KOR. JOUR. MICROBIOL April, 1993 p. 166~174 Vol. 31, No. 2

Streptomyces coelicolor (Müller)의 과산화수소 대응 반응에 관련된 단백질 양상의 분석

정혜정 · 노정혜*

서울대학교 자연과학대학 미생물학과, 서울대학교 분자미생물학연구센터

Streptomyces coelicolor **(Müller)의 세포에 100 μM의 과산화수소를 1시간 동안 처리하여 과산화수소 스트레스 중에 생성되는 단백질을 L-[^{35}S]-methionine을 이용하여 순간 표지하였다. 단백질을 추출하여 2차원 겔 전기영동으로 분석한 결과 지수 성장기의 세포가 가지는 총 세포 단백질 중 약 100개의 단백질의 합성이 과산화수소에 의해 증가되는 것을 관찰하였다. 이들을 Pin (peroxide inducible) 단백질이라고 명명하고 과산화수소 처리 후 발현이 증가되는 시간에 따라 네 그룹으로 나누었다. 약 60개의 Pin 단백질은 과산화수소 처리 후 20분 이내에 발현이 증가하여 1시간 동안 지속적으로 다량 합성되었다. 정체 성장기의 세포에서는 62개의 단백질의 합성이 과산화수소에 의해 증가되었으며, 이 중 21개의 단백질은 지수 성장기의 Pin 단백질과 일치하였다. 과산화수소에 대한 저항성이 증가한 세 가지 돌연변이체의 단백질을 지수 성장기에서 추출하여 2차원 겔 전기영동으로 분석한 결과, 각각의 경우 15, 17, 15개의 Pin 단백질을 야생형보다 항상적으로 다량 합성하는 것을 관찰하였다. 이 Pin 단백질 중 9개(D74.7a, E76.0c, E23.3, F50.7, F47.2a, F25.5, G39.6b, G24.0, H39.6a)는 두 가지 돌연변이체에서 공통적으로 증가되었고, 다른 3개(F39.7, H61.7, I20.8)는 세 가지 돌연변이체 모두에서 증가되었다. 따라서 이 단백질들은 *S. coelicolor*가 과산화수소 스트레스에 대응하는데 있어 중요한 역할을 담당한다고 추정된다.**

KEY WORDS □ ***Streptomyces coelicolor*** **Müller, hydrogen peroxide stress, two-dimensional gel electrophoresis, Pin(peroxide-inducible) proteins, hydrogen peroxide-resistant mutants**

산화적 스트레스에 대응하는 세포의 유전학적, 생리학적 반응에 관한 연구는 *Escherichia coli*와 *Salmonella typhimurium*을 대상으로 하여 활발히 진행되어 왔다(7). 산소가 존재하는 환경에서 생장하는 세균은 자연적으로 발생하는 활성 산소족에 대한 방어기작을 가지고 있는데, *E. coli* 등의 세균은 일련의 연관된 유전자를 유도함으로써 산화적 스트레스에 대처한다. 유도되는 단백질을 알아보기 위하여, 스트레스를 주는 동안 생성되는 단백질을 방사능으로 표지하고 이를 2차원으로 전기영동하여 분석하는 방법이 이용되어 왔다(1, 9). 이로부터 산화적 스트레스에 관련되는 두 가지 자극유전자군(stimulon), 즉, 과산화수소에 의해 유도되는 것과 superoxide radical에 의해 유도되는 것이 알려지게 되었다(2). 자극유전자군에 포함되는 유전자의 발현은 여러 조절단백질(regulator)에 의해 조절되고 같은 조절단백질의 조절을 받는 단백질들은 하나의 조절군(regulon)을 형성한다. *E. coli*와 *S. typhimurium*에서 과산화수소에 의해 발현이 유도되는 단백질 30여 가지 중 9가지는 OxyR 조절군에 포함된다(1, 8).

방선균(actinomycetes)의 한 속인 *Streptomyces*는 균류와 유사한 형태분화 과정을 거치는 호기성 세균이다. *S. coelicolor*가 과산화수소 스트레스에 대해서 어떻게 반응하는가를 조사해 본 결과, *S. coelicolor*도 *E. coli* 및 *S. typhimurium*과 마찬가지로 과산화수소에 대한 적응력을 가지고 있음이 알려졌다(4). 또한, 야생형에 비해서 과산화수소에 대한 저항성이 현저하게 증가한 돌연변이체들을 선발하여 그 특성을 조사해 본 결과, 이 돌연변이체 중에는 산화적 스트레스에 대한 반응을 조절하는 조절단백질의 돌연변이체가 있다는 추측을 할 수 있었다(4).

본 연구에서는, *S. coelicolor*가 과산화수소에 대한 저항성을 획득하는 과정에서 특이적으로 합성이 증가하는 단백질들이 존재할 것이라는 가정하에 과산화수소 처리에 의해 나타나는 단백질 발현 양상의 변화를 살펴보고 과산화수소에 대한 저항성이 증가한 *S. coelicolor* 돌연변이체들의 단백질을 야생형의 단백질과 비교하였다.

재료 및 방법

균주

S. coelicolor (Müller) (ATCC 10147)를 야생형으로 사용하였다. 과산화수소에 대한 저항성이 증가한 돌연변이체는, *S. coelicolor*의 포자에 NTG(N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine)를 처리하고 과산화수소에 대한 저항성을 야생형과 비교하여 그 저항성이 증가한 것을 선별하여 얻어내었다(4). 본 실험에서는

이 중 N7, N9, N24로 명명된 세 가지 돌연변이체를 사용하였다.

배양 조건

Hopwood 등의 방법(3)을 이용하여 얻은 포자를 YEME 배지에서 발아시키고, 발아한 배양액을 SY 배지(6)에 접종하여 30°C 진탕배양기에서 120 rpm으로 배양하였다. 성장 단계는 640 nm에서의 흡광도를 측정하여 결정하였는데, 지수 성장기의 시료는 배양 시간이 약 24시간 경과한 후 OD_{640}이 1.2~1.3에 이르렀을 때 취하였으며 정체 성장기의 시료는 배양 시간이 60시간 이상 경과하여 OD_{640}이 2.5 이상 되었을 때 취하였다.

과산화수소 처리 및 방사성 동위원소 표지

지수 성장기 또는 정체 성장기의 세포 배양액을 1 m*l*씩 mini-bead beater cell로 옮긴 후 과산화수소를 최종 농도가 100 μM이 되도록 희석하여 첨가하였다. 이와 동시에 L-[^{35}S]-methionine(>1,000 Ci/mmol; Amersham)을 20~30 μCi 첨가하고 30°C에서 1시간 또는 명시된 시간 동안 진탕배양하였다.

세포 추출액의 제조

일정 시간 동안 과산화수소를 처리한 세포 배양액을 1분간 얼음에서 식히고 원심분리하여 그 침전체를 세포 세척 용액(10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 2 mM PMSF)으로 세 번 세척하였다. 수확한 세포에 동일 부피의 유리 구슬(지름 0.1 mm)과 시료 용액 I(50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.3% SDS, 5% β-mercaptoethanol) 200 μ*l*를 첨가하고 −70°C에서 1시간 이상 얼린 후 mini-bead beater를 사용하여 분쇄하였다. 분쇄액을 100°C에서 5분간 중탕하고 식힌 후 DNase I과 RNase A를 각각 100 μg/m*l*, 50 μg/m*l*로 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 다시 100°C에서 3분간 중탕하고 식혔다. 이 현탁액을 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액만 취하고 여기에 동일 부피의 acetone을 첨가하여 단백질을 침전시켰다. 시료 용액 III(2% Ampholine, pH 5~7 : pH 3.5~10=9 : 1, 5.5% Triton X-100, 0.3% SDS, 2.8% β-mercaptoethanol) 60 μ*l*에 단백질 침전을 재현탁한 후 urea를 최종 농도가 9 M이 되도록 첨가하였다. Liquid scintillation으로 각 시료의 방사능 활성을 측정하였다.

2차원 전기영동

O'Farrell의 방법(5)에 따라 1 차원 등전점 전기영동을 행한 후 2차원 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 수행하였으며 전기영동 기구는 Bio-Rad사의 PROTEAN II xi를 사용하였다.

등전점 전기영동은 지름 1.5 mm, 길이 14 cm의 원통형 겔(3.5% acrylamide, 2% Ampholine, pH 5~7 : pH 3.5~10=4 : 1, 2% Triton X-100, 8 M urea) 상단에 250만 cpm의 시료를 얹은 후 6 mM H_3PO_4와 100 mM NaOH를 전해질로 사용하여 수행하였다. 전개는 400 V에서 12시간, 그리고 800 V에서 10시간 30분 동안 행하여 총 13,200 Vh에 이르도록 하였다. 전개가 끝난 겔은 유리관에서 빼낸 후 SDS-시료 환원 용액(375 mM Tris-HCl, pH 8.8, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.006% bromophenol blue) 5 m*l*에 30분간 담그어 두었다가 2차원 평판 겔로 옮겼다.

2차원 전기영동은 15 cm×16 cm×1.5 mm의 SDS-폴리아크릴아마이드 겔(10%, pH 8.8)을 사용하여 겔 하나당 40 mA의 일정 전류에서 bromophenol blue가 겔의 최하단에 올 때까지 전개하였다.

1차원 겔의 pH 경사도는, 함께 전기영동시킨 대조구 겔을 5 mm 간격으로 잘라서 25 mM KCl 1 m*l*에 1시간 이상 담그어 용출시킨 후 pH meter를 사용하여 측정하였다. 겔의 pH 구간을 7개로 나누어 pH 4.2부터 5.1의 구간은 C, pH 5.1부터 5.8의 구간은 D, pH 5.8부터 6.0의 구간은 E, pH 6.0부터 6.2의 구간은 F, pH 6.2부터 6.4의 구간은 G, pH 6.4부터 6.6의 구간은 H, 그리고 pH 6.6부터 7.5의 구간은 I라고 명명하였다. 단백질의 분자량은, 표준 단백질(Boehringer Mannheim Biochemica, Cat. No. 750 115)을 넣어 굳힌 지름 1.5 mm, 길이 5 mm의 1% agarose 조각을 2차원 전기영동시 함께 전개시켜 Coomassie Brilliant Blue로 염색, 비교함으로써 결정하였다.

Autoradiography

전개가 끝난 평판 겔을 고정액(40% methanol, 10% acetic acid)에 담그어 1시간 동안 흔들어 준 후 80°C에서 말렸다. 말린 겔 위에 X-ray 필름(Agfa)을 덮고 2주일 동안 −70°C에서 감광시켰다.

결과 및 고찰

지수 성장기의 *S. coelicolor*에서 과산화수소 처리에 의하여 유도되는 단백질의 분석

지수 성장기의 *S. coelicolor*에 100 μM의 과산화수소를 미리 처리하면, 이후에 20 mM의 과산화수소를 처리할 때의 생존률이 미리 처리하지 않은 경우에 비해서 7배 정도 증가하고 이 과정에서 몇 가지 산화환원효소의 활성이 함께 증가함을 관찰하였다(4). 이와 같이 *S. coelicolor*가 과산화수소에 대한 대응력을 획득하는 과정에서는 *E. coli* 및 *S. typhimurium*의 경우와 마찬가지로 단백질의 새로운 합성이 관여할 것이라고 생각하여 이 적응 현상을 전체적인 단백질 수준에서 관찰해 보았다.

100 μM의 과산화수소를 1시간 동안 처리한 지수 성장기의 세포와 과산화수소를 처리하지 않은 대조구 세포로부터 각각 총 세포 단백질을 추출하여 2차원 전기영동으로 분리하였다. 2차원 autoradiogram 상에서 약 1,400개의 세포 단백질을 구분할 수 있었고, 각각의 등전점 값의 범위와 분자량에 따라 이름을 붙여 비교하였다. 예를 들어 D74.7a는, 등전점 값이 pH 5.1~5.8 구간에 존재하고 분자량이 74.7 kD인 단백질 중에서 등전점 값이 가장 낮은 단백질이다.

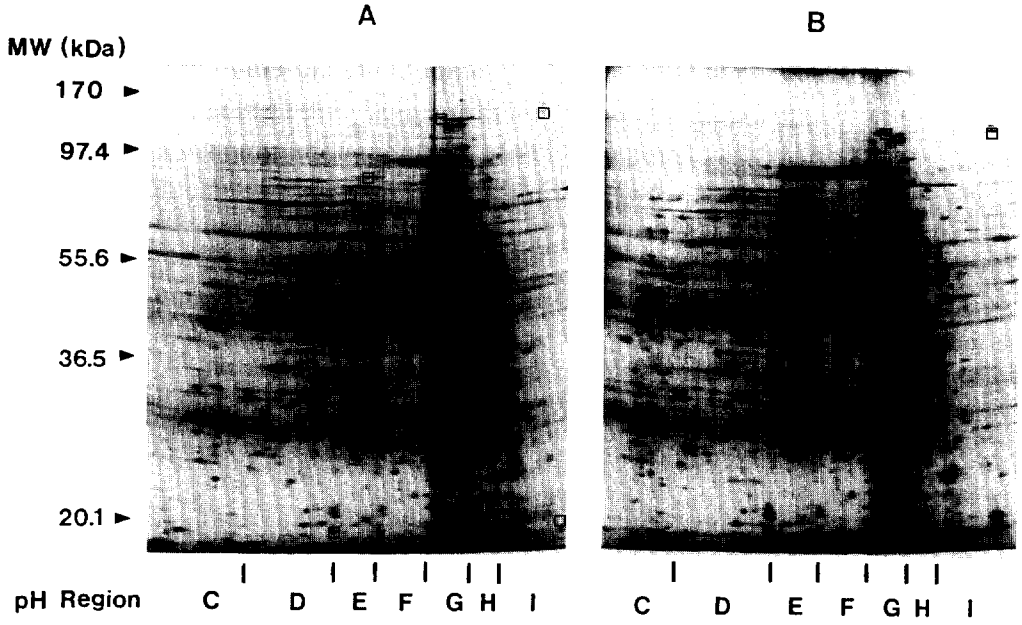

Fig. 1. *Autoradiogram of two-dimensional electrophoresis gel of proteins from cells labeled in exponential growth phase.*
Some of Pin proteins are indicated by □.
Panel A: proteins from untreated cells. Panel B: proteins from cells treated with 100 μM H_2O_2 for 1 hour.

과산화수소를 처리한 세포의 단백질과 대조구 세포의 단백질을 비교한 경우 1,400여 개의 세포 단백질 중에서 약 90개의 단백질의 합성이 과산화수소에 의해 증가됨을 관찰하였다(Fig. 1). 네 번의 독립된 실험에서 증가 현상이 두 번 이상 반복적으로 관찰된 단백질들을 Pin(peroxide inducible) 단백질이라고 명명하였다.

*S. coelicolor*가 과산화수소 스트레스에 대한 적응력을 획득한 기작은 Pin 단백질들의 발현 증가로 설명할 수 있다. 즉, 소량의 과산화수소를 처리하면 그로 인해 세포 구조 및 생체 대사에 손상이 일어나게 되고, 이에 대응하기 위해서 손상을 복구하는 기능을 가지는 단백질들이 과량 발현됨으로써 이후에 처리하는 보다 강한 자극에 대한 저항성이 증가된다는 것이다. 그러므로 *S. coelicolor*의 Pin 단백질 중에는 catalase를 비롯한 활성 산소족 분해효소들이 포함되어 있다고 생각할 수 있다.

이상에서 관찰한 내용은 *S. coelicolor*에 100 μM의 과산화수소 스트레스를 1시간 동안 주고 그동안 일어난 변화의 축적된 상태를 본 것이다. 그러나 왕성하게 성장하고 있는 세포에 어떤 스트레스를 주면 그 스트레스의 영향과 세포의 생리적인 대응 현상 사이의 상호작용에 의해서 세포내의 상태가 계속적으로 변화할 것이다. 따라서 과산화수소 처리에 의해 일어나는 세포내 단백질의 변화를 보다 상세히 알아보기 위하여 방사능 표지 시간을 변화시켜 보았다.

표지 시간을 변화시키기 위하여 지수 성장기의 *S. coelicolor* 세포를 세 개의 튜브에 1 ml씩 나누어 담고 각각에 100 μM의 과산화수소와 L-[^{35}S]-methionine을 첨가한 후 30°C에서 배양하였다. 배양 시간이 각 20분, 40분, 60분이 경과한 후에 세포를 수확하여 추출액을 준비하고 2차원 전기영동을 실시하였다. 과산화수소를 처리하지 않고 1시간 동안 방사능 표지한 시료의 2차원 전기영동 양상과 이 세 가지 시료의 2차원 전기영동 양상을 비교해 본 결과 Pin 단백질들의 발현이 증가되는 시간이 다양하게 분포하는 것을 관찰하였다(Fig. 2). C41.3이나 D52.0a와 같은 단백질은 과산화수소를 첨가한 시간부터 20분 이내에는 높은 속도로 합성되지만 그후 곧 합성 속도가 떨어져 60분 후에는 과산화수소를 처리하기 전과 거의 같은 양이 되는데, 이와 같은 양상을 보이는 10개의 단백질을 'transient Pin'이라고 명명하였다. D15.7 및 E65.4a와 같이 과산화수소 처리 초기부터 60분 후까지 계속 다량 합성되는 59개의 단백질은 'immediate Pin'이라고 명명하였으며, E23.3과 F25.5와 같이 20분 이내에는 합성량이 변화하지 않거나 감소하다가 20분 이후부터 합성이 점차 증가하여 40~60분 후에는 증가 현상을 확실히 관찰할 수 있는 8개의 단백질은 'delayed Pin'이라고 명명하였다. G19.5나 I17.0과 같이 40분 후까지도 양이 증가하지 않다가 60분에

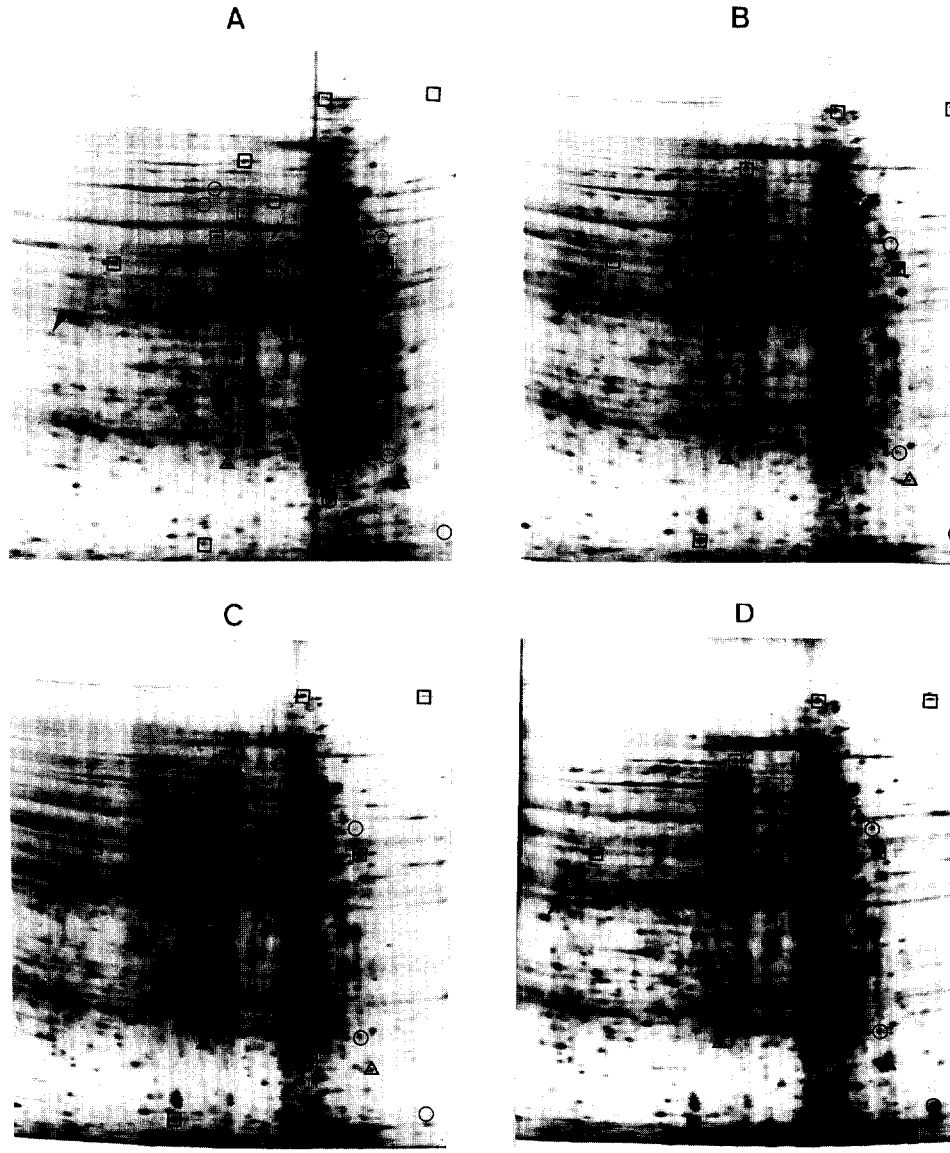

Fig. 2. *Kinetics of the expression of Pin proteins in exponential growth phase during 1 hour of hydrogen peroxide treatment.*

Proteins indicated by arrow heads are those which were induced within 20 minutes and returned to their normal expression level at 40 or 60 minutes following treatment (transient Pins). Proteins indicated by □ are those whose expression levels were increased within 20 minutes and consistently maintained to 1 hour (immediate Pins). Proteins which were induced only after 40 minutes (delayed Pins) or 60 minutes (late Pins) are indicated by △ or □, respectively.

Panel A: proteins from untreated cells. Panel B: proteins from cells treated with 100 μM H_2O_2 for 20 minutes. Panel C: proteins from cells treated with 100 μM H_2O_2 for 40 minutes. Panel D: proteins from cells treated with 100 μM H_2O_2 for 60 minutes.

이르러서야 합성이 유도되는 19개의 단백질은 'late Pin'이라고 이름붙인 그룹에 포함시켰다(Table 1). 전체 Pin 단백질 중 4개는 발현이 증가되는 양상을 시간의 경과에 따라 추적하기가 어려웠는데(unclassified Pin), 이 4개의 단백질을 포함한 총 100개의 Pin 단백질의 합성이 과산화수소를 처리한 지수 성

Table 1. *Pin (peroxide-inducible) proteins found in exponential growth phase.*

Group pH Region	Transient Pin	Immediate Pin	Delayed Pin	Late Pin	Unclassified Pin
C pH 4.2~5.1	61.6, 41.3	20.4			
D pH 5.1-5.8	62.0a 52.0a	74.7a, 57.1, 15.7		74.7c, 52.0b	
E pH 5.8-6.0	31.2	91.0a, b, 83.8a, b 78.7a, b, 76.0b 73.4a, b, c, 68.4 67.8b, 65.4a, c 57.3b, 48.0a 46.0, 37.5, 28.5 26.4	23.3	80.1a, 76.0c	
F pH 6.0-6.2	63.7 62.6a	99.0d, 77.4a 68.4, 67.8a 62.6b, 60.4, 58.3 57.3a, b, 52.9 50.7, 47.2a, 46.4 34.7, 29.3b, 27.8 19.2	47.2c, 25.5	24.4a, 22.0	39.7
G pH 6.2-6.4	33.8, 17.3	122.4, 68.4a 52.9, 48.0, 45.7 44.4a, b, 39.6b 29.3, 27.8, 21.8 20.8	60.4a, 59.4 39.6a	48.9, 28.8, 19.5	
H pH 6.4-6.6	41.4a	93.9, 57.3, 35.6		66.6, 61.7, 48.5 48.0	
I pH 6.6-7.5		128.8, 124.3 59.4a	21.2, 20.8	78.3, 24.7, 24.2 21.0, 17.0, 16.4	59.4b, 38.5 38.3
Number	10	59	8	19	4

Proteins were named on the basis of the region of their pI's and their molecular weights. Each number represents the molecular weight of the Pin protein in kDa.
Pin proteins of exponential growth phase were classified based on their induction time as in Fig. 2.

장기의 세포에서 증가된다. Pin 단백질의 발현 양상이 시간의 경과에 따라 변하는 것은 산화적 스트레스에 대응하는 세포의 상태가 변해가기 때문이라고 생각할 수 있고, transient Pin 단백질이나 immediate Pin 단백질 중의 일부가 이 대응 기작을 유발하는 방아쇠(trigger)의 역할을 한다고 추측해 볼 수 있다.

정체 성장기의 *S. coelicolor*에서 산화적 스트레스에 의하여 유도되는 단백질의 분석

과산화수소 처리에 의해 몇몇 산화환원효소의 활성이 증가하는 현상은 정체 성장기에서도 관찰되었으므로 앞과 같은 실험을 정체 성장기에서도 행하였다. Lee 등의 연구에서는 산화환원효소의 활성을 중기 및 후기 정체 성장기에서 측정하였으나(4), 정체 성장기가 진행됨에 따라 *in vivo*에서 방사능 표지가 잘 되지 않는 난점이 있었기 때문에 단백질 발현 양상의 분석은 색소가 형성되기 시작하는 초기 정체 성장기에서만 행하였다.

초기 정체 성장기의 *S. coelicolor* 세포에 100 μM의 과산화수소를 1시간 동안 처리하면서 방사능 표지한 시료와 과산화수소를 처리하지 않고 1시간 동안 방사능 표지한 시료를 2차원 전기영동으로 분리하여 비교 관찰하였다. 그 결과 관찰 가능한 총 세포 단백질 중에서 60여 개의 단백질의 합성량이 과산화수소에 의해 증가한 것을 볼 수 있었고(Fig. 3), 이 중 21개는 지수 성장기에서 관찰한 Pin 단백질과 같은 것임을 알 수 있었다(Table 2). 정체 성장기에서의 단백질 유도 양상은 지수 성장기에 비해 증가가 관찰되는 단백질의 갯수는 적은 반면 그 증가의 폭은 커진 것을 볼 수 있었다.

돌연변이체에서 발현되는 단백질의 분석

과산화수소에 대한 저항성이 야생형에 비해 현저하게 증가된 돌연변이체, N7, N9, N24의 세 가지

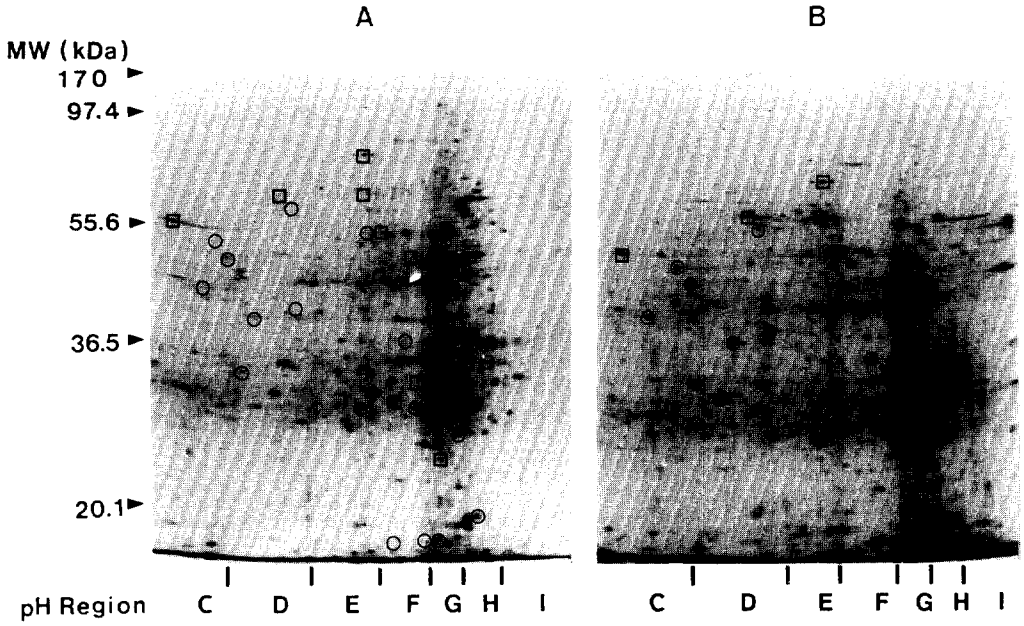

Fig. 3. *Autoradiogram of two-dimensional electrophoresis gel of proteins from cells labeled in stationary growth phase.*
Some of phase-independent Pin proteins which were induced in both exponential and stationary growth phases are indicated by □ and some of stationary phase-specific Pin proteins are indicated by ○. Panel A: proteins from untreated cells. Panel B: proteins from cells treated with 100 μM H_2O_2 for 1 hour.

Table 2. *Pin(peroxide-inducible) proteins found in stationary growth phase.*

pH Region	Molecular Weight (kDa)
C pH 4.2-5.1	61.6, 61.3, 57.3, 45.4, 33.0, 32.1, 26.9b, 26.2
D pH 5.1-5.8	74.7a, 72.1a, b, 58.3a, 53.6, 52.2, 41.9b, 39.2a, 29.6, 29.0, 26.8a
E pH 5.8-6.0	91.0b, 73.4b, c, 62.6, 24.1, 23.3, 14.5
F pH 6.0-6.2	62.6a, b, 52.9, 36.0, 32.3a, 29.3b, 25.5, 24.4c, 19.2, 15.6, 15.5
G pH 6.2-6.4 a	48.0, 44.4a, 40.0, 39.6b, 35.0, 28.8, 27.3, 24.0, 22.7b, 21.7, 20.8, 20.5, 16.2, 15.9, 15.6, 15.5
H pH 6.4-6.6	48.5, 39.6a, 35.6, 32.6, 29.3a, 25.0, 16.3
I pH 6.6-7.5	38.5, 38.3

The definitions of pH regions and molecular weights are the same as in Table 1.
Underlined proteins are phase-independent Pins which were induced in both exponential and stationary growth phases.

균주에 대하여 과산화수소를 처리하지 않은 상태에서 추출한 총 세포 단백질의 2차원 전기영동을 실시하고, autoradiogram을 이용하여 세 가지 돌연변이체들의 단백질 발현 양상을 과산화수소를 처리하지 않은 야생형의 단백질 발현 양상과 비교해 보았다. 그 결과 각 돌연변이체마다 30~40개 정도씩의 단백질을 야생형에 비해 특징적으로 다량 발현함을 관찰하였다 (Fig. 4).

다음으로, 돌연변이체들의 autoradiogram을 과산화수소를 처리한 야생형의 autoradiogram과 비교하여 N7, N9, N24에서 특징적으로 다량 발현되는 단백질 중 각각 15, 17, 15개의 단백질이 Pin 단백질인 것을 확인하였다(Table 3). Pin 단백질들이 과산화수소에 의한 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 기능이 있다고 유추할 경우, N7, N9, N24의 세 가지 돌연변이체가 항상적으로 다량 발현하는 Pin 단백질들이 이 돌연변이체들에게 과산화수소에 대한 저항성을 부여했다고 생각할 수 있다. 세 가지의 돌연변이체에서 다량 발현되는 32개의 Pin 단백질 중 9개(D 74.7a, E76.0c, F23.3, F50.7, F47.2a, F25.5, G39.6b, G24.0, H39.6a)는 두 돌연변이체에서 공통적으로 증가되었고, 다른 3개(F39.7, H61.7, I20.8)는 세 돌연변이체 모두에서 증가되었다. 이들은 세포에 과산화수소 내성을 부여하는 기본적인 단백질들일 것으로

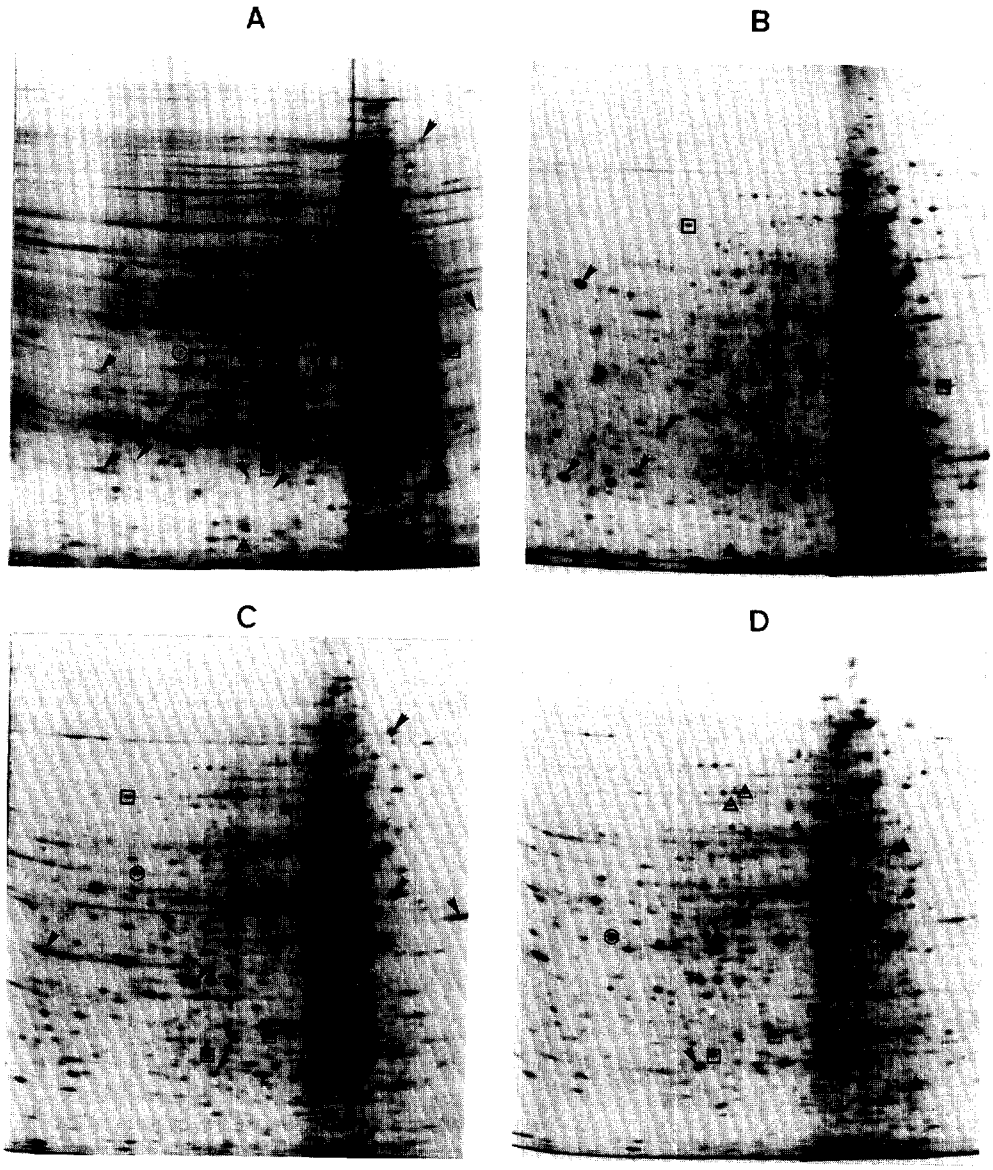

Fig. 4. *Autoradiogram of two-dimensional electrophoresis gel of proteins from hydrogen peroxide-resistant mutants.*
Exponentially growing cells of the mutants N7, N9, and N24 were incubated with L-[^{35}S]-methionine for 1 hour. Some of non-Pin proteins which increased in mutants are indicated by arrowheads, some of phase-independent Pin proteins by □, some of exponential phase-specific Pin proteins by △, and some of stationary phase-specific Pin proteins by ○.
Panel A: proteins from the wild type. Panel B: proteins from the mutant N7. Panel C: proteins from the mutant N9. Panel D: proteins from the mutant N24

추측된다.

관찰된 Pin 단백질 중 F29.3b는 다른 140여 개의 Pin에 비해 몇 가지 주목할 만한 특징을 가지고 있었다. F29.3b는 지수 성장기에서 뿐만 아니라 정체 성장기에서도 유도 현상이 관찰된 단백질인데, 지수 성장기에서 관찰된 101개의 Pin 단백질 중에서 그 증가의 폭이 가장 컸으며 정체 성장기에서 관찰된 60여 개의 Pin 단백질 중에서 증가의 폭이 가장 큰 8개

Table 3. *Increased production of Pin proteins in hydrogen peroxide-resistant cells without hydrogen peroxide treatment.*

Pin	Phase-Independent										Exponential Phase					
	D 74.7a	E 23.3	F 62.6a	F 29.3b	F 25.5	G 39.6b	G 20.8	H 35.6	I 38.5	I 38.3	D 52.0b	D 15.7	E 76.0b	E 76.0b	E 73.4a	E 68.4
N7																
N9																
N24																

Exponential Phase										Stationary Phase						Total
F 50.7	F 47.2a	F 39.7	F 22.0	G 33.8	G 27.8	H 61.7	H 41.4a	I 21.2	I 20.8	D 53.6	D 39.2a	G 40.0	G 24.0	G 15.6	H 39.6a	
																15
																17
																15

Pin proteins increased in mutants are indicated by shade.

(D29.6, D29.0, E73.4b, F62.6a, F36.0, F29.3b, F15.5, H16.3) 중에 속했다. 또한 이 단백질은 N24 돌연변이체에서 특징적으로 다량 발현되는 Pin 단백질 중의 하나였다(Table 3). F29.3b는, 지수 성장기의 세포에 paraquat을 150 μM로 1시간 동안 처리하여 과산화수소와는 또다른 산화적 스트레스를 주었을 때에도 발현이 증가되었으며, 지수 성장기의 세포를 43°C에서 30분간 배양하여 고온 스트레스를 주었을 때에도 발현이 증가되었다(결과 미제시). 이와 같은 관찰 결과들로부터 F29.3b는 과산화수소 내성을 획득하는 과정에서 뿐 아니라 일반적인 산화적 스트레스 및 고온 스트레스에 대응하는 과정에서도 중요한 역할을 담당한다고 생각할 수 있다.

본 실험에서 사용한 세 가지 돌연변이체는 야생형에 비해서 과산화수소에 대한 저항성이 증가했을 뿐 아니라 catalase, peroxidase, glutathione reductase, glucose 6-phosphate dehydrogenase 등의 활성이 함께 증가했다(4). 이 돌연변이체들이 이러한 다발적인(pleiotropic) 형질 변화를 나타낼 수 있는 기작의 하나로서 이들이 산화적 스트레스에 대한 방어 기작을 조절하는 조절단백질 유전자의 돌연변이체라는 가정을 할 수 있는데, 이 돌연변이체들의 단백질 발현 양상이 야생형에 비하여 30~40개의 단백질 수준에서 변화했다는 점이 이 가정을 뒷받침한다.

이상의 결과는 *S. coelicolor*에 과산화수소 스트레스를 주었을 때 나타나는 변화를 단백질 수준에서 관찰해 본 것이다. 여기서는, 야생형 *S. coelicolor*가 가지는 Pin 단백질들을 지수 성장기 및 정체 성장기에서 찾아내고 이들을 과산화수소에 대한 저항성이 증가된 돌연변이체에서 항상적으로 다량 발현되는 단백질의 집합과 비교하였다. 앞으로의 연구는, 야생형이 가지는 Pin 단백질들의 세포내 기능을 밝힘으로써 이들이 과산화수소에 의한 산화적 스트레스에서 작용하는 기능을 알아내는 방향으로 추진되어야 할 것이다.

사 사

본 연구는 과학재단 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학 연구센터)의 연구비 지원을 받아 수행되었다. 본 연구의 수행에 여러가지 조언을 주신 서울대학교 안태인교수께 감사드린다.

참 고 문 헌

1. **Christman, M.F., R.W. Morgan, F.S. Jacobson, and B.N. Ames,** 1985. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* **41**, 753-762.
2. **Farr, S.B. and T. Kogoma,** 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* **55**, 561-585.
3. **Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Kieser, C.J. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward, and H. Schrempf,** 1985. Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. The John Innes Foundation.
4. **Lee, J.-S., Y.-C. Hah, and J.-H. Roe,** 1993. The induction of oxidative enzymes in *Streptomyces coelicolor* upon hydrogen peroxide treatment. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1013-1018.
5. **O'Farrell, P.H.,** 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol.*

Chem. **250**, 4007-4021.
6. **Oki, T., Y. Matsuzawa, K. Kiyoshima, and A. Yoshimoto,** 1981. New anthracyclines, feudomycins, produced by the mutant from *Streptomyces coeruleorubidus* ME130-A4. *J. Antibiotics* **34**, 783-790.
7. **Storz, G., L.A. Tartaglia, S.B. Farr, and B.N. Ames,** 1990. Bacterial defenses against oxidative stress. *Trends Gen.* **6**, 363-368.
8. **VanBogelen, R.A., P.M. Kelley, and F.C. Neidhardt,** 1987. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidative stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli. J. Bacteriol.* **169**, 26-32.
9. **Walkup, L.K. and T. Kogoma,** 1989. Escherichia coli proteins inducible by oxidative stress mediated by the superoxide radical. *J. Bacteriol.* **171**, 1476-1484.

(Received March 11, 1993)
(Accepted March 29, 1993)

ABSTRACT: Profile Analysis of Proteins Related with Hydrogen Peroxide Response in *Streptomyces coelicolor* (Müller)

Hye-Jung Chung and Jung-Hye Roe* (Department of Microbiology, College of Natural Sciences, and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

Streptomyces coelicolor (Müller) cells were treated with 100 μM hydrogen peroxide for 1 hour and proteins synthesized during hydrogen peroxide stress were labeled with L-[^{35}S]-methionine. Total cellular proteins were extracted and analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In exponential growth phase, synthesis of about 100 proteins was increased by hydrogen peroxide treatment. These proteins were named as Pin (peroxide-inducible) proteins and classified into 4 subgroups according to their induction time after hydrogen peroxide treatment. About 60 of them were found to be induced within 20 minutes and maintained throughout 1 hour of treatment. In stationary growth phase, synthesis of 62 proteins was increased by hydrogen peroxide and 21 of them were the same Pins found in exponential growth phase. Proteins from the mutants which are resistant to hydrogen peroxide were obtained in exponential growth phase and compared with those from the wild type on two-dimensional gel. The three mutants, N7, N9, and N24, were found to have higher constitutive levels of 15, 17, and 15 Pin proteins respectively, than the wild type. 9 of these Pin proteins (D74.7a, E76.0c, E23.3, F50.7, F47.2a, F25.5, G39.6b, G24.0, H39.6a) increased in two of the three mutants and 3 proteins (F39.7, H61.7, I20.8) increased in all of the three mutants. These proteins might play important roles in the response of *S. coelicolor* to hydrogen peroxide.