

*Dictyostelium discoideum*의 포자가 발아중에 유출하는 Protease에 관하여

윤경하·윤철호
순천향대학 생물학과

Protease Released During Germination of *Dictyostelium discoideum* Spores

Yoon, Kyung-Ha and Cheol-Ho Yoon
Department of Biology, Soonchunhyang University

ABSTRACT: Characteristics and roles of protease released during the germination of *Dictyostelium discoideum* spores were investigated.

When heat activated, the spores germinated, progressively releasing the protease into the extra-cellular medium. The protease activity exhibited high at pH 2.5. When cycloheximide was added to culture, complete germination (emergence) and protease release were stopped. Addition of purified nonspecific protease to culture speeded up germination. These results suggest that excreted protease may play a role in removal of the spore wall.

KEY WORDS □ *Dictyostelium discoideum* spores, germination, characteristics and roles of protease.

세포성 점균류(cellular slime mold)인 *Dictyostelium discoideum*은 그의 독특한 생활사 때문에 세포분화 연구에 많이 이용되고 있다(Loomis, 1975) 이 균류의 생활사는 자유 유영생활을 하는 아메바로서 성장하고 증식하다가 외부의 영양이 고갈되면 아메바들은 동료 아메바가 내놓는 acrasin(cAMP)에 유인되어 다세포성 집락을 형성한다. 그 후 몇몇 발생단계를 거쳐 자루(stalk)와 포자(spore)를 가지는 sorocarp로 된다. Sorocarp의 자루는 노쇠하여 죽고 포자는 휴면상태로 존재하다가 포자의 외부에 먹이가 될만한 세균이 존재한다면, 아미노산의 혼합물이 존재하면 포자는 활성화단계와 팽창단계를 거쳐 포자벽이 파괴되어 아메바가 출현하게 된다(Bonner, 1967; Marin, 1976).

포자 발아에 대한 전자현미경적 연구(Hemmes *et al.*, 1972)에 의하면 포자의 벽은 두께와 전자

밀도에 따라 4층으로 구별되는데 외부층(Layer 1)은 hyaluronidase와 cellulase에 의해서 분해되지 않는 mucopolysaccharide로 되어 있고 가운데층(Layer 2a, Layer 2b)은 기원이 서로 다른 2층의 cellulose fibrils로 구성되고 내부층(Layer 3)은 cellulose와 protein으로 구성되어 원형질막과 접해 있다. 이와 같이 *D. discoideum*의 포자벽은 대부분이 cellulose로 구성되어 있기 때문에 포자 발아에 관한 연구는 주로 cellulase와 β -glucosidase 활성화에 대해 이루어졌고(Rosness, 1968; Jones *et al.*, 1979; Jones and Gupta, 1981) 포자벽에 소량으로 존재하는 protein에 관한 연구는 거의 이루어져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 *D. discoideum*의 포자가 발아중에 유출하는 protease의 특성과 기능을 밝히고자 한다.

이 논문은 1986년도 문교부 자유과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

재료 및 방법

균주의 보존 및 포자 수획

*D. discoideum*의 포자 수획은 *E. coli*를 50 ml의 액체합성배지(NH_4Cl 1.0g, MgSO_4 0.13g, KH_2PO_4 3.0g, Na_2HPO_4 6.0g, Glucose 4.0g, 증류수 1,000ml, pH 6.5)에서 37°C로 3일간 진탕배양한 후 배양액에 10^5 의 *D. discoideum*의 포자를 첨가하여 세균-포자 혼합액을 만들었다. 그리고 세균-포자 혼합액 1.0ml를 고체합성배지에 접종하여 광선하에서 25°C로 7일간 배양한 후 생성된 포자를 Cotter and Raper(1968a) 방법에 따라 수획하였다. 균주는 포자가 수획될 때까지 25°C에서 보존하였다.

포자의 발아 및 Protease원의 조제

포자의 발아실험을 하기 위하여 수획한 포자를 일정량의 증류수에 현탁하고 탈지면으로 여과하여 $\times 7500\text{g}$ 에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리된 상등액은 포자 발아저해제 실험에 사용하기 위하여 보존했고 침전된 포자는 10mM 인산완충액(pH 6.5)으로 3회 세척한 후 $10^8 \sim 10^9$ spores/ml가 되도록 같은 완충액에 현탁하여 45°C에서 30분간 열처리하였다. 열처리한 포자를 $10^6 \sim 10^7$ spores/ml가 되도록 10mM 인산완충액(pH 6.5)으로 희석한 후 포자 희석액 70ml를 용량 500ml의 triple baffled flask에 넣어 magnetic bar로 교반하면서 23°C에서 7시간 동안 발아시켰고 포자의 발아상태는 620nm에서 흡광도로 조사했다(Cotter and Raper, 1968b). 한편 포자가 발아중에 유출한 protease의 조제는 용량 500ml의 triple baffled flask속에서 포자를 발아시키면서 채취한 포자 희석액을 $\times 7500\text{g}$ 로 10분간 원심분리하여 상등액을 protease의 조효소(crude enzyme)로 사용하였다.

효소활성 측정

Protease의 활성은 1.0% casein(BDH) 용액을 기질로 하여 Folin-Ciocalteu 법(Folin and Ciocalteu, 1927)으로 측정하였다. 1.0% casein 용액 2.0ml와 0.05M glycine 완충액(pH 2.5) 2.0ml를 시험관에 넣고 37°C에서 5분간 예열한 후 여기에 조효소(crude enzyme)액 1.0ml를 가

하고 60분간 반응을 시킨 다음 10% TCA(trichloroacetic acid) 5ml를 가하여 반응을 정지시키고 20분간 단백질을 침전시켰다. 침전된 단백질을 제거하기 위하여 반응정지액을 whatman paper No. 1으로 여과한 후 여과액 1.0ml를 시험관에 넣고 10% Na_2CO_3 5ml와 4배로 희석된 Folin 시약 1.0ml를 가하여 20분 동안 반응시켜 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험치(blank)는 기질용액 2.0ml와 완충액 2.0ml를 시험관에 넣고 예열한 후 여기에 10% TCA 5ml를 넣은 다음에 조효소 1.0ml를 넣고 37°C에서 60분간 반응시킨 후 위와 같은 과정을 거쳐 측정했다. Protease 활성은 1.0ml의 조효소가 60분 동안에 casein으로부터 유리한 amino acid와 peptide의 양을 tyrosine의 양으로 표시하였다. 단백질양은 bovine serum albumin을 표준용액으로 하여 Lowry, *et al.*, (1951) 방법에 따라 측정했다.

포자 발아에 미치는 효소의 영향

10mM 인산완충액(pH 6.5)으로 3회 세척한 포자를 100ml의 인산완충액(pH 6.5)에 현탁하고 현탁액의 흡광도(absorbance)를 0.16으로 조절한 후 포자 현탁액 20ml씩을 용량 200ml의 삼각후라스크속에 각각 넣었다. 그리고 여기에 특이성이 없는 protease(type VI, Sigma)와 cellulase(type I, Sigma)를 개별적으로 혹은 혼합(효소의 최종농도 1mg/ml)하여 첨가한 후 23°C에서 3시간 동안 진탕하면서(150rpm) 포자를 발아시켰다. 포자의 발아상태는 현미경으로 조사하였다.

Autoinhibitor의 분리

포자 발아 실험준비 과정에서 포자 현탁액을 원심분리하여 얻은 노란색깔의 상등액을 Cotter and Raper(1968b) 방법에 따라 Whatman paper No. 1으로 여과한 후 멸균된 millipore filter(0.45 μl , pore size)로 다시 여과하여 여과액을 감압건조하였다.

결 과

포자의 발아와 protease의 유출

열처리한 포자를 10mM 인산완충액(pH 6.5)에

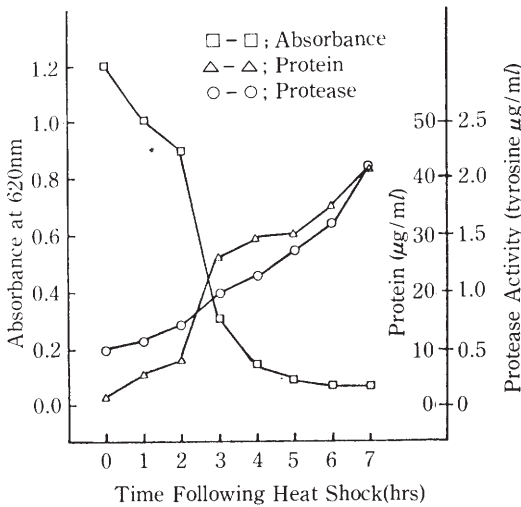


Fig. 1. Release of protease and protein during the incubation of heat-shocked spores.

서 7시간 동안 발아시켰을 때 시간의 경과와 더불어 포자는 발아하면서 단백질과 protease를 발아배지속으로 유출했다(Fig. 1). 그러나 단백질합성 저해제인 cycloheximide를 포자 발아배지에 넣고 (cycloheximide의 최종농도 400 μg/ml) 포자를 발아시켰을 때 단백질양은 발아배지에서 계속적으로 증가하였으나 protease는 초기에 증가하다가 3시간 이후부터는 증가하지 않았다. 또한 포자도 완전히 발아하지 못했다(Fig. 2, 3).

Protease의 활성에 미치는 pH의 영향

포자가 발아하면서 유출한 protease와 pH와의

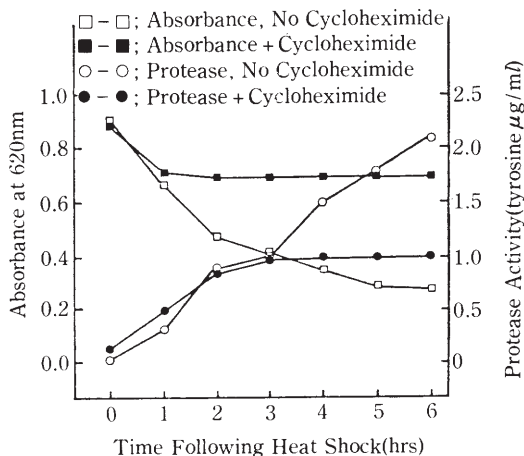


Fig. 2. Release of protease from spores inhibited by cycloheximide.

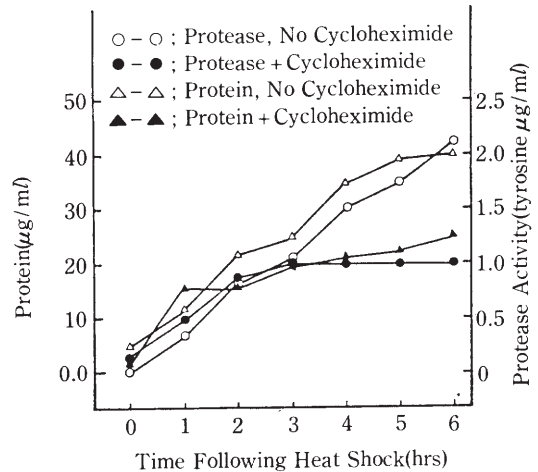


Fig. 3. Release of protease and protein from spores inhibited by cycloheximide.

관계를 조사하기 위하여 pH 2.0에서부터 pH 3.5까지는 0.05M glycine 완충액을 사용했고 pH 4.0에서부터 pH 5.5까지는 0.05M citrate 완충액을 사용하였다. 이들 완충액에서 protease의 활성을 측정한 결과 protease는 pH 2.5에서 높은 활성을 나타냈다(Fig. 4).

Protease 활성에 미치는 autoinhibitor의 영향

노란색갈과 갈색을 나타내는 autoinhibitor의 분말을 0.05M glycine 완충액(pH 2.5)에 적절한 농도로 용해하여 protease 활성에 미치는 autoinhibitor의 영향을 조사한 결과, autoinhibitor는

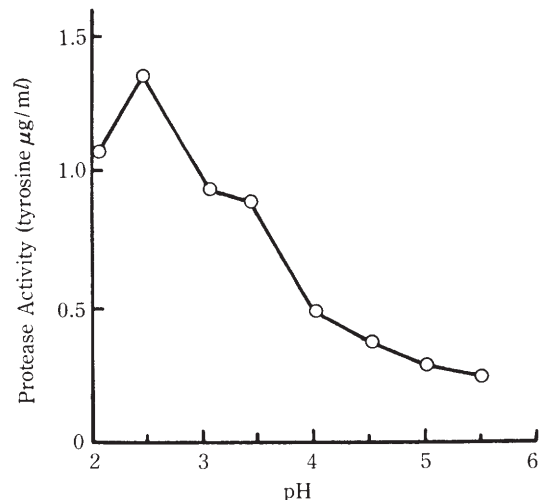


Fig. 4. Effect of pH on hydrolysis of casein by protease after 7 hr of germination.

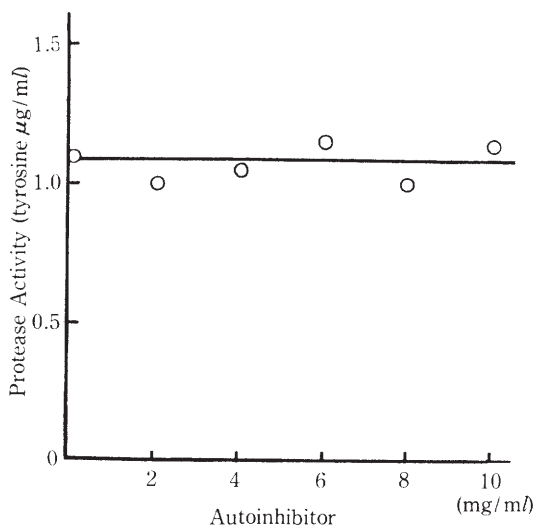


Fig. 5. Effect of autoinhibitor on hydrolysis of casein by protease.

Table 1. Effect of protease and cellulase on the rate of germination of *D. discoideum*.

Expt. situation	Amoebae (%)			
	Expt 1	Expt 2	Expt 3	Mean
Control	42.6	37.1	46.9	42.2
Protease	52.6	51.8	59.8	54.7
Cellulase	68.7	56.4	70.5	65.2
Protease + Cellulase	77.5	76.0	78.8	77.4
Cycloheximide	0	0	0	0

protease 활성에 아무런 영향을 끼치지 않았다 (Fig. 5).

포자 발아에 미치는 효소의 영향

포자 발아배지에 특이성이 없는 protease와 cellulase를 각각 첨가하여 포자를 발아시켰을 때 대조구는 42.2%의 아메바 출현율을 나타냈고 protease 첨가구는 54.7%, cellulase 첨가구는 65.2%의 아메바 출현율을 나타냈다. 그리고 protease와 cellulase를 혼합하여 발아배지에 첨가했을 때는 각각의 효소 첨가구에서 증가시킨 발아율의 합과 같은 발아율을 나타냈다. 단백질합성 저해제인 cycloheximide를 포자 발아배지에 첨가

하여 포자를 발아시켰을 때 포자는 팽창되었으나 아메바의 출현은 볼 수 없었다 (Table 1).

고 찰

*D. discoideum*의 포자 발아는 포자의 활성화단계와 포자의 팽창단계를 거쳐 포자벽이 파괴되어 아메바가 출현하는 단계 등 3단계로 이루어 지는데 (Cotter and Raper, 1966; Cotter and Raper, 1968b) 포자의 팽창단계 때 포자내에서 RNA와 단백질합성이 이루어져야지만 아메바가 출현된다 (Giri and Ennis, 1977; Giri and Ennis, 1978; Yagura and Iwabuchi, 1976) 만일 단백질합성 저해제나 RNA 합성 저해제를 포자 발아배지에 첨가하여 포자를 발아시켰을 때는 포자는 팽창되나 포자로부터 아메바의 출현은 억제된다 (Cotter *et al.*, 1969; Giri and Ennis, 1977) 포자 발아에 결합이 있는 몇몇 돌연변이체가 분리되었는데 (Ennis and Sussman, 1975) 이를 돌연변이체 가운데 돌연변이체 B (*grm* B)를 포자 발아배지 (10 mM 인산완충액, pH 6.7)에서 발아시켰을 때 포자는 팽창하나 아메바는 출현되지 않았다. 이와 같은 돌연변이체의 전자현미경적 연구에 의하면 포자벽 가운데 cellulose와 protein으로 구성되는 포자의 내층이 분해되지 않기 때문에 아메바의 출현이 억제된다고 하였다.

본 연구에서 단백질합성 저해제인 cycloheximide를 포자 발아완충액에 첨가하여 포자를 발아시켰을 때 포자는 팽창했으나 포자로부터 아메바의 출현을 볼 수 없었다 (Table 1). 그리고 단백질의 양은 발아배지에서 계속적으로 증가하였으나 protease의 활성은 초기에 증가하다가 3시간 이후부터는 증가되지 않았다 (Fig. 2, 3). 특히 특이성이 없는 protease를 포자 발아배지에 첨가하여 포자를 발아시켰을 때 대조구는 42.2%의 아메바 출현율을 나타낸 반면에 protease 첨가구는 54.7%의 아메바 출현율을 나타냈다. 이러한 결과들은 포자가 발아하는데 protease가 관여하고 있음을 나타내주고 있다.

적 요

*Dictyostelium discoideum*의 포자가 발아중에 유출한 protease의 특성과 기능을 조사했다. 열처리한 포자를 포자 발아배지에서 발아시켰을 때 포자는 배지속으로 protease를 유출하면서 발아했다. Protease 활성은 pH2.5에서 높은 활성을 나타냈다. 단백질합성 저해제인 cycloheximide를 포자 발아배지에 첨가하여 포자를 발아시켰을 때 포자의 발아와 protease의 유출은 중단되었다. 특이성이 없는 protease를 포자 발아배지에 첨가하여 포자를 발아시켰을 때 포자의 발아율은 촉진되었다. 이러한 실험의 결과들은 발아중에 유출되는 protease가 포자벽을 제거하는데 관여하고 있음을 시사하고 있다.

REFERENCES

1. Bonner, J.T., 1967. The cellular slime molds. 2nd ed. Princeton University, Princeton.
2. Cotter, D.A. and K.B. Raper, 1966. Spore germination in *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **56**, 880-887.
3. Cotter, D.A. and K.B. Raper, 1968a. Factors affecting the rate of heat-induced spore germination in *Dictyostelium discoideum*. *J. Bacteriol.* **96**, 86-92.
4. Cotter, D.A. and K.B. Raper, 1968b. Properties of germination spores of *Dictyostelium discoideum*. *J. Bacteriol.* **96**, 1680-1689.
5. Cotter, D.A., L.Y. Miura-Santo and M.R. Hohl, 1969. Ultrastructural changes during germination of *Dictyostelium discoideum* spores. *J. Bacteriol.* **100**, 1020-1026.
6. Ennis, H.L. and M. Sussman, 1975. Mutants of *Dictyostelium discoideum* defective in spore germination. *J. Bacteriol.* **124**, 62-64.
7. Folin, O. and V. Ciocalteu, 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in protein. *J. Biol. Chem.* **73**, 627-630.
8. Giri, J.G. and H.L. Ennis, 1977. Protein and RNA synthesis during spore germination in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **77**, 282-289.
9. Giri, J.G. and H.L. Ennis, 1978. Developmental changes in RNA and protein synthesis during germination of *Dictyostelium discoideum* spores. *Develop. Biol.* **67**, 189-201.
10. Hemmes, D.E., E.S. Kojima-Buddenhagen and H.H. Hohl, 1972. Structure and enzymatic analysis of the spore wall layers in *Dictyostelium discoideum*. *J. Ultrastruct. Res.* **41**, 407-417.
11. Jones, T.H.D., de. Renobales, M. and Pon, N., 1979. Cellulases released during the germination of *Dictyostelium discoideum* spores. *J. Bacteriol.* **137**, 752-757.
12. Jones, T.H.D. and M. Gupta, 1981. A protein inhibitor of cellulases in *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **102**, 1210-1216.
13. Loomis, W.F., 1975. *Dictyostelium discoideum*, a developmental system. Academic Press Inc., New York.
14. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951. Protein estimation with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
15. Marin, F.T., 1976. Regulation of development in *Dictyostelium discoideum* I, Initiation of the growth to development transition by amino acid starvation. *Dev. Biol.* **48**, 110-117.
16. Rosness, P.A., 1968. Cellulolytic enzymes during morphogenesis in *Dictyostelium discoideum*. *J. Bacteriol.* **96**, 639-645.
17. Yagura, T. and M. Iwabuchi, 1976. DNA, RNA and protein synthesis during germination of spores in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Exp. Cell Res.* **100**, 79-87.

(Received Sep. 6, 1988)