

## 팽이버섯에서 분리된 *FVFD16*과 *FVFD30* 유전자의 게놈클론의 염기서열 및 특성

김돌이\* · 東智則<sup>1</sup>

임업연구원 산림생물과, <sup>1</sup>일본 북해도립 임산시험장

### Sequence and Characterization of the Genomic Clone of the *FVFD16* and *FVFD30* Gene Isolated from *Flammulina velutipes*

Dool-Yi Kim\* and Tomo-Nori Azuma<sup>1</sup>

\*Division of Forest Biology, Forestry Research Institute, Seoul 130-012, Korea

<sup>1</sup>Hokkaido Forest Products Research Institute, Nishikagura 1-10, Asahikawa 071-01, Japan

**ABSTRACT:** We isolated genomic clone of *FVFD16* and *FVFD30* gene specifically expressed during fruit body formation of *Flammulina velutipes* [(Curt : Fr.) Sing] and determined the sequences. The *FVFD16* gene is including two introns in open reading frame, and *FVFD30* gene is including four introns. The introns were matched GT/AG rule. The *FVFD16* and *FVFD30* genes contained CAAT box with similarity arrange and TATA box. CT-rich region was presented before the transcription start point. *FVFD30* gene is investigated that expected the most activity of CCACC arrange. The result of *FVFD16* gene analysis showed 80% homology by cDNA clone that is gene family. From the results of genomic southern blot analysis, we presumed more than two copy number gene family of *FVFD16* and *FVFD30* gene.

**KEYWORDS:** *Flammulina velutipes*, gene family, intron, open reading frame, Southern blot analysis

담자균의 자실체 형성은 환경적인 요인과 유전적인 요인의 상호작용에 의해 이루어지므로 그 메커니즘을 밝히기는 어려운 점이 많다. 또한 담자균은 자실체 형성의 시기나 재배방법이 종에 따라 달라 이들 담자균의 재배에는 그 종간의 특성에 맞는 재배방법을 연구해야 한다. 그러므로 근래에는 유전공학의 발전으로 분자생물학적 측면에서 자실체 형성에 있어 중요한 역할을 하는 유전자가 치마버섯(*Schizophyllum commune*), 먹물버섯(*Coprinus comatus*), 표고(*Lentinula edodes*) 등에서 조금씩 밝혀지고 있다. Hoge 등(1982)은 치마버섯의 자실체 형성시에는 영양균사의 성장시보다 5% 정도 많은 유전자가 작용하고 있다고 보고하였다. 또한 먹물버섯에서는 돌연변이 유발처리에 의해 자실체 형성의 여러 단계에서 이상이 있는 변이체가 얻어졌다고 보고하고 있다(武丸, 1982). 표고에 있어서도 자실체 형성과 관계가 있는 *priA*, *priBc*, *mfbA*의 유전자가 단리되어 염기서열분석과 단백질 기능의 분석이 이루어지고 있다(Kajiwara 등, 1992; Endo 등, 1994; Kondoh 등, 1995).

팽이버섯(*Flammulina velutipes*(Curt : Fr.) Sing)의 자실체 형성에 관련된 분자생물학적 연구는 Azuma 등(1996)에 의해 *FDS* 유전자가 단리되어 염기서열분석 및 genomic DNA의 구조분석이 이루어졌으며, *FVFD16* 유전자는 Kim과 Azuma(1999) 그리고 *FVFD30* 유전자는 Kim 등(1999)에 의해 염

기서열분석이 이루어졌다.

본 연구는 자실체 형성에 관련된 유전자로서 이미 염기서열이 밝혀진 *FVFD16*과 *FVFD30* 두 유전자의 genomic DNA의 구조분석과 이들 유전자의 genome 내에서의 반복배열 또는 비슷한 염기서열을 가진 gene family의 존재를 확인하였으므로 이를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 균주와 배양조건

본 연구에 사용된 팽이버섯의 균주는 일본 북해도립 임산시험장으로부터 분양받았다. 25°C, 암실의 PDA 배지에서 일주일정도 자란 균사를 직경 5 mm 정도로 잘라 100 ml의 SMY 액체배지(sucrose 1%, malt extract 0.4%, yeast extract 0.4%)에 옮겨 7일 동안 암실에서 배양하였다. 그리고 균사들이 뭉치지 않도록 매일 15분 동안 진탕하였다. 이 배양액 20 ml을 다시 200 ml의 SMY액체배지가 들어 있는 500 ml 플라스크용기에 옮겼다. 그런 다음 암실에서 21일 동안 25°C에서 배양하여 genomic DNA추출에 사용하였다.

#### Genomic library의 조제

먼저 DNA의 추출은 액체배지에서 배양하고 있던 팽이버섯의 균사를 배지와 분리하여, Moller 등(1992)의 방법을 일부 변형하여 추출하였다. 전장의 genomic DNA의 단편을

\*Corresponding author

만들기 위하여 제한효소 *Sau3AI*을 사용하였다. 단편의 길이는 대략 15-23 kb로  $\lambda$ EMBL3 벡터는 *EcoRI*, *BamHI* 제한 효소에 의해 준비되었다. 벡터에의 삽입은 *In vitro* packaging extract에 의해 이루어졌다. packaged된 library는 *Escherichia coli* NM539에 plate되어져 증식되었다.

**Genomic library의 screening**

Genomic 클론은 nylon membrane (Hybond N<sup>+</sup>; Amersham)에 전이되었고, nylon membrane은 6xSSC (1xSSC: 0.15 M NaCl, 15 mM Na-citrate, pH 7.0), 0.1% SDS, 5xdenhardt's 용액 [1xdenhardt's: 0.02% polyvinylpyrrolidone (PVP), 0.02% ficoll, 0.02% bovine serum albumin(BSA)] 100  $\mu$ g/ml의 해리된 herring sperm DNA와 50% formamide의 용액에서 42°C, 1시간 동안 전처리 하였다. 그런 다음 hybridization을 위해 membrane은 ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP label된 *FVFD16*과 *FVFD30*의 cDNA probe를 사용하여 42°C에서 16시간 처리하였다. nylon membrane은 0.1% SDS를 포함한 2xSSC 용액으로 실온에서 5분간 씻은 후, 다시 같은 새로운 용액에서 30분간 같은 방법으로 씻었다. 그런 다음 다시 68°C에서 30분간 3번 반복하여 씻었다.

결과 분석을 위하여 nylon membrane을 X-ray film(fuji RX)을 이용하여 -80°C에서 24시간 노출시켰다.

Hybridization 결과,  $\lambda$ -phage에 삽입된 positive한 클론을 pBluescriptII KS(+)에 subclone하였다. 그리고 염기서열은 Thermo SequenceTM의 형광염색을 위한 sequence kit(Amersham)를 사용하여 분석하였다.

**Southern blot 분석**

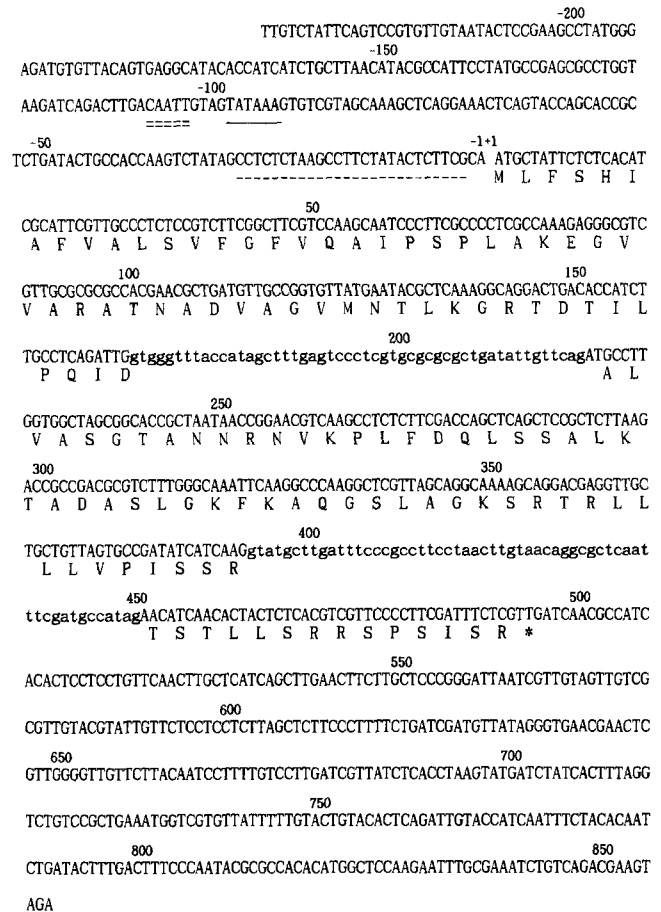
Genomic DNA(10  $\mu$ g)를 여러 가지 제한효소에 의해 절단하여, TBE buffer, 1% agarose gel로 분리하였다. nylon membrane으로의 전이는 알카리 용액에서 blotting하였다.

Southern hybridization의 조건은 plaque hybridization과 같은 조건하에서 실시하였다. hybridization 후의 membrane은 6xSSC의 실온에서 5분간 씻고, 다시 새로운 용액에서 30분간 씻었다. 그리고 0.1% SDS를 포함한 2xSSC에서 68°C, 30분간 씻은 후 크린벤치 내에서 UV를 조사하여 건조시켰다.

방사선 활성은 Bioimaging Analyzer(Fujix BAS2000; Fuji photo Film, Tokyo)에서 2~10시간 처리하여 autoradiograph를 촬영하였다.

**결과 및 고찰**

*FVFD16* genomic DNA의 비전사영역을 포함한 전 염기서열의 분석결과를 Fig. 1에 나타내었다. *FVFD16* genomic 유전자는 ORF영역에 51 bp와 58 bp의 짧은 2개의 intron을 가지고 있으며, 각 intron 양끝의 염기서열은 균류에서 자주 관찰되는 5'-GTXXGT-and-AG-3' 영역의 5'-GT-AG-3' rule이 보존되어 있음이 관찰되었다. 그러나 2번째 intron에서는 5-



**Fig. 1.** Nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of the *FVFD16* gene and its flanking region. The putative TATA-box is underlined. A possible CAAT box is double dashed. The CT motif is underlined with dashes. The introns are indicated by small letters.

GTXXGT-and-AG-3' 영역과 다른 GTXXGC-and-AG의 존재가 확인되었다. 또한 전사영역의 -99 부위에 TATA box로 예상되는 TATAAA 영역이 관찰되었다. CAAT영역은 -108 부위에 존재하고, CT-rich 영역은 -4에서 -28의 영역에 존재했다. Kondoh와 Shishido(1995)는 표고의 *mbfA* 유전자의 프로모터 영역의 해석결과 CT-rich 영역은 전사 개시 시에 어떤 중요한 역할을 하고 있다고 보고하였으나, 정확한 기능에 대해서는 아직 밝혀지지 않았다고 보고하였다. *FVFD16*의 genomic 클론과 cDNA 클론과의 상동성 분석 결과, 80.1%의 상동성을 나타내었고, 또한 아미노산서열은 85%의 homology가 검출되어 분석된 genomic 클론은 *FVFD16*의 gene family의 member로 예상되었다(Fig. 2, Fig. 3).

*FVFD30*의 비전사영역을 포함한 genomic DNA의 전 염기서열의 분석 결과를 Fig. 4에 나타내었다. *FVFD30* genomic DNA의 ORF 영역에 54 bp, 55 bp, 58 bp와 53 bp의 짧은 4개의 intron이 확인되었다. 또한 intron의 양끝에는 *FVFD16*과 마찬가지로 5'-GTXXGT-and-AG-3' 영역이 보존되어 있고, 5'-GT-AG-3' rule과 일치했다. 그러나 4번째 intron에서는 *FVFD16* 유전자의 2번째 intron과 마찬가지로 5'-GTXXGT-

```

TCTGATACTGCCACCAAGTCTATAGCCTCTCTAAGCCTTCTACTCTTCGCAATGCTCT 60 FVFD16
*****
TCTGATACTACCGTCAAGTCTACAGCCTCTCTAAGCCTTCTTAAGTCTTCGCAATGCTAT 60' FVFD16'

TCTCTCACATCGTCTTCGTTGCCCTCTCGGCTCTGGCGCTGTCACCAAGCAATTCCTTGGC 120 FVFD16
*****
TCTCTCACATCGCATTTCGTTGCCCTCTCGGCTCTGGCGCTGTCACCAAGCAATCCCTTGGC 120' FVFD16'

CCCTGGCCAAAGAGGGCGTTCGTTGAGCGCGCCACGAACGCTGATGTTACGGTGTCTTGA 180 FVFD16
*****
CCCTGGCCAAAGAGGGCGTTCGTTGAGCGCGCCACGAACGCTGATGTTGCGGCTGTATGA 180' FVFD16'

ACACCCCTCAAAGGCAGGACTGACACCATCTTGCCTCAGATTAATGCCTTGGTGGCTAGCG 240 FVFD16
*****
ATACCGTCAAAGGCAGGACTGACACCATCTTGCCTCAGATTAATGCCTTGGTGGCTAGCG 240' FVFD16'

GCAACGTTAATGACCGGAAGCTCAAGCCTCTCTTCCAGCAGCTCAGCTCAGCTCTTAAGA 300 FVFD16
*****
GCAACGCTAATAACCGGAAGCTCAAGCCTCTCTTCCAGCAGCTCAGCTCAGCTCTTAAGA 300' FVFD16'

CGCGCGACGCGCTTTGGGCAAAATCAAGGCCAAGGCTCGTTAGCAGGCAAAACAGGA 360 FVFD16
*****
CGCGCGACGCGCTTTGGGCAAAATCAAGGCCAAGGCTCGTTAGCAGGCAAAACAGGA 360' FVFD16'

CGAGGTGCTGCTGTTAGTCCGACATCATCAAGAATCAACGCTCCTCAGCTCGCTT 420 FVFD16
*****
CGAGGTGCTGCTGTTAGTCCGACATCATCAAGAATCAACGCTCCTCAGCTCGCTT 420' FVFD16'

CCCTTCGACATCTCGTTGATCAGCGCCATCGGACTCCTCCTGTTCAACCTGATTATCAG 480 FVFD16
*****
CCCTTCGATTTCTCGTTGATCAGCGCCATCACACTCCTCCTGTTCAACTTGCTCATCAG 480' FVFD16'

CTTGAACCTTCTGGTCCCGGATTGATCGCTGTAGTGTGCGGGTGTGAATGCTGTCTC 540 FVFD16
*****
CTTGAACCTTCTGGTCCCGGATTGATCGCTGTAGTGTGCGGGTGTGAATGCTGTCTC 540' FVFD16'

TGGGGTCTCTTACGGTCAATTTGGCCGATCTCTATCTAGTATGATCTATCACTTG 600 FVFD16
*****
T---CCTCCTCTTA-GCTCTCCCTTTCTGATGATGTTATAGGGTGAACGAACCTGTT 600' FVFD16'

AAATCTGTTCCGTAAG-ATGGTCCCTTTGTACTATATACTCAGATTTACCGTTCAATT 660 FVFD16
*****
GGGGTGTCTTACAATCCCTTTGTCTTGTATGATGTTAT-CTCACCTAAGTATGATCTATC 660' FVFD16'

TCTATA---CAATCTGATTTTGGTCTTGCCAG 694 FVFD16
*****
ACTTTAGTCTGTCCGCTGAAATGGTGTGTTAT 694' FVFD16'

```

Fig. 2. The sequence homologies between the *FVFD16* cDNA clone (FVFD16) and genomic FVFD16 clone (FVFD16'). Matching sequence are indicated with asterisk \*. The genomic FVFD16 clone was omitted intron sequences.

```

MLFSHIVFVA LSVFGLVQAI PSPLAKEGVV ERATNADVTG VLNTLKGRD TILPQINALV FVFD16
*****
MLFSHIAFVA LSVFGLVQAI PSPLAKEGVV ARATNADVAG VMNTLKGRD TILPQIDALV FVFD16'

ASGNVNDNRV KPLFDQLSSA LKTADASLQK FKAQGLSLAG TRTRSLLLVP TCORSTPFLS FVFD16
*****
ASGTANNRNV KPLFDQLSSA LKTADASLQK FKAQGLSLAG SRTRSLLLVP ISSRTSTLLS FVFD16'

RRSPSTSR FVFD16
*****
RRSPSISR FVFD16'

```

Fig. 3. Alignment of amino acid sequences of *FVFD16* cDNA clone (FVFD16) and genomic FVFD16 clone (FVFD16') proteins. Identical amino acid are indicated by asterisks \*.

and-AG-3' 영역과 다른 GTXXGC-and-AG 영역이 관찰되었다. 전사영역의 -229 부위에 TATA box로 예상되는 TATAAA 영역이 존재했다. 전사영역의 CAAT 영역은 -310 부위에 존재했고, 번역개시 시에 중요한 의미를 가진 염기서열로 생각되어지는 CCACC는 -22 영역에 존재했다. 이 CCACC 서열

```

-350 -300
GAAAACCTAAATCGCATTGATTACAGCGTATGGAACCTTCAACTGAAATCAGCTCGGATTGTTT
=====

-250
TOCTTTTCCGAACGCTGCCCGCTCTCGCTCTGAGAGAAAATGAGGACGCGCTTATAAATTAATTCGACCAA

-200 -150
COCCGCTGGCTTCTGGGACTTGTCTTCTGGGTGTCTAACCTTCCAATCTTCCCAATCTTCCAAGGGCTCCA

-100
AACTGAACGTGTAGTGTGGTGTGGTACGGCGCATGTGGCAACATCTCAGCCAGCCTCGACAGCTC

-50 -1+1
CTCGTTCAACCTCATCTCGTTAACCCCGCCCGTACCGTATCCACCTCGTCCGACGGGGCGC ATGCTAGT
----- M L V

50
ATCCGACCGGACAAATTAGAGGACAAGGCGCTTATCCCCCTTGACAACATCTTCCATAACGGCAAGGGTAGC
S D R D K L E D K A L I P L D N I F H N G K G T

100 150
TTAGTGCAAGCTCAGTCAAGTGGGAGGAGAAAACCGTGGCTTGTGTGCTTGACAACGGGAAA
L V Q A S V T S V E K E K T G G F V V L D N G E K

200
AGTCTTTTACGCTCTGGTGTGGGACTGGTCAAAGTGGTCCGCGCTGTGGACTTCCGCTCTAACCA
L P F Y V L V V A T G S K W S G P V D F P S K P

250 300
GAGGACGTGCAAGTGGTCTCGAGCAGAGAAAAGTTCAGGACGCCAAGAATCTTATTGCTGGAG
E D V T K W I S E Q R K K F K D A K N I V I A G G

350
GCGCTCTGTGGCTAGGtgtgtaattgactaccacagtcaggcaaaagtagtattcgctcaaacagA
G S V G L E

400
GCTGTCTGGAGATCAAAGATATTTGGCTgtgcttcaaccttctacgctcgattcgctgtgtgtct
L S G E I K D I W P

450 500
gacatacatccagGAAAAATCAGTCACTATCGTGACAGCCAAAAGAAGTGTGTAACAGTGTATACCCAGAC
E K S V T I V H S Q K K L L N S V Y P D

550
AAGTCCGGGACCGGCTGCGCAAGCTTACCGCCGGGCAACAGCTCGTCTCGAGCAAAATTCCTGGGG
K F R D R A A Q A Y R P R T K L V L D D Q I P G E

600 650
AACTGACCCAGGCGCTACTTCTGTGACAACCGCAATGGCAAGCAATTAAGTCCGATCTTATGtagcttc
L T P G A T S V T T R N G K T I T A D L I

700
tcccaatcatctcaaatttgaattggcgtgaccgttcttctatagTACCAGCATGGGGCAACAAACC
V P A W G N K P

750 800
GAACACCGCACTCTGTCTCACTGAAAGCGTCTTCCCAATGGATGGTCAAAATCCGGGACACCTTC
N T A L L S S L K D V L S P N G C V K I R D T F

850
CAAACCGAGGCTTATCTGATCTTTCGCTGGGAGATATCATGATGTGAACGAGCAGAAGCAAGCAGGAA
Q T Q A Y P D I F A L G D I I D V N E Q K Q A G K

900 950
AGGCCCAAGCGCATGCTGGTATGGTGTGCGGCAAGTCTTAGTATGTGCAAGGCGAGCGCTGAAGCAGAA
A Q A H A G M V A A N V L S Y V Q G Q P L K Q K

1000
GTACAAGGGAGCTATGAGTGTGCTCATCAACCGGCAAGtagtcatccccagtagaattgtaatgcat
Y K G S Y E L I V I T N G K

1050 1100
tcaatcatctgacgtgtcttcagAATGACGGAGTGGTACTTTGGCGTTTGGTGGGGAAAGTGTATGGAGG
N D G V G Y F G V W W G I V I G G

1150
GTGGTGGTGTGCTATTGAAAGCGAAGACCTCATGCTGCCGCAACAGGAGTGGCAACGGCGCCAGTAAA
W L A S L L K A K D L M L P A T R V A T G A S K

1200 1250
TAAGTGGAGTGTCTTCTTGTCTGTATACATACACATACCOCTAGAGTGTGTTAAATTAACCTATTATGC
*

1300
ATTCCATCACTGGCAGCGAAGAACAACCTGAATACACAAGCCCTGTGACGGGTGAAACTGAGAATTTGGGCTT

1350
GCTTTGGAAGCAAGCACCATTCTTTGAAAACCGCCACATCTTCAACCGGATACATAGCCAAGCCTCTGGTCC

1400
TTACCAATCTGAAGTCTAGA

```

Fig. 4. Nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of the *FVFD30* gene and its flanking region. The putative TATA-box is underlined. A possible CAAT box is double dashed. The ribosome binding site is indicated by a single dashed. The introns are indicated by small letters.

은 *Schizophyllum commune*와 *Neurospora crassa* 등에서 번역개시 시 codon의 바로 앞에 존재하여 리보솜과의 결합부위로 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다(Dons 등, 1984; Munger 등, 1985; Huiet와 Giles 등, 1986).

버섯의 genomic DNA 크기는 대장균의 약 10배, 고등동물의 100분의 1이라고 알려져 있다 (大澤, 1993). 또한 이들 genomic DNA에서는 exon과 intron이 존재하고 있지만, 실제, mRNA로서 단백질의 합성에는 exon만이 관여하며, intron은 DNA가 전사되어진 후 RNA 단계에서 splicing이 일어나 제거되어 진다(大澤, 1993). 그러나 유전자로서 역할은 하지 않지만, 생물의 진화와 함께 intron 길이와 수는 생물 종에 따라 다양하여, 이들 intron의 길이와 수에 의해 생물 종의 진화과정을 추정하기도 한다. 그러므로 고등 동물·식물들과 균류를 비교해 보면 intron의 수도 적고, 염기서열의 길이도 짧다. 효모의 경우에는 단 하나의 intron이 보고되어 있으며, 담자균의 경우에는 50~100 bp로 비교적 짧으며, intron의 수도 각각 다르다(Gurr 등, 1989). 표고의 *priA* 유전자는 2개, 치마버섯의 *Sc1*과 *Sc4* 유전자에서 각각 3개의 intron이 보고되어 있다(Kajiwara 등, 1992; Schuren과 Wessels, 1990). 팽이버섯의 경우에도 *FDS* 유전자에서 51 bp와 55 bp의 짧은 2개의 intron이 확인되었다(Azuma 등, 1996). 또한 본 연구결과 팽이버섯의 *FVFD16*에서도 2개의 intron이 그리고 *FVFD30* 유전자에서는 4개의 intron이 포함되어 있음을 확인하였다. 그러므로 이 두 유전자는 50~60 bp의 짧은 intron이 존재하고 있어 다른 사상균이나 담자균과의 유사성을 나타내었다(Gurr 등, 1989; Woudt 등, 1983). 일반적으로 진핵생물에서는 intron의 splicing 부위로서 5'-GT/AG-3' 염기서열이 보고되어 있는데, *N. crassa*의 *fes-1* 유전자의 3번째, *pl-1* 유전자의 1번째 intron에서는 5'-GTXXAG-AG-3'가 존재하고, *Aspergillus nidulans*의 *tpi* 유전자의 1번째와 2번째의 intron에서는 5'-GTXXGC-AG-3'의 서열을 나타낸다(Mcknight 등, 1986). 팽이버섯의 *FVFD16*과 *FVFD30* 유전자에서도 5'-GTXXGT-AG-3'의 서열이 존재하고 있지만, *FVFD16* 유전자의 2번째와 *FVFD30* 유전자의 4번째의 intron에서는 5'-GTXXGC-AG-3'의 존재가 확인되었다.

또한 *S. commune*의 경우는 intron 내에 TACTAA 또는 TACTAACA가 splicing에 관여하고 있다고 보고하였다(Langford와 Gallwitz, 1983; Langford 등, 1984; Jacquier 등, 1985). 또한 *S. commune* 외에도 *N. crassa*의 *qa* 유전자의 intron내에 TACTAACA 서열이 확인되었다고 보고하였으나(Munger 등, 1985; Huiet와 Giles, 1986; Rutledge, 1984), 팽이버섯의 *FVFD16*과 *FVFD30* 유전자에서는 TACTAA의 서열이 확인되지 않았다.

*FVFD16* 유전자의 Southern blot 분석결과를 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5에 나타낸 것과 같이 *EcoRI*의 제한효소에 의한 Southern blot 분석결과, 약 2.5 kb와 1.1 kb에 2本の 밴드가 검출되었는데, 이는 mapping의 결과와 일치하는 크기인 약 2.5 kb와 1.1 kb에서 관찰되었다. 그러나 *EcoRI*의 제한효소에 의한 결과가 다른 제한효소에 비해 밴드수가 적은 것은 약간의 DNA 분해가 원인이라고 생각된다. 그리고 *HincII*와 *SacI*의 Southern blot 분석결과에서는 3.5 kb, 2.7 kb, 2.5 kb, 2.4 kb, 2.2 kb와 18.1 kb, 2.7 kb, 2.5 kb와 1.1 kb의 밴드가 관찰되었다.

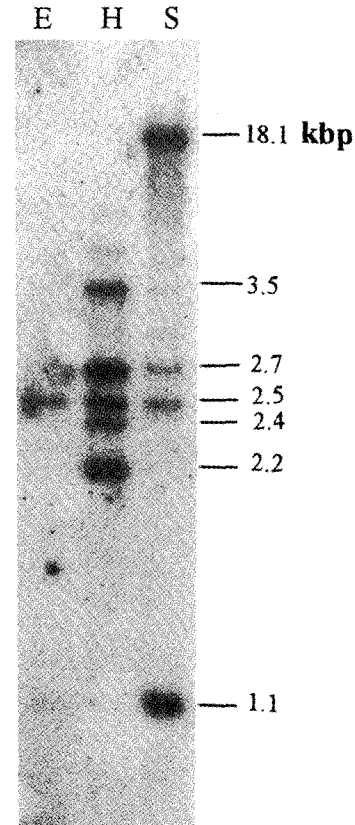
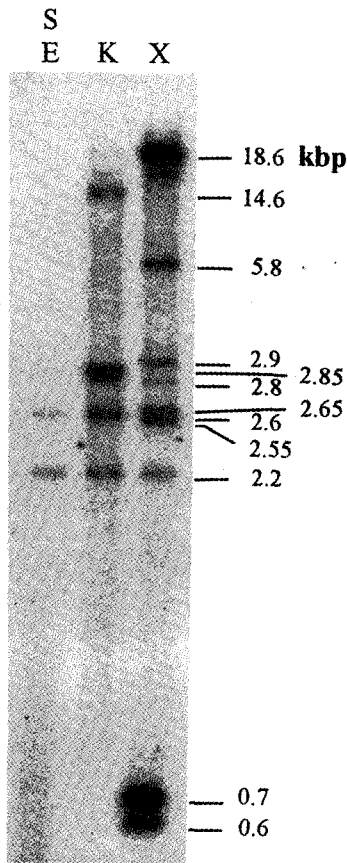


Fig. 5. Southern blot analysis of *Flammulina velutipes* genomic DNA. The genomic DNA (10  $\mu$ g each) were digested with *EcoRI* (E), *HincII* (H) and *SacI* (S) and then hybridized with *FVFD16* cDNA clone. Molecular weight markers are shown on the right.

*FVFD16* 유전자의 Southern blot 분석을 위해 사용된 probe cDNA 클론은 *EcoRI*, *HincII*, *SacI*의 절단부위가 포함되어 있지 않음에도 2개 이상의 밴드가 관찰된 것은 *FVFD16* 유전자가 적어도 2번 이상의 반복배열 혹은 gene family가 존재함을 알 수 있었다.

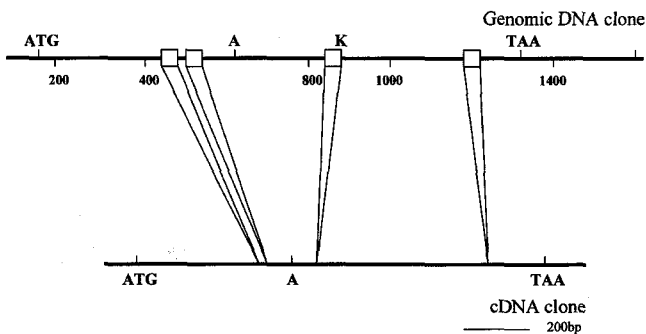
고등생물의 염색체 DNA의 단백질을 codon하는 mRNA나 기능성 RNA의 정보를 가진 유전자로서 작용하고 있는 부분은 겨우 10~20% 정도라고 한다. 이 이외의 비유전자영역의 대부분이 미지이지만, 그 상당수의 부분이 반복배열일 것으로 예상하고 있다. 그리고 반복배열 또는 gene family의 상동성은 종내에 80%, 종간에 50~60%로 상당히 높은 수치를 차지한다(野島, 1996). 따라서 본 연구결과 얻어진 팽이버섯의 *FVFD16* 유전자의 genomic DNA 클론은 *FVFD16* 유전자의 cDNA 클론의 염기서열 및 아미노산서열 분석결과(Figs. 2, 3) 80% 이상의 상동성을 나타내고 있고, Southern blot 분석결과에서도 각각의 제한효소에서 2개 이상의 밴드가 검출되었으므로 분석된 genomic DNA 클론은 *FVFD16* 유전자의 gene family의 member로 생각된다. 치마버섯의 경우에도 hydrophobic 단백질을 codon하는 *Sc1*, *Sc3*, *Sc4*, *Sc7*과 *Sc14* 유전자를 각각의 gene family로 보고하고 있다(Wessels, 1992; Schuren 등, 1993; Schuren와 Wessels,



**Fig. 6.** Southern blot analysis of *Flammulina velutipes* genomic DNA. The genomic DNA (10 µg each) were digested with *EcoRI* (E) and *SalI* (S), *KpnI* (K) and *XbaI* (X) and then hybridized with *FVFD30* cDNA clone. Molecular weight markers are shown on the right.

1990).

*FVFD30* 유전자의 Southern blot 분석결과를 Fig. 6에 나타내었다. *EcoRI*과 *SalI*의 2개의 제한효소에 의해 분해된 genomic DNA는 약 2.6 kb, 2.2 kb의 위치에 2개의 밴드가



**Fig. 7.** The *FVFD30* gene of *Flammulina velutipes* partial restriction maps and sequence strategy. Restriction enzyme sites used for sequencing are indicated: A (*AccI*), K (*KpnI*). Introns are indicated with open boxes. ATG and TAA indicated the position of the start and stop codon, respectively.

관찰되었다. *KpnI*에서는 약 14.6 kb, 2.85 kb, 2.6 kb와 2.2 kb의 4개의 밴드가 관찰되었고, *XbaI*에서 분해되어진 genomic DNA는 18.6 kb, 5.8 kb, 2.9 kb, 2.8 kb, 2.65 kb, 2.55 kb, 2.2 kb, 0.7 kb와 0.6 kb의 9개의 밴드가 관찰되었다. *FVFD30* 유전자의 cDNA 클론과 genomic DNA 클론의 해석에서 *FVFD30*의 제한효소지도를 작성했다(Fig. 7). Fig. 7에 나타난 것과 같이 사용된 제한효소 *EcoRI-SalI*의 인식부위는 존재하지 않지만, *KpnI*은 3번째의 intron 내에 1개의 인식 부위가 존재하고 있으며, Southern blot 분석결과에서도 2.85 kb와 2.6 kb가 확인되었다. *XbaI*은 cDNA 클론과 genomic DNA 클론에서는 절단부위가 존재하지 않았지만, genomic DNA의 Southern blot 분석결과 다수의 밴드가 확인되었다. 이상의 결과로 *FVFD30* 유전자에서도 2번 이상의 반복배열 또는 gene family의 존재가 확인되었다.

**적 요**

팽이버섯의 자실체형성 과정에 특이적으로 발현하는 *FVFD16*과 *FVFD30* 유전자의 genomic 클론을 단리하여 염기서열을 분석하였다. *FVFD16*은 Open Reading Frame(ORF) 내에 2개의 intron이 관찰되었고, *FVFD30* 유전자에서는 4개의 intron이 관찰되었다. 또한 intron의 특징적인 염기서열인 GT/AG의 rule과도 일치하고 있음이 밝혀졌다. *FVFD16*과 *FVFD30*의 두 유전자 모두에서 진행생물의 promoter 영역에서 자주 관찰되는 CAAT box와 유사한 배열과 TATA box가 존재했다. 또한, 전사개시점의 바로 앞에서 관찰되어지는 CT-rich의 영역이 존재하고 있었으며, 특히 *FVFD30*에서는 전사개시 시에 중요한 역할을 할 것으로 예상되는 CCACC의 서열이 관찰되었다. 한편 *FVFD16* genomic 클론의 염기서열 분석결과 cDNA 클론과 80%의 상동성을 나타내는 gene family임이 밝혀졌다.

여러 가지 제한효소에 의한 genomic southern blot 분석결과 *FVFD16*과 *FVFD30*은 2번 이상의 반복배열 또는 gene family의 존재가 확인되었다.

**참고문헌**

大澤 省三, 志村 令郎. 1993. RNA의 세계. 講談社. 사이언티파이크. pp 11-48.  
 野島 博. 1996. 遺傳子工學의 基礎. 東京化學同人. pp 122-135.  
 武丸 恒雄. 1982. 擔子菌類. 微生物遺傳子實驗法. 共立出版. pp 243-278.  
 Azuma, T., Harada, A., Kim, D. Y., Sakuma, Y., Kojima, Y. and Miura, K. 1996. Isolation of a gene specifically expressed during fruiting body differentiation in *Flammulina velutipes*. *Mokuzai gakkaiishi* 42(7): 688-692.  
 Azuma, T., Yao, I., Kim, D. Y., Sakuma, Y., Kojima, Y. and Miura, K. 1996. Sequence and characterization of the genomic clone of the *FDS* gene from the basidiomycete *Flammulina velutipes*. *Mokuzai gakkaiishi* 42(9): 875-880.  
 Dons, J. J. M., Mulder, G. H., Rouwendal, G. J. R., Springer,

- J., Bremer, W. and Wessels, J. G. H. 1984. Sequence analysis of a split gene involved in fruiting from the fungus *Schizophyllum commune*. *EMBO J.* 3(9): 2101-2106.
- Endo, H., Kajiwara, S., Tsunoka, O. and Shishido, K. 1994. A novel cDNA, *priBC*, encoding a protein with a Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> zinc cluster DNA-binding motif, derived from the basidiomycete *Lentinus edodes*. *Gene* 139: 117-121.
- Huiet, L. and Giles, N. H. 1986. The *qa* repressor gene of *Neurospora crassa*: Wild-type and mutant nucleotide sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3381-3385.
- Gurr, S. J., Unkles, S. E. and Kinghorn, J. R. 1989. The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. In *Gene Structure in Eukaryotic Microbes*. Kinghorn, J. R.(ed)Oxford: I.R.L. Press 93-139.
- Hoge, J. H. C., Sprigera, J. and Wessels, J. G. H. 1982. Change in complex RNA during fruiting-body initiation in the fungus *Schizophyllum commune*. *Exp. Mycol.* 6: 233-243.
- Jacquier, A. Rodriguez, J. R. and Rosbash, M. 1985. A quantitative analysis of the effects of 5' junction and TACTAAC box mutants and mutant combinations on yeast mRNA splicing. *Cell* 43: 423-430.
- Kajiwara, S., Yamaoka, K., Hori, K., Miyazawa, H., Saito, T., Kanno, T. and Shishido, K. 1992. Isolation and sequence of a developmentally regulated putative novel gene, *priA*, from the basidiomycete *Lentinus edodes*. *Gene* 114: 173-178.
- Kim, D. Y. and Azuma, T. 1999. Cloning of a Gene Specifically Expressed During Early Stage of Fruiting Body Formation in *Flammulina velutipes*. *The Kor. J. Mycol.* 27(3): 187-190.
- Kim, D. Y., Azuma, T., Harada, A., Sakuma, Y., Ando, A., Tamai, Y. and Miura K. 1999. Cloning and Sequence Analysis of a cDNA for the Gene *FVFD30*, Specifically Expressed During Fruiting Body Development in *Flammulina velutipes*. *Mushroom Sci. and Biotech.* 7(3): 95-99.
- Kondoh, O., Muto, A., Kajiwara, S., Takagi, J., Saito, Y. and Shishido, K. 1995. A fruiting body-specific cDNA, *mfbaC*, from the mushroom *Lentinus edodes* a high-molecular-weight cell-adhesion protein containing an Arg- Gly-Asp motif. *Gene* 154: 31-37.
- Kondoh, O. and Shishido, K. 1995. Characterization of the promoter region of a cell-adhesion protein gene derived from the basidiomycete *Lentinus edodes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 130: 189-192.
- Langford, C. J. and Gallwitz, D. 1983. Evidence for an intron-contained sequence required for the splicing of yeast RNA polymerase II transcripts. *Cell* 33: 519-527.
- Langford, C. J., Klinz, F. J., Donath, C. and Gallwitz, D. 1984. Point mutations identify the conserved, intron-contained TACTAAC box as an essential splicing signal sequence in yeast. *Cell* 36: 645-653.
- Moller, E. M., Bahnweg, G. and Geiger, H. H. 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(22): 6115-6116.
- Mcknight, G. L., O'Hara, P. J. and Parker, M. L. 1986. Nucleotide sequence of the Trisphosphate isomerase gene from *Aspergillus nidulans*: Implications for a differential loss of introns. *Cell* 46: 143-147.
- Munger, K., Germann, U. A. and Lerch, K. 1985. Isolation and structural organization of the *Neurospora crassa* copper metallothionein. *EMBO J.* 4(10): 2665-2668.
- Rutledge, B. J. 1984. Molecular characterization of the *qa-4* gene of *Neuroscrasa*. *Gene* 32: 275-287.
- Schuren, F. H. J., van der Lende, T. R. and Wessels, J. G. H. 1993. Fruiting genes of *Schizophyllum commune* are transcriptionally regulated. *Mycol. Res.* 97(5): 538-542.
- Schuren, F. G. H. and Wessels, J. G. H. 1990. Two genes specifically expressed in fruiting dikaryons of *Schizophyllum commune*: homologs with a gene not regulated by mating-type genes. *Gene* 90: 199-205.
- Wessels, J. G. H. 1992. Gene expression during fruiting *Schizophyllum commune*. *Mycol. Res.* 96(8): 609-620.
- Woudt, L. P., Pastink, A., Kempers, A. E., Jansen, A. E. M., Mager, W. H. and Planta, R. J. 1983. The genes coding for histone H3 and H4 in *Neurospora crassa* are unique and contain intervening sequences. *Nucl. Acids Res.* 11(16): 5347-5360.