

사상성 진균 *Aspergillus nidulans*에서 아쿠아포린 유전자 *aqpA*의 분리 및 분석

오동순[†] · 육함연[†] · 한갑훈*

우석대학교 보건복지대학 제약공학과

Identification and Characterization of the Aquaporin Gene *aqpA* in a Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*

Dong-Soon Oh[†], Hanyan Lu[†], and Kap-Hoon Han*

Department of Pharmaceutical Engineering, Woosuk University, Wanju 565-701, Republic of Korea

(Received December 6, 2011 / Accepted December 22, 2011)

Aquaporin is a water channel protein, which is classified as Major Intrinsic Protein (MIP), found in almost all organisms from bacteria to human. To date, more than 200 members of this family were identified. There are two major categories of MIP channels, orthodox aquaporins and aquaglyceroporins, which facilitate the diffusion across biological membranes of water or glycerol and other uncharged compounds, respectively. The full genome sequencing of various fungal species revealed 3 to 5 aquaporins in their genome. Although some functions of aquaporins found in yeast were characterized, however, no functional characteristics were studied so far in filamentous fungi, including *Aspergillus sp.* In this study, one orthodox aquaporin homolog gene, *aqpA*, and four aquaglyceroporin homologs, *aqpB-E*, in a model filamentous fungus *Aspergillus nidulans* were identified and the function of the *aqpA* gene was characterized. Knock-out of the *aqpA* gene didn't show any obvious phenotypic change under the osmotic stress, indicating that the function of the gene does not involved in the osmotic stress response or the function could be redundant. However, the mutant showed antifungal susceptibility resistance phenotype, suggesting that the function of the *aqpA* gene could be involved in sensing the antifungal substances rather than the osmotic stress response.

Keywords: *Aspergillus nidulans*, antifungal resistance, aquaglyceroporin, aquaporin, osmotic stress

아쿠아포린(aquaporin)은 MIP (Major Intrinsic Protein) 패밀리에 속하는 물 수송 채널(water transport channel) 단백질로 세포막에 존재하는 것으로 널리 알려져 있다(2, 14). 아쿠아포린은 인간을 비롯한 포유동물에서 다양한 isoform의 형태로 발견되며 신장, 뇌를 비롯한 다양한 기관계에서 물의 항상성(water homeostasis)유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 식물에서는 외부환경의 물의 공급 정도에 따라 물의 침투와 수송을 매개하는 역할을 한다(2, 14).

흥미롭게도 작은 세포의 크기와 큰 표면적 대 부피의 비율로 때문에 물수송 관련 단백질이 필요 없을 것으로 보이는 미생물에서도 아쿠아포린 단백질이 진화적으로 잘 보존되어 있다는 것이 발견되었다. 특히 유전체분석이 완료된 진핵 미생

물들의 경우 약 67%가 아쿠아포린 유전자를 가지고 있다는 것이 밝혀졌다(16, 21). 이러한 사실은 아쿠아포린이 미생물에서 물수송의 역할 뿐 아니라 다른 중요한 세포생물학적 기능을 할 수 있음을 암시한다. 그러나 최근까지 미생물에서의 아쿠아포린은 *Escherichia coli AqpZ* (6)와 *Saccharomyces cerevisiae AQY1*과 *AQY2* (5, 15)의 기능이 일부 밝혀졌을 뿐 대부분의 미생물에서는 그 기능과 역할이 정확히 규명되지 않았다.

아쿠아포린은 크게 정통 아쿠아포린(orthodox aquaporin)과 아쿠아글리세로포린(aquaglyceroporin)으로 구별되며, 효모와 곰팡이에서는 종에 따라 최고 5가지 종류의 다른 아쿠아포린이 발견되었다(16). 정통 아쿠아포린의 경우는 주로 세포 안으로 물의 유입 및 수송에 관여하여 삼투압조절에 중요한 역할을 하며, 아쿠아글리세로포린의 경우는 glycerol, polyol, urea를 비롯한 작은 비극성분자의 수송에 관여하여 영양분의 섭취와 삼

[†] These authors contributed equally to this work.

* For correspondence. E-mail: khhan@woosuk.ac.kr; Tel.: +82-63-290-1427; Fax: +82-63-290-1436

투압 간접조절의 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(16).

*S. cerevisiae*에서는 아쿠아포린인 삼투압의 조절에 관여함이 밝혀졌으나(5, 7, 15), 아쿠아포린이 HOG 경로와 같은 다른 삼투압 조절 신호전달체계(12)와 어떠한 상호작용을 통해 삼투압조절에 관여하는지의 여부에 대해서는 알려져 있지 않다. *S. cerevisiae* 아쿠아포린 단백질인 Aqy1이 포자형성초기에 선택적으로 발현되어 포자 내의 물 배출에 관여함으로써, 유성 혹은 무성포자의 성숙과정에 관여함이 밝혀졌다(18). 또한 급성 냉동조건에서 *AQY1* 혹은 *AQY2* 결실 돌연변이균주들은 야생형 균주보다 생존 능력이 약한 반면에, *AQY1* 혹은 *AQY2* 유전자를 과다발현 시키면 야생형 균주보다 생존 능력이 더 강한 것으로 알려져 있다(19, 20).

모델 사상성 진균(model filamentous fungus)이며 자용동체 자낭균(homothallic ascomycetes)인 *Aspergillus nidulans* (teleomorph=*Emericella nidulans*)는 무성분화와 유성분화의 생활사를 가지며 비교적 빠른 증식과 간단한 합성 배지에서 잘 자라고 다루기 쉬운 이점을 가지고 있어 생리학, 유전학적으로 많은 연구가 수행되어 왔다(13, 17). 또한, *A. nidulans*는 단세포인 효모(yeast)와는 달리 다세포생물(multicellular organism)이므로 세포간의 상호작용(cell to cell interaction), 유성 및 무성분화 과정(sexual and asexual differentiation processes), 그리고 그것들의 유전적인 조절 관계들이 다양하게 연구되어 왔다(1, 8). 뿐만 아니라 최근의 연구결과에 의하면 *A. nidulans*는 세 개의 carbonic anhydrase를 가지고 있어 이를 통하여 CO₂를 감지하는 것으로 보고되었으며(9), CO₂가 중탄산염(bicarbonate)이 되기 위해서는 물이 필요하므로 물 수송 단백질인 아쿠아포린과 상호작용할 가능성이 제기되었다(3). 따라서, 본 연구에서는 *A. nidulans*의 유전체에서 발견된 다섯 개의 아쿠아포린 유전자를 분리하고 이들 중에서 정통 아쿠아포린과 상동성이 높은 *aqpA* 유전자의 기능에 대하여 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지, 배양조건

*A. nidulans*의 야생형 균주로 Fungal Genetics Stock Center (FGSC)에서 FGSC A4를 분양 받아 사용하였으며 유전자 결손 실험용 형질전환 균주로는 *A. nidulans* NKU3 (*pyrG89*; *argB2*; *pyroA4*; Δ *nkuA::argB*⁺; *riboB2*)를 사용하였

다(9). 또한 형질전환 후 형질 분석시 대조군으로는 NKU3에 *A. fumigatus pyrG*를 형질전환시켜 얻어진 NKU3.1 (*pyrG89*, *AfpyrG*⁺; *argB2*; *pyroA4*; Δ *nkuA::argB*⁺; *riboB2*) 균주를 사용하였다. *A. nidulans*는 37°C에서 배양하였으며, 목적에 따라 완전배지인 CM 배지와 glucose를 1% 첨가한 최소배지 MM 배지를 사용하였다(10). MM 배지일 경우 균주의 영양요구성에 따라 pyridoxine HCl (0.5 µg/ml), *p*-aminobenzoate (1 µg/ml), uracil, uridine (1.2 g/L), potassium chloride (44.7 g/L) 등을 넣어 사용하였고 고체배지일 경우 2%가 되도록 agar powder를 첨가하여 사용하였다. *A. nidulans*의 형질전환은 Han 등(10)의 방법을 사용하였다.

제한효소 및 시약

제한효소는 빔스바이오(Korea), DCC-BIONET (Korea), NEB (USA) 등에서 구입하였고, 배지 조성물은 Difco (USA), Sigma (USA), Junsei (Japan) 등에서, 기타 시약은 Sigma (USA) 제품을 구입하여 사용하였다. 원형질체를 만들기 위해 Glucanex[®]200G (Novozymes[®], USA)를 사용하였다. Southern 혼성화 실험에는 QIABRANE-N⁺ (QIAGEN, Germany), BIOMAX[™] MS film (Kodac, USA)의 제품을 사용하였다. 탐침(probe) 제조를 위해 Random primer labeling kit (TaKaRa, Japan)을 사용하였다. Taq polymerase는 EX Taq (TaKaRa), i-Startaq[™] (Intron, Korea)을 사용하였고, agarose gel은 Agarose, LE, Analytical Grade (Promega, USA)를 사용하였으며, DNA 정제는 PCRquick-spin[™] (Intron), MEGA-spin[™] (Intron)을 사용하였다. E-test strip는 abbiodisk (Sweden)를 구입하여 사용하였다.

DNA 추출 및 조작

A. nidulans 형질전환체로부터 중합효소 연쇄반응(PCR)이나 Southern 분석을 수행하기 위한 유전체 DNA 추출은 말린 균사체 가루 20-60 mg을 미량튜브에 담아 400 µl의 lysis buffer [50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 50 mM EDTA (pH 8.0), 3% SDS, 1% 2-mercaptoethanol]를 첨가하여 잘 혼합하고, 이 튜브를 65°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 동량의 phenol/chloroform을 넣어 추출하고 에탄올로 침전시켰다.

유전자 제거(knock-out deletion)를 위해 Double-Joint PCR (22)을 수행하였다. 먼저 *aqpA* 유전자를 제거하기 위해 *aqpA* 5'For, *aqpA* 5'Rev 프라이머(Table 1)로 5'-flanking region을,

Table 1. Primers used in this study

Name	Sequence (5'→3')
<i>pyrG</i> Forward	GCCTCAAACAATGCTCTTCACC
<i>pyrG</i> Reverse	ATTCTGTCTGAGAGGAGGCACT
<i>aqpA</i> 5'For	GTGAGCATGTTGTCGTAGAAGA
<i>aqpA</i> 5'Rev (<i>pyrG</i> tail)	GGTGAAGAGCATTGTTTGAGGCGTGAGCGTTGAGACCGTGGATA
<i>aqpA</i> 3'For (<i>pyrG</i> tail)	AGTGCCTCTCTCAGACAGAATCGCTTGTGAATGCTTGCTGTGG
<i>aqpA</i> 3'Rev	GCCCGACGGTGAAGATGAGGAT
<i>aqpA</i> 5'nest	TGGCCTTGATGAGCTGGATTTG
<i>aqpA</i> 3'nest	CGAAGAGCGCAGCAATAGC

aqpA 3'For, *aqpA* 3'Rev 프라이머(Table 1)로 3'-flanking region을 증폭할 수 있도록 PCR을 수행하였고 *A. fumigatus* *pyrG* 유전자에서 *pyrG* Forward, *pyrG* Reverse 프라이머 (Table 1)로 PCR을 수행하여 첫 번째 PCR 산물을 얻어냈다. 두 번째 PCR은 첫 번째에서 얻어진 3종류의 절편을 이용하여 융합하는 PCR을 수행하였고, 마지막 단계로 annealing한 PCR 혼합물을 주형으로 하고 nested 프라이머(Table 1)로 PCR하여 *aqpA* 유전자 제거를 위한 PCR 최종산물을 제조한 다음, 이를 이용하여 host 균주인 NKU3을 형질전환하였다.

Southern 혼성화

A. nidulans 야생형과 *aqpA* 결손 돌연변이의 유전체 DNA를 추출하여 제한효소 *Pst*I을 처리한 후 0.7% TAE 아가로스 겔에서 DNA를 전기영동하여 0.4 N NaOH를 이용한 downward capillary 이동 방법을 통해 QIABRANE-N⁺ (QIAGEN)로 이동시켰다. DNA를 이동시킨 후, cross linking을 위하여 UV를 처리하였다. 탐침의 표지, 혼성화, 세척 그리고 신호의 감지는 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche, Germany) 방법에 따라 수행하였다. 이렇게 제작된 membrane을 KODAK BioMax MS film (Kodak)에 2시간 실온에서 노출시킨 후 현상하였다.

표현형 관찰

최소 배지에 *A. nidulans* 야생형과 *aqpA* 결손 형질전환체

를 각각 점 접종(point inoculation)하고 무성 또는 유성분화를 유도하지 않은 조건, 24시간 동안 밀봉하여 배양하고 해제시킨 유성분화 유도조건 등에서 4일간 37°C에서 배양하여 비교 관찰하였다. 또한 *A. nidulans* 야생형과 *aqpA* 결손 형질전환체의 무성포자를 0.01% Tween 80으로 수확하여 glucose 1%의 액상 최소배지에 1.0×10⁶ cells/ml이 되게 접종하고 24시간 37°C에서 진탕배양하여 비교·관찰하였다.

삼투 스트레스 반응 측정을 위해서는 CM, MM에 각각 0.5 M, 1.0 M, 1.5 M의 KCl, 0.5 M, 1.0 M, 1.5 M의 NaCl, 또는 1 M, 2 M의 sorbitol를 넣어 만든 고체배지에, 야생형과 돌연변이 균주를 점 접종(point inoculation)하고 37°C에서 2, 3일간 배양한 후 관찰하였다.

Epsilonmeter 테스트(E-test)는 고체 CM, MM 배지에 야생형과 돌연변이 균주를 뺄뺄히 접종한 후에 E-test strip을 배지 중앙에 숫자가 선명하게 보이는 부분을 앞으로 하여 놓고 37°C에서 24시간 동안 배양한 후에 관찰하였다. 항진균제인 fluconazole에 대한 MIC를 조사할 수 있는 E-test strip을 사용하였다.

산화스트레스 반응 테스트(Oxidative Stress Response Test)를 위해서는 CM, MM 배지에 각각 3, 4, 5 mM의 H₂O₂를 넣어 만들고, 야생형과 돌연변이균주를 각각 포자수가 10²-10⁶/ml이 되게 접종하여 37°C에서 24시간, 48시간 배양한 후에 관찰하였다.

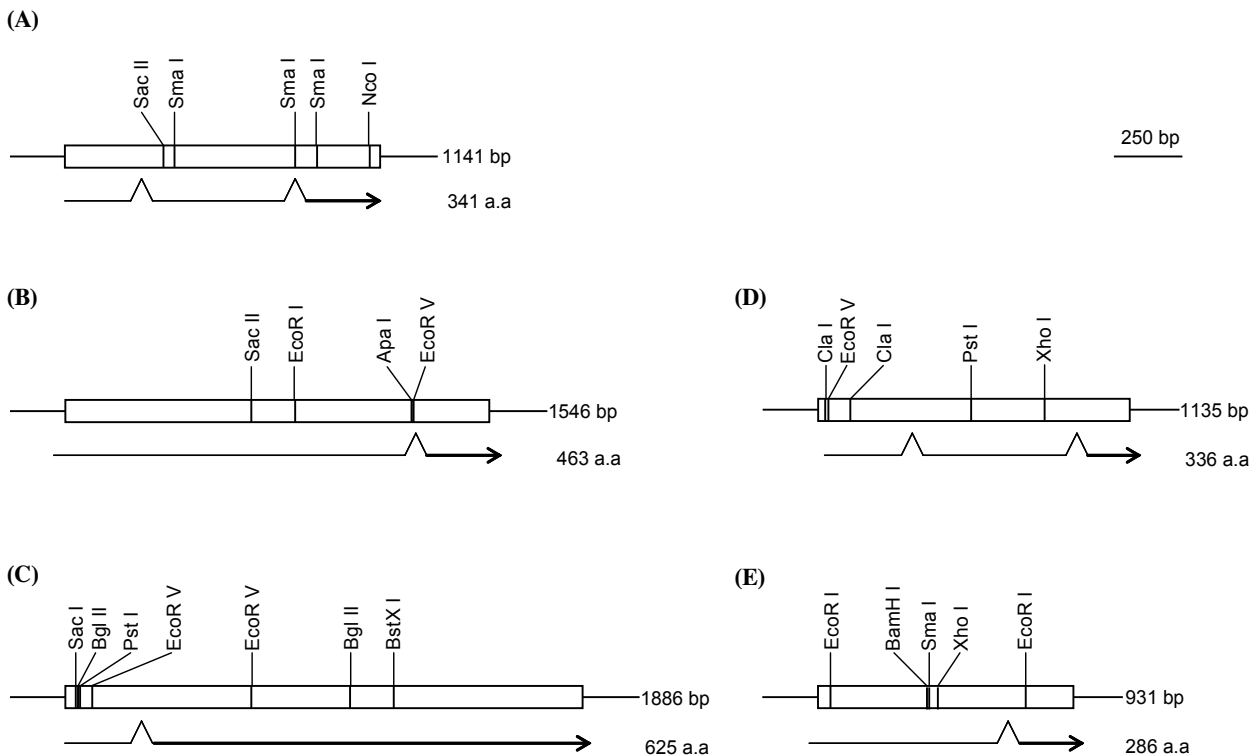


Fig. 1. The schematic diagram of the *aqpA-E* genes structures. Closed boxes represented ORF and arrows showed mRNA structure with intron(s). (A), *aqpA*; (B), *aqpB*; (C), *aqpC*; (D), *aqpD*; and (E), *aqpE*.

결과 및 고찰

A. nidulans에서 아쿠아포린 유전자의 분리

A. nidulans의 유전체 데이터베이스(http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group/FeatureSearch.html)를 통하여 효모의 아쿠아포린 유전자 AQY1과 AQY2의 염기서열과 아미노산 서열을 활용하여 BLAST 분석을 하였고 A. nidulans 유전체 데이터베이스의 annotation 내용을 비교유전체학적으로 분석한 결과 A. nidulans의 유전체에는 정통 아쿠아포린 유전자 한 개(ANID_10902.1)와 4개의 아쿠아글리세로포린 유전자(ANID_02822.1, ANID_07618.1, ANID_03915.1, ANID_00830.1)가 존재하는 것을 발견하였다. 본 연구에서는

정통 아쿠아포린 유전자 ANID_10902.1은 aqpA라고 명명하였고 아쿠아글리세로포린 유전자 ANID_02822.1, ANID_07618.1, ANID_03915.1, ANID_00830.1은 각각 aqpB, aqpC, aqpD, aqpE라고 명명하였다.

A. nidulans의 유전체 데이터베이스를 이용하여 분석한 결과, aqpA은 염색체 4번에 위치하고 있으며, ORF는 1141개의 뉴클리오티드로, 인트론을 2개 가지고 있으며 341개의 아미노산을 암호화하고 있는 것으로 확인되었다(Fig. 1A). 그 외에 aqpB, aqpC, aqpD, aqpE 유전자들은 각각 염색체 6번, 4번, 2번, 그리고 8번에 위치하고 있으며, 이 유전자들의 ORF들은 각각 463개, 625개, 336개, 그리고 286개의 아미노산을 암호화하고 있는 것으로 확인되었다(Fig. 1B-E).

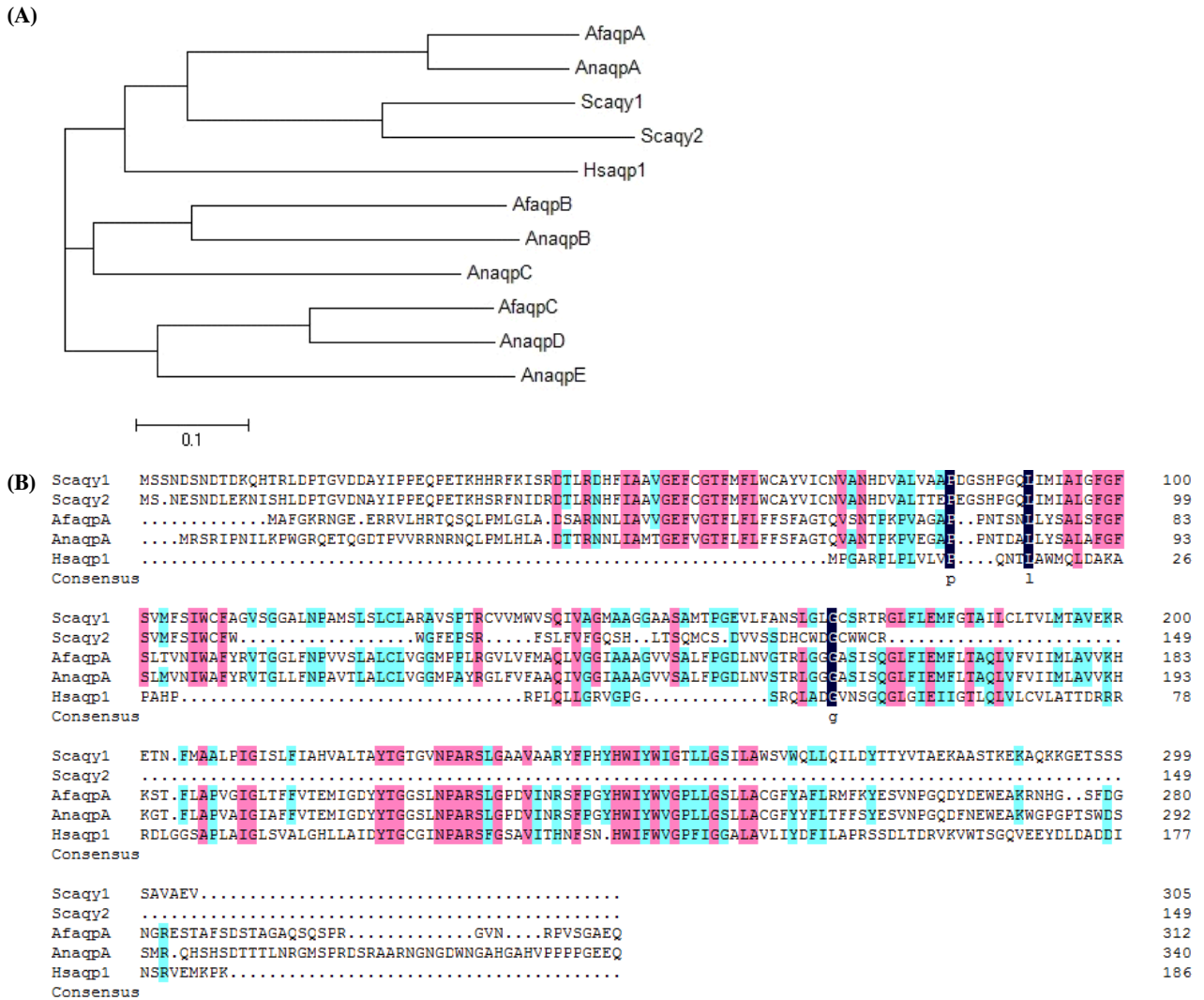


Fig 2. Phylogenetic tree of aquaporins found in A. nidulans (A) and multiple alignment of the aqpA gene (B) with other organisms were analyzed by using Mega V5 ClustalV program. Scaqy1 and Scaqy2 represent S. cerevisiae Aqy1 (GI: 45270022) and Aqy2 (GI: 259147940), respectively. AnaqpA-E and AfaqpA-C represent A. nidulans AqpA-E and A. fumigates AqpA-C, respectively. Hsaqp1 represents H. sapiens Aqp1 (GI: 297307116). The black filled boxes indicate conserved amino acid and the other closed boxes indicate identical or similar amino acids residues found in the aquaporin proteins.

*A. nidulans*에서 발견된 아쿠아포린 단백질들과 다른 진균이나 진핵생물에서 발견되는 아쿠아포린 단백질들과의 연관관계를 알아보려고 *S. cerevisiae*의 Aqy1, Aqy2, *Homo sapiens*의 Aqp1, 그리고 *A. fumigatus*의 유전체 정보에서 확인한 세계의 아쿠아포린 단백질(각각 AfaqpA, AfaqpB, AfaqpC로 명명)들과 상동성(homology)과 연관성을 조사하였다(Fig. 2). Phylogenetic tree 분석결과 *A. nidulans*의 정통 아쿠아포린 AqpA 단백질이 아쿠아글리세로포린 단백질들에 비하여 효모의 Aqy1, Aqy2, 그리고 인간의 Aqp1과 더 높은 상동성을 보여주었으며 아쿠아글리세로포린 단백질들은 *A. fumigatus* 유전체 상에 발견되는 아쿠아글리세로포린 단백질들과 같은 그룹에 속해 있음을 볼 수 있었다(Fig. 2A). 또한, multiple alignment 분석 결과 *A. nidulans*의 정통아쿠아포린 AqpA와 *S.cerevisiae*의 Aqy1, Aqy2, 그리고 *H. sapiens*의 Aqp1는 대체적으로 단백질 수준에서 물 수송과 관련된 도메인이 잘 보존된 것을 알 수 있었다(Fig. 2B).

***aqpA* 유전자의 결손돌연변이의 분리**

*A. nidulans*에서 분리된 아쿠아포린 유전자들 중 효모 및 인간의 아쿠아포린 단백질과 상동성이 높은 정통아쿠아포린 유전자인 *aqpA*의 기능을 알아보기 위해 *aqpA* 유전자를 이중교차(double crossing-over)를 통한 상동성 재조합(homologous recombination)에 의해 인위적으로 제거시키는 방법을 이용하여 결실 돌연변이를 제조하였다(Fig. 3A).

먼저, *aqpA* 유전자를 제거하기 위해 *A. nidulans*의 genomic DNA를 주형으로 하여 Double-Joint PCR을 통하여 얻어진 PCR 최종산물을 이용하여 형질전환용 *pyrG*⁻ 숙주인 NKU3을 형질전환 하였다. 얻어진 *pyrG*⁺ 형질전환체를 분리하여 PCR 및 Southern 혼성화를 통하여 아쿠아포린 유전자가 결실되었음을 확인하였다(Fig. 3A). 야생형 *aqpA* 유전자 5' 상류(upstream)에 *PstI* 절단부위가 두 군데 존재하고, 선택마커로 사용하는 *pyrG* 유전자 내부에 하나의 *PstI* 절단부위가 존재하므로 5' flanking 부위를 탐침으로 사용하여 Southern 분석을 하면 야생형은 2,504 bp의 DNA절편이 관찰되지만 *aqpA* ORF가 *pyrG*로 치환된 *aqpA* 결실 돌연변이(knock-out mutant)는 1,820 bp로 나타나는 것을 통하여 검증하였다(Fig. 3A).

***aqpA* 결손돌연변이의 삼투 및 산화스트레스 하에서의 형질 분석**

얻어진 *aqpA* 결손돌연변이 $\Delta aqpA$ 의 표현형질을 관찰하기 위해 최소배지와 완전배지 조건에서 점 접종을 하여 야생형 균주인 A4 및 NKU3.1과 비교 관찰하였다(Fig. 3B). 아쿠아포린 유전자가 *A. nidulans*의 군사생장에 어떤 영향을 주는지 알아보기 위해서 MM, CM배지에서 군사 생장을 관찰하였다. 일반 성장조건에서는 야생형과 $\Delta aqpA$ 균주의 클로니 크기와 모양, 그리고 성장률이 모두 비슷하였다. 이는 아쿠아포린 유전자의 기능은 일반 성장시에는 생장에 큰 역할을 하지 않음을 시사하고 있다.

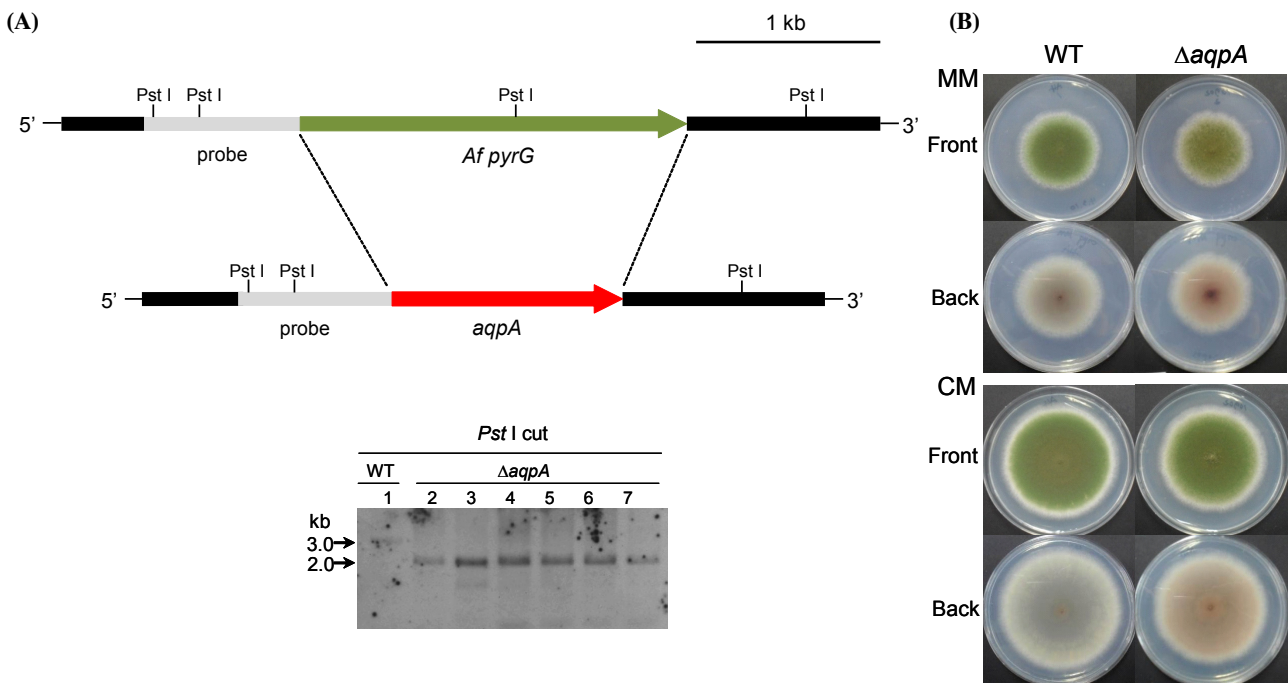


Fig. 3. Construction and phenotype of *aqpA* deletion mutant. (A) Schematic diagram of construction of the *aqpA* deletion mutant. The *aqpA* gene was replaced by the selective marker, *A. fumigates pyrG* gene, as the result of double homologous recombination. The *aqpA* gene deletion was confirmed by Southern blot analysis. 5'-flanking region of the *aqpA* gene was used as a probe. (B) Point inoculated WT (FGSC A4) and *aqpA* mutant, $\Delta aqpA$, in normal standard condition on solid MM and CM were shown.

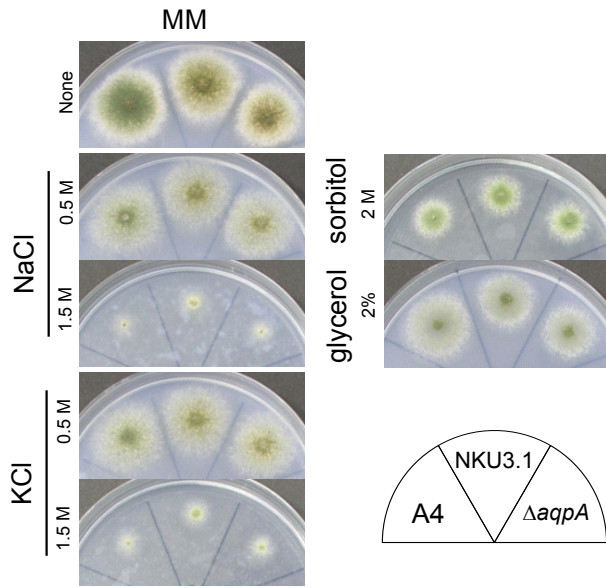


Fig. 4. Phenotype of *aqpA* deletion mutant under various salt and osmotic stress conditions. The Δaqp mutant's colony size and morphology was as same as WT and its isogenic control (NKU3.1). Left-side index indicates name and concentration of osmoticums applied in the medium and A4, nku3.1 and $\Delta aqpA$ indicate wild type strain, isogenic *aqpA*⁺ strain, and *aqpA* deletion strain, respectively.

아쿠아포린은 물을 수송하는 물 채널로 알려져 있기 때문에 높은 농도의 염분이 포함된 삼투 스트레스 상태에서는 일반적인 조건에서 성장할 때 보다 그 기능이 더 필요로 할 것으로 추정된다. 또한, *S. cerevisiae*의 *AQY1*, *AQY2* 등은 삼투압 조절에 관여하는 것으로 알려져 있기 때문에 *A. nidulans*에서도 *aqpA* 유전자가 삼투 스트레스에 대해 영향을 받는지 알아보았다(Fig. 4). 그러나 예상과 달리 각종 염류를 첨가한 삼투 스트레스 혹은 염 스트레스 환경에서 $\Delta aqpA$ 돌연변이 균주는 야생형과 뚜렷한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 4). 이러한 결과는 *A. nidulans*에서는 HOG 경로가 삼투 스트레스와 관련된 주된 신호전달 기작을 수행하고 있으며(11), *aqpA* 유전자가 결핍되었다 하더라도 세포 내에 존재하는 다른 아쿠아포린 유전자들로 인하여 그 기능이 보완되었을 수도 있음을 시사하고 있다.

또한, 과산화수소(H₂O₂)는 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)의 일종으로 세포내 산화제로 작용하여 다양한 세포내 독성과 부작용을 유발하며, H₂O₂는 그 화합물의 크기와 전기화학적 성질에 있어서 물과 같이 아쿠아포린에 의해 전달될 수 있는 성질을 가지고 있음이 보고되고 있다(4). 따라서 *A. nidulans*에서도 아쿠아포린이 H₂O₂의 감지나 전달에 관련이 있는지 알아보기 위하여 과산화수소를 각각 0, 3, 5 mM의 농도로 첨가하여 산화적 스트레스에 대한 반응에서의 감수성을 조사하였다. 그 결과 최소배지에서 5 mM의 H₂O₂를 첨가하면 야생형은 자라지 못하나 $\Delta aqpA$ 균주는 약간의 성장을

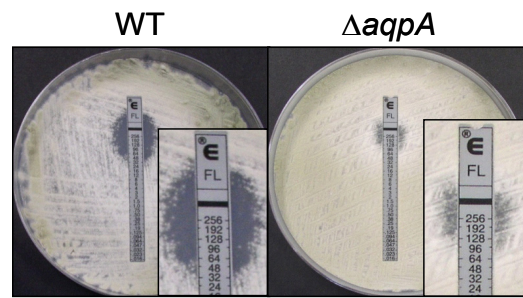


Fig. 5. Susceptibility test of the *aqpA* deletion mutant to the antifungal agent fluconazole by E-test. The E-test strips were applied on the streaked plates and incubated 24 h at 37°C.

관찰할 수 있었다(자료 미제시). 그러나 이러한 산화적 스트레스에 대한 저항성이 뚜렷이 보이지는 않았기 때문에 보다 정확한 조건에서의 추가 실험이 요구되리라 여겨진다.

aqpA 결손돌연변이의 항진균제 감수성 분석

아쿠아포린은 MIP이므로 물이나 분자량이 작은 물질들 뿐만 아니라 외부에서 유입되는 다양한 항생물질에 대하여 반응할 수 있을 가능성이 있다. 이와 같은 가능성을 알아보기로 결손돌연변이 $\Delta aqpA$ 균주를 이용하여 항진균제에 대한 내성을 테스트하였다. 상업적으로 판매되고 있는 E-test 키트를 이용하여 fluconazole에 대한 감수성을 측정한 결과 흥미롭게도 야생형에 비하여 $\Delta aqpA$ 균주에서 항진균제에 대한 저항성이 증가한 것을 볼 수 있었는데, 야생형의 MIC가 약 32 µg/ml 정도인 것에 비해 *aqpA* 돌연변이 균주는 128 µg/ml의 MIC를 나타내었다(Fig. 5). 이는 아쿠아포린이 단순히 물 채널로서의 역할뿐만 아니라 일부 항진균제를 감지하는 기능을 동시에 수행할 수 있다는 점을 시사하고 있다. 그리고 이와 같은 현상은 아직까지 다른 진균의 아쿠아포린에서는 알려지지 않은 기능으로 보인다. 따라서, 본 연구의 결과를 토대로 하여 추후 항진균제 감수성을 비롯한 산화적 스트레스에 관련한 아쿠아포린의 역할 및 그 기능에 대한 보다 심도 있는 연구가 추진되어야 할 것으로 여겨진다.

적요

아쿠아포린(aquaporin)은 MIP (Major Intrinsic Protein) 패밀리에 속하는 물 수송 채널(water transport channel) 단백질로 단세포 생물인 박테리아부터 다세포 고등생물인 인간에 이르기까지 다양한 기관계에서 잘 보존되어 있다. 아쿠아포린은 정통아쿠아포린(orthodox aquaporin)과 아쿠아글리세로포린(aquaglyceroporin)으로 구분되는데, 정통아쿠아포린은 주로 세포내의 물 유입 및 수송에 관여하며 아쿠아글리세로포린은 glycerol, polyol, urea를 비롯한 작은 비극성 분자의 수송에 관여하는 것으로 알려져 있다. 최근까지 효모에서 아쿠아포린 기능이 일부 밝혀졌지만 *Aspergillus* 속을 포함하는 사상성 진균에서는 거의 연구가 되어있지 않은 실정이다. 본 연구에서

는 *A. nidulans*의 유전체 염기서열 정보를 분석하여 하나의 정통아쿠아포린(*aqpA*)과 네 개의 아쿠아글리세로포린(*aqpB-E*)을 발견하였다. 이를 바탕으로 *aqpA* 유전자 결실돌연변이들을 만들어 그 기능을 분석하였다. *aqpA* 결실돌연변이는 각종 삼투 스트레스(osmotic stress)에서는 표현형의 변화가 거의 관찰되지 않았으며 이는 이들 유전자가 삼투 스트레스에 반응하지 않거나 유전자의 중복성 때문에 여겨진다. 그러나 항진균제인 fluconazole에 대해서 그 감수성이 적어지는 것이 관찰되었다. 이는 *aqpA* 유전자가 삼투스트레스 반응보다 항진균제의 감지에 더 기능을 가지고 있을 수 있음을 시사한다.

감사의 말

이 논문은 우석대학교 및 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2009-0072920).

참고문헌

- Adams, T.H. and J.H. Yu. 1998. Coordinate control of secondary metabolite production and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 674-677.
- Agre, P. 2006. The Aquaporin water channels. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 3, 5-13.
- Bahn, Y.S., G.M. Cox, R.J. Perfect, and J. Heitman. 2005. Carbonic anhydrase and CO₂ sensing during *Cryptococcus neoformans* growth, differentiation, and virulence. *Curr. Biol.* 15, 2013-2020.
- Bienert, G.P., J.K. Schjoerring, and T.P. Jahn. 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 994-1003.
- Bonhivers, M., J.M. Carbrey, S.J. Gould, and P. Agre. 1998. Aquaporins in *Saccharomyces*. Genetic and functional distinctions between laboratory and wild-type strains. *J. Biol. Chem.* 273, 27565-27572.
- Calamita, G., W.R. Bishai, G.M. Preston, W.B. Guggino, and P. Agre. 1995. Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270, 29063-29066.
- Carbrey, J.M., M. Bonhivers, J.D. Boeke, and P. Agre. 2001. Aquaporins in *Saccharomyces*: Characterization of a second functional water channel protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1000-1005.
- Han, K.H. 2009. Molecular genetics of *Emericella nidulans* sexual development. *Mycobiol.* 37, 171-182.
- Han K.H., Y.H. Chun, B. de C.P. Figueiredo, F.M. Soriani, M. Savoldi, A. Almeida, F. Rodrigues, C.T. Cairns, E. Bignell, J.M. Tobal, and *et al.* 2010. The conserved and divergent roles of carbonic anhydrases in the filamentous fungi *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 75, 1372-1388.
- 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. and R.A. Prade. 2002. Osmotic stress-coupled maintenance of polar growth in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 43, 1065-1078.
- Hohmann, S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 300-372.
- Käfer, E. 1965. Origins of translations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52, 217-232.
- King, L.S. and M. Yasui. 2002. Aquaporins and disease: lessons from mice to humans. *Trends Endocrinol. Metabol.* 13, 355-360.
- Meyrial, V., V. Laizé, R. Gobin, P. Ripoche, S. Hohmann, and F. Tacnet. 2001. Existence of a tightly regulated water channel in *Saccharomyces cerevisia*. *Eur. J. Biochem.* 268, 334-343.
- Pettersson, N., C. Filipsson, E. Becit, L. Brive, and S. Hohmann. 2005. Aquaporins in yeasts and filamentous fungi. *Biol. Cell.* 97, 487-500.
- Pontecorvo, G., J.A. Roper, L.M. Hemmons, K.D. MacDonald, and A.W.J. Bufton. 1953. The Genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 5, 142-238.
- Sidoux-Walter, F., N. Pettersson, and S. Hohmann. 2004. The *Saccharomyces cerevisiae* aquaporin Aqy1 is involved in sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 17422-17427.
- Tanghe, A., P. van Dijck, D. Colavizza, and J.M. Thevelein. 2004. Aquaporin-mediated improvement of freeze tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* is restricted to rapid freezing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3377-3382.
- Tanghe, A., P. van Dijck, F. Dumortier, A. Teunissen, S. Hohmann, and J.M. Thevelein. 2002. Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in baker's yeast, and over-expression improves freeze tolerance in industrial strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5981-5989.
- Tanghe, A., P. van Dijck, and J.M. Thevelein. 2006. Why do microorganisms have aquaporins? *Trends Microbiol.* 14, 78-85.
- 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.