

*Coprinus congregatus*에서 PCR에 의한 laccase 유전자의 부분 cloning

김순자 · 임영은 · 최형태*

강원대학교 생명과학부 미생물학전공, 서울대학교 분자미생물학 연구센터

*Coprinus congregatus*의 염색체 DNA를 주형으로 사용하고 균류 laccase에서 잘 보존된 copper binding region의 염기서열을 primer로 사용하여 PCR을 수행한 결과 144 bp 길이의 laccase 유전자 일부를 cloning하였다. 이의 염기서열을 분석한 결과 다른 균류의 laccase와 60-69% 정도의 상동성을 보였으며 추정된 아미노산 서열은 68-75%의 상동성을 보였다.

KEY WORDS □ copper binding region, *Coprinus congregatus*, laccase, PCR

Coprinus congregatus Fries는 버섯을 만드는 분화과정에서 2종류의 laccase 동위효소를 생성한다. 본 연구실에서는 산성액체 배양조건에서 세포막 연관 laccase가 대량 생성분비됨을 확인하였고(2), laccase의 다양한 기능을 밝히고자 이 효소를 분리정제하여 생화학적 특성을 분석하였으며(4), 산성환경에서 laccase가 배지를 중화시키며 자신은 물리화학적 특성이 변화됨을 보고하였다(1). 또한 laccase의 생성 조절 및 기능에 대한 분자생물학수준의 연구를 수행하기 위한 첫 단계로 형질전환 방법을 확립하였다(3).

균류에 존재하는 laccase의 유전자는 백색부후균을 포함한 담자균류에서 보고되었고 이들은 모두 구리를 가지고 있으며 copper-binding region(I, II)의 아미노산 서열 및 염기서열은 잘 보존되어 있다(6-8, 11, 12). D'Souza 등은 이를 PCR의 primer로 사용하여 백색부후균류를 대상으로 laccase 유전자의 일부를 cloning하고 이들의 염기서열을 비교 분석하였고(5), Jönsson 등은 RNA-PCR 방법으로 *Trametes versicolor*로부터 cDNA를 cloning하였다(9). 본 연구실에서 *C. congregatus*의 genomic DNA를 주형으로 사용하여 이 primer들을 이용한 PCR 실험을 수행하였고 이를 pGEM-T vector에 cloning하여 분석한 결과를 보고하고자 한다.

C. congregatus Fries dikaryon(a1×a2)을 YpSs 액체배지(100 ml)에 접종, 25°C에서 4일간 진탕배양하고 이를 Waring blender로 1초씩 5회 갈아서 새 YpSs 액체배지로 옮겨(접종량 10% v/v) 1일간 배양하여 균체를 얻었다. 균체는 수확 즉시 액체질소에 넣어 냉동하였으며 막자사발에서 액체질소를 더하며 분말로 만들었고 Moller 등(10)의 방법에 따라 염색체 DNA를 분리하였다. Primer는 copper-binding region의 염기서열을 토대로 D'Souza 등(5)이 보고한 forward primer 5'-CAYTGGCAYGGNTTYTTYCA-3'와 reverse primer

5'-RTGRCRTTGTACCARAANGT-3'를 사용하였다. PCR 증폭은 94°C 5분, 54°C 2분, 72°C 20분 cycle을 1회 수행하고, 94°C 1분, 56°C 2분, 72°C 3분 cycle을 30회 수행한 후 72°C에서 10분간 최종반응을 수행하였다. PCR 증폭에서 얻은 DNA 조각을 2% agarose gel에서 분석한 결과 144 bp 길

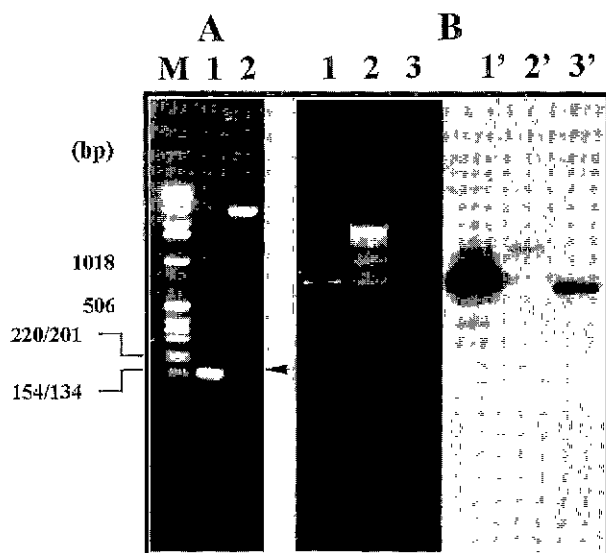


Fig. 1. A. Agarose gel electrophoresis (2%) of PCR amplified fragment of the copper binding region in laccase gene. M, molecular weight marker (The numbers represent the base pairs). 1, PCR product of laccase fragment 2, *ApaI-PstI* cut of PCR product cloned into pGEM-T vector. B. Agarose gel electrophoresis (1%: 1, 2 and 3) and Southern hybridization (1', 2' and 3') of *EcoRI* digested *Coprinus congregatus* genomic DNA and *Pleurotus ostreatus pox2* fragment. 1 and 1', pTLAC4 *EcoRI* cut as a positive control (3.14 kb). 2 and 2', *C. congregatus* genomic DNA. 3 and 3', *P. ostreatus pox2* fragment.

*To whom correspondence should be addressed
 Tel: 0361-250-8543, Fax: 0361-241-4627
 E-mail: htchoi@cc.kangwon.ac.kr

이의 DNA를 확인하였다(Fig. 1A). DNA 조각을 pGEM-T vector에 cloning하고 이를 vector의 multiple cloning site에 존재하는 PstI 및 ApaI 제한효소로 분해하여 전기영동 방법으로 분석한 결과 PCR 증폭에서 얻은 144 bp에 vector의 일부가 더해진 188 bp 길이의 DNA 조각을 확인하였으며 (Fig. 1A), 이를 pTLAC4로 명명하였다.

pTLAC4에 cloning된 DNA 조각이 laccase임을 확인하기 위하여 이미 알려진 느타리버섯의 제2 laccase 유전자(*pox2*: 이탈리아 나폴리대학의 Sannia 교수로부터 분양받았음)와 상동성을 확인하고 *C. congregatus*의 genomic DNA로부터 cloning된 것임을 확인하기 위한 Southern hybridization을 다음과 같이 수행하였다. EcoRI으로 분해한 느타리버섯의 *pox2* fragment 및 *C. congregatus*의 genomic DNA를 1% agarose gel에서 전기영동 방법으로 분리한 후(Fig. 1B) nylon membrane으로 옮기고 pTLAC4의 144 bp를 주형으로 PCR 방법에 의하여 합성된 probe(DIG DNA labelling kit, Boehringer Mannheim)와 68°C에서 13시간 동안 Southern hybridization을 수행하였다. 이를 alkaline phosphatase 기질인 disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1.1,3,7]decane}-4-yl-1-phenylphosphate (CDP-Star™; Boehringer Mannheim)를 사용한 chemiluminescence로 분석한 결과 *C. congregatus*의 genomic DNA에서 1개의 band가 확인되었고 느타리버섯의 *pox2* 유전자와도 상동성을 가지고 있음을 확인하였다(Fig. 1B).

pTLAC4의 염기서열을 서울대학교 공동기기원에 의뢰하여 분석하였고, 이를 발표된 백색부후균류의 laccase와 비교한 결과 intron을 가지고 있는 느타리버섯과 송편버섯류의

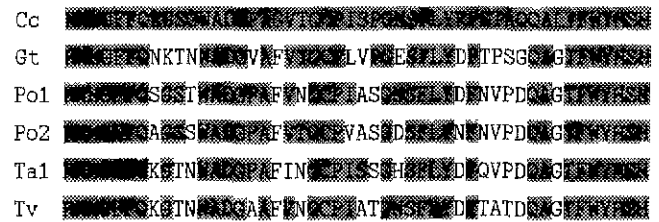


Fig. 3. Comparison of the predicted amino acid sequences with several fungal laccases. Legends are same as Fig. 2

laccase와 달리 *C. congregatus*의 laccase 유전자는 *Gloeophyllum trabeum*(5)과 같이 intron이 없었다(Fig. 2). Copper binding region을 포함하는 염기서열을 비교한 결과 *G. trabeum*의 경우 60.42%, 느타리의 제1 laccase 유전자(*pox1*)와 66.67%, 느타리버섯의 *pox2*와는 63.89%, *Trametes versicolor* 및 *T. villosa*의 경우 69.44%의 높은 상동성을 보였다(Fig. 2). 염기서열로부터 추정된 아미노산 서열을 비교한 결과 *G. trabeum*의 경우 68.75%, 느타리버섯의 *pox1*과 75.00%, *pox2*와 72.92%, 그리고 *T. versicolor* 및 *T. villosa*의 경우 70.83%의 상동성을 보였다(Fig. 3). 현재 *C. congregatus*에서 laccase 유전자의 발현조절을 연구하고자 pTLAC4를 probe로 사용하여 cDNA library로부터 laccase cDNA 유전자 cloning 작업을 수행하고 있다.

감사의 말

이 논문은 서울대학교 분자미생물학 연구센터를 통한 과

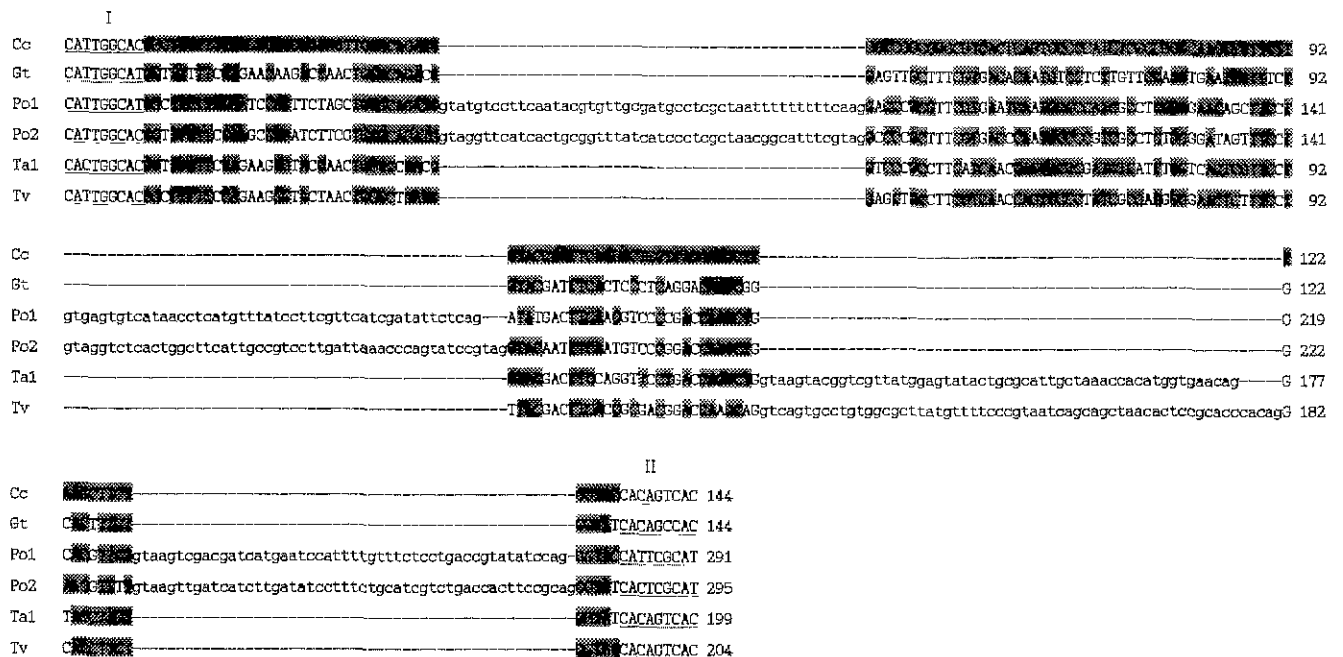


Fig. 2. Alignment of nucleotide sequences of the cloned laccase gene fragment with several fungal laccases. Cc, *Coprinus congregatus* Gt, *Gloeophyllum trabeum*. Po1, *Pleurotus ostreatus* laccase 1. Po2, *P. ostreatus* laccase 2. Ta1, *Trametes villosa* laccase I. Tv, *T. versicolor*. The copper binding regions I and II are underlined. The exon and intron sequences are presented by capitals and small letters respectively. The conserved nucleotides are shaded.

학재단 우수연구센터 지원 연구비로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 김순자, 임영은, 최형태. 1997. *Coprinus congregatus*에서 산성액배지에서 laccase 역할. 미생물학회지 **33**, 27-30.
2. 김순자, 최형태, 강사육, 하영철. 1991. *Coprinus congregatus*의 세포막 연관 laccase의 세포외 분비. 미생물학회지 **29**, 267-269.
3. 임영은, 김순자, 최형태. 1997. *Coprinus congregatus*에서 선형으로 전환한 plasmid DNA를 사용하여 phosphinothricin 저항성에 대한 형질전환. 미생물학회지 **33**, 274-276.
4. 최영옥, 김순자, 최형태. 1995. *Coprinus congregatus*가 분비하는 laccase의 분리 정제 및 특성 미생물과 산업 **21**, 351-358.
5. 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.
6. Giardina, P., R. Cannio, L. Martirani, L. Marzullo, G. Palmieri and G. Sannia. 1995. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2408-2413.
7. Giardina, P., V. Aurilia, R. Cannio, L. Marzullo, A. Amoresano, R. Siciliano, P. Pucci and G. Sannia. 1996. The gene, protein and glycan structures of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Eur. J. Biochem.* **235**, 508-515.
8. Jönsson, L., K. Sjöström, I. Häggström and P.O. Nyman. 1995. Characterization of a laccase gene from the white rot fungus *Trametes versicolor* and structural features of basidiomycete laccase. *Biochim. Biophys. Acta* **1251**, 210-215.
9. Jönsson, L., M. Saloheimo and M. Penttilä. 1997. Laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of *lccI* and expression in *Pichia pastoris*. *Curr. Genet.* **32**, 425-430.
10. 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.
11. Perry, C.R., M. Smith, C.H. Britnell, D.A. Wood and C. F. Thurston. 1993. Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1209-1218.
12. Yaver, D.S., F. Xu, E.J. Golightly, K.M. Brown, S.H. Brown, M.W. Rey, P. Schneider, T. Halkier, K. Mondorf and H. Dalboge. 1996. Purification, characterization, molecular cloning and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 834-841.

(Received December 7, 1998/Accepted March 9, 1999)

ABSTRACT: Cloning of laccase Gene Fragment from *Coprinus congregatus* by PCR

Soon-Ja Kim, Young-Eun Leem, and Hyung-Tae Choi* (Microbial Physiology lab, Division of Biological Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

Degenerate primers corresponding to the sequences of the copper-binding regions in the fungal laccases were used to isolate laccase gene specific fragment by PCR in *Coprinus congregatus*. A 144 bp DNA fragment was cloned and was identified to have 60-69 % homology with other fungal laccase genes. The predicted amino acid sequences showed 68-75% homology with other fungal laccase proteins.