

Aspergillus nidulans 온도감수성 돌연변이주의 분리 및 분석

朴 贊 圭 · 姜 炫 三

(서울대학교 자연대학 미생물학과)

Isolation and Analysis of Temperature Sensitive Mutants in *Aspergillus nidulans*

PARK, Chan Kyu and Hyun Sam KANG

(Dept. of Microbiology, College of Natural Science, Seoul National University)

ABSTRACT

About 40 temperature-sensitive mutants have been isolated as a preliminary step to study the spore germination, the cell cycle, and the control of macromolecular synthesis in *Aspergillus nidulans*.

To obtain temperature-sensitive mutants rapidly and effectively, the selective enrichment method using antifungal antibiotic nystatin was developed. Based on the data which had applied to the concentration of auxotrophic mutants by the earlier investigators, the optimal concentration and the time of treatment at the nonpermissive temperature were determined as 50 to 100 units per ml and 4.5 hr., respectively.

Out of 41 ts mutants assigned to the strain symbol PK, thirteen that seemed to be arrested at the early stage of spore germination were subjected to the further cytological and genetic analysis. Eight of these mutants are able to form germ tube and five not.

Staining with acid fuchsin for the 5 PK strains shows that one irreversible mutant, PK6 strain able to form germ tube, accumulate mitotic spindle, being arrested in mitosis. Another PK15 and PK23 strain have more than one intact nucleolus without germ tube formation at the restrictive temperature.

The temperature-sensitive mutation in PK12 strain, the only strain which is able to grow on the temperature shift from permissive to restrictive, is thought to be occurred in certain gene specific for the germination of spore.

All of the ts markers are recessive and complement each other in heterokaryon between two different ts markers at the restrictive temperature.

서 론

*Aspergillus nidulans*가 본격적으로 유

전학적 연구대상으로 사용된 것은 1950년대 초부터이다. G. Pontecorvo와 J. A. Roper를 비롯한 몇몇 학자들은, 이 균류가 homothallic할 뿐만 아니라, 무성생식, 유성생식

및 준유성생식(parasexual reproduction)등의 다양한 유전적 재조합(genetic recombination) 기작에 의하여 생명현상을 구현하고 있음을 관찰하고, 그 나름대로의 특수한 유전학적 연구대상 또는 일반적인 유전학적 연구수단으로 이용될 수 있음을 시사하였다(Pontecorvo 등 1953) 특히 異形핵혼합과 二培體형성, 체세포분열에 의한 염색체 분리(mitotic segregation)등, 일련의 과정으로 수행되는 준유성생식은 다른 진핵생물계에서 아직까지 보고되지 않은 현상이나(Roper, 1966; Sermonti, 1969), 고등동물에 대한 세포공학적 연구의 융합세포에서 일어나는 현상(Sekiguchi, 1978)과 극히 약간의 유사성을 가지고 있다고 생각된다. 뿐만 아니라 *A. nidulans*는 원시적인 분화의 형태로서, 포자발아 및 군사분지의 단계가 있으므로 효모에서는 불가능한 연구가 가능할 것이다(Sussman, 1976).

온도감수성변이주는 분자유전학에 있어서 생명체의 고분자 합성 기작, 즉 필수 불가결한 기능(indispensible function; Horowitz & Leupold, 1951)을 연구하는 하나의 수단이 된다. 그러나 더욱 중요한 것은 이와 같은 기작들이 어떻게 상호조절 될 것인가 하는 문제로, 현재는 온도감수성변이를 이용한 접근이 시도되고 있다. 상대적으로 간단한 계로 생각되는 대장균에서는 DNA복제, 단백질 합성 및 세포분열 등을 지표로 연구가 진행되고 있으며(Jones & Danachie, 1973) 그보다 복잡하다고 생각되는 효모나 고등 동물세포에서는 세포주기, 즉 G_1 , S, G_2 , M등으로 구분하여 온도감수성변이주를 분리하고 있다.(Hartwell, 1974. a, b; Nishimoto, 1978) 효모에서는 형태학적으로 구분 가능한 지표(land marks)가 있어서 온도감수성변이주의 분리가 용이하며, 형태발생(morphogenesis) 및 분화(differentiation)에 필수적인, 유전자 발현의 의존경로(dependent pathway) 또는 독립경로(independent pathway)에 대한 연구가 가능하다. 고등동물 세포에서는 G_1 기의 어

떠한 조절기작의 결손에 의해 초래된다고 생각되는 발암기작의 해명에, 정보를 제공해 줄 수 있는 장점도 가지고 있다.

한편, *A. nidulans*는 단세포 미생물과 유사한 복제주기를 가지고 있으나(Fiddy & Trinci, 1976) 효모에서와 같은 형태적 지표가 없어, 쉽게 세포의 상태를 판정할 수 없으나, 다핵체(coenocyte)로서 존재하기 때문에, 핵분열주기에 관한 돌연변이주를 용이하게 얻을 수 있는 장점이 있다.(Orr & Rosenberger, 1976)

실제로 Mercer(1975)와 Morris(1976 a & b)는 핵분열과 Septation, 군사내의 핵분포에 결함이 생긴 45개의 온도감수성변이주를 분리한 후, 체세포분열 이전에 결함이 생긴 25개의 변이주를 *nim*, 분열과정에 결함이 생긴 9개의 변이주를 *bim*, septa를 형성 못하는 5개의 변이주를 *sep*, 비정상적인 핵분포를 하는 5개의 변이주를 *nud*로 각각 명명하여 분류하였다.

Orr와 Rosenberger(1976 a & b)는 수백 개의 온도감수성변이주를 분리하고, 그중 발아관을 형성하나, 단핵 상태로 머물러 있으며 서로 다른 상보군(complementation group)에 속하는 11주를 선택하여 제한온도에서의 고분자 합성 상태와 핵분열 단계에 따라 분류하였다.

그렇지만 포자발아나 정상세포주기의 조절기작을 효과적으로 연구하기 위해서는 포자의 발아 초기에 변이가 일어난 군주가 많을수록 유리하게 된다. 따라서 본 실험에서는 종래 영양요구성 변이주의 농축에 사용되던(Bal, 1974; Snow, 1966; Ditchburn & Macdonald, 1971) 항진균제인 nystatin을 사용하여 포자발아의 초기단계에 결함이 생긴 온도감수성 변이주를 선택적으로 농축하는 방법을 개발하고자 하였으며, 분리된 포자발아 및 세포주기변이주를, 준유성생식을 이용한 유전학적 방법이나 세포학적 방법으로 분류, 분석하였다.

재료 및 방법

1. 균주 및 배지

본 실험에서 親株로 사용된 야생주 *A. nidulans* Ab는 건국대학교 생물학과로부터 분양받은 것으로 분리된 돌연변이주의 유전자형 및 표기는 Table 2와 같다.

Malt extract 배지는 Orr & Rosenberger (1976a)에 따랐다. 완전배지와 최소배지는 Prichard (1968)에 의한 것을 사용했고, 필요에 따라서 colony 크기를 줄이기 위하여 Sodium deoxycholate를 최종농도, 0.05%로 첨가했다.

NTG 돌연변이 유발에 사용된 구연산 완충액은 Miller (1975)에 의하였다. 또 균일한 포자현탁액을 만들기 위해 Sodium lauryl sulphate를 0.001%로 넣은 증류수를 희석액으로 사용했다.

2. NTG에 의한 돌연변이 유발

malt extract 사면배지에서 4~5일 키운 균주에 멸균증류수를 넣어 얻은 포자를 malt extract 액체배지에서 30°C, 2시간 발아시킨 후 원심분리하여 구연산 완충액으로 세척한 뒤 100µg/ml NTG를 포함한 동일완충액에 재현탁시킨다. (Adelberg 등 1965; Orr & Rosenberg, 1976a; Miller, 1975) 30분후 포자를 세척하고 0.001% SDS를 포함한 증류수에 재현탁시켜 malt extract 배지에 접종한다. 이 때 생존률은 약 5~10%이었다. 배지에서 포자가 형성되면 이를 사용해서 돌연변이주를 분리, 농축하였다.

온도감수성변이주는 malt extract 배지에서 키울 때 35°C에서는 자라나 42°C에서 자라지 못하는 것을 total selection 또는 wire replicator를 사용한 방법으로 분리하였다. (Prichard, 1968)

3. 온도감수성변이주의 농축

A. nidulans A6 또는 PK주의 포자를 biotin을 공급한 최소배지에서 42°C, 3시간 배양한 후, 원심분리하여 nystatin을 최종농도로 각각 50, 100, 200과 300 units/ml되

도록 첨가하였다. 이어서 42°C, 3시간 더 배양한 뒤 원심분리하여 0.01% SDS를 포함한 생리식염수에 재현탁시킨다. 이 현탁액을 적당하게 희석하여 malt extract 배지에 도포한 후 35°C에서 3일 배양한 colony를 사용하였다.

4. 자외선을 이용한 색소돌연변이주의 분리

포자현탁액을 약 10⁶포자/plate가 되도록 malt extract 배지에 도포한 후 10~20% 생존률로 자외선을 조사하고 35°C에서 2일 배양한 후 황색이나 백색 colony를 순수 분리하였다.

5. 세포학적 분석

투석막을 사용한 배양법과 acid fuchsin 염색법은 Gagnon (1966)과 Harsanyi (1977), Robinson & caten (1969) 등에 의거하였다. 미리 멸균한 사방 2cm의 투석막을 malt extract 한천배지 위에 무균적으로 올려 놓은 뒤 0.001% SDS의 생리식염수에 현탁된 포자용액 (10⁴포자/ml) 몇 방울을 막 표면에 떨어뜨린다. 적당시간 배양 후, 투석막을 조성을 변형시킨 Helly 고정액에 10분간 담근 다음 70% ethanol로 고정액의 노란색이 없어질 때까지 씻어내린다. 이리하여 염색할 때까지 70% ethanol에 보관한다.

보관된 투석막을 증류수와 1% 초산용액으로 여러번 씻은 뒤 1% 초산용액으로 만든 0.005% acid fuchsin 염색액 2ml에 2.5분간 담근다. 이어 붉은색이 없어질 때까지 1% 초산용액으로 씻어낸 후 1% 초산용액 한방울을 떨어뜨린 slide위에 올려 놓고 광학 현미경하에서 관찰한다.

6. 유전학적 방법

異形핵 혼합체와 二培體의 합성은 Prichard (1968)의 방법에 의하였다. 우선 malt extract 한천배지 2ml을 넣은 시험관에 멸균증류수 1ml을 넣고 백균이를 사용하여, 합성하고자 하는 두 균주, 즉 온도감수성 표시유전자 및 색소표시유전자를 가진 균주의 포자를 증류수 표면에 띄우고 서서히 흔들어서 바닥으로 가라앉지 않고 골고루 섞이게 한다. 이를 30°C에서 하룻밤 배양한

뒤 균체 덩어리를 백금으로 꺼내어, 멸균된 여과지로 습기를 제거한 후 malt extract 한천배지의 중앙에 놓고 여러개의 작은 조각으로 찢어서 배지 가장자리에 분포시킨다. 계속해서 40°C에서 2~3일 배양한 뒤 비교적 빨리 자라는 부채꼴 모양의 colony를 한천과 함께 떼어 내어 새로운 배지에 옮긴 후 42°C에서 4일 정도 배양한다. 이렇게 형성된 異形핵 혼합체의 colony로부터 포자현탁액을 만들어 약 2×10^7 개의 포자를 동일한 배지 및 조건에서 배양하던 二倍體가 선택적으로 분리될 수 있다.

異形핵 혼합체내에서 서로 다른 핵의 비는 colony의 모든 지역에서 무작위적으로 추출한 포자를 배양시킨 후, 발현된 colony 색깔에 의해서 서로 다른 색층 표시유전자의 비를 결정하고, 이로부터 각각의 핵의 비를 결정하였다(Warr & Roper, 1965).

결과 및 고찰

1. Nystatin 최적 농도 및 처리시간의 결정

Polyene계 항생물질은 세포벽의 sterol과 복합체를 형성하여 세포벽의 투과성에 커다란 변화를 초래하기 때문에, 세포의 대사활성이 증가되었을 때 선택적으로 작용한다고 보고된 바 있다. (Bal등, 1974; Snow, 1966) 이와 같은 효과로 polyene계 항생물질, N-glycosyl-polyfungin(Bal등, 1974)과 nystatin(Ditchburn & Macdonald, 1971)이 야생주와 변이주가 혼합되어 있는 최소한천배지나 최소액체배지로부터 영양요구성변이주를 농축하는데 사용되어 왔다.

마찬가지의 원리로 온도감수성변이주와 야생주는 제한 온도에서 서로 다른 감수성을 보일 것이 예상된다. 따라서 이와 같은 조건하에서 온도 감수성 돌연변이주를 선택적으로 농축하는 데는 nystatin의 농도와 제한온도에서의 배양 기간이 중요한 요인이 될 것이다. Fig. 1과 Fig.2에서 보는 바와 같이 미리 분리된 온도감수성변이주 중에서 제한 온도에서, 발아관을 형성하는 PK 6주

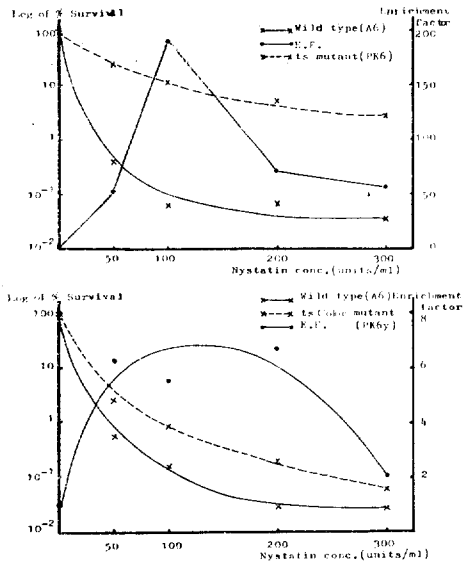


Fig. 1. The effect of different concentration of nystatin for 3 hrs., on the survival of conidia of wild type and PK6 strains in separate(upper) or mixed(lower) culture.

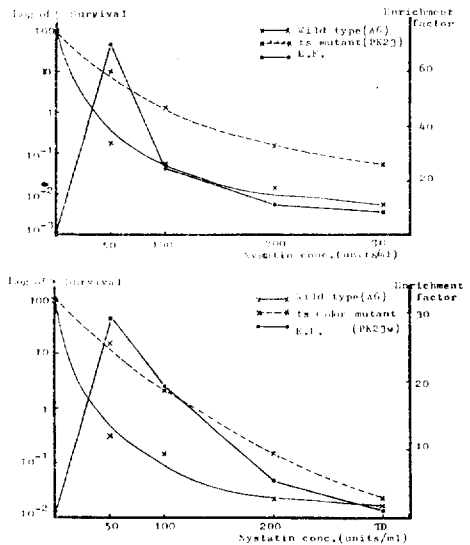


Fig. 2. The effect of different concentration of nystatin for 3 hrs., on the survival of conidia of wild type and PK23 strains in separate(upper) or mixed(lower) culture.

와 형성하지 않는 PK 23주를 사용하여 변이률의 농축이 가장 효율적인 nystatin농도를

결정하였다. 농축因數는 대조구를 1로 한 값으로 보정한, 야생주에 대한 온도감수성 변이주의 비를 나타낸다. PK 6주에 대해서는, 야생주와 혼합배양한 경우나 분리배양한 경우, 모두 nystatin 농도 100units/ml에서 최대로 농축되고 있다(Fig. 1). 한편 PK 23주의 경우는 50units/ml에서 효과적 인 것을 알 수 있다(Fig. 2). 이와 같은 결과는 아마도 서로 다른 유전적 결함을 가진 온도감수성변이주 간의 차이에 기인한 것으로 생각되나, 여하튼 발아 초기에 유전적

결함을 가진 온도감수성변이주가 50~100 units/ml의 nystatin 농도에서 야생주와 정도가 다른 감수성을 갖는 것은 분명한 일이다.

실제로 NTG를 처리한 후 배양시켜 표현형이 발현된 포자를 얻어서, 위에서 구한 농도로 nystatin을 처리하고, Bal등(1974)의 보고에 근거하여 배양시킨 결과 Table 1에서와 같이 nystatin 농도 50units/ml에서 그리고 4.5시간 배양한 후 항생제를 처리한 경우에 가장 높은 농축효과를 나타냈다. 또

Table 1. Concentration of ts mutant using antibiotic nystatin

Concentration of nystatin (units/ml)	Germination at rest. temp. (hr)	Incubation with nystatin(hr)	No. of Rest.	Colonies Permiss.	% of ts mutants ^a
Control	6 or 0	0	201±29 ^b	253±22	12.5
		3	56±7	77±13	5.9
50	3				
	4.5	1.5	21±5	32±4	29.4
100	3	3	5.2±2.2	7.6±3.9	13.3
	4.5	1.5	6.6±1.5	9.8±3.7	20

a. determined after duplicated plating

b. mean±standard error

이러한 방법으로 분리된 변이주들을 분석해 본 결과, 항진균제로 농축을 한 경우에는 그렇지 않은 경우보다, 발아 초기에 온도감수성 유전적 결함을 나타내는 변이주가 다른 시기에 온도감수성 유전적 결함을 나타내는 변이주보다 농축되는 비율이 약간 증가하는 것을 볼 수 있었다.

이러한 방법 이외에 실제로 동물세포에서는, thymidine합성효소를 저해하는 FUdR을 이용하거나, DNA합성이 일어나고 있는 세포에 BUdR을 도입시켜 자외선에 가까운 영역의 빛을 조사시키거나, 3H-thymidine 등을 이용하는 방법이 개발되고 있는 것을 볼 수 있으며(Nishimoto, 1978), 이들 방법은 원리적으로는 균류에도 적용가능하리라 생각된다. 그러나 이와 같은 농축법은 어느 것을 막론하고, 제한온도에서 안정성이 없는 변이주는 결코 분리할 수 없다는 문제점을 가지고 있다.

2. 돌연변이주의 선별

NTG로 돌연변이를 유발시켜, 35°C에서는 자라지만 42°C에서는 못자라는 40여개의 온도 감수성변이주를 親株 *A. nidulans* A6로부터 분리하였으며, 그 중 외견상 포자 발아의 초기에 유전적 결함이 일어난 것으로 보이는 13주에 대하여 주로 분석을 행하였다.

또 상보군을 결정하기 위하여 자외선을 처리(10~20% 생존률)하여 황색이나 백색을 띠는, 포자의 색소돌연변이를 유발시켰다. 그리하여 二重돌연변이주를 얻어 이후의 유전학적 분석에 사용하였다. 그 밖에 몇몇 온도 감수성 변이주에 대해서는, 준유성생식을 통하여 온도감수성 유전적 결손을 연구하기 위하여 NTG를 처리하여 영양요구성 돌연변이가 부가된 三重돌연변이주를 분리하였다(Table 2).

Table 2. Genotypes of *ts* mutants isolated

Symbol	Temperature-sensitive genetic marker	Additional color mutation ^a	Additional auxotrophic mutation ^b
PK 1	<i>ts</i> 1	white or yellow	No
PK 3	<i>ts</i> 3	"	No
PK 5	<i>ts</i> 5	"	yes
PK 6	<i>ts</i> 6	"	pyridoxine or nicotinic acid
PK 12	<i>ts</i> 12	"	No
PK 15	<i>ts</i> 15	"	No
PK 16	<i>ts</i> 16	"	No
PK 22	<i>ts</i> 22	"	No
PK 23	<i>ts</i> 23	"	vitamine-requiring
PK 24	<i>ts</i> 24	"	No
PK 34	<i>ts</i> 34	"	No
PK 38	<i>ts</i> 38	"	No
PK 41	<i>ts</i> 41	"	yes

a. in double mutants

b. in triple mutants

Linkage group of any genetic marker has not yet been assigned.

Table 3. Cytology of *ts* mutants at the nonpermissive temperature^a

<i>ts</i> mutant	Germ tube formation	Presence of intact nucleolus	Presumptive genotype ^b
PK 1	+	ND	ND
PK 3	+	ND	ND
PK 5	+	-?	ND
PK 6	+	-	<i>bim</i> 1
PK 12	-	ND	<i>grm</i> 1
PK 15	+	1 to 4	<i>nim</i> 1
PK 16	-	ND	<i>grm</i> 2
PK 22	-	ND	<i>grm</i> 3
PK 23	-	1 or 2	<i>grm</i> 4
PK 24	+	ND	<i>nim</i> 2
PK 34	-	ND	<i>grm</i> 5
PK 38	+	ND	ND
PK 41	+	+	<i>nim</i> 3

a. at 42°C after 20 hrs. cultivation

b. **ND**: not determined*grm*: mutant defective in germination*bim*: mutant that is arrested in mitosis*nim*: mutant that fails to enter mitosis**3. 온도감변성변이주의 세포학적 분석**

13 PK株에 대하여 제한온도에서 발아관 형성을 조사하여 보니, Table 3에서 보는 바와 같이 다섯株가 발아관을 형성하지 않

았다. 따라서 이들은 발아에 관여하는 유전자에 조건치사 돌연변이가 일어났다고 생각된다. 또 이들은 Table 5에서와 같이 서로 다른 상보군에 속하므로 일반적으로 서로

다른 cistron으로 생각되어 일단 서로 다른 *grm*의 표시유전자로 명명하였다.

N. cracssa(Charlang & Williams)나 *Dictiostelium discoideum*(Ennis & Sussman, 1975; Cotter & Dahlberg, 1977)에서는 이미 포자발아에 유전적 결손이 생긴 변이주가 분리되어 있으며, 전자의 경우는 세포막에 어떠한 손상이 있을 것이라고 생각되고 있고, 후자에서는 발아의 단계 즉 activation, swelling 및 amoebae 출현 등 각각에 해당하는 변이주를 얻고 있다.

Table 3에 보인 다섯 변이주에 대해 인과 방추사에 대한 염색을 한 결과 20시간 배양했음에도 불구하고 그림 3의 B, C, D에서 보인 바와 같이, 발아 초기에 머물러 있을 뿐만 아니라, 허용온도에서 8시간 배양한 PK株(Fig. 3A)와 대조적임을 알 수 있다. 야

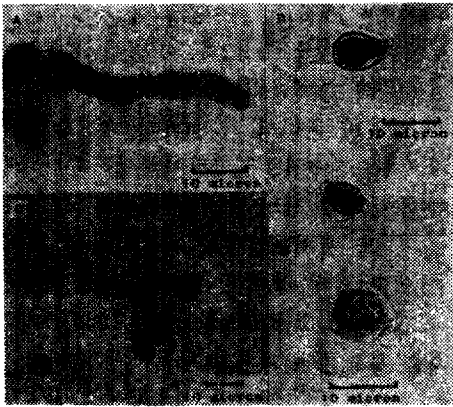


Fig. 3. Temperature-sensitive mutants of *A. nidulans* grown at 42°C for 20 hrs. except A which grown at 35°C for 8 hrs. All were stained with acid acid fucsin.

(A) PK23 strain($\times 2000$)

(B) PK6 strain($\times 2000$)

(C) PK23 strain($\times 800$)

(D) PK15 strain($\times 1500$).

생주의 경우도 마찬가지로 8시간 배양하면 그림 3A와 같이 핵이 세번 분열한 상태에 머물다(Bainbridge, 1971) PK 6株에서는 인이 보이지 않고 방추사라고 생각되는 물질이 있는 것으로 보아 세포분열 과정에 변이가 일어난 것으로 생각된다. Morris(1976

a)의 분류에 따르면 *bim*의 표현형에 해당하는 것으로 보인다. 그러나 PK5株(Table 3)에서 보는 바와 같이 방추사의 존재를 확인하기 불가능한 것은 포자를 고정할 때의 온도가 중요한 영향을 미치는 것 같다(Robinow & Caten, 1969).

PK 15(Fig. 3D)와 PK 23(Fig. 3C)株는 명확하게 한개 이상의 인이 존재하기 때문에 핵분열이 이미 시작된 것으로 생각된다. 따라서 발아관의 형성과 핵분열의 개시는 서로 독립적으로 일어날 수 있는 것으로 보인다. 그러나 세포분열시에 인의 행동이 아직 명확하지 않으므로 핵의 갯수를 인의 갯수로부터 추정하기는 어려울 것 같다(Robinow & Caten, 1969), Hartwell(1974 a, b)은 *Saccharomyces cerevisiae*에서 148 온도감수성 *cdc*(cell division cycle) 돌연변이주를 분리하고 세포분열과 DNA합성 단계의 여러 지표 사이에 두개의 의존경로가 있음을 규명하였다. 그러나 *A. nidulans*에서는 그와 같은 지표가 부족하므로 DNA나 RNA, 단백질 합성의 생화학적 분석과 유전학적 방법을 보완하여 온도감수성 돌연변이의 변이점(execution point)을 결정하여야 할 것이다.

PK 5와 PK 41주의 세포학적 특징은 아직 명확하게 구분되지 않았으며, PK 15주와 마찬가지로 어느정도 leaky한 돌연변이가 일어난 것으로 생각된다.

4. 온도 변환에 대한 변이주의 생장

11 PK주중 2주는 제한온도에서 허용온도로의 온도 변환에 의해 생장을 하지 않는 즉 비가역적인 특성을 보이고 있다(Table 4). 이론적으로 생각하면 온도감수성변이의 비가역성을 다음 두가지로 생각할 수 있을 것이다. 첫째는 온도감수성변이가 일어난 지점이 유전적 제어로 복잡하게 얽혀 있거나, 둘째로 제한온도에서의 오랜 기간 배양에 기인한 세포대사의 불균형으로 정상세포가 비가역상태로 변화된 경우가 있게 된다. 그런데 PK 6이나 PK 16株는 첫번째 경우보다는 오히려 후자에 속하는 것으로 생각

Table 4. Growth of ts mutants on the temperature-shift

ts mutant	From restrictive to permissive temperature	From permissive ^a to restrictive temperature ^b
RK 1	+	-
PK 3	+	-
PK 5	+	-
PK 6	-	-
PK 12	+	+
PK 15	+	-
PK 16	-	-
PK 22	+	-
PK 23	+	-
PK 24	+	-
PK 34	+	-

a. at 35°C for 20hr.

b. at 42°C

된다. 또 Table 4의 11 PK株 중 PK 12주는 허용온도에서 제한온도로 온도 변환을 하면 정상적인 생장을 나타내는데 이는 매우 흥미있는 현상으로 Table 3에서 보인 다섯 *grm* 돌연변이주 중에서 *grm* 1만이 온도 변환에 대한 생장을 보인 것이다. 따라서 *grm* 1 유전자는 정상세포주에게는 필요하지 않는 기능을 가지고 있으며 포자가 발아하는 동안에만 발현되는 유전자로 추측된다. 그렇다면 다른 *grm* 유전자의 표현형은 정상세포의 기능에도 영향을 미치는 것으로 생각할 수 있다. 따라서 포자가 발아하는, 즉 분화하는 때는 발아에 특이적인 유전자 뿐만 아니라 정상세포에 관여하는 유전자도 함께 관여할 것이며 분화가 진행됨에 따라 포자발아에 특이적인 유전자의 발현이 억제(repression)되거나, 활성화(activation)되지 않거나 할 것이다.

Jarvik와 Botstein(1973)은 형태발생 또는 생화학적 경로(biochemical pathway)에 있어서, 각각의 genetic event의 순서를 결정하는 간단한 유전학적 시험법을 개발하였다. 즉, 고온감수성 및 저온감수성 돌연변이를 우리가 알고자 하는 기능에 관여하는 두 유전자에 도입시켜서, 두 제한온도 사이에 온도 변환을 시켜 생장을 조사한 뒤, 두 기능의 관련 순서를 결정하는 것이다. 이는

이러한 온도감수성변이주의 분리와 이들 고온 및 저온감수성 돌연변이주 사이에 recombinant를 만드는 것이 가능한 생물계에는 어디에나 적용할 수 있다. 따라서 저온감수성변이주의 분리나(Dorm, 1965) recombinant 형성이 편리한 *A. nidulans*에도 적용하여, 온도감수성 돌연변이들에 관련되어 있는 유전자의 발현 순서를 결정할 수 있을 것이다. 또 배지조건이나 화학물질을 사용하여 어떤 일정 상태로 세포를 同調 배양시킨 후(Kessel & Rosenberger, 1968) 제한온도로 온도를 변환시킨 다음, 생장을 조사하는 방법도 동물세포의 온도감수성 돌연변이를 분석하는데 사용되고 있다(Nishimoto, 1978).

5. 제한온도에서의 상보성 실험

서로 다른 온도감수성 표시 유전자를 지닌 개체 사이에 합성된 異形핵혼합체나 二倍體 모두 제한온도에서 정상적으로 생장하는 것으로 보아 모든 표시유전자가 열성임을 알 수 있다(Table 5). 상보성 시험은 서로 같은 상보군에 속할 확률이 적고, 표현형이 크게 차이가 나는 온도감수성 돌연변이주 사이에서는 생략하였다. 그러나 온도감수성 표시유전자를 지닌 개체 사이에 합성된 異形핵혼합체내에 서로 다른 핵의 존재 비는 Table 5에서 보는 바와 같이 영양

Table 5. Complementation and nuclear ratio in heterokaryon at rest. temp.

	PK 1	PK 3	PK 6	PK12	PK15	PK16	PK22	PK23	PK24	PK34
PK 1		+	+		+D				+	
PK 3	U		+		+D				+	
PK 6		U			+D				+	
PK12						V	V	+		+D
PK15	U	B							+D	
PK16				V	U		+	+		+
PK22				V		B		+		+
PK23				U		U	U			+D
PK24	U	B	B		U					
PK34				U			B	U		

B. balanced heterokaryon
 V. PK12 strain grows only

U. unbalanced heterokaryon
 D. Formation of diploid sectors

요구성 돌연변이와는 다른 양상을 보인다. 이들 몇몇 온도감수성 돌연변이주 사이에서 얻은 불균형한 異形핵 혼합체는 상대형질간의 상호작용이나 핵과 세포질의 상호작용에 기인한 것이 아닌가 생각된다. 또 이들 異形핵 혼합체의 colony에서는 PK 15주에서 보는 바와 같이 영양요구성 표시 유전자를 사용해서 선택한 경우보다, 자발적인 二倍體의 sector가 높은 빈도로 형성되는 것은, 온도감수성 돌연변이에 의해 초래된 핵의

불안정한 상태나 그 밖의 알려지지 않은 요인에 의해, 핵융합의 빈도가 증가한 것으로 생각된다. 이와 같은 돌연변이주는 핵 융합 기작을 연구하는데 도움을 줄 수 있을 것이다.

분리된 온도감수성 돌연변이주의 표현형을 더욱 세부적으로 알기 위해서는 동형의 온도감수성 돌연변이주 사이에 이배체를 합성한 뒤 체세포분열 시의 염색체분리유형을 비교하는 방법도 도입할 수 있을 것이다.

적 요

40여 온도감수성 돌연변이주가 *Aspergillus nidulans*로 부터 분리되었다. 효과적인 온도감수성 돌연변이주의 분리를 위하여 항진균제 nystatin을 이용한 선택적 농축방법을 개발한 결과, 50 내지 100 units/ml의 처리농도와 비허용온도에서의 4.5처리시간이 가장 적합한 것으로 나타났다.

분리된 온도감수성 변이주 중 포자발아 초기에 머무는 것으로 보이는 13주에 대하여 세포학적 및 유전학적 분석을 행한 결과, 발아관을 형성하는 것 8주와 형성않는 것 5주가 관찰되었으며, 전자에 속하는 PK6 균주에서는 방추사형성이 증가하는 것으로 보아 세포분열과정에 유전적 결함이 생긴 것으로 추측된다.

후자에 속하는 몇몇 균주에서는 발아관을 형성않는데도 한개이상의 인을 보이는 것으로 보아 발아관 형성과 연관된 과정에 유전적 결함이 초래된 것으로 생각된다.

발아관을 형성않는 PK12균주의 경우 허용온도로 부터 비허용온도로의 온도변환에 대하여 정상적인 생장을 하는 것은 포자발아에 특이한 유전자에 돌연변이가 일어난 때문일 것이다.

또 이들 온도감수성 돌연변이주 간에 이형핵혼합체를 형성시켜 본 결과, 모든 표시유전자가 열성이며 서로 다른 complementation group에 속하는 것을 알 수 있었다.

REFERENCES

1. Adelberg, E. A. et al. 1965. Optimal condition for mutagen-esis by N-Methy 1-N'-N-Nitrosoguanidine in *E. coli* k12. *Bioc-hem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 788-795.

2. Bainbridge, B. W. 1971. Macromolecular composition and nuclear division during spore germination in *A. nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **60**, 319—325.
3. Bal, J. *et al.* 1974. Method for isolating auxotrophic mutants in *A. nidulans* using N-glycosyl-polyfungin. *J. Gen. Microbiol.* **84**, 111—116.
4. Charlang, G. and N. P. Williams. 1977. Germination-defective mutant of *N. crassa* that responds to siderophors. *J. Bacteriol.* **132**, 1042—1044.
5. Cotter, D. A. and K. R. Dahlberg. 1977. Isolation and characterization of *D. discoideum* spore mutants with altered activation requirements. *Exp. Mycol.* **1**, 107—115.
6. Ditchburn, P. and K. D. Macdonald. 1971. The differential effects of nystatin on growth of auxotrophic and prototrophic strains of *A. nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **67**, 299—306.
7. Eniss, H. L. and M. Sussman. 1975. Mutants of *D. discoideum* defective in spore germination. *J. Bacteriol.* **24**, 62—64.
8. Fiddy, C. and A. P. J. Trinci. 1976. Mitosis, septation, branching and the duplication cycle in *A. nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **97**, 169—184.
9. Gagnon, C. 1966. Fungus culture on cellophane membrane for cytochemical tests. *Stain Technol.* **41**, 247.
10. Harsanyi, Z. *et al.* 1977. Genetic damage induced by ethyl alcohol in *A. nidulans*. *Mut. Res.* **48**, 51—74.
11. Hartwell, L. H. 1974. *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol. Rev.* **38**, 164—198.
12. Hartwell, L. H. *et al.* 1974b. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science.* **183**, 46—51.
13. Horowitz, N. H. and U. Leupold. 1951. Some recent studies bearing on the one gene-one enzyme hypothesis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **16**, 65—74.
14. Jarvik, J. and D. Botstein. 1973. A genetic method for determining the order of events in a biological pathway. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **70**, 2046—2050.
15. Jones, N. C. and W. D. Donachie. 1973. Chromosome replication, transcription and control of cell division in *E. coli*. *Nature New Biol.* **243**, 100—103.
16. Kessel, M. and R. F. Rosenberg. 1968. Regulation and timing of DNA synthesis in hyphae of *A. nidulans*. *J. Bacteriol.* **95**, 2275—2281.
17. Mercer, B. and N. R. Morris. 1975. The effect of chloral hydrate upon mitosis in *A. nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **88**, 197—199.
18. Miller, J. H. 1974. Nitrosoguanidine mutagenesis, (in *Experiments in Molecular Genetics*, ed. J. H. Miller). p125—129 Cold Spring Harbor Laboratory.
19. Morris, N. R. 1976a. Mitotic mutants of *A. nidulans*. *Genet. Res. (Abst.)* **26**, 237—254.
20. Morris, N. R. 1976b. A temperature-sensitive mutants of *A. nidulans* reversibly blocked in nuclear division. *Exp. Cell Res. (Abst.)* **98**, 201—204.
21. Nishimoto, T. 1978. The temperature sensitive cell cycle mutants of animal cells. *Protein, Nucleic acid and Enzyme.* **23**, 337—348.
22. Orr, E. and R. F. Rosenberger. 1976a. Initial characterization of *A. nidulans* mutants blocked in the nuclear replication cycle. *I. Bacteriol.* **126**, 895—902.
23. Orr, E. and R. F. Rosenberger. 1976b. Determination of the execution points of mutations in the nuclear replication cycle of *A. nidulans*. *J. Bacteriol.* **126**, 903—906.
24. Pontecorvo, G. *et al.* 1953. The genetics of *A. nidulans*. *Adv. Genet.* **5**, 141—238.
25. Prichard, R. H. 1968. Genetics of *A. nidulans* (in *Experiments in Microbial Genetics*, ed. R. C. Clows and W. Hayss) p159—183. Blackwell Scientific Publications.

26. Roper, J.A. 1966. The parasexual cycle (The Fungi, ed. A.S. Sussmann and G.C. Ainsworth). *vol. 2*, p589—617. Academic Press.
27. Robinsons, C.F. and C.E. Caten. 1969. Mitosis in *A. nidulans*. *J. Cell. Sci.* **5**, 403—431.
28. Sekiguchi, T. 1978. Current progress in somatic cell engineering. *Protein, Nucleic acid and Enzyme*. **23**, 319—336.
29. Sermonti, G. 1969. The parasexual cycle in *A. nidulans* (in Genetics of antibiotic-producing microorganism). p175—192. John Wiley and Sons Ltd.
30. Snow, R. 1966. An enrichment method for auxotrophic yeast mutants using the antibiotic nystatin. *Nature* **211**, 206—207.
31. Sussmann, A.S. 1976. Activators of Fungal Spore Germination (in The Fungal Spore, ed. D.J. Weber and W.M. Hess) p101—139. John Wiley & Sons, Inc.
32. Warr, J.R. and J.A. Roper. 1965. Resistance to various inhibitors in *A. nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **40**, 273—281.