

## *Aspergillus nidulans*의 유성분화에 관여하는 *nsdC* 유전자의 분리 및 분석

김혜련 · 한동민\*

원광대학교 자연과학대학 생명과학부

사상성 진균인 *Aspergillus nidulans*에서 유성분화 초기단계, 또는 유성분화 유도를 위한 세포내 조건 형성 과정에 관여할 것으로 예상되는 유전자를 탐색하였다. 선행연구결과를 통해 유성분화를 전혀 하지 못하는 NSD (never in sexual development) 돌연변이주가 분리되어 *nsdA*, *nsdB*, *nsdC*, 그리고 *nsdD*의 4 상보군으로 동정된 바 있다. 본 연구에서는 이들 유전자 중 *nsdC* 유전자를 분리하고자 *A. nidulans* AMA1-Not I Genomic DNA library로 *nsdC6* 돌연변이균주를 형질전환하여 야생형처럼 유성분화를 할 수 있는 형질전환체를 분리하고 이들로부터 약 10 kb genomic DNA가 삽입된 library DNA를 분리하였다. Genomic priming system (GPS)을 이용하여 *nsdC6* 돌연변이를 상보하는 유전자의 부분 서열을 확보한 후 전체 DNA 염기서열을 결정하였다. 유전자 분석 결과 *nsdC*는 intron 없이 1,929염기(643개의 아미노산)로 구성된 Open reading frame (ORF)를 가지며, 약 1kb 정도의 비교적 긴 5'-UTR 부위에 2개의 intron을 가지고 있음이 확인되었다. 또한 NsdC polypeptide의 중앙에 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>HC 형태의 zinc finger DNA binding domain과 C 말단 부위에 coiled-coil domain이 존재하였다. *nsdC6* 돌연변이는 ORF의 407 bp와 408 bp 사이에 염기 T가 삽입되어 frameshift가 일어난 것으로 밝혀졌다. 따라서 *nsdC6* 돌연변이균주는 단지 139개 아미노산만 갖고 있는 결실 단백질이 생산됨을 알 수 있었다.

Key words □ *Aspergillus nidulans*, gene structure, *nsdC*, sexual development.

*A. nidulans*는 자가화합성 자낭균(homothallic ascomycetes)로서 무성생활사(asexual cycle)와 유성생활사(sexual cycle)를 모두 가지고 있으며 각 생식과정에는 독특한 기관의 형태발생이 수반된다. 무성생식과정을 통해 영양번식 균사(vegetative hyphae)로부터 족세포(foot cell), 분생포자경(conidiophore), vesicle, phialide로의 일련의 분화과정을 거쳐 최종적으로 분생포자(conidia)가 생성되는데 이 과정에 *bria*, *fluG*, *flbA* 등과 같은 많은 유전자들이 관여하는 것으로 밝혀졌다(1, 3, 11, 18). 유성생식 과정에서는 영양번식 균사가 융합되어 발생원기(primordia)가 형성되고 이것이 자낭구(cleistothecium)으로 분화되고 성숙해가면서 그 내부에 감수분열을 거친 자낭포자가 생성된다. 또한 자낭구 주변으로 포도송이처럼 Hülle cells이 발생하는데 이 세포들은 자낭구의 안정성 및 발생에 필요한 영양분의 공급과 관련이 있을 것으로 추정된다(19). 이러한 유성분화과정을 유도하는 signal이 무성분화의 경우와 동일한 세포내적 프로그램에 의해 초래되는지에 대해서는 알려진 바가 없으며, 다만 유성분화나 무성분화 모두 개체가 일정 시간 이상 성장하고, 또 공중균사(aerial mycelia)가 발생한 다음에야 유도되는 것으로 알려졌다(1). *Aspergillus*의 무성분화나 *Saccharomyces* 또는 *Neurospora*의 유성분화와 비교하여 *A. nidulans* 유성분화의 주요 특징은 영양분의 고갈이 아니라 오히려 충분한 양의 탄소원과 질소원에 의해 유성분화가 촉진된다는 점이다(8). 이러한 현상은 *A. nidulans*의 유성포자 형성이 좋지

않은 환경을 극복하기 위한 방법이기 보다는, 좋은 환경일 때 유전적으로 다양한 지수를 생산해내기 위한 방편일 가능성을 시사하고 있다.

Han 등(8)은 무성포자의 발생을 거의 억제하면서 유성분화에는 전혀 영향을 미치지 않는 조건을 설정하여, 이 조건하에서 유성분화 단계에 이상이 생긴 돌연변이주들을 대량 분리하였다. 그리고 이 유성분화 관련 돌연변이들을 크게 3군, 즉 유성분화가 전혀 일어나지 않는 NSD (Never in sexual Development), 유성분화 과정의 일정 단계에서 중단되는 BSD (Block in sexual Development), 그리고 유성분화 최종단계까지는 진행이 되지만, 그 양이나 생성시기가 야생형과 다른 ASD (Abnormal in sexual Development)로 분류하였다(8). 이 중에서 NSD에 속하는 돌연변이주들에 대한 유전학적 분석을 통해 3종의 상보군(*nsdA*, *nsdB*, *nsdD*)이 동정되었다(9). 이들 중 *nsdD* 유전자가 분리·분석되었는데 이 유전자산물은 GATA type zinc finger를 보유하고 있는 transcription factor일 것으로 추정되며 유성분화 활성화 기능을 갖고 있는 포지티브 조절자(positive regulator)로 밝혀졌다(10).

분석이 되어 있지 않던 NSD 돌연변이균주들(NSD113, NSD206, NSD207, NSD213, NSD216, NSD2100)로부터, 각 돌연변이의 유전학적 성상과 아울러 분화에 있어서의 형질에 대해 조사되어졌다. 최소배지에서의 NSD 돌연변이균주들의 성장속도는 야생형 균주의 53-72% 정도의 성장속도로 낮은 성장을 보였다. 또한, 최소배지에 효모추출물을 첨가한 배지에서도 야생형의 65-78% 정도의 낮은 성장속도를 보였다. *A. nidulans*의 야생형 균주 및 NSD 돌연변이균주들의 유성분화 양상을 관찰하였을 시 야생형

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 063-850-6220, Fax: 063-853-2516  
E-mail: dmhan@wonkwang.ac.kr

균주는 어느 조건에서도 유성분화 기관인 자낭구를 형성하였으나, NSD 돌연변이균주들은 일반 조건은 물론 유성분화 유도조건에서도 자낭구를 전혀 형성하지 못하였다. *A. nidulans*의 무성분화 기관인 분생포자병의 발생시간을 야생형 균주 및 NSD 돌연변이균주들에서 관찰하였을 시 NSD206, NSD207, NSD2100은 야생형 균주와 같은 시간인 28±1시간에 전체 콜로니 중 약 50% 정도의 콜로니에서 분생포자병이 발생하였다. NSD206의 돌연변이 유전자는 *nsdA4*, *nsdB5*, *nsdD19*의 돌연변이 유전자와 각각 상보되어 *nsdC6*라 명명되어졌고, 연관군 II에 연관됨이 결정되어졌다(5).

본 연구에서는 유성분화의 새로운 포지티브 조절자를 탐색의 일환으로서 *nsdC* 유전자를 분리하고자 하였다. 자가복제가 가능하여 형질전환율을 높인 pRG3-AMA1-NOT I library로 *nsdC6* 돌연변이주를 형질전환하여 이 돌연변이를 상보하는 유전자를 분리한 다음 염기서열을 결정하고 유전자의 구조적인 분석을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 벡터

*Aspergillus nidulans*의 야생형 균주는 Fungal Genetics Stock Center (FGSC, <http://www.fgsc.net>)에서 구입한 A4를 사용하였다. *nsdC* 돌연변이 균주로는 NSD206 (*nsdC*<sup>-</sup>)와 SSC014 (*nsdC*<sup>-</sup>, *argB*<sup>-</sup>) 그리고 *nsdC* 돌연변이를 상보할 수 있는 형질전환용 균주로 *pyrG89* 돌연변이를 가지고 있는 A773 (*pyrG89*<sup>-</sup>)과 SSC014 균주를 교배하여 얻어진 NSDP697 (*pyrG89*<sup>-</sup>, *nsdC*<sup>-</sup>)을 사용하였다. *Escherichia coli* 균주는 DH5 $\alpha$ 를 사용하였다. 본 실험에서 사용한 균주들의 유전자형과 벡터들은 Table 1에 정리하였다.

### 배지와 배양 조건

완전배지와(CM)와 최소배지(MM)는 Han 등(10)의 방법으로 준비하였다. *A. nidulans* 균주의 배양을 위해 주로 완전배지를 이용하였으며, 유전학적 분석을 위해서는 최소배지에 필요한 영양요구물이 첨가된 최소배지를 사용하였다. 접종용 무성포자는 3일간 배양한 배양접시로부터 0.1% Tween80으로 수확하여 사용하였다. *A. nidulans*는 보통 37°C에서 배양하였다. *E. coli* 균주들은 LB배지, ampicillin과 kanamycin이 첨가된 LB배지 또는 MacConkey agar배지에 배양하였다.

### 효소 및 시약

제한효소는 Roche (USA), Promega (USA), NEB (USA) 제품을 사용하였고 ligase는 T4 DNA ligase (Takara, Japan & Promega, USA)를 사용하였다. Reverse Transcriptase는 AMV (Roche, USA)를 사용하였다. 원형질체를 만들기 위해 Glucanex<sup>®</sup>200G (novozymes<sup>®</sup>, USA)를 사용하였고, BSA (Bovineserum albumin)는 SIGMA 제품을 사용하였다. Agarose gel은 Seakem<sup>®</sup> LE agarose (FMC, USA)를 사용하였으며, agarose gel로부터 DNA

**Table 1.** Strains and plasmid DNA

Strain	Genotype and description
<i>A. nidulans</i> strains	
A4 (FGSC4) <sup>a</sup>	wild type
A773 <sup>a</sup>	<i>pyrG89</i> ; <i>wA3 pyrA4</i> ; <i>veA1</i>
NSD206	<i>biA1</i> ; <i>nsdC6</i> ; <i>sB3</i> ; <i>chaA1</i>
SSC014	<i>biA1</i> ; <i>nsdC6</i> ; <i>argB2 methH2</i> ; <i>chaA1 veA1</i> (?)
HSY2	<i>anA1</i> ; $\Delta$ <i>argB::trpC</i>
NSDP697	<i>biA1 pyrG89</i> ; <i>nsdC6</i> ; <i>pyroA4</i>
NSDP6971	<i>biA1 pyrG89</i> ; <i>nsdC6</i> ; <i>pyroA4</i> (pNSDP6971)
GPS619	<i>biA1 pyrG89</i> ; <i>nsdC6</i> ; <i>pyroA4</i> (pGPS619)
GPS622	<i>biA1 pyrG89</i> ; <i>nsdC6</i> ; <i>pyroA4</i> (pGPS622)
GPS627	<i>biA1 pyrG89</i> ; <i>nsdC6</i> ; <i>pyroA4</i> (pGPS627)
<i>E. coli</i> strains	
DH5 $\alpha$	<i>upE44 <math>\Delta</math>lacU169 (<math>\phi</math>80 <math>\Delta</math>lacZ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>
Plasmid DNA	
pNSDP6971	About 10 kb <i>nsdC</i> genomic DNA screened from <i>AMA-Not I</i> library
pGPS619	pNSDP6971 gene targeting by GPS system
pGPS622	pNSDP6971 gene targeting by GPS system
pGPS627	pNSDP6971 gene targeting by GPS system

<sup>a</sup>Fungal Genetic Stock Center

정제는 UltraClean<sup>™</sup>15 DNA Purification Kit (MO BIO, USA)를 사용하였다. Plasmid DNA 추출은 Wizard<sup>®</sup> Plus SV Miniprep Kit (Promega, USA)를 사용하였다.

### DNA 추출

Subcoining을 수행하기 위한 plasmid DNA는 alkaline lysis 방법을 사용하였으며(16), 염기서열 분석을 위하여 Wizard<sup>®</sup> Plus SV Miniprep Kit (Promega, USA)로 plasmid DNA를 추출하였다. *A. nidulans* genomic DNA 추출은 Lee (13)의 방법을 이용하였다.

### *E. coli*와 *A. nidulans*의 형질전환

*E. coli*의 형질전환은 CaCl<sub>2</sub> 방법과 Electroporation 방법을 사용하였으며(16), *A. nidulans*의 형질전환은 Kim (12)의 방법을 변화시켜 사용하였다. 0.1% tween80으로 수확한 무성포자를 완전배지에 접종하여 16시간 배양한 균사체 덩어리를 증류수로 씻고 osmotic buffer (0.6 M KCl, 10 mM NaCl)로 다시 이용하여 2번 씻은 후, 차가운 osmotic buffer 10 ml과 Glucanex 1 g을 섞은 용액에 30°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 원형질체 분리 및 형질전환은 Kim (12)의 방법을 따랐다.

### GPS를 이용한 유전자 염기서열 분석

돌연변이 유전자의 분리 및 염기서열 분석은 transposon에 의한 유전자 결실을 응용한 GPS (Genome Priming system: NEB, USA)를 사용하여 수행하였다. 유전자의 돌연변이 유발을 위해 kanamycin 저항성과 DNA 양쪽 끝에 priming site를 갖는

transposon 요소 DNA 0.02  $\mu\text{g}$ 과 pNSDP6971 0.08  $\mu\text{g}$  그리고 transposase 1  $\mu\text{l}$ 을 혼합하였다. 혼합액을 37°C에서 10분간 반응시킨 후, start 용액 1  $\mu\text{l}$ 을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시키고, 효소를 불활성화하기 위해 75°C에서 10분간 반응하였다. 반응액으로 *E. coli* 형질전환체를 얻어 transposition된 plasmid DNA를 추출한 후, NSDP697를 형질전환 시켰다. *nsdC6* 돌연변이균주를 상보하지 않는 형질전환체를 분리하고 plasmid DNA를 Wizard® Plus SV Miniprep kit (Promega, USA)를 이용하여 추출하여 GPS 제품에 있는 N, S primer를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

#### 중합효소 연쇄반응(PCR) 수행과 Primers

중합효소 연쇄반응은 Han 등(10)의 방법에 따라 수행하였다. PCR과 RT-PCR을 수행하기 위해 rTaq, ExTaq 및 reverse transcriptase (TAKARA, Japan) 등의 효소를 사용하였다. 본 연구에서 사용된 primer들은 Table 2에 명시하였다.

### 결과 및 고찰

#### *nsdC* 유전자의 분리

AMA1서열이 존재하여 형질전환율이 월등히 향상되었다고 보고된 바 있는 *A. nidulans* AMA-NotI Genomic library (7)를 FGSC (Fungal Genomic Stock Center)에서 구입하여 *nsdC* 유전자의 분리에 이용하였다. 이 library의 vector에는 *A. nidulans*의 *pyrG89* 돌연변이를 상보할 수 있는 *Neurospora crassa*의 *pyr4* 유전자가 selectable marker로 존재하므로, *nsdC6* 돌연변이균주에 *pyrG89*를 도입한 NSDP697 균주를 형질전환 숙주로 사용하였다.

*nsdC* 유전자를 클로닝하기 위해, *A. nidulans* AMA1-NotI Genomic library DNA로 NSDP697 균주를 형질전환시켜 얻어진 *pyrG<sup>+</sup>* 형질전환체들을 완전배지에 점접종한 후, 37°C에서 4일간

Table 2. Oligonucleotide primers

Name	Sequence	Use
PC1	5'-GCC GAG CAT AAA GAA GCA-3'	Sequence, PCR
PC2	5'-TCG TTC ATC ATC TTC ATC-3'	Sequence, PCR
PC3	5'-CAA TAC AAT CGT GTC ATC-3'	Sequence
PC4	5'-GTT CCG TTC TCA GCA GTG-3'	Sequence
PC5	5'-AGT GCT TTC TTG TTT CTG-3'	Sequence
PC6	5'-GTC TTT CAC GCT ACC TCG-3'	Sequence
PC7	5'-TGG TTT CTC ATG GCA TTG-3'	Sequence
PC8	5'-GTG CTT GGA GAA CAG GAG-3'	Sequence
PC9	5'-CCT CTC AGA AAC GCC ATC-3'	Sequence
PC11	5'-CTT CAT CTC TTG TAC TCC-3'	Sequence
PC21	5'-GTC ATC AAC GGC ATC AAG-3'	Sequence, PCR
PC22	5'-CTA GCC ATA CAC TCC GAC-3'	Sequence, PCR
PC23	5'-GCT TCA TAC TGG TGA GCG-3'	Sequence, PCR
PC26	5'-CGA ACA GTC CCC TAC AGG-3'	PCR
PC47	5'-CTT CTT CCA ACT TCC TCC-3'	PCR

배양한 다음, 유성분화의 유·무를 관찰하였다. *nsdC6* 돌연변이균주인 형질전환 숙주 NSDP697은 유성분화를 전혀 못하는 것에 비해, 형질전환체들 중에서 정상적으로 유성분화를 하는 형질전환체 3개를 골라내었다. 이 형질전환체들이 *nsdC* 유전자를 포함하는 Genomic library DNA에 의해 정상적으로 유성분화를 하는 것인지 확인하기 위해, 이들로부터 genomic DNA를 추출하여 (13), *E. coli* 형질전환한 후 *E. coli* 형질전환체에서 plasmid DNA를 추출하였다. 이렇게 얻은 Genomic library plasmid를 pNSDP697이라 명명하고, 이 plasmid가 정말로 *nsdC* 돌연변이균주를 야생형처럼 형질전환시킬 수 있는 plasmid인지 확인하기 위해 NSDP697 균주에 다시 형질전환 하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, *nsdC6* 돌연변이균주(NSD206)는 유성분화를 전혀 하지 못하는 반면, pNSDP697을 *nsdC6* 돌연변이균주에 형질전

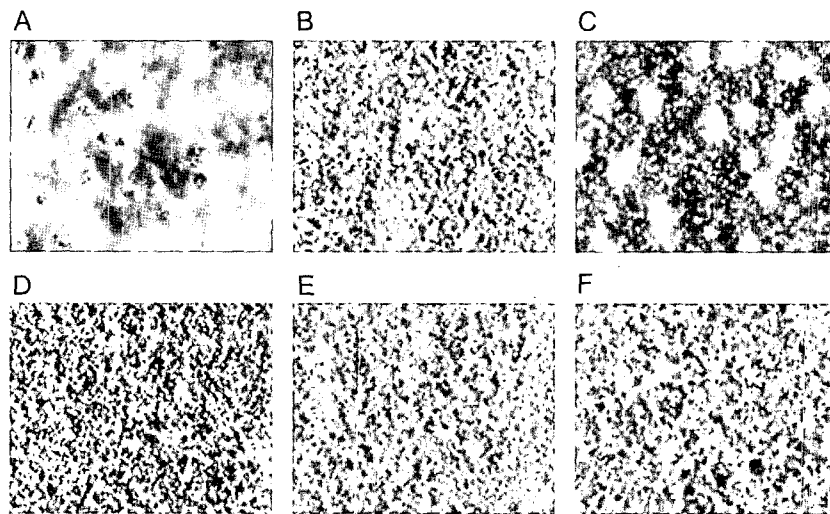
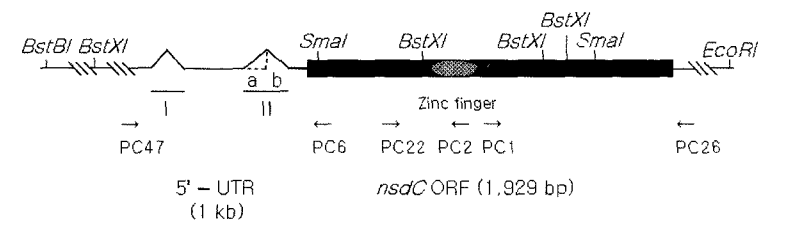


Fig. 1. Phenotypes of transformants targeted by GPS transposon. A; A4 (wild type), B; NSD206 (*nsdC6*), C; NSDP6971 (*nsdC6* mutant transformed with pNSDP6971 plasmid), D; GPS619, E; GPS622, F; GPS627. The photographs were taken from 72 hr cultures (magnification  $\times 30$ )

**A**

1 GCGTGTACAGAGTACATGATTGCCCGCTGTCGTACAGGGCCCTTTGTCGCCACTGGGTTGGCTCATCCCGGCATGGTC 80  
 81 TATATCTTGGCCGACCTACGCTCGCCCATCTAAAGGGAA\*GTTTGTATTGAGATGCTGCCTTGTTCAGGTCCCTACCTTT 160  
 161 TTCAATGACCTGAGTGTGTTGAC TGAAGCTGAAGCTGAGACTGGAGAGAAAAGTCACTGACCGGGAGCTGATCGTTAAAT 240  
 241 GGCACACAACCGGGCCGCTTTTACATATGTAATCAAGGGTGAATCAAACTTTGTAAATGAGCGGCTGCGTATGCAAG 320  
 321 TACAAGAGATGAAATCAATCTAATTTACAAGTCTCGCCCTGGTGGAGTCAACCGAATTTCACTAGGCGGG 400  
 401 GCGTTTGGCGGACGTTTACTAGAGAGCCCTTTCGCGCACTGATCGTCACTCCAGCCGCTTCTTCAACTTC 480  
 481 CTTCTCTTTTTCGCGCACTGTGACCTGTTACGTGATGTTCTGGCTCGCAGCTGCAATCCAAATTTTAAACC 560  
 561 AGCTCGTATATGCCATTTCCCTTTTCTTTCTTCTCCACACCCCTCGTCCGAACTTGCACCTCTCAGAAGCC 640  
 641 CATCATCTGCAGACCTATCTCGCTCGACCCAAACAGTCCGTTCCGTTCTCACTGATCTTGACATATACGGAATAC 720  
 721 CTGTACCAATCTATGCTCGCTGCTTACCATCAGTCCCAATCTCTGTTCTGACTAGTGGCCGATTACCTCCTTGGGA 800  
 801 TACTT... cgtaatctccctgtttgtctcgaccctgtttcttgagagcctcctgtctccaagcagcagatagtcgc 880  
 881 ccgtcaaacagggccgctcgtctccgtacctgtttataacaagctcggagctcgtctcgaatacgt... tcggtg 960  
 961 attgttttc... AGACGGAGCTTGTGGGCTCAGTCTACTAAGGATCGCCCGTCGCAACTTCTACCTGCAGTGCAGCCTA 1040  
 1041 GCTGAGCATCCGATCTCGCTGCGTTCGCGTACGGGCATCAAAGCTTTCCCAACCGATGGGTTGAATCTATAAAGAGT 1120  
 1121 GACAACTCTATACAGAGAGAAAAGAACGATTTCAATCTCTTGGTGAAGCTGATCAGTATCTGACGCTTCCGGGG 1200  
 1201 GTGCATCGTCTTGTTCCTGGCCCAATTTGTTCTAATAACTGCGAGGCTGAACCTCCAGCTTGCGCCACACTGCT. 1280  
 1281... ccacggcagcgcgctcttggagcctctcccaatcgtcttgccttggccttggcactcttcccttcttggagataatt 1360  
 1361 cctctggatccaaggtccgtctctcaaacctctccagtcagtgtttccaccccgagcagatccaacttccagctt 1440  
 1441 ccttggcagagagcctgctctcgtca... ttcgatsctc... CTCTTGGCCACTATCCATCGTTCGAGGT 1520  
 1521 AGCCTGAAAGACCCGGTACCATTGGCCGCTGATGACGTAACAACAGCGCCGCTGCCATCTCAACCCCTTTGACCCG 1600  
 1 M A A L M Q S N N E P V A I S T P L T A 20  
 1601 CTCATGGACCCGATGCTCGAGTTCGCCGGGATCTGCTACCTTTTAAACAGTCTAAACCTGACTCGAACCCTCACCT 1680  
 21 S S D P I A S S S P G S A T F L K Q S K P D S N L T 46  
 1681 CCATTCGCAACCGGGGTTAAACGTCAGCGGATCAAAGACTCTTACCAGGATGTCACCAACAGCAGTGCACAACTCT 1760  
 47 S I A N A G L N V T R S K D S L P A M S T T A V P N S 73  
 1761 GGCTCCGGGAGCGGCGAGCTCGAATCTCATAGAGATCGCGACAGGATAGCTCTCAGTTCGCGCGCAAGCGCTCGGCC 1840  
 74 G S A E R Q L E S H R D A D Q D S S Q V A R E A L G A 100  
 1841 TAGTGAGAAATCAGTCTAGCTCTGCTCGCGGACTCACTAGCCATACACTCCGACCAATGACAGTTCAGTCTCATCTCT 1920  
 101 S E K H Q S S S V G D S L A I H S D Q M Q V D S H P 126  
 1921 GTCCGGTGAAGCGGGCTCGGTTTCAACACTGCTGASACGGAAGTCTTAAATAACAGCTCGACTGTAGCAAGC 2000  
 127 G P G E A G D P V F N T A E N C T S L I N S S T V A S 153  
 2001 CCCGACCCATAGAAGTCTGCTCTCAGGACGCTGACCAACCGGCTCATCGAGAGCGGGGACTTGCATCAAGAAA 2080  
 154 P G P I E D S V S Q D G D Q P R H R D D G D L H Q E N 180  
 2081 TAATAACAAGCTTCTCATGCCCATGCTTACAGGGGCTTCAACGACCCCGGGCTGGTCTCAGCTTACCAAGCTCCG 2160  
 181 N N K A F S Y P M P T G A F N D P R R G L S L P S S 206  
 2161 GCCTCCACAGGCTGGTCAACGGTCTCCATCCGTAAGAAGTATAGATGCCCTAT TCGCAACGGAGTTCACAGGACAT 2240  
 207 G L H K A G Q R S P S A K K H R C P Y C A T E F T R H 233  
 2241 CACAACCTCAAAGCCACTCTCACACATAGTCAAGAGAAGCCGTTTGTATGCACGACTGTCAGTCAAGCTTCCGGGG 2320  
 234 H N L K S H L L T H S Q E K P F V C T T C Q S R F R R 260  
 2321 ACTTCATGACTCAAAGACACCAAAGCTTCACTAGTGGTAGCGACCCCAATATATGTCGAAGTCCGGGACGAGTTTG 2400  
 261 L H D L K R H Q K L H T G E R P H I C P K C G R R F 286  
 2401 CTCGGGTGATGCCCTTGGCGCTCAATAAGGGCCAGGCTGGCTGCTGCTGCTAGGGCCAGCATGGGAAGTTCAGCA 2480  
 287 A R G D A L A R H N K G Q G G C A G R R A S M G S Y A 313  
 2481 CCCAAGATGACTATGGTGAATGCCGAGCTGCTGGTCCGACGAGGCTATGGATGGGCTAGTTTACGCCGAGCCGGAAG 2560  
 314 P E D E Y G D A A A A G A D E A M D G L V Y A E P E R 340  
 2561 CATGGATGAAGTATGATCAACGACTTACACACTGCGGAGCTAAGAAGCTGATGTGCCCTCGGATCTGCGGCTCGCT 2640  
 341 M D E D D E R R Y N H P S I K H H R S V P S V R 366  
 2641 CAACAGCGTAAAGACTTCAAGCCGCTACACTAGCCTTACCCTCAATTCGCGGAGCAGCCCTCGCTGGCGGCT 2720  
 367 S N S V S S Y Q A R Q P S T Y D P I A A S F P S P G 393  
 2721 CTTTCCCTCCTTACAGCTCATGGCGGTTCTAGTCTCCCTTCCCATATCTCAGTCCGGGAATATGGCCTTCCG 2800  
 394 L F P P P T S H G G S S A S P S P I S Q S G N M A F P 420  
 2801 CTCGACAAACAGCCATCTGGCTCCCTGCTTTTGGCGCTTCAAACATGGCTGAAAGTCCAAGACCGCTCTCACGAGC 2880  
 421 S T N Q P S G S S A F A P S N M A E S P R P L S P N 446  
 2881 CACTATCTTCCCAACATAGGACACGGCGCGAAAACGCTCAACAATGCACCATCGCGCCCACTCTGCTGGAATCTCA 2960  
 447 A L S S H Q L G H G P E N G L O M H H R A H S A G I S 473  
 2961 CATCCATCCCTCAACATCATACAATCGTACAGGCCCTTCCAGGCTTCTCTTCCAACACACTGCAACGAGCTTAGG 3040  
 474 H P F P P Q Q S Y N R T G P S Q A S L S N H T A P S L G 500  
 3041 CTTTCCACCCTCAGCCGGGGCCCTCAACTCCGCGCCCTGCTGGGCTTGGGCTCTTGCAGCTCGTTTTTCCCTCC 3120  
 501 L P P P Q P G A P Q L P P P P P G L G S S E P R F S L 526  
 3121 ACTCGCAAAGCTCCGACGCTTCCGCTTCCGCGCTAAACATACGCCATCACATAGCCACTCGAATATCACGCTGGT 3200  
 527 H S Q S S V Q A S G S A A K H T P S H S H S S N H G 553  
 3201 TCTTTGACTTCCAAGACAATCCCGAAGCAGCATCAACGCATAACCTCCATACCTCAGCATCGGAGCTTTCGATCA 3280  
 554 S L T S K T I P E A A S T H N V H T S H D P S V F D Q 580  
 3281 GCAACGGAGCGGAGGAAGAAGCTTGGGAGTACATTCGCTCAGTTCATGAGGAACATAATGGACTCAAGTCCGGAGTAG 3360  
 581 Q R E R S E K L W E Y I R S H E E L N G I K S E V 608  
 3361 CACCCCTCAGGCAAGTGGCAGTCCGAGTGGAAAGCTGCACTAGCTCTGGTCTAGTGGTACACAATCATCAGTT 3440  
 609 A T L R A Q V A S S V N A S P T S G S S V T Q S S V 633  
 3441 GAGAGGGGACCAACAATACGGTCCACCGGTGAAGTCTATCTGACTGTGCGGCTCCGCCATGCTTACTGACTACCCCTGT 3520  
 634 E T G T T N T V Q R \* 643  
 3521 AGGGACTGTTCGCGGCTAATATGTTTCTAGCGCCACTTATGCTTGTGAATGATATATCATTCTACATGTTT 3600  
 3601 TATCTTGTGCGGTGATGACAGATGTTATGCAAAAGGGGCTTTTTCACTTGTTTGATGGGCTTTCGCTTATA 3680  
 3681 CCCAAACCTCGGTATATGGGAGAAAGTGTCTTCTGTTCTGTTCTCACTCAAGGGTATACATATATCTACGAGT 3760  
 3761 ACGGACATTTGTATGGTCTTACCTGGGATATAATTTCTTCTTCTTCTTCACTCAAGGGTATACATATATCTACGAGT 3840  
 3841 ACCTACATGTTTCTCATGGACTGCATTTATCCGAATTACCTGATATCTCCAATTTATGCAAGGTCATGATCA 3920  
 3921 AAGCGTCTGCTTTCGCAACCGCTCTGCGCGAGTCCGACTGCGCACGTGTCTGTACGAGTGGGCGGGCCGGGAGT 4000  
 4001 TTTGGTATGGAGTGTATAGATCTTCTAGCATCACTGGTCTGCGCAGTACCATGTTGTAATAAATAATGTTT 4080  
 4081 CTATTGAGTCGCTTFAAGGTAGGCAGCGTGAITCCAACATATATCCATGGAACATTCCCTCGAGTCTAGAATCGCC 4160  
 4161 TGGGAAAGTCTATTGGGTCAGAGTGTATCACTACTGGGCGGCGAGTGGTCCCGAGGCTTCAAGCAGGATCCGCGGG 4240  
 4241 CTTCCACTCTGGTAAACCGGATGTCACGGAGGCGCCAAAARCAAGAAACAGAGTGGAGTGTGAAAGTGAANA 4320  
 4321 GAAACAGCGAGTGTCAATTTGATGCTTTGAGAGGCTTAAAGCGCTTAAAGCGCTTAAAGCGCTTAAAGCGCTTAA 4400  
 4401 ATGGCTGCTATTAATATAGCAAAAGATAGCAACAATAAATTTACTTCTTAAAGTCTGACTGAGTNGATCAAT 4480  
 4481 GCTTTGCGCTTATTCTAGGATTTTACCAAGCAGGATAAAGGAGAGAGAGTGTGCTCACGCCGCTCGATCCGAT 4560  
 4561 TCTTAGCCAGTGGAGTGGGCTGGACCTTTCAGTACGATTTGATGAGTGGTGCAGACCCGACCTTTTACTGCAAGAA 4640  
 4641 CATAAATCATCTTTCGCCAATTTCTTCTGTACTCCGTACAACCTTTACACCTTTAAGGGAGAACACAATCTCTACCC 4720  
 4721 TCTTTCAGCCAGTCTACCTTTTCGTTCTTCTACTTCTCACTTGTGCGCTCTCTTCCCAAGATGACCGTCTACATAGC 4800  
 4801 TTCTGTACTAACCCCACTCTGCTTGTCTGCGAATTCACCCTGCT 4850

**B**



**Fig. 2.** Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *nsdC* gene. A. Nucleotide and deduced amino acid sequence. EST region is indicated by italic type. Intron I and Intron II denoted in lowercase. The predicted polypeptide sequence is shown below the nucleotide sequence. In amino acid sequences, conserved C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>HC Zn-finger region are shaded and conserved coiled-coil are underlined. Mutation site of *nsdC6* is indicated by arrow. B. Physical map of the *nsdC* gene. The *nsdC* gene has Intron I and Intron II. Intron II is spliced the alternative of a-b or b

환하여 얻은 형질전환체 NSDP6971은 야생형 균주(A4)처럼 유성분화를 하여 자낭구를 형성하는 것을 관찰하였다. 이 결과는 pNSDP6971 plasmid DNA가 *nsdC* 유전자를 포함하고 있다는 것을 의미한다.

### *nsdC* 유전자의 염기서열 결정

pNSDP6971 plasmid는 10 kb 정도의 *A. nidulans* genomic DNA를 가지고 있으므로, 먼저 transposon을 이용한 gene targeting 방법을 사용하여 *nsdC* 유전자를 포함하는 부위를 결정하였다. GPS (Genomic priming system) system을 사용하여 pNSDP6971 plasmid에 transposon이 무작위로 끼어들게 한 후, *E. coli*에 형질전환 하여 97개 plasmid DNA를 얻었다. 이렇게 얻은 plasmid들 중에서 transposon이 *nsdC* 유전자부위에 끼어들어가 *nsdC* 유전자가 파괴된 plasmid들로 *nsdC6* 돌연변이균주(NSDP697)를 형질전환 시켰을 때 유성분화 결함을 상보(complementation)하지 못할 것이다. 실제로 이 plasmid들을 *nsdC6* 돌연변이주(NSDP697)에 형질전환하여, 유성분화 결함을 상보하지 못하는 형질전환체를 3개 얻어내, 이들을 각각 GPS619, GPS622, 그리고 GPS627이라고 명명하였다. 3개의 형질전환체는 유성분화를 하지 못하여 자낭구를 형성하지 못하였다(Fig. 1). 여기서 얻어진 plasmid DNA를 각각 pGPS619, pGPS622, 그리고 pGPS627이라고 명명하였고, 이들을로부터 GPS system의 N, S primer를 사용하여 *nsdC* 유전자 일부의 염기서열을 결정하였다. 또한 이를 바탕으로 나머지 염기서열을 결정하기 위해 Specific primer PC1, PC2, PC3, PC4, PC5, PC6, PC7, PC8, PC9, PC11를 제작하였으며(Table 2), 제작한 primer를 이용해 pNSDP6971을 주형으로 총 4850 bp의 염기서열을 결정하였다(Fig. 2, 3).

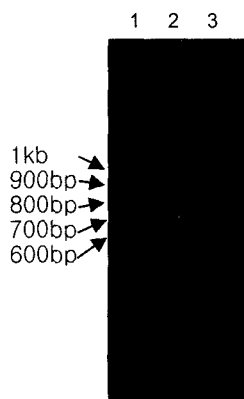
### *nsdC* 유전자의 구조 분석

결정된 염기서열을 *A. nidulans* genome database ([http://](http://www.broad.mit.edu)

[www.broad.mit.edu](http://www.broad.mit.edu))에서 검색한 결과 *nsdC*는 염색체 II의 contig 1.69에 위치하는 것이 확인되었다. Oklahoma 주립대학의 <http://www.fgsc.net> 사이트에 있는 *A. nidulans*의 Expressed Sequence Tag (EST)와 비교한 결과 *nsdC* ORF 부위와 동일한 EST (c9b10a1.f1, k5b08a1.r1, z4f05a1.f1)가 존재함을 확인하여 ORF를 유추할 수 있었다. 그리고 *nsdC* ORF 내 intron 분석을 위해 RT-PCR을 수행하였다. Primer는 Table 2에 명시되어 있는 PC47와 PC6, PC22와 PC2 그리고 PC1와 PC26의 조합을 이용하였다(Fig. 4). RT-PCR 산물을 agarose gel로부터 정제한 후, PC9, PC6, PC22, PC2, PC1, PC26 primer를 이용해 RT-PCR 산물의 염기서열을 결정하였다. 그 결과 primer 조합 PC22와 PC2, PC1과 PC26으로 증폭한 RT-PCR 산물의 염기서열은 대조균인 genomic DNA로 증폭된 PCR 산물의 염기서열과 같았다. 하지만 primer 조합 PC47, PC6으로 증폭한 RT-PCR 산물은 genomic DNA로 증폭된 PCR 산물과 차이가 있는 약 780 bp와 약 680 bp 산물을 만들었다(Fig. 3). 각각 염기서열 분석한 결과 *nsdC* 5'-UTR에 168 bp의 intron I과 212 bp intron II가 존재하고, intron II는 intron II의 114 bp만 splicing이 되는 경우(intron IIb)와 intron II 전체 212 bp가 splicing이 되는 경우(intron IIa-b)가 있었다. 약 780 bp 산물은 염기서열 결과 784 bp 임이 확인되었고 intron I과 intron IIb가 splicing되었다. 약 680 bp 산물은 686 bp였으며, intron I과 intron IIa-b가 splicing되었다(Fig. 2B). 따라서 *nsdC* ORF의 염기서열은 1,929개의 nucleotide로 643개의 아미노산을 암호화하고 있다. 종결코돈 TGA downstream 쪽으로 374 bp 부위에 transcription 종결 염기서열로 예상되는 TACAT가 확인되어 TACAT에서 transcription이 종결될 것으로 예상된다. *NsdC*의 아미노산 서열을 NCBI database에서 분석한 결과 아미노산 잔기에는 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>HC zinc finger domain이, [www.ch.embnet.org](http://www.ch.embnet.org)를 통하여 C 말단 부위에 coiled-coil domain이 존재함을 확인하였다(Fig. 3).

### *nsdC* 돌연변이 유전자의 염기서열 분석

NSD206의 돌연변이 유전자 *nsdC6*의 분석을 위해 Table 1에 명시되어 있는 PC9와 PC4, PC22와 PC2, PC23와 PC21의 primer 조합들을 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR product를 agarose gel로부터 정제한 후, PC4, PC22, PC21, PC23 primer를 이용하여 PCR product의 염기서열을 분석하였다. NSD206 돌연변이균주의 DNA로부터 PC22와 PC2 primer에 의해 증폭된 PCR product에서 *nsdC* ORF의 407 bp와 408 bp 사이에 염기 T가 삽입되었음을 확인하였다(Fig. 2A). 염기 T의 삽입으로 유전자의 암호해독과정에서 frameshift가 발생했을 것으로 예상된다. 이 결과 *nsdC6*는 139개 아미노산만으로 구성된 결실 단백질을 만들어 내었을 것으로 추측된다. *nsdC* ORF 내에 포함하고 있는 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>HC zinc finger domain을 만들어 내지 못하는 *nsdC* 돌연변이 균주는 전혀 유성분화를 못하는 표현형을 보인다(Fig. 1). 이 결과를 통해 *nsdC*의 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>HC zinc finger domain은 *A. nidulans*의 유성분화에 반드시 필요하다고 판단된다.



**Fig. 3.** Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products. lane 1, 100 bp DNA ladder; lane 2, RT-PCR product of wild type total RNA with primers of PC47 and PC6 (Table 2); lane 3, PCR product of wild type genomic DNA with primers of PC47 and PC6 (Table 2)

## 감사의 말

이 논문은 2005년도 원광대학교의 교비지원에 의해 수행되었습니다.

## 참고문헌

- Adams, T.H., J.K. Wieser, and J.H. Yu. 1998. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Rev.* 62, 35-54.
- 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.
- Boylan, M.T., P.M., Mirabito, C.E., Willett, C. R. Zimmerman, and W. E. Timberlake. 1987. Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* 7, 3113-3118.
- Champe, S.P., P. Rao, and A. Chang. 1987. An endogenous inducer of sexual development in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 133, 1383-1387.
- Cheong, S.S. 2000. MS. thesis. Study on the genes involved in the sexual development of *Aspergillus nidulans*. Wonkwang University, Chonbuk.
- Clutterbuck, A.J. 1969. A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 63, 317-327.
- Gems, D., I.L. Johnstone, and A.J. Clutterbuck. 1991. An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene* 98, 61-67.
- Han, D.M., Y.J. Han, Y.H. Lee, K.Y. Jahng, S.H. Jahng, and K.S. Chae. 1990. Inhibitory conditions of asexual development and their application for the screening of mutants defective in sexual development. *Kor. J. Mycol.* 18, 225-232.
- Han, D.M., Y.J. Han, J.H. Kim, K.Y. Jahng, Y.S. Chung, J.H. Chung, and K. S. Chae. 1994. Isolation and characterization of NSD mutants in *Aspergillus nidulans*. *Kor. J. Mycol.* 22, 1-8.
- 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.
- Johnstone, I.L., S.G. Hughes, and A.J. Clutterbuck. 1985. Cloning an *Aspergillus nidulans* developmental gene by transformation. *EMBO J.* 4, 1307-1311.
- Kim, J.H. 1994. MS. thesis. Isolation and characterization of *nsdD*<sup>+</sup> gene involved in early sexual development in *Aspergillus nidulans*. Wonkwang University, Chonbuk.
- Lee, B.N. and T.H. Adams. 1994. Over expression of *flbA*, an early regulator of *Aspergillus nidulans* asexual sporulation leads to activation of *brlA* and premature initiation of development. *Mol. Microbiol.* 14, 323-334.
- Navarro-Bordonaba, J. and T.H. Adams. 1994. Development of conidia and fruiting bodies in ascomycetes, p. 333-49. In J. G. H. Wessel and F. Meinhardt(ed.), Growth, differentiation, and sexuality, vol. 1. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany.
- 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, 141-38
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd ed. CSH.
- Yager, L. 1992. Early developmental events during asexual and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*, p. 19-1. In J. W. Bennet and M.A. Klich(ed.), *Aspergillus* biology and industrial applications. Butterworth-Heinemann, Boston, Mass, USA.
- Yu, J.H., J. Wieser, and T.H. Adams. 1996. The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G-protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J.* 15, 5184-5190.
- Zonneveld, B.J.M. 1977. Biochemistry and ultrastructure of sexual development in *Aspergillus*. In: Genetics and physiology of *Aspergillus*, J.E. Smith and J.A. Pateman eds. p. 59-80. Academic press. London, UK.

(Received September 22, 2006/Accepted November 29, 2006)

## ABSTRACT: Isolation and Characterization of the *nsdC* Gene in Sexual Development of *Aspergillus nidulans*

Hye-Ryun Kim and Dong-Min Han\* (Division of Life Sciences, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk 570-749, Korea)

A lot of mutants which cannot initiate sexual development were screened and several loci including *nsdA*, *nsdB*, *nsdC*, and *nsdD* were identified in homothallic ascomycetes *Aspergillus nidulans*. The NSD206, which has *nsdC6* allele, showed typical phenotype of NSD (Never in sexual development) mutants. The *nsdC* gene was cloned by transforming NSDP697 (*nsdC*<sup>-</sup>, *pryG*<sup>-</sup>) with AMA1-*NotI* genomic library. The transforming library DNA recovered from several transformants showing wild phenotype carried about 10 kb genomic DNA insert. The DNA sequence of *nsdC* was analysed using GPS (Genome priming system). The *nsdC* gene has an open reading frame (ORF) of 1,929 bp encoding a putative polypeptide of 643 amino acids. The NsdC carries C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>HC type zinc finger DNA binding domains in the middle of the polypeptide. A coiled-coil domain at its C terminus were also found. In *nsdC6* allele, a single T insertion was occurred between 407-408 bp leading to the frameshift mutation and early termination of translation producing the truncated protein which has only 139 amino acids.