

먹물버섯의 자가분해 과정에 대한 미세구조 연구

최형태¹ · 조정원^{*}

인제대학교 생명공학과, ¹강원대학교 생화학과

먹물버섯의 하나인 *Coprinellus congregatus*에서는 자실체가 성숙된 후 곧 자가분해되어 먹물로 전환된다. 이 자가분해 과정과 관련된 가수분해 효소의 역할을 이해하기 위한 첫 단계로서, 자가분해과정과 연관된 미세구조의 변화를 전자현미경으로 조사하였다. 자실체의 성숙과정에서 자실층과 자실하층에 존재하는 모든 세포질은 새로운 포자의 형성을 위하여 포자로 이동되는 것으로 보인다. 조직 내의 세포질의 고갈과 포자의 완성은 조직 내의 세포벽의 분해를 야기하는 것으로 보이며, 자실층과 자실하층의 세포벽은 동시에 분해 되는 것으로 생각된다. 본 연구는 먹물버섯의 자가분해가 세포질의 분해가 아닌 세포벽의 분해과정에 의한 것임을 보여 주었으며, chitin 분해효소와 같은 가수분해 효소의 중요성을 제시하였다.

Keywords □ autolysis, *Coprinellus congregatus*, electron microscopy

먹물버섯은 실험실에서 단기간에 자실체의 생성을 유도할 수 있는 몇 가지 버섯 중의 하나이다(8). 먹물버섯은 다양한 환경에서 균사체로 자라다가, 특정시기에 자실체를 만들게 되고, 자실체가 성숙되면서 자실체의 갓이 가장자리부터 자가분해 (autolysis)되어 먹물(black ink)처럼 떨어진다(6). 이 버섯의 자가분해 과정은 비교적 빠르게 진행되며, 분해산물인 먹물에서는 어떠한 세포의 모양도 관찰되지 않는다.

먹물버섯의 자가분해 과정에 대한 이해는 산업적으로 큰 의미를 가질 수 있다. 먹물버섯과 같은 고등균류의 세포벽에는 chitin이 포함되어 있으며, 따라서 자가분해는 chitin 분해효소(chitinase)의 생성과 밀접한 관계를 가지고 있을 것으로 판단된다. 선택성이 높은 항진균제의 개발을 위한 연구 중에서, 진균류에만 존재하는 세포벽을 target으로 한 항진균제의 개발을 위한 기초연구로서, 세포벽 구성성분의 하나인 키틴의 생합성효소(chitin synthase)에 대한 연구(1, 5)가 매우 활발하다. 그러나 키틴 생합성의 저해는 왕성하게 성장하는 균류에게는 효과가 있으나, 많은 기회주의적 병원성 균류(opportunistic pathogen)처럼 느리게 성장하는 균류에게는 효과가 떨어진다. 항진균제의 개발을 위한 새로운 방향으로서, 균류의 세포벽 생합성을 억제하는 대신에, chitin 분해효소를 이용하여 이미 존재하는 세포벽을 제거하는 방법을 생각할 수 있다. 여러 세균에서 chitin 분해효소에 대한 연구보고가 있으며(10), 식물병원성 균류들이 chitin 분해효소와 항진균제를 분비하는 세균에 의하여 효과적으로 제어됨이 보고 되었다(4). 병원성 균류의 가장 큰 특징 중의 하나로서, 주위 환경의 변화에 따라 효모형과 균사형으로 전환되는 이형태성(dimorphism: 9)이 있다. chitin 분해효소에 의한 세포벽의 제거는

이형태성의 억제에도 효과를 나타낼 것이다. 키틴질은 균류의 세포벽에만 존재하는 것이 아니고, 많은 곤충이나 게 등의 갑각류의 외골격을 구성하는 주성분이다. 근래 외국은 물론 우리의 식생활에서도 키틴질이 많은 식품 재료를 사용하는 빈도가 크게 증가하고 있다. 주변 환경으로 방출되는 이들의 외골격은 비록 독성이나 해는 없으나 환경에서 쉽게 분해 되지 않고 장기간 존재하므로, chitin 분해효소에 의해 이를 처리하는 것도 중요한 현안이다.

본 연구에서는 먹물버섯의 자가분해과정과 세포벽의 분해에 대한 일차적인 접근으로서, 자가분해 과정에서 나타나는 담자기, 자실층, 자실하층의 미세구조 변화를 투과 전자현미경을 사용하여 분석하였다.

재료 및 방법

균주의 배양

본 실험에 사용된 먹물버섯인 *Coprinellus congregatus*는 일핵체균(monokaryon) cc16 (mating type a1)과 cc44 (a4)을 YpSs 한천배지(Difco)에서 교배하여 얻어진 이핵체균(dikaryon)이다. 버섯시료를 동일시간 대에 대량 확보하기 위하여 버섯의 분화를 다음과 같이 유도하였다.

이핵체균을 YpSs 한천배지에 접종한 후, 배양접시를 처음 4일간 24°C의 암소(dark place)에서 배양하고 5일부터는 15시간의 light period와 9시간의 dark period를 교대로 바꾸어 주면서 배양하였다. light period 중에는 20 watt 형광등 1개를 30 cm의 거리에서 비추어 주었다. 이러한 배양 및 버섯분화 유도조건에서 자실체의 생성은 8일 후, 성숙 및 자가분해는 9일 후에 관찰되었다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-55-320-3264 Fax: 82-55-336-7706
E-mail: mbcwcho@inje.ac.kr

전자현미경에 의한 미세구조 변화

관찰 시점에서 버섯의 갓을 잘라 4% glutaraldehyde 용액 (50 mM cacodylate buffer + 50 mM CaCl₂)에서 2시간 고정하고 buffer로 씻어준 후, 1% osmium tetroxide로 2시간 고정하였다. 시료는 ethanol로 탈수 후 Spurr's resin으로 고정하였다. Ultramicrotome를 사용하여 얻은 두께 200 nm의 section들은 투과 전자현미경 (Hitachi H-7100, Japan)으로 100 KV에서 관찰되었다. 전자현미경 필름들은 스캐너 (Epson perfection 32000 photo)에 의해 positive image file로 전환되었다.

결과 및 고찰

YpSs한천배지에 이핵체균을 접종하고 8일째 dark period에서 갓과 줄기를 갖춘 자실체가 생성되는데, 작은 자실체(길이 2-5 mm)의 갓은 노란색으로 아직 성숙된 자실체에서 보이는 흰색을 띠지 않은 상태이며(Fig. 1a), 다음의 light period에서 자실체의

갓은 조금 더 커지면서 흰색을 나타냈다(Fig. 1b). 배양 9일째의 dark period에서, 자실체의 대는 길어지고 갓의 색깔이 검은색으로 전환되었다(Fig. 1c-f). 동일 시간대에 생성된 버섯의 자가분해는 dark period의 시작에서부터 11시간 이내에 완료되었다(Fig. 1g). 노란색 갓을 가진 작은 자실체(Fig. 1a)를 계속적인 dark period 하에서 배양하거나, 흰색 갓의 자실체 (Fig. 1b)를 계속적인 light period 하에서 배양하였을 때에도, 약간의 시간적인 지연 후에 자실체들의 다소 무질서한 성숙이 관찰되었다 (결과 제시 안함). 따라서 light period와 dark period의 교대가 자실체의 동시적인 성숙에 도움을 주기는 하지만, 필수적인 것은 아니라고 판단된다.

버섯의 자가분해 과정에서 일어나는 세포질 및 세포벽의 변화를 이해하기 위하여, 주름의 단면에서 일어나는 미세구조의 변화를 전자현미경으로 조사하였다. 배양 9일 후 dark period를 시작하기 2시간 전(Fig. 1b)의 자실체에서는 담자기당 한 개의 핵만이 관찰되었으며, 아직 포자의 형성이 관찰되지 않았으나(Fig. 2a), dark period의 시작과 동시에 고정된 버섯에서 이미 포자의

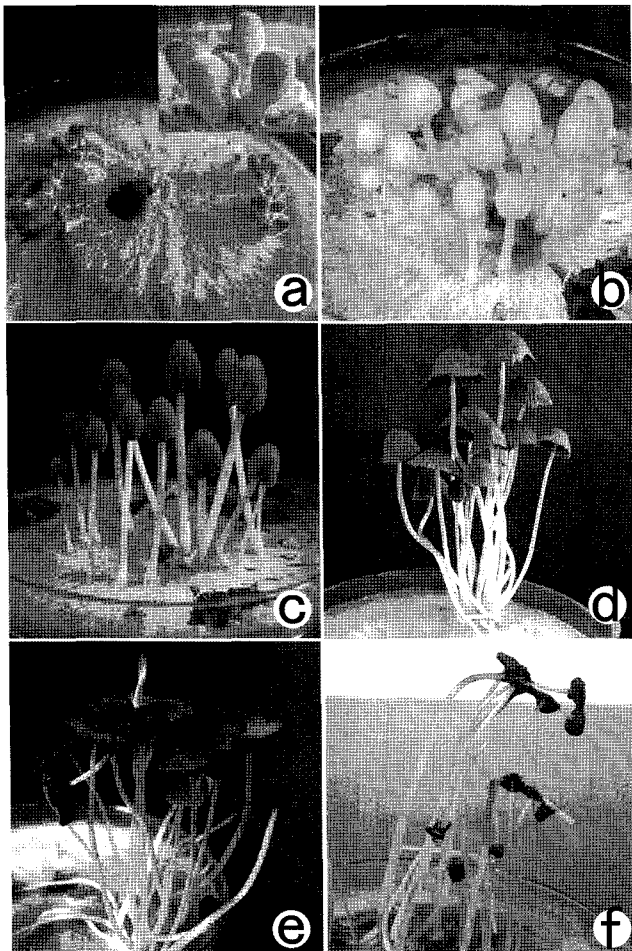


Fig. 1. Development of the mushroom and its autolysis. a, mushrooms developed at 2 hr before shift to dark period. The inset shows a magnified view of the small mushrooms. b-f, mushrooms developed at 0, 3, 8, 10, 11 hr after shift to dark period respectively. The size of the culture dishes is 9 cm in diameter.

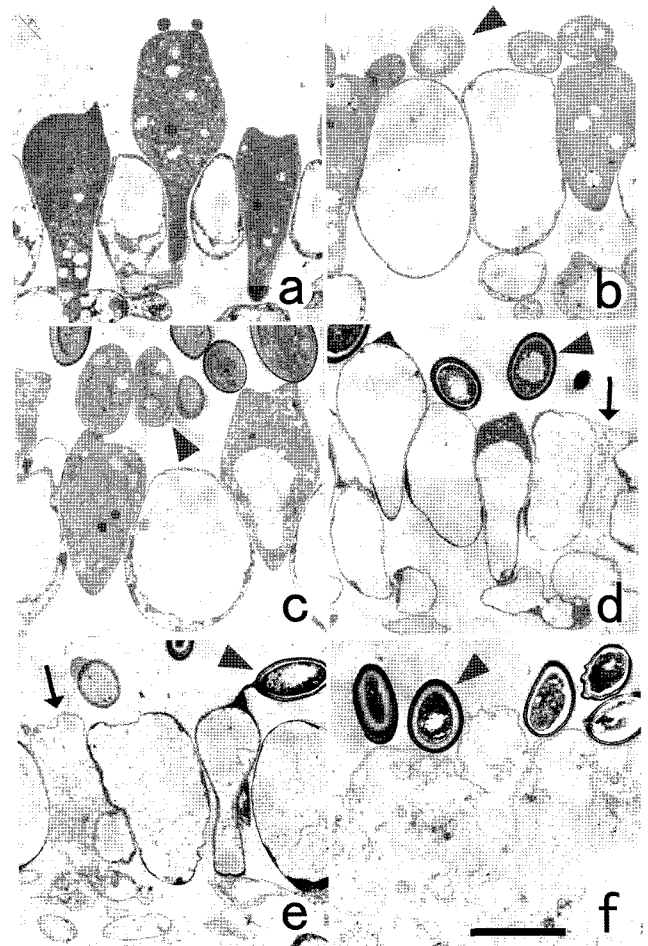


Fig. 2. Cross sections of the hymenium. a, hymenium fixed at 2 hr before shift to dark period. b-f, hymenium fixed at 0, 1, 7, 9, 11 hr after shift to dark period respectively. bar = 10 μm. Arrowheads indicate spores and arrows indicate partially degraded cell walls.

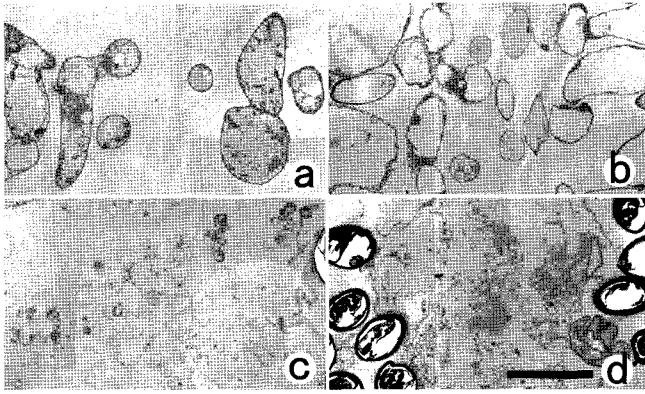


Fig. 3. Cross sections of the subhymenium. a-d, subhymenium fixed at 0, 7, 11, 11 hr after shift to dark period respectively. c and d are pictures taken from different specimens fixed at 11 hr. bar = 10 μ m.

발달이 확인되었다(Fig. 2b). Dark period로 전환하고 1시간 후에 고정된 버섯 시료에서는 보다 많은 포자들이 관찰되었으며, 포자의 세포벽이 검게 염색되기 시작하였다(Fig. 2c). Dark period 전환 7시간 후에 고정된 버섯에서는 담자기 내의 세포질의 대부분이 포자들로 이동된 것으로 확인되었으며, 포자의 두꺼운 세포벽이 검게 염색되었다(Fig. 2d). 또한 이때 이미 일부의 세포에서 세포벽의 분해가 시작되는 것으로 보이며(Fig. 2d, arrow), 이 시기에 담자포자의 성숙이 거의 완성단계에 이르렀음을 시사한다. Dark period 전환 9시간 후에 고정된 버섯에서는 담자기 내에서 세포질이 전혀 관찰되지 않았으며, 일부 담자기의 분해가 관찰되었다(Fig. 2e, arrow). Dark period 전환 11시간 후에 고정된 버섯에서는 모든 담자기의 세포벽이 부분적으로 분해 되어 있음을 알 수 있다(Fig. 2f).

자실하층의 경우에도 담자기의 경우와 유사하게, dark period로 전환한 직후에 존재하던 세포질(Fig. 3a)이 7시간 후에는 거의 사라졌다(Fig. 3b). 11시간이 지나면 세포벽의 분해가 자실하층 전체에서 관찰되었다(Fig. 3c, 3d).

핵이나 mitochondria의 구조에서 큰 변화가 나타나는 동물세포의 apoptosis 과정(7)과는 달리, 먹물버섯의 자가분해과정은 세포질이 담자포자로 이동하고 비어있는 세포의 세포벽 분해에 의한 변화과정이라고 판단된다. 따라서 자가분해과정은 chitin 분해효소를 포함한 세포벽 분해효소의 활성화에 의해 이루어지는 것으로 생각된다. 대부분의 세포질은 세포벽의 분해에 앞서 포자의 형성을 위해 소모되는 것으로 생각된다. 버섯의 분해산물은 흔히 먹물로 불려지지만, 수용성의 검은 색소가 분비되는 것으로 생각되지는 않는다. 분해산물이 검게 보이게 되는 것은, 자가분해와 더불어 포자의 세포벽이 두꺼워지면서 검은 색소도 함께 세포벽에 축적되기 때문인 것으로 보인다.

버섯 생성과정에서 나타나는 변화에 대한 연구보고는, 양송이의 생성 및 담자포자 생성 시 protease의 활성 변화(2), *Coprinus cinereus*의 버섯 성숙과정에서 glycogen의 대사(3) 등 주로 버섯 생성 초기 및 성숙과정에서 나타나는 변화에 대한 연구이다. 이에 반하여 버섯의 자가분해에 대한 체계적인 보고가 없어 이 연구결과는 진균류 세포의 사멸에 대한 기초 자료로써 활용될 것으로 기대한다.

감사의 글

본 연구는 2003년도 학술진흥재단의 지방대 육성지원사업(2003-002-C00201)의 연구비로 수행되었음. TEM의 사용에 도움을 주신 기초과학지원 연구원 대구분소에 감사드립니다.

참고문헌

1. Bahmed, K., R. Bonaly, M. Wathier, B. Pucci, and J. Coulon. 2002. Change of cell wall chitin content in amphotericin B resistant *Kluyveromyces* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 216, 99-103.
2. Burton, K., J. Hammond, and T. Minamide. 1994. Protease activity in *Agaricus bisporus* during periodic fruiting (flushing) and sporophore development. *Curr. Microbiol.* 28, 275-278.
3. Ji, J. and D. Moore. 1993. Glycogen metabolism in relation to fruit body maturation in *Coprinus cinereus*. *Mycol. Res.* 97, 283-289.
4. Kamensky, M., M. Ovadis, I. Chet, and L. Chermi. 2003. Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. *Soil Biol. Biochem.* 35, 323-331.
5. Mellado, E., G. Dubreucq, P. Mol, J. Safati, S. Paris, M. Diaquin, D. Holden, J. Rodriguez-Tudela, and P. Latge. 2003. Cell wall biogenesis in a double chitin synthase mutant (*chsG-1chsE-*) of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* 38, 98-109.
6. Moore-Landecker, E. 1990. Fundamentals of the fungi, 3rd ed., pp. 211-212. Prentice Hall.
7. Regula, K., K. Ens, and L. Kirshenbaum. 2003. Mitochondria-assisted cell suicide: a license to kill. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35, 559-567.
8. Ross, I. K. 1982. Localization of carpophore initiation in *Coprinus congregatus*. *J. Gen. Microbiol.* 128, 2755-2762.
9. Sundstrom, P. 2003. Fungal pathogens and host response. *ASM News* 69, 127-131.
10. Svitil, A., and D. Kirchman. 1998. A chitin-binding domain in a marine bacterial chitinase and other microbial chitinases: implications for the ecology and evolution of 1,4- β -glycanases. *Microbiol.* 144, 1299-1308.

(Received November 8, 2005/Accepted November 29, 2005)

ABSTRACT: Ultrastructural Studies on the Autolysis of *Coprinellus congregatus*

Hyung-Tae Choi¹ and Chung-Won Cho*(Department of Biotechnology, Inje University, Kimhae 621-749, ¹Department of Biochemistry, Kangwon University, Chunchun 200-701, Korea)

Coprinellus congregatus, known as an inky cap, is autolysed into ink soon after the maturation of the mushrooms. Electron microscopy was used to examine the ultrastructural changes associated with the autolysis as an initial step to understand the role of hydrolytic enzymes in this process. During the early stages of maturation of the mushrooms, most of cytoplasm of hymenial and subhymenial tissues seemed to be transported to the developing basidiospores. The depletion of cytoplasm within the tissues and the maturation of the basidiospores may initiate the degradation of the cell walls of the tissues. Both hymenial and subhymenial tissues seemed to degraded at the same time. This study suggested that the critical steps in the autolysis of mushrooms is not the degradation of the cytoplasm, but the degradation of the cell wall by hydrolytic enzymes such as chitinases.