

## *Myxococcus xanthus*의 protoporphyrin IX의 합성과 세포 성장에 대한 succinylacetone의 영향

이 병 옥

고신대학교 생명과학과

### The effects of succinylacetone on synthesis of protoporphyrin IX and cell growth of *Myxococcus xanthus*

Bheong-Uk Lee

Dept. of Biological Sciences, Kosin University, Busan 606-701, Korea

#### Abstract

Protoporphyrin IX is an intermediate molecule in the heme biosynthetic pathway. Intra- and extracellular concentrations of protoporphyrin IX in the wild type strain, *Myxococcus xanthus* DK1622 were measured by reverse phase HPLC. The amount of intracellular protoporphyrin IX continuously increased and reached 6.4 picomoles/mg of protein at the stationary phase. Extracellular protoporphyrin IX began to be detected from the mid-exponential phase. The culture supernatant that was collected in the stationary phase contained approximately 3.0 picomoles of protoporphyrin IX per mg of protein. Spores formed by nutrient depletion contained about 6.5 picomole protoporphyrin IX/mg of protein. The synthesis of protoporphyrin IX and cell growth were strongly inhibited by addition of succinylacetone to a final concentration of 500  $\mu$ M. Succinylacetone, however did not appear to interfere developmental processes. Normal developmental behaviors including aggregation and spore formation was achieved even if succinylacetone was added in a medium. Photolysis among cells grown on a starvation medium supplemented with succinylacetone was also observed. These results indicate that protoporphyrin IX may be important to *M. xanthus* vegetative growth, but not critical to development processes.

**Key words** – *Myxococcus xanthus*, protoporphyrin IX, succinylacetone

#### 서 론

주로 토양에서 서식하는 *Myxococcus xanthus*는 그람 음성의 간균 형태 세균으로, 수십억의 개체가 모여서 사회적 생활을 하며, 영양분의 고갈 시에는 비활성 포자를 갖는 자

실체(fruiting body)를 형성하는 것으로 알려졌다 [10, 29]. 기하급수적으로 성장하는 *M. xanthus* 세포는 약 4시간의 generation time을 갖는데, 이는 *Escherichia coli* 등에 비해서 비교적 긴 시간이다. 영양분이 고갈되기 시작하면 약  $10^5$  세포들이 한 지점으로 모여들어 자실체를 형성하기 시작하는데, 이 자실체 안에서는 간균 형태로 존재하던 세포들이 구형의 안정된 수면 포자인 myxospore들로 변해가는 형태 전환(encystment)이 일어난다 [29].

\*To whom all correspondence should be addressed

Tel : 051-990-2321, Fax : 051-405-9905

E-mail : bulee@kosin.ac.kr

Heme 구조를 갖는 화학물은 고등한 포유류에서는 물론 세균에서도 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [25]. *Escherichia coli*의 경우에 heme이 결여된 경우 호기성 대사를 수행하지 못하며, 발효가 가능한 탄소원만을 사용하여 성장할 수 있다[27]. 이는 heme이 미토콘드리아의 전자전달계에 존재하는 cytochrome C oxidase의 필수 조효소이기 때문이다[8]. 또한 *E. coli*의 경우에 protoporphyrin IX로부터 heme을 합성을 촉매하는 효소인 ferrochelatase (EC4.99.1.1)를 암호화하는 *hemH* 유전자에 돌연변이가 발생할 경우에, protoporphyrin IX가 세포 내에 축적되며, 푸른빛을 조사할 경우에는 tumbling 반응을 나타내고, 어두운 곳에서는 지속적인 running 반응을 하는 것으로 관찰되었다[33]. 사람을 비롯하여 포유류에서는 정확한 구조를 갖는 heme의 생산이 더욱 중요하다. 사람의 경우 heme 생합성에 문제가 생긴 경우에는 'Porphyria'로 불리는 유전성 질병에 걸리게 된다. 사람의 경우 최소 8개의 효소들이 정확한 구조의 heme 생합성 과정에 참여하는데, 이 중 어떤 효소에라도 이상이 생기면 Porphyria 증상을 나타내게 된다. Heme 생합성의 중간체인 protoporphyrin IX는 *Rhodobacter capsulatus* 및 *R. sphaeroides* 등에서 발견되는 bacteriochlorophyll의 전구체이며[13, 34], chlorophyll 및 bacteriochlorophyll 생산을 위한 전구체로서의 protoporphyrin IX의 역할은 최근 총설로서 정리가 되었다[32]. Protoporphyrin IX는 또한 *Bradyrhizobium japonicum*에서는 protoheme의 생산을 위한 중간체이기도 하며[12], 치아 질환의 원인 세균인 *Porphyromonas gingivalis*의 성장을 위한 필수 인자이기도 하다[26]. Protoporphyrin IX의 전구물질인 uroporphyrinogen III는 sulfite 및 nitrite reductase의 prosthetic 그룹으로 작용하는 siroheme 및 cobalamin (vitamin B<sub>12</sub>)의 전구 물질이기도 하다[14,22,24].

*M. xanthus*는 광합성을 하지는 않지만 빛에 반응하여 carotenoid를 합성한다[4-6]. 이 때 빛의 수용체로는 heme 합성의 중간물질인 protoporphyrin IX이 유력한 것으로 추정되고 있다[5]. *M. xanthus*는 heme 생합성 과정에 대한 연구가 아주 제한적으로 수행되었는데, 현재까지 유일한 연구는 protoporphyrinogen oxidase (EC1.3.3.4)를 발현하는 유전자에 관한 보고이다[9]. 이 보고에서는 *M. xanthus*로부터 이 효소를 암호화하는 유전자를 클로닝하고, *E. coli*에서 발현하여 50 kDa 크기의 subunit 두개로 구성된 hom-

odimer인 protoporphyrinogen oxidase를 분리하였음을 묘사하였다[9]. 이 효소는 기질로 protoporphyrinogen IX를 이용하여 1 mole의 protoporphyrin 및 3 mole의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 생성하는 것으로 조사되었다. 하지만 *M. xanthus*로부터 protoporphyrin IX의 존재에 대한 직접적인 관찰 보고는 현재까지 없었으며, protoporphyrin IX의 기능에 관한 연구도 수행된 바가 없다.

이 실험에서는, 성장 중인 세포 혹은 발생 포자 등에 존재하는 protoporphyrin IX의 농도를 측정하고, succinylacetone (4, 6-Dioxoheptanoic acid)의 첨가에 의해서 protoporphyrin IX의 생성이 저해되었을 경우에 세포의 성장에 미치는 영향을 측정하였다. 또한 발생에 미치는 succinylacetone의 영향을 알기 위하여, 자실체 형성, 포자 형성 및 발생 전의 단계에서 나타나는 photolysis 현상을 관찰하였다. Protoporphyrin IX의 저해제로 이용된 succinylacetone은, 현재까지도 heme의 결핍에 따른 현상을 조사하기 위해서 사용되고 있는데, protoporphyrin IX의 중간체를 촉매하는 ALA ( $\delta$ -aminolevulinic acid) dehydratase의 저해제로 작용한다[11]. ALA dehydratase는 protoporphyrin IX을 경유하는 생합성 과정에서 2개의  $\delta$ -aminolevulinate를 융합하여 porphobilinogen을 생산하는 과정을 촉매한다[11].

## 재료 및 방법

### 세균 균주와 배지

야생형 균주인 *M. xanthus* DK1622 [30]를 이용하였다. *M. xanthus*는 32°C의 CTT 액체 배지 [1% (w/v) casitone (Difco Laboratories), 10 mM Tris-HCl, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, pH8.0] [16] 혹은 고체 배지[1.5% (w/v) agar 첨가]에서 배양하였다. 포자 형성을 위한 발생 과정은 CF 고체 배지 [10 mM Tris-HCl, 1 mM potassium phosphate, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2 mg of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ml, 0.1% casitone, 2 mg of sodium pyruvate/ml, 1.5% (w/v) agar] [19]에서 수행되었는데 cm<sup>2</sup>의 면적 당 10<sup>7</sup> *M. xanthus* 균주가 배지의 표면 위에 골고루 분포하도록 도말하였다. Succinylacetone (Sigma)은 필요시에 최종 농도 500  $\mu$ M로 배지에 첨가되었다.

## Protoporphyrin IX 분석

*M. xanthus* 세포에서 여러 구조의 porphyrin들은 reverse phase HPLC를 사용하여 분석되었다[28]. 15 W 형광전구 (GE F15T8-SW) 2개로부터 12 cm 거리의 조명 아래에서 배양되거나 혹은 빛의 영향을 최소화하기 위하여 알루미늄 호일로 싸여져서 어두운 곳에서 배양된 세포들은 TPM buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{KHPO}_4$ , 8 mM  $\text{MgSO}_4$ , pH7.6) [19]로 수집하여 얼음에 놓고 60  $\mu\text{s}$ 에서 45 초 간격으로 2번을 microtip을 사용하여 sonication하여 사용하였다. Crude extract에는 같은 양의 0.9 N perchloric acid와 순수 메탄올을 각각 첨가하였다. Vortex를 이용하여 잘 혼합하여 10분을 기다린 후에, 원심분리기를 이용하여 세포 찌꺼기를 제거하였다. 6배의 부피에 해당하는 멸균증류수를 상층액에 첨가하여 잘 섞은 후에, 환원형인 protoporphyrinogen의 활성을 띄게 하기 위해 1시간동안 조명아래 두었다. 그 후에 메탄올-물로 equilibration된 Sep pak column (Millipore)를 통과시켰다. Porphyrin이 붙은 column을 50 ml 메탄올 (10% v/v)로 씻었다. Porphyrin은 정제된 메탄올 3 ml로 씻어내고  $\text{N}_2$  가스가 충전되어 있는 heat block에서 20분 동안 완전히 건조시켰다. Porphyrin이 포함된 용액 (Porphyrin Products Inc.) 10  $\mu\text{l}$ 와 1 N HCl 990  $\mu\text{l}$ 를 혼합하여 ACRODICE13으로 여과시켜 찌꺼기를 제거하였다. Control로 mesoporphyrin IX이 첨가된 샘플 200  $\mu\text{l}$ 를  $\text{C}_{18}$  ODS silica column이 장착된 Beckman 344 HPLC 장치를 사용하여 flow rate 분당 1.5 ml로 분리하였고, protoporphyrin IX 등은 흡광도 395 nm, 발광도 615 nm에서 관찰하였다. HPLC 분석 시에 최종 농도  $5 \times 10^8$  M이 되도록 첨가되어 HPLC로 분리된 mesoporphyrin IX와 protoporphyrin IX peak가 농도 측정을 위한 대조구로 이용되었는데(Fig. 1A), 모든 샘플에는 mesoporphyrin IX만을 첨가하여 HPLC로 분리한 후에 protoporphyrin IX 농도를 측정하는 상대적 기준으로 이용하였다. 샘플의 단백질의 농도는 BCA 시약(Pierce Chemical Co.)을 사용하여 소의 혈장 알부민(bovine serum albumin)을 기준으로 측정하였다.

## Photolysis 관찰 및 myxospore 계수

Photolysis [5,7]의 관찰을 위해서는, 어두운 곳에서 배양되어 안정기(200 Klett units)에 이른 세포를 수거한 후에 1

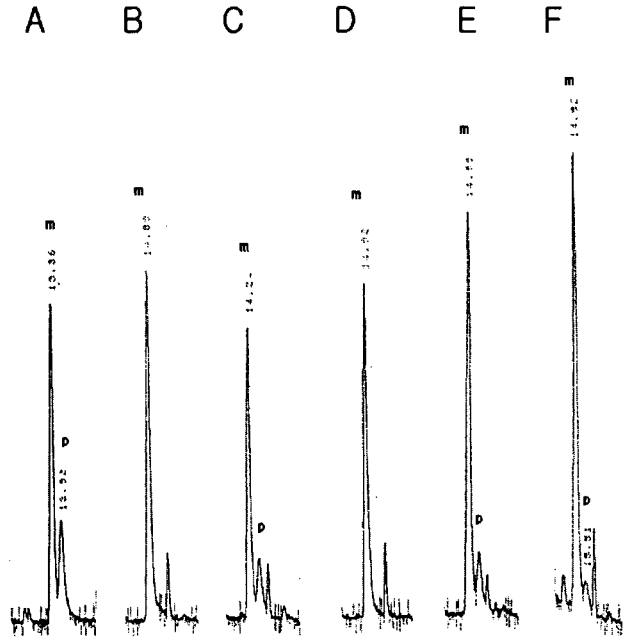


Fig. 1. HPLC profiles of protoporphyrin IX. The highest peaks (m) indicate mesoporphyrin IX added as control.

Mesoporphyrin IX peaks (m) were immediately followed by protoporphyrin IX peaks (p). A: Controls of mesoporphyrin IX (m) and protoporphyrin IX (p). B: Cells grown under illumination. Protoporphyrin IX peak was not detected. C: Cells grown in CTT liquid. Letter p indicates a protoporphyrin IX peak. D: Cells grown in CTT supplemented with 500  $\mu\text{M}$  succinylacetone. No protoporphyrin IX peak was observed. E: Spores formed on CF agar plate. F: Culture supernatant collected at the stationary phase.

ml를 CTT에 도달하여 15 W 형광전구(GE F15T8-SW) 2개로부터 12 cm 안에 놓아두었다. 72 시간 이상의 빛을 조사한 후에, 생존하는 colony의 숫자를 계수하였다. 포자 발생을 위해서는 CTT 액체 배지에서 배양된 세포를 수거한 후에,  $5 \times 10^8$ 의 세포를 지름 10 cm 짜리인 CF 고체 배지에 도달하여 발생을 유도하였다. 4일 동안 배양하여 형성된 자실체를 면도날로 고체 배지 표면에서 걷어내어 100 mM sodium phosphate (pH7.6), 10 mM KCl, 0.1 mM  $\text{MgSO}_4$ 가 함유된 완충액에 재혼탁시키고, 얼음에 놓고 60  $\mu\text{s}$ 에서 microtip (Heat Systemics Ultrasonics)을 사용하여 30초 간격으로 2번을 파쇄한 후에 Leitz phase-contrast 현미경 아래에 위치한 Petroff-Hausser counting chamber에서 포자 개수를 세었다.

## 결과 및 고찰

### *M. xanthus* protoporphyrin IX의 농도 측정

Dailey 등은 *M. xanthus*의 protoporphyrin oxidase를 암호화하는 유전자를 클로닝하여 대장균에서 발현시켰는데, 이 효소는 protoporphyrinogen IX를 분해하여 1:3의 비율로 protoporphyrin과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 생산하였다[9]. 이는 *M. xanthus*에 protoporphyrin이 존재하는 것을 의미하였다. 하지만 *M. xanthus*로부터 porphyrin의 존재에 대한 직접적인 관찰이나 농도를 측정된 보고는 없었다. 현재까지 보고된 세균류에 존재하는 porphyrin의 농도 측정은 주로 사람에게 기생하거나 감염되는 세균류를 중심으로 이루어졌는데, 예로 여드름의 원인균 중 하나인 *Propionibacterium acnes*와 *Haemophilus parainfluenzae*의 경우에 pH의 변화에 따른 poyphyrin의 생산량이 HPLC에 의해서 측정되었다[17,20].

본 실험에서는 어두운 곳에서 배양한 다양한 성장 단계에 있는 *M. xanthus* 세포들로부터 protoporphyrin을 분리 정제하여 reverse phase HPLC를 사용하여 농도를 측정하였다(Fig. 1 및 Table 1). Protoporphyrin IX의 농도를 비교 측정하기 위해 인위적으로 5×10<sup>8</sup> M이 되도록 첨가된 mesoporphyrin IX를 control로 하여, 관찰된 HPLC peak로부터 protoporphyrin IX의 실제 농도를 세포와 포자 및 성장 배지에서 계산하였다(Table 1). 어두운 곳에서 성장한

*M. xanthus* 균주만을 이용하여 실험을 한 이유는 빛에 의해서 protoporphyrin IX의 생성 자체가 심하게 방해받기 때문이다(Fig. 1B). *M. xanthus*에서 빛에 의한 protoporphyrin IX의 합성 저해는 매우 흥미로운데, 이는 protoporphyrin IX가 세포 내에 축적되는 돌연변이를 갖는 *Escherichia coli* 균주에서 관찰되었던 빛에 의한 치사 작용으로 설명이 가능할 것이다[23]. *visA* (= *hemH*) 유전자 돌연변이를 갖는 *E. coli* 돌연변이체는 빛에 민감하여 가시광선을 조사하는 경우에 죽게 되는 photosensitivity 현상이 나타나는데, 조사 결과 이는 *visA* 유전자가 암호화하는 ferrochelatase (EC4.99.1.1)의 결핍으로 protoporphyrin IX가 세포 내에 축적되어 발생하는 것으로 밝혀졌다. 따라서 *M. xanthus*도 빛의 작용으로부터 스스로를 보호하기 위하여 광수용체로 추정되는 protoporphyrin IX의 생산을 최소화하는 것이 아닌가 생각된다. 하지만 succinylacetone에 의해서 protoporphyrin IX의 합성을 방해할 때 성장 자체가 심하게 억제되는 현상이 일어남으로, 이처럼 빛이 조사되는 경우에는 필요한 최소량의 protoporphyrin IX만이 생산되는 것으로 생각된다.

어두운 곳에서 성장하는 *M. xanthus*에서의 protoporphyrin IX의 세포 내 농도는 약 55 Klett unit의 세포 성장을 보이는 초기 대수기에서는 세포 단백질 1 mg 당 0.1 picomole로 관찰되지만, 배양 시간에 따라서 계속적으로 증가하는 것으로 관찰되었고 세포의 성장이 더 이상 일어나지 않는 안정기에서 최고치에 이르렀다(Table 1). 이 시점에서 세포 성장은 초기 대수기와 비교하여 약 4배가 증가하였지만, 세포 내에 존재하는 protoporphyrin IX의 농도는 세포 단백질 1 mg 당 약 6.4 picomole로서 60배 이상의 농도가 존재하는 것으로 조사되었다(Fig. 1C, Table 1). 이는 세포가 성장함에 따라서 protoporphyrin IX의 합성이 세포 성장 속도보다도 빠르게 이루어지는 것을 의미한다. 또한, 세포 성장이 약 100 Klett unit에 도달한 대수기의 중간에 도달하면 protoporphyrin IX를 성장 배지에서 관찰할 수가 있었다. 세포 내의 주요 생체물질로서 많은 에너지를 이용하여 최소 9단계의 생합성 과정을 거쳐 생산되는 물질인 protoporphyrin IX의 세포 외로의 배출에 대한 이유는 알 수가 없지만, 미토콘드리아의 경우에 protoporphyrin IX의 축적은 미토콘드리아의 파괴와 세포의 치사를 야기시키고 [1], 또한 축적된 porphyrin에 의해서 세포의 photodes-

Table 1. Concentrations of protoporphyrin IX from various samples

Samples	Concentrations (picomoles/mg of protein)
CTT-55KUa	0.1
CTT-115KU	3.0
CTT-210KU	6.4
CTT-Sup	3.0
CTT+SA	N.D.
CTT+SA-Sup	N.D.
Spore	6.5
Spore+SA	1.1

a indicates Klett units. 55KU means that cells reached 55 Klett units when they were collected. Sup; supernatant, +SA; addition of succinylacetone into medium, N.D. stands for Not Detected.

truction이 일어난다는 보고도 있었다[16]. *Saccharomycopsis lipolytica*의 돌연변이체는 물에 용해되지 않는 적색 pigment를 분비하는데, 이 물질이 protoporphyrin IX로 밝혀졌다는 보고가 있었으며[2] 위에서도 언급된 *H. parainfluenzae*의 경우에 pH의 변화에 따라서 poyphyrin이 성장 배지 내에 얼마나 존재하는지가 측정되었다[20]. 하지만 *M. xanthus* 성장 배지에 존재하는 protoporphyrin IX이 분비에 의한 것인지 혹은 cell lysis 등에 의한 세포 파괴에 기인한 것인지는 알 수가 없다. *M. xanthus*의 경우에 성장 배양액에 존재하는 protoporphyrin IX 농도는 계속적으로 증가되어 안정기에 도달한 세포의 배양액에서는 세포의 단백질 대비하여 3.0 picomoles/mg of protein이 존재하는 것으로 측정되었다(Fig. 1F). 흥미롭게도 영양분의 고갈에 의해서 형성된 포자에서도 protoporphyrin IX는 6.5 picomoles/mg of protein로 존재하는 것으로 관찰되었다(Fig. 1E). 하지만 인위적인 protoporphyrin IX의 생성 억제제인 succinylacetone이 성장 배지에 최종 농도가 500  $\mu$ M이 되도록 첨가된 경우에는 세포 내에서의 성장 배지에서 protoporphyrin IX의 peak가 관찰되지 않았다(Fig. 1D).

*M. xanthus* 성장에 미치는 succinylacetone의 영향  
Heme의 생합성은 대부분의 생명체가 생명현상을 영위하기 위한 필수적인 과정이다[25]. *Bacteroides fragillis*의 경우 heme 혹은 protoporphyrin IX가 성장에 절대적으로 필요하여 배지에 3.8 picomole/ml이 첨가될 경우에 최대 성장율의 1/2 속도로 성장이 가능한 것으로 관찰되었다[31]. 인간에 있어서 heme의 중요성에 대한 방대한 연구가 진행중인데, heme의 생합성에 참여하는 유전자 중 하나에 이상이 생긴 경우에 heme 생합성을 할 수 없어 발생하는 Porphyria에 걸리게 되며, 이 병은 크게 erythropoietic porphyria와 hepatic porphyria로 구분되어 있다. 동물 세포 배양 등에서 인위적인 heme의 생합성을 방해하고, 그 영향을 연구할 경우에는 succinylacetone이 이용되어 왔다[3,11]. 최초의 보고로는 Ebert 등에 의한 malignant erythroleukemia 세포의 heme 생산을 방해하여 세포 성장에 미치는 영향을 관찰한 것이다[11]. 그 후에 골수세포에서 heme 생합성이 방해되는 경우에 globin의 합성에 미치는 영향을 관찰하기 위해서  $10^3$  M의 succinylacetone 첨가에 의해서 heme의 합성을 완전하게 증지시킬 수 있었으며,

$10^4$  M의 protoporphyrin IX의 첨가에 의해서 succinylacetone의 방해 효과를 어느 정도는 극복하였다는 보고도 있다[3]. 최근 Meyer 등은 COS-1 세포의 microsomal activity가 succinylacetone의 첨가에 의해서 감소한다는 것으로 보고[21]하는 등 heme의 생합성의 증지 혹은 감소에 대한 생리적 변화를 관찰하는 실험에 succinylacetone의 이용은 매우 유용하게 사용되고 있다.

*M. xanthus*의 성장에 미치는 succinylacetone의 영향이 조사되었을 때에, 최종 농도가 500  $\mu$ M이 되도록 CTT 액체 배지에 succinylacetone이 첨가되면 protoporphyrin IX의 생산이 관찰되지 않았고(Fig. 1D), 세포의 성장 속도가 심하게 저해되는 것을 관찰할 수가 있었다(Fig. 2). 약 4시간의 generation time을 보이는 *M. xanthus*는 정상적인 성장의 경우에는 배양 후 약 48시간 정도에 200 Klett unit에서 정지기에 도달하지만, 신선하게 만들어진 succinylacetone 500  $\mu$ M이 첨가된 배지에서는 배양 후 약 66시간 후에도 100 Klett unit 정도의 세포 성장도를 보였으며, 이 정도의 낮은 세포 성장에서 이미 정지기에 도달한 것으로 관찰되었다. Succinylacetone이 특이적으로 heme의 생합성을 방해하는 물질임을 고려한다면 이런 성장의 저해는 정상적인 heme 생산 과정의 방해에 기인한다고 보아야 할 것이다. CTT 액체 배지에 녹아 있는 succinylacetone의 활성은 제조 후에 1주일 이상 보관된 경우에는 세포 성장을 억제

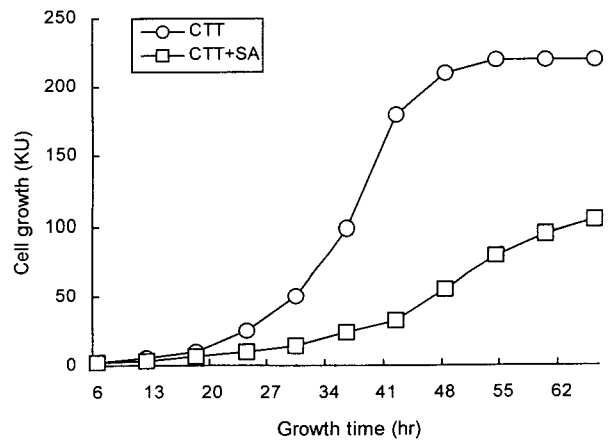


Fig. 2. The growth curves of *M. xanthus* DK1622. Vegetative cells in CTT medium grow exponentially with a generation time of about 4 hours and divided by binary fission (○). Freshly-made succinylacetone strongly inhibits cell growth (□).

하는 작용이 현저하게 감소되었다(data not shown).

Photolysis 및 포자 형성에 대한 succinylacetone의 영향

1965년 Burchard 등은 빛에 의해서 안정기의 세포들이 대부분 용해되는 현상인 photolysis를 보고하였다[7]. 연속된 연구에 의하여 photolysis는 푸른빛에 기인하여 발생하며, 이 경우에 푸른빛의 광수용체는 protoporphyrin IX일 것이라는 가능성이 제기되었다[5]. 본 실험에서는 succinylacetone에 의하여 protoporphyrin IX의 생합성이 방해받으면 photolysis의 발생 정도가 감소할 것으로 예상하여 실험을 수행하였지만 가시광선 자체가 protoporphyrin IX의 생산을 심하게 저해함으로 500 µM succinylacetone의 첨가된 배지에서 성장한 균주와 그렇지 않은 균주 사이에서 큰 차이를 관찰하지 못하였다(Table 2). 물론 콜로니의 개수는 열 배의 차이가 있으나 초기에 도달한 10<sup>8</sup> CFU 이상의 세균의 수에 비하면 photolysis는 매우 강하게 나타났으며, 따라서 생존한 콜로니 10개와 100개는 그다지 큰 차이가 아닐 것이다. Protoporphyrin IX가 푸른빛의 광수용체로서의 역할을 하는 것을 확인하기 위해서는 먼저 protoporphyrin IX까지의 생합성 회로를 근본적으로 차단하는 돌연변이를 *M. xanthus*에 도입한 후에, 푸른빛에 의해서 유발되는 또 다른 반응인 카로티노이드 합성 과정, carotenogenesis [4, 6]가 푸른빛에 의해서 유발되는지의 여부를 관찰하여야 할 것이다.

Protoporphyrin IX의 합성을 방해하는 succinylacetone의 첨가가 구형 포자 형성이 일어나는 발생과정에 영향을 미치는지를 관찰하였다. *M. xanthus*는 영양분의 고갈 시에 3가지 과정으로 구별되는 발생 과정을 겪으며, 동면 포자인 myxospore를 생산한다. 첫 번째로는 수십만 세포들이 일종의 리듬 운동을 하는 것과 같이 일치된 움직임을 보여주는 'rippling' 현상이 관찰되고, 이 후에는 수십만 세포가

Table 2. Photolysis of cells at the stationary phase

Media	Colony numbers/plate
CTT	<100
CTT+SA	< 10

+SA indicates that succinylacetone was added in medium.

Table 3. Spore ratios

Media	Ratios of spore number	
	Dark	Light
CTT/CF	100	12
CTT/CF+SA	96	8
CTT+SA/CF	100	<1
CTT+SA/CF+SA	89	<1

+SA indicates succinylacetone was supplemented in medium.

한 지점으로 모여들어 자실체를 형성하는 aggregation 및 자실체 형성기(fruiting body formation)가 뒤를 이으며, 마지막으로 이 자실체 안에서 간균 형태의 세포가 원형의 포자로 변환되는 포자 형성(sporulation)이 관찰된다[10,29]. 발생 과정 중에 빛이 조사되면 *M. xanthus*의 자실체 및 포자 형성은 방해를 받는다[18]. 본 실험에서도 가시광선이 조사된 경우에는 succinylacetone의 첨가 여부에 관계없이 발생 그 자체가 심하게 방해를 받았다(Table 3). 하지만 어두운 곳에서 발생 과정을 겪은 세포들은 succinylacetone의 첨가 여부에 관계없이 정상적인 포자 형성이 관찰되었다(Table 3). 포자의 개수를 계수한 결과, succinylacetone이 첨가된 배지에서 그렇지 않은 경우에 비하여 90% 이상의 포자 형성도를 나타냈다. 또한 발생 과정에 관찰되는, 세포들이 한 지점으로 집합하는 현상인 aggregation 및 다량의 포자들을 싸고 있는 자실체의 형성도 정상적인 것으로 관찰되었다. 반면에 succinylacetone의 첨가된 포자 내의 protoporphyrin IX 농도도 매우 낮은 것으로 나타났다(data not shown). 이는 protoporphyrin IX이 발생 과정에 크게 필요한 것은 아니라는 의미이거나, 최소한 succinylacetone의 작용이 발생 과정에는 크게 영향을 미치지 못한다는 의미로 해석되어야 할 것이다.

요 약

Heme 합성의 중간체이며 또한 광수용체로도 작용하는 protoporphyrin IX의 세포 내 농도 및 성장 배지에 존재하는 농도가 야생형 *M. xanthus* DK1622 균주로부터 측정되었다. Protoporphyrin IX의 세포 내 농도는 배양 시간이 경과함에 따라 계속 증가하여, 안정기에 최고치에 이르는 것으로 나타났다. 안정기에 도달한 세포 내에는 6.4 picomoles/

mg of protein의 protoporphyrin IX이 존재하는 것으로 밝혀졌다. Protoporphyrin IX은 대수기 중간 시기부터 세포외로 분비가 시작되어, 안정기에 도달한 세포의 배양액에서는 세포의 단백질 대비하여 3.0 picomoles/mg of protein이 존재하는 것으로 측정되었다. 영양분의 고갈에 기인하여 형성된 포자에서도 protoporphyrin IX의 농도는 6.5 picomoles/mg of protein이 존재하는 것으로 관찰되었다. Succinylacetone을 500  $\mu$ M 농도로 성장 배지에 첨가하였을 경우에 protoporphyrin IX의 생산은 검출이 불가능할 정도로 방해를 받았으며, 세포성장이 저해되고 세포 성장은 정상적 절반 수준인 약 100 Klett unit에서 정지하는 것으로 나타났다. 하지만 포자의 형성은 succinylacetone의 첨가에 관계없이 89-100%의 생성율을 보였으므로 정상 농도의 protoporphyrin IX가 *M. xanthus*의 성장을 위해서는 중요하지만, 포자 형성 과정에 필수적인 것으로 보이지는 않는다. 안정기 세포에서 나타나는 photolysis 현상도 succinylacetone의 첨가 여부에 관계없이 유사한 수준으로 관찰되었다.

### 감사의 글

본 연구의 일부는 고신대학교 2002년 교내연구비에 의해서 수행되었습니다. 또한 논문 정리에 도움을 대학원생 김상래, 김남진군에게 감사를 포함합니다.

### 참고 문헌

1. Antolin, I., H. Uria, D. Tolivia, M. J. Rodriguez-Colunga, C. Rodriguez, M. L. Kotler and A. Menendez-Pelaez. 1994. Porphyrin accumulation in the hardier glands of female Syrian hamster results in mitochondrial damage and cell death. *Anat. Rec.* **239**, 349-359.
2. Bassel, J., P. Hambright, R. Mortimer and A. J. Bearden. 1975. Mutant of the yeast *Saccharomycopsis lipolytica* that accumulates and excretes protoporphyrin IX. *J. Bacteriol.* **123**, 118-122.
3. Beru, N., K. Sahr and E. Goldwasser. 1983. Inhibition of heme synthesis in bone marrow cells by succinylacetone: effect on globin synthesis. *J. Cell. Biochem.* **21**, 93-105.
4. Botella J. A., F. J. Murillo and R. Ruiz-Vazquez. 1995. A cluster of structural and regulatory genes for light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Eur. J. Biochem.* **233**, 238-248.
5. Burchard, R. P. and M. Dworkin. 1966. Light-induced lysis and carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **91**, 535-545.
6. Burchard R. P. and S. B. Hendricks. 1969. Action spectrum for carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **97**, 1165-1168.
7. Burchard, R. P., S. A. Gordon and M. Dworkin. 1965. Action spectrum for the photolysis of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **91**, 896-897.
8. Carr, H. S. and D. R. Winge. 2003. Assembly of cytochrome c oxidase within mitochondrion. *Acc. Chem. Res.* **36**, 309-316.
9. Dailey H. A. and T. Dailey. 1996. Protoporphyrinogen oxidase of *Myxococcus xanthus*: expression, purification, and characterization of the cloned enzyme. *J. Biol. Chem.* **271**, 8714-8718.
10. Dworkin, M. 1996. Recent Advances in the Social and Developmental Biology of the Myxobacteria. *Microbiol. Rev.* **60**, 70-102.
11. Ebert, P. S., R. A. Hess, B. C. Frykholm and D. P. Tschudy. 1979. Succinylacetone, a potent inhibitor of heme biosynthesis: effect on cell growth, heme content and delta-aminolevulinic acid dehydratase activity of malignant murine erythroleukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 1382-1390.
12. Frustaci, J. M. and M. R. O'Brian. 1992. Characterization of *Bradyrhizobium japonicum* ferrochelatase mutant and isolation of the hemH gene. *J. Bacteriol.* **174**, 4223-4229.
13. Gibson, L. C. and C. N. Hunter. 1994. The bacteriochlorophyll biosynthesis gene, *bchM*, of *Rhodobacter sphaeroides* encodes S-adenosyl-L-methionine: Mg protoporphyrin IX methyltransferase. *FEBS Lett.* **352**, 127-130.
14. Hansen, J. M. Muldbjerg, H. Cherest and Y. Surdin-Kerjan. 1997. Siroheme biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* requires the products of both the MET1 and MET8 genes. *FEBS Lett.* **401**, 20-24.
15. Hodgkin, J. and D. Kaiser. 1977. Cell-cell stimulation of cell movement in nonmotile mutants of *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 2938-2942.
16. Iinuma, S., S. S. Farshi, B. Ortel and T. Hasan. 1994. A mechanistic study of cellular photodestruction

- with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin. *Br. J. Cancer* **70**, 21-28.
17. Kjeldstad, B., A. Johnsson and S. Sandberg. 1984. Influence of pH on porphyrin production in *Propionibacterium acnes*. *Arch. Dermatol. Res.* **276**, 396-400.
  18. Li, S., B.-U. Lee and L. J. Shimkets. 1992. *csgA* expression entrains *Myxococcus xanthus* development. *Genes Dev.* **6**, 401-410.
  19. Lee, B.-U., K. Lee, J. Mendez and L. J. Shimkets. 1995. A tactile sensory system of *Myxococcus xanthus* involves an extracellular NAD[P]<sup>+</sup>-containing protein. *Genes Dev.* **9**, 2964-2973.
  20. Luppia, P., K. Jacob and W. Ehret. 1993. The production of porphyrins from delta-aminolaevulinic acid by *Haemophilus parainfluenzae*. *Med. Microbiol.* **39**, 262-267.
  21. Meyer R. P., M. Podvynec and U. A. Meyer. 2002. Cytochrome P450 CYP1A1 accumulates in the cytosol of kidney and brain and is activated by heme. *Mol. Pharmacol.* **62**, 1061-1067.
  22. Murphy, M. J., L. M. Siegel, S. R. Tove and H. Kamin. 1974. Siroheme: a new prosthetic group participating in six-electron reduction reactions catalyzed by both sulfite and nitrite reductases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 612-616.
  23. Nakahigashi, K., K. Nishimura, K. Miyamoto and H. Inokuchi. 1991. Photosensitivity of a protoporphyrin-accumulating, light-sensitive mutant (*visA*) of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10520-10524.
  24. Raux, E., C. Thermes, P. Heathcote, A. Rambach and M. J. Warren. 1997. A role for *Salmonella typhimurium* *cbiK* in cobalamin (vitamin B<sub>12</sub>) and siroheme biosynthesis. *J. Bacteriol.* **179**, 3202-3212.
  25. Ryter S. W. and R. M. Tyrrell. 2000. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and anti-oxidant properties. *Free Radic Biol Med.* **28**, 289-309.
  26. Schifferle, R. E., S. A. Shostad, M. T. Bayers-Thering, D. W. Dyer and M. E. Neiders. 1996. Effect of protoporphyrin IX limitation on *Porphyromonas gingivalis*. *J. Endod.* **22**, 352-355.
  27. Schellhorn, H. E. and H. M. Hassan. 1988. Isolation and characterization of respiratory-deficient mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **170**, 78-83.
  28. Scolbe H. A., M. McKeag, P. R. Brown and G. J. Kavarinos. 1981. The rapid determination of erythrocyte porphyrins using reversed-phase high performance liquid chromatography. *Clin. Chim. Acta.* **113**, 253-265.
  29. Shimkets, L. J. 1990. Social and developmental biology of myxobacteria. *Microbiol. Rev.* **54**, 473-501.
  30. Shimkets, L. J. and D. Kaiser. 1982. Induction of coordinated movement of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **152**, 451-461.
  31. Sperry, J. F., M. D. Appleman and T. D. Wilkins. 1977. Requirement of heme for growth of *Bacteroides fragilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**, 386-390.
  32. Willow, R. D. 2003. Biosynthesis of chlorophyll from protoporphyrin IX. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 327-341.
  33. Yang, H., H. Inokuchi and J. Adler. 1995. Phototaxis away from blue light by an *Escherichia coli* mutant accumulating protoporphyrin IX. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7332-7336.
  34. Yang, Z. M. and C. E. Bauer. 1990. *Rhodobacter capsulatus* genes involved in early steps of the bacteriochlorophyll biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.* **172**, 5001-5010.

(Received April 27, 2003; Accepted November 14, 2003)