

*Aspergillus niger*에서 단백질분해효소 결함 돌연변이주의 제조 및 특성규명

정현세 · 채순기¹ · 박희문 · 맹필재 · 김정윤*

충남대학교 미생물학과, ¹배재대학교 생화학과

Isolation and Genetic Characterization of Extracellular Protease-deficient Mutants in *Aspergillus niger*. Heon Se Jeong, Suhn-Kee Chae¹, Hee Moon Park, Pil Jae Maeng and Jeong-Yoon Kim*. Department of Microbiology, Chungnam National University, Taejeon 302-705, Korea, ¹Department of Biochemistry, Pai Chai University, Taejeon 305-764, Korea - Several protease-deficient mutants of *Aspergillus niger* have been isolated by halo-screening on skim milk plate after UV irradiation of conidiospores. The extracellular proteolytic activities of the mutant strains grown in an optimized medium varied from 3% to 85% of that of the parental strain. Especially, two mutant strains named as ANPD-129 and ANPD-153, which had 3% and 49% of acid protease activity of the parental strain, respectively, were further characterized both physiologically and genetically. The growth rates of the mutants, ANPD-129 and ANPD-153, were similar to that of the parental strain, unlike other protease-deficient mutants. The diploid formed between the two mutants restored protease activity to a similar level of that of the parental strain. This result revealed that ANPD-129 and ANPD-153 had mutations at different loci. Using master strains with marked chromosomes these loci were assigned to linkage groups. The mutation locus (*prt129*) in ANPD-129 was assigned to linkage group VI and the locus (*prt153*) in ANPD-153 to linkage group III.

*Aspergillus*를 포함하는 사상균은 효소, 유기산 및 약리 활성이 있는 대사산물을 생산하는 유용한 미생물로 식품 산업, 주류산업, 의약품 뿐만 아니라 농업에도 유용하게 이용되어 왔다(1, 2). *Aspergillus* 속 균류들은 aflatoxin을 생산하는 몇몇 종을 제외하면 대부분 인체에 무해한 것으로 알려져 있으며, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* 등은 오래전부터 세포외 효소 및 유기산의 생산 그리고 전통발효식품의 생산에 사용되었기 때문에 안전한 균주로 인식이 되어왔다. 최근에는 *Aspergillus* 속 균류들은 이들이 가지고 있는 단백질분해 능력과 고등 진핵세포와 유사한 단백질 분해체계 때문에 고등 진핵세포 유래의 고부가가치의 이종단백질(heterologous protein)을 생산하기 위한 유용한 균주로 인식되고 있다(2-13).

*Aspergillus*를 숙주로 하여 이종유전자를 효율적으로 발현하는 체계를 확립하는데 반드시 고려해야할 요소는 숙주 균주 자체에서 만들어지는 단백질분해효소이다. 즉, *Aspergillus* 속 균류들은 세포외로 단백질분해효소를 분비하여 생산된 이종단백질을 분해하기 때문에 이종단백질 생산효율이 크게 낮아지게 된다(14). 이를 극복하기 위해서는 원하는 산물의 생산에는 영향을 미치지 않으나

단백질분해효소의 발현을 억제하는 발효조건을 조성하거나, 단백질분해효소를 만들지 못하는 혹은 적게 만드는 단백질분해효소 결함 돌연변이 숙주를 개발하는 것이 필요하다. 현재까지 *A. niger*에서는 7가지 단백질분해효소 유전자(*pepA, B, C, D, E, F, G*)가 클로닝되었다(15-20). 전체 단백질분해효소 활성의 80-85%를 차지하는 것으로 알려진 PepA(*Aspergillopepsin A*)는 aspartyl protease로 산성조건에서 활성을 나타내는 pepsin 계열의 세포외 단백질분해효소이고, PepB는 산성조건에서 활성을 나타내는 aspartyl protease이지만 non-pepsin 계열의 endopeptidase이다(14, 16). 이밖에 subtilisin type의 단백질분해효소인 PepC(15)와 alkaline protease인 PepD는 둘 다 serine 계열의 단백질분해효소이고, PepE는 aspartyl protease, PepF와 PepG는 serine carboxypeptidase인 것으로 알려졌다(17-20).

본 논문에서는 이종유전자 발현을 위한 숙주로 *A. niger*를 사용할 때 발생하는 문제점인 세포외 단백질분해효소에 의한 발현 산물의 분해를 해결하기 위한 한 방법으로서 단백질분해효소 결함 돌연변이주의 개발을 시도하였다. 또한, 자외선을 돌연변이 유발원으로 사용하여 얻은 단백질분해효소 결함 돌연변이주들의 생리적인 특성을 규명하고, 각 돌연변이주들끼리의 complementation test를 수행하여 allelism을 알아보았고, parasexual cycle을 이용하여 chromosome mapping(1, 21, 22)을 수행

*Corresponding author

Tel. 82-42-821-6419, Fax. 82-42-822-7367

E-mail: jykim@hanbat.chungnam.ac.kr

Key words: *Aspergillus niger*, Protease-deficient mutant, Chromosome mapping

Table 1. Genotypes of *A. niger* strains used in this study

Strains	Linkage group								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	?
FGSC A907			<i>bioA1</i>	<i>leuA1</i>	<i>nicA1</i>	<i>pabA1</i>	<i>nirA1</i>	<i>oliC2</i>	
FGSC A807	<i>olv1</i>	<i>hisD4</i>	<i>lysA7, bioA1</i>	<i>argF8</i>	<i>nicA1</i>	<i>pabA1</i>			
FGSC A739	<i>fwnA1</i>		<i>lysA7</i>						
FGSC A798			<i>argB2</i>						
ANPD-129			<i>argB2</i>						<i>prt129</i>
ANPD-153			<i>argB2</i>						<i>prt153</i>
F129H49	<i>fwnA1</i>		<i>lysA7</i>						<i>prt129</i>
F129H24	<i>fwnA1</i>		<i>argB2</i>						<i>prt129</i>
F153H39	<i>fwnA1</i>		<i>argB2</i>						<i>prt153</i>

함으로써 이들에 대한 유전학적인 분석을 시도하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에서 단백질분해효소 결함 돌연변이주를 제조하기 위한 모균주는 *A. niger* FGSC A798을 사용하였고, chromosome mapping을 위해서는 *A. niger* FGSC A907, A807과 *A. niger* FGSC A739를 사용하였다. 각 균주의 유전자형(genotype)은 Table 1에 나타내었다. 일반적인 배양은 고체완전배지(Yeast extract 1.5 g/l, Casamino acid 1.5 g/l, Glucose 10 g/l, Trace element solution 1 ml/l, Vitamine solution 1 ml/l)를 사용하였고, 단백질분해효소 결함 돌연변이주의 선별시에는 Protease Induction Media, PIM, (Glycerol 20 g/l, KH₂PO₄ 1.5 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/l, KCl 0.5 g/l, Arginine · HCl 0.3 g/l, Trace element solution 1 ml/l, 20X Salt mix 50 ml/l, Skim milk 10 g/l)와 Corn Starch Media, CSM, (Glucose 1 g/l, Corn starch 10 g/l, Arginine · HCl 0.3 g/l, 1 M MgSO₄ · 7H₂O 2 ml/l, Trace element solution 1 ml/l, 20X Salt mix 50 ml/l)를 사용하였다. 여러 가지 기질에 의한 단백질 분해효소 활성의 변화를 조사하기 위해서는 Protease Induction Media(PIM)를 적절히 변형시켜 사용하였다. 돌연변이주에 대한 chromosome mapping을 수행하기 위해서는 최소고체배지(Minimal Media)와 균주에 따라 요구되는 영양분을 최소고체배지에 적절히 첨가하여 제조한 배지를 사용하였다. 20X Salt mix는 1 liter 당 NaNO₃ 120 g (또는 NH₄Cl 74.5 g), KH₂PO₄ 16.3 g, K₂HPO₄ 20.9 g, KCl 10.4 g을 포함하고 있으며, Trace element solution은 1 liter 당 ZnSO₄ · 7H₂O 22 g, H₃BO₃ 11 g, MnCl₂ · 4H₂O 5 g, FeSO₄ · 7H₂O 5 g, CoCl₂ · 6H₂O 1.6 g, CuSO₄ · 5H₂O 1.6 g, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O 1.1 g, EDTA (disodium salt) 7.7 g을 포함하고 있으며, Vitamine solution은 1 liter 당 pyridoxin-HCl 0.1 g, thia-

min-HCl 0.15 g, para-aminobenzoic acid 0.75 g, nicotinic acid 2.5 g, riboflavin 2.5 g, choline-HCl 20 g, biotin 25 mg을 포함하고 있다. 모든 고체배지에는 agar를 2% 첨가하였고, colony의 크기를 작게하기 위하여 Triton X-100을 0.1% 되도록 첨가하였다. 배양온도는 모든 경우에 30℃를 유지하였으며, 진탕배양 시에는 200 rpm의 속도로 진탕을 하였다.

돌연변이의 유발 및 선별

완전고체배지에서 3일간 배양한 *A. niger* FGSC A798을 3 ml의 0.0001% Tween 80 용액으로 수확하여 포자 현탁액을 제조하였다. Haemocytometer (Marienfeldt, Germany)를 사용하여 포자수를 측정하고 100-300개의 포자를 skim milk가 첨가된 PIM 고체배지에 도달한 다음에 10-20%의 포자만 살아남도록 자외선을 조사(0.8 J/m²/sec, 4 min.)한 후 30℃에서 3-4일간 배양하였다. 자외선을 조사한 PIM 고체배지에서 자란 콜로니(colony) 중 모균주와 비교하여 투명환(clear ring)이 작거나 없는 것을 1차 선별하였다. 1차 선별된 돌연변이주들을 PIM 고체배지 및 CSM 고체배지에 각각 접종하여 CSM 배지에서는 투명환을 정상적으로 형성하지만 PIM 배지에서는 투명환을 형성하지 못하거나 작게 형성하는 돌연변이주들을 2차 선별하였다. 2차 선별시 CSM 고체배지에서 형성되는 투명환은 세포 외로 분비되는 amylase에 의해 corn starch가 분해되어 형성되는 것이므로 CSM 고체배지에서 투명환을 형성하지 못하는 균주는 일반적인 단백질 분비 기작(secretion pathway)에 결함이 발생한 균주로 간주하고 단백질분해효소 결함 돌연변이주의 선별에서 제외시켰다.

단백질분해효소 활성 측정

단백질분해효소의 활성을 측정하기 위한 기질로는 Hammarstein casein(Merck)을 사용하였다. 준비된 기질 용액 0.2 ml에 배양여액을 0.2 ml 첨가하고, 37℃ 항온수조에서 두 시간 반응시킨 후 0.4 M Trichloroacetic

acid (TCA) 0.6 ml을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 원심 분리한 후 상등액을 모아 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. Acid protease는 pH 3.0 그리고 alkaline protease는 pH 8.0 조건하에서 반응시켰다. 표준곡선은 1.81 mg의 tyrosine을 100 ml의 0.2 M HCl에 녹여 standard tyrosine solution을 제조하여 작성하였다. 분당 1 μ mole의 tyrosine이 방출되는 것을 1 unit로 정의하였으며, 활성도는 unit/g dry cell weight로 정의하였다. 단백질 정량은 Lowry의 방법을 변형하여 수행하였다(23).

단백질분해효소 결함 돌연변이주의 생장

50 ml의 PIM 배지가 들어있는 250 ml의 진탕 배양용 플라스크를 준비한 후 각 균주마다 15 내지 20 개의 플라스크에 동일한 갯수의 포자(10^6 spores/ml)를 접종하였다. 배양을 하면서 일정한 시간마다 2-3 개씩의 플라스크를 채취하여 각각을 여과하고 균사체의 건조중량을 측정하여 평균값을 구하였다.

Complementation test

최종 선별된 단백질분해효소 결함 돌연변이주들 (ANPD-129, ANPD-153)이 서로 다른 혹은 같은 유전자 위치에 결함을 가진 것인지를 확인하기 위하여 complementation test를 수행하였다. 이들 두 균주가 모두 *argB* mutant이기 때문에 이배체의 형성이 어려우므로 먼저 *A. niger* ANPD-129와 A739 사이에 diploid를 얻은 후 haploidization을 통해 서로 다른 선택표지를 갖는 F129H49(*fwnA1*, *lysA7*, *pri*)와 F153H39(*fwnA1*, *argB2*, *pri*)를 제조하였다. 제조된 F129H49와 F153H39를 사용하여 이배체를 형성시킨 후 이 균주를 PIM 고체배지에서 배양하여 투명환의 크기를 비교하였다.

Parasexual cycle 및 Chromosome mapping

시험관에 완전고체배지 2 ml을 분주하고 굳힌 후 멸균 증류수를 2 ml 첨가하고, 여기에 표준 균주(*A. niger* FGSC A907, A807 또는 A739)와 각각의 단백질분해효소 결함 돌연변이주를 함께 접종하였다. 약 24시간이 지난 후 conidiation이 되기 전의 균사체를 건져내어 물기를 짜고, 최소고체배지에 옮겨놓았다. 최소고체배지 위의 균사체를 네 조각으로 벌러놓고 30°C에서 3일 정도 배양하여 부채꼴 모양으로 자란 이형핵체(heterokaryon)를 얻었다. 얻어진 이형핵체를 재확인하기 위해 균사체 끝부분의 agar block을 자른 다음 다시 새로운 최소고체배지에 옮겨놓고 3일 정도 배양하였다. 최소고체배지에서 형성된 이형핵체의 포자를 0.0001% Tween 80 용액 2 ml로 긁어 모은 후 이것을 다시 최소고체배지에 도말하고 배양하였다. 불규칙적인 모양의 콜로니를 형성하는 이형핵체와는 달리 이배체(diploid)는 정상적인 모양의 콜로

니를 형성하므로 콜로니 모양을 조사하여 이배체를 선별하였다. 선별된 이배체를 benlate(0.6 μ g/ml)가 첨가된 완전고체배지의 한 복판에 일자로 도말하고 5-10일간 배양하였다. 무작위적인 염색체의 상실을 유도하기 위하여 배지내에 영양요구성 돌연변이주들이 요구하는 arginine, leucine, lysine 등을 부가적으로 첨가하였다. benlate가 첨가된 완전고체배지에서 반수체(haploid)가 만들어지면 부채꼴 모양의 구획(sector)이 형성되는데 이를 master plate에 옮겨 보관하였다. Master plate에 보관한 반수체를 각각의 marker test를 위한 배지에 replica-plating함으로써 돌연변이가 생긴 유전자에 대한 chromosome mapping을 수행하였다.

결과 및 고찰

단백질분해효소 결함 돌연변이주의 선별

단백질분해효소 결함 돌연변이주를 선별하기 위해서 PIM 평판배지에 포자를 접종하여 자외선을 조사한 결과 투명환을 형성하지 못하는 균주들이 관찰되었다. 하지만, 이들 대부분은 콜로니의 크기가 작고 포자의 형성이 매우 느리게 진행되는 것으로 관찰되었다. 이러한 균주들은 비록 단백질분해효소 결함 돌연변이주로 판명이 나더라도 성장속도가 느리기 때문에 최종 목적인 이종단백질의 발현을 위한 숙주로서 적합하지 않고, 포자가 형성되지 않는 균주들은 보존에 어려움이 있기 때문에 선별에서 제외시켰다. 본 실험에서는 모균주와 생장이 비슷한 균주, 즉 콜로니의 크기가 비슷하고 포자형성 정도도 비슷한 균주들만을 선별하였다. 선별된 돌연변이주들 중에서 분비기작에 결함이 발생한 돌연변이주는 배제하기 위하여 corn starch가 첨가된 고체배지(CSM)에 옮겨서 투명환의 형성이 가능한 균주를 선별하였다(Fig. 1). CSM 배지에서 투명환을 형성하지 못하는 균주는 amylase도 분비하지 못하는 것이기 때문에 분비기작에 결함이 생긴 것으로 간주하였다.

선별된 돌연변이주는 ANPD(*Aspergillus niger* protease deficient)라 명명하고 일련번호를 부여하였다. 13종의 균주(ANPD-25, 27, 44, 66, 109, 120, 129, 153, 154, 156, 165, 168, 171)를 선별하였는데, 이 돌연변이 균주들은 콜로니의 모양이나 색깔 등에 있어서 공통적인 특징은 가지고 있지 않으므로 단백질분해효소 결함 돌연변이주만이 나타내는 형태적인 특징은 없는 것으로 관찰되었다. 다만, 이들 돌연변이주들은 대부분 모균주에 비해서 포자의 형성이 다소 적거나 느린 현상을 나타내고 있다. 그러나, ANPD-129의 경우는 모균주와 비슷한 수준의 성장과 포자형성을 보였으며 ANPD-153의 경우는 형성되는 포자의 양은 모균주에 비해 감소하였지만 균사체의 형성은 모균주와 비슷한 수준을 나타내었다. 또한

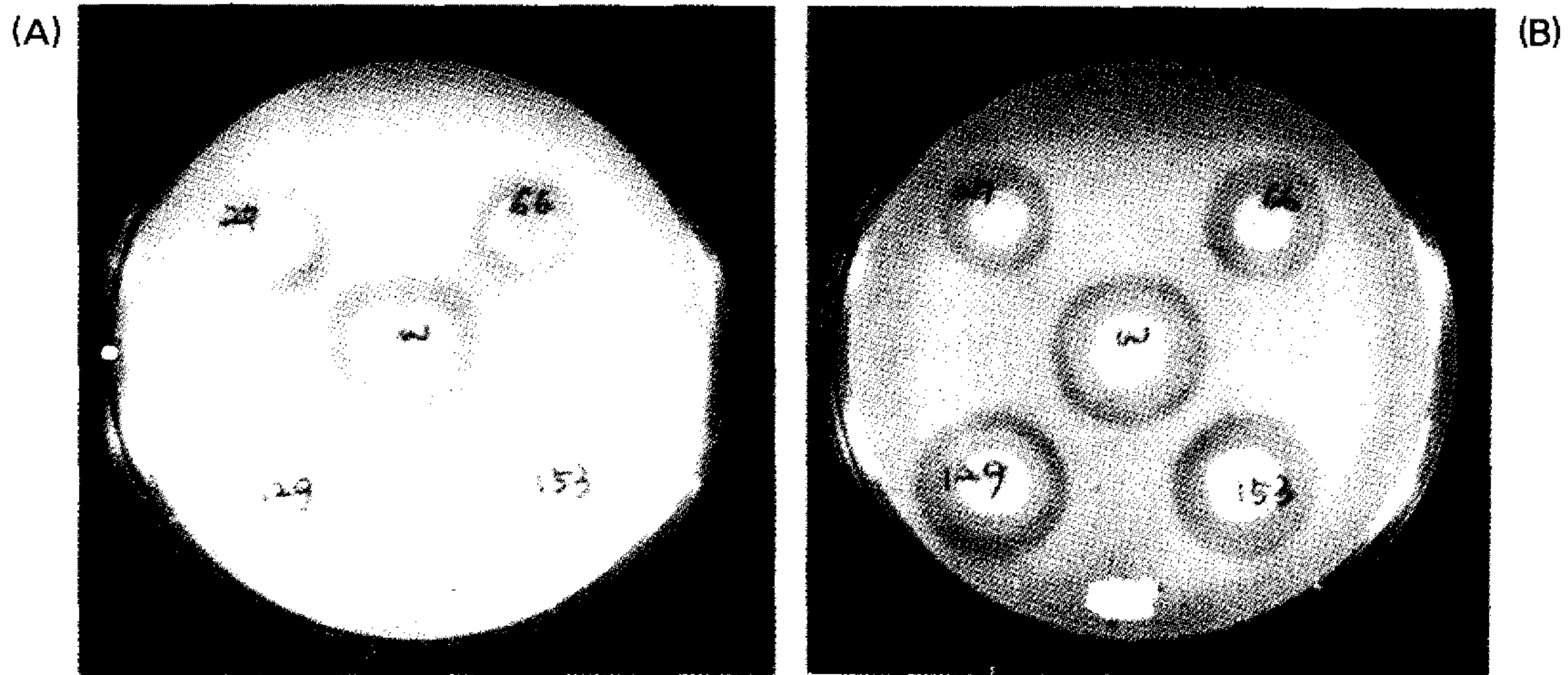


Fig. 1. Isolation of protease-deficient mutants.

The mutants that formed no or little clear zones on PIM (skim milk) plate (A) formed clear zones on CSM (starch) plate (B), which indicates that the isolated mutants are not defective in protein secretion. W, *A. niger* FGSC A798; 27, ANPD-27; 66, ANPD-66; 129, ANPD-129; 153, ANPD-153.

ANPD-153은 균사체의 색깔이 짙은 노란색을 띠는 특징도 가지고 있다.

단백질분해효소 결함 돌연변이주의 단백질분해효소 활성 조사

선별된 단백질분해효소 결함 돌연변이주들 중 일부에 대하여 산성조건하에서의 단백질분해효소 활성을 조사한 결과 대부분의 돌연변이주들이 모균주에 비해 효소 활성이 감소되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). ANPD-44, 120은 모균주의 40% 수준, ANPD-109, 153은 20-30% 정도의 낮은 활성을 나타내었으며, 특히 ANPD-129의 경우에는 단백질분해효소 활성이 모균주의 2-3% 수준으로 매우 낮게 검출되었다. 한편, 돌연변이주의 선별 시에 사용된 배지의 pH가 5.0 내외로 제조되어 산성 조건에서 돌연변이주의 선별이 이루어졌음에도 불구하고 중성 또는 알칼리 조건의 PIM 고체배지에서 모균주보다 작은 투명환을 형성하는 돌연변이주들이 관찰되었다. 이러한 균주들을 대상으로 알칼리 조건하에서 단백질분해효소 활성을 측정한 결과 ANPD-129가 모균주의 49% 그리고 ANPD-153이 13% 정도를 가지고 있는 것으로 나타났다(Fig. 2B). 한 균주에서 산성 및 알칼리 단백질분해효소의 활성이 모두 감소되었다는 것은 여러개의 유전자에 돌연변이가 유발되었을 가능성을 시사한다. 그러나, 이 돌연변이주들의 유전학적 연구를 수행하는 과정에서 여러개의 유전자에 돌연변이가 일어났을 가능성은 배제되었으며 한 유전자 위치에서 돌연변이가 일어난 것으로 판단되었다. 따라서, 이 돌연변이주들의 경우에는 단백질분해효소의 발현을 조절하는 조절 유전자에 돌연변이가 일어났을 가능성이 많은 것으로 생각된다.

단백질분해효소 결함 돌연변이주의 성장
 사상균류가 액체배지에서 자랄 때는 크게 구분하여 filamentous 또는 pellet 형태를 가질 수 있다. 이러한 형

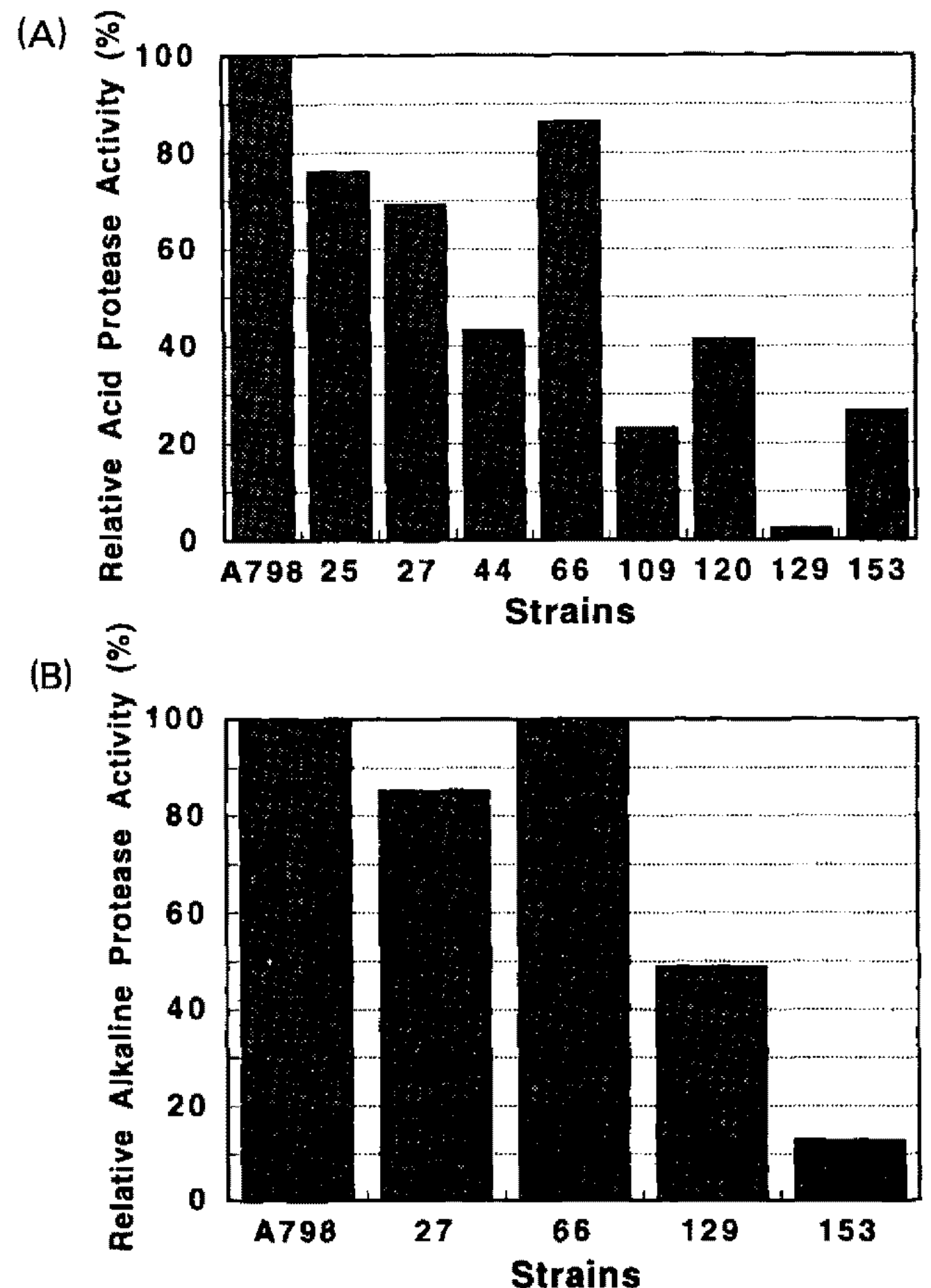


Fig. 2. Relative acid protease activities (A) and alkaline protease activities (B) of parent (*A. niger* FGSC A798) and protease-deficient mutant strains.

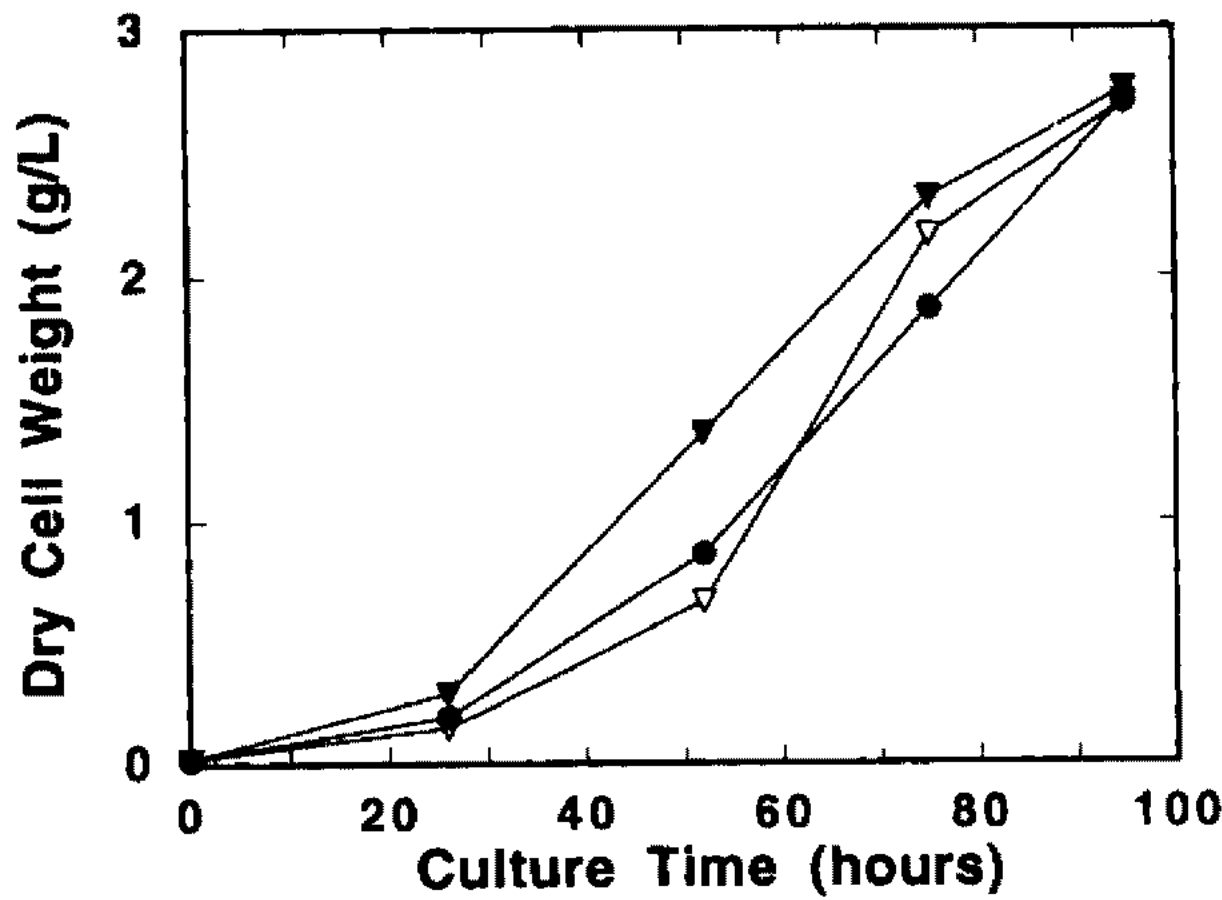


Fig. 3. Growth patterns of parent and protease-deficient mutant strains in PIM without casein. Spores were inoculated at $1.0 \times 10^6/ml$ (●, *A. niger* FGSC A798; ▽, ANPD-129; ▼, ANPD-153).

태 변화는 많은 경우에 있어서 배지조성과 최초 포자 접종량에 의해서 결정된다(24). 본 실험에서는 포자 접종량을 조절하여 모든 배양을 pellet 형태로 수행하였다. Fig. 3에서 보여주듯이 casein이 첨가되지 않은 PIM 배지에서 단백질분해효소 결함 돌연변이주들의 생장은 모균주에 비하여 느리지 않았다. 한편, 고체배지에서는 ANPD-153이 모균주보다 포자형성이 다소 느린 경향을 보이지만 콜로니의 직경을 비교해 보면 모균주와 크게 차이가 없음을 확인할 수 있었다.

Complementation test 및 Chromosome mapping

돌연변이가 일어난 유전자에 대하여 mapping을 수행하기 위하여 각각의 염색체에 표지유전자를 갖는 표준균주(*A. niger* FGSC A907)와 선별된 두 종류의 돌연변이주들(ANPD-129, 153)에 대해 각각 이형핵체를 유도한 후 이배체를 형성하였다. 형성된 이배체들을 benlate가 포함된 완전배지에서 일주일 정도 배양하여 부채꼴 모양으로 자란 반수체를 얻을 수 있었으며, 이 반수체들을 대상으로 marker test를 수행하였다. 그 결과 각각의 균주에 대하여 약 400 개의 segregant를 얻었지만 거의 모든 반수체들이 모균주와 동일한 유전자형을 가짐이 확인되었다. 이는 균주 자체가 이배체의 형성이 잘 이루어지지 않는 것일 수도 있고, 반수체의 포자가 서로 동일한 색깔을 갖기 때문에 선별 시에 명확한 구분을 하지 못하여 발생한 결과일 수도 있다. 따라서 이러한 문제를 해결하기 위하여 연한 갈색(fawn color)의 포자를 형성하는 *fwnA* 돌연변이주(*A. niger* FGSC A739)를 이용하여 단백질분해효소 결함 돌연변이주에 *fwnA*를 도입하였다.

A. niger FGSC A739와 돌연변이주들(ANPD-129, 153)에 대해 각각 이형핵체를 형성하고, 이배체를 선별하여 반수체를 형성한 결과 선별된 연한 갈색을 갖는 반

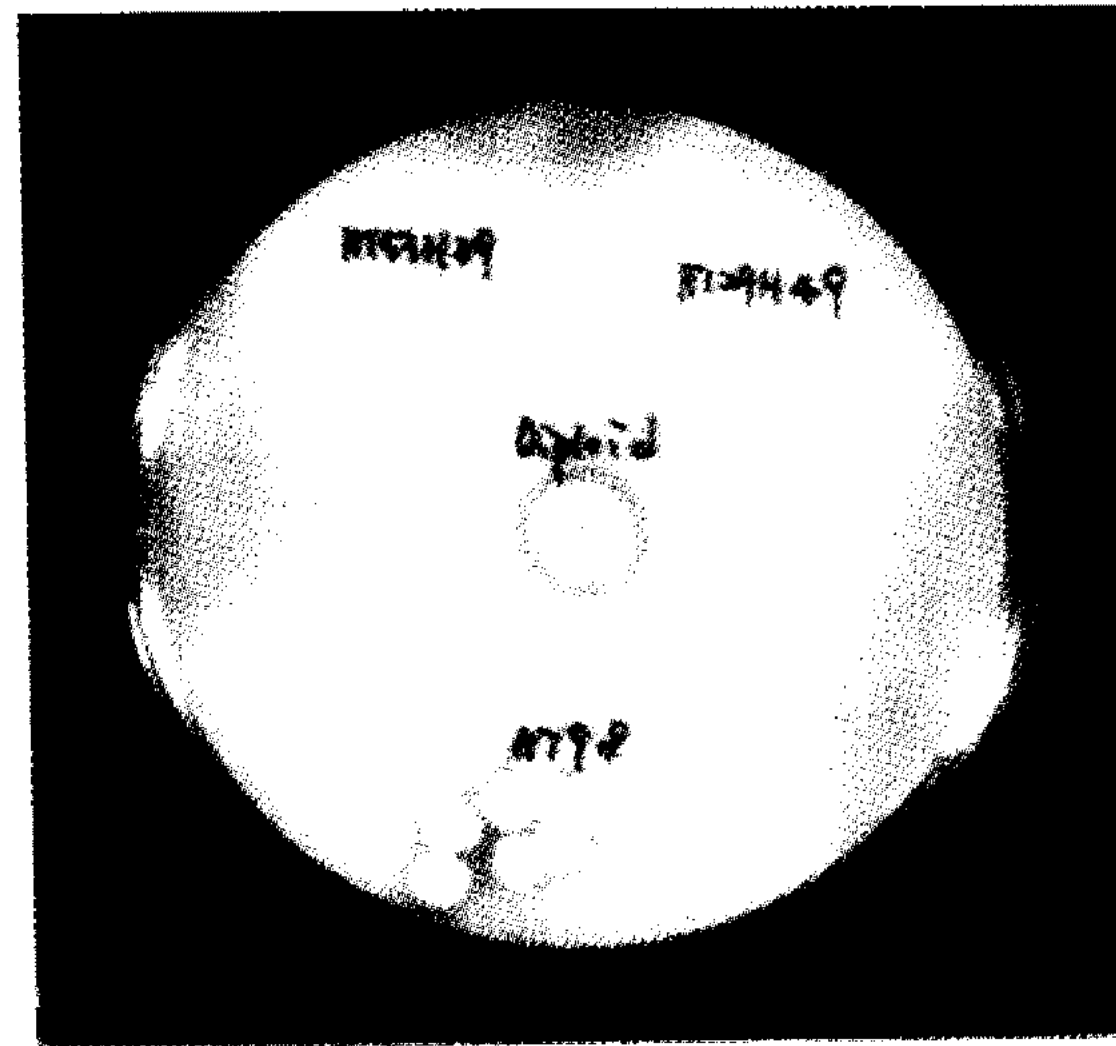


Fig. 4. Complementation test of F129H49 (a derivative of ANPD-129) and F153H39 (a derivative of ANPD-153). Diploid, the diploid formed between F129H49 and F153H39; A798, *A. niger* FGSC A798.

수체들이 각각의 표지들에 대하여 35-60%의 수준으로 분리가 이루어짐을 알 수 있었다. 이들 segregants 중에서 ANPD-129 돌연변이균주에 연한 갈색 포자 형성의 선택표지(*fwnA1*) 만이 도입된 F129H24(*fwnA1*, *argB2*, *prt129*)와 ANPD-153 균주에 *fwnA1* 선택표지가 도입된 F153H39(*fwnA1*, *argB2*, *prt153*)를 선별하였고, ANPD-129 균주에 *fwnA1*과 *lysA7* 선택표지가 도입된 F129H49(*fwnA1*, *lysA7*, *prt129*)를 선별하였다.

ANPD-129와 ANPD-153이 서로 다른 유전자에 돌연변이가 일어난 것인지를 확인하기 위하여 complementation test를 수행하였다. 서로 다른 표지유전자를 가지고 있는 F129H49와 F153H39를 사용하여 이배체를 형성한 다음 이 균주를 PIM 고체배지에 접종하여 투명환의 형성 여부를 알아보았다. 단백질분해효소 결함 돌연변이주들인 F129H49와 F153H39는 투명환을 형성하지 못하나 두 균주가 합쳐진 이배체는 모균주와 마찬가지로 투명환을 형성하는 것이 관찰되었다(Fig. 4). 이 결과는 ANPD-129와 ANPD-153은 서로 다른 locus에서 일어난 돌연변이에 의해 단백질분해효소 활성이 저하된 것임을 나타낸다.

표준균주로서 *A. niger* FGSC A807(*olvA1*, *hisD4*, *lysA7*, *bioA1*, *argF8*, *nicA1*, *pabA1*)를 사용하여 F129H24 균주에 있는 *prt129*와 F153H39 균주에 있는 *prt153*에 대한 chromosome mapping을 시도하였다. 각 mapping에 대하여 150 개 이상의 반수체 segregant를 분석하여 표준균주의 각 표지유전자와 *prt* 유전자 사이에서 일어난 유전자 재조합 빈도를 표시한 결과가 Table 2에 나타나 있다. 재조합 빈도에 의하면 *prt129*는 linkage group VI에 *prt153*은 linkage group III에 일어난 것임을

Table 2. Mitotic mapping of protease-deficient mutations

Linkage group	?	I	I	II	III	III	III	IV	V	VI
A807			<i>olvA1</i>	<i>hisD4</i>		<i>lysA7</i>	<i>bioA1</i>	<i>argF8</i>	<i>nicA1</i>	<i>pabA1</i>
F129H24	<i>prt129</i>	<i>fwnA1</i>			<i>argB2</i>					
recombination (%)*			44**	35		31	33	46***	28	11
F153H39	<i>prt153</i>	<i>fwnA1</i>			<i>argB2</i>					
recombination (%)*			41**	27		3	7	63***	30	30

*The percentages of recombination between the *prt* loci and the markers in the master strain A807, **overestimated because *fwnA* is epistatic to *olvA*, ***overestimated because *argB* and *argF* double mutation cannot be distinguished from *argB* single mutation. *prt*, protease deficiency; *fwnA*, *olvA*, fawn- or olive-cloured conidiospores; *hisD*, *argB*, *lysA*, *bioA*, *argF*, *nicA*, *pabA*, auxotrophs for histidine, arginine, lysine, biotin, arginine, nicotinic acid, p-aminobenzoic acid, respectively.

알 수 있다. Mattern 등(14)은 단백질분해효소 활성이 모균주의 1-2%에 불과한 돌연변이주를 분석한 결과 chromosome VI에 위치한 한 유전자에 돌연변이가 일어난 것임을 알았고, 그 돌연변이균주에서는 aspergillopepsin A와 aspergillopepsin B가 모두 결여되어 있다는 것으로 보아 단백질분해효소 발현을 조절하는 유전자에 돌연변이가 일어난 것으로 추측하였다. 본 실험에서 얻은 ANPD-129도 단백질분해효소 활성이 모균주의 2-3%에 불과하였고, 돌연변이가 일어난 위치가 chromosome VI이며, 산성 및 알칼리 조건하에서 모두 단백질분해효소 활성이 감소하는 것으로 미루어 보아 조절유전자일 가능성이 많이 있으나 Mattern 등이 얻은 돌연변이균주와 같은 유전자에 돌연변이가 발생한 것인지는 확실하지 않다.

요 약

*A. niger*를 숙주로 사용하여 이종유전자를 발현할 때 *A. niger*로부터 분비되는 단백질분해효소에 의해 생산된 단백질이 분해되는 문제점이 있기 때문에 단백질분해효소 결함 돌연변이주의 개발이 필요하다. 본 실험에서는 *A. niger*의 conidiospore를 자외선으로 처리한 후 skim milk plate에서 투명환 형성 능력을 측정함으로써 *A. niger*의 단백질분해효소 결함 돌연변이주들을 선별하고, 이들의 유전적 특성을 조사하였다. 선별된 돌연변이주들은 모균주에 비해 3-85% 정도의 단백질분해효소 활성을 가지고 있었으며, 특히 산성 조건하에서 단백질분해효소의 활성이 모균주의 3%와 49%를 가지고 있는 ANPD-129와 ANPD-153은 알칼리 조건하에서도 모균주의 27%와 13% 만을 가지고 있었다. 대부분의 단백질분해효소 결함 돌연변이주들과는 달리 ANPD-129와 ANPD-153은 모균주와 비슷한 성장속도를 보였다. 이 두 돌연변이주들 간에 형성된 이배체는 단백질분해효소를 모균주와 비슷하게 분비하였는데 이것을 통하여 두 돌연변이가 서로 다른 유전자 좌위에서 일어났다는 것을 알 수 있었다. ANPD-129와 ANPD-153을 대상으로 chromosome mapping을 수행한 결과 ANPD-129는 linkage group VI

에 그리고 ANPD-153은 linkage group III에 돌연변이가 일어난 것을 확인할 수 있었다.

감사의 말

본 연구는 '95 생명공학기술개발사업 연구비(95-B-01-02-A-03)에 의해 지원받았으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Bodie, E. A., G. L. Armstrong and N. S. Dunn-Coleman. 1994. Strain improvement of chymosin-producing strains of *Aspergillus niger* var. *awamori* using parasexual recombination. *Enzyme Microb. Technol.* **16**: 376-382.
- Van den Hondel, C. A. M. J. J., P. J. Punt and R. F. M. van Gorcom. 1991. Heterologous gene expression in filamentous fungi, p. 396-428. In J. W. Bennett and L. L. Lasure (ed.), *More gene manipulations in fungi*. Academic Press, London.
- Gouka, R. J., P. J. Punt, J. G. Hessing and C. A. van den Hondel. 1996. Analysis of heterologous protein production in defined recombinant *Aspergillus awamori* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1951-1957.
- Hellmuth, K., S. Pluschkell, J. K. Jung, E. Ruttkowski and U. Rinas. 1995. Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger* using genetic- and process-engineering techniques. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 978-984.
- Jeenes, D. J., B. Marczinke, D. A. MacKenzie and D. B. Archer. 1993. A truncated glucoamylase gene fusion for heterologous protein secretion from *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol. Lett.* **107**: 267-272.
- MacKenzie, D. A., D. J. Jeenes, N. J. Belshaw and D. B. Archer. 1993. Regulation of secreted protein production by filamentous fungi: recent development and perspectives. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2295-2307.
- MacRae, W. D., F. P. Buxton, D. I. Gwynne and R. W. Davies. 1993. Heterologous protein secretion directed by a repressible acid phosphatase system of *Aspergillus niger*. *Gene.* **132**: 193-198.
- Peberdy, J. F. 1994. Protein secretion in filamentous fun-

- gi-trying to understand a highly productive black box. *TIBTECH.* **12**: 50-57.
9. Roberts, I. N., D. J. Jeenes, D. A. MacKenzie, A. P. Wilkinson, I. G. Sumner and D. B. Archer. 1992. Heterologous gene expression in *Aspergillus niger*: a glucoamylase-porcine pancreatic prothrombinase A2 fusion protein is secreted and processed to yield mature enzyme. *Gene.* **122**: 155-161.
 10. Tsuchiya, K., S. Tada, K. Gomi, K. Kitamoto, C. Kumagai, Y. Jigami and G. Tamura. 1992. High level expression of the synthetic human lysozyme gene in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 109-114.
 11. Upshall, A., A. A. Kumar, M. C. Bailey, M. D. Parker, M. A. Favreau, K. P. Lewison, M. L. Joseph, J. M. Marganore and G. L. McKnight. 1987. Secretion of active human tissue plasminogen activator from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Bio/Technology.* **5**: 1301-1305.
 12. Ward, M. L., Y. Wilson, K. H. Kodama, M. W. Rey and R. M. Berka. 1990. Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression as a glucoamylase-chymosin fusion. *Bio/Technology.* **8**: 435-440.
 13. Ward, P. P., G. S. May, D. R. Headon and O. M. Conneely. 1992. An inducible expression system for the production of human lactoferrin in *Aspergillus nidulans*. *Gene.* **122**: 219-223.
 14. Mattem, I. E., J. M. van Noort, P. van den Berg, D. Archer, I. N. Roberts and C. A. M. J. van den Hondel. 1992. Isolation and characterization of mutants of *Aspergillus niger* deficient in extracellular proteases. *Mol. Gen. Genet.* **234**: 332-336.
 15. Frederick, G. D., P. Rombouts and F. P. Buxton. 1993. Cloning and characterisation of *pepC*, a gene encoding a serine protease from *Aspergillus niger*. *Gene.* **125**: 57-64.
 16. Inoue, H., T. Kimura, O. Makabe and K. Takahashi. 1991. The gene and deduced protein sequences of the zymogen of *Aspergillus niger* acid proteinase A. *J. Biol. Chem.* **266**: 19484-19489.
 17. Jarai, G., D. Kirchherr and F. P. Buxton. 1994. Cloning and characterization of the *pepD* gene of *Aspergillus niger* which codes for a subtilisin-like protease. *Gene.* **139**: 51-57.
 18. Jarai, G., H. van den Hombergh and F. P. Buxton. 1994. Cloning and characterization of the *pepE* gene of *Aspergillus niger* encoding a new aspartic protease and regulation of *pepE* and *pepC*. *Gene.* **145**: 171-178.
 19. Van den Hombergh, J. P. T. W., G. Jarai, F. P. Buxton and J. Visser. 1995. Presented at the 18th Fungal Genetic Conference, Pacific Grove, CA, USA.
 20. Van den Hombergh, J. P. T. W., G. Jarai, F. P. Buxton and J. Visser. 1994. Cloning, characterization and expression of *pepF*, a gene encoding a serine carboxypeptidase from *Aspergillus niger*. *Gene.* **151**: 73-79.
 21. Bos, C. J., S. M. Slakhorst, A. J. M. Debets and K. Swart. 1993. Linkage group analysis in *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 742-745.
 22. Debets, F., K. Swart, R. F. Hoekstra and C. J. Bos. 1993. Genetic maps of eight linkage groups of *Aspergillus niger* based on mitotic mapping. *Curr. Genet.* **23**: 47-53.
 23. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1953. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
 24. Braun, S. and S. E. Vecht-Lifshitz. 1991. Mycelial morphology and metabolite production. *TIBTECH.* **9**: 63-68.

(Received 19 February 1997)