

## 각종 탄소원이 *velA*<sup>+</sup> 및 *velA1* *Aspergillus nidulans*의 분화에 미치는 영향

한동민\* · 한유정 · 채건상<sup>1</sup> · 장광엽<sup>2</sup> · 이영훈<sup>3</sup>

원광대학교 분자생물학과

<sup>1</sup>전북대학교 분자생물학과

<sup>2</sup>전북대학교 생물학과

<sup>3</sup>한국과학기술원 화학과

## Effect of Various Carbon Sources on the Development of *Aspergillus nidulans* with *velA*<sup>+</sup> or *velA1* allele

Dong-Min Han\*, Yoo-Jeong Han, Keon-Sang Chae<sup>1</sup>,  
Kwang-Yeop Jahng<sup>2</sup> and Young-Hoon Lee<sup>3</sup>

Department of Molecular Biology, Wonkwang University, Chonbuk 570-749

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology, Chonbuk University, Chonbuk 570-756

<sup>2</sup>Department of Biology, Chonbuk University, Chonbuk 570-756

<sup>3</sup>Department of Chemistry, KAIST, Taejeon 305-701

**ABSTRACT:** Under standard condition (Han, *et al.*, 1990: glucose 1%-nitrate 0.1% minimal medium, 30 ml in 9 cm plate, 10<sup>6</sup> cells of inoculum per plate), wild type of *Aspergillus nidulans* developed both sexual and asexual organs in balance, while *velA1* mutant developed asexual ones preferentially. Increase of glucose concentration did not significantly affect the asexual sporulation. However, development of sexual organs were largely affected. It was greatly enhanced when favorable nitrogen source, for example, casein hydrolysate was added, which is contrary to the case of *Neurospora* or *Saccharomyces* where limitation of N source induces sexual development. On most of moderate C sources asexual development in *velA*<sup>+</sup> strain was largely inhibited except acetate on which only asexual spores were produced, while that in *velA1* mutant strain was not affected. Lactose promoted the sexual development even in *velA1* mutant, indicating that lactose itself or its metabolic intermediate may induce sexual development independent of allelic state of *velA* gene. On other moderate favorable C sources, glycerol, galactose and ethanol, asexual development was largely inhibited in *velA*<sup>+</sup> strain but not in *velA1* mutant strain. Sexual organs were, however, never produced on acetate. These results suggested that asexual development of wild type is largely dependent on C sources and the *velA* gene is involved in the repression of asexual development in not-enough-grown (non-competent) thalli resulting in preferential progression of sexual development.

**KEYWORDS:** *Aspergillus nidulans*, C sources, development, *velA* gene

자웅동체 자낭균(homothallic ascomycete)인 *Aspergillus nidulans*는 체세포 분열을 통하여 무성포자를 생성하는 무성생식과정과 감수분열에 의해 자낭포자를 생성하는 유성생식과정등의 생활사를 가

지며, 각각의 포자를 형성하는 과정에서는 독특한 형태발생이 이루어 진다(Smith *et al.*, 1977: Zonneveld, 1977). 무성분화가 일어나기 위해서는 적어도 20시간 정도의 성장기(competent time)가 필요하며 (Axelrod *et al.*, 1973), 그 이후에 분화가 유도되면, *brlA*, *abaA*, *wetA* 등 일련의 유전자에 의해 분화의

\*Corresponding author

진행이 조절받는다(Timberlake, 1990). 유성분화의 competent time에 대해서는 알려져 있지 않으나, 무성분화의 그것과 일치할 것으로 생각된다. Competence를 획득한 균사는 외부 또는 내부 조건에 따라 유성 또는 무성분화가 일어나도록 유도될 것이다. 이러한 조건에 대해 반응하는 신호전달체계가 있을 것으로 추측되며, 이 과정에는 많은 유전자들이 관여할 것으로 생각할 수 있다. 지금까지 알려진 유전자중에 이에 관계가 있을 것으로 추정되는 것으로는 *velA*<sup>+</sup> 유전자가 있다.

*velA* 돌연변이는 Käfer(1965)에 의해 분리 동정된 것으로서, 야생형의 경우 nonsporogenous hyphae가 상당히 많이 발생하는데 반해 이 돌연변이는 이것이 거의 나타나지 않는 형질로, 야생형보다 훨씬 많은 무성포자를 생성하며 colony가 보다 평평한 특징을 지니고 있다. 이러한 장점으로 인하여 *velA* 돌연변이는 지금까지 유전학적 분석을 위해 주로 사용되어 왔으며, 일반적으로 그 유전자형을 표시하지 않았다. Champe *et al.*(1981)은 *velA* 유전자가 단순히 형태적 차이를 보이는 것만은 아니고, 유성분화 및 무성분화의 시기나 그 양에서 차이가 나며, 이 형질은 온도에 민감함을 발견하였다. 그는 *velA*<sup>+</sup>와 *velA*<sup>-</sup> 균주 사이에 total protein의 차이를 SDS-PAGE를 통하여 분석한 결과 분자량 36,000의 protein이 *velA*<sup>-</sup> 균주에서는 만들어지지 않는다는 사실을 발견하였으며 아마도 이것이 *velA* 유전자가 coding 하고 있는 protein 일 것으로 추측하고 있다. 최근에 *velA*<sup>+</sup> 균주에 적색광을 조사하였을 때 무성포자가 다량 유도되고 이는 적외선 근처의 적색광에 의해 reversion 되는 현상이 보고되었다(Mooney and Yager, 1990). 또한 많은 aco 돌연변이들이 *velA* 돌연변이에 의해 부분적으로 suppression 되는 현상도 발견되었다(Butnik *et al.*, 1984). 이상과 같이 *velA* 유전자는 무성분화 또는 유성분화를 조절하는 기능을 가지고 있을 것으로 보이나 아직 그 기능이 정확히 알려지지 않았다.

*Aspergillus nidulans*는 다양한 종류의 당과 유기산을 비롯한 많은 유기물들을 유일 탄소원으로 이용할 수 있다. 성장에 가장 좋은 탄소원은 glucose, fructose 및 sucrose 등이 있고, 비교적 좋은 탄소원으로는 lactose, galactose, acetate, ethyl alcohol

및 glycerol 등이 있다(McCullough *et al.*, 1977). TCA cycle의 정상적인 운용이 무성분화를 정상적으로 진행시키는데 필요한 조건으로 알려져 있고(Galbraith and Smith, 1969; Ng *et al.*, 1972), 분화유도시기에 공기의 유통이 유성과 무성분화의 방향을 결정하는데 중요한 요인이라는 사실(Han *et al.*, 1990)로 미루어 볼 때, 에너지 대사 또는 탄소의 대사와 분화 사이에 어떤 관련이 있음을 추측할 수 있으며, 따라서 이들 다양한 탄소원에 따라 분화의 양상이 다를 수 있고 또 이를 인지하고 조절하는 유전자들이 존재할 것임을 가정할 수 있다. 본 연구에서는 이들 다양한 탄소원과 일부 에너지 대사에 영향을 미치는 요인들이 유성 또는 무성분화에 어떤 영향을 미치는 가를 알아보고, *velA*<sup>+</sup> 유전자가 이 과정에 어떻게 작용하는 가를 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

*Aspergillus nidulans*의 *velA*<sup>+</sup> 야생형 균주로는 FGSC4를 사용하였다. FGSC4와 FGSC168(*suA1ade* 20 *adE20 biA1; sB3; choA1; chaA1 velA1*)을 교배하여 영양요구성 돌연변이 지표를 지니지 않는 recombinant, SF1(*chaA1 velA1*)를 분리하여 *velA*<sup>-</sup> 돌연변이 균주로 사용하였다.

### 배지 및 배양

균주의 보관과 종균배양을 위해서는 Harsani (1976)의 완전 배지(CM)를 사용하였고, 콜로니의 크기를 제한하기 위해서 배지에 sodium deoxycholate를 최종농도 500 mg/l 되게 첨가하였다(Upshall *et al.*, 1977). 분화의 양상을 조사하기 위해서는 최소배지를 사용하였으며, 배지양, 접종량 및 배양 방법은 이전의 방법(Han *et al.*, 1990)에 따랐다.

### 성장속도의 측정

균의 성장 속도는 균체건량의 증가로 측정하였다. 3일간 배양한 균체의 무성포자를 10<sup>6</sup>/plate가 되도록 접종한 후 일정 시간 간격으로 균사를 수확하여 진공건조기로 완전히 건조한 다음 무게를 측정하였다(Zonneveld, 1980).

### 무성분화속도의 측정

무성포자를 ml 당  $10^6$ 이 되도록 희석하여 CM 고체배지에 1 ml 씩 접종하였다. 37°C 에서 배양하면서 일정 시간마다 지름이 1 cm인 코르크 뿔게 (cork borer)로 한천 조각을 분리해 내었다. 이를 0.1 % Tween 80 용액에 넣고 vortexing 하여 무성포자가 균체에서 떨어져 나오도록 한 후, hemacytometer를 사용하여 무성포자의 수를 측정하였다. 무성포자의 수는 5개의 한천 조각에서 측정된 수의 평균값으로 정하였다.

### 유성분화 속도의 측정

유성분화 속도는 laccase II의 조직염색법에 의해 관찰되는 primordia의 수로 측정하였다(Hermann *et al.*, 1983). 일정 시간마다 코르크 뿔게를 이용하여 배양중인 균사체를 지름 1 cm 되도록 분리해 내었다. 이에 laccase II 측정 용액을 처리하고 5분 후에 용액을 버린 후 37°C 에서 30분간 반응시켰다. 염색 되어진 청색의 primordia foci 수를 해부현미경하에서 측정하였다. 균사층에 의한 용액 흡수를 돕기 위해서 chloroform을 처리하였고 primordia의 수는 5개의 한천 조각에서 측정된 수의 평균값으로 정

하였다.

## 결과 및 고찰

표준조건(Han *et al.*, 1990) 하에서 glucose의 농도에 따른 분화양상을 Table 1에 나타내었다. 대체적으로 유성분화가 무성분화보다 glucose의 농도에 대하여 많은 영향을 받았다. 0.1% 이하의 농도에서는 성숙된 cleistothecia가 형성되지 못하였으며, 농도가 증가될수록 conidia 및 cleistothecia의 발생량이 증가하였고, 6% 이상의 농도에 대해 conidia 형성은 영향을 받지 않은 반면, cleistothecia의 형성은 거의 완벽하게 억제되었다. 이 결과는 energy 원이 불충분할 때에는 무성분화가 우선적으로 일어나며 유성분화가 유도되기 위해서는 충분한 energy 원이 필요함을 나타낸다. 6% 이상의 고농도에서는 유성분화만이 억제되었는데, 이러한 억제 현상은 질소원으로 0.1% casein hydrolysate 또는 ammonium tartrate를 첨가하였을 때 제거되었다. 이는 고농도의 glucose에 대한 분화억제가 carbon catabolite repression에 의한 유전적 조절 현상(Arst, 1977)과 관련이 있기 보다는 탄소원과 질소원의 불균형에 의한

Table 1. Effect of glucose concentration on sexual and asexual development

C source	conc. (%)	N source	conc. (%)	FGSC4 ( <i>vel</i> <sup>+</sup> )		SF1 ( <i>velA1</i> )	
				AS <sup>a</sup>	S <sup>b</sup>	AS	S
Glucose	0.5	Nitrate	0.1	++	-	++	-
	1		++	++	+++	+	
	2		++	+++	+++	++	
	3		++	+++	+++	++	
	6		+++	-	+++	-	
	12		+++	-	+++	-	
	0.5	Casein hydrolysate	0.1	++	++	++	+
	1		++	+++	+++	++	
	2		+	+++	+++	++	
	12		+	+++	++	+++	

<sup>a</sup>: +, less than  $10^5$  conidia per  $1 \pi \text{ mm}^2$  of plate culture.

++, more than  $10^5$  but less than  $10^7$  conidia per  $1 \pi \text{ mm}^2$  of plate culture.

+++ , more than  $10^7$  conidia per  $1 \pi \text{ mm}^2$  of plate culture.

<sup>b</sup>: +, less than 10 primordia per  $1 \pi \text{ mm}^2$  of plate culture.

++, more than 10 but less than 50 primordia per  $1 \pi \text{ mm}^2$  of plate culture.

+++ , more than 50 primordia per  $1 \pi \text{ mm}^2$  of plate culture.

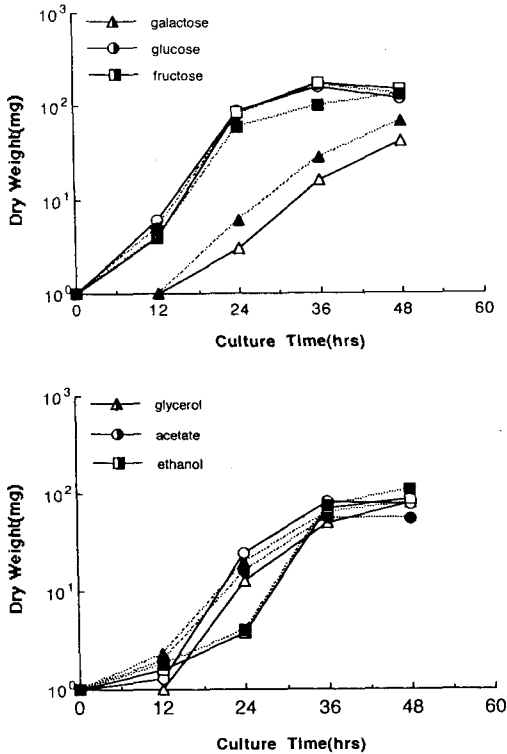


Fig. 1. Growth curves of FGSC4 (*velAI*, open symbols) and SF1 (*velAI*<sup>+</sup>, closed symbols) on various carbon sources.

현상으로 생각된다(Zonneveld, 1980). 이들 질소원을 공급하였을 경우 nitrate만을 질소원으로 주었을 경우보다 훨씬 높은 빈도로 유성분화가 발생하였다. 이상의 결과로부터 야생형에서 유성분화가 유도되기 위해서는 적당한 농도의 탄소원과 질소원이 균형적으로 필요하며, 질소원이 충분할 때에는 무성분화가 억제되고 유성분화가 주로 진행되는 것을 알 수 있었다. 이에 반해 *velAI* 돌연변이주에서는 영양분과는 별로 관계없이 무성분화로 우선적으로 진행되었다. 이는 *velA*<sup>+</sup> 유전자가 영양상태가 좋은 조건에 반응하여 무성분화를 억제하는 기능이 있음을 시사한다. 그러나 *velAI* 돌연변이주에서도 casein hydrolysate를 질소원으로 주었을 경우 유성분화가 상당히 증가되었는데, 이러듯 좋은 질소원에서 유성분화의 유도가 촉진되는 현상은 *Neurospora crassa*(Turian, 1977)나 *Saccharomyces cerevisiae*(Esposito and Klapholz, 1981)의 경우와는 정반대로서 주목된다. 오

히려 질소원에 대한 분화 억제는 무성분화에서 나타나고 있어 *Aspergillus nidulans*에서 분화의 유도 과정은 다른 filamentous fungi들과 많은 차이점이 있을 것으로 사료된다.

Glucose 외에 fructose, lactose, galactose, glycerol, ethanol 및 acetate 등의 탄소원 등에 대한 분화양상을 조사하고자 하였다. 분화 양상을 조사하기에 앞서 먼저 이들 탄소원에 대한 FGSC4와 SF1의 성장곡선을 구하여 보았다(Fig. 1). 이미 보고된 바대로(McCullough *et al.*, 1977) glucose와 fructose는 좋은 탄소원으로서 lag phase 없이 빠른성장을 보인 반면, galactose, ethanol, glycerol, acetate 및 lactose (자료미제시: glycerol과 거의 일치)등 비교적 좋은 탄소원으로 분류된 것들 거의 모두에는 12시간 가량의 lag phase를 보였으며 성장속도 또한 거의 비슷하였다. FGSC4와 SF1 사이에 성장상의 차이점은 발견되지 않았다. 좋은 탄소원으로 분류된 fructose에서 무성 및 유성 분화양상은 glucose인 경우와 일치하였다. 그러나 비교적 좋은 탄소원들에 대한 분화의 양상은 매우 다양하였다(Fig. 2, 3). Acetate가 탄소원으로 주어진 경우 야생형과 *velAI* 돌연변이주 모두 유성분화가 절대로 일어나지 않고 무성분화만이 일어났다. 이와 같은 결과는 *Penicillium* 또는 *Neurospora* 등에서도 나타나는데, 이는 분화의 방향을 결정하는데 에너지대사의 방식이 중요한 요인으로서 작용한다는 사실을 뒷받침 한다(Turian, 1977; Han *et al.*, 1990). Acetate는 TCA 회로만을 통하여 분해되는 에너지원이므로 무성분화를 진행하는 데는 TCA 회로의 운용만으로도 충분하지만 유성분화를 유도하기에는 부적당하며 다른 에너지대사 경로의 운용이 필요함을 나타내고 있다. 한편 lactose를 단일 탄소원으로 공급하였을 때는 *velA* 유전자의 allelic state에 관계없이 유성분화가 진행되었고, 이 과정은 *velAI* 돌연변이의 무성분화에 영향을 주지 않았다. 이 결과는 lactose의 대사산물이 *velA* 유전자와는 독립적으로 유성분화의 유도에 관여할 것임을 시사한다. Galactose와 glucose를 함께 넣어 준 배지에서는 위와 같은 현상이 나타나지 않는 것(결과 미제시)으로 보아 단순히 lactose가 분해되는 과정보다는 lactose가 변형된 어떤 물질이 유성분화를 특이하게 유도할 것으로 사료된다.

Glycerol, galactose 및 ethanol이 단일 탄소원일

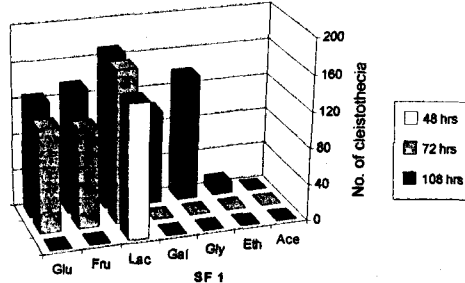
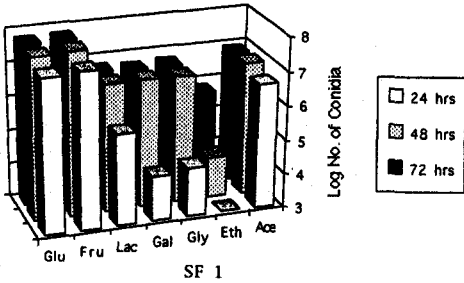
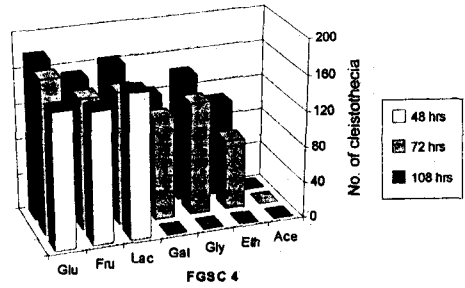
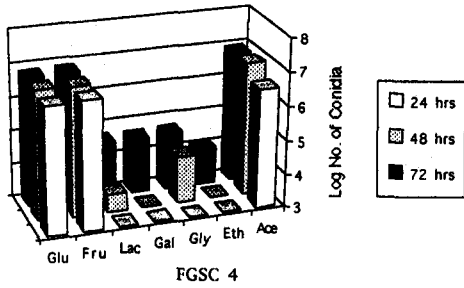


Fig. 2. Effect of various carbon sources on the asexual development of *velA* (SF1) and *velA*<sup>+</sup> strains: Conidiospores were harvested from 3 days-culture, adjusted to 10<sup>6</sup> cells per ml, inoculated on 30 ml plates containing various sugars as sole carbon source and incubated at 37°C for 72 hours. Culture blocks were removed by cork borer of 1 cm diameter, suspended in Tween 80 and vortexed vigorously. The conidiospore were counted using Hemacytometer under the microscope (×400).

Fig. 3. Effect of various carbon sources on the sexual development of *velA* and *velA*<sup>+</sup> (FGSC4) strains. Conidiospores were harvested from 3 days-culture, adjusted to 10<sup>6</sup> cells per ml, inoculated on 30 ml plates containing various sugars as sole carbon source and incubated at 37°C for 108 hours. The development of primordia was observed using the laccaseII chromogen, ADBP- DMA (Herman *et al.*, 1983).

경우에 야생형에서 무성분화가 억제되고 유성분화가 주로 발생하였다. 반면 *velA1* 돌연변이의 경우는 무성분화가 정상적으로 진행되었을 뿐만 아니라 유성분화가 억제되었다. 즉, 이들 탄소원들에 의한 분화양상은 *velA* 유전자의 allelic state에 매우 민감하게 반응하였다. *velA*<sup>+</sup> 야생형에서 glucose에 비해 좋지 않은 탄소원인 이들 탄소원에서 무성분화가 억제되고 유성분화가 촉진되는 현상은 glucose의 경우와 비교하여 볼 때 쉽게 설명이 되지 않는다. 다만 성장이 늦어짐으로 인해 전체 thallus의 밀도가 떨어지고 따라서 질소원의 고갈 또는 자체의 program에 의한 무성분화의 유도(Lee and Adams, 1994)가 일어나지 않은 상태에서 유성분화 쪽으로 분화가 비가역적으로 결정되어지기 때문인 것으로 생각된

다. 이 과정에서 *velA* 유전자는 무성분화의 signal이 생성될 때까지 무성분화를 억제하거나 유성분화를 우선적으로 유도하는 기능을 할 것으로 사료된다.

辭 謝

이 논문은 1990년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

參考文獻

Arst, H. N. and Bailey, C. R. 1977. Regulation of carbon metabolism In *Genetics and Physiology in Aspergillus*, edited by J. E. Smith and J. A. Pateman. pp131-146. Academic Press, New York.  
 Axelrod, D. E., Gealt, M. and Pastushok, M. 1973.

- Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Dev. Biol.* **34**: 9-15.
- Butnick, N. Z., Yager, L. N., Hermann, T. E., Kurtz, M. B. and Champe, S. P. 1984. Mutants of *Aspergillus nidulans* blocked at an early stage of development secrete an unusual metabolite. *J. Bacteriol.* **160**: 533-540.
- Champe, S. P., Kurtz, M. B., Yager, L. N., Butnick, N. L. and Axelrod, D. E. 1981. Spore formation in *Aspergillus nidulans*, In: The Fungal spore: Morphogenic Controls, edited by G. Turian and H. R. Hohl. pp255-276. Academic Press, New York.
- Esposito, R. E. and Klapholz, S. 1981. Meiosis and ascospore development. In: The molecular biology of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, edited by Strathern *et al.* pp.211-287. CSH.
- Galbraith, J. C. and Smith, J. E. 1969. Sporulation of *Aspergillus niger* in Submerged liquid cultures. *J. Gen. Microbiol.* **59**: 31-45.
- 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.
- Harsani, I., Granek, I. A. and Mackenzie, D. W. 1976. Genetic damage induced by ethyl alcohol in *A. nidulans*. *Mutation res.* **48**: 51-74.
- Hermann, T. E., Kurtz, M. B. and Champe, S. P. 1983. Laccase localized in Hülle cells and cleistothecial primordia of *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **154**: 955-964.
- Kafer, E. 1965. The origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **52**: 217-232.
- Lee, B. N. and Adams, T. H. 1994. The *Aspergillus nidulans fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes and Devel.* **8**: 641-651.
- McCullough, W., Payton, M. A. and Roberts, C. F. 1977. Carbon metabolism in *Aspergillus nidulans*. In: Genetics and Physiology in *Aspergillus*, edited by J. E. Smith and J. A. Pateman. pp97-130. Academic Press, New York.
- Mooney, J. L. and Yager, L. N. 1990. Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes and Devel.* **4**: 1473-1482.
- Ng, W. S., Smith, J. E. and Anderson, J. G. 1972. Changes in carbon catabolic pathways during synchronous development of *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.* **71**: 495-504.
- Smith, J. E., Anderson, J. G., Deans, S. G. and Davis, B. 1977. Asexual development in *Aspergillus*. In: Genetics and Physiology in *Aspergillus*, edited by J. E. Smith and J. A. Pateman. pp23-58. Academic Press, New York.
- Timberlake, W. E. 1990. Molecular genetics of *Aspergillus* development. *Ann. Rev. Genet.* **24**: 5-36.
- Turian, G. 1978. Sexual morphogenesis in the ascomycetes. In: The filamentous fungi: III. Developmental mycology, edited by Smith, J. E. *et al.* pp.315-333. John Wiley and Sons, New York.
- Upshall, A., Gidding, B. and Mortimore, I. D. 1977. The use of benlate for distinguishing between haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus terreus*. *J. Gen. Microbiol.* **100**: 413-418.
- Zonneveld, B. J. M. 1977. Biochemistry and ultrastructure of sexual development in *Aspergillus*. In: Genetics and physiology of *Aspergillus*, edited by J. E. Smith and J. A. Pateman. pp59-80. Academic Press.
- Zonneveld, B. J. M. 1980. Protease levels in relation to cAMP and a reserve polymer during growth and sexual differentiation of *Aspergillus nidulans*. *Exp. Mycol.* **4**: 140-146.