

*Aspergillus nidulans*의 광 조건하 유성분화에 관여하는 *silA* 유전자의 분리 및 기능분석

한상용¹ · 고진아¹ · 김종학¹ · 한규용² · 한갑훈³ · 한동민^{1,4*}

¹원광대학교 생명과학부, ²남서울대학교 치위생학과, ³우석대학교 제약공학과, ⁴원광대학교 생명공학연구소

Isolation and Functional Analysis of the *silA* Gene That Controls Sexual Development in Response to Light in *Aspergillus nidulans*

Sang-Yong Han¹, Jin-A Ko¹, Jong-Hak Kim¹, Kyu-Yong Han², Kap-Hoon Han³ and Dong-Min Han^{1,4*}

¹Division of Life Sciences, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

²Department of Dental Hygiene, Namseoul University, Chonan 331-707, Korea

³Department of Pharmaceutical Engineering, Woosuk University, Wanju 565-701, Korea

⁴Institute of Biotechnology, Wonkwang University, 570-749, Korea

(Received December 17, 2008. Accepted December 27, 2008)

ABSTRACT: When a homothallic ascomycete *Aspergillus nidulans* is exposed to visible light, cleistothecial development is inhibited. The light response of development in *A. nidulans* implies the existence of delicate regulation process including reception and translocation of light signaling and determination of development. Previously, mutants that could develop cleistothecia even in the presence of relatively intensive visible light were isolated and several complementation groups were identified. A gene that was able to complement the *silA98* mutation, which was responsible for preferred cleistothecia development under visible light, was isolated from AMA-*NoI* genomic library. The *silA* gene retained in the 4.3 kb recovered genomic library DNA has an open reading frame (ORF) consisted of 2,388 bp nucleotides, interrupted by 3 introns and consequently encoding 795 amino acids. The putative SilA carries a Zn₂Cys₆ binuclear cluster motif at N terminus and shows high amino acid sequence similarity to Aro80p of *Saccharomyces cerevisiae*. Deletion mutants of *silA* showed a strong induction of sexual development under visible light, indicating that SilA is involved in the negative regulation of sexual development in response to the light.

KEYWORDS: *Aspergillus nidulans*, Light, Sexual development, *silA*, Transcription factor

자낭균류에 속하는 진균들은 일반적으로 유성(sexual) 및 무성(asexual) 생식의 이중 생활사를 갖는다. 성장체 세포(vegetative cell)의 핵상은 단수체(haploid)이고, 이배체(diploid)는 생활사중 유성생식 과정에서 일시적으로 나타난다. 사상성 진균인 *Aspergillus nidulans*는 핵상의 변화로 보면 3종류의 생활사를 가지는데, 단수체의 핵상이 변화가 없는 무성생식, 단수체에서 이배체로 되었다가 감수분열에 의해 단수체로 변하는 유성생식, 그리고 이배체가 감수분열에 의하지 않고 nondisjunction에 의해 단수체화하는 준유성생식(parasexual cycle)이 그것이다(Pontecorovo *et al.*, 1953). 이 중 유성생식과정에서는 서로 다른 광이실(photocycle)이 융합한 후 다핵 광이실(coenocytic hyphae)이 이핵상(dikaryon)의 자낭을 만드는 특정한 광이실인 ascogenous hyphae로 분화하여 핵융합(karyogamy)이 일어나고 감수분열(meiosis)을 거치게 되며, 감수분열 후 체세포분열에 의해 하나의 자낭(ascus) 안에 8개의 자낭포자(ascospore)가

생성된다. 광이실 융합 후의 모든 과정은 광이실체에 의해 생성된 유성생식 구조물인 cleistothecium 내부에서 일어난다.

유전학적 및 생화학적 분석 결과에 의하면 무성포자(conidia) 형성에는 여러 가지 유전자의 발현이 요구되는 것으로 알려지고 있지만(Adams and Yu, 1998), 이들의 생리적 기능이나 조절기작에 관한 정보는 많지 못한 실정이다. 돌연변이의 출현 빈도로 추정된 바에 의하면, 무성포자 형성에는 적어도 약 200개의 유전자가 필요하고(Clutterbuck, 1969), 무성포자를 형성하고 있는 균체로부터 mRNA를 얻어 이에 대한 cDNA를 만들어 계산할 결과는 약 1,200개의 유전자가 요구된다고 알려졌는데(Timberlake, 1980), 이는 전체 게놈의 6% 정도를 차지하는 양이며, 이 중 포자형성과정에 특이하게 작용하는 유전자는 대략 300여종으로 추정된다. 이와 같은 결과는 적어도 mRNA 수준에서 볼 때 상당히 많은 양의 유전정보가 무성포자 분화 과정에 이용된다는 사실을 시사한다. 또한 무성분화의 신호 물질 생성에 관여할 것으로 추정되

*Corresponding author <E-mail : dmhan@wonkwang.ac.kr>

는 *fluG*(Lee and Adams, 1994), 무성분화 결정과정에 관여할 것으로 추정되는 *flbB*, *flbC*, *flbD*(Adams and Yu, 1998) 등이 보고되었다.

유성분화 유도과정에서 *Aspergillus*의 무성분화나 *Saccharomyces* 또는 *Neurospora*의 유성분화와 다른 중요한 특징은 영양분의 고갈이 유성분화를 유도하는 것이 아니라는 점이다. 오히려 유성분화는 충분한 양의 탄소원과 질소원이 있을 때 더욱 잘 일어난다(Han *et al.*, 1994). 이러한 현상은 *A. nidulans*의 유성포자 형성이 좋지 않은 환경을 극복하기 위한 방법이기 보다는, 좋은 환경일 때 유전적으로 다양한 자손을 생산해내기 위한 방편일 가능성을 시사하고 있다.

*A. nidulans*의 분화에 영향을 미치는 여러 환경 요인들을 조사한 결과 균체의 생장을 저해하는 요인 즉 스트레스가 존재할 때 유성분화는 억제되고 무성분화가 선호되는 경향이 있음이 확인되었다(Han *et al.*, 2003). 즉, 고농도의 포도당 및 글리세롤 또는 젓당과 같은 탄소원에서 무성분화보다 유성분화가 주로 유도되고, 반면 저농도의 포도당에서는 무성분화가 주로 유도되며 초산(acetate)을 탄소원으로 주었을 때는 무성분화만이 유도되었다. 이는 에너지 대사가 주로 호기성 호흡에 의존될 때 유성분화보다 무성분화로의 분화결정이 일어남을 시사하고 있다. 액체배양한 균사를 고체배지로 옮긴 후 공기를 차단하고 계속 배양하면 유성기관만 발생하는데, 이러한 현상은 저산소(hypoxia) 또는 혐기적(anaerobic) 조건에서는 유성분화가 주로 유도됨을 보여준다(Han *et al.*, 1990). 또한 1 M KCl, 0.5 M MgSO₄ 등 염분 스트레스(salt stress)와 1.2 M sorbitol과 같은 삼투 스트레스(osmotic stress) 또는 빛에 의한 스트레스(light stress) 등의 환경적 스트레스가 존재할 때 유성분화는 거의 억제되고 무성분화만 일어나는데 약조건에서 휴지상태로의 세포 분화는 유성포자보다는 무성포자가 선호된다는 사실을 나타내고 있다. 이러한 결과는 외부적 스트레스에 반응하여 분화의 방향을 결정하는 조절시스템이 존재할 것임을 시사하고 있다. 이와 같이 스트레스에 반응하여 분화의 방향을 결정하는 특이 유전자가 존재할 것이라는 개념 하에 새로운 유전자의 대량 탐색을 위한 방법으로서 빛에 반응하지 않는 돌연변이, 고삼투와 초산을 단일 탄소원으로 공급한 조건에 대해 반응이 다른 돌연변이를 분리 시도하여, 빛에 대해서만 특이하게 반응하는 돌연변이가 8종이 동정되었는데 이들은 각각 6종의 서로 다른 complementation 그룹에 속하는 것으로 판명되었으며 각각의 돌연변이 유전자들은 *silA98*, *silB216*, *silC18*, *silD6*, *silE11*, *silF174*로 명명되었다(Min *et al.*, 2007).

본 연구에서는 *silA98* 돌연변이를 상보하는 *silA* 유전자를 분리하여 그 구조를 분석하고, 유전자 결실 돌연변이를 제조하여 형질을 관찰함으로써 이 유전자의 기능을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

균주, 배지 및 배양조건

*A. nidulans*의 야생형 균주로 Fungal Genetics Stock Center(FGSC)에서 분양받은 A4를 사용하였으며 유전자 파괴 및 과다발현용 균주로는 *pyrG89*를 가진 A773균주와 교배하여 *veA*⁺이며 *pyrG89*의 지표를 지니는 재조합체를 분리하여 HSY2(*veA*⁺, Δ *argB::trpC*, *anA1*)로 명명하였으며 이를 사용하였다. *Escherichia coli* 균주는 DH5 α 를 사용하였다. 유전자를 분리하기 위한 genomic library는 FGSC에서 구입한 pRG3-AMA1-*NotI* library를 사용하였고, 재조합 plasmid DNA 제작과 DNA 증폭을 위한 벡터는 pBluescript II SK(-)(Stratagene, USA)와 T-Easy vector (Promega, USA)를 사용하였다.

완전배지(CM)와 최소배지(MM)는 Han 등(1990)의 방법으로 준비하였다. *A. nidulans* 균주는 37°C, 완전배지에서 3일간 배양하였으며, 유전학적 분석을 위하여 필요한 영양요구물이 첨가된 최소배지를 사용하였다. 콜로니 크기를 제한하기 위해서 sodium deoxycholate를 최종농도가 500 mg/l이 되게 첨가하였다. 무성포자는 3일간 배양한 배양접시로부터 0.01% Tween80으로 수확한 다음 적당한 점중수로 희석해서 이 희석액 1 ml을 액체 배양액에 접종하여 배양, 형질전환에 사용하였다. 유성분화를 효과적으로 유도하기 위해 접종 후, 24시간 동안 밀봉하여 배양하고 해제시킨 다음 계속 배양하였다(Han *et al.*, 1990). *E. coli* 균주들은 LB배지, ampicillin과 kanamycin이 첨가된 LB배지와 MacConkey agar배지에서 배양하였다.

DNA 추출 및 조작

silA 유전자의 염기서열을 분석하기 위해 AMA1-*NotI* library의 *NotI*-*SmaI* 4.3 kb의 genomic DNA가 삽입된 절편을 잘라내고 이를 pBluescript II SK에 클로닝하여 pSILA 라 하였으며 이의 제한효소 지도를 작성하였다(Fig. 1). 이 절편을 다시 *SalI* self ligation 6 kb(pSILA9803)과 *SalI*-*SalI* 1.3 kb 절편(pSILA9804), *PstI* self ligation 5.7 kb(pSILA9801), *PstI*-*PstI* 절편 1.6 kb(pSILA9802) 등과 같이 pBluescript II SK에 subcloning하여 염기서열을 분석하였다. 서브클로닝을 수행하기 위한 플라스미드 DNA는 alkaline lysis방법(Sambrook *et al.*, 1989)을 사용하여 준비하였으며, 중합효소 연쇄반응이나 *A. nidulans* 형질전환체로부터 플라스미드 DNA를 회수, 그리고 Southern analysis를 수행하기 위한 genomic DNA는 Lee and Taylor(1990)의 방법으로 추출하였다. 즉, 말린 균사체 가루 20~60 mg을 미량튜브에 담아, 400 μ l의 Lysis buffer[50 mM Tris-Cl(pH 8.0), 50 mM EDTA(pH 8.0), 3% SDS, 1% 2-mercaptoethanol]를 첨가하여 잘 혼합하였다. 이 tube를 65°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 동량의 phenol/chloroform을 넣어 추출하였고 에탄올로 침전

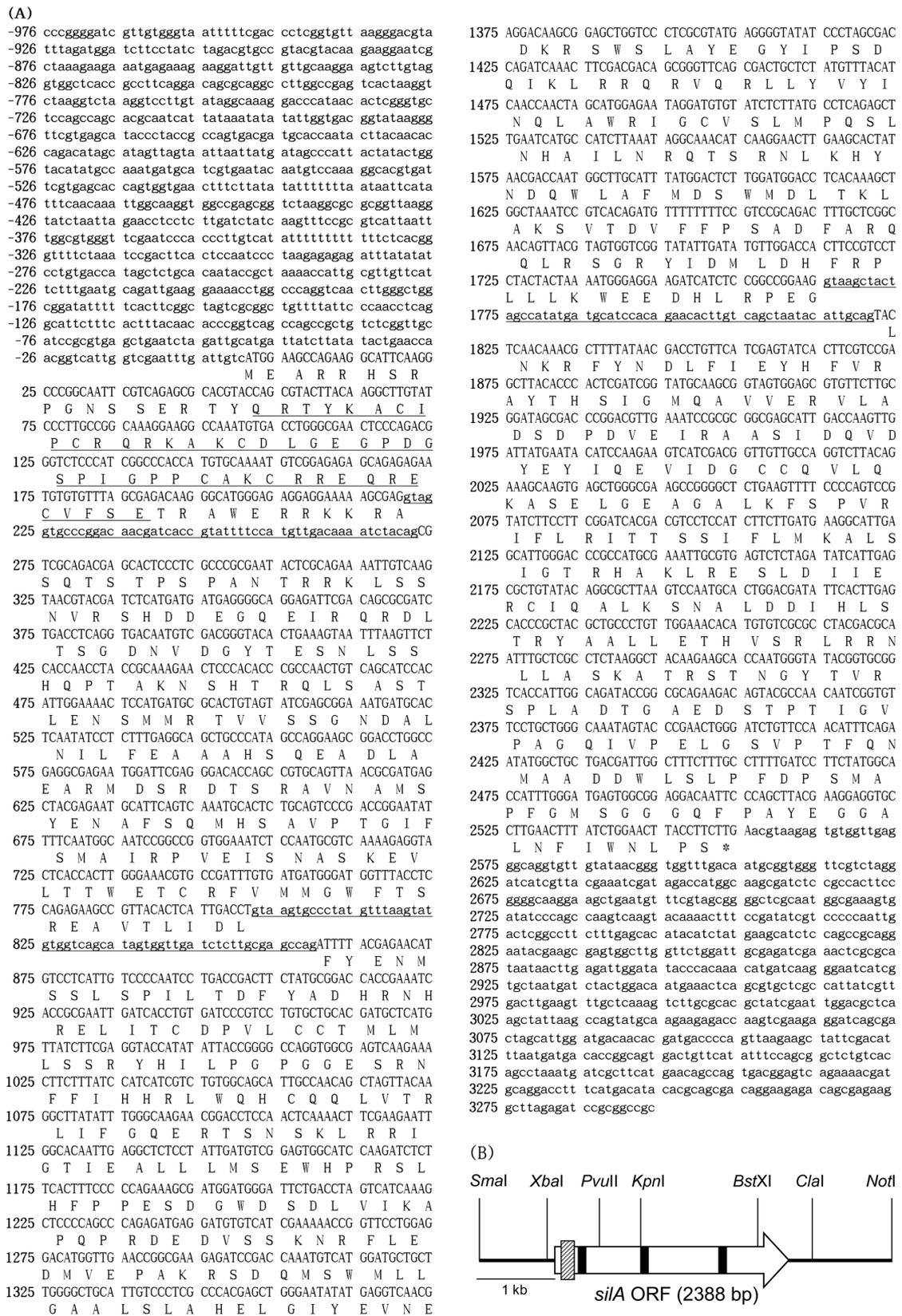


Fig. 1. DNA sequence and Physical map of *silA* gene. (A) The complete sequence of *SmaI-NotI* DNA fragment which includes the whole *silA* ORF is shown. Underlined capitalized letters are binuclear zinc cluster motif and underlined small alphabet regions indicate introns. (B) Restriction map and gene structure of *silA* gene. *silA* ORF is indicated as arrow. Introns and Zn_2Cys_6 binuclear zinc cluster motif are represented as black boxes and dashed box, respectively.

Table 1. Oligonucleotide primers used in this study

Name	Sequences (5'-3')
SAS 1	ACAATGTCCAAAGGCACG
OMK24	AAGGGTTCGTGAGCATACCC
OMK25	CAAATGAGGCCTCTAAACTGGTCAGGCAAGGGATACAAGCCTTG
OMK26	CAAGGTAGATCCAGGCCTAACACAAAGAGTGTGTGGTTGAGGGCAG
OMK27	CTGACGTAGCAAGCACTGCA
OMK28	GCGATCATTTAGGCTGTG
argB Forward	GACCAGTTTAGAGGCCTC
argB Reverse	GTGTTAGGCCTGGATCTA
SAS22	CCCTCGAGGGCCACACTCTTAC
SAS23	CCCTCGAGGGGAATTTGATTGT

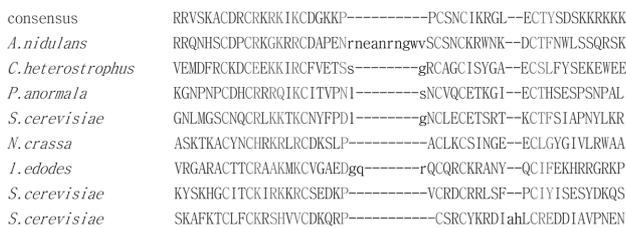


Fig. 2. Multiple alignment of Zn₂Cys₆ binuclear zinc cluster motif between various fungal transcription factors.

시켰다. 얻어진 DNA는 Sambrook(1989) 방법에 의해 DNA조작에 사용하였다.

UV조사를 통해 확보한 돌연변이균주들을 complementation하는 유전자를 확보하고자, *A. nidulans*에서 자가 복제서열(autonomous replication)인 AMA1을 가지고 있는 벡터를 사용한 고효율 형질전환 genomic library인 pRG3-AMA1-*NotI* library를 이용하여 형질전환을 실시하였다. *A. nidulans*의 형질전환은 Min 등(2007)의 방법을 사용하였으며 *E. coli*를 형질전환은 CaCl₂ 방법을 사용하였다(Sambrook *et al.*, 1989).

중합효소 연쇄반응은 Min 등(2007)의 방법에 따라 수행하였다. ORF 분석을 위한 PCR과 RT-PCR은 rTaq과 ExTaq(Takara, Japan)을 이용하였으며, reverse transcriptase는 AMV(Promega, USA)를 사용하였다. 반응산물은 0.7% agarose gel에서 전기영동 하여, 예상된 DNA band를 UltraCleanTM15 DNA Purification Kit으로 정제한 후, pGEM[®]-T Easy Vector System I을 이용하여 클로닝 하였다.

유전자 제거(deletion) 수행을 위해 Double-Joint PCR (Yu *et al.*, 2006)을 수행하였다. 먼저 oMK24, oMK25 primer(Table 1; Fig. 3A①, ②)로 5'-flanking region을, oMK26, oMK27 primer(Table 1; Fig. 3A③, ④)로 3'-flanking region을 증폭할 수 있도록 PCR을 수행하고, *argB* 유전자에서 *argB* Forward, *argB* Reverse primer (Table 1; Fig. 3A⑦, ⑧)로 PCR을 수행하여 첫 번째 PCR 산물을 얻어내었다. 두 번째 PCR은 첫 번째 PCR에

서 얻어진 3종류의 절편을 이용하여 융합하는 PCR을 수행하였고, 마지막 단계로 annealing한 PCR mixture를 주형으로 하고 nested primer 인 SAS1, oMK28(Table 1; Fig. 3A⑤, ⑥)으로 PCR 하여 *silA* deletion을 위한 PCR 최종산물을 제조한 다음 형질전환용 균주인 HSY2를 형질전환하였다(Fig. 3A).

silA 유전자의 과다발현 벡터를 제조하기 위하여 *A. nidulans* 야생형 균주의 genomic DNA를 주형으로 하여 SAS22과 SAS23 primer들(Table 1)로 PCR을 수행하여 *silA*의 ORF를 포함하는 약 2.4 kb의 PCR product를 얻었고, 이를 pGEM T-Easy 벡터에 클로닝하였다. 이를 염기서열을 분석 후 구성 염기서열이 모두 정상인 pSILAOET8를 얻어내었다. pSILAOET8과 *niaA* promoter를 포함하고 있는 pRB2-1 vector 각각을 *XhoI*으로 처리하여 ligation 하고 *E. coli* 형질전환체를 얻어 이를 pSILAO21이라 명명하였다.

Southern과 Northern hybridization

0.7% TAE agarose gel에서 DNA를 전기영동 하여 0.4 N NaOH를 이용한 upward capillary 이동을 통해 HybondTM-N⁺로 이동시켰다. DNA를 이동시킨 후, cross linking을 위하여 UV를 처리하고 Modified church buffer(Church and Gilbert, 1984)와 준비된 [α -³²P] labeled probe를 사용하여 hybridization을 수행하였다. Probe는 Random primer labeling kit(Takara, Japan)을 사용하여 제조하였다. Hybridization 후, membrane을 2× SSC와 0.5% SDS 혼합액으로 실온에서 10분간 세척하고, 이를 한 번 더 반복 세척한 후 1× SSC와 0.1% SDS 혼합액으로 65°C에서 30분간 세척하였다. 이렇게 세척된 membrane을 -70°C에서 KODAK BioMax MS Film(Kodak, USA)에 노출시켰다.

Northern 분석용 *A. nidulans* RNA는 말린 균사체 가루 50~100 mg으로부터 Easy-BLUETM(iNtRON)를 이용하여 추출하였다. 얻어진 RNA(약 20 mg)를 1.0% formaldehyde agarose gel에서 전기영동하여, 20× SSC를 이용한 upward capillary 이동을 통해 HybondTM-N⁺로 이동시켰

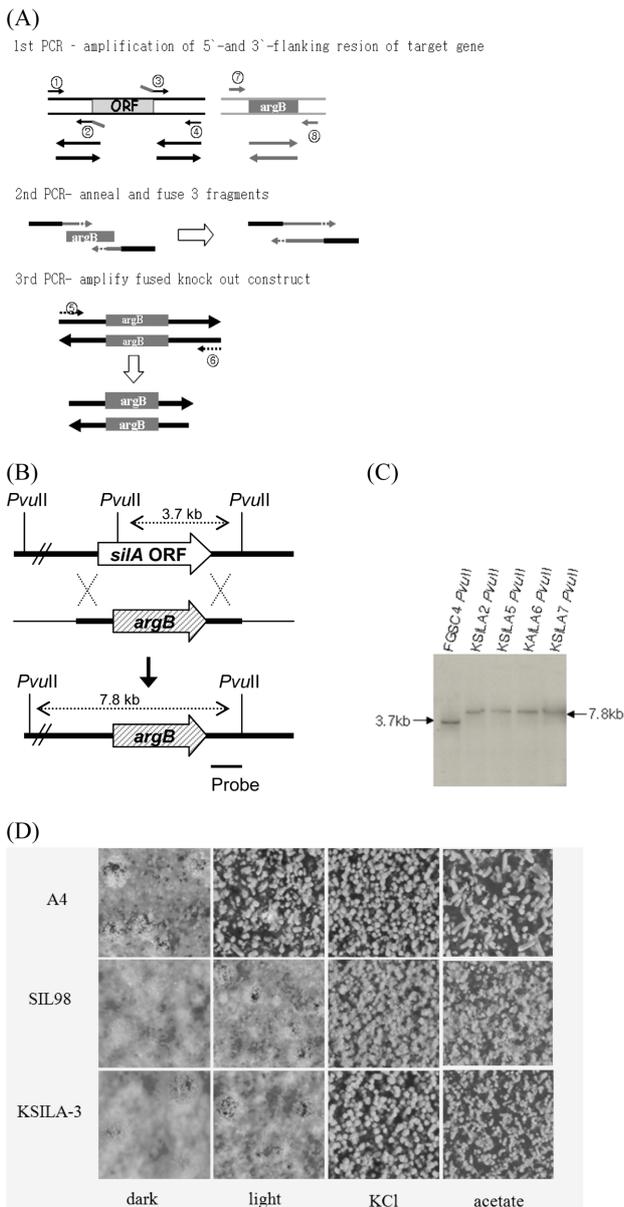


Fig. 3. Construction and phenotypes of *silA* deletion mutant. (A) Schematic diagram of generation of the *silA* gene deletion construct by DJ-PCR. (B) Schematic diagram of replacement of *silA* by a selection marker, *argB*. (C) Confirmation of the *silA* gene deletion by Southern hybridization. (D) Phenotype of *silA* deletion mutant (KSILA-3) and *silA* allelic mutant (SIL98).

다. Hybridization, probe labelling, washing 그리고 signal detection 은 Southern hybridization과 같은 방법으로 수행하였다.

표현형 및 유성분화와 무성분화 비율 조사

*A. nidulans*의 야생형 균주 및 *silA* 유전자의 결손 돌연변이 균주의 무성포자를 0.01% Tween 80으로 수확하여 glucose 1%의 고체 최소배지에 접종량이 2.0×10^6 cells/

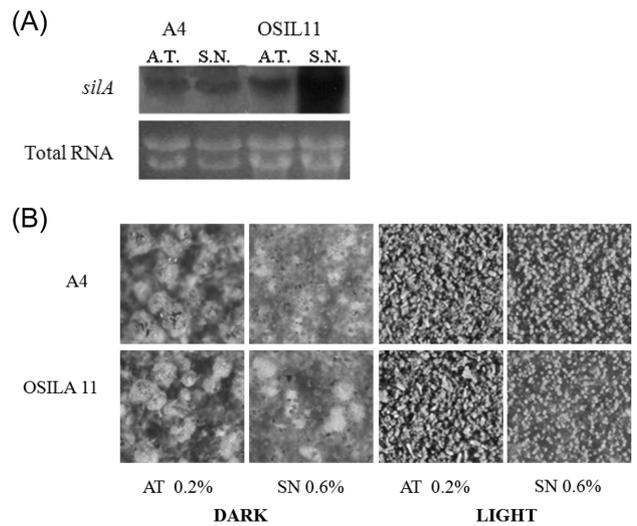


Fig. 4. Phenotype of *silA* over-expression strain. (A) Confirmation of over-expression of *silA* by Northern blot analysis. (B) Phenotypes of *silA* over-expression strain (OSILA11). AT (ammonium tartrate); repression condition, SN (sodium nitrate); induction condition.

*m*이 되게 희석하여 배양접시 당 $500 \mu\text{l}$ 를 접종한 다음 4일간 배양하여 관찰하였다. 유성분화의 비율은 36 mm^2 안에 있는 cleistothecia의 수를 세었고, 무성포자의 비율은 36 mm^2 안에 있는 무성포자를 0.01% Tween 80 1 ml에 희석시켜 haemocytometer를 이용하여 광학현미경으로 포자의 수를 세어 조사하였다.

결과 및 고찰

***silA* 유전자의 클로닝과 염기서열 결정**

A. nidulans 야생형 균주는 빛의 존재하에서는 유성생식이 강하게 억제되는 특성을 가지고 있다. 기존의 연구에서 자외선을 이용하여 돌연변이를 유발시킨 무성포자를 3,500 Lux의 형광등 빛이 존재하는 조건에서 완전배지에서 배양하였을 때 자낭각(cleistothecia)을 생성하는 돌연변이균주들 8종을 분리하였다(Min *et al.*, 2007). 이들은 각각 6종의 서로 다른 complementation 그룹에 속하는 것으로 판명되었으며 각각의 돌연변이 유전자들은 *silA98*, *silB216*, *silC18*, *silD6*, *silE11*, *silF174*로 명명되었다(Min *et al.*, 2007). 분리된 돌연변이균주들을 complementation 하는 유전자를 확보하고자, genomic library를 이용하여 형질전환을 실시하였다. 약 20,000여 *pyrG*⁺ 형질전환체를 분석하여 *silA98* 돌연변이를 complementation하는 genomic DNA 조각 *NotI-SmaI* 4.3 kb를 확보하였다.

silA 유전자를 분석하기 위해 라이브러리 절편 4.3 kb의 genomic DNA를 포함하는 pSILA의 restriction map과 DNA의 염기서열을 결정하였으며 Open Reading Frame (ORF)이 중단되는 부위를 중심으로 RT-PCR을 수행하여

intron의 존재를 확인하였다(Fig. 1). 그 결과 *silA* 유전자는 3개의 intron과 4개의 exon으로 구성되어 있는 것으로 밝혀졌으며, 3군데에 존재하는 intron은 각각 52 bp(intron I), 58 bp (intron II), 57 bp (intron III)의 크기를 가지고 있었다. ORF는 2,388 bp의 염기로 구성되어 있었으며 795개의 아미노산을 암호화하고 있는 것으로 추정되었다(Fig. 1). 염기서열이 분석된 결과를 토대로 NCBI(Nation Center for Biotechnology Information)의 *A. nidulans* genome database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)를 이용하여 검색한 결과, *silA* 유전자는 chromosome VII에 위치하고 있는 AN1893.2 유전자로 annotation 되어 있는 것을 확인하였다.

silA 유전자의 구조 분석

silA 유전자의 DNA 염기서열을 NCBI의 Blastn으로 상동성을 조사한 결과 *Saccharomyces cerevisiae*에서 aromatic 아미노산에 반응하여 활성이 조절되는 *ARO80* 유전자와 상동성이 있는 것으로 나타났으며, SilA 단백질은 N-terminus 부위의 아미노산 서열 24부터 59까지에 진균 특이적(fungal specific)인 보존된 Gal4 type Zn₂Cys₆ binuclear cluster DNA binding motif를 가지고 있는 것으로 나타났다(Fig. 2). 핵 세포에서 전사를 조절하는 GATA box나 TATA box를 검색한 결과 GATA box는 -174 bp에 한 군데 존재하고 TATA box는 -40 bp 등에서 존재하였지만 GATA box의 존재 위치로 미루어 보아 -174 bp의 GATA box가 전사를 조절하는 것으로 추정하고 있다. 그리고 특이하게 진핵세포 염색체의 양 끝에서 관찰되는 말단립(telomere) 염기서열이 -34 bp~-766 bp 부위에서 발견되었다.

silA 유전자의 결실 돌연변이의 분리 및 유전적 분석

silA 유전자의 기능을 알기위해 *A. nidulans* 야생형 균주의 유전자를 double crossing-over를 통한 상동성 재조합(homologous recombination)에 의해 인위적으로 결여시키는 방법을 이용하여 결실 돌연변이를 제조하였다. *silA* 유전자를 제거하기 위해 pSILA를 주형으로 재료 및 방법에 기술한 바와 같이 Double-Joint PCR(DJ-PCR; Yu *et al.*, 2006)을 수행하여 얻어진 PCR 최종산물로 형질전환용 균주인 HSY2를 형질전환 하였다(Fig. 3). 먼저 *argB*⁺인 형질전환체 중 *silA98* 돌연변이와 유사한 형질을 보이는 형질전환체를 4종 분리하여 Southern hybridization을 통하여 *silA* 유전자가 결실되었음을 확인하고자 하였다(Fig. 3C). Fig. 3B에 보듯이 야생형은 *silA* ORF 내에 *PvuII* 절단부위가 있으나 *argB* 유전자 내부에는 없다. 따라서 야생형은 ORF중 3' 말단을 probe로 사용했을 경우 약 3.7 kb의 DNA가 관찰되지만 *silA* ORF가 *argB*로 치환된 결실돌연변이는 *silA* ORF 외곽의 *PvuII* 절단부위만 잘리므로 약 7.8 kb의 DNA만 나타난다. Fig. 3C는 예상

과 정확하게 일치하는 결과를 보여주고 있다. *silA* 결실 돌연변이의 형질을 알아보기 위해 유성분화가 전혀 일어나지 않는 조건, 즉, 빛과 고삼투(0.6 M KCl) 등의 스트레스가 존재하는 조건과 초산을 단일 탄소원으로 주어진 경우에서의 유성분화 양상을 관찰하였다. 그 결과 돌연변이들은 고삼투 및 초산배지 조건에서는 야생형과 같이 유성분화를 하지 못하였다(Fig. 3D). 그러나 이들은 모두 *silA98* 돌연변이와 유사한 정도로 광 스트레스 조건하에서 유성생식 기관(cleistothecium)을 형성하였는데(Fig. 3D), 이 결과는 *silA* 유전자가 빛에 특이하게 반응하여 유성분화를 억제하는데 관여하는 유전자라는 것을 보여주고 있다.

silA 유전자의 과발현(over-expression)

silA 유전자 결실돌연변이의 형질은 SilA 단백질이 빛에 특이하게 반응하여 유성분화를 억제하는 기능이 있음을 보여준다. *silA* 유전자가 과다하게 발현되거나 특정 발생 과정에 강제적으로 발현되었을 때 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 nitrate에 의해서는 유도되고 ammonium에 의해서는 억제되는 *niiA* 프로모터를 이용하였다. *silA* 유전자를 *niiA* 프로모터에 재료 및 방법에서 기술한 바와 같이 재조합하여 과다발현 벡터인 pSILAO21를 제조하였으며 이를 호스트 균주인 HSY2에 형질전환 하였다. 이를 통하여 얻어진 형질전환체 중 Southern hybridization을 수행하여 하나의 copy만 삽입된 균주인 OSILA21균주를 얻었으며 이 균주를 이용하여 Northern Hybridization을 수행하여 전사발현양상을 확인하였다(Fig. 4). 표현형을 관찰하기 위하여 *niiA* 프로모터 발현을 억제하는 ammonium tartrate와 *niiA* 프로모터 발현을 유도하는 sodium nitrate를 첨가한 배지에서 빛이 없는 조건과 빛이 있는 조건하에서 각각 관찰을 하였고, *niiA* 프로모터 발현을 유도하는 sodium nitrate의 농도를 0.1%와 0.6% 상태에서 관찰하였다. 과 발현 균주와 야생형의 표현형이 각 조건에서 큰 차이를 보이지 않았으며 이는 *silA* 유전자의 발현양이나 유전자의 과발현으로 인해 야기될 수 있는 SilA 단백질 양의 차이가 형질에 크게 영향을 미치지 않을 수 있음을 보여 준다(Fig. 4).

적 요

*Aspergillus nidulans*는 빛이 없는 조건에서는 유성분화가 주로 일어나고 빛이 있는 조건에서는 유성분화가 억제되고 대신 무성분화가 유도된다. 빛에 의해서 유성분화가 억제되는 것은 빛에 반응하여 유성 또는 무성분화를 조절하는 유전자가 있다는 것을 시사한다. 따라서 빛에 의해서 조절되는 유전자를 연구하기 위하여 광 조건하에서 유성분화를 하는 *silA98* 돌연변이를 분리하였으며, 이를 보완하는 유전자를 분리 및 분석하고자 *A. nidulans*의

AMA-NotI genomic library로부터 silA98 돌연변이를 상보하는 유전자 silA를 분리하였다. silA 유전자의 예상 ORF는 2,388 bp의 염기로 구성되어지고 795개의 아미노산을 암호화하고 있었다. 이 유전자는 Saccharomyces cerevisiae의 ARO80 유전자와 상동성을 보이며 SilA 단백질의 N 말단에는 약 51.9%의 상동성을 가지는 Zn₂Cys₆ motif를 지니고 있었다. silA 유전자 결손돌연변이주는 광 존재 하에서만 아니라 고농도의 sorbitol에서도 유성분화가 유도되었다. 이는 silA 유전자가 빛과 고삼투 조건에서 유성분화를 억제하는 조절과정에 관여하고 있음을 의미한다. silA 유전자를 niiA promoter로 과다 발현시켰을 때의 형질은 야생형과 큰 차이를 보이지 않았다.

사 사

본 연구는 2006년도 원광대학교 교비연구비 지원으로 수행되었음.

참고문헌

- Adams, T. H. and Yu, J. H. 1998. Coordinate control of secondary metabolite production and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:674-677.
- Church, G. M. and Gilbert, W. 1984. Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1991-1995.
- Clutterbuck, A. J. 1969. A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 63:317-327.
- Han, D. M., Han, Y. J., Lee, Y. H., Jahng, K. Y., Jahng, S. H. and Chae, K. S. 1990. Inhibitory conditions of asexual development and their application for the screening of mutants defective in sexual development. *Kor. J. Mycol.* 18:225-232.
- Han, D. M., Han, Y. J., Chae, K. S., Jang, K. Y. and Lee, Y. H. 1994. Effects of carbon sources on the development of *Aspergillus nidulans* with *velA+* or *velA1* allele. *Kor. J. Mycol.* 22:332-337.
- Han, K. H., Lee, D. B., Kim, J. H., Kim, M. S., Han, K. Y., Kim, W. S., Park, Y. S., Kim, H. B. and Han, D. M. 2003. Environmental factors affecting development of *Aspergillus nidulans*. *J. Microbiol.* 41:34-40.
- Lee, B. N. and Adams, T. H. 1994. Overexpression of *flbA*, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of *brlA* and premature initiation of development. *Mol. Microbiol.* 14:323-334.
- Lee, S. B. and Taylor, J. W. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. in PCR Protocol; *A Guide to Methods and Application* pp. 282-287.
- Min, J. Y., Kim, H. R., Han, K. H. and Han, D. M. 2007. Isolation and characterization of *Aspergillus nidulans* mutants which undergo sexual development in light exposure. *Kor. J. Microbiol.* 43:77-82.
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., MacDonald, K. D. and Bufton, A. W. J. 1953. The Genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics.* 5:141-238.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: Laboratory manual, 2nd ed. CSH.*
- Timberlake, W. E. 1980. Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. *Developmental Biol.* 78:497-510.
- Yu, J. H. 2006. Heterotrimeric G protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*. *J. Microbiol.* 44: 145-149.