

## 사상진균 *Aspergillus oryzae*에서의 형질전환 방법 개선

중앙대학교 산업대학 생명공학과

이재원 · 윤찬도 · 함영태

=Abstract=

### Improvement of Transformation System in Filamentous Fungus *Aspergillus oryzae*

Jae Won Lee, Chan Do Yun and Young Tae Hahn

Departments of Biotechnology, Chung-Ang University, Ahn-Sung, Korea

*Aspergillus oryzae* is a filamentous fungus classified in the group *Aspergillaceae* *Ascomycetes*. *A. oryzae* is an important microorganism for industrial production of enzymes and fermented food products. It secretes large quantities of proteins or enzymes into the culture medium which makes this organism appealing for the production of heterologous proteins. Recently Electric field-mediated transformation method, electroporation, has been applied to fungal transformation. It is fast, simple to handle, and avoids the use of some chemicals. The optimum conditions for *A. oryzae* were determined with pILJ-16 and  $\sim 0.2 \times 10^5$  protoplast cell at various field strength. The survived population of protoplasts in the electric field were  $\sim 80\%$  of nonprotoplast cell population at 1.3 KV/cm to  $\sim 50\%$  at 6.3 KV/cm. The electrotransformation efficiency, expressed as transformants/ $\mu$ g of input DNA/population of protoplast cells, increased with the increment of the field strength up to 6.3 KV/cm. The highest value, 14.35%, was obtained at 6.3 KV/cm and 1540 $\Omega$ . Some antibiotics for the dominant selectable makers were applied to *A. oryzae* and *Tolypocladium inflatum*. Whereas phleomycin was very effective on *T. inflatum*, hygromycin B and phleomycin were not effective on *A. oryzae*. Protoplasts were obtained with hemicellulase and celluclast, instead of novozyme234. More than  $10^4$  transformants/ $\mu$ g of DNA with hemicellulase-treated protoplasts were obtained by using electroporation at the condition of 2,500 voltage, 1,540 ohm and 0.50 capacitance. Less than  $10^2$  transformants/ $\mu$ g of DNA were obtained with Novozyme234- and celluclast-treated protoplasts. [Kor J Med Mycol 6(1): 1-8]

**Key Words:** Transformation, *Aspergillus oryzae*, Electroporation, Hemicellulase, Phleomycin

### 서 론

*Aspergillus oryzae*는 산업적으로 효소 생산에 이용

되어 왔으며, 특히 동양에서는 대두를 주원료로 하는 발효 식품의 제조에 쓰여 왔기에, 식품이나 의약계에 쓰여 질 수 있는 반제품 또는 완제품의 유전공학적 생산에 이용할 수 있는 미생물이다. 특히 유전공학적 측면에서 보았을 때, *A. oryzae*는 자연적으로 많은 양의 효소들을 체외로 배출시키는 secretory machinery가 잘 발달되어 있다. 즉, *A. oryzae*에서 산업적으로 효용 가치가 높은 이종 단백질을 발현시킬 경우, 생산되는 단백질을 유전자 조작에 의하여 쉽게 세포 밖으로 배출시킬 수 있다. 이렇듯 발현 단백질의 세포외 배출은 미

†별책 요청 저자: 함영태, 456-756 경기도 안성시 대덕면 내지 산 40-1, 중앙대학교 산업대학 생명공학과  
전화: 031-670-3064, E mail: ythahm@cau.ac.kr

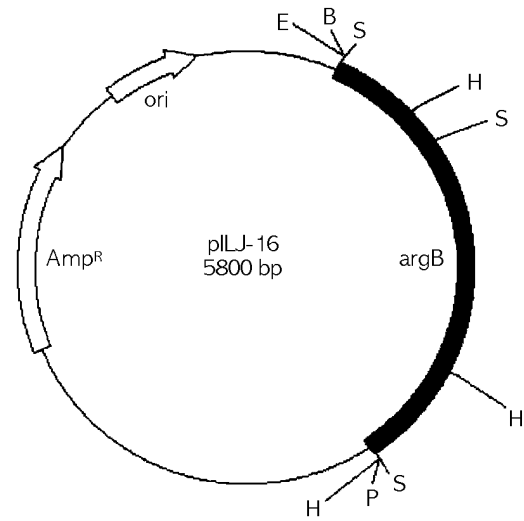
\*본 논문의 요지는 2000년 6월 17일 대한의진균학회 제7차 학술대회에서 발표되었음.

\*본 연구결과의 일부는 2000년도 중앙대학교 교내 연구비로 수행되었음.

생물을 이용한 유전공학적 이종 단백질의 생산에서 흔히 보여지는 문제점들을 해결할 수 있다. 이종 단백질의 생산시 많은 경우 세포 내에서 발현된 이종 단백질이 세포내 단백질 분해효소에 의하여 분해되어 지는 것을 볼 수 있는데 체외 배출시에는 생산 단백질을 체내 단백질 분해효소로부터 보호할 수 있다. 이와는 반대로 이종 단백질이 미생물의 체내에 축적될 때 세포 자체의 대사작용 등을 방해하여 세포의 생장을 저해하고 나아가서는 세포를 용해시켜 이종 단백질의 대량 생산이 불가능하여 지는 경우도 있다. 또한 일부 *Aspergillus* 종에서는 aflatoxin을 생산하여 동물은 물론 사람에게까지 피해를 입히는 사례가 발생하고 있으나, 독소 발현에 대한 molecular level에서의 연구는 미진한 실정에 있다.

이와 같은 특성을 지닌 *A. oryzae*의 유전공학적 응용 및 분자생물학적 연구를 위해서는 우선 높은 효율의 형질전환 방법이 개발되어야 한다. 일반적으로 곰팡이에서는 형질전환의 효율이 대단히 낮다. 최근에 들어 오면서 효율이 높은 발현 vector들의 개발과 전기장을 이용한 electroporation 방법들이 개발, 적용되고 있다. 최근 그 응용의 폭을 넓혀가고 있는 electric field-mediated transformation method, 즉 electroporation이 개발되기 전까지는 미생물에서는 PEG/CaCl<sub>2</sub> method, 동식물의 세포에서는 calcium phosphate/DNA coprecipitation 방법이 주로 이용되었다. 그러나 이 방법들은 다른 미생물과 fibroblasts<sup>1</sup> 등에서는 그 효율이 높지만, 일부 미생물과 세포에서는 그 적용의 범위가 제한되고 있다. 이에 반해 전기적 충격을 이용하는 electroporation은 어떤 유형의 세포를 막론하고 그 응용의 폭을 넓히고 있다. Electric Field-mediated transformation은 cell membrane에 순간적으로 high voltage electric field를 걸어주면 세포막에 pore를 형성하여 고분자 물질인 DNA의 세포막 통과가 용이하여 진다. 이렇게 형성된 pore는 0℃에서 자연적으로 다시 원상태의 세포막 구조를 형성한다. 이 방법은 그 조작이 간단하고 빠르며, 다양한 세포 즉, 예전의 방법으로는 다루기 힘든 미생물과 lymphocytes, neuronal cells, endocrine cells, primary animal cells, hepatoma cells, hematopoietic stem cells 그리고 plant protoplasts에 적용되고 있다.<sup>2-3</sup>

따라서 본 연구에서는 곰팡이에서의 형질전환 효율



**Fig. 1.** The restriction map of plLJ16. Abbreviations: E, *EcoRI*; B, *BamHI*; S, *Sall*; H, *HindIII*; P, *PstI*; ori, *E. coli* origin; Amp<sup>R</sup>, *E. coli* beta-lactamase gene; argB, *A. nidulans* ornithine carbamoyl transferase gene. Symbols; —, pUC8 DNA; —, *A. nidulans* argB gene. (Modified from Johnstone *et al.*, 1985)

을 높이기 위하여 기존의 형질전환 방법인 CaCl<sub>2</sub>/PEG 방법을 electroporation으로 대체하여 그 최적화 조건을 확립하고, dominant selectable marker를 선별하고자 항생제에 대한 저항성을 분석하였다. 또한 종전에는 원형질체가 많이 생성될수록 형질전환 효율도 좋을 것이라고 생각하였으나, 본 실험에서는 원형질체는 형질전환 단계에서 용해가 일어나 오히려 형질전환 효율이 낮아질 수 있다는 가정 하에 DNA가 들어갈 수 있을 정도의 손상만을 주는 대체효소를 찾아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

Microorganism, media and plasmid

본 연구에서는 *Aspergillus oryzae* YTH-1 strain과 *Tolypocladium inflatum* NRRL 8044 strain을 사용하였다. Strain stock은 30% 글리세린 용액에 넣어 -70℃에 보관하며, spore stock은 4℃에 보관하였다. Plasmid는 plLJ-16 (*argB* gene)을 사용하였다 (Fig. 1).

배지로는 *A. oryzae* 배양은 complex media로는 YPD medium (2% peptone, 2% glucose, 1% yeast extract)을

사용하였으며, minimal medium으로는 Czapek-Dox broth (3% Bacto-saccharose, 0.3% NaNO<sub>3</sub>, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05% KCl, 0.001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)를 사용하였다. *T. inflatum* 배양은 complex media로는 modified YPD medium (2% peptone, 2% glucose, 1% yeast extract, 0.5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.25% KCl)을 사용하였으며, minimal medium은 MSH medium (3% glucose, 0.075% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5% NaNO<sub>3</sub>, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05% KCl, 0.001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)를 사용하였다. Protoplast를 위한 배지에는 osmotic stabilizer로 1 M sucrose를 사용하였다. 시약들은 분석급으로 Sigma Co. 등에서 구입하여 사용하였다.

#### Antibiotics

항생물질 hygromycin B와 phleomycin을 Sigma Co.에서 구입하여 10 mg/ml stock solution을 만들어 0.45 µm membrane filter로 살균한 후, -20℃에 보관하며 사용하였다. 배양액에 첨가는 실험 농도별 (5~200 µg of antibiotic/ml of media)로 배양액을 petri dish에 넣기 직전 혼합하여 사용하였다.

#### Preparation of spore stock

Single colony의 *A. oryzae* YTH-1을 20 ml의 YPD agar 배지에 접종시킨 뒤, 30℃에서 7일간 배양하고 포자가 형성되면 5 ml의 dH<sub>2</sub>O를 넣고 각각 긁어내었다. 이 포자 용액을 cheesecloth로 여과시킨 후 8,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. Spore pellet을 20 ml의 dH<sub>2</sub>O를 이용 vortex한 후 8,000 rpm에서 15분간 원심분리하는 절차를 두 번 반복하였다. 수거한 포자는 10 ml의 1%의 Triton X-100 용액으로 원심분리하고, 3~5 ml의 같은 용액에 녹인 후 4℃에 보관하며 사용하였다.

#### Protoplast formation and isolation

10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup> spore를 200 mg/l D,L-arginine이 포함된 minimal media에 접종시킨 후, *A. oryzae*를 30℃에서 18시간 동안 180 rpm에서 aeration시키며 배양하였다. 발아된 mycelia를 9,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 수집하였다. 모은 pellet에 0.6 M MgSO<sub>4</sub>를 넣어 Vortex한 후 50 ml centrifuge tube에 옮겨 9,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하였다. 상등액을 버리고 osmotically

stabilized buffer 5 ml에 녹인 후, 효소 처리는 30℃, 100 rpm에서 2시간 동안 진탕 배양하였다. 대체효소 탐색에서는 기존의 novozyme234 (20 mg/g of mycelia)와 더불어 hemicellulase (50 mg/g of mycelia)와 celluclast (50 µl/g of mycelia)를 사용하여 비교하였다. Protoplast의 분리에는 ST buffer (0.6 M sorbitol, 100 mM Tris-Cl, pH 7.0)를 사용하였다. 수거한 protoplast에 2 X volume의 STE buffer (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA)를 넣고, 4℃, 9,000 rpm 10분간 원심분리를 하였으며, 상등액을 버리고 STC buffer 2 ml를 넣고 녹였다.

#### Transformation with Electroporation

*A. oryzae* protoplast를 STC buffer (1.2 M sorbitol, 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>)로 녹여 electroporator (EasyjecT PLUS, USA)를 이용하여 형질전환을 시켰다. 2500 V부터 500 단위로 500 V까지 적용하였다. Cuvette에 각각 4 µg의 DNA (pILJ-16)를 넣고, 20분 동안 ice에서 배양하였다. 리모콘을 사용하여 저항과 전기장별로 전기 충격을 가한 후 20분 동안 ice에서 배양하였다. Eppendorf tube에 YGS media (0.5% yeast extract, 2% D-glucose, 1.2 M sorbitol)를 800 µl를 넣고, 전기 충격을 가한 protoplast를 옮겼다 (희석 비율이 1/5). 30℃, 180 rpm, 2 hrs, Shaking하고 나서, 새로운 Eppendorf tube에 STC buffer (1.2 M sorbitol, 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>) 900 µl와 Sample (viability cuvette, transformant cuvette) 100 µl을 넣었다 (희석 비율이 1/50). Transformant cuvette 5개는 MMS agar media에 viability cuvette 5개는 YPD agar media에, 그리고 protoplast의 충수를 알기 위해 control로 전기 충격을 가하지 않은 protoplast를 YPD agar media에 각각 100 µl spreading하였다 (희석 비율이 1/500). 그 후 10일 동안 30℃ 배양하여 분석하였다. Selectable marker 탐색과 대체효소 실험에서는 2,500 voltage, 1,540 ohm, 0.50 capacitance에서 실시하였다.

#### Isolation of Chromosomal DNA

*A. oryzae*에서의 chromosomal DNA는 Davis 등<sup>4</sup>의 방법을 수정함으로써 사용하였다. Random primer와 <sup>32</sup>P-alpha-dATP를 이용한 probe DNA<sup>5</sup>를 사용하여 dot blot hybridization을 실시하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 형질전환의 효율을 높이기 위하여 기존의 형질전환 방법인 CaCl<sub>2</sub>/PEG 방법을 electroporation으로 대체하여 그 조건의 최적화를 확립하였고, dominant selectable marker의 사용을 위한 원형질체의 항생제 저항성 연구, 그리고 원형질체는 형질전환 단계에서 용해가 일어나 오히려 형질전환 효율이 낮아질 수 있다는 가정 하에 DNA가 들어갈 수 있을 정도의 최소의 손상만을 줄 수 있는 대체효소를 찾아보고자 곰팡이 형질전환에 주로 사용하였던 novozyme234 대신 hemicellulase와 cellulast (cellulase의 상품명)를 사용하여 형질전환 효율을 비교 분석하였다.

Optimal Electroporation Condition

미생물의 형질전환 방법은 분자생물학이나 유전공학 분야에서 중요한 기술이다. *E. coli*나 *B. subtilis*에서의 CaCl<sub>2</sub>/PEG (polyethylene glycol) 방법은 세포의 competence를 증가시키는 방법으로 발전되어 왔다<sup>6</sup>. 동물 세포에서는 calcium phosphate/DNA coprecipitation 방법을 주로 이용하여 왔으나, 이 방법은 fibroblasts 등에서는 그 효율이 높지만, 다른 유형의 세포에서는 적용하기에 어려움이 있었다<sup>7</sup>. 최근에 들어오면서 유전자의 형질전환은 electricfield-mediated transformation method (electroporation)의 개발로 미생물은 물론 동식물 세포에서도 그 응용의 폭을 넓히고 있다<sup>1-3</sup>. El-

ectroporation은 전기장을 이용하여 세포 내로 유전물질, 즉 DNA를 도입시키는 형질전환 방법으로서 분자생물학적 연구에 매우 중요하다. 살아 있는 세포에 high-strength electric field를 걸어 줌으로써 순간적으로 세포막의 구조를 변화시켜 pores를 형성한다. 그리고 형성된 pores를 통하여 세포내 물질과 외부물질의 확산 또는 교환이 이루어진다. 그러나 세포마다 그 세포막을 구성하는 물질이 다르므로 같은 형질전환 조건 하에서는 그 효율의 차이를 보인다<sup>8</sup>. Electroporation에 의한 형질전환의 가장 큰 장점은 그 방법이 신속하고 간단하며, 기존의 PEG-mediated transformation보다 세포의 재생력이 높다는데 장점이 있다. 이것은 종전의 방법과 가장 중요한 차이점으로 transformants의 안정성은 high-voltage electroporation에 의하여 repair system이 활성화되었다고 설명하고 있다<sup>9</sup>.

따라서 본 실험에서는 electroporation의 최적 조건에 미치는 여러 조건들<sup>1-3,9-11</sup> 중에서 electrical parameter를 조절하여 형질전환 효율을 높이고자 하였다. 700Ω에서의 형질전환 효율과 protoplast의 생존율 분석에서는 protoplast의 농도를 0.2×10<sup>5</sup>로, 전기 저항을 700Ω으로 고정하고 0.5 μF에서 voltage를 다르게 조정하여 효율을 분석해본 결과, 전기장이 1.3 KV/cm에서 6.3 KV/cm까지 증가할수록 형질전환 효율은 0.0684에서 0.1295로 점점 더 증가하며, 원형질체의 생존율은 전기장이 1.3 KV/cm일 때 71%이고, 6.3 KV/cm에서는 50%로 전기장이 증가할수록 약간씩 낮아졌다 (Fig. 2-A). Electrotransformation efficiency is transformants/μg of

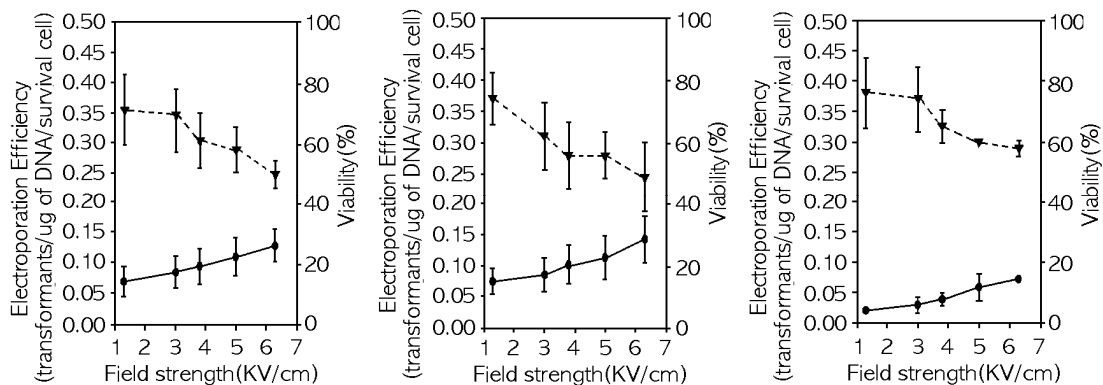


Fig. 2. Effect of the field strength on the electroporation efficiency and the survival rate of *A. oryzae* (A) at 700Ω (B) at 1,540Ω (C) 2,310Ω, —●— Electrotransformation efficiency, —▼— viability

**Table 1.** Protoplast population of *A. oryzae* YTH-1 and *T. inflatum* NRRL8044. The germinated spores ( $\sim 10^8$  conidia) were treated with lysing enzymes and  $\beta$ -glucuronidase at 37°C for 90 min

Strain	Media	Protoplast population (cells/ml)
<i>A. oryzae</i> YTH-1	Minimal media	$4.3\sim 4.6 \times 10^4$
	Complex media	$4.8 \times 10^4$
<i>T. inflatum</i> NRRL8044	Minimal media	$1.8\sim 2.5 \times 10^2$

input DNA /number of survival cell로 정했다. 1540Ω에서의 형질전환 효율과 원형질체의 생존율에서는 1.3 KV/cm에서 3.8 KV/cm까지 증가할수록 형질전환 효율은 0.0744부터 0.1136로 거의 평형을 유지하다가, 5 KV/cm와 6.3 KV/cm사이에서는 0.136에서 0.1435로 아주 급격히 높아졌다. 즉, 최적 형질전환 효율의 전기장 조건은 6.3 KV/cm에서 었다. 원형질체의 생존율은 전기장이 1.3 KV/cm에서 5.0 KV/cm까지는 74%에서 56%로 완만히 떨어지다가 6.3 KV/cm로 증가했을 때 49%로 나타났다 (Fig. 2-B). 2310Ω에서는 전기장이 1.3 KV/cm에서 6.3 KV/cm까지 증가할수록, 형질전환 효율은 0.0201에서 0.072로 기울기가 완만히 증가하는 경향을 보였다. 원형질체의 생존율을 보면, 1.3 KV/cm인 76%에서 6.3 KV/cm인 58%를 보였다 (Fig. 2-C). 본 실험 결과, *A. oryzae*에서의 최적 형질전환 조건은 2,500 voltage, 1,540 ohm, 0.50 capacitance였다.

Studies on antibiotic-resistancy of fungal protoplasts

*Aspergillus*에서는 여러 종류의 selectable marker들을 분리하여 사용하고 있다. *S. cerevisiae*에서 분리한 *ura3*<sup>12</sup>나 *pyrG*<sup>13</sup> gene은 *A. nidulans*의 mutant에서는 서로 상호 보완되지 않아 selectable marker로 사용하지 못한다. 그러나 *N. crassa*에서 분리한 *pyrG* gene은 *A. nidulans*에 상호 보완의 효과가 있어 쓰여지고 있으며<sup>14</sup>, 이 gene을 이용하여 많은 vector들이 만들어졌다. 그 외에도 nutritional selectable marker로 *A. nidulans*에서 분리해 낸 *trpC* gene<sup>15</sup>과 *argB* gene 등이 *A. nidulans*<sup>16</sup>, *A. oryzae*<sup>17</sup>, *A. niger*<sup>18</sup>의 transformation에 쓰여지고 있고 *A. niger*에서 분리해 낸 *pyrG* gene<sup>19</sup>이 그 auxotroph인 strain의 형질전환에 사용되고 있으며 *A. oryzae*에서도 사용되었다<sup>20</sup>. 하지만 이러한 nutritional selectable marker의 사용에는 그 유전자에 보완되는

mutant host cell이 필요로 한다. 따라서 본 연구에서는 *A. oryzae*와 *Tolypocladium inflatum*의 wild-type host에 직접 사용 가능한 dominant selectable marker를 찾고자 항생제에 대한 원형질체의 저항성을 비교 분석하였다.

Bleomycin 또는 phleomycin resistancy를 가지는 *E. coli* Tn5의 *ble* gene과 hygromycin B에 대한 저항성을 나타내는 *E. coli hph* gene의 사용 가능성을 분석하고자 항생물질 phleomycin과 hygromycin B를 선택, selectable condition을 찾고자 농도별 (5 µg~200 µg of antibiotic/ml of media)로 원형질체의 저항성을 비교 분석하였다. Lysing enzyme과  $\beta$ -glucuronidase를 germinated spore ( $\sim 10^8$ )에 처리하여 *A. oryzae*에서는  $4.3\sim 4.8 \times 10^4$  protoplast를 얻은 반면, *T. inflatum*에서는  $1.8\sim 2.5 \times 10^2$ 의 protoplast를 얻었다 (Table 1). *A. oryzae*의 hygromycin B 저항성을 농도 5 µg~200 µg of antibiotic/ml of media에서 조사한 결과, hygromycin 200 µg에서도 강한 저항성을 보여 주었고 (Table 2), *T. inflatum*에서는 항생물질 농도 25 µg/ml에서 60%의 세포수 감소를 보이며, 75 µg/ml에서는 90% 이상의 세포수 감소를 보여 주었다 (Table 2). Phleomycin 저항성에 대한 실험에서는 *A. oryzae*에서 phleomycin 50 µg/ml of media에서 50% 정도의 저항성을 보여 주고 있으며, 200 µg/ml 농도에서는 85% 정도의 세포수 감소가 관찰되었고 (Table 2), *T. inflatum*에서는 phleomycin 농도 5 µg/ml에서도 강한 성장 억제효과가 나타나는 것을 보여 주었다 (Table 2). 결과적으로 *A. oryzae*에서는 hygromycin B (up to 200 µg/ml of media)나 phleomycin (up to 50 µg/ml of media)에 대한 저항성 유전자를 selectable marker로 사용하기 힘든 반면 *T. inflatum*에서는 phleomycin resistant gene인 *ble* gene을 dominant selectable marker로서 사용할 수 있는 가능성을 보여 주었다.

**Table 2.** Survival of protoplasts of *A. oryzae* and *T. inflatum* with hygromycin and phleomycin

Div	<i>A. oryzae</i> YTH-1			<i>T. inflatum</i>			
	Antibiotic	Conc <sup>1</sup>	1	2	Conc <sup>1</sup>	1	2
Hygromycin B		0	100.0	100.0	0	100.0	100.0
		50	100.0	99.5	25	39.7	45.1
		100	96.8	99.8	50	23.8	26.5
		200	98.5	97.4	75	13.2	16.0
Phleomycin		0	100.0	100.0	0	100.0	100.0
		50	40.4	40.6	5	0.0	0.0
		100	33.3	52.8	10	0.0	0.0
		200	11.6	15.3	20	0.0	0.0

<sup>1</sup>µg/ml of culture media

**Table 3.** Transformation efficiency with various enzymes for protoplast preparation

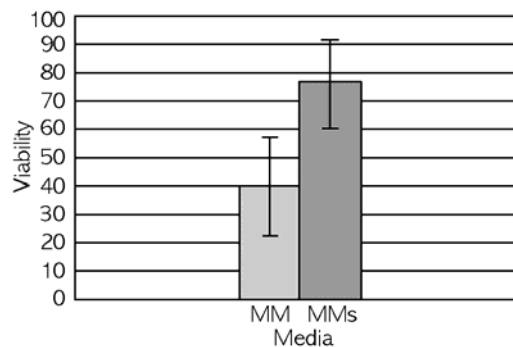
Enzyme	Culturing Time (hrs)	Transformation efficiency <sup>1</sup>
Novozyme234	10	4.3×10 <sup>2</sup>
Hemicellulase	10	8.3×10 <sup>3</sup>
	8	1.4×10 <sup>4</sup>
Celluclast	10	4.3×10 <sup>2</sup>
	8	1.0×10 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Transformation efficiency = transformants/µg of input DNA

형질전환 효율의 증대를 위한 대체효소의 탐색

Fungal protoplast를 만들 때 여러 종류의 효소들을 사용할 수 있는데 그 예로 helicase 또는 glucanase<sup>21</sup>과 zymolyase<sup>22</sup> 등이 있다. 현재 *Aspergillus*의 protoplast 제조에 가장 보편적으로 사용하는 효소는 fungus *Trichoderma viride*에서 추출한 Novozyme234<sup>23</sup>이다. 이 효소는 가수분해성 효소들의 집합체로 주로 β-1,3-glycanases와 chitinase를 포함하고 있다. 또한 protoplast 제조시 한가지 이상의 효소를 섞어 쓰는 경우도 많다. Yelton 등<sup>15</sup>은 *A. nidulans*의 protoplast 제조시 novozyme234와 β-glucuronidase (type H2S; Sigma)를 섞어 썼으며, Binninger 등 (1987)은 *Coprinus cinereus*에 cellulase와 chitinase를 같이 사용하였다.

일반적으로 곰팡이의 형질전환에서는 세포벽 때문



**Fig. 3.** Cell viability on minimal media (MM) and MMS media after electroporation

에 DNA가 들어가지 못해 형질전환 효율이 낮다고 생각하여 세포벽을 제거시킬 수 있는 효소를 사용하여 왔으며, 주로 사용하는 효소가 novozyme234와 곰팡이의 세포벽을 이루는 주성분인 chitin을 분해하는 chitinase이다. 이러한 효소의 선택에서는 protoplast 형성 효율이 좋을수록 형질전환 효율도 높을 것이라고 생각하는데 기인하고 있으나, 본 실험에서는 세포벽이 대부분 제거된 protoplast가 생성되면 실험 단계에서 원형질체의 용해 가능성이 커져 오히려 형질전환 효율이 낮아질 것이라는 가정 하에 DNA가 들어갈 수 있는 최소의 손상만을 주는 효소를 찾고자, 그 대체효소로 hemicellulase와 celluclast를 사용하여 형질전환 효율을 Novozyme234와 비교 분석하였다. Hemicellulase는 식물 세포의 세포벽을 구성하고 있는 hemicel-

lulose를 분해하며 cellulase의 상품명인 celluclast는 endo-, exo- $\beta$ -1,4-glucanase의 activity를 가지고 곰팡이의 세포벽을 분해하는 작용을 한다. Novozyme234를 기준으로 hemicellulase와 celluclast의 형질전환 효율을 분석한 결과, 배양시간이 10시간일 때 hemicellulase에서는  $8.3 \times 10^3$ , Novozyme234에서는  $4.3 \times 10^2$ 의 transformant를 얻었다. 반면 celluclast를 이용한 실험에서는 Novozyme234와 별 차이가 없었다. 또한 배양시간을 8시간으로 단축시켰을 때 hemicellulase 사용시  $1.4 \times 10^4$ 의 형질전환체를 얻었다 (Table 3). Hemicellulase에서의 높은 형질전환 효율은 protoplast의 회복에 기인하는 것으로 이는 형질전환 효율이 protoplast 제조 효율과는 다르다는 것을 시사한다. 즉 protoplast는 형질전환 실험 시 용해되기 쉬운 결점을 가지므로 높은 protoplast 생성이 높은 형질전환 효율과는 비례되지 않는다. Hemicellulase의 사용시 높은 형질전환 효율을 보이는 것은 protoplast의 생성보다는 DNA를 받아들일 수 있는 최소의 세포벽 손상으로, 이는 완전한 protoplast보다 용해의 가능성이 적으며, 높은 회복률을 보이는 것으로 사료된다. 또한 배양시간을 단축할수록 electroporation을 이용하여 형질전환을 하였을 때 더 좋은 형질전환 효율을 보이는 것을 확인하였다.

Transformants의 선별 시 일부 transformant는 처음에는 아주 천천히 자라 올라오다가 커다란 sector들을 형성하는 것들이 있다. 이러한 transformant들을 'abortive'라 부르며, 형질전환된 plasmid가 chromosomal DNA에 들어가지 않고 일시적으로 발현되었다가 mitotic 성장 중에 불활성 된다고 생각되어 진다. 이런 'abortive' transformant 중 극히 일부에서는 plasmid가 chromosomal DNA에 들어가 정상적인 성장을 하는 것도 있다. 따라서 본 실험에서 얻어진 transformant들을 MMS 배지에서 'abortive' transformant의 유무를 확인한 결과, 임의 추출한 100여 개의 시료에서 10% 이내로 나타났다. 또 transformant들로부터 chromosomal DNA를 추출하여 형질전환에 사용한 plasmid pILJ-16을 positive control로 dot blot hybridization을 통해 확인한 결과, *A. oryzae* YTH-1 (*argB*<sup>-</sup> mutant)에서는 음성 반응을 보인 반면, hemicellulase로 처리하여 형질전환시킨 transformants의 chromosomal DNA에서는 양성 반응을 보임으로서 형질전환을 확인할 수 있었다 (data not shown).

## Recovery

Electroporation 후 세포의 생존율은 osmotic stabilizer가 포함되어 있는 MMS 배지와 minimal media에서 비교 분석한 결과, osmotic stabilizer가 첨가되어 있는 MMS 배지에서는 70~80% 정도의 생존율을 보인 반면, minimal media에서는 40~50% 정도의 생존율을 보여 osmotic stabilizer 포함되어 있는 배지에서의 회복율이 높은 것으로 나타났다 (Fig. 3). 이는 효소 처리와 전기장 내에서 일부 손상된 세포가 osmotic stabilizer가 첨가된 배지에서 용해되지 않고 더 나은 회복율을 보이는 것으로 사료된다. 그러나 osmotic stabilizer가 함유되지 않은 minimal media에서도 생존율이 50%에 이르는 것으로 미루어 hemicellulase에 의한 세포벽의 손상이 novozyme234에 비하여 아주 적은 것으로 판단되었고 이렇듯 DNA를 받아들일 수 있으면서도 세포벽의 적은 손상은 형질전환 효율을 높일 수 있는 가능성을 보여 주었다.

## 참 고 문 헌

1. Goldman GH, Geremia R, Montagu MV, Herrera-Estrella A. Transformation of filamentous fungi by high voltage electroporation. *Bio-Rad* 1990; 1352
2. Potter H. Electroporation in biology: methods, applications, and instrumentation. *Anal Biochem* 1988; 174: 361-373
3. Simon JR, McEntee K. A rapid and efficient procedure for transformation of intact *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164: 1157-1164
4. Davis RW, Thomas M, Cameron J, et al. Rapid DNA isolation for enzymatic and hybridization analysis. *Methods Enzymol* 1989; 65: 404
5. Hodgson CP, Fisk RZ. Hybridization probe size control: optimized 'oligolabelling'. *Nucleic Acids Res* 1978; 15: 6295
6. Diver JM, Bryan LE, Sokol PA. Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Anal Biochem* 1990; 189: 75-79
7. Potter H. Application of electroporation in recom-

- binant DNA technology. *Methods Enzymol* 1993; 217: 461-478
8. Miller JF, Dower WJ, Tompkins LS. "high voltage electroporation of bacteria: genetic transformation of *C. jejuni* with plasmid DNA." *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 856-860
  9. Delorme E. Transformation of *S. cerevisiae* by Electroporation. *Appl Environ Microbiol* 1989; 55: 2242-2246
  10. Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 6127
  11. Luchansky JB, Muriana PM, Klaenhammer TR. Related Articles. Application of electroporation for transfer of plasmid DNA to *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Propionibacterium*. *Mol Microbiol* 1988; 2: 637
  12. Bach ML, Lactoute F, Botstein D. Evidence for transcriptional regulation of ornithine-5'-phosphate decarboxylase in yeast by hybridization of mRNA to the yeast structural gene cloned in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 386
  13. Palmer LM, Cove DJ. Pyrimidine biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. Isolation and preliminary characterization of auxotrophic mutants. *Mol Gen Genet* 1975; 138: 243
  14. Ballance DJ, Buxton FP, Turner G. Transformation of *Aspergillus nidulans* by the ornithine 5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 112: 284
  15. Yelton MM, Hamer JE, de Souza ER, Mullaney EJ, Timberlake WE. Developmental regulation of the *Aspergillus nidulans trpC* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 7576
  16. John MA, Peberdy J. Transformation of *Aspergillus nidulans* using the *argB* gene. *Enz Microbiol Technol* 1984; 6: 386
  17. Hahm YT, Batt CA. Genetic Transformation of an *argB* Mutant of *Aspergillus oryzae*. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54: 1610-1611
  18. Buxton FP, Radford A. The transformation of spheroplast of *Neurospora crassa* and the attempted isolation of autonomous replicator. *Mol Gen Genet* 1984; 196: 339
  19. van Hartingsveldt W, Mattern LE, Cora MJ, et al. Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the *pyrG* gene. *Mol Gen Genet* 1987; 206: 71
  20. Mattern IE, Unkles S, Kinghorn JR, Pouwels PH, van den hondel. CAMJJ. Transformation of *Aspergillus oryzae* using the *A. niger pyrG* gene. *Mol Gen Genet* 1987; 210: 460
  21. Beggs JD. Transformation of yeast by replication hybrid plasmid. *Nature* 1978; 275: 104
  22. Hasio CL, Carbon J. High frequency transformation of yeast by plasmids containing the cloned yeast *AGR4* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 3829
  23. Beach D, Nurse P. High-frequency transformation of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 1981; 290: 140