

Aspergillus nidulans mtDNA의 자가복제절편

장승환 · 한동민¹ · 장광엽*

전북대학교 유전공학연구소, 기초과학연구소, 자연과학대학 생물과학부,

¹원광대학교 분자생물학과

*Aspergillus nidulans*의 DNA로부터 *Saccharomyces cerevisiae*에서 스스로 복제가능하고, 형질전환율도 삽입벡터에 비해 10^4 배정도 높여주는 절편(*ANR1*, 4,950 bp)을 분리한 바 있다. *A. nidulans*에서 *ANR1*의 일부(4,520 bp *EcoRI* 절편)를 포함한 pILJ16-4.5는 삽입벡터인 pILJ16보다 170 배정도 높은 형질전환 효율을 보였으며, *S. cerevisiae*와 마찬가지로 plasmid 상태로 회수 가능했다. *A. nidulans* 세포 내에서 2-3 copy 정도로 염색체와는 별개로 존재하는 것으로 나타났으며, 재형질전환 능력도 있었다. *ANR1*은 미토콘드리아의 DNA에서 유래한 절편으로 밝혀졌으며, AT의 함량이 74.7%로 높았다. 하나의 ARS 핵심공통절편인 (A/T)TTTAT(A/G)TTT(AT)을 포함하고 있고, ARS 공통절편과 유사한(10/11 일치) 절편도 11 곳에 존재한다. Φ X174와 SV40 DNA에서 gyrase가 결합하는 부위의 공통편인 YRTGNYNN(Y=C 또는 T, R=A 또는 G, N=A, G, C 또는 T)도 6 곳에 존재하며, ColE1에서 gyrase가 결합하는 b site(CACTTTACC)와 일치하는 절편도 하나 포함하고 있으며, ABF1 결합 부위의 공통절편과 유사한 절편(TCN,ACG)도 하나 포함하고 있다. 이를 토대로 *ANR1*은 *A. nidulans*의 형질전환 후 회수가 가능한 replicating vector 개발에 이용할 수가 있다.

Key words □ *Aspergillus nidulans*, *ABF1*, *ANR1*, *ARS*, *mtDNA*

자가복제절편(ARS, autonomously replicating sequence)은 염색체, 미토콘드리아, 플라스미드 등에 존재하며, 복제가 시작되는 자리이다. 자가복제절편을 포함하는 DNA는 스스로 복제할 수 있는 능력을 갖는다는 특성 때문에, 유전자 분석을 위한 벡터 개발에 이용되어왔고, 다양한 벡터들이 개발되어 있다. 효모 *S. cerevisiae*에서는 replicator에 대한 많은 연구(4, 13, 33, 35)와 유용하고 다양한 벡터들이 개발되어 이용되고 있다(10, 36).

사상균류가 연구재료로 이용되면서 염색체(12, 19, 28), 미토콘드리아(1, 5, 20, 31) 및 자연적으로 존재하는 플라스미드로부터 자가복제절편을 분리하고, 이를 절편을 토대로 다루기 용이한 벡터를 제조하려는 연구가 수행되었다(2, 3, 12, 23, 34). *Aspergillus nidulans*에서도 자가복제절편을 분리하려는 노력이 있었다. 현재 Gems 등(1991)이 염색체로부터 분리한 *AMAI*이 유일한 자가복제절편으로 알려져 있고, 삽입벡터인 pILJ16보다 250 배정도 형질전환율을 높이고 세포 내에서 스스로 복제가 가능한 것으로 보고하였다(19). *A. nidulans*에는 천연 플라스미드가 존재하지 않는 것으로 알려져 있고, Ballance 등(1985)은 ARS들을 찾는 연구에서 미토콘드리아로부터 ARS 또는 ARS 외 유사한 절편을 분리하는데 실패하였으며, *A. nidulans*의 미토콘드리아 DNA 절편 중 *S. cerevisiae*와 *A. nidulans*에서 형질전환효율을 상당히 높여주는 절편을 분리했으나 염색체와 별개로 존재한다는 증거는 얻지 못했다(2). Stahl 등(1982)은 자낭균류 *Podospora anserina*의 미토콘드리아에 존재하는 플라스-

미드로부터 분리한 절편(ori)을 포함한 pBR322가 *Podospora*에서 스스로 복제 가능하다고 보고했고(31), Stohl 등(1983)도 *N. intermedia*에 존재하는 미토콘드리아의 천연플라스미드의 일부 절편은 형질전환율을 5-10 배 증가시킬 수 있다고 보고했다(34).

자가복제절편들의 특징을 보면, 핵심공통절편((A/T)TTTAT(A/G)TTT(AT))을 포함하고 있고, 염기 중 AT함량이 염색체의 평균 AT함량(60%)에 비해 높다(73-82%)(8). 또한, ARS에 결합하는 단백질 ABF1(ARS binding factor 1)이 결합하는 절편 등을 포함하고 있다(6, 16, 30). ABF1 결합부위는 몇몇 ARS(16, 30, 37), silencer elements(7), 몇몇 유전자의 upstream 부위(9, 30) 등에서 보고된 바 있다. 몇몇 연구자들이 ABF1과 유사한 기능을 수행하는 여러 인자들 BAF1(21), OBF1(18), GF1(17), TAF(22)을 보고했으며, 이들의 결합부위는 공통적으로 TCN_nACG_m이라는 공통절편을 갖는 것으로 알려지고 있다.

본 연구에서는 *A. nidulans*로부터 분리되어 *S. cerevisiae*에서 ARS로서의 특성을 보인 *ANR1*이 *A. nidulans*에서도 *S. cerevisiae*에서와 같이 형질전환효율을 높여주고 염색체와 별개로 존재할 수 있는지를 실험했다. *ANR1* 절편의 일부를 포함하고 있는 pILJ16-4.5는 pILJ16보다는 10^2 배정도 형질전환 효율을 높이는 것으로 나타났다. 형질전환체로부터 plasmid 상태로의 회수가 가능했으며, 재형질전환 능력도 있었다. Southern blotting 분석에서 염색체와는 별개로 존재하는 것으로 나타났으며, 4,950 염기 중 A와 T의 함량이 74.7%로 높았고, *A. nidulans*의 미토콘드리아에서 유래한 절편으로 밝혀졌다. ARS 핵심공통절편(ATTTATATTAA)을 포함하고 있고, 이와 유사한(11개 염기

*To whom correspondence should be addressed
Tel : 82-0652-270-3358, Fax : 82-0652-270-3362
E-mail : goodear@moak.chonbuk.ac.kr

중 10개가 일치됨) 절편도 11 곳에 존재하며, ABF1 결합부위의 공통절편(TCN_nACG)도 포함되어 있다.

재료 및 방법

균주, 배지와 배양조건

*A. nidulans*의 형질전환에는 G34(yA2; argB2 methH2)를, DNA 절편의 클로닝 및 증폭에는 *E. coli* JM109(recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiΔ(lac-proAB) F^r traD36 proAB⁺ lac^r lacZΔM15)를 이용했다.

G34 균주의 경우, protoplast 준비를 위해서는 YG broth (yeast extract 5 g, glucose 20 g)를, 다양한 무성포자를 얻기 위해서는 CMkma(MM stock solution 20 ml, glucose 10 g, yeast extract 1.5 g, casein hydrolysate 1.5 g, vitamin solution 10 ml, adenine solution 4 ml, methionine 0.07 g, arginine 0.07 g, agar 20 g) 배지를 사용하였다. *A. nidulans*의 Arg⁺ 형질전환체 선발에는 선택배지(Mkm; MM stock solution 20 ml, glucose 10 g, agar 20 g, methionine 0.07 g)를, mitotic stability test에는 완전배지(Mkma; MM stock solution 20 ml, potassium chloride 44.73 g, glucose 10 g, methionine 0.07 g, arginine 0.07 g)를 이용하여 37°C에서 배양했다(배지 성분은 1 리터 기준임).

E. coli JM109는 LB배지에서, 형질전환체 선발에는 ampicillin(50 g/ml)이 첨가된 LB배지에서 37°C로 배양했다(1).

플라스미드 제조

*A. nidulans*에서 형질전환을 비교 및 subcloning에는 삽입벡터 pILJ16을 이용하였다. 먼저 ANR1의 일부인 EcoRI 절편과 EcoRI으로 절단한 pILJ16을 결합시켜 pILJ16-4.5를 제조하였다. 형질전환에 이용한 플라스미드들은 pILJ16-1.7, pILJ16-2.7, pILJ16-3.0과 pILJ16-4.5이다. pILJ16-1.7과 pILJ16-2.7은 pILJ16-4.5 중 1,741 bp Smal/XbaI 절편과 2,741 bp XbaI/Smal 절편을 klenow 효소(BM, 1008404)를 이용한 filling-in 방법으로 각각

Table 1. Localization, relative efficiency of autonomously replicating sequence, and sequencing strategy for *A. nidulans* mtDNA fragment(4520 kb)

Plasmids	Clones				RET	MM	
	ESmRV	X	RV	ScH	EXSmH	NT	NT
ANR1							
pILJ16-4.5					170	AT	
pILJ16-3.0	→				108	"	
pILJ16-2.7		→			15	"	
pILJ16-1.7	→		→		30	"	
ARp1					250	"	
pILJ16					1	IT	

Arrows indicate the locations of the sequenced regions. E, EcoRI; H, HindIII; Rv, EcoRV; Sc, ScaI; Sm, Smal; X, XbaI. RET, relative efficiency of transformation; MM, mode of maintenance; NT, not tested; AT, autonomous, IT, integrative.

blunt 말단을 만든 다음, pILJ16/SmaI과 결합시켜 제조하였다. pILJ16-3.0은 3.0 kb EcoRV 절편을 pILJ16/SmaI과 결합시켜 제조하였다(Table 1).

DNA 추출

박테리아의 plasmid DNA는 alkali lysis 방법으로 추출했으며 (25). *A. nidulans*의 genomic DNA는 Osmani 등(1987)의 방법을 사용하였다(27).

*E. coli*와 *A. nidulans*의 형질전환

E. coli 형질전환은 CaCl₂ 방법을 이용하였고(25), *A. nidulans*의 형질전환은 Yelton 등의 방법을 사용하였다(39).

*A. nidulans*로부터 Plasmid DNA 추출

형질전환된 *A. nidulans*로부터 plasmid의 추출은 Genomic DNA 추출과 같은 방법으로 배양한 mycelia를 분말로 만든다. Microfuge tube에 0.15 ml 정도까지 넣고 500 μl의 extraction buffer(0.1 M Tris/HCl pH 9.0, 0.1 M NaCl, 0.5% SDS, 1 mM EDTA)로 잘 녹인다. 멸균된 glass beads(직경 0.40-0.50 mm)를 액의 표면까지 채우고, STE buffer(100 mM NaCl이 포함된 TE buffer)로 saturation된 phenol 250 μl와 STE buffer로 saturation된 chloroform/isoamyl alcohol(25/1)을 첨가한다. Vortex mixer로 실온에서 2~3분간 잘 섞은 뒤 원심분리(실온에서 2~3분)하여 상등액을 취하고, 중간층이 깨끗해질 때까지 phenol extraction을 반복한다. 상등액을 취하여 2배의 ethanol을 넣고 -70°C에서 5분간 침전시킨다. 70% ethanol로 세척하고, 진공건조(LABCONCO, FREEZONE 4.5)시킨 다음 50 μl의 TE buffer(10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 녹이고, *E. coli* 형질전환시 10~15 μl씩 이용하였다.

Southern hybridization과 reprobining

Southern hybridization용 probe는 pILJ16의 유전자 amp^r 부분을 제한효소 *Dra*I으로 처리하여 얻은 dsDNA 절편(0.69 kb, Fig. 1)과 hexanucleotide mixture(BOEHRINGER MANNHEIM, 1277081)를 이용하여 준비하였다. Southern hybridization blot은 capillary 방법으로 준비했으며(28), hybridization은 Church buffer(1.0 mM EDTA, 0.25 M Na₂HPO₄(7H₂O), 0.17% H₃PO₄)

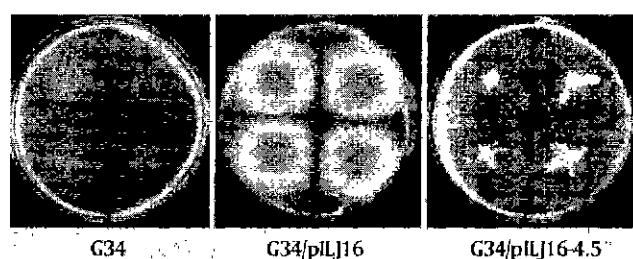


Fig. 1. Comparison of growth of the *A. nidulans* G34 and G34 transformants transformed with [pILJ16] and [pILJ16-4.5] on non-selective media.

(pH 7.4), 1.0% hydrolysated casein, 7% SDS)를 이용하였다.

Nylon membrane으로부터 probes를 제거하는 방법(28)을 이용하여 probe를 제거하고 이 blot과 pILJ16 argB 유전자의 *Sall* 절편 1.7 kb를 probe로 하여 reprobeing을 수행했다.

Mitotic stability

형질전환된 G34/pILJ16-4.5의 최초의 single colony로부터 무성포자를 완전배지와 선택배지에 도말 한 후 3일 동안(약 28세대) 배양하여 포자형성을 충분히 시킨다. 완전배지 및 선택배지로부터 무성포자를 0.08% Tween 용액으로 수확하여 각각 완전배지 및 선택배지에 같은 양의 무성포자(200여 개)를 접종한다. 3일 동안 배양한 후 완전배지와 선택배지에 형성된 colony의 수를 비교하여 *arg⁺* 안정도를 구한다.

염기서열 분석

염기서열 분석은 Sanger 등의 dideoxy chain termination 방법에 따라 수행하였다(29). Sequencing을 위한 주형 DNA는 각각의 plasmids pILJ16-1.7, pILJ16-2.7, pILJ16-3.0에서 제한효소 *Sall*을 이용하여 *argB* 절편을 제거하여 준비하였고, primer는 pUC8의 multi-cloning site(MCS) 양쪽 부분에 해당하는 절편으로서 forward primer로는 5'-GTTTCCCAGTC-CGAC-3'(NEB #1212, 17 mer)를 backward primer로는 5'-CAGGAA-ACAGCTATGAC-3'(Promega Q5401, 17 mer)를 이용하였다. 염기서열의 유사성 검색은 웹사이트 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>의 advanced BLAST search를 이용하였으며, 분석에 이용한 염기서열은 Database GenBank의 accession No. j01390이었다. DNA의 2차 구조 형성, palindrome, 반복절편 찾기 등의 분석은 DNASIS(Hitachi, ver 7.06)를 이용하였다.

결 과

A. nidulans 형질전환을

pILJ16-4.5는 *A. nidulans* G34에 대한 형질전환 효율이 삽입 벡터인 pILJ16에 비해 약 170 배 높았으며, subclones를 포함하고 있는 pILJ16-1.7, pILJ16-2.7, pILJ16-3.0은 pILJ16보다 30 배, 15 배, 108 배 높은 형질전환효율을 보였고, AMA1을 포함하고 있는 ARP1은 pILJ16보다 250 배 높은 효율을 보였다(Table 1).

형질전환체의 특징

G34/pILJ16의 경우는 선택배지에서 배양하면 colony 끝이 일정하고 매끄럽게 자라는 반면, pILJ16-1.7, pILJ16-2.7, pILJ16-3.0, pILJ16-4.5로 형질전환된 G34의 경우는 colony의 끝 부분이 일정하지 않고 거칠게(ragged) 자라는 특징을 보인다(24). 완전배지에서 배양하면, mycelia는 전체적으로 고르게 생장하지만 무성포자가 많이 형성되어 진하게 보이는 부분과 그렇지 않고 비교적 드물게 무성포자를 형성하여 연하게 보이는 두 부분으로 구분이 된다(Fig. 1). 이 두 부분의 무성포자를 각각 선택배지 및 완전배지에 접종하여 배양하면, 진하게 보이는 부분의 무성포자는 선택배지 및 완전배지 모두에서 자라는 반면, 연하게

보이는 부분의 무성포자는 선택배지에서는 전혀 자라지 못하고 완전배지에서만 자랐다.

형질전환 DNA의 문명

A. nidulans 형질전환체 G34/pILJ16-4.5로부터 추출한 genomic DNA로 *E. coli* JM109를 형질전환시켜 26 개의 형질전환체를 얻었다. 이들로부터 pILJ16-4.5를 분리했고, *E. coli* 및 *A. nidulans*를 재형질전환시킬 수 있었다. 26 개 모두 제한효소로 절단하여 전기영동한 결과 원래의 pILJ16-4.5와 동일한 위치에 band를 보였다.

pILJ16의 ampicillin 저항성 유전자부위를 probe로 한 Southern analysis에서는 G34에서 추출한 genomic DNA에서는 band를 보이지 않았고, 형질전환체 G34/pILJ16-4.5에서 추출한 DNA는 *E. coli*에서 추출한 pILJ16-4.5와 같은 위치에서 band를 보였다. 즉, 제한효소 *Bgl*II를 처리한 경우 JM109/pILJ16-4.5와 G34/pILJ16-4.5의 genomic DNA 모두 9.9 kb 부근에서 하나의 band를 형성하였으며, *Avi*II 처리에서는 모두 9 kb와 1 kb 부근에 두개의 band를 형성했다. 제한효소의 절단부위가 없는 *Cla*I를 처리한 경우 JM109/pILJ16-4.5는 8 kb와 20 kb 부근에 2개의 band를 형성했으며, G34/pILJ16-4.5는 well과 30 kb 이상의 부근에 두 개의 band를 형성했다(data not shown).

pILJ16의 *argB* 유전자 부위를 probe로 한 세포 내에서의 copy number를 추정하기 위한 Southern analysis에서 G34/pILJ16-4.5의 genomic DNA는 형질전환되지 않은 G34가 형성한 band와 *E. coli*에서 추출한 pILJ16-4.5가 형성한 band 모두를 포함했고, 같은 위치에 band를 형성하였다(Fig. 2). 그리고, G34/pILJ16-4.5의 DNA의 band 중에서 pILJ16-4.5에 해당하는 band가 G34 고유의 band보다 약 2~3배 진하게 형성되었다.

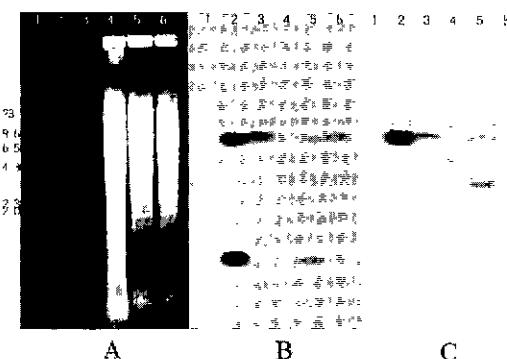


Fig. 2. Southern blot analysis of DNA from *A. nidulans* [pILJ16-4.5] transformants. DNA from one *argB*⁺ [pILJ16-4.5] transformant of *A. nidulans* strain G34 separated on a 0.6% agarose gel. Lanes 1, *N*HindIII size marker; 2, pILJ16-4.5, DNA from *E. coli* cut with *Avi*II; 3, cut with *Bgl*II; 4, DNA from untransformed *A. nidulans* strain G34 cut with *Bgl*II; 5, DNA from transformed *A. nidulans* [pILJ16-4.5] cut with *Avi*II; 6, cut with *Bgl*II (A). Blots were hybridised with ³²P-labelled (B) 0.69 kb *Dra*I fragment and (C) 1.7 kb *argB* fragment from pILJ16. (B & C) Autoradiograph prepared from the gel in panel A.

Table 2. Mitotic stability of G34/pILJ16 and G34/pILJ16-4.5 transformants

TF	M	TIC	MNG	arg ⁺ colonies		% arg ⁺
				S	NS	
G34/pILJ16	S	6.0×10^2	28	538	541	99
	NS	6.0×10^2	28	544	556	98
G34/pILJ16-4.5	S	6.0×10^3	28	35	100	35
	NS	6.0×10^3	28	19	202	10

Primary transformants were transferred to one selective(Mkm) and one non-selective(Mkma) plate and incubated at 37°C until fully conidiated. Harvested conidia were transferred to selective and non-selective media plate and formed arg⁺ colonies counted. TF, transformants; M, medium; TIC, total inoculated conidia; MNG, minimum number of generation; NS, non-selective; S, selective.

Mitotic stability

G34/pILJ16은 선택배지 및 완전배지 모두에서 3일(약 28 세대) 후에 형성된 무성포자 모두 arg⁺이었으나, G34/pILJ16-4.5

는 선택배지에서는 형성된 무성포자의 약 35%만이 arg⁺ colony를 형성하였고, 완전배지에서는 무성포자의 약 10%만이 arg⁺ colony를 형성하였다(Table 2).

ANR1 절편의 염기서열 분석

ANR1의 염기서열을 GenBank를 이용한 유사성 검색결과 *A. nidulans*의 미토콘드리아 DNA와 일치했으며(Accession No.: J01390), 염기서열의 분석 결과는 Fig. 3에 나타냈다. ANR1 절편은 AT의 함량이 74.7%로 높고, ARS의 핵심공통절편인 WTTTATRTTTW(W=A 또는 T, R=A 또는 G)와 일치하는 ATTTATATTATA를 하나(850-860) 포함하고 있으며, 11 개의 염기 중 10 개가 일치하는 ARS 핵심공통절편과 유사한(10/11) 절편도 11 개(19-29, 132-142, 310-320, 820-830, 827-837, 2031-2041, 2403-2413, 3393-3403, 3399-3409, 3879-3889와 3885-3895)가 포함하고 있다. ABF1-DNA 결합부위의 공통절편인 RTCRYBNNNNACG(R=A 또는 G, Y=C 또는 T, B=G, C 또는 T, N=A, G, C 또는 T)와 유사한 절편(TCTATATCTACG)도 하나(588-599) 포함하고 있다. ΦX174와 SV40 DNA에서

1 CTTTTATTAAACTTACTTTTCTTTTGTCTTATTACTAACTTAACTTTAATATCTT
↓ 4.5, 1.7 kb (10/11)
61 ACTTTACCTCCTTTTCTTAACTTAACTTGTGGTGAGATCATCACTTA
↓ 3.0 kb
121 AATATATGATTTAAATTTATATATATTTAATTCCTCTTATTTTATATTTT
↓ (10/11)
181 ATTAATCACTTAAACCTCTTAAATCAATTCTAAATTTTCTTTTGTAAAGT
241 ATTTGTTTAACTATCTATATATTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCT
301 TTAAATAATTTATTTTATTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCT
↓ (10/11)
361 GTTTACTTCTTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCT
421 ATTTTTTAAATTAATCTTCACTTAACTTCTTTCTTTCTTTCTTTCT
rep-5
481 AATAGTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCT
↓ rep-5
541 TGTTTAAACCTCTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCT
601 CTAACTCTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCT
661 TTAAATTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCT
rep-5
721 TAYACATAATCTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCT
781 CITACATTCATCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCT
↓ (10/11)
841 ATATTTAACCTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTAT
901 TAATCTTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTAT
↓ rep-2
961 TACATTTACCTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTAT
1021 TACTCTCTTTTGTGAGCTTCTTTTGTGAGCTTCTTTTGTGAGCT
1081 TCACTCTCTTTTGTGAGCTTCTTTTGTGAGCTTCTTTTGTGAGCT
1141 TTACCTCTCTTTTGTGAGCTTCTTTTGTGAGCTTCTTTTGTGAGCT
1201 CTAACTCTCTTTTGTGAGCTTCTTTTGTGAGCTTCTTTTGTGAGCT
↓ 0.5 kb J
1261 TTACCGAATCTGAGCTTCTTTTGTGAGCTTCTTTTGTGAGCTTCT
1321 AAAGTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTAT
1381 TTAAATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTAT
1441 AAATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTAT
1501 ATTTTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTAT
1561 ACTTTTGGATGATTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
1621 CGAAAGGATAAGGTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
1681 CTAACTTTATTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
↓ 1.7 kb J
1741 AGAGTAAACAGTATCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
1801 GTTGTATCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT
↓ GCS
1861 TAGGCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
1921 ACCAGAGAGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
1981 TTAACTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
↓ GCS
2041 CCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
2301 ATATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTAT
2361 TATGTTGTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
↓ GCS
2221 GCTAGGAGTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
2281 TATGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
2341 TAAATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTAT
2401 GGTGTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
↓ (10/11)

2461 ATTTATAATTTATCTTAACTTACCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
2521 ACATTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
↓ GCS
2581 CTTTGTATTATTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
↓ rep-2
2641 AGAGTAAATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTT
2701 TTTTAAATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTT
2761 GTTTATTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
2821 AAATGCGCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
2881 TCACTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
2941 CTATTCATTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
3001 TCCCTTAACTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
3061 AGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
3121 ACACCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
↓ 3.0 kb J
3181 ACACGATAACCGTTOGGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
3241 GCTTACATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTT
3301 TTAAATCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
3361 TCTGACATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTT
↓ (10/11)
3421 TTAAATGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
3481 TTTTACCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
3541 CAATTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
3601 TCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
3661 GATTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
3722 TCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
3781 TATGATTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
↓ rep-4
3841 TCACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTT
↓ (10/11)
3901 AGCTATTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
↓ rep-4
3961 ACACCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
4021 ATCTTACATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTAT
4081 AGTTTTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTAT
↓ rep-5
4141 TCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
↓ CS-3
4201 TACATTTATTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
4261 CCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
↓ rep-3
4321 TCCACACGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
4381 GTTGTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTT
4441 CGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
4501 TAACTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
↓ 2.7, 4.5 kb J
4561 ACCATTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
4621 ATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTAT
↓ rep-1
4681 AGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
4741 TATGATTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
↓ rep-3
4801 TCTTAACTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTAT
4861 ATCTTATTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
4921 TCCCTTAACTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTAT
↓ GCS

Fig. 3. Nucleotide sequence (from Database GenBank Accession No. j01390) of the cloned ANR1 mtDNA fragment with ARS activity of *A. nidulans*. The bold characters (850-861) indicate the ARS core consensus sequence. 10/11; ARS consensus like (10 bp matched of 11 bp) sequence, CSB-1 and CSB-3; consensus sequence of mtDNA replication origins, GCS; *E. coli* gyrase recognition site, rep-x; repeated sequences.

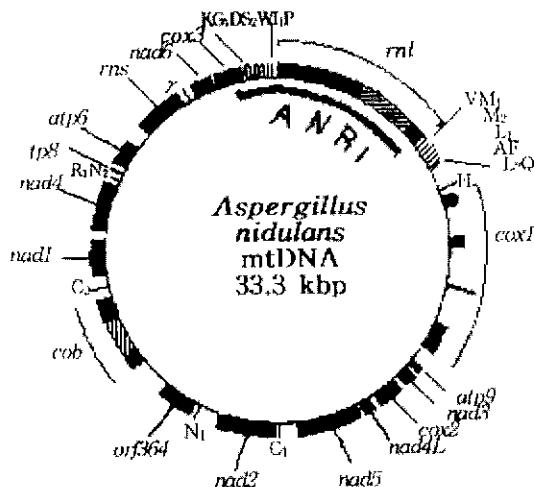


Fig. 4. The position of the ANR1 on the genetic map of the *A. nidulans* mitochondrial genomes. Genes for proteins and rRNA molecules are shown as filled boxes; tRNA genes are indicated by dashes inside the circle labelled with the IUB-IUPAC one-letter amino acid code. *cox3*; cytochrome c oxidase subunit III, K; Lys, G1; Gly₁, D; Asp, S₂; Ser₂, W; Trp, I₁; Ile₁, P; Pro, *ml*; 23S rRNA, V; Val, M₁; Met₁, M₂; Met₂, L₁; Leu₁, A; Ala, F; Phe, L₂; Leu₂, Q; Gln, H; His, *coxi*; cytochrome c oxidase subunit I, *atp9*; ATPase subunit 9, *nad3*; NADH dehydrogenase subunit 3, *cox2*; cytochrome c oxidase subunit II, *nad4L*; NADH dehydrogenase subunit 4L, *nad5*; NADH dehydrogenase subunit 5, C₁; Cys₁, *nad2*; NADH dehydrogenase subunit 2, N₁; Asn₁, *orf364*; unknown protein, *cob*; apocytochrome b, C₂; Cys₂, *nad1*; NADH dehydrogenase subunit 1, *nad4*; NADH dehydrogenase subunit 4, R₁; Arg₁, N₂; Asn₂, *atp8*; ATPase subunit 8, *atp6*; ATPase subunit 6, *ms*; 16S rRNA, Y; Tyr, *nad6*; NADH dehydrogenase subunit 6. Outer ring: transcription is clockwise, Hatched boxes indicate overlapping genes. Adopted from T. Brown & B. Franz Lang (1996).

gyrase가 결합하는 부위의 공통절편인 YRTGNYNYY(Y=C 또는 T, R=A 또는 G, N=A, G, C 또는 T)도 6 곳(1243-1252, 1811-1820, 2000-2009, 2034-2043, 2207-2216과 2567-2576)에 존재하며, ColE1에서 gyrase가 결합하는 *b* site(CACTTTTACCC)와 일치하는 절편도 하나(4046-4055) 포함하고 있다(29). 유전자의 복제, 안정화, 활성화 등에 관련된 인자들이 결합하는 부위의 공통절편(TCN7ACG)도 하나(588-599) 포함하고 있다. 복제 개시와 관계가 있는 요소로 추정되는 CSB-1 절편(TRTGY-TYTR)이 하나(4759-4767) 포함되어 있고, CSB-3(TATATAGAXATATAT)와 유사한 TATATATACATATAT 절편을 하나(4195-4209) 포함하고 있다. 반복절편(repeated sequences)들도 여러 곳에서 관찰되었다(Fig. 3).

Mitochondrial genome에서의 위치

ANR1 절편은 *A. nidulans*의 mitochondrial genome(33.3 kb)에서 cytochrome c oxidase subunit III의 3' 말단 부분에서(끝에서 161번째 염기부터) tRNA(Lys, Gly₁, Asp, Ser₂, Trp, Ile₁, Pro), 23S rRNA의 3' 말단 부분(끝에서 1,120번째 염기까지)에 해당하는 절편의 상보적인 절편이다(Fig. 4).

고 칠

대부분의 자가복제 절편들은 ARS 핵심공통절편(WTTTATRT-TTW), palindromes, 반복되는 절편, gyrase 결합부위 및 각종 결합인자들이 결합하는 부위 등을 포함하고 있는 특징 외에도, 이 절편을 이용한 형질전환에서 형질전환효율을 높여주는 특징이 있다.

효모 *S. cerevisiae*에서 높은 형질전환효율을 보인 바 있는 ANR1의 4.5 kb EcoRI 절편을 포함하고 있는 pILJ16-4.5로 *A. nidulans* 균주 G34를 형질전환시켰을 경우 삽입벡터인 pILJ16 보다 170배 정도의 높은 효율을 보였으며, subclones를 포함하고 있는 pILJ16-1.7, pILJ16-2.7, pILJ16-3.0은 pILJ16-4.5보다는 낮으나 pILJ16보다는 30 배, 15 배, 108 배 높은 형질전환효율을 보였다. 이들 형질전환체로부터 추출한 genomic DNA로 *E. coli* 형질전환체를 얻을 수 있었고, 원래의 plasmid를 분리할 수 있었기 때문에 *A. nidulans* 세포 내에서 염색체와 별개로 존재할 가능성이 높다고 생각된다.

G34/pILJ16은 선택배지에서 배양했을 경우 colony 끝이 매끄러운 반면, G34/pILJ16-4.5는 거친(ragged) 생장 형태를 보였다. 완전배지의 경우 이러한 현상을 더욱 뚜렷하게 관찰할 수 있다. 삽입벡터인 pILJ16은 형질전환시 염색체에 삽입되는 것으로 알려져 있으며, 영양번식시 생장에 필요한 *argB* 유전자가 균사에 일정하게 배분되어 균사의 생장이 고르게 된다고 볼 수 있다. 그러나, G34/pILJ16-4.5의 경우처럼 colony의 끝이 거친 것은 균사의 생장이 일정하지 않기 때문인데, 분지에 문제가 발생했거나, *argB* 유전자가 균사에 일정하게 배분되지 않아, *argB* 유전자를 포함하고 있는 균사의 생장만 이루어지기 때문으로 생각된다. G34/pILJ16-4.5에서 pILJ16-4.5가 염색체에 삽입되었다면 매끄러운 균사생장 형태를 보일 것이다. 그러나 염색체에 삽입되지 않고 별개로 존재한다면, 균사의 분지와 생장시 세포마다 일정한 수의 pILJ16-4.5가 배분되지 않을 가능성이 있다. G34의 경우 최소배지에 arginine과 methionine을 첨가한 MMma나 MMKma에서 배양하면 무성포자의 형성이 완전배지에 arginine과 methionine을 첨가한 CMma나 CMKma에서 배양했을 경우에 비해서 아주 저조하다. G34/pILJ16-4.5의 경우는 MMma에서 무성포자를 진하게 형성하는 부분과 드문드문 형성하는 즉, G34의 생장과 같은 양상을 보이는 부분으로 나누어지는데, 진하게 형성된 부분의 conidia는 MMm에서 자랄 수 있으나 G34와 같이 자란 부분의 conidia는 MMm에서 자라지 못했다. 이는 진한 부분의 conidia는 어떤 방법으로든 arginine 유전자를 포함하고 있으며, 드문드문 형성된 부분의 conidia는 생장 중에 arginine 유전자를 잃어버린 것으로 생각된다.

pILJ16의 ampicillin 저항성 유전자부위를 probe로 한 Southern analysis에서는 G34에서 추출한 genomic DNA에서는 band를 보이지 않았고, 형질전환체 G34/pILJ16-4.5에서 추출한 DNA는 *E. coli*에서 추출한 pILJ16-4.5와 같은 위치에서 band를 보였다. 즉, 제한효소 *Bgl*II를 처리한 경우 pILJ16-4.5는 9.9 kb 하나의 band를 형성하는데, G34/pILJ16-4.5의 genomic DNA도 같은 위치에 band를 형성하였으며, *Avr*II를 처리하면, pILJ16-

4.5는 9 kb와 1 kb의 두 절편으로 나누어지며, *AvII*가 probe 부위를 둘로 나누기 때문에 두 개의 band를 형성하는데, G34/pILJ16-4.5의 경우도 같은 위치에 두 개의 band를 형성했다. 만약, G34/pILJ16-4.5에서 pILJ16-4.5가 염색체에 삽입되었다면, *BglII*를 처리한 경우 *E. coli*에서 추출한 pILJ16-4.5와 다른 위치에서 band를 형성할 것이다. 그러나 tandem repeat로 삽입된 경우도 band의 위치가 같을 수 있기 때문에 이 점을 배제할 수는 없다. *AvII*처리의 경우 probe 부위를 둘로 나누기 때문에, G34/pILJ16-4.5의 경우 한 copy 또는 tandem repeat로 삽입되었다고 가정하면 *E. coli*에서 추출한 pILJ16-4.5에서와는 다른 부위에 band를 형성할 것이다. 제한효소의 절단부위가 없는 *ClaI*를 처리한 경우 JM109/pILJ16-4.5와 G34/pILJ16-4.5가 각기 다른 위치에 band를 형성했는데, 이는 G34/pILJ16-4.5가 *ClaI*으로 완전절단 되지 않았고, 이동이 제대로 되지 않아 well과 30 kb 이상의 부근에 두 개의 band를 형성한 것으로 보인다 (Fig. 4). 따라서 JM109/pILJ16-4.5와 G34/pILJ16-4.5의 DNA가 Southern analysis에서 같은 위치에 band를 형성한 것은 G34/pILJ16-4.5의 세포 내에서 plasmid pILJ16-4.5가 염색체와는 별개로 존재한다는 간접적인 증거로 해석할 수 있다.

세포 내에서의 copy number를 추정하기 위한 Southern analysis에서 G34/pILJ16-4.5의 genomic DNA는 G34가 형성한 band와 *E. coli*에서 추출한 pILJ16-4.5가 형성한 band 모두를 포함하고 같은 위치에 band를 형성하였다(Fig. 4). 이것은 G34 고유의 *argB* 절편 외에 염색체와는 별개의 *argB* 절편이 존재한다고 볼 수 있고, G34 고유의 band보다 약 2~3배 진하게 형성된 것은 G34/pILJ16-4.5의 세포 내에서 2~3 copy로 존재하는 것으로 사료된다.

G34/pILJ16은 선택 및 완전배지 모두에서 28세대 후에도 100% *arg⁺*로 안정하게 유지되는 반면, G34/pILJ16-4.5는 선택 배지에서는 56%만이 *arg⁺* colony를 형성하였고, 완전배지에서는 40%가 *arg⁺*로 나타났다(Table 2). 세포 내에서 2~3 copy 정도로 존재하면서도 선택배지에서 56%만이 *arg⁺*인 것은 염색체와 별개로 존재하기 때문으로 해석할 수 있으며, 형성된 무성 포자에 복제된 pILJ16-4.5가 일정하게 분배되지 않은 결과로 사료된다. 만약 염색체에 삽입되었다면 몇십 세대 후에도 거의 일정하게 분배되고 100% 가까이 *arg⁺*로 될 것이다. *S. cerevisiae*의 경우 동원체(centromere)나 말단체(telomere)를 이용하여 안정적인 벡터를 제조하여 이용하고 있다(10, 13, 32, 36). *ANRI*의 경우도 동원체나 말단체 같은 절편을 첨가하면 좀 더 안정적인 벡터를 제조할 수 있을 것이다.

*ANRI*은 *A. nidulans*의 미토콘드리아 DNA의 23S rRNA, 몇몇 tRNA(Lys, Gly₁, Asp, ser₂, Trp, Ile₁, Pro)와 cytochrome c oxidase subunit III의 일부에 해당하는 절편의 상보적인 strand이다. AT의 함량이 74.7%로 높고, ARS의 핵심일치점(ATTATATATTAA) 1개와 11염기 중 10개가 일치하는 절편도 11 곳에 존재한다. 또한, ABF1-DNA 결합부위의 일치점(CTCRYBNNNNACG(R=A 또는 G, Y=C 또는 T, B=G, C 또는 T, N=A, G, C 또는 T)와 유사한 절편(TCTATATCTACG)도 하나 포함하고 있고, ΦX174와 SV40 DNA의 gyrase 결합

부위와 일치하는 YRTGNYN(Y=C 또는 T, R=A 또는 G, N=A, G, C 또는 T)도 6 곳에 존재하며, ColE1에서 gyrase가 결합하는 b site(CACTTTTACCC)와 일치하는 절편, 복제개시와 관계가 있는 요소로 추정되는 CSB-1(consensus sequence block-1) 절편(TRTGYTYTR)(21)도 하나 포함되어 있고, CSB-3(TATATAGAXATATAT)(15)와 유사한 TATATATACATATAT 절편을 하나 포함하고 있다. 따라서 *ANRI*은 자가복제점들이 갖추고 있는 여러 조건 중 상당히 많은 요소들을 포함하고 있다.

결론적으로, 형질전환체 G34/pILJ16-4.5의 genomic DNA로 *E. coli* 형질전환체를 얻을 수 있었고, plasmid pILJ16의 pUC8에 해당하는 DNA 절편을 probe로 한 Southern analysis에서 G34/pILJ16-4.5의 genomic DNA가 *E. coli*에서 추출한 pILJ16-4.5가 형성한 band와 같은 위치에 band를 형성하는 점, pILJ16의 *argB* 유전자 부위를 probe로 한 Southern analysis에서 G34/pILJ16-4.5의 genomic DNA가 G34가 형성한 band와 *E. coli*에서 추출한 pILJ16-4.5가 형성한 band 모두를 포함하면서 같은 위치에 band를 형성한다는 점, 그리고 ARS의 여러 요소들을 갖추고 있는 점을 종합하면, pILJ16-4.5는 *E. coli* 뿐만 아니라 *A. nidulans*에서도 염색체와는 별개로 존재 할 수 있으며, *A. nidulans*의 미토콘드리아에서 유래한 *ANRI*은 적어도 하나 이상의 replicon을 포함하고 있어 자가복제능력이 있는 것으로 사료된다.

*S. cerevisiae*의 염색체의 경우 평균 40 kb마다 복제시작점(replicon)이 존재한다고 알려져 있으며, 미토콘드리아의 DNA(68-78 kb)도 4개의 복제시작점(*ori 1, ori2, ori3, ori5*)을 포함하고 있는 것으로 보고하였다(8, 15). 또한 동물의 미토콘드리아 DNA의 복제에 대한 연구도 수행된 바 있으며, 복제시작점이 하나 이상인 것으로 보고되었다(14).

따라서, *A. nidulans* 미토콘드리아 DNA(33 kb)에도 최소한 한 개 이상의 복제시작점이 존재할 것이며, 다른 부분에 대한 염기서열을 분석하면 ARS에 대한 더 많은 정보를 얻을 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구를 위해 균주와 플라스미드를 제공해 준 Dr. A. J. Clutterbuck에게 감사드리며, 연구의 진행 및 토의에 많은 도움을 주신 원광대학교 한동민 교수님과 전북대학교 채건상 교수님께도 감사드립니다. DNA 분리 및 염기서열 분석에 도움을 주신 유전공학연구소 및 기초과학연구소에도 감사드립니다. 그리고, 본 연구는 1997년도 학술진흥재단의 자유공모 연구비(KRF, 1997-001-D00303)로 수행되었다.

참고문헌

1. Almasan, A. and N.C. Mishira. 1990. Characterization of a novel plasmid-like element in *Neurospora crassa* derived mostly from the mitochondrial DNA. *Nucl. Acid. Res.* 18(19), 5871-5877.
2. Ballance, D.J. and G. Turner. 1985. Development of a high-

- frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene* **36**, 321-331.
3. Barnes, D.E. and D.W. MacDonald. 1986. Behaviour of recombinant plasmid in *Aspergillus nidulans*: structure and stability. *Curr. Genet.* **10**, 767-775.
 4. Beggs, J.D. 1978. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature* **275**(5676), 104-109.
 5. Beri, R.K., E.L. Lewis, and G. Turner. 1988. Behaviour of a replicating mitochondrial DNA sequence from *Aspergillus amstelodami* in *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* **13**, 479-486.
 6. Biswas, S.B. and E.E. Biswas. 1990. ARS binding factor I of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* binds to sequences in telomeric and nontelomeric autonomously replicating sequences. *Mol. Cell. Biol.* **10**(2), 810-815.
 7. Brand, A.H., G. Micklem, and K. Nasmyth. 1987. A yeast silencer contains sequences that can promote autonomous plasmid replication and transcriptional activation. *Cell* **51**(5), 709-719.
 8. Broach, J.R., J.R. Pringle, and E.W. Jones. 1991. *The Molecular and Cellular Biology of the yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics*. printed by Cold Spring Habbor Laboratory Press. **1**, 60-69 and 344-348.
 9. Buchman A.R., W.J. Kimmerly, J. Rine, and R.D. Kornberg. 1988. Two DNA-binding factors recognize specific sequences at silencers, upstream activating sequences, autonomously replicating sequences, and telomerers in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **8**(1), 210-225.
 10. Burke, D.T., G.F. Carle, and M.V. Olson. 1987. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* **236**(4803), 806-812.
 11. Buxton, F.P. and A. Radford. 1984. The transformation of mycelial spheroplasts of *Neurospora crassa* and the attempted isolation of an autonomous replicator. *Mol. Gen. Genet.* **196**, 339-344.
 12. Case, M.E., M. Schweizer, S.R. Kushner, and N.H. Giles. 1980. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5259-5263.
 13. Clarke, L. and J. Carbon. 1980. Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature* **287**, 504-509.
 14. Clayton, D.A. 1982. Replication of Animal Mitochondrial DNA. *Cell* **28**, 693-705.
 15. de Zamaroczy, M., G. Faugeron-Fonty, G. Baldacci, R. Gourost, and G. Bernardi. 1984. The *ori* sequences of the mitochondrial genome of a wild-type yeast strain: number, location, orientation and structure. *GENE* **32**, 439-457.
 16. Diffley, J.F.X. and B. Stillman. 1988. Purification of a yeast protein that binds to origins of DNA replication and transcriptional silencer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2120-2124.
 17. Dorsman, J.C., W.C. van Heeswijk, and L.A. Grivell. 1988. Identification of two factors which bind to the upstream sequences of a number of genes coding for mitochondrial proteins and to genetic elements important for cell division in yeast. *Nucl. Acid. Res.* **16**(15), 7287-7301.
 18. Eisenberg, S., C. Civalier, and B.-K. Tye. 1988. Specific interaction between a *Saccharomyces cerevisiae* protein and a DNA element associated with certain autonomously replicating sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 743-746.
 19. Gems, D., J.L. Johnstone, and A.J. Clutterbuck. 1991. An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *GENE* **98**, 61-67.
 20. Gross, S.R., P.H. Levine, S. Metzger, and G. Glaser. 1988. Recombination and Replication of Plasmid-Like Derivatives of a Short Section of the Mitochondrial Chromosome of *Neurospora crassa*. *Genetics* **121**, 693-701.
 21. Halfter, H.U. M. Iler, E.-L. Winnacker, and D. Gallwitz. 1989. Isolation and DNA-binding characteristics of a protein involved in transcription activation of two divergently transcribed, essential yeast genes. *EMBO J.* **8**(10), 3029-3037.
 22. Hamil, K.G., G.N. Hong, and Fried, H.M. 1988. Constitutive Transcription of Yeast Ribosomal Protein Gene TCM1 Is Promoted by Uncommon *cis*- and *trans*-Acting Elements. *Mol. Cell. Biol.* **8**(10), 4328-4341.
 23. Hughes, K., M.E. Case, R. Geever, D. Vapnek, and N.H. Giles. 1983. Chimeric plasmid that replicates autonomously in both *Escherichia coli* and *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**(4), 1053-1057.
 24. Jang, S.H. and K.Y. Jahng. 1999. Isolation of an Autonomously Replicating DNA Sequence from *Aspergillus nidulans*. *J. Microbiol.* **37**(2), 51-58.
 25. Sambrook, J., E.F. Fritch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
 26. Morrison, A. and N.R. Cozzarelli. 1981. Contacts between DNA gyrase and its binding site on DNA: Features of symmetry and asymmetry revealed by protection from nucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**(3), 1416-1420.
 27. Osmani, S.A., G.S. May, and N.R. Morris. 1987. Regulation of the mRNA levels of *nimA*, a gene for the G₂-M transition in *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Biol.* **104**, 1495-1504.
 28. Paietta, J. and G.A. Marzluf. 1985. Plasmid recovery from transformants and the isolation of chromosomal DNA segments improving plasmid replication in *Neurospora crassa*. *Curr. Genet.* **9**(5), 383-388.
 29. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
 30. Seta, F.D., I. Treich, J.-M. Buhler, and A. Sentenac. 1990. ABF1 Binding Sites in Yeast Polymerase Genes. *J. Biol. Chem.* **265**(25), 15168-15175.
 31. Stahl, U., P. Tudzynski, and K. Esser. 1982. Replication and expression of a bacterial-mitochondrial hybrid plasmid in the fungus *Podospora anserina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**(11), 3641-3645.
 32. Stinchcomb, D.T. and R.W. Davis. 1979. Centromeric DNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **158**(2), 157-190.
 33. Stinchcomb, D.T., K. Struhl, and R.W. Davis. 1979. Isolation and characterization of a yeast chromosomal replicator. *Nature* **282**, 39-43.
 34. Stohl, L. and A.M. Lambowitz. 1983. Construction of a shuttle vector for the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**(4), 1058-1062.
 35. Struhl, K., D.T. Stinchcomb, S. Scherer, and R.W. Davis. 1979. High-frequency transformation of yeast: Autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1035-1039.
 36. Szostak, J.W. and E.H. Blackburn. 1982. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* **29**(1), 245-255.
 37. Sweder, K.S., P.R. Rhode, and J.L. Campbell. 1988. Purifi-

- cation and Characterization of Proteins That Bind to Yeast ARSs. *J. Biol. Chem.* **263**(33), 17270-17277.
38. Walker, S.S., S.C. Francesconi, and S. Eisenberg. 1990. A DNA replication enhancer in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4665-4669.
39. Yelton, M.M., J.E. Hamer, and W.E. Timberlake. 1984. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1470-1474.
40. Zhu, J.D.L. Carlson, D.D. Dubey, K. Sharma, and J.A. Huberman. 1994. Comparison of the two major ARS elements of the *ura4* replication origin region with other ARS elements in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Chromosoma* **103**, 414-422.

(Received July 22, 1999/Accepted August 28, 1999)

ABSTRACT : Autonomously Mitochondrial Replicating Sequence of *Aspergillus nidulans*

Seung-Hwan Jang, Dong-Min Han¹, and Kwang-Yeop Jahng* (Institute for Molecular Biology and Genetics, Institute of Basic Science, Faculty of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea, ¹Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea)

We isolated the *ANR1* fragment from *Aspergillus nidulans* that could autonomously replicate and enhance transformation efficiency about 10⁴ fold compared to the integrative vector in *Saccharomyces cerevisiae*. In *A. nidulans* recombinant plasmid pILJ16-4.5 which carries the 4.5 kb EcoRI fragment of *ANR1* showed a 170-fold increase of transformation efficiency compared to the integrative vector pILJ16 and could be recovered from transformants as an intact form. Estimated copy number of transforming plasmid pILJ16-4.5 was scored as 2 to 3 copies in transformed *A. nidulans*. Recombinant plasmid pILJ16-4.5 is mitotically unstable, being lost from 65% of asexual progeny of transformants on selective medium and 90% on complete medium. Southern analysis of transformant DNA showed that the pILJ16-4.5 is maintained in free form. The sequencing data showed that *ANR1* fragment was originated from mitochondrial DNA of *A. nidulans* and contained high AT content as much as 74.7%. One ARS consensus sequence (A/T)TTTAT(A/G)TTT(A/T), 11 ARS-like sequence (agreement 10 of 11) and ABF1 binding core consensus sequence (TCN7ACG). Also six gyrase binding core consensus sequence (YRTGNYNYY; Y=C or T, R=A or G, N=A, G, C or T) of ΦX174 and SV40 DNA and one *b* site (CACTTTACC) combining with gyrase in ColE1 are shown. *ANR1* can be developed as a replicating plasmid for transformation system in *A. nidulans*.