

Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum NCIB 8327에서의 광수소발생 조절 기작에 대하여

나종욱 · 강사육

서울대학교 자연과학대학 미생물학과, 서울대학교 분자미생물학연구센터

녹색황세균인 *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* NCIB 8327의 성장은 암모늄, glutamine, glutamate와 질소가스를 각각의 질소원으로 사용하여 배양한 것 중에서 질소가스를 제외하고는 거의 일정하였고, 황화수소만 있을 경우보다 티오황산을 첨가하였을 때 좀 더 잘 자랐고, 아세트산을 더 첨가했을 때 매우 잘 자랐다. 4가지 서로 다른 질소원으로 키운 세포들 중에서 glutamine synthetase의 specific activity는 glutamate를 질소원으로 키운 세포들 중에서 glutamine synthetase의 경우와 거의 일정하였다. Glutamate에서 키운 세포의 파쇄액 중에서 반응액의 암모늄이온의 농도가 높아진 경우, glutamine synthetase의 활성은 낮아지고, glutamate synthase의 활성은 일정하며, glutamate dehydrogenase의 활성은 높아졌다. 암모늄이온의 농도를 달리하여 키운 세포의 파쇄액들 중에서 반응액의 암모늄이온의 농도가 높아짐에 따라 높은 농도의 암모늄이온에서 키운 세포의 파쇄액에서의 glutamine synthetase의 활성이 비교적 덜 불활성화되었다. Glutamine synthetase는 methionine sulfoximine의 농도가 높아짐에 따라 더 빨리 불활성화되었다. Glutamine synthetase는 빛이 있을 경우 활성이 증가하였고, 어두운 곳에서는 활성이 점차 낮아졌다. 온전한 세포에서의 수소발생은 빛에 의존하였고, 첨가된 암모늄 이온에 의해 저해되지만, methionine sulfoximine에 의해 곧바로 회복되었다. 수소발생이 빛에 의존하고, 암모늄 이온에 의해 쉽게 저해되었다. Methionine sulfoximine에 의해 빠르게 회복되는 것으로 보아, 본 균주는 nitrogenase에 의해 수소발생이 일어나며 glutamine synthetase의 간접적인 조절을 받는 것으로 추정된다.

KEY WORDS □ glutamate dehydrogenase, glutamate synthase, glutamine synthetase, nitrogenase

미생물에서 발견되는 수소의 대사는 수소의 흡수와 발생으로 대별할 수 있다. 수소의 흡수는 수소산화세균(hydrogen oxidizing bacteria), 메탄생성세균(methanogenic bacteria), 황산환원세균(sulfate reducer), 질소고정세균 및 광합성세균 등에서 발견되며 H_2 uptake hydrogenase의 매개에 의하여 수소가 흡수된다. 미생물이 수소를 만들기 위해서는 혐기적 환경이 필수적이며, 이러한 조건에서 당을 이용한 발효의 부산물로 수소가 형성되는 경우와 질소를 고정하는 미생물에서 암모니아합성과 동시에 나타나는 수소발생의 경우로 나누어 생각할 수 있다. 전자전달의 경우는 formate-hydrogenlyase와 phosphoclastic reaction에서 발견되는 H_2 evolution hydrogenase의 예가 있고, 후자의 경우는 nitrogenase의 예가 있다. 빛에 의존하는 수소의 발생은 녹조류인 *Scenedesmus*에서 처음 관찰된 이래 질소고정 능력이 있는 광합성세균에서 일어나는 보편적인 현상으로 인식되고 있다(3). 紫色非黃細菌에서 nitrogenase활성은 암모니아나 glutamine과 같은 질소화합물의 첨가에 의해 빠르고 완전하게 저해된다(12). 이러한 저해는 가

역적이고 효소의 활성은 질소원의 소비로 완전하게 회복될 수 있다(1). 효소에 대한 이러한 효과는 'switch on/off' 현상으로 정의되고(15) 이것은 유전자 수준에서 생기는 긴 시간 동안의 억제(repression)와는 명백하게 구별된다. Glutamine synthetase에 의해 합성된 glutamine이 수소발생을 저해하는 것으로 인식되고 있다(1, 6). 그러나, 이러한 결과는 紫色細菌에서의 경우이고 綠色細菌에서의 'switch on/off' 현상에 대한 연구 결과는 암모니아에 의한 저해에 한정되어 있으며(4, 5), 구체적인 기작은 가설 단계에 있으므로 綠色細菌내에서의 빛의 전달과 암모니아고정 및 질소고정에 관한 조절기작을 밝히는 자료가 요구된다.

본 논문에서는 본 균주로부터의 수소 발생에 영향을 끼치는 요인을 찾아 내고 암모니아 대사과정과 nitrogenase 및 hydrogenase의 조절에 관여하는 요인을 밝혀 녹색황세균에서 빛에 의한 수소발생현상과 질소대사과정간의 조절기작을 규명하는데 밀거름이 되고자 하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험에 사용한 균주인 *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* NCIB 8327는 R. Sirevag(Department of Biology, University of Oslo, Norway)로부터 분양받은 것이다.

시약

고순도의 상업용 표준제품이 본 실험에서 시약으로 사용되었다.

사용배지 및 배양

배지제조 및 배양은 Na와 Kang(8)의 방법이 사용되었고, 질소원으로는 NH_4Cl , L-glutamine, glutamate 및 질소가스가 사용되었다.

배양조건과 성장도 측정

접종용 배양액은 계대배양용 배지의 균주로부터 변형된 Pfennig의 배지 500 ml에 10%로 접종하여 30°C, 330 Lux에서 3일간 배양하여 사용하였다. 효소 정제용 균체는 10 l 배지에 접종용 배양액을 5% 정도 접종하여 위와 동일한 빛의 조건에서 4일간 배양한 다음 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻었다. 세균의 성장은 1 ml의 배양액에서 원심분리로 세포를 수확하여 세균색소의 추출용매인 acetone/methanol 혼합용액(v/v=7/2)을 넣고 1시간 정도 암실에서 기다린 후, 원심분리하여 얻은 상층액의 흡광도를 세균엽록소(bacteriochlorophyll) d에 해당하는 653 nm에서 측정하여 결정하였다.

조효소의 제조

배양액으로부터 6,000×g에서 20분의 원심분리로 수확된 세포는 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)로 두번 세척하여 초음파분쇄기나 Bead Beater로 파쇄된 뒤 10,000×g에서 30분의 원심분리로 수확된 상등액이 해당 실험의 조효소로 사용되었다.

단백질 정량

단백질의 양은 bovine serum albumin(Sigma Chemical Co.)을 표준단백질로 하여 Lowry 등(7)의 방법과 Bradford(2) 방법으로 측정되었다.

효소의 활성도 측정

Glutamine synthetase의 활성도는 Shapiro와 Stadtman(10) 방법에 따라 γ -glutamyltransferase 활성으로 측정되었다. 즉, 반응 혼합액은 80 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0), 0.8 mM ADP, 40 mM Na_2AsO_4 에 120 mM $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 과 120 mM NaOH를 섞어 사용하였다. 효소활성도는 효소시료 0.5 ml과 반응 혼합액 0.5 ml을 섞어 37°C에서 20분간 반응시킨 다음 반응정지 혼합액(10% FeCl_3 , 4 ml, 24% TCA 1 ml, 6 N HCl 0.5 ml, D.W. 6.5 ml) 2 ml을 넣어 540 nm에서의 흡광도변화를 측정하여 정하였다. 효소 활성단위는 1분당 1 μmol 의 γ -glutamylhydroxamate를 생성하는 양을 1 unit로 정하였다.

Glutamate synthase의 활성도는 Khanna와 Nicholas(5)의 방법에 따라 다음과 같이 측정되었다. 즉, 반응 혼합액은 50 mM HEPES buffer(pH 7.8), 5

mM 2-oxoglutarate, 35 μM NAD(P)H 및 10 mM L-glutamine을 섞어 사용하였다. 효소활성도는 효소 시료 0.5 ml과 반응혼합액 0.5 ml을 섞어 30°C에서 20분간 반응시킨 다음 340 nm에서의 흡광도 변화를 측정하여 정하였다. 효소 활성단위는 1분당 1 mmole의 NAD(P)H가 산화되는 양을 1 unit로 정하였다.

Glutamate dehydrogenase의 활성도는 Scheid H. W.(11)의 방법에 따라 다음과 같이 측정되었다. 즉, 반응혼합액은 50 mM HEPES buffer(pH 7.8), 10 μM 2-oxoglutarate, 35 μM NAD(P)H 및 10 mM NH_4Cl 을 섞어 사용하였다. 효소활성도는 효소시료 0.5 ml과 반응혼합액 0.5 ml을 섞어 40°C에서 20분간 반응시킨 다음 340 nm에서의 흡광도 변화를 측정하여 정하였다. 효소 활성단위는 1분당 1 mmole의 NAD(P)H가 산화되는 양을 1 unit로 정하였다.

수소발생의 측정

수소발생은 Na와 Kang(8)의 방법으로 측정되었다.

결과 및 고찰

미생물이 수소를 만들기 위해서는 혐기적 환경이 필수적이며, 이러한 조건에서 당을 이용한 발효의 부산물로 수소가 형성되는 경우와 질소를 고정하는 미생물에서 암모니아합성과 동시에 나타나는 수소발생의 경우로 나누어 생각할 수 있다. *Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum*에서의 연구는 암모니아의 농도가 30 mM 이하에서는 glutamine synthetase/glutamate synthase pathway를 통하지만, 그 이상의 농도에서는 glutamate dehydrogenase를 통하여 암모니아를 동화할 뿐만 아니라, alanine, glycine, serine, lysine 등의 아미노산에 의해 저해되며, mixed alkyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)에 의해 glutamine synthetase의 adenylation 상태가 안정화됨을 밝히는 보고(5)와 *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum*에서 nitrogenase의 'switch-off'가 1 mM의 암모니아에 의해서 일어나고, glutamine synthetase의 억제제인 methionine sulfoximine에 의해 'ammonia switch-off'가 억제된다는 보고(4)가 있다.

생장에 미치는 질소원의 영향

암모늄, glutamine, glutamate와 질소가스의 4가지를 각각의 질소원으로 사용하여 키운 배지 중에서 본 균주의 성장은 질소가스를 제외하고는 거의 일정하였다(Fig. 1). 또한, 황화수소만 있을 경우보다 티오황산을 첨가하였을 때 좀 더 잘 자랐을 뿐만 아니라 아세트산을 첨가했을 때 매우 잘 자랐다(Fig. 2). 이는 질소원이 광합성색소를 합성하는데 필수요소이고, 황화물과 간단한 구조의 유기산은 혐기성광합성작용의 전자공여체로 사용되기 때문에 생장이 이들에 의해 영향을 받는 것으로 생각된다.

질소원에 따른 효소활성 변화

4가지 서로 다른 질소원으로 키운 세포들 중에서

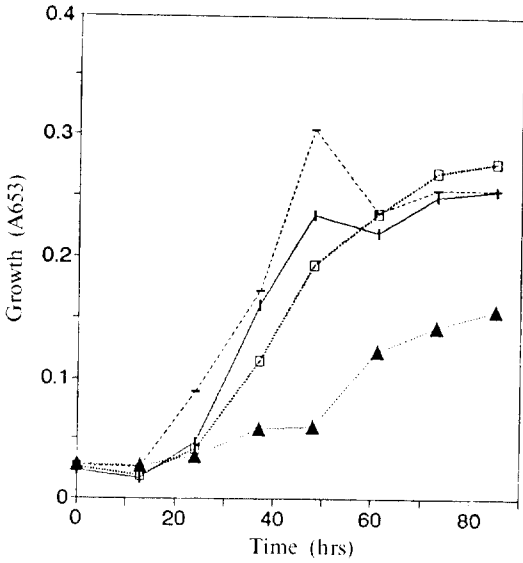


Fig. 1. Light-growth of *C. thiosulfatophilum* in the medium containing different nitrogen sources: ammonia (|), glutamine (—), glutamate (□), nitrogen gas (▲).

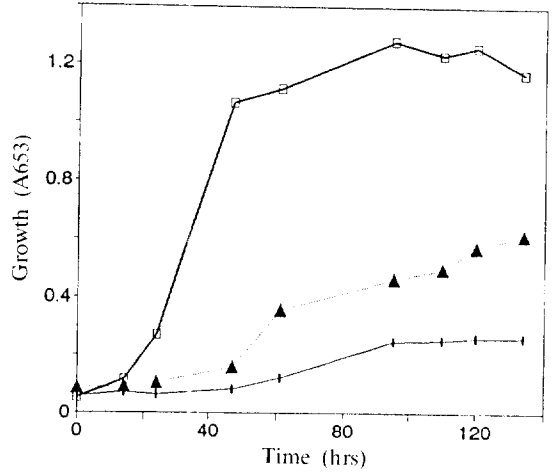


Fig. 2. Light-growth of *C. thiosulfatophilum* in the medium containing different sulfur sources: S (|), S+S₂O₃ (▲), S+S₂O₃+acetate (□).

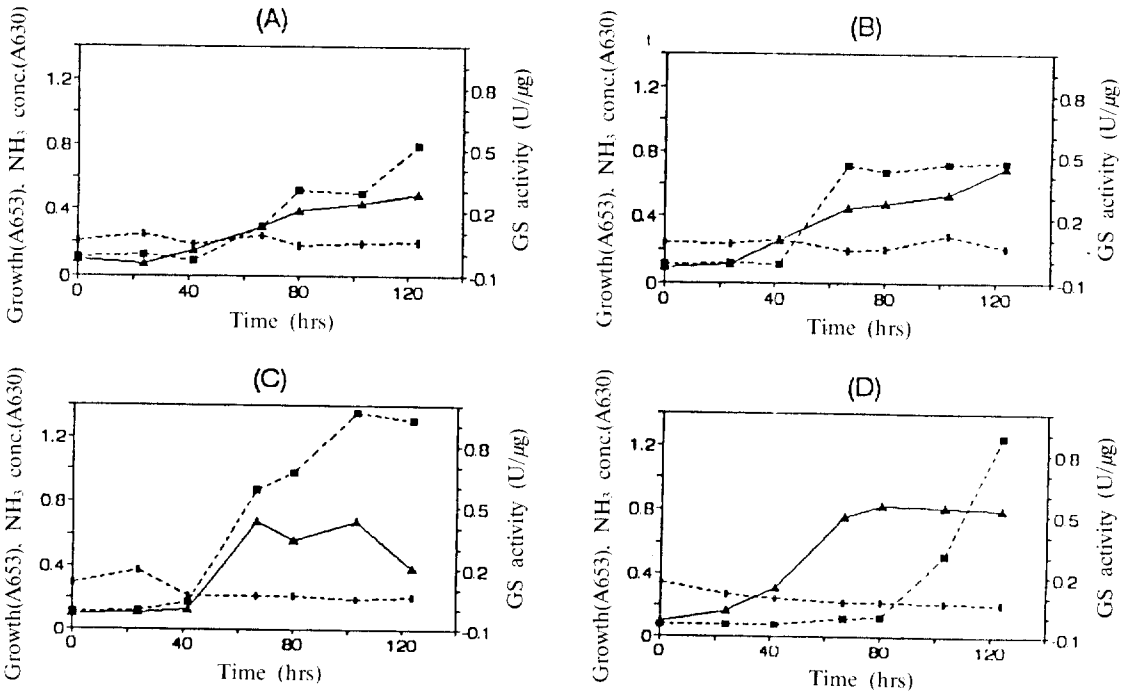


Fig. 3. Glutamine synthetase activity and changes of extracellular ammonium ion concentration during the culture of *C. thiosulfatophilum* in the medium containing 4 different nitrogen sources: nitrogen gas (A), ammonia (B), glutamate (C), glutamine (D); growth (▲), specific activity (■), ammonia concentration (|).

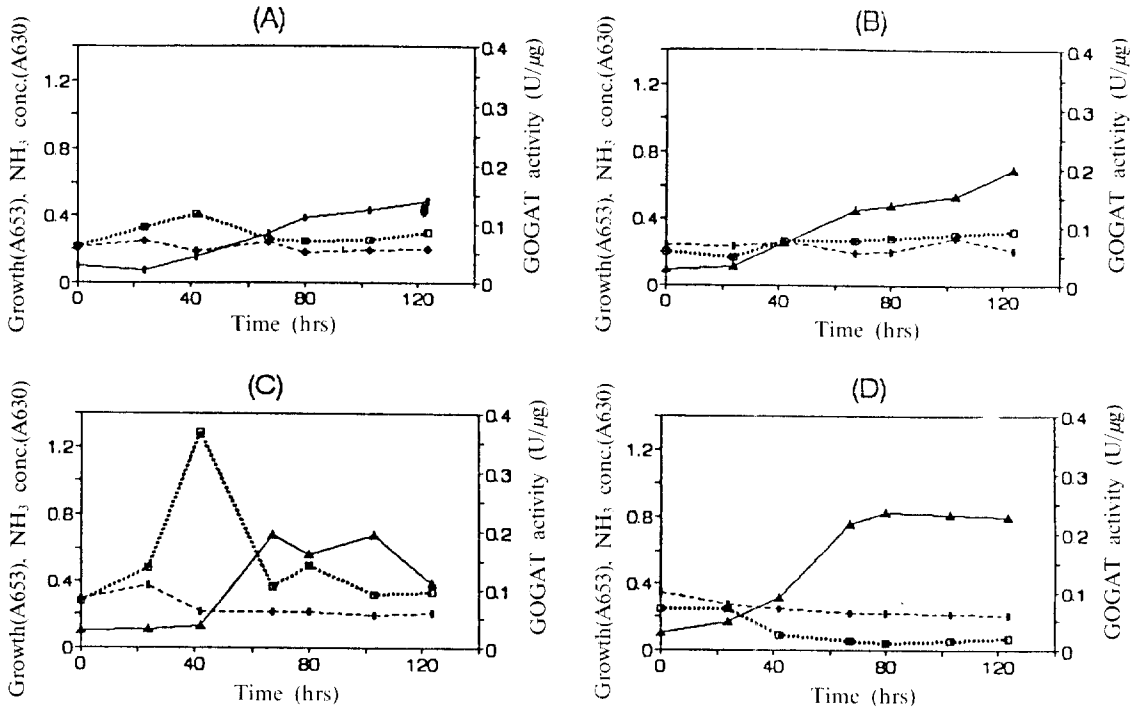


Fig. 4. *Glutamate synthase (GOGAT) activity and changes of extracellular ammonium ion concentration during the culture of C. thiosulfatophilum in the medium containing 4 different nitrogen sources: nitrogen gas (A), ammonia (B), glutamate (C), glutamine (D); growth (▲), specific activity (■), ammonia concentration(□).*

glutamine synthetase의 specific activity는 glutamate를 질소원으로 키운 세포의 파쇄액에서 최고로 높았지만(Fig. 3), glutamate synthase의 경우는 거의 일정하였다(Fig. 4). 이는 glutamine synthetase가 암모니아나 glutamine의 농도에 따라 매우 민감하게 활성이 조절되지만, glutamate synthase는 glutamine synthetase보다 이러한 물질에 덜 민감하게 조절되기 때문인 것으로 생각된다. Glutamate에서 키운 세포의 파쇄액 중에서 반응액의 암모늄이온의 농도가 높아진 경우, glutamine synthetase의 활성은 낮아지고, glutamate synthase의 활성은 일정하며, glutamate dehydrogenase의 활성은 높아졌다(Fig. 5). 암모늄이온의 농도를 달리하여 키운 세포의 파쇄액들 중에서 반응액의 암모늄이온의 농도가 높아짐에 따라 높은 농도의 암모늄이온에서 키운 세포의 파쇄액에서의 glutamine synthetase의 활성이 비교적 덜 불활성화되었다(Fig. 6). 이러한 사실은 암모니아의 농도가 높을 때(1 mM 이상)는 glutamate dehydrogenase를 통하여 암모니아가 동화되지만, 농도가 낮을 때에는 glutamine synthetase/glutamate synthase 경로를 거쳐 암모니아가 동화된다는 사실(10, 13)과 일치한다.

Glutamine synthetase활성과 수소발생의 관련성

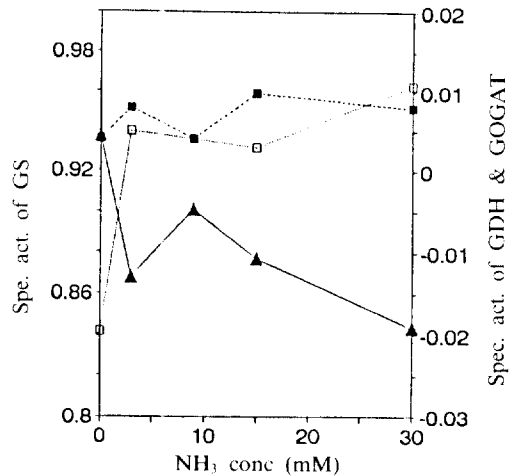


Fig. 5. *Effect of ammonium ion concentration on the activity of glutamine synthetase, glutamate synthase (GOGAT) and glutamate dehydrogenase in the crude extracts from whole cells of C. thiosulfatophilum grown in the medium containing glutamate: glutamine synthetase (▲), glutamate synthase (■) and glutamate dehydrogenase (□).*

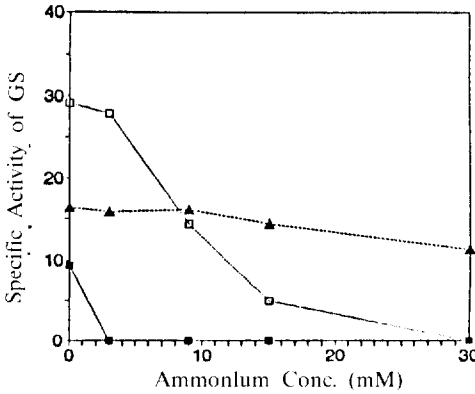


Fig. 6. Effect of ammonium ion concentration on the glutamine synthetase activity in the crude extracts from whole cells of *C. thiosulfatophilum* grown in the medium containing different NH₄Cl concentration: 0% (□), 0.03% (○), 0.3% (▲).

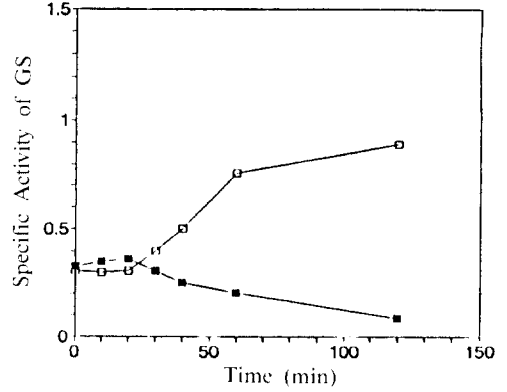


Fig. 8. Effect of light on the glutamine synthetase activity in the whole cells of *C. thiosulfatophilum* grown in the medium containing glutamate as nitrogen source: light (□), dark (■).

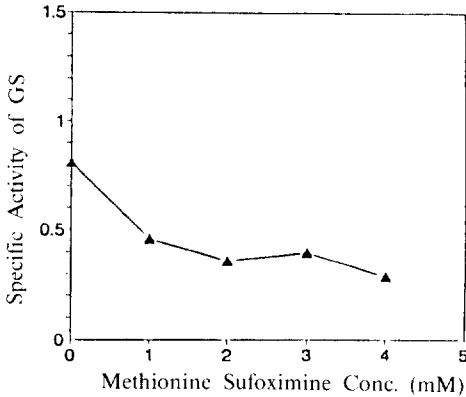


Fig. 7. Effect of methionine sulfoximine (MSX) concentration on the glutamine synthetase activity in the crude extracts from whole cells of *C. thiosulfatophilum* grown in the medium containing glutamate as nitrogen source.

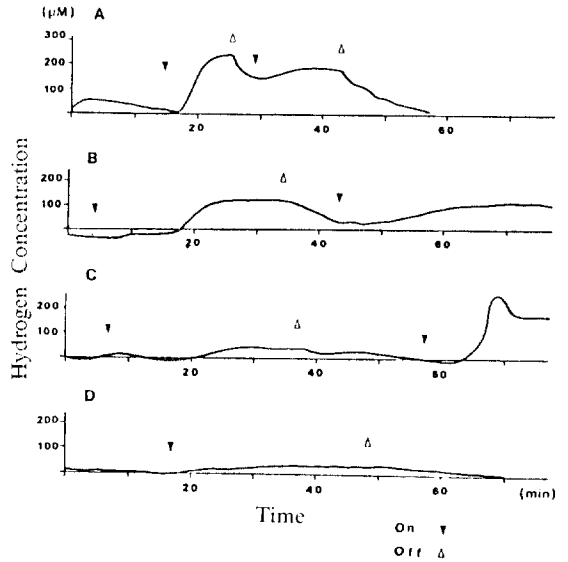


Fig. 9. Effect of light on the hydrogen evolution in the cells of *C. thiosulfatophilum* grown in the medium containing 4 different nitrogen sources: ammonia (A), glutamate (B), glutamine (C), nitrogen gas (D).

Glutamine synthetase의 활성이 methionine sulfoximine(MSX)의 농도가 높아짐에 따라 더 빨리 불활성화 되고(Fig. 7), 빛이 있을 경우 증가하지만 어두운 곳에서 점차 낮아지는 현상(Fig. 8)은 *Rhodospirillum rubrum*(14)과 *Rhodopseudomonas sphaeroides*(6)에서처럼 glutamine synthetase의 활성이 어두운 곳에서는 감소하지만 다시 빛을 쬐이면 원상복귀된다는 사실과 일치하였다. 4가지 서로 다른 질소원으로 키운 온전한 세포에서의 수소발생은 빛에 의존하고(Fig. 9), 첨가된 암모늄 이온의 농도가 증가함에 따라 저해되지만, methionine sulfoximine에 의해 곧바로 회복되었다(8). 이 경우는 암모늄이온이 배양액속에 매우 낮은 농도로 일정량 공급될 때에는 빛에 의해

수소가 발생된다는 보고(9)와 일치한다. 수소발생이 빛에 의존하고, 고농도의 암모늄 이온에 의해 쉽게 저해되었다가 methionine sulfoximine에 의해 빠르게 회복되는 것으로 보아, 본 균주는 nitrogenase에 의해 수소발생이 일어나며 다른 세균과 같이 glutamine synthetase의 간접적인 조절을 받는 것으로 추정된다. 따라서, 자색세균에서의 "switch on/off"

현상(15)이 암모늄이온에 의한 직접적인 영향보다는 암모니아 대사과정 중에 생기는 어떤 중간산물에 의해 매개되며(1, 12), 그것이 glutamine synthetase에 의해 합성된 glutamine일 것이라는 보고(1, 6)를 유념해 볼 때 'switch on/off' 현상이 본 균주에도 적용되리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. **Arp D.J. and W.G. Zumft**, 1983. L-methionine-SR-sulfoximine as a probe for the role of glutamine synthetase in nitrogenase switch-off ammonia and glutamine in *Rhodospseudomonas palustris*. *Arch. Microbiol.* **134**, 1722-1725.
2. **Bradford, M.M.**, 1976. A rapid and sensitive method of the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
3. **Colbeau, A., B.C. Kelley and P.M. Vignais**, 1980. Hydrogenase activity in *Rhodospseudomonas capsulata*: relationship with nitrogenase activity. *J. Bacteriol.* **144**, 141-148.
4. **Heda G.D. and M.T. Madigan**, 1986. Aspects of nitrogen fixation in *Chlorobium*. *Arch. Microbiol.* **143**, 330-336.
5. **Khanna S. and D.J.D. Nicholas**, 1983. Some properties of glutamine synthetase and glutamate synthase from *Chlorobium vibrioform f. thiosulfatophilum*. *Arch. Microbiol.* **134**, 98-103.
6. **Lee, H.J.**, 1986. Regulation of nitrogen fixation and ammonia assimilation in *Rhodospseudomonas sphaeroides* D-230. Ph. D. theses in SNU.
7. **Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall**, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
8. **Na, J.-U. and S.-O. Kang**, 1992. Factors affecting hydrogen evolution in *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* NCIB 8327. *Kor. J. Microbiol.* **30**, 553-557.
9. **Ormerod J.G., K.S. Ormerod and H. Gest**, 1961. Light-dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria: relationships with nitrogen metabolism. *Arch. Bioch. Biophys.* **94**, 449-463.
10. **Shapiro B.M. and E.R. Stadtman**, 1970. Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). 910-922. In: *Methods in Enzymology* (Vol. 17A), Tabor H. and C.W. Zabor (ed.), Academic Press, New York and London.
11. **Sheid H.W.**, 1980. *Z. Nat.* **35C**, 213-221.
12. **Sweet W.J. and R.H. Burris**, 1982. Effects of in vivo treatments on the activity of nitrogenase isolated from *Rhodospirillum rubrum*. *Bioch. Biophys. Acta.* **680**, 17-20.
13. **Taylor B.**, 1978. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 1127-1162.
14. **Woehle, D.L., B.A. Lueddecke and P.W. Ludden**, 1990. ATP-dependent and NAD-dependent modification of glutamine synthetase from *Rhodospirillum rubrum in vitro*. *J. Biol. Chem.* **265**, 13741-13749.
15. **Zumft W.G. and F. Castillo**, 1978. Regulatory properties of the nitrogenase from *Rhodospseudomonas palustris*. *Arch. Microbiol.* **117**, 53-60.

(Received December 3, 1992)

(Accepted December 18, 1992)

ABSTRACT: Light-dependent Hydrogen Production in *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* NCIB 8327: A Possibility of Regulation via Glutamine Synthetase

Na, Jong-Uk and Sa-Ouk Kang (Department of Microbiology, College of Natural Sciences, and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University)

Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum NCIB 8327 was grown on modified Pfennig's medium using ammonium chloride, glutamine, glutamate, or dinitrogen gas as nitrogen sources. Except for the case of dinitrogen gas, the extent of growth was almost the same. The specific activity of glutamine synthetase in crude extracts is the highest in the cells which were grown on the medium containing glutamate, but that of glutamate synthase is uniform for all four nitrogen sources. When the concentration of ammonium ions increases in the reaction mixture, the specific activity of glutamine synthetase in crude extract from the cells grown on glutamate decreases, but that of glutamate dehydrogenase increases, whereas that of glutamate synthase remains unchanged. When the concentration of methionine sulfoximine increases, the activity of glutamine synthetases decreases rapidly. On the other hand, when the concentration of ammonium ions increases in the reaction mixture gradually, the activity of glutamine synthetase from the cells grown on higher concentration of ammonium ions less decreases. In the presence of light, the activity of glutamine synthetase increases, but in the dark it decreases gradually. The production of hydrogen in intact cells depends on light. It is inhibited by adding ammonium ions, but restores immediately by adding methionine sulfoximine. The production of hydrogen in this strain can be mediated by nitrogenase only, and regulated by glutamine synthetase.