

## 細菌의 糖脂質에 關한 研究

第三報 *Selenomonas ruminantium* 에 依한 糖脂質의 *in vitro* 生合成

金 教 昌

忠北大學 農化學科

(1974년 5월 15일 수리)

## Studies on Glycolipid in Bacteria

### Part III. Biosynthesis of Glycolipid by Cell Free Extract of *Selenomonas ruminantium*

Kyo Chang Kim

Dept. of Agrochemistry, Chung Buk College

(Received May 15, 1974)

### Summary

Biosynthesis of glycolipid from glucosamine and  $C_{13:0}$  fatty acid was attempted using an enzyme preparation which was extracted from *Selenomonas ruminantium* grown in lactic acid medium by means of ultrasonication, and with cofactors of ATP, Co A,  $Mg^{++}$ , and UTP. The results are summarized as follows:

1. The rate of synthesis of glycolipid from  $^{14}C$ -glucosamine and tridecyl CoA by an enzyme from *Selenomonas ruminantium* was promoted by the presence of co-factors, ATP, Mg, and UTP.
2. The rate of incorporation of  $^{14}C$ -glucosamine into glycolipid by the centrifugal fraction of bacterial preparation was the highest in the 105,000 g supernatant fraction, indicating about twice the enzyme activity as the 6,000 rpm supernatant fraction.
3. The biosynthesis of glycolipid from  $^{14}C$ -glucosamine and tridecyl-CoA by the crude enzyme of the 105,000 g supernatant fraction of *Selenomonas ruminantium* cell preparation proceeded the most part of it in 30 minutes and completed in an hour.

### 一. 結 論

Lipid A 에 關한 研究는 *Salmonella typhirurium*  
(<sup>1</sup>) *Escherichia Coli*(<sup>2</sup>) *Serratia marcescens*, (<sup>3</sup>) *Sele-*

*nomonas ruminantium* (<sup>4,5</sup>) 등 여러 菌에 關하여 研究  
되어 있으며 Boivin (<sup>6</sup>) 등은 *Salmonella* 에서 酸處理  
後 分離한 劃分에 毒性에 關한 實驗을 하였다.  
Westphal (<sup>1</sup>) 등은 *Salmonella* 菌에서 稀酸處理後 分

離한 lipid 劃分을 分離하여 Lipid A 라고 命名하였으 며 化學構造에 對하여 研究하였다.

또한 著者는 前報<sup>(4,5)</sup>에서 *Selenomonas ruminantium* 으로부터 分離한 Lipid A 가 glucosaminyl  $\beta$ -1.6-glucosamine 에 O-acyl과 N-acyl 脂肪酸이 結合한 것임을 밝힌바 있다.

lipid A 의 生合成에 關한 研究는 一般의 脂 肪酸 및 그 成分인 glucosamine 의 生合成에 關한 知識以外에는 거의 알여지지 않고 있다.

Heath<sup>(7)</sup>는 다만 lipid A 의 構成脂肪酸인  $\beta$ -hydroxymyristic acid 의 動態를 追求하여 Lipid A 의 生合成을 밝히고자 하였으나 現在  $\beta$ -hydroxymyristic acid 을 *E. coli* B 의 粒子劃分과 incubation 할때 그 脂肪酸部分이 lysophosphatidylethanolamine 에  $\beta$  傳位되는 것을 알았을 뿐이다.

$\beta$  傳位된 phosphatidylethanolamine 에서  $\beta$ -hydroxymyristyl 基가 lipid A 로 다시 傳位되는 것도 生覺되나 確證을 얻지 못하였다. 著者는 糖 脂質의 生合成에 關한 研究를 試圖코져 前報<sup>(4)</sup>에서 glucosaminyl-1.6-glucosamine 의 構造를 밝힌 바 있는 糖脂質構成 成分인 glucosamine 을 <sup>14</sup>C 으로 label 된 glucosamine 과 脂肪酸을 基質로 하고 이에 ATP, Mg<sup>++</sup>, UTP.를 cofactor 로 添加하고 *Selenomonas ruminantium* 에서 抽出分劃된 酵素를 使用하여 *in vitro* 에서 糖脂質生合成을 試圖한 바 *Selenomonas ruminantium* 에서 分離한 것과 同一한 糖脂質을 生合成하는데 成功하였으므로 이에 報告하는 바이다.

## 二. 實驗方法

### 1. 使用菌株

綿羊의 第 1胃(rumen)에서 分離한 *Selenomonas ruminantium* Var. *lactilytica* 를 前報<sup>(4)</sup>에서와 같이 本實驗에서도 使用하였다.

### 2. 培地 및 培養條件<sup>(8)</sup>

上記한 菌株을 表 1 의 乳酸鹽培地에서 嫌氣의 으로 37°C 에서 培養하고 菌體密度가 O.D (660nm) 0.3—0.5에 이르렀을 때 遠心分離하여 菌體를 triethanol amine buffer (pH 7.5)로 씻고 遠心分離하는 操作을 두번 反復하여 實驗을 施行하였다.

Table 1. Composition of lactate medium (2l) for growing *Selenomonas ruminantium*.

Constituents	Amount
Trypticase	4g
yeast extract	4
Na-lactate (50%)	50ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.8
NaCl	1.8
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.01
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.01
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.026
Biotin	0.2mg
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	6
Cystein	1.5

### 3. 酵素의 抽出

②의 方法으로 얻은 菌體를 0.1mM dithiothreitol (DTT) 水溶液으로 洗滌後 窒素 gas 氣流中에서 10分間 超音波處理(100V, 10.5A)로서 細胞를 破壞한 후 6,000rpm 으로 15分間 遠心分離하여 未處理된 菌體를 除去한 다음 supernatant 를 다시 10,000rpm 에서 30分間 遠心分離하여 膜部分을 除去하고 다시 超遠心分離를 使用하여 105,000g 로 1時間 遠心分離하여 pellet 部分과 水溶液部分을 分劃하고 水溶液部分을 實驗에 使用하였다.

### 4. *in vitro* 反應條件

反應液은 2 mM ATP 10 $\mu$ l, 100mM triethanolamine HCl buffer 0.1ml, 0.5mM Coenzyme A, 10 $\mu$ l, 0.25mM tridecyl-CoA 5 $\mu$ l, 4mM Mg<sup>++</sup> (MgCl<sub>2</sub>로서) 5 $\mu$ l, 2mM UTP 10 $\mu$ l, <sup>14</sup>C-glucosamine (3 $\times$ 10<sup>4</sup> cpm) 20 $\mu$ l, 0.1mM DTT 10 $\mu$ l, 3 實驗에서 얻은 酵素(1mg/protein) 0.1ml 을 넣고 0.01M triethanol buffer 를 0.23 ml 를 加하여 pH 7.5 에서 最終液量이 0.5ml 가 되게하여 37°C 에서 2 時間 反應시켰다. 아울러서 이中 CoA, ATP, UTP, Mg<sup>++</sup>, 酵素를 各各 缺如시키면서 生合成 影響도 檢討하였다.

### 5. 糖脂質의 抽出<sup>(9)</sup>

反應液에 ethanol : ether (3 : 1)을 加하여 10分間 抽出하고 遠心分離하는 操作을 3回 反復하여 얻은 沈澱物을 chloroform : methanol (1 : 3)을 加

하고 抽出遠心 分離操作을 위와같이 3回 反復하여 上澄液에 磷脂質을 移行케하여 除去하였다. trichloro acetic acid (TCA)로 90°C에서 15分間 處理하고 遠心分離하여 TCA 可溶液部分을 除去하였다. 여기서 얻은 沈澱物을 물로 두번 씻고 80°C에서 1時間 chloroform : methanol (1 : 3)로 還流 處理하고 遠心分離한 上澄液은 眞空 濃縮하여 chloroform : methanol (8 : 2)로 抽出한 다음 다시 眞空濃縮시켰다. 이 濃縮劃分을 chloroform : methanol : water (65 : 25 : 4)를 溶媒系로 하여 thin layer chromatography (TLC)에 依하여 展開하고 autoradiogram을 한 다음 spot를 TLC에서 分離하고 chloroform : methanol (8 : 2)溶液으로 抽出하여 liquid scintillation spectrometer (Model LS 500, Horiba Seisakusho, kyoto)로 測定하였다. liquid scintillator<sup>(10)</sup>는 4g의 2,5-diphenyloxazole (PPO)과 0.1g 1,4-bis-2-(Phenylloxazol) benzene (POPOP)를 1l의 toluene에 溶解시킨 것을 vial當 10ml씩 넣고 測定하였다.

### 三. 結果 및 考察

#### (1) 糖脂質의 *in vitro* 生合成

*Selenomonas ruminantium*에서 抽出한 酵素로서 <sup>14</sup>C-glucosamine, 脂肪酸, ATP, CoA, Mg<sup>++</sup>, UTP의 混液을 37°C에서 2時間 동안 反應시키고 反應液에서 分離된 糖脂質을 TLC에 依하여 分離하고 autoradiography를 한 結果는 그림 1과 같다.

이 TLC의 spot에서 <sup>14</sup>C含有 糖脂質을 分離 抽出하여 liquid scintillation spectrometer에 依하여 糖脂質의 放射能을 測定한 結果는 表 2과 같다.

表 2에서 보는 바와 같이 <sup>14</sup>C-glucosamine과 tridecyl CoA로부터 glycolipid 合成에는 CoA는 必要가 없으며 ATP를 添加하지 않았을 境遇에는 完全系에 1/2程度의 反應을 보였다.

그리고 UTP를 添加치 않았을 경우에는 完全系에 約 1/3의 反應만을 보였다. 또한 Mg<sup>++</sup>을 加하지 않거나, 또는 酵素를 加하지 않고 反應시켰을 경우에는 反應치 않으며 酵素를 加熱하였을 경우에도 反應치 않았다. cofactor를 全然 添加하지 않고 基質과 酵素만으로 反應시켰을 境遇에도 反應치 않았다.

triglyceride의 合成에 있어서 遊離脂肪酸은 ester 結合前에 CoA와의 thioester 結合形成에

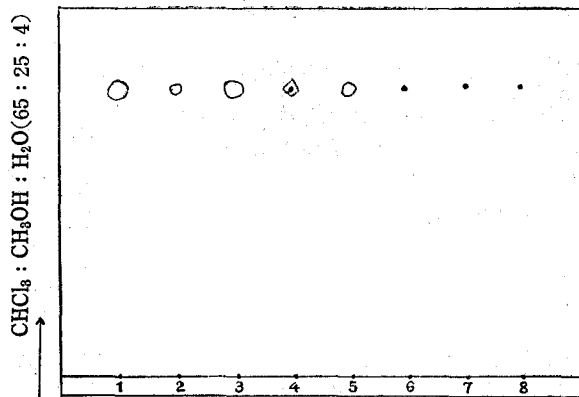


Fig. 1 Autoradiogram of glycolipid biosynthesized *in vitro* from <sup>14</sup>C-glucosamine and tridecyl-CoA by an crude enzyme preparation of *Selenomonas ruminantium* (1mg/protein) with various cofactors, ATP, UTP, CoA, and Mg<sup>++</sup>.

The mixture were incubated at 37°C for 2 hr. 1 : whole system, 2 : ATP, 3 : -CoA, 4 : -Mg<sup>++</sup> 5 : -UTP, 6 : -enzyme, 7 : enzyme heated (100°C 10 min.), 8 : -Cofactor (ATP, CoA, Mg<sup>++</sup>, UTP)

\* The whole system contained triethanolamine HCl buffer (pH 7.5, 100mM), ATP (2mM), CoA (0.5mM), Tridecyl CoA (0.25mM), Mg<sup>++</sup> (4mM), UTP (2mM), <sup>14</sup>C-glucosamine (3 × 10<sup>4</sup> cpm), 0.1mM DTT, enzyme (1mg/protein), in a total volume of 0.5ml.

Table 2. Requirement of various cofactors for the biosynthesis of radioactive glycolipid from <sup>14</sup>C-glucosamine and tridecyl CoA by *Selenomonas ruminantium*.

Experimental condition	Radioactivity in glycolipid
Whole system*	9.118
— ATP	4.629
— CoA	11.306
— Mg <sup>++</sup>	437
— UTP	3.635
— enzyme	423
enzyme heated**	416
— cofactor	456

\* The whole system contained triethanolamine HCl buffer (pH 7.5, 10mM), ATP (2mM), CoA (0.5mM), tridecyl CoA (0.25mM), Mg<sup>++</sup> (4mM), UTP (2mM), <sup>14</sup>C-glucosamine (3 × 10<sup>4</sup>cpm), DTT (0.1mM), enzyme (1mg/protein) in a total volume of 0.5ml

\*\* boiled for 10min.

ATP를 필요로 하는데 본實驗에서는 脂肪酸 O-acyl 및 N-acyl ester 結合에 遊離 脂肪酸이 아니고 脂肪酸의 CoA ester을 使用하였으므로 糖脂質生合成에 CoA가 必要치 않았던 것은 이 때문이라고 生覺되나 ATP는 그래도 必要로 한 것은 二個의 glucosamine의 1→6結合形成에 ATP 또는 UTP가 所要되는 때문이 아닌가 生覺된다.

glycosidic bound의 形成即 Transglycosylation에 一般的으로 ATP나 UTP가 必要한 것은 잘 알려져 있는 事實로 본實驗과 一致하는 것으로 生覺된다.

### (2) 酵素劃分に 依한 生合成

酵素的 存在 部位를 알기 爲하여 *Selenomonas ruminantium*을 乳酸鹽 培地에서 菌體密度가 O.D (660nm) 0.3-0.5까지 培養하여 菌體를 遠心分離에 依하여 分離하고 超音波處理로서 菌體를 破壞하여 遠心分離로 分劃한 다음 各劃分에 對하여 glycolipid 生合成을 試驗하고 TLC法으로 分離하고 autoradiogram에 依하여 spot를 確認하고 그 部分을 分離溶出하여 liquid scintillation spectrometer로 測定하여 遠心分離에 依한 各劃分과 radioactivity와의 關係는 表 3에 表示하였다.

**Table 3.** Biosynthesis of glycolipid by centrifugal fractions of bacterial preparation of *Selenomonas ruminantium*.

System	Radioactivity in glycolipids (cpm)
6,000 rpm sup.+cofactor	5.123
10,000 rpm sup.+cofactor	6.323
105,000g pellet.+cofactor	2.315
105,000g sup.+cofactor	9.123

cofactor; ATP, Mg, UTP

表 3에서 보던 6,000rpm supernatant에서의 5,123 cpm에 對하여 10,000 rpm supernatant는 6,323cpm을 나타냈다. 105,000g pellet는 105,000g supernatant의 約 1/4의 數値를 나타냈다. 이것으로 보아 glycolipid 合成酵素는 10,500g의 supernatant에 存在하는 것을 알 수 있다.

### (3) 生合成의 所要時間

完全生合成系에 依하여 糖脂質이 生合成되는 데 所要되는 時間을 調査한 바는 表 4과 같다. 即 5分, 10分, 30分, 60分, 120分別로 37°C에서 反應시켰을 때 <sup>14</sup>C-glucosamine 脂肪酸이 結合한 糖脂質의 Radioactivity는 各各 493cpm, 1,192cpm,

**Table 4.** Time Course in biocynthesis of glycolipid from <sup>14</sup>C-glucosamine and tridecyl-CoA by an enzyme preparation of *S. ruminantium*.

Incubation time at 37°C	Radioactivity of glycolipid(cpm) incorporated with <sup>14</sup> C-glucosamine
5min	493
10min	1,193
30min	2,250
60min	2,903
120min	2,950

2,250cpm 2,903cpm 및 2,950cpm으로서 60分程度까지는 2,903cpm으로서 反應이 거의 完結되는 것을 알 수 있다.

Heath<sup>(7)</sup>는 lipid A에서만 볼 수 있는 β-hydroxymyristylic acid는 細胞膜의 成分인 phosphatidylethanolamine의 β位置에서 移動하여 이것이 다시 lipid A로 轉移된다는 可能性을 示唆하였다.

本實驗의 表 2 結果에 依하면 糖脂質 生合成 酵素活性은 粒子劃分에서는 supernatant에 比하여 1/4밖에 되지 않는다. 이와 같이 supernatant에 酵素活性이 많은 것으로 보아 β-hydroxymyristylic 基가 phosphatidylethanolamine에서 lipid A로 轉移될 可能性은 적은 것으로 生覺된다.

## 四. 摘 要

乳酸鹽培地에서 培養한 *Selenomonas ruminantium* 菌體를 超音波處理後 抽出한 酵素와 cofactor로서 ATP, CoA, Mg<sup>++</sup>, UTP를 使用하여 *in vitro*에서 糖脂質을 生合成하여 본 結果는 다음과 같다.

1. *Selenomonas ruminantium*의 酵素에 依한 <sup>14</sup>C-glucosamine과 tridecyl-Co A로 부터의 糖脂質의 *in vitro* 生合成은 ATP, Mg<sup>++</sup>, UTP에 依하여 促進되었다.

2. 酵素抽出液을 遠心分離로 分劃하고 各劃分の glycolipid 合成能을 본 結果 105,000의 supernatant에 6,000rpm supernatant의 約 2배의 酵素活性을 나타내는 粗酵素가 存在함을 알았다.

3. 酵素反應은 30分일 때 大部分이 進行되며 1時間에서 거의 完結됨을 알았다.

끝으로 本研究를 遂行함에 있어서 校閱과 始終 指導鞭撻을 아끼지 않으신 서울大學校 農科大學 李春寧博士, 金載勗博士, 曹惠鉉博士님과 本論文을 完成함에 있어 도와주신 여러분께 衷心으로 感謝를 드립니다.

## 參 考 文 獻

1. Gmeiner J. Luderitz. O. and westphal O., European J. Biochem., 7 370 (1969)
2. Burton A.J., carter H.E., Biochemistry 3 411 (1964)
3. Adams. G.A. and Sigh P.P., Biochem. Biophys. Acta., 202 553 (1970)
4. Kamio Y., Kim. K.C. and Tabahashi H., Agr. Biol. Chem. 36 2195 (1972)
5. Kamio Y. Kim K.C. and Takahashi, H., Agr. Biol. Chem. 36 2545 (1972)
6. Boivin A. Mesrobeanu I. and Mesrobeanu L., C.R. Seances Soc. Biol., 114 307 (1933)
7. Taylor S.S. and Heath E.C., J. Biol. Chem., 244 6605 (1969)
8. Kanegasaki S. and Takahashi. H., J. Bacteriol., 93 456 (1967)
9. Kamio Y. Kim K.C. Takahashi H., J. Biochem. 70 187 (1971)
10. 蛋白質 核酸 酵素 編集部編 同位元素實驗法 p.25 (1968)