

Coryne 형 세균의 원형질체 융합에 관한 전자현미경적 관찰

박 청 · 임번삼 · 전문진 · 김우갑*

고려대학교 농화학과, 생물학과*

Electron Microscopic Observations on Protoplast Fusion of Coryneform Bacteria

Park Chung, Bun-Sam Lim, Moon-Jin Chun and Woo-Kap Kim*

Department of Agricultural Chemistry and *Department of Biology, Korea University

Overall procedure of cell fusion between *Brevibacterium flavum* and *Corynebacterium glutamicum* was morphologically observed by transmission electron microscopy. Protoplasts formed by treatment of cells with penicillin G and lysozyme in order were released through the pores generated on a certain region of cell walls to be spherical form. When two different protoplasts were met, cell wall and membrane in the contact zone was disappeared and followed by the mutual exchange of cytoplasmic and/or chromosomal materials. Cell wall regeneration speed of the protoplasts fused was slower than that of the non-fused, whereas the size of the former was confirmed as bigger than that of the latter.

Coryne 형 세균은, 核酸발효공업 (Kotani 등, 1978; Furuya and Teshiba, 1982) 이나 아미노산발효공업 (Kaneko and Sakaguchi, 1979; Zhdanova 등, 1981; Santamaric 등, 1982) 에 이용되어 발효공업에서 차지하고 있는 비중이 크다. 따라서 이들 균주의 생산성을 향상시키려는 많은 연구가 국내외적으로 수행되어 왔으며 (Tosaka 등, 1978; Takenouchi 등, 1979), 최근에는 細胞融合 方法이 많은 각광을 받고 있다 (Kaneko and Sakaguchi, 1979; Shtannikov 등, 1981). 서로 다른 두 원형질체간의 융합은 미생물의 種이나 屬에 관계없이 非特異的으로 일어날 수 있기 때문에 遺傳物質의 交換系가 잘 알려져 있지 않은 세균에 대해서는 유력한 유전물질 교환수단으로 주목을 받고 있다 (Foder and Alföldi, 1976; Götz 등, 1981).

저자들은 이미 lysine의 생성능이 있는 *Coryne* 형 세균의 원형질체 융합방법에 대하여 보고한 바 있는데 (Shin 등, 1984), 지금까지 발표

되고 있는 융합실험은 주로 융합 방법개발에 집중되어 왔으나 (Kao and Michayluk; 1974, Zimmermann and Vienken, 1982; Karube 등, 1984) 최근에는 電子顯微鏡을 이용한 연구도 활발하게 보고되고 있다. 그러나 이 보고들은 주로 *Bacillus* 속 (Frehel 등, 1979) 이나, *Streptomyces* 속 (Gumpert 등, 1980; Kang 등, 1983) 에 관한 연구들이 대부분이며 *Coryne* 형 세균에 대해서는 국내외적으로 거의 보고되어 있지 않은 실정이다.

이에 본 실험에서는 *Corynebacterium* 과 *Brevibacterium* 에 대한 원형질체 형성, 원형질체 융합 및 세포벽 재합성과정을 透過電子顯微鏡을 이용하여 관찰하였다.

材料 및 方法**使用菌株와 培地**

실험균주로는 *Brevibacterium flavum* AT - CC 21528과 *Corynebacterium glutamicum* A-

TCC 13058을 사용하였다. 種菌의 배양은 완전배지 (complete medium, CM)를 사용하였으며, 원형질체의 형성과 융합에는 최소배지 (minimal medium-yeast extract, MMYE)를 사용하였다 (Kaneko and Sakaguchi, 1979).

세포벽의 재생용 배지는 재생배지 (regeneration complete growth medium, RCG)를 사용하였다 (勝亦 등, 1982). 원형질체의 稀釋用 高張溶液으로는 희석액 (dilution fluid, DF)을 사용하였고, 융합에는 융합액 (fusion fluid, FF)을, 원형질체 형성을 위한 溶液으로는 용해액 (lysis fluid, LF)을 각각 사용하였다.

原形質체의 形成

CM 배지에서 배양한 *B. flavum*과 *C. glutamicum*을 각각 MMYE 배지에 접종하고 30°C에서 振盪培養하여 세포수가 1.0×10^8 cells/ml (O.D.₅₈₀ = 0.8~1.0) 되었을 때 penicillin G (Sigma製) 0.3 unit/ml를 처리하여 2시간 더 배양하였다. 이것을 濾過하여 얻은 균체를 lysozyme 350 μg/ml을 함유한 LF액에 현탁하고 30°C에서 靜置培養하면서 일정시간마다 원형질체의 형성 정도를 관찰하였다.

原形質체의 融合

융합시키려는 두 균주들의 원형질체를 같은 세포濃度 (1.0×10^8 cells/ml ~ 1.0×10^9 cells/ml)로 혼합한 후, 원심분리하여 얻은 침전물을 FF에 현탁하였다. 여기에 polyethylene glycol 6000 (PEG)을 가하여 30°C에서 10분간 반응시킨 후, FF를 첨가하고 시간 경과에 따른 융합 과정을 관찰하였다.

融合 原形質체의 細胞壁 再生

융합된 원형질체를 RCG 배지에 옮겨 30°C에서 배양하면서 세포벽의 재생 과정을 관찰하였다.

융합과정 세포의 透過電子顯微鏡的 관찰

각 사용 균주의 正常細胞와 원형질체 현탁액 및 융합 원형질체의 현탁액 각각을 원심분리 (4000rpm, 20分, 4°C)하여 얻은 침전세포를 전자현미경 관찰 재료로 사용하였다. 상기 방법으로 얻은 정상세포는 2.5% glutaraldehyde (in phosphate buffer, pH 7.2)에, 각 균주의 원형질체와 융합 및 재생 세포는 2.5% glutaraldehyde와 0.25M sucrose가 함유된 DF溶液

에 현탁시킨 후, 각각 4°C에서 3시간 동안 固定을 하였다. 고정이 끝난 세포는 0.2M phosphate buffer와 DF溶液으로 4회 원심분리하여 세척하였다. 이것을 1.0% O₃O₄ (in phosphate buffer, pH 7.2)에 현탁시켜 4°C에서 2시간 고정을 한 다음 phosphate buffer와 DF溶液으로 3회 세척하였다. 이 고정세포를 ethanol 및 acetone으로 탈수하여 Araldite 혼합액 (Anderson and André, 1968)에 包埋 (embedding) 하였다. 포매된 시료는 LKB-V Ultramicrotome으로 超薄切片을 만들어 uranyl acetate 및 lead citrate로 이중염색하여 투과전자 현미경 (JEOL 100CX-II)으로 80KV에서 관찰하였다.

結果 및 考察

正常細胞의 관찰

*B. flavum*과 *C. glutamicum*의 正常細胞는 서로 구분하기가 어려웠으며, 細胞의 크기도 비슷한 간상형을 나타내었다. 細胞分裂의 형태는 Komagata와 Yamada (1972)가 보고한 것과 유사하였다 (Fig. 1, 4). 두 균주 모두 세포벽, 세포막 및 nucleoid를 가진 전형적인 原核細胞의 형태를 나타내었다 (Fig. 1, 2, 3, 4). 상당수의 세포들이 격막을 1~4개씩 가지고 있었으며 (Fig. 3, 4), Fig. 2에서는 특히 세포분열시 형성되는 細胞隔膜이 求心的으로 일어나는 것을 뚜렷이 보여주고 있다. 형성된 격막의 한쪽이 함입되어 (Fig. 1), *Coryne*형 세균의 분열시의 한 형태인 V형 세포를 형성하기 직전의 모습도 관찰되었다 (Fig. 4).

原形質체의 形成過程 관찰

원형질체가 형성되어가는 과정에서의 정상세포는 penicillin G와 lysozyme의 작용을 받아 Fig. 7에서 보는 것과 같이 세포막과 세포벽이 분리되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 이 시점에서 세포분열이 진행중인 세포의 경우 한 세포벽내에서 두개의 원형질체를 형성하기도 하였다 (Fig. 7).

세포벽의 유약한 부위가 파괴되는 과정을 거쳐 그 부위를 통하여 원형질체가 방출되듯 유리되어 나음을 확인하였고 (Fig. 5, 6), 형성된

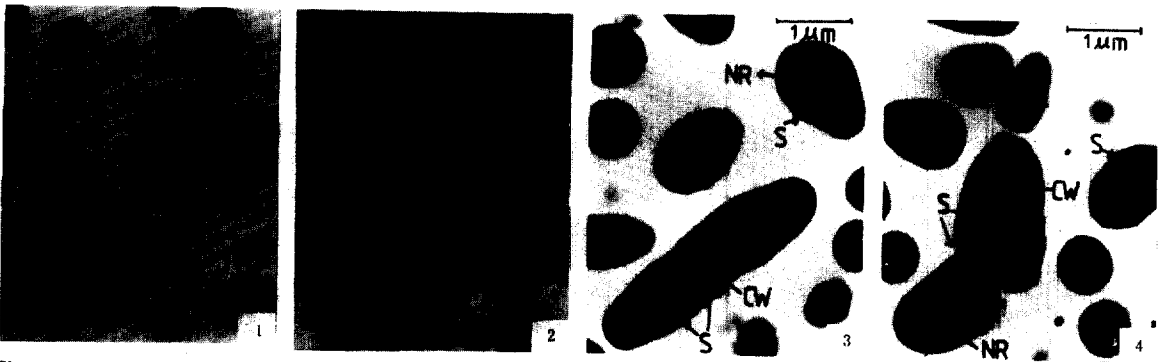


Fig. 1. Electron microscopic observation of normal cells of *B. flavum* ($\times 20000$).
Fig. 2. Normal cells of *B. flavum* ($\times 26000$) forming septa(S) during multiplication. Electron dense material (EDM).
Fig. 3,4. Normal cells of *C. glutamicum* forming septa(S) during multiplication ($\times 20000$).

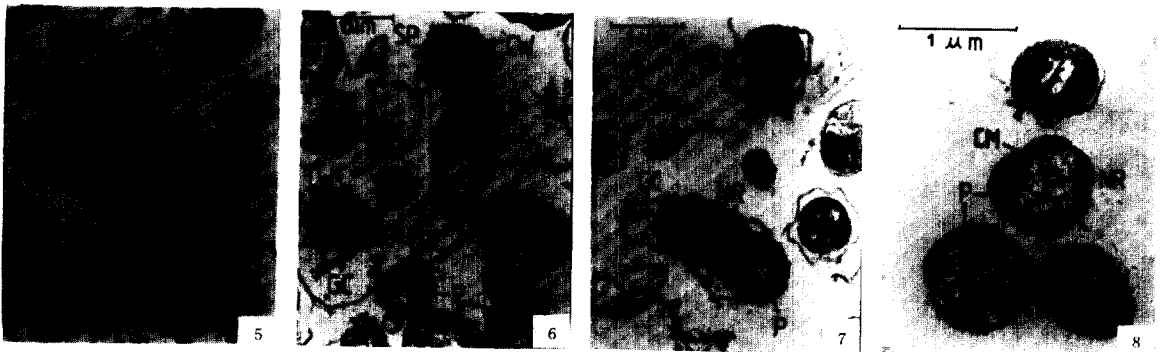


Fig. 5,6. Releasing protoplast of *B. flavum* ($\times 20000$).
Fig. 7,8. Releasing protoplast of *C. glutamicum* ($\times 20000$, $\times 32000$) showing protoplast(P), spheroplast(SP). Note that cell wall(CW) is completely dissolved out in Fig. 8.



Fig. 9. Protoplast contacting stage of *B. flavum* ($\times 56000$).
Fig. 10. Protoplast combining stage of *B. flavum* ($\times 32000$).
Fig. 11. Combining stage of *B. flavum* ($\times 80000$) showing fused zone. Cell membrane of contact zone was partially disappeared.
Fig. 12. Protoplast contacting stage of *C. glutamicum* ($\times 20000$).

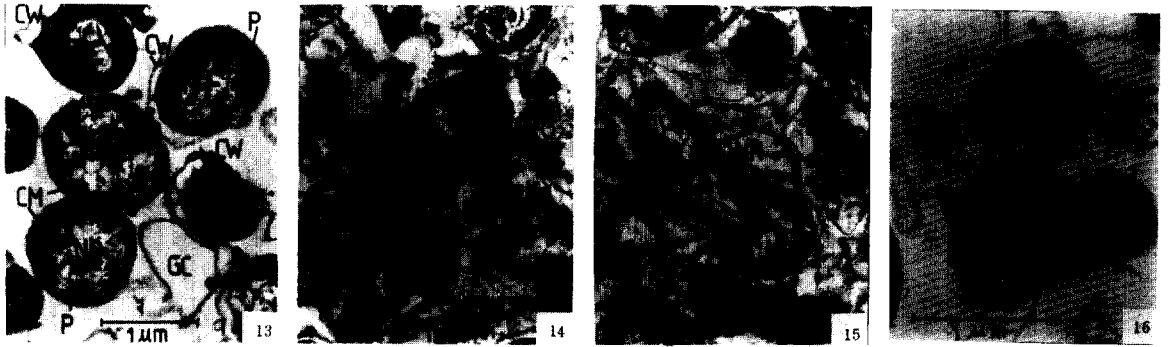


Fig. 13. Combining stage of *C. glutamicum* (x26000).

Fig. 14.15. More than two protoplasts were fusing together. Transfer of inner material between two protoplasts was noted of *B. flavum* (x26000).

Fig. 16. Fusing stage of *C. glutamicum* (x40000).

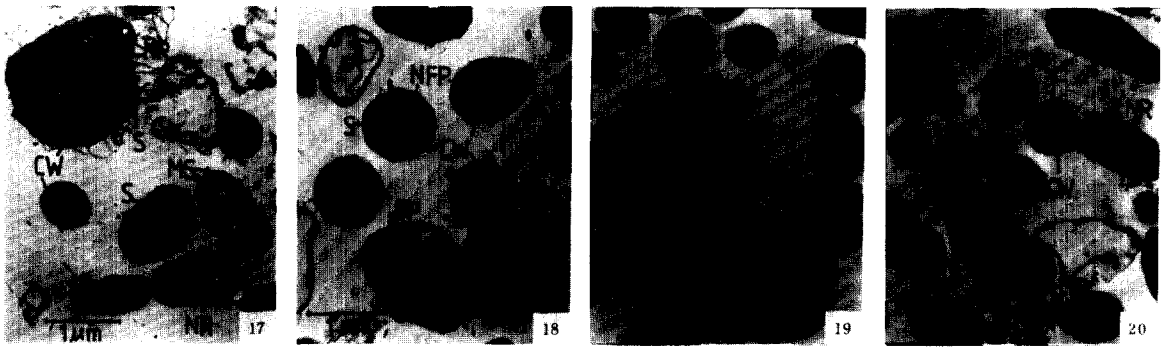


Fig. 17.18. Regeneration of *B. flavum* (x20000, x36000). Note that fused protoplasts were bigger than non-fused protoplasts.

Fig. 19.20. Regeneration of *C. glutamicum* (x20000). Mesosome(MS).

- | | | | |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------------|----------------|
| CW: Cell Well | P: Protoplast | CM: Cell membrane | GC: Ghost cell |
| NR: Nuclear region (Nucleoid) | | SP: Spheroplast | S: Septum |
| EP: Fused protoplast | PS: Periplasmic space | NFP: Non-fused protoplast | |
| EDM: Electron dense material | | MS: Mesosome | |

원형질체는 구형을 나타내었다(Fig. 8). 원형질체 형성후 ghost 도 뚜렷이 관찰 되었고, 둘레는 파괴되지 않은 채 유지되고 있었다(Fig. 6). 세포막과 세포벽사이의 분리는, 유약해진 세포벽의 부위를 통하여, 주위의 배지가 일부 유입되어 생긴 삼투압의 영향도 받은 듯 하다. 또한 원형질체가 세포벽의 외부로 방출, 유리되는 과정에서 방출이라 함은, 高張液 一部가 periplasmic space로 불러 들어오면서 고장액중의 二價 金屬이온들에 의해 형성되는 靜電氣力이 陰電荷를 띠는 세포막 성분과 결합하는 과정에서 일어나는 것으로 생각된다. 이러한 원형질

체 유리현상은 *Trichoderma koningii* (Ha and Hong, 1983) 에서도 관찰되었다.

고장액중에 방출되어 나온 원형질체의 내부 구조는 Fig. 8 에서 보듯이 원형질막, 원형질 및 nucleoid 등의 모습을 확인 할 수 있었다. 또한 원형질체의 내부에는 가운데에 농축되어 보이는 섬유상 물질도 보였다. Fig. 5 와 6 에서는 spheroplast 의 모습도 관찰되었다.

原形質體의 融合過程 관찰

형성된 원형질체들은 우선 물리적인 접촉과정을 거쳐서 접촉부위를 형성하였고(Fig. 9, 12) 접촉부위의 세포막이 소실되면서 원형질이 교

환되는 통로를 형성하였다(Fig. 10, 11). 이와 같은 원형질체의 단위막 사이의 접촉부위 형성과 융합부위의 형성은 *Bacillus subtilis* (Frehel 등, 1979), *Streptomyces* (Gumpert 등, 1980; Kang 등, 1983) 등의 보고와 일치하였다. 융합부위를 통하여 두 원형질체의 원형질과 핵물질이 융합되는 것을 볼 수 있는데, 두 원형질체의 접촉부위가 완전히 파괴되어 있으며, 아직 융합되지 않은 핵물질들이 Fig. 14에서 뚜렷이 보인다. 융합이 진행됨에 따라 원형질과 핵물질의 이동이 차츰 활발하게 나타났다(Fig. 15, 16). 융합되는 기작에 대해서는 지금까지 많은 연구가 이루어진 바 있는데(Poste 등, 1973; Peberdy, 1976; Cullis and Hope, 1978; Robinson 등, 1979) 본 실험에서 관찰된 융합과정은 막의 구조

변화에서 Gumpert (1980)의 보고와 일치하였으나, 두 원형질사이의 부정형이며 전자밀도가 낮은 투명한 점들로 구성되어 있다고 한 분리부위의 형성은 본 실험에서는 관찰할 수 없었다.

융합 원형질체의 細胞壁 再生過程 관찰

융합 원형질체는 비융합 원형질체보다 그 크기가 월등히 컸으며(Fig. 18, 19), 특히 비융합 원형질체에서는 細胞壁의 再生이 뚜렷이 관찰되었으나(Fig. 18) 융합 원형질체에서는 세포벽의 재생이 더디게 진행되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 17). 세포벽의 재생과 동시에 세포분열을 위한 격막의 형성도 진행되었으며(Fig. 17, 20) 특히 두 菌株 모두에서 mesosome의 존재를 확인할 수 있었다(Fig. 17, 20).

摘 要

*Brevibacterium flavum*과 *Corynebacterium glutamicum* 세포로부터의 원형질체 형성과정, 형성된 원형질체의 미세구조, 이들 원형질체간의 융합 및 세포벽 재생을 투과전자현미경을 사용하여 관찰하였다. 원형질체의 형성과정은 특이하게 관찰되었다. 즉, penicillin G와 lysozyme의 작용을 받아 세포벽의 한 부위가 파괴되어 생긴 細胞를 통하여 원형질이 빠져나가 구형의 원형질체를 형성하였다. 융합과정에서는 원형질체들이 서로 접촉하여 접촉부위를 형성하고 이어서 이 부위의 세포막이 일부 소실되며 양 원형질체간에 내부의 물질들이 이동하였다. 융합 원형질체들은 비융합 원형질체에 비하여 세포벽의 재생이 다소 더디게 일어나는 것으로 관찰되었으며, 융합 원형질체들이 비융합 원형질체들 보다 그 크기가 월등히 컸다.

REFERENCES

1. Anderson, M.A. and J. André, 1968. The extraction of some cell components with pronase and pepsin from thin sections of tissue embedded in an epon-araldit mixture. *J. de Microscopie* 7, 343-354.
2. Cullis, P. R., M.J. Hope, 1978. Effects of fusonogenic agent on membrane structure of erythrocyte ghosts and the mechanism of membrane fusion. *Nature* 271, 672-674.
3. Foder, K. and L. Alf ldi, 1976. Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium*, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 73, 2147-2150.
4. Frehel, G., A.M. Lheritier, C. Sanchez-Rivaz and P. Schaeffer, 1979. Electron Microscopic study of *Bacillus subtilis* Protoplast fusion. *J. Bacteriol.* 137, 1354-1361.
5. Furuya, A. and S. Teshiba, 1982. Production of 5'-IMP by mutants of *Brevibacterium ammoniagenes*, pp. 259-263 Genetics of Industrial microorganisms. Kodansha Ltd., Tokyo.
6. Gotz, F., S. Ahrne, and N. Lindberg, 1981. Plasmid transfer and genetic recombination by protoplast fusion in *Staphylococci*. *J. Bacteriol.* 145, 74.
7. Gumpert, J. 1980. Electron Microscopic analysis of protoplast fusion in *Streptomyces hydropiscus* and consideration on structural alterations in fusing membrane. *Arch. Microbiol* 126, 263-269.
8. Ha, Y. C., H.M. Lim H.M. Park, and S.W. Hong, 1983. Electron microscopic study of protoplasts released from the mycelium of *Trichoderma koningii*. *Korean J. Electron Microscopy* 13(1), 49-61.

9. Kang, H. S., J.S. Kim, Y.C. Hah, S.H. Chung, K.S. Shin and H.D. Lee, 1983. *Streptomyces* 속의 원형질 융합에 관한 연구. 국립보건원보 제 20권, Vol 20, 89-108.
10. Kaneko, H. and K. Sakaguchi, 1979. Fusion of protoplast and genetic recombination of *Brevibacterium flavum*. *Agri. Biol. Chem.* **43**, 1007-1013.
11. Kao, K.N. and M.R. Michayluk, 1974. A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplast. *Planta*, **115**, 355-367.
12. Karube, I., E. Tamiya and H. Matsuoaka, 1984. New cell fusion method using polymer membrane. *Eur. Biochem.* **125**, 13-15.
13. Komagata, K. and K. Yamada, 1972. Taxonomic studies on Coryneform bacteria, V. Classification of Coryneform bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **18**, 417-431.
14. Kotani, Y.K. Yamaguchi, F. Kato, and A. Furuya, 1978. Inosine accumulation by mutants of *Brevibacterium ammoniagenes*, strain improvement and culture conditions. *Agri. Biol. Chem.* **42**, 399-405.
15. Peberdy, J. F., 1979. Fungal Protoplasts; isolation reversion and fusion. *Ann. Rev. Microbiol.* **33**, 21-39.
16. Poste, G. and A.C. Allison, 1973. Membrane fusion. *Biochem. Biophys. Acta.* **330**, 421-465.
17. Robinson, J. M., D.S. Rose, R.L. Davidson and M.J. Karnovsky, 1979. Membrane alteration and other morphological features associated with polyethylene glycol induced cell fusion. *J. Cell. Sci.* **40**, 63-75.
18. Santamaric, R., J.M. Mesas, and J.F. Martin, 1982. Genetic recombination by protoplast fusion in Coryneform bacteria. 4th G.I.M. Abstract, p. 60.
19. Shin, M.G., B.S. Lim, S.Y. Lee, and M.J. Chun, 1984. The Protoplast formation, regeneration and fusion of Coryneform bacteria. *Kor. J. Microbiol.* **22**(3), 175-181.
20. Tosaka, O., K. Takinami, and Y. Hirose, 1978. L-Lysine production by S-(2-aminoethyl)-L-cysteine and α -Amino- β -hydroxyvaleric acid resistant mutants of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agri. Biol. Chem.* **42**, 745.
21. Takenouchi, E., T. Yamamoto, D.K. Nikolova, H. Tanaka and K. Soda, 1979. Lysine production by S-(β -aminoethyl)-L-cysteine resistant mutants of *Candida pelliculosa*. *Agri. Biol. Chem.* **43**, 727.
22. Zhdanova, N. Z., A.V. Shtammikov, and V.A. Livshits, 1981. *Genetika (Moscow)*. **17**(8), 1419-1428.
23. Zimmermann, U., and Vienken, J., 1982. Electric field-induced cell-to-cell fusion. *Topical review. J. Membr. Biol.* **67**, 158-174.
24. 勝亦 瞭一, 高山 健一郎, 古屋 晃, 1982. 遺伝的 組換之株の取得法, 日本特許, 昭 56-10987.

(Received August 12, 1985)