

## *Klebsiella aerogenes*의 카드뮴 적응 및 해독기작에 관련된 생리생화학적인 변화

<sup>1</sup>이기성 · 송인근 · <sup>1</sup>박영식 · 윤성녀 · 최영길

<sup>1</sup>배재대학교 생물학과

한양대학교 생물학과

### Physio-biochemical Changes Correlated with Cadmium Adaptation and Detoxification Mechanism in *Klebsiella aerogenes*

<sup>1</sup>Lee, Ki-Sung, In-Geun Song, <sup>1</sup>Young-Sik Park,  
Sung-Nyo Yoon and Yong-Keel Choi

<sup>1</sup>Department of Biology, PAI-CHAI University, Dae-jeon 302-735, Korea

Department of Biology, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

**ABSTRACT:** In the course of operating the accommodative and detoxifying mechanism against cadmium, its physio-biochemical changes were observed in *Klebsiella aerogenes* ATCC 10031.

Changes of enzyme activity concerned phosphate metabolism, changes of phospholipid composition and in view of energy metabolism the changes of the nucleotide pool were examined.

Activities of both alkaline and acid phosphatase were derepressed 4-10 folds under cadmium added cultures. Moreover, production of phospholipid such as lysophosphatidyl choline (LPC), phosphatidyl serine (PS) and phosphatidyl ethanolamine (PE) was increased and uridylyate nucleotide pool was increased under Cd-surplus culture. These results *i.e.* overproduction of phosphatase catalyzing phosphate residue, increase of the production of PE and PS which have a close affinity with cadmium, and increase of uridylyate nucleotide pool used as a carrier of polysaccharide synthesis like bacterial capsule exhibited cellular responses for active defence against Cd-pressure. It was postulated that these phenomena should play another assistant roles in Cd-detoxifying mechanism.

**KEY WORDS** □ phosphatase, derepression, phospholipid, nucleotide pool, defence

미생물에서 고등생물에 이르기까지 대부분의 생물은 중금속에 노출되었을 때, 중금속 이온과 결합하여 침전시킬 수 있는 대사산물을 생성하거나, 중금속 이온의 원자가를 변형시켜 승화시키거나 혹은 중금속 이온에 대한 세포막의 불투과성을 증가시키는 방법등과 같은 여러 종류의 적응·해독(adaptation/detoxification)기작을 운용하므로써, 독성이 강한 중금속의 높은 농도에서 성장할 수 있다(Aiking 등, 1982, 1984; Gadd와 Griffiths, 1978).

카드뮴(Cd)이나 수은(Hg)은 ammonia, amine, halide ion, cyanide ion과 쉽게 복합체를 형성하고, sulfur,

phosphorus, selenium과도 반응한다. 또 Cd과 Hg 등은 phosphate, 단백질의 cystenyl과 histidyl side group, purine, pteridine과 porphyrine과 같은 ligand에 대단히 강한 친화력을 지닌다.

이와 같이 중금속은 많은 생화학적 부위에 작용하므로써, 기능적인 sulfurhydryl기를 지닌 효소를 저해하거나, 핵산의 입체구조에 영향을 주기도 하고, oxidative phosphorylation의 경로를 분쇄시키기도 한다. 이와는 달리, 몇몇 효소에는 오히려 중금속 이온이 catalytic activity를 높여주기도 한다(Vallee와 Ulmer, 1972).

또 카드뮴은 인지질 성분 중 PE(phosphatidyl ethanolamine)과 PS(phosphatidyl serins)과 반응할 수 있는데,  $Ca^{2+}$  ( $10^{-6} M$ )과  $Na$  ( $10^{-4} M$ )보다 훨씬 낮은 농도 ( $10^{-8} M$ )에서도 반응하므로써 생체막을 확장시켜 독성효과를 나타내기도 한다(Suzuki와 Matsushida, 1968; Vallee와 Ulmer, 1972).

카드뮴은 TMV(tobacco mosaic virus)의 감염성과 증식을 저해하지만(Hoogveen, 1970), phosphate에 의하여 억제되어진다. 따라서 카드뮴은 인산의 축적 또는 인산대사를 변형시킬 수 있다(Vallee와 Ulmer, 1972; Aiking 등, 1984; Macaskie와 Dean, 1984; McEntee 등, 1986).

그러나 phosphate의 세포내 도입과 phosphate metabolism의 조절은 phosphate(pho) regulon에 의하여 복잡하게 제어되고 있다(Wanner, 1987<sup>a</sup>, 1987<sup>b</sup>). 특히 phosphate excess와 phosphate starvation 조건하에서 nucleotide pool의 변화는 대단히 크며, nucleotide 생합성에 결손이 있는 돌연변이체는 pyrimidine 또는 guanine을 starvation시킬 때, phosphate excess 조건에서도 ALPase(alkaline phosphatase)가 합성된다. 이러한 경우 ALPase의 유도는 세포내 phosphate pool이 낮아진 것 때문이 아니라 세포내 nucleotide의 변화에 의하여 조절된다고 볼 수 있다(Rao 등, 1986). 카드뮴 내성은 종종 penicilline 내성 plasmid에 연관되어 있기도 한다(Grubb과 O'Reilly, 1971; McEntee 등, 1986).

이상과 같이 세포내 카드뮴의 도입, 축적 과정 및 적응 해독기작은 모두 에너지 의존 기작일 뿐 아니라 phosphate와 매우 관련이 깊으며 동시에 많은 생리생화학적 변화가 수반되어진다. 따라서 본 연구는 *Klebsiella aerogenes* ATCC 10031을 재료로 phosphate metabolism과 관련된 주요 효소(alkaline phosphatase, acid phosphatase, polyphosphatase)의 활성도 변화, 세포막 성분인 인지질의 조성변화 및 energy metabolism의 조절관점에서 nucleotide pool의 변화를 조사하므로써, 카드뮴에 대한 적응, 해독기작이 운용될 때 일어나는 세포내 생리 생화학적 변화를 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주의 배양 및 수확

이 등(1990)의 방법으로 카드뮴의 첨가, 무기인산의 첨가, 결핍 배양하였으며, 적당한 시기에 수확하여 생리생화학적 실험에 사용할 시료를 얻었다.

### 효소의 활성도 측정

ACPase, ALPase : 배양되어진 세포를 적량 수확하여 5,000 rpm에서 10분간 원심분리한 다음 0.2 M NaCl 용액으로 2번 세척하였다. 세척한 세포에 Hughes (1971)의 방법에 따라 4°C에서 1분 간격으로 15회 초

음과 마쇄했다(Sonic dismembrator, Sonics & Materials 500 W). 이와 같이 조제된 효소추출액의 acid phosphatase(ACPase), alkaline phosphatase(ALPase) 활성도를 측정하기 위하여, Ernst(1975)가 고안한 방법을 적용하였다. 즉, 5 mM p-NPP, 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM KCl 반응액에 0.1 M acetate buffer pH 4.5는 ACPase 활성을 위해 0.1 M Tris-HCl buffer pH 9.0는 ALPase 활성을 위해 사용하였다.

상기와 같이 조제된 반응액에 효소추출액의 1 ml 씩을 넣고, 대조군에는 동량의 증류수를 넣어 잘 섞은 후, 37°C에서 10분간 반응시킨다. 다음 37.5% TCA(Trichloroacetic acid) 용액 0.5 ml를 가하여 효소의 활성을 정지시켰다. 10분 경과 후 재발색 시키기 위하여 1 N NaOH 용액 2.5 ml를 넣은 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 410 nm에서 나타나는 흡광도로 효소의 활성을 측정하였다.

Polyphosphatase : Polyphosphatase의 활성도 측정은 Kulaev와 Konoshenko(1971)와 Rubtsov와 Kulaev(1977)가 행한 방법에 의거하였다. 0.5 M Tris-HCl buffer(pH 7.4) 0.1 ml, 0.01 M  $MgCl_2$  0.5 ml, 2 M KCl 0.05 ml, 기질용액(poly-P(n=15))는 1 mg/ml) 0.1 ml에 효소추출액 0.2 ml를 가하여 반응시켰다.

반응은 37°C에서 20분간 시키며, 반응을 중지하기 위해 0.5 ml 7% PCA 용액을 가했다. 원심분리 후 상등액을 적량 취하여 ortho-P 정량방법(Berenblum과 Chain, 1938)을 이용하여 효소의 반응 결과 생성된 ortho-P를 정량함으로써 활성도를 구하였다.

### Thin Layer Chromatography for phospholipid isolation

Pi와 Cd을 첨가 또는 첨가하지 않은 배지에서 배양한 세포를 수확하여 Campbell과 Leuking(1983)이 행한 Bligh와 Dyer(1959)의 방법에 따라 지질을 추출하고, 40°C에서  $N_2$  gas로 농축시킨 후 TLC용 시료로 이용했다. TLC plate는 silica gel GF 254(Merk, Co.)를 0.5 mm 두께로 만들어 110°C에서 1시간 활성화시킨 후 사용했고, 전개용매는 chloroform-Me-OH-water(65 : 25 : 4, v/v/v)를 사용하여 45분간 전개시켰다. 이후 실온에서 건조시킨 다음 Hane's reagent를 분무하여, dry oven에서 110°C로 5~10분간 발색시켰다.

인지질의 분석은 High Speed TLC scanner(Shimadzu CS-920)을 사용하여 scan 하였다.

### Nucleotide 분획 및 HPLC 조건

Nucleotide의 group seperation : Khyrn(1975)과 Lothrop와 Uziel(1980) 방법을 변형한 Lee 등(1985)의 방법에 의거 nucleotide를 group seperation 했다. Cd 농도별로 배양된 세포에 5% cold PCA를 가하여 0°C에서 추출하여 acid soluble fraction을 얻은 후 2 M KOH로 중화시켰다. 이와 같이 중화되어진 acid soluble pool (시료)에서 nucleotide의 group seperation을 위

해서, Sepak silica gel cartridge를 사용하여 chromatography를 하였으며, 그 과정은 다음과 같다.

5 ml의 증류수로 silica gel cartridge를 세척하고, 5 ml의 시료를 acetonitrile/water(90/10 by vol.)으로 다시 세척했다. 그 후 900 ml/1 acetonitrile 농도로 조정되어진 12 ml의 시료를 4 ml/min 속도로 elution 시킨 후, 10 ml의 acetonitrile/water(90/10) 용액으로 다시 elution 시켰다. 그 후 9 ml의 증류수(4 ml/min)로 elution시켜 nucleotide group만을 얻었다.

HPLC 분리조건 : 앞에서 얻어진 nucleotide eluate를 한번 여과시킨 것을 시료로 하여, C<sub>18</sub> μBondapak column을 사용하여 HPLC 했다. 2.75% acetonitrile/65 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer에 2.5 mM PIC A reagent (pH 3.20)을 가한 완충용액을 사용하여 isocratic separation 했다(Lee와 Han 등, 1985). 이동속도는 1.0 ml/min로 elution시키며, 254 nm에서 detection 했다. 이와 같은 HPLC system의 장점은 ion exchange chromatography 없이도 ion suppression reagent인 PIC A를 사용하여 nucleotide를 분리하는 이외에, gradient가 아닌 isocratic separation에 의해 30분 이내에 모든 nucleotide를 완전히 분리해 내는 점이다. 각각의 nucleotide의 함량은 integrator를 사용하여 정량했다.

결과 및 고찰

효소활성도의 변화

*K. aerogenes*의 경우, starvation(S P) 후 카드뮴 첨가배지(NB, S'P', S'P)에서 적응기에는 모두 급격한 polyphosphatase의 활성이 감소하였다(Fig.1). 그러나 적응기가 끝나면서 카드뮴 처리 NB 배지와 인산첨가배지(S'P')에서 배양한 세포에서는 미세한 정도로 poly-Pase의 활성이 회복되었다. 이와는 반대로 카드뮴 비처리 NB 배지에서 배양한 세포에서는 계속 상승하였다. 이는 세포내 poly-P의 축적량 및 배지내 무기인산 농도와 관계가 깊다(이 등, 1990).

Alkaline phosphatase(ALPase) 활성도의 변화는, 모든 배양조건에서 공히 카드뮴 농도를 높게 처리하여 배양할수록 활성도가 높게 유지된 반면 카드뮴 비처리 실험구간에서는 오히려 활성도가 낮았다(Fig.2). Acid phosphatase(ACPase) 활성도의 변화 역시, ALPase 활성도 변화와 매우 유사하였으나, 카드뮴을 처리 실험군에서 약 10배 정도 활성이 증가하였다(Fig. 3). 즉 poly-Pase 활성도 변화는 카드뮴 처리에 대하여 ALPase, ACPase 활성도와 정반대의 경향을 띠고 있어 효소활성의 조절 system이 다름을 인식할 수 있다. 그리고 카드뮴 첨가 배양했을 때, 세포내에서 필요한 무기인산의 공급을 전적으로 ACPase, ALPase에 의한다고 볼 수 있다. 이처럼 적응기 중에 세포내 카드뮴이 compartmentalization 되므로서 ALPase, AC-

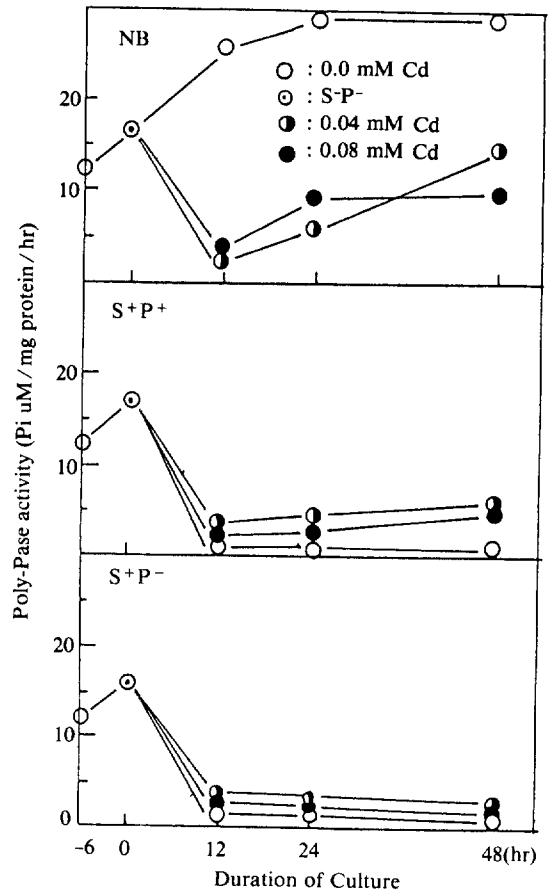


Fig. 1. Changes of polyphosphatase(poly-Pase) activity in *K. aerogenes* as affected by cadmium under variously cultured condition.

Pase의 활성이 억제되지 않고 계속 활성이 유지될 수 있다(Mitra 등, 1975 이 등, 1990).

이처럼 카드뮴에 비교적 내성이 있고 축적능이 높은 생물은, 종종 세포에서 카드뮴을 제거하는 방법에 의존하지 않고 오히려 phosphatase의 생성변화에 의하여 카드뮴에 내성을 지니기도 한다(Macaskie와 Dean, 1982)는 보분과 카드뮴에 노출되었을 때 phosphatase의 활성이 유도되며 이로 인해 cell-bound cadmium phosphate(Cd : Pi) 복합체의 형성이 이루어지므로 카드뮴에 대한 적응 해독이 가능하다(Lazdunski 등, 1969; Applebury 등, 1970; Pickett 등, 1976; Macaskie와 Dean, 1984)는 보분의 결과들은 본 연구결과와 매우 일치된다. Phosphate response(Wanner, 1987) 하에서 혹은 성장기(Rao 등, 1986)를 통해 배 때, exponential phase 때는 phosphatase(ALPase, ACPase)들이 repression되며, 정체기와 phosphate starvation 시킬 때는 phosphatase의 derepression 조건이 된다. 본 연구에서는 카드뮴 첨가 배양하에서 적응기가

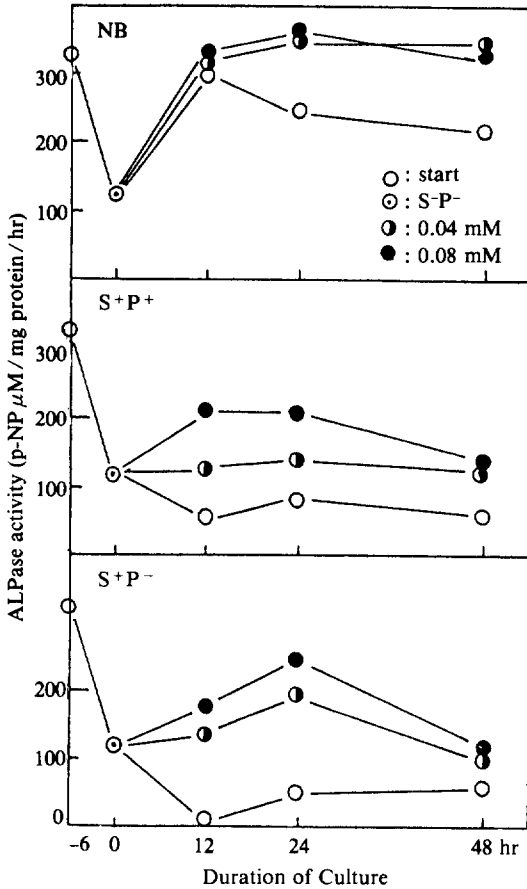


Fig. 2. Changes of alkaline phosphatase(ALPase) activity in *K. aerogenes* as affected by cadmium under variously cultured condition.

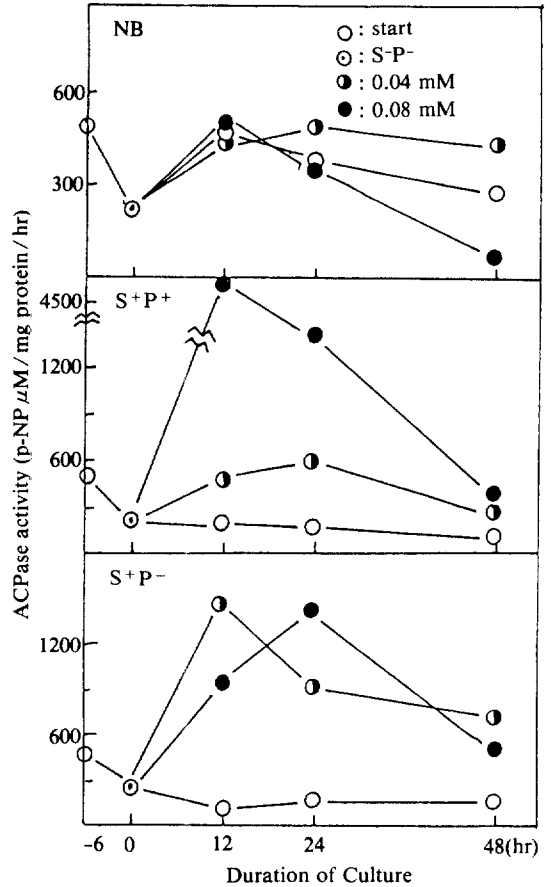


Fig. 3. Changes of acid phosphatase(ACPase) activity in *K. aerogenes* as affected by cadmium under variously cultured condition.

같다고 과도기로 접어들었을 때 ALPase, ACPase 합성이 overproduction, derepression되는 현상을 나타내 주었다. 비록 ACPase의 활성이 90% 감소될 경우에도 무기인산 중합체의 이용 및 분해에 영향을 미치지 않는다 할지라도 *Klebsiella aerogenes*의 경우 최소한의 이들을 효소의 overproduction이 카드뮴에 내성을 지니고 카드뮴의 독성으로부터 세포를 보호하는 또 하나의 기작으로 생각해 볼 수 있었다.

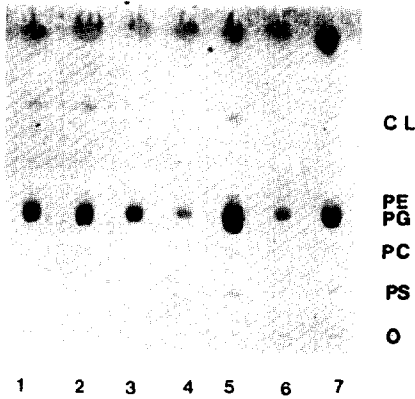
**인지질의 조성변화:** 대부분의 미생물은 환경변화에 의하여 막의 성분인 인지질의 조성이 변할 뿐 아니라, 막의 matrix로서 인지질의 효소복합체의 촉매기능을 변화시키기도 한다(Satadtländer 등, 1982).

*K. aerogenes*를 카드뮴 첨가, 비첨가, 인산첨가, 결핍 등 여러 배양조건하에서 인지질의 변화를 TLC로 분석하였다(Fig. 4, 5). 그 결과, PG(phosphatidyl glycerol)이 가장 주된 인지질로서, 카드뮴 첨가 배양할 경우 총인지질에 대한 PG의 비율이 변화되는 것을 볼 수

있었다. 이와는 반대로 최소배지에 카드뮴 첨가배양 실험군에서 LPC(lyphosphatidyl choline)와 PS(phosphatidyl serine)의 생성이 뚜렷이 관찰(Fig. 4, 6)되고, 적응기 중에(12시간, 24시간) PE(phosphatidyl ethanolamine)의 합성이 일어났다. CL(cardiolipin)의 양적동태는 최소배지에 카드뮴을 첨가 배양할 경우, 전 배양세포의 수준으로 거의 유지되었다.

이처럼 카드뮴을 첨가하거나 혹은 최소배지에서 배양할 경우 인지질의 조성이 바뀐다는 것은, 카드뮴이나 인산의 영향으로 민감하게 인지질의 대사가 변한다는 것을 의미한다. 즉, 인산 결핍 배양시킬 경우 ALPase와 phospholipase C가 동시에 induction 된다(Poole와 Hancock, 1983).

세균의 인지질 대사경로는 CDP-DG(cytidine diphosphate-diacylglycerol)의 key intermediate에서 PG(→DPG) 경로와 PS(PE, PC, LPC) 경로 2가지로 크게 갈라진다. 카드뮴 첨가배양 혹은 인산 제한 조건하에서



**Fig. 4.** Thin layer chromatogram and scanning profiles of phospholipid in *K. aerogenes* cultivated under various conditions.

CL: cardiolipin, PE: phosphatidyl ethanolamine, PG: phosphatidyl glycerol, PC: phosphatidyl choline, PS: phosphatidyl serine, O: origin, NB: nutrient broth complex medium, cont: without cadmium, 0.08: 0.08 mM cadmium added, 12h: culture time, S+P<sup>+</sup>: phosphate added minimal medium, S+P<sup>-</sup>: phosphate free minimal medium.

PS, PE, LPC의 생성이 증가되는 본 연구결과는 카드뮴 첨가 또는 인산 제한 조건에 의하여 인지질 대사경로 중 PS 경로가 활성화된 것으로 볼 수 있다. 아울러 카드뮴이 낮은 농도에서도 PE와 PS에 친화력이 매우 높다(Valles와 Ulmer, 1972)는 보문을 참고할 때, 본 연구에서 PS와 PE의 생성이 증가된 결과는 카드뮴 해독기작과도 매우 깊은 연관을 갖고 있다고 생각할 수 있다.

완전배지(NB)에서 배양했을 경우에는 풍부한 영양원으로 해서 인지질 대사경로에 카드뮴의 영향이 나타나지 않았으나, 정체기(48시간)에서는, 영양원의 고갈로 인한 다양한 인지질의 salvage pathway가 switch on되는 것을 볼 수 있다.

이처럼 카드뮴 첨가배양이나 무기인산 제한 배양할 때 인지질의 조성이 급격히 변화하는 현상은 카드뮴 pressure나 phosphate starvation에 대하여 나타나는 세포의 적응적 적응 현상 중의 하나로 설명될 수 있다. 아울러 막의 인지질 조성이 바뀌는 상은 결국 막기능 변화와도 관련이 되므로, 특히 카드뮴의 efflux, influx system의 활성화에도 영향을 미칠 것으로 예견할 수 있다.

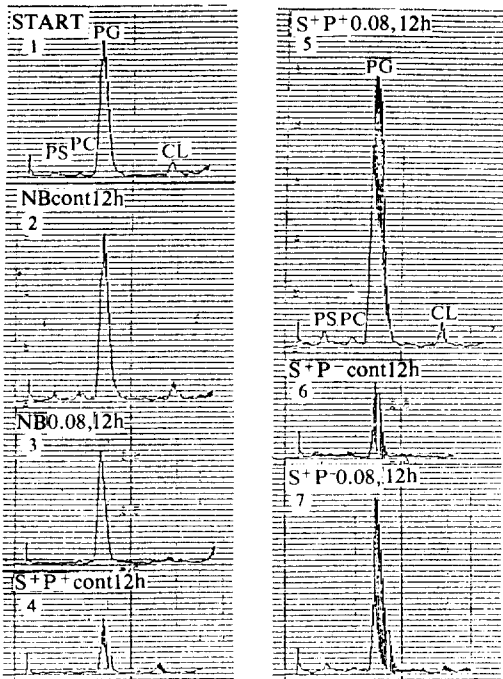
**Nucleotide pool의 변화:** Standard nucleotide를 HPLC에 적용한 결과 CMP, CDP, AMP, UMP, GMP, IMP, ADP, UDP, GDP, ATP, GTP, UTP 순으로 elution 되었고(Fig.6), nucleotids의 양은 5가지 이상의 농도로 standard nucleotide를 주입하여 integrator molecule에 의하여 농도별로 구해진 면적을 plotting하여 정량하였다.

전 배양되어진(정체기로 접어든) start 세포에서 cytidylate nucleotide pool(CMP+CDP)이 전체 nucleotide pool의 46.94%, starvation시킨 세포에서는 cytidylate nucleotide pool이 감소한 대신 adenylate nucleotide pool(AMP+ADP+ATP)이 증가하여 전체 nucleotide pool의 51.08%를 나타냈다(Table 1, 2, Fig.7, 8).

또 NB control 24 hr(정체기의) 세포에서는 guanylate pool이 증가하였으나, 카드뮴을 첨가배양한 NB (+Cd) 0.08 mM 24 hr(적응기 중의) 세포에서는 uridylate nucleotide pool이 증가됨을 볼 수 있었다(Table 1, 2, Fig.9, 10).

이처럼 배양조건에 따라 nucleotide pool의 변화는 심하게 나타났다. 특히 카드뮴 첨가배양(NB 0.08mM) 시, 나타나는 IMP(inosine monophosphate)의 증가현상과 adenylate pool의 감소현상을 guanylate pool의 증가현상과 연관지어 보면, IMP는 AMP와 GMP의 interconversion 경로의 중심중간산물이기 때문에 salvage pathway를 통한 adenylate nucleotide pool의 계속적인 turn-over 과정을 이해할 수 있다.

카드뮴 첨가 배양시 나타나는 uridylate pool의 증가는 uridylate(특히 UDP) 자체가 다당류를 포함한



**Fig. 5.** Thin layer chromatogram and scanning profiles of phospholipid in *K. aerogenes* cultivated under various conditions.

Abbreviations are the same as Fig. 4. 24h and 48h: culture time.

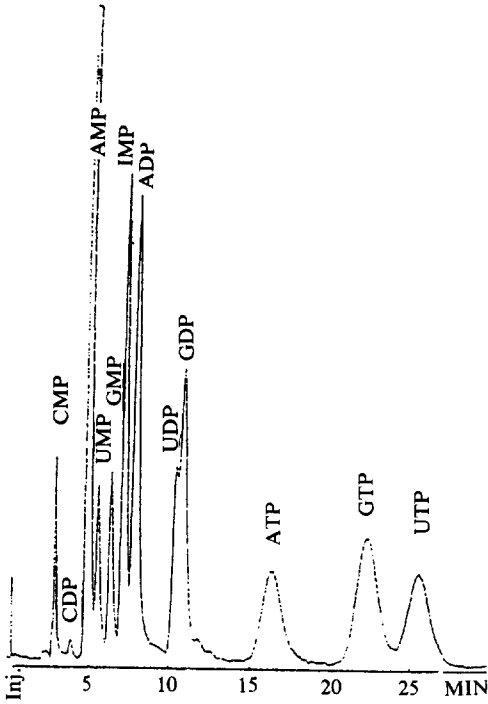


Fig. 6. HPLC chromatogram of standard nucleotides.

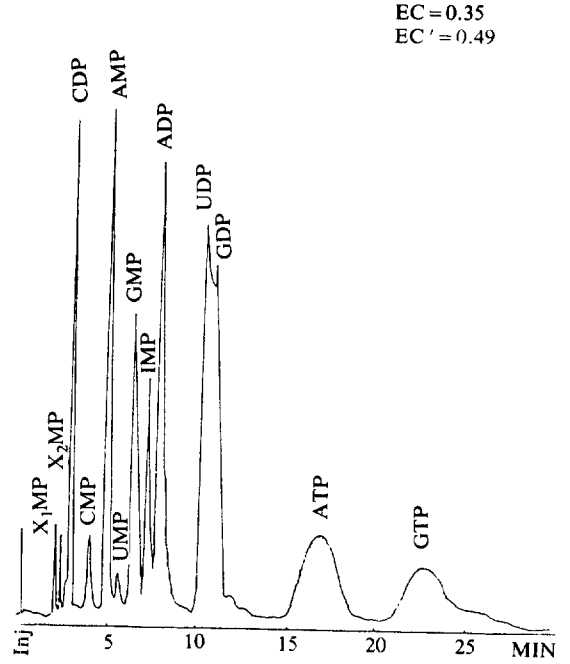


Fig. 8. Change in HPLC chromatogram of nucleotide pool and energy charge of starved(STARVATION) *K. aerogenes*.

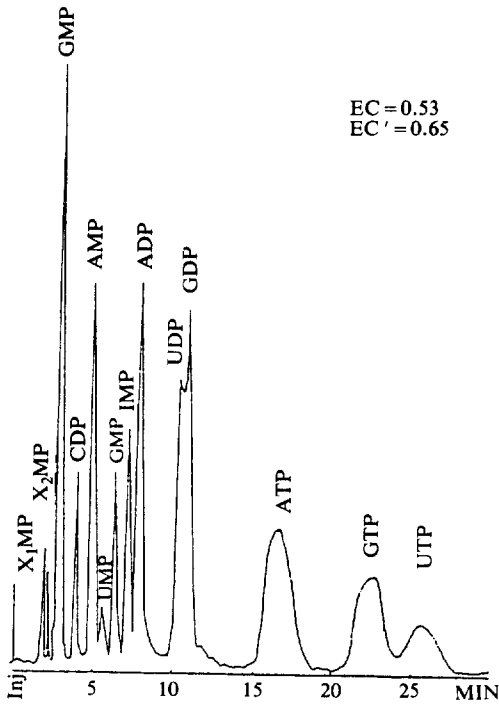


Fig. 7. Change in HPLC chromatogram of nucleotide pool and energy charge of precultured(START) *K. aerogenes*.

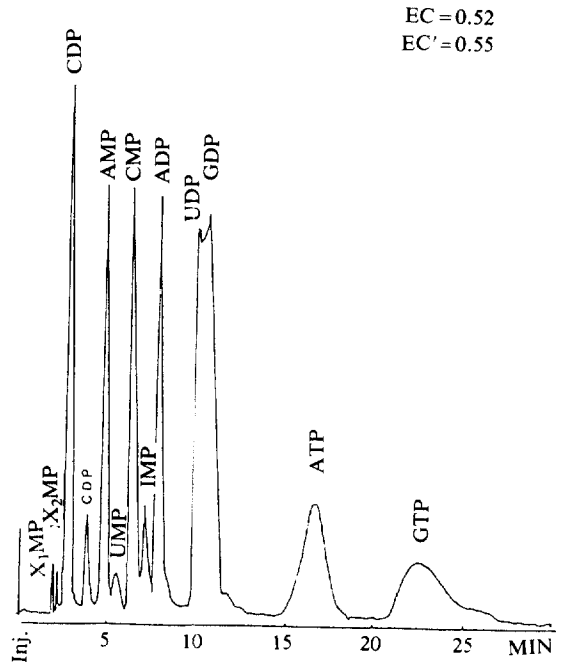


Fig. 9. Change in HPLC chromatogram of nucleotide pool and energy charge of *K. aerogenes* cultured without cadmium.

**Table 1.** Changes of various nucleotide pools and adenylate energy charge in *K. aerogenes* cultured with or without cadmium addition

$$EC = [ATP] + 0.5 [ADP] / [AMP] + [ADP] + [ATP]$$

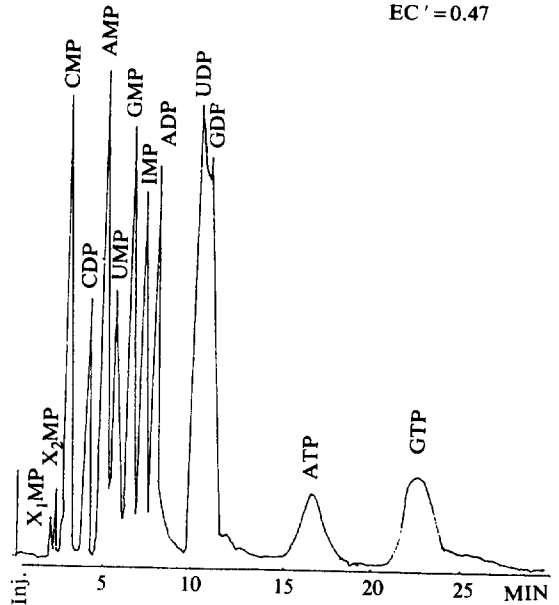
$$EC' = [ATP] + 0.5 [ADP] + [poly-P] / [AMP] + [ADP] + [ATP] + C[poly-P]$$

Culture condition	ΣA(%)	ΣG(%)	ΣU(%)	ΣC(%)	IMP	EC	EC'
Start	31.69	14.74	6.63	46.94	6.45	0.65	0.65
Starvation(S-P <sup>-</sup> )	51.08	17.86	6.84	24.22	6.10	0.35	0.49
NB control 24 hr	38.22	23.85	6.99	30.94	2.71	0.52	0.55
NB 0.08 mM(+Cd) 24 hr	29.73	27.58	21.22	21.47	9.29	0.20	0.47

**Table 2.** Purine and pyrimidine ribonucleotides in *Klebsiella aerogenes* ATCC 10031

Nucleotides	n mol/g wet wt			
	start	starvation	NB cont 24 hr	NB 0.08 24 hr
AMP	173	401	196	337
ADP	186	260	173	103
ATP	213	160	221	44
ΣA	572	821	590	484
GMP	53	77	196	206
GDP	106	90	123	137
GTP	106	120	49	103
ΣG	265	287	368	446
UMP	13	10	10	69
UDP	80	100	98	275
UTP	26		0	0
ΣU	119	110	108	344
CMP	795	369	454	279
CDP	53	20	24	68
ΣC	848	389	478	347
IMP	64	61	27	92
Adenylate energy charge	0.53	0.35	0.52	0.20

EC = 0.20  
EC' = 0.47



**Fig. 10.** Change in HPLC chromatogram of nucleotide pool and energy charge of *K. aerogenes* cultured with cadmium.

[AMP]+[ADP]+[ATP])값의 변화는 다음과 같다. Start(정체기의 전배양 세포), Starvation(당과 인산의 결핍배양, S P<sup>-</sup>), NB control (-Cd) 24 hr 및 NB 0.08 mM(+Cd) 24 hr 세포에서 각각 0.53, 0.35, 0.52, 0.20로 나타났다. 이러한 E.C 값은 일반적으로 log phase 세포는 0.8 정도, viability를 나타내는 세포는 0.5-0.8, 세균의 포자의 경우는 0.08 이하의 값을 나타내기도 한다. 그러나 E.C의 값은 생물에 따라 혹은 생육조건에 따라 커다란 차이가 나타난다(Chapman 등, 1971). 본 실험결과는 과도기 세포의 일반적인 E.C 값에 비하여 낮기는 하지만, 실험재료에 사용된 세포 모두가 정체기, starvation 혹은 카드뮴 첨가배양과 같은 안좋은 환경조건에서 생육된 것으로, *Klebsiella*

세포벽 합성물질에 대한 carrier로서 작용하기 때문에 세포벽 또는 세포표면에 카드뮴 축적이 많이 일어나는 현상과 관련지어 볼 수 있다. 즉, *Klebsiella aerogenes*의 경우 카드뮴에 적응되는 동안, 카드뮴의 통과과정을 어느 정도 차단하므로써 세포가 보호받을 수 있는 polysaccharide-containing capsule의 형성이 필요하다. (Aiking, 1982)는 보문을 에너지 대사측면에서 설명할 수 있는 결과라 하겠다.

**Energy charge의 변화:** Atkinson(1971)의 공식에 의한 adenylate charge ( $EC = [ATP] + 0.5[ADP] /$

*aerogenes*의 경우 starvation 시키거나 정체기에 도달한 세포는 E.C 값이 0.35-0.57의 범위에 들어간다(Chapman 등, 1971)는 보문의 결과와 유사하다. 그러나 무기인산 중합체 system을 지닌 세포에서는 phosphagen(동물의 경우, creatine phosphate)으로서 기능을 하는 poly-P 농도를 E.C 값을 계산하는데 new parameter로 넣어야 할 것이다(이 등, 1985). Creatine phosphate system을 지닌 생물에서는 E.C 값 계산에 creatine phosphate도 parameter로 적용하고 있다.

이러한 필요성은 다음과 같은 내용에서 뒷받침 되어 질 수 있다.

세포내 무기인산 중합체 생성기작은 luxury uptake와 overplus accumulation(hypercompensation effect)로 구분된다. 즉 luxury uptake mechanism은 질소, 황 같은 영양원이 고갈될 때 무기인산 중합체가 형성되는 것을 이르며, overplus accumulation mechanism은 인산 결핍 후 인산 충분조건에 노출시키면 과도하게 무기인산 중합체가 형성되는 것을 의미한다(Kulas와 Vagabov, 1983, Comeau 등, 1986).

이처럼 성장을 위한 인산의 저장고로서의 무기인산 중합체의 역할은 잘 인식되어지지만 energy source로서의 역할은 명확히 확립되어 있지 않았었다. 그러나 ATP/ADP ratio가 낮을 때 무기인산 중합체로부터 ATP 형성이 가능하다(Kulaev, 1979)는 보고 이래

저분자량의 무기인산 중합체는 energy pool로, 고분자량 무기인산 중합체는 phosphate reserve로 작용한다(Mino 등, 1985)는 보고로 인하여 무기인산 중합체는 ATP와 마찬가지로 energy source로서의 역할이 가능함이 밝혀졌다. 따라서 무기인산중합체를 E. C 계산에 parameter로 적용할 경우의 세포내 total energy charge는  $E.C' = [ATP] + 0.5[ADP] + [poly-P]/[AMP] + [ADP] + [ATP] + [poly-P]$ 와 같이 표시해 볼 수 있다(이 등, 1985). E.C' 값으로 계산한 결과 <무기인산 중합체의 양, data not show : 이 등(1990) 참조> start, starvation, NB(-Cd) 24 hr, NB(+Cd) 24 hr에서 각각 0.65, 0.49, 0.55, 0.47로 나타나 세포의 생리적, 생화학적 대사활성 상태를 합리적으로 표시할 수 있었다. 일반적으로 starvation 시킨 세포는 adenylate charge가 급격히 감소되면 회복되기 어렵다(Chapman 등, 1971; Reece 등, 1976; Cohen과 Kaplan 1977; Goodwin와 Takahashi, 1972).

본 연구에서도 starvation시킨 세포에서 떨어진 adenylate energy charge(0.35)는 카드뮴 첨가배양에서 극복하지 못하고 낮은 값(0.20)을 나타내었지만, total energy charge(E.C')값을 비교하면 0.49, 0.47로 각각 나타나 생리 생화학적 활성 상태는 세포분열 보다는 resting stage로 들어가 있음을 나타내 준다고 하겠다.

## 적 요

카드뮴 적응, 해독작용이 운동될 때, *Klebsiella aerogenes* ATCC 10031 세포에 일어나는 생리 생화학적 변화를 조사하고자 하였다.

인산대사에 관련된 효소의 활성도와 인지질 변화 및 에너지 대사의 조절관점에서 nucleotide pool의 변화를 조사하였다. 그 결과, 카드뮴 첨가농도가 높을수록 alkaline, acid phosphatase 모두 활성도가 4-10배까지 derepression 되었다. 또한 카드뮴 첨가 배양할 때, lysophosphatidyl choline(LPC), phosphatidyl serine(PS), phosphatidyl ethanolamine(PE)와 같은 인지질 생성이 증가되었으며, uridylate nucleotide pool이 증가되었다.

이처럼 인산기를 분해하는 phosphatase의 overproduction, 카드뮴과 친화력이 높은 PE, PS의 생성 증가, 그리고 capsule과 같은 다당류의 합성에 carrier로 이용되는 uridylate nucleotide pool의 증가현상은 카드뮴 pressure에 대한 세포의 적극적 방어 생리현상이라 볼 수 있으며, 최소한 또하나의 다른 보조적인 카드뮴 해독기작이라 추정할 수 있다.

## 사 사

이 논문은 학술진흥재단의 연구지원(1988. 5-1990. 5)에 의하여 수행된 연구의 일부임.

## 참고문헌

1. Aiking, H., K. Kok, H. van Heerikhulzen, and J. Van't Riet, 1982. Adaptation to cadmium by *Klebsiella aerogenes* growing in continuous culture proceeds mainly via formation of cadmium sulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 938-944.
2. Aiking, H., A. Stijman, C. van Garderen, H. van Heerikhulzen, and J. van't Riet, 1984. Inorganic phosphate accumulation and cadmium detoxification

in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 374-377.

3. Applebury, M.L., B.P. Johnson, and J.E. Coleman, 1970. Phosphate binding to alkaline phosphatase metal Ion dependence. *J. Biol. Chem.*, **245**, 4968-4975.
4. Atkinson, D.E., 1971. Adenine nucleotides as stoichiometric coupling agents in metabolism and as regulatory modifiers: the adenylate energy charge. pp. 1-21. IN H.J. Vogel(ed). *Metabolic regulation*. Academic Press Inc., New York.
5. Berenblum, I., and E. Chain, 1938. An improved method for the colorimetric determination of phosphate. *J. Biochem.* **32**, 295-298.
6. Campbell, T.B., and D.R. Lueking, 1983. Light mediated regulation of phospholipid synthesis in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **155**, 806-



- 816.
7. **Bligh, E.G., and W.J. Dyer**, 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917.
  8. **Chapman, A.G., L. Fall, and D.E. Atkinson**, 1971. Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation. *J. Bacteriol.* **108**, 1072-1086.
  9. **Cohen, L., and R. Kaplan**, 1977. Accumulation of nucleotides by starved *Escherichia coli* cells as a probe for the involvement of ribonucleases in ribonucleic acid degradation. *J. Bacteriol.* **129**, 651-657.
  10. **Comeau, Y., K.J. Hall, R.E.W. Hancock and W.K. Oldham**, 1986. Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal. *Wat. Res.* **20**, 1511-1521.
  11. **Ernst, S.A.**, 1975. Transport ATPase cytochemistry: Ultrastructural localization of potassium-dependent and potassium independent phosphatase activities in rat kidney cortex. *J. Cell. Biol.* **66**, 584-608.
  12. **Gadd, G.M. and A.J. Griffiths**, 1978. Microorganisms and heavy metal toxicity *Microbial Ecol.*, **4**, 303-317.
  13. **Goodwin, C.D., W.X. Balcavage, and J.R. Matton**, 1974. Energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: Effects of progressive starvation on respiration and pyridine nucleotide reduction linked to ethanol oxidation in intact cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **165**, 413-420.
  14. **Grubb, W.B., and R.J. O'Reilly**, 1971. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **42**, 377.
  15. **Hughes, D.E.**, 1971. 'Methods in microbiology', Academic press. London and New York. **5B**, 27-30.
  16. **Khym, J.X.**, 1975. An analytical system for rapid separation of tissue nucleotides at low pressures on conventional anion exchangers. *Clin. Chem.*, **21**, 124-1252.
  17. **Kulaev, I.S., and V.M. Vagavov**, 1983. Polyphosphates metabolism in microorganisms. *Adv. Microbiol. Physiol.* **24**, 83-171.
  18. **Kulaev, I.S., G.I. Konoshenko**, 1971. Detection and some properties of *Neurospora crassa* polyphosphates hydrolyzing inorganic polyphosphates to orthophosphate. *Biokhimiya*. **36**, 175-1182.
  19. **Kulaev, I.S.**, 1979. The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates. John Wiley and Sons, Ltd. New York.
  20. **Lazdunski, C., C. Petitclerc, and M. Lazdunski**, 1969. Structure-function relationships for some metalloalkaline phosphatases of *E. coli.*, *Eur. J. Biochem.*, **8**, 510-517.
  21. **Lee, K.S., J.S. Han, and Y.K. Choi**, 1985. High performance liquid chromatographic analysis of nucleotide pool during catabolic repression and derepression in *Saccharomyces uvarum*. Oral presentation at Microbiol. Soc. Korea.
  22. **Lee, K.S., S.A. Yoo, I.Y. Kwak, Y.S. Park, J.H. Chung and Y.K. Choi**, (1990). Cadmium detoxification mechanism in *Klebsiella aerogenes* ATCC 10031. *Kor. J. Microbiol.*, **29**, (in publication).
  23. **Lothrop, C.D., Jr. and M. Uziel**, 1980. Rapid separation of nucleotides from acid soluble pools by chromatography on silica, as exemplified with acid extracts of cultured cells. *Clin. Chem.*, **26/10**, 1430-1434.
  24. **Macaskie, L.E., and A.C.R. Dean**, 1984. Cadmium accumulation by a *Citrobacter* sp.. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 53-62.
  25. **Macaskie, L.E. and A.C.R. Dean**, 1982. Cadmium accumulation by microorganisms. *Environmental Technology Letters.* **3**, 49-56.
  26. **McEntee, J.D., J.R. Woodrow, and A.V. Quirk**, 1986. Investigation of cadmium resistance in an *Alcaligenes* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 515-520.
  27. **Mitra, R.S., R.H. Gray, B. Chin, and I.A. Berenstein**, 1975. Molecular mechanisms of accommodation in *Escherichia coli* to toxic levels of Cd. *J. Bacteriol.* **121**, 1180-1188.
  28. **Pickett, A.W., I.S. Carter and A.C.R. Dean**, 1976. Enzymic activities of cadmium and Zinc tolerant strains of *Klebsiella (Aerobacter) aerogenes* growing in glucose-limited chemostats. *Microbios* **15**, 105-11.
  29. **Poole, K. and R.E.W. Hancock**, 1983. Secretion of alkaline phosphatase and phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa* is specific and does not involve an increase in outer membrane permeability. *FEMS Microbiol. Lett.* **16**, 25-29.
  30. **Rao, N.N., E. Wang, J. Yshphe and A. Torriani**, 1986. Nucleotide pool in *pho* regulon mutants and alkaline phosphatase synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteria.* **166**, 205-211.
  31. **Rubtsov, P.M., I.S. Kulaev**, 1977. Some pathways of polyphosphate biosynthesis and degradation in *Acetabularia mediterranea*. *Biokhimiya*. **42**, 1083-1089.
  32. **Stadtlander, K., S. Rade, J. Ahlers**, 1982. Influence of growth condition on the composition of the plasma membrane from yeast and on Kinetic properties of two membrane functions. *J. Cellular. Biochem.* **20**, 369-380.
  33. **Suzuki, Y., H. Matsushita**, 1968. *Ind. Health* **6**, 128.
  34. **Vallee, B., and D.D. Ulmer**, 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Ann. Rev. Biochem.* **41**, 91-128.
  35. **Wanner, B.L.**, 1987<sup>a</sup>. Control of *pho* R-dependent bacterial alkaline phosphatase cloned variation by the *pho* M region. *J. Bacteriol.*, **169**, 900-903.
  36. **Wanner, B.L.**, 1987<sup>b</sup>. Phosphate regulation of gene expression in *Escherichia coli*. In. F.C. Neidhardt, J. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H.E. Umbarger (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella thyphimurium*. Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology, 1987. Washington, D.C.

(Received May 9, 1990)

(Accepted August 30, 1990)