

이담자효모 *Rhodospiridium toruloides*의 막단백질 인산화와 성 Pheromone, Rhodotorucine A의 작용

정 영 기

동의대학교 미생물학과

Effect of Sexual Pheromone on Phosphorylation of Membrane Protein in Heterobasidiomycetous Yeast *Rhodospiridium toruloides*

Yong-Kee Jeong

Dept. of Microbiology, Dong-eui University, Pusan 614-714, Korea

Abstract

When the membrane protein fraction of mating type a cells of heterobasidiomycetous yeast *R. toruloides* was phosphorylated *in vitro*, two phosphorylated proteins of 72Kd and 57Kd were detected on SDS-polyacrylamide gel. The phosphorylation reaction was inhibited by rhodotorucine A(Rh. A) which is a sexual pheromone secreted by mating type A cells. The inhibition of phosphorylation by Rh.A was dependent on Ca^{2+} , and independent on Mg^{2+} or calmodulin. When adding trigger peptidase (TPase) inhibitor, antipain, no inhibition of phosphorylation was observed. Also, by adding the trypsin-digested product of Rh. A, the phosphorylation was inhibited as the action of Rh. A. From these results, it is expected that the inhibition of membrane protein phosphorylation should be caused by the digested product of Rh. A with TPase.

Key words: phosphorylation, membrane protein, rhodotorucine A, heterobasidiomycetous yeast, *Rhodospiridium toruloides*

서 론

*Rhodospiridium toruloides*는 이담자효모(1)로서 각각 서로 다른 접합형 A형과 a형으로 나뉘어 존재하고 있으며 1배체에서는 출아에 의하여 영양증식을 행한다(2). *R. toruloides*는 영양증식 과정에서 상호간에 상대접합형 영양세포에 성분화를 유도하는 sexual pheromone을 체외로 분비하는데, A세포는 rhodotorucine A(Rh. A)를 구성적으로 분비하고 그 상대세포인 a형은 rhodotorucine a를 유도적으로 분비한다.

이들 영양세포는 상대세포의 sexual pheromone을 수용하면 세포주기의 G1기에서 영양증식을 멈추고 상대접합형세포를 향하여 진 접합관을 생성하면서 생식세포로 분화한다. Rh. A는 1978년 Kamiya 등(3)에 의하여 화학구조가 결정되었는데, 그 구조는 11개의 amino산잔기로 되어 있고 C말단의 cysteine이, polyisoprenoid, farnesyl기로서 수식된 lipopeptide 형태로 되어 있다.

Miyakawa 등(4)은 Rh. A가 상대접합형 a세포내로 전달되는 과정의 연구에서 수용세포 표면에 Rh. A를 받아들이는 수용체가 trypsin형의 thiol계 endopeptidase 활성이 있는 것을 보고하였다(5). 그후 a세포 표면에 존재하는 효소형 수용체를 정제하여 trigger peptidase(TPase)라 명명하고 막단백질로서의 특성을 파악하였다(6). Jeong 등(7)은 정제된 TPase를 인지질의 liposome에 재구성(reconstitution)하는데 성공하였으며, Miyakawa 등(8,9)이 파악한 Ca^{2+} -ATPase 와 Rh. A의 관계에 이어 Rh. A의 정보가 a형 세포막을 통과하여 세포내에 전달되는 과정을 세포내외의 주요 단백질의 역할 및 생리학적 변화를 중심으로 연구해오고 있다(10, 11). 그중 세포 막단백질에서 TPase를 중심으로 Ca^{2+} -ATPase와 TPase의 관계(11) 그리고 최근에는 Rh. A의 수용시 TPase와 phosphoprotein과의 관계를 비변성 인산화 반응의 변화로서 규명하여 보고한 바가 있다(12). 본 논문은 전보의 비변성 전기영동에 의한 단백

† To whom all correspondence should be addressed

질 인산화의 규명에 이어 인산화 단백질을 SDS-PAGE 로서 분석하고 Rh. A의 영향과 TPase의 역할을 조사 하였기에 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

균주는 *Rhodospordium toruloides* IFO 0880-M1057 (접합형 a형, 황색 colony)를 사용했으며, 배지는 YPG (glucose 2%, yeast extract 0.4%, polypeptone 0.5%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%)를 사용하였다. 배양은 500ml의 진탕 flask에 chloramphenicol 50 μg 을 첨가한 YPG배지 100ml를 넣고 같은 균주를 전배양한 배양액 2%(v/v)를 접종하여 28°C에서 진탕배양하였다.

세포막 단백분획 및 막단백질 가용화 분획의 조제

접합형 a형 세포를 진탕배양한 후 대수증식기($1 \sim 2 \times 10^7$ cells per ml)에서 집균하였다. 균체를 10mM Tris-HCl buffer(pH7.3)로서 2회 씻은 후 French press(20,000 p.s.i.)에 통과시켜 파쇄하였다. 20분간 원심분리(11,000 $\times g$)하여 얻은 침전물을 상기의 buffer로서 현탁하여 3~4회 깨끗이 씻은 후 세포막 단백질분획(particulate 분획)으로 하였다. 이 분획을 4%의 비이온성 계면활성제 Nonidet P-40에 현탁하여 0°C와 저온을 유지하면서 1분간씩 3회 sonication(ultrasonic cleaner, Branson 1200)하여 막결합 단백질을 추출하였다. 그후 침전을 제거한 상층을 세포막 단백질 가용화 분획으로 하였다(11).

Rhodotorucine A의 합성

Magline과 Merrifield의 방법(13)에 따라 고상법을 이용하여 합성하였다. 합성된 peptide는 Kamiya 등의 방법(3)에 의하여 peptide C-말단에 farnesyl기를 부가 하였다. 합성이 완료된 Rhodotorucine A(Rh. A)는 Sephadex LH-20 column chromatography($\phi 1.3\text{cm} \times 130\text{cm}$, 0.5mM DTT를 함유)를 통하여 정제하였다. 최종 Rh. A는 생리활성검정을 거쳐 활성의 유무를 확인한 다음 실험에 사용하였다. Rh. A 1 unit라 함은 검정균(접합형 a형균)에 작용하여 접합관 형성율이 30%가 되게 하는 Rh. A의 양으로 정의하였다.

Rhodotorucine A sulfoxide(Rh. A S-oxide)의 조제

Rh. A S-oxide는 Kamiya 등의 방법(3)에 의하여 Rh.

A를 산화시킴으로서 조제하였다. 즉, Rh. A 150 units를 10mM phosphate buffer(pH7.0)에 녹이고 여기에 0.1% NaIO_4 를 가하여 28°C에서 12시간 반응시켰다. 반응 후 반응액에 적당한 양의 증류수를 가하여 n-butanol 추출을 2회 반복 실시했다. Buthanol층을 회수하여 증류수로 2회가량 세척한 후 buthanol을 제거하고 생물검정에 의하여 활성이 없는 것을 확인하고 methanol에 녹여서 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

SDS-polyacrylamide gel 전기영동 및 autoradiography

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 에 의한 *in vitro* 인산화 반응을 한 다음, sample을 Laemmli 등이 행한 방법으로 SDS-10% polyacrylamide gel 전기영동을 했다(12).

영동 후, 상법에 따라 coomassie blue(R-250)에 의하여 단백질을 염색하고 탈색한 후 gel 건조를 행했다. $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ 로 인산화된 band는 autoradiography로 검출하였다 즉, X선 film(X-OMAT R or S, Kodak)을 건조 gel과 증감지(Cronex, Dupont)의 사이에 끼워 -80°C에서 2일간 방치한 후 현상하였다. 이 과정에서 필요한 단백질의 정량은 Lowry와 Resebrough법(14)에 의하여 실시하였다.

단백질의 *in vitro* 인산화

단백질의 *in vitro* 인산화 반응을 위하여 각각 2mM의 CaCl_2 및 MgCl_2 를 함유하는 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.3)에 막단백질 가용화 분획 15 μg 과 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 2 μCi , Rh. A 30 units를 포함하는 반응액을 총량 50 μl 이 되도록 조제하였다. 인산화 반응은 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 를 가하는 것으로부터 시작된다. Rh. A 존재하에서 시행할 경우에는 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 를 첨가하기 전에 0°C에서 30분간 단백질과 Rh. A만을 미리 반응시킨다. 인산화 반응은 0°C에서 15분간 행하고 SDS-PAGE용 sample buffer를 첨가한 후 100°C에서 1분간 비등하는 것에 의하여 반응을 정지시켰다.

사용시약

Phosphatidyl serine(PS)과 Antipain은 Pharmacia P-L Biochemicals Inc.에서 공급받았다. Nonidet P-40과 Ethyleneglycol-bis-(α -amino ethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA)는 Sigma 제품을 사용하였으며, Dithiothreitol(DTT)은 International Biotechnologies Inc.(IBI)에서 제공받았다 n-Octyl β -glucopyranoside(Oc Glc)는 Wako Pure Chemical Indu-

stries Ltd., 그리고 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 는 Amersham 제품을 사용하였다.

결과 및 고찰

세포막 단백질과 그 가용화 분획에서 인산화 단백질의 검출

막단백질을 비이온성 계면활성제 Nonidet P-40으로 가용화하여 얻은 단백질을 SDS-PAGE를 행하고 gel은 coomassie 염색하여 단백질 종류를 조사해 본 결과 무수한 종류의 단백질 band가 나타났다(Fig. 1, lane 2).

동시에, 막가용화 단백질을 *in vitro* 인산화한 결과 아주 특정한 단백질 band만이 인산화됨을 알았다. 그중에서도 매번 특이하게 인산화되는 band로서 72Kd와 57Kd의 단백질이 존재함을 확인하였다(Fig. 1, lane 3)

이 두 band는 가용화 전 분획인 particulate분획에서도 존재 여부를 조사해 본 결과 본 단백질은 막단백질

유래의 인산화 단백질을 알 수 있었다(Fig. 1의 lane 4).

막가용화 단백질의 인산화 반응에 대한 Rh.A의 작용

막의 가용화 단백질 중에 존재하는 인산화 단백질은 과연 성분화과정 중 접합형 a세포가 Rh. A를 수용할 때 생리현상과 관련된 반응인지를 확인할 필요가 있다. 그러므로 *in vitro* 인산화 반응 중 30 units의 Rh. A를 작용시켜 보았다. 그 결과 Fig. 2에서 보이는 바와 같이 Rh. A는 인산화 반응을 저해하였다(Fig. 2, lane3). 이 저해반응은 Rh. A를 산화 처리하여 실활시킨 rhodotorucine A S-oxide에 의하여 저해를 받지 않으므로서 (Fig. 2, lane2) pheromone의 활성에 의한 것임이 명백히 증명된다.

이 결과는 *in vitro*에서 세포가 표면의 수용체를 통하여 성분화 정보물질인 pheromone을 수용함과 동시에 이 물질은 단백질 인산화 반응을 저해함으로써 막 단백질의 변화에 영향을 주는 가능성을 강하게 시사한

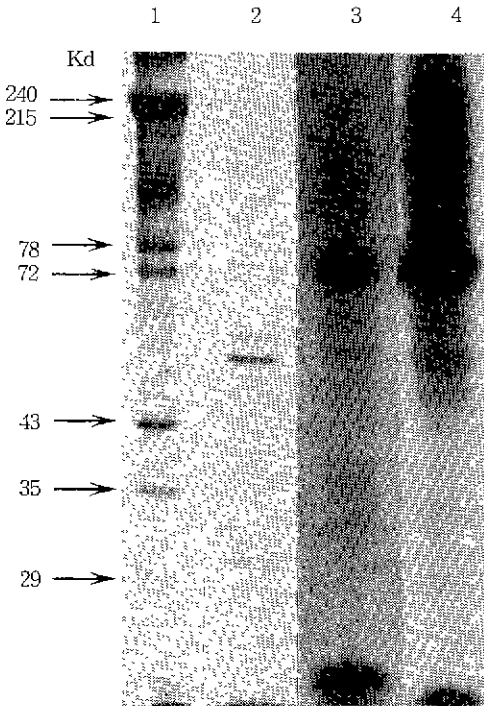


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of *in vitro* protein phosphorylation of particulate and solubilized membrane protein fractions. lane 1, Molecular marker(red blood cell protein); lane 2, Solubilized membrane protein fraction (Coomassie staining); lane 3, Solubilized membrane protein after phosphorylation; lane 4, Particulate protein after phosphorylation

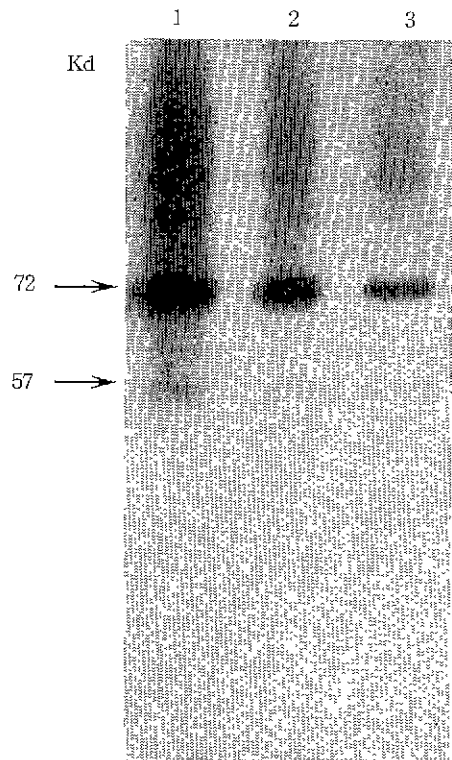


Fig. 2. Effect of rhodotorucine A on phosphorylation of solubilized fraction. lane 1, no Rh. A(rhodotorucine A); lane 2, Added Rh. A S-oxide(prepared by oxidation of 32units of Rh. A); lane 3, Added Rh. A(32 units).

다. 또한 이 저해반응은 펠자 등이 이전에 보고한 비변성 인산화 반응의 결과(11)와 일치하였다.

Rh. A의 인산화 저해에 대한 Ca^{2+} 의 의존성

막가용화 단백질에는 인산화 단백질 뿐만 아니라 trigger peptidase(TPase)도 함유되어 있다는 사실은 전 번 연구결과(9-11)에 의하여 밝혀진 바 있다. 그러면 Rh. A에 의한 인산화의 저해반응에 TPase가 관여할 수 있다는 예측이 가능하다. 본 실험은 이러한 예측을 확인하는 방법으로 TPase의 활성 발현에 필수적인 요소의 하나인 Ca^{2+} 가 인산화 저해반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 행했다. 아울러 같은 2가 양이온인 Mg^{2+} 에 대한 영향을 함께 시험해 보았다.

결과는 Fig. 3에서 보이는 바와 같이 Rh. A에 의한 인산화의 저해반응은 Mg^{2+} 의 존재에는 관계없이 Ca^{2+} 에 전적으로 의존하였다. 이는 TPase가 Rh. A를 분해하는 활성이 Ca^{2+} 에 절대적으로 의존하는 것과 일치하고 있다. 그러므로 Rh. A가 인산화 저해작용을 하는데는 TPase가 밀접하게 관련되고 있음을 예측할 수 있다.

Rh. A의 인산화 저해에 대한 calmodulin의 영향

Jeong 등이 이전에 보고한 결과(10)에 의하면 calmodulin(CaM)결합단백질 중에는 Rh. A의 수용체인 TPase와 Ca^{2+} -ATPase가 동시에 존재했으며, 그중에서 Ca^{2+} -ATPase는 활성 발현을 위하여 CaM을 요구했으나 TPase는 요구하지 않았다. 그러므로 Rh. A의 인산화 저해

반응에서 CaM의 영향을 검토함으로써 TPase와의 관련성을 알 수 있으리라고 판단하였다. CaM free의 분획을 위해서는 CaM 저해제인 trifluoperazine(TFP)을 넣으므로써 CaM의 작용을 제거하였다.

결과는 Fig. 4에서 보이는 바와 같이 Rh. A에 의한 단백질의 인산화 저해반응에는 CaM만으로는 아무런 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. 이는 막단백질 중에는 Ca^{2+} -ATPase와 TPase 등의 단백질이 존재하나 전자는 CaM에 의존성을 보이는 반면 TPase는 CaM과 무관한 결과로 미루어 볼 때 인산화 저해반응은 Rh. A와 TPase의 상호작용일 가능성을 강하게 시사하고 있다.

인산화 저해반응에 대한 TPase inhibitor의 영향

전술한 결과에 의하면 Rh. A가 수용체인 TPase에 의해 수용되면서 막단백질의 인산화 반응을 저해하는데는 TPase의 작용이 필수적일 것이라는 예측이 가능하다. 이를 증명하기 위하여 인산화 반응에 사용되는 막단백질 가용화 분획 sample을 인산화 하기 전에 TPase inhibitor인 antipain을 가한 후 preincubation시킴으로써 TPase활성을 실활시킨 다음에 인산화 반응을 행했다. 이로서 인산화 반응의 저해에 있어 TPase의 관련 유무를 확인하고자 하였다.

결과는 Fig. 5에서 보이는 바와 같다. 즉, antipain의

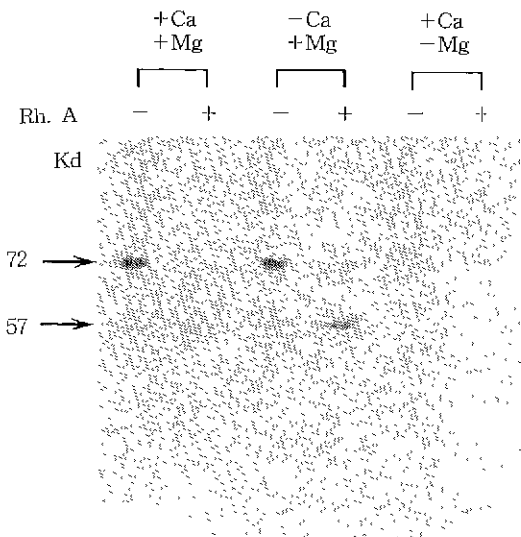


Fig. 3. Effect of Ca^{2+} and Mg^{2+} on inhibition of phosphorylation by Rh. A.

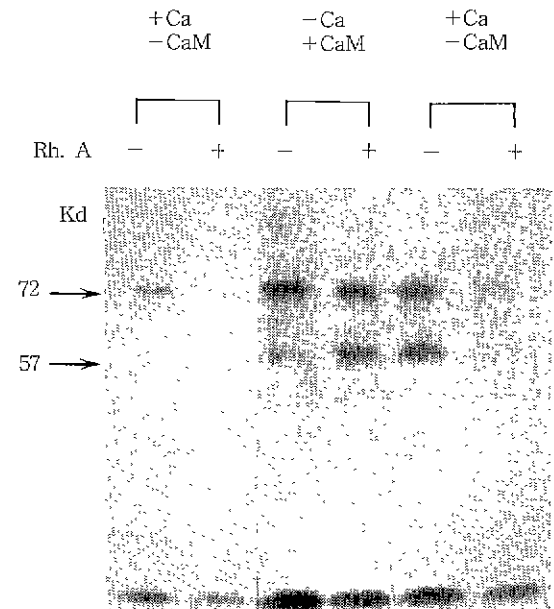


Fig. 4. Effect of Calmodulin(CaM) on Rh. A-induced inhibition of protein phosphorylation.

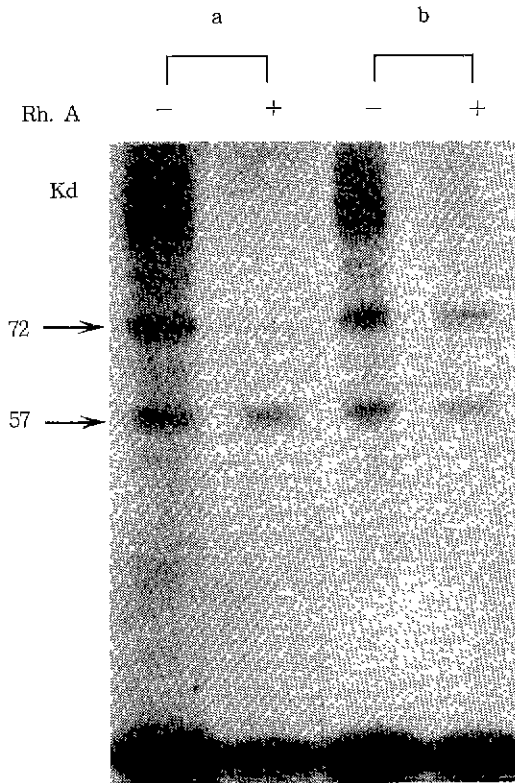


Fig. 5. Effect of TPase inhibitor on protein phosphorylation.

a. No inhibitor; b. Antipain(TPase inhibitor)

비존재하에서는 전항의 결과와 같이 저해양상을 보이나 antipain으로 TPase의 활성을 저해했을 경우는 인산화 저해반응이 복귀하였다. 이러한 결과는 Rh. A가 수용됨과 동시에 수용체 역할을 하는 TPase에 의하여 분해되기 때문에, TPase 활성이 있을 때만 인산화를 저해할 수 있다는 것은 Rh. A의 TPase 분해산물이 인산화 저해반응에 관여한다는 것을 강하게 시사하는 결과라 하겠다.

이런 결과는 Miyakawa 등의 연구(5)에서 접합형 a 세포 표면의 TPase가 Rh. A의 peptide 구조 중 Arg과 Asn 사이를 분해하여 N-말단측의 8개 peptide와 C말단측의 farnesyl tripeptide를 생성하는 것을 확인하였다. 그러나 이들 분해산물의 역할을 밝히지 못하였으나 본 연구결과에 의하여 해결의 가능성을 기대할 수 있겠다.

Trypsin-digested Rh. A가 인산화에 미치는 영향
TPase가 Rh. A를 수용과 동시에 분해하는 양상은

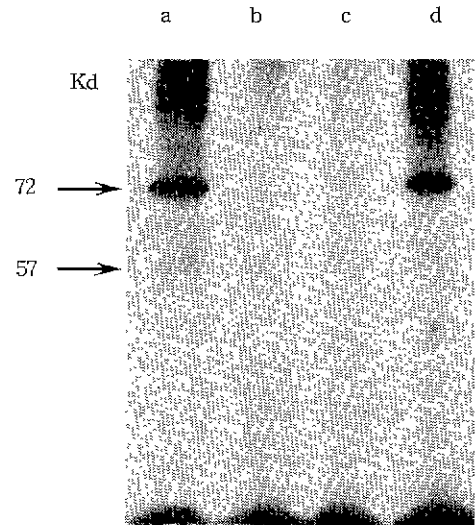


Fig. 6. Effect of trypsin-digested Rh. A on the protein phosphorylation.

a. No Rh. A; b. Added Rh. A; c. Added trypsin-digested Rh. A; d. Trypsin only.

trypsin type으로 분해한다는 사실이 Miyakawa 등에 의하여 보고된 바 있다(5). Rh. A의 TPase에 의한 분해산물이 인산화 저해에 관여한다면, trypsin으로 분해한 Rh. A의 분해산물과 같은 결과일 것이 예상되어 본 실험을 행했다.

결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같다. 즉, Rh. A대신에 trypsin으로 분해한 Rh. A 분해산물을 가했을 경우도 Rh. A의 효과와 동일하였다. 그러나 trypsin만으로는 아무런 영향을 나타내지 않았다. 이는 TPase에 의한 Rh. A의 분해산물이 인산화 저해반응에 관여한다는 사실을 증명하는 결과가 된다. 이 결과는 Jeong 등(11)이 최근에 발표한 바 있는 비변성 인산화 결과와 동일한 것을 확인하였다(11).

요 약

이담자효모 *Rhodosporidium toruloides* 접합형 a 세포의 막단백질 분해를 *in vitro* 인산화를 행한 결과 72Kd와 57Kd의 인산화 단백질이 존재하였다. 이 단백질은 접합형 A형 세포가 분비하는 sexual pheromone인 Rhodotorucine A(Rh. A)에 의하여 인산화가 저해되었다. Rh. A에 의한 인산화 저해작용은 Ca^{2+} 에는 의존하였으나 Mg^{2+} 이나 calmodulin에는 무관한 결과를 보였다. 인산화 저해반응에서 trigger peptidase(TPase) inhibitor인 antipain을 첨가했을 때 저해현상은 나타나지 않았다. 또한 Rh. A를 trypsin으로 분해한 산물을 인

산화 반응액에 첨가하였을 때 Rh. A의 효과와 같은 인산화 저해현상을 보였다. 이상의 결과로서 인산화 저해현상은 반응액 중의 TPase와 Rh. A간의 분해산물에 의하여 나타난다고 예측할 수 있다.

감사의 글

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

문헌

1. Bnno, I : Studies on sexuality of *Rhodotorula*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **13**, 167(1967)
2. Abe, K., Kusaka, I., and Fukui, S. : Morphological change in the early stages of the mating of *Rhodospordium toruloides* M1057, a strain of mating type a. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **24**, 287(1975)
3. Kamiya, Y., Sakurai, A., Tamura, S., Tsuchiya, E., Abe, K. and Fukui, S. : Structure of rhodotorucine A, a peptidyl factor inducing mating tube formation in *Rhodospordium toruloides*. *Agric Biol Chem.*, **43**, 363(1979)
4. Miyakawa, T., Nishihara, M., Tsuchiya, E. and Fukui, S. : Role of metabolism of the mating pheromone in sexual differentiation of the heterobasidiomycetous *Rhodospordium toruloides*. *J. Bacteriol.*, **151**, 1184(1982)
5. Miyakawa, T., Kaji, M., Jeong, Y. K., Tsuchiya, E. and Fukui, S. : Involvement of protein sulfhydryls in the trigger reaction of rhodotorucine A, a farnesyl peptide mating pheromone of *Rhodospordium toruloides*. *J. Bacteriol.*, **162**, 294(1985)
6. Miyakawa, T., Jeong, Y. K., Kaji, M., Tsuchiya, E. and Fukui, S. : Purification and characterization of a Ca^{2+} -dependent membrane peptidase involved in the signaling of mating pheromone in *Rhodospordium toruloides*. *J. Bacteriol.*, **169**, 1626(1985)
7. Jeong, Y. K., Miyakawa, T., Imabayashi, A., Tsuchiya, E. and Fukui, S. : Interaction with phospholipids of a membrane thiol peptidase that is essential for the signal transduction of mating pheromone in *Rhodospordium toruloides*. *Eur. J. Biochem.*, **169**, 511(1987)
8. Miyakawa, T., Tachikawa, T., Jeong, Y. K., Tsuchiya, E. and Fukui, S. : Transient increase of Ca^{2+} uptake as signal for mating pheromone-induced differentiation in the heterobasidiomycetous yeast *Rhodospordium toruloides*. *J. Bacteriol.*, **169**, 511(1985)
9. Miyakawa, T., Tachikawa, T., Jeong, Y. K., Tsuchiya, E. and Fukui, S. : Purification and characterization of Ca^{2+} -dependent membrane peptidase involved in the signal of mating pheromone in *Rhodospordium toruloides*. *J. Bacteriol.*, **169**, 511(1987)
10. Jeong, Y. K., Lee, T. H. and Jeong, K. T. : Relation of Ca^{2+} -ATPase and trigger peptidase (TPase) that are membrane proteins in a differentiation process on heterobasidiomycetous. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 1(1994)
11. Jeong, Y. K., Lee, T. H. and Ryu, B. H. : Inhibition of membrane protein phosphorylation by rhodotorucine A and involvement of trigger peptidase in this reaction in heterobasidiomycetous yeast *Rhodospordium toruloides*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 641(1996)
12. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**, 680(1970)
13. Magline, A. and Merrifield, R. B. : Chemical synthesis of peptides and proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 841(1970)
14. Lowry, O. H. and Resebrough, N. J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)

(1997년 9월 5일 접수)