

미생물 Ornithine Decarboxylase와 polyamines에 관하여

성 창 근

충남대학교 농과대학 식품공학과

Polyamine의 기능은 cell growth, division, differentiation과, 동물세포에서만 관찰되는 neoplastic transformation과 아주 밀접하게 관련되어 있다. 이들의 정확한 생화학적 기능이나 mechanistic 작용 등에 대하여는 알려진 바가 거의 없으나, 피상적 작용과 그 기능으로서는 다음과 같은 보고가 있다(1, 2, 3, 4, 19, 35). 1) DNA topoisomerase, DNA polymerase, apurinic endonuclease 등과 같은 핵산대사에 영향을 주며, 2) 핵산과의 잘 알려져있지 않은 상호작용에 의하여 침전을 하며, T_m 을 높이고, 제한효소에 대하여 핵산을 보호한다. 3) T₄phage에서는 Ca⁺⁺과 함께 주 양이온이며, 4) 단백질-단백질, 단백질-지질 상호작용에 의한 세포막의 삼차원적 구조와 기능, 융합 등에 어떤 관련이 있다. 5) 식물에 있어 노화를 억제하며, 6) 항암 항생제로서 이용되는 bleomycin, spergualin group의 전구체이다. 7) phospholipase C, protein kinase C를 활성화시킨다.

그런데 polyamine을 생합성하는 율속단계효소인 Ornithine Decarboxylase(ODC)는 미생물에서 많이 연구되어 왔으며 실제적으로 이 효소에 대한 연구는 세균에서 그 효시를 이루었다(1-5, 19, 35). 최근 들어서는 *Escherichia coli* (1-22), *Saccharomyces cerevisiae* (35-40), *Neurospora crassa*, *Physarum polycephalum*에서 보다 상세한 연구가 이루어졌는데, 본고에서는 *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*에 관하여 좀 더 자세히 살펴보고자 한다. Polyamines의 연구나 ODC효소에 대한 연구는 미생물이 많이 이용되었는데, 이는 비교적 쉽게 세포배양이 되기도 하지만, ODC가 결손된 변이주를 만들기가 비교적 용이한 이유도 있었다.

1. *Escherichia coli*

Fungi와 protozoa에서는 ODC가 putrescine 합성의 유일한 효소이나, *Escherichia coli*에서의 putrescine의 합성대사는 다른 생물과는 매우 다르며, putrescine 합성에 각각 다른 두 과정이 있다(Fig. 1). 즉 1) ODC는 합성능과 분해능이 각각 다른 두 효소로 알려져 있는데, Ornithine이 특이적 합성기능이 있는 ODC에 의하여 탈탄산되거나(2, 6), 2) Arginine이 arginine decarboxylase(ADC)의 합성기능에 의해 agmatine을 형성하고 다시 agmatine ureohydrolase에 의하여 가수분해되어 urea와 putrescine이 생성되는 과정이다(2, 7).

A. Biosynthetic Ornithine Decarboxylase

1. 정제효소의 특성

Table 1은 지금까지 연구보고된 ODC 효소에 대하여 간략하게 설명하고 있다. 이중 *E. coli*에 있어 biosynthetic ODC는 야생형에서 정제되었으며(8, 9), 그 유전자 또한 multicopy plasmid에 clone된 바 있다(10, 11). Biosynthetic ODC는 효소활성을 위하여, pyridoxal phosphate를 요구하고, 두개의 subunit로 이루어져 있으며, 각기 82,000의 분자량으로 구성되어 있다. 최적 pH는 8.1이며, pyridoxal phosphate를 위한 K_m 값은 1 μ M이고, ornithine의 K_m 값은 5.6 mM이었다. 이 효소는 기질인 Ornithine에 대하여 매우 특이적이나, 구조 유사체인 lysine에 대하여는 미미한 역가를 보인다(12).

2. Regulation

ODC효소와, 그 regulation을 연구한 논문으로는, putrescine, spermidine과 spermine에 의한 저해(inhibition)와 억제(repression), 여러 nucleotides에 대한 활성화, antizyme에 의한 저해, 그리고 cyclic-AMP에 의한 negative control 등이 있다. 1). spermidine과 spermine은 배지에 첨가시 효소의 형성을

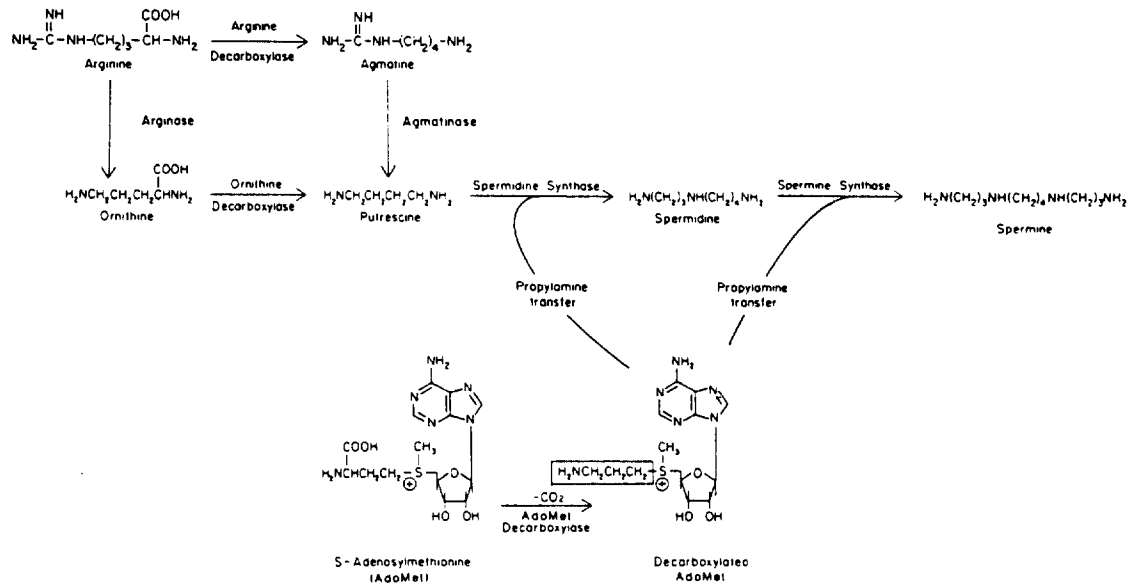


Fig. 1. Pathway for the biosynthesis of polyamine in *E. coli*.

억제하는 ODC의 경쟁저해제(competitive inhibitor)이다(13), 2) 여러 nucleotide mono, di-phosphate의 낮은 농도는 ODC효소 역가를 약간 높이며, guanosine triphosphate와 deoxy guanosine triphosphate는 효소의 역가를 약 4배 증가시킨다(8, 14). 3) c-AMP binding protein의 존재하에서, c-AMP는 ODC효소 생산을 감소시킨다(15, 16). 4) Kilikis (17-19) 등은 antizyme이라 불리는 cellular 단백질에 의하여 *in vitro*에서 ODC는 활성이 저해되는 reguloty system을 보고한 바 있다. 이는 열기성 단백질과 산성 단백질이며, 공유결합은 아니나, ODC와 ADC에 단단히 결합되어 있음이 알려졌다. 그러나, 이 결합은 높은 이온강도, 핵산의 농도, *E. coli*에서의 activaor protein 첨가시 되돌려진다.

최근에 두 종류의 antizyme proteins이 Panagiotidis와 Canellakis(20)에 의하여 순수 정제되었으며, 두 개의 ribosomal protein (S20/L26 and L34)과 동일함이 밝혀졌다. 그러나, antizyme-ODC의 상호작용이 *in vivo*에서는 어떤 생리학적 중요성이 있는지에 대해 전혀 알려지지 않고 있다.

3. ornithine 유사체에 의한 저해

E. coli ODC는 비가역적 저해제인 MFMO (mefluomethylornithine)와 alphamethylornithine에 의하여 저해된다. 그러나 원핵세포와 진핵세포의 저

해제로 널리 사용되며, mechanism-based irreversible inhibitor인 DFMO (difluomethylornithine)는 *E. coli*의 ODC효소활성을 저해하지 않는다. 이에 대한 보다 구체적 설명은 아직 알려지지 않고 있다(22).

4. Genetic studies

*speC*를 위한 유전자는 *E. coli* chromosome 상에서 63.4분에 위치하며 이 근처에 존재하는 몇개 유전자들의 순서로서 *metC glu speC metR speB speA* 등이 있다(26, 27). Point mutant와 deletion mutant *speC*가 많이 알려졌다(28, 19), deletion mutation에서는 완전해 효소역가를 상실한다. 표현형으로서의 ODC deficiency는 성장배지에 과량의 arginine를 첨가하면 ornithine의 생합성은 완전히 저해되고 *E. coli*는 arginase 역가를 전혀 갖지 않기 때문에, arginine으로부터 ornithine을 만들 수 없게 된다. *speC*가 삭제된 변이주는 ODC 효소 역가가 없다 하더라도 ADC-agmatine ureohydrolase 대사에 의하여 putrescine을 만들 수 있게 된다(3, 5, 29). 그리고 polyamines의 첨가가 없는 곳에서도 *speC* mutant에서는 상기 합성기작은 derepressed된다.

speC 유전자가 pBR322의 multicopy plasmid에 clone되었으며, 발현된 단백질들이 wild type과 *speC*, *speE*의 *E. coli* 균주에서 얻어졌다. Wright와 Boyle은 hybridization 실험에 의하여 16개의 세균

균주들 중 4가지만이 sequence homologous하다고 보고하였다(32).

B. biodegradative Ornithine Decarboxylase

1943년, Gale(1, 2, 33, 34)은 *E.coli*에서 inducible (biodegradative) ODC를 처음으로 보고한 바 있는데, 이 효소는 낮은 pH, semianaerobic과, 과량의 아미노산을 함유한 배지에서 성장될 때, 전체 단백질 양의 약 7%가 된다고 한다. Homogeneity로 정제된 biodegradative form 효소의 최적 pH는 6.9로서 biosynthetic의 8.2보다 낮으나, 다른 inducible 아미노산 decarboxylase보다는 상당히 높다. Immunological 연구는 두 효소가 상호간 cross-react하지 못함을 보여주었다.

진핵세포에서는 사람, 소, hamster, mouse, rat, yeast, 그리고 *trypanosoma brucei*의 유전자 구조가 sequencing에 의해 밝혀졌음에도 불구하고 *E.coli*에서는 알려지지 않고 있다(41). 이 두 가지 형태의 효소는 subunit 크기, dimeric 구조, kinetic 특성, 그리고 pyridoxal phosphate 요구성 등에서 매우 유사한 점이 많다. *E.coli* K-12와 같은 일반적인 *E.coli*에서는 biodegradative form의 ODC 효소가 알려지지 않고 있다.

II. *Saccharomyce cerevisiae*

동물세포와 같이 효모에 있어 모든 putrescine은 오직 ornithine의 탈탄산 반응에 의하여 생성된다. 이 효소는 유전학적, 생화학적으로 광범위하게 연구되어 왔지만, native 효소와 효소활성의 조절 특성에 대하여는 아직도 알려진 바가 많지 않다(35, 36).

A. ODC 효소와 그 특성

효모 ODC는 *spe2* 균주에서 정제되어 분자량(68,000), subunit(1)의 수 등이 밝혀졌다(37, 38). 이 균주는 adenosylmethionine decarboxylase가 결핍된 대신, ODC가 활성화 되어있고, Ornithine과 pyridoxal phosphate를 위한 K_m 은 각각 57μ , $0.6 \mu M$ 이다.

그리고 *E.coli*와는 상반되는 alpha-DFMO에 의하여 비가역적으로 활성이 저해 된다. 그 후 Tyagi 등은 protease 저해제 존재하에서 단백질을 분리하면, 분자량이 86,000이 됨을 보고하여, 분자량 68,000은 protease에 의한 분해되었음을 제안한 바 있다(37,

39).

한편 Fonzi와 Sypherd(41)은 clone 유전자의 핵산 염기서열로부터, subunit의 크기를 52,000으로 추론 하였으며 native 효소는 dimer로서 존재한다고 보고하여 상기 연구와 큰 차이를 보이고 있고 이는 효소의 크기에 있어 동물세포의 ODC가 약 50,000-60,000이기 때문에 이들과 유사하다.

B. Regulation

Posttranslational modification이 효모에 있어 ODC역가의 조절에 주된 역할을 하며, 효소활성의 반감기는 동물조직이나, *P. polycephalum*에서 보다 더욱 길다. 실제로 단백질합성저해제인 cycloheximide를 첨가하면, 50%의 역가를 소실하는데 6시간이나 걸리기 때문에 사람 rat 등의 10-30분과 비교된다(37, 40). 이는 효소 단백질에, PEST sequence가 없기 때문으로 고려될 수 있다. 효모 배양액에 spermidine과 spermine의 첨가는 ODC 효소역가를 급격히 떨어뜨려 2시간 80%의 활성이 소실된다. 그럼에도 불구하고 효소분자내로 transamidation에 의한 amines의 합체(incorporation), 인산화 탈인산화, pyridoxal phosphate에 대한 친화성의 변화, protease에 의한 분해, 또는 antizyme 등 어느기작에 의하여 이를 설명할 수 있는지에 대한 확실한 연구가 미흡하다(37-40).

ODC 활성은 효모 출아, 쇠퇴기 등에 따라 많은 차이가 있으나, 출아개시 6시간 후에 최고 정점을 보이며 ODC저해제를 처리해도 출아가 가능하다고 알려져 있다. ODC 효소역가는 너무 오래된 배양액에서 보다는 낮은 농도의 대수기에서 약 50배 높다. ODC 효소 양의 증가는 adenosylmethionine decarboxylase가 결손된 변이주에서 볼 수 있는데, amine이 없는 배지에서 배양되면 spermidine과 spermine이 전혀 축적되지 않는다. 이와같은 변화는 효소단백질량의 증가에 의하는지 또는 amine의 존재시 posttranslational modification에 의하는지 밝혀져야 될 줄 믿는다(37).

C. Gene structure

spe1, *spe10*처럼 ODC 효소생산이 없는 변이주가 여러 실험실에서 보고되었다.(36). 이 변이주들은 amine을 배지에 넣어주지 않으면 성장이 좋지 않으며, 다른 변이주들은 amine 첨가를 절대적으로 요구하고 있다. 이때 spermidine과 spermine은 put-

Table 1. Properties of purified Ornithine Decarboxylase from various source

Source	Final specific activity (umol/min/mg)	Purification Fold	Subunit Mr**	Amino acid number from cDNA sequence
Mouse kidney	22-70	2,500-10,000	53,000(2)	NA*
Rat liver	19-24	350,000-710,000	52,000(2)	NA
Human liver	NA	NA	51,150	461
Trypanosoma brucei	NA	NA	49,200	445
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NA	NA	52,400(2)**	466
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.5	1,500	86,000 or 68,000***	NA
<i>Physalum polycephalum</i>	20	3,500	43,000(2)	NA
<i>Physalum polycephalum</i>	20	5,000	52,000(2)	NA
<i>Neurospora crassa</i>	44	670	53,000(2)	NA
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	0.3	15,500	64,000(1)	NA
<i>Eschrichia coli</i> (synthetic)	99	4,300	82,000(2)***	NA
<i>Eschrichia coli</i> (degradative)	130	15	80,000(2)***	NA
<i>Lactobacillus</i> sp.	180	18	85,000(2 or 12)	NA

* NA: Not applicable

** the number of subunits is given in parenthesis

*** the reason for these discrepancies is not yet known

rescine 만큼 균체성장 효과가 있다. 이 변이주는 성장이 안되거나 늦어지는 외에 2가지 다른 특성을 보이는데 첫째, 포자형성이 불가능하고, 둘째, double-stranded RNA(mRNA) killer plasmid를 유지하지 못하나 spermidine이나 spermine을 넣으면 이러한 현상이 회복된다. *spe4*는 퇴행성 변이주이나 *spe1*과는 서로 linked되어 있지 않고, spermine 합성의 구조유전자로 보고된 바 있다.(38, 39).

*spe4*에서의 변이는 *spe1* 변이중의 성장속도를 늦추고, ODC활성을 측정할 수 없을만큼 미량이다. 이러한 점들을 고려하여 *spe40*이 spermine synthetase의 조절유전자로 생각되며 *spe1*과는 서로간 아주 밀접하게 연관되어 있다. 그러나 아직까지 수 많은 연구에도 불구하고 두개의 개개유전자의 분리에 대하여는 연구보고가 없다(35, 36).

*spe40*에서 변이는 *spe1*변이주가 야생효모 만큼 성장될 수 있어 ODC효소활성과 putrescine의 농도는 정상효모에 근접한다. 그런데, 흥미롭게도 spermidine은 발견되나 spermine은 발견되지 않는다. *spe4*와 *spe40*에서 *spe1*으로부터 야기되는 결손이 회복되는 기작은 전혀 밝혀지지 않았다(36). 아직도

spe1 유전자와 ODC의 구조유전자에 대하여는 많은 논란이 되고 있으나, Tabor 등은 *spe1* defect가 spermine synthetase 조절유전자로서 *spe10*으로 명명되어야 옳다고 제안한 바 있다(36).

Fonzi와 Supherd(41)은 효모 *spe1* 유전자를 clone하고, 핵산 염기서열을 밝히고 *E. coil speC* 균주에서 발현시켜 ODC가 구조유전자임을 밝혔다. 뿐만아니라 효모의 ODC 아미노산 서열이 동물과 비교시 40%의 homology가 있음을 보고하였다.

참고문헌

1. Gale, D.P.: The bacteria amino acid decarboxylase, Adv Enzymol 1946 : 6 : 1.
2. Morris, D.R., and Pillingame, R.H.: Regulation of amino acid decarboxylation, Annu Rev Biochem 1974 : 43 : 303.
3. Tabor, C.W., and Tabor, H.: Polyamines in microorganisms Microbiol Rev., 1985 : 49 : 81.
4. Tabor, C.W., and Tabor, H.: Polyamines Annu Biochem, 1984 : 53 : 739.
5. Tabor, C.W., and Tabor, H.: Microbial mutants

- delicent in polyamine synthesis, Heime YM (eds). The physiology of polyamines, Boca Raton, M CRC Press.
6. Morris, D.R., and Pardee, A.B.: A biosynthetic ornithine decarboxylase in *Escherichia coli*, *Biochem Biophys Res Commun* 1965 : **20** : 697.
 7. Morris, D.R., and Pardee, A.B.: Multiple pathways of putrescine biosynthesis in *Escherichia*, *J. Bio. Che.*, 1966 : **241** : 3129.
 8. Applebaum, D.M., Dunlap, K., and Morris, D. R.: Comparison of the biosynthesis and biodegradable decarboxylase of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 1977 : **16** : 1580.
 9. Morris, D.R., and Bocker, E.A.: Biosynthetic and biodegradative ornithine and arginine decarboxylase from *Escherichia coli*, *Methods Enzymol* 1983 : **94** : 125.
 10. Boyle, S.M., Maklum, G.D., Hafne, B.H., Wright, J.M., and Tabor, C.W.: Expression of the cloned genes encoding the putrescine biosynthetic enzymes and methionine adenosyl-transferase of *Escherichia coli*(*speA. speB. speC. and merK*), *Gene* 1984 : **30** : 129.
 11. Labon, C.W., Pabon, H, Hafnel, F.W., Matkham, G.D., and Boyle, S.M.: Cloning of the *Escherichia coli* genes for the biosynthesis enzymes for polyamines, *Methods Enzymol* 1983 : **94** : 117.
 12. Ipalashi, N., Hanimil, H, Muna, A., Kalepawa, I., and Bime, S.: Formation of a compensatory polyamines by *Escherichia coli* *polyamine requiring mutant during growth in the absence of polyamine*, *J. Bacteriol*, 1986 : **166** : 128.
 13. Tabor, H., and Labot, C.W.: Formation 1,4-deaminobutane and of spermidine by an ornithine auxotroph of *Escherichia coli* grown on limiting orithine or arginine, *J. Bio. Chem.* 1969 : **244** : 2286.
 14. Homa, B., Jame, I., and Pispa, J.: Ornithine decarboxylase from *Escherichia coli*: Stimulation of the enzyme activity by nucleotides, *Biochem Biophys Res Commun* 1972 : **47** : 11 65.
 15. Wephs, J.M., Boyle, S.S.M.: Negative control of ornithine decarboxylase and arginine decarboxylase by adenosine 3',5'-Lysine monophosphate in *Escherichia coli*, *Mol Gen Genet* 1982 : **186** : 482.
 16. Wiphs, J.M., Satishehimdran, C., Boyle, S.M.: Transcription of the *spe*(ornithine decarboxylase) gene of *Escherichia coli* is repressed by cycle AMP and is receptor protein, *Gene* 1986 : **44** : 37.
 17. Hllen, S., Kyrialidis, D.A., Canellahin, E.S.: Purification and properties of the antizymes of *Escherichia coli* to ornithine decarboxylase, *Biochem Biophys Acta* 1983 : **760** : 154.
 18. Kytiakidis, D.A., Helter, J.S., Canehakis, E.S.: Modulation of ornithine decarboxylase activity in *Escherichia coli*, *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 1978 : **75** : 4699.
 19. Canellaks, P.S., Viceps-Madore, D., Kyriakidis, D.A., Heller, J.S.: The regulation and function of ornithine decarboxylase and of the polyamines, *Curr Fop Cell Regul* 1979 : **15** : 155.
 20. Panaphothis, C.A., and Canehakis, E.S., Comparison of the basic *Escherichia coli* antizyme 1 and 2 with the ribosomal proteins S20.1 76 and 1.34. *J. Bio. Chem.*, 1984 : **259** : 15025.
 21. Kasluwam, K., and Igarashi, N.: Nonspecific inhibition of *Escherichia coli* ornithine decarboxylase by various ribosomal proteins: Detection of a new ribosomal protein possessing strong antizyme activity, *Biochem Biophys Acta* 1987 : **911** : 180.
 22. Tabor, C.W., and Rehogg, P.D.: The efect of isolation conditions on the polyamine content of *Escherichia coli* ribosomes, *J. Biol. Chem.* 1967 : **242** : 1044.
 23. Kallio, A., and Meccan, P.P.: Difluoromethylornithine irreversibly inactivate ornithine decarboxylase from *Pseudomonas aeruginosa* but does not inhibit the enzymes of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 1981 : **200** : 69.
 24. Maas, W.K.: Mapping of genes involved in the synthesis of spermidine in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 1972 : **119** : 1.
 25. Hafne, B.W., Tabor, C.W., and Tabor, H.: Isolation of a *merK* mutant with a temperature sensitive S-adenosylmethionine synthetase, *J. Bacteriol.* 1977 : **132** : 832.
 26. Hirshfield, I.N., Beifer, Z., and Maas, W.K.:

- Isolation and characterization of a mutant of *Escherichia coli* blocked in the synthesis of putrescine, *J. Bacteriol.* 1970 : **101** : 725.
27. Cunningham-rundles, S., and Maas, W.K.: Isolation characterization and mapping of *Escherichia coli* mutants blocked in the synthesis of ornithine decarboxylase. *J. Bacteriol.* 1975 : **124** : 791.
 28. Tabor, H., Hafner, P.W., and Tabor, C.W.: Localized mutagenesis of any specific region of the *Escherichia coli* chromosome with bacteriophage *mu.*, *Methods Enzymol* 1983 : **98** : 9329.
 29. Hafner, B.W., Tabor, C.W., Tabor, H.: Mutants of *Escherichia coli* that do not contain 1,4 diaminobutane(putrescine) or spermidine. *J. Biol. Chem.*, 1979 : **254** : 731-737.
 30. Morris, D.R., and Jorstad, C.M.(1970): *J. Bacteriol.*, 102 : 731-737.
 31. Morris, D.R., and Koffion, KI: Putrescine biosynthesis in *Escherichia coli*. Regulation through pathway selection, *J. Biol. Chem.* 1969 : **244** : 6094.
 32. Wright, J.M., Boyle, S.M.: Intergenetic homology of the *speC* gene encoding biosynthetic ornithine decarboxylase in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 1984 : **34** : 392.
 33. Gale, E.F.: The production of amines by Bacteria, *Biochem. J* 1940 : **34** : 392.
 34. Baddley, J., and Gale, E.P.: Codecarboxylase function of pyridoxal phosphate, *Nature* 1945 : **155** : 727.
 35. Tabor, C.W., Labor, H., and Tyagi, A.K.: Biochemical and genetic studies of polyamines in *Saccharomyces cerevisiae* in Kaye A.A., Chayen, R. (eds): *Advances in Polyamine Research*. New York, Raven Press, 1983, vol. 4.
 36. Cohn, M.S., Tabor, C.W., and Tabor, H.: Regulatory mutations affecting ornithine decarboxylase activity in *Saccharomyces cerevisiae.*, *J. Bacteriol* 1980 : **142** : 791.
 37. Tyagi, A.K., Tabor, C.W., Tabor, H.: Ornithine decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*: Purification properties and regulation of activity, *J. Biol. Chem.*, 1981 : **256** : 12156.
 38. Tyagi, A.K., Tabor, C.W., and Tabor, H.: Ornithine decarboxylase (*Saccharomyces cerevisiae*), *Methods Enzymol* 1983 : **94** : 135.
 39. Poso, H., and Pegg, A.E.: Measurement of the amount of ornithine decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae* and *saccharomyces uvarum* by using (¹⁴C) difluoromethylornithine, *Biochim Biophys Acta* 1983 : **743** : 209.
 40. Tyagi, A.K., Tabor, H., and Tabor, C.W.: Inactivation of yeast ornithine decarboxylase by polyamine *in vivo* dose not result from the incorporation of polyamines into enzyme protein, *Biochem Biophys Res Commun* 1982 : **109** : 533.
 41. Fonzi, W.A., Sypherd, P.S.: Expression of the gene for ornithine decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 1987 : **262** : 10127.