

## *Klebsiella aerogenes* ATCC 10031의 카드뮴 해독기작

이기성 · 유순애 · 객인영<sup>1</sup> · 박영식<sup>2</sup> · 최영길<sup>2</sup>

배재대학교 생물학과, <sup>1</sup>유전공학과

<sup>2</sup>한양대학교 자연과학대학 생물학과

## Cadmium Detoxification Mechanism in *Klebsiella aerogenes* ATCC 10031

Lee, Ki-Sung, Soon-Ae Yoo, In-Young Kwak<sup>1</sup>, Young-Sik Park<sup>2</sup>,  
and Yong-Keel Choi<sup>2</sup>

Department of Biology, PAI-CHAI University, Dae-jeon 302-735, Korea

<sup>1</sup>Department of Genetic Engineering, PAI-CHAI University, Dae-jeon 302-735 Korea

<sup>2</sup>Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

**ABSTRACT:** In order to examine that what kind of system correlated with cadmium detoxification mechanism in *Klebsiella aerogenes* ATCC 10031, we tried to investigate the effect of phosphate upon the detoxification and also elucidate whether the cadmium phosphate and / or polymeric Cd-Pi complex is formed actually in cell or not.

As the results, it was shown that growing pattern had long lag adaptive phase of 12 hr to 24 hr, at the concentrations of 0.02 mM and 0.08 mM cadmium, respectively. Cadmium was accumulated more highly in the fraction of cell wall and membrane than in those of cytoplasm.

In case of phosphate starving cells added cadmium, inorganic polyphosphate system was primarily correlated with Cd-detoxification during the lag phase for the accommodation to cadmium, on the other hand, Cd:Sulfide complex system secondarily correlated it during the stationary phase. These results implied that polyphosphate system and Cd:sulfide complex system, these two systems were operated compensatively each other.

Considering the results observed with EM and examined the changes of sulfide and polyphosphate amount, it was reflected that Cd:S complex was located at the cell surface.

In the results of *in-vivo* <sup>31</sup>P NMR spectra in the cells with cadmium pressure, several phosphate signals arose newly from the polyphosphate region with moving chemical shift of it.

This phenomenon strongly implied the actual existence of Cd:Pi complex and / or Cd:poly-P complex in the cell and also the cellular compartmentalization of cadmium detoxifying mechanism.

**KEY WORDS** □ cadmium, detoxification, Cd:S complex, polymeric Cd:Pi complex *in vivo* <sup>31</sup>P NMR

생물체 특히 조류, 세균, 균주 내에서의 inorganic polyphosphate(무기인산 중합체)의 기능은, energy storage polymer(phosphagen hypothesis, phosphate donor), phosphorous reserve polymer(phosphate pool) (Harold, 1966 ; Kulaev, 1979, 1983)임과 동시에, 주로 energy charge의 조절을 통한 물질대사 과정의 regulator 역할(Kulaev, 1979 ; 이 등, 1985 ; Aiking 등, 1984) 뿐만 아니라, histone DNA complex를 약하게 하여 gene derepression에 관여하고, 핵내의 RNA 합

성과정에 무기인산을 공급하는 기능도 있다(Weinstein과 Li, 1976).

또한 최근에 이르러서는 무기인산 중합체의 세포내 축적과정이 곧 중금속에 대한 detoxification mechanism과 깊은 관련이 있을 것으로 추정된 보고(Aiking 등, 1984) 이외에, 무기인산중합체의 세포내 축적과정은 세포내 인산의 이용 또는 도입형태를 energy-rich compound로 전환시키는 일련의 에너지 효율화 과정으로 표현한 보고가 있었다(이와 최, 1985). 이러한 polypho-

sphate의 다양한 기능 중 중금속에 대한 해독기작(detoxification mechanism)의 규명을 위해서는 보다 분명한 실험적 증거가 필요하다(이런 필요성은 아래에 기술하기로 한다). 많은 생물체들은 중금속 이온(Cd, Ni, Hg, Zn, Cu)에 대하여 여러 종류의 적응(adaptation), 또는 해독(detoxification)기작을 지니고 있다(Gadd와 Griffiths, 1978; Aiking 등, 1982, 1984; Khazaeli와 Mitra, 1981). 즉, 중금속에 대한 내성(해독 또는 적응)을 지닐 수 있는 방법으로는 첫째, 중금속 이온과 결합 침전시킬 수 있는 대사산물의 생성(이를테면 중금속 결합단백질, metallothionein 또는 CdS 복합체 생성에 의한 방법), 둘째, 중금속 이온의 내부 변형에 의한 방법, 즉, 보다 휘발성 화합물로 전환시키거나 원자가를 변형시키는 방법(R plasmid-determined Hg reductase), 셋째, 세포막의 불투과성을 증가시키므로써 중금속의 세포내 도입을 감소시키는 방법 등으로 대별할 수 있다.

이전의 연구에서 중금속 중 Cd에 대한 adaptation and/or detoxification mechanism에 관한 연구 중 Cd 첨가배양시 *E. coli*의 경우 lag phase가 더 길어지면서 특이한 Cd-binding protein의 합성이 유도되므로 가능하다는 보고(Mitra 등, 1975)가 있었던 이래 *Klebsiella aerogenes*의 경우 adaptation period는 *E. coli*의 경우와 유사하지만 adaptation 되어진 후 Cd와 무기 sulfide가 동일한 mole비로 축적되어짐을 관찰하고, 바로 세포내의 불용성 CdS 복합체의 생성이 곧 중금속 Cd에 대한 1차 detoxification mechanism이라고 추정된 보고(Aiking 등, 1982)가 있었으나, 이후 sulfate 제한 조건하에서 즉, sulfide 생성이 거의 불가능한 조건하에서 Cd에 대한 adaptation 여부를 가리는 연구(Aiking 등, 1984)에서는, CdS 생성기작 이외에 Pi accumulation(즉, 무기인산 중합체 합성) 기작이 제 2의 Cd detoxification mechanism이라고 최초로 추정하였다.

중금속(Hg, Cd) 해독작용 방법 중 저추동물(Kojima 등, 1976), 무척추동물과 진핵미생물(Olafson 등, 1979), 조류(Robinson, 1989)에서는 주로 Cd에 특이하게 결합하는 단백질(metallothionein)에 의하여 수행된다. Metallothionein으로 알려진 Cd-binding protein은 저분자량이며 cystein 함량이 높고 방향족 아미노산이 거의 없고, Hg, Zn, Cu 등과 다른 금속에도 친화력이 있는 특징까지 연구되어지고 있다.

그러나, 그 이후 blue-green algae(*Synechococcus* sp.)와 같은 원핵생물에서도 metallothionein의 존재가 보고되었고, 최근에 이르러서는 *E. coli*를 재료로 metallothionein과는 다른 성질을 띠는 Cd-binding protein의 존재가 확인되었지만(Khazaeli 등, 1981), 앞서 언급한 바와 같이 세균류에서는 *Klebsiella aerogenes* 경우처럼 CdS 복합체 형성이나 Pi 축적에 의한 중금속

해독작용도 중요한 것으로 보고되고 있다.

Metallothionein과 같은 Cd-binding protein에 의한 중금속 해독기작을 규명하는 연구에서는 세포질(Cd 축적, 80% 이상), 세포벽(10%), 세포막(4%) 분획에서 원자흡광분광법(Atomic Absorption Spectrometry)에 의한 Cd 정량, EM에 의한 관찰(EM의 상에서 Cd이 dense하게 나타남), Cd-binding protein의 분리방법 등으로 detoxification mechanism을 설명할 수 있었다. 그러나, CdS 또는 Pi 축적기작에 의한 중금속 해독기작을 규명하고자 했던 Aiking 등(1982, 1984)의 연구방법은 즉, 세포전체, 세포질, 세포벽, 세포막, 배양액 등의 분획으로 나누어 Cd와 sulfide를 정량하고, EM의 관찰 등을 통하여 그 기작을 설명하였기 때문에 CdS에 의한 detoxification 작용을 규명하는 데는 무리가 따르지 않았지만, 무기인산 중합체 축적기작에 의한 detoxification 작용을 설명하는 데는 약간의 무리가 따르 추정하는 정도로 설명하였을 뿐이다.

요컨대 본 연구자의 견해로는 Pi 축적(특히, 무기인산 중합체 생성 또는 분해, ortho-P 등의 도입)이 Cd detoxification 기작에 정확히 직접 관여할 경우 Pi 축적 과정에서 Cd와 Pi 결합 과정이 설명되어지거나 Cd : poly-P 복합체의 세포내 존재가 정확히 입증되어야 할 것이다.

따라서, 본 연구는 *Klebsiella aerogenes*의 Cd에 대한 적응, 해독기작에 metallothionein과 같은 중금속 결합단백질, Cd : poly-P complex, CdS complex system 중 어떠한 system이 관여하고 또 어떤 system이 추가되는지를 조사하고자 하였으며, 또한 Cd : poly-P complex의 세포내 존재여부를 확인하고자 하였다.

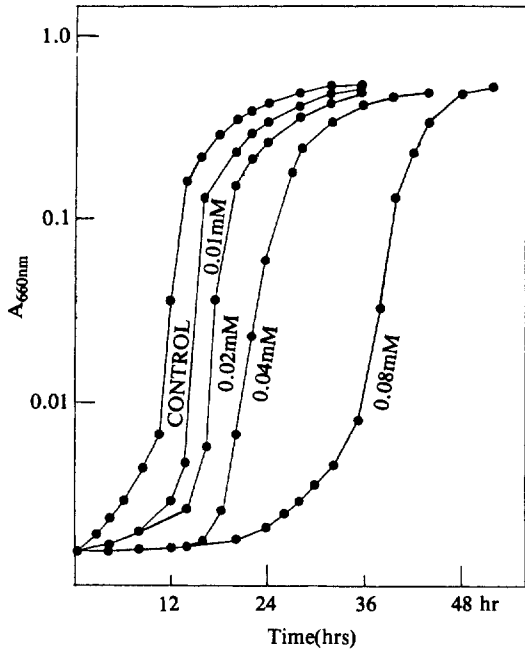
이를 위하여 여러 농도의 Cd 첨가 배양에 따른 long lag phase의 측정, 성장량 변화, 세포분획(전체세포, 세포벽, 세포질)에 존재하는 Cd의 축적정도, 무기인산 중합체의 축적량, inorganic acid-labile sulfide의 정량, SDS-PAGE에 의한 전체 단백질의 분석, 전자 현미경 관찰 및  $^{110}\text{P}$ -in vivo-NMR Spectroscopy를 시행하였다.

## 재료 및 방법

### Poly-P system을 지닌 생물의 선택 및 배양조건

poly-P system을 지닌 생물 중 본 연구실에서 보유한 bacteria 중 *Klebsiella aerogenes* ATCC 10031, ATCC 13883, *Klebsiella pneumoniae*를 대상으로 하여 최적 complex medium(NB)과 Pi 농도를 임의로 변경할 수 있는 synthetic medium(Knopf's 매지 : 이와 최, 1985, 1985, 1985; 윤 등, 1986)으로 나누어 배양했다.

즉, 카보름에 대한 적응, 해독기작에 무기인산의 영향을 조사하기 위하여 본 연구의 재료로 선정된(결과 및 Fig.1 참고) *K. aerogenes* ATCC 10031를 영양 한



**Fig. 1.** The rates of growth of the *Klebsiella aerogenes* in the presence of different concentrations (0.01, 0.02, 0.04, 0.08 mM) of cadmium and in the absence of cadmium (control).

천배지에서 30°C, 24 hr 전배양한 후(-6 hr), starvation 시킬 목적으로 당과 인산이 함유되지 않은 Knopp's minimal medium(s'p)에서 6 hr 생육시킨 후, 카드뮴과 무기인산을 첨가 또는 결핍시킨 Knopp's 최소 배지(s'p', s'p)와 NB 배지에, starvation시킨 세포(s'p)를 각각 접종한 다음, 12시간, 24시간, 48시간 배양되어진 세포들을 적량 수확하여 여러 생화학적 실험, 전자현미경 관찰 등을 위한 생물시료로 사용하였다.

**Cd 농도구배에 대한 상대적 성장 및 viability**

Cd이 함유되지 않은 영양한천 배지 위에서 나타난 colony 수와 정해진 농도구배로 Cd이 함유된 영양한천 배지 위에서 성장한 colony 수의 비로 표시했다.

**Cadmium 분석**

시료를 sonication한 후 원심분리를 하여 얻은 세포벽과 세포막 및 세포질의 분획에 존재하는 Cd의 정량을 AAS(Atomic Absorption Spectrometry : Perkin-Elmer model 403)에 의하여 행했다. 모든 시료는 graphite furnace에 적용하기 전 0.01 M HCl(Merk AG)로 희석하여 2-8 ppb( $\mu\text{g/l}$ ) 사이의 Cd 농도로 조정하여 측정했다(calibration curve의 linear part이므로). 측정조건은 다음과 같다.

drying stage, 30 sec at 100°C : ashing, 20 sec at 350

°C : atomization, 5 sec at 2000°C : cooling, 30 sec

특히 세포전체의 Cd 정량을 위해서는 conc. HCl에서 95°C 40분간 용출시킨 후 식힌 다음, 적절히 희석하여 사용하였다.

**Sulfide 분석**

Aiking 등(1982)이 행한 방법을 기준으로 했다. 세포내 inorganic acid-labile sulfide는 6%(wt/vol) NaOH 용액 0.2-2 ml로 95°C에서 15분간 2번 반응시켜 추출하였다. 그 혼합 추출액을 식힌 후 추출액 0.2 ml을 취하여, 증류수 0.2 ml와 0.25 ml의 2.6%(wt/vol) zinc acetate를 첨가하여 실온에서 심하게 흔들어서 섞는다. 그 다음 5 M HCl 용액에 녹인 0.1%(wt/vol) N,N-dimethyl-p-phenylenediamine monohydrochloride 0.125 ml 첨가 후, 투명해 질 때까지 흔들고, 6 M HCl 용액내에 0.0115 M FeCl<sub>3</sub> 0.05 ml를 첨가하여 1분간 혼합한 다음, 30분간 실온에서 방치한다. 마지막으로 0.425 ml의 증류수를 가하여 혼합한 다음 micro-centrifuge를 이용 12,000 g로 원심분리한다. 시료는 0-20 nmol Na<sub>2</sub>S의 표준곡선을 이용하여 670 nm에서 methylene blue 양으로 측정했다.

**Polyphosphate 분석**

무기인산 중합체의 분석은 이 등(1980, 1981), 이와 최(1985)가 행한 방법대로 분획하여 정량하였다. 즉, Miyachi와 Tamiya(1961)의 방법으로 무기인산 중합체를 분리한 후, 가수분해하여 Fiske와 Subbarow(1925)의 방법으로 정량하였다.

**EM 관찰**

수확된 세포를 원심분리하여 sample을 농축시킨 후 세척하였다. 농축된 세포에 OsO<sub>4</sub>를 처리한 후, 그 현탁액 한 방울을 carbon-coated 400 mesh copper grid에 떨어뜨리고 30초 후 이 grid를 여과지로 blotting하고 증류수로 닦은 다음 건조시켜 직접 TEM(JEOL 1005)에 적용하였다.

**세포내 총단백질의 변화 양상**

각 시험구간의 세포를 원심분리하여 수확한 후 0.1 M NaCl, 1% Triton X-100을 가하여 sonication한 후 Laemmli(1970) 방법에 따라 전기영동하였다.

완충용액은 0.25 M Tris-glycine buffer(pH 8.3)을 사용하였고 stacking gel은 3%, separation gel은 8%로 조제하여 prerunning(80 Volt)한 후 Tris-HCl buffer (pH 8.6)에 1% Sodium dodesyl sulfate, Glycerol, 2-Mercaptoethanol, Bromophenol blue을 가한 시료를 150 Volt로 전기영동하였다. Polypeptide 발색은 Coomassie brilliant blue(R-250)를 사용하였다.

**<sup>31</sup>P-NMR Spectroscopy**

Cd : Poly-P 복합체의 실체를 조사하기 위해 Cd 처리 배양세포와 비처리 배양세포에 대한 whole cell의 <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy를 시행하였다. 이를 위한 연구방법은 시료를 NMR로 측정하기 전에 2 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

용액으로 세척한 후 0.4 ml PCV/ml(total vol. 5 ml)의 밀도에서 20 mM HEPES-KOH buffer(pH 7.6)에 재현탁하였다. <sup>31</sup>P-NMR spectra(Bruker AM 300 spectrometer)는 121.5 MHz에서 pulsed Fourier transform (FT) mode로 측정하였다. 화학적 변화(chemical shift)는 85% phosphoric acid의 상대적인 ppm으로 나타내었다.

**결과 및 고찰**

**배양조건 및 Cd pressure**

Cd 첨가 배양에 따른 adaptation period와 성장곡선의 변화 그리고 Cd의 세포내 축적을 조사하기 위하여 영양양체(NB) 배지 및 영양한천배지에서 CdCl<sub>2</sub>를 2배 농도구배법으로 첨가하여(0.01-0.64 mM), 3균주를 대상으로 배양 실험하였다. 그 결과 *K. aerogenes* ATCC 10031은 0.16 mM, *K. aerogenes* ATCC 13883은 0.08 mM, *K. pneumoniae*는 0.16 mM, 카드뮴 농도에서 모두 viability를 잃었다(data not shown). 그람음성균으로서 *K. aerogenes* ATCC 10031를 본 연구의 실험재료로 사용하였고, 카드뮴 최대 처리농도는 0.08 mM로 정하였다.

**성장곡선 변화 및 adaptation period**

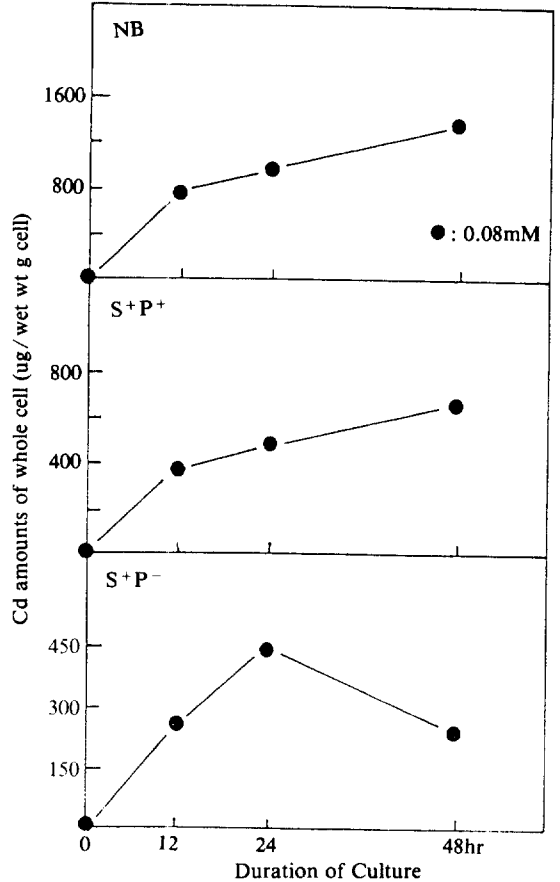
일련의 카드뮴 처리농도에 따른 *K. aerogenes* ATCC 10031의 성장율은 배지에 카드뮴 처리농도를 높게 처리할수록 long lag phase를 보이며, long lag phase를 통해서 카드뮴에 adaptation 되어진 세포는 다시 생장되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig.1). 즉 *K. aerogenes*의 경우 카드뮴을 0.02 mM 처리한 배지에서는 12시간, 0.08 mM 농도배지에서는 24시간 정도의 적응기가, 정상적인 성장을 위해 필요하다는 것이 관찰되었다. 이와 같은 카드뮴에 대한 적응기작은 *E. coli*의 경우 카드뮴의 영향으로 세포내 DNA의 brakeage가 일어나, DNA repair system이 exponential phase를 이루기 전에 먼저 유도되어야 하고, Cd-binding components의 생성이 유도되므로서 가능한 것이다(Mitra와 Berenstein, 1978, Khzaeli와 Mitra, 1981)는 보문과 유관하다.

따라서 본 연구대상 균주의 카드뮴에 대한 적응해독과정에는 어떠한 system이 주가 되는지를 조사하고자 poly-P, sulfide, metallothionein과 같은 Cd-binding components 등을 다음과 같이 분석한 것이다.

**세포내 카드뮴 축적량 변화**

*K. aerogenes*의 경우, 전체 세포에 축적된 카드뮴의 양은 무기인산을 결핍시킨 S<sup>+</sup>P<sup>-</sup> 배지에 비하여, NB 배지와 무기인산을 첨가한 S<sup>+</sup>P<sup>+</sup> 배지에서 카드뮴에 적응된 세포들에서 각각 3배, 2배 정도 더 많았다(Fig. 2).

이러한 결과는 *K. aerogenes* 세포의 카드뮴 적응 또는



**Fig. 2.** Cadmium amount accumulated in the whole cell of *K. aerogenes* cultivated upon 0.08 mM cadmium added medium such as complex medium (NB), phosphate added (S<sup>+</sup>P<sup>+</sup>) and phosphate free (S<sup>+</sup>P<sup>-</sup>) minimal medium.

해독기작에 무기인산의 영향을 잘 반영해 준다고 볼 수 있으며, 특히 인산이 결핍된 S<sup>+</sup>P<sup>-</sup> 배지에서 계속 배양된 세포가 정체기에 도달했을 때(48시간) 카드뮴이 감소되는 현상은 세포내 카드뮴 축적과정에 무기인산의 지속적인 공급이 필요하다는 것을 나타내 준다고 할 수 있다(Fig.2). 또 세포질과 세포벽 및 막에 축적된 카드뮴의 양은 모든 배양기를 통해서 그리고 모든 배양조건(NB, S<sup>+</sup>P<sup>+</sup>, S<sup>+</sup>P<sup>-</sup>)하에서 공히 세포벽에 더 많은 축적량(50-60%)을 보였다(Fig.3, 4). 이러한 결과는 *E. coli*의 경우 56%(Mitra 등, 1975), *P. putida*의 경우 60% 정도가 세포벽에 축적된다(Higham과 Sadler, 1984)는 보문과 유사하다. 특히 카드뮴 처리된 복합배지인 NB 배지에서 배양되어진 세포에서는 적응기(24시간)가 끝난 후 세포벽 및 막 분획에서 카드뮴 축적이 급격히 증가되는 것을 볼 수 있었다(Fig.4). 그러나, S<sup>+</sup>P<sup>-</sup> 최

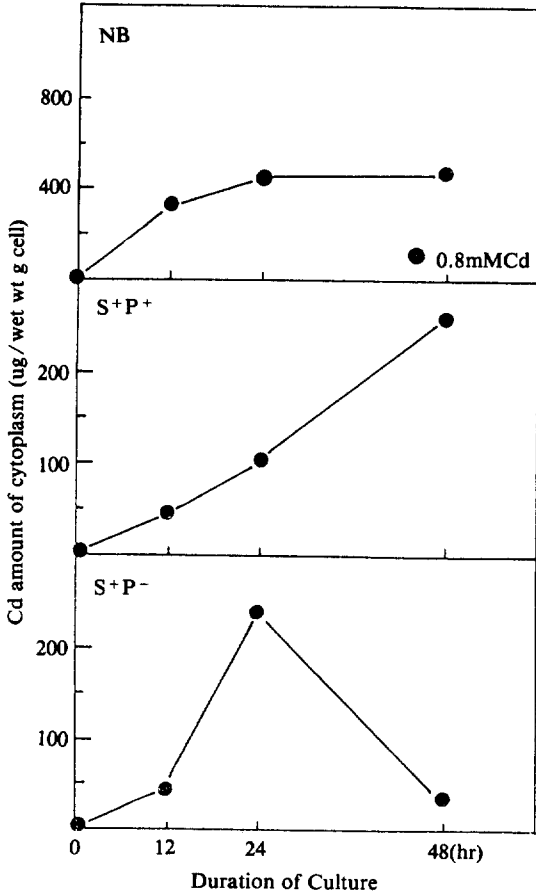


Fig. 3. Cadmium amount accumulated in cytoplasm of *K. aerogenes* under variously cultured conditions.

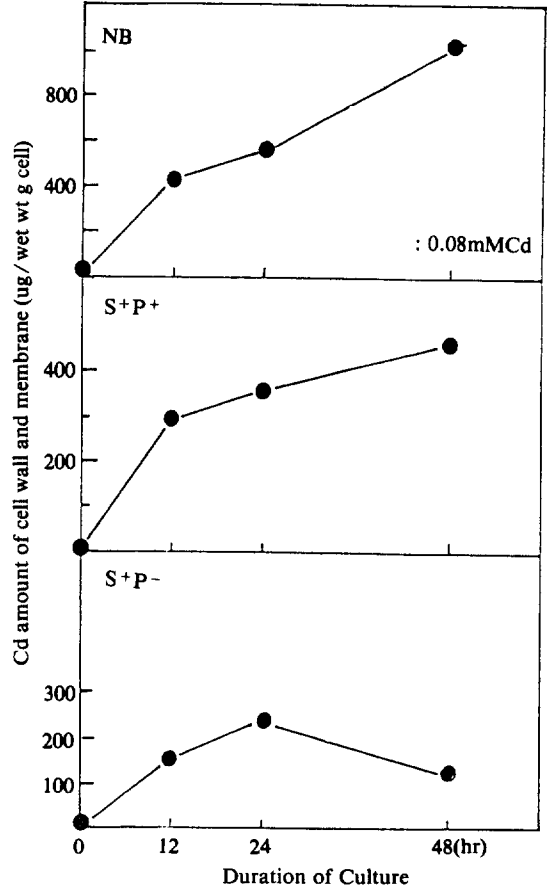


Fig. 4. Cadmium amount accumulated in cell wall and membrane of *K. aerogenes* under variously cultured conditions.

소배지에서 배양된 세포에서는 적응기가 지난 후 세포벽에 축적된 카드뮴 양은 완만한 증가를 보인 반면 (Fig.4) 세포질에서는 급격히 축적이 증가되는 것을 볼 수 있었다(Fig.3). 또 S<sup>+</sup>P<sup>-</sup> 배지에서 배양된 세포에서는 적응기가 끝난 후 세포질에서의 축적이 급격히 감소함을 보였으나(Fig.3), 세포벽에서의 축적량은 완만한 감소를 나타내었다(Fig.4).

세포질과 세포벽 및 막에 축적되어진 카드뮴의 양적 변화에 대한 결과는 여러 가지 배양조건(복합배지, 최소배지 혹은 인산첨가, 인산결핍) 중 특히 인산의 첨가, 결핍 배양조건이 세포분화에 분포하는 카드뮴 축적량과 유의한 상관관계가 있음을 보여준다. 아울러 인산결핍, 첨가 배양에서 세포질, 세포벽에 존재하는 acid-soluble poly-P와 acid-insoluble poly-P의 양적 변화와 카드뮴의 축적량 변화는 깊은 관계를 보여준다 (Fig.5, 6).

### 무기인산 중합체의 축적량 변화

*K. aerogenes*의 경우 산가용성 무기인산 중합체(acid soluble poly-P)의 축적량을 여러 가지 배양조건(NB, S<sup>+</sup>P<sup>+</sup>, S<sup>+</sup>P<sup>-</sup>, 카드뮴 첨가 또는 카드뮴을 첨가하지 않은 control, S<sup>+</sup>P<sup>-</sup>, preculture = start)하에서 조사한 결과, 최소배지(S<sup>+</sup>P<sup>+</sup>, S<sup>+</sup>P<sup>-</sup>)에서 배양했을 때 카드뮴을 첨가하지 않은 control 군에서 adaptation period 때 카드뮴 처리군에 비하여 많이 축적되었다(Fig.5). 이와는 반대로 산불용성 무기인산 중합체(acid insoluble poly-P)는 카드뮴 처리군에서 Pi starvation (S<sup>-</sup>P<sup>-</sup>)시킨 후에 인산을 첨가한 배지에서 배양할 경우, poly-P 합성이 증가하는 hypercompensation effect가 적응기 때 control 군에 비하여 더 크게 일어나는 것을 볼 수 있었다 (Fig.6).

여기서 특기할만한 결과는 acid soluble poly-P와 acid insoluble poly-P의 축적량 변화 중, 카드뮴 처

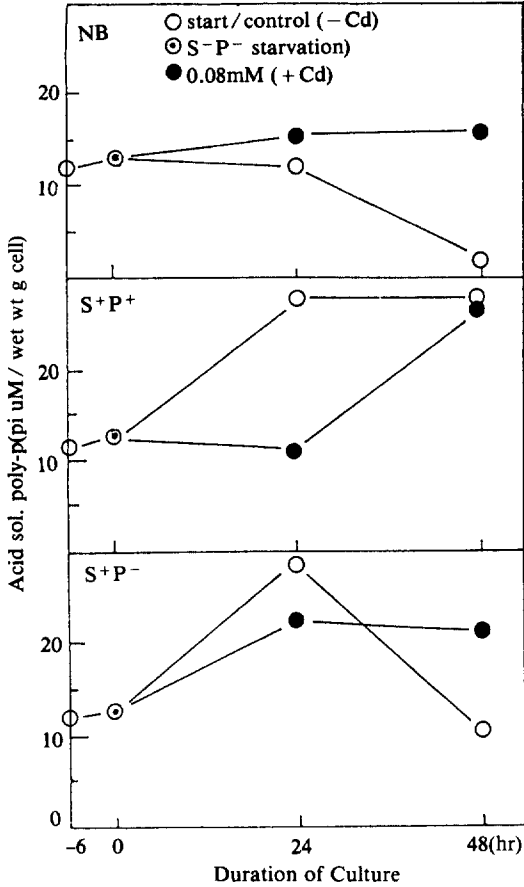


Fig. 5. Changes in the amount of acid soluble poly-P in *K. aerogenes* under variously cultured conditions.

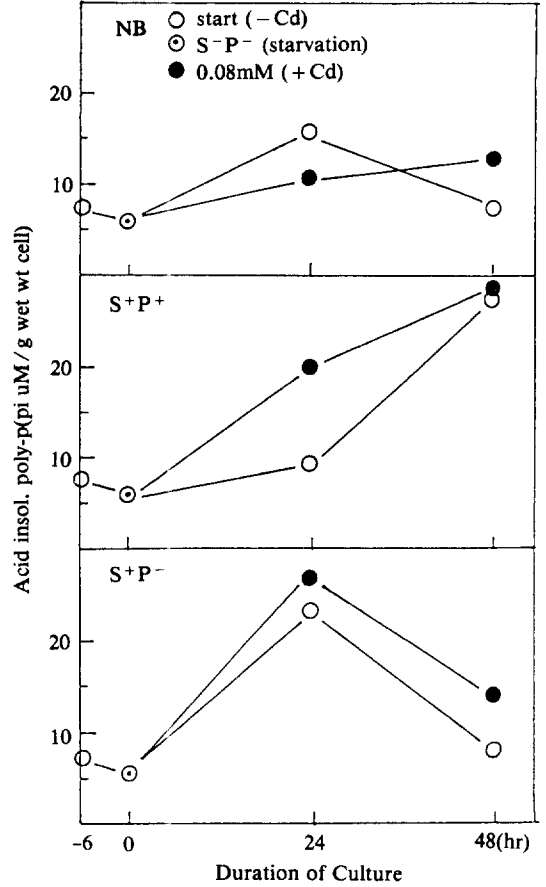


Fig. 6. Changes in the amount of acid insoluble poly-P in *K. aerogenes* under variously cultured conditions.

리구간에서 공히 acid soluble poly-P 축적량과 세포질의 카드뮴 축적량이 비례하며, acid insoluble poly-P 축적량과 세포벽의 카드뮴 축적량이 정확히 비례된다는 사실이다. 이는 세포내 카드뮴 축적현상으로부터 적응 해독과정은 세포내 poly-P 축적과정과 중요한 연관성을 지니고 있다는 것을 암시하여 준다.

결국, 세포내 카드뮴 축적에 무기인산을 비롯한 무기인산 중합체가 깊이 관계하고 있다는 것을 추정하여 볼 수 있다. 즉 poly-P system이 Cd 축적, 해독기작에 관련이 있다는 것을 강력히 시사해 준다. 특히 카드뮴 첨가 최소배지에서 배양한 세포들에서 무기인산 중합체와 카드뮴 축적이 동시적으로 증가되는 양상은, 대부분의 산업폐수가 실험실에서 조제된 최소배지처럼 빈약한 영양상태이므로, 중금속 오염폐수 및 인산염이 많이 존재하는 생활하수에서 중금속과 인산염을 동시에 제거하는 데에 미생물을 이용할 수 있는 근간을 제시해 주는 결과라 볼 수 있으며, 또한 폐수의 미생물학적 처리에 효율성 높은 미생물을 screen 하는데

중요한 생리적 결과라 볼 수 있다. 실제로 고농도의 카드뮴에 내성을 지닌 *Citrobacter* sp.가 카드뮴이 존재하는 폐수에서 약 65%의 카드뮴 제거능력을 가졌다는 보고(Macasakie과 Dean, 1984)이 있다.

Phosphate 제한 배양세포는 sulfate 또는 glucose 제한 배양세포보다 더 카드뮴에 민감하다(Aiking 등, 1984). 본 연구에서도 S<sup>+</sup>P<sup>-</sup> 세포에서 무기인산 중합체 변화양상이 다른 조건에서 배양한 세포보다 훨씬 심한 결과는 이와 매우 유관하다.

특히 최소배지(S<sup>+</sup>P<sup>-</sup>, S<sup>+</sup>P<sup>+</sup>)에서 카드뮴을 첨가배양할 때, 카드뮴을 첨가하지 않은 경우에 비하여 산 불용성 poly-P가 증가하고, 산가용성 poly-P가 감소하는 현상은 다음과 같이 추론할 수 있다. 세균에서 poly-P의 다양한 역할에 관련된 가설 가운데 중요한 세 가지는 (i) energy storage polymer (phosphagen hypothesis) (ii) phosphorus reserve polymer (iii) energy charge의 조절을 통한 물질대사 과정의 regulator이다.

여기서 두번째 가설에 관련을 지어 보면 본 연구

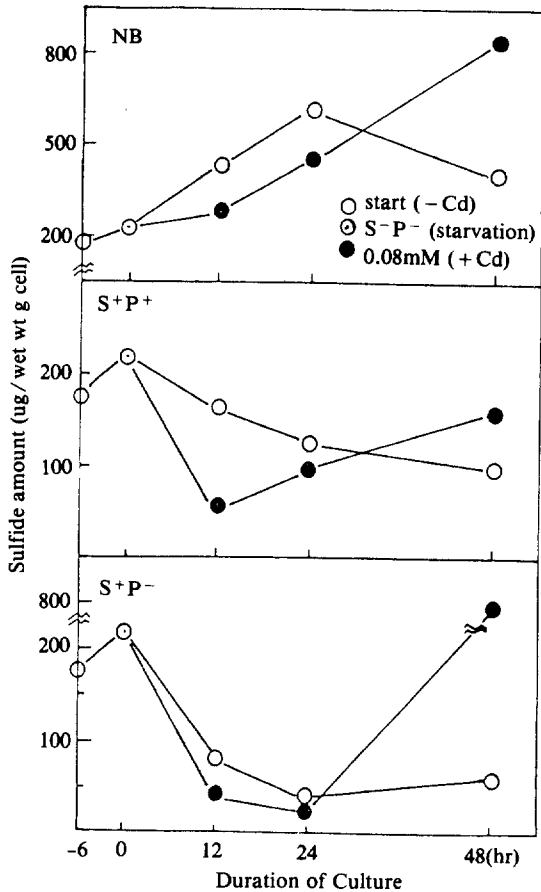


Fig. 7. Changes in the amount of cellular inorganic sulfide on *K. aerogenes* grown with added cadmium, or without cadmium.

결과는 확실히 poly-P가 phosphate storage polymer로서 중금속에 대하여 방어용 저장물질(defense reserve)로 특별한 역할을 담당하고 있다고 볼 수 있다.

세포내 Inorganic Sulfide 분석

*K. aerogenes*의 경우, 카드뮴을 첨가하지 않은 control (NB, S<sup>+</sup>P<sup>-</sup>, S<sup>-</sup>P<sup>-</sup>)군에서 카드뮴 처리군에 비하여 적응기 때 까지는 sulfide의 양이 더 많았다. 적응기를 지나 정체기에 도달하면서 반대의 현상이 일어났다 (Fig.7). 이러한 sulfide의 양적동태는 poly-P의 양적동태와 정반대의 현상인 것이다. Sulfide와 phosphate가 카드뮴에 counterion으로 작용할 수 있을 뿐 아니라, 2가 음이온으로 세포내에서 삼투압조절, ion의 balance, pH 조절 등과 같은 세포내 생리조절 측면에서 매우 중요하다고 볼 때, 특히 인산 고갈시기(48 hr 배양) 혹은 인산 결핍 배양시에 sulfide ion이 세포내 무기인산 중합체의 축적량 변화와는 반대로 증가한 것은 매우 유의한 관련성을 갖는다고 하겠다. 따라서

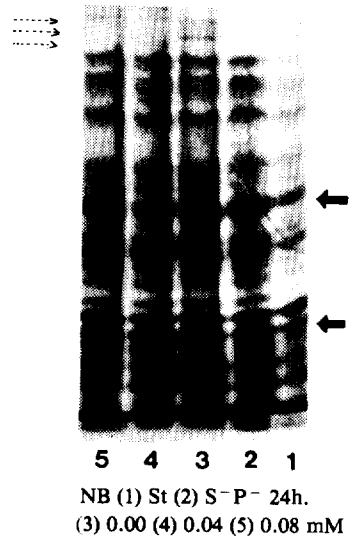


Fig. 8. Total protein profile by SDS-PAGE in *K. aerogenes* cultivated in complex medium with cadmium, or without cadmium.

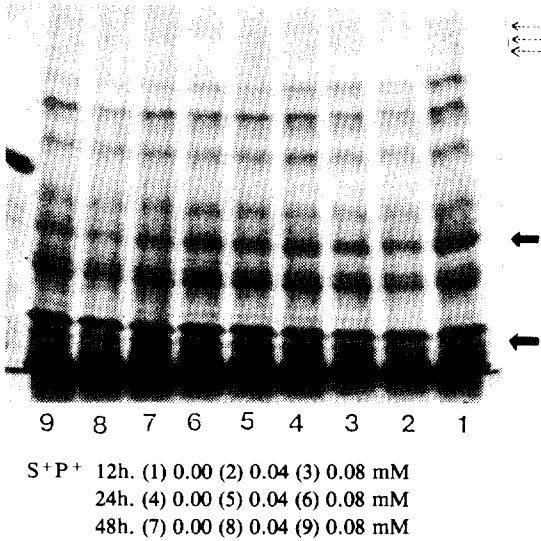
Dashed arrows (-----) show the protein bands (approximately M.W 155, 143, 125 Kd) decreased relatively under phosphate free and/or cadmium added conditions. Thick arrow (————) show the protein bands (M.W 37, 22 Kd) increased relatively under phosphate free conditions (S<sup>+</sup>P<sup>-</sup> cells), compared with cells cultivated in complex medium (NB) and in phosphate added minimal medium (S<sup>+</sup>P<sup>+</sup>).

poly-P system과 sulfide system은 카드뮴 축적 해독 기작에 서로 보완적인 system임을 뜻한다. 특히 S<sup>+</sup>P<sup>-</sup> 배지에서 배양한 세포의 경우, poly-P는 적응기(24시간) 때 최대 축적량을 보이다가 정체기(48시간) 때 감소되는데 반하여 sulfide는 정체기 때 최대의 축적량을 보였다. 이러한 사실은 poly-P system이 1차적으로 카드뮴 해독기작에 관여하며, poly-P가 고갈될 때 sulfide system이 2차적으로 해독과정에 관여한다는 것을 입증해 주는 것이다.

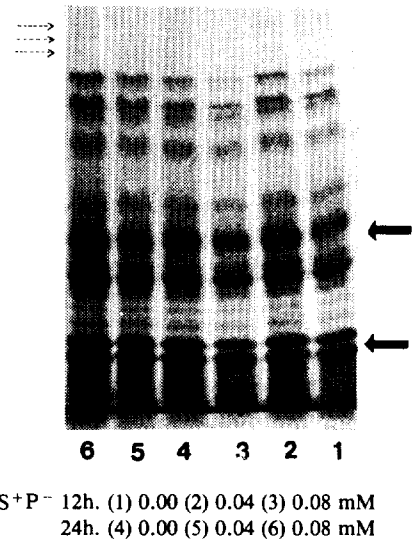
단백질의 변화

*K. aerogenes*의 경우 카드뮴 첨가 배양했을 때 특이하게 유도되는 단백질의 존재여부를 SDS-PAGE로 분석 조사한 결과, 카드뮴에 의해 유도되는 단백질은 없었으며, 오히려 인산의 결핍 혹은 카드뮴의 첨가에 의해 M.W 15.5만, 14.3만, 12.5만 정도의 단백질이 감소되었다(Fig.8-10).

이와 같은 protein profile의 양상은 포유류 등의 metallothionein (Hamer, 1986)의 유도 또는 *P. putida*에서 긴잠복기 후에 나타나는 Cd-binding protein (Higham와 Sadler, 1984), 혹은 *Alkaligenes* sp.에서 일정한 농도(0.1 mM 이상)의 카드뮴 처리로 유도되는 새로



**Fig. 9.** SDS-PAGE analysis of cellular total protein in *K. aerogenes* cultivated in minimal medium with cadmium, or without cadmium.



**Fig. 10.** SDS-PAGE analysis of cellular total protein in *K. aerogenes* cultivated in phosphate free medium with cadmium, or without cadmium.

운 막단백질을 기대할 수 없었다. 따라서 *K. aerogenes* ATCC 10031 균주는 카드뮴에 대한 적응 및 해독기작이 주로 무기인산 화합물 또는 무기황화물에 의한 침전물 형성 방법에 의존한다고 사료된다.

그러나 인산 제한하(S-P<sup>-</sup>, S-P<sup>0</sup> 세포)에서 즉 S-P<sup>-</sup> 세포에 비하여 오히려 두 개의 band(M.W : 3.7만, 2.2만)가 상대적인 증가를 보인 것은(Fig.8(2), Fig.9, 10) *E. coli* 경우에서 처럼 (Khazaeli와 Mitra, 1981) *K. aerogenes*도 인산 제한조건하에서는 cadmium binding protein 또는 phosphatase의 합성이 유도될 가능성을 예견해 준 결과라 하겠다.

즉, 인산결핍 배양세포에서 카드뮴에 민감한 것과 관련해 보면 잘 일치되는 결과라 하겠다.

**카드뮴 첨가 배양세포의 형태적인 변화**

카드뮴을 첨가한 배지에서 배양되어진 세포를 EM에 적용한 결과 세포외부에 많은 granule들이 관찰되었다. 그러나 일반적인 세포에서 세포외부에 무기인산 중합체 granule을 관찰하기 어렵기 때문에 단순한 무기인산 중합체 granule이라고 추정할 수 없다(Harold, 1966).

가상적인 polyphosphate : Cd complex는 불용성 colloidal suspension 상태로 세포내에 혹은 세포표면에 그리고 불용성 Cd : S complex는 세포표면에 존재한다 (Aikin, 등, 1982, 1984 ; Macaskie와 Dean, 1984 ; McEntee 등, 1986)는 보분의 결과와 본 연구에서 조사되어진 Cd의 축적량, 무기인산 중합체 축적량 및 sulfide 분석결과를 종합하여 볼 때, 본 연구에서 관찰되어진 세포표면에 존재하는 electron dense granule은 Cd : S complex particle로 인식되어진다(Fig.11).

즉, 0.08 mM 농도로 카드뮴을 첨가한 S-P<sup>-</sup> 배지에서 24 hr 배양한 세포(S-P<sup>-</sup> 0.08 mM 24 hr)에서 무기인산 중합체의 축적과 Cd의 축적이 동시에 일어나지만(Fig. 2, 5, 7) sulfide 함량은 최저상태로 감소되는 결과와 동일조건인 세포에서 EM 상에서 electron dense granule이 나타나지는 결과는(Fig.11-b), 이 electron dense particle이 CdS complex particle임을 반증해 주는 결과라 하겠다. 또 NB와 S-P<sup>-</sup> 배지에서 카드뮴에 대하여 적응기가 끝난 세포에서 sulfide가 증가하면서(Fig.7) 그 세포에서는 electron dense particle이 sulfide 함량과 비례하게 큰 것을 관찰할 수 있었다(Fig.11-c, d).

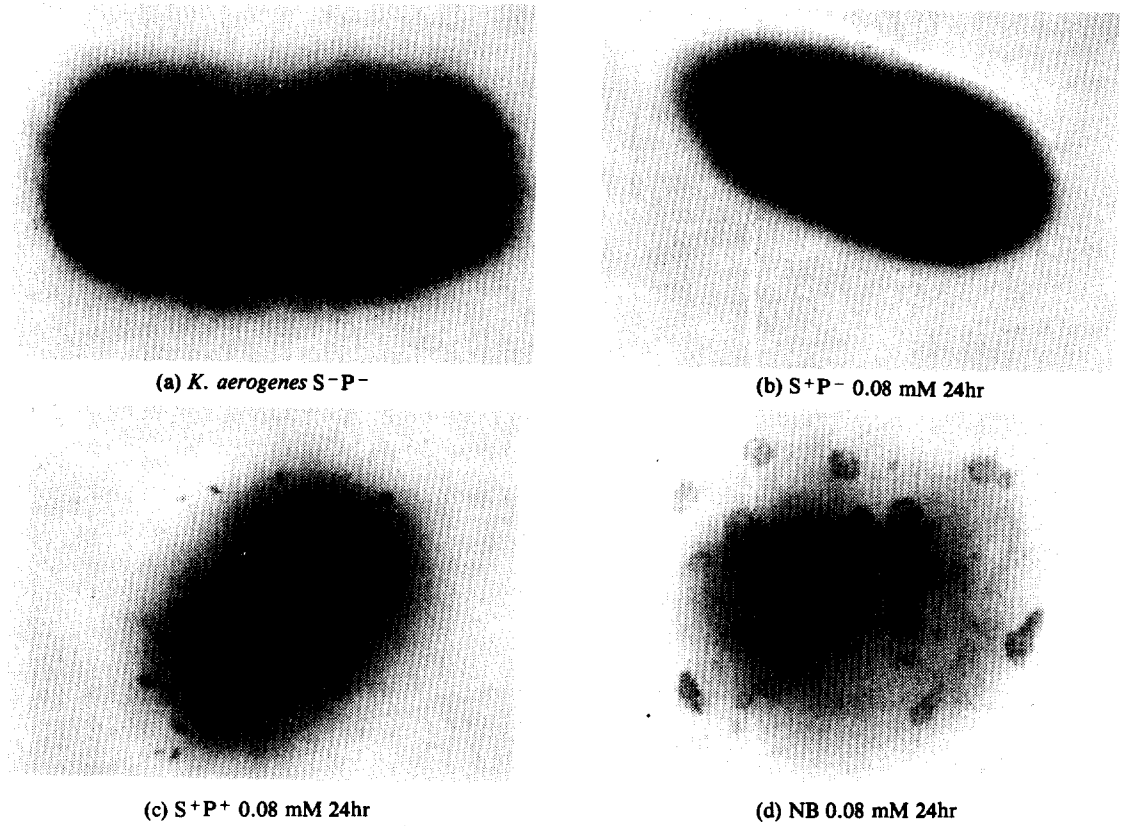
즉, *K. aerogenes* 경우 *Citrobacter* sp.(Macaskie와 Dean, 1984)와는 달리 poly-P complex는 세포내에 주로 존재한다고 볼 수 있다.

**<sup>31</sup>P-in vivo-NMR Spectroscopy**

*K. aerogenes* 경우, 카드뮴에 대한 적응 및 해독기작에 관여하는 system은 일차적으로 poly-P system이 작용하고, Cd : S complex는 이차적 또는 보완적인 system으로 작용하며, 다른 세균들에서 발견되는 카드뮴 결합 단백질 system은 발견하지 못하였다고 앞서 연구조사 되어진 생화학적, 전자현미경적 연구결과를 토대로 언급한 바가 있다. poly-P system이 실제로 카드뮴에 대한 해독기작에 관여한다는 것을 입증하기 위해서는 polymeric phosphate-Cd complex의 존재가 파악되어야 한다.

따라서 카드뮴을 처리하지 않은 배지에서 배양한 세포와 카드뮴 처리배지에서 배양한 세포를 *in vivo*



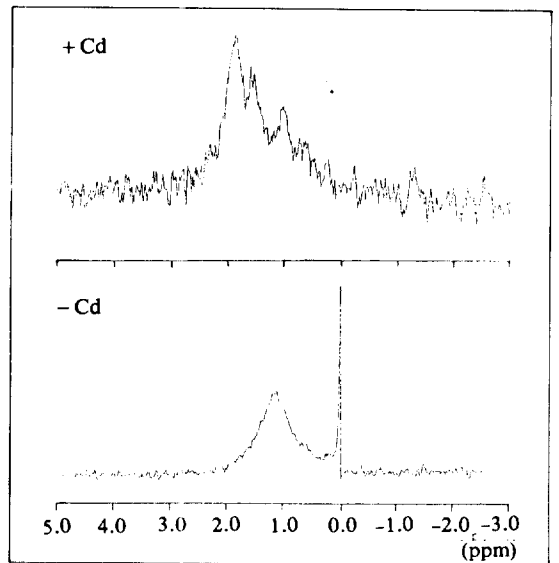


**Fig. 11.** Photographs by electron microscopy of unstained *K. aerogenes* cells grown under culture conditions in the absence(a) or presence(b, c, d) of cadmium.

상태에서 <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy에 적용하였다.

poly-P의 화학적 이동은 통상 1-2 ppm 범주에 들어간다(Kuchitsu 등, 1987)는 보문과 같이 본 연구에서도 카드뮴을 첨가 배양하지 않은 세포(-Cd, cell)에서 polyphosphatase peak의 chemical shift 값이 1.15 ppm을 나타내었다. 그러나 카드뮴 첨가 배양세포에서 <sup>31</sup>P-NMR spectra peak의 chemical shift가 변한 것을 볼 수 있었다(Fig.12). 즉 카드뮴 첨가 배양(+Cd, cell)했을 경우 1.9 ppm으로 downfield 이동하였고, 1.5, 1.6, 2.3 ppm에서 새로운 peak을 나타내었다.

일반적으로 pH의 변화에 따른 inorganic phosphate의 chemical shift 변화를 보면, phosphate monoanion 보다 phosphate dianion의 chemical shift가 2 ppm 정도 downshift로 이동하며, apoalkaline phosphatase의 존재하에 Zn<sup>2+</sup> 혹은 Cd<sup>2+</sup> complex를 형성했을 때 inorganic phosphate보다  $\alpha$ - $\delta$  ppm downshift로 이동되는 현상이 있으므로 이 경우 새로이 downfield shift 되어 나타난 peak와 인접된 여러 개의 peak은 카드뮴이 poly-phosphate anion에 직접 결합



**Fig. 12.** <sup>31</sup>P-in vivo-NMR spectra of *K. aerogenes* grown with and without cadmium addition.

하므로 Pi signal이 달라져서 생성된 peak로 해석할 수 있다. 이는 또한 산불용성 무기인산 중합체와 산 가용성 무기인산 중합체가 turn over 되면서 원래 위치하던 세포내 위치와는 다른 곳에서 카드뮴과 결합될 가능성을 주기 때문에 카드뮴 해독기작에 대한 compartmentalization도 이해할 수 있는 결과라 하겠다. 아울러, 이러한 결과는 poly-P : Cd complex의 세포내 존재를 강력히 시사해 주는 최초의 결과이다.

이와 같은 카드뮴에 대한 미생물의 적응 및 해독기작을 고려한다면, poly-P와 sulfide를 고농도로 축적할 수 있고, cell membrane transport system을 통해 유입된 카드뮴이 efflux system에 의해 유출되는 비율이 적은 mutant의 개발과 동시에 카드뮴 결합 단

백질의 gene expression이 향상된 transformant를 개발함으로써, 산업폐수 정화의 생물학적 filter로 미생물의 이용가능성을 보다 높일 수 있을 것이며 환경보전 및 경제적인 측면에서도 그 유용성이 높게 평가될 수 있을 것이다.

또한, poly-P : Cd complex 생성에 의한 중금속 해독기작은 중금속 오염 수역에서 미생물 혹은 조류의 대발생이 가능한 현상을 생리 생화학적 측면에서 설명할 수 있다. 즉, 무기인산 중합체가 인산기 저장 및 공여체로서의 기능을 함으로서 인산 충분 상태뿐 아니라 인산 제한하에서도 세포분열의 증폭이 가능하다는 사실 이외에, 중금속 오염하에서도 세포분열의 증폭이 가능함을 설명하게 해 준다는 점이다.

## 적 요

*Klebsiella aerogenes* ATCC 10031의 카드뮴 적응, 해독기작은 주로 어떤 system에 의존하는지를 조사하고자 하였다. 또 카드뮴 해독기작에 대한 무기인산의 영향을 조사함과 동시에, Cd : Phosphate 또는 polymeric Cd : phosphate complex가 실제로 세포내에 존재하는지를 파악하고자 하였다.

그 결과, 0.02 mM과 0.08mM 카드뮴 농도에서 각각 12시간, 24시간의 긴 적응기를 나타냈으며, 카드뮴은 세포벽과 세포막 분획에서 세포질 보다 많이 축적되었다. 인산결핍 배양세포에서는 무기인산 중합체 system이 적응기 중에 1차적으로, Cd : S complex system이 정체가 때 2차적으로 카드뮴 해독기작에 관여하는 것으로 조사되어 이 2 system은 서로 상호 보완적으로 운용되었다.

Cd : S complex는 EM 관찰, sulfide 및 무기인산 중합체의 양적 동태로 미루어 세포표면에 존재하는 것으로 밝혀졌다. 카드뮴 첨가 배양세포를 *in vivo*  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy에 적용한 결과, 무기인산 중합체의 peak는 chemical shift가 이동하면서 여러 개의 새로운 peak를 나타내었다. 이 결과는 세포내에 Cd : Pi 또는 polymeric Cd : Pi complex가 실제로 존재한다는 사실 이외에 카드뮴 해독기작의 세포내 compartmentalization을 나타내주는 결과라 하겠다.

## 사 사

이 논문은 학술진흥재단의 연구지원(1988. 5-1990. 5)에 의하여 수행된 연구의 일부임.

## 참고문헌

1. Aiking, H., K. Kok, H. van Heerikhuisen, and J. van't Riet, 1982. Adaptation to cadmium by *Klebsiella aerogenes* growing in continuous culture proceeds mainly via formation of cadmium sulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 938-944.
2. Aiking, H., A. Stijnman, C. van Garderen, H. van Heerikhuisen, and J. van't Riet, 1984. Inorganic phosphate accumulation and cadmium detoxification in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 374-377.
3. Fiske, C.H., and Y. Subbarow, 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**, 35.
4. Gadd, G.M. and A.J. Griffiths, 1978. Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial Ecol.*, **4**, 303-317.
5. Hamer, D.H., 1986. Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 913-51.
6. Harold, F.M., 1966. Inorganic polyphosphates in biology: Structure, metabolism and function. *Bacteriol. Reviews.* **30**, 772-779.
7. Higham, D.P., and P.J. Sadler, 1984. Cadmium-resistant *Pseudomonas putida* synthesizes novel cadmium proteins. *Science* **225**, 1043-1046.
8. Khazaeli, M.B. and R.S. Mitra, 1981. Cadmium-binding component in *Escherichia coli* during accumulation to low levels of this ion. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 46-50.
9. Kojima, T., C.B.L. Vallee and J.H.R. Kagi, 1976. Amino acid sequence of equine renal metallothionein-1B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 3413-3417.
10. Kuchitsu, K., T. Oh-hama, M. Tsuzuk, and S. Miyachi, 1987. Detection and characterization of acidic compartments(vacuoles) in *Chlorella vulgaris* 11b cells by  $^{31}\text{P}$ -*in vivo* NMR spectroscopy and cytochemical techniques. *Arch. Microbiol.* **148**, 83-87.
11. Kulaev, I.S., and V.M. Vagavov, 1983. Polyphosphate metabolism in microorganisms. *Adv. Microbiol. Physiol.* **24**, 83-171.
12. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins

- during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-685.
13. Lee, K.S., 1980. A study on phosphate metabolism in yeast (*Saccharomyces uvarum*) M.S. Thesis. Han Yang Univ.
  14. Lee, K.S., S.H. Cho, K.S. Lee, H.K. Shin, and Y.K. Choi, 1981. Effect of the carbon sources on the synthesis of phosphate compounds and respiratory activity of yeast (*Saccharomyces uvarum*) during growth phases. *Kor. J. Microbiol.* **19**, 63-77.
  15. Lee, K.S., J.S. Han, and Y.K. Choi, 1985. High performance liquid chromatographic analysis of nucleotide pool during catabolic repression and derepression in *Saccharomyces uvarum*. Oral presentation at Microbiol. Soc. Korea.
  16. Lee, K.S. and Y.K. Choi, 1985. Cytochemical observation of volutin granules and activities of Triphosphatase and polyphosphatase in *Saccharomyces uvarum*. *Kor. J. Mycology*. **13**, 141-148.
  17. Lee, K.S. and Y.K. Choi, 1985. Studies on the activities of ATPase, ACPase, ATPase and accumulation of volutin granules upon growth phase in *Saccharomyces uvarum*. *Kor. J. Microbiol.* **23**, 90-100.
  18. Lee, K.S. and Y.K. Choi, 1985. Studies on the changes in activities of ALPase, ACPase, ATPase and synthesis of volutin granules upon phosphate concentration in *Saccharomuces uvarum*. *Kor. J. Microbiol.* **23**, 84-89.
  19. Macaskie, L.E., and A.C.R. Dean, 1984. Cadmium accumulation by a *Citrobacter* sp., *J. Gen. Microbiol.* **130**, 53-62.
  20. McEntee, J.D., J.R. Woodrow, and A.V. Quirk, 1986. Investigation of cadmium resistance in an *Alcaligenes* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 515-520.
  21. Mitra, R.S. and I.A. Bernstein, 1978. Single-strand breakage in DNA of *Escherichia coli* exposed to Cd<sup>2+</sup>. *J. Bacteriol.*, **133**, 75-80.
  22. Mitra, R.S., R.H. Gray, B. Chin, and I.A. Berenstein, 1975. Molecular mechanisms of accomodation in *Escherichia coli* to toxic levels of Cd. *J. Bacteriol.* **121**, 1180-1188.
  23. Miyachi, S., and H. Tamiya, 1961. Distribution and turnover of phosphate compounds in growing chlorella cells. *Plant and Cell Physiol.* **2**, 415-424.
  24. Olafson, R.W., K. Abel and R.G. Sim, 1979. Prokaryotic metallothionein: preliminary characterization of a blue-green algae heavy metal-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 36-43.
  25. Robinson, N.J., 1989. Algal metallothioneins: secondary metabolites and proteins. *J. Appl. Microbiol.* **1**, 5-18.
  26. Weinstein, B.I., and H.C. Li, 1975. Stimulation of chromatin template activity by the physiological macromolecule polyphosphate: A possible mechanism for eukaryotic gene depression. *Arch. Biochem. Biophys.* **175**, 114-120.
  27. Yoon, S.N., K.S., Lee and Y.K. Choi, 1986. Induction of Ribonuclease during catabolic repression in *Saccharomyces uvarum*. *Kor. J. Mycol.* **14**, 201-207.

(Received May 9, 1990)

(Accepted May 15, 1990)