

광합성 세균인 *Rhodopseudomonas gelatinosa* ATCC 17013에서 Cytochrome c-551의 정제

강대길 · 최원기
전남대학교 자연과학대학 화학과

Purification of Cytochrome c-551 from Photosynthetic Bacterium, *Rhodopseudomonas gelatinosa* ATCC 17013

Kang, Dae-Gil and Won-Ki Choi

Department of Chemistry, College of Natural Science, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea

ABSTRACT: The soluble cytochrome c-551 of photosynthetic bacterium, *Rhodopseudomonas gelatinosa* ATCC 17013 was purified through a sequence of four step chromatography including CM-cellulose ion-exchange chromatography, DEAE-Sephacel chromatography, Sephacryl s-200 gel permeation chromatography, and HPLC (SP-5PW). The molecular weight of the purified cytochrome c-551 was 14,600 Da, and this protein shows the absorption peak at 551 nm, 522 nm, and 417 nm as the reduced form, and at 412 nm as the oxidized form. The cytochrome c-551 seems to be a substrate for the terminal oxidase in the electron transport chain.

KEY WORDS □ *Rhodopseudomonas gelatinosa* ATCC 17013, Cytochrome c-551.

미토콘드리아 전자전달계에서 c형 cytochrome은 ubiquinol ferricytochrome c oxidoreductase (E.C. 1.10.2.2.)로 부터 전자를 받아 전자전달계의 말단효소인 cytochrome c 산화효소 (E.C. 1.9.3.1.)에 의해 산화되어지는 전자전달계의 중간체로 널리 알려져 있다. 하지만 광합성 세균에서의 c형 cytochrome은 cytochrome c', cytochrome f, cytochrome c-551, cytochrome c-552, cytochrome c-554, cytochrome c-558, cytochrome c₁, cytochrome c₂ 등 다양한 종류가 존재하고 따라서 전자전달 메카니즘도 종에 따라 복잡하고 독특하다 (Clayton과 Sistrun, 1983). 광합성 세균에서의 전자전달체에 대한 연구 및 생체 에너지학적 연구는 Vernon (1953)과 Elsdon 등 (1953)으로부터 출발하여 최근에도 끊임없이 이에대한 연구 (Wynn 등 1986; Sone 등 1989)가 진행되고 있다. 동성 혐기성 자색 비유황 광합성 세균인 *Rhodopseudomonas gelatinosa*에는 가용성 cytochrome으로 cytochrome c', cytochrome f, cytochrome c-551 등이 존재하는 것으로 알려져 있는데 이 각각의 cytochrome에 대한 정확한 기능은 밝혀져 있지 않으며 그중 cytochrome c-551은 같은 속의 세균에는 알려져 있지 않고 *Rhodospirillum tenue*, *Azotobacter*

vinelandii, *Thermophillic bacterium* PS3 (Sone 등, 1989) 등에 존재하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 *Rhodopseudomonas gelatinosa* ATCC 17013 으로부터 cytochrome c-551을 정제하여 특성을 연구하므로써 본 세균의 전자전달 메카니즘을 밝히는데 도움을 주고자 한다.

재료 및 방법

균의 배양

Rhodopseudomonas gelatinosa ATCC 17013을 1% Yeast extract (Difco.), 0.1%, K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄, pH 7.2 액체배지에서 혐기성으로 약 12,000 Lux의 빛을 쬐여 주면서 30°C에서 배양하여 낮은 대수기에 수확하여 실험균주로 이용하였다.

재 료

실험에 이용된 DEAE-Sephacel과 전기영동 시약들은 Pharmacia 제품, CM-cellulose는 Merck 제품, Sephacryl s-200은 Sigma 제품, 그 밖의 완충용액을 포함한 여러시약들은 특급시약을 사용하였다. 그리고 소 심장의 cytochrome c 산화효소 (E.C. 1.9.3.1.)는 Sigma로부터 구입하여 사용하였다.

정 제

Rhodopseudomonas gelatinosa ATCC 17013에서 cytochrome c-551의 정제과정은 모두 4°C에서 수행하였다.

50g (wet wt.)의 cell을 200 ml의 200 mM potassium phosphate 완충용액 pH 7.2에 현탁시킨후 Ultrasonic oscillator를 이용하여 파쇄시킨 후 10,000 ×g에서 20분 원심분리 (Hitachi model SCR-BA)하여 얻어진 초추출물을 다시 145,000×g에서 2시간 원심분리 (Sorvall 75B)하여 가용성 단백질을 얻었다. 여기서 얻어진 가용성 단백질을 5l의 10 mM sodium acetate 완충용액 (pH 5.2)에서 하룻밤 동안 투석시킨후 10,000×g에서 10분 원심분리하여 낮은 pH에서 변성되어진 단백질을 제거하고 CM-cellulose chromatography를 하였다. 10 mM sodium acetate 완충용액 pH 5.2로 평형시킨 CM-cellulose column (2.8 cm×22 cm)에 2 ml/min의 일정속도로 단백질 용액을 주입한 후 0-0.3 M NaCl 직선 농도구배를 하여 단백질을 용출시켰다. 용출된 단백질 용액을 ultrafiltration (amicon PM-10)을 이용하여 농축하고 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.2)으로 바꾼후 같은 완충용액으로 미리 평형되어진 DEAE-Sephacel column (1 cm×2.5 cm)에 주입하여 결합하지 않고 용출된 단백질용액을 다시 모았다. 여기에서 모은 단백질용액은 0.1 M NaCl이 포함된 20 mM Tris-HCl 완충용액 pH 7.2로 평형된 Sephacrl s-200 겔 여과 크로마토그래피 (1.8 cm×50 cm)를 하고 이를 centricon (YM-10)를 이용 3 ml로 농축한 후 10 mM sodium acetate 완충용액 (pH 5.2)으로 미리 평형시킨 HPLC SP-5PW column (8.0 mm×7.5 cm)에 주입하여 KCl 구배를 걸어 정제된 cytochrome c-551을 얻었다.

Cytochrome c의 정성 및 정량

각 단계에서 c형 cytochrome의 확인은 Takaichi와 Morita (1981)법에 의해 pyridine hemochrome.으로 변형시킨후 환원-산화 차이 스펙트럼을 얻어서 확인하였고 정량은 같은 방법을 이용 ϵ_{660}^{red-ox} = 19.1로 부터 heme c이 양을 계산하였다.

Cytochrome c-551의 산화 환원 스펙트럼

환원된 cytochrome c-551을 Na₂S₂O₄로 환원시킨후 UV-vis spectrophotometer (Hitachi model 557)을 이용하여 scanning 하였고, 산화형은 potassium ferricyanide로 산화시킨후 과량의 potassium ferricyanide는 Sephadex G-25로 제거한후 scanning 하였다.

Cytochrome c산화효소에 의한 cytochrome c-551의 산화

정제된 cytochrome c-551을 과량의 Na₂S₂O₄로 환원시킨후 과량의 Na₂S₂O₄는 Sephadex G-25

column을 이용하여 제거하고 Bill 등 (1980)의 방법을 이용 cytochrome c산화효소에 의한 환원된 cytochrome c의 산화를 측정하였다.

기타방법

단백질의 정량은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 한 Lowry 법 (Lowry 등, 1951)을 이용하였고 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis는 Laemmli법 (Laemmli, 1971)을 이용 15% slab gel을 만들어 사용하였다.

결과 및 고찰

Cytochrome c-551의 정제

3일간 배양한 자색 비유황 광합성 세균 *Rhodopseudomonas gelatinosa* ATCC 17013 50g (wet wt.)을 초음파로 파쇄하고 원심분리하여 얻은 초추출물은 약 3,840 mg의 단백질이 포함되어 있고 Takaichi 와 Morita (1981)법에 의해 pyridine hemochrome.으로 변형시켜 환원-산화 차이 스펙트럼을 통해 c형 cytochrome이 포함되어 있음을 확인하였다.

이 시료를 145,000×g에서 2시간 동안 원심분리하여 광합성 생체막인 chromatophore막을 제거하고 가용성 단백질을 얻어 5l의 10 mM sodium acetate 완충용액 pH 5.2에 대해 하룻밤을 투석하였다.

pH 감소에 의해 변성되어진 백색 침전물을 원심분리하여 제거하고 변성되지 않은 시료는 10 mM sodium acetate 완충용액 pH 5.2에 평형되어진 CM-Cellulose 이온교환수지에 주입한 후 0-0.3 M NaCl

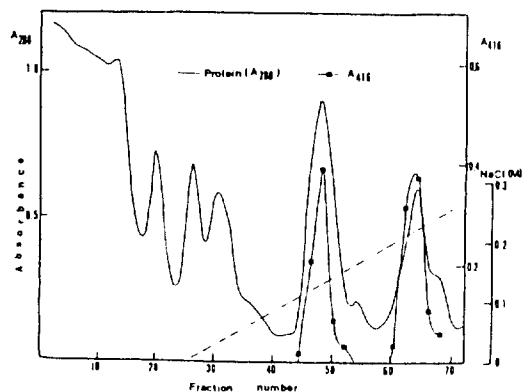


Fig. 1. Elution profile of CM-cellulose column chromatography of the purification procedure for Cytochrome c-551 from *Rhodopseudomonas gelatinosa*. The column (2.8 cm×22 cm) was equilibrated and eluted with 10 mM Na-acetate buffer at pH 5.2 at 1.8 ml/min with linear salt gradient from 0 to 0.3 M NaCl. The crude extract (200 ml) was applied and 15 ml fraction was collected.

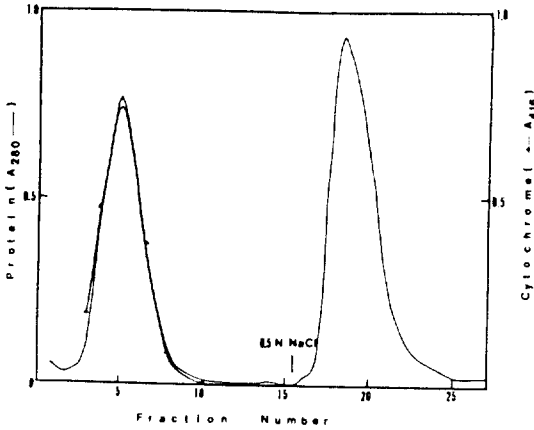


Fig. 2. Elution profile of DEAE-sephacel column chromatography of the purification procedure for Cytochrome c-551 from *Rhodopseudomonas gelatinosa*. Samples eluted from CM-cellulose were applied to the column (1 cm×2.5 cm) precisely equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer pH 7.2. The ultrafiltration concentrated sample was applied and 1.5 ml fraction was collected. The DEAE-sephacel bound sample was eluted with 0.5 N NaCl in above buffer

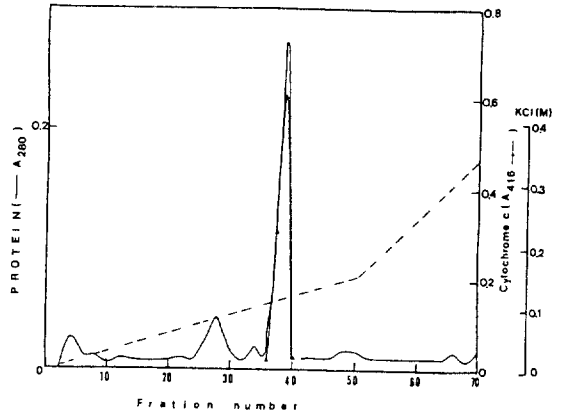


Fig. 4. HPLC ion exchange chromatography on SP-5 PW column. The sample eluted from Sephacryl s-200 column were concentrated and 4 ml were applied to a SP-5PW HPLC column (8.0 mm×7.5 cm) equilibrated with 10 mM Na-acetate buffer pH 5.2 and eluted at flow rate of 1 ml/min by successive application of KCl gradient.

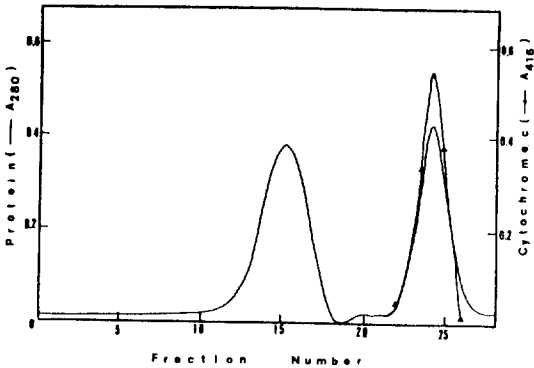


Fig. 3. Elution profile of Sephacryl s-200 gel filtration chromatography. The sample eluted from DEAE-sephacel column were concentrated and 2 ml were applied to Sephacryl s-200 column (1.8 cm×25 cm) equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) containing 0.1 N NaCl. Fractions of 2 ml were collected at a flow rate of 20 ml/hrs.

Table 1. Purification step of Cytochrome c-551 from *Rhodopseudomonas gelatinosa*

Purification step	Protein (mg)	Purity index*
Crude extract	3,840	—
Soluble proteins	1,112	—
CM-cellulose	78	0.82
DEAE-Sephacel	32	1.04
Sephacryl s-200	13	1.55
HPLC sp	7.2	2.23

*Purity index were assayed as absorbance of reduced cytochromes at its solet peak/absorbance of 280 nm.

직선구배 기울기를 걸어 용출액을 얻었다 (Fig. 1). 각 분액에 대해 환원-산화 차이 스펙트럼을 통해 61-68 분액에 c형 cytochrome이 포함되어 있음을 확인하였다. CM-Cellulose 이온교환수지를 통과한 시료 ($A_{416\text{red.}}/A_{280} = 0.82$)를 PM-10막을 이용한 Ultrafiltration하여 농축하고 완충용액 20 mM Tris-HCl 완

충용액을 (pH 7.2)으로 교환한 후 미리 같은 완충용액으로 평형시킨 DEAE-Sephacel column에 주입하여 결합되지 않은 단백질을 모았다.

농축한 이 시료를 Sephacryl s-200 겔 여과 크로마토그래피 (Fig. 3)를 하고 분액 23-25에서 용출되어지는 단백질액을 HPLC SP-5PW column을 이용한 이온교환 크로마토그래피를 하여 (Fig. 4) 정제된 cytochrome c-551을 얻었다. 각 정제단계를 요약하여 Table 1에 나타내었고 최종 얻어진 단백질의 양은 7.2 mg이고 전제지수 ($A_{416\text{red.}}/A_{280}$)는 2.23이었다.

산화 환원 스펙트럼

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 에 의해 환원된 cytochrome c-551은 α , β solet 흡수대가 각각 551 nm, 522 nm 그리고 417 nm에서 나타났고 potassium ferricyanide에 의해 산화된 cytochrome c-551은 solet 흡수대가 412 nm에서

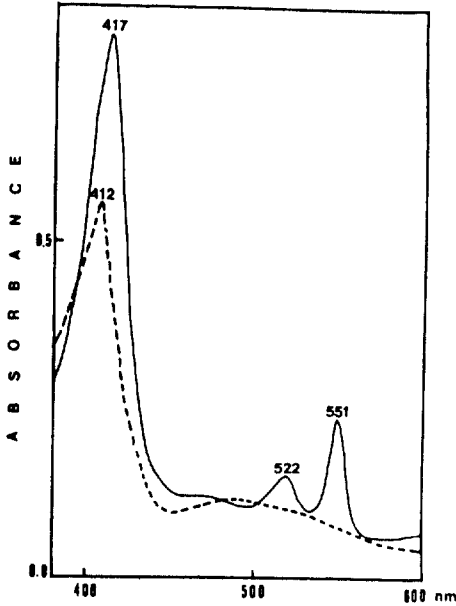


Fig. 5. UV-vis spectrum of cytochrome c-551 purified from *Rhodopseudomonas gelatinosa*. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ Reduced form (—), K -ferricyanide Oxidized form (-----).

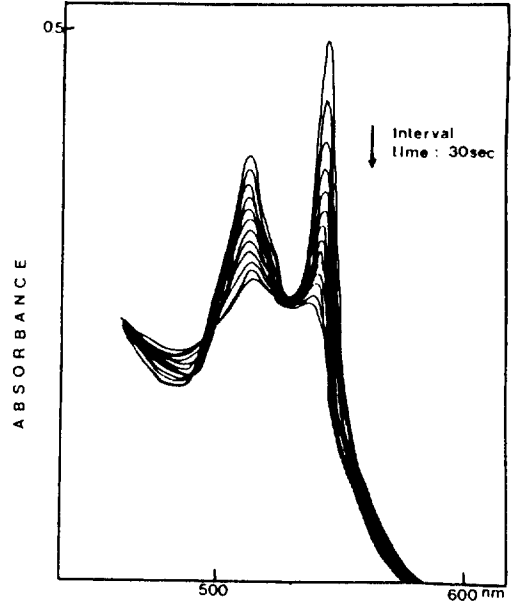


Fig. 7. Oxidation of reduced cytochrome c-551 from *Rhodopseudomonas gelatinosa*. The UV-vis spectrum was obtained in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing about 30 μM Cytochrome c-551, 25 mM KCl, 75 mM Choline chloride, 0.5% Tween 80 and 15 unit Cytochrome c oxidase.

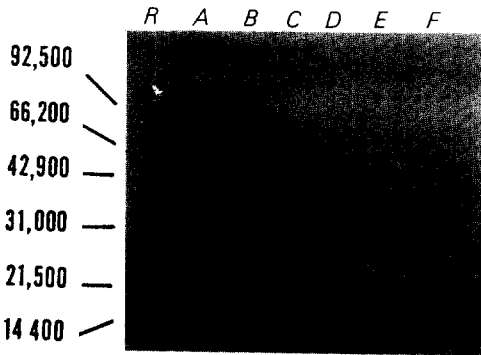


Fig. 6. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of samples from each purification steps. Lane A, B, C, D, E and F are sample from Crude extract, Soluble proteins, CM-cellulose chromatography, DEAE-sephacel chromatography, Sephacryl s-200 gel filtration chromatography, HPLC SP-ion exchange chromatography. Lane R; Reference proteins.

각각 나타냈다 (Fig. 5).

분자량 측정

Sephacryl s-200 겔 여과 크로마토그래피와 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 통해 cytochrome c는 subunit의 분자량이 약 14,600 Da인 단

량체인 것으로 보였다.

Cytochrome c-551 산화효소에 대한 반응성

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 에 의해 환원된 cytochrome c-551을 Bill 등 (1980)법에 의해 cytochrome c 산화효소에 의해 환원되는지 여부를 확인한 결과 시간의 변화에 따라 환원된 cytochrome c-551의 흡수대가 점점 감소됨으로 보아 소 심장 cytochrome c 산화효소에 의해 cytochrome c-551이 산화되어짐을 보였다. (Fig. 7) 이는 통성 혐기성 광합성 세균인 *Rhodopseudomonas gelatinosa* ATCC 17013에서 cytochrome c-551이 호흡사슬의 말단효소인 cytochrome c 산화효소의 기질로 작용함을 나타내므로 호기성으로 성장시킨 (Chemotrophically grown) 세균에서는 cytochrome c-551이 전자를 cytochrome c 산화효소에 직접 전달할 것으로 생각되어 진다.

혐기성으로 성장시킨 (Phototrophically grown) *Rhodopseudomonas gelatinosa*는 Q-cycle 모델 (Dutton과 Prince, 1982)을 통한 순환 전자전달을 할 것으로 생각되어 지지만 아직 각 전자전달계의 기능이 정확히 밝혀져 있지 않아 완전한 전자 전달계를 완성하는일은 앞으로 중요한 일이라 하겠다.

적 요

통성 혐기성 자색 비유황 광합성 세균 *Rhodospseudomonas gelatinosa* ATCC 17013에서 CM-Cellulose, DEAE-Sephacel 이온교환 크로마토그래피, Sephacryl s-200 겔 여과 크로마토그래피, SP-5PW column을 이용한 고속 액체크로마토그래피 등 4단계의 크로마토그래피를 이용하여 cytochrome c-551을 정제하였다. 정제된 cytochrome c-551은 subunit 분자량이 14,600 Da의 단량체로서 환원형의 UV-vis 스펙트럼에서 α , β , soret 흡수대가 각각 551 nm, 522 nm, 417 nm (산화형에서는 412 nm)였고 이 cytochrome c-551은 호기성 조건에서는 전자전달 말단효소인 cytochrome c 산화효소에 전자를 전달해 줄것으로 생각되어진다.

REFERENCES

1. Bill, K., R.P. Casse, C. Rogger and A. Azzi, 1980. Affinity chromatography purification of cytochrome c oxidase. *FEBS Lett.*, **120**(2), 248.
2. Clayton, K. and W.R. Sistron, 1983. "The photosynthetic bacteria" Plenum Press N.Y. pp. 249-279.
3. Dutton, P.L. and R. C. Prince, 1982. "Bioenergetics" (Nichols, D.G. Ed) Academic Press pp. 133-150.
4. Elsdon, S., M.D. Kamen and L.P. Vernon, 1953. A new soluble cytochromes. *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 6347.
5. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and K.J. Randall, 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265.
6. Lammler, U.K., 1971. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, **277**, 680.
7. Sone, N., E. Kutoh and Y. Yanagito, 1989. Cytochrome c-551 from the thermophilic bacterium PS3 grown under air-limited condition. *Biochim. Biophys. Acta.* **977**, 329.
8. Takaichi, S., S. Morita, 1981. Procedures and conditions for application of the pyridine hemochrome method to photosynthetically grown cells of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J. Biochem.*, **89**, 1513.
9. Vernone, P.P., 1953. Cytochrome c content of *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **43**, 492.
10. Wynn, R.M., C. Kampf, D.B. Gaul, W.K. Choi, R. W. Shaw and D.B. Knaff, 1986. Isolation of cytochrome bc₁ complex from photosynthetic bacteria *Rhodospseudomonas viridis* and *Rhodospirillum rubrum*. *Photosynth. Res.*, **9**, 181.

(Received March 11, 1991)

(Accepted April 29, 1991)