

*Aspergillus nidulans*내에서 *Aspergillus awamori*의 Glucoamylase 유전자 발현

김석준 · 유준희 · 정구홍

서울대학교 생물교육과 세포분화연구센터

*A. awamori*의 glucoamylase 유전자와 *A. nidulans*의 *trpC* marker 유전자를 가진 *A. nidulans*의 expression vector를 만들었다. 이 재조합 plasmid를 트립토판 영양요구주인 *A. nidulans* B17에 형질전환시켰다. Southern blotting으로 vector DNA가 *A. nidulans*의 chromosomal DNA에 integration된 것을 확인하였다. Northern blotting의 결과, glucoamylase 유전자는 induction 조건에서 mRNA를 합성하였다. glucoamylase의 역가가 형질전환체에서 증가하였으며, nondenaturing polyacrylamide gel에서 glucoamylase의 활성이 나타났다.

KEY WORDS □ *A. nidulans*, transformation, glucoamylase gene expression

Glucoamylase는 세포외분비 효소로서 starch를 분해하여 glucose를 만들어낸다. *Aspergillus*(*A. awamori*, *A. niger*)의 glucoamylase는 약 70 kD과 60 kD의 두 가지 형태(G1, G2)를 가지고 있다(14). 가용성 전분에 대한 G1과 G2의 활성은 같으며, C-말단을 제외하면 같은 아미노산 서열을 갖고 있다(3).

사상형균류(filamentous fungi)는 학문적, 상업적 관심을 받은 생물체이며 특히 *Aspergillus nidulans*와 *Neurospora crassa*는 유전학적으로도 잘 밝혀져 있다. 사상형균류로부터 얻을 수 있는 유용한 생산물로는 항생제, 유기산, 효소 등이 있다. 최근에는 유전공학적 기술을 이용한 외부유전자 발현의 숙주로서 주목받고 있다.

외부유전자의 발현에 사용된 첫번째 미생물은 대장균이었고 대장균에서의 외부유전자의 발현은 높은 수준으로 이루어질 수 있었으나 진핵생물기원인 유전자의 경우에는 생물학적 활성을 지니지 못한 적이 많았다. *Saccharomyces cerevisiae*, insect cell, mammalian cell을 포함한 고등생물도 외부유전자 발현을 위한 숙주로서 사용되었으나 아직 많은 문제점이 있다. 일반적으로 숙주의 선택은 경제적인 고려와 발현하고자 하는 단백질의 특성에 의해 결정된다. 외부유전자 발현을 위한 진핵생물 숙주로서 사상형균류는 다음과 같은 장점을 가지고 있다. 첫째로, *S. cerevisiae*와는 대조적으로 *Aspergillus*속의 많은 종들은 여러가지 효소를 다량으로 분비한다. 둘째로, 숙주로서 사용될 수 있는 균류들은 이미 산업적으로 이용되어 왔던 것들인데 이들은 모두 안전성이 공인되어 있다(22). 셋째로, 진핵생물의 단백질은 post-translational modification을 필요로 하고 이 과정은 완전한 생물학적 활성에 필수적으로 요구되는데, gly-

cosylation이나 protein folding 과정에 있어서 포유동물과 사상형균류가 매우 유사하다(21). 네째로, 단백질의 secretion에는 1차 translation산물의 아미노 말단에 signal sequence를 요구하고 이 sequence가 secretory pathway로 이끌어 주는데 이 signal sequence가 고등한 진핵생물의 것과 유사하다(3). 다섯째로, 사상형균류는 발효 및 생산물 분리과정이 잘 연구되어 있다(22).

사상형균류에서 이루어진 외부유전자 발현연구를 살펴보면 다음과 같다. 초기에는 사상형균류의 유전자를 발현시키는 시도가 이루어졌다. *A. nidulans*의 acetamidase 유전자(*amdS*)가 *A. niger*에서 발현되었다(11). 다음으로 *Mucormiehei*의 aspartic protease가 *A. oryzae*의 α -amylase 유전자 promoter하에서 높은 수준으로 발현되었고 생물학적 활성도 가지고 있었다(6). *Trichoderma reesei*의 cellobiohydrolase II의 발현도 *A. awamori*에서 가능하였다(22). 또한 원핵생물의 유전자도 사상형균류에서 발현되었다. *Aspergillus* promoter하에 있는 *E. coli*기원의 *hph* 유전자도 *A. nidulans*와 *A. niger*에서 발현되었다(12, 19). 많은 포유류 유전자도 사상형균류에서 발현되었다. Calf chymosin은 *A. nidulans*와 *A. niger*에서 발현되었고(7), interleukin B(5), interferon(9)의 signal sequence와 같이 고등한 진핵생물의 signal sequence도 인지하여 secretion을 지시하고 인공적으로 합성된 signal sequence(9)도 secretion을 지시한다고 밝혀졌다.

본 연구에서는 *trpC* selection marker system에서 *A. awamori*의 glucoamylase 유전자를 *A. nidulans*에 형질전환시켜 발현을 조사하였다.

재료 및 방법

균주와 plasmids

클로닝에 사용한 숙주는 *E. coli* NM522(8)이며 형질전환의 균주로 사용된 *A. nidulans* B17(*suA1*, *adE20*, *adE20*, *biA1*, SB3, *choA1*, *chaA1*, *uvSH1*, *pabaA1*, *yA2*, *trpC801*)은 B1과 FGSC237(27)을 접합하여 만든 트립토판 영양요구주인데 이 균주는 한동민 박사로부터 받았다. *A. nidulans*의 *trpC* 유전자와 *A. awamori*의 glucoamylase 유전자는 각각 pKBY2 (27)와 pGAR1(14)로부터 얻었고 클로닝 vector로는 pUC119(25)를 사용하였다.

배지와 배양조건

*E. coli*는 LB배지에서 배양했고 ampicilline은 100 µg/ml, tetracycline은 10 µg/ml로 사용했다. *A. nidulans*의 배양을 위해 사용한 배지는 Pontecorvo 등(17)의 방법에 따른 조성에 4 mM tryptophan, 3 µM para-aminobenzoic acid, 636 µM adenine, 3.95 mM sodium thiosulfate, 165 µM choline, 0.1 µM biotin을 첨가한 최소배지이다. 형질전환체를 선별할 때는 tryptophan을 제외하였고, induction 배양을 위해서는 glucose 대신 1% starch를 첨가하였다. 37 °C에서 배양하였으며 액체배지는 200 rpm으로 진탕하였다.

재조합플라스미드의 제조

pKBY2로부터 4.5 kb의 *trpC* 유전자 절편을 pUC 119에 클로닝하여 7.3 kb의 pUCTRP를 만들었다. *A. awamori*의 glucoamylase 유전자의 promoter, signal sequence, 구조유전자를 함유하는 3.4 kb의 DNA 절편을 pGAR1으로부터 분리하여 *EcoRI*으로 partial digest한 pUCTRP에 클로닝하여 10.7 kb의 pKHG2를 제조하였다(Fig. 1).

형질전환과 형질전환체의 선별

*A. nidulans*의 포자 현탁액을 최소배지에 4×10^5 conidia/ml로 접종한 후 37°C에서 18시간 동안 진탕배양하여 균사체를 수확하였다. 수확한 균사체를 0.6 M KCl로 세척하고 0.2 M phosphate buffer(pH 5.8)/0.6 M KCl/0.5% Novozym 234 용액에 침적시킨 후, 100 rpm으로 진탕하면서, 37°C에서 90분 동안 반응시켰다. 생성된 원형질체는 30 µm Nylon-Mesh로 여과하여 균사체로부터 분리하고 0.6 M KCl로 2회 세척하면서 원심분리하여(1000g, 10분) 농축시켰다 (26). 형질전환은 Ballance 등(1)의 방법에 따라 수행하였고, 형질전환체는 *trp⁻* 평판배지에서 선별하였다.

Glucoamylase 역가 측정

1% starch를 포함한 최소배지에 4×10^5 conidia/ml로 접종하여 72시간 키운 배양액으로부터 54% ammonium sulfate로 단백질을 침전시켰다. 원심분리(12000g, 20분, 4°C)한 다음 침전물을 0.2 M acetate buffer(pH 4.8)에 녹였다. 시료에 1% soluble starch/0.2 M acetate buffer(pH 4.8)를 동량 넣어서 반응혼

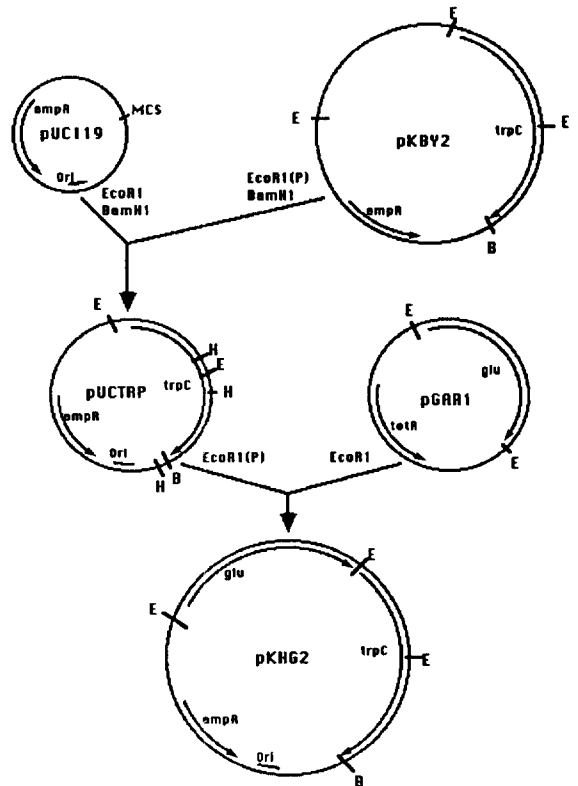


Fig. 1. Construction strategy of the recombinant plasmid pKHG2.

MCS, multiple cloning site; glu, *A. awamori* glucoamylase gene; *trpC*, *A. nidulans trpC* gene; ampR, ampicillin resistant gene; ori, replication origin of *E. coli*; E, *EcoRI*; B, *BamHI*; H, *HindIII*; *EcoRI* (P), partial digestion by *EcoRI*.

합액을 만들었다. 55°C 항온수조에서 30분간 반응시키고 5분간 끊어서 효소를 불활성화시켰다(16). 반응이 끝난 반응혼합액 속에 생성된 glucose양은 Somogyi-Nelson's method(23)를 따라 정량하였다. 단백질은 Lowry method(13)로 정량하였다. 효소 1 unit는 1분당 1 µg의 glucose를 생산할 수 있는 양으로 정하였다.

Aspergillus 핵산 추출

*A. nidulans*의 genomic DNA는 Raeder 등(20)의 방법으로, total RNA는 Osmani 등(15)의 방법으로 추출하였는데, RNA를 추출할 때, RNase-free DNase 대신에 2 M LiCl를 사용하였다. 핵산 추출액에 8 M LiCl를 1/3 부피로 첨가하고 4°C에서 4시간 방치한 다음 원심분리(13000g, 15분)로 RNA를 회수하였다. Nondenaturing gel에서의 glucoamylase의 활성 glucoamylase 역가 측정에 사용한 효소액을 12%

Table 1. *Glucoamylase specific activity of transformants.*

strains	Glucoamylase specific activity (unit/mg protein)
B17	154.25
KHG2-1	264.47
KHG2-2	1170.42
KHG2-3	375.83
KHG2-4	365.34
KHG2-5	323.00

acrylamide nondenaturing gel에서 전기영동한 다음, gel을 1% starch/ 0.2 M acetate buffer(pH 4.8)에 넣고 55°C에서 30분 동안 진탕(100 rpm)시킨 후 I₂-KI용액에 염색하였다.

결과 및 고찰

원형질체 형성

삼투안정제로 1.2 M MgSO₄·7H₂O를 사용할 경우에 1시간 40분까지는 원형질체 수가 서서히 증가하여 1g mycelium당 1.4×10⁷개를 생성하고 2시간 40분 이후에는 감소한다. 0.6 M KCl을 사용한 경우에는 2시간 20분까지 계속 증가하여 1g mycelium당 1.1×10⁸개의 원형질체를 방출하고 그 이후에는 급격히 감소한다. 따라서, 삼투안정제로서 MgSO₄보다 KCl을 사용하였을 때, 더 많은 원형질체를 얻을 수 있었으며, 이 후 실험에는 KCl을 사용하였다.

형질전환과 형질전환체의 선별

형질전환에서 대조군의 실험결과를 보면 trp⁺ 평판배지에는 노란색의 포자가 재생되었고, trp⁻ 평판배지에는 원형질체의 재생이 없었다. 1 µg의 DNA당 5개의 형질전환체를 얻었고 형질전환체의 평판배지는 대조군의 평판배지와는 달리 녹색 포자를 가진 형질전환체가 나타났다.

형질전환체에서의 Glucoamylase 유전자의 발현

형질전환체로부터 분리된 glucoamylase의 역가를 측정한 결과는 Table 1에 명시되어 있다. 5개의 클론의 형질전환체를 조사해본 결과 모든 형질전환체가 B17에 비해 증가된 glucoamylase 역가를 나타냈으며 그 중에서도 KHG2-2는 B17에 비해 7~8배의 역가를 나타냈다. 이 KHG2-2의 genomic DNA로 Southern analysis를 수행한 결과 형질전환에 사용한 plasmid인 pKHG2는 *A. nidulans*의 chromosomal DNA에 integration된 것을 확인할 수 있었다. pKHG2를 HindIII로 절단하면 7.4 kb를 포함하여 수 많은 DNA 절편을 얻을 수 있는데, 이 중 probe로 사용한 glucoamylase 유전자를 포함하고 있어 probe와 hybridization을 할 수 있는 것은 7.4 kb 절편이다. Fig. 2의 Southern analysis를 보면 KHG2-2는 11 kb와 6 kb의 band를 나타내고 있다. 즉, KHG2-2는

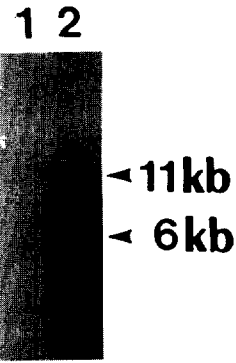


Fig. 2. Southern analysis of chromosomal DNA from an *A. nidulans* B17 and pKHG2 transformants (KHG2-2). lane 1, HindIII-digested chromosomal DNA from *A. nidulans* B17; lane 2, HindIII-digested chromosomal DNA from *A. nidulans* KHG2-2.

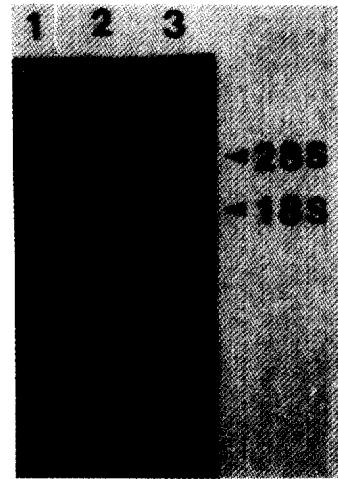


Fig. 3. Northern analysis of *A. nidulans* B17 and *A. nidulans* KHG2-2. lane 1, *A. nidulans* B17 cultured in induction condition (1% starch); lane 2, *A. nidulans* KHG2-2 cultured in noninduction condition (1% glucose); lane 3, *A. nidulans* KHG2-2 cultured in induction condition.

적어도 2 copies의 glucoamylase 유전자를 가지고 있다. KHG2-2에서의 glucoamylase 유전자 발현을 확인하기 위하여 northern analysis를 하였다(Fig. 3). Induction condition(1% starch)에서는 약 2.2 kb의 band가 나타났으나 noninduction condition(1% glucose)에서는 나타나지 않았다. *Aspergillus*(*A. awamori*, *A. niger*)의 glucoamylase는 두 가지 형태(G1,

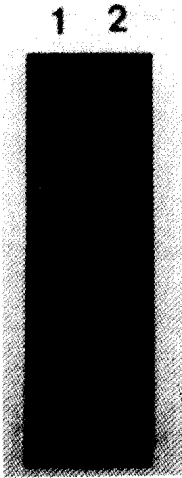


Fig. 4. Activities of *A. awamori* glucoamylase through 12% polyacrylamide gel electrophoresis under nondenaturing conditions. lane 1, *A. nidulans* KHG2-2; lane 2, *A. nidulans* B17.

G2)로 나타난다(4, 14). 이 두 가지 형태에 대한 설명으로 서로 다른 splicing에 의한 것이라는 보고(3)와 proteolytic processing에 의한 것이라는 보고(2, 24, 10)가 있다. Fig. 3(lane 3)에서 KHG2-2가 하나의 mRNA band를 나타내는 것은 후자의 보고를 지지한다. Noninduction condition에서 발현이 되지 않는 것은 *A. awamori*의 glucoamylase의 특성(14)과 일치한다. *A. niger*의 glucoamylase가 *gpdA* promoter와 *trpC* terminator system에서 발현되었을 때 mRNA의 degradation이 있었으나(18) 본 연구에서 *A. awamori*의 glucoamylase mRNA는 degradation을 보이지 않았다(Fig. 3 lane 3). KHG2-2의 배양액으로부터 단백질을 추출하여 nondenaturing polyacrylamide gel 전기영동을 한 결과 induction condition에서 *A. nidulans* B17에서는 보이지 않는 2개의 band가 나타났다(Fig. 4). 이것은 glucoamylase가 두 가지 형태로 존재한다는 보고(14)와 부합되며, proteolytic processing이 *A. nidulans*에서도 일어난다는 것을 보여준다.

결론적으로, 선별한 형질전환체 중에서 가장 큰 glucoamylase 역가를 나타낸 *A. nidulans* KHG2-2에는 chromosomal DNA에 integration된 vector DNA가 적어도 2 copies로 존재하며, glucoamylase 유전자는 정상적으로 발현되었다. Glucoamylase 역가는 *A. nidulans* B17보다 7~8배 높은 수치를 나타냈다.

감사의 말

본 논문은 주식회사 럭키의 학술연구 지원과 서울

대학교 세포분화연구센터의 지원에 의해 수행되었음.

참 고 문 헌

1. Ballance, D.J. and G. Turner, 1985. Development of a high frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene* **36**, 321-331.
2. Bartoszewicz, K., 1986. Glucoamylase of *Aspergillus niger*. *Acta Biochim. Pol.* **33**, 17-29.
3. Boel, E., I. Hjort, B. Svensson, F. Norris, K.E. Norris, and N.P. Fiil, 1984. Glucoamylase G1 and G2 from *Aspergillus niger* are synthesized from two different but closely related mRNAs. *EMBO J.* **3**, 1097-1102.
4. Boel, E., M.T. Hansen, I. Hjort, I. Hoegh, and N.P. Fiil, 1984. Two different types of intervening sequences in the glucoamylase gene from *Aspergillus niger*. *EMBO J.* **3**, 1581-1585.
5. Carrets, D., W. Janssen, P. Degrave, C.A.M.J.J. van den Hondel, J.R. Kingdon, W. Fiers, and R. Contreras, 1990. Heterologous gene expression by filamentous fungi: secretion of human interleukin-6 by *Aspergillus nidulans*. *Gene* **94**, 147-154.
6. Christensen, T., H. Woeldike, E. Boel, S.B. Mortensen, K. Hjortshøj, L. Thim, and M.T. Hansen, 1988. High level expression of recombinant genes in *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology* **6**, 1419-1422.
7. Cullen, D., G.L. Gray, L.J. Wilson, K.J. Hayenga, M.H. Lamsa, M.W. Rey, S. Norton, and R.M. Berka, 1987. Controlled expression and secretion of bovine chymosin in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnology* **5**, 369-376.
8. Gough, J.A. and N.E. Murray, 1980. Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J. Mol. Biol.* **166**, 1-19.
9. Gwynne, D.J., F.P. Buxton, S.A. Williams, S. Garven, and R.W. Davies, 1987. Genetically engineered secretion of active human interferon and bacterial endoglucanase from *Aspergillus nidulans*. *Biotechnology* **5**, 713-719.
10. Hayashida, S., K. Nakahara, K. Kuroda, T. Kamachi, K. Ohta, S. Iwanaga, T. Miyata, and Y. Sakaki, 1988. Evidence for post-translational generation of multiple forms of *Aspergillus awamori* var. *kawachi* glucoamylase. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 273-275.
11. Kelly, J.M. and J. Hynes, 1985. Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* **4**, 475-479.
12. Lockington, R.A., H.M. Sealy-Lewis, C. Sczacchio, and R.W. Davies, 1985. Cloning and characterization of the ethanol utilization regulon in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **33**, 137-149.
13. Lowry, O.H., N.J. Rosenberg, A.L. Farr, and R.L. Landall, 1951. Protein measurement with phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-267.
14. Nunberg, J., J. Meade, G. Cole, F.C. Lawyer, P.

- McCabe, V. Schweickart, R. Tal, V.P. Wittman, J.E. Flatgaard, and M.A. Innis, 1984. Molecular cloning and characterization of the glucoamylase gene of *Aspergillus awamori*. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 2306-2315.
15. Osmani, S.A., G.S. May, and N.R. Morris, 1987. Regulation of mRNA levels of *nimA*, a gene required for the G2-M transition in *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Biol.* **104**, 1495-1504.
16. Park, C.S., Y.J. Park, Y.H. Lee, H.S. Kang, and U.H. Pek, 1990. Expression of recombinant plasmids harboring glucoamylase gene STA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Microbiol.* **28**, 181-187.
17. Pontecorvo, G., J.A. Roper, L.J. Hemmons, K.D. MacDonald, and A.W.J. Bufton, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* **5**, 141-238.
18. Punt, P.J., N.D. Zegers, M. Busscher, P.H. Pouwels, and C.A.M.J.J. van den Hondel, 1991. Intracellular and extracellular production of proteins in *Aspergillus* under the control of expression signals of the highly expressed *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene. *J. Biotechnol.* **17**, 19-34.
19. Punt, P.J., R.D. Oliver, M.A. Dingemance, P.H. Pouwel, and C.A.M.J.J. van den Hondel, 1987. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *E. coli*. *Gene* **56**, 117-124.
20. Reader, U. and P. Broda, 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in appl. microbiol.* **1**, 17-20.
21. Salovuori, T., M. Makarow, H. Rauvala, J. Knowles, and L. Kaaraïen, 1987. Low molecular weight high-mannose type glycans in a secretory protein of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnology* **5**, 152-156.
22. Saunders, G., T.M. Picknett, M.F. Tuite, and M. Ward, 1989. Heterologous gene expression in filamentous fungi. *Tibtech.* **7**, 283-287.
23. Somogyi, M., 1951. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **152**, 19-23.
24. Svensson, B., K. Larsen, and A. Gunnarsson, 1986. Characterization of glucoamylase G2 from *Aspergillus niger*. *Eur. Biochem.* **154**, 497-502.
25. Vieira, J. and J. Messing, 1987. Production of single stranded plasmid DNA, p. 3-11. In R. Wu, and L. Grossman (ed.), *Methods in Enzymology* **153**. Academic Press, New York.
26. Yang, Y.K., Y. Park, Y.H. Rhee, and P.J. Maeng, 1989. Construction of intraspecific hybrids by nuclear transfer in *Aspergillus nidulans*. *Kor. J. Mycol.* **17**, 154-160.
27. Yelton, M.M., W.E. Timberlake, and C.A.M.J.J. van den Hondel, 1985. A cosmid for selecting genes by complementation in *Aspergillus nidulans*: selection of the developmentally regulated *yA* locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 834-838.

(Received February 11, 1993)

(Accepted February 22, 1993)

ABSTRACT: Expression of *Aspergillus awamori* Glucoamylase Gene in *Aspergillus nidulans*

Kim, Sukjoon, Junhi Yoo, and Guhung Jung (Department of Biology Education, Science Research Center for Cell Differentiation, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

The *A. nidulans* expression vector which contained *trpC* marker gene from *A. nidulans* was constructed to produce glucoamylase. The recombinant plasmid was introduced into auxotrophic mutant *A. nidulans* B17. Southern blot analysis of the genomic DNA from transformant showed that pKHG2 DNA had integrated into the *A. nidulans* chromosomes. Northern analysis of the total RNA from transformant showed that mRNA of glucoamylase gene was synthesized in induction condition. Specific activity of glucoamylase was increased in transformants. Glucoamylase was shown to be active in non-denaturing acrylamide gel.