

## 빛의 존재하에서도 유성분화를 하는 *Aspergillus nidulans*의 돌연변이체 분리 및 분석

민정렬 · 김혜련 · 한갑훈<sup>1</sup> · 한동민\*

원광대학교 자연과학대학 생명과학부,

<sup>1</sup>우석대학교 보건복지대학 제약공학과

자웅동체 자낭균류인 *Aspergillus nidulans*의 유성분화는 다양한 외부 환경 스트레스, 즉, 아세트산을 함유한 배지, 가시광선의 조사, 높은 삼투압 조건 등에서 강하게 저해받는다. 본 연구에서는 이에 관련된 유전자들을 분리, 분석하기 위하여 다양한 외부 환경 스트레스를 준 상태에서도 정상적으로 유성포자를 만들 수 있는 돌연변이 균주들을 분리하였다. 총 167개의 돌연변이 균주들 중에서 152종의 균주들은 각각 빛, 삼투, 아세트산 등의 조건에서 유성분화를 할 수 있었으나 두가지 이상을 동시에 주었을 때에는 유성분화를 하지 못하였다. 또한 6개의 돌연변이 균주들은 KCl 첨가 배지에서는 야생형과 변화가 없었으나 빛을 쬐거나 아세트산배지에서는 유성분화를 진행하였다. 그리고, 3개의 돌연변이 균주는 각각의 단일 스트레스 조건뿐만 아니라 KCl과 아세트산이 함께 들어 있는 배지에서도 유성분화를 할 수 있었다. 이들 가운데 아세트산과 KCl 배지에서는 야생형과 표현형이 동일하나, 빛이 있는 조건에서는 야생형과 달리 유성분화를 하는 돌연변이 6균주를 얻었으며 이를 SIL 돌연변이라 칭하였다. 상보군 검정결과 이들은 모두 각각 다른 돌연변이를 가지고 있는 것으로 파악되어 *silA*에서 *silF*까지 여섯 그룹으로 명명하였고, 우열검정 결과 이들은 모두 열성임이 확인되었다. 대부분의 균주들은 각각 3종류의 스트레스 조건에서 유성분화를 하는 돌연변이들이었기 때문에, 특별하게 빛에만 반응하여 분화에 영향을 주는 유전자는 몇몇에 불과하고, 다른 스트레스들과 관련된 유전자와 연관성이 많으며, 성장에 있어서는 외부 환경 스트레스에 따른 영향은 크지 않은 것으로 사료된다.

**Keywords** □ *Aspergillus nidulans*, environmental stress, sexual development, SIL mutants

자웅동체 자낭균(homothallic ascomycetes)인 *Aspergillus nidulans*는 무성생활사(asexual cycle)와 유성생활사(sexual cycle)를 모두 가지고 있는 모델 균주이다. 정상상태에서는 단수체(haploid) 상태로 존재하는 *A. nidulans*는 체세포 분열을 통하여 무성포자(conidia)를 생성하고 감수분열에 의해 자낭포자(ascospore)를 생성할 뿐만 아니라 독특한 준유성생식 과정의 생활사(parasexual cycle)를 가지며, 각각의 포자를 형성하는 과정에서 독특한 형태 발생이 이루어진다(16, 18).

영양번식 균사(vegetative hyphae)가 분생포자병(conidiophore)으로 분화하기 위해서는 일정한 성장요구시간(competent time)이 필요한 것으로 알려졌으며(2), 또한 성장시간 근처에서의 질소 환원효소(nitrate reductase)와 같은 유도성 효소의 양이나 포도당 소모율이 급격히 변화하는 것이 보고 된 바 있다(5). 성장요구시간은 유전적으로 조절되어지므로 세포내의 분화에 관한 내부 시간 조절 시스템(self-programmed internal clock system)이 있을 것으로 예상된다. 성장요구시간을 획득한 후, 분화로 유도된 균사는 족세포(foot cell), 분생포자병, vesicle, phialide로의 일련의 분화과정을 거쳐 최종적으로 무성포자(분생포자)를 생성한다. 이

러한 무성생식 과정에 대한 연구는 많이 진행되어, *brlA*, *fluG*, *fadA*와 같은 유전자들이 분석 되어졌으며(3, 10, 12, 17), 성장과 무성포자 발생 과정에서의 이들 유전자들의 상호작용과 조절에 대한 모델이 제시되었다(1). 성장과정으로부터 분화로의 진행은 FadA(Gα)-FlbA(RGS 단백질)의 길항적인 조절에 의해 유도되며, 이 FlbA에 의한 FadA 단백질 기능 중단이 분화의 유도과 밀접한 관련이 있을 것으로 추정된다(1, 17). 유성분화과정을 유도하는 신호가 무성분화의 경우와 동일한 세포내 프로그램에 의해 초래되는지에 대해서는 알려진 바가 없지만 유성분화과정에 필수적인 유전자인 *msdD*의 발현이 *flbA*에 의존적이라는 연구 결과는 유성분화의 시작도 FadA-FlbA 조절에 의한 분화유도가 필수적임을 시사한다(8).

유성생식과정의 경우는 두 종류의 세포가 영양번식 균사에서 각기 다른 방향으로 분화해 나가는데, 그 하나는 Hülle 세포로, 또 다른 하나는 발생원기(primordia)로 분화해 나간다. 그리고 이 발생원기는 최종적으로 폐쇄포자낭과(cleistothecia)로 분화해 나간다(18). 특히, 자낭(ascus)과 자낭포자(ascospore)는 폐쇄포자낭과 속에서 생성됨으로 폐쇄포자낭과의 형성단계가 유성분화의 가장 중요한 단계 중의 하나로 간주 될 수 있다. 그러나 폐쇄포자낭과보다 먼저 형성되어 최종적으로 숙성된 폐쇄포자낭과 주위를 에워싸는 Hülle 세포의 역할이나 유성분화 과정에 특이하

\*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 82-63-850-6220, Fax: 82-63-853-2516

E-mail: dmhan@wonkwang.ac.kr

게 관여하는 유전자들에 관해서는 별로 알려진 바가 없다. 다만 폐쇄포자낭과의 성숙과정에 영양분을 공급하는 기능을 가지고 있을 것으로 생각된다. 야생형의 경우 유성분화와 무성분화는 포도당을 탄소원으로 하는 최소배지에서는 서로 균형적으로 발생하나 이 균형은 외부적 요인에 의해 아주 민감하게 상실된다. 이러한 요인 중엔 탄소원의 종류, 또는 질소원의 종류와 양, 높은 삼투압 조건, 장파장의 빛, 그리고 통기의 차단 등이 포함되며 *veA* 유전자가 이들 중 몇몇 요인에 대해 반응하는 것으로 알려져 있다(6, 7, 9, 11, 12, 13).

유성분화가 유도되는데 있어 *A. nidulans*의 무성분화나 *Saccharomyces cerevisiae* 또는 *Neurospora crassa*의 유성분화와 다른 중요한 특징은 영양분의 고갈이 유성분화를 유도하는 것이 아니라는 점이다. 오히려, 유성분화는 충분한 양의 탄소원과 질소원이 있을 때 더욱 잘 일어난다(6, 9). 또한 분화에 영향을 미치는 여러 환경 요인들을 조사한 결과 균체의 생장을 저해하는 요인 즉 스트레스가 존재할 때 유성분화는 억제되고 무성분화가 선호되는 경향이 있음을 확인하였다(9). 즉, 고농도의 포도당 및 글리세롤 또는 젓당과 같은 탄소원에서는 무성분화보다 유성분화가 주로 유도되고, 반면 저농도의 포도당에서는 무성분화가 주로 유도되며 아세트산을 탄소원으로 주었을 때는 무성분화만이 유도되었다. 이는 에너지 대사가 주로 산소 호흡에 의존될 때 유성분화보다 무성분화의 분화결정이 일어남을 시사하고 있다. 액체배양한 균사를 배양접시로 옮긴 후 공기를 차단하고 계속 배양하면 유성기관만 발생하는데 이러한 현상은 저산소(hypoxia) 또는 무산소(anaerobic) 조건에서는 유성분화가 주로 유도됨을 보여준다. 또한 1 M KCl, 0.5 M MgSO<sub>4</sub> 등 염 스트레스(salt stress)와 1.2 M sorbitol과 같은 삼투 스트레스(osmotic stress) 또는 빛의 조사(light stress) 등의 환경적 스트레스가 존재할 때 유성분화는 거의 억제되고 무성분화만 일어나는데 악조건에서 휴지상태로의 세포 분화는 유성포자보다는 무성포자가 선호된다는 사실을 나타내고 있다.

빛은 많은 종류의 곰팡이들의 분화에 영향을 미치는 중요한 요인으로 알려져 왔다(15). *N. crassa*에서는 이미 빛에 관련된 *wc-1*, *wc-2*와 같은 유전자들이 개일주기(circadian rhythm)에 깊이 관여한다는 사실이 알려져 있고, *A. nidulans*에서도 이들의 상동 유전자인 *lreA*, *lreB*의 염기서열이 이미 밝혀진 상태이다(GenBank accession no. AF515628, AAP47576). 이외에 *A. nidulans*에서 분화에 대한 빛의 영향에 대해 보고된 바가 있는데(13), 그들은 특히 가시광선 중에서 긴 파장이 무성포자의 발생에 필요하다고 주장하였다. 이러한 현상은 *A. nidulans*의 유성포자 형성이 좋지 않은 환경을 극복하기 위한 방법이라기보다는 좋은 환경일 때 유전적으로 다양한 자손을 생산해내기 위한 방편일 가능성을 시사하고 있다.

이와 같이 *A. nidulans*는 외부 환경 스트레스 조건에서 유성분화에 영향을 받고, 심지어는 초기 분화과정조차 진행하지 못하는 경우도 있다. 따라서 본 연구는 외부 환경 스트레스에 반응하여 유성생식에 관여하는 유전자들을 밝히기 위하여, 정상적인 조건에서는 유성분화를 진행하지 못하는 외부 환경 스트레스 조건에

서도 유성생식을 진행하는 돌연변이를 분리하고자 하였다. 그 결과, 각 스트레스 조건에서 유성분화에 따라 4개의 그룹으로 나눌 수 있었는데, 1 M KCl 또는 2% 아세트산과 같은 조건을 비롯하여 빛과 같이 성장에 스트레스를 주는 조건에서 모두 유성분화를 잘 진행시키는 형질을 가지는 돌연변이 균주들인 SIS (Sexual development in Stress) 그룹을 분리하였다. 이 중에서 다시 1 M KCl과 2% 아세트산을 동시에 스트레스를 주는 조건에서도 유성분화를 하는 돌연변이들인 SDS (Sexual development in Double Stress) 그룹과 1 M KCl을 제외한 2% acetate와 빛을 각각 스트레스 조건으로 주었을 때 유성분화를 하는 돌연변이들인 SIA (Sexual development in Acetate) 그룹을 분리하였다. 이외에 오직 빛의 영향에 대해 반응하지 않고 유성분화를 하는 돌연변이들을 SIL (Sexual development in Light) 그룹으로 분류하였다. 본 연구에서는 이 중에서 SIL 그룹에 속하는 돌연변이 균주들을 가지고 유전학적 실험을 통하여 그들의 특징을 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 균주, 배지 및 배양조건

본 연구에 사용된 *A. nidulans* 균주의 종류 및 유전자형은 Table 1에 제시하였다. *A. nidulans*의 종균 및 포자수확을 위하여 완전배지(CM)를 사용하였다(7). 균주배양을 위하여 완전배지와 최소배지에 Agar는 Junsei (Japan)를 사용하였고, 37°C에서 배양하였다. 외부 환경 스트레스로 1 M KCl, 빛 노출(약 800  $\mu\text{Em}^2/\text{s}$ ), 혹은 2% acetate를 배지에 넣어주었다. *A. nidulans*의 야생형 균주 및 돌연변이균주들의 성장속도는 무성포자를 고체 최소배지(MM)와 완전배지(CM)에 점적중(point inoculation)하여 배양하면서 콜로니의 성장 속도를 24시간마다 4일간 자로 재어 측정하였다.

### 돌연변이 유발 및 돌연변이주의 분리

Table 1. Strains used in this study

Strains	Genotype	Source
FGSC4	Wild type	FGSC
G34	<i>yA2</i> ; <i>argB2</i> , <i>methH2</i>	Gems et al., 1991
SIL6 (SILD)	<i>silD6</i>	This study
SIL98 (SILA)	<i>silA98</i>	This study
SIL174 (SILF)	<i>silF174</i>	This study
SIL181 (SILE)	<i>silE181</i>	This study
SIL188 (SILC)	<i>silC188</i>	This study
SIL32 (SILB)	<i>silB32</i>	This study
SIS1 (SIS)	<i>sisA1</i>	This study
SDS162 (SDS)	<i>sdsA162</i>	This study
SIA36 (SIA)	<i>siaB36</i>	This study

FGSC: Fungal Genetics Stock Center

*A. nidulans*의 야생형인 FGSC4의 분생포자를 1 ml의 0.01% Tween 80으로 수확하고 배양접시에 300-500개의 포자가 도말되게 희석한 다음 평판배지에 도말하였다. UV를 2분간 쬐여준 돌연변이들을 외부 환경 스트레스 조건인 1 M KCl, 2% 아세트산 그리고 빛을 쬐여주는 조건(약  $800 \mu\text{Em}^2/\text{s}$ )에서 각각 37°C로 4일간 배양하여 이 중에 유성분화로 유도되는 균주들을 모두 선별하였다. 이중에 최종 선별한 균주들을 1 M KCl, 2% 아세트산 그리고 빛의 노출을 모두 동시에 주는 방법과 각각 두 종류의 스트레스를 주는 방법 그리고 각각 하나의 스트레스 조건에서만 제공하는 3가지의 방법으로 배양하여 돌연변이들을 각각 분리 하였다.

### 표현형 관찰

*A. nidulans*의 야생형 균주 및 돌연변이주들의 무성포자를 0.01% Tween 80으로 수확하여 각각 포도당 1%의 고체 최소배지와 고체 완전배지에 접종량이  $10^6$  cells/300  $\mu\text{l}$ 가 되게 희석하여 배양접시 당 300  $\mu\text{l}$ 를 접종한 다음 4일간 배양하였고, 유성분화 비율은 19.6 mm<sup>2</sup> 안에 있는 폐쇄포자낭과의 수를 세었고, 무성포자의 비율은 19.6 mm<sup>2</sup> 안에 있는 무성포자를 0.01% Tween 80 1 ml에 희석시켜 hemacytometer를 이용하여 광학현미경으로 무성포자수를 관찰하여 비교분석 하였다.

### 유전학적 분석

SIL 돌연변이의 상보군(complementation group)결정을 위해서는 각각의 돌연변이 균주들을 상호 교배하여 이들이 야생형의 형질을 보이는지(상보할 경우) 아니면 SIL 돌연변이 형질을 계속 가지고 있는지(상보하지 못하는 경우)를 측정하는 방법을 이용하였다. 이를 위하여 두개의 SIL 돌연변이 균주들을 조합하여 이들을 이핵체(heterokaryon)를 유도하는 Pontecorvo 등(14)의 배양 방법에 따라 배양하였다. 유성분화를 촉진하기 위하여 배양접시를 비닐랩으로 24시간동안 밀봉한 후에 제거하고 다시 37°C에서 7일간 배양한 후 형성된 유성포자들 중 이핵체의 무성포자들을 수확하여 완전배지에 접종하여 빛 조건하에서 배양하였다. 배양된 콜로니들에서의 유성분화 여부를 관찰하여, 각각의 균주들간의 상보 여부를 확인하였다. 돌연변이의 우열(dominant or recessive trait) 결정은 돌연변이 균주를 야생형 균주와 교배 후 이배체(diploid)를 제조하여 이 이핵체의 표현형이 야생형을 나타내는지 돌연변이형을 나타내는지의 여부에 따라 결정한다. 이를 위하여 SIL 돌연변이 균주들과 SIL 유전자들에 대하여 야생형인 G34균주를 교배하여 이핵체 균주를 얻는다. 이 균주를 37°C에서 4-5일간 배양한 후 무성포자를 0.01% Tween 80으로 수확하여, 교배한 두 균주 모두가 필요로 하는 영양요구물만을 포함한 최소 배지에 무성포자를  $10^7$  cell/plate가 되도록 희석, 접종하여 37°C에서 3일간 더 배양하였다. 이배체(diploid) 콜로니는 교배한 두 균주의 무성포자의 색이 상보되는 양상(초록색)으로 확인하였고 이것을 0.01% Tween 80으로 수확하여 고체 평판 배지에 도말하여 빛이 있는 조건에서 배양하여 얻어지는 형질을 통하여 우열을 결정하였다.

## 결과 및 고찰

### 외부 환경 스트레스 조건에 따른 돌연변이 균주들의 분리

야생형 균주인 FGSC4는 외부 환경 스트레스 조건인 고농도 염(1 M KCl), 포도당에 비해 좋지 않은 탄소원(2% 아세트산), 혹은 빛을 쬐여주는 조건(3,500 Lux)에서 유성생식 기관인 폐쇄포자낭과를 형성하지 못한다(9). 따라서 이러한 스트레스에 반응하여 분화의 방향을 결정하는 특이적 유전자가 존재할 것이라는 개념 하에 새로운 유전자의 대량 탐색을 위한 방법으로서 빛에 반응하지 않는 돌연변이, 고삼투와 아세트산을 단일 탄소원으로 공급한 조건에 대해 분화에 관련한 반응이 다른 돌연변이를 분리 분석하였다. 자외선을 이용하여 돌연변이를 유발시킨 무성포자를 1 M KCl 또는 1.2 M의 sorbitol을 첨가한 완전배지 또는 아세트산을 단일 탄소원으로 공급한 최소배지에서 배양하거나 3,500 Lux의 형광등 빛이 존재하는 조건에서 완전배지에서 배양하였을 때, 폐쇄포자낭과를 생성하는 돌연변이균주들을 분리하였다. 총 10,000여 콜로니를 검색하여 위에서 언급한 1 M KCl 또는 1.2 M의 sorbitol을 첨가한 완전배지 또는 아세트산을 단일 탄소원으로 공급한 최소배지 및 3,500 Lux의 형광등 빛이 존재하는 조건에서 폐쇄포자낭과를 발생시키는 돌연변이 약 200여종을 분리하였고, 이들을 표준조건(7; 최소배지, 30 ml, 포도당 1%, 37°C)에서 배양하면서 형질을 분석하여 최종적으로 167 종의 돌연변이를 확정하였다.

분리한 돌연변이들을 대상으로 각 스트레스의 조건에서 배양하여 서로 다른 스트레스들에 대한 성장과 분화양상을 조사하였다. 먼저 앞에서 언급한 특정 스트레스를 주었을때 특이하게 유성분화를 진행하는 돌연변이가 있는지 조사하였다. 모든 돌연변이들을 각 스트레스에 대한 유성분화 여부에 따라 분류하여 Table 2에 나타내었다. 대다수(152 종)의 돌연변이는 단일로 주어졌을 때 각각의 스트레스에 대해 각각 유성분화를 진행하고, 2종 이상의 스트레스가 동시에 존재할 때는 야생형과 같이 유성분화가 억제되는 형질을 보였다. 이들을 SIS 그룹이라 칭하였다. 이러한 조건 뿐 아니라 SIS 그룹과 달리 1 M KCl, 2% 아세트산의 두 가지 조건을 동시에 주었을 때에도 폐쇄포자낭과를 형성하는 돌연변이 균주 6개를 SDS그룹으로 분류하였고, 1 M KCl을 제외한 2% 아세트산과 빛 조건에서 각각 폐쇄포자낭과를 형성하는 3개의 돌연변이 균주들을 분류하여 SIA라 하였다. 마지막으로 오직 빛 조건에서만 폐쇄포자낭과를 형성하는 돌연변이 균주 6개를 분류하여 SIL이라 하였다(Table 2, Fig. 1).

**Table 2.** Grouping of mutants forming cleistothecia in the presence of stresses

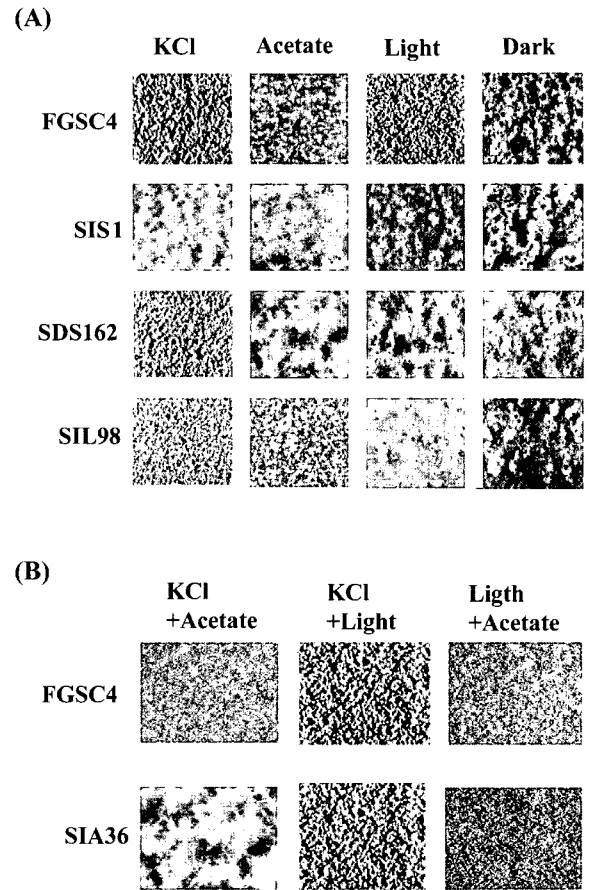
Environmental stress(es)	No. of mutants
KCl or light or acetate (SIS)	152
[KCl or light or acetate] or [KCl + acetate] (SDS)	6
light or acetate, not in KCl (SIA)	3
light only (SIL)	6

**SIL 돌연변이들의 특징**

빛의 양을 이용하여 밤과 낮을 구분하고 이를 이용하여 성장과 분화를 조절하는 개일주기(circadian rhythm)는 동식물 등과 같은 고등생물 뿐만 아니라 진균과 같은 미생물에서도 매우 중요한 것으로 알려지고 있으며, 현재 *N. crassa*에서의 개일주기는 많은 분자유전학적 연구가 진행되어 왔다(4). 그러나 아직까지 *Aspergillus* 종에서는 뚜렷한 빛과 관련된 연구가 진행되고 있지 않다. 본 연구에서 얻어진 돌연변이체들 중 빛에 특이적으로 반응하는 유전자가 관계된 것으로 보이는 SIL 돌연변이들에 대하여 보다 세밀한 형질 관찰을 수행하였고 이를 이용하여 향후 빛과 관련된 유전자 조절기작을 밝히고자 하였다. 빛을 쬐여주는 조건에서는 무성생식만을 진행하는 야생형과는 달리 빛 조건하에서 유성분화를 진행할 수 있는 SIL 돌연변이주 6종을 연구하였는데, 이 균주들은 빛 조건하에서는 야생형보다 적은 양의 무성포자를 생성하면서 훨씬 많은 양의 폐쇄포자낭과를 생성하였다(Table 3). 또한 이들 6개 균주들의 군사성장을 24시간 간격으로 96시간 동안 관찰하여 야생형과 비교한 결과 일반적으로 빛이 없는 조건과 빛을 쬐여준 조건에서 배양하였을 때 모두 야생형보다 성장이 떨어지는 것을 볼 수 있었다(Fig. 2 and 3). KCl과 아세트산 조건에서는 야생형과 돌연변이들 간의 성장에 특별한 차이는 보이지 않았다(자료 미제시).

SIL과 SDS 그룹에 속하는 돌연변이들의 상보군 결정을 위해 각각의 돌연변이를 교배하여 얻어진 자낭포자를 분석하였다(자낭포자 중 100%의 돌연변이 형질을 보이면 complementation하지 못하고 75%이면 complementation하는 것으로 판명함). 그 결과 SIL에 속하는 돌연변이들은 6종의 서로 다른 상보군에 속하는 것으로 판명되었다(21과 31의 돌연변이들은 결과를 얻지 못함). 따라서 각 돌연변이가 일어난 유전자들을 *silA*, *silB*, *silC*, *silD*, *silE*, 그리고 *silF*로 각각 명명하였고, 각각의 돌연변이 유전자 allele은 *silA98*, *silB32*, *silC188*, *silD6*, *silE181*, 그리고 *silF174*로 명명하였다. 이들을 모두 야생형과 교배하여 이배체를 얻은 다음 유성분화형질을 조사한 결과 모두 야생형 이배체와 같은 형질을 보임으로써 모든 돌연변이 유전자는 열성임을 알 수 있었다. 결

론적으로, SIL 돌연변이 균주들의 경우 상보군 결정과 우열결정 실험을 통해 이들이 모두 서로 다른 유전자에 돌연변이가 일어



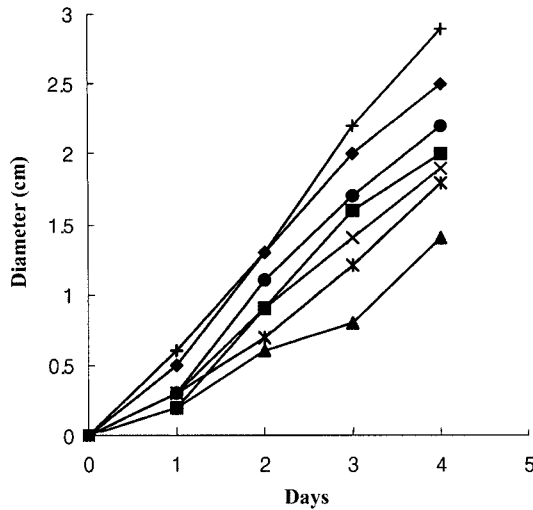
**Fig. 1.** Grouping of mutants according to the pattern of sexual development in the presence of environmental stresses. Developmental patterns of SIS1, SDS162 and SIL98 mutants (A) and SIA36 mutant (B) which were grown for 72 hr at 37°C on Light (3500 Lux), 1 M KCl, 2% acetate and 1 M KCl + 2% acetate media, were shown as representing SIS group, SDS group, SIA group, and SIL group strains.

**Table 3.** Effect of light illumination on the balance between sexual and asexual development of *A. nidulans*

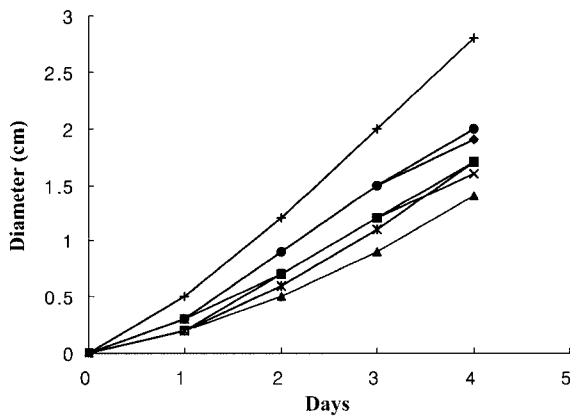
	DARK				LIGHT			
	MM		CM		MM		CM	
	sex <sup>a</sup>	asex <sup>b</sup>	sex	asex	sex	asex	sex	asex
FGSC4	++++	-	++++	+	-	++++	-	++++
SILA	++++	+	++++	+	++++	+	++++	+
SILB	++++	-	++++	+	+++	++	++++	+
SILC	++++	+	++++	+	+++	++	++++	+
SILD	++++	+	+++	+	+++	++	++++	+
SILE	++++	+	++++	+	+++	++	++++	+
SILF	++++	-	++++	+	+++	++	++++	+

<sup>a</sup>The number of cleistothecia was determined per 19.6 mm<sup>2</sup> area : -, 0; +, <20; ++, <50; +++, <100; +++++, >100

<sup>b</sup>The number of conidia was determined per 19.6 mm<sup>2</sup> area : -, >5×10<sup>4</sup>; +, <1×10<sup>6</sup>; ++, <1×10<sup>7</sup>; +++, <1×10<sup>8</sup>; +++++, >1×10<sup>8</sup>



**Fig. 2.** Growth of various SIL mutants in dark. Conidia were inoculated in the center of MM and incubated in dark. x, A4; ◆, SILD; ■, SILA; ▲, SILF; +, SILE; \*, SILC; ●, SILB



**Fig. 3.** Growth of various SIL mutants in the presence of light. Conidia were inoculated in the center of MM containing 1 M KCl. x, A4; ◆, SILD; ■, SILA; ▲, SILF; +, SILE; \*, SILC; ●, SILB

난 것이고 이 돌연변이들은 모두 열성임을 확인하였다(자료 미제시).

빛은 많은 종류의 곰팡이들의 분화에 영향을 미치는 중요한 요인으로 알려져 왔다(15). *A. nidulans*에서도 분화에 대한 빛의 영향에 대하여 보고 된 바가 있다(13). 특히 가시광선 중에서 긴 파장의 빛이 무성포자의 발생에 필요하다고 주장하였다. 본 연구에서 사용된 야생형의 빛에 관한 실험결과 또한 빛의 존재를 인지하고 이에 반응하여 생식의 방향을 결정하는 조절체계가 존재한다는 가정 하에서 그 조절체계를 구성하는 일부의 유전자가 존재할 것으로 추정할 수 있었다. 여기서 약 10,000개의 돌연변이를 분석해 본 결과 빛의 조건에서만 유성분화가 유도되는 돌연변이는 단지 6개의 균주만을 볼 수 있었고, 대부분의 균주는 SIS와 SDS 그룹처럼 각각 3종류의 스트레스 조건에서 유성분화

를 하는 돌연변이들이었고, SIA 그룹 또한 아세트산 뿐만 아니라 빛을 쬐여주는 조건에서도 유성분화가 유도되는 것으로 보아 특별하게 빛에만 반응하여 분화에 영향을 주는 유전자는 몇몇에 불과하고, 대부분 다른 스트레스에 관련된 유전자와 연관성이 있다고 생각되며, 균사 성장에 있어서는 외부환경 스트레스에 따른 영향은 크게 없는 것으로 사료된다.

### 감사의 말

이 논문은 2002년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2002-070-C00079).

### 참고문헌

- Adams, T.H., J.K. Wieser, and J.H. Yu. 1998. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 35-54.
- Axelrod, D.E., M. Gealt, and M. Pastushok. 1973. Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Dev. Biol.* 34, 9-15.
- Boylan, M.T., P.M. Mirabito, C.E. Willett, C.R. Zimmerman, and W. Timberlake. 1987. Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* 7, 3113-3118.
- Dunlab, J.C. and J.J. Loros. 2004. The *Neurospora* circadian system. *J. Biol. Rhythms.* 19, 414-424.
- Gealt, M.A. and D.E. Axelrod. 1974. Coordinate regulation of enzyme inducibility and developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Dev. Biol.* 41, 224-232.
- Han, D.M., Y.J. Han, K.S. Chae, K.Y. Jahng, and Y.H. Lee. 1994. Effects of various carbon sources on the development of *Aspergillus nidulans* with *velA* or *velA1* allele. *Kor. J. Mycol.* 22, 332-337.
- Han, D.M., Y.J. Han, Y.H. Lee, K.Y. Jahng, S.H. Jahng, and K.S. Chae. 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, K.H., K.Y. Han, J.H. Yu, K.S. Chae, K.Y. Jahng, and D.M. Han. 2001. The *nsdD* gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 41, 299-309.
- Han, K.H., D.B. Lee, J.H. Kim, M.S. Kim, K.Y. Han, W.S. Kim, Y.S. Park, H.B. Kim, and D.M. Han. 2003. Environmental factors affecting development of *Aspergillus nidulans*. *J. Microbiol.* 41, 34-40.
- Johnstone, I.L., S.G. Hughes, and A.J. Clutterbuck. 1985. Cloning an *Aspergillus nidulans* developmental gene by transformation. *EMBO J.* 4, 1307-1311.
- Kim, H.S., K.Y. Han, K. Kim, D.M. Han, K.Y. Jahng, and K.S. Chae. 2002. The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 37, 72-80.
- Lee, B.N. and T.H. Adams. 1994. The *Aspergillus nidulans fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal. *Genes Dev.* 8, 641-651.
- Mooney, J.L. and L.N. Yager. 1990. Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev.* 4, 1473-1482.
- Pontecorvo, G., J.A. Raper, L.M. Hemmons, K.D. MacDonald, and A.W.J. Bufton. 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*.

- Adv. Genet.* 5, 141-238.
15. Purschwitz, J, S. Muller, C. Kastner, and R. Fischer. 2006. Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 566-571.
16. Smith, J.E., J.G. Andeson, S.G. Deans, and B. Davis. 1977. Asexual development in *Aspergillus*, p. 23-58. *In: Genetics and Physiology in Aspergillus*, J.E. Smith and J.A. Pateman eds. Academic Press, New York, USA.
17. Yu, J.H., J. Wieser, and T.H. Adams. 1996. The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G-protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J.* 15, 184-190.
18. Zonneveld, B.J.M. 1977. Biochemistry and ultrastructure of sexual development in *Aspergillus*, p. 59-80. *In Genetics and physiology of Aspergillus*, J.E. Smith and J.A. Pateman (eds). Academic Press, New York, USA.

(Received April 5, 2007/Accepted May 23, 2007)

---

**ABSTRACT : Isolation and Characterization of *Aspergillus nidulans* Mutants Which Undergo Sexual Development in Light Exposure**

**Jung-Youl Min, Hye-Ryun Kim, Kap-Hoon Han<sup>1</sup>, and Dong-Min Han\*** (Div. Life Science, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk 560-749, Republic of Korea, <sup>1</sup>Dept. Pharmaceutical Engineering, Woosuk University, Wanju, Jeonbuk 565-701, Republic of Korea.)

In a homothallic ascomycete *Aspergillus nidulans*, sexual development is inhibited by various environmental stresses such as acetate medium, visible light and high osmolarity conditions. In order to study the genes involved in this stress-related regulatory network, we first attempted to isolate mutants that could develop cleistothecia even in the presence of any of those stresses including intensive visible light. More than 10,000 mutants were screened and 167 mutants were analyzed. Among them, 152 mutants underwent sexual development under the single stress condition of either high osmotic, high acetate or light condition but no sexual development in more than two stresses. Six mutants can produce cleistothecia under light or acetate stress but not in salt stress. Moreover, 6 mutants showed the ability to develop cleistothecia under the light but not under the acetate or osmo-stress. The mutants were revealed to have independent single gene mutation and grouped into different complementation groups (*silA-F*). The mutant alleles were all recessive to that of wild type. The light responsiveness of development implies the existence of delicate regulation process including reception and translocation of light signaling and determination of development.