

*Blastocladiella emersonii*의 단축된 포자형성과정에서 관찰된 핵의 소멸

윤현주 · 조정원*

인제대학교 생명공학부

Zoosporic fungi의 일종인 *Blastocladiella emersonii*에서는, 적은 수의 핵을 포함하는 작은 크기의 sporangium의 형성을 유도할 수 있다. 이들의 단축된 포자형성과정에서, sporangium 내에 존재하던 일부 핵들의 소멸이 관찰되었다. 이 결과는 핵의 소멸이 포자형성과정의 필수적인 부분과정이라는 가설을 뒷받침해준다. 핵의 소멸과정은 형태적으로 세포질의 autophagy와 유사하였으며, autophagy의 형태적인 발달과정을 연구하기 위한 좋은 모델 시스템이 될 것으로 생각한다.

Key words □ autophagy, *Blastocladiella emersonii*, nuclear degeneration, sporulation

하등 진핵생물(protoctista)로 분류되는 zoosporic fungi와 Myxomycetes는, 무성 포자의 형성을 위하여 여러 개의 핵을 포함하는 sporangium을 형성한다. Sporangium 안의 각각의 핵들은 비교적 일정한 양의 세포질과 함께 새로운 세포막으로 둘러싸이게 되며, 이렇게 만들어진 단핵 포자들은 방출되어 종의 번식에 기여하게 된다(1, 9).

일부의 Myxomycetes와 zoosporic fungi의 포자형성 과정에 대한 전자현미경 연구를 통하여, sporangium 안에 존재하던 핵들 중의 일부가 autophagy에 의해 소멸되는 모습이 관찰되었다(2, 6, 8, 10, 11). 그러나 핵의 소멸이 포자형성의 필수적인 과정 중의 일부인지, 그리고 포자형성 중 어떤 역할을 하는지에 대해서는 밝히지 못하였는바, 아마도 sporangium의 거대한 크기가 핵의 소멸과정에 관한 세밀한 연구를 저해한 것으로 생각된다.

Zoosporic fungi의 몇몇 종들은 단축된 포자형성과정을 통하여, 1-10개의 적은 핵을 포함하는 작은 sporangium을 형성할 수 있다는 것이 알려져 왔다(3, 12, 16). 비교적 최근에 *Allomyces macrogynus*의 단축된 포자형성과정에 대한 연구에서는, sporangium 전체의 핵 중에서 소멸되는 핵의 개수를 정량적으로 측정함으로써, 핵의 소멸이 포자형성과정의 필수적인 과정이라는 가설을 제안하였다(6). 그러나 가장 많이 연구된 zoosporic fungi의 하나라고 볼 수 있는 *Blastocladiella emersonii*의 단축된 포자형성과정에 대한 연구에서는, 핵의 소멸은 일어나지 않는 것으로 보고 되었다(4, 12).

본 연구에서는 핵의 소멸이 포자형성과정의 필수적인 과정이라는 가설을 뒷받침하기 위하여, *B. emersonii*의 단축된 포자형성과정을 재조사하고자 하였으며, 핵의 소멸이 일어난다는 증거들을 수집하였다.

재료 및 방법

Zoospore의 준비

본 연구에 사용된 *B. emersonii*의 균주는, 브라질의 Universidade de Sao Paulo의 S. L. Gomes 박사에게 의해 제공되었다. PYG agar (peptone 1.25 g, yeast extract 1.25 g, glucose 3 g, agar 20 g/L) plate에서 유지된 stock culture에 dilute salts solution (DS, 14)을 부으면, 약 1시간 후에 zoospore들이 방출된다. 이 zoospore 용액을 다시 새로운 PYG plate에 접종하여, 24°C에서 20 시간 동안 배양하고, 다시 DS를 부으면 실험에 사용할 zoospore 용액을 얻을 수 있다(15).

포자형성의 유도

Coverglass가 깔려있는 배양접시에 20 mL의 PYG broth를 붓고, zoospore 용액을 접종한다 (10^5 - 10^6 cells/90 × 15 mm plate). 단축된 포자형성과정의 유도를 위하여, 33°C에서 1-3시간 동안 PYG broth에서 자란 균체를, DS로 10분 동안에 5번 씻어준 다음, DS에 담긴 상태로 33°C에서 보관한다. zoospore는 DS로 씻은 지 3-4 시간 후에 균체(sporangium)로 부터 방출된다.

현미경의 사용

각 균체에 존재하는 핵의 수의 관찰은 전에 보고 된 방법(6)을 따라 행해졌다. 단축된 포자형성과정의 전자현미경 연구를 위하여, 1시간 동안 PYG broth에서 자란 균체를, DS로 10분 동안에 5번 씻어주었다. 33°C DS에 보관된 상태에서, 10분 마다 시료를 취하여 고정하였다. 고정방법은 chemical fixation(12) 혹은 cryofixation과 freeze substitution(5)의 방법을 사용하였다. 모든 시료는 90% 이상의 serial section을 통하여 분석되었다. 전자현미경은 Hitachi H-7100 (기초과학 지원연구원 대구분소) 이 사용되었다.

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 055-320-3264, Fax: 055-337-1301

E-mail: mbcwcho@inje.ac.kr

결 과

PYG broth에 zoospore를 접종하여 60분간 배양한 후, 균체를 DS로 옮겼을 때, 균체 당 핵의 수는 서서히 증가하다가, zoospore를 방출하기 전에 감소하였다(Fig. 1, Panel 1). 대부분의 균체들, 즉 sporangia는, 균체 당 한 개의 zoospore 만을 방출하였다. PYG broth에 zoospore를 접종하여 각각 120분, 150분, 180분간 배양한 후, 균체를 DS로 옮겼을 때, 항상 핵의 수의 초기의 증가와 후반부의 감소가 관찰되었다(Fig. 2, Panel 2).

전자현미경의 연구에서, DS로 옮긴지 90 - 100분 후, 균체에 들어있는 2개의 핵 중 한 개가, 핵막이외에도 두 층의 막에 의해 부분적으로 둘러싸여 있는 것이 관찰되었다(Fig. 2, Panel 1). 이 화학적으로 고정된 균체에서는, 납작한 vacuole로 추정되는 두층의 막 주변에서, 수많은 막대 모양의 vesicle들(Fig. 2, Panel 2), 또는 막이 감겨있는 형태의 lamellae 구조들(Fig. 2, Panel 3)도 관찰되었다. 본 연구에서 관찰된 대부분의 균체(약 50개)에서 핵은 부분적으로만 막에 둘러싸여 있었으며, 오직 한 개의 균체에서만 두 층의 막에 의해 완전히 둘러싸인 핵을 관찰할 수 있었다(Fig. 3, Panel 1). DS로 옮긴지 110 - 120분 후 고정된 균체의 일부에서는, 2개의 핵 중 한 개가 단일 막으로 이루어진 vacuole 안에서 관찰되었으며(Fig. 3, Panel 2 and 3), vacuole 안에서 분해되고 있는 핵도 관찰할 수 있었다(Fig. 3, Panel 3). DS로 옮긴지 110 - 120분 후 고정된 대부분의 균체에서는, 오직 1개의 핵만이 관찰되었다.

포자형성과정에서 나타나는 세포질의 autophagy와 핵의 소멸을 비교하기 위하여, 세포질의 autophagy라고 추정되는 변화도 추적되었다. 세포질의 일부가 단일 또는 이중 막에 둘러싸인 모습뿐만 아니라, 핵을 둘러싸고 있는 vacuole 및 vesicle과 유사한 구조물들이 세포질 또는 mitochondria의 주변에서 관찰되었다(Fig. 3, Panel 4 and 5).

핵의 소멸에 관여하는 vacuole 및 vesicle의 정체를 좀 더 명확

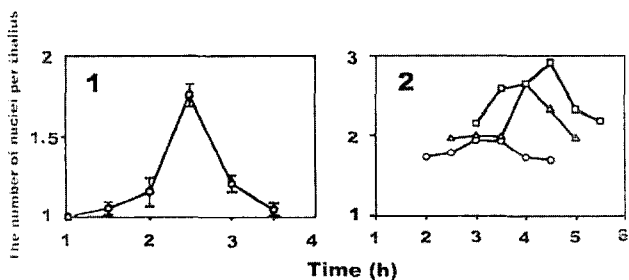


Fig. 1. Changes in the number of nuclei during sporogenesis. Sum of the number of nuclei within thalli was divided by the number of thalli examined. The time of zoospore inoculation into PYG broth was designated as 0 h. Panel 1, Zoospores were incubated in PYG broth for 60 min and then shifted to DS. More than 90% of the thalli discharged zoospores within 3 h after shift to DS. Panel 2, Zoospores were incubated in PYG broth for 120 min (○), 150 min (△), and 180 min (□) before shift to DS. More than 80% of the thalli discharged zoospores within 3.5 h after shift to DS.

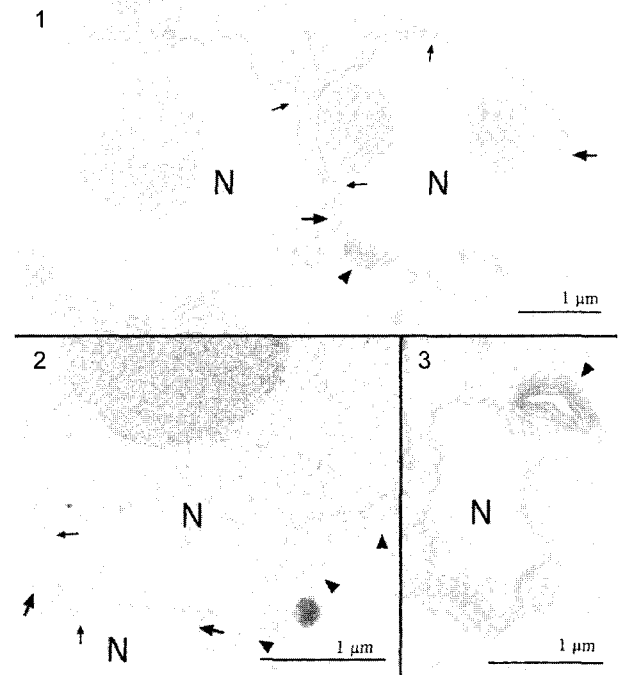


Fig. 2. Nuclei partially surrounded by a double-membrane bound vacuole. Panel 1, About two thirds of the surface of a nucleus is surrounded by a vacuole. Arrowhead indicates small lamellar structures. This thallus was stained with potassium ferricyanide. Panel 2, The surface of a nucleus that is not covered by a vacuole is associated with numerous rod-shaped vesicles (arrowheads). Panel 3, Lamellar structures (arrowhead) are associated with a vacuole. Abbreviations: M, mitochondria; N, nucleus; small arrow, nuclear envelope; large arrow, double-membrane bound vacuole.

히 하기 위하여, cryofixation과 freeze substitution을 통해 핵의 소멸과정을 조사하고자 하였다. 불행히도 핵을 둘러싸고 있는 이중막, vesicle, lamellae 등은 냉동 고정된 세포에서는 관찰되지 않았으며, 오직 핵을 둘러싸고 있는 단일 막으로 이루어진 vacuole 만이 관찰될 수 있었다(Fig. 3, Panel 6 and 7).

고 찰

*B. emersonii*의 포자형성과정에 관한 이전의 연구에서는, sporangium의 유도로부터 zoospore가 방출되기까지의 전 과정에서 핵의 수는 일정하게 유지된다고 보고되었다(3, 4). 그러나 핵의 수의 변화에 대한 본 연구의 정량적인 실험은, 초기의 핵 분열과 후기의 핵 소멸을 통해, sporangium 발달 초기의 핵의 수와 zoospore가 방출 될 때의 핵의 수가 유사해진다는 것을 보여 준다. 동시에 핵의 소멸은 포자형성과정의 필수적인 부분 과정이라고 생각 할 수 있다. 초기의 핵 분열은 핵의 세포주기 상태를 G1으로 돌리기 위해 필요한 과정으로 생각할 수 있을 것이다. 동시에, 후기의 핵 소멸은 세포질의 양과 핵의 수의 비를 조절해서, 비교적 일정한 크기의 세포질을 가진 단핵의 zoospore를 만들기 위한 작업이라고 생각할 수 있다.

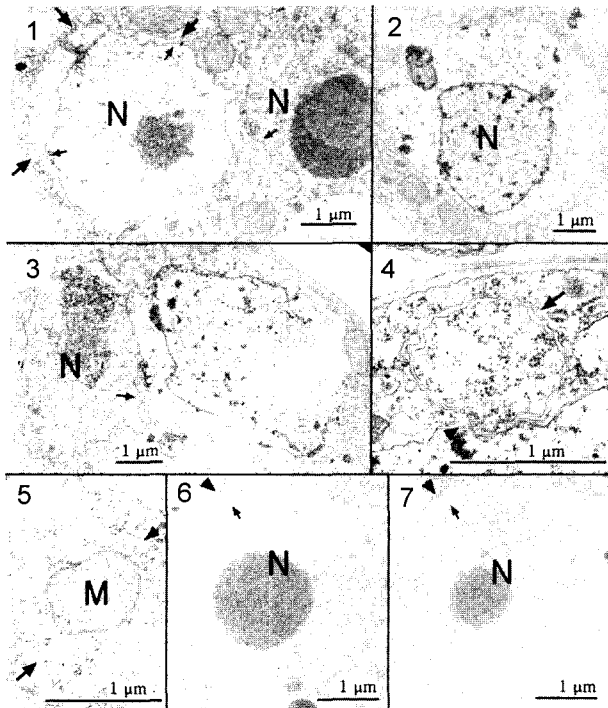


Fig. 3. Panel 1, Serial sections indicate that the nucleus is completely surrounded by a double-membrane bound vacuole. Panel 2, A nucleus is surrounded by a single-membrane bound vacuole. Panel 3, Degradation of the nucleus is observed within a single-membrane bound vacuole. Panel 4, Cytoplasm surrounded by a double-membrane bound vacuole and vesicles. Panel 5, A mitochondrion surrounded by a double-membrane bound vacuole and vesicles. Panels 6 and 7, Non-consecutive sections of a cryofixed cell. Single membrane (arrowheads) is barely observed outside the nuclear envelope.

전자현미경의 연구결과를 바탕으로, 핵의 소멸과정을 추정해 보면 다음과 같다. 우선 두 개의 핵 중 한 핵이 vacuole로 추정되는 이중 막에 의해 서서히 둘러싸이게 된다. 완전히 둘러싸인 다음에는 곧 한 층의 막이 사라지면서, 핵이 거대한 vacuole에 둘러싸이게 된다. 핵의 분해는 vacuole 안에서 시작되는 것으로 보인다.

이러한 핵의 소멸과정은 동물 세포에서 보고된 세포질의 autophagy와 매우 유사하며(7), *B. emersonii*에서 관찰되는 세포질의 autophagy와도 유사한 것으로 보인다. autophagy의 연구에서, 아직 밝혀지지 않은 문제들 중의 하나는 처음 세포질을 둘러싸게 되는 이중 막의 기원이다. *B. emersonii*에서 발견되는 수많은 vesicle들은, 이중 막의 기원이 동물에서의 주장과는 달리 ER이 아닐 수도 있다는 것을 제안한다. 그러나 chemical fixation에서 발견된 vesicle들이 단순한 artefacts일 수도 있다는 점, 그리고 cryofixation으로 vesicle을 보존하는데 실패했다는 점 때문에 더 이상의 추론은 가능하지 않다.

현재 cryofixation을 통해서 핵의 소멸에 관여하는 vacuole과 vesicle을 보존하기 위해 노력하고 있다. 이들 막의 보존은, 핵의 소멸과정을 autophagy 연구를 위한 훌륭한 모델 시스템으로 만

들 것으로 믿는다.

감사의 글

이 연구는 2002년 인제대학교 학술연구조성비의 지원으로 이루어졌습니다. TEM의 사용에 도움을 주신 기초과학지원 연구원 대구분소에 감사드립니다.

참고문헌

1. Alexopoulos, C. J. and C. W. Mims. 1979. Introductory Mycology. 3rd ed. John Wiley & Sons Inc.
2. Armbruster, H. C. 1982. Sporangiogenesis in three genera of the Saprolegniaceae. I. Pre-sporangium hyphae to early primary spore initial stage. *Mycologia* 74, 433-459.
3. Barstow, W. E., G. D. Freshour, and W. L. Lingle. 1987. Induction of minicycle sporogenesis. p. 270-273. In: Zoospore fungi in teaching and research. Eds., M. S. Fuller, and A. Jaworski. South-eastern Publishing Corp., Athens, Georgia.
4. Barstow, W. E. and J. S. Lovett. 1978. Ultrastructure of a reduced developmental cycle (Minicycle) in *Blastocladiella emersonii*. *Exp. Mycol.* 2, 145-155.
5. Cho, C. and M. S. Fuller. 1989. Ultrastructural organization of freeze-substituted zoospores of *Phytophthora palmivora*. *Can. J. Bot.* 67, 1493-1499.
6. Cho, H., H. Youn, and C. Cho. 1999. Changes in the number of nuclei during minicycle sporogenesis of *Allomyces macrogynus*. *Mycologia* 91:923-929.
7. Dunn, W. A. 1990. Studies on the mechanisms of autophagy: Maturation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.* 110, 1935-1945.
8. Dylewski, D. P. and C. E. Miller. 1983. Nuclear elimination during cyst formation in *Woronina pythii* (Plasmodiophoromycetes). *Mycologia* 75, 271-279.
9. Fuller, M. S. 1977. The zoospore, hallmark of the aquatic fungi. *Mycologia* 69, 1-20.
10. Guttes, E., S. Guttes, and H. P. Rusch. 1961. Morphological observations of growth and differentiation of *Physarum polycephalum* grown in pure culture. *Dev. Biol.* 3, 588-614.
11. Hemmes, D. E. and H. R. Hohl. 1973. Mitosis and nuclear degeneration: simultaneous events during secondary sporangia formation in *Phytophthora palmivora*. *Can. J. Bot.* 51, 1673-1675.
12. Hennessy, S. W. and E. C. Cantino. 1972. Lagphase sporogenesis in *Blastocladiella emersonii*: induced formation of unispored plantlets. *Mycologia* 64, 1066-1087.
13. Hepler, P. K. 1981. The structure of the endoplasmic reticulum revealed by osmium tetroxide potassium ferricyanide staining. *Eur. J. Cell Biol.* 26, 102-110.
14. Machlis, L. 1953. Growth and nutrition of water molds in the subgenus *Euallomyces*. I. Growth factor requirements. *Amer. J. Bot.* 40, 189-195.
15. Murphy, M. N. and J. S. Lovett. 1966. RNA and protein synthesis during zoospore differentiation in synchronized cultures of *Blastocladiella*. *Dev. Biol.* 14, 68-95.
16. Youatt, J. 1976. Sporangium formation in *Allomyces* throughout the growth cycle. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 67, 159-161.

(Received September 15, 2004/Accepted December 15, 2004)

ABSTRACT : Nuclear Degeneration During Reduced Sporogenesis in *Blastocladiella emersonii*.

Hyun-Joo Youn and Chung-Won Cho (Department of Microbiology, Inje University, Kimhae City, Kyungnam 621-740, Korea)

In *Blastocladiella emersonii*, a member of zoosporic fungi, development of small sporangia containing a few nuclei can be induced. During these reduced sporogenesis, degeneration of some of the nuclei was observed within the sporangia. This observation supports the hypothesis that the nuclear degeneration is an essential part of sporulation. Morphological changes associated with the nuclear degeneration were similar to those of the autophagy of cytoplasm. This system of nuclear degeneration would become the good model system for the study of autophagy.