

효모 세포의 Tripolyphosphatase와 Polyphosphatase 활성도 및 Volutin 과립의 세포학적 관찰

李 基 渥 · 崔 榮 吉

漢陽大學校 生物學科

Cytochemical Observation of Volutin Granules and Activities of Tripolyphosphatase and Polyphosphatase in *Saccharomyces uvarum*

Ki Sung Lee and Yong Keel Choi

Department of Biology, Hanyang University, Seoul 133, Korea

Abstract: To investigate cellular regulation of phosphate metabolism between catabolically repressed and derepressed states in *Saccharomyces uvarum*, the activities of polyphosphatases, the analysis of polyphosphate and cytochemical observation of volutin granules were examined according to the culture phase and under various phosphate concentrations. As the results, tripolyphosphatase activity was increased more than six-fold during catabolic repression as compared with those of catabolic derepression and the polyphosphatase activity increased at the time of maximal accumulation of acid insoluble polyphosphate "B". Of the low molecular weight polyphosphates, tripolyphosphate was mainly detected by thin layer chromatography. When the synthesis of volutin granules in derepressed cells was observed cytochemically, acid insoluble polyphosphate localizing at the cell wall was primarily synthesized and then transferred into the cytoplasm, nucleus and/or vacuole.

Keywords: *Saccharomyces uvarum*, Tripolyphosphatase, Polyphosphatase, Volutin granules, Catabolic repression and derepression.

균류세포에서 산 가용성 polyphosphate는 spore의 발아과정 초기에 주로 pyrophosphate로 이루어져 있으며, nucleotide, sugar-phosphate, RNA 합성에 이용된다 (Kulaev, 1979).

효모 세포 *Saccharomyces carlesbergensis*에서는 polyphosphate가 정체에 많은 양이 축적되며, 성장 시기 중에는 polyphosphate의 총 축적량이 감소한다. 즉 활발한 성장 시기에 polyphosphate의 축적이 억제됨을 볼 수 있다 (Tsiomenko 등 1974; Kulaev, 1979; Lee 등, 1985 I and II).

특히, 효모세포를 인산 결핍 배지에서 배양 후, phosphate-enriched 배지에서 catabolic derepression 시키면, 산 불용성 polyphosphate가 극히 높은 축적현상인

hypercompensation effect도 관찰된 바 있다 (Kulaev, 1979; Lee 등, 1985 I and II).

많은 하등한 생물체에서, 고분자 polyphosphate는 복잡한 인산 대사조절에 중요한 역할을 하고 있으며, 외부 당의 세포내 도입, 그리고 세포내의 ortho-P 수준 및 ADP/ATP system을 조절하는 기능도 있다 (Nesmeyanova 등, 1973; Lee 등, 1985 I and II).

*Saccharomyces bisporus*를 재료로 polyphosphate 축적과 ACPase 합성의 repression 또는 derepression사이의 상관관계를 살핀 연구 (Weimberg, 1976)에서는 세포의 ortho-P의 농도가 중요한 요인이라 하였고, polyphosphate 축적 및 분해 그리고 이에 관련된 효소에 관한 연구에서, Nyholm (1978)은, algae를 재료로, Nesme-

yanova등(1978)은 *E. coli*를 재료로 유사한 연구가 시행된 바 있다.

국내에서는 효모세포 *Saccharomyces uvarum*을 재료로 하여 catabolic repression 및 derepression 시켰을 때, polyphosphate 축적량, ortho-P, nucleotidic labile-P의 양적동태와 ACPase, ALPase 활성도의 변화 및 ACPase와 ALPase의 isoenzyme pattern이 조사된 바 있고(Lee 등, 1985 I, II, and IV), 유기물 합성(phospholipid, polysaccharide)과 polyphosphate 축적량사이의 상관관계를 살핀 연구가 있다(Lee 등, 1985).

본 연구는 효모세포를 catabolic repression과 derepression시켰을 때, polyphosphate합성 및 분해에 직접 관련된 tri-polyphosphatase와 polyphosphatase의 활성도동태를 조사하고, 효모세포에 존재하는 polyphosphate를 thin layer chromatography방법을 통하여 분석하여 세포내 인산대사 조절양상을 해석하고자 하였다.

또 배양시기 및 인산첨가배양에 따른 무기폴리인산의 세포내 축적상태, 세포내 위치, 전환과정을 조사하기 위해 염색을 통한 volutin과립의 세포학적 관찰을 행하였다.

재료 및 방법

효모의 생장 조건 및 배지

효모세포 *Saccharomyces uvarum* ATCC 9080의 catabolic repression 및 derepression 그리고 인산첨가배양은 전보(1985 I and II)와 동일한 방법으로 행하였다.

효소의 활성도 측정

1) Tripolyphosphatase, polyphosphatase.

Tripolyphosphatase(Tripoly-Pase)와 polyphosphatase(poly-Pase)의 활성도 측정은 Kulaev and Konoshenko(1971)와 Rubtsov and Kulaev(1977)가 행한 방법에 의거하였다. 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) 0.1 ml, 0.01 M MgCl₂ 0.05 ml, 2 M KCl 0.05 ml, 기질용액(Tripoly-P는 1.5 mg/ml, poly-P (n=15)는 1 mg/ml) 0.1 ml에 효소추출액 0.2 ml를 가하여 반응시켰다. 효소추출액은 전보(1985 I and II)와 마찬가지로 Hughes(1971) 방법에 의하여, 마쇄된 추출액을 15,000 rpm에서 10분간 원심분리시킨 상등액을 이용하였다.

37°C에서 20분간 반응시켰으며, 반응을 정지하기 위해 0.5 ml 7% PCA 용액을 가하였다. 원심분리 후 상등액을 적량 취하여 ortho-P 정량방법(Berenblum and Chain, 1938)을 이용하여 효소의 반응 결과 생성된

ortho-P를 정량함으로써 활성도를 구하였다.

Thin Layer Chromatography

1) 무기폴리인산(polyphosphate)의 분리

TLC에 적용하기 위한 효모세포의 무기폴리인산의 분리는 Harold(1963)의 방법에 의거하여, 적량의 효모세포에 alkaline sodium hypochlorite를 25°C, 45분간 처리한 후, 1 mM EDTA가 함유된 1.5 M NaCl과 ethanol을 처리하여 무기폴리인산 분획구를 얻었다.

이를 Aurenge and Normand(1964)의 방법에 따라 TLC를 적용하였다. 즉, cellulose(Sigma Chemical Co.) layer를 이용하였으며, linear poly-P의 분리를 위하여, 전개용매는 증류수, ethanol, isobutanol, isopropanol, conc NH₄OH, TCA를 혼합하여 (30+35+15+20+0.4+5 g) 조제하였다.

용매전개는 14 cm까지 하였으며, 전개 후 실온에서 건조시킨 다음 1% ammonium molybdate용액을 분무하고 다시 건조시킨 뒤 1% SnCl₂ (in 10% HCl) 용액을 분무하여 발색시켰다.

Volutin 과립의 염색

배양기간에 적당량 효모세포를 취하여, 증류수로 세척한 후, slide에 도말하고 열로 고정한 후 acetic acid가 첨가된 toluidine blue-malachite green 염색용액을 적하하고, 3~5분간 염색하였다. 그리고 증류수로 세척한 다음 KI-I₂ 용액을 3분간 반응시킨 다음 증류수로 세척한 뒤 검경하였다. 배경은 초록색을 띠며 volutin과립은 검은색을 띠는 특징으로 판별하였다(Laybourn, 1924).

결과 및 고찰

배양 조건에 따른 tripoly-Pase 및 poly-Pase의 활성도

catabolic repression시킨 효모세포를, 완전배지(YE)와 여러가지 농도로 인산을 처리한 최소배지에서 catabolic derepression 시켰을 때, tripolyphosphatase와 polyphosphatase의 활성도를 조사한 결과는 Fig. 1, 2 및 3에 표시하였다.

catabolic repression (starvation)시킨 세포가 정상배양세포에 비하여 tripoly-Pase의 활성도는 6배이상 증가하였다(Fig. 1).

인산의 첨가배양에 따른 tripoly-Pase의 활성도변화는 catabolic derepression시킬 때, 당만 첨가하고 Pi는 공급하지 않은 배양구(PO)에서, 배양중 지속적으로 높은 활성을 나타냈으나, 당과 인산을 모두 첨가한 시험

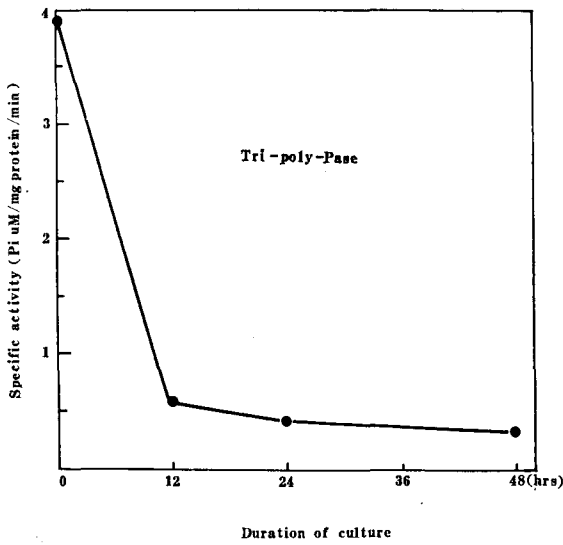


Fig. 1. Changes in tripolyphosphatase activity during growth on YE medium.

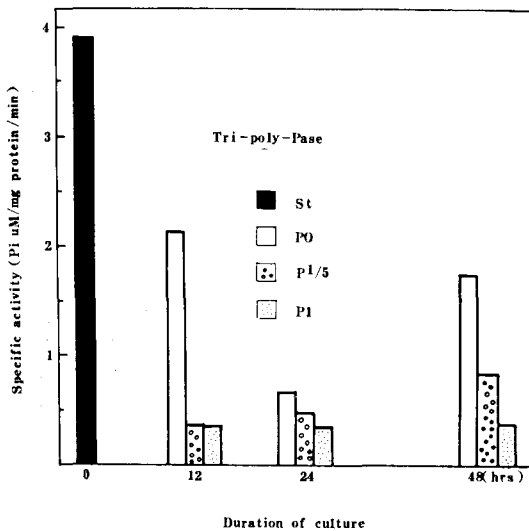


Fig. 2. Changes in tripolyphosphatase activity during growth on minimal medium supplemented with sugar and Pi free (St), Pi free (PO), Pi limited (PI/5) and Pi sufficient (PI).

구에서는 인산을 많이 첨가한 배양구일수록 급격한 활성도의 감소를 나타내었다(Fig. 2). 이러한 tripoly-Pase 활성도의 동태는 동일조건하에서의 ALPase, AC-Pase, ATPase 활성도 변화와 거의 유사함을 보여주었다 (Lee 등, 1985 I and II). 이와같이 활발한 세포 성장 시기가 아닌 repression시켰을 때 tripoly-Pase 및 ALPase

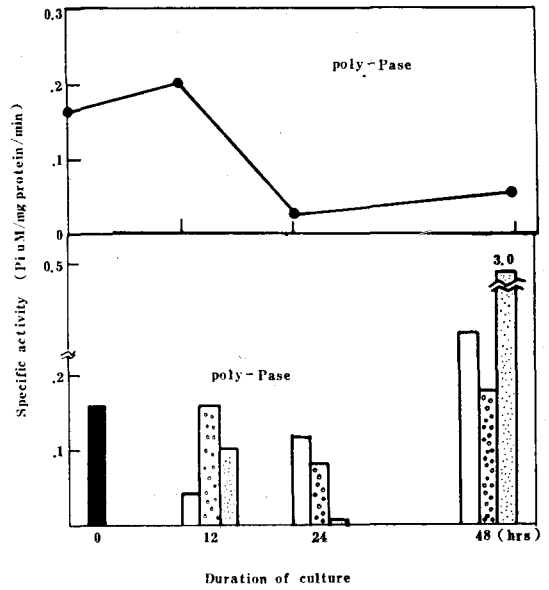


Fig. 3. Changes in polyphosphatase activity during growth on YE medium and on minimal medium. Symbols are the same as the previous figure.

등의 활성도가 높아진 것은 다른 종류의 phosphotransferase 반응과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각해 볼 수 있다.

Polyphosphatase의 활성도는 tripoly-Pase의 활성도 동태와는 달리 catabolic derepression시켰을 때도 급격한 감소를 나타내지 않았으며, 오히려 산불용성 무기 폴리인산이 최대함량을 보인 시기에 높은 활성도를 나타내었다(Fig. 3; Lee 등, 1985 I and II).

이러한 사실 증분 연구에서 catabolic repression시켰을 때, 다시 말해서 poly-P의 총 축적량이 가장 높은 시기 때 poly-P를 분해, 이용하는 효소(poly-Pase, tripoly-Pase)의 총활성도가 높았고, PO (phosphate free) 시험구에서 계속 높은 활성을 나타내었던 현상은, poly-P를 이용하는 효소의 활성은 poly-P의 분해, 감소에 관련 할 뿐 아니라, 축적에도 관련한다는 Nesmeyanova 등(1973), Grillo and Gibson (1979)의 연구와 유관하다.

Poly-P의 세포내 축적이 최대가 되려면, poly-P합성에 필요한 효소의 activation 또는 induction이 나타나거나, poly-P를 이용하는 효소의 repression 또는 inhibition이 일어나야 되거나, 두가지 모두가 일어나야 할 것이다. 그런데 poly-P kinase (poly-P 합성효소)의 활성도는 poly-P가 감소될 때, 증가하고(Nesmeyanova,

1973), ADP에 친화력이 강하다는 보문(Stahl and Felter, 1975)을 생각할 때, 본 실험에서 poly-P의 총 축적량이 감소되는 시기, 즉 catabolic derepression시킴 세포생장이 활발한 시기에, poly-P중 산불용성 고분자 poly-P (poly-P "B" type)의 함성은 증가하였던 현상(Lee, 1985 I and II)과 연관시키면, tripoly-Pase 및 poly-Pase의 활성도 증가는 poly-P중 가장 중심이 되며 pool역할을 수행하는 산불용성 poly-P의 축적에 관여한다고 생각할 수 있으며, 여러 성장조건 중 catabolic derepression 될 때, 세포내 poly-P의 합성경로는 총 축적량은 감소될지라도 repression시기 때 감소되어진 산불용성 poly-P를 우선적으로 축적하는 방향으로 진행되어 진다고 추정해 볼 수 있다.

또 poly-P 총 축적량, ortho-P함량, ALPase, poly-Pase, tripoly-Pase 활성도의 peak가 거의 일치함을 볼 수 있었다(Fig. 1, 2, 3, Lee 등, 1985 I and II).

본 연구에서 tripoly-Pase의 활성이 일반적으로 전 배양조건을 통해 poly-Pase의 활성보다 매우 높게 나타났는데, tripoly-Pase의 활성도가 poly-Pase의 활성도보다 3배 이상 높게 나타난다는 Kulaev (1971) 등의 결과와 유관하였다.

따라서, Lee 등(1985 I, II and IV)의 연구와 본 연구의 결과를 종합해 보면 catabolic repression시킨 세포에서 인산대사에 관련된 효소가(ACPase, ALPase ATPase, tripoly-Pase, poly-Pase) 모두 derepression현상이 일어남을 볼 수 있었다.

즉 catabolic repression(특히, p_i free)상태에 대한 인산대사조절 양식은 phosphate group을 가수분해하는 효소의 derepression에 의하여 compensation되는 것으로 추정할 수 있었다.

무기 폴리인산 분석

Fig. 4에 표시한 바와 같이 효모세포에 존재하는 저분자($n < 8$, p_i)무기폴리인산은 tripolyphosphate가 주로 검출되었고 ortho-P 역시 다량 분리되었으나, $n > 8$ 이상의 무기폴리인산은 전개되지 않고 origin에 많은 양 검출되었다.

Volutin과립의 세포학적 관찰

폴리인산은 효모 또는 다른 미생물에서, Babesh-Ernst bodies, metachromatic granule 또는 volutin granule로 오래전부터 불리워진 세포내 함유물의 한 종류로 알려져 있다(Kulaev, 1979; Widra, 1959). Volutin과립은 폴리인산, RNA, 단백질, 인지질, 양이온(Mg^{2+})이 복합적으로 결합되어 있다(Widra, 1959)고 하였다.

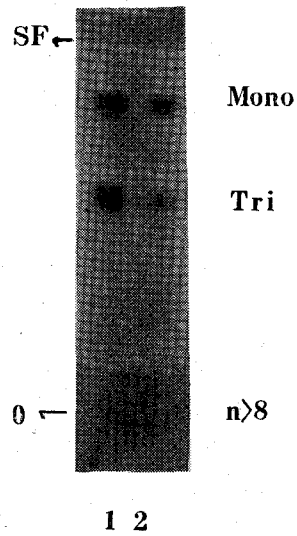


Fig. 4. Thin layer chromatograms of polyphosphate from *Saccharomyces uvarum* cells. 1: standard substance (mono; KH_2PO_4 , Tri; tripoly-p), 2: poly-P in yeast cells.

또 volutin과립은 toluidine blue와 methylene blue같은 염기성 염료에 의하여 metachromatic staining이 이뤄지는데, 이는 volutin과립의 성분 중 무기폴리인산에 의해 특이하게 metachromasy현상이 나타난다(Kulaev, 1979).

Volutin과립은 염색을 하지 않고 phase-contrast 현미경에 의해 생체내 관찰이 가능하다(Widra, 1959; Wilkinson and Dugid, 1960).

또 효모세포에서 산불용성 고분자 무기폴리인산은 세포의 세포벽 또는 peripheral region에, 산가용성 폴리인산은 세포질에, 염가용성 폴리인산은 액포에 위치한다 하였다(Indge, 1968; Kulaev 1979).

본 실험에서는 배양시기 및 배양조건(특히 무기인산 첨가영향)에 따른 volutin과립의 형성변화 및 세포내 위치를 조사하였는데 그 결과는 Fig. 5, 6에 표시하였다.

당과 인산이 결핍된 배지에서 생육한 세포(S)에서는 역시 세포벽 부위의 volutin과립은 보이지 않았고, 지속적인 무기인산 결핍상태의 시험구(PO)를 제외하고는, catabolic derepression시킨 시험구 모두에서 12시간 배양시켰을 때, 세포막 외부에 상당히 여러개의 커다란 과립이 형성된 것을 볼 수가 있으며, 24시간 배양에서는 모두 세포질 특히 액포나 핵에 volutin과립의 형성을 볼 수 있다.

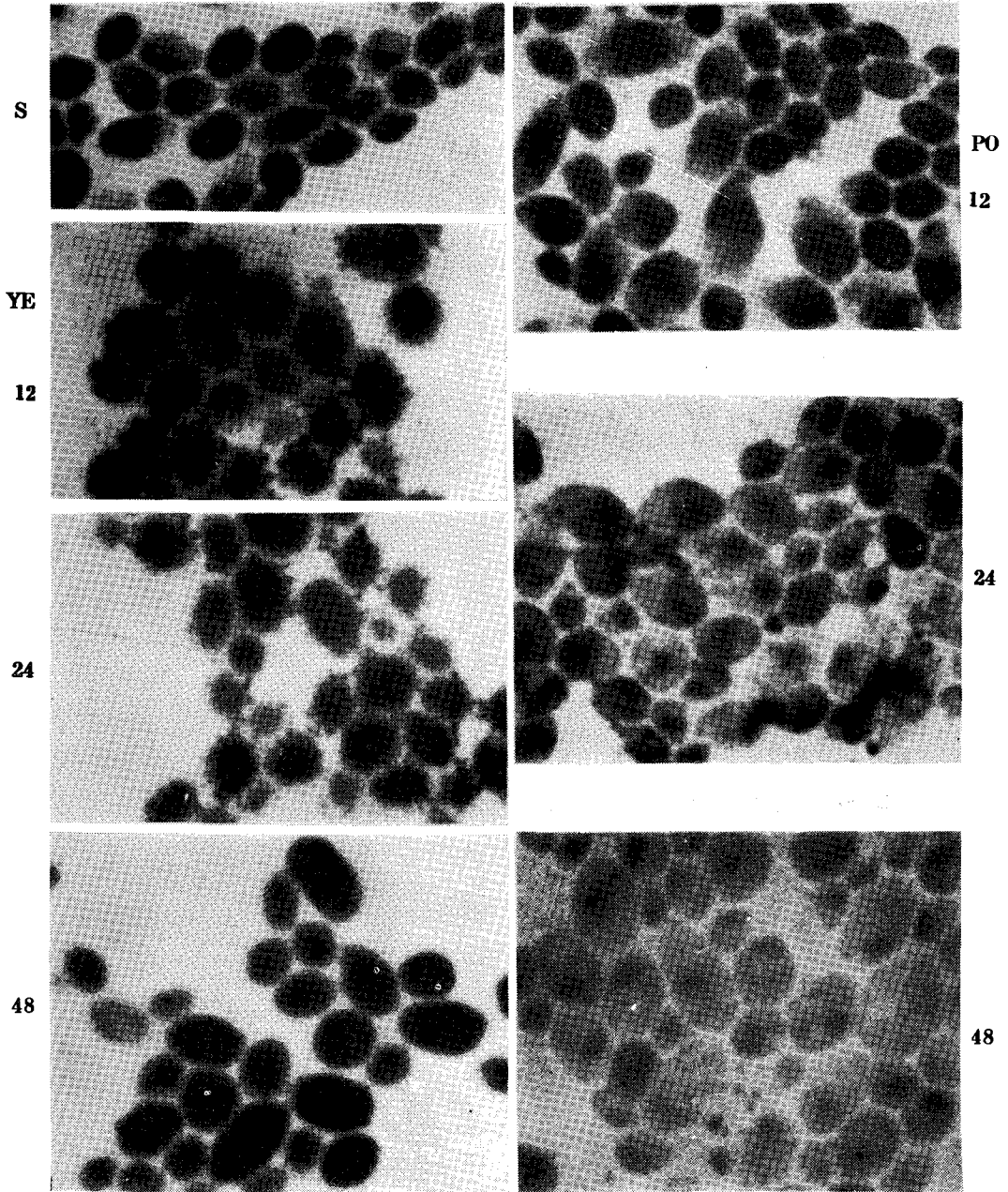


Fig. 5. Observation of metachromatic granule in *S. uvarum* during growth on YE complete medium and on Pi free minimal medium (PO). S→ starved intact cell. The numerals mean duration of the culture (hr).

무기폴리인산 형성에 대한 무기인산의 영향이 48시간 배양구에서는 인산 첨가정도에 따라 확실히 잘 나타났다.

즉 PO 시험구에서는 세포질내에도 거의 volutin과립

은 나타나지 않았으나, P 1/5, P1 시험구에서 나타난 바와 같이 무기인산을 많이 첨가하여 배양함에 따라 세포내(특히 액포)에 짙은 volutin과립의 형성을 볼 수 있다.

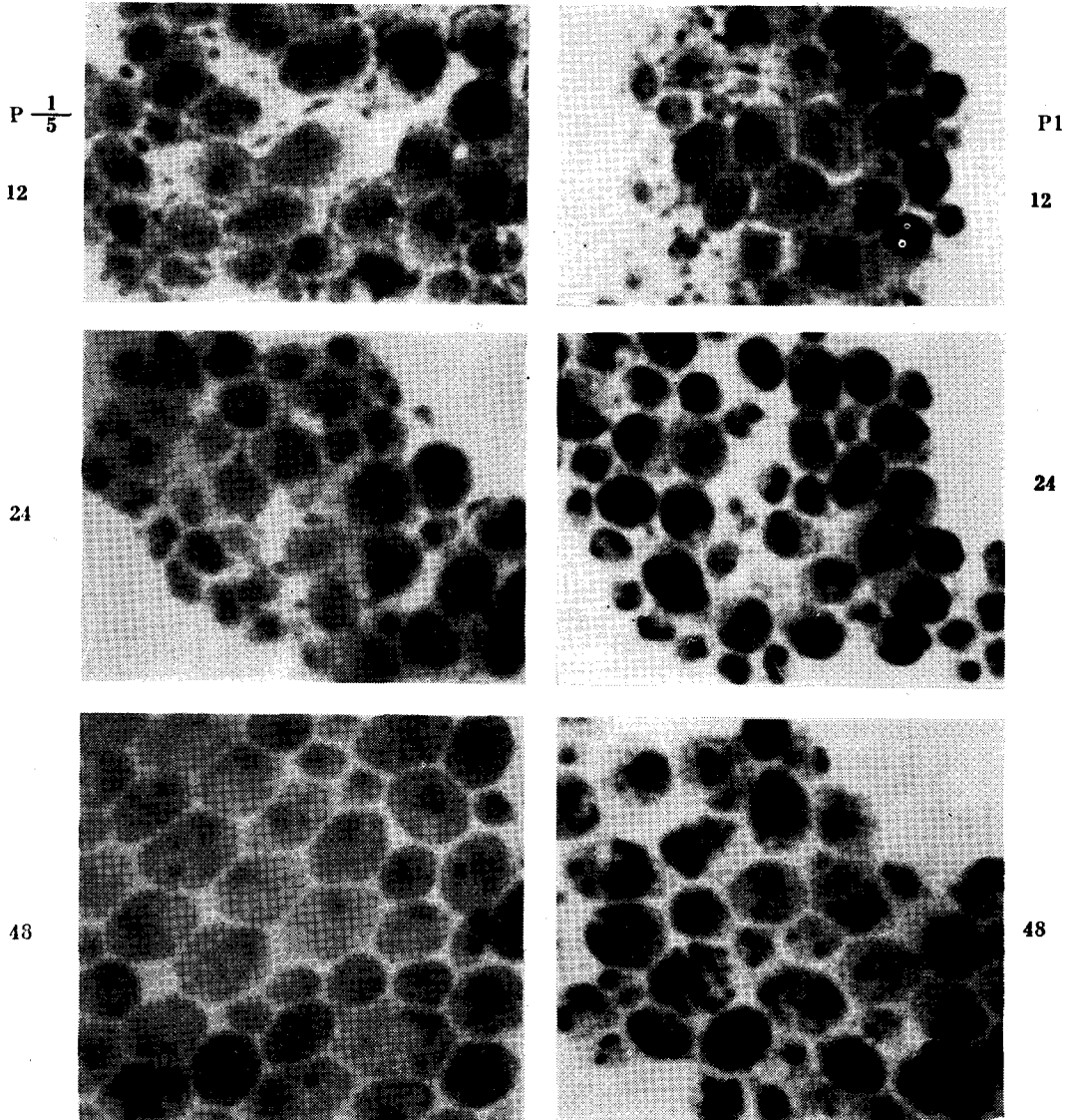


Fig. 6. Observation of metachromatic granule in *S. uvarum* during growth on Pi limited minimal medium (P 1/5) and on Pi sufficient minimal medium (PI).

이와같은 결과는 배양시기별 산불용성 poly-P "B" "C" 합성양(Lee 등 1985 I and II)과 세포학적 관찰이 매우 잘 일치하고 있으며, 여기서 특기할만한 사실은 효모에서는 역시 세포막 외부에 존재하는 무기폴리인산이 먼저 합성된 후, 배양되어지는 환경에(배양시기, 무기인산 유무에 따른 영향등) 따라, 세포내부로 전환되어가는 것을 볼 수가 있었다. 이러한 사실은 무기인산 결핍시 세포막 외부에 존재하는 고분자 무기폴리인산은 유의하게 합성되지 않는다는 Kulaev 등(1970)의

연구결과와 일치한다. 또, 비록 무기인산 결핍상태에서도 약간의 세포분열로 인한 biomass의 증가를 보인 것과 산 불용성 폴리인산의 감소 또는 손실되는 현상은 무기인산 결핍상태에서의 고분자 무기폴리인산의 기능이 외부의 당을 세포내로 도입하는 작용이외에 다른 목적, 즉 고분자의 산불용성 무기폴리인산이 분해되면서 세포내로 운반되어, 여러가지 생화학적 반응에 참여한다는 것을 강력히 추정해 볼 수 있다. 또 폴리인산의 분해과정의 생리적 중요성은 분해된 무기폴리

인산의 세포내 이동과 함께 폴리인산 기능의 변환이 일어나는 데 있다(Kulaev, 1979)는 보분과 마찬가지로 본연구에서도 volutin과립의 생성 및 전환은 성장조건과 세포에 의해 받아들여진 물질대사 양식에 따라 다양하게 변화하는 것을 관찰할 수 있었다.

적 요

이 연구는 효모 세포를 catabolic repression과 derepression시켰을 때, poly-P 합성 및 분해에 직접 관련된 tripoly-Pase와 poly-Pase의 활성도 동태를 조사하여 세포내 인산 대사 조절양상을 해석하고자 하였다. 또 TLC 방법을 통하여 무기 폴리인산을 분석하고, 배양시기 및 인산 첨가배양에 따른 무기폴리인산의 세포내 축적 상태, 세포내 위치, 전환과정을 조사하기 위해 염색을 통한 volutin 과립의 세포학적 관찰을 행하였다. Tripoly-Pase 활성도는 catabolic repression시킨 세포에서 derepression된 세포에 비하여 6배 이상 증가하였으며, poly-Pase 활성도는 산 불용성 무기폴리인산인 poly-P-“B”가 최대 축적량을 나타낸 시기에 최대의 활성도를 보였다. Linear poly-P의 분석에서는 tripoly-P가 주로 검출되었고 $n > 8$ 이상인 poly-P가 다량 검출되었다. catabolic derepression시킨 세포에서 volutin과립의 형성을 세포학적으로 관찰하였을 때, 세포벽에 존재하는 산 불용성 무기 폴리인산이 우선적으로 합성되었으며, 배양함에 따라 세포질, 핵 또는 액포로 전이되었다.

文 獻

Aurenge, J. and Normand, D.J.(1969): *Thin layer chromatography: A Laboratory Handbook*, 2nd Ed., 848~851.

Berenblum, I. and Chain, E.(1938): An improved method for the colorimetric determination of phosphate. *J. Biochem.* 32:295~298.

Grillo, J.F. and Gibson, J.(1979): Regulation of phosphate accumulation in the unicellular *Cyanobacterium synechococcus*. *J. Bacteriol.* 96:508~517.

Harold, F.M.(1962): Depletion and replenishment of the inorganic polyphosphate pool in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 83:1047~1057.

Harold, F.M.(1963): Inorganic polyphosphate of high molecular weight from *Aerobacter aerogenes*. *J.*

Bacteriol. 86:885~887.

Hughes, D.E.(1971): *Methods in Microbiology*, Academic Press, London and New York. 5B:27~30.

Indge, K.J.(1968): Polyphosphates of the yeast cell vacuole. *J. Gen. Microbiol.* 51:447~452.

Kulaev, I.S.(1979): *The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates*, John Wiley and Sons, Ltd., New York.

Kulaev, I.S. and Konshenko, G.I.(1971): Detection and some properties of *Neurospora crassa* polyphosphates hydrolyzing inorganic polyphosphates to orthophosphate. *Biokhimiya.* 36:1175~1182.

Kulaev, I.S. and Afanas'eva, T.P.(1970): The physiological role of inorganic polyphosphates in the yeast *Endomyces magnusii* (in Russian). *Dokl. Akad. Nauka SSSR.* 192:668.

Laybourn, R.L.(1924): A modification of Alberts stain for the *Diphtheria bacilli*. *J.A.M.A.* 83:121.

Lee, K.S. and Choi, Y.K.(1985): I. Studies on the activities of ALPase, ACPase, ATPase and accumulation of volutin granules upon growth phase in *Saccharomyces uvarum*. *Kor. J. Microbiol.* 23:90~100.

Lee, K.S. and Choi, Y.K.(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.* 23:84~89.

Lee, K.S. and Choi, Y.K.(1985): IV. Isoenzyme pattern of alkaline and acid phosphatase in the culture of *Saccharomyces uvarum*. *Kor. J. Microbiol.* 23:3 (in press).

Nesmeyanova, M.A., Dmitriev, A.D., Vobik, A.D. and Kulaev, I.S.(1973): On the regulation of some phosphorous metabolism enzymes in *E. coli*, in reaction mechanisms and control properties of phosphotransferase. Joint Biochemical Symposium UdS-SR-DDR, Reinhardsbrunn, Akademie-Verlag, Berlin. 82.

Nesmeyanova, M.A., Dmitriev, A.D. and Kulaev, I.S.(1973): High molecular weight polyphosphates and enzymes of polyphosphate metabolism in the process of *E. coli* growth. *Mikrobiologiya.* 42:213~219.

Nesmeyanova, M.A., Dmitriev, A.D. and Kulaev,

- I.S.(1974): The regulation of phosphorous metabolism and the level of polyphosphates in *Escherichia coli* K-12 by exogenous phosphate. *Mikrobiologiya*. 42:313~319.
- Nyholm, N.(1978): Dynamics of phosphate limited algal growth: Stimulation of phosphate shocks. *J. Theor. Biol.* 70:415~425.
- Rubtsov, P.M. and Kulaev, I.S.(1977): Some pathways of polyphosphate biosynthesis and degradation in *Acetabularia mediterranea*. *Biokhimiya* 42:1083~1089.
- Tsiomenko, A.B., Augustin, I., Vagabov, V.M. and Kulaev, I.S.(1975): The interrelationship of the metabolism of inorganic polyphosphatase and mannan in yeast (in Russian). *Doki. Akad. Nauk SSSR* 215:478.
- Weimberg, R.(1976): Repression of the acid phosphatase of *Saccharomyces bisporus* in relation to the polyphosphate content of the cells. *Can. J. Microbiol.* 22:867~872.
- Widra, A.(1959): Metachromatic granules of microorganisms. *J. Bacteriol.* 78:664~679.
- Wilkinson, J.P. and Duguid, J.P. (1960): The influences of cultural conditions on bacterial cytology. *Int. Rev. Cytol.* 9:1~8.
- Zaiss, U.(1983): On the allosteric regulation of polyphosphate metabolism in *Oscillatoria redekei*. *Naturwissenschaften* 70:617~618.

<Received June 11, 1985; Accepted July 29, 1985>