

## Rhodobacter capsulatus bc<sub>1</sub> 복합체의 일차 구조

채 영 규

한양대학교 생화학과

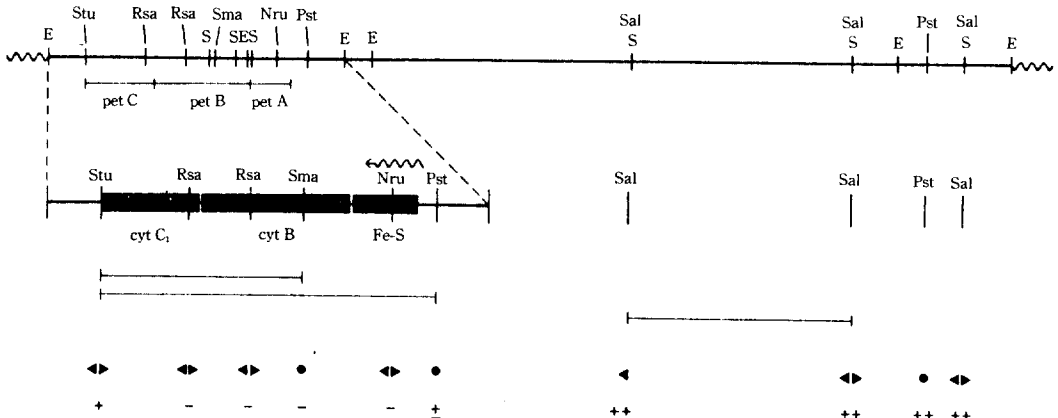
Cytochrome *b*C<sub>1</sub> 복합체는 에너지 생성기작에 필요한 요소이다. 이것은 mitochondria나 여러 세균의 호흡작용 뿐만 아니라, 엽록체(이 경우는 *b*<sub>6</sub>*f* 복합체라고 불려지고 있다)나 광합성 세균의 경우 광합성에 의한 전자 전달에 쓰이게 된다. 위의 어느 경우이나 이 복합체의 기능은 같다. 전체 과정의 결과 즉, quinone의 산화와 soluble electron carrier의 환원은 막을 통한 proton의 이동이다(1). Mitchell(2)의 chemiosmotic theory에 의하면 이렇게 이동된 proton은 막에 부착된 ATP ase를 이용한 ATP의 형성에 근거가 되는 proton-motive force를 제공한다. Quinol이 생성되는 곳과 soluble electron carrier의 유형성 및 궁극적인 목적지는 유기체나 혹은 그들의 성장 방법(광합성 혹은 호흡)에 따라 다르다.

분리 정제된 이 복합체에서 subunit의 수는 유기체에 따라서 그 수가 다르다. 예를들면 *Pracoccus*의 세계로부터(3) 효모의 11개까지(4)로 이들은 같은 기능적인 subunit를 포함한다. 즉, 한개의 cytochrome C<sub>1</sub> 단백질과 한개의 Rieske 2Fe-2S 단백질 그리고 다른 산화-환원 midpoint를 가진 두개의 heme으로 구성된 한개의 cytochrome *b*가 있다. 이와 더불어, 이 복합체는 적어도 두개의 뚜렷한 quinone 결합 부위를 가지고 있다고 여겨지며(5), 그 외에도 산화-환원과 관련이 없고 다른 특정한 역할이 알려지지 않은 subunit를 가진 것도 있다(6).

*b*C<sub>1</sub> 복합체는 광합성이나 혹은 호흡과정을 통하여 quinol을 quinone으로 바꾸어 준다. 이 과정은 Q-cycle hypothesis(2, 7, 8)라는 proton pumping과 연관되어 있으며 기능적으로 다른 두 장소(quinol 산화 장소, (Q<sub>2</sub>)와 quinone 환원 장소(Q<sub>c</sub>)에서 일어나는 것으로 보인다. Q<sub>2</sub> 자리는 막의 periplasmic(outer) side에 있으며 *b*-형

cytochrome과 2Fe-2S 단백질로 구성되어 있으며, Q<sub>c</sub> 자리는 막의 cytoplasmic(inner) side에 존재하며 주로 *b*-형 cytochrome을 포함한다. *b*C<sub>1</sub> 복합체의 세번째 기능적인 자리는 막에 있는 cytochrome C<sub>1</sub>을 포함하는 데 이것은 전자를 cytochrome reductase로부터 cytochrome C<sub>1</sub>을 거쳐 photosynthetic reaction center로(광합성인 경우) 혹은 cytochrome oxidase로(호흡작용인 경우) 전달해 주는 역할을 한다.

광합성 세균은 *b*C<sub>1</sub> 복합체에서 일어나는 일들을 연구하기 위해서 더욱 적합한 model이 될 수 있는데, 이는 그 구조가 간단하고(즉 적은 수의 subunit), flash-induced "single-turnover" 반응(광합성에서 reaction center가 섬광으로 인하여 산화후 *b*C<sub>1</sub> 복합체를 거치면서 순환하는 전자의 이동)을 관찰할 수 있는 장점 때문이다. 광합성 세균의 *b*C<sub>1</sub> 복합체의 구조와 기능에 대하여서는 생화학 그리고 생물리학의 응용으로 많이 밝혀졌으나(9), 이 복합체의 유전학적인 연구는 최근에 시작되었다(10, 11). 이미 효모 mitochondria의 *b*C<sub>1</sub> 복합체와 엽록체의 *b*<sub>6</sub>*f* 복합체의 일부 subunit에 대한 data가 밝혀졌다(13). 광합성 세균 중에서는 *R. capsulatus*가 가장 많이 유전학적으로 알려져 있기 때문에 *b*C<sub>1</sub> 복합체를 연구하는데 적당하다(14, 15). 생화학, 생물리학 그리고 유전학 등을 사용한 분자적인 수준에서 *b*C<sub>1</sub> 복합체에 대한 연구는 이 복합체와 다른 관련이 있는 막구성 구조와의 사이에서 또 이 복합체안에서 일어나는 전자 전달과정에 대한 연구(즉, *b*C<sub>1</sub> 복합체의 구조와 그 기능간의 연관성 분석)를 가능하게 한다. 첫번째 단계로써 *R. capsulatus* *b*C<sub>1</sub> 복합체의 Rieske Fe-S 단백질(*pet A*), cytochrome *b* (*pet B*), 그리고 cytochrome C<sub>1</sub> (*pet C*) apo-protein의 structural gene의 molecular cloning



**Fig. 1.** *R. capsulatus*의  $bC_1$  복합체의 모든 요소인 Rieske iron-sulfur 단백질 (*pet A*) Cyt  $b$  (*pet B*) 그리고 Cyt  $C_1$  (*pet C*)를 위한 structural gene을 가진 *pet* cluster를 보유하고 있는 plasmid pR 14A의 restriction map. *pet* gene 안과 밖에 형성된 mutant의 위치와 phenotype도 나타내었다. *pet* cluster의 전사의 방향은 화살표로 나타내었고(← -); 직선은 deletion의 정도를; 화살촉의 방향은 삽입된 kanamycin interposon의 방향을 나타낸다. 점(·)은 이 방향이 결정되지 않은 것이다.

과 각각의 Subunit의 nucleotide sequence에서 얻은 아미노산 배열에서 이 복합체 구성요소 각각의 기능을 밝혀보고자 한다.

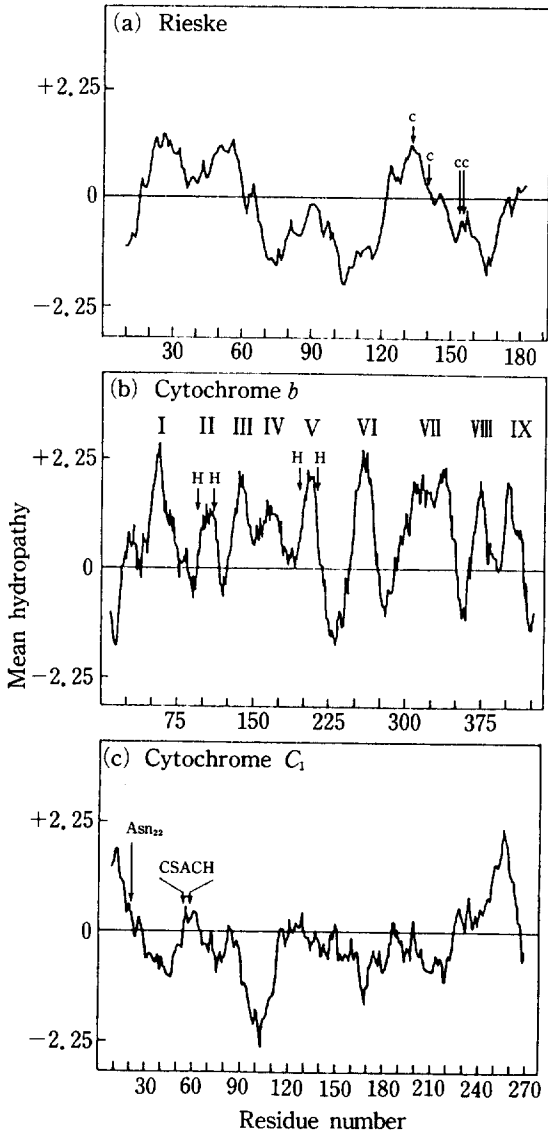
먼저  $bC_1$  복합체를 위한 structural gene을 분리하기 위하여  $bC_1$  복합체의 결함으로 광합성을 하지 못하는 *R. capsulatus* mutant를 사용하였다(16). *Eco* RI으로 부분 절단된 *R. capsulatus* DNA를 cosmid pLAFR 1(17)에 삽입하고 이렇게 얻어진 gene library를 R 126에 도입하였고, 항생제에 내성이 있고 광합성으로 자라는 colony만 선택하였다. 선택된 colony에서 분리된 plasmid(pR 14A)는 다섯개의 *Eco* RI 단편들(7.0, 2.7, 1.5, 1.3, 그리고 0.4 Kb)을 가지고 있었다.

pR 14A에서 *pet A*, *pet B* 그리고 *pet C* structural gene의 위치를 파악하기 위하여 synthetic mixed oligonucleotide probe가 사용되었는데 이들은 다른 유기체에서 얻어진 각 단백질의 진화적으로 보존된 아미노산 배열에서 얻어졌다(10, 11). *pet A*, *pet B*, *pet C* gene은 두개의 2.7과 1.3Kb의 *Eco* RI 단편에 매우 가깝게 서로 인접하여 operon을 이루고 있었으며(Fig. 1), 이는 nucleotide sequencing에 의하여 입증되었다(Fig. 2). *pet B*의 대부분과 *pet C* 전부에 걸친 insertion-deletion mutant와 *pet A*, *pet B* 그리

고 *pet C* gene 각각에서의 insertion mutation이 interposon mutagenesis technique(18)을 사용하여 만들어 졌고, 이들 mutation은 gene-transfer agent(GTA)-mediated genetic crosses에 의하여 wild-type strain의 염색체에 도입되었다. 얻어진  $bC_1$  mutant는 광합성 작용으로는 자라지 못하였으나 이 유기체가 갖는 branched respiratory pathway(19) 때문에 호흡작용에 의하여 자랐다. 이것은 *R. capsulatus*에서 기능적인  $bC_1$  복합체가 광합성 작용에 필수적이라는 것을 보여주지만 호흡작용과는 무관함을 나타낸다. 이는 respiratory pathway에서 분기점이  $bC_1$  복합체 이전인 quinone pool에 반드시 존재함을 뜻한다. *pet* cluster의 바깥부분에 여러 다른 insertion 혹은 deletion을 갖고 있는 mutant를 만들었으나(Fig. 1) 광합성으로 자라는 이들 mutant의 능력으로 보아 *pet* cluster의 주변에는 광합성 작용을 위한 다른 필수적인 gene이 없음을 나타낸다. crosshybridization 실험에서는  $bC_1$  복합체와 cytochrome  $C_2$ 를 위한 structural gene, light harvesting complex I과 II photosynthetic reaction center subunits 혹은 carotenoids와 bacteriochlorophyll biogenesis gene과의 사이에서 유사성이 없었다.

*pet* cluster중에서 첫번째 gene은 *pet A*로





**Fig.3.** *pet* gene product of Kyte와 Doolittle(24) 방법에 의한 hydrophathy profile. 각 그림에서 중간 선 위의 값은 소수성을 나타낸다. (a) Rieske 단백질, cystein 잔기의 위치는 (c)로 표시했다. (b) cytochrome *b*, H는 2 heme group과 결합하는 histidine 잔기를 표시했다. (c) cytochrome *C*<sub>1</sub>, c heme 결합 부위(CSACH)의 위치는 화살표로 표시했다. Asn 22는 mature polypeptide에서 첫번째 아미노산이 된 것으로 보아 leader sequence가 존재할 것이다.

*Neurospora crassa*의 Rieske 단백질(20)과 44% 유사성을 나타내고 있으며 Fe-S와 결합하는 4개의

cysteine 잔기는 *N. crassa*와 *R. capsulatus*에서 보존되어 있다. *pet A* ribosomal binding site인 GAAGGGAGA에서 7bp downstream에 있는 GTG codon에서 시작하여 576bp의 길이를 가지며 (Fig. 2) *pet B*와는 단지 12bp 길이의 *pet B* ribosome binding site를 가진 intercistronic region으로 이어져 있다. *pet B*는 1,341bp의 길이를 가지며 *pet B-pet C*와는 *pet C* ribosome binding site를 가진 17bp의 intercistronic region으로 구분되어 있으며 *pet C*는 840bp의 길이를 가진다 (Fig. 2). *pet C*는 효모 mitochondria(21) cytochrome *C*<sub>1</sub>과 같이 heme binding site가 보존되어 있다(cys-X-Y-Cys-His). *R. capsulatus*에서 *pet* operon을 위한 consensus sequence는 아직 밝혀지지 않았으나 *pet A*의 ribosome binding site에서 720bp upstream 부근이 다른 종의 *atp* operon의 promoter upstream(22)과 비슷하며 *pet C*의 downstream에 있는 G-C-rich stretches가 다른 세균에 존재하는 *rho*-independent transcription terminators와 유사하다(23). *pet* gene의 hydrophathy profile을 보면 (Fig. 3) *pet A*는 세균대의 소수성 부분을 가지고 있고 *pet B*는 9군데, 그리고 *pet C*는 Asn 22전까지가 leader sequence를 가지고 있는 것을 나타내며 2군데의 소수성 부분을 가지고 있다.

이상과 같이 *pet A, B, C*에 대한 일차적인 아미노산 배열을 알았고 여기서 우리는 위의 정보들을 토대로하여 *R. capsulatus*에 대한 site-specific oligonucleotide-directed mutagenesis 등 여러 연구를 할 수가 있을 것이다.

### 참고문헌

1. Rich, P. (1984) *Biochem. Biophys. Acta.* **768**, 53-79.
2. Mitchell, P. (1966) *Biol. Rev.* **41**, 445-502.
3. Yang, X., & Trumppower, B.L. (1986) *Methods Enzymol.* **126**, 316-325.
4. Schagger, H., Borchart, U., Aquila, H., Link, T.A. & Von Jagow, G. (1985) *FEBS Letter* **166**, 89-94.

5. Wakabayashi, S., Matsubara, H., Kim, C.H. & King, T.E. (1981) *J. Biol. Chem.* **257**, 9335-9339.
6. Ljungdahl, P.O., Pennoyer, J.D. & Trumppower, B.L. (1986) *Methods Enzymol* **126**, 181-191.
7. Crofts, A.R., Meinhardt, S.W., Jones, K.R. & Snozzi, M. (1983) *Biochem. Biophys. Acta.* **168**, 285-305.
8. Cramer, W.A. & Crafts, A.R. In Photo synthesis (Govinjee, A. ed) Vol I, pp 387-468. Academic Press, New York.
9. Crofts, A.R. (1984) In *The Enzymes of Biological Membrances* (Martonosi, A.N., ed). Vol. 4 pp 347-382. Plenum Press, New York.
10. Gabellini, N., Harnisch, U., MaCarthy, J.E.G., Hauska, G. & Sebald, W. (1985) *EMBO J.* **4**, 549-553.
11. Daldal, F., Davidson, E. & Cheng, S. (1987) *J. Mol. Biol.* **195**, 1-2.
12. Davidson, E. & Daldal, F. (1987) *J. Mol. Biol.* **195**, 13-24.
13. VanLoon, A.P.G.M., Kreike, J., DeRonde, G.T.J., Van der Horst, S.M., Gasser, S.M., & Grivell, L.A. (1983) *Eur. J. Biochem.* **135**, 457-462.
14. Youvan, D.C. & Marrs, B.C. (1984) *Cell* **39**, 1-3.
15. Scolnik, P.A. & Marrs, B.C. (1987) *Ann. Rev. Microbiol.* **41**, 703-726.
16. Robertson, D.E., Davidson, E., Prince, R.C., van den Berg, W.H., Marrs, B.L. & Dutton, P.L. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 584-591.
17. Friedman, A.M., Long, S.R., Brown, S.E., Buikema, W.J. & Ansubel, F.M. (1982) *Gene* **18**, 289-296.
18. Scolnik, P.A. & Haselkon, R. (1984) *Nature* **307**, 289-292.
19. LaMonica, R. & Marrs, B.L. (1976) *Biochim. Biophys. Acta.* **423**, 431-439.
20. Harnisch, U., Weiss, H. & Sebald, W. (1985) *Eur. J. Biochem.* **149**, 95-99.
21. Norbrega, F.G. & Tzagoloff, A. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 9828-9837.
22. Tybulewicz, V.L.J., Falk, G. & Walker, J.E. (1984) *J. Mol. Biol.* **179**, 185-214.
23. Plat, T. & Bear, D.G. (1983). In *Gene Function in Prokaryotes* (Beckwith, J., Davies, J. & Gallant, J.A., eds) pp 123-161. Cold Spring Harbor Lab press. Cold Spring Harbor, New York.
24. Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.