

## 광자극에 대한 *Amoeba*의 반응양상과 phosphatase의 특성 및 활성화도 변화

張楠基 · 林采成 · 裴眞浩  
서울대학교 師範大學 生物教育科

### The Characterization and Activity Changes of Phosphatases in *Amoeba* sp. to the Light Stimuli and Its Response Pattern

Chang, Nam-Kee, Chai-Seong Lim, and Jin-Ho Bae

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

#### ABSTRACT

*Amoeba* sp. was cultured under the light and the dark conditions, and the activity of phosphatases was investigated.

There was a linear correlation between the early reaction time and the activity of phosphatases when phosphatases were incubated at 30°C. Then the activity of acid phosphatase was about 2 times higher than that of alkaline phosphatase. The activity of phosphatase was optimal at pH 5.0 in acidic part and at pH 8.0 in alkaline part, respectively. The optimal temperature of phosphatases was near the 40°C.

The isozyme patterns of cytoplasmic acid phosphatase were compared with those of membraneous one. Both the isozyme patterns were shown to be polymorphic on the polyacrylamide gel, but different band patterns were observed in the isozymes of the cytoplasmic and the membraneous acid phosphatases.

The number of *Amoeba* sp. under the light stimulus for 48 hours decreased negative exponentially from the illumination

The activity of acid and alkaline phosphatases under the illumination of light increased 1.7 and 1.5 times higher, respectively, than the activity of those under the dark condition. This result appears to be related to the mechanism of the autophosphorylation.

#### 緒 論

Phosphoric monoester hydrolases(E. C. 3.1.3)중에서 orthophosphoric monoester를 가수분해하여 alcohol과 orthophosphate를 생성하는 효소가 있는데 pH에 따라 염기성에서 최적인 orthophosphoric-monoester phosphohydrolase(alkaline phosphatase ; E. C. 3.1.3.1)와

산성에서 최적인 orthophosphoric-monoester phosphohydrolase(acid phosphatase ; E. C. 3. 1. 3. 2)가 있다(Dixon and Webb, 1979).

이러한 phosphatase는 여러 종에서 분포되어 있고 transphosphorylation에 촉매작용을 하는, 폭넓은 활성도를 지닌 효소의 일종으로써, 분자량은 alkaline phosphatase의 경우는 80~120 kd 정도이며 acid phosphatase는 23~96 kd이고, subunit는 alkaline phosphatase는 2~4개이고 acid phosphatase는 1~3개이다(Plocke *et al.*, 1962 ; Dixon and Webb, 1979 ; Li, 1979 ; Dassa *et al.*, 1980 ; Schweingruber *et al.*, 1986).

Phosphatase의 최적 pH는 일정한 것이 아니라 생물의 종마다 독특한 양상을 보인다. 예를 들어서, *E. coli*의 acid phosphatase의 경우 강산성인 pH 2.5에서 활성도가 가장 높으며(Tetu *et al.*, 1979 ; Dassa *et al.*, 1982), 맥아(麥芽)의 경우는 pH 5.8이다(Joyce and Grisolia, 1960).

Phosphatase의 정확한 생리적인 기능에 대해서는 아직까지 잘 알려져 있지 않다. 그러나 acid phosphatase가 cAMP에 의해서 negative하게 제어된다는 것이 알려져 있으며 그 제어기작에는 ( i ) cAMP-CRP(cAMP Receptor protein) complex가 phosphatase gene의 전사에 정(正)이나 부(負)의 영향을 나타내거나, ( ii ) repressor protein에 의하여 negative control된다는 두가지 가설이 있다(Dassa *et al.*, 1982). 위에서 알 수 있는 바와 같이 second messenger 나 signal pathway에 관계한다는 cAMP가 phosphatase를 제어한다는 것을 phosphatase의 기능과 역할이 이러한 제어기작들과 깊은 연관이 있음을 암시해 준다.

효소의 공유결합적인 변화나 인산화와 탈인산화의 주기를 통한 조절단백질들은 많은 생물학적인 과정의 조절에 관계하는 중요한 제어기작이다. 식물에 있어서는 단백질의 인산화가 직간접적인 방법으로 광에 의해 조절되는 것으로 생각된다. 광뿐만 아니라 auxin이나 GA와 같은 것으로 *in vitro* 상태에서 단백질의 인산화를 조절한다는 연구가 있다(Ranjeva and Boudet, 1987). 또한 bacteria의 주화성에 인산화가 관여한다는 보고가 있으며(Hess *et al.*, 1987), 오징어의 광수용체인 retinal막에서 광의 조사로 인해서 <sup>32</sup>P의 유입이 약 7배 증가하였다는 보고가 있고(Vanderberg and Montal, 1983), *Halobacterium halobium*은 장파장의 가시광선에서 양성주광성을 보이고 단파장에서는 음성주광성을 보이는데 광에 의해서 흥분된 rhodopsin이 인산화되며 효소의 cascade를 증가시킨다는 보고가 있다(Stryer, 1984). 또한 광(光)이 파리(*Calliphora* spp.)의 rhodopsin을 인산화시킨다는 보고가 있다(Paulson and Bontrop, 1984).

*Amoeba* sp.의 경우에 광조사의 자극에 대하여 음성주광성의 반응을 나타낸다는 연구가 있으며(Grebecki and Klopocka, 1981 ; Klopocka and Grebecki, 1982), 특히 약 440~470nm의 청색 파장에서 그 민감도가 나타난다는 보고가 있다(James, 1987). 이러한 결과들은 *Amoeba*도 광자극에 대한 수용체가 있음을 뒷받침해 주며 주광성의 반응에 있어서 인산화의 연관성을 가정할 수 있다.

본 연구에서는 *Amoeba* sp.가 광자극을 오랜 시간 받았을 때 실제로 어떻게 반응하는가를 조사했고, 이로 인한 광자극에 대한 습성화를 고려해 보았으며 phosphatase의 특성과 광자극에 대한 phosphatase의 활성도를 조사해 봄으로써 *Amoeba*의 주광성에 대한 인산화의 관련성을 알아보려고 하였다.

## 材料 및 方法

### *Amoeba* 배양

#### 배양배지

변형된 Chalkley's solution(Jeon and Jeon, 1975)으로 저장이나 대량배양에 사용하였다. 배양 배지의 저장 배지로써 배지 I는 500ml의 증류수에 0.25몰 NaCl, 0.025몰 KCl, 0.025몰  $\text{NaHCO}_3$ , 0.004몰  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 를 넣고 배지 II에는 250ml 증류수에 0.05몰  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 넣었다. 사용배지는 배지 I에서 2ml을 취하고 배지 II에서 1ml을 취해서 증류수 1,000ml에 넣어서 사용하였다.

#### 저장 배양

*Amoeba*의 저장 배양은 Lorch와 Danielli(1953)의 방법을 따랐다. *Amoeba*는 알루미늄 해부 접시(26×21×5cm)에 *Colpidia*를 먹이로 하여 22±2℃에서 완전한 암조건의 향온배양기에서 배양하였다. 배양 배지는 한달에 한번 바꾸어 주었는데 이때 *Colpidia*와 약간의 삶은 밀알을 넣어 주었다.

#### 대량 배양

저장 배양한 *Amoeba*를 모아서 25℃ 향온배양기에서 해부접시에 완전히 빛이 차단되는 아크릴판으로 뚜껑을 하여 대량 배양했는데 *Tetrahymena pyriformis*를 먹이로 주었다. 먹이는 1~2일을 주기로 하여 주었고 그때마다 배양 배지와 해부접시를 바꾸어 주었다.

#### 단일 세포 배양

대량 배양한 *Amoeba* 한 개체를 Syracuse접시에 옮겨서 monclonal한 *Amoeba* 집단을 배양하였다. 이렇게 단일 세포에서 배양한 *Amoeba*를 실험에 이용하였다.

#### *Tetrahymena* 배양

*Tetrahymena*의 배양은 Goldstein과 Ko(1976)의 방법에 따랐다.

### 광원 거리에 따른 이동

약 5,000개체의 *Amoeba*를 길이가 13cm되는 시험관 바닥에 넣고 Chalkley's solution을 넣어 준 후 parafilm으로 완전히 밀봉하였다. 이 시험관을 25℃ 향온 배양기 안에서 옆으로 놓은 다음 약 8,000 Lux의 백색광을 한쪽에서 조사(照射)하여 48시간동안 *Amoeba*가 광자극에 대하여 회피하도록 하였다.

### Subcellular fractionation

#### Crude extract

대량 배양한 *Amoeba*를 이틀간 굵긴 후 250×g에서 2분간 원심분리하여 15ml 용량의 원추형 시험관에 모았다. Chalkley's solution으로 2회 세척하여 원심분리하여 모은 후에 다시 0.02M Tris-HCl(pH 7.2) buffer로 2회 세척하여 원심분리하여 모았다. 이렇게 하여 모은 *Amoeba*를 4℃에서 glass homogenizer로 세포를 파쇄시키고, 4℃, 1,000×g에서 30분 동안 원심분리하여 상층액을 얻어냈다.

#### 막의 분리

*Amoeba*의 막의 분리는 Ahn과 Jeon(1982)의 방법을 따랐다. 모든 과정은 4℃에서 수행하였으며, 1mM phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF)가 포함된 0.02 M Tris-HCl buffer,

pH 7.4(이하 TH buffer)를 사용하였다.

대량 배양한 *Amoeba*를 매일 세척하면서 3일간 굵긴 후 170×g에서 1분간 원심분리하여 15ml원추형 시험관에 모았다. TH buffer로 2회 세척한 후 glass homogenizer로 세포를 파쇄시키고, 파쇄물은 20 μM pore nylon screen을 사용하여 걸렀으며, 위에 걸러진 부분만을 650×g에서 4분간 원심분리하여 아래로 모았다. 상층액을 제거한 후 2회 TH buffer로 씻어주었고, 다시 원심분리하여 침전물의 윗쪽의 하얀 부분만을 얻어내어 이를 세포막 시료로 사용하였다. 얻어진 시료는 10% SLS를 최종 농도가 1%가 되도록 처리하여 단백질을 분리하였다(Kim, 1988).

### 단백질 정량

각 시료의 단백질 농도는 bovine serum albumin(BSA)이 표준으로 사용하여 Lowry 등(1951)의 방법에 따라서 결정하였다.

### Enzyme assay

Phosphatase의 활성도 측정은 다양한 pH의 buffer(결과 참조)에서 기질로써 10mM p-nitrophenyl phosphate(PNPP)가 분해되어 p-nitrophenol이 생성되는 능력으로써 수행하였다(Dassa *et al.*, 1980; Dassa *et al.*, 1982). 이때 enzymatic extract의 양은 전체량의 10%를 넘지 않도록 했다. 반응은 0.1N NaOH를 전체량의 10배를 넣어줌으로써 중지시켰다. 그리고 spectrophotometer(KLB-4070)를 이용하여 410nm에서 측정하였다.

효소의 1unit와 specific activity는 각 온도에서 1분당 기질 PNPP 1nmole을 분해하는 것으로 정의하였다.

광의 조사와 phosphatase의 활성도 측정은 약 8,000Lux의 백색광을 조사하여서 수행하였고 암조건의 대조군은 모든 실험적 조작을 거의 어두운 암실에서 행하였으며, 알루미늄 호일로 시험관을 완전히 싸서 반응을 시켰다. 광을 조사한 실험군이나 대조군 모두 20분간 반응시켰으며 30℃로 맞춘 항온순환장치(Haake W13)에서 수행하였다.

### 전기영동

단백질을 분리하기 위해서 Continuous-system polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 사용하였다(Hwang, 1986).

### 동위효소의 염색

전기영동을 마친 gel을 5℃에서 acetate-B buffer(acetate/NaOH-0.15M, pH 5.0)에 incubate시켰다. 그 후에 acetate-B buffer 40ml에 α-naphtyl acid phosphate 50mg과 fast blue BB 50mg을 용액에 넣어 acid phosphatase의 동위효소의 band를 찾아내어 촬영하였다.

## 結 果

### 광자극을 주었을 때 광원거리에 따른 *Amoeba*의 이동 개체수

Fig. 1에서 보는 바와 같이, 광자극을 준 후 24시간이 지나면 광원거리에서 멀어질수록 *Amoeba*의 개체수는 음지수 함수적으로 감소하였다( $Y=1480.1252 \times 10^{-0.2157x}$ ,  $r=0.97$ ). 그러므로 명확하게 *Amoeba*는 광자극에 대하여 반응하는 결과를 얻었다.

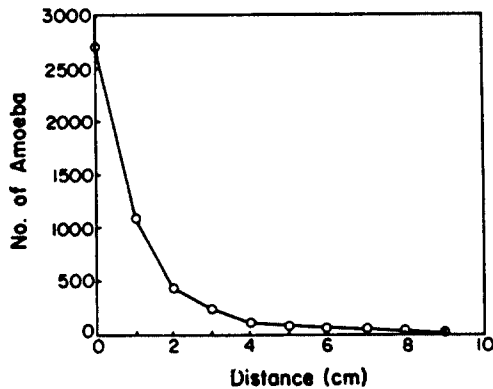


Fig. 1. Number of negatively migrating *Amoeba* to light stimulus for 48 hours.

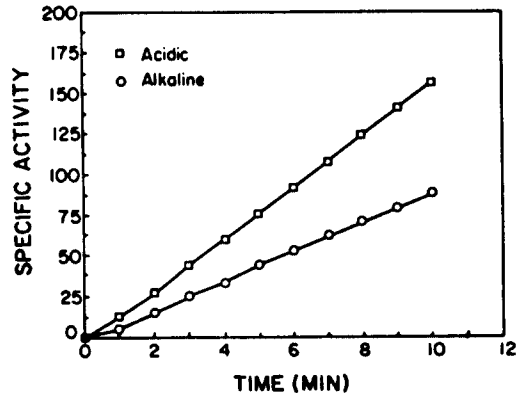


Fig. 2. Changes of the phosphatase activity with the early reaction time.

Phosphatase was incubated at 30°C with PNP-P(10mM) in acidic buffer(1M glycine, pH 5.0) and alkaline buffer(1M Tris, pH 8.0). Specific activity is expressed as units/mg protein/min.

**시간에 따른 acid phosphatase와 alkaline phosphatase의 활성도 변화**

시간이 지남에 따라서 acid phosphatase와 alkaline phosphatase는 모두 일차적인 비례로 활성도가 증가하였다(Fig. 2). 이러한 양상은 상당 시간(적어도 1시간 이상) 동안 Fig. 2에서 보는 바와 같이 일차적인 비례로 계속 증가하였다.

Acid phosphatase의 경우 1M glycine buffer(pH 5.0)를 사용하였고 alkaline phosphatase는 1M Tris-HCl buffer(pH 8.0)를 사용하였다.

활성도는 동일 온도, 동일 반응 시간에서 acid phosphatase가 alkaline phosphatase보다 더 높게 나타나는 결과를 얻었다.

**pH에 따른 Phosphatase의 활성도 변화**

Phosphatase의 최적 pH를 구하기 위해서 1M KCl buffer(pH 2.0), 1M citrate buffer(pH 3.6, 5.5), 1M glycine buffer(pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0), 1M Tris buffer(pH 8.0, 8.5, 9.0, 9.5), 1M carbonate buffer(pH 10.0, 10.7, 11.7)를 사용하였다.

Fig. 3에서 보면, KCl buffer를 사용한 pH 2.0에서는 활성도가 낮았고(98 units/mg protein/min), citrate buffer를 사용한 pH 5.5에서의 활성도는 pH 3.6의 경우보다 약 3배였으며, KCl buffer(pH 2.0)의 것에 비하면 약 4배 정도로 높게 나타났다.

Glycine buffer를 사용한 것을 살펴보면, pH 2.0에서는 활성도가 거의 없었으며, pH가 증가할수록 활성도도 증가하였다. 이때 pH 4.0~6.0의 활성도는 거의 비슷했는데 pH 5.0인 곳에서 활성도가 가장 큰 값을 나타내었다. 이 결과에 의하면 glycine buffer와 KCl buffer에서 같은 pH조건이라도 활성도가 차이가 나타남을 볼 수 있었다.

염기성 부근의 활성도는 전반적으로 산성 부근의 활성도에 비해서 낮은 값을 나타내었다.

Tris buffer를 사용한 것은 활성도가 전반적으로 높고 이중에서도 pH 8.0의 활성도가 가장

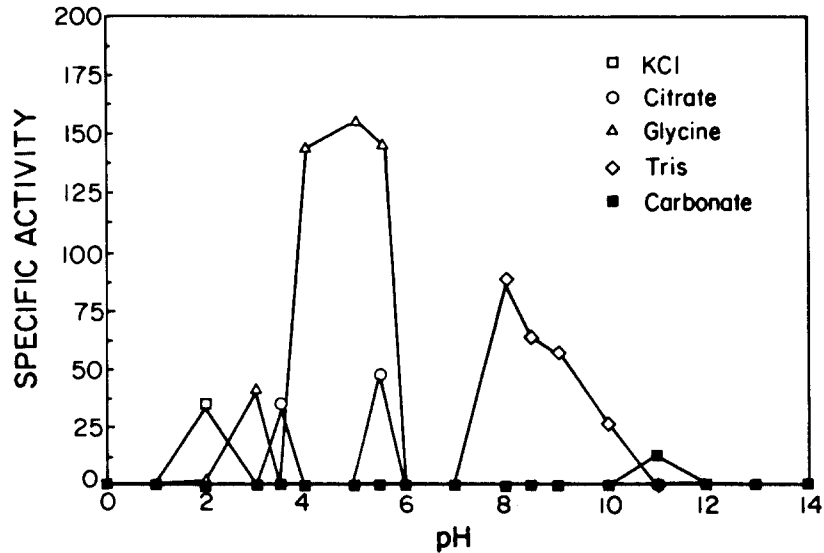


Fig. 3. Effect of pH on the activity of the phosphatase.  
Phosphatase was incubated at 30°C for 10 min.

높은 값으로 나타났다. Carbonate buffer를 사용한 구간은 현저한 활성도의 감소를 볼 수 있었다. pH 10.7이상의 강염기성 부근에서는 효소의 활성도는 거의 없었다.

#### 온도에 따른 Phosphatase의 활성도 변화

Phosphatase의 활성도를 20°C에서 50°C 사이에서 측정하였다(Fig. 4). Acid phosphatase의 경우 1M glycine buffer(pH 5.0)를 사용하였다. 이때의 양상은 20°C에서 점차로 온도가

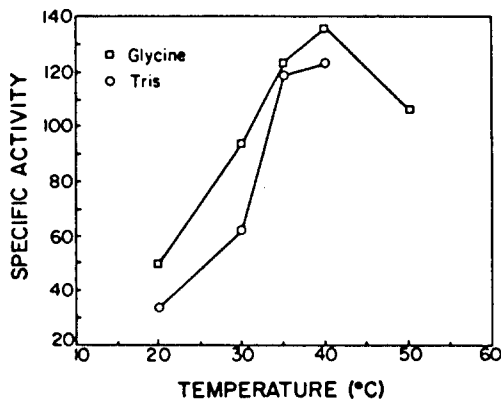


Fig. 4. Effect of temperature on the activity of the phosphatase.  
Phosphatase was incubated for 10 min.



Fig. 5. Isozyme patterns of the phosphatase.  
A : cytoplasm, B : membrane

올라갈 수록 활성도는 증가하였고, 35°C와 40°C에서 활성도가 가장 컸으며 50°C가 되면서 활성도가 감소되었다. 그러므로 acid phosphatase의 최적온도는 약 40°C 부근임을 알 수 있다.

Alkaline phosphatase의 경우에는 1M Tris(pH 9.0) buffer를 사용하였다. Alkaline phosphatase의 경우에도 acid phosphatase의 양상과 비슷하였다. 즉 최적온도는 약 40°C 부근이었다.

### 동위효소의 양상

Crude extract와 분리한 막을 시료로 해서 전기영동을 실시했는데 acid phosphatase의 경우에는 crude extract, 즉 세포질의 수용성 단백질중의 acid phosphatase와 막에 있는 acid phosphatase가 acrylamide gel상에서 band가 확연히 구분되었다(Fig. 5).

Acid phosphatase의 동위효소의 양상은 세포질의 경우에는 polymorphic의 형태로 Hwang (1986)의 결과와 비슷했으나, 막의 경우에는 그것과는 다른 형태의 polymorphic isozyme의 형태로 나타났다.

### 광조사에 의한 Phosphatase의 활성도 변화

광조사에 대한 *Amoeba*의 세포막에 존재하는 phosphatase의 활성도를 조사하였다. Acid phosphatase의 경우 1M citrate buffer(pH 5.0)를 조사하였고, alkaline phosphatase의 경우에 1M Tris buffer(pH 8.0)를 사용하였다.

세포질의 phosphatase의 활성도는 세포막에 존재하는 phosphatase의 활성도보다 10배 가량 낮은 결과를 나타내었다.

세포질의 phosphatase의 경우 광조사에 의한 활성도의 증가는 거의 없었다. 그러나 세포막의 phosphatase의 경우에는 현저한 활성도의 증가를 볼 수 있었다. Alkaline phosphatase의 경우에는 광조사 때의 활성도가 대조군보다 1.5배, acid phosphatase는 1.7배나 증가하였다.

## 論 議

광원 거리에 따라서 이동한 *Amoeba*의 개체수는 광원에서 멀어질수록 음지수 함수적으로 감소했다. 이로 인해서 *Amoeba*의 광자극에 대한 회피 정도도 개체 변이가 있음을 알 수 있다. 또한 광원에서 가장 가까운 곳에 가장 많은 수의 *Amoeba* 있다는 결과는 *Amoeba*가 광자극에 대하여 시간이 지나면서 어느 정도 적응한 것이라고 예상된다. 즉, 광자극에 대한 습성화가 일어났다는 것으로 생각할 수 있는데, 이것은 Chang *et al.* (1989)의 결과에서도 알 수 있었다.

Phosphatase의 특성과 기능은 각 *Amoeba* 종마다 특이하다. *Amoeba*의 경우에 acid phosphatase의 존재 유무에 대한 보고가 있는데 *Entamoeba histolytica*의 경우, 세포 표면의 acid phosphatase활성이 보고된 바 있다(Agrawal *et al.*, 1989).

시간에 따른 phosphatase의 활성도 변화는 시간과 활성도 변화에 있어 일차적 비례 관계를 관찰할 수 있었다. 이 결과는 phosphatase의 기질을 분해하는 기작이 매우 정확하고 규칙적이라고 할 수 있다. Acid phosphatase의 specific activity는 alkaline phosphatase의 그것보다 2배의 활성도를 갖는다는 보고(Hosek *et al.*, 1988)가 있는데, Fig. 2의 결과와 일치함을 알 수 있다.

pH에 따른 활성도 변화에서 acid phosphatase의 경우에는 pH 5.0에서 활성도가 최대가 되

었다(Fig. 3). 이것은 *Amoeba*의 경우에 acid phosphatase의 경우에 최적 pH는 5.0 부근임을 보여주는 것이며, pH 4.0~5.0 사이에서 거의 비슷한 활성도를 보여주는 것은 *Amoeba*의 acid phosphatase는 넓은 범위의 산성 pH에 걸쳐서 반응할 수 있는 것으로 사료된다. *Amoeba*의 최적 pH가 약 5.0 부근이라는 것은 *Entamoeba*의 결과와도 일치한다(Agrawal, 1989). Phosphatase의 최적 pH는 각 종마다 다른 양상을 보이는데 원생동물의 일종인 *Eimeria* spp.의 경우에는 pH 5.5이고 (Hosek, 1988), *E. coli*의 경우에는 pH 2.5이며(Dassa, 1979), 맥아의 경우는 pH 5.8로 보고되었다(Joyce and Grisolia, 1960).

Alkaline phosphatase의 경우에 pH 8.0에서 가장 큰 활성도를 보였으며(Fig. 3), bovine adrenal cortex의 경우에는 pH 8.0이다(Li, 1979). 이처럼 각 종마다 phosphatase의 독특한 최적 pH가 있는 것은 각 종에 있어서 phosphatase의 기능과 역할이 물질대사에 있어서 다를 수 있다는 것을 암시한다. 또한 같은 pH조건에서 사용한 buffer의 차이에 의하여 차이가 남은 phosphatase가 주변 환경에 의해서 활성도가 영향을 받는다고 사료된다.

온도에 따른 phosphatase의 활성도 변화는 약 40°C 부근에서 최대가 되었는데 이러한 결과는 *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* (Schonholzer *et al.*, 1985)등 많은 종에 있어서 최적 온도가 37°C라는 연구와 거의 유사한 결과이다. 그러므로 phosphatases는 온도 조건하에는 보존적인 것으로 사료된다.

Phosphatase의 동위효소상의 분석에 있어서 acid phosphatase의 경우에 세포질과 막간의 효소에 있어서 다른 양상의 결과를 얻을 수 있었는데 이로 보아서 세포질과 막의 acid phosphatase는 그 구조나 활성도의 차이가 있을 것이라는 것을 암시하고 있다. Acid phosphatase의 동위 효소 양상이 세포질과 막에 있어서 차이가 나는 것은 여러가지로 가정할 수 있다. 그러나 *Schizosaccharomyces pombe*에 있어서 acid phosphatase가 합성된 후 세포 표면에서는 mannose, galactose와 같은 당이 붙어 있는 당단백질의 형태를 띠게 된다는 연구에서도 알 수 있는 바와 같이 세포질과 막의 phosphatase의 합성과 기작이 다르다는 것을 암시해 주는데 posttranslational modification에 의한 결과가 아닌가 예상된다. 실제로 막과 세포질의 phosphatase의 활성도간에 큰 차이가 나는 결과를 얻을 수 있다.

Gottlieb and Dwyer(1981)의 연구에 의하면 원생 동물인 *Leishmania donovani*의 plasma membrane의 acid phosphatase의 활성도가 homegenate부분의 활성도보다 약 5배 높다는 것이 알려졌고, inhibitor나 metal cofactor에 대해서 membrane bound acid phosphatase가 더 민감하다고 알려졌다.

광조사에 의한 phosphatase의 활성도 변화에서 광조사시 phosphatase는 활성도가 증가함을

**Table 1.** Comparison of the phosphatase activity between the dark and illumination conditions.

Treatment	Mebrane		Cytoplasm	
	Acid	Alkaline	Acid	Alkaline
Dark	8971	4265	121.3	254.9
Illumination	15686	6549	134.8	269.6

Phosphatase was incubated at 30°C for 10min. in 1M citrate(pH 5.0) or 1M Tris(pH 8.0) buffer. The following data mean specific activity(units/mg protein/min.) of phosphatase.



얻을 수 있었다(Table 1). Lisman(1985)은 *Limulus* 광 수용체에서 visual transduction때 인산기가 착탈되는 결과를 얻어낼 수 있었다. 이처럼 phosphatase에 의해서 생성된 orthophosphate가 광에 관계하는 photomechanical transduction과정에 어떤 역할을 한다고 생각되어진다. 즉 생성된 phosphate가 photomechanical transduction에 관계하는 특정 단백질을 인산화시켜서 이러한 구조적으로 변화된 단백질이 그 후에 연속적인 반응을 나타내게 될 것이라고 예상된다. Phosphatase가 광조사에 의해서 활성도가 세포질의 phosphatase의 경우에는 광조사에 의한 활성도가 증가하지 않은 반면에 막의 phosphatase의 경우에는 활성도가 매우 크게 증가하였다(Table 1). 이것은 막의 phosphatase가 광수용과 그에 다른 주광성 등에 깊이 연관되어 있음을 크게 암시하고 있다. Phosphatase에 의해서 생성된 phosphate의 정확한 대사작용에 관하여 더 상세한 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다. 광수용에서 phosphatase의 역할 뿐만 아니라 여러 복잡한 기작과 일련의 연속적이며 신속한 대사 작용이 있을 것으로 생각된다. 이것은 phosphatase의 활성도가 적어도 하나 이상의 효소의 영향을 받는다는 보고(Kimer, 1977)에서 알 수 있는 바, 단순한 기작에 의하지 않을 것으로 예상된다.

최근에 visual excitation에 있어서 autophosphorylation, PDE(Phosphodiesterase)(Stryer, 1987)나 GTPase(Vanderberg and Montal, 1984), G-protein(Gilman, 1987)에 관한 연구가 활발히 수행되어지고 있는데 *Amoeba*의 광수용에 있어서도 이들과의 관련성 여부를 밝혀야 할 것으로 사료된다.

## 摘 要

*Amoeba*를 암조건과 광조건하에서 배양하여 phosphatase의 활성도를 조사한 결과는 다음과 같다.

*Amoeba*의 phosphatase를 30℃에 반응시켰을 때 초기반응시간과 활성도와는 1차적인 비례 관계가 있었다. 이때에 acid phosphatase의 활성도는 alkaline phosphatase보다 약 2배가 높았다. Phosphatase의 최적 pH는 산성부분에서는 pH 5.0이었고, 염기성 부분에서는 pH 8.0이었다. Phosphatase의 최적온도는 40℃로 나타났다.

*Amoeba*의 세포막과 세포질의 acid phosphatase의 동위효소를 비교해 본 결과, 모두 polyacrylamide gel 상에서 polymorphic한 형태를 나타내었으나, 세포질의 경우가 분명한 분리양상을 나타내었다. *Amoeba*에 48시간동안 광자극을 주었을 때, 광회피개체수는 광원으로부터 멀어질수록 음지수 함수적으로 감소하였다. 광조사를 하였을 때 acid phosphatase와 alkaline phosphatase는 암조건을 주었을 때보다도 각각 1.7배, 1.5배의 활성도 증가를 나타내었다. 이 결과는 autophosphorylation의 기작과 연관이 있는 것으로 추정된다.

## 引 用 文 獻

- Agrawal, A., V.C. Pendey, S. Kumar and P. Sager, 1989. Secretion of acid phosphatase by axenic *Entamoeba histolica* NIH-2000 and properties of the extracellular enzyme. J. Protozool. 36 : 90-92.

- Ahn, T.I. and K.W. Jeon, 1982. Structural and biochemical characteristics of the plasmalemma and vacuole membranes in *Amoeba*. *Exp. Cell. Res.* 137 : 153-268.
- Chang, N.K., C.S., Lim, J.H. Bae and H.J. Nam. 1989. Changes of protein synthetic patterns with habituations of *Amoeba* and *Planaria* by the light stimuli. *Korean J. Eco.* 12 : 37-49.
- Dassa, E., C. Tetu P.L. Boquet. 1980. Identification of the acid phosphatase (optimum pH 2.5) of *E. coli*. *FEBS Lett.* 13 : 275-278.
- Dassa, E., M. Cahu, B. Desjoyaux-Cherel and P.L. Boquet. 1982. The acid phosphatase with optimum pH of 2.5 of *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 275 : 6669-6676.
- Dixon, M. and E.C. Webb. *Enzymes*. 3rd ed. Longman. 1979.
- Gilman, A.G. 1987. G proteins : transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 615-649.
- Goldstein, L. and C. Ko. 1976. A method for mass culturing of large free-living *Amoeba*. *Methods Cell Biol.* 13 : 239-246.
- Gottlieb, M. and D.M. Dwyer. 1981. Protozoan Parasite of Humans : surface membrane with externally disposed acid phosphatase. *Sci.* 939-940.
- Grebeski A. and W. Klopocka, 1981. Functional interdependence of pseudopodia in *A. proteus* stimulated by light-shade difference. *J. Cell. Sci.* 50 : 245-258.
- Hess, J.F., K. Oosawa, P. Matsumura and M.I. Simon, 1987. Protein phosphorylation is involved in bacterial chemotaxis. *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 : 7609-7613.
- Hosek, J.E., K.S. Todd, JR. and M.S. Kuhlenschmidt, 1988. Demonstration of acid phosphatase in *Eimeria* spp. : partial characterization of the enzyme in *E. veriformis*. *J. Protozool.* 35 : 531-532.
- Hwang, S. Y. 1986. Comparisons of isozyme patterns between the symbiotic and non-symbiotic strains of *A. proteus*. Master's thesis. Seoul Natl. Univ.
- James, T.W. 1987. Photomechanical transduction in *A. proteus* : an action spectrum. *J. Photochem. Photobiol. B : Biology.* 1 : 203-211.
- Jeon, K.W. and M.S. Jeon, 1975. Cytoplasmic filaments and cellular wound healing in *Amoeba proteus*. *J. Cell. Biol.* 67 : 243-249.
- Joyce, B.K. and S. Grisolia. Grisolia, 1960. Purification and properties of a nonspecific phosphatase from wheat germ. *J. Biol. Chem.* 235 : 2278-2281.
- Kier, L.D., Weppelmon, R., and B.N. Ames. 1977. Regulation of two phosphatases and a cyclic phosphodiesterase of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 130 : 420-428.
- Kim, K.J. 1988. The fates and the roles of a transmembraneous glyco-protein in *A. proteus*. Master's Thesis. Seoul Natl. Univ.
- Klopocka, W. and A. Grebcki, 1982. Locomotion of *A. proteus*, after standardizing its body shape. *Protoplasma.* 112 : 37-45.
- Li, H. C. 1979. Purification and properties of a phosphorylase (phosphoprotein) phosphatase associated with an alkaline phosphatase of Mr. 35000 from bovine adrenal cortex. *Eur. J. Biochem.* 102 : 363-374.

- Lisman, J.E. 1985. A mechanism for memory storage insensitive to molecular turnover : A bistable autophosphorylating kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 : 3055-3057.
- Lorch, I.J. and J.F. Danielli. 1953. Nuclear transplantation in *Amoebae*. I. Some species characters of *A. proteus* and *A. discoides*. *Quart. J. Microsc. Sci.* 94 : 445-460.
- 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.
- Paulson, R. and J. Bontrop. 1984. Reversible phosphorylation of opsin induced by irradiation of blowfly retinol. *J. Comp. Physiol.* A155 : 39-45.
- Plocke, D.J., C. Levinthal and B.L. Vallee. 1962. Alkaline phosphatase of *E. coli* : A zinc metalloenzyme. *Biochemistry.* 1 : 373-378.
- Ranjeva, R. and A.M. Boudet. 1987. Phosphorylation of proteins in plants : regulatory effects and potential involvement in stimulus/response coupling. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 38 : 73-93.
- Schonholzer, F., A.M. Schweingruber, H. Trachsel and M.E. Schweingruber. 1985. Intracellular maturation and secretion of acid phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 147 : 273-279.
- Schweingruber, A.M., F. Schoenholzer, L. Keller, R. Schweingruber, H. Trachsel and M.E. Schweingrubver. 1986. Glycosylation and secretion of acid phosphatase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.* 158 : 133-140.
- Stryer, L. 1984. Light-activated retinal proteins. *Nature.* 312 : 498-499.
- Stryer, L. 1987. The molecules of visual excitation. *Sci. Amer.* 32-40.
- Tetu, C., E. Dassa and P.L. Boquet. 1979. Unusual pattern of nucleotide polyphosphate hydrolysis by the acid phosphatase (optimum pH=2.5) of *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87 : 314-322.
- Vandenberg, C.A. and M. Montal. 1983. Light activates cholera toxin-catalysed labeling of a 44,000-dalton protein in squid photoreceptors. *Biophys. J.* 41 : 25a.
- Vandenberg, C.A. and M. Montal. 1984. Light-Regulated biochemical events in Invertebrate photoreceptors. *Biochemistry.* 23 : 2339-2347.

(1991年 2月 7日 接受)