

*Coprinus congregatus*의 분화와 Phenoloxidase와의 관계

최 형 태
(강원대학교 자연과학대학 미생물학과)

Phenoloxidases and Photomorphogenesis in *Coprinus congregatus*

Hyoung Tae Choi
(Dept. of Microbiology, Kangwon University, Chuncheon)

Abstract

There have been many reports that phenoloxidase are correlated with development in many fungi. *C. congregatus*, one of mushroom-forming basidiomycetes, which requires light for its development also has phenoloxidases.

In *C. congregatus*, there are two sets of membrane-associated phenoloxidase (PHO I and PHO II) which are differentiated by their isozyme patterns, and each enzyme set consists of two different substrate specific enzyme protein; o-tolidine reacting enzyme, and DOPA reacting enzyme. PHO I which is localized by a protoplast-concanavalin A technique by using a new solidifying agent, Pluronic Polyol F 127, instead of agar appears in the vegetative hyphae, and PHO II appears at the early primordial stage on agar and at the sclerotial stage of liquid shake cultures. Inhibition of PHO I with the enzyme inhibitors inhibits mushroom formation as well as melanization of the vegetative hyphae at concentrations which do not inhibit the vegetative growth. PHO I deficient mutants do not form mushrooms or melanins, and the mutants show abnormal nuclear migration patterns. PHO II has roles; possibly cementing the adjacent hyphae during the actual three dimensional structure formation, and melanizing mushrooms and sclerotia. The possible roles of PHO I in the light reception complex and in melanin formation, the function of melanin, and possible roles of postulated post translational modifying enzymes which regulate the phenoloxidases, nuclear

migration pattern, and self-nonsel self recognition mechanism are discussed.

서 론

곰팡이는 일반적으로 분화가 일어나기 위하여 여러 자극들을 필요로하는 데 빛, 영양의 소실, CO₂의 농도등 다양하며 곰팡이의 종류에 따라 다른 자극이 요구된다.

자연계에 존재하는 빛에 의한 생물체의 분화는 그 작용과장에 의한 분류로 붉은색을 흡수하는 phytochrome에 의한 것과 푸른색에 의하여 일어나는 것등 두 종류가 있다. 곰팡이는 chlorophyll이나 phytochrome이 없는 반면 푸른색은 곰팡이의 생활사에 중요한 요인이 된다(Senger, 1982). 예를 들면 *Phycomyces*(Bergman et al., 1969; Cerda-Olmedo, 1977)와 *Trichoderma*(Galun, 1971)의 photophoresis, *Cochliobolus*의 sporulation(Chang, 1980), *Cyathus*(Lu, 1965)와 *Coprinus* (Manacherse, 1977)의 fruiting body형성등 곰팡이의 reproduction과 빛이 직접 연관된 것들이 있으며 *Phycomyces*(Bergman et al., 1969; Cerda-Olmedo, 1977)와 *Neurospora*(Zarokar, 1955)의 photocarotenogenesis, *Phycomyces*(Bergman et al., 1969; Cerda-Olmedo, 1977)와 *Pilobolus*(Page, 1962)의 phototropism등 빛에 의하여 많은 종의 곰팡이의 metabolism과 development가 영향을 받는다. 위와 같은 것들 중에서 다세포 생물에서 나타나는 분화의 특징인 여러가지 다른 기능을 가진 조직(tissue)의 형성에 대한 좋은 본보기를 제시하여 주는 것은 담자균류의 자실체 형성이라고 할 수 있다.

한편 곰팡이의 포자 및 포자생성기관은 녹색, 갈색, 흑색등 phenoloxidase의 산물인 melanin색소를 가지는 경우가 많으며 phenol oxidase가 곰팡이의 분화와

관련이 있다는 보고는 많이 있다. *Podospora*(Esser, 1968) *Schizophyllum*(Leonerd, 1971)등은 phenol oxidase가 fruiting body 형성에 직접 연관되어 있으며 *Aspergillus nidulans*(Clutterbuck) 경우 conidiospore의 성숙(maturation)에 이 효소가 관여한다. 버섯 형성균류의 하나인 *Coprinus congregatus*는 자실체 형성에 빛을 필요로 하고 이때 phenol oxidase가 중요한 역할을 하는 것으로 나타났으며 phenoloxidase와 mutant를 이용하여 이 효소가 *C. congregatus*의 분화에 미치는 영향을 조사하였다.

본 론

*Coprinus congregatus*의 생활사(life cycle)는 Fig.1과 같다. 다른 *Coprinus* spp.와는 달리 *C. congregatus*는 clamp connection이 없으며, 정상적으로 dikaryon만이 버섯을 형성할 수 있는데 dikaryon을 만드는 교배(mating)는 multiple allele, unifactorial mating type system에 의하여 이루어진다(Ross, 1979). *C. congregatus*는 적어도 3일 이상 자랐을 때에만 빛(445nm)의 자극에 반응할 수 있고 균사의 끝부분(hyphal tip)의 phenol oxidase activity가 가장 높으며 버섯 역시 빛의 자극을 받았을 당시의 hyphal tip에 생긴다 (Fig.2). 빛이 없는 곳에서 배양한 culture의 경우 3일째부터 매일 자라는 zone이 빛이 자극에 반응할 수 있고 그 전일(previous day)에 자라는 zone은 반응능력을 상실하며 3일 이상 자란 culture에 빛을 주면 그 다음 3일 동안 자라는 zone은 비록 phenol oxidase activity가 높지만 빛의 자극에 반응할 능력을 상실한다(Ross, 1985).

빛에 의한 분화의 유도는 2단계로 나눌 수 있는데 $50 \text{ E/ m}^2/\text{sec}$ 의 양을 5초내지 30분간 조사하면(Fixation I step) phenol oxidase activity가 저하되고 melanin생성이

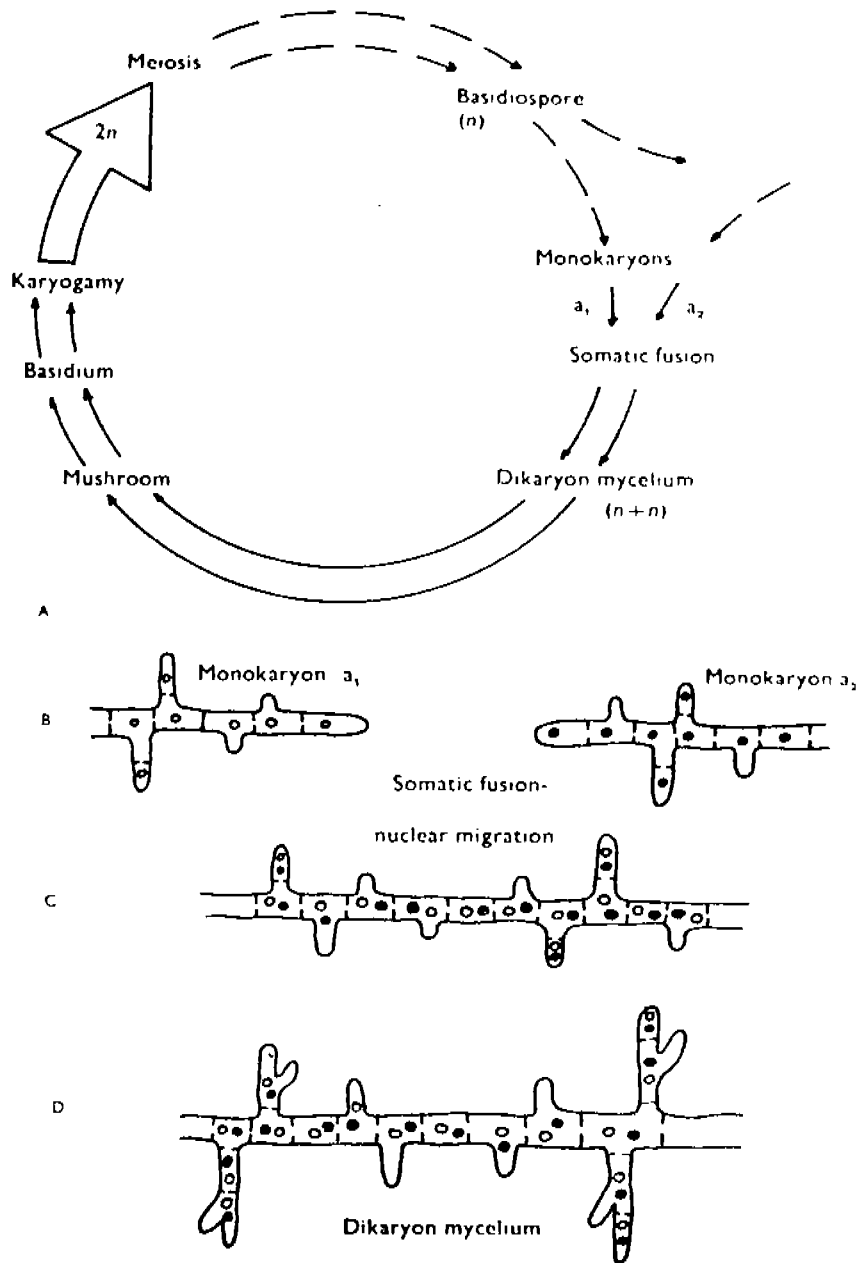


Fig. 1. Generalized life cycle and dikaryon formation.

A. Life cycle. $2n$; diploid, n ; haploid, a_1 & a_2 ; two compatible mating type alleles. B. Two compatible heterokaryons with uniuaculate cells branching at right angle. C. Same after fusion of apical cells & reciprocal migration of nuclei to make dikaryotic cells. D. Same after new growth from the dikaryotic cells branching now acutely.

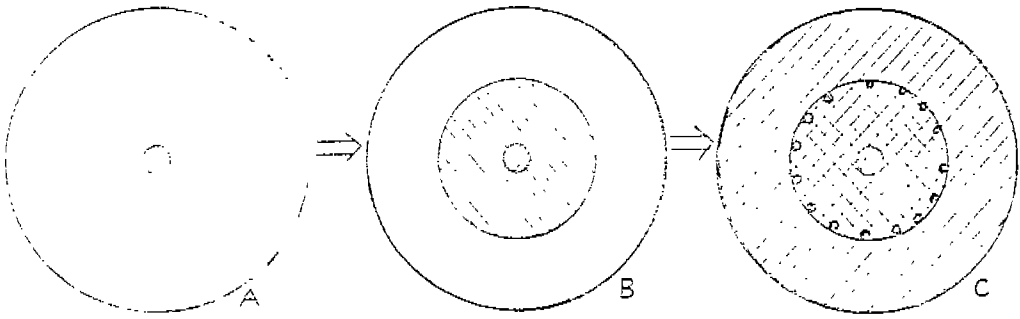


Fig. 2. Light effect on dark-grown culture.

A. Grow in the dark at 25C after inoculation. B. After 4 days give light for 3 hrs, then back to the dark. C. After 10 days, mushrooms grown on the hyphal tip zone where light was given.

시작되나 더이상 분화의 진행은 나타나질 않는다. Fixation I step의 3시간 내지 수일후 동일 양의 빛을 조사하면(Fixation II step)분화의 실제적인 발현이 시작되고 다음 3일 동안 자라는 zone의 빛에 대한 반응능력의 억제도 나타난다(Ross, 1985).

Phenol oxidase는 monophenol oxidase(E.C.1.14.18.1), catechol oxidase(E.C.1.10.3.1)와 laccase(E.C.1.10.3.2)로 나눌 수 있는데(Mason, 1957) *C. congregatus*는 catechol oxidase와 laccase activity를 가지고 있으며(Choi, 1986) 각각의 enzyme substrate를 catechol oxidase는 3, 4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)를 laccase는 o-tolidine을 사용하였다. 대부분의 fungal phenol oxidase와는 달리 *C. congregatus*의 경우는 membrane-associated enzyme이며 mediun으로 분비되지 않는다(Ross, 1982). 본 균주를 액체진탕 배양하여 mycelial pellet으로부터 protoplast를 얻어 phenol oxidase activity가 cell membrane 에 있음이 보고되었으나(Swords, 1984) 액체진탕 배양에서는 버섯이 형성되지 않고 Sclerotia가 형성되었으며 이때 phenol oxidase를 non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)에 의해 분리한 결과 agar culture의 hyphal tip enzyme(POXI)과는 다른 band pattern을 보였다(Choi *et al.*, 1987). 3차구조를 만들때 즉 Sclerotium과 primordium(초기버섯)에 있는 phenol oxidase(POX II)의

PAGE에 의한 band pattern은 서로 동일하므로 agar culture 의 hyphal tip enzyme이 membrane associated enzyme이라는 것을 증명하는 것이 필요하며 이는 Agar대신 cold temperature liquifying agent인 Pluronic Polyol F127(Gardener & Joner, 1984)을 사용하여 실험하였다. agar대신 Pluronic Polyol을 25%(w/v)농도로 solidifying agent로써 사용하여 균을 배양하고 hyphal tip을 sampling한 후 4 C에서 약 1시간 정도 보관한 다음 액체상태로 변한 medium을 물로 잘 세척하고 hyphal tip에서 protoplast를 얻고 cell membrane에 enzyme activity가 있음을 증명하였다(Choi, 1986).

Phenol oxidase inhibitor를 3가지 P-aminobenzoic acid, phenylthiourea, sodim thioglycollate 사용하여 본 균주의 분화에 대한 영향을 조사한 결과 균의 성장에 큰 영향을 미치지 않는 정도로 enzyme activity를 저하시켰을때 melanin색소 형성과 비섯형성에 비정상적인 결과를 유발하였으나 이는 두종류의 enzyme-catechol oxidase와 laccase의 activity를 거의 비슷하게 억제했을 뿐만 아니라 POX I과 POX II activity 모두 억제하였고 균체내의 여러 oxidoreductase의 activity에도 변화를 유발하였을 가능성이 아주 높기 때문에 phenol oxidase activity가 없거나 변화된 phenol oxidase mutant를 사용하여 그 역할을 실험하였다.

Mating type이 a_1 인 homokaryon을 애체진탕 배양한 후 waring blender로 수초간 처리하여 얻은 suspension에 UV를 조사하여 mutant를 얻었다. Wild type은 catechol oxidase와 laccase를 가지고 있는데 비하여 M3F7 mutant는 catechol oxidase만 가지고 있고 M3G2는 PAGE의 band pattern이 다른 laccase만을 가지고 있다(Fig.3).

이들 mutant를 a_2 mating type을 가진 wild type과 교배하였을 때 모두 정상적인 dikaryon을 형성하였으며 이때 생성된 dikaryon의 hyphal tip enzyme(POX I)은 모두 wild type dikaryon의 POX I과 동일한 band pattern을 가지고 있다. 동일한

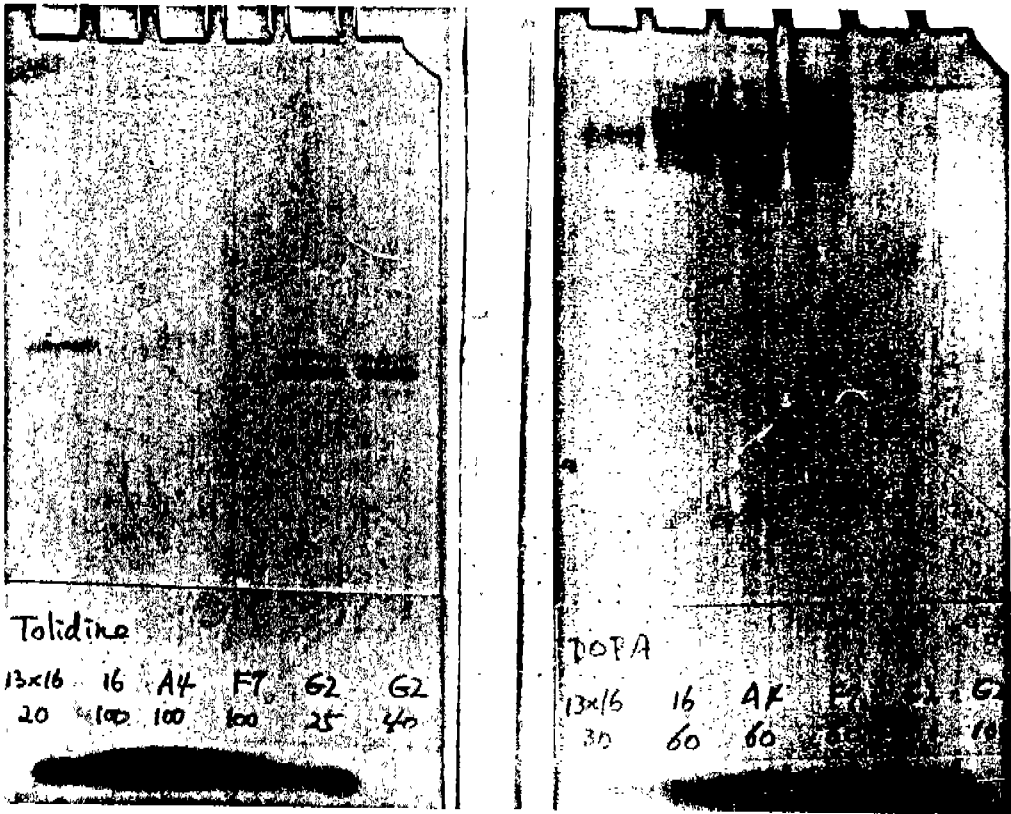


Fig. 3. Non-denaturing, native polyacrylamide gel analysis of crude extract. | 13x16; dikaryon(a1a2), 16; homokaryon(a1), A4; mutant M3A4, F7; mutant M3F7, G2; mutant M3G2, Left half; stained with o-toluidine, Right half; strains with DOPA.

mutant의 형질을 지닌 a_1 과 a_2 를 교배하였을 때에는 dikaryon의 생성이 이루어지지 않았으나 서로 다른 mutant의 형질을 지닌 a_1 과 a_2 의 교배는 성공적으로 이루어졌다. (Fig.4). 서로 다른 mating type을 가진 두 homokaryon이 교배될 때는 nuclear migration이 두 homokaryon쪽으로 동시에 일어나는데 (Fig.1) POX I mutant와 wild type의 교배시에는 mutant가 자란 zone의 바깥쪽에서만 버섯이 생성되며 mutant는 상대방의 nucleus를 받아들이지는 않고 자신의 것을 주기만하는 nuclear migration mutant이기도 하다. Phenol oxidase가 nuclear migration을 조절하는지 실험하기 위하여 두 wild type homokaryon (a_1 , a_2)을 3가지의 phenoloxidase



Fig. 4. Cross of compatible mutant strains with different phenotypes. M3F7(a1) x M3G2(a2).

inhibitor를 넣은 배지 상에서 교배한 결과 enzyme activity가 90%이상 억제되었을 때에도 nuclear migration은 정상 적으로 일어났으므로 POX I이 nuclear migration에 직접 연관된 것이 아니다. POX I mutant들은 enzyme의 band pattern으로 보아 structural gene mutation이라기 보다는 post translational modification system에 mutation이 일어난 것으로 추측되며 이것이 phenol oxidase와 nuclear migration을 regulation하는 기능을 가지고 있는 것으로 판단된다.

결 론

Phenol oxidase는 일반적으로 melanin 합성에 관여하고 있으며 반응 중간 산물이 *in vitro*에서 cell membrane의 permeability를 변 화시키고(Cory,1967) DNA의 물리화학적인 성질을 변화시키며(Miranda *et al.*,1984) 반응 산물중 특히 quinone류들이 hyphae의 surface component와 oxidative polymerization에 의하여 cross-linking을 유도한다(Leatham & Sthamann,1981;Moore,1965).

*C. congregatus*는 developmental stage에 따라 PAGE의 band pattern이 다른 POX I과 Pox II가 있으며 이들은 그 substrate specificity로 보아 각각 catechol oxidase와 laccase를 동시에 가 지고 있다. POX I은 solid medium culture의 hyphal tip에 있으 며 POX II는 sclerotium과 primordium에 있다. POX I은 빛을 받은 후 (Fixation I step) 그 activity가 곧바로 떨어지며 Fixation II step에는 POX I의 activity가 없어도 분화가 정상적으로 일어나므로 빛의 자극을 전달하는 Fixation I step에 관여하는 것으로 판단되며 그 후 enzyme activity의 저하는 reactive quinone을 더 이상 만들지 않 음으로써 자신에게 해를 앓기 위한 예방책이라고 볼 수 있다. Primordion 형 성시 POX II가 나타나는 것은 oxidative polymerization에 의한 hyphal의 cross-linking을 위한 것으로 판단되며 POX II activity 도 primordium의 크기가 1 cm정도일 때에는 이미 그 activity가 거의 사 라지는 것으로 보아 자신의 방어작용이라고 볼 수 있다.

이와같이 *C. congregatus*는 분화 단계에 다른 phenol oxidase군이 차례로 나타나며 이들중에서 solid medium culture의 hyphal tip enzyme은 light signal을 전달하는 기능을, primordium의 enzyme은 hyphal의 cross-linking을 유도하는 기능을

가졌다.

참 고 문 헌

1. Bergman, K. et al. (1969). *Bact. Rev.* 33; 99-157.
2. Cerda-Olmedo, E. (1977). *Ann. Rev. Microbiol.* 31; 535-547.
3. Chang, H.S. (1980). *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 74; 642-643.
4. Choi, H.T. (1986). Ph.D. Thesis U.C.Santa Barbara, California.
5. Choi, H.T. *et al.* (1987). *Mycol.* 79; 166-172.
6. Clutterbuck, A.J. (1972). *J.Gen.Microbiol.* 70;423-435.
7. Cory, J.G. (1967). *J.Biol.Chem.* 242;218-221.
8. Esser, K. (1968). *Genet.* 60; 281-288.
9. Galun, E. (1971). *Plant Cell Physiol.* 12; 779-783.
10. Gardener, S., & J.G.Jones. (1981). *J.Gen.Microbiol.* 130;731-733
11. Leatham, G.F., & M.A.Sthmann. (1984). *J.Gen.Microbiol.* 125;147-157.
12. Leonard, T.J. (1971). *J.Bact.* 106;162-167.
13. Lu, B.C. (1965). *Am. J.Bot.* 52;432-437.
14. Manchere, G. (1977). In *Biotechnol. & Fungal Differentiation.* J.Meyrath & J.D. Bullock(ed). 43-65. Academic Press.
15. Mason, H.S. (1957). *Adv. Enzymol.* 19;70-233.
16. Miranda, M. *et al.* (1984). *Mol.Gen.Genet* 193; 395-399.
17. Moore, E.J. (1965). *Am.J.Bot.*52;389-395.
18. Page, R.M. (1962). *Sci.*138;1238-1245.
19. Ross, I.K. (1979). In *Viruses & Plasmid In Fungi.* P.A.Lemke(ed). 485-524. Marcel Dekker Inc.
20. _____(1982). *J.Gen.Microbiol.* 128; 2763-2770.
21. _____(1985). In *Develop.Biol. of Higher Fungi.* D.Moore *et al*(ed). 353-373. Cambridge Univ. Press.
22. Senger, H. (1982). *Photochem.Photobiol.* 35; 911-920.
23. Swords, K.M.M.S. (1984). MA Thesis. U.C. Santa Barbara, California.

저 자 약 력

최 형 태 (崔 炯 泰) 박사

- 1974. 2 서울대학교 미생물학과 (이학사)
- 1979. 2 서울대학교 대학원 미생물학과 (이학석사)
- 1987. 3 미국 California대학교 Santa Barbara 생물학과 (Ph. D.)
- 1987-88 미국 San Diego, Scripps 연구소 분자생물학연구소 연구원
- 1988. 5 - 현재 강원대학교 미생물학과 교수