

이담자균 효모의 성분화 과정중 인지질의 작용과 배지조성의 제한이 성분화에 미치는 영향

정영기[†] · 강원대 · 남수완

동의대학교 미생물학과

The Action of Phospholipids and Effect of Medium Composition During Sexual Differentiation Process in Heterobasidiomycetous Yeast *Rhodospordium toruloides*.

Yong-Kee Jeong[†], Won-Dae Kang and Soo-Wan Nam

Department of Microbiology, Dong-eui University, Pusan, 614-714, Korea

Abstract

The action of phospholipid on the rhodotorucine A(Rh.A) acceptance by heterobasidiomyceteous yeast *Rhodospordium toruloides* mating type a cells and the effect of medium composition during sexual differentiation were investigated. Activation of trigger peptidase(TPase) was very sensitive to the originated phospholipid from *R. toruloides* and was more sensitive to phospholipid liposome made up of phospholipid. Phospholipid present on the membrane of mating type a cells consists of phosphatidylglycerol(PG), phosphatidylethanolamine(PE), phosphatidylcholine(PC), phosphatidylinositol(PI), and phosphatidylserine(PS) of 12.9, suprisingly 45.4, 11.0, and 13.9%, respectively.

As the result of using C-1 and N-1 mediums which limited C and N sources capable of inhibiting the synthesis of phospholipid, it resulted inhibiting sexual differentiation and production of Rh.A from mating type A cells.

Key words : Phospholipid, sexual differentiation, *Rhodospordium toruloides*.

서 론

이담자균 효모 *Rhodospordium toruloides*는 영양증식 시기에는 성접합형이 서로다른 A세포와 a세포로 나뉘어 있으며 각각 출아에 의하여 증식해 가고 있다(1). 이들 세포는 상대세포를 인식하여 성유인 물질인 pheromone을 분비

하는데, 상대세포가 분비하는 성pheromone을 수용하면 세포는 영양증식을 멈추고 성접합관을 생성하면서 생식세포로 변한다(2). 이 과정을 본 연구계에서는 성분화라 한다. 접합형 A세포가 a세포를 향하여 분비하는 성pheromone을 rhodotorucine A(Rh.A)라 하는데, 이것은 접합형 a세포를 생식세포로 유도하고 성접합관을 생성하도록하여 형태적인

[†] Corresponding author

변화를 초래하는 물질이다(3). 성접합과정에서 서로 상대 세포의 sexpheromone을 수용하면 세포표면 단백질의 변화에 의하여 양 세포는 강한 응집현상을 보이면서 융합한다(4). Miyakawa와 Jeong등은 Rh. A를 수용하는 a세포 표면에 receptor 역할을 하면서 동시에 효소활성을 가지는 단백질이 있는 것을 발견하고(5) 이물질을 분리 정제하여 Trigger peptidase(TPase)라 명명하여 보고한바 있다(6). 그리고 필자등은 최근에 양 세포의 당단백질을 중심으로 생리적비교를 연구한 바 있다(7,8).

특히, Rh.A의 정보가 a세포에 의해 수용될 때 TPase는 세포 표면에서 Rh.A를 수용함과 동시에 분해대사하는 것이 매우 중요한 trigger reaction임이 규명되었다(5). 그래서 필자등은 a세포로부터 분리한 TPase의 성질을 *in vitro*에서 조사한 결과 본 효소는 Ca^{2+} 을 절대적으로 요구했으며 아울러 인지질을 요구하는 막 단백질효소 특유의 성질을 지닌 것을 알았다(6). 이후 정제된 TPase를 인공 제작된 liposome에 재구성 함으로서 본 효소가 세포표면에서 Rh.A의 수용체로서 역할을 수행하는 사실을 증명한 바 있다(9).

이상의 결과를 바탕으로 본 논문에서는 세포 유래의 인지질이 성분화에 미치는 영향을 검토하고 아울러 인지질 생합성을 저지 할 수 있는 제한된 배지 조성을 사용하여 상대 세포의 성분화 유도 효과를 조사 함으로서 인지질이 성분화에 미치는 작용을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주

균주는 *Rhodospiridium toruloides* IFO 0559-M919 (접합형 A, 적색colony, 난형)과 *R. toruloides* IFO 0880-M1057(접합형 a, 황색colony, 장 난형)을 사용했다(5).

배지조성 및 배양

배지조성은 완전배지로서 사용한 YPG(0.4% yeast extract, 0.5% polypepton, 2% glucose, 0.1% $(NH_4)_2SO_4$, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)와 최소 배지로서 사용한 MM배지(2% glucose, 0.3% $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% KH_2PO_4 , 0.01% $CaCl_2$, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01% NaCl, 1ml vitamine mixture per 100ml) 그리고 탄소원을 제한시킨 C-limit(C-l)배지(0.2% glucose, 0.4% yeast extract, 0.5% polypepton, 0.1% KH_2PO_4 , 0.5% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)와

질소원을 제한시킨 N-limit(N-l)배지(2% glucose, 0.04% yeast extract, 0.05% polypepton, 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)를 사용하였다.

배양은 500ml의 진탕 flask에 chloramphenicol 50 μ g을 첨가한 상기의 각 배지 100ml에 미리 전배양한 균을 2% 이식하여 28°C에서 진탕배양 하였다. 배양시간은 본배양균 접종후 18시간을 기준으로하나 균수를 측정하여 1×10^8 cells/ml되는 시기를 집균시기로 하였다.

R. toruloides 세포로부터 인지질의 추출

R. toruloides 접합형 a세포의 영양세포를 총 세포수 4×10^{11} cells되게 집균하여 0.01M phosphate buffer(pH7.3)에 현탁하고 동일 buffer로서 2회 세척한다. 세포를 French press(20,000 p.s.i)로서 파쇄한후 원심분리(11,000 \times g, 60min, 4°C)하여 침전물을 취하고, 이 침전물은 상기의 phosphate buffer로서 2회 세척하여 막 분획으로 하였다. 이 막 분획을 chloroform : methanol, 2 : 1(v/v)에 현탁하여 sonicator(model W-225R)로서 충분히 진동간반함으로서 지질을 추출하였다. 원심분리에 의하여 chloroform/methanol층(CM층)을 취하였다. CM층을 0.9% NaCl용액으로 세척하여 감압농축으로 용매를 제거하여 얻은 표품을 전 지질로 하였다. 전 지질 분획을 lichenic acid column chromatography를 거쳐 인지질 분획을 취하여 이를 세포 유래의 인지질로 사용하였다.

인지질의 검색

전 인지질 분획의 표품을 TCL용 silica gel plate(Kiesel 60, merk co.)를 사용하여 전개용매 chloroform : methanol : ammonia수(28%), 65 : 35 : 1로서 TCL를 행하였다. 인지질이 전개된 TLCplate를 잘 건조한후 하기의 Dittmer 시약으로 분무하여 발색시켜 표준 인지질과 비교하여 검색하였다. 인지질의 함량은 발색도를 densitometer(digital densitometer-DNN-33L ; Kagaku Sangyo)로서 측정함으로서 정하였다.

※ Dittmer 시약

A액 : 25N H_2SO_4 100ml에 MoO_3 4.01g을 가하여 잘 저으면서 가열용해 시킨다.

B액 : A액 50ml에 분말 molybden 0.18g을 가하여 잘 저으면서 가열용해 시킨다.

A액과 B액을 같은 양으로 혼합하며, 그 혼합액에 2배의

증류수를 가하여 발색시약으로 사용하였다.

TPase의 활성과 성접합관 측정

부분정제한 TPase는 Miyakawa 등의 방법(6)에 의하여 조제하였으며, TPase의 활성측은 Jeong 등의 방법(10)에 따라 행했다. 즉, 1mM DTT(Dithiothreitol), CaCl₂, 0.7% OG(n-octyl-β-D-glucopyranoside)가 함유된 0.01M phosphate buffer(pH7.0) 1ml을 반응액으로 하며 여기에 효소액과 30U의 Rh.A를 혼합하여 28°C에서 30분간 반응하여 Rh.A의 실활정도로서 TPase의 성을 측정하였다. TPase 1U는 1분간에 1U의 Rh.A활성을 실활시키는 효소활성으로 정의한다.

또한, Rh.A를 대수증식기에 있는 접합형 a세포에 가했을 때 생성되는 접합관형성균을 측정하여 총균수에 대한 percentage로서 산출하여 성접합관 형성율을 정하였다.

Rh.A의 생산

대시험관(φ1.3×18cm)에 5ml의 YPG배지를 넣고 slant로부터 *R.toruloides* 접합형 A세포를 한 백금이 이식하여 하룻밤동안 전배양을 행한다. 500ml의 Δ-flask에 100 ml YPG를 넣은 생산 배지에 전배양한균을 2% 이식하여 약 18시간~20시간 배양하여 균의 생육이 1-3×10⁶ cells/ml정도 되는 시기에 원심분리(11,000×g, 10분, 4°C)에 의하여 집균한다. 배양액에 존재하는 Rh.A의 활성을 측정(5)함으로써 생산정도를 확인하였다.

결과 및 고찰

TPase활성에 미치는 인지질의 영향 TPase는 세포막에 존재하는 단백질로서 세포를 파쇄하여 막으로부터 가용화한 단백질을 정제한 물질(6)이다. 본래 정제 TPase의 활성은 아미노 인지질인 phosphatidylserine(PS)과 phosphatidylethanolamine(PE)에 의존한다는 결과가 보고된 바 있다. (6). 본 실험에서는 기존의 PS, PE와 *R. toruloides* 유래의 세포막 인지질이 TPase활성에 미치는 영향을 비교 검토하였다. 인지질 5μg 이상에서는 효소활성에 뚜렷한 차이를 보이지 않았으나 5μg 이하의 적은양에서는 세포유래의 인지질이 PS, PE보다 TPase활성에 미치는 의존도가 월등히 높다는 사실을 확인할수 있었다(Fig. 1 참조). 이 결과에 의하여 TPase가 막단백효소 특유의 인지질 의존성을 나타내는 특성을 재확인할수 있었으며, PS, PE와 같은 단일 인지질 성

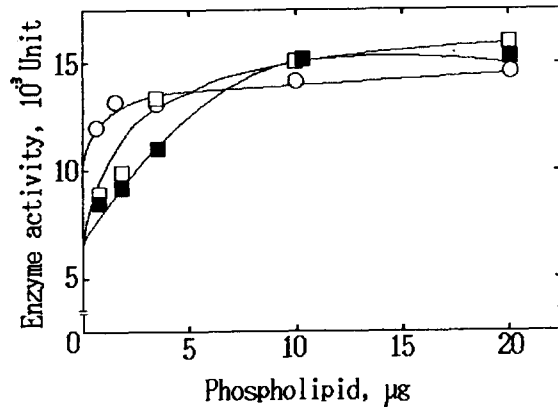


Fig. 1. Activation on of TPase by various phospholipid.

- : Phospholipids of *R. toruloides*
- : Phosphatidylethanolamine
- : Phosphatidylserine

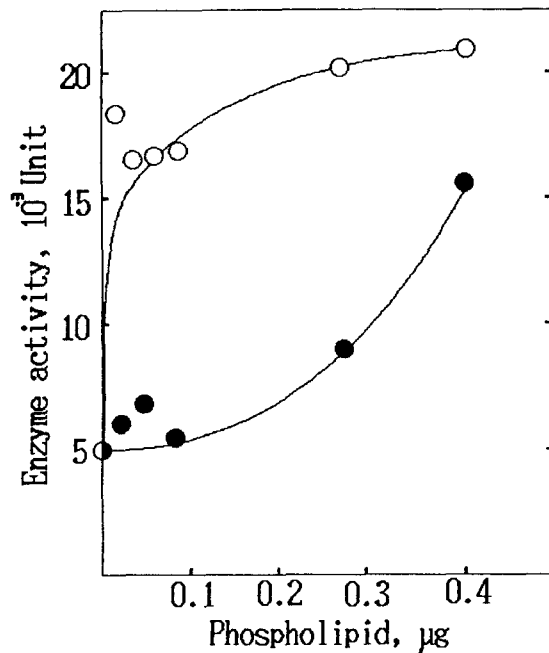


Fig. 2. Effect of phospholipids liposome on activation of TPase.

- : Liposomes
- : Phospholipids

분보다 세포 유래의 복합 인지질이 소량으로도 민감하게 TPase의 활성화에 작용하는 사실을 확인할 수 있었다.

또한, 상기의 결과를 바탕으로 세포 유래의 인지질과 그의 liposome에 대한 효과를 비교하였다. Fig. 2에서 보이는 바와같이 인지질 자체보다 인지질 liposome이 TPase활성을 크게 높이는 것을 알았다. 이는 TPase가 막단백질로서 막의 인지질의 2중층에 함몰하여 존재하면서 활성발현을 행하고 있는 막단백질의 특성을 잘 나타내보이는 결과라 하겠다. 특히, 이 결과는 Jeong등(9)이 정제TPase로서 인공 인지질 liposome에 재구성하여 활성발현을 실시한 결과와 일치하고 있다.

R. toruloides 세포유래 인지질의 조성

R. toruloides 세포막 분획으로부터 인지질을 추출하여 TLC에 의한 인지질의 조성을 조사하였다. Fig. 3과 같이 phosphatidylglycerol(PG)이 12.9%, phosphatidylethanolamine(PE)이 45.4%, phosphatidylcholine(PC)이 11.0%, phosphatidylinositol(PI)이 10.5%, phosphatidylserine(PS)이 13.9% 등의 조성을 보였다. 특히, TPase의 활성화에 관여하는 것으로 보고(9)된 바 있는 아미노 인지질인 PE와 PS가 전체 인지질의 약 60%를 차지하는 특성을 보였다. 그중 PE는 45.4%로서 거의 절반을 차지하는 조성

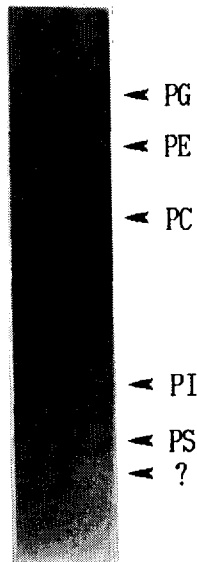


Fig. 3. Composition of phospholipids in *R. toruloides*.

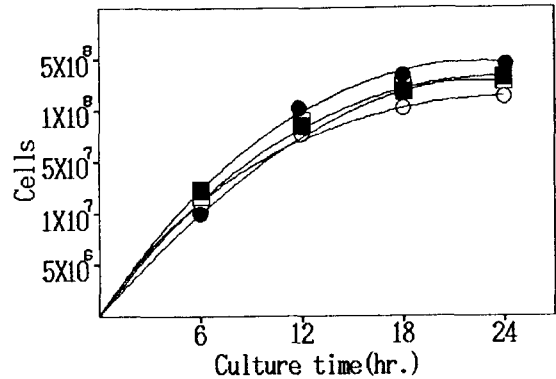


Fig. 4. Cell growth of *R. toruloides* mating type a cells in various mediums.

●-● : YPG medium ○-○ : MM medium
□-□ : C-1 medium ■-■ : N-1 medium

을 보였다(Fig. 3). Data는 실지 않았으나 이들 인지질의 조성은 본 효모에 있어 접합형 A세포와 a세포에서 거의 동일한 것을 확인할 수 있었다.

제한배지에서 배양된 a세포의 Rh.A수용력

접합형 a세포를 각각 다른 배지 즉, C원을 제한한 C-1배지와 N원을 제한한 N-1배지 그리고 최소배지인 MM배지에서 대수증식기 까지 배양한 세포에 대하여 Rh.A의 수용력을 검토하였다. 이들 제한 배지들은 인지질의 완벽한 합성을 저지할 것으로 예상되어 이러한 배지조건에서 생육된 a세포가 Rh.A의 수용력에 영향이 있을것으로 예상했다. a세포의 Rh.A수용력은 a세포와 접촉한 Rh.A의 실활정도로서 산정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 제한 배지에서 배양된 세포와 YPG배지에서 배양된 세포는 거의 동일한 생육을 행하였으므로 Rh.A수용력 검정을 위한 실험에 전혀 지장이 없을 것으로 판단하였다. 그 결과 Fig. 5에서 나타낸 바와 같이 제한 배지에서는 YPG배지에서 보다 Rh.A수용력이 10-30% 정도 저하되는 사실을 알수 있었다. 특히, N-1배지 조건의 경우 30%감소효과를 보였다. 이 결과로서 미리 언급해 두고 싶은 것은 C원과 N원 그리고 최소배지를 써서 배지조성을 제한 하였다고는 하나 이들 조건이 꼭 인지질만의 합성에 영향을 미치는 것이 아니라는 사실이다. 이 실험에서 한가지 아쉬운 점이 있다면 이들 제한 배지들

사용하였을 때 인지질의 조성구와 량의 변화를 Fig. 3의 결과와 비교했으면 좋았다는 것이다.

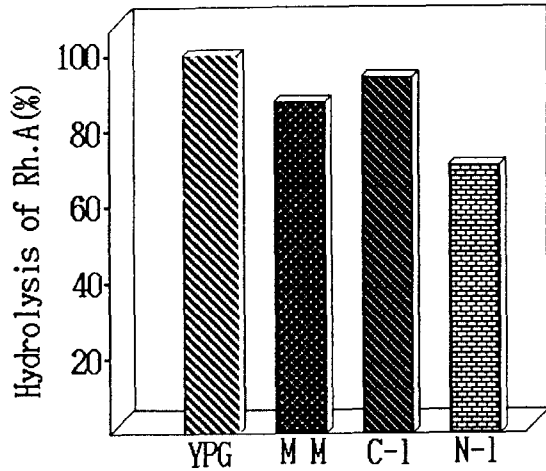


Fig. 5. Hydrolysis percentage of rhodotorucine A by mating type a cells which cultured in each medium.

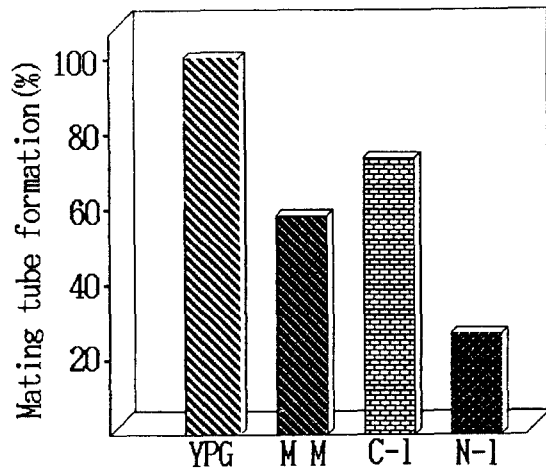


Fig. 6. Mating tube formation of mating type a cells which cultured in each medium.

제한배지조건에서 a세포의 성분화

접합형 a세포가 Rh.A를 수용하는 능력과 세포가 성분화하는 정도는 일치해야 한다. 이를 증명하기 위하여 본 실험을 행하였다. 세포의 성분화 정도의 측정은 Rh.A를 배지중에 가했을때 성접합관을 생성하는 정도로서 파악하였다. 결

과는 Fig. 6에서 보인다. YPG배지 조건에서 배양된 세포의 성분화율을 100%로 하였을 때 N-1배지가 가장 낮은 30%, MM배지가 58%, C-1배지는 70%로 성분화가 저지되는 것을 알았다. 이 결과는 Fig. 5에서 보인 Rh.A의 수용과 비교할 때 수치적으로 차이가 있으나 N-1배지가 Rh.A수용과 성분화에 있어 가장 크게 저지되는 것으로 보아 일치하는 결과를 얻을수 있었다. 마찬가지로 MM배지와 C-1배지 조건에서도 같은 결과가 도출된 것을 고려할 때 C원과 N원은 본 효소의 성분화에 중요한 요소임을 알 수 있었다.

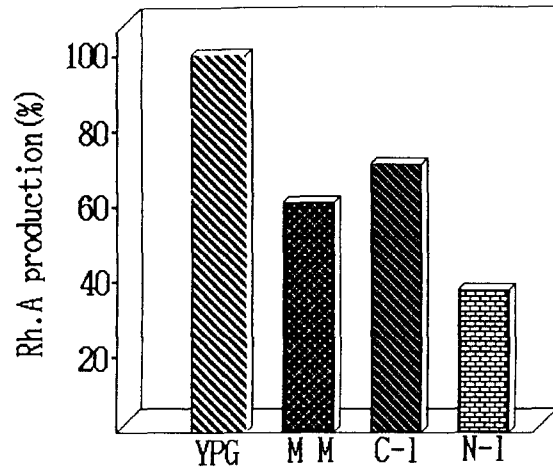


Fig. 7. Rhodotorucine A production by mating type a cells which cultured in each medium.

제한배지가 Rh.A생산에 미치는 영향

각 제한배지의 조건에서 접합형 A세포에 의한 Rh.A의 생산력을 완전배지인 YPG와 비교 검토하였다. 그 결과 Rh.A의 생산에 있어서도 N원을 제한하였을 때 YPG배지에서의 생산을 100%로 하였을때와 비교하여 41%로 강한 저지를 보였다. 그리고 MM배지에서는 60%, C-1배지에서는 72%로 YPG에 비하여 생산억제의 결과로 나타났다. 이들 결과는 앞서 언급한 a세포에서 Rh.A의 수용이나 성분화율에 미치는 영향과 동일한 결과를 보였다. 그러므로 배지의 C원과 N원의 제한은 접합형 a세포에서는 Rh.A의 수용과 동시에 성분화율을 저지했으며 A세포에서는 Rh.A의 생산을 저지하였다. 이는 C원과 N원의 제한으로 세포내 다양한 변화를 초래할수 있으나 그중 인지질의 합성 저해를 예상할수 있다. 그러나 YPG배지와 C-1, N-1배지를 사용했을 때

세포내 인지질 합성에 대한 비교를 하지못하여 큰 아쉬움으로 남는다.

요 약

이담자균 효모 *Rhodosporidium toruloides* 접합형 a세포가 상대 접합형 A세포가 분비하는 Rhodotorucine A(Rh.A)를 수용하는 과정에서 인지질의 효과와, 배지조성을 한정시킨 조건에서 성분화에 미치는 영향을 검토하였다.

a세포에서 Rh.A를 수용하는 receptor인 trigger peptidase (TPase)의 활성은 *Rhodosporidium toruloides* 유래의 인지질에 매우 민감하게 의존하였다. 그러나 인지질로 형성된 phospholipid liposome에 의한 TPase의 활성의존도가 더 컸다.

Rh.A수용세포인 a세포의 막에 존재하는 인지질의 조성은 phosphatidylglycerol(PG), phosphatidylethanolamine(PE), phosphatidylcholine(PC), phosphatidylinositol(PI), phosphatidylserine(PS)이 각각 12.9, 45.4, 11.0, 10.5, 13.9%를 나타냈다. 그중에서 PE가 약 반을 차지하는 특성을 보였다.

인지질의 합성을 저해할 수 있는 C원과 N원을 제한한 C-1배지, N-1배지를 사용하여 균을 배양해본 결과 N원을 제한했을 경우가 성분화와 Rh.A생성에 있어 강하게 저해하는 결과를 보였다.

감사의 말

본 연구는 1992년 과학재단 핵심전문연구과제 연구비 지원(과제번호 KOSEF 921-1500-056-2)에 의하여 행한 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Bano, I. : Studies on sexuality of *Rhodotorula*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 13, 167-196(1967).
2. Abe, K., I. Kusaka, and S. Fukui. : Morphological change in the early stage of the mating of *Rhodosporidium toruloides* M1057, a strain of mating type a. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 24, 287-290(1975).
3. Kamiya, Y., A. Sakurai, S. S. Tamura, E. Tsuchiya, A. Abe and S. Fukui. : Structure of rhodotorucine A, a peptidyl factor inducing mating tube formation in *Rhodosporidium toruloides*. *Agric. Biol. Chem.*, 43, 363-369(1979).
4. Jeong, Y. K., T. H. Lee, Y. L. Choi and W. D. Kang. : Characterization of sexual agglutination and involvement of cel-surface protein sexual cell-cell interaction of heterobasidiomycetous yeast. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 249-254(1995).
5. Miyakawa, T., M. Nishihara, E. Tsuchiya and S. Fukui. : Role of metabolism of the mating pheromone in sexual differentiation of the heterobasidiomycetous *Rhodosporidium toruloides*. *J. Bacteriol.*, 151, 1184-1194(1982).
6. Miyakawa, T., Y. K. Jeong, M. Kaji, E. Tsuchiya and S. Fukui. : Purification and characterization of a Ca^{2+} -dependent membrane peptidase involved in the signaling of mating pheromone in *Rhodosporidium toruloides*. *J. Bacteriol.*, 169, 1626-1631(1987).
7. Jeong, Y. K., B. W. Kim. : The comparison of the characteristics of partially purified internal invertase by mating type in the Heterobasidiomycetous yeast. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 625-629(1992).
8. Jeong, Y. K., B. H. Ryu. : Purification of internal invertase in *Rhodosporidium toruloides* Mating type A cells. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 21, 725-730(1992).
9. Jeong, Y. K., T. Miyakawa, A. Imabayashi, E. Tsuchiya and S. Fukui. : Interaction with phospholipids of a membrane thiol peptidase that is essential for the signal transduction of mating pheromone in *Rhodosporidium toruloides*. *Eur. J. Biochem.*, 169, 511-515(1987).
10. Jeong, Y. K., T. H. Lee and K. T. Jeong. : Relation of Ca^{2+} -ATPase and Trigger peptidase(TPase) that are membrane protein in a differentiation process on heterobasidiomycetous yeast. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 1-6(1994).