



Characterization of artificially induced zinc-tolerant yeast mutants

Sangman Lee¹

아연 저항성 갖는 인위적으로 유도된 효모 돌연변이체의 특성

이상만¹

Received: 10 January 2017 / Accepted: 7 March 2017 / Published Online: 30 June 2017
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2017

Abstract Bioremediation is a technique using microorganisms to clean up contaminated pollutants including heavy metals. It is well known that yeasts have a high capacity to remove a wide range of metals by biosorption. Therefore, this study was focused on to obtain yeast mutant that has strong tolerance to zinc (Zn), one of representative heavy metals. The Zn resistant yeast mutant (ZnR) was induced and isolated by growing yeast cells in media containing 1 mM ZnCl₂ and gradually increasing the concentration until 80 mM ZnCl₂, in which cells were adapted and survived. The induced ZnR cells showed strong tolerance to Zn stress compared with control cells. Moreover, the ZnR cells showed increased tolerance to cadmium and nickel stress but decreased tolerance to copper stress. The increased tolerance of ZnR cells to Zn stress was due to mutation of genes. This study can be useful in bioremediation of heavy metals as the metal tolerant microorganism was artificially induced in short time.

Keywords Bioremediation · Heavy metal · Mutation · Yeast · Zinc

Sangman Lee (✉)
E-mail: sangman@knu.ac.kr

¹Division of Applied Biology and Chemistry, School of Applied Biosciences, College of Agriculture and Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

중금속은 생물의 성장에 불필요한 카드뮴, 납, 수은 등이 존재하며 이들은 적은 양으로 존재해도 생물에 치명적으로 작용할 수 있으며 구리, 아연, 철 등의 생물의 성장에 필요한 중금속은 적정량 이상으로 존재할 때 생물에게 해를 끼친다. 따라서 생물은 중금속 스트레스에 방어하는 메커니즘이 오랜 세월을 통해서 발전되어 왔으며 현재도 진행 중이다.

중금속으로 오염된 수질 및 토양을 정화하기 위해서 미생물이 이용되는 생물학적정화가 있다(Gad 등, 2010; Gaur 등, 2014). *Saccharomyces cerevisiae*를 포함한 효모는 다양한 종류의 금속을 흡착하고 세포들이 서로 쉽게 뭉쳐서 무게의 증가로 수질 환경에서 바닥으로 침전되는 방식으로 금속 제거하는 능력이 탁월하다. 효모의 이러한 특징 때문에 중금속을 정화하는 생물학적정화에 효과적으로 이용이 된다(Soares와 Soares 2012). 하지만 중금속을 많이 축적하고 동시에 저항성도 높은 돌연변이 된 효모를 분리하기란 불가능에 가깝다고 알려졌다(Ruta 등, 2010). 따라서 생물학적정화에 사용되는 미생물은 세포 내 중금속 축적을 높이는 것에 초점을 두기 보다는 고농도의 중금속이 함유된 환경에서 죽지 않고 살아 남는 미생물 분리가 최근의 연구 동향이다(Soares와 Soares 2012; Gaur 등, 2014).

본 연구의 목적은 대표적인 중금속 중 하나인 아연에 큰 저항성 갖는 효모의 분리가 인위적으로 실험실 조건에서 가능한지를 알아보며 분리된 효모의 특성을 분석하며 또한 아연 저항성과 관련성이 있는 후보 유전자를 알아보는 것이다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용된 대조구 효모는 *Saccharomyces cerevisiae* strain INVsc1 (*his3Δ1/his31 leu2/leu2 trp1-289/trp1-289 ura3-52/ura3-*

52) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로서 pYES2 벡터 (Invitrogen)를 포함하고 있으며 아연 저항성 효모 유도 및 분리에 이용되었다. 효모 성장에 사용된 배지(SC-Ura+Glc)는 우라실이 없고 그 외 성장에 필요한 질소와 아미노산을 포함하고 있으며 2% 포도당을 첨가하였다(Lee와 Kang 2005).

아연 저항성을 갖는 효모 유도

아연에 저항성을 갖는 효모 유도는 대조구 효모를 5 mL 액체 배지에 접종해서 30 °C에서 24 h 키운 후 자란 효모 100 μ L를 1 mM ZnCl₂이 포함된 5 mL 배지에 접종하였다. 24-48 h 이내에 효모가 잘 자라면 아연의 농도를 1 mM 단위로 점차 높였으며 잘 자라지 않으면 아연의 농도를 높이지 않고 현재 또는 이전 사용된 농도에서 성장이 계속 진행되도록 하여 최종 80 mM까지 하였으며 이 농도는 효모가 성장하는 한계점 근처의 농도로 보여진다. 이렇게 하여 아연에 저항성을 갖는 효모를 Zinc Resistant (ZnR)이라 명명하였으며 유도하는데 걸리는 시간은 대략 6개월 정도이다.

금속 민감성 분석

다양한 금속에 대한 효모의 민감성 분석은 액체배지에 24 h 키운 효모 50 μ L를 다양한 금속이 여러 농도로 존재하는 5 mL 액체배지에 접종하여 30 °C에서 24 h 키운 후 분광광도계로 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DNA microarray 분석

대조구와 ZnR 효모를 액체배지에 30 °C에서 24 h 키운 후 RNA를 추출한 후 Agilent's 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)을 이용하여 전체 RNA의 질을 측정하였고 Agilent's Low RNA Input Linear Amplification kit PLUS를 이용하여 증폭 및 라벨링 과정을 거쳤으며 microarray hybridization/wash은 Agilent's Gene Expression Hybridization/Wash Kit를 이용하였다. 사용된 microarray는 Agilent사의 Agilent yeast whole genome (V1) 4 × 44K array이다. 스캔 및 영상분석은 Agilent's DNA microarray scanner 및 Feature Extraction Software를 이용하였고 데이터 분석은 Agilent's GeneSpring Software를 이용하여 normalization 및 clustering 등을 수행하였다.

결과 및 고찰

ZnR의 아연 저항성 분석

오랜 기간 동안 중금속에 노출된 미생물은 그렇지 않은 미생물에 비해서 중금속저항성이 높다는 연구 결과가 있다(Díaz-Raviña와 Bååth 2001; Villegas 등, 2005; Zafar 등, 2007). 또한 미생물을 중금속 스트레스에 인위적으로 오랜 기간 노출시켜 중금속에 대한 저항성 증가를 유도할 수 있다는 연구 결과도 있다(Díaz-Raviña와 Bååth 1996). 본 연구에서 인위적으로 효모를 지속적으로 아연에 노출시켜 아연에 대한 저항성이 증가된 효모 ZnR은 성장 속도, 콜로니 모양 및 색깔에 있어 대조구인 효모와 비교하여 차이가 없었다. 분리된 ZnR이 아연에 대한 저항성 증가가 일시적인 아연 스트레스에 대한 적응인지 아니면

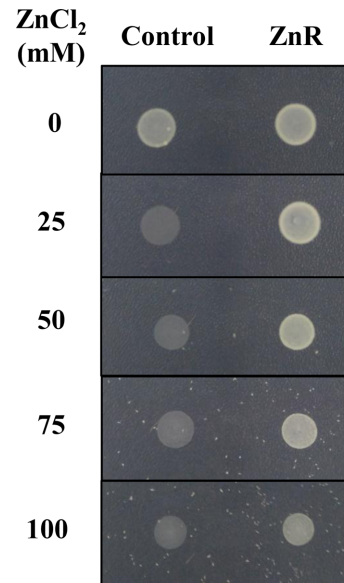


Fig. 1 Comparison of sensitivity to Zn of control and Zn resistant (ZnR) yeast mutant. Both control and ZnR cells were grown on SC-Ura+Glc agar media containing various concentrations of Zn for 48 h at 30 °C, after which photographs were taken

영구적으로 획득한 것인지를 알아보기 위해서 ZnR을 아연 스트레스가 없는 배지에 여러 번 성장하게 해서 아연에 대한 일시적 적응을 없앴다. 이러한 ZnR을 다양한 농도의 아연이 포함된 고체배지에 10 μ L 접종한 후 2 d 배양하여 아연에 대한 저항성 증가가 영구적인지 분석하였다(Fig. 1). 대조구 효모는 아연의 농도가 25 mM일 때 콜로니 생성이 안되었지만 ZnR은 아연의 농도가 100 mM인 경우에도 콜로니 생성이 가능하였다. 이러한 결과는 ZnR이 고농도의 아연에 대한 저항성 증가가 일시적인 적응에 의한 것이 아니고 영구적으로 획득한 것이며 그 이유로서 아연 저항성 관련 유전자에 돌연변이가 일어난 결과라고 추정된다.

ZnR의 다양한 금속 저항성 분석

한 종류의 중금속 스트레스에 적용된 미생물은 종종 다른 종류의 중금속에 저항성을 보이기도 한다(Rehman 등, 2008). 따라서 ZnR이 아연뿐만 아니라 다른 종류의 금속 스트레스에도 저항성을 획득했는지를 알아보았다(Fig. 2). 이번에는 고체배지가 아닌 액체배지 조건에서 아연에 대한 저항성을 비교한 결과 대조구 효모는 아연의 농도가 20 mM일 때 성장이 거의 일어나지 않았으며 30 mM일 때는 성장이 멈췄고 이에 반해서 ZnR은 아연의 농도가 60 mM 되어도 성장은 40% 정도만 억제되었지만 성장은 지속적으로 유지됨을 알 수 있다(Fig. 2A). ZnR은 아연뿐만 아니라 카드뮴에 대한 저항성도 증가되었음을 볼 수 있었고(Fig. 2B) 니켈에 대한 저항성 증가도 있음을 알 수 있었다(Fig. 2C). ZnR은 구리에 대한 저항성은 오히려 감소되었고(Fig. 2D) 알루미늄과 수은에 대한 저항성은 변화가 없음을 확인하였다(Fig. 2E, F). 본 연구에서 효모의 아연에 대한 저항성 증가가 아연 이외의 다른 금속인 카드뮴과 니켈에 대한 저항성 증가로 이어질 수 있는 것은 기존의 연구 결과와 유사하

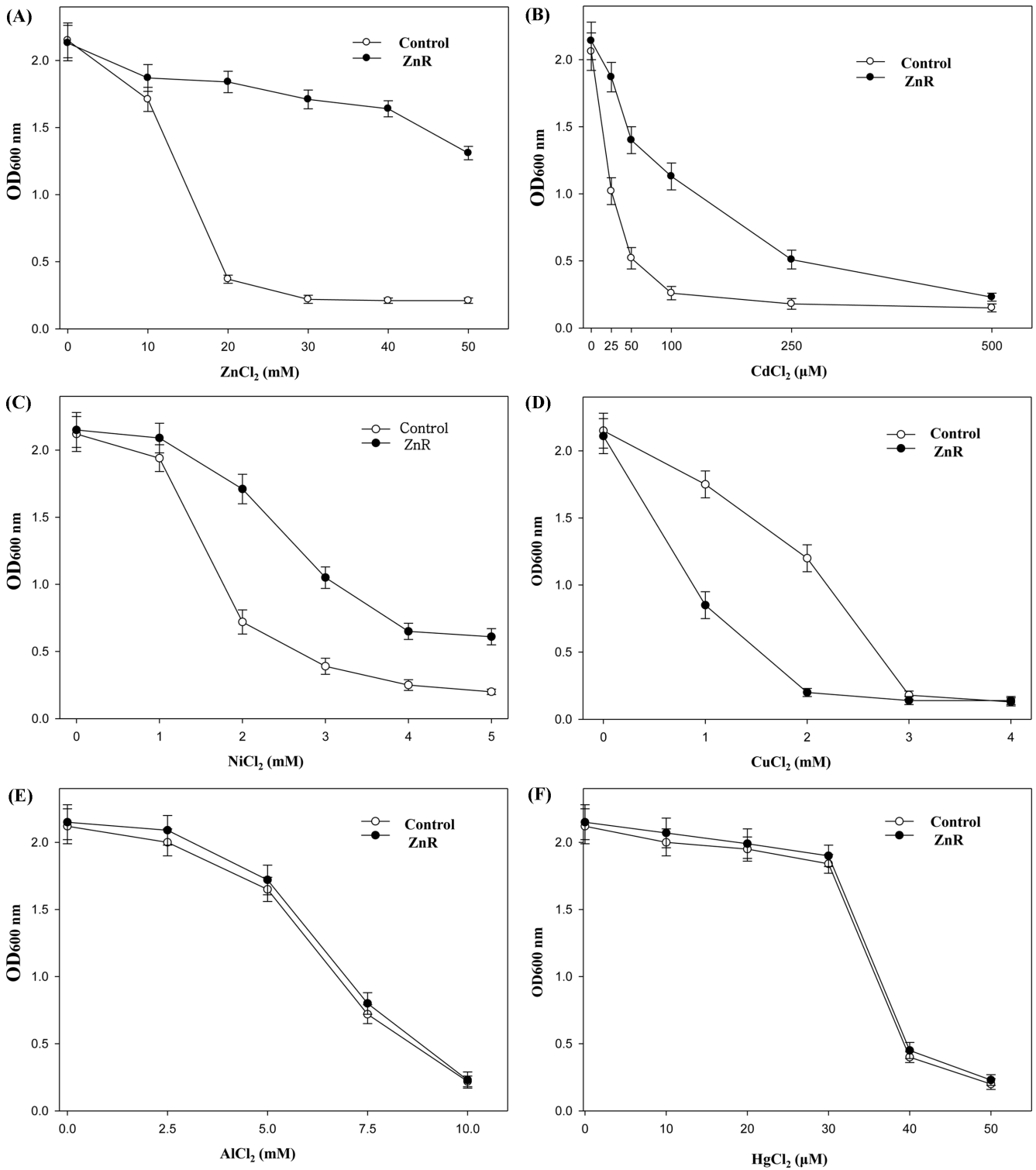


Fig. 2 Comparison of sensitivity to various metals between control and Zn resistant (ZnR) yeast mutant. Both control and ZnR cells were grown in liquid SC-Ura+Glc media containing various concentrations of metals for 24 h at 30 °C. (A), Zn; (B), Cd; (C), Ni; (D), Cu; (E), Al; (F), Hg. Cell density was then measured spectrophotometrically at 600 nm. Values shown are the means ± SE of three replicates

Table 1 Partial list of up-regulated genes in Zn resistant (ZnR) yeast mutant

Fold change	Gene symbol	Molecular function
90.73	MF(ALPHA)1	pheromone
65.12	ORF:YLR012C	molecular_function unknown
55.94	SAG1	cell adhesion receptor
42.26	AGA1	cell adhesion receptor
29.87	ORF:YGL193C	molecular_function unknown
28.82	URA3	orotidine-5-phosphate decarboxylase
25.09	YGP1	molecular_function unknown
20.30	RME1	transcription factor
20.02	SCS7	not yet annotated
19.75	STE3	mating-type a-factor pheromone receptor
19.42	PGM2	phosphoglucosyltransferase
17.43	UBC4	ubiquitin conjugating enzyme
17.10	FRE7	molecular_function unknown
16.87	PRM1	molecular_function unknown
16.80	SPI1	molecular_function unknown
15.47	ORF:YML025C	structural constituent of ribosome
13.33	ROX3	RNA polymerase II transcription mediator
13.09	SRC1	molecular_function unknown
12.93	FPR3	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
12.42	REG2	protein phosphatase type 1
12.20	FUS3	MAP kinase
11.94	MET10	sulfite reductase (NADPH)
11.70	SSY5	molecular_function unknown
11.58	ORF:YGR067C	molecular_function unknown
11.47	ORF:YDR116C	structural constituent of ribosome
11.21	ORF:YCR041W	molecular_function unknown
11.11	PRC1	carboxypeptidase C
10.62	DCP2	molecular_function unknown
10.59	PMT1	dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase
10.56	TPO3	spermine transporter

지만(Ahemad와 Malik 2012) 구리에 대한 저항성 감소는 일련의 아연 저항성 유도 과정에서 구리 저항성 관련 유전자에 돌연변이가 일어난 결과라고 추정된다.

ZnR의 변화된 유전자 발현 분석

카드뮴, 납, 아연 등을 포함한 대부분의 중금속은 돌연변이를 유발하는 물질로 알려져 있다(Jin 등, 2003; Giaginis 등, 2006). 미생물은 중금속 스트레스에 적응하기 위해서 생리적 및 유전적 적응을 통해서 이루어진다(Duxbury와 Bicknell 1983; Diaz-Raviña와 Bääth 1996). 따라서 ZnR이 아연에 대한 저항성 증가의 원인으로 관련 유전자의 돌연변이에 기인한다고 추정되며 이를 확인하기 위해서 DNA microarray 분석을 하였다. 그 결과 ZnR은 control 효모와 비교하여 10배 이상 유전자발현이 증가된 것이 30 유전자 이상이며(Table 1) 정 반대로 유전자발현이 5배 이상 감소한 것도 30 유전자 정도로 보였다(Table 2). 발현이 증감된 상당수의 유전자의 기능은 아직 잘 알려지지 않았으며 아마도 아연 중금속 저항성에 관련이 있다고 추정된다.

Table 2 Partial list of down-regulated genes in Zn resistant (ZnR) yeast mutant

Fold change	Gene symbol	Molecular function
0.05	SPS100	molecular_function unknown
0.07	ORF:YKR105C	not yet annotated
0.08	ORF:YOR055W	molecular_function unknown
0.08	ORF:YGL007W	molecular_function unknown
0.08	SOL2	molecular_function unknown
0.09	ORF:YFL067W	molecular_function unknown
0.09	GIT1	molecular_function unknown
0.10	ORF:YCR105W	molecular_function unknown
0.10	ORF:YCR103C	molecular_function unknown
0.11	ORF:YCR100C	molecular_function unknown
0.12	ORF:YDL222C	molecular_function unknown
0.13	ORF:YLR279W	molecular_function unknown
0.13	JIP4	molecular_function unknown
0.14	ORF:YAL018C	molecular_function unknown
0.14	PGK1	phosphoglycerate kinase
0.14	ORF:YDL152W	molecular_function unknown
0.14	ORF:YBL100C	molecular_function unknown
0.15	BAP2	amino acid transporter
0.15	ECM23	molecular_function unknown
0.15	ORF:YOR338W	molecular_function unknown
0.15	ORF:YCR099C	molecular_function unknown
0.15	ORF:YHR214W	molecular_function unknown
0.15	ORF:YAR066W	molecular_function unknown
0.16	ORF:YOR263C	molecular_function unknown
0.16	ORF:YKL102C	molecular_function unknown
0.16	SPC25	structural constituent of cytoskeleton
0.16	AQY2	water channel
0.17	MAM1	molecular_function unknown
0.17	PBI2	endopeptidase inhibitor
0.17	ORF:YKR005C	molecular_function unknown
0.17	TIR3	molecular_function unknown
0.17	ORF:YCL069W	not yet annotated

유전자 기능이 알려진 것 중에서 sulfite reductase는 시스테인 생합성에 관여하며 대조구와 비교해서 발현이 12배 증가하였다. 시스테인은 중금속 스트레스 방어에 중요한 역할을 하는 글루타치온(glutathione)과 메탈로티오닌(metallothionein)의 주요 구성성분의 아미노산이다(Yadav 2010; Sakulsak 2012). 본 연구에서 분리된 ZnR이 아연에 대해서 저항성이 증가된 이유는 세포 내로 들어온 과량의 아연을 글루타치온과 메탈로티오닌에 존재하는 시스테인의 SH기가 아연과 결합하여 아연의 독성을 줄여 주기 때문이라고 추정된다. 이번 실험의 결과는 ZnR이 아연 저항성 관련 유전자에 돌연변이가 일어나 아연에 대한 저항성 증가가 영구적 획득된 것임을 알려준다.

본 연구 결과는 효모의 아연에 대한 저항성 증가는 돌연변이에 의한 영구적 획득으로서 실험실 조건 내에서 인위적으로 유도 가능하며 중금속을 정화하는 생물학적정화에 유용하게 될 것임을 확인시켜준다.

초 록

생물학적정화는 미생물을 이용하여 중금속을 포함한 오염물질을 정화하는 방법이다. 효모는 다양한 중금속을 흡착하여 정화하는 능력이 우수하다고 잘 알려졌다. 따라서 본 연구는 여러 중금속 중 하나인 아연에 저항성인 큰 효모를 인위적인 돌연변이를 통해서 얻는 것에 초점을 두었다. 대조구인 효모를 1 mM 농도의 아연이 포함된 배지에서 키운 후 점차 아연의 농도를 높여 최종적으로 80 mM이 되는 지점까지 키웠으며 이 농도는 효모가 점진적 적응을 거쳤어도 성장이 불가능한 한계점 근처이며 이렇게 유도 분리된 효모를 ZnR이라 명명하였다. ZnR은 대조구 효모보다 아연에 대한 저항성이 현저히 증가되었으며 이외에 카드뮴과 니켈에 대한 저항성도 증가되었지만 구리에 대한 저항성은 오히려 감소 되었다. ZnR이 보여준 아연에 대한 저항성 증가는 유전자 돌연변이에 의한 영구적인 획득 결과이다. 단 기간 내에 아연에 대한 저항성 큰 효모의 인위적인 유도 및 분리는 생물학적정화 연구에 유용하게 쓰여질 정보이다.

Keywords 돌연변이 · 생물학적정화 · 아연 · 중금속 · 효모

References

- Ahemad M, Malik A (2012) Bioaccumulation of heavy metals by zinc resistant bacterial isolated from agricultural soils irrigated with wastewater. *Bacteriol J* 2: 12–21
- Díaz-Raviña, Bååth E (1996) Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Appl Environ Microbiol* 62: 2970–2977
- Díaz-Raviña M, Bååth E (2001) Response of bacterial communities pre-exposed to different metals and reinoculated in an unpolluted soil. *Soil Biology Biochemistry* 33: 241–248
- Duxbury T, Bicknell B (1983) Metal-tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soils. *Soil Biol Biochem* 15: 243–250
- Gad AS, Attia M, Ahmed HA (2010) Heavy metals bio-remediation by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* and *Opuntia indica* waste. *J American Sci* 6: 79–87
- Gaur N, Flora G, Yadav M, Tiwari A (2014) A review with recent advancements on bioremediation-based abolition of heavy metals. *Environ Sci Processes Impacts* 16: 180–193
- Giaginis C, Gatzidou E, Theocharis S (2006) DNA repair systems at targets of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 213: 282–290
- Jin YH, Clark AB, Slebos RJ, Al-Rafai H, Taylor JA, Kundel TA, Resnick MA, Gordenin DA (2003) Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat Gen* 34: 326–329
- Lee S, Kang BS (2005) Phytochelatin is not a primary factor in determining copper tolerance. *J Plant Biol* 48: 32–38
- Rehman A, Farooq H, Hasnain S (2008) Biosorption of copper by yeast, *Loddermyces elongisporus*, isolated from industrial effluents: its potential use in wastewater treatment. *J Basic Microbiol* 48: 195–201
- Ruta L, Paraschivescu C, Matache M, Avramescu S, Farcassanu IC (2010) Removing heavy metals from synthetic effluents using “kamikaze” *Saccharomyces cerevisiae* cells. *App Microbiol Biotechnol* 85: 763–771
- Sakulsak N (2012) Metallothionein: An overview on its metal homeostatic regulation in mammals. *Int J Morphol* 30: 1007–1012
- Soares EV, Soares HM (2012) Bioremediation of industrial effluents containing heavy metals using brewing cells of *Saccharomyces cerevisiae* as a green technology: a review. *Environ Sci Pollut Res Int* 19: 1066–1083
- Villegas LB, Amoroso MJ, deFiguerola LIC (2005) Copper tolerant yeasts isolated from polluted area of Argentina. *J Basic Microbiol* 45: 381–391
- Yadav SK (2010) Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metals stress tolerance of plants. *South African J Bot* 76:167–179
- Zafar S, Aquil F, Ahmad I (2007) Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresource Technology* 98: 2557–2561