

# Aspergillus fumigatus에서 Methyltransferase 유전자 AfuvipB와 AfuvipC의 분리 및 분석

모하메드 · 한갑훈\*

우석대학교 제약공학과

## Isolation and Characterization of Two Methyltransferase Genes, *AfuvipB* and *AfuvipC* in *Aspergillus fumigatus*

Mohammed A. Abdo Elgabbar and Kap-Hoon Han\*

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

**ABSTRACT :** In filamentous fungi, velvet complex associated with the *veA* gene plays pivotal roles in development and secondary metabolism. In a model fungus *Aspergillus nidulans*, many proteins that can interact with *VeA*, including two methyltransferases *VipB* and *VipC*, have been isolated and characterized. In this study, we isolated homologs of the *vipB* and *vipC* genes in the human opportunistic pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* and named *AfuvipB* and *AfuvipC*. The *AfuvipB* gene, annotated as *Afu3g14920* in the *Aspergillus* Genome Database (*AspGD*) database, consists of 1,510 bp interrupted with 10 introns yielding 336 amino acid-long putative methyltransferase protein. Similarly, *AfuvipC*, which is *Afu8g01930*, has 10 introns and encodes a polypeptide with 339 amino acids having a methyltransferase domain in the middle of the protein. To characterize the function of the genes in *A. fumigatus*, knock-out mutants were generated and the phenotypes were observed. Deletion of *AfuvipB* gene caused no obvious phenotypic change on point inoculation but showed smaller colony than wild-type when the mutant was subjected to culture on single spore-driven culture condition. However, *AfuvipC* deletion mutant demonstrated no phenotypic difference from wild type both in point inoculation and streaking cultures. These results indicate that the two methyltransferases might have a redundant role and could be dispensable in normal culture conditions.

**KEYWORDS :** *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, Methyltransferase, *vipB*, *vipC*

### 서론

곰팡이(진균)는 일반적으로 포자를 형성하여 자손을 번식하며, 감수분열을 거쳐 포자를 만드는 유성포자와 유사 분열을 통하여 만들어지는 무성포자로 나누어진다. 토양

미생물인 *Aspergillus*속은 종에 따라 유성 및 무성 생식기관을 가지고 있는데, 특히 *Aspergillus nidulans*의 경우 유성생식(sexual development)과 무성생식(asexual development)뿐만 아니라 준유성생식 생활사(parasexual cycle)를 가지고 있어 다양한 유전학적 분석이 가능하므로 유전학적 모델 시스템으로 오랫동안 사용되었다[1]. 이러한 *A. nidulans*의 분화과정은 외부환경과 유전자들의 발현조절에 의하여 매우 정교하게 제어되는 것으로 알려져 있으며, 분화를 조절하는 다양한 유전자들이 분리 분석되었다[2-4].

*A. nidulans*는 자웅동체 자낭균(homothallic ascomycetes)이므로 교배형(mating type)이 없고 유전적인 조절과 환경적인 영향에 따라 유성포자인 ascospore를 만들 수 있으며, 유성분화는 무성분화와 달리 cleistothecium으로 불리는 fruiting body를 형성하여 그 내부에서 meiosis를 통한 포자형성이 일어나므로 이를 위해서 유성분화에만 특이적으로 관여하는 많은 유전자들이 존재할 것으로 추측된다. 현재까지 알려진 유성분화 조절 유전자들 중 대표적인 유전자

Kor. J. Mycol. 2015 March, 43(1): 33-39  
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2015.43.1.33>  
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249  
 © The Korean Society of Mycology

\*Corresponding author

E-mail: khhan@woosuk.ac.kr

Received February 10, 2015

Revised March 5, 2015

Accepted March 11, 2015

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

중 하나는 *nsdD* 유전자로 이 유전자는 GATA type zinc finger를 가진 전사인자(transcription factor)를 암호화하고 있으며 이 유전자가 제거되거나 돌연변이가 생겼을 경우 유성분화를 하지 못하게 되고 과다발현되었을 경우 유성분화를 촉진하게 하는 유성분화의 양성조절인자(positive regulator)이다[5]. 이외에  $C_2H_2$  zinc finger transcription factor를 암호화하는 *nsdC*와 *nosA*를 비롯하여 유성분화의 음성조절자(negative regulator)인 *rosA* 유전자가 보고되었으며, APSES 단백질을 암호화하는 *rgdA* 유전자도 유성분화에 많은 영향을 미치는 것으로 알려졌다[6-9]. 특히 *A. nidulans*의 유성분화는 다양한 외부 환경요인에 따라 영향을 받는 것으로 보고되었는데, 그 중 빛의 존재는 유성분화를 억제하는 반면 저산소조건(hypoxia) 및 고농도의  $CO_2$  조건에서는 유성분화를 촉진하는 것으로 알려졌다[10, 11].

*A. nidulans* 야생형 균주의 경우 무성분화와 유성분화가 적절한 균형을 맞추어 진행되는데, 이러한 분화과정의 균형은 *veA* 유전자의 영향을 많이 받게 된다[12]. *veA* 유전자의 돌연변이인 *veA1*를 가지고 있는 균주의 경우 야생형 균주에서 빛을 차단하면 유성분화가 증가되고 빛을 쬐어줘야 무성분화가 촉진되는 것에 비하여 일반 배양조건에서 유성분화가 현저히 줄어들고 빛을 쬐어주지 않아도 무성분화가 촉진되었기 때문에 무성분화 등을 연구하기 위한 유전학적 균주로 주로 사용되어 왔다[13]. 그러나 이러한 *veA1* 돌연변이의 특성 때문에 *veA1* 돌연변이를 가지고 있는 실험실 균주에서는 유성분화에 대한 연구가 매우 어려웠으며, 이 때문에 유성분화에 대한 연구나 유성분화와 무성분화의 균형 조절과 관련된 기작도 최근에서야 밝혀지기 시작했다. 최근의 연구에 따르면 *VeA* 단백질은 velvet domain이라는 보존된 부위를 가지고 있고 주로 빛에 의한 외부 신호전달에 따라 핵으로 이동하며 핵에서 여러 종류의 파트너 단백질들과 결합하여 빛에 의한 분화의 결정이나 이차 대사산물의 생성을 조절하는 진균 특이적인 velvet 단백질 복합체를 가지고 있다[14]. 따라서 *VeA* 단백질과 결합하는 파트너 단백질이 어떤 종류인지에 따라서 다양한 역할을 수행하며 tandem affinity purification (TAP)이나 면역 침강법 등을 통하여 몇 개의 상호작용 단백질들이 밝혀진 바 있다[15]. 이보다 먼저 다양한 파트너 단백질을 확보하기 위하여 yeast two hybrid 등의 방법을 통하여 스크리닝한 결과 *VipA*, *VipB*, *VipC* (*VeA* interacting protein)라 명명한 세 종류의 단백질들을 확보한 바 있다[16]. 이들 중 *VipB*와 *VipC* 단백질은 모두 methyltransferase 도메인을 가지고 있는 단백질로, 그 중 특히 *VipC*는 *VeA*뿐만 아니라 또 다른 methyltransferase인 *VapA*와 결합하여 세포막에서 핵으로 외부 신호를 전달하는데 중요한 작용을 하는 것으로 보고되었다[17].

본 연구에서는 기회감염 균주이며 유성생식을 하지 않는 병원균 *Aspergillus fumigatus*에서 *A. nidulans vipB*와 *vipC* 유전자의 ortholog들인 *AfuvipB*와 *AfuvipC*를 분리하였고,

이들의 유전자를 제거한 돌연변이 균주들을 제작하여 *A. fumigatus*에서 이들 유전자들의 기능을 분석하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주, 배지, 배양조건, 형질전환 및 표현형 관찰

*A. fumigatus*의 야생형 균주로 Fungal Genetics Stock Center (FGSC)에서 FGSC A1100을 분양받아 사용하였으며 유전자 결손 실험용 형질전환 균주로는 *A. fumigatus* AF349 (*pyrG*, *nkuA*)를 사용하였다. 형질전환체와의 형질 비교를 위한 대조군으로는 Af349에 *pyrG* 유전자만을 형질전환한 Af349.1 균주(*nkuA*)를 사용하였다. 재조합 plasmid DNA 제작과 DNA 증폭을 위한 벡터는 pJET1.2 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하였고 대장균 균주 *Escherichia coli*는 DH5 $\alpha$  (Thermo Fischer Scientific)를 사용하였다.

*A. fumigatus*의 배양을 위한 완전배지는 *A. nidulans*를 배양하는 배지와 동일하게 Han 등[5]의 방법으로 준비하였다. *A. fumigatus* 균주는 완전배지에 접종하여 37°C에서 조건에 따라 2~4일간 배양하였으며, *E. coli*는 ampicillin (100 ug/mL)이 첨가된 luria bertani(LB) 배지에서 배양하였다. *A. fumigatus*의 형질전환은 Han 등[18]의 방법대로 세포벽 분해효소를 활용하여 protoplast를 제조한 후 polyethylenglycol (PEG)과 함께 DNA를 처리하여 수행하였다. 표현형을 관찰하기 위해서는 완전배지에 *A. fumigatus* 야생형 균주와 *AfuvipB* 및 *AfuvipC* 결손 형질전환체를 각각 점 접종(point inoculation)과 streaking 하고 2~4일간 37°C에서 배양하여 비교 관찰하였다.

### DNA 추출, 조작 및 유전자제거 돌연변이 제조

유전자 제거(knock-out)를 위해서는 double-joint polymerase chain reaction (DJ-PCR)을 수행하였다[19]. 먼저 *AfuvipB* (Afu3g14920)을 제거하기 위해 *AfuvipB* 5'-Forward, *AfuvipB* 5'-Reverse primers로 5'-flanking region을, *AfuvipB* 3'-Forward, *AfuvipB* 3'-Reverse primers로 3'-flanking region을 증폭할 수 있도록 PCR을 수행하였고 (Table 1), *A. fumigatus pyrG* 유전자에서 *pyrG* Forward, *pyrG* Reverse primers (Table 1)로 PCR을 수행하여 첫 번째 PCR 산물을 얻었다. 두 번째 PCR은 첫 번째에서 얻은 세 종류의 절편을 이용하여 융합하는 PCR을 수행하였고, 마지막 단계로 annealing한 PCR 혼합물을 주형으로 하고 5'-, 3'-nested primer (Table 1)로 PCR하여 유전자 제거를 위한 PCR 최종산물을 제조하였다. DJ-PCR을 수행하여 얻은 PCR 최종산물을 형질전환용 *pyrG* 영양 요구주인 Af349에 형질전환 하였다. 얻은 *pyrG* 형질전환체들을 PCR을 통하여 *AfuvipB*와 *AfuvipC* 유전자가 결실되었음을 확인하였다 (Fig. 3). 얻은 각 유전자 결실돌연변이의 형질을 알아보기 위해 여러 개체의 돌연변이체를 완전배지 조건에서 점 점

**Table 1.** Oligonucleotide primers used in this study

Name	Sequences (5'~3')
AfuvipB 5'For	GAG AGT GGG CGT GAT TTG ATT G
AfuvipB 5'Rev(pyrG-tail)	(GGT GAA GAG CAT TGT TTG AGG C) GGT GCT TCC AGG GTT AGT GTG
AfuvipB 3'For(pyrG-tail)	(AGT GCC TCC TCT CAG ACA GAA T) GAC ATG GCG CAG ACT CCT ATC
AfuvipB 3'Rev	ACT GTC TGC CCC AAC TGT ATG
AfuvipB 5'nest	CAC GCC CCG ACT TAC AAC AGA G
AfuvipB 3'nest	AAG GGG CCG TGG TGA TTA TGG
pyrG Forward	GCCTCAAACAATGCTCTTCACC
pyrG Reverse	ATTCTGTCTGAGAGGAGGCACT
AfuvipC 5'For	CGA CCT TGA TGG CTT TGT AAC C
AfuvipC 5'Rev(pyrG-tail)	(GGT GAA GAG CAT TGT TTG AGG C) GTA GGC GGA GTC GGC ATC GTC
AfuvipC 3'For(pyrG-tail)	(AGT GCC TCC TCT CAG ACA GAA T) GCT TAT TGC CTG CGT TGT ATC A
AfuvipC 3'Rev	CTT TGT CTA GCA GCG GTG TGG
AfuvipC 5'nest	ATG GCG GCA GAT GAT AAT G
AfuvipC 3'nest	ACC TGC AGT AGT CGT GTT CC

종을 하여 관찰하였고 그들 중 *AfuvipB* 돌연변이의 경우 형질전환체 9번(tf9), 그리고 *AfuvipC* 돌연변이의 경우 형질전환체 5번(tf5)을 대표적인 형질 관찰을 위하여 활용하였다(Figs. 4, 5).

*A. fumigatus* 형질전환체로부터 PCR을 수행하기 위한 유전체 DNA 추출은 말린 균사체 가루 20~60 mg을 미량튜브에 담아 400 uL 용해 용액(lysis buffer; 50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 50 mM EDTA (pH 8.0), 3% SDS, 1% 2-mercaptoethanol)을 첨가하여 잘 혼합하고, 이 튜브를 65°C에서 1 시간 동안 반응 후, 동량의 phenol/chloroform을 넣어 추출하고 에탄올로 침전시킨 후 말려서 적정량의 증류수에 녹여 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### *A. fumigatus*의 *AfuvipB*와 *AfuvipC* 유전자 구조 및 염기서열분석

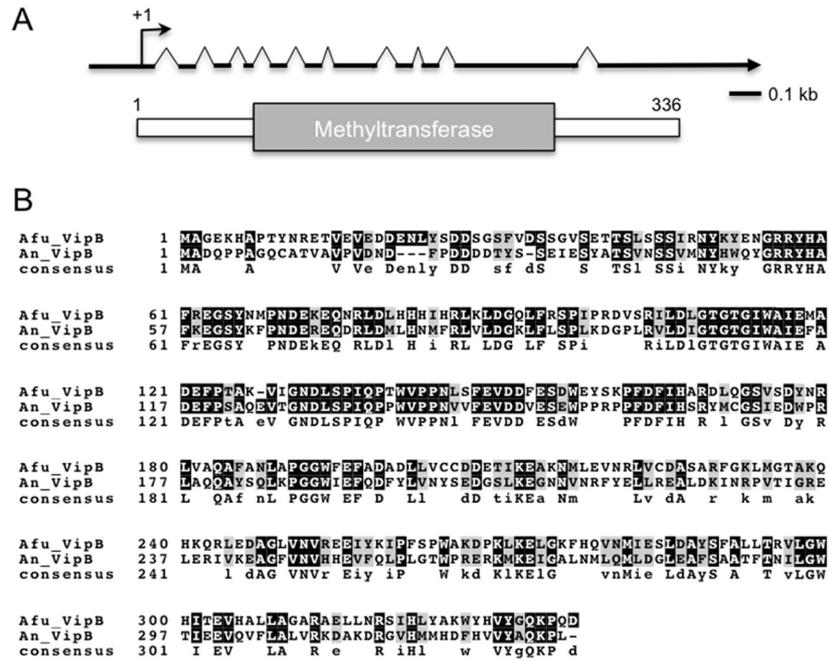
*A. nidulans*에서 *vipB*와 *vipC* 유전자는 모두 methyltransferase를 암호화하고 있으며 Aspergillus Genome Database (AspGD, <http://aspgd.broadinstitute.org>)에서 각각 AN5416과 AN8945인 것으로 알려져 있다. 현재까지 이 두 유전자 산물을 포함한 최소한 네 개의 methyltransferase가 VeA 단백질과 결합하여 상호작용을 하는 것으로 보고되었다[20]. 본 연구에서는 기존에 확보된 *A. nidulans vipB*와 *vipC* 유전자 염기서열과 이를 통하여 얻은 단백질 아미노산 서열을 바탕으로 [21, 22] 인간 기회감염 진균인 *A. fumigatus*에서 상동유전자를 확보하고 그 기능을 분석하고자 먼저 Blastp 분석을 통하여 데이터베이스를 검색하였다.

먼저 *vipB* 유전자 산물인 VipB 단백질은 NCBI의 protein

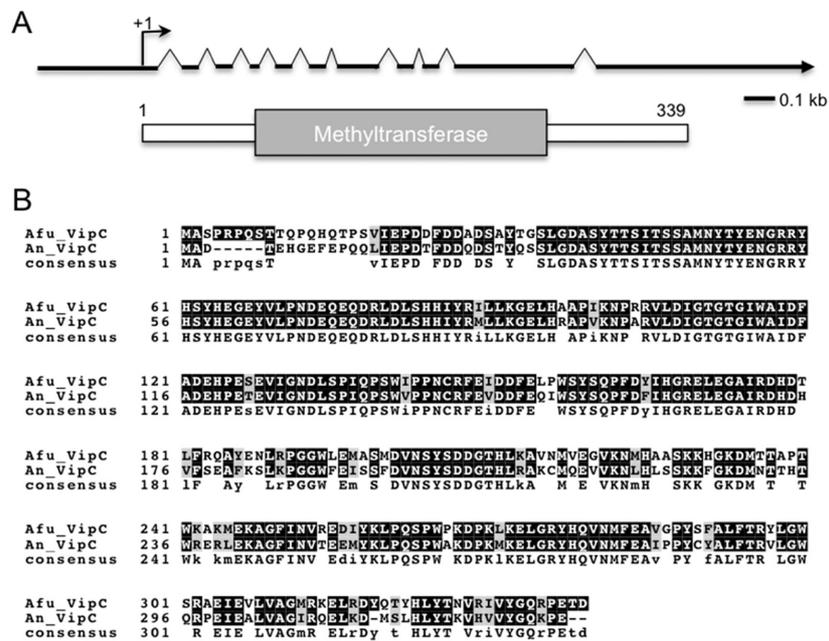
BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)를 통하여 유사 단백질들을 분석한 결과 *A. fumigatus*에서는 Afu3g14920 좌위에 해당하는 유전자 산물이 e-value 2e-98, 상동아미노산(identities) 46%, 그리고 유사아미노산(positives) 65%로 가장 상동성이 높은 것으로 나타났으며 이를 *AfuvipB* 유전자라 명명하였다(Fig. 1). *vipC* 유전자의 경우도 마찬가지로 Blastp 검색을 실시하여 *A. fumigatus* Afu8g01930 유전자가 e-value 8e-172, 70%의 identities와 80%의 positives로 매우 높은 상동성을 나타내어 이 유전자를 *AfuvipC*라 명명하였다(Fig. 2).

얻은 유전자들은 AspGD를 이용하여 각각의 유전자 정보를 확인하였다. Afu3g14920 유전자는 *A. fumigatus* 유전체 분석 균주인 Af293에서 3번 염색체에 존재하며 open reading frame (ORF)는 1,510 bp 크기를 가지고 있으나 10개의 인트론으로 암호화(coding) 부위가 나누어져 있어 엑손 부위만으로는 1,011 bp이며, 336개의 아미노산을 가진 단백질을 암호화하고 있다. 얻은 단백질 서열을 pfam을 통한 도메인 분석결과 72-254 아미노산 잔기에 methyltransferase 도메인을 가지고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

*AfuvipC*로 이름지어진 Afu8g01930의 경우 유전자 구조는 앞서 확인한 *AfuvipB*와 유사성이 높았다. Afu8g01930 유전자의 경우도 10개의 인트론이 존재하여 1,577 bp의 유전자에서 인트론을 제외한 1,020 bp에서 339개 아미노산을 가진 단백질을 암호화하고 있었다. 이 AfuVipC 단백질의 경우도 76-255 아미노산 잔기에 보존된 methyltransferase 도메인이 있음이 확인되었다(Fig. 2). 이를 통하여 *A. fumigatus*에는 *A. nidulans*에서 알려진 *vipB*와 *vipC* 유전자의 상동유전자가 존재한다는 것을 알 수 있었으며 *AfuvipB*와 *AfuvipC* 사이의 엑손-인트론의 숫자와 구조가 상호 유사할



**Fig. 1.** *AfuvipB* gene structure. (A) Arrow indicates transcription direction and introns were positioned as discontinuity of the arrow. +1 indicates translation start position. White box showed *AfuvipB* gene product and numbers are amino acids residues and grey box indicates the conserved methyltransferase domain. (B) Gene product similarity between *AfuvipB* and *vipB* from *A. nidulans* (*AnvipB*). Inverted box indicates identical amino acid residues and grey box shows similar amino acid residues between two sequences. The alignment was done by ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and visualized by BoxShade ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)).



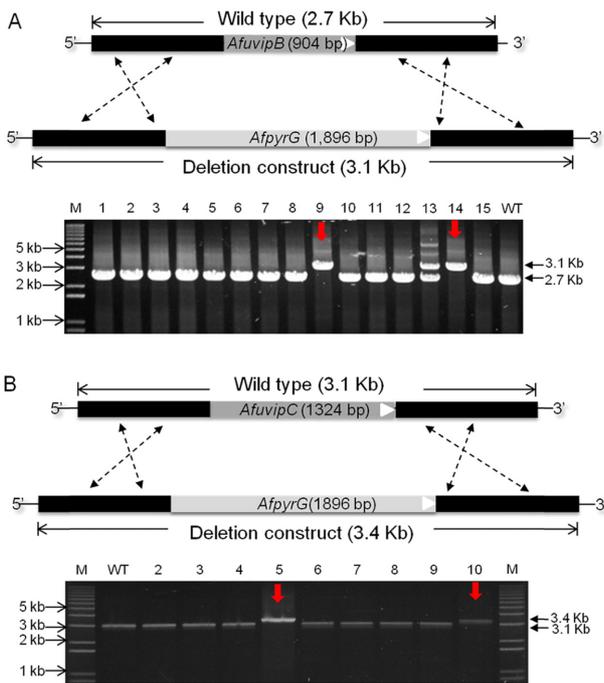
**Fig. 2.** *AfuvipC* gene structure. (A) Arrow indicates transcription direction and introns were positioned as discontinuity of the arrow. +1 indicates translation start position. White box showed *AfuvipC* gene product and numbers are amino acids residues and grey box indicates the conserved methyltransferase domain. (B) Gene product similarity between *AfuvipC* and *vipC* from *A. nidulans* (*AnvipC*). Inverted box indicates identical amino acid residues and grey box shows similar amino acid residues between two sequences. The alignment was done by ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and visualized by BoxShade ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)).

뿐만 아니라 *AfuVipB* 및 *AfuVipC* 단백질의 아미노산 서열도 유사성이 상당히 높아 두 유전자가 상동유전자이며 중복적인 기능을 수행할 수 있을 가능성도 배제할 수 없다 (자료 미제시).

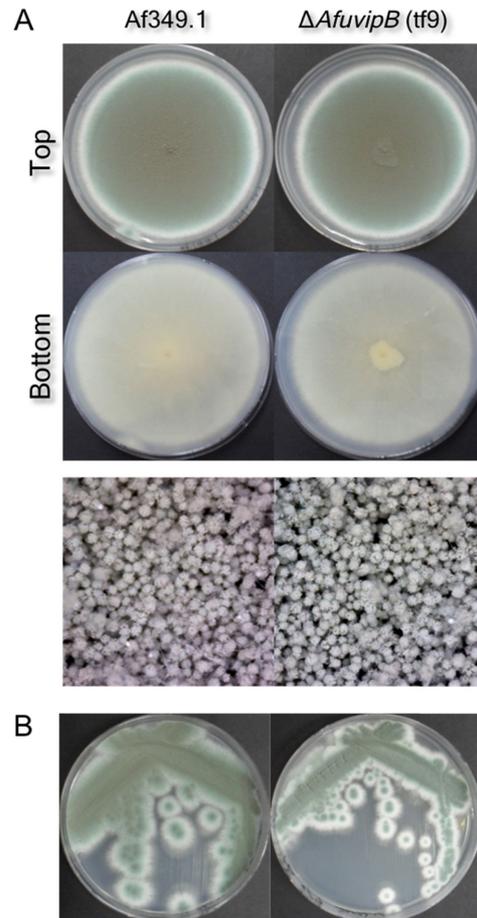
***AfuvipB*와 *AfuvipC* 유전자의 결실 돌연변이의 분리 및 형질 분석**

*A. nidulans vipB*와 *vipC* 유전자와 상동성을 가진 *AfuvipB* 그리고 *AfuvipC* 유전자에 대하여 세포 내 기능을 알아보기 위해 *A. fumigatus* 야생형 균주에서 해당 유전자를 이중 crossing-over를 통한 상동성 재조합 (homologous recombination) 방법에 의해 인위적으로 제거시킨 결실 돌연변이를 제조하였다 (Fig. 3). 돌연변이 균주의 형질 관찰 결과, *AfuvipB* 돌연변이 균주의 콜로니 크기는 야생형에 비해 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. Fig. 4A에서 보는 바와 같이, 완전배지에서 점 접종 후 37°C에서 96시간 배양하였을 경우 전체적인 콜로니의 크기 (Fig. 4A top)가 야생형과 동일하였으며, 배양접시 아랫부분을 살펴본 결과 균주가 성장

하면서 멜라닌을 축적한다거나 하는 대사물질의 차이를 육안으로는 관찰하지 못하였다 (Fig. 4A bottom). 콜로니를 현미경으로 관찰하여 포자형성을 비교하였으나 포자병 (conidiophore)의 형태나 형성되는 포자의 개수 등에도 야생형과 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 4). 그러나 한 가지 흥미로운 사실은 완전배지에 점 접종하지 않고 루프를 이용하여 포자를 streaking 후 37°C에서 48시간 배양하여 단일 콜로니를 확보하여 관찰하였을 시, 야생형의 대략적인 콜로니 크기는  $1.18 \pm 0.11$  cm인데 비하여 *AfuvipB* 돌연변이 균주는  $0.89 \pm 0.32$  cm로서 야생형에 비하여 약 75%의 콜로니 크기를 보였다. 또한 분화되어 무성포자를 만드는 속도도 야생형에 비해 느려서 포자가 형성되는 중앙부분과 아직 분화가 시작되지 않은 콜로니 가장자리까지의 거리가 야생형에 비해 좀 더 큰 것을 관찰할 수 있다 (Fig. 4B). 이는 점 접종 중의 경우 다량의 포자가 한꺼번에 접종되어 발아하



**Fig. 3.** Strategy of *AfuvipB* and *AfuvipC* deletion mutants construction and confirmation of the deletion mutant by polymerase chain reaction (PCR). (A) Schematic illustration of wild type and *AfuvipB* deletion construction and diagnostic PCR for isolating knock-out transformants were shown. Transformant numbers 9 and 14 showed increased band size (3.1 kb) which is corresponding to the size of deletion construct instead of wild type size (2.7 kb). (B) *AfuvipC* deletion strain was also verified by PCR. Transformant numbers 5 and 10 were produced 3.4 kb PCR amplicon which is expected size of deletion construct. vertical arrows indicate deletion strains. M, size marker; WT, wild type strain A1100.



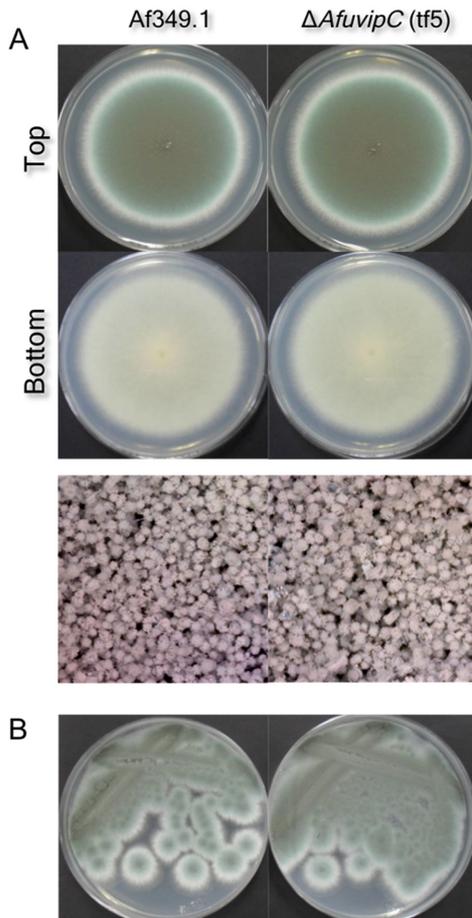
**Fig. 4.** Phenotype of *AfuvipB* deletion mutant ( $\Delta$ *AfuvipB*). (A)  $\Delta$ *AfuvipB* strain and isogenic control (Af349.1) were point inoculated and cultured on complete medium (CM) for 96 hours at 37°C. Top and bottom of the cultured plates and the enlarged microscopic picture for observing conidiophore and conidia are shown. (B)  $\Delta$ *AfuvipB* strain and isogenic control (Af349.1) were streaked and cultured on CM for 48 hours at 37°C.

여 콜로니를 형성하므로 전체적인 콜로니 성장 및 분화 과정에 야생형과 돌연변이 균주가 차이를 보이지 않을 수 있지만, 단일포자에서부터 콜로니가 만들어지는 streaking의 경우 *AfuvipB* 유전자가 제거됨에 따라 성장 및 분화에 영향을 보이는 형질을 나타낼 수 있다는 사실을 시사하고 있다. 따라서 추후 연구단계에서 단일포자에서부터 성장하고 분화되는 과정을 야생형과 *AfuvipB* 돌연변이 균주에서 보다 세밀하게 관찰하여 연구할 필요가 있다고 생각된다.

비록 *AfuvipC* 유전자는 유전자 구조 및 암호화된 단백질 서열이 *AfuvipB*와 비슷하였지만, *AfuvipC* 유전자를 제거한 돌연변이 균주에서는 *AfuvipB* 돌연변이 균주에서 볼 수 있었던 형질을 관찰하기 어려웠다. Fig. 5A에서 볼 수 있듯이 완전배지에서 점 접종 후 84시간을 배양하여 관찰한 결과 전체적인 콜로니의 크기와 배지로 분비하는 대사물질, 그리고 분화되어 나타나는 포자병 및 포자의 모양

등이 모두 야생형과 차이가 없는 것으로 관찰되었다. 또한 단일포자에서 얻은 콜로니의 경우에도 야생형과 돌연변이 균주 사이에 모양과 크기가 차이가 없음을 확인할 수 있었다(Fig. 5B).

*A. nidulans*에서 *VipC*의 경우 세포막에 존재하는 methyltransferase로서 *VeA* 단백질 뿐만 아니라 이들과 결합하는 새로운 methyltransferase인 *VapA*, *VapB* 등과 함께 복합체를 형성하고 이 복합체는 외부의 신호에 따라 시그널을 핵으로 전달해주는 매우 중요한 기능을 수행하는 것으로 최근 보고되었다[17]. 그러나 *A. fumigatus*의 경우 유성분화를 스스로 할 수 없는 heterothallic한 균주이며 실험실 조건에서도 유성분화를 유도하기가 매우 까다롭기 때문에 이 유전자가 *A. fumigatus*의 유성분화에 영향을 끼치는지에 대하여는 확인을 하기에는 어려움이 있었다. 또한 앞서 언급한 바대로 *AfuvipB*와 *AfuvipC* 두 유전자가 상호 유사하기 때문에 두 유전자가 상호보완적인 기능을 할 수 있으므로 각각의 유전자를 제거한 것으로는 형태 분화적으로는 큰 변화를 나타내지 않을 수 있다. 따라서 두 유전자가 모두 제거된 이중 돌연변이를 제조하여 형질을 분석해야 하나, *A. nidulans*와 달리 유전학적 연구가 매우 제한적인 *A. fumigatus*의 경우 이중 돌연변이를 제조하는데 상당한 어려움이 있어 이중 돌연변이가 제조 및 형질 관찰을 통한 유전자의 기능 분석은 추후 보충 연구가 필요할 것으로 보인다. 뿐만 아니라 *A. nidulans*의 경우에도 *vipB*, *vipC* 제거 돌연변이 균주만으로는 균주의 표현형이 크게 달라지지 않았다는 보고가 있으므로 개별 돌연변이 균주가 특별한 표현형적 차이를 보이지 않는 것은 어느 정도 예상된 결과임을 시사하고 있다[16, 21, 22]. 이와 더불어 본 유전자들이 암호화하고 있는 methyltransferase의 기능이 균주의 성장속도나 포자형성 등과 같은 표현형에는 직접적인 영향을 주지 않을 가능성도 배제할 수 없다. AspGD에서 *A. fumigatus* 유전체의 methyltransferase를 검색하였을 경우 methyltransferase 유전자가 최소 24개 이상이며 다양한 아미노산 생산에 필요한 methyl기를 공급하는 역할을 하는 methyltransferase등도 다수 존재하기 때문이다. 그럼에도 불구하고 본 연구를 통하여 얻을 수 있었던 성과로는 *A. nidulans*에서 중요한 기능을 수행하는 두 methyltransferase 유전자들이 모두 병원균인 *A. fumigatus*에 잘 보존되어 있었고 그 유전자를 확보하고 기능을 분석하였으므로 추후 이를 바탕으로 한 기회감염과 관련된 병원성에 대한 형질을 연구하여 세포질에 존재하는 methyltransferase가 기회감염 병원성에 영향을 주는지에 대한 여부 등을 연구하는데 사용될 수 있는 토대가 되었다고 보여진다.



**Fig. 5.** Phenotype of *AfuvipC* deletion mutant ( $\Delta$ *AfuvipC*). (A)  $\Delta$ *AfuvipC* strain and isogenic control (Af349.1) were point inoculated and cultured on complete medium (CM) for 96 hours at 37°C. Top and bottom of the cultured plates and the enlarged microscopic picture for observing conidiophore and conidia are shown. (B)  $\Delta$ *AfuvipC* strain and isogenic control (Af349.1) were streaked and cultured on CM for 48 hours at 37°C.

## 적 요

사상성 진균에서 *veA* 유전자와 연계되어 있는 velvet 복합체는 진균의 분화와 이차 대사산물의 조절에 매우 중요

한 기능을 한다. 모델 사상균인 *Aspergillus nidulans*의 경우 methyltransferase인 VipB와 VipC를 포함한 여러 단백질들이 VeA 단백질과 상호작용하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 인간 기회감염 진균인 *Aspergillus fumigatus*에서 vipB와 vipC 유전자의 상동유전자를 분리하여 각각 AfuvipB와 AfuvipC로 명명하였다. AfuvipB 유전자는 AspGD 데이터베이스에 Afu3g14920으로 등록되어 있으며 1,510 bp 길이에 10개의 인트론을 가지고 있고, 유전자 산물은 336 아미노산 잔기로 구성된 단백질로 methyltransferase 도메인을 가지고 있었다. AfuvipC는 Afu8g01930으로 AfuvipB와 유사하게 10개의 인트론을 가지고 있으며 339개의 아미노산으로 구성된 methyltransferase를 암호화하고 있었다. *A. fumigatus*에서 각각의 유전자에 대한 기능을 알아보기 위하여 유전자제거 돌연변이 균주들을 제조하고 그들의 표현형을 관찰하였다. AfuvipB 유전자 제거 돌연변이는 점 접종을 하였을 경우 대조군에 비하여 표현형의 차이를 보이지 않았다. 그러나 단일 포자에서 성장한 콜로니를 비교해 보았을 때 대조군에 비하여 그 크기가 작고 분화 속도도 약간 더딘 것을 관찰할 수 있었다. 반면에 AfuvipC 유전자 제거 돌연변이는 대조군과 비교하였을 때 표현형의 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 두 개의 methyltransferase가 상호 중복적인 역할을 수행하거나 정상적인 실험실 배양조건에서는 중요한 기능을 수행하지 않을 수 있음을 시사한다.

## Acknowledgements

This research was supported by Basic Science Research Programs through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (2009-0089716, NRF-2012R1A1A4A01012864).

## REFERENCES

- Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons LM, Macdonald KD, Bufton AW. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* 1953;5:141-238.
- Adams TH, Wieser JK, Yu JH. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:35-54.
- Han KH. Molecular genetics of *Emericella nidulans* sexual development. *Mycobiology* 2009;37:171-82.
- Yu JH. Regulation of development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology* 2010;38:229-37.
- Han KH, Han KY, Yu JH, Chae KS, Jahng KY, Han DM. The *nsdD* gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 2001;41:299-309.
- Kim HR, Chae KS, Han KH, Han DM. The *nsdC* gene encoding a putative C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-type transcription factor is a key activator of sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 2009;182:771-83.
- Vienken K, Fischer R. The Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> putative transcription factor NosA controls fruiting body formation in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 2006;61:544-54.
- Vienken K, Scherer M, Fischer R. The Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> putative *Aspergillus nidulans* transcription factor repressor of sexual development inhibits sexual development under low-carbon conditions and in submerged culture. *Genetics* 2005;169:619-30.
- Lee JY, Kim LH, Kim HE, Park JS, Han KH, Han DM. A putative APSES transcription factor is necessary for normal growth and development of *Aspergillus nidulans*. *J Microbiol* 2013;51:800-6.
- Han KH, Lee DB, Kim JH, Kim MS, Han KY, Kim WS, Park YS, Kim HB, Han DM. Environmental factors affecting development of *Aspergillus nidulans*. *J Microbiol* 2003;41:34-40.
- Han KH, Yang YS, Kim JH. Effect of high CO<sub>2</sub> concentration on activation of sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Kor J Mycol* 2013;41:192-96.
- Kim H, Han K, Kim K, Han D, Jahng K, Chae K. The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 2002;37:72-80.
- Käfer E. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv Genet* 1977;19:33-131.
- Bayram O, Krappmann S, Ni M, Bok JW, Helmstaedt K, Valerius O, Braus-Stromeier S, Kwon NJ, Keller NP, Yu JH, et al. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 2008;320:1504-6.
- Sarikaya-Bayram O, Bayram O, Valerius O, Park HS, Irniger S, Gerke J, Ni M, Han KH, Yu JH, Braus GH. LaeA control of velvet family regulatory proteins for light-dependent development and fungal cell-type specificity. *PLoS Genet* 2010;6:e1001226.
- Kim HS. Isolation and functional analysis of the *veA* gene and *vip* genes of *Aspergillus nidulans* [dissertation]. Jeonju (Korea): Chonbuk National University; 2002.
- Sarikaya-Bayram O, Bayram O, Feussner K, Kim JH, Kim HS, Kaefer A, Feussner I, Chae KS, Han DM, Han KH, et al. Membrane-bound methyltransferase complex VapA-VipC-VapB guides epigenetic control of fungal development. *Dev Cell* 2014;29:406-20.
- Han KH, Chun YH, Figueiredo BC, Soriani FM, Savoldi M, Almeida A, Rodrigues F, Cairns CT, Bignell E, Tobal JM, et al. The conserved and divergent roles of carbonic anhydrases in the filamentous fungi *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 2010;75:1372-88.
- Yu JH, Hamari Z, Han KH, Seo JA, Reyes-Domínguez Y, Scazzocchio C. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* 2004;41:973-81.
- Sarikaya-Bayram O, Palmer JM, Keller N, Braus GH, Bayram O. One Juliet and four Romeos: VeA and its methyltransferases. *Front Microbiol* 2015;6:1.
- Oh M. Isolation and functional analysis of *vipB* in *Aspergillus nidulans*. [dissertation]. Jeonju (Korea): Chonbuk National University; 2005.
- Song SY. Isolation and functional analysis of *vipC* in *Aspergillus nidulans*. [dissertation]. Jeonju (Korea): Chonbuk National University; 2005.