

*Klebsiella pneumoniae*가 생산하는 Glutamine synthetase의 정제 및 특성

차정학* · 이왕식¹ · 성하진
고려대학교 유전공학과, ¹농화학과

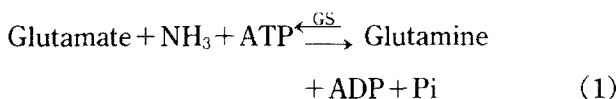
Purification and Characterization of Glutamine synthetase of *Klebsiella pneumoniae*

Cha, Jung-Hak*, Wang-Sik Lee¹ and Ha-Chin Sung

Department of Genetic Engineering and ¹Department of Agricultural Chemistry,
Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract — Glutamine synthetase (GS) of *Klebsiella pneumoniae* was purified and identified its properties. It was determined to be composed of 12 identical subunits and its molecular weight was about 600,000. Its optimum pH and temperature were identified as pH 7.0 and 37°C respectively, and also there was no considerable variation of activity between pH 5 and 8. When GS was incubated at 57°C for 10 min, its activity was decreased to half of maximum activity. It was observed that *K. pneumoniae* has adenylation-deadenylation system which regulates activity of GS according to the quality and quantity of nitrogen source like GS of *E. coli*. Also its GS was very similar to that of *E. coli*. in structure deduced from the immunodiffusion experiment using anti-*E. coli* GS antibody.

Glutamine synthetase(GS, EC 6.3.1.2)는 생체내 질소화합물의 합성 경로에서 amino기 공여체로서 중심적 역할을 하는 glutamine의 합성반응을 촉매하는 효소이다(1)(식 1).



*E. coli*에서의 GS 활성은 uridylyltransferase, P_{II} 단백질, adenylyltransferase 등이 관여하는 adenylation system에 의해 주위 질소원의 종류와 양에 따라 조절되어지며 구조유전자인 *glnA*의 발현 역시 유리 암모니아 농도에 따라 조절되어진다(2).

한편 GS는 그 조절유전자들과 함께 *nif*, *put*, *hut* 등 poor nitrogen source의 이용에 관련된 유전자군의 발현에도 관여한다고 알려져 있다(3-5).

본 연구에서는 질소 고정균인 *Klebsiella pneumoniae*의 GS 및 그 조절유전자가 질소고정 유전자의 발현에 미치는 영향을 살펴보기에 앞서 본 균의 GS를 분리, 정제하여 그 효소학적 성질과 활성조절기작을 검토함으로써 *E. coli* GS와의 유사성을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 균주는 KAIST 유전자 은행으로부터 구입한 *Klebsiella pneumoniae* M5a1(KCTC 1560)과 고려대학교 유전공학과 미생물 유전학 실험실에 보관되어 있는 *Escherichia coli* K-12이다.

배양 및 무세포 추출액의 조제

5l jar fermenter에(MD-300, L.E. Marubishi Co. Ltd, Japan) 3l의 GSI 배지(Glucose 1%, KH₂PO₄ 0.06%, K₂HPO₄ 0.06%, MgSO₄ 0.036%, Yeast extract

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, glutamine synthetase, adenylation

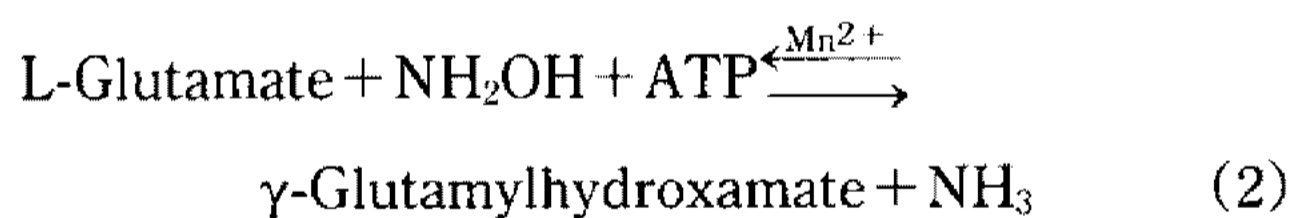
*Corresponding author

0.36%, Na-Glutamate 0.53%, pH 7.0)를 넣고 24시간 동안 전배양한 균체를 1% 되게 접종하여 37°C, 250 rpm, 0.8 vvm에서 20시간 동안 배양한다. 배양된 균체를 원심분리하여 회수한 다음, 0.1 M의 potassium phosphate buffer(KPB, pH 7.0)로 0.5 g/ml 되게 현탁시켜 초음파 파쇄하고 20,000×g, 4°C에서 원심분리하여 얻은 상등액을 무세포 추출액으로 사용하였다.

효소 활성의 측정(6)

GS의 활성은 adenylylation state에 영향을 받지 않는 transferring activity(식 2)를 L-glutamate 35 mM, ADP 0.4 mM, potassium arsenate 10 mM, hydroxylamine 10 mM, imidazole buffer(pH 7.0) 0.1 M의 반응계에서 측정하였으며 1분간 1 μmole의 γ-glutamylhydroxamate를 형성시키는 효소량을 1 unit으로 결정하였다.

효소반응은 MnCl₂ 혹은 효소액을 반응액 전체가 1 ml이 되도록 첨가함으로써 시작하였고 10분 반응 후에 반응 정지액(10% FeCl₃ : 24% TCA : 6 N HCl : 증류수 = 8 : 2 : 1 : 13) 2 ml을 넣고 정지시킨 다음 원심분리하여 그 상등액의 흡광도를 540 nm에서 측정, γ-glutamylhydroxamate를 이용하여 얻은 표준 곡선으로부터 활성을 정하였다.



단백질 정량

Egg albumin을 표준 단백질로 하여 Lowry(7)법에 따라 측정하였다.

전기 영동

효소 단백질의 순도를 검정하기 위해 Davis(8)법으로 disc electrophoresis를 실시하였다.

분자량 측정 및 Subunit의 조성 결정

효소의 분자량은 Ultrogel AcA 22 column(1.6×56 cm)에 의한 gel 여과로부터 측정하였으며 subunit의 조성은 Weber and Osbon(9)의 방법에 의한 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis로부터 결정하였다.

Immunodiffusion

E. coli K-12와 *K. pneumoniae*를 GSI 배지에서 배양한 후 ammonium sulfate 분획을 20~60%로 실시, 이를 농축한 조효소액 30 μg과 anti-*E. coli* GS 항체 50 μg을 이용하여 Ouchterlony(10) 방법에 의해 실시하였다.

Adenylylation state의 결정

Adenylylation된 subunit의 transferring activity가 60 mM MgCl₂에 의해 저해됨을 이용하여 다음 식으로부터 adenylylation state(\bar{n})를 결정하였다(11).

$$\bar{n} = 12 - 12 \times [\text{activity in } 0.4 \text{ mM MnCl}_2 + 60 \text{ mM MgCl}_2 \text{ at pH } 7.2 / \text{activity in } 0.4 \text{ mM MnCl}_2 \text{ at pH } 7.38]$$

결과 및 고찰

효소의 정제

모든 정제과정은 4°C에서 실시하였으며 정제과정에 사용한 buffer에는 0.1 mM의 MnCl₂를 안정제로 첨가하였다.

Ammonium sulfate 분획 : 무세포 추출액에 ammonium sulfate를 가해 20~60%의 분획을 취하고 이를 0.1 M KPB에서 투석함으로써 비활성을 약 2배 증가시켰다.

DEAE-Sepharose CL6B 이온교환 : Ammonium sulfate 분획을 농축, DEAE-Sepharose CL6B column(2.5×30 cm, bed vol. 100 ml)에 흡착시킨 후 KPB 0.1 M에서 1 M로 gradient를 걸어 총 500 ml의 완충 용액으로 용출시킨 결과(20 ml/hr, 50 ml/tube), GS는 약 0.3~0.6 M의 염 농도에서 용출되었으며 비활성은 약 3배 증가하였다.

Sepharose CL6B gel 여과 : 이온교환으로부터 얻은 GS 분획을 PEG 6,000으로 농축, 투석한 것을 Sepharose CL6B column(1.2×100 cm, bed vol. 110 ml)에서 0.1 M KPB로 두차례 gel 여과(6 ml/hr, 2 ml/tube)시킨 결과, 효소의 비활성이 4.6배 증가하였다.

Affigel-blue affinity chromatography : Gel 여과로부터 얻은 GS 분획을 Affigel-blue column(1.8×15 cm, bed vol. 15 ml)에 흡착시키고 25 mM imidazole,

1 mM MnCl₂, 0.1 M KCl의 혼합용액으로 씻어낸 다음, ADP 0 mM에서 8 mM까지 gradient로 용출(20 ml/hr, 2 ml/tube)시켰다(Fig. 1).

GS는 ADP 2~5 mM에서 용출되었으며 이를 5% polyacrylamide gel에서 tube당 3 mM로 전기영동한 결과 단일 단백질로 정제되었음을 확인하였다(Fig. 2).

이상의 정제과정으로부터 회수율 6.5%, 정제 배수 약 29배의 GS 표품을 얻었으며(Table 1), 이 GS 표품을 이용하여 GS의 일반적 성질을 검토하였다.

효소의 특성

분자량 및 subunit의 조성 : 본 GS의 분자량은 Ultragel AcA22 gel 여과로부터 약 600,000으로 확인되었으며 이는 *E. coli*의 592,000, *B. subtilis*의 600,000과 비교하여 볼 때 거의 동일한 크기를 가졌다(Fig. 3).

한편 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 실시한 결과 분자량 50,000의 단일 subunit 12개로

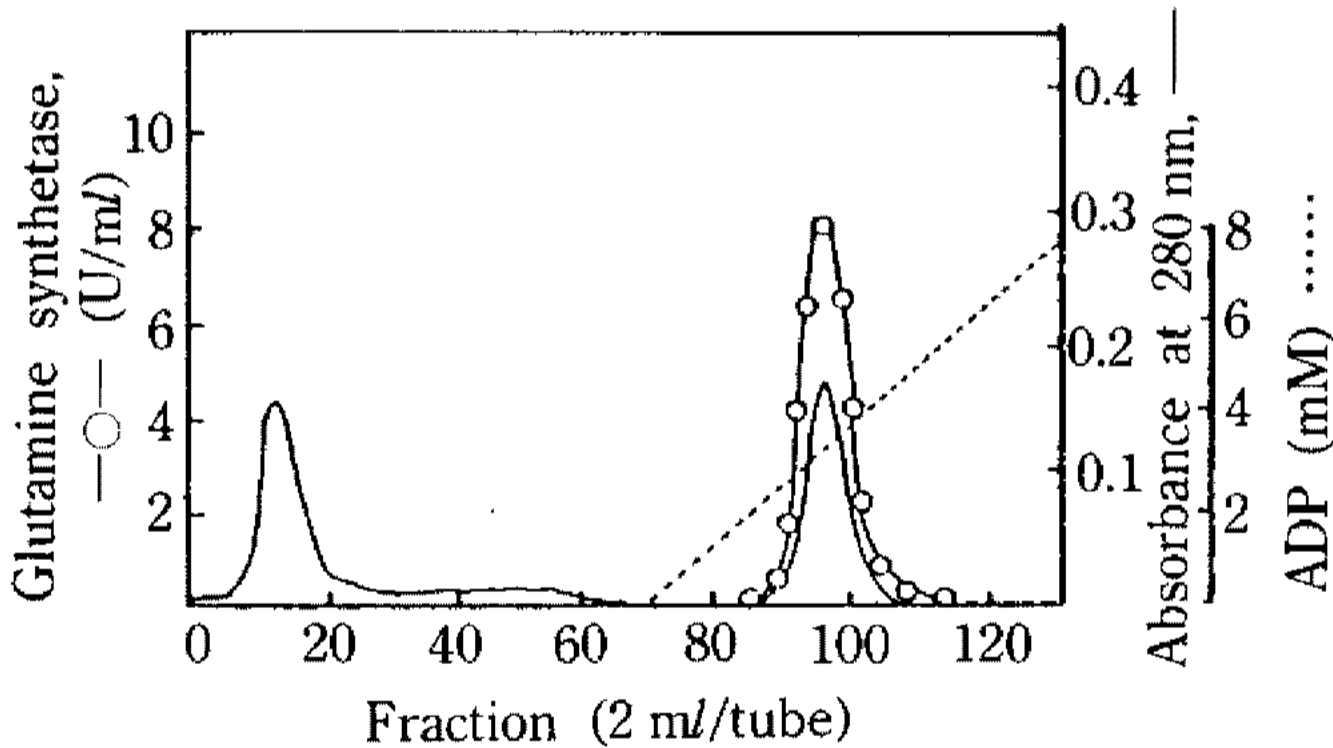


Fig. 1. Elution pattern of *K. pneumoniae* glutamine synthetase from Affigel-blue column.

After protein was loaded, the column was washed with 25 mM imidazole buffer containing 1 mM MnCl₂, 0.1 M KCl and eluted with a linear gradient of ADP dissolved in the same buffer composition.

구성되어져 있음이 밝혀졌으며 이것 역시 *E. coli*, *B. subtilis*에서 얻어진 결과와 동일하다(Fig. 4).

효소의 일반적 성질 : 최적 반응 pH는 7.0, 최적 반응온도는 pH 7.0에서 37°C로 나타났고 각 pH에서 10분 동안 효소를 방치한 후 그 활성을 측정해 본 결과 pH 5~8 사이에서는 활성에 큰 변화가 나타나지 않았다. 또 열안정성을 조사하기 위해 10분 동안 열처리한 후 그 활성을 측정해 본 바에 의하면 50°C까지는 안정하였으나 57°C에서는 전체 활성의 50%가 소실되는 것으로 나타났다.

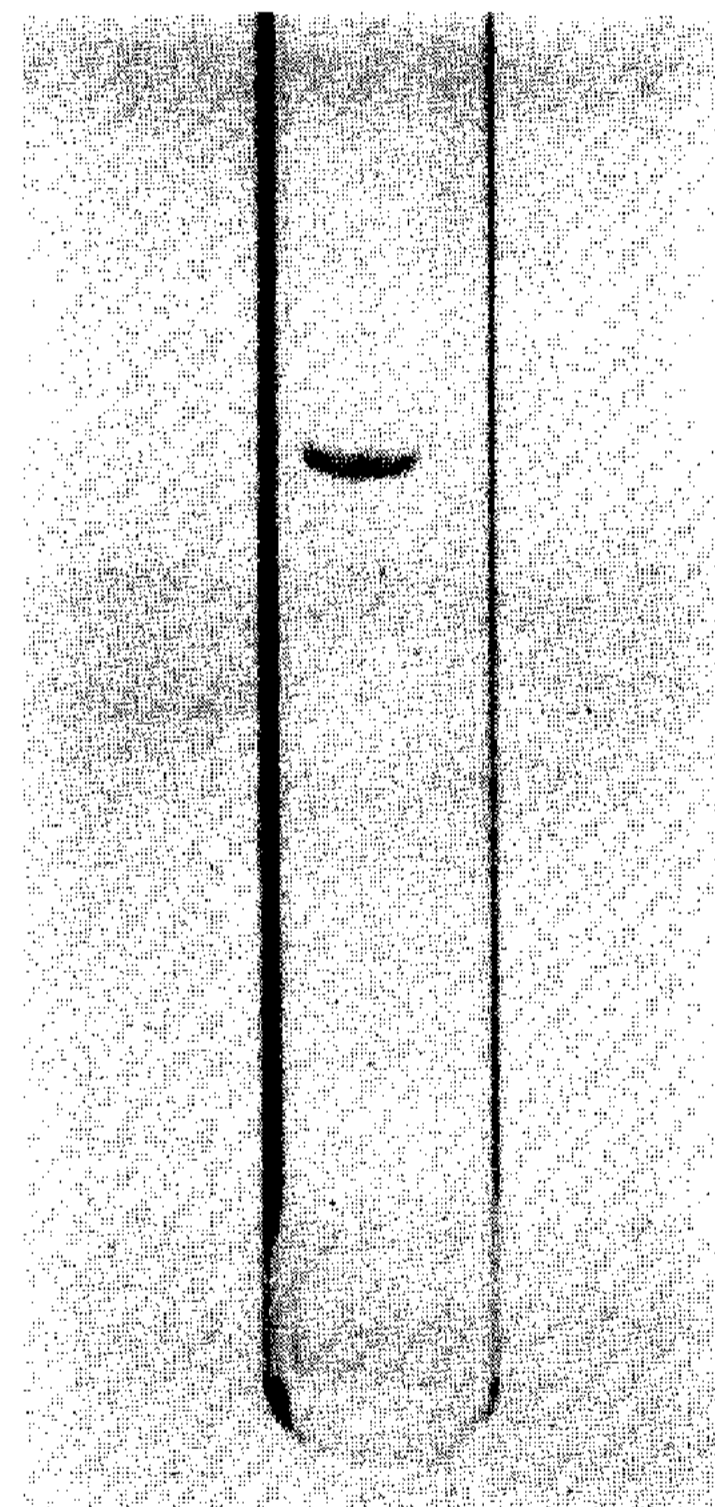


Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of GS. 20 µg of protein was subjected on 5.0% polyacrylamide gel and the current was adjusted to an output of 3 mA per gel tube.

Table 1. Purification of glutamine synthetase of *K. pneumoniae*

Purification procedure	Total protein(mg)	Total activity(units)	Specific activity(unit/mg pro.)
Cell-free extracts	1,072	1,779	1.66
Ammonium sulfate (20~60%)	334	1,249	3.74
DEAE-Sepharose CL-6B	60	277	4.62
1st Sepharose CL-6B	29	187	6.49
2nd Sepharose CL-6B	11.5	155	13.47
Affigel-blue	2.5	117	48.02

1 unit: 1 µmole (γ-glutamylhydroxamate) per 1 min in transferring reaction

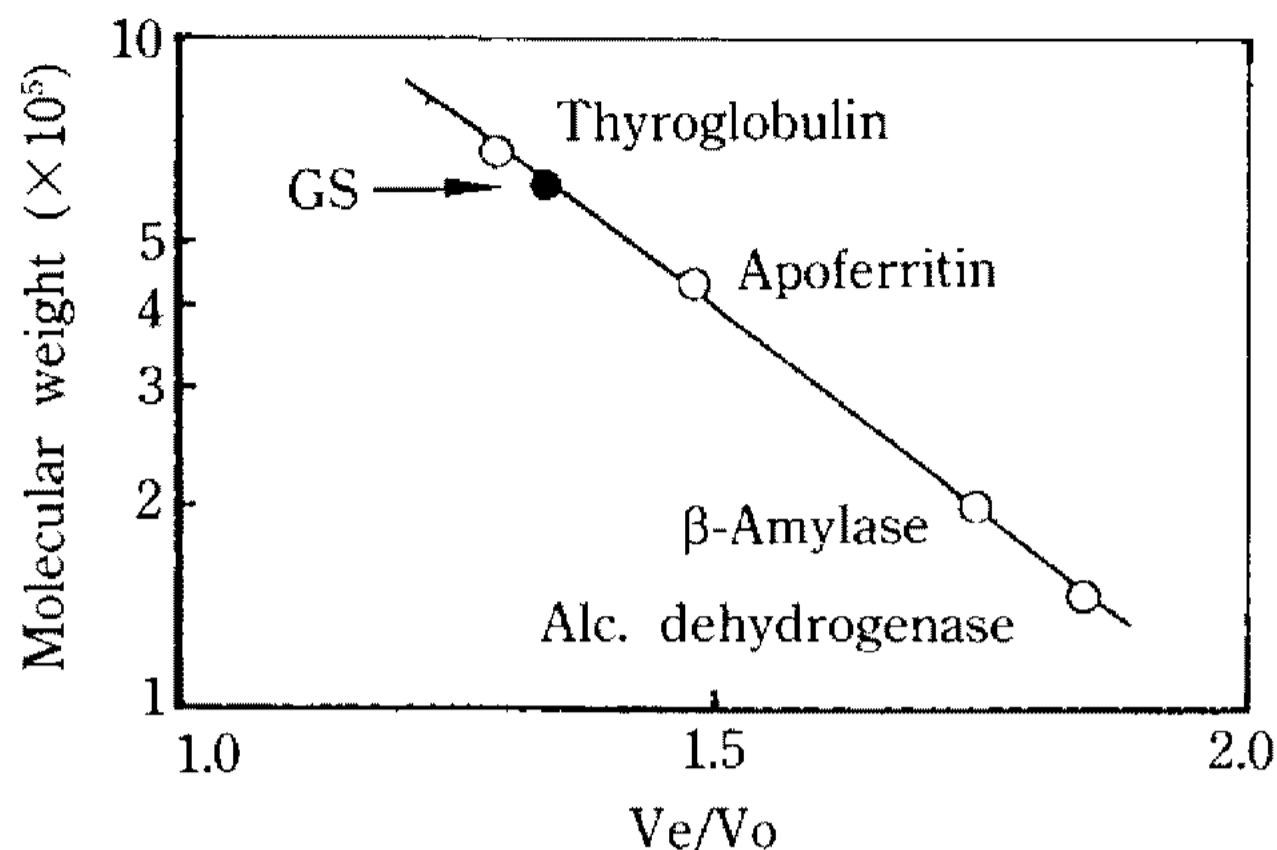


Fig. 3. Determination of molecular weight of GS by ultragel AcA-22 gel fractionation.

1 mg/ml of thyroglobulin (669,000), apoferritin (443,000), β-amylase (200,000), alcohol dehydrogenase (150,000), and GS were loaded on the column separately and eluted with 50 mM imidazole buffer containing 0.2 mM MnCl₂, 0.1 M KCl. M.W. vs Ve/Vo was plotted on semi-log paper.

본 효소의 transferring reaction에 관여하는 기질에 대한 친화력은 Lineweaver-Burk plot에 의한 substrate saturation kinetics로부터 ADP는 0.035 mM, hydroxylamine은 3.63 mM, glutamine은 9.75 mM의 Km 값을 나타냈다(Table 2).

E. coli GS와의 혈청학적 유사성 : anti-*E. coli* GS 항체를 이용한 immunodiffusion으로부터 본 GS와 *E. coli* GS와의 혈청학적 유사성을 검토한 결과, 두 항원이 anti-*E. coli* 항체에 대해 부채꼴 모양의 뚜렷한 침강선을 형성하는 complete identity reaction을 보였다(Fig. 5).

이와 같은 complete identity reaction은 두 효소가 구조적 측면에서 매우 큰 유사성이 있음을 의미할 뿐만 아니라 분류학적으로도 밀접한 두 세균의 관계를 미루어 볼 때 활성의 조절, 구조유전자의 발현 등에 관여하는 생화학적, 유전학적 특성에 있어서도 상당한 공통성을 가질 것으로 추정된다.

Adenylylation-Deadenylylation에 의한 GS 활성조절 : 장내 세균인 *Klebsiella aerogenes*, *E. coli* 등이 생산하는 GS의 경우 질소원의 종류와 양, 그리고 그 영향으로 형성되는 세포내 α-ketoglutarate와 L-glutamine의 비율에 따라 구조유전자인 *glnA*의 발현이 전사 단계에서 조절되어지며 이미 발현된 GS는 adenylylation에 의해서 활성조절이 이루어진다. 이와 같은 GS 활성 및 발현의 조절기작은 질소기체, 아미노산

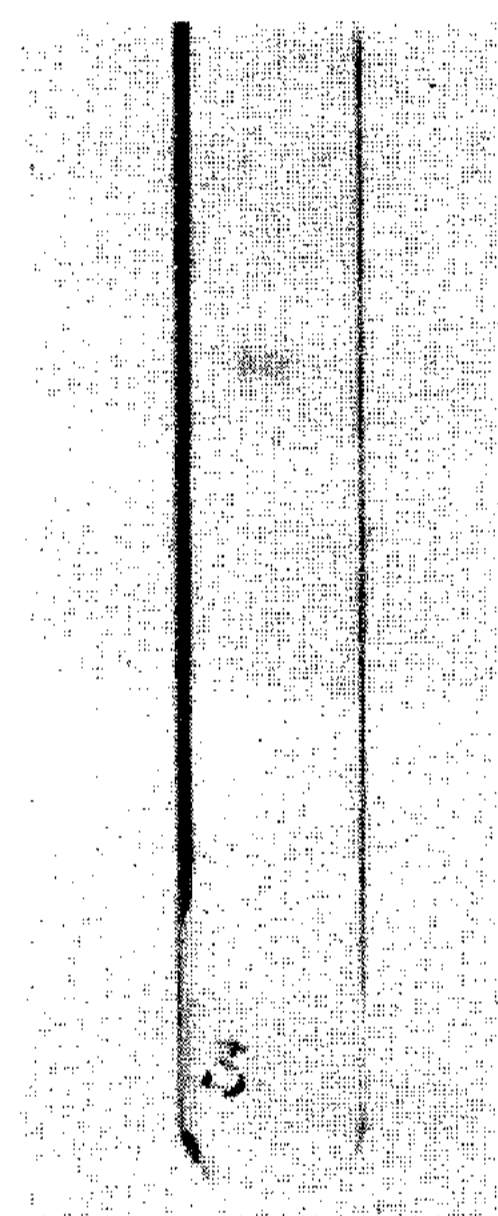
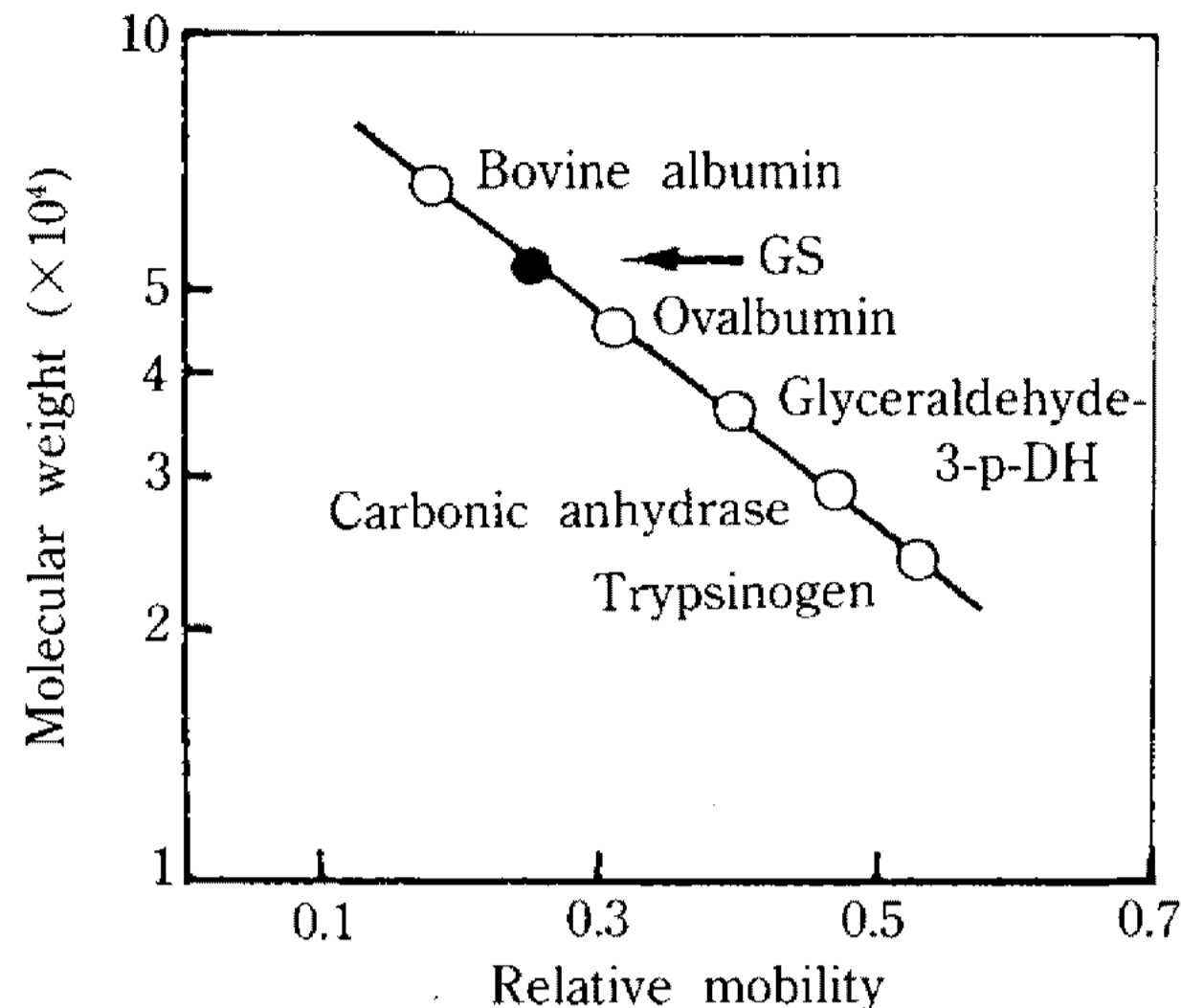


Fig. 4. SDS gel electrophoresis of GS from *K. pneumoniae*.

The GS, bovine albumine (66,000), ovalbumine (45,000), glyceraldehyde-3-p-DH (36,000), carbonic anhydrase (29,000), trypsinogen (24,000) were incubated with 1% SDS and 3% 2-mercaptoethanol at 30°C for 15 hr. The mixture (15 μg protein) was subjected to electrophoresis in the presence of 0.1% SDS at a current of 8 mA per tube for 5 hr at pH 7.2.

등과 같은 질소 함유 화합물의 이용에 관련된 유전자군(Ntr system)의 발현에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌지만 *B. subtilis* 등의 몇몇 세균에서는 GS adenylylation이 관찰되지 않고 있어 모든 세균이 동일한 조절 기작을 갖는 것은 아니다.

*K. pneumoniae*의 GS가 *E. coli* GS와 유사한 활성 조절기작을 가지고 있는지를 확인하기 위해 질소원의 종류와 양에 따른 adenylylation state와 total trans-

Table 2. Properties of glutamine synthetase from *K. pneumoniae*

Optimum pH	7.0 (transferring reaction)
Optimum temperature	37°C (at pH 7.0)
pH stability	5~8
Thermostability†	58°C
K_m value to	ADP 0.035 mM
	Hydroxylamine 3.63 mM
	Glutamine 9.75 mM

†Half of the initial activity was lost at the temperature indicated for 10 min

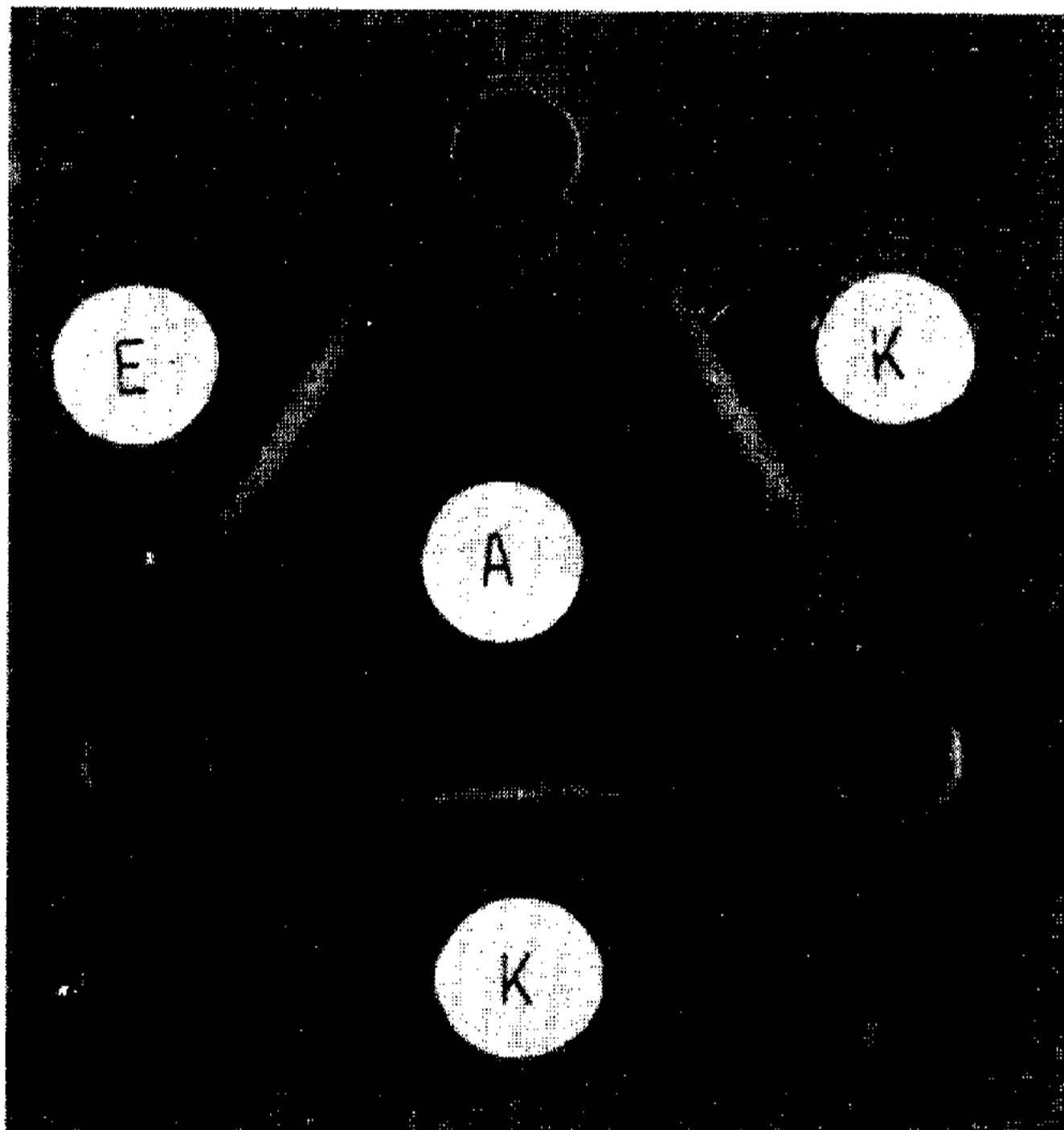


Fig. 5. Immunodiffusion of *K. pneumoniae* GS.
A: Antibody against *E. coli* GS, E: *E. coli* GS, K: *K. pneumoniae* GS

ferring activity의 변화를 살펴 보았다.

Transferring activity는 Table 3에서 보는 바와 같이 질소원으로서 사용한 NH_4Cl , glutamate의 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타냈으며 질소원으로서의 대사가 훨씬 더 용이한 NH_4Cl 가 glutamate 보다 더 낮은 농도에서부터 뚜렷하게 GS 활성을 저해하였다. Total transferring activity가 전사된 GS 단백질의 양과 비례하는 값임을 고려할 때 *K. pneumoniae* GS는 *E. coli*와 동일하게 Ntr system에 의하여 암모니아 repression을 받는다고 하겠다.

한편 adenylation state도 질소원의 농도 증가에

Table 3. The State of adenylation of *K. pneumoniae* GS at different concentrations of ammonium chloride and glutamate as a nitrogen source

Concentration (mM)	NH_4Cl		Glutamate	
	Activity (U/mg pro.)	\bar{n}^*	Activity (U/mg pro.)	\bar{n}
1	0.82	1.0	0.69	0.5
5	0.95	3.4	0.70	4.1
30	0.57	6.0	1.53	4.3
100	0.56	10.9	1.00	5.9

* $\bar{n} = 12 - 12$

$\times \frac{\text{activity in } 0.4 \text{ mM MnCl}_2 + 60 \text{ mM MgCl}_2 \text{ at pH } 7.2}{\text{activity in } 0.4 \text{ mM MnCl}_2 \text{ at pH } 7.38}$

따라 증가하였는데 glutamate 보다는 NH_4Cl 의 경우에서 뚜렷한 증가를 나타냈다. 이는 *K. pneumoniae*가 *E. coli*와 같이 GS의 활성조절을 위해 adenylation system을 가지고 있으며 이 system은 아미노산 등의 poor nitrogen source 보다는 rich nitrogen source인 유리 암모니아가 존재할 때 GS 활성을 현저하게 저해함을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로부터 *K. pneumoniae*의 GS가 분자량, subunit의 구성, amino acid 조성 등의 일반적 물성에서 *E. coli* GS와 매우 유사할 뿐만 아니라 그 발현과 활성 조절에 있어서도 *E. coli*와 동일하게 이루어지고 있음을 추정할 수 있었다.

따라서 *K. pneumoniae*의 질소 고정 능력에 미치는 *gln* operon의 역할을 규명함에 있어서 이미 밝혀진 *E. coli gln* operon과의 비교분석이 가능하며 나아가 이를 *K. pneumoniae*에 직접 적용하는 것도 가능할 것으로 생각된다.

요 약

*K. pneumoniae*의 *nif* 유전자 발현에 미치는 *glnA* 산물(GS)의 영향을 살펴보기 앞서 *K. pneumoniae*의 GS를 분리·정제하여 그 성질을 조사하였다.

*K. pneumoniae*의 GS는 분자량 약 600,000의 12개 동일 subunit으로 구성되어 있으며 최적 반응 pH 및 온도는 각기 pH 7.0, 37°C였고 pH 5~8 사이에서 활성의 변화가 크지 않았으며 57°C에서 10분간 열처리할 때 50%의 활성 감소가 나타났다.

또 암모니아 농도의 변화에 따라 adenylation-deadenylation 기작에 의한 활성조절기작이 *E. coli* GS와 동일 했으며 anti-*E. coli* GS 항체를 이용한 immunodiffusion에서도 *K. pneumoniae* GS가 *E. coli* GS와 혈청학적으로 매우 유사함이 드러났다.

참고문헌

1. Dixon, R.A.: *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 2745 (1984)
2. Magasanik, B.: *Trends in Biochemical Science*, **2**, 9 (1977)
3. Tubb, R.S.: *Nature*, **251**, 481 (1974)
4. Streicher, S.L., K.T. Shanmugam, F. Ausubel, C. Morandi and R.B. Goldberg: *J. Bacteriol.*, **120**, 815 (1974)
5. Shanmugam, K.T., F. O'Gara, K. Anderson and R.C. Valentine: *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, **29**, 263 (1978)
6. Tachicki, T., S. Wakisaka, H. Kumagai and T. Tochikura: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1487 (1981)
7. Lowry, O.H., N.T. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
8. Davis, B.J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci. US.*, **121**, 404 (1964)
9. Weber, K. and M. Osborn: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969)
10. Ouchterlony, O.: *Handbook of Immunodiffusion and Immuno-electrophoresis*, Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, Michigan, (1969)
11. Stadtman, E.R., P.Z. Smyrniotis, J.N. Davis and M.E. Wittenberger: *Anal. Biochem.*, **95**, 275 (1979)

(Received May 8, 1991)