

Article

*Coprinellus congregatus*의 laccase 유전자 프로모터의 산성반응인자 분석

김수연 · Linh Nguyen · 최형태*

강원대학교 생화학과

Analysis of an acid-responsive element in a promoter of laccase gene in the inky cap, *Coprinellus congregatus*

Su Yeon Kim, Linh Nguyen, and Hyoung T. Choi*

Department of Biochemistry, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

(Received June 14, 2016; Revised July 7, 2016; Accepted July 8, 2016)

ABSTRACT: The inky cap, *Coprinellus congregatus*, produces several laccase isozymes during its life cycle: both hyphal tip laccase and sclerotial laccase are involved in the fungal development. When this fungus was transferred to an acid liquid medium (pH 4.0–4.5), a new laccase was synthesized and secreted into the culture supernatant. In order to examine its regulation by external pH, green fluorescent protein gene was ligated at the downstream of the promoters having different lengths. These expression vectors having different promoter lengths were inserted into the fungal transformation vector, pBARGEM7-1. These expression vectors were introduced to the mating type a1 and a2 monokaryons, and the transformants were selected by the phosphinothricin resistance. Transformant a1 (a1TF) and transformant a2 (a2TF) were mated with each other to generate homozygotic dikaryon transformants. All these transformants were grown in neutral liquid medium for 5 days, and then the whole cell homogenates were transferred to the acidic liquid medium (pH 4.1). After 36 h incubation at 25°C, cells were harvested for the analysis of GFP expression. GFP expression was detected in the transformant having full-length promoter (2.0 kb), but other transformants having shorter length promoter (shorter than 1.29 kb) failed to show the fluorescence. Therefore, the acid-responsive element in the laccase promoter should be localized between -2.0 kb ~ -1.29 kb region.

Key words: *Coprinellus congregatus*, acid stress, laccase, promoter analysis

먹물버섯의 한 종인 *Coprinellus congregatus*는 비교적 간단한 복합배지인 YpSs (soluble starch 15 g, yeast extract 4 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, agar 16 g, 1 L d-H₂O: pH 7.0)에서 잘 자라며, 빛을 조절함으로써 이핵체(dikaryon)로부터 버섯 생성을 유도할 수 있다(Choi and Cho, 2005). 이 균은 생활사 동안 여러 종류의 laccase (benzenediol:oxygen oxidoreductase, EC1.10.3.2)를 생성한다. 버섯생성과 관련되었다고 보고된 hyphal tip laccase (Ross, 1982), 버섯 시원체 시기에 생성되는 primordial laccase (Choi, 미발표 자료), 액체배양에서 2주 이상 된 균사체에 생성되는 sclerotium에 존재하는 sclerotial laccase (Choi *et al.*, 1987) 등이며 이들은 모두 세포막에 연관된 것으로 확인되었다(Choi and Ross, 1990).

*C. congregatus*를 중성 액체배지에서 배양하면 상등액에는 laccase 활성이 전혀 없으나, 이 균을 pH 4.1 배지에서 배양하면 1일 후부터 상등액에서 laccase 활성이 확인된다(Kim *et al.*, 1991). 이 효소의 cDNA (*lac2*)를 확보하고 northern blot 분석을 통하여 중성에서는 발현되지 않고 산성 조건에서만 발현됨을 확인하였다(Kim *et al.*, 2001). 이 유전자의 발현 양상을 분석하고자 promoter 및 genomic DNA 유전자를 cloning하였다(Kim *et al.*, 2006). 유전자의 발현 양상을 정확하게 분석하고자 cDNA를 promoter와 재조합하여 효모균에 도입하고 발현을 분석한 결과 산 충격보다는 활성산소 자극에 의하여 발현되었다(Kim *et al.*, 2006).

*C. congregatus*에서 시원체와 sclerotium 생성 등의 분화는 물론 산 충격에 대한 반응도 오직 이핵체 균사에서 나타나는 현상이므로, *lac2* promoter는 이핵체라는 신호와 산 충격 신

*For correspondence. E-mail: htchoi@kangwon.ac.kr;
Tel.: +82-33-250-8511; Fax: +82-33-259-5664

호전달과 관련된 단백질이 각각 결합하는 DNA 지역을 보유해야 한다. 이 분석을 위하여 *lac2* promoter를 다양한 길이로 PCR을 사용하여 증폭하고 이를 green fluorescent protein (GFP) 유전자와 재조합한 후 버섯균류의 형질전환 벡터인 pBARGEM7-1 (Leem et al., 1999)을 사용하여 발현벡터를 구축하였다. 이 벡터를 *C. congregatus*의 두 가지 일핵체(monokaryon: a1, a2)에 도입하고 선발된 일핵체 형질전환체끼리 교배함으로써 동형접합 이핵체인 형질전환체를 확보하였다. 그리고 이 형질전환체들이 pH 4.1 배지에서 GFP를 발현하는가 확인함으로써 산 충격에 대한 반응을 보이는 프로모터 부분을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

C. congregatus 형질전환 벡터에 laccase 2 유전자 promoter와 GFP 재조합

산성 laccase 유전자의 promoter (EMBL, AY217088: 2.0 kb)를 *Xho*I linker와 *Bam*HI linker를 각각 연결한 primer로 증폭하였고 *Aspergillus nidulans*에서 사용한 GFP (Lee et al., 2004)를 *Bam*HI linker와 *Sac*I linker를 연결한 primer로 증폭한 후 이를 각 제한효소로 처리하였다. *C. congregatus*의 형질전환 벡터로 사용했던 pBARGEM7-1 (Leem et al., 1999)을 *Xho*I과 *Sac*I으로 처리하고 *lac2* promoter-GFP (F0)를 모두 연결한 발현벡터를 구축하였다. Laccase 프로모터의 5' 지역부터 차례로 제거한 다양한 길이의 프로모터를 GFP와 연결하기 위하여 이미 확보한 F0 벡터를 template로 사용하고 앞에 사용한 동일한 *Xho*I linker와 *Sac*I linker를 가진 primer들을 제조하여 프로모터 길이 1.85 kb (F1), 1.57 kb (F2), 1.29 kb (F3), 0.89 kb (F4), 0.57 kb (F5), 0.34 kb (F6), 그리고 0.18 kb (F7)를 가진 발현벡터를 구축하였다. 본 실험에서는 이 중에서 F0, F3 및 F5의 발현 여부가 분석되었다.

*C. congregatus*에 재조합 발현벡터의 도입, 형질전환체 선발 및 이핵체 생성

C. congregatus 일핵체 중에서 교배형 a1과 a2를 대상으로 원형질체를 사용한 형질전환 방법(Leem et al., 1999)으로 재조합 발현벡터 F0, F3, F5를 도입하고 glutamine synthetase 억제제인 phosphinothricin이 포함된 배지(100 µg/ml)에서 형질전환체들을 생성하였다. 사상성 진균류에서 형질전환에 의한 외래 유전자의 도입은 염색체 내에 무작위로 삽입되는 방식이므로 효율을 더하기 위하여 재조합 벡터를 *Not*I으로 처리하여

linear form으로 만들어 실험을 수행하였다. 형질전환체임을 확인하기 위하여 발현벡터의 *lac2* promoter (F5 primer 앞에 ATA를 첨가한 *Xho*I linker 연결)와 GFP 유전자 부분의 특이 primer (Forward, 5'-ATACTCGAGCTGGCAGCGAG-3'; reverse, 5'-TTTAGGTCACGAGGGTGGGCC-3')를 제작하고, 이를 사용하여 annealing 온도 57°C 조건에서 PCR로 750 bp를 증폭함으로써 분석하였다. 선발된 형질전환체 a1 (a1TF)과 a2 (a2TF)를 서로 교배하여 동형접합(homozygotic) 이핵체 형질전환체(a1TFxa2TF)를 생성하였다.

동형접합 이핵체 형질전환체에서 다양한 길이의 프로모터들에 의한 발현 양상 분석

야생형 이핵체(a1 x a2), 동형접합 이핵체 형질전환체(a1TF x a2TF) 균들을 각각 YpSs 중성액배지(soluble starch 15 g, yeast extract 4 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, d-H₂O 1 L)에 접종하고 5일 동안 종균을 배양하였다. 균이 자란 후 Waring blender로 균체를 갈아서 pH 4.1 액체배지에 접종하고(10% v/v) 배양 36시간 후 원심분리 방법으로 시료를 확보하였다. 각 시료를 4% paraformaldehyde로 고정, 처리 후 confocal microscope (Super Sensitive High Resolution Confocal Laser Scanning Microscope, Zeiss)로 녹색형광(excitation 488 nm, emission 529/546 nm)의 발현을 분석하고 ZEN 프로그램을 사용하여 녹색형광의 밝기를 수치로 확인하였다.

결과 및 고찰

이 실험에 사용한 *C. congregatus*는 pH 4.0-4.5 사이의 액체 배지에서 산성 laccase를 생성, 분비하며(Kim et al., 1991), 이때 배양액의 pH는 배양 2일 후에 pH 5.5 이상으로 상승하고(Kim et al., 1997), 효소의 생성 분비도 중단된다. 이와 같이 이핵체 균사에서 산 충격에 의하여 발현되는 *lac2*의 발현조절 양상을 분석하고자 2 kb-180 bp로 증폭된 다양한 길이의 promoter에 GFP를 연결하고 형질전환 벡터인 pBARGEM7-1과 재조합하였다(Fig. 1). 다양한 길이의 프로모터를 제작하기 위한 primer의 위치를 Fig. 2에 제시하였다. 전체 8종류 다른 길이의 프로모터 발현벡터를 *C. congregatus* 일핵체 a1과 a2에 각각 형질전환 방법으로 도입한 결과 각 교배형에서 F0, F3 및 F5 발현벡터가 도입된 15개 이상의 형질전환체를 분리하였다. 선발된 균주 중에서 F0과 F5 형질전환체들을 대상으로 *lac2* promoter-GFP 일부를 증폭하는 특이 primer를 사용하여 예상 길이 750 bp를 PCR로 증폭하여 형질전환체임을 확인하였다

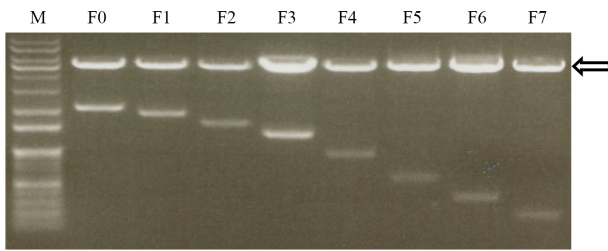


Fig. 1. Confirmation of expression vector (*lac2* promoter-GFP) construction in pBARGEM7-1. M, molecular weight marker; F0-F7, double cut with *Xho*I and *Bam*HI showing different lengths of *lac2* promoters and GFP+ pBARGEM7-1 (arrow). F0, 2.0 kb; F1, 1.85 kb; F2, 1.57 kb; F3, 1.29 kb; F4, 890 bp; F5, 570 bp; F6, 340 bp; F7, 180 bp.

(Fig. 3). 다양한 길이(F0, F3, F5)의 promoter-GFP를 가진 일핵체 형질전환체 a1 TF와 a2 TF를 교배하여 동형접합 이핵체 (homozygotic dikaryon)들을 확보하고 이 형질전환체들을 증성 액체배지(YpSs, pH 7.0)에서 5일간 배양한 후 배양액 전체를 Waring blender로 갈아서 산성 액체배지(YpSs, pH 4.1)로 옮겨 36시간 동안 배양하였다. 각 동형접합 형질전환체들의 균체를 모아 형광을 분석한 결과 2.0 kb promoter 전체를 가진 F0 동형접합 형질전환체만 형광을 보일 뿐 5'-지역을 차례로 제거하여 짧아진 길이를 가진 F3 및 F5 형질전환체들은 형광을 보이지 않았다(Fig. 4). 이 결과는 산 충격에 대하여 반응하는 DNA element가 -2.0 kb ~ -1.29 kb 사이에 존재함을 시사한

<i>gatccggccaagacctcgatatgagcgggtctggaatgacgactaagtaga</i>	(F0)	- 2008
<i>gtttcagcaagacttatgactctgatttctacgcgtcggtgctcaatc</i>		- 1908
<i>gtcgaatattggtacgacatgccgtctccgacaattgtccgcgcgggcgc</i>		- 1808
<i>ttacctggaccagacaaaacgggatggtctggcgaattgactccacggctc</i>	(F1)	- 1808
<i>ggggacctcatcagtttccagatcgactattattggcagggtaggtcag</i>		- 1708
<i>cagtggagaccactataatattggtgtacccaataggctgtaccgcgggc</i>		- 1608
<i>ggcatacaacgcactgcgataccaaccagccagaatcgacgccttgat</i>		- 1508
<i>cttgaccaccatgaccaccatgcacactgcgcactggacctacttaaga</i>		- 1408
<i>tattatccctaggtacttacgacactgaaagtacaaggccgcgcaccc</i>		- 1308
<i>tctgttcaggcgtctcaagagttgcctcgtgagttacctttgagggttcga</i>	(F2)	- 1308
<i>gggtgacagctgtccccgggtaccggcgtcttgagctccgtttcattcaagt</i>		- 1208
<i>ttccagggtcgttctggtactgcgactaacgcctctgcgcgattttagctc</i>		- 1108
<i>tgacttgtttcgtgttgctcaatggcgcgtcggagtgagcgcggcg</i>		- 1008
<i>gcgtcagcagctcctagtgtgtcctgtttatcccgctgcaggaagtaat</i>		- 908
<i>cgaagcctcgcgttaccgcagctccagcaaatgaatccggagtgaatc</i>		- 808
<i>tgcgactccgaggaccagagcacagtgctcagggaacgaggtctctcag</i>	(F3)	- 808
<i>gatctccttacttgtccgattcatctttgcattgtgtccaggcgaatcgt</i>		- 708
<i>gctgcagtgctgactgatttggggacataattcttggctcgtcgaagtctag</i>		- 608
<i>actctagcagttgggtttctaagggtggtgtcactacctattggaggctcc</i>		- 508
<i>ctcgcgagcgtctgcctcgcagcactcattcttcccacacaatatca</i>		- 408
<i>agatgtgtgagatgaagggtcccaaccacaggcgggtgacagttacaac</i>		- 308
<i>tcggggctcgaacgtcgcggtcaatcaagtcgtcatggagttattgtcct</i>		- 208
<i>tctgattttcgtcctcacttgcaggggccaggcgggctcaaacgttcga</i>		- 108
<i>ccacacagagaagtatggagaataagtattcttcaaaattattacggtga</i>	(F4)	- 108
<i>acgcgtggtgtatgtacttctactgggatacaacggtggttaggaatcgg</i>		- 8
<i>ggtggctgtgtgtagtgcactgacgctggtgctttggctacgagaggtac</i>		
<i>gttagtttcttcttacttcaagattggactgacgtccaggtga</i>		
<i>tcaccgtggtgcgttcaacaatgaaggagccttgttagggacattctcg</i>		
<i>aatatgcgtgtggcactcagaacatcgctgcctccgcgacgacaggga</i>		
<i>ctatgaaagcaatgtgagtatgaatttacaagctttgaagggttagcac</i>		
<i>aaagagctcacaggaatagaagccaacatgctggcagcgaaggatggg</i>	(F5)	- 508
<i>gaatccgaactgcatggtgatgaagacgatattgggggactttggggg</i>		- 408
<i>tgccagagaccctacacagatttctttagctcgatacgaacacatatca</i>		- 308
<i>agatctccccgctcgatggagtcttacctctggaatccaggagtcgtg</i>		- 208
<i>ggctgtcaaatttttgttggccaccgatgactcaaccgccgtttcgcgg</i>	(F6)	- 208
<i>gcacttgccgtcatcgcacgggtctgttgggtgccgtcgcgtcgggtcaa</i>		- 108
<i>ggcaggcgagacccccgacgtcagggtacacctggttaaaggtaacggg</i>		- 8
<i>ctgtgttctacacaccttgcattacgtttctgcgcgactcagcgaaca</i>	(F7)	- 108
<i>gtacggttcagcggcgctgttggtagagtgccgtcagcttcaagtcac</i>		- 8
<i>ccaagtgcctgaacgtcctgaggtataaataacctctggaggtcaagcag</i>		
<i>tatgttcCAACAACTACATCTTCTTTCTTTGAACTCTCCCCC</i>		

Fig. 2. Laccase gene promoter sequence and sites of the primers for F0-F7. TATA box with bold-faced letters and the 5'-end of the cDNA with capital italics.

다. 이 지역에는 병원성 균류 *Candida albicans*에서 filament-specific regulator로 보고된 UME6 결합부위(-1.95 kb, -1.92 kb) (Banerjee *et al.*, 2008), *Saccharomyces cerevisiae*에서 mating과 pseudohyphal growth 신호와 관련된 전사조절인자인 Ste12 결합부위(-1.57 kb, -1.52 kb, -1.44 kb) (Hoi and Dumas, 2010), *S. cerevisiae*에서 filamentation을 조절하는 전사인자인 Sut1 결합부위(-1.46 kb, -1.34 kb) (Foster *et al.*, 2013), 그리고 *S. cerevisiae*의 Gcn4 결합부위와 유사성을 보이는 염기서열 등이 존재한다. 이들이 *C. congregatus*에서 어떤 자극에 대하여 반응할 것인지 여부는 이 부분을 제거한 프로모터

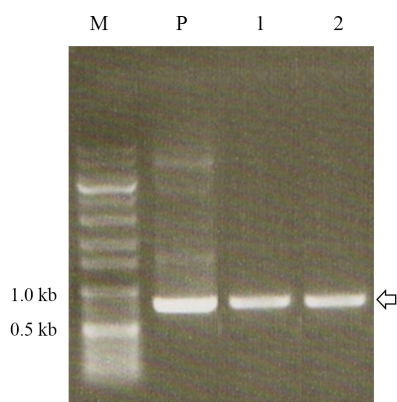


Fig. 3. Confirmation of transformants by PCR using constructed vector specific primers. Arrow represented the amplified DNA fragment (750 bp). M, molecular weight marker; P, positive control (expression vector); 1, transformant F0; 2, transformant F5.

를 분석해야 할 것이다. 그러나 아직 pH 4.0-4.5 수준의 산 충격에 대한 DNA-responsive element에 대한 보고가 없어 -2.0 kb ~ -1.29 kb 사이의 프로모터를 일부 제거한 promoter-GFP 조합인 F1 형질전환체와 F2 형질전환체들의 GFP 발현을 분석해야 한다. 또한 GFP 발현도 wild type (a1 and a2)은 물론 F0, F3 및 F5 일핵체 형질전환체에서는 나타나지 않았기 때문에 (Choi, 미발표 결과), F1과 F2 및 기타 다른 길이의 프로모터를 가진 동형접합 이핵체 형질전환체를 분석해야 할 것이다.

균류에서 산 충격에 대한 반응(적응)을 연구한 보고는 비교적 적다. 배양환경의 pH 변화에 대한 적응, 즉 pH 변화의 신호 전달과정은 *A. nidulans*에서 알칼리 충격의 신호전달 경로의 단백질인 PalA, B, C, F, I, H, alkaline phosphatase인 PalD 및 regulatory protein인 PacC가 가장 잘 알려졌다 (Peñalva and Arst, 2002; Peñalva *et al.*, 2008), *Candida albicans*에서 PacC homolog인 PRR2가 보고되었다 (Ramon *et al.*, 1999). 이 단백질들은 alkaline pH의 자극에 반응하여 신호를 전달하고 PacC 조절단백질이 산성 조건에서 필요한 단백질의 유전자 발현을 억제하고 알칼리 배양조건에서 필요한 단백질들의 유전자를 발현시키는 체계이다. 또 병원균류인 *Fusarium oxysporum*에서는 salt stress에 대한 저항성을 조절하는 PacC 전사인자가 pH에 따라 발현이 변화되었다 (Caracuel *et al.*, 2003).

버섯균류에서 산 충격에 의한 유전자의 발현에 대한 보고가 없어 이 실험이 이핵체 신호 및 산 충격 신호에 의한 유전자 발현 연구에 도움을 줄 것이라고 판단된다.

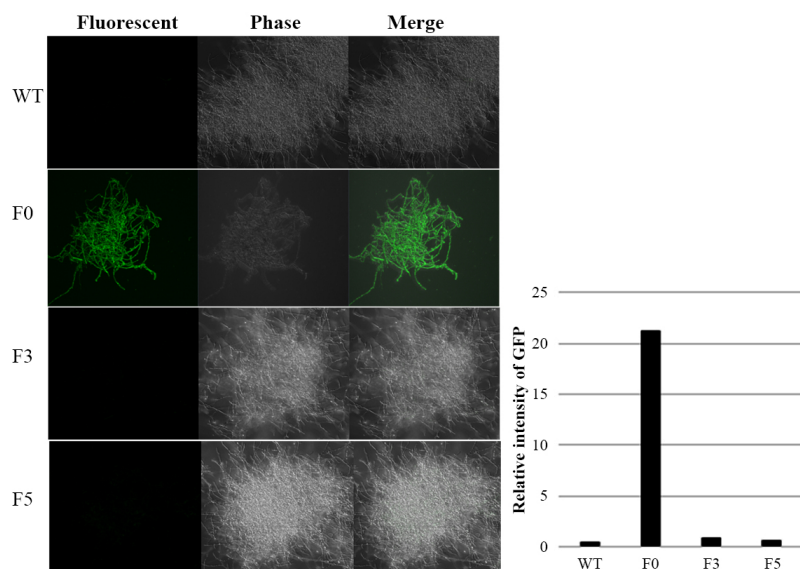


Fig. 4. Analysis of GFP expression in four different dikaryotic mycelia grown under acid liquid medium by confocal microscopy. Cells were obtained from 36 h cultures. Left, F0 homozygotic dikaryon showed fluorescence but all three other dikaryons (WT, F3, and F5) did not; Right, F0 transformant showed the highest fluorescence when compared with other strains.

적 요

먹물버섯의 하나인 *Coprinellus congregatus*는 생활사 동안 여러 종의 laccase 효소를 생성한다. 균사 끝 효소와 버섯시원체 효소 및 sclerotium (균핵) 효소들은 모두 이 균의 분화와 관련되었다. 이핵체 균사를 산성 액체배지(pH 4.0-4.5)에 접종하면 새로운 laccase가 합성되어 분비된다. 이 laccase 유전자의 프로모터의 어느 부분이 산 충격의 신호에 관련된 단백질이 결합하는가 분석하기 위하여 녹색형광단백질(green fluorescent protein, GFP) 유전자를 laccase 프로모터 2.0 kb 다음에 연결하고, 이를 형질전환 벡터인 pBARGEM7-1에 삽입함으로써 발현벡터를 구축하였다. 이 promoter-GFP 조합의 5'-region부터 차례로 제거한 짧은 길이의 이 발현벡터를 먹물버섯 교배형 a1균과 a2균에 형질전환 방법으로 도입시키고 phosphinothricin 저항성으로 형질전환체들을 선발하였다. 선발된 형질전환체 a1 (a1TF)과 a2 (a2TF)를 서로 교배하여 동형접합(homozygotic) 이핵체 형질전환체를 만들었다. 이들을 산성 액체배지에서 36시간 배양하고 균체를 모아 confocal microscope를 사용하여 형광을 분석하였다. Laccase 유전자의 전체 프로모터(2.0 kb)를 가진 발현벡터(F0-GFP)를 도입한 동형접합 형질전환체에서는 형광을 보였으나, 그 보다 짧은 길이(1.29 kb 이하)의 프로모터를 가진 형질전환체에서는 형광이 나타나지 않았다. 이 결과에 근거하여 먹물버섯의 산 충격에 대한 신호를 받는 부위가 laccase 유전자 프로모터의 -2.0 kb ~ -1.29 kb 사이에 있을 것으로 추정한다.

감사의 말

이 논문은 2013년 미래부 기본연구지원사업(과제번호 2013R1A1A2012009)의 연구비로 수행되었음.

References

- Banerjee, M., Thompson, D.S., Lazzell, A., Carlisle, P.L., Pierce, C., Monteagudo, C., Lopez-Ribot, J.L., and Kadosh, D. 2008. *UME6*, a novel filament-specific regulator of *Candida albicans* hyphal extension and virulence. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1354-1365.
- Caracul, Z., Casanova, C., Roncero, M.I.G., Pietro, A.D., and Ramos, J. 2003. pH response transcription factor PacC controls salt stress tolerance and expression of the P-type Na⁺-ATPase Ena1 in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot. Cell* **2**, 1246-1252.
- Choi, H.T. and Cho, C.W. 2005. Ultrastructural studies on the autolysis of *Coprinellus congregatus*. *Korean J. Microbiol.* **41**, 312-315.
- Choi, H.T. and Ross, I.K. 1990. Localization of phenoloxidases in *Coprinus congregatus* grown on a low-temperature-liquifying medium. *Korean J. Microbiol.* **28**, 274-277.
- Choi, H.T., Wilks, R.L., and Ross, I.K. 1987. Formation of sclerotia in liquid culture of *Coprinus congregatus* and their phenoloxidase isozymes. *Mycologia* **79**, 166-172.
- Foster, H.A., Cui, M., Naveenathavalan, A., Unden, H., Schwanbeck, R., and Höfken, T. 2013. The zinc cluster protein Sut1 contributes to filamentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **12**, 244-253.
- Hoi, J.W.S. and Dumas, B. 2010. Ste12 and Ste12-like proteins, fungal transcription factors regulating development and pathogenicity. *Eukaryot. Cell* **9**, 480-485.
- Kim, S.J., Choi, H.T., Kang, S.O., and Hah, Y.C. 1991. Secretion of membrane-associated laccase in liquid culture of *Coprinus congregatus*. *Korean J. Microbiol.* **29**, 267-269.
- Kim, D.S., Kwak, E.J., and Choi, H.T. 2006. Increase of yeast survival under oxidative stress by the expression of the laccase gene from *Coprinellus congregatus*. *J. Microbiol.* **44**, 617-621.
- Kim, S., Leem, Y., and Choi, H.T. 1997. Role of laccase in a low pH liquid medium in *Coprinus congregatus*. *Korean J. Microbiol.* **33**, 27-30.
- Kim, S.J., Leem, Y.E., Kim, K., and Choi, H.T. 2001. Cloning of an acidic laccase gene (*clac2*) from *Coprinus congregatus* and its expression by external pH. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**, 151-156.
- Lee, J.I., Choi, J.H., Park, B.C., Park, Y.H., Lee, M.Y., Park, H.M., and Maeng, P.J. 2004. Differential expression of the chitin synthase genes of *Aspergillus nidulans*, *chsA*, *chsB*, and *chsC*, in response to developmental status and environmental factors. *Fungal Genet. Biol.* **41**, 635-646.
- Leem, Y.E., Kim, S.J., Ross, I.K., and Choi, H.T. 1999. Transformation and laccase mutant isolation in *Coprinus congregatus* by restriction enzyme mediated integration. *FEMS Microbiol. Lett.* **172**, 35-40.
- Peñalva, M.A. and Arst, H.N. 2002. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 426-446.
- Peñalva, M.A., Tilburn, J., Bignell, E., and Arst, H.N. 2008. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol.* **16**, 291-300.
- Ramon, A.M., Porta, A., and Fonzi, W.A. 1999. Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by *PRR2*. *J. Bacteriol.* **181**, 7524-7530.
- Ross, I.K. 1982. The role of laccase in carpophore initiation in *Coprinus congregatus*. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 2763-2770.