

*Coprinus congregatus*의 빛에 의한 분화와 Phenoloxidase의 역할

최 형 태

강원대학교 자연과학대학 미생물학과

빛에 의한 생물체의 분화는 작용파장별로 분류할 때 고등식물에서 흔히 나타나는 붉은 빛에 의한 분화와 곰팡이류에서 볼 수 있는 푸른 빛에 의한 것 두 종류가 있다. 곰팡이는 Chlorophyll이나 Phytochrome이 없어 붉은색 파장을 흡수하는 phytochrome에 의한 분화는 없으나 푸른색은 곰팡이의 생활사에 중요한 요인이 된다(1). 예를 들면 *Phycomyces* (2, 3)와 *Trichoderma* (4)의 photophoresis, *Cyathus* (5)와 *Coprinus* (6)의 fruiting body형성, *Phycomyces* (2, 3)와 *Neurospora* (7)의 photocarotenogenesis, *Phycomyces* (2, 3)와 *Pilobolus* (8)의 phototropism 등 곰팡이의 metabolism과 development가 푸른 빛에 의하여 영향을 받는다.

한편 곰팡이의 포자 및 포자생성기관은 녹색, 갈색, 흑색 등 phenoloxidase의 산물인 melanin 색소를 가지는 경우가 많으며 그 예로는 *Podospora* (9), *Schizophyllum* (10), *Aspergillus* (11) 등과 같이 reproduction 할 때 phenoloxidase가 직접적 혹은 간접적으로 연관되어 있다. 버섯형성균류의 하나인 *Coprinus congregatus*는 버섯형성과정에서 빛을 필요로 하며 이때 phenoloxidase가 어떠한 역할을 하는지 실험하였다.

*C. congregatus*의 생활사는 일반 담자균류와 동일하나 dikaryon에 clamp connection이 없는 것이 특징이며 unifactorial multiple allele mating type system에 의하여 교배가 이루어진다(12). 본 균주는 soluble starch를 탄소원으로 사용하여 3일 이상 배양할 때 푸른 빛(445 nm)의 자극에 반응하고 가장 최근의 1일 정도 자란 지역(hyphal tip)의 phenoloxidase activity가 가장

높으며 버섯은 빛을 받은 당시의 hyphal tip에서 형성된다. 또한 빛에 의한 버섯형성지역이 지정되면(Fixation step) 그 다음의 3일동안 자라는 hyphal tip들은 비록 phenoloxidase의 activity가 높아도 빛의 자극에 반응할 능력을 상실한다(13). 빛에 의한 분화의 유도는 2단계로 나눌 수 있는데 $50\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$ 의 빛을 5초 내지 30분간 주면 phenoloxidase activity가 저하되고 melanin 생성이 일어나지만 버섯형성의 분화는 나타나지 않는다(Fixation I step). Fixation I step 후 3시간 내지 수일 후 동량의 빛을 주면 분화가 비로소 시작되고 다음 3일동안 자라는 zone의 빛에 대한 반응능력의 억제도 나타난다(Fixation II step)(13).

Phenoloxidase는 monophenoloxidase(E. C. 1. 14. 18. 1), catechol oxidase(E. C. 1. 10. 3. 1.), laccase(E. C. 1. 10. 3. 2.)로 나눌 수 있는데(14), *C. congregatus*는 catechol oxidase와 laccase activity를 가지고 있으며(15) 각각의 enzyme substrate로 3, 4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)와 o-tolidine을 사용하였다. 일반적인 fungal phenoloxidase와 달리 본 균주의 경우는 cell membrane associated enzyme이며 배지로 분비되지 않는다(16). 본 균주를 액체진탕배양하여 mycelial pellet으로부터 protoplast를 얻어 phenoloxidase activity가 cell membrane에 있음이 보고되었으나(17) 액체진탕배양시는 버섯대신 sclerotia가 형성되었고 non-denaturing PAGE에 의하여 이 enzyme을 분석한 결과 agar culture의 hyphal tip enzyme과는 다른 band pattern을 보였다(Fig. 1). 균주가 분화단계를 거쳐 3차구조를 만들 때 즉

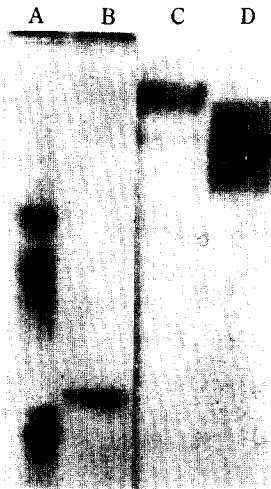


Fig. 1. Non-denaturing PAGE analysis.
 A, D; liquid shake culture, sclerotia.
 B, C; agar culture, hyphal tips.
 A, B; laccase, stained with o-tolidine.
 C, D; catechol oxidase, stained with DOPA.

sclerotium과 primordium을 만들 때 존재하는 phenoloxidase는 hyphal tip enzyme와 band pattern이 다르므로 cold temperature liquifying agent인 Pluronic Polyol F127(18)을 agar 대신 25% (w/v) 농도로 사용하여 본 균주를 배양한 후 4°C에서 1시간 보관하여 액화된 배지를 세척, 제거한 후 hyphal tip에서 protoplast를 얻고 실험한 결과 enzyme activity가 cell membrane에 있음이 증명되었다(19).

Phenoloxidase mutant를 얻기 위하여 mating type a1 homokaryon을 UV 처리하여 mutant를 얻고 hyphal tip phenoloxidase를 non-denaturing PAGE로 분석하여 laccase activity는 없고 catechol oxidase activity는 있는 F7 mutant와 그 반대인 G2 mutant를 대상으로 분화실험을 계속하였다(Fig. 2). 이들 mutant를 wild type a2와 교배했을 때 모두 버섯을 만드는 정상적인 dikaryon을 형성하였으며 이들의 hyphal tip phenoloxidase도 wild type dikaryon과 동일하였다. 동일한 mutant의 형질을 가진 a1과 a2를 교배 하였을 때 dikaryon의 생성이 이루어지지 않았으나 서로 다른 mutant의 형질을 지닌 a1과 a2의 교배는 정상적인 dikaryon을 형성하였다(Fig. 3). 이를 미루어 볼 때 F7과 G2는 struc-



Fig. 2. Non-denaturing PAGE analysis of hyphal tips.
 A, G; wild type dikaryon ($a_1 \times a_2$).
 B, H; wild type homokaryon (a_1).
 C, I; A4 mutant from a_1
 D, J; F7 mutant from a_1
 E, F, K, L; G2 mutant from a_1
 A - F; laccase stained with o-tolidine.
 G - L; catechol oxidase stained with DOPA.

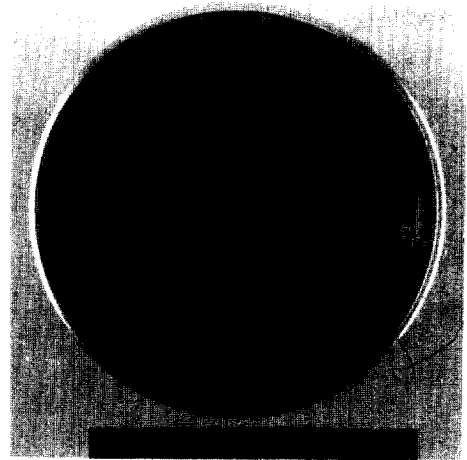


Fig. 3. Mating of two compatible mutants.
 a_2 with G2 character \times F7 (a_1).

tural gene mutant라기 보다는 post translational modification system에 mutation이 일어난 것으로 판단된다.

Phenoloxidase는 일반적으로 melanin 합성에 관여하고 있으며 반응중간산물이 cell membrane의 permeability를 변화시키고(20) DNA의 물리화학적 성질을 변화시키며(21) 특히 quinone류들이 hyphae의 surface component와 oxidative polymerization에 의하여 hyphae들간의 cross-linking을 유도한다(22, 23). *C. congregatus*는 분화단계에 따라 agar culture의

hyphal tip enzyme(POX I)과 3차구조 형성시 나타나는 sclerotial, primordial enzyme(POX II) 등 두 종류가 있으며 이들은 그 기질 특이성으로 보아 각각 catechol oxidase와 laccase를 동시에 가지고 있다. POX I은 빛을 받은 후(Fixation I step) 그 activity가 떨어지며 Fixation II step에는 POX I의 activity가 없어도 분화단계가 진행된다. POX II는 POX I의 activity가 측정할 수 없을 정도로 저하된 후, 그리고 3차구조를 형성할 때 나타나며 이들은 인접한 균사의 cross-linking에 관여하는 것으로 판단된다.

참고문헌

- Senger, H., 1982. *Photochem. Photobiol.* **35**: 911-920.
- Bergman, K. et al., 1969. *Bact. Rev.* **33**: 99-157.
- Cerda-Olmedo, E., 1977. *Ann. Rev. Microbiol.* **31**: 537-547.
- Galun, E., 1971. *Plant Cell Physiol.* **12**: 779-783.
- Lu, B.C., 1965. *Am. J. Bot.* **52**: 432-437.
- Manachere, G., 1977. In *Biotechnol. & Fungal Differentiation*. J. Meyrath & J. D. Bullock (ed). 43-65. Academic Press.
- Zalokar, M., 1955. *Arch. Biochem. Biophys.* **56**: 318-325.
- Page, R.M., 1962. *Sci.* **138**: 1238-1245.
- Esser, K., 1968. *Genet.* **60**: 281-288.
- Leonard, T.J., 1971. *J. Bact.* **106**: 162-167.
- Clutterbuck, A.J., 1972. *J. Gen. Microbiol.* **70**: 423-435.
- Ross, I.K., 1979. In *Viruses & Plasmid in Fungi*. P.A. Lemke (ed). 485-524. Marcel Dekker Inc.
- Ross, I.K., 1985. In *Developmental Biol. of Higher Fungi*. D. Moore et al(ed). 353-373. Cambridge Univ. Press.
- Mason, H.S., 1957. *Adv. Enzymol.* **19**: 79-233.
- Choi, H.T. et al., 1987. *Mycol.* **79**: 166-172.
- Ross, I.K., 1982. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 2763-2770.
- Swords, K.M.M.S., 1984. MA Thesis. U.C. Santa Barbara, California.
- Gardener, S. & J.G. Jones, 1984. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 731-733.
- Choi, H.T., 1986. Ph.D. Thesis. U.C. Santa Barbara, California.
- Cory, J.G., 1967. *J. Biol. Chem.*, **242**: 218-221.
- Miranda, M. et al., 1984. *Mol. Gen. Genet.* **193**: 395-399.
- Leatham, G.F. & M.A. Stahmann, 1981. *J. Gen. Microbiol.* **125**: 147-157.
- Moore, E.J., 1965. *Am. J. Bot.* **52**: 389-395.