

구름버섯에서 리그닌 분해효소 유전자들의 클로닝

김용호 · 정수진 · 김선경 · 송홍규 · 최형태*

강원대학교 생명과학부 미생물학과

리그닌 분해에 관련된 효소 중 laccase는 구리 결합부위가, lignin peroxidase와 manganese peroxidase는 헴(heme) 결합부위의 아미노산 서열이 잘 보존된 단백질들이다. 국내에서 분리한 구름버섯(*Trametes versicolor*)을 대상으로 관련 유전자들의 보존된 지역의 염기서열을 근거로 중합연쇄반응(PCR)에 필요한 primer를 제작하였고, 이를 사용하여 해당 유전자의 조각을 확보하였다. 이를 pGEM-T vector에 cloning하고 그 염기서열을 분석한 결과 약 1.3 kb의 laccase 조각은 다른 백색부후균의 laccase와 65-97%의 상동성을 보였다. 또한 185 bp의 lignin peroxidase 조각과 443 bp의 manganese peroxidase 조각을 타 백색부후균의 효소들과 비교한 결과 각각 80-95% 및 61-83%의 상동성을 보였다.

Key words □ *Trametes versicolor*, laccase, lignin peroxidase, manganese peroxidase, PCR

리그닌은 섬유질 및 hemicellulose와 함께 자연계에 매우 풍부한 유기탄소 화합물이면서도 아직 활용도가 가장 낮은 고분자 화합물이다. 또한 리그닌은 분해가 매우 어려운 화합물로서 리그닌 분해능을 가진 여러 가지 미생물 및 그 효소들은 다양한 난분해성 물질을 분해할 수 있어 오염물질 및 독성물질의 제거가 가능하므로 리그닌 분해관련 미생물 및 효소들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(5, 13).

담자균류 중에서 목재의 섬유질과 리그닌을 함께 분해하는 백색부후균은 리그닌을 분해하는 효소군, 즉 laccase, lignin peroxidase (LiP) 및 manganese peroxidase (MnP)를 모두, 또는 일부 가지고 있어 이들의 효소단백질과 유전자에 대한 연구가 많은 실험실에서 진행되고 있다. 국내에는 자생하지 않으나 주로 미국에서 리그닌 분해효소에 대한 연구가 수행되는 *Phanerochaete chrysosporium*(2)과 우리나라의 삼림에도 널리 분포하는 *Trametes versicolor*(구름버섯)의 리그닌 분해효소에 대한 연구가 활발하게 수행되고 있다(3, 14). 균류의 laccase는 구리를 가지고 있는 blue copper oxidase로써 4곳의 구리결합 부위는 잘 보존되어 있으며, 이 지역의 염기서열을 PCR primer로 사용하여 laccase 유전자 조각을 cloning할 수 있다(1, 4, 11). LiP과 MnP는 모두 heme을 작용기로 가지고 있으며 heme 결합부위의 염기서열도 잘 보존되어 있어 PCR primer로 사용할 수 있다.

본 실험실에서는 강원도 동해지역에서 분리한 구름버섯을 대상으로 hygromycin B에 대한 저항성을 선택표지로 사용하는 형질전환 방법을 확립하였다(12). 강력한 리그닌 분해능을 가진 이 균을 대상으로 관련 효소들의 유전자에 대한 연구를 수행하기 위하여 primer를 제작하고 이를 사용하여 각 효소들의 유전자

조각을 cloning하였으며 보고된 유전자와의 상동성을 비교하였다.

재료 및 방법

균주 및 염색체 DNA 분리

구름버섯 dikaryon(9522)에서 분리된 monokaryon(9522-1)을 실험에 사용하였으며 염색체 DNA는 완전배지(12)에서 1일간 진탕 배양한 균체로부터 CTAB 방법(15)으로 분리하였다. Cloning된 유전자 조각의 증폭을 위하여 대장균 XL1-Blue에 형질전환 방법으로 재조합된 벡터를 도입하였다.

Laccase 유전자 조각의 증폭

PCR에 사용할 primer는 다음과 같이 제작하였다. 구리결합 부위가 잘 보존된 laccase의 경우 부위 I (P-1: 5'-CAYTGGCAYG-GNTTYTTYCA-3'; Kim 등, 2001)을 forward primer, 부위 III (P-3: 5'-TGNCCGTGMARRTGSAAANGG-3') 및 부위 IV (P-4: 5'-RT-CRAITRTGGCRTGSAGGAA-3'; 1)를 reverse primer로 사용하였다. PCR 수행조건은 96°C에서 5분간 1회 denaturation하고, 95°C 1분, 51°C 2분(P-1,3) 또는 52°C 2분(P-1,4), 72°C 2분 반응을 30회 반복하였으며, 최종적으로 72°C에서 5분간 1회 증폭하였다. 증폭된 유전자 조각은 agarose gel로 분석하였고, gel로부터 elution하여 pGEM-T vector에 cloning한 후 염기서열을 분석하였다.(M은 A 또는 C; N은 A, C, G, T 중 하나; R은 A 또는 G; S는 C 또는 G; Y는 C 또는 T를 나타냄)

Peroxidase 유전자 조각의 증폭

LiP과 MnP들의 유전자 조각을 증폭하기 위한 primer는 다음과 같이 제작하였다. *P. chrysosporium*을 대표로 3가지 백색부후균의 MnP들이 가지는 heme 결합부위 중에서 distal H (histidine)

*To whom correspondence should be addressed.
 Tel: 033-250-8543, Fax: 033-241-4627
 E-mail: htchoi@kangwon.ac.kr

부위(F-1: 5'-CTGACSTTCCACGACGCCATC-3')와 F-1의 downstream 부위(F-2: 5'-CACGACGCCATCGSCATCTC-3')를 forward primer로, proximal H 부위(R-1: 5'-CGTTGTTGGVRAGAAGTTGG-3')와 hydrogen-bonded D (aspartic acid) 부위(R-2: 5'-GTGCGASR-CSAGMAGMGMGAC-3')를 reverse primer로 사용하였다. PCR 수행조건은 F-1과 R-1 조합의 경우 96°C 5분 1회의 denaturation 과정, <95°C 1분, 51°C 2분, 72°C 2분> 증폭반응을 30 cycle, 그리고 마지막에 72°C 5분 1회로 증폭하였다. F-2와 R-2 조합의 경우 96°C 5분 1회, <95°C 1분, 60°C 2분, 72°C 2분> 30 cycle, 72°C 5분 1회로 증폭하였다. 증폭된 유전자 조각은 laccase의 경우와 동일하게 처리하여 염기서열을 분석하였다.

확인된 염기서열을 GenBank의 Database를 이용하여 보고된 효소들의 유전자와 그 상동성을 비교 분석하였다.

결과 및 고찰

Laccase 유전자 증폭

구름버섯 monokaryon (9522-1)의 laccase 유전자를 증폭하기 위하여 염색체 DNA를 template로, 구리결합 부위의 염기서열을

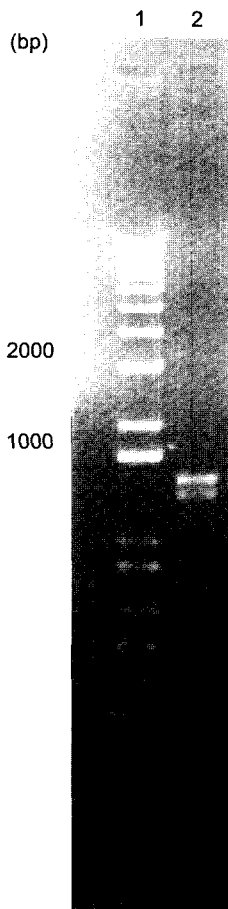


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products by P-1 and P-3 primers of the laccase copper binding domains in *T. versicolor*. Lanes 1, 1 kb DNA molecular weight marker; 2, two PCR products.

primer로 사용하는 PCR을 수행한 결과 P-1과 P-3 조합에서 약 1.3 kb와 1.4 kb 길이의 조각을 확보하였고(Fig. 1), P-1과 P-4 조합에서 1.5 kb 및 1.6 kb 길이의 증폭된 DNA를 확인하였다 (자료 미제시). 이들의 염기서열을 분석하기 위하여 증폭된 DNA를 pGEM-T vector에 cloning하였다. P-1과 P-3 조합에서 증폭된 1.3 kb 조각의 염기서열을 Fig. 2와 같으며 이 유전자를 *klc1*이라 명명하였다. *Klc1*의 아미노산 서열을 *Pleurotus ostreatus* POX2 (6; GenBank Z34848), *T. versicolor* Lcc1 (10; GenBank X84683), *T. villosa* Lcc4 (17; GenBank L78077)의 해당부분과 비교한 결과 각각 65.7%, 97.4%, 97.1%의 상동성을 보였다(Fig. 3). 이 결과는 확보한 *Klc1*의 아미노산 서열이 같은 종인 *T. versicolor* Lcc1과 가장 상동성이 높았고, 세포생리학적 특성이 매우 유사한

```

1  CATTGGCACGGTTTTTCCAGAAGGGTACTAACTGGGCTGATGGAGCTGCCITCGTCAAC
   H W H G F F Q K G T N W A D G A A F V N
61  CAGTACCCTATCGCGAGGGGAACTCCTTCCTTTACGAGTTACCCGCGAGGGACCAAGCA
   Q Y P I A R G N S F L Y E F T A R D Q A
121 Ggctcagtcctgtggcgttaagtctcccgtaatacagcagtaaacctccgcaccceca
   G
181  ggcaccttctggtagccacagtcactgtctacgcagtagctgctggttgcggggcccg
   T F W Y H S H L S T Q Y C D G L R G P
241  ATGGTCGTATACGACCCGAGTGACCCGCATCGCGACCTTTACGACGTCGACGACGAGACC
   M V V Y D P S D P H A D L Y D V D D E T
301  ACGATCATCAGCTCTGATTGGTATCACACCGCCACTTCGCTCGGTGCTGCCTTCCCG
   T I I T L S D W Y H T A T S L G A A F P
361  taagttaccgccgcacggagtaagaccggatctaactatactacgttcaggactgg
   T G
421  CTCGACTCTACCCGTGATCAATGGGTTGGCCGTTTCGCGAGTGGTGACGACCTGACCT
   S D S T L I N G L G R F A S G D S T D L
481  TGCGGTCATCACTGTCGAGCAGGGCAAGCGgttagtataccclctatagttggcactgt
   A V I T V E Q G K R
541  gccattgctgacagtaactctcagctaccgtagcgtcttctcactgcttgcgaccccc
   Y R M R L L S L S C D P
601  AACTATGCTTCTCCATCGACGGCCACAACATGACCATCATCGAGGCCGACCGCTCAAC
   N Y V F S I D G H N M T I I E A D A V N
661  CAGGACCCCTCAGGTCGACTCCATCCAGATCTACGCCGACAACTTACTCCTCTCGTC
   H E P L T V D S I Q I Y A G Q R Y S F V
721  glacgtactctggacagtcagatcacgcccaagcccgatgctaacgcgccactacgctcagC
   L
781  TTACCGCTGACCCAGGACATCGACAACACTTTCATCCGTCGCCCTGCCAGCGCCGGTACCA
   T A D Q D I D N Y F I R A L P S A G T T
841  CTTCCGTCGACGGCGCATCAACTCGGCTATCCTCGCTACTCTGGTGCCCTCCGAGGTTG
   S F D G G I N S A I L R Y S G A S E V D
901  ACCCGACGACCAGGAGACCACGAGCGTCTCCCCCTCGACGAGGCGAACCTCGTGCCCC
   P T T T E T T S V L P L D E A N L V P L
961  TTGACAGCCCGCTGCTglaagttgcacctgcactgcaaggatcgccatactgacac
   D S P A A
1021 gctcccgagccccggtagcccaacattggcgggtgctgactacgcttgaacctggactt
   P G D P N I G G V D Y A L N L D F
1081 CAACTTCGATGGCACCAACTTTCATCAACGACGTCCTCTCGTACCCCACTGTCCC
   N F D G T N F F I N D V S F V T P T V P
1141 TGCTCTCTCCAGATCCTTAGCGGTACCATCTCCGCGGCCGACCTCCTCCCGAGCGCAG
   V L L Q I L S G T I S A A D L L P S G S
1201 TCTCTTCGCGCTCCCGTCCAACCTCGACGATCGAGATCTCGTTCGCCATCACCOCGACGAA
   L F A L P S N S T I E I S F P I T A T N
1261 CGCGCCCGCGCGCCGATCCCTTCATCTGCACGGCC 1298
   A P G A P H P F H L H G
    
```

Fig. 2. Nucleotide sequences of the lower band (*klc1*) in Fig. 1, and its deduced amino acid sequence. Putative copper binding domains were underlined.

```

1
Klc1: HWHGFFQKGTNWADGAAEVNCPY IARQNSFLYEFTAPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPMAVYD
Pox2: HWHGFFQAGSSWADGPAEVTQCFVASGDSFLYNENVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPMAVYD
Lcc1: HWHGFFQKGTNWADGAAEVNCPY IATQNSFLYDF IATDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPMAVYD
Lcc4: HWHGFFQKGTNWADGAAEVNCPY IATQNSFLYDF IATDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPMAVYD

66
Klc1: PSOPHADLYQVDDDETYITLSDWYHTAAELGAAAFH IGSOSTLINGLGRFAGGDSSTDLAVITVEGQ
Pox2: PSOPHADLYQVDDDETYITLSDWYHTAAELGAAAFH IGSOSTLINGLGRFAGGDSSTDLAVITVEGQ
Lcc1: PSOPHADLYQVDDDETYITLSDWYHTAAELGAAAFH IGSOSTLINGLGRFAGGDSSTDLAVITVEGQ
Lcc4: PSOPHADLYQVDDDETYITLSDWYHTAAELGAAAFH IGSOSTLINGLGRFAGGDSSTDLAVITVEGQ

131
Klc1: KRYRMBLLSL SCQPNVYVESIDGHNMITEADAVNHEPLTVDSIQYAGQRYSEVLTADQDIDNYI
Pox2: KRYRMBLLSL SCQPNVYVESIDGHNMITEADAVNHEPLTVDSIQYAGQRYSEVLTADQDIDNYI
Lcc1: KRYRMBLLSL SCQPNVYVESIDGHNMITEADAVNHEPLTVDSIQYAGQRYSEVLTADQDIDNYI
Lcc4: KRYRMBLLSL SCQPNVYVESIDGHNMITEADAVNHEPLTVDSIQYAGQRYSEVLTADQDIDNYI

196
Klc1: IRANPNLQSTGEVGGINSALRYSGASEVDPTTITTSVPLDEANLVPLDSPAAPGDPNI GGVD
Pox2: IRANPNLQSTGEVGGINSALRYSGASEVDPTTITTSVPLDEANLVPLDSPAAPGDPNI GGVD
Lcc1: IRANPNLQSTGEVGGINSALRYSGASEVDPTTITTSVPLDEANLVPLDSPAAPGDPNI GGVD
Lcc4: IRANPNLQSTGEVGGINSALRYSGASEVDPTTITTSVPLDEANLVPLDSPAAPGDPNI GGVD

261
Klc1: YALNLDNFQGTNFF I I INDVSEVSPITVYVLLQISGTTSAADLIPSGSLFALPNSNTEISEPFI
Pox2: I N I NLAMAFDFITBELTINGVPELPEIAPVLLQISGASTAASLLPSGSLYELEANKVVEISMBA
Lcc1: YALNLDNFQGTNFF I I INDVSEVSPITVYVLLQISGTTSAADLIPSGSLFALPNSNTEISEPFI
Lcc4: YALNLDNFQGTNFF I I INDVSEVSPITVYVLLQISGTTSAADLIPSGSLFALPNSNTEISEPFI

326
Klc1: IATNAPGAPHPFHLLHG
Pox2: L L AVGGHPFHLLHG
Lcc1: IATNAPGAPHPFHLLHG
Lcc4: IATNAPGAPHPFHLLHG
    
```

Fig. 3. Comparison of amino acid sequences of Klc1 with other laccases. The same amino acids were shaded. Pox2, *P. ostreatus* laccase 2 (GenBank Z34848); Lcc1, *T. versicolor* laccase 1 (GenBank X84683); Lcc4, *T. villosa* laccase 4 (GenBank L78077).

*T. villosa*의 Lcc4와도 높은 상동성을 보인 반면 느타리 버섯균의 laccase와는 상대적으로 낮은 상동성을 보였다.

P-1과 P-3 조합에서 얻은 약 1.4 kb 길이의 유전자 조각의 염기서열을 분석한 결과 *kic1*과 달랐으며, P-1과 P-4 조합에서는 P-1과 P-3 조합에서 얻은 각각의 유전자를 더 길게 증폭한 것으로 확인되었다(자료 미제시).

Peroxidase 유전자 증폭

구름버섯의 LiP과 MnP들이 가지는 heme 결합부위의 염기서열을 이용하여 각 효소의 유전자를 증폭하고자 PCR을 수행한 결과 F-1과 R-1 조합에서 185 bp의 DNA band를, F-2와 R-2 조합에서 443 bp 길이의 DNA band를 확보하였고, 이들을 각각 pGEM-T vector에 cloning하였다(Fig. 4). 증폭된 185 bp의 염기서열은 Fig. 5A와 같으며, LiP으로 추정되는 Klp1의 아미노산 서열을 *P. chrysosporium* LiP1(16; GenBank AAD02880), *T. versicolor* LiP1(9; GenBank S32581), LiP2(9; GenBank S47649)의 해당부분과 비교한 결과 각각 80%, 95%, 85%의 상동성을 보였다(Fig. 5B). *klp1*의 17번째 codon GNC가 다른 LiP의 경우와 같이 GGC가 되어 glycine이 된다면 *T. versicolor* LiP1 (GenBank S32581)과 97.5%의 높은 상동성을 보인다. F-1과 R-1 조합으로 증폭된 유전자 조각이 상대적으로 짧아 다른 LiP들과 높은 상동성을 보인 것으로 판단되며, 더 긴 유전자를 확보하여

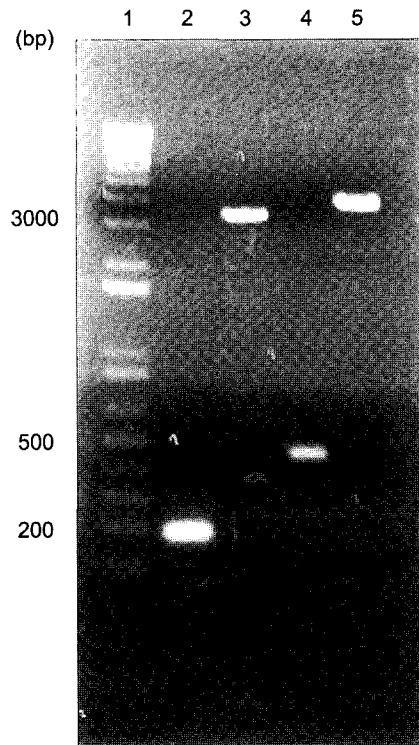


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of PCR products and the pGEM-T plasmids containing the cloned PCR products in *T. versicolor*. Lanes 1, 1 kb DNA molecular weight marker; 2, PCR product (*klp1*) amplified with F-1 and R-1 primers (185 bp); 3, cloned *klp1* with pGEM-T vector; 4, PCR product (*kmp1*) amplified with F-2 and R-2 primers (443 bp); 5, cloned *kmp1* with pGEM-T vector.

```

A
1 CTGACCTCCACGACGCCATCGCCATCTCCCCGCCCTCGAGGCCAGGCATCTTCGGgta
   L T F H D A I A I S P A L E A Q X I F G
63 cgctgacccaattgtagccatagcaaaaaatcgtaaccaggatgcgctgtagTGGCGGTGGTGC
   G G G A
131 CGACGGCTCCATCGCGATCTTTCCCGAGATCGAGACCAACTTCTTCCCAACAACG
   D G S I A I F P E I E T N F F P T T

B
1                               40
Klp1: LTFHDAVLSFALEADQIFGGGGAGCSAIEPCLTNEFPF
Pc-lip: LVFHDAVLSFALEADQIFGGGGAGCSIMEDTETNEFPF
Tv-lip1: LTFHDAVLSFALEADQIFGGGGAGCSAIEPCLTNEFPF
Tv-lip2: LTFHDAVLSFALEADQIFGGGGAGCSAIEPCLTNEFPF
    
```

Fig. 5. A: Nucleotide sequences of a PCR product (185 bp) and its deduced amino acid sequence. B: Comparison of amino acid sequence of Klp1 with other lignin peroxidases. Pc-lip, *P. chrysosporium* LIP (GenBank AAD46494); Tv-lip1, *T. versicolor* LIP I/IV precursor (GenBank S32581); Tv-lip2, *T. versicolor* LIP II/III precursor (GenBank S47649)

분석한다면 다음의 MnP 경우와 같이 60~85% 정도의 상동성을 보일 것으로 판단된다.

증폭된 443 bp의 염기서열은 Fig. 6에 정리하였으며 MnP로 추정되는 Kmp1의 아미노산 서열을 *P. chrysosporium* MnP1(7;

```

1 CAGCAGCCATCGGCATCTCGCCGCCATCGCCCGGACTGGCAAGTTCGGAGGTGGAGAC
  H D A I G I S P A I A R T G K F G G G D
61 GCGGACGGCTCCATTGCCATAITCGCCGACATCGAAACCACTCCACGCGAACACGGT
  A D G S I A I F A D I E T N F H A N N G
121 GTGGACGAAATCATCGGCGAGCAGGACCGTTCATCGCCGCCACCACTCACCACCGCC
  V D E I I G E Q A P F I A R H N L T T A
181 GACTTgtgtgtaaccgcatogcaactactgttctcatogctgacctcogagtaagCATCCAGTTCG
  D F I Q F A
251 CTGTGTGAATCGGCGTGAGCAACTGCCCTGGCGGCCCGTCTGAAGCTTTCATCGGCCG
  G A I G V S N C P G A P R L N V F I G R
311 CAAGGATGCTACTCAGCCCGCGCCGACCTCACCGTCCCGAGCCCTCGAGCAGCGTAC
  K D A T Q P A P D L T V P E P F D D V T
371 CATGATCTTTCGCCGCTTCGCCGACGCCGGCAAGTTCACCCCGCCGAGGTGCTCGCT
  M I L A R F A D A G K F T P A E V V S L
431 GCTGGCCTCGCAC
  L A S H
    
```

Fig. 6. Nucleotide sequences of *kmp1* and its deduced amino acid sequence.

```

1
Kmp1 HDAIQISPAIARTGKFGGQDADGSAIFADIETNFHANNGVDEIIGEQAPFIARHNLTTA
Pc-Lip HDAIAPAMEAQGKFGGGGADGSMIFDDIEPNFHPNIGLDEIINLQKPFVQKHGVTGP
Mnp2 HDAIQISRKANKAGVFGGGADGSAIFADIETNFHANNGVDEIDTQAPIARHNLTTA
MP2 HDAIQISPSIASRQGFQGGGADGSAIFEDIETNFHANLGVDEIDEQRPFIARHNLTTA
61
Kmp1 DFIQFAGAIGVSNCPGAPRLNVFI GRKDATQPA PDLTVPEPFDDVTMILARFADAGKFTF
Pc-Lip DFIQFAGAVALSNCPGAPOMNFFTGRRPATQAPDGLVPEPFHTVDQIARVNDAGEFDE
Mnp2 DFIQFAGAIGVSNCPGAPRL DVFL GRKDATQPA PDLTVPEPFDDVTKLARFDDAGKFS
MP2 DFIQFAGAIGVSNCPGAPQL DVFL GRPDATQPA PDLTVPEPFDDVDSIERFSDAGGFTF
121
Kmp1 AEVVS LLASH
Pc-Lip LELVWMLSAH
Mnp2 DEVVA LLVSH
MP2 AEI VA LLVSH
    
```

Fig. 7. Comparison of amino acid sequences of Kmp1 with other lignin/manganese peroxidases. Pc-Lip, *P. chrysosporium* lignin peroxidase B precursor (GenBank JH0156); Mnp2 *T. versicolor* manganese peroxidase isozyme Mnp2 (GenBank AAD02880); MP2, *T. versicolor* manganese peroxidase isozyme MP2 (GenBank CAA83148).

GenBank JH0156), *T. versicolor* MNP2 (GenBank AAD02880; unpublished)와 MP2 (8; GenBank CAA83148)의 해당부분과 비교한 결과 각각 61%, 85%, 83%의 상동성을 보였다(Fig. 7).

Blue copper oxidase라고도 알려진 laccase는 구리 결합부위가 잘 보존되어 있으므로 해당지역의 염기서열을 PCR primer로 사용하여 유전자 조각의 증폭이 가능하다. 이 실험을 통하여 LiP과 MnP들이 공통적으로 가지는 heme-binding domain의 염기서열을 PCR primer로 사용할 수 있음이 확인되었다. 또한 이 실험에서 확보한 구름버섯의 laccase, lignin peroxidase, manganese peroxidase 유전자의 조각들을 외국 균주의 해당 유전자부분과 비교하였을 때 laccase인 Klc1의 경우 외국의 동일 균주와 매우 높은 상동성을 보인 것에 비하여 manganese peroxidase인 Kmp1의 아미노산 서열은 외국 균주와 83-85%의 상동성을 보였으며, 이는 국내에서 분리한 미생물 자원은 외국의 동일 종과 비교할 때 난분해성 물질의 분해와 깊은 관련이 있는 세 가지 효소들의

유전자에서 고유한 유전자를 가지고 있는 것으로 확인하였다. 앞으로 이 유전자들에 대한 연구를 통하여 구름버섯이 난분해성 물질을 분해하는 과정에서 관련 유전자들의 발현조절 기전을 분석하고자 한다.

감사의 글

이 연구는 한국과학재단 특정기초연구 (R01-2002-000-00270-0) 지원으로 수행되었음.

참고문헌

1. 조지현, 최형태, 김경훈. 2000. 영지버섯 laccase 유전자의 구리결합부위 I과 IV사이 지역의 클로닝. 미생물학회지 36, 192-195.
2. Cameron, M., S. Timofeevski, and S.D. Aust. 2000. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 751-758.
3. Collins, P.J., M.M. O'Brien, and A.D. Dobson. 1999. Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel extracellular peroxidase from *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1343-1347.
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. Fritsche, W., K. Scheibner, A. Herre, and M. Hofrichter. 2000. Fungal degradation of explosives: TNT and related nitroaromatic compounds. In *Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives*, ed. by J. Spain, J. Hughes and H.-J. Knackmuss, Lewis Pub. Boca Raton.
6. 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.
7. Huopoene K., P. Ollikka, M. Kalin, I. Walther, P. Mantsala, and J. Reiser. 1990. Characterization of lignin peroxidase-encoding genes from lignin-degrading basidiomycetes. *Gene* 89, 145-150.
8. Johansson, T. and P.O. Nyman. 1996. A cluster of genes encoding major isozymes of lignin peroxidase and manganese peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Gene* 170, 31-38.
9. Jonsson, L. and P.O. Nyman. 1994. Tandem lignin peroxidase genes of the fungus *Trametes versicolor*. *Biochim. Biophys. Acta* 1218, 408-412.
10. Jonsson, L., K. Sjostrom, I. Haggstrom, and P.O. Nyman. 1995. Characterization of a laccase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor* and structural features of basidiomycete laccases. *Biochim. Biophys. Acta* 1251, 210-215.
11. 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.
12. Kim, K., Y. Leem, K. Kim, K. Kim, and H.T. Choi. 2002. Transformation of the medicinal basidiomycete *Trametes versicolor* to hygromycin B resistance by restriction enzyme mediated integration. *FEMS Microbiol. Lett.* 209, 273-276.
13. Mester, T. and M. Tien. 2000. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pol-

- lutants. *Int. Biodet. Biodeg.* 46, 51-59.
14. Mikkuni, 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.
15. Möller, E.M., G. Bahnweg, H. Sandermann, and 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.
16. Stewart, P. and D. Cullen. 1999. Organization and differential regulation of a cluster of lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 181, 3427-3432.
17. 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 22, 2003/Accepted September 4, 2003)

ABSTRACT: Partial Cloning of Genes for Lignin Degrading Enzymes in *Trametes versicolor*

Yong Ho Kim, Su Jin Cheong, Sun Kyung Kim, Hong Gyu Song, and Hyoung T. Choi*
(Department of Microbiology, Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea)

Laccase, lignin- and manganese peroxidase are implicated in the lignin degradation. The nucleotide sequences of four copper-binding domains in fungal laccases, and heme-binding domains of lignin- and manganese peroxidases are well conserved, and therefore these short fragments can be used for the PCR for the gene amplification. We synthesized several PCR primers according to their sequences, and run PCR to amplify the lignin degrading genes of *Trametes versicolor* isolated in Korea. PCR products were cloned with pGEM-T vector in order to determine their nucleotide sequences. A laccase fragment (1.3 kb) showed 65-97% homologies, lignin peroxidase fragment (185 bp) showed 80-95% homologies, and manganese peroxidase fragment (443 bp) showed 61-83% homologies when compared with other white-rot fungal enzymes.