

Candida pseudotropicalis 융합세포의 유전적 분석

전순배·배 석

전남대학교 자연과학대학 생물학과

Genetic analysis of protoplast fusants
of *Candida pseudotropicalis*

Chun, Soon-Bai and Suk Bai

Department of Biology, College of Natural Sciences,
Chonnam National University, Kwang-ju, Korea.

ABSTRACT: The genetic analysis and characterization of protoplast fusion hybrids between complementary auxotrophic mutants of *Candida pseudotropicalis* were carried out. Nuclear fusion appeared to occur in fusion hybrids (e.g., F15 and F33), as strongly suggested by isolation of recombinants after mitotic segregation of parental genetic markers. This was confirmed by DNA content, nuclear staining and comparison of survival rate to UV light. After keeping fusion hybrids for approximately one year, the frequency of spontaneous mitotic segregation was 3.0×10^{-4} - 8.1×10^{-4} while that of induced mitotic segregation was 1.4×10^{-3} - 1.7×10^{-3} . These results suggested that they maintained stable karyogamy-state. It was also found that the production of β -D-galactosidase from F15, F33 and F158 was somewhat increased when compared with that from either auxotrophic parents or wild type.

KEY WORDS □ *Candida pseudotropicalis*, fusion hybrids, genetic analysis.

Candida pseudotropicalis 는 diploid type 인 *Kluyveromyces marxianus* (*fragilis*)나 *Kluyveromyces lactis*의 β -D-galactosidase 생산능 및 알코올 발효능에 있어서 비교될만 하며 (Castillo and Sanchez, 1978; de Bales and Castillo, 1979) 자연 상태에서 안정된 haploid (Meyer *et al.*, 1984)이므로 균주개발의 한 방법인 원형질체 융합으로 diploid를 만들어 융합균주의 효소생산증대를 목적으로 본 연구에서는 원형질체 융합을 시도하여 얻어진 융합체의 핵 융합상태 및 안정성을 DNA 함량, 세포체적측정, 핵염색, 형질분리분석, UV조사에 따른 생존력비교 그리고 포자형성유무 (Ferenczy and Maraz, 1977; Svoboda, 1978)를 통하여 검토하였으며 융합체에 대한 β -D-galactosidase 활성을 측정하였다.

재료 및 방법

융합체의 제조

본 실험에 사용된 균주는 *C. pseudotropicalis* CBS 607이었고 융합체의 제조에 이용된 상보적 영양요구성 돌연변이 균주와 융합방법은 Chun과 Bai (1987)의 보문에 기술되어 있다.

형질분리분석

자연형질분리 (Spontaneous mitotic segregation) 분석은 약 1년 동안 보존하였던 융합세포들을 YEPD (1% Yeast extract, Difco; 2% Bacto-peptone, Difco; 2% glucose; 2% Bacto-agar, Difco) 고체배지에 접종하여 30°C에서 2~3일간 배양한 후 나타난 colony를 최소배지와 phloxine B 배지 (Fink, 1970)에 각각 replica-plating 하였

* 이 논문은 한국과학재단의 1985년도 연구비에 의하여 연구되었음.

다. plating한 배지는 30°C에서 5~7일간 배양한 후 최소배지에서는 자라지 못하고 phloxine B 배지에서 붉은색을 띠는 colony를 영양요구성 segregants로 분리하였다. 한편, 유도형질분리 (Induced mitotic segregation) 분석은 융합체들을 p-fluoro-DL-phenylalanine (Sigma)이 100~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 함유된 YEPD 고체배지에서 2~3일간 배양하여 segregants를 유도한 다음 이들의 분리는 상술한 방법으로 실시하였고 융합체들의 ploidy 상태와 핵융합상태는 다음 기술된 4가지 방법에 따랐다.

DNA 정량

정지기 세포 ($1\sim 5\times 10^9/\text{mL}$)를 Stewart (1975) 방법에 의해 perchloric acid로 DNA를 추출하고 diphenylamine (Sigma) 방법 (Burton, 1968)에 의해 600 nm에서 세포당 DNA 양을 측정하였다. 표준 DNA는 herring Sperm DNA (Sigma)를 사용하였다.

핵 염색

YEPD 고체배지에서 30°C로 5~6시간 배양한 후 대수기에 들어간 세포를 취하여 Fournier 등 (1977)의 방법으로 Giemsa (Merck) 염색한 뒤 $1,000\sim 1,500\times$ 에서 관찰하였다.

세포체적 측정

출아세포를 없애기 위해 세포를 정지기까지 배양한 후 50개 이상 세포의 장축과 단축을 측정하여 $V=4/3\pi\cdot a\cdot b^2$ ($a=1/2$ 장축, $b=1/2$ 단축)의 공식에 의하여 세포체적을 계산하였다.

UV조사에 의한 생존력 비교

UV조사에 대한 생존력은 ploidy에 비례한다고 알려져 있다 (Olaiya and Sogin, 1979; Rhoads and Sarachek, 1984). 따라서 융합체들의 생존력을 양친의 그것과 비교하기 위해 Olaiya와 Sogin (1979)의 방법에 따라 융합균주와 이들 양친, 그리고 대조군으로 diploid인 *Kluyveromyces fragilis* N100과 haploid인 *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A (a mating type)에 대하여 UV조사 (15 W, 파장 254 nm, 조사거리 및 시간 45 cm, 0~90 초)에 따른 생존력을 조사하였다.

β -D-galactosidase 활성측정

2% lactose를 에너지 및 탄소원으로 하는 YEP 배지를 사용하여 세포를 배양하였고, 효소추출은

Dickson과 Markin (1980)의 방법에 의해 실시하였다. 효소활성은 O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (Sigma)의 가수분해산물인 O-nitrophenol 양을 420 nm에서 측정하여 분당, 세포당 picomole (pM)로 표시하였다.

포자형성

2% malt extract와 YM 고체배지에 각각 균체를 접종하여 일주일 이상 30°C에서 배양한 후 포자형성유무를 조사하였다 (van der Walt and Johannsen, 1984).

결과 및 고찰

C. pseudotropicalis CBS 607로부터 제조한 영양요구성 돌연변이균주간의 상보적 교잡을 원형질체 융합방법으로 실시하였다. 선택된 총 160개 융합체들 중 최대생장율이 양친의 그것들 ($0.94\sim 0.95\text{ h}^{-1}$)에 비해 양호한 성장율 ($0.96\times 0.98\text{ h}^{-1}$)을 나타낸 4개의 융합체, F15, F33, F106 그리고 F158의 교잡성을 조사하였는데 융합체들의 세포 크기, 체적 그리고 세포당 DNA 양은 양친의 그것에 비해 유의있게 증가하였다. Table 1에서 보여준 바와 같이 *S. cerevisiae* haploid type인 X2180-1A (a mating type)을 대조군으로 하여 세포당 DNA 양 (fg/cell)을 측정해 본 결과 F15, F33 그리고 F158의 경우 *S. cerevisiae*의 $22.2\pm 0.5\text{ fg/cell}$ 과 양친에서 측정한 $22.9\sim 23.1\pm 0.4\text{ fg/cell}$ 과 견주어 보았을 때 약 2배로 haploid에서 diploid로 ploidy가 증가되었음을 알 수 있었다.

또 F106의 경우는 양친의 DNA 양에 비해 약 1.5배로 aneuploid인 것 같다. 이들 융합체들에 대한 보다 확실한 융합상태를 검토하기 위하여 형질 분리 분석을 시행하였다. Table 2, 3에 나타난 바와 같이 자연형질 분리의 경우 총 1,563~12,926 colony에 대한 분리빈도가 각각 F15, 8.1×10^{-4} ; F33, 3.0×10^{-4} ; F106, 1.2×10^{-3} ; F158, 1.3×10^{-3} 이었고, 유도형질분리의 경우 총 1,544~12,627 colony에 대한 분리빈도는 각각 F15, 1.7×10^{-3} ; F33, 1.4×10^{-3} ; F106, 2.4×10^{-3} ; F158, 3.2×10^{-3} 이었다.

이때 colony의 크기는 균일하였으며 sector의 형성도 거의 없었고, p-fluoro-DL-phenylalanine

Table 1. Cell Size, Volume and DNA content of *C. pseudotropicalis* parental strains and fusion hybrids

Strain	Mean length (μm)	Mean width (μm)	Mean Volume (μm^3)	DNA/cell (fg)	ploidy (n) ^a
Parentals:					
<i>his met</i>	7.5 \pm 0.9	4.0 \pm 0.5	65.7 \pm 23.4	22.9 \pm 0.6	1
<i>his asn</i>	5.6 \pm 0.5	5.1 \pm 0.4	77.8 \pm 18.8	22.6 \pm 0.5	1
<i>trp asp</i>	5.7 \pm 0.7	5.3 \pm 0.4	85.9 \pm 23.0	23.3 \pm 0.2	1
<i>trp leu</i>	5.9 \pm 0.5	5.3 \pm 0.4	88.4 \pm 20.5	23.4 \pm 0.3	1
Fusants:					
F15	13.3 \pm 1.1	5.5 \pm 0.5	215.6 \pm 55.9	45.3 \pm 1.4	1.96 \pm 0.05
F33	12.2 \pm 1.4	5.4 \pm 0.5	191.9 \pm 56.1	46.2 \pm 0.6	2.0 \pm 0.02
F106	10.0 \pm 1.0	5.9 \pm 0.5	186.7 \pm 49.3	35.1 \pm 0.6	1.51 \pm 0.03
F158	9.8 \pm 1.0	5.8 \pm 0.4	175.9 \pm 41.5	44.6 \pm 1.0	1.94 \pm 0.05
X2180-1A ^b	7.2 \pm 1.0	5.2 \pm 0.4	104.8 \pm 29.9	22.2 \pm 0.5	1

a For F15 and F33, haploid(n) value based on average of parents *his met* + *trp asp* (23.1 \pm 0.4 fg/cell)

For F106, haploid(n) value based on average of parents *his asn* + *trp leu* (23.0 \pm 0.4 fg/cell)

For F158, haploid(n) value based on average of parents *his asn* + *trp asp* (22.9 \pm 0.4 fg/cell)

b *S. cerevisiae* X2180-1A, a haploid strain obtained from Yeast Genetic Stock, University of California, U.S.A.

Table 2. Mitotic segregation analysis of two fusion hybrids

	Fusion hybrids			
	F15(<i>his met</i> + <i>trp asp</i>)		F33(<i>his met</i> + <i>trp asp</i>)	
	SMS ^a	IMS ^b	SMS	IMS
Total colonies screened	12372	12290	12926	12627
Total auxotrophic segregants	10	21	4	18
Frequency of segregation	8.1 \times 10 ⁻⁴	1.7 \times 10 ⁻³	3.0 \times 10 ⁻⁴	1.4 \times 10 ⁻³
Phenotypes of segregants				
Parental: <i>his met</i>	3	4	0	3
<i>trp asp</i>	0	0	0	0
Recombinant: <i>his</i>	6	11	4	12
<i>trp</i>	0	3	0	1
<i>his trp</i>	1	2	0	2
<i>his met trp</i>	0	1	0	0

a Spontaneous mitotic segregation

b Induced mitotic segregation

처리로 형질분리빈도가 증가됨을 보여주었다. 또, F15와 F33의 경우 양친형은 물론 교잡형인 *his trp*, *his met trp*요구성 돌연변이 균주가 분리되어 이들의 DNA 양을 정량해 본 결과 44.0~45.1 fg/cell로 diploid type임을 알 수 있었는데 이는 상동염색체간의 crossing over나 염색체의 재분배에 기인된 것 같다. 이러한 결과는 이들 융합체 내에서 핵융합이 일어났음을 입증해 주고 있다. 그리고 위와같은 융합상태를 확인하기 위해 핵염색 및 UV조사에 대한 생존력을 조사하였다. 핵염색은 Fournier 등(1977)의 Giemsa 염색방법으로

실시하였는데 융합체의 핵이 양친의 그것에 비하여 더 크고 한개의 핵임을 알 수 있었다(Plate 1).

또한 야생형인 *C. pseudotropicalis*와 이의 diploid type이라고 추정되는 *K. fragilis* N100 그리고 haploid type인 *S. cerevisiae* \times 2180-1A를 대조균주로 사용하여 융합체들과 이들 양친에 대하여 UV조사시간이 증가함에 따른 이들의 생존력을 비교해 본 결과 F15, F33, F158 그리고 diploid인 *K. fragilis*의 생존력이 haploid type인 양친들 보다 높은 경향을 보여주었다(Fig. 1).

Table 3. Mitotic segregation analysis of two fusion hybrids

	Fusion hybrids			
	F106(<i>his asn</i> + <i>trp leu</i>)		F158(<i>his asn</i> + <i>trp asp</i>)	
	SMS ^a	IMS ^b	SMS	IMS
Total colonies screened	1575	1675	1563	1544
Total auxotrophic segregants	2	4	2	5
Frequency of segregation	1.2×10^{-3}	2.4×10^{-3}	1.3×10^{-3}	3.2×10^{-3}
Phenotypes of segregants				
Parental: <i>his asn</i>	0	1	1	1
<i>trp asp</i>	0	0	0	0
<i>trp leu</i>	0	0	0	0
Recombinant: <i>his asn</i>	2	3	1	2
	0	0	0	2

a Spontaneous mitotic segregation
 b Induced mitotic segregation

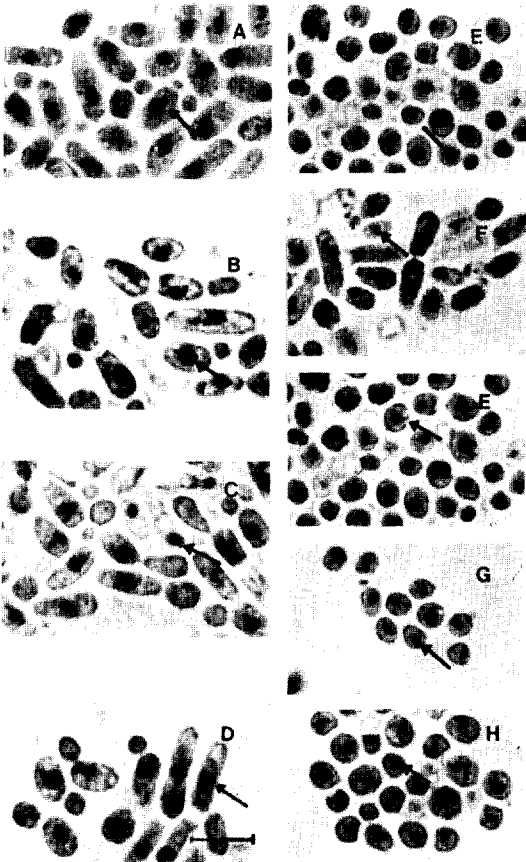


Plate 1. Photomicrography of nuclei of fusion hybrids and parentals.
 A: F15, B: F33, C: F158, D: F106, E: *trp asp*, F: *his met*, G: *his asn*, H: *trp leu* Arrows indicate nucleus, Bar equals 10 μ m.

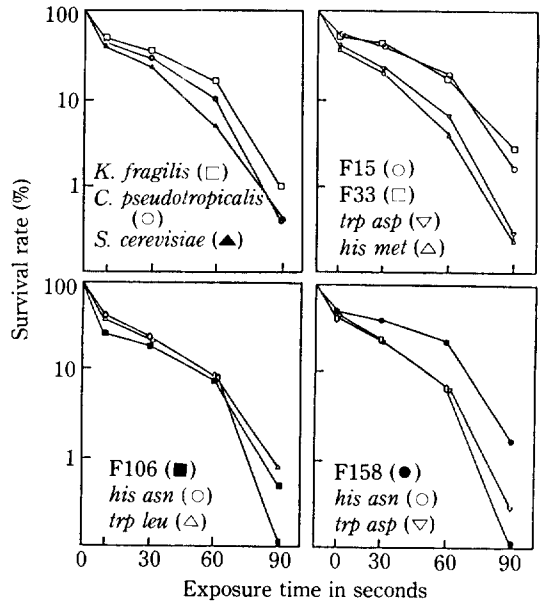


Fig. 1. Survival rate of different yeast strains as compared with fusion hybrids after exposure to UV light. Late log phase cells grown in YEPD broth at 30°C were washed in sterile distilled water and serial dilutions were plated onto YEPD plates. The YEPD plates were exposed to UV light for increasing periods of time. Survival rate was shown as relative percentage of colonies on plates without UV exposure.

한편, DNA 함량으로 보아 aneuploid인 F106은 haploid type인 양친들에 비해 UV에 감수성이 더 높았다. 이는 *Candida albicans*의 isogenic series중 aneuploid가 euploid보다 UV조사 후

pyrimidine dimer repair 과정에서 더 비효율적이므로 감수성이 높다고 보고한 Rhoads와 Sarchek(1984)의 결과와 일치하고 있다. 이상의 결과들로 미루어 보아 F15, F33 그리고 F158 융합체들에서는 핵융합이 일어난 것을 강력히 시사해 주고 있으며 또한 1년동안 계대보존 후에도 자연형질 분리가 별로 일어나지 않았고 생장율이 야생형 균주와 유사한 것으로 보아 안정성이 상당히 높은 것으로 판단되었다. 다음으로 F15, F33 및 F158과 이의 양친형 그리고 야생형에 대한 β -D-galactosidase 활성을 측정하였다. 그 결과 F15와 F33에서는 각각 0.73 pM/cell/min과 0.78 pM/cell/min 이었고 양친인 *his met*와 *trp asp* 요구성 균주에서 각각 0.61 pM/cell/min와 0.59 pM/cell/min으로 1.2~1.3배의 증가를 보였다. 한편, F158에서도 양친인 *his asn*과 *trp asp* 요구성 균주중 *his asn* 요구성 균주에서 0.55 pM/cell/min이었는데 반해 0.69 pM/cell/min으로 약 1.2배의 증가를 보여 gene dosage 증가에 의한 균주개발에 원형질체 융합방법이 활용될 수 있

을 것으로 보여진다. 융합체들에 대한 포자형성은 *C. pseudotropicalis*의 diploid type이라고 보고 있는 *K. marxianus*(*fragilis*)의 포자형성 최적배지(van der Walt and Johannsen, 1984)인 2% malt extract나 YM 고체배지에서 7일 이상 배양하면서 포자형성을 유도하였던 바 포자형성이 일어나지 않았다. 이 같은 결과는 포자형성조건을 찾지 못하였거나, 동일 mating type일 수도 있을 것이다. 그렇지 않으면 융합체의 유전적 특성, 즉 융합 후 염색체 재구성에 의한 포자형성능력의 상실에 기인될 수도 있다. 이와 비슷한 결과가 *S. cerevisiae*의 종내 원형질체 융합에서도 관찰된 바 있다(Ferenczy and Maraz, 1977; Svoboda, 1978). 융합체들의 포자형성능 결여를 고려해 볼 때, 유성포자를 형성할 수 있는 *K. marxianus*와 *K. lactis*와 같은 diploid type의 불안정성을 감안한다면 동일 mating type 간의 원형질체 융합으로 만든 안정성이 있는 융합체 diploid가 산업적으로 이용될 수 있을 것으로 본다.

적 요

*Candida pseudotropicalis*의 상보적 영양요구성 돌연변이 균주간의 원형질체 융합으로 얻어진 융합체들의 특성을 밝히고 이들의 유전적 분석을 실시하였다. 융합체 F15와 F33의 경우 양친의 marker를 가진 교집합형이 분리되었고 DNA 함량, 핵염색 그리고 자외선조사 후 생존력 비교를 통해서 핵융합이 일어난 것으로 확인되었다. 약 1년 이상의 보존 후에도 자연형질 분리빈도는 $3.0 \times 10^{-4} \sim 8.1 \times 10^{-4}$ 이고 유도형질 분리빈도는 $1.4 \times 10^{-3} \sim 1.7 \times 10^{-3}$ 으로 안정된 융합상태를 유지하고 있음을 알 수 있었다. 한편, 융합체 F15, F33과 F158의 β -D-galactosidase 생산능이 양친형 및 야생형의 생산능에 비해 증가되었다.

REFERENCES

- Burton, K. 1968. Determination of DNA concentration with diphenylamine. In: Methods in Enzymology. Colowick, S.P. and N.D. Kaplan (ed.), Academic Press Inc., New York. Vol. 12, p. 163-166.
- Castillo, F.J. and S.B. de Sanchez. 1978. Studies on the growth of *Kluyveromyces fragilis* in whey for the production of yeast protein. *Acta. Cient Venez.* **29**: 113-119.
- Chun, S.B. and S. Bai. 1987. Improvement of the regeneration and protoplasts fusion of *Candida pseudotropicalis* by bovine serum albumin, myoinositol and ergosterol. *Kor. J. Microbiol.* **25**: 274-281.
- de Bales, S.A. and F.J. Castillo. 1979. Production of lactase by *Candida pseudotropicalis* grown in whey. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 1201-1205.
- Dickson, R.C. and J.S. Markin. 1980. Physiological studies of β -D-galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* **149**: 777-785.
- Ferenczy, L. and A. Maraz. 1977. Transfer of mitochondria by protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* **268**: 524-525.
- Fink, G.R. 1970. The biochemical genetics of

- yeast. In: Methods in Enzymology. Tabor, H and C.W. Tabor (ed.), Academic Press, New York. Vol. 17A. p. 59-78.
8. Fournier, P., A. Provost, C. Bourguignon and H. Heslot. 1977. Recombination after protoplast fusion in the yeast *Candida tropicalis*. *Arch. Microbiol.* **115**: 143-149.
 9. Meyer, S.A., D.G. Shearn and D. Yarrow. 1984. *Candida* Berkhout. In: N.J.W. Kreger-van Rij (ed.), The Yeast. a taxonomic study. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. p. 722-723.
 10. Olaiya, A.F. and S.J. Sogin. 1979. Ploidy determination of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **140**: 1043-1049.
 11. Rhoads, D.D. and A. Sarachek. 1984. Cellular inactivation and mitotic recombination induced by ultraviolet radiation in aneuploid and euploid strains of *Candida albicans*. *Mycopathologia.* **87**: 35-41.
 12. Stewart, P.R. 1975. Analytical methods for yeast. In: Methods in Cell Biology. Prescott, D.M. (ed.), Academic Press, New York. Vol. 12, p. 122-123.
 13. Svoboda, A. 1978. Fusion of yeast protoplasts by polyethylene glycol. *J. Gen. Microbiol.* **109**. 169-175.
 14. Van der Walt, J.P. and E. Johannsen. 1984. *Kluyveromyces* van der Walt emend, van der Walt. In: The Yeast. a taxonomic study. N.J.W. Kreger-van Rij (ed.), Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam. p. 233-234.

(Received Feb. 4, 1988)