

Sphingomonas sp. KS 301의 Superoxide Dismutase 정제 및 특성

강희정 · 정재훈 · 최지혜 · 손승렬^{1*}

단국대학교 첨단과학부 미생물학전공,

¹단국대학교 기초과학연구소

유류오염 토양에서 난분해성 물질인 PAH (polycyclic aromatic hydrocarbon)들을 잘 분해하는 균주 중 SOD (superoxide dismutase) 활성이 높은 균주인 *Sphingomonas* sp. KS 301의 SOD 특성을 알아보기 위하여 Ammonium sulfate 침전, DEAE-Sepharose 크로마토그래피, Superose-12 겔 여과 크로마토그래피, Uno-Q1 이온교환 크로마토그래피를 이용하여 SOD 단백질을 정제하였다. *Sphingomonas* sp. KS 301은 DEAE-Sepharose 크로마토그래피로 분석한 결과, 기존의 알려진 세균들과는 달리 서로 다른 5가지의 SOD 활성을 가지고 있는 것으로 나타났으며 본 연구에서는 그 중 SOD III를 부분 정제하였다. 정제한 SOD III는 Mn type 및 Fe type *Escherichia coli* SOD와 비교했을 때 비활성도(specific activity)가 5배로 높게 나타났다. SOD III의 분자량은 SDS-PAGE에서는 23 kDa으로 측정되었으며 Superose-12 겔 여과 크로마토그래피 후 native 상태의 분자량은 71 kDa으로 정제한 SOD는 3개의 소단위체로 구성되어 있는 것으로 보여진다. 정제한 SOD III의 최적 pH는 7.0 이었고 20°C에서 최적의 활성을 보였다. 또한 SOD의 종류를 알 수 있는 억제물질 NaN₃, H₂O₂, KCN를 이용한 억제효과를 살펴보았더니 NaN₃에만 억제되어 Mn type의 SOD임을 알 수 있었다. 또한 이 효소의 아미노 말단의 아미노산 서열은 *Psudomonase ovalis* 및 *Vibrio cholerae*의 SOD와 가장 유사하였다.

Key words □ PAH, SOD, *Sphingomonas*

활성산소란 산소 라디칼(oxygen free radical) 및 이것으로 파생된 여러 가지 산소화합물들을 통칭하는 말로 모두 반응성이 높은 특징을 가지고 있다. 이 활성산소(reactive oxygen)는 각종 세포들의 여러 대사과정에서 끊임없이 생성된다.

활성산소는 동물과 식물의 체내에 존재하고 있으며, 원래 체내에 침입해온 이물질(세균, 바이러스, 곰팡이, 니코틴 등)을 없애는 식세포의 세포막에서 나와 이물질을 제거하는 역할을 하는 물질이다. 하지만 환경화학물질, 자외선, 혈액순환장애, 스트레스 등으로 생산된 활성산소는 인체에 치명적인 피해를 준다.

또한 산소는 지구상에서 가장 많은 원소로(53.8%) 건조대기 중에 21%를 차지하고 있으며, 호기성 생물은 산소를 전자 수용체로 하는 호흡을 통해 에너지를 획득하는 등 절대적으로 필요하지만 각종 물리적, 화학적, 환경적 요인 등에 의하여 superoxide anion radical (O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radical (OH), singlet oxygen (¹O₂)과 같은 반응성이 매우 큰 활성산소로 전환되면 생체에 치명적인 산소독성을 일으킨다(12).

이렇게 생성된 활성산소는 DNA의 sugar를 공격하여 backbone을 끊거나 염기의 radical 형성반응을 유발하여 DNA에 손상을 주고, 지질에도 손상을 주는데, 지질이 손상 받으면 막의 유동성이 증가해 세포막의 전위차가 파괴되어 결국 막의 산화적 손상

이 온다. 또한 단백질에는 oxygen species와 상호작용에 의해 단백질을 분해하거나 불활성화시켜 단백질에 변화를 가져온다(12). 그러므로 이런 변화를 일으키는 활성산소들은 결국 돌연변이, 노화, 암 등 각종 질병을 일으킨다(1, 2, 3).

이와 같은 산화적 공격에 대한 생체 내 방어 체계는 superoxide dismutase, catalase, peroxidase 등의 효소와 vitamin E, vitamin C, glutathione, ubiquinone, urate 등과 같은 항산화 물질이 존재하여 스스로를 보호하고 있다. 이들 중에서 superoxide dismutase (SOD)는 활성산소족(Reactive Oxygen Species, ROS)의 하나인 superoxide anion radical을 산소분자(O₂)와 과산화수소(H₂O₂)로 변환시키는 역할을 하는 항산화 효소로 생체 내에 유독하게 작용하는 활성산소를 제거해 주는 역할을 한다.

SOD는 활성부위 금속에 따라서 Fe-SOD, Mn-SOD, CuZn-SOD, Ni-SOD 등으로 나뉘어 진다(8). 대부분의 세균은 세포질에 Fe-SOD, Mn-SOD를 가지고 있어 세포질을 방어하는 역할을 하며 monomeric subunit 당 0.5-1.0 g-atom의 Fe이나 Mn 이온을 가지고 있다. 또한 동일한 subunit의 dimer나 tetramer의 구조를 가지고 있으며 아미노산 서열이 거의 일치하는 것으로 보아 태초에 같은 하나의 유전자에서 유래한 것으로 추정되어 진다(13). 또한 Fe-SOD와 Mn-SOD는 H₂O₂에 대한 sensitivity에 의해 구별하는데 Fe-SOD는 H₂O₂에 sensitive 하지만 Mn-SOD는 H₂O₂에 안정적이다(18). 그러나 *Propionibacterium shermanii*, *Streptococcus mutans*, *Bacteriodes gingivalis* 등의 SOD들은 Mn

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 82-41-550-3455, Fax: 82-41-551-9229

E-mail: syson@dankook.ac.kr

이나 Fe를 모두 활성부위에 가질 수 있고, *Methanobacterium bryantii*, *Nocardia asteroides*, *Streptomyces* sp.의 SOD들도 Fe이나 Zn을 모두 활성부위에 가질 수 있어, 이러한 type의 SOD들을 cambialistic SOD라고 한다. 이런 cambialistic SOD는 SOD 활성부위에 두 가지 금속이 결합하기 때문에 H₂O₂에 대한 sensitivity가 다양하게 나타난다(4, 11, 22). CuZn-SOD는 superoxide anion이 세포막을 통과할 수 없기 때문에 세포 밖이나 periplasm 자체에서 발생하는 superoxide anion을 제거하기 위해서 독립적인 진화를 한 것으로 추정되는데 Fe-SOD와 Mn-SOD와는 아미노산 서열이나 구조가 구별된다(5). 또한 CuZn-SOD는 여러 형태의 SOD들 중 가장 연구가 잘 되어있으며, cyanide나 H₂O₂에 의해서 활성이 억제 된다.

Ni-SOD는 1996년에 방선균의 일종인 *Streptomyces* sp.로부터 니켈을 활성부위 금속으로 가지는 Ni-SOD가 분리되면서 알려졌는데 아미노산 조성과 아미노 말단의 아미노산 서열, immunocross-reactivity에서 다른 세 종류의 SOD와는 다르다(24).

이처럼 SOD는 진핵생물이나 원핵생물에서 산화적 스트레스에 대한 생체 내 방어 작용을 하는 주된 효소로, *E. coli*나 병원성 세균에서 SOD에 관한 연구는 비교적 자세히 잘되어 있지만 유류 오염토양에서 phenanthrene과 같은 난분해성 PAH (polycyclic aromatic hydrocarbon)들을 분해하는 미생물의 SOD에 관한 연구는 거의 이루어진 것이 없는 상태다. PAH들은 aromatic ring들이 두 개 이상 다양한 형태로 결합되어 있는 물질들로서 이들이 분해되는 과정에서 부산물로 많은 양의 활성 산소들이 생산됨을 예상할 수 있다. 이 활성산소들을 제거하는 데에는 SOD가 필수적이므로 PAH 분해 균들의 SOD들은 연구해 볼 가치가 있다.

따라서 본 연구는 유류 오염 토양에서 phenanthrene과 같은 난분해성 PAH들을 분해하는 미생물들 중에서 SOD 활성이 높은 균주로부터 SOD를 순수 정제하여 PAH 분해균주 자신의 산화적 스트레스에 대한 방어 체계 담당하는 SOD들의 특성을 밝히고자 수행되었다.

재료 및 방법

균주 배양

본 실험실에서 유류에 오염된 토양으로부터 분리 동정한 난분해성 PAH들을 분해하는 미생물들 중에서 SOD 활성이 가장 우수한 *Sphigomonas* sp. KS 301 배양을 위해 100 ml의 TSB (Tryptic Soy Broth)에 균을 접종한 후 30°C에서 24-48 시간 200 rpm으로 진탕배양 하였다. 배양 후 다시 4.5 L로 대량 배양하였다. 배양된 세포들을 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 모으고 -70°C에 보관하였다.

재료 및 시약

DEAE-Sepharose FF resin과 Superose-12 10/300, HiPrep 16/10 phenyl (low sub) column (Amersham, USA)들과 Uno Q1 prepacked column (BioRad, USA)은 구입하여 사용하였으며, column들을 이용한 chromatography는 온도가 4°C로 유지되는 저

온실에서 BioRad 사의 Biologic HR workstation을 이용하였다.

효소활성을 비교하기 위하여 사용한 Mn type과 Fe type의 *E. coli* SOD 들은 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다.

효소 정제

얼린 세포를 50 mM potassium phosphate (pH 8.0) 완충용액, 300 mM NaCl에 잘 녹이고, French Press를 이용하여 3회 파괴하였다. 파괴된 세포를 4°C에서 54,000×g로 3시간 원심 분리하여 얻은 상층액을 crude extract로 이용하였다.

Crude extract에 ammonium sulfate를 천천히 가하여 35%로 포화시키고 20,000 rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 취한 후 ammonium sulfate를 다시 75%로 포화되도록 천천히 가하여 완전히 녹이고 20,000 rpm에서 15분간 다시 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 얻은 단백질 침전물을 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액 10 ml로 잘 녹이고 투석 망에 넣어 4°C에서 18 시간동안 완충용액을 3회 바꾸어 가며 투석하여 ammonium sulfate를 제거하였다.

투석한 ammonium sulfate 분획물에 대해 DEAE-Sepharose 크로마토그래피를 실시하였다. DEAE-Sepharose fast flow (2.5×14 cm) resin을 충전하여 1 L의 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액으로 2 ml/min의 유속으로 column을 충분히 평형화시켰다. Ammonium sulfate가 제거된 단백질 분획물을 1.5 ml/min의 유속으로 장전한 후 1 L의 동일 완충용액으로 결합되지 않는 단백질이 완전히 제거되도록 흘려주었다. 수지에 결합된 단백질을 0-350 mM NaCl 농도 구배를 걸어 1.2 ml/min의 유속으로 총 1 L를 흘리면서 7 ml씩 분획하여 SOD 활성을 측정하고 가장 높은 분획들을 모아 다음 과정에 이용하였다.

DEAE-Sepharose 크로마토그래피를 통하여 얻은 각각의 SOD 활성 분획들에 대해 Phenyl-Sepharose 크로마토그래피를 실시하였다. HiPrep Phenyl-Sepharose column (16×10 cm)를 1.2 M ammonium sulfate가 함유된 20 mM Tris (pH 8.0) 완충용액으로 충분히 평형화시켰다. 20 mM Tris (pH 8.0) 완충용액으로 투석한 각각의 SOD 분획물들에 ammonium sulfate를 1.2 M 되게 첨가하여 column에 0.4 ml/min의 유속으로 장전하고 동일 완충용액으로 다시 흘려주었다. 이 과정에서 유출물을 fraction당 4 ml씩 분획한 후 SOD 활성을 측정하고 모았다. 본 연구에 이용된 SOD들은 모두 Phenyl-Sepharose column에 결합하지 않고 관통하거나 세척 과정에서 모두 발견되었으므로, ammonium sulfate 농도 구배를 하지 않았다.

Phenyl-Sepharose 크로마토그래피를 통하여 얻은 SOD 활성분획물들에 대해 Superose-12 10/300 column으로 크로마토그래피를 실시하였다. 먼저 100 mM NaCl이 들어있는 20 mM Tris (pH 8.0) 완충용액 50 ml로 column을 충분히 평형화시켰다. 이때 유속은 0.35 ml/min으로 조절하였다. Phenyl-Sepharose 크로마토그래피를 수행한 각 SOD 시료들을 ultrafiltration (NOVEX 사의 viva spin)으로 농축하고 NaCl과 glycerol이 각각 100 mM, 7% 되게 첨가한 후 column에 장전하고, equilibration과 동일한 조건으로 흘리며 fraction당 0.75 ml씩 수집하였다. Solution

assay를 통하여 SOD 활성이 높은 분획물들을 모아 20 mM Tris (pH 8.0) 완충용액으로 4°C에서 투석하였다.

Superose-12 gel filtration 크로마토그래피를 통해 얻은 SOD 활성이 높은 분획물들에 대해 Uno-Q1 ion exchange 크로마토그래피를 수행하였다. Uno-Q1 column을 20 mM Tris (pH 8.0) 완충용액으로 충분히 평형화시킨 후 투석한 SOD 시료를 0.2 ml/min의 유속으로 장전하고 동일 완충용액으로 세척하였다. 15 ml의 20 mM Tris (pH 8.0) 완충용액으로 세척 한 후 총 15 ml의 0~500 mM NaCl 농도 구배를 걸어 분획 하였다. 각 분획들에 SOD solution assay와 SDS-PAGE를 수행하여 활성과 순수도가 높은 분획을 모아 20 mM Tris (pH 8.0) 완충용액으로 투석하여 NaCl을 제거하고 생화학적 및 물리화학적 특성을 조사하였다.

단백질 정량과 전기영동

단백질 정량은 BSA (Bovine Serum Albumin)을 표준 단백질로 이용하여 Bradford 방법(7)에 따라 595 nm에서 흡광도를 측정하여 수행 하였다.

효소정제 단계마다 SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)로 효율을 측정해 가며, 최종 정제를 확인하였다. 효소를 4× 시료 완충용액 (1 M Tris-HCl; pH 6.8, 3 ml, 70% glycerol 1.4 ml, SDS 0.3 g, β-mercaptoethanol 0.5 ml, bromo-phenol blue 100 μl)과 섞은 후 100°C에서 5 분간 가열하여 변성 처리하였다. 변성 처리한 효소를 12% polyacrylamide separating gel과 5% stacking gel을 이용하여 120 V로 2시간 동안 전기영동을 실시하였다.

SOD 효소활성 측정

Gel-overlay assay

10% 비변성 polyacrylamide 전기영동을 실시한 후 gel을 0.2% nitroblue tetrazolium (NBT)이 포함된 50 mM potassium phosphate (pH 7.8) 완충용액에 담가 실온에서 30분간 천천히 흔들어 주었다. 그 후 28 mM N,N,N',N'-tetra-methylethylenedi-amide (TEMED)와 2.8×10^{-5} M riboflavin이 포함된 50 mM potassium phosphate (pH 7.8) 완충용액에 담근 후 SOD 활성 band가 보일 때까지 형광 불빛을 쬐어주었다(22).

Solution assay

SOD 활성을 간접적으로 측정하는 방법으로 xanthine/xanthine oxidase에 의해 SOD 활성을 cytochrome c와 NBT를 이용하는 두 가지 방법이 있는데 cytochrome c reduction assay (16)을 이용하여 측정하는 것보다 NBT reduction assay (20)를 이용하여 측정하는 것이 2.5배 민감하다고 알려져 있기 때문에 NBT reduction assay를 이용하였다. 100 μM xanthine, 25 μM NBT, 1 mM EDTA를 50 mM potassium phosphate (pH 7.0) 완충용액에 넣어 반응 용액을 만들었다. 여기에 xanthine oxidase을 100 μg 넣어주고 적당량의 SOD를 넣어 반응 용액을 0.5 ml 만들었다. 반응 용액을 30°C에서 20분간 반응시킨 후 560 nm 흡광치로부터 SOD 활성을 측정하였다. SOD의 활성은 xanthine oxidase에 의한 NBT의 환원을 50% 억제하였을 때 1 unit 라고 정의하

였다.

SOD의 특성

SOD의 분자량을 측정하기 위해 정제된 SOD를 12% SDS-PAGE를 실시하고 크기를 알고 있는 표준 단백질들과 비교하여 분자량을 계산하였으며, 더 정확한 분자량을 알기 위하여 MALDI-TOF MS를 이용한 분석을 기초과학지원연구소에 분석을 의뢰하였다. Native 상태의 분자량을 측정하기 위해서 Superose-12 gel filtration 크로마토그래피를 실시하였다. 먼저 여과한 100 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 8.0) 완충용액으로 유속 0.2 ml/min으로 흘러주면서 column을 충분히 평형화시킨 후 표준 단백질들, amylase (200 kDa), alcohol dehydrogenase (150 kDa), bovine serum albumin (68 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), lysozyme (14.4 kDa) (Sigma)과 정제한 SOD들을 각각 장전하여 0.4 ml/fraction으로 받고 standard graph를 그린 후 정제된 SOD들의 복합체 여부를 판단하였다.

SOD의 비활성도 (specific activity)를 비교하기 위해 반응 용액에 정제된 SOD III와 Mn 및 Fe type의 *E. coli* SOD (Sigma)를 각각 20 ng, 40 ng, 60 ng, 80 ng, 100 ng씩 넣고 xanthine oxidase 100 μg을 넣어 30°C에서 20분간 반응시킨 후 560 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

SOD의 종류를 알아보기 위해 정제한 SOD와 Mn type의 *E. coli* SOD에 SOD 활성의 억제 물질인 KCN, H₂O₂, NaN₃ 또는 EDTA를 여러 가지 농도로 반응 용액에 첨가하고 30°C에서 20분간 반응시킨 후 NBT reduction assay로 측정하였다.

SOD 활성의 최적 pH를 알아보기 위해 50 mM sodium acetate (pH 5.0) 완충용액, 50 mM 2-[N-Morpholino]-ethanesulfonic acid (MES)(pH 6.0) 완충용액, 50 mM potassium phosphate (pH 7.0, 7.8) 완충용액, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액, 50 mM glycine (pH 9.0, 10.0) 완충용액을 넣고 NBT reduction assay로 30°C에서 20분간 반응한 후 SOD 활성을 측정하였으며, 열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 reagent들과 xanthine oxidase가 없는 반응 용액에 적당량의 SOD를 넣고 각각 45°C에서 0, 5분, 10분, 15분, 30분 동안 미리 반응시킨 후 xanthine, NBT, xanthine oxidase 넣고 다시 30°C에서 20 분간 반응시킨 후 흡광도 560 nm에서 SOD의 활성을 측정하였다. 또한 분리 정제한 SOD의 최적 온도를 알아보기 위하여 10-60°C까지 다양한 온도에서 NBT reduction assay로 활성을 측정하였다.

결 과

SOD의 순수정제

배양한 *Sphingomonas* sp. KS 301 균을 수확하여 French Press를 이용하여 세포 추출물을 만들고 DEAE-Sepharose 크로마토그래피를 시행하였다. 각 분획물들의 SOD 활성을 측정한 결과 Fig. 1과 같이 다섯 가지의 활성이 발견되었다. 이 활성들은 비변성 PAGE로 전기영동을 한 후 gel overlay assay로 확인 한 결과 Fig. 2와 잘 일치하는 것을 보아 *Sphingomonas* sp. KS

301은 최소한 서로 다른 다섯 가지의 SOD들을 가지는 것으로 사료된다. 즉, Solution assay 상에서의 가장 활성이 높은 분획은 gel overlay assay상에서 가장 굵은 활성 띠로 나타났으며 또한 SDS-PAGE와 비교하였을 경우에도 서로 다른 크기의 SOD 단백질 활성 띠를 발견할 수 있었다. 측정 결과 발견한 다섯 가지의 활성들을 SOD I, II, III, IV, V라고 명명하고 각각 정제 과정에 이용하였다(Fig. 2). 각 SOD 활성을 가지는 분획들을 모아 각각

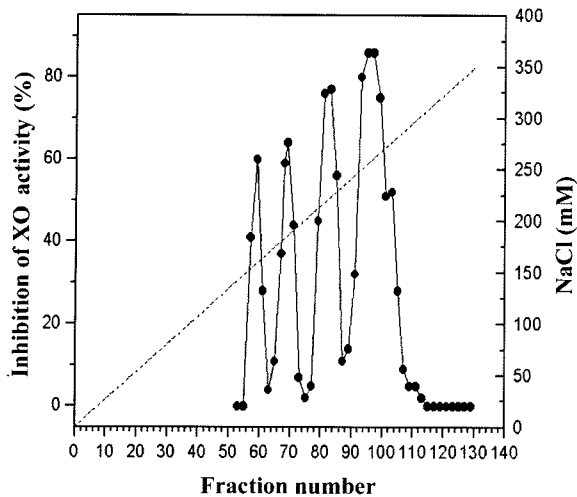


Fig. 1. SOD activity profile after DEAE-Sepharose chromatography.

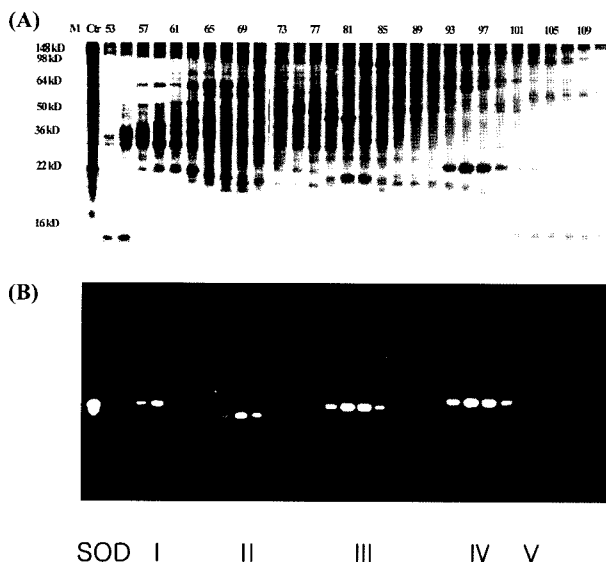


Fig. 2. SDS-PAGE and Gel-overlay assay after DEAE-Sepharose chromatography. (A) The Coomassie-stained SDS-PAGE. Lane M indicates molecular weight standard marker (148 kD; phosphorylase b, 98 kD; bovine serum albumin, 64 kD; glutamate dehydrogenase, 50 kD; alcohol dehydrogenase, 36 kD; carbonic anhydrase, 22 kD; myoglobin red, 16 kD; lysozyme), and lane ctr indicates the crude extract. (B) Gel-overlay assay after native PAGE. The numbers indicate the fraction numbers.

ammonium sulfate 35-75% 포화를 통하여 분획하고 20 mM Tris (pH 8.0) 완충용액으로 하룻밤 투석하였다. 투석한 분획들을 Phenyl-Sepharose 크로마토그래피를 실시하였는데 Phenyl-Sepharose column에는 SOD가 결합되지 않고 관통하여 solution assay를 통해 SOD 활성이 높은 분획을 모아 ultrafiltration으로 농축하고 Superose-12 gel filtration 크로마토그래피를 실시하였다 (Fig. 3A and 3B). 각 분획물 들을 solution assay와 gel overlay assay를 실시하여 SOD 활성이 높은 분획을 모으고 20 mM Tris (pH 8.0) 완충용액으로 하룻밤 투석하여 NaCl을 제거한 후 다섯 가지의 SOD들을 Uno-Q1 ion exchange 크로마토그래피를 실시하였다.

Uno-Q1 ion exchange 크로마토그래피를 실시한 후(Fig. 3C) solution assay와 SDS-PAGE를 이용하여 정제도를 조사해 본 결과 DEAE-Sepharose 크로마토그래피에서 가장 강한 활성을 나타내는 SOD III가 정제되었다. 정제된 SOD III를 SDS-PAGE, 비변성 PAGE 후 Coomassie staining, 그리고 비변성 PAGE 후 gel

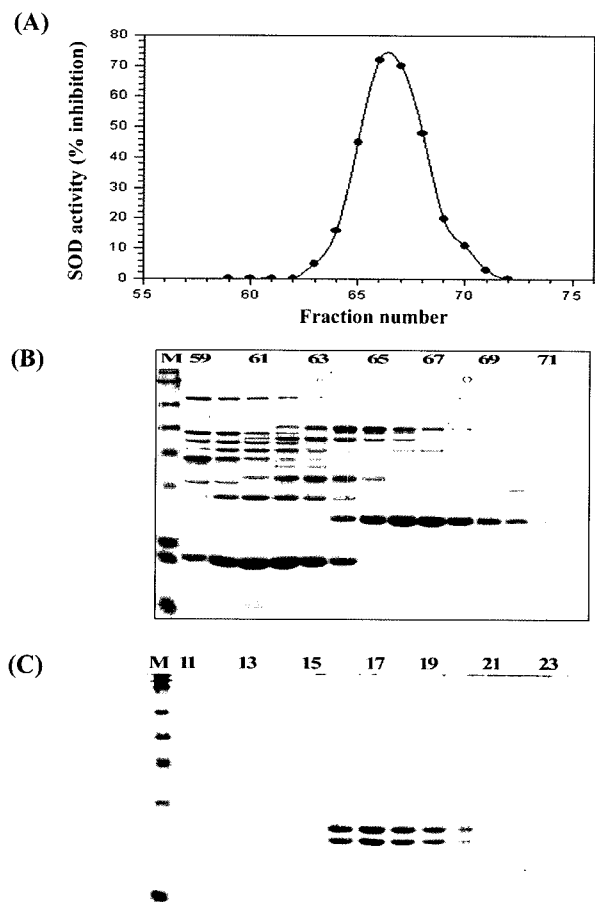


Fig. 3. Superose-12 Gel filtration chromatography of the SOD III. (A) SOD activity profile. (B) Coomassie-stained SDS-PAGE gel. C: Uno Q ion-exchange chromatography of SOD III. Size markers are same as those of Fig. 2. Numbers on top of the gel are fraction numbers.

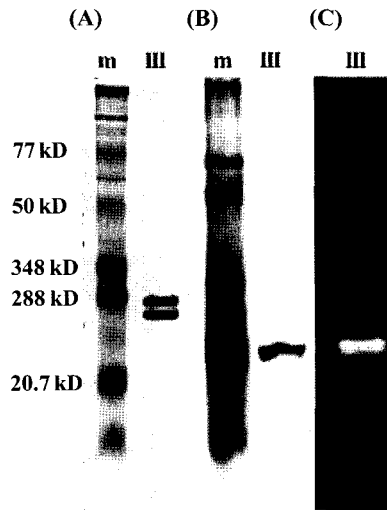


Fig. 4. Gel electrophoresis of the purified SOD III. (A) 12 % SDS-PAGE followed by Coomassie staining, (B) 10 % native-PAGE, (C) gel-overlay assay after 10% native-PAGE. Used molecular weight markers were bovine serum albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, soybean trypsin inhibitor, and lysozyme.

overlay assay를 비교하였다(Fig. 4). SOD III는 비변성 PAGE와 gel overlay assay에서 단일 band를 보였으며, 또한 DEAE-Sepharose 크로마토그래피, Phenyl-Sepharose 크로마토그래피, Superose-12 gel filtration 크로마토그래피 상에서는 단일 band를 보였지만, 여전히 SDS-PAGE상에서 이중 band를 보였다. 따라서 SOD III는 완전히 순수 정제되었다고는 볼 수 없다. 그러나 SDS-PAGE와 비변성 PAGE로부터 다른 SOD들과 크기를 비교해 본 결과 Uno-Q1 ion exchange 크로마토그래피 상의 band 중 작은 단백질이 SOD 활성을 가지는 것으로 나타났다. SOD 분리 정제 단계를 Table 1에 정리하였다. Superose-12 column과 Uno-Q1 ion exchange column을 거치면서 SOD III는 단백질총량은 0.7 mg, 비활성도(specific activity)는 25334 units/mg 이었고 169 배로 정제되었다.

정제된 SOD의 생화학적 특성

SOD의 분자량은 12% SDS-PAGE에서 SOD III는 23 kDa으로 측정되었다. 다시 MALDI-TOF MS를 이용하여 정확한 SOD 분자량을 측정한 결과 22.5 kDa으로 나타나 SDS-PAGE의 결과와

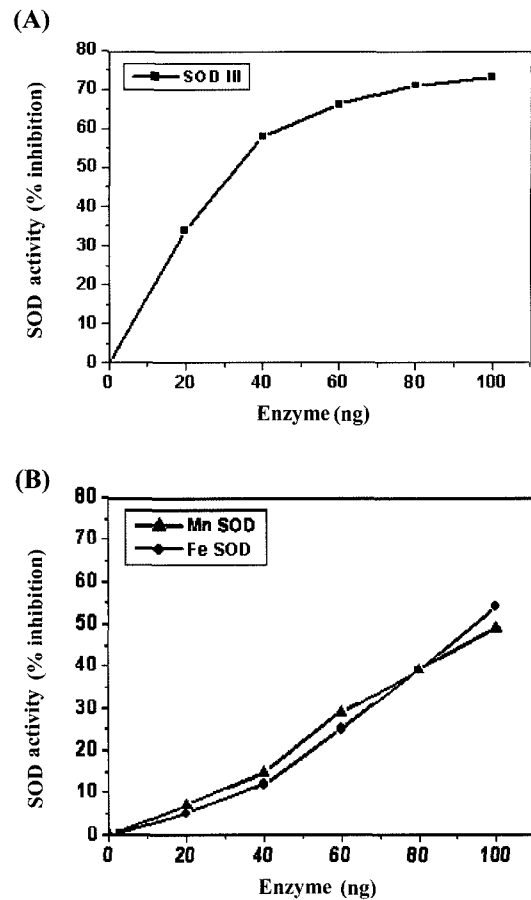


Fig. 5. Dose-dependent activities of the purified SOD III. (A) Purified *Sphingomonas* sp. KS 301 SOD III. (B) *E. coli* Mn-SOD and Fe-SOD.

거의 유사하였다. SOD의 분자구조를 알아보기 위하여 Superose-12 gel filtration 크로마토그래피를 실시한 후 native 상태의 SOD의 크기를 알고 있는 표준 단백질과 비교하였을 때 SOD III는 71 kDa으로 측정되어 정제된 SOD가 최소한 2개 이상으로 이루어진 복합체라는 것을 알 수 있었다.

Sphingomonas sp. KS 301 균주에서 분리 정제한 SOD와 Mn 및 Fe type의 *E. coli* SOD의 농도를 달리 하면서 활성을 측정하고 비교하였다. Fig. 5에서 알 수 있듯이 본 연구에서 정제된 SOD III가 *E. coli*의 SOD들보다 비활성도가 높게 나타났다. 즉 SOD III는 5배 정도 활성이 높게 나타났다. Fig. 5의 결과로 계

Table 1. Purification of SOD III from *Sphingomonas* sp. KS 301

Step	Total protein (mg)	Total activity (10 ³ units)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	1860	280.8	150	100	1
DEAE-Sepharose	103.2	141.9	1376	50.5	9
Phenyl-Sepharose	25.1	120.5	4801	42.9	32
S-12 gel filtration	2.4	62.4	26000	22.2	173
Uno-Q chromatography	0.7	18.6	25334	6.6	169

1 unit is defined as 50% inhibition of xanthine oxidase activity at 30°C for 20 min.

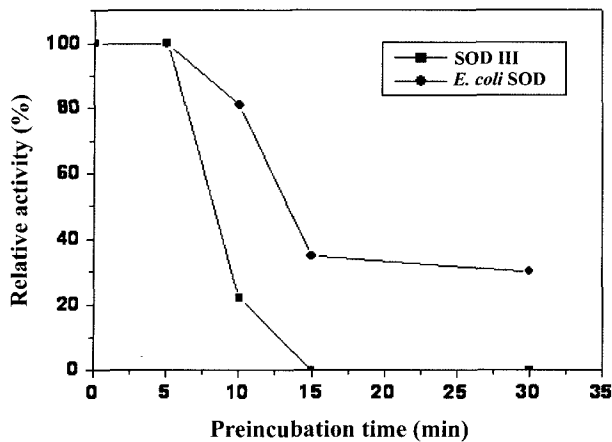


Fig. 6. Heat stability of the purified SOD III at 45°C.

산된 정제된 SOD III의 비활성도는 30,000 U/mg로 나타났다. 이 결과는 SOD III 정제표 (Table 1)와 비교하였을 때와 유사함을 알 수 있다. 또한 xanthine oxidase의 활성을 50% 이상 억제하는 SOD의 양을 넣었을 때는 직선상의 상관관계가 떨어짐을 볼 수 있었다.

정제된 SOD III의 시간 증가에 따른 열에 대한 안정성을 알아보기 위하여 여러 온도에서 배양하면서 5분 간격으로 30분 동안 SOD 활성을 측정하였다. 45°C 이상에서는 SOD 활성이 없다가 45°C 이하부터 SOD 활성을 보였는데 10분 동안 preincubation 시키면 SOD 활성이 20% 감소하고 30분에서는 SOD 활성이 거의 없었다(Fig. 6). 또한 최적의 SOD 활성온도는 20°C인 것으로 나타났다. 정제된 SOD를 각기 다른 pH를 갖는 완충용액을 사용하여 SOD 활성을 측정하는 결과, pH 7.0에서 가장 높은 활성을 보인 반면, pH 6.0 이하에서는 활성이 거의 나타나지 않았으며 pH 8.0 이상에서도 그 활성이 급격하게 감소함을 알 수 있었으므로 매우 좁은 최적 pH 범위를 가졌다고 볼 수 있다(결과 미제시).

Table 2. Inhibition of *Sphingomonas* sp. KS 301 SOD III by NaN_3 , H_2O_2 , and KCN

Inhibitor	Concentration (mM)	Relative activity (%)	Inhibition (%)
None	0	100	0
NaN_3	0.5	93	7
	1	67	33
	10	44	56
H_2O_2	0.5	100	0
	1	100	0
	10	96	4
KCN	0.5	96	4
	1	100	0
	10	100	0

SOD 활성의 억제 물질의 효과

일반적으로 H_2O_2 와 cyanide는 CuZn-SOD의 활성을 억제하고 H_2O_2 와 azide는 Fe-SOD의 활성을 억제한다. Mn-SOD는 azide에 의해 활성이 억제된다. 하지만 cambialistic SOD들은 양상이 다양하다. 정제된 SOD III는 10 mM NaN_3 에서 56% 활성이 억제되었다. 하지만 KCN과 H_2O_2 는 SOD III를 10% 이하 억제시켰다(Table 2). 또한 비교 단백질로 사용한 *E. coli*의 Mn-SOD의 경우에도 NaN_3 에 의해서 활성이 억제되었지만 cyanide와 H_2O_2 에 의해서는 그렇지 않아 정제된 SOD III는 Mn-SOD형이라는 것을 알 수 있었다. 또한 정제된 SOD III가 금속 이온에 영향을 받는 지 알아보기 위해 우선 EDTA에 영향을 받는 지 먼저 확인하였다. 1 mM EDTA, 5 mM EDTA를 반응 용액에 넣어 NBT reduction assay로 SOD 활성을 측정해 보니 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 따라서 다른 금속이온의 영향을 받는 지 여부를 확인하지 않았다.

SOD의 N-말단의 아미노산 서열분석

Sphingomonas sp. KS 301 균주로부터 분리 정제된 SOD를 기초과학연구원 연구소에 의뢰하여 N-말단 아미노산 서열을 분석하였다. 분석 결과를 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)를 이용하여 다른 알려진 균주들의 SOD 아미노산 서열과의 유사도를 살펴보면 SOD III는 분석한 13개의 N-말단 아미노산 서열 중 9개의 N-말단 아미노산 서열이 *Pseudomonas ovalis* 및 *Vibrio cholerae*의 SOD들과 가장 유사하였다(Table 3).

고찰

SOD는 활성산소를 제거하는 항산화제로 다양한 진핵생물이나 원핵생물에서 발견되는 주 효소이며 최근에는 각종 노화 및 질병 치료제로 연구가 활발한 효소 중 하나이다. 본 연구에서는 난분해성 PAHs로 오염된 유류 오염 토양으로부터 분리한 *Sphingomonas* sp. KS 301의 SOD를 순수 정제하여 그 특징을 알아보고자 하였다.

Streptococcus pyogenes type 12가 생산하는 Mn-SOD는 세포외에 SOD를 가지고 있는데 비해(10) *Sphingomonas* sp. KS 301

Table 3. Comparison of N-terminal amino acid sequence of SOD III from *Sphingomonas* sp. KS 301 with bacterial SODs

N-terminal amino acid sequence	
SOD III	MAFVLPDLPYSXD
<i>Pseudomonas ovalis</i> (Fe)	* * * * * * * *
<i>Vibrio cholerae</i> (Fe)	MAFELPPLPYAHD
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Mn)	* * * * * * * *
	MPHALPPLPYAYD

*homologous amino acid sequence.

균주의 SOD 활성은 배양액에서는 나타나지 않은 반면 세포 추출물에서 SOD 활성이 나타났기 때문에 SOD가 세포내에 존재한다는 것을 알 수 있었다. 일반적으로 Mn-SOD와 Fe-SOD는 주로 cytoplasm에 존재하고 CuZn-SOD는 periplasm에 존재한다(17).

Sphingomonas sp. KS 301 균의 세포 추출물을 DEAE-Sephrose 크로마토그래피를 시행하여 SOD 활성을 측정할 결과 다섯 가지의 활성이 발견되었다. 이 활성들은 비변성 PAGE 전기영동을 실시한 후 gel overlay assay를 한 결과 *Sphingomonas* 균은 최소한 서로 다른 다섯 가지의 SOD들을 가지는 것으로 사료된다. *E. coli*의 경우 3가지 SOD를 가지고 있고 *S. aureus*의 경우 2개의 SOD를 가지고 있는 반면 *B. subtilis*의 경우에는 1개의 SOD만 가지고 있다(9, 14).

정제한 SOD의 분자량은 SDS-PAGE, MALDI-TOF, Superose-12 gel filtration 크로마토그래피를 실시하여 분자량을 측정할 결과 SOD III는 2개 이상으로 이루어진 복합체라는 것을 알 수 있었다. Fe-SOD인 경우에는 40 kDa 크기의 dimer나 90 kDa 크기의 tetramer들로 주로 이루어져 있는데 *Desulfovibrio gigas*의 경우 22 kDa으로 이루어진 homodimer이며, Ni-SOD인 *Streptomyces coelicolor*의 경우에는 13.4 kDa의 tetramer를 이루고 있다(11, 21, 24). 일반적으로 bacteria의 SOD들의 분자량은 18.0-22.0 kDa (23)으로 이루어져 있으며 dimer의 형태를 가지고 있는데, 정제한 *Sphingomonas* sp. KS 301의 SOD III는 다른 bacteria의 SOD보다 약간 크며 dimer를 이루고 있는 것으로 보인다.

분리된 SOD들의 종류를 알 수 있는 NaN_3 , H_2O_2 , KCN을 이용한 inhibitor의 효과를 살펴보았는데 SOD III는 10 mM NaN_3 에 의해서 56% 억제되었으며 H_2O_2 와 KCN에 의해서는 10% 미만으로 억제되었다. 일반적으로 CuZn-SOD의 경우 H_2O_2 , KCN에 의해 억제되며 Mn-SOD의 경우 NaN_3 에 의해 억제된다. 또한 Fe-SOD는 H_2O_2 와 NaN_3 에 의해 억제되는데 H_2O_2 에 의한 Fe-SOD의 활성억제는 H_2O_2 와 Fe-SOD의 tryptophane과의 상호작용의 결과로 알려져 있다(19). 따라서 정제한 SOD는 Mn-type으로 보여진다. 2가지 금속을 가지는 cambialistic SOD들은 같은 active site에 2가지 금속이 결합하기 때문에 억제효과가 다양하게 나타난다(11). *Streptomyces* sp.의 Ni-SOD의 경우 NaN_3 에 의해 억제된다는 보고가 있었고(24) *Crithidia fasciculata*의 Fe-SOD는 H_2O_2 와 NaN_3 에 의해 억제된다. 또한 정제한 SOD가 금속 이온에 영향을 받는지 알아보기 위해 우선 EDTA에 영향을 받는지 먼저 확인하였다. 1 mM EDTA, 5 mM EDTA를 반응 용액에 넣어 NBT reduction assay로 SOD 활성을 측정해 보니 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

또한 정제한 SOD들의 열에 대한 안정성을 조사해본 결과 SOD III는 45°C에서 활성이 50% 감소되는 $T_{1/2}$ 이 7-8분으로 짧아 열에 대해 불안정 하였다. 반면에 대조군으로 이용한 *E. coli* SOD는 45°C에서 약 13분의 $T_{1/2}$ 을 가지는 것으로 나타났다. 기존의 알려진 다양한 종들의 SOD들도 그 내열성이 서로 상이하게 보고 되어져 있으며 일반적으로는 열에 안정하지만, 최근에 보고된 *E. coli*의 CuZn-SOD (6), *Streptomyces*의 Ni-SOD들은 열

에 불안정하다고 보고되었다(24). 다양한 온도에서 정제한 SOD의 활성을 측정해 본 결과, 20-30°C 사이에서 가장 높은 활성을 보이며 온도가 올라갈수록 활성이 급격하게 감소하여 40°C 이상에서 50%로 떨어지고, 60°C에서는 그 활성이 전혀 나타나지 않았다. 이 결과는 대조군으로 이용한 *E. coli* SOD나 기존의 알려진 SOD들과 유사하므로, *Sphingomonas* sp.의 SOD도 활성을 위한 최적온도가 낮음을 알 수 있다. 정제한 SOD는 pH 7.0에서 가장 높은 활성을 가지는 매우 좁은 최적 pH 범위를 갖는 것으로 보였으며 이는 pH 3~9까지의 pH 범위를 가지는 *Desulfovibrio gigas*의 Fe-SOD (11)와 pH 7~10의 범위를 가지는 *Fasciola hepatica*의 CuZn-SOD (15)들과 상이하게 나타났다.

PAH들에 오염된 유류 오염 토양에서 분리한 *Sphingomonas*는 PAH 분해에 관한 연구는 많았지만 *Sphingomonas* 균주 자체가 가지고 있는 SOD에 관한 연구는 없었다. 본 실험을 통해 *Sphingomonas* sp. KS 301은 기존의 알려진 세균들과는 달리 5가지의 SOD 활성을 가지고 있는 것으로 나타났으며, 정제한 SOD III는 Mn type의 SOD로 사료된다.

감사의 말

이 연구는 2006학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 수행되었음.

참고문헌

- Adelman, R., R.L. Saul, and B.N. Ames. 1989. Oxidative damage to DNA: Relation to species metabolic rate and life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2706-2708.
- Ames, B.N. 1983. Dietary carcinogens and anti-carcinogens. *Science* 221, 1256-1264.
- Amstad, P. and D. Cerutti. 1990. Genetic modulation of the cellular antioxidant defense capacity. *Environ. Health Perspect.* 88, 77-82.
- Barriere, C., R. Bruckner, and R. Talon. 2001. Characterization of the single superoxide dismutase of *Staphylococcus xylosum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4096-4104.
- Benov, L., L.Y. Chang, B. Day, and I. Fridovich. 1995. Copper, zinc superoxide dismutase in *Escherichia coli*: periplasmic location. *Arch. Biochem. Biophys.* 319, 508-511.
- Benov, L.T. and I. Fridovich. 1994. *Escherichia coli* expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 269, 25310-25314.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Chung, H.J., E-J. Kim, U. Park, and J-H. Roe. 1995. Isolation and genetic mapping of paraquat-resistant sporulating mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J. Microbiol.* 33, 215-221.
- Clements, M.O., S.P. Watson, and S.J. Foster. 1999. Characterization of the major superoxide dismutase of *Staphylococcus aureus* and its role in starvation survival, stress resistance and pathogenicity. *J. Bacteriol.* 181, 3898-3903.
- Dieter, G., R. Werner, and V. Stefan. 1998. Extracellular superoxide dismutase from *Streptomyces pyogenes* type 12 strain in man-

- ganesedependent. *FEMS Microbiol. Lett.* 160, 217-224.
11. Dos Santos, W. G., I. Pacheco, M.Y. Liu, M. Teixeira, A.V. Xavier, and J. Legall. 1999. Purification and characterization of an iron superoxide dismutase and a catalase from the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio gigas*. *J. Bacteriol.* 182, 796-804.
 12. Farr, S.B. and T. Konomi. 1991. Oxidative stress responses of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* 55, 561-585.
 13. Hassan, H.M. 1989. Microbial superoxide dismutases *Adv. Genet.* 26, 65-97.
 14. Inaoka, T., Y. Matsumura, and T. Tsuchido. 1998. Molecular cloning and nucleotide sequence of the superoxide dismutase gene and characterization of its product from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180, 3697-3703.
 15. Kim, T.S., Y. Jung, B.K. Na, K.S. Kim, and P.R. Chung. 2000. Molecular cloning and expression of Cu/Zn-containing superoxide dismutase from *Fasciola hepatica*. *Infection Immunity* 68, 3941-3948.
 16. McCord, J.M., B.B. Keele, Jr., and I. Fridovich. 1971. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: The physiological function of superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 1024-1027.
 17. Merkamm, M. and A. Guyonvarch. 2000. Cloning of the *sodA* gene from *Corynebacterium melassecola* and role of superoxide dismutase in cellular viability. *J. Bacteriol.* 183, 317-322.
 18. Misra, H.P. and I. Fridovich. 1978. Inhibition of superoxide dismutases by azide. *Arch. Biochem. Biophys.* 189, 317-322.
 19. Parker, M.W. and C.C.F. Blake. 1988. Iron- and manganese-containing superoxide dismutases can be distinguished by analysis of their primary structures. *FEBS* 229, 377-382.
 20. Ravindranath, S.D. and I. Fridovich. 1975. Isolation and characterization of a manganese-containing superoxide dismutase from yeast. *J. Biol. Chem.* 250, 6107-6112.
 21. Steinman, H.M. 1985. Bacterocuprein superoxide dismutase in pseudomonads. *J. Bacteriol.* 162, 1255-1260.
 22. Yamakura, F., I. Matsumoto, and K. Terauchi. 1991. Isolation of Mn-SOD and low active Fe-SOD from *Methylobacterium J*; consisting of identical proteins. *Free Radical Res. Commun.* 12-13, 329-334.
 23. Yost, F.J. and I. Fridovich. 1973. An iron-superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 248, 4905-4908.
 24. Youn, H-D., E-J. Kim, J-H. Roe, Y.C. Hah, and S-O. Kang. 1996. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem. J.* 318, 889-896.

(Received April 2, 2007/Accepted April 27, 2007)

ABSTRACT : Purification and Characterization of Superoxide Dismutase in *Sphingomonas* sp. KS 301
Hee Jeong Kang, Jae Hoon Jeong, Ji-Hye Choi, and Seung-Yeol Son^{1*} (Department of Microbiology, and ¹Institute of Basic Sciences, Dankook University, Cheonan 330-714, Republic of Korea)

Sphingomonas sp. KS 301, which was isolated from oil contaminated soil, was shown to have five different SODs (SOD I, II, III, IV, V) which can be separated by DEAE-Sepharose chromatography, and SOD III was finally purified in this study by ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sepharose chromatography, Superose 12 gel filtration and Uno-Q1 ion exchange chromatography. The molecular weight of SOD III was 23 kDa as determined by SDS-PAGE and the apparent molecular weight of the native enzyme was estimated to be approximately 71 kDa by Superose-12 gel filtration chromatography. These data suggest that the purified SOD consists of at least two subunits. The specific activity of the SOD III was higher than Mn type or Fe type SOD of *Escherichia coli* by 5 fold. To determine the type of SOD III, inhibitory effects of NaN_3 , H_2O_2 , and KCN were examined. 10 mM NaN_3 was able to inhibit 56% of the SOD III activity, which indicates that this SOD is Mn type. The optimum pH of the SOD III was 7.0 and the optimum temperature was 20°C. N-terminal amino acid sequence of purified SOD III was most similar to those of *Pseudomonas ovalis* and *Vibrio cholerae* among bacteria.