

RESEARCH ARTICLE

Aspergillus nidulans 무성분화 촉진 조건의 단백질체 및 해당 유전자 기능분석

임주연, 강은혜, 정보리, 박희문*

충남대학교 대학원 생명과학과

Functional Analysis of *Aspergillus nidulans* Genes Selected by Proteomic Analysis under Conditions Inducing Asexual Development

Joo-Yeon Lim, Eun-Hye Kang, Bo Ri Jung, Hee-Moon Park*

Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

*Corresponding author: hmpark@cnu.ac.kr

Abstract

Despite the significance of external environmental factors in differentiation, putative factors involved in differentiation of *Aspergillus nidulans* have not yet been fully understood. A sporulation-specific proteome analysis of *A. nidulans* in the present study revealed that the expression levels of more than 2,400 proteins were affected under conditions inducing sporulation (0.6 M KCl) compared with normal conditions. Among the proteins with predicted functions, two targets, AN1342 and AN9419, were functionally analyzed using targeted deletion strains and phenotypic observations. For AN1342, because the deletion of the corresponding open reading frame caused a reduction in stalk length during asexual development and in pigment production in liquid culture, the gene was designated as *sspA* (short stalk & pigment). Deletion of the AN9419 gene, which is predicted to encode alanyl-tRNA synthetase, led to severe growth defects due to alanine auxotrophy and abolishment of asexual reproduction and thus, the gene was designated as *alaA*.

Keywords: *Aspergillus nidulans*, Development, Proteome, Sporulation

서론

*Aspergillus nidulans*는 자낭균류에 속하는 비병원성 사상균으로, Pontecorvo 등[1]에 의해 진핵세포생물 분화 연구용 모델로 사용되기 시작했다. 효모 유전자의 1.5배에 달하는 유전자를 갖고 있으며, 계통진화학적 측면을 비롯한 많은 부분에서 단세포 균류인 효모에 비해 고등 진핵생물에 더 가까운 특성을 갖고 있다. 무성포자생식 과정은 균사의 foot cell이 형성되

OPEN ACCESS

Kor. J. Mycol. 2017 September, 45(3): 196-211
<https://doi.org/10.4489/KJM.20170024>

pISSN : 0253-651X
 eISSN : 2383-5249

Received: 28 July, 2017

Revised: 30 August, 2017

Accepted: 30 August, 2017

© The Korean Society of Mycology



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

고 이후 균사의 foot cell에서 stalk, metulae, phialide 순으로 기관을 만들고 체세포 분열을 거쳐 phialide 끝에 분생포자(conidia)를 생성한다. 무성분화과정은 central regulatory pathway에 의해 유도되고 조절되는데, *brlA*, *abaA* 그리고 *wetA*를 중심으로 구성된 전사인자의 연속적인 작용을 통하여 조절되고 있다[2]. 이들 세 유전자는 StuA 또는 MedA와 같은 mediator들과 상호작용하여, 수많은 유전자들의 시간적 공간적 발현을 조절함으로써 무성분화과정에 영향을 미친다[3]. 대표적인 자웅동체성 균류인 *A. nidulans*는 단수체에서 이배체를 거쳐 감수분열에 의해 단수체의 포자를 형성하는 유성생식의 생활사도 가지고 있다. 유성생식기관은 cleistothecium으로 검붉은 구의 형태인데, 그 안에 8개의 자낭포자(ascospore)를 포함하는 자낭(ascus)이 발달된다. 영양생장단계에서 여러 가지 환경 조건과 유전적인 조절이 상호작용하여 무성분화 또는 유성분화 발달을 조절하게 되는데, 이 때 분화를 조절하는 핵심 인자로 알려진 단백질이 VeA이다. VeA는 균류 특이적 단백질로, 빛이 없을 때 특이적으로 핵 안으로 이동하여 유성분화를 유도한다[4]. 돌연변이의 *veA1* 유전자를 갖는 균주는 유성분화 빈도가 감소하고, *veA* 결손균주는 cleistothecia를 생산하지 못한다[5]. 그 외 분화에 영향을 미치는 세포 내 요소로는 COP complex를 예로 들 수 있는데, 이는 총 7개의 COPs (α -, β -, β' -, γ -, δ -, ε -, 그리고 ζ -COP), ras-like GTPase, ADP ribosylation factor로 구성이 되어 소포체와 골지복합체 사이의 단백질 수송에 관여하는 막성구조체이나 ε -COP이 결손되면 유성분화 기관의 형성을 현저히 감소시킨다[6]. 빛 이외에도 탄소원과 질소원의 종류와 농도, 염의 종류와 농도 등이 분화를 결정하는 환경요소로 알려져 있는데, 특히 염이 첨가된 조건에서 유성분화 보다는 무성분화 쪽으로 분화가 촉진된다[7].

*A. nidulans*의 분화와 관련하여 단백질 분석을 시도한 선행연구로는, 영양생장이 개시되는 포자발아(germination) 단계에서의 단백체를 비교 분석한 연구가 있으며[8], osmoadaptation과 hypoxia에 대응하는 인자를 찾기 위하여 osmostress와 저산소 조건에서 각각 단백체를 분석한 보고가 있다[9, 10]. 본 연구에서는 단백질 분석을 통해 무성포자 형성에 특이적으로 작용하는 유전자를 찾고 기능을 규명하고자 하였다. 이를 위하여 액체 배지에서 키운 균사체를 무성포자 형성을 촉진하는 인자로 알려진 KCl이 0.6 M 농도로 첨가된 고체 배지에 옮겨 9시간과 18시간 배양한 후 추출한 단백질의 변화를 분석하여 새로운 무성분화 특이 인자를 찾고자 하였다. 단백질의 분리 동정을 위한 2-DE (dimensional electrophoresis) 분석을 통해 총 2,400여개의 단백질 spot을 확인했고, 그 중 발현양이 유의성 있게 변화한 단백질 spot 100여개를 선별하였다. 단백질 분석용 시료 추출 시간대별로 spot의 발현 변화 양상에 따라 총 5개의 그룹으로 나누고, 그 중 일부 단백질의 유전자를 결손 시킨 재조합 균주를 제작하고 표현형을 관찰함으로써, 해당 유전자의 기능을 해석하고자 하였다. 단백질 생성량이 크게 변하는 spot 중에서도 현재까지 그 기능이 잘 알려져 있지 않은 단백질을 기능분석의 대상으로 삼았다. 본 연구에서는 AN1342와 AN9419 두 유전자의 ORF를 각각 결손 시킨 형질전환체를 제조하여 분화과정 등 표현형의 변화를 관찰하였고, 이에 근거하여 두 유전자를 각각 *sspA* (short stalk & pigment)와 *alaA* (alanyl-tRNA synthetase)로 명명하였다.

재료 및 방법

단백체 분석용 시료 준비

야생형 균주인 *Aspergillus nidulans* FGSC A4를 완전배지에서 14시간 액체배양한 후 멸균증류수와 등장완충용액으로 세척했다. 무성포자 형성을 촉진하는 0.6 M KCl을 첨가한 고체배지와 첨가하지 않은 고체배지로 옮겨 각각 9시간과 18시간 배양한 균사체를 걷어내어 Miracloth를 이용하여 물기를 짜낸 후 액체질소로 얼려 다음과 같은 조건으로 파쇄하여 단백체를 추출하였다. 즉, 균사체 파우더에 7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 1% (w/v) dithiothreitol (DTT) and 2% (v/v) pharmalyte and 1 mM benzamidine로 구성된 단백질 추출용 완충용액을 첨가하여 motor-driven homogenizer를 이용해 균질화하였다. 상온에서 vortexing 후, 15,000xg 로 1 시간 동안 15°C에서 원심분리하여 불용성 물질을 제거한 단백질 추출액을 준비하고 Bradford assay로 단백질 농도를 측정하였다[11].

2D PAGE 및 이미지 분석

IPG dry strips을 12~16시간 동안 7 M urea, 2 M thiourea, 2% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 1% dithiothreitol (DTT), 1% pharmalyte에 적신 후 200 µg의 시료를 넣어주었다. Isoelectric focusing (IEF)은 20°C에서 Multiphor II electrophoresis unit과 EPS 3500 XL power supply (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK)을 사용하여 진행하였다. Strip을 equilibration buffer (50 mM Tris-Cl, pH6.8 containing 6 M urea, 2% SDS, 30% glycerol)에서 처음에는 1% DTT와, 두 번째는 2.5% iodoacetamide와 10분씩 반응 후, SDS-PAGE gels 위에 올리고 20°C에서 1,700 Vh로 전기영동 하였다. Gel은 은염색으로 시각화하여 PDQuest software (version 7.0; BioRad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 단백질 분석용 시료는 동일한 배양 조건과 추출 조건에 따라 독립적으로 3번 준비하여, 각각 2-DE를 통한 단백질 전개 실험을 반복하였다.

분리된 단백질의 동정

단백체를 2-DE로 전개시킨 후 얻은 단백질 spot은 modified porcine trypsin을 처리하여 단백화하였다[12]. SDS, 유기용매, 염색 시약 등의 불순물을 제거하기 위해 50%의 acetonitrile로 세척하고, trypsin (8~10 ng/µL)을 처리하여 37°C에서 8~10시간 반응시켰다. 단백질 분해반응은 0.5% trifluoroacetic acid를 5 µL 첨가하여 종결시키고 단백질 단편들을 수용액 상태로 회수하여, C18ZipTips (Millipore)을 이용하여 1~5 µL 부피로 탈염 및 농축하였다. 이 농축액은 동량의 50% aqueous acetonitrile에 포화된 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid와 혼합하고, 질량분석을 위하여 target plate 위에 적하 하였다. 질량분석기는 Ettan MALDI-TOF (Amersham Biosciences)를 사용하였다. Target plate 상에 있는 단백질 단편들은 337 nm의 N2 laser를 조사하여 기화시킨 다음, 20 Kv injection pulse로 가속시켰다. 300 laser shots의 누적 peaks에 의해 각각의 단백질 spot에 대한 mass spectrum을 구하였다. ProFound 검색 엔진으로부터 얻어진 단백질 정보를 *Aspergillus nidulans* Database (<http://www.broad>

mit.edu/annotation/genome/aspergillus_nidulans/Home.html) 정보와 비교하여 195개 단백질에 해당하는 최종 목록을 얻을 수 있었다. 기능이 밝혀져 있지 않은 단백질의 경우에는 BLAST search를 통하여 찾아진 다른 생물체 유래 ortholog의 자료를 통해 그 기능을 유추하였다.

균주 및 배지

본 연구에 사용된 *Aspergillus nidulans* 균주는 Table 1에 정리된 바와 같다. Minimal medium (MM)과 complete medium (CM)에서 37°C로 배양하였으며, 각 배지의 조성은 기존에 보고된 바와 같다[1, 13]. *Escherichia coli* 균주는 DH5 α 를 사용하였고, LB (Luria-Bertani; 1% Bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)에서 배양하였다. Ampicillin 농도는 50 μ g/mL로 사용하였다.

Table 1. *Aspergillus nidulans* strains used in this study

Strains	Genotype	Source
FGSC A4	<i>veA</i> ⁺	FGSC
TJ1+argB	<i>yA2; argB2; pyroA4; argB; veA1</i>	Prof. Shun-Kee Chae
SK880	<i>yA2; argB2; pyroA4; veA</i> ⁺ ; <i>pILJ16 (argB</i> ⁺)	Kang et al.[14]
A1153+argB	<i>yA1; pabaA1; pyroA4; nkuA::bar</i>	This study
Δ <i>sspA</i>	<i>yA2; pyroA4; argB2; veA1; sspA::argB</i>	This study
Δ <i>alaA</i>	<i>yA1; pabaA1; pyroA4; argB2; nkuA::bar; alaA::argB</i>	This study

TJ1+argB, isogenic wild type strain;

Δ *sspA*, *sspA*-deletion strain; Δ *alaA*, *alaA*-deletion strain;

sspA, short stalk & pigment; *alaA*, alanyl-tRNA synthetase.

DNA 절편 제작 및 형질전환

결손 시키고자 하는 유전자(AN1342, AN9419) 각각의 flanking region을 AspGD를 통해 확인 하고, ORF 부분을 *argB* marker로 대체하도록 조작하여 T-vector에 재조합 하였다. *A. nidulans*를 액체 배양한 후 균사체를 VinoTaste Pro (Novozymes) 0.3 g이 첨가된 osmotic buffer (0.6 M KCl, 10 mM NaCl, pH7.5) 15 mL에 풀어주고 30°C에서 1~2시간 반응하여 protoplast로 만들었다. Miracloth를 이용해 protoplast 이외의 산물을 걸러내고 남은 용액에서 원심분리를 통해 protoplast 만을 수득하였다. STC 용액[1.2 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM CaCl₂]을 15 mL 첨가하고 원심분리 후 용액을 제거한 후, 4:1의 비율로 STC 용액과 PEG 용액[25% polyethylene glycol 6000, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM CaCl₂]을 넣고 4°C에서 20분 반응시켰다. 그런 다음 500 μ L PEG 용액을 추가로 넣고 상온에서 20분 반응시켰다. 1 mL의 KC 용액(0.6 M KCl, 50 mM CaCl₂) 첨가 후, 선택배지에 분주하고, 0.8% TOP agar를 부어 식힌 후, 37°C에서 배양하여 형질전환체를 선별하였다.

표현형 관찰

고체배지에서 2일간 배양하여 생성된 포자를 0.08% Tween 80 용액에 보관하였다. 2 ×

$10^7/\mu\text{L}$ 의 포자용액을 고체배지에 접종하여 37°C 에서 배양한 후 균사의 형태 및 생장을 관찰하였다. 10^6 개의 포자를 액체배지에 접종하여 각각 48시간과 96시간 배양하여 얻은 배양체를 유리관이나 petri dish에 옮겨서 균사체 볼의 크기와 색을 관찰하였다. 무성분화기관을 현미경으로 관찰하기 위해서, CM agar block에 포자용액을 접종한 후 cover glass를 올려 24시간 배양했다. 균사체가 자라서 붙은 cover glass를 slide glass에 올려서 DIC 현미경으로 관찰하였고, 20개 이상의 conidiophore의 stalk 길이를 측정해 통계적으로 분석하였다. 유성분화는 액체배지에 키운 균사체를 Casamino acid가 0.15% 첨가된 MM 고체배지에 올려주고, 공기와 빛을 차단하여 3~4일 정제 배양하여 유도하였다. 공기 차단은 24시간 후에 해제하였다 [14]. 유성분화기관의 형성 여부 및 형태 변화는 해부현미경으로 관찰하였다.

RNA 추출과 qRT-PCR

KCl (0.6 M)이 첨가되지 않은 최소 평판배지(A9, A18)와 첨가된 최소 평판배지(A9K, A18K)에서 9시간(A9, A9K)과 18시간(A18, A18K) 무성분화를 유도시킨 배양체를 각각 수득한 후, 액체질소를 첨가한 상태에서 파쇄하였다. RNA는 thiocyanate/CsCl의 밀도 차에 의한 수정된 분리 방법을 이용하여 추출하였다[15]. 분리한 RNA를 주형으로 10 mM dNTPs, 10 pmole/ μL Oligo dT, 5X reverse transcriptase buffer, 100 mM DTT, 20 U/ μL M-MLV reverse transcriptase (Elpis Biotech, Daejeon, Korea)를 이용해 cDNA로 합성하였다. AN1342-344For (TGGCCCCCGGTTTCGTAAA)와 AN1342-1367Rev (TCCTTGAGGGCTGCAATGGC), AN9419-591For (CGGTAAGTGGAGCTTTGGGG)와 AN9419-1593Rev (ACGCTCTTCAGCCATGATGC)의 primer set과 합성된 cDNA를 주형가닥으로 사용하여 PCR을 수행했고 1% agarose gel와 전기영동장치를 이용하여 증폭된 산물을 확인하였다.

결과 및 고찰

2-DE를 이용한 포자 형성-특이 단백질의 분리 분석

야생형 균주를 영양생장 단계까지 키운 후, *Aspergillus nidulans*의 무성포자 형성을 촉진하는 환경인자로 알려진 0.6 M KCl이 첨가된 배지와 첨가되지 않은 배지로 옮겨 배양하였다. 각각 9시간, 18시간 동안 무성분화를 유도한 배양체를 파쇄하여 단백질을 추출하고 투석하여 배지성분 등의 불순물을 제거한 후, 2-DE 방법으로 단백질을 전개하여, mass spectrometer로 동정하고 기존에 알려진 것과 비교 분석하고자 하였다. 세 차례에 걸쳐 시행한 단백질의 2-DE 전개 결과는 유사한 양상을 보였으며, 총 2,400여 개의 spot이 동정되었다(자료제시 생략). 그 중 KCl 존재 유무와 무성분화 유도 시간에 따라 발현양상의 변화를 보인 단백질 정보를 *Aspergillus* database (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/aspergillus_nidulans/Home.html)와 비교한 결과, 약 200개의 단백질이 동정되었고, *A. nidulans*의 단백질로 동정되지 않는 경우에는 다른 생물체의 유전체 및 단백질 분석 데이터베이스에 존재하는 ortholog를 검색하여 검출된 단백질의 기능을 유추하였다. 각 spot의 intensity 평균값이 무성분화 유도시간에 따라 변화하는 양상을 비교하여 총 5개의 그룹으로 분류하였다(Table 2). UU 그룹은 0.6 M KCl을 첨가한 배지에서 9시간과 18시간 무성분화를

Table 2. List of identified proteins with different expression pattern under conditions for asexual development

	AN no.	Name	pI	MW	A9K/A9	A18K/A18	Functions
UU group: Increase at 9 hr and 18 hr with KCl supplement							
1	AN0240	pppA	4.9	14.42	2.16	1.68	Transaldolase
2	AN0252		6.7	28.29	3.79	1.62	F0F1-type ATP synthase, gamma subunit
3	AN0285		4.5	16.12	4.13	2.10	Glucosamine-6-phosphate isomerase
4	AN0688		5.4	44.21	5.92	1.50	Transketolase
5	AN1222	sasA	5.2	34.77	4.00	4.35	S-adenosylmethionine synthetase
6	AN1263		5.3	34.80	6.42	2.92	S-adenosylhomocysteine hydrolase
7	AN1918	acuF	5.4	39.17	2.75	1.76	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)
8	AN1950		6.3	11.73	3.39	2.39	Transient receptor potential (TRP) ion channel
9	AN2295		6.0	24.74	2.32	2.90	Succinyl-CoA synthetase, alpha subunit
10	AN2315		4.4	41.02	1.45	2.20	F0F1-type ATP synthase, beta subunit
11			4.8	33.71	2.29	3.37	
12			5.3	21.66	2.72	1.22	
13	AN2435	aclA	5.2	24.84	2.58	1.40	ATP-citrate lyase
14	AN2875	fbaA	5.7	22.19	2.57	1.58	Fructose 1,6-bisphosphate aldolase
15	AN2932		4.3	9.34	3.51	2.52	Translation initiation factor 4F, helicase subunit (eIF-4A) and related helicases
16	AN2968	ippA	5.1	30.75	3.36	1.59	Inorganic pyrophosphatase / Nucleosome remodeling factor, subunit NURF38
17	AN3059	pgmA	5.2	16.24	2.01	1.39	Phosphoglycerate mutase
18	AN4015		4.8	14.53	3.14	1.07	Translation initiation factor 5A (eIF-5A)
19	AN4443	methH	5.4	18.28	5.07	2.99	Methionine synthase II (cobalamin-independent) / Methionine req., methionine synthase; THPTG methyl transferase
20	AN4667	aspA	4.4	34.15	2.70	1.92	Septin family protein (P-loop GTPase) / Septin
21	AN4736		5.5	21.87	1.82	2.33	Apurinic/apyrimidinic endonuclease and related enzymes
22	AN4871	chiB	4.8	43.53	2.65	3.99	Chitinase
23			4.8	48.13	70.69	3.20	
24	AN5206	lysB	4.4	19.38	3.11	2.42	Isocitrate dehydrogenase, alpha subunit / Lysine req., homoisocitrate dehydrogenase
25	AN5210	pkiA	6.7	33.83	3.66	2.29	Pyruvate kinase / Pyruvate kinase
26	AN5563	gldB	5.7	23.03	2.94	2.42	Aldo/keto reductase family proteins / glycerol deH, osmotolerance
27	AN5895	gdiA	4.7	23.35	2.70	2.36	RAB proteins geranylgeranyltransferase component A (RAB escort protein)
28	AN6010	sgdE	5.0	49.99	1.73	2.60	Molecular chaperones mortalin/PBP74/GRP75, HSP70 superfamily / Spore germination deficient, homology to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Scel
29			5.7	24.82	1.71	2.02	
30	AN6330		5.3	35.71	3.17	2.00	Elongation factor 2
31	AN6341		5.4	85.27	1.35	2.79	Actin-binding protein Coronin, contains WD40 repeats
32	AN6542	actA	5.2	10.41	40.36	4.52	Actin and related proteins
33	AN6631		5.4	11.87	4.56	1.90	Mitochondrial F1F0-ATP synthase, subunit d/ATP7

pI: isoelectric point; MW: molecular weight.

Table 2. List of identified proteins with different expression pattern under conditions for asexual development (Continued)

	AN no.	Name	pI	MW	A9K/A9	A18K/A18	Functions
34	AN7387	pcrA	5.4	23.29	2.66	1.44	Pyrroline-5-carboxylate reductase / Proline synthesis: pyrroline-5-carboxylase reductase
35	AN7570	tubB	5.4	41.02	2.72	1.54	Alpha tubulin / Alpha-tubulin 2
36			5.4	43.82	2.64	1.23	
37	AN7710		5.5	14.81	3.04	1.78	Predicted phosphatase/phosphohexomutase
38	AN7725	pyroA	6.1	36.33	2.20	1.75	Stationary phase-induced protein, SOR/SNZ family / Pyridoxine req.
39	AN8275	citA	6.0	17.28	3.49	2.26	Citrate synthase
40	AN9124		5.4	58.54	1.12	1.20	Molecular co-chaperone STI1
UD group: Increase at 9 hr but decrease at 18 hr with KCl supplement							
1	AN0232	ureD	5.18	16.61	1.65	0.43	Ni2+-binding GTPase involved in regulation of expression and maturation of urease and hydrogenase
2	AN0860		5.14	55.60	1.79	0.46	Hypothetical protein
3	AN11037		5.04	44.96	74.20	0.01	Hypothetical protein
4	AN2829	gmdC	6.70	58.63	1.21	0.07	Amidases / Benzamide ut., General amidase
5	AN2999	idpA	7.97	50.10	1.54	0.32	NADP-dependent isocitrate dehydrogenase / NADP-isocitrate dehydrogenase
6	AN3019		4.18	26.07	1.08	0.00	26S proteasome regulatory complex, subunit RPN12/PSMD8
7	AN4376	gdhA	4.66	19.94	1.14	0.26	Glutamate/leucine/phenylalanine/valine dehydrogenases /
8			5.24	16.52	2.11	0.70	Ammonium sensitive NADP-glutamate deH
9			5.93	13.01	5.83	0.54	
10	AN4443	metH	5.49	16.91	2.94	0.68	Methionine synthase II (cobalamin-independent) / Methionine req., methionine synthase; THPTG methyl transferase
11	AN5129	hsp70	4.78	80.19	1.03	0.85	Molecular chaperones HSP70/HSC70, HSP70 superfamily
12	AN5746	acuN	4.19	19.25	3.24	0.00	Enolase / Acetate ut., enolase
13	AN6182	galD	6.64	49.58	1.68	0.26	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase
14	AN6314		5.49	21.11	1.87	0.46	Hypothetical protein
15	AN6708	pdhA	5.04	40.83	1.05	0.00	Dihydrolipoamide acetyltransferase
16	AN7331		6.10	11.37	1.04	0.23	Cyanate lyase
17	AN7812	stcN	4.72	86.68	3.41	0.28	GMC oxidoreductase
18			4.73	88.56	2.65	0.14	
19	AN7999		5.31	9.96	8.18	0.48	Hypothetical protein
20	AN8979	alcA	6.60	11.59	1.14	0.32	Alcohol dehydrogenase, class V / Ethanol non-ut., alcohol deH I
DU group: Decrease at 9 hr but increase at 18 hr with KCl supplement							
1	AN0410	bimG	4.5	35.45	0.26	2.17	Serine/threonine specific protein phosphatase PP1, catalytic subunit / Blocked in mitosis, phosphoprotein
2	AN0472	engA	6.4	48.85	0.59	3.24	Predicted endo-1,3-beta-glucanase
3	AN0688		7.4	54.74	0.48	1.33	Transketolase
4	AN1047		4.8	93.14	0.81	2.67	Molecular chaperones HSP105/HSP110/SSE1, HSP70 superfamily
5	AN1342		7.8	42.65	0.43	525.07	Alanine-glyoxylate aminotransferase AGT1
6	AN1502	nagA	4.1	89.50	0.01	1.44	Beta-N-acetylhexosaminidase / N-acetylglucosaminidase

pI: isoelectric point; MW: molecular weight.

Table 2. List of identified proteins with different expression pattern under conditions for asexual development (Continued)

	AN no.	Name	pI	MW	A9K/A9	A18K/A18	Functions
7	AN1638		5.1	101.67	0.17	3.39	Puromycin-sensitive aminopeptidase and related aminopeptidases
8	AN2062	bipA	4.2	84.45	0.47	2.15	Molecular chaperones GRP78/BiP/KAR2, HSP70 superfamily / Homology to ER-resident chaperone
9	AN4086		5.5	81.28	0.25	1.43	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta subunit
10	AN4163	cpcB	7.8	36.38	0.45	1.84	CPC2 protein/ WD40 repeat
11	AN4727	ugeA	7.3	43.00	0.47	1.28	UDP-glucose 4-epimerase/UDP-sulfoquinovose synthase
12	AN5577	sodB	8.0	16.48	0.91	3.31	Manganese superoxide dismutase / Mn-superoxide dismutase
13	AN5626	facA	6.8	85.73	0.13	1.49	Acyl-CoA synthetase / Fluoroacetate res., acetate ut. acetyl-coA synthetase
14			6.9	85.65	0.20	1.23	
15	AN7388	cpeA	6.4	86.60	0.08	1.13	Catalase (peroxidase I) / Catalase-peroxidase ("laccase II"), cliestothecial
16	AN8269	hsp90	4.7	98.90	0.38	1.10	Molecular chaperone (HSP90 family)
17			4.9	84.10	0.54	2.44	
18	AN11930		6.3	62.78	0.92	2.48	Meiotic recombination protein Dmc1
DD group: Decrease at 9 hr and 18 hr with KCl supplement							
1	AN0083	taf30	6.1	23.28	0.43	0.74	Transcription initiation factor IIF, auxiliary subunit
2	AN0285		5.8	26.80	0.43	0.97	Glucosamine-6-phosphate isomerase
3	AN0381		5.9	60.80	0.49	0.89	Chaperonin complex component, TCP-1 beta subunit (CCT2)
4	AN0567		6.8	26.06	0.33	0.63	GMC oxidoreductase
5	AN1163		5.9	87.81	0.74	0.43	Chaperone HSP104 and related ATP-dependent Clp proteases
6	AN1194	sD	7.8	23.18	0.33	0.76	Adenosine 5'-phosphosulfate kinase / Sulphate ut., APS kinase
7	AN1222	sasA	5.3	46.11	0.91	0.47	S-adenosylmethionine synthetase
8	AN1429	codA	6.6	65.53	0.25	0.78	Choline dehydrogenase and related flavoproteins
9	AN1913		6.4	79.88	0.46	0.94	Lysyl-tRNA synthetase (class II)
10	AN2867	pgmB	5.6	62.40	0.40	0.62	Phosphoglucomutase / Phosphoglucomutase
11	AN2964	pdhX	7.3	34.91	0.45	0.38	Dihydrolipoamide acetyltransferase
12	AN3255		6.5	23.23	0.71	0.04	Gluthione S transferase
13	AN3720		6.6	105.43	0.29	0.89	Vesicle coat complex COPII, subunit SEC24/subunit SFB2
14	AN3741	alcB	7.7	43.82	0.21	0.74	Alcohol dehydrogenase, class V / Alcohol deH II
15	AN3894		6.7	96.52	0.27	0.88	Aconitase/homoaconitase (aconitase superfamily)
16	AN4000	fabM	6.3	100.19	0.16	0.46	Forced activation of brlA, poly-A binding protein
17	AN4163	cpcB	6.9	22.41	0.49	0.29	G protein beta subunit-like protein / Cross-pathway control, RACK1 homologue
18			8.3	21.14	0.55	0.19	
19	AN4430		5.7	35.38	0.49	0.95	Acetolactate synthase, small subunit
20	AN4457		7.2	18.24	0.31	0.63	20S proteasome, regulatory subunit beta type PSMB2/PRE1
21	AN4869		7.4	25.65	0.05	0.18	20S proteasome, regulatory subunit alpha type PSMA6/SCL1
22			7.4	25.13	0.33	0.65	
23	AN5482	ran	8.1	22.58	0.38	0.47	GTPase Ran/TC4/GSP1 (nuclear protein transport pathway)/ Nuclear transport

pI: isoelectric point; MW: molecular weight.

Table 2. List of identified proteins with different expression pattern under conditions for asexual development (Continued)

	AN no.	Name	pI	MW	A9K/A9	A18K/A18	Functions
24	AN5525	acoA	6.1	81.81	0.42	0.70	Aconitase/homoaconitase (aconitase superfamily)
25			6.8	95.85	0.35	0.97	
26	AN5778		7.4	43.76	0.46	0.85	Actin-related protein Arp2/3 complex, subunit ARPC1/p41-ARC
27	AN5907		7.4	9.62	0.17	0.42	Ribose/galactose isomerase
28	AN6048		7.5	45.24	0.16	0.64	Aspartate aminotransferase/Glutamic oxaloacetic transaminase AAT2/GOT1
29	AN6541		5.6	98.34	0.33	0.51	Glycinamide ribonucleotide synthetase (GARS)/Aminoimidazole ribonucleotide synthetase (AIRS)
30	AN6700		5.6	89.83	0.55	0.47	ATPase component of ABC transporters with duplicated ATPase domains/Translation elongation factor EF-3b
31	AN6717	mdhA	7.9	16.66	0.43	0.72	NAD-dependent malate dehydrogenase / Homology to mitochondrial malate dehydrogenase
32	AN6726		5.5	25.94	0.43	0.95	20S proteasome, regulatory subunit alpha type PSMA2/PRE8
33	AN6985		4.6	67.68	0.22	0.70	Ribulose kinase
34	AN7074		6.7	32.13	0.36	0.40	Short chain DH
35	AN7388	cpeA	6.5	86.86	0.15	0.40	Catalase (peroxidase I) / Catalase-peroxidase ("laccase II"),
36			6.7	87.19	0.10	0.27	cliestothelial
37			6.4	86.60	0.28	0.94	
38			6.6	86.86	0.10	0.30	
39			7.6	33.13	0.39	0.68	
40	AN7687		5.7	85.13	0.36	0.53	Translocase of outer mitochondrial membrane complex, subunit TOM70/TOM72
41	AN7806	stcU	5.5	26.39	0.12	0.23	Sterigmatocystin biosynthesis
42	AN7812	stcN	4.8	98.89	0.11	0.29	GMC oxidoreductase
43	AN7895	cipB	5.5	39.07	0.48	0.36	NADPH:quinone reductase and related Zn-dependent oxidoreductases / Concanamycin responsive protein
44	AN8277	cysD	7.0	50.54	0.48	0.69	Cystathionine beta-lyases/cystathionine gamma-synthases / Sup. of meth, homocysteine synthase
45	AN8684	ngn24	7.0	23.26	0.32	0.35	Predicted N-acetyltransferase
46	AN8979	alcA	7.5	21.18	0.23	0.24	Alcohol dehydrogenase, class V / Ethanol non-ut., alcohol deH I
47	AN9304		5.3	19.06	0.49	0.62	Glutathione S-transferase
48	AN9408	fasB	6.5	96.64	0.47	0.63	Enoyl reductase domain of yeast-type FAS1 / Beta subunit, fatty acid synthase
49	AN9419		6.1	110.33	0.27	0.92	Alanyl-tRNA synthetase
NC group: No change at 9 hr but change at 18 hr with KCl supplement							
1	AN0232	ureD	5.5	28.18	1.00	279.45	Ni2+-binding GTPase involved in regulation of expression and maturation of urease and hydrogenase / Urea ut., urease, nickel-binding protein
2	AN0942	ladA	5.7	46.81	1.00	0.33	Sorbitol dehydrogenase
3	AN3741	alcB	7.7	43.82	1.00	0.00	Alcohol dehydrogenase, class V / Alcohol deH II
4	AN4577	fmdS	5.2	57.40	1.00	0.00	Predicted acetamidase/formamidase / Formamide ut., formamidase
5	AN7812	stcN	5.2	73.42	1.00	0.13	GMC oxidoreductase
6			5.2	71.66	1.00	0.30	

pI: isoelectric point; MW: molecular weight.

유도한 경우가 KCl을 첨가하지 않은 배지의 경우보다 단백질 생성량이 2배 이상 증가한 spot 들이다. 총 42개의 UU spot 중에서 KOGs (eukaryotic orthologous groups)를 통해 기능을 유추할 수 있는 spot 40개를 정리하였다. UD 그룹은 KCl을 첨가한 배지에서 배양 시 9시간 때에는 증가하지만, 18시간 때에는 감소하는 그룹으로 총 39개 spot이 이에 속하였다. 그 중 2배 이상의 증가 또는 감소를 보이는 것은 총 22개였으며, KOG를 통해 기능을 유추할 수 있는 20개를 UD 그룹으로 분류하였다. DU 그룹을 UD 그룹과 반대로 9시간에서 감소하고 18시간에서 증가하는 18개의 spot이다. 이와 같은 양상을 보이는 spot은 59개였는데 차이가 2배 이상 되는 것으로 기준을 적용했을 때 22개로 추려졌고, 그 중 18개의 spot 만이 기능 유추가 가능한 단백질로 확인되었다. DD 그룹은 두 시간대에서 모두 감소하는 양상을 보이는 그룹이다. 104개의 spot 중에서 49개의 spot이 현저한 감소를 보이며 기능 유추가 가능한 것으로 분류되었다. 마지막으로 9시간 때에는 KCl을 첨가한 경우와 크게 차이가 없다가 18시간 대에서 단백질 생성의 변화가 현저하게 달라지는 12개의 spot 중 기능이 유추 가능한 6개를 NC 그룹으로 분류하였다.

각 그룹별 biological process를 기반으로 나눈 GO term을 Table 3에 정리하였다. UU 그룹에서는 생물학적인 과정의 조절(regulation of biological process), 탄소원의 대사(carbohydrate metabolic process), 수송(transport)에 관여하는 단백질이 주로 속했다. UD 그룹의 단백질의 주요 기능은 생물학적인 과정의 조절, 세포 내 아미노산 대사(cellular amino acid metabolic process), 화학물질에 대한 반응(response to chemical) 일 것으로 추정할 수 있었다. DU 그룹은 화학물질과 스트레스에 반응(response to stress) 및 탄소원의 대사와 기관 조직화(organelle organization)에 관여하는 단백질이 높은 비율로 분포했다. KCl 조건에서 모두 감소하는 DD 그룹에 속한 단백질들은 탄소원의 대사과정과 생물학적 과정 조절의 기능이 있을 것으로 추정되었다.

무성분화 관련 신규 유전자의 기능분석

단백체 분석을 통해 0.6 M KCl 첨가에 의해 생성량이 변화하는 단백질을 총 5개의 그룹으로 분류 가능하였는데, 그 중 단백질 생성량의 변화가 큰 폭으로 변하면서도 현재까지 기능 연구가 진행되지 않았던 AN1342, AN7812, AN7999, AN9419의 4가지 유전자들을 선정하여 결손균주 제작을 시도하였다. 즉, 유전자의 기능을 규명하기 위하여 해당 유전자의 5' flanking region과 3' flanking region의 서열을 database를 통해 알아낸 후 제한효소 절단부위가 포함된 primer로 PCR 반응하여 증폭시키고 해당 산물을 정제하였다. 두 산물 사이에 *argB* 유전자를 재조합시킨 플라스미드를 제작하여 형질전환 시켰다. 유전자 결손 형질전환체를 얻기 위한 각각의 시도 중 Southern analysis를 통하여 최종적으로 염색체 상 유전자 결손이 확정된 AN1342와 AN9419 결손균주를 대상으로 이후의 분화 및 표현형 관찰 실험을 행하였다.

예상 아미노산서열 분석 결과 alanine-glyoxylate transaminase를 암호화하는 것으로 예측되는 AN1342 유전자에 의해 생성되는 단백질의 분화 단계별 발현 양상은 DU 그룹에 속하였다. 특히, 이 단백질은 KCl이 첨가된 배지에서 18시간 배양했을 때 생성량이 약 500배 증가하였다. 한편 DD 그룹에 속하는 AN9419는 예상 아미노산 분석 결과 alanyl-tRNA synthetase

Table 3. GO term distribution of proteins belonging to the different expression group

GO term (Biological process)	UU ^a (%)	UD ^b (%)	DU ^c (%)	DD ^d (%)	NC ^e (%)
Regulation of biological process (RBP)	31.4	23.5	25	16.7	20
Carbohydrate metabolic process (CMP)	28.6	17.6	37.5	21.4	40
Transport (TP)	28.6	11.8	6.3	11.9	-
Developmental process (DP)	20	-	25	11.9	-
Response to chemical (RC)	17.1	23.5	43.8	11.9	-
Response to stress (RS)	17.1	11.8	37.5	9.5	-
Cellular amino acid metabolic process (CAMP)	14.3	29.4	12.5	19	20
Filamentous growth (FG)	14.3	5.9	12.5	7.1	-
Organelle organization (OO)	14.3	5.9	31.3	11.9	-
Cell cycle (CC)	11.4	-	12.5	4.8	-
Cytoskeleton organization (CO)	8.6	-	6.3	-	-
Cellular respiration (CR)	8.6	5.9	-	7.1	-
Protein folding (PF)	8.6	5.9	6.3	2.4	-
Sexual sporulation (SS)	8.6	-	6.3	2.4	-
Cytokinesis (CY)	5.7	-	6.3	2.4	-
Lipid metabolic process (LMP)	5.7	-	6.3	2.4	-
Translation (TL)	5.7	5.9	6.3	7.1	-
Cellular homeostasis (CH)	5.7	-	-	4.8	-
DNA metabolic process (DMP)	5.7	-	18.8	-	-
Asexual sporulation (AS)	2.9	-	-	2.4	-
Vitain metabolic process (VMP)	2.9	-	-	-	-
Signal transduction (ST)	2.9	5.9	6.3	4.8	20
Vesicle-mediated transport (VMT)	2.9	5.9	-	2.4	-
Protein catabolic process (PCP)	-	11.8	6.3	7.1	-
Cellular protein modification process (CPMP)	-	11.8	18.8	4.8	-
Secondary metabolic process (SMP)	-	5.9	-	4.8	20
Conjugation (CJ)	-	-	18.8	2.4	-
Pathogenesis (P)	-	-	18.8	4.8	-
RNA metabolic process (RMP)	-	-	12.5	7.1	-
Ribosome biogenesis (RB)	-	-	6.3	-	-
Transcription (TC)	-	-	6.3	2.4	-
Nucleus organization (NO)	-	-	6.3	2.4	-
Toxic metabolic process (TMP)	-	-	-	2.4	-
Biological process unknown (BPU)	5.7	5.9	6.3	9.5	-
NI		29.4	6.3	7.1	20
Total proteins (number)	35	17	16	42	5

^aUU: Increase at 9 hr and 18 hr with KCl supplement.

^bUD: Increase at 9 hr but decrease at 18 hr with KCl supplement.

^cDU: Decrease at 9 hr but increase at 18 hr with KCl supplement.

^dDD: Decrease at 9 hr and 18 hr with KCl supplement.

^eNC: No change at 9 hr but change at 18 hr with KCl supplement.

를 암호화하는 것으로 예측되는데, 이 단백질은 KCl에 의해 그 발현양이 줄어드는 양상을 보였고, 무성분화 9시간 보다 18시간에 감소폭이 더 큰 특성을 보였다(Table 2).

해당 유전자 결손에 따른 생장 및 분화 과정의 변화를 위하여 동일한 양의 포자를 고체배지와 액체배지에 접종하여 포자와 색소형성 및 군사생장속도 등을 관찰하였다. AN1342 결손 균주의 고체배지 상 표현형은 야생형과 크게 다르지 않았고 생장 속도 또한 큰 차이가 없었지만(Fig. 1A) 액체배양 시에는 배양 96시간 즈음에 연한 분홍색 색소가 생성되어 배지로 유리되었다(Fig. 2). AN9419 결손균주는 형질전환체 실험으로 얻기가 용이하지 않았는데, 일주일 이상 배양했을 때 하얗고 가느다란 군사체가 관찰되었다. 몇 차례 반복 시행한 유전자 결손 변이주 제작 실험에서 얻어진 형질전환체가 모두 이러한 생장양상을 보였다. 이는 아마도 이 유전자 산물이 영양생장에 필수적인 알라닌 대사과정에 영향을 미치기 때문인 것으로 추정된다. 생장율도 아주 낮고 포자도 거의 형성되지 않는 양상을 보이기 때문에, 포자대신 CM

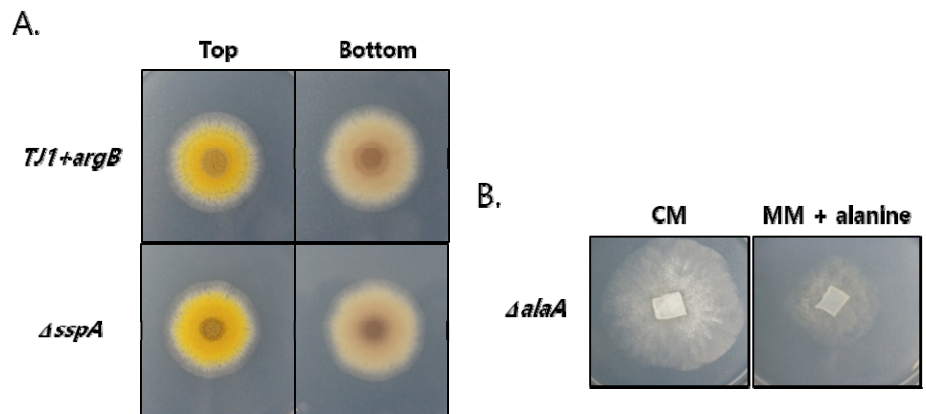


Fig. 1. Growth patterns of the deletion strains. A, colony development of strains grown on minimal media with pyridoxine (0.5 µg/mL) at 37°C for 3 days; B, agar block (1 × 1 cm²) was put on complete and minimal media with alanine, respectively. *TJI+argB*, isogenic wild type strain; *ΔsspA*, *sspA*-deletion strain; *ΔalaA*, *alaA*-deletion strain; CM, complete medium; MM, minimal medium; *sspA*, short stalk & pigment; *alaA*, alanyl-tRNA synthetase.

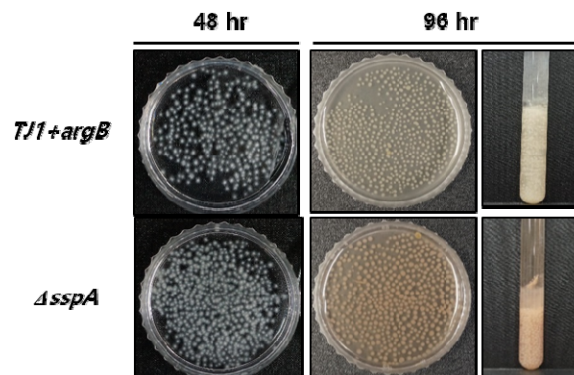


Fig. 2. Mycelial production in minimal medium. After 48 hr and 96 hr incubation, the morphology and pigmentation of mycelial balls were observed. *TJI+argB*, isogenic wild type strain; *ΔsspA*, *sspA*-deletion strain; *sspA*, short stalk & pigment.

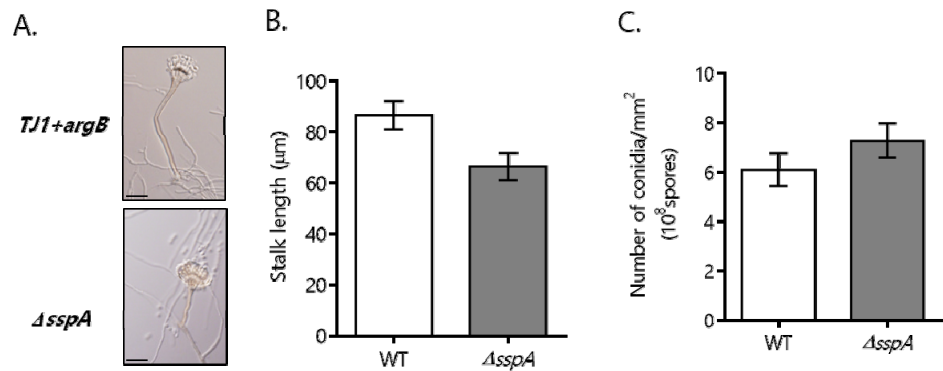


Fig. 3. Development of asexual reproductive organs. A, Cover glasses on agar blocks inoculated with spore suspension were incubated for 22 hr, removed, and put on a new slide glass, respectively. Mature conidiophores were photographed under microscope; B, Mean values of stalk length for wild type (WT, *TJI+argB*) and *sspA* deletion strain ($\Delta sspA$) (p-value = 0.04); C, Mean number of conidia produced for wild type and *sspA* deletion strain (p-value = 0.35); *TJI+argB*, isogenic wild type strain; WT, wild strain (*TJI+argB*); $\Delta sspA$, *sspA*-deletion strain; *sspA*, short stalk & pigment (scale bars = 20 μm).

배지 상에 균사체가 자란 agar block을 옮겨 계대배양 하였는데, 이 조건에서도 하얀색의 균사만 발달하였다. 예상 아미노산 서열 분석 결과 AN9419가 암호화하는 단백질이 alanyl-tRNA synthetase의 기능을 할 것으로 추정되었기 때문에, MM배지에 알라닌을 첨가하여 배양해 보았다. 그 결과 MM에서는 거의 자라지 않던 균사가 알라닌을 첨가한 배지에서는 자라는 것이 관찰되었다(Fig. 1B). 따라서, 포자를 형성하지 못하는 AN9419 결손균주는 이후의 분화과정을 유도하여 표현형 변화를 관찰하는 실험에서는 제외하고 AN1342 결손균주를 대상으로 추후 실험을 진행하였다.

무성분화기관인 분생포자경(conidiophore) 형태를 DIC 현미경으로 관찰한 결과, AN1342 결손균주는 stalk의 길이가 야생형에 비해 짧게 형성되었다 (Fig. 3A). 즉, 야생형은 stalk의 길이가 평균 $86.6 \pm 5.6 \mu\text{m}$ 인데 반하여 AN1342 결손균주는 $66.4 \pm 5.4 \mu\text{m}$ 로 통계적으로 유의미한 수준의 변화를 보였다 (p-value, 0.04) (Fig. 3B). 하지만 무성분화의 최종 산물인 분생포자의 생성률은 야생형(6.1×10^8)과 결손주(7.3×10^8)간에 통계적으로 유의미한 변화를 보이지 않았다(p-value, 0.35) (Fig. 3C). 유성분화를 유도하는 환경요인인 빛과 산소를 차단한 조건에서 AN1342 결손균주의 표현형 변화를 관찰한 결과, 야생형(*TJI+argB*)과 큰 차이가 없었다 (자료제시 생략). 다만, 대조군과 AN1342 결손균주 모두 유성분화 유도 조건임에도 불구하고, 유성기관과 더불어 무성포자도 함께 관찰되었는데, 이 결과는 실험에 사용된 균주가 유성분화를 조절하는 *veA* 유전자의 N-terminus가 부족한 *veA1*의 유전형이기 때문인 것으로 추정하였다. 따라서 AN1342의 결손은 유성분화에는 영향을 미치지 않는 것으로 결론 지을 수 있었다. 한편, 유전자 결손에 의한 표현형 변화에 근거하여 conidiophore의 stalk 길이가 짧아지고 액체배양 시 색소를 생성하는 AN1342 유전자는 *sspA* (short stalk & pigment)로 명명하였다. 또한, 유전자 결손 시 알라닌 영양요구성을 보이며 *Saccharomyces cerevisiae* 등에서 alanyl-tRNA synthetase를 암호화하는 유전자인 *ALA1*으로 명명된 바 있는 AN9419는 *alaA*로 명명하였다.

전사체 검증

*sspA*와 *alaA*가 암호화하는 유전자의 발현양상을 분석하기 위해, 무성분화 유도시간 및 KCl 존재 유무 등을 달리한 배양체로부터 CsCl-농도구배 초원심분리법으로 RNA를 추출한 후, cDNA로 합성하고 제작한 primer-set을 이용하여 각각의 유전자를 증폭하였다. *sspA*의 경우 단백질은 18시간에 KCl이 포함된 배지에서 500배 증가를 보였는데 반하여 전사체는 무성분화 유도 18시간에 KCl 존재 유무와 무관하게 모두 동일한 수준으로 발현되었으며, *alaA* 전사체는 무성분화 유도 시간과 KCl 존재 유무와 무관하게 거의 유사한 수준으로 증폭이 되었다 (Fig. 4). 이러한 결과로 미루어 볼 때, 분석에 사용한 두 유전자는 군사생장 및 분화에 필수적이기는 하나 많은 양의 전사체를 필요로 하지 않거나, 전사체의 생성과 분해가 매우 빠른 속도로 진행되는 특성을 가지는 것으로 추정하였다.

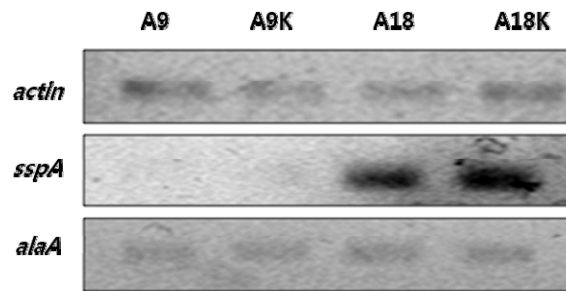


Fig. 4. Transcript analysis of *sspA* and *alaA* under different culture conditions. Total RNAs from wild type strain grown under different culture conditions were used for RT-PCR analysis using specific primer set for *act*, *sspA*, and *alaA* gene. Actin gene (*act*) was used for internal control. *sspA*, short stalk & pigment; *alaA*, alanyl-tRNA synthetase.

무성분화 과정 동안 특이적으로 생성량이 변하는 단백질을 찾고자 무성포자 형성을 촉진하는 0.6 M KCl이 첨가된 배지와 첨가되지 않은 배지에서 각기 9시간과 18시간으로 무성분화기간을 달리한 4가지의 배양체로부터 얻은 단백체를 분석하여 총 200여개의 단백질을 동정하였고, 그 중 무성분화 유도조건 변화에 따라 단백질 생성량의 차이가 큰 4가지 단백질을 암호화하는 유전자를 선별하여 결손균주를 제작하였다. 그 결과 *sspA*로 명명한 AN1342 결손균주는 성장속도, 유성분화 등은 야생형과 다르지 않았지만 무성분화기관인 분생포자경의 stalk 길이가 짧아지고 액체배양 시 분홍색 색소를 생성하였기 때문에 *sspA*는 정상적인 무성기관의 형성과 색소생성 과정에 필요한 인자로 판정되었다. 한편, *alaA*로 명명한 AN9419는 GO 분석 결과 alanyl-tRNA synthetase 유전자일 것으로 예측되었고, 해당 유전자 결손균주는 성장능이 심하게 손상되어 알라닌을 첨가한 배지에서 어느 정도 군사생장이 가능하였으나 무성포자형성은 거의 불가능했다. 이러한 결과는 *alaA*가 알라닌 생합성 과정에 중요한 역할을 하는 효소를 암호화하고 있어 정상적인 군사생장과 분화에 필수적임을 알 수 있었다.

적요

*Aspergillus nidulans*의 포자형성 및 무성분화에 관여하는 새로운 인자를 찾고자, 포자형

성 촉진 조건인 0.6 M KCl이 첨가된 배지와 첨가되지 않은 배지에서 자란 균사체의 단백질체 분석을 시도하였다. 2DE 분석을 통해 2,400여개의 spot을 확인하였고, 무성분화 유도 9시간 및 18시간 별로 생성량의 변화양상을 기준으로 총 5개의 그룹으로 나눌 수 있었다. 기능 분석이 아직까지 이루어지지 않은 단백질을 암호화하고 있는 유전자들 가운데 DU 그룹에 속하는 AN1342와 DD 그룹에 속하는 AN9419 두 개의 유전자의 기능을 알아보고자 유전자결손 돌연변이주를 제작하고 표현형을 관찰하였다. Alanine-glyoxylate aminotransferase의 기능을 할 것으로 예측되는 AN1342을 결손 시키면 무성분화 기관인 stalk의 길이가 짧아졌고, 액체 배양 시 야생형과 달리 배지로 분홍색 색소가 분비되어 *sspA*라 명명하였다. AN9419 결손균주는 균사생장이 심각하게 저해되고 알라닌이 첨가되어야 균사생장이 가능하였으나 무성포자 형성은 거의 이루어지지 않았으며 GO분석을 통하여 alanyl-tRNA synthetase의 기능을 할 것으로 유추된 점에 근거하여 *alaA*라 명명하였다.

Acknowledgements

This study was financially supported by research fund of Chungnam National University in 2015.

REFERENCES

1. Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons LM, Macdonald KD, Bufton AW. The genetics of *Aspergillus nidulans*. Adv Genet 1953;5:141-238.
2. Adams TH, Wieser JK, Yu JH. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. Microbiol Mol Biol Rev 1998;62:35-54.
3. Busby TM, Miller KY, Miller BL. Suppression and enhancement of the *Aspergillus nidulans* medusa mutation by altered dosage of the bristle and stunted genes. Genetics 1996;143:155-63.
4. Palmer JM, Theisen JM, Duran RM, Grayburn WS, Calvo AM, Keller NP. Secondary metabolism and development is mediated by LlmF control of VeA subcellular localization in *Aspergillus nidulans*. PLoS Genet 2013;9:e1003193.
5. Kim H, Han K, Kim K, Han D, Jahng K, Chae K. The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet Biol 2002;37:72-80.
6. Kang EH, Song EJ, Kook JH, Lee HH, Jeong BR, Park HM. Depletion of ϵ -COP in the COPI vesicular coat reduces cleistothecium production in *Aspergillus nidulans*. Mycobiology 2015;43:31-6.
7. Han KH, Lee DB, Kim JH, Kim MS, Han KY, Kim WS, Park YS, Kim HB, Han DM. Environmental factors affecting development of *Aspergillus nidulans*. J Microbiol 2003;41:34-40.
8. Oh YT, Ahn CS, Kim JG, Ro HS, Lee CW, Kim JW. Proteomic analysis of early phase of conidia germination in *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet Biol 2010;47:246-53.
9. Kim Y, Nandakumar MP, Marten MR. Proteome map of *Aspergillus nidulans* during osmoadaptation. Fungal Genet Biol 2007;44:886-95.
10. Shimizu M, Fujii T, Masuo S, Fujita K, Takaya N. Proteomic analysis of *Aspergillus*

nidulans cultured under hypoxic conditions. *Proteomics* 2009;9:7-19.

11. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
12. Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, Mortensen P, Shevchenko A, Boucherie H, Mann M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14440-5.
13. Harsanyi Z, Granek IA, Mackenzie DW. Genetic damage induced by ethyl alcohol in *Aspergillus nidulans*. *Mutat Res* 1977;48:51-73.
14. Kang EH, Kim JA, Oh HW, Park HM. LAMMER Kinase LkhA plays multiple roles in the vegetative growth and asexual and sexual development of *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* 2013;8:e58762.
15. Glisin V, Crkvenjakov R, Byus C. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry* 1974;13:2633-7.