

## 환경 스트레스에 의한 세포 내 신호의 이동 경로와 유전적 조절

김일섭 · 김현영 · 강홍규<sup>1</sup> · 윤호성\*

경북대학교 생물학과, <sup>1</sup>제주대학교 아열대 원예산업 연구소

### Genetic Regulation of Cellular Responses and Signal Targeting Pathways Invoked by an Environmental Stress

Il-Sup Kim, Hyun-Young Kim, Hong-Gyu Kang<sup>1</sup> and Ho-Sung Yoon\*

Department of Biology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

<sup>1</sup>Subtropical Horticulture Research Institute, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

**Abstract** – A cell is the product of a long period of evolution and can be represented as an optimized system (homeostasis). Stimuli from the outside environment are received by sensory apparatus on the surface of the cell and transferred through complicated pathways and eventually regulate gene expression. These signals affect cell physiology, growth, and development, and the interaction among genes in the signal transduction pathway is a critical part of the regulation. In this study, the interactions of deletion mutants and overexpression of the extracopies of the genes were used to understand their relationships to each other. Also, green fluorescent protein (GFP reporter gene) was fused to the regulatory genes to elucidate their interactions. Cooverexpression of the two genes in extracopy plasmids suggested that *patS* acts at the downstream of *hetR* in the regulatory network. The experiments using *gfp* fusion in different genetic background cells also indicated the epistasis relationships between the two genes. A model describing the regulatory network that controls cell development is presented.

**Key words** : signal targeting pathway, genetic epistasis, cellular development

## 서 론

세포는 오랜 시간 진화의 결과로 하나의 최적화된 계를 가진다(항상성). 변화하는 외부 환경으로부터의 자극(environmental stress)은 세포 표면에서 신호로 받아들여져 복잡한 과정을 거쳐 세포 내를 이동 또는 전달되며 대부분 궁극적으로 유전적 조절로 이어진다. 이들 신호는 세포의 생리대사, 성장, 발달에 영향을 미치게 되며

유전자 간의 상호 작용 또한 중요한 부분이다. 본 연구는 세포 발생을 제어하는 핵심적인 조절 유전자들 간의 상호 조절 연관 관계를 reporter gene (GFP) fusion, double knock-out 및 double overexpression과 같은 분자생물학적인 방법으로 탐구하여, 유전자 조절경로 네트워크(genetic regulatory network)를 밝히고자 하였다. 다양한 유전자 돌연변이의 상호작용은 우리가 유전자 간의 조절 관계를 상세히 논하는 데 사용되었다.

*Anabaena* PCC 7120은 공간적인 분리를 통해 두 종류의 세포가 광합성과 질소고정을 모두 이용하는 사상 남세균(filamentous cyanobacterium)이다. 질산염이나 암모

\* Corresponding author: Ho-Sung Yoon, Tel. 053-950-5348, Fax. 053-953-3066, E-mail. hyoon@knu.ac.kr

니아와 같은 질소원이 풍부한 경우, *Anabaena*는 100개 혹은 그보다 많은 수의 영양세포들(vegetative cells)로 이루어진 선상의 상태로 증식한다. 반면, *Anabaena* PCC 7120은 질소원이 없을 경우, 스스로 공기 중의 질소가스를 고정할 수 있는 특수 분화된 이형세포들(heterocysts)이 광합성 영양세포 10개 당 하나의 패턴으로 만들어져 주위 세포에는 질소고정산물을 제공하는 한편 주위의 영양세포로부터는 탄수화물을 제공받게 된다. 즉, 주위 환경에 질소원이 감소하면 각각의 세포들은 질소결핍을 감지하게 되고, 9~14시간 사이(실험실 조건하)에 이형세포로 분화하려는 움직임을 보이게 되고 이후 18~24시간 사이에 이형세포를 형성한다(Yoon and Golden 2001). 사상체가 성장하고 이형세포 사이의 영양세포의 수가 증가함에 따라, 양쪽의 이형세포로부터 멀리 떨어진 중간쯤의 영양세포들은 이형세포로부터의 질소원 공급이 부족하게 되어 다시 이형세포로의 분화를 시작하게 됨으로써 10개의 영양세포당 하나의 이형세포라는 패턴이 계속 유지가 된다.

그 동안 이형세포로의 분화와 패턴형성에 관련된 유전자들에 대한 연구를 통해, *hetR*, *pata*, *patS*, *hetN*의 네 개 유전자들이 중요한 조절인자로 작용하는 것으로 알려져 있다(Golden and Yoon 2003). *hetR* 유전자는 이형세포의 발생 조절자(master regulator)로, 펩티드(peptide)의 단백질 분해효소 활성화에 필요한 두 세린(serine) 잔기 중 하나에 돌연변이가 일어나게 되면 Het<sup>-</sup> 표현형이 나타나고(Buikema and Haselkorn 1991; Zhou *et al.* 1998; Dong *et al.* 2000; Buikema and Haselkorn 2001) 과발현 혹은 여분의 *hetR* 사본이 첨가되면 이형세포가 발생하지 않는 정상조건하에서도 보통보다 많은 수의 이형세포가 형성되는 multiple-contiguous-heterocyst (Mch) 표현형을 보인다(Buikema and Haselkorn 1991; Buikema and Haselkorn 2001). HetR은 자기 자신 및 *patS* 프로모터 부위의 DNA에 결합하는 것으로 보고되었으며, *in vitro* 실험을 통해 48번째 아미노산인 시스테인이 알라닌으로 치환된 돌연변이체는 DNA 결합과 이합체화반응(dimerization)이 저해되어 이형세포로 분화하지 않는다는 사실이 밝혀졌다(Huang *et al.* 2004). 또한, *hetR*의 프로모터 부위에는 다수의 전사개시점이 존재하는데, 이들 중 일부는 *hetR*과 전사 활성인자 *ntcA*를 필요로 하거나 *hetR* 스스로를 요구하는 것으로 보인다(Buikema and Haselkorn 2001; Muro-Pastor *et al.* 2002).

*patS*와 *hetN*은 유도성 프로모터를 통한 과발현 또는 다수의 사본 존재 시, *hetR*과는 대조적으로 이형세포로의 분화를 저해한다. *patS* 유전자는 filaments가 분화되도록 유도될 때 직접적으로 패턴 형성을 조절한다. *patS* 삭

제돌연변이체(*patS*-null mutant)는 질소결핍배지에서는 Mch 표현형을 나타내며 질산염의 존재하에서는 비정상적인 분화를 보인다(Yoon and Golden 1998). *patS* 유전자는 13개 또는 17개의 아미노산으로 이루어진 펩티드를 암호화하고 있으며, C-말단에 위치한 5개 아미노산서열로 만든 펜타펩티드(pentapeptide)를 *Anabaena* PCC 7120 culture에 투여하였을 경우 이형세포의 형성을 억제한다는 것이 밝혀졌다. PatS 펩티드가 패턴형성을 결정하는 억제신호의 구배를 생성하기 위해 filament를 따라 이형세포가 분화하는 방향으로부터 확산되어 나간다고 제안되어 왔다(Yoon and Golden 1998). PatS 신호에 대한 수용체는 세포질에 있고(Wu *et al.* 2004), PatS의 C-말단 펜타펩티드가 *hetR* 자신의 프로모터영역에서 HetR 단백질과의 결합을 막는다는 사실은 *hetR* 자기조절을 억제하는 데 PatS가 직접적으로 관여한다는 것을 제시해 준다. *hetR* (R223W) 돌연변이 대립유전자형이 PatS와 함께 패턴형성으로의 분화를 억제하는 것으로 알려진 또 다른 저해자인 HetN에 의한 억제에 감수성을 나타내지 않는 것으로 나타났다. 또한, *patS* 결실돌연변이체가 72시간 후에 Mch 패턴에서 야생형 패턴으로 바뀌어진다는 사실은 패턴형성유지에 연관되어 있는 또 다른 인자들이 존재한다는 것을 제시한다(Yoon and Golden 2001).

*hetN*은 ketoacyl reductase를 암호화하고 있으며 과발현시 이형세포의 분화를 억제시키고 이형세포 패턴유지에 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 알려져 있다. *patS* 돌연변이체와 다르게, *hetN*이 발현되지 않은 filament는 유도 후 24시간 동안은 정상적인 이형세포의 패턴형성을 나타내나, 그 이후로는 과도한 분화의 결과로 Mch 표현형이 나타난다. *hetN* 유전자가 발현되지 않을 경우에 Mch 표현형이 늦게 나타나고 *hetN* 정상적인 발현이 유도 후 12시간이 지나서야 나타난다는 사실은 HetN이 이형세포패턴 형성에서는 결정적 역할을 하고 있지 않다는 것을 제시한다. 대신에, HetN은 세포 성장과 분열에 의해 filament를 연장시키고 새로운 이형세포를 형성하는 것으로써 패턴을 유지시키는 데는 중요한 역할을 하는 것으로 보인다.

1992년에 발견된 *patA* 유전자는 아직까지 돌연변이의 표현형과 이형세포형성과정에서의 역할에 대해 알려진 바가 거의 없다. 이 유전자는 CheY 서열과 유사한 C-말단과 신호전달과 관련이 있는 조절인자서열의 N-말단으로 이루어져 있는 두 개의 도메인을 암호화하고 있다. CheY의 인산화에 필수적인 세 개의 아미노산이 보존되어 있다는 사실은 PatA의 조절이 인산화와 관련될 수 있다는 것을 제안한다. 돌연변이체는 사상체 중간에 나

타나는 이형세포가 거의 형성되지 않으나, filament의 길이에 상관없이 filament의 끝에서 하나의 이형세포로 분화된다. *patA* 돌연변이체에서 사상체 중간에 이형세포가 관찰되지 않는다는 사실은 *patA*를 필요로 하지 않는 말단세포에서의 독특한 분화 과정이 있다는 것을 제시해 준다. *patA* 돌연변이체에서 *hetR*을 과발현시켰을 경우에 Mch 표현형이 억제된다는 사실은 *patA*가 분화를 조절하는 조절 네트워크에서 *hetR* 전사의 하류인자(downstream)로 작용한다는 것을 의미한다 (Buikema and Haselkorn 2001). *patA* 돌연변이체의 말단에 위치한 세포에서만 *hetR* 전사가 유도되는 것은 PatA 또한 *hetR* 전사 과정의 상류(upstream)에 영향을 끼친다는 것을 나타낸다 (Buikema and Haselkorn 2001).

유전적인 상위작용 분석은 유전자 산물 기능의 대사 경로나 모든 유전자에 대한 자세한 분자적인 지식이 없이도 유전자와 조절 경로에 대한 이들 상호 간의 역할과 기능적인 관계를 파악하는 데 이용될 수 있다. 본 연구에서는 *hetR*과 *patS* 유전자의 단일돌연변이체 및 이중돌연변이 간의 표현형을 비교하고, *hetR*과 *patS* 유전자 동시 과발현 형질을 분석함으로써 이들 유전자 간의 상위성(epistasis) 및 이형세포분화와 패턴형성 과정의 관계를 알아봄으로써 유전자 조절경로 네트워크(genetic regulatory network)를 밝히고자 하였다

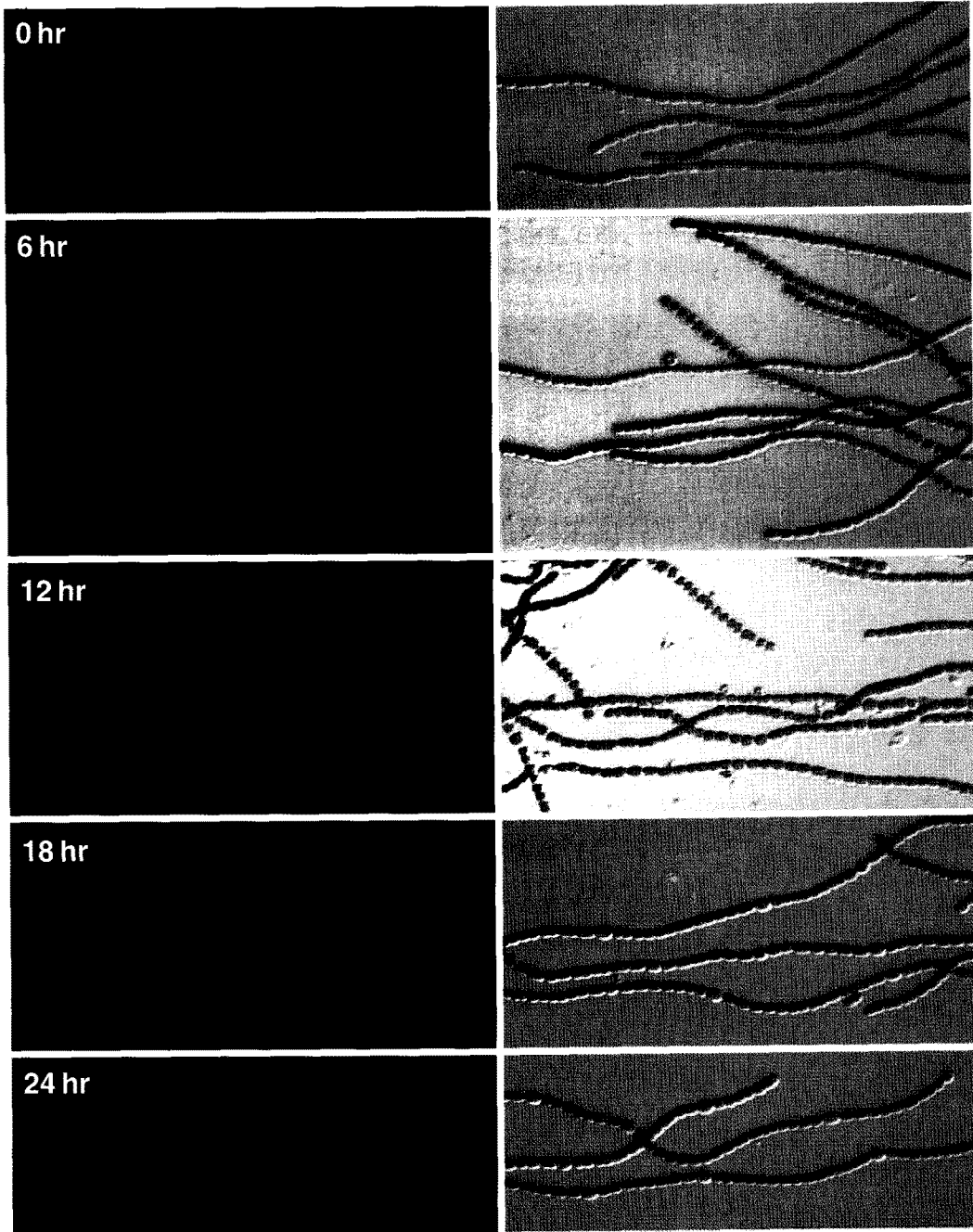
## 재료 및 방법

*Escherichia coli*와 *Anabaena* PCC 7120의 성장, 항생제의 농도, BG-110배지를 사용하는 이형세포형성의 유도, 질소원의 결핍, 그리고 photomicroscopy에 대한 조건들은 Borthakur *et al.* (2005) 연구에서 제시된 방법과 동일하게 이루어졌다 (Borthakur *et al.* 2005). 이형세포 간의 평균 간격을 결정하기 위해서, 인접하지 않은 두 이형세포 사이의 영양세포수의 수는 Fig. 1에서 제시된 시간 동안 측정되었다. Multiple-contiguous-heterocyst 형성의 백분율을 결정하기 위해서, 100개의 이형세포가 계산되었고 인접한 이형세포의 수도 각각 기록되었다. 모든 결과는 표준편차를 제시하는 오차율을 포함하는 3번의 반복실험의 평균을 기록하였다.

Plasmid pSMC164는 각각 *patS* 유전자를 UHM101과 UHM103 계통으로부터 결실시켜 UHM111과 UHM113 계통을 형성하기 위해 사용되었다. pSMC164는 pSMC147에서 유래되었고, pSMC147은 *patS*의 결실을 유도하도록 설계되었다. pSMC164를 만들기 위해서,  $\Omega$  Sp<sup>r</sup>/Sm<sup>r</sup> interposon을 포함하는 작은 단편이 pSMC147의 *EcoRV*

site 안으로 이동되었다. Plasmid pDP120은 구리 농도의존성 *petE* 프로모터로부터 *hetR*을 과발현하기 위해서 사용된 이동성 벡터이다. 342-bp *petE* 프로모터와 3'말단에 첨가된 6개의 히스티딘 코돈을 포함하는 *hetR* 암호화 영역에 상응하는 920-bp 단편은 PCR을 통해 증폭된 후, 개별적으로 TA cloning vector pGEM-T (Promega)으로 클로닝되었다. P<sub>*petE*</sub>는 *ApaI-PstI* 단편으로서 pBluescript 벡터 안으로 이동되었다. 그리고 *hetR*은 그 후에 P<sub>*petE*</sub>의 3'말단과 *hetR*의 5'말단에서 pDR119를 만들기 위해 프라이머에 의해 만들어진 *NdeI* site들을 이용하는 *NdeI-pstI* 단편으로서 이 벡터 안으로 이동되었다. P<sub>*petE*</sub>-*hetR* 결합체는 pDR120을 만들기 위해 *KpnI-SacI* 단편으로서 pDR119에서 pAM504로 이동되었다. Plasmid pDR151은 PCR에 의해 생성되는 *patS* 암호화 영역의 35 bp 상류에서 시작하는 308-bp 단편의 첨가에 의해 만들어진 pDR120과 다르다 (프라이머 *patSF-BamHI*과 *patSR-SacI*을 사용함). 308-bp 단편은 pGEM-T 벡터로 클로닝되었고, 프라이머 내부에 포함된 제한효소 절단부위를 사용하는 *BamHI-SacI* 단편으로서 P<sub>*petE*</sub>-*hetR* 결합체를 포함하는 pDR119로 이동되었다. 결과물로 생긴 P<sub>*petE*</sub>-*hetR* *patS* 합성 오피론은 그 후에 pDR151을 만들기 위해 *KpnI-SacI* 단편으로서 pAM504로 클로닝 되었다. 모든 PCR 생산물은 다음의 단계에 사용되기 전에 염기서열 분석에 사용되어 Taq 돌연변이가 없는지 검증되었다.

유전자 결실은, 결실된 영역에 스펙티노마이신 (spectinomycin)과 스트렙토마이신 (streptomycin)에 대한 저항성을 부여하는  $\Omega$  interposon을 삽입하는 이중-결실 돌연변이체를 만듦으로써 이루어 졌다. 그리고 염색체 안으로 삽입되어 플라스미드로 통합된 세포는 스펙티노마이신과 스트렙토마이신에 선택적인 플라스미드 pSMC164를 제외하면 모두 네오마이신 (neomycin) 저항성이다. 단일의 재조합 (single recombination)은 비선택적인 액체 배양에서 성장되고 두 번 2차 배양되었다. 사상체 안에서의 혼합 배양을 피하기 위해서 사상체는 액체 2차 배양 전에 한번 Branson 1510 ultrasonic cleaner를 사용해서 대부분 단일 세포들로 분해되었다. 그리고 다시 벡터에 있는 *sacB* 유전자를 빠져나가게 하기 위해 5% 자당 (sucrose)을 포함하는 고체 BG-11 배지에 도포되었다. 벡터의 결손은 네오마이신에 대한 감수성과 벡터에 의해 암호화되는 몇몇의 저항성을 시험함으로써 증명된다. UHM111과 UHM113은 5% 자당, 스펙티노마이신 그리고 스트렙토마이신을 포함하는 BG-11 배지에 저항성을 보였다. 돌연변이 구조를 확인하기 위해서 설계된 프라이머로 돌연변이의 영역을 증폭하였고, PCR 생산물의 크기는 돌연변이 구성체가 야생형 영역으로 복귀했는지를 확



**Fig. 1.** Expression pattern of the *hetR-gfp* fusion construct. Heterocyst formation was induced by removing fixed nitrogen sources from the media (0 hour). Heterocyst development and *gfp* fluorescence was monitored as indicated time intervals (hours at the left top corner of the pictures). Left panel, fluorescence photomicrographs; right panel, bright field photomicrographs.

인하는 데 사용되었다. 이중 재조합에서 결실 돌연변이의 초기 선발을 위해서, 군체 (colony) PCR이 사용되었다.

#### 결과 및 고찰

본 연구에서는 이형세포의 패턴을 형성하는 데 필수

적인 유전자들의 돌연변이를 유발하였을 경우, 이러한 유전적 변화가 이형세포의 발생에 미치는 영향을 알아 보았다. 이러한 목적하에 *Anabaena* PCC 7120의 *hetR*과 *patS* 유전자를 대상으로 단일 돌연변이와 이중 돌연변이의 경우에는 한 유전자의 발현이 다른 관련 유전자 발현을 제어하는 등의 유전자 간 상호작용 (epistasis)을 분석

**Table 1.** Phenotype of the mutant backgrounds and overexpression of the genes involved in heterocyst pattern formation. Plus signs indicate the strength of the phenotype

Genetic background	Extracopy	Phenotype	Reference
WT	<i>patS</i>	Het <sup>-</sup>	Yoon and Golden 1998
WT	<i>hetR</i>	Het <sup>+++</sup>	Buikema and Haselkorn 1991
WT	<i>patS+hetR</i>	Het <sup>-</sup>	This study
<i>patS</i> <sup>-</sup>	-	Het <sup>+++</sup>	Yoon and Golden 1998
<i>hetR</i> <sup>-</sup>	-	Het <sup>-</sup>	Buikema and Haselkorn 1991
<i>patS</i> <sup>-</sup> , <i>hetR</i> <sup>-</sup>	-	Het <sup>-</sup>	This study
<i>patS</i> <sup>-</sup>	<i>hetR</i>	Het <sup>+++</sup>	This study
<i>hetR</i> <sup>-</sup>	<i>patS</i>	Het <sup>-</sup>	This study
WT	<i>hetR</i> +peptide	Het <sup>++</sup>	This study

하였다. 또한 과발현 벡터를 이용해서 하나의 유전자 또는 두 개의 유전자를 동시에 과발현함으로써 두 유전자 간의 상호작용을 이해하고자 하였다 (Table 1). 단백질 형성 자체를 못하게 하는 돌연변이 (deletion mutants)를 시행하여 단백질 일부만 돌연변이를 일으키는 경우 (point mutation/insertion mutation)가 잠재적으로 연구결과에 끼칠 수 있는 여러 문제점을 사전에 예방하고자 하였다. 예를 들어, *Anabaena* PCC 7120에서 *hetR* 유전자의 179 번째 염기에 점 돌연변이가 일어나 serine이 asparagine으로 바뀐 *hetR* 유전자의 돌연변이형 (mutant allele)과 정상적인 염기서열을 가진 야생형 유전자형 (wild-type allele)이 한 세포 내에 동시에 존재할 경우, 돌연변이 유전자형이 야생형 유전자형보다 우성이라는 사실이 보고된 바 있다 (Huang *et al.* 2004). 또 다른 경우로서, 삼입 돌연변이, 정지역제 돌연변이, 틀이동 돌연변이에 의해 초래될 수 있는 불완전 펩티드들이 그 기능이 변화하는 것으로 나타났고 (Egland and Greenberg 2000), 전위인자의 삼입은 주위 유전자들의 조절에 영향을 주는 것으로 나타났다 (Wang and Roth 1988). 이 연구에서 사용된 돌연변이들 각각은 스펙티노마이신과 스트렙토마이신 모두에게 저항성을 부여하는 interposon을 가진 유전자로 교체하여 특정유전자가 완전히 결실될 수 있도록 유도하였다.

또한, 이 연구에서 사용된 특정 돌연변이들은 외인성 DNA의 첨가 없이 유전자 암호부위를 결실시키는 유전자 교환을 통해서 돌연변이가 만들어졌다. 단일시스트론으로 암호화된 유전자들이 비활성화될 경우, 이러한 종류의 돌연변이는 주변 유전자들의 발현에 가장 적은 영

향을 끼치며, 항생제 저항성 마커들의 사용에 의한 영향을 받지 않는다. 이러한 돌연변이들의 유도는 박테리아에서는 가능한 일이고, *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 같은 다른 선상 (filamentous)의 남조류에서는 이루어져 왔으나, *Anabaena* PCC 7120에서의 실험은 많지 않았다. 이 연구에서는 Cai and Wolk (1990)의 연구에 제시된 방법을 약간 변형시켜 돌연변이 선택 마커를 남기지 않는 돌연변이체들을 만들었다. 특히, 단일 재조합형 (single recombinants)은 단일 세포들 내에서 표지되지 않은 염색체들이 완전한 분리되도록 충분한 시간을 주어 자라도록 하였으며 filament들은 서로 섞이기 않도록 두 번째 재조합 (double recombinants) 전에 서로 나누었다. 그 다음, colony PCR은 두 번째 재조합을 통해 원하는 유전형을 지닌 filaments를 선별하기 위해 사용되었는데, 조사된 이중 재조합형들의 대략 절반이 원하는 돌연변이들을 가졌음을 확인되었다.

*hetR* 삭제 돌연변이체는 유전자의 암호 및 프로모터 부위를 염색체로부터 제거하여 만들어졌다. 야생형과는 달리, *hetR* 단일 돌연변이체는 모든 조건하에서 Het<sup>-</sup>로 나타났는데, 이는 치환 돌연변이 및 삼입 돌연변이들을 이용한 *hetR* 선행연구들과 일치하는 결과이다 (Table 1) (Black *et al.* 1993; Dong *et al.* 2000). *patS*<sup>-</sup> 돌연변이체의 경우, *patS* 유전자를 포함하고 있는 381 bp의 부분을 염색체로부터 삭제하였거나 (Yoon and Golden 1998), 종류에 따라서는 Ω Sp<sup>r</sup>/Sm<sup>r</sup> cassette에 의해 대체시킴으로써 만들어졌다. 그 결과, Ω Sp<sup>r</sup>/Sm<sup>r</sup> cassette을 포함하지 않는 *patS* 결실 단일 돌연변이체는 이전에 보고된 바와 같이, *patS* Ω Sp<sup>r</sup>/Sm<sup>r</sup> cassette대체돌연변이와 표현형이 같았다 (Yoon and Golden 1998, 2001). 또한, *hetR*, *patS*의 이중 돌연변이들이 단일 돌연변이체와의 표현형 비교분석 및 가능한 상위 작용 (epistasis)을 알아보기 위해 만들어졌으며, 각각의 돌연변이들이 이형세포 발생 및 패턴형성에 관한 확실한 표현형을 나타냄으로써, 어떤 경우의 돌연변이가 이중 돌연변이의 표현형에 기반을 둔 상위인가를 확인하는 것이 가능하였다.

HetR이 *Anabaena* PCC 7120에서 분화의 주된 조절자이고 이형세포형성의 양성 조절 (positive regulation)을 위해 필요하다는 폭넓은 증거가 있다. HetR은 이형세포 발생 초기에 발현이 시작되어 점차로 패턴을 이루며 결국엔 이형세포내부에서 발현이 증가된다는 사실을 알 수 있다 (Fig. 1). HetR 이외의 다른 양성 조절인자들이 HetR에 의해 직접적으로 조절된다는 증거가 제시된 바 없다는 사실로부터 HetR의 중요한 기능 중 하나가 분화 과정을 직접적으로 조절하는 PatS와 같은 분화억제자를 저해한다는 가정을 할 수 있다. 만약 이 가정이 사실이

라면, *patS*의 비활성이 *hetR*의 비활성에 상위성을 가질 것이다. 반면에, HetR이 직접적으로 분화에 필요한 다른 인자들을 조절하고 분화과정에 절대적으로 필요하다면, *hetR*의 비활성이 상위성을 가져야만 하고 이중 돌연변이 표현형들은 Het가 되어야만 한다. 실험 결과,  $\Delta hetR$  (*hetR* deletion) 배경하에 *patS* 유전자 이중 돌연변이체가 단일 *hetR*-삭제 돌연변이체인 Het와 같은 표현형을 나타냄으로써, 이형세포의 분화과정에 있어서 HetR의 주된 역할이 PatS에 의한 분화억제자에 의해 저해되지 않는다는 사실을 제시해 준다고 할 수 있다 (Table 1).

*hetR* 결실의 상위성은, 조절되지 않을 경우 분화과정에 있어 과도하거나 변형된 패턴형성이 나타날 수 있는 유전적 배경에서 조차도 요구되는 이형세포 형성에 있어서 없어서는 안될 양성조절자로서의 HetR의 역할을 분명히 한다. HetR은 질소결핍조건에서 *ntcA* (Muro-Pastor et al. 2002), *patS* (Huang et al. 2004), *hetR* (Black et al. 1993), *hetP* (Fernandez-Pinas and Wolk 1994), *hetC* (Khudyakov and Wolk 1997), *devA* (Cai and Wolk 1990)의 여섯 개 조절 유전자들의 발현을 유도하기 위해 요구되나, 단지 이들 유전자 중 프로모터 부위들과 HetR 사이의 직접적인 상호작용에 대해서 증명된 것은 PatS와 HetR 간의 상호작용뿐이다 (Huang et al. 2004). *hetR* 결실돌연변이체의 Het<sup>-</sup> 표현형을 억제하는 돌연변이들을 분리하는 데 실패한 상위성 실험결과는 *hetR*이 직접적으로 분화에 필요한 *hetR*과 *patS* 유전자들뿐만 아니라 다른 인자의 활성을 직접적으로 조절한다는 것을 나타낸다.

*hetR*을 포함한 플라스미드가 구리 유도성 *petE* 프로모터에 의해 야생형 계통에서 과발현될 때, Mch 표현형이 나타나는 반면 (Buikema and Haselkorn 2001), 같은 프로모터에 의한 *patS*의 과발현은 이형세포 형성을 완전히 저해하는 것으로 알려져 있다 (Yoon and Golden 1998). 이형세포 형성과정에서의 *patS*의 이형세포 저해작용이

*hetR* 전사의 하류조절로 작동하는지를 알아보기 위해, 구리 유도성 *petE* 프로모터의 조절하에 *hetR*이나 *hetR*과 *patS* 두 유전자를 포함한 재조합 오페론을 가지는 pDR120과 pDR151 plasmid가 야생형 계통과 *patS* 또는 *hetR* 돌연변이체로 도입되었다. 구리의 존재하에 이들 플라스미드가 포함된 균주를 배양한 경우, *hetR*이나 *hetR*과 *patS*가 동시에 과발현되었다. 구리 결핍 배지에서 배양했을 때, P<sub>petE</sub>로부터의 전사는 멈추고, 어느 한 쪽의 유전자도 벡터에 의해 발현되지 않았다. 만약 *patS*의 이형세포 저해작용이 *hetR*의 하류 전사 조절에 국한된다면, *petE* 프로모터를 거쳐 우회하는 *hetR*의 정상적 전사 조절은 *patS*가 과발현했을 때에도 이형세포를 형성할 것이다. 구리가 포함된 배지에서 *hetR* 유전자를 과발현하는 pDR120은 예상된 것처럼 Mch 표현형을 나타냈다. 반대로 야생형 계통과 *patS hetR* 두 개의 유전자를 동시에 과발현하는 pDR151에 의해 형질전환된 UHM111계통은 이형세포가 발견되지 않았다 (Het<sup>-</sup>). 구리결핍 배지인 BG-11에서 pDR151을 포함하는 야생형 계통에서 heterocyst 형성은 pDR151이 없는 같은 계통의 것과 유사하게 나타났다 (wild type). 이 결과는 *patS*는 P<sub>petE</sub>에 의해 *hetR*의 본래 전사 조절을 우회한 이후에 이형세포의 형성에서 *patS*의 이형세포 저해 활동이 줄어들지 않는 것은 *hetR* 전사의 하류인자로 행동하는 것을 암시한다. *patS* 과발현이 *hetR* 과발현의 상위라는 사실은 *patS*가 *hetR* 전사 조절의 하류로써 이형세포의 형성을 저해하는 능력이 있음을 보여준다. 최근에, Huang et al. (2004)은 HetR은 이량체의 형태일 때 *patS* 프로모터 부분에 결합할 수 있는 능력이 있는 DNA-결합 단백질이며, PatS pentapeptide는 DNA-HetR 결합을 저지한다 (Table 1, *hetR*+peptide). *hetR* 상위 실험 결과 중, *hetR*이 조건적으로 과발현되는 계통의 이형세포 분화를 억제하는 PatS나 HetN의 상위적 능력은 HetR이 이형세포 형성에 필수적

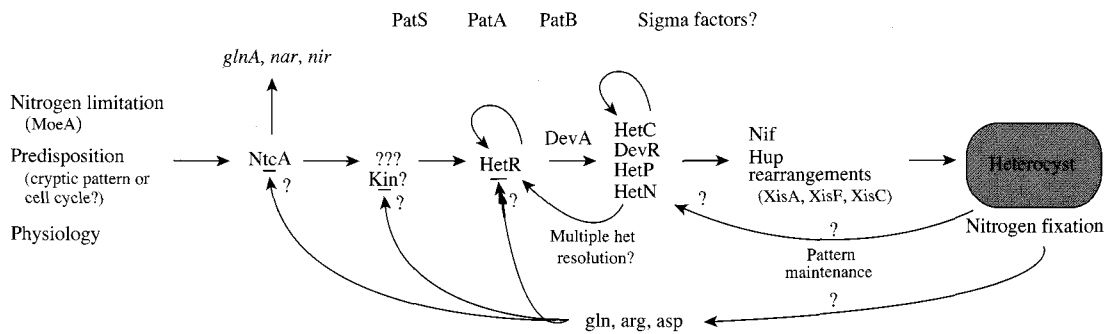


Fig. 2. Genetic regulation and interactions among genes involved in heterocyst pattern formation. Arrows, activation of the downstream gene; bars, repression of the downstream gene.

이나 부가적인 요소의 활성을 직접적으로 조절한다고 제시한다.

Fig. 2는 이전에 알려진 유전자와 이번 연구에서 조사된 유전자 사이의 상호작용과 분화의 조절에 대한 영향을 나타내는 모델로, 이 체계는 생물학적 스위치같이 작동한다. 생물학적 스위치는 입력 신호가 all-or-none 이원 반응에 들어가 전환되고 발생체계에서 세포의 운명을 조절하는 것을 보여준다(Ferrell and Machleder 1998). 질소 결핍상태에서 *hetR* 의존적 분화 경로의 활성화를 이끄는 NtcA의 DNA-결합 활성을 높이는 2-oxoglutarate이 세포 내에서 증가되면 *ntcA*의 활성화를 가져온다. 생물학적 스위치의 두 가지 다른 특징으로는, 간접적인 양성 피드백 회로를 거치는 *hetR* 전사의 초기 유도가 NtcA와 질소 결핍신호에 의존하지만, 후에 일어나는 유도는 체계를 매우 민감하게 무제한 증폭할 수 있게 만드는 직접적인 양성 자기조절을 거치는 HetR의 예를 들 수 있다(Ferrell and Machleder 1998; Ferrell 2002). PatS는 과도한 분화를 방지하고 패턴 형성을 제어하도록 생물학적 스위치의 유도를 방지하는 역할을 한다(Yoon and Golden 1998). 다른 연구에서 보여진 것처럼, *patS*와 *hetN*을 동시에 비활성시킨 돌연변이체는 filament의 모든 세포가 완전히 이형세포가 되도록 만든다(Borthakur *et al.* 2005). PatS와 HetN은 *patS*와 *hetN*의 과발현에 민감히 반응하지 않는 단백질을 암호화하고 있는 *hetR* 대립 유전자의 활성을 방지하는 것으로 볼 수 있다(Khudyakov and Golden 2004). 이 연구에서 증명된 것처럼 PatS, HetN 중에서 *patS*의 과발현은 *hetR*의 것에 대해 우위이기 때문에 *hetR* 전사 upstream과 마찬가지로 *hetR* downstream의 활성이 조절되는 것으로 볼 수 있다. *hetR* 상위 실험 결과는, 분화에 필요한 부가적인 요소들은 그들의 활성에 HetR이 거의 직접적으로 관여하지 않는다는 것을 나타낸다. PatA는 분화에서 PatS와 HetN의 음성적인 영향의 전사감쇠를 보여주고 우위 실험 결과에 의해 제안된 것처럼 PatS와 HetN의 상반되는 영향에 독립인 분화를 촉진한다. PatA의 모든 3가지 기능은 비록 모델 안에서 묘사되진 못했지만 아마도 HetR을 통해 조정된다고 보여진다(Fig. 2).

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 20070301-034-021-008-01-00)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## 참 고 문 헌

- Black TA, Y Cai and CP Wolk. 1993. Spatial expression and autoregulation of *hetR*, a gene involved in the control of heterocyst development in *Anabaena*. *Mol. Microbiol.* 9:77-84.
- Borthakur PB, CC Orozco, SS Young-Robbins, R Haselkorn and SM Callahan. 2005. Inactivation of *patS* and *hetN* causes lethal levels of heterocyst differentiation in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microbiol.* 57:111-123.
- Buikema WJ and R Haselkorn. 1991. Characterization of a gene controlling heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Genes Dev.* 5:321-330.
- Buikema WJ and R Haselkorn. 2001. Expression of the *Anabaena* *hetR* gene from a copper-regulated promoter leads to heterocyst differentiation under repressing conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98:2729-2734.
- Cai YP and CP Wolk. 1990. Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *J. Bacteriol.* 172:3138-3145.
- Dong Y, X Huang, XY Wu and J Zhao. 2000. Identification of the active site of HetR protease and its requirement for heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 182:1575-1579.
- Egland KA and EP Greenberg. 2000. Conversion of the *Vibrio fischeri* transcriptional activator, LuxR, to a repressor. *J. Bacteriol.* 182:805-811.
- Fernandez-Pinas F and CP Wolk. 1994. Expression of *luxCD-E* in *Anabaena* sp. can replace the use of exogenous aldehyde for in vivo localization of transcription by *luxAB*. *Gene* 150:169-174.
- Ferrell JE, Jr. 2002. Self-perpetuating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14:140-148.
- Ferrell JE, Jr. and EM Machleder. 1998. The biochemical basis of an all-or-none cell fate switch in *Xenopus* oocytes. *Science* 280:895-898.
- Golden JW and HS Yoon. 2003. Heterocyst development in *Anabaena*. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:557-563.
- Huang X, Y Dong and J Zhao. 2004. HetR homodimer is a DNA-binding protein required for heterocyst differentiation, and the DNA-binding activity is inhibited by PatS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101:4848-4853.
- Khudyakov I and CP Wolk. 1997. *hetC*, a gene coding for a protein similar to bacterial ABC protein exporters, is involved in early regulation of heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 179:6971-6978.

- Khudyakov IY and JW Golden. 2004. Different functions of HetR, a master regulator of heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. PCC 7120, can be separated by mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101:16040-16045.
- Muro-Pastor AM, A Valladares, E Flores and A Herrero. 2002. Mutual dependence of the expression of the cell differentiation regulatory protein HetR and the global nitrogen regulator NtcA during heterocyst development. *Mol. Microbiol.* 44:1377-1385.
- Wang A and JR Roth. 1988. Activation of silent genes by transposons Tn5 and Tn10. *Genetics* 120:875-885.
- Wu X, D Liu, MH Lee and JW Golden. 2004. *patS* minigenes inhibit heterocyst development of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 186:6422-6429.
- Yoon HS and JW Golden. 1998. Heterocyst pattern formation controlled by a diffusible peptide. *Science* 282:935-938.
- Yoon HS and JW Golden. 2001. *PatS* and products of nitrogen fixation control heterocyst pattern. *J. Bacteriol.* 183:2605-2613.
- Zhou R, X Wei, N Jiang, H Li, Y Dong, KL Hsi and J Zhao. 1998. Evidence that HetR protein is an unusual serine-type protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95:4959-4963.

Manuscript Received: November 7, 2008

Revision Accepted: November 25, 2008

Responsible Editor: Hak Young Lee