

방사선 물질 Li^+ , Rb^+ , Cs^+ 이 *Neurospora crassa*의 성장 일주기에 미치는 영향

한 상 진

한림대학교 자연과학대학 생물학과

The Comparison of Radiactive Elements Li^+ , Rb^+ , and Cs^+ Effect on the Growth Circadian Rhythm in *Neurospora crassa*

Sang-Zin Han

Department of Biology, Hallym University

ABSTRACT

Radioactive elements Li^+ , Rb^+ and Cs^+ effect the period shortening in proportion to the higher concentration on the growth of *Neurospora crassa*. 1 mM LiCl presented the result of the period length 0.52 h shorter than average circadian rhythm 21.66 h. 1 mM RbCl reduced the period length 1.13 h than control period 21.89 h and 1 mM CsCl reduced 2.12 h than control period 21.89 h. In the equal concentration Cs^+ had an extreme effect.

Fatal doses of Li^+ , Rb^+ and Cs^+ are 20 mM, 30 mM and 20 mM. In the fatal concentration *Neurospora* didn't develop more after 7 days and the formation of spores were not given in regular order. Circadian length of *Neurospora* decreased generally at the last cycle of the growth.

서 론

거의 모든 생물체에서 볼 수 있는 일주기는 일정한 환경조건에서 약 24 시간의 주기를 나타내며, 이는 생체대사와 생리작용에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다^{1,2)}. 일주기 현상의 변동은 생물체가 처

한 일정한 조건을 벗어나게 됨으로써 초래되며, 그 요인인 "Zeitgeber (time-giver)"는 광선이나 온도와 같은 환경조건의 변화나^{3,4)}, 또는 생체대사에 영향을 미치는 여러 가지 물질에 의한 것 등 다양하게 밝혀져 있다^{5,6)}.

빵곰팡이 *Neurospora*의 포자형성도 일정한 환경 조건에서 일주기적으로 이루어지며⁷⁾, 이에 대한 기

* 이 논문은 1991학년도 한림대학교 학술연구 조성비 지원으로 이루어진 것임.

작연구로써 세포내의 생화학적 변화^{8,9)}, 온도와 광선 파장의 효과^{10~13)} 등에 관한 실험결과가 다수 발표되었다^{2,14)}.

중금속 이온이나 방사선 물질 역시 일주기에 영향을 미친다는 사실도 밝혀져 있다^{15,16)}. De Serres¹⁵⁾와 Nemerofsky¹⁶⁾는 방사선 물질이 *Neurospora*의 포자형성에 변화를 주거나 유전인자의 돌연변이를 일으킨다는 사실을 보고했다. Chung 등¹⁷⁾은 저준위 방사선에 대한 효과를 관찰하여 *Neurospora*의 성장주기와 포자형성 상태의 변화 등을 조사하였다.

방사선 물질에 의한 영향에 대하여 하등 및 고등 식물이나 동물의 많은 생물체에서 이러한 결과가 형태적, 유전적인 측면에서 규명된 바가 있으나^{18,19)}, 지금까지 방사선 잔존물질의 영향에 대해서는 밝혀진 바가 없다. 이 연구는 날로 발전하는 핵이용 기술과 중금속 물질이용으로 자연환경에 잔존하는 방사선 물질 혹은 중금속 이온들이 생명체에 미치는 영향력을 조사하기 위하여 *Neurospora*를 대상으로 실험하였다. 이 실험에는 방사선 물질로 이용되는 알칼리성 중금속 이온 물질인 Li^+ , Rb^+ , Cs^+ 에 의한 *Neurospora*의 성장상태 및 포자형성 주기의 변화를 조사하고, 물질의 농도에 따른 영향 역시 관찰하였다.

재료 및 방법

이 실험대상인 *Neurospora crassa*는 형태적 변이형인 *bd csp⁻¹* (Fungal Genetics Stock Center, University of Kansas Medical Center, Kansas City, KS)을 실험재료로 사용하였다.

Vogel's salts 0.3%, glucose 0.5%, arginine이 포함된 원배양액²⁰⁾을 배양접시(지름 15 cm)에 70 ml씩 일정표면이 되도록 넣어 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 의 온도와, 백색광 55~60 Lux (20W/15)의 외부 요인이 차단된 항온기 안에서 72 시간 배양시켜 자연성장시킨 다음, 새로 형성된 포자를 필요한 실험배양에 사용하였다. 접종시에는 배양액 12 ml씩 채운 각 유리관(길이 60 cm, 지름 1 cm)에 같은 수의 세포가 들어

가도록 72 시간 배양시킨 접시에서 지름 5 mm의 원통관으로 일정한 면적을 찍어 접종하였다. *Neurospora*는 매 2주마다 새 배양액에 배양시켜 신선한 포자를 실험에 사용토록 하였다¹⁴⁾

실험은 성장주기에 영향이 없는 적색광 0.01~0.05 Lux (20W/15 with red acrylic plate filters²¹⁾)에서 실내온도 $25 \pm 0/5^\circ\text{C}$, 습도 $35 \pm 5\%$ 를 항상 유지할 수 있는 실험실에서 9일간 수행되었다. 온도는 온도기록기의 6개 감지기를 직접 실험유리관 위에 놓아 *Neurospora*의 성장상태가 일정온도에서 이루어지는 지를 기록 점검하였다(SS-100P-6P, KONICS).

방사선 물질에 대한 영향을 알아보기 위한 실험으로 원배양액에 방사선 물질인 알칼리성 중금속 이온이 함유된 LiCl, RbCl, CsCl(s. c. Merck)을 농도별로 1 mM부터 고농도로 각각 혼합하여 배양한 후, 성장상태 및 주기를 조사하였다(Fig. 1).

*Neurospora*의 성장 끝부분을 매일 정해진 시간에 표시하여 각 유리관마다 실험 기간동안 매일 성장한 길이를 계산하고, 매번 포자가 형성된 중심부 사이의 성장길이를 *Neurospora*의 하루 주기로 하여 평균치를 산출하였다. 같은 농도로 배양시킨 유리관은 최소한 8개씩 취하여 *Neurospora*의 성장주기를 좀 더 정확히 계산해 낼 수 있도록 하였다. 통계방법은 컴퓨터 프로그램을 사용하여 얻어낸 평균치를 Siegel²²⁾의 공식에 의해 유의성 여부를 판별하였다.

결과 및 고찰

9일간 실험실에서 배양시킨 *Neurospora* 실험유리관을 꺼내어 매일 같은 시간에 성장끝 부위를 표시한 것에서 24 시간동안 자란 길이를 계산해 내고, 포자가 형성된 부위의 중심부에서 다음 번 포자형성된 중심부까지의 길이를 측정하여 포자가 형성된 평균 주기를 계산한 결과 LiCl, RbCl, CsCl의 농도별로 다음 Table 1과 같은 성장길리와 성장주기(τ) 결과가 나왔다.

농도에 따라 포자형성 주기에 현저하게 나타나는 차이는 실험물질이 고농도일수록 큰 차이로 주기가

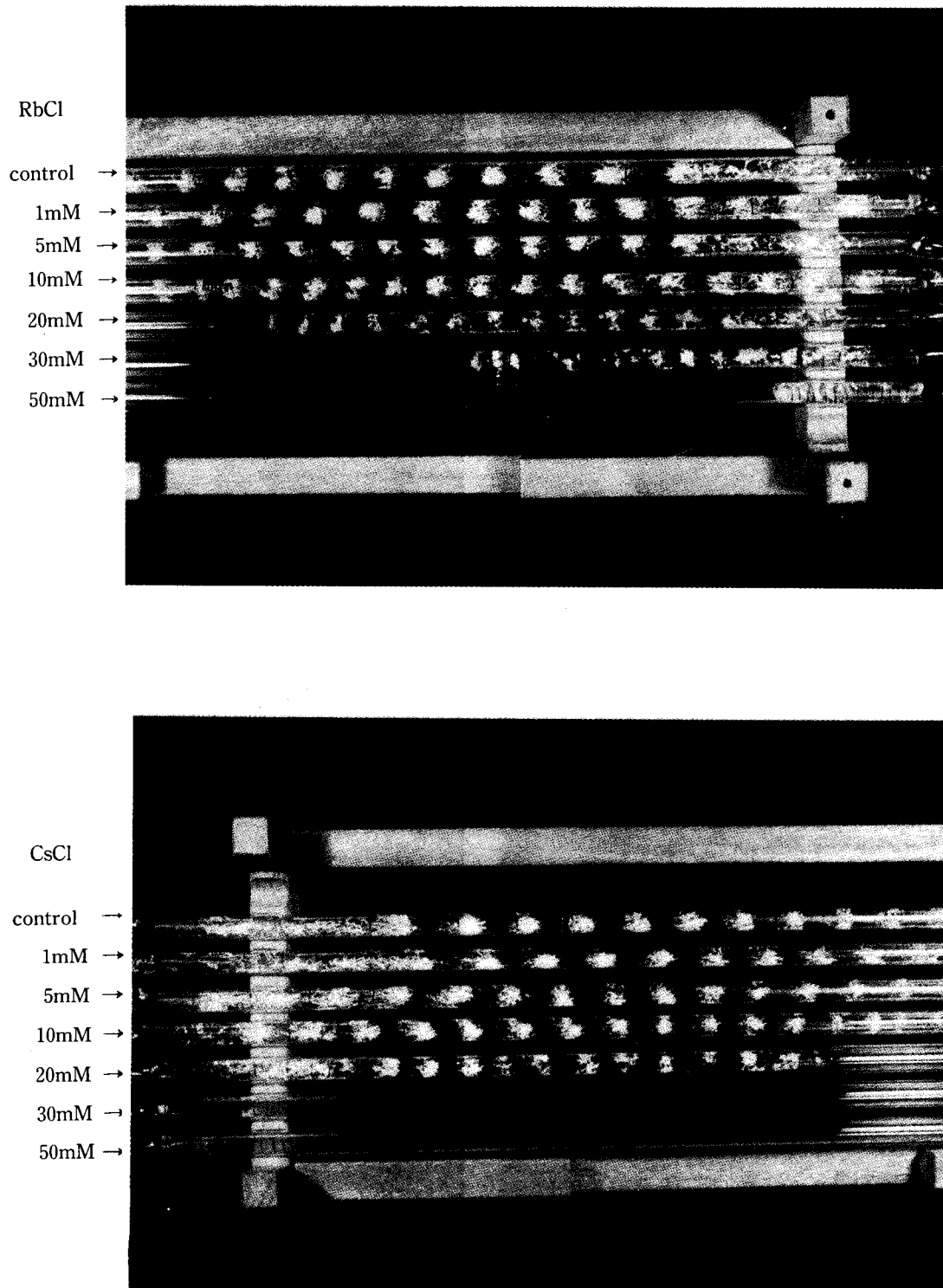


Fig. 1. Appearance of strains *bd csp*⁻¹ of *Neurospora crassa* on various concentrations of RbCl and CsCl in growth tubes.

Table 1. Growthlength (mm/24 h) and periodlength (τ) of *Neurospora* in the medium with different concentrations of LiCl, RbCl, and CsCl.

	mm/24 h		τ (h) \pm SE
LiCl (mM)			
control	27.0	24.5	21.66 \pm 0.11
1	28.1	24.7	21.14 \pm 0.14
5	30.9	26.3	20.40 \pm 0.17
10	27.6	22.1	18.58 \pm 0.10
20	22.1	17.9	16.42 \pm 0.23
30	7.2		
50	4.4		
RbCl (mM)			
control	24.8	19.5	21.89 \pm 0.17
1	25.1	22.8	20.76 \pm 0.14
5	24.0	22.4	18.82 \pm 0.21
10	21.9	19.2	17.22 \pm 0.11
20	19.9	12.7	14.55 \pm 0.16
30	12.1	6.1	11.87 \pm 0.28
50	5.5		
CsCl (mM)			
control	24.8	19.5	21.89 \pm 0.17
1	28.0	24.6	19.37 \pm 0.14
5	26.7	24.6	17.76 \pm 0.07
10	24.2	14.7	15.53 \pm 0.15
20	20.5	15.0	13.84 \pm 0.14
30	5.2		
50	3.5		

SE: Standard error.

단축되었다. Li⁺을 포함한 배양액에서는 대조군의 성장주기가 21.66 \pm 0.32시간에서 16.42시간으로까지 단축되었고, Rb⁺이나 Cs⁺이 포함된 배양액에서는 대조군의 성장주기가 21.89 \pm 0.48시간에서 각각 11.87시간과 13.84시간으로까지 단축된 주기를 보였다. 각 물질의 농도별 성장주기의 변화를 Fig. 2에 그래프로 표기하였다. 성장주기의 단축된 차이는 χ^2 -검사에서 매우 유의성 있는 결과로 나타났다 ($p > 0.05$). 심지어 Li⁺과 Cs⁺이 포함된 배양액에서는 30 mM 이상, Rb⁺이 포함된 배양액에서는 50 mM 이상의 농도에서 매우 짧은 성장길이를 보여

주기측정을 할 수 없을 정도였으며, 실험을 마치는 날까지 자라지 못하고 7일간의 성장에 그쳤다(Fig. 3).

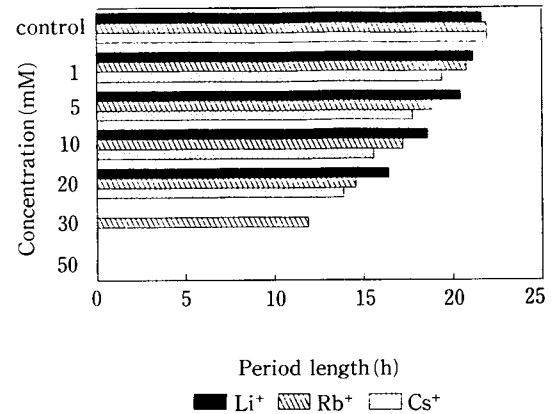


Fig. 2. Period changes as a function of the quantity of LiCl, RbCl, and CsCl in the media.

Fig. 3a-c는 9일동안 배양한 *Neurospora*의 일주기 성장변화를 보여준다. 모든 실험군의 *Neurospora*가 대조군보다 짧은 주기로 성장하였으며, 마지막 날에는 공통적으로 성장이 부진한 상태를 보였다. 그러나 이 차이는 통계적 유의성을 보이지 않았다.

실험 결과에서 Li⁺, Rb⁺, Cs⁺ 이온 모두가 *Neurospora*의 포자형성과 성장주기에 영향을 미치는 것을 알 수 있다. *Neurospora*의 성장주기가 LiCl의 제일 약한 농도 1 mM에서 배양시켰을 때 0.52시간 단축된 주기를 보였고, 그보다 20 배 높은 농도 20 mM에서는 평균 5.24시간까지 주기가 단축되었다.

일반적으로 알려진 Li⁺의 효과는 식물에서나 동물에서 주기를 연장시키는 것으로 보고되어 있다^{6,23,24}). Li⁺이 대사작용에 영향을 미치어 대사 리듬을 느리게 작동시킴으로써 식물의 운동이나 동물의 활동상태를 지연시켜 주기가 연장된다고 본다. 동물에서는 간혹 활동주기가 단축되는 효과가 나타나는 경우도 있으나²⁵), 분명한 기작에 대하여 설명된

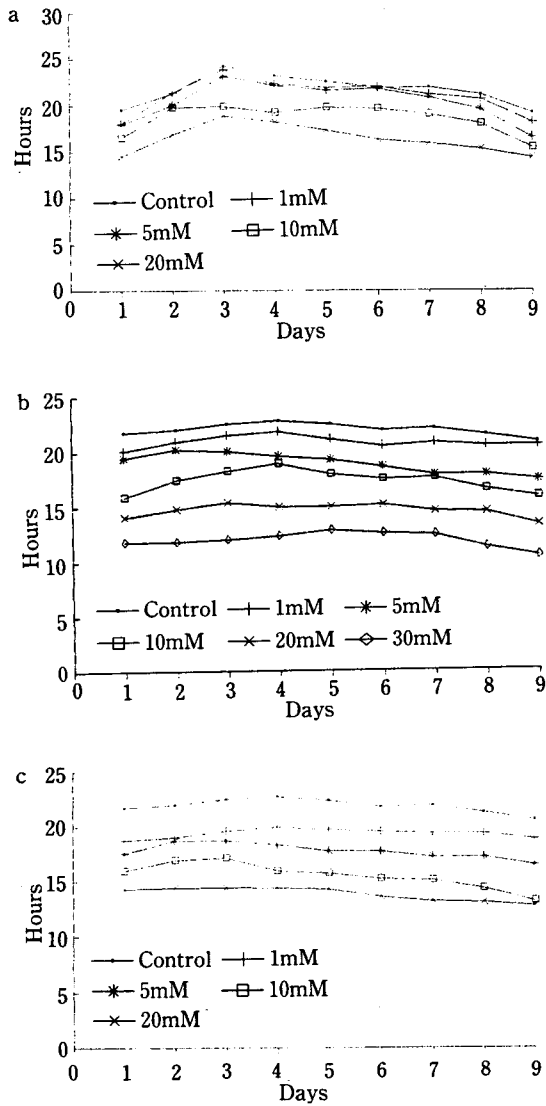


Fig. 3 Daily period changes of strains *Neurospora crassa* as a function of various concentrations of LiCl (a), RbCl (b), and CsCl (c). Period length shortened among the higher concentration and showed minimal length at the last of the growth cycle.

바는 없다. Kornblatt와 Musil²⁶⁾은 효모에서 엔올라아제 작용이 Li⁺과 Na⁺에 의해 장애가 일어나는 것을 발견하였는데, 마찬가지로 *Neurospora*에서도 Li⁺이 유사한 작용을 일으켜 포자형성주기의 단축을 초래한다고 볼 수 있다. 엔올라아제는 해당

과정에서 Mg⁺⁺과 복합체를 형성하여 고에너지 인산화합물이 생성되는 두 번째 반응에서 촉매역할을 한다. 이때 Li⁺이 Mg⁺⁺작용을 저해시킴으로써 복합체가 형성되지 못하여 엔올라아제의 활성을 막아 해당과정을 통한 에너지 공급을 차단시키게 되므로 세포내 대사와 성장에 영향을 미치게 된다. Fig. 1에서 볼 수 있듯이 Li⁺ 20mM에서 극심한 성장장애가 일어났고, 30 mM이상에서는 7일까지 포자형성을 구별할 수 없을 정도로 자라다가 그 이후에는 성장이 중단되는 것으로 보아 에너지 공급이 거의 일어나지 못할 정도로 치사작용을 일으킨다고 설명할 수 있다.

Rb⁺이나 Cs⁺에 의해서도 Li⁺의 경우와 마찬가지로 성장주기의 단축효과를 보였다. Rb⁺에 의한 단축시간은 최소 1.13시간이며, Cs⁺에 의해서는 2.52시간 단축되고 고농도 20 mM에서는 각각 7.34시간과 8.05시간 단축되었다. 이 결과는 Li⁺이나 Rb⁺보다 Cs⁺의 효과가 같은 농도에서 가장 강하게 나타나는 것을 보여주는 것이다. 그러므로 RbCl의 50 mM 이상에서는 더 이상 성장주기를 보이지 못한 반면에 CsCl에서는 30 mM 이상에서 같은 장애현상을 보였다. 이러한 성장주기의 소멸에는 농도상 Li⁺과 Cs⁺이 더 크게 작용하였다고 볼 수 있다.

Rhizobia와 Agrobacterium에서는 Rb⁺에 의해 α -glucosidase가 자극되어 성장의 촉진효과가 나타난 반면에²⁷⁾, Oxalis에서 Rb⁺농도가 2.5~5mM에서 단축효과가, 그 이상의 농도에서는 연장효과를 보였다¹⁸⁾. Rb⁺은 Na⁺/K⁺-ATPase 시스템에서 K⁺대신 치환되어 반응을 자극하거나 활성화시켜 단백질 합성물을 피이드 백으로 조절한다고 Buroyone의 모델로²⁸⁾ 설명한다. 역시 Oxalis에도 세포내 Rb⁺농도가 높을수록 도리어 단백질 합성물이 떨어진다. Cs⁺이 40 mM까지는 주기가 연장되고, 그 이상의 농도에서는 주기가 단축되었다¹⁸⁾. *Neurospora*는 저농도에서부터 단축된 현상을 지속적으로 보였으며, 20 배 높은 농도까지는 성장주기가 짧아졌다가 그 이상의 고농도에서는 성장을 보이지 않았다.

세 가지 알칼리 이온을 포함한 배양액에서 배양된

*Neurospora*의 성장주기가 공통적으로 마지막 실험 부분에서 저하되는 현상은 단백질의 합성률을 감소시키는 작용도 있겠으나, 세포의 노화를 가속시키고, 한편 배양액의 변성에도 원인이 있을 것으로 본다¹⁴⁾.

저준위 방사선은 *Neurospora*에 별 영향을 미치지 않는다¹⁷⁾고 하나, 잔존물질이 1mM일지라도 성장주기에 단축 내지 장애 효과를 보이는 것이 증명되었다.

환경에 이러한 잔존물질이 있을 경우, 우리가 잘 알다시피 먹이연쇄에 관련되어 있는 한²⁹⁾ 모든 생물에게 영향을 미치고, 저농도일지라도 생물체에 위협을 가져다 주는 것이 확실하다³⁰⁾. 크고 수명이 긴 생물체일수록 노출된 부분이 크므로 방사선에 대한 민감도가 높기 때문에 생리적, 유전적인 위험부담이 다른 작은 생물체나 짧은 수명을 가진 것보다 월등하게 크다³¹⁾. 생물체에 미치는 방사선 물질의 영향과 그에 대한 평가를 위하여 생태학적 연구와 더불어 여러 가지 특수 환경에서 가져오는 변화를 생리학, 생화학, 유전학 등의 다양한 각도로 초점을 맞추어 구체적인 연구가 계속 수행되어야 할 것이 과제라 남아있다.

결 론

방사선 물질 Li^+ , Rb^+ , Cs^+ 이 포함된 배양액에서 관찰한 *Neurospora crassa*의 성장주기는 고농도일수록 비례적으로 단축되었다. 평균 성장 일주기 21.66시간에 비하여 1mM의 $LiCl$ 배양액에서 0.52시간만큼, 1mM $RbCl$ 배양액에서 대조군의 일주기 21.89시간보다 1.13 시간, 그리고 1mM $CsCl$ 배양액에서는 대조군의 일주기보다 2.12시간만큼 각각 주기가 단축되는 결과를 보였고, 같은 농도에서 Cs^+ 이 가장 심한 영향을 미치는 것으로 나타났다. 각각의 *Neurospora*에 미치는 치사량은 Li^+ 이 20 mM, Rb^+ 이 30 mM, Cs^+ 이 20 mM 농도로써 포자형성이 불분명하고 성장한계가 뚜렷하여 7일 이후에는 성장이 중단되었다. 실험후반에는 *Neurospora*의 성장 일주기가 전반적으로 단축되었

다.

참 고 문 헌

1. Bünning, E., The physiological clock. Springer Stuttgart, N.Y, Berlin (1977)
2. Dunlap, J. C., Closely watched clock. *TIG* 6, 159-165 (1990)
3. Han, S. Z., Lithiumchloride changes sensitivity of hamster rhythm to light pulses. *J. interdis. cys. res.* 15, 139-146 (1984)
4. Cornelius, G. and L. Rensing, Circadian rhythm of heat shock protein synthesis of *Neurospora crassa*. *Euro. J. Cell Biol.* 40, 130-132, (1986)
5. Schmid, H. and W. Engelmann, Effects of Li^+ , Rb^+ and TEA on the locomotor activity rhythm of *Musca domestica*. *J. int. cys. res.* 18(2), 83-102, (1987)
6. 한상진, Azadirachtin에 의한 *Leucophaea maderae*의 활동주기변화와 뇌신경에 의한 조절 관계 조사. *동물학회지* 32, 441-449 (1989)
7. Rensing, L. and K. Goedeke, Circadian rhythm and cell cycle; possible entraining mechanisms. *Chronobiologia* 3, 53-65 (1976)
8. Brody, S., C. Dieckmann, and S. Milolajczyk, Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: the effects of point mutations on the proteolipid portion of the mitochondrial ATP synthetase, *Mol. Gen. Genet.* 200, 155-161 (1985)
9. Roeder, P. E., M. L. Sargent, and S. Brody, Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: Oscillations in fatty acids. *Biochemistry* 21, 4909-4916 (1982)
10. Loros, J. J. and J. J. Feldman, Loss of temperature compensation of circadian period length in the *frq-9* mutant of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Rhythms.* 1, 187-188 (1986)
11. Mattern, D. L., L. R. Forman, and S. Brody, Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: A mutation affecting temperature compensation

- Cell Biol.* **79**, 825-829 (1982)
12. Sargent, M. I., and W. R. Briggs, The effects of light on a circadian rhythm of conidiation in *Neurospora crassa*. *Plant Physiol.* **42**, 1504-1510 (1967)
 13. Lauter, F. R., and V. E. A. Russo, Blue light induction of circadian specific genes in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Res.* **19**(24), 6883-6894 (1991)
 14. Dharmananda, S., and J. F. Feldman, Spatial distribution of circadian clock phase in aging cultures of *Neurospora crassa*. *Plant Physiol.* **63**, 1049-1054 (1979)
 15. de Serres, F. J., Comparison of mutational changes induced by ultraviolet light, ⁸⁶Sr gamma rays, and carbon in *Neurospora crassa*. In: *Advances in Radiation Research. Biology and Medicine.* (J. F., Duplan, editor). New York; Gordon and Breach, Science Publishers, Inc. **1**, 377-384 (1973)
 16. Nemerofsky, A., The interactive effect of ultraviolet irradiation and 5-bromouracil at the rib-1 locus in *Neurospora crassa*. *Can. J. Genet. Cytol.* **17**, 275-278 (1975)
 17. Chung, Y. H., M. S. Chung, and S. Z. Han, Effects of low-level radioactive irradiation on circadian rhythm of *Neurospora crassa*. *Env. Mutagens & Carcinogens* **11**(1), 1-11 (1991)
 18. Rinnan, T., and A. Johnsson, Effects of alkali ions on the circadian leaf movements of *Oxalis regnellii*. *Physiol. Plant.* **66**, 139-143 (1986)
 19. Hah, J. C., Effects of the heavy pollution on the primordial germ cells of developing *Amphibia*. *Kor. J. Zoology.* **21** (2), 43-58 (1978)
 20. Vogel, H. J., Distribution of lysine pathways among fungi : evolutionary implications. *Am. Natural.* **98**, 438-556 (1964)
 21. Feldman, J. F. and M. N. Hoyle, Isolation of circadian clock mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics.* **82**, 9-17 (1973)
 22. Siegel, S., *On parametric statistics for the behavioural sciences.* McGraw-Hill, New York, Toronto, London (1956)
 23. Engelmann, W., and M. Schrempf, Membrane models for circadian rhythms. *Photochem. Photobiol. Rev.* **5**, 49-86 (1980)
 24. Johnsson, A., W. Engelmann, B. Pflug, and W. Klemke, Period lengthening of human circadian rhythms by lithium carbonate, a prophylactic for depressive disorders. *Brain Res.* **8**, 129-147 (1981)
 25. Delius, K., M. Gunderoth-Palmowski, I. Krause, and W. Engelmann, Effects of lithium salts on the behaviour and circadian system of *Mesocricetus auratus*. *J. inter discipl. Cys. Res.* **18**, 289-300 (1987)
 26. Kornblatt, M. J., and R. Musil, The inhibition of yeast enolase by Li⁺ and Na⁺. *Arch. Biochem. and Biophysics.* **277** (2), 301-305 (1990)
 27. Hoelzle, I., and J. G. Streeter, Stimulation of α -glucosidases from fast-growing *rhizobia* and *agrobacterium tumefaciens* by K⁺, NH₄⁺ and Rb⁺. *Can. J. Microbiol.* **36**, 223-227 (1990)
 28. Burgoyne, R. D., A model for the molecular basis of circadian rhythms involving monovalent ion-mediated translational control. *FEBS Lett.* **94**, 17-19 (1978)
 29. Reichle, D. E., P. B. Dunaway, and D. J. Nelson, Turnover and concentration of radionuclides in food chains. *Nucl. Safety* **11**, 43-55 (1970)
 30. Wickler, F. W., and V. Schultz, *Radioecology : Nuclear Energy and the Environment.* Vol. I and II. CRC Press, Boca Raton, Fla. (1982)
 31. Jordan, C. F., *Ecological effects of nuclear radiation.* Atomic Energy Commission. 331-344 (1983)