

전기충격과 화학적 돌연변이원 *N*-Methyl-*N'*-Nitro-*N*-Nitrosoguanidine의 병행처리에 의한 방선균과 효모의 돌연변이 유발

선종호^{2,3} · 김정희¹ · 박은미^{2,3} · 김 근^{1*}

¹수원대학교 유전공학연구소, ²수원대학교 생명과학부, ³서울대학교 분자미생물학 연구센터

방선균(*Streptomyces*) 포자와 효모(*Saccharomyces*) 반수체 및 배수체 세포를 대상으로 전기충격(AC 38V/1.3 cm)이 화학적 돌연변이원인 *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG)의 세포치사효과와 돌연변이 유발에 미치는 영향을 조사하였다. 방선균의 경우 전기충격 단독 처리로는 180분 처리하였을 때 생존율이 100%이었으나 960분 처리한 경우에는 모두 사멸하였다. 전기충격과 NTG처리를 병행한 바 방선균의 경우 180분 처리시, NTG 단독 처리시 보다 생존율이 72%에서 48%로 감소되었고, 반수체 효모의 경우 40분 처리시 8%에서 3%로, 배수체 효모의 경우 25%에서 10%로 각각 감소되었다. 전기충격과 NTG에 의한 영양요구 돌연변이 형성율에 있어서는 전기충격이 NTG에 의한 돌연변이율을 120분 처리 후 1.8%에서 13.6%로, 반수체효모의 경우 40분처리 후 2.4%에서 4.8%로 각각 증가시켰다.

KEY WORDS □ Electric shock, NTG, mutation, *Streptomyces*, *Saccharomyces*

전기충격(electric shock)이 효모(6, 8)와 세균(4, 6)의 체세포의 생존능과 세포막의 permeability에 미치는 영향에 대하여 몇몇 연구 보고가 있었는데, 조사 결과 전기충격은 permeability에 가역적 상실을 일으킨다고 분석되었다(4, 5). 이 현상은 미생물 세포에 전기충격을 줌으로써 유전물질에 미생물 세포내로 도입하는 데에 사용되기도 하였다(1, 7). 한편 전기충격이 효모 포자와 *Bacillus* 포자에 미치는 영향에 대한 연구결과에서는 효모포자는 효모 체세포와 마찬가지로 강한 전기충격에 의해 급격히 사멸하였으나 *Bacillus*에 있어서는 체세포가 급격히 사멸한 반면 포자의 경우는 전기충격에 매우 강한 생존능을 나타내었다(8).

DNA 이상에 의하여 형성된 돌연변이주들은 자신이 가지고 있는 능력을 더 많이 발휘할 수가 있는데, 이런 현상에 착안하여 인위적으로 돌연변이 빈도를 높여 산업적으로 유용한 균주의 개량에 사용하여 왔다. 인위적 돌연변이를 유발할 수 있는 방법은 자외선·X-ray 등을 사용한 물리적 방법과 base analog·alkylating agent 등을 사용하는 화학적 방법이 있다.

본 연구에서는 산업적으로 유용한 미생물인 방선균 *Streptomyces*와 효모 *Saccharomyces*를 대상으로 기존에 실행하고 있는 물리적, 화학적 돌연변이 방법과는 다른 방법으로 물리적 방법인 전기충격과 화학적 돌연변이 방법을 병행할 때 돌연변이 발생 빈도를 높일 수 있는 가능성을 보고자 하였다.

본 실험에 사용한 균주는 방선균의 경우 여러 항생제를 생산하는 *Streptomyces coelicolor* J1501을 사용하였는데 이 경우에는 hyphae와 포자의 혼합 용액을, 솜으로 적당량 채운 1.000 µl 용량의 플라스틱 blue tip에 통과시켜 포자만을

얻어 사용했고, 효모는 반수체로서 *Saccharomyces diastaticus* (ATCC 28339)와 포자형성능이 있어서 배수체로 확인된 *S. kluyveri* YJ2를 사용하였다. 균의 배양을 위해서는 방선균은 완전배지로서 R2YE배지(2)와 최소배지(L-asparagine 0.05%, K₂SO₄ 0.05%, MgSO₄ · 7H₂O 0.02%, trace element solution 2.0%, amino acid stock solution 0.25%, glucose 1%)(2)를 사용하여 배양하였다. 효모는 완전배지로서는 1%(w/v) yeast extract(Y), 2%(w/v) peptone(P), 2%(w/v) dextrose(D)로 구성된 YPD배지를 사용하였고, 최소배지로서는 SD배지(0.67% Difco yeast nitrogen base without amino acids, 2% dextrose)를 사용하였다. 고체배지는 2% agar를 포함하였다. 모든 균주의 배양은 30°C에서 행하였으며, 액체 배양시에는 진탕배양기에서 200 rpm의 속도로 배양하였다.

전기충격을 위해서는 DC-to-AC 변환장치 [Inverter 2SD 227(CS9013)]와 승압기(step-up transformer)를 이용하여 DC 9 V를 AC 38 V로 변환하였고(Fig. 1), 돌연변이를 시키고자 하는 포자나 세포 현탁액을 담은 sample tube로서 1.5 ml Eppendorf tube를 이용하였는데 이 Eppendorf tube의 외부로부터 내부로 2개의 핀으로(핀 사이의간격, 1.3 cm) tube벽을 관통시켜 전극으로써 사용하였다. 돌연변이원의 처리실험을 위해서는 Eppendorf tube에 20% glycerol과 0.01 M MgCl₂ · 6H₂O가 함유된 포자 혹은 세포현탁액을 넣고 필요시에 전기충격을 주면서 chemical mutagen인 *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine(방선균의 경우 1 mg/ml, 효모의 경우 0.06 mg/ml)을 동시에 처리하였다. 적당한 시간(min) 간격으로 30°C를 유지한 sample tube로부터 포자 혹은 세포현탁액(1 × 10⁸/ml)을 취하여 각 균주에 해당하는 완전고체배지에 도말하고 배양하여 나타난 colony를 계수하여 생존율을 계산하였으며, 2회 반복 실험한 후 평균하여 결과를 나타내었다. 돌연

*To whom correspondence should be addressed

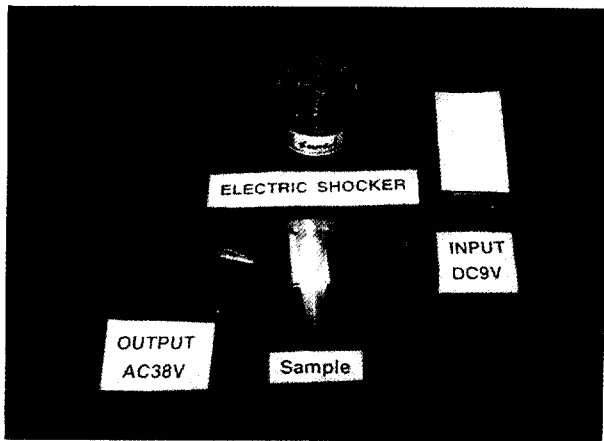


Fig. 1. The photograph of the device used for electric shock.

변이원 처리 후 생존한 colony들을 일정 비율로 희석하여 완전 고체배지에 도말하고 배양한 후 나타난 colony들을 다시 최소배지에 replica plating하여 자라지 못한 colony 수를 측정하여 영양요구 돌연변이주(auxotrophic mutant) 형성율(%)=(최소배지에서 성장하지 않은 colony 수÷완전배지에서 성장한 colony 전체수×100)을 계산하였고, 2회 반복 실험 후 평균치를 결과로 나타내었다.

전기충격과 NTG의 세포생존율에 대한 영향을 조사한 결과 방선균 포자의 경우 전기충격만을 단독 처리한 경우는 180분 동안에는 생존율이 100%를 유지하였으나, 960분 후에는 0%로 모든 포자가 사멸하였다(Fig. 2). 반면에 전혀 아무 처리를 하지 않은 대조군의 경우는 960분(16시간) 후에 생존율이 100%로 생존능에 지장이 없었는데 반하여 전기충격 단독처리를 한 포자들은 모두 사멸하였으며, NTG만을 처리한 포자들도 마찬가지로 모두 사멸하였다. 전기충격과 NTG를 동시에 처리한 경우는 90분 동안 급격한 치사효과를 보여 50%의 생존율을 나타내었다. 한편, 180분 후에는 NTG 단독처리는 생존율이 72%, NTG와 전기충격 동시처리는 생

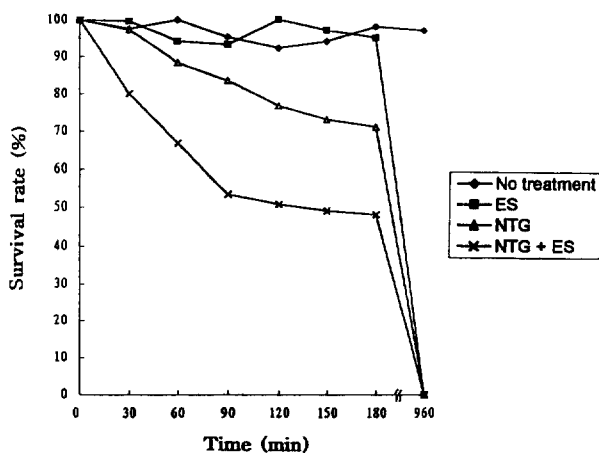


Fig. 2. The survival rate of *Streptomyces coelicolor* after different treatment time. Spore suspension (1×10^8 spores/ml) was treated with electric shock (ES), NTG, or NTG plus ES and then each survival rate was examined.

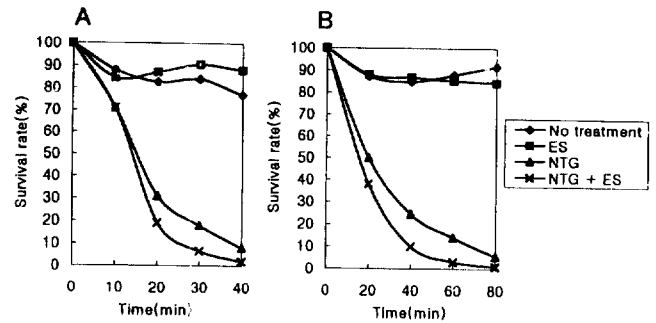


Fig. 3. The survival rates of haploid yeast (A) and polyloid yeast (B) after different treatment time. Cell suspension (1×10^8 cells/ml) was treated with electric shock (ES), NTG, or NTG plus ES and then each survival rate was examined.

존율이 48%로서 전기충격이 NTG의 세포치사효과를 증진시켰다.

전기충격과 NTG에 의한 효모의 생존율 조사결과는 반수체의 경우 Fig. 3(A) 그리고 배수체의 경우 Fig. 3(B)에 각각 나타내었다. 여기에서 나타난 바와 같이 전기충격 단독처리는 본 실험에 실시한 처리 시간 동안은 효모세포를 사멸시키지 않은 것으로 보인다. NTG를 전기충격과 동시에 처리했을 때는 생존율이 뚜렷히 감소하였는데 반수체 효모의 경우 40분 처리시 8%에서 3%로 배수체효모의 경우 25%에서 10%로 각각 감소하였다. 이와같이 NTG와 전기충격을 동시 처리한 세포들이 NTG단독 처리한 세포들보다 더 급속히 사멸한 것으로 미루어 보아 전기충격이 NTG의 사멸효과를 증진시킨 것으로 해석된다. 한편 NTG 단독 혹은 NTG와 전기충격 동시처리는 반수체의 경우가 배수체의 경우보다 더 많은 세포사멸, 즉 더 적은 생존율을 보였는데, 비슷한 사멸효과를 나타내기 위해서는 배수체의 경우가 약 2배 정도의 더 많은 돌연변이원 처리 시간이 필요하였다. 본 실험 결과에서 전기충격과 NTG의 동시처리에 의한 방선균의 포자와 효모의 반수체 및 배수체의 생존율 감소를 비교해 보면 몇가지 사실을 지적할 수 있는데 5% 이하의 생존율을 나타내기 위해서는 반수체 효모의 경우 40분(Fig. 3A), 배수체의 경우 80분(Fig. 3B)이 걸리는데 비하여, 방선균 포자의 경우 50% 이하의 생존율을 나타내기 위해서는 180분이 걸리는 것(Fig. 2)으로 볼 때 역시 방선균의 포자가 효모 세포에 비하여 외부 stress에 월등히 강함을 알 수 있다. 한편 효모 배수체가 비슷한 생존율을 나타내기 위하여 효모 반수체보다 약 2배의 시간이 걸리는 것으로 보아 여기에서 사용된 배수체는 genome 수가 반수체의 2배인 이배체인 것으로 사료된다. 한편 다른 연구 보고에서 사용된 전기의 실험조건과 본 연구의 실험 조건이 달라서 정확한 비교는 할 수 없지만, 다른 연구보고에서는 직류(DC) 전기에 의한 전기충격 단독[10-30 mA/cm², 1-3 min(3); 5,000-21,000 V/cm, 4-20 μ s pulse(6); 5,400 V/cm, 90 μ s pulse(8)]로서 만으로도 세포가 사멸됨을 관찰하였으나, 본 실험에서 나타난 바와 같이 방선균의 경우 180분, 효모의 경우 40-80분 동안의 전기충격 단독처리에서도 세포가 사멸하지 않았고, 방선균의 경우 960분 후에야 비로소 100% 사멸한 것으로 보아 본 실험에

Table 1. The mutation rate of *Streptomyces coelicolor* treated by NTG or NTG plus electric shock after different treatment time^a

Mutagen	Mutation rate(%) after			
	30 min	60	120	180
NTG	2.1	8.6	1.8	2.0
NTG+ES ^b	4.1	3.6	13.6	4.7

^aSpore suspension (1×10^8 spores/ml) was treated with NTG or NTG plus electric shock for different time and then each auxotrophic mutation rate was determined. ^bES, electric shock.

Table 2. The mutation rate of haploid yeast treated by NTG or NTG plus electric shock after different treatment time^a

Mutagen	Mutation rate(%) after	
	20 min	40
NTG	0.7	2.4
NTG+ES ^b	2.2	4.8

^aHaploid yeast cell suspension (1×10^8 cells/ml) was treated with NTG or NTG plus electric shock for different time and then each auxotrophic mutation rate was determined. ^bES, electric shock.

사용한 교류(AC) 전기충격의 강도(38 V/1.3 cm)는 상대적으로 약하였다고 사료된다.

한편 방선균 포자와 효모세포에서의 돌연변이율은 전기충격과 NTG 동시 처리에 의해 전반적으로 증가하였다. 영양요구돌연변이율을 조사한 결과에서는, 방선균의 경우 NTG를 단독 사용한 돌연변이 방법은 60분에서 8.6%로 최대의 돌연변이형성율을 보였으며, 전기충격과 NTG를 병행한 돌연변이 방법에서는 120분에서 13.6%로서 최대의 돌연변이율을 나타내었다(Table 1). 단수체 효모의 경우 돌연변이율을 Table 2에 나타내었는데, 20분 처리 때보다 40분 처리 후에 영양요구 돌연변이주의 수가 증가하였고 NTG와 전기충격 동시처리의 경우가 NTG 단독처리 경우보다 2배 이상의 영양요구 돌연변이주를 생성시켰다. 방선균 포자의 경우 흥미로운 사실은 Table 1의 결과로는 NTG 처리시간 60분 후에 최대 돌연변이율을 나타내었고, 전기충격 동시처리시에는 120분에 최대 돌연변이율을 나타냈는데 왜 특정시간에 최대돌연변이율이 나타나는지는 현재로서는 뚜렷히 설명할 수가 없다.

본 실험 결과에서 전체적으로 나타난 바와 같이 전기충격은 화학적 돌연변이원인 NTG에 의한 방선균의 포자와 효모세포에 대한 치사율과 영양요구돌연변이주 생성율을 증가시켰다. 전기충격은 세포막의 투과성의 가역적 상실을 일으키고(4, 5), 세포막의 투과성의 가역적 혹은 불가역적 상실은 전기장의 세기에 달려있다고 알려져 있다(9). Yonemoto (8)등은 강한 전기충격 후 효모의 포자 표면에 작은 구멍이 많이 형성된 것을 관찰하였고, 또한 효모세포 및 효모포자가 전기충격에 의하여 phloxine B에 의한 세포염색이 더 잘

되는 것을 관찰하였다. 전기충격이 유전물질의 구조를 변형시켜 돌연변이를 일으켰다는 보고는 아직 없는 현재의 상황에서 전기충격의 세포막의 투과성에 대한 이상의 연구 보고들로 미루어보아 본 실험에서 나타난 전기충격의 NTG에 대한 치사율 및 돌연변이율 증진 효과는 현재로서는 전기충격이 세포 envelope의 구조를 변형시켜 NTG의 세포내 유입을 용이케 한 것으로 해석해 볼 수 있다.

본 연구는 대한민국 통산산업부의 대체에너지 개발사업 및 서울대학교 분자미생물학연구센터를 통한 한국과학재단 우수연구센터의 연구지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Delorme, E. 1989. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2242-2246.
2. Hobwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Kieser, C.J. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward, and H. Schrepf. 1985. Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual. John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
3. Inoue, Y. and A. Kimura. 1993. Effects of electric shock on *Escherichia coli* K-12: Purification of a 23-kDa protein from electric shock-induced fluid of *E. coli*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 867-869.
4. Jacob, H.-E., W. Forster, and H. Berg. 1981. Microbiological implications of electric field effects. II. Inactivation of yeast cells and repair of their cell envelope. *Z. Allg. Mikrobiol.* **21**, 225-233.
5. Kinoshita, K. Jr. and T.Y. Tsong. 1977. Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane. *Nature (London)* **268**, 438-441.
6. Sale, A.J.H. and W.A. Hamilton. 1967. Effects of high electric fields on microorganisms. I. Killing of bacteria and yeasts. *Biochim. Biophys. Acta* **148**, 781-788.
7. Shivarova, N., W. Forster, H.-E. Jacob, and R. Grigorova. 1983. Microbiological implications of electric fields effects. VII. Stimulation of plasmid transformation of *Bacillus cereus* protoplasts by electric field pulses. *Z. Allg. Mikrobiol.* **23**, 595-599.
8. Yonemoto, Y.T., Yamashita, M., Muraji, W., Tatebe, H., Ooshima, J., Kato, A., Kimura, and K. Murata. 1993. Resistance of yeast and bacterial spores to high voltage electric pulses. *J. Ferment. Bioeng.* **75**, 99-102.
9. Zimmermann, U. 1986. Electrical breakdown, electroporation, and electrofusion. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **105**, 175-256.

(Received May 22, 1997/Accepted September 12, 1997)

ABSTRACT: Induction of Mutation of *Streptomyces* and Yeast by Simultaneous Treatment of Electric Shock and Chemical Mutagen *N*-Methyl-*N'*-Nitro-*N*-Nitrosoguanidine

Sun Jong Ho^{2,3}, Jung Hee Kim¹, Keun Kim^{1*} and Uhn Mee Park^{2,3} (¹Center for Genetic Engineering Research, ²Division of Life Science, The University of Suwon, 445-743, Korea, ³Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, 151-742, Korea)

The effect of electric shock (AC 38 V/1.3 cm) on the lethal effect and induction rate of mutation of chemical mutagen *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG) was examined by using the spores of *Streptomyces* and the cells of haploid and polyploid yeast strains of *Saccharomyces*. Spores of *Streptomyces* were all alive after 180 min of electric shock, but all dead after 960 min-treatment. When the spores of *Streptomyces* or the cells of haploid and polyploid yeast were treated with electric shock and NTG, the electric shock increased the lethal effect of NTG; the survival rate of *Streptomyces* dropped from 72 to 48% after 180 min-treatment and those of haploid- and polyploid-yeast decreased from 8 to 3% and 25 to 10%, respectively, after 40 min-treatment. The electric shock also increased mutation rates of *Streptomyces* and haploid yeast, from 1.8 to 13.6% after 120 min-treatment and from 2.4 to 4.8% after 40 min-treatment, respectively.