

이담자균 효모 *Rhodosporidium toruloides*에서 Rhodotorucine A에 의한 막단백질 인산화의 저해와 Trigger Peptidase의 관련성

정영기* · 이태호¹ · 류병호²

동의대학교 미생물학과, ¹부산대학교 미생물학과, ²경성대학교 식품공학과

Inhibition of Membrane Protein Phosphorylation by Rhodotorucine A and Involvement of Trigger Peptidase in This Reaction in Heterobasidiomycetous Yeast *Rhodosporidium toruloides*. Yong-Kee Jeong*, Tae-Ho Lee¹ and Beung-Ho Ryu². Department of Microbiology, Dong-eui University, Pusan, 614-714, Korea, ¹Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-753, ²Department of Food Microbiology and Technology, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea — [γ -³²P]ATP was used to test phosphorylation of membrane proteins of mating type a cells of heterobasidiomycetous yeast *Rhodosporidium toruloides* separated by non-denaturing electrophoresis. The phosphoprotein was observed in the membrane proteins. The phosphorylation was inhibited by the pheromone rhodotorucine A (Rh. A) secreted by mating type A of the yeast. Rh. A didn't inhibit the phosphorylation in the presence of a trigger peptidase (TPase) inhibitor, antipain. Partially digested Rh. A by trypsin maintained the phosphorylation inhibitory activity. These results show that TPase activity plays an important role in the transduction of pheromone signal in the yeast.

이담자균 효모 *Rhodosporidium toruloides*(1)는 서로 다른 접합형의 A형과 a형세포로 나뉘어 존재하고 있으나 1배체에서는 각각 출아에 의하여 영양증식을 하고 있다(2). 이들 세포가 성접합으로 유성증식을 행할 때는 접합하기전에 상대 배우자 세포가 분비하는 성 pheromone을 수용하는 과정을 거친다.

저자 등의 최근 보고(3)에 의하면 각 접합형의 세포는 상대세포의 pheromone을 수용한 후에 더욱 성응집율이 증가하여 성적 접합빈도를 높인다는 사실을 밝힌 바 있다. 이 균들은 영양증식 과정에서 서로 상대 접합형 세포를 향하여 성적유인 물질인 pheromone을 분비하는데, A형 세포는 rhodotorucine A(Rh. A)를 구성적으로 분비하고 a형 세포는 rhodotorucine a를 유도적으로 분비한다. 각 영양세포는 상대세포가 분비하는 pheromone을 수용하면 세포주기의 G1기에서 영양증식을 멈추고 긴 접합관을 생성하면서 생식세포로 분화한다. 이 과정을 본 연구에서는 성분화라 표현한다. 접합형 A형 세포가 생산분비하는 Rh. A는 Abe 등(2)에 의하여 발견된 후, Kamiya 등(4)에 의하여 구조가 결정되었다. 즉, Rh. A는 N-말단을 Tyr으로 시작하여 C-말단 Cys까지 11개의 아미노산으로 구성되어있으며 C-말단의 Cys이, polyisoprenoid, farnesyl기로 수식된 lipopeptide 형태로 된 물질이다.

Rh. A의 정보가 표적세포인 a형 세포내에 전달되는 과정을 연구하기 위하여 a형 세포와 Rh. A를 함께 28°C

에서 incubation시킨 결과 Rh. A는 세포표면과 접촉함으로써 급속히 가수분해되어 실패되었으며 그와 동시에 a형 세포는 생식세포로 전환되는 사실을 알았다(5). a형 세포는 pheromone을 수용하면 이를 분해하고, 이 분해반응에는 세포표면단백질이 관여함을 시사한다. 그 후 a형 세포표면에는 trypsin형의 thiol계 endopeptidase가 Rh. A의 대사에 관여함을 알게 되었다(6).

Miyakawa와 Jeong 등(7,8)은 a형세포 표면에 존재하는 효소형 수용체를 정제하여 trigger peptides(TPase)라 명명하고 막단백질로서의 특성을 확립하였다(7). 또한, 이 막단백질 중에는 TPase와 Ca²⁺-ATPase가 공존하여 Rh. A 정보의 전달에 상호 깊이 관여하는 사실을 보고(9)한 바 있으며, 아울러 막단백질 중에 인산화단백질의 존재도 확인된 바 있다(6). 접합형 a세포가 Rh. A를 수용하는 성분화 과정에 Ca²⁺-ATPase의 활성이 저해되어(9,10) 세포내 Ca²⁺의 농도를 조절한다는 사실이 보고된 바 있다. 이를 배경으로하여 본 논문에서는 막단백질 중 인산화 되는 단백질의 검토와 TPase가 Rh. A를 수용하는 과정에서 인산화에 미치는 영향을 조사하였기에 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

균주는 *Rhodosporidium toruloides* IFO 059-M919(접합형 A, 적색 colony, 난형)를 사용했으며, 배양은 500 ml의 진탕 flask에 chloramphenicol 50 µg을 첨가한 YPG배지(0.4% yeast extract, 0.5% polypeptone, 2% glucose, 0.1% NH₂PO₄, 0.05% MgSO₄) 100 ml에 전배

*Corresponding author.

Key words: Phosphorylation, Rhodotorucine A, Trigger peptidase, *Rhodosporidium toruloides*, Membrane protein, Yeast.

양한 균을 2%를 이식하여 28°C에서 배양하였다.

Rhodotorucine A

Merrifield의 방법(11)에 따라서 고상법을 이용하여 합성하였다. 합성된 peptide는 Kamiya 등의 방법(4)에 의하여 peptide의 C-말단에 farnesyl기를 부가하였다. 합성이 완료된 Rh. A는 Sephadex LH-20 column chromatography(\emptyset 1.3 cm \times 30 cm, 0.5 mM DTT를 함유한 methanol) 법으로 정제하였다. 최종 Rh. A는 생물활성검정을 거쳐 활성의 유무를 확인한 후 실험에 사용하였다. Rh. A 1 unit라 함은 검정균(a세포)에 접합관형성율이 30%가 되게 하는 Rh. A의 양으로 정의하였다.

세포막 단백질의 가용화

세포막 단백질의 가용화는 Jeong 등의 방법(9)에 의하여 행하였다. 즉, 접합형 a세포를 500 ml 진탕 flask에 YPG배지 100 ml 단위로 배양한 후, 대수증식기(3×10^7 cells per ml)까지 배양하여 집균하였다. 균체를 각 1 mM의 EDTA(Ethylene diamine tetra acetic acid), DTT(Dithiothreitol), PMSF(phenyl methyl sulfonyl fluoride)가 함유된 0.01 M Tris-HCl buffer(pH 7.3, 이하 buffer A라함)로 2회 세척 후 sonication(ultrasonic processor model VC-1500, 800 W)하여 파쇄 하였다. 20분 원심분리(11,000 \times g, 4°C) 하여 얻은 침전물을 다시 상기의 buffer A로 3회 씻고 4%의 Nonidet-40(NP-40)에 현탁하였다. 위의 현탁액을 1분간 sonication(200 W)함으로써 막단백질을 가용화하여 추출하였다. 4°C에서 약 1시간 방치후 원심분리(11,000 \times g, 60분)하고 상층을 취하여 세포막 단백질 가용분획으로 사용하였다.

비변성 전기영동 및 인산화

비변성 전기영동은 슬레브 겔의 크기 1 \times 180 \times 180 mm로 제작한 것을 사용하였다. 4%의 nonidet-40(NP-40)으로서 가용화한 막단백질을 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 7.3)로서 5배 희석하여 최종 detergent의 농도가 0.8% 되도록 처리하였다. 그런 다음 30%의 sucrose를 적당량 가하여 전기영동 표품 단백질로 하였다. 4°C의 냉실에서 6 mA의 전류를 흘려 약 14시간 전기영동한 후 겔을 buffer B(20 mM HEPES, 0.1 mM DTT, 0.7% OG(n-octyl β -D-glucopyranoside), 1 mM CaCl₂, 5 μ g/100 ml phosphatidylethanolamine)에 잘 세척하여 비변성 전기영동 표품으로 사용하였다.

단백질의 인산화 반응은, 상기의 비변성 전기영동 gel을 1 lane씩 잘라 buffer B 3 ml을 반응액으로하여 비닐봉지에 gel과 함께 넣고 여기에 [γ -³²P]ATP 5 μ ci를 가함으로서 반응을 개시하여 비닐입구를 잘 봉합하고 실온에서 30분간 반응시킨다. 반응은 10% methanol과 10% 초산수용액의 혼합액에 담구어서 종료시킨다. 반

응이 끝난 gel은 10 mM의 EDTA, 50 mM NaH₂PO₄, 50 mM Na₄P₂O₇을 함유하는 수용액에서 잘 세척한 후 건조한다. 인산화단백질의 검정은 autoradiograph(12)로서 행하였다. 즉, X-선 필름(KODAK, X-OMAT R or S)을 [γ -³²P]ATP로서 인산화 시킨 gel과 증감지(DU-PONT, CRONET)의 사이에 끼워서 -80°C에서 2일간 보관한 후 현상액(RENDOL-RENFIX)으로 현상하였다.

TPase의 활성 측정

이전에 보고한 Jeong 등의 방법(9)에 의하여 측정하였다. 0.01 M Tris-HCl buffer(pH 7.3)에 1 mM CaCl₂, 0.1 mM DTT, 0.3 mM NP-40, 0.07 mM phosphatidylserine(PS)을 함유한 반응액 1 ml에 30 U의 rhodotorucine A와 효소액으로서 막단백질 가용화용액이나 비변성 전기영동 겔파쇄액 10 μ l을 혼합하여 28°C에서 30분간 반응시켰다. 효소활성은 rhodotorucine A를 실험시키는 정도로서 결정하였다. 여기서 TPase 1 U라 함은 1분간에 1 U의 rhodotorucine A활성을 실험시키는 것으로 정한다.

결과 및 고찰

막단백질 가용화 분획의 비변성 전기영동과 인산화 단백질의 검출

접합형 a세포의 막단백질 가용화 분획을 비변성 전기영동한 동일 gel로서 coomassie blue(R-250, Bio-RAD) 염색과 [γ -³²P]ATP로서 인산화를 각각 따로 행하였다. 결과는 Fig. 1에서 보이는 바와 같이 coomassie blue로서 염색된 단백질 부위와 일치하는 위치에서 인산화되는 단백질의 존재를 확인 할 수 있었다. 이 인

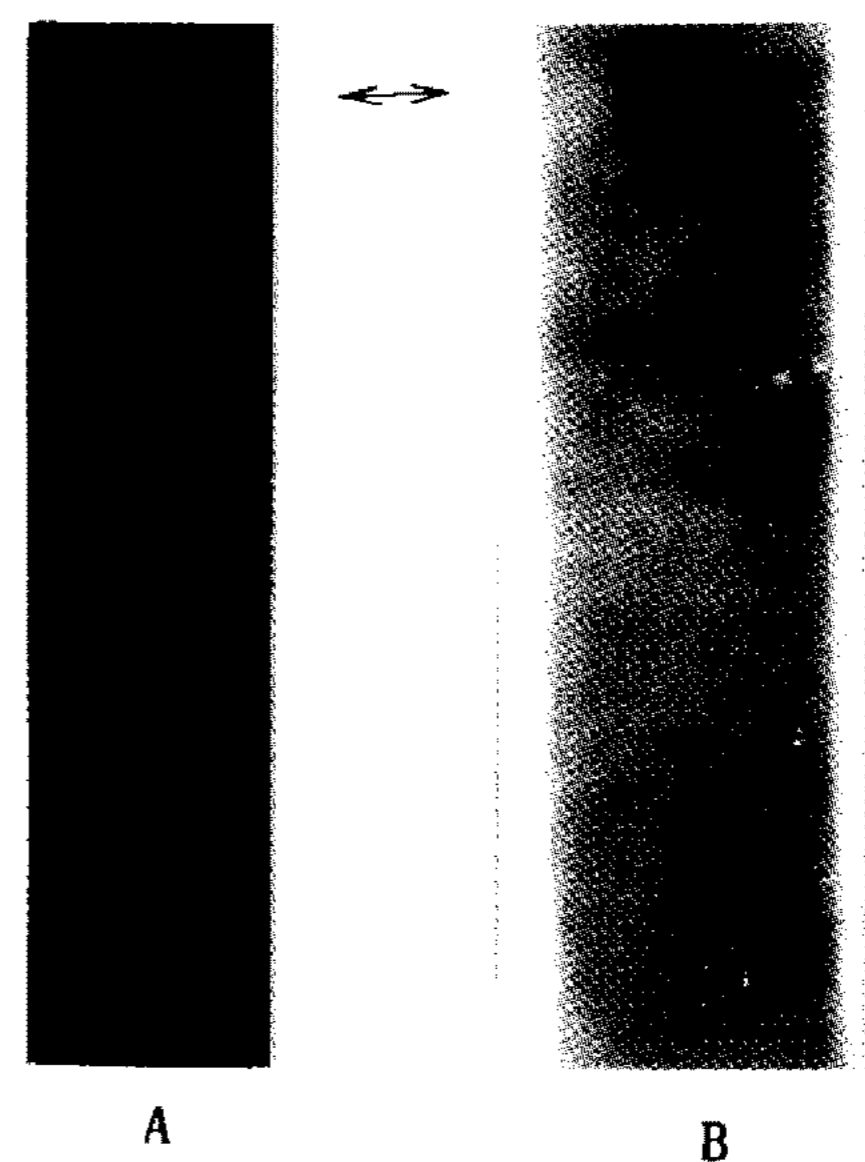


Fig. 1. *In situ* phosphorylation of solubilized proteins in non-denaturing gel by [γ -³²P]ATP and coomassie staining. A, coomassie blue staining; B, phosphorylation.

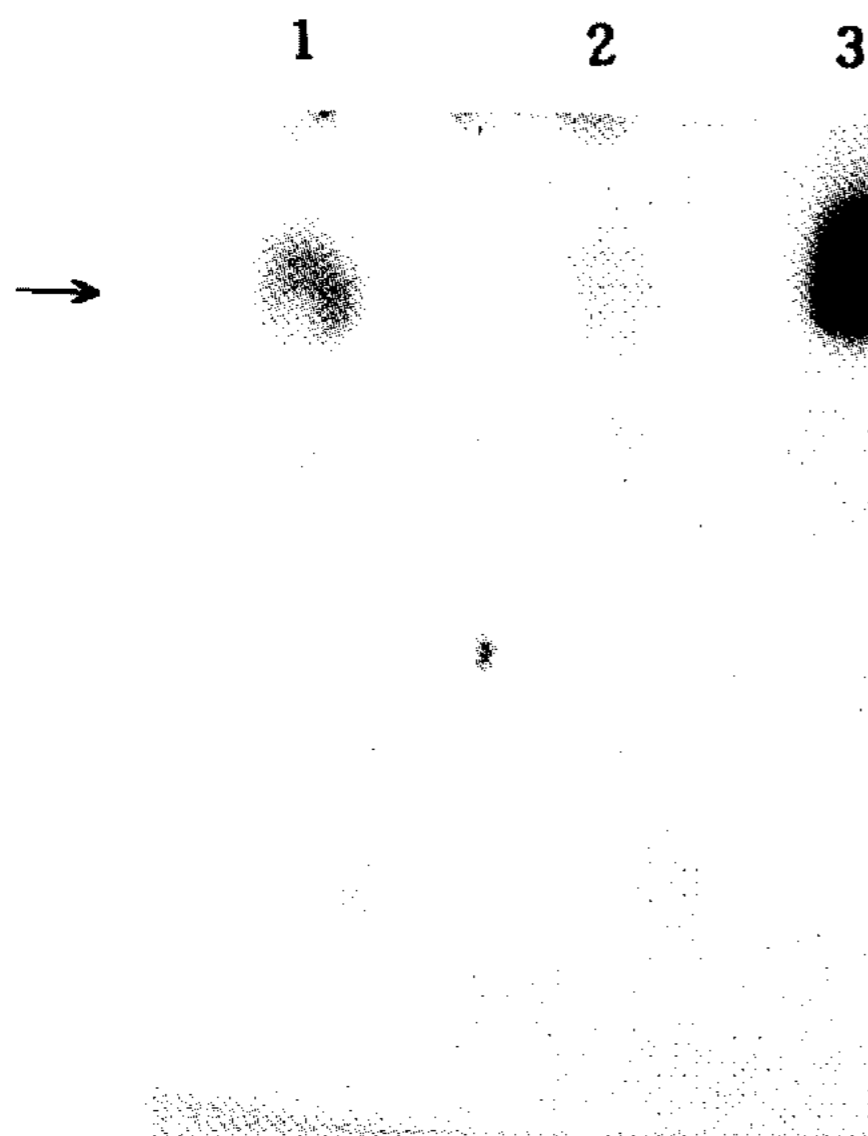


Fig. 2. Effect of rhodotorucine A (Rh. A) on membrane solubilized protein phosphorylation.

Lane 1, no addition of Rh. A; Lane 2, addition of Rh. A; Lane 3, addition of Rh. A S-oxide (Prepared oxidation of 30 U of rhodotorucine A).

산화 단백질은 Miyakawa 등(6)이 같은 막단백질 가용화분획으로 SDS-PAGE에 의하여 검출한 100 kd, 90 kd, 72 kd의 인산화 단백질을 포함하고 있는지는 알 수 없으나, 막계에 존재하는 단백질 중 특이하게 인산화되는 단백질의 존재를 확인할 수 있었다. 그러나 이 단계에서는 이 인산화가 autophosphorylation인지 proteinkinase에 의한 인산화인지는 알 수 없다.

Rh. A에 의한 막단백질 인산화의 저해

Rh. A가 a세포의 표면에 접촉하여 세포내로 전달될 때 막에 존재하는 인산화 단백질이 정보전달에 어떤 역할을 한다면, 이 단백질의 인산화는 Rh. A에 의하여 변화될 수 있다는 추측이 가능하다. 그래서 인산화 반응중에 30 U의 Rh. A를 첨가하여 인산화의 변화에 대해 검토하였다. Fig. 2에서 보이는 바와 같이 막단백질의 인산화는 Rh. A에 의하여 완벽하게 저해되는 것을 알았다. 이 저해현상이 확실히 Rh. A의 활성화에 의한 것인지를 확인 하기위하여 Rh. A를 산화하여 실험시킨 Rh. A S-oxide를 적용시켜 보았다. 그러나, Rh. A S-oxide에 대해서는 저해되지 않았다. 그러므로 Rh. A에 의하여 저해 받은 막단백질의 인산화반응은 이전에 필자 등이 보고한 바 있는 Ca²⁺-ATPase의 저해(9)와 같은 맥락에서 Rh. A 정보가 세포내에 전달되는 과정에서 중요하게 관여되는 현상으로 예측되어진다.

인산화 단백질 중 TPase존재의 확인

막단백질 가용화 분획에는 당연히 TPase가 존재한다(7). 이 가용화 분획을 비변성전기영동한 결과 인산화 단백질이 검출되었기 때문에 TPase와 인산화 단백질은

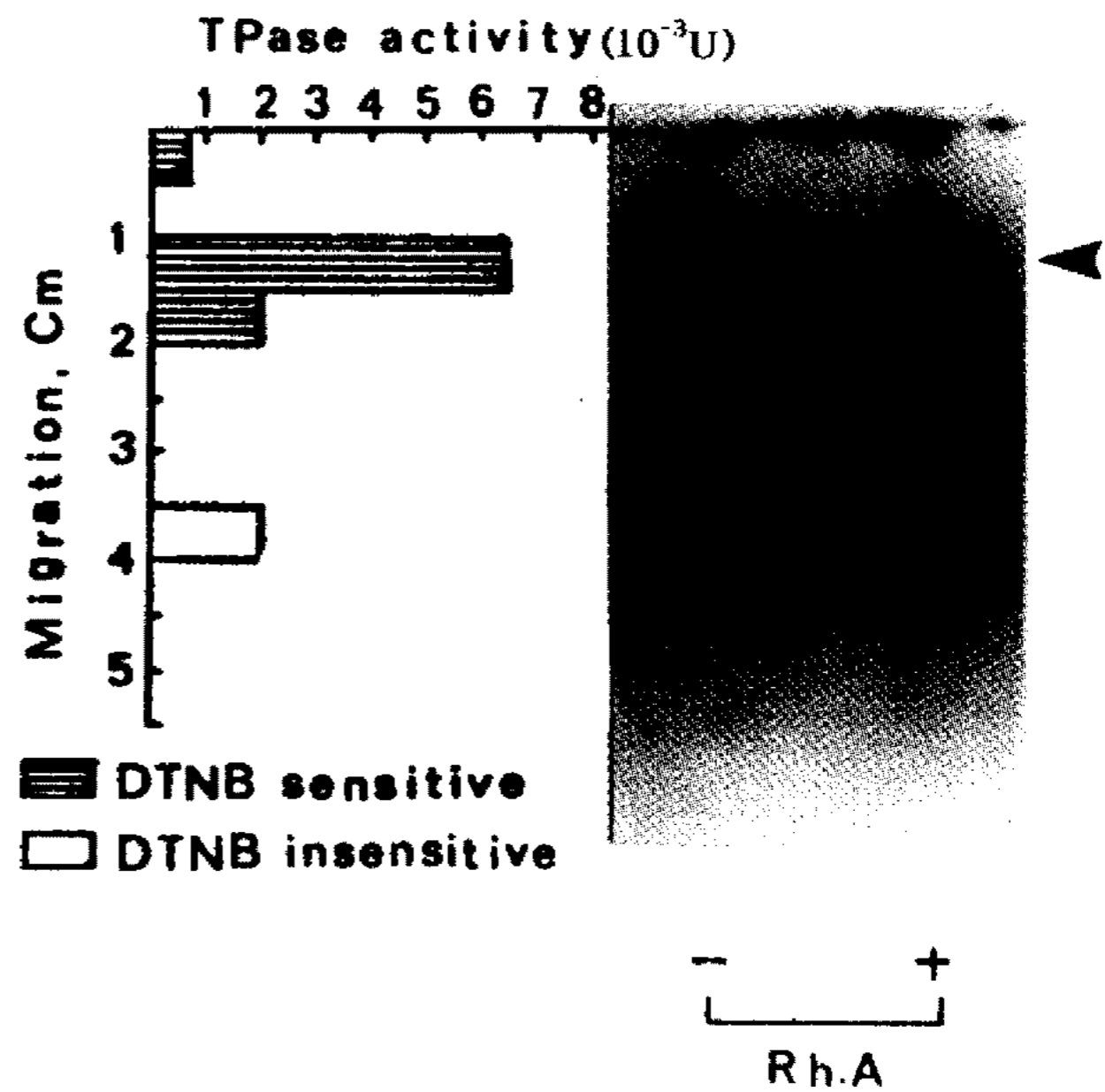


Fig. 3. Phosphorylation of solubilized protein and trigger peptidase activity on phosphorylated protein.

전기영동상 같은 fraction에 존재할 가능성이 높다. 그래서 이를 규명하기 위하여 비변성전기영동한 gel을 위에서부터 5 mm씩 잘라서 TPase의 활성부위를 조사하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 TPase의 활성은 인산화 단백질과 일치하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 TPase가 Rh. A를 수용하는 과정에서 인산화 저해반응에 중요하게 관여하고 있다는 사실을 강하게 시사하는 결과이다. TPase는 thiol계 endopeptidase이므로 DTNB(5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid))에 대하여 강하게 활성저해를 받으므로(6) Fig. 3에서 진정한 TPase의 활성은 당연히 DTNB sensitive fraction에 해당한다. 그러나 지금의 단계에서는 인산화 단백질과 TPase가 같은 단백질이라는 증거는 없지만 앞으로 확인할 필요가 있다고 사료된다.

단백질 인산화에 대한 인지질의 효과

인산화 단백질의 유래는 접합형 a세포의 막단백질이므로 막의 인지질 2중층에 끼여서 존재할 가능성이 크다. 일반적으로 TPase를 비롯하여 막단백효소는 인지질에 활성이 의존하는 경우가 많다(7). 본 인산화 반응에 있어서 인지질의 효과를 검토하기 위하여 인산화 반응액에 5 µg per ml의 인지질(phosphatidyl serine, PS)을 첨가하여 반응시켰다. Fig. 4에서와 같이 인산화된 sport를 densitometer(Toyokagaku Sangyo DNN-33L)에 의하여 측정된 결과 PS를 첨가 한 경우가 첨가하지 않은 경우보다 약 40%정도의 강한 인산화를 보였다. 본 인산화 반응계가 protein kinase에 의해 진행된다고 예상할 때 이 효소 역시 막단백질 특유의 인지질 의존성을 보인다고 예측할 수 있다.

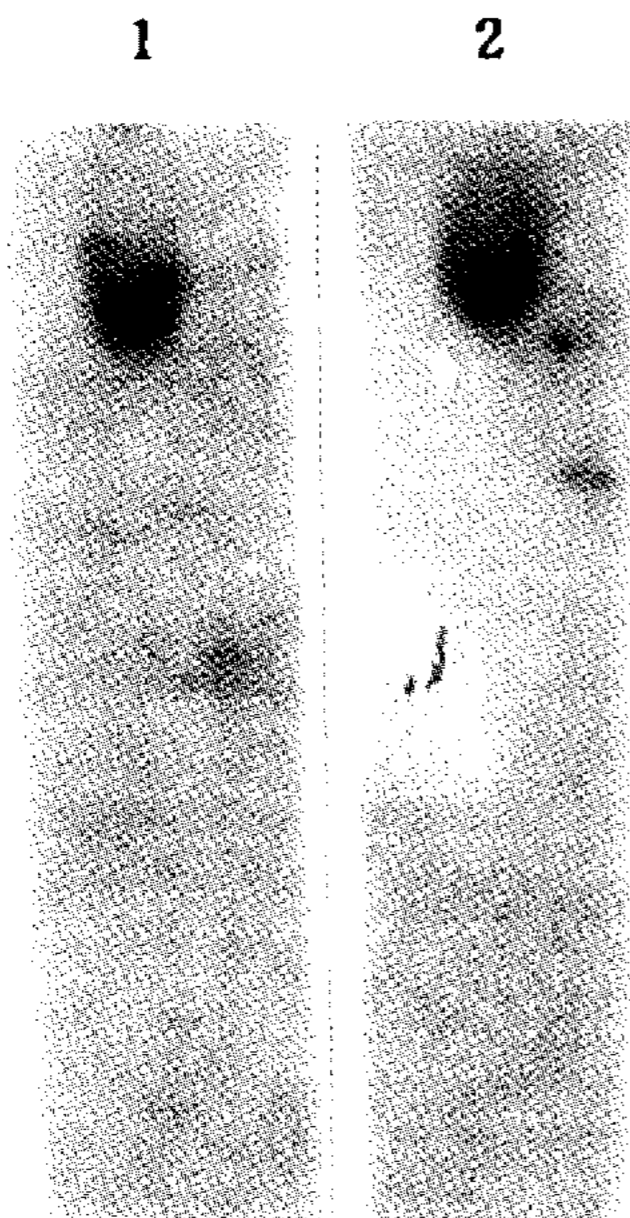


Fig. 4. Effect of phosphatidylserin (PS) on non-denaturing protein phosphorylation.

Lane 1, no addition of PS; Lane 2, addition of PS.

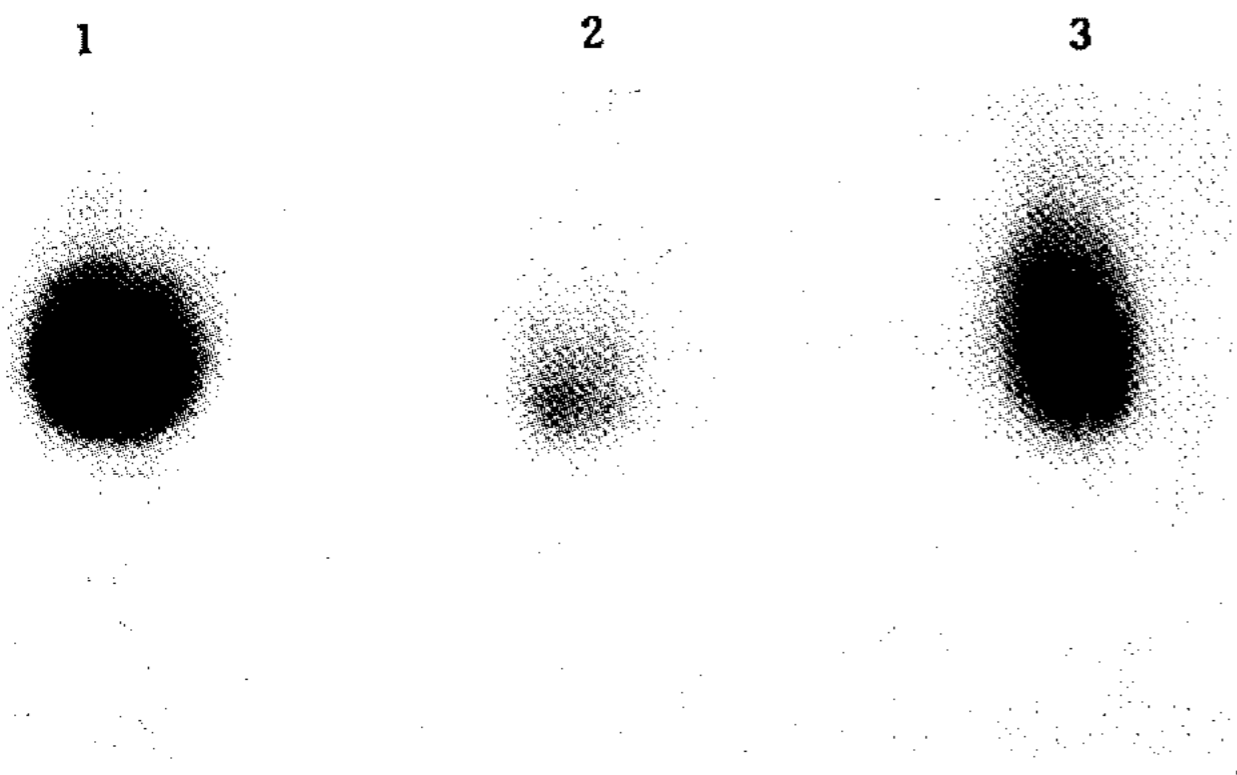


Fig. 5. Effect of TPase inhibitor (antipain) on inhibition of phosphorylation by rhodotorucine A.

Lane 1, no addition of rhodotorucine A; Lane 2, addition of rhodotorucine A; Lane 3, addition of rhodotorucine A and antipain.

TPase저해제(antipain)가 인산화에 미치는 영향

Rh. A의 정보가 접합형 a세포내에 전달되는 과정에서 제일 첫 단계로 세포표면에 있는 TPase에 의해 수용됨과 동시에 Rh. A는 분해대사되는 것이 성분화의 중요한 signaling으로 알려져있다(5). 만약 Rh. A에 의한 인산화의 저해반응이 성분화에 필요한 정보의 전달에 관련된 반응이라면 TPase에 의한 Rh. A의 대사가 인산화와 무관하지 않을 것이라는 추측이 가능하게 된다. 이를 증명하기 위하여 TPase저해제로 알려져있는 antipain(7)을 인산화반응계에 적용시켜 인산화에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 5에서 보이는 바와 같이 antipain을 첨가 할 경우에는 Rh. A에 의한 인산화 저해 현상이 나타나지 않았다. 이 결과로 미루어 볼 수 있는 것은 인산화 단백질 중에는 TPase도 같이 존재하기

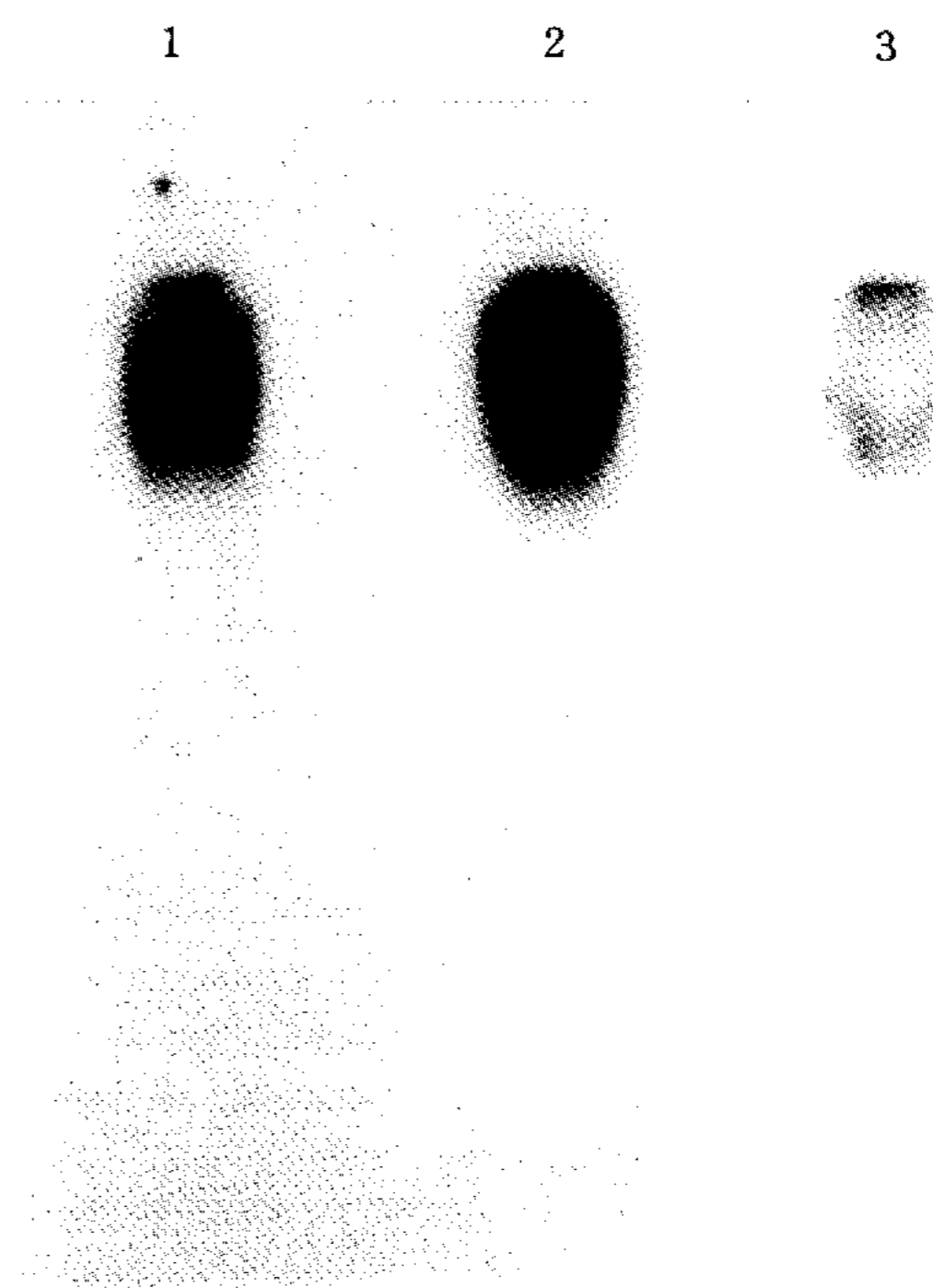


Fig. 6. Effect of trypsinized rhodotorucine A on phosphorylation.

Lane 1, addition of rhodotorucine A; Lane 2, no addition of rhodotorucine A; Lane 3, addition of trypsinized rhodotorucine A.

때문에 반응계에 Rh. A를 가하면 당연히 TPase에 의하여 분해될 것이다. 그러면 인산화 저해반응에는 Rh. A의 분해산물이 작용할 가능성이 클 것으로 예상된다. 그러나 antipain에 의해 TPase가 저해됨으로서 인산화 저해현상도 나타나지 않는 것이 아닐까 하는 추측이 가능하게 된다.

Trypsinized rhodotorucine A에 의한 인산화의 저해

Antipain이 TPase를 저해 할 경우 Rh. A는 인산화를 저해하지 않는다는 상기의 결과는 역으로 생각하면 Rh. A의 TPase에 의한 분해산물이 인산화를 저해한다는 결론을 산출하게 된다. 이를 증명하기 위하여 인산화 반응계에 Rh. A의 trypsin 분해산물을 첨가하여 인산화의 변화를 관찰하였다. TPase는 trypsin형 효소활성을 갖기 때문에 Rh. A의 분해산물은 동일한 물질이란 증명은 이미 보고 된 바 있다(6). 이를 바탕으로 trypsin으로 분해한 Rh. A의 산물을 인산화 반응계에 작용시킨 결과 강한 인산화 저해현상을 보였다(Fig. 6 참조). 물론 Rh. A도 Fig. 2의 결과와 동일하게 인산화를 저해하는 현상을 보였으나 Rh. A의 Trypsin분해산물은 이보다도 더 강한 저해를 보임으로서, TPase가 Rh. A를 수용할 때 분해대사하는 의의를 설명할 수 있는 좋은 결과라 사료된다.

이상의 결과를 정리해 보면 Table 1과 같이 설명할 수 있다. 즉, 인산화 반응계에서 Rh. A는 인산화를 저해하지만 산화처리하여 성분화의 활성이 없는 Rh. A

Table 1. Inhibition of phosphorylation by various conditions.

Conditions	Inhibition of phosphorylation	
Rhodotorucine A	-	-
Rhodotorucine A	+	+
Rhodotorucine A S-oxide	+	-
Rhodotorucine A	-	-
Antipain	+	
Rhodotorucine A	+	-
Antipain	+	
Trypsinized rhodotorucine A	+	+
Antipain	+	

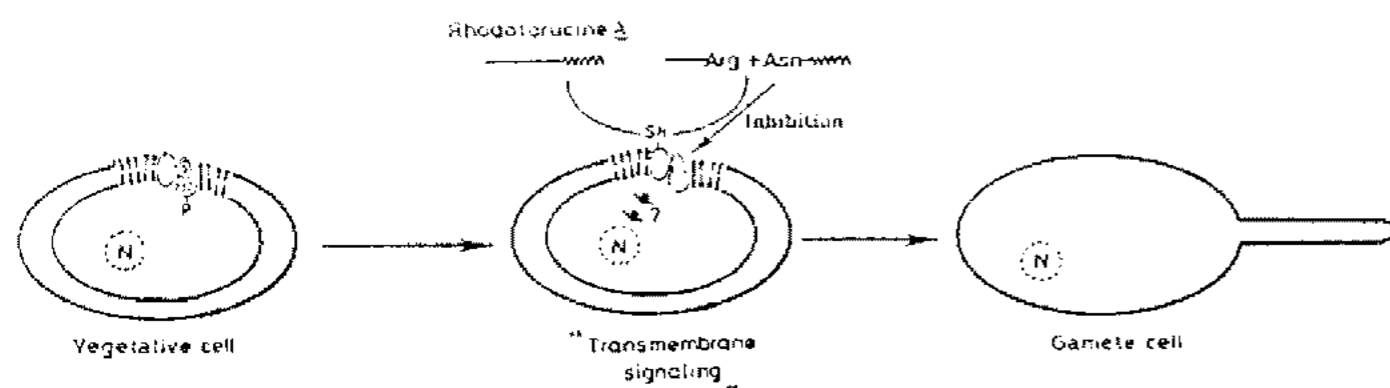


Fig. 7. Schematic model of transmembrane signaling of rhodotorucine A on *Rhodosporidium toruloides*.

S-oxide는 저해하지 않는다. 그리고 반응계에 TPase저해제인 antipain을 첨가하면 저해반응이 없으며 이때 antipain만으로는 인산화에 아무런 영향을 주지 않는 것을 확인하였다. TPase에 의한 Rh. A 분해산물과 동일한 trypsin분해산물에 의해서는 antipain의 유무에 관계없이 인산화가 저해 되는 것을 알았다.

지금까지 얻어진 결과를 정리하면 Fig. 7의 model로서 설명할 수 있다. 세포가 영양증식시기에는 TPase의 인접위치에 인산화되는 단백질이 존재하여 필요에 따라서 인산화되고 있다고 예상된다. 그러나 Rh. A의 정보를 수용하여 생식세포로 변하는 과정에서 TPase가 Rh. A를 분해하게 되고 그 결과로 생긴 분해산물에 의하여 막단백질의 인산화가 저해받게 된다. 현재로서는 이 인산화저해로서 영향을 받는 차기현상에 대해서는 알수없으나, TPase가 인산화 저해 반응에 결정적 역할을 함으로서 Rh. A의 정보전달을 주관하는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과로서 Rh. A의 정보가 a세포에 전달되는 과정에서 TPase에 의하여 Rh. A가 대사되는 의의를 규명할 수있고 또 대사된 Rh. A의 분해산물의 역할을 예측할 수 있는 좋은 자료가 되리라 확신한다.

요 약

이담자 효모균 *Rhodosporidium toruloides* 접합형 a 세포의 막단백질 가용화 분해를 비변성 전기영동에 의하여 인산화 한 결과 인산화 되는 단백질을 발견하였다. 이 단백질의 인산화는 Rhodotorucine A(Rh. A)에 의

하여 저해되었다. 본 인산화 단백질에는 trigger-peptidase(TPase)가 존재하고 있는 것을 확인 하였으며, TPase inhibitor(antipain)를 반응액에 첨가할 경우 Rh. A에 의한 인산화 저해작용은 나타나지 않았다. 그리고, Rh. A를 trypsin으로 분해한 산물을 반응액에 첨가했을 경우 인산화 저해현상이 있는 것으로 보아, 인산화의 저해반응에는 TPase가 중요한 작용을 하는 것이 확인 되었다.

감사의 말

본 연구는 1992년 한국과학재단연구비 지원(과제번호 KOSEF 921-1500-056-2)에 의하여 행하였으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Bano, I. 1967. Studies on sexuality of *Rhodotorula*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 167-196.
- Abe, K., I. Kusaka and S. Fukui. 1975. Morphological change in the early stages of the mating of *Rhodosporidium toruloides* M1057, a strain of mating type a. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **24**: 287-290.
- Jeong, Y.K., T.H. Lee, Y.L. Choi and W.D. Kang. 1995. Characterization of sexual agglutination and involvement of cell-surface protein sexual cell-cell interactions of heterobasidiomycetous yeast. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 249-254.
- Kamiya, Y., A. Sakurai, S. Tamura, E. Tsuchiya, A. Abe and S. Fukui. 1979. Structure of rhodotorucine A, a peptidyl factor inducing mating tube formation in *Rhodosporidium toruloides*. *Agric. Biol. chem.* **43**: 363-369.
- Miyakawa, T., M. Nishihara, E. Tsuchiya and S. Fukui. 1982. Role of metabolism of the mating pheromone in sexual differentiation of the heterobasidiomycetous *Rhodosporidium toruloides*. *J. Bacteriol.* **151**: 1184-1194.
- Miyakawa, T., M. Kaji, Y.K. Jeong, E. Tsuchiga and S. Fukui. 1985. Involvement of protein sulfhydryls in the trigger reaction of rhodotorucine A, a farnesyl peptide mating pheromone of *Rhodosporidium toruloides*. *J. Bacteriol.* **162**: 294-299.
- Miyakawa, T., Y.K. Jeong, M. Kaji, E. Tsuchiga and S. Fukui. 1987. Purification and characterization of a Ca^{2+} -dependent membrane peptidase involved in the signaling of mating pheromone in *Rhodosporidium toruloides*. *J. Bacteriol.* **169**: 1626-1631.
- 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 *Rhodosporidium toruloides*. *Eur. J. Biochem.* **169**: 511-515.
- Jeong, Y.K., T.H. Lee and K.T. Jeong. 1994. Relation of Ca^{2+} -ATPase and Trigger peptidase (TPase) that are membrane proteins in a differentiation process on heterobasidiomycetous yeast. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech-*

mol. **22**: 1-6.

10. Miyakawa, T., T. Tachikawa, Y.K. Jeong, E. Tsuchiya and S. Fukui. 1987. Inhibition of membrane Ca^{2+} -AT-Pase *in vitro* by mating pheromone in *Rhodospodium toruloides*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **83**: 1087-1093.
11. Magline, A. and R.B. Merrifield. 1970. Chemical synthesis of peptides and proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **39**: 841-866.
12. Miyakawa, T., T. Kadoda, Y. Okubo, T. Hatano, E. Tsuchiya and S. Fukui. 1984. Mating pheromone-induced alteration of cell surface proteins in the heterobasidiomycetous yeast, *Tremella mesenterica*. *J. Bacteriol.* **158**: 814-819.

(Received 29 July 1996)