

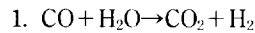
Rhodospirillum rubrum에서 일산화탄소의 산화계 관련효소

홍 승 서
선일포도당(주)

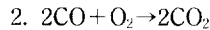
1. 서 론

대기를 오염시키는 주범은 여러가지가 있겠으나 그 중에서도 일산화탄소와 아황산가스가 중요한 오염원이라고 볼 수 있다. 자연계에서 일산화탄소의 생성과 소멸과정은 그림 1에서 보는바와 같이 다양한 기작에 의해 이루어지고 있다고 볼 수 있다(1). 이때 생성되는 일산화탄소량은 연간 $1.3-1.4 \times 10^{15}$ g으로 추정되고 있으며 원시시대 대기 중에는 0.1 ppm 수준이던 것이 요즈음 오염된 대기 중에는 200 ppm까지 존재하기도 한다.

생성된 일산화탄소의 산화중 박테리아에 의한 산화를 살펴보면 Table 1에서 보는 바와같이 다양한 미생물이 관여되고 있는데 미생물이 일산화탄소를 기질로 이용할 수 있다는 것은 이미 금세기 초부터 연구되어 왔다(2, 3, 4). 일산화탄소(CO)를 산화시킬 수 있는 능력은 호기성 및 혐기성, Gram+ 및 -, Archaeobacteria를 포함하는 각종 미생물에 골고루 존재한다(5, 6). 한편 식물(7, 8)과 동물(9)에 의한 CO의 산화도 보고한 바 있다. CO cycle에서 생물학적인 방법에 의한 일산화탄소의 제거(9, 10, 11)가 매우 중요하며 또한 생성되는 CO의 50% 이상이 생물학적 과정에 의해 생성된다. 즉, 해초의 float cells과 blue-green algae의 gas vacuole 등은 많은 양의 CO를 함유하며 heme, porphyrin, chlorophyll 분해대사 과정에서 생성되기도 한다(12, 13, 14). Eiskmann 등(15)은 *Methanobacterium thermoautotrophicum*이 CO₂와 H₂로부터 CO를 생성한다고 보고하였으며 *Morganella morganii*에 의해 방향족 아미노산으로부터 CO가 합성된다는 보고도 있었다(16).



$$\Delta G^0 = -4.77 \text{ kcal/mole CO}$$



$$\Delta G^0 = -61 \text{ kcal/mole CO}$$

상기 두 반응은 각각 H₂O와 O₂에 의한 산화반응으로서 CO를 에너지원으로 사용한다는 것은 열역학적으로 가능하나 CO를 에너지원으로 이용하기 위해서는 energy barrier를 낮추어야 하는데 현재 산업적으로 metal oxides를 사용하고 있다. 상기의 생물학적인 산화반응에서 첫번째 반응은 carbon monoxide dehydrogenase (CODH)에 의해 진행되고 두번째 반응은 carbon monoxide oxidase (COOX)에 의해 촉매된다.

2. 미생물에 의한 CO 산화효소제

여러 팀들에 의해 비광합성세균이 일산화탄소를 유일한 탄소원으로 이용하여 acetate를 합성한다는 것이 입증되었으며 특히 *Clostridium thermoaceticum*이 pyruvate와 CO₂로부터 acetate를 합성한다고 보고하였다(17). 그 이후 Wood 그룹은 methyltetrahydrofolate, CO 및 coenzyme을 기질로 하여 ferredoxin, phosphotransacetylase, methyl transferase, carbon monoxide dehydrogenase, corrinoid enzyme, F3-X인자와 thiaminepyrophosphate-dependent pyruvate: ferredoxin oxidoreductase 등의 효소에 의해 acetyl-CoA가 합성된다고 보고하였다(17, 18, 19, 20). 또한 이들은 *Clostridium thermoaceticum*에 의해 CO와 methyltetrahydrofolate로부터 acetate를 합성하는 데 hydrogenase, CODH, corri-

noid enzyme, F3-X fraction 및 transmethylase 등이 요구된다고 보고하였는데 이때 에너지원으로 ATP가 요구된다(19).

그리고 CODH 존재하에 coenzyme A, methyl기 및 carboxyl기를 반응시키면 acetyl CoA가 생성되며 (20) CODH와 acetyl CoA 존재하에 CO가 acetyl-CoA의 C-1 위치로 치환된다는 것을 증명하였는데 이 반응은 ferredoxin과 기타 전자전달체에 의해 촉진되었다. 그러므로 CODH는 autotrophic 경로에서 탄소대사의 기본 효소인 것을 알 수가 있다. 그런데 acetyl CoA를 합성하는 능력은 CODH의 일반적인 특성이 아니다. 즉 *Rhodospirillum rubrum*의 CODH는 치환반응을 촉매하지 않으며 이것에 관하여 CODH의 반응기작이 확실하게 입증되지 않고 있으나 Wood 등은 한가지 모델을 제시했는데 (21, 22) 이들은 여기에서 acetyl-CoA 합성효소는 3종류의 결합부위를 갖고 있는데 site X는 methyl기 결합부위이고, site Y는 CO 결합부위이며 끝으로 site Z는 CoA 결합부위라고 설명하였다. 호기성 세균의 일산화탄소 산화계 효소인 carbon monoxide dehydrogenase(CODH)는 O₂에 대해 안정하고 일산화탄소에 의해 유도(induction)되며 CO를 CO₂로 산화시킨다(23, 24). 이들 효소는 CO에 대한 친화력이 강하고 *in vitro*에서 methylene blue를 환원시키며 (electron acceptor) 정제된 효소는 molybdenum (Mo)과 Fe를 cofactor로 요구하며, 또는 selenium (Se), Zn 및 Cu 등을 요구하기도 한다. Black 등은 호기성 세균중 *Pseudomonas thermocarboxydovrans*의 carbon monoxide dehydrogenase 유전자를 cloning하였다(25).

한편 acetogens, dissimilatory sulfate reducer 및 methanogens 등 혐기성 세균의 CODH는 constitutive하게 합성되는 metalloprotein으로 산소에 노출되면 불활성화되며 single carbon과 acetyl-CoA의 치환에 의해 acetate를 생성한다(26-30). 각종 미생물의 일산화탄소 산화계 효소를 살펴보면 다음과 같다. 즉 *Methanothrix soehngenii*의 정제된 CODH 단백질의 분자량은 190 kDa이고 ($\alpha\beta$)₂ tetramer당 Ni 2분자와 Fe 18분자를 함유하고 있으며(31) *Clostridium thermoaceticum* CODH 단백질의 분자량은 440 kDa이고 ($\alpha\beta$)₃ hexamer로 존재하며 $\alpha\beta$ Dimer당 Ni 1.8분자, Fe 11분자 및 Zn 1분자를 함

유하고 있다(32, 33). *Methanothrix soehngenii*(34)와 *Cl. thermoaceticum*(35, 36) 효소를 encoding하는 유전자는 cloning하여 sequence도 보고되었다.

그런데 광합성세균의 일산화탄소 산화효소(CODHs)는 호기성 및 혐기성 세균 효소의 두가지 특성을 모두 보인다. 즉 혐기적인 조건 하에서 CO에 의해 유도(induction)되고 *in vitro*에서 methylviologen 같은 low-potential acceptor를 환원시키면서 CO를 매우 효과적으로 CO₂로 산화시키고 산소에 대단히 불안정한 특성을 보인다. 미생물에 의한 일산화탄소의 산화는 CO에 안정한 Hydrogenase와 연관되어 수소가스(H₂)를 발생시켜 연료용으로서 전환이 연구되고 있다(37-40).

이와같이 자인의 미생물내에 일산화탄소 산화효소가 유도되어 존재하는 이유는 여러가지로 추정할 수 있으나 우선은 일산화탄소가 그 미생물 자체에 유독하거나 질소고정 등의 특수한 대사에 영향을 주기 때문인 것으로 보인다(41). 본 고에서는 혐기적인 광조건에서는 광합성을 하며 carbon monoxide dehydrogenase가 유도되나 호기적, 암조건 하에서는 유도되지 않고 단지 균체성장만 하며 PHB를 생산하는 *Rhodospirillum rubrum*(42)의 일산화탄소 산화효소계에 대하여 고찰해 보기로 한다.

3. Nickel을 함유한 CO dehydrogenase

효소의 prosthetic group으로서 nickel이 발견된 것은 최근의 일로서 Jack bean urease가 여러해 동안 연구되어 Dixon 등에 의해 nickel 효소라는 것이 밝혀 졌는데(43) 그 이후 몇 가지 hydrogenase들이 nickel 효소로 확인되었다(44).

그리고 *Clostridium spp.*와 *M. barkeri*의 CODH도 nickel 효소로 밝혀졌고, methanogens의 methane 생성에도 관여한다. *Methanobacterium byranttii*가 성장하며 nickel을 이용한다는 보고가 있었고(45) 그 외에도 여러 미생물들에서 보고된 바 있다(46-48). 한편 *Rhodospirillum rubrum*에서는 미생물을 일산화탄소에 노출시킬 때만 nickel의 흡수가 발견되었는데(Paul L. Ludden, unpublished data) 이는 일산화탄소 이용에 관여하는 효소체계중에 nickel을 cofactor로 요구하는 효소가 있다는 것을 알 수가 있다.

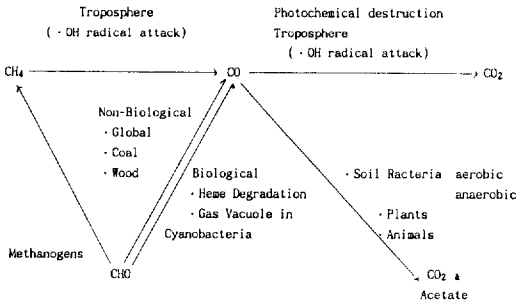


Fig. 1. The global carbon monoxide cycle

혐기성 세균에서 분리한 carbon monoxide dehydrogenases은 크게 두 가지로 분류할 수 있다. 즉, acetogens와 methanogens로부터 분리, 정제된 CO dehydrogenases은 분자량이 크고 multimer로 구성되어 있으며 O₂에 불안정하고 nickel과 Fe-S를 함유하는 효소로써 이들은 acetyl-CoA의 합성이나 분해에 관여하고 있다(49-51). 반면에 광합성 세균인 *Rhodospirillum rubrum*으로부터 분리·정제된 효소는 O₂에 불안정하고 monomer로 구성되어 있으며 분자량62,000의 nickel과 Fe-S를 함유하는 효소로 일산화탄소를 이산화탄소로 산화시키는 기능을 갖는다(52).

*Rhodospirillum rubrum*의 CO dehydrogenase와 일산화탄소에 안정한 hydrogenase 등은 일산화탄소에 의해 특이적으로 유도(induction)되는데 이는 CO dehydrogenase의 생리화학적 기능은 CO의 산화이며 이때 hydrogenase에 의해 proton이 환원되어 H₂가 발생하는 것이다(37). Phototrophs인 *Rhodospirillum rubrum*의 carbon monoxide dehydrogenase의 생화학적인 특성은 완전히 규명되었다. 이 효소는 62 kDa의 monomer로 Ni 1.2분자, Fe 8.1분자 및 Zn 0.4분자로 이루어져 있다(52,53,54). *In vitro*에서 정제된 효소는 electron acceptor로 methyl viologen을 환원시키면서 이산화탄소를 산화시키는데 이때 CO에 대한 K_m 값은 32 μM이고(55) V_{max}는 약 7,000 μmol/CO.min.mg protein이었다(54). 다른 혐기성 세균의 carbon monoxide dehydrogenase는 CO와 acetyl-CoA의 C-1과의 치환능력이 있으나 본 효소는 이들과 달리 치환능력이 없이 단지 CO를 CO₂로 산화시킨다(52).

전술한 바와같이 본 CODH효소는 그의 활성을

위해 Ni을 요구하며 일산화탄소가 존재하고 Ni이 존재하지 않는 조건에서 배양하면 활성이 없는 효소인 apo-protein을 생산하나 효소생산량은 Ni이 존재할 때와 동일하다. 그런데 이 apo-protein은 *in vivo*나 *in vitro*조건에서 Ni을 첨가하면 다시 활성을 회복한다(56,57). 즉 carbon monoxide dehydrogenase의 활성을 위해 Ni이 필수적인데 활성부위에 nickel이 존재하는 것은 electron paramagnetic resonance signals로도 확인되었다(58). 이 nickel center는 일산화탄소와 결합하여 일산화탄소의 산화 및 H₂ 가스 발생과정 중에서 CO의 binding site 역할을 하며(그림 2) 여기에서 발생한 electron은 Fe-S protein(electron carriers)을 통해 hydrogenase로 전달되어 protons과 결합해 H₂를 발생시킨다. 정제에 의해 62 kDa의 CO dehydrogenase와 21 kDa의 단백질이 같은 몰비로 존재하며 이 작은 단백질은 monomer당 유일한 금속으로 4개의 Fe 분자를 요구하는 것으로 확인되었다.

Nickel은 적어도 4가지 종류의 효소군에 cotactor로 존재한다(59,60). 그러나 실제 nickel center의 구조와 nickel이 결합되어 활성이 있는 효소를 만드는 기작을 많이 알려져 있지 않다. 또한 *R. rubrum*의 CO dehydrogenase를 제외한 nickel enzyme은 apoenzymes이 *in vitro* 조건에서 nickel에 의해 활성화된다는 보고는 아직 없었다. 즉 *R. rubrum*의 CO dehydrogenase에서 nickel이 없는 apoenzyme이 존재한다는 것은 이 metalloenzyme의 nickel이 결합된 활성부위(active site)의 구조와 기능을 규명하는데 좋은 모델이 될 수 있다.

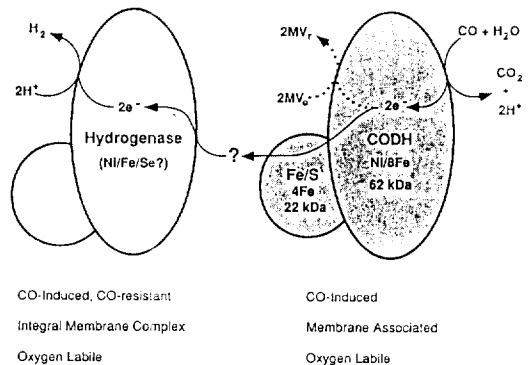


Fig. 2. Model for the enzyme system of carbon monoxide oxidation in *Rhodospirillum rubrum*.

4. *R. rubrum* CO 산화효소계의 생화학적 및 유전학적 특성

(1) 일산화탄소의 산화효소계의 구성

그림 3에서 보는 바와 같이 Ni, Fe, S가 함유된 carbon monoxide dehydrogenase에 CO가 결합하여 H₂O를 전자수용체로 반응하여 CO₂, 2H⁺와 2e⁻를 생성한다. 이때 발생된 전자는 전자전달체(Fe/S 단백질)에 의해 Ni와 Fe가 함유된 hydrogenase로 전달되어 H₂를 발생시킨다. 이때 ferredoxin 단백질인 전자전달체는 carbon monoxide dehydrogenase와 1:1 몰비로 존재하며 이들 전자전달체와 hydrogenase 사이에 다른 효소단계가 더 있는지는 아직 밝혀지지 않았다.

(2) CO 산화효소계의 CO에 의한 유도(induction)

먼저 Uffen은 광합성세균의 하나인 *Rhodocyclus gelatinosus*를 혐기적인 암조건 하에서 일산화탄소에 노출시키면 CO를 탄소원으로 이용할 수 있다고 보고하였다(39). *R. rubrum*의 경우에는 CO에 노출시키면 CO dehydrogenase의 합성량이 급격히 증가하였는데(38) 이들 광합성세균의 이와같은 특성은 CO dehydrogenase활성이 CO 존재에 의해 전혀 영향을 받지 않는 acetogens과 methanogens의 경우와 상이한 현상이다. *R. rubrum*에서 효소역가는 명조건에서 CO를 처리하였을 때 최대로 밝혀졌으며 nitrogenase를 생산하는 *R. rubrum*이 CO dehydrogenase효소를 함유한다는 것은 CO dehydrogenase의 발현조절을 이해하는 데 중요한 사실이다.

*R. rubrum*을 O₂에 노출시키면 몇분내에 효소합성이 중단되며 이미 세포내에 존재하는 효소의 활성도 상실된다. CO가 존재하더라도 O₂에 의한 저해작용을 막지는 못한다. Cyanide와 carbonyl sulfide는 모두 강력한 저해제이며 nickel은 효소합성에 요구되는 것은 아니다. CO에 의해 유도되는 hydrogenase는 CO에 인정하며 가역적으로 세포막에 강하게 결합하고 *in vitro*에서 nickel을 요구하는데 이는 일반적으로 다른 미생물에서 발견되는 hydrogenase와 유사한 특성이다. 저해제인 CN은 holo-enzyme에는 결합되나 apo-enzyme에는 결합하지 않는다. 즉 CN은 nickel center에 결합한다는 것을 의미한다. CN이 결합된 효소는 CO처리에 의해 그 활성을 100% 회복할 수 있으나 nickel을 첨가해도

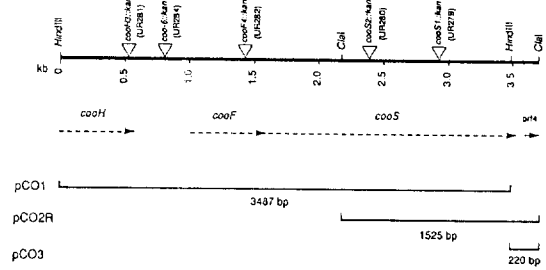


Fig. 3. Organization of the *coo* region. The figure presents the 3.7 kb cloned and sequenced region, indicating the *Hind*III and *Cla*I restriction sites. It also shows the locations of the cassette insertions and designate the putative transcripts.

CN은 제거되지 않는다.

(3) Ni-Fe 결합부위의 특성

1) CODH의 생화학적 분석과 Ni-Fe 센터

*R. rubrum*의 CODH는 CO가 결합하는 촉매부위로 추정되는 prosthetic group을 갖고 있는데 이 부위에 nickel과 Fe가 존재한다는 것은 *Cl. thermoacetica*이나 *M. thermoautotrophicum*의 CODH와 유사하나 분광학적인 특성은 매우 다르다. 현재 이 Ni-Fe 부위의 구조 및 기능을 밝히고 CO의 산화에 있어서의 역할을 규명하기 위해 UV-visible spectroscopy, EPR, Mossbauer spectroscopy, ENDOR spectroscopy, EXAFS spectroscopy, NMR 및 X-ray crystallography 등의 각종 분광학적인 분석이 이용되고 있다. 이와같은 분석을 통해 Ni과 결합된 Fe 분자의 숫자와 종류 및 그들을 연결하는 ligand가 결정될 것이다. CODH는 다음과 같은 측면에서 중요한 효소이다. 즉 C-1 cycle에서의 역할과 autotrophy에서 에너지원으로 중요하며 다른 nickel효소 연구에도 모델을 이용될 수가 있다. 왜냐하면 앞에서 언급했듯이 nickel이 없는 apoenzyme 상태에서도 안정하기 때문에 연구에 사용하기가 편리하다. 그리고 Ni-Fe부위의 구조규명에 대한 연구가 위스컨신대학의 생화학자 P.W. Ludden에 의해 가설이 발표된 바 있다.

2) Nickel insertase의 분리

효소작용 없이도 *in vitro*에서 apoenzyme과 nickel을 반응시키면 효소역가가 회복되지만 insertase를 첨가하면 반응속도가 빨라진다. 그러므로 *in vivo*에서는 이 반응에 관련되는 효소가 있을 것으로

추정된다. 왜냐하면 Apo-CODH의 활성화를 위해 Ni²⁺의 최적농도는 *in vitro*에서 0.5 mM 이상이나 살재 세포내에는 Ni²⁺의 농도가 이보다 훨씬 낮을 것으로 보이기 때문이다. 더욱이 *in vitro*에서 Co²⁺가 Ni²⁺의 competitive inhibitor (Ki Co²⁺ = 180 μM)로 작용한다(61). 그러므로 Ni을 선택적으로 결합부위에 결합시키는 Nickel insertase(correctase)가 세포내에 존재할 것으로 추정되며 현재 이에 대한 연구가 진행중인데 특히 최근 미국의 위스컨신 대학 미생물학과 Gary P. Roberts 그룹에서 *R. rubrum*의 유전자를 클로닝하는 과정에서 nickel-binding에 관여하는 것으로 추정되는 유전자를 찾았다.

(4) *R. rubrum* CODH 부위의 유전학적 분석

CODH와 Fe/S 단백질(전자전달체)의 아미노산 서열(54)을 근거로 probes를 만들어 Hind III로 가수분해한 *R. rubrum* chromosomal DNA로부터 hybridization에 의해 CODH를 coding하는 유전자를 함유는 DNA를 분리하여 *E. coli*로 cloning하였다(62). 이 cloning된 유전자 조각을 site-specific insertion 방법으로 mutant를 분석하여(63) 그림 3에서 보는 바와같이 CODH를 코딩하는 *cooS* 유전자, 전자전달 기능을 갖는 것으로 추정되는 *cooF* 유전자가 동시에 전사되고 이들 단백질의 모든 유전자(open reading frame)가 포함되어 있는 것을 알 수 있었다. 그리고 *cooF*의 upstream에 hydrogenase를 코딩하는 *cooH* 유전자의 일부가 존재하며 *cooS* downstream에 이들과 동시에 전사되는 4번째 ORF가 있는 것을 확인하였다. 이 네번째 open reading frame은 위에서 언급한 바와같이 nickel binding에 관련되는 것으로 보이며 따라서 nickel insertase 등이 존재하는 것으로 추정된다.

즉 *R. rubrum* 유전자의 염기서열, mutation 및 생리화학적 특성 등의 분석을 통해 CODH와 Fe/S 전자전달체단백질은 밀접하게 연관되어 있으며 CO 산화효소계의 일부분이라고 볼 수 있다. 또한 이들은 최소한 두개 이상의 전사단위를 갖고 있는 것으로 보이며 현재로서는 각각의 전체 전사단위는 알 수가 없다. 각 유전자는 일반적인 다른 CODH, hydrogenase 및 Fe/S 전자전달체와의 염기서열 비교를 통해 상당부분 동일성(Homology)을 확인하였는데 (G+C)함량은 63-64%이었다. 그림 3에서와 같은 cassette insertion mutagenesis 등의 방법에 의해 *cooS* 부

	Sequence	Position	
Group 1	<i>Ec</i> FdnH	35	DVSTCIGCKACQVACSEWN
	<i>Ec</i> Orf2	8	EPLMCTGTCNTCLAACSDVH
	<i>Ec</i> HycB	8	DSLTCIGCHTCEAACSETH
	<i>Rr</i> CooF	13	NFDLCLSHSCGELACAVAH
	<i>Ec</i> NarY	12	NLDKCIIGCHTCSVTCKNVW
	<i>Ec</i> NarH	12	NLDKCIIGCHTCSVTCKNVW
	<i>Ec</i> DmsB	9	DSSRGTGCKTCECLACKDYK
	<i>Ws</i> FdhB	12	DEARCIDCHGCDVACKEYH
Consensus			----Ctgc-C--aC----
Group 2	<i>Ec</i> FdnH	96	RKDGCIIDCEDPGLCKACPSAG
	<i>Ec</i> Orf2	47	APVYVHCIEEAPLQVCPVNA
	<i>Ec</i> HycB	47	APQLCHHCEDAPCAVYCPVNA
	<i>Rr</i> CooF	61	MPMQCRQCEDAPCTFACPTGA
	<i>Ec</i> NarY	179	LPRLCEHCLNPSCVATCPGSA
	<i>Ec</i> NarH	180	LPRLCEHCLNPSCVATCPGSA
	<i>Ec</i> DmsB	62	LSISCNHCEDPACTKVCPSGA
	<i>Ws</i> FdhB	55	LSIACMHCSDAPCAQVCPVDC
Consensus			-p--C-hCed--C--CP--a
Group 3	<i>Ec</i> FdnH	129	QSENCIGCGYCIAGGPFNI
	<i>Ec</i> Orf2	78	NESLCIGCKLCAVYCPFGA
	<i>Ec</i> HycB	78	NESLCVSKLCLGAIACPFGA
	<i>Rr</i> CooF	92	VEQHCIGCKLCAVYCPFGA
	<i>Ec</i> NarY	212	DQDKCRGWRLLCISGCPYKK
	<i>Ec</i> NarH	213	DQDKCRGWRMLITGCPYKK
	<i>Ec</i> DmsB	94	DEDVCIIGRYCHMACPSGA
	<i>Ws</i> FdhB	87	DKEKCIIGCYLCAVCPFGA
Consensus			----Ctgc--C--CPfga
Group 4	<i>Ec</i> FdnH	156	RVYKTCICVD--7-PACVKTCPTGA
	<i>Ec</i> Orf2	142	VAVYKCDLDF--5-PACVRCAPNQA
	<i>Ec</i> HycB	139	IAYVKCDLCSF--5-PACARMCPKA
	<i>Rr</i> CooF	129	VAKKCDLQVD--9-PACVIAEPTKA
	<i>Ec</i> NarY	239	KSEKCIFCYIP--7-TVCSETCVGRI
	<i>Ec</i> NarH	240	KSEKCIFCYIP--7-TVCSETCVGRI
	<i>Ec</i> DmsB	121	HMTKCDGCVY--6-PICVESCLPRA
	<i>Ws</i> FdhB	119	PHDKCTFCAG--24-PVCAAMCTKA
Consensus			---KC--C-----p-C---Cp--a

Fig. 4. Comparison of the cysteine clusters of *cooF* with those of other Fe/S proteins. The sequences of *E. coli* nitrate inducible formate dehydrogenase subunit (*Ec* FdnH), *E. coli* bacterioferritin-associated protein (*Ec* Orf2), *E. coli* hydrogenase subunit (*Ec* HycB), *R. rubrum* Fe/S protein (*Rr* CooF), *E. coli* second nitrate reductase subunit (*Ec* NarY), *E. coli* nitrate reductase subunit (*Ec* NarH), *E. coli* dimethyl sulfide reductase subunit (*Ec* DmsB), and *Wolinella succinogenes* formate dehydrogenase subunit (*Ws* FdhB) are shown. Asterisks indicate cysteines (except for tryptophan in the third cluster of the *nar* gene products), and nominal proline positions are designated by an arrow. Consensus amino acids are capitalized if present in at least five sequence. The position in the protein of the first indicated residue is give.

위를 불활성화시키면 일산화탄소의 산화반응이 전혀 진행되지 않았으며 *cooF* 유전자부분을 불활성화시키면 CODH의 활성이 wild type의 2-3%를 나타내었다. 이것과 염기서열 비교에 의해 *cooS*는 CODH를, 그리고 *cooF*는 전자전달체를 코딩하는 것이 확실하나 *cooH*가 hydrogenase유전자를 코딩한다는 증거는 상대적으로 미약하다. 그러나 *cooH*를 불활성화시켰을 때 CODH 효소는 활성을 보이고 있으나

Table 1. Bacteria which oxidize CO to CO₂.

	Properties	Genera
Aerobes	CO-induced CO oxidation	Arthrobacter, Azomonas, Azotobacter, Bacillus Bradyrhizobium, Methylomonas, Mycobacteria, Nocardia, Pseudomonas, Streptomyces
	Constitutive C ₁ ⇌ Acetate interconversion	Acetobacterium, Acetogenium, Clostridium Eubacterium, Peptostreptococcus, Sporomusan, Archaeoglobus, Desulfobacterium, Desulfococcus, Desulfomaculum, Desulfosarcina, Desulfovibrio, Methanobacterium, Methanosarcina, Methanotrix
Anaerobes	CO-induced CO oxidation (photosynthetid)	Rhodospirillum, Rubrivivax

H₂가 전혀 발생하지 않는 것으로 보아 hydrogenase를 코딩한다고 추정할 수 있다. 특히 *cooH* 유전자는 NADH-ubiquinone oxidoreductase(64)와 상냥한 유사성을 보인다.

*cooF*와 7가지 다른 cysteine-rich oxidoreductase 단백질을 서로 비교분석해 보면 4가지 전형적인 형태로 분류할 수 있는데 그림 4에서 이들과 *R. rubrum* Fe/S단백질을 비교하였다. 이중 한가지 전형(그룹 3)은 4Fe-4S이고(65), 다른 ferredoxin들과는 달리 *R. rubrum*의 *cooF* 단백질은 분자량이 크고 pI값이 염기성이다. CODH로부터 CO에 의해 유도되는 hydrogenase로의 전자전달에 있어서 *cooF* 단백질의 역할은 정제된 CODH. *cooF* 단백질과 hydrogenase가 함유된 세포막을 세포막을 이용한 실험에서 전자전달체임이 규명되었다(54).

R. rubrum CODH의 생리적인 역할은 acetyl-CoA synthase와 다르지만 *cooS* 단백질, *C. thermoaceticum*의 β-subunit 그리고 *M. soehngeni*의 α-subunit들은 생화학적인 성질과 염기서열 상에서 상당한 유사성을 갖는다. 즉 *R. rubrum cooSq*의 염기서열은 *C. thermoaceticum* β-subunit과 67%의 유사성을 보였고(35) *M. soehngeni*의 α-subunit와는 47%의 유사성을 보였고(34). 또한 *cooS*는 Ni를 함유하는 hydrogenase(66,67)와 urease(68)에서 보이는 histidine motif와 유사함을 보이고 Fe hydrogenase와는 다른 특성을 보인다(69). 물론 이는 모든 Ni 효소의 공통적인 특징은 아니다.

전체적으로 *R. rubrum cooHFS* 부위는 *E. coli*의

formate hydrogen lyase(70,71,72)와 유사한 기능을 나타내는 것으로 보인다. 그런데 Gorrell 등은(73) *R. rubrum*도 formate 산화반응시 수소가스를 생산하는 것으로 보고하였다. 즉 *E. coli*에 있어서 *fdhF* 유전자 생성물인 selenomolybdenum protein인 formate dehydrogenase에의 환원이 동시에 진행된다. 이때 H⁺의 환원은 HycE 유전자 생성물인 Ni함유 hydrogenase에 의해 촉매된다. 그런데 *R. rubrum*에서 Ni-CODH(*cooS*)에 의한 CO의 산화는 *cooF* 생성물인 Fe/S 단백질을 통한 H⁺의 환원과 동시에 진행되며 이때 H⁺의 환원은 *cooH* 생성물인 hydrogenase에 의해 촉매되는 것이 *E. coli* 경우와 유사하다. 그러나 *R. rubrum*의 일산화탄소 산화제에서는 추가적인 에너지원이 없어도 단지 CO의 산화에 의해 미생물이 성장할 수 있다는 차이점이 있다(39,40). 이런 점에서는 오히려 *R. rubrum*의 CO 산화제는 methanogenic bacteria에 의한 CO 산화 및 H⁺ 환원제와 유사한 특성을 보인다(74).

5. 결 론

지구상에서 일산화탄소가 생물학적 및 비생물학적으로 널리 생성되어 존재하므로(1) 다양한 박테리아에 이를 산화시키는 효소계가 존재하는 것은 놀랄만한 일은 아니다. 실제로 자연계에는 미생물, 식물 및 동물 등에 CO 산화계가 존재하고 있으며 특히 미생물 중에는 호기성 및 혐기성은 물론이고 Gram +, - 등에도 다양하게 유도되어 있다. *R.*

*rubrum*과 같은 광합성세균(phototrophs)들은 대사에 의해서나 광산화반응(photooxidative process)에 의해 일산화탄소가 생성되는 환경에서 잘 서식한다. 이와같이 미생물들이 CO 산화계 효소를 보유하고 CO 산화에 의해 환원제를 제공할 뿐 아니라 에너지 및 탄소원으로 사용할 수 있는 것은 독성이 있는 일산화탄소에 대한 방어기작(protective mechanism)인 것으로 이해된다. *Rhodospirillum rubrum*의 경우 실제로 CO 산화계 효소역가가 상실된 변이주를 CO에 노출시켰을 때 성장이 억제되는 것이 관찰되었고(62) 따라서 H₂ 생성이나 질소고정 능력 등에 대한 저해 효과는 더 클 것으로 예상할 수 있다. 그런데 CO 산화계 효소가 발현되는 조건은 미생물마다 조금씩 다른 양상을 보이는 데 이는 유도 및 변이과정에서 효소발현조절계의 변이 차이에 의한 것으로 추정된다.

*R. rubrum*의 CO 산화계는 *M. soehngenii*보다 *C. thermoacetium*의 acetyl-CoA synthase/carbon monoxide dehydrogenase와 더 유사한 특성을 보인다. 그런데 본 효소들의 각 기능이 효소의 어떤 subunit나 반응에 의해 촉매되는가 등이 더 규명되어야 할 것이고 이런 면에서 Ni이 없는 apo-enzyme 상태에서 안정성을 유지하고 있는 *R. rubrum*의 CO 산화계 효소에 대한 연구가 더 필요할 것이다. 즉 자연계의 미생물에서 일산화탄소 산화효소계의 역할 및 활용방안에 대한 연구에 이들의 이용이 가능할 것으로 보인다.

끝으로 환경적인 측면에서 대기중 CO의 제거를 위해 이에 대한 연구가 더 있어야 할 것으로 보이며 에너지 면에서도 Biogas의 생성 및 질소고정 등과 관련하여 체계적인 접근이 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Conrad, R. (1988), Adv. Microb. Ecol. **10**: 231-283.
- Beijerinck, M. W., A. Van Delden (1903), Cent. Bakt. Parasitenk II **10**: 4-57.
- Kaserer, H. (1906), Cent. Bakt. Parasitenk II **16**: 681-696.
- Kluyver, A. J. and G. T. P. Schnellen (1947), Arch. Biochem. **14**: 57-70.
- Kim, Y. M., and G. D. Hegeman (1983), Int. Rev. Cytol. **81**: 1-28.
- Uffen, R. L. (1981), Enzyme Microb. Technol. **3**: 197-206.
- Krall, A.R., and N.E. Tolbert (1957), Plant Phys. **32**: 321-326.
- Dalton, D. A., S. A. Russel, and H. J. Evans (1988), Biofactors **1**: 321-326.
- Breckenridge, B. (1953), Amer. J. Physiol. **273**: 61-69.
- Jaffe, L. S. (1970), Ann. New York Acad Sci **174**: 77-82.
- Weinstock, B., and H. Nicki (1972), Science **176**: 290-292.
- Engel, R. R., J. M. Matsen, S. S. Chapman, and S. Schwartz (1972), J. Bact. **112**: 1310-1315.
- Bauer, K., R. Conrad, and W. Seiler (1980), Biochem. Biophys. Acta, **589**: 46-55.
- Schlegel, H. G. (1974), Tellus. **26**: 11-20.
- Eiksmann, B., G. Fuchs, and R. K. Thauer (1985), Eur. J. Biochem. **146**: 149-154.
- Hino, S., and H. Tauchi (1987), Arch. Microbiol. **148**: 167-171.
- Drake, H. L., S. Hu, and H. G. Wood (1981), J. Biol. Chem. **256**: 11137-11144.
- Hu, S., H. L. Drake, and H. G. Wood (1982), J. Bacteriol. **149**: 440-448.
- Pezacka, E., and H. G. Wood (1984), Arch. Microbiol. **137**: 63-69.
- Ragsdale, S. W., and H. G. Wood (1985), J. Biol. Chem. **260**: 3970-3977.
- Pezacka, E., and H. G. Wood (1986), J. Biol. Chem. **261**: 1609-1615.
- Wood, H. G., S. W. Ragsdale, and E. Pezacka (1982), FEMS Microbiology Rev. **39**: 345-362.
- Meyer, O (1989), Aerobic carbon monoxide oxidizing bacteria, P331-350, in H. G. Schlegel and B. Bowien(ed.), Autotrophic bacteria, Science Tech. Publishers, Madison, WI USA.
- Williams, E., J. Colby, C. M. Lyons, and J. Bell (1986), Biotechnol. Genet. Eng. Rev. **4**: 169-211.
- Black, G. W., C. M. Lyons, E. Williams, J. Colby, M. Kehoe, and C. o'Reilly (1990), FEMS

- Microbiol. Lett. **70**: 249-254.
26. Jones, W. J., D. P. Nagle, Jr and W. B. Whitman (1987), Microbiol. Rev. **51**: 135-177.
 27. Ljungdahl, L.G. (1986), Annu. Rev. Microbiol. **40**: 415-450.
 28. Ragsdale, S. W., J. R. Baur, C. M. Gorst, S. R. Harder, W.-P. Lu, D. L. Roberts, J. A. Runquist, and I. Schiau (1990), FEMS Microbiol. Rev. **87**: 397-402.
 29. Thauer, R. K., D. Moller-Zinkhan, and A. M. Spormann (1989), Annu. Rev. Microbiol. **43**: 43-67.
 30. Sood, H. G. (1991), FASEB. J. **5**: 156-163.
 31. Jetten, M. S. M., W. R. Hagen, A. J. Pierik, A. J. M. Stams, and A. J. B. Zehnder (1991), Eur. J. Biochem. **185**: 385-391.
 32. Lu, W.-P., and S. W. Ragsdale (1991), J. Biol. Chem. **266**: 3554-3564.
 33. Ragsdale, S. W., J. E. Clark, L. G. Ljungdahl, L. L. Lundie and H. L. Drake (1983), J. Biol. Chem. **258**: 2364-2369.
 34. Eggen, R. I. L., A. C. M. Geerling, M. S. M. Jetten, and W. M. de Vos (1991), J. Biol. Chem. **258**: 2364-2369.
 35. Morton, T. A., J. A. Runquist, S. W. Ragsdale, T. Shanmugasundaram, H. G. Wood, and L. G. Ljungdahl (1991), J. Biol. Chem. **266**: 23824-23828.
 36. Roberts, D. L., J. E. James-Hagstrom, D. K. Garvin, C. M. Gorst, J. A. Runquist, J. R. Baur, F. C. Haase, and S. W. Ragsdale (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **86**: 32-36.
 37. Bonam, D., L. Lehman, G. P. Roberts and P. W. Ludden (1989), J. Bacteriol. **171**: 3102-3107.
 38. Bonam, D., S. A. Murrel, and P. W. Ludden (1984), J. Bacteriol. **159**: 693-699.
 39. Uffen, R. L. (1976), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. **73**: 3298-3302.
 40. Uffen, R. L. (1983), J. Bacteriol. **155**: 956-965.
 41. Hong, S. S., and R. L. Kerby, unpublished data.
 42. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.
 43. Dixon, N. E., C. Gazzola, R. L. Blakeley, and B. Zerner (1975), J. Amer. Chem. Soc. **97**: 4131-4133.
 44. Graf, E. G., and R. K. Thauer (1981), FEBS Letters **136**: 1195-1204.
 45. Jarrell, K. F., and G. D. Sprott (1982), J. Bact. **151**: 1195-1204.
 46. Campbell, P. M., and G. D. Smitjh (1986), Arch. Biochem. Biophys. **244**: 470-477.
 47. Drake, H. L., In The Bioinorganic Chemistry of Nickel, Lancaster J. R. Eds (VCH Publishers, Inc., New York. Weinheim, 1988).
 48. Stults, L. W., S. Mallick, and R. J. Maier (1987), J. Bact. **169**: 1398-1402.
 49. Wood, H. G., S. W. Ragsdale, and E. Pezacka (1986), Biochem. Int. **12**: 421-440.
 50. Terlesky, K. C., M. J. K. Nelson, and J. G. Ferry (1986), J. Bacteriol. **168**: 1053-1058.
 51. Krzycki, J. A. and J. G. Zeikus (1984), J. Bacteriol. **158**: 231-237.
 52. Bonam, D., and P. W. Ludden (1987), J. Biol. Chem. **262**: 2980-2987.
 53. Ensign, S. A., D. Bonam, and P. W. Ludden (1989), Biochemistry **28**: 4968-4973.
 54. Ensign, S. A. and P. W. Ludden (1991), J. Biol. Chem. **266**: 18395-18403.
 55. Ensign, S. A., M. R. Hyman, and P. W. Ludden (1989), Biochemistry **28**: 4973-4979.
 56. Bona, D., M. C. Mckenna, P. J. Stephens, and P. W. Ludden (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. **85**: 31-35.
 57. Ensign, S. A., M. J. Campbell, and P. W. Ludden (1990), Biochemistry **29**: 2162-2168.
 58. Stephens, P. J., M.-C. Mckenna, S. A. Ensign, D. Bonam, and P. W. Ludden (1989), J. Biol. Chem. **264**: 16347-16350.
 59. Hausinger, R. D. (1987), Microbiol. Rev. **51**: 22-42.
 60. Walsh, C. T. and Orme-Johnson, W. H. (1987), Biochemistry **26**: 4901-4906.
 61. Ludden, P. W., and G. P. Roberts: unpublished data.
 62. Kerby, R. L., S. S. Hong, S. A. Ensign, L. J. Coppoc, P. W. Ludden, and G. P. Robert (1992), J. Bacteriol. **174**: 5284-5294.
 63. Hong, S. S., R. L. Kerby, and G. P. Roberts: unpublished data
 64. Fearnley, I. M., M. J. Runswick, and J. E. Walker (1989), EMBO J. **8**: 665-672.

-
65. Bruschi, M., and F. Guerlesquin (1988), *FEMS Microbiol. Rev.* **54**: 155-176.
 66. Monon, N. K., J. Robins, H. D. Peck, Jr., C. Y. Chatelus, E.-S. Choi, and A. E. Przyyla (1990), *J. Bacteriol.* **172**: 1969-1977.
 67. Reeve, J. N., G. S. Beckler, D. S. Cram, P. T. Hamilton, J. W. Brown, J. A. Krzycki, A. F. Kolodziej, L. Alex, W. H. Orme-Johnson, and C. T. Walsh (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 3031-3035.
 68. Mulrooney, S. B., and R. P. Hausinger (1990), *J. Bacteriol.* **172**: 5837-5843.
 69. Voordouw, G., J. D. Strang, and F. R. Wilson (1989), *J. Bacteriol.* **171**: 3881-3889.
 70. Bohm, R., M. Sauter, and A. Bock (1990), *Mol. Microbiol.* **4**: 231-243.
 71. Lutz, S., A. Jacobi, V. Schlensog, R. Bohm, G. Sawers, and A. Bock (1991), *Mol. Microbiol.* **5**: 123-135.
 72. Stewart, V. (1988), *Microbiol. Rev.* **52**: 190-232.
 73. Gorrell, T. E. and R. L. Uffen (1977), *J. Bacteriol.* **131**: 533-543.
 74. Terlesky, K. C. and J. G. Ferry (1988), *J. Biol. Chem.* **263**: 4075-4079.