

치마버섯에서 이형 유전자 발현에 관한 연구

박동철¹ · 김현정 · 김옥미 · 배준태 · 박선희 · 이병훈 · 이갑량*

영남대학교 식품영양학과, ¹김천전문대학 식품가공과

The Studies on the Heterogenous Gene Expression in *Schizophyllum commune*

Dong-Chul Park¹, Hyun-Jeong Kim, Ok-Mi Kim, Jun-Tae Bae,
Sun-Hee Park, Byeung-Hun Lee and Kap-Rang Lee*

Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyungsan 712-749

¹Department of Food Science and Technology, Kimchun Junior College 740-200, Korea

ABSTRACT: The *trp2* gene encoding trifunctional enzyme in *Coprinus cinereus* was investigated the expression in the heterothallic mushroom species. To identify the homology of *trp2* gene to *Schizophyllum commune* and *Pleurotus ostreatus*, southern hybridization was performed with plasmid pHIONA8 containing *C. cinereus trp2* gene as a probe, which resulted in a strong signal indicating an homologous sequence to the chromosomal DNA of *S. commune*. About 50 transformants per dish was appeared in the complementation test by pHIONA8 using *S. commune* tryptophan auxotroph as host. In the mating test between transformants and other mating type alleles, the fruiting body of *S. commune* was formed at 30°C in 2~3 weeks.

KEYWORD: *Schizophyllum commune*, *trp2* gene

진균류 중에서 버섯의 유전자 분리 및 특성에 관한 연구는 주로 식용 및 약용버섯 그리고 생활 주기가 짧은 종을 중심으로 이루어져 오고 있다. 특히 재배조건과 이를 통한 인위적인 생산성 증대에 중심이 되어왔던 과거의 연구형태와는 달리 최근에는 버섯으로부터 항암성 물질과 기타 생리활성물질에 관련된 효소 및 대사관련 유전자의 분리 및 그 특성에 연구방향이 집중되고 있다(Kos 등, 1985, 1988; Hamer 등, 1987; Kim 등, 1988; Buxton 등, 1990).

버섯의 생활사는 대체로 2개의 포자 접합으로부터 시작되어 이핵체인 heterokaryon이 되면서 자실체를 형성하고 다시 단핵성의 homokaryon이 이루어진다(Raper 등, 1983). 이러한 homokaryon으로서 원형질체를 제조하고, 다시 융합시켜 새로운 종을 개발하는 기술과 더불어 최근 수년동안 유전자로 형질전환시키는 기술이 알려지면서 많은 연구

들이 보고되고 있다(Specht 등, 1988).

본 연구에서 다루는 담자균류의 아미노산 생합성 경로에 관련된 유전자의 발현에 있어서, *Coprinus cinereus*내에서 이형 유전자인 *Schizophyllum commune*의 *trp1*과 *Phanerochaete chrysosporium*의 *trpC* 발현은 일어났지만 *Aspergillus nidulans*의 *trpC*는 발현되지 않았음이 보고된 바 있다(Cassleton 등, 1989). 그리고 원핵세포인 *E. coli*에서 팽나무 버섯의 *leu2* gene도 발현이 보고된 바 있으며(Byun 등, 1989), *S. commune*의 *trp1* gene은 *E. coli*의 tryptophan 영양요구성 균주가 이용되어 분리, 발현되었으며, 이는 *E. coli*내에서 plasmid의 promoter가 *Serratia marcescens* 의존성일 때에만 가능할 것으로 추측하고 있다(Munoz-Rivas 등, 1986B). 자낭균류와 담자균류에서는 chorismate 전구물질로부터 tryptophan 생합성 단계에 관여하는 4개의 효소 유전자가 보고되어 있으며, *C. cinereus*에서 *trp2* gene은 3개의 효소기능을 발취하며 그의 *trp1*, *trp3*, *trp4*

*Corresponding author

gene 등이 분리, 보고되어 있다(Casselton 등, 1989).

그러므로 본 연구에서는 *Coprinus cinereus*에서 분리된 tryptophan 생합성 관련 효소유전자 *trp2*를 이종인 *S. commune*에서 발현시켜 그에 대한 결과를 검토하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배지조성

S. commune T1은 University of Vermont(U.S.A.)에 보존된 tryptophan 영양요구주를 숙주로 사용하였으며, *Coprinus cinereus*의 *trp2* gene이 함유된 pHIONA8은 상보성 검정에 사용하였다. Wild type의 *S. commune* 1-71과 *Pleurotus ostreatus*로부터 분리된 chromosomal DNA는 *C. cinereus trp2* gene과의 유전적 상동성 비교를 위해 사용되었으며, cosmid DNA pTC20은 *S. commune* T1의 영양요구성 확인 및 배양에 사용되었다(Table 1). 균사의 배양과 형질전환체의 선발에 사용된 배지는 CYM 및 CYMT 배지를 사용하였으며(Park 등, 1994), plasmid 제조시에는 ampicillin을 50~100 µg/ml로 첨가한 LB 배지를 사용하였다.

균주의 배양 및 원형질체 제조

S. commune T1을 이용한 원형질체의 제조는 CYMT 한천배지에서 약 1주일 정도 배양시킨 균총을 waring blender로 약 1분간 마쇄시킨 다음, 100 ml CYMT 액체배지에 접종하여 30°C에서 250 rpm으로 약 48시간 배양시킨 후 다시 blender로 1분 정도 마쇄시켜 약 9시간 더 진탕배양시켰

다. 배양이 끝난 균사액을 약 900 rpm으로 5분간 원심분리시켜 상정액을 버리고 0.5 M MO 용액 [10 mM MES(pH 6.3), 0.5 M MgSO₄] 및 1 M MO 용액 [20 mM MES(pH 6.3), 1 M MgSO₄]으로 현탁한 후 원심분리하여 다시 1 M MO 1 ml와 1 ml의 Novozym(50 mg/ml dissolved in 0.5 M MO) 처리로서 원형질체 형성을 유도하였다(Munoz-Rivas 등, 1986). Novozym은 30°C에서 4시간 동안 천천히 흔들면서 처리하고 다시 0.5 M MO로서 재현탁 원심분리하여 집균된 원형질체 100 µl당 1 M sorbitol과 1 M calcium chloride (pH 6.3)를 가하여 최종농도를 1~3 × 10⁸ 원형질체/ml로 조정하여 얼음속에 보관하였다.

Southern hybridization 및 형질전환체의 선발

C. cinereus trp2 유전자와 이종의 버섯류에 대한 상동성을 살펴보기 위하여 wild type의 *S. commune*과 *P. ostreatus*의 염색체 DNA를 각각 분리한 후 제한효소 *EcoRI*으로 절단하여 0.8% agarose gel에 전기영동시킨 후 southern hybridization을 실시하였다. 염색체 DNA는 균사체를 배양하여 제조되었으며(Specht 등, 1982), plasmid DNA는 alkaline lysis법에 따라 제조되었다.

분리된 *trp2* gene에 대하여 상보성 검증을 통한 유전자 발현을 확인하기 위하여, 먼저 tryptophan 영양요구주인 *S. commune* T1의 원형질체 1-3 × 10⁷ cells(100~200 µl)에 대하여 2~20 µg(5 µl)의 pHIONA8 DNA와 5 µl의 1 M CaCl₂를 혼합하여 얼음속에서 약 25분간 형질전환시킨 다음, 동량의 50% polyethylene glycol 3350을 가한 후 잘 섞어 재생배지로서 2.5 ml의 CYM과 1 M Magnes-

Table 1. List of strains and plasmids used

Strains & Plasmids	Mating type	Genotype	Source
<i>S. commune</i> T1	Aα4β1 Bα2β2	<i>trp1</i> , <i>ura1</i>	C. P. Novotony
<i>S. commune</i> 1-71	Aα3β1 Bα4β7	wild	C. P. Novotony
<i>Pleurotus ostreatus</i>		wild	K. R. Lee
pTC20		Amp ^r , TRP1 ⁺ , <i>cos</i>	C. Specht
pHION8		Amp ^r , <i>trp2</i>	L. A. Casselton
pUC9		Amp ^r	K. R. Lee

Amp^r, ampicillin resistance (β-lactamase); TRP1⁺, gene coding for indol-3-glycerol phosphate synthetase and phosphoribosylanthranilate isomerase activities; *cos*, *cos* site for lamda packaging; *trp2*, glutamine amidotransferase, phosphoribosyl anthranilate isomerase and indole glycerol phosphate synthetase.

ium sulfate(pH 6.3)를 혼합하여 실온에서 약 12시간 배양하여 균사의 성장을 유도하였다. 약간 성장된 균사체는 2% low-melting agarose gel를 넣어 풀고루 섞어 CYM 한천배지 위에 부어 굳힌 다음, 30°C에서 2~3일 배양한 후에 나타나는 균총으로서 형질전환 여부를 확인하였다(Munoz-Rivas 등, 1986A).

Mating test

*S. commune*은 4종의 allele 즉 A α 와 B β 그리고 B α 와 B β allele를 가지며, 균사간의 접합은 A와 B allele중 1개 allele만의 차이로 일어나는 것으로 알려져 있다. Mating test는 배양된 *S. commune* T1과 1-71의 균총을 2~3 mm 정도로 잘라서 CYM 혹은 CYMT 한천 배지상에서 0.5 cm 정도 간격으로 놓고, 30°C에서 2~3일간 배양시킨 다음, 현미경으로 clamp cell의 형성유무를 관찰함으로써 dikaryon을 확인하였다.

결과 및 고찰

Tryptophan 생합성에 관련된 유전자는 *C. cinereus*의 경우 *trp1*(tryptophan synthetase), *trp2*(glutamine amidotransferase, Phosphoribosyl anthranilate isomerase, Indole-3-glycerol phosphate synthetase), *trp3*(anthranilate sythetase) 그리고 *trp4*(Phosphoribosyl transferase) gene 등이 분리, 보고되었으며(Burrows 등, 1987; Benninger 등, 1988; Casselton, 1989), *S. commune*의 경우는 *trp1* gene으로 명명된 Indole-3-glycerol phosphate synthetase가 분리되어 원핵세포인 *E. coli*에서 발현된 바 있다(Munoz-Rivas 등, 1986B).



Fig. 1. Physical map of plasmid pHIONA8 containing the *Coprinus cinereus trp2* gene. The thick line represents the pUC9 vector sequence. The insert is a 3.5 kb *EcoRI*-fragment. Restriction sites are designated: E, *EcoRI*; S, *SalI* (Casselton L. A.)

C. cinereus, *S. commune* 및 *P. ostreatus*간의 유전자 상동성을 확인하기 위하여 *S. commune* (wild type)의 염색체 DNA에 대하여 probe로서 *C. cinereus trp2* gene을 가지는 pHIONA8(Fig. 1)를 사용하여 southern blot을 실시하였다. Fig. 2에서 처럼 *S. commune*의 염색체 DNA에서는 몇 개의 강한 signal이 나타났으며, 이는 *C. cinereus*의 *trp2* 유전자가 *S. commune*의 tryptophan 생합성 유전자와 상당한 homology가 있는 것으로 사료된다.

*C. cinereus*의 *trp2* gene을 *S. commune*의 tryptophan 영양요구성 균주에 대한 상보성 검증을 유전자의 발현으로 조사하였다. Fig. 3에서 처럼 형질전환 후 약 72시간 경에 형질전환체 homo-karyon 균총이 A(pUC9, control)에 비하여 B(pHION8 containing *trp2* gene of *C. cinereus*) CYM 평판배지 전면에서 왕성하게 생육하고 있음이 관찰되었다. 따라서 이종간에도 유전자의 발현이

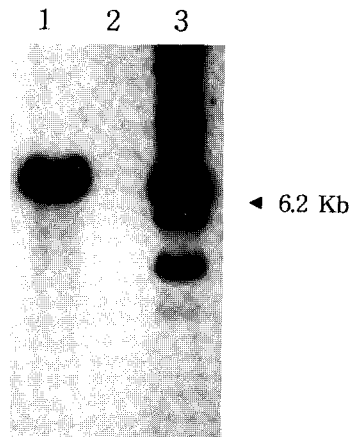


Fig. 2. Southern analysis of *S. commune* chromosomal DNA probed with *EcoRI* fragment of plasmid pHIONA8. Genomic DNA was digested with *EcoRI* completely and transferred to nylon membrane and probed with the ³²P-labelled pHIONA8-*EcoRI* fragment. The autoradiogram was exposed at room temperature for 5 min.
Lane 1: Plasmid pHIONA8
Lane 2: *Pleurotus ostreatus* chromosomal DNA
Lane 3: *Schizophyllum commune* 1-71 chromosomal DNA

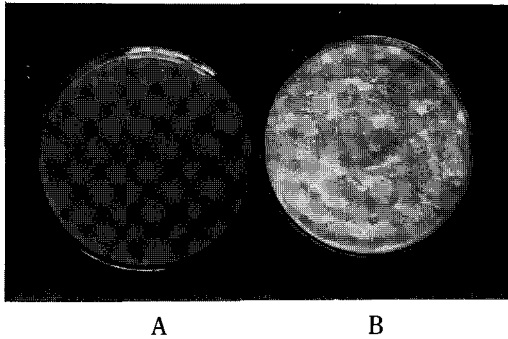


Fig. 3. Comparison of *S. commune* T1 transformant with plasmid pUC9 and pHIONA8 containing the *trp2* gene of *C. cinereus*. The mycelium was grown on CYM medium at 30°C for 72 hours.

A: pUC9 (control), B: pHIONA8 (*trp2* gene of *C. cinereus*)

아주 잘 일어나고 있음을 알 수 있었으며, 이같은 결과는 *C. cinereus trp2* gene이 homothallic species인 *Coprinus bilantus*에서의 발현과 비교하여 볼때 아주 흥미로운 결과로 사료된다(Burrows, 1990).

그리고 형질전환된 *S. commune* T1의 mating activity를 확인하기 위하여 CYM 배지상에서 mating type이 다른 *S. commune* 1-71과의 mating test에서 3일후 clamp cell이 유도된 다음 약 2~3주만에 완전한 자실체의 형성을 확인하였다 (not shown data).

적 요

*Coprinus cinereus*에서 tryptophan 생합성에 관여하는 *trp2* 유전자의 이종 버섯에서의 발현여부를 조사하였다. 유전자 상동성을 확인하기 위하여, *C. cinereus trp2* 유전자를 함유하는 재조합 DNA인 pHIONA8을 probe로 사용하여 southern blot을 한 결과 *S. commune* 1-71의 tryptophan 생합성 유전자와 상당한 homology가 있는 것으로 나타났다. pHIONA8 DNA를 이용한 *S. commune* T1(tryptophan 영양요구주)의 상보성 검증에서는 pertri-dish당 약 50개의 형질전환체가 나타났다. 이들 형질전환체는 다른 *S. commune*의

다른 화합성 균주와의 교배 실험에서 clamp cell의 유도와 동시에 약 2~3주만에 자실체를 관찰하였다.

참고문헌

- Benninger, D. M., Skrzynia, C., Pukkia, P. J. and Casselton, L. A. 1987, DNA-mediated transformation of the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *EMBO J.* 6: 835-840.
- Burrows, D. M., Elliot, T. J. and Casselton, L. A., 1990. DNA-mediated transformation of the secondarily homothallic basidiomycete *Coprinus bilantus*. *Current Genetics* 17: 175-177.
- Buxton, F. P. and Radford, A. 1983. Cloning of the Structural Gene for Orotidine 5'-Phosphate Carboxylase of *Neurospora crassa* by Expression in *Escherichia coli.*, *Mol. Gen. Genet.* 190: 403-405.
- Byun, M. O., Young-Bok Yoo, Seung-Joo Go, Chang-Hyun You, Dong-Yul Cha and Yong-Hwan Park, 1989. Cloning and Expression of *Leu 2* Gene (β -isopropylmalate dehydrogenase) from the basidiomycete *Flammulina velutipes* in *E. coli.*, *Kor. J. Mycol.* 17(1): 35-38.
- Casselton, L. A. and A. de la Fuente Herce, 1989. Heterologous gene expression in the basidiomycete fungus *Coprinus cinereus*. *Curr. Genet.* 16: 35-40.
- Hamer, J. M. and Timberlake, W. E. 1987. Functional Organization of the *Aspergillus nidulans trpC* Promoter, *Molecular and Cellular Biology* 7(7): 2352-2359.
- Kim, S. Y. and Marzluf, G. A. 1988. Transformation of *Neurospora crassa* with the *trp-1* gene and the effect of host upon the fate of the transforming DNA. *Curr. Genet.* 13: 65-70.
- Kos, T., Kuijvenhoven, J., Wernars, K., Bob, C. J., van den Broek, H. W. J. P., Pouwels, H. and van den Hondel, C. A. M. J. J. 1985. Isolation and characterization of the *Aspergillus niger trpC* gene. *Gene.* 39: 231-238.
- Kos, T., J. Kuijvenhoven, Hanny, G. M. Hessing, P. H. Pouwels and C. A. M. J. J. van den Hondel, 1988. Nucleotide sequence of the *Aspergillus niger trpC* gene: structural relationship with analogous genes of other organism. *Curr. Genet.* 13: 137-144.
- Munoz-Rivas, A. M., Specht, C. A., Drummond, B. J., Froeliger, E., Novotny, C. P. and Ullrich, R. C. 1986A. Transformation of the

- basidiomycete. *Schizophyllum commune*. *Mol. Gen. Genet.* **205**: 103-106.
- Munoz-Rivas, A. M., Specht, C. A., Ullrich, R. C. and Novotny, C. P. 1986B. Isolation of the DNA sequence coding indole-3-glycerol phosphate synthetase and phosphoribosyl-anthranilate isomerase of *Schizophyllum commune*. *Curr. Genet.* **10**: 909-913.
- Park, D. C., Novotny, C. P., Ullrich, R. C., Lee, K. D. and Lee, K. R. 1994. Isolation and characterization of A α mating locus from *Schizophyllum commune*. *The Korean Journal of mycology.* **22**(3): 247-253.
- Raper, C. A. 1983. Controls for development and differentiation of the dikaryon in basidiomycetes. In: "Secondary Metabolism and Differentiation in Fungi". pp.195-238 Marcel Dekker, Inc., New York.
- Specht, C. A., Dirusso, C. C., Munoz-Rivas, A., Novotny, C. P. and Ullrich, R. C. 1982. A method for extracting high-molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Anal. Biochem.* **119**: 158-163.
- Specht, C. A., Munoz-Rivas, A., Novotny, C. P. and Ullrich, R. C. 1988. Transformation of *Schizophyllum commune*: an analysis of parameters for improving transformation frequencies. *Exp. Mycol.* **12**: 357-366.