

## *Streptomyces coelicolor*의 Catalase들의 분석

김형표 · 이종수 · 하영철 · 노정혜\*

서울대학교 자연과학대학 미생물학과, 서울대학교 분자미생물학 연구센터

비변성 폴리아크릴아미드 겔에서 *Streptomyces coelicolor*의 catalase 활성 염색을 실시하여 여러개의 catalase 활성 띠를 관찰하였으며, 그 유형이 성장기에 따라 달라짐을 알았다. 포자와 정체 성장기에는 정체 성장기에만 특이적인 Cat1(760 kD)이 관찰되었고, Cat2(300 kD)를 제외한 모든 활성 띠들이 나타났다. 중기 대수 성장기에는 Cat2와 Cat3-2(140 kD) 등 2개의 catalase 띠가 나타나며, 후기 대수 성장기에는 Cat3-1(170 kD), Cat3-2, Cat3-3(130 kD), Cat4(70 kD) 등의 활성 띠가 나타났다. NTG 처리로 돌연변이화된 *S. coelicolor*의 포자를 Bennet 평판 배지에서 배양한 후 과산화수소 거품 test를 실시하여, 약 5000 여개의 콜로니 중 거품 형성 속도나 양이 감소한 콜로니를 12개 얻었다. 야생형에 견주어 대부분 catalase 활성이 감소하였으며, 대수 성장기와 정체 성장기에서 모두 감소하였다. 거품형성을 하지 않는 모든 돌연변이체에서 Cat3-2 띠의 강도가 현저히 약해져 있음으로 보아 Cat3-2가 주된 catalase인 것으로 추정된다. 대수 성장기에서 수확한 *S. coelicolor* 세포 추출액에서 Sepharose CL-4B, DEAE Sepharose CL-6B, Phenyl Sepharose CL-4B, Hydroxylapatite 크로마토그래피 등 4단계의 크로마토그래피를 수행하여 Cat3-2를 정제하였다. 비변성 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동을 수행한 결과 Cat3-2의 분자량은 140 kD인 것으로 생각되고, SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기 영동을 수행한 결과 Cat3-2는 67 kD의 동일한 subunit을 2개 가지고 있는 효소로 추정된다.

**KEY WORDS** □ *Streptomyces coelicolor*, growth phase, catalase activities, catalase-deficient mutants, catalase purification

Catalase는 과산화수소를  $H_2O$ 와  $O_2$ 로 분해하는 작용을 촉매하는 효소로서 많은 생물체로부터 순수 분리되고 연구되어왔다. *Escherichia coli*(4, 5)와 *Bacillus subtilis*(19, 20), *Saccharomyces cerevisiae*(27, 28)를 포함한 많은 생물체들은 두가지의 독특한 catalase들을 가지고 있는데 반해, *Neurospora crassa*(11), *Proteus mirabilis*(12)등의 생물체들은 한 종류의 catalase만을 가지고 있다. *P. mirabilis*와 *S. cerevisiae*등의 catalase는 4개의 protoheme IX group을 가지고 있고 4개의 60 kD 단위체를 가지고 있는 등 포유류의 catalase와 유사하지만 *E. coli*나 *N. crassa* 등의 catalase는 단위체의 구성이나 크기, protoheme 조성등에서 포유류의 catalase와 많은 차이를 보이고 있다.

*E. coli*는 catalase와 peroxidase의 기능을 동시에 가지고 있는 hydroperoxidase I(HPI)과 catalase의 기능만을 가지고 있는 hydroperoxidase II(HPII)라는 두 종류의 catalase를 가지고 있는데 이들은 각각 *katG*와 *katE*라는 유전자로부터 합성된다(14, 16). 이 두 효소를 분리하여 그 특성을 조사해본 결과 이들은 전형적인 포유류의 catalase뿐만 아니라 이들 서로간에도 많은 차이점을 보이고 있었다. HPI는 81 kD의 단위체로 구성된 tetramer로서 두개의 protoheme IX

원자단을 가지고 있는데 반해(5), HPII는 93 kD의 단위체로 구성된 hexamer로서 heme d-유사 원자단을 가지고 있다(18). 그리고 이들은 서로 다른 자극에 의해 유도된다. HPI의 합성은 배지에  $H_2O_2$ 를 첨가할 때 유도되며 HPII의 합성은 세포가 정체 성장기에 들어가거나 TCA 회로의 중간 산물을 이용해서 성장할 때 유도된다(17).

이들의 유도를 조절하는 기작에 대해 최근 많은 연구가 수행되고 있다. *katG* 유전자는 *oxyR* regulon의 일부로서 밝혀졌다(3). *OxyR*은 산화된 형태와 환원된 형태 등 두가지 유형으로 존재할 수 있는데 산화적 스트레스를 받으면 그 자신이 산화되어 여러 유전자의 능동 조절 인자로 작용하는 것으로 추정되고 있다(29). *katE* 유전자의 발현을 유도하기 위해서는 능동 조절 인자로서 *katF* 유전자 산물을 필요로 하는데(15, 22, 26), *katF*의 염기 서열을 분석한 결과 *KatF* 단백질은 기존의 알려진 RNA 중합 효소의  $\sigma$  factor와 아주 유사한 것으로 밝혀졌다(23). *KatF*는 *KatE* 합성의 조절 뿐만 아니라 자외선의 손상에 대한 방어 기작에도 연관되어 있어서 exonuclease III를 encode하고 있는 *xthA*의 발현도 조절하는 것으로 추정되고 있다(25). 아마 *KatF* 단백질은 세포가 성장을 멈추었을 때 RNA 중합 효소가 *katE*와 *xthA*

유전자의 프로모터를 인지하게 하는 기능을 가지고 있는 것으로 생각된다.

*B. subtilis*는 두 종류의 독특한 catalase를 가지고 있는데 최근에 이 두 효소가 순수 분리되고 그 특성이 밝혀졌다. Catalase-1은 65 kD의 단위체로 구성된 hexamer로서 protoheme IX 원자단을 가지고 있다(19). 이 효소는 중기 대수 성장기에서 유일하게 발현되는 catalase로서 세포가 정체 성장기에 들어서거나  $H_2O_2$ 에 노출되었을 때 그 활성이 유도되는 것으로 알려졌는데(21) 아직까지 *E. coli*나 *Salmonella typhimurium*의 OxyR이나 KatF같은 조절 인자를 찾아내지는 못했다. Catalase-2는 81 kD의 단위체로 구성된 hexamer로서 heme d-유사 원자단을 가지고 있다(20). 이 효소는 포자에서 유일하게 발현되는 catalase로서 *spo0* 돌연변이체에서는 발현이 안되는 것으로 보아 포자 분화와 연관이 있는 것으로 추정된다(21).

*Streptomyces*속 균주들은 호기성 세균으로, 형태적 분화 과정이 진행 세포인 균류와 유사하여 심층균사, 기균사, 포자등 다양한 과정을 거친다. 그리고 생리적인 분화 과정을 통해 다양한 이차대사 산물을 생성하는 것으로 잘 알려져 있다. *Streptomyces coelicolor*의 경우 포자 형성을 위하여 산소를 꼭 필요로 하는데, 분화과정에 있어서 산소의 역할에 대하여는 거의 연구된 바가 없다. 본 실험실에서는 *S. coelicolor*에 낮은 농도의  $H_2O_2$ 를 처리하면 나중에 세포에 치명적인 손상을 입힐 수 있는  $H_2O_2$ 를 처리했을 때 그렇지 않은 세포에 비해 더 잘 살아 남을 수 있다는 결과를 보고한 바 있다(24). 이러한 적응 기작은 낮은 농도의  $H_2O_2$ 를 처리했을 때 catalase, peroxidase, glutathione reductase, 그리고 glucose-6-phosphate dehydrogenase 등의 활성이 증가하는 것과 연관이 있을 것이라고 추정하고 있다. 본 논문에서는 *S. coelicolor*에서  $H_2O_2$  분해 효소인 catalase의 생성 및 특성에 관한 연구 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 배양 조건

실험 재료로는 *Streptomyces coelicolor* (Muller) (ATCC #10147)을 사용하였다. 계대 배양 배지로는 Bennet 배지를 사용하였으며, 종균 배양 배지의 조성은 Glucose 3g, Soytone 17g, Peptone 3g,  $CaCO_3$  4g을 증류수에 녹여 1 L가 되게 하였다. 최소 배지는 Hopwood등(10)의 방법에 따랐다. 성장에 따른 catalase의 유형 변화를 관찰하기 위해서 발아된 포자를 4%의 희석 비율로 최소 배지에 접종한 후 각각 24-28 시간(중기 대수 성장기), 40-48 시간(후기 대수 성장기), 7-10 일(정체 성장기)동안  $30^\circ C$ 에서 120 rpm으로 배양하였다. 효소를 정제하기 위해서는 *S. coelicolor*를 종균 배양 배지 25 ml에서 48 시간 진탕

배양한 후, 25 ml의 동일 배지에 1% 희석 비율로 접종하여  $30^\circ C$ 에서 24시간 진탕배양하고 이를 다시 최소 배지 2 L에 6% 희석 비율로 접종한 후,  $30^\circ C$ 에서 24 시간 진탕배양하였다.

### 돌연변이 유발 및 돌연변이체 탐색

약  $10^8$ 개의 포자에 1 mg/ml 또는 3 mg/ml 농도로 NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)를 처리하여, 0.1-1%의 생존율을 보이는 조건에서 돌연변이를 유발하였다. NTG를 처리한 다음 한 plate에 50-100개의 colony가 생기도록 포자를 접종한 후 과산화수소 거품 test를 실시하였다. 주사기로 30% 과산화수소를 1-2 방울씩 각 colony 위에 적하하여, 야생형보다 거품 생성량이나 속도가 감소한 것을 catalase 결핍 돌연변이체 후보로 선정하였다. 이들을 최소배지에서 배양하면서 각 성장기에서의 세포 추출액을 얻어, native gel 에서의 활성 염색을 행하거나 용액에서의 활성 측정을 실시하여 catalase 활성이 감소하는 것을 확인한 후 돌연변이체를 선별하였다.

### 효소 활성 측정 방법

효소의 기질인 과산화수소가 감소하는 정도를 감지하여 효소 활성을 측정하였다(1). 과산화수소가 240 nm에서 흡광하는 특징을 이용하여, catalase 활성으로 인한 240 nm에서의 흡광도 감소를 관측함으로써 catalase의 활성을 측정할 수 있다. 효소의 활성단위는 1 분당  $1 \mu mol$ 의  $H_2O_2$ 를 분해하는 효소의 양을 1 unit으로 정하였다. Native gel 상에서의 catalase 활성염색은 Clare등(6)의 음성 염색 방법으로 행하였다. Horseradish peroxidase(Sigma사 제품) 용액에 약 45 분간 gel을 담그었다가 과산화수소를 10 mM 까지 첨가한다. 이 때 catalase 활성이 있는 때 부분에서는 과산화수소가 제거되고 나머지 부분에는 여전히 과산화수소가 잔존한다. 10 분후 증류수로 잠깐 세척한 후, diaminobenzidine 용액에 담가 두면 peroxidase가 과산화수소와 diaminobenzidine을 기질로 이용하여 발색반응을 일으킨다. 반면, catalase가 위치한 부분에는 과산화수소가 결핍되어 발색이 안되어 투명한 띠를 볼 수 있다.

### 단백질 정량

Bradford(2)의 방법을 따랐다. 표준 단백질로는 bovine serum albumin (Sigma사 제품)을 사용하였다.

### 효소의 정제

#### 1. 조효소(crude enzyme)의 제조

$4^\circ C$ 에서  $4000 \times g$ 로 30 분간 원심분리하여 균체를 수확하고, 0.1 mm 유리알을 이용해 bead beater로 균체를 분쇄한 후,  $4^\circ C$ 에서  $20,000 \times g$ 로 1 시간 원심분리하여 상층액을 수확하였다. 여기에 30% 황산암모늄 용액이 되도록 황산 암모늄을 혼합하여 1 시간 동안 침전시킨 다음,  $10,000 \times g$ 에서 30 분간 원심분리하여 상층액을 수확하였다. 이 상층액에 60% 황산암모늄 용액이 되도록 황산 암모늄을 혼합하여 1 시간 동안 침전시킨 다음,  $10,000 \times g$ 에서 30 분간 원심분

리하여 침전물을 수확하였다. 이 침전물을 0.05 M 인산 완충용액(pH 6.2)에 녹여 조효소(crude enzyme)로 사용하였다.

2. 효소의 순수 분리

가. Sepharose CL-4B 겔 여과 크로마토그래피  
Sepharose CL-4B (Sigma사 제품)를 컬럼(2.8×76 cm)에 충전하여 0.05 M 인산 완충용액(pH 6.2)으로 세척하고 시료를 주입한 후 700 ml의 동일 용액으로 용출시켰다. 용출 속도는 25 ml/hr이었고, 5.0 ml/씩 분획하였다.

나. DEAE Sepharose CL-6B 이온 교환 크로마토그래피

DEAE Sepharose CL-6B (Sigma사 제품)를 컬럼 (4.0×8.0 cm)에 충전하여 0.05 M 인산 완충용액(pH 6.2)으로 세척하고 농축된 시료를 주입한 후, 700 ml의 동일 용액으로 먼저 용출시키고 다시 동일 완충용액에서 0.15-0.70 M NaCl의 선형 농도 경사에 의해 용출시켰다. 용출 속도는 25 ml/hr이었고, 5.0 ml/씩 분획하였다.

다. Phenyl Sepharose CL-4B 크로마토그래피

Phenyl Sepharose CL-4B (Sigma사 제품)를 컬럼 (2.2×3.0 cm)에 충전하여 0.5 M 황산 암모늄이 포함된 0.01 M 인산 완충용액(pH 6.2)으로 세척하고 시료를 주입한 후, 0.5 M 황산 암모늄이 포함된 250 ml의 동일 용액으로 먼저 용출시키고 다시 0.5-0.0 M 황산 암모늄의 선형 농도 경사에 의해 용출시켰다. 용출 속도는 50 ml/hr이었고, 5.0 ml/씩 분획하였다.

라. Hydroxylapatite 크로마토그래피

Hydroxylapatite (BioRad사 제품)를 컬럼(1.5×5.0 cm)에 충전하여 10 mM 인산 완충용액(pH 6.8)으로 세척하고 농축된 시료를 주입한 후, 50 ml의 동일 용액으로 먼저 용출시키고 50-200 mM 인산 완충용액 (pH 6.8)의 선형 농도 경사에 의해 용출시켰다. 용출 속도는 67 ml/hr이었고, 3.0 ml/씩 분획하였다.

전기 영동

1. 비변성 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동

Davis(7)의 방법을 변형하여 불연속 완충 용액 체제로 상단 겔은 4%, 하단 겔은 9%로 사용하였다. 시료에 0.02% bromophenol blue, 20% glycerol을 섞어 겔에 부하한 후 시료가 상단 겔을 통과할 동안은 80 V, 하단 겔을 통과할 동안은 150 V의 전압으로 전기 영동을 행하였다.

2. SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기 영동

Hames와 Rickwood(8)의 방법을 변형하여 SDS-불연속 완충 용액 체제로 상단 겔은 4%, 하단 겔은 10%로 사용하였다. 시료는 동량의 2x SDS sample buffer (125 mM Tris(pH 6.8), 4% SDS, 23% glycerol, 0.002% bromophenol blue, 5% β-mercaptoethanol)와 섞어서 5분간 100°C에서 중탕한 후 사용하였다. 분자량 측정을 위한 표준 단백질로는 2-macroglobulin (reduced form; 170 kD), phosphor-lase b (97.5 kD), glutamate dehydrogenase (55.4

kD), lactate dehydrogenase (36.5 kD) (이상 Boehringer Mannheim Biochemica사 제품)등을 사용하였다.

Catalase 분자량 결정

변성되지 않은 catalase의 분자량의 결정은 Hedrick등(9)의 방법에 따랐다. 여러 농도의 폴리아크릴아미드 겔에서 각 단백질 띠들의 bromophenol blue에 대한 이동거리(R<sub>i</sub>)를 측정하고, log(R<sub>i</sub>)와 겔 농도 사이의 일차 함수 관계를 회귀 분석하여 기울기를 구하였다. 이 기울기를 표준단백질로부터 구한 기울기 표준곡선과 대조하여 분자량을 구하였다.

결과 및 고찰

성장에 따른 catalase 활성 띠들의 유형 변화와 그들의 분자량 결정

*S. coelicolor* 세포 추출액의 catalase 활성을 비변성 겔에서 활성 염색을 통하여 측정하여 본 결과, 활성을 나타내는 띠들을 여러개 관찰할 수 있었다 (그림 1). 또한, 포자기부터 균사 성장기를 거쳐 성장함에 따라

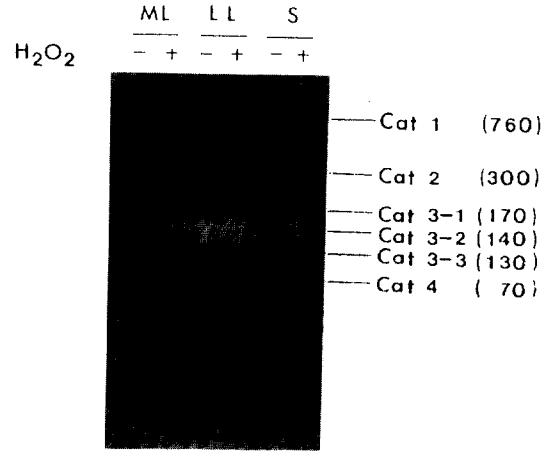


Fig. 1. Catalase band patterns at different growth phases

Cell extracts were obtained from cells grown for 30 hours (midlogarithmic growth phase; ML), 48 hours (late-logarithmic growth phase; LL), or 10 days (stationary growth phase; S) after inoculation of germinated spores in minimal media. Samples were treated with either nothing (-) or 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 minutes (+). Cell extracts containing 50 μg protein were loaded on 8% native polyacrylamide gel. Catalase bands were stained negatively as described in the text. Numbers in parenthesis are approximate molecular weight(kD) determined through electrophoresis on gels of several different % of acrylamide.

catalase 활성을 나타내는 띠들의 유형이 크게 변함을 관찰하였다. 포자 발아 이후 하루 정도 지난 중기 대수 성장기에는 Cat2와 Cat3-2 등 2개의 catalase 띠가 나타나며, 2-3일 배양 후의 후기 대수 성장기에는 Cat 2가 사라지고 Cat3-1, Cat3-2, Cat3-3와 Cat4의 띠가 관찰되었다. 정체 성장기에는 정체 성장기에만 특이적인 Cat1이 관찰되었고, Cat2를 제외한 모든 활성 띠들을 볼 수 있었다.

각 isozyme들의 과산화수소에 의한 유도 여부를 규명하기 위하여, 100 μM 과산화수소를 1시간 동안 처리한 후 세포 추출액에서의 catalase의 활성 변화를 활성 염색을 실시하여 알아 보고자 하였다. Cat1이나 Cat4의 활성이 과산화수소 처리에 의하여 약간 유도되어 증가되는 것으로 관찰되었다. 그러나, 활성 염색을 통하여 활성을 측정하는 방법의 민감도를 감안할 때, 각 활성 띠들의 항체를 이용하여 과산화수소 처리후 그 활성이나 전사체의 변화를 살펴 보는 방법 등 보다 더 정확한 방법을 통하여 확인하여야 할 것이다.

변성되지 않은 catalase 활성 띠들의 분자량을 결정하기 위해 disc 겔 전기 영동을 수행하였다. Resolving gel이 각각 6, 8, 9, 10, 11, 13.5, 15%인 비변성 폴리아크릴아미드 겔에 전기 영동을 수행하여 각 활성 띠들의 상대적 이동 거리를 측정하였다. 이를 Hedrick등(1968)의 방법에 따라 분자량을 계산한 결과 Cat1은 760 kD, Cat2는 300 kD, Cat3는 130-170 kD, 그리고 Cat4는 70 kD인 것으로 각각 추정되었다.

**Catalase 결핍 돌연변이체의 분리 및 그 특성**

*S. coelicolor*에서 여러가지 catalase isozyme 또는 유전자가 존재하는지를 확인하기 위해 catalase가 결핍된 돌연변이체를 분리하였다. 약 10<sup>8</sup>개의 포자에 NTG(1 mg/ml 또는 3 mg/ml, pH8.0)를 처리하여 약 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup>개의 포자가 생존하는 범위로 돌연변이를 유발하였다. 포자를 Bennet 평판 배지에 도말하여 30 °C에서 배양한 후 과산화수소 거품 test를 실시하여,

약 5000 여개 정도의 콜로니 중 거품 형성 속도나 양이 감소한 콜로니를 12 개 얻었다. 이들중 8개의 콜로니는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리후 거품이 거의 형성되지 않거나 아주 느린 속도로 형성되는데 반해 3개의 콜로니는 야생형에 비해 약간 느린 속도로 거품이 형성되었다. 이들 돌연변이체들의 형질을 자세히 알아 보고 catalase의 결핍을 확인하기 위하여, 용액상에서 catalase의 활성 측정을 실시하였다. 그림 2에서 보여지듯이 야생형에 견주어 대부분 활성이 감소하였으며, 대수 성장기와 정체 성장기에서 모두 감소하였다. 활성의 감소는 거품을 형성하지 못하는 돌연변이체(K1-K10)의 경우 더욱 현저하였다. 이들 돌연변이체들에 있어서 catalase 활성을 나타내는 띠들의 변화를 알아보기 위해 활성 염색을 수행하였다. 이 염색 결과를 각각의 띠별로 그 활성의 크기를 정리하면 표 1과 같다. 활성 염색 결과를 토대로 살펴보면,

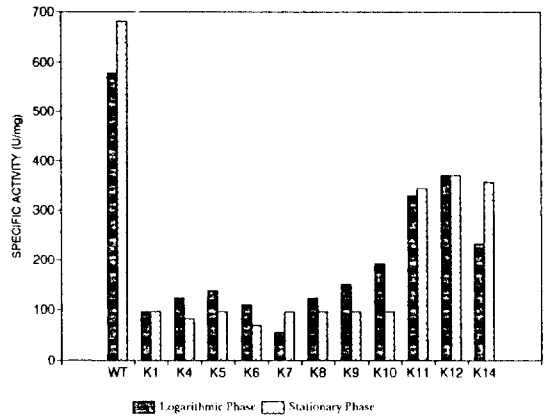


Fig. 2. Catalase activity in cell extracts from various catalase-deficient mutants  
WT: wild type, K1-K14: catalase-deficient mutants.

Table 1. Changes in catalase band patterns of catalase-deficient mutants<sup>a</sup>

Band	Growth Phase <sup>b</sup>	Non-Bubbling					Slow-Bubbling					
		1	6	7	9	10	4	5	8	11	12	14
Cat 1	S	+	++	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Cat 3-1	L	++	+	++	++	+++	-	-	-	-	+++	-
	S	+	-	-	-	++	-	-	-	+++	+++	+++
Cat 3-2	L	-	-	-	-	-	+	+	+	+++	+++	+++
	S	-	+	+	+	-	+	+	+	+++	+++	+++
Cat 3-3	L	+	-	+	++	-	+++	+++	-	-	++	-
	S	+	++	++	++	+	+	+	-	-	-	+++
Cat 4	L	++	-	++	+++	+	+++	+++	+++	+	+++	+++
	S	+	++	++	+	++	+	++	+	+	++	++

a. band intensity, +++: Wild type level  
b. L: Logarithmic phase, S: Stationary phase

**Table 2.** Purification steps for catalase

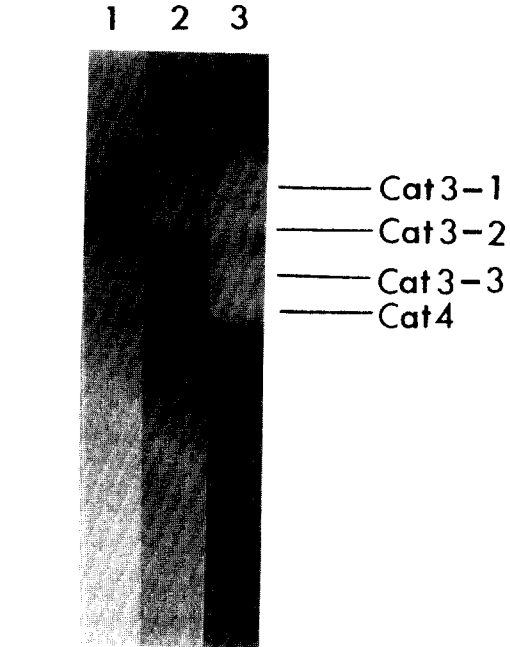
	Vol (ml)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Total Unit (/1000)	Purification (n-fold)	Yield (%)
Crude extract	70	359	591	212.2	1.0	100.0
Ammonium sulphate 30-60%	10	108	742	79.9	1.3	37.6
Sepharose CL-4B	118	63	2784	175.4	4.7	82.7
DEAE Sepharose CL-6B	49	8.9	5773	51.3	9.8	24.2
Phenyl Sepharose CL-4B	8	0.32	138417	44.0	234	20.7
Hydroxylapatite	5	0.16	163850	25.9	277	12.2

과산화수소 처리시 거품이 거의 형성되지 않은 돌연변이체의 경우 대부분 Cat3-2의 강도가 현저히 약해져 있으며, 과산화수소 처리시 야생형에 비해 조금 느린 속도로 거품이 형성되는 돌연변이체의 경우는 Cat3-2의 띠가 나타나고 오히려 Cat3-1이나 Cat3-3 등 다른 띠의 강도가 약해지는 것을 알 수 있었다. 그러므로 *S. coelicolor*에서는 Cat3-2가 주된 catalase인 것으로 추정된다. 또한 이 돌연변이체들 중 K6을 제외하고는 모두가 정체 성장기에서만 특이적으로 나타나는 Cat1도 Cat3와 함께 현저히 감소된 것으로 나타났다. 이와 같이 catalase 결핍 돌연변이체들 마다 선택적인 띠가 결핍되거나 감소되고 여러 성장기 마다 특이적인 활성들을 발현하면서 catalase 유형이 변화하는 현상으로 미루어 보아 *S. coelicolor*는 여러개의 catalase 관련 유전자를 지닌 것으로 추측할 수 있다. 이는 catalase 결핍 돌연변이체를 얻은 확률이 생존 포자중  $4 \times 10^{-2}$  정도의 높은 확률이었다는 사실과도 부합된다.

서로 다른 isozyme들의 존재 여부와 그들의 기능 및 조절 양상을 밝히기 위해서는 이들 효소들을 순수 분리해서 상호 비교하는 과정과 유전자를 클로닝하여 발현을 연구하는 작업이 함께 요구된다. *S. coelicolor*의 catalase 유전자를 클로닝하기 위해서는 catalase 결핍 돌연변이체들을 이용하는 방법이 있는데, *S. coelicolor*의 genomic library를 제조한 다음 이를 catalase 결핍 돌연변이체에 형질 변환시켜 거품을 형성하는 colony를 탐색하면 catalase 유전자를 찾을 수 있을 것으로 기대된다.

#### Catalase의 정제

*S. coelicolor*를 최소 배지에서 배양하여 후기 대수 성장기에 이르렀을 때 균체를 수확하고 분쇄한 후, 30-60% 황산 암모늄을 이용하여 단백질을 농축하였다. Sepharose CL-4B 겔 여과 크로마토그래피를 수행한 결과 44-88 분획에서 효소 활성이 분리되었고, 이들을 DEAE-Sepharose CL-6B 이온 교환 수지에 부착시켜 NaCl 0.15-0.6 M 선형 농도 경사에 의해 용출시켰더니 NaCl 0.4-0.5 M에 해당하는 분획에서 단일 피크로 분리되었다. 이어서 Phenyl Sepharose CL-4B 크로마토그래피에서는 0.5-0.0 M 황산 암모늄 선형 농도 경사에 의해 용출시켰는데 황산 암모늄 0.3-0.0 M에 해당하는 분획에서 효소가 분리되었다.



**Fig. 3.** Electrophoretic pattern of purified catalase on non-denaturing gel.

Lane 1: Coomassie blue staining (3  $\mu$ g protein)  
 Lane 2: Catalase activity staining (3  $\mu$ g protein)  
 Lane 3: Catalase activity staining of cell extracts (20  $\mu$ g protein)

Hydroxylapatite 크로마토그래피에서는 60-100 mM 인산 완충 용액에 해당하는 분획에서 효소가 분리되었다. 이상의 네 차례의 크로마토그래피로 분리한 결과 12.2% 수율에 정제도가 280배 정도 증가한 효소를 얻을 수 있었다(표 2). 비변성 폴리알리아미드 겔 전기영동을 행하여 Coomassie Blue 염색과 활성염색을 병행한 결과 Cat3-2가 분리된 것을 확인하였다(그림 3). 분리된 효소의 활성 염색시 Cat3-2 띠의 위쪽으로 얇게 흩어진 활성을 볼 수 있는데, 이는

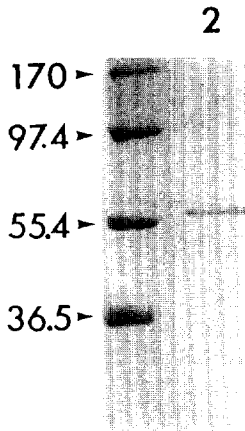


Fig. 4. Electrophoretic mobility of purified catalase on SDS-polyacrylamide gel.

Lane 1: Molecular weight markers;  $\alpha$ -macroglobulin (170 kD; reduced from), phosphorylase b (97.4 kD), glutamate dehydrogenase (55.4 kD), and lactate dehydrogenase (36.5 kD)

Lane 2: Purified catalase

분리된 효소의 당함량이 13%인 것(결과 미제시)으로 보아 Cat3-2가 glycosylation된 결과라고 추측된다. Cat3-1이 Cat3-2의 glycosylation된 형태인지는 분명치 않으나 표1에 나타난 돌연변이체들의 catalase유형으로 보아 Cat3-1과 Cat3-2는 동종의 단백질로 보기에는 어려운 점이 있다. SDS-폴리아크릴아미드 겔에 분자량 표준단백질과 같이 전기영동을 행하여 분자량을 추정한 결과 Cat3-2는 한 가지 크기의 단위체만을 가지며, 이 단위체의 분자량은 67 kD로 추정되었다(그림 4). 변성되지 않은 Cat3-2의 분자량은 전기영동을 통해 약 140 kD으로 추정되었는데, 이것으로 보아 Cat3-2는 67 kD의 동일한 단위체 2개를 가지고 있는 효소로 생각된다.

Cat3-2의 최적 pH를 구하기 위하여 pH 3.7에서 pH 12.8사이의 완충용액에서 효소 활성을 측정된 결과, pH 7과 pH 11사이에서 최대 활성을 보였으며 pH 4.8에서도 최대 활성의 60% 정도의 활성을 나타내었다(결과 미제시). 이와 같이 광범위한 pH에서 효소 활성을 보이는 양상은 전형적인 catalase와 비슷하였다. 또한 300 nm에서 700 nm 사이의 흡광 spectrum을 측정된 결과 402 nm에서 Soret band를 나타내었는데(결과 미제시). 이는 Cat3-2가 heme 단백질임을 보여준다.

Knoch등에 의해 *Streptomyces venezuelae*에서도 catalase가 분리되었는데, 이 효소는 catalase 기능이 외에 bromoperoxidase 기능도 함께 가지고 있었다(13). *S. venezuelae*에서 분리된 bromoperoxidase-catalase는 단위체 분자량이 약 65 kD인 dimer로

이루어져 있고 광범위한 최적 pH를 가지고 있으며 흡광 spectrum을 조사해보았을 때 Soret band를 나타내는 heme 단백질로 추정된다는 점에서 *S. coelicolor*의 Cat3-2와 유사한 점을 가지고 있다. 그러나 Cat3-2의 경우  $H_2O_2$ 와 *o*-dianisidine을 기질로 사용하여 활성을 측정해 보았을 때, peroxidase의 활성을 나타내지 않았다.

## 사 사

본 논문의 연구는 과학재단 목적기초 연구 지원비(1991년, 노 정혜)와 과학 재단 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학 연구센터) 연구비(1991년, 하 영철)의 지원을 받아 수행되었다.

## 참 고 문 헌

1. Beers, R. F., Jr. and I. W. Sizer. 1951. Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.*, **195**, 133-140.
2. 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**, 248-252.
3. Christman, M. F., R. W. Morgan, F. S. Jacobson and B. N. Ames. 1985. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *S. typhimurium*. *Cell*, **41**, 753-762.
4. Claiborne, D. A., D. P. Malinowski and I. Fridovich. 1979. Purification and characterization of hydroperoxidase II of *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.*, **254**, 11664-11668.
5. Claiborne, D. A. and I. Fridovich. 1979. Purification of *o*-dianisidine peroxidase from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.*, **254**, 4245-4252.
6. Clare, D. A., M. H. Duong, D. Darr, F. Archibald and I. Fridovich. 1984. Effects of molecular oxygen on detection of superoxide radical with nitroblue tetrazolium and on activity stains for catalase. *Anal. Biochem.*, **140**, 532-537.
7. Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**(2), 404-427.
8. Hames, E.D. and D. Rickwood. 1980. Gel electrophoresis: A practical approach. Oxford university press, Oxford, England.
9. Hedrick, J.L. and A.J. Smith. 1968. Size and charge isomer separation and estimation of molecular-weights of proteins by disc gel-electrophoresis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**, 155-164.
10. Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Kieser, C.J. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward and H. Schrempf. 1985.

- Methods in genetic manipulation of streptomyces a laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, England.
11. **Jacob, G.S. and W.H. Orme-Johnson.** 1979. Catalase of *Neurospora crassa*. I. Induction, purification, and physical properties. *Biochemistry*, **18**, 2967-2975.
  12. **Jouve, H. M., C. Lasounerie and J. Pelmont,** 1983. Properties of a catalase from a peroxide-resistant mutant of *Proteus mirabilis*. *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, **61**, 1219-1227.
  13. **Knoch, M., K.H.V. Pee, L.C. Vining and F. Lingens,** 1989. Purification, properties and immunological detection of a bromo-catalase from *Streptomyces venezuelae* and from a chloramphenicol-nonproducing mutant. *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 2493-2502.
  14. **Loewen, P.C.** 1984a. Isolation of catalase-deficient *Escherichia coli* mutants and genetic mapping of *katE*, a locus that affects catalase activity. *J. Bacteriol.*, **157**, 622-626.
  15. **Loewen, P.C. and B.L. Triggs.** 1984b. Genetic mapping of *katF*, a locus that with *katE* affects the synthesis of a second catalase species in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **160**, 668-675.
  16. **Loewen, P.C., B.L. Triggs, C.S. George and B.E. Hrabarchuk.** 1985a. Genetic mapping of *katG*, a locus that affects synthesis of the bifunctional catalase-peroxidase hydroperoxidase I in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **162**, 661-667.
  17. **Loewen, P.C., J. Switala and B.L. Triggs-Raine.** 1985b. Catalase HPI and HPII in *Escherichia coli* are induced independently. *Arch. Biochem. Biophys.*, **243**, 144-149.
  18. **Loewen, P.C. and J. Switala.** 1986. Purification and characterization of catalase HPII from *Escherichia coli* K12. *Biochem. Cell Biol.*, **64**, 638-646.
  19. **Loewen, P.C. and J. Switala.** 1987a. Purification and characterization of catalase-I from *Bacillus subtilis*. *Biochem. Cell Biol.*, **65**, 939-947.
  20. **Loewen, P.C. and J. Switala.** 1987b. Purification and characterization of spore-specific catalase-2 from *Bacillus subtilis*. *Biochem. Cell Biol.*, **66**, 707-714.
  21. **Loewen, P.C. and J. Switala.** 1987c. Multiple catalases in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **169**, 3601-3607.
  22. **Mulvey, M.R., P.A. Sorby, B.L. Triggs-Raine and P. C. Loewen.** 1988. Cloning and physical characterization of *katE* and *katF* required for catalase HPII expression in *Escherichia coli*. *Gene*, **73**, 337-345.
  23. **Mulvey, M.R. and P.C. Loewen,** 1989. Nucleotide sequence of *katF* of *Escherichia coli* suggests KatF protein is a novel  $\sigma$  transcription factor. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 9979-9991.
  24. **Roe, J.H., J.S. Lee, H.P. Kim and Y.C. Hah.** 1991. Responses of *Streptomyces coelicolor* upon hydrogen peroxide stress. Proceedings of Seoul Conference on Actinomycetes, 33-44, Research Center for Molecular Microbiology, Seoul, Korea.
  25. **Sak, B.D., A. Eisenstark and D. Touati.** 1989. Exonuclease III and the catalase hydroperoxidase II in *Escherichia coli* are both regulated by the *katF* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3271-3275.
  26. **Schellhorn, H.E. and H.M. Hassan.** 1988. Transcriptional regulation of *katE* in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **170**, 4286-4292.
  27. **Seah, T.C.M., R. Bhatti and J.G. Kaplan.** 1973. Novel catalatic proteins of baker's yeast. I. An atypical catalase. *Can. J. Biochem.*, **51**, 1551-1555.
  28. **Seah, T.C.M. and J.G. Kaplan.** 1973. Purification and properties of the catalase of baker's yeast. *J. Biol. Chem.*, **248**, 2889-2893.
  29. **Storz, G., L.A. Tartaglia and B.N. Ames.** 1990. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science*, **248**, 189-194.

(Received June 23, 1992)

(Accepted July 7, 1992)

---

**ABSTRACT: Multiple Catalases of *Streptomyces coelicolor***

**Kim, Hyoung-Pyo, Jong-Soo Lee, Yung-Chil Hah and Jung-Hye Roe** (Department of Microbiology and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

*Streptomyces coelicolor* produces at least 4 catalase activity bands with different electrophoretic mobilities on polyacrylamide gel which vary during development. Spores and mycelia at stationary phase produced all the activity bands (Cat1, 760 kD; Cat3-1, 170 kD; Cat3-2, 140 kD; Cat3-3, 130 kD; Cat4, 70 kD) except for Cat2 (300 kD). Mycelia at mid-logarithmic phase produced only Cat2 and Cat3-2 bands, and mycelia at late-logarithmic phase produced bands except Cat1 and Cat2. Catalase-deficient mutants were screened in *S. coelicolor* by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bubbling test following NTG mutagenesis. We tested several non-bubbling or slow-bubbling mutants for their catalase activities. The overall activities in cell extracts decreased more than 5 fold. Activity bands in native gel selectively decreased in intensity or disappeared. In all the non-bubbling mutants tested, Cat3-2 band decreased significantly or disappeared, suggesting that Cat3-2 is the major catalase. The selective disappearance of bands in mutants suggest that each band is governed by different genes. We purified catalase activity from cell extracts obtained at late-logarithmic phase. Following chromatographies on Sepharose CL-4B, DEAE Sepharose CL-6B, Phenyl Sepharose CL-4B, and hydroxylapatite columns, only the Cat3-2 activity was obtained. The native form of Cat3-2 has molecular weight of approximately 140 kD, judged by gel electrophoresis. The electrophoretic mobility on SDS-polyacrylamide gel suggests that this enzyme contains 2 identical subunits of 67 kD.