

*Stigmatella aurantiaca*의 발생에 대한 연구(II)

—발생과정에서 단백질합성에 미치는 pheromone과 GMP의 영향—

구 남 온·김 영 민
(연세대학교 이과대학 생물학과)

Studies on the development of *Stigmatella aurantiaca*(II)

—Effects of pheromene and GMP on the protein synthesis during development—

Ku, Nam-On and Young-Min Kim

(Department of Biology, College of Science, Yonsei University, Seoul 120, Korea)

ABSTRACT

Effects of pheromone and GMP on the protein synthesis during development of *Stigmatella aurantiaca* under the starved condition were examined and compared with that of light on the same process. Light, pheromone, and GMP induced at least three, five, and two kinds of new proteins, respectively; one of them having molecular weight 30,000 was the only protein present in all cases. It was also observed that there are an increase or decrease in the expression and disappearance or reappearance of several vegetative proteins during development under the each condition. It may be deduced from all these results that the mechanism of development in *Stigmatella aurantiaca* is a complex one which may be affected not only by a class of development-specific proteins but also by other classes of new proteins as well as several classes of proteins present in the vegetative cells.

서 론

Myxobacteria는 유기물이 포함되지 않은 한 천평판배지에서 다세포체를 형성하는 세균들로, 발생하는 동안에 모든 세균들은 집합중심으로 이동하여 stalk와 포자낭으로된 fruiting body를 형성하고, 이 fruiting body 내에 포함된 세균들은 myxospore로 분화된다(White, 1981).

이러한 특징을 갖는 myxobacteria중에서 한 개의 stalk와 여러 개의 포자낭으로된 fruiting body를 형성하는 *Stigmatella aurantiaca*의 발생과정에는 빛이 큰 영향을 미치는데, 빛이 있을 때에는 fruiting body가 형성되나 빛이 없을 때는 fruiting body가 형성되지 않고 모든 세균들은 등성(ridge) 속에서 myxospore로 전환된다(Qualls *et al.*, 1978a and 1978b).

*S. aurantiaca*의 발생에 미치는 빛의 영향에 대

해서는 많은 연구가 있었는데, 특히 Inouye *et al.* (1980)은 이 세균이 빛이 있을 때에 더 많은 종류의 가용성단백질(soluble protein)을 합성한다고 보고하여 이들 단백질이 fruiting body의 형성에 관계가 있음을 암시하였다.

한편 Stephens and White(1980)는 몇가지 guanine의 유도체, 특히 GMP가 빛의 효과를 대신하여 fruiting body의 형성을 유도할 수 있다고 하였고, 또한 Stephens *et al.* (1982)은 이 세균이 빛의 존재하에서 발생할 때 확산되어 나오는 분자량이 1,800 정도인 지방성 물질을 분리하고, 이 물질이 세균 사이에 신호로 작용하여 빛이 없을 때에도 fruiting body의 형성을 유도할 수 있는 pheromone이라고 하였다.

따라서 본 저자들은 빛과 동일한 효과를 나타내는 GMP와 pheromone이 발생과정의 각 단계에서 단백질의 합성에 미치는 영향을 관찰하고, 이 결과를 빛의 효과와 비교함으로써 *S. auran-*

*tiaca*의 발생과정에서의 GMP, pheromone 또는 빛의 상대적인 작용기작을 알아보기 위하여 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주 및 배양

미국 Indiana University의 David White로부터 제공받은 *Stigmatella aurantiaca* DW4 CN29을 Qualls *et al.* (1978a)의 방법에 따라 1% Bactocasitone(Difco)과 0.35% yeast extract, 8mM MgSO₄가 포함된 액체 CT배지를 이용하여 30°C에서 진탕배양하였다(Kim and Kim, 1984).

2. Fruiting body의 형성

CT배지에서 성장하는 세균의 농도가 1.5×10^8 cells/ml가 될 때 Kim and Kim(1984)의 방법에 의해 세균을 모아 CPS 용액(10mM NaCl, 10mM KCl, 3.4mM CaCl₂)으로 4×10^{10} cells/ml이 되도록 재현탁하였다. 이 세균 현탁액을 1.5%의 한천(Difco)이 첨가된 CPS배지(CPS용액, 1.5% 한천), GMP배지(2mM Tris 완충액, pH7.2; 0.8 mM GMP) 또는 pheromone 배지(2mM Tris 완충액, pH 7.2; Pheromone, Kim and Kim, 1984) 위에 micropipette(Gilson)을 이용하여 5 μ l씩 떨어뜨린 다음, pheromone배지와 GMP 배지에 접종된 세균들은 암소에서 배양하고 CPS 배지에 접종된 세균들은 215 lux의 빛을 비추어 주면서 30°C에서 배양하였다(Kim and Kim, 1984).

GMP배지와 pheromone배지의 제조는 Stephens *et al.* (1982)과 Stephens and White (1980)의 결과를 이용한 Kim and Kim (1984)의 방법을 따랐다.

3. pheromone 용액의 제조

pheromone배지에 첨가된 pheromone은 Kim and Kim(1984)의 방법에 따라 준비하였다. 즉 영양이 결핍된 배지 위에 여과지를 깔고, 이 위에 *S. aurantiaca*를 접종한 다음, 빛을 비추어주면서 fruiting body형성을 유도한 후, 이 여과지를 물로 descending chromatography하여 pheromone을 추출하였다.

4. Soluble fracton의 분리

세균을 각각의 배지에 접종하여 배양하는 동안, 시간별로 8×10^{10} 에 해당하는 세균을 모아

1ml의 10mM sodium phosphate 완충액(pH 7.1)에 현탁시킨 다음, 2분동안 초음파로 세균을 파괴한 후, 원심분리(100,000 \times g/90min/4°C)하여 상등액을 soluble fraction으로 사용하였다.

5. 전기영동

soluble fraction내의 가용성단백질을 관찰하기 위해 Laemmli(1970)의 방법에 의한 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 slab gel 장치로 실시하였다. 사용한 gel에는 0.1%의 SDS(BRL)와 12.5%의 acrylamide(Bio-Rad)가 포함되어있으며, 전개는 bromophenol blue(sigma)의 푸른색이 stacking gel에 있을 동안에는 200volt로 전압을 유지하고, 그 이후에는 300volt의 전압을 유지하면서 실시하였다. 단백질의 염색은 Merril(1981)의 silver staining방법을 사용하였다. 그리고 가용성 단백질들의 분자량을 알아보기 위하여 분자량이 잘 알려진 몇 가지 단백질을 함께 전기영동하였는데 사용된 단백질은 다음과 같다.

Bovine serum albumin(Schwarz/Mann), 68,000; ovalbumin(Schwarz/Mann), 45,000; chymotrypsinogen A (Schwarz/Mann), 25,700; myoglobin(Schwarz/Mann), 17,000; cytochrome c (Sigma), 12,400.

6. 단백질 정량

Soluble fraction에 포함된 단백질의 양은 Bradford(1976)의 방법으로 결정하였다.

결과 및 고찰

현재까지 보고된 바에 의하면, *Stigmatella aurantiaca*는 빛이 없을 때는 발생 0시간에서 4.5시간까지 세균들이 한 곳으로 모이다가 6.5시간부터 12시간까지는 등성을 형성하고, 14시간부터 18.5시간 사이에 myxospore로 전환이 되나, 빛이 있을 때는 0시간부터 4.5시간 사이에 세균들이 집합중심으로 모여 6.5시간에서 21시간까지 fruiting body를 형성하고 23.5시간부터 31시간사이에는 myxospore로 분화된다고 한다(Qualls *et al.*, 1978a and 1978b; Inouye *et al.*, 1980; Stephens and White, 1980; White, 1981).

Inouye *et al.* (1980)의 결과에 의하면, 이 세균의 membrane과 spore에 존재하는 단백질은 빛

의 유무에 관계없이 발생 전 과정에서 큰 변화 없이 거의 동일하였으므로 본 실험에서는 soluble fraction을 사용하였다. 그리고 발생과정에서 나타나는 단백질의 변화 양상은 전기영동을 한 후에 gel상에서 직접 각 단백질의 띠를 비교하여 관찰하였다.

1. 단백질 합성에 미치는 빛의 영향

*S. aurantiaca*가 빛의 존재하에서 발생하였을 때는 영양세포(vegetative cell)에 존재하던 많은 종류의 단백질들이 시간에 따라 큰 변화를 보였음은 물론, 적어도 세가지의 새로운 단백질이 발생과정에서 합성되고 있음을 관찰할 수 있었다. 즉 Fig. 1에서와 같이 단백질 1과 2는 발생 직후부터 거의 나타나지 않았고 단백질 5는 23.5시간부터, 단백질 9는 23.5시간부터 합성이 되지 않았다. 또한 단백질 3과 4 및 6도 영양세포에 존재하던 것들로 발생 직후부터 합성이 되지 않다가, 단백질 3은 9.5시간부터, 단백질 4는 12시간부터, 그리고 단백질 6은 18.5시간부터 다시 합성이 되었다. 한편 단백질 7과 8 및 10은 영양세포에서는 나타나지 않았던 단백질로, 단백질 7(36,000)은 발생 후 12시간에 나타났다가 18.5시

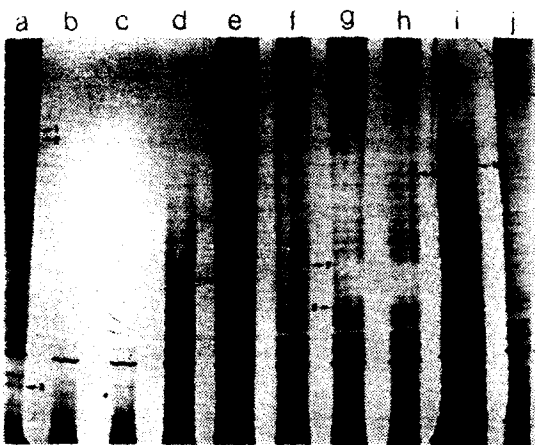


Fig. 1. Pattern of soluble protein synthesis during development on the CPS medium under the light condition. Cells spotted on the CPS medium were incubated at 30°C under the light and the soluble fractions prepared from cells collected after various times of incubation were then analyzed by SDS-PAGE as described in method. Symbols: protein pattern in vegetative cells (a) and in cells developed for 4.5(b), 6.5(c), 9.5(d), 12(e), 14(f), 18.5(g), 21(h), 23.5(i), and 31(j) hours, respectively.

간부터 사라졌으며, 단백질 8(30,000)은 18.5시간부터 새로 합성이 되었고, 단백질 10(68,000)은 발생 직후부터 합성이 되었으나 23.5시간부터 더 많이 나타났다.

이와 같은 사실은 빛의 존재하에서 *S. aurantiaca*가 발생할 때에는 새로운 단백질의 합성이 유도되어 이 세균의 특이한 발생을 일으키기도 하지만, 발생이전부터 이 세균에 존재하던 몇 가지의 단백질도 발생에 직접 또는 간접으로 참여하고 있음을 알 수 있다. 그리고 새로 나타난 단백질들 중에서 단백질 10은 발생의 전 과정에 영향을 미치지만 myxospore의 형성에 특히 중요한 작용을 하며, 단백질 7은 fruiting body 형성의 중간 단계에, 그리고 단백질 8은 fruiting body 형성의 후반기와 myxospore 형성 단계에 영향을 미치고 있음을 추측할 수 있다.

2. 단백질 합성에 미치는 pheromone의 영향

pheromone의 영향을 받으면서 빛이 없는 곳에서 발생한 세균들에서도 빛의 영향을 받은 세균에서와 동일하게 영양세포에 존재하던 단백질들의 소실, 감소, 또는 소실되었다가 다시 나타나는 현상이 있었음은 물론 몇 가지 새로운 단백



Fig. 2. Pattern of soluble protein synthesis during development on the pheromone medium under the dark condition. Cells spotted on the pheromone medium were incubated at 30°C under the dark and the soluble fractions prepared from cells collected after various times of incubation were then analyzed by SDS-PAGE as described in method. Symbols: protein pattern in vegetative cells (a) and in cells developed for 4.5(b), 6.5 (c), 9.5 (d), 12(e), 14(f), 18.5(g), 21(h), 23.5(i), and 31(j) hours, respectively.

질의 출현도 관찰되었다(Fig. 2). 단백질 1과 2를 포함한 다수의 단백질들은 빛의 영향을 받은 세균에서와 같이 발생시간이 경과함에 따라 완전히 소실 또는 감소되었으며, 단백질 3과 6은 발생 직후에 소실되었다가 9.5시간부터 다시 나타났는데, 단백질 6의 경우는 영양세포에서 합성되었던 것보다 상대적으로 그 양이 적게 나타났다. 그리고 단백질 5는 발생 9.5시간부터 사라졌다가 14시간부터 다시 나타났다. 한편 단백질 4, 7, 8, 9, 10 등은 영양세포에서 볼 수 없었던 단백질들인데, 단백질 4(30,000)는 발생 9.5시간부터, 단백질 7(33,000)과 8(35,000)은 23.5시간부터 합성이 되었으며, 단백질 9(38,000)는 발생초기에 형성되어 계속 나타나다가 21시간 경과시에 소실된 후 31시간에 다시 나타났고, 단백질 10(34,000)은 발생 31시간에 처음 나타났다.

이 결과는 빛의 영향을 받아 발생한 세균들과 마찬가지로, pheromone의 영향을 받아 발생한 세균에서도 영양세포에 존재하던 몇 종류의 단백질들이 새로 형성된 단백질들과 함께 발생을 유도하고 있음을 보여주고 있다. 그리고 새로 나타난 단백질 4는 fruiting body 및 myxospore의 형성에, 단백질 9는 세균집합체 형성을 포함한 발생의 전 과정에 참여하고, 단백질 7, 8, 10 등은 myxospore의 분화에 관여하는 것으로 추측이 된다.

3. 단백질 합성에 미치는 GMP의 영향

GMP의 영향을 받은 세균들에서도 빛이나 pheromone의 영향을 받은 세균들 처럼 영양세포에 존재하던 몇 가지 단백질들이 발생에 참여하고 있음을 추측할 수 있었다. Fig. 3에서와 같이 단백질 1과 2는 발생을 시작한 후 거의 나타나지 않았고, 단백질 3은 발생 직후부터, 단백질 7은 9.5시간부터 영양세포에서 보다 더 많이 형성되었으며, 단백질 4는 18.5시간부터 나타나지 않았다. 한편 단백질 5와 6은 발생도중에 새로 형성된 단백질로, 단백질 5(30,000)는 18.5시간부터 계속 합성된 것으로 보아 이 세균의 fruiting body형성 후반에서부터 myxospore의 형성에 까지 영향을 미치는 것으로 추측이 되며, 단백질 6(25,000)은 18.5시간에 나타났으나 23.5시간부터 그 양이 급격히 감소하는 것으로 보아

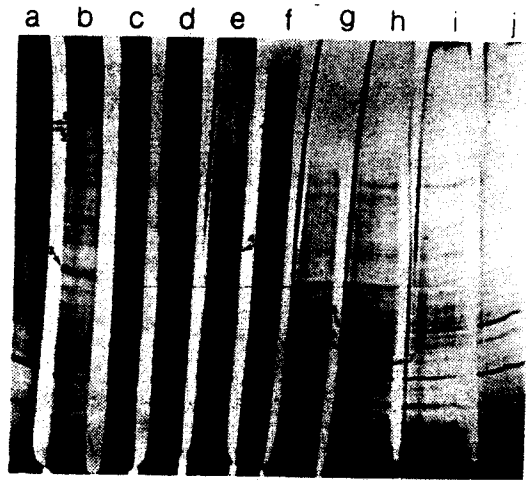


Fig. 3. Pattern of soluble protein synthesis during development on the GMP medium under the dark condition. Cells spotted on the GMP medium were incubated at 30°C under the dark and the soluble fractions prepared from cells collected after various times of incubation were then analyzed by SDS-PAGE as described in method. Symbols: protein pattern in vegetative cells (a) and in cells developed for 4.5(b), 6.5(c), 9.5(d), 12(e), 14(f), 18.5(g), 21(h), 23.5(i), and 31(j) hours, respectively.

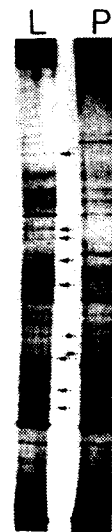


Fig. 4. Comparison of soluble protein synthesis under the different developmental conditions. The soluble fractions from cells developed for 18.5 hours under the CPS medium-light (L) and pheromone medium-dark (P) condition were analyzed by SDS-PAGE as described in method. Some proteins present in one preparation, but absent or weakly expressed in the other, are indicated by arrows.

fruiting body 형성의 후반에 강하게 작용하고 있음을 보여주고 있다.

이와 같은 여러가지 사실들을 종합하여 볼 때, *S. aurantiaca*가 영양이 결핍된 상태에서 빛이나 pheromone 또는 GMP의 영향을 받아 다세포체의 fruiting body로 발생하는 데에는, 발생과정에서 새로이 형성되는 특수한 단백질들 뿐만 아니라 발생 이전에 이미 존재하고 있던 단백질들의 일부도 작용하고 있음을 짐작할 수 있다. 그리고 GMP의 영향을 받은 세균에서 나타난 단백질 4와 단백질 6의 경우에서와 같이, 이 세균이 발생하는 동안 몇 가지 단백질들이 서로 교차하여 변화되는 현상은 이 단백질들이 발생과정에서 다른 단백질의 합성을 억제 또는 자극시킬 수 있음을 암시하여 준다.

위의 세가지 경우에서 공통적으로 분자량이 30,000인 단백질이 새로 합성된 사실은 이 단백

질이 *S. aurantiaca*가 어떤 조건하에서 발생하더라도 중요한 작용을 나타내는 단백질임을 시사하여 준다.

한편 서로 다른 조건하에서 발생한 세균에서 유도된 새로운 단백질들 중 분자량이 30,000인 것을 제외하고는 공통된 단백질이 없다는 사실은, 이 세균이 상기한 세가지의 서로 다른 조건하에서 동일한 발생현상을 나타내지만(White, 1981), 이런 현상이 어떤 공통된 특정 단백질에 의해서만 일어나는 것이 아니라 발생 조건에 따라 특유한 단백질이 유도되고, 이들 특유의 단백질이 제각기 독특하게 *S. aurantiaca*의 발생을 유도할 수 있는 복잡한 과정임을 짐작할 수 있다. 이와 같은 복잡성은 빛과 pheromone의 영향을 각각 받으면서 동일 시간동안 발생한 서로 다른 세균에 존재하는 단백질들을 비교한 Fig. 4로부터 명확히 알 수 있다.

적 요

*Stigmatella aurantiaca*가 영양이 결핍된 상태에서 발생하는 동안 단백질 합성에 미치는 pheromone과 GMP의 영향을 조사하여 이 결과를 빛의 영향과 비교하였다.

이 세균이 빛의 영향을 받으면서 발생하였을 때는 적어도 세가지의 새로운 단백질이 유도되었고, pheromone의 경우에는 다섯종류, GMP의 경우에는 두종류의 새로운 단백질이 각각 유도되었는데, 이들 중에서 한종류(30,000)의 단백질만 모든 경우에 공통으로 유도되고 있음이 밝혀졌다. 그리고 이 세균이 각각의 조건하에서 발생하는 동안, 영양세포에 존재하던 몇가지 단백질들의 양적인 증감이나 소실, 또는 재합성의 현상도 볼 수 있었다.

이와 같은 사실은 *S. aurantiaca*의 발생이 새로운 단백질 뿐만 아니라 발생 이전에 존재하던 단백질에 의해서도 영향을 받고 있음은 물론, 서로 다른 조건하에서 유도되는 상이한 단백질들에 의해 동일한 발생현상을 나타낼 수 있는 복잡한 과정임을 암시하고 있다.

References

- 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; 248-254.
- Inouye, M., S. Inouye, and D.R. Zusman. 1979. Biosynthesis and self-assembly of protein S, a development specific protein of *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76; 209-213.
- Inouye, S., D. White, and M. Inouye. 1980. Development of *Stigmatella aurantiaca*: Effect of light and gene expression. *J. Bacteriol.* 141; 1360-1365.
- Kim, S.O., and Y.M. Kim. 1984. Studies on the development of *Stigmatella aurantiaca* (I): Effects of cations, pheromone, and GMP on the fruiting body formation. *Kor. J. Microbiol.* Submitted.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227; 680-685.
- Merril, C.R., D. Goldman, S.A. Sedman, and M. H. Ebert. 1981. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211; 1437-1438.
- Qualls, G.T., K. Stephens and D. White. 1978a. Morphogenetic movements and multicellular development in fruiting myxobacterium *Stigmatella*

- aurantiaca*. *Develop. Biol.* 66; 270-274.
8. Qualls, G.T., K. Stephens, and D. White. 1978b. Light stimulated morphogenesis in fruiting myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Science* 201; 444-445.
 9. Stephens, K. and D. White. 1980. Morphogenetic effects of light and guanine derivatives on the fruiting myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *J. Bacteriol.* 144; 322-326.
 10. Stephens, K., G.D. Hegeman, and D. White. 1982. Pheromone produced by the myxobacterium, *Stigmatella aurantiaca*. *J. Bacteriol.* 149; 739-747.
 11. White, D. 1981. Cell interactions and the control of development in myxobacteria populations. *Intl. Rev. Cytol.* 72; 203-227.