

북미자생 치마버섯의 Mating Locus의 염기서열

박동철* · 이상선¹ · 이인선² · 김현정² · 이갑량³

김천대학 식품가공과, ¹한국교원대학교 대학원 생물과학 및 생물교육학전공
²계명대학교 식품가공과, ³영남대학교 식품영양학과

Nucleotide Sequence of Mating Locus of *Schizophyllum commune* Indigenous to North America

Dong-Cheol Park*, Sang-Sun Lee¹, In-Seon Lee²,
Hyeun-Jeong Kim² and Kap-Rang Lee³

Department of Food Science & Technology, Kim-Cheon College, Kim-Cheon 740-200, Korea

¹Major in Biological Science and Education, Korea National University of Education,
Chung-Buk 363-791, Korea

²Department of Food Technology & Science, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

³Department of Food & Nutrition, Yeung-Nam University, Kyongsan 712-749, Korea

ABSTRACT: This study was carried out to compare DNA sequence of mating type locus concerning with direct formation of fruiting body in *Schizophyllum commune* which is growing in North America with that of same species growing in South America. The nucleotide sequence appeared to have about 96% homology to 1-71 A α 3 allele from South America strain, showing a conservative feature. The polypeptide sequence showed about 82% homology when compared partially with mating activity region of 1-71 A α 3 allele. In addition, this polypeptide sequence indicated 74% and 82% identity in homeodomain and acidic-rich regions known as a transcription factor respectively.

KEYWORD: *Schizophyllum*, mating locus, homology, homeodomain

발생과정의 조절에 관련된 유전자 연구에 적합한 담자균류중의 하나인 치마버섯(*Schizophyllum commune*)은 목재부후균 버섯으로서 2주내 생활주기가 끝난다. 발생중의 주요 과정에 대한 세포조직 및 유전적 연구로는 대부분 교잡을 통한 방법으로 실행되어 왔으며, 이핵체 형성에 관여하는 4종의 북대륙유전자 A α , A β , B α 및 B β 유전자좌는 독특한 2개의 서로 다른 경로에 의해 조절된다고 알려져 있다(Raper, 1985). *S. commune*의 화합성검사와 연관분석에서는 전체적인 유성생식 발달과정이 두 개의 배우자가 서로 다른 대립유전자의 'A' 및 'B'를 가져야 할 경우에만 전체의 완전한 주기가 진행된다. 그리고 'A' 경로의 작동은 A α 나 A β 어느 하나의 차이로도 일어나며, 'B' 경로 역시 B α 나 B β 중의 어느 하나만의 차이로 전체 경로가 진행된다(Stankis 등, 1990). Raper 등(1988)은 처음으로 'A' 및 'B' 교배유전자좌의 유전자 산물이 어떠한 기능을 가질것으로 보고하였으며, 재래적인 방식으로 4개 유전자좌 각각의 대립유전자들을 열거하여, 여러 가지 교배형 돌연변이 균주 획득에 성공하였다. 즉 어떤 돌연변이는 교배형 유전자좌에서 일어나는 반면에, 다른 것은 'A' 및 'B' loci에 의해 조절받을 것으로 예상되는 비연관유전자에서 돌연변이가 일어남을 보고하

였다. 이러한 초창기의 연구로부터 나온 교배형의 분류 및 분석연구는 근래에 와서 분자생물학적 방법들을 이용한 연구결과들이 많이 보고되고 있다(Ullich 등, 1980; Munoz-Rivas 등, 1986; Specht 등, 1988; Shen 등, 1990, 1996; 박 등, 1994; Yang 등, 1995). 'A' 및 'B' 교배형 유전자좌에 의한 조절 과정에서 반화합성 교배에서의 nuclear migration은 'B' loci에 의해 조절되고, nuclear pairing, 세포격벽 형성, hook cell 형성, conjugate nuclear division, hook cell septation은 'A' loci에 의해 조절받는 것으로 밝혀졌다(Koltin, 1967, 1970; Ullich, 1978). 물론 'A' 및 'B' loci가 다른 유전자들을 어떻게 조절하는가는 *S. commune*의 체계에 있어 가장 흥미로우면서도 규명하기 어려운것 중의 하나이다. 그리고 Wendland 등(1995)은 B α 1 교배 유전자좌내에 pheromone receptor 및 putative pheromone 유전자가 존재하여 교배유전자를 작동시킴을 보고하였다. 또한 Giasson 등(1989)은 2개의 A α 유전자좌 즉 A α 1, A α 4 교배 유전자좌의 염기서열을 밝힌 결과, A α 1의 ORF 2.8 kb 단편과 A α 4의 ORF 1.2 kb 간에는 낮은 상동성의 염기배열과 함께, A α 4의 1.2 kb가 모든 A α 활성을 가지지 않고, A α 유전자좌를 갖는 recipient strain에 의존한다는 연구 결과로, 이는 A α 유전자좌가 1개 이상의 polypeptide를 coding하고, 2개의 화합성 A α 균주간의 교배에서 A α polypeptide의 특정 set가 작

*Corresponding author

용하여 'A' 경로를 작동시킬 것으로 추정되고 있다. 이러한 사실은 A α 3 유전자좌의 염기서열을 A α 1과 A α 4와 비교함으로써 더욱 분명해지고 있다. Stankis등(1992)은 A α 3 교배 활성을 가지는 3.2 kb DNA 염기서열결정에서 A α 1 및 A α 4 ORF와의 높은 상동성의 관계를 보고하였다. 그리고 Spect 등(1992)은 이핵형포자가 2개의 서로 다른 'A' 대립형질만으로 'A' 경로를 작동시키기에 충분하다고 보고하였지만, 현재로서는 유전자산물이 교배과정에서 어떤 상호작용을 할 것이라는 것이 분명치 않으며, 다만 몇 가지 종에서 밝혀진 homeodomain의 polypeptide 배열, 즉 DNA binding 부위의 염기배열이 부분적으로 상동성을 가지고 있다. 그러나 이들 polypeptide의 기능에 있어 homeodomain의 중요한 기능은 아직 밝혀지지 않고 있으며, 흥미로운 사실중의 하나는 각 대립형질이 개체발생의 유도에 있어서 동일하게 작동된다는 점이다. 그러나 1 set의 교배형유전자좌를 가지는 담자균인 *Ustilago maydis*와는 달리, *S. commune*의 2 set 유전자좌 존재 이유는 아직 의문으로 남아있으며, A α 와 A β loci의 유전자산물 특성, 그리고 이들 산물이 어떤 target에 작용하는가는 더 연구되어야 할 과제로 남아있다. 따라서 본 실험에서는 치마버섯의 교배유전자좌에 있어서 유성생식 경로 조절에 관여하는 homeodomain의 특성을 교배유전자의 염기서열로서 검토할 목적으로 Specht 등(1992)이 분리한 남미자생의 유전자좌를 probe로 이용하여 북미지역에서 자생하는 치마버섯에서 분리된 교배유전자의 염기서열과 비교하여 이들의 특성을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

S. commune, *E. coli* 균주 및 plasmids 특성

본 연구에서 사용된 *S. commune*은 University of Vermont (U.S.A.)에 보존된 균주를 사용 하였으며, 이들 중 남미산 UVM 1-71과 북미산 1-34 strain은 genomic library 제조 및 mating locus의 분리에 사용되었다. 그리고 mating type에 있어 recipient와 tester strain으로 사용된 다른 균주는 mating type 및 영양요구성 표시와 함께 Table 1에 나타내었다. 그리

Table 1. List of *Schizophyllum commune* strains and cosmid clones

Strain	Genotype ^{a)}	Source
UVM 1-71	A α 3 β 1 B α 4 β 7	C. P. Novotony
UVM 1-34	A α 3 β 20 B α 3 β 3	C. P. Novotony
UVM T1	A α 4 β 1 B α 2 β 2 <i>trp1 ura1</i>	C. P. Novotony
UVM 4-40	A α 4 β 6 B α 1 β 1	C. P. Novotony
pBluescriptII	Amp ^r	Stratagene
pSC13	Amp ^r	This work
pSCE1	Amp ^r	This work
pSCE2	Amp ^r	This work

^{a)}A α , A β , B α and B β mating type gene (numbers indicate specific alleles); *trp1*, synthesis of tryptophan (indol 3-glycerol phosphate synthetase and phospho-ribosyl-anthranilate isomerase); *ura1*, synthesis of uracil (orotidine-5'-monophosphate decarboxylase).

Table 2. Composition of culture media

Medium ingredients	Medium (g/l) ^{a)}			
	CYM	CYMT	LB	2YT
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5	0.5		
KH ₂ PO ₄	0.46	0.46		
K ₂ HPO ₄	1.0	1.0		
Bacto-peptone	2.0	2.0		
Bacto-yeast extract	2.0	2.0	5	10
Dextrose	20	20		
Tryptophan		0.8		
Bacto-trypton			10	16
NaCl	10	5		
Agar	15	15	15	15

^{a)}CYM, Complete yeast medium; CYMT, CYM plus trptophan medium; LB, Luria-Bertani medium; YT, Tryptone-yeast extract medium; TB, Terrific Broth medium.

고 *E. coli* strain DH1 α 는 2개의 genomic library 제조시 host 균주로 사용되었으며, *E. coli* JM109는 M13 phage vector에 cloning된 recombinant phage의 증식과 일반적인 plasmid 제조에 사용되었다. *E. coli* DH5 α 는 주로 subcloning의 host로 그리고 pTC20 cosmid는 library 제조에 사용되었다. 그 외 plasmid는 subcloning 등에 사용되었다.

사용 배지

*S. commune*의 배양과 mating test, 그리고 Trp1⁺ transformant들의 선별에는 CYM 배지를 사용했으며, *trp1* recipient와 tester 균주를 사용할 때는 tryptophan을 최종농도 0.8 g/l로 첨가한 CYMT 배지를 사용했다. *E. coli*의 배양에는 LB, 2YT 배지를 사용했으며, 필요에 따라 ampicillin을 50~100 μ g/ml로 첨가하여 사용하였다(Table 2).

DNA sequencing 및 분석

S. commune 1-34 strain의 A α 3 mating type gene의 sequencing은 dideoxy chain termination method에 따라 행하였다 (Sanger 등, 1977). 사용한 sequencing kit는 United States Biochemical의 Sequenase T7 DNA polymerase version 2.0을 사용하였으며, 기타 acrylamide, bisacrylamide, urea 등은 Sigma 및 BRL 제품을 사용하였다. 그리고 A α 3 mating activity를 나타내는 5.7 kb의 *Pst*I-fragment는 random subcloning method로 pBluescriptII KS나 pGEM7의 *Bam*HI site에 0.5~2 kb 크기로 partial digestion시킨 DNA를 subcloning하여 sequencing reaction에 사용하였다. 반응에 사용된 primer인 T7, T3 및 Reverse primer는 oligonucleotide synthesizer (Dupont)로 합성하여 각 반응에 5~10 ng 농도로 사용하였다. 염기와 polypeptide 서열에 대한 homology 분석은 Blast program을 사용하였다.

결과 및 고찰

Mating activity를 갖는 cosmid clone pSC13(박 등, 1994)

에서 나타나는 non-homology 특성과 다른 진핵성 homeobox 에 대한 비교는 여러 가지 분석을 통하여 더욱 구체적으로 밝혀져야 하겠지만, 이들 sequence 결과는 기존연구의 A α 1, A α 4 등의 유전자좌를 비롯한 multicellular eukaryotes(예: *Drosophila*, *Ustilago maydis*)의 homeodomain 분석에 많은 기여를 할 것으로 사료된다.

적 요

Cosmid clone으로부터 mating activity를 가지는 pSC13의 양 말단은 1-71 A α 3 교배유전자좌 Z3 부위 2,430 bp와 Y3 region 8,160 bp 부근에서 homology를 지니는 것으로 나타나 교배활성에 필요한 모든 부위를 함유하는 것으로 사료되었다. 그리고 pSCE2는 1-71 A α 3의 Y region의 6,080 bp 부근에서 거의 완전한 homology를 가지는 것으로 보아 A α 3의 Y region을 함유하고 있음을 알 수 있으며, 또한 pSCE1도 MEP의 일부 sequence와도 거의 완전한 homology를 가지는 것으로 나타나 1-71 A α 3 교배유전자좌와 모두 유사한 염기서열을 모두 지니면서 북미자생 치마버섯의 교배유전자좌의 염기배열이 남미자생의 것과 거의 유사한 분자적 구조를 지니고 있음을 나타내었다. 결정된 DNA sequence는 3265 bp로서 남미산 치마버섯 1-71 strain의 mating 활성을 나타내는 A α 3 locus 염기서열중에 Z region과 거의 완전한 약 96%의 homology를 나타내었다. 또한 Polypeptide sequence 비교에서도 약 82%의 높은 homology를 나타내었으며, 특히 transcription regulator로 알려진 homeodomain 및 acidic region 에서는 각각 약 74%, 82%의 상당히 높은 비율의 homology를 지니고 있음이 확인되었다. 이러한 결과로 보아 남미와 북미의 대륙간에 자생하는 같은 allele type 간에도 상당히 높은 비율의 교배유전자좌의 보존이 이루어지고 있음을 알 수 있다.

감사의 글

이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 박동철, Novotny, C. P., Ullrich, R. C., 이갑득, 이갑량, 1994. 치마버섯(*Schizophyllum commune*)으로부터 A α 3 mating locus의 분리 및 특성. 한국균학회지 **22**(3): 247-253.
- Asada, Y., Yue, C., Wu, J., Shen, G. P., Novotny, C. P. and Ullrich, R. C. 1997. *Schizophyllum commune* A α mating-type proteins, Y and Z, form complexes in all combinations *in vitro*. *Genetics* **147**(1): 117-123.
- Giasson, L., Specht, C. A., Milgrim, C., Novotny, C. P. and Ullrich, R. C. 1989. Cloning and comparison of A α mating-type alleles of the Basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Mol. Gen. Genet.* **218**: 72-77.
- Koltin, Y. 1970. Studies on mutations disruptive to nuclear migration in *Schizophyllum commune*. *Mol. Gen. Genet.* **106**: 155-161.
- Koltin, Y., Raper, J. R. and Simchen, G. 1967. Genetic structure of the compatibility factors of *Schizophyllum commune*: The B factor. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **57**: 55-62.
- Munoz-Rivas, A. M., Specht, C. A., Drummond, B. J., Froeliger, E., Novotny, C. P. and Ullrich, R. C. 1986. Transformation of the basidiomycete, *Schizophyllum commune*. *Mol. Gen. Genet.* **205**: 103-106.
- Raper, C. A. 1988. *Schizophyllum commune*, A model for genetic studies of the basidiomycotina. In *Advances in Plant Pathology* **6**: 511-522.
- Schlesinger, R., Kahmann, R. and Kamper, J. 1997. The homeodomain of the heterodimeric bE and bW proteins of *Ustilago maydis* are both critical for function. *Mol. Gen. Genet.* **254**(5): 514-519.
- Shen, G. P., Park, D. C., Ullrich, R. C. and Novotny, C. P. 1996. Cloning and characterization of a *Schizophyllum* gene with A β 6 mating-type activity. *Curr. Genet.* **29**: 136-142.
- Snager, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463-5467.
- Specht, C. A., Stankis, M. M., Giasson, L., Charles, P., Novotny, and Robert, C. Ullrich, 1992. Functional analysis of the homeodomain-related proteins of the A α locus of *Schizophyllum commune*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 7174-7178.
- Stankis, M. M., Charles, A., Specht, Huiling Yang, Luc Giasson, Robert C. Ullrich and Charles P. Novotny, 1992. The A α mating locus of *Schizophyllum commune* encodes two dissimilar multiallelic homeodomain protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 7169-7173.
- Stankis, M. M., Specht, C. A. and Giasson, L. 1990. Sexual incompatibility in *Schizophyllum commune* from classical genetics to a molecular view. *Sem. Dev. Biol.* **1**: 195-206.
- Ullrich, R. C. 1978. On the regulation of gene expression: incompatibility in *Schizophyllum*. *Genetics* **88**: 709-722.
- Ullrich, R. C., Droms, K. A., Doyon, J. D. and Specht, C. A. 1980. Characterization of DNA from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Exp. Mycol.* **4**: 123-134.
- Wendlans, J., Vaillancourt, L. J., Hegner, J., Lengeler, K. B., Laddison, K. J., Specht, C. A., Raper, C. A. and Kothe, E. 1995. The mating-type locus B of *Schizophyllum commune* contains a pheromone receptor gene and putative pheromone genes. *EMBO J.* **14**(21): 5271-5278.
- Yang, H., Shen, G. P., Park, D. C., Novotny, C. P. and Ullrich, R. C. 1995. The A mating-type transcripts of *Schizophyllum commune*. *Exp. Mycol.* **19**: 16-25.