

*Aspergillus nidulans*에서 MsnA 하위 유전자로 선별된 단당류 수송자 *mstB*의 기능 분석

전미향·채순기*

배재대학교 생화학과

Characterization of a Monosaccharide Transporter *mstB* Isolated as a Downstream Gene of MsnA in *Aspergillus nidulans*

Mee-Hyang Jeon and Suh-Keek Chae*

Department of Biochemistry, Paichai University, Daejeon 302-735, Republic of Korea

(Received September 22, 2011 / Accepted October 7, 2011)

To screen downstream genes of *Aspergillus nidulans* MsnA showing amino acid sequence similarity to the zinc finger region of Msn2/4 stress response transcription factors in *Saccharomyces cerevisiae*, differentially expressed genes (DEG) in MsnA overexpressed or *msnA* null mutant strains compared to wild type have been isolated. The cognate gene IDs were identified by DNA sequencing of the selected DEGs. Among those, DEG6 was known as *mstB* encoding a putative monosaccharide transporter. Expression level of *mstB* mRNA was increased in MsnA overproducing strains and MsnA bound directly to the promoter region of *mstB* *in vitro*. MstB containing twelve transmembrane domains exhibited 80% of amino acid sequence identities to *A. niger* MstA a high-affinity monosaccharide transporter. A null mutant of *mstB* was phenotypically undistinguishable to wild type. On the other hand, forced overexpression of MstB caused the increased formation of sexual structure cleistothecia in 0.1% glucose condition where wild type showed almost no cleistothecia. This result implies that *mstB* is involved in transport of monosaccharide required for sexual differentiation.

Keywords: *Aspergillus nidulans*, *msnA*, *mstB*, monosaccharide transporter, sexual development

*Aspergillus nidulans*는 homothallic한 자낭균으로 무성포자(conidiospore)를 생성하는 무성생식 생활사와 유성생식 기관인 cleistothecium 안에서 감수분열을 거쳐 유성포자(ascospore)를 생성하는 유성생식 생활사를 보유하고 있다(26). 무성분화 과정은 포자의 발아에 따른 균사(hyphae)의 성장과 이들이 엮어진 균사체(mycelia)에서 conidiophore, vesicle, phialide의 순차적인 형성과정을 거쳐 최종적으로 무성포자를 생성한다. 이 과정에는 전사인자 BrlA의 발현이 필수적으로 요구되며 *brlA*는 또 다른 전사인자들인 *abaA*와 *wetA*를 순차적으로 발현시켜 무성분화를 유도한다(1, 25). 무성포자가 생성되지 않는 fluffy 돌연변이체들의 분리(33)와 해당 유전자들 클로닝으로 *flbB*, *flbC*, *flbD*와 *flbE* 전사인자들이 밝혀졌고 이들은 단계적으로 또는 협력하여 *brlA*의 발현을 조절하게 된다(7, 9, 22, 34).

Han 등(15)은 *A. nidulans*에서 무성분화를 억제하고 유성분화만이 유도되는 저산소 농도의 배양 조건을 확립하였고 나아가 유성분화를 억제하고 무성분화만이 유도되는 환경으로 지속적인 빛의 제공, 1 M KCl 또는 0.6 M NaCl을 첨가한 높은 삼투물 농도 배지에서의 배양 및 유일 탄소원으로 acetate를 사용한 경우를 보고하였다. 또한 이러한 배양 조건을 이용하여 유성분화가 결여된 *nsd* (Never in Sexual Development) 돌연변이체들을 분리하였고(11, 12), 유성분화에 필수적인 전사인자 *nsdD* 및 *nsdC* 유전자를 동정하였다(13, 20). 이 유전자들과 유사하게 유성분화에 필수적인 유전자로 알려진 *veA*는 Käfer (17)에 의해 분리된 것으로서, *veA* 결손 돌연변이체는 *nsd* 돌연변이체와 마찬가지로 무성분화만을 유도하였고 유성분화가 전혀 일어나지 못하였다(19). 특히 유성분화 과정은 빛에 의하여 억제되는데 최근 보고에서 *VeA*는 *VelB* 및 *LaeA*와 복합체를 이루어 빛 신호전달 과정에 참여한다고 밝혀졌다(2).

* For correspondence. E-mail: chae@pcu.ac.kr; Tel.: +82-42-520-5614; Fax: +82-70-4362-6306

높은 삼투물 농도 배지는 *A. nidulans*의 유성분화를 억제하고 무성분화만을 유도하는데 이는 osmotic stress에 따른 신호 전달과정이 분화의 운명을 결정하는 유전자들의 발현과 연관성이 있을 것을 시사한다. *Saccharomyces cerevisiae*에서 osmotic stress에 따른 신호전달은 HOG (High Osmolarity Glycerol) 경로가 담당하고 있으며 MAPK인 Hog1과 Msn2/4, Hot1, Sko1 전사인자들과의 협력을 통하여 관련 유전자들의 발현을 조절하는 것으로 알려졌다(3). *A. nidulans*에서도 효모와 유사하게 HogA MAPK 신호전달 회로가 osmotic stress에 따른 유전자 발현에 관여한다고 알려졌다(10).

*A. nidulans*가 높은 삼투물 조건에서 유성분화가 억제되는 현상이 HogA MAPK 신호전달회로와 연관되어 있는지 알아보기 위하여 효모의 Msn2/4와 유사한 단백질로 보고된 MsnA (14)의 결손 및 과발현이 분화에 미치는 영향을 조사하였다. *msnA* 결손 돌연변이체는 야생주에 비하여 성장이 매우 느리고 유성 생식기관의 생성이 증가하였으며 또한 MsnA 과발현은 무성 분화를 억제하여 fluffy 표현형을 나타내어 MsnA가 분화 과정에 관련이 있음을 확인할 수 있었다(16). 하지만 Han 등(14)이 예측했던 것과 달리 *msnA*는 osmotic stress 반응에는 관여하지 않았으며 이와 유사한 결과는 MsnA와 전체적으로 아미노산 서열 유사도가 높고 Msn2/4의 유사 단백질로 분리되었던 *Trichoderma atroviride* Seb1도 osmotic stress 반응에 직접적인 영향이 없는 것으로 보고된 바 있다(27).

본 연구에서는 MsnA의 기능을 더 조사하기 위하여 *msnA* 결손 돌연변이체 및 MsnA 과발현 균주에서 야생주와 비교하여 차별적으로 발현되는 유전자(DEG)를 분리하여 동정하였다. 이들 중 DEG6는 *A. niger* monosaccharide transporter *mstA*와 높은 유사도를 나타내었으며 *A. nidulans*에서 *mstB*로 명명된 유전자로서 MsnA 과발현 균주에서 발현이 증가하였고 *mstB* 프로모터 부위에 MsnA가 직접 결합할 수 있음을 확인하여 MsnA 하위 유전자임을 검증하였다. 또한 0.1% glucose 조건에서 MstB 과발현 균주가 야생주에 비하여 유성 생식기관의 생성이 증가함을 확인하였으며 이는 단당류 수송자인 MstB가 유성분화 과정에서 필요한 당 수송을 담당하고 있음을 시사하고 있다.

재료 및 방법

균주 및 배양 조건

실험에 사용된 *A. nidulans* 균주는 Table 1에 나타냈으며, 배양에 사용된 완전배지(CM)와 최소배지(MM)는 Käfer (18)의 방법에 따라 제조하였다. 접종에 사용된 무성포자는 완전배지에서 3일간 배양 후 0.01% Tween 80으로 수확하여 사용하였으며 모든 균주는 37°C에서 배양하였고, 액체배양의 경우 200 rpm으로 16시간 동안 배양하였다. 단백질 과발현을 위하여 *alcA* 프로모터를 이용한 경우에는 유일 탄소원으로 100 mM threonine을 사용한 완전배지(CMT)에서 발현을 유도하였으며, *niiA* 프로모터를 이용한 경우에는 Han 등(20)의 방법에 따라 억제배지에는 질소원으로 0.2% ammonium tartrate를 유도배지에는 0.6% sodium nitrate를 사용하여 과발현을 유도하였다.

E. coli 균주는 XL1 Blue (MRF⁺)와 BL21-DE3를 사용하였으며 형질전환체는 ampicillin (100 µg/ml, USB, USA)이 든 LB 배지에 접종 후 37°C에서 배양하였다.

*A. nidulans*와 *E. coli* 형질전환

A. nidulans 형질전환은 원형질체(protoplast)를 제조하여 시도하였다. 원형질체 제조는 완전배지 200 ml에 약 10⁷/ml의 분생포자를 접종 후 37°C, 200 rpm으로 16시간 동안 진탕 배양해서 얻어진 균사체를 멸균된 갈매기와 miracloth (Calbiochem, USA)를 이용하여 수확하고 멸균된 증류수와 등장 완충용액 (0.6 M potassium chloride, 10 mM sodium chloride, pH 7.5)으로 세척한 후 세포벽 분해효소 Glucanex 200G (Novozymes, USA)가 든 용액(0.2 g/등장 완충용액 20 ml)에 섞어 30°C, 80 rpm으로 2시간 반응시켰다. 반응액을 4°C에서 5,000 rpm으로 7분간 원심분리하고 등장 완충용액과 STC 용액[1.2 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM CaCl₂]으로 세척 후 재차 원심분리하여 침전된 원형질체를 0.8 ml STC 용액으로 섞었다. 이 원형질체 용액에 10 µg DNA와 25% PEG 용액[25% PEG 6000, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM CaCl₂] 0.2 ml을 첨가하여 얼음에서 20분간 반응시킨 뒤 PEG 용액 5 ml을 추가한 후 상온에서 20분간 반응시켰다. 그 후 KC (0.6 M KCl, 5 mM CaCl₂) 용액을 10 ml 첨가한 뒤 0.6 M

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

| Strain | Genotype | Source |
|---------|---|-------------------------------------|
| A4 | <i>veA</i> ⁺ | FGSC ^a |
| A1153 | <i>yA1 pabaA1; argB2; pyroA4; nkuA::bar</i> | FGSC |
| SK461 | <i>pabaA1; argB2; pyroA4; chaA1, veA1</i> | Cross # 357.11.7 |
| SK564 | <i>pabaA1; argB2; ΔmsnA::argB⁺ choA1; veA⁺</i> | Cross # 381.1.25 |
| SK568 | <i>pabaA1; argB2; veA⁺</i> | Cross # 381.3.14 |
| SK579-5 | <i>pabaA1; argB2; pyroA4; chaA1 veA1, alcA(p)::msnA::argB⁺</i> | Transformant of SK461 with pQa-msnA |
| SK878 | <i>pabaA1; pyroA4; chaA1 veA1</i> | Cross # 415.2.3 |
| SK905-1 | <i>yA1 pabaA1; ΔmstB::argB⁺ argB2; pyroA4; nkuA::bar</i> | Disruption of <i>mstB</i> in A1153 |
| SK906 | <i>pabaA1; argB2; veA⁺, niiA(p)::mstB::argB⁺</i> | Transformant of SK568 with pNQ-mstB |
| SK907 | <i>pabaA1; argB2; pyroA4; chaA1 veA1, niiA(p)::mstB::argB⁺</i> | Transformant of SK461 with pNQ-mstB |

^a FGSC, Fungal Genetics Stock Center in Kansas City

KCl이 포함된 최소배지에 도달하고 상위배지를 부어 굳힌 다음 37°C에서 3일간 배양하였다(21).

E. coli 형질전환은 electroporation 방법(5)에 따라 40 μ l의 세포와 DNA 혼합물을 0.2 cm 큐벳에 넣고 2.5 KV로 처리 후 LB 배지 1 ml를 넣어 37°C에서 1시간 동안 배양 후 ampicillin이 든 LB 배지에 도달 하였다.

mstB 과발현 및 결손 돌연변이체 제조

mstB cDNA는 *A. nidulans* cDNA library를 주형으로 하여 *mstB* F primer (5'-ATATGAATTCATGGCGGACGGTGTC GTTG-3')와 *mstB* R primer (5'-ATATCTCGAGTTACGCC TTCTTAGCAATGTC-3')로 PCR을 수행하여 확보하였다. 또한 이 DNA를 제한효소 *EcoRI*과 *XhoI*으로 처리하고 동일한 효소로 처리된 과발현 벡터 pNQ-argB (*niiA* promoter, *N. crassa* qa-4 terminator, *argB*⁺ 보유)와 ligation 후 *E. coli* 균주 XL-1 Blue(MRF')에 형질전환하여 과발현 plasmid (pNQ-*mstB*)를 제조하였다. 이를 *A. nidulans* SK568에 형질전환하고 Northern 분석을 하여 *mstB*가 과발현된 형질전환체를 선별하였다.

mstB 결손 돌연변이체 제조를 위해서는 double joint PCR 방법(35)에 따라 *mstB* DF1 primer (5'-ACTCGTTTCGCTGT CTTGTTC-3')와 *mstB* DR1-tail primer (5'-AGTCAAATGA GGCCTCTAACTGGTCAATGTACATTTTGGGAGGCG GTTG-3')로 *argB*⁺ tail이 달린 *mstB* 5' flanking 부위를 PCR 하고 *mstB* DF2-tail primer (5'-GCCAAGGTAGATCCAGG CCTAACACAGGCGAGGGGCGTGAAGGTGAC-3')와 *mstB* DR2 primer (5'-TAGCATTGCGAGACTCAATG-3')로 다른 쪽의 *argB*⁺ tail이 달린 *mstB* 3' flanking 부위를 PCR 하였다. *argB* genomic DNA는 pILJ16 plasmid를 주형으로 하여 *argB* DF primer (5'-TGACCAGTTTAGAGGCCTC ATTTGACT-3')와 *argB* DR primer (5'-TGTGTTAGGCCT GGATCTACCTTGGC-3')로 PCR하여 획득하였다. 획득한 세 부위(5' 및 3' flanking 부위, *argB* gDNA)를 1:1:3의 비율로 섞은 뒤 primer를 넣지 않고 두 번째 PCR을 수행하였고 이를 주형으로 하여 *mstB* NF primer (5'-AAGATATCGGCG AGTTGTTTCAG-3')와 *mstB* NR primer (5'-CTAACTCCCG TTATTTCCAGATTC-3')로 PCR하여 *mstB* 대신 *argB* 유전자가 대체된 DNA 조각을 얻었다. 이를 A1153 균주에 형질전환하여 형질전환체를 확보하였고 Southern 및 PCR 분석을 통해 *mstB* 결손 여부를 확인하였다.

GST와 융합된 MsnA의 발현 및 *mstB* promoter와의 결합 조사

Glutathione S-transferase (GST)에 융합된 MsnA (GST-MsnA)의 발현 및 분리를 위하여 *E. coli* BL21-DE3에 pGEX4T-1 (Pharmacia Biotech, USA)에 *msnA* cDNA를 클로닝하고 이를(pGEX4T-1/*msnA*) *E. coli*에 형질전환하였다. 형질전환체에 1 mM IPTG를 30°C에서 4시간 동안 처리한 뒤 lysis 용액 [20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 0.1 mM EDTA

(pH 8.0), 0.1% Triton X-100] 1 ml에 섞고 초음파를 이용하여 분쇄하였다. 분쇄된 용액을 4°C, 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 단백질이 포함된 상층액을 수확하였다. Glutathione sepharose 4B resin (Amersham Bioscience, Sweden)을 단백질이 포함된 상층액 구획과 섞은 뒤 4°C에서 10시간 동안 반응시킨 후 lysis 용액으로 5번 세척하여 GST와 융합된 단백질을 순수 분리하였다.

MsnA와 *mstB* 프로모터와의 결합을 알아보기 위하여 GST-MsnA와 *mstB* PF primer (5'-TGTGGAGGAGAAGTCTGG AGTC-3')와 *mstB* PR primer (5'-TGAGGGTTACTGTTGG AAGGAC-3')로 PCR하여 얻어진 *mstB* 프로모터 DNA를 섞은 뒤 lysis 용액으로 채워(1 ml) 4°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 그 후 lysis 용액으로 5번의 세척과정을 거친 뒤 *mstB* PF와 *mstB* PR primer로 PCR하여 *mstB* 프로모터 DNA가 GST 또는 GST-MsnA에 의한 침강 여부를 확인하였다.

Northern 및 Southern 분석

Northern 분석을 위하여 배양된 균사체를 액체질소를 이용하여 분쇄한 뒤 Trizol (Invitrogen, USA)을 이용하여 RNA를 분리하고 전기영동을 하고 Immobilon-Ny⁺ Transfer Membrane (Millipore, USA)에 옮겼다. 이를 자외선으로 cross-link하고 hybridization buffer (0.25 M Na₂HPO₄, 1.0% Hydrolysed Casein, 7.0% SDS, 1.0 mM EDTA, H₃PO₄)로 65°C에서 1시간 동안 pre-hybridization을 하였다. Random primer DNA labeling kit (TAKARA, Japan)를 이용하여 ³²P로 표지된 탐침자를 사용하여 12시간의 hybridization 과정을 마친 뒤, 세척액 A (2×SSC, 0.1% SDS)로 35°C에서 15분, 세척액 B (0.1×SSC, 0.1% SDS)로 65°C에서 15분씩 두 번 세척한 뒤 X-ray 필름에 감광하여 확인하였다. Southern 분석은 genomic DNA를 획득 후 제한효소로 8시간 처리 한 뒤 0.8% agarose 겔에 전기영동하고 10 N NaOH를 이용하여 membrane으로 옮긴 후 hybridization 하였다.

DEG 선별 및 동정

DEG 선별을 위하여 Gene Fishing kit (Seegene, Korea)를 사용하였고 판매자가 제시한 방법에 따라 분석을 수행하였다. 야생주, *msnA* 결손 돌연변이체 및 MsnA 과발현 균주들을 대상으로 각 균주에서 RNA를 추출하였고 제공된 역전사 효소를 이용하여 단 가닥 cDNA를 합성하였다. 이를 주형으로 kit에 포함된 6종류의 arbitrary ACP primer를 이용하여 PCR 한 후 agarose 겔에 전기영동 하였고 야생주의 PCR 밴드와 강도 차이를 보이는 DEG들을 선별하였다. 선별된 각 DEG들의 DNA 조각을 agarose 겔에서 분리하여 정제 후 동일한 primer로 증폭하였고 이들의 염기서열을 결정하였다.

결과 및 고찰

차별적으로 발현되는 유전자(DEG) 선별 및 동정

*msnA*에 의하여 조절되는 하위 유전자를 선별하기 위해서

Table 2. Gene IDs of the selected DEGs

| DEG No. | Gene ID | Protein BLAST match |
|---------|---------|---|
| DEG4 | AN2702 | No informative BLAST hits |
| DEG6 | AN6669 | monosaccharide transporter (<i>mstB</i>) |
| DEG8 | AN4260 | No informative BLAST hits |
| DEG9 | AN5568 | Leucine rich repeat domain-containing protein |

야생주, *msnA* 결손 돌연변이체 및 *MsnA* 과발현 균주들을 대상으로 DEG 분석을 수행하였다(Fig. 1). 각 DEG들의 결정된 염기서열을 이용하여 미국 Broad Institute에서 운영하는 *A. nidulans* genome database (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group/MultiHome.html)에서 BlastN을 수행하여 해당 유전자를 확인하였다(Table 2). 이들 DEG 중 기능이 유추되는 DEG6를 선발하여 후속연구를 진행하였다. DEG6에 해당하는 유전자는 *mstB* (Genbank No. XP_664273)로 명명되어 있었으며 단백질은 Major Facilitator Superfamily의 monosaccharide 수송에 관여하는 수송자(transporter)로 예측된 바 있었다(31).

*mstB*는 1,605개의 뉴클레오타이드를 가지며, 3개의 인트론과 534개의 단백질을 암호화하고 있다. High affinity monosaccharide transporter인 *A. nidulans* MstA (CAC80843), HxtA (CAD59636) 그리고 *A. niger* MstA (AAL89822)와는

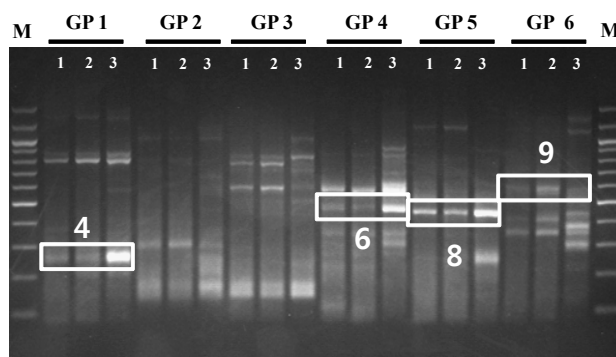


Fig. 1. Photographs of gels containing differentially expressed genes (DEGs) of wild type, $\Delta msnA$, and *MsnA* overexpressed strains. Wild type (A4) and $\Delta msnA$ were incubated in CM liquid and overexpressed *MsnA* strain was incubated CMT liquid media at 37°C with shaking at 200 rpm for 16 h. Isolated total RNA was used for DEG screening using 6 general primers (GP1 to GP6). Four DEGs were identified for further analysis. Boxes indicate selected DEG bands (numbers 4, 6, 8 and 9). 1: Wild type (A4), 2: $\Delta msnA$, 3: *MsnA* overexpressed strain.

각각 84.4%, 27.2%, 80.3%의 아미노산 서열 동일성을 보이며 (Fig. 2), glucose 인식자인 *S. cerevisiae* Snf3 (CAA98771),

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|------|-----------|-----------|----------|----------|---------|----------|---------|---------|-----------|---------|---------|--------|--------|---------|---------|-----|
| A.nidulans mstA | 1: | MADAVIAGQ | RVEAPVTWK | AYLMCVFA | AFGGIFFG | YDSGYIN | GVMGMDY | FIQFTG | KVKSET | PAA---- | QFVISS | SNKSLI | 76 | | | | |
| A.nidulans mstB | 1: | MADGVVAGT | RVEAPVTWK | AYLMCAFA | AFGGIFFG | YDSGYIN | GVMAMDY | FIHFSG | KVKAEE | YAADNL | SGYVISS | SNKSLI | 80 | | | | |
| A.niger mstA | 1: | MAEGFVDAS | RVEAPVTLK | AYLMCAFA | AFGGIFFG | YDSGYIS | GVMGMRY | FIEFEGL | -DYNITP | TDTSFV--- | LPSNKK | SLI | 76 | | | | |
| A.nidulans mstA | 77: | TSILSAGT | FFGAILI | AGDLAEW | YERRITI | IINCGVF | MAEVAFA | QIASTT | VPMLVV | GRLLI | AGVEV | GFVSAIL | ILYMSE | ISPRR | 156 | | |
| A.nidulans mstB | 81: | TSILSAGT | FFGAILI | AGDLADW | FERRITI | IISCGIF | MEVVALQ | TASTT | VALLV | GRLLI | AGVEV | GFVSAIL | ILYMSE | IAPRK | 160 | | |
| A.niger mstA | 77: | TSILSAGT | FFGAILI | AGDLADW | FERRITI | IIVSGCV | FIVEVILQ | TASTS | LGLLV | GRLLV | AGVEV | GFVSAIL | ILYMSE | IAPRK | 156 | | |
| A.nidulans mstA | 157: | FRGAIVSGY | QFCIT | ITIGLML | ASCVDY | TENRNL | DSGSYRI | PIALQ | LLWAIL | ILGIGL | FVLPE | SPRYV | VRKNN | LAERAK | ILARV | 236 | |
| A.nidulans mstB | 161: | VRGAIVSGY | QFCVT | ITIGLML | ASCVDY | TENRNL | DSGSYRI | PIGLQ | LLWAIL | ILAVGL | FLLPE | SPRYV | VRKGD | VSSAA | RVLARV | 240 | |
| A.niger mstA | 157: | VRGAIVSGY | QFCIT | ITIGLML | ASCVDY | TENRNL | DSGSYRI | PIGLQ | LWAIL | GGGLL | CCLPE | SPRYV | VRKGD | LAKAE | VRLARV | 236 | |
| A.nidulans mstA | 237: | RGQPPESE | YITQEL | AEIVAN | NEYEMQ | VIFPGG | YFATW | NCFRG | LRSF | SPNSNL | RRTVL | GTSLQ | MMQ | QWTG | VNFV | FYFGTTF | 316 |
| A.nidulans mstB | 241: | RDQDVES | DYVKEE | LAEIVAN | NEYEMSL | IPQGGY | FATWNC | FRGSI | WSPNS | NLRRT | ILGTSL | QMMQ | QWTG | VNFV | FYFGTTF | 320 | |
| A.niger mstA | 237: | RGQPQDS | DYIKDE | LAEIVAN | NEYEMQ | VIFEGG | YFVSWN | CFRGS | IFSPNS | NLRRT | VLGTSL | QMMQ | QWTG | VNFV | FYFGTTF | 316 | |
| A.nidulans mstA | 317: | FQNLGTI | DDPFLI | SMITTIV | NVESTP | ISFYT | MEKLR | GRRLP | LLWGA | LGMVIC | QFIVA | IAGTV | DGNSK | TVSAQ | ISFICI | YIY | 396 |
| A.nidulans mstB | 321: | FTNLGTI | DDPFLI | SMITTIV | NVESTP | ISFYT | MEKLR | GRRLP | LLWGA | LGMVIC | QFIVA | IAGTV | DGNSK | TVSAQ | ISFICI | YIY | 400 |
| A.niger mstA | 317: | FQSLGTI | DDPFLI | SMITTIV | NVESTP | ISFYT | IEKFR | GRRLP | LLWGA | LGMVIC | QFIVA | IAGTV | DGNSK | HAVSA | EISFICI | YIY | 396 |
| A.nidulans mstA | 397: | FFFASTW | GPGAWV | VIGETI | FLPIRS | RGVAL | STASN | NLWNC | IIAVIT | PYMVD | DKGNL | KSRV | FFFIW | GSIC | ACAFV | YVYFLI | 476 |
| A.nidulans mstB | 401: | FFFASTW | GPGAWV | VIGETI | FLPIRS | RGVAL | STASN | NLWNC | IIAVIT | PYMVD | DKGNL | KSRV | FFFIW | GSIC | ACAFV | YVYFLI | 480 |
| A.niger mstA | 397: | FFFASTW | GPGAWV | VIGETI | FLPIRS | RGVAL | STASN | NLWNC | IIAVIT | PYMVD | DKGDL | KAKV | FFFIW | GSIC | ACAFV | YVYFLI | 476 |
| A.nidulans mstA | 477: | PETKGLT | LEQVDK | MMETT | PTSAK | WPHST | FATEM | GMEK | ENAST | TVESAA--- | | | | | | | 527 |
| A.nidulans mstB | 481: | PETKGLT | LEQVDK | MMETT | PTSSK | WPHGT | FFAEM | GMEK | EDVT | QTVED | IAKKA | | | | | | 534 |
| A.niger mstA | 477: | PETKGLT | LEQVDK | MMETT | PTSAK | WPHGT | FATEM | GMEK | ENAST | TVESAA--- | | | | | | | 530 |

Fig. 2. Amino acid sequence alignment of *A. nidulans* MstB (XP_664273) and other high-affinity glucose transporters, *A. nidulans* MstA (CAC80843) and *A. niger* MstA (AAL89822). Boxes indicate identical amino acids.

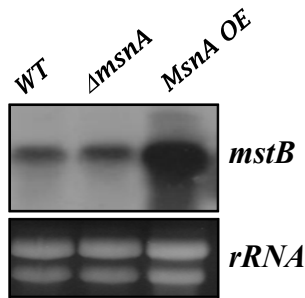


Fig. 3. Expression levels of *mstB* mRNA. Wild type (A4), $\Delta msnA$ (SK564), and MsnA overexpression strain (MsnA OE, SK579-5) were inoculated in liquid CMT and incubated at 37°C with shaking at 200 rpm for 16 h. The blot having 10 μ g total RNA per lane were probed with *mstB* cDNA. rRNA indicates ribosomal RNA loaded per lane.

Rgt2 (CAA65621) 그리고 *N. crassa* RCO-3 (AAA99806)와는 각각 38.5%, 40.2%, 41.2%의 아미노산 서열 동일성을 보였다.

*mstB*의 상위 염기서열 2,586 bp 부위를 분석한 결과 5개의 STRE (STress Response Element, AGGGG: -5, -875, -1,630, -1,732, -2,228 bp)와 10개의 CreA 결합 부위(SYGGRG: -66, -87, -97, -381, -766, -835, -1,064, -1,095, -1,722, -2,019 bp) 그리고 3개의 PacC 결합 부위(GCCARG: -547, -707, -2,162 bp)가 존재함을 확인할 수 있었다(4, 6, 24). 이는 *A. niger*의 high-affinity monosaccharide transporter로 알려진 *mstA*의 상위 염기서열에서도 유사하게 발견되는 것으로 실제 *A. niger mstA*는 CreA에 의하여 carbon catabolite repression을 받아 발현이 조절되며 또한 pH에 의해 활성이 조절되는 전사인자 PacC의 영향도 받는 것으로 보고된 바 있다(28). MstB는 MstA와의 높은 아미노산 서열 동일성과 CreA에 의한 조절 가능성에 따라 high-affinity monosaccharide 수송자로 예측된다.

*Saccharomyces cerevisiae*에는 대략 20개의 육탄당 수송자(Hexose transporter; HXT1-17, GAL2, SNF3, 및 RGT2)가 존재하며, 이 중 7개(HXT1-4, 6, 7, 및 GAL2)만이 주요 수송자로서 기능할 뿐(23), 나머지는 glucose 인식자(SNF3와 RGT2) 혹은 HXT 계열 돌연변이체의 성장 회복에만 관여하고(HXT8-17) 육탄당 수송에는 직접적으로 관여하지는 않는다고 알려져 있다. 현재 *Aspergillus nidulans*에는 17개, *Candida albicans*에는 20개의 육탄당 수송자 유전자가 있는 것으로 보고되었다(8, 31).

msnA 하위 유전자로서의 *mstB*에 대한 검증

DEG6는 DEG 분석 시 MsnA 과발현 균주에서 발현이 증가한 것으로 분리되었는데 이의 검증을 위하여 CMT 배지에서 *alcA* promoter를 이용하여 MsnA를 과발현한 균주에서 *mstB* Northern 분석을 수행하였다. 그 결과 MsnA 과발현 균주에서 *mstB*의 발현이 함께 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 3). 이런 결과는 MsnA가 *mstB*의 발현을 유도하는 촉진자의

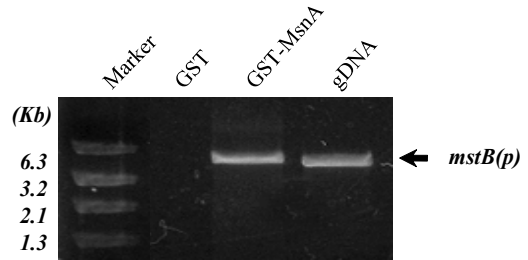


Fig. 4. *In vitro* assay for the binding of MsnA to the promoter region of *mstB*. GST tagged MsnA (GST-MsnA) and the *mstB* promoter DNA fragment were incubated for 12 h at 4°C *in vitro*. GST-MsnA was pulled down with GST beads and washed 5 times. The presence of the co-precipitated promoter DNA fragment with GST-MsnA was analyzed by PCR amplification. GST was used as a negative control and *A. nidulans* genomic DNA was used as a positive control for the PCR amplification of the *mstB* promoter. The resulting 4,690 bp PCR amplicon of *mstB* promoter was visualized by 1% agarose gel followed by ethidium bromide staining.

역할을 하고 있음을 시사하고 있다. 반면 동일한 배지에서 배양한 *msnA* 결손 돌연변이체에서의 *mstB* Northern 분석 결과에서는 야생주와 비교하여 발현량의 차이를 구별할 수 없었다(Fig. 3).

*mstB*가 MsnA에 의하여 직접적으로 발현이 조절되는지를 확인하기 위하여 *mstB*의 프로모터 부위의 MsnA의 결합 여부를 *in vitro*에서 조사하였다. GST-MsnA와 *mstB* 프로모터 DNA 절편을 섞어 GST bead로 GST-MsnA를 침강시킨 후 *mstB* 프로모터 DNA 절편의 침강 여부를 PCR로 확인하였다. GST-MsnA를 사용하여 침강한 조사구에서는 PCR DNA 절편이 확인되었으나 GST 단백질을 이용한 대조구에서는 PCR에 의한 *mstB* 프로모터 DNA 절편이 증폭되지 않았다(Fig. 4). 이는 MsnA가 *mstB* 프로모터 부위에 직접적으로 결합할 수 있음을 나타내고 있다.

mstB 결손 돌연변이체의 표현형 조사

고친화성 당류 수송자로 예상되는 *mstB* 유전자 결손 돌연변이를 제조하여 성장 및 분화에 미치는 영향을 조사하였다. *mstB* 결손 돌연변이체는 PCR (자료 미제시) 및 Southern 분석을 수행하여 확인하였다(Fig. 5). 0.1% glucose 또는 1% glucose CM 및 MM 배지 조건 배양한 *mstB* 결손 돌연변이는 성장 과정에 있어 야생주와 차이를 구별할 수 없었다(Fig. 6A, 0.1% glucose CM에서 배양한 자료 미제시). 또한 1% glucose CM 배지에서의 유성생식 기관 cleistothecia 형성은 야생주와 큰 차이가 없었으며, 0.1% glucose CM에서도 야생주와 유사하게 cleistothecium의 형성이 거의 일어나지 못하였다(Fig. 6B).

*mstB*의 결손에도 불구하고 야생주와 유사한 표현형질을 나타내는 것은 *mstB*의 기능을 보완할 수 있는 또 다른 당류

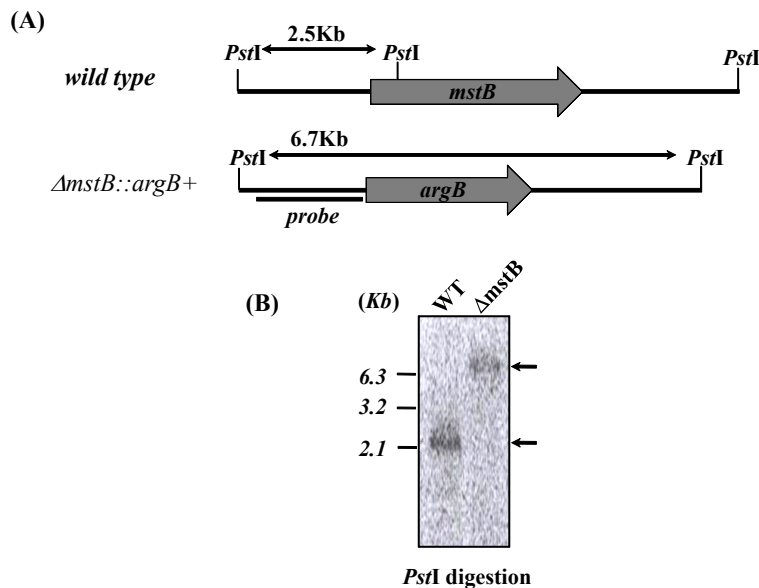


Fig. 5. Disruption of *mstB*. (A) Scheme of the *mstB* knock-out construct. (B) Southern analysis of a null mutant of *mstB*. Genomic DNAs of wild type and $\Delta mstB$ were isolated, restricted with *PstI* and hybridized with the ^{32}P -labeled DNA probe indicated within the figure.

수송자(예로 약 85% 아미노산 서열 동일성을 나타내는 *mstA*)가 존재하여 나타나는 것으로 예측된다. 실제 *S. cerevisiae*에서 당류 수송자 4개가 동시에 결여되어도 야생주와 차이를 나타내지 않았으며(32), MstB와 80%의 아미노산 서열 동일성을 나타낸 *A. niger mstA* 결손 돌연변이주 또한 야생주와 표현형이 유사하다는 것이 보고된 바 있다(28).

저농도 glucose 조건에서 MstB 과발현에 따른 유성분화의 촉진

*A. nidulans*는 0.5% glucose 이하의 조건에서 유성분화가

잘 일어나지 않으며 유성생식 기관인 cleistothecia의 수와 크기도 매우 감소한다고 알려져 있다(15). *mstB*를 *niiA* promoter를 이용하여 과발현한 균주를 0.1% glucose CM 배지에서 배양했을 시 야생주와는 달리 유성생식 기관의 수와 크기가 증가하는 것을 확인하였으며 이와 같은 유성분화 촉진 현상은 *veA*⁺와 *veA1* 유전적 배경에서 모두 관찰되었다(Fig. 7).

곰팡이들에게 있어 당류의 분해와 다양한 당류의 흡수는 성장에 많은 영향을 끼쳐 영양생식 균사체의 세포벽을 구성하게 되며 이러한 당류는 유성분화 과정 중에 다시 분해 과정을 거쳐 생식 기관을 만드는 에너지로 사용된다고 알려져

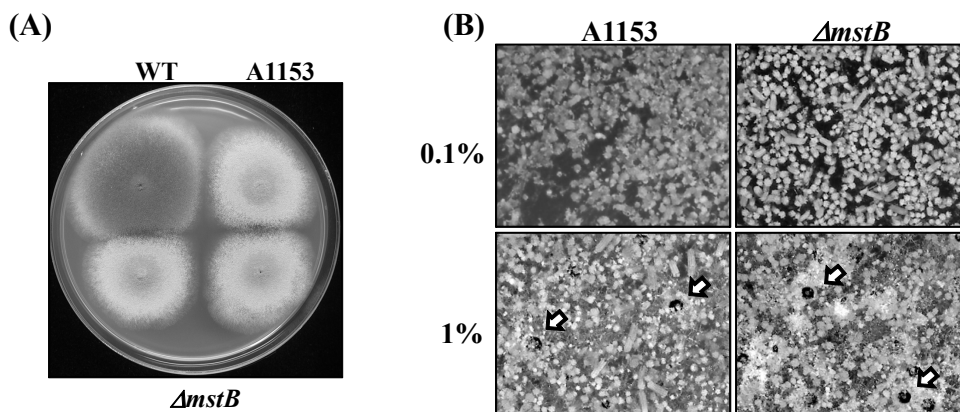


Fig. 6. Phenotype of *mstB* deletion strain. (A) The point inoculated control strains (A4 and A1153 as a host strain for *mstB* knock-out) and $\Delta mstB$ (SK905-1) were grown for 3 days on MM (1% glucose) solid media. The $\Delta mstB$ exhibited no difference on growth and conidiophore formation compared with wild type. (B) The cleistothecial production of $\Delta mstB$. The $\Delta mstB$ and wild type were grown in 0.1% and 1% glucose CM media for 6 days. No difference between wild type and $\Delta mstB$ was observed.

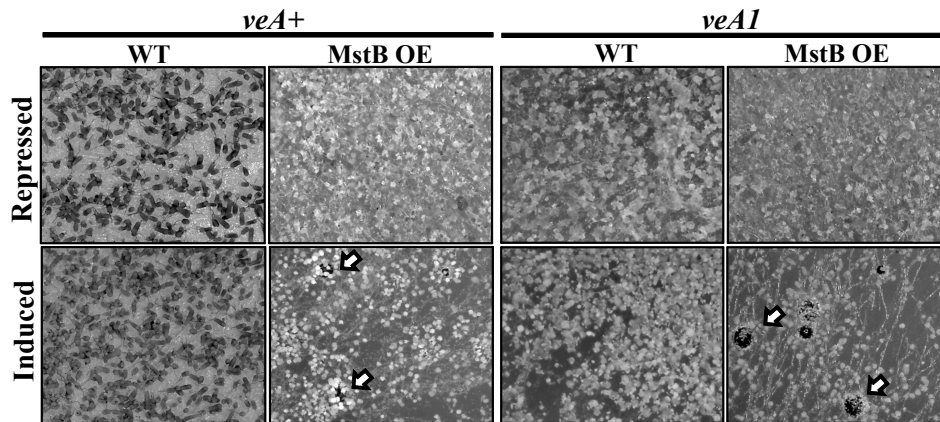


Fig. 7. Increased cleistothecial formation in the MstB overexpressed strain on 0.1% low glucose condition. Point inoculated wild type (A4 and SK878) and MstB overexpressed (MstB OE, SK906 and SK907) strains in both *veA*⁺ and *veA*⁻ genetic backgrounds were grown on 0.1% glucose CM. Under repressing conditions, no developmental change occurred compared with wild type. However induction of MstB with 0.6% sodium nitrate caused enhanced sexual structure formation. The arrows indicate sexual organs cleistothecia.

있다(36, 37). *A. nidulans*의 고친화성 육탄당 수송자인 *hxtA*는 cleistothecia가 생성되는 시기에 가장 많은 발현이 관찰되었으며 특히 ascogenous hyphae에서 다량 위치하고 있어 유성분화 기간의 당수송에 관련된 유전자로 보고되었다(31). 또한 다당류인 mutan을 분해하는 *A. nidulans* mutanase (α -1,3-glucanase) 유전자인 *mutA*도 어린 cleistothecium에 영양 공급을 하는 Hülle 세포에서 매우 높이 발현되고 있어 유성생식 기관의 형성 시 다당류의 분해와 단당류 수송체들이 역할이 중요할 것으로 예견된 바 있다(30). *S. pombe*에서도 감수분열 과정에 특이적인 유전자로 육탄당 수송자가 분리된 바 있으며 이 유전자는 감수분열에 절대적인 전사인자 *Mei4*에 의하여 발현이 조절된다고 알려져 당 수송자들과 유성분화와의 관련성을 보여주고있다(29).

*A. nidulans*의 성장 및 분화 기간 동안의 microarray 결과에서 *mstB*의 mRNA 발현은 영양 균사체 형성 시기에는 발현이 억제되었다가 무성포자의 형성 시기에 증가하였고 또한 유성분화 기간 중 cleistothecia 생성 직전에 가장 높은 발현이 일어난 것으로 나타났다(유영만 등, 미보고 결과). 따라서 *mstB*도 유성분화 과정에서 *hxtA*와 유사한 당 수송의 역할을 수행할 것으로 예측된다.

적요

스트레스 반응에 관여하는 *Saccharomyces cerevisiae* 전사인자인 Msn2/4의 C₂H₂ zinc finger 부위와 아미노산 서열 유사성을 보이는 *Aspergillus nidulans* MsnA의 하위 유전자 획득을 위하여 *msnA* 결손 돌연변이체 또는 과발현 균주에서 야생주와 비교하여 차별적으로 발현되는 유전자(Differentially Expressed Gene, DEG)들을 분리하였다. 선별된 DEG들은 염기서열 결정을 통해 해당 유전자들을 동정하였고 이들 중 DEG6는 단당류 수송자(monosaccharide transporter)로 예측

된 *mstB* 유전자로 밝혀졌다. *mstB*의 발현은 MsnA 과발현에 의하여 증가되었으며 MsnA는 *in vitro*에서 *mstB* 프로모터 부위에 직접적으로 결합하였다. MstB는 12개의 막결합 부위를 가지며 *A. niger*의 고친화성 단당류 수송자(high-affinity monosaccharide transporter)인 MstA와 80%의 높은 아미노산 서열 동일성을 보였다. *mstB* 결손 돌연변이체의 표현형은 야생주와 유사하였으나 MstB가 과발현된 균주는 낮은 당 농도인 0.1% glucose 배지에서 유성생식 기관인 cleistothecia의 형성이 증가하였다. 이러한 결과는 단당류 수송자인 MstB가 유성분화 과정에서 요구되는 당의 수송에 관여하고 있음을 시사한다.

감사의 말

이 논문은 2008년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국 학술진흥재단의 지원(KRF-2008-313-C00803)을 받아 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

- Andrisnopoulos, A. and W.E. Timberlake. 1994. The *Aspergillus nidulans abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2503-2515.
- Bayram, O., S. Krappmann, M. Ni, J.W. Bok, K. Helmstaedt, O. Valerius, S. Braus-Stromeier, N.J. Kwon, N.P. Keller, J.H. Yu, and et al. 2008. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320, 1504-1506.
- Capaldi, A.P., T. Kaplan, Y. Liu, N. Habib, A. Regev, N. Friedman, and E.K. O'Shea. 2008. Structure and function of a transcriptional network activated by the MAPK Hog1. *Nat. Genet.* 40, 1300-1306.
- Cubero, B. and C. Scazzocchio. 1994. Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for

- CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* 13, 407-415.
5. Dower, W.J., J.F. Miller, and C.W. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16, 6127-6145.
 6. Espeso, E.A., J. Tilburn, L. Sánchez-Pulido, C.V. Brown, A. Valencia, H.N. Arst Jr., and M.A. Peñalva. 1997. Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J. Mol. Biol.* 274, 466-480.
 7. Etchebeste, O., M. Ni, A. Garzia, N.J. Kwon, R. Fischer, J.H. Yu, E.A. Espeso, and U. Ugalde. 2008. Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 7, 38-48.
 8. Fan, J., V. Chaturvedi, and S.H. Shen. 2002. Identification and phylogenetic analysis of a glucose transporter gene family from the human pathogenic yeast *Candida albicans*. *J. Mol. Evol.* 55, 336-346.
 9. Garzia, A., O. Etchebeste, E. Herrero-Garcia, R. Fischer, E.A. Espeso, and U. Ugalde. 2009. *Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB. *Mol. Microbiol.* 71, 172-184.
 10. Hagiwara, D., Y. Asano, J. Marui, A. Yoshimi, T. Mizuno, and K. Abe. 2009. Transcriptional profiling for *Aspergillus nidulans* HogA MAPK signaling pathway in response to fludioxonil and osmotic stress. *Fungal Genet. Biol.* 46, 868-878.
 11. Han, D.M., Y.J. Han, J.H. Kim, K.Y. Jahng, Y.S. Chung, J.H. Chung, and K.S. Chae. 1994. Isolation and characterization of NSD mutants in *Aspergillus nidulans*. *Kor. J. Mycol.* 22, 1-7.
 12. Han, K.H., S.S. Cheong, H.S. Hoe, and D.M. Han. 1998. Characterization of several NSD mutants of *Aspergillus nidulans* that never undergo sexual development. *Kor. J. Genet.* 20, 257-264.
 13. 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.
 14. Han, K.-H. and R.A. Prade. 2002. Osmotic stress-coupled maintenance of polar growth in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 43, 1065-1078.
 15. Han, K.-H., D.-B. Lee, J.-H. Kim, M.-S. Kim, K.-Y. Han, Y.-S. Park, W.-S. Kim, H.-B. Kim, and D.-M. Han. 2003. Environmental factors affecting development of *Aspergillus nidulans*. *J. Microbiol.* 41, 34-40.
 16. Jeon, M.H., D. Hagiwara, A. Yoshimi, K. Abe, D.M. Han, and S.K. Chae. 2009. Analysis of *nrdA*, a negative regulator of differentiation in *Aspergillus nidulans*. In *Proceeding of 25th Fungal Genetics Conference*, Pacific Grove, CA, USA.
 17. Käfer, E. 1965. Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52, 217-232.
 18. Käfer, E. 1977. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv. Genet.* 33-67.
 19. Kim, H., K. Han, K. Kim, D. Han, K. Jahng, and K. Chae. 2002. The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 37, 72-80.
 20. Kim, H.R., K.S. Chae, K.H. Han, and D.M. Han. 2009. The *nsdC* gene encoding a putative C₂H₂-type transcription factor is a key activator of sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 182, 771-783.
 21. Kwon, N.J. 2005. Ph. D. thesis. Paichai University. Seoul, Republic of Korea.
 22. Kwon, N.J., A. Garzia, E.A. Espeso, U. Ugalde, and J.H. Yu. 2010. FlbC is a putative nuclear C₂H₂ transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 77, 1203-1219.
 23. Maier, A., B. Völker, E. Boles, and G.F. Fuhrmann. 2002. Characterization of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (counter transport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters. *FEMS Yeast Res.* 2, 539-550.
 24. Marchler, G., C. Schüller, G. Adam, and H. Ruis. 1993. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinases A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* 12, 1997-2003.
 25. Megabit, P.M., T.H. Adams, and W.E. Timberlake. 1989. Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell* 57, 859-868.
 26. Pontecorvo, G., J.A. Roper, L.M. Hemmons, K.D. Macdonald, and A.W. Bufton. 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 5, 141-238.
 27. Seidl, V., B. Seiboth, L. Karaffa, and C.P. Kubicek. 2004. The fungal STRE-element-binding protein Seb1 is involved but not essential for glycerol dehydrogenase (*gld1*) gene expression and glycerol accumulation in *Trichoderma atroviride* during osmotic stress. *Fungal Genet. Biol.* 41, 1132-1140.
 28. Vankuyk, P.A., J.A. Diderich, A.P. MacCabe, O. Hererro, G.J. Ruijter, and J. Visser. 2004. *Aspergillus niger* *mstA* encodes a high-affinity sugar/H⁺ symporter which is regulated in response to extracellular pH. *Biochem. J.* 379, 375-383.
 29. Watanabe, T., K. Miyashita, T.T. Saito, T. Yoneki, Y. Kakiyama, K. Nabeshima, Y.A. Kishi, C. Shimoda, and H. Nojima. 2001. Comprehensive isolation of meiosis-specific genes identifies novel proteins and unusual non-coding transcripts in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* 29, 2327-2337.
 30. Wei, H., M. Scherer, A. Singh, R. Liese, and R. Fischer. 2001. *Aspergillus nidulans* alpha-1,3 glucanase (mutanase), *mutA*, is expressed during sexual development and mobilizes mutan. *Fungal Genet. Biol.* 34, 217-227.
 31. Wei, H., K. Vienken, R. Weber, S. Bunting, N. Requena, and R. Fischer. 2004. A putative high affinity hexose transporter, *hxtA*, of *Aspergillus nidulans* is induced in vegetative hyphae upon starvation and in ascogenous hyphae during cleistothecium formation. *Fungal Genet. Biol.* 41, 148-156.
 32. Wiczorke, R., S. Krampe, T. Weierstall, K. Freidel, C.P. Hollenberg, and E. Boles. 1999. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 464, 123-128.
 33. Wieser, J., B.-N. Lee, J. Fondon 3rd, and T.H. Adams. 1994. Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* 27, 62-69.
 34. Wieser, J. and T.H. Adams. 1995. *flbD* encodes a Myb-like DNA-binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. *Genes Dev.* 9, 491-502.
 35. Yu, J.H., Z. Hamari, K.H. Han, J.A. Seo, Y. Reyes-Domínguez, and C. Scazzocchio. 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* 41, 973-981.
 36. Zonneveld, B.J. 1972. Morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. The significance of a alpha-1,3-glucan of the cell wall and alpha-1,3-glucanase for cleistothecium development. *Biochim. Biophys. Acta* 273, 174-187.
 37. Zonneveld, B.J. 1973. Inhibitory effect of 2-deoxyglucose on cell wall alpha-1,3-glucan synthesis and cleistothecium development in *Aspergillus nidulans*. *Dev. Biol.* 34, 1-8.