KOR. JOUR. MICROBIOL. June, 1990 p. 128-133 Vol. 28, No. 2

*Rhizopus*속의 histones에 관한 연구

민병례 · 이은영
상명여자대학교 자연과학대학 생물학과

Studies on the Histones of the Genus *Rhizopus*

Min, Byung-Re and Eun-Young Lee
Department of Biology, College of Natural Sciences,
Sang Myung Women's University, Seoul 110-743, Korea

ABSTRACT: The chromatin of all higher eukaryotic cells contains a group of very basic low-molecular weight proteins, the histones. But much less is known about histones in lower eukaryotes. Our purpose was to study the histones of the genus *Rhizopus*. After isolation and purification of nucleoprotein the basic nucleoproteins were analyzed by gel electrophoresis, in sodium dodecyl sulfate as well as acid/urea gels and compared with calf thymus histones. Their electrophoretic mobility in polyacrylamide gel indicate that they are histone homologous, although not identical, to the H2A, H2B, H3 and H4 histones of mammals with the exception of H1. The result suggests that *Rhizopus* thus appears to contain histone proteins which are homologous to the histones from in higher eukaryotes. The similarity between the calf thymus histone H1 and the *Rhizopus* high band group remains to be discussed.

KEY WORDS □ ***Rhizopus*, histones electrophoretic mobility, SDS-gel, Acid/urea gel**

모든 고등한 진핵생물의 핵 안에는 histone이 nucleosome의 구성으로써 존재하며(van Holde, 1989) 이들 histones은 H1, H2A, H2B, H3, H4로 크게 5개로 구성되어 있음이 알려져 있다(Nadeau *et al.*, 1974). 하등한 진핵생물인 곰팡이의 histone에 대한 최초의 연구는 Tonino와 Rozijn (1966)에 의하여 보고된 것으로 yeast로부터 추출한 3 group의 basic proteins을 histones으로 간주한 것이다. 그 후 곰팡이에서의 histone들의 존재여부는 여러 학자들간에 논란의 대상이 되어 왔고 Felden 등(1976)은 5가지 subunits를 모두 가진 균류는 아직 보고된 바 없다고 하였으나 Pastink 등(1979)은 yeast인 *Saccharomyces carlsbergensis*에서 고등한 진핵생물과 매우 homologous한 histone들의 완전한 set가 존재함을 보고하였다.

특히 하등한 진핵생물들의 histone에 대한 연구가 적은 이유로는 fungal genome의 크기가 매우 작으며 (Gell & Oliver, 1981), 매우 소량의 histone이 들어 있으며(Brandt & von Holt, 1982) 또한 chromatin으로부터 histone을 분리하고 순수 정제하는 과정이 매우 어렵기 때문으로 보고되어 있다(Pastink *et al.*, 1979). 그밖에 yeast 등에서는 매우 강한 protease가 포함되어 있어(Schulze *et al.*, 1969) histone의 분리 정제 동안에 proteolysis에 의해 histone이 없어지거나 나타날 수도 있는 것 같다는 보고(Goff, 1976) 등도 있다. 따라서 균류에서의 histone에 대한 연구보고는 *Saccharomyces cerevisiae*(Duffus, 1971;Wintersberger *et al.*, 1973;Suchiliene & Gineitis, 1978), *Saccharomyces carlsbergensis*(Pastink *et al.*, 1979), *Neurospora crassa*(Goff, 1976), *Aspergillus nidulans*(Richard *et al.*, 1976;Felden, 1976), *Phycomyces blakesleeanus*(Cohen & Steins, 1975; Morris *et al.*, 1977) 등에서 histone들에 대한 보고가 되어 있을 뿐이며 lower fungi에 속하는 *Rhizopus*의 histone들에 대한 연구 보고는 아직 발표된 바가 없고, 단지 *Rhizopus* 중에서 가장 핵이 크고 많은 수의 염

이 논문은 1989년도 문교부 학술연구 조성비에 의한 자유공모과제로 선정되어 연구되었음

색체를 가진(Min *et al.*, 1982), *Rhizopus nigricans*에서 척추동물과 유사한 histones이 존재함을 추정 보고한 바 있다(Lee & Min 1989, 1990). 따라서 본 연구에서는 *Rhizopus nigricans* 외에 5종의 *Rhizopus*에서 histone을 추출하여 존재여부를 확인하며 척추동물의 histone과도 비교 검토하고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

실험균주 및 배양

실험재료로는 *Rhizopus*속 중에서 *R. acidus, R. arrhizus, R. formosaensis, R. japonicus, R. oryzae*의 5균주로써 모균주는 PDA(Potato Dextrose Agar) 사면배지에 포자로 접종하여 25-28℃의 항온 배양기에서 48시간 배양하여 4℃에서 냉장 보관한다.

모균주에 멸균 증류수 10 ml을 넣어 포자현탁액을 준비한다. 이 현탁액 2 ml을 취하여 200 ml의 YPD(0.3% Yeast Extract;1% Peptone;3% Dextrose) 액체배지에 접종하여 rotary shaker에서 28℃, 180 rpm으로 배양한다.

배양된 균체는 여과하여 배지를 제거한 후 사용하였다.

핵의 분리

핵과 histone을 분리하는 모든 과정은 4℃에서 진행하였고 균체로부터 핵을 분리하는 방법은 Cohen과 Stein(1975)의 방법을 수정하여 사용하였다.

균체를 유발로 분쇄한 후 0.25 M sucrose를 포함하는 homogenizing buffer(20 mM Tris-HCl;0.5 mM EDTA;15 mM $MgCl_2$;40 mM KCl;25 mM ascorbate; pH 7.4)로 현탁시켰다. 현탁액은 4000 rpm의 homogenizer로 1시간 동안 blending한 후 현탁액 위에 0.25 M sucrose homogenizing buffer를 충분히 첨가하여 30×g로 3분간 원심분리한 후 상등액만을 다시 1000×g로 10분간 원심분리하였다. 침전물은 0.25 M sucrose buffer로 resuspend하고, 그 중 4 ml을 취하여 10 ml 용량의 원심분리관에 담겨 있는 6 ml의 0.75 M sucrose resuspension buffer(20 mM Tris-HCl;0.5 mM EDTA; 15 mM $MgCl_2$;40 mM KCl;pH 7.4) 위에 조심스럽게 올려놓고 120×g로 10분간 원심분리하였다.

Buffer 모두에는 protease inhibitor로 $NaHSO_3$를 첨가하였고 침전물은 2차 증류수로 suspend한 후 수초간 blending하여 4℃에서 하룻밤 방치하여 핵을 swelling out 시켰다.

Histones의 분리 및 정제

핵으로부터 histone을 분리하는 방법은 Sommer (1978)의 방법을 수정하여 사용하였다.

22,000×g로 15분간 원심분리하여 얻은 침전물에 ice-cold 0.2 N HCl을 붓고 충분히 섞은 후 14,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 상등액에 최종농도가 0.4 N 되도록 H_2SO_4를 첨가시킨 다음 6 vol.의 cold-acetone을 첨가하여 4℃에서 하룻밤 방치하였다. 37,000×g로 60분간 원심분리하고 1회 더 반복한 후 acetone을 증발시켜 건조된 재료를 냉장 보관하였다.

Histones의 전기영동

분리 정제된 histone은 acid-urea polyacrylamide gel과 SDS-gel을 이용하여 전개 분리시켰고 standard로써는 calf thymus histone(Sigma)을 사용하여 electrophoretic mobility를 비교하였다.

Acid-urea gel은 Panyim과 Chalkley(1969, a)와 Spiker(1980)의 방법을 수정하여 사용하였다. 15% polyacrylamide, 2.5 M Urea로 준비된 separating gel은 0.9 N glacial acetic acid를 electrode buffer로 하여 10℃에서 200 V의 constant로 5시간 pre-electrophoresis한 후 7.5% polyacrylamide, 2.5 M Urea의 stacking gel을 준비하였다. 160 V constant로 stacking한 후 200 V constant로 separating 하였다. Tracking dye는 Methyl green을 사용하였다.

SDS-gel은 Laemmli(1970)의 방법을 수정하여 사용하였다. 5종의 *Rhizopus* 각각은 standard와 함께 18% polyacrylamide, 0.1% SDS의 running gel과 12% polyacrylamide stacking gel을 사용하였고 5종을 함께 전기영동한 경우는 15% polyacrylamide, 0.1% SDS의 running gel과 12% polyacrylamide stacking gel을 사용하였으며 tracking dye는 Bromophenol blue를 사용하였고 분자량을 비교하기 위하여 marker protein으로 Cytochrome C(M.W. 11700)을 사용하여 분리된 histone의 mobility와 비교하였다.

이상의 *Rhizopus*의 핵의 분리 및 histones의 분리, 정제 과정과 전기영동을 이용한 histone의 분리 등 모든 실험조건은 *R. nigricans*을 실험균주로 연구한 결과(Lee & Min 1989, 1990)를 참고로 최적의 조건을 찾아 실험하였다.

결과 및 고찰

*Rhizopus*의 5종 각각을 standard로써 calf thymus histone과 함께 15% polyacrylamide의 acid-urea gel과 18% polyacrylamide SDS-gel에서 각각 전기영동하였다(Fig.1-5). 전체적으로 acid-urea gel에서는 SDS-gel에서 보다 낮은 electrophoreticmobility를 보여주었고 calf thymus histone 보다 *Rhizopus* 속의 proteins이 좀 더 낮은 electromobility를 보여주었다. *Rhizopus* 5종이 유사하게 전개되었기 때문에 좀 더 정확하게 비교하기 위하여 5종을 함께 하나의 gel에 전기영동시켜 비교하였고(Fig.6), SDS-gel은 분자량을 표시하기 위하여 marker protein으로 Cytochrome C (MW 11700)를 사용하였고 이 때의 gel 농도는 15% polyacrylamide gel을 사용하였다(Fig.7).

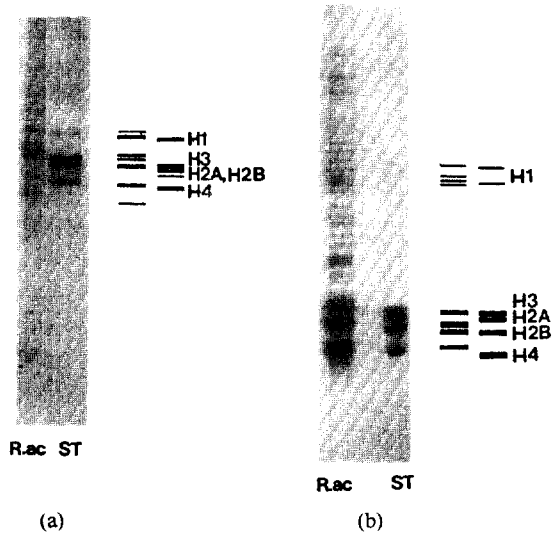

Fig. 1. *Comparison of Rhizopus acidus and calf thymus histone on 15% polyacrylamide/acid-urea gel electrophoresis (a), on 18% polyacrylamide, 0.1% SDS gel electrophoresis (b).*
R.ac: *Rhizopus acidus*
ST: Standard (calf thymus histone)

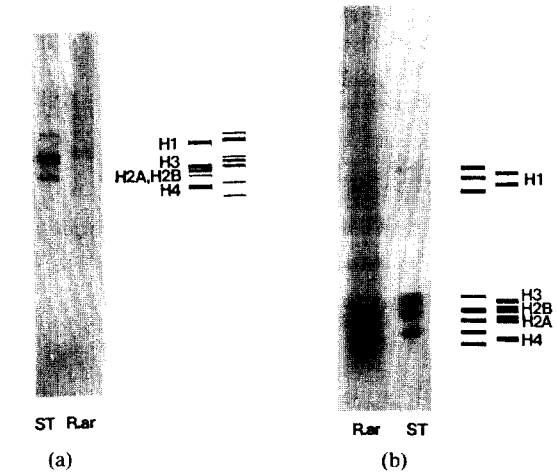

Fig. 2. *Comparison of Rhizopus arrhizus and calf thymus histone on 15% polyacrylamide/acid-urea gel electrophoresis (a), on 18% polyacrylamide, 0.1% SDS gel electrophoresis (b).*
R.ar: *Rhizopus arrhizus*
ST: Standard (calf thymus histone)

Standard의 H1과 유사한 위치에 있는 H1-like protein은 *R. formosaensis*의 경우만이 acid-urea gel에서 하나의 band로 나타났고 나머지 종들은 모두 2개의 band로 분리되었으며 18%의 polyacrylamide gel에서

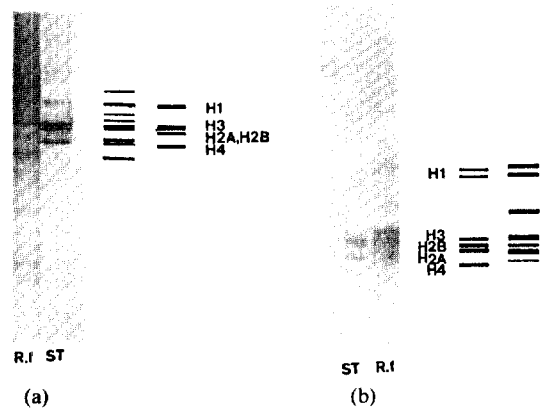

Fig. 3. *Comparison of Rhizopus formosaensis and calf thymus histone on 15% polyacrylamide/acid-urea gel electrophoresis (a), on 18% polyacrylamide, 0.1% SDS gel electrophoresis (b).*
R.f: *Rhizopus formosaensis*
ST: Standard (calf thymus histone)

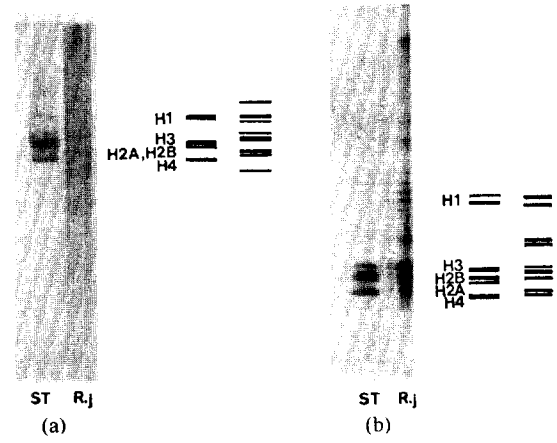

Fig. 4. *Comparison of Rhizopus japonicus and calf thymus histone on 15% polyacrylamide/acid-rea gel electrophoresis (a), on 18% polyacrylamide, 0.1% SDS gel electrophoresis (b).*
R.j: *Rhizopus japonicus*
ST: Standard (calf thymus histone)

는 3-4개 band, 15%의 gel에서는 5종 모두가 3 band를 보여주고 있고 calf thymus histone H1은 SDS의 15%, 18% polyacrylamide gel에서 2개의 band로 분리되었다. 균류에서 *Neurospora*(Goff, 1976)와 *Aspergillus*(Felden *et al.*, 1976) 등에서는 H1이 존재한다는 보고가 있으나 yeast에서는 존재하지 않을 가능성이 있으며 (Smith, 1984) yeast에서 H1의 기능을 가진 protein은 크기, 아미노산 구성, 용해 특성 등이 고등한 진핵생물의 H1과는 전혀 다르다(van Holde, 1989)고 보고

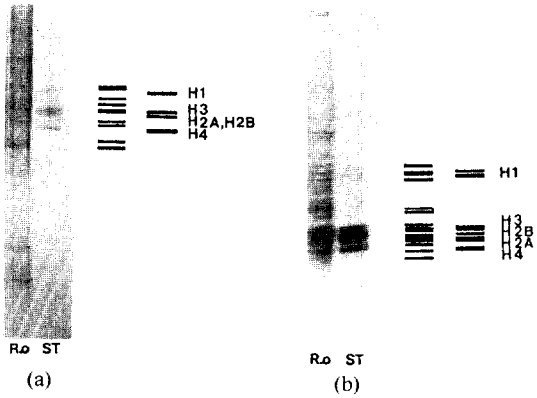

Fig. 5. *Comparison of Rhizopus oryzae and calf thymus histone on 15% polyacrylamide/acid-urea gel electrophoresis (a), on 18% polyacrylamide, 0.1% SDS gel electrophoresis (b).*
R.o: *Rhizopus oxyzae*
ST: Standard (calf thymus histone)

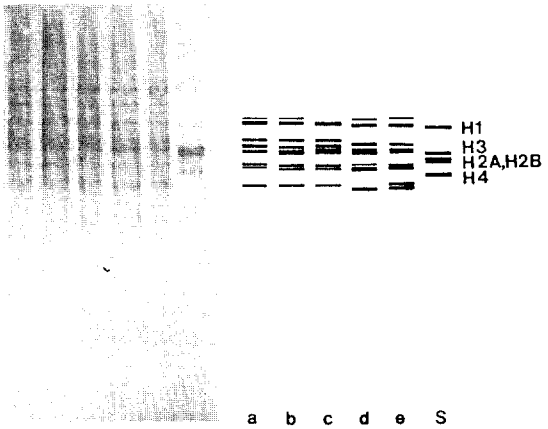

Fig. 6. *15% polyacrylamide acid-urea gel electrophoresis of histones isolated from 5 species of Rhizopus S; calf thymus histones as standard, and histones from a; Rhizopus acidus, b; R. arrhizus, c; R. formosaensis, d; R. japonicus, e; R. oryzae.*

되어 있다. 일반적으로 histone H1은 진화학상 가장 변화하기 쉬운 분자이며(van Holde, 1989), 고등한 식물이 옥수수에서(Ivanchenko, 1987) H1이 최소 6개의 protein으로 구성되어 있으면서 2개의 band로 나타내며 매우 heterogeneity 하다는 사실 등을 참고로 할 때 본인의 실험에서는 acid-urea gel에서 standard H1과 매우 유사한 electrophoreticmobility를 갖는 band를 볼 수 있으나 아미노산 구성 등의 연구를 좀 더 수행하여야만 *Rhizopus* 속의 H1 존재여부가 정확하게 밝혀질 것으로 사료된다.

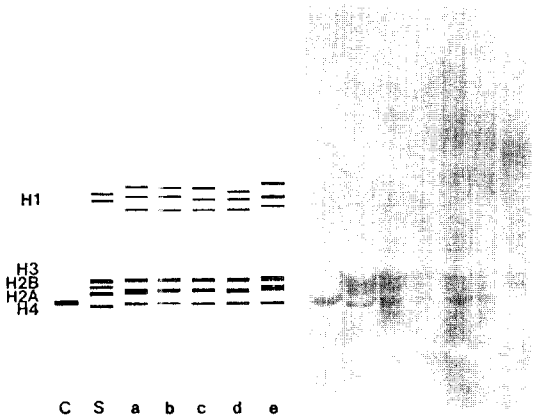

Fig. 7. *15% polyacrylamide SDS-gel electrophoresis of histones isolated from 5 species of Rhizopus C; Cytochrome C as molecular weight marker (MW 11700), and histones from a; R. acidus b; R. arrhizus, c; R. formosaensis, d; R. japonicus, e; R. oryzae.*

Histone H2A와 H2B는 aicd-urea gel에서는 standard인 calf thymus histone 보다 낮은 mobility를 보여주고 있으며 18% SDS-gel에서는 standard와 유사한 위치에 모두 2 band로 분리되어 전개되었고 15% polyacrylamide SDS-gel에서는 standard는 2개로 분리되었으나 H2A와 H2B가 분리되지 않고 하나의 band로 전개되었다.

Aspergillus nidulans(Felden *et al.*, 1976), *Neurospora crassa*(Hsiang & Cole, 1973;Goff, 1976), *Saccharomyces cerevisiae*(Franco *et al.*, 1974) 등에서 효유류와 유사한 H2A와 H2B가 보고된 바가 있다. 또한 H2A와 H2B의 histone gene의 chain length는 생물의 종에 따라 차이를 보여주지만 진화학상 전혀 다른 calf thymus와 yeast 사이에 H2A protein sequence의 80%가 homology이고 H2B protein은 아미노산기 38-130까지가 78%의 homology를 나타낸다고 보고되어 있는 (Grunstein *et al.*, 1984) 점 등을 고려할 때 *Rhizopus* 속에서도 고등 진핵생물과 유사한 H2A, H2B가 존재하는 것을 추정할 수 있다.

Histone H3와 histone H4는 18% polyacrylamide SDS-gel과 15% polyacrylamide SDS-gel에서 calf thymus histone H3, H4와 유사한 protein이 있음을 볼 수 있었으나 acid-urea gel에서는 다른 proteins band와 마찬가지로 매우 낮은 electrophoreticmobility를 보이고 있다. 분자량을 확인하기 위하여 marker protein으로 사용한 Cytochrome C(MW 11700)와 15% SDS-gel에서 11300의 분자량을 가진 calf thymus histone H4와 유사한 mobility를 보이고 있다.

Histone proteins 중에서 H3와 H4는 진화학상 가장

잘 보전되어 온 것으로 알려져 있다. 즉, yeast에서 사람에 이르기까지 거의 30종에 이르는 histone H4 gene은 모든 종에서 정확하게 102개의 아미노산으로 구성되어 있고 calf와 pea는 단지 2곳에서만 차이가 있을 뿐이며 calf와 yeast 사이에도 8개만이 다르다고 보고되어 있다(Delange *et al.*, 1969, b). 또한 histone H3 gene을 20종 이상에서 sequencing 하였을 때 단 1종인 쥐에서만 134개이고 나머지는 135개 아미노산으로 구성되어 있었으며 calf와 yeast 사이에는 135 아미노산 중에서 15개만이 차이가 나는 것으로 보고되어 있으며 이러한 constancy는 H3와 H4가 nucleosome 구조를 결정하는데 중요한 역할을 하는 것으로 설명되어지고 있다(van Holde, 1989).

이상과 같은 결과와 연구 보고 등을 종합하여 고찰할 때 하등 균류에 속하는 *Rhizopus* 속에서도 고등한 진핵생물과 유사한 histone H2A, H2B, H3, H4를 포함하고 있음을 추정할 수 있고 histone H1은 좀 더 연구할 과제이며 이들 histone에 대하여 하나하나의 protein을 분리하여 정확한 분자량, 아미노산 구성 등을 비교하고자 한다.

적 요

고등한 진핵생물에서 nucleosome 구성에 중요한 역할을 하는 histone 단백질이 하등한 진핵생물에서도 존재하는지의 여부를 알아보기 위하여 실험을 하였다. 하등한 균류에 속하는 *Rhizopus* 속의 5종(*R. acidus, R. arrhizus, R. formosaensis, R. japonicus, R. oryzae*)을 재료로 하여 15% polyacrylamide acid-urea gel과 18% polyacrylamide SDS-gel을 이용하여 전기영동하였다. 분자량을 비교하기 위하여 marker protein으로 Cytochrome C와 함께 15% polyacrylamide SDS-gel을 이용하였으며 모든 gel에서 standard로써 calf thymus histone을 사용하여 electrophoreticmobility를 비교하였고 또 한 속내에서의 종간의 차이가 있는지를 실험하였다. 실험결과는 한 속내에서 종에 따른 차이로 볼 수 없었으며 standard인 calf thymus histone H1, H2A, H2B, H3, H4와 유사한 electromobility를 갖는 protein band를 확인할 수 있었으며 H1 histone은 명확하게 일치되지가 않았다. 따라서 하등한 균류인 *Rhizopus*에서도 고등 진핵생물과 유사한 단백질이 존재함을 추정할 수가 있었다.

참고문헌

1. **Brandt, W. F. and C. von Holt,** 1982. The primary structure of Yeast Histone H3, *Eur. J. Biochem.*, **121**, 501-510.
2. **Cohen, R. J. and G. S. Stein,** 1975. Chromosomal proteins of *Phycomyces blakesleeanus, Exp. Cell Res.*, **96**, 247-254.
3. **Delange, R. J., D. M. Fambrough, E. L. Smith and J. Bonner,** 1969. Calf and pea Histone IV, III. Complete amino acid sequence of of pea seedling histone IV; comparison with the homologous calf thymus histone. *J. Biol. Chem.*, **224**, 5669-5679.
4. **Duffus, J.H.,** 1971. The isolation and properties of nucleohistone from the fission Yeast, *Schizosaccharomyces pombe. Biochem. Biophys. Acta.*, **228**, 627-635.
5. **Felden, R.A., M.M. Sanders and N.R. Morris,** 1976. Presence of histone in *Aspergillus nidulans, J. Cell Biol.*, **68**, 430-439.
6. **Goff, C.G.,** 1976. Histones of *Neurospora crassa. J. Biol. Chem.*, **251**(13), 4131-4138.
7. **Grunstein, M., M. Rykowski, D. Kolodrubetz, J. Choe and J. Wallis,** 1984. A genetic analysis of histone protein subtypes in Yeast. In Histone genes. John Wiley & Sons, 35-63.
8. **Hsiang, M.W. and R.D. Cole,** 1978. Methods in Cell Biology Vol. 18. Academic press, 189-228.
9. **Ivanchenko, M., E. Georgieva, A. Uschewa and Z. Avramova,** 1987. A study on the heterogeneity of histone H1 from dry maize embryo, *J. Biochem.*, **162**, 339-344.
10. **Laemmli, U.K.,** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
11. **Lee, E.Y. and B.R. Min,** 1989. Histones of *Rhizopus nigricans* Enrenberg, *J. Basic Science.* Sang Myung Women's Univ. Vol. 3, 53-62.
12. **Lee, E.Y. and B.R. Min,** 1990. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of histones from *Rhizopus nigricans, J. Basic Science* Sang Myung Women's Univ. Vol. 4.
13. **Min, B.R., T.J. Lee and Y.K. Choi,** 1982. Chromosomal studies on the genus of *Rhizopus.* I. Chromosomal studies on 7 species of the genus *Rhizopus, Kor. J. Microbiol.*, **20**, 134-146.
14. **Morris, N.R., R.A. Felden, M.A. Gealt, R.V. Nardi, G. Sheie-Neiss and M.M. Sanders,** 1977. The *Aspergillus* Nucleus; Histones, Chromatin and Tubulin, 267-279.
15. **Nadeau, P., D. Pallatta and J.G. Lafontaine,** 1974. Electrophoretic study of plant histones; Comparison with vertebrate histones, *Arch. Biochem. Biophys.*, **161**, 171-177.
16. **Panyim, S. and R. Chalkley,** 1969. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Arch. Biochem. Biophys.*, **130**, 337-346.
17. **Pastink , A., T.A. Berkhout, W.H. Mager and R.J. Planta,** 1979. Analysis of histones from the yeast *Sac-*

charomyces carlsbergensis, Biochem. J., **177**, 917-923.
18. **Richard, A.F., M.S. Marlin and N.R. Morris,** 1976. Presence of histones in *Aspergillu nidulans, J. Cell Biol.*, **68**, 430-439.
19. **Smith, M.,** 1984. The organization of the yeast histone genes. In Histone genes. John Wiley & Sons 3-33.
20. **Sommer, A.,** 1978. Yeast chromatin: Search for H1, *Molec. Gen. Genet.*, **161**, 323-331.
21. **Spiker, S.,** 1980. A modification of the acetic acid-Urea system for use in microslab polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **108**, 263-265.
22. **Suchiliene, S.P. and A. Gineitis,** 1978. Histone from *Saccharmyces cerevisiae, Exp. Cell Res.*, **114**, 454-458.
23. **Tonino, G.J.M. and T.H. Rozijn,** 1966. On the occurrence of histones in yeast, *Biochem. Biophys. Acta.*, **124**, 427-429.
24. **van Holde, K.,** 1989. Chromatin. Springer-Verlag. 69-180.
25. **Wintersberger, U., P. Smith and K. Letnansky,** 1973. Yeast chromatin preparation from isolated nuclei, histone composition and transcription capacity, *Eur. J. Biochem.*, **33**, 123-130.

(Received May 12, 1990)
(Accepted May 15, 1990)