

*Saccharomycopsis lipolytica*의 온도감수성 변이에 관한 연구

조 석금 · 남궁 석*

안양공업전문대학 식품영양학과

*서울보건전문대학 식품영양학과
(1988. 6. 25 수리)

Studies on Temperature-sensitive Mutant of *Saccharomycopsis lipolytica*

Seok-Gum Cho and Sok Namkung*

Dept. of Food and Nutrition, An Yang Technical College, An Yang

Dept. of Food and Nutrition, Seoul Health Junior College, Seoul, 100-013, Korea

(Received June 25, 1988)

ABSTRACT

Properties of purified isocitrate lyase from *Saccharomycopsis lipolytica* ATCC 44601 and MX9-11RX8 temperature-sensitive mutant were investigated.

Purified isocitrate lyase from temperature-sensitive mutant was indistinguishable from the wild type enzyme with respect to the isoelectric pH(5.3), the thermostability and Km value for *threo*-Ds-isocitrate(about 0.2 mM). When isocitrate lyase induced by acetate minimal medium at 33°C, MX9-11RX8 mutant did not express enzyme activity but did synthesize polypeptide chain whose electrophoretic mobilities were equal to those of the purified enzymes.

서 론

Isocitrate lyase(EC4.1.3.1)는 TCA 회로와 유도성 anaplerotic 경로인 glyoxylate 회로의 공통적 대사산물인 *threo*-Ds-isocitrate를 succinate와 glyoxylate로 분열하는 반응을 촉매하는 branch point 효소로서, glyoxylate 회로의 지표효소로서 중요하다.¹⁾ 이 효소는 곰팡이²⁾, 세균,³⁾ 조류,⁴⁾ 고등식물의 종자,⁵⁾ 그리고 선충류⁶⁾ 등으로부터 정제되어 그 성질이 보

고되었다.

온도감수성이라는 조건부 돌연변이는 생명에 필수적인 기능을 가진 유전자의 동정에 극히 유의하며,⁷⁾ 일반적으로 missense 변이의 일종으로서⁸⁾ 온도의 변화에 따라서 단백질의 생물학적인 활성이 변화하고, 아미노산 잔기가 치환된 polypeptide 사슬을 생산한다고 알려져 왔다.⁹⁾ 효소의 역할을 유전적 결손에 의하여 조사할 때에는 결손변이가 그 효소의 구조유전자에서 일어나는 것이 필요하며,¹⁰⁾ 구조적전자로 mapping된 온도감수성 변이균주는 po-

lypeptide 사슬의 folding이나 subunit의 집합이 변이에 의하여 온도감수성으로 되었다고 보고되어 있다.^{9, 11~13} 이와 같이 온도감수성 변이에 관한 연구는 여러종(種)들에서 이루어지고 있으나 *Saccharomycopsis lipolytica* isocitrate lyase의 온도 감수성 변이에 대한 효소학적 연구는 거의 없다.

이에 저자들은 전보¹⁴에서 본 효모 온도감수성 변이균주의 isocitrate lyase를 정제하여 보고한 바 있다. 본 연구에서는 정제한 isocitrate lyase의 성질을 조사하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주 및 기본배지

본 연구에 사용된 균주는 야생형 균주로서 *Saccharomycopsis lipolytica* ATCC 44601과 온도감수성 변이균주로서 전보¹⁵에서 변이유발하여 분리한 MX9-11 RX8 변이균주를 사용하였다. 사용배지와 배양 방법은 전보^{14, 15}에서 보고한 방법에 따랐다.

전기영동

Gel 등전점 전기영동¹⁶과 sodium dodecylsulfate (SDE) gel 전기영동¹⁷은 disc형 또는 slab형 gel 전기영동장치(Model E-IES 12-10 및 EIES 17-30TR, 小池精密機器製作所, 日本)를 사용하였고 SDS gel 전기영동은 각 시료(약 400 μ g 단백질)를 acrylamide 농도를 10~20% (W/V)까지 지수적으로 증가시키면서 영동하였다. Sucrose density gradient 등전점 전기영동은 110 ml 들이 column을 사용하여 Vestenberg¹⁸의 방법에 따라서 측정하였다.

변이균주의 제한온도에서 단백질 확인

야생균주와 온도감수성 변이균주 시료준비는 glucose 최소배지에서 배양한 세포와, glucose 최소배지에서 배양한 세포를 각각 23°C 및 33°C의 acetate 최소배지에서 활성을 유도한 세포를 acetate 최소배지에서 isocitrate lyase를 유도한 균체의 조제 때와 같은 방법¹⁵으로 처리한 균체를 French press (평균 500 kg/cm²)로써 파쇄하여 얻은 여액을 조추출액으로 사용하였다.

효소활성 측정

Isocitrate lyase (EC 4.1.3.1)의 활성은 Dixon과 Kornberg¹⁹의 방법에 의하여 측정하였다. 효소활성 단위는 실온에서 1분간 생산물 1 mmol을 형성할 수 있는 양을 1 unit로 표시하였다.

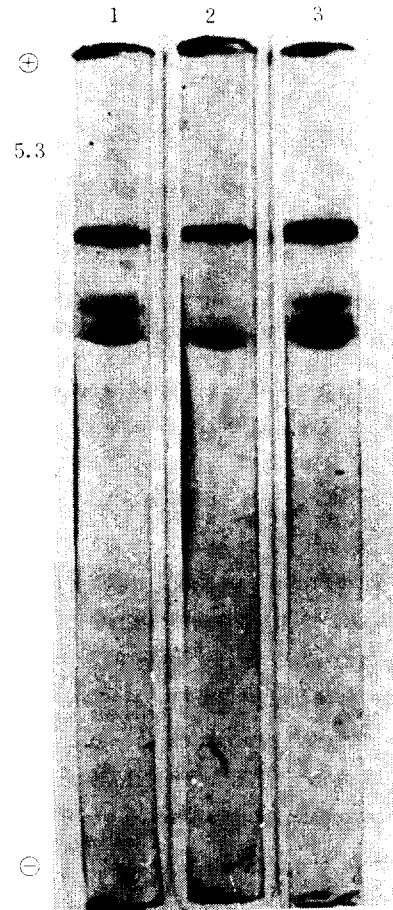


Fig. 1. Gel electrofocusing of the purified isocitrate lyase. Gel 1, the wild type ICL from ATCC 44601; Gel 2, the mutant type ICL from MX9-11RX8; Gel 3, an equal mixture of the wild and mutant type enzymes, pH value is shown at right of the gel.

결 과

Isocitrate lyase의 등전점

정제효소의 등전점을 조사하기 위하여 정제효소

를 5% (W/V) polyacrylamide gel 중에서 등전점 전기영동한 결과 Fig. 1에 나타난 바와같이 pH. 3.5 ~ 10 범위의 ampholine을 사용하여 야생형 균주와 MX 9-11 RX 8 변이균주의 정제효소 및 두 효소를 혼합한 시료를 등전점 전기영동하면 pH 5.3에서 대부분의 단백질이 한개의 band를 형성하였고, pH 5.6과 5.9에서도 몇개의 얇은 band를 형성하였다.

활성과 pH가 대응하는가를 조사하기 위하여 야생형 균주의 조효소를 sucrose densitive gradient 전기영동한 결과는 Fig. 2와 같이 전기영동 중에서 단백질의 등전점 침전이 생기고 pH 4.06 분획까지 점차 하강하였다. Isocitrate lyase 활성이 대부분은 pH 5.34에 peak를 형성하였으며, pH 5.97에도 작은 활성 peak가 나타났다. pH 5.34 ± 0.1 범위에서 회수된 효소활성은 최초의 약 2%에 지나지 않았다.

이들 결과로부터 등전점 pI는 5.3으로 결정되었다.

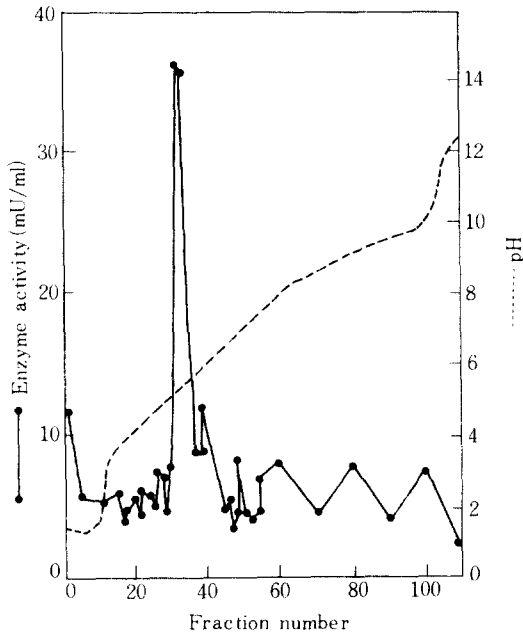


Fig. 2. Sucrose density-gradient electrofocusing of ATC-C 44601 isocitrate lyase.

Isocitrate lyase의 열 안정성

야생형 균주의 정제효소와 MX 9-11 RX 8 변이균주 정제효소의 열 실패를 35°C와 40°C 및 45°C에서 조

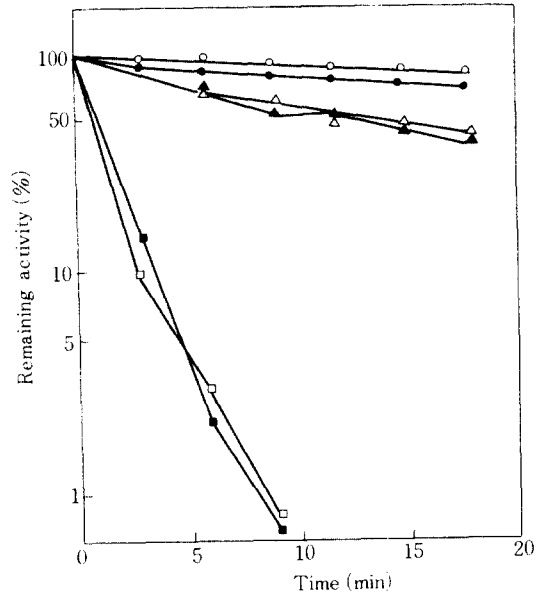


Fig. 3. Heat inactivation of the purified isocitrate lyase. Enzyme was heated in 20mM imidazole-HCl buffer (pH 7.0) at 35°C (○, ●), 40°C (▲, △) and 45°C (□, ■). The initial activity of the wild type enzyme (open symbol) was 125 mU/ml, whereas that of MX9-11 RX8 (closed symbol) was 108 mU/ml.

사한 결과 Fig. 3과 같이 정제한 두 효소의 열 안정성은 잔존활성이 1% 이하로 감소하는 범위까지는 거의 동일하였다. 그리고 불활성화한 효소는 저온으로 유지하여도 활성을 회복할 수 없었다. 이 사실은 본 효소의 열 실패가 불가역적이고, 효소의 열 안정성이 온도의존성이라는 것을 나타낸다.

기질농도와 반응속도

정제효소의 농도를 일정하게 하고 기질의 농도를 변화시키면서 23°C와 33°C에서 측정된 반응속도를 Lineweaver-Burk의 방법에 따라 plot 한 결과는 Fig. 4와 같다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 threo-Ds isocitrate에 대한 정제효소의 Michaelis-Menten constant (Km)는 야생형균주의 isocitrate lyase가 23°C와 33°C에서 각각 0.22mM과 0.21mM이고 MX9-11RX8 변이균주의 isocitrate lyase는 양쪽 온도에서 0.18mM로 같았다.

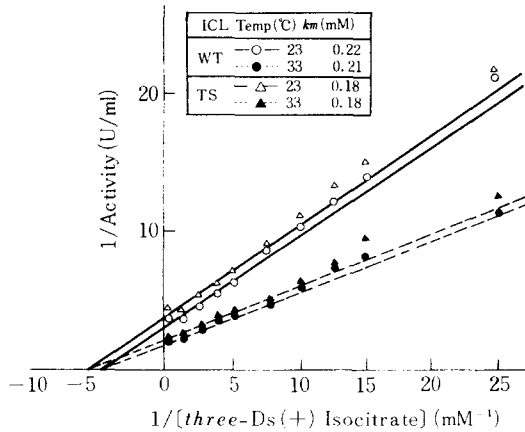


Fig. 4. Lineweaver-Burk plots for the determination of K_m values of purified isocitrate lyase.

이 사실로부터 야생형 균주와 MX9-11 RX8 변이 균주 isocitrate lyase의 K_m 값은 실질적으로 동일하며, 23°C의 허용온도에서 정제한 온도감수성 변이 균주의 효소는 야생형 균주의 효소와 마찬가지로 33°C의 제한온도에서도 정상적으로 작용하고 있다고 생각된다.

야생형 균주 및 온도감수성 변이균주가 생성한 단백질

MX9-11 RX8 변이균주가 제한온도인 33°C에서 isocitrate lyase로 추정되는 단백질을 생성하고 있는가를 조사하기 위하여 정제효소를 대조군으로 하여 세포 추출액의 전단백질을 SDS-gel 전기영동으로 관찰한 결과는 Fig. 5와 같고, 각세포 추출액의 효소 비활성을 Fig. 5의 아래에 나타내었다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 야생형 균주 및 MX9-11 RX8 변이균주의 glucose 최소배지에서 생육한 세포에서는 포도당에 의하여 isocitrate lyase의 생성이 억제되어²¹⁾ 낮은 활성을 가지므로 isocitrate lyase에 대응하는 단백질은 전혀 나타나지 않았다 (lane 1, 4). 한편 야생형 균주와 MX9-11 RX8 변이균주를 23°C 또는 33°C에서 아세트산 유도한 세포 추출액에는 정제 isocitrate lyase와 같은 이동도를 가지는 단백질이 관찰되었다. 즉 33°C에서 아세트산 유도한 MX9-11 RX8 변이균주의 세포 추출액 (lane 6)에는 포도당 생육세포의 추출액 (lane 4)과 비슷한 아

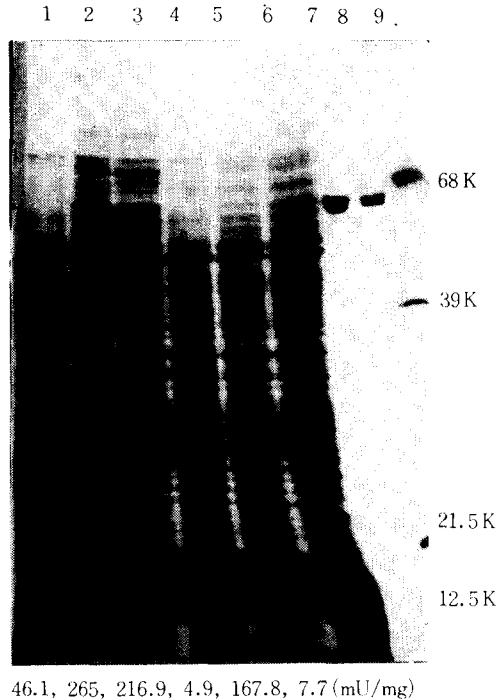


Fig. 5. Protocol of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of crude extract attained by French press. Lanes 1 to 3 are samples from ATCC 44601 grown in glucose minimal medium (lane 1), and induced in acetate minimal medium at 23°C (lane 2) and 33°C (lane 3). Lane 4 to 6 are samples from MX9-11 RX8 grown in glucose minimal medium (lane 4), and induced in acetate minimal medium at 23°C (lane 5) and 33°C (lane 6). Lanes 7 and 8 are samples of purified enzyme from ATCC 44601 and MX9-11 RX8, respectively. Lane 9, molecular weight calibration proteins. ICL specific activity of samples were saw to the bottom of protocol.

주 낮은 isocitrate lyase 활성을 나타내었지만 isocitrate lyase에 상당하는 단백질은 23°C에서 아세트산 유도한 세포추출액 (lane 5)과 같은 정도로 생산하였다.

이 결과로부터 온도감수성 변이균주 MX9-11 RX8는 제한온도에서도 isocitrate lyase 단백질은 합성되며, 단지 불활성화한 상태로 존재하고 있다고 생각된다^{9,12)}

고 찰

여러 가지 온도감수성 단백질의 성질이 조사된 보고는 대장균의 Lac repressor²¹⁾와 RNA polymerase²²⁾ 및 bacteriophage P22의 spike 단백질¹²⁾ 등을 제외하고는 거의 없다. 본 연구에서 정제된 온도감수성 변이균주 isocitrate lyase는 야생균주의 효소와 비교하여 같은 성질을 나타내었다. 즉 온도감수성 변이균주 효소의 subunit 분자량¹⁴⁾과 최적 pH¹⁴⁾는 같았으며 23°C 및 33°C에서 온도감수성 변이균주 isocitrate lyase km 값 0.18mM은 야생균주 효소의 km 값 0.22M보다 오히려 적었으므로 효소의 촉매기능은 돌연변이에 의하여 조금도 손상받지 않았다(Fig. 4). 특히 두 정제효소의 열 안정성은 각 시험온도에서 거의 같았다(Fig. 20). 이것은 온도 감수성을 나타내는 MX9-11RX8 변이균주가 제한온도에서 isocitrate lyase의 활성을 전혀 생성할 수 없는 것을 고려하면 이 변이균주의 열 안정성이 현저한 특성이 있다. 그러므로 온도감수성 변이균주의 isocitrate lyase는 야생형 균주의 효소와 비교하여 정상적으로 작용하고 있다고 생각된다.

유전자내에서 2회의 돌연변이에 의한 단백질의 열 안정성의 변화는 그 단백질의 구조의 변화를 반영한다고 생각되므로 온도감수성 돌연변이 균주의 열 불안정 단백질의 생산은 그 단백질에 대한 유전자의 위치가 구조유전자란 증거로서 사용되어지고 있다.²⁵⁾ 또한 변이균주의 단백질이 비록 구조유전자로 mapping되어 있다고 하여도 허용온도에서 단백질이 성숙되어질 때 열 안정성이 변화하지 않는 온도감수성 변이균주는 bacteriophage,¹²⁾ 세균²⁴⁾ 효모²⁵⁾에서도 보고되어 있다. 한편 온도감수성 변이균주의 정제효소와 야생형균주의 정제효소의 열 안정성이 거의 동일하였지만(Fig.3) MX9-11(Icl⁻)²³⁾의 표현형인 Icl⁻의 복귀 변이균주중에서는 isocitrate lyase의 단백질의 열 불안정한 복귀변이균주도 분리되어 졌으므로²³⁾ 33°C의 제한온도에서 생육할 수 없는 MX9-11(Icl⁻)의 온도감수성 돌연변이 균주인 MX9-11RX8의 Icl의 표현형 위치는 isocitrate laase에 대하여 구조유전자로 추정되며, 그 단백질의 기능이나 원핵생물 또는 진핵생물 유전자의

특이성등에 기인하지 않는다고 사료된다.⁹⁾

온도감수성인 MX9-11RX8 변이균주는 33°C의 제한온도에서도 23°C와 마찬가지로 isocitrate lyase의 단백질을 생산하였다(Fig. 5). 이것은 정제효소에 대응하는 단백질은 포도당 생육세포에서는 검출되지 않았으므로 다른 단백질을 isocitrate lyase로 오인할 가능성은 없기 때문에 온도감수성변이가 Icl 표현형의 조절 부위에 일어나서 전사와 번역이 고온에서 저지될 가능성은 없다. 따라서 33°C에서 아세트산을 유도한 MX9-11RX8 변이균주는 불활성화한 isocitrate lyase의 missense 단백질을 생산하고 있다고 사료된다.^{9, 12, 21)}

Missense 단백질에 관한 연구로서, Smith등은 bacteriophage P22 spike 단백질의 missense polypeptide 사슬은 제한온도에서는 단백질이 정상적으로 folding 되지 않든가 또는 subunit의 집합이 불완전하게 되어 있기 때문이라 하였고^{9, 12)} 또한 온도감수성 변이균주가 제한온도에서 축적하는 변이형 polypeptide 사슬의 구조는 unfolding 사슬에 가까우므로 사슬의 folding이 일어나지 않는다고 보고되어 있다.¹²⁾ 그러나 polypeptide 사슬의 folding 과정에서 협동적인 소수성 상호작용이나 수소결합에 의하여 일정한 과정을 거쳐서 입체구조가 형성되므로 도중의 단계에서는 중요한 역할을 가진 아미노산 잔기도 입체구조가 완성된 후에는 단백질 전체의 열 안정성에는 전혀 영향을 미치지 않을 수도 있다. 실제로 열 불안정한 변이형 단백질도 분자 전체의 3차 구조는 야생형 단백질과 상동하다는 것이 phage P22 tail spike 단백질의 연구에서 보고되어 있다.⁹⁾ 이것으로 예상되는 바와같이 아마 온도감수성 변이균주는 missense polypeptide 사슬을 생산한 후 그것이 활성을 가지는 단백질로 성숙하는 단계가 온도감수성으로 되었거나 또는 야생형과 전혀 구별할 수 없는 입체구조로 되어있다고 생각된다.

요 약

Saccharomycopsis lipolytica ATCC44601과 온도감수성 변이균주인 MX9-11RX8로부터 정제한 isocitrate lyase의 성질을 조사하였다.

허용온도에서 정제한 야생형균주 및 온도감수성 변이균주 isocitrate lyase는 등전점(pH 5.3), 35°C와 40°C 및 45°C에서의 열 안정성 그리고 23°C와 33°C에서 threo-Ds-isocitrate에 대한 K_m 값(약 0.2mM)에 대하여 차이가 없었으며, 온도감수성 변이균주는 33°C의 acetate 최소배지에서 유도하였을 때 효소활성은 거의 나타나지 않았지만 isocitrate lyase에 해당하는 polypeptide 사슬을 23°C의 허용온도에서 유도하였을 때와 거의 같은 양을 생산하였다.

참 고 문 헌

- 1) Laporte, D. C., K. Walsh, D. E. Koshland, jr.: The branch point effect, *J. biol. chem.*, **259**, 14068(1984)
- 2) Johanson, R. A., Hill, J. M., McFadden, B. A.: Isocitrate lyase from *Neurospora crassa*. I. Purification, kinetic mechanism, and interaction with inhibitor, *Biochim. Biophys. Acta*, **364**, 341(1974)
- 3) McFadden, B. A., Rao, G. R., Cohen, A. L., Roche, T. E.: Isocitrate lyase from *Pseudomonas indigofera*. V. Subunits and terminal residues and the relation to catalytic activity, *Biochemistry*, **7**, 3574(1968)
- 4) John, P. C. L., Syrett, P. T.: The purification and properties of isocitrate lyase from *Chlorella*, *Biochem. J.*, **105**, 409(1967)
- 5) Khan, F. R., Saleemuddin, M., Siddigi, M., McFadden, B. A.: Genetics and function of isocitrate lyase in *Coprinus*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **183**, 13(1977)
- 6) Reiss, U. Rothstein, M.: Isocitrate lyase from the free-living Nematode, *Biochemistry*, **13**, 1796(1974)
- 7) Hartwell, L. H., Culotti, J., Pringle, J. R., Reid, B. J.: Genetic control of the cell division cycle in yeast, *Science*, **183**, 46(1974)
- 8) 百瀬春生: Application and technology of conditional mutation(a monographic review), *日 穰 I.*, **56**, 592(1978)
- 9) Smith, D. H., King, J.: Temperature-sensitive mutants blocked in the folding or subunit assembly of the bacteriophage P22 tail spike protein. III. Inactive polypeptide chains synthesized at 39°C, *J. Mol. Biol.*, **145**, 653(1981)
- 10) King, H. B., Casselton, L. A.: Genetics and function of isocitrate lyase in *Coprinus*, *Molec. Gen. Genet.*, **157**, 319(1977)
- 11) Smith, D. H., Berget, P. B., King, J.: Temperature-sensitive mutants blocked in the folding or subunit assembly of the bacteriophage P22 tail spike protein. I. Fine-structure mapping, *Genetics*, **96**, 331(1980)
- 12) Goldenberg, D. P., King, J.: Temperature-sensitive mutants blocked in the folding or subunit assembly of the bacteriophage P22 tail spike protein. II. Active mutant proteins matured at 30°C, *J. Mol. Biol.*, **145**, 633(1981)
- 13) Ishihama, A.: Subunit assembly of *Escherichia coli* RNA polymerase, *Adv. Biophys.*, **14**, 1(1980)
- 14) 조석금: *Sacchamycopsis lipolytica* isocitrate lyase의 정제와 성질, 한국산업미생물학회지, **15**, 420(1987)
- 15) 조석금: *Sacchamycopsis lipolytica* isocitrate lyase의 온도감수성 변이균주의 분리 및 특성, 한국산업미생물학회지, **15**, 414(1987)
- 16) Wrigley, C. W.: Gel electrofocusing, *Methods Enzymol.*, **22**, 559(1971)
- 17) Laemli, U. K.: Proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature(London)*, **227**, 680(1970)
- 18) Vesterberg, O.: Isoelectric focusing of protein, *Methods Enzymol.*, **22**, 389(1971)
- 19) Dixon, G. H., Kornberg, H. L.: Assay Methods for key enzymes of the glyoxylate cycle, *Biochem. J.*, **72**, 3(1959)
- 20) Tabuchi, T., Igoshi, K.: Regulation of enzyme synthesis of the glyoxylate, the citric acid and

- the methylcitric acid cycles in *Candida lipolytica*, *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 2381(1978)
- 21) Oshima, Y., Tomizawa, J., Horiuchi, T.: Isolation of temperature-sensitive Lac repressors, *J. Mol. Biol.*, **34**, 195(1968)
- 22) Ishihama, A.: Subunit assembly of *Escherichia coli* RNA polymerase, *Adv. Biophys.*, **14**, 1(1981)
- 23) Matsuoka, M., Ueda, Y., Aiba, S.: Role and control of isocitrate lyase in *Candida lipolytica*, *J. Bact.*, **144**, 692(1980)
- 24) Kornberg, H. L., Smith, J.: Temperature-sensitive synthesise of isocitrate lyase in *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta.*, **123**, 654(1966)
- 25) Matsumoto, K., Toh-e, A., Oshima, Y.: Genetic control of galactokinase synthesis in *saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.*, **134**, 446 (1978)