

먹물버섯의 생성 · 자가소화 과정에서 laccase 및 chitinase의 발현

김윤정 · 박혜연 · 조정원¹ · 최형태*

강원대학교 생명과학부 생화학과, ¹인제대학교 생명공학부

먹물버섯은 버섯 시원체로부터 버섯이 성숙되는 과정에서 자가소화가 일어나 먹물이라 불리는 검은 액체를 생성한다. 이 과정에서 멜라닌을 생성하는 laccase, 균류 세포벽 성분의 하나인 키틴을 분해하는 chitinase의 관련을 분석하고자 Northern hybridization 방법을 이용하여 유전자의 발현을 분석하였다. 시원체가 생성되고 버섯이 성숙되어 먹물을 생성하는 시기에 따라 멜라닌색소 생성 효소인 laccase와 키틴분해효소인 chitinase의 발현이 증가하는 것이 확인되었다.

Key words □ chitinase, *Coprinellus congregatus*, laccase, mushroom autolysis

균류의 자손번식, 즉 포자의 이동은 다양한 방법으로 진행된다. 바람에 의하여 퍼지는 경우가 가장 흔하고, 빗물 또는 곤충에 의하여 전파되는 경우가 그 다음이다. 대부분의 버섯균류들은 담자포자가 바람에 의하여 널리 이동되는 방식을 사용하며, 일부 버섯균류는 곤충이 자실체를 먹게 됨에 따라 담자포자가 곤충의 몸에 붙어 이동하는 방법을 사용한다. 먹물버섯류는 매우 특이한 경우로써 버섯의 시원체가 생성되고 점차 성숙되면서 바로 버섯 자실체의 자가분해(autolysis)가 진행된다(10). 자가분해가 진행되는 과정에서 용해된 세포 성분이 검은 먹물로 변하게 되며, 이를 칭하여 먹물버섯류라고 부른다.

균류가 생성하는 검은색은 대부분 멜라닌이며, 멜라닌을 생성하는 과정은 polyketide-melanin 생합성 경로와 dopa-melanin 생합성 경로 두 종류가 보고되었다(11). 일부 자낭균과 불완전균류가 생성하는 polyketide-melanin을 제외하면 대부분의 버섯균류가 생성하는 검은색은 dihydroxyphenylalanine 및 아미노기가 연결된 페놀화합물을 기질로 사용하는 laccase가 관련된 dopa-melanin이다. Laccase는 많은 균류에서 다양한 기능을 보이는데, 대표적인 사상성 진균류인 자낭균 *Aspergillus nidulans*에서는 포자색깔인 melanin 생성에(12), 버섯을 만드는 담자균류인 표고버섯에서는 버섯의 생성에 laccase가 관련되었다(7). 또한 AIDS 환자와 같이 면역체계가 약화된 사람들에게 감염될 경우 치명적인 *Cryptococcus neoformans*의 경우 laccase의 산물인 멜라닌이 병원성과 관련되었다고 보고되었다(2). 균류의 laccase 기능 중에서 가장 활발히 연구되는 분야는 백색부후균류의 lignin 및 난분해성 물질의 분해이다(3, 4).

선택성이 높은 항진균제의 개발을 위한 연구 중에서, 진균류에만 존재하는 세포벽을 target으로 한 항진균제의 개발을 위한 기

초연구로서, 세포벽 구성성분의 하나인 키틴의 생합성효소(chitin synthase)에 대한 연구(9)가 매우 활발하다. 그러나 항진균제의 개발을 위한 새로운 방향으로서, 균류의 세포벽 생합성을 억제하는 대신에 키틴을 구성성분인 *N*-acetylglucosamine으로 가수분해하는 효소인 chitinase를 이용하여 이미 존재하는 세포벽을 제거하는 방법을 생각할 수 있다. 여러 세균에서 chitinase에 대한 연구보고가 있으며(13), 식물병원성 균류들이 chitinase와 항진균제를 분비하는 세균에 의하여 효과적으로 제어됨(5)이 보고되었다. NCBI gene bank에는 매우 많은 생물체로부터 chitinase 유전자가 등록되어 있다. 대부분이 세균과 동식물의 유전자이지만, *Aspergillus fumigatus*, *Neurospora crassa*, *Trichoderma* spp. 및 *Saccharomyces cerevisiae* 등 일부의 균류 chitinase 유전자가 보고되었다.

먹물버섯(inky cap)의 하나인 *Coprinellus* (= *Coprinus*) *congregatus*는 YpSs 배지(가용성 전분 1.5%, yeast extract 0.4%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%)에서 성장하고 적절한 빛을 받으면 버섯생성이 잘 유도되며(1), 버섯이 생성/사멸되는 과정에서 버섯의 갓(pileus와 gill)이 자가소화에 의하여 빠르게 녹아 먹물로 변하여 포자와 함께 떨어진다. 이 과정에서 먹물, 즉 검은 색소인 멜라닌이 빠르게 생성되고, 버섯조직 세포에 존재하는 chitin이 분해되므로 laccase 및 chitinase가 직접적으로 관련되었는지 확인하고자 실험을 수행하였다. 각각의 유전자조각을 사용하여 probe를 제작하고 Northern hybridization 방법으로 유전자의 발현을 분석하였기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주의 배양 및 분화단계별 시료 수집

C. congregatus dikaryon (N+N)을 YpSs 한천배지에 접종하고 25°C에서 빛을 조절하며 배양하였다(1). 분화단계별 시료는 시원체(길이 2-3 mm), young fruit body (dark period 전환 3시간 후)

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 033-250-8511, Fax: 033-242-0459
E-mail: htchoi@kangwon.ac.kr

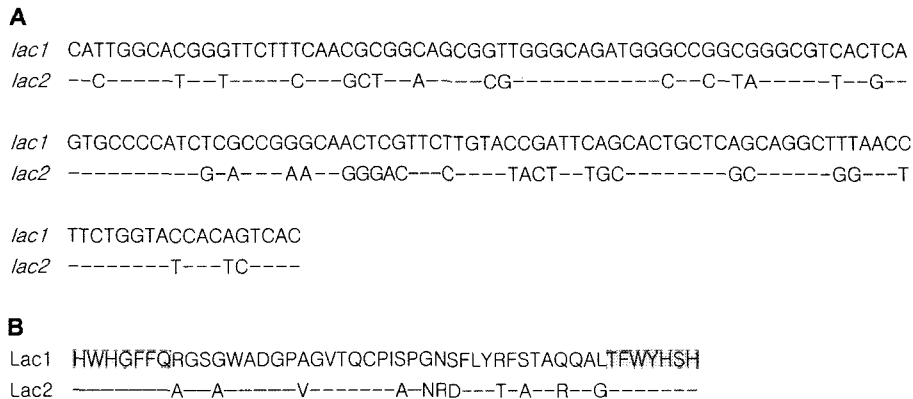


Fig. 1. (A) Comparison of nucleotide sequences of laccase I and laccase II between copper binding domain I and II. (B) Comparison of deduced amino acid sequences of the laccase fragments of A. Hyphens in *lac2/Lac2* represent the same nucleotides/amino acids as in *lac1/Lac1*. Copper binding domain I and II are shaded.

및 *matured fruit body* (dark period 전환 8시간 후)의 세 단계에서 수집하였으며 최와 조(1)의 Fig. 1과 동일하다.

Laccase와 chitinase 발현분석을 위한 Northern hybridization

C. congregatus 염색체 DNA는 Leem 등(8)의 방법에 따라 분리하였다. Laccase 유전자를 확보하기 위하여 laccase 구리결합 부위 I과 II에 근거하여 forward primer 5'-CAY TGG CAY GGN TTY TTY CA-3' 및 reverse primer 5'-RTG AST RTG RTA CCA RAA NG-3'의 degenerated primer (6)를 사용하였고, PCR에 의하여 증폭된 유전자 조각은 T-vector에 연결하여 염기서열을 분석하였고 이를 template로 사용한 PCR 방법으로 probe를 제작하였다. Chitinase 유전자는 오스트리아 Vienna University of Technology의 C. Kubicek 교수로부터 분양받은 *Hypocrea rufa*의 chitinase (910 bp, accession no. AY665591)를 random primer를 사용한 probe를 제작하였다. *C. congregatus* 분화단계 별 시료로부터 총 RNA를 Kim 등(6)의 방법에 따라 분리하였으며, slot blot 기기를 사용하여 각 시료 당 10 µg의 RNA를 nylon membrane에 loading하였다. Laccase와 chitinase 발현을 분석하기 위하여 각각의 probe는 DIG-DNA labeling kit (Boehringer Mannheim)을 사용하여 제작하였으며 alkaline phosphatase 효소를 이용한 CDP-Star 화학발광법(8)으로 확인하였다.

결과 및 고찰

*C. congregatus*의 염색체 DNA를 주형으로 laccase 유전자 조각을 구리결합부위의 primer를 사용하여 PCR로 증폭한 결과 144 bp의 유전자 조각이 확인되었고, 이를 T-vector에 연결하고 염기서열을 분석한 결과 Fig. 1과 같다. *C. congregatus*에서 보고된 acidic laccase (*lac2*; accession no. AJ271339) 유전자(6)의 동일 부분과 71.5%의 identity를 보였고 염기서열을 아미노산 서열로 전환한 후 Lac2와 비교한 결과 77.1% 동일하였다. 또한 *Trametes villosa* laccase1 (accession no. Q99044) 및 *Phlebia tremellosa* laccase (accession no. AM282562)의 구리결합 부위

I-II 지역과 비교한 결과 각각 70.8% 및 72.9%가 동일하였다. *C. congregatus*의 Lac2는 액체배양 시 산 충격에 의하여 발현되는 효소이므로 새로 증폭된 laccase 유전자 조각은 acidic laccase와 다른 새로운 laccase (*lac1*)임이 확인되었다.

*C. congregatus*의 자실체가 시원체로부터 성숙되는 과정에서 laccase에 의한 멜라닌색소의 생성과 자실체 세포벽의 키틴질 분해가 진행되는 것을 확인하고자 먹물버섯 *lac1*과 *H. rufa*의 chitinase의 probe를 제작하였으며 각 분화단계 별 시료의 RNA를 대상으로 Northern hybridization을 수행한 결과 Fig. 2와 같다. Laccase는 낮은 발현을 보이는 이핵체 균사에 비하여, 시원체와 young mushroom에서 상승된 발현을 보였고, *matured mushroom*에서 가장 강한 발현이 확인되었다. 즉 버섯이 용해되어 먹물로 전환되는 과정에서 laccase가 강하게 발현되어 멜라닌을 생성하여 먹물 색깔을 띠게 한다. 담자포자 현탁액인 먹물에 멜라닌이 다량 함유된 것은 멜라닌의 다양한 보호효과(14)를 통하여 담자포자의 이동 및 전파에 긍정적 효과를 더하는 것으로 판단된다.

*H. rufa*의 chitinase의 사용가능성을 확인하기 위하여 probe를 제작하고 BamHI로 가수분해한 *C. congregatus* 염색체 DNA와 Southern hybridization을 수행한 결과 뚜렷한 band를 확인할 수 있었다 (결과 미제시). Chitinase의 경우 이핵체 균사 및 시원체에서는 발현을 확인할 수 없는 정도였으나 young mushroom에서 발현이 시작되었고, *matured mushroom*에서 가장 강한 발현을 보였다. 이 시기에 laccase 및 chitinase의 발현이 강하게 나타나는 것은 이때 담자포자를 생성하는 담자의 주름 층이 검게 착색되는 것, 그리고 담자포자를 생성하는 담자기 세포층의 일부 세포벽이 분해되는 것(1)과 일치한다.

*C. congregatus*의 자실체가 자기분해되는 과정에서 세포벽이 용해되며(1), 이때 세포벽에 함유된 키틴이 분해되는 것을 간접적으로 확인하고자 chitinase의 발현을 분석하였다. 이 결과는 *C. congregatus*의 자실체가 자기분해되는 과정에서 발현되는 chitinase가 세포벽의 키틴질을 분해하는 것을 시사하며, *C. congregatus*의 chitinase 유전자 및 효소의 활용에 대한 가능성을 제시하였다.

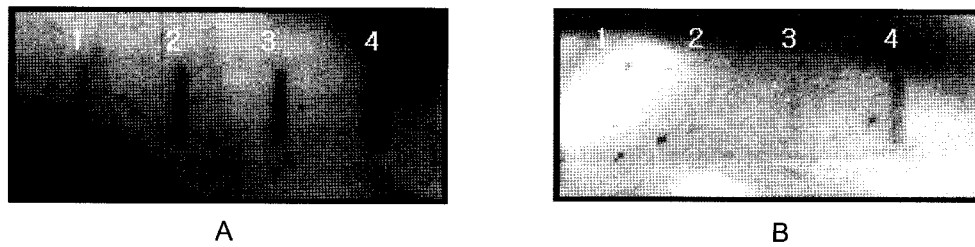


Fig. 2. Confirmation of laccase (A) and chitinase (B) gene expression during the development of mushroom. Total RNA (10 µg) of each sample was loaded and detection was performed with laccase (A) or chitinase (B) probe, respectively. Lane 1, dikaryotic mycelium; lane 2, primordium; lane 3, young mushroom; lane 4, matured mushroom. (Results for negative control with monokaryotic mycelia which had no laccase or chitinase activities were not shown).

감사의 글

이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지방대 육성지원사업 (2004-C00171)의 연구비로 수행되었음.

참고문헌

1. 최형태, 조정원. 2005. 먹물버섯의 자가분해 과정에 대한 미세구조 연구. 미생물학회지 41, 312-325.
2. Casadevall, A., A.L. Rosas, and J.D. Nosanchuk. 2000. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Op. Microbiol.* 3, 354-358.
3. Cheong, S., S. Yeo, H.G. Song, and H.T. Choi. 2006. Determination of laccase gene expression during degradation of 2,4,6-trinitrotoluene and its catabolic intermediates in *Trametes versicolor*. *Microbiol. Res.* Available online on 2006. 1. 19.
4. Han, M.J., H.T. Choi, and H.G. Song. 2004. Degradation of phenanthrene by *Trametes versicolor* and its laccase. *J. Microbiol.* 42, 94-98.
5. Kamensky, M., M. Ovadis, I. Chet, and L. Chernin. 2003. Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. *Soil Biol. Biochem.* 35, 323-331.
6. 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.
7. Leatham, G.F. and M.A. Stahmann. 1981. Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. *J. Gen. Microbiol.* 125, 147-157.
8. Leem, Y., S. Kim, I.K. Ross, and H.T. Choi. 1999. Transformation and laccase mutant isolation in *Coprinus congregatus* by restriction enzyme-mediated integration. *FEMS Microbiol. Lett.* 172, 35-40.
9. Mellado, E., G. Dubreucq, P. Mol, J. Safati, S. Paris, M. Diaquin, D. Holden, J. Rodriguez-Tudela, and P. Latgé. 2003. Cell wall biogenesis in a double chitin synthase mutant (*chsG/chsE*) of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* 38, 98-109.
10. Moore-Landecker, E. 1990. Fundamentals of the fungi, 3rd ed., p 212. Prentice-Hall, Inc.
11. Nicolaus, R.A. 1962. Biogenesis of melanins. *Rassegna Medicina Sperimentale* 9 (suppl. 1), 1-32.
12. Scherer, M. and R. Fischer. 1998. Purification and characterization of laccase II of *Aspergillus nidulans*. *Arch. Microbiol.* 170, 78-84.
13. Svitil, A. and D. Kirchman. 1998. A chitin-binding domain in a marine bacterial chitinase and other microbial chitinases: implications for the ecology and evolution of 1,4-β-glycanases. *Microbiol.* 144, 1299-1308.
14. Wang, Y. and A. Casadevall. 1994. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3864-3866.

(Received August 23, 2006/Accepted September 12, 2006)

ABSTRACT: Chitinase and Laccase Expression during the Fruit Body Development in *Coprinellus Congregatus*

Yun-jung Kim, Hye-yeon Park, Chung-won Cho¹, and Hyoung T. Choi* (Department of Biochemistry, Kangwon National University, Chunchon 200-701, ¹Department of Biotechnology, Inje University, Kimhae 621-749, Korea)

When fruit bodies of *Coprinellus congregatus* were matured, they were autolysed to form black ink. During the developmental changes, cell walls of basidia were degraded. Laccase formed melanin which was the typical black pigment of fungi, and chitinase hydrolyzed the chitin which was a component of fungal cell wall. When laccase and chitinase genes were used as the probe for the Northern analysis to confirm their expression during the fruit body development, both gene expressions were increased as the mushroom was getting matured.