

담자성 효모 *Trimorphomyces papilionaceus* 이배체균의 세포학적 특성

정해숙 · 최형태* · 윤권상

강원대학교 자연과학대학 미생물학과
서울대학교 분자미생물학 연구센터

Trimorphomyces papilionaceus dikaryon으로부터 자연적인 돌연변이에 의해 분리한 이배체를 대상으로 성장속도, U.V.광 조사 후의 생존율, U.V. 분광광도계와 Hoechst 33258 핵염색에 의한 DNA 함량 등을 monokaryon 및 dikaryon과 비교하여 결정하였다. 이배체는 dikaryon 핵의 DNA 양과 비슷하였고 monokaryon 핵의 DNA 양의 2배 정도가 되었다. Glyoxalase II의 band 양상에서 monokaryon은 한 개의 isozyme band만을 보인 반면, 이배체와 dikaryon은 같은 위치에서 두 개의 isozyme band가 관찰되었다. 이전전개한 전기영동실험에서 dikaryon 특이 단백질은 분자량이 66,000 보다 컸으며 분자량 24,000~29,000 사이에서 이배체 특이 단백질이 존재한다.

KEY WORDS □ *Trimorphomyces papilionaceus*, diploid, basidiomycetous yeast

생물체가 유성생식에 의하여 번식할 경우 서로 다른 성인자를 가진 반수체가 접합하여 일시적인 dikaryon 상태를 거쳐 핵융합에 의한 diploid 형성으로 진행된다. 균류는 생활사를 통하여 체세포와 생식기관이 모두 반수체(haploid) 성격을 띠고 있는데 자낭균류와 담자균류가 생활사중 dikaryophase를 가지고 있으며 이 현상은 현재까지 알려진 어떤 생물군에서도 발견되지 않는 독특한 현상으로, 자낭균류의 경우 ascogonium 형성시기에 일시적으로 나타나나 버섯을 생성하는 담자균류는 서로 다른 성인자를 가진 monokaryotic mycelium이 접합하여 dikaryotic mycelium을 형성한다. 이들이 외부의 자극을 받아 버섯을 생성하고 담자기내에서 핵융합이 일어나며 이배체는 매우 짧은 기간동안 유지되고 핵융합 즉시 감수분열이 발생한다(2, 11).

*Trimorphomyces papilionaceus*는 Tremellaceae과에 속하는 담자성 효모이고 이들은 monokaryon과 dikaryon 상태에서 단세포로 계속 분열과 성장을 하며 dikaryon은 정상적으로 자낭균의 하나인 *Arthrinium*이 있을 때 이에 기생하여 dikaryon의 핵이 karyogamy가 일어나 이배체를 만든다(13). 이배체를 얻는 주된 목적은 이배체 형성 후 즉시 감수분열이 일어나고 4개의 담자포자(haploid)를 만들므로 dikaryon에서 이배체로의 전환기작은 물론 이배체에서 반수체로의 전환기작을 연구하는데 적당하다. 본 연구에서는 glucose 최소배지에서 dikaryotic yeast를 계속적으로 계대배양하던 중 자연적인 돌연변이에 의해 생긴 이배체균주를 분리하였기에 이를 보고한다.

재료 및 방법

균주 및 배양특성 실험

본 실험에 사용한 균주는 Dr. R. Bandoni(Univ. British Columbia)로부터 받은 *T. papilionaceus* dikaryon과 여기에서 분리한 K13(monokaryon) 및 이배체이며 YEPD 배지에 접종, 25°C에서 배양한 후 4°C에서 보관하였다. 성장속도는 glucose 최소배지에서 4~5일간 배양한 균체를 새로운 액체배지에 흡광도 600 nm에서 0.04가 되게 접종한 후 12시간 간격으로 흡광도를 측정하여 성장곡선을 구하였다.

최소배지는 정 등(1)이 사용한 최소배지에서 미량 원소 용액을 제외하고 사용하였다. 즉 KH_2PO_4 1.0g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g, CaCl_2 0.1g, thiamine 용액 100 μg , glucose 10g을 1L에 가하고 pH 6.0으로 조절하여 사용하였다.

Fluorescent microscope에 의한 핵 관찰

최소배지에서 24시간 액체배양한 균체를 증류수로 세척한 후 slide glass에 DAPI 용액 [mounting medium I(glycerol : phosphate buffered saline=1 : 2) 10 ml에 10 mg propylgallate를 용해시키고 6 μl DAPI 용액(5 mg 4,6-diamidino-2-phenylindole/3 m/ methanol)을 혼합하여 냉암소에 보관]을 한 방울 떨어뜨리고 그 위에 균체를 Pasteur pipette으로 잘 섞어준다. 이를 실온에서 10분간 염색한 후 cover glass를 덮고 현미경으로 각 균주의 모양과 핵 존재를 관찰하였다(9).

U.V.광 조사 후의 생존율 측정

최소배지에서 24시간 진탕배양한 균을 인산염완충액(0.01 M, pH 6.5)으로 두 번 세척한 후 10 ml의 인산염완충액(0.1% Triton X-100 포함)에 현탁시키고 U.V. 등과의 거리는 15 cm 간격을 두며 8분 동안 U.

V. 광을 조사하였다. 이를 희석하여 YEPD 한천배지에 도말하고 5~6일 뒤에 나온 colony를 대조구와 비교하여 생존율을 알아보았다.

U.V. spectrophotometer에 의한 DNA양 분석

최소배지에서 24시간 진탕배양한 균체를 인산염 완충액으로 세척한 후 20~45% sucrose step gradient에 균을 넣고 250×g에서 30분간 원심분리 후 현미경으로 각 층을 관찰하고 25% sucrose 층에서 G1 phase의 효모를 분리하였다(7). 이를 Eppendorf tube에 4.5×10^8 cell씩 넣고 0.3g glass bead, 100 μ l phenol, 100 μ l chloroform : isoamyl alcohol 혼합액(24 : 1), 200 μ l lysis buffer를 더하고 7분간 세포를 분쇄하여 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA용액 10 μ l를 100배 희석하여 흡광도를 260 nm에서 측정하여 DNA량을 계산하였다.

Hoechst 33258 염색에 의한 DNA fluorescent intensity 측정

Hoechst 33258에 의한 핵 염색에서 G1 phase의 효모는 위와 동일한 방법으로 준비하였으며 15분 동안 Hoechst 33258로 핵을 염색한 후(14) DNA fluorometer TKO 100(Hoefer)을 이용하여 염색된 DNA의 fluorescence 값(Excitation at 365 nm, emission at 460 nm)을 측정하였다.

Glyoxalase II isozyme 양상 비교

T. papilionaceus monokaryon, dikaryon. 이배체를 최소배지에서 48시간 진탕배양한 후 1,100×g로 원심분리하여 얻은 균체를 0.05 M Tris-HCl 완충용액(pH 7.2)으로 두 번, 0.02 M Tris-HCl [+1 mM DTT (dithiothreitol)] 완충용액(pH 8.2)으로 한 번 세척하였다. 여기에 0.5%의 Triton X-100과 Ig glass bead를 넣고 Mini-bead beater로 분쇄한 후 4°C, 27,700×g에서 1시간 동안 원심분리하여 상층액을 조효소로 사용하였다. 조효소액을 4% stacking gel/8% running gel로 만든 non-denaturing PAGE(6)에 의한 전기영동을 실시한 후 효소활성 염색법(16)으로 isozyme의 위치를 확인하였다.

Two-dimensional gel 전기영동에 의한 총단백질 비교

Isoelectric focusing(IEF) PAGE에서 효소시료는 9.5 M urea, 2.0% Triton X-100, 5% β -mercaptoethanol, 1.6% pH 5~7 ampholine, 0.4% pH 3~10 ampholine을 함유한 시료처리액과 같은 비율로 섞어 9.2 M Urea, 4% acrylamide, 2% Triton X-100, 1.6% pH 5~7 ampholine, 0.4% pH 3~10 ampholine, 0.01% ammonium persulfate, 0.1% TEMED로 만든 IEF gel에 loading한 후 focusing은 0.01 M H_3PO_4 와 0.02 M NaOH 수용액을 각각 양극과 음극으로 하여 4°C, 500 V(constant volt)에서 4시간 전기영동하였다. 1차 전개한 gel은 10% resolving gel과 4% stacking gel로 구성된 SDS second dimension gel에서 15 mA로 전기영동한 후 gel은 silver staining하였다.

결과 및 고찰

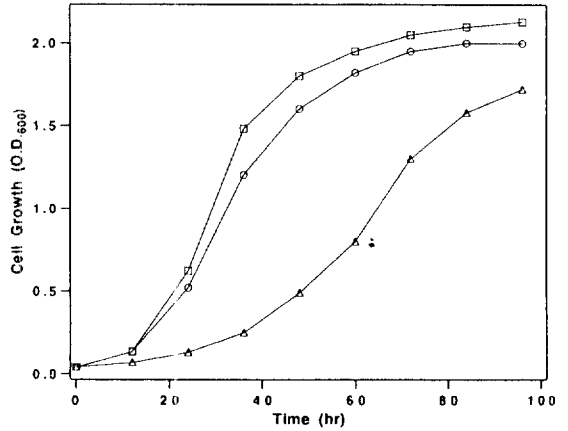


Fig. 1. Growth curve of three strains of *T. papilionaceus* in minimal medium.

△: *T. papilionaceus* K13, monokaryon; ○: *T. papilionaceus* dikaryon; □: *T. papilionaceus* diploid.

생장속도의 비교

최소배지에서 *T. papilionaceus*의 각 균주를 진탕 배양하여 생장정도를 알아보았다. 이배체는 접종 2일 후에 정체기에 들어가고 이러한 생장속도는 dikaryon과 거의 비슷한 수준이며, monokaryon은 이들보다 훨씬 늦은 4일 후에 정체기에 도달하는 것으로 관찰된다(Fig. 1).

Phase contrast, Normaski와 fluorescent microscope에 의한 관찰

Phase contrast와 Normaski microscope로 세포 모양을 보았을 때 monokaryon과 이배체는 효모와 비슷한 형태이며, dikaryon은 나비모양인 H자 형태를 갖는다. 또한 DAPI로 균의 핵을 염색하여 현미경으로 관찰하였을 때 이배체는 monokaryon처럼 한 개의 핵을 가지고 있으며 dikaryon은 H자 양쪽에 하나씩 위치한 두 개의 핵을 볼 수 있다(Fig. 2). 이와 같은 현상은 세포의 핵을 DAPI로 염색하였을 때 남자균인 *Schizophyllum commune*의 이배체의 형태가 monokaryon과 유사한 것처럼(11) *T. papilionaceus* 이배체의 세포모양과 핵상태는 나비모양과 2개의 핵을 가진 dikaryon과 달리 monokaryon처럼 효모모양이며 한 개의 핵을 갖는다(Fig. 2). 다른 담자균에서 핵융합이 일어나는 것처럼 이 실험에서도 한 개의 이배체의 핵은 dikaryon의 두 핵이 융합한 것으로 판단된다.

U.V.광 조사 후에 측정된 생존율

*T. papilionaceus*의 monokaryon, dikaryon, 이배체를 U.V.광 조사 후 YEPD 한천배지에 나온 colony의 수를 측정하여 대조구와 비교하였을 때 이배체는 monokaryon의 두배의 생존율을, dikaryon과는 유사한 생존율을 보인다(Fig. 3-A).

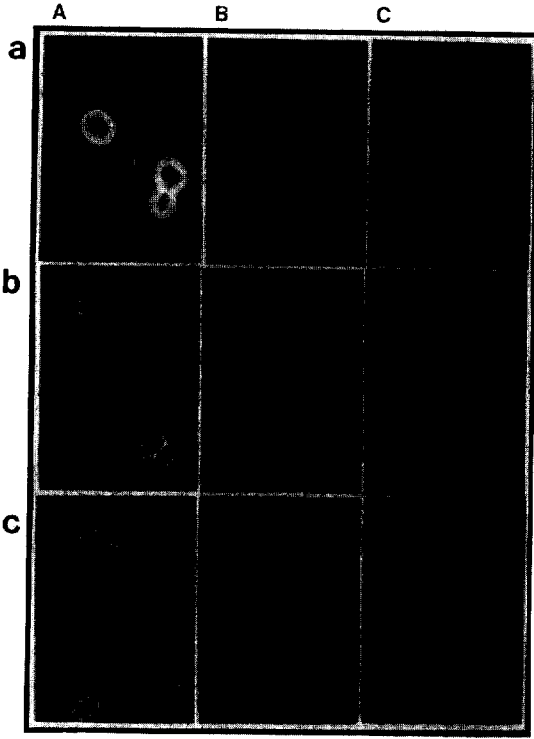


Fig. 2. Phase contrast (A), Nomarski (B), and fluorescent microscopy (C) of *T. papilionaceus*. a, Monokaryon; b, Dikaryon; c, Diploid.

U.V. 분광광도계에 의한 DNA 농도분석

최소배지에서 배양한 균을 20~45%의 sucrose gradient로 분획하였을 때 25% sucrose층에 G1 phase의 효모가 가장 많이 존재하였고 이를 분리 세척한 후 일정수의 세포에서 DNA를 추출하여 양을 측정할 결과 이배체는 dikaryon과 유사하였으며 monokaryon보다는 약 1.5배 정도 높았다(Fig. 3-B).
Hoechst 33258 염색에 의한 DNA 농도 분석

최소배지에서 액체진탕배양한 균에서 G1 phase의 효모만을 분리하여 Hoechst 33258로 염색하여 fluorescence값을 측정하였다. Hoechst 33258은 DNA만을 염색하므로 DNA 함량측정에 적합하다(12, 14). 일정수에 대한 세포의 fluorescence값은 이배체가 dikaryon보다 약간 낮았으나 비슷한 수준이었으며 monokaryon보다 2배 정도 높았다(Fig. 3-C). 이상의 결과들, 즉 U.V.광 조사 후의 생존율, U.V. spectrophotometer를 이용한 방법과 Hoechst 33258로 세포의 핵을 염색하여 DNA의 fluorescence intensity로 DNA 함량을 비교해 볼 때 이배체는 dikaryon과 비슷한 수준이었으며 monokaryon의 2배 정도였다. 이러한 결과는 담자균인 *Armillaria mellea*(phytopathogenic fungus)와 자낭균인 *Asp. nidulans*의 DNA를 mithramycin으로 염색하여 fluorescence를

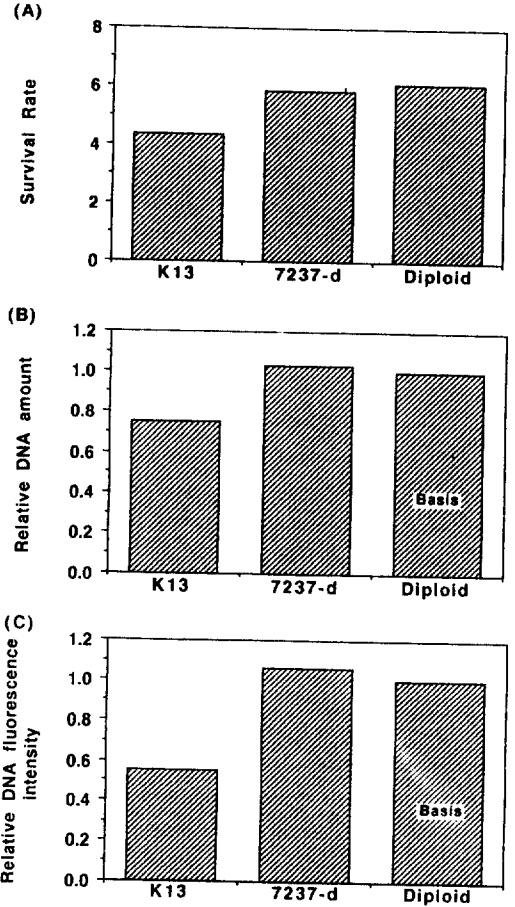


Fig. 3. Determination of diploidy of *T. papilionaceus*. A: Survival rate after U.V. irradiation. B: Relative DNA amount by U.V. spectrophotometry (OD₂₆₀ value of diploid is set to 100). C: Assay of DNA concentration by Hoechst dye 33258 (Fluorescence value of diploid is set to 100).

측정(3.8)하였을 때 이배체의 DNA 함량이 haploid의 2배로 나타난 결과와 유사하였다.

***T. papilionaceus*에서 glyoxalase II isozyme 양상**

최소배지에서 진탕배양하여 얻은 각 균의 조효소를 추출하여 native gel에서 전기영동 후 활성염색한 결과 monokaryon은 한 개의 isozyme을 가지고 있으며 이배체는 dikaryon과 같은 위치에서 두 개의 isozyme을 가지고 있다(Fig. 4).

이상과 같이 분석한 이배체의 확인 실험결과 모양과 핵의 수가 다름에도 불구하고 이배체는 dikaryon과 같이 두개의 핵량을 보유하고 있는 것으로 판단되며 두 균주사이에 밀접한 관계가 있음을 알 수 있고 이 배체균의 확실성을 증명하는 실험이라 할 수 있다.

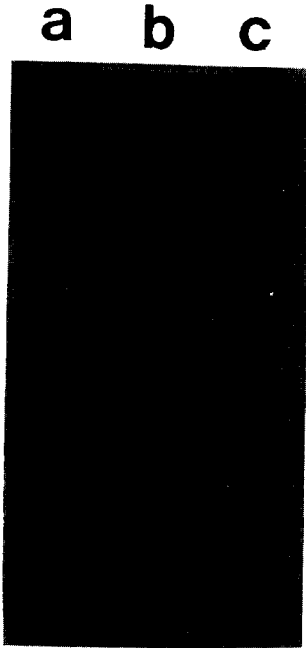


Fig. 4. Glyoxalase II isozymes of *T. papilionaceus* by native PAGE analysis.
a, Monokaryon; b, Dikaryon; c, Diploid.

또한 담자균 *Cop. cinereus*의 이배체는 haploid와 교배되어 dikaryon을 형성한다고 보고되었다(4, 5). 이와 같은 교배현상이 분리된 *T. papilionaceus*의 이배체에서도 일어나 monokaryon들과 교배되는 것을 관찰하였으며 이와 같은 기작을 유전학적으로 설명할 수 있도록 연구를 계속해야 할 것이다.

Two-dimensional gel 전기영동에 의한 protein profile의 분석

최소배지에서 2일간 액체배양한 monokaryon, dikaryon, 이배체의 총단백질을 분석하여 생활사의 각 단계에 위치한 균의 단백질 분포상 차이를 알아보았다. SDS-PAGE나 2-D PAGE는 단백질 수준에서 세포의 생리적인 특성을 비교 분석하는데 많이 이용되며 특히 병원성 균류에서 병원성의 유·무를 확인하는데 이용되므로(10, 15) 이 실험에서도 이와 같은 방법을 이용하였다. Two-dimensional PAGE를 이용한 단백질의 분포에서 dikaryon 특이 단백질은 분자량이 66,000 보다 컸으며(Fig. 5B의 원과 화살표), 분자량 24,000~29,000 사이에서 alkaline pH에 존재하는 이배체 특이 단백질(Fig. 5C의 원과 화살표)은 핵융합상태를 유지하는 등의 이배체의 독특한 생리적 대사에 연관이 있는 것으로 추정된다. 한편 monokaryon은 다른 균주와 같은 단백질량을 전기영동하였으나 단백질의 band와 반점이 dikaryon이나 이배체보다 희미하였고 수도 적었다. 앞으로 분화기작을 설명하기 위해서는 균주에 따라 이러한 차이를 보이는

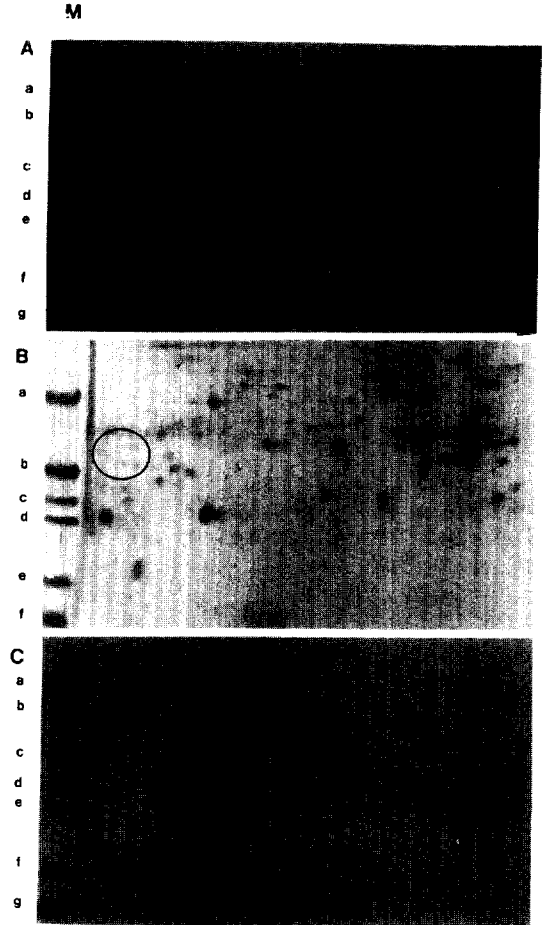


Fig. 5. Two dimensional PAGE analysis of *T. papilionaceus*.

Arrowheads and circles represent the possible stage-specific proteins.

A, Monokaryon; B, Dikaryon; C, Diploid.
M, Molecular weight marker; a, 66 kd; b, 45 kd; c, 36 kd; d, 29 kd; e, 24 kd; f, 20 kd; g, 14 kd.

각 단백질의 역할과 기능에 대하여 더 많은 연구가 필요하다고 판단된다.

사 사

이 논문은 과학재단 우수센터(서울대학교 분자미생물학 연구센터) 지원연구비(1992)에 의해 수행되었음.

참 고 문 헌

1. 정해숙, 최형태, 윤권상, 1992. *Trimorphomyces papilionaceus*에서 laccase의 catabolite repression

- 에 의한 조절. 미생물학지 30, 78-82.
2. Alexopoulos, C.J., 1962. Introductory Mycology. John Wiley & Sons.
 3. Anderson, J.B., D.M. Petsche and A.L. Franklin, 1985. Nuclear DNA content of benomyl-induced segregants of diploid strains of the phyto-pathogenic fungus *Amillaria mellea*. *Can. J. Genet. and Cytol.* 27, 47-50.
 4. Casselton, L.A., 1965. The production and behavior of diploids of *Coprinus cinereus*. *Genet. Res.* 6, 190-208.
 5. Casselton, L.A. and D. Lewis, 1966. Compatibility and stability of diploids in *Coprinus cinereus*. *Genet. Res.* 8, 61-72.
 6. Davis, B.J., 1964. Disc electrophoresis 2. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.
 7. Flegel, T.A., 1981. Conjugation process in the jelly fungus *Sirobasidium magnum*. *Can. J. Bot.* 59, 929-938.
 8. Franklin, A.L., W.G. Filion and J.B. Anderson, 1983. Determination of nuclear DNA content in fungi using mithramycin: vegetative diploidy in *Amillaria mellea* confirmed. *Can. J. Microbiol.* 29, 1179-1183.
 9. Heath, I.B., 1982. Fluorescent staining of fungal nuclei. p. 169-171. In M. Fuller and A. Jaworski (ed.), Zoosporic fungi in teaching & research.
 10. Kim, W.K. and H.J. Reisener, 1988. Evidence for binding between host proteins and pathogen wall components in the wheat stem rust system from affinity protein blotting technique. *Can. J. Bot.* 66, 1702-1706.
 11. Koltin, J. and J.R. Raper, 1968. Dikaryosis: Genetic determination in *Schizophyllum*. *Science* 160, 85-86.
 12. McCoy, W.F. and B.H. Olson, 1985. Fluorometric determination of the DNA concentration in municipal drinking water. *Appl. Env. Microbiol.* 49, 811-817.
 13. Oberwinkler, F. and R.J. Bandoni, 1983. *Trimorphomyces*: a new genus in the Tremellaceae. *System. Appl. Microbiol.* 4, 105-113.
 14. Paul, J.H., 1982. Use of Hoechst 33258 and 33342 for enumeration of attached and planktonic bacteria. *Appl. Env. Microbiol.* 43, 939-944.
 15. Powell, W.A. and N.K. Van Alfen, 1987. Two nonhomologous viruses of *Cryphonectria parasitica* reduce accumulation of specific virulence-associated polypeptide. *Am. Soc. Microbiol.* 169, 5324-5326.
 16. Principato, G.B., G. Rosi, V. Talesa, E. Giovannini and L. Uotila, 1987. Purification of characterization of two forms of glyoxalase II from the liver and brain of Wister rats. *Biochem. Biophys. Acta* 911, 349-355.

(Received February 1, 1993)

(Accepted February 20, 1993)

ABSTRACT: Cell Biological Characteristics of *Trimorphomyces papilionaceus* diploid

Chung, Hae Sook, Hyoung Tae Choi* and Kwon Sang Yoon (Department of Microbiology, Kangwon National University, and Rearch Center for Molecular Microbiology, Seoul National University)

The growth rate, survival rate after U.V. irradiation and relative nuclear content of *T. papilionaceus* diploid which was isolated from the dikaryon by spontaneous mutation had been determined by comparing with monokaryon and dikaryon. The nuclear DNA of diploid was similar to that of the dikaryon and had approximately twice as much nuclear DNA as the monokaryon. While the monokaryon showed one band in glyoxalase II isozyme in native PAGE, the diploid and the dikaryon had two major bands whose banding patterns were identical. Dikaryon specific proteins larger than M.W. 66,000 were appeared and diploid specific proteins between M.W. 24,000 and M.W. 29,000 were showed in two dimensional PAGE.