Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.
Vol. 17, No. 5, 412-420 (1989)

*Bacillus amyloliquefaciens*에서 Puromycin과 Magnesium에 의한 α-Amylase의 분비저해

안순자[1] · 김순옥[1] · 이동희[2] · 송방호[1]*

[1]경북대학교 사범대학 생물교육과 [2]건국대학교 공과대학 미생물공학과

Disturbance of α-Amylase Secretion from *Bacillus amyloliquefaciens* Cells by the Treatment of Puromycin and Magnesium

Ahn,Soon-Ja[1], Soon-Ok Kim[1], Dong-Hee Lee[2] and Bang-Ho Song[1]*

[1]Department of Biology, Teachers College, Kyungpook University
[2]Department of Microbial Technology, College of Engineering, Kunkook University

To know how the ribosomes involved in secretory protein synthesis were attached to the cytoplasmic membrane in *Bacillus amyloliquefaciens*, the cells were treated with puromycin combinated with magnesium at the logarithmic phase, and the variation of cell-bound and extracellular α-amylase activity was assayed for determining the α-amylase translocation blocking through the cytoplasmic membrane. In the abnormal α-amylase producing mutant in which the C-terminal of the α-amylase structure was deleted, *B. amyloliquefaciens* CH10-2, the α-amylase was translocated normally through the cytoplasmic membranes, and the translocation blocking by puromycin was revealed to have a similar pattern as that in the wild type. This means that the C-terminal part of the enzyme structure may not have a signal for secretion. The cell death of the logarithmic phase cells in both strains was not affected much under 20 μg/ml of puromycin, however, the α-amylase translocation was blocked markedly under less than 10 μg/ml of the puromycin concentration. The blocking of the enzyme secretion by puromycin may be due to the detachment of the ribosomes from cytoplasmic membranes by disturbing the nascent polypeptide synthesis. Further evidence for confirming this was that the detachment was increased in 50 mM of magnesium ion because the extracellular α-amylase activity was decreased more under this condition.

If the cells were treated with trypsin combinated with lysozyme, the extracellular α-amylase activity from the cultured medium was reduced markedly, however, the activity from the cells treated with trypsin only was not reduced. This means that the nascent polypeptides protruding from the cytoplasmic membrane were sensitive to the trypsin digestion, whereas the matured ones were not. Therefore, the protruding polypeptides from the cytoplasmic membranes may be truncated by trypsin before forming their final tertiary structures by folding in the cell wall layer.

세포막에서의 단백질의 통과는 분비되는 단백질의 입체구조의 변형에 의해 야기되는 경우로 설명되는 막트리거 가설(membrane trigger hypothesis)과 (1), 이 단백분자 수송에 관계되는 진핵세포의 신호인식입자(signal recognition particle, SRP)와 독킹 단백(docking protein, DP), 원핵세포의 *prl*A/*sec*Y, *prl*C, *sec*A, B, C, 산물 등 환경적 요인과 분비 단백분자 자체의 signal cleavage에 의한 복합적 조절작용에 의해 야기되는 경우로 설명되는 신호가설(signal hypothesis) (2) 등, 두 가지를 생각할 수 있다. 본 연구에서는 주로 분비되는 단백분자의 막통과 과정에서 ribosome을 세포질막에 부착시키는 것

Key words: Signal hypothesis, secretion, *Bacillus amyloliquefaciens*, ribosome-membrane association, puromycin
*Corresponding author

으로 가상되는 nascent polypeptide쇄의 가교를 끊으므로서 ribosome이 막으로부터 이탈되게 하였을 때 단백분비의 방해가 일어나는가를 검토하므로서 간접적으로 ribosome에서 protrude되어 나오는 nascent polypeptide에 의해 ribosome이 막에 부착되어 있는가의 여부를 검토하고저 하였다.

단백의 분비가설에 대해서는 1975년 Blobel 등에 의한 신호가설(2-8)이 가장 유력시 되고 있다. 이 가설의 cotranslational transport system에 의하면 분비단백은 막에 결합된 ribosome에서 합성되어, 합성과 동시에 분비된다고 설명하고 있다. 이 때 분비단백을 합성하는 ribosome의 nascent polypeptide에 의한 막에의 부착, ribosome의 막으로부터의 해리 등에 대해서는 Smith 등(9-11)에 의해 보고되었다. 즉 *in vitro*에서 *E. coli*의 ribosome과 막에 [^{3}H] uracil, [^{14}C]oleic acid를 각각 가하여 라벨링 하였을 때 막에 결합된 ribosome이 puromycin에 의해서 해리되는 것이 확인되었고(9), 또 *Bacillus subtilis*의 protoplast에서 protrude되는 nascent polypeptide를 diazoiodosulfanilic acid로 라벨링하였을 때 labelled chain이 puromycin과 Mg^{++}에 의해 해리되는 것을 연구한 바 있다(11). 그리고 막과 ribosom은 KCl (12), EDTA(13) 혹은 타의 조건(14)에서도 해리되는 것이 보고된 바 있다.

본 실험에서는 *in vivo* 에서 *Streptomyces alboniger* 가 생성하는 단백합성 저해제인 puromycin을 사용하여 막 결합 ribosome의 해리에 대해 구명하고자 하였다. 이 puromycin의 구조는 6-dimethyl-3′-deoxy-3′-*p*-methoxyphenylalanylamino adenosine (15)으로 되어 있으며 이 물질을 *Bacillus amyloliquefaciens*의 대수증식기 세포배양액에 첨가하였을 때, 만약 ribosome이 protrude되어 나오는 nascent polypeptide에 의해 막에 부착되어 있다면, polypeptide의 합성이 억제되기 때문에 그 가교가 끊어져서 세포의 막에 부착된 ribosome이 막으로부터 해리되어 단백질의 분비가 저해될 것으로 추측되었다. 즉, 이러한 조건에서 puromycin을 처리하였을 때 extracellular 및 cell-bound α-amylase의 활성이 상실된다면, ribosome이 nascent polypeptide에 의해 막에 결합되어 있다는 것을 간접적으로 추정할 수 있으리라 생각되며 이 과정에 Mg^{++}을 동시 첨가하였을 때 세포외 α-amylase 활성이 더욱 감소하였기에 ribosome과 막의 해리가 Mg^{++}에 의해 촉진되었던 것으로 생각되었다. 또, 세포막 외부로 분비되는 nascent polypeptide 및 folding 과정을 거쳐 성숙된 α-amylase 분자의 trypsin에 대한 감수성을 조사함으로서 polypeptide의 성숙과정을 알고자 하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시 균주

액화형 α-amylase를 다량 생성, 분비하는 *B. amyloliquefaciens*와 친주의 분자량이 58 kDa인데 비해 분자량이 34 kDa인 이상 α-amylase 생성균주인 *B. amyloliquefaciens* CH10-2(16)를 사용하였다.

배 양

1.8% nutrient broth(NB) 배지 10 m*l*를 가한 L-test tube에 37℃에서 하룻밤 종배양한 균액을 2% 접종하여 6시간 경과된 후(대수증식기) 10 μg/m*l*의 tunicamycin(TM) 및 puromycin을 첨가하여 계속 배양하였다. 1.8% NB 배지 10 m*l*를 주입한 L-test tube에서 37℃ 하룻밤 배양한 후 이를 사까구찌 후라스크에 2% 접종하여 18시간 더 배양하였다. 이 균액을 10,000g 3분간 원심집균하여 처음 배양액의 1/5량의 PMC(17)에 현탁한 세포에 puromycin, magnesium 혹은 trypsin을 첨가하여 계속 배양하였다.

이 때 PMC는 Sanders와 May에(17) 의한 것으로 그 구성성분은 tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), 25 mM ; $(NH_4)_2HPO_4$, 3.8 mM ; KCl 5 mM ; sodium citrate, 4.25 mM ; $CaCl_2$, 0.125 mM ; $ZnSO_4$, 0.0125 mM ; 0.025% (wt/vol) casamino acid, 0.25 m*l* trace metal solution per liter ; 22% (wt/vol) sucrose 로서 HCl을 가하여 pH 7.3이 되게 조정하였다. Trace metal solution(18) : $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 5 mg ; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 2 mg ; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 65 mg ; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 mg ; KCl, 100 μg/m*l*, pH는 7.0으로 하였다.

축적된 cell-bound α-amylase의 분비

1.8% NB배지 10 m*l*를 가한 L-test tube에 균을 접종 후 37℃에서 하룻밤 종배양한 균액을 다시 L-test tube에 2% 접종하여 6시간 진탕 배양한 후 TM를 첨가하여 5시간 배양한 세포에 bacitracin, puromycin, chloramphenicol 등을 첨가하여 1시간 더 배양하였다. 그 후 11,000g에 3분간 원심집균하였으며 이 때 상등액을 세포 외 효소원으로 사용하였다. 회수된 균체는 2 mM CaAc, chloramphenicol

이 함유된 0.02 M Tris-Cl buffer (pH 7.2)로 2회 세척하였다. 세척된 균체를 lysozyme(mg/ml)용액으로 37℃에서 40분간 반응시켜 세포벽을 분해하였다. 이 때 lysozyme 용액은 0.4 M sucrose가 함유된 1/15 M potassium phosphate buffer (pH 7.2)에 제조하였으며 이를 protoplast wash 획분으로 구분지어 cell-bound α-amylase원으로 사용하였다. 이 때 lysozyme 추출액은 배양액의 1/10량이었으며 전 과정은 4℃에서 수행하였다.

Puromycin과 Mg^{++}에 의한 막결합 ribosome의 해리

상기와 동일방법으로 1.8% NB배지에서 종배양한 균액을 100 ml의 NB가 함유된 사카구찌 후라스크에 2% 접종하여 18시간 동안 진탕배양한 후 11,000g에서 3분간 원심집균하였다. 회수된 균체를 PMC로 2회 세척한 후 설탕이 22% 함유된 PMC 배지에 현탁하여 puromycin (10 μg/ml), Mg^{++} (10 mM, 50 mM)을 첨가한 후 37℃에서 처리하면서 경시적으로 배양액을 회수하여 이를 효소원으로 사용하였다.

Nascent polypeptide의 trypsin 감수성

Step 1 : 상기와 같이 종배양(37℃)한 균액을 1.8% NB 배지가 함유된 사카구찌 후라스크에 2% 접종하여 18시간 진탕배양하였다. 생육정지기에 원심집균하여 회수된 균체를 PMC에 2회 세척한 후 설탕이 22% 함유된 PMC에 현탁하여 trypsin (10 μg/ml), lysozyme (133 μg/ml)을 첨가하여 배양하였다. 그 배양액을 경시적으로 회수하여 원심분리한 후 효소원으로 사용하였다.

Step 2 : Step 1에서 trypsin, lysozyme을 첨가하여 현탁한 균체를 37℃, 1시간 동안 처리한 후 세포를 PMC로 세척하여 배양액에 함유된 trypsin, lysozyme을 제거한 후 신선한 PMC 배지에 재현탁하여 계속 진탕배양하면서 경시적으로 그 배양외액을 취하여 효소의 활성을 무첨가구와 비교 검정하였다.

α-amylase의 역가측정

효소의 역가는 Fuwa의 blue value법을 (18) 수정한 Matsuzaki 등 (19)의 방법에 의해 측정하였다. 2 mM calcium acetate가 함유된 1/15 M potassium phosphate buffer (pH 7.2)에 1% soluble starch를 용해하여 기질로 사용하였다. 10분 후 1.0 M acetic acid가 함유된 0.1 M I_2용액(사용직전 60배 희석)을 가하여 700 nm에서의 흡광도를 측정하였다. α-amylase 1 unit는 37℃에서 1분간 1 mg의 기질을 가수분해하는 역가로 나타내었다.

Polyacrylamide gel electrophoresis

7.5% polyacrylamide slab에서 효소단백을 전기영동한 후 (20-21), 4% soluble starch gel을 전기영동한 gel에 folding하여 I_2염색하였을 때 전분이 분해된 부분을 효소의 활성 band로 판정하였다 (22). 각 효소액은 glycerin, bromophenol blue (0.1% BPB)를 가하여 영동시료로 사용하였다. 이 때 시료는 한 lane 당 200 μl씩 charge하였으며 40 mA에서 5시간 전기영동하였다. 이 때 사용한 buffer는 Tris-Glycine buffer (pH 8, 3)였다. 효소활성은 4% soluble starch를 함유한 7.5% acrylamide gel을 조제하여 전기영동한 gel에 42℃에서 40분간 folding하여 starch를 영동한 gel에 흡착시킨 후 활성부분은 starch가 분해되어 흡착되지 않았기에 I_2-acetic acid 용액으로 염색하였을 때 보라색의 gel에 나타나는 흰 밴드로 판정하였다.

결과 및 고찰

Puromycin에 의한 cell-bound α-amalyase의 생성저해

대수증식기의 *Bacillus* 세포에 세포벽 합성저해제인 tunicamycin (TM)을 처리하면 세포벽의 합성이 억제되어 세포외로 분비되어야 할 α-amylase가 세포벽 획분에서 회수된다 (23). 이 성질을 이용하여 TM을 처리한 *B. amyloliquefaciens* 세포에 extracellular α-amylase의 분비를 억제시켜 (23) 세포막과 세포벽 사이 즉 periplasmic space 또는 세포벽에 cell-bound α-amylase로서 축적시킨 후, 여기에 다시 bacitracin, puromycin 등을 첨가하여 한시간 동안 처리하면서 이들 축적된 cell-bound α-amylase의 분비 여부를 조사하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 TM 비처리구의 cell-bound α-amylase 활성이 5.1 unit인데 비해 세포벽 합성을 저해시킨 TM처리구는 9.8 unit로 세포벽에 cell-bound α-amylase가 축적되었다. TM 첨가 후 cell-bound α-amylase가 축적된 세포에 다시 다른 종류의 세포벽 합성저해인 bacitracin을 첨가했을 때는 9.5 unit로 축적된 cell-bound α-amylase 활성이 그대로 유지되었으나 단백합성저해제인 puromycin을 첨가시는 chloramphenicol의 첨가시와 유사한 레벨의 8.1 unit로 활성이 감소되었으며 TM 비처리구는 5.1 unit에서 2.5 unit로 감소되었다. 이 결과로 미루어 볼 때 세포벽 합성저해시는 cell-bound α-amylase의 활성이 그대

Table 1. Effect of antibiotics[1] on the secretion of accumulated cell-bound α-amylase.

Antibiotics	Tunicamycin	α-Amylase Unit[2]	
		Extracellular	Cell-bound
None	–	92	5.1
	+	75	9.8
Bacitracin	–	93	4.6
	+	80	9.5
Puromycin	–	78	2.5
	+	78	8.1
Chloramphenicol	–	76	2.2
	+	76	7.9

1) The tunicamycin (10 μg/ml) was added to the culture broth in midlog phase cells and cultured 5 hrs more. After that, the harvested cells were resuspended with the fresh PMC medium and further cultured 1 hr more after addition of other antibiotics. The cultured broth and protoplast wash fractions were used as an extracellular and cell-bound α-amylase sources, respectively. Protoplast wash fractions were prepared from the lysates of lysozyme hydrolysis.
2) The blue value method was used.

로 유지되었으나 puromycin 처리시는 단백합성 및 분비의 저해현상이 나타나서 cell-bound α-amylase의 활성이 감소하였다.

Puromycin이 균의 생육도 및 효소생성에 미치는 영향

친주와 변이주의 배양액에 puromycin 첨가시 막과 ribosome의 해리에 의한 단백분비의 저해가 동일한 pattern으로 일어나는 가를 알아보았다. *B. amyloliquefaciens* 및 변이주 CH10-2를 NB 배지에 접종 후 37 C에서 진탕배양하여 mid-log phase (OD_{550nm}=1.5-2.0)의 세포를 회수한 후 puromycin을 최고 20 μg/ml 농도까지 첨가하여 6시간 더 배양한 후 균의 생육도, 세포 내외의 α-amylase의 활성을 검정하여 본 바는 Fig.1과 같으며 이 때 mid-log phase의 세포에 10 μg/ml의 puromycin을 가하여 약 30시간까지 배양하면서 extracellular α-amylase의 활성을 검정한 바는 Fig.2와 같다. 즉 Fig.1에서 puromycin 5 μg/ml 이상의 농도에서는 extracellular 및 cell-bound α-amylase의 활성이 현저히 감소하여 세포외 효소인 경우 5 μg/ml의 농도에서 친주가 60%, 변이주는 50% 정도 저하되었다. 세포벽에 축적된 cell-bound 효소도 친주는 약 70%,

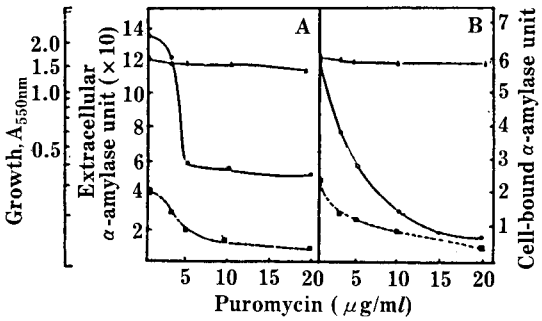

Fig. 1. Extracelluar and cell-bound α-amylase activity from the puromycin treated cells.
Bacillus amyloliquefaciens wild type and *B. amyloliquefaciens* CH10-2 strains were grown with shaking in the nutrient broth at 37°C. At mid-log phase (A_{550nm} = 1.5-2.0), cells were harvested and resuspended in the fresh PMC medium supplemented with each concentration of puromycin and continued further culture 6 hrs more. Enzyme preparation and the activity assay were described in details at "Materials and Methods". Enzyme activity was measured in A_{700nm} by the blue value method. One unit of α-amylase means the activity for hydrolyzing 1 mg of starch in 1 min. at 37°C.
Symbols: ▲-▲; growth, ●-●; extracellular α-amylase activity, ■-■; cell-bound α-amylase activity.
A; *B. amyloliquefaciens*, B; *B. amyloliquefaciens* CH10-2.

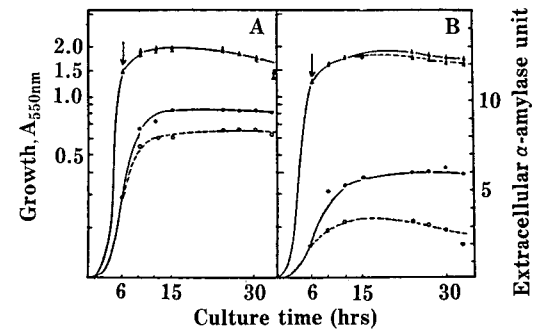

Fig. 2. Effect of puromycin to the growth and the extracellular α-amylase secretion.
B. amyloliquefaciens and *B. amyloliquefaciens* CH10-2 were grown in nutrient broth with shaking at 37°C. At mid-log phase ($A_{550\ nm}$ = 1.5-2.0), the puromycin was added to the cultured broth (arrows indicated) and continued further culture. Enzyme preparations and activity assay were described in details at "Materials and Method."
Symbols: ▲-▲; growth, ●-●; extracellular α-amylase activity from the cells cultured in the absence of puromycin, and △-△; growth, ○-○; the activity in the presence of puromycin.
A; *B. amyloliquefaciens wild type*, B; *B. amyloliquefaciens* CH10-2.

변이주는 약 50% 저하됨을 알 수 있었다. 또, Fig.2

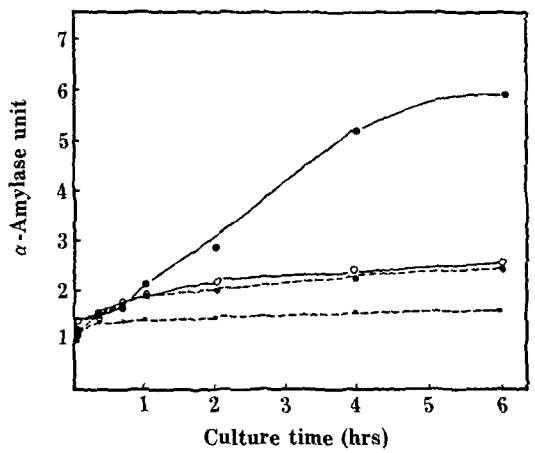

Fig. 3. Disturbance of extracellular α-amylase secretion by puromycin and magnesium.

Cells were cultured in NB medium with shaking for 18 hrs at 37°C. The harvested cells washed 2 times with PMC medium and were suspended with the medium (22% sucrose) supplemented with 10 μg/ml of puromycin and Mg^{++}. The cell suspensions were incubated at 37°C. Aliquiots of the suspensions were centrifuged with time intervals and the supernatants were used as an enzyme sources.

Symbols: ●-●; control, ○-○; puromycin, ●-●; puromycin + Mg^{++} 50 mM, ●-● ; puromycin + Mg^{++} 10 mM

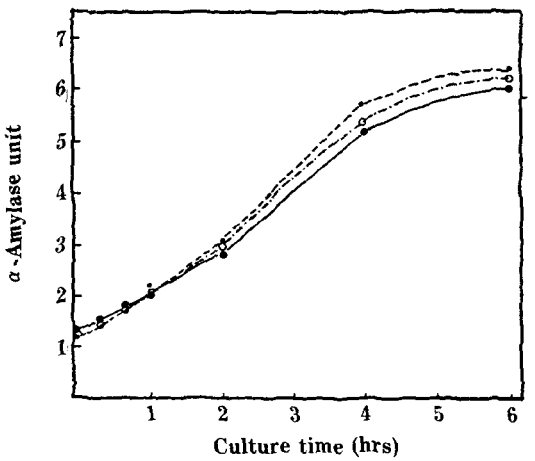

Fig. 4. Effect of Mg^{++} on α-amylase activity.

The harvested cells from NB culture with shaking for 18 hrs at 37°C and were suspended with PMC medium (22% sucrose) containing Mg^{++} after washing 2 times with the medium. With the cell suspensions were incubating at 37°C, aliquiots of the cell suspensions with time intervals were centrifuged and supernatants were applied to the extracellular α-amylase assay.

Symbol: ●-●; control, ○-○; Mg^{++} 10 mM, and ●-●; Mg^{++} 50 mM

에서 보는 바와 같이 puromycin이 대수증식기 말기에 투여되었을 경우 세포의 사멸에는 친주 및 변이주에서 크게 영향을 미치지 않았으나 α-amylase 활성은 현저히 감소하는 현상이 나타났다. 이상의 두 가지 실험결과로 미루어 볼 때, puromycin이 대수증식기의 세포에 첨가될 경우 이미 배양된 균의 사멸에는 크게 영향을미치지 않았으나, extracellular α-amylase의 활성이 감소되는 점은 puromycin에 의해 nascent polypeptide의 합성저해에 의해 분비과정이 방해되었기 때문으로 생각된다. 특히 이 두 가지 실험과정에서 α-amylase의 이상변이주(16)에서도 동일한 양상으로 효소활성이 저해됨은 α-amylase structure의 carboxy 말단쪽에 세포막 투과의 신호가 내재되어 있다고 보기는 어려울 것으로 생각되며 양 균주에서 거의 동일양상으로 효소활성이 상실됨은 분자의 아미노 말단측 즉 초기에 합성되는 nascent polypeptide에 의한 ribosome의 막에의 부착력이 상실되었기 때문으로 해석된다.

Puromycin과 magnesium에 의한 막결합 ribosome의 해리

그러나 이 때 α-amylase의 활성의 저하가 polypeptide의 합성의 저해만에 의한 것인지, 합성의 저해에 의해 ribosome을 막에 부착하겠금 하는 polypeptide chain의 연장이 저해됨으로 인해 막과 ribosome이 해리가 수반되기 때문에 일어나는 것인지에 대하여 알아보고저 생육정지기에 회수한 균체에 puromycin 첨가시 Mg^{++}을 동시에 첨가하여 보았다. 그 결과, Fig.3에서 보는 바와 같이 생육정지기에 회수한 균체에 puromycin(10 μg/ml)를 첨가하여 배양하였을 경우 대조구가 6 unit인데 비해 puromycin 처리시는 2.4 unit로 활성의 약 60%가 감소되었다. 그러나 여기에 Mg^{++}의 단백의 분비저해에 대한 첨가효과를 알아보고자 생육정지기에 회수한 균체에 Mg^{++}을 puromycin과 동시에 첨가하여 보았다. 즉, puromycin만 첨가했을 때에 비해 puromycin에 10 mM의 Mg^{++}을 첨가하였을 때 효소활성이 약 2.4 unit로 별다른 차이가 없었으나, 50 mM의 Mg^{++}을 첨가시는 약 1.5 unit로 효소활성이 더욱 저하되었으며 이 때 puromycin에 의한 효과가 훨씬 컸음을 알 수 있었다. Mg^{++}이 효소분자의 활성에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 효소반응액에 Mg^{++}을 첨가하여 보았을 경우 Fig. 4에서 보는 바와 같이 10 mM, 50 mM의 Mg^{++}을 첨가하여도 효소활성은 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

이상의 결과로 유추하건데 puromycin에 의해 신

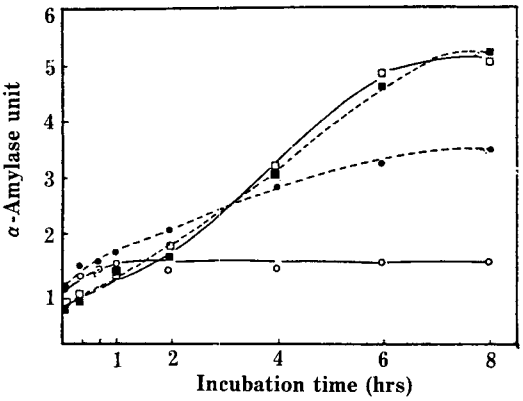

Fig. 5. Extracellular α-amylase secretion from the cells treated with trypsin and lysozyme.
Cells were grown at 37°C with shaking for 18 hrs, then the cells were harvested after washing 2 times with PMC medium and suspended with the medium (22% sucrose) containing trypsin and lysozyme (○); lysozyme alone (●); trypsin alone (■); and no addition (□).

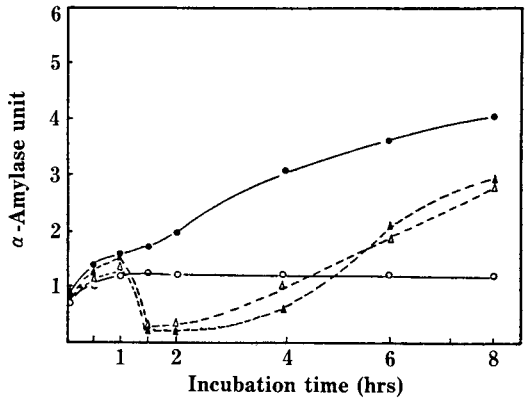

Fig. 6. Restoration of the extracellular α-amylase secretion from the trypsin digested protoplasts.
Cells were cultured with shaking for 28 hrs. The harvested cells were suspended with PMC medium (22% sucrose) containing trypsin and lysozyme (○), and lysozyme alone (●). The suspensions were incubated 1 hr more, after washing with PMC medium, the harvested cells were resuspended with fresh medium under removed condition of trypsin and lysozyme (△), and of lysozyme alone (▲).

생 polypeptide쇄의 연장이 방해됨으로 인해 ribosome을 막에 부착시키는 polypeptide쇄 가교가 끊어지므로서 extracellular α-amylase의 활성이 저하된 것으로 생각된다. 동시에 이 때 공존하는 50 mM의 Mg^{++}에 의해 막과 ribosome의 해리가 촉진되었기 때문에 효소의 분비가 저해되어 extracellular α-amylase의 효소활성이 현저히 저하되었을 것으로 생각된다. 만약 ribosome이 protrude되는 nascent polypeptide에 의하지 않고 다른 방법으로 막에 부착되어 있다면 puromycin 처리구의 extracellular α-amylase 활성저하가 크게 나타나지 않고 상대적으로 Mg^{++}의 첨가효과가 더 크게 나타났을 것으로 생각된다.

Puromycin을 첨가한 배양액의 α-amylase의 전기영동상

Puromycin과 Mg^{++} 첨가시 분비되는 세포외 효소의 전기적 이동도를 이들 물질의 무첨가구와 비교하여 검토하였다. Puromycin과 Mg^{++} 첨가시 효소의 활성밴드는 그 이동성은 대조구와 동일하였으나 활성밴드는 약하게 나타났기에 효소활성이 현저히 상실됨을 알 수 있었다. 이 때 효소활성밴드가 약해짐은 puromycin에 의한 막결합 ribosome의 해리에 의해 α-amylase 단백의 합성 및 분비가 현저히 감소되었기 때문으로 추정된다(데이타 생략).

Nascent polypeptide의 trypsin 감수성

막 결합 ribosome에서 합성분비되는 nascent polypeptide의 성숙과정을 알아보기 위해 정지기에 회수한 균체에 trypsin(10 μg/ml)과 lysozyme(133 μg/ml)을 처리해 보았다. 그 결과 Fig.5에서 보는 바와 같이 α-amylase 활성이 trypsin만을 첨가시는 무첨가구와 동일하게 5.2 unit 정도로 나타나서 효소활성은 감소되지 않았으나 lysozyme과 trypsin을 같이 첨가했을 때는 효소활성이 1.5 unit로 현저히 저하되었다. 그리고 lysozyme 처리시 배양 초기에 효소활성이 증가함은 periplasm에 축적되어 있었든 cell-bound α-amylase가 lysozyme에 의한 세포벽의 분해로 인해 유출된 것으로 생각된다.

또, Fig.6에서 보는 바와 같이 생육정지기에 회수한 균체를 PMC에 현탁한 후 trypsin과 lysozyme을 첨가하여 1시간 더 처리한 후 trypsin과 lysozyme을 제거하여 PMC에 재현탁하였을 경우와 제거하지 않고 그대로 배양하였을 경우 extracellular α-amylase의 활성을 비교 검정하였다. 그 결과, 효소활성이 lysozyme을 처리한 것은 8시간 배양시 4.3 unit까지 증가하였으나 lysozyme과 trypsin을 동시에 첨가하였을 때는 이미 분비된 효소활성만을 유지하였다. 그러나 이 때 lysozyme만의 첨가구는 lysozyme을 제거하고 lysozyme과 trypsin 첨가구는 이들을 다시 제거한 경우에 효소활성이 회복되면서 상승함을 알 수 있었다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 lysozyme과 trypsin의 동시첨가에 의해서만 효소활성이 감소함은

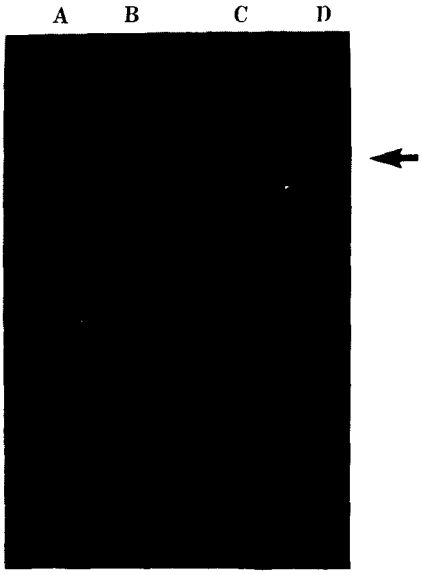

Fig. 7. Electrophoretic pattern of α-amylase from the cells treated with trypsin and lysozyme.
Extracellular α-amylase of cells cultured in the presence and absence of trypsin and lysozyme, were charged in each lane of 7.5% acrylamide slab gel. After electrophoresis, α-amylase assay staining was performed. Each lane was treated as follows; lane A: control, B: trypsin, C: trypsin + lysozyme, D: lysozyme. Arrow indicates α-amylase bands.

lysozyme에 의해 세포벽이 분해된 세포에 protrude되는 polypeptide가 trypsin에 의해 면도되는 현상(26)이 나타났거나 folding이 되어 3차 구조를 형성하기 이전의 trypsin 감수성 α-amylase 구조가 분해되었기 때문으로 생각된다. 이 때 trypsin만 첨가했을 경우 및 trypsin과 lysozyme을 동시에 첨가했을 경우 효소활성밴드를 전기영동상으로 조사한 바(Fig.7) 활성밴드에 강약의 차이가 있기는 하나, 어느 경우에든 밴드의 이동도는 동일 하였다. 이 결과는 protrude되는 polypeptide가 trypsin에 의해 분해된 경우의 미성숙된 분자는 효소활성이 상실되었기 때문에 효소의 활성밴드로는 나타나지 않은 것으로 생각된다.

*Bacillus*속 세균은 대부분의 분비 단백질을 세포질에 있는 ribosome에서 합성하여 세포표층구조를 통과시키므로서 세포외로 분비하고 있다. 이러한 분비단백은 세균세포막의 내층에 존재하는 polysome에서 합성되며 polypeptide 분자가 합성되는 과정에서 합성과 동시에 세포막을 통과하는 것으로 설명되고 있다. 이러한 분비단백의 합성과정에 aminoacyl-tRNA의 aminoacyl-adenyl 부분의 analogue인 puromycin을 처리하므로서 puromycin의 아미노기가 nascent peptide C-말단과의 결합에 의해 연속되는 아미노산 대신에 peptidyl-puromycin entity가 생성되므로서 즉, puromycin이 끼워져 들어가게 되므로서, 다음 아미노산의 결합이 방해되어 polypeptide의 체인 생성이 중단된다. 이 때 ribosome에서 protrude되는 polypeptide쇄에 의해 ribosome이 막에 결합되어 있다고 가정할 때, 이러한 방해현상은 ribosome의 polypeptide쇄에 의한 막에의 부착능을 상실케 하며, 따라서 막으로부터 ribosome이 해리되게 되고 단백의 분비현상은 정지되게 된다. 본 실험에서는 이 puromycin을 사용하여 nascent polypeptide의 합성을 방해하여 ribosome을 막으로부터 해리시키므로서 막에서 polypeptide의 protruding을 중지시키게되고 그 결과, 세포외 단백의 분비가 저해되는가의 여부를 검토하고자 하였으며, 이 때 ribosome은 ribosome에서 신생으로 합성되는 polypeptide쇄에 의해 막에 부착되어 있는가를 알고자 하였다.

Bacillus amyloliquefaciens 친주와 α-amylase 구조유전자에 변이가 일어나 α-amylase의 활성은 있으나 야생주의 α-amylase (MW 58 kDa)보다 훨씬 작은 분자, 즉 이상 α-amylase (MW 34 kDa) 생성변이주 CH10-2의 배양액에 puromycin을 처리하여 nascent polypeptide의 합성을 방해하였다. 그 결과 이들 양균주 모두 효소의 분비가 억제되는 것을 볼 때 α-amylase 단백의 분비는 membrane-trigger 가설(1)에서의 설명처럼 세포 내외에서의 분비단백 자체의 입체구조변형에 기인되는 것이라기 보다는 puromycin에 의한 polypeptide쇄 연장의 저해로 인하여 ribosome과 막이 해리되었기 때문에 분비가 저해가 되는 것으로 추측된다. 만약 이 때 분비되는 polypeptide 자체 내에 막통과 시그날이 존재한다면 C-말단의 상당부분이 결실된 변이주의 α-amylase는 분비되지 않거나, puromycin에 대한 감수성이 다르게 나타날 것으로 예상되나 변이주의 경우도 친주와 동일양상으로 분비가 억제됨을 알 수 있었다. 또 nascent polypeptide에 의해 ribosome이 막에 부착되어 있다면 puromycin 첨가에 의해 ribosome이 막으로부터 해리될 것이나 단순한 부착에 의해 ribosome이 막에 부착되어 있을 경우는 고농도의 Mg^{++} 첨가에 의해서 해리될 것으로 생각된다. 본 실험에서는 puromycin 첨가시 세포외 효소의 활성이 현저히 감소됨을 볼 때 Smith 등(9)의 보고에서

와 같이 nascent polypeptide에 의해 ribosome이 막에 부착되어 있다고 예측되고 있으며 이 때 50 mM의 Mg^{++} 첨가에 의해 다소 ribosome의 이탈효과가 더 부가되었다고 생각된다. 이는 또 ribosome의 막에의 단순결합시 막의 해리에 촉진작용을 하는 것으로 보고된 Mg^{++}을(24) puromycin과 동시에 첨가해 보았을 때 효소의 분비가 저하되었으나 Mg^{++}만이 첨가된 경우는 효소의 분비에 영향이 없었다. 이 때 Mg^{++} 그 자체로서 효소활성에는 저해현상이 없었으며 50 mM Mg^{++}을 puromycin과 동시 첨가하는 경우 extracellular α-amylase 활성이 더욱 저하하는 이유는 막과 ribosome의 해리과정이 Mg^{++}에 의해 다소 촉진되므로서 polypeptide의 세포막 통과가 방해되어 분비된 α-amylase 단백의 절대량이 감소하였기 때문으로 생각된다. 이 결과는 정제된 동물세포에서의 microsome이라든가(12), 식물세포의 chroloplast에서는(25) 이와 같이 nascent polypeptide에 의하지 않고 direct attachment되어 있어서 nascent polypeptide의 합성을 puromycin으로 방해하여도 ribosome이 막으로부터 해리되지 않으나 여기에 고농도의 염을 가하든가, 막 이탈성 인자를 첨가할 경우에만 ribosome이 막으로부터 이탈된다는 실험결과와는 상반된 것으로 생각되었다. 이에 비해 정제된 세균의 막-polysome 복합체의 *in vitro* 실험에서 puromycin만에 의해서도 nascent polypeptide쇄의 합성방해로 인하여 ribosome이 막으로부터 해리되기 때문에 ribosome이 막에 nascent polypeptide에 의해 부착되어 있다고 설명하며 이는 weak association으로 안정화를 유지하는 농도의 Mg^{++}, K^{+} 이온의 존재하에서도 puromycin에 의해 ribosome이 막으로부터 해리되었다는 Smith 등(9)의 보고와 비교할 때 본 결과는 *in vivo*에서의 실험으로서 puromycin만에 의해서도 세포의 효소의 활성이 현저히 감소함을 볼 때 ribosome이 nascent polypeptide에 의해 부착되어 있던 것이 막으로부터 이탈되었기 때문으로 생각되며 여기에 50 mM의 Mg^{++}의 첨가효과가 다소 나타나기에 흥미로운 실험결과로 생각되어 보고하는 바이다. 또한 puromycin 처리 후의 효소를 처리 전의 효소와 비교하여 전기영동하였을 때 이동성은 같으나 활성에는 현저한 차이를 나타내었으며 이는 puromycin에 의한 분비방해로 효소의 절대량이 감소되었기 때문으로 해석된다.

이와 같은 실험결과로 미루어 볼 때 *B. amyloliquefciens*에서는 ribosome의 막에의 부착이 진핵세포에서 보고된 바와 같이 direct attachment된 것이 아니라 nascent polypeptide에 의해 부착되어 있어서 ribosome의 막과의 복합체 즉, 막 결합 ribosome에 의해 α-amylase 단백이 합성되며, 합성되면서 길어지는 nascent polypeptide쇄는 합성과 동시에 막을 통과하여 signal sequence의 processing이 일어나는 것으로 생각된다. Lysozyme으로 세포벽을 분해한 세포에 trypsin을 처리했을 경우 protoplasts 외액의 α-amylase 활성은 저하되나 세포외로 분비된 효소나 periplasm에 축적되어 있던 효소는 trypsin에 비감수성인 점으로 보아 막을 통과하는 과정의 protruding polypeptide나 통과한 직후의 미성숙된 nascent polypeptide는 trypsin에 의해 쉽게 분해되나 polypeptide가 완전히 합성되어 막에서 해리된 후 3차 구조로 folding이 되었거나 세포외로 분비된 α-amylase 단백은 trypsin에 대해 비 감수성의 상태로 분해되지 않는 것으로 생각되었다. 이러한 결과는 *Bacillus.*에서 분비단백의 folding 과정이 세포벽의 내층 부위에서 이루어져 3차 구조를 형성한 성숙된 효소단백으로서 세포벽을 통과하는 것으로 믿어진다. 즉 α-amylase의 3차 구조형성은 세포벽 통과 이전에 이루어지는 것으로 생각된다.

요 약

*Bacillus amyloliquefaciens*의 extracellular α-amylase는 세포질막에 결합된 ribosome에서 합성되며 이 때 ribosome은 nascent polypeptide쇄에 의해 막에 부착된 것으로 추측된다. α-amylase 생산균주인 *B. amyloliquefaciens* 야생주의 정상단백(MW, 58 kDa)과 이 균주의 α-amylase 구조유전자에 변이가 일어나 carboxy 말단이 결실된 변이주의 이상단백(33 kDa)은 동일조건하의 배양외액에서 그 효소활성이 검출됨을 볼 때, α-amylase의 carboxy 말단에는 막 투과의 신호가 없는 것으로 생각된다. 그러나 이들 양균주의 대수증식기 세포에 puromycin을 20 μg/m*l*까지 가하여 6시간 동안 처리한 결과 균의 사멸에는 영향을 미치지 않았으나 extracellular α-amylase 활성은 10 μg/m*l*의 농도에서도 동일양상으로 감소하였다. 이 감소요인은 puromycin 처리시 막결합 ribosome에서의 막과 ribosome의 가교로 작용할 것으로 예상되는 nascent polypeptide 합성이 중단되므로 막으로부터 ribosome이 해리되어 α-amylase의 분비가 억제된 것으로 추측된다. 이 현상은 50 mM의 magnesium의 첨가효과가 약하게 나타났기 때문에 ribosome은 nascent polypeptide의 가교로 막에 부착되어 있는 것으로 생각된다. 또 lysozyme 처리에 의해 세포벽을 분해한

protoplast에 trypsin을 함께 처리하므로서 세포외액의 α-amylase 활성이 상실됨은 막의 외부로 protruding되는 nascent polypeptide가 trypsin에 의해 분해되기 때문으로 생각된다. 3차 구조를 형성한 extracellular α-amylase의 경우 trypsin 내성임을 감안할 때 이 분자가 세포막 통과 직후, 세포벽을 통과하기 이전에 folding이 이루어져서 그 후 성숙된 단백으로서 세포벽을 통과하는 것으로 믿어진다.

사 사

본 연구는 한국과학재단의 일반연구 학술조성비의 지원에 의한 연구결과입니다.

참고문헌

1. Crooke, E. and W. Wickner: *Science,* **210,** 861 (1980).
2. 송방호 : 유전자재조합 실용화 기술, 한국생화학회, 137 (1986)
3. Blobel, G.: *Secretory Mechanism, Symposia Soc. Exper. Biol.* Cambridgy Univ. Press., **33,** 5 (1979).
4. Siegel, V. and P. Walter: *Cell,* **52,** 39 (1988).
5. Pugsley A.P. and M. Schwartz: *FEMS Microbiol Rev.,* **32,** 3 (1985).
6. 송방호 : 유전공학, 한국유전공학 연구조합, **19,** 56 (1987)
7. 송방호, 김순옥, 이상만, 김종국 : 유전공학연구소보, 경북대학교 유전공학연구소, **2,** 81 (1987)
8. Song, B.H., M.S. Kim, L. Stauning, J. Neuhard: Bacterial cell surfaces in bioscience, program and abstracts. Tokyo, 185 (1987).
9. Smith, W.P., P.C. Tai and B.D. David: *Proc. Natl. Acad. Sci.,* **75,** 814 (1978).
10. Smith, W.P., P.C. Tai, R.C. Tompson and B.D. Davis: *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.,* **36,** 897 (1977).
11. Smith, W.P., B.D. Davis and P.C. Tai: *Biochemistry,* **18,** 198 (1979).
12. Adelman, M.R., D.D. Sabatini and G. Blobel: *J. Cell. Biol.,* **56,** 206 (1973).
13. Rosbash, M. and S.C. Penman: *J. Mol. Biol.,* **56,** 206 (1973).
14. Sabatini, D.D. and G. Kreibich: *In the Enzymes of Biological Membranes,* ed. Matronosi, A.: Plenum Press, New York, **2,** 531 (1976).
15. Yarmolinsky, M.B. and De la Haba GL.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **45,** 1721 (1959).
16. Song, B.H. and J.H. Hwang: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.,* **12,** 1 (1984).
17. Sanders, R.L. and B.K. May: *Biochim. Biophy. Acta.,* **365,** 235 (1974).
18. Hughus, R.C.: *Biochem. J.,* **119,** 849 (1970).
19. Matsuzaki, H., K. Yamane, K. Yamaguchi, Y. Nagata and B. Maruo: *Biochim. Biophy. Acta.,* **365,** 235 (1974).
20. Weber, K. and M. Osborn: *J. Biol. Chem.,* **244,** 4406 (1969).
21. Fairbanks, G. and L.S. Theodore and D.F.H. Wallach: *Biochem.,* **10,** 2606 (1971).
22. 송방호 : 과학교육연구지, 경북대학교 과학교육연구소, **5,** 99 (1981)
23. Sasaki, T., M. Yamasaki, B. Maruo, Y. Yoneda, K. Yamane, A. Takatsuki and G. Tamura: *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **70,** 125 (1976).
24. Davis, B.D. and P-C. Tai: *Nature,* **283,** 433 (1980).
25. Chua, N.H., G. Blobel, P. Slekevitz and G.E. Palade: *J. Cell. Biol.,* **71,** 497 (1976).
26. Randall, L.L. and S.J.S. Hardy: *Microbiol. Rev.,* **48,** 290 (1984).

(Received June 26, 1989)