

「酵母에 있어 性 pheromone情報の 전달기구에 관한 연구

부산 동주여전 식품영양학과
정 영 기

고등생물에서는 細胞가 상호간에 情報를 교환하면서 發生 分化 增殖 등을 조절하며 생활해 가고 있다. 特히 동물세포와 같은 多細胞生物은 peptide性 情報因子인 호르몬이나 增殖因子 등과 같은 化學的 情報物質을 매체로 하는 세포간 Communication이 생리적 조절에 관계하고 있으며, 生體代謝 조절에 중요한 역할을 담당하고 있다. 이러한 情報因子가 標的細胞의 膜에 존재하는 受容體를 통하여 전달되어 특이적인 生物應答을 유도하는 기구의 해명은 생물학 및 생화학의 분야에서 중요한 과제중의 하나라 생각된다. 이러한 연구를 행하기 위하여 그 재료로서 多細胞生物 세포를 사용한다면 細胞間 相互依存關係가 多樣하기 때문에 많은 복잡성을 초래하게 된다. 이와 같은 난점을 감안하여 筆者 등은 원시진핵세포인 효모를 재료로 하여 복잡한 동물세포에서 情報因子가 細胞內에 전달되는 기구의 모델을 확립할 것을 목적으로 연구를 행했다.

효모의 生活環에서 보면, 1倍體細胞는 접합형을 달리하는 양세포사이에서 性接合에 의한 2倍體細胞를 形成하여 다시 새로운 世代에 移行한다. 性的세포융합은 2종의 세포사이에서 행해지는 특이성이 매우 높은 반응에 기인하고 있기 때문에, 양 세포간의 관계는 多細胞와는 달리 단순하다는 점이 연구재료로서의 利點으로 들 수 있겠다. 이러한 利點을 살려 얻어낸 정보전달기구를 해명하기 위한 몇가지 결과를 소개한다.

사용균주와 Pheromone

本 研究에 사용한 균주, 異담자균효모 *Rhodosporidium toruloides* (1)는 1倍體世代에서

는 Heterothallic이다. 즉, 접합형 A형 또는 a형을 가지는 세포로서 출아에 의한 영양증식을 행하고 있다. 이들 영양세포는 상호간의 영양세포에게 性分化(영양세포가 생식세포로 변환)를 유도하는 性分化情報物質(性pheromone)을 生産分泌한다. 즉, A細胞는 Rhodotorucine A를 構成的으로 分泌하고, a細胞에서는 Rhodotorucine a를 誘導的으로 分泌한다. 各 榮養細胞는 性分化誘導物質(Sexual pheromone)을 受容하면 영양증식을 정지한 후 접합관을 형성하고 生殖細胞로 分化한다(2).

그후, 양 접합관은 선단에서 융합하여 세포질혼합, 핵융합의 결과 Heterodiploid로 된다. 이어서 2倍體細胞는 감수분열하여 孢子形成으로 향한다(Fig.1 참조). 接合型 A細胞는 性pheromone(Rhodotorucine A)을 생산 분비하는데, pheromone의 화학구조는(末端 cysteine이 isoprenoid farnesyl基로 수식되고 11개의 아미노산(Tyr-Pro-Glu-Ile-Ser-Trp-Thr-Arg-Asn-Gly-Cys-(S-farnesyl)OH)으로 된

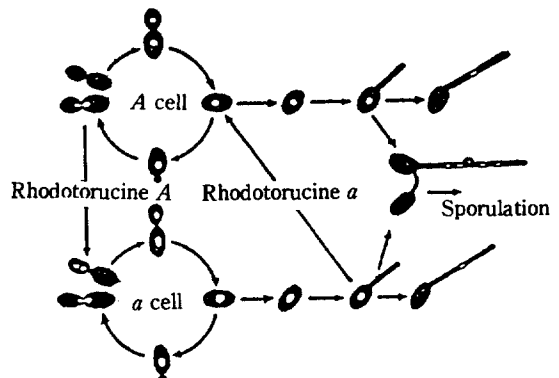


Fig. 1. Mating pheromone-mediated Sexual Conjugation in the Life Cycle of *R. toruloides*.

lipopeptide의 구조를 가진다(3, 4).

受容體의 정제 및 성질(5)

a세포의 膜에 존재하는 受容體는 Rhodotorucine A의 受容과 同時에 pheromone을 분해한다는 사실이 Nishihara(5)에 의해 밝혀졌다. 그러나, 그 분해반응의 意義는 확실치 않으나 性分化 과정에서 必順的인 것임이 증명됐다(6). 그러므로 이 受容體는 pheromone의 수용작용과 효소활성을

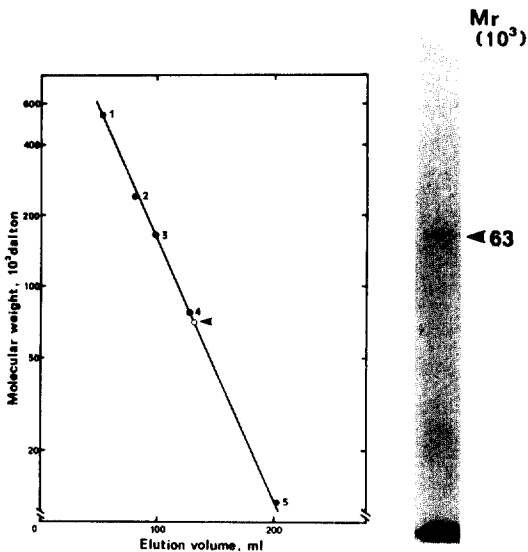


Fig. 2. Determination of molecular weight of trigger peptidase. (A) The active fraction from ConA affinity chromatography was analyzed by Sepharose 6B gel filtration in the presence of 0.3 mM OG. The molecular weight marks used were as follows: 1, -galactosidase(Mr = 540,000): 2, catalase (Mr = 260,000): 3, glucose oxidase (Mr = 160,000): 4, lactoperoxidase (Br = 78,000): 5, cytochrome c (Mr = 11,000). The arrow indicates the position of trigger peptidase. (B) Proteins from the active fraction from Sepharose 6B gel filtration were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins in the active fraction ca. 4 ml) from Sepharose 6B gel filtration were labeled by incubation with 200 μ Ci of $Na^{125}I$ and two Iodo-beads for 30 min at room temperature. The labeled protein sample was dialyzed extensively against deionized water, lyophilized, and then subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (12.5% acrylamide). The radioactive bands on the dried gel were detected by autoradiography.

을 同時에 가지면서 정보전달에 중요한 역할을 담당하고 있다고 판단하여 이것을 Trigger Peptidase(TPase)로 命名하고 그 정제를 행하고 성질을 파악했다(5).

정제된 TPase(Trigger peptidase)는 分子量 63~68 KDa의 monomer蛋白質임이 밝혀졌다(Fig. 2 참조). 또한, 本精製 TPase는 A형 세포(Rhodotorucine A 생산균주)와 M-39(a형 유래의 性分化能결손 돌연변이주)에는 존재하지 않는 a세포에만 특이하게 존재하는 受容體임을 확인했다(5).

Intact cell을 이용한 實驗에서 本 受容體는 protease活性으로서 trypsin型的 分解패턴을 가지며 thiol基 修飾試藥 5, 5'-dithiose(2-nitro 安息香酸, DTNB)에 의해 活性이 저해되므로 thiol系 Endopeptidase인 것이 밝혀져 있다. 그래서 本精製 TPase는 intact cell에서 존재하는 受容體(TPase)와 同一한 物質인 것을 확인하기 위한 실험을 했다. 즉, ^{125}I 로 標識한 Rhodotorucine A를 基質로 하여 精製 TPase와의 反應을 확인한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 Trypsin型的 분해 패턴을 보이고 DTNB에 의해 活性이 저해되는 것으로 보아 목적으로 하는 thiol系 protease임을 확인했다. 이로써 本精製 TPase는 intact cell에서의 受容體와 同一物質임이 증명되었다.

情報物質 Rhodotorucine A는 구조상 peptide의 C末端에 farnesyl基가 존재하며, 이는 情報物質이 細胞內에 전달될 때 signal 因子로서 역할을 할지도 모른다는 추측을 하게 되었다. 그러면, 이

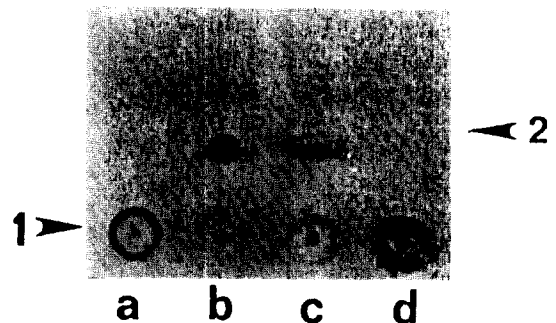


Fig. 3. Pattern of hydrolysis of rhodotorucine A. a, no addition, b, with trypsin, c, with trigger peptidase, d, with trigger peptidase and 1 mM DTNB. 1: Rhodotorucine A. 2: ^{125}I -N-terminal octapeptide produce.

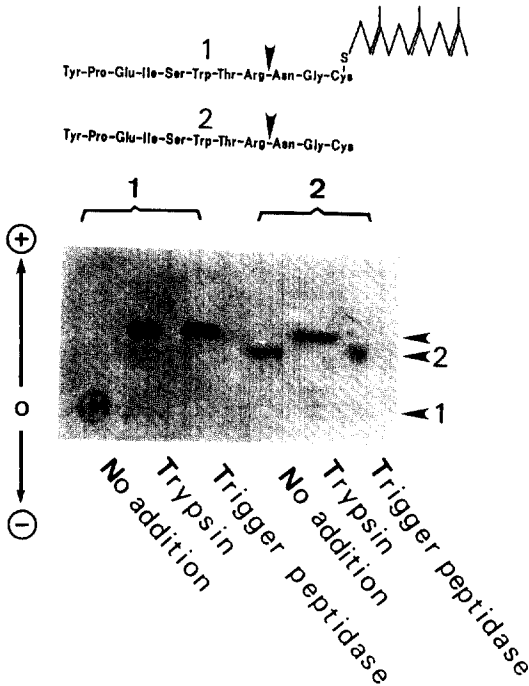


Fig. 4. Pattern of hydrolysis of rhodotorucine A and desfarnesyl rhodotorucine A by trigger peptidase.

를 수용하는 TPase는 farnesyl기에 對한 독특한 基質特異性을 보일 것임에 틀림없다. 이를 확인하기 위하여 Rhodotorucine A의 全構造를 가지는 물질과 C末端의 farnesyl基를 제거한 desfarnesyl Rhodotorucine A를 각각 ¹²⁵I로서 標識한 것을 基質로 하여 試驗했다. 結果는 Fig. 4에서 보이는 바와 같다. 精製 TPase는 Rhodotorucine A의 全構造를 요구했으며, desfarnesyl Rhodotorucine A에 대해서는 反應하지 않는 매우 특이한 基質特異性을 가지는 것을 확인했다. 그 以外の TPase 諸性質에 대해서는 Table 1을 참조하기 바란다.

精製 TPase의 Reconstitution(7)

本 精製 TPase는 phospholipid를 요구하는 性質이 있는 것을 알았다(5). 이는 膜을 形成하는 phospholipid bilayer에 TPase가 결합하여 존재한다는 것을 생각할 때 TPase의 활성화와 phos-

Table 1. Properties Trigger Peptidase.

| |
|-------------------------------------|
| Mating type(a)-specificity |
| Trypsin-like hydrolysis |
| High specificity to rhodotorucine A |
| Thiol protease |
| Membrane-binding glycoprotein |
| Ca ²⁺ requirement |
| Phospholipids requirement |
| M.W 63Kd |

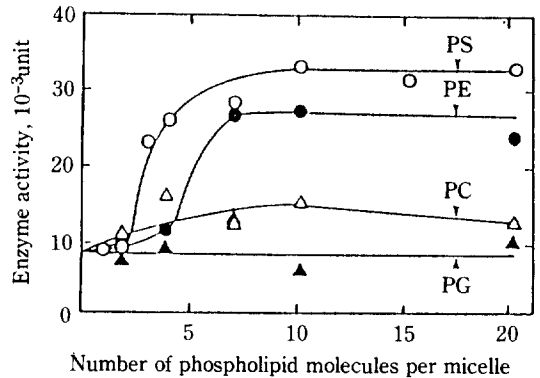


Fig. 5. Effect of Various Phospholipids on TPase Activity.

pholipid間的 관계를 확실히 파악하는 것이 정보전달기구의 해명에 중요한 부문에 해당한다고 생각된다. 그래서, TPase 活性에 미치는 phospholipid의 영향을 分子수준에서 조사했다. 이 實驗은 Mixed micell method(8)에 준하여 행했다. 結果는 Fig. 5에서 보이는 바와 같다. phosphatidyl Serine의 경우 약 2분자에서부터 TPase를 활성화하기 시작하여 약 7분자가 되면 효소활성은 절정에 달했다. 그 이상의 phospholipid 分子數에 對해서는 효소활성에 영향을 미치지 않았다. 그리고, 特記할 사실은 本 TPase는 여러 phospholipid種 중에서도 Amino phospholipid 만을 요구하는 선택성을 가진다는 것이다. 이 결과는 細胞의 膜에 있어 受容體가 phospholipid bilayer를 細胞 內部까지 통과하여 존재하고 있다는 결론을 내리는데 중요한 資料가 되었다. 이로써 本 受容體는 情報物質이 transmembrane 하는데 매우 중요한 기능을 한다는 것이 밝혀지게 되었다.

다음은 本 精製 TPase가 phospholipid

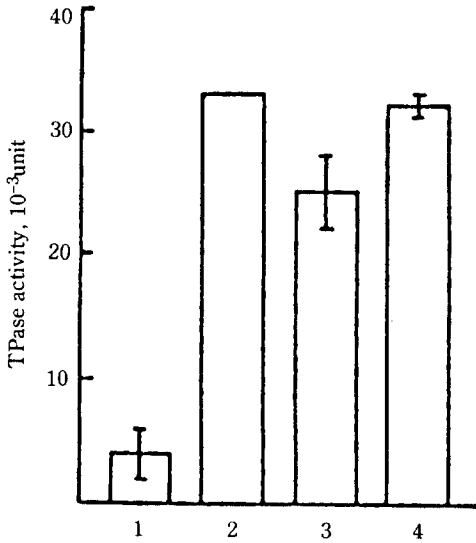


Fig. 6. Activation of TPase by reconstitution into liposomes. Reconstitution was carried out with 0.035 units TPase, 0.1 mM liposomes and 35 mM OG. (1) TPase activity determined in the absence of phospholipids; (2) TPase activity determined in the presence of sonic dispersion of phospholipids; (3) TPase reconstitution to liposomes by the OG dilution method, the resulting proteoliposomes isolated by centrifugation and TPase activity in the pellet determined after suspending the pellet in buffer A; (4) proteoliposomes isolate as (3) but then TPase activity was assayed after disruption of the liposomes by the addition of Triton X-100 (0.2%).

liposome에 reconstitution 되었을 때 *in vivo*와 同一한 活性를 발휘할 수 있을 것인가를 확인하기 위하여 reconstitution을 행했다. 方法은 octylglucoside dilution method(9)에 준했다. 結果는 Fig. 6에서 보는 바와 같다. 精製 TPase는 거의 100%가 liposome에 reconstitution 되었으며 그 중 약 80%가 活性이 發現되었다(7). 나머지 약 20%는 活性中心이 逆方向으로 結合하여 活性化되지 않는 것도 확인할 수 있었다. 이는 本 精製酵素가 受容體와 同一物質이며 膜에서의 情報物質을 受容하는 重要한 역할을 再確認하는 자료가 되었다.

性pheromone 전달과정 초기에서 受容細胞의 生理的應答(10, 11)

접합형 a세포가 Rhodotorucine A를 受容하여

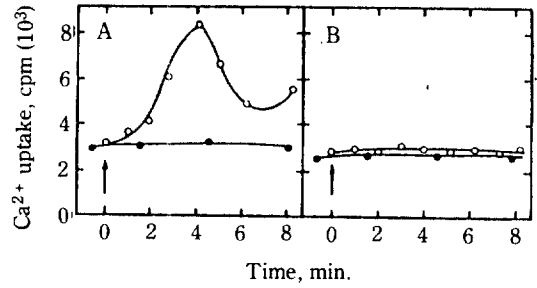


Fig. 7. Effect of the mating pheromone on immediate ⁴⁵Ca²⁺ uptake after pheromone addition in a cells and in a sterile mutant (M-39) cells. The ⁴⁵Ca²⁺ uptake was measured as described in the legend to Fig. 1 except that the incubation was performed at 15 °C. The radioactivity associated with cells at 0 min of incubation (1.050 cpm) was subtracted from the data shown. A, a cells; B, M-39 cells. ○, with pheromone; ●, without pheromone.

증식세포로 分化하기 위해서는 培地 中에 Ca²⁺의 존재가 필수적인 조건이었다. 또한, 一般的으로 세포가 정보물질을 수용하면 세포내의 전달과정에서 Ca²⁺이나 cAMP, cGMP 등의 물질이 second messenger로 작용한다는 說이 있다.

Rhodotorucine A 작용時的 세포내 Ca²⁺ 대사의 변화를 조사하기 위하여 ⁴⁵Ca²⁺를 투입시켜 세포내 Ca²⁺의 농도를 측정하였다. 그 결과 Rhodotorucine A의 수용과 동시에 세포내의 Ca²⁺의 농도는 즉시적으로 증가하는 현상을 보였다(Fig. 7-A). 이 Ca²⁺ 증가작용은 성분화과정에 필수적인 현상인지를 확인하기 위하여 a세포 유래의 Rhodotorucine A의 대사를 결손한 돌연변이주(성분화능 결손 돌연변이주)에 대해서도 같은 실험을 한 결과 Ca²⁺의 증가작용은 나타나지 않은 것을 확인하였다(Fig. 7-B). 이 초기의 Ca²⁺ 증가반응이 성분화의 signal반응이라면, 이것은 성분화 초기에 세포내의 Ca²⁺조절기구에 어떤 변화가 있는 것을 시사한다. 一般的으로 외부로부터 流入되는 Ca²⁺은 세포막에 존재하는 Ca²⁺-pump의 작용에 의하여 세포의 외부로 流出되므로서 세포내의 Ca²⁺의 농도는 一定하게 유지되고 있다. 또한, Ca²⁺-pump의 작용조절은 Ca²⁺-ATPase에 의해 행해지고 있으므로 Ca²⁺-ATPase의 활성화과 Rhodotorucine A와의 관계를 조사했다. 그 결과 Rhodotorucine A는 세포막 Ca²⁺-ATPase 활성화

을 완전히 저해하는 것을 확인하였다(11). 이 결과는 바로 Ca^{2+} -pump의 기능저해와 직결하기 때문에 성분화 초기의 Ca^{2+} 대사의 급격한 변화는 性分化의 signal 反應을 의미하는, 표적세포에 있어 초기의 生理的 應答이라 할 수 있다.

受容細胞의 生化學的 應答(12, 13, 14)

一般적으로 標的細胞에서 수용체가 情報物質을 수용하면 수용체 주변의 단백질 인산화반응이 변

화하는 것에 의해 효소활성을 조절한다는 說이 있다. 정보전달계에도 그와같은 生化學的 應答이 있을 것을 예상하고 a세포膜에서의 인산화 변화를 시험했다. Fig. 8에서 보이는 바와 같이 特異하게 인산화되는 단백질 72 KDa와 57 KDa이 존재하는 것이 확인되었다. 이들은 Rhodotorucine A의 첨가에 의하여 이 인산화반응이 저해됨을 알았다. 즉, 이 사실은 性分化 初期에 膜蛋白質 인산화의 저해를 의미하는 것이다(14). 이 인산화반응의 저해과정에서 TPase(受容體)의 역할을 확인하기 위하여 膜단백질을 조제한 후 native 電氣泳動 하여 인산화단백질 부분에서의 TPase의 존재를 확인하였다(data not shown). 그 결과 本 인산화단백질에는 TPase가 존재하는 것을 확인했다. 그러므



Fig. 8. *In vitro* Protein Phosphorylation of Particulate and Solubilized fractions on SDS-PAGE gel.

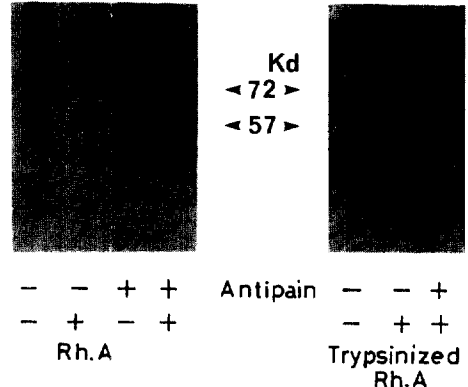


Fig. 9. Effect of Trypsin-digested rhodotorucine A and Antipain on Protein Phosphorylation (*in vitro*).

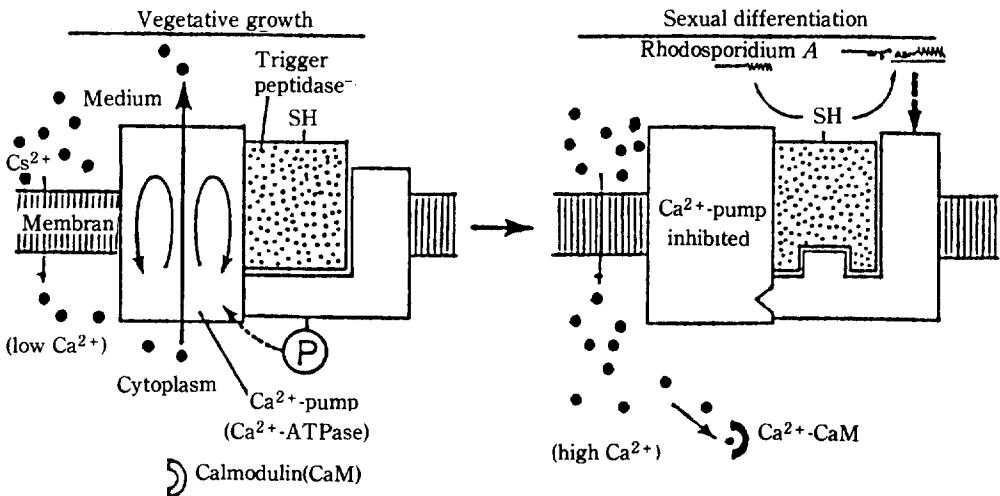


Fig. 10. Schematic Model of Transmembrane Signaling of Rhodotorucine A on *Rhodospodinium toruloides*.

로 Rhodotorucine A의 인산화 저해반응에는 TPase에 의해 분해된 Rhodotorucine A의 분해 단편이 작용하고 있다는 가능성을 강하게 시사했다.

이것을 증명하기 위하여 TPase의 inhibitor인 Antipain을 이용하여 실험한 결과, Fig. 9에서 보이는 바와 같이 Antipain 첨가에 의해 TPase의 활성이 소실됐을 경우에는 인산화 저해반응이 회복되는 것을 확인하였다. 이 결과를 재확인하기 위하여 Rhodotorucine A를 미리 Trypsin으로 분해시킨 후 분해단편으로 같은 실험을 행한 결과 Antipain의 존재 여부에 관계없이 인산화가 저해된다는 사실을 밝혀냈다. 이는 R세포가 性分化 과정에서 Rhodotorucine A의 수용과 同時에 필수적으로 일어나는 분해반응의 意義를 解明하는 매우 중요한 실마리가 되었다.

결론 및 고찰

筆者 등은 본 연구에서 論한 TPase(수용체), Ca^{2+} -ATPase, phosphoprotein의 3者が 강력하게 결합된 하나의 혼합체를 형성하고 있는 것을 증명할 수 있었다(data not shown). 이런 여러가지 결과를 종합할 때 Fig. 10과 같은 모델로서 本情報傳達系를 설명할 수 있다. 즉, 평상시 a세포 막에는 수용체(TPase) 인산화단백질 그리고 Ca^{2+} -ATPase가 복합체를 형성하여 존재하고 있다. 여기서 Ca^{2+} -ATPase는 活性化 상태로 존재하고 Ca^{2+} -pump를 작동시켜 세포내에 流入되는 Ca^{2+} 을 적당하게 세포밖으로 流出시켜 항상 세포내의 Ca^{2+} 농도를 일정하게 유지시키는 역할을 하고 있다. 그러나 세포가 情報物質(Rhodotorucine A)을 수용하게 되면 수용체는 그의 수용과 동시에 이를 분해하고 분해된 정보물질의 단편은 인산화 단백질의 인산화를 저해하게 된다. 단백질의 인산화 저해의 간접적인 영향으로 Ca^{2+} -ATPase는 불활성화 되고 따라서 Ca^{2+} -pump의 작동은 inhibition 된다. 그 결과 세포내의 Ca^{2+} 의 농도는 즉시적으로 증가현상을 보이고 이들의 Ca^{2+} 은 본 정보 전달계에 있어 계속적으로 second messenger로서 역할을 하게 된다. 본 연구에서는 이以後의 연

구를 계속 행하고 있다.

本 연구에 있어 수용체가 同時에 protease의 活性을 가지는 것과 情報物質에 대한 분해반응이 性分化의 必順的 요소라는 것은 他的 보고된 例가 없는 매우 흥미있는 사실이라 하겠다. 앞으로, 더욱 연구가 진전되어 生體內 情報物質의 전달기구를 해명하는 완전한 모델이 확립되었으면 하는 바람이다.

本 研究를 시중 지도해 주신 일본 福山大學 유전공학연구소 교수이신 福井作藏 박사과 히로시마대학 생물화학연구소 교수 宮川都吉 박사께 감사드립니다.

REFERENCES

1. I. Banno: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**, 167 (1967).
2. Abe, K., Kusaka, I. and Fukui, S.: *J. Bacteriol.* **122**, 710-718 (1975).
3. Kamiya, Y., Sakurai, A., Tamura, S., Tsuchiya, E., Abe, K. and Fukui, S.: *Agric. Biol. Chem.* **43**, 363-369 (1979).
4. Kamiya, Y., Sakurai, A., Tamura, S., Takahashi, N., Abe, K., Tsuchiya, E., Fukui, S., Kitada, C., and Fujino, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **87**, 1087-1093 (1978).
5. T. Miyakawa, M. Kaji, Y.K. Jeong, E. Tsuchiya, and S. Fukui: *J. Bacteriol.* **169**, 1626-1631 (1987).
6. T. Migakawa, M., Nishihara, E., Tsuchiya, and S. Fukui: *J. Bacteriol.* **151**, 1184 (1982).
7. Y.K. Jeong, T. Miyakawa, A. Imabayashi, E. Tsuchiya, and S. Fukui: *Eur. J. Biochem.* **169**, 151-1515 (1987).
8. Hannun, Y.A., Loomis, E.A.: *Acc. Chem. Res.* **16**, 251-258 (1986).
9. Racker, E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **55**, 224-230 (1973).
10. T. Migakawa, T. Tachikawa, Y.K. Jeong, E. Tsuchiya, and S. Fukui: *J. Bacteriol.* **162**, 1304 (1985).
11. Miyakawa, T., Tachikawa, T., Jeong, Y.K., Tsuchiya, E., and Fukui, S.: *Biochem. Bio-*

-
- phys. Res. Commun.* **143**, 893-900 (1987).
12. T. Miyakawa, M. Kaji, T. Yasutake, Y.K. Jeong, E. Tsuchiya and S. Fukui: *J. Bacteriol.* **162**, 294 (1985).
 13. T. Miyakawa, H. Maruyama, E. Tsuchiya and S. Fukui: *Agric. Biol. Chem.* **46**, 2179 (1987).
 14. Y.K. Jeong, in preparation.