

먹물버섯 *Coprinellus congregatus*에서 분열자를 사용한 형질전환

박남미 · 김동식 · 최형태*

강원대학교 생명과학부 미생물생리학 실험실

먹물버섯의 하나인 *Coprinellus congregatus*를 대상으로 유전자의 도입을 위한 형질전환 실험에서 원형질체를 생성하지 않고 분열자(oidium)를 사용하는 방법을 확립하였다. 분열자는 20일 이상 된 CKMM 한천배지에서 생성되며, 이를 밤샘배양으로 발아를 촉진시킨 상태에서 전기천공방법으로 항생물질 *basta*에 대한 형질전환을 수행한 결과 10-20 형질전환체/ μg DNA의 수율로 형질전환체를 확보할 수 있었다. 이 형질전환체들은 도입된 벡터가 염색체 상에 삽입되어 유전적으로 안정된 상태를 유지하였다.

Key words □ genetic transformation, oidia, *Coprinellus congregatus*

먹물버섯의 하나인 *Coprinellus congregatus*는 버섯이 생성·성숙되는 과정에서 빠르게 갓이 자기분해 되어 먹물로 변한다. 이 버섯 균은 실험실에서 배양이 매우 쉽고, 실험자의 의도에 따라 빛을 조절함으로써 분화가 쉽게 유도되므로 분화의 연구재료로 사용하기에 적합하다(7). 이 균을 YpSs 한천배지에 배양하여 분화를 유도하면 두 종 이상의 laccase가 확인된다(1). 이 균을 대상으로 분화와 관련된 효소들의 유전자에 대한 연구를 수행하고자 산성 laccase의 유전자를 클로닝하고 발현을 분석하였으며(5), 원형질체를 만들고 제한효소매개 삽입법에 의한 형질전환 방법을 확립하였다(6).

사상성 진균류의 형질전환은 균류의 두꺼운 세포벽이 형질전환 벡터의 도입에 대한 장벽으로 작용하기 때문에 세포벽 제거 효소를 사용하여 원형질체를 생성하고 여기에 형질전환 벡터를 도입시키기 위하여 CaCl_2 를 사용하거나 electroporation 방법(전기천공법)을 사용한다(2, 6). 이때 사용되는 세포벽 제거효소는 상당히 높은 가격이며, 원형질체를 생성하고 다루는 과정도 오염의 가능성 및 원형질체 파괴의 위험이 있어 숙련이 필요한 과정이다. 버섯 곰팡이와 분류학적으로 가장 가까운 자낭균류의 경우 분생포자 및 분열자와 같은 무성포자를 대량 생성하므로 이를 이용한 형질전환 방법이 보고되었다. Wendland 등(9)은 *Ashybia gossypii*의 발아된 분생포자에 electroporation 방법으로 유전자를 도입하여 gene disruption을 시도하였다. 이러한 자낭균류에 비하여 담자균류, 특히 버섯 곰팡이들은 상대적으로 무성생식 포자의 생성이 저조하기 때문에 원형질체를 이용한 형질전환을 수행한다(4).

*C. congregatus*는 YpSs 한천배지에서 성장과 분화가 용이하게 유도되지만 균사체의 fragmentation(조각 생성)을 통한 무성포자의 하나인 분열자가 생성되지 않는 반면, 최소배지에서 4주 동안

배양할 경우 분열자가 생성됨을 확인하였다. 이와 같이 버섯 곰팡이에서 처음으로 생성된 분열자를 이용하여 원형질체의 과정을 거치지 않고 형질전환 실험을 성공적으로 수행하여 이를 보고한다.

재료 및 방법

균주의 배양

본 실험에 사용한 균주는 *C. congregatus* 일핵체(monokaryon) mating type a1이고, YpSs slant 배지(1.5% soluble starch, 0.4% yeast extract, 0.1% K_2HPO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)에 접종하여 25°C에서 배양한 후 4°C에 보관하였다. 분열자를 얻기 위하여 최소배지인 CKMM 한천배지(6)에 일핵체를 접종하고 25°C에서 4주 동안 배양하였다. 멸균 증류수를 더하여 균사체의 표면을 긁어 분열자를 모았다. 균사체 및 균체조각을 제거하기 위하여 Milipore의 여과기를 사용하여 여액에 있는 분열자만 모았다. 분열자의 평균 크기는 $3 \times 7 \mu\text{m}$ 의 막대모양이며(Fig. 1), 분열자를 멸균 증류수로 2회 세척하고 YpSs 액체배지에 현탁($10^7/\text{ml}$)한 후 48°C에서 15분간 열 충격을 더하였다. 분열자는 25°C에서 8 시간 진탕배양 함으로써 초기발아를 유도하였다.

형질전환 수행

초기발아가 유도된 분열자를 SMT 완충액 (270 mM sucrose, 1 mM MgCl_2 in 10 mM Tris, pH 7.5)으로 15,000 rpm에서 15 분간 2회 원심분리 함으로써 세척하고 SMT 완충액 100 μl 에 현탁하였다. 미리 0°C로 보관한 electroporation 용 cuvette (0.2 mm)에 형질전환 벡터 pBARGEM7-1 10 μg (6)과 *EcoRI* (30 U)을 분열자 현탁액과 혼합하여 15분간 얼음에서 보관하였다. 형질전환 벡터를 더한 원형질체 현탁액을 Electroporater (EquiBio, 미국)에서 1.5 kV, 20 μF 의 전기충격을 가하였고, CKMM top agar (한천 0.8%) 10 ml과 혼합한 후 미리 *basta* (phosphinothricin으로

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-33-250-8543, Fax: 82-33-242-0459
E-mail: htchoi@kangwon.ac.kr

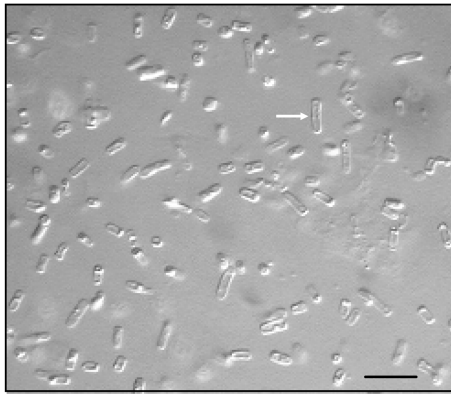


Fig. 1. Photomicrograph of oidia from monokaryon of *C. congregatus*. White arrow indicates oidium generated from the fungus. Black scale bar represents 10 μ m.

35 μ g/ml)를 함유하는 bottom agar(한천 1.6%) 위에 더하였다. 이를 25°C에서 4-5일간 배양하고 생성되는 균사를 CKMM-basta 한천배지 (150 μ g/ml)로 옮겨 배양하여 형질전환체를 분리하였다.

형질전환체의 확인

형질전환체들은 선택배지 및 YpSs 배지에서 성장정도를 확인하였고 Leem 등(6)의 방법에 따라 형질전환체로부터 염색체 DNA를 분리하였다. pBARGEM7-1을 주형으로 Klenow 효소를 사용하여 제작한 DIG 표식을 붙인 probe를 사용하고 형질전환체의 염색체 DNA를 여러 종의 제한효소로 분해하여 Leem 등 (6)의 방법에 따라 Southern hybridization을 수행하였으며 CDP-Sr³²P (Roche)를 사용한 화학발광법으로 검출하였다.

결과 및 고찰

먹물버섯의 분열자를 사용하고 전기충격을 더 함으로써 항생 물질 저항성 유전자에 대한 형질전환 실험에서 10-20 형질전환체/ μ g DNA의 수율을 얻었다. 이 값은 다른 버섯균류의 원형질체를 이용하는 형질전환 실험결과와 비교하면 느타리버섯의 경우 200 형질전환체/ μ g DNA (2), electroporation 방법을 사용한 *Holleya sinicauda*의 경우 60 형질전환체/ μ g DNA (8)의 결과에 비하여 작은 수치이다. 그러나 CaCl_2 방법을 사용한 영지와 구름버섯의 경우 각각 4-17 형질전환체/ μ g DNA (4)와 25-50 형질전환체/ μ g DNA (3)와 비교할 때 비슷한 값을 보였다. 한편 *Neurospora crassa*의 무성포자를 30°C에서 2.5 시간 발아시키고 형질전환을 시도하여 7-9 형질전환체/ μ g DNA (10)를 얻은 것에 비하여 조금 우수한 수율을 보였다.

형질전환체들을 선택배지에 배양하였을 때 성장을 보이지 못한 recipient cell과 달리 성장을 보였다(Fig. 2). 이들을 basta가 포함되어 있지 않은 완전배지에서 10회 이상 계대배양하고 다시 선택 배지로 옮겼을 경우에도 형질전환체들은 성장을 보였으므로 도입된 벡터가 염색체 내에 안정되게 삽입된 것으로 판단된다. 몇

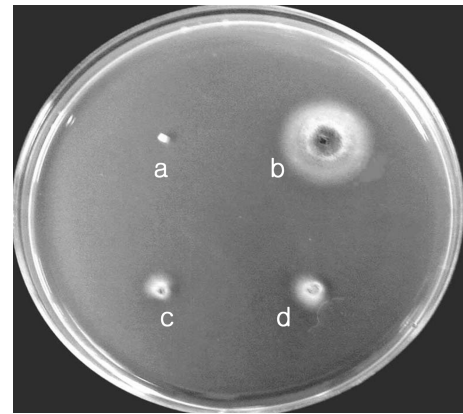


Fig. 2. Growth of transformants on CKMM plus basta plate (150 μ g/ml) for 4 days at 25°C. a, recipient strain (cc16); b, transformant cc16bar15; c, transformant cc16bar10; d, transformant cc16bar7.

종의 형질전환체들 간에 성장에 차이를 보였는데 이는 도입된 벡터의 삽입 위치에 따라 다양한 변이가 유도될 수 있으므로 생장이 우수한 cc16bar15에 비하여 생장이 상대적으로 느린 cc16bar7과 cc16bar10의 경우 세포대사와 관련된 효소에 변이가 되었을 것으로 판단된다. 형질전환체의 염색체 DNA를 제한효소로 분해하고 pBARGEM7-1 probe를 사용하여 Southern hybridization을 수행한 결과 도입된 벡터가 염색체 내에 안정되게 삽입된 것으로 확인되었다(Fig. 3). 이는 autonomously replicating sequence (ARS)와 재조합된 효소균의 벡터와 달리 진

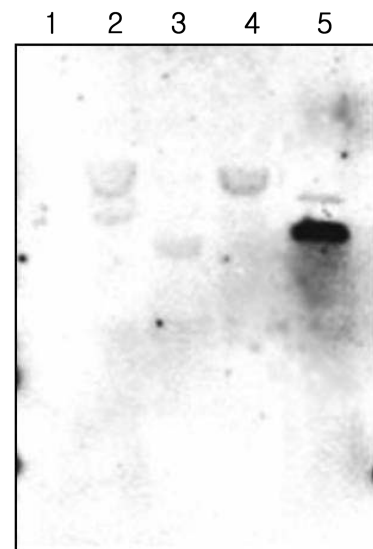


Fig. 3. Confirmation of the integration of the plasmid DNA by Southern hybridization using probe generated by Klenow reaction with pBARGEM7-1 as the template. Lane 1, recipient strain as the negative control; lane 2, transformant cc16bar10 digested with *Bam*HI; lane 3, same as lane 2 but digested with *Hind*III; lane 4, transformant cc16bar15 digested with *Bam*HI; lane 5, pBARGEM7-1 as the positive control digested with *Bam*HI.

균류의 경우 외래 유전자가 염색체 내로 삽입되는 것과 동일한 결과를 나타낸다.

이상의 결과에 근거하여 무성포자의 하나인 분열자를 사용한 형질전환 방법이 원형질체의 생성 및 처리과정을 이용한 형질전환 방법을 대체할 수 있다고 판단된다.

참고문헌

1. Choi, H.T., R.W. Wilks, and I.K. Ross. 1987. Formation of sclerotia in liquid cultures of *Coprinus congregatus* and their phenoloxidase isozymes. *Mycol.* 79, 166-172.
2. Irie, T., Y. Honda, T. Watanabe, and M. Kuwahara. 2001. Efficient transformation of filamentous fungus *Pleurotus ostreatus* using single-strand carrier. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 563-565.
3. 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.
4. 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.
5. Kim, S., Y. Leem, K. Kim, and H.T. Choi. 2001. Cloning of an acidic laccase gene (*clac2*) from *Coprinus congregatus* and its expression by external pH. *FEMS Microbiol. Lett.* 195, 151-156.
6. 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.
7. Ross, I.K. 1982. Role of laccase in carpophore initiation in *Coprinus congregatus*. *J. Gen. Microbiol.* 128, 2763-2770.
8. Schade, D., A. Walther, and J. Wendland. 2003. The development of a transformation system for the dimorphic plant pathogen *Hollaea sinecauda* based on *Ashbya gossypii* DNA element. *Fungal Genet. Biol.* 40, 65-71.
9. Wendland, J., Y. Ayad-Durieux, P. Knechtle, C. Rebischung, and P. Philippsen. 2000. PCR-based gene targeting in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Gene* 242, 381-391.
10. Dhawale, S., J. Palletta, and G. Marzluf. 1984. A new, rapid and efficient transformation procedure for *Neurospora*. *Curr. Genet.* 8, 77-79.

(Received February 9, 2006/Accepted March 14, 2006)

ABSTRACT : Genetic Transformation of a Mushroom Forming Fungus *Coprinellus congregatus* to an Antibiotic Resistance Using Oidia Instead of Protoplast Generation
Namsee Park, Dongsik Kim, and Hyoun T. Choi* (Microbial Physiology Lab, Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea)

Genetic transformation of a mushroom-forming fungus *Coprinellus congregatus* to antibiotic resistance gene had been successfully carried out by electroporation to oidia instead of protoplasts. Since there was no protoplast generation step which required not only cell wall degrading enzymes but many skillful procedures, commercial herbicide (basta) could be used without any difficulty with simple procedure. The transformation yield was 10-20 transformants/ μ g DNA, and the transformants were very stable even after 10 consecutive transfers through the non-selective medium.