

연한흰갯구멍버섯(*Tyromyces chioneus*) 리보뉴클레아제의 몇가지 물리화학적특성

김승익, 류만석, 리호남

위대한 수령 김일성 동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《생물학연구에서 무엇보다도 중요한것은 지금 있는 자연부원을 효과적으로 리용할수 있게 하는것입니다.》(《김일성전집》 제37권 451페이지)

리보뉴클레아제(RN아제)는 리보핵산물작용분해효소로서 생체내의 핵산대사연구와 유전자공학연구에서 중요한 역할을 하며 항종양작용을 가지는것으로 하여 의학부문에서 주목되고있는 효소이다.[1-8]

우리는 연한흰갯구멍버섯에서 분리정제한 새로운 RN아제의 물리화학적특성을 밝히기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

실험재료로는 연한흰갯구멍버섯에서 분리정제한 리보뉴클레아제를 리용하였다.

실험기구로는 고속원심분리기(《Centrifuge 5424》), 항온수욕조(《XO-20》), 자외선분광광도계(《LabTech, UV-200》), pH미터(《Orion》)를 리용하였다.

새로운 리보뉴클레아제의 물리화학적특성지표로서 최적pH와 pH안정성, 최적온도와 열안정성, 금속이온의 영향, 올리고리보뉴클레오타이드에 대한 물작용분해특성을 검토하였다.

최적pH와 pH안정성은 다음과 같이 결정하였다.

각이한 pH의 0.1mol/L 초산완충액, Tris-염산완충액, 중탄산완충액에서 연한흰갯구멍버섯RN아제의 활성을 측정하였다. 활성이 가장 높은 pH값을 최적pH로 정하였다.

pH안정성은 각이한 pH의 초산완충액, Tris-염산완충액, 중탄산완충액에 연한흰갯구멍버섯RN아제를 넣고 30℃에서 60min 놓아두었다가 최적pH로 맞춘 다음 리보뉴클레아제의 활성을 측정하고 활성이 최대에 유지되는 구간을 pH안정성구간으로 보았다.

최적온도는 다음과 같이 결정하였다.

연한흰갯구멍버섯RN아제를 최적pH조건에서 각이한 온도(4, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90℃)에서 반응시킨 후 활성을 측정하고 활성이 가장 높이 나타나는 온도를 최적온도로 정하였다.

열안정성을 결정하기 위해 분리정제한 리보뉴클레아제를 각이한 온도에서 60min 놓아두었다가 60℃에서 효소활성을 측정하였으며 0℃에서 보관한 리보뉴클레아제의 활성을 100%로 보고 열안정성그래프를 작성하였다.

효소의 활성에 미치는 금속이온의 영향을 알아보기 위하여 각이한 농도(1, 10, 20mmol/L)의 KCl, CoCl₂, MgCl₂, CaCl₂, ZnCl₂, HgCl₂, MnCl₂, CuSO₄, FeSO₄, AlCl₃용액에 정제한 효소를 4℃에서 1h 놓아두었다가 각각 활성을 측정하였다. 금속이온을 처리하지 않은 대조구의 효

소활성을 100%로 보고 각종 금속이온처리후의 상대효소활성을 계산하였다.

인공적으로 합성한 올리고리보뉴클레오티드에 대한 물작용분해특성은 10mg/mL의 poly A와 poly C 10 μ L를 각각 tRNA대신 반응기질로 첨가하고 연한흰갯구멍버섯RN아제를 넣어 반응시킨 후 poly A구는 260nm, poly C구는 280nm에서 흡광도를 측정하여 분해특성을 검토하였다.

리보뉴클레아제의 활성은 다음과 같이 측정하였다.

5 μ L의 효소용액을 0.1mol/L 초산완충액(pH 4.4) 135 μ L에 넣고 10mg/mL 효모tRNA 10 μ L를 첨가하였다. 잘 혼합하여 37°C수욕조에서 15min동안 반응시키고 3.7% 과염소산 350 μ L를 넣어 반응을 중지시켰다. 12 000r/min에서 15min동안 원심분리하고 상청액을 취하여 260nm에서 흡광도를 측정하였다. 우의 반응조건에서 1min동안에 A_{260} 값을 0.1만큼 변화시키는 효소의 양을 1단위(U)로 정하였다.

결과 및 고찰

연한흰갯구멍버섯RN아제의 최적pH와 pH안정성 각이한 pH의 완충액에서 연한흰갯구멍버섯RN아제의 활성을 측정한 결과는 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 pH 3.8~4.4부근에서 연한흰갯구멍버섯RN아제의 활성은 가장 높으며 pH 6이상에서는 활성이 대단히 낮았다. pH 3.5~4.5범위에서 비교적 활성이 높았으므로 이 효소는 일종의 산성RN아제라는것을 알수 있다.

각이한 pH의 완충액(초산완충액, Tris-염산완충액, 중탄산완충액)에 분리정제한 RN아제를 넣고 30°C에서 60min동안 놓아두었다가 pH를 4.4로 조절한 다음 리보뉴클레아제의 활성을 측정한 결과는 그림 2와 같다.

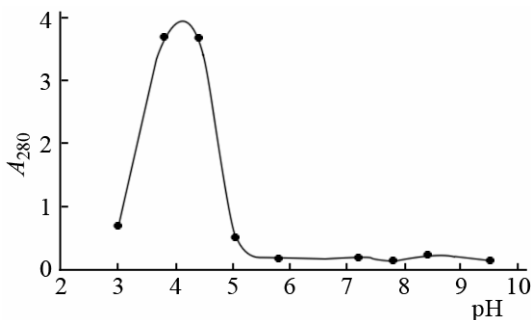


그림 1. pH에 따르는 연한흰갯구멍버섯RN아제의 활성

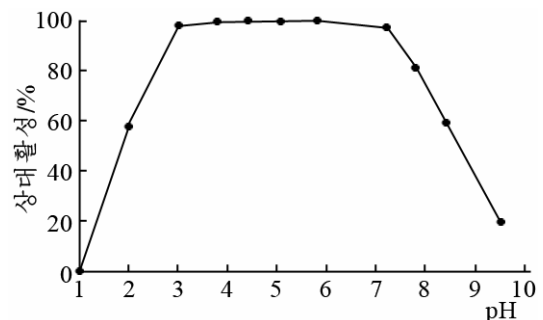


그림 2. 연한흰갯구멍버섯RN아제의 pH안정성

그림 2에서 보는바와 같이 분리정제한 RN아제는 pH 3~7구간에서 60min동안 방치하여도 활성을 100%로 유지하였으며 pH 2이하, pH 9이상에서는 활성이 급격히 떨어졌다. 이로 부터 연한흰갯구멍버섯RN아제는 pH 3~7구간에서 안정하게 작용할수 있다는것을 알수 있다.

연한흰갯구멍버섯RN아제의 최적온도와 열안정성 pH 4.4의 초산완충액에 들어있는 연한흰갯구멍버섯RN아제의 활성을 4~90°C의 각이한 온도에서 측정한 결과는 그림 3과 같다.

그림 3에서 보는바와 같이 연한흰갯구멍버섯RN아제의 활성은 60°C에서 제일 높았으며 그 이상의 온도에서는 활성이 급격히 감소하였다. 이것은 연한흰갯구멍버섯RN아제의

최적온도가 다른 기원의 RN아제들과 별로 차이가 없다는 것을 보여준다.

연한흰갯구멍버섯 RN아제를 각이한 온도에서 60min 동안 처리하고 효소활성을 측정한 결과는 그림 4와 같다.

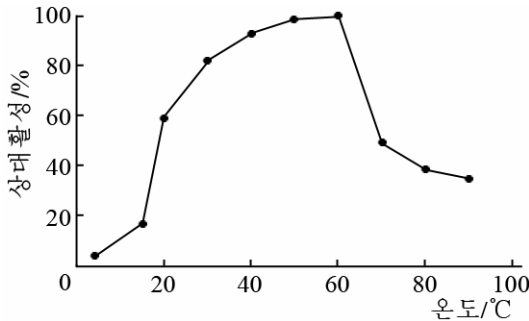


그림 3. 온도에 따르는 연한흰갯구멍버섯 RN아제의 활성

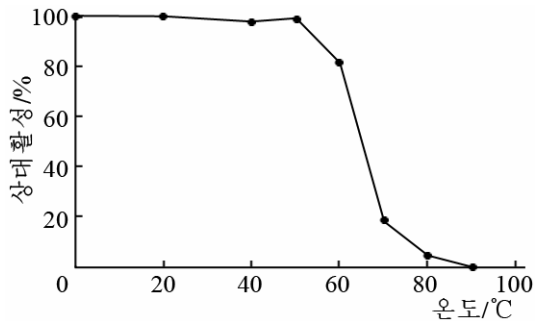


그림 4. 연한흰갯구멍버섯 RN아제의 열안정성

그림 4에서 보는바와 같이 연한흰갯구멍버섯 RN아제는 50°C까지의 처리온도에서는 상당히 안정하며 60°C에서는 초기 효소활성의 80%가 유지되었고 그보다 높은 온도에서는 활성이 급격히 감소되었다.

연한흰갯구멍버섯 RN아제의 활성에 미치는 금속이온의 영향 각이한 금속이온이 연한흰갯구멍버섯 RN아제의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 표 1과 같다.

표 1에서 보는바와 같이 대부분의 금속이온은 연한흰갯구멍버섯 RN아제의 활성을 일정한 정도로 억제하였다. K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} 의 억제작용이 비교적 약하며 특히 K^+ 은 비교적 낮은 농도에서 효소의 활성에 거의 영향을 주지 않았으나 높은 농도(10mmol/L 이상)에서는 일정한 정도로 영향을 주었다. Al^{3+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} 의 억제작용이 가장 세다. 특히 Al^{3+} , Hg^{2+} 은 10mmol/L 농도에서 효소활성을 각각 92.4, 93.7% 억제하며 20mmol/L에서는 효소활성을 완전히 억제하였다.

표 1. 연한흰갯구멍버섯 RN아제 활성에 미치는 금속이온의 영향

금속이온	RN아제의 상대활성/%		
	1mmol/L	10mmol/L	20mmol/L
대조	100.0	100.0	100.0
K^+	98.7	75.4	68.2
Mg^{2+}	64.3	58.3	57.5
Ca^{2+}	61.2	46.9	43.2
Mn^{2+}	39.8	38.9	24.6
Cu^{2+}	22.5	11.5	5.8
Zn^{2+}	75.4	37.5	13.4
Hg^{2+}	18.6	6.3	0
Co^{2+}	32.6	28.6	24.6
Fe^{2+}	35.8	15.4	13.9
Al^{3+}	43.2	7.6	0

연한흰갯구멍버섯 RN아제의 합성올리고리보뉴클레오타이드에 대한 물작용분해특성 연한흰갯구멍버섯 RN아제의 합성올리고리보뉴클레오타이드에 대한 물작용분해활성을 측정한 결과는 표 2와 같다.

표 2. 분리정제한 RN아제의 올리고리보뉴클레오타이드분해활성

합성올리고리보뉴클레오타이드	분해활성
Poly A	대조구 0.056(A_{260})
	시험구 0.220(A_{260})
Poly C	대조구 0.045(A_{280})
	시험구 0.100(A_{280})

표 2에서 보는바와 같이 분리정제한 리보뉴클레아제는 Poly A, Poly C에 대한 물작용분해활성을 일정한 정도로 나타냈으며 Poly A에 대한 물작용분해활성이 Poly C분해활성보다 더 높았다.

맺 는 말

- 1) 연한흰갯구멍버섯RN아제는 일종의 산성효소로서 최적pH는 4.4이며 pH 3~7구간에 서 안정하게 작용할수 있다.
- 2) 연한흰갯구멍버섯RN아제의 최적온도는 60°C이며 50°C이하의 온도에서 비교적 안정하다.
- 3) 대부분의 금속이온은 연한흰갯구멍버섯RN아제의 활성을 일정한 정도로 저해하며 Al^{3+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} 의 저해작용은 대단히 강하다.
- 4) 연한흰갯구멍버섯RN아제는 Poly A, Poly C에 대하여 일정한 물작용분해활성을 가진다.

참 고 문 헌

- [1] D. L. Dewi et al.; Int. J. Mol. Med., 29, 6, 1060, 2012.
- [2] H. Kobayashi et al.; Biosci. Biotechnol. Biochem., 67, 10, 2307, 2003.
- [3] T. B. Ng et al.; Peptides, 25, 8, 1365, 2004.
- [4] P. H. Ngai et al.; Peptides, 25, 1, 11, 2004.
- [5] S. V. Chodge et al.; Biochemistry, 54, 2911, 2014.
- [6] 张哲 等; 食用菌, 6, 8, 2009.
- [7] 卯晓岚; 中国大型真菌, 河南科学技术出版社, 434~435, 2000.
- [8] 李淼 等; 中国食用菌, 32, 2, 28, 2013.

주체108(2019)년 4월 5일 원고접수

Characterization of Ribonuclease from *Tyromyces chioneus*

Kim Sung Ik, Ryu Man Sok and Ri Ho Nam

A novel ribonuclease(RNase) derived from dry fruiting bodies of *Tyromyces chioneus* is a certain acidic nuclease with optimal pH of 4.4, which is stable in pH range from 3 to 7. Optimal temperature of this enzyme is about 60°C and this enzyme is stable below 50°C. The activity of this RNase is inhibited by a majority of metal ions tested, especially Al^{3+} , Hg^{2+} and Cu^{2+} . This enzyme has low ribonucleolytic activity against polyhomoribonucleotides (Poly A, Poly C).

Key words: *Tyromyces chioneus*, ribonuclease, characterization