

Aspergillus nidulans forkhead 유전자 *fkhE*의 구조와 기능 분석

박미혜 · 김현영 · 김종화 · 한갑훈*

우석대학교 제약공학과

Gene Structure and Function of *fkhE*, a Forkhead Gene in a Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*

Mi-Hye Park, Hyoun-Young Kim, Jong Hwa Kim and Kap-Hoon Han*

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

(Received December 13, 2010. Accepted December 21, 2010)

ABSTRACT: A homothallic filamentous fungus *Aspergillus nidulans* has been used as the a model organism for studying growth and development for eukaryotic system. Various studies about specific transcription factors have been performed for elucidating the molecular mechanisms of growth, asexual and sexual developmental processes. Among them, the *fkhE* gene (AN2025.3) is located in chromosome VII and contains an ORF encoding 718 amino acid polypeptide intervening with two short introns. The cDNA sequencing revealed that at least four types of alternative splicing events were occurred when the *fkhE* gene was transcribed. The putative FkhE polypeptide contains a conserved forkhead domain and a bipartite nuclear localization signal at it's N-terminus and C-terminus, respectively. Deletion of *fkhE* resulted in impaired conidiophore formation in a solid medium. However, the sexual developmental process or cleistothecia formation was normal. Furthermore, *fkhE* deletion mutant produced conidiophores and conidia under the submerged culture, indicating that the *fkhE* gene is involved in asexual developmental process similar to the *fkhF* gene.

KEYWORDS : Asexual development, *Aspergillus nidulans*, Forkhead, Transcription factor

서 론

모델 사상성 진균(filamentous fungi)인 *Aspergillus nidulans* (teleomorph: *Emericella nidulans*)는 성장과 분화과정에서 뚜렷한 형태발생이 일어나며 homothallic하여 서로 다른 mating partner가 없어도 유성분화를 진행할 수 있다. 또한, 외부 환경에 따라 유성 및 무성분화의 두 과정이 선택적으로 유도되기 때문에, 두 분화과정 사이의 상호 연계성 연구와 분화의 운명결정에 관여하는 유전자들에 대한 연구가 진행되어 오고 있다(Adams *et al.*, 1998; Han *et al.*, 2003). 뿐만 아니라, *A. nidulans*는 환경변화에 따른 세포 신호전달에 관여하는 새로운 유전자들을 발굴하고 연구하는데 있어서 매우 유용한 것으로 알려져 있다(Han and Prade, 2002).

최근의 연구결과에 의하면 *A. nidulans*에서 분화과정의 주된 조절은 heterotrimeric G-protein과 cAMP/PKA 및 MAP kinase를 통한 신호전달체계가 담당하고 있음이 밝혀졌으며, 특히 유성분화에 관여하는 G-protein 신호전달

시스템(G-protein coupled receptor; G protein-RGS interaction; PKA; MAP Kinase 등)이 속속 밝혀지고 있다(Chang *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2004). 또한 유성분화를 유도하는 필수적인 전사인자(transcription factor)가 돌연변이체를 이용한 연구들을 통하여 밝혀졌는데, *veA*와 *nsdD*, *nsdC* 등과 같은 중요한 유전자들이 분리 분석되었다(Han *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2009). 출아 효모 *Saccharomyces cerevisiae*의 분화에 중요한 역할을 하는 Ste12의 homolog인 SteA는 homoeodomain과 zinc finger domain을 지니고 있는 단백질로서 유성분화의 조절자 역할을 한다는 사실과, 아미노산 대사에 중요한 기능을 하는 COP9 signalosome의 구성요소들이 유성분화의 진행에 필수적이라는 사실들도 알려졌다(Busch *et al.*, 2003; Vallim *et al.*, 2000). 뿐만 아니라 진균 특이적인 Zn₂Cys₆ domain을 지닌 RosA는 유성분화의 억제자로 작용한다는 것이 밝혀졌다(Vienken *et al.*, 2005). *A. nidulans*의 무성분화는 유성분화에 비하여 상대적으로 많은 관련 유전자들이 밝혀졌으며, *brlA* 라는 전사요소의 발현이 그 핵심인 것으로 알려져 있다(Adams *et al.*, 1998).

뿐만 아니라, *A. nidulans*에서는 최근 forkhead 유전자중

*Corresponding author <E-mail : khhan@woosuk.ac.kr>

하나인 *fhpA*(=*fkhA*) 유전자가 유성분화에 관여하고 있으리라 추정된 연구가 보고되었다(Lee *et al.*, 2005). Forkhead (=winged-helix)형 전사인자들은 효모에서 사람에게 이르기까지 모든 진핵세포 생물에서 매우 다양한 세포반응과 분화과정에 관여하는 조절인자로 알려져 왔는데, Foxp3의 경우 regulatory T 세포의 분화와 기능에 매우 결정적인 역할을 하며 Foxp3 유전자 제거시 치명적인 자가면역반응인 림프세포증식 질환(lymphoproliferative disease)이 발병되는 것이 보고되어 있다(Ziegler, 2006). Foxm1(forkhead box m1)은 세포증식에 관련되어 있으며 DNA 복제와 유사분열에 필수적인 세포주기 관련 유전자들의 발현을 조절하고, 다양한 인간 암세포에서 발현이 증가하는 것이 알려졌다(Kim *et al.*, 2006). 또한 FoxO 계열의 단백질들은 growth arrest와 apoptosis를 조절하며, Phosphoinositide 3 kinase(PI3K)에 의해 저해되고 FoxO가 기능을 못하면 세포성장 조절이 일어나지 못하여 지방암 등 악성종양으로 발전한다(Reagan-Shaw and Ahmad, 2006). *S. cerevisiae*의 경우는 forkhead 유전자들이 세포 분열이나 유성생식 및 분화에 매우 깊은 관련이 있음이 알려져 왔고, 분열형 효모인 *Schizosaccharomycete pombe*에서도 이들의 homolog들이 거의 같은 기능을 수행한다는 것이 알려졌다. *S. pombe*의 *fkh1*, *fkh2* 유전자는 세포 주기 조절 및 유성분화에 관여하고(Szilagyi *et al.*, 2005), *S. cerevisiae* *fkh1*, *fkh2* 유전자들은 oxidative stress response에 중요하게 관여하는 것이 알려져 있다(Shapira *et al.*, 2004).

사상성 진균에서는 유일하게 *A. nidulans*에서만 일부 forkhead 유전자의 기능이 밝혀지기 시작했다. 최근에는 forkhead 유전자 *fkhA*가 유성분화에 깊이 관여하고 있으며 positive regulator로 작용할 가능성이 크다는 사실이 보고되었다(Lee *et al.*, 2005). 이 유전자는 over-expression library를 사용하여 과다발현을 통한 유성분화 관련 유전자들의 검색과정에서 분리되었는데, *fkhA* 유전자는 ORF를 포함한 전체 유전자가 inducible promoter인 *niiA*(p)에 역방향으로 삽입되어 있었으며, 형질전환체의 over-expression 된 표현형이 유성분화를 전혀 하지 못하는 것으로 밝혀졌다. 이는 역방향으로 들어간 *fkhA*의 ORF에서 antisense transcript가 만들어져서 정상 *fkhA* mRNA의 기능을 repression 한 결과로 추정하고 있다(Lee *et al.*, 2005). 또한, *A. nidulans*에서만 특이적으로 발견된 *fkhF*는 유성분화가 아닌 무성분화 과정에 관여할 가능성이 높은 것으로 알려졌다(Park *et al.*, 2009).

본 연구에서는 *A. nidulans*에서 무성분화에 관여할 것으로 추정되는 *fkhF* 유전자와 매우 높은 상동성을 보이는 forkhead 유전자인 *fkhE*(AN2025.3)를 대상으로 하여 그 발현 및 유전자의 기능을 확인하고자 하였다. 이를 위하여 *fkhE* 유전자의 cDNA를 확보하여 엑손-인트론의 구조를 분석하였으며, *fkhE* 유전자를 제거한 돌연변이체를 제조하였다. 돌연변이체의 형질을 관찰한 결과 이 유전자는 *fkhF*와 매우 유사하게 무성분화에 관련을 하고 있음을 보여주었다.

재료 및 방법

균주, 배지, 배양조건 및 형질전환

*A. nidulans*의 야생형 균주로 Fungal Genetics Stock Center (FGSC)에서 FGSC A4를 분양받아 사용하였으며 유전자 결손 실험용 형질전환 균주로는 *A. nidulans* A1145(*pyrG89*; *pyrA4*; *nkuA*; *argB*; *riboB2*)를 사용하였다. 재조합 plasmid DNA 제작과 DNA 증폭을 위한 벡터는 pJET1.2(Fermentas, Canada)를 사용하였다. *Escherichia coli*는 DH5 α 를 사용하였다.

*A. nidulans*의 배양을 위한 완전배지(CM)와 최소배지(MM)는 Han *et al.* (2001)의 방법으로 준비하였다. *A. nidulans* 균주는 완전배지에 접종하여 37°C에서 3일간 배양하였으며, 유전학적 분석을 위해서는 필요한 영양요구물이 첨가된 최소배지를 사용하였다. *E. coli*는 ampicillin(100 μ g/ml)이 첨가된 LB 배지에서 배양하였다. *A. nidulans*의 형질전환은 Tilburn *et al.* (1983) 또는 Han *et al.* (2001)의 방법을 사용하였다.

DNA 추출 및 조작

A. nidulans 형질전환체로부터 증합효소 연쇄반응(PCR)이나 Southern 분석을 수행하기 위한 유전체 DNA 추출은 말린 균사체 가루 20~60 mg을 미량튜브에 담아 400 μ l의 lysis buffer[50 mM Tris-Cl(pH8.0), 50 mM EDTA(pH8.0), 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 (Yu *et al.*, 2004)을 수행하였다. 먼저 AN2025.3을 제거하기 위해 *fkhE1*, *fkhE2* primers(Table 1)로 5'-flanking region을, *fkhE3*, *fkhE4* primers(Table 1)로 3'-flanking region을 증폭할 수 있도록 PCR을 수행하였고 *A. fumigatus pryG* 유전자에서 *pyrG* Forward, *pyrG* Reverse primers(Table 1)로 PCR을 수행하여 첫 번째 PCR 산물을 얻어냈다. 두 번째 PCR은 첫 번째에서 얻어진 3 종류의 절편을 이용하여 융합하는 PCR을 수행하였고, 마지막 단계로 annealing한 PCR 혼합물을 주형으로 하고 nested primer(Table 1)로 PCR하여 *fkhE* 유전자 제거를 위한 PCR 최종산물을 제조한 다음, 이를 이용하여 host 균주인 A1145를 형질전환하였다.

Southern 혼성화

A. nidulans 야생형과 *fkhE* 결손 돌연변이의 유전체 DNA를 추출하여 *Bam*HI 처리 후 0.7% TAE 아가로스 젤에서 DNA를 전기영동하여 0.4 N NaOH를 이용한 downward capillary 이동 방법을 통해 QIABRANE-N⁺(Qiagen, Germany)으로 이동시켰다. DNA를 이동시킨 후, cross linking을 위하여 UV를 처리하였다. 탐침 labelling, Hybridization, Washing 그리고 Signal detection은 DIG High Prime DNA Labeling and

Detection Starter Kit II(Roche, Germany) 방법에 따라 수행하였다. 이렇게 제작된 membrane을 KODAK BioMax MS film(Kodak, USA)에 2시간 실온에서 노출시킨 후 현상하였다.

표현형 관찰

최소 배지에 *A. nidulans* 야생형과 *fkhE* 결손 형질전환체를 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 *fkhE* 결손 형질전환체의 무성포자를 0.01% Tween 80으로 수확하여 glucose 1%의 액상 최소배지에 1.0×10^6 cells/ml이 되게 접종하고 24시간 37°C에서 진탕배양하여 비교 관찰하였다.

결과 및 고찰

*A. nidulans*의 *fkhE* forkhead 유전자의 구조 및 염기서열분석

일반적으로 진핵생물에서 forkhead 유전자가 분화 및 세포조절에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있고 효모 등에서는 일부 기능이 알려져 있으나 사상성 진균(filamentous fungi)에서는 유전자에 대한 정보나 기작이 아직 많이 알려져 있지 않다. 최근의 보고에 의하면, *A. nidulans*에서는 6개의 forkhead 유전자가 발견되었으며 이들 가운데에서 AN2025.3과 AN8949.3은 다른 효모 및 사상성 진균에서는 발견되지 않는 특이적인 유전자들이 확인되었고, 이들을 AN2025.3는 *fkhE*로, 그리고 AN8949.3는 *fkhF*로 각각 명명한 바 있다 (Park *et al.*, 2009). 본 연구에서는 *A. nidulans*에 특이적으로 발견되는 *fkhE*에 관하여 연구를 수행하기 위해 이 유전자에

대한 유전체 및 cDNA 염기서열 분석을 실시하였다.

먼저 *fkhE* 유전자는 NCBI의 *A. nidulans* genome database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/aspergillus/>)와 Broad Institute의 데이터베이스 (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group/MultiHome.html)를 이용하여 검색하여, 염색체 7번에 위치하고 있는 AN2025.3 유전자로 annotation 되어 있는 것을 확인하였다. 이 데이터베이스에 따르면 *fkhE* 유전자는 2개의 인트론과 3개의 엑손으로 구성되어 있고 인트론은 239 bp와 135 bp의 크기를 가지고 있으며, ORF는 627개의 아미노산을 암호화하고 있는 것으로 추정되었다. 그러나, 이를 확인하기 위하여 RT-PCR을 통하여 cDNA를 확보하여 유전자 구조를 분석해 본 결과 *fkhE*는 예상보다 짧은 2개의 인트론을 가지고 있으며 1455 bp에 유전체 염기서열분석에서는 빠져있는 염기 'T'가 추가되어 있는 것을 발견하였다(Fig. 1). Fig. 1에서 보는바와 같이 *fkhE*의 ORF는 1233 bp에서 1281 bp까지 49 bp의 첫 번째 인트론(인트론 I)과 1467 bp에서 1515 bp까지 49 bp의 두 번째 인트론(인트론 II)으로 구성되어 있으며 718개의 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화하고 있는 것으로 밝혀졌다. 이 예상된 FkhE 단백질중에 forkhead 도메인은 N 말단의 130-205번 아미노산에 존재하고 있는 것으로 pfam 및 smart (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 검색 결과 드러났다. 또한 이러한 forkhead 단백질은 전사요소(transcription factor)로서 기능을 하리라 예상되는데, FkhE 단백질의 359-375 아미노산에 단백질이 핵 내로 이동할 때 필요한 bipartite nuclear localization signal(NLS)이 존재하는 것이 밝혀졌다(Fig. 1).

fkhE 유전자의 mRNA 분석

fkhE 유전자의 구조를 분석하기 위하여 cDNA 확보를

Table 1. Oligonucleotide primers used in this study

Name	Sequences(5'-3')
fkhE 5' For	GCGAGGCCTGATATGGATGAG
fkhE 5' Rev (pyrGtail)	GGTGAAGAGCATTTGTTTGAGGCAGGGTACTCTGCGCAACGAAG
fkhE 3' For (pyrGtail)	AGTGCCTCCTCTCAGACAGAATTTGACGAGATCGCAGTAGGCA
fkhE 3' Rev	AAGCCCTCGCCTCAAACCTTCT
fkhE 5' nest	CACGGCCGAAATCCCTTGTAT
fkhE 3' nest	CCGGTGAGTGAAGTAGCCGAC
pyrG Forward	GCCTCAAACAATGCTCTTCACC
pyrG Reverse	ATTCTGTCTGAGAGGAGGCACT
fkhE RT For-2	CCTTTCCCAAACCTGCCACAAC
fkhE RT Rev-2	CGCATAAACAAGTGCCAGATCC
fkhE RT GAP	CCGCGTCTGTATTATCAT
fkhE RT GAP Rev	ATCCTCCCTCGGTATCGT
fkhE ENTR For	CACCATGAGCGCTACCAGCCCC
fkhE ENTR Rev	GCAACTACTGAAGACGAA

통하여 mRNA 구조를 조사하는 과정에서 일부 mRNA는 정상적으로 인트론을 제거하지 못하거나 splicing 양상이 서로 다르다는 것이 밝혀졌다. 인트론의 구조를 조사하기에 앞서 대략적인 5'-UTR(untranslated region)을 알아보기 위하여 ORF의 5'-flanking 부위의 두군데에서 프라이머를 제작하여 RT-PCR을 수행한 결과 번역개시코돈인 ATG를 기준으로 -115 bp에서 시작하는 프라이머를 사용하면 cDNA가 증폭 되지 않는데 반하여 -58 bp에서 시작하는 프라이머를 사용한 PCR에서는 cDNA가 증폭되는 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 2).

ATGAGCGCTACCAGCCCCTCAAGACATCGACCGATATCGTTTGTGGGAAAGTGGCTGGAT 60
 M S A T S P S R H R P I S F V G K W L D 20

ACGATAGAAGAAACAGCGGCCACCACAGTCCAATAGCTACCCCGGCCGAGGTCTTTACCA 120
 T I E E T A A P Q S T S Y P G R R S L P 40

CGTTTCGAGCAAACTAAACCTCACTGGGTCCACTCGTTTGGCCACCGCCGCGACAATAT 180
 R S S K S N L T G S T L V G P R R R Q Y 60

ACCGGTATCTCTAGATACTCGTCTGTGGTCTACGTCGAGTCCGCGGCCTAGATA 240
 T G I S L D T R P R V V Y V E S A S P R 80

AAGAGCAGAAAAGACGCGCTTCCGCGCCGCTTTTACAGCTGGAAGGCCACTCTTACCACG 300
 K S R K D A F R A V F H S W K A T L T T 100

CGGACAACGAGCCATGAAGCCTTCCAGCAGCCCTTCGCGATAACCCCGAGCTCGCCATT 360
 R T T S H E A F P A A L R D N P E L A I 120

GCAGAGCTCAGCTCGCATTTTCCGCCAACCTTGGCGTCTTAATCGAGCGCGCTCGCGG 420
 A E L S S H L S A N F A V L I E A A L R 140

AACAGCCCGTCAAAGCGCTGTCTGCTCGCCAGATATGCAAGGAGATCATGCGAGCGGAT 480
 N S P S K A L S A R Q I C K E I M R A D 160

CATTGGTACCGCGCCATAAAGAAATTCGGTGGCAGGAATGTGTCCGCGCGGAACCTTTC 540
 H W Y R A H K K F G W E C V A R E L S 180

TCGAACCCCGTGTCCAACCGGTATCGAATGCGCCAGGGTAGGGTTAGGAATAAGGGG 600
 S N P V F Q P V I E C R Q G R V R N K G 200

GTGAAGTGGCAACTCACCGCAGTTGATCCTTCTTGGCATTACGACTGCTCCCTGGCGG 660
 V K W Q L T A V D P S L A I T T A P W R 220

GCGCCGCGAATTCGGTTCCTTCCGCTGGAGCTATCAACTGAAGCGGAATCTACTGAG 720
 A P R N S V P Y P L E L S T E A E S T E 240

AGGCAGATGGAGCAGTCCGCGCTGAAGTACAGCACGCGCAAGCTCCTCGTCCGCTCT 780
 R Q M E Q S R P E G T D T P Q A P R P S 260

TTAGCGCGCTTGGCCACCGGCTGTATTATCATCGACACTACCCCTACATCCTCAACCT 840
 L A A L A T A S V L S S T L P L H P Q P 280

GCGGAAGATCCAATCGAAAGAAAGAGGGCTTGGTATCCTTTACGGCACTTGGCCCTTCT 900
 A E D P I A K K E A L V S F T A L G P S 300

CGTAGCCCGCGATAATATCATACAAGTATGCGCTCCACCTTCGCCACAGTCTGGTGAG 960
 R S P A I I S Y N D A P P P S H Q S G E 320

AATGTATTGAGCCTGACAAGCCGACGATACCGAGGGAGGATCGGAGCTGCCTCGAGGT 1020
 N V F R P D K A D D T E G G S E L P R G 340

CGCGGATCGAATGATGAGCAAAAGCACCCCTGGACGCGAGTACGGCAATGAAAATAGGAAG 1080
 R G S N D E Q K H P G R S D G N E N R K 360

CGCCAGCGATTATCCTCGCCTGAAGGCAAGGTCCAGACGCAAAATTTGCGTGCCTCTAT 1140
 R Q R L S S P E R T R S R R K F A C V Y 380

CACAAA7ACGACCTATCACTACAGCAGGTACACACTGTTAGATACCGGACCTCGCATG 1200
 H K Y D P I T Y S S V H T V R Y R T C M 400

GGTCCGGGCTCAAATATGTGCTGAGCTCAGCGAGTATCGCCACCTTCAGCTCTTTC 1260
 G P G F K Y V S E L S 411

ACATTGCTCACTGACCATTTAGCGCCACCTAGAGCGTAGCCACCAAGAATATGTGCGCC 1320
 R H L E R S H Q E Y V C A 424

GAAGTGCCTGCGCACTATGACAATGTCTGTGTTTACAACATCCAGCAGAGCAATTGTAT 1380
 K C L R H Y D N V S V Y N I H A E H C I 444

Fig. 1. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the *fhkE* gene. Underlined nucleotide sequences indicate introns I and II, and dashed sequence indicated alternative splicing region found in intron I. Italicized amino acid sequence and underlined sequence indicate conserved forkhead domain and bipartite nuclear localization signal, respectively.

CGTAGCCCGAGTTATAGTCAAGAACAAGGGTGGGAAATGCTGTGGAGATTCAGATTC 1440
 V R P S Y S Q E Q G W E M L W R F R F P 464

GCATGACCCGTGTTCCAGATGACATCTGATTGGACCTGCCTGCCCGTTGTTGATTCCTGA 1500
 H D P V P D D I 472

CTGATTTTGAGATAGATAATTTACCGGTGCCCGCCTCTACGGCCTCAACTACCTCGCC 1560
 Y I S P V P P P L R P Q L P R 487

TAAACATCCCGAGTCTCTGCGCTCCAAAGTGGACAATAGCGCACGCCAAGTCCAGCTT 1620
 L N I P E S L P V Q V D N S A R P S P A 507

CCTCAACTGCGGCCACGGCAGCTGACCCCTGCGGACACCAGCTCGACCCAGGCCCCCA 1680
 S S T A A T A D L T P A D T S S T Q A P 527

CACCCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGTCTAATTTCTGATTCTATTACTGAGGCAC 1740
 T P S N S S D Q Q S S N S R I P I T E A 547

TGAAAATCTTGTATACCGCATTGAGGCAATGAGGACCGGCTTCTACGTGTGAAGAAA 1800
 L K T L V Y R I Q R I E E R L S T C E E 567

ATACGACCCGGTGTCTACAGAAGTGTAAATGCCGTGAGGCAATGTTCCAAACATGATGA 1860
 N T T R L L Q K C E M P S G H G P N M M 587

TCGCCAGCAAAATGGCTGAAGCATCACTTCTGGGGCTCTATTTATTCTCAATGCATCG 1920
 I P T Q M A E A S L L G G S I Y S Q C I 607

CITTCAGCGGCTCATGCTTTCTCCAGGCACTAATCCAAAGCATCCGGTCTCAACAGCT 1980
 A S D G S M L S P G S H N P S I R S N S 627

CTCTGTCAAACCTGCCCGCTCGGCTCGTCCAGCGGTGTAACCACTGGGACACCTTCAG 2040
 S L S N C P P L G S S T A V T T G T P S 647

AAAACACACACTAGTGAAGAACTTTTCGCGGACTTGTATGTGCACTTGCCTTCGGAA 2100
 E N T P S E E L F S P D F D V H L P F G 667

ACCCAGAGAATAGGTGCGGGAACCGGACCGGATGCTGATGGCGGCTGGTAGAAG 2160
 N P E N L G A G A T D T D A D G G L V E 687

ACAGTTTATGCGGACCTGGACTTGAAGCCTGGAAGCAGGAGCATATGGAGCATTTG 2220
 D S F M P D L D F E A W N E E H I G A F 707

GGTCCGTGCCTAGTTTCTGCTTCACTAGTTGCTGA 2255
 G S V P S F V F S S C - 718

Fig. 1. Continued.

이 결과로 보아 이 유전자의 전사개시부위는 대략적으로 -58에서 -115 bp부위에 존재하며 기존에 추측하고 있던 번역개시코돈 ATG에서부터 단백질 합성이 개시된다고 추측할 수 있다.

엑손-인트론 구조를 확인하기 위해 Fig 2에서와 같이 cDNA를 클로닝하여 염기서열을 분석한 18개의 서로 다른 cDNA 클론중에서 11개의 클론(61%)만이 두 개의 49 bp 인트론이 잘려나가는 정상적인 splicing이 일어나는 것을 알 수 있었다. 이 외에, 16.7%에 해당하는 3개의 클론은 앞쪽의 인트론 I은 제거되지 않고 뒤쪽의 인트론 II만 제거되는 패턴을 보였고 2개의클론(11%)은 두 개의 인트론이 모두 제거되지 않았다. 또한, 2개의 클론은 특이하게 두 개의 인트론이 모두 제거되기는 하였으나 인트론 I에서 49개의 인트론이 제거되는 대신 11 bp가 더 많은 60 bp 부위가 splicing 되는 전형적인 alternative splicing 패턴을 보였다. 또한 두 번째 인트론이 제거되지 않은 상태에서 첫 번째 인트론이 제거된 경우는 아직 확인되지 못하였기 때문에 두 번째 인트론은 기본적으로 제거된 상태에서 첫 번째 인트론이 선택적으로 splicing이 일어나거나 혹은 전체 인트론이 splicing이 일어나지 않는 식으로 유전자 프로세싱이 일어난다고 추측할 수 있다. 이러한 alternative splicing은 진균에서 드물지 않게 일어나며 최근 *A. nidulans*의 유성분화에 관여하는 *nsdC* 유전자에서도 이와 유사한 현상이 보고된 바 있다(Kim *et al.*, 2009). 이렇듯 alternative splicing 뿐만 아니라, *fhkE* 유전자의 인트론 I은 진균에서 나타나는 전형적인 splicing signal인 GT-AG의 서

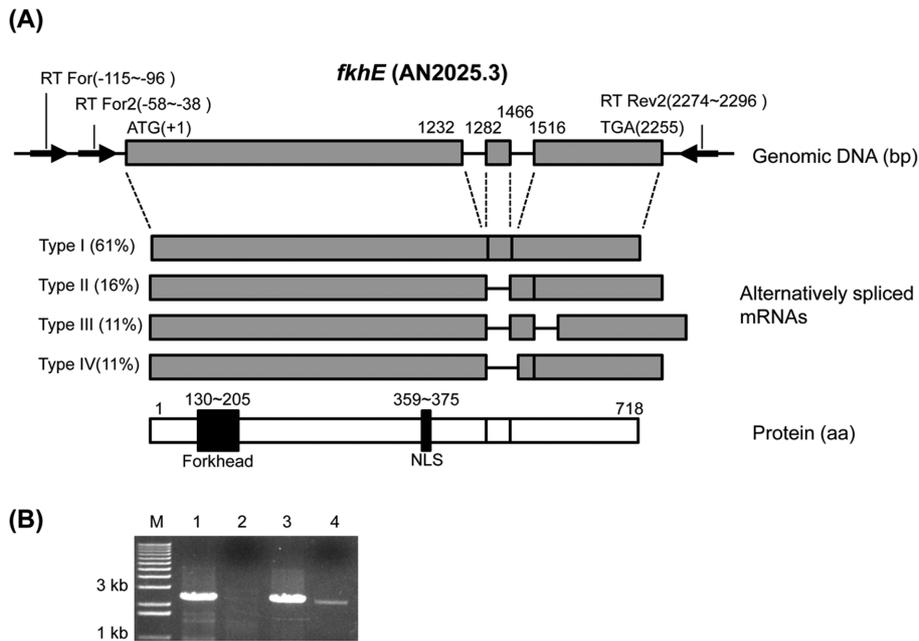


Fig. 2. Schematic diagram of the gene structure (A) and cDNA analysis of the *fkhE* gene (B). Grey boxes indicated exons and arrows indicate location and direction of the primers (A). M, DNA size marker; lane 1, PCR using RT For and RT Rev2 primer set with genomic DNA; lane 2, PCR using RT For and RT Rev2 primer set with cDNA; lane 3, PCR using RT For2 and RT Rev2 primer set with genomic DNA; lane 4, PCR using RT For2 and RT Rev2 primer set with cDNA.

열을 가지는 것이 아니라 GC-AG로 구성되어 있다. 그러나 현재까지 이러한 alternative splicing이나 변형된 인트론 제거 서열이 유전자의 기능에 어떤 역할을 하는지에 대해서는 알려진 바가 없다. 또한 정상적인 전사체가 아닌 alternative splicing으로 만들어진 mRNA는 정상적인 단백질이 아닌 truncated 단백질을 합성할 것으로 예상되나 이러한 비정상적인 단백질이 세포내에서 어떠한 기능을 수행하는지에 대해서도 아직 연구되지 않았다.

***fkhF* 유전자의 결실 돌연변이의 분리 및 분화과정에 관련된 유전학적 분석**

*A. nidulans*의 특이적인 forkhead 유전자인 *fkhE*의 세포 내 기능을 알아보기 위해 *A. nidulans* 야생형 균주의 *fkhE* 유전자를 double crossing-over를 통한 상동성 재조합(homologous recombination)에 의해 인위적으로 제거시키는 knock-out 방법을 이용하여 결실 돌연변이를 제조하였다(Fig. 3). *fkhE* 유전자를 제거하기 위해 *A. nidulans*의 genomic DNA를 주형으로 하고, 재료 및 방법에 기술한대로 Double-Joint PCR을 수행하여 얻어진 PCR 최종산물을 이용하여 형질전환용 *pyrG* 영양요구주인 A1145를 형질전환하였다(Fig. 3). 먼저, 얻어진 *pyrG*⁺ 형질전환체들 중 PCR 및 Southern hybridization을 통하여 *fkhE* 유전자가 결실되었음을 확인하였다(Fig. 3). 얻어진 *fkhE* 결실돌연변이의 형질을 알아보기 위해 두 개의 서로 다른 돌연변이체를 최소배지조건에서 점 접종을 하여 관찰하였다. 관찰 결과, Fig. 3에서 보는바와 같이, *fkhE* 돌

연변이 균주의 콜로니 크기는 야생형에 비해 약간 저해되었고 콜로니의 색깔이 녹색이 아닌 고동색에 가까운 모습을 보임으로써 무성포자의 형성이 정상적이지 않음을 보여주었다. 이를 현미경으로 관찰한 결과 무성포자(conidia)의 성숙에 문제가 있었다. 무성포자의 형성은 모든 진균에서 매우 중요하며 유전적으로 프로그램되어 있으므로 본 *fkhE* 유전자의 기능이 무성포자의 성숙이나 형성에 영향을 주는 것으로 사료되어진다.

무성분화뿐만 아니라 유성분화에 이 유전자가 어떤 영향을 주는지 알아보기 위해 다양한 유성분화 유도조건에서 야생형과 *fkhE* 돌연변이주의 생장과 분화를 관찰하였다. 그 결과 배양접시의 밀봉, 5% 이산화탄소 조건, 미호기적 조건 및 혐기적 조건에서 *fkhE* 결실돌연변이의 유성분화는 야생형에 비해 큰 차이가 없음을 알 수 있다(Fig. 3, 혐기적 조건 외 자료 미제시). 이는 *fkhE*의 기능이 유성분화의 조절과는 관계가 없음을 시사하고 있으며, 기존에 보고된 *fkhF*와 매우 유사한 기능을 하는 유전자임을 알 수 있다(Park *et al.*, 2009).

앞서의 연구결과가 시사하듯, *fkhE*는 유성분화와는 관계가 없으며 무성분화의 조절에 영향을 미치는 것으로 보이므로 야생형과 돌연변이균주의 액체배양을 통하여 *fkhE* 결실돌연변이가 형질의 차이를 보이는지 알아보았다. 이는 야생형 균주의 경우 액체배양시에는 분화를 전혀 하지 못하고 영양생장상태(vegetative growth)로만 자라지만 무성분화에 영향을 주거나 무성분화의 억제가 제한되었을 때에는 액체 배양에서도 포자를 형성하거나 무성포자병(conidiophore)을

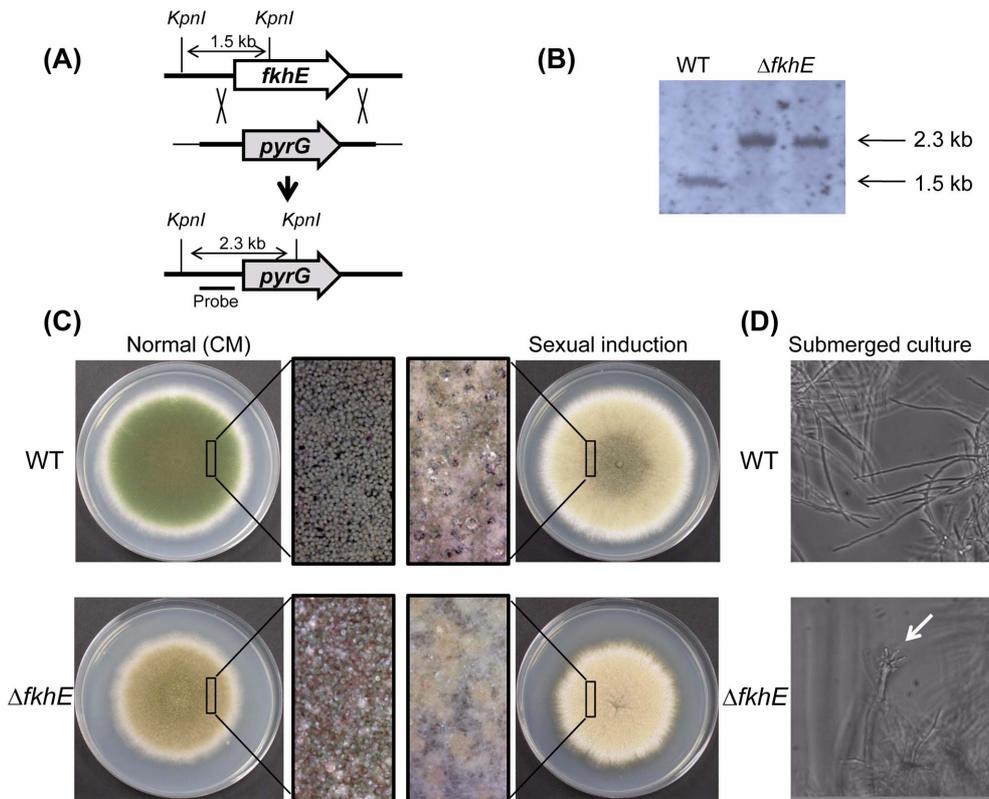


Fig. 3. Construction and phenotype of *fhkE* deletion mutant. (A) Schematic diagram of construction of the *fhkE* deletion mutant. The *fhkE* gene was replaced by the selective marker, *pyrG*, as the result of double homologous recombination. (B) Confirmation of the *fhkE* gene deletion by Southern blot analysis. 5'-flanking region of the *fhkE* gene was used as a probe. (C) Point inoculated WT and *fhkE* mutant in normal and sexually induced condition on solid CM were shown. (D) Microscopic picture of wild type and *fhkE* deletion mutant showed that the *fhkE* mutant develop conidiophore (arrow) in liquid submerged culture.

형성할 수 있기 때문이다. *fhkE* 돌연변이 균주를 24시간동안 최소배지에서 액체진탕배양한 결과, 완전하게 분화된 무성포자병이 형성됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 이와 같은 결과는 *fhkE* 유전자는 *A. nidulans*에서 유성분화에는 관여하지 않지만, 무성분화를 억제하는데 관여하는 유전자라는 것을 보여준다.

이러한 결과를 종합하여볼 때 *A. nidulans*에서 특이적으로 존재하는 두 forkhead 유전자 *fhkE*와 *fhkF*는 단백질 서열뿐만 아니라 유전자의 DNA 염기서열도 매우 상동성이 높으며 (Park *et al.*, 2009), 유전자 제거 돌연변이의 형질을 관찰한 결과 두 유전자 돌연변이 균주가 매우 유사하게 무성분화에 영향을 주는 것을 알 수 있다. 따라서 이 두 유전자는 공통 조상 유전자에서 duplication을 통하여 만들어졌을 수 있다는 점을 시사한다. 그러나 한편으로, *fhkF* 유전자도 *fhkE* 유전자와 유사하게 alternative splicing이 일어나는지에 대해서는 아직 알려지지 않았으므로 향후 이에 대한 연구가 필요하다고 사료된다.

적요

모델 사상성 진균 *Aspergillus nidulans*는 분화과정을 연구

하는 진핵세포 시스템으로 사용되어 왔다. 이러한 분화과정은 매우 다양한 유전자들의 발현을 통하여 조절되며 이와 관련된 다양한 전사요소들의 기능이 연구되어 왔다. 이들 중 forkhead 유전자는 일반적으로 감수분열 및 세포주기 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 왔으며 *A. nidulans*에서도 유사한 기능을 하리라 예상되어 왔다. 이와 관련된 연구를 위하여 *A. nidulans* 유전체에 존재하는 6개의 forkhead 유전자를 발견, 확보하였고, 최근에는 효모 및 다른 진균에서는 발견되지 않는 *A. nidulans* 특이적 forkhead 유전자인 *fhkF*의 구조와 기능이 분석된 바 있다. 본 연구에서는 *fhkF*와 매우 유사한 단백질 서열을 가지고 있는 *fhkE*(AN2025.3) 유전자의 기능을 분석하였다. 본 유전자의 기능을 분석하기 위해 RT-PCR을 통하여 cDNA 서열을 분석한 결과 약 3종류의 서로 다른 mRNA가 존재하는 것이 밝혀졌고 이는 alternative splicing에 의한 것으로 추정되었다. 이들 3종류의 mRNA중 한 종류만 정상적인 ORF를 가지고 있으며 조사한 전체 cDNA 발현의 61%를 차지하였다. *fhkE* 유전자는 718개의 아미노산을 암호화하는 하나의 ORF를 가지고 있었으며 N 말단에 보존된 forkhead 도메인을 가지고 있었다. *fhkE* 유전자를 제거한 유전자 제거 돌연변이 균주는 *fhkF*와 유사하게 고체배지에서는

무성포자의 형성이 저해되었으나 유성분화에는 별다른 영향을 미치지 않았으며 액체 진탕배양에서는 야생형과 다르게 무성포자병(conidiophore)이 형성되었다. 이러한 결과는 *fkhE* 유전자가 무성분화에 관련되었음을 보여준다.

사 사

이 논문은 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단 기초연구지원과제(313-2008-2-C00804) 및 2010학년도 우석대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 수행된 연구임.

참고문헌

- Adams, T. H., Wieser, J. K. and Yu, J. H. 1998. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:35-54.
- Busch, S., Eckert, S. E., Krappmann, S. and Braus, G. H. 2003. The COP9 signalosome is an essential regulator of development in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 49:717-730.
- Chang, M. H., Chae, K. S., Han, D. M. and Jahng, K. Y. 2004. The GanB Galpha-protein negatively regulates asexual sporulation and plays a positive role in conidial germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics.* 167:1305-1315.
- Han, K. H., Han, K. Y., Yu, J. H., Chae, K. S., Jahng, K. Y. and Han, D. M. 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., Lee, D. B., Kim, J. H., Kim, M. S., Han, K. Y., Kim, W. S., Park, Y. S., Kim, H. B. and Han, D. M. 2003. Environmental factors affecting development of *Aspergillus nidulans*. *J. Microbiol.* 41:34-40.
- Han, K. H. and Prade, R. A. 2002. Osmotic stress-coupled maintenance of polar growth in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 43:1065-1078.
- Han, K. H., Seo, J. A. and Yu, J. H. 2004. A putative G protein-coupled receptor negatively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 51:1333-1345.
- Kim, H., Han, K., Kim, K., Han, D., Jahng, K. and Chae, K. 2002. The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 37:72-80.
- Kim, H. R., Chae, K. S., Han, K. H. and Han, D. M. 2009. The *nsdC* gene encoding a putative C2H2-type transcription factor is a key activator of sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics.* 182:771-783.
- Kim, I. M., Ackerson, T., Ramakrishna, S., Tretiakova, M., Wang, I. C., Kalin, T. V., Major, M. L., Gusarova, G. A., Yoder, H. M., Costa, R. H. and Kalinichenko, V. V. 2006. The Forkhead Box m1 transcription factor stimulates the proliferation of tumor cells during development of lung cancer. *Cancer Res.* 66:2153-2161.
- Lee, B. Y., Han, S. Y., Choi, H. G., Kim, J. H., Han, K. H. and Han, D. M. 2005. Screening of growth- or development-related genes by using genomic library with inducible promoter in *Aspergillus nidulans*. *J. Microbiol.* 43:523-528.
- Park, M. H., Kim, H. Y., Kim, J. H. and Han, K. H. 2009. Structural and functional analysis of a forkhead Gene, *fkhF*, in a filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Kor. J. Microbiol.* 45:312-317.
- Reagan-Shaw, S. and Ahmad, N. 2006. RNA interference-mediated depletion of phosphoinositide 3-kinase activates forkhead box class O transcription factors and induces cell cycle arrest and apoptosis in breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 66:1062-1069.
- Shapira, M., Segal, E. and Botstein, D. 2004. Disruption of yeast forkhead-associated cell cycle transcription by oxidative stress. *Mol. Biol. Cell.* 15:5659-5669.
- Szilagyi, Z., Batta, G., Enczi, K. and Sipiczki, M. 2005. Characterisation of two novel fork-head gene homologues of *Schizosaccharomyces pombe*: their involvement in cell cycle and sexual differentiation. *Gene.* 348:101-109.
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G., Zabicki, J. O. and Davies, R. W. 1983. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene.* 26:205-211.
- Vallim, M. A., Miller, K. Y. and Miller, B. L. 2000. *Aspergillus* SteA (sterile12-like) is a homeodomain-C₂/H₂-Zn²⁺ finger transcription factor required for sexual reproduction. *Mol. Microbiol.* 36:290-301.
- Vienken, K., Scherer, M. and Fischer, R. 2005. *cherZn(II)₂Cys₆* putative *Aspergillus nidulans* transcription factor repressor of sexual dctor represinhibits sexual dctor represunder low-carbon conditions and in submersed culture. *Genetics.* 169:619-630.
- Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Dominguez, Y. and Scazzocchio, C. 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* 41:973-981.
- Ziegler, S. F. 2006. FOXP3: Of Mice and Men. *Annu. Rev. Immunol.* 24:209-226.