

## *Schizophyllum commune*의 ribosomal RNA의 生合成에 關한 研究

環境衛生科 趙 德 炫  
助 教 授  
齒 衛 生 科 吳 世 源  
助 教 授

### I. 緒 論

生物은 주위환경에 의하여 끊임없이 적응분화하여 오고 있다.

원시핵균의 분화는 일시적 단계로 분화 성장하지만 진정핵균의 분화는 단계적 분화를 통하여 일어난다. 이단계적 분화를 밝히기 위하여 분화의 시기를 같이하는 무리를 얻어야 한다. 이를 위하여 개발된 것이 同調培養이다.

원시핵균의 동조배양법은 많이 개발되었지만 진정핵균중 고등균류의 동조배양은 거의 개발되어 있지 않다.

Heint & Niderperum<sup>9)</sup>이 코چه배지에서 *Coprinus lagopus* 배양에 성공하였고 액체 배지에서는 Schwalb<sup>24)</sup>가 *Schizophyllum commune*을 동조하는 데 성공하였다.

RNA의 生合成에 관한 연구는 Kumer & Wu<sup>13)</sup>가 HeLa 세포에서 행하였고 Long & Dawid<sup>17)</sup>는 *Drosophila melanogaster*에서 rRNA의 생합성과 processing을 연구하였다. Penman et al.<sup>22)</sup>은 mRNA의 生合成과 processing에 대하여 Darnell et al.<sup>4)</sup>은 포유동물 세포에서 mRNA의 生合成과 processing을 연구하였다.

高等菌類의 同調化에 따른 연구는 Bromberg & Schwalb<sup>1)</sup>가 *S. commune*의 膽子胞子를 연구하였다.

이에 本 研究에서는 *S. commune*의 rRNA의 生合成을 <sup>3</sup>H-uridine을 追跡子로 하여 1次菌絲와 2次菌絲의 分化關係를 밝히는 데 그 목적이 있다.

### II. 실험방법 및 재료

#### 1. 실험재료

실험에 사용된 菌株는 *S. commune* Fr.의 야생균주를 채집하여 石川辰夫<sup>23)</sup>와 Schwalb & Miles<sup>26)</sup>의 방법으로 단포자를 분리하였다.

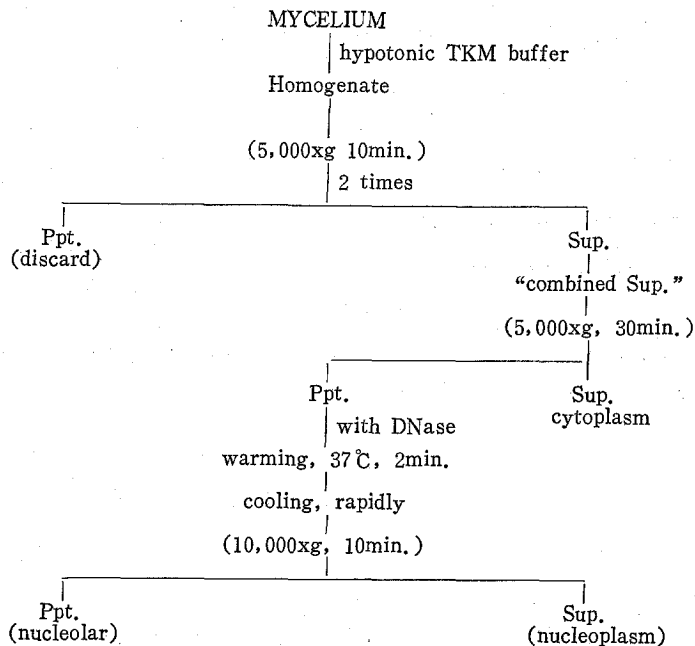
## 2. 실험방법

同調培養은 분리된 단포자를 3~4일간 前培養하여 Schwalb<sup>24)</sup>의 방법대로 배양하였으며 배지중 glucose의 농도를 약간 변형하여 사용하였다(Table 1).

세포의 파괴와 분획은 Greenberg & Penman<sup>5)</sup> 그리고 Lee et al.<sup>15)</sup>의 방법대로 0~4°C에서 분획하였다(fig.1). Polysome의 추출은 시료에 MgCl<sub>2</sub>를 加하여 최종농도가 30mM되게 하여 0°C에서 30분간 방치한 후 2000rpm (Beckman, J-21B)으로 서서히 원심분리하여 침전물을 얻었다. rRNA, mRNA, Hn-RNA는 Lee et al.<sup>15)</sup>의 방법대로 0~4°C에서 추출하였다. total RNA는 Kumer<sup>12)</sup>의 방법대로 세포질내의 총 RNA를 추출하였다. 초원심 밀도기

Table 1. Media were used in culture

constituents	unit	Medium A	medium B	medium C	medium D	medium E	medium F
Glucose	g	1	4	8	12	16	20
L-asparagine	g	2	2	2	2	2	2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	g	1	1	1	1	1	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	g	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	g	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Thiamin-HCl	μg	120	120	120	120	120	120
D. W.	ml	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Fig. 1. Subcellular fractionation from the mycelium of *S. commune*.

울기는 Luthe<sup>18)</sup>와 Lee et al.<sup>15)</sup>의 방법대로 하였다. 追跡자의 실험은 rRNA와 mRNA의 processing을 [5.6-<sup>3</sup>H] uridine으로 균사접합기, vegetative dikaryon, primordia 형성기로 나누어 마지막 5시간씩 incorporation 시켰다. <sup>3</sup>H-uridine(48 $\mu$ ci/m mol)을 1 $\mu$ ci/1ml의 일정량을 배지에 넣어서 추적하였다. 다음 세포를 냉각시킨 후 균사를 끊어 모아서 glass fiber filter(GF/A)에 모아서 3~4회 냉각수로 세척하였다. 방사능의 측정은 Lee & Yoon<sup>16)</sup>의 방법대로 liquid scintillation counter(PAKARD)에서 방사능을 측정하였다. Hn-RNA와 mRNA는 Lee et al.<sup>15)</sup>의 방법으로 liquid scintillation counter(PAKARD)에서 측정하였다.

### III. 실험 결과

#### 1. 2次菌絲의 RNA 함량

*S. commune*의 생활사를 통한 Hn-RNA, mRNA, rRNA 및 total RNA의 함량이 균사접합단계, vegetative dikaryon, primordia 형성단계에서 어떻게 RNA의 함량이 변하는가를 조사한 것은 다음과 같다. fig.2에서 보는 것처럼 Hn-RNA는 primordia 형성기(288시간 배양)에서 가장 높았고 다음은 vegetative dikaryon 형성기의 144시간, 96시간, 192시간 배양순으로 높았다. 그러나 균사접합기와 primordia의 형성기에서는 감소하였다. mRNA는

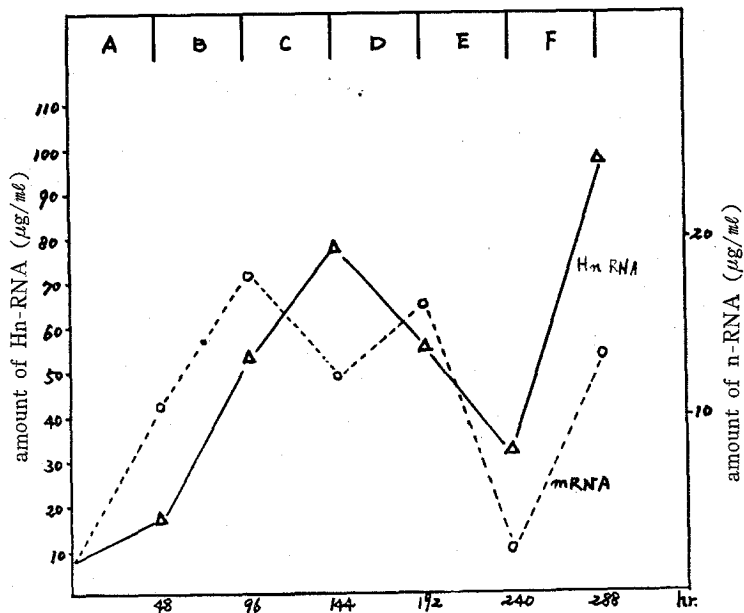


Fig. 2. Changes in the synthesis of Hn-RNA and m-RNA of second hyphae of *S. commune* during their life cycle.

A: hyphae fusion growth stage. B,C,D: vegetative dikaryon growth stage. E,F: primordia formation stage.

vegetative dikaryon의 96시간, 192시간의 배양과 primordia의 288시간 배양에서 높았다. 그러나 primordia의 240시간 배양에서는 오히려 감소하였다. fig.3은 total RNA의 vegetative dikaryon의 144시간 배양에서 제일 높았고 primordia의 288시간 배양이 다음으로 높았다. 또 vegetative dikaryon의 48시간, 192시간, 배양에서는 낮았다. rRNA는 primordia의 288시간 배양, vegetative dikaryon의 144시간 배양, 192시간, 240시간 배양순으로 높았다. total RNA가 제일 높았을 때는 rRNA의 3.5배나 되었다. Fig.2와 Fig.3를 비교하면 vegetative dikaryon의 144시간 배 RNA의 함량이 높았고 primordia 288시간 배양에서도 RNA의 함량이 높았다.

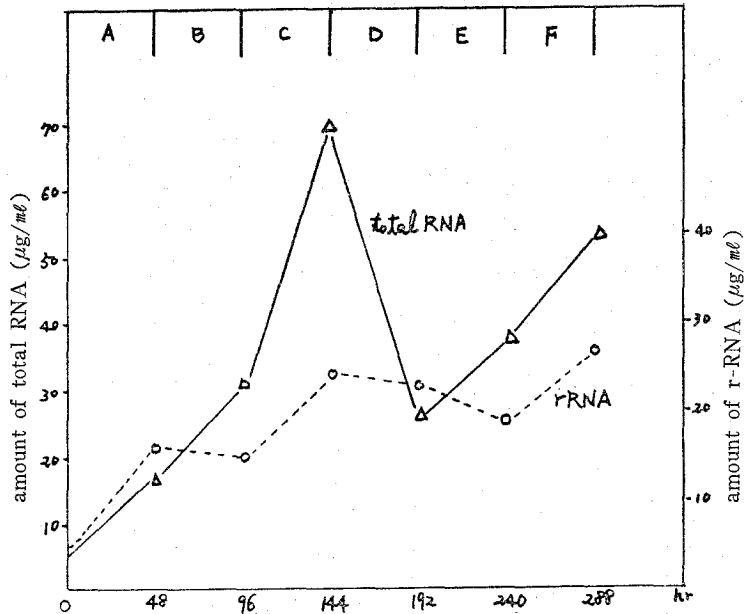


Fig. 3. Changes in the synthesis of total RNA and rRNA of second hyphae of *S. commune* during their life cycle.

A: hyphae fusion growth stage. B, C, D: vegetative dikaryon growth stage.  
E, F: primordia formation stage.

## 2. 1次菌絲와 2次菌絲의 $^3\text{H}$ -uridine의 RNA로의 전환

*S. commune*의 생활사를 통한  $^3\text{H}$ -uridine이 Hn-RNA, mRNA, rRNA 및 total RNA 등으로 전환되는 것을 추적한 결과는 다음과 같다. Fig.4는 2차 균사에서 48시간 배양중 마지막 5시간 동안  $1\mu\text{Ci}/1\text{ml}$ 씩 접종하여 추적한 것이다. 균사접합기의 RNA로의 전환은 rRNA와 total RNA가 Hn-RNA와 mRNA보다 전환이 약 3배 높았다. 96시간 배양의 vegetative dikaryon 형성기에서는 total RNA가 rRNA보다 1.6배 정도 높았으며 rRNA는 Hn-RNA와 mRNA보다 2.5배 정도 높게 나타났다. 144시간의 vegetative dikaryon에서는 RNA의 전환

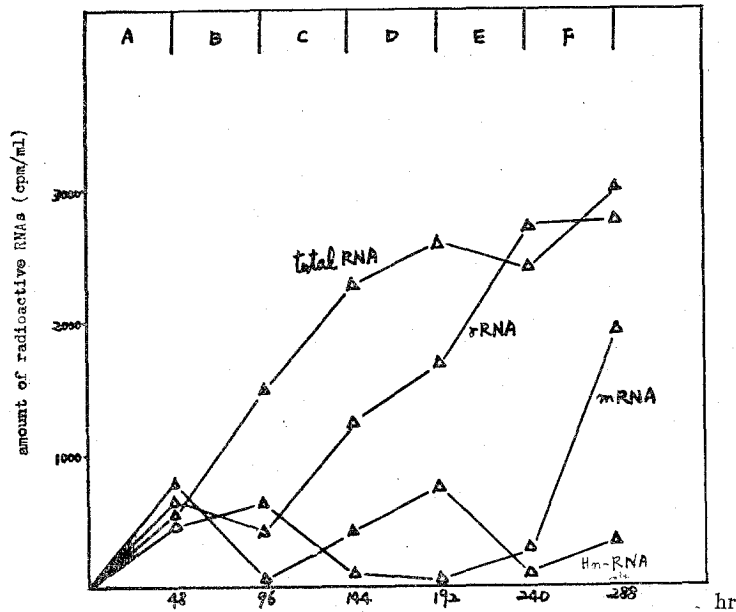


Fig. 4. Labeling characters of RNAs in *S. commune* treated with  $^3\text{H}$ -uridine for 5 hours during second hyphae differentiation.

A: hyphae fusion growth stage. B, C, D: vegetative dikaryon growth stage. E, F: primordia formation stage.

은 감소현상을 나타내었으며 rRNA가 제일 감소하였다. 이 때의 total RNA는 rRNA의 4배 정도 높았고 Hn-RNA는 mRNA의 3배 정도 높았다. 배양시간 192시간의 vegetative dikaryon 에서는 전자보다 증가 현상을 나타내었으며 total RNA는 rRNA보다 약 1.4배 높았고 Hn-RNA는 mRNA보다 4배 높았다. 이 때는 rRNA와 mRNA의 높은 증가가 있었다. 배양시간 240시간 primordia 형성기 때는 total RNA와 rRNA가 증가하였지만 Hn-RNA와 mRNA는 감소하였다. total RNA는 rRNA의 약 1.4배, Hn-RNA는 mRNA의 3배 정도였다. 배양시간 288시간의 primordia에 처리한 것은 total RNA와 mRNA는 증가하였지만 rRNA와 Hn-RNA는 감소하였다. 이 때 total RNA는 rRNA의 약 1.8배, mRNA는 Hn-RNA의 1.3배 정도였다.

Fig. 5은 1차균사를 2차균사와 똑같은 조건에서  $^3\text{H}$ -uridine으로 처리하여 RNA로의 전환을 추적한 결과이다. 48시간의 배양에서는 total RNA, rRNA, Hn-RNA, mRNA는 거의 비슷하게 전환되었다. 96시간의 배양에서는 total RNA와 mRNA는 rRNA와 mRNA보다 전환율이 높았다. total RNA는 rRNA보다 3.5배 정도 높았고 mRNA는 Hn-RNA보다 2배 정도 높았다. 144시간의 배양에서는 total RNA, rRNA, Hn-RNA는 전환율이 빨랐고 mRNA는 오히려 감소 현상을 나타내었다. 이 때의 total RNA는 rRNA의 약 1.7배 Hn-RNA는 mRNA의 4배 정도나 높았다. 배양시간 192시간에서의 전환은 total RNA, rRNA, Hn-RNA

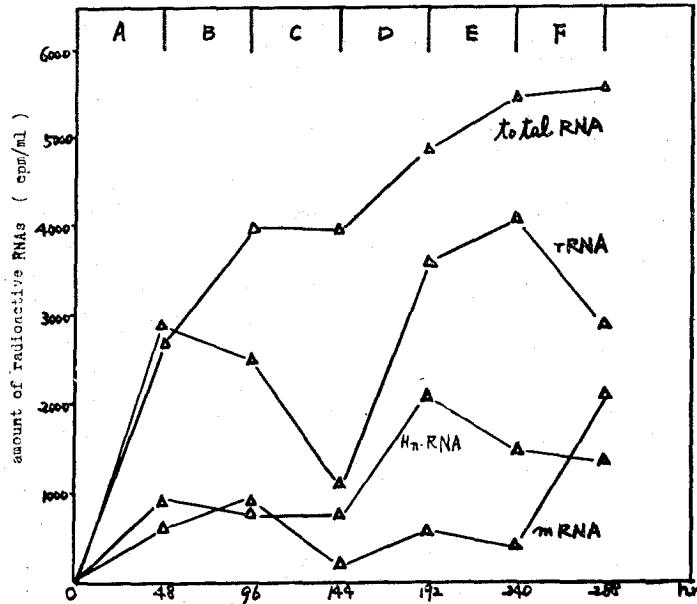


Fig. 5. Labeling characters of RNAs in monohyphae of *S. commune* treated with  $^3\text{H}$ -uridine for 5 hours.

는 전자보다 증가하였고 mRNA는 오히려 감소하였다. 이 때 total RNA는 rRNA보다 1.6배, Hn-RNA는 mRNA보다 10배나 전환이 빨랐다, 240시간의 배양에서는 rRNA는 total RNA보다 전환이 약간 빨랐고 mRNA는 Hn-RNA보다 전환이 빨랐다. 288시간 배양한 것은 total RNA, rRNA, mRNA, Hn-RNA의 순서로 RNA로의 전환이 빨랐다. 특히 mRNA는 Hn-RNA보다 6배나 빨랐다.

Fig. 4와 Fig. 5의 1차균사와 2차균사의 전환율을 비교하면 48시간 배양에서 2차균사의 total RNA와 rRNA가 1차균사 때보다 3.8배 정도 전환이 빨랐다. 96시간의 배양에서는 2차균사의 total RNA가 1차균사의 RNA보다 2.6배, rRNA는 5배, Hn-RNA와 mRNA는 2배 정도 전환이 빨랐다. 144시간 배양에서는 2차균사의 total RNA가 1차균사보다 1.6배 정도 전환이 빨랐다. 192시간의 배양에서는 2차균사의 total RNA가 1차균사보다 1.3배, rRNA는 2배, Hn-RNA는 3배, mRNA는 5배나 전환이 빨랐다. 240시간의 배양에서는 2차균사의 total RNA가 1차균사보다 1.5배 Hn-RNA는 5배나 전환이 빨랐으며 Hn-RNA와 mRNA의 전환은 비슷하였다. 288시간의 배양에서는 2차균사가 1차균사보다 total RNA는 2배 정도, Hn-RNA는 4.5배 정도 전환이 빨랐다. 나머지는 비슷하게 전환율이 같았다.

#### IV. 考 察

Penman et al.<sup>22)</sup>은 HeLa 세포에서 Hn-RNA가 poly(A) mRNA로 Processing되는 데 15분이 소요되며 Kim<sup>11)</sup>도 *A. phoenicis*에서 똑같은 보고를 하였다. 또 Rohein et al.<sup>23)</sup>도 *R. stolonifer*에서 <sup>3</sup>H-uridine의 poly(A) mRNA로의 processing에 15분이 걸린다고 보고하였다. 그러나 본 실험의 *S. commune*에서는 일률적으로 5시간씩 추적한 결과여서 정확한 소요시간은 알 수 없지만 5시간은 소요되지 않을 것으로 사료된다.

Kim & Choi<sup>14)</sup>는 *A. niger*의 포자를 동조적으로 배양하여 포자가 형성되는 시기를 전후로 하여 RNA의 단백질 대사를 조사하고 포자가 형성되기 전에 RNA 합성이 2~3배 정도 활발하다고 보고하였다. Kim<sup>11)</sup>은 *A. phoenicis*에서 RNA의 생합성은 오히려 경자 형성기에 약 2~2.3배 정도 왕성하다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 vegetative dikargon 형성기와 primordia 형성기 때가 균사접합 때보다는 RNA 합성이 활발하였다. 1차균사와 배양시간 240~280시간에서 높았으며 그외는 대체로 완만하게 감소하였다. 1차균사와 2차균사의 RNA 함량은 2차균사가 1차균사보다 RNA 생합성이 활발하고 약 2배 왕성하였다.

Martens & Sargent<sup>19)</sup>는 <sup>3</sup>H-uridine의 RNA로의 전환은 포자가 형성되기 직전에 최대치였다고 보고하였으며 배양할 때 RNA의 양은 감소하나 DNA의 양은 서서히 증가한다고 보고하였다. 그리고 *N. crassa*의 RNA와 DNA의 生合成은 생활사를 통하여 큰 기복이 없이 꾸준히 일어난다고 하였다. 그러나 Kim<sup>11)</sup>은 *A. phoenicis*의 RNA와 DNA의 생합성은 分化 과정에 따라 기복을 나타낸다고 하였다. 이것은 *S. commune*의 본 실험에서도 비슷하였다.

#### V. 結 論

*Schizophyllum commune* Fr.의 생활사를 통한 rRNA의 생합성과 processing을 <sup>3</sup>H-uridine으로 연구한 결과는 다음과 같다.

1. <sup>3</sup>H-uridine의 processing은 2차균사에서는 primordia 형성기 동안 높았고 1차균사에서는 288시간 배양에서 높았다. 그러나 240시간 배양에서는 낮았다. <sup>3</sup>H-uridine의 rRNA로의 processing은 1차균사보다 2차균사가 2.5배 빨랐다.

2. RNA의 생합성은 2차균사에서는 primordia 형성기에서 높았고 1차균사에서는 240~288 배양시간에서 높았다. RNA의 생합성은 1차균사보다 2차균사가 2배 정도 높았다.

## 參 考 文 獻

1. Bromberg, S.K. and M.N. Schwalb: Studies on basidiospores developments in *Schizophyllum commune*. *J. Gen. Microbiol.* **96**, 409—413(1976).
2. Bromberg, S.K. and M.N. Schwalb: Sporulation in *S. commune*: Changes in enzyme activity. *Mycol.* **70**, 481—486(1978).
3. Ceriotti, G.: Determination of nucleic acids in animal tissues. *J. Biol. Chem.* **214**, 59—70(1955).
4. Darnell, J.E., Jelinek, W.R. and G.R. Molly Biogenesis of RNA: Genetic regulation in mammalian cells. *Science*, **181**, 1215—1221(1973).
5. Greenberg, H. and S. Penman: Methylation and processing of ribosomal RNA in HeLa cells. *J. Mol. Biol.* **21**, 527—535(1966).
6. Gegenheimer, P., N. Watson and D. Apirion: Multiple pathways for primary processing of ribosomal RNA in *E. coli*. *J. Bio. Chem.* **252**(9) 3064—3073(1977).
7. Griffin, D.H. and C. Breuker: Ribonucleic acid synthesis during the differentiation of sporangia in the water Mold *Achlya*. *J. Bacteriol.* **98**(2), 689—696(1969).
8. Gould, H. and H.R. Matthews: Separation methods for nucleic acids, Amsterdam(1976).
9. Heintz, C.E. and D.J. Niederpruen: Ultrastructure of quiescent and germinated basidiospores and oidia of *Coprinus lagopus*. *Mycol.* **63**, 745—766(1971).
10. Hinton, R. and M. Dobrota: Density gradient centrifugation, Amsterdam(1976).
11. Kim, B.S.: Biosynthesis of RNA during the life cycle of *A. phoenicis*. *Kor. Univ.* (1984).
12. Kumer, A.: Studies on ribosomal RNA from *Tetrahymena* by zone velocity sedimentation in sucrose gradients and base analysis. *Biochem. Biophys. Acta*, **186**, 1326—1331(1969).
13. Kumer, A. and R.S. Wu: Role of ribosomal RNA transcription in ribosome processing in HeLa cells. *J. Mol. Biol.* **80**, 265—276(1973).
14. Kim, J.H. and Y.S. Choi: Biosynthesis of the exoenzymes during the synchronous development of *A. niger* in submerged culture. *Atomic Energy Res. Inst., Seoul, Korea*. code, No.5—2—2(1972).
15. Lee, S.Y., J. Mendeck and G. Brawerman: A polynucleotide segment rich in adenylic acid in the rapidly-labeled polyribosomal RNA component of mouse sarcoma 180 ascites cells. *Pro. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **68**, 1331—1335(1971).
16. Lee, S.Y. and Y.S. Yoon: Effect of adriamycin on nucleic acid synthesis in culture Murine L5178Y cells. *Kor. Biochem.* **11**(1): 69—79(1978).
17. Long, E.O. and I.B. Dawid: Alternative pathways in the processing of ribosomal RNA precursor in *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* **138**, 873—878(1980).
18. Luthe, D.S.: A simple technique for the preparation and storage of sucrose gradient. *Analytic. Biochem.* **195**, 230—232(1978).
19. Martens, C.L. and M.L. Sargent: Circadian rhythms of nucleic acid metabolism in *N. crassa*. *J. Bacteriol.* **117**(3), 1210—1215(1974).
20. Mirkes, P.E.: Polysome, ribonucleic acid and protein synthesis during germination of *Neurospora crassa* conidia. *J. Bacteriol.* **117**(1), 196—202(1974).
21. Penman, S.: RNA metabolism in the HeLa cell nucleus. *J. Mol. Biol.* **17**, 117—130(1966).
22. Penman, S., C. Vesco and M. Penman: Localization and kinetics of formation of nuclear



- heterodisperse RNA, cytoplasmic heterodisperse RNA and polyribosome associated mRNA in HeLa cells. *J. Mol. Biol.* **34**, 49—69(1968).
23. Rohin, J.R., R.H. Knight and J.L. van Etten: Synthesis of RNA during the germination of *R. stolonifer* sporangis spores. *Dev. Biol.* **41**, 137—145(1974).
  24. Schwalb, M.N.: Commitment to fruiting in synchronously developing culture of the basidiomycetes *Schizophyllum commune*. *Arch. Mikrobiol.* **79**, 102—107(1971).
  25. Schwalb, M.N.: Developmental regulation of amylase activity during fruiting of *S. commune*. *J. Bacteriol.* **103**(3): 1205—1209(1971).
  26. Schwalb, M.N. and P.G. Miles: Morphogenesis of *S. commune*: I. Morphological variation and mating behavior of the thin mutation. *Amer. J. Bot.* **54**, 440—446(1976).
  27. Schmdt, G. and S.J. Tannhauser: A method for the determination of DNA, RNA and phosphoprotein in animal tissue. *J. Biol. Chem.* **161**, 83—89(1945).
  28. 石川辰夫: 微生物遺傳學 實驗法, 共立出版株式會社, 日本(1982).
  29. 黑田行昭: 培養細胞遺傳學 實驗法, 共立出版株式會社, 日本(1981).

## Biosynthesis of ribosomal RNA in *Schizophyllum commune*

**Duck-hyun Cho**

*Dept. of Environmental Hygiene*

**Sei-weon Oh**

*Dept. of Dental Hygiene*

*Kwangju Health Junior College*

### >Abstract<

Biosynthesis and processing of cytoplasmic rRNA precursor during life cycle of *Schizophyllum commune* Fr. were studied by using  $^3\text{H}$ -uridine.

1. Incorporations of  $^3\text{H}$ -uridine were high during primordia formation stage in second hyphae and were high during 288 hours cultures in monohyphae but declined during 240 hours cultures. Incorporations of  $^3\text{H}$ -uridine into rRNA were more rapid 2.5-folds at second hyphae than monohyphae.

2. Biosynthesis of RNA were high at primordia formation stage in second hyphae and were high during period cultures from 240 hours to 288 hours at monohyphae. Biosynthesis of RNA were higher 2-folds at second hyphae than monohyphae.