

## 이담자효모 *Rhodosporidium toruloides*의 성pheromone(Rh.A)에 의한 성접합형 특이적 인산화 저해 반응

정 영 기<sup>†</sup>

동의대학교 미생물학과

### Mating-type-specific inhibition of phosphorylation by sexual pheromone (Rh. A) on heterobasidiomycetous yeast *Rhodosporidium toruloides*.

Yong-Kee Jeong<sup>†</sup>

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

#### Abstract

Two phosphorylated proteins having molecular weights of 57kD and 72kD were detected from the solubilized membrane protein fraction of mating type a cells of *Rhodosporidium toruloides* which belongs to heterobasidiomycetous yeast.

The phosphorylation of the protein was inhibited by a sexual pheromone, Rhodotorucine A (Rh. A), which is secreted from mating type a cells. On the other hand, counterpart mating type A cells and M-39 strain which is a sterile mutant derived from a cells, had also the same two phosphorylated proteins. However, the phosphorylation of the protein from A cells and M-39 strain were not inhibited by the Rh. A.

It suggests that inhibition of the phosphorylation reaction by the Rh. A in mating type a cells is a mating-type-specific reaction that relate to transduction mechanism of sexual pheromone signaling.

**Key words :** *Rhodosporidium toruloides*, RhodotorucineA, Phosphorylation, Membrane protein, Sexual pheromone.

#### 서 론

이담자균 효모 *Rhodosporidium toruloides*<sup>1)</sup>는 접합형이 서로 다른 A형과 a형으로 존재하고 있으며 1배체에서는 각각 출아 분열에 의하여 영양 증식을 행하고 있다. 이들은 영양 증식 과정에서 상호간에 상대 접합형 영양 세포에 대해 성 분화를 유도하는 sexual pheromone을 분비하는데,

A세포는 rhodotorucine A를 구성적으로 분비하고, a형 세포는 rhodotorucine a를 유도적으로 분비한다.

각 영양 세포는 상대 세포의 sexual pheromone을 수용하면 세포 주기의 G1기에서 영양 증식을 멈추고 상대 접합 세포를 향하여 긴 접합관을 생성하면서 생식세포로 분화한다. 이 과정을 본 연구에서는 성분화 과정이라 정하고 연구를 진행하였다.

<sup>†</sup> Corresponding author

접합형 A세포가 생산 분비하는 rhodotorucine A는 1975년 Abe<sup>2)</sup> 등에 의하여 발견되어 정제된 후, 1978년 Kamiya 등에 의하여 화학 구조가 결정되었으며, 그 구조는 화학합성에 의하여 확인되었다.<sup>3)</sup> Rhodotorucine A의 구조는 11개의 amino 산 잔기로 되어 있고 C말단의 cysteine 이, polyisoprenoid, farnesyl기로서 수식된 lipopeptide 형태로 되어 있다.

Rhodotorucine A의 정보가 표적세포인 a세포 내로 전달되는 과정의 연구<sup>4)</sup>에서, a세포와 rhodotorucine A를 함께 incubation시킨 결과 pheromone은 세포 표면과 접촉함으로써 가수분해되어 실험 됨을 알 수 있었다. 이 결과는 세포의 표면에 pheromone의 수용체 역할을 함과 동시에 pheromone을 가수분해하는 물질이 존재함을 강하게 시사했다.

그 후 a세포표면에는 trypsin형의 thiol계 효소 endopeptidase가 pheromone대사에 관여하고 있음을 알게 되었다.<sup>5)</sup>

Miyakawa와 필자 등은 세포 표면에 존재하는 효소형 수용체에 대해 trigger peptidase(TPase)라 명명하고 이를 세포 표면으로부터 분리 정제하여 그 특이성과 제성질을 파악했다.<sup>6)</sup> 또, Jeong 등은 정제한 TPase를 phospholipid liposome에 reconstitution하는데 성공하였다.<sup>7)</sup> 필자 등은 접합형 a세포 표면 단백질은 TPase가 Rh. A를 가수분해함과 동시에 성 pheromone의 정보를 세포내로 전달하면서 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도가 증가하는 등 급작스런 생리적 변화를 보고한바 있다.<sup>8)</sup>

아울러 최근에는 TPase주변의 Ca<sup>2+</sup>-ATPase의 존재를 발견하여 정보 전달 관련설을 파악하고<sup>9)</sup> 나아가 TPase와 막단백질의 인산화에 대한 관계도 규명한 바 있다.<sup>10)</sup>

이러한 일련의 연구 과정에 이어서 Rh. A에 의하여 저해되는 막단백질의 인산화 반응은 접합형 특이적인 반응임을 증명하였기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배양

균주는 *Rhodosporidium toruloides* IFO 0559-M919(접합형 A, 적색 colony 형성)와 *R. toruloides* IFO 0880-M1057(접합형 a형, 황색 colony 형성), 그리고 IFO 0880-1057(접합형 a형) 유래의 성분화 결손변이주 *R. toruloides*

M-39(Sterile mutant-39)를 사용하였다. 배양은 500ml의 진탕 flask에 chloramphenicol 50μg을 첨가한 YPG배지(2% glucose, 0.4% yeast extract, 0.5% polypeptone, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.005% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O) 100ml를 배양온도 28°C에서 진탕 배양을 행했다.

### 세포막단백분획 및 막단백질 가용화 분획의 조제

접합형 a형 세포를 500ml 진탕 flask에 YPG배지 100ml단위로 진탕 배양 한 후 대수증식기(1~2×10<sup>7</sup> cells per ml)에서 집균하였다. 균체를 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.3)로서 2회 씻은 후 French press(20,000 p.s.i)에 통과시켜 파쇄하였다. 20분간 원심분리 (11,000×g)하여 얻은 침전물을 상기의 buffer로서 현탁하여 3~4회 깨끗이 씻은 후 세포막 단백질분획으로 하였다. 이 분획을 4%의 Nonidet P-40에 현탁하여 얼음 속에서 0°C의 저온을 유지하면서 1분간씩 3회 Sonication(Ultrasonic cleaner, Branson 1200)을 가하여 막결합 단백질을 추출하였다. 그 후 4°C에서 1시간 동안 방치한 후 원심분리 (11,000×g per min, 60mins)하여 침전을 제거한 상층을 세포막 단백질 가용화 분획으로 하였다.<sup>9)</sup>

### Rhodotorucine A

Merrifield의 방법<sup>11)</sup>에 따라 고상법을 이용하여 합성하였다. 합성된 peptide는 Kamiya 등의 방법<sup>3)</sup>에 의하여 peptide C-말단에 farnesyl기를 부가하였다. 합성이 완료된 Rhodotorucine A (Rh. A)는 Sephadex LH-20 column chromatography(Φ1.3cm×130cm 0.5mM DTT를 함유)를 통하여 정제하였다. 최종 Rh. A는 생리 활성 검증을 거쳐 활성의 유무를 확인한 다음 실험에 사용하였다. Rh. A 1unit라 함은 검정균(접합형 a형균)에 작용하여 접합관 형성이 30%가 되게 하는 Rh. A의 양으로 정의하였다.

### Rhodotorucine A Sulfoxide(Rh. A S-oxide)

Rh. A S-oxide는 Kamiya 등의 방법<sup>3)</sup>에 의하여 Rh. A를 산화시킴으로서 조제하였다. 즉, Rh. A 150units를 10mM phosphate buffer(pH 7.0)에 녹이고 여기에 0.1% NaIO<sub>4</sub>를 가하여 28°C에서 12시간 반응하였다. 반응후 반응액에 적당한 량의 증류수를 가하여 n-butanol 추출을 2회 반복 실시했다. Butanol층을 회수하여 증류수로 2회 가량 세척

후 buthanol을 제거하고 생물검정에 의하여 활성이 없는 것을 확인하고 methanol에 녹여서  $-30^{\circ}\text{C}$ 에 보관하면서 실험에 사용하였다.

SDS-polyacrylamide gel 전기영동 및 Autoradiography [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP에 의한 *in vitro* 인산화 반응을 한 다음, sample을 Laemmli 등이 행한 방법<sup>12)</sup>으로 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 했다.

영동후, coomassie blue (BIO-RAD, R-250)에 의하여 단백질을 염색하고 탈색, gel건조를 행했다. [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]APT로서 인산화된 band의 검출은 autoradiography로서 출현시켰다. 즉, X선 film(Kodak, X-OMIT R or S)을 건조 gel과 증감지(DUPONT, CRONES)의 사이에 끼워  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 2일간 방치한 후 현상하였다.

이 과정에서 필요한 단백질의 정량은 Lowry법<sup>13)</sup>에 의하여 실시하였다.

#### 단백질의 *in vitro* 인산화

단백질의 *in vitro*인산화 반응을 위하여 2mM의  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ 를 함유하는 10mM Tris-HCl buffer(pH 7.3)에 막 단백질 가용화 표품 15 $\mu\text{g}$ 과 [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP 2 $\mu\text{Ci}$ , Rh. A 30 u를 포함하는 반응액을 총량 50 $\mu\text{l}$ 이 되도록 조제하였다. 인산화 반응은 [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP(Amersham)를 가하는 것으로부터 시작된다. Rh. A 존재 하에서 시행할 경우에는 [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP를 첨가하기 전에  $0^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 단백질과 Rh. A만을 preincubation한다. 인산화 반응은  $0^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 행하고 SDS-PAGE용 sample buffer를 첨가한 후  $100^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 반응하는 것에 의하여 반응을 정지시켰다. 인산화 단백질의 검출은 인산화 반응 후 sample을 SDS-PAGE하여 gel을 건조시킨 다음 autoradiography함으로써 할 수 있었다.

#### 비변성 단백질 전기영동 및 인산화

비변성 전기영동은 슬레브 겔의 크기  $1 \times 180 \times 180\text{mm}$ 로 제작한 것을 사용하였다.

앞서 언급한 가용화한 막단백질을 0.01M Tris-HCl buffer(pH 7.3)로서 5배 희석하여 최종 detergent의 농도가 0.8% 이하 되도록 처리하였다. 그런 다음 30%의 sucrose를 적당량 가하여 전기영동 표품단백질로 하였다.  $4^{\circ}\text{C}$ 의 냉실에서 6mA의 전류를 흘려 약 14시간 전기영동한 후 겔을

buffer A(20mM HEPES, 0.1mM DDT, 0.7% OG(n-octyl  $\beta$ -D-glucopyranoside), 1mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 $\mu\text{g}/100\text{ml}$  phosphatidylethanolamine)에 잘 세척하여 비변성 전기영동 표품으로 하였다.

단백질의 인산화 반응은, 상기의 비변성 전기영동 gel을 1 lane씩 잘라 buffer A 3ml을 반응액으로 하여 비닐봉지에 gel과 함께 넣고 여기에 [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP 5 $\mu\text{Ci}$ 를 가함으로써 반응을 개시하여 비닐입구를 잘 봉합하고 실온에서 30분간 반응시킨다.

반응은 10% methanol과 10% 초산용액의 혼합액에 담구어서 종료시킨다. 반응이 끝난 gel은 10mM의 EDTA, 50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 50mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 을 함유하는 수용액에서 잘 세척한 후 건조하여, 인산화 단백질의 검출은 autoradiography로서 하였다.

## 결과 및 고찰

#### 막 가용화 단백질중 인산화단백질의 확인

접합형 a세포의 막 가용화 단백질을 SDS-PAGE를 행하여 coomassie blue에 의하여 단백질 염색을 하고 다른 한편은 [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP에 의하여 인산화 되는 단백질을 검출하였다. Fig.1에서 보이는 바와 같이 막단백질은 예상대로 많은 종류가 검출되고 있었으나 그중 인산화되는 단백질은 57kD와 72kD의 단백질만이 특이하게 인산화 되는 것을 알았다. 뿐만 아니라 비변성 전기영동에 의하여 검출된 단백질도 인산화되는 것을 확인할 수 있었다. 비변성 단백질인산화의 결과는 필자 등이 최근에 보고한<sup>12)</sup> 결과와 일치함을 재확인하였다.

#### 막 파쇄 및 가용화획분의 인산화 단백질은 동일한가

막단백질을 추출하기 위하여 a세포를 파쇄하여 정해진 완충용액에 잘 씻어 가용화하는 과정을 거쳐 단백질을 회수하게 된다(재료 및 방법참조). 인산화 단백질이 세포막으로부터 정확하게 회수되었는지 막파쇄분획(가용화 전단계의 분획)과 가용화후의 단백질 표품으로 인산화의 특성을 비교하였다. Fig. 2와 3에서 보는 바와 같이 partial fraction(막 파쇄 분획)에서 인산화되는 57kD와 72kD의 단백질이 검출되었다. 또 이들 인산화 단백질은 Rh. A에 의하여 인산화의 저해를 보였다. Rh. A의 인산화 저해현상은 산화에

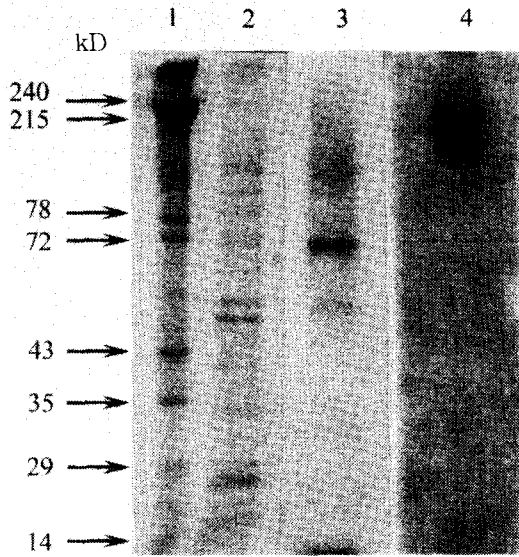


Fig. 1. Phosphorylation of solubilized membrane proteins in denaturing and nondenaturing gel by  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  and coomassie staining.

lane1, Molecular marker(red blood cell protein) ; lane2, Solubilized fraction on SDS-PAGE(coomassie staining) ; lane3, Solubilized protein phosphorylation on SDS-PAGE ; lane4, Solubilized protein phosphorylation on non denaturing gel.

의하여 Rh. A의 활성을 실패 시킨 Rh. A S-oxide에 의해서 회복되었다. 이 결과는 최근 필자 등이 보고한 비변성 단백질 전기영동에 의한 인산화의 결과와 일치하였다.<sup>10)</sup> 똑같은 결과가 가용화한 단백질로 인산화한 Fig.3에서도 일치하는 것을 알았다.

그러므로 세포막 파쇄분획의 인산화 단백질은 정확하게 가용화되어 양 단백질이 동일 단백질임을 확인할 수 있었다.

#### 접합형 특이적 인산화 반응의 확인

접합형 A세포가 생산하여 a세포가 수용함으로써 유성적 성분화를 유도하는 signal 전달 물질이 rhodotorucine A(Rh. A)이다. 이 Rh. A의 제반 반응과 역할은 접합형 a세포에만 특이적으로 나타나는 것은 현재까지 밝혀진 사실이다.

만약 전술한 결과에서 Rh. A가 인산화를 저해하는 현상이 성분화 signal의 전달 반응과 밀접한 관계가 있는 반응

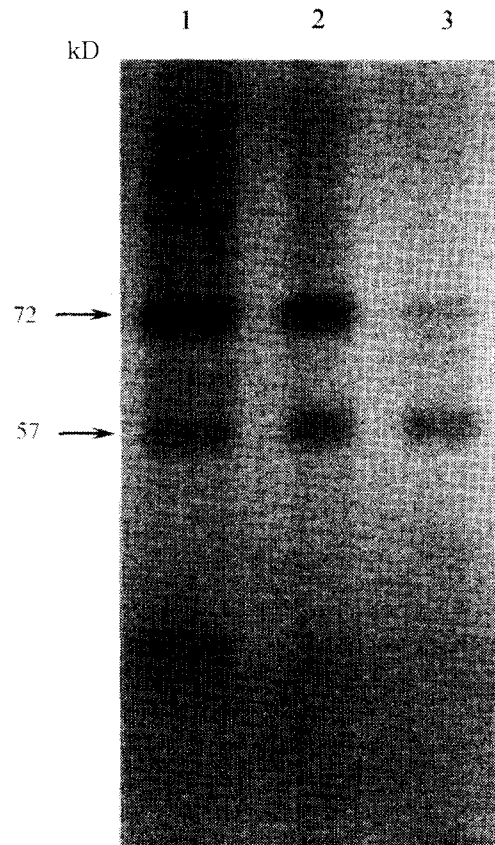


Fig. 2 Effect of rhodotorucine A on *in vitro* phosphorylation of particulated fraction with SDS-PAGE.

lane1, - Rh. A ; lane 2, + Rh. A S-oxide(prepared by 32U of Rh. A) ; lane3, + Rh. A

이라면 이 인산화에 대한 Rh. A의 저해반응은 a세포에서만 나타나는 특이성이 있어야 하기에 A형세포, M-39(a세포유래의 성분화 결손변이주)와 함께 동일한 방법으로 인산화 저해유무를 검토하였다.

결과는 Fig. 4에서 보이는 바와 같다. 접합형A세포와 M-39균주에서도 a세포와 같은 인산화 단백질이 존재하였으나 Rh.A에 의한 영향은 a세포 유래의 인산화 단백질만이 저해를 받는 반면 A세포나 M-39균주 유래의 세포에서는 Rh. A가 인산화 반응에 아무런 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다. 그러므로 Rh. A에 의한 선택적인 단백질 인산화 저해 반응은 a세포가 성분화 정보물질인 Rh. A를 수용

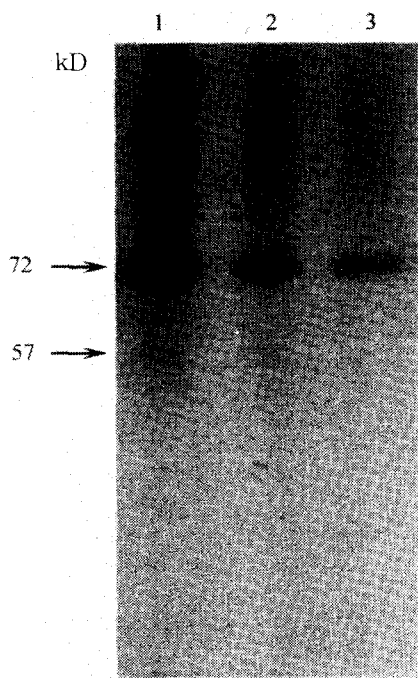


Fig. 3. Effect of rhodotorucine A on *in vitro* phosphorylation of solubilized fraction with SDS-PAGE.

lane1, - Rh. A : lane 2, + Rh. A S-oxide(prepared by 32U of Rh. A) : lane3, + Rh. A(32U)

할 때 그 signal이 세포내로 전달되는 과정에서 발생하는 성접합형 특이적인 반응으로 확인되는 중요한 사실로 사료 된다.

외래 단백질에 대한 인산화 반응의 유무

본 실험의 인산화 반응은 세포막에 존재하는 단백질이 *protein kinase*의 작용에 의하여 효소학적 촉매반응으로 인산화 될 수도 있을 것이며, 특이한 단백질에 인산이 물리적으로 결합 가능성도 배제할 수 없을 것이다. 그러므로 인산화 반응시 막단백질 표품에 외래의 단백질인  $\kappa$ -casein을 혼합하여 인산화 유무를 확인함으로써 본 인산화계에서 *protein kinase*의 작용 여하에 따른 인산화인지를 규명할 수 있다.

그 결과 Fig. 5에서 보이는 바와 같이  $\kappa$ -casein도 완벽하게 인산화되었다.

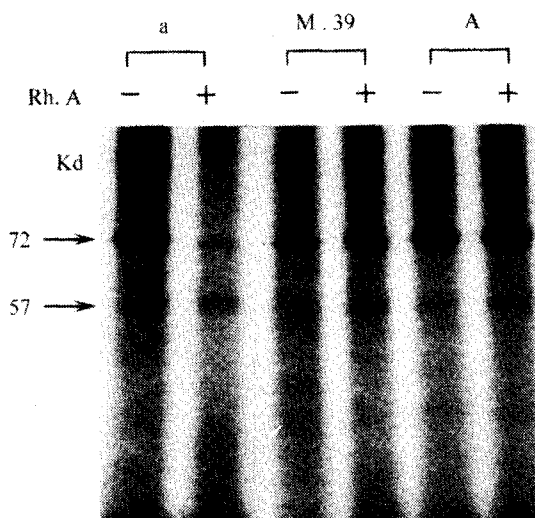


Fig. 4. Inhibition of *in vitro* protein phosphorylation by Rh. A and its mating type-specificity.

a, *Rhodosporidium toruloides* IFO 0880-M1057 (mating type a) ; M-39, *R. toruloides* M-39(sterile mutant) ; A, *R. toruloides* IFO 0559-M919 (mating type A)

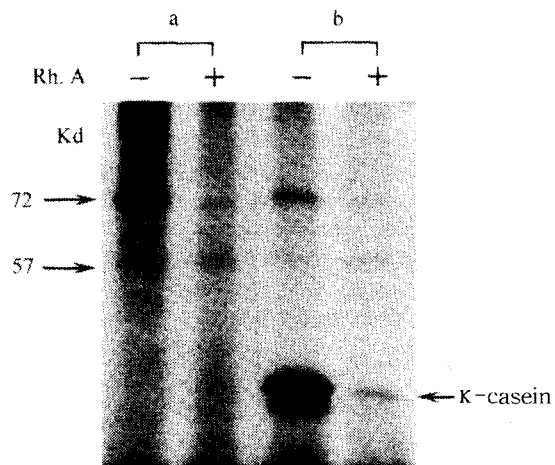


Fig. 5. Phosphorylation of exogenous protein,  $\kappa$ -casein, by solubilized membrane protein.

a, no  $\kappa$ -casein ; b, added  $\kappa$ -casein

아울러 세포막 인산화 단백질인 57kD, 72kD과 마찬가지로 외래단백질인  $\kappa$ -casein역시 Rh. A에 의하여 인산화가 저해됨을 알았다.

이상의 결과에서 추측할 수 있는 것은 인산화 촉매반응에 관여하는 proteinkinase의 활성이 Rh. A에 의하여 저해 받아 그 결과 인산화가 저해 받는 현상으로 나타날 수 있다는 것이다.

즉, a세포가 Rh. A를 수용하면 그 정보가 세포내로 전달 되는 과정에서 평소에 활성화되어있던 proteinkinase가 저해 받아 인산화 저해현상으로 나타남을 강하게 시사한다. 인산화 저해반응의 연결된 세포의 생리작용은 앞으로 연구를 계속해야 할 과제로 사료된다.

## 요 약

이담자 효모 *Rhodospidium toruloides*의 접합형 a세포의 가용화 분획에서 인산화단백질 57kD와 72kD를 검출하였다. 이 단백질의 인산화는 접합형 A세포가 분비하는 sexual pheromone, Rhodotorucine A(Rh. A), 에 의하여 저해되었다.

한편, 상대접합형 A세포와 a세포유래의 성분화 결손 변이주 M-39에서도 인산화되는 57kD와 72kD가 각각 존재 하였다. 그러나 A세포와 M-39균주의 인산화 단백질은 Rh. A에 의하여 인산화 반응이 저해 받지 않았다. 그러므로 접합형 a세포에서 Rh. A에 의한 인산화 저해현상은 성pheromone 정보의 전달기구에 관여하는 성분화 특이적인 반응으로 사료된다.

## 사 사

본 논문은 1992년도 한국과학재단 연구조성비의 지원에 의하여 수행된 과제(KOSEF 921-1500-056-2)의 일부이며, 지원에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Bnno, I. Studies on sexuality of *Rhodotorula*, *J.Gen. Appl. Microbiol.* 13, 167-169(1967).
2. Abe, K., I.Kusaka, and S. Fukui, Morphological change in the early stages of *Rhodospidium toruloides*

- M1057, a strain of mating type a. *J.Gen. Appl. Microbiol.* 24, 287-290(1975).
3. Kamiya, Y., A. sakurai, S. Tamura, E. Tsuchiya, K. Abe, and S. Fukui, Structure of rhodotorucine A, a peptidyl factor inducing mating tube formation in *Rhodospidium toruloides*. *Agric. Biol. Chem.* 43, 363-369(1979).
4. Miyakawa, T., M. Nishihara, E. Tsuchiya, and S. Fukui. Role of metabolism of the mating pheromone in sexual differentiation of the heterobasidiomycetous *Rodosporidium toruloides*. *J. Bacteriol.* 151, 1184-1194(1982).
5. Miyakawa, T., Y. K. Jeong, E. Tsuchiya and S. Fukui. Involvement of protein sulfhydryls in the trigger reaction of rhodotorucine A, a farnesyl peptide mating pheromone of *Rhodospidium toruloides*. *J. Bacteriol.* 162, 294-299(1985).
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 *Rhodospidium toruloides*. *J. Bacteriol.* 169, 1626-1631(1987).
7. Jeong, Y.K., T. Miyakawa, A. Imabayashi, Tsuchiya and S. Fukui. Interaction with phospholipids of a membrane thiol peptidase that is essential for the signal transduction of mating pheromone in *Rhodospidium toruloides*. *Eur. J. Biochem.* 169, 511-515(1987).
8. Miyakawa, T. T. Tachikawa, Y. K.Jeong, E. Tsuchiya, and S. Fukui. Transient increase of  $Ca^{2+}$  uptake as signal for mating pheromone-induced differentiation in the heterobasidiomycetous yeast *Rhodospidium toruloides*. *J. Bacteriol.* 162, 1304-1306(1985).
9. Jeong, Y. K., T. H. Lee and K. T. Jeong, Relation of  $Ca^{2+}$ -ATPase and Triggerpeptidase(TPase) that are membrane proteins in a differentiation process on heterobasidiomycetous yeast *Rhodospidium toruloides*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24(6), 641-646(1994).
10. Jeong, Y. K., T. H. Lee and B. H. Ryu, Inhibition of membrane protein phosphorylation by rhodotorucine A and involvement of trigger peptidase in this reaction in heterobasidiomycetous yeast *Rhodospidium toruloides*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24(6), 641-646(1996).
11. Magline, A and R. B. Merrifield. Chemical synthesis of peptides and peptides and proteins, *Ann. Rev. Biochem.* 39, 841-866(1970).

정 영 기

12. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227 : 680-685(1970).
13. Lowry, O. H. and N. J. Reasbrough. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-276(1951).