

열자극에 따른 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*) 의 Isocitrate Dehydrogenase와 Glutamate Dehydrogenase의 활성도 및 유리 아미노산의 변화

金學顯·張楠基

서울대학교 師範大學 生物教育科

Changes in the Activities of Isocitrate Dehydrogenase and Glutamate Dehydrogenase and in Free Amino Acid Pool by Heat Shock in *Saccharomyces cerevisiae*

Kim, Hak-Hyeon, and Nam-Kee Chang

Dept. of Biology, College of Education, Seoul National University

ABSTRACT

Changes in the activities of isocitrate dehydrogenase (IDH) and glutamate dehydrogenase (GDH) and changes in free amino acids in the cytoplasm of *Saccharomyces cerevisiae* have been studied under heat shock condition.

Heat shock conditions led to a significant decrease of NAD-IDH and NAD-GDH. It was shown appeared that the meaningful patterns of increase of NADP-IDH and NADP-GDH. It suggested that heat shock in yeast leads to a splitting of the TCA cycle and that glutamate synthesis takes place through the coupling of the NADP-linked isocitrate and glutamate dehydrogenase.

It was shown that about 14% of total free amino acids of yeast cells was decreased by heat shock. Especially heat shock condition resulted in the marked decreases of serine family amino acids such as serine, glycine and cysteine, and in the considerable increases of the rates of methionine, alanine, glutamin.

緒 論

열자극에 관한 연구는 초파리의 침샘 염색체에서 시작된 이래 많은 연구보고가 있었다. 생물의 종류에 따라 여러 가지 종류의 Heat shock protein(HSP)가 발견되었고 그중 80~90, 68~75, 15~30 KDa의 HSP는 모든 생물에서 공통적으로 나타난다(Lindquist, 1986). HSP의

역할은 열자극하에서 세포를 보호하는 것(Craig, 1985)으로 믿어지며, thermotolerance와의 상관관계가 *Saccharomyces cerevisiae*(McAlister and Finkelstein, 1980), *Dictyostelium discoideum*(Loomis and Wheeler, 1982) 등에서 보고되었고 Johnson과 Singer(1980)는 열자극시 *S. cerevisiae*의 세포주기중 G1기에서 일시적으로 성장이 정지된다고 보고한 바 있다.

HSP는 열 이외의 다른 자극에 의해서도 발현된다는 보고가 있다(Mazon, 1978). Ethanol의 경우는 translation errors를, amino acid analog는 abnormal protein등을 만들어내는데 amital, antimicine, azide, dinitrophenol, rotenone, ionophores등은 산화적 인산화의 억제와 산화 환원상태의 변화를 야기하고 anaerobiosis쇼크나 anaerobiosis에서 회복되면서도 많은 HSP를 만들어 낸다(Lindquist, 1986).

열자극은 효모 이외의 다른 균류에서 호흡을 일시적으로 억제한다. 이것은 열자극이 mitochondria에 영향을 준다는 것을 시사해 주며, 산화적 인산화가 결핍된 mitochondria mutant에 열자극을 주었을 때 세포내의 ATP양은 정상 효모의 경우와 비교하면 ATP양과는 차이가 없으나 많은 HSP를 만들어 낸다는 결과(Weitzel, 1987)와 열자극 하에서 세포내 ATP양이 50% 정도 감소한다는 보고(Findly, 1983)는 HSP induction이 respiratory stress로부터 세포를 보호해 주고 대사속도를 증가시킨다는 관점보다는 오히려 TCA cycle과 산화적 인산화를 억제한다고 가정할 수 있다.

이 가정하에서 Brook Trout의 전기 영동에 의한 연구에서 NADP-IDH의 faster moving IDH는 4°C에서 17°C로 처리하였을 때 양적으로 증가한다는 보고(Moon, 1975)와 효모에 있어서 HSP의 inducer인 azide를 처리할 경우 NADP-IDH의 활성도가 증가하고 TCA cycle에서 isocitrate가 NADP-IDH에 의하여 glutamate의 생합성 과정에 참여한다는 가설(Machado, 1975)은 첫째, Anaerobiosis와 Azide가 Hsp를 만들어낼 수 있는 하나의 Inducer라는 점에서, 둘째, 고온 적응에서 NADP-IDH가 만들어진다면 단시간의 자극 하에서도 많은 NADP-IDH가 합성될 가능성이 있다는 점에서, 셋째, TCA cycle에서 NADP-IDH에 의하여 isocitrate가 glutamate생합성 과정에 쓰인다면 열자극하에서 TCA cycle과 산화적 인산화의 억제를 설명할 수 있다는 점에서 관심을 끌었다. 또한 최근 열자극을 주었을 때 *Escherichia coli*에서 serine catabolism이 증가한다는 보고(Blomberg, 1989)는 열자극이 유리아미노산 대사과정과 관련될 수 있다는 것으로 대단히 흥미로운 실험결과이다.

본 연구에서는 *S. cerevisiae*를 재료 하여 열자극하에서 IDH의 변화와 그에 따른 glutamate생합성 경로의 작동 여부를 조사하고, 세포내 아미노산 pool상의 변화를 HPLC로 조사하였다.

材料 및 方法

Yeast strain

Saccharomyces cerevisiae ATCC 24858, wild type, diploid(a/)를 서울대 미생물학과와 KAIST에서 분양을 받았다.

배지 및 배양조건

YPD배지(1% yeast extract, 2% bactopectone, 2% dextrose)로 25~27°C에서 진탕 배양되었다.

열자극 조건 및 단백질 시료의 준비

Late log phase의 ($10^7 \sim 10^8$ cell) 효모를 순환수조에서 배양온도보다 $10 \sim 15^\circ\text{C}$ 높은 온도로 일정시간 자극을 준 후 sorvall centrifuge로 3,000 rpm에서 3분 동안 원심분리하여 수확하였다. 수확한 시료는 0.02M tris-HCl(pH 7.0), 1mM PMSF 혹은 0.1M phosphate buffer(pH 7.0), 1mM EDTA, 1mM PMSF를 포함하는 용액으로 두번 씻고, 수확한 효모와 동일한 부피의 위 완충용액을 가한 후 10초~20초 간격으로 6분 동안 sonication한 다음 10,000g에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 취해 enzyme assay를 위한 시료로 사용하였다. 위 모든 과정은 4°C 하에서 수행되었다.

단백질정량

Lowry *et al.* (1951)의 발색법으로 O.D. 750nm에서 측정되었다.

Enzyme Assay

NAD와 NADP-IDH은 Borthwick *et al.* (1984)의 방법에 의해 NADH-GDH는 Doherty의 방법에 의해, NADPH-GDH는 Talley(1972)의 방법에 따라, UV-Visible spectrophotometer (Varian, DMS 90)로 340nm에서 NADH 및 NADPH의 생성량 혹은 감소량으로 측정되었다.

Isozyme 전기영동 및 Gel염색

Isozyme은 7% polyacrylamide gel electrophoresis로 수행되었고 gel 완충용액은 50mM tris와 25mM boric acid(pH 8.8)을 사용하였다(McLellan, 1982). Gel은 50V에서 30분 100V 정전압에서 bromophenol blue선이 다 빠져 나갈 때까지 수행되었다. 전기영동이 끝난 gel은 Turner(1974)의 방법에 따라 PMS와 NBT를 사용하여 염색하였다.

High power liquid chromatography(HPLC)분석

Heinrikson과 Meredith(1984)의 방법과 Evert(1986)의 방법을 기초로 하여 분석하였다. 20ml의 10^7 cell을 수확한 후 0.1M phosphate buffer로 두번 씻은 후 0.4N perchloric acid 2ml를 넣은 후 sonication하였다. Sonication이 끝난 후 10,000g에서 20분 원심분리한 다음 상등액을 취해서 trifluoroacetic acid 1과 MeOH를 7:3으로 섞은 용액을 시료와 혼합하여(시료: 용액=1:2) MeOH과 물로 활성화시킨 Sep-Pak C18을 통과시켜 아미노산 이외의 다른 모든 불순물을 제거한 다음, Sep-Pak을 통과한 용액을 vial에 받아서 50 μl 을 취하여 건조시킨 다음 PITC유도체 시약(MeOH: water: TEA(triethylamine): PITC(phenylisothiocyanate)=7:1:1:1) 20 μl 를 넣어 수 초간 섞은 후 실온에서 20분 방치한 다음 진공건조기에서 건조하였다.

Disodium hydrogen phosphate 710mg을 milli-Q water에 녹인 용액을 H_3PO_4 로 pH 7.4로 맞춘 1l 용액에서 950ml을 취하여 CH_3CN 50ml과 섞은 후 millifore-filter로 거른 용액 250 μl 에 건조한 잔사를 녹인 후 10 μl 를 PICO-TAG분석에 사용하였다.

HPLC분석 시스템은 두 개의 waters M510 pump와 waters U6K injector, waters M680 controller, Young-In D520A integrator, waters M441 UV detector로 이루어졌다. Column은 waters, 4 μm 의 Pico-tag column이었고 48°C , UV 254nm에서 detect되었다.

용출액은 20g의 sodium acetate 3 hydrate와 600 μ l TEA를 HPLC용 물에 녹인 후 H_3PO_4 로 pH 6.4, 1/용액으로 맞춘 다음, 이 용액 940ml와 CH_3CN 60ml을 섞은 후 millipore filter(0.45 μ m)로 거른 용액 A와 millipore filter(0.5 μ m)로 거른 60A CH_3CN 용액 B를 이용하였으며 gradient table은 아래와 같이 준비하였다.

Time (min.)	Flow (rate)	A (%)	B (%)	Curve
0	1.0	100	0	*
10.0	1.0	54	46	5
10.5	1.0	0	100	6
11.0	1.5	0	100	6
14.0	1.5	0	100	6
14.5	1.5	100	0	6
20.5	1.5	100	0	6
21.0	1.0	100	0	6

結 果

지금까지 밝혀진 바에 의하면 효모의 IDH에는 NADP와 NAD를 조효소로 하는 isozyme으로서 NAD-IDH는 이화작용에 NADP-IDH는 생합성에 관여한다고 알려져 있다(Machado, 1975).

열차극 온도를 결정하기 위해 30분간 정해진 온도에서 열차극을 준 결과는 Fig. 1의 (A)와 같다. 배양온도보다 12 $^{\circ}C$ 높은 37 $^{\circ}C$ 에서 가장 높은 NADP-IDH의 활성도를 보였으며 이것은 열차극을 주지 않은 효모와 비교하여 2배 정도 증가한 것이다.

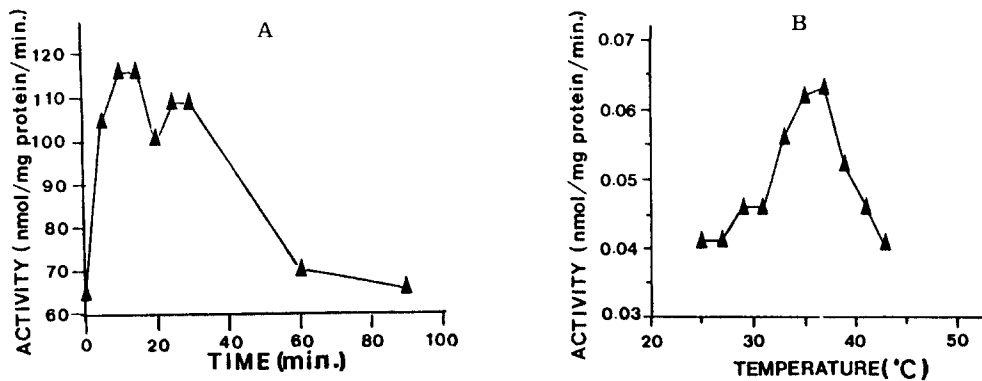


Fig. 1. Changes in the level of NADP-IDH activities during the exposure of *S. cerevisiae* to heat

A) Activities of NADP-IDH were plotted against the time of incubation after the temperature shift from 25 $^{\circ}C$ to 39 $^{\circ}C$

B) Activities of NADP-IDH were plotted against the temperature of heat-shock during 30min.

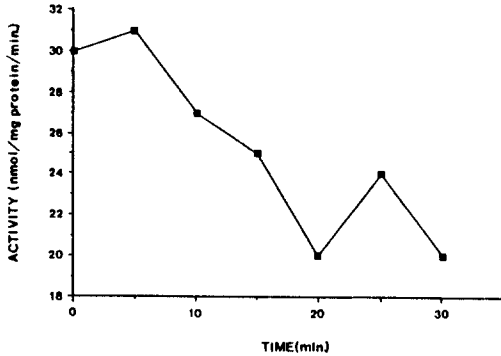
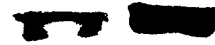


Fig. 2. Changes in the level of NAD-IDH activities during the exposure of *S. cerevisiae* to heat
S. cerevisiae growing at 25°C were shifted to 37°C and changes in the enzymatic activities were determined as described in the Materials and Methods.



(A) (B)

Fig. 3. The patterns after isozyme-gel electrophoresis of NAD-IDH in heat-shocked(A) and control(B) yeast.

Fig. 1의 (B)의 시간에 따른 열자극의 효과는 자극시간이 15분만 되면 활성도가 정점에 달하고 30분 이후에는 다시 원 상태로 복귀해가면서 1시간 30분경에는 정상적인 정도로 적응하는 양상을 보여 주었다.

NAD-IDH의 경우는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 열자극 시간이 증가함에 따라 점차 활성도가 감소하는 경향을 나타냈으며 동량의 단백질을 loading한 isozyme의 activity staining의 결과도 Fig. 3에 나타난 것처럼 열처리한 효모의 경우 염색 정도가 훨씬 약하였다.

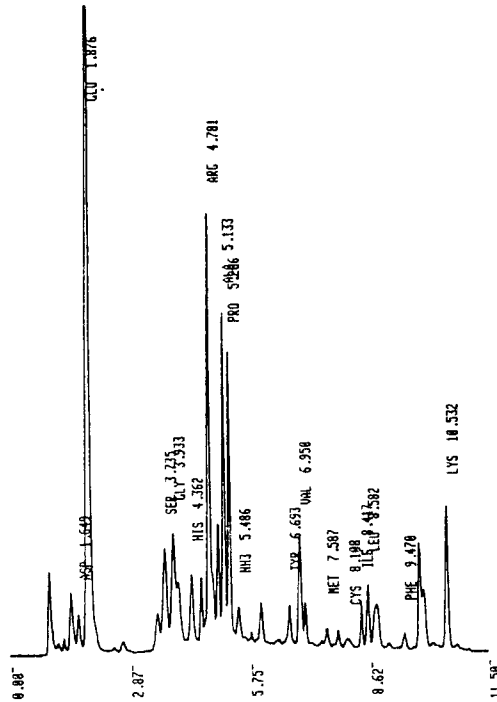
NAD-IDH와 NADP-IDH의 작용에 의해 생성된 α -ketoglutaric acids가 아미노산의 합성 과정에 이용되는지를 알아 보기 위해 열자극 하에서 NADPH-GDH와 NADH-GDH의 활성도를 측정 한 결과는 Table 1에서 제시된 바와 같이 NADPH-GDH는 활성이 20% 증가하였고 NADH-GDH는 30% 감소하였다. 이 결과에 따르면 열자극시 glutamate 합성이 증가하는 경향을 나타내고 있다.

Table 1. Enzyme activities in heat-shocked and controlled *S. cerevisiae*

	Enzyme activity (n mol/mg protein/min.)	
	Cont.	Heat-shocked
GDH-NADPH	54.4	63.7
GDH-NADH	156	119

스트레스 상황에서 glutamate가 축적되고 amino acid pool이 달라진다는 연구보고에 따라 세포질 내의 총 유리아미노산을 HPLC로 분석하였다.

그 결과는 Table 2에 보는 바와 같이 총 유리아미노산에 대한 각각의 아미노산의 비율상의 변화를 살펴보면 Asp, Ser, Gly, Pro, Cys등이 비율이 감소하였고 Glu, Ala, Met, Lys이 증가하는 경향을 나타내었으며 His, Arg, Leu, Ilu등은 거의 변화하지 않았다. 조사된 아미



노산을 그 성질에 따라 나누어 비율상의 변화를 보면 polar uncharged 아미노산의 감소가 두드러지며 positive charged 아미노산과 negative charged 아미노산의 증가는 비슷한 경향을 나

Fig. 4. HPLC chromatogram of amino acids from *S. cerevisiae* grown at 27°C before heat shock.

The amino acids were extracted with 0.4N perchloric acid and neutralized with K_2CO_3 . After passing through Sep-pac C-18, the amino acids were eluted with solution T (Trifluoroacetic acid, 0.1A : MEOH = 7 : 3) and concentrated under vacuum with rotary evaporator. The residues were dissolved in a small amount of sample dilution solution and the solution was to make PITC derivatives. The injection volume was $10\mu l$.

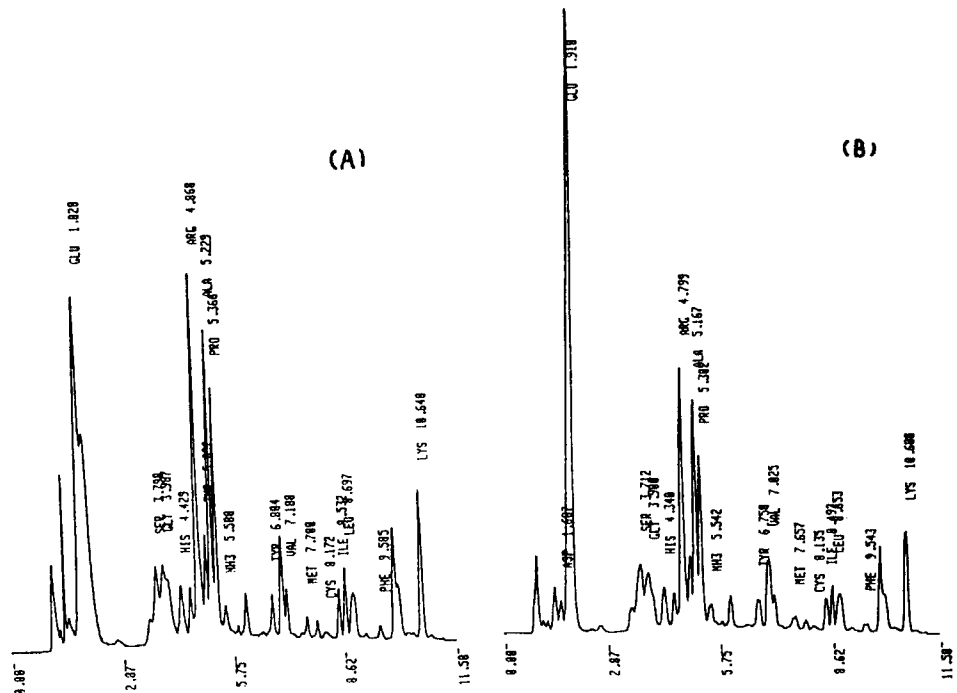


Fig. 5. HPLC chromatogram of amino acids from heat shocked *S. cerevisiae* for 15 min (A) and 30 min (B) at 38°C

The extraction procedure was the same as the shown in Fig. 4

Table 2. Changes in the ratio of each amino acid to total amino acids in heat shocked for 15min(H 15) and 30min(H 30) and control *S. cerevisiae*

	Relative proportion			Changed rate	
	CON	H 15	H 30	H 15	H 30
Aspartic acid	0.7556		0.6333		-16.2
Glutamic acids	28.9250	33.8415	32.0028	17.6	10.6
Serine	3.2884	2.0488	2.5499	-37.7	-22.5
Glycine	8.0543	5.3783	3.6760	-33.2	-54.4
Histidine	2.5793	2.7651	2.5232	7.3	-2.1
Arginine	15.4652	16.9898	15.5447	9.9	0.5
Threonine		1.7607			
Alanine	6.7112	7.3675	7.9786	9.8	18.9
Proline	7.5112	6.9934	6.2547	-6.9	-16.7
Tyrosin	1.6226	2.0525	1.6537	26.5	2.0
Valine	8.7108	0.5550	9.9829	-93.6	14.2
Methionine	0.5861	1.2114	0.9013	106.7	53.8
Cysteine	0.9631	0.8538	0.6384	-11.3	-33.7
Isoleucine	1.3131	1.6710	1.3244	27.3	0.9
Leucine	1.6697	2.2495	1.7267	34.7	3.4
Phenylalanine	0.7884	0.8454	0.6104	7.2	-22.6
Lysine	10.6147	12.9698	11.4981	22.2	8.3
NH	0.4516	0.4458	0.5000	-1.3	10.7
Total	100.0	100.0	100.0	0	0

타내었다.

합성경로에 따라 아미노산을 구분하여 비교해 보면 serine family의 감소가 원래 대조군 효모에 있던 비율의 반 정도로 감소하였다. 불리한 환경조건에서 축적된다고 알려진 Pro은 본 실험 결과에 의하면 그 비율이 감소하는 양상을 나타내었고 특이한 것은 polar uncharged이며 serine family인 Ser, Gly, Cys의 감소가 현격하다는 것과 Met와 Ala의 비율증가가 두드러진다는 사실이다. 또한 NADP-GDH활성도의 증가와 Glu의 비율 증가는 일관성 있는 결과로 생각된다.

Table 3. Relative proportion of amino acids in control and heat shocked *S. cerevisiae* as expressed by peak areas of HPLC analysis

	Area			Decreased rate	
	CON	H 15	H 30	H 15	H 30
Total Amino acids	5051028	4826174	4350006	-4.5	-13.9

H 15 : Heat shocked *S. cerevisiae* for 15 min.

H 30 : Heat shocked *S. cerevisiae* for 30 min.

CON : Control *S. cerevisiae*

Area=Base line corrected area of each peak(1 area=0.5uV seconds)

총 유리 아미노산 변화는 Table 3에 제시된 바와 같이 15분의 열자극에 4.5%, 30분에 13.9% 감소하였다. 이러한 유리 아미노산의 감소에도 불구하고 세포내의 암모니아 농도는 감소하고 아미노산간 비율에 있어서만 증가하였다.

論 議

*Tetrahymena*를 재료로 열자극 후 세포내의 ATP양을 NMR로 측정 한 바에 의하면 3분 이내에 ATP양이 50% 정도 감소하였다는 보고가 있고(Findly, 1983), 산화적 인산화가 결핍된 *S. cerevisiae*의 mitochondrial mutant를 재료로 한 연구에 의하면, 열자극 단백질 양상에 있어서나 열자극 반응시 세포질의 pH 감소현상을 발견할 수 없었고 이 mutant는 열자극후 회복되지 않고 죽었다는 보고(Weitzel, 1987)가 있다. 이는 NAD-IDH는 이화작용에 NADP-GDH는 생합성에 관여한다는 Machado(1975)의 주장에 따르면 본 실험에서 NAD-IDH활성도가 열자극 반응 하에서 감소된 결과와 일치하는 현상으로 생각된다.

NH_4^+ 에 의하여 NADP-GDH의 활성도는 촉진되고 NAD-GDH의 활성도는 억제된다. 그러나 본 실험결과에서 열자극시 NAD-GDH는 활성도가 감소하고 NADP-GDH는 활성도가 증가한 양상은, NADP-GDH의 경우 NH_4^+ 의 양이 열자극후 감소한 결과를 고려하면 이는 NH_4^+ 에 의하여 유도되었다기 보다는 열자극으로 ATP가 감소, 질소원을 제한하고, 합성과정의 필요성이 증대되면서 활성도가 증가되었거나 ATP감소에 따른 protease의 활성도 저하에 기인한 것으로 사료된다.

효모가 glucose, fructose, galactose 등은 facilitated diffusion에 의해 흡수하고 대부분의 아미노산과 allantoin, urea, ammonia와 같은 질소원은 능동수송에 의해서 흡수한다는 것(Strathern, 1982)과 Mazon(1978)이 NADP-GDH의 활성도가 감소하는데는 대사 에너지가 필요하다는 것을 증명한 실험은 이런 점에서 매우 시사적이다.

Machado(1975)은 효모가 hypoxic condition에서 자랄 때 TCA cycle이 분리되어 NADP-IDH와 NADP-GDH의 연합으로 glutamate가 생성되는 경로를 주장한 바 있는데, 본 실험 결과에 의하면 이 경로가 열자극 하에서 작동하고 있음을 시사해 준다. 그러나 glutamate합성의 기질이 되는 α -ketoglutarate가 NADP-IDH의 작용에 의해서만 생성된다고는 생각할 수 없고 다른 경로를 통해서도 보충될 수 있다고 생각된다.

열자극을 받은 효모와 대조군 효모 세포의 HPLC로 분석한 총 유리아미노산의 양은 14% 정도 감소했으며, 유리아미노산 중 특기할 만한 사실은 Ala, Met, Val, Glu의 비율 증가가 현저하고 serine family인 Ser, Gly, Cys의 감소가 두드러진다는 사실이다. 일반적으로 스트레스 환경에서 Pro가 축적되는 것으로 알려져 있는데(Corcuera, 1989), 본 실험 결과에서는 그 비율이 감소하는 경향을 나타내었다. 저온처리를 한 식물에 있어서도 저온 저항성인 경우는 Pro축적이 일어나지만 저온 감수성인 경우는 Ala, Gln의 증가가 명백하다는 사실(Moon, 1975)은 본 실험결과와 유사하다.

최근 Matthews와 Neidhardt(1988, 1989)은 Met을 축적하는 *E. coli* mutant를 재료로한 열자극 실험에서 serine catabolism의 증가가 *E. coli* 3종류의 열자극 단백질(lysl-tRNA synthetase, C14.7, G13.5)의 발현을 조절하며, 열자극은 Ser을 Gly 및 단백질 합성의 시작과 핵산 생합성에 필요한 C1 units을 생산에서 pyruvate를 통해서 acetyl CoA와 acetate의 생

산으로 전환시킨다고 보고한 바 있다. 이 결과는 열자극 반응시 아미노산 중 Met의 active한 형태인 AdoMet의 생성에 관여하는 AdoMet synthetase의 활성억제로 Met의 축적과 Ser deaminase의 증가된 활성에서 기인한 Ser catabolism의 증대로 Ser의 급격한 감소를 초래할 것으로 예견되는데 이는 본 실험에서 53.8%에 해당하는 methionine비율 증대와 22.5%에 상당하는 serine의 감소 결과와 일치하며 이는 *S. cerevisiae*에서도 동일한 serine catabolism이 작동할 가능성이 충분히 있음을 시사해 준다고 하겠다.

열자극으로 Ser family를 구성하는 Gly, Cys의 감소도 두드러진 현상인데 Gly의 경우 Gly 생합성의 precursor인 ser의 급격한 감소와 더불어 stress환경에서 축적되는 것으로 알려진 glycinebetaine의 생성에 쓰임으로서(Lone, 1987) 그 비율의 현격한 감소를 초래할 수도 있을 것이다. 단 아직 열자극 반응에서 glycinebetaine이 축적된다는 보고는 없었다. 다만 흔히 alamone이라고 불리는 phosphorylated dinucleotide(AppppG, ApppA, Ap ppGpp, AppppG)가 열자극 후 수 분내로 축적된다는 보고가 *E. coli*와 *S. triphimurium*에서 보고(Lindquist, 1986)된 바 있는데, 이 alamone의 축적에는 다량의 adenine과 guanine이 요구되며 이들을 합성하는데는 Gly, Asp, Gln이 다량으로 필요하고 부산물로서 Glu이 나온다는 점은 Gly, Asp의 비율 감소와 함께 Glu증가에도 어떤 실마리를 제공하는 것 같다. cysteine 역시 합성경로에 모두 Ser이 필요하다는 사실과 cysteine합성의 중요한 한 효소인 homocysteine-cysteine synthetase가 열자극 반응시 축적된 Met에 의하여 억제된다는 사실(Strathern, 1982)로 보아 열자극 반응시 Cys가 합성될 여지가 전혀 없으며 급격한 감소를 고려하면 Ser뿐만 아니라 Gly, Cys과 같은 serine family의 catabolism증가가 열자극 반응과 관련될 수 있다고 사료된다.

Met축적의 효과와 역할은 명확하게 알려진 바 없다. 다만 Met의 축적은 AdoMet synthetase활성도 감소와도 연관될 것이고 따라서 이 AdoMet을 필요로 하는 핵산과 단백질의 methylation, polyamine과 cyclopropane fatty acids, phosphatidyl choline의 생합성 같은 것들이 영향을 받을 것으로 추측된다.

Glu상대적 증가는 NADP-GDH활성도와 관련하여서도 일관성 있는 결과일 뿐만 아니라 다른 여러 스트레스 환경에서 축적된다는 보고와도 일치한다. 또한 이는 산성 아미노산으로써 세포 내의 pH저하에도 일역을 할 것으로 사료된다.

HPLC로 분석해 본 전체 유리아미노산의 양은 열자극 후 14%가 감소하였는데 이러한 큰 감소는 본 실험 결과 NH_4^+ 의 양이 오히려 감소했다는 것과 대부분의 질소원은 능동수송으로 흡수되는데 열자극후 ATP양이 50% 정도 감소함에 따라 질소원의 제한을 초래할 수 있다는 사실로 부터 serine family 아미노산의 catabolism은 증가할지라도 아미노산 전체적으로 볼 때는 오히려 단백질 합성이 증가함으로써 유리아미노산의 급격한 증가가 이루어졌다고 생각된다. 본 실험결과에서 분해에 관여하는 NAD-IDH, NAD-GDH의 활성 감소와 합성에 관여하는 NADP-IDH, NADP-GDH활성도 증가도 열자극 시 세포 전체적으로 볼 때 분해보다는 합성이 열자극 후 증대됨을 시사해 준다고 하겠다.

摘 要

*Saccharomyces cerevisiae*에 열자극을 주어 isocytate dehydrogenase(IDH)와 glutamate dehyd-

rogenase(GDH)활성도의 변화와 세포질 내의 유리아미노산의 변화를 조사하였다. 열자극 하에서 NAD-IDH와 NAD-GDH활성도는 감소하였으며 NADP-IDH와 NADP-GDH의 활성도는 증가하였다. 이 결과는 효모에 열자극을 주었을 때 hypoxic condition처럼 NADP-IDH와 NADP-GDH의 연합으로 glutamate를 합성하는 것으로 추정된다.

열자극으로 효모의 총 유리아미노산중 14%가 감소하였다. 특히 serine family인 Ser, Gly, Cys의 현격한 감소를 초래했고 Met, Ala, Glu의 상대비율이 증가하였다.

引 用 文 獻

- Blomberg, A. 1989. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase(NAD) in acquired osmotolerance of *S. cerevisiae*. J. Bacteriol. 171 : 1087-1092.
- Corcuera, L.J. 1989. Proline metabolism in *Solanum tuberosum* cell suspension culture under water stress
- Craig, E.A. 1985. The heat shock response. Crit. Rev. Biochem. 18 : 239-280.
- Evert, R.F. 1986. Amino acid analysis by HPLC : optimized conditions for chromatography of phenylthiocarbonyl derivatives. Anal. Biochem. 154 : 431-435.
- Findly, R.C. 1983. *In vivo* phosphorus-31 nuclear magnetic resonances reveals lowered ATP during heat shock of tetra hymena. Sci. 219, 1223-1225.
- Heinrikson, R.L. and S.C. Meredith. 1984. Amino acid analysis by reversephase high-performance liquid chromatography : precolum derivatization with phenylisothiocyanate. Anal. Biochem. 136 : 65-74.
- Johnston, G.C. and R.A. Singer. 1980. Ribosomal precursor RNA metabolism and cell division in the yeast *S. cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. 178 : 357-360.
- Lindquist, S. 1986. The heat shock response. Ann. Rev. Biochem. 55 : 1151-1191.
- Loomis, W.F. and S.A. Wheeler. 1982. Chromatin associated heat shock proteins of *Dictyostelium*. Dev. Biol. 90 : 412-418.
- Lone M.I. 1987. Influence of proline and glycinebetain on salt tolerance of cultured barley embryos. J. Exp. Bot. 188 : 479-490.
- Lowry, O.L., N.J. Rosenberg, A.L. Farr and R.T. Randle. 1951. Protein measurement with phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.
- Machado, A. 1975. Isocitrate dehydrogenase and oxoglutarate dehydrogenase activities of Baker's Yeast grown in a variety of hypoxic condition. Mol. Cell. Biochem. 6, 93-100.
- Mazon, M.J. 1978. Effect of glucose starvation on the NADP-GDH of Yeast J. Bacteriol. 133, 780-785.
- McAlister, L. and D.B. Finkelstein. 1980. Heat shock proteins and thermal resistance in yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 93 : 819-824.
- McLellan, T. 1982. Electrophoresis buffer for polyacrylamide gels at various pH. Anal. Biochem. 126 : 94-99.

- Metthews, R.G. and F.C. Neidhardt. 1988. Ab normal induction of heat shock proteins in the an *E. coli* mutant deficient in adenosylmethionine synthetase activity. *J. Bacteriol.* 170 : 1582-1588.
- Metthews, R.G. and F.C. Neidhardt. 1989. Elevated serine catabolism is associated with the heat shock response in *E. coli*. *J. Bacteriol.* 171 : 2619-2625.
- Moon, T.W. 1975. Isozymes II : Pysiological function. Academic Press. 207-220.
- Munro, G.F., *et al.* 1972. Dependance of the putrescine content of *E. coli* on the osmotic strength of the medium. *J. Biol. Chem.* 247 : 1272-1280.
- Strathern, J.R. 1982. The molecular biology of the yeast *Saccharomyces* : Metabolism and gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory. 101-293, 339-461.
- Tally, D.J. 1972. Evidence for NADPH- and NADH-specific isozymes of GDH and the continuous inducibility of the NADPH-specific isozyme throughout the cell cycle of the eukaryotic *Chlorella*. *J. Biol. Chem.* 247 : 7927-7935.
- Turner, B.M. 1974. A comparison of the soluble and mitochondrial forms of human isocitrate dehydrogenase and an examination of the secondary isozymes derived from the soluble form. *Ann. Hum. Genet.* 37 : 455-467.
- Weitzel, G. 1987. The cytoplasmic pH, ATP content and total protein synthesis rate during heat-shock protein inducing treatments in yeast. *Exp. Cell Res.* 170, 64-79.

(1991年 2月 7日 接受)