

진균 바이러스에 의한 밤나무 동고병균의 유전자 발현 조절

김 대 혁

전북대학교 유전공학연구소
전북 전주시 덕진동 560-758

dsRNA로 구성된 mycovirus가 밤나무 동고병을 일으키는 자낭균 *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr,의 세포질에 존재하는 것이 보고되었으며 (Anagnostakis, 1987; Van Alfen, 1986) 이와 같은 mycovirus 혹은 dsRNA의 직접적인 기능이 밝혀지지 않은 다른 많은 진균의 경우와는 달리 *C. parasitica*는 이들 mycovirus의 존재가 직접적으로 균주의 식물기주에 대한 병원성 저하(hypovirulence)를 가져오는 원인임이 확인되었다 (Choi and Nuss, 1992; Nuss and Koltin, 1990; Van Alfen, 1986). 이와 같은 Hypovirulence 현상은 자연에서 존재하는 생물적 방제의 좋은 예로 이를 연구함으로써 첫째, 장기적으로 새로운 형태의 식물 병 방제의 가능성과, 둘째, 병원성에 관련된 진균의 유전자 발견 및 이들 유전자들의 발현 조절기작, 셋째, Mycovirus에 의한 진균의 유전자 발현의 조절(Fungal Gene Regulation by Mycovirus)기작 등에 관한 연구에 좋은 예가 될 수 있다고 하겠다.

Mycovirus의 감염 결과 나타나는 *C. parasitica*의 병징은 침입한 mycovirus strain에 의해 결정되는 것으로 알려졌으며 그중 보고된 대부분의 병징을 모두 야기시키면서 그 연구가 가장 활발한 mycovirus CHV1-713 (*Cryphonectria Hypovirulence Virus*1-713)은 12,712bp의 dsRNA로 구성되고(Shapira et al., 1991) 이에 감염된 균주(hypovirulent strain)의 병징으로는 1) 병원성의 저하, 2) 무성 포자 형성 능의 감소, 3) 고유한 색소 형성 능의 감소, 4) polyphenol oxidase인 Laccase의 감소, 5) Oxalate 생산의 감소 등이 있다(Elliston, 1985). 이중 포자 형성 능과 색소 형성 능의 저하는 hypovirulent strain을 육안으로 쉽게 구별하게 하는 형태적 특징(phenotypic markers)으로 긴요하게 사용된다. 이들 병징외에 CHV1-713에 의한 hypovirulent strain은 다른 일반적인 virus감염의 경우(기주 유전자들의 정상적인 transcription 또는 translation machinery에 이상을 일으키는 일반적인 대사 생리의 저해)와는 달리 기주인 *C. parasitica*내의 특정한 유전자들의 전사 과정을 주로 억제(down-regulation)함이 보고되어 있다(Powell and Van Alfen, 1987). 이들 CHV1-713에 의해 down-regulation되는 특정 유전자들의 예로는 1) extracellular laccase gene (*Lac1*; fungal polyphenol oxidase)(Kim et al., 1994) 2) Cryparin (*Crp1*; cell surface hydrophobin) (Zhang et al., 1994) 3) *Vir1* and *Vir2* (fungal sexual pheromone) (Zhang et al., 1993), Cutinase

(Varley et al., 1992)등이 알려져 있다. CHV1-713에 의한 hypovirulent strain의 전반적인 특징은 균사의 성장 등과 같은 vegetative growth에는 virus감염의 영향을 받지 않으나 무성 포자 형성 및 유성생식 등과 같은 정상적인 발생 및 분화 과정이 저해되어 이들의 생육적 특성이 정상 과정을 거치지 않고 juvenile stage로 남아 있게 된다. 결론적으로 이들 형태학적 그리고 분자 생물학적 특징들은 정상 균주와 이병 균주간의 비교, 관찰을 용이하게 하여 이들을 이용하여 *C. parasitica*에서 병원성 유전자를 알아내고 이 유전자들의 발현기작 및 CHV1-713에 의한 *C. parasitica*의 유전자 발현 조절기작등을 규명하는데 사용되는 중요한 척도들이 될 수 있다. 본 연구는 첫째, 어떻게 CHV1-713이 *C. parasitica*의 molecular marker gene들에 특이적으로 작용하는가와 둘째, 이처럼 mycovirus에 특이적으로 영향을 받는 유전자들의 *C. parasitica*에서 생물학적인 기능이 무엇인가를 marker rescuing과 marker exchange의 방법으로 각각 연구함으로써 mycovirus에 의한 진균의 유전자조절 및 hypovirulence의 분자 생물학적인 기작에 관해 밝히고자 하였다.

Fungal Regulation by mycovirus occurred through a putative DNA binding regulatory gene, *Hsm 1*, in *Cryphonectria parasitica*.

형질 전환 운반체(p Δ lac1)를 이용하여 항생제(hygromycin B)에 대한 저항성을 갖게 한 wild type균주 EP155/2(MatA, virulent, virus-free, ATCC38755)의 형질 전환 체중 선발된 돌연변이체(insertional mutant)인 HSM1(hypovirulence symptom mimicking1)은 고체 배지 상에서 mycovirus감염 없이 mycovirus에 감염된 이병 균주(hypovirulent strain)와 같은 외부 형태적 특징들을 나타내고 있었다. 선발된 돌연변이체 HSM1을 parent strain인 EP155/2 와 EP155/2에 CHV1-713을 감염시킨 EP155/2의 isogenic hypovirulent strain(UEP1)과 비교 조사하여 본 결과 색소체 형성의 저하 및 무성 포자 형성의 감소에 있어서 UEP1과 동일한 수준을 나타내었다. extracellular laccase (Lac1)의 형성도 HSM1에서는 EP155/2과 비교하여 현저히 감소되고 그 양은 UEP1의 수준에 머물고 있음이 기질을 이용한 spectrophotometry에 의해 확인되었다. 이상과 같은 생리적, 형태적 특징 외에 분자 생물학적인 특징을 나타내는 *C. parasitica*의 여러 molecular marker gene들의 경우 *C. parasitica* 액체 배양 후 48시간에 그 발현이 최고에 이르는 early expression gene인 Lac1과 Cry1은 HSM1에서 EP155/2과 비교하여 각각 75%와 80%의 감소가 있었고, 이 감소량은 UEP1의 경우와 비슷하였다. *C. parasitica*에서 그 발현이 배양 후 120시간 후에 최고에 이르는 late expression gene에 속하는 *Vir1*과 *Vir2*의 경우에서도 마찬가지로 HSM1의 발현은 EP155/2의 그것과 비교하여 현저히(10배 이상) 감소되는 것을 나타냈다. 이상의 발견들로부터 이들 여러 mycovirus감염 특징을 나타내게 하는 돌연변이 유전자를 획득하기 위해 형질 전환 운반체에 존재하는 *E. coli*의 plasmid를 이용하여 marker rescuing을 실시한 후 이를 조

사한 결과 형질 전환 운반체가 *C. parasitica*의 genome내로 삽입된 부위는 두 유전자 *Hsm1*과 *Hsm2*의 사이임이 밝혀졌다. 이와 같은 삽입은 유전자 *Hsm1*과 *Hsm2* 중 특히 *Hsm1*의 발현에 영향을 미치며, 그 영향 정도는 액체 배양 초기(<48시간)에는 25%의 down-regulation을 보였으나 배양 후기(>72시간)에는 200%내외가 overexpression됨을 확인하였다 (Fig. 1). 형질 전환 운반체 삽입에 의해 야기된 *Hsm1*의 발현의 차이가 곧 돌연변이체 HSM1에서 여러 mycovirus감염의 특징을 보이는 것을 확인하는 방법으로는 일반적으로 균주 HSM1을 mating type이 다른 균주와의 Mating한 후 얻은 여러 자낭 포자들을 형질 전환 운반체 내에 존재하는 selective marker인 hygromycin B에 대한 저항성과 감염병징과의 상관을 확인하는 “reverse genetics”을 이용함이 보편적이거나 균주 HSM1의 경우는 그 특징 중의 하나인 fungal pheromone인 *Vir1*과 *Vir2*의 감소에 의해 HSM1은 mating 결과 자낭각은 형성하나 자낭 포자는 형성치 못하는 “sterile”함을 나타냄으로 이와 같은 분석이 가능하지 못했다. 이를 위해 wild type의 유전자 *Hsm1*을 균주 HSM1에 넣어 “in trans” phenotypic complementation을 실시한 결과 *Hsm1*을 포함하는 형질 전환 운반체의 경우에서만 wild type의 균주와 같은 정상 형질을 나타냄으로써 *Hsm1*의 발현의 변화가 곧 여러 감염병징의 원인임을 제시할 수 있었다. 이상의 결과를 바탕으로 유전자 *Hsm1*을 분석한 결과 *Hsm1*은 DNA binding Protein중 leucine-zipper domain을 갖는 b-zip protein과 homology를 나타냈다.

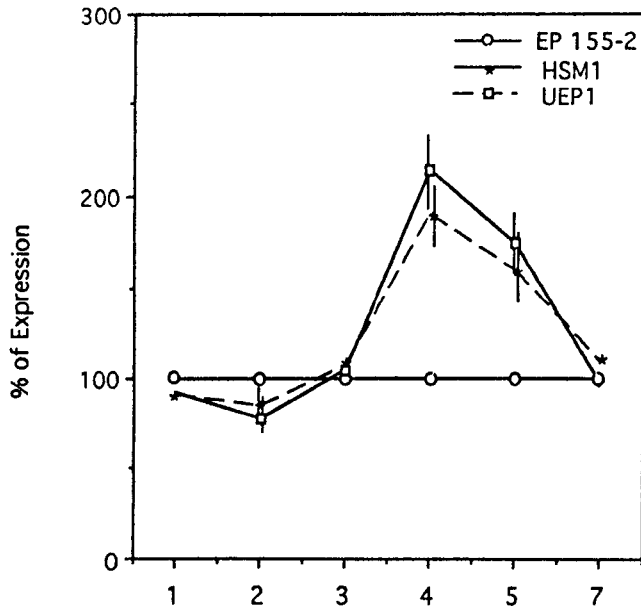


Fig. 1. Comparison of *Hsm1* expression. *Hsm1* expression from UEP1 and HSM1 was normalized to that of wild type isolate, EP 155/2. Numbers at bottom indicate incubation times(days) of liquid culture.

Characterization of biological function of a fungal gene using gene replacement.

유전자 치환을 이용하여 유전자의 생물적 기능의 검색은 현실적으로 치환될 유전자를 확보하고 치환체 선발 방법의 용이함과 같은 기술적인 점 외에 치환될 유전자의 특성 (즉, 치환될 유전자가 lethal gene이 아니고 치환될 부위가 recombination이 비교적 활발한 부위여야 함)상의 문제점들의 해결을 전제로 하는 어려움으로 인해 현재 3, 4종의 식물 병원 진균에서 6-7개의 유전자 치환의 경우가 보고되고 있으나 원하는 유전자 및 나아가 유전자 내의 특정 부위만을 선택적이고 특이적으로 치환 혹은 돌연변이를 일으킬 수 있다는 빼놓을 수 없는 장점에 의해 기주 기생체간의 상호작용의 결과로서 인식되는 식물 병원 유전자들을 검색, 확인하는 작업에 계속 시도되고 있다. 따라서 본 연구는 *C. parasitica*에서 여러 marker gene들의 생물적 기능을 분석하기 위해 이들 marker gene들을 변형시킨 유전자 치환 운반체를 이용하여 유전자 치환체를 획득한 후 이를 정상 균주와 비교함으로써 이들 marker gene들과 virus감염 병징 및 식물 병원성과의 상관 관계를 밝히는데 이용하였다.

진균의 laccase의 경우 색소체의 형성, 자실체의 형성, 식물 lignin의 분해와 유독한 phenolic compound들을 분해하는 등의 그 생물적 기능이 제시되나 *Aspergillus nidulans*의 경우를 제외하고는 아직 그 기능의 증명이 불확실한 상태이다. *C. parasitica*의 형질 전환 과정중의 "homologous recombination"을 이용한 *Lac 1*의 치환체는 안정한 형질전환체 중 1/24의 확률로 획득할 수 있었다. 치환된 돌연변이체(*Lac 1*-null mutant)에서도 계속하여 intracellular laccase가 존재함을 확인함으로써 말미암아 *Neurospora crassa*의 경우와는 달리 *C. parasitica*에서는 밝혀진 두개의 laccase) Extracellular- and Intracellular laccase; *Lac 1* and *Lac 2*, respectively)가 각각 다른 유전자에 의해 발현됨을 확인하고 치환체를 wild type의 균주와 비교하여 얻은 실험 결과 치환체의 경우 조사한 특성 중 병원성을 비롯한 mycovirus감염병징 중 그 어떤 것에 있어서도 차이를 보이지 않았으나 밤나무 수피에 많은 tannin을 고농도(>2%)로 첨가한 배지에서 지금까지 알려지지 않은 새로운 형태의 Laccase(*Lac 3*)를 생산함을 확인하였다. 더 나아가 지금까지 밝혀진 *C. parasitica*의 모든 laccase(*Lac 1*, 2 & 3)역시 CHV1-713의 감염에 의해 Down-regulation되는 것을 확인할 수 있었다.

*Vir 1*의 경우 원하는 치환돌연변이체를 1/80의 확률로 얻을 수 있었으며 이를 wild type과 비교하여 무성 포자 형성의 감소 및 유성생식의 능력을 나타내었으며 이로부터 얻은 결과와 유전자 염기 배열의 homology에 의해 이들이 *C. parasitica*의 sexual pheromone을 code하고 있음을 확인하였다.

Cryparin의 경우 진균의 hydrophobin에 속하는 단백질로서 구조체에 대한 소수성을 갖게 하는 특성 외에 ceratoulmin과 같은 phytotoxin 그리고 elicitor, allergen 등의 다양한 기능이 제시되고 있다. 특히 Cryparin은 *C. parasitica*에서 매우 풍부한 단백질로서 유전자 발현이 액체 배양 48시간 후에 전체 mRNA중 25%(Zhang et al., 1994)를

차지하고 있을 정도이다. 현재 본 연구자 등에 의해 그 치환이 시도된 바 조사한 300여 개의 형질 전환 체중 치환체의 존재를 확인할 수 없었으나 본 연구자에 의해 형질전환 운반체 조작에 의한 “two-way selection” 및 cryparin의 단순 분리방법 등의 개발을 통한 선발법에 의해 가능성이 있는 형질전환체의 선발과 이에 대한 확인이 진행 중이다.

Conclusion

Mycovirus감염에 의한 *C. parasitica*의 영향 기작으로는 *C. parasitica*에서의 정상적인 signal transduction과정 중 세포내 2차 전달자인 Ca^{++} 생산에 관련된 조절기작에 영향을 주고 있음이 제시되고 있으며 이들에 의해 조절을 받는 *C. parasitica*에서의 여러 final target으로는 mycovirus감염 병징들과 함께 지금까지 밝혀진 *C. parasitica*의 몇 가지 유전자들로 제시되고 있지만 이들 기주-기생체간의 상호작용을 처음 전달하는 기주 *C. parasitica*에서의 primary target이 되는 유전자에 대한 연구가 다른 일반적인 virus의 감염의 경우에서처럼 미비하다 할 수 있다. 이에 균주 HSM1에서 유전자 *Hsm1*의 발현 양의 변화에 따라 이병균주(UEP1)에서와 같이 marker gene 발현이 억제되는 현상과 더 나아가 이병 균주에서의 *Hsm1*발현의 양상이 wild type에서와는 다른 균주 HSM1과 같은 형태를 나타냄으로 *C. parasitica*에서 여러 marker gene들에 대한 조절 유전자로서의 *Hsm1*의 가능성과 나아가 CHV1-713에 의해 영향받는 조절 유전자임을 제시함으로 mycovirus에 의한 *C. parasitica*의 유전자 조절기작으로서 *C. parasitica*내의 “regulatory hierarchy”내의 key regulatory gene을 통한 조절기작을 나타내고 있다 (Fig. 2).

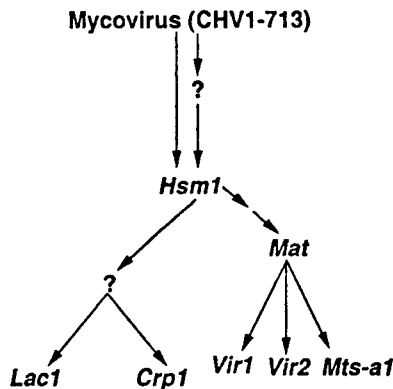


Fig. 2. The putative regulatory hierarchy of gene regulations by CHV1-713 in *Cryphonectria parasitica*. Lines with arrow head represent the possible steps and directions in mode of action. ? indicates unidentified gene(s). *Hsm1*, *Mat*, *Lac1*, *Crp1*, *Vir1*, *Vir2*, and *Mts-a1* represent genes for hypovirulence symptom micmicking1, mating type locus, extracellular laccase1, cryparin, pheromone1, pheromone2 and mating type “a”-specific gene, respectively.

여러 병징과 marker gene들간의 상호관계 및 이들 marker gene들의 생물학적 기능을 연구하고자 실시한 유전자 치환 실험중 *Lac 1*의 경우 functional redundancy에 의한 새로운 형태의 inducible extracellular laccase(*Lac 3*)의 존재를 확인하였으나 *Lac 1*의 경우 병원성과 직접적인 연관을 지을 수는 없으나 *C. parasitica*에서의 전반적인 laccase의 생물학적 기능은 더욱 강조된다 할 수 있다.

*Vir 1*의 생물학적 기능을 살펴본 결과 이들은 *C. parasitica*의 유성생식에 관련된 sex pheromone으로서 정상적인 자낭의 형성에 관련될 뿐더러 더 나아가 이들의 식물병리학적인 중요성은 *C. parasitica*의 mycovirus에 대한 유일한 자기 방어 수단인 vegetative compatibility group(VCG)을 결정하는 유전자들의 재조합을 차단함으로써 *C. parasitica* 집단 내의 VCG를 단순화시킴으로 이병 균주와 정상 균주간의 균사체의 융합을 통한 virus의 전파가 용이하게 한다. 또 mycovirus감염에 의한 무성 포자의 형성의 감소는 밤나무 동고병의 2차 전염원의 수를 감소함으로써 밤나무 동고병균에 대한 생물적 방제에 있어서 중요한 의미를 갖는다 할 수 있다.

유전자 *Cry 1*의 치환 돌연변이체의 획득과 이를 이용한 연구는 앞으로 그 연구가 한창인 곰팡이 hydrophobin gene의 여러 생물학적인 기능과 더불어 유전자 *Cry 1*의 병원성과의 관계 및 대량발현을 하는 *Cry 1*에서 얻은 변형된 형태의 promoter와 reporter gene으로 구성된 chimeric fusion gene의 형질전환으로 얻은 형질전환체에서 이들 reporter gene의 발현을 살펴보는 “promoter analysis”와 이들로부터 밝혀질 promoter내의 중요한 cis-element 및 이들 각각의 cis-element들에 대한 mycovirus의 영향을 연구하는데 필수적이다. 현재 본 연구자등에 의해 *Cry 1*의 형질전환체의 선발에 관한 효과적인 방법의 개발로 치환체의 획득과 이를 이용한 연구가 낙관적이라 할 수 있다.

Literature cited

1. Anagnostakis, S. L. 1987. Chestnut blight: the classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia* 79:23-27.
2. Choi, G. H., and Nuss, D. L. 1992. Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. *Science* 257:800-803.
3. Elliston, J. E. 1985. Characteristics of dsRNA-free and dsRNA containing strains of *Endothia parasitica* in relation to hypovirulence. *Phytopathology* 75:151-158.
4. Kim, D. H., and Van Alfen, N. K. 1995. Fungal gene regulation by mycovirus occurred through the potential regulatory gene from the host fungus, *Cryphonectria parasitica* (in review).
5. Kim, D. H., Rigling, D., Zhang, L., and Van Alfen, N. K. 1994. A new extracellular laccase of *Cryphonectria parasitica* is revealed by deletion of *Lac A*.

Mol. Plant-Microbe Interact. 8:259-266.

6. Powell, W. A., and Van Alfen, N. K. 1987. Differential accumulation of poly (A)+ RNA between virulent and double-stranded RNA-induced hypovirulent strains of *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. Mol. Cell. Biol. 7:3688-3693.
7. Shapira, R., Choi, G. H., and Nuss, D. L. 1991. Virus-like genetic organization and expression strategy for a double-stranded RNA genetic element associated with biological control of chestnut blight. EMBO. J. 10:731-739.
8. Varley, D. A., Podila, G. K., and Hiermath, S. T. 1992. Cutinase in *Cryphonectria parasitica*, the chestnut blight fungus: Suppression of cutinase gene expression in isogenic hypovirulent strains containing double-stranded RNAs. Mol. Cell. Biol. 12:4539-4544.
9. Zhang, L., Churchill, A. C. U., Kazmierczak, P., Kim, D. H., and Van Alfen, N. K. 1993. Hypovirulence-associated traits induced by a mycovirus of *Cryphonectria parasitica* are mimicked by targeted inactivation of a host gene. Mol. Cell. Biol. 13:7782-7792.
10. Zhang, L., Villalon, D., Sun, Y., Kazmierczak, P., and Van Alfen, N. K. 1994. Virus-associated down-regulation of the gene encoding cryparin, an abundant cell-surface protein from the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. Gene 139:59-64.