

*Saccharomyces uvarum*의 Alkaline 및 Acid Phosphatase의 Isoenzyme 양상에 대하여

李基滉 · 崔榮吉

한양대학교 생물학과

Isoenzyme pattern of Alkaline and Acid Phosphatase in the Culture of *Saccharomyces uvarum*

Lee, Ki-Sung and Yong-Keel Choi

Department of Biology, Hanyang University, Seoul, Korea

The present study was designed to investigate isoenzyme (ACPase, ALPase) pattern and its regulatory function between catabolically repressed and derepressed states in yeast, *Saccharomyces uvarum*.

As the results, no other isoenzyme was detectable in acid phosphatase, but there were three isoenzyme types in alkaline phosphatase. Type "B" isoenzyme among alkaline phosphatases in catabolically repressed cell was derepressed, but in normally cultivated cell, type "C" isoenzyme was derepressed while type "B" activity was lowered. Type "B" isoenzyme could be postulated as repressible enzyme, type "A" as constitutive enzyme and type "C" as L-histidinol phosphatase, respectively. Also, it could be shown that type "B" ALPase, repressible enzyme, compensated for phosphate group supplier under catabolically repressed states. Protein profile in cytoplasmic soluble fraction of exponential phase cell was characterized by negative charged protein.

Phosphates (phosphate monoesters)의 분해 효소를 phosphomonoesterases (phosphatase)라 하며, 일반적으로 P-O-C의 Pi moiety에 특이성을 지닌다. Acid, alkaline phosphatase (Nyc 등, 1966; Suzuki and Sato, 1973; Benun and Blum, 1975)는 polyol-P, sugar-P, nucleoside monophosphates, phenyl phosphate, p-nitrophenyl phosphates (p-NPP), P-EP, phosphocholine, phosphoethanolamine, phosphoserine과 같이 광범위한 기질에 대해 특이성이 있다. 이러한 phosphomonoester 외에도, inorganic pyrophosphate, ADP, ATP,도 기질로 이용할 수 있다(O'Leary, 1983). 인지질 화합물의 경우는 glycerol의 C₃ 위치에 phosphate

mono ester group을 지닌 것에 대해서만 acid-Pase, alkaline-Pase가 작용할 수 있다.(Blank and Synder, 1970). 세균의 alkaline phosphatase는 P-N bond도 가수 분해할 수 있어, 소위 nonspecific phosphatase로서의 기능이 가능하다(Synder and Wilson, 1972). 또 고도의 기질 특이성을 나타내는 phosphatase로는 phosphoglycolate (Richardson and Tolbert 1961; O'Leary, 1983) 3-phosphoglycerate (Randall 등 1971), Fructose-1,6-diphosphate (Rao and Modi 1976), Sedoheptulose-1, 7-diphosphate (Breazeale 등, 1978), inorganic pyrophosphate (Popli and Singh, 1977)를 기질로 하는 phosphatase가 있다. 그러나 특이하

계도 효모의 alkaline phosphatase는 일반적인 모든 phosphate ester에는 거의 반응을 하지 않고 p-NPP에 대하여 특이성을 지니고 있다 (Attiaz and Bonnet, 1972).

또 세균, 균류, 고등식물, 조류 모두에서 phosphatase type은 constitutive Pi-irrepressible enzyme 또는 phosphate ester-induced Pi repressible enzyme의 2가지 type으로 대별할 수 있다(O'Leary, 1983). 세포의 ortho-P 분해에 관련이 있고 세포 표면에 존재하는 Pi-repressible enzyme은 세포내 물질 대사에 관계하는 세포내 phosphatase와 일반적으로 다른 것으로 보고되었다(O'Leary, 1983).

본 연구는 효모세포의 ACPase, ALPase의 isoenzyme type을 규명함과 아울러, 그 isoenzyme type 중 어느 것이 constitutive 또는 repressible enzyme type인가를 조사하고, 각각의 isoenzyme 활성화도비율을 살펴보아 배양조건(catabolic repression and derepression) 및 무기인산 제한에 따른 각 type의 세포내 조절기능을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

효모세포의 배양

효모세포(*Saccharomyces uvarum*; ATCC 9080)의 생장조건 즉 catabolic repression 및 derepression은 전보(1985, I, II)와 동일한 방법으로 행하였다.

전기영동

• **Cellulose acetate membrane electrophoresis**; 효모세포의 마쇄액을 원심분리하여(10,000 rpm, 10분) 얻은 상등액에 함유된 수용성 단백질을 cellulose acetate membrane electrophoresis에 적용하여 분석하였다. Cellulose acetate membrane을 0.09M Tris-barbiturate(pH 8.8)에 5~6분 포화시킨 후 blotting하고, 시료를 2 μ l 가하였으며, 0.09 M Tris-barbiturate(pH 8.8) 완충용액을 사용하여, 235V로 30분간 전기영동하였다. 그 후 Ponceau-S로 5~8분간 염색한 다음 5% acetic acid로 2분간씩 3번 탈색시킨 후 scan하였다.

• **Starch gel electrophoresis**; 효모세포의 ACPase의 isoenzyme을 분석하고자 Sparkes 등(1975)의 방법으로 starch gel electrophoresis를 행하였다. 12% starch gel을 6mm 두께로 조제한 후, 0.186%의 EDTA가 첨가된 citrate-phosphate buffer(pH 5.9)를 영동용 buffer로 사용하여 4v/cm로 18시간 전기영동하였다. 그 후 ACPase의 기질인 phenolphthalein diphosphate pentasodium salt(동경화성, Co.) 0.3% 용액을 피복시킨 후 37°C에서 1시간 반응시키고, 28% 암모니아수를 피복시켜 분홍색을 나타내는 band를 조사하였다.

• **Polyacrylamide gel electrophoresis**; 효모세포의 ALPase isoenzyme pattern을 배양 조건에 따라 분석하였다.

시료의 조제는 마쇄된 효모추출액에 NaCl은 0.1M 농도, Triton X-100은 1.0%의 농도가 되도록(Onishi 등, 1979; Clark 등, 1982) 가한 후, 다시 초음파 마쇄시킨 후, 원심분리하여(12,000 rpm, 10분) 상등액을 시료로 사용하였다. 이를 Davis(1964) 방법을 의거하여 EDTA, glycerol, bromophenol blue를 가하여 영동용 시료를 조제하였고, stacking gel은 2.5%, separating gel은 7%로 조제하여, 2mA/well로 전 영동을 행한 후 5mA/well로 전기영동하였다. 영동용 완충용액은 0.01M Tris-glycine buffer(pH 8.3)를 이용하였다. 영동이 끝난 후 ALPase isoenzyme의 분석은 Clark 등(1982)이 행한 방법대로 ALPase의 기질인 p-NPP를 피복시키고, 30분~1시간 37°C에서 반응시킨 후, 나타나는 노란색 band를 high speed TLC scanner(Shimadzu CS-920)로 410nm에서 scanning하였다.

결과 및 고찰

조류의 경우, 외부의 alkaline phosphatase의 활성이 높아짐에 따라 세포내 acid phosphatase에 의하여 축적된 폴리인산의 가수분해가 일어난다(Lim, 1977). 그러나 이와는 반대로, 효모의 경우 Pi-repressible phosphatase를 유도하기 위해서는 세포내 축적된 무기폴리인산이

외부의 무기 인산과 함께 소모되어야 하고, Pi-repressible enzyme은 세포내 무기인산과 무기폴리인산이 상당량 존재할 때는 외부의 무기인산 소모 후에만 유도되어진다(Weimberg, 1977).

ALPase는 정상적으로 무기인산 결핍상태 후, 곧바로 또는 성장율이 떨어지기 전에 유도되어지는 것은, 성장율의 변화에 의한 것보다는 세포내 인산화합물의 결핍이 주된 요인이다(O'Leary, 1983). 이와같이 phosphatase 합성에 대한 repressive effect는 1차적으로 mRNA 전사 기작에 의한 것이지만, end-product modulator로 작용하는 내적인 pool-products에 의한 2차적인 효소 조절에 의한 것으로 볼 수 있다(Elgavish등, 1982). 세포벽을 가지고 있는 대부분의 세균이나 조류에서는 Pi-repressible phosphatase는 periplasmic region에 존재한다(O'Leary, 1983). 또, 조류의 경우, 세포벽이 결손된 mutant의 경우 Pi-repressible alkaline 그리고 neutral phosphatase는 손상되

면서 release된다(Loppes, 1975, 1976)고 하였다. 이와같이 induction과 repression mechanism의 표현으로 phosphatase합성의 물질대사 조절 및 세포내 유기인산의 이용과 phosphorus 결핍의 탐지를 이해하는데 매우 유용하다.

본 연구에서도 역시, 배양조건 및 무기인산 제한에 대한 phosphatase의 합성조절(induction/repression)이 나타난 것은 전보(1985, I, II)의 결과에서도 설명되었다.

본 연구에서, ACPase의 경우는 isoenzyme type이 전기 영동상으로는 1가지 type만이 존재하였다. 그러나 ALPase의 경우는 Onishi등(1979)와 Clark등(1982)의 연구 결과와 마찬가지로 3 type의 isoenzyme이 조사되었다.

효소의 ALPase는 glycoprotein이며, 주된 효소의 활성도는 액포의 내벽에 나타난다(Onishi등, 1979; Clark등, 1982)고 하였다. 이 3가지 isoenzyme은 모두 p-NPP에 대해 반응을 하는데, constitutive (p-NPP specific ALPase), L-histidinol phosphate에도 기질의 특

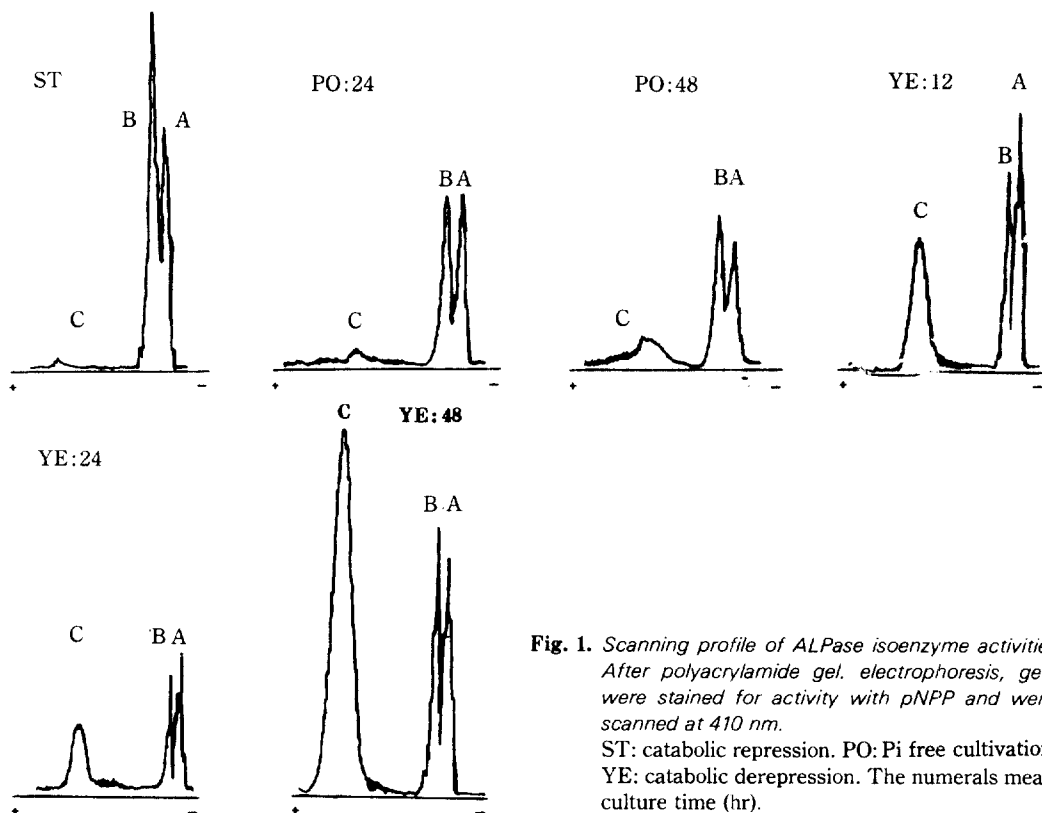


Fig. 1. Scanning profile of ALPase isoenzyme activities. After polyacrylamide gel electrophoresis, gels were stained for activity with pNPP and were scanned at 410 nm. ST: catabolic repression. PO: Pi free cultivation. YE: catabolic derepression. The numerals mean culture time (hr).

이성이 나타나는 L-histidinol phosphatase (L-histidine의 생합성과 관련), nonspecific AL-Pase (repressible ALPase)으로 구분된다 (Onishi 등, 1979; Mitchell 등 1981; Clark 등, 1982). 또, L-histidinol phosphatase type은 무기인산 결핍 때 나타나지 않는다 (Onishi 등 1979)고 하였다.

본 실험의 경우 peak "B"의 isoenzyme이 무기인산이 결핍된 배지에서 생육된 세포 (PO)에서는 지속적으로 높은 활성도를 띠었으나, 완전배지 (YE medium)로 옮겨 배양 (catabolic derepression)시킨 세포에서는 활성도의 감소를 나타냈고, 특히 catabolic repression (sugar free, pi free)시킨 세포 (ST)에서 활성 비율이 가장 높은 것으로 미루어, peak "B"의 효소 활성도는 repressible enzyme type의 활성도로 추정할 수 있었다. 또 peak "A" isoenzyme은 무기인산 결핍배양의 경우나 완전배지에서 배양될 경우에 계속 일정한 활성도를 나타내는 것으로 미루어 constitutive enzyme type으로 추정되었다. 그리고 무기인산이 결핍된 배지에서 배양된 세포에서 peak "C" isoenzyme의 활성이 안나타나는 것으로 미루어 peak "C" isoenzyme은 L-histidinol phosphatase로 추정되어진다 (Fig. 1.).

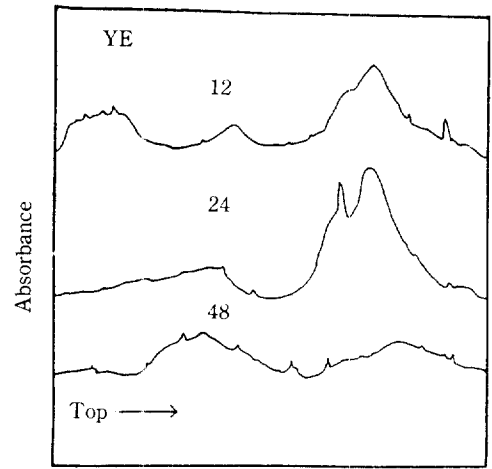
적 요

본 연구는 효모세포 (*Saccharomyces uvarum*)의 ACPase, ALPase의 isoenzyme type을 규명함과 아울러, isoenzyme type중 어느 것이 constitutive 또는 repressible enzyme type인가를 조사하고, 각각의 isoenzyme 활성도 비율을 살펴본다 배양조건 (catabolic repression and derepression) 및 무기인산 제한에 따른 각 type의 세포내 조절기능을 분석하고자 하였다.

· Acid phosphatase는 또 다른 isoenzyme type이 발견되지 않았으나, alkaline phosphatase의 경우는 3가지 type이 p-NPP에 specificity를 지녔다. 세포질의 수용성단백질 분석결과 exponential phase의 세포는 주로 음전하를 띤 단백질이 높은 함량을 나타내었다. 당과 인산이 결핍된 배지에서 생육된 (catabolic repression) 세포에서 AL-Pase isoenzyme 중 type "B"의 활성도가 매우 높아졌으나, 완전배지에서 배양된 (catabolic derepression) 세포에서는 type "B"의 활성도 감소 및 type "C"의 활성도 증가 현상을 볼 수 있었다. ALPase 중 "A" peak는 constitutive enzyme, "B" peak는 repressible enzyme, peak "C"는 L-histidinol phosphatase로 추정되었다.

REFERENCES

1. Attiaz, J. and J.L. Bonnet. 1972. A specific alkaline p-nitrophenyl phosphatase activity from baker's yeast. *Biochim, Biophys, Acta*,



Densitometric Recordings

Fig. 2. Densitometric recordings of cellulose acetate membrane electrophoresis of scuble cytoplasmic extracts from *S. uvarum*.

결국 세포의 무기인산 제한에 따른 인산대사의 조절적인 측면에서, 기능적인 ortho-p 또는 인산화 과정을 보상해 주는 역할을 "B" type의 ALPase isoenzyme이 행하는 것으로 생각되어진다. 그리고 배양시기에 따른 수용성단백질 합성변화는 Fig. 2.에 표시한 바와 같이 exponential 시기 (12, 24시간)의 세포에서 음전하를 띤 단백질이 높은 함량을 나타냈고 배양시기에 따라 단백질 합성의 변화가 나타났다.

268: 422-425.

2. Bennun, A., and J.J. Blum. 1975. Properties of the induced acid phosphatase and of the constitutive acid phosphatase of *Euglena*, *Biochim. Biophys. Acta*, 128: 23-27.

3. Blank, M.L., and F. Synder, 1970. Specificities of alkaline and acid phosphatases in the dephosphorylation of phospholipid. *Biochem.* **9**: 5034-5038.
4. Breazeale, V.D., B.B. Buchanan, and R.A. Wolosicik. 1978. Chloroplast sedoheptulose 1,7-biphosphatase; Evidence for regulation by the ferredoxin/thioredoxin system, *Z. Naturforsch.* **33C**, 521.
5. Clark, D.W., J.S. Tkacz, and J.O. Lampen. 1982. Asparagine-linged carbohydrate does not determine the cellular location of Yeast vacuolar nonspecific alkaline phosphatase. *An. Soc. Microbiol.* **152**: 865-873.
6. Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**: 404-427.
7. Lim, C.K., 1977. Accumulation of water soluble phosphorus and hydrolysis of polyphosphates by *Cladophora glomerata* (Chlorophyceae), *J. Phycol.*, **13**; 46.
8. Loppes, R. and R. Deltour. 1975. Changes in phosphatase activity associated with cell wall defects in *Chlamydomonas reinhardi*. *Arch. Microbiol.*, **103**: 247.
9. Loppes, R. 1976. Release of enzymes by normal and wall-free cells of *Chlamydomonas*. *J. Bacteriol.* **128**: 114-118.
10. Nyc, J.F., R.J. Kadner, and B.J. Crocken. 1966. A repressible alkaline phosphatase in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **241**: 1468-1472.
11. O'Leary, W.M. 1983. 'Critical Reviews in Microbiobiology' CRC. Press, Inc. Boca Raton, Florida. **10**: 317-391.
12. Onishi, H.R., J.S. Tkacz, and J.O. Lampen. 1979. Glycoprotein nature of yeast alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* **10**: 11943-11952.
13. Randal. D.D., N.E. Tolbert, and D. Gremol. 1971. 3-phosphoglycerate phosphatase in plants. II. distribution, physiological considerations, and comparison with P-glycolate phosphatase. *Plant physiol.* **48**: 480-485.
14. Rao, N.N., and V.V. Modi. 1976. Fructose-1,6-diphosphatase from *Mangifera indica*. *Phytochem.* **15**: 1437-1442.
15. Sparkes, M.C., N.L. Crist., and R.S. Sparkes. 1975. *Anal. Biochem.* **64**: 316 "Electrophoresis in the separation of Biological Macromolecules" John Wiley & Sons. New York. 1980. p.282.
16. Suzuki, T., and S. Sato. 1973. Properties of acid phosphatase in the cell wall of tobacco cells cultured in vitro, *Plant Cell Physiol.* **14**: 585-594.
17. Synder, S.L., and I.B. Wilson. 1972. Phosphoramidic acids; A new class of nonspecific substrates for alkaline phosphatase from *Escherichia coli*. *Biochem.* **11**: 1616-1622.
18. Weimberg, R. 1977. Repression of the acid phosphatase of *Saccharomyces bisporus* in relation to the polyphosphate content of the cells. *Can. J. Microbiol.* **22**: 867-872.
19. Lee, K.S. and Y.K. Choi. 1985.
 - I. Studies on the activities of ALPase, ACPase, ATPase and accumulation of volutin granules upon growth phase in *Saccharomyces uvarum*.
Kor. J. Microbiol, 23:2 (in press)
20. Lee, K.S. and Y.K. Choi. 1985
 - II. Studies on the Changes in activities of ALPase, ACPase, ATPase and synthesis of volutin granules upon phosphate concentration in *Saccharomyces uvarum*.
Kor. J. Microbiol. 23:2 (in press)

(Received June 10, 1985)