

Halobacterium sp. EH10 NADH dehydrogenase의 Na⁺ 요구성

배 무* · 이정임

이화여자대학교 자연과학대학 생물학과

Na⁺ Requirement of NADH dehydrogenase from an Extreme Halophile, *Halobacterium* sp. EH10 Isolated from a Saltern in Korea

Bae, Moo* and Jeong-Im Lee

Department of Biological Science, Ewha Woman's University, Seoul 120-750, Korea

Abstract — Intracellular enzymes of an extreme halophilic bacterium, *Halobacterium* sp. EH10, isolated from a saltern in Korea was investigated. The membrane-bound enzyme, NADH dehydrogenase, involved in electron transport system was stimulated by the addition of 2.0 M NaCl. The respiratory enzyme activities such as NADH oxidase and NADH dehydrogenase was decreased on removal of Na⁺ ion and restored when replaced with cations like K⁺, Li⁺ and NH₄⁺ ions. Furthermore, their activities were affected by the anions such like carbonate, acetate, sulfate, chloride and nitrate at the presence of Na⁺ ion. Lactate dehydrogenase activity was highest at the saturated solution of NaCl and isocitrate dehydrogenase activity was a maximum level at 1.0 M NaCl. These results suggested that the enzyme activities of the respiratory chain in *Halobacterium* sp. EH10 was stimulated by the presence of Na⁺ ion.

국내에서 분리동정한 신종 고도 호염성세균인 *Halobacterium* sp. EH10(1)은 최적 증식을 위해 50°C의 배양온도와 3.4 M 이상의 NaCl을 요구하는 세균이다.

호염성세균의 물질수송계에 관해서는 *Halobacterium halobium* 등 극히 일부에서 조사되어 Na⁺의 존재가 알려져 있고, 해양세균인 *Vibrio alginolyticus*는 아미노산 수송계에 Na⁺ 구동력이 필수임을 밝히고 있다(2, 3). 또한 *Vibrio alginolyticus*의 호흡계 NADH oxidase는 Na⁺에 의해서 활성화된다고 하였다(4).

*Halobacterium cutirubrum*에서 전자전달계에 관여하는 DPNH oxidase계, 특히 DPNH dehydrogenase는 2 M 내지 3 M의 염농도에서 최적 활성을 나타내며 여러 가지 양, 음이온에 의해서도 활성화된다(5). 특히, 이들 막 결합효소들의 최적 활성 pH가 9로

Na⁺ pump의 최적 pH와 일치한다는 점으로부터 Na⁺ pump와 이들 효소가 서로 상호작용하는 것으로 추정되고 있다(6-8).

이와 같이 고도호염성세균은 비호염성세균과는 다른 특성을 갖고 있으나, 이들 세균의 세포내 생리대사에 염이 어떻게 작용하는지는 아직도 명확치 않은 점이 많다.

본 연구실험에서는 국내 염전으로부터 분리한 기존 기록된 고도 호염성세균과는 다른 *Halobacterium* sp. EH10의 몇몇 대사 경로에 관여하는 효소와 막 결합 효소인 NADH oxidase계의 NADH dehydrogenase의 염의존성과 이들 효소활성에 미치는 여러 이온의 영향을 조사하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주

전보(1)에서 보고한 국내 염전으로부터 분리동정한 고도 호염성세균 *Halobacterium* sp. EH10을 사용하

Key words: Extremely halophilic bacterium, NADH dehydrogenase

*Corresponding author

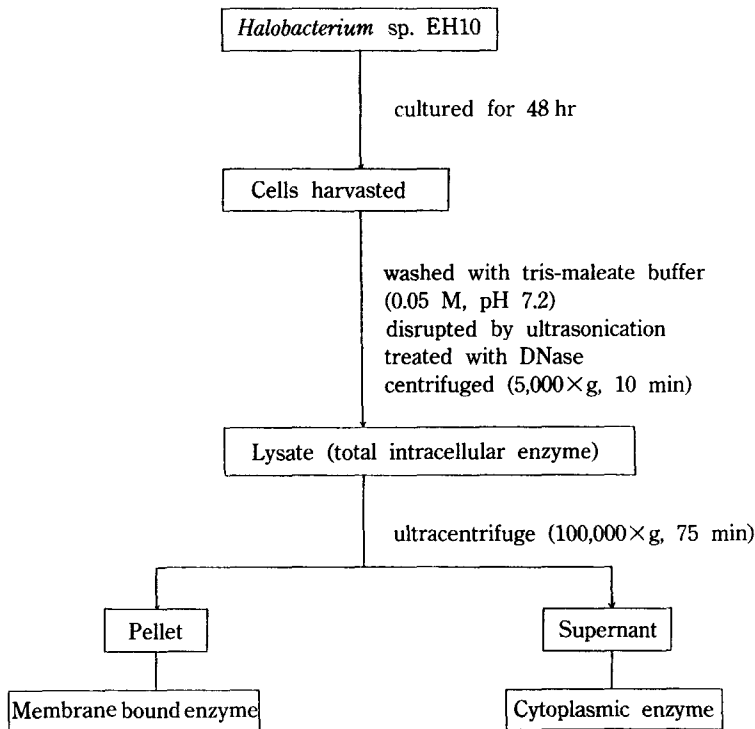


Fig. 1. Preparation of enzyme solution.

었다.

시약

NAD, NADH, Pyruvate 등 실험에 사용한 모든 시약은 Sigma 회사의 제품을 이용하였으며 NaCl은 TEDIA사의 순수 제품을 사용하였다.

효소용액의 조제

NaCl이 25%(4.3 M) 포함된 SGM 배지(1)에서 대수증식기 말기까지 진탕배양한 균체를 원심분리하고, 이것을 25% NaCl을 포함한 0.05 M Tris-maleate 완충액(pH 7.0)으로 2회 세척한 후 초음파 분쇄기(Braunsonic, 1510)로 200 watt에서 4분간 2회 냉각하면서 마쇄하였다. 마쇄된 균체현탁액을 다시 원심분리(5000×g, 10 min)하여 침전물을 제거한 후 상정액을 세포내 조효소로 이용하였으며 이 상정액을 다시 초고속 원심분리기(Bekman, Model L5-50)로 100,000×g에서 75분간 원심분리하여 상정액과 침전물로 분리한 후 상정액(세포질내 효소) 및 침전물(막 결합효소) 각각에서 효소의 활성을 조사하였다(Fig.

1). 조효소 용액은 -70℃에서 보관하였으며 조제한 후 12시간 이내에 사용하였다(9, 10).

효소활성의 측정

세포내 효소(Lactate dehydrogenase, Alanine dehydrogenase, Glucocinase, Isocitrate dehydrogenase, Glucose-6-phosphate dehydrogenase)의 활성 측정은 Bergmeyer(11)의 실험서 방법에 의해 조사하였으며, 전자전달계 효소인 NADH oxidase, NADH Dehydrogenase의 활성 측정은 각각 Mackler(14)와 Lanyi 등(5)의 방법에 따라 spectrophotometer에 의해 조사하였다.

실험한 모든 효소의 활성은 처음 1분간 흡광도의 변화로 결정하였다.

결과 및 고찰

세포내 효소의 활성

Halobacterium sp. EH10의 세포내 특정대사 경로에 관여하는 효소들의 활성을 세포내 효소액을 이용하여

Table 1. Effects of NaCl concentration on activity of intracellular enzyme from *Halobacterium* sp. EH10

Enzyme	Activity (Δ O.D./min., $\times 10^{-3}$)					
	NaCl concentration (M)					
	none	1	2	3	4	5
Lactate dehydrogenase	58	77	83	106	130	200
Isocitrate dehydrogenase	210	240	140	130	70	50
Alanine dehydrogenase	5	5	4	2	2	0
Glucokinase	5	7	11	8	7	7
NADH dehydrogenase ^a	49	134	140	119	101	99
NADH oxidase ^b	68	139	150	137	100	63
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	none					

^aFAD used as electron acceptor

^bElectron acceptor; oxygen

조사하였고 이 효소들의 활성에 대한 NaCl의 영향도 함께 조사하였다.

그 결과 *Halobacterium* sp. EH10의 Lactate dehydrogenase는 0, 1, 2, 3, 4, 5 M NaCl 순으로 활성이 높게 나타났고(Table 1) 4 M KCl에서도 높은 활성을 나타내었고 이러한 현상은 젖갈에서 분리한 중정도 호염성균이며 단백질 분해효소를 분비하는 H6 균주에서도 관찰되었다(12). 또한 Isocitrate dehydrogenase는 1 M NaCl에서 가장 높은 활성을 나타내었으며 NADH oxidase 및 NADH dehydrogenase는 2 M NaCl에서 최적 활성을 나타내었다. 이러한 결과를 토대로 하여 본 연구에서는 고도 호염성세균의 세포내 NaCl 농도와 유사한 2 M NaCl에서 최적 활성을 나타내는 NADH oxidase계와 NADH dehydrogenase에 대한 성질을 더욱 상세히 조사하였다.

NADH oxidase계의 세포내 분포

Halobacterium sp. EH10의 NADH oxidase계의 세포내 분포를 조사한 결과 전체 세포파쇄 현탁액인 총 효소(total enzyme)계의 경우, 반응액 중 1 M NaCl에서 최적 활성을 나타내었으며 2 M NaCl 이상에서는 활성이 감소되었다. 또한 세포질내 효소(cytoplasmic enzyme)의 경우 1 M에서 5 M까지 비교적

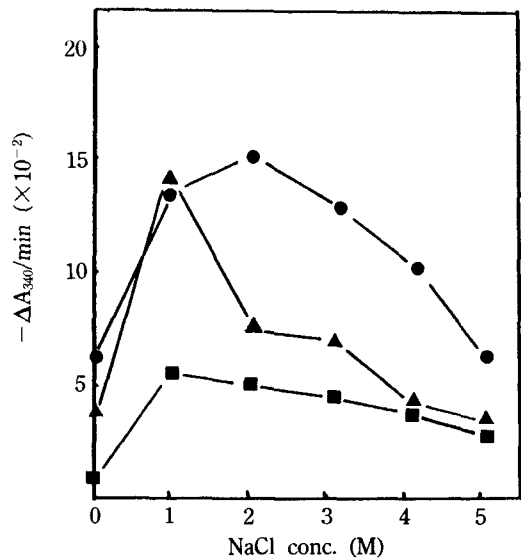


Fig. 2. Intracellular localization of NADH oxidase in *Halobacterium* sp. EH10.

▲-▲; Total enzyme, ●-●; Membrane bound enzyme, ■-■; cytoplasmic enzyme

낮은 효소활성을 나타내는 반면 막 결합효소(membrane bound enzyme) 분획은 2 M NaCl에서 최적 활성을 나타냈고 3, 4, 5 M NaCl에서 농도가 높아짐에 따라 높은 활성은 차츰 감소를 나타냈다(Fig. 2). 이러한 결과는 NADH oxidase계가 주로 세포막과 결합하여 존재함을 암시하고 있는 것이다.

NADH dehydrogenase의 염 의존성

NADH oxidase계의 염의존성은 NADH dehydrogenase의 특성에서 기인된 것(14)이므로 NADH dehydrogenase의 염의존성을 조사하였다. 그 결과 *Halobacterium* sp. EH10의 NADH dehydrogenase는 Na^+ , NH_4^+ , Li^+ 과 같은 양이온과 carbonate, acetate, sulfate, chloride 등의 음이온에 의해 활성화됨이 나타났다(Fig. 3, 4). 따라서 NADH dehydrogenase의 NaCl 요구성이 인정되지만 그 성질은 비특이적임을 알 수 있었다.

pH의 영향

Halobacterium sp. EH10의 NADH dehydrogenase의 최적 활성 pH를 조사한 결과 pH 9에서 최적 활성을 나타냈으며, 최적 pH 범위가 8 내지 10으로 비교적 넓다(Fig. 5).

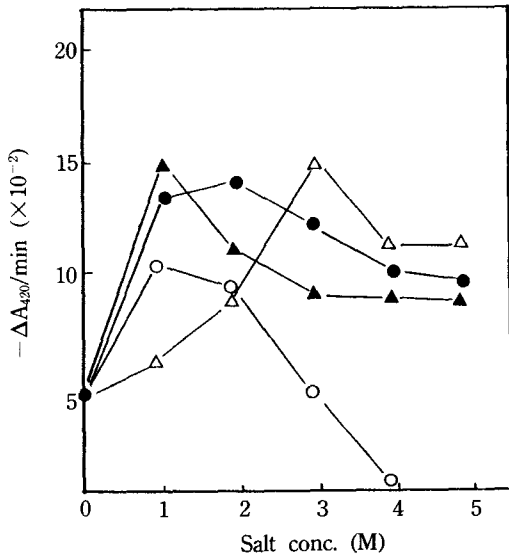


Fig. 3. Effect of cations on the NADH dehydrogenase from *Halobacterium* sp. EH10.
●-●; NaCl, ○-○; KCl, ▲-▲; LiCl, △-△; NH₄Cl

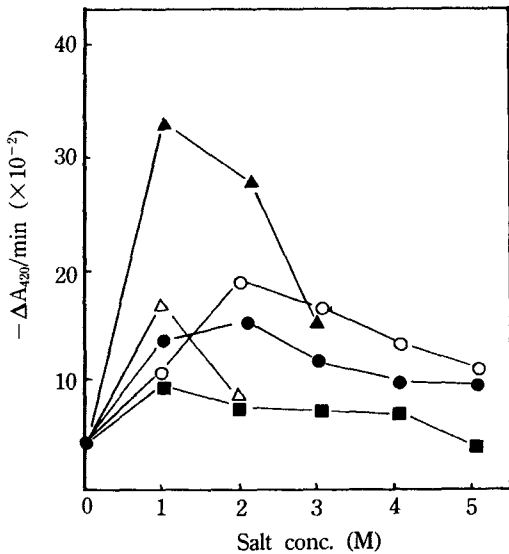


Fig. 4. Effect of anion on the NADH dehydrogenase from *Halobacterium* sp. EH10.
●-●; sodium chloridate, ○-○; sodium acetate, ▲-▲; sodium carbonate, △-△; sodium sulfate, ■-■; sodium nitrate

이같은 결과는 *Vibrio*속 호염성세균이 Na⁺ 배출이 알칼리성 pH에서 최적 활성을 나타내는 Na⁺ 요구성 NADH oxidase와 서로 연관되어 있다는 결과와 공통됨을 제시해주고 있다(6, 7).

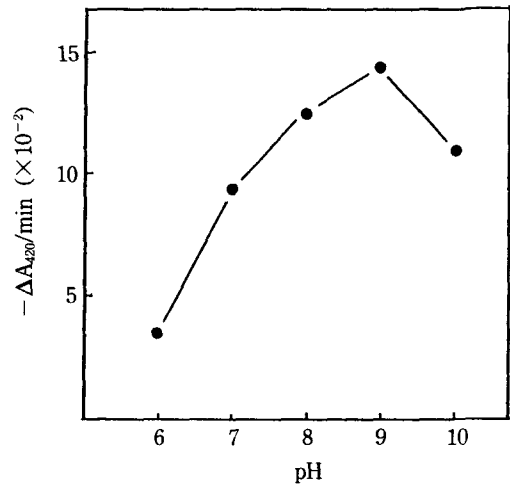


Fig. 5. Effects of pH on the NADH dehydrogenase from *Halobacterium* sp. EH10.
NaCl conc.; 2 M
Buffer; 0.05 M Tris-maleate (pH 6~8), 0.05 M Glycine-NaOH (pH 9~10)

Table 2. Effects of detergent on activity of NADH oxidase from *Halobacterium* sp. EH10

Chemicals	Activity
	-ΔA ₃₄₀ /min. (×10 ⁻²)
Control	38
EDTA (5 mM)	46
SDS (1 mM)	433
Tween 80 (0.01%)	328

계면활성제의 영향

NADH oxidase의 활성에 미치는 계면활성제의 영향을 조사한 결과 SDS와 Tween 80에 의해 효소의 활성이 증가되었다(Table 2). 이것은 막에 결합되어 있던 NADH oxidase가 계면활성제에 의해 막으로부터 유리되어 일시적으로 활성이 증가되기 때문이라고 생각된다(13).

NADH에 대한 Michaelis-Menten 상수의 결정

완충액의 Na⁺ 농도를 1M과 3M로 달리하고 NADH의 농도를 0.2, 0.3, 0.05, 0.025 mM로 각각 변화시키면서 활성을 측정하였으며 Michaelis-Menten 식에 따라 Km값을 구한 결과 0.0526 mM로 나타났으며 1M NaCl일 때 비경쟁적 저해작용이 나타났다(Fig. 6).

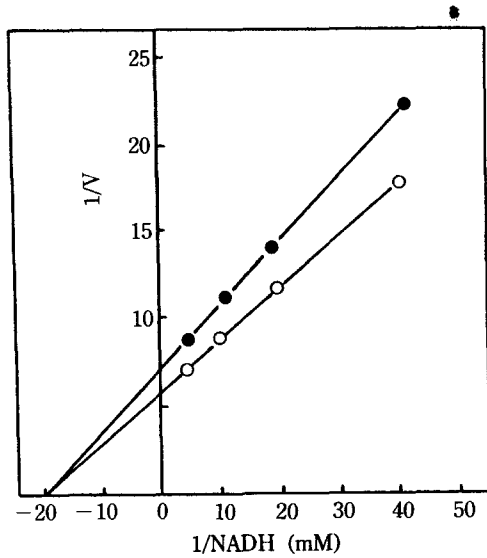


Fig. 6. Double reciprocal plot of NADH oxidase initial enzyme rates in the presence of NaCl.

●-●; 1 M NaCl, ○-○; 3 M NaCl

요 약

국내 염전으로부터 분리한 고도 호염성세균인 *Halobacterium* sp. EH10의 세포내 효소의 활성을 조사한 결과 Lactate dehydrogenase는 완충액의 NaCl 농도가 5 M인 포화용액일 때, 그리고 isocitrate dehydrogenase는 1 M 부근에서 높은 활성을 나타냈다. 막 결합효소인 NADH oxidase와 NADH dehydrogenase의 최적 활성 NaCl 농도는 2 M이었고, 이들 막 결합효소는 고농도의 Na^+ 이온을 요구하였으며 최적 활성 pH는 9였다. 또한 이들 효소는 Na^+ , K^+ , Li 등의 양이온과 chloride, acetate sulfate 등의 음이온에 의해서 활성화되었다.

NADH oxidase의 K_m 값은 0.0526 mM이었고 SDS와 Tween 80에 의해 효소의 활성이 증가되었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 연구지원(1986)에 의하여 수행되었으며 이에 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

- Bae, M and J.I. Lee: *Kor. J. Microbiol.*, **29**, No. 1 (1991) (in press)
- Tokuda, H., T. Nakamura and T. Unemoto: *Biochemistry*, **20**, 4198 (1981)
- Tokuda, H., M. Sugasawa and T. Unemoto: *J. Biol. Chem.*, **257**, 788 (1982)
- Unemoto, T. and M. Hayashi: *J. Biochem.*, **85**, 1461
- Lanyi, J.K.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 2864 (1969)
- Tokuda, H. and T. Unemoto: *J. Bacteriol.*, **156**, 636 (1983)
- Tokuda, H. and T. Unemoto: *J. Gen. Microbiol.*, **259**, 7785 (1984)
- Udagawa, T., T. Unemoto and H. Tokuda: *J. Biol. Chem.*, **261**, 2616 (1986)
- Christian, H.G., H. Lars and H. Baltscheffsky: *Biochem. Biophys. Acta.*, **239**, 200 (1985)
- Unemoto, T., M. Hayashi and M. Hayashi: *J. Biochem.*, **82**, 1389 (1977)
- Bergmeyer, H.U.: *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, 2nd ed., Vol. 1, 427, 457; Vol. 2, 576, 627 (1974)
- Song, K.S.: MS Thesis, Ewha Woman's University, 43 (1986)
- Lanyi, J.K.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 4552 (1971)
- Lanyi, J.K.: *J. Biol. Chem.*, **224**, 4168 (1969)
- Mackler, B.: *Methods in Enzymology* Vol. X, 261 (1967)

(Received February 2, 1991)