

Moraxella sp. CK-1의 세포의 Autolysins 특성 연구

안준익 · 김철호 · 최영길^{1*}

한양대학교 자연과학대학 생물학과, ¹서울대학교 분자미생물학연구소

남조류 분해세균으로 알려진 *Moraxella* sp. CK-1의 세포의 자가용균효소의 특성을 규명하였다. *Moraxella* sp. CK-1은 대수증식기 초기부터 세포외부로 자가용균효소를 분비하며, 이들 효소는 60-70°C, pH 9.0의 최적 활성 조건을 나타내었다. 이들 효소는 Na⁺, K⁺, Li⁺ 등의 이온에 의해 활성이 촉진되고, Ba²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ 및 Mn²⁺ 등의 이온에 의해 활성이 억제되며, 특히, Fe³⁺와 Cu²⁺ 이온 존재하에서는 효소의 활성이 거의 나타나지 않았다. *Micrococcus luteus* 세포를 기질로 이용하여 renaturing SDS-PAGE를 수행한 결과 *Moraxella* sp. CK-1은 분자량이 각각 30, 32, 38 그리고 41 kDa인 4가지 효소를 분비하며, 이 중 32와 41 kDa의 효소는 성장 초기부터 사멸기까지 지속적으로 배지에 분포하는 반면, 38 kDa의 효소는 대수증식기 중기 이전, 30 kDa의 효소는 대수증식기 중기 이후에 배지에 분포하였다. *M. luteus*의 SDS-insoluble peptidoglycan에 효소추출물을 처리하였을 때 반응액의 유리 아미노기 농도가 증가하는 것은 이들 효소가 N-acetylmuramyl-L-alanine amidase 또는 endopeptidase라는 사실을 시사한다.

KEY WORD □ Autolysin, renaturing SDS-PAGE, zymogram, *Moraxella* sp.

대부분의 진정세균은 자신의 세포벽을 분해할 수 있는 하나 이상의 자가용균효소(autolysin)를 가진다(2, 22). 자가용균효소의 종류는 크게 peptidoglycan의 N-acetylmuramic acid에 작용하여 환원당을 유리시키는 β -1,4-N-acetylmuramidase, N-acetylglucosamine에 작용하여 환원당을 유리시키는 β -1,4-N-acetylglucosaminidase, N-acetylmuramic acid와 L-alanine 사이의 결합을 가수분해하는 N-acetylmuramyl-L-alanine amidase, 그리고 펩티드결합을 분해하는 peptidase로 나뉘어진다(10, 15).

자가용균효소의 기능은 현재까지 명확하게 밝혀지지 않았지만, 세포벽의 성장과 turnover, 세포의 분열, 편모의 형성, 형질전환과정에서의 competence, penicillin 계열 항생물질에 의한 용균작용(3, 11, 18) 등에 관여하는 것으로 알려져 있고, 포자형성세균에서의 피질 성숙(cortex maturation), 모세포 용균(mother cell lysis), 그리고 발아과정에서의 피질 용균(cortex autolysis) 등(6, 17)의 작용을 하며, *Streptococcus pneumoniae*에서는 virulence에도 관여하는 것으로 알려져 있다(4).

이들 효소는 일반적으로 하나의 polypeptide로 이루어져 있어(19), SDS를 함유하는 겔에서 전기영동한 후에도 재활성화될 수 있기 때문에, renaturing SDS-PAGE방법을 통하여 많은 연구가 이루어졌다(15, 16). 그러나 이들 연구의 대부분은 *Bacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* 등의 그람 양성 세균에서 많이 이루어졌으며, 그람음성세균의 경우에는 *Escherichia coli*와 *Pseudomonas aeruginosa*에서 일부 이루어졌을 뿐이다(13).

본 연구에서는 세포의 효소의 작용을 통하여 남조류의 세포벽을 분해하는 것으로 알려진 그람 음성 세균인 *Morax-*

ella sp. CK-1(1)의 자가용균 활성을 확인하고, 이 효소의 특성을 규명하는 한편 세포벽 분해효소의 특성 규명에 기질로서 널리 이용되는 *Micrococcus luteus*를 기질로 이용한 renaturing SDS-PAGE(zymogram)법을 통하여 이 세균의 세포의 자가용균효소의 profile 및 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

사용 균주와 배양조건

본 연구에서 이용한 *Moraxella* sp. CK-1은 BG-11C 배지(NaNO₃ 1.5 g, K₂HPO₄ 0.04 g, MgSO₄·7H₂O 0.075 g, CaCl₂·2H₂O 0.036 g, citric acid 0.006 g, ferric ammonium citrate 0.006 g, EDTA disodium 0.001 g, Na₂CO₃ 0.02 g, H₃BO₃ 2.86 mg, ZnSO₄·7H₂O 0.222 mg, Na₂MoO₄·2H₂O 0.39 mg, CuSO₄·5H₂O 0.079 mg, Co(NO₃)₂·6H₂O 0.0494 mg, casitone 2 g/l)에 접종하여 37°C의 배양기에서 150 rpm으로 진탕 배양하였다. 자가용균효소의 기질로 이용한 *M. luteus*는 LB 배지에 접종하여 동일 조건에서 배양하였다.

기질의 준비

자가용균효소의 기질로는 *M. luteus* ATCC4698과 *Moraxella* sp. CK-1의 heat-killed cells를 사용하였다. 각각의 세균 배양액을 원심분리(10,000×g, 4°C, 15 min, Beckman J2-21, JS 7.5 rotor)하여 수확된 세포를 20 mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충액으로 2-3회 씻어준 후 동일 완충액에 현탁하여 100°C에서 약 30분 동안 끓였다. 다시 원심분리하여 얻어진 세포침전물을 냉동건조하여 -20°C에서 보관하였다.

효소의 활성 측정

자가용균효소의 활성은 Takamoto 등의 방법(20)을 변용하

*To whom correspondence should be addressed

여 측정하였다. 상기의 과정에서 얻어진 *Moraxella* sp. CK-1과 *M. luteus*의 heat-killed cells을 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)에 현탁하여 660 nm의 파장에서 흡광도가 1.2 정도 되게 맞추어 준비한 기질용액에 일정량의 효소용액을 처리한 후 40°C에서 20분간 반응시켜 660 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 반응 전과 반응 후의 흡광도 차이를 비교하여 활성도를 계산하였으며, 1 unit는 1분간 흡광도를 0.001 하락시키는 효소의 양으로 환산하였다.

단백질 정량

단백질은 bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry 방법(14)으로 정량하였다.

세포 분획별 효소 활성도 측정

Moraxella sp. CK-1의 세포 분획은 Watt(23)의 방법에 따라 Table 1과 같은 분획을 얻었다. 1) 전배양한 세균배양액 10 ml을 pH 7.4의 BG-11C 배지 1 l에 접종하여 대수생장기 ($A_{660}=0.7-0.8$)까지 배양하여 원심분리(6,000×g, 4°C, 15분)하고, 2) 상등액 300 ml을 80% ammonium sulfate로 침전시킨 후 원심분리(20,000×g, 4°C, 20분)하여 얻어진 침전물을 50 mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충용액에 대하여 삼투하여 culture supernatant fraction을 얻었다. 3) 1) 단계의 세포 침전물은 phosphate buffered saline(PBS; NaCl 8.5 g/l of 0.066 M NaPO₄ buffer, pH 7.0)으로 2회 세척하고 같은 완충용액 30 ml에 현탁한다. 4) 이 중 6 ml을 원심분리하여 침전물을 5 ml의 0.1 mg/ml polymyxin B(Sigma)에 현탁하여 37°C에서 30분간 배양한 후 실온에서 9,000×g, 20분간 원심분리하고, 상등액을 pore size 0.2 μm의 membrane filter paper로 여과하여 얻어진 여과액을 periplasmic fraction으로 이용하였다. 5) 4) 단계의 세포 침전물을 0.1 mM의 PMSF(phenyl-methylsulfonyl fluoride)를 함유하는 PBS 15 ml에 현탁하여 지름 0.1 mm의 bead beater로 3분 간격으로 10회에 걸쳐 30초간 세포를 마쇄한 후 여과지(Whatman No. 1)로 여과하여 bead를 제거하고, 여과액을 원심분리(40,000×g, 4°C, 40분)하여 상등액을 cytoplasmic fraction으로 이용하였다. 6) 3) 단계의 세포현탁액 중 4) 단계에서 이용하고 남은 나머지 24 ml을 원심분리(10,000×g, 4°C, 10분)하고, 세포침전물을 0.1 mM의 PMSF를 함유하는 PBS 15 ml에 현탁하여 bead

beater로 마쇄하여 bead를 제거하고, 이 중 1 ml을 cell homogenate로 이용하였고, 7) 나머지는 원심분리(6,000×g, 4°C, 10분)한 후 상등액을 초고속원심분리(Beckman Optima™ TLX ultracentrifuge, TLA-100.3 rotor; 100,000×g, 4°C, 30분)하여 침전액을 12 ml의 2% Sarkosyl(Sigma) 용액에 현탁하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 초고속원심분리(100,000×g, 4°C, 30분)하여 상등액을 cytoplasmic membrane fraction으로 이용하였다. 8) 7)단계에서 얻어진 침전물을 2% SDS를 함유하는 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)에 현탁하여 초고속원심분리(100,000×g, 4°C, 30분)하여 얻은 상등액을 outer membrane fraction으로 이용하였다. 9) 8)에서 얻어진 침전물을 2% SDS를 함유하는 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)으로 2회 세척한 후 초고속원심분리(100,000×g, 4°C, 30분)하여 얻은 침전물을 peptidoglycan-associated fraction으로 이용하였다. 각 분획을 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)에 투석시킨 후, 각각을 기질용액에 첨가하여 660 nm에서의 흡광도 변화를 측정하였다.

세균의 생장에 따른 세포의 자가용균효소 활성도

Moraxella sp. CK-1을 배양하면서 일정시간 간격으로 20 ml을 취하여 660 nm에서 흡광도를 측정하고 원심분리하여 얻어진 상등액의 pH를 측정하는 한편 200 μl씩을 상기의 기질용액에 가하여 반응시킴으로써 세포의 자가용균효소의 활성도 변화를 측정하였다.

세포외 효소의 분리 및 농축

BG-11C배지에서 전배양한 *Moraxella* sp. CK-1 배양액 30 ml을 3 l의 동일 배지에 접종하여 대수생장기($A_{660}=0.7-0.8$)까지 배양한 후 원심분리(6,000×g, 4°C, 40 min)하였다. 상등액을 0.2 μm 막여과지로 여과한 다음, YM-3 초막여과지(ultramembrane filter; Diaflo)를 이용하여 분자량이 3,000 Da 이상인 물질을 200 ml까지 농축하였다. 이 농축액에 80% saturated ammonium sulfate를 녹여 10시간 동안 잘 섞은 후 원심분리(20,000×g, 4°C, 20 min)하여 얻어진 침전물을 10 ml의 20 mM Tris-HCl(pH 8.0)에 현탁하여 dialysis tube (MWCO of 3,000 Da)에 넣고 2 l의 동일 완충용액에 대하여 2회 투석하여 세포외 효소를 얻었다. 세포배양을 제외한 모든 실험은 4°C의 조건에서 진행하였다.

자가용균효소의 물리·화학적 특성

적정 온도: 기질 용액 2 ml에 효소용액의 단백질 농도가 10 μg/ml이 되게 약 30 μl를 첨가한 후, 4, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C로 각각 조절된 배양기에서 20분간 반응시키고, 각 반응액에서의 활성도를 측정하였다.

적정 pH: 냉동건조한 heat-killed *Moraxella* sp. CK-1 cells와 heat-killed *M. luteus* cells을 A_{660} 가 1.8-2.0 정도 되게 증류수에 현탁하여 pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0으로 각각 조절한 20 mM Tris-HCl 완충용액과 1:1의 비율로 혼합하여 각각의 pH에서 2개씩의 기질용액을 준비하였다. 각 pH 조건으로 준비된 2개씩의 기질용액 중 하나에 증류수에 현탁한 효소용액을 최종용액을 최종 단백질 농도가 10 μg/ml이

Table 1. Lytic activity of subcellular fractions of *Moraxella* sp. CK-1 on the substrate

Subcellular fraction	Activity on each substrate	
	<i>Moraxella</i> sp. CK-1	<i>M. luteus</i>
Culture supernatant	++	++
Periplasmic fraction	+	+
Cytoplasmic fraction	+	+
Cell homogenate	+	+
Outermembrane fraction	-	-
Cytoplasmic membrane fraction	+	+
Peptidoglycan-associated fraction	-	-

++, maximal activity; +, minimal activity; -, no activity.

Table 2. Effect of various chemicals and metal ions on the lytic activity of extracellular enzymes of *Moraxella* sp. CK-1 in buffer

Reagent	Concentration(mM)	Relative activity(%)
Control		100.0
NaCl	10	106.2
KCl	10	105.5
LiCl	10	101.4
BaCl ₂	10	97.3
MgCl ₂	10	98.2
CaCl ₂	10	96.8
MnCl ₂	10	71.4
FeCl ₃	10	0
CuCl ₂	10	12.0
2-Mercaptoethanol	10	111.4
Dithiothreitol	10	114.8
PMSF	0.1	108.1
EDTA	10	93.3
BSA	0.4 mg/ml	95.2

*Autolytic activity was assayed in 20 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0).

되게 약 30 μ l씩 첨가하고 다른 하나에는 동량의 증류수를 첨가하여 40°C에서 20분간 배양한 후 기질용액의 흡광도 변화를 확인함으로써 효소활성도를 측정하였다.

화학적 인자의 영향: 기질용액 1.8 ml과 금속이온과 화학 물질들 Table 2와 같이 농도별(최종농도)로 0.2 ml씩 섞은 후 단백질농도의 최종농도가 10 μ g/mm²이 되도록 효소용액을 첨가하고 40°C에서 20분간 반응시킨 후 효소활성도를 측정·비교하였다.

Renaturing SDS-PAGE(Zymogram)

완충용액 조성등은 Laemmli 방법(12)을 따라 실시하였으며, 재활성화는 Foster(6)의 방법을 변용하여 적용하였다. Separating gel의 중합 전에 heat-killed *M. luteus* cells이 0.2%(w/v)가 되도록 겔용액에 첨가하였다. 효소농축액은 sample loading buffer에 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 전기영동은 Hoefer사의 SE600 전기영동장치를 사용하였으며, stacking gel에서는 20 mA로, separating gel에서는 40 mA의 전류로 4°C에서 행하였다. 전기영동을 끝낸 후, 겔을 300 ml의 deionized water에 담구어 30분간 상온에서 천천히 교반함으로써 여분의 SDS를 제거하였다. 겔을 renaturation buffer(0.025 M sodium phosphate, pH 8.0, 1% Triton X-100, 1 mM MgCl₂)에 담근 후 40°C에서 12-16시간 동안 천천히 교반하였다. 효소의 활성은 불투명한 겔에서 투명한 band로서 나타났다. 효소의 분자량은 같은 겔에서 전기영동하여 Coomassie brilliant blue R-250(Bio-Rad)로 염색한 표준단백질과 비교하여 측정하였다.

세균의 생장에 따른 세포외 자가용균효소의 분포

Moraxella sp. CK-1을 진탕배양하면서 6, 9, 12, 15, 18, 24시간에 100 ml의 세포배양액을 취하여 세포외 효소농축하였다. 각각을 renaturing SDS-PAGE 방법으로 전기영동하여 나타나는 clear band를 비교함으로써 세균의 생장에 따른 세포외 자가용균효소의 분포를 확인하였다.

기질 특이성

세포외 분해효소가 peptidoglycan의 어떤 부위를 가수분해하는지는 *M. luteus*의 SDS-insoluble peptidoglycan을 기질로 이용한 효소반응액에서의 환원당과 유리 아미노기의 농도변화를 측정함으로써 확인하였다. 환원당은 Thompson과 Shockman의 방법(21)으로, 유리 아미노기는 Ghuysen 등(7,8)의 방법으로 정량하였다. 환원당 정량을 위한 표준 곡선은 glucose를, 유리 아미노기 정량을 위한 표준 곡선은 glycine을 각각 이용하였다.

기질 준비: *M. luteus*의 SDS-insoluble peptidoglycan은 Foster의 방법(6)을 변용하여 다음과 같이 분리하였다. LB 배지에서 대수기($A_{600}=1.0$)에 있는 *M. luteus* 배양액을 원심 분리(10,000×g, 4°C, 20 min)하여 얻어진 세포침전물을 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)으로 2회 세척한 후 냉동건조하였다. 건조한 세포 1g을 100 ml의 4% SDS 용액에 현탁하여 30분간 끓이고 식힌 후 실온에서 30,000×g로 20분간 원심분리하여 침전물을 수확하였다. 침전물을 다시 4% SDS 용액에 현탁하여 끓이는 과정을 2회 더 반복한다. SDS를 제거하기 위하여 침전물을 400 ml의 끓는 증류수에 현탁하여 원심분리하는 과정을 5회 반복하고 얻어진 세포침전물을 다시 냉동건조하여 -20°C에서 보관하였다.

환원당과 유리 아미노기의 농도 변화: 상기의 기질을 5 mg/ml되게 20 mM Tris 완충용액(pH 8.0)에 현탁한 10 ml의 기질용액에 농축한 세포외 효소를 최종농도가 10 μ g/ml되게 첨가하여 40°C 배양기에서 150 rpm의 속도로 진탕배양하였다. 반응과정 중 일정시간 간격으로 0.5 ml의 반응액을 취하여 2.5 ml의 끓는 증류수를 첨가함으로써 더 이상의 반응을 억제하였다. 효소활성도를 측정하고, 10분간 끓인 후 12,000×g, 20°C의 조건에서 10분간 원심분리하여 상등액의 환원당과 유리 아미노기 농도를 정량하였다.

결과 및 고찰

세포분획별 효소 활성도

Moraxella sp. CK-1의 세포 분획별 분해 활성을 확인한 결과 Table 1에서와 같이 *Moraxella* sp. CK-1과 *M. luteus* 세포에 대하여 세포외 분획에서 가장 높은 활성을 보였고, 세포질과 세포막, periplasm, cell homogenate에서도 활성을 나타내었다. 그러나 세포외막과 peptidoglycan에서는 활성이 나타나지 않았는데, 이러한 결과는 세포외 자가용균효소의 세포내 첫번째 위치가 세포막과 periplasm이라는 것을 시사한다. 이러한 결과는 같은 그람음성세균인 *E. coli*의 muramidase가 세포외막에서 활성을 가진다는 것(10)과 *P. aeruginosa*의 경우 세포질에서는 활성이 나타나지 않는다는 보고(3)와는 상반된 결과이다.

세균의 생장과 세포외 효소 활성도 변화

BG-11C 배지에서 60시간 동안 배양하면서 생장곡선을 추적하였다. 배양 12시간만에 최대 생장을 보였으며, 12시간 이후는 다른 세균들이 보여주는 생장곡선과는 달리 안정기가 거의 없이 완전한 사멸기를 나타내었다. 배양액의 pH는

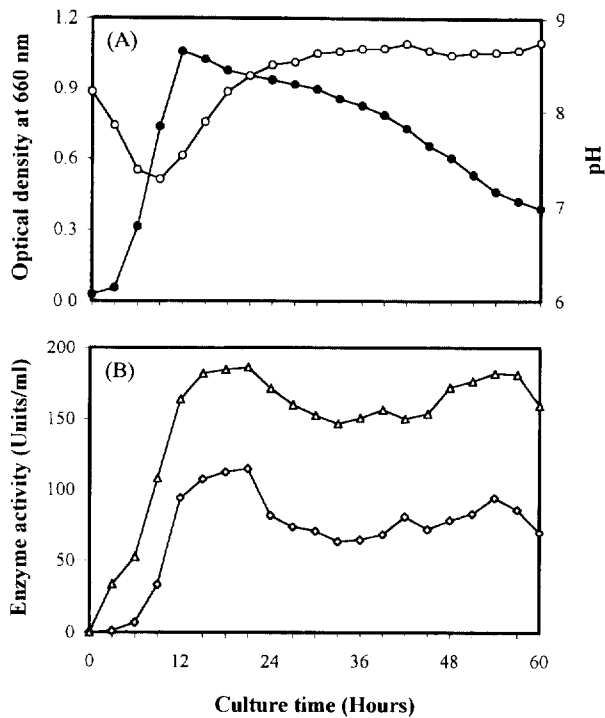


Fig. 1. Extracellular lytic activity of *Moraxella* sp. CK-1 against *Moraxella* sp. and *M. luteus*. (A) Growth curve of *Moraxella* sp. CK-1 and pH variation of culture media. (B) Variation of extracellular lytic enzyme activity. ●, Growth curve of *Moraxella* sp. CK-1 in the BG-11C at 37°C; ○, pH variation of the culture media; ◇, Enzyme activity using heat-killed *Moraxella* sp. CK-1 cells as substrate; △, Enzyme activity using heat-killed *M. luteus* cells as substrate.

초기 8.2였으나, 대수증식기 중기까지는 pH 7.2로 감소하였으며, 이후 계속 증가하여 pH 9.0에서 안정되었다(Fig. 1A). Fig. 1B에서 보는 바와 같이 heat-killed *Moraxella* sp. CK-1에 대한 활성도는 대수증식기 말기(12시간)까지 급속히 증가하였으며, 21시간까지 서서히 증가하여 최대활성을 나타내었다. 그 이후, 세포외 분해효소의 활성은 완만히 감소하였으나, 33시간 이후 다시 증가하였고 54시간 이후 다시 감소하는 경향을 나타내었다. Heat-killed *M. luteus*에 대한 활성도는 *Moraxella* sp. CK-1에 비해 높았지만, 활성에 대한 변화 경향은 거의 유사하였다. 이처럼 *Moraxella* sp. CK-1의 생장곡선상의 특성 즉, 안정기 없이 바로 완만한 사멸기로 접어드는 것은 대수증식기 말기 이후 21시간까지 효소 활성이 지속적으로 증가하였기 때문이며, 33시간 이후로 다시 한번 활성이 증가한 것은 세포내에 존재하는 자가용균효소가 세포 배양액으로 용출된대 기인한 것으로 추정된다(20).

효소의 물리·화학적 특성

자가용균효소는 heat-killed *Moraxella* sp. CK-1과 *M. luteus*의 두 기질에 대해 모두 60-70°C, pH 9.0에서 가장 높은 활성을 보였으며, 90°C에서도 최적온도에서의 활성에 비해 60% 가량의 활성을 나타내었다(Fig. 2). pH 9.0 이상의 염기적 조건에서는 효소활성도가 감소하는 것을 관찰할 수 있었

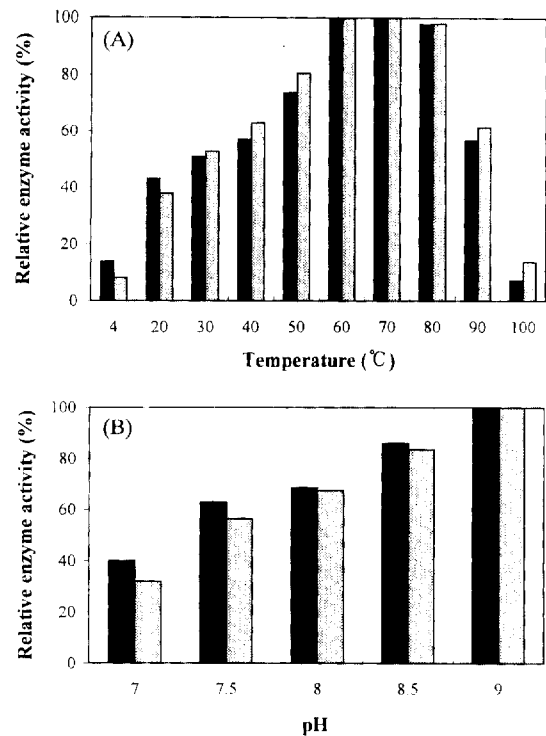


Fig. 2. Optimal pH(A) and temperature(B) for the cell wall-lytic activity of extracellular enzyme(s) of *Moraxella* sp. CK-1. ■, When heat-killed *Moraxella* sp. CK-1 cells were used as substrate; ▨, When heat-killed *M. luteus* cells were used as substrate.

으나, 이러한 조건에서는 효소가 첨가되지 않았을 경우에도 기질용액의 흡광도가 약간 감소하였으므로 Fig. 2에는 나타나지 않았다.

Na⁺와 K⁺, Li⁺ 등의 1가 양이온은 효소의 활성을 촉진시키는 반면, Ba²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺ 등 2가 양이온은 억제하는 작용을 하였다. 특히, 10 mM의 Fe³⁺ 이온은 효소의 활성을 완전히 억제시켰으며, 같은 농도의 Cu²⁺ 이온도 효소활성의 약 88% 억제하였다. 2-mercaptoethanol과 dithiothreitol, phenylmethylsulfonyl fluoride는 효소활성을 촉진하였으며, EDTA와 BSA는 4.7-8.1% 가량 억제하였다(Table 2). Li⁺를 제외한 중금속이온들은 대부분 효소의 활성을 저해하였는데, 이러한 결과는 *P. aeruginosa* PAO1(3), *Bacillus subtilis* 168(6), 그리고 *Staphylococcus aureus*(19)의 자가용균효소의 경우에서와 유사하다.

Renaturing SDS-PAGE 분석

세균의 생장곡선상에서 다른 시기에 세포배양액을 농축하여 세포외 자가용균효소의 분포 양상을 PAGE상의 clear band로 확인한 결과 총 4개의 band(A1-A4)가 나타났다(Fig. 3). A1과 A3 band는 생장곡선상에서 지속적으로 나타났으나, A2 band는 생장 초기에서부터 대수증식기 중기까지만 나타났으며, A4 band는 대수증식기 중기에서 나타나서 시간이 흐를수록 분포가 점점 감소하는 경향을 보였다. 이와 같이 세균의 생장에 따라 세포외 자가용균효소 분포가 변화하는 것은 *E. coli*와 다른 세균들(3,5,9)에서와 마찬가지로

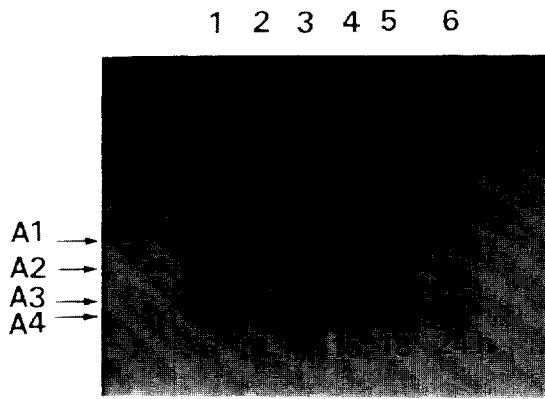


Fig. 3. Temporal distribution of the extracellular autolysins during batch culture of *Moraxella* sp. CK-1. At 3 hour intervals, the optical density at 660 nm of the sample was determined. The protein samples isolated at the indicated times were subjected to the renaturing SDS-PAGE. Lanes: 1, 6 h after inoculation($A_{660}=0.257$); 2, 9 h after inoculation($A_{660}=0.673$); 3, 12 h after inoculation ($A_{660}=0.971$); 4, 15 h after inoculation($A_{660}=0.948$); 5, 18 h after inoculation($A_{660}=0.908$); 6, 24 h after inoculation($A_{660}=0.824$). A1-A4 represent 4 lytic enzymes of 40, 38, 32 and 30 kDa, respectively.

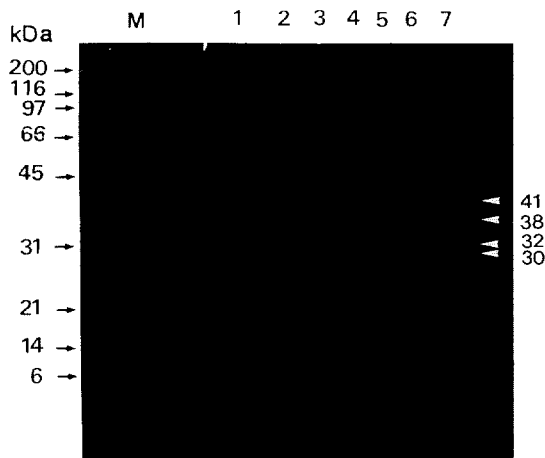


Fig. 4. Extracellular autolysin profile of *Moraxella* sp. CK-1. Protein sample was prepared at exponential growth phase($A_{660}=0.7-0.8$). Lanes: M, Marker proteins; 1, 30 g of protein; 2, 60 g of protein; 3, 90 g of protein; 4, 120 g of protein; 5, 150 g of protein; 6, 220 g of protein; 7, 230 g of protein were electrophoresed, respectively.

Moraxella sp. CK-1의 세포벽이 세포가 생장함에 따라 물리 화학적으로 변화한다는 것을 반영한다.

생장곡선상의 대수증식기 중기에서 딸기사이의 세포배양액을 농축하여 renaturing SDS-PAGE를 시행한 결과 분자량이 각각 30, 32, 38, 그리고 41 kDa인 4개의 band가 나타났다(Fig. 4). 그러나 이러한 결과는 세포의 자가용균효소가 4가지 존재하는 것을 반영한다고 보기는 어렵다. 왜냐하면, 열처리, SDS에 대한 민감도 그리고 기질 특이성 때문에 세포에 존재하는 모든 자가용균효소가 똑같이 재활성 또는 검출되지 않을 수도 있으며, 세포질에서 세포 밖으로 이동되

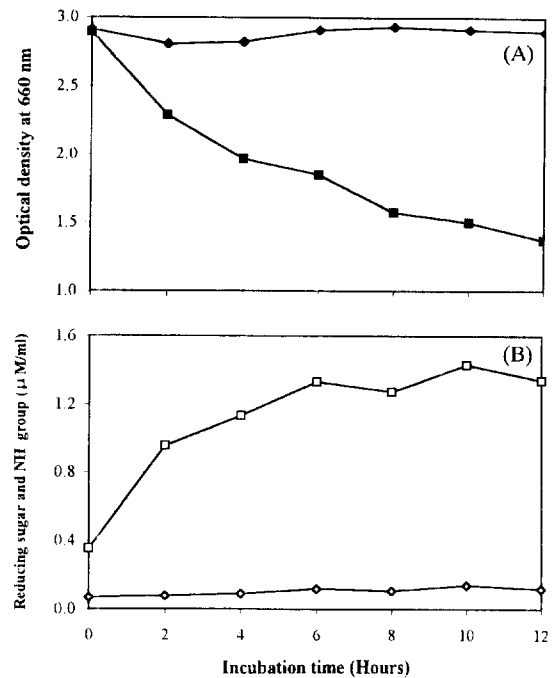


Fig. 5. The time course of the digestion of the *M. luteus* cell wall with extracellular enzyme(s) of *Moraxella* sp. CK-1. A, Variation of optical density at 660 nm; B, Amount of reducing sugars and amino groups when treated with enzyme(s). ◆, Optical density in enzyme free solution; ■, Optical density in enzyme-treated solution; ◇, Reducing sugars; □, Free amino groups.

는 동안 proteolytic processing이나 covalent modification 등의 과정을 거침으로써 활성을 갖는 새로운 효소가 나타날 수 있기 때문이다(15, 19). 이러한 특성을 규명하기 위해서는 유전자 분리 및 특성을 확인하고, isozymes과의 상관관계를 해석할 필요가 있다.

자가용균효소의 기질 특이성

Fig. 5는 *Moraxella* sp. CK-1의 세포의 자가용균효소에 의한 *M. luteus*의 SDS-insoluble peptidoglycan 분해 양상과, 이로 인한 효소 반응액의 환원당과 유리 아미노기 농도 변화를 나타낸 것이다. 기질 용액에 효소를 처리하였을 때 시간이 경과함에 따라 반응액의 흡광도(A_{660})가 감소하며(Fig. 5A), 이 과정에서 환원당의 농도는 일정 수준에서 유지되는 반면 유리 아미노기의 농도는 점차 증가하였다(Fig. 5B). 이러한 결과는 *Moraxella* sp. CK-1의 세포의 자가용균효소는 amidase 또는 endopeptidase와 같은 peptidase임을 강력히 시사한다. *Moraxella* sp. CK-1이 분비하는 4가지 세포벽 분해 효소 중 32 kDa의 효소 유전자를 클로닝하여 염기서열을 분석한 결과, 이 효소는 thermophilic alkaline proteinase로 밝혀졌다(2). 이상의 결과에서 *Moraxella* sp. CK-1은 세포외부로 peptidase 계열의 자가용균효소를 분비한다는 사실을 알 수 있었다. 현재까지 자가용균효소에 대한 연구가 그람 양성세균에 편중되어졌으며, 그람 음성세균의 경우에도 *E. coli*와 *P. aeruginosa*에는 연구된 바가 없다는 점을 감안할 때 *Moraxella* sp. CK-1의 자가용균효소는 큰 의미를 가진다.

감사의 말

본 연구는 서울대학교 분자미생물학 연구센터를 통한 한국과학재단 우수연구센터 지원금에 의한 것입니다.

참고문헌

1. 김철호. 1996. 남조류(*Anabaena cylindrica*) 분해세균인 *Moraxella* sp. CK-1의 분리 및 특성. 한양대학교 박사학위논문.
2. 온탁범. 1996. Molecular cloning, expression and characterization of the gene encoding *Moraxella* sp. autolysin. 한양대학교 석사학위논문.
3. Bernadsky, G., T.J. Beveridge and A.J. Clarke. 1994. Analysis of the sodium dodecyl sulfate-stable peptidoglycan autolysins of select gram-negative pathogens by using renaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **176**, 5225-5232.
4. Berry, A.M., R.A. Lock, D. Hansman and J.C. Paton. 1989. Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **57**, 2324-2330
5. Fein, J.E. and H.J. Rogers. 1976. Autolytic enzyme-deficient mutants of *Bacillus subtilis* 168. *J. Bacteriol.* **127**, 1427-1442.
6. Foster, S.J. 1992. Analysis of the autolysins of *Bacillus subtilis* 168 during vegetative growth and differentiation by using renaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **174**, 464-470.
7. Ghuysen, J.M. 1968. Use of bacteriolytic enzyme in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriol. Rev.* **32**, 425-464.
8. Ghuysen, J.M., D.J. Tipper and J.L. Strominger. 1966. Enzymes that degrade bacterial cell walls. *Methods Enzymol.* **8**, 685-699.
9. Goodell, E.W. and U. Schuwarz. 1985. Release of cell wall peptides into culture medium by exponentially growing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **162**, 391-397.
10. Holtje, J.V. and E. Tuomanen. 1991. The murein hydrolases of *Escherichia coli*: properties functions and impact on the course of infections *in vivo*. *J. Gen Microbiol.* **137**, 441-454.
11. Jayaswal, R.K., Y.I. Lee and B.J. Wilkinson. 1990. Cloning and expression of a *Staphylococcus aureus* gene encoding a peptidoglycan hydrolase activity. *J. Bacteriol.* **172**, 5783-5788.
12. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London) **227**, 680-685.
13. Leclerc, D. and A. Asselin. 1989. Detection of bacterial cell wall hydrolase after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Can. J. Microbiol.* **35**, 749-753.
14. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
15. stlie, H.M., Vegarud G. and T. Langsrud. 1995. Autolysis of *Lactococci*: Detection of lytic enzyme by polyacrylamide gel electrophoresis and characterization in buffer system. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3598-3603.
16. Potvin, C., D. Leclerc, G. Tremblay, A. Asselin and G. Bellemare. 1988. Cloning, sequencing and expression of a *Bacillus* bacteriolytic enzyme in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **214**, 241-248.
17. Smith, T.J. and S.J. Foster. 1995. Characterization of the involvement of two compensatory autolysins in the mother cell lysis during sporulation of *Bacillus subtilis* strain 168. *J. Bacteriol.* **177**, 3855-3862.
18. Sugai, M., H. Komatsuzawa, T. Akiyama, Y.M. Hong, T. Oshida, Y. Miyake, T. Yamaguchi and H. Suginaka. 1990. Identification of endo- β -N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramyl-L-alanine amidase as cluster-dispersing enzymes in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **177**, 1491-1496.
19. Sugai, M., T. Akiyama, H. Komatsuzawa, Y. Miyake and H. Suginaka. 1990. Characterization of sodium dodecyl sulfate-stable *Staphylococcus aureus* bacteriolytic enzymes by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **172**, 6494-6498.
20. Takamoto, S., K. Yamada and Y. Ezura. 1994. Production of bacteriolytic enzymes during the growth of a marine bacterium *Alteromonas* sp. No. 8-R. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **40**, 499-508.
21. Thompson J.S. and G.D. Shockman. 1968. A modification of the Park and Johnson reducing sugar determination suitable for the assay of insoluble materials: Its application to bacterial cell walls. *Anal. Biochem.* **22**, 260-268.
22. Ward, J.B. and R. Williamson. 1984. Bacterial autolysins: specificity and function. p. 159-166. In C. Nombela(ed.), Microbial cell wall synthesis and autolysis. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
23. Watt, S.R. and A.J. Clarke. 1994. Initial characterization of two extracellular autolysins from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **176**, 4784-4789.

(Received January 21, 1997/Accepted March 19, 1997)

ABSTRACT: Characterization of the Extracellular Autolysins from *Moraxella* sp. CK-1.

Joon-Ik Ahn, Chul-Ho Kim and Yong-Keel Choi*(Dept. of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

We studied the characteristics of extracellular autolysins from *Moraxella* sp. CK-1 which has been known to lyse the cyanobacterial cell walls. This bacterium excreted autolysins from the early exponential growth phase. These enzymes showed optimal action condition of 60-70 °C and pH 9.0. Whereas Na⁺, K⁺ and Li⁺ ions exhibited positive effect on the enzyme activity, Ba²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ and Mn²⁺ ions exhibited negative effect. Especially, Fe³⁺ and Cu²⁺ ions almost completely suppressed the activity. Four extracellular autolysins of 30, 32, 38 and 41 kDa were detected in renaturing SDS-PAGE gel containing 0.2% heat-killed *Micrococcus luteus* cells as substrate. Among these 4 autolysins, 2 enzymes of 32 and 41 kDa distributed in the culture medium throughout the experimental time, but the 38 kDa enzyme diminished and 30 kDa began to appear at mid-exponential growth phase. When SDS-insoluble peptidoglycan of *M. luteus* was treated with the autolysins of *Moraxella* sp. CK-1, the concentration of free amino groups in reaction mixture increased. This indicates that the autolysins are N-acetylmuramyl-L-alanine amidase or endopeptidase.