

# *Micromonospora*屬 菌株들의 protoplast生成, 菌絲體로의還元 및 融合에 대한 研究

金 洸 秀 · 李 世 永\*

(韓國科學技術院 生物工學科 · \*高麗大學校 農科大學 農化學科)

## Formation, Regeneration, and Fusion of Protoplast of *Micromonospora* spp.

KIM, Kwang Soo, and Se Yong LEE\*

(Dept. of Biological Science and Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, \*Dept. of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Korea University)

### ABSTRACT

Conditions for efficient formation and regeneration of protoplasts of *Micromonospora rosaria* and *Micromonospora purpurea* were investigated. The state of inoculum, culture stage and growth in a medium containing partially growth-inhibiting concentration of glycing have significant effects on protoplasting. A high frequency of regeneration (up to 30%) was accomplished with a hypertonic regeneration agar medium defined by Okanishi for *Streptomyces*.

Using the optimal conditions for protoplasting and regeneration, protoplast fusion of auxotrophic *M. rosaria* was carried out. Polyethylene glycol 1,000 was chosen for fusogenic agent. When single auxotrophs were used, the recombinant frequency of auxotrophic markers varied from 1.3 to 3.2%. Using two double auxotrophs, the recombinant frequencies of 0.7~4.3% were obtained. Much lower frequencies (three or more orders of magnitude) were observed by the conventional matings.

### 緒 論

박테리아의 protoplast는 이미 1950年代에 그 製造 方法 및 形態 觀察 등에 관한 基礎的인 結果가 보고된 바 있었다<sup>3,15)</sup>. 그러나 박테리아의 protoplast가 微生物의 遺傳學的 研究에 획기적인 수단으로 각광을 받게 된 것은 비교적 최근의 일이다. Sagara 등은<sup>14)</sup> *Streptomyces griseoflavus*를 부분적으로 成長을 抑制하는 정도의 glycine 농도를 함유한 培地에서 培養했을 때 효과적

으로 protoplast를 生成할 수 있음을 보임으로써 최초로 박테리아의 protoplast를 신속하게 또 反復가능하게 製造할 수 있는 方法을 결정했다. 이어서 Okanishi 등은<sup>12)</sup> 1974년에 生成되는 protoplast를 安定化시킬 수 있는 緩衝溶液과 원래의 菌絲形態로 再生시킬 수 있는 培養 培地를 開發하는데 성공하였다. 한편, 같은 해 Kao 등은<sup>8)</sup> 폴리에틸렌글리콜이 protoplast融合을 매우 효과적으로 誘發할 수 있음을 발견하고 이를 植物細胞의 融合에 사용하였다.

上記한 研究 結果 등을 기반으로 하여 Foder

등과<sup>4)</sup> Hopwood등은<sup>7)</sup> 각각 *Bacillus*屬과 *Streptomyces*屬의 박테리아에 대하여 최초로 protoplast融合을 微生物의 遺傳學的 研究에 성공적으로 導入하였다. 그 이후 여러 종류의 박테리아에 대하여 protoplast融合에 대한 研究 結果가 報告되어 왔다(Reference 6 참조). 그림 1은 이제까지 사용되어 온 protoplast融合實驗 과정들을 일

반화 하여 간단히 圖表로 나타낸 것이다.

*Micromonospora*속의 微生物들은 여러가지 다양한 抗生劑를 生成하는 主要한 放線菌의 한 group이면서도<sup>17)</sup>, 그 基礎 및 遺傳學的인 研究가 매우 缺如되어 있었다. 1980年 Szvoboda등은<sup>16)</sup> *Micromonospora*의 protoplast融合에 대하여 처음으로 報告한 바 있으나 그 效率 등에서 다

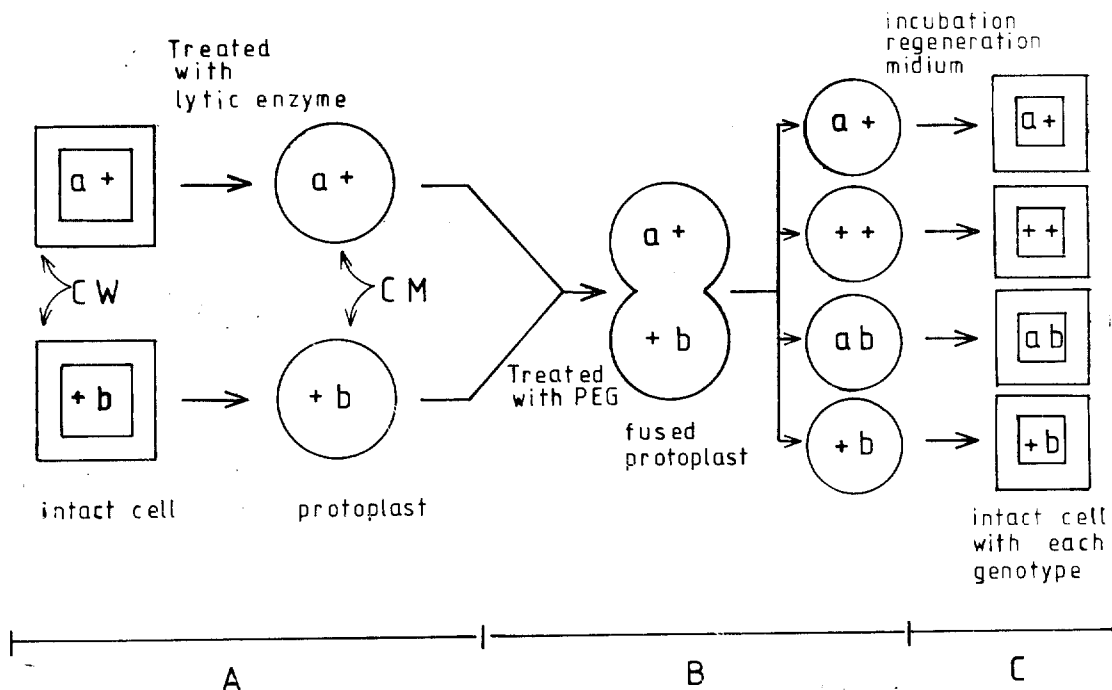


Fig. 1. Schematic procedure of fusion of bacterial protoplasts: A; Protoplast formation, B; Protoplast fusion, C; Regeneration of protoplasts.

소不振하여 *Micromonospora*에 속한 여러 菌株에 基本 procedure로 適用하기에는 부적합하였다. 이에 본인들은 protoplast融合에 대한 技術을 放線菌類에 확대 적용하여 일반적인 方法을 開發하여 이 微生物들의 遺傳學的 研究와 菌株 開發에 適用하기 위하여 *Micromonospora rosaria*와 *M. purpurea*를 가지고 研究를 수행하였다.

材料 및 方法

菌株 本 實驗에서 사용한 菌株은 macrolide계 抗生物質인 rosamicin 生産菌株인 *M. rosaria*와 aminoglycoside系 抗生物質 gentamicin의 生産菌株인 *M. purpurea*였다. 이들은 일반적인 放線

菌類와 달리 孢子 形成이 극히 制限되어 있었으며 여러 環境因子에 매우 敏感한 微生物이었다.

培地 本 菌株들의 培養을 위해 複合培地로 GER medium을 사용하였으며 이는 리터당 비프익스트랙트 3g, 트립톤 5g, 포도당 1g, 可溶性 전분 24g, 이스트익스트랙트 5g, CaCO<sub>3</sub> 2g을 含有하였고 pH는 7.6으로 調整하였다. 單純培地로는 M40 medium<sup>13)</sup>을 사용하였다. protoplast의 生成과 菌絲體로의 還元을 위하여는 Okanishi 등<sup>12)</sup>이 開發한 培地를 基本 培地로 사용하였다.

Protoplast의 生成 및 觀察 GER 培地에서 培養된 菌體를 遠心分離(7,000rpm, 10分)하여 medium P<sup>12)</sup>로 洗滌한 후 다시 振盪시키고 여기에 細胞壁 分解酵素인 lysozyme을 처리하였다.

一定 시간 간격으로 sample을 취하여 적절한 濃度로 희석한 후 位相差顯微鏡과 haemocytometer를 사용하여 生成된 protoplast를 定量하였다.

**Protoplast의 菌絲體로의 還元** 生成된 protoplast는 medium P를 사용하여 적절히 희석한 후 還元 培地에 plating 하였다. 30°C에서 약 8~10일 培養한 후 群落의 形態와 숫자를 확인하였다. 이때 Okanishi 등<sup>12)</sup>의 還元培地를 基本으로 하여 *Micromonospora*에 適合하도록 각 成分의 濃度を 결정하였다. Protoplast로 되지 않은 菌絲 조각에서 由來한 群落은 증류수로 稀釋하고 plating 한 후 자란 群落으로서 比較, 확인되었다.

**Protoplast 融合** Cross 하고자 하는 2가지 strain의 protoplast를 誘導한 다음 이들을 섞어 medium P에 振盪시켜 각각 약  $1 \times 10^9$ 개의 protoplast가 2ml 속에 들어가게 하였다. 여기에 PEG 1,000을 처리하여 최종 濃도가 50% 되게 하고 약 5分間 32°C에서 放置한 후 遠心分離(5,000rpm, 10分)로 PEG를 제거하고 medium P로 稀釋하여 還元培地 위에 0.1ml씩 plating하였다. 이 때 非營養要求 再組合體 群落을 확인하기 위해 還元培地에 관련된 아미노산 등을 添加한 것과 添加하지 않은 것을 同時に 사용하였으며 이들을 32°C에서 8~10일 동안 培養하면서 觀察하였다.

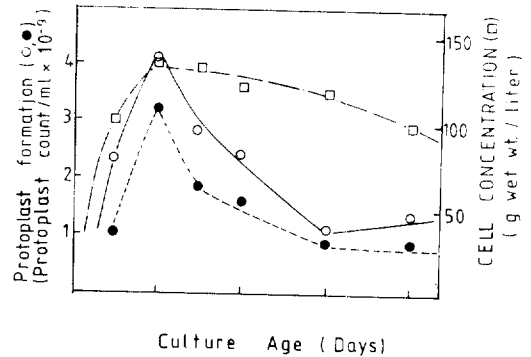
**正常交雜** Ochi 등<sup>10)</sup>의 方法을 약간 修正하여 사용하였다.

## 結果 및 考察

### 1. *Micromonospora* 菌株의 效率인 protoplast 生成

거의 대부분의 박테리아들은 매우 堅固한 細胞壁에 의해서 둘러싸여 있다. 細胞融合 등의 protoplast를 利用한 研究에 있어서 박테리아의 細胞壁을 손쉽게 除去하여 多量의 protoplast를 效率의으로 획득하는 것은 가장 基礎的이고 重要한 段階가 된다. 均一한 條件으로 培養시킨 *M. rosaria*菌이 각 成長段階에서 protoplast가 生成되는 效率을 測定, 比較해본 결과(그림 2), logarithmic phase가 거의 끝나갈 때 가장 效果의임을 알 수 있었다. 특히 *M. rosaria*菌의 成

長段階가 變함에 따라 protoplast 生成效率은 아주 현저하게 차이가 나는 것으로서 본 菌株의 細胞壁 成分의 成長段階에 따른 變化를 豫測할 수 있었다.



**Fig. 2.** Effect of culture age on protoplasting and growth (without glycine) (treatment time: 1.5hrs(●), 5hrs(○) lysozyme concentration: 2mg/ml buffer)

Sagara 등<sup>14)</sup>이 그 效果를 발견한 이래 여러 放線菌에서 成長培地에 glycine을 添加함으로써 protoplast 生成을 促進할 수 있음이 報告되었다<sup>5,7)</sup>. Glycine의 이와 같은 效果는 아직 確實히 糾明되지 않았으나 細胞壁의 成分을 變化시킴으로써 誘發되리라고 推定되었다<sup>5,6)</sup>. 그러나 본인들이 glycine외에 다른 아미노산들에 대하여 그 效果를 조사해본 결과, 유일하게 glycine만이 protoplast 生成을 促進하는 效果를 나타냈으며 이는 glycine만이 실험한 濃度(0.07~0.15%)에서 *M. rosaria*菌의 成長을 阻害한다는 사실과 일치하였다. 또한 glycine의 最適 濃度は 0.075%로 결정되었으며 이 濃度에서 *M. rosaria*菌은 부분적으로 成長이 阻害되었다. 다른 放線菌의 경우 菌株에 따라 glycine은 1.0~3.5%<sup>5,7)</sup>의 濃度로 사용되었으며 모두 각 菌의 成長을 阻害하는 濃度였다. 이와 같은 사실로써 glycine이 protoplast 生成을 促進하는 것은 菌絲體의 成長을 阻害하는, 즉 성장속도를 낮추는 現象과 관련되어 있음을 示唆한다.

細胞壁 分解酵素로 사용한 lysozyme의 濃度を 變화시켰을 때 1mg/ml에 거의 maximum에 도달했으며(그림 3), 2mg/ml 이상에서는 增加 效果가 없었으므로 2mg/ml의 濃度로써 實驗하였

다. 한편, 몇몇 學者들은 보다 효과적으로 protoplast를 生成하기 위해 lysozyme에 lytic enzyme를 添加 사용하였다<sup>7,12)</sup>. Basidiomycetes에서 分離된 (Sigma제품) lytic enzyme의 添加效果를 조사한 결과(표 1), 약간의 增加를 觀察할 수 있었으나 현저한 차이는 없었으므로 lysozyme만

같은 效率로 protoplast를 生成시킬 수 있었다.

2. 細胞壁의 再生과 菌絲體로의 還元

Protoplast를 이용한 微生物의 遺傳學的 研究에 있어서 除去된 細胞壁의 再生을 통한 菌絲體로의 還元은 가장 중요하고도 必須의 단계이다<sup>2,10)</sup>. 여러 放線菌들에 대하여 數種의 再生培

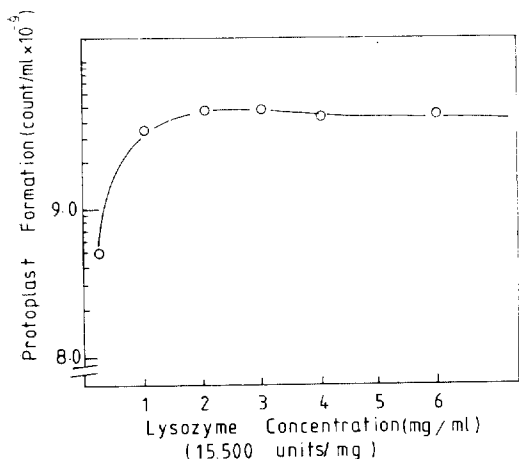


Fig. 3. Effect of lysozyme concentration on protoplasting efficiency (enzyme treatment: 2hrs)

Table 1. Effect of the addition of lytic enzyme on the protoplasting and regeneration.\*

Concentration of added lytic enzyme(mg/ml)	Protoplast formation after 2hr reaction	Regeneration frequency(%)
0	1.2×10 <sup>9</sup> /ml	25
0.17	1.4×10 <sup>9</sup> /ml	NT**
0.33	1.6×10 <sup>9</sup> /ml	25.7
0.67	1.6×10 <sup>9</sup> /ml	NT
1.0	1.7×10 <sup>9</sup> /ml	22.3

\*: Protoplasting and regeneraidon were performed under the optimized conditions.

\*\* : NT; not tested.

으로 사용하였다.

위에서 決定된 最適 條件 등을 사용하여 均一하게 菌體를 키웠을 때 lytic enzyme만으로도 1시간 미만의 反應으로써 거의 100% 效率로써 protoplast를 生成시킬 수 있었다. 그림 4,5는 反應 前과 反應 後의 protoplast生成을 位相差顯微鏡으로 觀察한 것이다. 그리고 *M. rosaria*에 대하여 결정된 條件으로써 *M. purpurea*도 거의

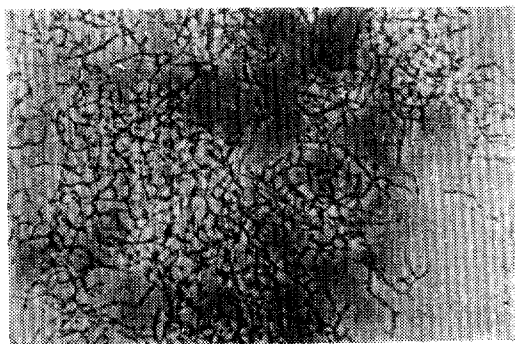


Fig. 4. Phase contrast microscopy of intact mycelia of *M. rosaria*(×900)

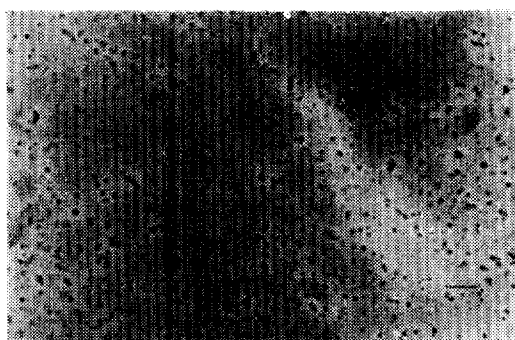


Fig. 5. Phase contrast microscopy of protoplasts of *M. rosaria*. Mycelial fragments are rarely seen.

地가 開發되어 菌株마다 약간씩 變化시켜서 사용되고 있다<sup>10,11,12)</sup> 豫備的으로 테스트해본 결과 이 가운데 Okanishi<sup>12)</sup>등이 開發한 R1 배지가 *Micromonospra*의 再生에 가장 좋았으므로 이를 基本 培地로 사용하였다. 표 2는 *M. rosaria*의 再生培地에서 窒素源으로 사용한 아미노산을 달리했을 때의 效果를 보여주고 있으며 아스파라진이 가장 좋았다. 滲透壓에 의한 protoplast의 破손을 막기 위해 sucrose를 添加하였으며 이때 添加濃度의 效果 및 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>의 效果는 표 3에서 나타나고 있다. 각각 12.5%(w/v)과 0.025%(w/v)를 最適 濃度로 決定할 수 있었다. 그의 여러 成分 및 條件에 대하여 調査한 결과를 표

**Table 2.** Effect of amino acids added to the regeneration agar medium on regeneration efficiencies.

Amino acid*	Relative regeneration efficiencies
Asparagine	100
Arginine	10
Glutamic acid	61.5
Glutamine	22
Leucine	34.5
Proline	28

\*: Each amino acid was added at the concentration of 0.2% (w/v).

4에 나타냈으며 이 가운데 특히 pH를 약 알칼리로 調節하는 것이 매우 重要的 것으로 나타났

**Table 3.** Effects of concentration of sucrose and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  on the regeneration.

Sucrose(% w/v)	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (% w/v)	Regeneration efficiencies(%)
10	0	23.0
10	0.001	24.0
10	0.005	24.8
10	0.05	21.2
10	0.1	7.3
5	0.025	23.0
7.5	0.025	24.9
10.0	0.025	24.8
12.5	0.025	29.6
15	0.025	19.1
20	0.025	2.0

**Table 4.** Modification of Okanishi *et al.*'s R1 medium for regeneration of *M. rosaria* and *M. purpurea*.

Components	R1 medium	Modified medium for <i>M. rosaria</i>	Modified medium for <i>M. purpurea</i>
Sucrose	103~171g/liter	125g/liter	125g/liter
L-asparagine	2g/liter	4g/liter	—
L-proline	—	—	4.0g/liter
Casamino acid	0.1g/liter	0.1g*/liter	0.1g/liter
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4.1g/liter(20mM)	10.1g/liter(50mM)	10.1g/liter(50mM)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7.4g/liter(50mM)	3.0g/liter(20mM)	3.0g/liter(20mM)
pH of buffer	7.2	7.7	7.7
Regeneration temperature	28°C	32°C	32°C

\*: In fusion experiment, casamino acid is omitted to avoid formation of colonies arising from auxotrophs due to casamino acid supplement.

다. *M. purpurea*도 類似한 條件으로 결정되었으나 窒素源으로서는 아스파라진보다 프롤라인이 優秀하였다(표 4). 결정된 培地 위에서 再生시켰을 때 나타나는 群落들은 protoplast에서 由來한 true regenerant일 수도 있고 아직 protoplast로 되지 않은 菌絲 조각에서 由來할 수도 있다. 이들은 '材料 및 方法'에 나타난 過程으로 상호 識別되었으며 아울러 再生培地 위에서도 形態적으로 識別할 수 있었다(그림 6). 즉 true regenerant는 조그맣고 흰색을 띠는 群落으로 나타났으며, 菌絲 조각에서 由來한 群落들은 보다 크고 붉은 pigment를 보이는 群落으로 나타났다. 그러나 위에서 決定된 實驗 條件에서 後者に 속

**Fig. 6.** Morphological difference between regenerant colonies and colonies from nonprotoplasted mycelial fragment.

하는 群落들은 전체의 1% 미만이었다.

본인들이 開發한 方法으로써 *M. rosaria*와 *M. purpurea*의 protoplast들이 30%까지 再生됨을 觀察하였으며 이것은 Szvoboda등<sup>15)</sup>이 다른 *Micromonospora*에 대해 觀察한 頻度を 훨씬 증가하는 것이었다<sup>9)</sup>.

**3. Protoplast 融合에 의한 *M. rosaria* 菌株들의 遺傳子 再組合 頻度の 增加**

폴리에틸렌글리콜 1,000을 사용하여 分離된 數種의 *M. rosaria* 突然變異株들 사이의 交雜을 細胞融合으로써 誘發하였다. 먼저 사용된 單一 혹은 二重 營養要求株들이 偶發적으로 非營養要求株로 가는 頻도로 測定해본 결과 모두 다  $1.0 \times 10^{-9}$  per C.F.U. (Colony Forming Unit) 이하였

때 그 頻度 역시  $1 \sim 3 \times 10^{-6}$ /C.F.U.였다(표 5). 그러나 PEG를 처리한 결과, 再組合 群落의 頻度は  $1 \sim 3 \times 10^{-2}$ /C.F.U.로서 거의  $10^4$ 배나 增加하였다. 數種의 marker를 갖는 菌株들이 거의 다 이와 같은 頻도로 나타나는 것으로 보아 PEG에 의해 *M. rosaria*의 chromosome 全般에 걸쳐 이와같은 활발한 再組合이 誘發됨을 推定할 수 있었다. 이는 다른 Streptomycetes 菌株에서 報告된 높은 頻도에 相當하는 값이었다<sup>2,7)</sup>. 한편, 표 5에 나타난 바와 같이 MR28과 MR29 菌株는 PEG에 의해 높은 頻度の 再組合이 誘發되지 못했는데 이것은 이 두 菌株가 같은 parent에서 由來하였기 때문으로 보인다. 즉 이들은 똑같은 site에 突然變異를 갖고 있어서 PEG에

**Table 5.** Recombinant frequency between auxotrophic strains of *M. rosaria* by protoplast fusion and standard crossing.

Cross (genetic markers)	Prototrophic frequencies		Recombinant frequencies by standard crossing
	with PRG 1,000	without PEG	
MR18(trp)×MR20(lys)	$3.2 \times 10^{-2}$	$1.5 \times 10^{-5}$	NT*
MR18(trp)×MR4(ade)	$1.3 \times 10^{-2}$	$3.7 \times 10^{-5}$	NT
MR217(arg ura)×MR28(his trp)	$4.3 \times 10^{-2}$	$7.0 \times 10^{-7}$	$1.4 \times 10^{-4}$
MR210(ile ade)×MR221(arg his)	$0.7 \times 10^{-2}$	$3.1 \times 10^{-6}$	$2.8 \times 10^{-6}$
MR28(his trp)×MR29(ade trp)	$1.1 \times 10^{-6}$	NT	NT

\*: Not tested

다. 한편, 다른 誘發劑 없이 2가지 菌株들을 Standard crossing method<sup>10)</sup>으로써 交雜시켜 非營養要求로 나타나는 再組合 頻度を 測定하였을

의해서도 이 site는 再組合이 일어날 수 없기 때문에 非營養要求의 再組合 菌株가 나타나기 어려운 것으로 풀이 된다.

**摘 要**

*Micromonospora*의 Protoplast를 效果적으로 誘發하고 다시 菌絲形態로 還元시키기 위한 條件들을 조사하였다. Inoculum의 상태, 成長段階, 培地에 glycine을 넣어서 부분적으로 成長을 抑制하는 것 등이 매우 重要하였다. Protoplast의 還元을 위한 培地로는 Okanishi가 *Streptomyces*의 protoplast를 위하여 開發한 還元培地가 가장 適合하였는데 이 培地를 사용하여 30% 정도의 *Micromonospora rosaria* protoplast의 還元率을 얻었다.

Protoplast의 生成과 還元の 最適 條件을 사용하여 *M. rosaria* 營養要求株의 protoplast 融合實驗을 수행하였다. 分子量 1,000의 PEG를 사용하여 單一 營養要求株들 간에 實驗하였을 때 遺傳子 再組合 頻度は  $1.3 \sim 3.2\%$  정도였으며 二重營養要求株들을 사용하였을 때는 再組合 頻도가  $0.7 \sim 4.3\%$  정도였다. 이들 營養要求株들의 正常 交雜頻度は protoplast融合에 의한 遺傳子 再組合 頻도보다 대략  $\frac{1}{1,000}$  이하였다.

## 引用文献

1. Alföldi, L. 1982. Fusion of microbial protoplasts: problems and perspectives. p.59~71. In A. Hollanender(ed.). Genetic engineering of microorganisms for chemicals. Plenum Press.
2. Baltz, R.H. 1978. Genetic recombination in *Streptomyces fradiae* by protoplast fusion and cell regeneration. *J. Gen. Microbiol.* **107** : 93~102.
3. Bradley, S.G. 1959. Protoplasts of *Streptomyces griseus* and *Nocardia Paraguayensis*. *J. Bacteriol.* **77** : 115~116.
4. Fodor, K., and Alföldi, L. 1976. Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73** : 2147~2150.
5. Hammes, W., Schleifer, K.H., and Kandler, O. 1973. *J. Bacteriol.* **116** : 1029~1053.
6. Hopwood, D.A. 1981. Genetic studies with bacterial protoplasts. *Ann. Rev. Microbiol.* **35** : 237~272.
7. Hopwood, D.A., Wright, H.M., Bibb, M.J., and Cohen, S.N. 1977. Genetic recombination through protoplast fusion in *Streptomyces*. *Nature*(London). **268** : 171~174.
8. Kao, K.N., and Michayluk, M.R. 1974. Method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta*, **115** : 355 : 367.
9. Kim, K.S., Ryu, D.Y., and Lee, S.Y. 1983. Application of protoplast fusion technique to genetic recombination of *Micromonospora rosaria*. *J. Gen. Appl. Microbiol. in press*.
10. Ochi, K., Hitchcock, M.J.M., and Katz, E.1979. High frequency fusion of *Streptomyces parvulus* or *Streptomyces antibioticus* protoplasts induced by polyethylene glycol. *J. Bacteriol.* **139** : 984~992.
11. Oh, Y.K., Speth, J.L., and Nash, C.H. 1980. Protoplast fusion with *Streptosporangium viridogriseum*. *Dev. Ind. Microbiol.* **21** : 219~226.
12. Okanishi, Mf, Suzuki, K., and Umezawa, H. 1974. Formation and reversion of Streptomycete protoplasts: cultural conditions and morphological study. *J. Gen. Microbiol.* **80** : 389~400.
13. Polsinelli, M., and Beretta, M. 1966. Genetic recombination in crosses between *Streptomyces aureofaciens* and *S. rimosus*. *J. Bacteriol.* **91** : 63~68.
14. Sagara, Y., Fukui, K., Ota, F., Yoshida, N., Kashiyama, T., and Fujimoto, M. 1971. Rapid formation of protoplasts of *Streptomyces griseoflavus* and their fine structure. *Jap. J. Microbiol.* **15** : 73~84.
15. Sohler, A., Romano, A.H., and Nickerson, W.J. 1958. Biochemistry of the *Actinomycetales*. III. Cell wall composition and the action of lysozyme upon cells and cell walls of the Actinomycetales. *J. Bacteriol.* **75** : 283~290.
16. Szvoboda, Gy, Lang, T., Gado, I., Ambrus, G., Kari, C., Fodor, K., and Alföldi, L. 1980. In, L. Frenczy and G.L. Farkas(ed.), Adv Protopl. Res. p.235~240.
17. Wagman, G.H., and Weinstein, M.J. 1980. Antibiotics from *Micromonospora*. *Ann. Rev. Microbiol.* **34** : 537~557.