

## Aspergillus nidulans 영양균사에서 효소전구체형 ChsC 활성의 검출

박범찬 · 박윤희 · 박희문\*

충남대학교 생명과학부 미생물학전공

*Saccharomyces cerevisiae*의 class I 키틴생합성 효소인 Chs1의 활성측정법을 적용하여 *Aspergillus nidulans*의 영양균사에서 class I 키틴생합성 효소인 ChsC의 활성측정을 시도하였다. 그 결과, *A. nidulans*의 class I 키틴생합성 효소도 효모류의 경우와 마찬가지로 트립신 처리에 의하여 활성화되는 효소전구체형태(zymogenic form)로 존재함을 알 수 있었다. 그리고 *A. nidulans* 야생형의 class I 키틴생합성 효소활성은 트립신 처리에 의하여 6배 가량 증가되었다. 반면, *chsC* 유전자가 파괴된 돌연변이주는 트립신 처리에 의하여 효소활성이 증가되지 아니하였을 뿐만 아니라, 효소활성의 수준도 트립신을 처리하지 아니한 야생형의 class I 키틴생합성 효소활성과 거의 동일한 수준이었다. 따라서, 트립신을 처리하여 측정할 *A. nidulans* 야생형의 class I 키틴생합성 효소활성 값에서 트립신을 처리하지 아니한 야생형의 class I 키틴생합성 효소활성을 제외한 값이 *A. nidulans* 야생형의 ChsC 효소활성임을 알았다. 이러한 조건을 토대로 영양균사 성장과정 동안 ChsC의 효소활성을 측정할 결과, *chsC* 유전자의 발현양상과 유사하게 액체배양상태의 영양균사가 무성분화능을 획득하는 시기로 알려진 시간대에 효소의 활성이 증가하였다. 이러한 결과는 이미 보고된 바와 같이 *chs* 유전자가 *A. nidulans*의 영양균사 성장에 관여함을 시사하고 있다.

**Key words** □ *A. nidulans*, ChsC, class I chitin synthase, vegetative hyphae, zymogen

세포의 형태를 유지하고 삼투압과 해로운 외부물질로부터 세포를 보호하는 등의 기능을 수행하는 곰팡이류의 세포벽은, 만노프로테인(mannoprotein), (1,3)/(1,6)-글루칸(glucan) 그리고 키틴(chitin)의 세 가지 성분에 의한 초월적 분자구조(supramolecular structure)로 구성되어 있다(8). 효모의 세포벽에서 글루칸이 전체 중량의 20~30%를, 키틴이 1~3%를 차지하고 있는 반면, 사상균류의 경우 전체 중량의 30% 이상을 키틴이 차지한다(8, 15). 키틴은 N-acetyl-D-glucosamine이  $\beta$ -1,4로 연결된 단일중합체로 곰팡이의 성장과 형태발생에 필수적인 요소이며, 특히 응용적인 측면에서는 항진균제의 표적이 될 수 있기 때문에 그 합성과정 등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

발효효모인 *Saccharomyces cerevisiae*의 키틴생합성은 Chs1, Chs2 및 Chs3의 세 가지 동위효소(isozyme)에 의해 이루어진다. Chs1은 모세포로부터 딸세포가 분리되는 과정동안 작용하는 키틴네이즈(chitinase)의 과도한 작용에 의하여 손상된 딸세포의 세포벽을 수선(repair)하는 기능을, Chs2는 딸세포와 모세포 사이에 형성되는 1차 격벽의 형성에, 그리고 Chs3는 격벽이 아닌 주변부의 세포벽(lateral wall), 딸세포와 모세포 사이의 키틴고리(chitin ring)와 그리고 접합과정에 발생하는 shmoo의 형성에 관여하는 것으로 밝혀졌다(15). 비록 *S. cerevisiae*의 세포벽을 구성하는 키틴의 90% 이상이 Chs3에 의하여 합성되지만 *in vitro*에서 활성은 Chs2보다 적어도 2배, Chs1보다 약 100배 낮은 것

로 밝혀졌다(3, 17). 이와 같이 세 개의 동위효소는 각기 다른 기능과 효소적 특성을 가지므로, 이러한 정보를 바탕으로 각각의 동위효소의 고유한 효소활성 측정법이 확립되었다. 일반적으로 키틴생합성 효소의 활성에는 특이적인 2가 양이온을 필요로 한다(11). Chs1의 효소활성은  $Mg^{2+}$ 나  $Mn^{2+}$ 을 필요로 하는 반면  $Co^{2+}$ 에 의해서는 저해를 받는다. 그러나 Chs2는  $Co^{2+}$  첨가에 의해 강하게 활성화되며,  $Mg^{2+}$ 나  $Mn^{2+}$ 에 의해서는 약하게 활성화된다(16). Chs3의 경우에는 Chs1과 2의 중간적인 특징을 보여,  $Mg^{2+}$ 와  $Co^{2+}$ 에 의해 비슷한 수준으로 활성화된다(3, 19).

사상균인 *Aspergillus nidulans*는 효모류와는 달리 전체중량의 40%를 키틴이 차지하며(18), 키틴 합성과 관련된 유전자로 *chsA*, *chsB*, *chsC*, *chsD*와 *csmA*가 알려져 있다(15). 다섯 개의 키틴생합성 효소 유전자는 균사생장과 분화과정 동안 각기 다른 기능을 수행하는 것으로 밝혀졌는데(1, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 18), 예를 들면, *chsB*는 정상적인 균사생장에 필수적이며(1), *csmA*는 균사의 모양유지와 세포벽의 극성과 관련이 있다(6). 한편, *chsA*, *chsC*와 *chsD*는 균사 성장과 무성분화에 있어서 중복되는 기능을 하는데, *chsA*는 *chsC*와 균사생장과 분생포자경 발달을(5), *chsD*와는 포자형성의 기능을 공유한다(10). 또한 *chsD*는 *chsB*와도 그 기능을 공유하여 균사생장에도 역할을 한다(7). 한편, *A. nidulans*의 ChsC는, 균사생장 동안 전사체가 검출되더라도 불구하고 *chsC* 유전자가 파괴된 돌연변이체에서 검출 가능한 표현형이 나타나지 않아 생체 내에서의 기능이 명확히 규명되지 못하였다(10). 이상과 같이 *A. nidulans*의 분화과정 동안 키틴생합성 유전자의 발현(조절)양상을 전사체 수준에서는 비교적 자세히 연구되

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 042-821-6417, Fax: 042-822-7367  
E-mail: hmpark@cnu.ac.kr

고 있으나, *S. cerevisiae*와는 달리 *A. nidulans* 키틴생합성 동위 효소의 활성을 개별적으로 측정할 수 있는 조건이 확립되지 아니하여 분화과정 동안 각 동위효소의 효소활성 변화를 조사하거나, 항체 등을 이용한 효소단백질 합성 양의 변화 등을 분석한 예가 없다.

따라서 본 연구에서는 *S. cerevisiae*의 세 가지 동위효소 중 시험관 내 효소 활성이 가장 높게 검출되는 Chs1과 같은 class I으로 분류되며(18), 기존의 보고와는 달리 전사체(transcript)의 발현 양상을 조사한 결과, *A. nidulans*의 분화과정 특히 무성생식과정 및 유성생식과정에서 특정한 기능을 수행할 가능성이 높은 것으로 조사된 *chsC* 유전자(9, 13, 14) 발현산물인 ChsC의 효소활성 측정조건을 조사 하였다. 이를 위하여 균사체 및 효소원의 수득이 용이한 액체배지에서 영양균사를 배양한 후 배양시간 별로 수득하여, *chsC* 전사체의 양을 확인하는 한편, *S. cerevisiae*의 Chs1 효소 활성측정법을 응용하여 *A. nidulans* ChsC의 효소활성 측정을 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양 조건

실험과정에 사용된 균주는 *Aspergillus nidulans* FGSC A610 (*vA2 pabaA1 veA1*), FGSC A26(*biA1, veA1*)과 RDC13(*vA2 pabaA1 chsC::argB argB::trpCB trpC801 veA1*)(14)이며, 완전배지[complete medium(CM) 0.15% casamino acid, 0.15% yeast extract, 1% glucose, 1× vitamin solution, 1× mineral salt solution)에서 16시간까지 진탕배양하여 시간대 별로 영양균사를 얻었다.

50 mineral salt stock solution의 조성은 152 g/l NaNO<sub>3</sub>, 26 g/l MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 152 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 g/l KCl, 4 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 0.4 g/l ZnCl<sub>2</sub>, 0.008 g/l MnCl<sub>2</sub>, 0.032 g/l CuSO<sub>4</sub> 그리고 0.127 g/l FeCl<sub>2</sub>이며, 100× vitamin solution은 250 mg/l *p*-aminobenzoic acid, 250 mg/l pyridoxine, 250 mg/l thiamin-HCl, 1 mg/l biotin, 50 mg/l nicotinic acid, 250 mg/l ascorbic acid 그리고 250 mg/l folic acid이다.

### 키틴생합성 효소원의 제조

완전액체배지에서 10, 12, 14 그리고 16시간 동안 진탕배양하여 생성된 균사를 Mira cloth (Calbiochem, UK)로 여과하고, 차가운 증류수와 TM 완충용액 (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 25 mM MgCl<sub>2</sub>)로 세척하였다. TM 완충용액을 제거한 뒤, 액체질소로 급냉하여 연마하였다. 연마한 세포를 5 ml/g의 TM 완충용액에 현탁하여 homogenizer로 섞어 주었다. 세포 슬러리를 3,000×g, 4°C에서 10분간 원심분리한 뒤 상층액을 취하여 60,000×g, 4°C에서 45분간 초원심분리하였다. 원심분리 후 침전물을 차가운 TE 완충용액 (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA)로 현탁한 후, homogenization 하여 40,000×g, 4°C에서 30분간 초원심 분리하였다. 초원심분리하여 얻어진 침전물은 차가운 TG 완충용액 (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 33% Glycerol) 0.5 ml에 현탁하여 즉시 사용하거나 -70 °C에서 보관하였다. 단백질의 농도는 BCA

(Sigma, USA)법으로 측정하였다.

### 키틴생합성 효소활성 측정

키틴생합성효소의 활성은 Bulawa(2)의 방법을 변형하여 측정하였다. 야생형인 FGSC A610과 *chsC*가 파괴된 돌연변이주인 RDC13를 대상으로 키틴으로 전환된 전체 UDP-N-acetyl-D-glucosamine의 양을 측정하였다. 각각의 효소활성은 각기 세 번 반복하여 측정하였다. 또한 반응액 50 µl에는 30~80 µg의 단백질, 5 µl [<sup>14</sup>C]UDP-N-acetyl-D-glucosamine (NEN<sup>TM</sup> Life Science, USA; specific activity 200 mCi/mmol), 20 mM UDP-N-acetyl-D-glucosamine (Sigma, USA), 1,600 mM N-acetyl-D-glucosamine (Sigma, USA), 200 mM Tris-Cl (pH 7.4)과 100 mM MgCl<sub>2</sub>이 포함되어 있다. 반응액을 30°C에서 1시간 30분 반응시킨 뒤, 10% Trichloroacetic acid 4 ml 첨가하여 반응을 종료시키고 25 mm glass microfiber filters (type GF/C, Whatman, USA)를 사용하여 여과하였다. 여과지를 100% 에탄올로 두 번 세척한 뒤 액체섬광계수기(Microbeta Trilux, LKB Wallac, USA)를 사용하여 생성된 키틴에 포함된 방사능의 양을 측정하였다.

효소활성의 분석에 있어서 트립신(trypsin)의 전처리에 의한 효소활성의 증대여부를 조사하고자, 반응액 준비 시 다양한 농도의 트립신 용액 (300 µg/ml trypsin type III from bovine pancreas; Sigma, USA)을 30~80 µg의 단백질에 첨가하여 최종부피가 40 µl이 되게 하고, 이 반응액을 30°C에서 15분 반응시킨 뒤 soybean (Sigma, USA) 유래의 트립신 저해제 (450 µg/ml)을 2 µl 첨가하여 트립신의 작용을 정지시킨 후 키틴생합성 효소활성을 측정하였다.

### 전사체의 분석

*A. nidulans*의 균사체를 액체질소로 급랭시킨 다음 곱게 연마하고 0.2 g/ml이 되도록 GT 완충용액 (4 M guanidium thiocyanate, 25 mM sodium acetate, pH 6.0), 0.5% N-lauryl sarcosyl, 0.84% -mercaptoethanol)에 녹인 후 균질화시키고 원심분리하여 침전물을 제거하여 2 ml의 5.7 M CsCl solution (5.7 M CsCl, 25 mM sodium acetate, pH 6.0) 위에 조심스럽게 얹었다. SW55Ti (Beckman, USA) swing rotor로(125,000×g)로 18시간 동안 원심분리하여 얻은 pellet을 600 µl의 0.1% DEPC가 처리된 TES 완충용액(10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.1% SDS)에 녹이고 동량의 PCI (phenol/chloroform, chloroform=25:24:1, pH 4.5)처리 후 상층액만을 취하였다. 이 과정을 두 번 반복한 뒤 상층액에 두 배의 에탄올 첨가시켜 -70°C에서 보관하였다.

6% 포름알데히드가 포함된 1%의 변성 아가로즈 젤 (denaturation agarose gel)에 레인당 총 20~40 µg의 RNA를 적정한 후 MOPS 완충용액을 사용하여 전기영동하고 0.1% DEPC가 처리된 증류수로 포름알데히드를 제거하였다. 모세관 전이법(capillary blotting)으로 Hybond-N membrane (Amersham Pharmacia)에 RNA를 전이시키고, 젤 찌거기를 제거한 다음 UV cross-linker (Hoefer, USA)내에서 1200 µJ/cm<sup>2</sup>로 2분간 RNA를 고정시켰다. 탐침자로 사용할 DNA절편은 *chsC*에 대하여 특이적인 프라이머 쌍을 이용해 PCR로 증폭하였고(12), 무작위 탐침자 DNA 표지법

(random primed DNA labeling)으로 표지하였다. RNA가 부착된 막은 융합완충용액(hybridization buffer: 5× Denhardt's solution, 0.1% SDS, 5×SSC, 50% deionized formamide, carrier DNA 100 µg/ml)에서 2시간 동안 42°C에서 전 반응시킨 후 변성시킨  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP-표지-탐침자를 첨가하여 16시간 동안 반응시키고 1차 세척액 (2× SSC, 0.1% SDS)으로 42°C에서 5분, 15분간 2회 세척하고, 2차 세척액 (0.2× SSC, 0.1% SDS)으로 42°C에서 15분간 2회 세척하였으며, 3차 세척액 (0.1× SSC, 0.1% SDS)으로 68°C에서 30분간 2회 세척하였다. 2× SSC로 세척한 Blot은 공기 중에서 말린 후 X-ray 필름 (Kodak BIOMAX film)으로 감광시켰고, 노출이 끝난 필름은 현상액, 물, 고정액의 순서로 현상하여 확인하였다.

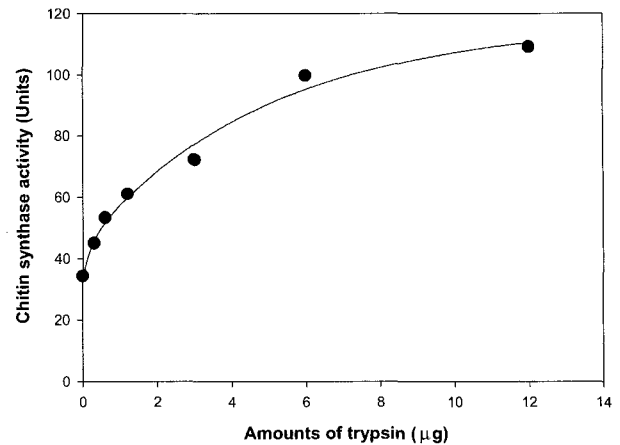
## 결과 및 고찰

### ChsC의 키틴생합성 효소활성 검출

본 연구에서는 *A. nidulans*의 키틴생합성 동위효소 중 *S. cerevisiae*의 Chs1과 동일한 class I 키틴생합성효소에 속하여 상대적으로 시험관 내 효소활성이 가장 높을 것으로 예상되며, 해당 유전자가 파괴된 균주가 확보되어 있어 모든 동위효소가 다 발현될 야생형과의 비교실험이 가능한 ChsC의 효소활성을 측정해 보고자 하였다. ChsC의 효소활성 측정에 필요한 효소원으로는 특별한 분화상태를 보여주지 아니하는 상태인 영양균사를 상대적으로 충분히 얻을 수 있는 액체배양제로부터 분리한 막단백질분획을 사용하였다. 즉 *chsC* 유전자가 정상적으로 존재하는 야생형인 FGSC A610와 *chsC* 유전자만 파괴되고 나머지 유전적 배경이 동일한 RDC13 (*chsC* 균주) 균주를 액체배양하여 얻은 균사체로부터 막단백질 분획을 분리하여 ChsC의 키틴생합성 효소활성을 측정하였다. ChsC의 효소반응 및 활성측정 조건은 *S. cerevisiae*의 Chs1의 활성측정 조건을 기본으로 이를 변형하여 수행하였다.

우선 지금까지 곱광이에서 조사된 대부분의 키틴생합성효소가 효소전구체(zymogen) 형태로 존재하여 트립신 등의 단백질 가수분해효소로 전처리 하여야만 효소가 활성화되는 것으로 알려져 있으므로(11), *A. nidulans*의 ChsC도 효소전구체형으로 존재하는지 확인하고자 야생형인 A610의 막단백질분획을 다양한 농도의 트립신으로 처리한 후, 그 활성을 측정하여 보았다. 그 결과 Fig. 1에 나타난 것처럼, 트립신을 처리하지 않은 경우에는 효소활성이 낮았으나, 트립신 처리 농도가 증가함에 따라 효소활성이 증가하였다. 그러나, 트립신 농도가 아주 높은 경우에는 효소의 활성의 증가폭이 오히려 감소하는 경향을 나타내므로 효소전구체형의 ChsC를 활성화시키기 위한 트립신의 처리농도를 120 µg/ml로 정하였다.

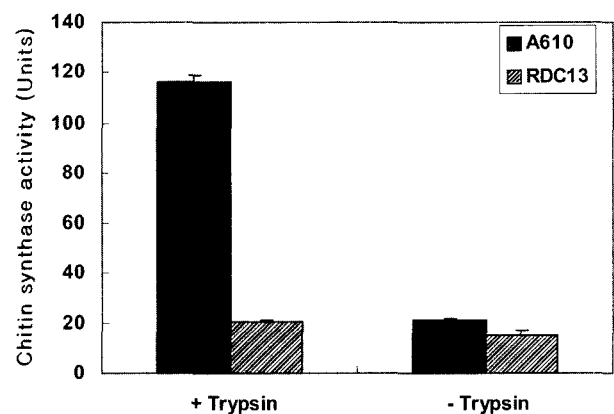
한편, 키틴생합성 효소활성의 측정을 위하여 적용된 반응조건이 *A. nidulans*에서 발견되는 다수의 키틴생합성 동위효소 중 ChsC의 활성을 선택적으로 측정하는 것인지를 확인하기 위하여, 야생형인 A610과 *chsC* 돌연변이주인 RDC13의 키틴생합성 효소활성을 측정하여 비교하여 보았다. 그 결과, Fig. 2에서 보여진 것처럼, 트립신을 처리하지 않은 경우에는 야생형과 돌연변이형



**Fig. 1.** Effect of trypsin concentration on activation of zymogenic class I chitin synthase activity in vegetative hyphae of the *Aspergillus nidulans* FGSC A610. Each reaction was carried out in triplicate. Incorporation of UDP-GlcNAc into an insoluble product was measured and converted to specific activity (unit). One unit means 1 nmole of UDP-GlcNAc incorporated per 1 hour and 1 mg protein.

두 균주의 효소활성이 거의 차이가 없을 정도의 동일한 수준으로 아주 낮게 검출되었으며, 트립신을 처리하여 효소전구체 단백질의 부분적인 분해를 유도하였을 때, *chsC* 균주의 효소활성은 무시할 수준의 증가를 보인 반면, 야생형은 약 6배 가량 증가하는 것으로 조사 되었다. 이상의 결과로 볼 때, 트립신을 처리하지 아니한 조건에서 검출되는 야생형과 돌연변이형의 효소활성은 ChsC가 아닌 다른 동위효소의 활성에 해당하는 것으로 트립신 처리에 무관하게 일정한 수준으로 검출됨을 알 수 있다.

따라서, Fig. 1과 Fig. 2의 결과를 종합해 보면, *S. cerevisiae* Chs1의 활성측정에 사용되는 효소반응조건이 동일한 class I에 속하는 키틴생합성 효소, 특히 *A. nidulans* ChsC의 효소활성 측정에 적용될 수 있으며, 트립신을 처리한 후 측정된 효소활성 값



**Fig. 2.** Class I chitin synthase activity of wild type (A610) and *chsC* strain (RDC13). Reactions were carried out with trypsin or without trypsin. Incorporation of UDP-GlcNAc into an insoluble product was measured and converted to specific activity (unit). One unit means 1 nmole of UDP-GlcNAc incorporated per 1 hour and 1 mg protein.

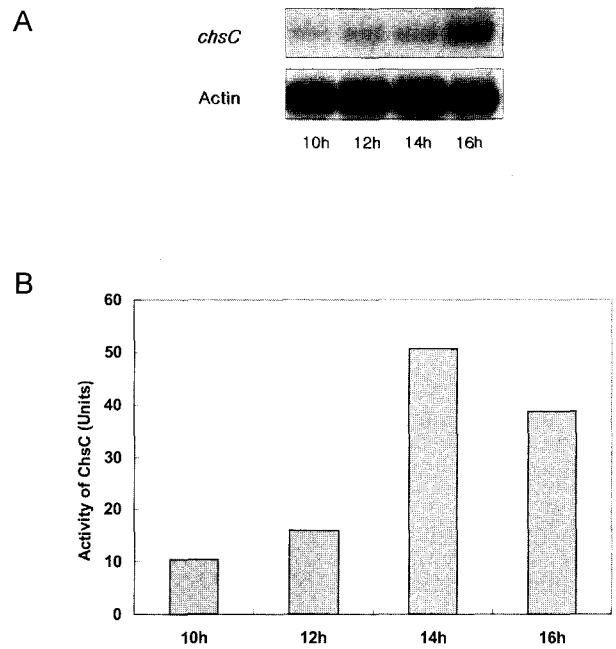
으로부터 대조구에 해당하는 트립신을 처리하지 않은 상태에서 검출되는 비특이적 효소활성 값을 제하면 ChsC에 의한 키틴생합성 효소활성을 선택적으로 측정할 수 있음을 알 수 있다. 또한 *A. nidulans* ChsC가 대다수의 곰팡이 유래 키틴생합성 효소와 마찬가지로 효소전구체 형태로 존재함을 확인하였다.

**영양균사 성장과정의 *chsC* 발현과 ChsC 효소활성의 변이 양상**

기존의 연구에 의하면 균사성장 동안 *chsC* 전사체가 검출됨에도 불구하고, *chsC* 유전자가 파괴에 따른 특이적인 표현형의 변화가 관찰되지 아니한다고 하였다(10). 그러나 본 연구진의 조사 결과에 의하면, *chsC* 유전자는 *chsA* 유전자와 함께 세포분열주기의 G1기 때 최대로 발현되고, 성장중인 균사체에서 잘 검출되어 균사벽의 확장 및 세포벽 견고성 유지에 필요한 키틴의 생합성에 관여할 가능성이 확인되었으며(12), 무성생식과정 동안 분화조절 인자인 *AbaA*에 의하여 전사체의 발현이 증대되었다(18). 특이하게도 고체배지 상에서 무성분화가 유도되기 전의 영양균사에서 전사체의 양이 점진적으로 증가하다가 무성생식과정 동안에는 아직 낮은 수준으로 유지되었으며, 유성생식과정의 후반부에 전사체의 발현이 일시적으로 급격히 증가하였다 사라지는 것으로 조사되었다(10). 한편, 액체배양으로 얻어진 영양균사는 육안으로 인식될 만한 형태변화를 수반한 분화가 유도되지 않으나, 대략 12시간 정도의 배양시간이 경과하면 고체배지 상에서 유도되는 무성분화능을 획득하는 것으로 알려져 있다(14).

따라서, 앞서 실험으로 확정된 ChsC 효소활성법을 근거로 *A. nidulans*의 *chsC* 발현양상(전사체의 양 변화)과 ChsC 효소활성과의 상관관계를 조사하기 위한 방편으로 액체배양 시기별로 영양균사 수득하여 대상으로 전사체의 발현량 변화와 효소활성의 변화를 측정하여 보았다. 수득한 영양균사로부터 총 mRNA를 분리한 후 *chsC*에 특이적인 DNA 탐침자를 이용하여 발현양상을 살펴 본 결과, Fig. 3A에서 보듯이 *chsC* 전사체의 발현은 균사생장이 진행됨에 따라 계속 증가하였다. 이러한 증가 추세는 무성분화 시기에도 지속되는 것으로 알려져 있다(10). 한편 영양균사 성장 동안의 ChsC 효소활성을 측정해 본 경우(Fig. 3B), 전사체의 발현양상과 유사하게, 균사생장이 진행됨에 따라 ChsC의 활성이 증가하였으나 배양 16시간째에 약간 감소하는 양상을 보였다. 이러한 양상은 배양 16시간까지 *chsC* 전사체의 발현량이 지속적으로 증가한 변화추이와는 약간의 차이를 보이는 것인데, 이러한 차이는 전사체 분석과 효소활성 분석에 사용된 각각의 야생형 균주인 FGSC A26 (*biA1, veA1*)과 FGGSC A610 (*yA2 pabaA1 veA1*)의 유전적 배경의 차이에 의한 성장률의 차이 등에서 비롯된 것으로 해석 된다.

그러나, 전사체의 발현량 증가양상과 효소활성의 증가 양상이 약간의 차이가 있음에도 불구하고 전체적으로 14시간 내지 16시간 이후에 전사체의 발현과 및 효소활성의 증가가 두드러지는 현상은, 액체배지에서의 균사성장 12시간 경과 한 후에는 무성분화가 가능하게 하는 분화능(developmental competency)을 획득하게 된다는 보고(14)와 무성분화조절인자인 *AbaA*에 의하여 *chsC*



**Fig. 3.** Northern analysis of *chsC* expression (A) and ChsC chitin synthase activity (B) in vegetative hyphae. Vegetative hyphae were collected from liquid cultures at 10, 12, 14 and 16 h after media had been inoculated with conidia of the wild type strain FGSC A26 (*biA1, veA1*). Northern blot analysis was performed with the probe specific to the *chsC* gene (A). Chitin synthase activity was measured by using the membrane preparations from the vegetative hyphae of the wild type strain FGSC A610 as crude enzyme sources. In each measurement, enzyme activity without the trypsin-pretreatment was accounted as a negative control. One unit means 1 nmole of UDP-GlcNAc incorporated per 1 hour and 1 mg protein (B).

의 발현이 조절된다는 기존의 보고(9, 13, 14)와 함께, *chsC* 유전자 및 그 산물이 영양균사의 정상적인 성장 과정과 무성분화 과정에도 일정 부분 관여하고 있음을 시사하는 것이다.

이상의 결과로부터 *A. nidulans*의 class I 키틴생합성 효소인 ChsC의 효소활성은 [<sup>14</sup>C]UDP-N-acetyl-D-glucosamine 등으로 구성된 기질과 효소원인 막단백질이 포함된 반응액에 120 μg/ml의 농도로 트립신을 첨가한 뒤 30°C에서 15분 반응시키고, 트립신 저해제 (450 μg/ml)을 2 μl 첨가하여 트립신의 작용을 정지시킨 후, 1시간 30분 동안 반응시키면 측정이 가능한 것으로 판명되었다. 따라서, 앞으로 본 논문에서 확인된 ChsC의 효소활성 측정법으로 무성분화 과정 및 유성분화 과정 동안의 ChsC 효소활성 변화를 기존에 조사된 *chsC*의 전사체 발현 양상과 비교한다면 아직 규명되지 아니한 *A. nidulans*의 성장 및 분화와 연관된 *chsC*의 세포 내 기능을 규명할 수 있는 새로운 정보를 얻을 수 있으리라 판단된다.

**감사의 말**

본 연구의 일부는 한국학술진흥재단의 순수기초연구그룹 지원

사업(과제번호: KRF-2002-070-C00079)에 의하여 수행되었음.

### 참고문헌

- Borgia, P.T., N. Iartchouk, P.J. Riggle, K.R. Winter, Y. Koltin, and C.E. Bulawa. 1996. The *chsB* gene of *Aspergillus nidulans* necessary for normal hyphal growth and development. *Fungal Genet. Biol.* 20, 193-203.
- Bulawa, C.E., M. Slater, E. Cabib, J. Au-Young, A. Sburlati, W.L. Jr. Adair, and P.W. Robbins. 1986. The *Saccharomyces cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis *in vivo*. *Cell* 46, 213-225.
- Choi, W.J. and E. Cabib. 1994. The use of divalent cations and pH for the determination of specific yeast chitin synthetases. *Anal. Biochem.* 219, 368-372.
- Fujiwara, M., H. Horiuchi, A. Ohta, and M. Takagi. 1997. A novel fungal gene encoding chitin synthase with a myosin motor-like domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 75-78.
- Fujiwara, M., M. Ichinomiya, T. Motoyama, H. Horiuchi, A. Ohta, and M. Takagi. 2000. Evidence that the *Aspergillus nidulans* class I and class II chitin synthase genes, *chsC* and *chsA*, share critical roles in hyphal wall integrity and conidiophore development. *J. Biochem. (Tokyo)*. 127, 359-366.
- Horiuchi, H., M. Fujiwara, S. Yamashita, A. Ohta, and M. Takagi. 1999. Proliferation of intrahyphal hyphae caused by disruption of *csmA*, which encodes a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 181, 3721-3729.
- Ichinomiya, M., T. Motoyama, M. Fujiwara, M. Takagi, H. Horiuchi, and A. Ohta. 2002. Repression of *chsB* expression reveals the functional importance of class IV chitin synthase gene *chsD* in hyphal growth and conidiation of *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 148, 1335-1347.
- Lagorce, A., V. Le Berre-Anton, B. Aguilar-Uscanga, H. Martin-Yken, A. Dagkessamanskaia, and J. Francois. 2002. Involvement of *GFAI*, which encodes glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase, in the activation of the chitin synthesis pathway in response to cell-wall defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 269, 1697-1707.
- Lee J.I., J.H. Choi, B.C. Park, Y.H. Park, M.Y. Lee, H.M. Park, and P.J. Maeng. 2004. Differential expression of the chitin synthase genes of *Aspergillus nidulans*, *chsA*, *chsB*, and *chsC*, in response to developmental status and environmental factors. *Fungal Genet. Biol.* 41, 635-646.
- Motoyama, T., M. Kojima, H. Horiuchi, A. Ohta, and M. Tagagi. 1994. Isolation of a chitin synthase gene (*chsC*) of *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 2254-2257.
- Orlean, P. 1987. Two chitin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 262, 5732-5739.
- Park, B.C., P.J. Maeng, and H.M. Park. 2001. Cell cycle-dependent expression of chitin synthase genes in *Aspergillus nidulans*. *J. Microbiol.* 39, 74-78.
- Park, B.C., Y.H. Park, and H.M. Park. 2003. Activation of *chsC* transcription by *AbaA* during asexual development of *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 220, 241-246.
- Park, B.C. 2002. Ph.D. Thesis. Chungnam National University, Daejeon, Korea
- Roncero, C. 2002. The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr. Genet.* 41, 367-378.
- Sburlati, A. and E. Cabib. 1986. Chitin synthetase 2, a presumptive participant in septum formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 261, 15147-15152.
- Shaw, J.A., P.C. Mol, B. Bower, S.J. Silverman, M.H. Valdivieso, A. Duran, and E. Cabib. 1991. The function of chitin synthases 2 and 3 in *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol.* 114, 111-123.
- Specht, C.A., Y. Liu, P.W. Robbins, C.E. Bulawa, N. Iartchouk, K.R. Winter, P.J. Riggle, J.C. Rhodes, C.L. Dodge, D.W. Culp, and P.T. Borgia. 1996. The *chsD* and *chsE* genes of *Aspergillus nidulans* and their roles in chitin synthesis. *Fungal Genet. Biol.* 20, 153-167.
- Valdivieso, M.H., L. Ferrario, M. Vai, A. Duran, and L. Popolo. 2000. Chitin synthesis in *gasI* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 182, 4752-4757.

(Received 25 May, 2004/Accepted 16 June, 2004)

### ABSTRACT: Detection of Zymogenic ChsC Activity in Vegetative Hyphae of *Aspergillus nidulans*.

Bum-Chan Park, Yun-Hee Park, and Hee-Moon Park (Department of Microbiology, School of Bioscience and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea)

In the vegetative hyphae of *Aspergillus nidulans*, a zymogenic form of the class I chitin synthase activity was successfully measured by the assay condition for *Saccharomyces cerevisiae* class I chitin synthase, Chs1. The class I chitin synthase activity of the *A. nidulans chsC* wild type strain was increased about six-fold by trypsin-pretreatment, but that of the *chsC* disruption strain revealed no increase. Interestingly enough, level of the class I chitin synthase activity of the *chsC* disruption strain was almost the same as that of the *chsC* wild type without trypsin-pretreatment. These results indicated that the *A. nidulans* ChsC activity could be measured by accounting the class I chitin synthase activity without the trypsin-pretreatment as an internal control. Consistence to the expression pattern of the *chsC* revealed by northern blot analysis, the activity of ChsC was increased upon reaching the culture time for acquiring developmental competence. Our results shown here also supported the previous report suggesting the possible involvement of ChsC in vegetative hyphal growth of *A. nidulans*.