

## 폴리아민에 의한 양배추 포스포리파제 D의 활성화

고 은 희  
덕성여자대학교 화학과  
(2003. 8. 12 접수)

### Activation of Cabbage Phospholipase D by Polyamines

Eun-Hie Koh

Department of Chemistry, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea  
(Received August 12, 2003)

**요 약.** 양배추 포스포리파제 D(PLD)에 대한 포리아민들의 영향을 조사하였다. PLD 활성도는 phosphatidylcholine small unilamellar 베시클을 기질로 하여 pH- stat 방법으로 생성물질 phosphatidic acid를 적정하여 결정하였다. 양배추 PLD는 스퍼민 1 mM 농도에서 약 4배 활성화되었다. 이 스퍼민 효과는 전에 보고된 쥐 뇌 미토콘드리아 분획의 PLD 활성화와 유사한 결과를 보여주고 있다. 양이온성 polypeptide인 polylysine과 polyhistidine에 의해서도 양배추 PLD가 상당히 활성화되는 것을 알았다. 특히 polyhistidine은 0.062 mM 농도에서 약 5.5배의 활성화 효과를 나타냈다. 이 포리아민 효과는 phosphatidylcholine/sodium dodecyl sulfate 혼합미셀계에서도 재확인하였다. 포리아민에 대한 PLD 활성화의 의미를 PLD 활성부위와 관계 지워 고찰하였다.

**주제어:** 양배추 포스포리파제 D, 포리아민, 스퍼민, 포리라이신, 폴리히스티딘

**ABSTRACT.** The effect of polyamines on the cabbage phospholipase D(PLD) activity was investigated. The PLD activity was determined by pH-stat titration of phosphatidic acid, one of the enzymatic reaction product, using phosphatidyl choline small unilamellar vesicles as a substrate. The cabbage PLD was activated approximately 4 fold by spermine at 1 mM concentration. This spermine effect appears to be similar to the previous report on the PLD activation of rat brain mitochondrial fraction. It was also found that cationic polypeptides such as polylysine and polyhistidine exerted a marked enhancement effect on the cabbage PLD. Particularly polyhistidine exerted approximately 5.5 fold enhancement effect at 0.062 mM concentration. The polyamine effect on the cabbage PLD was reexamined in the phosphatidylcholine/sodium dodecyl sulfate mixed micellar system. The relevance of polyamine effect on PLD activity is discussed in relation to the active site of PLD.

**Keywords:** Cabbage Phospholipase D, Polyamine, Spermine, Polylysine, Polyhistidine

### 서 론

Phospholipase D(PLD)의 효소활성을 처음 홍당무에서 phosphatidylcholine을 가수분해 시키는 lecithinase로 알려졌으나 그 후 여러 식물들에 광범위하게 분포되어있는 효소로 밝혀졌다.<sup>1</sup> 최근 PLD의 cDNA의 복제와 발현이 castor bean을 필두로 하여 쌀, 양배추 등에서 이루어져 PLD의 유전자 연구가 본 계도에 오르고

있다.<sup>2,3</sup> 그리고 PLD의 역할에 대해서도 단순한 세포막 인지질의 분해효소가 아니라 세포막 기능의 조절자로써의 기능이 크게 부각되고 있다.<sup>4</sup> PLD의 생성물인 phosphatidic acid(PA) 자체가 신호전달 분자로써 기능하고 있음이 밝혀지고 있으며 또한 diacylglycerol(DAG) 같은 PA의 대사물질도 제2의 신호전달자로 각종 인지질 생합성에 영향을 미치고 있음이 보고되고 있다.<sup>5</sup>

한편 PLD 활성화에 의한 세포 2중막의 파괴와 식물의

노화 현상과의 연계 가능성이 제안되었으나 이렇다할 진전이 없었다. 그러나 분자생물학적 방법을 이용한 PLD $\alpha$ -antisense 처리된 *arabidopsis*의 잎은 abscisic acid와 ethylene에 의해 촉진된 노화 속도가 현저히 감소됨이 관찰되었다.<sup>6</sup> 또한 영양결핍, 냉해, 방사선, 손상 등의 각종 스트레스 조건하에서 PLD의 활성이 증가함이 밝혀지고 있어 환경변화에 대한 PLD의 역할에 많은 관심이 집중되고 있다.<sup>7,8</sup> 쌀의 경우 특정한 병원균에 의해 PLD 유전자 발현이 증가되었고,<sup>9</sup>  $\gamma$ -radiation에 의해 cauliflower의 PA가 촉진된 것이 보고 되었다.<sup>10</sup> 이런 PLD의 생리 역할 가능성은 PLD 자체의 저해나 활성화 연구로 이어지고 있다. 대표적 예로 양배추 PLD가 lysophospholipid에 의해 저해되고 있음이 알려졌으며,<sup>11</sup> hexadecylphosphocholine등이 PLD를 활성화시키는 것으로 보고 되었다.

Spermine같은 polyamine은 세포의 증식과 분화에 주요 역할을 하는 것으로 알려졌으며,<sup>13</sup> 인지질 관련 효소들의 활성화에도 영향을 미치는 물질로 보고되고 있다. 이미 본 연구실에서 spermine 영향을 주 뇌 미토콘드리아 분획의 PLD를 가지고 검토한 바 있다.<sup>15</sup> 올레산 존재 하에서 spermine은 미토콘드리아 PLD를 대역적 배 정도 활성화시킴을 보고하였다. 그러나 분리되지 않은 뇌 미토콘드리아 분획의 PLD를 그대로 사용하였기 때문에 PLD 효소 자체에 대한 영향을 체계적으로 검증하는 데에는 한계가 있었다. 즉 spermine의 영향이 미토콘드리아 세포막의 변형이나 또는  $Ca^{2+}$  수송 등의 변화에 기인한 것인지의 여부는 배제시키지 못하였다. 본 실험에서는 이들 문제점들을 극복하기 위해 정제된 양배추 PLD를 효소원으로 사용하였으며 PLD 활성 측정도 두 가지 다른 방법을 동원하였다. 이 실험결과 식물 PLD의 활성도 spermine 같은 양이온성 polyamine에 의해 활성화됨을 확인할 수 있었으며 가능한 활성화 메커니즘을 고찰하였다.

## 실험

**시약 및 기기.** 달걀 phosphatidylcholine(PC), spermine, polylysine, polyhistidine, 1,4-Piperazinediethanesulfonic acid(PIPES), 2-[morpholino] ethane sulfonic acid(MES), sodium dodecyl sulfate(SDS) 등은 Sigma 회사(U.S.A.)로부터 구입하였다. Spermine은 Fluka(Japan) 제품이며, octyl-sepharose CL-4B은 Pharmacia Biotech(Sweden)

것을 사용하였다. 1,2-di[1-<sup>14</sup>C]palmitoyl-L-3-phosphatidylcholine은 lysophosphatidylcholine과 1,2-di[1-<sup>14</sup>C]palmitic acid(N-EN제품)로부터 합성하였다. 자동 pH-stat 기기는 Metrohm 회사의 718 titroprocessor를 사용했다.

**양배추 포스파리파제 D정제.** 양배추 PLD는 Lee와 Choi 방법에 따라 정제하였다. PLD의 아세톤 가루는 사보이 양배추 속의 노랑 잎을 갈아서 얻은 주스를 55°C로 열처리한 후 윗 말국을 냉동 아세톤에 넣어 양금으로 얻었다. 냉동 건조된 이 아세톤 가루를 octylsepharose CL-4B column에 통과시켜 약 400배의 순도로 정제하였다. 이 소수성 칼럼은 30 mL PIPES (pH 6.2) 완충용액으로 평형시켰으며 PLD는  $Ca^{2+}$ 의 농도를 변화시키면서 용출시켰다. SDS/PAGE 상에서 정제된 PLD는 가장 큰 단일 띠로 나타났다.

**PLD 활성측정.** pH-stat 방법은 PLD에 의해 마지막 에스터 결합의 choline이 가수분해되어 생성된 PA의 산성을 NaOH로 적정하여 정량하였다. PLD 기질인 PC는 small unilamellar vesicles(SUV) 형태로 얻어 사용하였다. PC SUV는 달걀 PC 25 mg을 질소가스로 완전히 말린 후 4 mL의 증류수를 넣고 probe type sonicator로 4°C에서 1 시간동안 sonication시켜 만들었다. SUV를 형성하지 못한 잔여 PC는 40,000×g로 20분간 원심 분리하여 제거하였다. 이렇게 얻어진 PC SUV 8 mM을 1 mM MES(pH 7.0) 완충용액과 10 mM  $CaCl_2$ 를 포함하는 4 mL의 반응 혼합물에 넣어 30°C에서 반응시켰다. 효소 반응은 PLD를 넣는 것으로 시작하였으며 생성되는 PA는 시간에 따른 NaOH의 적정량으로 결정하였다. 대개의 경우 초기 300초간의 NaOH 적정량을 기준으로 PA농도를 추정하였다.

방사성 동위원소로 표지된 1,2-di[1-<sup>14</sup>C] palmitoyl-L-3-phosphatidylcholine을 이용한 PLD 활성측정은 PC/SDS 혼합미셀체에서 수행하였다. PC/SDS 혼합미셀은 PC: SDS의 비를 2:1로 하였으며 chloroform에 녹인 PC와 methanol에 녹인 SDS를 함께 질소 가스로 말린 후 MES 완충용액을 넣고 sonication하여 만들었다. 최종 반응 용액 50  $\mu$ L에는 4 mM 달걀 PC, 0.1  $\mu$ Ci 1,2-di[1-<sup>14</sup>C] palmitoyl-L-3-phosphatidylcholine, 2 mM SDS, 1  $\mu$ g 양배추 PLD와 20 mM  $CaCl_2$ 가 포함되었다. 반응은 효소 첨가로부터 시작하였으며 37°C 15분간 반응시켰다. 반응은 200  $\mu$ L chloroform/methanol/1N HCl (100:50:3, v/v/v)로 종결시켰으며 150  $\mu$ L 0.1 M KCl를 첨가한 후 원심분리하여 유기층을 얻었다. 유기층을 말

려 얻은 지질들은 TLC(Merck사 제품: Silia gel 60 F<sub>250</sub>) 위에 전개하여 분리하였다. 전개용매 조성은 ethylacetate/iso-octane/acetic acid/water(13:2:3:10, v/v/v/v)였으며 요오드 증기로 전개된 인지질을 식별하였다. 생성물질인 PA 부분은 콤팩트 liquid scintillation counter(Wallac 1409)로 그 방사능을 측정하였다. 모든 측정값들은 반복하여 얻었으며 평균값을 결과로 취하였다.

## 결과 및 고찰

**pH-stat에 의한 PLD 활성도 측정.** PLD의 활성도 측정방법으로는 분광학적 방법, pH 적정법, 방사성 동위원소법 등이 이용되고 있다. 본 연구에서는 외부의 첨가물질 특히 색소의 영향을 받지 않는 pH 적정법을 정제된 양배추 PLD에 적용하였다. 그리고 가능한 생체 조건과 유사한 기질상태를 유지하기 위해 PC SUV를 이용하였다. 양배추 PLD의 효소특성은 PC SUV를 기질로 하였을 때 최적 pH는 7.0-7.2 사이로 밝혀졌으며(Fig. 1A), Ca<sup>2+</sup>농도는 10 mM 일 때 가장 높게 나타났다(Fig. 1B). 기질농도에 대한 PLD 활성도를 PC SUV 0.2 mM ~ 8.0 mM 사이에서 측정한 결과 Michaelis-Menten 형태의 hyperbolic curve를 얻었으며(Fig. 1C), Lineweaver-Burk Plot에 의해 결정된 V<sub>max</sub>는 0.13  $\mu$ mol/min이며, K<sub>m</sub> 값은 0.82 mM이었다. PLD의 활성은 초기기울기를 기준으로 NaOH량으로부터 측정하였다. PC/SDS mixed micellar system인 경우 K<sub>m</sub>값이 2.04 mM로 보고된 바 있어<sup>16</sup> 기질로 PC SUV를 사용한 경우가 효소와 기질 사이의 친화력 측면에서 더 유리함을 알 수 있었다. Fig. 1의 실험조건 하에서 각종 polyamine들이 PLD에 미치는 영향을 살폈다.

**Spermine의 영향.** 재현성 있는 결과를 얻기 위해 PLD 활성에 의한 NaOH 소비량을 600초간 측정한 후 spermine을 넣고 다시 600초를 더 측정하였다(Fig. 2A). PLD 활성화 정도는 spermine을 넣기 전과 후의 초기기울기를 비교하여 추정하였다(Fig. 2B). Spermine의 농도가 1 mM일 때 PLD의 활성이 약 4배 증가하였으며 spermine의 PLD 활성화 영향은 검토된 2 mM 까지 지속되었다. 쥐 뇌 미토콘드리아 분획의 PLD 경우 1 mM spermine에 의해 비슷한 정도의 활성화가 보고 되었다.<sup>15</sup> 이 결과는 동물 PLD와 마찬가지로 식물 PLD도 spermine에 의해 활성화됨을 보여주고 있다. 더 나아가 양배추 PLD의 활성화는 쥐 뇌의 PLD와는 달리 정제된 상태

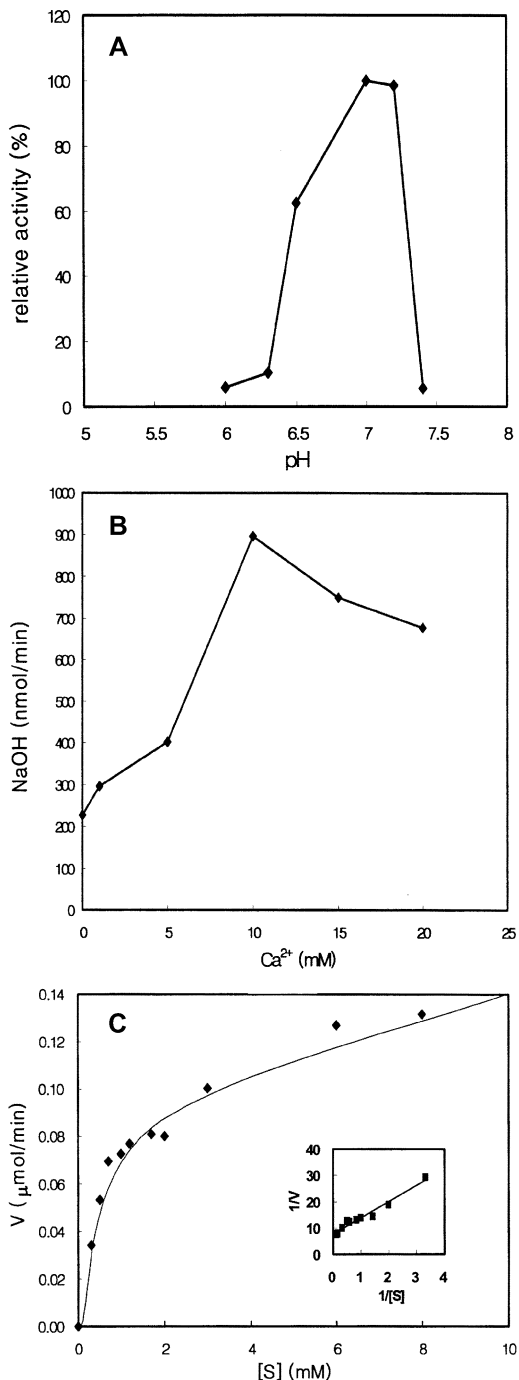


Fig. 1. Characterization of cabbage PLD by pH-stat method. PC SUV was used as a substrate and product PA was determined by titration with NaOH at 30 °C. A. Effect of pH on the PLD activity; B. Effect of calcium on the PLD activity; C. Effect of PC SUV concentration on the PLD activity.

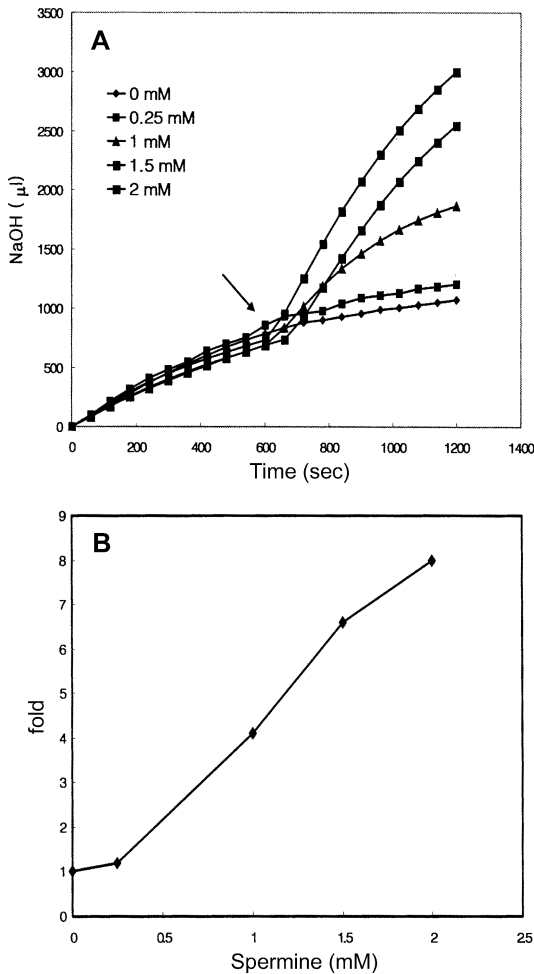


Fig. 2. Effect of spermine on the cabbage PLD activity. A. Traces of titration curve of PLD activity before and after addition of spermine. Arrow indicates the addition time of spermine; B. Activational effect of spermine expressed by enhanced fold. The initial slope of PLD activity obtained after spermine addition was compared to that of blank PLD activity without spermine.

의 PLD를 효소원으로 사용하였기 때문에 spermine의 영향이 효소자체 또는 PC SUV와의 상호작용에 의한 것으로 국한시킬 수 있다.

**Cationic polypeptide 및 monoamine의 영향.** Spermine과 같이 아민기를 가지고 있는 염기성 아미노산의 축합체인 polylysine은 중성수용액에서 양전하를 띠고 있다. 동물 PLD에서와 같이 polylysine의 PLD 활성화 효과를 양배추 PLD에서도 검토하였다(Fig. 3A). 기대한 대로 polylysine(5 kD)은 양배추 PLD를 3.12 mg/mL(0.062

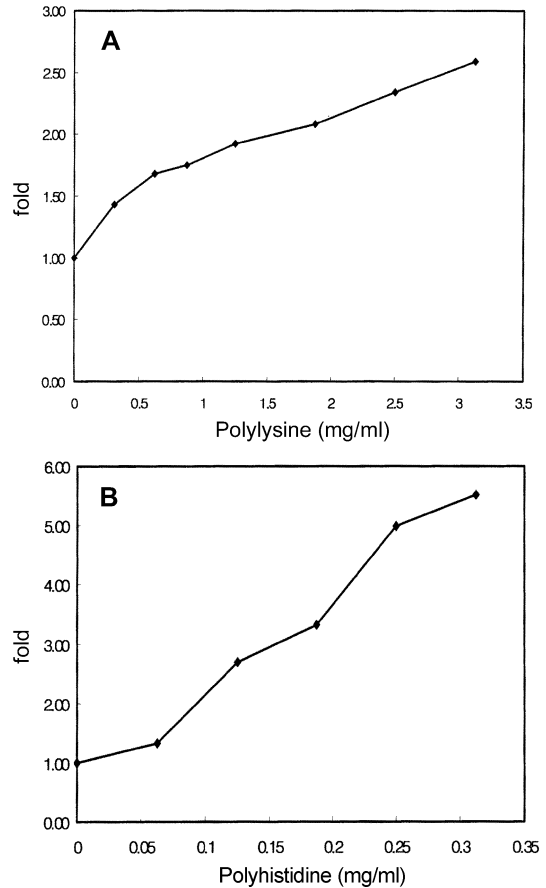


Fig. 3. Effect of cationic polypeptides on the cabbage PLD activity. Activational effect of polypeptides was expressed by comparing the initial slope of PLD activity before and after addition of the polypeptide. A. Polylysine (5 kD); B. Polyhistidine (5 kD).

mM) 농도에서 약 2.6배 활성화시켰다. 다른 양이온성 polypeptide인 polyhistidine(5 kD)의 경우도 0.312 mg/ml (0.062 mM) 조건에서 약 5.5배의 활성화 효과를 보여주었다(Fig. 3B). 겉보기로 단위분자당 polyhistidine의 효과가 polylysine의 것보다 대략 20배 정도 더 효과적 인 것처럼 보인다. 이들 polypeptide들은 bovine pulmonary artery endothelial cell의 PLD의 활성화자로도 보고되어 있다.<sup>18</sup> 양배추 PLD 활성화 현상을 각 polypeptide에 대응하는 monomer를 가지고 그 활성화 정도를 검토해 보았다(Table 1). 양배추의 PLD는 1.0 mM lysine에 의해서는 1.8배, 5.0 mM 경우에는 2.8배의 활성화 효과를 보여주었다. 뇌 미토콘드리아 PLD의 경우 lysine은 활성화 효과가 없었다.<sup>15</sup> 아미노산 분자를 기준으로 polylysine

Table 1. Effects of basic amino acid and monoamine on the cabbage PLD activity

Amino acid/monoamine		Activation (fold)
Lysine	1.0 mM	1.8
	5.0 mM	2.8
Histidine	0.1 mM	1.8
	0.5 mM	3.2
<hr/>		
Histamine	0.1 mM	3.1
	0.5 mM	4.2
Serotonine	1.0 mM	2.8
	5.0 mM	4.2

과 lysine을 비교하면 lysine의 활성화 효과가 약 4배가량 더 효율적인 것으로 나타났다. Histidine의 경우 0.5 mM일 때 3.2배의 활성화 효과를 보여주어 polyhistidine 경우처럼 lysine보다 훨씬 더(10배 이상) 활성화 효과가 있음을 보여주고 있다. Histamine의 경우는 histidine 보다 효과가 더 있었으며 또 다른 monoamine인 serotonin 도 어느 정도 활성화 효과를 보여주었다.

**PC-SDS mixed micellar system에서의 polyamine 영향.** Polyamine의 양배추에 대한 활성화 효과를 방사성 동위원소로 표지된 PC를 사용하여 PC/SDS 혼합미셀계에서 검토하였다. 이 PC/SDS 혼합미셀계는 계면 활성제인 SDS를 포함하고 있기 때문에 그 생성과정이 PC SUV를 만드는 것보다 간단하다. 이런 간편성과 재현성의 장점을 이용해 steady-state kinetics를 여러 polylysine 농도에서 수행하였다(Fig. 4). 이 실험에서 spermine과 polylysine이외에 단순한 아민인 ethylamine과 ethylenediamine도 검토하였다.  $k_{cat}$ 에 대한 각 polyamine의 영향은 초기기울기로부터 구하였다(Table 2). 이 방법에 의한 polyamine들의 PLD 활성화 효과는 ethylenediamine, spermine, polylysine 순서로 증가되었으며, 농도를 기준으로만 비교하면 polylysine은 spermine 보다 22배가량 더 효과적으로 PLD를 활성화시켰다. Ethylamine의 경우 PLD에 대한 활성화 효과가 관찰되지 않아 Table 2에 수록하지 않았다.

**활성화 메커니즘 고찰.** Polyamine은 polycationic 물질로 단백질이나 세포막 표면의 anionic sites에 정전기적으로 상호작용을 하므로써 단백질의 구조나 세포막의 표면전하의 변화를 유도할 수 있다.<sup>19</sup> Polyamine의 영향을 받고 있는 효소로는 phospholipase C와 insulin

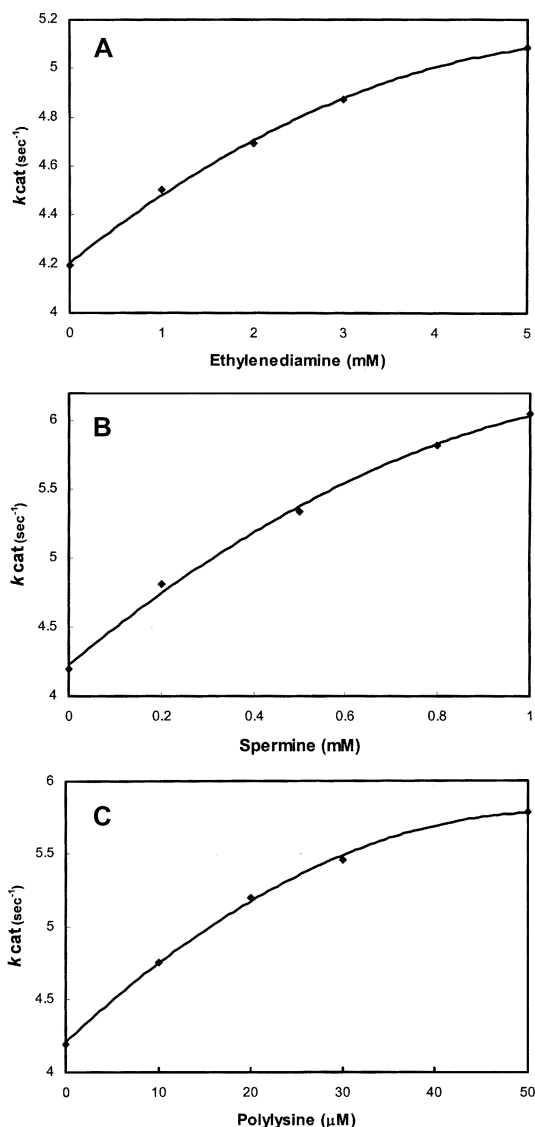


Fig. 4. Effect of various amines on the  $k_{cat}$  of cabbage PLD determined by PC/SDS mixed micellar system at 37 °C. A. Ethylenediamine; B. Spermine; C. Polylysine (5 kD).

Table 2. Effect of polyamines on the  $k_{cat}$  of cabbage PLD determined by PC/SDS mixed micellar system

Dependence of $k_{cat}$ on polyamine ( $k_{cat}/\text{mM}$ )	
Ethylenediamine	0.175
Spermine	2.32
Polylysine (5kD)	51.0

receptor kinase 등이 보고되었고,<sup>20,21</sup> 대표적인 세포막 변화 현상은 미토콘드리아 inner membrane permeability

transition을 막아주는 것으로 알려져 있다.<sup>22</sup> 그 외 potassium channel kir 2.1를 spermine이 막는다는 보고도 있다.<sup>23</sup> 본 실험에서 관찰된 양배추 PLD에 대한 polyamine 활성화 영향은 다음의 두 가지 제안이 가능하다. 첫째는 polyamine이 효소단백질에 직접 작용하여 효소 활성을 증가시키는 것이고, 두 번째는 기질인 PC에 작용해 PLD와 기질 복합체 형성에 좀 더 유리한 형태를 제공하도록 하는 것이다. 이 가능성 중 효소와 기질사이의 복합체 형성에 영향을 줄 가능성이 높다. 이러한 예측은 최근 구조가 밝혀진 박테리아(*Streptomyces* sp. stain PMF) PLD에서 기질이 결합되는 활성부위(HKD motif)의 aspartate residue의 음이온이 기질의 음이온과 상호작용의 가능성을 제시한 바 있다.<sup>24</sup> 이 경우 polyamine 같은 양전하를 갖는 물질이 기질의 phosphate 음이온을 잠정적으로 중화시킬 가능성을 생각할 수 있다. 흥미 있는 현상은 현재 PLD를 활성화 시키고 있는 lysine과 histidine은 활성부위를 구성하고 있는 염기성 아미노산들이라는 점이다. 물론 현재의 결과는 결정적인 단서를 제공해 주지 못하기 때문에 spermine 존재 하에서의 단백질의 구조변화나 더 철저한 kinetics의 수행이 필요하다.

본 연구는 2002년도 덕성여자대학교 자연과학연구소 연구지원비에 의하여 이루어졌으며 pH-stat 적정법에 의한 실험은 손영신의 석사학위 논문의 일환으로 수행되었다. 방사성 동위원소를 이용한 실험은 서울대 화학부의 이진환의 도움을 받았다.

## 인 용 문 헌

1. Heller, M. *Adv. Lipid Res.* **1978**, 16, 267.
2. Wang, X.; Xu, L.; Zheng, L. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 20312.
3. Kim, D.-U.; Roh, T.-Y.; Lee, J.; Noh, J.-Y.; Jang, Y.-J.; Hoe, K.-L.; Yoo, H.-S.; Choi, M.-U. *Biochim. Biophys.*

- Acta* **1999**, 1437, 409.
4. Munnik, T.; Irvine, R. F.; Musgrave, A. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1389, 222.
5. Kent, C. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, 64, 315.
6. Fan, L.; Zheng, S.; Wang, X. *Plant Cell*, **1997**, 9, 2183.
7. Lee, S.; Suh, S.; Kim, S.; Crain, R. C.; Kwak, J. M.; Nam, H. G.; Lee, Y. *Plant J.* **1997**, 12, 547.
8. Zien, C. A.; Wang, C.; Wang, X.; Welti, R. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, 1530, 236.
9. Young, S. A.; Wang, X.; Leach, J. E. *Plant Cell*, **1996**, 8, 1079.
10. Voisine, R.; Vezina, L.; Willemot, C. *Plant Physiol.* **1993**, 102, 213.
11. Ryu, S. B.; Karlsson, B. H.; Ozgen, M.; Palta, J. P. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, 94, 12717.
12. Dittrich, N.; Haftendorn, R.; Ulbrich-Hofmann, R. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1391, 265.
13. Teti, D.; Visalli, M.; McNair, H. *J. Chromatography B* **2002**, 781, 107.
14. Coburn, R. F.; Jones, D. H.; Morgan, C. P.; Baron, C. B.; Cockcroft, S. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1584, 20.
15. Koh, E.-H. *J. Korean Chem. Soc.* **2000**, 44, 448.
16. Lee, J.; Choi, M.-U. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1996**, 17, 905.
17. Lee, C. H.; Choi, M.-U. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1984**, 5, 154.
18. Vepa, S.; Scribner, W. M.; Natarajan, V. *Am. J. Physiol.* **1997**, 27, 2608.
19. Bashford, C. L.; Alder, G. M.; Graham, J. M.; Menestrina, G.; Pasternak, C. A. *J. Membrane Biol.* **1988**, 103, 79.
20. Eichberg, J.; Zetisky, W.; Bell, M. E.; Cavanagh, E. *J. Neurochem.* **1981**, 36, 1868.
21. Haber, M. T.; Fukui, T.; Lebowitz, M. S.; Lowenstein, J. M. *Arch. Biochem. Biophys.* **1991**, 288, 243.
22. Tassani, V.; Bibom, C.; Toniello, A.; Siliprandi, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, 1348, 265.
23. Xie, L. H.; John, S. A.; Weiss, J. N. *J. Gen. Physiol.* **2002**, 120, 53.
24. Leiros, I.; Secundo, F.; Zambonelli, C.; Servi, S.; Hough, E. *Structure*, **2000**, 8, 655.