

Neurospora crassa ars-1 프로모터의 발현을 조사

- 단 보 -

이병욱* · 구상호

고신대학교 생명과학과

Transcription level of the *ars-1* promoter of *Neurospora crassa*

Bheong-Uk Lee* and Sang Ho Koo

Dept. of Biological Sciences, Kosin University, Busan 606-701, Korea

Abstract

The *ars* gene of the *Neurospora crassa* encodes arylsulfatase and is expressed under sulfur limitation. An *ars-1* promoter (*P_{ars}*) translationally-fused to a *lacZ* gene was transformed into the *N. crassa* RLM 35-35, a *his-3 invl* strain and integrated into the *his-3* locus by a single crossover homologous recombination. β -galactosidase specific activity was measured from mycelia grown in sulfur-limited Vogel's medium. Enzyme activity reached its maximum at 14 hour after the shift to derepressing condition. When activity from homokaryon generated by microconidiation was measured, it was 17% higher than that from heterokaryon.

Key words - *Neurospora crassa*, *ars-1*, arylsulfatase, promoter strength

서 론

1927년 Dodge에 의해 최초로 균사형 진균류인 *Neurospora*의 유전학적 연구에 관한 보고서[10]가 발표된 이래, Beadle과 Tatum은 X선에 의한 *N. crassa*의 돌연변이를 연구하여 하나의 유전자가 하나의 효소를 생산한다는 One gene-One enzyme 설을 발표하였으며[2] 이 발견으로 인해 노벨상을 수상하였다. 이 후 *N. crassa*는 진균류의 유전학적 혹은 생화학적 연구뿐만 아니라 생명과학 전체에서 대표되는 생명체로서 연구가 되어왔다[12,23]. 특히 최근 분자 생물학의 발달로 인하여 과거 고전 유전학적 방법들에 의해 발견되고 고찰되었던, 수많은 *Neurospora*의 생명 현상들이

분자 수준에서 재조명되어 가는 중이다. 특히 최근에는 *N. crassa* OR74 A 균주를 이용한 genome project가 완료되어 유전자 전체 서열의 이용이 가능하게 되었다[18]. 따라서 그동안 축적된 *N. crassa*의 유전학적, 생리학적 특성을 이용하여, 이질단백질의 발현 등 *N. crassa*의 산업적인 응용이 시도되고 있다[13,14,26,29-31].

황 (S)은 아미노산의 구성 성분으로, 생명체의 기능에 절대적으로 필요한 필수원소로서 황의 대사 과정은 매우 세밀하게 조절되고 있다[20]. *N. crassa*에서 황의 대사에 매우 중요한 위치를 차지하는 arylsulfatase (arylsulfate sulfohydrolase; EC 3.1.6.1)는 균사를 비롯하여, 무성 생식포자인 conidia에도 존재하며, 세포내외 및 표면에도 모두 존재하는 것으로 알려졌다[5,27,28]. *ars-1* 유전자의 발현은 배지내의 황의 농도에 따라서 조절되는데, 황의 결핍 시에는 발현을 derepression시키는 것으로 보고가 되어졌으며[6], 유사한 기작

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 051-400-2321, Fax : 051-405-9905
E-mail : bulee@kosin.ac.kr

이 *Aspergillus nidulans* 에서도 관찰되었다[1]. CYC3 및 SCON 단백질들이 각각 *N. crassa ars-1* 유전자의 positive regulator 및 negative regulator로 참여하는 것으로 알려졌으나[14,19,21], 이들이 인식하는 프로모터의 cis-acting DNA 서열에 대해서는 자세한 연구가 수행된 바가 없다. cis-acting 서열의 연구를 위해서는 쉽게 프로모터의 발현율을 측정하는 방법을 확보하는 것이 선행되어야 하며, 그 방법들 중의 하나가, 보고유전자 (reporter gene)로 가장 많이 이용하는 *Escherichia coli*의 *lacZ* 유전자를 연결하여 발현율을 조사하는 것이다[7,8]. 본 논문은 *N. crassa*의 arylsulfatase를 암호화하는 *ars-1* 유전자 프로모터의 발현율 조사에 관한 보고로서, 보고유전자인 *lacZ*를 보유한 pDE3[11]에 *ars-1* 프로모터를 연결한 후에, 황의 농도를 변화시킨 성장 배지 내에서의 발현율의 변화를 측정하는 것이다.

재료 및 방법

균주 및 성장 배지

*N. crassa*의 *ars-1* 유전자는 성장 배지에 존재하는 황의 농도에 따라서 발현도가 크게 달라지는 것으로 알려졌다 [14]. 이 실험에서는 *ars-1* 프로모터에 보고유전자가 연결된 구조 (이 후에는 *Pars-lacZ* 표기함)를 갖는 플라스미드를 *N. crassa* RLM 35-35, a *his-3 inl* 균주 (Stanford University의 Robert Metzenberg 교수님에 의해서 제공됨)에 형질전환시킨 후에 사용하였다. 다른 황 농도를 갖는 배지에서 성장시킨 후에 β-galactosidase의 활성을 측정함으로써 *ars-1* 프로모터에 의한 발현도를 측정하였다. *N. crassa*는 액체, 고체배양 모두 30°C에서 배양되었으며, 액체 배양의 경우 150~200 rpm의 진탕배양기를 사용하였다. *Pars-lacZ*의 발현율을 측정하기 위한 배지는 황을 제외한 Vogel 최소 배지[9]를 기본으로 필요시에는 발현조건에 따른 화학물을 첨가하였다. 형질전환체 선택 배지로는 sorbose 배지[9]를 사용하였다. 성장속도의 측정을 위해서는 race tube[9]를 사용하였으며, 12시간 간격으로 균사의 성장을 측정하여 단위 시간 당 성장 속도를 mm로 나타내었다 (Table 1). DNA 조작을 위한 균주는 *E. coli* DH5a [*F-*, *80dlacZ M15*, *endA1*, *recA1*, *hsdR17*, (*rk-*,*mk+*), *supE44*, *THI-1*, *gyrA96*, *relA1*, (*lacZYA-argF*)U169][32]를 이용하였다. *E. coli* 성장 배지는 LB [16]를 이용하였으며 필요시에 ampicillin (100 μg/ml)을 첨가하였다.

Table 1. The growth rates of homokaryon and heterokaryon. Homokaryon showed 8~37.5% faster growth rates than heterokaryon. Numbers represent the average of two or three separate experiments. (A: normal Vogle's medium, B: MgSO₄ minus, C: plus 2 mM MgSO₄, D: plus 0.1 mM MgSO₄, E: plus 2 mM MgSO₄, F: plus 0.1 mM MgSO₄)

Media	Growth rates (mm/h)	
	Homokaryon	Heterokaryon
A	4.1	3.6
B	4	3.75
C	4.3	3.6
D	4	3.4
E	4.8	3
F	3.95	3.4

ars-lacZ fusion plasmid의 조립 및 형질전환

Pars-lacZ 발현율을 측정하기 위한 벡터의 조립은, Ebbole가 조립한 pDE3[11]를 *Bgl*III와 *Sma*I으로 절단한 후 *Pars* 프로모터 및 *ars-1* 유전자의 Kozak 서열과 시작 코오돈 (ATG)를 PCR[4]로 증폭한 후에 *lacZ*에 연결하였다 (Fig. 1). PCR을 위한 프라이머 서열은 5'-TTCAGATCTAAGGGGCAA CTGGCTGTTAG-3' 및 5'-TTACCCGGGGCGCATTCTGA

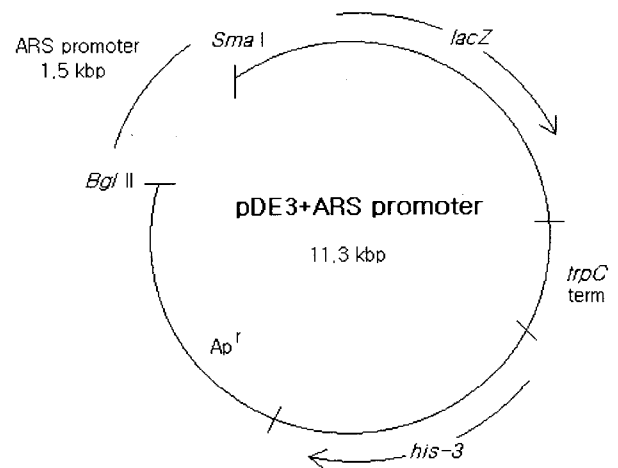


Fig. 1. An 1.5 kbp *ars-1* promoter DNA fragment was inserted in the *Bgl*III-*Sma*I site of pDE3. Partial *his-3* gene fragment allows a single crossover homologous recombination, resulting in complementation of the *his-3* gene.

ATGGGTTTTG-3'를 사용하였으며 cloning에 이용된 *Bgl*II 및 *Sma*I 인식 서열은 이탤릭체로 표시하였다 (Fig. 2). PCR 조건은 1 μ g genomic DNA, 프라이머 200 nM, dNTP 각 200 μ M 및 1 unit *Vent* polymerase가 사용되었다. PCR의 조건은 먼저 95 $^{\circ}$ C에서 5분을 반응시킨 뒤에, 95 $^{\circ}$ C에서 1분, 70 $^{\circ}$ C에서 1분, 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 2분을 30회 반복하고, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분을 처리하여 증폭을 완료 하였다. PCR 결과로 얻어진 약 1.5 kbp 길이의 DNA를 전기영동을 통해 확인하였고 *Pars-lacZ*의 연결 부위는 서열분석을 통한 확인 하였다 (Fig. 2). *Pars-lacZ*를 갖는 형질전환체의 분리, YDE3 내에 존재하는 *his-3* 유전자가 *N. crassa* RLM 35-35 균주의 *his-3* locus로의 교차에 의한 재조합 방식으로 삽입 되면 *his-3+* 균주로 전환되는 것을 통해 확인할 수가 있다

A.
 ATGATCTAAGGGGAACTGGCTGTAGTCGTCGCTGCAAAATCTATCAGTTCATGTCAAA
 ACCATGCTTACCTGTGATGAGAACGGACACGAGTGGGACATGCCAGAGTCCAGCACCCG
 ATATCAATTCCGACCAGGCGACTGCGACATTGTCTGGCCCATACCGACAATCGCACAGC
 AACCATGAACATGGTATACGCGATTATCACCATCTCTTGGCCCATAGATGTCACCTTA
 CTTGCCGTACTGTCCAGAGGCGGAGTAGTCAGCATACTCCCCAAGGCTGTGTCATTG
 ATATATTCCTCACCAAAGTCTCGGTGGCCCGCCAGCTAGAGAGAAAAGTATAATGAGCC
 AGCTAGAGTCTTTAAGGCCTTGAACCTCGGACGCAATAATGTCATGTTGCCATGTGAA
 TGGACGTATCTGCTGTGCGACAAGATGCCTAACAGCATGACAGATATGATCTTGATGAC
 ATTCACCTGGGGCTCTGCTTCAACGACTCGGTTTCGTCGCTTCTAGACTCTGTTCTCTC
 ATCTCCCTCGGGAACATGGCTGTGATAAATCGATTATAGATACCTTCTCAGAAAATCTG
 ATAGCGGTGATAGACCTAGTCCGAGCTGGCGTGGCAGTGTCCCTCAAAAGAGGCTCTC
 TTTCTTTTCTAAAGACGGCTGGTCCCATGGCGTTGAACCATCTTTGCCAGTCTTAAAG
 AAGAGCGTTTCAGGCCGATGGGAATCTGGGCAATATAAGTACTTGTCCCCTCAAGAT
 ATCAATATGGAAATACCTTGGATCATGGAATGCGCAAGATCACCTAAATCTAAACTCG
 AACTCGGAAACGCGTTCGAGGAAATCTCCCTTTTCTAAGAACTACCTGAGTGTATCCC
 TACCTTAGAGATTCAATCCGAACACGGAGGCCGACAACCTCCAGAATCAGTTATCCC
 AGATACCCTGCGTACATGAAAGGCCGAGATAATCACGACATAAGTGTCTGGATTTCGTT
 AGACGGGCCCTTATTTGCGAACAAGATGCTACCTTCCCACAAAATCGGTTGCAGAAAACG
 ACAAACATGAGCAATGAGCATAGAGATAAATCGCACCATCTCGTAGTTTGACATTGGCT
 TCGGAACAGAGTTGCCATGGAATCTCTTATAGTAACGCTCGCATGGTGAACCTGCCGCAA
 ACTAGCACGCCATCGATGACTTTACGCCAACCTCCAAGCCACCAACCGGAAACATCGC
 ATGCAAAGGAGCAACGCTTAGCAATCACAGCCCCAATCCGAAGTCACTACTCGATT
 ATATGACGATGAAAACATAATTTGCCGGAGTTATCCCAACATGATATGGGTATAGATG
 TTGCTTAGGATCCCGACCTTTTGCAGTGGCCAGGCGGTATTTATTCGAAAACCTCATGATCA
 TTGTTACTACCCTGGGAATCCCTTCACTTACTGTTTTTCAACATCAGAGCACTTTG
 TCAAAAACCCATTCAGAATG

B. *Bgl*III-*ars* promoter-Kozak-ATG-*Sma*I-BanHI-CGTGTTTTA-*lacZ*

Fig. 2. The *ars-1* promoter sequence and an *ars-lacZ* junction.

- A. The *ars-1* promoter sequence (GenBank accession number U89492). Underlined sequences were used to design PCR primers described in the text.
- B. The junction sequence. The *N. crassa ars-1* promoter, Kozak sequence and ATG (start codon) are connected to a *lacZ* structural gene in frame via *Sma*I site.

[15]. Macroconidia 형성을 위해서는 25 $^{\circ}$ C 배양기에서 12시간 간격으로 빛과 어둠을 반복하며 약 1주일간 배양하였다. 형질전환의 조건은 채집된 macroconidia 90 μ l에 10 μ l의 circular DNA 첨가 후, 1.5 kV/mm, 600 Ω , 25 μ F 조건에서 Bio-Rad Gene Pulser를 이용한 전기천공법을 이용하였다[17]. 형질전환 후에 포자들을 0.7-0.8% top agar에 현탁한 후 sorbose 배지에 도말하여 2-3일 후에는 형질전환체를 확인할 수 있었다[4].

***ars-1* 프로모터의 발현을 측정**

ars-1 promoter의 발현을 다른 황 농도를 갖는 배지에서 성장시킨 균주로부터 β -galactosidase의 활성을 측정함으로써 측정하였다. *N. crassa*의 성장은 30 $^{\circ}$ C에서 수행되었으며, 액체 배양의 경우 150~200 rpm의 진탕배양기를 사용하였다. *Pars-lacZ*의 발현을 측정하기 위한 배지는 황을 제외한 Vogel 최소 배지[9]를 기본으로 필요시에는 발현조건에 따른 화학물을 첨가하였다 (Fig. 2, Table 1). β -galactosidase의 활성 측정을 위한 기질로는 *o*-nitrophenyl- β -D-galactoside (ONPG)를 사용하였으며, 단백질 농도는 BCA 시약을 사용하여 소의 혈장 알부민을 기준으로 분석하였다[3]. β -galactosidase의 활성은 1 분당 단백질 1 milligram이 생성하는 *o*-nitrophenol의 생성이 nanomole을 단위로 계산되었으며, $213 \times A_{420} / (\text{reaction volume, 0.1ml})$ (mg of protein/ml of extract) (reaction time, min.)의 공식을 이용하여 계산되어졌다[7,8].

Homokaryon 균주 분리

Homokaryon의 형성은 Pandit 등의 방법을 이용하였다 [22]. 이를 위해서는 먼저 흰색 셀로판 종이를 1% KOH에 5분간 끓인 후, 3차 멸균 증류수에 3~4차례 세척한 후, 거즈에 싸서 멸균하여 2% 증류수 고체배지에 깔았다. 이 때 주의할 점은 2% 증류수 고체 배지를 말리지 않고 수분을 충분히 가진 상태로 유지한 상태에서 균주를 접종해야한다는 점이다. 접종 후, 7~10일간 25 $^{\circ}$ C 배양기에서 12시간 빛/어둠 주기로 7~10일의 배양한 후, 셀로판 종이 위로 형성된 약간의 macroconidia를 70% alcohol 거즈로 닦은 후, 셀로판 종이를 제거하고 12~24시간 후, 1~2 ml 3차 멸균 증류수를 배지표면에 첨가 후, 멸균 면도날을 이용하여 microconidia를 수거하며, 이 과정을 2~3차례정도 더 반복

하였다. 수거된 microconidia는 광학현미경을 통하여, 균사의 오염정도를 관찰하였으며 심각한 오염을 발견할 수 없었다. 수거된 microconidia는 성장배지에 도달 후에 선별하였다.

결과 및 고찰

Pars 프로모터의 발현을 *lacZ* 보고 유전자에 의해 암호화되는 β -galactosidase 활성 측정을 통하여 조사할 수가 있다. 다른 황 농도를 갖는 배지에서 성장한 균주로부터의 β -galactosidase의 활성 측정은, 각 *N. crassa* 균주를 Vogel의 최소 배지에서 배양한 후에, 멸균 증류수로 균사를 세척한 뒤에 측정되고 (Fig. 3에서 0 시간), 다시 다른 조건의 황 농도를 갖는 배지에서 12 시간 배양된 후에 수행되었다 (Fig. 3). *N. crassa* RLM 35-35의 heterokaryon 혹은 homokaryon 형질전환체의 성장 속도는 race tube에 접종

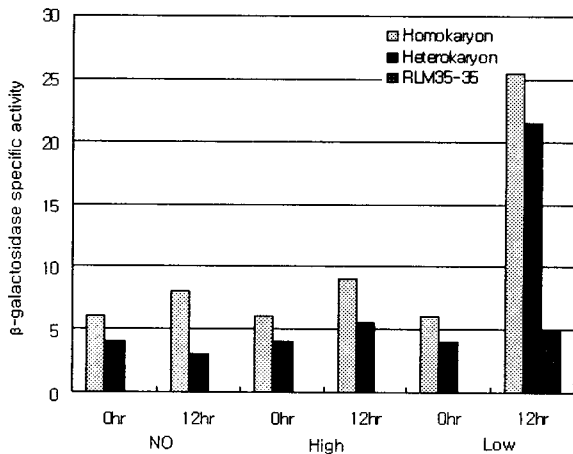


Fig. 3. β -galactosidase specific activities measured from *N. crassa* RLM 35-35 transformants containing a *Pars-lacZ* translation fusion. Bars represent the average of three separate experiments. Induction under low sulfur condition was clearly shown at 12 hours. NO is sulfur minus condition, High means sulfur repressing condition (Vogel's medium 2 mM $MgSO_4$), Low means sulfur derepressing condition (Vogel's medium with 0.1 mM $MgSO_4$ only). β -galactosidase specific activities were measured from *N. crassa* RLM 35-35 homokaryon or *N. heterokaryon*. Total concentration of protein was measured using Bradford assay kit.

후, 30°C 배양기에서 3~4일 동안 관찰하였으며 V(성장속도)=성장한 길이/시간으로 계산되었다. Fig. 3의 그래프에서 나타나듯이, 황이 결여된 (0.1 mM $MgSO_4$) 배지에서는 배양 12 시간 후에 β -galactosidase의 활성이 약 5 배 증가한 것을 볼 수가 있다. *Pars-lacZ*를 갖지 않는 *N. crassa* RLM 35-35 자체에서는 활성의 증가가 관찰되지 않았으므로 증가된 활성은 *Pars-lacZ*의 발현에 기인하였음을 알 수가 있다. 또한 heterokaryon 보다는 homokaryon에서 17% 정도 더 높은 β -galactosidase 활성을 보였으므로, 유전자 copy에 의한 dose effect로 생각할 수가 있으나 활성의 큰 차이는 없었다. *N. crassa* RLM 35-35 homokaryon과 heterokaryon의 성장속도 측정결과, homokaryon의 성장속도가 heterokaryon의 성장속도보다 평균 16.5%도 빠른 것으로 나타났다. 위의 결과들로 미루어 본다면 도입된 외부 유전자의 발현에 homologous 균주가 heterologous 균주보다 더 효율적이라는 것을 간접적으로 알 수 있었다 (Fig. 3).

N. crassa ars-1 유전자의 발현 조절은 positive regulator인 CYC3와 negative regulator들인 SCON에 의해서 이루어지는 것으로 보고되었다[14,19,21]. 하지만 이들이 *ars* 프로모터에서 인식하는 서열에 대한 보고는 없었으며, 대략의 프로모터 위치를 파악한 논문이 1989년 Paietta에 의해 보고되었다[20]. 본 실험을 통하여 β -galactosidase를 통한 *ars-1* 프로모터의 strength를 측정하는 것이 가능하다는 것이 입증되었다. 따라서 *ars-1* 프로모터에 대한 좀더 수월한 분석이 가능하게 되었다고 생각된다. 5' 말단으로부터 순차적인 deletion을 갖는 프로모터를 *lacZ* 유전자에 연결하여 발현율을 측정하는 것도 가능하며, linker scanning 방법 등을 도입할 수도 있을 것이다. 더욱이 이런 방법들을 통하여 발현율이 높은 *ars-1* 프로모터의 변이 서열이 조립된다면 산업적인 응용도 가능할 수 있다. *N. crassa*는 산업적으로 응용될 경우에 매우 안전한 균주로 평가되고 있으며 [21] 과거 수십 년 간에 축적된 유전학적 연구 결과는 매우 유용한 것으로 생각된다. 더욱이 최근에 완료되어 이용이 가능한 유전체 서열을 분석하면, 순수 연구뿐만 아니라 더욱 빠른 응용 연구도 가능하다 할 것이다. 따라서 최근 지난 수십 년 동안에 축적된 유전학적, 분자생물학적 지식 기반 및 유전체 정보를 이용한 *N. crassa*의 산업적인 응용 연구 활발하게 수행되고 있다. 최근 *N. crassa*를 숙주로 이용하여 이질 단백질을 생산하는 특허를 취득한 경우[25,29,

XC)와 식물 단백질을 발현시킨 연구 보고가 있었다[26].

본 연구에서는 *ars-1* 프로모터가 *N. crassa*에서 황의 농도 조절에 의해서 이질 단백질의 발현 조절에 대한 가능성을 보여주었다는 것과 *lacZ*와 같은 보고유전자의 연결에 의해서 더 자세한 프로모터의 특성을 연구하는 것이 가능하다는 보여주었다. 이는 *N. crassa*로부터 *ars-1* 프로모터의 발현을 더욱 세밀하게 연구할 수 있는 방법을 제시한 것이며, 더욱 높은 발현을 갖는 프로모터의 조립도 가능할 것으로 생각된다. 이후에는 *N. crassa*로부터 외부 이질 단백질의 발현 실험도 필요할 것으로 생각된다.

요 약

Arylsulfatase를 암호화하는 *Neurospora crassa*의 *ars-1* 유전자는 황의 결핍에 의해서 발현이 조절된다. *lacZ* 유전자에 연결된 *ars-1* 프로모터 (Pars)가 *N. crassa* RLM 35-35 *his-3 inl* 균주에 형질전환되고, 유사 서열 재조합에 의한 단일 교차에 의해서 염색체의 *his-3* 부위로 도입이 되었다. 황이 결여된 Vogel의 배지에서 자란 균사로부터 β -galactosidase 활성이 측정되었다. β -galactosidase 활성은 derepression 조건으로 변환한지 14 시간 후에 최고치를 기록하였다. Microconidiation에 의해서 생산된 homokaryon에서 측정된 활성은 heterokaryon보다 17% 증가가 되었음을 보여주었다. 이 실험은 *ars-1* 프로모터의 발현을 측정할 수 있는 한 방법을 제시한 것으로, 보다 수월한 *ars-1* 발현 조절 연구가 가능할 것이다.

감사의 글

N. crassa RLM 35-35 균주 및 pDE3 플라스미드를 각각 제공해 주신 Stanford University의 R. Metzenberg 교수님과 C. Yanoisky 교수님 및 *ars-1* 프로모터가 삽입된 플라스미드를 제공해 주신 Wright State University의 J. Paietta 교수님께 감사드립니다. 또한 이 논문의 정리에 도움을 준 대학원생 김상래군에게 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Apte, B. N., P. N. Bhavsar and O. Siddiqi. 1974. The

- regulation of aryl sulphatase in *Aspergillus nidulans*. *J. Mol. Biol.* **86**, 637-648
2. Beadle, G. W. and E. L. Tatum. 1941. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **27**, 499-506.
3. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
4. Bruchez, J. J. P., J. Eberle and V. E. A. Russo. 1993. Regulatory sequences involved in the translation of *Neurospora crassa* mRNA: Kozak sequences and stop codon. *Fungal. Genet. Newsl.* **40**, 85-88.
5. Burton E. G. and R. L. Metzenberg. 1973. Aryl sulfatase in ascospores of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **113**, 519-520.
6. Burton E. G. and R. L. Metzenberg. 1972. Novel mutation causing derepression of several enzymes of sulfur metabolism in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **109**, 140-151.
7. Casadaban, M. J. 1975. Fusing of the *Escherichia coli lac* genes to the *ara* promoter; a general technique using bacteriophage Mu-1 insertions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**, 809-813.
8. Casadaban M. J., A. Martinez-Arias, S. K. Shapira and J. Chou. 1983. Beta-galactosidase gene fusions for analyzing gene expression in *Escherichia coli* and yeast. *Meth. Enzymol.* **100**, 293-308.
9. Davis, R. H. and F. J. de Serres. 1970. Genetic and microbial research techniques for *Neurospora crassa*. *Methods. Enzymol.* **17A**, 79-143.
10. Dodge, B. O. 1927. Nuclear phenomena associated with heterothalism and homothalism in the ascomycete *Neurospora*. *J. Agric. Res.* **35**, 289-305.
11. Ebbole, D. 1990. Vectors for construction of translational fusions to beta-galactosidase. *Fungal Genet. Newsl.* **37**, 15-16
12. Horowitz, N. H. 1991. Fifty years ago: the *Neurospora* revolution. *Genetics* **127**, 631-635.
13. Jeense, D. J., D. A. Mackenzie, I. N. Roberts and D. B. Archer. 1991. Heterologous protein production by filamentous fungi. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **9**, 327-367.
14. Kanaan M. N. and G. A. Marzluf. 1993. The positive-acting sulfur regulatory protein CYS3 of *Neurospora crassa*: nuclear localization, autogenous control, and regions required for transcriptional activation. *Mol.*

- Gen. Genet.* **239**, 334-344.
15. Legerton T. L. and C. Yanofsky. 1985. Cloning and characterization of the multifunctional *his-3* gene of *Neurospora crassa*. *Gene* **39**, 129-140
 16. Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. pp. 68. CSH. Cold Spring Harbor, New York.
 17. Margolin, B. S., M. Freitag and E. U. Selker. 1997. Improved plasmids for gene targeting at the *his-3* locus of *Neurospora crassa* by electroporation. *Fungal Genet. Newsl.* **47**, 112
 18. *Neurospora* Sequencing Project. Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research "assembly version 3" [www-genome.wi.mit.edu]
 19. Paietta J. V. 1990. Molecular cloning and analysis of the *scon-2* negative regulatory gene of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell Biol.* **10**, 5207-5214.
 20. Paietta, J. V. 1989. Molecular cloning and regulatory analysis of the arylsulfatase structural gene of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell Biol.* **9**, 3630-3637.
 21. Paietta J. V., R. A. Akins, A. M. Lambowitz and G. A. Marzluf. 1987. Molecular cloning and characterization of the *cys-3* regulatory gene of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell Biol.* **7**, 2506-11.
 22. Pandit A. and R. Maheshwari. 1993. A simple method of obtaining pure microconidia in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Newsl.* **40**, 63-65.
 23. Perkins, D. D. 1992. *Neurospora*: the organism behind the molecular revolution. *Genetics* **130**, 687-701.
 24. Perkins D. D. and R. H. Davis. 2000. Evidence for safety of *Neurospora* species for academic and commercial uses. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5107-5109.
 25. Radford, A. and J. H. Parish. 1998. Production of heterologous peptides. U.S. Patent #5,834,191.
 26. Rasmussen-Wilson, S. J., J. S. Palas, V. J. Wolf, C. S. Taft and C. P. Selitrennikoff. 1997. Expression of a plant protein by *Neurospora crassa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3488-3493.
 27. Scott, W.A., K. D. Munkres and R. L. Metzberg. 1971. A particulate fraction from *Neurospora crassa* exhibiting aryl sulfatase activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **142**, 623-632.
 28. Scott, W. A. and R. L. Metzberg. 1970. Location of arylsulfatase in conidia and young mycelia of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **104**, 1254-1265.
 29. Stuart, W. D. 2001. Combinatorial metabolic libraries. U. S. Patent #6,268,140.
 30. Stuart, W. D., J. M. Ivy and K. Koo. 1997. *Neurospora* expression system. U.S. Patent #5,695,965.
 31. Timberlake, W. E. and M. A. Marshall. 1989. Genetic engineering of filamentous fungi. *Science* **244**, 1313-1317.
 32. Woodcock, D. M., P. J. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. DeCruz, M. Noyer-Weidner, S. S. Smith, M. Z. Michael and M. W. Graham. 1989. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* **17**, 3469-3478.

(Received January 18, 2003; Accepted April 14, 2003)