

## 겨울우산버섯의 원형질체 분리와 유전자 형질전환

유선화\* · 김명길

국립산림과학원 임산공학부 화학미생물과

### Protoplast Isolation and Genetic Transformation of *Polyporus brumalis*

Sun-Hwa Ryu\* and Myung-Kil Kim

Division of Wood Chemistry & Microbiology, Korea Forest Research Institute (KFRI), Seoul 130-712, Republic of Korea

(Received October 27, 2014 / Accepted November 22, 2014)

This experiment was undertaken to investigate proper conditions for protoplast isolation and genetic transformation of the white rot fungi, *Polyporus brumalis*. The protoplasts were formed from mycelia at a frequency of  $1 \times 10^7$ /ml with 0.5% Usukizyme. The transformation vector (pYHgt) was constructed using hygromycin resistance gene (*hph*) for the selectable maker. The yield was 100–160 transformants/ $\mu$ g DNA in a transformation mediated by 40% polyethylene glycol solution with aurintricarboxylic acid, heparin and supermidine. The genomic integration of the pYHgt was confirmed by *hph*-specific PCR and the expected amplified band appeared only in the transformants. These results could be an efficient tool in gene engineering of the genus *polyporus*.

**Keywords:** *Polyporus brumalis*, protoplast, pYHgt, transformation, white rot fungi

백색부후균(White Rot Fungi, WRF)은 laccase와 lignin peroxidase (LiP) 그리고 manganese peroxidase (MnP)와 같은 효소를 세포 외로 분비하여 견고한 구조의 리그닌을 분해하면서 나무를 부후시킨다(Becker *et al.*, 1993; Hatakka, 1994). 리그닌 분해효소는 기질특이성이 낮기 때문에 리그닌 외에 염료나 내분비계 장애물질 등 난분해성 유해화합물을 분해할 수 있으며, 분해과정이 세포외에서 이루어지기 때문에 고농도의 독성화합물과 불용성화합물의 분해도 가능하다(Pasti-Grigsby *et al.*, 1992; Barr and Aust, 1994; Pointing, 2001; Shin *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 2008). 난분해성 유해화합물의 생물학적 정화의 실용화를 위해서는 우선 분해력이 우수한 미생물의 개발이 필요하다. 형질전환법은 외래 유전자의 도입 또는 특정 유전자의 제거를 통해 임의로 유전형질을 변화시키는 방법으로 유용한 유전자의 특성연구와 이를 이용한 새로운 미생물 균주의 개발에 이용할 수 있다. 담자균에 속하는 백색부후균은 단단한 세포벽으로 인해 외래물질의 도입이 어렵기 때문에 균사의 세포벽을 제거한 원형질체를 제조하여 유전자를 도입하는 형질전환 방법이 많이 시도되었다. Peng 등 (1992)은 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)의 균사에 세포벽 분해효소로 Novozyme 234를 처리하여 원형질체를 분리하고 *hph* 유전자를 선택표지로 활용하여 형질전환에 성공하였다. Leem 등 (1999)은 먹물버섯(*Coprinus congregatus*)의 균사에 Novozyme

234를 처리하여 원형질체를 분리하고 여기에 *bar* 유전자를 선택표지로 형질전환 하였다. Kim 등(2007)은 기계충버섯(*Irpex lacteus*)과 아교버섯(*Phlebia tremellosa*)의 균사에 Glucanex 200G를 세포벽 분해효소로 처리하여 원형질체를 분리하고 선택 표지로 *bar* 유전자를 활용하여 형질전환체를 제작하였다.

겨울우산버섯(*Polyporus brumalis*)은 국내에 자생하는 백색 부후균으로서 대표적인 내분비계 장애물질로 분류되어 있는 다이부틸프탈레이트(DBP)와 같은 난분해성 물질을 분해 할 수 있는 능력이 있으며 다양한 독성물질이 존재하는 환경에서 군사생장이 가능하여 복합적인 환경에 적합한 균주로 보고 되었다(Lee *et al.*, 2007). DBP를 포함하는 프탈레이트류는 플라스틱 산업에 널리 사용되며 그 독성이 매우 강한 것으로 알려져 있어 관심이 높은 환경오염물질이다. 겨울우산버섯은 리그닌 분해효소를 분비해서 이러한 오염 물질을 분해할 수 있는 것으로 생각된다(Lee *et al.*, 2007; Ryu *et al.*, 2008). 복합적인 환경에서 리그닌 분해효소의 기능을 이해하고 분해력이 향상된 겨울우산버섯의 균주를 확보하기 위해서는 형질전환을 통한 리그닌 분해효소의 유전자 발현 조절이 필요하다. 그러나 *Polyporus* 속의 형질전환에 대한 연구는 보고 된 바가 없으며 먹물버섯과 같은 다른 균류에서 확립된 형질전환법은 겨울우산버섯에 시도하였으나 낮은 원형질체 생성율과 항생제에 대한 민감성 차이로 겨울우산버섯에는 적합하지 않았다. 본 연구에서는 겨울우산버섯의 균사에서 원형질체를 분리하는 조건과 특정 유전자를 도입할 수 있는 형질전환 방법을 확립하였다.

\*For correspondence. E-mail: shryu@forest.go.kr; Tel.: +82-2-961-2758; Fax: +82-2-961-2769

공시균주로 사용된 겨울우산버섯은 국립산림과학원에서 수집하여 보관하고 있는 KFRI 20912 균주를 이용하였다. PDA (potato dextrose agar, DIFCO) 고체배지에서 7일간 28°C에서 배양하여 균사 상태로 유지하였고 액체배양 시 균사가 자란 배지를 멸균된 칼을 이용하여 0.5 cm<sup>2</sup> 이하로 작게 잘라서 PDB (potato dextrose broth, DIFCO) 액체배지 100 ml에 모두 접종하여 28°C에서 200 rpm으로 진탕하며 배양시켰다. 원형질체 분리를 위해 접종 5일 후 마쇄기로 배양된 균사를 1초씩 5회 마쇄한 다음 20 ml를 취하여 새로운 PDB 100 ml로 옮겨서 5일간 더 배양하였다. 배양한 균사를 다시 마쇄하여 20 ml씩 다섯 개의 CKMM (Maltose, 5 g; KNO<sub>3</sub>, 1 g; Trace elements, 20 ml; Salt solution, 12.5 ml; Thiamin HCl, 500 µl/ 500 ml) 배지 100 ml에 분취하고 28°C에서 하룻밤 진탕 배양하였다. 배양시킨 균사를 50 ml 튜브에 나누어 담고 상온에서 3,000 rpm으로 15분 동안 원심분리 하였다. 가라앉은 균사가 떨어지지 않도록 조심해서 상등액의 배지는 버리고 균사의 2배 부피가 되는 양의 0.6 M sucrose를 넣어 균사가 완전히 풀어질 때까지 진탕한 후, 3,000 rpm으로 10분 동안 원심분리 하였다. 다시 상등액을 버리고 가라앉은 균사에 0.6 M sucrose 처리를 한 번 더 실행하여 균사를 회수하였다. 회수한 균사의 2배 부피가 되는 양의 0.6 M sucrose에 세포벽 분해효소로 Usukizyme (Kyowa Chemical Products)을 넣어 0.5% 농도의 효소액을 만들었다. 이를 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 찌꺼기를 침전시키고 0.45 µm 크기의 주사기 필터로 효소액을 걸러서 회수된 균사에 넣고 풀어주었다. 효소액이 첨가된 균사를 멸균된 삼각플라스크로 옮긴 뒤 30°C 수조에서 70 rpm 속도로 3시간 이상 진탕하였다. 필터의 구멍 크기가 0.2 µm가 되는 glass-wool filtration kit (Sigma)를 감압장치에 연결하고 진탕한 균사 혼합액을 통과시켜 분해되지 않은 균사와 세포 찌꺼기를 걸러 주었다. 필터를 빠져 나온 원형질체 용액을 4°C에서 9,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 원형질체를 침전시켰다. 상등액은 버리고 10 ml의 1 M STC 완충용액(1 M Sorbitol, 10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>)을 넣고 피펫을 이용하여 침전된 원형질체를 천천히 풀어주었다. 한 번 더 원심분리를 실시하고 침전된 원형질체를 700 µl의 STC 완충용액에 다시 현탁하였다. 현미경을 보면서 hemocytometer로 원형질체를

계수하여 ml당 1 × 10<sup>7</sup>개의 농도가 되도록 STC 완충용액 양을 조절하였다. 세포벽 분해효소로 Usukizyme을 처리한 후 시간별로 형성된 원형질체 상태와 수를 관찰한 결과 2시간 이하의 짧은 시간에서는 원형질체 수가 ml당 1 × 10<sup>3</sup>개 이하로 너무 적게 형성되고 4시간 이상 길게 반응시키면 세포가 파괴되어 찌꺼기들이 많아지고 원형질체의 안정성이 떨어지는 현상을 보여 3시간 반응이 적절하였다. 백색부후균의 세포벽을 분해하는 효소로 기존연구에서는 주로 Novozym 234와 Glucanex 200G를 사용하였다(Peng *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 2007). 그러나 겨울우산버섯에 Novozym 234와 Glucanex 200G를 처리했을 때 얻어지는 원형질체는 ml당 1 × 10<sup>3</sup>개 이하로 형질전환에 필요한 양의 원형질체를 확보하기 어려웠다.

구름버섯과 아교버섯 등에 사용했던 형질전환 벡터 pBARGPE는 항생제 phosphinothricin에 대한 저항성을 부여하는 *bar* 유전자를 가지고 있다(Yeo *et al.*, 2007; Kum *et al.*, 2011). 겨울우산버섯은 100 µg/ml 이상 높은 농도의 phosphinothricin에서도 균사가 성장하여 선택표지로 *bar* 유전자가 적합하지 않았다. 이를 대체할 수 있는 항생제로 hygromycin B를 농도별로 CKMM 고체배지에 첨가하여 균사 성장을 조사하였다. 항생제 hygromycin B를 10 µg/ml씩 증가 시켜 10개의 농도별 실험균을 만들어 25-28°C에서 30일간 겨울우산버섯의 배양 상태를 확인하여 적절한 항생제 농도를 조사하였다. Hygromycin B의 50 µg/ml 이상의 농도에서는 겨울우산버섯의 균사가 전혀 성장하지 못하여(Fig. 1) pBARGPE 벡터가 가지고 있는 *bar* 유전자를 제거하고 hygromycin B에 저항성을 부여하는 hygromycin B phosphotransferase (*hph*) 유전자를 삽입하여 겨울우산버섯 형질전환용 벡터(pHYgpt)를 제작하였다(Fig. 2).

회수된 원형질체 100 µl에 2 µl의 100 mM aurintricarboxylic acid (ATA, Sigma), 1 µl의 100 mM heparin(Sigma), 1 µl의 250 mM spermidine (Sigma), 그리고 10 µl의 pHYgpt (1 µg/µl)를 첨가하여 조심스럽게 혼합하였다. 얼음에 30분 동안 반응시키고 1 ml의 PEG 용액(40% polyethylene glycol 4000, 25 mM Tris-HCl,

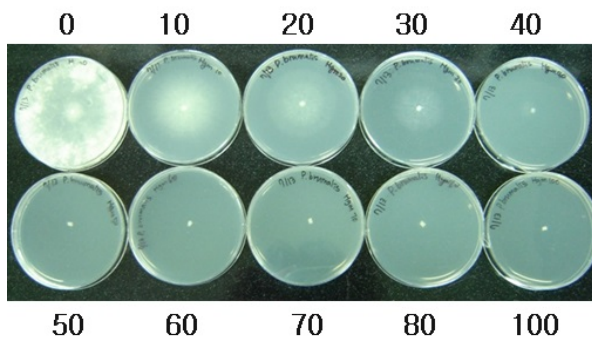


Fig. 1. Mycelium growth inhibition of *P. brumalis* by hygromycin B. Values were expressed the concentration of hygromycin B from 0 µg/ml to 100 µg/ml.

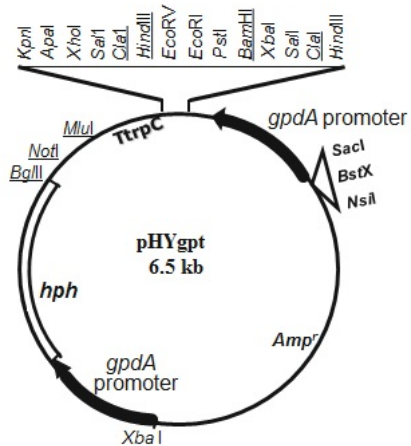


Fig. 2. Restriction map of the transforming plasmid pHYgpt. A hygromycin resistance gene is indicated as *hph*, which is under the control of the *gpdA* promoter (*gpdA*).

25 mM CaCl<sub>2</sub>)을 더하고 조심스럽게 혼합한 후 실온에서 20분간 다시 반응을 시켰다. 반응액에 1 M sorbitol이 첨가된 CKMM 배지 1 ml를 첨가한 후 25–28 °C에서 하룻밤 정치 배양하였다. 배양된 혼합액을 1 M sorbitol과 항생제(hygromycin B 50 µg/ml, ampicillin 50 µg/ml)가 첨가된 CKMM 상층배지(한천 0.8%)에 현탁시키고 CKMM 고체배지(한천 1.5%)에 도포하여 25 °C에서 배양하였다. 원형질체로부터 재생되어 자라는 균사를 형질전환체로 1차 선별하여 멸균된 칼로 0.5 cm<sup>2</sup> 이하로 잘라서 항생제 농도가 두 배(hygromycin B 100 µg/ml와 ampicillin 100 µg/ml)로 첨가된 CKMM 고체배지에 옮긴 후 다시 배양하며 정상적인 성장을 보이는 균사를 2차 선별하였다(Fig. 3).

도입한 벡터가 형질전환체의 염색체 DNA에 안정적으로 삽입되었는지 확인하기 위하여 형질전환체와 wild type의 DNA를 분리하여 PCR을 수행하였다. 각 균사를 액체질소로 얼려서 막자사발에서 마쇄한 다음 약 100 mg씩 1.5 ml 튜브에 담고 DNA 추출 완충용액(1 M Tris-HCl; pH 8, 5 M NaCl, 0.5 M EDTA; pH 8, 20% SDS)을 300 µl 첨가하여 진탕하였다. 상온에서 3000 rpm으로 10분 원심분리하여 상등액을 새 튜브로 옮기고 동일한 양의 phenol/chloroform을 첨가한 후 진탕으로 잘 섞이게 하여 다시 원심분리하고 상등액을 새 튜브로 옮겼다. 여기에 isopropanol을 처리하여 DNA를 침전시킨 후 70% ethanol로 씻어주었다. 마지막으로 30 µl의 증류수와 3 µl의 RNase (10 mg/ml)를 첨가하여 DNA를 녹였다. PCR 반응을 위해 1 µg의 DNA를 벡터에 존재하는 *hph* 유전자 부분에서 제작된 forward primer (ATGCC TGAAGTACCGC)와 reverse primer (CAAAGCATCTCATCG)로 Accupower PCR Premix (Bioneer)를 사용하여 PCR 반응하였다. 반응 조건은 1 step, 1 cycle; 94 °C, 2분, 2 step, 25 cycle; 94 °C, 30초; 60 °C, 30초; 72 °C, 30초, 3 step, 1 cycle; 72 °C, 5분으로 하였다. 겨울우산버섯의 wild type 균사에서는 PCR 산물이 없으며 항생제 배지에서 선별된 형질전환체의 균사에서는 pHYgpt 벡터의 플라스미드에서 얻어진 PCR 산물과 동일한 크기의 산물을 보여 균사의 염색체 내로 형질전환 벡터가 도입되었음을 확인하였다(Fig. 4).

최종 선별된 형질전환체는 벡터 1 µg 당 100–160개의 수율로 먹물버섯의 형질전환 수율(500–600개/µg DNA) 보다 낮으나 아

교버섯(15–25개/µg DNA)과 구름버섯(25–50개/µg DNA)의 형질전환 수율보다 높았다(Leem *et al.*, 1999; Yeo *et al.*, 2007; Kum *et al.*, 2011). 본 실험에서는 형질전환 수율을 높이기 위해 heparin과 ATA 그리고 spermidine을 첨가하였는데 heparin은 벡터의 도입이 원활하도록 원형질체가 응집되는 것을 방지하며, ATA는 외래 유전자를 분해시키는 nuclease의 저해제로 형질전환 과정에서 벡터 DNA가 분해되는 것을 막을 수 있으며, 양이온을 띠는 spermidine은 음이온을 갖는 벡터 DNA를 원형질체 표면으로 붙여주기 때문에 벡터가 세포 내로 삽입되는 효율을 높이는 것으로 알려져 있다(Hallick *et al.*, 1977; Dickman 1988; Li *et al.*, 2006). Li 등(2006)은 느타리버섯의 형질전환에서 이러한 시약을 첨가하여 기존의 방법보다 40배 이상 형질전환 효율을 높여 80–180개/µg DNA의 수율을 얻었는데 겨울우산버섯은 이와 유사한 수율이다.

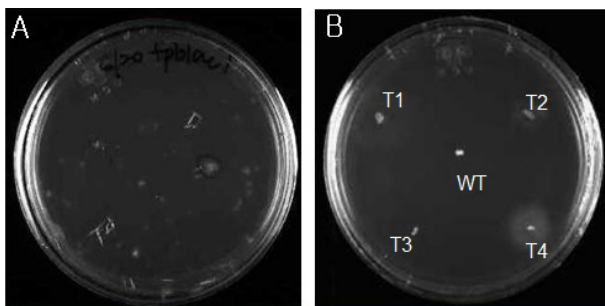
본 연구에서 확립된 겨울우산버섯의 원형질체 분리 조건과 형질전환 방법은 *Polyporus* 속에 포함되는 다른 종에도 적용할 수 있을 것이며 이러한 형질전환 방법은 특정 유전자의 기능 연구와 난분해성 유해물질로 오염된 환경을 정화 할 수 있는 새로운 균주 개발에 유용 할 것으로 사료된다.

## 적요

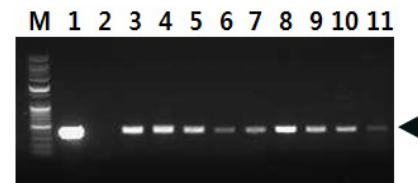
본 연구에서는 백색부후균인 겨울우산버섯의 원형질체 분리 조건과 유전자 형질전환 방법을 확립하였다. 겨울우산버섯 균사에 세포벽 분해효소로 0.5% Usukizyme을 처리하여 ml당 1 × 10<sup>7</sup>개의 원형질체를 확보할 수 있었다. 형질전환체의 선별을 위해 hygromycin에 대한 저항성을 갖는 유전자(*hph*)를 선택표지로 이용하여 형질전환용 벡터(pHYgpt)를 제작하였다. 40% polyethylene glycol 용액과 aurintricarboxylic acid와 heparin, spermidine을 첨가하여 형질전환을 수행 한 결과 벡터 1 µg 당 100–160개의 수율로 형질전환체를 얻었다. 도입된 벡터는 *hph* 유전자의 PCR 증폭을 통해 형질전환체의 염색체내에 삽입되었음을 확인하였다. 이러한 결과는 *polyporus* 속의 유전자를 활용한 새로운 균주 개발에 유용한 기술이 될 것이다.

## 감사의 말

본 연구는 국립산림과학원 연구과제(FP0600-2013-01)에 의해 수행되었음.



**Fig. 3.** Selection of transformants generated with pHYgpt. The 1<sup>st</sup> selection medium contains 50 µg/ml hygromycin B (A) and the 2<sup>nd</sup> selection medium contains 100 µg/ml hygromycin B (B). WT, wild type strain; T1–T4, represent the transformants.



**Fig. 4.** Confirmation of genomic integration of the vector into the host chromosomal DNA by PCR in the wild type and transformants of *P. brumalis* (M, molecular weight maker; 1, vector plasmid; 2, wild-type strain; 3–11, transformant).

## References

- Barr, D.P. and Aust, S.D.** 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol.* **28**, 78-87.
- Becker, H.G. and Sinitsyn, A.P.** 1993. Mn-peroxidase from *Pleurotus ostreatus*: the action on the lignin. *Biotechnol. Lett.* **15**, 289-294.
- Dickman, M.B.** 1988. Whole cell transformation of the alfalfa fungal pathogen *Colletorichum trifolii*. *Curr. Genet.* **14**, 241-246.
- Hallick, R.B., Chelm, B.K., Gray, P.W., and Orozco, E.M. Jr.** 1977. Use of aurintricarboxylic acid as an inhibitor of nucleases during nucleic acid isolation. *Nucleic Acids Res.* **4**, 3055-3064.
- Hatakka, A.** 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**, 125-135.
- Hwang, S.S., Choi, H.T., and Song, H.G.** 2008. Biodegradation of endocrine-disrupting phthalates by *Pleurotus ostreatus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 767-772.
- Kim, Y.J., Kim, M., Song, H.G., and Choi, H.T.** 2007. Genetic transformation of *Irpex lacteus* and *Phlebia tremellosa* to an antibiotic resistance. *Kor. J. Microbiol.* **43**, 147-149.
- Kum, H., Lee, S., Ryu, S., and Choi, H.T.** 2011. Degradation of endocrine disrupting chemicals by genetic transformants with two lignin degrading enzymes in *Phlebia tremellosa*. *J. Microbiol.* **49**, 824-827.
- Lee, S.M., Lee, J.W., Koo, B.W., Kim, M.K., Choi, D.H., and Choi, I.G.** 2007. Dibutyl phthalate biodegradation by the white rot fungus, *Polyporus brumalis*. *Biotechnol. Bioeng.* **97**, 1516-1522.
- Leem, Y., Kim, S.J., Ross, I.K., and Choi, H.T.** 1999. Transformation and laccase mutant isolation in *Coprinus congregatus* by restriction enzyme-mediated integration. *FEMS Microbiol. Lett.* **172**, 35-40.
- Li, G., Li, R., Liu, Q., Wang, Q., Chen, M., and Li, B.** 2006. A highly efficient polyethylene glycol-mediated transformation method for mushrooms. *FEMS Microbiol. Lett.* **256**, 203-208.
- Pasti-Grigsby, M.B., Paszczynski, A., Goszczynski, S., Crawford, D.L., and Crawford, R.L.** 1992. Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3605-3613.
- Peng, M., Singh, N.K., and Lemke, P.A.** 1992. Recovery of recombinant plasmids from *Pleurotus ostreatus* transformants. *Curr. Genet.* **22**, 53-59.
- Pointing, S.B.** 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 20-33.
- Ryu, S.H., Lee, A.Y., and Kim, M.** 2008. Molecular characteristics of two laccase from the basidiomycete fungus *Polyporus brumalis*. *J. Microbiol.* **46**, 62-69.
- Shin, E.H., Choi, H.T., and Song, H.G.** 2007. Biodegradation of endocrine-disrupting bisphenol A by white rot fungus *Irpex lacteus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 1147-1151.
- Yeo, S., Park, N., Song, H.G., and Choi, H.T.** 2007. Generation of a transformant showing higher manganese peroxidase (MnP) activity by overexpression of MnP gene in *Trametes versicolor*. *J. Microbiol.* **45**, 213-218.