THE KOREAN JOURNAL OF MYCOLOGY
Vol. 23, No 1, p86-91 March 1995
Printed in S. KOREA
Copyright © 1995 by The Korean Society of Mycology

*Rhizopus oryzae*의 카드뮴 해독기작과 이에 관련된 동위효소의 변화 양상

이기성 · 김영호 · *박영식 · **박용근
배재대학교 생물학과
**한양대학교 생물학과*
***고려대학교 생물학과*

Detoxification Mechanism and Isoenzyme Pattern Changes against Cadmium in *Rhizopus oryzae*

Ki-Sung Lee, Young-Ho Kim, Young-Sik Park* and Yong-Keun Park**
Department of Biology, Paichai University
**Department of Biology, Hanyang University*
***Department of Biology, Korea University*

ABSTRACT: Isoenzymatic analysis related with cadmium adaptation and detoxifying mechanism were carried out upon *Rhizopus oryzae*. When cadmium was added into *R. oryzae* culture, activities of malate dehydrogenase (MDH) and glucose phosphate isomerase (GPI) related with carbohydrate metabolizing pathways were stimulated. Novel isoenzyme CAT-2 related with removing intracellular toxic peroxides, was induced lately and derepressed very highly. On the other hand, lactate-catabolizing enzymes such as lactate dehydrogenase (LDH) and alcohol dehydrogenase (ADH) were repressed. These results strongly suggest that, under cadmium stress, much of derepression of enzymes relating with central metabolism such as TCA cycle that produces high yield of energy and relating with removal of toxic peroxides should be necessary.

KEYWORDS: Isoenzyme, cadmium, adaptation, PGM, GPI, LDH, ADH, MDH, AMY, ALP, ACP, EST, CAT, G-6-PD, DASOX

동위효소(isoenzyme)는 같은 기질에 작용하고, 기질을 같은 생성물로 전환시킬 수 있으며, 구조의 차이에 의해서 전기영동상에서 다르게 이동한다. 하나의 생물체에 같은 반응을 촉매할 수 있는 다른 동위효소를 갖는다는 사실의 중요성은 이들 동위효소가 다양한 환경요인에 대하여 서로 다르게 반응한다는 사실이다(McNaughton, 1972; Salisbury and Ross, 1992). 또한 한 종류의 동위효소간에 같은 아미노산 서열을 갖는다 할지라도 그들의 전하, 촉매능력 및 환경변화에 대한 반응이 다를 수도 있다(Trewavas, 1976).

미생물에서의 동위효소실험은 균주의 돌연변이 발생 여부의 확인과 돌연변이 균주의 metabolism 조절기작을 파악하는 연구에 주로 이용되었다(Sugahara 등, 1991; Emory 등, 1990; Francis 등, 1990; Goldman 등, 1990; Pradel and Boquet, 1988).

본 연구에서는 중금속 카드뮴(Cd^{+})과 당, 인산의 결핍($S^{-}P^{-}$)과 같은 환경stress하에서 배양된 세포와 정상 배양된 세포(St)사이의 생리·생화학적인 물질대사 및 에너지대사의 조절양상을 비교 해석하기 위해 중요한 여러가지 key enzyme에 대한 동위효소 양상 변화를 조사하였다.

*Corresponding author

재료 및 방법

사용균주

한양대학교 생물학과 미생물학 연구실에서 보관 중인 *Rhizopus oryzae*를 분양받아 실험균주로 사용하였다

배양조건 및 균주

*R. oryzae*의 카드뮴에 대한 적응기(adaptation period)를 조사하고 성장에 대한 카드뮴의 영향을 조사하기 위하여 PYE 영양액체배지(glucose 30 g, peptone 10 g, yeast extract 3 g, DW. 1 *l*: Difco사 제품)를 멸균한 후, 카드뮴($CdCl_2$) 농축용액을 2배 희석 농도구배법으로 0.5 mM에서 8 mM까지 처리하여 사용하였다.

PYE 영양액체배지에서 다량 전배양되어진 세포(St 실험군)를 starvation 시킬 목적으로 당과 인산이 함유되지 않은 Czapek's minimal medium($NaNo_3$ 3.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, KCl 0.5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, DW. 1 *l*)에서 12시간 현탁배양(S^-P^- 실험군)하였다.

이렇게 starvation 되어진 세포 중 일부를 $CdCl_2$가 0.5 mM 농도로 처리된 PYE 영양액체배지에 접종하여 24시간(Cd^+ 24 hr. 실험군), 48시간(Cd^+ 48 hr. 실험군) 배양하였고, 일부는 카드뮴이 첨가되지 않은 배지에 접종하여 24시간(Cd^- 24 hr. 실험군), 48시간(Cd^- 48 hr. 실험군) 배양하였다. 배양되어진 세포들을 적량씩 수확하고, wet weight를 측정하여, 동위효소 분석실험의 시료로 사용하였다.

동위효소분석

동위효소 분석을 위해 각 실험 구간의 세포를 수확하여 NaCl과 Triton X-100을 각각 0.1 M, 1.0% 농도가 되도록 가하고 초음파 마쇄(Clark 등, 1982; Onishi 등, 1979)한 후 원심분리(12,000 rpm., 10분)하였다. 상등액에 EDTA와 glycerol를 가하여 전기영동 시료로 이용하였다. 1% agarose gel을 5 mm 두께로 조제한 후 0.186%의 EDTA가 첨가된 TBE buffer(pH 8.4)를 영동용 buffer로 사용하여 5 mA/well로 전기영동하였다.

전기영동이 끝난 후 다음과 같은 각 동위효소의 기질을 피복시켜 37℃에서 1시간 반응시킨 후 band를 조사하였다.

(1) Alcohol dehydrogenase (ADH) ; 25 m*l* 0.05 M Tris-HCl pH 8.6 buffer, 0.3 m*l* EtOH, 20 mg NAD, 10 mg MTT, 4 mg PMS.

(2) Lactate dehydrogenase (LDH) ; 20 m*l* 0.05 M Tris-HCl pH 8.0 buffer, 100 m*l* Ca-Lactate, 10 mg NAD, 5 mg MTT, 2.5 mg PMS.

(3) Malate dehydrogenase (MDH) ; 25 m*l* 0.1M Tris-HCl pH 8.0 buffer, 350 m*l* L-malate, 10 mg NAD, 7.5 mg MTT, 5 mg PMS.

(4) Alkaline phosphatase (ALP) ; 5 m*l* 0.05 M Tris-HCl pH 9.0 buffer, 50 mg β-naphtyl phosphoric acid, 50 mg fast blue RR salt, 10 mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10 mg $MnCl_2 \cdot 4H_2O$.

(5) Acid phosphatase (ACP) ; 100 m*l* 0.2 M acetate pH 4.0 buffer, 100 mg α-naphtyl acid phosphate, 100 mg Fast Garmet GBC, 10 mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$.

(6) Catalase (CAT) ; 30 m*l* 6 mM Na-thiosulfate, 500 mg soluble starch, 70 m*l* 5% H_2O_2-100 m*l* 15% KI, 1 m*l* acetic acid glacial.

(7) Esterase (EST) ; 2 m*l* α-Naphtyl acetate, 40 mg Fast blue RR salt, 50 m*l* 0.2 M phosphate pH 4.3 buffer, 10 m*l* 0.2 M phosphate pH 4.0 buffer ; 10 m*l* H_2O, 2 m*l* acetic acid glatial, 10 m*l* Methanol.

(8) D-Aspartate oxidase (DASOX) ; 50 m*l* 0.5 M Tris-HCl pH 8.0 buffer, 200 mg D-Aspartate, 8 m*l* FAD, peroxidase 500 unit, 25 mg 3-Amino-9-ethyl carbazole.

(9) Glucose-phosphate isomerase (GPI) ; 10 mg 0.5 M Tris-HCl pH 8.0 buffer, 20 mg fructose-6-phosphate, 4 mg MTT, 6 mg PMS, 8 mg NADP, 20 unit G-6-PD, 16 mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$.

(10) Phosphoglucomutase (PGM) ; 10 m*l* 0.5 M Tris-HCl pH 7.0 buffer, 40 mg G-1-P, 5 mg MTT, 4 mg PMS, 5 mg NADP, 0.5 mg G-1,6-PD, 20 unit G-6-PD, 40 mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.5 m*l* 1 M NaCN.

(11) Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) ; 25 m*l* 0.2 M Tris-HCl pH 8.0 buffer, 10 m*l* G-6-P, 5 m*l* 0.2 M $HgCl_2$, 5 mg NADP, 7.5 mg MTT, 5 mg PMS, (12) Amylase (AMY)-100 m*l* 0.02

M K-phosphate pH 7.3 buffer, 10 g starch soln.-20 m*l* KI-I_2 soln.

(12) Amylase (AMY) ; 100 m*l* 0.02 M K-phosphate pH 7.3 buffer, 10 g starch Soln. ; 20 m*l* KI-I_2 Soln.

결 과

카드뮴의 첨가, 당과 인산의 결핍과 같은 환경 stress에서 배양된 세포와 정상 배양된 세포 사이에 물질대사 및 에너지대사의 조절양상을 비교 해석하기 위하여 특이한 동위효소의 induction, repression 등을 조사하였다(Fig. 1, 2).

본 실험에서 분석되어진 동위효소의 종류는 크게 carbohydrate metabolizing key enzyme으로는 glycolysis에 관여하는 PGM, GPI, LDH, ADH 및 TCA cycle에 관여하는 MDH, 그리고 다당류 분해효소인 AMY 등이다. 또한 amino acid 대사에 관여하는 DASOX와 G-6-PD 그리고 에너지대사에 필수적 key enzyme 인 ACP, ALP와 ETS 등을 분석하는 한편, 독성있는 과산화물 분해에 관여하는 CAT을 조사하였다.

LDH 동위효소는 (−)극과 (+)극으로 각각 1개씩 이동하는 dimorphic enzyme으로 나타났으며 부분적 functional enzyme 또는 subunit으로 생각되어지는 band 2는 카드뮴 첨가 배양시 전혀 활성이 나타나지 않았다(Fig. 1).

MDH 동위효소 pattern은 (+)극으로 이동하는 2개의 dimorphic enzyme으로 검출되었는데(Fig. 1), slow movement 하는 band 2는, 당과 인산을 결핍시킨 후 당과 인산이 충분이 함유된 배지에 옮겨 배양할 때 카드뮴 첨가군과 비처리군 모두에서 induction 되었으며 특히, fast movement 하는 band 1은 카드뮴 첨가 배양세포에서 상대적으로 활성이 증가되었다.

G-6-PD와 DASOX는 공히 (+)극으로 이동하는 monomorphic enzyme으로 나타났으며 여러 배양조건에서 그 활성은 거의 동일하였다(Fig. 1).

ALP는 (+)극으로 이동하는 monomorphic enzyme으로 나타난 반면에, ACP는 (+)극에서 1개, (−)

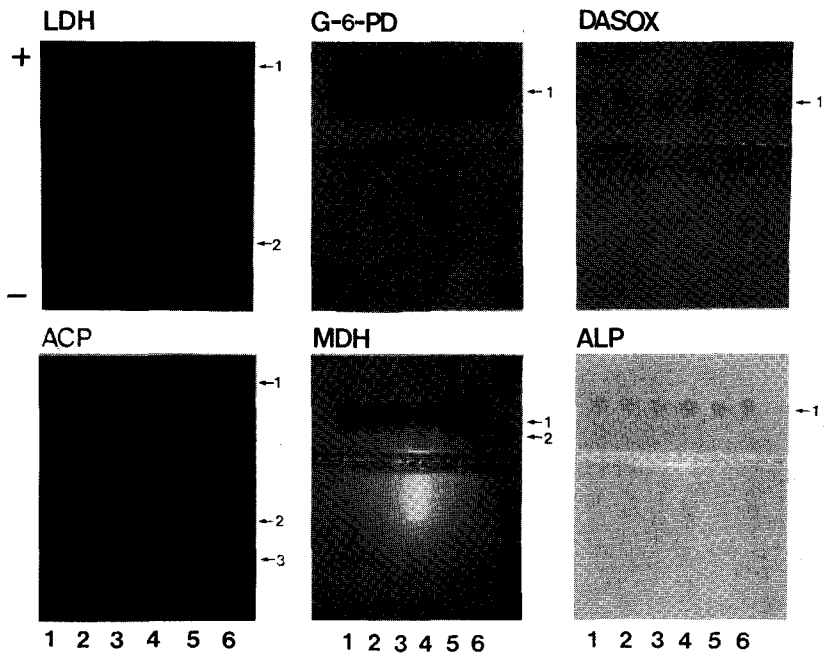

Fig. 1. Isoenzyme electrophoretic patterns in *R. oryzae* under various culture conditions (1. St, 2. S^-P^-, 3. Cd^- 24, 4. Cd^- 48, 5. Cd^+ 24, 6. Cd^+ 48).
LDH: lactate dehydrogenase, G-6-PD: glucose-6-phosphate dehydrogenase, DASOX: D-aspartate oxidase, ACP: acid phosphatase, MDH: malate dehydrogenase, ALP: alkaline phosphatase.

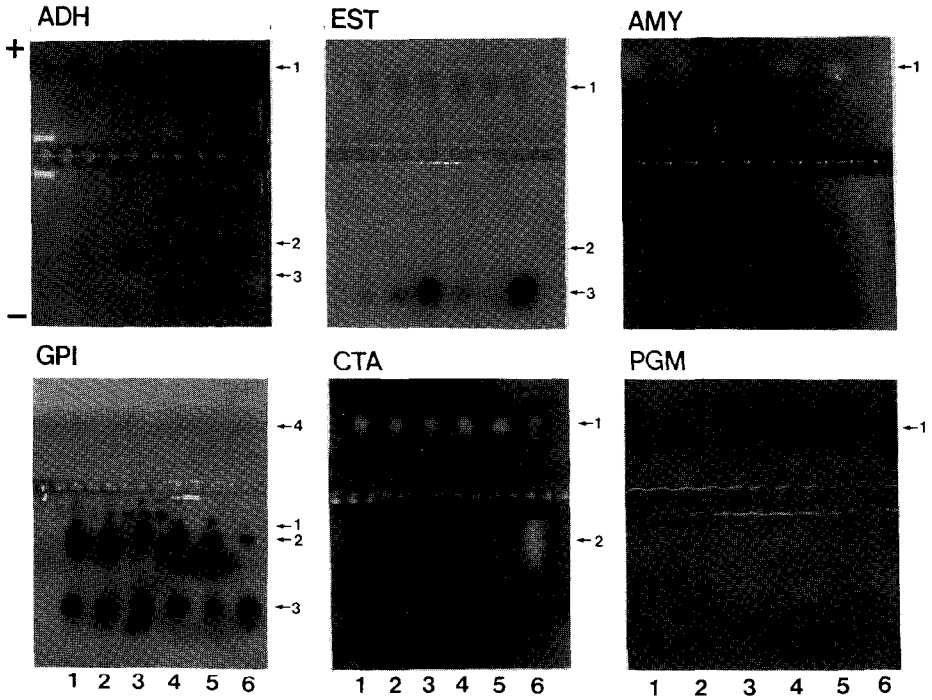

Fig. 2. Isoenzyme electrophoretic patterns in *R. oryzae* under various culture conditions (1. St, 2. $S^{-}P^{-}$, 3. Cd^{-} 24, 4. Cd^{-} 48, 5. Cd^{+} 24, 6. Cd^{+} 48).
ADH: alcohol dehydrogenase, EST: esterase, AMY: α-amylase, GPI: glucose phosphate isomerase, CTA: catalase, PGM: phosphoglucomutase

극 쪽에서 2개의 band를 관찰할 수 있어 polymorphism을 보여 주었으며 카드뮴 첨가 배양시 (−)극 쪽으로 이동하는 ACP 동위효소들은 그 활성이 소멸 내지는 감소되었다(Fig. 1).

PGM의 동위효소는 음(+)극으로 이동하는 monomorphic enzyme으로 여러 배양조건에서 거의 유사한 활성을 보였다(Fig. 2).

GPI의 동위효소 pattern은 양(+)극으로 1개의 band가 음(−)극으로 3개의 band로 나타나는 polymorphic enzyme으로서 특히 카드뮴 첨가 배양시 anodal movement 하는 band 1, 2는 감소한 반면 band 3은 증가하였다(Fig. 2).

ADH는 (+)쪽으로 1개, (−)쪽으로 2개의 band가 형성되는 polymorphic 동위효소 형태를 지니고 있으며 카드뮴 첨가 배양한 세포에서 (−)극으로 이동하는 band 2, 3의 활성이 감소하여 거의 탐지되지 않았다(Fig. 2).

AMY와 CAT는 공히 (+)극으로 이동하는 monomorphic enzyme으로 나타났으며 카드뮴 첨가에 대한 영향은 거의 나타나지 않았다(Fig. 2). CAT의 활성은 매우 특이할 만한 경우로 카드뮴 첨가 배양하여 적응되는 세포(Cd^{+} 48)에서 band 2의 (−)극으로 이동되는 동위효소의 활성이 induction 됨을 알 수 있었다.

EST의 경우 (+)극에 1개 (−)극에 2개 존재하는 polymorphic enzyme으로 나타났으며 카드뮴 첨가 배양시 (−)극으로 이동한 band 2의 활성은 소멸된 반면, band 3은 카드뮴에 대하여 적응이 끝난 세포(Cd^{+} 48 H)에서는 효소의 활성이 최대로 derepression되었다(Fig. 2).

고 찰

세포내 물질대사 및 에너지대사의 조절에 대한 카드뮴의 영향을 조사하기 위해 시행된 동위효소의 분석 결과를 살펴보면, 카드뮴 첨가배양했을 때, cy-

tosolic과 mitochondrial 동위효소 2 type이 존재하고, TCA 회로에 관여(Doonan, 1990)하는 MDH와 glycolysis, gluconeogenesis, pentose phosphate cycle, glycoprotein 합성 및 inositol 합성 등에 관여(Morgan 등, 1990)하는 GPI 동위효소 중 band 3와 EST 동위효소 중 band 3는 활성이 증가된 반면 LDH, ADH, ALP, EST 동위효소 1, 2 등은 감소되었다. 그리고 아미노산 대사에 관여하는 G-6-PD, DASOX 및 PGM, AMY 등은 카드뮴에 영향을 받지 않았다. 그러나 특이할 만한 사실로 독성과산화물 제거에 관여하는 CAT의 경우 새로운 동위효소가 induction됨을 알 수 있었다.

즉, 카드뮴 영향하에서는 carbohydrate metabolic pathway가 활성(MDH, GPI)된 반면 lactate를 이용하는 enzyme(LDH, ADH)은 감소된 사실은 중금속 영향하에서 세포의 성장과 에너지 공급을 위해 에너지 수율이 낮은 lactate를 이용하는 경로보다는 에너지 수율이 높은 TCA 회로에 작용하는 효소들 외에 독성과산화물 제거에 관여하는 효소(CAT)들의 더 많은 derepression이 필요하다는 것을 알 수 있었다.

카드뮴 첨가시 감소내지는 활성이 억제된 GPI (band 1, 2)와 ADH(band 2, 3)의 동위효소는 배지내 당의 결핍 및 충분 조건을 고려했을 때 carbon-catabolite repressible type(Wills, 1990)일 것으로 예측할 수 있다.

또 아미노산 대사에 관여하는 G-6-PD, DASOX 및 AMY 등의 동위효소의 활성이 일정한 것으로 미루어 카드뮴 영향하에서도 단백질 합성 및 다당류 이용에 필요한 대사과정은 저해받지 않는다는 것을 알 수 있다.

결국 카드뮴에 대한 생리적 적극적 방어수단으로 카드뮴 적응 및 해독과정에 있는 세포들은, sugar metabolizing 효소(MDH, GPI) 및 독성과산화물 제거에 관여하는 효소(CAT)의 동위효소 활성의 증가, lactate 이용 효소(LDH, ADH)의 동위효소 활성의 감소 및 총지질 화합물의 조성 변화 등과 같은 다양한 생리·생화학적 물질대사 경로의 변화를 통해서 카드뮴 적응, 해독기작이 이루어진다고 볼 수 있다.

적 요

*Rhizopus oryzae*의 카드뮴 적응 및 해독기작과 이에 관련된 세포내 생리·생화학적 변화를 조사하였다. *R. oryzae*는 카드뮴을 첨가 배양하였을 때 카드뮴 영향하에서는 carbohydrate metabolic pathway에 관련된 효소 활성(MDH, GPI)이 촉진되고 과산화물 제거에 관여하는 효소가 새롭게 유도(CAT 2)된 반면, lactate를 이용하는 효소(LDH, ADH)의 활성이 감소된 사실은 중금속 영향하에서 세포의 성장과 에너지 공급을 위해 에너지 수율이 낮은 lactate를 이용하는 경로보다는 에너지 수율이 높은 TCA cycle 경로에 작용하는 효소들과 독성과산화물 제거에 관여하는 효소의 더 많은 derepression이 필요하다는 것을 알 수 있었다.

사 사

본 논문은 학술진흥재단 자유공모과제 연구비 (1988. 6. 1.~1990. 6. 1.)의 일부로 수행되었음.

參考文獻

Clark, D.W., Tkacz, J.S. and Lanpen, J.O. 1982. Asparagine-linged carborhydrate does not determine the cellular location of Yeast vacuolar nonspecific alkaline phosphatase. *An. Soc. Microbiol.* **152**: 865-873.

Doonan, S. 1990. Isoenzymes: Genetic determination, evolution and function.-Aspartate aminotransferase and malate dehydrogenase: Patterns of evolution. *Biochemical Society Transactions.* **18**: 167-171.

Emori, M., Takagi, M., Maruo, B. and Yano, K. 1990. Molecular cloning, nucleotide sequencing and expression of the *Bacillus subtilis* (natto) IAm1212 -amylasegene, which encodes an -amylase structurally similar to but enzymatically distint from that of *B. subtilis. 2633. J. Bacteriol.* **88**: 4901-4908.

Francis, K., Patel, P., Wendt, J.C. and Shanmugam, K.T. 1990. Purification and characterization of two forms of hydrogenase isoenzyme 1 form *Escherichia coli. J. Bacteriol.* **88**: 5750-5757.

Goldman, S., Hecht, K. and Mevarech, M. 1990. Extracellular Ca^{++}-dependent inducible archaebacterium *Haloarcula marismortui. J. Bacteriol.* **88**: 7065-7070.

Lee, K.S., Kang, S.W., Kim, Y.H., Kim, E.A., Kim, K.H. and Choi, Y.K. 1990. Cadmium detoxification mechanism of Cd-resistant *Bacillus* sp. Isolated from industrial sewage. *Kor. J. Limnol.* **2**: 115-127.

McNaughton, S.J. 1972. Enzyme thermal adaptations. The evolution of homeostasis in plant. *American Naturalist.* **106**: 165-172.

Morgan, M.J., Walker J.I.H., Redmill, A.A.M. and Faik, P. 1990. Molecular genetics of glucose phosphate isomerase. *Biochemical society Trans-actions.* **18**: 183-187.

Onishis, H.R., Tkacz, J.S. and Lampen, J.O. 1979. Glycoprotein nature of yeast alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* **10**: 11943-11952.

Pradal, E. and Boquet, P.L. 1988. Acid phosphates of *Escherichia coli*, molecular cloning and analysis of age, the structural gene for a periplasmic acid glucose phosphate. *J. Bacteriol.* **86**: 4916-4923.

Sugahara, T., Konno, Y., Ohta, H., Ito, K., Kaneko, J., Kamio Y. and Izaki, K. 1991. Purification and properties of two membrane alkaline phosphatases from *Bacillus subtilis 168. J. Bacteriol.* **89**: 1824-1826.

Trewavas, A. 1976. Post-transcriptional modification of protein by phosphorylation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **27**: 349-374.

Will, C. 1990. Regulation of sugar and ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae. Cri. rev. Biochem. Mol. Biology.* **25**: 245-280.