

사상곰팡이의 분자유전학적 연구 Molecular Genetics of Filamentous Fungi

윤 성 환

순천향대학교 생명과학부

지구상에 곤충류 다음으로 다양하게 존재하는 곰팡이는 분해자로서 생태계의 먹이사슬을 완성하는 데 중요한 위치를 차지할 뿐 아니라 기생체 또는 병원체로서 각종 동, 식물, 미생물의 생장에 큰 영향을 끼친다. 곰팡이는 외부로부터 영양공급이 필요한 타가영양체이며 단세포(효모) 또는 다세포의 형태(사상곰팡이, filamentous fungi)로 존재하고 버섯류를 제외하면 눈으로 관찰이 어렵기 때문에 미생물의 범주에 속한다. 하지만 세균 등의 원핵생물과 달리 완전히 분화된 세포 내 소기관을 가지고 있는 하등한 진핵생물이다[3, 12]. 또한 곰팡이는 병원균과 같은 유해 미생물로서 뿐 아니라 다양한 종류의 2차 대사산물 및 식품의 생산자와 같은 유용미생물로서도 산업적인 측면에서 많은 주목을 받고 있다. 한편, 최근 들어 곰팡이의 이러한 생태, 생리, 세포학적 특성 때문에 사람을 비롯한 고등진핵생물의 분자생물학적 연구를 위한 모델로도 각광을 받고 있다. 본 논문에서는 곰팡이 중 균사와 같은 다세포 구조를 형성하는 사상곰팡이의 유전학적 연구 현황 및 응용가능성 등에 관해 몇 가지 예를 중심으로 설명하고자 한다.

고전 유전학적 접근

전통적인 유전학은 주로 양친간의 교배에 의한 자손 형질의 분석을 통해 이루어져 왔다. 특히 곰팡이는 고등 진핵생물과 다른 여러 특징을 가지고 있기 때문에 고전 유전학의 연구 도구로 오래 전부터 사용되어 왔다[13]. 일단 곰팡이는 인공적으로 쉽게 배양할 수 있으며 생활 주기가 짧아 여러 세대에 걸친 유전 연구에 적합하다. 또한 유성생식을 통해 감수분열 과정에서 일어나는 유전적 재조합의 산물인 자손을 일반적으로 쉽게 얻을 수 있으며 무성 생식을 통해서도 유전적으로 동일한 집단을 대규모로 확보할 수 있다. 하지만 무엇보다도 곰팡이를 이용한 유전학 연구의 가장 큰 장점은 사상곰팡이가 대부분의 생활사에 걸쳐 반수체(haploid)의 핵상을 가지고 있다는 사실이다. 반수체 상태에서는 돌연변이에 의한 형질의 변화가 배수체의 경우와 달리 그대로 드러나기 때문에 대상 곰팡이로부터 유용한 돌연변이체의 선발이 상대적으로 쉽다. 실제 유전연구

는 주로 *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Penicillium* spp. 등과 같은 모델 곰팡이를 이용하여 이루어 졌다[13]. 이들 모델 곰팡이는 죽은 유기물에서 영양분을 공급받는 부생균(saprophytes)으로서 이들의 생장, 분화, 생리에 관련된 다양한 형질이 유전연구의 대상이었다. 연구방법으로는 자외선 조사나 EMS 처리와 같은 돌연변이 유발방법을 통해 연구 대상 형질에 관한 돌연변이균주를 선발하고 다양한 조합의 교배를 통해 해당 돌연변이의 원인 유전자에 대한 분석이 이루어졌다. 한편 이들 모델 곰팡이 외에 식물병원균의 대부분을 차지하는 병원성 곰팡이의 유전학은 기주 식물의 저항성과 관련한 곰팡이의 병원성 유전자를 중심으로 이루어졌다[46].

유전학 연구의 어려움

앞서 언급한 곰팡이의 장점에도 불구하고 곰팡이의 독특한 생식방법은 오히려 유전연구에 장애가 되기도 한다. 곰팡이 중에는 서로 성이 다른 배우자끼리의 결합에 의한 유성생식 방법으로 번식하는 자가불화합성(self-sterile, heterothallic) 곰팡이 외에도 배우자간의 결합 없이 한 개체로부터 감수분열을 통해 자손을 생산할 수 있는 자가화합성(self-fertile, homothallic) 곰팡이가 있다. 또한 자연 상태에서 유성생식능력을 잃어 무성생식으로만 번식을 하는 불완전균류가 있다[3, 10, 12, 47]. 자가화합성 곰팡이의 경우 자손은 비록 핵융합 후 감수분열에 의해 형성되지만, 자가화합성 때문에 불완전균류의 무성생식에 의해 형성되는 무성포자와 마찬가지로 모든 형질이 모체와 100% 동일하다. 일반적으로 고등생물에서 유성생식은 무성생식보다 번거롭고 비효율적인데도 불구하고 중요한 번식방법으로 계속 유지되어왔다. 이는 무성생식에 의해 형성된 자손들이 돌연변이라는 매우 드문 현상에 의해서만 유전적 변이를 획득하는 데 반해 유성세대의 자손은 유전자재조합(recombination)의 방법으로 부모와 유전적으로 다른 형질을 상대적으로 빨리 획득하여 성장환경의 변화에 보다 쉽게 적응할 수 있기 때문이라고 할 수 있다. 그러나 이러한 관점에서 자가화합성 곰팡이와 불완전균류의 자손생산은 유성생식의 일반적인 장점을

지니고 있지 못한다고 할 수 있다. 따라서 이러한 곰팡이의 생식방법은 유성생식의 진화적 의미를 다른 관점에서 접근할 수 있게 하지만 실제로 곰팡이의 여러 형질들에 관한 유전학적 연구에는 큰 걸림돌이 되어 왔다[48]. 한편 이와 같은 문제를 극복하기 위해 여러 대체 방법이 시도되었다. 먼저 서로 다른 핵을 공통의 세포질에 함유할 수 있는 이질핵체(heterokaryon)의 형성[49]이나 원형질체 융합 방법[16, 40]을 통해 유전자 재조합 개체를 얻을 수 있었으나 일반적으로 적용할 만큼의 결과는 아니었다. 그밖에 자가화합성 곰팡이의 경우 서로 다른 종류의 돌연변이 사이의 complementation을 이용한 교배(outcross)가 확인되었으며[7, 34], 불완전균류에서는 준유성교환(parasexuality)에 의한 유전분석이 이루어졌다.

분자생물학적 접근

최근에 급속히 발달한 분자생물학적 연구기법은 곰팡이의 고전 유전학적 연구결과를 재확인할 뿐 아니라 유전학 연구의 새로운 길을 제시하였다. 실제로 20여 년 전 사상곰팡이의 세포로부터 게놈 DNA가 처음으로 분리된 후 지금까지 사상곰팡이의 분자유전학적 연구는 눈부신 발전을 하였다.

I. 형질전환

외부 DNA의 도입에 의한 사상곰팡이의 형질전환은 분자유전학 연구의 출발점으로 인식되었다[14, 33]. 먼저 곰팡이의 단단한 세포벽이 외부 유전자의 도입에 장애가 되기 때문에 세포벽을 분해하여 얻어지는 원형질체를 형질전환의 competent cell로 이용하는 방법이 시도되었다. 그러나 매우 복잡한 곰팡이의 세포벽 구성 성분 때문에 원형질체 형성에 관한 조건들, 즉 세포벽 분해효소, 삼투압 조절제, 재생배지의 성분 등은 곰팡이의 종류에 따라 매우 다양하였다. 일반적으로 세포벽 분해 효소로는 Novozyme, β -glucuronidase, cellulase 등이 사용되는데 최근 Novo사에서 Novozyme 생산을 중단하여 Driselase 등으로 대체하고 있지만 특수한 경우에 연구자들이 어려움을 겪고 있다. 삼투압 조절제로는 NaCl, KCl, NH_4Cl 등의 무기물과 sorbitol, sucrose, mannitol 등의 유기물이 사용된다. 대개 성공적인 형질전환을 위해서 $10^5 \sim 10^6/\text{ml}$ 정도의 원형질체를 확보하여야 한다. 외부 DNA는 원형질체와 혼합된 후 PEG(polyethyleneglycol)와 calcium shock에 의해 원형질체 안으로 들어간다. 이때 외부 DNA에 포함되어있는 곰팡이용 표지인자로는 주로 항생제 저항성 유전자를 사용한다(예, hygromycin B, phleomycin, benomyl, geneticin, blasticidin-S 등)[9, 20, 32, 35, 38]. 사상곰팡이의 경우 세포 내로 도입된 외부 DNA는 곰팡이의 염색체 DNA(chromosomal DNA)에 삽입되어야만 형질을 발현할 수 있다. 이와 같은 이유로 재생배지에서 선발된 형질전환체는 대부분 안정적으로 외부 DNA 생물산업

를 함유하고 있으나 가끔 계대배양 과정에서 looping out 등의 mechanism에 의해 외부 DNA를 잃는 수도 있다. 한편 사상곰팡이의 형질전환은 다른 방법으로도 가능하다. 특히 최근에 식물의 형질전환에 주로 이용되는 bombardment[19]나 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 곰팡이 게놈 내 외부 유전자의 도입이 시도되고 있으며[17, 28, 30, 31], 세균의 형질전환 방법 중 하나인 electroporation도 곰팡이의 무성포자 또는 원형질체를 이용하여 시도되고 있다[8, 36]. 하지만 이들 방법은 아직 일반화가 안 되었기 때문에 앞서 설명한 원형질체와 PEG에 의한 방법이 가장 안정적인 곰팡이의 형질전환 방법이라 할 수 있다. 사상 곰팡이의 형질전환 빈도는 곰팡이의 종류에 따라 다양하지만(1,000 ~ 0.1/ μg) 세균의 형질전환 빈도와 비교해 상당히 떨어진다. 따라서 상대적으로 형질전환률이 높은 *N. crassa*의 경우[2, 42]를 제외하고 다른 곰팡이에서는 형질전환이 게놈 library 탐색을 통한 돌연변이 균주의 complementation과 같은 목적으로는 널리 사용되지 못하고 있다. 이를 해결하기 위해 세균의 plasmid와 같이 외부 유전자를 포함할 수 있고 곰팡이 세포 내에서 스스로 복제할 수 있는 곰팡이 유래 plasmid에 관한 연구가 진행되었다. 하지만 효모 균인 *Saccharomyces cerevisiae*의 2μ plasmid를 제외하고 사상곰팡이의 plasmid는 주로 미토콘드리아에서 발견되었으며 그 기능이나 특징이 gene cloning과 complementation에 적합하지 않았다[5].

II. 돌연변이 유발법(유전체 삽입 변이체 집단 육성방법)

유전 연구에 필수적인 표지인자 삽입 돌연변이체의 육성은 세균이나 식물의 경우 transposon을 이용하여 이루어지고 있다. 사상곰팡이의 경우 식물병원균인 *Fusarium oxysporum*의 *impala*라는 transposon을 이용한 표지인자 삽입 돌연변이 방법이 몇몇 곰팡이에서 시도되고 있으나 적용 대상이 제한적이다[29, 41]. 또한 대부분의 곰팡이 transposon은 게놈 내에서 활발히 활동하지 못하기 때문에 돌연변이 유발방법으로는 유용성이 그리 크지 않다[11]. 따라서 여러 대체 방법이 개발되었는데 가장 대표적인 방법은 곰팡이의 형질전환법을 응용하여 개발된 제한효소에 의한 유전체 삽입법(Restriction Enzyme-Mediated Integration, REMI)과 *A. tumefaciens*에 의한 형질전환법(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT)이다. REMI는 곰팡이 원형질체에 곰팡이 게놈과 유사성이 없는 형질전환용 벡터 DNA를 첨가하여 곰팡이의 형질전환체를 얻는 방법에 근거를 두고 있다. 이때 벡터 DNA는 곰팡이 게놈 내로 비상동성 재조합(illegitimate recombination)에 의해 삽입된다[37]. 그런데 REMI의 경우 원형의 벡터 DNA를 적당한 제한효소로 절단하여 선형화(linearization) 시킨 후 과량의 제한효소와 함께 곰팡이 원형질체에 첨가하면 원형 벡터 DNA에 의한 곰팡이의 일반적인 형질전환법에 비해 훨씬 많

은 형질전환체를 얻을 수 있다(경우에 따라 50~100배 이상). 또한 벡터가 계놈 내 제한효소 절단부위에 무작위적으로 삽입되기 때문에 효과적인 유전체 삽입 변이 균주 (insertional mutants) 를 얻을 수 있다[22,27]. REMI에 대한 정확한 메카니즘은 밝혀져 있지 않지만 곰팡이의 계놈 DNA가 REMI과정 중 원형질체에 첨가되는 과량의 제한효소에 의해 일시적으로 절단되었다가 복구될 때 선형 벡터 DNA의 제한효소 절단 부위와 계놈 DNA의 해당 부위 사이에서 상동성 재조합 (homologous recombination)이 일어나 계놈 내로 벡터가 무작위적으로 삽입된다고 추측하고 있다. 그러나 거대 단백질인 제한효소가 어떻게 곰팡이의 원형질체의 세포막과 핵막을 통과하는 지에 대한 실험적 증거는 없다. 한편 REMI 돌연변이 균주의 교배를 통한 유전분석과 벡터의 특정 부위를 이용하여 계놈 내 벡터 삽입위치와 돌연변이 원인 유전자를 확인·분석할 수 있다. 하지만 경우에 따라서 벡터 DNA의 계놈 내 삽입이 삽입부위 근처 유전자의 결실(deletion)이나, 계놈의 재정렬 (genomic rearrangement) 등을 일으켜 삽입된 벡터가 돌연변이 유전자에 tagging 되지 않는 경우가 발생하기도 한다. 하지만 REMI에 의한 유전자의 결실 등도 원하는 형질의 돌연변이 균주를 보다 빨리 얻는 데 도움이 되기도 한다[49]. 지금까지 REMI를 이용하여 많은 사상곰팡이의 돌연변이체 집단이 육성되었으며 그들의 유전분석 등을 통해 여러 돌연변이 원인 유전자가 동정, 확인되었다[1, 4, 6, 39]. 한편 최근 들어 ATMT에 의한 곰팡이 계놈 내 T-DNA의 삽입이 몇몇 사상곰팡이에서 확인된 후 식물의 경우[21]와 마찬가지로 이를 이용한 사상곰팡이의 형질전환 및 유전체 삽입 돌연변이 균주 집단의 육성이 진행되고 있다. ATMT에 의한 곰팡이 계놈 내 외부 유전자의 삽입은 REMI를 비롯한 기존의 형질전환 방법에 비해 몇 가지 장점을 가지고 있다. 먼저 실험방법이 매우 간단하다. 기존의 방법에서는 곰팡이의 원형질체 분리와 형질전환용 벡터 DNA의 확보가 필수적이다. 특히 각 곰팡이에 알맞은 원형질체 분리 조건을 찾는 데 상당한 시간과 노력이 필요하다. 하지만 ATMT의 경우 원하는 사상곰팡이의 포자와 적당한 표지인자를 포함한 T-DNA 함유 *A. tumefaciens* 균주와의 혼합을 통해 쉽게 곰팡이의 형질전환체를 얻을 수 있다. 그리고 단일 copy의 벡터가 계놈에 무작위적으로 삽입되어 있는 변이체를 상대적으로 많이 얻을 수 있으며 REMI에 비해 곰팡이 계놈 구조의 변화에 큰 영향을 끼치지 않기 때문에 삽입 벡터의 특정 부위를 이용하여 곰팡이 계놈 내 벡터 삽입위치 뿐 아니라 돌연변이 원인유전자의 특성을 쉽게 확인할 수 있다. 이와 같은 장점으로 ATMT는 곰팡이의 보다 손쉬운 형질전환 방법으로서 뿐 아니라 유전분석이 용이한 유전체 삽입 변이 균주 집단을 효과적으로 육성할 수 있는 수단으로서 각광을 받고 있다[31]. 그러나 최적의 ATMT 조건은 사상곰팡이마다 다르며 ATMT 방법이 제대로 적용되지 않는 경우도 있기 때

문에 모든 사상곰팡이의 최적 돌연변이 유발법은 아니다.

III. 유전자 기능 연구

이미 분리된 곰팡이 유전자의 기능연구는 형질전환에 의한 외부 DNA의 곰팡이 핵 내 유입과 상동성 재조합에 의한 해당 유전자의 disruption 이나 deletion 방법을 통해 이루어진다. 이와 같은 방법은 세균의 유전자 knock-out을 위한 marker exchange 방법과 원리가 비슷하다. gene disruption의 경우 해당 유전자의 파손된 조각(truncated copy)을 형질전환용 벡터에 포함시켜 핵 안으로 유입시킨 후 계놈의 유전자와 벡터의 파손된 유전자 조각사이의 단일 교차(single cross-over)에 의한 상동성 재조합을 통해 유전자의 knock-out을 일으킨다. gene deletion의 경우 해당 유전자의 5'과 3' 인접 부위(flanks) 사이에 형질전환용 표지인자를 끼워넣은 선형의 벡터를 핵 안에 유입시킨 후 벡터와 계놈의 해당 부위사이의 이중 교차(double cross-over)를 통해 유전자를 계놈에서 deletion 시키고 그 위치에 표지인자를 대신 삽입시킬 수 있다[45]. 이러한 곰팡이 유전자 knock-out의 성패는 벡터에 포함되어 있는 곰팡이 유전자 조각 또는 유전자 인접부위의 길이에 의해 결정된다. 실제로 *S. cerevisiae*의 경우 6개의 DNA 염기 상동성만으로도 충분한 상동성 재조합의 가능성이 밝혀졌다[37]. 또한 gene deletion의 경우도 벡터에 계놈과 100% 유사도를 지닌 해당 유전자의 5'과 3' flank 부위를 수십 개만 포함시켜도 높은 확률로 상동성 재조합이 일어난다 [26]. 따라서 효모곰팡이의 경우 유전자 knock-out을 위한 벡터의 제작을 PCR 증폭으로 쉽게 해결할 수 있어 많은 유전자의 기능이 밝혀지고 있다[18, 25, 43]. 이러한 PCR-based gene targeting 방법이 목화의 병원성 사상곰팡이인 *Ashbya gossypii*에도 적용이 되고 있지만 [44] 대부분의 사상곰팡이의 경우 벡터 DNA 염기와 계놈 사이에 최소한 300 ~ 400개의 DNA 염기 유사도가 있어야만 상동성 재조합을 20 ~ 30% 정도의 빈도로 기대할 수 있다. 따라서 사상곰팡이 유전자의 deletion의 경우 형질전환용 벡터 제작에 많은 시간과 노력이 필요하기 때문에 다수의 유전자 기능을 한꺼번에 연구하는 데 어려움이 많다. 최근에 Lee 등은 inverse PCR 방법을 이용하여 gene deletion용 벡터 제작시간을 단축하였다[23, 24]. 한편 위의 방법을 통한 유전자 기능연구가 어려운 경우(예를 들면 치사 유전자) antisense RNA에 의한 gene silencing 방법이 시도 되고 있으나 antisense RNA의 dose와 표현형 변화사이의 상관관계에 대한 연구가 필수적이다.

사상곰팡이의 유전체학 연구

효모곰팡이인 *S. cerevisiae*의 전체 계놈 구조 및 DNA 염기 서열의 결정은 1996년에 완성되었지만[15] 사상곰팡이의 유전체 연구는 1990년대 말 *A. nidulans*에서 처음 시도되었다. 연

구방법도 효모와 달리 shot-gun sequencing에 의한 게놈 DNA의 염기서열 결정 및 생물정보학적 기법을 이용한 유전자 유사도 비교와 유전자 기능의 추정 및 데이터의 구축 등이었다. 따라서 아직까지 *A. nidulans*의 완벽한 유전자 지도에 바탕을 둔 전체 게놈의 분석은 완성되지 않았다. 더욱이 이러한 *A. nidulans*의 유전체학 연구는 미국의 거대 기업인 Pioneer사와 Millenium사의 합작기업인 Cereon Genomics 사에 의해 이루어졌으며 아직까지 연구내용이 완전히 공개되지 않고 있다. 단지 대학을 비롯한 비영리 연구단체들에게만 제한적으로 게놈 데이터로의 접근이 허용되고 있을 뿐이다(<http://microbial.cereon.com>).

한편 전통적인 곰팡이 유전학은 유전연구에 적합한 몇몇 모델곰팡이에 의존하는데 반해 최근의 유전체학 출현은 모델곰팡이의 연구 후 다른 곰팡이로의 적용과정을 생략하고 산업적 가치가 높은 곰팡이의 직접적인 대량 유전연구를 가능케 하고 있다. 이에 따라 여러 식물병원성 사상곰팡이인 *A. gossypii*, *Magnaporthe grisea*(벼 도열병균), *C. heterostrophus*(옥수수 깨씨무늬병균), *Gibberella zeae*(맥류 병원균) 등과 이전에 유전연구에 어려움을 겪었던 동물 병원성 사상 곰팡이(*Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Pneumocystis carinii*)

표 1. 사상곰팡이 연구의 범위와 내용

유전체학 연구

- 1) 구조 유전체학
 - 가. 버섯을 비롯한 우리 나라 주요 곰팡이의 유전적 다양성 조사 및 경쟁력 있는 종의 선발
 - 나. shot-gun sequencing, EST, microarray 분석, database 구축
- 2) 기능 유전체학
 - 가. 유전체 삽입 돌연변이체 집단의 대량 육성
 - 나. 돌연변이체의 형질분석 및 관련 유전자의 분리, 기능 분석
 - 다. 기능 유전자와 다양한 유전 표지를 이용한 유전자 지도의 작성
 - 라. 신호전달 관련 유전자의 대량 탐색, 기능 규명, 신호전달체계 network의 통합적인 규명

유용물질 생산기작

- 1) 의약품, 농용 유용물질 생성 곰팡이 균주의 선발, 대사기작 연구
 - 가. 유용물질 생산 균주의 탐색 및 선발
 - 나. 이에 관여하는 물질 및 유전자(군)의 분리
 - 다. 물질 생합성 유전자의 기능 규명, 발현 및 조절 기작 규명
 - 마. 작용 기작에 대한 분자생물학적 연구
- 2) 대사공학을 통한 신물질의 개발에 관한 연구
 - 가. 희귀 곰팡이 또는 인공배양불능 곰팡이로부터 물질 생합성 관련 유전자원의 확보
 - 나. 생합성 관련 유전자의 치환 등을 통한 대사경로의 변경
 - 다. 생합성 유전자(군)의 heterologous expression 을 통한 물질의 대량생산

식물병 발생 기작에 대한 분자생물학적 연구

- 1) 병 발생에 있어서 병원균 대사물질의 역할 규명
 - 가. 병원성관련 대사물질(기주특이적 독소, 곰팡이독소, 세포벽분해효소, 저항성반응 유도물질 등)의 탐색
 - 나. 대사물질의 생물검정법 확립
- 2) 대사물질의 생합성에 관한 분자유전학적 연구
 - 가. 대사물질 미생성 돌연변이 균주의 탐색 및 선발, 대사물질 생합성 경로 규명 및 유전분석
 - 나. 생합성 관련 유전자(군)의 분리 및 기능 규명
 - 다. 대사물질 생합성의 조절 기작 규명
 - 라. 병원성 관련 물질의 생합성 억제기술 개발
- 3) 대사물질과 관련된 병원성의 변이에 관한 연구
 - 가. 병원균 집단 내 대사물질 생성 변이의 측정
 - 나. 대사물질 생합성의 진화적 유래 규명
- 4) 병저항성 식물 개발에 필요한 곰팡이 대사물질의 연구
 - 가. 대사물질 생합성과 관련된 식물-곰팡이 상호 작용의 규명
 - 나. 곰팡이 대사물질 생합성 유전자를 이용한 병저항성 형질전환식물의 개발

특수환경 적응 기작

- 1) 곰팡이에 의한 유해물질의 분해 및 제거에 관한 연구
 - 가. 각종 유해물질(독소, 공업폐기물, 중금속 등)의 분해 곰팡이 탐색 및 선발
 - 나. 분해 대사 경로의 생화학적 연구 및 분해 관련 유전자(군)의 분리
 - 다. 유전자 조작에 의한 분해능 강화 및 다양한 기질 특이성을 갖는 균주의 창출
 - 라. 비슷한 능력을 갖는 식물과의 관계 규명 및 이를 이용한 환경정화 시스템 창출
- 2) 유해환경 적응 곰팡이에 관한 연구

생물산업

등이 새로운 병원성 곰팡이의 유전체학 연구 모델 겸 직접 연구 대상이 되고 있다. 이러한 맥락에서 예전부터 *A. nidulans* 보다 훨씬 연구가 많이 이루어진 *N. crassa*의 유전체학 연구가 지연되는 점을 이해할 수 있을 것이다. 이들 곰팡이의 유전체학 연구의 주요 방향은 *A. nidulans*의 경우와 마찬가지로 shot-gun sequencing에 의한 전체 게놈의 DNA 염기서열 결정 및 유전자의 유사도 분석, DNA chip 기술과 비교유전체학을 통한 병 발생 관련 형질에 특이적인 유전자의 분석 등이다. 그러나 사상곰팡이의 유전체학은 여전히 거대 기업에 의해 주도적으로 연구되고 있으며 이들은 막대한 연구인력과 장비를 단시간에 투입하여 전체 게놈 수준에서 병원성 곰팡이의 특징을 파악함으로써 병원균의 방제와 병 저항성 생물자원의 개발에 총력을 기울이고 있다. 한편 거대기업보다 규모가 작은 구미의 대학과 국립연구소에서는 곰팡이의 EST 분석을 통해 곰팡이의 특정 분화단계에 필수적인 유전자 집단을 집중 분석하고 있으며 전체 게놈 수준의 연구는 여러 연구 집단의 협동연구에 의존하고 있다.

앞으로의 전망

아직까지 사상곰팡이의 대량 유전체 연구는 게놈 염기서열 결정 및 생물정보학 기술을 이용한 기능유전자의 추정, 유사도 분석이 주를 이루고 있으며 최근 들어 DNA chip을 이용한 유전자의 발현양상 및 기능의 추정이 대량으로 이루어지고 있다. 특히 곰팡이의 여러 life style(부생, 기생, 공생)에 대표적인 종들 간의 비교유전체학 연구를 통해 각 생활 단계에 특이적인 유전자군을 구분하여 산업적으로 활용이 가능한 유전자를 확보하려고 한다. 또한 유용물질의 대사과정에 관한 유전자의 대량 탐색도 유전체학 수준에서 시도되어 유전자 조작에 의한 곰팡이의 새로운 대사공학(metabolic engineering) 분야가 주목을 받고 있다. 현재 몇몇 사상곰팡이에 국한되어 있지만 사상곰팡이의 게놈 DNA에 관한 자료는 매우 방대하다. 그리고 이러한 자료의 처리와 이용은 컴퓨터에 절대적으로 의존하고 있는 실정이다. 하지만 그 다음 단계의 연구방향은 게놈의 유전자 하나 하나의 기능을 생물학적으로 밝히고 생명공학적으로 가치가 높은 유전자를 탐색, 선발하여 이용하는 것이다. 하지만 곰팡이 게놈의 대량 분석과 달리 현재의 개별 유전자 기능에 관한 연구는 전 세계적으로 아직 시작 단계에 불과하다. 사상곰팡이 유전자의 기능 연구는 개별 유전자의 disruption 또는 deletion에 의한 유전자 knock-out과 같은 분자생물학적 연구와 교배를 이용한 전통유전학의 결합이 필수적이거나 현재의 곰팡이 유전자의 knock-out 방법으로는 사상곰팡이의 유전자 기능을 대량으로 분석하는 데에 한계가 있다. 따라서 이를 극복하고 구조 유전체학 연구와 같은 수준의 신속하고 종합적인 유전자 기능 연구를 위해서는 유전체 삽입 변이체 집단

의 육성이 무엇보다 중요할 것이다. 풍부한 표지인자 삽입 돌연변이체 집단이 확보되면 유전분석 및 유전자 분리를 통해 각 형질의 유전자 기능을 생물학적으로 구명하고 나아가 기존의 게놈 염기서열 및 EST, DNA chip 등의 결과와 비교 통합하여 곰팡이 게놈을 구조적, 기능적으로 분석할 수 있을 것이다.

최근 우리 나라에서도 생물공학의 중요성이 점점 강조가 되고 있을 뿐 아니라 정부도 적극적인 의지로 많은 연구비를 투자하고 있다. 특히 앞서 언급한 돌연변이 집단을 이용한 곰팡이의 기능 유전체학 연구는 연구 대상 곰팡이 또는 대상형질의 차별화에 따라 우리도 집중하면 빠른 시일 내에 선진국 수준의 경쟁력을 확보할 수 있을 것이다. 우리 나라에서 경쟁력을 확보할 수 있는 사상곰팡이의 분자유전학적 연구 범위와 내용을 표 1에 간단히 정리해 보았다.

참고문헌

1. Akamatsu, H., Y. Itoh, M. Kodama, H. Otani, and K. Kohmoto. 1997. AAL-toxin deficient mutants of *Alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme-mediated integration. *Phytopathology* **87**: 967-972.
2. Akins, R. A., and A. M. Lambowitz. 1985. General methods for cloning *Neurospora crassa* nuclear genes by complementation of mutants. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 2272-2278.
3. Alexopoulos, C. J., C. W. Mims, and M. Blackwell. 1996. *Introductory Mycology*, 4th ed., John Wiley, New York, U.S.A.
4. Balhad re, P. V., A. J. Foster, and N. J. Talbot. 1999. Identification of pathogenicity mutants of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* by insertional mutagenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**: 129-142.
5. Bertrand H. 2000. Role of mitochondrial DNA in the senescence and hypovirulence of fungi and potential for plant disease control. *Annu. Rev. Phytopathol.* **38**: 397-422.
6. B lker, M., H. U. B hnert, K. H. Braun, J. G rl, and R. Kahmann. 1995. Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol. Gen. Genet.* **248**: 547-552.
7. Bowden, R. L. and Leslie, J. F. 1999. Sexual Recombination in *Gibberella zeae*. *Phytopathology* **89**: 182-188.
8. Chakraborty, B. N., and M. Kapoor. 1990. Transformation of filamentous fungi by electroporation. *Nucleic Acids Res.* **18**: 22.
9. Chaure P., S. J. Gurr, P. Spanu. 2000. Stable transformation of *Erysiphe graminis* an obligate biotrophic pathogen of barley. *Nat. Biotechnol.* **18**: 205-207.
10. Coppin, E., R. Debuchy, S. Arnaise, and M. Picard. 1997. Mating types and sexual development in filamentous

- ascomycetes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 411-428.
11. Daboussi. S. F. 1996. Fungal transposable elements: Generators of diversity and genetic tools. *J. Genet.* **75**: 325-329.
 12. Deacon, J. W. 1997. *Modern Mycology*, 3rd ed., Blackwell Science, Oxford, U.K.
 13. Fincham, J. R. S., P. R. Day, and A. Radford. 1979. *Fungal Genetics*, 4th ed. Blackwell Scientific Publishers, Oxford, U.K.
 14. Fincham, J. R. S. 1989. Transformation in Fungi. *Microbiol. Rev.* **53**: 148-170.
 15. Goffeau A. B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, and et al. 1996. Life with 6000 Genes. *Science* **274**: 546-573.
 16. Gokhale, D. V. 1992. Fungal protoplast fusion-A tool for breeding industrial strains. *J. Sci. Ind. Res.* **51**: 497-506.
 17. de Groot, M. J. A., P. Bundock, P. J. J. Hooykass, and A. G. M. Beijersbergen. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat. Biotech.* **16**: 839-842.
 18. Hamer L., K. Adachi, M. V. Montenegro-Chamorro, and et al. 2001. Gene discovery and gene function assignment in filamentous fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 5110-5115.
 19. Hilber U. W., M. Bodmer, F. D. Smith, W. Koller. 1994. Biolistic transformation of conidia of *Botryotinia fuckeliana*. *Curr. Genet.* **25**: 124-127.
 20. Kimura M., T. Kamakura, Q. Z. Tao, I. Kaneko, I. Yamaguchi. 1994. Cloning of the blasticidin S deaminase gene (BSD) from *Aspergillus terreus* and its use as a selectable marker for *Schizosaccharomyces pombe* and *Pyricularia oryzae*. *Mol. Gen. Genet.* **242**: 121-129.
 21. Krysan, P. J., J. C. Young, and M. R. Sussman. 1999. T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**: 2283-2290.
 22. Kuspa, A., and W. F. Loomis. 1992. Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 8803-8807.
 23. Lee, T., Y. K. Han, K. H. Kim, S. H. Yun, and Y. W. Lee. 2001. *Tri13* and *Tri7* determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *submitted*.
 24. Lee, T., D.-W. Oh, H.-S. Kim, J. Lee, Y.-H Kim, S.-H. Yun, and Y.-W. Lee. 2001. Identification of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae* by using PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2966-2972.
 25. Longtine M. S., A 3rd. McKenzie, D. J. Demarini, N. G. Shah, A. Wach, A. Brachat, P. Philippsen, J. R. Pringle. 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 953-961.
 26. Lorenz M. C., R. S. Muir, E. Lim, J. McElver, S. C. Weber, J. Heitman. 1995. Gene disruption with PCR products in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **158**: 113-117.
 27. Lu, S., L. Lyngholm, G. Yang, C. Bronson, and O. C. Yoder. 1994. Tagged mutations at the *Tox1* locus of *Cochliobolus heterostrophus* by restriction enzyme-mediated integration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 12469-12653.
 28. Malonek S, F. Meinhardt. 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic ascomycete *Calonectria morgani*. *Curr. Genet.* **40**: 152-155.
 29. Migheli, Q. C. Steinberg, J. M. Daviere, and et al. 2000. Recovery of mutants impaired in pathogenicity after transposition of *impala* in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Phytopathology* **90**: 1279-1284.
 30. Mikosch T. S., B. Lavrijssen, A. S. Sonnenberg, L. J. van Griensven. 2001. Transformation of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. *Curr. Genet.* **39**: 35-39.
 31. Mullins, E. D., X. Chen, P. Romaine, R. Raina, D. M. Geiser, and S. Kang. 2001. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: An efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology* **91**: 173-180.
 32. Orbach, M. J., E. B. Porro, and C. Yanofsky. 1986. Cloning and characterization of the gene for β -tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 2452-2461.
 33. Peberdy, J. F., C. E. Caten, J. E. Ogden, and J. W. Bennett. 1991. *Applied Molecular Genetics of Fungi*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K.
 34. Pilgeram, A. L., and J. M. Henson. 1992. Sexual crosses of homothallic fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* based on use of an auxotroph obtained by transformation. *Exp. Mycol.* **16**: 35-43.
 35. Punt, P. J., R. P. Oliver, M. A. Dingemans, P. H. Pouwels, and C. A. M. J. J. van den Hondel. 1987. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* **56**: 117-124.
 36. Robinson M., A. Sharon. 1999. Transformation of the bioherbicide *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* by electroporation of germinated conidia. *Curr. Genet.* **36**: 98-104.
 37. Schiestle, R. H., and T. D. Petes. 1991. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 7585-7589.
 38. Schuren F. H., J. G. Wessels. 1994. Highly-efficient transformation of the homobasidiomycete *Schizophyllum commune* to phleomycin resistance. *Curr. Genet.* **26**: 179-183.

39. Sweigard, J. A., A. M. Carroll, L. Farrall, F. G. Chumley, and B. Valent. 1998. *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 404-412.
40. Talbot, N. J., A. Coddington, I. N. Roberts, and R. P. Oliver. 1988. Diploid construction by protoplast fusion in *Fulvia fulva* (syn. *Cladosporium fulvum*): genetic analysis of an imperfect plant pathogen. *Curr. Genet.* **14**: 567-572.
41. Villalba F., M. H. Lebrun, A. Hua-Van, M. J. Daboussi, M. C. Grosjean-Cournoyer. 2001. Transposon *impala*, a novel tool for gene tagging in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 308-315.
42. Vollmer, S. J., and C. Yanofsky. 1986. Efficient cloning of genes of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 4869-4873.
43. Wach A., A. Brachat, R. Pohlmann, P. Philippsen. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793-1808.
44. Wendland J., Y. Ayad-Durieux, P. Knechtle, C. Rebischung, P. Philippsen. 2000. PCR-based gene targeting in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Gene* **242**: 381-391.
45. Wirsal, S. B. G. Turgeon, and O. C. Yoder. 1996. Deletion of the *Cochliobolus heterostrophus* mating-type (*MAT*) locus promotes the function of *MAT* transgenes. *Curr. Genet.* **29**: 241-249.
46. Yoder, O. C., and B. G. Turgeon. 1996. Molecular-genetic evaluation of fungal molecules for roles in pathogenesis to plants. *J. Genet.* **75**: 425-440.
47. Yun, S.-H., T. Arie, I. Kaneko, O. C. Yoder, and B. G. Turgeon. 2000. Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and asexual species. *Fungal Genet. Biol.* **31**: 7-20.
48. Yun, S.-H., Berbee, M. L., Yoder, O. C., and Turgeon, B. G. 1999. Evolution of the fungal self-fertile reproductive life style from self-sterile ancestors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 5592-5597.
49. Yun, S.-H., B. G. Turgeon, and O. C. Yoder. 1998. REMI-induced mutants of *Mycosphaerella zeae-maydis* lacking the PM-toxin are deficient in pathogenesis to corn. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **52**: 53-66.