

영지버섯 *Laccase* 유전자의 구리결합부위 I과 IV사이 지역의 클로닝

조지현 · 최형태 · 김경훈*

강원대학교 자연과학대학 생명과학부

백색부후균류 *laccase*의 아미노 말단과 카복시 말단에 잘 보존된 구리결합부위를 암호화하는 DNA 염기서열과 상보적인 primer를 이용하여 백색부후균의 일종인 영지버섯 *Ganoderma lucidum*에서 *laccase* 유전자 단편을 분리하였다. PCR로 증폭하여 클로닝한 1.6 Kb DNA 절편의 염기 서열을 결정하여 분석하였다. 이 DNA에는 7개의 인트론이 존재하였으며 엑손의 염기서열과 이로부터 추정된 아미노산 서열은 *Trametes villosa laccase(lcc1)*와 각각 47%, 79% 동일하였다. 기타 다른 백색부후균류의 *laccase* 아미노산 서열과는 66~78% 동일하였다.

Key words □ *Ganoderma lucidum*, *laccase*, PCR, white-rot fungi

식물과 균류에서 발견되는 *laccase*(EC 10.3.2.2)는 구리를 포함하고 있으며 페놀화합물을 산화시키고 반응과정에서 기질로부터 얻어진 전자를 산소에 전달하여 물로 환원시키는 기능을 갖는다(3,6). 식물에 존재하는 *laccase*는 lignin을 분해하고, 균류에서는 리그닌 분해 이외에 포자 형성이나 색소 생성에도 관여한다(3). 먹물버섯, *Coprinus congregatus* Fries의 *laccase*는 버섯을 만드는 분화과정에서 생성되며, 특히 먹물버섯의 산성액체 배양조건에서는 새로운 산성 *laccase*가 대량 생성분비되어 배지를 중화한다고 보고되었다(1,2). *Laccase* 유전자 및 단백질은 백색부후균을 포함한 많은 담자균류에서 보고되었고 이들은 모두 구리를 가지고 있으며 copper-binding region(I, II, III, IV)의 아미노산 서열 및 DNA 염기서열은 잘 보존되어 있다(3). D'Souza 등(4)은 copper-binding region(I, II)을 증합효소연쇄반응(PCR)의 primer로 사용하여 백색부후균류를 대상으로 *laccase* 유전자의 일부를 클로닝하여 이들의 염기서열을 분석하였다. 본 연구에서는 약리 효과가 인정된 영지버섯의 분자생물학적 연구의 일환으로 copper-binding region(I, IV)에 상보적인 primer들을 이용하여 영지버섯의 genomic DNA로부터 *laccase* 유전자 단편을 PCR로 증폭하였으며 이를 pGEM-T vector에 클로닝하여 염기서열을 분석하였다.

농업기술연구소에서 분양받은 *Ganoderma lucidum* ASI7071을 PDA 액체배지(250 ml)에 접종하여 30°C에서 7일간 진탕배양(150 rpm)하였으며, 이를 blending하여 새 PDA 액체배지로 옮겨(접종량의 10% v/v) 1일간 배양하여 균체를 얻었다. 균체는 수확 즉시 액체질소에 넣어 냉동하였으며 막자사발에서 액체질소를 더하여 분말로 만들어 Moller 등(8)의 방법에 따라 염색체 DNA를 분리하였다. *Laccase* 유전자의 보존된 구리결합부위 염기서열(3)을 토대로 forward primer I(5'-CAYTGGCAYGGNTTY-

TTYCA-3'; Y는 C와 T, N은 네 염기 모두)와 reverse primer IV(5'-TCRATRTGGCARTGSAGGAA-3'; R은 A와 G, S는 C와 G)를 제작하여 영지버섯 염색체 DNA를 주형으로 PCR을 하였다. PCR은 94°C 5분, 50°C 2분, 72°C 20분 cycle을 1회 수행하고, 94°C 1분, 52°C 2분, 72°C 3분 cycle을 30회 수행한 후 72°C에서 10분간 최종반응을 수행하였다. *Laccase* 유전자의 증폭을 1% agarose gel에서 분석한 결과 1.6 Kb 길이의 DNA를 확인하였다(Fig. 1). 이 DNA 조각을 pGEM-T vector에 클로닝하고 이를 vector내의 multiple cloning site에 존재하는 *NotI*과 *NcoI* 인지부위를 해당 제한효소로 절단한 결과, 증폭된 1.6 Kb와 동일한 절편을 확인하였으며(Fig. 1), 이 재조합 플라스미드를 pGL-8이라고 명명하였다.

pGL-8내에 삽입된 절편이 *laccase* 유전자에서 유래되었는지를

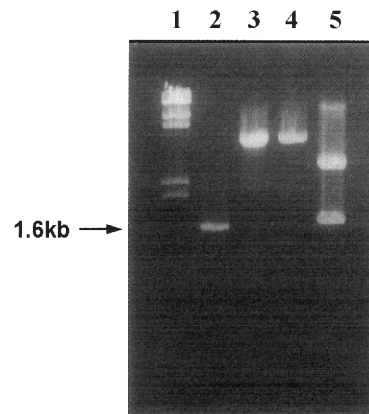


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis (1%) of PCR amplified *laccase* gene fragment. 1, λ /HindIII size marker; 2, PCR product of *Ganoderma lucidum* chromosomal DNA; 3, pGL-8 cut with *NcoI*; 4, pGL-8 cut with *NotI*; 5, pGL-8 cut with *NcoI* plus *NotI*.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 033-250-8527, Fax: 033-251-3990
E-mail: kkim@cc.kangwon.ac.kr

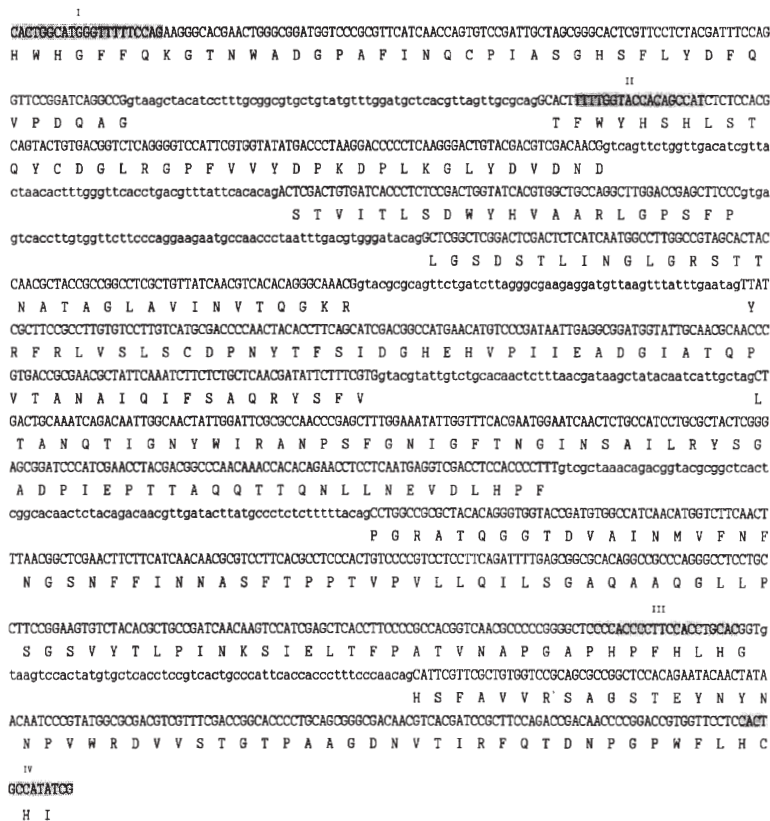


Fig. 2. Nucleotide sequence of a laccase gene-specific DNA from *Ganoderma lucidum*. The predicted amino acid sequence is also shown. Putative introns are shown in lower case. Copper-binding regions of the laccase gene are shaded.

확인하기 위하여 pGL-8을 주형으로 하여 laccase 유전자 내에 존재하는 보존성이 높은 구리결합부위 I, II, III(3)에 상보적인 primer로 PCR을 수행한 결과 primer I, II(5'-GTGACTATGATACCAGAANG-3')를 사용한 PCR에서는 200 bp, primer I, III(5'-TGNCCTGTMARRTGSAAMGG-3'; M은 A와 C)에서는 1.3 Kb의 산물을 확인하였으며 이들은 모두 예상되는 길이였다. 또한 pGL-8에 포함된 laccase 절편이 영지버섯 염색체 DNA에서 기원한 것임을 확인하기 위하여 영지버섯 염색체 DNA를 주형으로 하여 구리결합부위 I, IV(3)에 상보적인 primer I, IV를 사용하여 PCR로 새로 증폭하여 얻은 1.6 Kb DNA와 pGL-8의 삽입 절편을 각각 *Sal*I와 *Nhe*I 제한효소로 절단하여 그 크기를 분석한 결과 이 두 DNA의 제한효소 처리 절편의 크기는 서로 일치하였다. 따라서 pGL-8에 클로닝된 laccase 절편은 영지버섯에서 유래한 것이라고 결론지었다(결과 미제시).

pGL-8에 클로닝된 DNA의 여러 제한효소 절편을 적절한 phagemid에 subcloning한 후, 이들의 염기서열을 한양대학교 소재 BIONEX사에 의뢰하여 결정하였으며(Fig. 2) 이 결과는 GenBank에 등록하였다(GenBank AF185275). 이 염기서열은 degenerate primer I과 IV를 이용하여 증폭한 DNA에서 유래되었

으므로 Fig. 2에 제시된 I과 IV 부분의 염기서열은 실제 염기서열과 부분적으로 다를 것이다. 분석된 1584 bp DNA에는 7개의 인트론이 있고 모두 388개의 코돈이 확인되었다(Fig. 2, 3). 이를 발표된 백색부후균의 laccase 내의 copper binding region을 포함하는 염기서열과 비교한 결과 *Trametes villosa lcc1*(10)과 intron을 제외한 부위에서 47% 동일하였으며, 아미노산 서열은 79% 동일하였다. 또한 이 DNA의 염기서열로 추정한 아미노산의 서열을 다른 백색부후균의 laccase 아미노산 서열과 비교한 결과, *Coriolus versicolor* CLV3(7)와 79%, *Coriolus hirsutus* phenoloxidase(5)와 78%, *Trametes versicolor lcc1*(9) 및 *Trametes villosa lcc2*(10)와 77%, 그리고 *Trametes versicolor lcc4*(4)와는 66% 일치하였다(Fig. 3). 현재 영지버섯의 genomic DNA library를 제작하여 laccase 유전자의 아미노 말단과 카복시 말단의 염기서열을 탐색중이다.

감사의 말

이 연구는 1998년도 교육부 유전공학연구비의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

```

Gla      HHGGEFQKGTNWADGPAFINQCPIASGHSFLYDFQVPODQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGFPVVYDPKDLKGLYDV
Tal(lcc1)*****S*****AAD***
Tv(lcc1) *****V*****H*****F*****HASR***
Ch       *****V*****S*****N*****HAS***
Tal(lcc2)*****A*****E*****V*****H*****F*****HASR***
Cv(CLV3) *****S*****N*****AAD***

DNDSTVITLSDWYHVAARLGPSFPLGSDSTLINGLRSTTNATAGLAVINVTGQKRYRFLVSLSCDPNVTFSIDGHEHVPIIEA
***D****V*****K***A***A*****K***PSTT**D*S*****P*****FNMT---*T
**E*****T*****R**F**A*****ASTP**A*****QH*****I*****NLTV---*V
**D****A***T**K***A***A*****PSTTA**D*****K*****H*****DLT---*V
**E*****T*****K***A***A*****ASTP**A*****QH*****I*****NLTV---*V
***D****V*****NV***A***A*****K***PSTT**D*S***P*****NMT---*T

DGIATQPTVANAIIQIFSAQRYSEVLNTQITGNVWIRANPSFGNIGFTNGINSAILRYSGADPIETTAQQTQNLNEVDLHP
*S=N*A*LVVDS***A*****E***AVD*****G*****D***AAV***T*T*STAP***N***
***NS**LLVDS***A*****N***V***N***TV**AG*****Q***VA***T*T*SVIP*I*TN***
*S=NS**LVVDS***A*****N*D*DV*****N***V**AG*****GD***V***T*DDPTK*****
**NS**LLVDS***A*****N***V***N***TV**AG*****Q*RPVA***T*TPSVIP*I*TN***
*S=N*A*LVVDS***A*****E***AVD*****N***V***G*****D***AAV***T*T*STEP***VN***

----FPGRATGGTDVAINMVFNFGSNFFINNASTPPTVPVLLQLSGAQAAGLLPSGSVYTLPIINKSIELTFPATVNAAG
LVTT-V**SPVA**V*L***A*****T*****GT*****I***N*D*****S**S*AD**IS***AA**
LARNPV**SP*P**V*K*L*LA*****T*****T*****T**D***A***P**AHST**I*L***AL***
LATMAV**SPVA**V*T***A*****T*****G***V*****I***N*D*****S**S*AD**IS***AA**
LARMPV**SP*P**V*K*L*LA*****T*****T*****T**D***A***P**AHST**I*L***AL***
VATA-V**SPVA**V*L***A*****T*****G*****I***GN**D*****S**S*AD**IS***AA**

APHPFHLHGHSFAVVRASGSTEYNNPNVWRDVSSTGTPAAGDNVITRFQTDNPGFWFLHCHI
*****A*****V***D**IF*****R*****D*****
*****A*****T***D--*IF*****
*****A*****V***D**IF*****R*****N*****
*****A*****T***D--*IF*****
*****A*****V***D**IF*****R*****

```

Fig. 3 Alignment of the predicted amino acid sequence of the laccase gene with those of other known laccase genes. Gaps were introduced where necessary to optimize the alignment. Identical (*) amino acid residues in all the laccases are indicated. Gla, *Ganoderma lucidum*; Tal (lcc1), *Trametes villosa* (laccase 1); Tv (lcc1), *Trametes versicolor* (laccase 1); Ch, *Coriolus hirsutus* phenoloxidase; Tal (lcc2), *Trametes villosa* (laccase 2); Cv (CLV3), *Coriolus versicolor* (laccase 3). The copper-binding regions I, II, III and IV are shaded.

참고문헌

1. 김순자, 최형태, 강사육, 하영철. 1991. *Coprinus congregatus*의 세포막 연관 laccase의 세포외 분비. 미생물학회지 29, 267-269.
2. 김순자, 임영은, 최형태. 1997. *Coprinus congregatus*에서 산성액배배지에서의 laccase 역할. 미생물학회지 33, 27-30.
3. Coll, P.M., C. Tabernero, R. Santamaria, and P. Perez. 1993. Characterization and structural analysis of the laccase I gene from the newly isolated ligninolytic basidiomycete PM1 (CECT 2971). *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4129-4135.
4. D'Souza, T.M., K. Boominathan, and C.A. Reddy. 1996. Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3739-3744.
5. Kojima, Y., Y. Tsukuda, Y. Kawai, A. Tsukamoto, J. Sugiura, M. Sakaino, and Y. Kita. 1990. Cloning, sequence analysis, and expression of ligninolytic phenoloxidase genes of the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *J. Biol. Chem.* 265, 15224-15230.
6. Messerschmidt, A., R. Ladenstein, R. Huber, M. Bolognesi, L. Avighiano, R. Petruzzelli, A. Rossi, and A. Finazzi-Agro. 1992. Refined crystal structure of ascorbate oxidase at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 224, 179-205.
7. Mikuni, J. and N. Morohoshi. 1997. Cloning and sequencing of a second laccase gene from the white-rot fungus *Coriolus versicolor*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 155, 79-84.
8. Moller, E.M., G. Bahnweg, H. Sandermann, and H.H. Geiger.

1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucl. Acids Res.* 20, 6115-6116.
9. Ong, E. and W.B.R. Pollock, and M. Smith. 1997. Cloning and sequence analysis of two laccase complementary DNAs from the ligninolytic basidiomycete *Trametes versicolor*. *Gene* 196, 113-119.
10. Yaver, D.S. and E.J. Golightly. 1996. Cloning and Characterization of three laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*: genomic organization of the laccase gene family. *Gene* 181, 95-102.

(Received August 23, 2000/Accepted September 6, 2000)

ABSTRACT: Cloning of a Laccase Gene Fragment from *Ganoderma lucidum*

Ji Hyun Cho, Hyung-Tae Choi, and Kyunghoon Kim*(Division of Biological Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea)

Degenerate primers corresponding to the consensus sequences of the copper-binding regions in the N- and C-terminal domains of fungal laccases were used to isolate laccase gene-specific sequences from a white rot fungus *Ganoderma lucidum* which has been known to strengthen the immune system. A 1.6 Kbp fragment was amplified by PCR and its base sequence was determined. Locating seven introns within the base sequence, we could deduce its amino acid sequence. The nucleotide sequence without introns was 47% identical to that of *lcc1* gene of *Trametes villosa*; the identity in amino acid sequences of the two was 79%. The deduced amino acid sequence was also similar to those of *Coriolus versicolor lcc3* (79%), *Coriolus hirsutus phenoloxidase* (78%), *Trametes versicolor lcc1* (77%), *Trametes villosa lcc2* (77%) and *Trametes versicolor lcc4* (66%).