

Vitreoscilla C₁에서 Paraquat와 Iron에 의한 Iron Superoxide Dismutase의 유도

† 박 기 인

전북대학교 자연과학대학 생물과학부

(접수 : 2003. 9. 19. 게재승인 : 2003. 12. 24.)

Induction of Iron Superoxide Dismutase by Paraquat and Iron in *Vitreoscilla* C₁

Kie-In Park†

Division of Biological Science, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea

(Received : 2003. 9. 19. Accepted : 2003. 12. 24.)

Superoxide dismutase which is metalloenzyme that decomposes superoxide radicals into hydrogen peroxide and molecular oxygen. *Vitreoscilla* has FeSOD. Expression of FeSOD to paraquat was largely constitutive. This suggests that the basal level of FeSOD is sufficient to provide protection against superoxide generated during normal aerobic metabolism. Induction of SOD by iron supports that insertion of the active site metal into the corresponding apoprotein. The effect of paraquat on induction by iron seemed that iron brought the synergism effect in SOD activity with paraquat. It suggests that the relief of growth inhibition is due to protection against the lethality of O₂⁻ afforded by the elevated SOD. There may be control of FeSOD activity posttranslationally. Posttranslation control of enzyme function is particularly feasible for a metalloenzyme, for which conversion of apo- to holoenzyme may be the rate-limiting or regulatory step.

Key Words : SOD, superoxide radical, *Vitreoscilla*, iron, paraquat

서 론

산소 분자는 호기성 생물체들에게 필수적인 요소이다. 산소가 존재할 때, 호기성 미생물체들과 통성 미생물체들은 산소를 호흡의 최종 수용체로 사용한다. 산소분자가 물분자로 환원되는 동안 4개의 전자를 필요로 하며 이 과정에서 초산화 음이온 (O₂⁻), 과산화수소 (H₂O₂) 그리고 hydroxyl radical (OH·)과 같은 중간물질들이 생성된다(1, 2). 이들은 유해한 활성산소로써 세포내의 지방과 단백질 그리고 DNA를 파괴하며 노화과정과 관련이 있는 것으로 보고 되어 있다(3). 생물체들은 이러한 활성 산소 중간물질 (reductive oxygen intermediates)들을 파괴시키는 기작을 지니고 있다(4). 그 주요한 기작은 Superoxide dismutase (SOD), Catalase, Peroxidase 등과 같은 방어 효소 (defense enzyme)들에 의해 이뤄진다. SOD는 활성산소를 과산화수소와 산소로 분해 시

키며 과산화수소는 다시 catalase와 peroxidase에 의해 분해 된다 (5). Fig. 1은 이들에 대한 전체적인 기작을 도식화한 것이다.

SOD는 metalloenzyme이며 활성 부위의 금속 이온 (metal cofactor)의 산화와 환원에 의해 반응이 촉진된다. SOD는 금속 보조인자의 종류에 따라 크게 4종류로 분류된다. Manganese를 지닌 MnSOD, iron을 지닌 FeSOD, copper와 zinc를 지닌 CuZnSOD들이다(6). 대부분의 박테리아들은 세포질에 두 종류, FeSOD와 MnSOD를 지니고 있다(7). 이들은 동일한 소단위 분자들의 dimers 혹은 tetramers로 구성되어 있으며 거의 동일한 단백질 1차 구조와 3차 구조를 지니고 있다. 이것은 FeSOD와 MnSOD가 동일한 조상으로부터 진화되어 왔음을 의미한다(8). 하지만 구조적인 유사성에도 불구하고 대부분의 SOD들은 금속이온에 대한 절대적 특이성을 지니고 있다(9). 반면 CuZnSOD는 FeSOD, MnSOD와 비교 할 때 염기 서열이나 단백질 구조에 있어 유사한 부분이 거의 없으며 이는 독자적인 진화를 의미한다. CuZnSOD는 periplasm에 존재하며 *E. coli*와 몇몇 박테리아에서 발견된다(10). NiSOD는 *Streptomyces* spp.에서 발견되며 아미노산의 조성, N-terminal 아미노산 배열 그리고 immunocross-reactivity에 근거해 볼 때 위의 3가지 SOD와는 많은 차이가

† Corresponding Author : Molecular Genetics Laboratory, Division of Biological Science, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea

Tel : +82-63-270-3361, Fax : +82-63-270-3362

E-mail : park253@moak.chonbuk.ac.kr

있다(11).

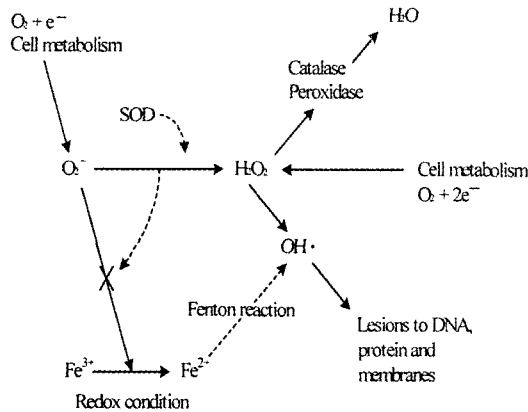


Figure 1. Schematic representation of the role of SOD in preventing hydroxyl radical formation.

*E. coli*에서는 FeSOD가 호기적 상태와 혐기적 상태 모두에서 발현 될 수 있는 반면 MnSOD는 오직 호기적 상태에서만 발현이 된다(12). 이 MnSOD는 산화적 물질대사 중에 생성된 초산화 음이온들과 높은 산소 분압 또는 redox-active compounds들에 의해 유도된다(13, 14). 또한 금속 이온들도 SOD 활성도에 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데(15), Mn(II)와 Fe(II)의 금속 이온의 증가는 apo-상태의 비활성 효소들을 holo 상태의 활성 효소들로 빠르게 전환시키며 SOD들의 활성을 증가시킨다.

*Vitreoscilla*는 절대적 호기성 미생물체로써 purple 박테리아의 beta subdivision으로 분류된다. 이들은 산소가 부족 할 때 박테리아 헤모글로빈을 합성시키는 특징을 지니고 있다. *Vitreoscilla* 헤모글로빈 (VtHb)은 산소가 제한적으로 존재할 때 이를 이용할 수 있는 최종 산화제 (terminal oxidase)로써 사용되어진다(16, 17).

최근 노화와 질병 등의 원인으로 체내 활성 산소에 대한 관심이 높아지고, 이들에 대한 생물학적인 제거의 다양한 관점에서 SOD에 관한 연구들이 수행되고 있다. *Vitreoscilla*는 FeSOD를 지닌 것으로 알려졌으나 아직 그 특성이 보고된 바 없다(18). 본 연구는 paraquat와 iron를 사용한 효소학적 실험방법을 통해 *Vitreoscilla*의 FeSOD의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주와 배지 및 배양조건

Vitreoscilla 야생형은 University of Western Ontario, Murrar의 strain C1, culture #389를 분양 받았다. 배양은 PYA 배지에서 실시했으며 그 성분은 1.0% peptone, 1.0% yeast extract, 0.002% sodium acetate, 1.5% agar (액체배지에서 제외)이며 10 N NaOH, pH 7.8로 적정 되었다. 실험을 위해 고체 배지에서 자란 단일 colony를 액체 배지로 접종하였고 48시간 배양기에서 배양 후 새로운 배지로 3%(w/v) 접종하였다. 호기성 상태를 유지하기 위해 플라스크와 배지의

비율은 5:1, 배양기의 회전속도는 200 rpm, 20-25℃를 유지하였다.

시약

Iron과 paraquat, 기타 시약들은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. Iron은 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 필터 하여 멸균된 상태로 사용하였다. Paraquat (methyl viologen) 역시 멸균된 stock solution으로부터 사용하였다.

Crude extract의 준비

PYA 배지로 3% 접종된 후 *Vitreoscilla*는 24시간 동안 안정기까지 배양되었다. 5,000 x g, 4℃에서 15분간 원심분리한 후, pellet을 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.8에서 세척하여 금속 시약들의 잔류를 제거하였고, 다시 50 mM potassium phosphate, pH 7.8과 0.1 mM EDTA를 포함하는 buffer에 녹인 후 4℃에서 초음파 파쇄기로 (550 sonic dismembrator, microtip at setting 4, Fisher Scientific) 세포 파쇄를 수행하였다. 1,000 x g, 4℃에서 원심분리 하여 고형물을 침전시킨 다음 상층액인 crude extract는 실험에 즉시 사용하거나 -80℃에 보관하였다.

SOD 활성도 측정 (SOD assay)

SOD 활성도 측정은 flavin이 nitro blue tetrazolium (NBT)을 환원하는 원리에 근거하여 간접적인 방법으로 측정하였다. 반응물은 enzyme과 0.0036 M NBT, 0.01 M methionine, 1.17×10^{-6} M riboflavin, 2×10^{-5} sodium cyanide를 포함하고 있으며, 이 반응물을 40W 형광등에서 (fluorescent bulb) 6분간 조사한 후 환원된 NBT의 흡광도를 560 nm, 25℃에서 측정하였다. 모든 흡광도 측정에는 HP 8453 spectrophotometer (Hewlett Packard, USA)를 사용했다. Inhibition percent와 specific activity는 다음과 같은 공식을 사용하여 계산하였다.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\Delta A_{560} \text{ without SOD} - \Delta A_{560} \text{ with SOD}}{\Delta A_{560} \text{ without SOD}} \times 100$$

$$\text{Units/mg} = \frac{1000}{\mu\text{g enzyme resulting in } 1/2 \text{ max. inhibition}}$$

Polyacrylamide gel electrophoresis

Non-denaturing PAGE는 SDS와 2-mercaptoethanol을 제거한 후 Laemmli method를 이용했다. 그 후 SOD 활성도 측정을 위해 NBT negative staining을 수행하였다. 전기 영동 후 gel을 2.35×10^{-3} M NBT 용액에 20분간 담근 후 gel을 다시 0.028 M TEMED와 2.8×10^{-5} M riboflavin을 포함하는 pH 7.8, 0.036 M potassium phosphate로 옮겨 15분간 빛을 차단하였다. 그 후 형광등으로 15분간 빛을 조사하였으며, 조사하는 동안 SOD를 포함하고 있는 부분을 제외하고는 gel이 파란색으로 변했다.

단백질 양 측정은 Lowry method를 이용했다. Gel을 coomassie blue R-250으로 염색하였고 분자량 (molecular weight) 결정을 위해 standard로 BSA (bovine serum albumin)

을 사용하였다.

생장곡선 측정

*Vitreoscilla*를 배지에서 0.5 ml씩 제거한 후 회석하여 흡광도를 측정했다. *Vitreoscilla* 3% 접종 후부터 4시간 간격으로 32시간 동안 측정하였다.

결과 및 고찰

Paraquat (PQ)에 의한 FeSOD의 일정 발현

많은 호기성 미생물들은 산소압 (oxygen pressure)이 증가되면 그들의 defense enzymes들의 활성을 증가시킨다(19, 20). PQ는 박테리아의 세포질에서 초산화 음이온을 생성시키는 redox-cycling agent이다. Paraquat를 *Vitreoscilla* 접종 직전, 배지에 각각 5, 10, 15, 20, 25 μM을 첨가하였다. 안정화 단계까지 배양 후 (24시간), crude extract를 얻어 SOD 활성도를 측정하였으며, 그 측정 결과 활성도는 각각 10 μM PQ 첨가 시 37 U/mg, 25 μM PQ 첨가 시 38 U/mg로 아무 것도 첨가하지 않았을 때의 36 U/mg과 비교 시 거의 일정하게 SOD가 발현됨을 알 수 있었다. 즉 *Vitreoscilla*가 산화적 스트레스에 의해 FeSOD를 현저히 발현시키지 않음을 알 수 있었다(Fig. 2). 이 결과는 절대적 호기성인 *Vitreoscilla*가 어떤 초산화 음이온에도 대비할 수 있도록 충분한 FeSOD 활성도를 기본적으로 지니고 있음을 의미한다.

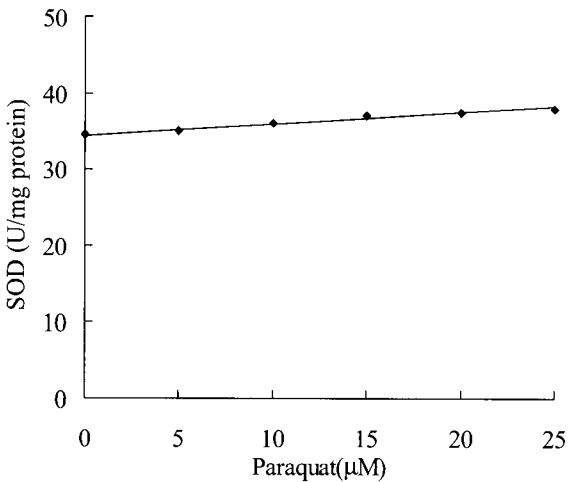


Figure 2. Constitutive expression of SOD by paraquat (PQ).

Iron에 의한 FeSOD의 유도 현상

Yano와 Nishi는 *E. coli*에서 Mn(II)을 첨가해서 호기적으로 배양했을 때 첨가하지 않고 배양했을 때보다 3배나 많은 SOD가 유도됨을 관찰했고, 또한 *Pseudomonas ovalis*에서 iron을 첨가한 배지에서 FeSOD의 활성이 증가됨을 관찰했다(21). Fig. 3은 보조인자인 iron에 대한 FeSOD 활성도에 대한 영향을 조사한 결과로써, *Vitreoscilla*를 접종하기 직전의 배지 내에 iron을 각각 5, 10, 15 μM 첨가한 후 안정화 단계까지 (24시간) 배양 후 SOD 활성도를 측정한 결과이다. 활성도는 각각 5 μM Fe 첨가 시 42 U/mg, Fe 10 μM 첨가 시

45 U/mg로 측정되었다. 아무 것도 첨가하지 않았을 때의 36 U/mg과 비교 시 미량의 Fe의 증가에 대해서도 SOD 활성도가 증가했음을 알 수 있다. 금속이온 첨가에 의한 SOD의 유도들은 CN-resistant respiration을 증가시키지는 않았다(22). 이 결과로써 초산화 음이온에 대한 SOD 조절 기작과 금속이온에 대한 기작과는 다르다는 것을 알 수 있었으며, 이는 결과적으로 활성 부위에 금속 이온이 삽입됨으로써 apoprotein이 holo 상태로 전환되었음을 의미한다.

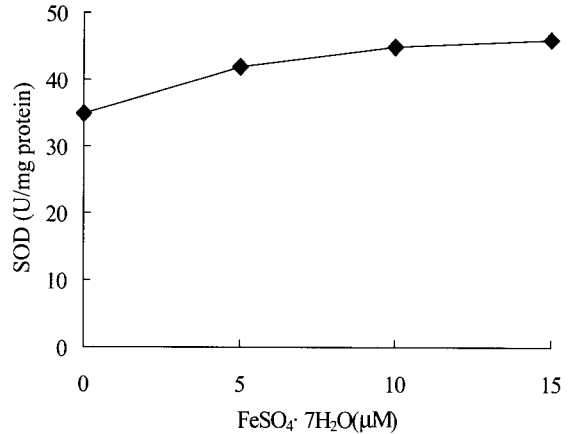


Figure 3. Induction of SOD by Iron.

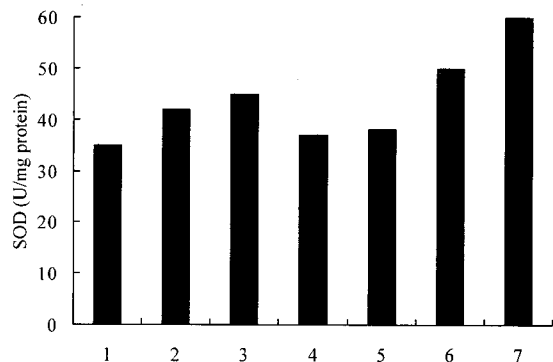


Figure 4. Effect of paraquat and iron in PYA medium. 1 : no addition, 2 : 5 μM Fe(II), 3 : 10 μM Fe(II), 4 : 10 μM PQ, 5 : 25 μM PQ, 6 : 25 μM PQ and 5 μM Fe(II), 7 : 25 μM PQ and 10 μM Fe(II).

Paraquat와 Iron에 의한 SOD Synergism Effect

Fig. 4는 PQ와 iron에 의한 SOD 활성도를 조사한 결과이다. *Vitreoscilla*의 접종 직전 각각 25 μM PQ와 5 μM Fe, 25 μM PQ와 10 μM Fe를 배지에 첨가하였다. 안정기까지 배양 후 (24시간) 활성도를 측정하였다. 결과는 각각 50 U/mg (lane 6)과 59 U/mg (lane 7)로 아무 것도 처리하지 않았을 경우인 36 U/mg (lane 1)과 PQ만 처리하였을 경우 (lane 2, 3), Fe만 처리하였을 경우 (lane 4, 5)보다도 현저히 증가한 수치이다(Fig. 4). 이는 PQ에 의해 생성된 초산화 음이온에 의해 Fe에 대한 유도가 증가된 synergism effect이다. Fig. 5(a)는 non-denaturing gel electrophoresis와 SOD activity staining을 통해 위의 사실을 확인한 것이다. Fig. 5(a)의 lane 1, 2, 3은 Fig. 4의 lane 1, 4, 5와 일치되며, Fig. 5(a)의 lane

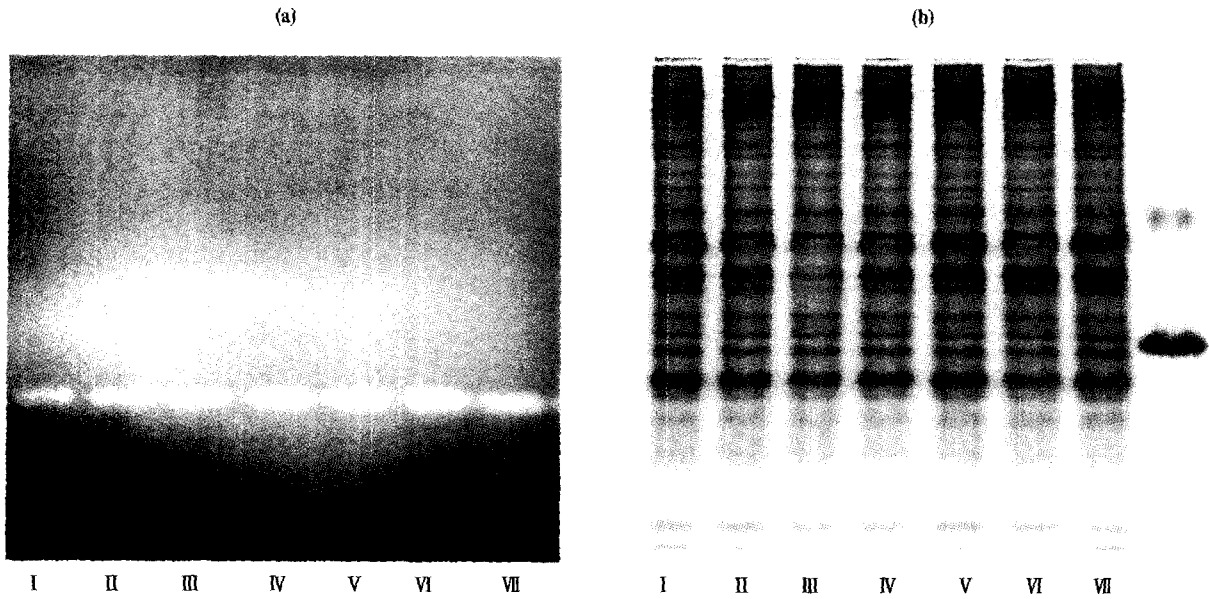


Figure 5. Visualization of SOD activity from extracts of *Vitreoscilla* treated paraquat and iron. I : no addition, II : 10 μ M PQ, III : 25 μ M PQ, IV : 5 μ M Fe(II), V : 10 μ M Fe(II), VI : 25 μ M PQ, and 5 μ M Fe(II), VII : 25 μ M PQ and 10 μ M Fe(II)

4, 5는 Fig. 4의 lane 2, 3과 일치한다. 또한 Fig. 5(a)의 6, 7은 Fig. 4의 lane 6, 7과 동일함을 보여주고 있다.

Fig. 5(b)는 동일한 양의 단백질이 loading 됐음을 보여주는 결과로써, *Vitreoscilla* FeSOD의 MW 55 kD (kilo dalton)이며 이는 다른 생물체와 유사하게 두 개의 동일한 소분자(27 kD)로 구성되어 있을 것으로 사료된다(19). 가장 오른쪽 lane은 BSA (dimer MW 132 kD, monomer MW 66 kD)를 standard marker로 사용한 것이다.

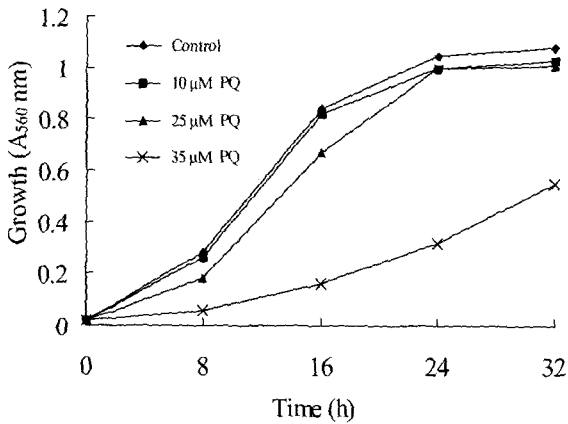


Figure 6. Effect of paraquat on growth of *Vitreoscilla* in PYA medium.

성장곡선 측정

Fig. 6, 7은 *Vitreoscilla*의 성장에 초산화 음이온과 금속이온이 미치는 영향을 측정한 결과이다. Fig. 6은 세포 접종 직전 10, 25, 35 μ M PQ를 배지에 첨가하여 0, 8, 16, 24, 32시간마다 흡광도를 측정된 결과이다. 10, 25 μ M PQ를 첨가했을 경우, 아무 것도 첨가하지 않은 것과 비교 시 약간의 성장저해가 있었지만 곧 회복되면서 24시간이 지나 안정기로 접어들

면서 원상태로 성장이 회복되었다. 32 μ M PQ 첨가 시에는 성장이 저해 받았고 24시간이 지나서야 서서히 회복되는 양상을 보이기 시작했다. 이는 *Vitreoscilla*가 절대적 호기성 미생물로 어떤 초산화 음이온에도 대비할 수 있도록 충분한 FeSOD 활성도를 기본적으로 지니고 있음을 의미한다.

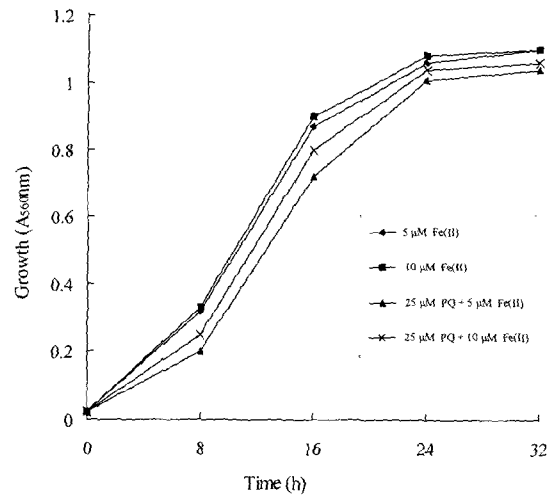


Figure 7. Effect of iron to paraquat inhibition on growth of *Vitreoscilla* in the PYA medium.

Fig. 7에서는 각각 5, 10 μ M Fe, 25 μ M PQ와 5 μ M Fe, 25 μ M PQ와 10 μ M Fe를 함께 배지에 첨가하여 흡광도를 측정된 결과이다. Fig. 6과 Fig. 7을 종합하여 볼 때 PQ와 더불어 Fe를 첨가했을 경우에는 PQ만 첨가했을 때와 비교하였을 때 성장이 정상으로 회복됨을 알 수 있었다. 이 결과는 초산화 음이온에 대한 성장의 저해가 Fe의 첨가로 SOD 활성도를 증가시켜 완화됐음을 의미한다.

요약

본 연구에서는 절대적 호기성인 *Vitreoscilla*가 지닌 FeSOD의 특성을 밝히고자 paraquat와 iron을 사용하여 실험하였다. *Vitreoscilla*에서 FeSOD의 활성도는 초산화 음이온을 생성하는 paraquat에 대해 커다란 영향 없이 일정하게 발현되었다. 이 결과는 *Vitreoscilla*는 호기적인 물질대사 동안 생성되어지는 초산화 음이온에 대해 방어할 수 있을 만큼 충분한 FeSOD를 평상시 지니고 있음을 의미한다. 또한 다른 요소에 의한 FeSOD의 발현 가능성이 고려되어졌다. 보조 인자인 Fe를 처리한 결과 활성도가 증가됨을 알 수 있었다. 이는 CN-resistant respiration을 증가시키는 초산화 음이온에 대한 조절 기작과는 달리 apoenzyme 상태가 보조 인자인 금속 이온 (Fe)에 의해 holoenzyme 상태로 전환되었음을 의미한다. PQ와 Fe를 함께 처리하였을 경우, FeSOD의 증가는 PQ에 의해서 생성된 초산화 음이온에 의해 apo 상태에서 holo 상태로 FeSOD의 활성이 증진되는 synergism effect로 설명되어진다. 결론적으로 metalloenzyme인 SOD의 경우는 이런 전환이 활성 속도를 제한하거나 조절할 수도 있는 posttranslational 수준의 조절 기작이 존재함을 알 수 있었다.

REFERENCES

- Fridovich, I (1978), The biology of oxygen radicals. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutase provide an important defense, *Science* **201**, 875-880.
- Imlay, J. A. and S. Linn (1988), DNA damage and oxygen radical toxicity, *Science* **240**, 1302-1308.
- Herouart, D., S. Sigaud, S. Moreau, P. Frendo, D. Youati, and A. Buppo (1996), Cloning and characterization of the katA gene of *Rhizobium meliloti* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase, *J. Bacteriol.* **178**, 6802-6809.
- Sadosky, A. B., L. A. Wiater, and H. A. Shuman (1993), Identification of *Legionella pneumophila* genes required for growth within and killing of human macrophages, *Infect. Immun.* **61**, 5361-5373.
- Rocha, E. R. and C. J. Smith (1995), Biochemical and genetic analysis of a catalase from the anaerobic bacterium *Bacteriodes fragilis*, *J. Bacteriol.* **177**, 3111-3119.
- Kim, E. J., H. P. Kim, Y. C. Hah, and J. H. Roe (1996), Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*, *Eur. J. Biochem.* **241**, 178-185.
- Kim, E. J., H. J. Chung, B. Suh, Y. C. Hah, and J. H. Roe (1998), Transcriptional and post-transcriptional regulation by nickel of sodN gene encoding nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces coelicolor* Muller, *Mol. Microbiol.* **27**, 187-195.
- Hughes, M. N. and R. K. Poole (1989), Metals and microorganisms, Chapman and Hall, London, England.
- Touati, D (1992), Regulation and protective role of the microbial superoxide dismutase, In *Molecular biology of free radical scavenging systems*, J. G. Scandalios, Ed., pp231-261, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Benov, L. T. and I. Fridovich (1994), *Escherichia coli* expresses a copper- and zinc containing superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.* **269**, 25310-25314.
- Youn, H. D., H. Youn, J. W. Lee, Y. I. Yim, J. K. Lee, Y. C. Hah, and S. O. Kang (1996) Unique isozymes of superoxide dismutase in *Streptomyces griseus*, *Arch. Biochem. Biophys.* **334**, 341-348.
- Hassan, H. M. and I. Fridovich (1977), Enzymatic defense against the toxicity of oxygen and streptonigrin in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* **129**, 1574-1583.
- Gregory, E. M. and I. Fridovich (1973), The induction of superoxide dismutase by molecular oxygen, *J. Bacteriol.* **114**, 543-548.
- Hassan, H. M. and I. Fridovich (1979), Intracellular production of superoxide radical and hydrogen peroxide by redox active compounds, *Arch. Biochem. Biophys.* **136**, 385-395.
- Pugh, S. Y. R., J. L. DiGiuseppi, and I. Fridovich (1984), Induction of superoxide dismutase in *Escherichia coli* by manganese and iron, *J. Bacteriol.* **160**, 137-142.
- Woese, C. R., W. G. Weisburg, B. J. Paster, C. M. Hahn, R. S. Tanner, N. R. Krieg, H. P. Kooops, H. Harms, and E. Stackebrandt (1984), The phylogeny of purple bacteria: the beta subdivision, *Systematic and Appl. Microbiol.* **5**, 327-336.
- Boerman, S. J. and D. A. Webster (1982) Control of heme content in *Vitreoscilla* by oxygen, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **28**, 35-43.
- Oh, I. S. (1999), Enzymatic and genetic studies on the iron superoxide dismutase purified from *Vitreoscilla* C₁, Ph.D Dissertation, Dept. of Biology, Chonbuk National University, Chonbuk.
- Gregory, E. M. and I. Fridovich (1973), Oxygen toxicity and the superoxide dismutase, *J. Bacteriol.* **114**, 1193-1197.
- MacMichael, G. J (1988), The response of gram-negative, thermophilic bacteria to oxygen, *Microb. Ecol.* **15**, 115-122.
- Yano, K. and H. Nishie (1978) Superoxide dismutase in facultatively anaerobic bacteria : enzyme level in relation to growth conditions, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **24**, 333-340.