

베타-1,3-글루칸 합성효소 저해제의 스크리닝을 위한 효소원 제조법

박희문* · 이동원 · 송미령 · 김정윤 · 김성욱¹ · 복성해¹
충남대학교 미생물학과, ¹KIST 유전공학연구소 생물소재그룹

Preparation of Enzyme Source for Screening of Enzyme Inhibitor of β -1,3-glucan Synthase

Hee-Moon Park*, Dong-Won Lee, Mi-Ryeong Song, Jeong-Yoon Kim, Sung-Uk Kim¹ and Song-Hae Bok¹

Department of Microbiology, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea
¹Bioproducts R.G., Genetic Engineering Research Institute, KIST, P.O. Box 17, Taedok Science Town, Taejeon 305-606, Korea

Abstract — Assay conditions for screening of β -1,3-glucan synthase inhibitor were evaluated. Cells in the beginning of mid-log phase showed the highest activity of the β -1,3-glucan synthase. Cells permeabilized with 1% digitonin treatment could be used as a good crude enzyme source for convenient screening of the β -1,3-glucan synthase inhibitors. Calcofluor white (0.125% in final) and papulacandin B (25 μ g/ml) inhibit 90% and more than 50% of the β -1,3-glucan synthase activity, respectively. Cells grown at 37°C showed higher enzyme activity than those of 25°C. Catalytic factor of the β -1,3-glucan synthase was solubilized from particulated membrane preparations, holoenzyme, by extracting with 0.00938% CHAPS.

진균류는 동식물에 다양한 질병을 야기하는 병원성 미생물의 하나로 잘 알려져 있다. 특히 사람에게 다양한 종류의 감염성 질환을 야기하므로 보다 효과적인 새로운 항진균성 활성물질의 개발이 절실히 요구되고 있다. 최근 급증하는 AIDS 환자나 장기이식수술 환자 등과 같이 정상적인 면역체계에 이상이 생긴 환자의 경우, 세균성 질환의 방지를 위해서는 광범위 항세균성 약제를 투여하고 있으나, *Candida albicans*나 *Aspergillus fumigatus* 등의 기회감염성 진균류나 이전에는 별 문제를 야기하지 아니하였던 진균류인 *Cryptococcus neoformans*나 *Pneumocystis carinii* 등에 의하여 야기되는 전신성 진균질환이 환자의 생명을 위협할 수 있는 새로운 요인으로 대두되고 있다(1). 따라서, 진균의 방제나 진균성 질환의 치료에 이용될 수 있는 새로운 종류의 항진균활성 물질을 생성하는 미생물의 탐색 및 개발은 매우 시급하고 긴요한 과제라 하겠다.

효과적인 항진균 활성 물질은 진균에 대해서는 특이적으로 작용하나 고등동물에는 무해하여야 하며,

광범위한 진균류에 작용하는 것이어야 한다. 따라서, 이러한 항진균성 물질 생성 미생물을 탐색하기 위한 접근방법으로는, 진균에만 존재하는 세포구성물질의 합성을 저해할 수 있는 미생물을 선별하는 것이다. 가능성 있는 항진균 표적(potential antifungal targets)들로 *Candida albicans*에서 거론되는 것을 살펴보면, cell-wall-associated mannoprotein, 병원성에 관여하는 것으로 여겨지는 secreted aspartic proteins, cell-wall biosynthesis 그리고, translation elongation factor EF-3 등이 있다(2). 그런데, 진균세포의 세포벽을 이루는 물질 중 키틴과 베타글루칸은 진균에 특이적으로 존재하는 세포구성물질로서 이들의 합성이 저해될 경우 진균의 생장을 선택적으로 방해할 수 있어 신규항생물질(또는 생성미생물) 탐색의 좋은 대상으로 인식되고 있다. 특히 키틴은 진균류와 곤충류를 제외한 생물체에서는 발견되지 아니하며, 베타글루칸도 동물에서는 발견되지 않는 것들이 대부분이므로, 이들의 합성을 저해하는 물질은 고등동물에 대해 독성이 없는 항진균제로 사용될 수 있다(3). 그런데 대표적인 키틴합성저해제로 알려져 있는 polyoxin이나 nikkomycin의 경우 동물이나 사람에게 감염된 진균의 퇴치에는 효과를 나타내지 아니한다. 이는 아마도

Key words: β -1,3-glucan synthase, inhibitor, solubilization, detergent, catalytic factor

*Corresponding author

이들 물질의 투과성에 문제가 있거나 진균세포에 의해 분해되기 때문일 수도 있다. 예를 들면 *S. cerevisiae*의 경우 *in vivo*에서는 *in vitro*보다 훨씬 높은 농도의 polyoxin D를 처리하여야 효과가 있음이 보고된 바 있으며(4), *S. cerevisiae*에서 그 존재가 밝혀진 세 가지의 키틴합성효소(5) 중 세포 성장에 필수적인 효소(Chs2)가 필수적이지 아니한 키틴합성효소(Chs1)보다 키틴합성 저해제에 의하여 훨씬 덜 저해됨이 보고된 바 있으며(6), nikkomycin Z은 Chs3(chitin synthase 3)에 대한 특이적 저해제임이 밝혀진 바가 있다(7). 한편 글루칸합성효소의 저해제로 알려진 papulacandin B나 cyclopeptide 계통의 aculeacin과 cilofungin 등도 작용하는 진균의 범위가 각기 달라, papulacandin의 경우는 *Schizosaccharomyces pombe*에 cilofungin의 경우는 *C. albicans*에 효과적인 것으로 보고되었다(3). 따라서, 진균의 세포벽 구성성분의 합성저해제를 탐색하고자 할 때 대상 균류의 세포벽합성효소 체계에 대한 사전 정보가 필요하며, 이를 근간으로 진균의 세포벽합성 저해능을 갖는 활성물질이나 미생물의 탐색을 위한 효과적인 *in vitro* 검출체계의 확립이 절대적으로 필요하다.

본 연구에서는 *S. cerevisiae*를 대상으로, 세포벽 구성성분 중 베타-1,3-글루칸의 합성에 관여하는 효소를 특이적으로 저해하는 저해제의 스크리닝에 요구되는 효율적인 효소활성 측정법의 개발을 목적으로 간편한 효소원 제조법과 각종 저해제에 의한 효소의 저해정도 및 막단백질 형태로 존재하는 효소의 용액화 조건 등을 조사하였다.

균주로는 *Saccharomyces cerevisiae* GS-1-36(α , SUC 2, mal, gal2, CUP1, ATCC 26108)을 사용하였으며, 균주배양을 위한 배지 및 배양조건, 각종 효소원의 제조 방법 및 베타-1,3-글루칸 합성효소의 활성측정은 Park 등(8)이 보고한 바와 동일한 방법을 사용하였다. 한편, digitonin 처리한 세포(permeabilized cell)는 Fernandez 등(9)이 *S. cerevisiae*의 키틴합성효소 측정시 적용하였던 방법을 변형하여 다음과 같이 제조하였다. 즉, 대수기 중반의 세포 250 mg을 eppendorf tube에 옮겨 1% digitonin 용액 750 μ l을 첨가하였다. 이를 30°C에서 15분간 진탕하고 TEM(50 mM Tris, 1 mM EDTA [(ethylene dinitro) tetraacetic acid], pH 7.5, 1 mM 2-mercaptoethanol) 용액으로 2~3차례 원심분리하여 세척하였다. 침전물 현탁액의 최종부피가 750 μ l이 되도록 TEM 용액에 재현탁하고 이를 즉시 효소활성 측정에 사용하였다.

생장에 따른 세포벽 다당류 합성효소의 활성조사

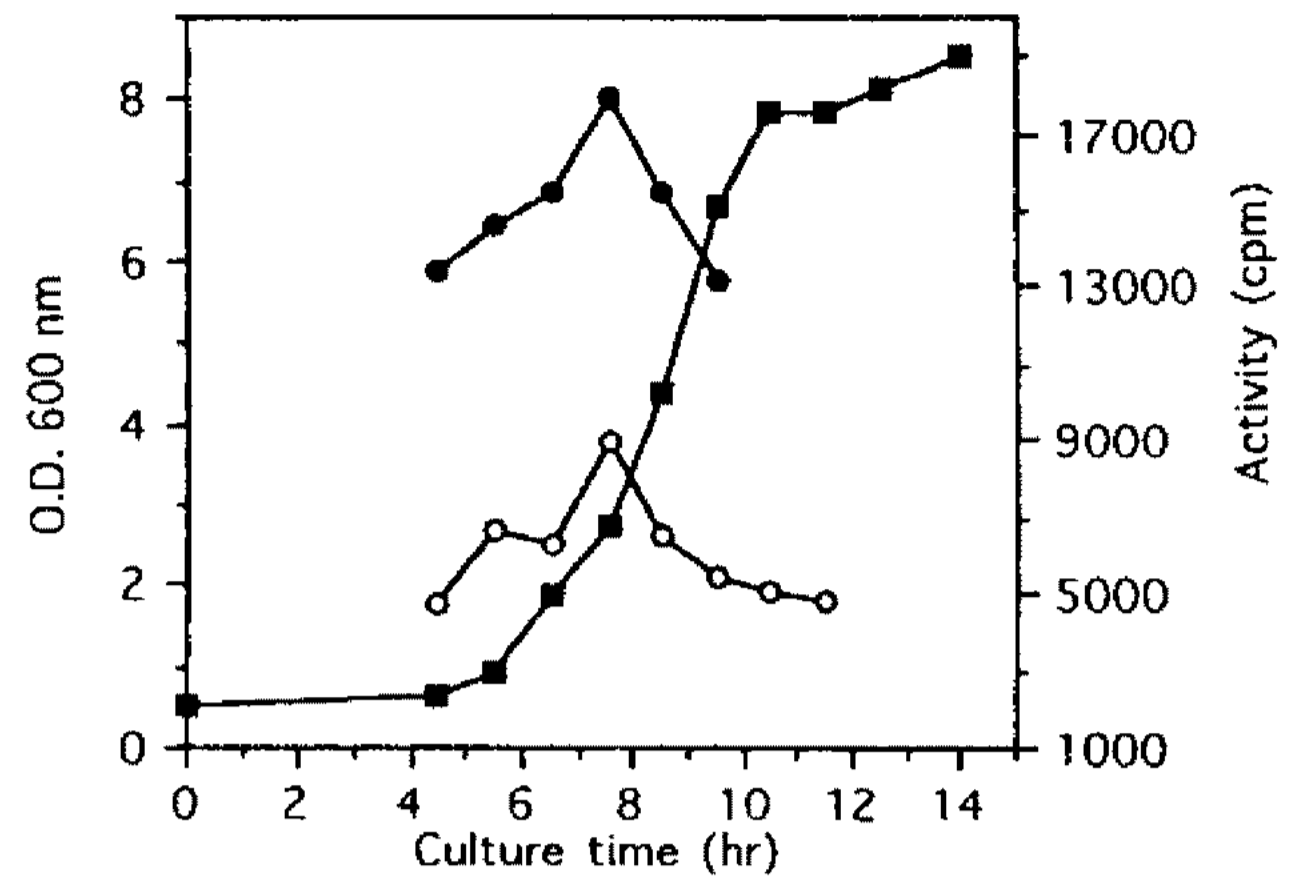


Fig. 1. Growth curve and β -1,3-glucan synthase activity of *Saccharomyces cerevisiae*.

(■): OD at 600 nm of cells grown at 30°C, (●): Holoenzyme was used as an enzyme for the assay, (○): Cells permeabilized with 1% digitonin was used as an enzyme for the assay.

*Saccharomyces cerevisiae*의 경우 세포벽 다당류 합성효소 중 베타-1,3-글루칸 합성효소의 활성은 대수기 중반 직전(약 7.5시간)에 그 활성이 가장 높은 것으로 조사되었다(Fig. 1). 그런데, 대수기 중반의 세포를 수득한 후, 파쇄하고 이를 초원심분리하여 효소원을 제조하는 방법은 다량의 시료를 대상으로 하는 스크리닝 과정에는 매우 번거로운 방법이다. 따라서, 간편하게 효소원을 제조하기 위한 방법으로 키틴합성효소능의 측정시 적용된 바 있는 digitonin 처리에 의한 세포의 permeabilization 방법(9)을 적용하여 보았다. 즉, Fig. 1에서 보듯이 1% digitonin을 처리하여 permeabilization 시킨 세포를 효소원으로 사용하여 효소활성을 측정할 경우, 그 활성이 holoenzyme을 사용한 경우에 비하여 약 절반에 해당하는 수치를 보이는 하나, 효소활성의 측정에 이용될 수 있는 충분한 수치였으며, 세포의 성장주기에 따른 효소활성의 변화양상은 holoenzyme을 효소원으로 사용한 경우와 동일하였다. 따라서, 다량의 시료를 대상으로 효소의 활성을 측정하고자 할 때에는, 그 제조과정이 번거로운 holoenzyme보다는 digitonin을 처리한 세포를 효소원으로 사용하는 것이 훨씬 효율적임을 알 수 있었다.

이상의 결과와 이미 보고된 바 있는 *S. cerevisiae*의 chitin synthase 활성측정 결과(9)로부터, 효모류의 세포벽 구성 다당류 합성효소의 활성은 대수기 중반 직전의 세포에서 가장 높게 검출된다는 사실도 확인할 수 있었다. 따라서, 세포벽합성 저해제의 활성을 *in vitro*에서 효모를 대상으로 측정하고자 할 때는, 대수기 중반 직전의 세포를 1% digitonin으로 처리한

후, 이를 효소원으로 사용하면 효과적인 조사가 가능할 것으로 판정되었다.

저해제가 세포벽합성효소의 *in vitro* 활성에 미치는 효과

Chitin synthase의 저해제로 잘 알려져 있는 calcofluor(10, 11)가 β -1,3-glucan synthase의 *in vitro* 활성에 미치는 효과를 조사한 결과 Table 1에서 보듯이, 최종농도 0.125% 이상으로 calcofluor가 존재하면 90%의 활성이 감소되는 것으로 나타났다. 이러한 현상을 정확히 규명하기 위하여는 순수분리 정제된 효소원을 사용한 실험 등이 진행되어야 될 것이나, 베타-1,3-글루칸 합성저해 효과를 나타내는 물질을 스크리닝하면 키틴합성 저해제로도 작용할 수 있는 물질도 함께 스크리닝할 수 있는 가능성을 제시한다는 점에서 매우 흥미로운 결과라 사료된다. 한편, 글루칸합성 저해제로 알려져 있는 papulacandin B(12)가 베타-1,3-글루칸 합성효소의 *in vitro* 활성에 미치는 효과를 조사한 결과, Table 2에서 보듯이 최종농도가 25 μ g/ml 인 경우 약 50%에서 63%에 달하는 효소활성의 저해를 나타내었다. 여기서 특기할 만한 사실은 효소원으로 25°C보다 37°C에서 배양한 *S. cerevisiae*로부터 제조한 효소원이 저해제인 papulacandin B에 의하여 더 심하게 저해를 받는다는 사실과, 37°C에서 배양한 *S. cerevisiae*로부터 제조한 효소원의 spe-

Table 1. Effect of calcofluor on glucan synthase activity

Concentration of calcofluor (%)	Glucan Synthase Activity (%)
0	100.0
0.125	8.0
0.25	10.0
0.5	9.1

Table 2. Effect of papulacandin B on glucan synthase activity

Enzyme source*	Papulacandin (25 μ g/ml)	Specific activity (unit)	Decrease in activity (%)
Cells grown at 25°C	-	61.0	
	+	30.0	50.8
Cells grown at 37°C	-	70.5	
	+	25.9	63.3

*Particulate membrane fractions from the cells were used as enzyme (holoenzyme).

cific activity가 25°C의 경우보다 높게(70.5 : 61.0) 나타난다는 사실이다. 따라서, 베타-1,3-글루칸 합성효소의 *in vitro* 활성 저해능을 이용한 세포벽 합성저해제의 스크리닝에 37°C에서 배양한 *S. cerevisiae*로부터 베타-1,3-글루칸 합성효소를 제조하여 사용하는 것이 유리할 것으로 사료된다.

각종 detergent가 베타-1,3-글루칸 합성효소 활성에 미치는 영향

진균류의 베타-1,3-글루칸 합성효소 중 GTP-binding 단백질의 용액화를 시도한 보고는 있으나(13), catalytic factor의 용액화를 시도한 경우는 적으며(14), 특히 *S. cerevisiae*의 catalytic factor를 용액화한 보고는 없다. 따라서, catalytic factor의 용액화를 시도하기 위하여, 용액화에 사용될 detergent가 효소활성에 미치는 효과를 조사하고, 이를 근거로 catalytic factor의 용액화를 시도하였다.

Soluble factor의 용액화에 사용된 Tergitol NP-40 (Sigma)(13)와 *Neurospora crassa*의 베타-1,3-글루칸 합성효소의 용액화에 사용된 octylglucoside 및 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethyl-ammonia]-1-propanesulfonate(CHAPS), 그리고 sodium deoxycholate(14)가 베타-1,3-글루칸 합성효소능에 미치는 효과를 조사하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보듯이 Tergitol NP-40는 첨가농도가 증가함에 따라 효소활성도 다소 증가하는 양상을 보이는 반면, CHAPS는 최종농도 0.185%까지는 효소활성을 저해하지 아니하나 그 이상의 농도에서는 효소활성을 저해하는 양상을 나타내었다. 한편, sodium deoxycholate와 octylglucoside는 효소활성을 현저히 저해하는 것으로 나타났다. 그런데, Ter-

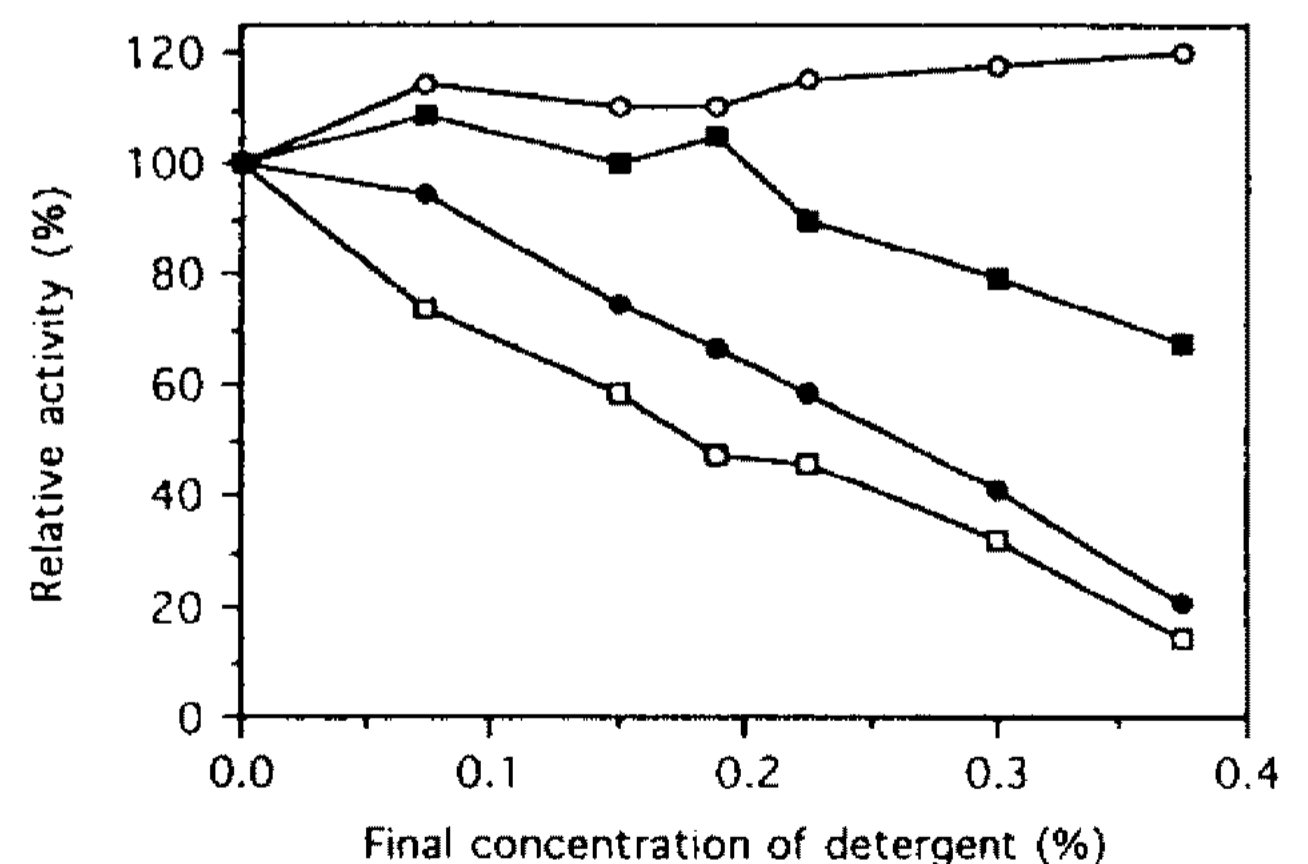


Fig. 2. Effect of detergent on β -1,3-glucan synthase activity.

To a standard reaction mixture, various amounts of detergent were added. (○): Tergitol NP-40, (●): Sodium deoxycholate, (□): Octylglucoside, (■): CHAPS

Table 3. Solubilization of catalytic factor using CHAPS from the particulate membrane fractions remaining after extraction of soluble factor

Concentration of CHAPS (%)	β -1,3-glucan synthase activity (cpm)	
	Supernatant	Precipitate
0	11,227 (100)*	
0.0038	11,836 (105)	1,068
0.0375	12,356 (110)	693
0.0938	12,507 (114)	519
0.2344	8,387 (75)	228

The precipitate, obtained by centrifugation of CHAPS treated particulate membrane fraction, was resuspended in TEMG buffer and used for the assay of enzyme activity with soluble factor.

*The activity in resuspended particulate membrane fractions before CHAPS treatment was taken as 100%.

gitol NP-40의 경우 효소활성유지에는 효과가 좋으나 이미 soluble factor 만 선택적으로 용액화시키는 것으로 판명된 바 있을 뿐만 아니라, 분자량이 커서 효소의 정제과정에 필수적으로 수반되는 효소액의 농축과정 동안 단백질과 함께 농축되어 효소액의 점도를 높혀 효소액의 조작을 어렵게 하고, 크로마토그래피의 분해능을 저하시키는 단점이 있다(Park과 Cabib, 미발표 자료). 따라서, 이미 *N. crassa*의 경우 사용된 바 있고, 분자량도 작아 다루기에 편리한 CHAPS를 이용하여 catalytic factor의 용액화를 시도하여 보았다.

CHAPS를 사용한 catalytic factor의 용액화

Catalytic factor 만 선택적으로 용액화 시키기 위하여, 우선 holoenzyme에 NaCl과 Tergitol NP-40를 처리하여 soluble factor를 용액화시켜 제거하였다. 그 결과 얻어진 particulate membrane fraction으로 존재하는 catalytic factor에 각기 다른 농도의 CHAPS를 처리하고, 원심분리하여 상등액과 침전물을 얻은 후 이를 각기 soluble factor와 재구성(reconstitution)하여 베타-1,3-글루칸 합성효능을 조사하였다. 그 결과 Table 3에서 보듯이 최종농도 0.0938%의 CHAPS를 처리하면 거의 대부분의 catalytic factor가 용액화됨을 알 수 있었다. 이 결과를 이용하여 soluble factor와 함께 catalytic factor도 용액상태로 얻을 수 있으므로 *S. cerevisiae*의 베타-1,3-글루칸합성효소의 분리 정제에 이은 특성 규명이 훨씬 용이하게 될 것이며, 세포벽 합성 저해제의 스크리닝에 유용하게 이용될 베타-1,3-글루칸 합성효소의 저해능을 *in vitro*에서 측정할 수

있는 보다 개선된 측정법의 고안에도 크게 도움이 될 것이다.

감사의 말

본 연구는 과기처 지원에 의한 "G7 생리활성 선도물질 탐색기술 개발연구"의 일환으로 수행된 것임.

참고문헌

- Georgopapadaku, N.H. and T.J. Walsh. 1994. Human mycoses: Drugs and targets for emerging pathogens. *Science* **264**: 371-372.
- Tuite, M.F. 1992. Antifungal drug development: the identification of new targets. *Trends in Biotechnology* **10**: 235-239.
- Cabib, E., S.J. Silverman, J.A. Shaw, S.D. Gupta, H.M. Park, J.T. Mullins, P.C. Mol. and B. Bower. 1991. Carbohydrates as structural constituents of yeast cell wall and septum. *Pure & Appl. Chem.* **63**: 483-489.
- Bowers, B., G. Levin, and E. Cabib. 1974. Effect of polyoxin D on chitin synthesis and septum formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **119**: 564-575.
- Bulawa, C.E. 1993. Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**: 505-534.
- Cabib, E. 1991. Differential inhibition of chitin synthetases 1 and 2 from *Saccharomyces cerevisiae* by polyoxin D and nikkomycins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 170-173.
- Gaughran, J.P., M.H. Lai, D.R. Kirsch, and S.J. Silverman. 1994. Nikkomycin Z is a specific inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* chitin synthase isozyme Chs3 *in vivo* and *in vitro*. *J. Bacteriol.* **176**: 5857-5860.
- Park, H.M., J.Y. Kim, S.W. Kim, and S.H. Bok. 1995. Properties of β -1,3-glucan synthase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**(3):
- Fernandez, M.P., J.U. Correa, and E. Cabib. 1982. Activation of chitin synthetase in permeabilized cells of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking proteinase B. *J. Bacteriol.* **152**: 1255-1264.
- Roncero, C. and A. Duran. 1984. Effect of Calcofluor White and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: *in vivo* activation of chitin polymerization. *J. Bacteriol.* **163**: 1180-1185.
- Selitrennikoff, C.P. 1984. Calcofluor white inhibits *Neurospora* chitin synthase activity. *Exp. Mycol.* **8**: 269-272.
- Baguley, B.C., G. Rommele, J. Gruner, and W.

- Wehrli. 1979. Papulacandin B: an inhibitor of glucan synthesis in yeast spheroplasts. *Eur. J. Biochem.* **97**: 345-351.
13. Kang, M.S. and E. Cabib. 1986. Regulation of fungal cell wall growth: a guanidine nucleotide-binding, proteinaceous component required for activity of (1-3)- β -D-glucan synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 5808-5812.
14. Quigly, D.R., M. Hrmova, and C.P. Selitrenikoff. 1988. β (1-3) glucan synthase of *Neurospora crassa*: solubilization and partial characterization. *Exp. Mycol.* **12**: 141-150.

(Received 5 January 1995)