

Development of Non-protoplast transformation System in *Aspergillus oryzae*.

Jae Won Lee and Young Tae Hahm

Departments of Biotechnology, Chung-Ang University, An-Sung 456-756

Tel: (0334) 670-3064, FAX: (0334) 675-0406

Abstract

Aspergillus oryzae is a filamentous fungus classified in the group *Aspergillaceae* *Ascomycetes*. It is an important microorganism for industrial production of enzymes and fermented food productions. It secretes large quantities of proteins or enzymes into the culture medium which makes this organism appealing for the production of heterologous proteins. Recently Electric field-mediated transformation method, electroporation, has been applied to fungal transformation. In this study, fungal transformation was carried out by bypassing the protoplast isolation step, decreasing the culturing time and non-protoplast transformation for the increment of transformation efficiency. Transformants were obtained with electroporation in optimal condition 2,500 voltage, 1,540 ohm and 0.50 capacitance. More than 1,000 transformants were obtained with 6-10 hrs cultured mycelia without enzyme treatment, called non-protoplast transformation.

Introduction

Filamentous fungus인 *Aspergillus*는 산업적으로 효소 생산에 이용되어 왔으며, 특히 동양에서는 대두를 주원료로 하는 발효 식품의 제조에 쓰여 왔기에, 식품이나 의약계에 쓰여 질 수 있는 반제품 또는 완제품의 유전공학적인 생산에 이용할 수 있는 미생물이다. 특히 유전공학적인 측면에서 보았을 때, *A. oryzae*는 관심을 끌만한 특징들을 가지고 있다. *A. oryzae* 내에서 산업적으로 효용 가치가 있는 이종 단백질을 발현시킬 경우, 생산된 단백질을 쉽게 세포 밖으로 배출시킬 수 있다. 즉 *A. oryzae*는 자연적으로 많은 양의 효소들을 체외로 배출시킬 수 있는 secretory machinery가 잘 발달되어 있다. 최근에 들어오면서 유전자의 형질전환은 electricfield-mediated transformation method (electroporation)의 개발로 미생물은 물론 동식물 세포에서도 그 응용의 폭을 넓히고 있다. Electroporation은 세포 내로 유전물질, 즉 DNA를 도입시키는 형질전환으로서 분자생물학적인 연구에 매우 중요하다. 살아있는 세포에 high-strength electric field를 걸어 줌으로써 순간적으로 세포막의 구조를 변화시켜 세포막 외부에 pores를 형성한다. 그리고 형성된 pores를 통하여 세포 내 물질과 외부 물질의 확산 또는 교환이 이루어진다. 이러한 전기장을 이용한 형질전환은 동식물 세포의 적용은 물론 최근에는 여러 종류의 Gram-negative 및 positive bacteria cell에 까지도 그 적용의 범위를 넓혀 가고 있으며, 효모 및 곰팡이에서도 시도되고 있다. 그러나 세포마다 그 세포막을 구성하는 물질이 다르므로 같은 형질전환 조건하에서는 그 효율의 차이를 보인다 (Miller et al., 1988). Electroporation에 의한 형질전환의 가장 큰 장점은 그 방법이 신속하고 간단하다는데 있다. 이 방법은 형질전환을 위한 준비로 세포와 plasmid DNA를 원심분리하여 현탁하는 과정이 전부이고 electric pulse도 약 6ms 정도이다. 그리고 electroporation후 바로 배지에 배양함으로써 종전의 sorbitol에 의한 정제과정, heat shock, 사전배양 등의 과정을 생략할 수 있어 한번에 많은

실험을 병행할 수 있다. 다음으로 electroporation에 의한 형질전환은 PEG-mediated transformation보다 세포의 재생력이 높다는데 장점이 있다. 이것은 종전의 방법과 가장 중요한 차이점으로 transformants의 안정성은 high-voltage electroporation에 의하여 repair system이 활성화되었다고 설명하고 있다 (Delorme, 1988). Electric-field-mediated transformation에서 형질전환의 효율은 여러 가지 요인에 영향을 받는다. Electro-competant cells은 electroporation동안 0°C를 유지하여야 한다. DNA는 적은 부피의 물을 포함하는데 이것은 ionic strength를 최소로 하기 위해서이다. Electroporation에 영향을 미치는 또 다른 요인들로는 field strength와 pulses이다. 이 두 관계는 서로 반비례적인 관계로 field strength는 낮을수록 효과적이며 pulses는 길수록 효과적이다. 세포의 농도는 높을수록 형질전환이 잘되고, 화학적 transformation 방법보다 훨씬 높은 DNA 농도의 1차식적인 증가가 효율에 영향을 미친다. 따라서 electric field-mediated transformation에 영향을 미치는 제반 요인들에 대한 연구 결과는 각기 다른 세포에 적용시키기 위한 적정 형질전환 조건의 확립에 중요하며, 아직까지 그 활용의 범위가 제한되고 있는 다른 곰팡이 분야에서도 보다 간단하고, 빠른 형질전환 방법을 확립할 수 있을 것이다. 따라서 본 연구에서는 본 연구실에서 확립한 *A. oryzae*의 electroporation 최적조건 2500 voltage, 1540 ohm 그리고 0.50 capacitance를 사용하여 형질전환 효율이 높은 원형질체 제조 효소의 탐색과 원형질체를 사용하지 않는 형질전환 방법을 최적화 하고자 하였다.

재료 및 방법.

microorganism, media and plasmid

본 연구에서는 *Aspergillus oryzae* YTH-1 strain(argB⁻ mutant)와 플라스미드는 pILJ-16(argB gene)을 사용하였다. 배양을 위한 media로써 *A. oryzae* 배양은 complex media로는 YPD medium(2% peptone, 2% glucose, 1% yeast extract)를 사용하였으며 minimal medium으로는 Czapek-Dox broth(3% Bacto-saccharose, 0.3% NaNO₃, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄-7H₂O, 0.05% KCl, 0.001% FeSO₄-7H₂O)를 사용하였다. Transformant를 위한 selection media로는 minimal medium에 osmotic stabilizer로써 1M sucrose를 사용하였다.

Plasmid DNA Preparation

5ml LB/amp (25ug/ml) broth에서 37°C, overnight 배양시킨 *E. coli*를 eppendorf tube에 옮겨 원심분리 (12,000 Xg, 30sec)하여 cell pellet을 collection하여 0.5ml STE buffer (0.1M NaCl, 10mM Tris-Cl, pH 8.0, 0.1mM EDTA)에 cell pellet을 현탁시키고 원심분리 (12,000 Xg, 30sec)하여 상등액을 제거하고 pellet을 ice-cold한 100ul의 Sol'n I (50mM glucose, 25mM Tris-Cl, pH 8.0, 0.1mM EDTA)을 첨가하여 현탁시킨 후, 여기에 ice-cold한 200ul의 Sol'n II (0.2N Naoh, 1% SDS)를 첨가하여 조심스럽게 tube를 inverting하며 섞어주었다. ice에서 10분간 반응시키고 ice-cold한 Sol'n III (3M Potassium and 5M Acetate) 150ul를 첨가하여 조심스럽게 섞어준 뒤 ice에서 5분간 방치한 후, 4°C, 12,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 fresh tube에 옮긴다. RNase (25mg/ml) 5ul를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응하여 RNA를 제거하였다. 반응이 끝나면 같은 양의 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1)을 첨가하여 vortex하고 4°C, 12,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 취하고 2배의 ice-cold한 100% ethanol을 첨가하여 -70°C에서 침전시킨 뒤 4°C, 12,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 ice-cold한 70% ethanol로 2번 wash한 후 pellet을 air dry시켰다. dry시킨 pellet을 TE buffer (1mM EDTA, 10mM

Tris-Cl, pH 8.0)에 녹여 -20°C에 보관하였다.

Preparation of spore stock.

single colony의 *A. oryzae* YTH-1을 20ml의 YPD agar medium 여러 개에 접종시킨 뒤 30°C에서 7일간 배양하고 spore가 형성되면 5ml의 dH₂O를 넣고 각각 긁어낸다. 이 spore solution을 cheesecloth로 여과시킨 후 8,000rpm에서 15분간 원심분리 한다. spore pellet을 20ml의 dH₂O를 이용 vortex한 후 8,000rpm에서 15분간 원심분리 한다. spore pellet을 dH₂O를 이용 한번 더 위와 같이 반복한다. 또 spore pellet을 10ml의 1%의 Triton X-100 용액에 녹인 후 다시 원심분리 한다. spore pellet을 3-5ml의 같은 용액에 녹인 후 4°C에 보관하며 사용하였다.

Electroporation

원형질체를 이용한 형질전환에서는 원형질체를 만들기 위한 효소로써 Novozyme 234 (20mg/g of mycelia), Hemicellulase (50mg/g of mycelia), Celluclast (50ul/g of mycelia)를 사용하였다. 10⁷-10⁸ spore를 200mg/l D,L-arginine이 포함된 minimal media에 접종시킨 후, *A. oryzae*를 30°C에서 6시간동안 aeration(180rpm)시키며 배양한다. 발아된 mycelia를 9000rpm에서 10분간 원심분리 하여 수집한 다음 osmotically stabilized된 osmotic buffer(1.2M MgSO₄, pH 5.8, 5mM 2-mercaptoethanol) 5ml에 잘 섞는다. mycelia를 STC buffer(1.2M sorbitol, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM CaCl₂) 2ml로 부유한 후 vortex하고 9,000rpm에서 10분간 두 번 세척하여 준다. 이렇게 모은 mycelia를 STC buffer 800ul에 녹여 얼음 속에 보관한다. 10ug의 plasmid DNA를 25ul의 STC buffer에 녹인 후 800ul의 non-protoplast에 넣고 이것을 전극간의 길이가 4mm되는 cuvette에 넣은 후 electro-mediated field transformation(EASYJECT PLUS, EquipBio. co)한다. *A. oryzae*에서 electroporation의 최적 조건을 2500voltage, 0.5capacitance, 1540ohm으로 한 후 60분간 얼음 속에 넣어둔다. mixture를 STC buffer로 두 번 세척한 다음 STC buffer 0.2ml에 녹인다. cell을 1.0M sucrose가 함유된 minimal media plate에 접종 한 후 30°C에서 3-5일간 배양한다. Transformant들이 자라 올라오면 complex agar plate에 옮긴 다음 spore stock을 얻기 위해 30°C에서 배양하였다.

Chromosomal DNA 분리

*A. oryzae*에서의 chromosomal DNA는 Davis et al (1980)의 방법을 수정함으로써 사용하였다. 대략 106-108의 *A. oryzae* spore를 100ml의 YPD 액체배지에 접종한 후 30°C에서 이틀간 통기시켜 배양했다. 자란 mycelia를 Whatman filter paper를 이용하여 여과시킨 후 -70°C에서 보관하여 얼린 후 액체질소와 0.10 - 0.12mm glass bead를 이용하여 막자사발에서 갈았다. mycelia powder를 50ml polypropylene tube에 옮긴 후 mg당 7ml의 extract buffer (1% sarkosyl, 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM EDTA)로 녹였다. Mixture를 20분간 ice에서 배양하고 12,000rpm에서 10분간 centrifuge했다. 상층액을 새 50ml polypropylene tube에 옮긴 후 50ul RNaseA (10mg/ml)를 첨가하고 37°C에서 30분간 incubation했다. 상층액을 동일 부피의 phenol을 첨가시킨 후 12,000rpm에서 10분간 centrifuge했다. Extraction에 phenol: chloroform: isoamylalcohol(25: 24: 1)를 첨가하여 12,000rpm에서 10분간 centrifuge했다. 또한 동일한 부피의 chloroform: isoamylalcohol(24:1)을 첨가하여 12,000rpm에서 20분간 centrifuge하였다. Extraction에 3M-NaOAc (pH 5.2 : 1/10 sample volumn)과 2배 volumn의 ice-cold한 ethanol을 첨가시키고 invertly하게 mix한 후 mixture를 10분

간 ice에 놓아두었다. 12,000rpm으로 20분간 centrifuge하고 1.6ml의 dH₂O로 녹인 후 PEG 8000(20%)-NaCl(2.5M) (1/2 volume of dH₂O)를 첨가하고 60분간 ice에 놓아두었다. 12,000rpm에서 20분간 centrifuge하고 70% ethanol로 두 번 세척하고 12,000rpm으로 10분간 centrifuge한 후 eppendorf tube로 옮기고 TE buffer에 녹여 -20°C에서 보관하였다.

Southern blot hybridization

random primer와 32P-alpha-dATP를 이용한 probe DNA는 Hodgson과 Fisk(1987)에 서술된 방법을 사용하였다. 200ng의 template DNA와 60ng의 random hexamer oligonucleotide primer를 3분간 boiling한 후 ice에 1분간 정치하였다. mixture에 2ul의 10X klenow buffer, 10mM A0dNTP 각 1ul, 100uCi의 [alpha-32P]dATP 1ul, 5unit의 klenow enzyme 1ul를 넣고 총 부피를 20ul로 맞추었다. 반응은 37°C water bath에서 1시간 수행하였고 DNA는 Sephadex G-50 column을 이용하여 32P-alpha-dATP와 결합하지 않은 probe와 분리하였다. Agarose gel을 통해 전기적으로 분리해낸 DNA fragments를 Nytran filter(DuPont Co.)로 옮기는 방법은 Southern(1975)의 방법에 의해 수행하였다. 0.2M HCl로 부분적으로 depurination 시킨 후 15분간 실온에서 shaking한 후 0.5M NaOH, 1.5M NaCl로 실온에서 30분간 끊임없이 shaking해주며 DNA를 denature시킨다. gel을 0.5M Tris-Cl, pH 8.0, 1.5M NaCl로 shaking해주며 실온에서 neutralization시킨다. DNA를 nytran filter로 옮기기 위해서 10X SSC buffer(1.5M NaCl and 0.15M sodium citrate, pH7.0)로 overnight한다. nytran filter를 crossing한 후 prehybridization solution(50% formamide, 5X SSC, 5X Denhardt's solution, 0.1% SDS, 100ug/ml denatured salmon sper DNA)에 넣고 2시간동안 shaking하였다. 대략 0.5ml의 32-P로 labeling된 probe를 10분간 boiling한 후 10분간 ice에 놓아둔다. Hybridization은 42°C에서 16시간동안 수행하였다. nytran filter를 0.1X SSC, 0.1% SDS로 30분간 세척하고 -70°C에서 x-ray film에 노출시킨다. 사용한 filter를 다른 probe를 이용하여 다시 rehybridization할 때에는 0.01X SSC, 0.01% SDS로 20분씩 두 번 boiling하여 probe를 제거시킨 후 사용하며 filter의 prehybridization과 hybridization은 위와 같은 방법으로 수행한다.

Result and Discussion.

본 연구에서는 *A. oryzae*의 형질전환 효율을 개선하고자 원형질체 제조를 위한 대체효소를 탐색하였고, 나아가 원형질체를 이용하지 않고 발아하는 균사로 electroporation을 이용하여 형질전환시키는 방법을 시도하였다.

대체 효소의 탐색

기존에 곰팡이의 형질전환에서는 helicase, glucanase(Beggs, 1978), zymolyase(Hsiao and Carbon 1979)와 현재 가장 보편적으로 사용하는 효소인 fungus *Trichoderma viride*에서 추출한 Novozyme 234(Beach and Nurse, 1981)을 사용하였으나 본 실험에서는 hemicellulase와 celluclast로 대체하여 형질전환 효율을 Novozyme 234 비교 분석하였다(Table 1). 원형질체 제조는 일반적으로 18시간 배양된 발아 균사체를 사용하나, 본 실험에서는 배양시간을 10시간과 8시간으로 단축하였다. 효소의 비교에서는 Novozyme 234를 기준으로 Hemicellulase와 celluclast의 형질전환 효율을 분석한 결과 hemicellulase를 이용한 형질전환에서 Novozyme 234를 사용한 결과보다 30배 이상의 높은 형질전환체를 얻었다. 반면 celluclast를 이용한 실험에서는 Novozyme 234와 차이가 없었다. Hemicellulase에서의 높은 형질전환 효율은 원형질체의 회복에 기인하는 것으로 분석된다.

Table 1.

Transformation efficiency with various enzymes for protoplast preparation.

Enzyme	Culturing time(hrs)	Transformation efficiency ¹
Novozyme 234	10	4.3×10^2
Hemicellulase	10	83×10^2
	8	141.3×10^2
Celluclast	10	4.3×10^2
	8	1×10^2

1. Transformation efficiency = transformants / ug of input DNA

이는 형질전환 효율이 원형질체 제조 효율과는 다르다는 것을 시사한다. 원형질체는 형질전환 실험시 용해되기 쉬운 결점을 가지므로 높은 원형질체 생성이 높은 형질전환 효율과는 비례되지 않는다. 따라서 본 실험에서 hemicellulase의 사용시 높은 형질전환 효율을 보이는 것은 원형질체의 생성보다 DNA를 받아들일 수 있는 상태로의 세포벽 손상이 적은 상태로의 전환으로 이는 완전한 원형질체보다 용해의 가능성이 적으며 높은 회복률을 보이는 것으로 사료된다.

Non-protoplast transformation

포자의 발아 및 배양 시간을 18시간에서 12시간, 10시간, 6시간으로 단축시키며 electroporation을 실시하였다. Figure 1에서는 8시간 배양한 발아포자를 보여주고 있다. Electroporation 후 세포의 생존은 osmotic stabilizer가 포함되어 있는 HMS 배지와 minimal media에서 비교 분석한 결과 (Fig. 2), osmotic stabilizer가 첨가되어 있는 HMS 배지에서는 70-80% 정도의 생존율을 보였고, minimal media에서는 40-50% 정도의 생존율을 보였다. 이는 전기장내에서 일부 손상된 세포가 osmotic stabilizer가 첨가된 배지에서 용해되지 않고 더 나은 회복율을 보이는 것으로 사료된다.

Non-protoplast 형질전환은 포자의 배양시간을 10-6시간으로 줄여 가며 electroporation한 결과 10시간 배양된 세포에서는 형질전환 효율이 1.4×10^4 이었으며, 8시간에서는 6.7×10^4 , 6시간에서는 8.3×10^4 으로 분석되었다(Table 2). 이는 Robinson과 Sharon(1999)의 실험에서 2-3시간 배양으로 ~ 10의 형질전환체를 얻은 것보다 더 높게 나타나고 있다. 이러한 non-protoplast 형질전환 방법은 *Saccharomyces cerevisiae*의 calcium chloride처리(Limura et al., 1983), lithium acetate처리(Ito et al., 1983)등이 있다. abortive 형질전환체의 분석을 각 실험별로 임의 추출한 100여 개의 시료에 제한하여 분석한 결과, 10% 이내로 나타나고 있다.

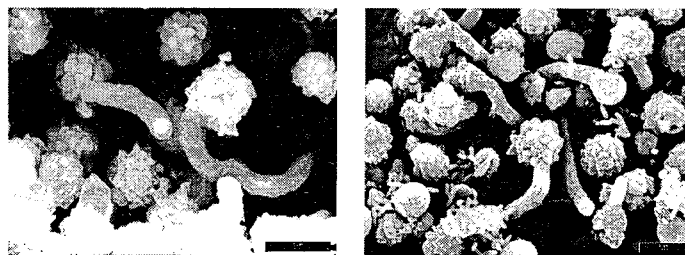


Figure 1. Scanning Electron Micrograph of 8 hrs-cultured germinated spores.

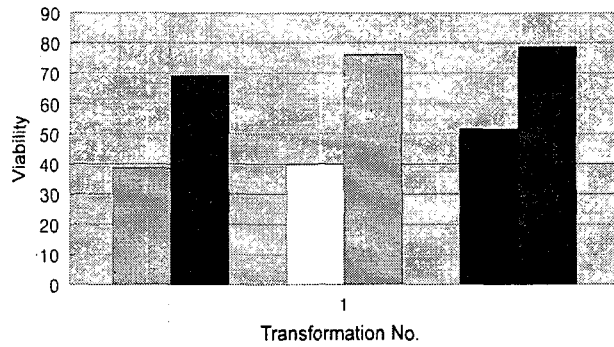


Figure 2. Cell viability on minimal media and HMS media after electroporation.

Table 2. Transformation efficiency of non-protoplast electroporation at different culturing times with *A. oryzae*.

Culturing time	Transformation efficiency ¹
6시간	8.3×10^4
8시간	6.7×10^4
10시간	1.4×10^4

1. Transformation efficiency = transformants / ug of input DNA

References

1. Beach, D. and P. Nurse. "High-frequency transformation of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*"(1981), Nature, 290: 140
2. Beggs, J. D.. "Tranformaion of yeast by replication hybrid plasmid."(1978) Nature, 275: 104
3. Delorme. e. "Transformation fo *S. cerevisiae* by Electroporation."(1989), Appl. Environ. Microviol., 55:2242-2246
4. Hahm, Y.T. and C.A. Batt, "Genetic Transformation of on *argB* Mutant of *Aspergillus oryzae*"(1988), Appl. Environ. Microbiol., 54: 1610-1611.
5. Hahm, Y.T. and C.A. Batt, "Expression and Secretion of Thaumatin from *Aspergillus oryzae*"(1990), Agric. Biol. Chem., 54:2513.
6. Hasio, C. L and J. Carbon. "High frequency transformation of yeast by plasmids containing the cloned yeast *AGR4* gene."(1979), Proc. Natl. Acad. sCI. usa, 76: 3829
7. Hicks, J. B., A. Hinnen and G. R. Fink, 1978, *cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 43 : 1305
8. Iimura, Y., K. Gotoh, K. Ouchi and T. Nishima, 1983, Agric. Biol. Chem., 47: 897.
9. Ito, H., Y. Fuluda, K. Murata and A. Kimura, "Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations"(1983), J. Bacteriol., 153: 163.
10. Miller, J. F., W. J. Dower and L. S. Tompkins. "high voltage electroporation of bacteria : genetic transformation of *C. jejuni* with plasmid DNA."(1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA,

85:856-860

11. Micah Robinson, Amir Sharon, "Transformation of the bioherbicide *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* by electroporation of germinated conidia" (1999), *Curr Genet*, 36: 98-104
12. Potter, 1990
13. Venancio A, Domingues L, Lima N,"Transformation of a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* using lithium acetate and pYAC4"(1999), *J. Basic Microbiol.*, 39: 37-41.