

치마버섯 Mating Locus(Y-region)의 비교분석에 관한 연구

이인선* · 박동철¹

계명대학교 식품가공학과
¹김천대학 식품가공과

Studies on the Comparative Analysis of Mating Locus (Y-region) of *Schizophyllum commune*

In-Seon Lee* and Dong-Cheol Park¹

Dept. of Food Science & Technology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

¹Dept. of Food Processing & Technology, Kim-Cheon College, Kim-Cheon 740-200, Korea

Abstract

This study was conducted to do the comparative analysis of mating type locus controlling the direct formation of fruiting body in *Schizophyllum commune* which is indigenous to North America with that of other identified mating locus. The 3120 bp Y-region nucleotide of A α 3 mating locus activating a developmental pathway in *S. commune* was determined, and appeared to have about 96% homology to *S. commune* 1-71 A α 3 allele indigenous to South America, showing strongly a conservative feature. This nucleotide analysis also showed above 96% homology highly in the seven presumed exons, and about 97% in the acidic rich region (AR), about 99% in homeodomain (HD), about 97% in the basic rich region (BR), about 95% in the serine rich region (Ser) respectively. In the comparative analysis to the translated polypeptide sequence, *S. commune* A α 3 mating locus containing Y-region also showed about 97% homology to the region of *S. commune* indigenous to North America, but the identity ratio to Y1 including Y4, Y5, Y6 different allele types was declined to about 41~49%. In the analysis of functional loci controlling mating activity, it is assumed to have a highly conservative feature showing about 98% homology in homeodomain polypeptide. Especially, it is notable that the homology ratio of above 85% in homeodomain motif between mating type alleles was higher than in the AR, BR, Ser showing about 10~50% homology .

Key words – *Schizophyllum commune*, mating locus, homology, homeodomain

서 론

고품질의 버섯 생산은 접종시 어떤 종균을 사용하는가에

좌우되며 이를 위한 육종 방안으로서 이종간의 교배 유전자 좌를 이용한 교잡법이 이용되고 그 결과 내병성을 지니는 종균개발과 함께 양송이 및 느타리 버섯등의 경제적인 농업 작물들이 mating-type 유전자들의 교배촉진연구에 이용되고 있다[8]. 일반적으로 버섯에서는 breeding을 조절하는 2개의 mating type loci중 A-loci로 알려진 유전자의 산물로

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 053-580-5538, Fax : 053-580-5538
E-mail : inseon@kmuucc.kmu.ac.kr

서 transcription factor가 되는 homeodomain protein들이 mating에 주요 역할을 하며 이들 transcription factor들이 활성 형태가 되기 위해서는 서로 다른 allele type 간에 생성된 factor들 간에 heterodimerization 형태가 되어야 하는 것으로 알려져 있다[1,5]. 자연상태에서는 서로 다른 mating type을 지니는 2개의 homokaryon cell이 융합하면서 하나의 세포질내에서 서로 다른 단백질의 융합이 일어난다. 그러나 homobasidiomycete 간의 융합은 교배형에 상관 없이 일어나지만 mating 균사간의 핵의 교환은 B loci로 알려진 교배 유전자좌의 유전자 산물인 pheromone과 pheromone receptor가 관여하면서 핵물질의 이동을 주도한다[3,4,6,7,9,13,22,23]. 지금까지 버섯의 자실체 형성에 관한 발생유전자가 체계적으로 연구되어온 품종중에는 치마버섯(*Schizophyllum commune*)이 비교적 많이 이용되어왔으며, 이는 목재부후균 버섯으로서 생활사가 2주 이내에 끝나는 것으로 알려져 있다. 이 버섯에 관한 세포 및 유전적 연구는 대부분 교잡을 통한 방법을 이용하여 왔으며, dikaryon 형성은 2개의 서로 다른 경로를 4가지의 복대립 교배 유전자인 $A\alpha$, $A\beta$, $B\alpha$ 및 $B\beta$ locus가 조절하는 것으로 알려져 있다[2]. 따라서 *S. commune*의 전체적인 유성적인 발생과정은 배우자가 서로 다른 대립유전자 'A' 및 'B'를 가져야 할 경우에만 자실체 형성과정이 일어나지만 'A' 경로의 작동은 $A\alpha$ 나 $A\beta$ 어느 하나의 차이로도 일어나며, 'B' 경로 역시 $B\alpha$ 나 $B\beta$ 중의 어느 하나만의 차이로도 전체 경로가 진행된다. 'A' 및 'B' 교배유전자좌가 어떠한 기능을 가질 것으로 처음 추측보고한 사람은 Raper 등[12]이었으며, 이들은 재래적인 방식으로 4개 유전자좌 각각의 대립유전자들을 이용하여 여러 가지 교배형 돌연변이 균주를 획득하였다. 즉 어떤 돌연변이는 교배형 유전자좌에서 일어나고, 또 한편으로는 'A' 및 'B' loci에 의해 조절될 것으로 추측되는 비연관 유전자좌에서 돌연변이가 일어나는 것으로 확인하였다. 수년전부터 이들 교배유전자좌에 대한 분자생물학적 연구에 대한 많은 결과들이 최근까지 보고되고 있으며[10,11,14,16~21,24,25], 이들 보고에서 확인된 사실은 'A' 및 'B' 교배형 유전자좌에 의한 조절 과정에서 'B' loci는 nuclear migration을 그리고 'A' loci는 nuclear pairing 및 세포격벽 형성, hook cell 형성, conjugate nuclear division, hook cell septation에 관여한다는 것이다. 최근에 분리 보고된 치마버섯의 $A\alpha 6$ locus에 대한 분자생물학적 분석에서 다른 $A\alpha$ mating allele 유

전자와 비교한 결과, 이미 밝혀진 Z 및 Y mating gene 및 homeodomain부위와 유사한 구조유전자 형태를 취하고 있음이 밝혀졌으며[17], 또한 mating locus의 염기서열 분석에서는 $A\alpha 1$, $A\alpha 4$ 유전자좌의 $A\alpha 1$ ORF 2.8kb 단편과 $A\alpha 4$ ORF 1.2kb 사이에는 낮은 homology와, $A\alpha 4$ 1.2kb가 다른 $A\alpha$ 유전자좌를 갖는 recipient strain에 의존하여 mating activity를 나타낸다는 사실이 보고된 바 있다[15]. 이들 결과로부터 $A\alpha$ 유전자좌는 1개 이상의 polypeptide를 coding 하고, 2개의 화합성 $A\alpha$ 균주간의 교배에서 $A\alpha$ polypeptide의 특정 set가 작용하여 'A' 경로를 작동시킬 것으로 추정하고 있다. 그리고 $A\alpha 3$ 교배활성을 가지는 3.2kb DNA 염기서열결정에서는 $A\alpha 1$ 및 $A\alpha 4$ ORF 사이에 나타나는 높은 homology적 특성[20], 그리고 이핵형포자가 2개의 서로 다른 'A' 대립형질만으로 'A' 경로를 작동시키기 에 충분하다고 보고하였지만[19], 현재로서는 유전자산물간의 상호작용은 분명히 밝혀지지 않고 있으며 다만 몇 가지 종에서 밝혀진 homeodomain의 polypeptide 배열 즉 DNA binding 부위의 부분적인 염기배열 homology특성만 보고되고 있다. 본 실험은 치마버섯의 교배유전자좌에 있어서 유성생식 경로 조절 및 자실체 형성에 관여하는 mating locus의 염기서열 및 homeodomain의 특성을 이미 밝혀진 allele typesr간에 비교 분석하여 이들 locus를 기타 유용버섯류의 육종등에 응용하고자 시도되었다. 따라서 분리된 locus를 probe로 사용하여 북미지역 자생의 치마버섯에서 $A\alpha 3$ locus를 분리하고, 이들 mating locus로부터 동일 유전자군내에 존재하면서 Z-region과 전사방향이 반대로 위치하는 Y-region의 염기서열을 결정하여 그 특성을 비교하였다.

재료 및 방법

S. commune, *E. coli* 균주 및 p asmid의 특성

*S. commune*은 University of Vermont (U.S.A.)에 보존된 균주를 본 실험에 사용하였으며, 이들 중 북미산 1-34 strain은 genomic library의 제조 및 $A\alpha$ mating locus 분리에 사용되었다[10]. Mating activity 확인을 위하여 사용된 recipient와 tester strain은 mating allele type 및 영양요구성 표시와 함께 Table 1에 나타내었다. 또한 *E. coli* strain DH1 α 는 genomic library 제조시 host 균주로 사용되었다.

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

Strain	Genotype	Source
UVM 1-71	A α 3 β 1 B α 4 β 7	C. P. Novotony
UVM 1-34	A α 3 β 206 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

A α , A β , B α and B β mating type gene (numbers indicate specific alleles and x refers to an undetermined mating type); *trp1*, synthesis of tryptophan (indol 3-glycerol phosphate synthetase and phospho-ribosyl-anthranilate isomerase); *ura1*, synthesis of uracil (orotidine-5'-monophosphate ecarboxylase)

사용 배지

*S. commune*의 배양과 mating test, 그리고 Trp1⁺ transformant들의 선발에는 CYM 배지를 사용했으며, *trp1* recipient 와 tester 균주를 사용할 때는 tryptophan을 최종농도 0.8 g/l 로 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 polypeptide 분석

S. commune 1-34 strain의 A α 3 mating type gene의 sequencing은 dideoxy chain termination method에 따라 행

Table 2. Compositions of culture media

Medium ingredients	Medium (g/L)			
	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

CYM, Complex yeast medium; CYMT, CYM plus trptophanmedium; LB, Luria-Bertani medium; YT, Trptone-yeastextract medium; TB, Terrific Broth medium

하였다[15]. 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 5.7kb의 *Pst*I-fragment는 random subcloning method로 pBluescriptII KS나 pGEM7의 *Bam*HI site 에 0.5-2 kb 크기로 partial digstion시킨 DNA를 subcloning 하여 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 homolgy 비교 분석은 blast program을 사용하였다.

결과 및 고찰

균류의 접합유전자(mating gene)를 분리하여 분석하고 다른 유용버섯류의 육종에 응용하기 위하여 생활사가 약 2 주 이내로 아주 짧게 끝나면서 multiallelic mating type을 지니는 치마버섯(*S. commune*)의 mating gene을 이용하였다. 먼저 관련 유전자의 분리를 위하여 제조된 genomic library 로 부터 분리된 pSC13 cosmid clone이 A α mating activity 에 필요한 Z-region의 일부와 Y-region 전부를 지니고 있음을 확인하였다[10]. 전사방향의 Z-region에 대하여 반대로 위치하는 Y-region은 mating이 일어날 때 mating alleles type에 따라 자실체 형성과정에 반드시 관여하는 것으로 알려져 있으며, 따라서 분리된 cosmid clone에 대한 mating activity를 확인하기 위하여 이미 알려진 A α 1~A α 9의 A α mating alleles에 대하여 각각의 실험을 수행하였다. 그 결과 1-71 균주에서 Z3의 일부와 및 Y3-region 모두를 포함 하는 약 5.7kb의 cosmid clone pSC13이 A α 1을 제외한 A α 2 및 A α 4~9까지의 allele type 균주에 대하여 모두 activity를 나타내었으며 이는 남미산의 A α 3 mating locus 와 같은 결과를 나타내었다. 그리고 Fig. 1의 Y-region의 염기서열에서 나타나 있는 3개의 hoemodomain은 mating activity의 발현에 A α 1 mating allele type을 포함한 mating activity 유도에 필수적인 부분으로 알려져 있으며[19], 본 연구의 결과에서도 같은 위치에 존재하는 것으로 나타났다.

접합유전자의 활성유도에 대하여 Specht 등[19]은 Z-region과 Y-region에서 만들어진 유전자 산물들이 multimeric

protein complex 형태가 되어 자실체 발생 조절에 관여할 것으로 추측하고 있으며 이에 관한 Z-Y polypeptide complex 에 의한 활성화 모델을 제시한 바 있다. 그리고 치마버섯의 균사로부터 genomic library를 제조하고 여기에서 분리된 mating activity 함유 A α 3 mating locus의 염기서열 결정을 위하여 분리된 cosmid clone중 Z3-region [10]을 제외한 Y-region의 염기서열을 결정하였다.

결정된 Y-region의 전체 DNA sequence는 3,120 bp로서 Fig. 1에 나타나 있으며, 이는 남미산 치마버섯(1-71)의 mating 활성을 나타내는 A α 3 locus 염기서열중에 Y-region의 모든 sequence를 포함하고 있음을 일차적으로 확인하였다. 전기영동에서는 second loading으로 한개 반응당 약 250 bp를 읽었으며, 이들 subclone들의 sequence overlapping 부위로부터는 oligonucleotide synthesizer로 primer를 합성하여 전체 sequence를 양방향으로 확인하였다. Blast program을 사용한 전체의 nucleotide 염기서열의 homology 비교분석에서는 1-71에 대하여 약 96%의 높은 homology를 나타내었으며, 1-71 A α 3 mating locus에서 모두 7개로 추정되는 exon의 위치에 따라 그에 대한 homology 결과를 Fig. 1에서 homeodomain과 acidic-rich, basic rich region, serine rich region 등과 함께 나타내었다.

7개의 exon에서의 염기서열은 남미자생의 1-71 A α 3 mating locus의 Y3에 대하여 거의 96% 이상에 이르는 homology를 나타내었으며, 부분적으로 AR (acidic rich region)에서 약 97%, HD (homeodomain)에서는 약 99%, BR (basic rich region)에서 약 97%, 그리고 Ser (serine rich region)에서 약 95%의 높은 homology를 나타내어 지역간에 유전자

상의 큰 변화는 나타나지 않는 것으로 확인되었다. 또한 Fig. 2에서는 blast program을 이용한 translated polypeptide sequence결과를 나타내었으며 이를 자생지가 다른 남미산 *S. commune* A α 3 mating locus내의 Y-region을 비롯하여 다른 A α alleles내의 Y-region과 비교 분석한 결과이다. Table 3에서의 homology 분석결과를 살펴보면 남미산 A α 3의 Y3-region [20]과는 약 97%의 높은 homology를 나타내고 있지만 그 외 A α mating allele gene, 즉 Y1, Y4-region [20], Y5-region [24], Y6-region [17]과는 41~49%의 낮은 homology로 mating activity에 관여하고 있는 것으로 나타났다. 특히 mating에 있어 transcription regulator로 알려진 homeodomain motif에서는 약 98%의 homology가 나타남으로서 Z-region [11]의 74%에 비하여 지역간에 상당히 높은 유전적 보존성이 확인되었다. 또한 남미의 Y3와는 AR에서 97%, BR에서 100% 그리고 Ser에서도 98%의 상당히 높은 homology를 지니고 있음도 확인하였다(Table 3). 이러한 결과는 남미와 북미에 자생하는 같은 mating allele type간에 염기서열에 있어 상당히 높은 형태의 유전적 보존이 이루어지고 있음을 추측할 수 있으며, 특히 homeodomain motif에서는 Y1을 비롯한 다른 mating allele gene과도 85% 이상의 높은 homology를 나타내었으며 그 외 AR, BR, Ser 부위에서는 10~50%에 이르는 낮은 비율로 나타났다. 특히 결정된 염기서열중에서 homeodomain은 helix-turn-helix 형태의 배열에 관련된 구조들은 *Drosophila*의 antennapedia protein에서 그리고 *Ustilago maydis*의 mating-type polypeptide (bE2 & bW) 등에서도 비슷하게 나타나고 있는 것으로 알려져 있다.

Table 3. Polypeptide identities of *S. commune* UVM 1-34 A α 3 mating locus to other mating allele types (Y1, Y3, Y4, Y5, Y6-region)

Mating allele types (Y-region)	Identity ratio of <i>S. commune</i> UVM 1-34 A α 3 (Y-region)				
	Polypeptide sequence (exon)	Homeodomain motif	Acidic rich region	Basic rich region	Serine rich region
Y1	49	90	36	24	43
Y3	97	98	97	100	98
Y4	41	86	14	21	48
Y5	46	86	36	38	50
Y6	41	85	10	17	48

치마버섯 Mating Locus(Y-region)의 비교분석에 관한 연구

ATGGTGGACTCGACTCAAACCTCCTCCAAGGATATCTACTTCCGGGAAGGATCTCGCTTCTTGGCCCTCTCTCGAGGGCG 80
 CTCTCCCTTCCACAGCCCGTTGGCTGACCGACGTGACCTTGGACCTCTGCCACTCCCCGACCTCAAAGCCCTCCACC 160
 AR

GCCGTCTCAAAGATGCAGGGCTCCCTCCGAAGACCACCAAGTCTGCCATCAAAGCGTACGACGAAGCCTGCTCCCGATGG 240
 AR

AGGAGCACCGTCGACGAATCCTTCAAAGCTACTGCTAGCGCAGTCTCGCCCCGCAACTTGCATCTCTTGTCTGTGCTCCG 320
 TCATCATGTCTACGGCAGCAAGTGCAGAAGTGGCTATGGCAGGTTCTTTCAGGTTCCCGAGCTATGGAAGGCGGAGATGG 400
 CCAAGCAGCGGCTCACATTACCGTACCATGGACACAGACAAGAAGCCTGTCCAAAATTCCACTCTGTGCGTCTGTAC 480
 HD1

TGGTGGCACTCGTATCCATCTCACACCTTCTCAGGAATACAGCCCTCTGCTCGAGCTGTACTTCCACTTCAACGCCAT 560
 HD2

CCCACCTTCGCAGACCGTGCATGCTCGCAGAGAAGACGGGTATGCAAACCAGGCAGATCACAGTTTGGGTACGTCCACC 640
 HD2

TGTTCCCTTACTTTCGCATCATATTGACGGCTTCCAGTTCAGAAATCATCGTTCGACGGGCCAAGGGTCCCTTCCCGCAT 720
 HD3

GGCGCGACTGACAAGGTGCACCTGTTCCATTGTCTGCCGCTCGATCGTAGTTGACCGACTCTACCAGATCCCGATGG 800
 AGGAATTCGAGCGCCAGCGGAGAATATGGCAGCGAAGCTACTGCCGTTCTGTTACCCCTCACACCTCCGCCCTGCCCA 880
 TCAGGCAGCGAGAATGCGTCTCTGTAGGTCAATCCCGCGCCACGTTGAGCGCTGCGAAGAGCAAGAAGCCAGACGG 960
 CGACAAAGAGGCCCTGCGCAAGATCGGAAGAAGCGCTCAGAGACGCGAAGACCGGAAAGCAAACTCGTGGACTG 1040
 TCTTGGGCGCCTTGGTTGGCGCGGAGTGCAGCAAGCGCCCGGGCCAAAGAATTGGAAGAAGAGCAAAAAGCGGCTCGC 1120
 AAGAAGCACAGGACGTCGAGATGGCGATGCTACGAACTCGCAGAGAGCGCAAGACCAAGGCGATGCCGCGACC 1200
 CGCAGGTCAAGTTCATGGATGGATGGGCGGCTCATAAGAATCAACCAAGACAACCTTATCTGCCCTCGATAGCA 1280
 AGGCAGAACTTCGATTCGCCCCGATGGCTTACCCCTGCCCGCTCGCCTTACGCATGGGTTTCATACGGCGCCCAAGTCTTC 1360
 CATGTCAGTCAATGCAACCGCAGTGTCCCTCCCGTGCATGCTTGCAGGTCATGCCATCTGGCCATTAAGGATGCT 1440
 GGCATTTCCGACATCGTAAAGCTGGGAAAGGGAAGCCCTCACAGAAGTGGTCTCTTCTCGTACTTACATGTAATCTT 1520
 GACATTAACCTGCATGTCACAGCCACACCCACCCCGCTACCTTCAGTACCGTTCTCTCGCCGACCTCATCCCGCC 1600
 TCAAAGCGATGCGTCTCCGTAAGCATTCCCGGCCACCTACGACTCGGCTCTGTCCCTATGACATTCGTCGCCCTCAT 1680
 ACTCTCAGATTCTCCTTCGTTACGGCAGCAATCGTTCCCGCTCCGCCAACGTTACCCCTTTCGAGCGTCGGCGAGAAGG 1760
 CCATTCTGGCGGATCGACGCTTACTCGTCTTTCGAAAGCCTCAGGGTGTATGTCGAGAGGTGTGATGATTATTTC 1840
 ATACGGGTCTGCAAGTGTGATTACTTCCATCCCGAGTCTCCACTCCGAAGAAACAGACTTCTGTCCTTCCGACCCAGAC 1920
 CTTGTGTGCTTACCGCGCGAAGGCTCAGCGCTGGAGAAATCGAAGTGGCCATCTCGTTGCCGCTGATTCTGACGCTG 2000
 CTCGTAGGGGATCACATATGTTCCCGCGGAGCACTCTCGACTCTGCTGTGTGGACCTTCCCGCGCACTTCAAATC 2080
 CGGCTCGTCAAGCCCTTAGTTCCCGCGAGCCAATCGTTCGGCCAGACGACTTCGCCCTTTCGCTCTTGCAGAGAA 2160
 BR

GCGTCCGAAGCGCAGGGCTCCGAAGGAGAAGAAGCAGGCGGAGAAGGAGCGCGCAAGGAGGAAAAGCGCGCGCGGA 2240
 BR

AGGAGGCAAAGCAGGCCAAGAAGGACAGGAAAGAGCAAAGGCGCGCTTCTCGTGGTACCCGTCAACTCTCGACACC 2320
 Ser

AGCCGAGCATCGTCCGTTACCTCCGACGATCGGCGACGTTCGAGGAAGTCGAGGACATCCCGAAAACCCAGGGACTCTTC 2400
 Ser

CGCGTCTCCGCTGCATCCGCAAGTACCCCTTCTCTTCTTCTACCTCCTCTCGAAGCTCGTTCGAGCAGGATGCGCG 2480
 Ser

CGACGCTCGCATGAACGAGAGCCTGCCGTTGTGGCCAGCGACAACCTTGTGCTCGGCACGGACGAGGATCTGACCATG 2560
 ACGCCGAGTTGATGGCGCAGCTTTTCGGCGAAGACGATGCCTCCGGCTCGACGAACCCATGCAATCCGAAGGGTTTCAG 2640
 TCCAGACATGCTCACCTTCTCGAGCTGCAACGATGGCGCTTAGGTGACATGACGGCTGACGTTAATATGGCCCGAGCTC 2720
 GGTGATCTCAGTAACACACAGCTGAGCTTCGACGACATGAACTGGACAGCAGCATCGAOCCTAGCACACAGCCTGCCG 2800
 CTCTTTCGACTCATCTTCTGAAACGTTGAGCATGGACTTCAATTGGCTGCTCCCAATGTGCCAACAGGGCGCCGATT 2880
 GGTCCGCTCATTTGGCATGACCCCTCCACCCTCCAAATCAAGCTTCTCGGCGGCACATATCCATGGAGCTCGG 2960
 GGAACCAATACCAAGATGCACCGTTGAACTTCGCTGACCTGAGCTTTGAACCTCGGCGCGGCGAAGACTGCTTCATCAA 3040
 CTTGATCACAAACCCCTCGGTGGCAGATGCTCACCGTCTGAGCTCTGCATCCATCCTACACCATCTACCCCTTCTCC 3120

Fig. 1. The Nucleotide sequence of 3120 bp of putative $A\alpha 3$ mating locus(Y-region) isolated from *Schizophyllum commune* UVM 1-34 indigenous to North America. Putative exons partially concerning with $A\alpha 3$ mating activity are indicated with seven shaded boxes. Underlined sequences in the shaded boxes, HD and AR, BR, Ser, indicate homeodomain motifs and acidic, basic, serine-rich regions.

치마버섯 Mating Locus(Y-region)의 비교분석에 관한 연구

Y3(1-34) SRLNAMRPPYAFPATYDSASVPMTFAAAHTLRFSFVTDSQSFGRQRYPLSVGEKVHSGAIDALTRR
Y1 T::::::::::::R::::A::::V:QVTK:T:A::::A::::KP:ISTRPN-IT:D:MSQ:VSS
Y3(1-71) ::::::::::::::::::::Q::::::::::A:::::::::::
Y4 ::::::::::::::P:NA:A::L::SV:SSTQFA:A::NR::::AE:T:RKATVPAACTL::Y:ISK
Y5 ::::::::::::::P:NP:T::S:STTRPGQ:A:P::A::::AT:GPFKRVATYPPIVTLIDLFN
Y6 ::::::::::::::R:NP:T::L::T:Q:HQ::A::A::::KE:LVTQSPTRSVYR:VMDNLVS

7

Y3(1-34) FESLRVLCAEFSTPKKQ--TSSFERQTLCR-LRAEGLTAGEIEVRHL-VAADSYAARRAITVYTPRA
Y1 ::R::L:SV:L:V-SRNPPLPA::H:R:VD--V::::S:VTAL:FTPG:--::::L:V::IP::
Y3(1-71) ::::::::::::::-::::-::::-::::K:::::::::::
Y4 :AG::L::V:Q:VSSRSISL:TS:SGK:A-G::T::T::ASGVQTH:--::::::::::P:S:
Y5 RLR:LSTDESPLCDETF--VAHERS:VQ--:I::::R:ASS:KVIS--::::::::::V::::T:
Y6 HFDRLR:LGDSEFATSS-SVMV:HEV:RG--::::::::::V:AS:LRS--NP::::::::::P:K:

Y3(1-34) TLDSVVVDLPRALQLRLVKPLVPAEPIVRPDDFAPFVALAEKRAKRARRAKEKKQAEKEARKEEKRA
Y1 P:P:T:L::::RA::H:M:LP:TVTQ::A::::I::::R::R:K::::R:E::Q:K:DK:EK
Y3(1-71) :::::::::::::::::::::
Y4 P::C::HN:A::::KQ:R:M:L:Q:V:Q:A::::I:R::R::R:KE::QR:ALE::Q:K:DR:ER
Y5 P:E:M:R:AL:VRSHWIR::SH::Q::::R:A::::K::::L:E:QI::A::K:
Y6 P:E:I:T::::RQQ:IR:M:LPQ:V:Q:A::::I::::R::R:KE::::RLE::L:KR:R:KA
BR

Y3(1-34) RKEAKQAKDRKEQRAGLPRRSPSTLDTSRASSVTSASATSRRKSRTRKRP-RDSS-ASSAASARTP
Y1 K:AGLPHRAPSTVDAPDVSS:AS:LDSVST:ARK:SKKSKRQPSS---SS-RA:VA::G---R:
Y3(1-71) ::::::::::::::::::::S::::::::::-::::-::::V:::::
Y4 Q:ASRSQRDPSMDA-DVQS:AS:VAS::SLPARK:SKKSRKS:GESAASS--AT:VA:V---:
Y5 ::ERKKADLPRHSPS-MVDAQDSSRA:VT:DASTPPRK--:ASRKSDKASRTP--V:S::::
Y6 GLPKQSPSSMAVDS---LS:VS:VSDPSS::RKLKSKARKSSKSA:DSS-AA:V::G---:
BR Ser

Y3(1-34) SLSSTSSRRSSGTSMPATPRMNESLPVVASDNFVLGTDEDLTMPELMAQLFGED---DASGLDEPM
Y1 ::::::::::::::M::S::GPEQ::I::ASD:A::GE::VS:DAD::A::::S:ENA::V:Y:L:
Y3(1-71) ::::::::::::::::::::K:V:::::::::::
Y4 ::::::::::::::M::G::PEQD::IM:TAD:NFAGD::V::D:A::::EDGA:ALGQ--:
Y5 ::A::::M::G::PDQ::I::SD:A::G::FAMSQD::::EASSVGQMQ---
Y6 ::V::::M::G::GPEQN::IMSTADFN:PG::V::SD::TE::::ASDT:VLGQ--T
Ser

Y3(1-34) QSEGFSPDMLIFSSCNDGALGDMTADVNMPGLDLSNTQLSFDDMNWTSSIDLSTQPAASFSSSET
Y1 HP:P:TA::IT:T:A::::::::::N:-----S:I::::A:VGSNA:DP:-----
Y3(1-71) ::::::::::::::::::::D::::::::::M:::::::::::
Y4 :Y:E::::T:T:TAG::S::::D::NAYTS:Q:V::::G-FG:DA:NS:PGLFGDE
Y5 -T:E:T::T:T:TAG::S::::G:SNVYVS:QNV::G:EA:LG:GAPEY:PLG:FGNE
Y6 VHDEIT::T::TDS::S::::D::SVYAG:Q:I::S:AA:LG:GA:DS:PLG:FEQE

Y3(1-34) LSMDFNLLPQ--CANTAPDWSALIGMTPSTTSQINVLGGTYPCELGTTNTNAPLNFADLSFELGA
Y1 -----ESGGDE:SHWLDISFDR:T::::::::::S::::SDNM::D:S:T:G:DT
Y3(1-71) S::::::::::-::::::::::H::::S::::::::::D:
Y4 SNTGLD::SHNLLGD:QMSDLSYTAP--P::I::S:A::::SDSLGTPF:MN:WT:G:::
Y5 SNVEL::D:NLLGD:QMSDLSYTAP--S::I::S:Q::::SDS:TTSF::N:WT:G::P
Y6 SNVGLD::SH--NLLGGTQMSDYTCPT::P::I::::T::::SDN:S:FDMN:WT:G:::

Y3(1-34) GEDCFINFDHNP--LGGTMLTV
Y1 :A:Y:SG:-N:T-I::TIM:
Y3(1-71) ::::::::::::::-::::::::::A:
Y4 CD:G:AG:GN--L::AVA:
Y5 CD:G:AS:GN:LNL::AVA:
Y6 CD:G:AG:GN--L::AVAA

Fig. 2. Continued.

요 약

북미산 *S. commune* UVM1-34의 $A\alpha 3$ mating locus를 지니는 cosmid clone pSC13의 mating activity에 필요한 sequence 함유여부를 확인한 후 sequencing을 행하고 이에 대한 비교분석을 실시하였다. 그 결과 blast program을 사용한 전체 nucleotide 염기서열의 homology 비교분석에서 남미산 1-71에 대하여 약 96%의 높은 homology를 나타내었으며, 1-71 $A\alpha 3$ mating locus에서 모두 7개로 추정되는 exon의 염기서열의 비교실험에서도 거의 96% 이상에 이르는 homology를 나타내었다. 부분적으로는 AR (acidic rich region)에서 약 97%, HD (homeodomain)에서는 약 99%, BR (basic rich region)에서 약 97%, 그리고 Ser (serine rich region)에서 약 95%의 높은 homology를 나타내어 지역간에 유전자상의 큰 변화는 나타나지 않는 것으로 확인되었다. 그리고 translated polypeptide sequence 를 이용하여 자생지가 다른 남미산 *S. commune* $A\alpha 3$ mating locus 내의 Y-region은 비롯하여 다른 $A\alpha$ alleles 내의 Y-region과 비교 분석한 결과 남미산에 대해 전체적으로 약 97%의 높은 homology를 나타내고 있지만 그 외 $A\alpha$ mating allele gene의 Y-region과는 41~49%의 낮은 homology로 mating activity에 관여하고 있는 것으로 나타났다. 특히 mating에 있어 transcription regulator로 알려진 homeodomain에서는 약 98%의 homology가 나타남으로서 Z-region의 74%에 비하여 대륙간에 상당히 높은 유전자 보존성이 확인되었다. 또한 AR에서 97%, BR에서 100% 그리고 Ser에서도 98%의 상당히 높은 homology를 지니는 사실을 확인하였다. 이러한 결과로 보아 남미와 북미에 자생하는 같은 mating allele type간에는 상당히 높은 비율의 염기서열 보존이 이루어지고 있음을 알 수 있었으며, 비록 다른 $A\alpha$ alleles 간의 비교이지만 다른 mating alleles간의 약 50% homology와 비교할 때 보다 상당히 높은 결과로 보인다. 특히 homeodomain motif의 비교에서 Y1을 비롯한 다른 mating allele gene과도 85% 이상의 높은 homology를 나타내었으며 그 외 AR, BR, Ser 부위에서는 10~50%에 이르는 낮은 비율로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 · 한국과학재단 지정 계명대학교 전

통 미생물자원 개발 및 산업화 연구센터의 지원에 의한 것입니다.

참 고 문 헌

1. Asada, Y., C. Yue, J. Wu, G. P. Shen, C. P. Novotony and R. C. Ullrich. 1997. *Schizophyllum commune* A alpha mating-type proteins, Y and Z, form complexes in all combinations in vitro. *Genetics* **147**(1), 117-123.
2. Casselton, L. and N. S. Olesnicky. 1998. Molecular genetics of mating recognition in basidiomycete fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**(1), 55-70.
3. Fowler, T. J., S. M. DeSimone, M. F. Mitton, J. Kurjan and C. A. Raper. 1999. Multiple sex pheromones and receptors of a mushroom-producing fungus elicit mating in yeast. *Mol. Biol. Cell* **10**(8), 2559-2572.
4. Fowler, T. J., M. F. Mitton, L. J. Vaillancourt and C. A. Raper. 2001. Changes in Mate Recognition Through Alterations of Pheromones and Receptors in the Multisexual Mushroom Fungus *Schizophyllum commune*. *Genetics* **158**(4), 1491-1503.
5. Giasson, L., C. A. Specht, C. Milgrim, C. P. Novotny, and R. C. Ullrich. 1989. Cloning and comparison of A alpha mating-type alleles of the Basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Mol. Gen. Genet.* **218**, 72-77.
6. Gola, S., J. Hegner and E. Kothe. 2000. Chimeric pheromone receptors in the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Fungal Genet. Biol.* **30**(3), 191-196.
7. Kothe, E. 1999. Mating types and pheromone recognition in the Homobasidiomycete *Schizophyllum commune*. *Fungal Genet. Biol.* **27**(2-3), 146-152.
8. Kothe, E. 2001. Mating-type genes for basidiomycete strain improvement in mushroom farming. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**(5-6), 602-612.
9. Koltin, Y. 1970. Studies on mutations disruptive to nuclear migration in *Schizophyllum commune*. *Mol. Gen. Genet.* **106**, 155-161.
10. Park, D.C., C. P. Novotony, R. C. Ullrich, K. D. Lee and K. R. Lee. 1994. Isolation and Characterization of A alpha mating locus from *Schizophyllum commune*. *Kor. J. Mycol.* **22**(3), 247-253
11. Park, D.C., S. S. Lee, I. S. Lee, H. J. Kim and K. R. Lee. 2000. Nucleotide Sequence of Mating Locus of *Schizophyllum commune* Indigenous to North America. *Kor. J. Mycol.* **22**(3), 247-253
12. Raper, J. R., G. S. Krongelb and M. G. Baxter. 1958.

- The number and distribution of compatibility factors in *Schizophyllum commune*. *Amer. Nat.* **92**(865), 221-232
13. Raudaskoski, M. 1970. The Relationship between B-Mating-Type Genes and Nuclear Migration in *Schizophyllum commune*. *Fungal Genet. Biol.* **24**(1/2), 207-227.
 14. Robertson, C. I., K. A. Bartholomew, C. P. Novotny and R. C. Ullrich. 1996. Deletion of the *Schizophyllum commune* A alpha locus: the roles of A alpha Y and Z mating-type genes. *Genetics* **144**(4), 1437-1444.
 15. Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5463-5467.
 16. Schubert, D, K. B. Lengeler, E. Kothe. 2000. Identification of mating-type dependent genes by non-radioactive, arbitrarily primed PCR in *Schizophyllum commune*. *J. Basic Microbiol.* **40**(1), 65-70.
 17. Shen, G. P., Y. Chen, D. Song, Z. Peng, C. P. Novotny and R. C. Ullrich. 2001. The Aalpha6 locus: its relation to mating-type regulation of sexual development in *Schizophyllum commune*. *Curr. Genet.* **39**(5-6), 340-345.
 18. Shen, G. P., D. C. Park, R. C. Ullrich and C. P. Novotny. 1996. Cloning and Characterization of a *Schizophyllum* gene with Aβ6 mating-type activity. *Curr. Genet.* **29**, 136-142.
 19. Specht, C. A., M. M. Stankis, L. Giasson, C. P. Novotny and R. C. Ullrich. 1992. Functional analysis of the homeodomain-related proteins of the Aα locus of *Schizophyllum commune*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **89**, 7174-7178.
 20. Stankis, M. M., C. A. Specht, H. Yang, L. Giasson, R. C. Ullrich and C. P. Novotny. 1992. The Aα mating locus of *Schizophyllum commune* encodes two dissimilar multiallelic homeodomain protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7169-7173.
 21. Stankis, M. M., C. A. Specht, and L. Giasson. 1990. Sexual incompatibility in *Schizophyllum commune* from classical genetics to a molecular view. *Sem. Dev. Biol.* **1**, 195-206.
 22. Vaillancourt, L. J., M. Raudaskoski, C. A. Specht and C. A. Raper. 1997. Multiple genes encoding pheromones and a pheromone receptor define the B beta 1 mating-type specificity in *Schizophyllum commune*. *Genetics* **146**(2), 541-551.
 23. Wendland, J. and E. Kothe. 1996. Allelic divergence at B alpha 1 pheromone receptor genes of *Schizophyllum commune*. *FEMS Microbiol Lett.* **145**(3), 451-455.
 24. Wu, J., R. C. Ullrich and C. P. Novotny. 1996. Regions in the Z5 mating gene of *Schizophyllum commune* involved in Y-Z binding and recognition. *Mol. Gen. Genet.* **252**(6), 739-745.
 25. Yue, C., M. Osier, C. P. Novotny and R. C. Ullrich. 1997. The specificity determinant of the Y mating-type proteins of *Schizophyllum commune* is also essential for Y-Z protein binding. *Genetics* **145**(2), 253-260.

(Received February 19, 2002; Accepted April 3, 2002)