

# Vacuolar Arginine Compartmentation of Arginine Metabolism in *Neurospora crassa*

서울대학교 자연과학대학 미생물학과

이 연 희

## 서 론

진핵세포와 무핵세포의 가장 큰 차이점은 막으로 둘러싸인 소기관의 존재유무이다. 무핵세포의 경우는 세포 내 모든 물질들이 세포질 한 공간에 존재하므로써 최종 대사산물에 의해 효소의 반응 속도를 조절하거나 효소들의 생산을 조절하므로써 전체 대사가 조절된다. 이에 반하여 진핵세포의 경우 여러 소기관들이 존재하여, 여러가지 대사경로와 중간산물들을 분리시킬 수 있다(compartmentation). Compartmentation에 의한 잇점들을 나열해 보면 다음과 같다. 1) 합성과정과 분해 과정을 분리시켜 futile cycle을 방지하여 에너지 손실을 막을 수 있다. 2) 중간대사산물이 확산이나 분해에 의해 소실되는 것을 막아 각기 적절한 곳에 고농도로 집적시킴으로써, 기질과 조절 분자들의 농도변화에 민감히 대처하게 한다. 3) 이 결과, 세포질 내 수분의 solvent capacity를 유지시켜 준다. 4) 세포대사에 영향을 미치는 조절인자들을 필요시까지 과량으로 세포 내에 저장할 수 있다. 한편 compartmentation에 의해 야기되는 문제점도 있다. 분자들이 각 소기관(compartment)으로 이동하기 위해서는 특별한 운반기전(transport mechanism)이 필요하다. 또한 세포 내 대사를 총괄적으로 조절하기 위해서는 소기관 상호간의 연락이 필요하게 된다. 진핵세포의 경우 이러한 compartmentation이 전체 대사에 얼마나 중요하며, 또한 각 소기관 내외로의 물질이동 기전과 소기관간의 상호 연락 기전을 알아보는 데에는 *Neurospora crassa*가 가장 좋은 생물이다.

## *Neurospora crassa*에서의 L-아르기닌의 대사경로

*N. crassa*의 아르기닌 대사는 크게 셋으로 나눌 수 있다<sup>1)</sup>. 오르니틴의 생산, carbamoyl phosphate의 생산, 그리고 이 둘로부터 아르기닌의 생산이다. 분해과정을 통해 아르기닌은 오르니틴과 요소로 가수분해되며, 요소는 암모니아와 이산화탄소로 분해되고, 오르니틴은 글루타메이트로 전환된다(Fig.1). *N. crassa*에서 아르기닌의 생산은 두 소기관에서 9개의 반응과정으로 이루어져 있다. 처음 7과정의 효소들은 미토콘드리아 위치하며 글루타메이트로부터 시투롤린을 생산하는 데 관여한다. 마지막 두 과정의 효소는 세포질에 존재하며 시투롤린으로부터 아르기닌을 만든다. 아르기닌 합성 과정의 처음 효소인 acetylglutamate synthase는 글루타메이트와 아세틸 Co.A로부터 acetylglutamate를 만든다. Acetylglutamate는 acetylglutamate kinase와 acetylglutamyl phosphate reductase에 의해 acetylglutamate 5-semialdehyde로 전환된다. 이 두 개의 효소는 매우 특이하게 한 개의 단백질로 만들어져 미토콘드리아로 이동되면서 두 개의 효소로 분리된다.<sup>2)</sup> Acetylornithine transaminase는 글루타메이트의 아미노기를 acetylglutamate 5-semialdehyde에 전달해서 acetylornithine을 만든다. 이것은 ornithine acetyltransferase에 의해 ornithine과 아세틸기로 되고, 아세틸기는 다시 글루타메이트로 재사용된다.

이렇게 생산된 오르니틴은 세 가지 과정을 거쳐 아르기닌으로 전환된다. 즉 ornithine car-

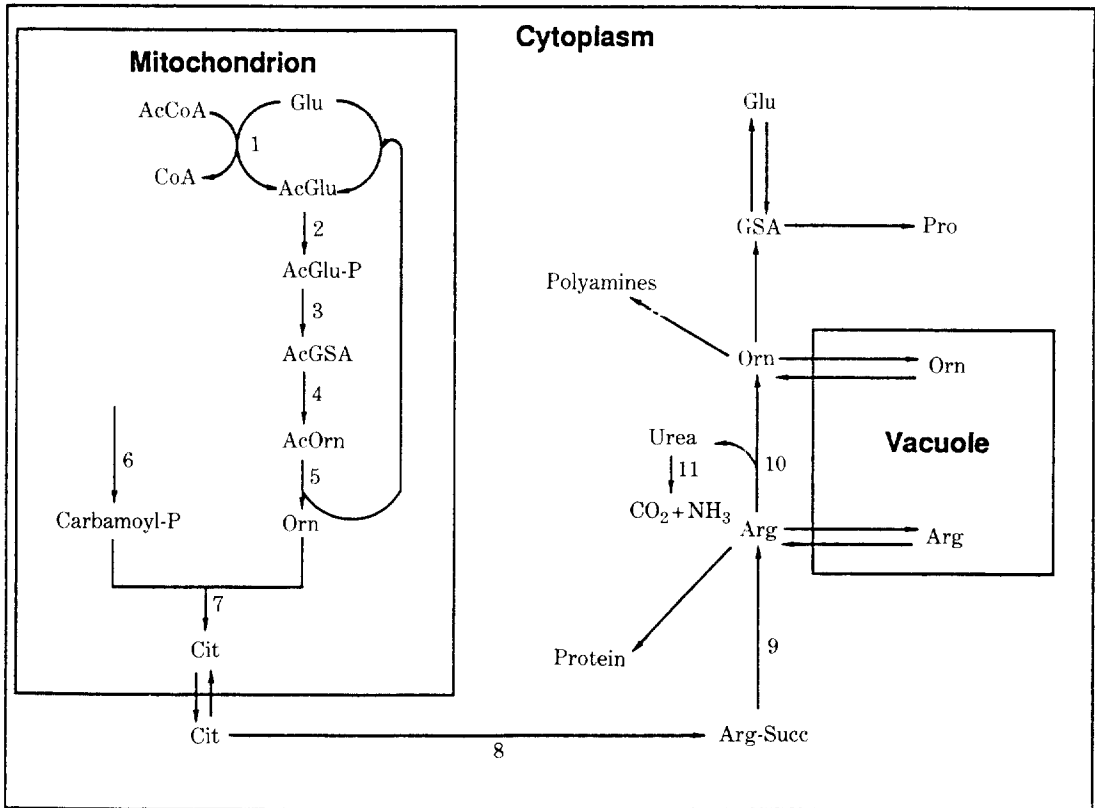


Fig. 1. Arginine Metabolism in *Neurospora crassa*

bamoyltransferase는 오르니틴과 carbamoyl phosphate를 축합시켜 시투롤린을 형성시킨다. Carbamoyl phosphate는 하등생물의 경우(효모까지 포함)와 달리 미토콘드리아에 존재하는 아르기닌에만 특이한 carbamoyl phosphate synthetase에 의해 생성된다. 미토콘드리아에서 생성된 시투롤린은 세포질로 운반되어 argininosuccinate synthetase와 argininosuccinate lyase에 의해 아르기닌으로 전환된다. 아르기닌은 단백질 합성에 사용되거나, 아르기나제에 의해 요소와 오르니틴으로 분해되거나, 액포에 저장된다.<sup>3)</sup>

아르기닌의 생합성은 두 가지 다른 기전에 의해 조절된다. "General amino acid control system"과 "Feed-back inhibition"이 그것들이다. *N. crassa*에서 "Cross-pathway control"이라 불리는 "General amino acid control system"은 한 아미노산 결핍으로 야기되는 다른 아미노산 대사에 생기는 변화이다. 어떤 한 아미노산이 결핍

되면 이 아미노산과 연관되는 모든 과정의 효소들의 발현이 증가하게 된다. 즉 다른 아미노산 생합성 과정에 의해 아르기닌 대사에 관여하는 효소량이 조절되게 된다.<sup>4-6)</sup> 예를 들면, carbamoyl phosphate synthetase 경우 아르기닌 공급이 억제되거나 다른 아미노산이 결핍되면 다시 발현되어 200 배 이상 증가하게 된다.<sup>6)</sup>

"Feed-back inhibition"은 최종 대사산물에 의한 효소 활성의 조절이다. 아르기닌 생합성 과정의 처음 두 효소인 acetylglutamate synthase와 acetylglutamate kinase는 미토콘드리아에 존재하면서<sup>7,8)</sup> 세포질의 아르기닌에 의해 조절된다.<sup>6,9)</sup> 즉 이 두 효소에 의해 오르니틴의 공급을 조절함으로써 아르기닌 합성을 조절한다. 이 두 가지 조절기전 이외에도, 세포질의 아르기닌에 의해 아르기나제와<sup>10)</sup> ornithine transaminase가 유도되어 아르기닌의 분해를 촉진한다.<sup>11)</sup> 하지만 다음과 같은 문제점들은 아직 밝혀지지 않고 있

다. 1) 아르기닌 대사를 조절하는 다른 인자들은 무엇이며 어떻게 작용하는지. 2) 대사가 세포 내 여러 곳에서 일어날 때 중간대사물들이 어떻게 각 소기관 내외로 이동하는지. 3) 소기관 사이에 상호 어떻게 연락해서 전체 조절이 되는지. 4) 액포에 어떻게 이동 저장되는지 등이다.

## 아르기닌 대사에 있어서 액포의 중요성

대부분의 무핵세포의 경우 아미노산은 미량 존재하며 이들의 분해효소들도 “uninduced” 상태로 유지된다. 반면에 진핵세포의 경우, 종종 많은 양의 아미노산들이 분해효소가 있음에도 불구하고 세포 내에 존재하고 있다. 이것은 대부분의 아미노산들이 액포에 존재하므로써 분해가 되지 않기 때문이다.<sup>12-15)</sup>

액포는 식물과 곰팡이 세포에서 전체 부피의 25~95%를 차지하는 가장 큰 소기관이다. 액포는 endoplasmic reticulum에서 pro-vacuole 상태로 생기거나 smooth E.R.이 확장되어 만들어진 후 작은 액포들이 합쳐져 세포 내의 큰 액포를 이루게 된다. 한편 골기체로부터 생성되거나 식균작용에 의해서 생긴다는 증거도 있다.<sup>16)</sup>

액포는 pH가 낮고 여러가지의 많은 가수분해 효소를 가지고 있는<sup>17)</sup> 동물세포의 리소조움에 해당하는 기관이다. 리소조움의 역할 이외에도 세포질로부터 여러 기질과 이온 등을 저장, 세포질의 영양분과 이온의 항상성을 유지시켜 주며 세포 내 압력을 일정하게 유지시키는 기계적 작용도 한다. 이 중 가장 중요한 역할은 저장작용이라 하겠다. 즉 세포질에 존재하는 효소 억제물질들을 세포질로부터 격리 저장하여 평상시의 생합성이 억제되지 않도록 하며, 유사시에는 축적된 영양분을 질소원이나 탄소원으로 사용하게 한다.<sup>16)</sup>

*N. crassa*의 액포는 여러가지 proteases, ribonucleases, alkaline phosphatase,  $\alpha$ -mannosidase와 많은 양의 아르기닌, 히스티딘, 리신 등 염기성 아미노산을 저장하고 있다.<sup>14,18)</sup> 만일 아르기닌이 세포질에 고루 분포되어 있다면 8mM이 되며,<sup>19)</sup> 이 농도에서는 생합성이 중단되고 분해효소가 유도되게 된다. 실제 세포 내에서는 높

은 농도의 아르기닌이 존재함에도 불구하고 합성이 계속된다. 질소원이 결핍되면 세포 내 아르기닌과 오르니틴의 농도가 급격히 감소되나,<sup>20)</sup> 이때 분해효소의 활성은 증가되지 않는다. 즉 분해의 증가는 효소에 의한 증가가 아닌 기질의 증가, 즉 액포에 저장되어 있던 아르기닌이 세포질로 이동되어 질소원으로 사용되었음을 알 수 있다.<sup>13,20)</sup>

*N. crassa*에서 아르기닌은 98% 이상이 액포에 저장되어, 세포질에 존재하는 아르기닌의 양을 필요시 쉽게 증감시켜 반응할 수 있게 한다. 즉 액포막이 액포와 세포질간의 아미노산의 자유로운 이동을 막는다. 이에 따라 대부분의 아르기닌은 분해효소인 아르기나제로부터 분리 저장되어 있다가 질소원 부족시 아르기닌 공급원으로 작용한다.<sup>13,20,21)</sup> 다시 말하면 대부분의 아르기닌은 액포에 존재하므로써 여러 성장조건하에서도 비교적 일정하게 세포질 내의 아르기닌 농도가 유지되게 되는 것이다.

## *N. crassa*에서의 아르기닌의 액포로의 이동

*Saccharomyces cerevisiae*에서 아르기닌의 이동은 적어도 세가지 다른 기전에 의해 이루어지는 것으로 생각된다. 1) ATP-dependent arginine specific transport: 리신이 아르기닌의 이동을 억제하지 않는다.<sup>22)</sup> 2) ATP-independent arginine/lysine specific transport: 아르기닌 이동은 리신에 의해 경쟁적으로 억제되지 않으나 리신의 이동은 아르기닌에 의해 경쟁적으로 억제된다.<sup>22)</sup> 3) arginine/histidine antiport: 아르기닌이 히스티딘의 이동으로 생긴 농도 경사에 의해 축적되는 경우가<sup>23)</sup> 밝혀져 있다. 아르기닌 이동은 특이성이 넓어서 L-lysine, *N*<sub>w</sub>-methyl-L-lysine, D-arginine 등이 아르기닌 이동에 경쟁적으로 작용한다.

*N. crassa*의 경우 생체내 실험으로 아르기닌 이동에 대사에너지가 필요함이 발견되었다.<sup>25,26)</sup> 단 호흡과정의 억제물질은 아르기닌 운반을 억제하나 해당과정의 억제물질은 작용하지 않는다. 액포막으로 만든 vesicle을 사용한 생체의 실험으로는

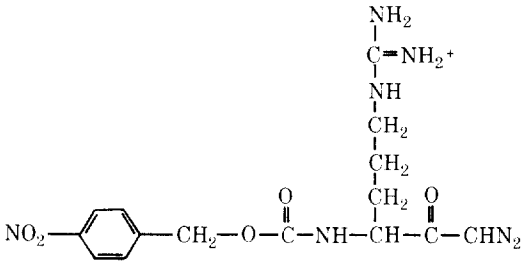


Fig. 2. Structure of *N* $\alpha$ -nitrobenzoxycarbonyl arginyl diazomethane.

ATP-dependent 와 ATP-independent 한 아르기닌 이동이 밝혀졌다.<sup>27)</sup> *N. crassa* 에서는 *S. cerevisiae* 와는 달리 매우 특이성이 강해 L-lysine, L-ornithine, L-homoarginine, *N* $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester 등 결사슬이 다른 아미노산들은 경쟁적으로 작용하지 못한다.<sup>28)</sup>

### 액포의 아르기닌 운반체

흔히 receptor 나 운반체를 순수분리하기 위해 서 인공 지질막에 추출된 단백질을 삽입시키는 방법이 사용되고 있다.<sup>29)</sup> 이 경우 단백질의 추출, 분리, 삽입 과정 중 단백질 본래의 기능을 잃지 말아야 하는 어려움이 있다. 특히 detergent 사용시에 이온적 결합으로 형성된 기질-수용체의 복합체가 분해될 수 있어 각 단계에서 단백질을 인지하기 어렵게 된다. 이에 반해 방사성을 가진 친화표지 (Affinity Label)를 사용하는 경우 극소량의 단백질도 쉽게 인지될 수 있다.

액포에 있는 아르기닌 운반체의 인식 특이성이 L-구조와 결사슬에 있는 것을 이용해서 카르복실기에 디아조기를 가진 아르기닌 유도체를 사용 아르기닌 운반체를 표지시켰다 (Fig. 2).<sup>30)</sup> 디아조기는 UV 나 열에 의해 반응성이 강한 카르벤을 만들며, 이는 단백질의 O-H, S-H, N-H 에 쉽게 결합한다.<sup>31)</sup> 또한 카르벤으로부터 Wolff 전이에 의해 생성되는 케텐도 O-H, S-H, N-H 에 의해 공격받아 단백질과 공유결합을 하게 된다. 방사성을 띤 *N* $\alpha$ -nitrobenzoxycarbonyl arginyl diazomethane 으로 액포를 표지시키면 분자량 40,000의 단백질 하나만이 특이하게 표지되었다. 이 표지된 단백질은 아르기닌 운반체로 확인되었다.<sup>28)</sup> 또한

아르기닌의 이동에 -SH 가 관여함도 밝혀졌으며<sup>30)</sup> 이 유도체로 표지된 액포로부터 아르기닌 운반체가 순수분리되었다.<sup>32)</sup>

### 미래의 전망

순수분리된 아르기닌 운반체로부터 아미노산 서열을 알아내어 항체와 oligonucleotide 를 합성 이들을 이용하여 아르기닌 운반체의 유전자를 얻어 낼 것이다. 유전자를 분자유전학적 방법으로 변화시켜 새로운 액포 돌연변이를 만들어서 이 돌연변이와 wild type 을 비교함으로써 액포의 중요성을 알아낼 수 있을 것이다.

### 참고문헌

1. Davis, R.H. (1986) *Microbiol. Rev.* **50**, 280-313.
2. Wandinger-Ness, A.U., Ness, S.A. and Weiss, R.L. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 4820-4827.
3. Weiss, R.L. (1976) *J. Bacteriol.* **126**, 1173-1179.
4. Carsiotis, M. and Jones, R.F. (1974) *J. Bacteriol.* **119**, 889-892.
5. Carsiotis, M., Jones, R.F. and Wesseling, A.C. (1974) *J. Bacteriol.* **119**, 893-898.
6. Cybis, J.J. and Davis, R.H. (1975) *J. Bacteriol.* **123**, 196-202.
7. Davis, R.H. (1972) *Science*, **178**, 835-840
8. Weiss, R.L. and Davis, R.H. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 5409-5413.
9. Wolf, E.C. and Weiss, R.L. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 9189-9195.
10. Davis, R.H. (1970) *Biochim. Biophys. Acta.* **215**, 412-414.
11. Weiss, R.L. and Anterasian, G.P. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 6794-6980.
12. Wiemken, A. and Dürr, M. (1974) *Arch. Microbiol.*, **101**, 45-57.
13. Huber-Wälchi, V. and Wiemken, A. (1979) *Arch. Microbiol.* **120**, 141-149.
14. Matile, P. (1978) *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **29**, 193-213.
15. Messenguy, F., Collin, O. and Ten Have, J.

- (1980) *Eur. J. Biochem.* **108**, 439-447.
16. Macrobbe, E.A.C. (1979) in *Plant Organelles* pp.61-68 (Reid, E. eds.) Halsted Press, New York.
17. Boller, T., Dürr, M. and Wiemken, A. (1986) *Ann. Rev. Plant Physiol.* **37**, 137-164.
18. Vaughn, L.E. and Davis, R.H. (1981) *Molec. Cellul. Biol.* **1**, 797-806.
19. Davis, R.H. (1972) *Science* **178**, 835-840.
20. Legerton, T.L. and Weiss, R.L. (1979) *J. Bacteriol.* **138**, 909-914.
21. Legerton, T.L. and Weiss, R.L. (1984). *J. Biol. Chem.* **259**, 8875-8879.
22. Sato, T., Ohsumi, Y. and Anraku, Y. (1984 a) *J. Biol. Chem.* **259**, 11505-11508.
23. Sato, T., Ohsumi, Y. and Anraku, Y. (1984 b) *J. Biol. Chem.* **259**, 11509-115011.
24. Dürr, M., Boller, T.H. and Wiemken (1976) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **73**, 193-199.
25. Drainas, C.D. and Weiss, R.L. (1982 a) *J. Bacteriol.* **150**, 770-778.
26. Drainas, C.D. and Weiss, R.L. (1982 b) *J. Bacteriol.* **150**, 779-784.
27. Zerez, C.R., Weiss, R.L., Franklin, C. and Bowman, B.J. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 8877-8882.
28. Paek, Y.L. and Weiss, R.L. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 7285-7290.
29. Oomen, R.P. and Kaplan, H. (1987) *Biochemistry* **26**, 303-308.
30. Lee, Y. and Weiss, R.L. (1989) *Kor. J. Microbiol.* **27**, 108-116.
31. Smith, A.B. III. and Dieter, R.K. (1981) *Tetrahedron* **37**, 2407-2439.
32. Lee, Y. and Weiss, R.L. (1989) *Kor. J. Microbiol.* **27**, 117-123.