

치마버섯(*Schizophyllum commune*)으로부터 A α mating locus의 분리 및 특성

박동철* · Charles P. Novotny¹ · Robert C. Ullich² · 이갑득³ · 이갑량
영남대학교 식품영양학과
Department of ¹Microbiology and ²Botany, University of Vermont
³동국대학교 화학과

Isolation and Characterization of A α mating locus from *Schizophyllum commune*

Dong-Chul Park, Charles P. Novotny¹, Robert C. Ullich²,
Kap-Duk Lee³ and Kap-Rang Lee

Dept. of Food & Nutrition, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea
Department of ¹Microbiology and ²Botany, University of Vermont, Burlington, VT05405, U.S.A.
³Dept. of Chemistry, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

ABSTRACT: This study was carried out to isolate and characterize A α mating locus controlling fruiting body formation directly in the Basidiomycete *Schizophyllum commune* growing in the North America. Total numbers of genomic library of *S. commune* UVM1-34 was about 2×10^4 cells. About 90% library was appeared to have about 35 kb inserted genome DNA in cosmid pTC20 vector. 6 clones were proved to have positive signal to probes within Z and Y region in colony and southern hybridization. In the mating activity test, all the 6 positive clones were appeared to have A α 3 mating activity although they had two different restriction patterns. pSC13 containing 5.7 Kb *PsyI*-fragment of UVM 1-34 A α 3 allele showed about 50% clamp cell formation indicating mating activity when cotransformation was done together with cosmid pTC20.

KEYWORDS: Basidiomycete, *Schizophyllum commune*, mating locus

담자균류중의 하나인 치마버섯(*Schizophyllum commune*)은 life cycle 동안에 homokaryon과 dikaryon으로 성장형태가 구분되며, 발아시에는 haploid spore가 homokaryon으로 되며 이들 homokaryon이 유전적으로 다른 포자와 융합하여 dikaryon을 형성한다. 여기에서 mating loci는 2개의 homokaryon 간의 sexual compatibility를 결정한다(Fincham등, 1979; Raper등, 1983, 1974). 치마버섯은 실험실에서 쉽게 자실체를 유도할 수 있고, life cycle이 10-14일로 비교적 짧기 때문에 유전분석이 용이한 model

system으로 선택되어 mating locus에 대한 연구가 집중적으로 이루어졌다(Giasson등, 1989; Koltin등, 1967; Rpaer등, 1988, 1985; Specht등, 1992; Stankis등, 1992, 1990; Ullich등, 1978). 그리고 현재는 Specht등(1988)에 의해 형질전환 체계의 확립으로 분자생물학적인 연구가 쉽게 이루어지고 있으며, 발생중의 주요과정에 대한 세포 조직학적 및 유전적 연구는 Raper등(1988, 1985)에 의하여 잘 연구 보고되어 있다. 또한 multiallele로 존재하는 4개의 A α , A β , B α 및 B β mating locus는 독특한 경로에 의해 조절되고 있는 것으로 알려져 있다(Ullich등, 1985). 이들 4개의 loci가 다른 유전자들을 조절하는 master

*Corresponding author

switch 역할을 어떻게 하는 가는 지금도 주요 관심사가 되고 있으며, 모두 59개로 추측되는 mating alleles에 대한 특성은 계속 연구중에 있다.

따라서 본 연구에서는 자실체 형성에 직접 관여하는 것으로 알려져 있는 A α mating locus를 북미 지역에서 자생하는 종으로부터 분리하여 대륙간에 나타나는 유전적 특성을 고찰해 보고자 한다.

材料 및 方法

균주, plasmids 및 배지

본 실험에서 사용된 치마버섯은 University of

Table 1. List of *S. commune* strains

Strain	Genotype	Use
UVM 1-34	A α 3 β 20 Ba3 β 3	t
UVM 1-65	A α 3 β 5 Ba1 β x	t
UVM 1-71	A α 3 β 1 Ba4 β 7	t
UVM 2-20	A α 4 β 1 Ba3 β 22	t
UVM 12-43	A α 3 β 5 Ba2 β 2 <i>ura1</i>	t
UVM T1	A α 4 β 1 Ba2 β 2 <i>trp1 ura1</i>	r
UVM T11	A α 4 β 1 Ba1 β 6 <i>trp1 ura1</i>	r
UVM T22	A α 3 β 1 Ba2 β 2 <i>trp1 ura1</i>	r

A α , A β , B α and B β mating type gene(numbers indicate specific alleles and x refers to an undetermined mating type); t, tester strain; r, recipient strain.

Vermont(U.S.A.)에 보존된 것을 사용하였으며 genomic library 제조에는 UVM 1-34가 이용되었다. 그리고 recipient와 test 균주에 대한 mating type 및 영양요구성은 Table 1에 나타내었다.

E. coli DH1 α 는 genomic library 제조시 host 균주로 사용되었으며, *E. coli* JM109는 recombinant phage의 증식과 일반적인 plasmid 조제에 사용되었다. *E. coli* DH5 α 는 주로 subcloning의 host 균주로, 그리고 pTC20 cosmid는 library 제조에 사용되었고, 그외의 plasmid는 subcloning등에 사용되었으며, 이들의 genotype은 Table 2에 나타내었다.

균사의 배양과 mating test, 그리고 Trp1⁺ transformants의 선발에는 CYM 배지(0.5 g MgSO₄·7H₂O, 0.46 g KH₂PO₄, 1.0 g K₂HPO₄, 2.0 g Bacto-Peptone, 2.0 g Bacto-Yeast Extract, 20 g Dextrose per liter)를 사용했으며, *trp1* recipient와 tester 균주를 사용할 때는 tryptophan을 최종농도 0.8 g/l로 첨가한 CYMT 배지를 사용했다. *E. coli*의 배양에는 LB, 2 YT 배지를 사용했으며, 필요에 따라 ampicillin을 50-100 μ g/ml로 첨가하여 사용하였다.

균사 배양 및 자실체 유도

치마버섯 균사의 배양은 Raper등(1974)이 사용한 CYM 배지를 사용하였으며 필요에 따라 agar를 첨가하였다. 자실체 유도는 다른 mating type allele을 가지는 colony를 절단하여 CYM 혹은 CYMT 한천 배지에 약 5 mm 간격으로 배양시켜, 약 2-3일 후에

Table 2. List of *Escherichia coli* strains and plasmids

Strains & plasmids	Genotype	Source
DH1 α	<i>supE</i> , <i>hsdR</i> ⁻ , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thiA1</i> , <i>relA1</i>	Novotony
DH5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r ⁻ k, m ⁺ k), <i>sup44</i> , <i>thi-1</i> , λ ⁻ , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>argF-lacZya</i>)169, α 80 <i>lacZ</i> Δ M15	GIBCOBRL
JM109	<i>recA1</i> , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>)	Promega
pTC20	Amp ^r , TRP1 ⁺ , <i>cos</i>	C. Specht
pBluescriptII KS(+)	Amp ^r	STRATGENE
pGEM7	Amp ^r	Promega
pSC13	Amp ^r	This work
pSCE1	Amp ^r	This work
pSCE2	Amp ^r	This work

fusion이 일어난 dikaryon을 현미경으로 관찰하여 clamp cell의 형성을 확인하고, 약 10-14일 정도 더 배양시켜 자실체의 형성을 확인한 후 4°C에 보관하였다.

균사로부터 chromosomal DNA 제조

Genomic library 제조에 쓰여진 UVM 1-34의 chromosomal DNA는 Specht등(1982)의 방법에 따라 추출하였다. DNA 정제를 위해 CsCl-gradient를 수행하였으며, 60,000 rpm에서 6시간 원심분리 후 DNA band를 syringe로 추출하여, EtBr을 제거 후 투석하여 농도를 확인하고, -20°C에 보관하였다.

Genomic library 제조

Genomic library는 STRATGENE의 GIGAPACK II PACKAGING EXTRACT kit를 사용하여 제조되었으며, 약 200 kb의 chromosomal DNA를 *Sau*3 AI으로 처리하여 약 30-40 kb 크기만을 이용하였으며, Vector와 Host cell로는 pTC20 cosmid와 *E. coli* DH1α를 각각 사용하였다.

Hybridization

Colony hybridization은 사용된 GB003 S & S Nytran membrane 제조사인 Schleicher & Schuell사의 방법에 준하였으며, Southern hybridization은 ICN의 Biotrans™ Nylon membrane을 사용하여 Maniatis등(1982)의 방법에 따라 수행하였다. Hybridization에는 ³²P-oligolabeled DNA를 probe로 사용하여 약 10⁶ cpm/ml 정도로 첨가하였다. Probe는 Pharmacia LKB의 oligolabeling kit의 방법에 준하여 제조하였다.

Protoplast 제조 및 transformation

치마버섯의 protoplast 제조는 Munoz-Rivas등(1986)의 방법에 따라 균사를 waring blender로 마쇄시킨 다음, 100 ml CYM 액체배지에 접종하여 30°C, 250 rpm으로 약 48시간 배양시킨 후, 다시 1분 정도 마쇄시켜, 9시간 더 진탕배양시켜 사용하였다. 집균된 protoplast 100 μl 당 1 ml의 1M sorbitol과 50 μl의 1M CaCl₂를 첨가하여 hemocytometer로 protoplast의 수를 계산하고, 최종 cell의 농도를 1-5×10⁸ protoplasts/ml로 하여 얼음속에 보관하였다.

분리된 mating locus의 activity를 확인하기 위한 transformation은 Specht등(1988)의 방법에 따라 주로 tryptophan 영양요구주로 만든 protoplast를 반응당 1-3×10⁷ cells 씩 사용하였으며, 30°C에서 2-3일 배양 후에 나타나는 균사 colony들로 mating test를 실시하였다.

結果 및 考察

치마버섯 Genome의 Aα locus 검정

UVM1-34 균주의 genomic DNA내에 Aα3 allele의

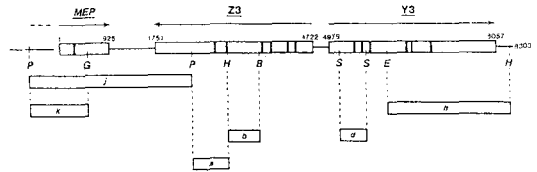


Fig. 1. Restriction map of UVM1-71 Aα3 allele. P, *Pst*I; G, *Bgl*II; H, *Hind*III; B, *Bam*HI; S, *Sal*I; E, *Eco*RI. Arrows indicate the direction of transcription. MEP partially encodes a putative methalloendopeptidase. Genes Z3 and Y3 are shown with putative exons(open boxes), and introns(shaded boxes). Nucleotide positions specify the beginning and end of DNA sequenced(left-to right). Boxes a-k is fragments used in probe preparation(Mary *et al.*, 1992).

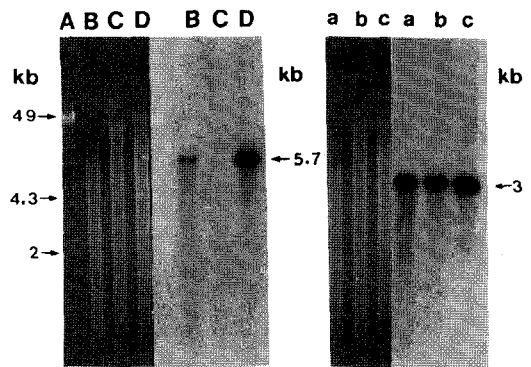


Fig. 2. Southern analysis of *S. commune* chromosomal DNA probed with 'k' and 'a' fragments. The chromosomal DNA was digested with *Pst*I completely. Lane A: λ-*Hind*III DNA size marker, lane B, a: UVM 1-71, lane C, b: UVM 1-65, lane D, c: UVM 1-34

확인을 위하여 Southern hybridization을 수행하였다. Probe DNA는 Specht등(1992)이 남미자생의 UVM 1-71 균주로부터 분리한 Aα3 allele locus 내의 단편들을 사용하였다(Fig. 1). 그 결과 Fig. 2에서처럼 'a' probe에 대해서는 약 5.7 kb 부근에, 그리고 'k' probe에 대해서는 약 3 kb 부근에 signal을 나타내었다. Stankis등(1992)이 행한 1-71 균주의 Aα3 allele의 sequence에서는 Aα1에서 Aα9까지의 allele에 대해 모두 mating activity를 가지는 5,733 bp 단편과 비교할 때 1-34 균주에서도 거의 같은 genome 크기의 Aα allele를 가지고 있음을 알 수 있었으며, 같은 Aα3 allele를 가지는 1-65(Aα3β5 Ba1βx) strain의 *Pst*I-digested chromosomal DNA에 대해서는 signal이 전혀 나타나지 않았다. 이 같은 결과는 유럽 지역의 England(Knole park)에서 채취된 1-65 균주의 Aα3 allele이 남미 Brazil에서 채취된 1-71 strain의 Aα3 allele locus와 homology가 없는 것으로 추측된다. 그리고 'k' probe에 대해서 모두 같은 크기의 signal을 나타내는 것을 볼 때 공통의 MEP 유전자를 발현하고 있는 것으로 사료된다. 치마버섯에서 나타나는 MEP 유전자내의 TLFHEMGMHAM peptide 배열은 전형적인 Zink-dependent metalloendopeptidase의 active site 임이 암시되고 있지만,

MEP locus가 Aα locus를 어떻게 조절하는 가는지 아직 밝혀지지 않고 있다.

UVM 1-34 균주의 genomic library 동정 및 colony hybridization

제조된 library의 Insert genome 크기를 분석하기 위하여 무작위 10개 colony에 대한 DNA 분석한 결과, Fig. 3에서처럼 평균 약 35 kb의 Inserted DNA를 함유하고 있는 것으로 확인되었다. 'a', 'd' Probe로서 약 1×10⁴개의 colony에 대한 점정 결과 probe 'a'에 대해 signal을 나타내는 1개 clone과 보다 약한 signal을 띠는 2개 clone을 얻었으며, 순수한 clone 분리를 위해 다시 'd' probe를 사용한 결과 약 60%가 두 probe에 대해 positive signal을 나타냄을 확인하였다.

이 중에서 probe 'a', 'd'에 강한 signal을 띠는 6개의 순수한 colony를 임의로 다시 선정하여 cosmid DNA를 추출하여 제한효소형을 확인한 결과, Fig. 4에서처럼 2가지의 제한효소형이 나타남으로서 서로 다른 fanking region을 지니고 있음을 알 수 있었다.

UVM 1-34 Aα3 allele clones에 대한 southern hybridization

제한효소형이 같은 clone 중에서 2개를 선정하여 MEP region의 'k'와 Z 부위의 probe 'a'를 사용한 결과 2가지형의 clone 모두 강한 signal을 나타내

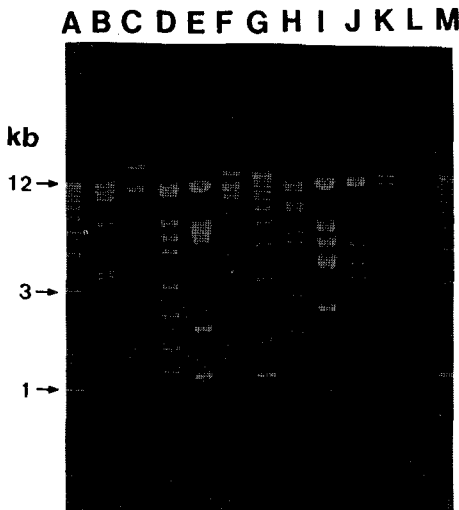


Fig. 3. Electrophoretic analysis of UVM 1-34 genomic library. Cosmid DNAs were digested with *Eco*RI completely. Lane A, G, M: 1 kb ladder DNA, lane B-F, H-L: Cosmid library DNAs

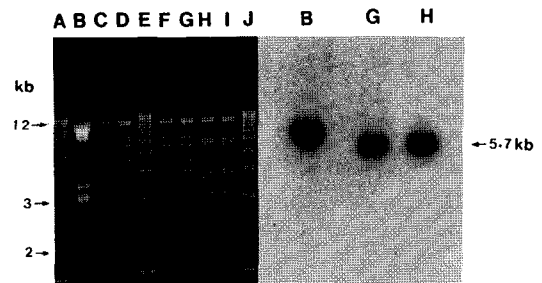


Fig. 4. Southern analysis of UVM 1-34 Aα3 alleles probed with 'b' fragment. Cosmid DNAs were digested with *Pst*I completely. Lane A, E, J: 1 kb ladder DNA, lane B: UVM 1-71 Aα3 cosmid, lane C: No.2, lane D: No.6, lane F: No.13, lane G: No.16, lane H: No.18, lane I: No.20

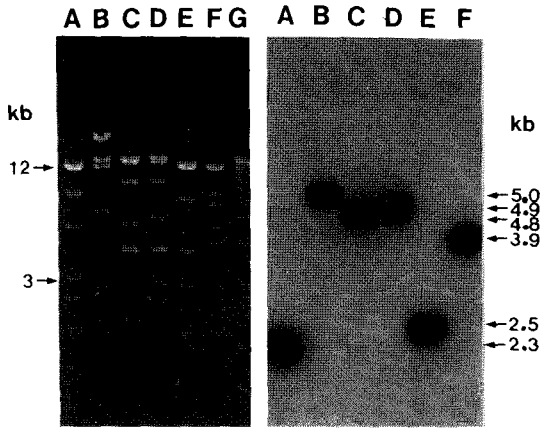


Fig. 5. Southern analysis of cloned 1-34 A α 3 allele (No.13) probed with 'h' fragment. Cosmid DNA was digested with 3 restriction enzymes completely.
Lane A: *Hind*III/*Eco*RI, lane B: *Hind*III, lane C: *Bam*HI/*Hind*III, lane D: *Bam*HI, lane E: *Eco*RI/*Bam*HI, lane F: *Eco*RI, lane G: 1 kb ladder DNA

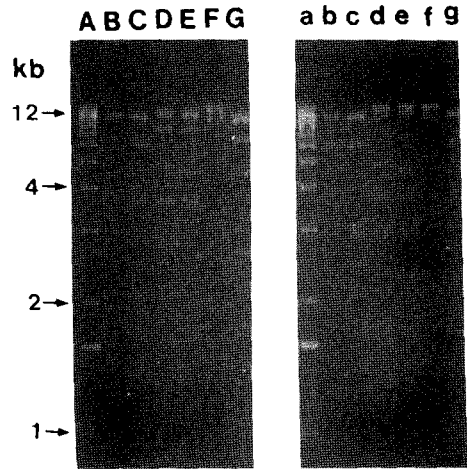


Fig. 6. Electrophoretic patterns of UVM 1-34 A α 3 cosmid clone No.13, 18 digested with restriction enzymes.
Lane A, a: 1 kb ladder DNA, lane B: No.13-*Eco*RI, lane b: No.18-*Eco*RI, lane C: No.13-*Eco*RI/*Bam*HI, lane c: No.18-*Eco*RI/*Bam*HI, lane D: No.13-*Bam*HI, lane d: No.18-*Bam*HI, lane E: No.13-*Bam*HI/*Hind*III, lane e: No.18-*Bam*HI/*Hind*III, lane F: No.13-*Hind*III, lane f: No.18-*Hind*III, lane G: No.13-*Hind*III/*Eco*RI, lane g: No.18-*Hind*III/*Eco*RI

Table 3. Fraction of A α^a transformants/TRP⁺ transformants obtained with three recipients each carrying 6 A α 3 allele clones.

Putative alleles carried by cosmid	A α^a allele of recipient cells		
	UVM T1	UVM T11	UVM T22
pTC 20 cosmid	0/10 ^b	0/10	0/10
17C cosmid	6/10	4/10	0/10
No. 2	6/10	8/10	0/10
No. 6	6/10	6/10	0/10
No. 13	6/10	10/10	0/10
No. 16	4/10	4/10	0/10
No. 18	0/10	8/10	0/10
No. 20	4/10	7/10	0/10

A α^a transformants produced hook cells and mated with strains carrying the same A α and A β alleles as the recipient, ^bRatio of A α to trp⁺ transformants

었다. 이들 중 한개 clone에 대해서 probe 'h'를 사용하여 확인한 결과, Fig.5에서처럼 모두 강한 signal을 볼 수 있었으며, 이로서 거의 완전한 mating locus를 함유하고 있음을 추측할 수 있었다.

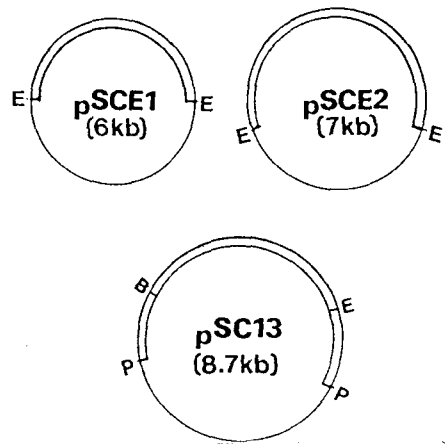


Fig. 7. Physical map of subclones from UVM 1-34 A α 3 cosmid clone (No.13). The thick line indicates for the *S. commune* genomic DNA and the thin line for pBluescriptII KS(+). E, *Eco*RI; P, *Pst*I; B, *Bam*HI

UVM 1-34 A α 3 allele clone의 Mating test
Colony hybridization에서 얻은 모두 6개 clone의

cosmid DNA로 transformation 시켜 CYM 배지에서 성장하는 trp^+ transformants로서 mating test를 실시한 결과, Table 3에서처럼 clone 모두가 mating activity를 가지고 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Fig. 4에서처럼 두가지의 다른 제한효소형을 가지면서 Z3 내의 probe에 대하여 같은 signal을 공통으로 가지는 결과와 비교해 볼 때, 같은 mating activity를 나타내는 locus들이 존재할 것으로 사료된다.

UVM 1-34 A α 3 allele clones의 제한효소형 및 mating activity region 확인

Mating test에서 선정된 두개의 clone(No.13, 18)에 대한 제한효소형은 Fig. 6에 나타난 바와 같으며, Fig. 7에서는 No.13으로부터 A α mating locus를 포함할 것으로 추측되는 3 kb(pSCE1), 4 kb(pSCE2), 5.7 kb(pSC13) 단편을 pBluescript II KS(+)에 subcloning 시켜 모식도로 나타내었다. 이들 3개의 clone들 중 Z, Y region이 함유하는 pSC13 DNA로서 pTC20 cosmid와 함께 cotransformation을 시켜 mating test를 한 결과, 약 50%의 mating activity를 가지는 것으로 나타났다.

摘 要

본 연구는 고등균류중 담자균류에 속하는 치마버섯에 있어 자실체 형성을 직접적으로 조절하는 mating locus의 분리 및 특성을 규명하고자 하였다. 북미 자생의 치마버섯 UVM 1-34 균주로부터 A α 3 allele 분리를 위하여 만든 genomic library의 전체 숫자는 약 2×10^4 cells로서 이중 약 90%가 약 35 kb의 inserted DNA를 가진 것으로 나타났으며, colony 및 southern hybridization을 통해 얻은 6개의 clone 모두가 mating activity를 나타내었다. 이 중에서 1개 clone을 선정하여 남미자생의 UVM 1-71 A α 3 allele의 Z, Y region을 포함하는 5.7 kb의 단편을 pBluescript II KS(+)에 subcloning 시켜 $trp1$ gene 함유의 pTC20 cosmid와 함께 cotransformation 시킨 결과 약 50%의 clamp cell 형성을 보임으로서 이 clone이 mating activity를 가지는 것으로 나타났다.

参考文献

- Fincham J. R. S., P. R. Day, A. Radford, 1979, "Fungal Genetics" 4th Ed. University of California Press. Berkeley.
- Giasson L., C. A. Specht, C. Milgrim, C. P. Novotny, and R. C. Ullrich, 1989, Cloning and comparison of A α mating-type alleles of the Basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Mol. Gen. Genet.* **218**: 72-77.
- Koltin Y., J. R. Raper and G. Simchen, 1967, Genetic structure of the compatibility factors of *Schizophyllum commune*: The B factor *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **57**: 55-62.
- Maniatis T., E. F. Fritsch, J. Sambrook, 1982, Molecular cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Munoz-Rivas A. M., C. A. Specht, B. J. Drummond, E. Froeliger, C. P. Novotny, and R. C. Ullrich, 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.
- Raper C. A., 1985, B-mating-type genes influence survival of nuclei separated from heterokaryons of *Schizophyllum*, *Experimental Mycology*, **9**: 149-160.
- Raper C. A., 1983, Controls for development and differentiation of the dikaryon in basidiomycetes. In: "Secondary Metabolism and Differentiation in Fungi". pp. 195-238 Marcel Dekker, Inc., New York.
- Raper, J. R., and R. M. Hoffman, 1974, *Schizophyllum commune*. In: King RC(ed) Handbook of genetics. Plenum, Press New York, pp. 597-626.
- Specht C. A., M. M. Stankis, L. Giasson, 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., USA*, **89**: 7174-7178.
- Specht C. A., A. Munoz-Rivas, C. P. Novotny, and R. C. Ullrich, 1988, Transformation of *Schizophyllum commune*: an analysis of parameters for improving transformation frequencies. *Exp. Mycol.* **12**: 357-366.
- Specht C. A., C. C. Diruso, C. P. Novotny, and R. C. Ullrich, 1982, A method for extracting high-molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi.

Anal. Biochem. **119**: 158-163.

Stankis M. M., C. A. Specht, Huiling Yang, Luc Giasson, R. C. Ullrich, C. P. Novotny, 1992, The A α mating locus of *Schizophyllum commune* encodes two dissimilar multiallelic homeodomain protein, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **89**: 7169-7173.

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.

Ullrich R. C., C. P. Novotny, C. A. Specht, E. H. Froeliger and A. M. Munoz-Rivas, 1985, Transforming basidiomycetes. In 'Molecular Genetics of Filamentous Fungi', Alan R. Liss Inc. pp. 39-54.

Ullrich, R. C., 1978, On the regulation of gene expression: incompatibility in *Schizophyllum*, *Genetics* **88**: 709-722.