

*Saccharomyces uvarum* 의 인산염첨가배양에 따른 ALPase,  
ACPase, ATPase 활성도와 volutin 과립의 함량변화

李基溍 · 崔榮吉

한양대학교 생물학과

**Studies on the Changes in Activities of ALPase, ACPase, ATPase  
and Synthesis of Volutin Granules upon Phosphate Concentration in  
*Saccharomyces uvarum***

Lee, Ki-Sung · Yong-Keel Choi

Department of Biology, Hanyang University

The effect of exogenous phosphate supply on the regulation of phosphate metabolism was investigated during catabolic repression and catabolic derepression in yeast (*Saccharomyces uvarum*). As the results, when sugar was supplemented in cells cultivated under phosphate free, the growth rate was low but it was capable of cell division. Polyphosphate "B" was accumulated highly in proportion to amount of phosphate added to the medium. Without regard to phosphate supply of the medium, the total amount of polyphosphate was almost similar, although each polyphosphate was turned over. Activities of all phosphatases remained continuously high in the cells cultivated in the phosphate free medium. Especially, under catabolic repression, the function of polyphosphate system was shown to compensate the ATP/ADP system as phosphate donor, energy source and regulator.

세포내 인산대사 조절에 있어, 세포내·외의 무기인산 농도의 영향에 관한 보고는 많이 있었다. 세포외 즉, 배지내의 무기인산 농도에 따른 생리적 변화 및 인산대사 조절에 관한 연구 중, Rubtsov (1977) 등의 연구에서는 *Acetabularia mediterranea* 를 재료로, 무기인산을 결핍시킨 배지에서 배양했을 때, 무기폴리인산의 합성과 분해에 미치는 영향을 살펴보았으며, Nesmeyanova (1978) 등은 *E. coli* 를 재료로 무기인산의 영향에 대하여 alkaline phosphatase 와 acid phosphatase 의 물질대사 양식 및 유전적인 조절의 상호관계를 효소의 활성도와 관련지어 연구하였다.

Tsal (1979) 등에 의해서는 무기인산 결핍상태

하에서 생장률 및 호흡율에 관한 연구가 수행된 바 있으며, Roomans (1979) 등에 의해서는 *Saccharomyces cerevisiae* 을 재료로 무기인산도입에 대한 양이온의 작용에 관한 연구가 있었으며, *Neurospora crassa* 를 재료로 인산공급에 따른 인산의 도입 속도에 관한 연구 (Bever 등, 1977) 가 있었다. 이와 최 (1981, 1982) 등에 의해서는 *Saccharomyces uvarum* 을 재료로, 무기인산의 첨가배양에 따른 유기물 합성 (인지질, 다당류, 핵산, 단백질) 및 무기폴리인산 각형의 축적량의 변화 및 전환과정에 관한 연구가 시행된 바 있다. 또 무기인산 (ortho-P) 는 alkaline phosphatase 의 활성도를 억제시킬 뿐 아니라, alkaline phosphatase 의 합성을 억제하

며, 정도는 덜하지만 acid phosphatase (nonspecific phosphomonoesterase)의 활성도 억제하며, ortho-P의 세포내·외 수준에 따라 AL-Pase, polyphosphatase, tripolyphosphatase의 합성이 조정된다 하였다(Nesmeyanova 등, 1974, 1975, 1978).

본 연구에서는 효모세포(*Saccharomyces uvarum*: ATCC 9080)을 재료로, 무기인산의 농도(free, deficient, sufficient, excess)를 달리 적용하여 배양하였을 경우, 세포내 무기폴리인산의 축적량, ortho-P, nucleotidic labile-P의 함량 및 ALPase, ACPase, ATPase의 활성도 변화를 조사하여, catabolic repression시킨 세포와 catabolic derepression시킨 세포의 인산 대사 조절에 대한 무기인산 농도의 영향을 살펴 고사 하였다. 또 무기폴리인산 각형의 축적량과 여러 phosphatase의 활성도 변화를 총활성도 외에  $K^+$ -stimulated,  $Mg^{++}$ -stimulated type의 활성도로 구분하여, 상호 관련지어 해석하였다.

### 재료 및 방법

#### 효모의 생장배지 조제

최소배지는 인산 첨가배양에 따른 영향을 조사하기 위해, 무기인산의 농도를 임의로 조절할 수 있는 Knopp's 최소배지를 이용하였다(Maltose 15g,  $KH_2PO_4$  0.25g,  $Ca(NO_3)_2$  1g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.25g, KCl 0.12g, FeCl, trace,  $D \cdot H_2O$  1l; pH 5.0). 무기인산의 농도 설정은 Knopp's 배지에 함유된 인산의 함량을 근거로 하였다. 즉, 인산결핍(PO), Knopp's 배지에 포함된 인산량의 1/5 (P1/5; phosphate limited), Knopp's 배지수준(P1; phosphate sufficient), Knopp's 배지 수준의 10배(P10; phosphate excess)의 구간으로 하였다. 효모세포(*S. uvarum*)의 배양은 전보(I, 1985)와 마찬가지로, 전 배양된 세포를 maltose 및 인산을 결핍시킨 Knopp's 배지에 24시간 생육시킨 세포(catabolic repression)를 위에서 정한 농도로 인산을 처리한 배지에 다시 접종하였다(catabolic derepression).

효모의 생장을 측정, 인산화합물 분획, 효소

의 활성도 측정,  $Mg^{++}$  도입량은 전보(Lee 등 1985, I)와 동일한 방법으로 행하였다.

### 결과 및 고찰

#### 효모의 생장

배지에 무기인산 농도가 높을 수록 효모세포의 개체군 생장은 좋은 것으로 나타났으며(Fig. 1) PO시험구에서도 약간의 개체군 성장을 보였는데 이러한 결과는 비록 세포외부(배지)에 인산이 결핍되어어도 세포분열에 필요한 무기인산은 세포내 인산에 좌우되므로, 개체군 생장이 가능하다는 Tsal 등(1979)의 연구결과와 일치한다.  $Mg^{++}$ 이온의 세포내로 흡입된 양은 전 처리구에서 유사하였다.

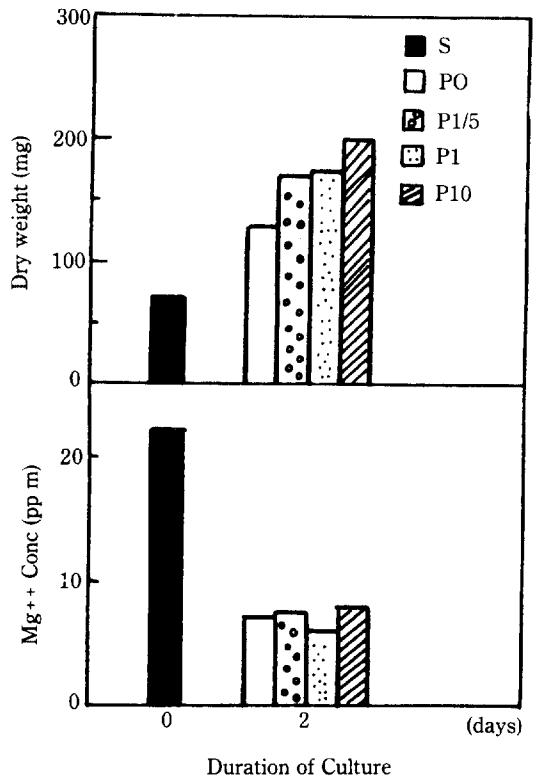


Fig. 1. Changes of population growth and  $Mg^{++}$  uptake in *Saccharomyces uvarum* according to the concentration of phosphate in minimal medium.: (S) Starved, (PO) Pi free, (P 1/5) Pi limited, (P1) Pi sufficient, (P10) Pi excess medium

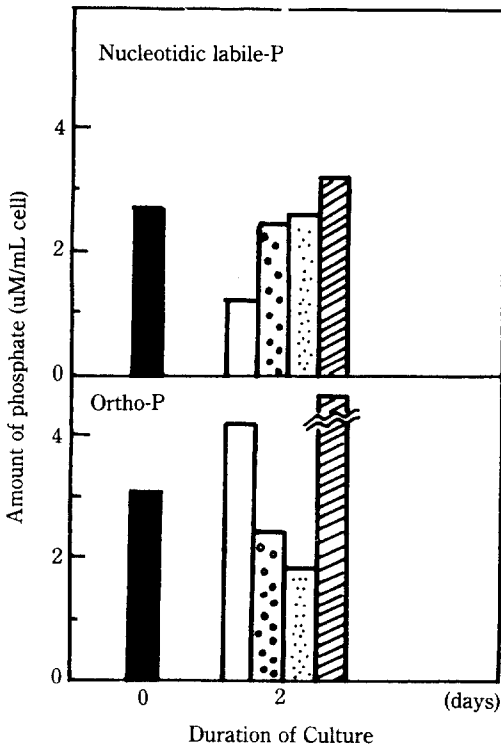


Fig. 2. Changes in amount of ortho - p and nucleotidic labile-p, according to the phosphate concentration in minimal medium.; Symbol is the same as the previous Figure

### 인산화합물, volutin과립의 양적동태 및 효소 활성도

Nucleotidic labile-P는 당과 인산이 결합된 배지에서 생육된 세포에 비하여 PO배양구는 감소 현상을, P1/5, P1, P10, 처리구에서는 유사한 수준을 나타내었다. ortho-P는 PO구에서는 오히려 함량이 증가되었으며, 특히 P10 배양구(phosphate excess)에서는 급격한 증가를 보였다(Fig. 2). 또 폴리인산 "A"형의 함량은 결핍배지에서 생육된 세포에 비하여, 전 시험구에서 비슷한 정도로 감소하였으나, 폴리인산 "B"형의 경우는 인산을 배지에 높게 처리한 시험구일수록 많은 축적량을 나타냈고, 폴리인산 "C"형은 전 처리구에서 약간 증가하였다(Fig. 3).

이와같이 인산첨가농도에 따라 폴리인산 "B"형이 비례적으로 합성이 증가한 현상은, 효모의 경우 인산도입과정은 2가 양이온의 영향을 받

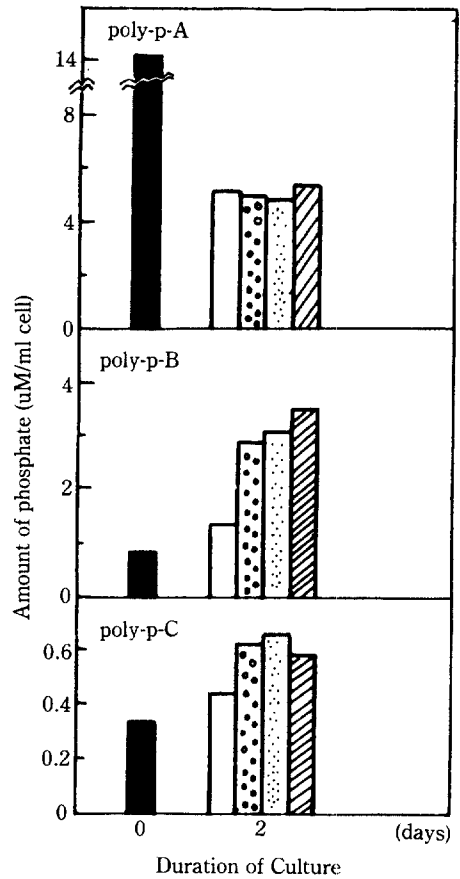


Fig. 3. Changes in amount of accumulated metachromatic granule such as poly-P-A, B, C, according to the phosphate concentration in minimal medium.; Symbol is the same as the previous Figure.

으며(Roomans 등, 1979),  $Mg^{++}$ 농도가 높고, pH가 산성을 나타낼 때 인산도입속도가 빠르고(Goad 등, 1978), 인산의 세포내 도입속도는 인산의 첨가정도에 따라 달라지며(Beever and Burns, 1977). 인산의 농도가 높을 때 세포내 도입방법은 proton motive force에 의한 system과 carrier protein에 의한 2가지 system이 모두 작동(Rosenberg 등, 1979)한다는 보문과 유관함을 보인다. 또 인산결핍 배양세포는, 인산을 공급하였을 때 폴리인산을 축적하여, lag phase가 길어지며, 세포 성장보다는 인산을 저장하는 것이 우선이다(Nyholm, 1978)는 보문과도 일치한다. 무기인산 첨가배양에 따른 효소의 활성도 변화를 살펴 보면 PO시험구(지

속적인 인산결핍 시험구)에서는 ALPase, ACPase, ATPase 등 모든 phosphatase의 활성도가 계속 높게 유지되었으나, 인산을 첨가한 시험구(P1/5, P1, P10)에서는 모두 활성도가 감소하였다(Fig. 4).

세포내 ortho-P, Nucleotidic labile-P의 함량, 무기폴리인산 축적량과 phosphatase의 활성도를 살펴 볼 때 인산을 계속 결핍시킨 PO 시험구에서 ortho-P수준이 높아지고, nucleotidic labile-P의 세포내 수준이 떨어지는 것은, Rosario(1982) 등, Goodwin(1974) 등, Sabina(1981) 등의 보문과 일치한다. 또 PO 시험구에서 ALPase, ACPase, ATPase 활성이 지속적인 것은, Nesmyanova 등(1981)이 *E. coli*를 계속 인산결핍 시켰을 때, ALPase와 ACPase는 지속적인 높은 활성도가 나타난다는 보문과 일치하고, 또 인산의 농도와 ALPase의 관계를

보고한 Fitzgerald and Nelson(1966)의 연구와 녹조류와 갈조류를 재료로한 Perry(1972)의 연구, 그리고 효모를 재료로한 Toda and Yabe(1979)의 연구와 일치된다. 세포내 ortho-P는 무기폴리인산의 분해, phosphatase에 의한 인산화합물의 분해등으로 생성되는데, 48시간 배양한 PO 시험구에서 세포내 ortho-P의 높은 수준과 nucleotidic labile-P의 낮은수준, ALPase, ACPase, ATPase의 높은 활성도, 총무기폴리인산의 감소현상을 살펴보면, 지속되는 인산결핍으로 인하여, 낮아진 ATP의 세포내 수준을  $ATP \rightleftharpoons poly-P$ 의 가역반응 과정에서 폴리인산으로 부티 ATP가 형성되는 방향으로 인산화 반응이 일어남을 잘 반영해 준다(Felter and Stahl 1975; Tsal 등 1979).

무기폴리인산의 축적량과 여러 phosphatase

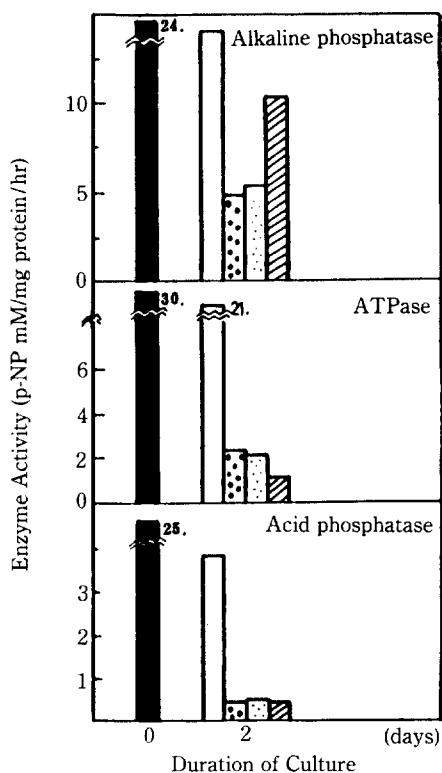


Fig. 4. Changes in the total activity of alkaline, acid phosphatase and ATPase, according to the Pi concentration in minimal medium.; Symbol is the same as the previous Figure.

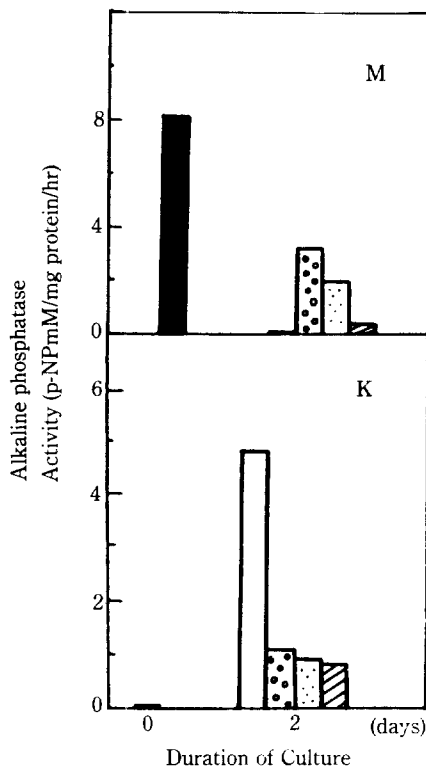
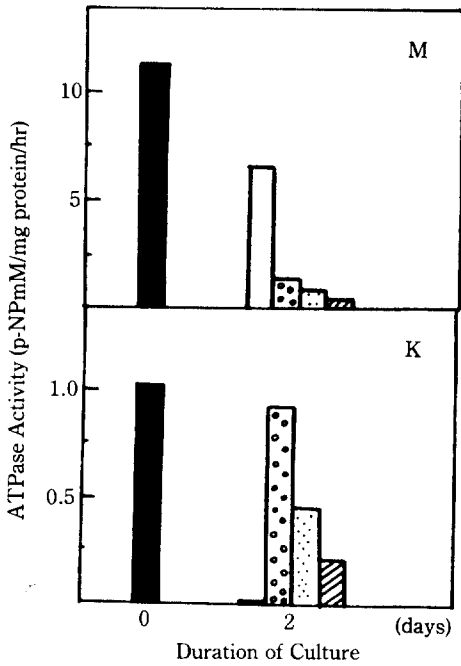
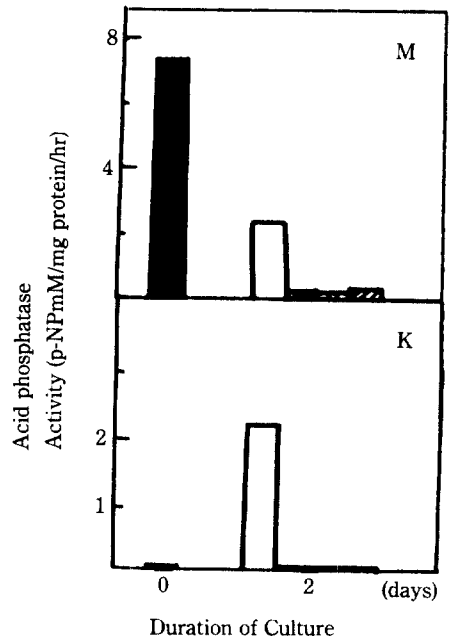


Fig. 5. K: Changes in K<sup>+</sup> - Stimulated alkaline phosphatase activity.

M: Changes in Mg<sup>++</sup> - stimulated alkaline phosphatase activity, according to the Pi concentration in the minimal medium.; Symbol is the same as the previous Figure.



**Fig. 6. K:** Changes in K<sup>+</sup> - stimulated ATPase activity. **M:** Changes in Mg<sup>++</sup> - stimulated ATPase activity, according to the Pi concentration in minimal medium.: Symbol is the same as the previous Figure.



**Fig. 7. K:** Changes in K<sup>+</sup> stimulated acid phosphatase activity. **M:** Changes in Mg<sup>++</sup> - stimulated acid phosphatase activity, according to the Pi concentration in minimal medium.; Symbol is the same as the previous Figure.

의 K<sup>+</sup>-stimulated, Mg<sup>++</sup>-stimulated type의 활성도와 관련지어 볼 때, 역시 K<sup>+</sup>-stimulated type은 무기폴리인산의 합성에, Mg<sup>++</sup>-stimulated type은 무기폴리인산의 분해에 직접, 간접으로 관여하는 것으로 추정되었다(Fig. 5, 6, 7.).

또 본 실험에서 PO시험구에서 phosphatase가 높은 활성도를 나타낸 것은, Pi free 상태하에서의 세포내 인산대사 조절을 위한 효모세포의 생리적 조절현상을 잘 시사해 주고 있으며, ACPase, ATPase, ALPase의 총활성도가 세포내·외의 무기인산과 poly-P 축적량에 의해 영향을 받으며, 동시에 변하고 있음은 ACPase, ALPase, ATPase가 하나의 조절유전자에 의하여 derepression, repression이 조절됨을 잘 반영하고 있는데 이는 Nesmeyanova (1978) 등, Weimberg (1976), 그리고 Chang and Caruso (1983)의 보분과 일치되고 있다. 또 PO시험구에서 무기폴리인산의 축적량이 감소되는 점으로 미루어, 무기폴리인산이 인산의 결핍등과 같은 좋지 않은 환경에서는 무기인산 저장과 공여체

역할을 수행하는 것으로 나타났으며, 물질대사의 regulator 역할을 하는 것으로 나타났다. 즉 무기폴리인산의 전환은 나타날지라도 총무기폴리인산의 함량의 변화가 여러 phosphatase의 활성도 변화에 비하여 심하지 않은 현상이 이러한 regulator 역할을 잘 반영해 준다. 또 당과 인산의 결핍된 배지에서 생육된 세포에 인산공급 또는 당을 공급했을 때 단순히 초기의 세포내 인산도입이 다른 물질대사 또는 세포의 생장을 위한 것보다는 오히려 세포벽에 존재하는 무기폴리 인산을 축적하는 양상을 생각해 볼때, 효모세포의 경우 무기폴리인산의 축적과정은 단순한 인산기의 축적 및 나쁜 환경에서 나타나는 일시적인 현상이 아니라, 세포내 인산의 이용 또는 도입형태를 energy-rich compound로 전환시키는 일련의 에너지 효율화 과정이라 볼 수 있다. 무기폴리인산의 축적 및 형성순서 그리고 전환과정은 효모세포 고유의 생리적, 유전적인 지배로 나타나는 현상으로 생각되어진다.

## 적 요

효모세포(*Saccharomyces uvarum* ATCC 9080)를 재료로, 무기인산의 농도(free, deficient, excess)를 달리 적용하여 배양하였을 경우, 세포내 무기폴리인산의 축적량, ortho-P, nucleotidic labile-P의 함량 및 ALPase, ACPase, ATPase의 활성도 변화를 관련지어, catabolic repression시킨 세포와 catabolic derepression시킨 세포의 인산대사 조절에 대한 무기인산 농도의 영향을 살펴보고자 하였다. 무기인산을 결핍시킨 배지에서 배양된 세포(PO)는 배지에 당을 첨가하면 분열속도는 늦지만 세포분열이 가능하고, 무기폴리인산 축적이 감소되었다. 인산의 첨가 농도에 관계없이 무기폴리인산 각형의 함량변화(전환)는 있었지만 총무기폴리인산의 함량은 거의 유사하였다. 정상배양세포에 비하여, 당은 공급되었지만 인산은 결핍배지에서 배양한 세포에서 ALPase, ACPase, ATPase의 활성도가 지속적으로 높았다. 무기인산 결핍배지에서 배양한 세포내에 존재하는 무기폴리인산계의 기능이 특히 당과 무기인산 결핍(catabolic repression)시기에 무기인산 공여체, 에너지원 및 regulator로 ATP/ADP system의 기능을 보충작용하는 것으로 나타났다.

## REFERENCES (II)

1. Beever, R.E. and D.J.W. Burns. 1977. Adaptive changes in phosphate uptake by the fungus *Neurospora* in response to phosphate supply. *J. Bacteriol.* 132:520-525.
2. Chang, W.H. and J.L. Caruso. 1983. Lower temperature and orthophosphate control of alkaline phosphatase in a Cold-Requiring Plant. *Cryobiol.* 20: 380-382.
3. Felter, S. and A. Stahl. 1973. Enzymes du metabolisme des polyphosphates dans la levure. III. Purification et propriétés de la polyphosphate-ADP-Phosphotransferase. *Biochem.* 55:245-251.
4. Goad, L.S., T.E. Jensen, and R.P. Ayala. 1978. Phosphate metabolism in blue green bacteria. V.F actors affecting phosphate uptake in *Plectonema*. *Can. J. Microbiol.* 24:105-108.
5. Goetsch, L. and B. Byers. 1982. Meiotic cytology of *Saccharomyces cerevisiae* in protoplast lysates. *Mol. Gen. Genet.* 187: 53-60.
6. Goodwin, C.D., W.X. Balcavage, and J.R. Matton. 1974. Energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*; Effect of progressive starvation on respiration and pyridine nucleotide reduction linked to ethanol oxidation in intact cells. *Arch. Biochim. Biophys.* 165:413-420.
7. Nesmeyannova, M.A., A.D. Dmitriev, I.S. Kulaev. 1973. High molecular weight polyphosphates and enzymes of polyphosphate metabolism in the process of *E.coli* growth. *Mikrobiologiya*, 42:213-219.
8. Nyholm, N. 1978. Dynamics of phosphate limited algal growth: Stimulation of phosphate shocks. *J. Theor. Biol.* 70:415-425.
9. Rosario L., C. Domiguez, A. Busturia, and M. Saez. 1982. Mechanisms of appearance of the pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: Inactivation of sugar transport systems. *J. Bacteriol.* 152:19-25.
10. Rosenberg, H., R.G. Gerdes, and F.M. Harold. 1979. Energy coupling to the transport of inorganic phosphate in *Escherichia coli* K12. *J. Biochem.* 178:133-137.
11. Roomans, G.M., and G.W.F.H. Borst-Pauwels. 1979. Interaction of cations with phosphate uptake by *Saccharomyces cerevisiae*; Effects of surface potential. *J. Biochem.* 178:521-527.
12. Sabina, R.L., P. Dalke, A.R. Hanks, J.M. Magill, and C.W. Magill. 1981. Changes in nucleotide pools during conidial germination in *Neurospora crassa*. *Can. J. Biochem.* 59:899-905.
13. Toda, K., and I. Yabe. 1979. Mathematical model of cell growth and phosphatase biosynthesis in *Saccharomyces carlsbergensis* under phosphate limitation. *Biotech. and Bioeng.* 21:487-502.
14. Tsal, J.C., S.L. Aladegbami, and G.R. Vela. 1979. Phosphate-limited culture of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 139:639-645.
15. 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.

(Received May 5, 1985)