

## 아교버섯과 기계충버섯의 형질전환

김윤정 · 김명길<sup>1</sup> · 송홍규 · 최형태\*

강원대학교 생명과학부 생명과학연구소, <sup>1</sup>국립산림과학원 화학미생물과

국내에서 분리한 백색부후균 기계충버섯(*Irpex lacteus*)과 아교버섯(*Phlebia tremellosa*)을 대상으로 유전자 도입을 위한 형질전환 방법을 확립하였다. 아교버섯의 경우 원형질체 생성 및 재생 방법을 이용하여 이핵체(dikaryon)로부터 일핵체(monokaryon: Pt05-2)를 얻어 실험에 사용하였다. 형질전환체의 선발을 위한 선택표지는 glutamine synthetase의 inhibitor인 phosphinothricin에 대하여 저항성을 부여하는 유전자(*bar*)를 사용하였고, 이 유전자를 가진 형질전환용 벡터, pBARGEM7-1 (5 µg)과 제한효소 *EcoRI* (30 u)를 동시에 원형질체에 처리하는 제한효소매개 삽입방법을 사용하였다. 기계충버섯( $5 \times 10^7$  cells) 및 아교버섯( $2.5 \times 10^7$  cells)의 원형질체를 대상으로 형질전환을 수행한 결과 벡터 1 µg당 각각 형질전환체 50-70개 및 15-25개의 수율을 보였으며 형질전환용 벡터가 각 형질전환체에 안정되게 존재함을 확인하였다.

**Key words** □ genetic transformation, *Irpex lacteus*, *Phlebia tremellosa*, phosphinothricin resistance

리그닌은 지구에 존재하는 유기 탄소화합물 중에서 섬유질 다음을 차지하기 때문에 지구의 탄소원 순환과정에서 중요한 비중을 차지한다. 리그닌의 구조는 phenylpropanoid 유도체가 다양하게 결합된 것으로서 이들의 분해에 탁월한 성능을 보이는 백색부후균의 경우 laccase, lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP)를 가지고 있다(5). 이 효소들은 리그닌뿐만 아니라 다양한 난분해성물질의 분해능도 보임에 따라 다핵방향족 탄화수소와 유기 할로젠 화합물의 분해 및 다양한 염료의 탈색 등 다양한 난분해성 인공합성 유기물들을 분해할 수 있다(4). 이와 같이 다양한 물질의 분해능을 보이는 백색부후균에 대한 연구는 우리나라에는 자생하지 않는 *Phanerochaete chrysosporium*을 대상으로 미국에서 활발히 진행되고 있다(2, 3). 그러므로 우리의 생물자원의 활용을 높이기 위하여 우리나라에서 분리한 백색부후균을 대상으로 리그닌 분해와 관련된 효소들에 대한 분자생물학적 연구를 수행할 필요가 있다.

형질전환법은 분자생물학에서 외래 유전자의 도입 및 특정 유전자제거 변이주(knock-out mutant)의 제조에 유용하게 사용되는 수단이다. 고등균류에 속하는 백색부후균의 형질전환에 대한 논문은 1980년대부터 많이 발표되고 있으며, 형질전환 방법의 확립 후 다양한 유전자의 도입 및 변이주의 생성에 활용되고 있다. 국내에서 분리된 기계충버섯(*Irpex lacteus*)과 아교버섯(*Phlebia tremellosa*)은 모두 백색부후균류에 속하며 이들은 다양한 난분해성 물질의 분해에 우수한 효과를 보인다. 기계충버섯은 합성염료의 분해(11), 2,4,6-trinitrotoluene의 분해(6)에 대한 보고가 있고 MnP 효소 및 다핵방향족 탄화수소의 분해(1)에 대한 발표가 있

다. 한편 아교버섯은 합성염료의 탈색에 대한 발표(9) 및 기타 리그닌 분해와 관련된 효소에 대한 보고가 있다(13). 이와 같이 두 균류의 경우 다양한 난분해성 화합물의 분해에 대한 활발한 연구가 진행되고 있음에도 불구하고 두 균주 모두 분해관련 유전자 및 형질전환에 대한 연구가 보고된 바 없다. 이에 저자들은 국내에서 분리된 두 가지 균주들을 대상으로 분자생물학 수준의 연구를 진행하기 위한 첫 단계로서 형질전환 방법을 확립하였으며 이를 보고하고자 한다.

기계충버섯과 아교버섯의 배양을 위하여 완전배지는 potato dextrose agar (PDA), 최소배지는 CKMM (10)을 사용하였다. 아교버섯 이핵체로부터 원형질체를 이용한 방법(7)으로 일핵체 (Pt05-2)를 확보하였으며 PDA에 접종하고 30°C에서 5일 동안 배양한 후 접종용 칼로 잘라 CKMM (100 ml)에 접종하여 진탕배양하였다. 배양 4일 후 Waring blender를 사용하여 균체를 1초씩 5회 처리하고 10 ml를 다시 CKMM (100 ml)에 접종하였다. 밤샘배양 후 균체를 모아 STC 완충액(0.55 M sorbitol, 10 mM Tris·HCl; pH 7.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>)으로 3회 세척하고 동일한 완충액(20 ml)에 현탁한 후 세포벽 분해효소(Glucanex 200G 4%, 20 ml)를 더하여 30°C에서 2시간 처리하여 원형질체를 생성하였다. Glutamine synthetase inhibitor인 phosphinothricin에 대한 저항성 유전자(*bar*)를 선택표지로서 가진 pBARGEM7-1을 형질전환체용 벡터로 사용하였다(10). 기계충버섯의 경우  $5 \times 10^7$ 개, 아교버섯의 경우  $2.4 \times 10^7$ 개의 원형질체 현탁액 100 µl를 Eppendorf tube에 더하고 벡터 5 µg과 *EcoRI* (30 U)를 혼합하여 얼음에서 30분간 반응하였다. Polyethyleneglycol 6000 (40%) 1 ml를 더하고 조심스럽게 혼합한 후 실온에서 20분간 반응시켰다(7, 8). 형질전환 처리된 원형질체를 0.55 M sorbitol과 phosphinothricin 50 µg/ml이 첨가된 CKMM soft agar (0.8%)에 현탁시키고 이를

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-33-250-8511, Fax: 82-33-242-0459  
E-mail: htchoi@kangwon.ac.kr

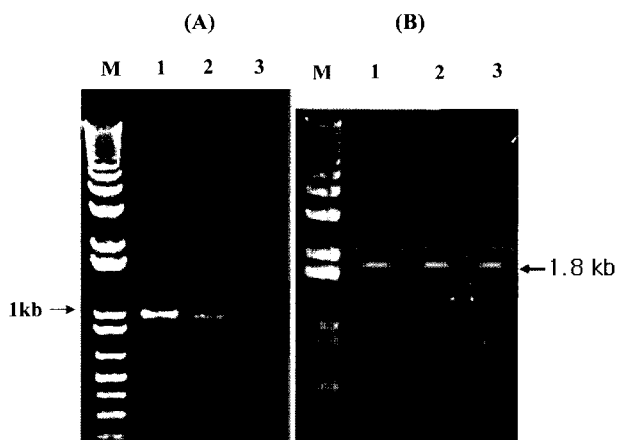
미리 준비한 bottom agar (phosphinothricin 50 µg/ml, 한천 1.6%)에 overlay하여 30°C에서 배양하면서 재생되는 균체를 확인하였다. 선택배지에서 성장하는 균을 선발하여 phosphinothricin 100 µg/ml이 첨가된 CKMM 한천배지에서 성장을 확인하고 recipient 균주에 비하여 생장이 우수하거나 변화된 성장 양상을 보이는 형질전환체들을 선발하였다. 기계충버섯의 경우 50-70 형질전환체/µg pasmid DNA의 수율을 보였고, 아교버섯의 경우 15-25 형질전환체/µg pasmid DNA의 형질전환 수율을 보였다. 이러한 수율은 *Coprinellus* (= *Coprinus*) *congregatus*의 500-600/µg DNA (10)와 비교하면 낮은 값이지만, *Trametes versicolor*의 25-50/µg DNA (7)와 비슷한 수율을 보였으며, 양송이의 1-5형질전환체/µg DNA (12) 보다 우수한 수율을 보였다.

기계충버섯 및 아교버섯의 형질전환체 150여개를 대상으로 성장에 큰 변화가 없이 잘 자라는 균주 및 집락의 모양이 변한 균주 등 다양한 형질전환체를 분리하였다. 이들의 세포생리학적 변화를 분석하기 위하여 형질전환체들과 recipient strain으로부터 CTAB-Proteinase K 방법(10)을 이용하여 chromosomal DNA를 분리하였다. 형질전환 벡터인 pBARGEM7-1의 존재를 확인하기 위하여 promoter (*trp C*)-specific한 forward primer 5'-GTCGACAGAAGATGATATTG-3'와 *bar*-specific한 reverse primer 5'-TCA TCAGATCTCGGTGACGGGCAGG-3'를 제작하여 각 균주들의 total DNA를 template로 사용하여 PCR을 수행하였다. 아교버섯 형질전환체들에게서 벡터가 존재할 때 PCR에 의하여 증폭되는 DNA 조각의 길이는 930 bp이다. Recipient strain에서는 증폭되지 않은 반면 형질전환체 20균주를 대상으로 PCR을 수행하여 확인하였으며, 임의로 2균주의 결과를 recipient 균주와 비교하였다

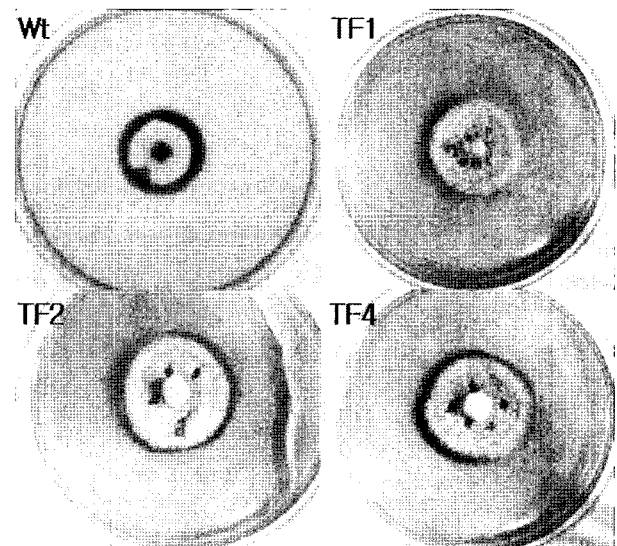
(Fig. 1A; 기계충버섯, 결과 미제시). 한편 이 PCR이 특이적으로 정확하게 진행되었는지 확인하고자 본 실험실에서 클로닝하여 등록한 아교버섯 laccase 유전자(EMBL Nucleotide Sequence Database accession number: AM282562)의 특정 염기서열에 근거한 laccase-specific PCR primer (forward primer; 5'-GGGGA TCCTACCAATGTTTTCCTTC-3' 및 reverse primer; 5'-GTAG GATCCGGCTTCACTGACGCC-3')를 제작하였다. 이 primer들을 사용하여 동일한 DNA 시료를 대상으로 PCR을 수행하고 전기영동을 통하여 증폭되는 1.8 kb 길이의 laccase 유전자 조각을 확인함으로써 앞에 실험한 *bar*-specific PCR이 정상적으로 진행되었음을 증명하였다(Fig. 1B).

형질전환체의 성장 및 laccase 활성의 변화를 1차 확인하기 위하여 PDA 배지에서 배양하고 laccase 기질인 *o*-tolidine을 균체에 더하여 발색을 비교한 결과 형질전환체들의 집락상태가 변화되었으며, laccase 활성에 변화가 나타났다(Fig. 2). 이와 같이 특정 효소의 활성이 저하되는 현상은 먹물버섯에서도 확인된 바 있으며(10), 도입된 벡터가 염색체 상의 다양한 위치로 삽입됨에 따라 다양한 형질의 변화를 보이는 것으로 판단된다. 이상의 다양한 형질전환체들은 항생물질이 없는 비선택적 배지인 완전배지에서 5회 이상 계대배양한 후에도 저항성은 물론 도입된 유전자의 존재를 PCR 방법으로 확인할 수 있었다. 한편 기계충버섯은 laccase 활성이 확인되지 않아(결과 미제시) 아교버섯의 laccase 유전자를 발현벡터로 재조합하여 형질전환 방법으로 기계충버섯에 도입하고자 한다. 기계충버섯과 아교버섯에 대한 이 보고는 우리 생물자원을 대상으로 형질전환 방법을 확립한 국제적 첫 보고이다.

난분해성물질 분해능이 우수한 백색부후균들을 대상으로 형질전환 방법이 확립됨에 따라 laccase 활성이 매우 낮은 기계충버



**Fig. 1.** (A) Confirmation of integration of pBARGEM7-1 into transformant chromosomal DNAs by PCR with the plasmid-specific primers using different DNA sources from transformants. Lane M, molecular weight marker (1 kb ladder); lane 1, transformant 1 (TF1); lane 2, TF2; lane 3, recipient strain as the negative control. Arrow represents the amplified product. (B) PCR by the laccase gene-specific primers using the same DNA sources in A panel. This reaction supports that result of A panel shows not a non-specific PCR but the *bar*-specific PCR. Lanes are same as in A, and the arrow represents the amplified laccase gene fragments.



**Fig. 2.** Comparison of the growing patterns and laccase activity by adding *o*-tolidine as the enzyme substrate. Wt, recipient strain; TF1, 2 and 4 represent the transformants.

섯과 MnP 활성이 없는 아교버섯에 각각 laccase 또는 MnP 효소의 유전자를 도입하여 분해능이 더욱 향상된 균주를 확보하고자 한다.

### 감사의 말

이 연구는 산림과학원의 연구비로 수행되었음.

### 참고문헌

1. Baborova, P., M. Moder, P. Baldrian, K. Cajthamlova, and T. Cajthaml. 2006. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Res. Microbiol.* 156, 248-253.
2. Cameron, M., S. Timofeevski, and S. Aust. 2000. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 751-758.
3. Cullen, D. 1997. Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. *J. Biotechnol.* 53, 273-289.
4. Field, J., E. de Jong, G. Feijoo-Costa, and J. de Bont. 1993. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol.* 11, 44-49.
5. Karam, J. and J. Nicell. 1997. Potential applications of enzymes in waste treatment. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 10, 344-348.
6. Kim, H. and H.G. Song. 2003. Transformation and mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene by the white rot fungus *Irpex lacteus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 150-156.
7. Kim, K., Y. Leem, K. Kim, K. Kim, and H.T. Choi. 2002. Transformation of the medicinal basidiomycetes *Trametes versicolor* to hygromycin B resistance by restriction enzyme mediated integration. *FEMS Microbiol. Lett.* 209, 273-276.
8. Kim, S., J. Song, and H.T. Choi. 2004. Genetic transformation and mutant isolation in *Ganoderma lucidum* by restriction enzyme-mediated integration. *FEMS Microbiol. Lett.* 233, 201-204.
9. Kirby, N., R. Marchant, and G. McMullan. 2000. Decolourisation of synthetic textile dyes by *Phlebia tremellosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 188, 93-96.
10. Leem, Y., S. Kim, I.K. Ross, and H.T. Choi. 1999. Transformation and laccase mutant isolation in *Coprinus congregatus* by restriction enzyme-mediated integration. *FEMS Microbiol. Lett.* 172, 35-40.
11. Malachova, K., Z. Pavlickova, C. Novotny, K. Svobodova, D. Lednicka, and E. Musilkova. 2006. Reduction of mutagenicity of synthetic dyes by successive treatment with activated sludge and the ligninolytic fungus *Irpex lacteus*. *Environ. Mol. Mutagen.* 47, 533-540.
12. Van de Rhee, M., P. Graa, H. Huizing, and H. Mooibroek. 1996. Transformation of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*, to hygromycin B resistance. *Mol. Gen. Genet.* 250, 252-258.
13. Vares, T., O. Niemenmaa, and A. Hatakka. 1994. Secretion of ligninolytic enzymes and mineralization of C-ring-labelled synthetic lignin by three *Phlebia tremellosa* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 569-575.

(Received February 8, 2007/Accepted June 14, 2007)

### ABSTRACT : Genetic Transformation of *Irpex lacteus* and *Phlebia tremellosa* to an Antibiotic Resistance

Yunjung Kim, Myungkil Kim<sup>1</sup>, Hong-Gyu Song, and Hyoung T. Choi\* (Division of Life Sciences, and Research Institute of Life Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Republic of Korea, <sup>1</sup>Division of Wood Chemistry and Microbiology, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Republic of Korea)

White-rot fungi which degrade lignin can also degrade diverse recalcitrant compounds such as polymeric dyes, explosives, pesticides, and endocrine disrupting chemicals. Lignin degrading enzymes are involved in the degradation reactions, and introduction of foreign genes into a white-rot fungus is required in order to increase the degrading capacity. Genetic transformation experiment has been carried out in *Irpex lacteus* and *Phlebia tremellosa* to an antibiotic resistance. The transformation yields were 50-70 transformants/ $\mu$ g DNA and 15-25 transformants/ $\mu$ g DNA in *I. lacteus* and *P. tremellosa*, respectively. The stable replication of the plasmid was confirmed by PCR using the plasmid-specific primers, and many mutants were generated during this integration in both fungi.