

검정곰팡이(*Aspergillus niger*)의 孢子形成에 미치는 cAMP, 테오필린 및 카페인에 影響에 관한 研究

高榮珠·金鍾協*

梨花女大 大学院 藥学科 *同德女大

The Effects of Cyclic AMP, Theophylline and Caffeine on Sporulation of *Aspergillus niger* in the Defined Media

Young-Joo Koh and Jong-Hyup Kim*

Dept. of Pharmacy, Graduate school, Ehwa Woman's University, Seoul 120, Korea and
Dong-Duck Women's University, Seoul 136, Korea

ABSTRACT: *Aspergillus niger* van Tieghem was cultured by the method of synchronous and submerged culture. The sporulation occurred through the culture and its life cycle and differentiation were completed in the experiments. The effects of cAMP, theophylline and caffeine on the sporulation of *A. niger* were investigated. In the sporulation medium, the sporulation was stimulated by addition of cAMP and its optimum concentration was 10^{-4} M. In the sporulation medium, the sporulation was stimulated by addition of theophylline and its optimum concentration was 10 mg/ml. In the sporulation medium, the sporulation was stimulated by addition of caffeine and its optimum concentration was 300 mg/ml. Theophylline added to the sporulation medium together with cAMP enhanced the promotion effect of cAMP on sporulation. Caffeine added to the sporulation medium together with cAMP enhanced the promotion effect of cAMP on sporulation. In the sporulation medium, the sporulation was stimulated by addition of neither AMP nor ATP. In the potassium acetate medium, cAMP, theophylline and caffeine stimulated the sporulation, respectively.

KEYWORDS: *Aspergillus niger*, Sporulation, cAMP, Theophylline, caffeine.

cAMP (Adenosine 3', 5'-monophosphate)는 동식물과 미생물의 세포기능을 조절하는데 있어서 중요한 역할을 한다(Kamisaka, 1970; Robinson 등, 1971).

cAMP는 자낭균류(Ascomycetes)인 *Schizosaccharomyces* (Schlanderer 등, 1974), *Saccharomyces* (Sy 등, 1972; Van 등, 1971), *Neurospora* (Flawia 등, 1972; Rosenberg 등, 1978), *Aspergillus* (Zonneveld 등, 1976)와 담자균류(Basidiomycetes)인 *Coprinus* (Uno 등, 1973), 조균류(Phycomyces)인 *Mucor* (Paznokas, 1974), *Blastocladiella* (Silverman 등, 1975)를 포함한 많은 종류의 곰팡이에서 발견되었다. 세포내 cAMP의 함량변화는 많은 연구에서 관찰되었고, 이는 그 미생

물의 분화적 또는 형태학적 변화와 관련이 있다고 한다.

점균류인 *Dictyostelium discoideum*에서 cAMP는 응집화의 initiator 역할을 하고(Konijn 등, 1968), 줄기의 형성에 영향을 미친다(Bonner, 1970). Uno와 Ishikawa(Uno 등, 1974)는 담자균인 *Coprinus macrorhizus*에서 포도당은 자실체의 형성을 억제하고 cAMP의 농도를 감소시킨다고 하였다. Galsky(Galsky 등, 1972) 등은 cAMP는 *Monacrosporium doedycoides*에서 폐자기(Perithecium)의 형성을 조절한다고 하였다. Feldman과 Thayer(Feldman 등, 1974)는 *Neurospora crassa*에 있어서 포도당에 의한 tyrosinase 생성억제작용이 cAMP에 의해서 해제된다는 것을 발견하였다. Tyrosinase는

유성생식으로의 분화에 관여한다고 한다. cAMP는 *Puccinia graminis*에서 성장을 저해했고(Bose 등, 1974), *Fusarium solani*에서는 후막포자의 생성률을 증가시켰다(Meyers 등, 1972).

Pall(Pall, 1977)은 *Neurospora crassa*에서 cAMP 함량을 조절하는 것은 세포막의 전위라고 하였고, *N. crassa*의 세포막을 탈분극시키면 세포내 cAMP 함량이 일시적으로 빠르게 증가했다. Larsen과 Sypherd(Larsen 등, 1974)는 *Mucor racemosus*에서 효모-균사적 동종이형이 cAMP에 의해 조절된다는 것을 보고하였다. Silverman과 Epstein(Silverman 등, 1975)은 *Blastocladiella emersonii*의 분화시 cAMP 함량이 변하는 것을 발견하였다.

*Escherichia coli*에서 cAMP는 Catabolite(gene)-activator protein(CAP)과 결합하여 유전인자의 전사를 촉진했다. Catabolite repression을 받는 유도효소의 생합성에 있어서는, CAP가 mRNA 합성을 하는 Promoter에 먼저 결합하여 RNA polymerase로 하여금 Promoter에 붙을 수 있게 한다. 이 CAP는 cAMP와 먼저 결합됨으로써 Promoter에 결합하여 전사작용을 촉진한다. 포도당은 ATP가 cAMP로 되는 생성반응을 억제할 뿐 아니라 AMP으로의 분해를 촉진하기 때문에, CAP와 cAMP와의 결합을 막음으로써 결과적으로 Catabolite의 억제를 받는 유도효소의 생산을 억제하는 것이다. 따라서 포도당이 존재하면 cAMP가 적게 생기고 RNA polymerase가 Promoter에 붙지 못하므로 mRNA 생성이 저해되는 것이다. *E. coli*에 있어서 인위적으로 첨가한 cAMP가 포도당에 의한 유도효소의 생성억제작용을 해제한다는 것이 밝혀지고 나서, 곰팡이에서도 비슷한 효과가 추궁되었다.

Schizosaccharomyces pombe(Schlanderer 등, 1974)와 *Saccharomyces fragilis*(Sy 등, 1972)에 있어서 cAMP의 함량은 배지내의 포도당의 함량에 의해서 영향을 받는다. 그러나, 포도당만이 효모에 있어서 cAMP의 함량에 영향을 미치는 유일한 요인인지는 명확하지 않다. *Schizosaccharomyces pombe*(Schlanderer 등, 1974), *Saccharomyces calbergensis*(Van 등, 1971), *Saccharomyces fragilis*(Sy 등, 1972)에서 포도당에 의한 repression이 해제된 후 세포내의 cAMP의 함량이 상승한다는 것이 알려졌다. Tsuboi(Tsuboi 등, 1972)는 *Saccharomyces cerevisiae*에서 포자형성과 glucose repression에 대

한 cAMP의 영향을 연구하였다. 이 실험에서 자낭의 생성량은 1%포도당 존재시 50~20%로 감소되었다. 이 억제효과는 $10^{-4}M$ cAMP의 첨가에 의해서 부분적으로 회복되었으나, 다른 종류의 nucleotide는 회복효과가 없었다. 혐기적 상태에서 성장한 *S. cerevisiae*의 호흡억제에 대한 glucose repression을 cAMP가 해제시킨 예가 있다. Tsuboi(1973) 등은 포도당 1%를 함유한 배지에서 테오필린이 포자형성을 촉진한다고 하였고, 이 촉진효과는 테오필린이 cAMP-phosphodiesterase의 저해제로서 작용하여 cAMP의 분해를 억제한 결과라고 보았다.

본 연구에서는 효모균류에 있어서 포자형성이 Catabolite repression의 해제에 의하여 일어나고, 이때 cAMP가 CAP(Catabolite gene-activator protein)와 결합하여 포자형성을 지배하는 유전인자들을 활성화하여 포자형성용 단백질소들을 만드는 mRNA를 전사한다는 이론에 의거해서, 검정곰팡이에서도 이와같은 cAMP, 테오필린 및 카페인의 영향이 효모균의 경우와 유사하게 작용하는가를 추궁하고자 이 연구를 실시하였다.

材料 및 方法

실험균주

Aspergillus niger van Tieghem(IMI 41873) 균주를 실험에 사용하였다.

배 지

1) 감자 글루코오스 사면배지(Potato glucose slant agar)

감자 300g을 쥌 다음 껍질을 벗기고 막자사발에 넣어 마쇄하고 증류수 500 ml에 넣고 진탕한 후, 한 천 15g과 글루코오스 20g을 넣어 섞어서 녹인 다음 증류수를 넣어 전체량을 1000 ml로 하고 고압멸균하였다. 이것을 건열멸균한 시험관에 5 ml씩 분주하고 솜마개를 하여 굳힌 후 4°C에 보관하였다.

2) 진탕배양 배지

A 배지로는 기초 무기염류 용액(Basal minerals) 20 ml, 암모늄염 792 mg, 글루코오스 4g을 증류수에 녹여 전체량을 200 ml가 되도록 한 후에 1N 염산을 사용하여 pH 2.3으로 정확히 조정하였다. 이와 같이 제조한 배지를 250 ml 삼각 플라스크에 50 ml씩 넣고 솜마개를 한 다음 고압멸균하였다. 기초 무기염류 용액의 조성은 Table I과 같으며, A 배지의 조성은 Table II와 같다.

Table I. Components of basal minerals for liquid media.

Components	Contents
KH_2PO_4	1,000 (mg)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250
$\text{CuSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	0.234
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6.32
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.10
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.50
CaCl_2	46.7
Distilled water	1,000 (ml)

Table II. Components of liquid medium for shake culture.

Components	Contents
Basal Minerals* ($\times 10$)	100 ml
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.96 g
Glucose	20.0 g
Distilled water	900 ml
pH	2.3

* Contents are ten times fold than that of Table I

3) 액침배양 배지 (Liquid medium for submerged culture)

액침배양 배지는 동조배양을 위하여 2종류의 배지를 조제하였다. 조제된 배지의 조성은 Table III과 같다. B 배지는 저질소 배지 (Low nitrogen medium)로, 기초 무기염류 용액의 10배 농축액을 100 ml 넣고 황산암모늄 0.66g (5 mM), 글루코오스 10g을 가한 다음 증류수로 1000 ml가 되게하고, pH 4.6으로 조절하였다.

C 배지는 시트르산과 황산암모늄이 들어간 배지 (Citrate ammonium medium)이며, 10배 농축된 기초 무기염류 용액 100 ml를 넣고 황산암모늄 1.98 g (15 mM), 시트르산 12.6g (60 mM)을 넣은 다음 증류수로 1000 ml가 되게하고 5 N 수산화나트륨을 사용하여 pH 4.6으로 조절하였다. 이들 B 및 C 배지를 배양용기 (Jar fermenter (용량 1l))에 넣은 다음 고압멸균하였다. 소포제인 P₂₀₀은 따로 멸균하여 배양전에 무균적으로 균체와 같이 넣어 주었다.

4) 정지배양용 배지

D 배지는 질산나트륨과 글루코오스가 들어있는 배

Table III. Components of liquid media for submerged culture.

Components	Contents	
	B medium	C medium
Basal minerals* ($\times 10$)	100ml	100ml
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.66g	1.98g
Glucose	10.0g	
Citric acid		12.6g
Polypropylene glycol (P ₂₀₀)	1.0ml	1.0ml
Distilled water	900ml	900ml
pH	4.6	4.6

* Contents are ten times fold than that of Table I

지 (Nitrate glucose medium)로서, 10배로 농축된 기초 무기염류 용액 100 ml를 넣고 인산이수소칼륨 12g, 인산일수소칼륨 1.13g, 질산나트륨 5.1g (60 mM) 및 글루코오스 20g을 넣은 후 증류수에 녹여 전체량이 1000 ml가 되도록 하였으며, pH를 5.5가 되도록 조절하였다. D 배지의 조성은 Table IV와 같다.

아세트산염 배지는 pH 5.5 Tris (hydroxymethyl) amino methane maleate buffer 1000 ml에 Yeast nitrogen base without amino acids 6.7g, Potassium acetate 1.963g을 가하여 만든다. 아세트산염 배지의 조성은 Table V와 같고, Yeast nitrogen base without amino acids의 조성은 Table VI와 같다.

이들 D 배지 및 아세트산 배지를 500 ml 비이커에 넣고 두께 2 cm되는 솜을 가재로 싸서 덮은 후 고압

Table IV. Components of liquid medium (D) for static culture.

Components	contents
Basal minerals*	100ml
Glucose	20.0g
KH_2PO_4	12.0g
K_2HPO_4	1.13g
NaNO_3	5.1g
Distilled water	900ml
pH	5.5

* Contents are ten times fold than that of Table I

Table V. Components of potassium acetate medium.

Components	Contents
Yeast nitrogen base without amino acids	6.7g
Potassium acetate	1.963g
Tris aminomethane maleate buffer	1000ml
pH	

멸균하였다.

시 약

cAMP (Adenosine 3', 5'-monophosphate), AMP (Adenosine 5'-monophosphate), ATP (Adenosine 5'-triphosphate), 테오필린, 카페인은 모두 Sigma Co. 제품을 사용하였고, Polypropylene glycol (P₂₀₀)은 Dow chemical Co. (U.K.)의 것을 사용하였다. 그의 실험에 사용한 모든 시약은 GR급을 사용하였다.

실험방법

검정곰팡이의 분화단계를 관찰하기 위하여 Anderson과 Smith (1971)의 방법을 응용, 다음과 같이 4 단계로 동조배양하였다.

1) 사면배양

계대배양된 검정곰팡이를 무균상태에서 감자-글루코오스 사면배지에 접종하여 28°C에서 7일간 항온배양하여 포자를 얻었다.

2) 진탕배양

멸균증류수 5 ml를 무균상태에서 사면배양된 검정곰팡이에 붓고 백금이로 여러번 긁어서 포자와 균사의 현탁액을 얻고 이것을 미세공유리거르개 (Sintered glass filter)로 가압하여 거르고 여액 1 ml를 A 배지에 접종시켜 진탕배양하였다. 접종후 30°C의 진탕배양기 (120 Strokes/min)에서 48시간 동안 배양하여 포자를 받아시키고 균등한 연령의 균사를 얻었다.

3) 액침배양

진탕배양 결과 얻어진 균사들을 취하여 멸균한 나이론제 Cheese cloth로 걸러내었다. 거르는 동안 멸균증류수로 2회 세척하고 멸균된 스파라로 멸서 750 ml의 배지가 들어있는 B 배지에 접종하였다. 접종된 균사의 무게는 압착상태로서 2.0g이었다. 소포제 P₂₀₀을 첨가하고 배양용기 (Jar fermenter)를 고

Table VI. Yeast nitrogen base without amino acids.

(Difco Co., U.S.A.)	
Ingredients per Liter	Weight
Nitrogen Sources	
Ammonium Sulfate	5 g
Vitamins	
Biotin	2 mcg
Calcium Pantothenate	400 mcg
Folic acid	2 mcg
Inositol	2000 mcg
Niacin	400 mcg
p-Aminobenzoic acid, Difco	200 mcg
Pyridoxine Hydrochloride	400 mcg
Riboflavine	200 mcg
Thiamine Hydrochloride	400 mcg
Compounds supplying trace elements	
Boric acid	500 mcg
Copper Sulfate	40 mcg
Potassium Iodide	100 mcg
Ferric Chloride 10	200 mcg
Manganese Sulfate	400 mcg
Sodium Molybdate	200 mcg
Zinc Sulfate	400 mcg
Salts	
Potassium Phosphate Monobasic	1 g
Manganese Sulfate	0.5 g
Sodium Chloride	0.1 g
Calcium Chloride	0.1g
Amounts of final medium from 100g dehydrated medium	14.9 l

정시킨 후 640 rpm의 교반속도가 되도록 Tachometer를 사용하여 회전속도를 조절하였다. 이 경우 배양은 30°C에서 실시하였다. 배양용기의 온도조절은 항온기 속에 배양용기를 8 cm 정도의 깊이로 담그어 실시하였다. 항온기내에서는 별도로 교반기를 설치하였다. 배양용기내에 있는 통기관의 노즐 (Air Sparger)을 통하여 공기를 공급하였다. 통기원은 기포발생기를 사용하였으며, 통기량은 유량조절계 (Air flow meter, 3l/min 용량)를 사용하여 조절하였다. 접종후 14시간까지는 25 ml/min의 공기를 주

입하고, 그 이후 22시간은 380 ml/min가 되도록 공기를 주입하였다. 총 36시간이 경과한 후에 성숙된 균사를 수거하여 거르고 멸균 증류수로 2회 세척한 다음 압착 균체량 2.0g을 C배지 750 ml에 접종하였다. 여기에 소포제 P₂₀₀을 1 ml 첨가하고 배지량의 1/2에 해당하는 공기(380 ml/min)를 공급하면서 30°C에서 24시간 배양하였다.

4) 정치배양

정당과 경자가 형성된 검정곰팡이를 치즈크로스로서 거르고 멸균증류수로 세척한 다음 0.5g을 D배지에 접종하고 포자가 형성될 때까지 30°C로 정치배양하였다.

곰팡이의 포자형성실험

cAMP, 테오필린, 카페인이 검정곰팡이의 포자형성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 다음과 같이 처리하였다.

1) cAMP 첨가실험

정당과 경자가 형성된 검정곰팡이를 C배지에서 D배지로 옮기기 직전에 D배지에 cAMP를 10⁻⁶M, 10⁻⁵M, 10⁻⁴M, 10⁻³M이 되게 첨가하였다. cAMP를 첨가하지 않은 D배지를 대조군으로 하여 검정곰팡이를 옮긴 후 정치배양하였다. 12시간 간격으로 균사의 형태를 관찰하였고, 접종 48시간, 72시간, 96시간후 형성된 포자수를 측정하였다. cAMP 처리군 및 정상군의 배양액 일정량을 취하여 고무로 끝을 덮어씌운 유리봉으로 균사를 비빈 후, 계면활성제 Polyoxyethylene sorbitan monooleate(Tween 80)를 1적 가하고 교반용 프로펠라(Impeller)로 1000 rpm의 속도로 교반하여 정당과 경자로 부터 포자르라 분리시킨다. 이를 소결유리관(1G3)으로 거른 후 포자수를 혈구계산기(Haemocytometer)로 측정하였다.

2) 테오필린, 카페인 첨가실험

D배지에 카페인을 10 mg/ml, 30 mg/ml, 100 mg/ml, 300 mg/ml, 1000 mg/ml이 되게 첨가하고 검정곰팡이를 옮긴 후 72시간 후에 형성된 포자수를 측정하였다. D배지에 테오필린을 1 mg/ml, 3 mg/ml, 10 mg/ml, 30 mg/ml, 100 mg/ml, 300 mg/ml이 되게 첨가하고 검정곰팡이를 옮긴 후 72시간 후에 형성된 포자수를 측정하였다.

3) cAMP와 테오필린, 카페인 동시 첨가실험

D배지에 cAMP 10⁻⁴M과 테오필린 10 mg/ml를 혼합하여 첨가하고 검정곰팡이를 옮긴 후 48시간, 72시간, 96시간 후 형성된 포자수를 측정하였다. D

배지에 cAMP 10⁻⁴M과 카페인 300 mg/ml를 혼합하여 첨가하고 검정곰팡이를 옮긴 후 48시간, 72시간, 96시간 경과한 후에 형성된 포자수를 측정하였다.

4) AMP, ATP 첨가실험

D배지에 AMP, ATP를 각각 10⁻⁶M, 10⁻⁵M, 10⁻⁴M, 10⁻³M이 되게 첨가하고 검정곰팡이를 옮긴 후 72시간 후에 형성된 포자수를 측정하였다.

5) 아세트산염 배지에서의 cAMP, 테오필린, 카페인 첨가실험

아세트산염 배지에 cAMP 10⁻⁴M, 테오필린 10 mg/ml, 카페인 300 mg/ml가 되게 첨가한다. 여기에 검정곰팡이를 옮긴 후 72시간 후에 형성된 포자수를 측정하였다.

結果 및 考察

검정곰팡이의 성장 및 포자형성

배지조성을 A, B, C 및 D의 4단계로 나누어 주면서 일정한 조건에서 검정곰팡이를 배양하였을 때 생활사의 형태는 균일하게 나타났다. 사면배지에서 배양한 포자를 취하여 A배지에서 48시간 진탕배양하였을 때 배양초기에 포자의 팽창이 일어났으며, 중기에는 발아가 일정하게 일어났고 후기에는 발아된 균사가 균일하게 성장했다. A배지에서 배양한 균체를 B배지에 옮겨 36시간 배양하였을 때, 균사의 성장이 왕성하였으며 영양균사외에 격벽이 없는 생식균사인 포자병이 출현하였다.

B배지에서 배양한 균체를 C배지에 옮겨 24시간 배양하였을 때, 포자병으로 부터 정당과 제1경자, 제2경자각 형성되었다. C배지에서 배양한 균체를 다시 D배지에 옮겨 36시간 배양하였을 때, 무성포자의 생성이 일어나는 것을 관찰하였다.

cAMP 처리군과 정상군 모두 36시간을 전후하여 일제히 포자형성이 시작되었다. 형성된 포자수를 혈구계산기로 측정한 결과 48시간, 72시간, 96시간 후 모두에서 10⁻⁴M cAMP가 가장 큰 포자형성 촉진효과를 나타내었다. 그 결과는 Fig. 1과 같다.

테오필린, 카페인 처리군과 정상군은 모두 36시간을 전후하여 포자형성이 시작되었다. D배지에 접종한 지 72시간 후 형성된 포자수를 측정한 결과, 테오필린은 10 mg/ml, 카페인 300 mg/ml에서 포자형성이 가장 촉진되었다. 그 결과는 Fig. 2, 3과 같다.

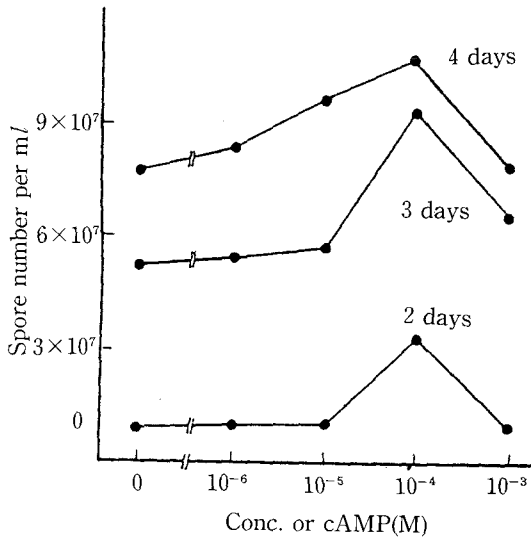


Fig. 1. Effect of cAMP levels on sporulation added to D medium.

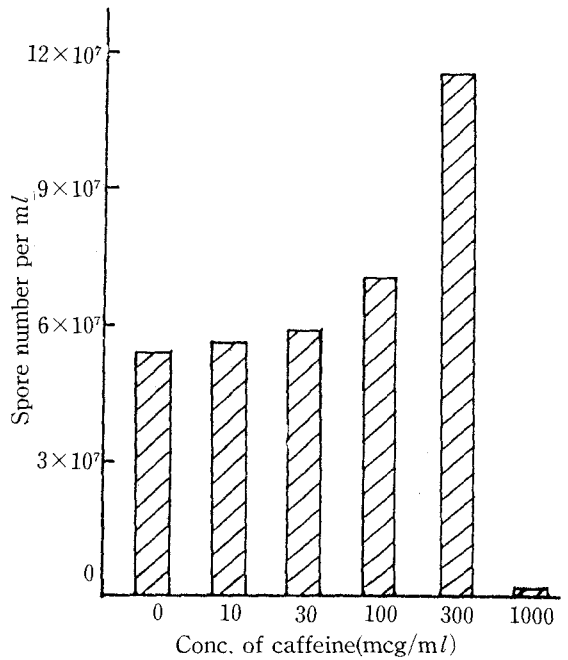


Fig. 3. Effect of caffeine levels on sporulation added to D medium.

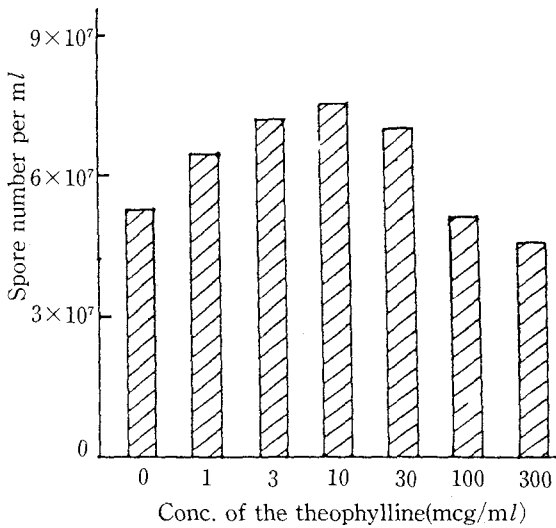


Fig. 2. Effect of theophylline levels on sporulation added to D medium.

cAMP와 카페인을 동시에 처리한 군과 cAMP와 테오필린을 동시에 처리한 군의 포자수를 측정 한 결과, cAMP 단독 처리군보다 cAMP와 테오필린 동시처리군과 cAMP와 카페인 동시처리군에서 포자형성이 더 활발하였다. 그 결과는 Fig. 4, 5와 같다.

AMP 처리군, ATP 처리군과 정상군은 모두 36시간을 전후하여 포자형성이 시작되었다. D배지에 접종한 지 72시간 후 형성된 포자수를 측정 한 결과,

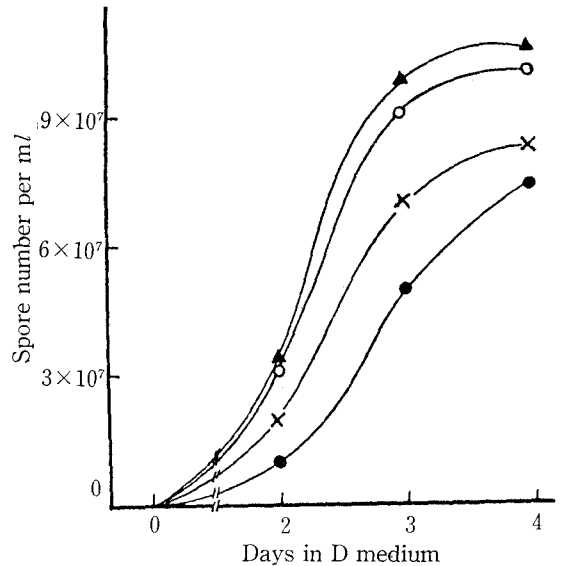


Fig. 4. Interaction between cAMP and theophylline in the promotion of sporulation. 10⁻⁴M cAMP and/or 10 mcg/ml theophylline were added to D medium.

●, control; ○, 10⁻⁴M cAMP alone; ×, 10 mcg/ml theophylline alone; ▲, 10⁻⁴M cAMP plus 10 mcg/ml theophylline

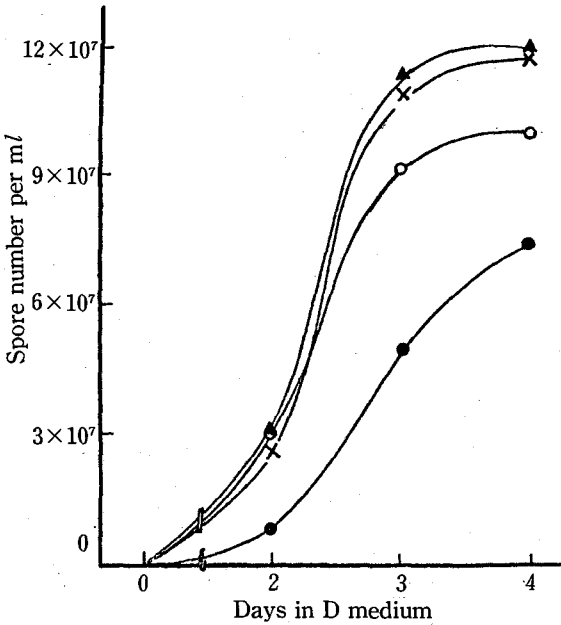


Fig.5. Interaction between cAMP and caffeine in the promotion of sporulation. 10⁻⁴M cAMP and/or 300 mcg/ml caffeine were added to D medium. ●, control; ○, 10⁻⁴M cAMP alone; ×, 300 mcg/ml caffeine alone; ▲, 10⁻⁴M cAMP plus 300 mcg/ml caffeine.

ATP나 AMP는 포자형성 촉진효과가 없었다. 그 결과는 Table VII와 같다.

아세트산염 배지에 cAMP, 테오필린, 카페인을 각각 처리하고 접종한 지 72시간 후 형성된 포자수를 측정한 결과, cAMP와 테오필린은 포자형성을 약간 촉진했고, 카페인은 촉진효과가 훨씬 더 크게

나타났다.

검정곰팡이를 Smith(Anderson 등, 1971) 등이 고안한 A, B, C 및 D배지를 사용하여 배양하였다. 그리하여 분화과정을 인위적으로 조절하여 생활사를 고찰하였다. A 배지에서는 발아가 일어났으며, B 배지에서는 포자병의 형성이, C 배지에서는 정낭과 경자의 형성이 동조적으로 일어났고, D 배지에서는 무성포자의 형성이 일어났다.

포도당을 함유하고 있는 D 배지에 cAMP를 첨가한 후 검정곰팡이를 배양하였을 때, 포자형성 촉진 효과가 나타났다. 이것은 포도당 1%와 아세트산 1%를 함유한 효모균의 포자형성용 배지에서 cAMP가 포도당에 의한 포자형성억제를 해제하였다고 하는 Tsuboi(Tsuboi 등, 1972) 등의 결과와 같았다.

cAMP는 2가지 효소 즉, adenylate cyclase와 phosphodiesterase의 작용을 받는다. adenylate cyclase는 ATP로 부터 cAMP로의 전환을 촉매하고(Perkins, 1973), cAMP-phosphodiesterase는 cAMP를 AMP로 분해한다(Aboud 등, 1971). 이들 효소들은 생체내에서 cAMP의 농도를 조절하는데 중요한 역할을 한다(Greengard 등, 1970). cAMP-phosphodiesterase의 활성은 methylxanthin 유도체에 의해 저해되므로(Aboud 등, 1971), 테오필린과 카페인도 cAMP-phosphodiesterase의 저해제로 작용한다고 한다. 그러므로, 포도당을 함유한 D 배지에 테오필린과 카페인을 각각 첨가하였을 때 나타난 포자형성 촉진효과는 테오필린과 카페인이 cAMP-phosphodiesterase의 작용을 억제함으로써 cAMP를 보호 유지한 것이 아닌가 고찰된다.

Table VII. The number of spores influenced by AMP or ATP during sporulation in D medium.

(3 days after inoculation)

Chemicals	Conc. of chemicals(M)	Spore number per ml
5' - AMP	10 ⁻⁶	5.090 × 10 ⁷ ± 0.379 × 10 ⁷ *
	10 ⁻⁵	5.362 × 10 ⁷ ± 0.211 × 10 ⁷
	10 ⁻⁴	5.354 × 10 ⁷ ± 0.384 × 10 ⁷
	10 ⁻³	5.134 × 10 ⁷ ± 0.520 × 10 ⁷
	10 ⁻⁶	5.154 × 10 ⁷ ± 0.481 × 10 ⁷
5' - ATP	10 ⁻⁵	5.096 × 10 ⁷ ± 0.599 × 10 ⁷
	10 ⁻⁴	5.186 × 10 ⁷ ± 0.763 × 10 ⁷
	10 ⁻³	5.052 × 10 ⁷ ± 0.166 × 10 ⁷
Control		5.151 × 10 ⁷ ± 0.340 × 10 ⁷

* mean ± S.D of triplicate determination

Table VIII. The number of spores influenced by cAMP, caffeine or theophylline during sporulation in acetate medium.

(3 days after inoculation)	
Chemicals	Spore number per ml
Control	$1.225 \times 10^6 \pm 0.043 \times 10^{**}$
cAMP	$1.393 \times 10^6 \pm 0.098 \times 10^{**}$
theophylline	$1.440 \times 10^6 \pm 0.118 \times 10^{**}$
caffeine	$1.918 \times 10^6 \pm 0.129 \times 10^{***}$

* mean \pm S.D of triplicate determinations
 Different from the control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

cAMP와 테오필린 또는 cAMP와 카페인을 동시에 첨가하였을 때에는 cAMP 단독처리군보다 포자가 더 많이 생성되었는데, 이것은 cAMP의 분해억제효과라고 볼 수 있다.

AMP나 ATP는 검정곰팡이의 포자형성에 아무런 영향도 미치지 않았다. 포자형성 배지에 첨가된 AMP나 ATP가 검정곰팡이에 직접 작용을 했다는 가정하에서 이 결과는 cAMP 자체가 검정곰팡이의 포자형성에 직접 관여한다고 해석할 수 있으나 반면, AMP, ATP의 세포막 투과여부 등 이들 약물의 작용발현이 저해될 수 있는 여러 요인들에 의해 AMP나 ATP가 검정곰팡이에 직접 작용하지 못했을 가능성도 있다.

아세트산염 배지에 있어서 cAMP나 테오필린은 약간의 포자형성 촉진효과를 나타내었고 ($0.01 < p < 0.05$), 카페인을 포자형성 촉진효과가 훨씬 더 크게 나타냈다 ($p < 0.01$). 카페인의 효과에 있어서는 Loprieno와 Schupbach (Loprieno 등, 1971)가 지적한 바와 같이 포자형성에 특이적으로 작용하는 DNA 복제에 관련이 있는 것이 아닌가 생각된다.

포자형성용 배지에는 포도당이 함유되어 있으므로 검정곰팡이에게 maintenance energy와 동시에 macromolecule 합성에 필요한 에너지를 주어서 포자형성이 왕성하지만, 탄소원으로 아세트이트만 함유한 배지에서는 에너지 생성량이 적으므로 포자형성율이 훨씬 낮다. 그러므로, 포도당을 함유한 포자형성용 배지에서 검정곰팡이를 배양할 때 cAMP를 첨가해 주면, 포도당이 포자형성에 필요한 에너지를 충분히 공급해 주면서 동시에 포도당의 포자형성억제효과가 cAMP에 의해 해제되어 왕성한 포자형성이 일어난다고 고찰된다.

摘 要

1. 검정곰팡이 (*Aspergillus niger*)를 실험군주로 하여 동조적으로 액침배양한 결과 포자의 발아로부터 균사의 성장, 생식기관의 성숙 및 무성포자의 형성까지를 재현시켰다.
2. 포자형성용 배지(D배지)에 cAMP를 첨가한 실험구에 있어서는 포자형성이 촉진되었고, 그 최적농도는 $10^{-4}M$ 이었다.
3. 포자형성용 배지(D배지)에 첨가한 테오필린은 포자형성을 촉진하였고, 그 최적농도는 10 mg/ml 이었다.
4. 포자형성용 배지(D배지)에 첨가한 카페인을 포자형성을 촉진하였고, 그 최적농도는 300 mg/ml 이었다.
5. 포자형성용 배지(D배지)에 cAMP와 테오필린을 함께 첨가한 실험구에서는 cAMP 단독 첨가 실험구보다 포자형성 촉진효과가 더욱 강화되었다.
6. 포자형성용 배지(D배지)에 cAMP와 카페인을 함께 첨가한 실험구에서는 cAMP 단독 첨가 실험구보다 포자형성 촉진효과가 더욱 강화되었다.
7. 포자형성용 배지(D배지)에 AMP나 ATP를 첨가한 실험구에서는 포자형성 촉진효과가 거의 없었다.
8. 아세트산염 배지에 cAMP, 테오필린, 카페인을 각각 첨가한 실험구에서는 포자형성에 대해 촉진효과를 나타내었다.

參考文獻

About, M. and Burger, M.(1971): Cyclic 3', 5'-adenosine monophosphodiesterase and the release of catabolite repression of m-galactosidase by exogenous cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**: 174-182.

Anderson, J.G. and Smith, J.E.(1971): Synchronous initiation and maturation of *Aspergillus niger* conidiophores in culture. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **56**(1): 9-29.

Bonner, J.T.(1970): Induction of stalk cell formation by cyclic AMP in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.)* **65**: 100-113.

- Bose, A. and Shaw, M.(1974): In vitro growth of wheat and flax rust fungi on complex and chemically defined media. *Can. J. Botany* **52**: 1183-1195.
- Flawia, M.M. and Torres, H.N.(1972): Adenylate cyclase activity in *Neurospora crassa*, I. General properties. *J. Biol. Chem.* **247**: 6873-6879.
- Feldman, J.F. and Thayer, J.P.(1974): Regulation of tyrosinase synthesis in *Neurospora* by cyclic AMP. *Proc. Fed. Am. Soc. Exptl. Biol.* **33**: 1467, Abstr.
- Greengard, P. and Costa, F.(1970): Role of cyclic AMP in cell function. *Raven Press*, New York.
- Galsky, A.H., Monoson, H.L., Pikul, F.J. and Thompson, J.S.(1972): Promotion of perithecial initial formation in the imperfect fungus *Monacrosporium doedycoides* by 6-methyl purine and its reversal by cyclic AMP. *Am. J. Botany* **59**: 669, Abstr.
- Konijn, Th. M., Barkley, D.S., Chang, Y.Y. and Bonner, J.T.(1968): Cyclic AMP: a naturally occurring acrasin in the cellular slime molds. *Amer. Naturalist* **102**: 225-234.
- Kamisaka, S.(1970): Auxin-induced growth of tuber tissue of Jerusalem artichoke. VII. Effect of cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate on the auxin induced cell expansion growth. In: Plant growth substances, D.J. Carr, Ed., p.654-660.
- Loprieno, N. and Schupbach, M.(1971): On the effect of caffeine on mutation and recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen.* **110**: 348-354.
- Larsen, A.D. and Sypherd, P.S.(1974): Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and morphogenesis in *Mucor racemosus*. *J. Bacteriol.* **117**: 432-438.
- Meyers, J.A. and Cook, R.J.(1972): Induction of chlamydospore formation in *Fusarium solani* by abrupt removal of the organic carbon substrate. *Phytopathology* **62**: 1148-1153.
- Perkins, J.P.(1973): Adenyl cyclase. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **3**: 1-64.
- Paznokas, J.L. and Sypherd, P.S.(1974): Respiratory capacity, cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and morphogenesis in *Mucor racemosus*. *J. Bacteriol.* **124**: 134-139.
- Pall, M.L.(1977): Cyclic AMP and the plasma membrane potential in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **252**: 7146-7150.
- Robinson, G.A., Butcher, R.W. and Sutherland, E. W.(1971): Cyclic AMP. *New York-London Academic Press*. pp.51-100.
- Rosenberg, G. and Pall, M.(1978): Cyclic AMP and cyclic GMP in germinating conidia of *Neurospora crassa*. *Arch. Microbiol.* **118**: 87-90.
- Sy, J. and Richter, D.(1972): Content of cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate and adenyl cyclase in yeast at various growth conditions. *Biochemistry* **2**: 2788-2791.
- Schlanderer, G. and Dellweg, H.(1974): Cyclic AMP and catabolite repression in yeast. *Eur. J. Biochem.* **49**: 305-316.
- Silverman, P.M. and Epstein, P.M.(1975): Cyclic nucleotide metabolism couples to cytodifferentiation of *Blastocladiella emersonii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**: 442-446.
- Tsuboi, M., Kamisaka, S. and Yanagishima, N. (1972): Effect of cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate on the sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant. Cell Physiol.* **13**: 585-588.
- Tsuboi, M. and Yanagishima, N.(1973): Effect of cyclic AMP, theophylline and caffeine on the glucose repression of sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **93**: 1-12.
- Uno, I. and Ishikawa, T.(1973): Purification and identification of the fruiting-inducing substances in *Coprinus macrorrhizus*. *J. Bacteriol.* **113**: 1240-1248.
- Uno, J. and Ishikawa, T.(1974): Effect of glucose on the fruit body formation and adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate levels in *Coprinus macrorrhizus*. *J. Bacteriol.* **120**: 96-100.
- Van Wijk, R. and Konijn, T.M.(1971): Cyclic 3', 5'-AMP in *Saccharomyces carlsbergensis* under various conditions of catabolite repression. *FEBS Lett.* **13**: 184-186.
- Zonneveld, B.J.M.(1976): The effects of glucose and manganese on adenosine 3', 5'-monophosphate levels during growth and differentiation of *Aspergillus niger*. *Arch. Microbiol.* **108**: 41-44.

Accepted for Publication 2 November 1987