

## Moraxella sp. CK-1의 세포외 Autolysin의 분리 정제 및 활성도 측정

오영상 · 이장현<sup>1</sup> · 한명수<sup>2</sup> · 윤문영\*

한양대학교 화학과, <sup>1</sup>평택대학교 교양학부, <sup>2</sup>한양대학교 생명과학과

*Moraxella* sp. CK-1는 남조류 *Anabaena cylindrica*의 생장을 억제한다고 알려져 있다. *Moraxella* sp. CK-1의 세포외 autolysin의 분리는 다음과 같은 방법으로 분리를 시도하였다. 흡광도 660 nm에서 0.7~0.8이 되도록 BGC-11 세포배양액에서 키우고, 원심분리로 균주인 *Moraxella* sp. CK-1를 제거한 뒤 세포배양액을 Amicon ultrafiltration으로 농축을 하였다. 농축한 세포배양액을 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 0~20%, 20~40%, 40~60%, 60~80%로 분획하여 단백질을 14,000×g로 침전시켰다. 침전된 단백질을 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 완충용액으로 현탁시킨 뒤, 동일 완충용액을 이용하여 투석을 하였다. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 분획한 뒤 활성확인을 위해 *Anabaena cylindrica*가 도포된 평판배지에서 활성을 확인한 결과, 40~60%, 60~80%에서 활성이 있음을 확인하였다. 이들을 각각 Mono-Q<sup>TM</sup> HR 5/5 (column volume 1 ml) column을 이용하여 FPLC에서 단백질을 분리하였다. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 분획한 40~60%에서는 major peak 3개, 60~80% 분획에서는 2개의 major peak가 분리되었다. Mono-Q<sup>TM</sup> HR 5/5 column에서 분리되어 나온 major peak 5개를 투석한 뒤 *Anabaena cylindrica* lawn에서 활성을 확인하였으나 확인이 되지 않았다. PVDF membrane을 이용하여 transfer하여 40~60% 침전에서 17 kDa의 단백질을 얻어냈다. 이를 N-terminal amino acid sequence를 하여 serine protease의 계열임을 확인하였다.

**Key words** □ *Anabaena cylindrica*, Extracellular autolysin, *Moraxella* sp. CK-1

수계 생태계의 부영양화란 식물플랑크톤 성장의 제한 영양소(growth-limiting factor)인 인산염과 질산염의 유입이 증가함으로써 수계의 1차 생산력이 증가하는 현상을 말하며, 대부분의 호수에서는 인산염이 제한영양소로 작용하는 경우가 많다(11). 이런 부영양화는 수화 현상, 어류의 폐사 등과 같은 여러 가지 부작용의 결과를 나타내는 원인으로서 무기 영양염류 물질의 유입뿐만 아니라 상류로부터 기원하는 퇴사 및 유기물질의 유입도 부영양화의 요인으로 포함되어진다. 부영양화의 가장 현저한 결과 중 남조류의 수화 현상은 온대지역 호수에서 여름과 가을에 영양염 유입의 증가와 물리화학적 요인, 특히 수온 상승 및 높은 광강도의 상승작용에 의해 매년 비슷한 시기에 계속적으로 나타나고 있다(10).

특히, 남조류는 질소고정 및 광합성, 높은 생장을 등의 특성으로 인간을 포함한 다른 생물의 생장과 생태계에 큰 영향을 끼친다. 토양에 분포하는 남조류는 점액질의 sheaths를 합성하거나 filament 형태로 존재함으로써 토양의 침식 방지 및 수분유지에 큰 역할을 하며(15), 질소고정이나 광합성 작용으로 고등식물의 생장을 촉진시키는 기능을 갖는 유용한 종도 있다(7, 12). 그러나 수화를 일으키는 남조류의 50% 가량은 독소를 합성하며(20), 이러한 독소를 갖는 대표적인 남조류로는 *Microcystis*와 *Oscillatoria*, *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Lyngbya*, *Synechococcus*, *Nodularia*, *Coelosphaerum*, *Gloeotricha*, *Trichodesmium*, *Nostoc*

등이 알려져 있다(2, 8, 14, 15, 20, 23, 30). 담수생태계에서 남조류의 대발생 현상인 수화는 빛의 차단에 의해 수중생물의 광합성이 저하됨으로써 수생태계의 먹이사슬이 파괴되고, 수표면에 대량증식한 조류가 일시에 소멸하면서 각종 미생물에 의해 분해되는 과정에서 용존산소가 결핍되며, 대발생을 거친 남조류가 먹이사슬의 상층에 속하는 다른 수생물들에 의해 이용됨으로써, 미생물에 의해 분해되는 과정에서의 각종 유기물과 질소, 인 등의 무기염류가 용출되어 부영양화를 반복, 심화시킨다. 또한 남조류는 자연수계에서 이루어지는 질소고정의 대부분을 차지하는 생물로 알려져 있어 수질의 부영양화에 지대한 역할을 한다. 이온화되지 않은 암모니아가 어패류등에 축적되면 심한 독성을 띠면서 수생태계 및 양식업에 치명적인 피해를 초래하게 된다. 더 나아가 남조류의 독소는 가축과 야생동물, 사람에게 치명적 피해를 초래한다. “Fast death factor (FDF)”, “Very fast death factor (VFDF)”으로 알려진 이들 독소는(4, 13, 21) 자연수계에서 몇 주 동안 분해되지 않고 존재하며(13, 18, 22, 32) ‘침전-여과-염소살균’과 같은 기존의 정수처리법으로는 남조류 세포와 독소를 완전히 제거할 수 없기 때문에(4, 9, 13, 20) 음용수나 먹이사슬을 통하여 사람이 섭취할 가능성은 매우 높다(14, 15, 32).

수화가 진행 중인 부영양화되어 있는 수역에서 발생하는 수화를 조절하기 위하여 황산동(CuSO<sub>4</sub>)이나 이산화염소(ClO<sub>2</sub>), 오존(O<sub>3</sub>) 등과 같은 화학물질들을 부분적으로 사용하고 있다(22). 그 중 비용이 가장 저렴하여 널리 이용되는 황산동은 남조류에 특이(specific)하지 않아 식물플랑크톤(phytoplankton)을 제거함으로써 수생태계의 먹이사슬을 파괴하고, 어류에도 독성을 갖는 것으

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: +82-2-2290-0946, Fax: +82-2-2299-0762  
E-mail: myyoon@hanyang.ac.kr

로 알려져 있다(5, 15, 22). 뿐만 아니라 일시적 효과만 나타내기 때문에 반복 사용해야 하는 단점을 가지고 있다(22). 또한 조류의 수화 현상시 수반되는 환경의 높은 염기적 조건하에서 불안정해지고 남조류가 분비하는 아미노산, 펩티드, 유기산, 다당류등과 같은 다량의 유기물과 반응하여 무독성 화합물을 형성함으로써 효율이 저하되기 때문에 많은 양의 처리가 불가피하며 경제적인 측면 및 수증의 다른 생물에 대한 독성과 부식의 문제가 더욱 심각해진다(14, 15, 19, 22, 27).

본 실험에서는 수화 발생 원인종인 *Anabaena cylindrica*를 목표생물로 하는 *Moraxella* sp. CK-1으로부터 세포 밖으로 배출되는 autolysin을 분리 및 정제하여 *Anabaena cylindrica*의 성장을 억제하는 효소의 종류를 밝히고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주와 배양조건

*Moraxella* sp. CK-1은 0.2% Casiton (Difco, USA)를 함유하는 BG-11배지( $\text{NaNO}_3$  1.5 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.04 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.075g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.036 g, ferric ammonium citrate 0.006 g, EDTA disodium 0.001 g,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.02 g,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  2.86 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.222 mg,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.39 mg,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.079 mg,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.0494 mg, Citric acid 0.006 g/l, 이하에서는 BGC-11배지로 말함)에 접종하여 37°C에서 150 rpm의 속도로  $A_{660\text{nm}}=0.7\sim0.8$ 으로 성장될 때까지 진탕 배양하였다. 고체배지는 상기 배지 성분에 1.8%의 agar를 첨가하여 이용하였다.

### Autolysin 단백질의 분리

BGC-11배지에서 배양한 *Moraxella* sp. CK-1을 대수생장기( $A_{660\text{nm}}=0.7\sim0.8$ )까지 배양한 후 원심분리(7,000×g, 20 min, Beckman JA-10)를 통하여 균주를 제외한 세포배양액을 얻은 뒤, YM-10 membrane filter (exclusion limit 10 kDa, Millipore)를 가지는 Amicon ultrafiltration장치로 농축하였다. 이 농축액을 다시 원심분리(7,000×g, 20 min, Beckman JA-21)하여 상층액을 모았다. 상층액을 교반을 하면서  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 최고 농도가 30% (176 g/L)되도록 첨가한 뒤 30분이 지난 뒤 원심분리(14,000×g, 25 min, Beckman JA-21)하여 침전물(0~30% 분획)과 상층액으로 분리하였다. 얻어진 상층액에 다시  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 50%(126 g/L)첨가하고 30분이 지난 뒤 원심분리(14,000×g, 25 min)하여 상층액과 침전물(30~50%분획)을 분리하였다. 50%까지  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 첨가된 상층액에 또다시  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 80%(210 g/L)까지 첨가하고 30분이 지난 뒤 원심분리(14,000×g, 25 min)하여 상층액과 침전물(50~80%)을 분리하였다.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 퍼센트별로 얻어진 침전물을 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 완충용액으로 현탁하고 동일 완충용액 2 L에서 12시간 삼투(spectra/por 4 membrane, spectrum laboratories, USA)하여  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 제거하였다. VIVA SPIN (VIVASPIN 15 Concentrator, exclusion limit 10 kDa, Vivascience, UK)으로 원심분리기(3,000×g, 20 min)를 이용하여 분획을 각각 농축하였다. 위의 모든 과정은 4°C에서 수행하였다. 단백질의 정

량은 BSA (Bovine Serum Albumin)을 기준시료로 하여 bradford method를 이용하였다(1). FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, AKTA purifier 10, Amersham Pharmacia biotech, Sweden)에서 Mono-Q™ HR 5/5 (column volume 1 ml) column을 사용하였다.

위의 방법에서 얻어낸 0~20%, 20~40%, 40~60%, 60~80%의 시료를 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 완충용액을 이용하여 1 ml/min의 속도로 2 M의 NaCl을 linear gradient (gradient volume=

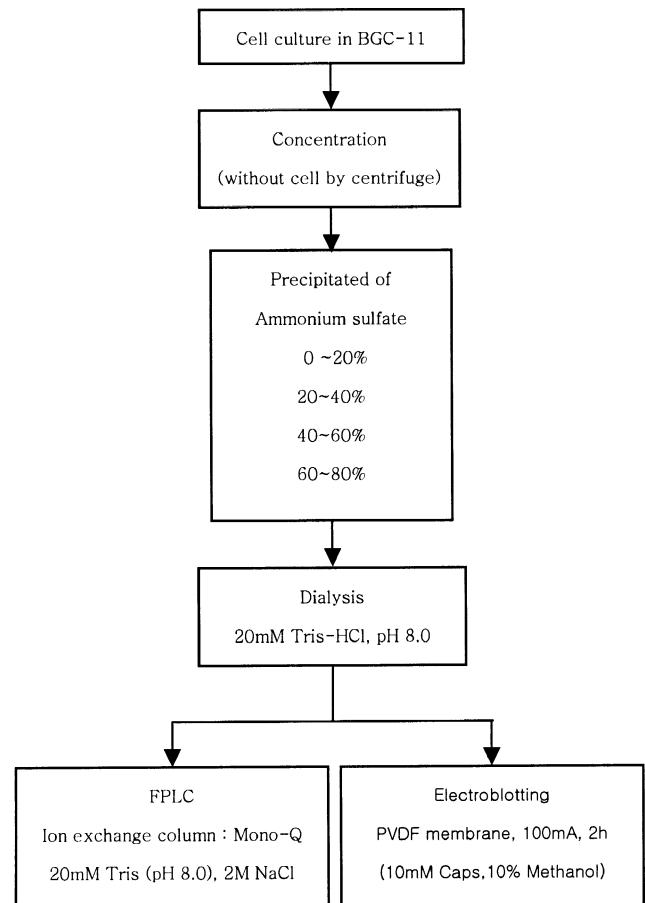


Table 1. Flow diagram of purification steps

Table 2. Purification of autolysin produced by *Moraxella* sp. CK-1

Purification Step	Volume (ml)	Total Protein ( $\mu\text{g}$ )	Relative activity
Crude extract	2000	$26.8 \times 10^3$	N/D
Concentrated	40	$3.56 \times 10^3$	3
Precipitated of ammonium sulfate			
0-20%	$5 \times 10^{-3}$	0.18	0
20-40%	$5 \times 10^{-3}$	2.02	0
40-60%	$5 \times 10^{-3}$	0.16	3
60-80%	$5 \times 10^{-3}$	0.64	1

\*Relative activity determined by lawn assay of clear zone size (N/D: not determined).

20 ml) 방법으로 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은, FPLC control software인 UNICON™ V3.10 (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden)의 peak fraction mode로 하여  $A_{280\text{ nm}}$ 에서 column을 통과하여 나온 시료를 분획하여 시험관에 받을 수 있도록 하였다. 이를 동일 완충용액에서 투석하여 염을 제거하였다. Autolysin의 분리과정의 단계 및 활성도를 Table 1과 Table 2에 각각 나타내었다.

#### 단백질의 확인

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 분획하여 투석한 것과 FPLC의 이온 교환 크로마토그래피로 분리한 분획들을 15% SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, Mini-Protein II electrophoresis, gel thickness 1.5 mm, Bio-Rad, USA)에서 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝난 gel을 Coomassie gel staining solution (1)을 이용하여 염색하고, Coomassie gel destaining solution으로 탈색하여 단백질을 확인하였다.

#### SDS-insoluble peptidoglycan *Anabaena cylindrica* 기질의 준비

*Anabaena cylindrica*를 *Moraxella* sp. CK-1의 autolytic enzyme의 기질로 사용하였다. *Anabaena cylindrica*를 세균 배양액에서 원심분리하고 냉동건조된 세포침전물 0.9 g을 4%(w/v) SDS 100 ml로 현탁하고 30분간 끓이고 식힌 뒤 실온에서 14,000×g, 30 min 원심분리하였다. 세포침전물을 다시 4%(w/v) SDS 100 ml에 현탁한 뒤 30분 동안 끓이고 원심분리하는 과정을 3회 반복한 뒤, 400 ml 끓는 증류수로 현탁하여 원심분리하는 과정을 5회 반복하여 SDS를 제거하였다. 세포침전물을 다시 냉동건조하여 SDS-insoluble한 기질을 준비하였다.

#### 활성도 측정

활성도 측정은 Takamoto등의 방법(27)을 변용하여 측정하였다. 위의 과정에서 얻어진 SDS-insoluble peptidoglycan *Anabaena cylindrica* 기질을 막자사발에 이용하여 곱게 파쇄한 뒤 20 mM Tris-HCl pH 8.0로  $A_{660\text{ nm}}$  (UV-2101PC, UV-VIS scanning spectrophotometer, SHIMAZU, Japan)에서 1.2~1.5가 되도록 현탁하였다. 각각을 앞에서 준비한 기질 980  $\mu\text{l}$ 에 각 단계에서 나온 시료를 5  $\mu\text{g}$  첨가한 뒤 40°C에서 30분 동안 흡광도의 변화를 관찰하였다.

반응 전과 반응 후의 흡광도 차이를 비교하여 활성도를 측정하였다.

#### Double-layer agar method

남조류 분해능력을 확인하기 위해 *Anabaena cylindrica*를 숙주로 하는 double-layer agar method (25)를 변형하여 실시하였다.

BGC-11 배지에 1%의 agar를 첨가하여 굳힌 평판 배지를 미리 준비하고, 2%의 agar를 함유하는 증류수와 2배 농축된 BGC-11 배지를 각각 멸균하고 50°C까지 온도를 내린 후, 각각을 멸균된 15 ml에 5 ml씩을 섞은 다음, 대수생장기의 남조류 10 ml을 원심분리(7,000×g, 20 min, 4°C)하여 얻은 침전물을 상기의 배지

와 섞은 후, 미리 준비 되어있는 BGC-11 평판배지위에 붓고 수평판 위에서 굳힌 후, 조류 배양기에서 30°C, 7일간 배양하여 *Anabaena cylindrica*를 성장시켰다.

*Anabaena cylindrica*가 도포 되어있는 평판배지에 고온멸균한 지름이 10 mm인 Whatman paper를 평판배지에 올려놓은 뒤,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 분획한 시료와 FPLC의 이온 교환 크로마토그래피로부터  $A_{280\text{ nm}}$ 의 peak별로 분리하여 나온 시료를 3  $\mu\text{g}$ 씩 Whatman paper에 놓아 조류배양기에서 2일 배양을 하여 clear zone의 형성을 관찰하였다.

#### Autolysin활성을 지닌 단백질의 아미노산 서열분석

15% SDS-PAGE에서 일차적으로 분리한 뒤 PVDF (Polyvinylidene difluoride, Millipore corporation, USA) membrane으로 Blotting (Mini Trans-Blot Transfer Cell, Bio-Rad, USA)을 transfer buffer (10 mM Caps, 10% Methanol)에서 100 mA로 2시간 이동하였다.

2시간 경과한 뒤 단백질이 이동된 PVDF membrane은 Ponceau S로 발색하여 단백질 확인을 하였다. Ponceau S로 발색하여 나타난 단백질부분을 한국기초과학지원연구원(KBSI, Korea Basic Science Institute)에 protein sequence를 확인하였다. Edman method를 이용하여 염기서열을 확인하는 PRO (Procise 491 protein sequencer)로 10개의 단백질 염기서열을 확인하였다.

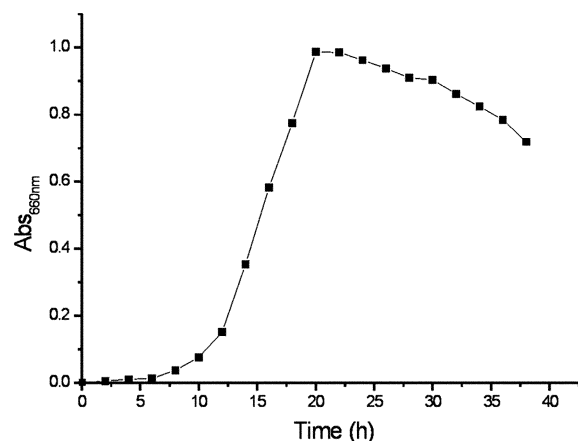
### 결과 및 고찰

#### *Moraxella* sp. CK-1의 생장 특성

BGC-11 배지에서 37°C, 150 rpm에서 진탕배양 하였을때 18시간만에 대수증식기( $A_{660\text{ nm}}=0.7\sim0.8$ )에 도달하였다. 일반적인 세균들의 생장곡선과 달리 안정기가 거의 없이 완전한 사멸기를 나타내었다(Fig. 1).

#### 세포배양액의 농축 및 autolysin 활성의 확인

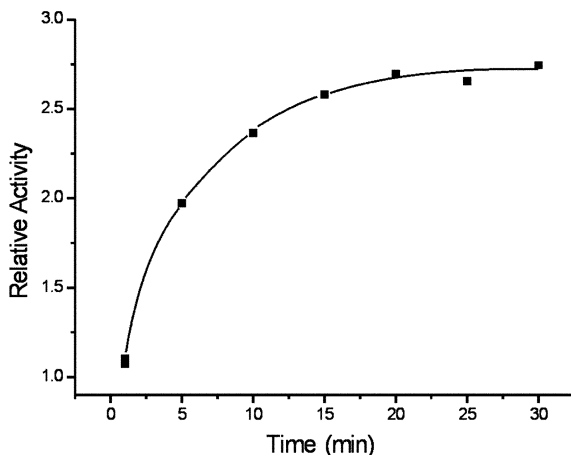
2L의 BGC-11세포 배양액에서 *Moraxella* sp. CK-1균주를 원심



**Fig. 1.** Growth curve of *Moraxella* sp. CK-1 in BGC-11. *Moraxella* sp. CK-1 was grown at 37°C in BGC-11 medium. At the indicated time point, a portion of culture was aliquoted and the degree of cell growth was determined by optical density at  $A_{660\text{ nm}}$ .

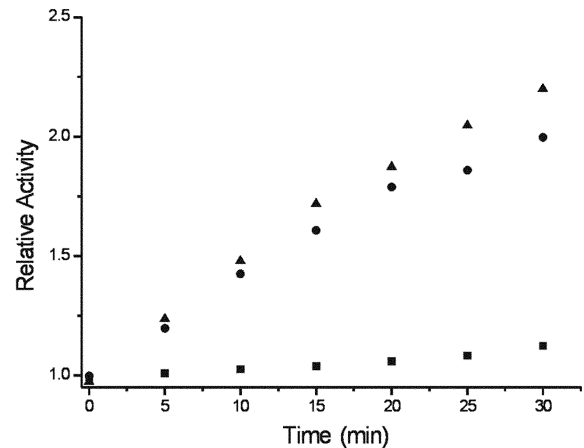
분리(7,000×g, 20 min, 4°C)를 통하여 분리한 뒤 배양액만을 얻었다. 얻어진 배양액을 Amicon ultrafiltration을 통해 40 ml까지 농축을 하였다(50×농도농축). *Moraxella* sp. CK-1가 목표생물인 *Anabaena cylindrica*의 생장을 억제하는 autolysin을 생성하는지 확인하고자 농축한 세포배양액을 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 0~80%까지 처리하여 모든 단백질을 얻었다. *Anabaena cylindrica*가 도포된 평판배지에서 활성 확인을 위해 3차 증류수, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 완충용액과 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>처리하여 얻은 시료를 *Anabaena cylindrica*가 도포된 평판배지에 접종을 한 뒤 2일간 30°C인 조류배양기에서 clear zone 형성을 관찰하여, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 침전한 곳에서만 clear zone을 형성하는 활성을 확인하였다. 또한 UV를 이용한 활성확인 방법으로 SDS-insoluble한 *Anabaena cylindrica*는 완충용액에 용해되지 않기 때문에 냉동건조시킨 *Anabaena cylindrica*를 막자사발을 이용하여 곱게 파쇄하여 A<sub>660 nm</sub>에서의 흡광도가 1.2~1.5가 되도록 완충용액에 현탁하여 활성도를 측정하였다. 40°C에서 30분 반응시킨 뒤 흡광도의 변화를 관찰하였다. Control로 사용한 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 완충용액을 첨가한 곳에서는 40°C에서 30분 반응 뒤의 흡광도의 변화가 거의 없었으나 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>침전법으로 얻은 시료를 첨가한 곳에서는 흡광도의 변화가 있었음을 확인하여 autolysin에 의한 활성을 다시 한번 확인하였다(Fig. 2).

*Moraxella* sp. CK-1 균주 밖으로 나오는 단백질 중 남조류의 세포벽을 분해하는 autolysin의 존재를 확인하기 위해 *Anabaena cylindrica*가 도포된 평판배지와 UV를 이용하여 autolysin의 존재와 활성 여부를 확인하였다. 분리를 용이하게 하기 위해 분획의 범위를 0~30%, 30~50%, 50~80%로 세분화하였다. 이처럼 3군데로 나누어 분획한 시료의 활성도를 *Anabaena cylindrica*가 도포

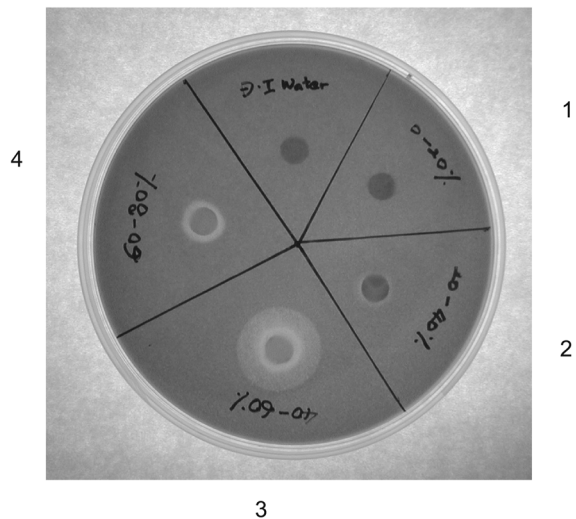


**Fig. 2.** Identification of autolysin activity in the culture medium of *Moraxella* sp. CK-1. To verify the extracellular autolysin, the culture medium of *Moraxella* sp. CK-1 was harvested and concentrated with Amicon as described in “Materials and Method”. Fraction of concentrated culture medium was mixed with SDS-insoluble peptidoglycan *Anabaena cylindrica* to the reaction volume of 1 ml and incubated at 40°C for 30 min. Representative activity was determined by the ratio of A<sub>660 nm</sub> reaction with fraction of culture medium to A<sub>660 nm</sub> reaction without culture medium.

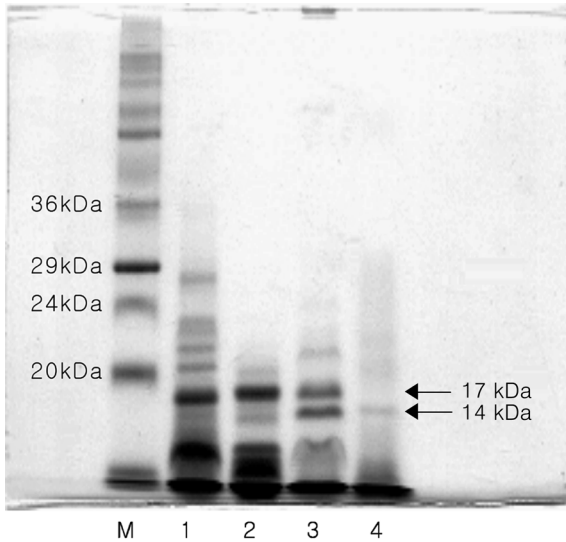
된 평판배지에서 관찰하였다. 30~50%, 50~80%로 분획한 곳에서 clear zone를 형성하여 활성도가 있음을 확인하였다. UV를 이용한 활성도 측정에서는 농축한 세포배양액을 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>침전법으로 0~80%까지 모든 단백질을 침전시킨 분획의 활성도보다 다소 약하지만(data not shown) 50~80%에서 활성도가 30~50%보다 더 크게 나타났다(Fig. 3A). 이로써 활성도를 갖는 autolysin은 30~80%분획에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 침전됨을 확인하였고, 분획의 범위를 더욱 세분화하여 0~20%, 20~40%, 40~60%, 60~80%로 분



C



**Fig. 3.** A: Pinpointing of the ammonium sulfate precipitated region (0~30%, 30~50%, 50~80%) containing autolysin activity. Concentrated culture supernatants were further separated by ammonium sulfate fractionation (■, 0~30%; ●, 30~50%; ▲, 50~80%). Autolysin activity was determined by the same method described in Fig. 2. Three independent experiments showed similar results. B: Detection of autolysin activity from double-layer agar method (lawn assay). Culture medium was concentrated and fractionated by ammonium sulfate precipitation. Autolysin activity from the fraction was detected by lawn assay as described in “Materials and Method”. Clear zone indicates the lysis of *Anabaena cylindrica* by autolysin from *Moraxella* sp. CK-1 (C, D.I Water; 1, 0~20%; 2, 20~40%; 3, 40~60%; 4, 60~80%)



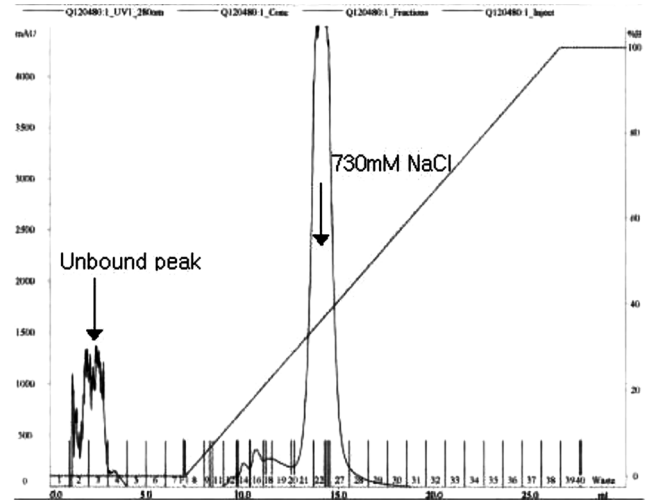
**Fig. 4.** SDS-PAGE analysis of ammonium sulfate fraction containing autolysis activity. The fractions pooled samples were subjected to gel electrophoresis (15% SDS-PAGE) and Coomassie stain. (M, marker; 1, 0~20%; 2, 20~40%; 3, 40~60%; 4, 60~80%)

확하여 **활성도가** 나타나는 영역을 좁혀보았다. 평판배지에서 40~60%, 60~80%에서 clear zone을 형성하는 **활성도가** 있음을 확인하였다(Fig. 3B). 0~20%와 20~40%의 분획구간에서는 autolysin과는 관련이 없는 단백질들의 침전이 있음을 알 수 있었다. **활성이** 처음 관찰된 곳은 60~80% 분획 구간이었지만 경과 시간이 좀더 지나자 40~60% 구간이 **활성도가** 더 크게 관찰되었다. **활성도가** 있는 분획의 단백질의 분자량을 15% SDS-PAGE에서 확인하여 20 kDa이하에 autolysin의 **활성도에** 관련된 중요한 단백질의 band가 2개가 있음을 확인하였다. 이들의 분자량은 17 kDa, 14 kDa부근에서 나타났다(Fig. 4).

#### FPLC를 이용한 단백질의 분리

일차적으로  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 에서 분획한 시료에서 autolysin을 분리 및 정제하기 위해 이온 교환 크로마토그래피를 두번째 분리 단계로 이용하였다. 0~80%까지  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  침전법을 이용하여 얻은 Mono-Q<sup>TM</sup> HR 5/5을 이용하려 하였으나, 압력상승에 의해 정상적인 작동을 방해하였다. 분획의 범위를 네 곳(0~20%, 20~40%, 40~60%, 60~80%)으로 하여 FPLC에서 위의 조건으로 분리하였다. 0~20%의 분획에서는 3개의 major peak가 나왔는데 resin과 결합하지 않은 peak와 염(NaCl)의 gradient가 240 mM과 920 mM에서 peak가 나왔고, 20~40%의 분획에서는 major peak로는 결합하지 않은 peak가 여러 혼합물을 나타내는 형상을 띠며 나왔다. 40~60%인 경우에는 결합하지 않은 peak, 염의 gradient가 250 mM와 730 mM에서 peak가 나타났다(data not shown). 또한 60~80%의 경우에는 결합하지 않은 peak와 730 mM에서 두개의 중요한 peak가 분리되었다(Fig. 5).

Column을 통하여 나온 부분들을 모아 투석한 뒤 15% SDS-PAGE에서 단백질 분리 확인과 평판배지에서의 활성을 보려



**Fig. 5.** Elution profile of 60~80% fraction from anion exchange column chromatography. Samples from Fig. 4. were further purified and separated by Mono-Q<sup>TM</sup> HR 5/5 column in FPLC system. Column was pre-equilibrated with the buffer (20 mM Tris, pH 8.0) and 300  $\mu$ l of each sample was loaded. Column was washed with 5 ml (5 bed volume) of same buffer and bound proteins were eluted by 0~2 M NaCl linear gradient.

하였으나 불행히도 단백질의 band와 clear zone을 확인할 수 없었다. *Moraxella* sp. CK-1에서 나오는 autolysin의 활성에 의해 단백질이 분해가 일어났기 때문에 bradford method를 이용한 단백질의 양이 적었을 뿐만 아니라, 세포 밖으로 분비되는 세포 외 효소(extracellular enzyme)의 양이 적기 때문이라 생각되어진다.

위의 이온 교환 크로마토그래피의 결과는 20~40% 분획에서는 Mono-Q<sup>TM</sup> H/R 5/5의 resin과의 결합이 없음을 나타내고있으며, 40~60%분획의 경우는 250 mM과 730 mM의 염이 첨가되었을 때 major peak가 나타나는 것으로 보아 15% SDS-PAGE에서 보여지는 20~40%와 40~60% 분획의 17 kDa부근에서 나타나는 band는 서로 다른 단백질일 것으로 생각되어진다. 평판배지의 **활성도 측정**에서도 이를 보여주고 있다.

또한, 평판배지에서 활성을 보인 40~60% 분획과 60~80%의 분획의 경우 이온 교환 크로마토그래피의 분석을 볼 경우 250 mM과 730 mM의 염의 첨가에서 peak의 분리가 있음을 보여주고 있다. 이들의 peak가 autolysin과 관련된 중요한 부분이라 생각되어진다.

#### PRO (Procise 491 protein sequencer)로부터의 단백질 아미노산의 분석

15% SDS-PAGE로 단백질을 일차적으로 분리한 뒤 PVDF membrane을 이용하여 100 mA로 2시간 이동하였다. 2시간 경과한 뒤 PVDF membrane을 Ponceau S로 발색하여 이동된 단백질의 분자량이 17 kDa임을 확인하였다. 단백질이 이동된 PVDF membrane에서 단백질의 N-terminal로부터 10개의 아미노산 분석을 한국기초과학지원연구원(KBSI)에 의뢰하여 Table 3의 결과를

**Table 3.** Determination of amino acid sequence of extracellular protein containing autolysin activity.

Residue	Amino acid
1 <sup>a</sup>	Ala, Ser, Arg
2	Glu, Gly
3	Gly
4	Asn
5 <sup>b</sup>	X
6 <sup>a</sup>	Gly
7	Phe, Leu
8	Ile
9	Arg
10	Ala
11	Glu

<sup>a</sup>Perfectly confidence can not peak to result.<sup>b</sup>Not determined.

```

1 : MTRQMILAVG AEG NAGFI-RAE 23
2 : FIPHLMR AEG QQGPIARAE 41
3 : TNILSTIDVG QAGPV-RSSYG MKA 407
4 : ASPLHPP AEG QAP--VRIDQMPPEA F 250

```

**Fig. 6.** Amino acid alignment of *Moraxella* sp. CK-1 autolysin with other extracellular hydrolase proteins. Identical amino acids are shown in white point on a black background. The origins of the sequences was as follows; 1, N-Carbamoyl-D-Amino-Acid Amidohydrolase from *Agrobacterium tumefaciens* (31); 2, Phosphonate monoester hydrolase from *Burkholderia caryophylli* (6); 3, Extracellular basic protease precursor from *Dichelobacter nodosus* (16, 17, 29); 4, Probable hydrolase protein from *Ralstonia solanacearum* (24, 26).

얻었다.

결과를 바탕으로 GenBank (NCBI, National Center for Biotechnology Information)에서 protein sequence를 검색하였고, 이를 Clustal X에서 일치도를 찾아 Fig. 6의 결과를 얻었다.

*Agrobacterium tumefaciens*는 토양의 질소를 고정시켜서 D-form의 아미노산을 분해할 수 있는 amidohydrolase를 갖고 있다고 보고되어있다(31). *Moraxella*와 같이 질소를 고정시키는 *Agrobacterium tumefaciens*의 amidohydrolase과는 70%의 일치도를 보여 주고 있다.

*Burkholderia caryophylli*는 인을 고정시켜서 식물의 광합성에서의 첫번째 분해 작용을 하는 phosphonate monoester hydrolase와는 40%의 일치성을 보이고 있다(6).

*Moraxella*종과 같은 gram negative인 *Dichelobacter nodosus*의 경우에는 extracellular basic protease precursor과는 50%의 일치성을 보이며 autolysin을 가지는 점을 보아 *Moraxella* sp. CK-1과 유사성이 많은 단백질을 알 수 있었다. 밝혀진 *Dichelobacter nodosus*의 세포외 효소의 단백질 서열은 1-603개의 아미노산 서열을 갖고 있고 이중에서 133-476번에서 단백질의 활성을 갖는 것으로 보고되어졌다(16, 17, 29). 또한 *Moraxella* sp. CK-1의 N-

terminal 아미노산 서열과 391번부터 일치함을 보여주고 있다. *Ralstonia solanacearum*은 *Bacillus solanacearum*이라고 알려져 있으며 probable hydrolase protein과 80%의 일치도를 보여주었다. *Ralstonia solanacearum*역시 gram negative이면서 autolysin이 과실 식물 열매의 껍질을 분해하는 것으로 알려져 있다(24, 26).

Autolysin의 활성을 갖는 단백질은 여러 종류가 있으며, *Moraxella* sp. CK-1균주에서 목표생물인 *Anabaena cylindrica*에 대하여 직접적인 활성이 있음을 확인했고, 이를 PVDF membrane으로 이동시켜 아미노산 서열을 분석한 결과를 토대로 단백질의 종류를 확인한 결과 hydrolase 계열의 serine protease일 것으로 예측된다. 앞으로 *Moraxella* sp. CK-1의 autolysin을 대량 발현을 할 수 있도록 cloning system을 개발하면 우리나라와 같이 물 부족국가에서 담수의 수확현상 억제에 큰 도움이 되리라 생각되어진다.

## 참고문헌

- Bollag, D.M., M.D. Rozycki, and S.J. Edelman. 1996. Protein Methods, 2nd ed., p. 62-67, 127, Wiley-Liss, Inc., New York.
- Carmichael, W.W. 1988. Toxins of freshwater algae, p. 121-147. Handbook of Natural Toxins, Vol. 3. Marine Toxins and Venoms. Marcel Dekker Inc., New York.
- Carmichael, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.* 72, 445-459.
- Carmichael, W.W. 1994. The toxins of cyanobacteria. *Sci. Am.* 270, 64-72.
- Crance, J.H. 1963. The effects of copper sulfate on *Microcystis* and zooplankton in ponds. *Prog. Fish. Cult.* 25, 198-202.
- Dotson, S.B., C.E. Smith, C.S. Ling, G.F. Barry, and G.M. Kishore. 1996. Identification, characterization, and cloning of a phosphonate monoester hydrolase from *Burkholderia caryophylli* PG2982. *J. Biol. Chem.* 271, 25754-25761.
- Fay, P. 1992. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol. Rev.* 56, 340-373.
- Hawser, S.P., J.M. O'Neil, M.R. Roman and G.A. Codd. 1992. Toxicity of blooms the cyanobacterium *Trichodesmium* to zooplankton. *J. Appl. Phycol.* 4, 79-86.
- Himberg, K., A.M. Keijola, L. Hiisvira, H. Pyysalo, and K. Sivonen. 1989. The effect of water treatment processes on the removal of hepatotoxins from *Microcystis* and *Oscillatoria* cyanobacteria: A laboratory study. *Wat. Res.* 23, 979-984.
- Horne, A.J., and C.R. Goldman. 1994. Limnology. 2nd ed., MacGraw-Hill, Inc. New York.
- Jeffries, M. and D. Mills. 1990. Freshwater Ecology. Principles and Applications. Belhaven Press, London.
- Khan, Z.U.M., Z.U.T. Begum, R. Mandal and M.Z. Hossain. 1994. Cyanobacteria in rice soils. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 296-298.
- Kiviranta, J., K. Sivonen, K. Lahti, R. Luukkainen and S.I.N. Hel-sinki. 1991. Production and biodegradation of cyanobacterial toxins-a laboratory study. *Arch. Hydrobiol.* 121, 281-294.
- Lee, R.E. 1980. Phycology, 1st ed., p. 32-65. Cambridge University Press, New York, USA.
- Lee, R.E. 1989. Phycology, 2nd ed., p. 55-101. Cambridge University Press, New York, USA.

16. Lilley, G.G., D.J. Stewart, and A.A. Kortt. 1992. Amino acid and DNA sequences of an extracellular basic protease of *Dichelobacter nodosus* show that it is a member of the subtilisin family of proteases. *Eur. J. Biochem.* 210, 13-21.
17. Lilley, G.G., M.C. Riffkin, D.J. Stewart, and A.A. Kortt. 1995. Nucleotide and deduced protein sequence of the extracellular, serine basic protease gene (bprB) from *Dichelobacter nodosus* strain 305: comparison with the basic protease gene (bprV) from virulent strain 198. *Mol. Biol. Int.* 36, 101-111.
18. Maatta, C.L., J. Hietala, M. Reinikainen, and M. Walls. 1995. Do *Microcystis aeruginosa* toxins accumulate in the food web: a laboratory study. *Hydrobiologia.* 304, 23-27.
19. Mitchell, R. 1974. Introduction to Environmental Microbiology, p. 206-210. Prentice-Hall, Inc., New Jersey.
20. Rapala, J., K. Lahti, K. Sivonen, and S.I. Nlendam. 1994. Biodegradability and adsorption on lake sediments of cyanobacterial heptotoxins and anatoxin-a. *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 423-428.
21. Reinikainen, M., J. Kiviranta, V. Ulvi, and M.L.N. Paavola. 1995. Acute toxin effects of a novel cyanobacterial toxin on the crustacean *Artemia alina* and *Daphnia pulex*. *Arch. Hydrobiol.* 133, 61-69.
22. Reyssac, S.J. and M. Pletikoscic. 1990. Cyanobacteria in fish ponds. *Aquaculture.* 88, 1-20.
23. Rinehart, K.L., M. Namikoshi, and B.W. Choi. 1994. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.* 6, 159-176.
24. Salanoubat, M., S. Genin, F. Artiguenave, J. Gouzy, S. Manganot, M. Arlat, A. Billault, P. Brottier, J.C. Camus, L. Cattolico, M. Chandler, N. Choisne, C. Claudel-Renard, S. Cunnac, N. Demange, C. Gaspin, M. Lavie, A. Moisan, C. Robert, W. Saurin, T. Schiex, P. Siguier, P. Thebault, M. Whalen, P. Wincker, M. Levy, J. Weissenbach, and C.A. Boucher. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 415, 497-502.
25. Sakata, T., Y. Fujita, and H. Yasumoto. 1991. Plaque formation by algicidal *Saprospira* sp. on a lawn of *Chaetoceros ceratosporum*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57, 1147-1152.
26. Shiomi, Y., M. Nishiyama, T. Onizuka, and T. Marumoto. 1999. Comparison of bacterial community structures in the rhizoplane of tomato plants grown in soils suppressive and conducive towards bacterial wilt. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3996-4001.
27. Stewart, W.D.P. and M.J. Daft. 1977. Microbial pathogens of cyanophycean blooms, p. 177-218. In M.R. Droop and H.W. Kanasch (ed.), *Advances in Aquatic Microbiology*. Volume I. Academic Press, London.
28. Takamoto, S., K. Yamada, and Y. Ezura. 1994. Production of bacteriolytic enzymes during the growth of a marine bacterium *Alteromonas* sp. No. 8-R. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 40, 499-508.
29. Vaughan P.R., L.F. Wang, D.J. Stewart, G.G. Lilley, A. Kortt. 1994. A. Expression in *Escherichia coli* of the extracellular basic protease from *Dichelobacter nodosus*. *Microbiology* 140, 2093-100.
30. Wolk, C.P. 1973. Physiology and cytological chemistry of blue-green algae. *Bacteriol. Rev.* 37, 32-101.
31. Wang, W.C., W.H. Hsu, F.T. Chien, and C.Y. Chen. 2001. Crystal structure and site-directed mutagenesis studies of N-carbamoyl-D-amino-acid amidohydrolase from *Agrobacterium radiobacter* reveals a homotetramer and insight into a catalytic cleft. *J. Mol. Biol.* 306, 251-261.
32. Watanabe, M.M., K. Kaya, and N. Takamura. 1992. Fate of the toxic cyclic heptapeptides, the *Microcystins*, from blooms of *Microcystis* (Cyanobacteria) in a hypertrophic lake. *J. Phycol.* 28, 761-767.

(Received May 30, 2003/Accepted July 21, 2003)

# ABSTRACT : Purification and Assay of Extracellular Autolysin from *Moraxella* sp. CK-1

Young-Sang Oh, Chang-Hyun Lee<sup>1</sup>, Myung-Soo Han<sup>2</sup>, and Moon-Young Yoon\* (Department of Chemistry, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea, <sup>1</sup>Division of General Education, Pyongtak University, Pyongtak 450-701, Korea, <sup>2</sup>Department of Life Science, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea)

*Moraxella* sp. CK-1 is known to inhibit the growth of *Anabaena cylindrica*, a cyanobacterium. It has been documented that the ability of this growth inhibition of *Anabaena cylindrica* was attributed to extracellular autolysin from *Moraxella* sp. CK-1. However, it remains to be elucidated identification and characterization of autolysin have yet been elucidated. In this study, we tried to purify and identify autolysin secreted from *Moraxella* sp. CK-1. Cells were grown in a complex liquid medium (BGC-11) and culture supernatants were collected, followed by ammonium sulfate fractionation. Fractions were further separated with anion exchange column, Mono-Q, in FPLC system and analyzed by SDS/PAGE. The fraction containing high autolysin activity showed a single distinct protein peak in anion column and molecular mass of about 17 kDa in SDS/PAGE. N-terminal amino acid sequencing of the protein was analyzed, of which result showed the homology with some proteases, including extracellular serine protease, *Dichelobacter nodosus*.