino acids in plant peroxisomes. *Phytochem.* 10:2627-2631.

Schomburg, D. and Salzmann, M. 1990. Class 4: Lyases, Phenylalanine ammonia-lyase in Enzyme Handbook 1, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Schuster, B. and Retey, J. 1994. Serine-202 is the putative precursor of the active site dehydroalanine of phenylalanine ammonia-lyase. Site-directed mutagenesis studies on the enzyme from parsley (*Petroselinum crispum* L.) *FEBS Lett.* 349:2562-254.

Schuster, B. and Retey, J. 1995. The mechanism of action of phenylalanine ammonia-lyase: the role of prosthetic dehydroalanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8433-8437.

Taylor, R.G. and McInnes, R.R. 1994. Site-directed mutagenesis of conserved serines in rat histidase. *J. Biol. Chem.* 269:

- 27473-27477.
- Wu, P.-C., Kroening, T. A., White, P. J. and Kendrick, K. E. 1992. Histidine ammonia-lyase from *Streptomyces griseus*. *Gene* 115:19-25.
- Young, D. and Davis, R. W. 1983. Polymerase II genes: Isolation with antibody probes. *Science* 222:778-782.