

비름에서 ATP 가수분해효소와 상동성을 가지는 유전자의 클로닝

한 규 웅†

한남대학교 생물학과

Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of *Amaranthus viridis* Homologue of the H⁺-Transporting ATPase Gene

Kyu-Woong Hahn†

Department of Biology, Hannam University, 300-791, Taejon

Abstract

Using differential hybridization, a cDNA clone was isolated fortuitously from *Amaranthus viridis* and sequenced. This nucleotide sequence exhibited 55.1% identity with *vma6* which encodes the 36-kD subunit of the vacuolar proton transporting ATPase in *Saccharomyces cerevisiae*. The predicted open reading frame encodes a protein of 221 amino acid sequence with a calculated molecular weight of 25,452 and reveals high levels of similarity with subunit D polypeptide of vacuolar H⁺-ATPase (e.g., 48.5, 51.2 and 49.3% identity to the vacuolar 36-kD chain of yeast, vacuolar 32-kD polypeptide IV of human and vacuolar 28-kD protein of bovine chromaffin granules, respectively). The hydropathy index computation revealed that this predicted protein is a peripheral protein. These results indicated that the predicted protein may play a structural role in the vacuolar H⁺-ATPase as does γ subunit in V-type ATPase.

서 론

생체막을 통한 이온의 수송은 기본적으로 막결합 ATP 가수분해효소(ATPase; EC 3.6.1.3)에 의해 이루어진다. 이 때 ATPase 자체의 화학 반응의 작용에 따르는 것을 1차 수송, 다른 수송체의 펌핑에 의해 이루어진 전하구배의 작용에 따르면 2차 수송이라 하며(Harold, 1986), 식물체에서는 대부분 1차 수송에 따르는 것으로 알려져 있다. 이 가운데 수소 수송 ATPase(H⁺-ATPase; EC 3.6.1.35)는 세포의 막성 구조에 위치하며, 수소 이온을 원형질로부터 세포 밖과 세포소기관 안으로 각각 이동시켜 수소 이온의

전기화학적 전위 차이(H⁺-electrochemical potential difference; $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$)를 확립하게 된다.

원형질막의 H⁺-ATPase는 P-type(plasma membranetype) 효소들의 범주에 속하고, 액포, ER 등 세포소기관의 막에 있는 효소는 H⁺-translocase의 V-type(vacuolar membranetype)에 속한다(Rea and Turner, 1990). P-type H⁺-ATPase는 100-kD의 polypeptide가 dimer를 이루어 반응을 촉매하는 동안 phosphorylated(acyl-phosphate) intermediate를 형성한다. 여기에 속하는 효소들로는 동물 세포막의 (Na⁺+K⁺)-ATPase, ER의 Ca²⁺-ATPase, 위 점막의 (H⁺+K⁺)-ATPase, 그리고 원핵세포의 원형질막에 있

† Corresponding author

는 K^+ -ATPase 등이 있으며, 이들은 모두 상동성을 가지는 염기서열을 가지고 있다(Serrano *et al.*, 1986).

반면에 V-type ATPase는 400~500-kD의 크기를 가지며 3개에서 10개의 subunit으로 이루어져 있는데, 이들 가운데 67~72-kD와 55~62-kD polypeptides, 그리고 16-kD proteolipid는 공통으로 나타나며, 식물과 진균류의 액포막 H^+ -ATPase들과 동물의 clathrin-coated vesicle과 chromaffin granule의 H^+ -ATPase들은 서로 면역학적으로 교차반응을 나타낸다(Manolson *et al.*, 1987). 대체로 식물과 진균류에서는 6~7개의 major subunit과 2~3개의 minor subunit으로 이루어진다고 여겨진다. Parry *et al.* (1989)은 67-, 55-, 52-, 44-, 그리고 32-kD polypeptide들은 막바깥으로 돌출된 부분(F_1)을, 100-과 16-kD polypeptide는 막에 몰입되어 있는 부분(F_0)을 형성한다고 보고하였으며, Kane *et al.* (1992)은 42-kD polypeptide도 역시 peripheral subunit임을 밝혔다.

최근 들어 *Saccharomyces*와 *Neurospora*, 그리고 *Arabidopsis* 등으로 V-type H^+ -ATPase의 subunit을 코딩하는 유전자의 탐색이 활발하게 이루어지고 있다(Bowman *et al.*, 1995; Graham *et al.*, 1995, 1994; Jones *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 1995; Perera *et al.*, 1995; Supekova *et al.*, 1995; Xie *et al.*, 1994). 연구가 가장 많이 이루어진 yeast의 경우, 모두 10개의 유전자가 확인되었으며, 특히 minor subunit polypeptide에 대한 탐색도 꾸준히 이루어지고 있다. 여기에 식물에서 yeast의 36-kD polypeptide(VMA6)와 사람의 32-kD polypeptide, 그리고 bovine의 28-kD subunit D polypeptide에 상동성을 가지는 단백질을 코딩하는 cDNA 염기서열을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

Strains and Media

식물재료는 비름(*Amaranthus viridis*)을, *E. coli* 균주로는 Stratagene 회사에서 구입한 XL1-Blue MRF⁺와 SOLR을 사용하였으며, 배양 배지로는 LB(yeast extract 0.5%, trypton 1.0%, sodium chloride 1.0%)를 이용하였다. 형질 전환된 균주는 LB에 ampicilin을 50 μ g/ml 농도로 첨가하여 배양하였다.

Isolation of cDNA

비름에서 추출한 mRNA로부터 Stratagene의 방법에 따라 Uni-ZAP XR cDNA library를 제작한 후 Hybond-Nmembrane에 옮겨 heterologous primer를 이용하여 cDNA library를 screening하였다. 강한 signal을 보이는 phagemid 클론을 선별하여 *E. coli* XL-I Blue MRF⁺ cell에 helper phage인 Exassist와 같이 감염시켜 phagemid DNA의 형태로 *E. coli* SOLR strain에 *in vivo* excision하였다. DNA 염기서열은 dideoxynucleotide chain termination method로 결정하였다.

Homology and Hydropathy index search

cDNA 염기서열로부터 deduced amino acid 서열을 확인하고 BLAST 프로그램으로 비교하였다. Hydropathy index computation은 PCGENE 프로그램을 이용하였다.

결과 및 고찰

비름에서 분리한 cDNA 클론을 AV14라 이름 붙였다. AV14의 염기서열(Fig. 1)은 *S. cerevisiae*의 vma6 유전자와 55.1%의 상동성을 보인다. 한편, 이 클론에서 연역된 아미노산의 염기서열은 221개의 아미노산을 가지며 약 25-kD 크기로 yeast의 VMA6와 48.5%의 상동성을 보였으며(Fig. 2), 이 밖에도 사람의 액포에서 분리한 H^+ -ATPase의 chain D polypeptide와 51.2%, bovine의 chromaffin granular H^+ -ATPase polypeptide IV와 49.3%의 상동성을 가진다. VMA6는 *S. cerevisiae* vacuolar H^+ -ATPase의 membrane sector에 있는 36-kD polypeptide이며(Bauerle *et al.*, 1993), 사람 액포의 32-kD chain D(EMBL S34132)와 bovine chromaffin granule의 28-kD polypeptide IV(Wang *et al.*, 1988)는 V-type H^+ ATPase를 이루는 subunit D polypeptide라고 알려져 있다.

수소 수송 ATPase는 ATP를 가수분해하는 F_1 부위와 막을 통과하는 channel을 형성하는 F_0 부위로 구성되며 많은 subunit으로 이루어져 있다. 이 가운데 F_1 은 다섯 가지의 subunit이 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ 의 조성비를 이루고 있으며 이들을 코딩하는 유전자는 multigene family를 이루고 있다. *Neurospora crassa*의 경우, subunit A와 B polypeptide는 ATP 결합 부위와 가수분해 부위를 가지고 있는 F_1 구성 성분이며, subunit C polypeptide는 막을 통과하여 수소 통로를

```

CTGTGCGCTGAGCTGTTGATGAATATAGCATATGATGTGCCAGGCAACGAAACC 59
      M M C Q A T E P
TTGTCAACTTCTTAGAGTACATCAGTATGGTCACATGATTGATAATGTTGTCGATT 119
      L S T F L E Y I T T Y G H M I D N V V L I
GTGACCGGAACCTTTGCATGAGAGGGATGTTCAAGAACTGTTGGAATAATGTCACCTTA 179
      V T G T L H E R D Y D E L L E K C H P L
GGGATGTTTGAATATTGCTACCTTACCTGCTGCTCAGAAATGAGGGATTTATATAGA 239
      G M F D S I A T L A V A D N M R D L Y R
TTGGTGCTTGTGATACTCCCTTGGCCCATCTCTCCGAGTGTACACATCGAGGAC 299
      L V L V D T P L A P Y F S E C I T S E D
TTGGATGATGAAACATTGAGATTATGAGAAACACCTTTACAAAGCATATCTTGAGGAT 359
      L D D M N I E I M R N T L Y K A Y L E D
TTCTATCGATTCTGTGAGAACTTGGTGGGCTACTGCAGAGATTATGTCCGATCTCTT 419
      F Y R F C Q N L G G A T A E I M S D L L
GOCCTTGAGGCTGATAGAAGAGCTCTTAATTAACAATTAAGCATTGGAACTGAACTT 479
      A F E A D R R A L N I T I N S I G T E L
ACAAGGAAGACCGCTAAGAAGTGTACTCGAGCTTTGGGCTCTTGTATCCTTATGACAT 539
      T R E D R K K L Y L S S F G L L Y P Y G H
GAAGAGCTGCTCTTCTGAGGATGATAGATCAGGTTGGTGTGTTGGAAAAATATCCA 599
      E E L A L S E D V D Q V R C V M E K Y P
CGGTATCAGTCAATATCTCCAAGTGTCTTATGAGAAAAAGCCAGATGCTGGACAAAGG 659
      P Y Q S I F S K M S Y G E K P D A G Q G
CGTTTTATGAAGAGGAGTCAAGAGTATGCTTATCATTGAAACAACAGTCCATATGCR 719
      R F M K R R S R V M L I I *
TGTGTTCTTTCATACATGAGGTTGAGGGACAGAAATAGGAATCTGATGTGGATTC 779
      T G A A T G C G T T G C A C A A A C C A A A A G T C T A G A G T T T C A C G A C A G T T T G T G T C T A T T C T
AGTGTCTTGTGACAAAGTGGCTTCTGAGCAAAATGAAAAACCTGTGTGATTGCAAGGA 839
      A T T G C A G G A T G A A T T C A T G T T G A T G G C C T T G T A C A C T A A C T A A A T C A T G T A G S T
TGTAGAATCAATGCAACATATATTAATCTGACAGAGTGGAAATAAGCTTGTGGTGTG 899
      A T T A C T T C A T T C A A A A G G T C A C C T A G A T T C C A T T C T G T G G G G A C C A G A C A T T A T A T G T
CGGTTTTGTGTAACCTGACTGAATTTGACATATTAAGTCAAAATTTGACTGCTT 1019
      C A T T C A T T G C T G T G A A T T G C C T A T T A C T C A A A A A A A A A A A A A A A
CATTCTGCTGTGAATTGCCATTTACTCTAAAAAAMAAAAAAMAAAAA 1189
    
```

Fig. 1. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of cDNA clone. The single letter amino acid code is placed below the second nucleotide of its codon. The termination codon is labeled with an asterisk.

```

              10          20          30
AV14      M M C Q A T E P L S T F L E Y I T Y G H M I D N V V L I V T G T L
VMA6      S S Y S S E L T T S L I Q E Y A S S K L Y H E F N Y I R D S S G S T R K F M D Y I T Y G Y M I D N V A L M I T G T I
              40          50          60          70          80          90          100          110
AV14      H E R D V Q E L L E X C H P L G M F D S I A T L A V A Q N M R D L Y R L V L V D T P L A P Y F S E C I - T S E D L D D M
VMA6      H D R K G E I L Q R C H P L G M F D T L P L S V A T D L E S L Y E T V L V D T P L A P Y F K N C F D T A E E L D D M
              120          130          140          150          160          170
AV14      N I E I I R N K L Y K A Y L E D F Y R F - C Q N L G G A T A E I M S D L L A F E A D R R A V N I T I N S I - G T E L T R
VMA6      N I E I I R N K L Y K A Y L E D F Y N F Y T E E I P E P A K E Q M T L L G F E A D R R S I N I A L N S L Q S S D I D P
              180          190          200          210          220          230
AV14      E D R R K L Y S D F G L L Y P Y G H E E L A L S E D V D Q V R C V M E K Y P P Y Q S I F S K M S Y G E K P D A G Q G R F
VMA6      D L K S D L L P N I G K L Y P L A T F H L A Q A Q D F E G V R A A L A N Y Y E Y R G F L E T G N L E D H F Y Q L E M E L
              240          250          260          270          280          290
AV14
VMA6
              300          310          320          330          340
AV14      M K R R S R V M L I I
VMA6      C R D A F T Q D F A I S T W A M M K S K E Q E V R N I T W I A E C I A Q N Q R E R I N N Y I S V Y
    
```

Fig. 2. Amino acid sequence homology between AV14 of *A. viridis* and VMA6 of yeast using the single letter amino acid code. Identities between AV14 and VMA6 are marked with :, similarities with single dots.

형성하는 F₀ 구성 성분이라고 알려졌다(Bowman *et al.*, 1992). 지금까지 밝혀진 바에 따르면 V-type ATPase의 subunit들 가운데 67~72-kD polypeptide는 촉매 기능을 하는 β chain(Bowman *et al.*, 1986; Zimniak *et al.*, 1988), 55~62-kD polypeptide는 조절 기능을 가지는 α-chain(Manolson *et al.*, 1985)을 형성하며, 16-kD subunit은 H⁺-channel을 형성하며 매우 높은 hydrophobicity를 나타낸다(Bowman *et al.*, 1995; Rea *et al.*, 1987; Sun *et al.*, 1987). 이 두 부위를 연결하는 기능을 할 것이라고 생각되는 subunit γ, δ와 ε은 아직 뚜렷하게 밝혀지지 않았으나 대개 20~40-kD 정도의 크기를 가지며 membrane spanning 특성을 가질 것으로 생각된다. 이들의 염기서열은 종 사이에 변이가 매우 크며, 유전자 사이의 상동성도 비교적 낮은 편이다. AV14는 yeast와 bovine의 subunit D polypeptide와 50% 가까운 상동성을 가지며, hydropathy index를 조사한 결과 peripheral protein의 특성을 가지고 있으며 hydrophobic domain과 hydrophilic domain이 반복하여 나타나고 있다(Fig. 3).

한편, Nelson *et al.*, (1995)은 bovine의 chromaffin

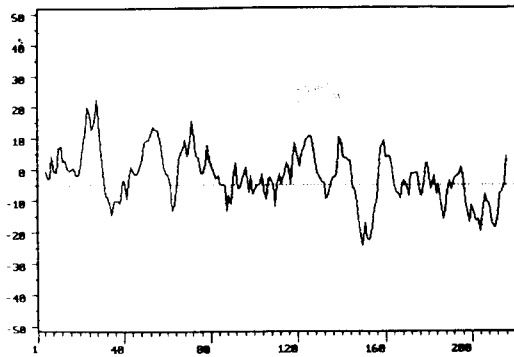


Fig. 3. Hydropathy index of AV14 from amino acid 1 to amino acid 221. Computed using an interval of 9 amino acids. Grand Average of Hydropathy = -1.6. The dotted line plotted at the -1.6 value represents the midpoint line. The hydrophobic domains are above that line and the hydrophilic ones are below it. Y axis, hydropathy index value; X axis, amino acid number.

granule에서 분리한 vacuolar H⁺-ATPase의 subunit D polypeptide(Mw. 28,336)가 yeast의 *vma8* 유전자가 코딩하는 vacuolar H⁺-ATPase의 subunit D polypeptide (Mw. 29,176)와 55%의 상동성을 보이며, V-ATPase의 catalytic sector에 위치하는 integral subunit으로 그 구조상 F-ATPase의 γ subunit의 analogy일 것이라고 주장하였다. 또한 Graham *et al.* (1995)은 yeast의 *vma8*에 돌연변이를 일으키면 V₀ subunit은 액포막에 안전하게 자리잡은 반면 V₁ subunit은 막구조에 결합하지 못해 V-ATPase 활성이 전혀 나타나지 않았다고 보고하였다. 따라서 VMA8이 V₀에 V₁ subunit을 결합시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. *vma8*의 염기서열이 아직 등록되어 있지 않아 직접 비교하지 못하였으나, bovine의 subunit D polypeptide처럼 AV14도 VMA8과 유사한 특성을 나타낼 가능성도 배제할 수 없다. VMA6과 VMA8이 yeast subunit D polypeptide의 multigene이거나 γ subunit을 함께 구성하는 요소일 가능성이 매우 높기 때문이다.

이러한 사실들로 미루어 볼 때, AV14는 F₁과 F₀ 사이를 이어주는 stalk을 구성하는 한 subunit로서 액포막과 원형질의 경계에 위치하는 γ subunit일 가능성이 매우 높다 하겠으며, 이에 관련하여 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

비름(*Amaranthus viridis*)에서 분리한 cDNA 클론의 염기서열을 조사한 결과 다음과 같은 사실을 알았다.

1. 이 클론은 *Saccharomyces cerevisiae*의 vacuolar H⁺-ATPase의 36-kD subunit를 코딩하는 *vma6* 유전자와 55.1%의 상동성을 가진다.
2. 이 클론에서 코딩되는 단백질은 221개의 아미노산으로 이루어지며 25,452 Da의 분자량을 가진다.
3. 이 단백질은 yeast의 vacuolar 36-kD 단백질과 48.5%, 사람의 32-kD polypeptide IV와 51.2%, 그리고 소의 chromaffin granule의 28-kD 단백질과 49.3% 등 vacuolar H⁺-ATPase의 subunit D와 높은 유사성을 보인다.
4. 이 단백질의 hydropathy index는 peripheral protein의 성질을 나타낸다.

이러한 사실로 미루어 이 단백질은 아마도 V-type H⁺-

ATPase의 한 구조체로서 역할을 수행할 것으로 여겨진다.

참고문헌

- Bauerle, C., Ho, M. N., Lindorfer, M. A. and Stevens, T. H. : The *Saccharomyces cerevisiae vma6* gene encodes the 36-kD subunit of the vacuolar H⁺-ATPase membrane sector. *J. Biol. Chem.* 268, 12749 (1993)
- Bowman, E. J., Mandala, S., Taiz, L. and Bowman, B. J. : Structural studies of the vacuolar membrane ATPase from *Neurospora crassa* and comparison with the tonoplast membrane ATPase from *Zea mays*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 48 (1986)
- Bowman, E. J., Tenny, K. and Bowman, B. J. : Isolation of genes encoding the *Neurospora* vacuolar ATPase. Analysis of *vma-1* encoding the 67-kDa subunit reveals homology to other ATPase. *J. Biol. Chem.* 263, 13994 (1988)
- Bowman, E. J., Vazquez-Laslop, N. and Bowman, E. J. : The vacuolar ATPase of *Neurospora crassa*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24, 361 (1992)
- Bowman, E. J., Steinhardt, A. and Bowman, B. J. : Isolation of the *vma-4* gene encoding the 26-kD subunit of the *Neurospora crassa* vacuolar ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1237, 95 (1995)
- Graham, L. A., Hill, K. J. and Stevens, T. H. : VMA8 encodes a 32-kDa V₁ subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar H⁺-ATPase required for function and assembly of the enzyme complex. *J. Biol. Chem.* 270, 15037 (1995)
- Harold, F. M., "The Vital Force : A Study of Bioenergetics". Freeman, New York. (1986)
- Jones, P. C., Harrison, M. A., Kim, Y. I. : Finbow ME and Findlay JB. Structure and function of the protonconducting sector of the vacuolar H⁺-ATPase. *Biochem. Soc. Trans.* 22, 805 (1994)
- Kane, P. M., Kuehn, M. C., Howald-Stevenson, I. and Stevens TH. : Assembly and targeting of peripheral and integral membrane subunits of the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 267, 447 (1992)
- Manolson, M. F., Rea, P. A. and Poole, R. J. : Identification of 3-O-(4-benzoyl)benzoyl-adenosine 5'-triphosphate- and N, N'-dicyclohexylcarbodiimide-binding subunits of a higher plant H⁺ translocating tonoplast ATPase. *J. Biol. Chem.* 260, 12273 (1985)
- Manolson, M. F., Percy, J. M., Apps, D. K., Xie, X. S., Stone, D. K. and Poole, R. J. : *Membrane Proteins*. Eds. SC Goheen. L Hjelmeland, M McNamee and R Gennis. pp. 427-434, Bio-Rad, New York. (1987)

- Nelson, H., Mandiyan, S. and Nelson, N. : A bovine cDNA and a yeast gene (VMA8) encoding the subunit D of the vacuolar H⁺-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 497 (1995)
- Parry, R. V., Turner, J. C. and Rea, P. A. : High purity preparations of higher plant vacuolar H⁺-ATPase reveal additional subunits. Revised subunit composition. *J. Biol. Chem.* 264, 20025 (1989)
- Perera, I. Y., Li, X. and Sze, H. : Several distinct genes encode nearly identical to 16-kD proteolipids of the vacuolar H⁺-ATPase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 29, 227 (1995)
- Rea, P. A., Griffith, E. J. and Sanders, S. : Purification of the N, N'-dicyclohexylcarbodiimide-binding proteolipid of a higher plant tonoplast H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 262, 14745 (1987)
- Rea, P. A. and Turner, J. C. : Tonoplast adenosine triphosphatase and inorganic pyrophosphatase. In : *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 3. Edited by PJ Lea, Academic Press.
- Serrano, R., Kielland-Brandt, M. C. and Fink, G. R. : Yeast plasmamembrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺+K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature* 319, 689 (1986)
- Supekova, L., Supek, F. and Nelson, N. : The *Saccharomyces cerevisiae* VMA10 is an intron-containing gene encoding a novel 13-kDa subunit of vacuolar H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 270, 13726 (1995)
- Sun, S. Z., Xie, X. S. and Stone, D. K. : Isolation and reconstruction of the dicyclohexylcarbodiimide-sensitive proton pore of the clathrin-coated vesicle proton translocating complex. *J. Biol. Chem.* 262, 14790 (1987)
- Wang, S. Y., Moriyama, Y., Mandel, M., Hulmes, J. D., Pan, Y. C. E., Danho, W., Nelson, H. and Nelson, N. : Cloning of cDNA encoding a 32-kDa protein. An accessory polypeptide of the H⁺-ATPase from chromaffin granules. *J. Biol. Chem.* 263, 17638 (1988)
- Xie, X. S., Crider, B. P., Ma, Y. M. and Stone, D. K. : Role of a 50-57-kDa polypeptide heterodimer in the function of the clathrin-coated vesicle proton pump. *J. Biol. Chem.* 269, 25809 (1994)
- Zimniak, L., Dittrich, P., Gogarten, J. P., Kibak, H. and Taiz, L. : The cDNA sequence of the 64-kDa subunit of the carrot vacuolar H⁺-ATPase. Homology to the beta-chain of F₀F₁-ATPase. *J. Biol. Chem.* 263, 9102 (1998)