J. Appl. Biol. Chem. **54**(2), 94-100 (2011)

Article

*Bacillus licheniformis*로 부터 분리된 phospholipase D 유전자의 발현 및 생화학 특성

강한철* · 윤상홍 · 이창묵 · 구본성

농촌진흥청, 국립농업과학원, 기능성물질개발과

Expression and Biochemical Characteristics of a *Phospholipase D* from *Bacillus licheniformis*

Han-Chul Kang*, Sang-Hong Yoon, Chang-Muk Lee, and Bon-Sung Koo

Department of Functional Bio-material, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

Received April 21, 2011; Accepted May 23, 2011

A gene encoding a putative phospholipase D was isolated from *Bacillus licheniformis* and cloned into pGEM-T easy vector. The gene was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) using a pET-21(a) vector containing His6 tag. Affinity purification of the recombinant phospholipase D with nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) resin resulted major one-band by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis. The purified enzyme showed a molecular weight of 44 kDa. The optimum activity of enzyme was around pH 7.0 and the enzyme was also the most stable around this condition. The optimum temperature was about 40-45°C and the enzyme still showed considerable activities at wide range of temperature. Among various detergents, Triton X-100 significantly increased the enzyme activity, resulting in 181% activity of control at 0.6 mM of the detergent. Calcium ion did not significantly affect the enzyme activity, suggesting that the enzyme might be classified into Ca^{2+}-independent PLD.

Key words: *Bacillus licheniformis,* phospholipase D

서 론

· Phospholipase D (PLD; EC 3.1.4.4)는 phospholipase의 일종이며 cardiolipin synthases, phosphatidylserine synthases, 일부 endonucleases 들을 포함하는 superfamily의 member이다. 다른 종류의 phospholipase [A, B, 또는 C]와 달리 D형인 PLD는 최초에 carrot, cabbage, castor bean 등의 식물체로부터 분리되고 특성이 연구되어 왔다. PLD의 역할과 관련하여 과거에는 식물체와 포유류에서의 signal transduction 에서의 중요한 역할에 대하여 많은 관심을 가져 왔다. 그러나 PLD의 기능이 점점 더 밝혀져서 transmembrane signaling 이외에도, intracellular protein trafficking, secretion, cell morphology의 변화, membrane degradation, reorganization 및 cell regulation 등 다양한 기능을 수행하는 것으로 알려지고 있다[Takami 등, 1994; Exton, 2002; Wang, 2004]. PLD는 두가지 반응을 수행할 수 있다. 첫번째는 phospholipid를 가수분해시켜 phosphatidic acid와 free alcohol을 만드는 반응. 즉, phosphatidylcholine과 같은 phospholipid를 분해시킬 경우 phosphatidic acid와 choline 이 형성된다. 두번째로는 phosphatidyl group을 여러 종류의 phosphatidyl alcohols에 부착시키는 transphosphatidylation 반응을 수행한다[Waite, 1999; Liscovitch 등, 2000]. PLD에 의하여 생성되는 이러한 두가지 반응은 서로 경쟁관계에 있으며 transphosphatidylation 반응에 의해 생성된 화합물들이 종종 PLD에 의해 분해가 되기도 한다[Juneja 등, 1988]. Glycerophospholipid의 경우에는 이 효소들이 두 종류의 acyl ester 분해를 촉매시키며(phospholipase A1 및 A2) 또한 두 종류의 phosphate ester 결합을 분해시킨다(phospholipase C 및 D).

거의 대부분의 PLD superfamily는 잘 보존된 부위인 HxKxxxxD를 가지고 있으며 이 부위를 HKD motif라고 한다[Waite, 1999; Jenkins 와 Frohman, 2005]. 식물세포에서 발견되는 PLD는 PX 및 PH 부위를 가지고 있는데 이 부분은 단백질의 membrane targeting 및 polyphosphoinositide signaling에 관여한다[Ulbrich-Hofmann, 2000; Qin와 Wang, 2002; Leeuwen 등, 2004]. 그러나 미생물의 PLD 들은 이러한 조절 부위가 없는 것으로 현재까지 알려지고 있다. 미생물의 PLD는

*Corresponding author
Phone:+82-31-299-1694; Fax:+82-31-299-1672
E-mail: hckang09@korea.kr

doi:10.3839/jabc.2011.017

*Streptomyces*로 부터 비교적 연구가 많이 된 편이다[Shimbo 등, 1993; Iwasaki 등, 1994; Ogino 등, 1999; Hatanaka 등, 2002]. 일부 포유류 및 식물체 또는 yeast의 PLD 종류들[Qin 등, 1997; Sciorra 등, 1999]은 phosphoinositide 결합부위를 갖추고 있으며 이는 calcium 과의 결합을 통하여 효소활성에 관여하는 것으로 알려지고 있다[Zheng 등, 2000]. PLD 연구가 비교적 많이 이루어진 bacteria인 *Streptomyces* 종으로부터 분리된 일부의 PLD는 기존의 PLD와는 다르게 두 종류의 금속이온(철 및 망간)을 보효소로 함유하는 것으로 알려지고 있다[Zambonelli 등, 2003]. 대부분의 *Streptomyces*의 PLD들은 Ca^{2+}의 농도에 무관하게 효소 반응이 이루어지는데 반하여 *S. chromofuscus*의 PLD 들은 Ca^{2+}에 의해 효소 활성이 촉진될 정도로 미생물 자원의 PLD는 그 특성이 다양한 것으로 판단되고 있다[Yang과 Roberts, 2002]. Bacteria의 PLD 들이 대부분 세포외 배출 단백질인 경우가 많으며 N-terminal signal sequence를 갖추고 있으나 식물체, 효모, 포유류의 PLD들은 이러한 sequence가 없다. 분자량의 경우에 있어서 *Streptomyces hachijoensis*의 PLD 경우는 적은 것이 16 kDa에서[Okawa과 Yamaguvhi, 1975] 대부분의 40-70 kDa까지 분포하고 있으며 [review; Wang, 2004; Jenkins와 Frohman, 2005] *Homo sapiens*는 120 kDa [Sung 등, 1999]에 이를 정도로 다양하게 알려지고 있다. 한편 PLD는 생체내에서의 다양한 역할 이외에도 생물공정산업에서 여러 종류의 phospholipid 전이반응을 촉매시키는데 이용되어 오고 있다[Servi, 1999; Ulbrich-Hofmann 2000; Maria 등, 2007]. 그 외에도 식품 가공에서 emulsifier 유사체 물질인 lysolecithin 또는 monoglyceride 등의 생산에도 활용되고 있다[Maria 등, 2007]. 일반적으로 식물체에서 추출된 PLD는 열에 약한 경우가 많아[Lambrecht와 Ulbrich-Hofmann, 1992] 생물공정에 활용하기에 부적절한 것으로 알려지고 있다. 현재까지 PLD 관련 유전자들은 bacteria에서 포유류 동물에 이르기까지 다양한 재료에서 분리가 되었다. 그러나 미생물에서는 PLD가 대부분 *Streptomyces*에서 연구가 많이 되고 상대적으로 다른 미생물에서의 연구는 대체로 부족한 편이다. 지금까지 많은 종류가 알려진 고등 동식물의 PLD는 비교적 생체내에서의 기능이 많이 알려져 왔으나 bacteria의 PLD는 기능이 거의 알려지지 않고 있다. 또한 박테리아의 PLD는 산업적으로 유용하게 이용될 수 있는 가능성까지도 있다. 따라서 본 연구에서는 bacteria의 일종인 *Bacillus*에서 PLD 유전자를 분리하여 *E. coli* 에서 발현시킨 다음 순수 분리하여 그 생화학 특성을 조사한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건. 본 실험에서 사용된 *Bacillus licheniformis* (KACC 10476)는 Korean Agricultural Culture Collection (KACC)에서 분양을 받았으며 beef extract 1.0 g/L, yeast extract 2.0 g/L, peptone 5.0 g/L 및 NaCl 5.0 g/L로 제조된 배지에서 배양하였다. *E. coli*는 tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L 및 NaCl 10 g/L으로 조성된 배지에 100 μg/mL의 ampicillin을 투여하여 배양하였다. *E. coli* DH5α는 *Bacillus*로 부터 분리한 PLD 후보 유전자의 클로닝에 이용 되었으며 T7 RNA polymerase 유전자를 보유하고 있는 *E. coli* BL21 (DE3)는 분리된 유전자의 발현에 이용되었다.

PLD 유전자의 클로닝. *Bacillus* 균주는 30°C에서 150 rpm의 속도로 24 시간 동안 진탕 배양한 후 원심분리에 의해 회수하였다. 전체의 genomic DNA는 genomic DNA 분리 kit (Bioneer, Daejon, Korea)를 사용하여 분리하였으며 -20°C에 보존하면서 실험에 사용하였다. *Bacillus*로 부터의 PLD 후보 유전자는 NCBI 유전자은행(1191 bp; NCBI, GI3028580)을 참조하여 선정하였다. PLD 유전자를 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 분리하기 위하여 sense primer 로서 5-ttg gtg ccg ctt atg att atg gta-3을 그리고 antisense primer 로서 5'-taa aaa gaa tga aat cga ttt cgc-3를 이용하였다. 증폭되는 유전자는 발현벡터에서 His-6 재조합 단백질을 만들기 위하여 stop codon을 제거하도록 프라이머를 구성하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 5분 동안 denaturation, 58°C에서 20초 동안 annealing, 72°C에서 1분 30초 동안 amplification의 과정을 25회 반복하여 수행하였다. 증폭된 유전자를 pET-21(a) 발현 벡터에 삽입시키기 위하여 N-terminal의 시작 부위에 *Nde* I을 부착하기 위한 2차 PCR을 시도하였으며 이때 sense primer로서 5'-cat atg gtg ccg ctt atg att atg-3'(밑줄 부분은 *Nde* I 적응부위)을 이용하였고 antisense primer는 1차 PCR에서와 같은 primer를 사용하였으며 PCR 조건도 같았다. 이렇게 얻어진 PCR 산물은 분리하여 pGEM-T Easy vector (Promega, Sanfrancisco, CA)에 결합시킨 다음에 *E. coli* DH5α 세포에 형질전환 시켰다. 형질전환된 대장균은 ampicillin (100 μg/mL), isopropyl β-D-thiogalacto-pyranoside (IPTG; 0.5 mM) 및 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galacto-pyranoside (75 μg/mL)를 함유하는 agar 함유 고체 배지에서 37°C 조건으로 24시간 동안 배양하였다. PLD 유전자를 함유하는 벡터는 상업용 plasmid 분리 kit (DyneBio, Daejon, Korea)를 사용하여 분리한 후 DNA sequence 분석에 의하여 목적 유전자의 삽입을 확인하였다. 목적하는 유전자가 삽입된 pGEM-T easy vector는 *Nde* I 및 *Sal* I으로 분해시켜 삽입 유전자를 추출한 후 역시 같은 제한 효소들로 절단시킨 pET-21(a)에 결합시켰다. 이렇게 만들어진 발현벡터는 pET-21-pld 로 명명하였다.

PLD 유전자의 발현 및 조단백질 추출. pET-21-pld는 *E. coli* BL21 (DE3) 세포에 형질전환 시킨 후 ampicillin 함유 LB-agar 배지에서 배양하였다. 선발된 colony는 같은 액체 배지에서 A_{600}가 0.5가량 될 때까지 배양한 후 충분한 량의 단백질을 얻기 위해 200 mL의 배지에 접종하였다. 두 시간의 추가 배양 이후 1 mM의 IPTG를 첨가하고 27°C에서 50 rpm의 조건으로 10시간 동안 배양하였다. 배양된 균체는 원심분리에 의해 회수한 후 완충용액 A (20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 500 mM NaCl, 및 5 mM imidazole)로 씻어냈다. 세포들은 같은 완충액으로 현탁 시킨 후 초음파의 방법으로 파쇄시키고 상온에서 원심분리 (10,000 g, 10분)의 방법에 의해 상등액을 회수 하였다.

PLD의 친화 크로마토그라피 분리. 50 mL의 완충액 A에 녹인 조단백질은 Ni(II) 이온으로 charge시키고 같은 완충액으로 충전시킨 nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) resin column

(1×10 cm)에 통과시켰다. 컬럼은 완충용액 B (20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 500 mM NaCl, 및 80 mM imidazole)로 씻어냈고 이어서 resin에 결합된 단백질은 추출용 완충용액(50 mM Tris-HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 및 50-1000 mM imidazole linear gradient)을 이용하여 0.5 mL/min 의 비교적 느린 속도로 용출시키며 단백질 분획을 회수하였다. PLD를 함유하는 단백질 분획은 효소 활성도를 측정하여 추적하였다. 효소 활성도를 갖는 단백질 분획들은 완충용액 C (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 20% glycerol, 및 2 mM EDTA)를 이용하여 4°C에서 12시간 동안 투석시켰다. 이중에서 효소 활성도가 가장 높은 분획을 이용하여 전기영동 분석 및 각종 생화학 실험을 수행하였다.

PLD의 효소활성 측정. PLD의 효소활성도는 D'Arrigo 등의 방법[1955]에 따라 spectrophotometry의 방법에 의해 측정하였다. 즉, 효소반응은 50 mM Tris-HCl (pH 7.0), 10 mM $CaCl_2$, *p*-nitrophenylphosphocholine (25 μmol), 2.5 unit의 phosphatase (from potato, Sigma, St Louis, Missouri) 용액을 이용하였다. 효소반응은 기질과 효소를 첨가하여 시작하였고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 100°C에서 5분간 처리하여 효소반응을 중단시켰다. Phosphatase에 의하여 유리된 *p*-nitrophenol의 생성량은 400 nm를 측정하여 계산 하였다. 효소 활성도 1 unit은 1분 동안에 1 μmol의 *p*-nitrophenol을 생산하는 효소의 량으로 정의하였다.

효소의 활성도 및 안정화도에 미치는 pH, 온도 및 양 이온의 영향. 효소 반응에 미치는 pH 효과에 있어서 pH 5.0-7.0은 potassium phosphate를 사용하였고 pH 7.0-11.0은 Tris-HCl 완충용액을 사용하였다. 이와 같이 효소 반응을 위한 완충용액만 다르게 한 후 효소 반응은 상기와 같이 표준 효소반응 측정법으로 활성도를 측정하였다. pH 변화가 효소의 안정성에 미치는 영향을 실험하기 위하여 분리된 효소 분획 100 μL를 서로 다른 완충액에 녹였으며 이때 사용된 완충액의 pH 범위는 4.0에서 10.0까지 였다. pH 4.0에서 5.0까지는 citrate phosphate를 pH 6.0 에서 7.0까지는 potassium 완충액을 그리고 pH 8.0에서 11.0까지는 Tris-HCl 완충액을 사용하였다. 이렇게 서로 다른 완충용액에 녹인 효소는 실내온도(약 25°C)에서 4시간 동안 보존하였다. 잔여 활성도를 측정하기 위하여 50 μL를 회수한 후 pH 7.0에서 표준 효소활성 측정 방법에 의해 PLD의 효소 활성도를 측정하였다. PLD의 효소 활성도에 미치는 온도효과는 최적 pH 조건 하에서 15°C에서 50°C의 범위의 서로 다른 온도에서 효소 반응을 시킨 후 표준 효소활성도 측정법으로 잔여 활성도를 측정하였다. 나머지 모든 조건은 표준 활성도 측정법에 의하여 활성도를 측정하였다. PLD의 효소활성에 미치는 2가 금속이온의 영향은 표준 활성도 측정법의 조건에서 금속이온을 첨가하는 방법에 의하였고 나머지 모든 조건은 같았다. 금속이온으로서는 Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, 및 Fe^{2+} 를 비금속성 양이온으로는 K^{+} 및 Ca^{2+}를 사용하였다.

기타 분석 방법. 단백질 농도는 Bradford[1976]의 방법에 준했으며 표준 단백질로 bovine serum albumin을 사용 하였다. 전기영동(SDS-PAGE)은 Laemmli [1970]의 방법에 따라서 5%의 stacking gel과 12.5%의 resolving gel을 사용하였고 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 단백질들을 염색하였다.

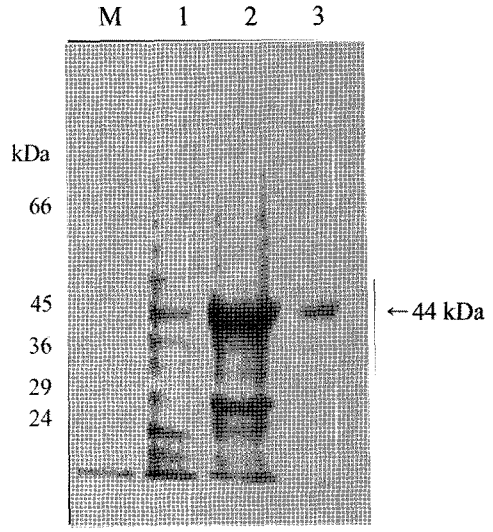

Fig. 1. SDS-PAGE analysis of a PLD from *B. licheniformis*. Lane M, molecular mass markers; lane 1, crude extract from *E.coli* BL21 (DE3) harboring pET-21 vector without insert gene (*i.e.*, vector control); lane 2, crude extract from *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pET-21-pld; lane 3, the PLD purified by affinity chromatography using Ni-NTA resin.

결과 및 고찰

PLD의 *E. coli* 내에서의 발현 및 단백질 분리. 발현 벡터에 삽입된 PLD 유전자로부터 보다 충분한 양의 단백질을 얻기 위하여 발현벡터가 삽입된 *E. coli* BL21 (DE3)을 일반적인 배양조건인 200 rpm, 37°C에서 배양하였고 IPTG를 이용하여 단백질을 과량 발현시켰다. 그러나 이 조건에서 발현시킨 PLD는 응집체가 생성되는 것으로 판단되었다. 따라서 *E. coli*는 보다 낮은 온도인 27°C의 조건에서 비교적 느린 속도인 50 rpm으로 교반하면서 배양하였으며 이러한 조건에서 용해성 단백질을 얻어냈다. 단백질이 발현되는 균체는 2시간 간격으로 16시간 까지 표본을 채취하고 효소 활성도를 측정한 결과 이러한 조건에서는 10시간 가량 발현시킬 때 16.8 U/mg protein 을 나타내 상대적으로 가장 많은 PLD가 생성되는 것으로 판단 되었다. 따라서 이 조건에서 발현시킨 단백질은 세포내에 상당히 높은 비율로 축적된 상태이기 때문에 친화크로마토그라피로 비교적 쉽게 분리 되었다(Fig. 1). 분리된 단백질 분획중에서 효소 활성도가 가장 높은 분획을 환원제인 β-mercaptoethanol로 처리하여 전기영동을 시도하였으며 약 44 kDa의 주요 단일 밴드를 나타내고 있다. 이러한 분자량은 NCBI data bank 에서 유추된 45358 Da과 상당히 근접된 결과를 나타내고 있다. 분리된 단백질은 약 16.5 U/mg protein의 specific activity를 나타내었다. 방선균의 일종인 *Shewanella* sp 또는 다른 박테리아인 *Streptomyces* sp. YU100에서 분리된 PLD의 분자량은 각각 64 및 70 kDa [Tsuruta 등, 2007; Lee 등, 2009]의 분자량을 보여 본 실험에서 분리된 PLD와 차이를 보이고 있다. 그러나 다른 bacteria인 *Streptomyces tendae*의 PLD는 43 kDa의 분자량을 나타내 본 실험의 PLD와 상당히 비슷한 결과를 보이고 있다

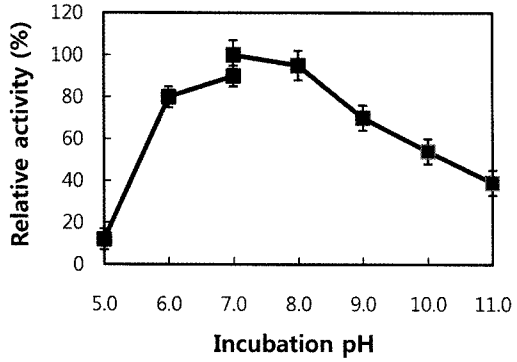

Fig. 2. pH effect on the PLD activity of *B. licheniformis*. The reaction mixture was consisted of potassiume phosphate for pH 5.0-7.0 and Tris-HCl for pH 7.0-11.0. Maximum activity was considered as 100%, equivalent to 15.4 U/mg protein.

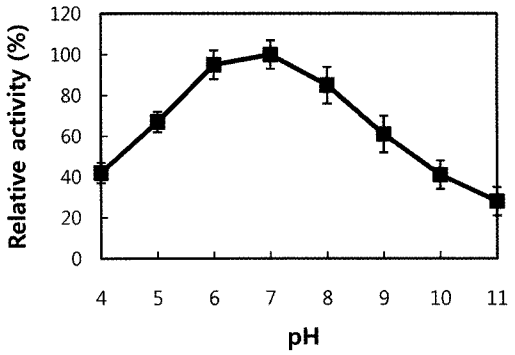

Fig. 3. pH stability of the PLD from *B. licheniformis*. The PLD preparation was suspended in different buffers ranging from pH 4.0 to 11.0; 50 mM citrate phosphate buffer for pH 4.0-5.0, potassium phosphate for pH 6.0-7.0, and Tris-HCl for pH 8.0-11.0. After 4 h standing, each aliquot was withdrawn and the enzyme activity was measured under standard assay condition. Maximum activity at pH 7.0 was considered as 100% activity equivalent to 14.2 U/mg protein. Each point represents the average of three experiments.

[Simkhada 등, 2007]. 한편 박테리아의 일종인 *Corynebacterium pseudotuberculosis*의 PLD는 상당한 독성을 나타내며 인체내에 침투할 경우 macrophage의 사멸에 관련되는 것으로 알려져 있다[Mckean 등, 2007]. 이와같이 membrane을 공격하는 단백질의 경우 일반적인 발현 벡터를 이용하여 *E. coli* 에서의 발현시킬 때 어려움을 겪는 경우가 종종 있다. 그런데 본 실험에서는 PLD가 용해성 상태로 발현되었는데도 균주가 지속적으로 성장한 점으로 보아 본 실험의 효소와 약 41% homology를 보이며 독성을 나타내는 *C. pseudotuberculosis* 의 PLD 와는 서로 다른 것으로 판단된다.

최적 pH 및 pH 안정성. PLD의 활성도에 미치는 pH 효과를 시험하기 위하여 pH 5.0에서 11.0까지의 서로 다른 pH 조건에서 효소 활성도를 측정하였다(Fig. 2). 최적 활성도는 pH 7.0 근처에서 나타났으며 pH 9.0의 조건에서도 여전히 최대 활성도의 65%를 보였다. 약산성인 pH 6.0에서는 약 80%의 효소 활성도를 나타내었고 pH 5.0에서는 매우 낮은 효소 활성도를 나타내고 있다. 이와 같이 전체적으로 볼 때 산성 pH 보다는 중성 및 약 알칼리성 pH 조건에서 보다 높은 효소 활성도를 나타내고 있다. 이러한 최적 pH는 *Actinomycetes* 에서 분리된 PLD와 비슷한 결과를 나타내고 있다[Lim 등, 2002]. 한편 *Streptomyces* 의 PLD 들은 대부분 최적 PH가 7.0 또는 8.0을 나타내어[Imamura 와 Horiuti, 1979; Simkhada 등, 2007] 본 실험에서와 약간의 차이만을 보이고 있다. PLD의 안정성에 미치는 pH 의 효과를 여러 pH 범위에서 조사하였으며 비교적 충분한 시간인 4시간 동안의 처리 이후 표준 효소 활성도 측정법으로 활성도를 조사한 결과가 Fig. 3과 같다. 잔여 활성도를 측정하였을 때 PLD는 전반적으로 산성 또는 알칼리성 보다는 중성 pH에서 비교적 안정함을 보이고 있다. 이 효소는 pH 7.0 에서 가장 안정 하였으며 pH 8.0에서도 여전히 82%의 잔여 활성도를 보이고 있다. 한편 비교적 산성인 pH 5.0 또는 알칼리성인 pH 9.0으로 pH 가 변화할 경우 각각 64 및 60%의 잔존 활성도를 나타내어 점점 효소의 안정도가 떨어짐을 알 수 있었다.

최적 온도 및 열 안정성. 분리된 PLD의 최적 온도를 시험하기 위하여 표준 효소 활성도 측정 조건에서 온도만 다르게 효소 활성을 측정하였다(Fig. 4). PLD 는 40-45°C에서 최적 활성

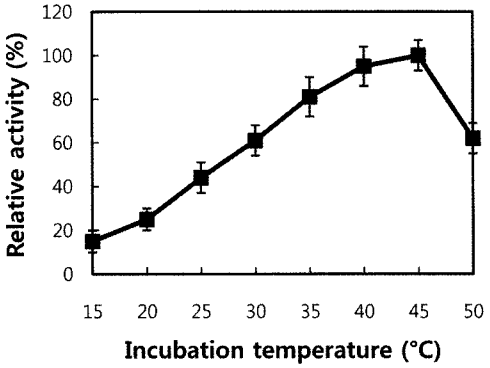

Fig. 4. Effect of temperature on the PLD activity of *B. licheniformis* The PLD activity was measured at different temperatures under the standard assay condition. The maximum activity was observed at 45°C, thus this activity was considered as 100% activity, which was equivalent to 15.6 U/mg protein. Each point represents the average of three experiments.

도를 나타내었고 비교적 넓은 범위의 온도에서 상당히 높은 효소 활성도를 나타내었다. 비교적 높은 온도인 50°C의 온도 조건에서도 최대 활성도의 약 60%의 효소 활성도를 나타내었다. 그러나 25°C의 온도 조건 에서는 약 45%의 효소 활성도를 나타내었다. 따라서 분리된 효소는 일반적인 효소의 최적 온도인 37°C보다 조금 높은 온도에서 최적 활성도를 보이는 특성을 나타내고 있다. 다른 bacteria인 *Streptomyces* 종류에서 분리된 PLD 들도 비교적 높은 온도에서 최적 활성을 보이고 있어 본 실험과 비슷한 결과를 나타 내었다 [Juneja 등, 1988; Hatanaka 등, 2002; Simkhada 등, 2007]. 분리된 효소의 열 안정성은 효소를 45, 55, 및 65°C의 온도에서 일정시간 동안 보존한 다음 잔여 활성도를 측정하는 방법으로 실험하였다(Fig. 5). 이러한 온도에서 20분 동안 열처리시킨 이후의 잔여 활성도는 각각 73, 51, 33%의 활성도를 나타내었다. 그러나 30분 동안의 열처리 이후에는 각각 33, 24 및 12%의 잔여 활성도를 나타내었다. 따라서 분리된 효소는 열 안정성에 있어서 *Streptomyces*에서 분리된 PLD 와 비슷한 수준으로 평가된다[Shimkada 등, 2007].

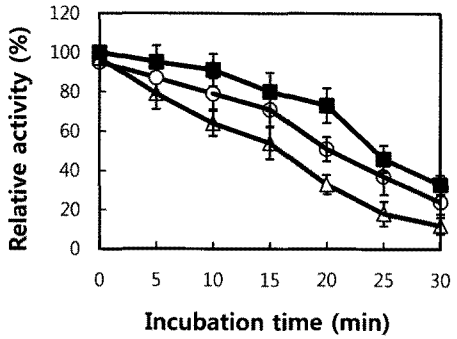

Fig. 5. Thermal stability of PLD from *B. licheniformis*. The PLD was suspended in Tris-HCl (pH 7.0) at different temperature (-■-, 45°C; -○-, 55°C; -△-, 65°C). After heat treatment for 30 min, residual activities were measured under standard assay condition. Maximum activity of the enzyme was considered as 100%, equivalent to12.5 U/mg protein.

Table 1. Effect of various divalent cations on the activity of PLD from *B. licheniformis*

Reagents	Relative activity	
	2 mM	5 mM
None	100	
Ca	107	115
Mg	115	165
Mn	75	67
Co	49	38
Zn	67	56
Cu	76	42
Fe	42	21

Each counter part ion was chloride and 100% enzyme activity was equivalent to 12.2U/mg protein.

PLD의 활성도에 미치는 2가 양이온 효과. PLD에 대하여 여러 종류의 2가 양이온 (2 및 5.0 mM) 존재하에서 효소 활성도를 측정한 결과는 Table 1과 같다. 여러 2가 양이온 중에서 Mg^{2+}은 효소 활성을 상당히 높이는 효과를 나타내었는데 대조구에 비하여 115 및 165% (각각 2.0 및 5.0 mM)의 효소 활성도를 나타내었다. Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+} 또는 Cu^{2+} 이온은 효소 활성을 상당히 억제하는 현상을 나타내었다. 한편 *S. chromofuscus*의 PLD는 철 및 망간에 의해 효소 활성이 촉진되며[Zambonelli 등, 2003] *Streptomyces* sp. CS-57 에서 분리된 PLD는 Mn^{2+} 또는 Co^{2+}에 의하여 효소 활성이 증대되는 것으로 보고되었는데[Simkhada 등, 2007] 이러한 결과는 본 실험의 PLD와 상반되고 있다. Ca^{2+} 이온은 어느 정도의 효소 활성 촉진 현상을 나타내었으나 대조구 대비 107 또는 115% 의 효소 활성도를 나타내는 것으로 보아 효소 활성에 중요하게 작용하지는 않는 것으로 판단된다. 이러한 결과는 Ca^{2+} 이온에 의해 효소활성이 촉진되는 경우가 많은 동물 또는 식물 세포의 PLD [Qin 등, 1997; Zheng 등, 2000; Exton, 2002]와 상반된 결과를 나타내고 있다. 한편 *Streptomyces* 종류들 중에서도 *Streptomyces antibioticus, Streptomyces cinnamoneus, Streptomyces halstedii* 등의 PLD는 Ca^{2+} 이온이 효소 활성도에 큰 영향을 미치지 않아 Ca^{2+} 비의존적 효소로 분류되고 있으며 이러한 점에서 본 실험의 결과와 유사하였다. 그러나 *Streptomyces tendae* [Mander 등, 2009] 또는 *S. chromofuscus* [Yang와 Roberts, 2002]의 PLD는 상당히 촉진 됨이 보고되어 Ca^{2+} 의존적 효소로 분류되고 있으며 본 실험의 결과와 상반된 결과를 나타내고 있다. 대부분의 동, 식물세포 유래의 PLD 와 달리 미생물의 PLD는 Ca^{2+} 의존적 또는 비의존적 효소활성을 보이는 경우로 나뉘어져 이에 대한 지속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

Table 2. Effect of various detergents on the activity of PLD from *B. licheniformis*

Detergents (0.5 mM)	Type of ion	Relative activity (%)
None		100
Triton X-100	Non ionic	152
Tween 20	Non ionic	87
Tween 80	Non ionic	67
Deoxycholic acid	Anionic	21
SDS	Anionic	5
CHAPS	Zwitter ionic	127

Note: One hundred percent activity of the enzyme was 13.5 U/mg protein.

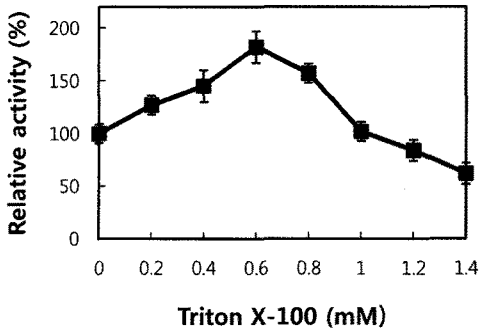

Fig. 6. Effect of Triton X-100 on the PLD activity of *B. licheniformis* The PLD activity was measured at different concentration of Triton X-100. The control activity was considered as 100%, which was equivalent to 14.9 U/mg protein. Each point represents the average of three experiments.

여러 detergent가 효소활성도에 미치는 영향. 여러 종류의 non ionic, anionic, 또는 zwitterionic detergent들이 PLD의 효소 활성도에 미치는 영향에 대하여 조사 하였다(Table 2). 여러 종류의 detergent 중에서 non ionic detergent인 Triton X-100이 PLD의 효소 활성도를 가장 많이 촉진시켰으며 zwitter ionic detergent인 CHAPS에 의해서도 상당한 효소 활성 촉진 효과가 있었다. 그러나 나머지 detergent 들은 효소 활성을 오히려 억제시켰으며 SDS의 첨가에 의해서는 효소 활성도가 거의 나오지 않았다. 따라서 Triton X-100을 여러 농도로 첨가하여 PLD의 효소 활성에 미치는 영향을 다시 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. Triton X-100을 0.6 mM까지 첨가할 경우 PLD의 효소 활성도는 점진적으로 증가하여 대조구 대비 최대 181%의 효소 활성도를 나타내었다. 그 이상의 농도에서는 효소활성도가 점점 감소하였다. 대체로 1.0 mM 이상의 농도에서는 대조구보다 낮은 효소 활성도를 나타내어 1.4 mM에서 약 62%의 효소 활성도를 나타내었다. 동물 세포에서 분리된 PLD는 detergent의 일종인 Triton X-100에 의해 용해도와 활성도 모두가 증가되는 경우가 많아 PLD 활성도를 측정할 경우에 detergent를 첨가하

는 경우가 종종 있다[Kanoh 등, 1991; Horwitz와 Davis, 1993]. 따라서 본 실험에서 분리된 bacteria 기원의 PLD에 대하여서도 detergent 효과를 측정한 결과 Triton X-100에 의하여 효소 활성도가 증대하였다. 이러한 결과는 다른 bacteria인 *Streptomyces* 종에서 분리된 PLD들과 비슷한 결과를 나타내고 있어[Shimkada 등, 2007; Mander 등, 2009] 본 실험에서 분리된 PLD 와 비슷한 용해 특성을 보이는 것으로 판단된다.

초 록

*Bacillus licheniformis*로 부터 phospholipase D (PLD)로 추정되는 유전자를 PCR 기술을 이용하여 분리하여 pGEM-T easy 운반체에 cloning 하였다. 분리된 유전자는 His6가 붙은 pET-21 운반체를 이용하여 *E. coli* BL21 (DE3)에서 발현시켰다. 재조합된 PLD는 nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) resin을 갖는 column을 이용하여 affinity chromatography로 분리하였다. SDS-PAGE 분석 결과 PLD로 추정되는 단백질은 약 44 kDa의 주요 단일밴드를 나타내었다. 분리된 효소의 최적 활성도는 pH 7.0에서 나타났으며 이 조건에서 또한 효소가 제일 안정되었다. 효소활성에 미치는 최적 온도는 40-45°C의 온도에서 형성되어 비교적 높은 온도를 나타내었으며 비교적 넓은 범위의 온도에서 상당히 높은 효소 활성도를 나타내었다. 여러가지 detergent 중에서 Triton X-100을 0.6 mM까지 첨가할 경우 PLD의 효소활성도는 점진적으로 증가하여 대조구 대비 최대 181%의 효소 활성도를 나타내었다.

Key words: *Bacillus licheniformis,* phospholipase D

감사의 글

본 논문은 한국 농촌진흥청 농업과학원의 농업과학기술 경상연구(과제번호 PJ006703)로 수행되었습니다.

참고문헌

Bradford MM (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

D'Arrigo P, Piergianni V, Scarcelli D, and Servi S (1995) A spectrophotometric assay for phospholipase D. *Analytica Chimica Acta* **304**, 249-254.

Exton JH (2002) Phospholipase D: Structure, regulation and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **144**, 1-94.

Hatanaka T, Negishi T, Kubota-Akizawa M, and Hagishita T (2002) Study on thermostability of phospholipase D from *Streptomyces* sp. *Biochim Biophys Acta* **1598**, 156-164.

Horwitz J and Davis LL (1993) The substrate specificity of brain microsomal phospholipase D. *Biochem J* **295**, 793-798.

Imamura S and Horiuti Y (1979) Purification of *Streptomyces chromofuscus* phospholipase D by hydrophobic affinity chromatography on palmitoyl cellulose. *J Biochem* **85**, 79-95.

Iwasaki Y, Nakano H, and Yamane T (1994) Phospholipase D from *Streptomyces antibioticus*: Cloning, sequencing, expression and relationship to other phospholipases. *Appl Microbiol Biotechnol* **42**, 290-299.

Jenkins GM and Frohman MA (2005) Phospholipase D: A lipid centric review. *Cell Mol Life* Sci **62**, 2305-2316.

Juneja LR, Kazuoka T, Yamane T, and Shimizu S (1988) Kinetic evaluation of conversion of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine by phospholipase D from different sources. *Biochim Biophys Acta* **960**, 334-341.

Kanoh H, Kanaho Y, and Nozawa Y (1991) Activation and solubilization by Triton X-100 of membrane bound phospholipase D of rat brain. *Lipids* **26**, 223-227.

Lambrecht R and Ulbrich-Hofmann (1992) A facile purification procedure of phospholipase D fromcabbage and its characterization. *Biol Chem* **373**, 81-87.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lee JS, Batochir M, Demirev AV, and Nam DH (2009) Molecular cloning of the phospholipase D gene from *Streptomyces* sp. YU100 and its expression in *Escherichia coli*. *J Microbiol* **47**, 116-122.

Leeuwen W, Okresz L, Bogre L, and Munnik T (2004) Learning the lipid language of plant signaling. *Trends Plant Sci* **9**, 378-384.

Lim SK, Choi JW, Chung MH, Lee ET, and Khang YH (2002) Production and characterization of extracellular phospholipase D from *Streptomyces* sp. YU 100. *J Microbiol Biotechnol* **12**, 189-195.

Liscovitch M, Czarny M, Fiucci G, and Tang X (2000) Phospholipase D: Molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem J* **345**, 401-415.

Mander P, Simkhada JR, Cho SS, Park SJ, Choi HS, Lee HC, Sohng JK, and Yoo JC (2009) A novel Ca^{2+}-dependent phospholipase D from *Streptomyces tendae*, possessing only hydrolytic activity. *Arch Pharm Res* **32**, 1461-1467.

Maria LD, Vind J, Oxenbell KM, and Svendsen A (2007) Phospholipases and their industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**, 290-300.

McKean SC, Davies JK, and Moore RJ (2007) Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environ-mental factors and plays a role in macrophage death. *Microbiology* **153**, 2203-2211.

Ogino C, Negi Y, Matsumiya T, Nakaoka K, Kondo A, and Kuroda S (1999) Purification, characterization and sequence determination of phospholipase D secreted by *Strepto-verticillium cinnamoneum*. *J Biochem* **125**, 263-269.

Okawa Y and Yamaguvhi T (1975) Studies on phospholipases from *Streptomyces*: Purification and properties of *Streptomyces hachijoensis* phospholipase D. *J Biochem* **78**, 363-372.

Qin C and Wang X (2002) The *Arabidopsis* phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLA1 with distinct regulatory domains. *Plant Physiol* **128**,1057-1068.

Qin W, Pappan K, and Wang X (1997) Molecular heterogeneity of phospholipase D (PLD): Cloning of PLD-gamma and regulation of plant PLD-gamma, beta and alpha by phosphoinositide and calcium. *J Biol Chem* **272**, 28267-28273.

Sciorra VA, Rudge SA, Prestwich GD, Frohman MA, Engebrech J, and Morris AJ (1999) Identification of a phosphoinositide binding motif that mediates activation of mammalian and yeast phospholipase D isoenzymes. *EMBO J* **20**, 5911-5921.

Servi S (1999) Phospholipases as synthetic catalysts. *Topics Curr Chem* **200**, 127-158.

Shimbo K, Iwasaki Y, Yamane T, and Ina K (1993) Purification and properties of phospholipase D from *Streptomyces antibioticus*. *Agric Biol Chem* **57**, 1946-1948.

Simkhada JR, Cho SS, Lee HJ, and Yoo JC (2007) Purification and biochemical properties of phospholipase D (PLD57) produced by *Streptomyces* sp. CS-57. *Arch Pharm Res* **30**, 1302-1308.

Sung TC, Altshuller YM, Morris AJ, and Frohman MA (1999) Molecular analysis of mammalian phospholipase. *J Biol Chem* **274**, 494-502.

Takami M, Hidaka N, Miki S, and Suzuki Y (1994) Enzymatic synthesis of novel phospha-tidylkojic acid and phosphatidylarbutin and their inhibitory effects on tyrosinase activity. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**, 1716-1717.

Tsuruta H, Hayashi R, Ohkawa H, and Ohkatsu N (2007) Characteristics and gene cloning of phospholipase D of the psychrophile, *Shewanella* sp. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 2534-2542.

Ulbrich-Hofmann R (2000) Phospholipases used in lipid transformation. In *Enzymes in Lipid Modification*, Bornscheuer UT (ed.), pp. 219-262, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

Waite M (1999) The PLD superfamily: Insights into catalysis. *Biochim Biophys Acta* **1439**, 187-197.

Wang X (2004) Lipid signaling. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 329-336.

Yang H and Roberts MF (2002) Cloning, overexpression and characterization of a bacterial Ca^{2+} -dependent phospholipase D. *Protein Sci* **11**, 2958-2968.

Zambonelli C, Casali M, and Roberts MF (2003) Mutagenesis of putative catalytic and regulatory residues of *Streptomyces chromofuscus* phospholipase D differentially modifies phosphatase and phosphodiesterase activities. *J Biol Chem* **278**, 52282-52289.

Zheng L, Krishnamoorthi R, Zolkiewski M, and Wang X (2000) Distinct Ca^{2+} binding properties of novel C2 domains of plant phospholipase D alpha and beta. *J Biol Chem* **275**, 19700-19706.