

***Saccharomyces uvarum*의 배양시기에 따른  
ALPase, ACPase, ATPase 활성도와 volutin 과립 축적량**

李基渥 · 崔榮吉

漢陽大學校 生物學科

**Studies on the Activities of ALPase, ACPase, ATPase and  
Accumulation of Volutin Granules upon Growth Phase in  
*Saccharomyces uvarum***

Lee, Ki Sung and Yong-Keel, Choi

Department of Biology, Hanyang University

The present study was designed to investigate cellular regulation of phosphate metabolism between catabolically repressed and derepressed states in yeast (*Saccharomyces uvarum*). The activities of various phosphatases and the contents of phosphate compounds were detected according to the culture phase and various phosphate concentrations.

As the results, *Saccharomyces uvarum* derepressed many phosphate metabolizing enzymes such as alkaline phosphatase, acid phosphatase and ATPase more than ten fold simultaneously during catabolic repression (phosphate and sugar starvation). At the same state, the amounts of orthophosphate, nucleotidic labile phosphate and acid soluble polyphosphate were increased, compared to basal levels of normally cultivated cells.  $Mg^{++}$ -stimulated type among all phosphatases was appeared to have most of the enzyme activity. It could be postulated that  $K^{+}$ -stimulated alkaline phosphatase was directly or indirectly correlated with the synthesis of acid insoluble polyphosphate  $Mg^{++}$ -stimulated phosphatase with the degradation of polyphosphates.

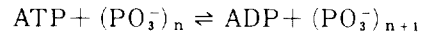
In case of cultivation in the medium supplemented with sugar and phosphate (catabolic derepression), phosphatase activities except for alkaline phosphatase were decreased rapidly through the progressive batch culture. After 12 hrs culture, at early exponential phase, the cellular accumulation of acid insoluble polyphosphate increased about 5 fold, compared to those of the starved cells. Under catabolic repression, it could be postulated that intracellular phosphate metabolism was regulated by derepressions of phosphatases. The function of polyphosphate system was shown to compensate the ATP/ADP system as phosphate donor and energy source especially during catabolic repression.

여러가지 생물세포에서 수행되는 인산화합물의 생리적 기능 및 이들의 양적 동태등을 추적하는 것이 생명과학 모든 분야에 상당한 비중을 차지한다는 것은 주지의 사실이다. 생물체의 중요한 인산화합물은 phosphonate, AMP, ADP, ATP, phosphine, hypophosphite, phosphite,

orthophosphate, pyrophosphate, phosphonium salts, phosphate monoesters, phosphate diesters, metaphosphates, polyphosphates 등으로 요약해 볼 수 있다(Kulaev, 1979; O'Leary, 1983). 이 중에서 inorganic polyphosphate (무기폴리인산)은 생물체의 세포내에서 일어나

는 인산화 반응에 매우 중요한 역할을 수행하는 인산화합물이다(Kulaev, 1979). 많은 미생물의 세포에 존재하는 무기폴리인산의 중요성 및 기능이 Wiame (1949) 과 Ebel (1952), 그리고 Widra (1959) 에 의한 고전적인 연구 이래 무기폴리인산의 구조가 phosphoric anhydride group 에 의하여 결합된 linear 구조의 ortho-P 중합체라는 것이 밝혀지고, 무기폴리인산의 각각의 anhydride 결합이 가수분해되어 생길 에너지는, ATP 의 말단인산결합의 가수분해시 생기는 에너지와 동일하다는 것이 증명됨으로서, 무기폴리인산이 고에너지 화합물인 관점에서 관심을 끌기 시작하였다 (Kulaev, 1979) 이 후 세포내에서 무기폴리인산의 생리적 기능, 축적량의 변화, 생물체에서의 존재 범위, 세포내 위치, 추출방법등에 관한 연구가 활발하게 되었다. 무기폴리인산의 구조적 특징에 따른 분류는, metaphosphate (ring form 또는 cyclic form;  $M_nP_nO_{3n}$ ,  $n=3\sim 15$ ,  $M\rightarrow H^+$  또는 1 가 양이온), 폴리인산 (linear form;  $M_{(n-2)}P_nO_{(n+1)}$ ,  $n=2\sim 10^6$ ) 과 가지형 무기폴리인산 (ultraphosphate; 고분자) 으로 나누어 진다 (Friedberg and Avigad, 1968; Kulaev 1979). 생체내 무기폴리인산의 존재확인은, 염색을 이용한 세포화학적 방법 (Dmitrieva and Bekker, 1962), 2 가 양이온 처리에 의한 침전 방법 (Harold, 1966), paper chromatography (Berg, 1957; Ohashi, 1975) 와 paper electrophoresis (Wade and Morgan, 1955), thin layer chromatography (Kulaev 등, 1974; Tanzer 등, 1968), ion exchange chromatography (Kura and Ohashi, 1971) 방법 등이 있으며, 화학적인 추출 방법 (Miyachi and Tamiya, 1961), nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy 방법 (Glonek 등, 1971), 그리고 최근에 이르러 Dietrich (1976) 에 의하여 agarose gel electrophoresis 방법이 소개되었다. 세포내에 무기폴리인산이 존재하는 생물체는 매우 다양하여, 세균, 방선균류, 균류 (효모, 곰팡이, 조균류, 불완전균류, 담자균류 등), 남조류, 조류 (홍조류, 갈조류), 이끼류, 원생동물, 곤충, 개구리의 배, 포유류의 뇌, 동물세포의 핵, 간세포, 시금치세

포 등에 널리 분포한다 (Kulaev, 1979). 무기폴리인산의 세포내 존재형태는 화학적 추출방법에 의하여 산가용성, 염가용성, 산 불용성 폴리인산 그리고 RNA-poly-P complex, protein-poly-P complex로 나타난다 (Friedberg and Avigad, 1968.; Kulaev, 1979). 무기폴리인산의 세포내 위치도 생물체에 따라 다양하여, 세균의 경우 세포질 또는 mesosome (Voelz 등, 1966) 에 위치하며, 균류나 조류는 액포에 존재한다 (Kulaev, 1979). 특히 효모의 경우 고분자 무기폴리인산은 액포 (Indge, 1968) 뿐 아니라, 세포막 외부 (Van Steveninck and Booij, 1964) 에 존재하고 저분자의 무기폴리인산은 세포질에 존재한다 (Kulaev, 1979). 무기폴리인산의 세포내 생합성경로는 아직 정확히 밝혀지지 않았지만, 많은 학자들에 의해 다음과 같은 가설이 인정되고 있다 (Harold, 1962; Kulaev, 1979).



세포내 ATP의 농도가 낮아질 때, 무기폴리인산으로 부터 ATP가 합성되는 데 특히 효모의 경우는 주로 poly-P로 부터 ATP가 형성된다 (Felter and Stahl, 1975). 또 효모의 경우는 polyphosphate kinase는 2 가지 isoenzyme이 존재하는데 그 중 하나는 세포질에 존재하며, 단지 고분자 poly-P로 부터 ATP를 생성하는 기능을 지닌다. 다른 하나는 액포에 존재하며, 고분자의 무기폴리인산으로 부터 ATP를 생성하는 기능뿐 아니라, ATP로 부터 poly-P를 생성할 수 있다고 하였다. 무기폴리인산을 가수분해 하는 효소는 polyphosphate depolymerase, polyphosphatase, tripolyphosphatase 등으로 나누어진다 (Kulaev, 1979). 이와같이 생성되고, 축적 분해되어진 무기폴리인산의 세포내 생리적 기능은 다양하여, 유기불합성 (다당류, 핵산, 인지질 등)에 관여하고, 당흡수, 무기인산 저장과 공급원 및 에너지원으로 작용한다 (Kulaev, 1979; 1972; 1970, Harold, 1960; Zaiβ, 1983). 이러한 기능외에 무기폴리인산은 핵의 주된 성분일 뿐 아니라 histone-DNA complex를 약하게 하여 gene derepression에 관여하고, 핵내의 RNA 합성과정에 무기인산을 공급하는 기능도 있다 (Weinstein and

Li, 1976) 최근에 이르러서는 무기폴리인산의 기능이 미생물내에서 물질대사 과정의 regulator 일 뿐 아니라, 중금속에 대한 방어작용에도 관여한다(Aiking 등, 1984)고 하였다. 이와같이 세포내 저장물질의 하나로 많은 생물체의 세포에 존재하고 생리적 기능이 다양한 무기폴리인산에 대한 연구는, 비교적 최근에 까지도 대부분 화학적인 추출방법을 통한 무기폴리인산 축적량 변화에 의하여, 무기폴리인산의 세포내 기능을 해석하였다(Nyholm, 1978; Grillo and Gibson, 1979; Correll 1965; Goad 등, 1978; Harold, 1962, 1963).

근래에는 무기폴리인산의 합성 및 분해에 관련된 효소의 정제 또는 활성도를 측정하여, 무기폴리인산의 세포내 기능을 해석하는 연구가 있었다. 무기폴리인산 합성효소와 polyphosphatase의 활성도에 관한 연구(Grillo and Gibson, 1979), *Saccharomyces carlsbergensis* 를 재료로 하여 생장시기에 따른 ACPase 활성도(Toda and Yabe, 1979), 탄소원과 pH에 따른 ACPase와 ALPase 합성 및 분해(Nahas 등, 1982), 무기폴리인산과 ACPase 관계(Weimberg, 1976), ALPase와 온도 및 ortho-P의 관계(Chang and Caruso, 1983), 무기폴리인산 합성과 분해 및 polyphosphatase (Rubtsov and Kulaev, 1977; Nesmeyanova 등, 1973; 1974; Kulaev and Konoshenko, 1971; Varma 등, 1983), 무기폴리인산과 RNase의 관계(Correll, 1965) 등의 연구가 있었다.

따라서, 본 연구는 효모(*Saccharomyces uvarum*)를 재료로 하여 배양시기에 따라, 합성되는 무기폴리인산의 축적량, ortho-P 등 인산 화합물의 함량 변화와 인산대사에 직접 간접으로 관련된 효소(ALPase, ACPase, ATPase)의 활성도 변화등을 관련지어, catabolic repression 및 catabolic derepression시에 일어나는 세포내 인산대사 조절과정을 조사하는 한편, 무기폴리인산제와 ATP/ADP system 중 어느 것이 어느 시기에 보다 효율적인 무기인산 공여체로 작용하는 가를 조사하고 무기폴리인산의 세포내 기능을 재조명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 효모의 성장배지 조제

• 완전배지 (YE 배지); *Saccharomyces uvarum* (ATCC 9080)의 배양을 위해서는 Yeast Extract (YE) 액체배지 (yeast extract 5g, glucose 20g, peptone 10g, D-H<sub>2</sub>O 1l)를 사용하였다. 접종하기 전에 효모세포를 YE 한천 배지에서 24시간 전배양 한 후에, 전 배양된 세포를 starvation (catabolic repression) 시킬 목적으로, 당과 인산이 함유되지 않은 Knopp's 최소배지에서 24시간 magnetic stirrer로 현탁시켰으며, 이같이 starvation된 세포를 YE 액체배지에 접종하고 (catabolic derepression), 30°C에서 진탕배양하였다 (130 cycle/min).

### 효모의 생장을 측정

• 효모의 생장율; 배양시기에 따른 생장율은 Bailey and Nejad (1961)의 방법에 의거하여 비색법으로 측정하였다. 배양중간기에 따라, 적량의 세포를 수확하여 증류수에 서적하고 현탁시킨 후, 세포 현탁액 1ml에, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>을 conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 2% 농도가 되도록 조정된 digestion 용액 2ml를 가하여 100°C에서 30분간 중탕시키고, 냉각되어진 반응액에 증류수를 첨가하여 5ml가 되도록 희석한 다음 580nm에서 흡광도로 측정하였다.

• Mg<sup>++</sup>이온 도입; Mg<sup>++</sup>이온의 정량은 Thiazole yellow를 지시약으로, hydroxylamine-hydrochloride와 1% 전분용액을 혼합하여 composite 용액을 조제한 후, 효모세포가 제거된 2ml의 배지에, 2ml의 composite 용액을 가한 뒤, 1ml의 2.5N NaOH 용액을 첨가하고, 5분 후에 525nm에서 흡광도로 측정하였다.

### 인산화합물과 무기폴리인산 (volutin 과립)의 분획

배양시기에 따른 효모세포의 인산화합물 및 무기폴리인산의 함량은 배양간기에 적량의 세포를 수확하여 0.2M NaCl 용액으로 2회 세척한 다음, 이(1980, 1981) 등, 최(1983) 등이 행한 방법대로 분획하여 정량하였다. 세포의 분획은 Schmidt와 Tanhauser (1945)의 변법으로, 무기폴리인산 (metachromatic granule)의 분리는

Miyachi와 Tamiya (1961)의 방법으로, ortho-P의 분리는 Berenblum과 Chain (1938)의 방법으로, nucleotidic labile-P의 함량은 Crane과 Lipman (1953)의 방법을 적용하였고, 인산화합물의 정량은 Fiske와 Subbarow (1925)의 방법으로 측정하였다.

### 효소의 활성도 측정

• **ACPase, ATPase, ALPase**; 배양 중간기에 적량의 효모세포를 수확하여 5000rpm에서 10분간 원심분리한 다음 0.2M NaCl 용액으로 2번 세척하였다. 세척한 세포에 Hughes (1971)의 방법에 따라 4°C에서 1분 간격으로 15회 초음파 마쇄하였다(Sonic dismembrator, Fisher, mode 300, intermediate tip 사용). 이를 증류수로 다시 현탁시킨 후 조효소 추출액으로 사용하였다. 이와같이 조제된 효소추출액의 acid phosphatase (ACPase), ATPase, alkaline phosphatase (ALPase)의 활성도를 측정하기 위하여 Ernst (1975)가 고안한 방법을 적용하였다. 즉, phosphatase (acid, alkaline) 및 ATPase 복합체 중 일부효소의 한 기질인 para-nitrophenyl-phosphate (p-NPP, Merck Co)가, 추출액 중의 phosphatase 및 ATPase에 의해 분해되어 생성되는 para-nitrophenol (p-NP)의 농도를 분광광도계로 측정하여 효소의 활성도를 정량적으로 측정하였다. 그러나 p-NPP를 분해하는 효소는 여러가지 type이 존재하므로 이들을 구분하기 위하여 다음과 같은 반응액이 고안되었다(Ernst 1975; Stahl 등, 1976).

Basic반응액(p-NPP 5mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, KCl 10mM)은 ACPase, ATPase, ALPase의 총 활성도를 측정하기 위하여, K<sup>+</sup>-free 반응액은 K<sup>+</sup>-stimulated phosphatase (ACPase, ALPase, ATPase)의 활성도를 측정하기 위하여, 그리고 Mg<sup>++</sup>-free 반응액은 Mg<sup>++</sup>-stimulated phosphatase의 활성도를 측정하기 위하여 고안되었다. Phosphatase는 최적 pH에 따라 구별되어지는 바, ACPase, ATPase, ALPase의 구분은 각각 반응액의 pH를 완충용액을 사용하여, pH 4.5 (0.1M acetate buffer)에서 나타나는 활성도를 ACPase의 활성도로, pH 7.0 (0.1M Tris-HCl buffer)에서의 활성도는 A-

TPase (Ernst 1975; Stahl and Broderon 1976), pH 9.0 (0.1M Tris-HCl buffer)에서의 활성도는 ALPase의 활성도로 나타내었다.

상기와 같이 조제된 반응액에, 효소추출액 1ml씩을 넣고, 대조군에는 동량의 증류수를 넣어 잘 섞은 후, 37°C에서 10분간 반응시켰다. 다음 37.5% TCA (trichloro acetic acid) 용액 0.5ml를 가하여 효소의 활성을 정지시켰다. 10분 경과 후 재발색시키기 위하여 1N NaOH 용액 2.5ml를 넣은 후 5,000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 410nm에서 나타나는 흡광도로 효소의 활성을 측정하였다. 단백질 정량은 Lowry (1951) 등의 방법을 적용하였다.

## 결과 및 고찰

### 효모의 성장 및 Mg<sup>++</sup>이온의 흡수

효모세포의 개체군 생장은 YE액체 배지에 접종 후 6시간을 전후하여 lag phase가 끝나면서, 24시간 경에 exponential phase에 이르며,

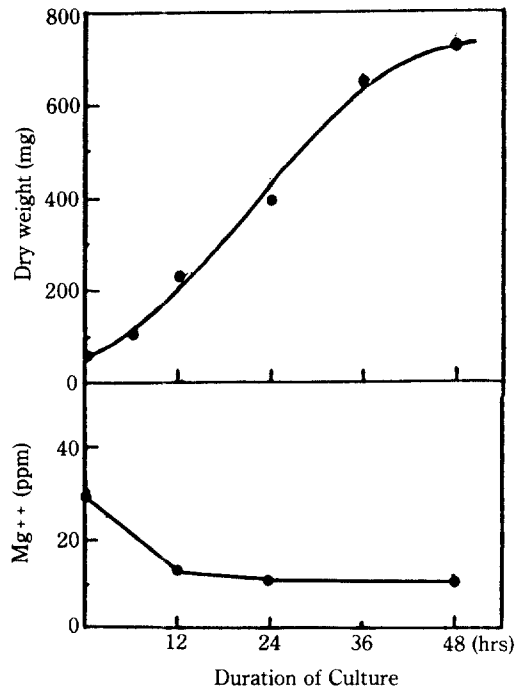


Fig. 1. Changes of population growth, and Mg<sup>++</sup> uptake in *Saccharomyces uvarum* according to the culture phase on YE medium

36시간 경에는 exponential phase가 끝나면서, 정체기로 들어가기 시작하여, 48시간 경에 완전히 정체기에 도달하였다.

Mg<sup>++</sup>이온의 세포내 도입량의 변화는 exponential phase의 초기인 12시간을 전후하여, 전 배양기에 걸쳐 유사한 것으로 미루어 배양 후 12시간 경에 세포내 필요한 Mg<sup>++</sup>이온을 배지로부터 이미 도입한 것으로 나타났다(Fig. 1).

**인산화합물, volutin과립 및 효소활성도**

배양시기에 따른 효모세포의 인산화합물의 함량변화는 Fig. 2에 나타내었다. 당과 인산이 결핍된 배지에서 생육시킨 세포(0시간)에서는

ortho-P와 nucleotidic labile-P가 모두 lag, log phase에 이룬 세포에 비하여, 1.5배 이상의 함량을 나타내었으며, 정체기로 접어들면서 결핍배지에서 생육시킨 세포의 수준으로 도달하였다. 인지질의 경우 exponential 시기의 초기에 가장 높은 함량을 보이다가 그 후 배양기간을 통하여 거의 일정한 함량을 나타내었다.

배양시기에 따른 volutin과립(무기폴리인산) 축적량의 동태는 Fig. 3에 나타내었다. 무기폴리인산의 type 중 폴리인산 "A"형은 당과 인산을 결핍시킨 세포가 정상배양 중인 세포에 비해 매우 높은 함량을 지닌 반면에, 폴리인산 "B"형은 exponential 시기의 초기(12시간)의 세포가 결핍배지에서 생육시킨 세포에 비하여, 5배 가량의 높은 축적량을 나타냈으며, 폴리인산 "C"

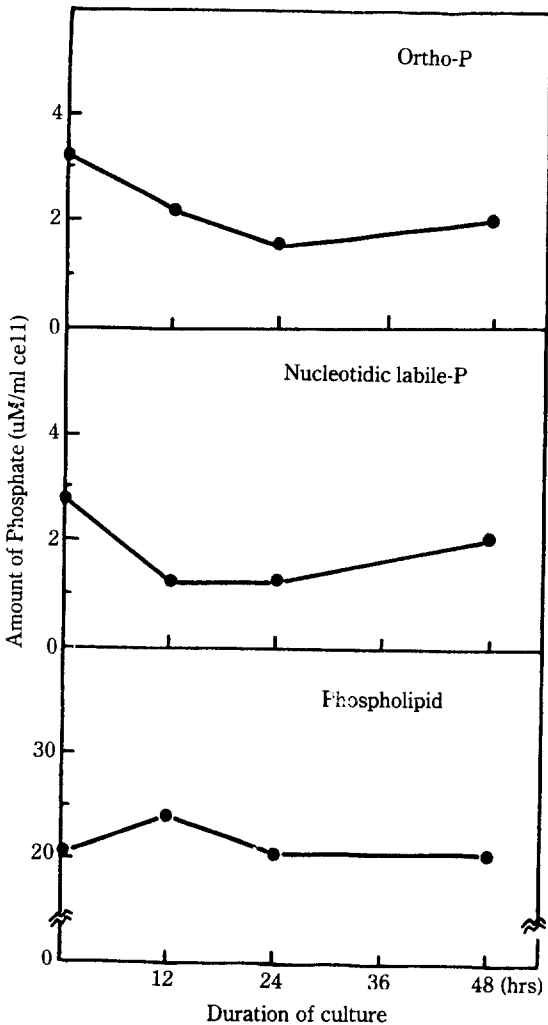


Fig. 2. Changes in amount of ortho-p, nucleotidic labile-p, and phospholipid during culture phase on YE medium

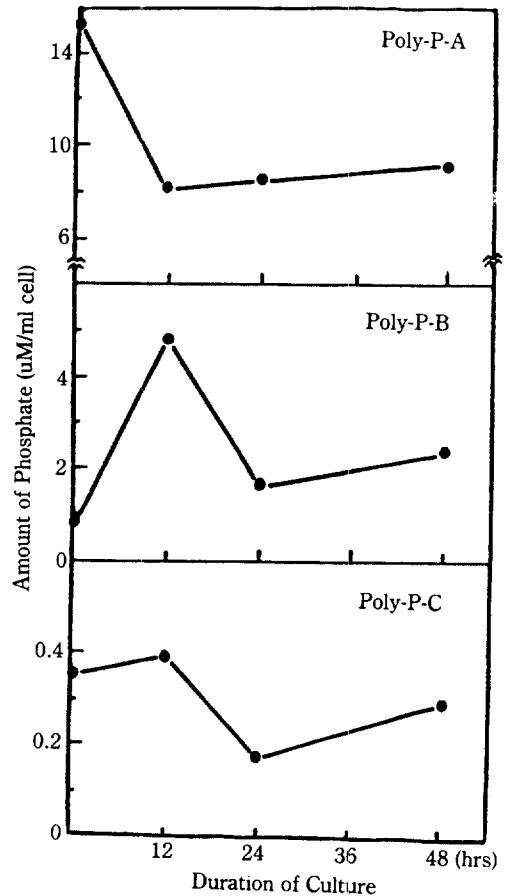


Fig. 3. Changes in amount of accumulated metachromatic granule such as poly-P-A, B, C, during growth on YE medium

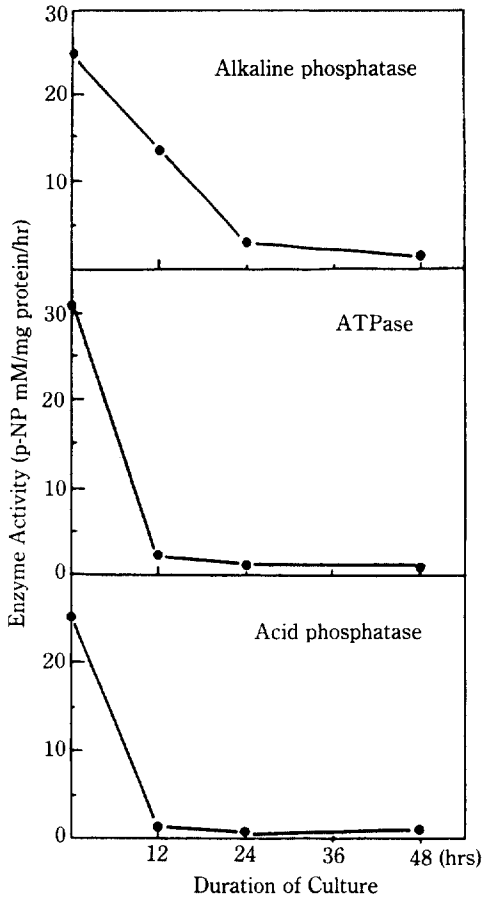


Fig. 4. Changes in the total activity of alkaline, acid phosphatase and ATPase during growth on YE medium

형 역시 같은 시기에 약간의 증가를 보여 주었다. 또 24시간(exponential phase) 배양세포에서는 12시간 배양세포에 비하여, 폴리인산 "A" 형은 약간의 증가를, 폴리인산 "B"형과 "C"형은 급격한 감소를 나타내었다. ALPase, ATPase, ACPase의 배양시간에 따른 총 활성도의 변화는 Fig. 4에 나타내었다. 당과 인산을 결핍시킨 세포가, YE액체배지에서 정상배양한 세포에 비하여, 모든 phosphatase의 활성도가 10~15배 이상 높기 나타났는데, 12, 24, 48시간 배양함에 따라, ALPase의 활성도는 점진적으로 감소하고, ATPase와 ACPase의 활성도는 급격한 감소를 나타내어, 12시간 이후의 배양세포에서는 모두 거의 일정한 수준의 활성도를 유지하였으나, ACPase의 활성도는 정체가

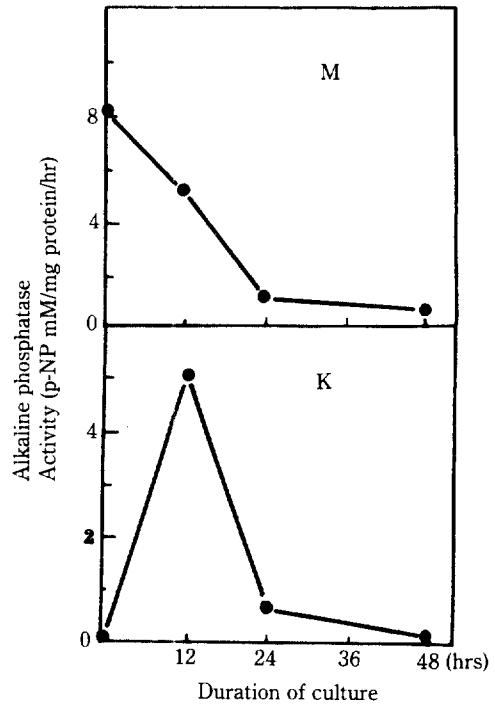


Fig. 5. K: Changes in K<sup>+</sup>-stimulated alkaline phosphatase activity.  
M: Changes in Mg<sup>++</sup>-stimulated alkaline phosphatase activity during growth on YE medium

로 접어들면서 다소의 증가를 나타내었다. 또 ALPase, ATPase, ACPase를 K<sup>+</sup>-stimulated, Mg<sup>++</sup>-stimulated type으로 구분하여 표시한 활성도 변화는 Fig. 5, 6, 7에 나타내었다.

ALPase의 경우, 당과 인산이 결핍된 배지에서 생육한 세포 뿐 아니라, 정상배양세포에서, Mg<sup>++</sup>-stimulated type이 주된 활성도를 보여, 전 배양기를 통해 ALPase총활성도에 대하여 40~60%의 활성도를 나타내었으며, K<sup>+</sup>-stimulated type의 활성도는 당과 인산을 결핍시킨 세포와 정체가세포에서 나타나지 않았으나, exponential시기 때 ALPase 총활성도의 37%의 활성도를 보였다. ALPase 중 K<sup>+</sup>-stimulated type은 전 배양기를 통해 12시간에 이르러 가장 높은 활성도를 보였으나, Mg<sup>++</sup>-stimulated type은 배양시간이 경과함에 따라, 점진적으로 활성도가 감소하는 양상을 띠었다. ATPase의 경우도, Mg<sup>++</sup>-stimulated type이 역시 주된 활성도를 보였으며, 배양시간이 경과함에 따라 환

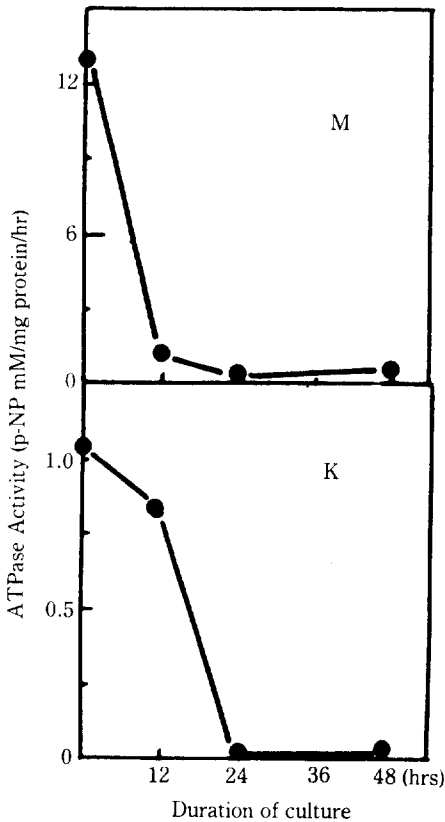


Fig. 6. K: Changes in K<sup>+</sup>-stimulated ATPase activity.

M: Changes in Mg<sup>++</sup>-stimulated ATPase activity during growth on YE medium

성도가 급격히 감소하였다. K<sup>+</sup>-stimulated ATPase의 활성도는 결핍배지에서 생육된 세포에서 높은 활성도를 나타내었다가 집진적으로 감소하면서, 24시간 이후에는 거의 활성도를 나타내지 않았다.

ACPase의 활성도를 배양시기 별로 살펴 볼 때, 중회성도의 동태는 ATPase와 비슷한 양상을 보이나, K<sup>+</sup>-stimulated, Mg<sup>++</sup>-stimulated ACPase의 동태는 ALPase와 ATPase의 경우와는 달리 나타났고, ACPase 역시 Mg<sup>++</sup>-stimulated ACPase가 주된 활성을 띠었다.

효모세포내 인산화합물과 volutin과립의 축적량 및 ALPase, ATPase, ACPase의 활성도가 인산대사의 조절에 어떠한 상호 연관성을 보이는지 살펴보면, YE배지에서 정상배양 중인 세포에 비하여, 결핍배지에서 생육된 세포에서, ortho-P, nucleotidic labile-P, poly-P-A의

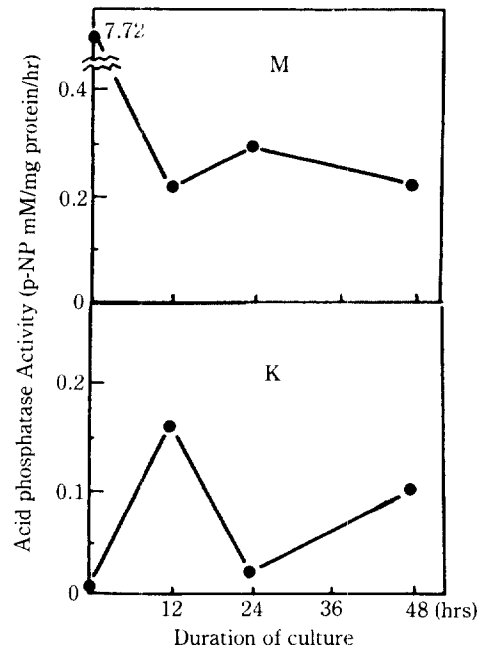


Fig. 7. K: Changes in K<sup>+</sup>-stimulated acid phosphatase activity.

M: Changes in Mg<sup>++</sup>-stimulated acid phosphatase activity during growth on YE medium

합량과, ALPase, ATPase, ACPase의 활성도가 매우 높았으나, 산 불용성 무기 폴리인산 "B"형은 적은 축적량을 나타내었다. 이러한 사실 중, ortho-P와 nucleotidic labile-P의 세포내 함량이 증가된 것은 여러 phosphatase의 높은 활성도에 의하여 세포내 무기 및 유기인산 화합물의 분해에 기인한 것으로 생각되어진다.

효모 (Attias and Bonnet, 1972), *E. coli* (Nesmeyanova 등, 1978), *Neurospora crassa* (Kadner and Nyc, 1969)의 세포에서는, 무기인산이 없는 배지에서 배양될 때 특히 활성이 증가하는 repressible ALPase와 배지의 인산 농도에 관계없이 합성되는 nonrepressible (constitutive) ALPase 등 2 가지 형의 ALPase가 존재한다 하였는 데 본 실험에서도 starved 세포에서, ALPase를 비롯한 여러 phosphatase의 활성도가 10~15배 높아진 까닭은 무기인산 결핍에 의해 유도된 repressible enzyme type이 주된 활성도를 나타내었기 때문으로 생각되어지며, Nesmeyanova 등 (1978), Nahas 등 (1982), Toda and

Yabe(1979)의 연구에서 나타난 ALPase 및 AC-Pase 활성도 변화와 일치됨을 보여주고 있다.

배양기간 중 exponential phase 초기(12시간) 배양시에 산 불용성 무기폴리인산이 증가되는 현상은 Nesmeyanova(1973) 등의 *E. coli*를 재료로 한 실험보고 및 Lee(1981) 등, Choi(1983) 등의 *Saccharomyces uvarum*을 재료로 한 실험보고와 잘 일치하는 데, 물질대사 및 세포분열 등이 왕성한 exponential 시기에 산 불용성 무기폴리인산의 축적량이 높은 것은, 무기폴리인산이 유기물 못지 않게 세포내 중요한 대사물질임과 동시에, 지속적인 무기인산공여체 및 에너지원으로서의 역할을 수행하는 기능을 지녔음을 잘 반영해 준다. 또 24시간 배양된 세포내 ortho-P의 함량과 nucleotidic labile-P의 함량이 낮은 수준을 나타내고, 총 무기폴리인산의 함량이 줄어들고, 산 불용성 폴리인산의 함량감소로 미루어, 유기물합성, ATP 생성 등의 물질대사에 산 불용성 무기폴리인산이 주된 역할을 수행한다는 것이 강력히 시사되며, 특히 효모세포에서는 polyphosphate kinase의 친화력이 ATP보다는 ADP에 더욱 강하여, ATP로부터 무기폴리인산이 형성되어지는 경로보다는, 주로 무기폴리인산으로부터 ATP가 생성된다는 Felter and Stahl(1975)과 Shabalin and Vagobov(1977)의 보고가 이를 잘 뒷받침하여 준다. 또 본 실험의 경우 결핍배지에서 생육된 세포에서 총 무기폴리인산의 함량이 정상 배양세포에 비해 높기는 하지만(Harold, 1961; Kulaev, 1979) 산가용성 무기폴리인산이 주된 함량을 나타낸 것은 결핍배지에서 생육되는 동안 세포내에 이미 축적되었던 산불용성 무기폴리인산이 depolymerase에 의해 분해되어 산가용성 무기폴리인산으로 전환되었기 때문으로 생각된다. 그리고 무기폴리인산의 축적량과 phosphatase의 활성도를 배양시기 별로 살펴 볼 때, ALPase, ACPase, ATPase 활성도가 가장 높은 시기에 총 무기폴리인산의 축적량, ortho-P, nucleotidic labile-P의 함량이 모두 높아져 있는 점이 두드러진 현상인데, 이러한 현상은 세포내 ortho-P의 수준이 높아질 때, 무기폴리인산을 이용하는 효소는 무기폴리인산의 분해에

관련되기 보다는 축적에 참여한다는(Kulaev 등, 1971; Grillo and Gibson, 1979) 보고와 잘 일치하며, 무기폴리인산이 최고의 축적량을 보일 때 가장 중요한 ALPase의 활성도가 일치한다는 Nesmeyanova 등(1973)의 보고와도 같은 결과를 나타내었다.

한편 무기폴리인산의 축적량과 phosphatase 각 형의 활성도의 동태를 비교해 보면, 결핍배지에서 생육시킨 세포(catabolic repression)를 YE배지에서 배양(catabolic derepression)할 때, ALPase, ACPase, ATPase의 총 활성도는 급격히 떨어져 지지만,  $K^+$ -stimulated phosphatase는 12시간 배양시기에 높은 활성도를 보였다. 이와같이 본 연구에서,  $Mg^{++}$ 이온이 결핍되는 시기에  $K^+$ -stimulated phosphatase가 활성도의 증가가 나타난 것은, Ogino(1983) 등의 연구에서  $Mg^{++}$ ,  $K^+$ 과 인산이 효모의 액모에 축적되고, 배지의  $Mg^{++}$ 이온이 결핍되면  $K^+$ / $Na^+$ 의 교환이 증가된다는 보고와 유관하다. 또  $K^+$ -stimulated phosphatase의 활성도가 높아지는 시기에 총 무기폴리인산의 함량은 적어 지지만, 산 불용성 무기폴리인산(폴리인산 "B"형)이 최대 축적량을 보인 것과 일치함을 보여 준다. 이러한 현상은 동시기에 총 효소활성도, ortho-P와 nucleotidic labile-P가 감소되는 점으로 미루어  $K^+$ -stimulated phosphatase가 유기인산화합물 및 ATP의 분해에 관련되었다기 보다는 산 불용성 무기폴리인산의 합성 및 축적에 연관되었을 것으로 생각되어진다. 또, ALPase, ACPase, ATPase의  $Mg^{++}$ -stimulated type의 배양기에 따른 활성도의 변화는 각각의 총 효소활성도의 동태와 같은 양상을 띠었는데  $Mg^{++}$ -stimulated phosphatase는 산 불용성 무기폴리인산의 분해에 관여하는 것으로 추정되었다.

Rubtsov and Kulaev(1977)의 연구에서, 무기폴리인산이 ortho-P 및 ATP의 세포내 수준을 조절한다고 하였는데, 본 실험에서도 catabolic repression시켰을 때와 catabolic derepression시켰을 때 나타나는 효모세포의 무기폴리인산의 총 축적량 변화에 비하여, 여러가지 phosphatase의 활성도 변화는 무척 큰 것으로 보아 세포내 ortho-P의 수준을 조절하는 기



능, 무기인산 공여체 및 pool로서의 기능, 그리고 에너지원으로서의 조절기능은 무기폴리인산

system이 ATP/ADP system에 우선되는 것으로 생각되어 진다.

## 摘 要

효모세포(*Saccharomyces uvarum*)을 재료로 하여, 인산대사에 관련된 여러 가지 효소의 활성도 변화를 중심으로, 유기불합성, 무기폴리인산의 축적량과 ortho-P함량 등을 관련지어, catabolic repression 및 derepression 시에 일어나는 세포내 인산대사의 조절과정을 조사하고자 하였다.

연구결과는 다음과 같이 요약해 볼수 있다. 당과 인산이 첨가되지 않은 배지에서 생육된 세포에서, alkaline phosphatase, acid phosphatase, ATPase 활성도가 정상배양중인 세포에 비해 10배 이상 동시적으로 증가(derepression)되었다. 인산과 당(탄소원) 등의 영양분이 첨가된 배지에서 배양한 세포에서, ALPase를 제외한 나머지 phosphatase의 활성도는 급격히 감소하였다.

Alkaline phosphatase, acid phosphatase 모두  $Mg^{++}$ -stimulated type이 주된 활성도를 나타냈고, 동시기에 ortho-P, poly-P-"A", nucleotidic labile-P가 세포내에서 높은 함량을 나타내었다. 초기의 exponential phase 인 12 시간 배양세포에서, catabolic repression시킨 세포에 비하여 산 불용성 무기폴리인산("B"형)은 5배 이상 축적되었다. ALPase중  $K^{+}$ -stimulated type은 무기폴리인산함성체,  $Mg^{++}$ -stimulated type은 무기폴리인산분해와 연관이 있을 것으로 추정되었다. Catabolic repression시기의 세포내 인산대사 조절 및 인산 수준을 여러 phosphatase의 활성도 증가(derepression)에 의하여 보완되어지는 것으로 생각되어 진다.

## REFERENCES

1. Aiking, H., A. Stijman, C. van Garderen, H. van Heerikhuizen, and J. van Treit. 1984. Inorganic Phosphate Accumulation and Cadmium Detoxification in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:374-377.
2. Attiaz, J and J.L. Bonnet. 1972. A specific alkaline p-nitrophenyl phosphatase activity from baker's yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* **268**:422-425.
3. Berenblum, I., and E. Chain. 1938. An improved method for the colorimetric determination of phosphate. *J. Biochem.* **32**:295-298.
4. Berg. G.G. 1957. Ascending chromatography polyphosphates. *Analyt. Chem.* **30**:213-217.
5. Chang, W.H., and J.L. Caruso. 1983. Lower temperature and orthophosphate control of alkaline phosphatase in a Cold-Requiring Plant. *Cryobiol.* **20**:380-382.
6. Choi, Y.K., K.S. Lee, C.S. Lee, and S.H. Cho. 1981. The effect of inorganic phosphate metabolism and the biosynthesis of organic compounds in Yeast. *Bull. Environ. Scil* **4**:57-76.
7. Correl, D.L. 1965. Ribonucleic acid-polyphosphate from alage III. Hydrolysis studies. *Plant and Cell Physiol.* **6**:661-669.
8. Crane. R.K., and F. Lipman. 1953. The effects of arsenate on ascorbic phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **201**:235-243.
9. Dietrich, S.M.C. 1976. Presence of polyphosphate of low molecular weight in *Zygomycetes*. *J. Bacteriol.* **127**:1408-1423.
10. Dmitrieva, S.Y., Z.E. Bekker. 1962. The nature of volutin granules in *Penicillium chrysogenum* (in Russian). *Tsitologiya.* **4**:691.
11. Ernst, S.A. 1975. Transport ATPase cytochemistry: Ultrastructural localization of potassium-dependent and potassium independent phosphatase activities in rat kidney cortex. *J. Cell. Biol.* **66**:584-608.
12. Felter, S., and A. Stahl. 1975. "Recherches sur la polyphosphate-synthetase de *Saccharomyces cerevisiae*." *C. R. Acad. Sci. Paris.* **2800**:1903-1907.
13. Fiske. C.H., and Y. Subbarow. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**:35.
14. Friedberg, I., and G. Avigad. 1968. Structures containing polyphosphate in *Micrococcus lysodeikticus*. *J. Bact.* **96**:544-553.

15. Glonek, T., M. Lunde, and T.C. Myery. 1971. Studies of biological polyphosphate through the use of phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. *Arch. Biochem. Biophys.* **142**:508.
16. Goad, L.S., T.E. Jensen, and R.P. Ayala. 1978. Phosphate metabolism in blue green bacteria. V.F actors affecting phosphate uptake in *Plectonema*. *Can. J. Microbiol.* **24**: 105-108.
17. Grillo, J.F., and J. Gibson. 1979. Regulation of Phosphate accumulation in the unicellular *Cyanobacterium synechococcus*. *J. Bacteriol* **96**:508-517.
18. Harold, F.M. 1962. Depletion and replenishment of the inorganic polyphosphate pool in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **83**:1047-1057.
19. Harold, F.M. 1966. Inorganic polyphosphates in Biology: Structure, metabolism and function. *Bact. Rev.* **30**:772-779.
20. Hughes, D.E. 1971. 'Methods in microbiology' Academic press. London and New York. **5B**: 27-30.
21. Indge, K.J. 1968. Metabolic lysis of yeast protoplasts. *J. Gen. Microbiol.* **51**:433-436.
22. Indge, K.J. 1968. Polyphosphates of the yeast cell vacuole. *J. Gen. Microbiol.* **51**: 447-452.
23. Kadner, R.J., and J.F. Nyc. 1969. A repressible alkaline phosphatase in *Neurospora crassa*. III. Enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* **244**: 5125-5129.
24. Kulaev, I.S. 1979. *The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates*. John Wiley and sons, Ltd. New York.
25. Kulaev, I.S., A. Shadi, and S.E. Mansurova. 1974. Polyphosphates in the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* under various culture conditions (in Russian). *Biokhimiya.* **39**:656.
26. Kulaev, I.S., G.I. Konoshenko. 1971. Detection and some properties of *Neurospora crassa* polyphosphates hydrolyzing inorganic polyphosphates to orthophosphate. *Biokhimiya.* **36**:1175-1182.
27. Kulaev, I.S., and T.P. Afanas'eva. 1970. The physiological role of inorganic polyphosphates in the yeast *Endomyces magnusii* (in Russian). *Dokl. Akad. Nauka SSSR.* **192**:668.
28. Kulaev, I.S., V. Vagabov, and A.B. Tsiomenko. 1972. The correlation between the accumulation of polysaccharides by the cell walls and some polyphosphate fractions in yeasts (in Russian). *Dokl. Akad. Nauka SSSR.* **204**:734.
29. Kura, G., and S. Ohashi. 1971. Chromatographic separation of cyclic phosphates by means of an anion-exchange dextran gel. *J. Chromatogr.* **56**:111-120.
30. Lee, C.S., S.H. Cho, K.S. Lee, H.K. Shin, and Y.K. Choi. 1981. Effect of the carbon sources on the synthesis of phosphate compounds and respiratory activity of yeast (*Saccharomyces uvarum*) during growth phases. *Kor. J. Microbiol.* **19**:63-77.
31. Lee, K.S. 1980. A study on phosphate metabolism in yeast (*Saccharomyces uvarum*) *M.S. Thesis*. Hanyang Univ.
32. Lowry, O.M., N.J. Rosenbrough., A.L. Farr., and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
33. Miyachi, S. 1961. Inorganic polyphosphate in spinach leaves. *J. Biochem.* (Tokyo) **50**:364-371.
34. Miyachi, S., and H. Tamiya. 1961. Distribution and turnover of phosphate compounds in growing chlorella cells. *Plant and cell physiol.* **2**:415-424.
35. Nahas, E., H.F. Terenzi and A. Rossi. 1982. Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid phosphatase (EC 3.1.3.2) and alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) in *Neurospora crassa*. *J. Gen Microbiol.* **128**:2017-2021.
36. Nesmeyanova, M.A., A.D. Dmitriev. A.D. Vobik, and I.S. Kulaev. 1973. 'On the regulation of some phosphorous metabolism enzymes in *E. coli*, in reaction mechanisms and control properties of phosphotransferase. Joint Biochemical symposium UdSSR-DDR,

- Reinhardtsbrunn, Akademie-Verlag, Berlin. 82.
37. Nesmeyanova, M.A., A.D. Dmibrieva., and I.S. Kulaev. 1974. The regulation of phosphorous metabolism and the level of polyphosphates in *Esherichia coli* K-12 exogenous phosphate. *Mikrobiologiya*. **42**: 313-319.
  38. Nesmeyanova, M.A., O.B. Maraeva, M.N. Kolot, I. S. Kulaev. 1978. Interrelationships of metabolic and genetic regulation of alkaline and acid phosphatases in *E. coli* cells. *Biokhimiya*, **43**:1783-1989. (Translation UDC 557, 154, **52**:1403-1408, 1979)
  39. Nyholm, N. 1978. Dynamics of phosphate limited algal growth: Stimulation of phosphate shocks. *J. Theor. Biol.* **70**:415-425.
  40. Ogino, T., J.A. den Hollander, and R.G. Shulman. 1983. <sup>39</sup>K, <sup>23</sup>Na, and <sup>31</sup>P NMR studies of ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*; stoichiometry/cation exchange/proton pump/intracellular pH/dysprosium tripolyphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**:5185-5189.
  41. Ohashi, S. 1975. Chromatography of phosphorus oxyacids. *Pure Appl. Chem.* **44**: 415.
  42. O'Leary, W.M. 1983. 'Critical Reviews in Microbiology', CRC. Press, Inc. Boca Raton, Florida. **10**:317-391
  43. Onishi, H.R., J.S. Tkacz, and J.O. Lampen. 1979. Glycoprotein nature of yeast alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* **10**:11943-11952.
  44. Rubtsov, P.M., I.S. Kulaev. 1977. Some pathways of polyphosphate biosynthesis and degradation in *Acetabularia mediterranea*. *Biokhimiya*. **42**:1083-1089.
  45. Schmidt, G., and S.J. Tannhauser. 1945. A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoprotein in animal tissue. *J. Biol. Chem.* **161**:83-89.
  46. Shabalin, Yu. A., V.I. Vagabov. 1977. Polyphosphate activity in vacuoles of yeasts. *Biokhimiya*. **42**: 1642-1649.
  47. Stahl, W.L., and S.H. Broderson. 1976. Histochemical localization of potassium-stimulated p-nitrophenyl phosphatase activity in the somato sensory cortex of the rat. *J. Histochem. Cytochem.* **24**:721-739.
  48. Tanzer, J.M., M.I. Krichevsky, and M. Chassy. 1968. Separation of polyphosphates by anionexchange thin-layer chromatography. *J. Chromatog.* **38**:526-531.
  49. Toda, K., and I. Yabe. 1979. Mathematical model of cell growth and phosphatase biosynthesis in *Sacharomyces carlsbergensis* under phosphate limitation. *Biotechn. and Bioeng.* **21**: 487-502.
  50. Van Steveninck, J., and H.L. Booij. 1964. The role of polyphosphate in the transport mechanism of glucose in yeast cells. *J. Gen. Physiol.* **58**:543.
  51. Varma, A.K., W. Rigsby, and D.C. Jordan. 1983. A new inorganic pyrophosphate utilizing bacterium from a stagnant lake. *Can. J. Microbiol.* **29**:1470-1474.
  52. Weimberg, R. 1977. Repression of the acid phosphatase of *Saccharomyces bisporus* in relation to the polyphosphate content of the cells. *Can. J. Microbiol.* **22**: 867-872.
  53. Weinstein, B.I., and H.C. Li. 1975. Stimulation of chromatin template activity by the physiological macromolecule polyphosphate: A possible mechanism for eukaryotic gene depression. *Arch. Biochem. Biophys.* **175**: 114-120.
  54. Wiame, J.M. 1949. The occurrence and physiological behavior of two metaphosphate fractions in yeast. *J. Biol. Chem.* **178**:919-929.
  55. Widra, A. 1959. Metachromatic granules of microorganisms. *J. Bactriol.* **78**:664-679.
  56. Zaiβ. U. 1983. On the allosteric regulation of polyphosphate metabolism in *Oscillatoria redeckei*. *Naturwissenschaften* **70**: 617-718.

(Received May 5, 1985)