

pBRG-4를 이용한 *Metarhizium anisopliae*의 형질전환

이동규¹ · 예완해¹ · 황철원² · 권석태³ · 강선철*

대구대학교 생물공학과, ¹농업과학기술원 분자유전과,
²한동대학교 환경미생물학교실, ³성균관대학교 유전공학과

초 록 : 작물 병해충에 대한 무공해 미생물 농약 개발의 일환으로 곤충 병원성 곰팡이 *Metarhizium anisopliae*의 분자생물학적 육종을 위해 이 균주의 형질전환계를 확립하였다. *M. anisopliae*의 원형질체를 제작하여 benomyl 약제에 대하여 저항성을 나타내는 *Aspergillus flavus* 유래의 β -tubulin 유전자를 갖는 pBRG-4 plasmid DNA를 polyethylene glycol 방법으로 형질 전환하였다. 이 형질전환은 pBRG-4 DNA 50 μ g당 10개의 효율로 이루어졌으며, 그 결과 야생형 균주들이 2.5 μ g/ml 농도의 benomyl 존재 하에서도 성장이 억제되는데 반하여 선발된 형질전환체들은 5.0 μ g/ml 농도의 benomyl 함유 배지에서도 잘 성장하였다. 또한 이 형질전환체들의 chromosomal DNA를 분리하여 Southern 분석한 결과 β -tubulin 유전자가 homologous recombination에 의하여 *M. anisopliae*의 genome속에 삽입 되었음을 확인하였다.(1998년 1월 23일 접수, 1998년 6월 1일 수리)

서 론

지난 50년 동안 농업에서 해충을 방제하기 위한 유기합성 농약의 사용은 계속 증가해 왔고, 보다 효과적이고 새로운 화학 살충제들이 개발되었다. 특히 개발도상국에서는 화학 살충제의 남용으로 작물의 생산성 증대는 이루어지지만 토양과 담수의 오염, 자연 생태계의 파괴, 농약의 잔류독성 등 인류의 건강에까지 심각한 문제를 낳게 했다. 따라서 화학 농약 사용의 여러 가지 문제점 때문에 해충 방제에 보다 환경 친화적인 생물학적 방제법의 개발을 유도하게 되었다.^{1,3)}

*Metarhizium anisopliae*는 나비목, 매미목 등에 속하는 곤충의 천연적인 병원균으로 생물학적 방제제로써의 높은 잠재력을 갖고 있다.⁴⁾ 그러나 생물농약들은 유기합성 농약보다 살충효과가 떨어지기 때문에 그동안 화학적 방제의 그늘에 가려 소홀히 취급되어 왔다. 지금까지의 미생물 농약개발은 주로 자연 생태계에 존재하는 우수균주를 단순 분리, 선별하여 이용해 왔기 때문에 그 효과가 크지 못한 단점이 있었다.⁵⁾ 특히 *M. anisopliae* 등의 살충성 곰팡이 균주를 해충방제에 적용했을 때 해충이 죽기까지 대략 5-10일의 긴 시간이 소요되기 때문에 살포 시기를 놓쳐 작물에 심각한 피해를 가져올 수 있다. 따라서 이들 균주를 이용한 생물농약의 개발은 실험실 수준의 극히 제한적 연구만이 수행되었다. 따라서 보다 실용적인 생물농약으로 *M. anisopliae*를 이용하기 위해서는 이 균주의 살충효과를 획기적으로 개선할 필요가 있다. 이를 위해서는 곤충 발병에 관계하는 유전자를 분리하여, 곰팡이에서 상시적으로 발현하는 promoter 아래에서 이 유전자가 발현되도록 조작한다면 병원성이 증진된 미생물 살충제 개발이 가능하다.⁶⁾ 이러한 연구를 수행하기 위해서 먼저 이 균주의 형질전환계의 확립이 필수적으로 요구되어 진다.

한편 최근에는 유전자 조작기술의 발달로 진핵세포인 곰

팡이 균주중 일부인 *Neurospora crassa*와 *Aspergillus nidulans* 등 산업적으로 중요한 균주들로부터 형질전환 시스템이 확립되어 가고 있고 유용물질의 대량 생산과 유용균의 분자생물학적 육종이 성공적으로 수행되고 있다.⁷⁾ 이들 곰팡이에서의 형질전환은 외부로부터 도입된 DNA가 숙주 세포의 염색체 내에 integration함으로써 일어나며, *Saccharomyces cerevisiae*에서의 DNA 형질전환 시스템이 이미 모델화 된 바 있다.⁸⁾ 그러나 아직까지 다양한 종류의 곰팡이에 공통적으로 작용하는 효율적인 곰팡이의 형질전환계는 개발되지 못하였으며, 형질전환율은 몇몇 곰팡이에서만 선택적으로 작용하는 선발 표지유전자(marker gene)에 의하여 좌우됨이 확인되었다. 이들 표지 유전자는 원래 세균에서 먼저 이용된 약제 내성 유전자를 곰팡이에 적용한 *Bml* (benomyl resistance), *BSD* (blasticidin S deaminase) 등의 유전자^{9,10)}와 영양요구 상보성 유전자(*argB*, *pyrG*) 등이 개발되어 이용되고 있다.^{11,12)}

본 연구에서는 *M. anisopliae*(ATCC 20500) 균주의 살충 효과 증진을 위한 유전공학적 육종에 적용할 목적으로 본 균주를 *Aspergillus flavus* 유래의 benomyl 내성 유전자인 β -tubulin 유전자를 갖는 pBRG-4 plasmid를 이용하여 형질 전환시킨 후 외래유전자가 host genome 속에 안정적으로 삽입, 발현될 수 있음을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시균주 및 형질전환 Vector

본 실험에 사용한 *M. anisopliae*(ATCC 20500) 균주는 ATCC로부터 구입하였다. *M. anisopliae*는 Sabouraud dextrose agar(SDA, 1% neopepton, 4% dextrose, 1.5% Bacto-agar/1 L) 평판배지에서 유지시켰고, 1%(w/v) yeast extract

찾는말 : 생물농약, *Metarhizium anisopliae*, 형질전환, homologous recombination

*연락처

를 포함하는 SDA 배지에서 포자를 형성시켜 hemacytometer로 포자수를 계측한 후 액체 배양에 이용하였다. 곰팡이 형질전환에 사용한 vector pBRG-4⁹⁾는 미국 North Carolina 주립대학교 Payne 교수로부터 분양받아 사용하였다.

*M. anisopliae*의 원형질체 제조

*M. anisopliae*의 conidia(1×10^8)를 YEPD(yeast extract 20.0 g, Bacto-pepton 1.0 g, dextrose 20.0 g/l L) 배지 100 ml(250 ml conical flask)에 접종 후 28°C에서 48시간 배양하였다. 배양된 균사체를 멸균한 Miraclotth로 여과하여 수확한 후 0.6 M KCl로 두번 세척하였다. 세척한 균사체를 8 mg/ml Novozyme 234(Novo Biolabs, USA)를 포함하는 35 ml의 0.6 M KCl 용액에 현탁하여 28°C에서 3~4시간 보존한 후 현미경을 통하여 원형질체가 제조되었는지를 확인하였다. 균사체 현탁액으로부터 원형질체를 분리하기 위해 멸균된 Miraclotth를 4겹으로 하여 여과하고, 여액을 3,000×g로 5분 동안 원심 분리하였다. 이때 얻어진 원형질체는 0.6 M KCl에 현탁시킨 다음 형질전환에 이용하였다.

곰팡이 형질전환

제조된 원형질체를 원심 분리(3,000×g, 5분)하여 0.6 M KCl, 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl(pH 7.5)을 포함하는 완충용액 속에 1.0×10^8 원형질체/ml 농도로 현탁한 다음 vector DNA[(50 µg/ 60 µl TE buffer (pH 8.0)]와 50 µl의 PTC 용액[25% polyethylene glycol 8000 (PEG), 10 mM Tris-HCl (pH7.5), 50 mM CaCl₂]을 원형질체 현탁액 200 µl속에 혼합하여, 15분 동안 얼음 속에서 방치하였다. 이 원형질체에 2.5 ml의 PTC용액을 재첨가하여 상온에서 30분간 방치한 후 원심 분리(3,000×g, 5분)하여 500 µl의 0.6 M KCl에 현탁하였다. 이 현탁액을 100 µl씩 나눈 다음, 5~10 ml의 용해된 선발 한천배지(YEPD, 2.5~5.0 µg/ml benomyl, 0.9% agar, 0.6 M KCl)에 섞어 도말한 후에 28°C에서 배양하였다.

형질전환체의 genomic DNA 분리

*M. anisopliae*의 염색체 DNA를 Pfeifer와 Khachatourians¹³⁾의 방법에 의하여 분리하였다. 이를 위해 먼저 *M. anisopliae*의 분생포자를 YEPD 배지에 접종하여 27°C에서 4일 배양 후 여과지로 균사체를 모아서 동결 건조하였다. 균사체 1.0 g을 막자사발에서 갈아서 extraction buffer [(0.2 M Tris-HCl(pH 8.0), 0.25 M NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS, 20 µg/ml proteinase K)] 5 ml를 첨가하여 섞은 다음 5분 후에 20%(w/v) SDS용액 1.0 ml를 첨가하였다. 이 혼합물에 sodium perchlorate 염을 최종농도가 1.0 M이 되게 첨가하여 섞은 후, phenol/chloroform extraction을 수행한 다음 원심분리(8,000×g, 15 min)하여 상등액을 회수하였다. 이것을 ethanol 침전하여 염색체 DNA를 얻은 다음 TE buffer (pH 8.0)에 녹여서 Southern 분석에 사용하였다.

Probe 제조 및 Southern 분석

Probe 제조는 random priming법¹⁴⁾에 의해 vector DNA를 [³²P]-dCTP (3,000 Ci/mol)로 표지하고, G-50 Sephadex column chromatography를 이용하여 [³²P]로 표지된 probe DNA를 분리하였으며, 95°C에서 5분간 변성시켜 Southern hybridization에 사용하였다.

한편 *M. anisopliae*로부터 분리한 genomic DNA는 EcoRI으로 절단후 0.7% agarose gel에 5 µg씩 전기영동하고, 모세관 전이법¹⁵⁾으로 나일론 막에 전이하였다. 이 나일론 막을 hybridization 용액 (6×SSPE, 0.5% SDS, 5×Denhardt's 용액, 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA)내에서 2시간 전처리후, [³²P]로 표지된 probe를 첨가하여 20시간 65°C에서 반응시켰다. Hybridization이 완료된 나일론 막을 상온에서 2×SSC와 0.1% SDS 용액으로 15분간 2회 세척하고, 65°C에서 0.1×SSC와 0.1% SDS 용액으로 30분간 2회 세척하였다. 세척이 완료된 나일론 막을 공기 중에서 건조시킨 다음 -70°C에서 X-ray film에 감광하였다.

결과 및 고찰

*M. anisopliae*의 benomyl에 대한 감수성 시험 및 원형질체 제조

살균제로 사용되는 benomyl[2-(methoxycarbonylamino)benzimidazole]은 *A. flavus*에서 형질전환의 선발 약제로 사용되어 왔다.⁹⁾ 본 연구에서는 *M. anisopliae*의 benomyl에 대한 감수성을 규명하기 위하여 “재료 및 방법”에서 기술한 바와 같이 *M. anisopliae*의 균사체에 Novozyme 234를 처리하여 원형질체를 얻었다(Fig. 1). *M. anisopliae* 원형질체는 benomyl 수화제 50%원액(동양화학)의 1.0 µg/ml 농도에서는 성장이 가능하나 2.0 µg/ml 농도 이상에서는 성장이 저해되었다(미발표). 따라서 형질전환된 benomyl 저항성 균주를 선발하기 위하여 benomyl 2.5 µg/ml과 5.0 µg/ml을 배지에 첨가하여 선발배지로 사용하였다.

Benomyl 저항성 유전자(β-tubulin)의 형질전환

β-tubulin 유전자는 *Aspergillus flavus*에서 분리되었으며,

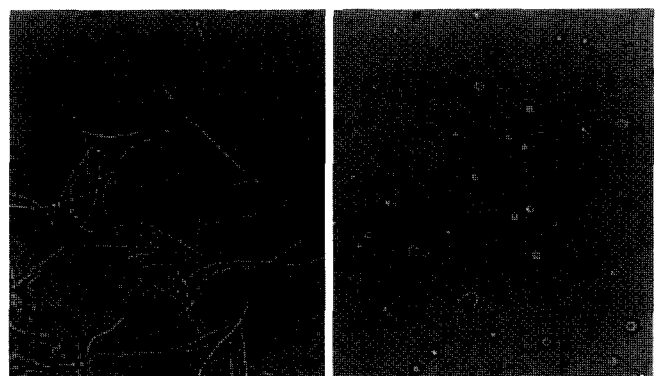


Fig. 1. Photographs showing the production of protoplasts. Left, before treatment of Novozyme 234; right, after treatment of 8 mg/ml concentrations of Novozyme 234 at 28°C for 3~4 hours (×100).

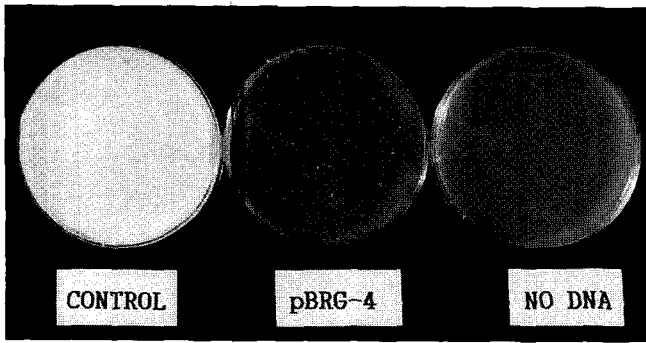


Fig. 2. Selection of benomyl-resistant transformants. Control, protoplasts were plated on the non-selective medium; pBRG-4, protoplasts transformed with pBRG-4 were plated on the selective medium containing benomyl (2.5 $\mu\text{g/ml}$); no DNA, protoplasts transformed without pBRG-4 were plated on the selective medium containing benomyl (2.5 $\mu\text{g/ml}$).

benomyl 저항성을 갖고 있어서 형질전환에서 선발 marker로 사용되어 왔다.^{16,17)} Plasmid pBRG-4는 β -tubulin 유전자와 uracil 영양요구주에 대한 선발 marker인 *Neurospora crassa* 유래의 *pyr-4*(orotidine-5'-phosphate decarboxylase) 유전자를 같이 포함하고 있다.⁹⁾ 이 pBRG-4 DNA 50 μg 을 polyethylene glycol 방법으로 *M. anisopliae*에 형질전환하였을 때 benomyl 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 선발 배지에서 10개의 colony를 얻었다 (Fig. 2). 이 형질전환체들은 야생형 균주들이 benomyl 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 생장이 억제되는데 반하여 benomyl 5 $\mu\text{g/ml}$ 에서도 생장이 가능하였다.

이상의 결과 형질전환 효율이 0.2/ μg DNA로 나타났는데 *A. nidulans* 유래의 benomyl 저항성 유전자와 비슷한 결과이나 다른 곰팡이들에 비해서는 효율이 다소 낮았다.⁹⁾ 특히 Bogo 등¹⁶⁾은 particle bombardment를 이용하여 32~201/ μg DNA의 효율로 형질전환시킬 수 있었으며, 이 결과는 electrophoration이나 PEG법 보다 매우 높은 효율을 나타냈다. 그러나 particle bombardment를 이용할 경우 homologous recombination 보다는 nonspecific incorporation에 의하여 형질전환된다고 밝혀졌기 때문에 서로 장단점이 있을 수 있다. 따라서 gene disruption이나 유전자 분리의 목적으로는 PEG법이 유리하고, 외래의 유전자를 형질 전환하는 데는 particle bombardment를 이용하는 것이 유리할 것으로 사료된다.^{17,18)}

형질전환체의 genomic Southern 분석

선발된 colony 중 4개를 YEPD 배지에 배양한 후 genomic DNA(각각을 T1, T2, T3, T4로 명명)를 분리하여 Southern 분석을 위한 DNA 시료로 사용하였다. 이때 probe로는 pBRG-4로부터 β -tubulin 유전자를 가진 약 2.8 kb *KpnI-HindIII* 단편을 [³²P]-dCTP로 표지하여 이용하였다. Fig. 3에서 보여주는 바와 같이 genomic Southern을 분석한 결과 T2, T3, T4에서 강한 signal이 나타남을 확인하였다. 이상의 결과는 PEG법에 의해 *M. anisopliae*를 형질전환하면 외래 유전자가 *M. anisopliae* genome속으로 재조합될 수 있음을

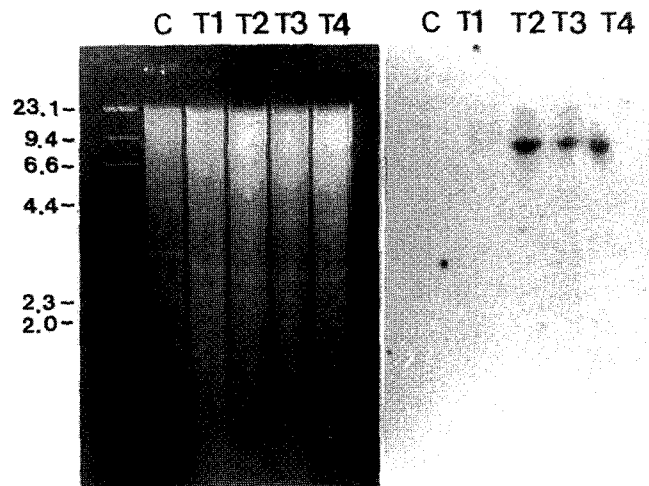


Fig. 3. Southern blot analysis of genomic DNA of transformants. DNA samples isolated from *M. anisopliae* transformants (C, native *M. anisopliae* chromosomal DNA; T1, T2, T3 and T4, chromosomal DNA from each transformed *M. anisopliae* clones), were digested with *EcoRI* and hybridized with ³²P-labeled *KpnI-HindIII* fragment of pBRG-4, a vector containing β -tubulin gene of *A. flavus*.

나타낸다. 또한 각각의 positive signal이 약 8.0 kb 정도의 동일한 위치에서 확인되었으므로 *A. flavus*와 마찬가지로 외래 유전자가 homologous recombination 기작에 의하여 host 염색체상의 특정부위에 삽입된 것으로 추정된다. 이것은 pBRG-4에 들어있는 *pyr4* 유전자가 *M. anisopliae*의 orotidine-5'-phosphate decarboxylase에 충분한 homology를 갖고 있기 때문에 homologous recombination에 의하여 유전자가 genome 속으로 삽입된 것으로 사료된다. 만약 heterologous integration이 일어났다면 제한효소에 의하여 생성되는 band 양상이 매우 복잡하게 나타날 것이다.¹⁹⁾ 그러나 이에 대한 정확한 기작을 이해하기 위해서는 삽입되는 유전자 주변의 염기서열과 작용효소에 대한 보다 자세한 연구가 필요할 것이다.

이상의 결과에 의하여 *A. flavus* 유래의 β -tubulin 유전자를 선발 maker로 이용한 *M. anisopliae*(ATCC 20500)의 형질전환체가 안정적으로 제조되었음을 확인하였다. 최근 생물학적 방제의 필요성이 절실히 요구됨에 따라 곤충병원균의 잠재력에 관심의 초점이 모아지고 병원균 침투와 병원기작에 대한 생리학 및 생화학적 연구가 활발히 이루어졌으며 병원균이 생성하는 protease, chitinase, lipase 등의 효소에 의하여 병원성이 결정된다고 밝혀졌다.²⁰⁾ 그러나 이 효소들 중에 어떤 효소가 병원성에 결정적인 작용을 하는지는 아직 논란이 많다. '어떤 효소가 병원성을 결정하는 인자인가'에 대한 결정적인 증거는 표피침투 과정에 참가하는 효소들의 유전자를 cloning하여 gene disruption 등의 방법을 통한 효소결손 돌연변이체를 만들었을 때 병원성의 저하가 나타나야 하고, 효소결손 돌연변이체 효소에 대한 유전자를 형질전환하였을 때 병원성이 회복되어야 한다.²¹⁾ 만약 병원성 인자가 결정된다면 이 효소에 대한 유전자가 과발현 하도록 조작하여 병원균에 형질전환한다면 살충효

과가 상승된 균주 육종이 가능할 것으로 기대된다. 이와같은 *M. anisopliae*의 살충기작 연구 및 미생물 농약 개발 연구에 이 균주의 형질전환 방법은 매우 유용하게 이용될 것이다.

감사의 글

본 논문은 1997년도 농림수산 특정연구과제의 연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Pfeifer, T. A. and T. A. Grigliatti (1996) Future Perspectives on insect pest management: engineering the pest. *J. Invertebr. Pathol.* **67**, 109-119.
- Lacey, L. A. and M. Goettel (1995) Current development in microbial control of insect pest and prospects for the early 21st century. *Entomophaga* **40**, 3-28.
- Choi, Y. C., J. O. Lee and Y. K. Kim (1997) Present and future of microbial pesticide. *Korean J. Weed Sci.* **17**, 112-123.
- Samuels, K. D. Z., J. B. Heale and M. Lewellyn (1989) Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *J. Invertebr. Pathol.* **53**, 25-31.
- Jackson, C. W., J. B. Heale and R. A. Hall (1985) Trait associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanborni* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*. *Ann. Appl. Biol.* **106**, 39-48.
- St. Leger, R. J., L. Joshi, M. J. Bidochka and D. W. Roberts (1996) Construction of an improved mycoinsecticide over-expressing a toxic protease. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6349-6354.
- Timberlake, W. E. and M. A. Marshall (1989) Genetic engineering of filamentous fungi. *Science* **244**, 1313-1317.
- Hinnen, A., J. B. Hicks and G. R. Fink (1978) Transformation of yeast. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1929-1933.
- Seip, E. R., C. P. Woloshuk, G. A. Payne and S. E. Curtis (1990) Isolation and sequence analysis of a β -tubulin gene from *Aspergillus flavus* and its use as a selectable marker. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3686-3692.
- Kimura, M., T. Kamakura, Q. Z. Tao, I. Kaneko and I. Yamaguchi (1994) Cloning of blasticidin S deaminase (BSD) gene from *Aspergillus terreus* and its use as a selective marker for *Schizosaccharomyces pombe* and *Pyricularia oryzae*. *Mol. Gen. Genet.* **242**, 121-129.
- Horiuchi, H., N. Takaya, K. Yanai, M. Nakamura, A. Ohta and M. Takagi (1995) Cloning of the *Rhizopus niveus pyr4* gene and its use for transformation of *Rhizopus delemar*. *Curr. Genet.* **27**, 472-478.
- Bergès, T. and C. Burreau (1991) Isolation of uridine auxotrophs from *Trichoderma reesei* and efficient transformation with the cloned *ura3* and *ura5* genes. *Curr. Genet.* **19**, 359-365.
- Pfeifer, T. A. and G. G. Khachatourians (1989) Isolation and characterization of DNA from the entomopathogen *Beauveria bassiana*. *Exp. Micol.* **13**, 392-402.
- Feinberg, A. and B. Vogelstein (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY.
- Bogo, M. R., M. H. Vainstein, F. J. L. Aragão, E. Rech and A. Schrank (1996) High frequency gene conversion among benomyl resistant transformants in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **142**, 123-127.
- Pfeifer, T. A. and G. G. Khachatourians (1992) *Beauveria bassiana* protoplast regeneration and transformation using electroporation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 376-381.
- Lorito, M., C. K. Haynes, D. Pietro and G. E. Harman (1993) Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. *Curr. Genet.* **24**, 349-356.
- Yelton, M. M., J. E. Hammer and W. E. Timberlak (1984) Transformation of *Aspergillus* by using a *trp c* plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1470-1474.
- Samson, R. A., H. C. Evans and J. P. Latgé (1988) "Atlas of Entomopathogenic Fungi" Springer-Verlag, NY.
- St. Leger, R. J., R. M. Cooper and A. K. Charnley (1991) Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* **58**, 415-426.

Transformation of *Metarhizium anisopliae* by using pBRG-4

Dong Gyu Lee, Wan Hae Yeh¹, Cher Won Hwang², Suk Tae Kwon³ and Sun Chul Kang* (*Department of Biotechnology, Taegu University, Kyungsan, Kyungbook 712-714, Korea; ¹Molecular Genetic Division, National Agricultural Science and Technology Institute, RDA, Suwon 441-100, Korea; ²Department of Environmental Microbiology, Handong University, Pohang 791-940, Korea; ³Department of Genetic Engineering, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea*)

Abstract : We have established a transformation system for entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, in order to develop mycoinsecticide by recombinant DNA techniques. Protoplasts of *M. anisopliae* would be transformed to a benomyl-resistant by introducing pBRG-4 plasmid DNA, which contains a β -tubulin gene of *Aspergillus flavus* conferring resistance to benomyl and a *pyr4* gene of *Neurospora crassa*, in the presence of 5% polyethylene glycol and 10 mM calcium chloride. Transformants occurring at a frequency of 10 colonies per 50 μ g pBRG-4 DNA grew on the 5 μ g/ml concentrations of benomyl, while the wild type was inhibited by 2.5 μ g/ml. From the Southern analysis using genomic DNAs isolated from *M. anisopliae* transformants, the positive signals suggested that the β -tubulin gene had integrated in the *M. anisopliae* genome by homologous recombination.

Key words : mycoinsecticide, *Metarhizium anisopliae*, transformation, homologous recombination

*Corresponding author