

## *Aspergillus nidulans* mtDNA의 자가복제절편

장승환 · 한동민<sup>1</sup> · 장광엽\*

전북대학교 유전공학연구소, 기초과학연구소, 자연과학대학 생물과학부,

<sup>1</sup>원광대학교 분자생물학과

*Aspergillus nidulans*의 DNA로부터 *Saccharomyces cerevisiae*에서 스스로 복제가능하고, 형질전환율도 삽입벡터에 비해  $10^4$  배정도 높여주는 절편(*ANR1*, 4,950 bp)을 분리한 바 있다. *A. nidulans*에서 *ANR1*의 일부(4,520 bp *EcoRI* 절편)를 포함한 pILJ16-4.5는 삽입벡터인 pILJ16보다 170 배정도 높은 형질전환 효율을 보였으며, *S. cerevisiae*와 마찬가지로 plasmid 상태로 회수 가능했다. *A. nidulans* 세포 내에서 2-3 copy 정도로 염색체와는 별개로 존재하는 것으로 나타났으며, 재형질전환 능력도 있었다. *ANR1*은 미토콘드리아의 DNA에서 유래한 절편으로 밝혀졌으며, AT의 함량이 74.7%로 높았다. 하나의 *ARS* 핵심공통절편인 (A/T)TTTAT(A/G)TTT(A/T)을 포함하고 있고, *ARS* 공통절편과 유사한(10/11 일치) 절편도 11 곳에 존재한다.  $\Phi$ X174와 SV40 DNA에서 *gyrase*가 결합하는 부위의 공통편인 YRTGNYNNY(Y=C 또는 T, R=A 또는 G, N=A, G, C 또는 T)도 6 곳에 존재하며, *ColE1*에서 *gyrase*가 결합하는 *b* site(CACTTTACC)와 일치하는 절편도 하나 포함하고 있으며, *ABF1* 결합 부위의 공통절편과 유사한 절편(TCN<sub>7</sub>ACG)도 하나 포함하고 있다. 이를 토대로 *ANR1*은 *A. nidulans*의 형질전환 후 회수가 가능한 replicating vector 개발에 이용할 수가 있다.

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

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

사상균류가 연구재료로 이용되면서 염색체(12, 19, 28), 미토콘드리아(1, 5, 20, 31) 및 자연적으로 존재하는 플라스미드로부터 자가복제절편을 분리하고, 이들 절편을 토대로 다루기 용이한 벡터를 제조하려는 연구가 수행되었다(2, 3, 12, 23, 34). *Aspergillus nidulans*에서도 자가복제절편을 분리하려는 노력이 있었다. 현재 Gems 등(1991)이 염색체로부터 분리한 *AMA1*이 유일한 자가복제절편으로 알려져 있고, 삽입벡터인 pILJ16보다 250 배정도 형질전환율을 높이고 세포 내에서 스스로 복제가 가능한 것으로 보고하였다(19). *A. nidulans*에는 천연 플라스미드가 존재하지 않는 것으로 알려져 있고, Ballance 등(1985)은 *ARS*들을 찾는 연구에서 미토콘드리아로부터 *ARS* 또는 *ARS*와 유사한 절편을 분리하는데 실패하였으며, *A. nidulans*의 미토콘드리아 DNA 절편 중 *S. cerevisiae*와 *A. nidulans*에서 형질전환효율을 상당히 높여주는 절편을 분리했으나 염색체와 별개로 존재한다는 증거는 얻지 못했다(2). Stahl 등(1982)은 사상균류 *Podospora anserina*의 미토콘드리아에 존재하는 플라스-

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

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

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

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

중 10개가 일치됨) 절편도 11 곳에 존재하며, ABF1 결합부위의 공통절편(TCN<sub>7</sub>ACG)도 포함되어 있다.

## 재료 및 방법

### 균주, 배지와 배양조건

*A. nidulans*의 형질전환에는 G34(yA2; *argB2 methF2*)를, DNA 절편의 클로닝 및 증폭에는 *E. coli* JM109(*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi*Δ(*lac-proAB*) *F*[*traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ*Δ*M15*])를 이용했다.

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

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

### 플라스미드 제조

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

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

### DNA 추출

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

### *E. coli*와 *A. nidulans*의 형질전환

*E. coli* 형질전환은 CaCl<sub>2</sub> 방법을 이용하였고(25), *A. nidulans*의 형질전환은 Yelton 등의 방법을 사용하였다(39).

### *A. nidulans*로부터 Plasmid DNA 추출

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

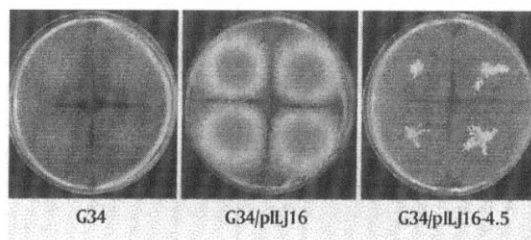
### Southern hybridization과 reprobing

Southern hybridization용 probe는 pILJ16의 유전자 *amp<sup>r</sup>* 부분을 제한효소 *DraI*으로 처리하여 얻은 dsDNA 절편(0.69 kb, Fig. 1)과 hexanucleotide mixture(BOEHRINGER MANNHEIM, 1277081)를 이용하여 준비하였다. Southern hybridization blot은 capillary 방법으로 준비했으며(28), hybridization은 Church buffer(1.0 mM EDTA, 0.25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(7H<sub>2</sub>O), 0.17% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

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

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

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



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

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

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

### Mitotic stability

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

### 염기서열 분석

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

## 결 과

### A. nidulans 형질전환율

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

### 형질전환체의 특징

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

보이는 부분의 무성포자는 선택배지에서는 전혀 자라지 못하고 완전배지에서만 자랐다.

### 형질전환 DNA의 운명

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

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

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

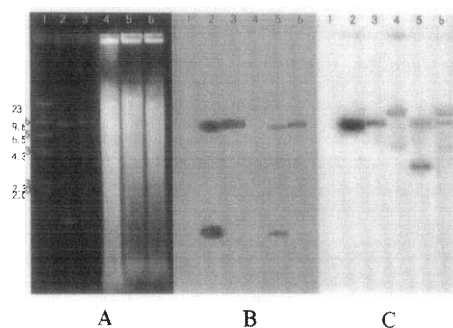


Fig. 2. Southern blot analysis of DNA from *A. nidulans* [pILJ16-4.5] transformants. DNA from one *argB<sup>+</sup>* [pILJ16-4.5] transformant of *A. nidulans* strain G34 separated on a 0.6% agarose gel. Lanes 1,  $\lambda$ HindIII size marker; 2, pILJ16-4.5, DNA from *E. coli* cut with *AviII*; 3, cut with *BglII*; 4, DNA from untransformed *A. nidulans* strain G34 cut with *BglII*; 5, DNA from transformed *A. nidulans* [pILJ16-4.5] cut with *AviII*; 6, cut with *BglII* (A). Blots were hybridised with  $^{32}$ P-labelled (B)0.69 kb *DraI* fragment and (C) 1.7 kb *argB* fragment from pILJ16. (B & C) Autoradiograph prepared from the gel in panel A.

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

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

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

### Mitotic stability

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

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

### ANR1 절편의 염기서열 분석

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



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





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

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

G34/pILJ16은 선택 및 완전배지 모두에서 28세대 후에도 100% *arg*<sup>+</sup>로 안정하게 유지되는 반면, G34/pILJ16-4.5는 선택 배지에서는 56%만이 *arg*<sup>+</sup> colony를 형성하였고, 완전배지에서는 40%가 *arg*<sup>+</sup>로 나타났다(Table 2). 세포 내에서 2~3 copy 정도로 존재하면서도 선택배지에서 56%만이 *arg*<sup>+</sup>인 것은 염색체와 별개로 존재하기 때문으로 해석할 수 있으며, 형성된 무성 포자에 복제된 pILJ16-4.5가 일정하게 분배되지 않은 결과로 사료된다. 만약 염색체에 삽입되었다면 몇 십 세대 후에도 거의 일정하게 분배되고 100% 가까이 *arg*<sup>+</sup>로 될 것이다. *S. cerevisiae*의 경우 동원체(centromere)나 말단체(telomere)를 이용하여 안정적인 벡터를 제조하여 이용하고 있다(10, 13, 32, 36). *ANR1*의 경우도 동원체나 말단체 같은 절편을 첨가하면 좀 더 안정적인 벡터를 제조할 수 있을 것이다.

*ANR1*은 *A. nidulans*의 미토콘드리아 DNA의 23S rRNA, 몇몇 tRNA(Lys, Gly<sub>1</sub>, Asp, ser<sub>2</sub>, Trp, Ile<sub>1</sub>, Pro)와 cytochrome c oxidase subunit III의 일부에 해당하는 절편의 상보적인 strand이다. AT의 함량이 74.7%로 높고, ARS의 핵심일치절편(ATTTATATTTA) 1개와 11염기 중 10개가 일치하는 절편도 11 곳에 존재한다. 또한, ABF1-DNA 결합부위의 일치절편인 RTCRYBNNNNACG(R=A 또는 G, Y=C 또는 T, B=G, C 또는 T, N=A, G, C 또는 T)와 유사한 절편(TCTATATCTACG)도 하나 포함하고 있고, ΦX174와 SV40 DNA의 gyrase 결합

부위와 일치하는 YRTGNYNNY(Y=C 또는 T, R=A 또는 G, N=A, G, C 또는 T)도 6 곳에 존재하며, ColE1에서 gyrase가 결합하는 *b* site(CACTTTACC)와 일치하는 절편, 복제개시와 관계가 있는 요소로 추정되는 CSB-1(consensus sequence block-1) 절편(TRTGYTYTR)(21)도 하나 포함되어 있고, CSB-3(TATATAGAXATATAT)(15)와 유사한 TATATATACATATAT 절편을 하나 포함하고 있다. 따라서 *ANR1*은 자가복제절편들이 갖고 있는 여러 조건 중 상당히 많은 요소들을 포함하고 있다.

결론적으로, 형질전환체 G34/pILJ16-4.5의 genomic DNA로 *E. coli* 형질전환체를 얻을 수 있었고, plasmid pILJ16의 pUC8에 해당하는 DNA 절편을 probe로 한 Southern analysis에서 G34/pILJ16-4.5의 genomic DNA가 *E. coli*에서 추출한 pILJ16-4.5가 형성한 band와 같은 위치에 band를 형성하는 점, pILJ16의 *argB* 유전자 부위를 probe로 한 Southern analysis에서 G34/pILJ16-4.5의 genomic DNA가 G34가 형성한 band와 *E. coli*에서 추출한 pILJ16-4.5가 형성한 band 모두를 포함하면서 같은 위치에 band를 형성한다는 점, 그리고 ARS의 여러 요소들을 갖추고 있는 점을 종합하면, pILJ16-4.5는 *E. coli* 뿐만 아니라 *A. nidulans*에서도 염색체와는 별개로 존재할 수 있으며, *A. nidulans*의 미토콘드리아에서 유래한 *ANR1*은 적어도 하나 이상의 replicon을 포함하고 있어 자가복제능력이 있는 것으로 사료된다.

*S. cerevisiae*의 염색체의 경우 평균 40 kb마다 복제시작점(replicon)이 존재한다고 알려져 있으며, 미토콘드리아의 DNA(68-78 kb)도 4개의 복제시작점(*ori* 1, *ori*2, *ori*3, *ori*5)를 포함하고 있는 것으로 보고하였다(8, 15). 또한 동물의 미토콘드리아 DNA의 복제에 대한 연구도 수행된 바 있으며, 복제시작점이 하나 이상인 것으로 보고되었다(14).

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

## 감사의 글

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

## 참고문헌

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

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

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

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

---

# ABSTRACT: Autonomously Mitochondrial Replicating Sequence of *Aspergillus nidulans*

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

We isolated the *ANR1* fragment from *Aspergillus nidulans* that could autonomously replicate and enhance transformation efficiency about 10<sup>4</sup> fold compared to the integrative vector in *Saccharomyces cerevisiae*. In *A. nidulans* recombinant plasmid pILJ16-4.5 which carries the 4.5 kb *EcoRI* fragment of *ANR1* showed a 170-fold increase of transformation efficiency compared to the integrative vector pILJ16 and could be recovered from transformants as an intact form. Estimated copy number of transforming plasmid pILJ16-4.5 was scored as 2 to 3 copies in transformed *A. nidulans*. Recombinant plasmid pILJ16-4.5 is mitotically unstable, being lost from 65% of asexual progeny of transformants on selective medium and 90% on complete medium. Southern analysis of transformant DNA showed that the pILJ16-4.5 is maintained in free form. The sequencing data showed that *ANR1* fragment was originated from mitochondrial DNA of *A. nidulans* and contained high AT content as much as 74.7%. One ARS consensus sequence (A/T)TTTAT(A/G)TTT(A/T), 11 ARS-like sequence (agreement 10 of 11) and ABF1 binding core consensus sequence (TCN7ACG). Also six gyrase binding core consensus sequence (YRTGNYNYY; Y=C or T, R=A or G, N=A, G, C or T) of  $\Phi$ X174 and SV40 DNA and one *b* site (CACTTTACC) combining with gyrase in ColE1 are shown. *ANR1* can be developed as a replicating plasmid for transformation system in *A. nidulans*.