

*Neurospora crassa*의 중금속 축적

우승희 · 김옥경¹ · 이연희*

서울여자대학교 자연과학대학 생물학과, ¹식품과학과

*Neurospora crassa*를 카드뮴, 철, 망간, 납 등이 각각 첨가된 배지에서 배양할 경우 각 중금속들이 균사에 저장되는 것을 관찰하였다. 각 중금속들은 단백질에 결합되어 각기 다른 세포내 소기관에 축적되었고, 중금속이 첨가된 배지에서 성장한 균사는 서로 매우 상이한 단백질 분포 양상을 보여주었다. 카드뮴을 제외한 중금속들은 예상과는 달리 *N. crassa*의 성장을 억제하지 않았으며 납의 경우는 오히려 성장을 촉진하였다. 카드뮴이 첨가된 배지에서 conidiospore는 정상적인 길이 성장을 하지 못하고 둥근 형태로 성장하였으며, 길이 성장을 하던 균사는 두께가 두꺼워짐이 관찰되었다.

KEY WORDS □ *Neurospora crassa*, heavy metal, cadmium, iron, manganese, lead

현대 산업화에 따라 광산이나 제련소 또는 전기 도금 공장이 밀집되어 있는 공업단지의 산업 폐수에는 상당량의 중금속이 존재하며, 이러한 폐수의 배출로 인한 인근 담수와 근해로의 중금속 유입은 주요 환경 오염 원인이 되고 있다. 중금속에 의한 환경 오염은 직접적으로 인체에 피해를 줄 뿐만 아니라 미생물에 의한 오염 물질의 분해를 저해하여 자정 작용을 지연시키는 원인이 되는 등(17, 19), 생태계에 미치는 영향이 크므로 이에 대한 대책이 절실히 요구된다(13).

중금속들은 생물체 내의 금속들을 결합 부위로부터 제거시켜 단백질과 핵산의 구조변화를 일으키거나 막의 투과성을 변화시켜 독성을 나타내는 것으로 생각되고 있다(7). 여러가지 중금속 중에서 아연과 구리는 주요 필수 영양소로서 여러가지 효소 반응에 참여하나 과량으로 존재할 때에는 위험하다. 카드뮴, 은, 수은, 금, 니켈, 코발트 등의 중금속은 구리와 아연에 비하여 더욱 생명체에 미치는 영향이 크다.

납의 경우는 사람의 신경계에 영향을 미치며 heme의 생산을 방해한다고 알려져 있으며(6), *Escherichia coli*에서 성장, 호흡과 ATPase 활성을 감소시킨다는 보고가 있다(4). 하지만 일반적으로 생명체들이 중금속에 대해 어떻게 대응하는지에 대한 정보는 아직 미흡하다.

세균의 경우는 높은 농도의 중금속에 적응하여 생존하는 경우들이 보고되고 있다. 중금속에 대한 미생물의 저항 기작으로는 첫째, 세포막의 불투과성을 증가시켜 중금속의 세포내 도입을 감소시키는 방법, 둘째, 중금속 이온과 결합하여 침전시킬 수 있는 대사 산물을 생성하는 방법, 셋째, 중금속 이온을 보다 휘발성이 강한 화합물로 전환시키거나 다른 원자의 이온으로 변형시키는 방법, 그리고 넷째, efflux 메커니즘으로 이미 세포내로 들어온 중금속을 세포 바깥

으로 내 보내는 방법 등이 보고되어 있다(1, 2, 3, 9, 10, 12, 16).

세균보다 고등한 곰팡이의 경우는 위에 언급한 방법 이외에도 세포내 소기관 안에 compartmentation시켜 중금속에 의한 영향을 피한다고 생각되고 있다(8, 14). 하지만 아직 여러 종류의 중금속이 세포내 어느 소기관에 저장되는지의 여부와, 세포벽을 통과한 후 세포내 소기관까지의 이동 경로, 세포내 소기관에서 어떠한 형태로 존재하며, 다시 바깥으로 efflux되는지에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없다.

본 실험에서는 인체에 무해하고 유전 정보가 많이 누적되어 있는 Ascomycotina에 속하는 *Neurospora crassa*를 이용하여 여러가지 중금속이 성장에 미치는 영향, 세포내 소기관에 저장되는지의 여부와 이들 중금속에 대해 *N. crassa*가 어떠한 변화를 보이는지 알아 보았다.

재료 및 방법

사용균주 및 시약

*N. crassa*는 74A (FGSC 987)를 사용하였으며 이를 Vogel's 고체 배지(20)에서 2주간 배양한 후 멸균 증류수로 포자 용액을 만들어 배지 1 ml/당 10⁶개의 포자가 되도록 집중하였다. 배지용 시약과 다른 시약들은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다.

배양 조건

N. crassa 74A는 Vogel's 액체 배지에 집중하여 30°C에서 16시간 진탕 배양하였다. 각각의 중금속은 염형태(CdCl₂, FeCl₃, MnCl₂, PbCl₂)로 증류수에 녹인 후(0.1 M) nitrocellulose filter paper(Millipore, Type HA, 0.45 μm)로 여과하여 사용하였다.

세포내 소기관의 분리

세포내 소기관을 분리하는 다른 논문(15)에 기술된 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 배양된 *N. crassa*를 여과지(Whatman No.1)로 여과하고 과량의 냉각 탈이온수로 씻어 배지와 균사 표면의 중금속을 제거하였다. 다음의 전 과정은 4°C에서 행하였다. 균사를 완충 용액 A[1 M sorbitol, 10 mM MES/Tris buffer (pH 6.9), 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM o-phenanthroline, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)]과 glass bead(직경=0.3~0.5 mm)가 들어있는 340 ml chamber에 넣은 후 bead-beater(Biospec Products)을 이용하여 분쇄하였다. 과열을 방지하기 위해, 20초 동안 분쇄 후 20초 동안 쉬는 것을 8번 반복하였다. 분쇄된 혼탁액은 고속 냉장 원심분리기(Sorvall RC5B)를 이용하여 4,000×g에서 10분 동안 원심 분리시켜 분쇄되지 않은 균사를 제거했다. 상등액을 10,000×g에서 30분간 원심 분리시켜 세포내 소기관들을 세포질로부터 분리시켰다. 침전된 세포내 소기관 들은 완충 용액 A에 현탁액을 만든 후 이를 sucrose step density gradient에 없애 초고속 원심분리기(Beckman L8)에서 SW28 rotor를 이용하여 100,000×g에서 2시간 동안 원심 분리시켜 각각 1 ml 되는 분획 16개를 얻었다. Sucrose step density gradient는 위의 완충용액으로 각각 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 M sucrose용액을 만들어 사용 직전에 8 ml/씩(총 32 ml)의 step gradient를 만들어 사용하였다.

각 분획의 중금속 양의 측정

각 1 ml 분획에 50% TCA 를 1 ml/씩 가하여 하룻밤 동안 방치한 후, 용출되고 남은 불용성의 침전물들은 원심분리기(Sorvall 28S)를 이용하여 10,000×g에서 20분간 원심분리로 제거한 후에 atomic adsorption spectrophotometer(Instrumental Laboratory Inc., Model AASP 457)를 이용하여 중금속의 농도를 측정하였다.

현미경 관찰

*N. crassa*를 중금속(1 mM)이 첨가된 Vogel's 액체 배지와 고체 배지에서 배양하면서 현미경을 이용하여 관찰하였다.

단백질과의 결합 확인

중금속이 첨가된 액체 배지에서 *N. crassa*를 배양한 후 위에서 언급한 대로 여과법으로 균사를 모아 bead beater로 썬 후 깨지지 않은 균사체는 4000×g에서 10분간 원심 분리시켜 제거하였다. 상등액에 sarkosyl을 가하여(final conc. 1%) 30분간 Vortex Genie II를 사용하여 단백질을 용출시켰다. 용출되고 남은 것들은 초고속 원심분리기를 사용하여 100,000×g에서 1시간 동안 원심 분리시켜 제거하였다. 상등액을 bed volume이 3 ml되는 Bio-Gel P2(cut out mol. wt.=1800) column을 통과시켜 2 ml되는 10개의 분획을 받아 atomic adsorption spectrophotometer로 중금속의 양을 측정하였다.

단백질 발현 양상에 대한 중금속의 영향

각각의 중금속이 첨가(1 mM)된 액체 배지에서 배

양한 *N. crassa*의 균사를 냉각 탈이온수로 씻은 후 mini bead beater(Biospec Products)를 사용하여 분쇄시켰다. 여기에 SDS를 최종농도가 2% 되게 넣어 끓는 물에서 증탕으로 10분간 끓여 단백질을 용출시켰다. 용출되지 않은 것들은 microcentrifuge를 사용하여 15,000 rpm에서 5분간 원심 분리로 제거시켰다. 이의 상등액을 Lammeli 방법(11)에 따라 SDS denaturing gel을 이용하여 전기영동을 한 후 단백질은 0.05% Coomassie brilliant blue R 250으로 염색하였다.

결과 및 고찰

과량의 중금속이 세포 성장을 억제하는 일반적인 관찰(1)과 다르게, *N. crassa*는 철, 망간이 첨가된 배지와 첨가되지 않은 배지에서 성장 정도가 같았으며, 납이 첨가된 배지에서는 생장이 더욱 증가하였다(Table 1). 이와는 대조적으로 카드뮴이 첨가된 배지에서의 생장은 매우 억제되었다(Table 1). 특히 카드뮴이 배지에 첨가된 경우는 conidiospore의 생산이 현격히 줄었고, conidiospore가 균사로부터 분리되지 못하고 미성숙 상태로 균사내에 존재하였으며, aerial hyphae 생산도 감소되었다(Fig. 1). 카드뮴이 함유된 액체 배지에서는 conidiospore가 발아한 후 정상적인 길이 성장을 하지 못하고 mycelium ball을 형성하였으며, 또한 균사의 직경이 증가하였다(Fig. 2). 카드뮴은 고등 동식물에서 기형을 유발함이 보고되었을 뿐만 아니라 *Hansenula*의 경우 yeast (ovoid form) 형태에서 균사체 형태로 성장하게 하고 고농도의 카드뮴은 clump 형성을 유발시킨다는 보고가 되어있다(18). 이는 카드뮴이 효모와 *N. crassa* 두 경우 모두 분화에 영향을 주는 것으로 생각된다. 한편 철이 첨가된 배지에서는 균사내에 granule이 축적되어 있는 것이 관찰되었다(Fig. 3).

각각의 중금속들이 균사 겉에 부착되어 있지 않고 균사 내부에 흡수되어 존재 하는 지를 확인하였을 때, Table 2에 나타났듯이 각각의 중금속들은 균사내에서

Table 1. The effect of heavy metals on the growth of *N. crassa*. *N. crassa* was cultivated in 250 ml of Vogel's liquid media containing each heavy metal (1 mM) until stationary phase and the wet weight was measured after mycelium were collected using a filtration method as described in Materials and Methods.

Heavy metal (1 mM)	Wet weight (g)
Control	6.04
Cadmium	1.94
Iron	7.58
Manganese	6.40
Lead	8.24

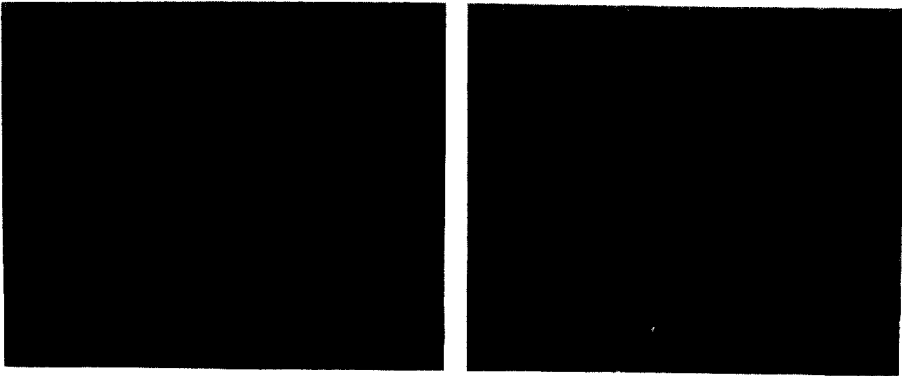


Fig. 1. Morphology of mycelium grown in Vogel's liquid media. (a, in the absence of cadmium; b, in the presence of cadmium)



Fig. 2. Morphology of mycelium grown in Vogel's solid media. (a, in the absence of cadmium; b, in the presence of cadmium)

Table 2. The amount of heavy metal accumulated in the mycelium. *N. crassa* was cultivated in Vogel's liquid media in the presence of heavy metal (1 mM). The amount of heavy metal in the mycelium was measured with an atomic adsorption spectrophotometer as described in Materials and Methods.

Heavy metal	Heavy metal accumulated in mycelium (µg/g wet mycelium weight)
Cadmium	1.24
Iron	45
Manganese	251
Lead	357



Fig. 3. Mycelium grown in the presence of iron.

발견되었다(Table 2). 이중에서 특히 납의 경우는 배지에 남아 있는 총 납의 양보다 두배되는 양이 균사 내부에 존재하였다. 세포내에서 중금속이 축적되는 곳을 알아내기 위하여 세포질과 세포내 소기관 분획

으로 분리시킨 후에 중금속의 양을 측정하였을 때 카드뮴, 철, 망간, 납 모두 세포내 소기관 분획에 존재하였다. 각각의 중금속이 각기 다른 세포내 소기관에 존재하는 가를 알아내기 위해 sucrose step density gradient를 이용하여 세포내 소기관들을 분리한 후, 각 분획에 존재하는 금속의 양을 측정했을 경우 각 중금속은 각기 다른 분획에서 발견되었다(Fig. 4). 망간의 경우는 sucrose step density gradient 상에서 한가지 세포내 소기관이 소실되었다. 이는 망간의 축적으로 인해 세포내 소기관의 비중이 증가되어 원래의 분획 위치에서 이동된 것으로 생각된다. 균사 내로의 이동에 세포 활성이 필요한 가를 알아내기 위하여 균사를 여과지에 거른 후, 건조시켜 filter상태로 만들어 중금속 용액을 통과시켰을 때는 극미량의 중금속만이 균사에 남는 것으로 보아 중금속의 균사체 내로의 이동에는 세포 활성이 필요한 것으로 생각된다(data not shown). 이는 *Hansenula*의 경우 카드뮴 축적이 dinitrophenol, KNO_3 와 같은 대사 억제제에 의해 억제된다는 보고(21)와 일치하는 것이다.

세포내 소기관에서 중금속은 다른 물질과 결합되지

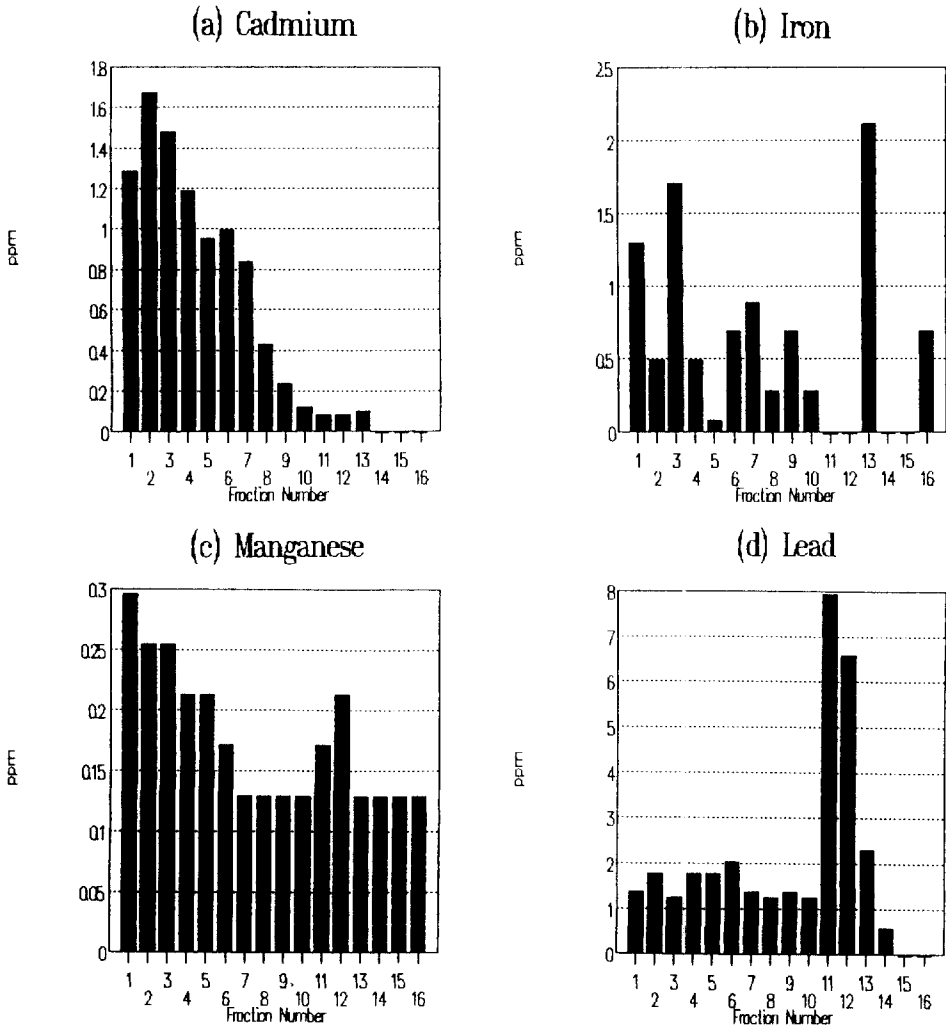


Fig. 4. The amount of heavy metal in each subcellular organellar fraction separated on sucrose step density gradient.

Subcellular organelles of mycelium grown in the presence of each heavy metal (1 mM) were separated on a sucrose step density gradient and the amount of heavy metal in each fraction was measured as described in Materials and Methods.

않은 유리된 상태로 존재할 수도 있으나, polyphosphate와 결합하거나(2), 혹은 methallothionein과 같은 단백질에 결합되어 있다는 보고가 있다(5). 이를 알아내기 위하여 중금속이 들어있는 배지에서 배양한 균사에서 단백질을 detergent로 용출시킨 후, 이를 gel filtration column(Bio-Gel P2)을 통과시켜 단백질과의 결합을 확인하였다. Bio-Gel P2는 cut out mol. wt이 1,800 daltons으로 단백질은 void volume으로 용출시키는 점을 이용하여 단백질과 결합된 중금속과 결합되지 않은 중금속을 분리시켰다. 각각의 중금속은 모두 void volume으로 배출되는 것으로 보아 분자량이 큰 물질, 즉 단백질과 결합되어 있음을 보여

주었다(data not shown).

각각의 중금속이 새로운 단백질의 발현을 유도하는 지 알아보기 위하여 *N. crassa*를 각기 다른 중금속이 함유된 배지에서 배양한 후 균사의 단백질을 SDS denaturing gel electrophoresis를 사용하여 비교하였다. 각기 다른 중금속 배지에서 생장한 균사들은 각기 다른 단백질이 발현되었다(Fig. 5). 이들 단백질들이 중금속에 대한 저항성을 주는 요인인 지는 좀 더 연구가 되어야 하겠다.

실험의 결과를 종합해 보면 각각의 중금속들은 *N. crassa*의 각기 다른 세포내 소기관에 저장되며, 각기 다른 단백질의 발현을 유도시키는 점으로 미루어 볼때

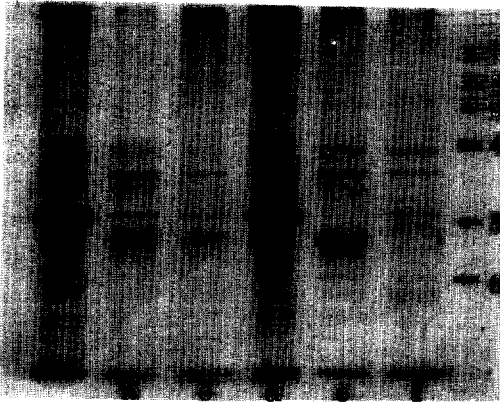


Fig. 5. Protein profiles of mycelium grown in the presence of heavy metals.

Total proteins were extracted from mycelium which were grown in the presence of each heavy metal and electrophoresed on a 12% SDS denaturing gel as described in Materials and Methods. a, cadmium; b, lead; c, manganese; d, copper; e, iron; f, without heavy metal. (mol. wt. marker proteins: 1, 205 kDa; 2, 116 kDa; 3, 97.4 kDa; 4, 66 kDa; 5, 45 kDa; 6, 29 kDa)

*N. crassa*에 미치는 영향이 각기 다름을 알 수 있었다. 특히 낮은 성장을 촉진했으나 카드뮴은 성장을 억제하고 세포의 형태를 변화시키는 등 서로 상반된 작용을 한다는 것을 관찰하였다. 따라서 이들 두 가지 중금속이 *N. crassa*의 대사에 미치는 영향과 축적 메커니즘에 대한 연구는 진행생물의 중금속에 대한 대응 기작에 대한 중요한 정보를 줄 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 1993년 서울여자대학교 교내 연구비로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

1. Aiking, H., K. Kok, H. van Heerikhuizen, and J. van't Riet, 1982. Adaptation to cadmium by *Klebsiella aerogenes* growing in continuous culture proceeds mainly via formation of cadmium sulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 938-944.
2. Aoukaty, A., V.D. Appanna, and J. Hyang, 1991. Exocellular and intracellular accumulation of lead in *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 is mediated by the phosphate content of the growth medium. *FEMS Microbiol. Letts.* **83**, 283-290.
3. Gimmler, H., B. Treffny, M. Kowalski, and U. Zimmermann, 1991. The resistance of *Dunaliella*

- acidophila* against heavy metals: the importance of the zeta potential. *J. Plant Physiol.* **138**, 708-716.
4. Gibson, J.F., S.G. Hadfield, M.N. Hughes, and P. K. Poole, 1980. Effects of trialkyllead compounds on growth, respiration and ion transport in *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.* **116**, 99-110.
5. Hamer, D.H., 1986. Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 913-951.
6. Haust, H.L., H.C. Poon, M. Inwood, E.K. O'hea, D.S.M. Haines, C.J. Forret, and D.S. Keyes, 1985. Occupational lead exposure: studies in two brothers showing differential susceptibility to lead. *Clin. Biochem.* **18**, 102-107.
7. Hughes, M.N. and R.K. Poole, 1989. Metal-microbe interaction. p. 1-17. In R.K. Poole and G.M. Gadd(ed.), Metal-microbe interaction. IRL Press, Oxford.
8. Kaneta, M., H. Hikichi, S. Endo, and N. Sugiyama, 1983. Isolation of a cadmium-binding protein from cadmium-treated rice plants (*Oryza sativa* L.). *Agric. Biol. Chem.* **47**, 417-418.
9. Khazaali, M.B. and R.S. Mitra, 1981. Cadmium-resistant *Pseudomonas putida* synthesizes novel cadmium proteins. *Science* **225**, 1043-1046.
10. Kozlowski, H., B. Radomska, T. Kiss, J. Balla, L. Nakonieczna, J.J. Pastuszak, and Y. Langelier, 1991. Coordination of copper (II) ions to catechoyl-dipeptides, the inhibitors of leucine aminopeptidase and ribonucleotide reductase. *J. Inorg. Biochem.* **43**, 779-787.
11. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
12. Macaskie, L.E. and A.C.R. Dean, 1984. Cadmium accumulation by a *Citrobacter* sp. *J. General Microbiol.* **130**, 53-62.
13. Nagayama, T. and T. Kurechi, 1979. The effects of heavy metals on the microorganisms in river water. *Eisei Kagaku* **25**, 289-294.
14. Neilands, J.B., 1989. Metal ions and bacteria. p. 141-163. John Wiley & Sons, Inc., New York.
15. Paek, Y.L. and R.L. Weiss, 1989. Identification of an arginine carrier in the vacuolar membrane of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **264**, 7285-7290.
16. Silver, S., T.K. Misra, and R.A. Laddaga, 1989. Bacterial resistance to toxic heavy metals, p. 121-140. In T.J. Beveridge and R.J. Doyle (ed.), Metal ions and bacteria. John Wiley & Sons, Inc., New York.
17. Simon, S., G. Nucifora, and T.K. Misra, 1989. Bacterial resistance ATPases; primary pumps for exporting toxic cations and anions. *TIBS* **14**, 76-80.
18. Song, H.I. and T.S. Yu, 1991. Morphological changes of *Hansenula anomala* B-7 by cadmium ion. *Kor. Jour. Microbiol.* **29**, 397-401.
19. Tijero, J., E. Guardiola, F. Mirada, and M. Cortijo, 1991. Effect of Cu^{2+} , Ni^{+} , and Zn^{+} on an anaerobic digestion system. *J. Environ. Sci.*

- Health* **26**, 799-811.
20. Vogel, H.J., 1964. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *Am. Nat.* **98**, 435-446.
21. Yu, T.S., H.I. Song, and K.T. Chung, 1990. Mechanism of cadmium accumulation into the

cell of cadmium-ion tolerant yeast. *Kor. J. App. Microbiol. Biotech.* **18**, 233-238.

(Received April 29, 1993)

(Accepted May 24, 1993)

ABSTRACT: Heavy Metal Accumulation in *Neurospora crassa*

Seunghee Woo, Ok-kyoung Kim¹, and Yeonhee Lee* (Department of Biology and ¹Department of Food Science, Seoul Woman's University, Seoul 139-744, Korea)

Neurospora crassa accumulated cadmium, iron, manganese and lead in the mycelium. The growth of *N. crassa* was inhibited in the presence of cadmium but not in the presence of iron or manganese. In the presence of lead, the growth of *N. crassa* was accelerated. In the presence of cadmium, mycelium became thick and a conidiospore grew into a mycelial ball instead of normal threadlike growth. Each metal was accumulated in different subcellular organelles bound to protein and induced different proteins.