

표고균사 갈변과 관련된 BCR (Brown Color Repressor) 유전자 분리

김영호, 박수철¹, 전창성, 유창현, 성재모², 공원식*
국립원예특작과학원 버섯과, ¹국립농업과학원, ²머쉬텍

BCR (Brown Color Repressor) gene isolation related to mycelial browning of *Lentinus edodes*

Young-Ho Kim, Soo-Cheol Park¹, Chang-Sung Jhune, Chang-Hyun You, Jae-Mo Sung² and Won-Sik Kong*

Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Eumseong 369-873.

¹National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707.

²Mushtech, Hoengseong, 225-852, Korea.

(Received september 12, 2012, Revised september 21, 2012, Accepted september 22, 2012)

ABSTRACT: Recently sawdust cultivation of Shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) is increasing. It is important to make mycelia to be brown on the substrate surface. This browned surface in sawdust cultivation plays an important role like as artificial bark of the oak log, which protects the other pests and suppresses water evaporation in the substrate. In order to isolate genes which related to brown color formation, differential display method was used. Two cDNA fragments obtained by DD-PCR were 1.2 and 1.6kb and these were expressed in white colored mycelia from *L. edodes*, but not brown colored mycelia. Partial sequencing of these cDNA fragments showed that the 1.6kb cDNA had 100% identity with the microsatellites gene from *Dugenia polichroa*. However, the other 1.2kb cDNA fragment had poly T tail on 3' region of partial open reading frame on 5' region. The new primer designed based on the sequence of 1.2kb cDNA was constructed. RT-PCR analysis using the newly designed 0.12kb cDNA specific primer showed that the gene was only expressed in white color mycelia, but not in brown color mycelia. Sequence analysis of 5' region of this 1.2kb cDNA revealed that this gene contained partial open reading frame consisted of 110 amino acid. Homology search using DNASIS database showed that this gene had high sequence homology of 66.7% in DNA level and 69.2 % in amino acid level with dTDP-glucose 4,6-dehydratases gene from *Arabidopsis thaliana*. The dTDP-glucose 4,6-dehydratases gene was known to be function to have tolerance with oxidation stress. These results strongly suggest that this gene isolated from white mycelia of *L. edodes* might have a function of repressor against mycelia browning. Therefore I designated this gene as BCR (Brown Color Repressor) gene.

KEYWORD : *Lentinula edodes*, Shiitake, Mycelial browning, Sawdust cultivation, BCR(Brown Color Repressor) gene

서 론

표고(*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler)는 주로 참나무원목을 이용하여 재배하며 원목 내에서 균사생장기간이 길어 첫 버섯을 수확하려면 1년 이상 소요되고, 재배기간이 최소한 5년이나 걸리고 재료에 대한 버섯으로의 회수율도 낮다. 또한 앞으로 표고 재배용 원목의 수요가 많고 참나무의 확보가 어려워 구득이 어려워지고 있기 때문에 최근 톱밥을 이용한 표고 재배가 점차 증가하고 있는 경향이다 (Ando, 1974; Diehle와 Royse, 1985; Royse, 1985). 톱밥을 이용한 표고버섯 재배에 있어서 균사가 완전히 성장하면 백색으로 되며 이 상태에서 버섯을 발생시키면 버섯수도 적고 푸른곰팡이병 등에 오염되어 많은 수량

을 기대할 수 없게 된다. 따라서 배지표면에 나무의 표피와 같은 역할을 할 수 있는 인공피막이 형성되도록 갈변화시키는 것이 중요하다. 적갈색으로 갈변화된 것은 외부공기와 접촉시켜도 다른 균이 오염되지 않을 뿐만 아니라 배지내 수분증발을 억제하고 버섯발생을 양호하게 한다. 그러나 표고의 톱밥재배에서 배지의 갈변을 위하여 100일에서 150일까지 너무 긴 배양기간이 요구되기 때문에, 농가에서는 그로 인하여 시설비의 과다 투자와 배양실의 확보 등의 부담을 안게 된다. 따라서 표고톱밥재배시 배지의 갈변을 촉진시키거나 갈변이 빠른 균주를 조기에 선발할 수 있는 시스템의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다(김 등, 2007, 2009a, b, 2011). 본 연구에는 표고 톱밥재배를 안정적으로 실시하고 재배기간을 단축시킬 수 있는 방법을 모색하고 이에 알맞은 표고의 품종을 개발하는 데 기초자료를 제공코자 실시하였다. 표고균사가 성장하고 성숙하는 동안

* Corresponding author (wskong@korea.kr)

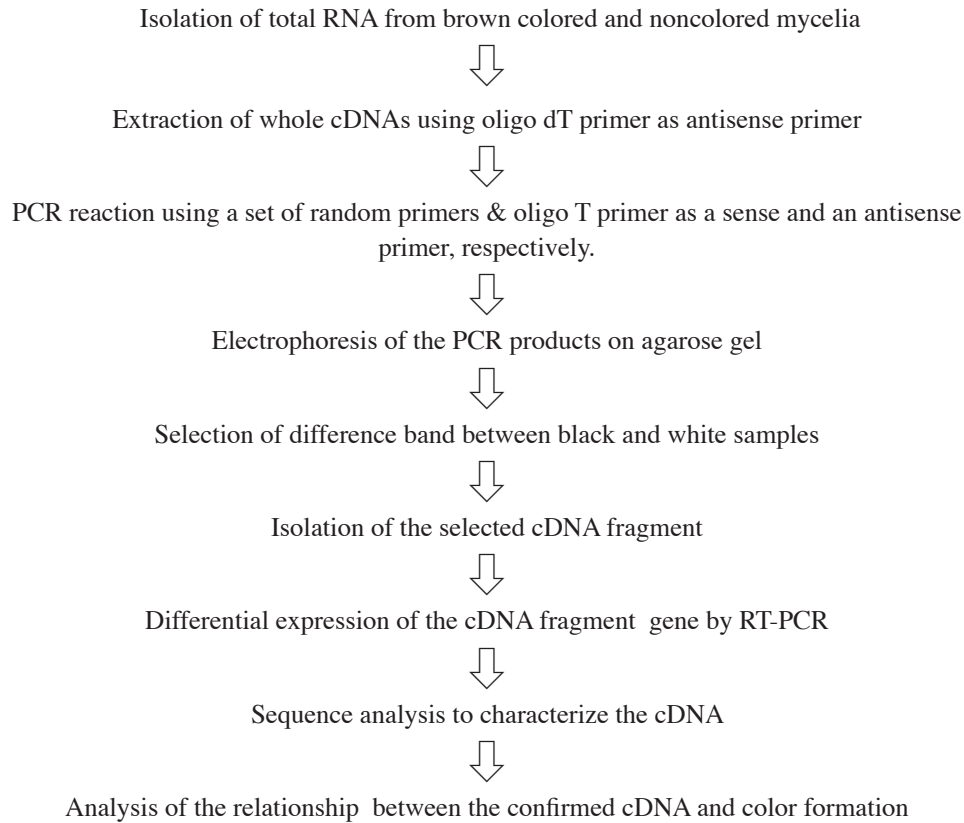


Fig. 1. Scheme of mRNA differential display to isolate the genes related to brown color formation

Table 1. List of primer used in differential display

Code	Sequence(5' to 3')
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPA-04	AATCGGGCTC
OPA-08	GTGACGTAGG
OPA-09	GGGTAACGCC
OPA-10	GTGATCGCAG
OPA-11	CAATCGCCGT
OPA-12	TCGGCGATAG
OPA-16	AGCCAGCGAA
OPA-19	CAAACGATCC

발생되는 색소에 의하여 갈변이 이루어지므로 이때 다르게 발현하는 mRNA의 cDNA를 차별화 전개(differential display)를 통하여 특이적으로 발현되는 특이 유전자를 탐색하고, 유전자 은행에서 상동성을 비교한 후 이를 primer로 제작하여 시기적으로 다르게 성장한 균사에서 이 유전자의 발현을 조사하여 확인코자 하였다.

재료 및 방법

갈변관련 유전자 탐색체계

표고의 톱밥재배에서 배지의 갈변을 위하여 100일에서 150일까지 배양하여 완료되는 톱밥배지는 너무 긴 재배기간을 요구한다. 따라서 갈변을 단축시키는 방법으로 갈변에 특이적으

로 발현되는 유전자를 분리하기 위해 갈변이 되지 않은 균사와 갈변이 완전히 된 균사로부터 RNA를 분리하여 Fig. 1과 같이 mRNA differential display의 방법을 통해 특이 발현 유전자를 탐색코자 하였다.

공시재료

표고의 갈변에 관련된 유전자를 분리동정하기 위하여 농기 3호 균주(ASI 3046)를 샐레에 20ml씩 분주된 PDB(potato dextrose broth)배지에 직경 5mm의 균총을 접종하여 15일 및 40일 동안 배양하여 균사의 상태가 백색인 균사와 갈색인 균사를 공시하였다. 또한 분리된 갈변특이 유전자의 확인을 위하여 15, 30, 53일간을 각각 배양한 후 균사의 상태가 백색, 약 20% 정도의 갈변이 진행된 균사, 그리고 갈색균사에서 자실체가 발생한 균사를 공시재료로 하였다.

균사로부터 total RNA의 분리

표고의 균사로부터 total RNA분리는 Sambrook 등(1989)의 lithium chloride법을 수정한 Yang 등(1993)의 방법으로 실시하였다. 공시재료인 표고 균사시료들을 거즈를 이용하여 균사체만을 분리한 다음 액체질소를 넣고 급속 냉동시키면서 살균된 유발에서 미세하게 마쇄 후, 10 ml의 grinding buffer(GB : 100mM Tris-HCl, 10mMEDTA, 1%SDS)가 담겨진 원심분리관으로 옮겨 phenol과 chloroform-isoamylalcohol(1:1) 21:1의 용액(PIAA) 10ml를 넣고 잘 혼합하여 원심분리후 수층을 취하였다. RNA를 포함한 이 수층에 1/3부피의 8M LiCl(최종농도 2M)을 넣어 4℃에서 밤새 보관한 다음, 10,000rpm에서 30분 동안 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 이 침전물은 0.4 ml의 100mM Tris HCl/10mMEDTA용액에 재현탁시키고 다시 원심분리 후, 1/10부피의 3M NaOAc와 2.5배 부피의 에틸알콜을 가하여 -20℃에서 1시간이상 보관하여 침강시킨 후, 원심분리하고 70% 에틸알콜로 세척건조시켜 100mM Tris HCl/10mMEDTA 용액으로 재현탁하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 Sambrook 등(1989)의 방법에 의하여 spectrophotometer를 이용하여 260과 280nm에서 흡광도를 측정한 후 agarose/formaldehyde 겔에서 전기영동하여 확인하였다.

Differential display PCR

표고의 균사로부터 추출한 total RNA중 갈변에 관련된 유전자를 탐색하기 위하여 mRNA의 cDNA합성을 실시하였다. 이때 역전사 반응을 위한 antisense primer는 oligo dT primer (5'-CGAGGAATTCTTT-3')를 이용하였다. 처음 1st strand cDNA의 합성은 DNase I를 처리한 2 μ g의 total RNA, 0.5 μ g의 oligo dT primer, 25mM의 dNTPs, 200 units의 M-MLV reverse transcriptase와 20 units의 ribonuclease inhibitor의 20 μ l 반응

혼합액에서 수행하였다. 이 혼합액은 42℃에서 30분간 반응시킨 후, 65℃에서 10분간 가열하여 반응을 중지하여 1st strand cDNA의 합성하였다. 이어서 2nd strand cDNA를 합성을 위한 PCR반응은 20 μ l의 RT반응 혼합액에 0.25 μ g의 oligo dT primer, 각각 다른 10 bp의 arbitrary sense primer(Table 1), 10 μ l의 10 X DNA polymerase buffer, 10 μ l의 25 μ M MgCl₂, dNTPs의 최종 농도가 각각 0.25mM이 되도록 하고, 2.5 units의 Taq DNA polymerase와 혼합하여 100 μ l반응액으로 수행하였다. PCR반응은 변성은 94℃에서 30초, 어닐링은 48℃에서 30초, 증폭은 72℃에서 1분을 1 cycle로 하여 40cycles를 실행하였다. 백색의 균사와 갈색의 균사를 사용한 각각의 PCR생산물들은 1.3% agarose gel에서 전기영동에 의하여 분리하였으며 이들 간에 차이를 나타내면서 발현된 각 cDNA 절편은 gel extraction kit(Quagen)을 사용하여 추출하였다.

갈변관련 유전자의 검정

Differential display PCR방법으로 증폭시킨 표고 유래의 갈변관련 유전자의 검정을 위하여 RT-PCR을 실시하였다. RT-PCR반응은 추출된 cDNA 단편의 internal영역 염기서열에 대응하는 5'-CCCTCCTCACTACCAGT-3'의 특이 primer를 arbitrary primer대신 PCR반응의 sense primer로서 사용된 것을 제외하고, differential display분석에서와 같이 수행하였다.

DNA염기서열 결정

mRNA differential display에 의하여 차이를 나타낸 cDNA 단편을 agarose gel로부터 gel extraction kit를 사용하여 분리하였다. 분리된 특이 cDNA 단편을 EcoRV로 절단 후 dTTP를 첨가한 ligation 벡터(pBluescript KS⁺)와 혼합하여 ligase와 buffer가 첨가된 20 μ l의 최종반응액을 16℃에서 15시간 ligation 시키고, *E. coli* DH5 α 균주에 형질전환 시켰다(Sambrook, 1989). 형질전환된 *E. coli*로부터 특이발현 cDNA 단편이 포함된 plasmid를 DNA extraction kit(Quagen)을 사용하여 대량분리 후, 염기서열 분석에 이용하였다. 염기서열 결정은 원하는 DNA단편을 Sanger의 chain termination 방법(1977)으로 sequence kit version 2.0(United State Biochemical Co.)를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 Prosis 프로그램으로 PIR데이터베이스에서 아미노산 상동성을 검색하였고, DNASIS를 이용하여 Gene Bank의 데이터베이스에서 DNA 염기 상동성을 검색하였다.

계놈 DNA의 분리

표고갈변관련 유전자로부터 제작된 primer의 working test를 위하여 *L. edodes* 9 균주, *Pleurotus ostreatus* 5 균주, 그리고 *P. conucopiae*, *P. cystidiosus*, *P. salmoneo-*

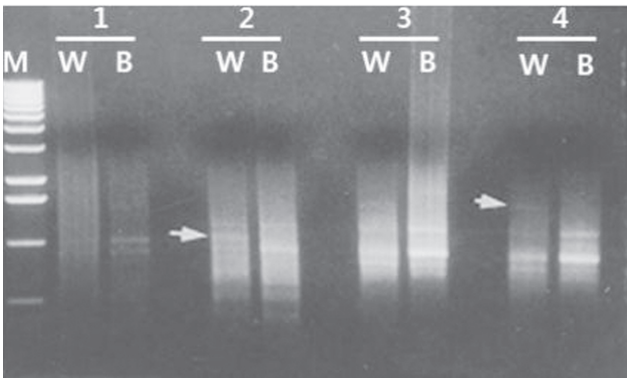


Fig. 2. Differential display to identify specific expressed genes related to browning from white and brown colored mycelia of *L. edodes*. Total RNA(2 μ g) from white(W) and brown(B) colored mycelia was subjected to differential display analysis to isolate the gene related mycelial browning. RNA from two colored mycelia were used in cDNA synthesis using oligo dT primer and then amplified by PCR with combination of various random 10 mer primers, mixed primer of OPA 1 to OPA19(1), OPA 3(2), OPA 8(3) and OPA 10(4), and oligo dT primer. The PCR products were separated by electrophoresis on 1.2% agarose gel with 1kb ladder DNA size marker(M). Arrow indicates position of PCR products(1.2, 1.6 kb) which are only generated by white mycelia.

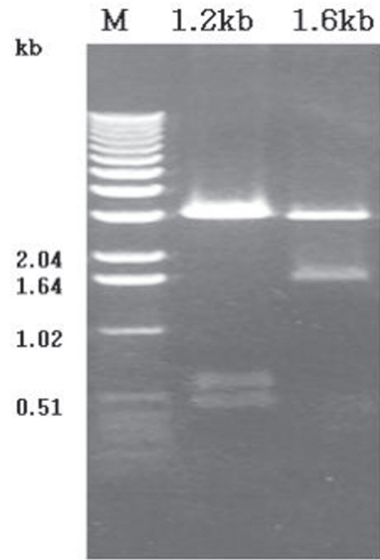


Fig. 3. Cloning of cDNA fragments, which are specifically expressed on white colored mycelia of *L. edodes*, into pBluescriptor cut with EcoRV. Lane 1 is clone 1(1.2kb) from differential display of white mycelia by using OPA 3, lane 2 is clone 2(1.6 kb) from differential display of white mycelia by using OPA 10. M is 1kb ladder DNA size maker.

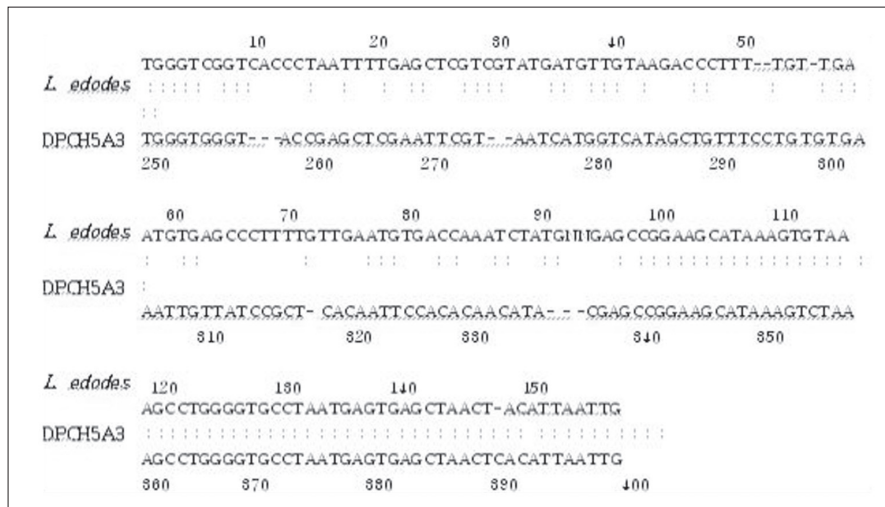


Fig. 4. Comparison of deduced DNA of 1.6kb cDNA fragment from white mycelia of *L. edodes* with microsatellites from the planarian flatworm *Dugenia polychroa*.

stramineus, *P. sajor-caju*, *P. florida*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum* 각 1 균주씩을 PDB액체배지에 15일간 배양하였다. 배양된 균사체를 3M paper위에 놓고 배지를 제거한 후 동결건조하여 유발에서 액체질소로 마쇄하였다. 마쇄된 균사체 200mg에 CTAB buffer(1% hexadecyl trimethyl ammonium bromide, 0.7M NaCl, Tris-HCl, 1% 2-mer-

captoethanol, 0.2% sds, 50mMEDTA) 600 μ l를 넣고, vortex 후 65 $^{\circ}$ C에서 40분간 반응 시켰다. 반응 후 동량의 chloroform을 넣은 후 조심스럽게 섞고 12,000rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 새로운 tube에 옮기고 isopropanol로 침전 시켰다. 침전물을 TE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) 300 μ l에 잘 녹인 후 RNase를 처리하고 phenol: chloroform:


```

5' TAT CAG CCA CTG GGT CGG TCA CCC TAA TTT TGA GCT
CGT CCG TCA TGA TGT TGT CGA GCC CTT TAT TGA ATG
TGA CCA AAT CTA TCA TCT TGC TTG TCC CGC ATC *CCC
TCC TCA CTA CCA GTT TAA TCT GTC CCA AAA ACC GTC
AAG ACT TCT TTC AGG GAC CTC AAT ATG CTT GCT TCG
GCC AAG GCA CCA AGG CAC GGT CTG ATC TCA AGC
AC-----CC AAA AGT GCC TCA CTT
ACT TTT ATG TAC GAA TCG GAA CGG TCA TCA CTG GAT
GTC GGT AAT TTT CTT TA**G GTT AAT TAG ATT GGG GAT
ACA TAT TCG AAT AAT ATC GAT GGT TAT ACA TAT AAA
AAA AAA A 3'

```

Fig. 5. Partial sequencing of the 1.2kb cDNA fragment and construction of the 1.2 kb cDNA specific new primers. Putative poly A tail signals(AATAA) and a poly A tail(AAAA) are indicated. Dotted underline portion(*, **) were constructed as sense primer(* 5' CCCTCCTCACTACCA GT 3') and antisense primer(** 5' CCCC AATCTAATTAAC C 3').

isoamylalcohol(25:24:1)을 동량으로 넣어 5분간 조심스럽게 섞은 후 12,000rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 취한 후 0.3M ammonium acetate와 absolute ethanol로 침전시키고 70% ethanol로 세척하였다. 분리된 DNA를 TE buffer에 녹인 후 spectrophotometer (260nm/280nm)에서 흡광도(O.D)를 측정하여 template DNA의 농도를 조정하였다.

RAPD 분석

PCR 반응액의 조성은 기본적으로 Williams 등(1990)의 방법에 따랐다. 그러나 $MgCl_2$ 의 농도, template DNA의 농도 등은 예비시험을 통하여 결정하였다. 20 μ l의 반응총액에서 20mM Tris-HCl, 0.1mMEDTA, 0.1M KCl, 0.5% Tween 20의 buffer를 사용하였고, 100 μ M $MgCl_2$, 100 μ M primer, 25ng의 DNA, 0.2mM dNTP, 1 unit Taq polymerase(Boehringer Mannheim Co.)를 첨가하였다. PCR 반응은 94 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 pre-denaturing시키고, 94 $^{\circ}$ C에서 1분동안 annealing 시킨 다음, 94 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 denaturing, 55 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 annealing, 72 $^{\circ}$ C 2분-polymerization을 35 cycle로 처리하였다. 처리한 PCR산물은 1% agarose gel상에서 전기영동한 후 ethium bromide로 염색 후 UV하에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

백색과 갈색균사간에 특이적으로 발견되는 cDNA의 확인 표고균사로부터 갈변에 관련된 유전자를 탐색하기 위하여 15일간 배양된 백색의 균사와 40일간 배양된 갈색의 균사로부터 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA로부터 역전사효소를 이용하여 total cDNA를 합성한 후 다양한 random primer를 사용하여 differential display를 실시한 결과 OPA 3와 OPA 10을 primer로 사용한 differential display PCR반응에서 각각 1.2kb와 1.6kb의 밴드가 백색균사로부터 특이하게 나타나는 것이 확인되었다(Fig. 2). Sreenivasaprasad와 Burton(1995)은 양송이의 자실체를 수확 후 신선한 버섯과 저장 중 갈변된 버섯에서 mRNA differential display를 실시한 결과 신선버섯에서 두 개의 다르게 발현하는 cDNA 절편을 분리하였다. 이는 갈변과정 중에 갈변에 대해 특이하게 반응하는 유전자들이 많이 발현하는 것으로 생각된다. 이 특이 밴드들을 분석하기 위하여 agarose 젤에서 분리 후 EcoRV로 절단된 plasmid에 클로닝한 후 제한효소 *EcoR*I과 *Hind* III로 절단하여 삽입된 cDNA의 특성을 확인하였다(Fig. 3). 그 결과 1.2 kb cDNA는 내부에 *EcoR*I 또는 *Hin* III중에 하나의 site를 가지고 있기 때문에 0.5,

0.7 kb의 두 개의 insert로 분리되었다.

염기서열 분석

클로닝된 cDNA단편들의 특성을 분석하기 위하여 부분 염기서열을 실시한 결과 1.6kb의 cDNA단편의 96번째부터 159번째 63bp에 해당하는 염기서열 부분은 *Dugenia polichroa* (planarian flatworm)에서 보고(Ramachandran, unpublished)된 micro satellites 유전자와 100%의 상동성을 나타내었다(Fig. 4). 이 결과는 1.6kb의 cDNA가 protein coding 유전자가 아닐 것이라고 사료되었다. 반면 1.2kb의 cDNA단편의 부분염기서열(약200bp)분석결과 이 cDNA는 고등생물의 mRNA에서 볼 수 있는 특징인 poly A tail과 부분적 open reading frame을 3'말단과 5'말단에서 각각 가지고 있었다(Fig. 5). 그러므로 1.2kb의 cDNA단편을 protein coding gene으로서 본 연구에서 추구하는 색소생성 관련 유전자의 일종일 것으로 추정되었다.

1.2kb cDNA의 색소형성관련성 확인

Protein coding 유전자로 추정되는 1.2kb cDNA 단편의 색소생성 관련여부를 확인하기 위하여 RT-PCR방법을 이용한 유전자 발현 분석을 실시하였다. 먼저 이 1.2kb cDNA 단편의 정확한 발현 신호(signal)를 탐지하기 위하여 cDNA의 판독된 염기서열과 일치하는 20mer의 특이 primer를 제작하였다(Fig. 5).

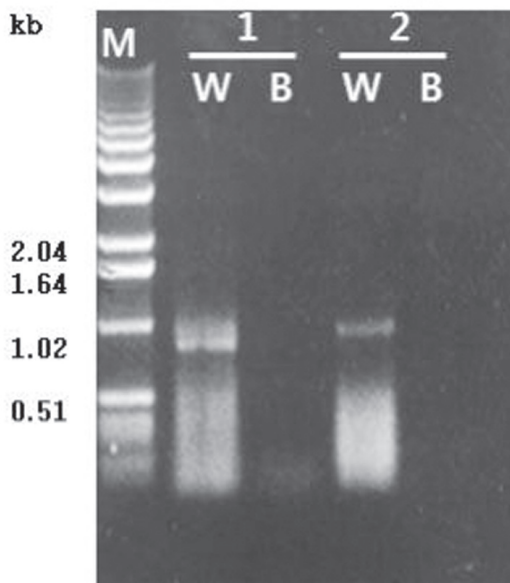


Fig. 6. RT-PCR by using newly designed specific primer with RNA of periodical grown mycelia of *L. edodes*. Total RNA(2 μ g) from white(W) and brown(B) colored mycelia was amplified by PCR with newly designed specific primer(1), and designed sense primer and oligo dT primer(2). The RT-PCR products were separated by electrophoresis on 1.2% agarose gel with 1kb ladder DNA size marker(M).

분리된 백색 및 갈변균사의 total RNA를 이용하여 제작된 primer를 이용하여 RT-PCR을 실시한 결과 백색균사에서만 cDNA의 증폭이 확인되었다(Fig. 6). 이 결과는 이 유전자가 균사의 갈변에 관련이 있음을 나타내고 있으나 균사가 백색인 상태에서 생성되어 갈변이 되면서 사라지는 것인지 또는 시기적으로 균사의 성장과 관련된 유전자인지를 확인하기 위한 시기적 발현시험이 필요한 것으로 사료되었다.

1.2kb 유전자의 확인

백색의 표고균사로부터 분리한 1.2kb 유전자절편으로부터 제작한 primer를 가지고 표고균주 9개와 현재 품종으로 등록되어 있는 원형느타리, 2-1, 201, 202 품종과 애느타리 품종을 포함한 느타리 5균주, 노랑느타리, 전복느타리, 여름느타리, 사철느타리, 팽이, 영지 등, 각각 1 균주씩을 공시하여 PCR로 이 유전자의 존재여부를 확인하였다(Fig. 7). 그 결과 공시한 9균주의 표고 균주에서만 PCR산물을 확인할 수 있었으며 다른 균주에서는 cDNA합성이 인정되지 않아 이 유전자가 표고에만 고유하게 존재함을 알 수 있었으며, 표고균주의 분별에도 사용될 것으로도 기대되었다.

1.2kb 유전자의 발육시기별 발현 양상

앞에서 분리된 1.2kb 유전자가 색소생성과 관련이 있는지, 표고 균사의 생육시기별로 발현되는 유전자 인지를 확인하기 위하여 15일간 배양된 백색의 균사, 30일간 배양하여 갈변이 되기 시작하는 균사 및 47일간 배양하여 균중이 완전한 갈색으로 되어 원기를 형성한 균사로부터 total RNA를 분리 정량한 후, RT-PCR에 의한 1.2kb 유전자 의 검출정도를 분석하였다(Fig. 8, 9). 그 결과 이 유전자에 대응하는 이 cDNA는 백색균사에서만 발현되었으며, 원기를 형성하거나 균사가 갈변화되는 균사에서

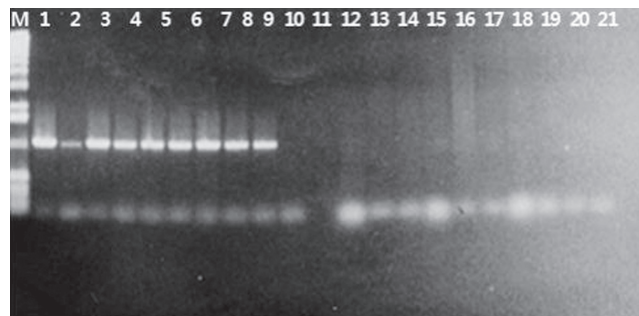


Fig. 7. PCR analysis searching the BCR gene on other species using newly designed specific primer. Lane 1 to 9 were 9 strains of *L. edodes* and lane 10 to 14 were 5 strains of *P. ostreatus*. Lane 15, 16, 17, 18, 19, 20, and 21 were *P. conucopiae*, *P. cystidiosus*, *P. salmoneo-stramineus*, *P. sajor-caju*, *P. florida*, *Flammulina velutipes*, and *Ganoderma lucidum*, respectively. The PCR products were separated by electrophoresis on 1.2% agarose gel with 1kb ladder DNA size marker(M).

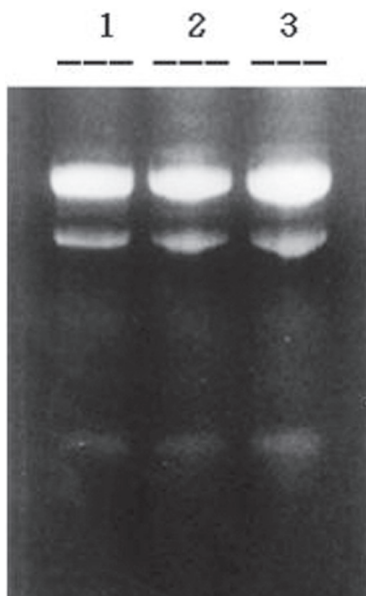


Fig. 8. Total RNA isolation from white mycelia(1), brown mycelia(2), fruiting mycelia(3) of *L. edodes*

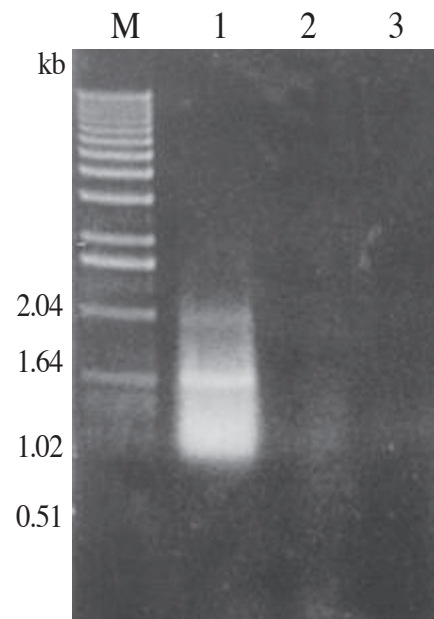


Fig. 9. RT-PCR by using newly designed BCR specific primer with RNA of periodical grown mycelia of *L. edodes*. Total RNA from white mycelia(1), brown mycelia(2), fruiting mycelia(3) of *L. edodes* was subjected to RT-PCR reaction to analyze the 1.2kb gene expression pattern in various stages.

10	20	30	40	50
5' ATCAGCCACTGGGTCCGGTCACCCTAATTTTGAGCTCGTCCGTCATGATG				
I S H W V G H P N F E L V R H D V				
60	70	80	90	100
TTGTCGAGCCTTTATGATTGAATGTGACCAAATCTATCATCTTGCTTGT				
V E P F M I E C G Q I Y H L A C				
110	120	130	140	150
CCCGCATCCCCTCCTCACTACCAGTTTAAATCTGTCAAACCGTCAAGAC				
P A S E P H Y Q F N S V K T V K T				
160	170	180	190	200
TTCTTTCATGGGTACCCTCAATATGCTTGGTCCGGCCAAGGTACCAAGGG				
S F M G T L N M L G R A K V P R A				
210	220	230	240	250
CACGTTTCCTGATCTCAAGCACCTCCAAGGTGTACGGAGACCCTGAGGTC				
R F L I S S T S K V Y G D P E V				
260	270	280	290	300
AACCCACAACCTGAGGATTACTGGGGTAATGTCAACCCGATTGGTGATCG				
N P Q P E D Y W G N V N P I G D R				
310	320			
GGCTTTCATGATGAAGGAAAAGGGTCGG 3'				
A C Y D E G K G				

Fig. 10. Nucleotide and deduced amino acid sequence of cDNA fragment isolated by mRNA differential display of white mycelia of *L. edodes*.

	10	20	30	40	50
<i>L. edodes</i>	ATCAGCCACTGGGTCGGTCAACCTAATTTGAGCTCGTCGGTCATGATG				
dTDP-G	GTTATGCACCATTTTCAGTAACCCCTAACCTTTGAGATGATCCGTCACGATG				
	60	70	80	90	100
<i>L. edodes</i>	TTGTCGAGCCCTTATGATGAAATGTGACCAAATCTATCATCTTGCTTGT				
dTDP-G	TGGTGAGCCGATTTCTTGTGAGGTTGATCAGATCTACCATTTGCTTGC				
	110	120	130	140	150
<i>L. edodes</i>	CCC GCATCCCTCCTCACTACCAGTTAATTTCTGTCAAAAACCGTCAAGAC				
dTDP-G	CCTGCTTCTCCTGTTCAATTAACAATTCACCCGTC AAGACTATCAAGAC				
	160	170	180	190	200
<i>L. edodes</i>	TTCTTTTCATGGGTACCCCTCAATATGCTTGGTTCGGCCAAAGGTACCAAGGG				
dTDP-G	GAATGTGGTTGGAACATTGAACATGCTTGGTTGGCTAAGCGAGTTGGGG				
	210	220	230	240	250
<i>L. edodes</i>	CACGTTTCTGATCTCAAGCACCTCCAAAGGTGTACGGAGACCCCTGAGGTC				
dTDP-G	CTAGATTTCTTCTGACGAGTACCAGTGAGGTTTATGGTGATCCTCTCGAC				
	260	270	280	290	300
<i>L. edodes</i>	AACCCACAACCTGAGGATTAATGGGGTAAATGTC AACCCGATTTGGTGATCG				
dTDP-G	CATCCTCAGGTTGAGACTTACTGGGGCAACGTTAATCCCATTTGGTGTTCG				
	310	320			
<i>L. edodes</i>	GGCTTTCTATGATGAAGGAAAAGGGTCGG				
dTDP-G	TACTTGCTACGATGAAGGAAAACGTACGG				

Fig. 11. Sequence homology between cDNA fragment and dTDP-glucose 4,6-dehydratases gene of *Arabidopsis thaliana*. Comparison of the deduced DNA sequence of the partial cDNA fragment of white mycelia of *L. edodes* with the dTDP-glucose 4,6-dehydratases gene of *A. thaliana*.

는 발견되지 않았다(Fig. 9). 이러한 결과는 이 유전자가 균사의 생육과 관련된 대사 생리에 필요한 유전자가 아니고, 갈색색소 형성을 조절하는 유전자로서 이 유전자의 생산물이 갈색형성 관련 효소의 유전자를 억제하는 repressor로서 작용하는 것으로 추정되기 때문에 이 유전자를 BCR(brown color repressor) 유전자로 명명하였다.

BCR 유전자의 염기서열 분석

표고균사의 갈변에 대한 repressor 유전자로 추정되는 BCR 유전자의 특성을 분석하기 위하여 이 유전자 단편의 염기서열을 분석하였다. 약 300 bp의 5'말단영역의 염기를 결정하고 아미노산을 추정된 결과, 약 110개의 아미노산으로 구성된 open reading frame을 가지고 있는 것으로 밝혀졌다(Fig. 10). 이 염기서열을 유전자은행에 보고된 기존의 유전자들과 상동성을 비교한 결과 *Arabidopsis thaliana*로부터 분리된 dTDP-glucose 4,6-dehydratase 유전자의 DNA 및 아미노산과 66.9%와 69.2%의 상동성을 보였다(Fig. 11, 12).

dTDP-glucose 4,6-dehydratase는 효모에서 세포의 thiol를 산화시키고 산화 stress를 유도하는 diamide가 과발현(overexpress)될 때 산화에 의한 피해에 저항성을 나타내게 하는 기능을 가진 것으로 밝혀져 있다(Kushnir 등, 1995). 곰팡

	10	20	30	40	50
<i>L. edodes</i>	ISHWVGHDPNFEVLRHDVVVEPFMIECDQIYHLACPASPPHYQFNSVKTVKT				
dTDP-G	VMHFSMPNFEMIRHDVVVEPILLEVDQIYHLACPASPVHYKFMVVKTIKT				
	60	70	80	90	100
<i>L. edodes</i>	SFMGTLNMLGRAKVPRARFLISSTSKVYGDPEVNPQPEDYWGNNVPIGDR				
dTDP-G	NVVGTLNMLGLAKRVGARFLTS TSEVYGDPLQHPQVETYWGNNVPIGVR				
	160	170	180	190	200
<i>L. edodes</i>	ACYDEGKGS				
dTDP-G	SCYDEGRRT				
	210	220	230	240	250
<i>L. edodes</i>					
dTDP-G					
	260				

Fig. 12. Comparison of the deduced amino acid sequence of the cDNA fragment of white mycelia of *L. edodes* with the dTDP-glucose 4,6-dehydratases gene of *Arabidopsis thaliana*.

이나 식물에서 색소를 형성하는 효소들의 대부분이 산화반응을 나타내며 작용하는 효소이므로 이러한 결과를 종합하여 볼 때 이 시험에서 표고의 갈변이 phenoloxidase와 같이 산화환원반응에 의한 작용임을 감안할 때 분리된 BCR 유전자가 갈변과정에 관련된 repressor 유전자일 가능성이 매우 높은 것으로 추정되어졌다. 향후 이 유전자를 homologous recombinant에 의해 만든 anti-sense mRNA 방법 등을 통해 발현억제 시킴으로서 이 유전자의 색소형성 관련여부를 정확히 증명할 수 있을 것이며, 또한 유전자조작을 통하여 발현된 갈변 균주를 이용하여 갈변과 생육과의 관계 구명 및 병해저항성 관련여부 등의 연구에 이용될 수 있으며, 농가 재배의 표고 톱밥재배에서 배양기간을 상당히 단축시킬 수 있어 전체 재배기간을 단축시키는 등 버섯의 육종연구와 산업과 관련된 다양한 분야에서 이용될 수 있으므로 지속적인 연구가 진행되어야 될 것으로 생각된다.

적 요

표고균사에서 갈변시기를 조절하고 확인할 수 있는 유전공학 적 시스템을 개발하여 톱밥재배용 표고균주를 조기에 선별할 수 있도록 표고균사가 갈변되는 동안 균사상태에서 특이적으로 발현되는 유전자를 분리하기 위하여 갈변되지 않은 균사와 갈변이 완전히 이루어진 균사에서 differential display를 실시하였다. 그 결과 이들 균사로부터 특이적으로 발현되는 두 개의 1.6kb와 1.2kb의 cDNA clone을 선별하여 염기서열을 분석하였다. 이 중 1.6kb의 cDNA단편은 *Dugenia polichroa*로부터 분리된 microsatellites 유전자와 100%의 상동성을 나타냈다. 그러나 1.2kb의 cDNA 단편은 3' 부위에 poly A tail과 5 부위에 partial open reading frame를 가지고 있어 이를 primer

로 제작한 후 갈변되지 않은 균사와 갈변이 이루어진 균사에서 RT-PCR을 실시하여 본 결과 갈변이 되지 않은 백색의 균사에서 발현이 확인되었다. 1.2kb의 cDNA 단편의 5' 부위의 염기서열 분석은 110개의 아미노산으로 구성된 partial open reading frame으로 나타났다. 이 유전자를 *DNASIS database*에서 상동성을 비교해 본 결과 *Arabidopsis thaliana*에서 분리된 dTDP-glucose 4,6- dehydratases 유전자와 DNA 수준에서는 66.7%, 아미노산 수준에서는 69.2%의 높은 상동성을 나타내었다. 갈변에 관련된 특이 유전자(BCR gene)를 확인하였다. 이 유전자는 산화 stress에 대해 저항성을 나타내는 기능을 가진 것으로 알려져 있어 표고 균사가 갈변될 때 repressor로서 작용할 것으로 생각된다. 따라서 이 유전자를 BCR (Brown Color Repressor) 유전자라고 명명하였다.

참고문헌

- 김영호, 유창현, 성재모, 공원식. 2007. 표고버섯의 톱밥재배에 있어 갈변과 관련된 효소작용. *한국버섯학회지* 5(3&4) : 91-97
- 김영호, 전창성, 박수철, 유창현, 성재모, 공원식. 2009a. 표고균사 갈변시 세포내 효소의 변화. *한국버섯학회지* 7(3) : 110-114
- 김영호, 전창성, 박수철, 유창현, 성재모, 공원식. 2009b. 환경 조건이 표고톱밥배지의 갈변에 미치는 영향. *한국버섯학회지* 7(3) : 115-121
- 김영호, 전창성, 박수철, 유창현, 성재모, 공원식. 2011. 표고수집균주의 재배적 특성 및 갈변과의 상관관계. *한국버섯학회지* 9(4) : 145-154
- Ando, M. 1974. Fruit-body formation on *Lentinus edodes*(Berk.) Sing. on artificial media. *Mushroom Sci.* IX(Part1) : 415-422.
- Diehle, D. A. and Royse, D. J. 1985. Shiitake cultivation on sawdust : evaluation of selected genotypes for biological efficiency and mushroom size. *Mycologia* 78 : 929-933
- Kushnir, S., Babiyshuk, E., Kampfenkel, K., Belles-Boix, E., Van Montagu, M., and Inze, D. 1995. Characterization of *Arabidopsis thaliana* cDNAs that render yeasts tolerant toward the thiol-oxidizing drug diamides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92(23) : 10580-10584.
- Royse, D. J. 1985. Effect of spawn run time and substrates nutrition on yield and size of the shiitake mushroom. *Mycologia.* 77(5) : 756-762.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(12) :5463-5467
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nded, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1659 p. ISBN 0-87969-309-6
- Sreenivasaprasad, S. and Burton, K. S. 1995. RNA display for identification of differentially expressed mRNA species associated with post-harvest quality of *Agaricus bisporus*. *Science and Cultivation of Edible Fungi*, Elliot(ed). *Mushroom Science X IV* : 749-754.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tigey, S. V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18 : 6513-6535.
- Yang, Y., Kwon, H. B., Peng, H. P., and Shih, M. C. 1993. Stress responses and metabolic regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in *Arabidopsis*. *Plant Physio.* 101 : 209-216.