

살충성곰팡이 *Metarhizium anisopliae*의 *ura5* 유전자의 분리동정

黃哲源* · 朴寅哲¹ · 李東奎² · 姜善哲²

한동대학교 환경미생물학교실, ¹농업과학기술원 분자유전과, ²대구대학교 생물공학과

초록 : 환경친화형 생물농약개발을 위한 방안의 일환으로, 벼멸구 등 농해충병원사상균 *Metarhizium anisopliae*의 분자생물학적 육종을 위해 영양요구성 돌연변이를 상보하는 선택유전자, *ura5* (Orotate phosphoribosyl transferase)를 cloning하였다. Cloning방법으로는 기존에 알려진 사상균의 *ura5*유전자들간에 확인된 상보성 염기배열을 합성하여, 이것을 primer로 사용하여 PCR기법에 의해 부분적으로 cloning하였다. 또한, PCR기법에 의해 cloning된 *ura5*유전자단편의 염기배열을 결정된 결과, *Trichoderma reesei*의 *ura5*유전자와는 아미노산수준에서 약 85%의 상동성을 나타내었으며, 이 단편을 이용하여 *Metarhizium anisopliae*의 genomic library로부터 *ura5*유전자가 포함된 약 4.4 kb의 DNA단편을 cloning 하였다.(1996년 11월 11일 접수, 1996년 12월 16일 수리)

서 론

좁은 경지면적에서 최대수확을 거두기 위한 집약적농법은 과다한 유기합성농약의 사용으로 인해 농업환경을 점점 악화시키고 있다. 특히, 해충(멸구 등)에 의한 농작물의 피해가 증가함에 따라 유기합성농약의 사용빈도 또한 높아져 해충의 생물학적방제에 관한 연구는 농학 뿐만 아니라 관련 학문의 여러 분야에서도 많은 관심을 가지고 연구되고 있다. 그 중 살충성곰팡이에 의한 해충의 생물학적 방제는 그들이 직접 해충과 접촉함으로써 해충을 죽임에 따라 이미 많은 학자들간에 관심의 대상이 되어왔으며, 또한 연구되어 왔다.¹⁾

*Metarhizium anisopliae*는 살충성곰팡이(Entomopathogenic fungi) 로써 멸구인 *Nilaparvata lugens*의 자연적인 생물학적 천적으로 해충방제에 이용되어왔으나²⁾ 이들 곰팡이는 자연적인 변이에 의해 살충성이 변함에 따라 이들 균의 새로운 분리 및 돌연변이유발과 고전적인 유전교잡등으로 살충성이 강화된 균의 육종에 관한 연구도 함께 진행되고 있다.^{2,4)}

이들 균의 살충성은 균이 해충의 표피층에 침투시, 세포외로 분비되는 여러가지 가수분해효소(Chitinase, Lipase, Protease)의 상호작용에 의한 것으로 알려져 있다.^{5,6)} 한편, 분자생물학의 발달에 의한 recombinant DNA기술은 산업적으로 유용한 곰팡이의 형질전환에 이용되어 곰팡이로부터 유용물질의 대량생산과 유용균의 분자생물학적 육종에 이용되고 있다.⁷⁾ 그러나, 곰팡이의 형질전환율은 선택표지 유전자에 의해 좌우되며, 지금까지 몇종의 세균에 이용된 약제내성 선택유전자(*BSD*)와 영양요구상보성 선택유전자(*argB*, *pyrG*) 등이 개발되어 이용되고 있다.^{7,9)} 이에 본 연구는 살충성곰팡이 *Metarhizium anisopliae*의 recombinant DNA기술에 의한 분자생물학적 육종을 위해 uracil

영양요구성 돌연변이를 상보하는 선택표지유전자*ura5* (Orotate phosphoribosyl transferase)를 cloning하고 해석하였다.

재료 및 방법

실험균주, Plasmid, 효소 및 시약

본 실험에 사용된 살충성곰팡이 *Metarhizium anisopliae*는 미국 ATCC에서 구입한 No.20500의 wild type이며 이들의 배양을 위한 배지로서 YPD배지를 사용하였다. 배지 조성은 0.1%(w/v) yeast extract, 1%(w/v) pepton, 2%(w/v) glucose이다. recombinant DNA조작을 위해 대장균 XL1-Blue MRF'(Stratagene Co.)와 JA221(*recA1*, *leuB6*, *trpE5*, *lacY*)을 사용하였고, 대장균배지로서는 L-broth를 사용했으며 필요에 따라 ampicillin 50 ug/ml, tetracycline 10 ug/ml를 첨가하였다. DNA의 sub-cloning을 위한 plasmid는 pBluescript(Stratagene Co.)를 사용하였고 염기배열결정을 위해 pUC119 plasmid 등을 사용하였다.

본 실험에서 사용된 효소 및 시약중 특별한 언급이 없는 것은 일본Takara Shuzo Co. 제품과 Sigma Co. 제품을 사용하였다.

*Metarhizium anisopliae*의 total DNA 분리

*Metarhizium anisopliae*의 total DNA 분리는 Horiuchi 등의 방법¹⁰⁾을 일부변경하여 사용하였다. 먼저 균을 YPD배지에 접종하여 27°C에서 4~5일 액체배양한 후 배양액으로부터 균사체를 모아 TE-buffer로 씻은 다음 동결시켜둔다

전체 약 1g의 균체를 멸균한 막자사발을 이용하여 dry ice 위에서 파쇄한 후 5.0 ml의 extraction buffer(0.2M EDTA, 0.5% SDS, 20 µg/ml Protease)에 넣어 5분 동안 정치한 후 1.0 ml의 2% SDS(w/v)를 첨가하여 잘 섞은다음

찾는말 : Entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae*, Orotate phosphoribosyl transferase, PCR.

*연락처자

다시 solid sodiumperchlorate 를 1M 되게 녹여 몇분동안 반응시킨 후 phenol-chloroform 추출을 한 다음 ethanol침전시켜 TE buffer에 녹여 사용하였다.

PCR법에 의한 genomic amplification

본 실험에 사용한 PCR기기는 Perkin-Elmer/Cetus제품을 사용하였으며 이때에 사용된 Taq DNA polymerase는 Promega Co.제품을 사용하였다.

PCR 조건으로서는, 총 40cycle로서 각각 94°C-1 min. (melting), 55°C-1 min.(annealing), 72°C-1 min. (ex-tention)으로 행하여졌으며 마지막 cycle에서만 72°C-5 min.의 extention조건으로 행하였다. 여기에서 얻어진 PCR산물은 Ultrafree-MC Filter(Millipore Co.)를 이용하여 elution시켜 pUC119의 *Xba*I, *Bam*HI site에 ligation 한 후 대장균 JA 221에서 증식시켰다.

PCR 단편의 염기배열 결정

단편의 염기배열은 Sanger 등의 방법¹²⁾에 의한 Dideoxy chain termination법에 따라 실시 되었다.

Genomic DNA Library작성

*M. anisopliae*의 total DNA를 *Sau*3AI제한효소로 부분절단 후 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 9~23 Kb 절편을 회수하였다. 이 절편을 DASHII Vector/*Bam*HI (Stratagene Co.)에 ligation시켜 GigapackII packaging extract(Stratagene Co.)으로 실험관내에서 packaging하여 *E. coli* XLI-Blue에 감염시켰다. 이때 packaged phage의 titer는 2×10^4 이었다.

Southern hybridization

Southern hybridization은 Sambrook 등의 방법¹³⁾에 의해 행하였다. DNA를 0.6%의 agarose 전기영동 분리 후, Hybond-N⁺(Amersham Co.)에 옮긴 다음 ³²P 동위원소로 labeling된 probe를 사용하여 65°C에서 행하였다.

결과 및 고찰

PCR법에 의한 *ura5* 유전자의 cloning

이미 알려진 몇종의 곰팡이와 효모의 *ura5*유전자의⁹⁾ 상동성의 조사결과 몇 부분에서 높은 상동성을 발견하여, 이 부분을 근거로 PCR을 위한 임의의 primer를 작성하였다.

PCR산물을 pUC119 vector에 cloning할 때의 용이성에 대비하여 primer에 *Xba*I site(N₁, N₂), *Bam*HI site(N₃)를 추가하였다. 사용된 primer의 염기서열(A)과 PCR결과(B)를 Fig. 1에 나타내었다.

Fig.1, (B)의 lane1에서 보듯이 약 250 bp의 증폭된 DNA단편을 얻을수가 있었다

Band의 양상에서 major가 아닌 몇 개의 minor band도 보였으나 primer 작성시 N₁과 N₃의 거리는 약 250 bp로서 이에 적합한 major 250 bp의 band를 *ura5* 유전자의 부분이

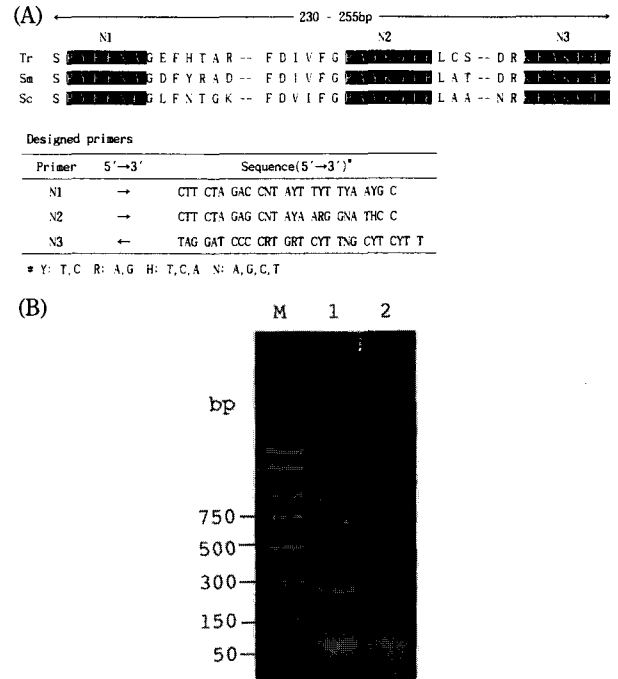


Fig. 1. Alignment of conserved regions of fungal *URA5* including the sequences used to design primers(boxed). (A) Predicted distance between primer sets is shown in bp. and PCR primers used in this study. (B) Amplified *URA5* DNA fragment from genomic DNA of *Metarhizium anisopliae* used primer N₁, N₃(lane 1), primer N₂, N₃ (lane 2).

라 사료되어 다음실험에 사용하였다.

***ura5* 유전자의 부분 염기서열 분석**

pUC119 vector의 *Xba*I site와 *Bam*HI site에 cloning 된 *ura5*유전자의 부분 염기서열은 Sanger 등¹¹⁾의 방법에 의해 결정하였다. 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

본 논문에서 PCR법에 의해 cloning 되어 염기서열이 결정된 부분은 *T. reesei*,⁹⁾ *S. macrospora*¹³⁾의 *ura5*유전자의 5'부분에 해당되며, 이들 5'부분은 *ura5*유전자 산물인 orotate phosphoribosyl transferase에서 phosphoribosyl pyrophosphate의 binding site로 추정되는 3'부분에 비해 상동성이 적은데도 불구하고, 특히 *T. reesei*⁹⁾의 *ura5*유전자와는 amino acid수준에서 매우 높은 85.5%의 상동성을 나타내어 본 연구에서 cloning된 *ura5*유전자는 *M. anisopliae*의 *ura5*유전자의 5'부분임을 확인할 수가 있었다. 이는 살충성 곰팡이류 에서는 처음 cloning된 영양요구성 상보유전자이며 *M. anisopliae*에서는 uracil합성에 관한 신규 유전자로 사료 된다.

***ura5* PCR 단편을 이용한 genomic library에서의 *ura5* 유전자의 cloning**

먼저 *M. anisopliae*에서 *ura5* 유전자의 존재양상을 확인 하기 위하여 total genomic DNA와 *ura5* PCR 산물을 probe로하여 Southern hybridization을 실시한 결과 *ura5*유전자는 *M. anisopliae*의 genome에 single copy로 존재

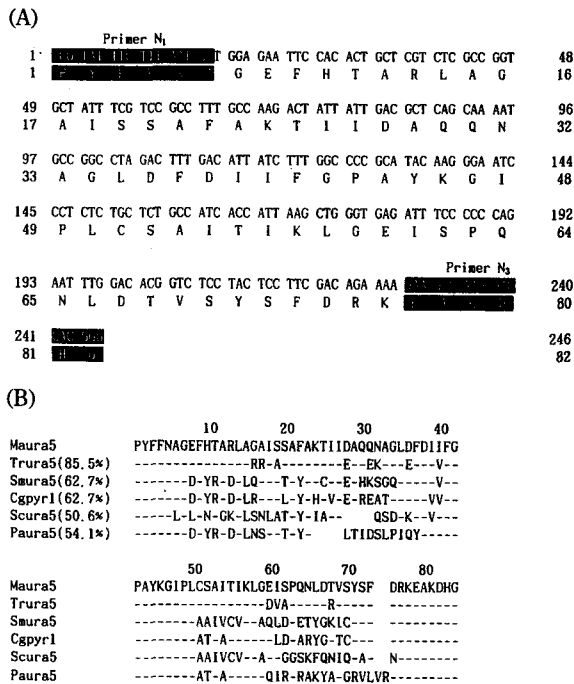


Fig. 2. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the PCR amplified fragments of *URA5* from *M. anisopliae*(A). Comparison of amino acid sequences deduced from PCR amplified fragment with other fungus *Ura5* genes(B). The numbers in the percentage are amino acid homologies; Dashes are shown identities between sequences. Gene abbreviations: Maura5, *M. anisopliae URA5*; Trura5, *Trichoderma reesei URA5*; Smura5, *Sordaria macrospora URA5*; Cgpyr1, *Colletotrichum graminicola PYR1*; Scura5, *Saccharomyces cerevisiae URA5*; Paura5, *Podospora anserina URA5*.

함을 확인하였다(미발표)

이는 다음의 실험 결과에서도 증명되었다.

이미 재료와 방법 에서 기술한 대로 작성한 *M. anisopliae*의 genomic library로 부터 *ura5* PCR 산물을 probe로 plaque hybridization을 하여 약 10개의 positive plaque를 선택하고 Southern blot로 확인한 후 그 중 1개의 clone을 몇가지 제한효소로 절단하여 Southern 분석한 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

Fig.3, B)의 4.4 kb의 *Sall* 절단 단편을 pBluescript의 *Sall*에 site에 sub-cloning한 후 PCR산물을 probe로 Southern hybridization하여 cloning된 *ura5*유전자의 물리적 지도를 작성하였다(Fig. 4).

Total genomic Southern hybridization에서도 확인한 바 있으나 본 연구에서 clone된 *ura5*유전자는 *M. anisopliae*에 single copy로 존재하며 *M. anisopliae*에서 처음 cloning된 신규유전자로서 *M. anisopliae*의 살충성 기구해석 및 궁극적으로 살충성 곰팡이의 분자 생물학적 육종의 첫 시작이며 중요한 단서로서 작용할 것이다.

감사의 말

본 논문은 농림수산 특정연구 과제의 연구비(1996년도)

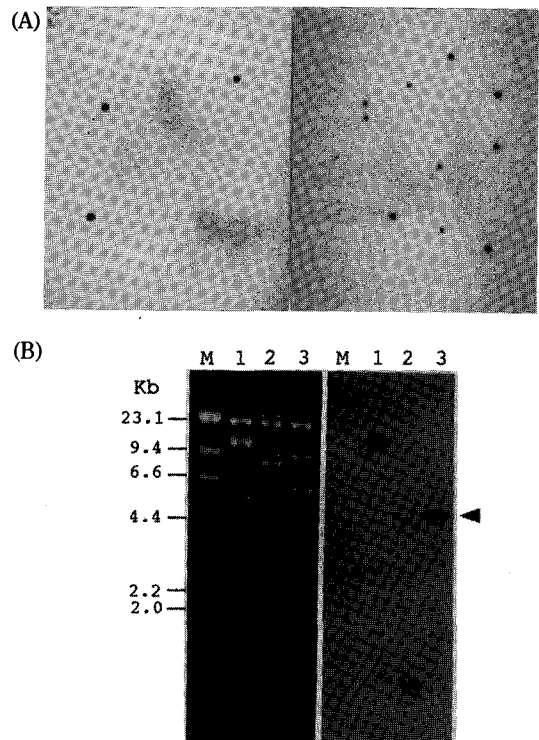


Fig. 3. Plaque hybridization with ³²P-labeled *URA5* PCR fragment of *M. anisopliae* as a probe(A). The left panel is the first and the right is secondary screening. Southern hybridization of positive clones(B). The arrow is subcloned fragment(about 4.4Kb). Lanes are positive clone digested with *Bam*HI(lane 1), *Eco*RI(lane 2), *Sal*I(lane 3) and λ DNA digested with *Hind*III(lane M, size marker).

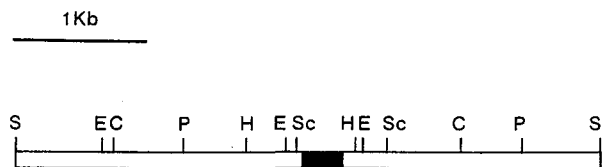


Fig. 4. Restrictional map of cloned fragment containing putative *URA5* gene of *M. anisopliae*. Probe binding region is indicated by a thick line. Restriction enzyme abbreviations: C, *Clal*; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; P, *Pst*I; S, *Sal*I; Sc, *Sac*I.

지원에 의해 수행된 결과입니다.

참고 문헌

- Gillespie, A. T. (1988) Use of fungi to control pests of agricultural importance. In "Fungi in Biological control systems"(M. N. Burge, Ed.) pp. 31-60. Manchester Univ. Press, New York.
- Heale, J. B. (1982) Genetic studies on fungi attacking insects. In "Invertebrate pathology and microbial control : Proceeding of IIIrd international colloquium on Invertebrate pathology"(C.C. Payne and H.D. Burges, Eds), pp. 25-27. Society for Invertebrate pathology. Brinton.
- Jackson, C. W., and J. B. Heale, (1987) Parasexual crosses by hyphal anastomosis and protoplast fusion in

- the entomopathogen. *Verticillium lecanii*. *J. Gen. Microbiol.*, (133), 3537-3547.
4. Heale, J. B. (1988) The potential impact of fungal genetics and molecular biology on biological control, with particular reference to entomopathogen. In "Fungi in Biological Control System" (M.N. Burge, Ed.), Manchester Univ. Press, New York
 5. Samuels, K. D. Z., J. B. Heale, and M. Liewellyn. (1989) Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* to ward *Nilaparvata lugens*. *J. Invertebr. Pathol.*, **53**, 25-31.
 6. St. Leger, R. J., R. M. Cooper, and A. K. Charnley. (1991) Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr Pathol.*, **58**, 415-426.
 7. Kimura, M., T. Kamakura, Q. Z. Tao, I. Kenko, and I. Yamaguchi. (1994) Cloning of blasticidin S deaminase gene(BSD) from *Aspergillus terreus* and its use as a selective marker for *Schizosaccharomyces pombe* and *Pyricularia oryzae*. *Mol. Gen Genet.* **242**, 121-129.
 8. Horiuchi, H., N. Takaya, K. Yanai, M. Nakamura, A. Ohta and M. Takagi. (1995) Cloning of the *Rhizopus niveus pry4* gene and its use for transformation of *Rhizopus delemar*. *Curr Genet.* **27**, 472-478.
 9. Berges, T and C. Burreau. (1991) Isolation of uridine auxotrophs from *Trichoderma reesei* and efficient transformation with the cloned *ura3* and *ura5* genes. *Curr Genet.* **19**, 359-365.
 10. Horiuchi, H., K. Yanai, T. Okazaki, M. Takagi, K. Yano. (1988) Isolation and sequencing of a genomic clone encoding aspartic proteinase of *Rhizopus niveus*. *J. Bacterio.* **170**, 272-278.
 11. Sanger, F., S. Nicklen, A. R. Coulson. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitor. *Proc. Natl. Acad Sci. USA.* **74**, 5463-5467.
 12. Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual(2nd edn.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
 13. Le Chevanton L., G. Leblon. (1989) The *ura5* gene of a ascomycete *Sordaria macrospora* molecular cloning, characterization and expression in *Escherichia coli*. *Gene.* **77**, 39-49.

Isolation and Identification of *ura5* Gene in Entomopathogenic Fungus, *Metarhizium anisopliae*

Cher Won Hwang*, In Cheol Park¹, Dong Kyu Lee² and Sun Cheol Kang³(¹Department of Environmental Microbiology, Handong University Heung hae-eub, Puk-ku, Pohang, Kyeoung buk 791-940, Korea; ²Molecular Genetic Division, National Agricultural Science and Technology Institute, RDA. Suwon; ³Department of Biotechnology, Taegu University Taegu)

Abstract : About 250 bp *ura5* gene (Orotate phosphoribosyl transferase) fragment was cloned from genomic DNA of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* by using PCR method. Entire nucleotide sequences of cloned DNA fragment were determined and analyzed as compared with other fungus *ura5* genes. The amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence showed 85.5% homology to *ura5* protein of *Trichoderma reesei*. Using this 250 bp PCR fragment we have isolated full *ura5* gene of *M. anisopliae* by genomic Southern hybridization and the isolated 4.4 kb DNA fragments were mapped by restriction enzyme.

Key words : entomopathogenic Fungi, *Metarhizium anisopliae*, Orotate phosphoribosyl transferase, PCR

*Corresponding author