

이담자 효모의 세포간 성응집의 특성과 표면단백질의 관련성

정영기* · 이태호¹ · 최용락² · 강원대

동의대학교 미생물학과, ¹부산대학교 미생물학과, ²동아대학교 농화학과

Characterization of Sexual Agglutination and Involvement of Cell-Surface Protein Sexual Cell-Cell Interactions of Heterobasidiomycetous Yeast

Yong-Kee Jeong*, Tea-Ho Lee¹, Yong-Lack Choi² and Won-Dae Kang

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

¹Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-375, Korea

²Department of Agricultural Chemistry, Dong-A University, Pusan 604-714

Abstract — When mating type A and a cells of heterobasidiomycetous yeast *Rhodospiridium toruloides* were mix-cultured, both of the mating type cells have shown strong agglutination. But this agglutination was not detectable when the A and a cell were cultured separately. From reagglutination made just after the result of disassembling the agglutination by sonication, we knew that the agglutination was sexual-agglutination, not simple physical cell agglutination. The sexual agglutination was progressed actively on logarithmic phase and, in addition, progressed faster on mating type a cell treated with rhodotorucine A. These sexual agglutination have been inhibited by several protease such as trypsin, pronase, chymotrypsin and thermolysin and inhibited by 5 mM DTT as well.

이담자 효모 *Rhodospiridium toruloides*(1)는 성접합형이 서로 다른 A형과 a형으로 존재하고 있으며 이들 세포는 1배체에서는 각각 출아분열에 의하여 영양증식을 하고 있다(2). 이들은 영양증식과정에서 상호간에 상대접합형 영양세포에 성분화를 유도하는 sexual pheromone을 분비하는데, 접합형 A세포는 rhodotorucine A를 구성적으로 분비하고, a형 세포는 rhodotorucine a를 유도적으로 분비한다.

각 영양세포는 상대세포의 sexual pheromone을 수용하면 세포주기의 G1기에서 영양증식을 멈추고 상대접합형세포를 향하여 접합관을 생성하면서 생식세포로 분화한다. 접합형 A세포가 분비하는 rhodotorucine A는 1975년 Abe(2) 등에 의하여 발견되어 정제된 후 화학구조가 결정되었다(3).

이러한 성분화 유도물질을 분비하는 미생물은 많이 존재하고 있으나 같은 이담자 효모 중에서는 *Tremella mesenterica*가 peptide성 유도물질을 분비하는 것으로 잘 알려져 있다(4, 5). 이들 효모들은 성 pheromone에 의하여 성접합관을 형성하는 등 형태적인 변화를 초

래할 뿐만 아니라 생화학적인 변화에 의하여 세포상호간에 성접합이 용이하게 되도록 유도되어지고 있다. 실제로 Miyakawa 등은 *Tremella mesenterica*를 통하여, 상대접합형세포의 성 pheromone을 받은 세포는 세포표면의 주된 단백질이 변화하고, 이 변화는 성접합을 위한 세포응집현상을 유도한다는 결론을 내리고 있다(6, 7). 본 연구는 아직 성분화에 따른 세포표면 단백질의 변화가 잘 알려지지 않고 있는 이담자효모 *R. toruloides*에 대하여, 성접합 시 세포의 응집에 있어 표면 단백질의 변환과 관련 여부를 파악하기 위한 목적의 일환으로 행해졌다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

균주는 *Rhodospiridium toruloides* IFO 059-M919 (접합형 A)와 *R. toruloides* IFO 0880-M1057(접합형 a)로서 본 연구실에 보관하고 있는 균주를 사용하였다. 성 pheromone 생산 및 균의 생육을 위한 배양은 500 ml의 진탕 flask에 chloramphenicol 50 µg을 첨가한 YPG 배지(8) 100 ml를 넣어 배양온도 28°C에서 행했다. 응집현상의 관찰을 위한 배양은 대시험관(18

Key words: Sexual agglutination, sexual differentiation, cell-surface protein, *Rhodospiridium toruloides*
*Corresponding author

×180 mm)에 YPG 배지 5 ml을 넣어 진탕배양하였다.

Rhodotorucine A의 생산 및 부분정제

500 ml의 진탕 flask에 YPG 배지 100 ml 단위로 하여 미리 전배양된 A세포를 1×10^6 cells/ml의 농도로 접종하고 16~20시간동안 본배양한 후 세포수가 1×10^8 cells/ml 되는 시기에 원심분리(11,000×g, 10 min) 하여 상등액을 취한다. 배양상등액의 pheromone(Rhodotorucine A) 활성을 검정한 후 액량의 약 1/3 되게 n-butanol을 첨가하여 조심스럽게 흔들어 분액여두에 의하여 n-butanol 층을 회수한다. 회수된 butanol 층에서 pheromone의 활성을 확인한 다음 용매를 제거하여 농축된 조 pheromone을 methanol에 녹여 -20°C에 저장하면서 부분정제 pheromone으로 사용하였다.

성응집 반응

대시험관(18×180 mm)에 5 ml의 YPG 배지를 넣고 A세포와 a세포를 동을 혼합하여 세포수 1×10^7 cells/ml 되게 접종한다. 28°C에서 진탕배양하면서 시간과 조건별로 응집율을 관찰하였다. 성응집율은 현미경에 포착된 부분의 전체 균수를 측정하고 이에 대하여 응집을 형성하고 있는 균주를 백분율로 산출하였다. 즉,

$$\text{응집율} = \frac{\text{응집을 형성한 균수}}{\text{전체 균수}} \times 100$$

으로 하여 같은 sample에서 3회씩 산출하여 근사치 2조를 택하여 평균함으로써 응집율을 구하였다. 이때 A세포, a세포만을 같은 조건으로 배양한 것을 대조군으로 하여 비교하였다.

성응집에 대한 물리적(sonication), 화학적(protease)처리

초음파(sonication) 처리는 A와 a세포를 혼합배양하여 완벽하게 응집이 일어난 시점에서 bath형 초음파발생기(Branson 1200)를 이용하여 약 10분 정도 초음파처리를 하였다.

성응집 되었던 세포가 초음파의 물리적인 처리에 의하여 완전히 와해된 후에 다시 28°C에서 전과 같이 진탕배양을 계속하면서 시간별로 재 응집되는 현상을 관찰하였다.

Protease의 처리는 멸균배지에 미리 각종 protease (pronase 25 µg/ml, trypsin 100 µg/ml, chymotrypsin 200 µg/ml, thermolysin 200 µg/ml)를 첨가하였다. 각각의 농도로 용해된 효소액은 milipore filter(pore

size 0.45 µm)로서 세균을 완전히 제거한 다음 배지에 첨가하였다. 대조군은 protease를 첨가하지 않는 배지에서 나타난 응집율로써 protease 첨가 배지에서의 응집율과 비교하였다.

성분화 세포의 유도

5 ml의 YPG 배지에서 a세포를 1×10^7 cells/ml까지 배양하여 부분정제된 rhodotorucine A를 32u 첨가하고 1시간, 2시간동안 배양하여 성분화 세포로 유도하였다. 그 후 원심분리(11,000×g, 5 min) 하여 성 pheromone이 함유된 배지를 제거하고 신선한 YPG 배지에서 성접합을 관찰하였다.

결과 및 고찰

성응집 반응

접합형 A세포와 a세포를 따로 배양한 것과 A와 a세포를 혼합 배양했을 경우를 비교해 본 결과 혼합 배양에서 세포가 강하게 응집되는 현상을 알 수 있었다(Fig. 1). 이 응집 현상의 변화를 시간별로 점검해 본 결과 혼합배양 3시간이 지나면 약 90% 이상 응집하는 것을 알았다(Fig. 2). 그러나 접합형 A세포와 a세포를 따로 배양했을 경우에는 배양 4시간까지 전혀 응집이 일어나지 않았다. 이러한 결과는 양 접합형 세포는 서로 상대세포를 인식하여 결합되는 성적 특이적인 응집현상일 가능성이 클 것으로 예상된다. 이를 뒷받침할 수 있는 이론으로 Miyakawa 등이 *T. mesenterica*를 재료로 한 연구에서, 이 효모 세포는 상대접합형세포가 분비하는 성 pheromone을 수용하면 세포표면 단백질의 변화를 촉진하여 세포간 성적 접합의 특이적인 상호작용을 하고 있다고 보고한 바 있다(6).

성접합 특이적 응집의 확인

Fig. 1과 2의 결과에서 나타난 응집현상은 단순한 물리적인 현상인지 아니면 성접합과정에서 필수적으로 따르는 특이적인 반응의 결과인지를 확인하기 위하여 초음파처리를 하였다. A세포와 a세포를 혼합하여 시간에 따른 응집현상을 관찰한 결과 Fig. 3에서 보이는 바와 같이 4시간까지는 Fig. 2에서 보인 결과와 일치하였다. 4시간 배양 후 세포의 응집이 최고에 달했을 시점에서 초음파처리를 하여 물리적으로 세포를 분산시켰다. 분산된 세포를 다시 같은 조건에서 연장 배양하여 재응집상태를 관찰하였다. 초음파 처리 후 거의 완전히 분산된 세포는 곧 재응집을 시작하여 약 2시간 후에는 거의 초음파처리 전의 정도로 응집

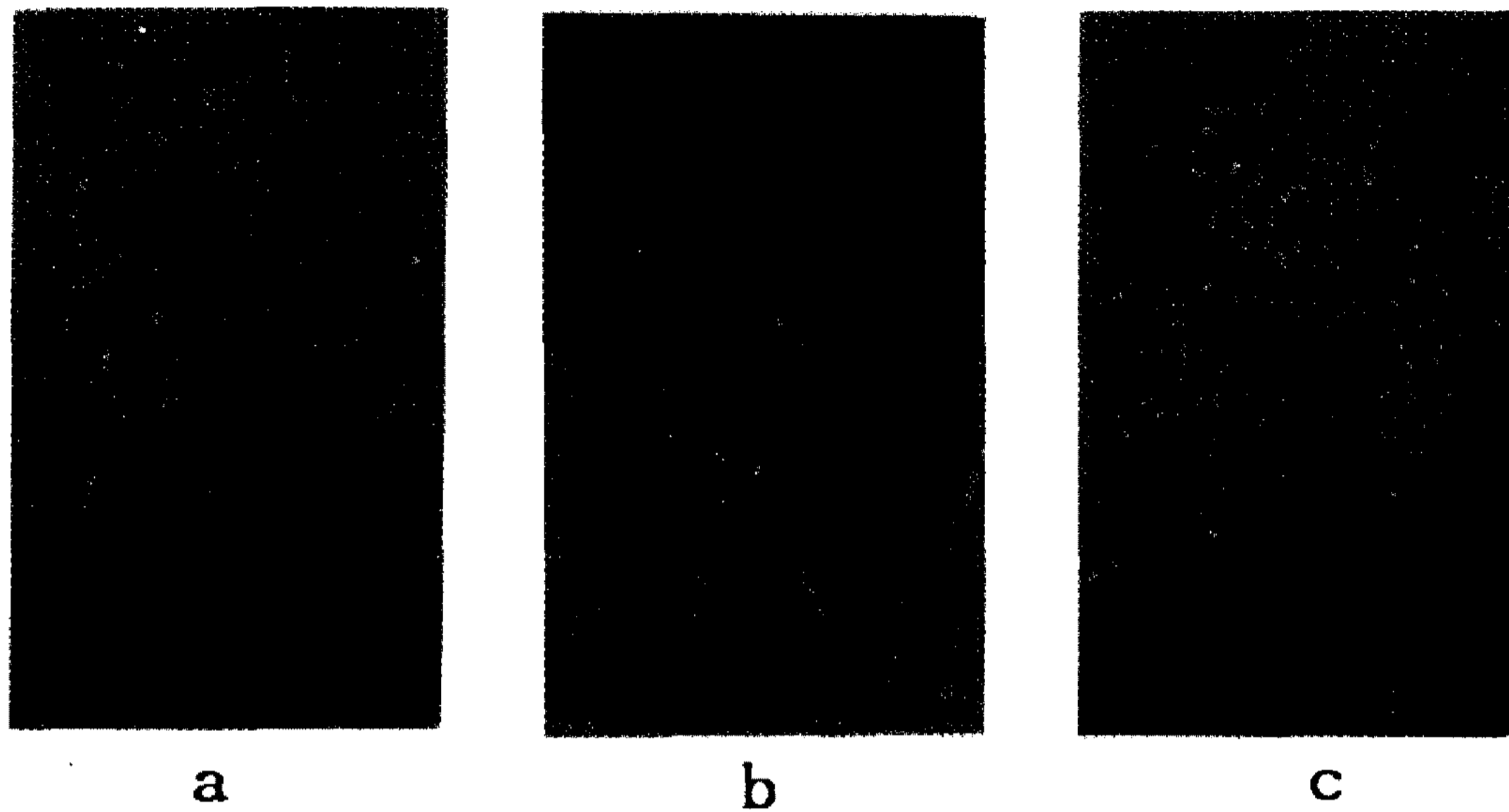


Fig. 1. Sexual agglutination of *Rhodosporidium toruloides* a; mating type A cells, b; mating type a cells, c; mixture of mating type A and a cells.

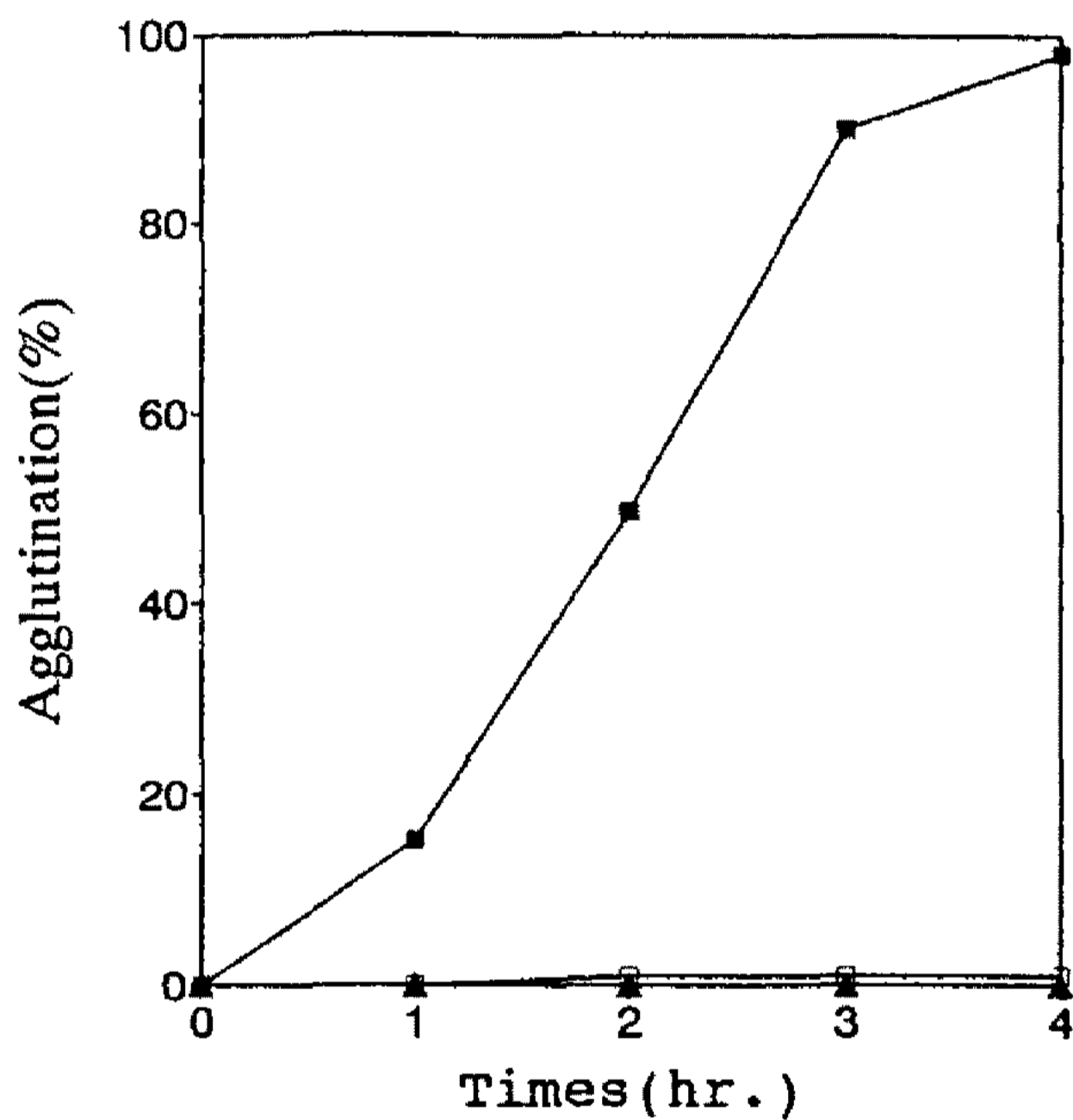


Fig. 2. Time course of sexual agglutination on *R. toruloides*.

-■-: mixture of mating type A and a cells, -▲-: mating type A cells, -□-: mating type a cells

되었다(Fig. 3). 그러나 초음파 처리를 하지 않은 세포는 그대로 응집된 상태를 유지하고 있었다. 이 결과로써 본 응집 반응은 서로 접합형 상대세포를 인식하여 형성되는 성적 특이적인 응집임을 예상할 수 있었다.

세포생육 시기에 따른 성응집

성응집현상은 접합형이 서로 다른 세포가 상대세포를 인식하여 상호정보물질을 교환함으로써 세포가

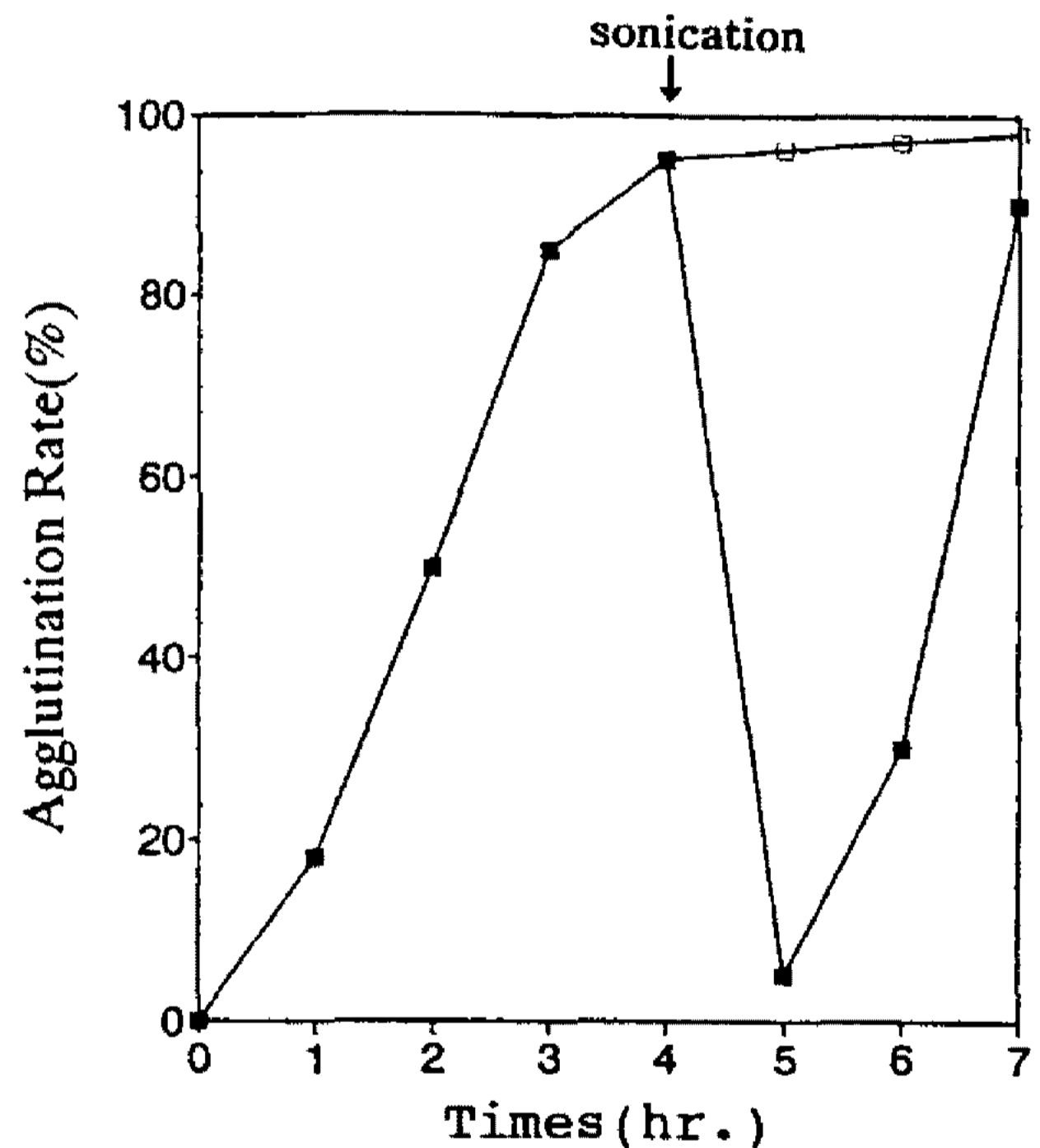


Fig. 3. Effect of sonication treatment on agglutination. -□-: none treatment of sonication, -■-: treatment of sonication

변화하는 과정에서 발생하는 현상으로 본다. 그러면 세포의 생육시기에 따라 상대세포를 인식하는 정도가 다르라는 예상을 할 수 있다.

각 세포를 8시간, 18시간, 30시간 이상으로 나누어 배양하여 이를 각각 유도기, 대수증식기, 정지기로 분류하였다. 이들 세포를 원심분리에 의하여 집균하고 접합형 A와 a세포를 혼합하여 처음 세포수가 1×10^7 cells/ml 되게 대시험관에 총 5 ml을 배양하면서 시

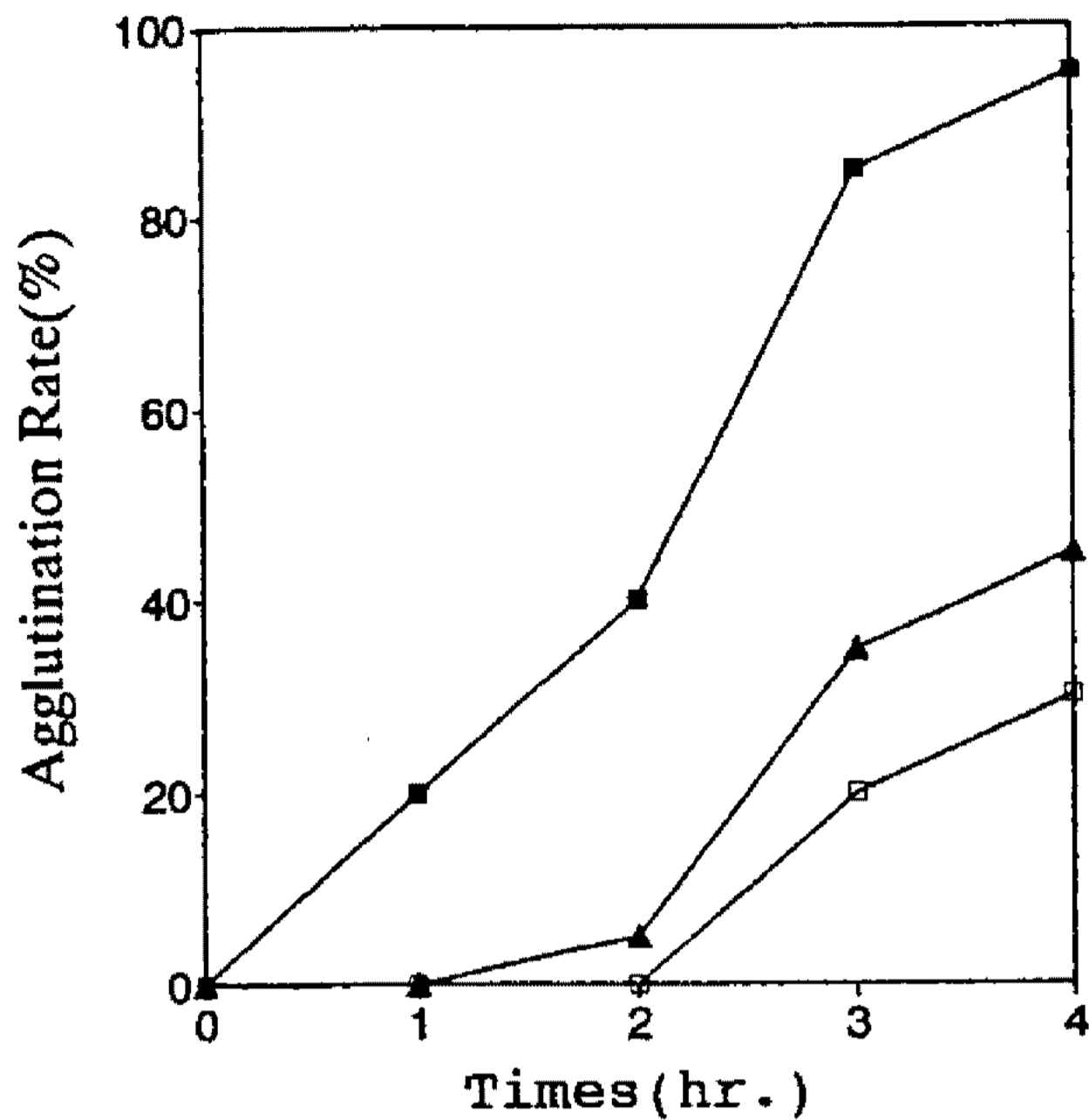


Fig. 4. Agglutination in each growth phase on *Rhodospiridium toruloides*.

—■—: agglutination of logarithmic phase cells (18 hr culture), —▲—: agglutination of lag phase cells (8 hr culture), —□—: agglutination of stationary phase cells (30 hr culture)

간별로 응집현상을 관찰하였다.

Fig. 4에서 보이는 바와 같이 A세포가 Rhodotorucine A를 가장 많이 생산한다고 알려진 대수증식기(배양 시작 후 16~20시간)에서 가장 높은 응집율을 보였다. 이 결과는 양성세포가 상대세포를 향해 분비하는 성 pheromone을 인식할수록 높은 응집율을 나타내는 것을 의미한다. 반면에 유도기와 정지기의 세포는 응집율이 낮았다. 이는 같은 결과는 이담자효모 *T. mesenterica*를 재료로 실험하여, 세포간의 성응집은 성 pheromone에 의해서 유도되는 성분화를 위한 세포 변화의 한 과정이라고 언급한 바 있는 Miyakawa 등의 보고(10)와 일치하는 결과라 사료된다.

a세포의 성 pheromone 수용 후의 성응집 효과

Fig. 4의 결과에서 성 pheromone의 분비가 활발한 대수증식기의 세포에서 성응집이 왕성하게 일어났으며, Miyakawa 등의 보고(10)에서도 성응집현상은 성 pheromone에 의존하여 나타난다고 하였다. 이같은 사실로 미루어 볼 때 세포가 성 pheromone을 수용하여 생식세포로 변화되는 과정에서 성응집현상이 일어난다고 예상할 수 있다.

a세포를 대수증식기까지 배양하여 집균 후 신선한 YPG 배지에 1×10^7 cells/ml 되게 재현탁 하였다. 여기에 부분정제한 rhodotorucine A 32U를 1시간, 2

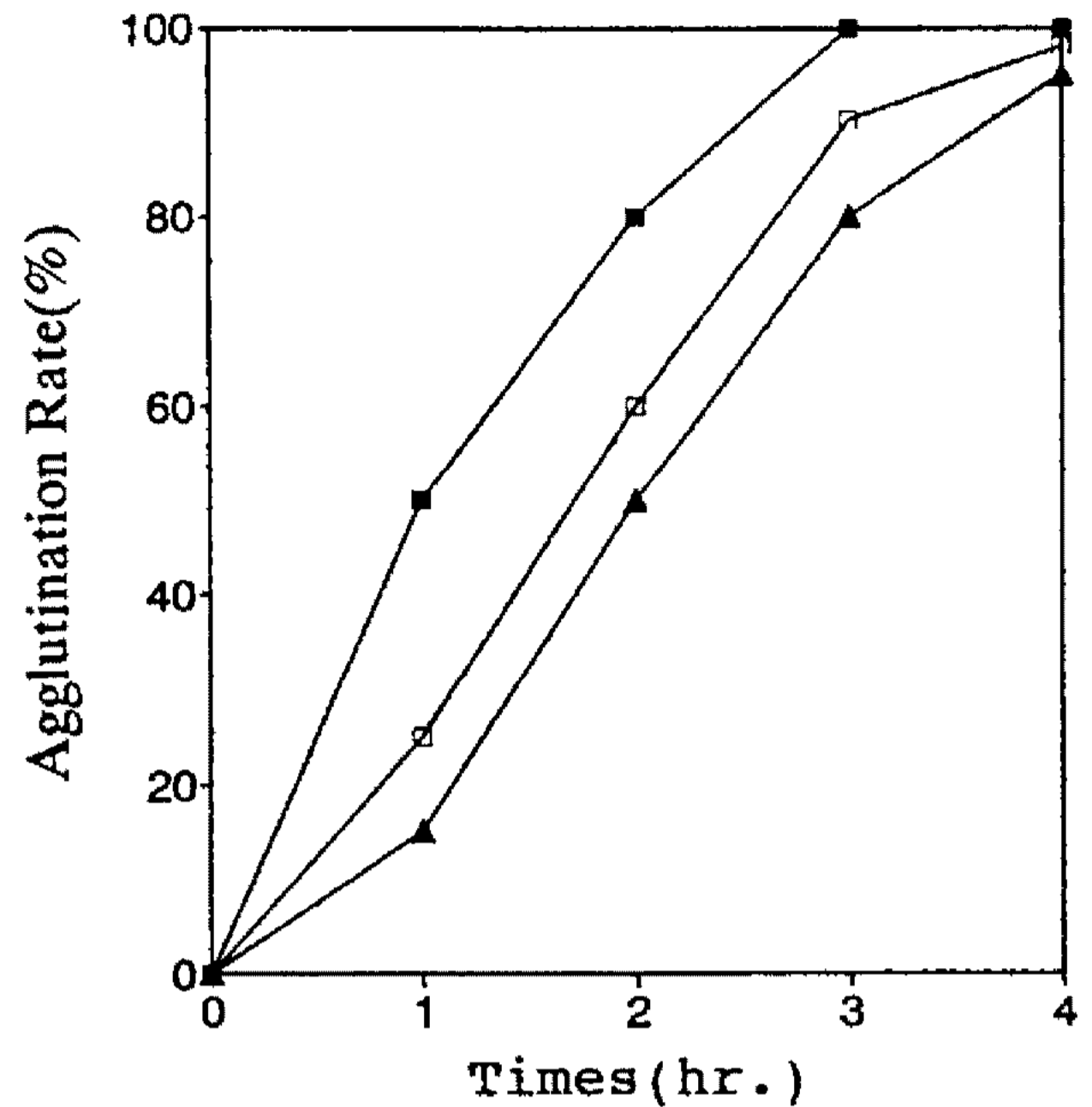


Fig. 5. Effect of rhodotorucine A treatment on sexual agglutination.

—▲—: nontreated a cells with rhodotorucine A, —□—: a cells treated with rhodotorucine A (1 hr), —■—: a cells treated with rhodotorucine A (2 hr)

시간동안 처리하고 원심분리에 의하여 재집균함으로써 rhodotorucine A를 제거하였다. 그런 다음 여기에 같은 수의 A세포를 첨가하여 28°C에서 배양하면서 시간별로 응집율을 검토하였다.

Fig. 5에서 보이는 바와 같이 a세포를 미리 rhodotorucine A로써 전처리한 경우의 성응집이 빨리 일어났다. 1시간 전처리 했을 때보다 2시간 처리한 것의 응집율이 높은 것으로 보아, 성응집은 상대세포가 분비하는 성 pheromone의 수용과 밀접한 관계가 있다는 것을 강하게 시사하였다. 즉, 성 pheromone으로 전처리한 세포는 이미 pheromone의 수용으로 인하여 생식세포로 변화하기 시작했으며, 이 변화는 세포표면단백질의 변화를 유도하여 상대 배우자 세포와 잘 응집할 수 있는 구조로 변화할 수 있다고 추측된다.

성응집에 대한 각종 protease의 영향

세포가 상대세포의 성 pheromone을 수용하여 세포표면 단백질의 변화를 초래하여 접합형 세포간에 성응집을 유도한다면 각종 protease에 대한 응집의 변화를 시험해 볼 필요가 있다. 대시험관에 A 및 a 세포를 1×10^7 cells/ml 되게 하여 총 5 ml의 YPG 배지에 pronase 25 µg/ml을 가하여 배양하면서 protease를 넣지 않은 군과 세포응집율을 비교하였다.

Fig. 6에서 보는 바와 같이 pronase를 넣지 않은 군에 비하여 pronase를 넣은 군의 세포는 월등하게

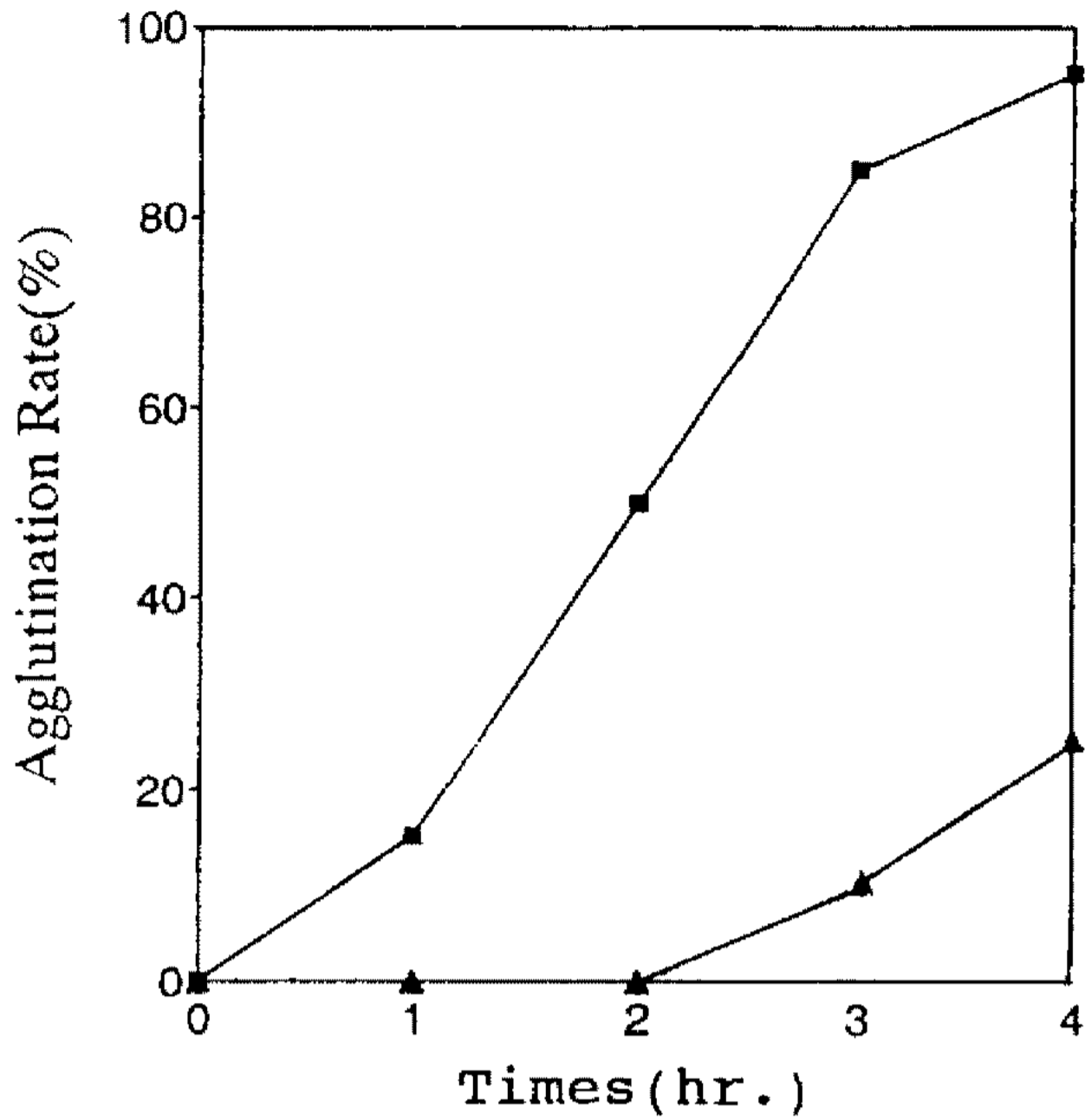


Fig. 6. Time course of sexual agglutination after treated with trypsin and pronase.

—■—: none (control), —▲—: treatment of pronase (25 µg/ml)

Table 1. Effect of various protease treatments of each mating type cells on sexual agglutination

Pretreatment	Agglutination (%)			
	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr
None (control)	15	50	85	95
Trypsin (100 µg/ml)	0	0	0	0
Chymotrypsin (200 µg/ml)	0	0	0	10
Thermolysin (200 µg/ml)	0	0	0	0
DTT (5 mM)	0	0	5*	12

응집율이 떨어지는 것을 확인하였다. 또한 trypsin, chymotrypsin과 thermolysin을 첨가한 경우에도 같은 결과를 나타내었다(Table 1). 환원제인 dithiothreitol (DTT)에 대해서도 낮은 응집율을 보였다. DTT는 thiol과 disulphied기에 의해 결합되게 하는 작용을 방해하여 성응집을 저해하는 것으로 예상된다. 물론 이들 각종 protease와 DTT는 균의 생육에는 전혀 영향을 미치지 않는 농도임을 확인하였다. Data로서는 신지 않았지만, 이들 protease가 성 pheromone을 분해하여 성분화를 차단할 염려가 있으므로, 혼합된 양세포가 성응집한 후에 protease의 영향을 검토해 보았다. protease 처리를 하고 약 1시간 반응을 했을 때 응집되었던 세포가 상당수 해체되어 있는

것을 알 수 있었다. 이 결과는 Table 1에서 보이는 결과와 거의 일치하였다.

이상의 결론으로 양접합형세포는 혼합배양을 했을 때 서로 상대세포를 인식함과 동시에 세포표면 단백질이 상호응집을 유도하는 구조로 변화하나 protease와 환원제는 이들의 구조와 결합을 파괴하여 응집을 저지하는 것으로 추측된다. *Rhodosporidium toruloides*의 각 접합형 세포가 상대세포의 성 pheromone을 수용하면 세포표면 단백질 중 어느 것이 특이적으로 변화하는 지는 본 실험만으로는 알 수 없다. 그러나 *Tremella mesenterica*를 재료로 한 실험결과(9)에 비추어 볼 때 본 균주 역시 성응집현상과 세포 표면 단백질의 변화는 불가분의 관계에 있음을 예측할 수 있다.

요 약

이담자 효모 *Rhodosporidium toruloides*의 접합형 A세포와 a세포를 혼합 배양했을 때 양 세포는 강한 응집현상을 보였다. 이 응집은 A와 a세포를 각각 배양했을 때는 일어나지 않았다. 초음파처리로 세포의 응집을 해체해 보았으나 곧 바로 재응집되는 것으로 보아 본 응집현상은 단순한 물리적인 세포 응집이 아닌 성응집 현상인 것을 알 수 있었다.

성응집 반응은 대수증식기의 세포에서 활발히 진행되었으며, a세포를 rhodotorucine A로서 처리한 세포에 대해서는 성응집이 빠르게 진행되었다. 이들 응집반응은 trypsin, pronase, chymotrypsin, thermolysin 등의 각종 protease(25~200 µg/ml)에 대하여 저해되었다. 또 5 mM의 DTT에 대해서도 저해되었다. 이들 결과는 양 접합형세포의 성응집에는 세포표면 단백질의 변화가 큰 역할을 하고 있다는 것을 시사한다.

감사의 말

본 연구는 1994년도 동의대학교 재단학술연구비 지원에 의하여 행하였으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Bano, I. 1967. Studies on sexuality of *Rhodotolula*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 167-196.
2. Abe, K., I. Kusaka, and S. Fukui. 1975. Morphological change in the early stages of the mating of *Rhodosporidium toruloides*. *J. Bacteriol.* **122**: 710-718.

3. Kamiya, Y., A. Sakurai, S. Tamura, E. Tsuchiya, K. Abe, and S. Fukui, 1979. Structure of rhodotorucine A, a peptidyl factor inducing mating tube formation in *Rhodospiridium toruloides*. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 363-369.
4. Bandoni, R.J. 1963. Conjugation in *Tramella mesenterica*. *Canadian Journal of Botany.* **41**: 467-474.
5. Bandoni, R.J. 1965. Secondary control of conjugation in *Tremella mesenterica*. *Canadian J. Botany.* **43**: 627-630.
6. Miyagawa, T., Okubo, Y.T., Tsuchiya, E., Yamashida, I. and Fukui, S. 1982. Appearance of new protein species of the cell surface during sexual differentiation in the heterobasidiomycetous yeast, *Tremella mesenterica*. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 2403-2405.
7. Miyakawa, T., Kadota, T., Okubo, Y., Hatano, T., Tsuchiya, E. and Fukui, S. 1984. Mating pheromone-induced alteration of cell surface proteins in the hetero basidiomycetous yeast, *Tremella mesenterica*. *J. Bacteriol.* **158**: 814-819.
8. Miyakawa, T., Kaji, M., Yasutake, T., Jeong, Y.K., Tsuchiya, E. and Fukui, S. 1985. Involvement of protein sulfhydryls in the trigger reaction of Rhodotorucine A, a farnesyl peptide mating pheromone of *Rhodospiridium toruloides*. *J. Bacteriol.* **162**: 294-299.
9. Jeong, Y.K., T. Miyakawa, A. Imabayashi, E. Tsuchiya, and S. Fukui. 1987. Interaction with phospholipids of a membrane thiol peptidase that is essential for the signal transduction of mating pheromone in *Rhodospiridium toruloides*. *Eur. J. Biochem.* **169**: 511-515.
10. Miyakawa, T., Y. Azuma, E. Tsuchiya, and S. Fukui. 1989. Involvement of cell-surface proteins in sexual cell-cell interaction of *Tremella mesenterica*, a hetero basidiomycetous fungus. *J. General Microbiology.* **133**: 439-443.

(Received 9 March 1995)