The Korean Journal of Microbiology, Vol. 41, No. 4, December 2005, p. 246-254
Copyright©2005, The Microbiological Society of Korea

Neurospora crassa rcm-1 돌연변이체의 특성

김상래 · 이병욱*
고신대학교 자연과학대학 생명과학부

***Neurospora crassa*의 게놈 분석을 통하여 tetratricopeptide repeat (TPR) 부위를 보유할 것으로 추정되는 19종의 단백질을 찾아냈다. 이중에서 한 단백질은 *Saccharomyces cerevisiae*에서 다양한 유전자들의 공통 전사 억제인자로 알려진 Ssn6 단백질에 60% 이상의 유사도를 보였다. *N. crassa*의 RIP (repeat-induced point mutation) 과정을 통하여 생산된 돌연변이 균주들은 모두 느리게 성장하였는데, 4가지로 구분되는 돌연변이 표현형을 나타냈다. 첫 번째 돌연변이 표현형은 균사가 *ropy* 돌연변이와 유사한 균사 모양으로 성장하고 밀도가 높아 보였고, 대분생포자는 *yellow*와 *csp* 표현형을 보였다. 두 번째 돌연변이형은 늦은 성장을 보였지만 대분생포자를 생산하였다. 세 번째는 매우 느린 균사 성장을 보였고 *acon* 표현형을 나타냈다. 마지막 돌연변이형은 거의 공기 중으로 균사를 뻗지 못하였으며 *acon* 표현형을 보였는데, *rco-1* RIP 돌연변이체와 유사하였다. 돌연변이체들은 모두 male로서는 수정능을 보였지만 female로서는 교배가 불가능했으며 자낭각을 생산하지 못하였다. 이 결과들은 이 유전자가 *N. crassa*의 성장은 물론 무성생식 및 유성생식의 여러 과정에 관여함을 나타낸다. 염색체와 cDNA의 서열을 분석한 결과에 따르면, 유전자가 6개의 인트론을 보유하고 있고, 총 917개의 아미노산으로 구성된 102 kDa의 단백질을 암호화할 것으로 예상되었다. 이 유전자를 *rcm-1* (regulation of conidiation and morphology)으로 명명하였다.**

Key words □ ***Neurospora crassa rcm-1*, Ssn6, tetratricopeptide repeat**

*Neurospora crassa*는 게놈 프로젝트에 의해 대부분의 유전자 서열이 밝혀진 상태로서, 유성생식과 무성생식의 발생 과정에 관여하는 유전자들의 기능을 밝히기 위한 연구가 분자생물학, 단백질체학 및 유전체학 등을 이용하여 활발하게 진행 중이다(7, 22). *N. crassa*는 세 개의 구분되는 포자형성 경로를 통해 무성생식 포자인 대분생포자(macroconidium)와 소분생포자(microconidium), 그리고 생식포자인 자낭포자를 생성한다. 대분생포자의 형성은 성장해 가는 환경에서 탄소원이 결핍되게 되면 생장력 있는 조직인 균사가 성장표면으로부터 공기 중으로 성장하여 균사의 정점으로부터 수축(constriction)이 생기기 시작하고 결국에는 격막이 형성되며, 결체(connective)라 불리는 떨어지기 쉬운 구조로 이웃한 대분생포자들과 연결되어진다. 대분생포자 형성의 전 과정에는 12-24시간이 걸린다. 소분생포자는 대분생포자와는 다른 과정으로 형성되는데 소분생포자공(microconidiopore)의 벽을 통해 분화됨으로 형성된다. 생식 주기에서는 성숙한 균사체가 여성생식 기관인 전자낭각(protoperithecium)으로 성숙된 후에 다른 교배형(mating type)을 가지는 세포, 즉 교배형 *A*와 *a* 간에 수정되었을 때 많은 자낭(ascus)을 포함하는 자낭각으로 성숙되는데 하나의 접합자로부터 형성되며 각각의 자낭에는 여덟 개의 반수체 자낭포자가 들어있다.

*N. crassa*의 초기 분자생물학 연구를 통하여 무성생식 포장 형성 시에 발현되는 *con* 유전자들이 분리되었다(1, 13). Yamashiro 등은 이런 *con* 유전자들 중에서 *con-10* 유전자에 hygromycin에 저항성을 부여하는 hygromycin B phosphotransferase 유전자 (*hph*)를 연결하여 *N. crassa*에 도입하고, 돌연변이를 유발하여 hygromycin이 첨가된 영양배지에서 생존한 균주들을 분리하였다(30). 이는 이 생존 균주에서는 무성포자 형성 시에 선택적으로 발현되는 *con-10* 유전자가 발현 시점이 아닌 영양분이 풍부한 성장기에 발현되었다는 의미이다. 이처럼 시기에 맞지 않는 발현의 원인이 되는 돌연변이를 갖는 유전자를 분리함으로서, *con* 유전자들의 발현 조절에 관여하는 *rco-1* 유전자가 찾을 수가 있었다. 즉 *con* 유전자들은 무성생식 포자의 형성 시에 발현하지만, *rco-1* 유전자의 기능이 결여된 경우에는 영양 성분이 풍부하여 성장하는 균사에서도 발현되는 것으로 밝혀졌다. 연구 결과에 따르면 *rco-1*은 다면발현성(pleiotropic) 유전자로서 *N. crassa*의 성장 과정, 무성 및 유성생식포자 형성 과정은 물론 균사의 성장 방향 등 다양한 형질의 발현에 관여하는 것으로 알려졌다.

RCO1은 604개의 아미노산으로 구성된 66 kDa의 단백질로 *Saccharomyces cerevisiae*에서 다양한 유전자 발현 억제에 관여하는 Tup1 단백질과 46.3%의 유사도를 보여주며, 특히 Tup1 단백질이 보유한 WD40 (β-transducin) 반복 부위가 존재하는 후반부(C-말단)에서는 70%에 가까운 일치도(identity)를 보이는 것으로 나타났다. 다른 점은 Tup1은 전반부에(N-말단) 글루타민이 풍부한 지역이 존재하는 반면에, RCO1은 프롤린이 풍부한 위치가 존재하는 것이다. 기존 *S. cerevisiae*의 연구에 의하면 Tup1은 독립적으로 활동하는 것이 아니라 언제나 Ssn6와 연합하여 Ssn6-Tup1의 전사 복합체를 이루어 작동하는 것으로 알려졌다(15). 1

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 051-400-2321, Fax: 051-405-9905
E-mail: bulee@kosin.ac.kr

개의 Ssn6와 4개의 Tup1 단백질로 구성되는 Ssn6-Tup1 복합체는 스스로 DNA에 결합하지 못하지만, 여러 종류의 DNA-결합 단백질들과 연합하여 프로모터에 결합함으로서 전사를 억제시키는 것으로 보고가 되었다(25, 28). *S. cerevisiae* 세포에서 Ssn6-Tup1 복합체가 발현을 억제하는 유전자군에는 a-인자 특이성 유전자군, 반수체 특이성 유전자군, 포도당에 의해서 발현이 억제되는 유전자군, DNA 손상이 유발하는 유전자군, 산소 이용 유전자군, 포자형성 특이성 유전자군, 체세포분열 특이성 유전자군, 응집(flocculation) 유전자군, 전분 분해에 관련된 유전자 및 삼투압에 의한 스트레스에 의해서 유발되는 유전자군 등이 속하는 것으로 알려졌다(25). *S. cerevisiae*에서 *ssn6* 혹은 *tup1* 유전자가 결여된 균주는 성장이 매우 지연되며, 유성생식 포자 형성을 할 수가 없는 등 여러 가지 세포의 기능에 문제가 있는 것으로 보고가 되었다(4, 21, 23). 현재 흥미로운 사실은 Tup1과 Ssn6와 유사성을 갖는 단백질들이 현재까지 유전자 혹은 게놈의 탐색이 가능한 진핵생물에는 공통적으로 존재하는 것이다 (Table 1). 즉 Ssn6-Tup1 복합체 체계는 진핵생물이 보편적으로 이용하는 공통 발현 억제 체계일 것으로 생각되고 있다(25).

Ssn6는 10개의 TPR (tetratricopeptide repeat) 부위를 보유한 것으로 보고되었다(4, 25). TPR 부위는 공통일치 서열이 WX2LGX2YX8AX3FX2AX4P(X, 정해지지 않은 아미노산)인 34개의 아미노산 잔기로 구성되어지고, 박테리아로부터 포유동물까지에 존재하는 많은 단백질 내에 존재하는 것으로 알려져 있다. TPR 부위를 보유한 단백질들은 일반적으로 3-19개의 TPR을 포함하는 것으로 나타났으며, TPR 부위의 유사성을 비교하면 일치하는 서열에 제한된 최소한의 유사도만 나타난다. 그러나 유사한 TPR 부위들을 TPR 단백질 사이에서 비교하면, 일치하는 서열 이상의 두드러진 유사도를 나타낸다. 이것은 TPR 부위에서 일치하는 서열은 단단하게 압축된 helix-turn-helix 도메인 형성을 위한 기능을 한다고 추측할 수 있고, 일치하는 서열 외부의 잔기들은 단백질 간의 상호작용에 관여한다고 추측할 수 있다. 각각의 TPR 부위들은 특별한 인식 단백질과 상호작용하고 광범위하게 세포 주기 조절, 전사, 스플라이싱(splicing) 또는 단백질 수송 등의 역할을 한다.

이 보고서는 *N. crassa*의 게놈 데이터베이스(7)로부터 TPR 부위를 보유한 단백질을 탐색한 후에, *S. cerevisiae* Ssn6와 유사도가 높은 단백질을 암호화하는 유전자를 클로닝하여 이 유전자가 결여되었을 경우에 성장 및 포자 형성에 미치는 영향을 연구한 결과를 기술한 것이다. 이 유전자가 RIP(12, 17) 과정을 통하여 돌연변이가 유도되었을 경우에 포자 형성 및 균사 성장에서 여러 다양한 표현형이 관찰되었음으로 이 유전자를 *rcm-1* (regulation of conidiation and morphology)이라 명명하였다.

Table 1. Eucaryotic homologs of *S. cerevisiae* Ssn6 and Tup1

Ssn6 homologs	Tup1 homologs
C. albicans Ssn6	*C. albicans* Tup1
C. elegans D2021	*C. elegans* Unc-37
D. discoideum TrfA	*D. discoideum* Tup1
D. melanogaster ?	*D. melanogaster* Groucho
H. sapiens UTX-TPR/UTY-TPR	*H. sapiens* HirA/TLE1
M. musculus UTX-TPR	*M. musculus* HirA
N. crassa RCM1	*N. crassa* RCO1

재료 및 방법

사용균주 및 배양

N. crassa OR-74 *A*를 야생형 균주로 사용하였다. 형질전환용 균주로는 *N. crassa* RLM35-35, *his-3 inl a* 균주(Stanford University의 Robert Metzenberg 교수 제공)를 사용하였으며, Vogel 최소배지 (5)에 히스티딘(500 μg/ml)과 이노시톨 (200 μg/ml)을 첨가한 배지에서 배양하였다. 교배형을 조사하기 위해서는 SC 배지에서 배양한 *N. crassa fl A*와 *N. crassa fl a*를 사용하였다(5). DNA 조작을 위해서는 *Escherichia coli* DH5α 균주가 사용되었으며 분자생물학의 기본적인 기술은 참고문헌 14를 따랐다.

rcm-1 염색체 DNA 및 cDNA의 분리 및 서열분석

Neurospora 게놈 프로젝트 데이터베이스 (7)의 분석을 통하여 얻어진 정보에 따라서 *rcm*-1의 염색체 유전자를 PCR로 증폭하기위한 프라이머 서열을 결정하였다. PCR을 통한 증폭을 위해서 먼저 Vogel's 배지에 배양된 *N. crassa* OR-74 *A* 균주로부터 염색체 DNA를 추출하였다. 추출한 염색체 DNA에서 *rcm-1* 유전자를 증폭하기 위한 PCR에서 염색체 DNA 100 ng, 5'-ATTGAATTCACGATGGTAGGTTCCGTGTCCGAG-3' 및 5'-ATTACGCGTGGTACACGGCAGATGATGTAATC-3'의 서열을 갖는 프라이머 각각 200 nM, dNTP 각 200 μM, 1.5 mM $MgCl_2$, 1.5 U *Taq* 중합효소(Promega)가 사용되었다. 각각의 프라이머 앞에는 제한효소부위가 삽입되었는데, 앞의 프라이머는 *Eco*RI 절단 부위가 삽입되었으며, 뒤 프라이머는 *Mlu*I 부위가 삽입되었다. PCR의 조건은 먼저 95°C에서 3분을 반응시킨 뒤에, 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 그리고 72°C에서 6분을 30회 반복하고, 마지막으로 72°C에서 5분을 처리하여 증폭을 완료하였다. PCR 결과로 얻어진 약 2.9 kb 길이의 DNA를 아가로즈 전기영동을 통해 확인하였다. PCR 증폭 DNA는 자동서열 분석기를 통하여 서열을 확인한 후에 pBLX-1의 *Eco*RI과 *Mlu*I부위로 삽입된 후에 *E. coli* DH5α로 형질전환 되어져 플라스미드인 pSR-rcm1이 조립되었다 (Fig. 1). *rcm-1* cDNA는 염색체 DNA를 증폭하기 위한 프라이머를 이용하여 Orbach 등에 의해서 조립된 cDNA 라이브러리 (18)를 주형으로 PCR 방법으로 증폭하거나 혹은 전체 RNA를 분리한 후에 RT-PCR 방법으로 증폭한 후에 클로닝하고 자동서열분석기를 통하여 서열을 결정하였다. 모든 DNA 서열 분석은 Hitachi 사의 DNASIS 프로그램으로 수행하였다.

염색체 DNA의 형질전환

pSR-rcm1을 *N. crassa* RLM35-35 *a*로 형질전환하기 위해 Margolin의 전기천공법을 변형하여 이용했다(15). 125 ml Erlenmeyer 플라스크에 히스티딘 (500 μg/ml), 이노시톨 (200 μg/ml), 1.5% 한천, 그리고 1.5% sucrose가 첨가된 Vogel 최소 배지

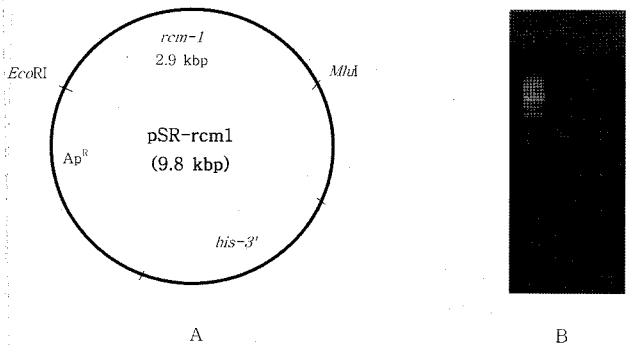

Fig. 1. Plasmid pSR-rcm1 used for *rcm*-1 RIP process. A. a 2.9 kbp PCR product containing *rcm-1* genomic DNA was inserted into a 6.9 kbp pBLX-1 plasmid, resulting in construction of a 9.8 kbp plasmid that can integrate into *his-3* locus. B. the agarose gel electrophoresis of pSR-rcm1 digested with *Eco*RI and *Mlu*I.

를 20 ml 넣어서 멸균 후에 *N. crassa* RLM35-35를 접종하였다. 30°C 배양기에서 3일간 빛이 없이 배양한 후, 25°C에서 빛을 12시간 간격으로 조사하며, 2주간 배양하였다. 배양으로 인해 형성된 대분생포자를 수집하고 멸균된 거즈를 통과시켜서, 균사를 제거하였다. 이후의 과정은 Margolin 등의 방법에 따라 진행하였으며 전기천공의 조건은 15 Volt/cm, 600 Ω, 25 μF의 조건을 이용하였다. 형질전환된 후에 균주들은 Vogel/sorbose 배지(2% sorbose, 0.05% 글루코오스, 0.05% 프룩토오스, 1.5% 한천, 2)에 이노시톨(200 μg/ml)을 첨가한 배지에 도말되었으며, 30°C에서 배양되어졌다. 형질전환체 균주를 이용하여 동종핵을 갖는 균주의 분리가 수행되었다.

동종핵(homokaryon) 균주 분리

*N. crassa*는 여러 개의 핵을 갖는 대분생포자를 형성하고, 형질전환 시에는 대부분 이 중에서 한 개의 핵에만 외부의 유전자가 도입된다. 따라서 순수한 동종핵 만을 갖는 균주의 분리가 필요한데 이를 위해서 Pandit 등의 방법을 이용하였다(19). 이를 위해서는 먼저 흰색 셀로판 종이를 1% KOH에 5분간 끓인 후, 3차 멸균 증류수에 3-4차례 세척한 후, 거즈에 싸서 멸균하여 2% 증류수 고체배지에 깔았다. 이 때 주의할 점은 2% 증류수 고체배지를 말리지 않고 수분을 충분히 가진 상태로 유지한 상태에서 균주를 접종해야한다는 점이다. 접종 후, 25°C 배양기에서 12시간 주기로 빛과 어둠을 반복하여 7-10일간 배양한 후, 셀로판 종이 위로 형성된 약간의 대분생포자를 70% 알코올 거즈로 닦은 후, 셀로판 종이를 제거하고 12-24시간 후, 1-2 ml 3차 멸균 증류수를 배지표면에 첨가 후, 멸균 면도날을 이용하여 소분생포자를 수거하며, 수거된 소분생포자는 Vogel/sorbose 최소배지에 도말 후에 다시 선별하였으며, 순수한 소분생포자만을 분리하기 위하여 이 과정을 2-3 차례 다시 반복하였다. 수거된 소분생포자는 광학현미경을 통하여, 균사의 오염정도를 관찰한 결과 심각한 오염을 발견할 수 없었다.

rcm-1 RIP 돌연변이체의 관찰

유성생식 교배 시에 발생하는 RIP 현상을 이용하여 *N. crassa rcm-1*의 돌연변이체를 얻고 표현형을 관찰하였다. *his-3* 부위에 추가로 *rcm-1* 염색체가 삽입된 동종핵 균주를 Vogel의 최소 배지에 이노시톨과 한천이 첨가된 배지에 접종한 후에, 30°C에서 약 1주일 정도 배양하고, SC 배지에 배양된 *N. crassa* OR-74 *A*와 교배하였다. 자낭으로부터 자낭포자를 1개씩 각 튜브로 옮긴 후에 65°C에서 25분간 가열하여 발아를 유도하였다. 발아된 균주를 30°C에서 배양하고 야생형과 다르게 성장하는 균주들을 형태별로 구분하였다. 균사의 성장 형태가 야생형과 다른 균주들은 RIP에 의해서 *rcm-1* 돌연변이체가 일어난 균주로 가정하고, 첫째로 이들을 형태별로 구분 배양하여 이들의 성장과정을 2일 단위로 사진을 촬영하여 관찰하였다. 또한 이들 *rcm-1* 돌연변이체의 성장 속도를 측정하기 위하여 CTT (Vogel 최소배지, 0.3% 글루코오스, 0.5% 아르기닌 HCl, 2% 한천)배지 약 5 ml 가량을 가는 관형태의 성장 튜브에 넣고, 한 쪽 끝에 균주를 접종하여 30°C에서 균사의 성장과정을 12시간 간격으로 측정하였다 (5). 균주의 교배형을 조사하기 위해서는 SC 배지에 배양된 *N. crassa fl A*와 *fl a*와 교배하여, 25°C에서 배양한 후에 자낭각의 발생 여부를 조사하였다.

결과 및 고찰

*N. crassa*의 TPR 단백질들

세균에서부터 포유류의 단백질에 걸쳐서 광범위하게 발견되는 TPR 단백질들은 매우 다양한 세포내의 활동에 참여하는 것으로 알려졌다(3, 25). 예로 TPR 부위를 보유한 단백질인 *Homo sapiens*의 PP5는 protein phosphatase의 기능을 갖는 것이 보고되었고(4), *Pichia pastoris*의 PAS8p는 단백질의 수송에 참여하는 것으로 알려졌다(26). 게놈 정보를 분석한 결과에 의하면 *N. crassa*에는 TPR 부위를 보유한 단백질이 최소 19종류 이상 존재하는 것으로 나타났다 (Table 2). 현재까지 보고된 TPR 단백질들에서 TPR 부위의 개수는 3-19개인 것으로 보고되었는데, *N. crassa*의 경우 컴퓨터의 분석에 의하면 고열에 대한 스트레스 단백질인 Sti1p와 유사성을 보이는 단백질은 2개의 TPR 부위를 가지고 있으며, *S. cerevisiae*의 Ski3p와 유사한 단백질의 경우에 11개를 보유하는 등 다양한 분포를 보였다(Table 2). *N. crassa*가 보유한 19종류의 TPR 단백질들의 가능한 기능들을 살펴보면 *S. cerevisiae*의 공통 발현 억제자인 Ssn6와 유사성을 보이는 단백질을 비롯하여, 세포 분열에 관여하는 단백질, 전사에 참여하는 단백질, 고열 등에 저항하기 위한 스트레스 단백질, 단백질 수송에 참여하는 단백질 등 세포의 다양한 생리 현상에 참여하는 것으로 나타났으며, 3종의 단백질은 현재까지 기능을 예측할 수가 없는 것으로 나타났다.

본 연구에서는 특히 *S. cerevisiae*를 비롯하여 많은 종류의 생명체에서 공통적인 전사 억제 인자로 활동하는 Ssn6과 유사도가 높은 단백질을 암호화하는 *N. crassa*의 유전자를 분리하여 돌연

Table 2. *Neurospora crassa* proteins containing TPR motifs

Loci	Number of TPRs[a]	Homologous proteins and functions	Identified species
NCU06842.2	10	General repressor protein Ssn6	*S. cerevisiae*
NCU10632.2	4	N-terminal aceyltransferase 1	*M. musculus*
NCU01174.2	6	Related to cell division control protein CDC23	*N. crassa*
NCU10273.2	3	Hsc70 co-chaperone	*A. fumigatus*
NCU00310.2	6	RNA Pol III subunit Tfc4p	*S. cerevisiae*
NCU00714.2	2	Heat shock protein Sti1p	*S. cerevisiae*
NCU09438.2	11	sRNA virus protection protein Ski3p	*S. cerevisiae*
NCU01315.2	5	UDP-N-Acetylglucosaminyltransferase	*N. crassa*
NCU01377.2	7	Anaphase control protein cut9	*N. crassa*
NCU01433.2	3	Serine/threonine phosphatase ppt1	*N. crassa*
NCU04245.2	9	Mitochondrial precursor import protein tom70	*N. crassa*
NCU00213.2	7	Nuclear protein for mitosis BimA	*E. nidulans*
NCU02960.2	4	Peroxysome targeting signal receptor Pas8p	*P. pastoris*
NCU00095.2	9	Triple-helical DNA-binding protein Cdp1	*A. fumigatus*
NCU00170.2	7	DnaJ and TPR domain protein	*A.fumigatus*
NCU02424.2	3	DnaK and TPR domain protein	*A. fumigatus*
NCU06340.2	3	Unknown function	
NCU08664.2	2	Unknown function	
NCU09658.2	3	Unknown function	

[a]Expected number of TPR motifs based on genome analyses

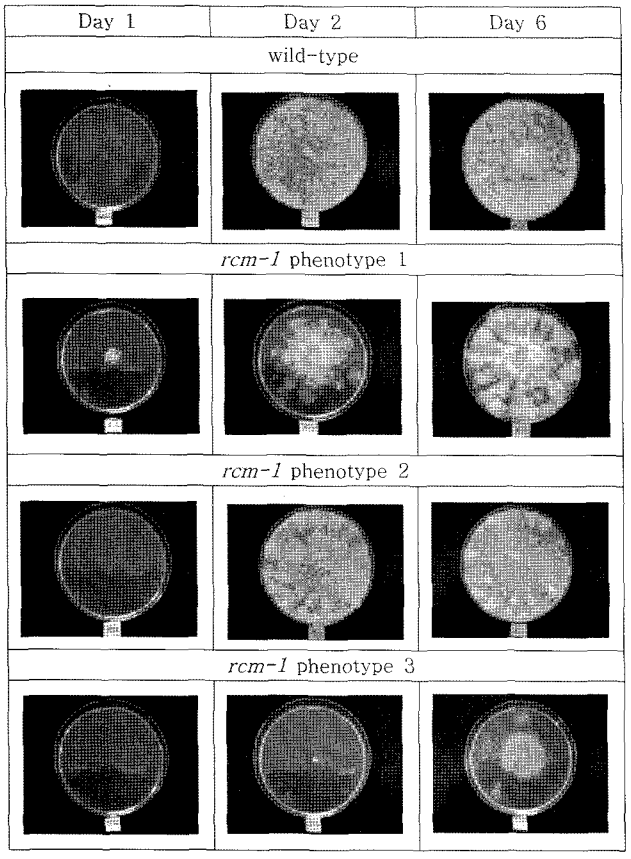

Fig. 2. Hyphal growth of potential *rcm-1* RIP mutants. Different growth patterns and rates are clearly seen.

변이를 유도함으로서 이 유전자가 성장, 무성생식 및 유성생식에 미치는 영향을 조사하였다. *S. cerevisiae*에서 Ssn6는 Tup1과 함께 복합체를 이루어, 교배 인자 a-특이성 유전자군, 포도당 억제 유전자군, 포자 형성 특이성 유전자군을 포함 하여 최소 10개의 다른 세포 활동에 관여하는 유전자군을 억제하는 것으로 밝혀져 있다(25). 따라서 *S. cerevisiae*에서 Ssn6 돌연변이체의 경우 매우 느린 성장 속도 및 유성생식 능력 결여 등 여러 형태의 표현형을 나타내는 것으로 보고되었다(27). *S. cerevisiae* 이외에도 점액균류(slime mold)인 *Dictyostelium discoideum*의 Ssn6 유사체인 TFRA 역시 정상적인 성장과 초기 발생 과정에 필수적인 것으로 보고되었으며(23), *Candida albicans*의 SSN6는 효모형과 균사형의 형태적 전환은 물론 병원성에도 관여하는 것으로 보고되었다(8).

염기서열 분석을 통한 RCM1의 특성

Orbach 등의 cDNA 라이브러리와 mRNA의 RT-PCR에 의해서 클로닝된 *rcm-1* 유전자의 cDNA와 인트론을 보유한 염색체의 서열을 비교 분석해 본 결과 *rcm-1* 유전자는 6개의 인트론을 가지고 있는 것으로 밝혀졌다(Fig. 3). 이는 인트론 및 엑손부위가 *N. crassa*의 게놈 프로젝트에 의해 보고된 서열 분석과 차이가 없음을 의미한다. RCM1 단백질의 서열 분석 결과 총 917개의 아미노산으로 구성되어 있고, 분자량이 102 kDa일 것으로 예상되었다(Fig. 3). RCM1은 전체적으로 *S. cerevisiae*의 Ssn6와 60% 이상의 유사도를 보였으며, 특히 N-말단 쪽에 존재하는 TPR 부위들은 Ssn6와 80% 이상의 유사성을 나타냈다(Fig. 4). 이는 왜 *rcm-1*의 RIP 돌연변이체들이 다양한 표현형을 나타내는지에 대한 설명이 된다. *S. cerevisiae*의 Ssn6은 다양한 세포 과정에 작

Fig. 3. Nucleotide sequence of *rcm-1*. A 3,142-bp sequence containing *rcm-1* is shown. Also shown is the predicted sequence of the corresponding RCM1 polypeptide. Underlined DNA sequences indicate six introns.

용하는데, 각 경우에 다른 TPR 부위들이 작용한다는 증거들이 보고되었다(10, 24, 27). 마찬가지로 RCM1도 돌연변이가 발생한 부위에 따라서 여러 종류의 표현형이 한 돌연변이체에서 관찰된다고 볼 수가 있다.

특이한 점은 Ssn6은 중간 부위에 다량의 글루타민(glutamine)이 존재하는 반면에 RCM1의 경우에는 다량의 프롤린(proline)이 존재하는 점이다. 이는 RCO1과 Tup1 간에도 관찰되었던 현상으로 *S. cerevisiae* Tup1과 유사성을 나타내는 *N. crassa*의 RCO1의 경우에도 Tup1과는 다르게 글루타민 대신에 다량의 프롤린을 갖는 부위가 존재하는 것으로 보고되었다(30). 다량의 프롤린(proline)이 존재하는 proline-rich region (PRR)을 갖는 단백질들은 원핵 및 진핵 생명체에 다양하게 분포하는 것으로 보고되었다 (28). 현재까지 PRR의 자세한 기능은 알려지지 않았지만 다른 단백질들과 상호 작용을 통하여 세포의 기능에 필수적인 역

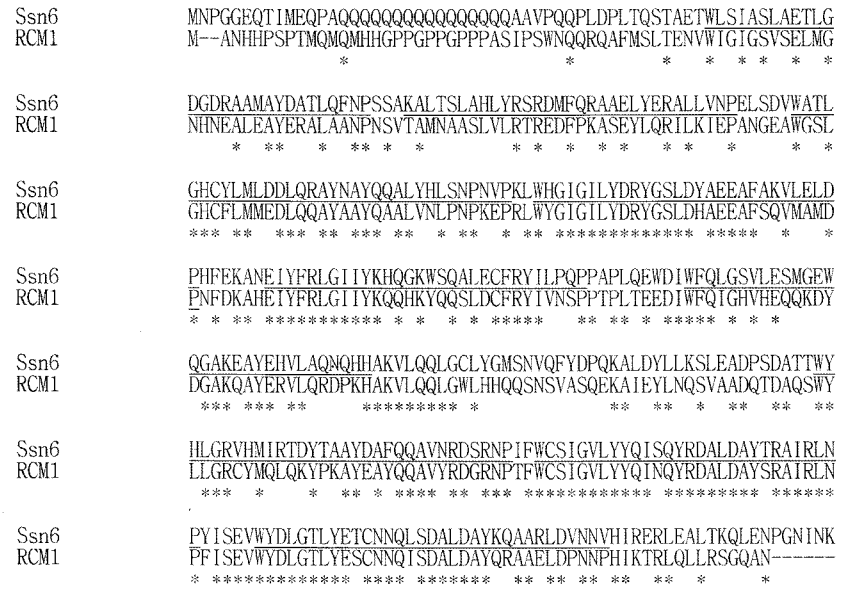

Fig. 4. Amino acid sequence comparison of the N-terminal portions of Ssn6 and RCM1. Asterisks mark identical residues. Underlined amino acid sequences indicate TPR motifs.

할을 한다는 것이 생각되고 있다(28). 예로 *Mus musculus*의 mSos1의 PRR은 SH3 (Src homology 3) 영역에 결합한다는 것이 알려졌다(22).

rcm-1 RIP 돌연변이체의 표현형

상기에서 언급하였듯이 Ssn6와 Tup1은 복합체를 이루어 세포의 다양한 과정을 억제하기 때문에 Ssn6나 Tup1에 돌연변이가 발생한 경우에 여러 가지 돌연변이 표현형이 관찰되었다(11). 따라서 *N. crassa* RCM1에 최소한 10개가 존재하는 것으로 생각되는 TPR 부위 및 C-말단 부위에 돌연변이가 발생하면, 정상적인 RCM1의 경우에 상호작용을 수행하던 여러 단백질들과 상호인식하지 못함으로써 여러 가지 다양한 돌연변이 표현형이 발생할 것으로 생각되었다. 이는 *S. cerevisiae*에서 Ssn6와 복합체를 이루어 공동으로 전사 억제 작용을 하는 Tup1과 높은 유사도를 보이는 *N. crassa* 단백질인 RCO1의 돌연변이체 연구에서도 관찰된 현상이다(30). *rco-1*의 돌연변이체들은 성장 속도가 야생형에 비해서 3배 이상 느리며, 무성생식 포자를 형성하지 못하거나 형성이 되어도 분리하지 못하는 표현형을 나타냈으며, 유성생식 시에는 female로서 기능을 하지 못하는 것으로 관찰되었다. 특히 흥미로운 것은 야생형의 균사 성장 방향은 시계 방향인데 반하여 반시계 방향으로 성장한 점이다. 또한 대개 무성생식포자인 대분생포자의 형성 시에 발현되는 *con* 유전자들이 영양이 풍부한 성장 상태에서도 발현되었다.

N. crassa rcm-1 유전자의 돌연변이를 유도하기 위해서 RIP 과정을 이용하였다. 6개의 인트론을 포함하는 2.9 kbp *rcm-1* 염색체 유전자를 pBULX-1 벡터로 삽입하여 pSR-rcm1을 조립하였는데, 이 벡터는 *his-3* 유전자의 일부를 보유하고 있음으로 상동성 유전자 재조합(homologous recombination)에 의해서 돌연변이를 갖는 *his-3* 염색체 부위에 도입되어 정상적인 *his-3* 유전자를 회복시킬 수가 있다(Fig. 1A, B). 따라서 전기천공법으로 pSR-rcm1이 도입된 대분생포자는 정상적인 *his-3* 유전자를 보유하게 됨으로 히스티딘이 첨가되지 않은 Vogel/sorbose 최소배지에서 생존할 수가 있다. *N. crassa*의 대분생포자는 다핵체(multinuclei)로서 형질전환 시에 하나의 핵으로만 원하는 유전자가 도입되는 경향이 있다. 하지만 순종의 교배를 위해서는 동종의 핵만으로 구성된 균주를 분리하는 과정이 필수적인데, 이는 1개의 핵만을 보유하는 소분생포자의 분리를 통하여 가능해진다.

rcm-1 유전자를 추가로 보유한 *N. crassa* RLM35-35 *a* 균주와 야생형인 OR-74 *A* 균주를 교배한 후에 자낭각에서 발사되는 자낭포자를 하나씩 분리하여 적정한 조건에서 발아시켰을 때, 조사된 547개의 자낭포자 중에서 451개가 발아하여 약 80% 정도의 발아율을 보였다. 이런 발아된 균주 중에서 균사의 성장 형태 및 속도, female 교배능 등을 조사하여 돌연변이를 분리한 경우에 약 20% 정도가 돌연변이 표현형을 나타냈는데, 일반적으로 RIP 과정을 통해서 예상되는 돌연변이율 25%보다는 다소 낮았다. 발생한 돌연변이형은 성장속도 및 형태에 따라서 4 종류의 다른 돌연변이 표현형으로 분류되어졌다. 돌연변이형이 차지하는 빈도수를 보면 각각 6%, 9%, 6% 및 1%였고, *rco-1*의 RIP 균주와 유사한 형태를 보이는 네 번째 돌연변이형이 가장 적게 생성됨을 알 수가 있다 (Table 3, Fig. 2).

형태적으로 다른 특징을 설명하면 첫 번째 *rcm-1* 돌연변이체의 표현형(Fig. 2)은 야생형에 비해 균사가 심하게 뭉쳐서 자라는 것을 볼 수 있다. 6일 이후로는 정상적으로 균사가 골고루 퍼져 자라면서 공기 중으로 균사를 형성하고 대분생포자를 만드는 야생형과는 다른 형태로 눈 결정과 흡사한 모양을 나타내며 대분생포자의 형성 또한 제대로 되지 못하고 주황색이 아니 노

Table 3. The numbers and percentages of mutants from *rcm-1* RIP cross

Total Germination	Mutant phenotypes			
	1	2	3	4
451[a] (82)[b]	33 (6)	50 (9)	34 (6)	5 (1)

[a]The number of ascospores
[b](ascospores/total ascospores) x 100.
Total 547 ascospores were tested.

Table 4. Summary of the characteristics of *rcm-1* mutants

Mutant types	Linear growth rate (mm/h)	Conidiation[a]	Female fertility[b]	Spiral growth[c]
wild-type	3.08	+	+	cw
1	0.8	*csp*	-	cw
2	1.36	+	-	cw
3	<0.1	*acon*	-	cw
4	1.58	*acon*	-	cw

[a]+, normal conidiation; *csp*, conidial separation; defective *acon*, aconidial
[b]+, fertile; -, sterile

란색을 띠는 것을 관찰 할 수 있었다. 이는 *ropy* 돌연변이체(29)와 유사한 균사 성장 형태로 볼 수 가 있으며 대분생포자의 색은 *yellow* 돌연변이와 유사하였다. 두 번째 *rcm-1* 돌연변이 표현형은 균사가 야생형처럼 골고루 퍼져 자라지 못하고 조금 뭉쳐 자라는 것을 볼 수 있지만, 균사가 모두 퍼진 후에 포자 형성과정에서 대분생포자는 야생형과 차이가 없어 보였다. 세 번째 *rcm-1* 돌연변이 표현형은 그림에서 보는 것과 같이 성장이 매우 느렸다. 균사가 퍼져 나가는 과정 또한 관찰 할 수 없을 정도로 굉장히 뭉쳐서 자라는 것을 볼 수 있다. 한 가지 주목할 점은 첫 번째와 세 번째 돌연변이체는 성장해 가는 과정에서 균사 성장과 다르게 다른 공간에서 새로운 균사의 성장을 관찰 할 수 있었는데, 처음에는 균주를 접종할 때 공기 중의 다른 포자에 의한 오염으로 생각하였으나, 반복 실험과 균사의 성장 속도를 측정하기 위한 실험에서도 균사의 성장 과정과는 상관없는 부분에서의 균사의 성장을 관찰 할 수 있었고, 이런 현상으로 인하여 성장속도 측정에서도 24시간 이상의 성장 속도를 측정하기가 곤란했다. 반복실험의 결과로 예측컨대, 균사가 성장해 가는 과정 중에서 포자형성을 일찍 하는 것이 아닌지 추측된다. 마지막 돌연변이형은 *rco-1* RIP 돌연변이와 거의 유사한 성장을 보였다(30). 균사가 고체 배지 표면을 얇게 덮는 형태로 성장하였으며 공기 중으로 균사를 뻗거나 대분생포자를 형성하는 것이 불가능하였다. 하지만 균사는 시계 방향으로 성장함으로 반시계 방향으로 성장하는 *rco-1* 돌연변이체와 구별되었다.

각각의 *rcm-1* 돌연변이 표형형별로 교배형을 구분하고 male과 female로서의 교배능력을 확인하기 위하여 *N. crassa fl A*와 *fl a*를 이용하였는데, 모든 돌연변이가 male으로서는 수정능을 보이나, female로서는 교배능력을 보이지 않는 것으로 나타났으며 자낭각을 전혀 형성하지 못하거나 형성을 하더라고 뚜렷하지 못했다(Table 4). 따라서 상기의 결과들은 *rcm-1*이 *rco-1*과 같이 무성생식과 유성생식에 모두 관여한다는 것을 보여준다. 유사하게 *Aspergillis nidulans*의 *stuA*와 *medA* 유전자들이 정상적인 무성생식 포자형성과 다른 교배형 간의 유성생식에 관여한다(18). 이는 아마도 진균류는 무성생식과 유성생식 포자형성 과정의 어떤 부분을 공유하고 있다는 의미가 될 수도 있다.

모든 돌연변이체들은 공통적으로 야생형에 비해서 느린 성장을 보였다. 각 표현형별로 성장 속도를 측정하기 위해서 CTT 배지를 담은 긴 튜브를 이용하였으며, 정확한 측정을 위하여 모두 같은 조건에서 만든 배지에 같은 시간대에 접종되었고 30°C 배양기에서 동시에 12 시간을 주기로 빛과 어둠을 반복하며 배양되어졌다. 성장속도는 매 12시간 간격으로 최고 36시간까지 측정되었다. 야생형의 균사 성장 속도는 시간 당 약 3 mm인데 반하여, 돌연변이체의 성장 속도는 가장 늦은 경우에는 0.1 mm/h의 속도를 보이고, 다른 돌연변체들도 약 0.8-1.6 mm/h 정도로 야생형과 비교하면 2배 이상 느린 성장을 보였다. 유일하게 대분생포자를 생산하는 능력을 보유하고 있던 두 번째 돌연변이체도 약 1.36 mm/h의 성장 속도를 보였다. 균사의 성장 방향을 배지 위에서 관찰하면 *N. crassa* OR74 *A* 같은 야생형 균주의 경우에는 시계 방향(clockwise)로 휘어지는 반면에 *rco-1* 돌연변이체들은 반시계 방향(counter clockwise)로 균사가 성장하는 것으로 밝혀졌다. 하지만 *rcm-1* 돌연변이체들은 야생형과 동일하게 모두 시계방향으로 균사가 성장하는 것으로 나타났는데 이는 *rcm-1* 유전자는 *rco-1* 유전자와는 다르게 균사의 성장 방향에는 관여하지 않는다는 의미이다.

RCO1과의 관계 및 과제

앞으로 수행되어야 할 과제는 첫째로 Ssn6와 유사도가 높은 RCM1이, *S. cerevisiae* Ssn6-Tup1 복합체가 공통 억제 인자의 기능처럼(21) Tup1에 높은 유사도를 보이는 RCO1과 실질적으로 상호작용을 하는가를 밝히는 것이다. 이를 위해서 *S. cerevisiae*의 two-hybrid system(6)을 이용하여 서로 간에 상호작용이 일어나는지 확인 중이다. 불행하게도 현재까지 밝혀진 것은 RCO1 단백질의 경우에 two-hybrid 플라스미드의 DNA의 결합 부위(DB)에만 융합한 경우(DB-RCO1)에도 단독으로 *lacZ*의 발현을 유발한다는 것(autoactivation)이다. 이는 RCO1이 S. *cerevisiae*의 전사조절 단백질들과 결합한다는 의미로서 RCO1-RCM1 상호작용을 조사하는데 어려움을 준다. 현재 RCM1의 TPR 부위를 DB 부위에 연결하는 실험을 수행하고 있다. 두 번째로 흥미로운 연구는 RCM1에 존재하는 각각의 TPR 부위가 *N. crassa*의 성장 및 생식에 어떤 영향을 미치는지에 관한 실험이다. 마지막 관심은 RCM1 및 RCO1이 *N. crassa*에서 어떤 단백질들과 상호작용을 하는지 밝히는 것이다. *S. cerevisiae*의 Ssn6-Tup1은 다양한 전사조절 단백질들과 상호작용을 하는데 *N. crassa*에는 *S. cerevisiae*의 이런 전사 조절 단백질들과 유사성을 보이는 단백질이 존재하지 않는다. 즉 Mcm1나 Mig1 등과 같이 *S. cerevisiae*의 Ssn6-Tup1 복합체와 상호작용을 하여 DNA에 결합함으로서 유전자 전사 억제에 참여하는 단백질들에 높은 유사도를 보이는 단백질

들이 *N. crassa*의 게놈에는 전혀 존재하지 않는 것으로 분석되었다. 이는 RCM1 혹은 RCO1은 아직까지 보고되지 않은 다른 형태와 종류의 단백질들과 상호작용을 한다는 의미일 수도 있다. 따라서 RCM1을 미끼로 하여 RCM1과 상호작용을 하는 *N. crassa*의 단백질들은 탐색하는 연구를 수행 중에 있다.

감사의 글

본 연구의 일부는 고신대학교 2005년 교내연구비에 의해서 수행되었음.

참고문헌

1. Berlin, V. and C. Yanofsky. 1985. Isolation and characterization of genes differentially expressed during conidiation of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 5, 849-855
2. Brockman, H.E. and F.J. DeSerres. 1963. "Sorbose toxicity" in *Neurospora crassa*. *Am. J. Bot.* 50, 709-714.
3. D'Andrea, L. D. and L. Regan. 2003. TPR proteins: the versatile helix. *TIBS* 28, 655-662.
4. Das, A.K., P.T.W. Cohen, and D. Barford. 1998. The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J.* 17, 1192-1199.
5. Davis, R.H. and F.J. de Serres. 1970. Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. *Methods Enzymol.* 27A, 79-143.
6. Field, S. and O. Song. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
7. Galagan J. E. *et al.* 2003. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* 422, 859-868.
8. Hwang, C.S., J.H. Oh, W.K. Huh, H.S. Yim, and S.O. Kang. 2003. Ssn6, an important factor for morphological conversion and virulence in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 47, 1029-1043.
9. Hynes, M.J. 2003. The *Neurospora crassa* genome opens up the world of filamentous fungi. *Genome Biol.* 4, 217.
10. Jabet, C., E.R. Sprague, A.P. VanDemark, and C. Wolberger. 2000. Characterization of the N-terminal domain of the yeast transcriptional repressor Tup1. *J. Biol. Chem.* 275, 9011-9018.
11. Keleher, C.A., M.J. Redd, J. Schultz, M. Carlson, and A.D. Johnson. 1992. Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell* 68, 709-719.
12. Kuldau, G.A., N.B. Raju, and N.L. Glass. 1998. Repeat-induced point mutations in *Pad-1*, a putative RNA splicing factor from *Neurospora crassa*, confer dominant lethal effects on ascus development. *Fungal Genet. Biol.* 23, 169-180.
13. Madi, L., D.J. Ebbole, B.T. White, and C. Yanofsky. 1994. mutants of *Neurospora crassa* that alter gene expression and conidia development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 6226-6230.
14. Maniatis T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. CSH, Cold Spring Harbor, New York.
15. Margolin, B.S., M. Freitag, and E.U. Selker. 1997. Improved plasmids for gene targeting at the *his-3* locus of *Neurospora crassa* by electroporation. *Fungal Genet. Newsl.* 44, 34-36.
16. Miller, K.Y., J. Wu, and B.L. Miller. 1992. StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes Dev.* 6, 1770-1782.
17. Noubissi, F.K., K. McCluskey, and D.P. Kasbekar. 2000. Repeat-induced point mutation (RIP) in crosses with wild-isolated strains of *Neurospora crassa*: evidence for dominant reduction of RIP. *Fungal Genet. Biol.* 31, 91-97.
18. Orbach, M.J., M. Sachs, and C. Yanofsky. 1990. The *Neurospora crassa arg-2* locus structure and expression of the gene encoding the small subunit of arginine-specific carbamoyl phosphate synthetase. *J. Biol. Chem.* 265, 10981-10987.
19. Pandit, A. and R. Maheshwari. 1993. A simple method of obtaining pure microconidia in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Newsl.* 40, 63-65.
20. Plamann, M., P.F. Mike, J.H. Tinsley, and K.S. Bruno. 1994. Cytoplasmic dynein and actin-related protein Arp1 are required for normal nuclear distribution in filamentous fungi. *J. Cell Biol.* 127:139-149.
21. Redd, M.J., M.B. Arnaud, and A.D. Johnson. 1997. A Complex composed of Tup1 and Ssn6 represses transcription *in Vitro*. *J. Biol. Chem.* 272:11193-11197.
22. Rozakis-Adcock, M., R. Fernley, J. Wade, T. Pawson, and D. Bowtell. 1993. The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* 363, 83-85.
23. Saito, J., T. Kon, A. Nagasaki, H. Adaci, and K. Sutoh. 1998. *Dictyostelium* TRFA Homologous to Yeast Ssn6 is required for normal growth and early development. *J. Biol. Chem.* 273, 24654-24659.
24. Smith, R.L. and A.D. Johnson. 2000. A sequence resembling a peroxisomal targeting sequence directs the interaction between the tetratricopeptide repeats of Ssn6 and the homeodomain α-2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 3901-3906.
25. Smith, R. L. and A. D. Johnson. 2000. Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *TIBS* 25, 325-330.
26. Terlecky, S.R., W.M. Nuttley, D. McCollum, E. Sock, and S. Subramani. 1995. The *Pichia pastoris* peroxisomal protein PAS8p is the receptor for the C-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal. *EMBO J.* 14, 3627-3634.
27. Tzamarias, D. and K. Struhl. 1995. Distinct TPR motifs of Cyc8 are involved in recruiting the Cyc8-Tup1 corepressor complex to differentially regulated promoters. *Genes Dev.* 9, 821-831.
28. Varanasi, U.S., M. Klis, P.B. Mikesell, and R.J. Trumbly. 1996. The Cyc8 (Ssn6)-Tup1 corepressor complex is composed of one Cyc8 and four Tup1 subunits. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6707-6714.
29. Williamson, M. P. 1994. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.* 297, 249-260.
30. Yamashiro, C.T., D.J. Ebbole, B.-U. Lee, R.E. Brown, C. Bourland, L. Madi, and C. Yanofsky. 1996. Characteristic of *rco-1* of *Neurospora crassa*, a pleiotropic gene affecting growth and development that encodes a homolog of Tup1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6218-6228.

(Received November 1, 2005/Accepted November 23, 2005)

ABSTRACT: Characterization of the *Neurospora crassa rcm-1* Mutants

Sang-Rae Kim and Bheong-Uk Lee* (Division of Biological Sciences, Kosin University, Busan 606-701, Korea)

Analysis of the complete genome of *Neurospora crassa* reveals that at least 19 proteins contain tetratricopeptide repeat (TPR) motifs. One of them shows over 60% homology to Ssn6 of *Saccharomyces cerevisiae*, a universal repressor that mediates repression of genes involved in various cellular processes. Mutant strains generated by RIP (repeat-induced point mutation) process showed four distinctive vegetative growth patterns and slow growth in various rates. Firstly, a mutant showed denser mycelial growth, *yellow*, *csp*, and looked like *ropy* mutant. Secondly, slower growth, dense mycelial, and conidial phenotype. Thirdly, extremely slower growth and aconidial. And finally, flat, little aerial hyphae, *acon*, and similar with a *rco-1* RIP mutant. They are all male-fertile, yet female-sterile and produced little or no perithecium. It seems that various phenotypes were occurred depending upon mostly likely, the degree of RIP. These results indicate that this gene may be involved in several cellular possess during vegetative growth, and asexual and sexual development. Therefore it is pleiotropic. Sequence analysis of cDNA shows that it encodes a putative 102 kDa protein composed of 917 amino acids, and has six introns. It is designated *rcm-1* (regulation of conidiation and morphology).