Journal of the Korean Chemical Society
2006, *Vol. 50, No. 5*
Printed in the Republic of Korea

설프히드릴 변형 화합물질들에 의한 양배추 포스포리파제 D의 시스테인 잔기의 특성

고 은 희*
덕성여자대학교 화학과
(2006. 8. 12 접수)

Characterization of Cysteine Residues in Cabbage Phospholipase D by Sulfhydryl Group Modifying Chemicals

Eun-Hie Koh*
Department of Chemistry, Duksung Woman's University, Seoul 132-714, Korea
(Received August 12, 2006)

요 약. 양배추 포스포리파아제 D(PLD)의 8개의 시스테인 잔기들의 특성을 파악하기 위해 설프히드릴(SH)기와 반응하는 각종 화학물질들을 동원하였다. 5,5'-다이티오비스(2-니트로벤조산) (DTNB)는 시스테인 잔기의 SH기를 적정하기 위해 이용하였으며, 412nm에서의 환원된 DTNB의 값으로부터 자연 상태의 PLD는 1몰 당 4개의 SH기가 있는 것으로 나타났으나, 8 M의 요소 등으로 3차원 구조를 교란 시킨 변성된 PLD는 8개의 SH기가 적정되었다. 이 결과로 시스테인 잔기의 반(4개)은 외부에 노출되어 있고 그 나머지 반은 내부에 가려져 있다고 추정할 수 있다. SH기 변형 시약인 p-클로로머큐리벤조산(PCMB), 요오드아세트산, 요오드아세트아미드, 그리고 N-에칠마레이미드 등은 모두 PLD를 비활성화 시켰다. 이들 중 다이티오스라이톨(DTT)로 처리했을 때 유일하게 PCMB에 의해 비활성화 된 PLD는 가역적으로 그 활성이 회복되었다. 다양한 작용기를 갖는 다이설파이드들을 이용한 노출된 SH기의 주위 환경을 검토한 결과 음전하나 전하를 띄지 않은 다이설파이드들이 양전하를 띈 시스타민 보다 더 효과적으로 PLD를 비활성화 시키는 것으로 나타났다. 그 이외 시스테인 잔기의 산화-환원 전환이 PLD 활성에 미치는 영향을 과산화수소를 이용하여 검토하였다. 과산화수소 산화에 의해 70% 이상 잃은 PLD 활성은 대부분 DTT에 의해 복원되었다. 이들 결과로부터 양배추 PLD의 시스테인 잔기들이 모두 SH기로 존재한다는 것을 반응을 통해 확인 할 수 있었으며, 또한 외부에 노출된 4개의SH기는 PLD 활성 조절에 지대한 영향을 미치고 있는 것으로 나타났다.

주제어: 포스포리파아제 D, 설프히드릴 기, 5,5'-다이티오비스(2-니트로벤조산)(DTNB), p-클로로머큐리벤조산(PCMB)

ABSTRACT. Several SH group modifying chemicals were used to characterize the eight cysteine residues of cabbage PLD. 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoate)(DTNB) was used to titrate the SH group of cysteine residues . Based on the optical density at 412nm due to the reduced DTNB, 4 SH groups are found to be present in a native PLD while 8 SH groups in the denatured PLD whose tertiary structure was perturbed by 8M urea. The results imply that among the 8 cysteine residues of PLD, the half(4) are exposed on the surface whereas the other half are present at the interior of the enzyme tertiary structure. The PLD was inactivated by SH modifying reagents such as p-chloromercuribenzoate(PCMB), iodoacetate, iodoacetamide, and N-ethylmaleimide. At the addition of dithiothreitol(DTT) only the PCMB inhibited PLD activity was recovered reversibly. The micro-environment of the exposed SH group of cysteine residues was examined with various disulfide compounds with different functional groups and we found that anionic or neutral disulfides appear to be more effective than the positively charged cystamine for inactivating the PLD activity. The effect of redox state of

cysteine residues on the PLD activity was further explored with H_2O_2. The oxidation of SH groups by H_2O_2 inhibited the PLD activity more than 70%, which was mostly recovered by DTT. From these results, we could confirm chemically that all the cysteine residues of PLD are present as in their reduced SH forms and the 4 SH groups exposed on the surface of the enzyme may play important roles in the regulation of PLD activity.

Keywords: Phospholipase D, Sulfhydryl Group, 5,5′-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB), p-chloromecuribenzoate(PCMB)

서 론

포스포리파제 D(Phospholipase D(PLD); EC 3.1.4.4)는 글리세롤 인지질을 가수분해하여 포스파티드산(phosphatidic acid(PA))과 OH 기를 갖는 머리그룹을 생성하는 효소다. 이 효소활성은 처음 홍당무에서 포스포티딜코린(phosphatidylcholin(PC))을 가수분해 시키는 lecithinase로 알려졌으나 그 후 여러 동식물들에 광범위하게 분포되어있는 효소로 밝혀 졌다.[1] PLD는 단순한 세포막 인지질의 분해효소가 아니라 다른 세포막 포스포리파제들과 같이 세포의 기능조절에 관여하는 것으로 인식되어, 신호전달 관련 효소로서의 그 중요성이 크게 부각되고 있다.[2] 식물 PLD는 씨의 발아와 성장,[3,4] 활성 산소들(ROS)에 의한 손상,[5] 노화 현상[6]과 Cu^{+2} 의 영향[7] 등에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 중요성에도 불구하고 PLD의 조절 메커니즘이나 분자구조는 아직 잘 밝혀져 있지 못하다. PLD의 cDNA 복제와 발현은 castor bean[8]을 필두로 하여 쌀,[9] 양배추,[10] 아기장대,[11] 딸기[12] 등에서 이루어져 PLD의 유전자 연구의 토대를 마련해 주고 있다.

분자 측면에서, 단백질의 시스테인 잔기는 오래 전부터 여러 기능이 있을 것으로 추정되어 오고 있다. 일반적으로 시스테인 잔기는 분자간 다이설파이드 결합으로 단백질의 3차원 구조를 안정화 시킨다고 알려져 있으며,[13] 또한 환원된 상태의 설프히드릴 (SH)기는 효소의 활성 부위 등에서 핵심 기능기로 참여하는 것으로 인식되어 지고 있다.[14] 이와 함께 시스테인 잔기의 다른 기능으로 세포내의 여러 생리조절에 중요한 역할을 하고 있다는 논문이 적지 않게 보고되고 있다. 한 예로 CXXC 서열을 갖고 있는 glutaredoxin[15]이나 protein disulfide isomerase[16]의 경우는 설프히드릴-다이설파이드의 산화 환원 상태의 변화에 따라 이들의 활성이 달라지고 있다고 알려져 있다. 그 외 또 다른 시스테인 잔기의 역할로 금속 결합 장소를 제공해 주기도 한다.[17]

양배추 PLD의 경우 설프히드릴(SH)기를 변형시키는 p-클로로머큐리벤조산(PCMB)에 의해 PLD의 활성이 저해된다는 사실은 오래 전에 알려져 있었으며,[18] 그 후 이 시스테인 잔기의 존재 가능성은 재 확인 되었고 그 이외에도 필요 불가결한 히스티딘 잔기의 존재도 밝혀 졌다.[19] 그러나 분자 수준에서는 더 이상의 진전이 없는 가운데, 양배추 PLD의 유전자 α가 복제되면서 그 cDNA로부터 아미노산 서열을 추정할 수 있게 되었다.[10] 분자량이 92 kDa인 양배추 PLD는 812개의 아미노산으로 이루어져 있으며 그 중 시스테인 잔기는 8개인 것으로 판명되었고 CXXC 서열도 갖고 있는 것으로 나타났다. 이에 따라 8개의 시스테인 잔기 중 어떤 것이 SH기로 존재하고 어떤 잔기가 다이설파이드로 존재하느냐가 큰 관심사로 대두되었다. 이 문제는 양배추 PLD 단백질의 트립신 조각들을 MALDI-TOF 질량분석기로 분석한 결과 모든 시스테인이 환원된 설프히드릴(SH)기로 존재하리라는 것으로 추정 되었다.[20]

본 실험에서는 양배추PLD의 SH기가 어떤 양상으로 PLD 단백질에 분포되어 있나를 각종 설프히드릴기를 변형시키는 화합물질들을 이용하여 검토하고자 한다. 우선 정제된 양배추 PLD의 SH기는 5,5′-다이티오비스(2-니트로벤조산) (DTNB)로 적정하여 그 숫자를 화학적 방법으로 확인하고, 더 나아가 각종 다이설파이드 유도체들을 이용하여 표면에 있는 SH기와의 반응 정도를 검토하여 이들 SH 기의 주위 환경을 유추해 보려고 한다. 그 이외 SH기의 산화-환원 변환이 어떻게 PLD 활성에 영향을 미치는 지를 검증 하려고 한다.

재료 및 방법

재 료. 양배추는 야채시장에서 구입한 신선한 사보이(savoy)품종을 사용하였다. Sigma 회사(U.S.A.)로부터 계란 phosphatidylcholin(PC), sodium dodecyl

sulfate(SDS), 5,5′-dithiobis(2-nitrobenzoate)(DTNB), N-ethylmaleimide(NEM), dithiothreitol(DTT), iodoacetic acid, iodoacetamide 및 1,4-piperazinediethanesulfonic acid (PIPES) 등을 구입하였고, ethyl disulfide, cystamine, 3',3'-ditiodipropionic acid와 2-hydroxyethyl disulfide는 Aldrich(U.S.A.)에서 구입하였다. Octyl sepharose CL-4B는 Pharmacia Biotech(Sweden) 제품이며, 순수하지 못한 계란 PC는 산화 알루미늄 대롱 크로마토그라피로 정제하여 사용하였다. p-Chloromercuribenzoate (PCMB)와 hydrogen peroxide는 TCI(Japan)에서 구입하였으며 그 외의 모든 시약들은 상업적으로 구매할 수 있는 시약 등급을 사용하였다.

양배추 포스파리파제 D정제. 양배추 PLD는 Lee와 Choi 방법에[21] 따라 정제하였다. 양배추의 아세톤 가루는 양배추 속의 노란 흰 잎 쥬스를 55 °C로 열 처리한 후 냉동 건조시켜 만들었다. 이 아세톤 가루를 Lambrecht and Ulbrich-Hoffman 방법에[22] 따라 50 mM $CaCl_2$를 포함하는 20 mM PIPES buffer(pH 6.2)로 평형시킨 octylsepharose CL-4B column에 넣고 Ca^{+2}의 농도를 변화시키면서 용출시켰다. 대략 400배 정도로 정제되었으며, 이 정제된 PLD는 SDS-PAGE 상에서 단일 띠로 나타났다.

포스포리파제 D의 활성 측정. PLD 활동도 측정은 PC을 기질로 하여 분광학적 방법으로 수행하였다. 이 방법은 Appleton 등에 의해 개발되었고 Jung등에[23] 의해 개선된 방법으로 효소반응의 최종 생성물의 하나인 콜린의 분석에 기본을 두고 있다. PLD반응에 사용될 PC는 클로로포름에 녹인 5 mmole의 PC을 코텍스 시험관에서 질소 기체로 건조시킨 다음, 여기에 PC와 몰 비율이 2:1이 되는 분량의 25 mM SDS 0.1 ml를 넣고 초음파기로 분산시킨 후 10 mM MES 완충용액(pH 6.3) 0.9 ml로 희석시켜 만들었다. 이 PC-SDS 혼합용액에 125 mM $CaCl_2$ 0.1 ml와 효소용액 0.01 ml를 넣고 37 °C에서 15분 동안 반응시켰다. 반응용기를 ice-water bath에 넣어 종결시키고, 5%(w/v) 알부민(BSA) 용액 0.1 ml와 20%(v/v) perchloric acid 0.15 ml를 넣어 주었다. 이 혼합물은 vortex mixer로 잘 섞어준 후 15분 동안 원심분리 하였다. 상층 액 1.0 ml를 원심분리용 시험관에 옮기고 0.2 ml의 찬 potassium triiodide를 넣어 choline periodide 침전을 얻었다. 이 침전물은 1,2-dichloroethane 5 ml에 녹인 후 365 nm에서 그 흡광도를 측정하였다. PLD활동도 단위는 1분당 생성된 choline의 mol로 정의하였다.

DTNB에 의한 SH기 적정. 필요한 stock용액은 최종 반응혼합액의 PLD농도가 3.04 μM이 되고 DTNB는 0.1 mM이 되도록 준비하였다. 그리고 $CaCl_2$와 EGTA 용액은 각각 그 농도가 5 mM과 1 mM이 되도록 하였다. 모든 용액은 pH 6.5 0.01 M의 KH_2PO_4 완충용액으로 만들었다. 생성된 TNB^-의 흡광도는 412 nm (ε=13,600 $M^{-1}cm^{-1}$)에서 Uvikon-930 spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. 기기의 영점을 맞추기 위해서 PLD를 제외한 반응혼합액을 blank로 사용하였으며 PLD가 들은 반응혼합액은 온도(25 °C)를 일정하게 유지하기 위해 10분 후에 그 흡광도를 측정하였다. PLD의 SH기 적정은 자연 상태와 변성 상태 조건을 비교하였으며 Ca^{+2}의 영향도 검토하였다. 정제된 PLD 시료 양의 제한으로 자연 상태 조건을 제외하고 중복실험을 수행하지 못했다. 몇 번의 예비실험으로 미루어 SH기 적정의 실험 오차는 대략 10% 내외로 추정 할 수 있다.

SH기 변형 실험. SH기 변형시약은 모두 pH 6.5의 0.01 M KH_2PO4 완충용액에서 만들었고 PCMB용액은 Boyer의 방법에[24] 따라 제조하였다. PLD는 주어진 농도의 변형시약과 시간에 따라 37 °C에서 반응시킨 후 남은 PLD의 활성을 측정하였다. DTT에 의한 PLD 활성 회복실험은 특정한 경우를 제외하고 대략 2배 정도의 양을 반응혼합액에 첨가하여 수행하였다. 변형실험은 대부분 중복 실험을 하였으나 결과는 산술 평균치만으로 나타내었다.

단백질 정량. PLD시료의 단백질 함량은 Bradford 방법[25]으로 수행하였다.

결과 및 고찰

PLD 시스테인 잔기의 적정. Ellman 시약으로도 알려진 DTNB는 설프히드릴(SH) 기와 반응하여 혼성 다이설파이드를 형성하고 환원된 노랑색의 TNB^-를 내놓는다. 이 현상을 응용한 DTNB의 단백질의 SH기 적정은 시스테인 잔기들 중에 얼마만큼의 자유스

Table 1. Titration of SH group in PLD with DTNB.

Reaction condition	Reagent added	Absorbance at 412 nm	[SH][a] (μM)	[PLD][b] (μM)	[SH]/[PLD][c]
native PLD		0.174	12.79	3.04	4.21
Ca^{+2} effect	$CaCl_2$ 5 mM	0.166	12.21	3.04	4.02
	EGTA 1 mM	0.172	12.65	3.04	4.16
denaturing	SDS 0.5 %	0.199	14.63	3.04	4.81
	urea 8 M	0.185	13.60	1.52	8.95
	guanidine-HCl 6 M	0.182	13.38	1.52	8.80

[a]SH concentration was calculated from absorbance of TNB^{-1} (ε=13600 $M^{-1}cm^{-1}$). [b]Protein was determined by Bradford protein assay. [c]The ratio means the number of SH group per PLD molecule.

런 SH기가 존재하느냐를 밝히는 좋은 수단이 되고 있다.[2,6] 양배추 PLD의 시스테인 잔기는 복제된 cDNA로부터 8개인 것으로 알려졌으며,[10] 더 나아가 MALDI-TOF 질량분석기를 이용한 PLD분석으로부터 시스테인 잔기들이 모두 환원된 상태인 SH기로 있을 것으로 추정되고 있다.[20] 이를 독립적인 방법으로 확인하기 위해 이 실험에서는 정제된 양배추 PLD를 DTNB로 적정하였다. TNB^-의 생성은 반응용액의 pH, 이온세기 및 DTNB의 농도에 영향을 받기 때문에 몇 번의 예비 실험 결과 반응조건으로 아무 이온도 더 넣지 않은 0.01 M KH_2PO_4 buffer(pH 6.5)를 사용하였고 DTNB 농도는 0.1 mM을 선택했다. 관측된 TNB^- 흡광도 412 nm로부터 얻어진 PLD 분자당 SH 기의 수는 *Table* 1에 수록하였다. 자연상태의 PLD는 4개의 자유스런 SH기가 적정되었다. 한편 단백질의 상태에 따라 SH기의 숫자에 어떤 변화가 오는가를 보기 위해 Ca^{2+} 이온, SDS, 및 변성시약 등을 처리하였다. Ca^{2+} 이온은 DTNB 적정에 별 영향을 주지 않았으며, 0.5%의 SDS경우에도 그리 큰 영향을 미치지 못한 것으로 나타났다. 그러나 urea와 guanidine-HCl에 의해 PLD를 변성시켰을 때는 8개가 넘는 SH기가 적정되었다. 변성된 PLD의 이 숫치는 실험의 오차를 고려하면 MALDI-TOF 질량분석기를 이용한 결과와 일치한다고 보아도 큰 무리가 없을 것이다. 즉 이 결과는 PLD의 시스테인은 모두 환원된 상태로 있다는 것을 화학적인 방법으로 확인한 셈이다. 그리고 더 나아가 이 결과는 시스테인 잔기의 반(4개)은 외부에 노출되어 있고 그 나머지 반은 내부에 가려져 있다는 정보를 제공해주고 있다. SDS 존재 하에서 SH기가 별로 증가하지 않은 것은 이 조건에서 PLD의 3차원 구조가 변하지 않았다는 것을 의미하며, 이는 PLD활성 측정방법으로 흔히 PC-SDS혼성 미셀을 기질로 사용하고 있다는 것과 상통한다.

SH기 변형 화학물질의 영향. 양배추 PLD는 설프히드릴(SH)기를 변형시키는 PCMB에 의해 그 활성이 저해된다는 사실은 이미 알려져 있었으나,[18,19] 양배추 PLD의 유전자 정보 등에[10,20] 의해 8개의 시스테인 잔기가 모두 환원된 상태일 것이리라는 추정은 PLD의 SH기의 특성을 다시 들여다 볼 필요성을 대두시키고 있다. *Fig.* 1에는 PCMB에 의한 PLD 비활성화 결과를 반응 시간과 농도에 따라 보여주고 있다. PLD의 활성 측정은 재료 및 방법에서 기술한대로PC-SDS혼성 미셀을 기질로 사용하였으며, 표준조건에서 정제된 PLD의 활성은 대략 3.75 nmol/min/mg protein으로 얻어졌다. PCMB에 의한 비활성화 정도는 정상 활동도의 백분율(percent of control activity)로 나타내었다. PLD 비활성화는 농도와 반응시간에 따르는 것으로 나타났으며 20 μM의 PCMB인 경우 15분 동안에 활동도의 80%까지 비활성화가 진행되

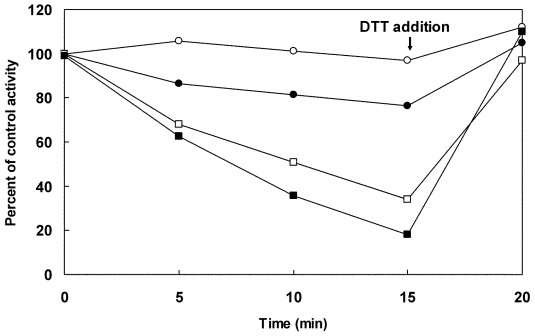


Fig. 1. Time-course of PLD inactivation by PCMB. Effect of PCMB was examined with 0.52 μM PLD for different periods of incubation time in 0.01 M KH_2PO_4 buffer (pH 6.5) at 37 °C. The concentration of PCMB: control (○); 5 μM (●); 10 μM (□); 20 μM (■). At the end of 15 min incubation period the mixtures were treated with 0.5 mM dithiothreitol for 5 min. The residual activity was determined as described in Experimental section.

었다. 이 비활성화된 PLD는 0.5 mM DTT에 의해 원래의 활동도를 되찾았다. 이 결과는 표면에 노출되어 있는 SH기가 가역적으로 PCMB에 의해 그 역할이 좌우되고 있음을 보여주고 있다. 다른 SH기 변형 시약인 요오드아세트산과 요오드아세트아미드의 결과는 *Fig.* 2에, 그리고 NEM의 경우는 *Fig.* 3에 각각 도시하였다. 이들 알킬화시키는 시약도 PLD 활성을 차단했으나 DTT에 의해 활성이 회복되지는 못했다. 요오드아세트아미드의 경우 2.5 mM에서부터 PLD 활성을 75% 정도 비활성화 시켰으며, NEM의 경우는 5 mM 농도, 60분 반응에서 대략 60%의 비활성화 효과를 보여주었다. 이들 결과들 특히 NEM의 경우는 과거 보고들에 비하면 더 민감한 비활성 효과를 나타내고 있다. Yang 등은[18] NEM 효과가 없다고 보고했으며, Lee 등은[19] 20 mM NEM에서 50%까지의 차단 효과밖에 보지 못했다고 보고하고 있다. 이런 차이는 본 실험의 경우 실험조건의 최적화와 더불어 더

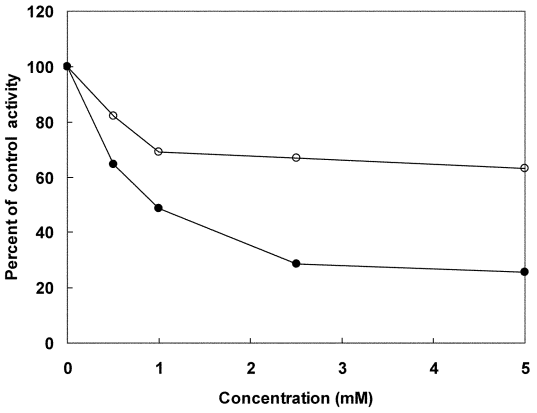


Fig. 2. Effect of iodoacetate and iodoacetamide on the PLD activity. The reaction was carried out with 0.52 μM PLD for 30 min in 0.01 M KH_2PO_4 buffer (pH 6.5) at 37 °C. Iodoacetate (○); iodoacetamide (●).

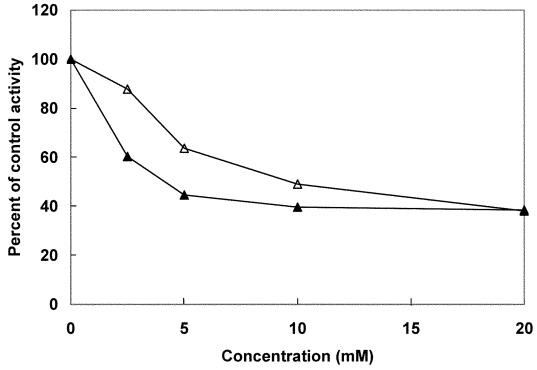


Fig. 3. Effect of N-ethylmaleimide on the PLD activity. All reactions were performed under the same conditions as previous experiment. The varied time of pre-incubation was examined: 30 min (△); 60 min (▲).

정제된 PLD를 사용한 것에서 연유하였으리라 짐작된다. PLD의 SH기가 효소 활성에 필요 불가결하다면 당연히 정도의 차는 있을지언정 모든 SH기 변형 시약은 PLD에 대한 비활성화 효과가 다 있어야 할 것이다.

표면에 있는 SH기의 주위 환경을 유추해 보려고 각종 다이설파이드 유도체들을 이용하여 그 반응성을 검토하였다. 그 결과는 *Table* 2에 수록하였다. 검토된 5개의 다이설파이드는 DTNB를 포함 ethyl disulfide, cystamine, 2-hydroxyethyl disulfide, 3,3′-dithiodipropionic acid 등으로 모두 PLD의 활성을 저해시켰다. 약 30% 저해 효과를 보여준 시스타민의 경우를 제외하고 다른 다이설파이드들은 대개 50% 가량의 비활성화 효과를 보여 주었다. 이는 이 실험 반응조건하에서 양전하를 띈 시스타민이 음전하나 전하를 띄지 않은 다이설파이드들 보다 PLD와의 반응성이 적다는 것을 말해주고 있다. 이 결과는 활성에 관여하는 SH기 주위에 양전하를 띈 잔기의 존재 가능성을 암시해 주고 있다.

Table 2. Effect of various disulfides on the activity of PLD.[a]

RSSR	Molecular formula	[RSSR]	Inhibition(%)
5,5'-dithiobis(2-nitro-benzoic acid)	$[SC_6H_3(NO_2)CO_2H]_2$	1 mM	52.5
cystamine	$(SCH_2CH_2NH_2)_2$	100 μM[b]	30.4
2,2'-hydroxyethyl disulfide	$(SCH_2CH_2OH)_2$	1 mM	49.3
3,3'-dithiodipro- pionic acid	$(SCH_2CH_2\ CO_2H)_2$	1 mM	52.6
ethyl disulfide	$(SCH_2CH_3)_2$	1 mM	54.3

[a]The reaction was performed in 0.01 M KH_2PO_4 buffer (pH 6.5) for 15 min at 37 °C. The amount of PLD used was 0.52 μM. [b]The maximum inhibition was obtained at this concentration.

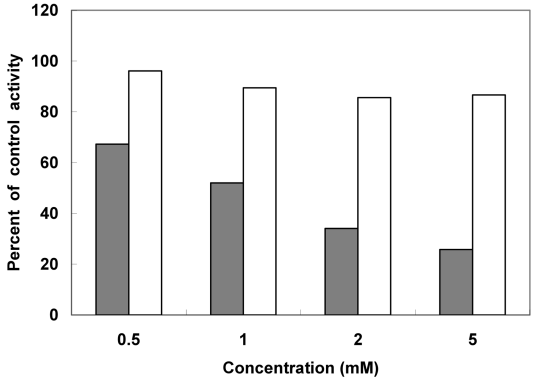


Fig. 4. Effect of H_2O_2 on the PLD activity. H_2O_2 was pre-incubated for 15 min and after that DTT was treated for another 15 min. The remaining PLD activity was determined as previously described.

SH기의 산화 반응 영향. PLD 활성에 자유스런 SH기의 중요성이 부각되면서 다음 단계로 SH기의 산화-환원 변환이 어떻게 PLD 활성에 영향을 미치는가를 H_2O_2를 이용하여 검증 하였다. *Fig.* 4에 PLD 활성에 대한 H_2O_2 영향을 도시하였다. 예측한 대로 과산화수소 농도에 따라 PLD의 활성이 줄어 들었으며 5 mM에서는 PLD 활성의 70% 이상을 잃은 것으로 나타났다. 이 관찰은 위의 SH기 변형 시약들의 결과와 일치하는 현상으로 자유스런 SH기가 PLD 활성 조절에 큰 역할을 한다는 것을 보여주는 또 하나의 증거라고 할 수 있다. 이 H_2O_2 산화에 의해 비활성화된 PLD는 DTT에 의해 대부분 복원시킬 수 있었다.

본 실험에서 변성된 양배추 PLD에서 8개의 SH기를 적정할 수 있었다는 것은 MALDI-TOF 질량분석기를 이용한 PLD분석에서 얻어진 결과를[20] 화학적인 방법으로 확인할 수 있었다는데 그 의의가 있다고 하겠다. 그리고 더 나아가 자연 상태의 PLD에서는 분자 당 4개의 SH기밖에 적정되지 않았다는 사실(*Table* 1)은 시스테인 잔기의 반(4개)은 외부에 노출되어 있고, 이들 자유스런 SH기가 PLD 활성 변화에 극적으로 참여하고 있다는 추정을 가능케 한다. 이를 뒷받침하는 결과로 PCMB와 DTT에 의한 PLD 활성의 가역적 비활성화 실험(*Fig.* 1)과 시스테인 잔기의 산화-환원 전환이 PLD 활성에 미치는 과산화수소 영향(*Fig.* 4) 등을 들 수 있다.

그러나 이들 일련의 결과는 양배추 PLD의 반응 메커니즘 연구에 새로운 방향을 제공함과 동시에 여러 문제점을 야기시키고 있다. 표면에 있는 자유스런 SH기 중 어떤 것이 가장 중요한 것일까? 이의 해답은 각 시스테인 잔기를 대상으로 하는 특이자리 돌연변이(site-specific mutagenesis) 실험으로 가능할 것이다. 그리고 양배추 PLD 활성에 대한 SH기의 기능이 촉매측면이냐 또는 조절 기능이냐의 문제가 남아 있다. 현재로는 양배추 PLD에도 PLD 수퍼 가족에 속하는 히스티딘-라이신-아스파틱 산(HKD) 구조가 있기[10] 때문에 아마도 이 히스티딘 잔기가 포스파티딜-효소 중간체 촉매에 관여할 가능성이 높다.[27] 따라서 양배추 PLD 활성에 대한 SH기의 기능은 조절 기능일 것이라는 관점이 더 타당하다. 그럼 어떻게 SH기에 의해 PLD 활성이 좌우될까? 그리고 이들이 씨앗의 발아와 성장[3,4] 그리고 활성 산소들(ROS)에 의한 손상[5] 등과 어떤 상관 관계가 있는가 등이 새로운 관심의 대상이 되고 있다. 양배추 PLD의 외부에 노출된 4개의 SH기가 PLD 활성 조절에 지대한 영향을 미치고 있다는 본 연구 결과는 이 분야 연구의 새 지평을 여는 계기가 될 것으로 믿어진다.

본 연구는 2005년도 덕성여자대학교 자연과학연구소 연구지원비에 의하여 이루어졌으며 실험은 김문정의 도움을 받았다.

인 용 문 헌

1. Heller, M. *Adv. Lipid Res.* **1978**, *16*, 267.
2. Peng, Z.; Beaven, M. A. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 5201.
3. Wang, X.; Dyer, H. J.; Zheng, L. *Arch. Biochim. Biophys.* **1993**, *306*, 486.
4. Wang, X. *Plant Physiol.* **2005**, *139*, 566.
5. Zhang, W.; Yu, L.; Zhang, Y.; Wang, X. *Biochim. Biophys. Acta*, **2005**, *1736*, 1.
6. Ryu, S. B.; Wang, X. *Plant Physiol.* **1995**, *108*, 713.
7. Navari-Izzo, F.; Cestone, B.; Cavallini, A.; Natali, L.; Giordani, T.; Quartacci, M. F. *Phytochemistry*, **2006**, *67*, 1232.
8. Wang, X.; Xu, L.; Zheng, L. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20312.
9. Ueki, J.; Monoka, S.; Komeri, T.; Kumashiro, T. *Plant cell Physiol.* **1995**, *36*, 903.
10. Kim, D. U.; Roh, T.; Lee, J.; Noh, J. Y.; Jang, Y. J.; Hoe, K. L.; Yoo, H. S.; Choi, M. -U. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1437*, 409.
11. Qin, C.; Wang, X. *Plant Physiol.* **2002**, *128*, 1057.

12. Yuan, H.; Chen, L.; Paliyath, G.; Sullivan, A.; Murr, D. P. *Plant Physiol. Biochem*. **2005**, *43*, 535.
13. Karim, C. B.; Paterlini, M. G.; Reddy, L. G.; Hunter, G. W.; Barany, G.; Thomas, D. D. *J. Biol. Chem*. **2001**, *276*, 38814.
14. Gadda, G.; Banerjee, A.; Dangott, L. J.; Fitzpatrick, P. F. *J. Biol. Chem*. **2000**, *275*, 31891.
15. Aslund, F.; Zheng, M.; Beckwith, J.; Storz, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1999**, *96*, 6161.
16. Bennett, T. A.; Edwards, B. S.; Sklar, L. A.; Rogeli. S. *J. Immunol*. **2000**, *164*, 4210.
17. Nakamura, M.; Nakajima, T.; Ohba, Y.; Yamauchi, S.; Lee, B. R.; Ichishima, E. *Biochem. J*. **2000**, *350*, 537.
18. Yang, S. F.; Freer, S.; Benson, A. A. *J. Biol. Chem*. **1967**, *242*, 477.
19. Lee, H.; Choi, M.-U.; Koh, E.-H. *Korean Biochem. J*. **1989**, *22*, 487.
20. Hwang, I. S.; Park, S. J.; Roh, T.; Choi, M.; Kim, H. *J. Rapid Commun. Mass Spectrom*. **2001**, *15*, 110.
21. Lee, J.; Choi, M.-U. *Bull. Korean Chem. Soc*. **1996**, *17*, 905.
22. Dittrich, N.; Haftendorn, R.; Ulbrich-Hofmann, R. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1391*, 265.
23. Jung, K.; Koh, E.; Choi, M.-U. *Bull. Korean Chem. Soc*. **1989**, *10*, 595.
24. Boyer, P. D. *J. Am. Chem. Soc*. **1954**, *76*, 4331.
25. Bradford, M. M. *Anal. Biochem*. **1976**, *72*, 248.
26. Wilson, J. M.; Wu, D.; Motiu-DeGrood, R.; Hupe, D. J. *J. Am. Chem. Soc*. **1980**, *102*, 359.
27. Interthal, H.; Pouliot, J. J.; Champoux, J. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 12009.