

## *Streptomyces coelicolor*의 발아과정 중 RNA와 단백질 합성의 주기적 변화

이지훈 · 한홍의\*

인하대학교 이과대학 생물학과, 서울대학교 분자미생물학연구소

성장인자가 포함되지 않은 무기염 액체배지(ISP-4)에서 *Streptomyces coelicolor* A3(2)의 포자가 발아할 때, 성장인자의 주기적인 요구성이(양 등, 1993) 단백질과 RNA 합성과 어떤 관계를 가지고 있는지를 규명하고자 하였다. 발아는 10시간 정도 걸렸으며 이때 성장인자의 요구성이 2시간 주기로 반복되는 것을 재입증하였다. 포자의 크기는 시간에 따라 증가하였으나, 포자수는 표준 평판계수법에서 감소하였다. 포자 집단은 생리적으로 살아있거나, 휴면 중인 포자와 죽은 포자로 구분될 수 있었다. 이러한 발아과정에서 포자를 acridine orange(AO)와 iodinitrotetrazolium chloride(INT)로 염색하여 형광현미경으로 관찰하였을 때 RNA와 단백질도 일정한 주기를 갖고 합성되었으며, 이 주기성은 성장인자의 요구 주기와 거의 일치하였다. 이로써 발아 초기에 포자 집단은 성장인자 중에서 특히 단백질 합성과 관련된 물질인 아미노산이 주기적으로 요구되고 있음을 토론하였다.

**KEY WORDS** □ *Streptomyces coelicolor* A3(2), AO, INT, polyacrylamide gel medium, growth factors, germination

*Streptomyces coelicolor* A3(2)는 원영양체로서 성장인자가 필요하지 않다(18). 그러나 성장과정 중 유도기에 해당하는 시기인 포자의 발아과정에서 성장인자(growth factor)를 요구한다. 그리고 유전적이 아니고 생리적으로 성장인자를 요구하는 상태와 그렇지 않은 상태가 주기적으로 일어나며 이들은 단백질 합성에 직접적으로 관련되어 있다는 사실이 보고된 바 있다(3). 이 결과들은 평판배양에 의한 집락수로 측정되었다. 사용된 표준평판계수법(standard plate count)은 무기염 최소배지(ISP-4 배지)와 영양배지(Bennet's 배지)에서 형성된 집락수 차이로 계산되었다(2,3). 그러나 그 신빙성에 대하여 의문이 제기되어 왔다.

그 이유는 실험에 사용된 균주가 고체배지에 사용된 한천을 분해하여 성장할 수 있으므로(1,7) 양쪽 배지에서 형성된 집락수가 성장인자를 요구하고 있는지 혹은 아닌지를 정확히 판단할 수 없기 때문이다. 이를 해결하기 위한 연구로서 한천 대신에 polyacrylamide gel(PAG)를 사용하여 방선균을 생장시킬 수 있는 방법이 고안되어 발표된 바 있다(1,3). 현재까지 이 PAG를 분해할 수 있는 미생물을 발견하지 못하였다. 그리고 표준평판계수법은 집락수의 측정에 오차를 많이 초래하기 때문에 실험결과의 신빙성이 낮아진다는 판단이었다. 따라서 포자의 발아과정에서 포자에 손상을 주지 않고 단백질 합성기작에 관련된 RNA 및 효소를 측정할 수 있는 형광현미경법을 이용하여 성장인자요구상태의 주기적인 변화를 관찰할 수 있는 연구가 필요하였다.

먼저 RNA에 관련된 연구를 위해서 AO(Acridine orange)라는 시약을 이용할 수 있다. AO염색에 의해 붉은색 또는 녹색으로 세균이 염색된다는 것은 여러 논문에서 보고되어

왔다. 이렇게 색깔이 구분될 수 있는 것은 RNA의 함량에 기인한다고 한다(15,16). 즉, 단일가닥의 RNA는 많은 AO 분자와 결합을 하여 dimer로서 AO 형광염료간의 상호작용이 일어나고, 그 결과 붉은색으로 보인다. 반면, 2중나선인 DNA의 단단한 구조는 적은 AO분자와 결합하게 되고, AO 형광염료간의 상호작용이 일어나지 않아 녹색으로 보인다(16). 그 결과 높은 성장율을 보이는 활성세포(active cell)는 많은 RNA 때문에 붉은색으로 보이며 매우 낮은 성장율을 보이는 불활성 세포(inactive cell)의 경우 대부분 DNA를 가지기 때문에 녹색으로 보인다(15). 또한, 최근의 세균의 생리활성 상태를 조사하는 방법 중 하나가 전자전달계의 활성도를 이용한 방법이다(6). 대부분 생물의 총 대사활성의 많은 부분이 전자 전달계의 활성도와 연관되어져 있다(6,14,22). 이러한 전자 전달계의 활성도는 인공적인 전자 수용체를 이용함에 의해서 쉽게 측정될 수 있다(10,22). 이러한 물질로 최근 많이 쓰이는 물질이 INT라는 시약이다. INT는 탈수소효소와 반응하여 활성도가 높은 세포에서 붉은색이 나타나는 INT-formazan 결정을 형성시킨다(6). 이러한 결정은 광학 현미경을 통해 관찰할 수 있으며 이 결정을 ethanol이나 다른 유기용매를 이용하여 추출하여 분광광도계로 정량분석 할 수 있다(21).

본 연구는 이러한 방법으로 *S. coelicolor*의 성장인자 요구의 주기적 변화가 사실인지를 확인하기 위하여 단백질과 RNA 양과의 어떠한 관계를 갖고 있는지를 규명하고자 하였다. 그 결과 포자의 발아과정 중 성장인자 요구성의 주기가 존재하며, 이 주기는 RNA와 단백질의 합성주기와 일치됨이 확인되었다. 그리고 형광현미경에 의한 AO 염색법으로도 활성 포자의 RNA 양에 대한 증가와 감소의 판독이 가능하였다.

\*To whom correspondence should be addressed

## 재료 및 방법

### 균주배양 및 포자회수

본 연구에 사용한 *Streptomyces coelicolor* A3(2)는 서울대학교 분자미생물학 연구센터에서 분양받았다. 균주는 영양배지인 Bennett's 평판배지(증류수 1 L당 glucose, 10g; peptone, 2g; beef extract, 1g; yeast extract, 1g; agar, 15g; pH 7.2)에서 한달 간격으로 계대배양하여 사용하였다.

포자의 회수는 Bennett's 평판배지에 균주를 각각 접종하여 25°C에서 30일간 배양한 후 배양접시에 멸균증류수를 10 ml/씩 넣고 유리봉으로 긁어 균체를 증류수에 현탁하였다. 이 현탁액을 멸균 pipette으로 회수하여 40-50개의 유리 구슬(Ø: 4 mm)이 들어있는 polystyrene tube(30×120 mm)로 옮긴 후 균사체로부터 포자를 분리시키기 위해 10분 이상 vortex mixer로 강하게 진탕하였다. 현미경으로 포자를 관찰한 결과 균사체는 포자 수의 1% 미만을 차지하였다. 포자액은 4°C에서 5일간 보관하여 사용하였고 한달 간격으로 포자를 재 회수하여 실험하였다.

### 배지의 제조

포자의 액체 배양에는 ISP-4(International streptomyces project-4) 무기염 최소배지(증류수 1 L당 glucose, 5g; NH<sub>4</sub>-Cl, 2g; NaCl, 1g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1g; 미량 원소 용액, 1 ml; pH 7.2)를 사용하였다. 미량 원소는 증류수 100 ml당 MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.1g; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1g; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1g을 녹였으며 ISP-4배지 1 L당 1 ml를 첨가하였다. 모든 배지는 121°C에서 15분간 고압 살균하였다.

집락계수를 위해서 Bennett's 평판배지와 ISP-4 평판배지를 사용하였다. 이러한 평판배지는 한천을 이용한 기존의 방법과 PAG(Polyacrylamide gel)를 이용한 새로운 방법으로 제조하였다. 한천을 이용한 방법은 위에 제시한 Bennett's와 ISP-4 성분을 용해시킨 후 pH를 맞추고 1.5%의 한천을 넣어 진자레인지로 끓인 후 121°C에서 15분간 멸균하였다. 멸균 후 일회용 사레(녹십자 의공 Ø: 87 mm)에 15-20 ml씩 분주하여 상온에서 고화시키고 응결수 제거를 위해 45°C 배양기에서 24시간 정도 건조시킨 후 사용하였다.

PAG 배지를 이용한 방법은 다음과 같은 방법에 의해 제조했다. 먼저 만들고자 하는 평판배지 수에 20 ml를 곱한 양의 증류수를 준비했다. 이를 2개의 비이커에 각각 반씩 나눠 첫번째 비이커에는 증류수 100 ml당 4.83 g의 acrylamide (Sigma)를 넣고 녹인 뒤 10% ammonium persulfate(Sigma) 용액을 증류수 100 ml당 2 ml 넣었다. 두번째 비이커에는 증류수 100 ml당 0.17 g의 N,N'-methylene-bis-acrylamide(Sigma)를 충분히 녹인 뒤 여과시켰다. 이러한 2개의 비이커를 하나로 섞은 뒤 유리사레에 20 ml씩 분주하였다. 이를 고화시키기 위해서 각 유리사레당 200 µl의 10% N,N,N',N'-tetramethylethylene-diamine(Bio-Rad) 용액을 첨가한 뒤 즉시 유리막대로 잘 저어주었다. 약 15분 뒤 고화된 PAG가 있는 유리사레를 특별히 제조된 통에 넣고 12시간 정도 흐르는 물로 세척하였다. 이 과정에서 사용된 통은 아래쪽으로 물이 들어가서 위로 흘러 나오도록 고안된 통을 사용하였다. 12시간

후 유리사레를 꺼내 45°C 부란기에 넣어 PAG가 거의 마를 때(약 24시간 정도)까지 두었다. 그 후 각 유리사레당 배양액(Bennett, ISP-4)을 각각 10 ml씩 넣어 흡수시켰다. 배지가 모두 흡수된 후 유리사레를 신문지로 잘 포장한 후 121°C에서 15분간 멸균하였다. 마지막으로 멸균된 유리사레를 45°C 부란기에 넣어 12시간 정도 응결수를 제거하여 사용하였다.

### 시료의 채취

증류수로 회수한 포자 현탁액을 ISP-4 액체배지 1 L에 포자의 최종 농도가  $3 \times 10^5$  포자/ml로 접종하였다. 배양조는 시료의 채취가 용이하도록 pyrex 유리로 500 ml 크기로 제작하여 사용하였다. 포자액을 접종한 배양조는 공기의 주입량을 분당 2 L가 되도록 하였으며 25°C 배양기에 넣어 배양하였다. 시료는 매 2시간 간격으로 채취하였다.

### 집락의 계수

채취된 시료를 약  $3 \times 10^3$ /ml 되도록 멸균 증류수로 희석하여 0.1 ml씩 각 평판배지에 접종하였다. 25°C 배양기에서 5-7일 배양 후 1차 계수를 하였고 3-4일 후 다시 집락수의 변화를 관찰하였다. 배지에 따라 집락 형성시기의 차이를 보이므로 집락수의 계수는 15일 이후까지 계속 관찰하였다. 평판 배양법의 오차를 최소화하기 위하여 동일한 세개의 배지에서 집락수를 계수하여 평균하였고 반복 실험으로 그 결과를 확인하였다.

시료 중 성장 인자를 필요로 하는 포자의 수는 아미노산 및 vitamine 등이 포함된 Bennett's 고체 영양배지(solid rich medium, B)에서 계수한 집락의 수에서 성장 인자가 전혀 없는 ISP-4 무기염 고체배지(mineral solid medium, I)에서 계수한 집락수의 차이(B-I)로 계산하였다.

### AO 염색

포자 집단내에 존재하는 대사적으로 활성인 포자를 검출하기 위하여 AO 염색방법을 사용하였다. 4 ml의 시료의 채취 후, 채취된 시료의 변화를 막기 위하여 시료에 10% pi-buffered GTA(증류수, 80 ml; 50% glutaraldehyde(GTA), 20 ml; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.23 g; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4 g)를 최종 농도가 1%되도록 첨가 하여 4°C 암실에서 보관하였다. 30분 이내에 이 시료에 0.1% AO용액(증류수, 95 ml; AO(Acridine orange, Janssen chimica), 100 mg; 50% GTA, 5 ml)를 최종농도가 0.01% 되도록 첨가하여 5분간 암실에 방치 하였다. 이 사이에 막여과기(Ø25 mm-용, Gelman)에 Nucleopore filter(0.2 µm pore size, 25-mm diameter, prestained black polycarbonate membrane filter)를 끼웠다. 5분 후 처리된 용액을 pipette으로 5 ml 채취하여 막여과기를 시켰다. Slide glass위에 얇은 immersion oil(Non-fluorescence, Olympus co.)의 막을 형성시킨 후 여과지를 막여과기에서 forceps으로 Slide glass 위로 옮겼다. 이때 여과지의 시료면이 위로 가게 하였다. 이 여과지 위에 다시 적은 양의 immersion oil을 떨어뜨린 후 Coverglass로 덮어주면서 oil이 잘 퍼지도록 부드럽게 압력을 가하였다.

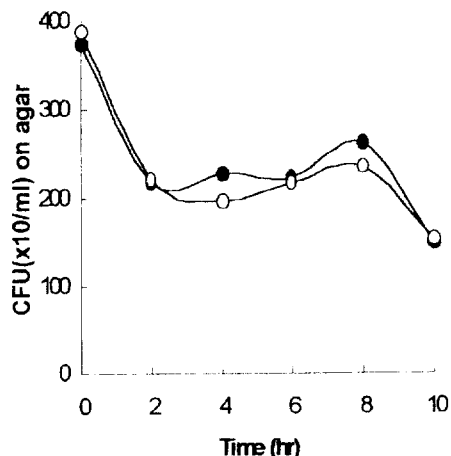
현미경 관찰은 200-W mercury burner를 갖춘 Olympus optical model BH2-RFCA의  $\times 100$  oil immersion fluorescence objective(Olympus model DPlan 100)로 관찰하였다. AO 관찰시에는 blue(490 nm) excitation filter(Olympus model BP490)와 515 nm barrier(cutoff) filter(Olympus model BA 515)의 combination filter를 사용하였다. 포자의 관찰은 이러한 형광현미경에 CCD color camera(Toshiba model IK-637K)를 연결하여 Image analyser system으로 포자수와 크기를 얻었다. Image analyser system은 일반컴퓨터에 하드웨어와 소프트웨어로 Imagraph board(Imagraph Co.)와 Optimas 5.2 program(Optimas Co.)을 각각 사용하였다. 그리고 하나의 filter당 임의로 20개의 field를 선택해 포자에 대한 자료를 얻었다. 이렇게 얻은 자료는 Microsoft Exel 5.0(Microsoft Co.)과 MicroCal Origin(MicroCal software Inc.) program을 통해 계산 및 통계 처리하였다. 또한 사진은 Color video printer(Sony model CVP-G7)을 이용하여 얻었다.

### INT 환원을 측정

4 ml의 시료를 채취 후, 채취된 시료에 0.2% INT(Iodonitrotetrazolium chloride, Fluka) 염료를 넣어 최종 농도가 0.02 % 되도록 하여 진탕 배양기에서 25°C로 30분간 배양하였다. 그 후 pi-buffered GTA를 넣어 고정시키고 4°C 암실에서 보관하였다. 24시간 이내에 high speed centrifuge를 이용하여 18,000 rpm으로 15분간 포자를 침전시킨 뒤 상층액을 제거하였다. 침전된 포자에 100% 에탄올 5 ml를 첨가하여 10분간 흔들려 주었다. 다시 18,000 rpm으로 15분간 centrifuge하여 포자를 침전시킨 뒤 상층액을 얻었다. 이 액을 spectrophotometer를 이용하여 480 nm에서 0 hr를 기준으로 하여 O.D값을 얻었다(21). 위 과정에서 에탄올 첨가 후의 과정은 에탄올의 증발을 막기 위해 가능한 한 신속히 처리하였고 PARA film을 이용하여 sealing하였다.

## 결 과

### 집락수의 변화



**Table 1.** Comparison of SPC and DMC during the germination of *S. coelicolor* A3(2) (Units:  $\times 10^3$  spores/ml)

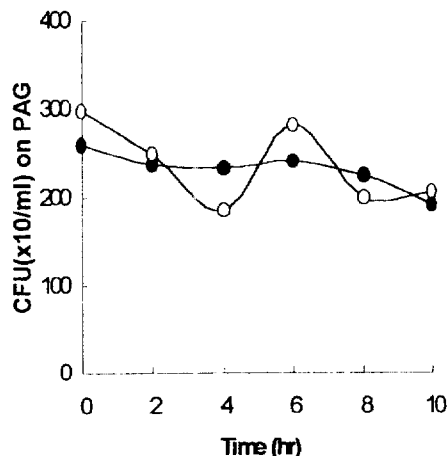
Time(hr)	SPC		DMC
	Agar	PAG	AO
0	35	279	520
2	212	243	519
4	250	248	519
6	239	285	520
8	309	266	522
10	122	162	525

Total colony numbers were counted on Bennett media.

ISP-4 무기염 액체 배지에서 포자의 발아과정 중 시간에 따른 집락수의 변화를 알아보았다. 집락수는 Polyacrylamide gel(PAG)과 한천으로 고화시킨 ISP-4와 Bennet's 고체 배지를 이용하여 2시간 간격으로 총 집락수를 세수하였다. 그 결과는 Fig 1과 같다. 집락수의 측정오차는 최대로 5% 미만이었다. 시간이 경과함에 따라 집락수가 점차 감소하는 경향을 보였다. 한천배지의 경우 집락수가 Bennet's와 ISP-4 배지가 각각 60.4와 60.2%나 감소하였으며, PAG 배지의 경우 각각 25.9, 30.9%씩 감소하였다. PAG가 한천에 비해 더 높은 집락수를 얻을 수 있었고 더 정확하였다.

총생균수를 측정하는 방법을 비교하기 위하여 표준평판계수법(SPC, standard plate counts)과 직접 현미경 계수법(DMC, direct microscopic counts)을 하였다. DMC는 AO를 이용한 방법(AODC)을 사용하였으며, SPC는 고화제로 한천과 PAG를 이용하였다. 그 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. SPC는 약  $200-350 \times 10^3$  spores/ml 정도였으며, AODC는 약  $520 \times 10^3$  spores/ml로 나타났다. 즉, SPC가 AODC에 비해 50% 정도 적게 계수되었다. 또한 SPC는 균수가 시간에 따라 변화함을 볼 수 있었으나 AODC는 거의 일정한 수준을 유지하였다. 특히 SPC의 경우 포자수가 2시간 이내에 급격히 감소하였으나 그 이유는 밝히지 못하였다.

### 성장인자 요구성의 주기적 변화



**Fig. 1.** Changes of colony numbers at the lag phase of *S. coelicolor* A3(2) in ISP-4 liquid medium. Total colony numbers were counted on Bennett(●) and ISP-4(○) media, using different solidifying agents, agar and polyacrylamide gel(PAG).

영양 요구체(auxotroph)와 원영양체(prototroph)의 차이는 성장인자의 요구 유무의 차이이다. 이러한 생리학적 상태를 알아보기 위하여 성장인자가 함유된 Bennett's 배지와 이를 함유하지 않은 ISP-4 배지에서 형성된 집락수의 차이로 판단하였다. 영양배지(Bennett's 평판 배지)에서의 집락수가 무기염 최소 배지(ISP-4 평판 배지)에 비해 많은 경우는 성장인자요구 상태(auxotrophic state, A)라 할 수 있고, 반대로 무기염 최소 배지가 더 많은 경우는 원양체 상태(prototrophic state, P)라 간주할 수 있다. 따라서 Fig. 1의 결과로부터 집락수의 차이를 계산한 결과 액체 배양시 유도기에서도 성장인자 요구성이 있음을 알 수 있었다(Fig. 2). 포자의 생리상태는 4시간째와 8시간째에서 overshoot함을 볼 수 있었다. 이 시간 때에 많은 성장인자를 요구한다고 볼 수 있다. 이러한 양상들은 한천과 PAG 배지에서 모두 나타났으며, 특히 PAG 배지에서 진폭이 크고 뚜렷히 나타났다. 따라서 ISP-4

무기염 액체 배지에서 포자가 발아할 때 성장인자 요구성이 일정한 주기로 변화한다는 것을 알 수 있었다.

**RNA 합성의 주기적 변화**

형광현미경 하에서 Acridine Orange(AO) 염색시 DNA는 녹색(green)으로, RNA는 붉은색(red/orange)으로 크게 2개의 색으로 구분되어 염색된다(Fig. 3).

이러한 색에 따라 포자의 상태를 파악하고자 하였다. Fig. 4의 사진들은 포자를 ISP-4 무기염 고체 배지에 접종하여 배양한 포자의 사진들이다. 0시간 때의 사진을 보면 녹색과 붉은색의 포자를 볼 수 있으며 색이 뚜렷히 구별됨을 알 수 있다. ISP-4 무기염 배지에서 배양한 후 8시간째에서 포자에 발아관이 형성되기 시작했으며, 8시간과 10시간 때에는 짧은 균사체가 관찰되었다. 그러나 10시간 때에서 균사가 관찰되었다 할지라도 균사가 짧고 서로 엉켜 있지 않았기 때문에 포자수를 계수할 수 있었다. 하지만 12시간 때부터는

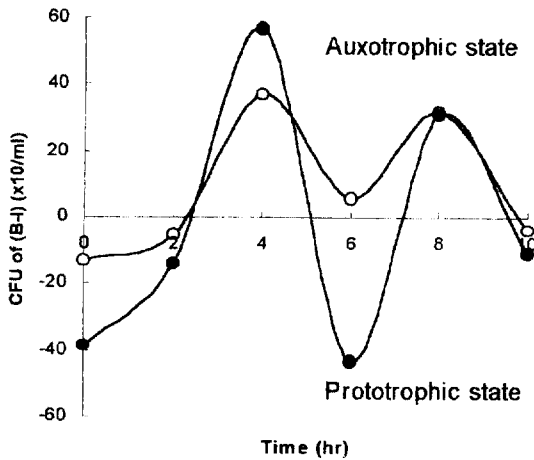


Fig. 2. Periodical changes of prototrophic and auxotrophic state at lag phase of *S. coelicolor* A3(2) in ISP-4 liquid medium. Prototrophic and auxotrophic states were expressed as the difference of colony numbers formed on Bennett's and ISP-4 solid media. Solid media were made of Agar(○) and PAG(●).

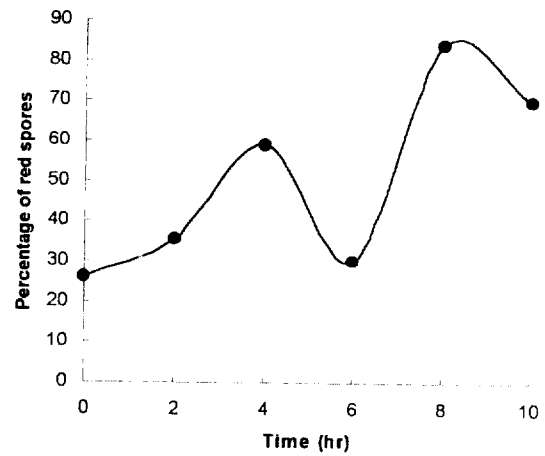


Fig. 4. Periodical changes of RNA synthesis during germination of *Streptomyces coelicolor* A3(2) in IS-4 liquid medium. RNA synthesis was expressed as percentages of red spores by acridine orange stain.

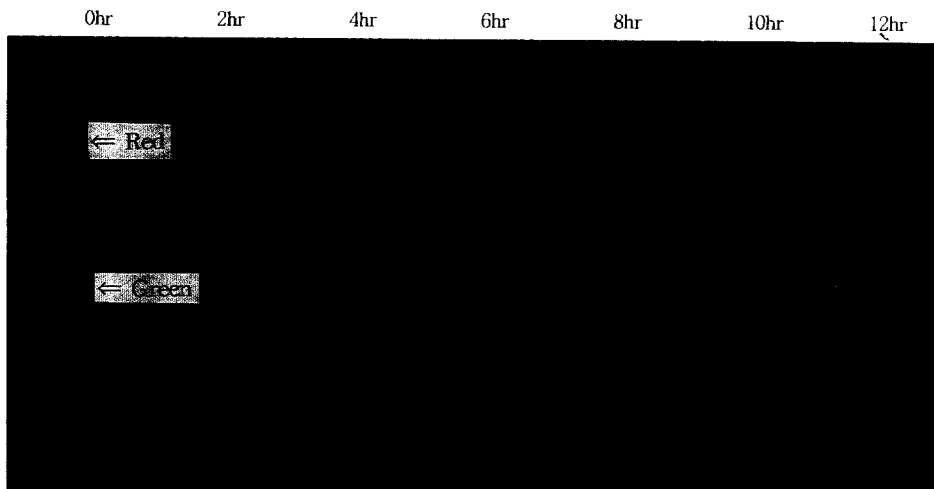


Fig. 3. Germination process of *S. coelicolor* A3(2) in ISP-4 liquid medium.

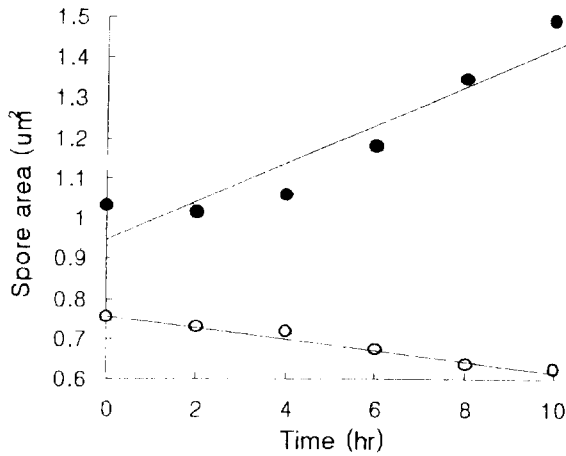


Fig. 5. Size changes of red(●) and green(○) spores of *Streptomyces coelicolor* A3(2) in ISP-4 liquid medium.

서로 엉켜 있어서 계수는 불가능하였다. 또한 이렇게 색이 뚜렷이 구별됨에 따라 AO 염색을 이용하여 균집내 RNA 양의 변화를 측정할 수 있었다.

RNA의 합성을 알아보기 위하여 AO 염색에 의한 포자의 색깔에 따라 전체수에 대한 두 군의 백분율을 구하였다(Fig. 4). 그 결과 붉은색 포자의 비율은 4시간째와 8시간째에서 overshoot하였고, 발아기간 중 그 수가 증가하였다. 특히, 이러한 현상은 Fig. 2에서 보여지는 성장인자를 요구하는 주기성과 유사한 양상임을 알 수 있었다.

### 포자의 크기

성장인자의 요구와 RNA 양의 증가가 일어날 때, 포자의 크기가 다른 현상이 관찰됨으로서 ISP-4 액체 배지에서 시간에 따른 포자 크기의 변화를 조사하였다. AO를 이용해 염색한 후 붉은색과 녹색의 두 군으로 포자를 나눈 뒤 각 군의 크기를 영상분석장치를 이용하여 얻었다. Fig. 5는 각 시간대에서 두 군의 포자를 각각 100개 이상씩 조사하여 크기를 조사한 다음에 그 크기의 평균값을 보여주고 있다. 포자의 크기는 현미경상에 나타난 포자의 면적을 그 값을 상대적으로 구하였다. 붉은색 포자군의 크기는 2시간까지 유지되었으나, 그 후 점차적으로 증가하는 경향을 보였다. 반대로 녹색 포자군의 크기는 일관되게 감소하는 경향을 보였다. 이러한 붉은색 포자군의 크기의 증가는 RNA 양의 증가와 비례함을 의미한다.

### 단백질 합성의 주기적 변화

무기염 액체 배지(ISP-4)에서 배양시 시간이 경과함에 따라 단백질인 탄소수효소의 합성물의 변화를 조사하기 위하여 INT 환원율을 측정하였다(Fig. 6). 0.4시간까지는 급격한 증가를 보였으며 6시간까지는 감소하였고, 다시 8시간째까지는 증가하다 8시간 이후 10시간째까지는 감소하는 양상을 보였다. 이러한 주기성은 Fig. 2와 Fig. 4에서 본 바와 같이 증감주기와 4시간과 8시간째에서 overshoot하는 양상을 같았다. 이것은 RNA와 단백질의 합성이 거의 같은 시간대에

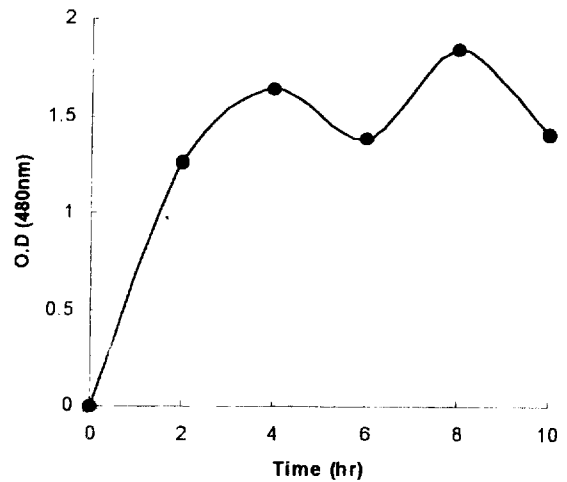


Fig. 6. Periodical changes of protein synthesis of *Streptomyces coelicolor* A3(2) in ISP-4 liquid medium. Protein synthesis was expressed by INT reduction assay.

일어나고 있으며, 이 시기에 성장인자가 요구되고 있음을 의미한다.

## 고찰

세균의 계수에 있어서 고화제로는 한천이 가장 일반적으로 사용되어져 왔으나 이것을 분해하는 미생물이 존재하기 때문에 종종 문제가 제기되기도 하였다(1, 7). 이러한 단점을 극복하기 위해서 여러 연구가 진행되었고 최근 PAG(polyacryl amide gel)를 이용한 방법이 소개되기도 하였다(1, 3). 본 실험에서 *Streptomyces coelicolor*의 시간별 생균수 측정을 위해 이러한 한천을 이용한 방법과 PAG를 이용한 방법을 시도하였다. 그 결과 한천과 PAG 모두 정도의 차이는 있지만 전체적으로 초기보다 후기로 갈수록 집락수가 감소하는 경향을 보였다(Fig. 1). 특히 이러한 경향은 고화제로 한천을 쓴 경우(Fig. 1A)가 PAG를 쓴 경우(Fig. 1B)에 비해 뚜렷히 보여졌다. 그러나 이러한 집락수가 감소하는 현상이 시료 채취의 오차 때문에 일어나는 현상은 아닌 것으로 판단된다. 그 이유로 같은 시료에서 집락수 계수와 AODC를 위해 동시에 시료 채취를 하였을 때 AODC는 거의 일정한 수를 유지함을 볼 수 있었기 때문에 시료 채취의 오차는 아닌 것으로 판단된다(Table 1). 또한 평균계수의 오차를 줄이기 위해 3개의 반복수를 두어 평균하였으며 이것의 최대 오차 범위가 5%를 넘지 않았기 때문에 점종의 오차도 아닌 것으로 생각된다. 이렇게 시간에 따라 집락수가 감소하는 현상은 발아과정 중 생리상태의 변화로 추정되어지나 이에 대한 이유는 아직 정확히 밝혀져 있지 않다.

무기염 최소배지(ISP-4 media)와 영양배지(Bennet's media)에서 계수된 집락수를 이용하여 성장인자 요구성을 파악할 수 있었다. 그 결과 영양요구체와 원영양요구체가 2시간 간격으로 일정한 증감 주기를 가짐을 볼 수 있었다(Fig. 2). *S. coelicolor*의 유도기에서 이러한 주기성은 성장인자 중 아미노산에 의해 일어나며 포자내 단백질 합성과 밀접한 연관이

있는 30S ribosome이 직접적으로 관여함이 이미 보고된 바 있다(3). 이는 액체 배양시 포자의 생리적 성질이 배양시간에 따라 다르다는 것을 의미한다. 이러한 증감 주기는 한천이나 PAG에서 모두 같은 양상을 보이나 한천에 비해 PAG의 경우 진폭이 크고 2시간 간격으로 영양요구체와 원영양요구체로 뚜렷하게 변화함을 볼 수 있었다. 이는 한천내에 존재하는 불순물 중 ISP-4 배지 성분에는 존재하지 않는 어떤 물질이 존재하며 이것을 이용함으로써 일어나는 현상이 아닌가 생각된다. 실제로 한천은 제조공정에 따라 상당량의 이온들이 존재함이 알려져 있으며(1,20), 특히 *Streptomyces* 속종 *S. coelicolor*가 한천을 분해하는 능력이 다른 종과 비교시 특히 높다고 알려져 있다(1,7). 이렇게 한천은 세균의 성장에 의해 분해될 수 있기 때문에 성장인자의 정확한 영향에 대해 조사하기에는 적당치 않다. 그러므로 한천보다는 PAG가 집락수 계수에 있어서 더 유용하며, 특정 물질의 생리적 영향에 대한 연구에 적합하다고 생각된다.

*Streptomyces coelicolor*의 발아과정 중 RNA 합성의 주기적 변화를 파악하기 위해서 AO 염색법을 이용하였다. Fig. 3은 1,500배로 관찰된 포자로 붉은색과 녹색이 뚜렷이 구분되었으며 간혹 노란색을 띠는 포자도 관찰할 수 있었다. 과거의 논문에 의하면 붉은색과 녹색을 띠는 세균이 혼재시 색구별이 어렵다고 보고된 바 있다(15). 그러나 이러한 AO 염색에 관한 대부분의 논문은 그 대상이 자연계의 시료이며 담수나 해수 또는 토양 미생물을 대상으로 하였다. 그렇기 때문에 세균의 크기가 극히 작아서 색의 구별이 쉽지 않았던 것으로 생각된다. 실제로 토양미생물의 72% 이상이 0.3  $\mu\text{m}$  이하이며 빈영양성의 해수에서도 0.3  $\mu\text{m}$  이하의 세균이 많다고 한다(5) 그러나 본 연구에서 사용된 균은 포자 크기가 1  $\mu\text{m}$  전후였으며(Fig. 5) 영상분석장치의 도움으로 사진과 같이 두 군(붉은색, 녹색)으로 나누는데 큰 어려움은 없었다. 그러나 노란색의 포자가 나누기가 곤란하기도 하였으나 이 색깔의 균이 극히 적었기 때문에 두 군으로 분리하는데 별다른 어려움은 없었다. 이렇게 색깔로 두 군을 나누기 위해서는 AO 염색 후 가능한 빠른 시간내에 관찰을 해야 했다. 이는 AO의 경우 형광성의 감소가 빨리 일어나며(17) 색깔의 변화에 영향을 주기 때문이다. 현미경을 고정시켜 놓고 계속 관찰한 결과 붉은색의 포자는 점차 노란색으로 변화하였다가 녹색으로 변화하였다. 이러한 형광성의 감소시간을 측정하지는 않았지만 본 실험에서는 AO 염색 후 20분 이내에 한 시료당 20개 field를 영상분석장치를 이용하여 상을 저장하였고 실험 완료 후 포자의 크기와 색을 구분하였다.

이러한 두 개의 군을 붉은색군과 녹색군으로 나누어 백분율을 구하였다(Fig. 4). 그 결과 RNA가 다량 존재하는 활성상태인 붉은색 포자의 비율이 증감주기를 가진다는 것을 볼 수 있었다. 0-2시간째는 약간의 증가를 나타내는데 이시간은 적응기로 판단되며 2시간 때를 기준으로 보았을 때 2시간 간격으로 증감주기를 가짐을 볼 수 있었다. 4시간째와 8시간째에서는 붉은색의 포자수가 급격히 증가하였으며 6시간째와 10시간째에서는 급격히 감소하였다. 이러한 증감주기는 영양요구체의 진동현상(Fig. 3)과 같은 주기를 이루었다.

이러한 양상의 일치는 반복된 여러 번의 실험에서 일관되게 보여져 왔다. 이것은 ISP-4 무기염 액체 배지에서 배양시 시간에 따라 RNA함량이 변화함을 의미한다. *Streptomyces*속의 발아에 관한 연구에 의하면 단백질 합성은 RNA합성과 동시에 또는 RNA 합성의 시작 후 수분 이내에 시작된다고 한다(9). 즉, 4시간째와 8시간째에서 세포내 RNA 함량이 증가함은 이시기가 단백질 합성이 증가되는 시기로 판단할 수 있다. Fig. 2와 4를 비교하면 이러한 시기에는 영양원의 세포내 합성이 가능한 원영양체라 할지라도 세포 외부에 필요한 영양원이 존재한다면 영양요구체로 전환될 수 있음을 의미한다. *S. antibioticus*의 경우, 포자의 발아시 단백질이 분해되는 것으로 보고되어 있다(13). 이는 원영양체인 *Streptomyces*가 단백질의 분해에 의해 필요한 아미노산을 얻음을 의미한다. 그러나 외부에 이러한 아미노산이 있거나 포자내 아미노산 함량이 부족할 때 외부의 아미노산을 이용하는 영양요구체로 전환되는 것으로 생각된다. 그 후 합성과 분해가 진행됨에 따라서 다시 원영양체로 전환되기 때문에 생리상태의 진동현상이 일어나는 것으로 생각된다. 또한 활성상태인 붉은색의 포자비율이 시간에 따라 전체적으로 증가하는 현상을 볼 수 있는데 집락수는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 시간이 경과함에 따라 감소함을 알 수 있다. 그러므로 시간의 경과에 따라 활성포자가 점진적으로 증가한다고 보기는 어렵다. 이는 아마도 전에 생성된 RNA가 분해되지 않고 남아있기 때문이 아닌가 생각된다. 실제로 *S. antibioticus*의 RNA 분해에 관한 연구에서 배양시간에 따라 차이는 있으나 RNA가 어느정도 감소 후 상당량의 RNA가 1시간까지 유지됨을 보이고 있다(12). 이 논문에서는 1시간 이후의 연구 결과가 없었으나 안정적인 RNA의 일부가 분해되지 않고 축적되어 붉은색 포자의 비율이 증가되는 것처럼 보이는 것이 아닌가 생각된다.

이러한 두 군의 포자 크기를 측정해 본 결과 활성상태인 붉은색을 띠는 포자는 일반적으로 포자 크기가 커지는 반면 불활성 포자인 녹색을 띠는 포자는 작아짐을 볼 수 있었다(Fig. 5). 다만 붉은색 포자의 크기 중 2시간 째에서 0시간째에서 보다 약간 감소하는 경향을 보였다. 이러한 현상은 반복된 실험에서도 일관되게 보여졌다. 이는 영양이 결핍된 환경에 적응하기 위한 형태적인 적응으로 세균이 축소화하는 경향이 있다는 보고(19)와 관련이 있는 것으로 추정된다. 즉, 미생물이 새로운 환경에 적응하기 위해서 세포가 작아지는 현상으로 볼 수 있으며 이는 생존을 위한 전략이라고 볼 수 있다. 또한 여기서 불활성 포자는 일시적 휴면상태인 포자(dormant spore)와 죽은 포자(dead spore)를 모두 포함한다. 그러므로 이러한 녹색을 띠는 불활성 포자의 감소현상은 불활성 포자의 감소현상 중에서 죽은 포자는 녹색으로 유지되고 휴면포자는 활성화되어 녹색에서 붉은색으로 전환된다. 이 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 녹색포자의 수가 감소되고 붉은색 포자가 시간이 지남에 따라 증가하는 현상으로 설명될 수 있다. 그러므로 포자 중에는 활성포자, 휴면포자, 죽은 포자로 구성되어 있다고 볼 수 있다.

관련 평판계수법과 직접 현미경 계수법을 비교해 본 결과 일반적으로 집락수 계수법에 비해 직접 현미경 계수법은 약

2배 이상의 차이를 보였다(Table 1). 이러한 결과는 직접 현미경에 의한 계수가 집락수의 계수보다 100배 이상 높다는 보고(4, 15)에 비해 대단히 적은 차이에 불과하다. 그러나 이러한 보고는 그 대상이 하수나 해수, 담수와 같은 자연계 시료이기 때문에 실험실적인 조건에서 배양된 시료와는 차이가 있을 것이다. 실제로 액체배지에서 키운 세균을 AODC와 다양한 고체 배지에 접종하여 계수한 결과 배양일자와 세균에 따라 차이가 있었지만 크기는 약 10<sup>3</sup>배에서 적게는 10배 이하 수가 차이가 난다고 한다(8, 16). 이러한 차이가 발생하는 것은 현미경에 의한 직접계수법에는 죽은 세포와 살아있는 있으나 배양되지 않는 세포(VBNC, viable but non-culturable cell)가 포함되어 있기 때문이다. 그렇기 때문에 고체 배지에서 집락을 형성하는 세균은 단지 전체 세균의 일부에 지나지 않는다. 이러한 표준평판계수법의 단점은 많은 시간이 필요하며 여과나 희석에 의해 물리적으로 세균이 제거될 수도 있고 입자나 고체 표면에 세포가 부착될 수 있어 고르게 분포되지 않아 정확도가 떨어질 수도 있다(16). 이러한 이유로 시료에서 직접 세균의 생리활성 상태를 연구하려는 움직임이 초기의 관심사가 되어왔다. AO에 의한 생리활성 상태의 조사 또한 이러한 맥락에서 중요한 의미를 가진다고 볼 수 있다.

또한 INT를 이용하여 세균의 생리상태를 파악하고자 하였다. 그 결과 INT-formazan을 형성시킨 후 ethanol을 이용하여 추출하여 INT 환원율을 얻을 수 있었다(Fig. 6). 이 graph 또한 Fig. 2와 4를 비교해 보면 동일한 증감주기를 가짐을 볼 수 있다. 다만 Fig. 6의 경우 0시간째에서 2시간째로 INT 환원율이 급격히 증가하였으나, 이는 0시간째의 경우 무기염 액체배지에 포자를 접종한 직후이기 때문에 활성화가 될 때에서 나온 결과로 판단된다. 이렇게 INT 환원율이 변화하는 것은 탄소수호소의 양이 변화함을 알 수 있어 난편적으로 나타내 세포내 단백질의 합성정도를 유추할 수 있었다.

요약하면 *S. coelicolor* A3(2)는 성장인자가 없는 영양조건에서 생장할 때 포자의 발아시간은 10시간 정도였으며, 포자의 크기가 증가하였다. 발아과정 중 성장인자의 요구가 주기적으로 일어났고, 이 주기적 성질은 RNA와 단백질 합성의 주기와 일치하였다. 이로써 포자들은 배지내 성장인자 중 아미노산을 요구했으며 그 요구시간이 주기적으로 진동함이 확인되었다. 이 연구는 포자에 손상을 주지 않는 상태에서 아미노산의 종류와 양을 조절 공급함으로써 단백질 합성을 유도할 수 있는 가능성이 있음을 시사하고 있다.

## 감사의 말

본 연구는 과학재단 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학연구센터)의 연구비와 인하대학교 기초과학연구소의 1993년도 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 백지호. 1995. 환천과 폴리아크릴아마이드 젤 배지상에서 *Streptomyces* spp. 배양특성의 비교. 석사학위 논문. 인하대

- 학교.
- 양 문, 한홍의. 1993. *Streptomyces coelicolor* A3(2)의 유도기에서 성장 인자 요구성의 고대 현상. 한국미생물학회지. **31**, 512-519.
  - 양 문. 1995. *Streptomyces coelicolor*의 발아과정 중 아미노산 요구시기의 Damped Oscillation 양상. 박사학위논문. 인하대학교.
  - Atlas, R.M. and R. Bartha. 1993. Microbial ecology: fundamentals and applications. Benjamin/Cummings Publishing Company, INC., p. 165-211.
  - Bae, H.C., E.H. Costa-Robles and L.E. Casida. 1972. Microflora of soil as viewed by transmission electron microscopy. *Appl. Microbiol.* **23**, 637-648.
  - Bitton, Gabriel and Ben Koopman. 1982. Tetrazolium reduction-malachite green method for assessing the viability of filamentous bacteria in active sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 964-966.
  - Buttner, M., A.M. Smith and M.J. Bibb. 1988. At least three different RNA polymerase holoenzyme direct transcription of the agarase gene(dagA) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Cell.* **52**, 599-607.
  - Byrd, J.J., H. Xu and R.R. Colwell. 1991. Viable but nonculturable bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 875-878.
  - Demain, A.L. and N.A. Solomon. 1985. Biology of industrial microorganisms. Benjamin/Cummings Publishing Company, INC.
  - Devol, A.M. and T.T. Packard. 1978. Seasonal changes in respiratory enzyme activity and productivity in Lake Washington microplankton. *Limnol. Oceanogr.* **23**, 104-111.
  - Dutton, R.J., G. Bitton and B. Koopman. 1983. Malachite green-INT(MINT) method for determining active bacteria in sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 1263-1267.
  - Guijarro, J.A., J.E. Suarez, J.A. Salas and C. Hardison. 1982. Characterization of RNA species synthesized during germination and vegetative growth of *Streptomyces antibioticus* *FEMS Microbiol. Lett.* **14**, 205-209.
  - Guijarro, J.A., J.E. Suarez, J.A. Salas and C. Hardison. 1983. Pattern of protein degradation during germination of *Streptomyces antibioticus*. *J. Microbiol.* **29**, 637-643.
  - Haddock, B.A. and C.W. Jones. 1977. Bacterial respiration. *Bacteriol. Rev.* **41**, 47-99.
  - Hobbie, J.E., R.J. Daley and S. Jasper. 1977. Use of nucleopore filter for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 1225-1228.
  - Kepner, R.L. and J.R. Pratt. 1994. Use of fluochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: Past and present. *Microbiological Reviews.* **58**, 603-615.
  - King, L.K. and B.C. Parker. 1988. A simple, rapid method for enumerating total viable and metabolically active bacteria in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1630-1631.
  - Locci, R. 1989. *Streptomyces* and related genera. In Bergey's manual of systematics bacteriology. Williams, S.T. et al., Vol. 4, p. 2451-2464. Williams & Wilkins. Baltimore.
  - Morita, R.Y. 1982. Starvation-survival of heterotrophs in the marine environment. p. 171-198. In K. C. Marshall (ed). *Advances in microbial ecology*. Vol. 6. Plenum Press, New York and London.

20. Okami, Y., S. Arima and M. Suzuki. 1963. Influence of agar on the morphology and pigmentation of *Streptomyces*. *Appl. Microbiol.* **11**, 493-497.
21. Rodriguez, G.G., D. Phipps, K. Ishiguro and H.F. Ridgway. 1992. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1801-1808.
22. Tabor, P.S. and R.A. Neihof. 1982. Improved method for determination of respiring individual microorganisms in natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 1249-1255.

(Received November 5, 1996/Accepted January 3, 1997)

---

**ABSTRACT: Periodical Changes of RNA and Protein Syntheses During the Germination of *Streptomyces coelicolor***

**Ji-Hoon Lee and Hong-Ui Han\***(Department of Biology, College of Science, Inha University, Incheon 402-751, and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

This study was to elucidate the relation between the periodical requirement of growth factors(Yang *et al.*, 1993) and the synthesis of RNA and protein during the germination of *Streptomyces coelicolor* A3(2) in mineral liquid medium(ISP-4) without addition of growth factors. As results, The germination time was about 10 hr, and meanwhile, periodical nutritional requirement was verified to be repeated with interval of 2 hr. Spore size was enlarged with time but its number was rather decreased. Spore could be divided into viable, dormant, and dead state. In such a germination process it was found that RNA and protein were being synthesized periodically when spores were stained with AO and INT methods and observed under the fluorescence microscope. Those syntheses were coincided with the period of nutritional requirement. Hence, it was discussed that spore population in early germination would need amino acids related to protein synthesis.