THE KOREAN JOURNAL OF MYCOLOGY
Vol. 22, No 1, p31-35 March 1994
Copyright © 1994 by The Korean Society of Mycology
Printed in S. KOREA

*Coprinus cinereus*에서 Validamycin 저항성균주의 세포학적 변화

심재영 · 최형태 · 윤권상*
강원대학교 미생물학과

Cell Biological Changes of Validamycin Resistant Strain in *Coprinus cinereus*

Jae-Yong Shim, Hyoung-Tae Choi and Kwon-Sang Yoon*
Department of Microbiology, Kangwon National University, Chunchon 200-701

ABSTRACT: ***Coprinus cinereus*** **resistant strain against validamycin was successfully isolated. Germination rate of oidiospores, branching pattern, and localization of actin protein of the resistant strain were compared with normal strain. The resistant strain showed better germiantion rate of oidia (about 20 fold), more frequent branching, and even actin localization on validamycin plate where actin content was severely reduced in case of normal strain.**

KEYWORDS: ***Coprinus cinereus*****, validamycin, actin.**

균류는 진핵생물중 가장 하등인 것으로 추측되나 생활사에 따른 분화과정을 거치므로 흔히 진핵생물을 대상으로 하는 연구대상으로 흔히 이용되고 있다. 또한 벼, 밀을 포함하여 여러가지 농작물이 균류에 의하여 피해를 당함은 물론 최근 균류가 사람에게 질병을 유발한다는 보고가 많아짐에 따라 이들의 생리·세포학적 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 *Candida albicans*(Rico 등, 1991), *Cryptococcus neoformans*(Kwon-Chung 등, 1992), *Histoplasma capsulatum*(Maresca & Kobayashi, 1989), *Paracoccidioides brasiliensis*(San-Blas, 1993)등 AIDS 발병 후 2차 감염을 일으키는 균류에 대한 연구가 진행되고 있다. 이들의 경우 병원성이 이형태성(Dimorphism: 균사형(Hypahl form)과 효모형(Yeast form)의 전환)과 관련되어 있어 세포의 모양에 관련된 것으로 알려진 actin에 의한 균의 모양에 대한 보고(Kobori 등, 1992; Lasker and Riggsby, 1992)가 있으며 콩의 녹병균인 *Uromyces appendiculatus*(Hoch 등, 1987)의 병원성과 관련하여 균사모양에 대한 연구가 보고된 바 있다.

*Corresponding author

현재까지 알려져 있는 fungicide 또는 fungistatic 물질로서 validamycin(Vm)은 담자균을 선택적으로 저해하는 물질로 알려져 있는데 Vm은 이와같은 특이한 action spectrum 때문에 rice sheath blight를 일으키는 *Rhizoctonia cerealis*를 방제하는데 효과적으로 이용되어 온 농약성분의 하나이다. Vm은 *Streptomyces hygroscopicus var. limoneus*에 의하여 형성되는 pseudo-oligosaccharide antibiotics로서(Asano 등, 1987) 흔히 fungicide로 알려져 있으나 사실상 균사생장의 형태학적 및 생리학적 둔화, 포자형성율의 저하, 포자발아율의 저하등의 static action을 하는 것으로 알려져 있다. Validamycin은 담자균의 glucose에서 출발하는 inositol 자체의 생합성은 저해하지 않으나 inositol의 phosphatidylinositol로의 incorporation을 특이적으로 저해하는 것으로 추측되고 있다(Robson 등, 1989). 또한 phosphatidylinositol은 세포벽과 결합되어 있는 wall-synthesizing enzyme의 어떤 것을 자극하여 세포벽 생합성에 영향을 주어 균사의 분지 또는 포자벽의 형성을 불완전하게 하여 fungistatic action을 나타내는 것으로 보고되었다(Hanson, 1984).

본 연구과제는 *Coprinus cinereus*를 대상으로

Vm의 저항성을 유발하여 위상차 현미경에 의한 균사의 현미경적인 분지양상(branching pattern) 및 균사의 생장양상과 밀접한 관계가 있는 actin 단백질을 항체를 이용한 형광항체(immunofluorescent) 현미경방법으로 Vm 저항성 균주를 정상균주와 비교분석하였다.

材料 및 方法

저항성 균주의 분리

*C. cinereus monokaryon*으로부터 Vm에 대하여 저항성을 가진 균을 다음과 같은 두가지 방법으로 분리하였다. 첫째, YMG 한천배지에 균을 접종, 25℃에서 7일간 배양하고 무성생식포자(Oidia)를 얻었다. YMG 한천배지에 Vm을 더하고(YMG-Vm; 100 μg/ml) 한 plate당 1,000개 정도의 oidia를 접종하여 colony를 얻었다. 한개의 colony로부터 다시 oidia를 얻어 동일한 방법으로 YMG-Vm 배지에서 배양하고 (2회 반복) 다시 oidia를 얻어 20개의 colony를 무작위로 선발하였다. 이들을 Petri 접시(지름 5 cm, YMG-Vm 배지)에 접종하고(cork borer 사용: 지름 0.5 cm) 길이생장을 측정하여 가장 잘 자라는 균주(#13)를 얻었다. 두번째 방법으로 변이유발물질(자외선)을 사용하여 저항성 균주를 얻었다. YMG 한천배지에서 얻은 oidia를 인산염 완충액(0.01 M, pH 6.8)에 현탁시키고($1\text{-}5\times10^6$/ml) 자외선을 처리(20 cm, 2분)하여 저항성을 보이는 균주(vmm)를 얻었다. Vm에 대하여 저항성을 가지는 균주들은 YMG-Vm 배지에서 계대하고 이를 4℃에서 보관하였다.

저항성균사의 무성생식포자 발아율 비교

정상균과 저항성균(#13)을 각각 YMG, YMG-Vm 배지에서 7일간 배양하고 무성생식포자(oidiospore)를 얻었다. 이를 희석하여 동시에 YMG, YMG-Vm 배지에 접종하고 발아율을 비교하였다.

저항성균사의 branching pattern 조사

C.cinereus 정상균 및 저항성균(#13, vmm)을 각각 YMG 배지와 YMG-Vm 배지에서 배양하고 다시 이를 cellophane을 얹은 동일배지에 접종, 25℃에서 4일간 배양하였다. 균사의 끝부분(hyphal tips)을 포함한 cellophane을 면도칼로 도려내어 위상차 현미경 하에서 균사의 분지양상을 비교하였다.

저항성균사의 Actin 단백질의 분포연구

C. cinereus 정상균 및 저항성균(#13)을 앞의 방법과 동일하게 배양하고 cellophane 위에 자란 균사의 actin 단백질을 Runeberg and Raudaskoski (1986)의 방법과 Salo등(1989)의 방법을 다음과 같이 변형하여 염색하였다. 시료를 5 mM $MgCl_2$, 2% DMSO, 3% p-formaldehyde를 포함한 인산염 완충액(50 mM, pH 6.5: 고정액)에서 2.5시간 동안 고정하고 50 mM 인산염 완충액(pH 6.5)(⇒PB)으로 3회 세척하였다. 고정된 균사를 0.01-0.02% Novozyme이 있는 PB용액으로 37℃에서 20분간 처리하고 이를 PBS(saline in phosphate buffer, 50 mM, pH 7.3) 용액으로 3회 세척하였다. 이를 Triton X-100(0.1%)를 함유한 PBS에 10분간 적시고 다시 PBS에 50분간 방치하였다. 처리된 균사를 Monoclonal Anti-actin antibody(mouse IgG)(Sigma A1804, PB로 40배 희석)와 30-60분간 반응 후 0.1% Bovine serum albumin을 포함한 PB로 세척하고 FITC-conjugated Goat Anti-mouse IgG antibody(Sigma F4018, PB로 30배 희석)로 30-60분간 염색하였다. PBS(pH 8.4)로 3회 세척하고 DAPI(1 μg/ml), n-propylgallate(2.5 mg/ml)을 포함한 PBS(pH 8.4)를 glycerol과 2:1로 혼합한 형광발색제를 시료에 더하고 자외선 형광현미경으로 관찰하였다.

結果 및 考察

Validamycin 저항성 균류의 무성생식포자 발아율 비교

식물병원균인 *Rhizoctonia* 속의 경우 Vm에 의하여 포자생성율이 떨어졌다는 보고가 있어(Robson 등, 1988) 본 실험에서는 생성된 포자의 발아율을 조사하였다. 정상균(YMG 배지)의 포자와 저항성균(YMG-Vm 배지)의 포자를 각각 YMG와 YMG-Vm 배지에 동시에 접종하였을 때 정상균의 포자는 Vm에 의하여 발아율이 5% 수준으로 저하된 반면 저항성균의 경우 Vm에 의하여 전혀 영향을 받지 않았다(Table 1). 이는 저항성균의 경우 Vm에 의하

Table 1. Comparison of oidia germination rate of validamycin resistant strain (YMG-Vm grown) with normal strain (YMG grown) by inoculating oidia on YMG and YMG-Vm plates.

Normal Strain (YMG grown)		Resistant Strain (#13; YMG-Vm grown)	
YMG	YMG-Vm	YMG	YMG-Vm
11-15%	0.6-0.7%	11-16%	9-12%

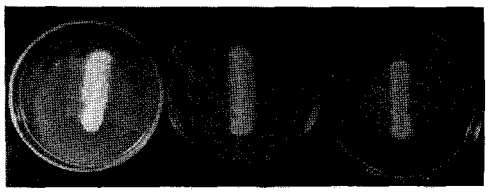

Fig. 1. Growth of *C. cinereus* wild type and resistant strain on at 25℃ for 2 days. 1; Normal strain on YMG plate, 2; Normal strian on YMG with validamycin plate, 3; Resistant strain on YMG with validamycin plate.

여 자손번식에 영향을 받지 않음을 시사한다.

Validamycin 저항성 균류의 branching pattern

균사성 균류는 균사끝 세포(hyphal tip cell)가 자라나는 끝성장(tip growth)을 보인다(Cole, 1986). 끝성장을 하는 원동력으로 균사의 안밖으로 미세전류가 흘러 이에 이끌려 세포내의 vesicle들이 균사끝 쪽으로 모인다는 주장과(McGillviray and Gow, 1987), actin 단백질에 의하여 끝성장을 하게 된다는 주장(Yokoyama 등, 1990)이 있다. Vm에 의하여 세포막과 세포벽에 모두 이상이 생긴다면 균의 길이생장(linear growth)에 영향을 주는 것은 물론 균사의 분지양상에도 변화가 나타날 것이다. *C. cinereus* 정상균과 #13을 cellophane을 얹은 배지에 접종하고 25℃에서 2일간 배양 후 균사의 자란 정도를 관찰하였다(Fig. 1). 정상균을 YMG 배지, Vm 포함배지, #13 균을 Vm 포함배지에 배양하였을 때 균사의 길이생장은 정상균(YMG 배지), 정상균(Vm 포함배지), #13 균(Vm 포함배지)의 순이었고(Fig. 1), 균사의 조밀도는 #13 균(Vm 포함배지), 정상균(YMG 배지), 정상균(Vm 포함배지)의 순이었다(Fig. 2). 즉 Vm에 대하여 저항성을 보이는 균주는 길이생장은 저조하나 분지를 자주하여 조밀한 균사를 생성하므로 균체중량에는 큰 차이가 없는 것으로 판단된다. 특기할 만한 사항은 정상균을 Vm 포함배지에서 배양할 경우 기층균사(aerial hypha)의 생성이 크게 떨어지지만 #13 균의 경우 Vm 포함배지에서 상당량의 기층균사를 만드는 것으로 나타났다. 접합균류(Zygomycetes), 자낭균류(Ascomycetes), 불완전균류(Deuteromycetes)의 경우 기층균사들이 무성생식포자를 생산하며(Cole, 1986) Vm이 담자균류의 자손번식을 억제하는 것으로 보고되었으므로(Robson 등, 1988) #13 균의 경우 번식에 영향이 없는 것으로 판단된다. 균사의 branching pattern을 위상차 현미경으로 관찰한 결과 변이주(vmm)는 Vm의 존재와 관계없이 50-150 μm마다, 정상균은 150-250 μm마다 분지를 하므로 변이주가 더 자주 분지하는 것으로 판단된다(Fig. 3).

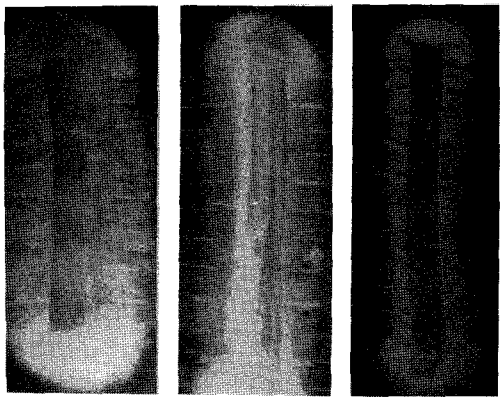

Fig. 2. Closer photography of Fig. 1. 1; Normal strain on YMG plate, 2; Normal strain on YMG with validamycin plate, 3; Resistant strain on YMG with validamycin plate.

Validamycin 저항성 균류의 Actin 단백질 분포

Actin 단백질의 분포를 확인하기 위하여 아메바의 actin을 생쥐에 주사하여 얻은 monoclonal antiactin antibody(Sigma A1804, mouse IgG)를 처리하고 다시 1차 항체(mouse IgG)에 대한 2차 항체로써 형광물질(FITC)이 연결된 antimouse IgG antibody를 염소(Goat)에서 얻어(Sigma F4018) 이를 발색항체로 사용하였다. 정상균을 YMG 배지에서 배양한 경우

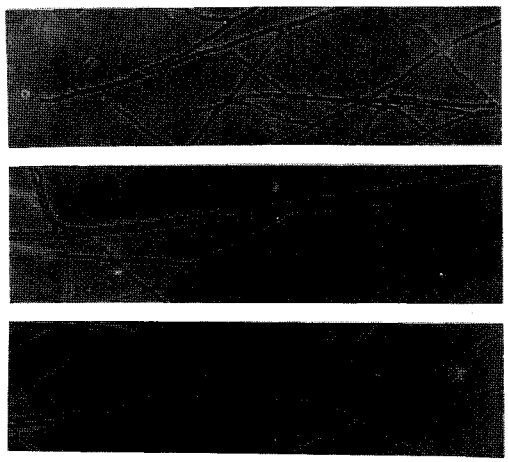

Fig. 3. Phase contrast microscopy (400x) for branching patterns of *C. cinereus* normal strain and resistant strain at 25℃ for 4 days. 1; Normal strain on YMG plate, 2; UV mutant (vmm) on YMG plate, 3. Vmm on YMG with validamycin plate.

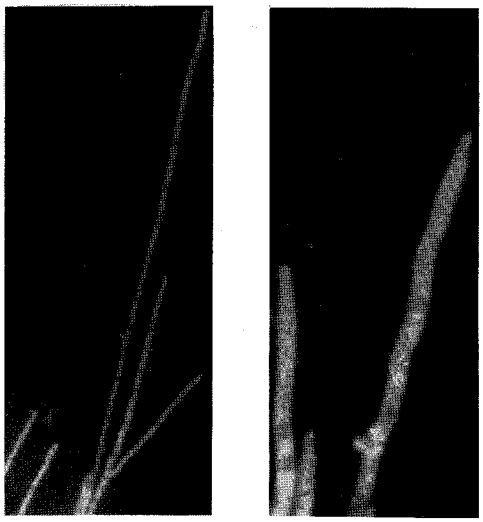

Fig. 4. Fluorescent microscopy for actin in *C. cinereus* normal strain on YMG plate. 1; Magnification 400x, 2; Magnification 1,000x.

균사끝 부분과 그 주위에 매우 강한 actin 형광이 나타났고(Fig. 4) 이는 actin이 균사끝 세포의 주위에 (Kobori등, 1992), 또는 균사의 상당부분(약 200 μm)에 actin이 있음을 보고한 Yokoyama등(1990)의 결과와 같다. Vm이 포함된 배지에서 정상균은 형광의

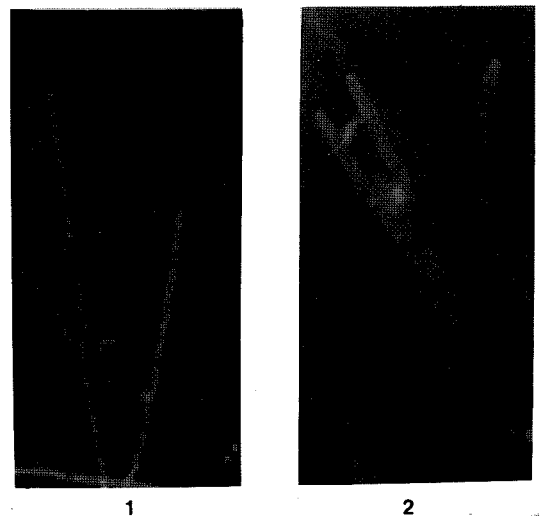

Fig. 5. Same as Fig. 4, but grown on YMG with validamycin plate. 1; Magnification 400x, 2; Magnification 1,000x.

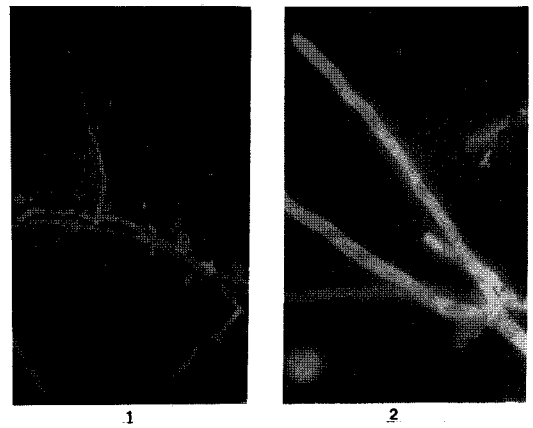

Fig. 6. Same as Fig. 5, but resistant strain grown on YMG with validamycin plate. 1; Magnification 400x, 2; Magnification 1,000x.

밝기가 감소한 것으로 볼 때 actin의 양이 균사끝 부분 근처에만 소량 남아있을 뿐 전체적인 양이 훨씬 적음을 알 수 있다(Fig. 5). #13 균(Vm이 포함된 배지)이 분지를 자주함은 물론 형광의 밝기가 정상적인 균의 경우와 비슷한 분포를 보이므로(Fig. 6) #13 균의 경우 Vm에 의하여 actin 단백질의 감소는 나타나지 않은 것으로 판단된다. 즉 Vm에 대한 저항성을 보이는 균주를 정상적인 균주와 Vm이 포함된 배지에서 배양하여 현미경적인 구조를 비교한

결과 저항성 균주가 분지를 자주하며(기층균사의 생성도 동일함) actin 단백질의 생성도 control(정상균을 YMG 배지에서 배양한 경우)과 같은 정도를 유지함을 확인하였다.

摘 要

균사성 담자균의 생장을 억제하는 validamycin에 대하여 저항성을 보이는 *Coprinus cinereus*를 분리하고 무성생식포자의 발아율, 균사생장방식 및 actin 단백질의 분포를 정상균과 비교하였다. 저항성균주는 validamycin이 있어도 무성생식포자의 발아율이 정상균의 동일조건보다 월등하며(약 20배), 정상균보다 분지를 자주하는 것으로 나타났다. 저항성균은 분지와 관계가 있는 것으로 알려진 actin의 분포가 Vm에 의하여 감소되는 정상균과는 달리 Vm에 의한 영향없이 균사끝과 균사끝 세포에 분포하는 것으로 나타났다.

謝 辭

본 연구는 1992-1993년도 학술진흥재단 자유공모과제 학술연구 조성비에 의하여 수행되었으며 이에 감사를 드린다.

參考文獻

Asano, N., Yamaguchi, T., Kameda, Y. and Matsui, K. 1987. Effect of validamycins on glycohydrolases of *Rhizoctonia solani*. *The J. Antibiotics.* **40**: 526-532.

Cole, G. T. 1986. Models of cell differentiation in conidial fungi. *Microbiol. Rev.* **50**: 95-132.

Hanson, B. A. 1984. Role of inositol containing sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae* during inositol starvation. *J. Bacteriol.* **159**: 837-842.

Hoch, H. C., Staples, R. C., Whitehead, B., Comeau, J. and Wolf, E. D. 1987. Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in *Uromyces*. *Science* **235**: 1659-1662.

Kobori, H., Saro, M. and Osumi, M. 1992. Relationship of actin organization to growth in the two forms of the dimorphic yeast *Candida tropicalis*. *Protopla.* **167**: 193-204.

Kwon-Chung, K. J., Edman, J. C. and Wickes, B. L. 1992. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immunit.* **60**: 602-605.

Lasker, B. A. and Riggsby, W. S. 1992. Transcription of the single actin gene of *Candida albicans* during the yeast-to-mycelial conversion. *Exp. Mycol.* **16**: 155-162.

Maresça, B. and Kobayashi, G. S. 1989. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi. *Microbiol. Rev.* **53**: 186-209.

McGillviray, A. M. and Gow, N. A. R. 1987. The transhyphal electric current of *Neurospora crassa* is carried principally by proton. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 28755-2881.

Rico, H., Herrero, E., Miragall, F. and Sentandreu, R. 1991. An Electron microscopy study of wall expansion during *Candida albicans* yeast and mycelial growth using concanavalin A-ferritin of mannoproteins. *Arch. Microbiol.* **156**: 111-114.

Robson, G. D., Kuhn, P. J. and Trinci, A. P. J. 1988. Effects of validamycin A on the morphology, growth and sporulation of *Rhizoctonia cerealis, Fusarium culmorum* and other fungi. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 3187-3194.

Robson, G. D., Kuhn, P. J. and Trinci, A. P. J. 1989. Effects of validamycin A on the inositol content and branching of *Rhizoctonia cerealis* and other fungi. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 739-750.

Runeberg, P., and Raudaskoski, M. 1986. Cytoskeletal elements in the hyphae of the homobasidiomycete *Schizophyllum commune* visualized with indirect immunofluorescence and NBD-phallacidin. *Eur. J. Cell Biol.* **41**: 25-32.

Salo, V., Niini, S. S., Virtanen, I. and Raudaskoski, M. 1989. Comparative immunocytochemistry of the cytoskeleton in filamentous fungi with dikaryotic and multinucleate hyphae. *J. Cell Sci.* **94**: 11-24.

San-Blas, G. 1993. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.* **31**: 99-113.

Yokoyama, K., Kaji, H., Nishimura, K., and Miyaji, M. 1990. The role of microfilaments and microtubules in apical growth and dimorphism of *Candida albicans*. *J. Gene. Microbiol.* **136**: 1067-1075.