

최 중
연구보고서

느타리버섯의 자실체 형성관련 유전자 및 변이체
균주를 이용한 육종소재 개발에 관한 연구

Studies for strain development to improve mushroom strain using the specific genes related with the fruiting bodies formation and mutant strains in *P. ostreatus*.

건국대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “느타리버섯의 자실체 형성관련 유전자 및 변이체 균주를 이용한 육종소재 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 8월 30일

주관연구기관명 : 건국대학교

총괄연구책임자 : 이 창 수

세부연구책임자 : 이 창 수

연 구 원 : 조 중 호

연 구 원 : 김 남 국

연 구 원 : 박 혜 란

협동연구기관명 : 코아바이오

생명과학연구소

협동연구책임자 : 이 진 성

연 구 원 : 김 기 환

연 구 원 : 박 재 홍

연 구 원 : 서 형 중

요 약 문

I. 제 목

느타리버섯의 자실체 형성관련 유전자 및 변이체 균주를 이용한 육종소재 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

버섯 자실체의 형성기작은 경제적으로나 학문적으로 버섯산업의 종사자에게 가장 주요한 관심대상 중 하나이다. 그러나 세계적으로 버섯의 자실체 형성관련 유전자의 분리나 기작에 대한 규명은 단편적으로만 이루어졌다. 본 연구의 목적은 국내에서 가장 많이 재배되며 경제적으로 중요한 느타리버섯을 대상으로 자실체 형성 및 형태에 관한 돌연변이체를 대량으로 분리하여 새로운 육종소재로 제공하고, 자실체 생육단계 별 특이발현 유전자와 돌연변이체 유발 원인유전자를 분리하여 그 유전자의 기능을 형질전환 기법을 통해 밝힘으로써 유전자와 유용형질과의 관계를 규명하고자 한다. 이렇게 해서 개발된 유용한 돌연변이체와 형질전환체는 교배육종과 분자육종의 소재로서 이용하여 느타리버섯의 품종개발을 촉진하고자 한다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

- 국제식물신품종 보호동맹(UPOV: The International Union for the Protection of New Varieties of Plants)에 가입됨으로써 느타리버섯이 보호품종으로 등록되어 우리나라 고유의 다양한 느타리버섯의 품종개발이 더욱 절실히 요구되고 있다.
- 수집된 느타리버섯균의 형태적 변이의 한계로 인하여 육종 소재의 소진 가능성이 높기 때문에 새로운 소재와 육종기술의 개발이 필요한 실정에 있다.
- 국내 소비자의 요구에 적합한 형태와 품질의 느타리버섯을 생산하기위한 신 육종소재의 기술개발이 이루어져야 할 필요성이 지적되고 있다.
- 양송이, 표고, 느타리 등 식용버섯류에서 형질전환에 관한 연구보고가 급속도로 증가하고 있어 형질전환 버섯의 실용화에 대한 기대감이 점차 높아지고 있다.
- 식용버섯류의 유용유전자들을 대량으로 분리 분석할 수 있는 기술이 요구된다.

- Post-genome 시대에 요구되는 대량의 유전자 기능분석 기술이 버섯류에서도 급속히 확산되고 있다.

나. 경제·산업적 측면

- 느타리버섯은 쌀, 사과 등 70가지 주요 농산물 중 단위면적 당 소득이 가장 높은 농산물로 밝혀졌다(1999).
- 느타리버섯은 1999년 8,000호 이상의 농가에서 70,000톤 이상을 생산하여 3,000억원의 생산액으로 농업총생산의 1.1%를 차지하고 있다.
- 최근 중국으로부터 느타리버섯의 종균이 수입되어 국내 버섯산업의 기반을 위협하고 있다.
- 중국으로부터 생버섯 수입의 가능성에 대비한 국내의 고품질, 고부가가치 느타리버섯의 품종 개발이 시급한 실정에 있다.
- 버섯류에서 유용유전자 개발 및 이용이 증가하고 있어 식품적인 가치 이외에 산업적 이용에 관한 연구도 활성화되어야 한다.

다. 사회·문화적 측면

- 건강, 무공해 식품으로서 소비자로부터 사랑을 받고 또한 대외 경쟁력 있는 농민들의 고소득 작목으로서 느타리버섯이 계속 유지되어야 한다.
- 버섯류 중 양송이는 유럽으로 대변되고 있고, 표고와 팽이버섯은 일본이 종주국으로 인정받는 것처럼 느타리버섯은 우리나라가 종주국이라는 입지를 굳힐 수 있는 세계적으로 인정받는 학문적, 실용적 연구업적과 연구그룹이 육성될 수 있도록 뒷받침되어야 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

- 느타리버섯 자실체 형성관련 돌연변이체 선발 및 변이의 원인유전자 분석
 - 느타리버섯의 REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration) 형질전환 방법에 의한 tagging mutant의 대량 선발.
 - 전통적인 U.V mutagenesis에 의한 돌연변이체의 대량 선발.
 - 병 재배에 의한 돌연변이체의 자실체 유기법의 확립과 자실체 및 균사체의 특성조사.
 - 느타리버섯 tagging mutant로부터 plasmid rescue에 의한 표현형 관련 유용형질 유전자의 분리.
 - 자실체 형태 및 품질관련 유용한 변이체의 원인유전자 기능분석 및 육종 소재화.

- 자실체의 발생단계별 특이발현 유전자의 염기서열 결정 및 발현양상 분석
 - 돌연변이처리용 모본으로 설정한 균주의 자실체 발생단계별 cDNA library의 제작과 total RNA의 대량 분리.
 - cDNA Random sequencing에 의한 자실체 발생단계별 특이발현 유전자의 분리.
 - Reverse northern blot에 의한 특이발현 유전자의 분리 및 발생단계별 발현양상 분석.
 - 특이발현 cDNA를 probe로 이용한 genomic clone의 선발 및 염기서열의 결정과 구조분석
 - 상동성 검색 및 구조분석에 의한 기능 유추.

- 자실체 형성관련 유전자와 표현형과의 관련성 분석 및 육종소재에의 이용개발
 - 돌연변이 원인유전자와 특이발현 유전자의 상동성 및 구조분석.
 - 유전자 결손과 과리발현의 형질전환체 생산을 위한 재조합 vector 제작.
 - 유전자 결손 및 과리발현 형질전환체 제작.
 - 형질전환체의 자실체 특성 규명에 의한 유전자의 기능 해석.
 - 유용형질관련 유전자 및 형질전환체의 육종소재로 이용.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

- 변이체 생산 조건확립 및 대량 분리
 - REMI 형질전환 체계를 확립함
 - U.V mutagenesis에 의한 돌연변이체 유발 최적조건을 확립함
 - 6,000개의 UV 처리 돌연변이체를 분리함
 - 형질전환체를 다수 분리함

현재 국내의 유전육종 소재는 부족하여 새로운 품종개발을 위한 연구 수행이 어렵다. 그러므로, 본 연구를 통해 개발된 돌연변이체의 특성분석을 수행하여, 육종소재로서의 사용이 가능하며, 다양한 유전형질을 가지는 균주는 관련된 발생의 기작을 밝히는 대상균주로서의 사용이 가능하다. 또한 형질전환의 체계는 향후 버섯의 약용, 기능성에 대한 연구 및 특정 유전자의 기능을 밝히기 위해서 필수적이며, 다양한 목적에 따라 그 사용이 가능하다.

- 자실체 발생단계별 특이발현 cDNA의 분리 및 발현분석
 - 8개 발생단계별 cDNA library를 제작함

- cDNA Random sequencing에 의한 자실체 발생단계별 16,000개 발현 유전자를 대량으로 분리하여 일차적으로 1,500개 unigene을 선발함.
- Genomic library를 제작함

느타리버섯의 8단계 발생단계에서의 EST 분석의 확립은 분자 유전학적 연구를 위한 매우 큰 성과를 이루었다고 할 수 있다. 다양한 목적의 연구기반이 되며, 유전 육종 및 첨단 기술의 수행을 위한 가장 필수적인 결과가 수행되었다.

- 느타리버섯 자실체 형성관련 돌연변이체 선발
 - 병 재배에 의한 돌연변이체의 자실체 유기
 - 버섯 특성분석을 통한 변이선발 수행함
 - 임성단핵 균주를 선발함
 - 색변이체를 분리, 특성분석함

다양한 돌연변이체는 변이기작을 분석하는 연구에서 사용이 가능하며, 돌연변이가 가지는 새로운 특성을 이용한 신품종 개발의 연구가 진행될 수 있다. 본 연구에서 분리한 임성단핵의 균주는 진균류의 영양식을 밝히는 매우 중요한 균주이며, 나아가 형질 전환의 체계를 완성하는 가장 이상적인 균주로서의 가치를 가진다. 그러므로 이렇게 중요한 임성단핵 균주는 육성되고, 연구되어 사용되어야 한다.

- 돌연변이 원인유전자의 분리와 구조결정
 - 단백질 분석을 통한 색변이의 원인을 분석함
 - DD-RT PCR을 이용한 변이원인 분석함
 - Reverse northern분석을 통한 임성단핵균주의 변이 원인 분석

돌연변이의 원인분석 연구는 학술적인 면에서 생리적 기작을 밝히는 중요한 연구라 할 수 있다. 나아가 신품종 개발과정에서 요구되는 품종 특이적인 표지인자의 개발 연구를 위해 중요하게 사용이 가능하다. 많은 분석연구 중에서 목적에 따라 적합한 방법이 시험되었으며, 이 후의 분석연구에서 동일한 전략으로 수행될 수 있다.

- 발생단계별 특이발현 유전자의 구조 분석
 - Reverse northern blot 분석에 의한 특이발현 유전자들의 발현 profile을 제작함
 - 72개 발생단계 특이발현 유전자를 선발함
 - 발생단계별 특이발현 유전자들의 상동성 검색 및 구조 분석에 의한 기능을 유추함

본 과제에 의해서 제작된 발현 프로파일은 버섯의 발생연구를 완성할 가장 중요한 data라 할 수 있다. 이러한 기본 연구의 수행은 이 후의 분석을 용이하게 한다. 72개의 발생 특이적인 유전자가 분석되었고, 동정되었다. 또한 4개의 가장 유의한 유전자는 전체 유전자 염기서열을 분석하여, 구조 분석이 수행되었다. 나머지 선발된 유전자에 대한 분석이 진행이 요구되고 있다.

o 형질전환에 의한 자실체 형성관련 유전자들의 기능분석

- beta tubulin promoter를 이용한 과리발현용 재조합 vector를 제작함
- 자실체 형성관련 유전자의 과리발현 형질전환을 수행함
- 형질전환체의 표현형을 검정 중

유전자의 over-expression 체계의 확립은 유전자의 기능을 밝히는 실험적인 방법임과 동시에 물질생산의 측면에서 사용될 수 있다. 본 과제에서는 느타리버섯의 발생단계 전체에서 다량 발현되는 beta-tubulin gene promoter를 이용하였다. 이러한 체계는 목적유전자의 발현량을 증가시켜 생리적 변화를 연구하는 측면과 동시에 또한 무한적 배양이 가능한 균사 상에서의 특정 유전자의 발현을 통한 물질 분리 및 특성분석이 가능하다.

o 자실체 형성관련 유전자와 표현형과의 관련성 규명

- 느타리버섯의 8개 발생단계에서의 16,000개 EST 분석의 완료
- 4,397개의 unigene 분석 및 yeast database의 검색을 통한 유전자 기능 분석함
- 농진청 농생명 유전체 정보센터에 database 구축함

느타리버섯의 8단계 발생단계에서의 EST 분석이 완성되었다. 중요한 연구기반인 본 결과는 이 후 전체적인 상동성 분석 및 기능분석, 그리고, chip 제작을 통한 발현 분석의 연구가 진행되어야만 한다. 또한 database의 정비를 통한 유용한 활용이 가능하도록 한다.

o 육종소재 개발

- 색변이체의 육종소재로 이용함
- 형질전환체 및 돌연변이체의 육종소재로의 이용을 위한 균주 제작

임성단핵 균주는 유전 육종의 측면에서, 색변이 균주는 버섯 품종개발에서 매우 중요한 육종소재로 인식되고 있다. 국내의 신품종 개발을 위해서는 색변이 균주를 사용하면 큰 성과를 얻을 수 있다. 그러므로 색변이 균주의 육종소재로서의 연구 개발이

요구된다. 그 외에 형질전환체는 약용, 기능성 버섯 개발의 측면에서, 그리고 돌연변이체는 유전 유종적 측면에서의 사용이 고려될 수 있으며, 이러한 연구를 진행할 수 있는 모균주의 제작이 우선되어야 할 것이다.

SUMMARY

(영문 요약문)

1. Subject

Studies for strain development to improve mushroom strain using the specific genes related with the fruiting bodies formation and mutant strains in *P. ostreatus*.

2. Objectives of the project

In the basidiomycetes, fruiting body formation is the most important and dramatic morphogenetic processes. The resultant product, the basidiocarp or fruit bodies of basidiomycetes are the complex structures where meiosis and basidiospore differentiation occur. The basidiomycetes which have the fleshy fruit bodies were called as mushroom and used as one of the important food. Therefore, the study of fruiting mechanism is important not only for basic knowledge on the mechanisms controlling this process, but also for its putative utilization to improve the output of industrially cultivated species. But for other basidiomycetes of edible value, there are few studies for genetic and molecular biological analysis of fruiting body mechanisms because molecular genetic system was not well developed such as the transformation system, mutant analysis and gene identification.

Pleurotus ostreatus known as the oyster mushroom is commercially important in the world mushroom market. In addition to importance for food production, *P. ostreatus* has, recently, received increasing attention for use in biobleaching, catalysis of difficult chemical conversion, and the pharmaceutical industry. But the fruiting body formation of important edible basidiomycetes is still unexplained and new stains are required to improve mushroom strains. Most of commercial strain cultured in Korea is not the developed stain by the studies, but the collected strain which is not stable and unknown phenotypes.

Both of our teams have focused on isolating the mutant derived by UV light and transformants and on analyzing the fruiting mechanism of *P. ostreatus* through molecular genetic approaches. In order to isolate the new strain for strain

improvements, the mutagenesis will be applied by this project. The mutant strains may be useful in genetic breeding programs and for the studies of fungal development and genetics. The transformation system of *P.ostreatus* will be examined, which is very important for fully accomplishing molecular genetic research. At the same time, for the study the developmental process of *P. ostreatus* and its regulatory mechanism, many numbers of EST sequence will be analyzed in developmental stages, and their expression profile will be constructed. The EST database construction is important to study development and is expected the improved genetic studies about developmental mechanism of *P.ostreatus*. The differentially expressed genes and other genes will be cloned and functionally analyzed. After our project, it will be the first analysis using many number of mutants strains and ESTs in *P.ostreatus*. And we can guess the function of the isolated fruiting body specifically expressed genes comparing the phenotype of overexpression transgenic mushrooms and suggest the useful information to identify the mechanism of fruiting body formation of *P. ostreatus*.

3. Contents and ranges of the project

A. The examination of condition for mutagenesis and mutants isolation

- 1) built up the transformation system by REMI transformation of *P.ostreatus*.
- 2) examine the condition of UV mutagenesis.
- 3) isolate mutant strain.
- 4) characterize the mushroom traits of mutant strains.
- 5) select the strain for the strain improvement.

The REMI transformation system will be examined *ura3* gene in uracil auxotrophs. But we will tried to develop the system using the antibiotics resistance gene. The new strain isolated by mutagenesis will be prepared for stain improvement in *P.ostreatus*

B. Gene expression profile and EST analysis of *Pleurotus ostreatus*

- 1) construct cDNA libraries of eight developmental stages.
- 2) analyse EST by cDNA random sequencing.
- 3) search the homology of ESTs by BLAST program.
- 4) construct the gene expression profile during fruiting by reverse northern.

- 5) screening the stage specific genes

The cDNA database will be constructed by using the EST results. This database will be contained the functional categories classified by yeast database. All data will be submitted to any researcher to use for the studies of *P. ostreatus*.

C. Differential gene expression during the developmental stages

- 1) Select the specifically expressed genes from EST analysis.
- 2) Isolate full length cDNA of fruit body specific gene by RACE method.
- 3) Analyse the gene expression in fruiting by northern blot, quantitative RT-PCR or Real-time PCR.

After analysing expression pattern of selected genes, we will isolate the most specific gene for fruit body formation in *P. ostreatus*. Full length cDNA of this gene will be constructed with over-expressing vector to be transformed into *P. ostreatus*.

D. Functional analysis of specific genes by the over-expression in *P. ostreatus*.

- 1) prepare the cassette vector for over-expressing gene by using beta tubulin promoter and terminator of *P. ostreatus*.
- 2) construct the over-expressing vector by recombination of specific cDNA into cassette vector.
- 3) prepare the host strain, which have homothallic character to be necessary for developing transgenic fruiting bodies without mating.
- 4) transform host strain by integrating the over-expressing recombinant vector.
- 5) analyse the gene expression level and the fruiting phenotype of transgenic mushroom.

The function of specific fruiting gene will be able to be suggested by analysing the gene expression and the phenotype of transgenic mushrooms.

4. Research results and suggestions for application of results

Pleurotus ostreatus, the oyster mushroom, is one of the most widely cultivated and important edible mushrooms in the world. In order to study the developmental process of *P. ostreatus* and its regulatory mechanism, both of our teams have focused on isolating the mutant derived by UV light and transformants and on analyzing the fruiting mechanism of *P. ostreatus* through molecular genetic approaches.

The results are summarized as follows.

1) The examination of condition for mutagenesis and mutants isolation

Restriction enzyme-mediated integration (REMI) transformation system was used to transform uracil auxotrophs by *ura3* gene and homothallic strain by carboxin resistant gene. The optimal condition for REMI of *P. ostreatus* was achieved when 1 μ g of vector DNA was added into 1×10^7 protoplasts along with 10 units *Bam*HI. Southern blot analysis revealed that about 50% of transformants examined were caused by REMI event and 30% carried single copy insertion at the genome. We proved that the REMI method might be a useful tool for efficient transformation and tagging mutagenesis of *P. ostreatus*.

The optimal conditions of UV treatment were examined and UV derived mutants were isolated and characterized by fruiting. 3,000 colonies were examined for abnormal mycelial and fruiting phenotypes. Forty one strains displayed variant phenotypes in mycelia and fruiting processes. The variant phenotypes were classified into 6 groups: (1) auxotrophic strains, which are incapable of growing on minimal media and can only grow when provided with their specific requirements; (2) abnormal vegetative strains, which grow very slowly on minimal and complete media; (3) primordiumless strains, which fail to develop to the formation of primordia; (4) maturationless strains, which form primordia, but do not form mature fruiting bodies; (5) specifically colored strains, which have specific bluish grey or bluish white pileus; (6) poorly spored strains, which fail to produce basidiospore or which produce few spores. These variant strains may be useful in genetic breeding programs and for the studies of fungal development and genetics. The proteome spots related with the mutation of the color-specific mutant was screened by 2DE analysis, and ten spots were isolated.

Monokaryotic fruiting strain should provide a good system to induce and

identify mutants, because mutations from such strain directly bring about mutant phenotypes regardless of their dominance. Homokaryotic fruiting mutant (MB-1) of *Pleurotus ostreatus* was isolated by fruiting inducement of monospore isolates. In normal strains, compatible mating process is essential for formation of fruiting bodies. But, the homokaryotic fruiting strain formed fruiting bodies without mating process with other strains. Only cold (4°C) shock treatment for 3 days was required for the fruiting of this strain. And then, the fruiting was performed at 18°C. After 10 days of fruiting, clamp connections were developed. In this time, it is detected by DAPI staining that all mycelia contained two nuclei per one cell. And after 25 days, complete fruiting bodies were developed. By microscopic observation of basidia, We knew that the basidia of this strain were normal and contained four spores. The protein pattern of this strain by SDS-PAGE was compared with that of their parental strain, ASI2706. And the EST clones related with the mutation of monokaryotic fruiting strain were screened by reverse northern analysis.

2) Gene expression profile and EST analysis of *Pleurotus ostreatus*

To characterize genes involved in fruit body development, eight complementary DNA (cDNA) libraries were constructed from RNA isolated from eight developmental stages of *Pleurotus ostreatus*. Using single-pass sequencing of cDNA clones, 16,000 expressed sequence tags (EST) were generated from eight cDNA libraries. A BLASTX search revealed that 173 of basidiospore ESTs (34%), 390 of the liquid-cultured mycelia ESTs (41%) and 531 of the mature fruiting body EST (50%) showed significant similarity to protein sequences described in the nonredundant database (E values $\leq 1 \times 10^{-5}$). When basidiospore, liquid-cultured mycelia, and mature fruiting body ESTs were compared by the Seqman II program, among the total of 16,000 ESTs, 4397 ESTs were unigenes. The functional catalogs of the ESTs were made by comparison with functionally identified *Saccharomyces cerevisiae* genes. All EST data were submitted at the database of National Institute of Agricultural Biotechnology. The EST database was constructed in www.niab.go.kr/nabic/index.html .

And to identify for differentially expressed genes during fruit body formation, we studied the gene expression profiles of 1594 unigenes using macroarray. Five stages, basidiospores, liquid-cultured mycelia, primordia, young fruiting body, and

mature fruiting body of *P. ostreatus* were compared for differential gene expression. There was a significant distinction in gene expression profile during fruiting body formation. Among the 1594 unigenes, 1528 unigene were altered in expression. 151 (9.5%) genes were expressed at higher levels on liquid-cultured mycelia, 161 (10.1%) genes were expressed at higher levels on primordia, 407 (25.5%) genes were expressed at higher levels on young fruit body, 634 (39.8%) genes were expressed at higher levels on mature fruit body, and 175 (11%) were expressed at higher levels on basidiospores. Also, We isolated the most specifically expressed genes in mycelia (8 genes), fruiting bodies (37 genes) and spores (7 genes). These genes were suggested that they significantly functioned in developmental process, and the functions of these gene were analyzed. These results indicate that our screening strategy is effective in isolating novel stage specific genes of *P. ostreatus*.

3) Differential gene expression during the developmental stages and the functional analysis of specific genes by the over-expression in *P. ostreatus*.

Of many stage-specific genes, firstly, we selected the metalloprotease gene which was the most specifically expressed gene during the fruiting body formation. A cDNA clone, PoMTP, encoding a putative metzincin family metalloprotease was isolated from the expressed sequence tags of a basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. The 5'-end sequence of PoMTP was determined by the 5'-RACE method. Full-length cDNA sequence (1,140bp) of PoMTP contained a 870bp open reading frame encoding a protein product of 290 amino acids in addition to a 99bp of 5'-untranslated sequence and a 171bp of 3'-untranslated sequence with a poly(A) tail. The deduced amino-acid sequences of PoMTP contained an extensive zinc-binding consensus sequence and a so-called Met-turn sequence which are typical for the metzincin family of metalloproteases, indicating that the PoMTP protein belongs to the metzincin metalloproteases. Northern blot and quantitative RT-PCR analysis indicated the PoMTP mRNA to be abundant at primordial and fruit body stages, but scarce at the mycelial stage, suggesting that the PoMTP metalloprotease plays an important role in mushroom fruiting. So, we decided that the functional analysis of PoMTP will perform by over-expression in *P. ostreatus*.

Also, we analyzed the expression of CK-II alpa subunit gene, G protein beta

subunit gene and ten unknown genes by Northern blotting, quantitative RT PCR or real time PCR. These fruiting body-specific genes were confirmed that they are differently expressed during developmental stages.

To test the function of Metalloprotease gene, we used the carboxin resistance gene, pTMI, obtained from Japanese researcher. At the same time, we constructed the over-expression vector of metalloprotease gene. This vector consisted of a full length cDNA of metalloprotease gene fused to the promoter and terminator regions of the *P. ostreatus* beta-tubulin gene. We co-transformed the carboxin resistance gene, pTMI, and the over-expression vector of metalloprotease gene of *P.ostreatus* by the REMI method. The host was used the monokaryotic fruiting strain. Many transformants were isolated, and now, were characterized by fruiting. By the character of host stain, the transformants were not developed stably and were developed lately. So, we can't isolate any significant transformant for developmental studies. Therefore, we are isolating the new monokaryotic fruiting strain which have more stable and effective phenotypes. But, It is suggested that this transformation system for functional studies can be used to express genes of *P.ostreatus*.

4) The preparation of new strains for stain improvement in *P.ostreatus*

The cap color of fruiting bodies may be one of the important traits for improvement strain of mushrooms. For the first time, specific colored strains of *P.ostreatus* were collected on the base of different visual color. We collected white, black, and bluish grey colored strains. This cap color was evaluated using UV/VIS spectrophotometer and color meter. The optical density was showed the highest value in black strain and then followed by normal dark grey, bluish grey, and white strain. It is reveal that the color values by color meter were different between specific colored strains. We can know that these strains are important strain for strain improvement of *P.ostreatus*. We analyzed the proteomes of different colored mushroom to develop the molecular genetic marker for protection of new strain. In the proteome analysis of mushroom, the relative expression patterns were compared by two-dimensional electrophoresis. More than 700 protein spots were detected on each gel. We found that 10 spots were identified to be differently expressed protein between different colored strains.

Many other mutant strains collected by this project were analyzed by above strategy. And these strains were used to develop the new improved strain by

mating process. After this work, we will be able to use the strain through the different purpose.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Outline of project-----	22
Chapter 2. Current state of research ibn domestic and foreign country-----	29
Chapter 3. Contents and Results-----	35
Section 1. The studies for development of mutant strain and strain improvement.	
1. Introduction-----	35
2. Material and method-----	35
3. Results and Discussion-----	45
A. Analysis of UV-derived mutants.	
B. Transformation of Uracil auxotroph by REMI method.	
C. Selection useful strains for genetic breeding.	
D. Transformation of <i>P. ostreatus</i> by using carboxin resistant gene.	
E. Analysis of the gene related with phenotypes of mutants.	
Section 2. The construction of gene expression profile in <i>P.ostreatus</i> and differential gene expression during the developmental stages.	
1. Introduction-----	84
2. Material and method-----	85
3. Results and Discussion-----	87
A. The construction of cDNA libraries during the developmental stages.	
B. Analysis of ESTs by cDNA random sequencing.	
C. Functional analysis of EST sequence base on gene ontology assignments.	
D. Gene expression profile during developmental stages.	

- E. Isolation of EST sequence during eight developmental stages.
- F. The construction of EST database on website.

Section 3. Fuctional analysis of fruiting bodies specific genes and the isoltion of new strain for strain improvement of mushroom.

1. Introduction-----	105
2. Material and method-----	105
3. Results and Discussion-----	108
A. Analysis of fruiting bodies specific genes during the developmental stages.	
B. Functional analysis of fruiting bodies specific genes by over-expression.	
C. Development of new strain for strain improvement of mushroom.	
Chapter 4. Accopmlishment of project and contribute to related matters-----	126
Chapter 5. Program of results application-----	132
Chapter 6. Acquirement of scientific technique information-----	134
Chapter 7. Reference -----	136

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요-----	22
1.	버섯연구의 중요성-----	22
가.	농업분야의 국제경쟁력	
나.	버섯분야의 국제경쟁력	
2.	버섯의 가치-----	23
가.	버섯은 유일한 작물성 미생물	
나.	버섯의 인체 효능	
3.	버섯 재배기술의 발전과정-----	24
4.	버섯 연구의 필요성-----	25
가.	한국형 고부가성 재배작물	
나.	경제적 중요성	
다.	사회적 중요성	
라.	학술적 중요성	
제 2 장	국내외 기술개발 현황-----	29
1.	국내 최신 연구동향 (최근 3-5년)-----	29
가.	버섯의 재배기술 및 효능 연구	
나.	버섯연구의 분자생물학적 분석기법 도입	
다.	느타리버섯과 그 유전자 연구	
라.	버섯 특허의 내용	
2.	국외 최신 연구동향 (최근 3-5년)-----	30
가.	주 연구대상 : 양송이버섯	
나.	느타리버섯 연구의 증가	
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과-----	35
제1절 버섯 변이주 개발 및 균주개량에의 이용연구		
1.	서론-----	35
2.	재료 및 방법-----	35
가.	U.V mutagenesis에 의한 돌연변이체 제작조건 확립	
나.	U.V. mutagenesis에 의한 대량의 돌연변이체 분리 및 분석	

다. REMI법에 의한 느타리버섯의 형질전환	
1) 느타리버섯 (ASI2029)의 uracil 영양요구성 균주를 이용한 형질전환	
2) Uracil 요구성 균주의 형질전환체 확인 및 대량의 형질전환체 제작	
라. 유전 육종에 유용한 돌연변이체의 선발	
마. Carboxin 저항성 유전자를 이용한 느타리버섯의 형질전환	
바. 돌연변이 원인유전자의 분리와 구조결정	
1) 돌연변이 균주의 프로테옴 분석	
가) 버섯의 균사체와 자실체로부터 단백질의 분리	
나) 단백질의 정량 및 SDA-PAGE 분석	
다) 이차원전기영동 분석	
라) Gel 염색	
2) 돌연변이 균주의 유전자 발현 분석	
가) DD-RT PCR	
나) Reverse Northern 분석	
다) 발현 profile제작	
3. 결과 및 고찰-----	45
가. UV mutagenesis를 통한 제작한 느타리버섯 변이체의 분석	
1) 돌연변이의 선발	
2) 자외선 처리 돌연변이 균주의 특성 분석	
나. Uracil 영양요구성 균주에 대한 REMI 형질전환	
다. 유전 육종에 유용한 돌연변이체의 선발	
1) 음성단핵 균주의 선발	
2) 흑, 백색 변이주의 선발	
라. Carboxin 저항성 유전자를 이용한 느타리버섯의 형질전환	
마. 돌연변이 원인유전자의 분리와 구조결정	
1) 2D 분석을 통한 색변이체의 변이 원인 검정	
가) UV 처리를 통해 분리한 푸른 갓색 버섯과 모균주의 분석	
나) 흑백색 변이체의 변이 원인 분석	
2) 음성단핵균주의 변이 원인 분석	

제2절 느타리버섯의 발생단계별 대량유전자 분리 및 특이발현 유전자의 분석연구

1. 서론-----	84
2. 재료 및 방법-----	84
가. 버섯 자실체의 cDNA library 제작	

나. EST 분석 및 기능별 분류	
다. Unigene을 이용한 Reverse blotting과 발현 profile 제작	
1) Reverse northern blot	
2) 발현 profile 제작	
3. 결과 및 고찰-----	87
가. 버섯 자실체의 cDNA library 제작	
나. cDNA random sequencing에 의한 균사, 자실체, 포자 단계별 발현 유전자 대량 분리	
다. EST 염기서열의 기능별 분류	
라. 발생 단계별 발현 Profile 분석	
마. 전체 느타리버섯의 발생단계의 발현 유전자 대량 분리	
바. 느타리버섯 EST의 database 구축 및 website 자료공개	

제3절 자실체 형성관련 유전자들의 기능분석 및 육종소재 개발

1. 서론-----	105
2. 재료 및 방법-----	105
가. 자실체 형성관련 후보유전자의 클로닝 및 발생단계별 발현 특성분석	
1) 후보유전자의 선발 및 발현분석	
2) 선발 유전자의 full length cDNA 클로닝	
3) 선발된 유전자의 정량 RT-PCR을 이용한 발현양상의 분석	
나. 형질전환에 의한 자실체 형성관련 유전자들의 기능분석	
1) 자실체 형성관련 유전자와 변이체 원인유전자의 재조합 vector 제작.	
2) 임성단핵 균주에의 재조합 vector의 형질전환	
3. 결과 및 고찰-----	108
가. 발생단계별 특이발현 유전자의 구조 및 기능유추	
1) 느타리버섯에서 유전자의 발현분석을 위한 housekeeping 유전자의 분석	
2) 자실체형성과정에서 특이적으로 발현되는 metalloprotease 유전자의 분석	
3) 자실체형성과정에서 특이적으로 발현되는 CK-II 유전자의 분석	
4) 자실체형성과정에서 특이적으로 발현되는 GPB 유전자의 분석	
5) 자실체 형성과정에서 특이 발현하는 유전자의 발현 분석	
나. 형질전환에 의한 자실체 형성관련 유전자의 기능분석	
1) 자실체 형성관련 유전자와 변이체 원인유전자의 재조합 vector 제작.	
2) 임성단핵 균주에의 재조합 발현 vector의 형질전환	
다. 육종소재 개발	

1) 육종소재로서의 흑색변이체 균주	
2) 백색, 청색버섯의 이용	
3) 소포자 균주의 육종 소재로 이용의 어려움	
4) 형질전환체의 이용을 위한 조건	
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도-----	126
1. 연차별 연구개발 내용-----	126
2. 연구 개발 목표의 달성도 및 기술발전의 기여도-----	128
3. 논문 발표 및 활용 실적-----	131
제 5 장 연구개발결과의 활용계획-----	132
1. 추가 연구의 필요성-----	132
2. 타 연구에의 응용-----	132
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	134
1. Real time PCR 법에 의한 유전자 발현량의 세밀한 분석-----	134
2. RNAi에 의한 유전자 기능분석-----	134
3. Carboxin 저항성 형질전환을 통한 manganese peroxidase의 과다발현.-----	134
4. 느타리버섯의 혈전 용해능 및 metalloprotease 연구-----	135
5. 해외 느타리버섯의 연구경향-----	135
제 7 장 참고문헌-----	136

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 버섯연구의 중요성

가. 농업분야의 국제경쟁력

세계무역협정(WTO) 출범과 동시에 우리나라의 농업은 큰 어려움에 직면하고 있다. 교통과 통신이 발달하고 각종 정보를 신속하게 공유할 수 있는 시대가 되어 살기 좋은 세상이 되었지만, 세계화가 되면서 농업은 경지면적이 우리보다 수십 배나 넓고 기계화된 선진농산물 수출국들과 경쟁을 해야 한다. 더구나 기후가 비슷하고 지리적으로 가까이 있으면서 인건비가 저렴한 중국과 인접해 있기 때문에 우리의 농산물은 국제적인 경쟁력을 갖추기가 쉽지 않으며, 전자제품 등 경쟁력이 있는 공산품을 수출하기 위한 전략적인 문제도 있어 농업은 점차 위축되어 가는 것이 현실이다. 또한 한·칠레 간의 자유무역협정이 체결될 것으로 보아 관세 등에 의한 농업의 보호막은 사실상 점차 없어지는 상황에 직면해 있다.

나. 버섯분야의 국제경쟁력

이에 우리 농업은 국제경쟁력 제고·고품질·생력·안전농산물 생산에 주력하고 있다. 개방화에 대비하여 농가 경쟁력 제고와 직결되는 작목 및 기술을 집중개발하고, 농산물의 품질 향상 및 친환경 농업기술 개발에 중점을 두고 있다. 농산물의 부가가치를 높일 수 있도록 농업생명공학을 이용한 새로운 친환경, 고품질의 품종과 소득향상을 위한 다용도 기능성 품종 개발 등 새로운 품종 육성에 주력하고 농산물 생산비 절감을 위한 재배기술 개발로 노력비를 절감하는 것을 국가적인 목표로 선정하여 수행하고 있다(2003, 국정감사자료). 이러한 노력에 대하여, 버섯은 친환경 농업기술에 의해 재배되며, 무농약 청정 작물로서 국내 농업총생산액의 3%나 차지하는 비중이 높은 작물이다. 그러나 재배의 기술적 어려움이 있으며, 국내 버섯 농업 실정에 맞는 다양한 품종이 빈약하여 농가의 재배 실패가 잇따르며 버섯 농가의 어려움을 가중시키고 있다. 현재 약용으로서 버섯의 기능이 주목받고 있어 일부 중소기업체에 의해 산업화되어 있으나, 이에 대한 연구는 초기단계에 머물고 있다. 국제적으로는 농업생명공학을 이용하여 버섯을 식용은 물론 약용자원으로 적극 이용하려는 연구가 활발하며, 더 나아가 화학적으로 분해가 어려운 난분해 물질의 분해능을 증가시키는 산업적 연구도 활발히 시도되고 있다. 한편 국내에서도 버섯의 유전자 정보의 database 구축과 이들 유전자의 기능 분석 및 형질전환을 통한 대사기작 연구 등의 첨단 기초연구 분야에 최근 상당한 성과를 올리고 있어서, 농업생명공학 기술을 통한 버섯연구의 국제적 경쟁력 제고의 가능성이 매우 높은 시점에 있다. 따라서 버섯 분야에 대한 농업생

명공학 기술을 도입하여 버섯의 분자생물학적 기초연구와 실용화 연구에 집중적으로 병행해서 추진한다면 신 재배기술의 개발, 신품종의 육성 및 신기능 생물소재 개발로 농업을 고부가가치 산업으로 발전시킴으로써 농가 경쟁력향상과 버섯 분야에서의 유리한 국제적 경쟁력에 진입할 수 있을 것이다.

2. 버섯의 가치

가. 버섯은 유일한 작물성 미생물

우리가 일반적으로 버섯이라고 하는 것은 영어로 머쉬룸(mushroom), 프랑스어로는 샴피옹(champignon), 독일어로는 필쯔(Pilze), 스페인어로는 hong(Hong), 일본어로는 기노코, 중국어로는 모구라 부른다. 버섯의 정의는 많은 사전이나 책에서 혼란을 가져올 정도로 애매모호하게 사용하고 있다. 영국의 국제균류연구소(International Mycological Institute)에서는 ‘눈으로 볼 수 있고, 손으로 채취할 수 있을 정도로 크고, 지하생 또는 지상생으로 독특한 자실체를 가지는 큰 곰팡이로 담자균류나 자낭균류를 의미한다.’ 라고 정의하였다.

분류학적으로 생물균, 균계, 진핵균류의 담자균아문과 자낭균아문에 속하는 버섯은 많은 균류 중에서 거의 대부분 담자균류나 자낭균류에 속하는데, 이때의 버섯은 담자균류나 자낭균류의 여러 가지 생육단계 중에서 자실체를 의미한다. 담자균류로는 느타리, 표고, 양송이 등이 있고, 자낭균류에는 곰보버섯, 동충하초 등이 있다. 자실체는 생식기관으로서 유성생식을 거친 유성포자가 형성되고 성숙되어 이곳에서 결국 방출된다. 유성포자는 식물의 종자에 해당되는 것으로 자연계에 비산되어 다른 지역으로 번식되는데 커다란 역할을 한다. 인간은 자실체를 식량, 식품, 약용, 제품의 원료로 다양하게 이용하고 있다.

버섯은 항암효과, 성인병 예방, 면역활성 물질 함유 등 의학적 가치와 활용범위가 다양하여 버섯관련 사업은 21세기에 가장 유용한 생물산업이 될 것으로 전망한다. 버섯은 셀룰라아제, 리그나아제 등의 효소를 분비하여 섬유소와 목질소를 분해하여 영양을 섭취함으로써, 자연계에서 분해자 또는 환원자로서 유기물 순환에 매우 중요한 역할을 맡고 있으므로 버섯을 자연의 보고, 숨겨진 보물이라고 표현하기도 한다. 아울러 미래에 다가올 우주 시대에 대비하여 미국의 NASA(미국항공우주국)에서 버섯을 ‘우주 식품’ 또는 ‘미래의 식품’ 으로 지정하여 극찬하였는데, 이것은 버섯이 과거와 현재 그리고 미래로 이어지는 영원한 식품임을 시사하고 있다. 즉 버섯은 미생물로 번식하여 작물로 재배되어 과일같이 생으로든 먹을 수 있는 자연식 건강식품이기도 하다.

나. 버섯의 인체 효능

버섯은 다른 식품에서 볼 수 없는 특수한 성분이 다수 함유되어 있고, 그 기능도 다양한 것으로 알려져 있다. 버섯은 이용 면에서 보면 식용, 약용, 독버섯 등으로 구분할 수 있으며, 식품적인 기능은 크게 영양분이나 기호성을 볼 수 있고, 약리효능을 나타내는 2차적인 생리기능이 있다. 식용버섯의 일반성분은 채소와 비슷하고 에너지가 적어 비만 등을 초래하지 않고 다이어트용 식품이라고도 할 수 있다. 버섯은 일반 채소보다 비타민 B1, B2, 나이아신 등은 많으나 칼슘이나 비타민A 등은 오히려 적다. 또한 버섯의 약리적 기능은 항생물질, 혈당강하 물질, 콜레스테롤 감소물질, 항혈전 물질, 항염증 물질, 신경보호 물질, 락틴 등 다양한 생체기능 조절물질들이 있다. 버섯의 생물활성은 항생물질로 1945년 낙엽버섯 (*Marasminus conigenus*)으로부터 마리스믹산 (marasmic acid) 이 보고 된 이래 지금까지 약 180여종 이상 보고 되었다. 항종양 활성물질은 대부분 다당류인 글루칸(glucan)류로 그들의 독특한 화학구조 특성에 따라 일부 작용 기작이 다르다. 최근 새로운 항암 면역요법제로서 이용될 수 있는 버섯 다당류에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 자실체나 균사체 내에는 여러 가지 기능성물질이 많이 함유되어 있는 버섯이 많으며 (중국은 약 260종), 이중 일부는 의약품이나 건강식품으로 개발되어 이용하고 있으며 앞으로 연구가 진행되면 훨씬 더 많이 이용될 것으로 추정된다.

3. 버섯 재배기술의 발전과정

버섯은 옛날부터 특별한 식용이나 약용으로 이용되어 왔지만 초기의 사람들은 시행착오를 겪으면서 버섯의 식용 여부를 판가름하여 식용버섯을 수집해 왔다. 버섯을 인간의 힘으로 인공 재배하게 된 역사는 1,000년 이상으로 거슬러 올라간다. 초기의 버섯 재배는 과학적인 지식에 기초를 둔 것이라기보다는 많은 시행착오를 거치는 경험의 부산물이라고 할 수 있다. 인공재배 버섯 중에서 가장 많이 재배되고 있는 것은 양송이로서 세계 약 70여 개국에서 연간 1천 톤 정도 생산된다. 우리나라에서 버섯을 인공재배하기 시작한 것은 1900년대 초로 표고버섯이 가장 먼저 시작되었다. 다음으로 외국에서 들어온 양송이가 1961년, 느타리버섯이 1971년부터 재배가 시작되었다. 70년대 초부터 우리나라 사람들의 식성에 맞는 느타리버섯의 원목, 벗짚, 폐면 재배법이 개발되었다. 특히 최근에는 경제성이 높고 기계화 재배가 가능한 팽이, 큰느타리, 만가닥버섯 등의 재배가 늘어나고 있다. 이러한 버섯을 재배하는 재료로서 처음에는 버섯 종류에 따라 상수리나무, 미루나무 등의 원목을 주로 이용하였으나 양송이, 느타리버섯 등의 재배가 늘어나면서 점차 벗짚, 폐면 등의 농림산부산물로 확대되었다. 이후 톱밥을 이용하는 팽이 등의 병재배가 활발해지면서 이의 대체재료나 첨가재료의 연구 개발이 다양하게 시도되고 있다. 버섯의 재배기술은 세계에서 가장 많이 재배되고 있는 양송이 재배와 더불어 발전하고 있다. 이러한 발전은 버섯생리의 과학적 기초연구 결과를 실제 재배기술에 적용함으로써 가능하게 되었다. 이렇게 버섯생리의 기초적

연구성과와 실용화 재배기술의 발전은 현재까지 영국과 네덜란드에 의해 주도되어 왔으나, 점차 미국, 일본, 중국을 비롯하여 국내로 확산되어 가고 있다.

4. 버섯 연구의 필요성

가. 한국형 고부가성 재배작물

버섯이 국내 농업에서 차지하는 높은 비율과 더불어 버섯이 가지는 중요한 식용, 약용 혹은 산업용으로도 이용할 수 있는 장점, 그리고 버섯은 생활주기가 빠르고 연중 재배가 가능하다는 점은 한정된 수량에 대해 년 간 1, 2회의 수확을 하는 다른 작물에 비해 큰 장점으로 여겨지고 있다. 이미 수확한 배지에서 다시 반복적으로 생산되는 면도 장점이라 할 수 있다.

현재 국내 연구진에 의한 세계 버섯연구 분야에서의 선두적인 연구 성과 등을 고려할 때 최근 한·칠레 자유무역협정, 국제식물신품종보호동맹 (UPOV)과 같은 국내 농업에 불어오는 거센 세계적 흐름에 대응할 수 있는 조치가 버섯 분야에서도 조속히 수행되어야 한다는 필요성을 절실하게 느끼게 한다. 나아가, 지속적인 연구투자를 함으로써 세계적인 경쟁력을 가지는 벼 작물에서처럼, 어려운 연구여건 하에서도 높은 연구 경쟁력을 확보하고 있는 버섯 작물에 대한 국가적인 연구지원 전략이 세워져야 한다. 벼에 대한 국제적 정세에서도 알 수 있듯이 첨단기술을 접목한 산업화 없이 생산위주의 농업은 세계적 경쟁력 제고의 큰 문제점을 가진다.

나. 경제적 중요성

- 세계적 식품 : 버섯은 120여개국 이상에서 세계인이 즐겨먹는 공통식품의 하나가 되었다. 버섯을 산업화하여 전문적으로 재배하는 나라는 22개국에 불과하지만 다른 작물보다 소득이 매우 높다.
- 생산량 증가 : 세계의 버섯 생산량은 최근의 통계자료는 없으나 600만톤/년 정도로 추정되며, 양송이가 가장 많고 다음이 느타리, 표고버섯의 순이다. 양송이는 미국, 프랑스, 네덜란드, 등의 지역에서 많이 재배하고 있으나 생산량의 증가속도가 매우 미미하다. 느타리버섯은 동남아시아 지역을 중심으로 재배가 급격히 늘어나고 있으며, 현재는 생산량이 표고보다 많을 것으로 추정되고 있다. 버섯의 총 생산량은 중국이 약 400만톤으로 가장 많고 미국과 일본이 36만톤 정도로 비슷한 수준이다.
- 국내 주요작물 : 건강, 무공해 식품으로서 느타리버섯은 쌀, 사과 등 70가지 주요 농산물 중 단위면적 당 소득이 가장 높은 농산물로서 8,000호 이상의 농가에서 70,000톤 이상을 생산하여 3,000억원의 생산액으로 농업총생산의 1.1%를 차지하고 있는 국내의 중요 작물 중의 하나로 자리매김하였다.

- 국내 재배농가 : 우리나라에서 버섯의 농업총생산액은 약 7,000억원으로 우리나라 경종작물의 3%나 차지할 정도로 비중이 크다. 인공재배 버섯 농가는 약 2만호, 생산량은 건표고를 생버섯으로 환산하였을 때 약 17만톤으로 느타리버섯이 40%, 팽이와 표고버섯이 21%이나 2003년부터는 팽이버섯의 생산량이 더 많은 것으로 보며, 다음이 양송이 순으로 많다. 재배하는 버섯의 종류는 중국이 가장 다양하고 다음이 일본, 한국 순으로 많으며, 개발도상국을 중심으로 버섯의 재배가 많이 늘어가고 있다.
- 종균수입 : 최근 중국으로부터 느타리버섯의 종균이 수입되어 국내 버섯산업의 기반을 위협하고 있다. 또한 중국으로부터 생버섯 수입의 가능성에 대비한 국내의 고품질, 고부가가치 느타리버섯의 품종 개발이 시급한 실정에 있다.

다. 사회적 중요성

- 건강식품의 관심도 : 근래에는 생활수준이 향상되고 건강식품에 대한 관심이 높아졌으며 이들 버섯의 활용에 대한 사회적 관심도가 높아짐에 따라 다양한 연구가 요구되고 있다. 그러나 기초연구가 크게 이루어지지 않아서 버섯은 그 성분이나 약리적 기능에 대한 의견에도 다소 차이가 나며, 재배기술에 대한 연구도 초기의 재배 연구와 마찬가지로 과학적인 지식에 기초를 둔 것이라기보다는 많은 시행착오를 거치는 연구를 통해 수행되고 있으며, 그런 연구자료 또한 미비하다.
- 자연 친화적 식품 : 무농약·무공해 식품은 소비자 선호도 1위로서 자연 친화적 식품의 대표이며, 소비자로부터 사랑을 받고 또한 대외 경쟁력 있는 농민들의 고소득 작목으로 사회적 인식이 확립되어 있다.
- 국제 품종보호 협약 : 우리나라의 버섯 작물은 WTO, 한·칠레 자유무역 협정 등의 개방화 및 UPOV와 같은 국제 품종보호 협약에서 국제적인 경쟁력을 지니고 있지 않다. 이것은 우리나라가 버섯 농업이 생산위주의 후진형 구조를 가지고 있어 결국엔 다른 작물에서와 마찬가지로 거대하고 기계화된 생산방식에 대항할 경쟁력이 약해서 상대국과의 협상에서 커다란 약점으로 작용될 가능성이 크다.
- 지적재산권 : 공산품과 농산물의 개방화는 이미 받아들일 수밖에 없는 국제정세이며, 또한 지적재산권을 중시하는 국제적 협약에서도 품종의 개발 및 보호에 대한 중요성을 알 수 있다. 국제 식물신품종 보호동맹 (UPOV: The International Union for the Protection of New Varieties of Plants)에 의해 느타리버섯이 보호 품종으로 등록되어 느타리버섯의 품종에 대한 국제 경쟁력의 재고가 필요하며, 이것은 분자생물학적 기초연구를 통한 이해에 기초되어야 한다.

라. 학술적 중요성

- 버섯 연구동향 : Post-genome 시대에 요구되는 대량 유전자의 발굴 및 그 기능

분석 기술이 버섯류에서도 급속히 확산되고 있다. 또한 양송이, 표고, 느타리 등 식용버섯류에서 형질전환에 관한 연구보고가 급속도로 증가하고 있어 형질전환 버섯의 실용화에 대한 기대감이 점차 높아지고 있다. 느타리버섯류는 국내에서 가장 많이 재배되는 버섯 품목으로 국제 경쟁력의 지속적 유지를 위한 기술개발이 필요하다. 느타리버섯의 형질전환과 유전자 개발 기술은 선진외국과 거의 대등한 수준에 육박하고 있으며, 더 한층 연구 활성화로 이 분야의 기술선점이 요구된다.

- 국제 경쟁력 : 느타리 버섯류의 시장은 유럽, 미국, 일본 등에서는 매우 작으므로 연구그룹의 형성이 어려울 것으로 생각되어 상대적 연구 경쟁력이 높은 분야이다. 현재 느타리버섯에서의 게놈에 대한 분석은 스페인을 비롯한 유럽의 연구 그룹에서 주도적으로 수행하고 있으며, 최근 균사 성장에 대한 QTL 분석과 교배형과 관련한 유전자의 분석 등도 수행하기 시작하였다. 자실체 발생관련 유전자 분석 및 형질전환을 통한 유전자 기능분석에 대한 연구는 한국과 일본의 연구팀에 의해 주로 수행되고 있다.
- 한정된 육종소재 : 국제 식물신품종 보호동맹(UPOV)에 의해 우리나라 고유의 다양한 버섯의 품종개발이 더욱 절실히 요구되고 있다. 고품질 또는 신기능성 품종의 개발에서는 다양한 특성의 육종소재가 필요하나 수집된 버섯균의 변이의 한계로 인하여 육종 소재의 소진 가능성이 높기 때문에 새로운 소재와 육종기술의 개발이 필요한 실정에 있다.
- 미약한 품종개발 현황 : 현재 보급된 버섯품종은 많은 유전자원을 활용하지 못하고 단순화되어 있어서 환경 적응성이 낮고 병해충의 피해가 증가하기 쉽고 중온성 위주로 육성되었다. 우리나라는 사계절에 따른 기온의 변화가 매우 심하므로 고온기, 저온기 재배에 알맞은 품종이 육성되어야 한다. 새로운 신품종의 수를 확대 개발하여 농가에서 선택할 수 있는 폭이 넓어질 수 있도록 하는 방안이 절실히 요청되고 있다. 열대 및 한대 지역의 다양한 유전자원을 광범위하게 수집하여 육종모본으로 활용하고, 병이나 불량환경에 강한 유전자를 찾아서 형질전환을 하는 방법 등으로 기후변화나 지역적 특성에 알맞은 새로운 품종을 많이 육성하여야 한다. 현재 느타리버섯 재배는 주로 봄·가을재배용으로 품종이 육성되어 있으며, 여름에는 여름느타리가 재배되나 겨울철에 적당한 저온성 품종이 없으므로 농민들의 요구에 적합한 형태와 품질의 저온성 느타리버섯 신품종 개발이 필요하다.
- 버섯유전자 정보 : 국내 연구진에 의해 최초로 보고 되어 농진청의 유전체 database를 통해 공개된 느타리버섯의 EST분석 자료에 대해서 실용적으로 활용할 수 있는 기회를 가짐으로써, 유전적 연구에서 경쟁력을 갖춰야 한다.
- 버섯 유전자 이용연구 : 버섯류에서 유용유전자 개발 및 이용이 증가하고 있어

식품적 가치 이외에 산업적 이용에 관한 연구도 활성화되어야 한다. 현재 국제적으로 양송이, 표고, 느타리 등의 식용 버섯류에서 형질전환에 관한 연구보고가 급속도로 증가하고 있고, 형질전환 버섯의 실용화를 수행하고 있으며, 느타리버섯에서도 유용유전자의 개발 및 이용이 증가하고 있으므로 식품적 가치 이외에 산업적으로 이용을 위한 기초연구가 필요하다.

- 고품질 : 버섯은 고품질일수록 시장성이 높고 가격과 수출에서 유리한 점이 많다. 그러므로 물량위주에서 고급 품질이 우선되도록 재배되어야 한다. 이와 같은 목적을 달성하기 위하여서는 고품질 우량신품종 육성, 우량배지개발, 고온성 발효기술개발 재배사의 정확한 온, 습도 관리 등이 매우 중요하다. 버섯 품질의 대사적 원리의 이해를 위한 연구가 선행되어야 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내 최신 연구동향 (최근 3-5년)

가. 버섯의 재배기술 및 효능 연구

초기의 국내버섯의 연구는 느타리버섯을 주로 하여, 그 외 식용버섯에 대한 자실체 형성 및 함유성분 특성 등을 분석하는 연구가 다수 수행되었다. 또한 식용버섯에 대한 재배환경과 배지조성 등의 인공재배에 관한 육종 연구가 주를 이루었고, 이러한 노력들은 1990년대 말까지 지속적으로 이루어졌다. 이 시기에 재배과정 중에 발생하는 버섯 병에 대한 원인 및 방제를 위한 연구도 시작되었다. 1990년대에 이르러서는 버섯이 가지는 약리효과의 가능성에 크게 주목되었다. 구름버섯의 항암 효과에 대한 연구를 비롯하여 상황버섯, 영지버섯, 신령버섯, 잔나비겉상 버섯, 잎새버섯, 까치버섯, 노루궁뎅이버섯, 그리고 동충하초 등의 약리효과 즉 면역활성, 항암활성, 용혈활성, 간기능 및 지질대사에의 효과, 세포독성, 그리고 항산화 활성에 대한 연구가 활발히 진행되었으며, 이와 같은 연구경향이 최근에는 차가버섯, 꽃송이버섯, 그리고 뽕나무버섯을 대상으로 점차 확대되어 가고 있다. 또한 식용버섯인 표고, 양송이, 느타리버섯 등을 비롯하여 만가닥버섯, 능이버섯, 쫄레버섯 등의 생리활성 효과에 대해서도 그 연구가 확산되고 있다.

나. 버섯연구의 분자생물학적 분석기법 도입

버섯의 약리효과에 대한 관심과 동시에, 버섯의 생리화학적 특성 및 분자유전학적 연구가 증가하였다. 버섯의 리보솜 RNA의 ITS 영역에 대한 분자유전학적 연구를 통한 버섯의 계통분석 연구가 수행되었으며, 버섯 종류를 분류할 수 있는 DNA 표지인자의 개발연구도 수행되었다. 한편 청정식품으로서의 버섯에 대한 높은 관심은 버섯의 품질을 높이기 위한 노력과 신제품 개발을 위한 연구의 필요성을 촉진시켰다. 또한 농가의 재배 실패와 노동력을 줄이기 위해 새로운 재배기술들이 이 시기에 연구되었고, 고품질 버섯에 대한 요구에 의해 원형질체 융합이라는 첨단기술을 이용한 품종개량 연구가 수행되었다. 그리하여 현재도 느타리버섯류 중에서도 가장 많이 재배되고 있는 품종 중의 하나인 원형느타리버섯이 개발되었다. 이에 품종 개량의 요구도는 더욱 증가되었고, 더 나아가 식용버섯의 장점과 약용버섯의 장점을 혼합하는 등 새로운 개념의 버섯품종 개발연구도 요구되고 있다. 그러나 버섯의 생리대사에 대한 분자수준의 과학적 이해 부족으로 버섯의 재배과정과 품질 향상의 면에서 항상 걸림돌이 되어 왔으며, 이러한 한계는 2000년대에 접어들면서 분자적 수준의 버섯 연구로 돌파구를 모색하고 있는 추세에 있다.

다. 느타리버섯과 그 유전자 연구

최근의 국내연구는 버섯 작물 중에서 가장 많은 생산량을 차지하는 느타리버섯을 주 대상으로 연구가 이루어지고 있다. 느타리과에 속하는 큰느타리버섯과 송이버섯 등은 그 품질이 뛰어나 느타리버섯과 동시에 품질관리나 육성에 많은 관심을 가지게 되었다. 갈변저해나 저장 중 품질 변화에 관한 연구들은 재배와 유통과정에서 버섯의 품질을 유지하기 위하여 수행되었고, 향기와 물성특성에 대한 연구는 버섯의 고품질의 원인분석을 가능하게 하였다. 동시에 느타리버섯 재배과정 중 가장 문제가 되는 병해충과 바이러스의 방제를 위한 많은 연구도 품질연구와 아울러 다수 수행되었다.

버섯 품질에 대한 관심은 버섯 생리대사의 분자수준의 이해가 요구되었고, 국내 연구진에 의해 느타리버섯에서 EST(expressed sequence tag) 분석이 이루어졌다. 이 느타리버섯의 유전정보 분석이 다른 나라보다 국내 연구진이 앞서게 됨으로서, 느타리버섯 분야의 종주국으로서의 입지를 더 높이는 계기를 마련하였다. 또한 생명공학 분야에서 최근의 연구경향이 대량 유전자의 분석, 프로테옴 및 형질전환 등의 분석법을 이용하고 있으며, 국내 버섯연구에도 위와 같은 첨단 분석기법의 적극도입으로 세계적 연구 흐름에 맞춰가는 기틀을 마련한 상태라고 할 수 있다. 또한 느타리버섯에서의 이러한 연구성과는 다른 식용, 약용 버섯류에서의 연구에도 적용될 수 있기에 전반적인 버섯 연구의 활성화에도 큰 영향을 미칠 수 있다.

라. 버섯 특허의 내용

버섯에 대한 국내특허는 현재 총 3,099건 정도가 보고 되었고, 이 중에서 최근 5년간의 특허건수는 약 1999건으로 전체의 1/3에 달하는 것을 알 수 있다. 이를 통해 최근 들어 버섯 분야에서도 산업성의 중요성을 인식하게 되었다는 것을 알 수 있다. 그러나 다수의 특허가 버섯의 인공재배에 관한 용기와 기술에 관한 것이며, 그 외 대부분의 내용이 버섯 및 버섯 추출물을 이용한 기능성 쌀, 김치, 장, 그리고 요구르트 등의 기능성 식품과 음료에 관한 내용으로 이루어져 있다. 즉 버섯에서 실용화된 분야는 주로 버섯의 기능성, 약용 특성의 분야로서, 몇 개의 약용물질에 대한 내용을 제외하고는 첨단기술과 고도의 학문적 지식에 의거한 국제 경쟁력을 가질 수 있는 내용이 적다는 것을 알 수 있다. 우리나라의 국제적 경쟁력 제고를 위한 여건에 맞는 장기적 투자를 통한 고부가 가치의 연구내용들이 개발되어야 한다. 이는 버섯대상의 지속적인 기초연구가 선행될 때에 국제 경쟁력 있는 실용화 연구도 그 성과를 가져올 수 있으리라 기대된다.

2. 국외 최신 연구동향 (최근 3-5년)

가. 주 연구대상 : 양송이버섯

국외의 버섯 연구동향은 국제버섯학회에서 5년 주기로 출판하는 Mushroom Science를 통해서도 그 경향을 쉽게 파악할 수 있다. 1990년대 말까지 버섯의 생리적 특성분석 및 육종에 관한 연구는 주로 양송이버섯에 집중되어 있다고 볼 수 있다. 작물로서의 품질관리 및 재배요령 등 실제 농가가 필요로 하는 연구 또한 양송이버섯에서 이루어졌으며, 버섯의 발생과 형태 그리고 버섯의 선발표지인자 개발에 이르는 분자유전학적 연구에도 양송이버섯에 집중되어 연구가 이루어졌다. 또한 버섯에서 발생하는 질병 연구도 양송이버섯을 중심으로 이루어져 온 것을 알 수 있다. 현재 양송이버섯의 품질이 매우 안정적이며 국제적으로도 무리 없이 잘 유통되고 있는 것은 이러한 국제적인 많은 연구의 성과가 바탕이 되었기 때문이다. 양송이버섯에 대한 연구는 주로 유럽의 선진 농업국가에서 이루어졌다. 그 외에 미국, 인도, 이란 등의 국가에서도 연구가 수행되었다. 이러한 연구의 성과는 자국의 양송이버섯 산업을 발전시켰으며, 그 결과 전 세계적으로 양송이버섯에 대한 대부분의 소비와 재배는 이들 나라의 다국적 기업에서 생산하는 품종과 종균을 사용하고 있다. 기술과 자원 등 모든 면에서 국제적인 경쟁력을 갖추므로 인해 후발 연구국가가 경쟁에 뛰어들 엄두도 못 내고 있는 실정이다.

나. 느타리버섯 연구의 증가

그러나 점차적으로 양송이 연구와 함께 버섯의 유전육종 및 생리적 특성분석 분야에서 느타리버섯에 대한 연구도 점차 증가되고 있다. 품종개발 분야에서는 느타리버섯의 품종개발이 주된 연구가 되고 있고, 재배 연구에 대한 내용에서도 느타리버섯이 전 세계적으로 주목을 받고 있다. 초기의 느타리버섯의 연구에서는 자실체에서 발현되는 물질(hydrophobin)에 대한 연구로부터 시작되었으나, 차츰 느타리버섯의 난분해 물질에 대한 분해능력에 대해 주목하기 시작하였다. 1990년대 말 이후로 시작된 난분해물질의 분해효소인 laccase 및 manganese peroxidase의 활성연구가 느타리버섯의 주요 연구과제로서 지속적으로 연구되고 있고, 최근에는 이들 효소들의 미백효과와 환경쓰레기 처리능력 등에 대해서도 크게 관심을 보이고 있다. 느타리버섯의 형질전환 연구도 최근 활성화되기 시작하여 manganese peroxidase 등의 유전자 조작을 통한 과발현 등의 기능연구 등이 수행되고 있다. 2000년대 초기에 들어서서 수행된 느타리버섯 자체에 대한 분자유전학적 연구는 군사 생장, 품질 및 생산형질에 관여하는 게놈상의 QTL 분석이 스페인의 연구팀에 의해 진행되고 있다. 일본의 연구팀들도 느타리버섯의 형질전환에 많은 관심을 가지고 있는 실정이다. 이와 같이 전 세계적으로 느타리버섯의 연구 활성화가 점차 높아지고 있는 반면에 식용으로만 인정되는 양송이버섯에 대한 연구 활동은 크게 감소하는 추세에 있다. 식용뿐만 아니라 약리효능이 있는 느타리버섯을 연구하는 나라는 유럽의 스페인, 그리스, 네덜란드, 독일, 체

코로나로 기존 양송이버섯에 대한 관심이 점차 느타리버섯으로 이어지고 있으며, 미국에서는 멕시코가, 그 외에 아시아에서는 일본, 인도, 이스라엘 등의 나라에서도 느타리버섯에 대한 연구가 집중적으로 수행되고 있다. 약용 느타리버섯에 관심이 많은 중앙아시아와 동유럽 국가를 포함하면 이제 전체 버섯 시장에서 양송이버섯 다음의 2 번째의 생산량을 가지는 느타리버섯에 대한 연구의 관심은 전 세계적이라고 할 수 있다. 버섯연구에서 누가 더 빠르게 유리한 위치를 차지하는가에 따라 양송이버섯 분야의 국제 정세에서처럼 느타리버섯에서도 국제적인 질서가 매겨지리라 생각된다.

* 국내 연구동향

주요연구내용	연구기관/연구자	참고문헌
사테를 이용한 느타리버섯의 기내 자실체 발생유도	건국대/조중호 외	2003,버섯학회지,2
꽃송이버섯의 배양조건에 관한 연구	전남대/오득실	2003,석사학위논문
양송이버섯의 갈변저해제 및 저장 중 품질특성 연구	경북대/오덕환 외	2003,식품저장유통학회지
느타리버섯 재배에서의 병해발생과 방제연구	건국대/전창성	2002,박사학위논문
표고재배 시 버섯 발생량과 품질에 관한 연구	원광대/김원식	2002,석사학위논문
먹물버섯 균의 형태학적 특성 및 인공재배 연구	충남대/김용균	2002,석사학위논문
균근성 식용버섯의 인공재배기술	충북대/조남석 외	2002,한국목재공학회
느타리버섯 배지에 대한 오존의 살균효과	강원대/노문기	2001,석사학위논문
느타리버섯의 배지성분과 개선에 관한 연구	고려대/이동철	2000,석사학위논문
큰느타리버섯의 인공재배 및 생리활성에 관한 연구	강원대/강미선	1999,석사학위논문
새송이버섯의 수확시기별 저장중 품질변화	경남농업기술원/김태성 외	1999,한국식품영양과학회
표고버섯 자실체 형성에 미치는 티아민의 영향	경상대/이상원 외	1999,식품저장유통학회지
한국산 새송이버섯의 향기조성 및 물성특성	충북대/박지숙	2003,석사학위논문
환경기체조성 예측 및 MA저장 중 버섯품질 변화	농촌진흥청/이현동 외	2003,식품저장유통학회지
단포자 분리를 통한 느타리버섯의 입성단핵균주 분리	충북대/차재순 외	2002
능이 및 켈레버섯의 생리활성에 관한 연구	성균관대/이현숙	2002,석사학위논문
느타리버섯균의 배지내 리그닌분해효소 생산	영남대/이재성 외	2002,한국농화학회지
느타리버섯 부위별, 생육시기별 지방산 조성의 변화	경북농업기술원/윤재탁 외	2000,한국균학회지
큰느타리버섯의 MA저장중 품질변화	경남농업기술원/이동선 외	2001,식품저장유통학회지
표고버섯의 건조 및 품질 변화 특성	금동혁외	2000,한국농업기계학회
개암버섯균의 생리적 특성 및 자실체 유도에 관한 연구	충남대/강안식	1999,박사학위논문
느타리버섯 저장 중 이화학적, 생리적 특성 변화 연구	경희대/김재광	1999,박사학위논문
능이버섯으로부터 분리한 저분자 화학물의 화학구조	생명공학연구소/유익동 외	2000,한국농화학회지
전해산화수 처리와 아가리쿠스버섯의 저장중 품질변화	식품개발연구원/김종훈 외	2000,식품저장유통학회지
느타리버섯의 맛색 변이체의 proteome 분석	건국대/추교선 외	2003,한국균학회
Real-Time PCR 법에 의한 느타리버섯 GPB 발현분석	건국대/조중호 외	2003,한국균학회
느타리버섯의 유전자 database 구축	건국대/이창수 외	2003,농진청홈페이지
느타리버섯의 유전자 발현 양상과 EST 분석	건국대/이승호	2002,석사학위논문
느타리버섯의 발생단계별 EST 유전자 분리	농업과학기술원/김범기 외	2002,한국균학회
REMI 법에 의한 느타리버섯의 형질전환 시스템 연구	건국대/조중호 외	2002,한국균학회
팽이버섯의 자실체형성에 관련된 유전자의 분리 분석	농업과학기술원/김들이	2000,한국균학회
느타리버섯 병의 PCR법 이용 조기진단과 균 검출기술연구	충북대/차재순 외	1999,한국균학회
느타리버섯의 PEG법 이용 Ura3 유전자 형질전환 연구	농업과학기술원/김범기외	1999,한국균학회지
느타리버섯 isometric virus와 dsRNA의 cDNA 분리	경상대/김은진	1999,석사학위논문
먹물/눈물 버섯속의 ITS 염기서열에 의한 계통 분석	농업과학기술원/박동석외	1999,한국균학회지
느타리버섯의 형질전환체계 개발	농업과학기술원/김범기 외	1999,한국균학회소식
팽이버섯 자실체의 조기발현 유전자 클로닝	농업과학기술원/차지척 외	1999,한국균학회지

* 국외 연구동향

주요 연구내용	연구기관	참고문헌
느타리의 RAPD에 의한 종다양성 분석	브라질	Mycol Res. 2003
느타리버섯의 외가닥 RNA mycovirus에 관한 연구	한국	Virology. 2003
느타리버섯의 Laccase 유전자 promoter에 관한 연구	이탈리아	Microbiology. 2003
느타리버섯의 trehalose phosphorylase 유전자 클로닝	한국	Protein Expr Purif. 2003
느타리버섯의 품질과 생산량을 조절하는 계놈 QTL 연구	스페인	Appl Environ Microbiol. 2003
형광성슈도모나스를 이용한 느타리버섯의 성장촉진 연구	한국	FEMS Microbiol Lett. 2003
Particle bombardment를 이용한 느타리버섯의 형질전환	일본	FEMS Microbiol Lett. 2002
벗짚과 밀짚을 이용한 느타리버섯의 재배	미국	Bioresour Technol. 2002
느타리버섯에서 균사 특이 Hydrophobin의 특성	스페인	Appl Environ Microbiol. 2002
느타리버섯에서 균사생장조절하는 QTL 분석	스페인	Appl Environ Microbiol. 2002
느타리버섯의 발생단계에 따른 EST 분석 연구	한국	Fungal Genet Biol. 2002
표고버섯의 hydrophobin 분석	일본	Biosci Biotechnol Biochem. 2002
느타리버섯에서 단핵주의 성장과 교배형과의 관계	스페인	Appl Environ Microbiol. 2001
느타리버섯에서 laccase의 발현양상	아일랜드	Microbiology. 2001
효율 높은 느타리버섯의 형질전환법	일본	Appl Microbiol Biotechnol. 2001
느타리버섯으로부터 manganese peroxidase 유전자의 발현	일본	Appl Microbiol Biotechnol. 2001
Veratryl alcohol 처리와 느타리버섯의 자실체 형성 촉진	브라질	FEMS Microbiol Lett. 2001
양송이버섯의 serine proteinase의 클로닝 및 발현특성	영국	Fungal Genet Biol. 2001
양송이버섯의 manganese peroxidase	핀란드	Appl Microbiol Biotechnol. 2001
느타리버섯의 항균, 항세포 독성 활성연구	러시아	Int. J. Medicinal Mushrooms, 2002
양송이버섯의 분자 마커의 이용	스페인	FEMS Microbiol Lett. 2001
양송이버섯의 microsatellite 클로닝	프랑스	Fungal Genet Biol. 2000
Agrobacterium을 이용한 양송이의 형질전환	미국	Appl Environ Microbiol. 2000
느타리버섯 자실체의 발생과 기질에 관한 연구	멕시코	Mushroom Science, 2000
느타리버섯 육종의 분자유전학적 기술	스페인	Mushroom Science, 2000
양송이버섯 SCAR marker 이용한 갖색 연구	미국	Mushroom Science, 2000
양송이버섯의 교배에 의한 갈색종 육종	영국	Mushroom Science, 2000
2DG에 저항성 느타리버섯의 육종	멕시코	Mushroom Science, 2000
양송이 종과 관련된 육종생물학	영국	Mushroom Science, 2000
느타리버섯이 무포자 균주의 개발	네덜란드	Mushroom Science, 2000
느타리버섯을 이용한 폐목재의 처리	미국	Int. J. Medicinal Mushrooms, 2000
영지버섯의 항독성, 항암효과	인도	Int. J. Medicinal Mushrooms, 2000
느타리버섯 효소의 bisphenol A의 분해능	일본	Biosci Biotechnol Biochem. 2000
느타리버섯의 manganese peroxidase	이탈리아	Arch Biochem Biophys. 2000
느타리버섯의 laccase	이탈리아	Appl Environ Microbiol. 2000
느타리버섯의 lectin	일본	Biochim Biophys Acta. 2000
느타리버섯의 aryl-alcohol oxidase	스페인	Biochim Biophys Acta. 2000

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 버섯 변이주 개발 및 균주개량에의 이용연구

1. 서론

느타리버섯은 전 세계 버섯 시장에서 중요한 품목이며 특히 동아시아에서는 식용으로 크게 주목을 받고 있다. 이러한 식용 작물의 중요성 이외에도 복잡한 화합물의 분해 및 약용의 역할에서 또한 주목을 받고 있다. 단핵 균주에서 이핵 균주로 변형되는 생활사를 가지는 느타리버섯은 특정 조건에서 자실체를 형성하고 포자를 형성함으로써 발생과정이 진행된다. 발생과정이 제한된 돌연변이는 발생과정을 이해하는 데 도움이 되며 임성단핵주와 같은 돌연변이 균주는 유전 육종, 특히 교배 없이 자실체 상의 형질을 분석할 수 있는 형질전환 체계에서 아주 유용하다. 버섯 변이주의 개발은 버섯의 발생학적인 유전학적인 중요성을 가짐과 동시에 새로운 형질의 균주 개량에 이용이 가능하다.

버섯의 육종방법에는 도입 육종법, 분리 육종법, 배수성 육종법, 그리고 돌연변이 육종법 등이 있다. 돌연변이 육종법은 짧은 시간 내에 원하는 표현형의 변화를 가진 돌연변이주를 획득하여야만 하는데 그러므로 인위적인 돌연변이를 유기 시켜야만 한다. 돌연변이를 유발하는 방법에 따라 물리적 돌연변이 (X-선, 자외선 등), 화학적 돌연변이 (염기 유사체, 염기구조 변화제, DNA 결합제), 그리고 생물적 돌연변이 (phage Mu, Transposon) 등으로 구분될 수 있다.

이러한 돌연변이는 대부분 DNA 상에서 무작위적으로 위치에 제한 없이 유발되기도 하고, DNA 상에서 변화된 특정 위치의 유전자를 찾아내는 방법이 있어 특정 유전자의 기능과 산물의 구조와 특성에 관한 심도 있는 연구를 가능하게 한다. 그러므로 본 실험에서는 U.V 조사에 의한 무작위적인 돌연변이 유발을 통한 다량의 특이 형질 균주를 획득하고, DNA tagging을 통한 변화된 특정 유전자의 기능을 밝히는 방법을 사용하여 돌연변이를 제작한다.

2. 재료 및 방법

가. U.V mutagenesis에 의한 돌연변이체 제작조건 확립

돌연변이체를 대량으로 분리하여 새로운 육종소재로 제공하기 위해서는 변이처리용 모본의 설정이 중요하다. 그러므로 변이처리용 모본은 한국 자생종으로서, 농업과 학기술원에서 수집 보관 중인 ASI2029 균주를 주로 사용하였으며, 그 외에 상품화되

어 농가에서 재배되어, 그 특성이 잘 알려진 원형 1호, 흑평 등을 사용하였다. 여기서 사용된 ASI2029 균주는 한국 특산 균주의 장점을 가지는 이유로 발생단계가 세밀하게 분석되는 분자유전학적 분석에서도 모균주로 사용되는 균주이다.

ASI2029와 원형 1호의 균주로부터 다양한 효소의 처리를 통해 원형질체 분리의 조건을 확립하였으며, 평균 10^9 개/ml 이상의 원형질체를 분리하였다. 이 원형질체에 대해 U.V.선을 조사하여 mutagenesis를 수행하였고, 생존곡선을 작성하여, U.V. mutagenesis의 최적의 조건을 확립하였다 (Figure 1.1).

나. U.V. mutagenesis에 의한 대량의 돌연변이체 분리 및 분석

돌연변이체의 대량선발을 위하여 두개 종으로부터 원형질체를 분리하여 각각의 최적 U.V. 조사 조건에서 돌연변이를 대량으로 유발시켰다. 분리된 돌연변이체의 개수는 ASI2029 균주는 5000개와 원형 1호는 1200개이다. 이 균주들은 모두 표1에서의 방법에 따라 영양요구성 여부를 판단하였으며 (Table 1.1), 또한 유발된 돌연변이가 자실체 발생과정에서 받은 영향을 분석하기 위해, 모든 균주에 대해 5만복으로 자실체를 발생시켜, 종자관리소에서 작성한 버섯특성분석 기준에 따라 특성이 분석되었다. 버섯 특성분석 기준은 종자관리소 홈페이지 (<http://www.seed.go.kr>)에서 얻을 수 있다.

다. REMI법에 의한 느타리버섯의 형질전환

1) 느타리버섯 (ASI2029)의 uracil 영양요구성 균주를 이용한 형질전환

한국특산의 느타리버섯인 ASI2029 균주에 대해서 UV mutagenesis를 통해 돌연변이를 유발하고, uridine (50mg/ml)과 5'-fluoro-orotic acid (5'-FOA, 1.5mg/ml)가 함유된 최소배지에서 성장시킴으로써, uracil 영양요구성 균주를 선발하였으며, 그 중에서 가장 뚜렷한 형질을 보이는 ASI2029-34 균주를 선발, 형질전환에 사용하였다. 이렇게 선발한 uracil 영양요구성 균주를 숙주로 이용하여 느타리버섯의 형질전환을 수행하기 위하여 전통적인 PEG 방법에 적당한 제한효소를 첨가함으로써 형질전환의 효율을 증가시키는 REMI (Restriction enzyme-mediated Integration) 법을 사용하였다. 느타리버섯에서 REMI 형질전환 방법은 그 조건이 확립되어 보고된 바가 없으므로, 먼저 최적의 조건을 시험하였다.

Uracil 영양요구성 균주를 이용한 느타리버섯의 형질전환은 uracil 영양요구성 균주에 대한 형질의 보완이 가능한 유전자로써는 Ura3와 Ura5 유전자를 클로닝하여 사용하여 시험하였다 (pTRUra3-2 and pTRUra5 vector). 또한 형질전환의 최대한의 효율을 증가시키기 위해서, (1) 첨가되는 제한효소의 종류와 량, (2) DNA의 량, 그리고 (3) 원형질체의 개수에 대하여 반복 실험을 통해 최적의 조건을 검증하였다.

2) Uracil 요구성 균주의 형질전환체 확인 및 대량의 형질전환체 제작

느타리버섯 영양요구성 균주에 대한 형질전환체 선발은 최소배지에서 1-4차 screening을 통해 수행하였다. 이렇게 선발된 형질전환체는 게놈 DNA를 추출하였고, 이 게놈 DNA를 주형으로 pTRura3-2 vector의 염기서열을 기초로 제작한 primer를 사용하여 PCR증폭 반응을 수행함으로써, 1-4차 Screening을 통해 선발한 모든 콜로니는 PCR증폭 반응을 통해 형질전환체가 확인되었다. PCR증폭 반응은 형질전환시키지 않은 ASI2029-34 균주를 대조군으로 사용하여 수행하였다. 또한 tagging mutant의 분석에서는 삽입된 vector의 삽입 형태와 삽입된 vector의 수가 중요하므로, 선발된 형질전환체의 vector 삽입 형태와 삽입된 vector의 수를 확인하기 위하여 Southern 분석을 수행하였다.

돌연변이체는 UV 조사를 통해 다량의 돌연변이체를 제작할 수 있으나, 선발 이후의 분석이 어렵다는 단점을 가지고 있다. 그러나, 외래 DNA를 첨가하고, 게놈 내에서 그 위치를 확인할 수 있도록 하여, 돌연변이체 (tagging mutagenesis)를 제작한다면, 선발된 돌연변이의 원인 유전자를 찾는 과정이 용이하다. 그러므로, 형질전환을 이용하여 임의의 변이체를 다수제작하고, 특성분석 후 선발, 분석을 수행한다. 형질전환을 통한 다수의 tagging 돌연변이체는 이미 확립된 최적의 조건을 통해 제작하고, 분리하여, 버섯 특성분석을 수행한다.

라. 유전 육종에 유용한 돌연변이체의 선발

느타리버섯의 포자를 채취해서 단포자를 분리하고, 각 단포자에 대해 생육조건을 주어줌으로써, 임성의 단핵주를 선발한다. 또한 느타리버섯으로부터 발생된 색특이적인 균주를 농가 또는 농업과학기술원으로부터 수집한다. 수집된 버섯 균주는 모두 균사배양특성, 자실체 및 재배 특성을 분석한다. 또한 좀더 객관화된 결과를 얻기 위해서 수집균주 자실체의 이화학적 특성분석을 수행한다. 발생시킨 자실체를 채취하여 갓 부위와 줄기부위에 대해서 색차계를 이용하여 갓색에 대한 명도, 황색도, 녹색도 (l, a, b value)를 먼저 측정한다. 버섯의 물성은 물성측정기 (Figure 1.2)를 이용하여, 버섯 자실체의 시료를 가로세로 1cm X 1cm로 잘라 준비하여 측정한다. 반복된 시료를 준비하여 반복 측정된 값의 평균값을 산정한다.

마. Carboxin 저항성 유전자를 이용한 느타리버섯의 형질전환

항생제 저항성 형질전환은 uracil 영양요구성 균주의 형질전환과 동일한 조건으로 진행되었다. 다양한 항생제의 사용이 검토되었으며, 이 중에서 항균제로서 느타리버섯의 성장을 완벽하게 억제하며, 가격이 저렴한 carboxin을 사용하였다. 기존에 다른 균류에서 보고된 항생제 저항성 형질전환의 도입을 시험하던 중, 2000년 일본 연구자에 의해 carboxin을 이용한 느타리버섯의 형질전환이 보고가 되었으며, 이 후의 연구를

통해 완벽하게 확립이 되어진 체계이다. Carboxin은 2 μ g/ml의 농도로 사용이 되며, carboxin 저항성 유전자를 가지는 형질전환용 vector DNA (pTM1, Figure 1.3)는 일본 연구자로부터 분양받아 사용이 가능하였다. 형질전환체의 선발은 carboxin 배지에서 수행되었으며, 이미 보고된 방법에 따라 PCR 증폭과 제한효소의 처리를 통해 확인하였다.

느타리버섯에서 carboxin 저항성 유전자를 이용한 형질전환은 영양요구주를 미리 선발해야 하는 체계에 비해 정상 균주를 대상으로 다량 제작할 수 있다는 장점을 가진다. 그러므로 새롭게 분리한 임성단핵균주의 원형질체를 분리하고, carboxin 저항성 vector인 pTM1을 사용하여 REMI 방법을 통해 다수의 tagging 돌연변이체의 제작하였다. 제작된 다수의 tagging 돌연변이체는 2, 3차 스크리닝을 통해 항생제 저항성이 안정적인 균주만을 선발하였고, 최종 선발된 균주에 대해서 PCR과 제한효소 처리를 통해 항생제 저항성 유전자의 형질전환을 확인하였다.

최종 선발된 형질전환체는 모두 임성단핵주의 자실체 선발 방식에 따라 생육과정을 통해 자실체를 발생시켰으며, 모든 균주에 대한 버섯 특성분석을 수행하였다.

바. 돌연변이 원인유전자의 분리와 구조결정

1) 돌연변이 균주의 프로테옴 분석

가) 버섯의 균사체와 자실체로부터 단백질의 분리

각 균주의 균사체는 250ml 플라스크에 버섯 완전배지를 각 100ml씩 분주하여 고체배지 균사(직경 0.75cm) 4조각씩을 넣어 10일간 27 $^{\circ}$ C에서 정치 배양하였고 자실체는 톱밥배지에서 수확하였다. 배양된 균사체는 멸균된 차가운 증류수에 세척하여 액체 배지성분을 제거하였고, filter paper (Whatman no.1)로 여과하여 수집하였다. 각 시료들은 액체 질소에 마쇄하여 준비하였다. 단백질의 추출은 Molloy 등(1998)의 방법을 수정, 보완하여 수용성 및 불수용성 단백질, 그리고 총단백질로 구분하여 추출한다. 이 중 수용성 단백질은 0.5g의 시료에 0.6ml의 추출용액 (0.1M sodium phosphate, pH8.3)을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 40분간 vortex하며 현탁하였다. 15,000rpm에서 40분간 원심분리하여 상등액을 취하여 SDS-PAGE에 이용한다.

나) 단백질의 정량 및 SDA-PAGE 분석

동일량의 단백질은 전기영동하여 비교 분석하기 위해서 단백질의 정확한 정량 과정이 필요하다. 단백질의 정량은 Bradford법을 기초로한 protein assay system (Bio-rad, USA)을 이용한다. Standard protein으로는 BSA(bovine serum albumin)를 이용하고, 시료들은 SDS reducing 용액과 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 처리하고 polyacrylamide gel은 5%의 stacking gel과 10%의 separating gel로 구성한다. 단백질

은 200 μ g을 SDS reducing 용액과 함께 전기영동 한다. 전기영동의 running 조건은 70 Volt에서 한 시간 동안 그리고 85 Volt에서 12시간 가량으로 수행한다.

다) 이차원전기영동 분석

각 시료의 단백질 발현양상을 분석하기 위하여 염색방법에 따라 각 0.1mg과 1mg의 단백질을 이용한다. 각 단백질은 17cm길이의 immobilized pH gradient strip(Bio-Rad, 3-10NL)에 16시간동안 재수화 (rehydration) 시킨 후 등전점전기영동 (isoelectric focusing)을 실시한다. 등전점전기영동은 20 $^{\circ}$ C에서, 각 strip에 전류가 50 μ A 이상 넘지 않도록 설정하며 100V에서 1시간, 500V에서 1시간 전개 후 순차적으로 8,000V까지 상승시켜 총 45,000Vhr와 80,000Vhr가 될 때까지 실시한다. 등전점전기영동 후 분자량에 따른 분리를 위하여 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)가 포함된 12% acrylamide gel(18cm \times 20cm)을 이용하여 최초 10mA에서 1시간동안 전개 후, 염색시약이 gel 바닥면까지 전개될 때 까지 20mA에서 전개한다. 분리된 단백질의 분자량과 pI값은 2D SDS-PAGE용 표준물질(Bio-RAD, USA)을 이용하여 측정한다.

라) Gel 염색

분리된 단백질을 가시화하기 위하여 coomassie stain과 silver stain을 이용하여 실시한다. Coomassie stain은 gel을 40% methanol과 5% phosphoric acid가 포함된 용액에서 3시간동안 고정화하고, 0.1% coomassie brilliant blue G-250이 포함된 염색용액을 이용하여 전개된 단백질을 가시화 시킨 후, gel 표면에 남아있는 염색시약은 증류수를 이용하여 탈색시켜 단백질 spot을 확인한다.

Silver stain은 EMBL(Shevchenko 등, 1996)방법에 기초하여 실시한다. 전기영동이 끝난 후 50% methanol, 5% acetic acid에서 20분간 고정화시킨 후 50% methanol과 증류수를 이용하여 gel을 충분히 씻어준 뒤 0.2% sodium thiosulfate를 이용하여 1분간 반응시킨다. 0.1% silver nitrate에서 20분간 반응시킨 후 증류수를 이용하여 남아있는 silver nitrate를 충분히 제거하고, 0.04% formaldehyde와 2% sodium carbonate를 포함한 용액을 이용하여 발색반응을 유도한다. 발색반응이 충분히 진행되면 5% acetic acid를 이용하여 반응을 정지시킨다.

2) 돌연변이 균주의 유전자 발현 분석

가) DD-RT PCR

비교 시료 간에 서로 다르게 발현되는 유전자(DEGs: Differentially Expressed Genes)를 탐색하기 위하여 TRIzol을 이용하여 각 시료의 total RNA를 분리하고, RT 반응에 의해 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 PCR반응의 주형으로 사용하고,

GeneFishing™ DEG kits의 서로 다른 20개의 ACP(Annealing Control Primer)를 이용하여 발현차이 유전자 탐색에 이용하였다. 반응된 PCR product를 agarose상에 전기영동하고, KODAK Image analyzer를 통하여 발현량을 분석하였다. 유전자 발현의 차이를 보이는 유전자 단편을 agarose상에서 회수하여 재 증폭한 후 cloning기법을 통해 유전자 염기서열을 결정하였다.

나) Reverse Northern 분석

각 EST clone을 정량하여 50ng/ul로 일치시킨 후 nylon membrane에 1ul 씩 점적한 후 denaturation 용액과 중화용액에서 1분씩 정치 후 UV cross linker를 사용하여 DNA를 고정시킨 filter를 사용하였다. Probe 제작에 사용된 RNA는 TRI Reagent를 사용하여 분리하였으며, 방사선 표지된 probe는 50ug total RNA와 reverse transcriptase와 oligo dT primer, 10mM dNTP, 70uCi [α - 32 P] dCTP를 사용하여 37°C에서 1시간동안 반응시켜 제작되었다. 이들은 hybridization solution (6XSSC, 0.1%SDS, 5X Denhardt solution, 100ug salmon sperm DNA를 사용하여 65°C에서 overnight 반응 후, 1XSSC/0.1%SDS로 washing한 후 X-ray film에 exposure시켰다.

다) 발현 profile제작

현상한 X-ray film을 Agfa사의 ARCUSII 로 scanning한 후 TIFF image를 nonlining사의 Total lab software program을 사용하여 pixel density를 결정하였다. actin 유전자의 값을 100으로 하여 다른 clone들의 값을 상대적으로 결정하여 이를 excel에서 database화 하였다.

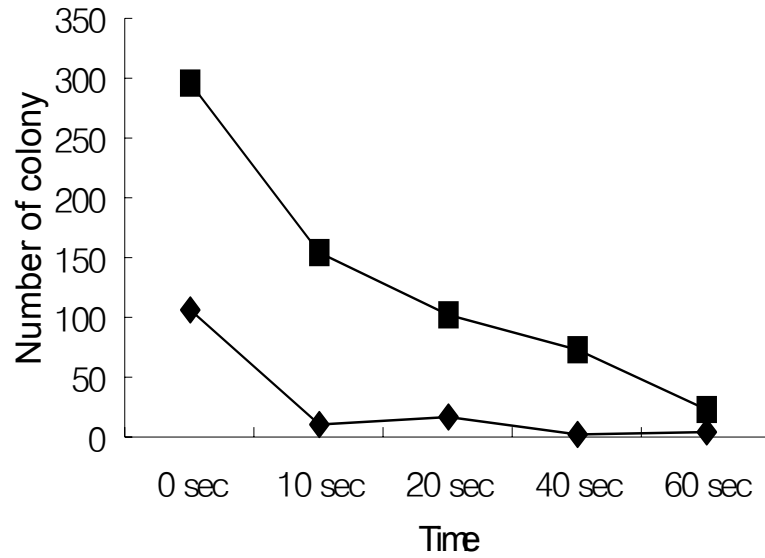


Figure 1.1 Effect of UV light on the survival of *Pleurotus ostreatus* protoplasts. Suspensions of 1×10^5 protoplasts (◆) or 1×10^6 protoplasts (■) were treated by UV irradiation for various durations, then spread on MCM containing 0.6 M sucrose. Survival percentages were scored after incubation at 28°C for 5 days.

Table 1.1 List of solutions used for the screening of auxotrophic mutants

1	2	3	4	5	6	7	8
1. Choline							
2. Cystine	Biotine						
3. Citrulline	Glutamate	Adenine					
4. Cytosine	Histidine	Nicotinic acid	Aneurine				
*5. Folic acid	Isoleucine	Methionine	Pyridoxine	Arginine			
6. Guanine	Inositol	Ornithine	Pantothenic acid	Serine	Alanine		
7. Glycine	Leucine	Proline	PABA	Thymine	Tryptophan	Aspartate	
8. Glutamine	Lysine	Phenylalanine	Riboflavin	Tyrosine	Threonine	Valine	Asparagine
*9.	(NH ₄) ₂ SO ₄		Na ₂ S ₂ O ₃				

Amino acid: 0.5 mg/ml, Vitamin and Nucleic acid: 0.1 mg/ml

*5: Folic acid, Isoleucine, Methionine, Pyridoxine, Arginine, Serine, Thymine, Tyrosine

*9: (NH₄)₂SO₄ Na₂S₂O₃



Figure 1.2. Texture analyzer to test the texture of fruiting bodies.

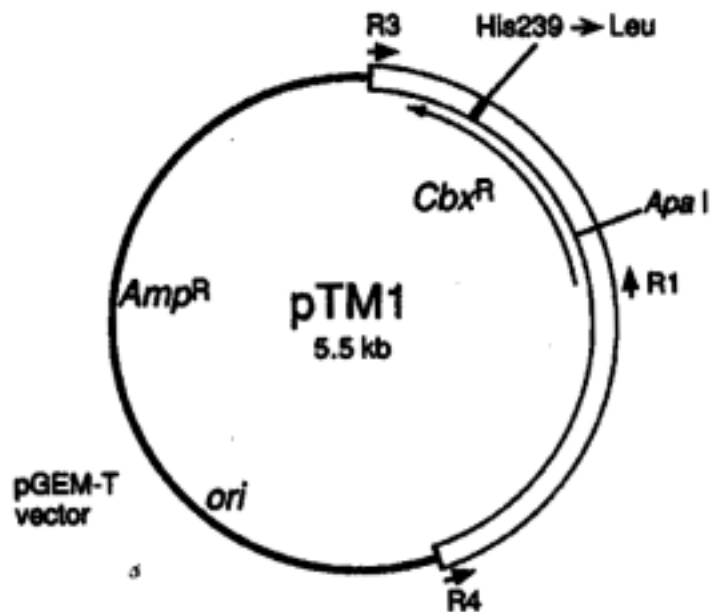


Figure 1.3 Physical map of the plasmid pTM1. The open box represents a 2.5kb DNA sequence from *P. ostreatus* which contains the mutant *sd1* gene (*Carb^R*). The location of the coding sequence and the direction of transcription are indicated by the inside arrow. the line represents the pGEM-T vector plasmid which contains the ampicillin-resistant marker (*Amp^R*) and origin (*ori*) for vegetative DNA replication in *E.coli*. Position of the amino acid substitution (His239 to Leu) and a recognition site for *Apa*I in the *Carb^R* sequence are also indicated. Small arrows represent the location of the primer molecules, R1, R3 and R4, used for amplification and detection of the *sd1* sequence.

3. 결과 및 고찰

가. UV mutagenesis를 통한 제작한 느타리버섯 변이체의 분석

U.V. 조사에 의한 돌연변이 유발은 주로 세균에서 사용되는 대표적인 방법이다. 자외선은 DNA상의 염기치환은 물론, DNA 결실을 유도하는 효과적인 돌연변이원이다. 버섯에서의 이러한 방법에 의한 육종법은 주로 무포자 균주를 얻기 위해 시도하여, 극히 적은 량의 포자를 가지거나 거의 포자가 없는 버섯을 개발하였다. 그러므로 본 실험에서는 느타리버섯의 다양한 형질의 돌연변이 종을 대량으로 만들기 위해서 U.V. 조사에 의한 돌연변이 유발을 수행하였고, 제작된 돌연변이는 특성분석을 수행하였다.

1) 돌연변이의 선발

돌연변이가 일어난 균주의 표현형의 특성은 포자의 색깔변이, 균총의 형태변이, 영양요구성 및 저항성 변이 등이 있다. 초기의 유전연구에서 자실체 형성과정 중 특정 과정은 유전적인 결정에 의해 조절된다는 것이 연구되었고, 먹물버섯에서도 자외선 조사에 의해 자실체 형성과정의 돌연변이를 선발하였다. 그러므로 느타리버섯에서도 자실체 형성과정의 특이성이 돌연변이를 선발하는 유전적 표지가 될 수 있으므로 우리는 자외선 처리된 균주에 대하여 배양적, 자실체 특성분석을 통해 돌연변이를 선발하였다.

정상적인 발생과정과 형태를 나타내는 ASI2029 (Figure 1.4a)에 자외선을 조사하여 5,000개 이상의 균주를 제작하였고 배양적, 자실체 특성을 분석하였다. 이 중에서 39개 균주는 균사와 자실체 상태에서 특이적인 형질을 나타내었고, 각 특성에 따라 6개의 그룹으로 나눌 수 있었다 (Table 1.2, Figure 1.4). (1)영양요구성 균주, 최소배지에서 자라지 않으나 필요한 영양소를 제공하면 잘 자라는 균주; (2)배양 특이 균주, 최소배지와 완전배지 모두에서 잘 자라지 못하는 균주; (3)원기 미생성 균주, 자실체 발생과정 중 원기를 생성 못하는 균주; (4)미성숙 균주, 자실체 발생과정 중 원기를 생성하나 성숙한 자실체를 형성하지 못하는 균주; (5)색특이 균주, 발생된 자실체의 갖의 색이 정상이 갈회색임에 비해 회청색이나 청백색을 나타내는 균주; (6)소포자형성 균주, 포자를 형성 못하거나 극히 적은 량을 형성하는 균주.

2) 자외선 처리 돌연변이 균주의 특성 분석

정상균주인 ASI2029는 이핵주이며 완전배지와 최소배지에서 빠르고 밀집하게 자란다 (Figure 1.4a, Table 1.4). 원기는 자실체 발생조건 하에서 평균 3.5일 만에 생성되기 시작하고, 정상적인 자실체와 많은 량의 포자 (level 5)를 형성한다. 어린 자실체의 갖의 색은 흑회색이며 성숙 자실체의 경우 갈회색을 나타낸다. 돌연변이체의 선발

은 다양한 특성에 대하여 정상균주와의 비교 분석에 의해서 수행되었으며, 39개의 특이한 형질의 돌연변이 균주를 선발하였다.

(1) 영양요구성 균주: 선발 배지에 대하여 돌연변이 처리된 균주를 배양 시킴으로써 영양요구성 균주를 선발하였다. 약 10^7 개의 원형질체에 대해 선발 빈도는 2.4%로서 최초 73개의 균주가 선발되었다. 이 균주들의 요구 영양소를 찾고, 유전적 표지를 검정하기 위하여 변형된 Holliday 용액을 이용하였다 (Table 1.1). 최초 73개의 변이체 중에서 23개의 변이체가 2개 또는 3개 종류의 요구 영양소를 가지며, 영양요구성 균주로 선발이 되었고, 각 유전적 표지도 검정되었다 (Table 1.3). 이러한 영양요구성 균주는 아미노산 요구성 (21 균주), 비타민 요구성 (1 균주) 그리고 아미노산과 비타민은 동시에 요구하는 아미노산 /비타민 요구성 (4 균주)으로 분류할 수 있다. 이 균주들은 최소배지에서 완전히 성장을 못하거나 성장이 느리고 균총이 흐리게 성장하며, 요구 영양소가 첨가된 최소배지에서는 완전하게 성장한다. 또한 최소배지에서 성장을 못하며 여러 개의 다른 영양소를 요구하는 균주는 멀티 요구성이거나 영양소 용액에 존재하지 않지만 완전배지에 존재하는 어떤 것을 요구하는 균주일 것이다. 이것에 대한 차후의 연구가 필요하다. 최초 선발한 73개 균주 중에서 14개 균주는 멀티 요구성이거나 유전적 표지를 찾을 수 없었다. 7개 균주는 최소배지 뿐 아니라 완전배지에서도 완전히 성장하지 못하였다. 73개 균주에 대하여 back mutation을 시험하기 위해 최소배지에 접종하였다. 7일에서 15일 동안 배양시킨 후 그 중 10개 균주 (41.1%)는 정상적인 배양특성으로 전환됨을 확인하였다. 이러한 back mutation 율은 이미 보고된 빈도수와 비슷하였다.

(2) 배양 특이 균주: 영양요구성 균주는 최소배지에서는 못자라며 완전배지에서는 잘 자라는 균주를 선발하여 그 특성분석 및 유전적 표지를 검정하였다. 그러나 균사를 배양했을 때 최소배지와 완전배지 모두에서 자라지 않는 균주를 또한 선발 할 수 있었다. 이러한 특이한 배양적 특성을 가지는 균주도 자실체 발생과정을 통해 버섯 특성분석을 수행하였다 (Table 1.4). 이러한 배양적 특성은 돌연변이의 심화에 의해서 일어난 것이라 예상된다. 자실체 발생과정 중에서 톱밥배지에서는 균사가 배양되었으나, 원기 발생일은 긴 특징을 가진다. 그러나 자실체는 대체로 정상적이며, 포자의량은 단지 약간 적은 편이었다.

(3) 원기 미생성 균주 와 미성숙 균주: 느타리버섯의 자실체 발생과정은 원기생성과정과 자실체 생성단계로 크게 2단계로 나눌 수 있다. 자실체 발생조건에서 3-5일 후 원기가 생성되고, 자실체는 원기생성 후 4-6일 뒤에 형성된다. 발생단계의 변이는 먹물버섯에서와 같이 자실체 발생기작을 이해하는 데 중요한 균주이다. 자외선 조사된 3,000개 균주 모두를 자실체 발생을 유도하여 자실체 특성을 분석하였다. 발생단계의 변이체 분리를 위해서 발생조건 하에서 원기 생성일수를 관찰하는 동시에 균사의 배양특성을 분석하였다. 발생단계의 변이체의 선발은 재연성을 가진 3개의 균주를 선

발하였다. 90일 이상의 기간 동안 자실체 발생조건을 유지했을 경우에도 UVM831은 원기생성에 실패하였고, UVM534 과 790은 자실체를 형성하지 못했다. 이 원기 미생성 균주 와 미성숙 균주는 첫 번째 시험재배에서 분리하였고, 이후 다른 조건과 장소에서도 동일한 결과를 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한 균사의 배양에서도 완전배지와 최소배지에서 비정상적인 결과를 가지고 있음을 알 수 있었다. 그러므로 우리는 이 3개의 균주가 발생단계의 변이체임을 확인할 수 있고 다른 특성과 중복임 됨을 알 수 있었다. UVM831은 배양속도가 느린 원기 미생성 균주이고, UVM534 은 Isoleucine/Lysine 요구성이며 미성숙 균주이다. 미성숙 균주의 원기생성일은 정상에 비하여 굉장히 늦는 것을 알 수 있었다. 발생변이체의 빈도 (0.1%)는 먹물버섯이 18.4% 임에 비해 낮은 것을 알 수 있었다.

(4) 색특이 균주: 느타리버섯의 자실체 발생과정 중에서 형태적인 특성은 많은 재배 환경적인 영향을 받는다. 그러므로 자실체로부터 형태 변이체를 찾는다는 것은 어려운 일이다. 자실체 발생 시험동안 우리는 분리된 균주의 자실체 형태 변이체를 찾으려 시도하였으나, 색변이체를 제외하고는 자실체 발생과정 중 재연성을 나타내는 변이체를 찾을 수는 없었다. 선발한 색 변이체는 정상의 균주가 어린 자실체의 경우 흑회색을, 성숙 자실체의 경우 갈회색을 나타내는 것에 비하여 2개의 색변이체를 선발할 수 있었다. 이렇게 선발된 색 변이체는 원기 생성일과 배양 속도 그리고 포자의 량이 시험되었다 (Table 1.5). 자실체의 갓색이 청회색을 나타내는 변이체인 UVM676 은 최소배지와 완전배지에서 모두 늦은 성장을 보였고, 포자의 생성량이 적음을 알 수 있었다. 그러므로 이 결과는 UVM676이 자외선 조사에 의해 갓색의 변화를 가져왔으며, 먹물버섯에서 처럼 포자량과 갓색과의 관계가 있음을 알 수 있었다. UVM1068은 최소배지와 완전배지에서 모두 빠른 성장을 보였으며 다른 특징에서의 큰 차이는 없었고 자실체 갓색이 청백색을 나타내는 특징을 가졌다. 일반적으로 버섯 갓의 색은 배지의 산도와 재배 온도에 따라 변화된다. 그러나 이 균주는 자실체 발생과정인 원기부터 성숙 자실체까지 동일한 청백색을 계속적으로 안정적으로 유지하는 것을 볼 수 있었고 (Figure 1.4a, b, c), 반복 수행과 다른 장소, 다른 배지를 사용해도 같은 형질을 나타냄을 관찰할 수 있었다. 그러므로 UVM1068은 자외선 조사에 의해 특이한 갓색을 가지는 변이체로 확인할 수 있었다.

(5) 소포자형성 균주: 느타리버섯의 재배과정 중 포자의 비산은 포자를 흡수한 재배자의 호흡기 안에서 포자 표면이 항원으로 제공되어 알레르기를 유발시킬 수 있다. 이러한 심각한 건강상의 문제 뿐 아니라 포자의 생성은 환경적인 영향과 상업적인 영향을 준다. 이러한 결점을 극복하기 위해서 무포자 형성 균주 개발이 이미 Eger 등에 의해 수행되었다. 그러나 이러한 균주는 그 중요성에도 불구하고 버섯 품질의 면에서의 결점을 가지고 있다. 자외선 조사되어 분리된 3,000개 균주의 포자형성은 육안에 의해 분석되었다. 자실체의 갓의 지름이 3.5cm되고 건강한 자실체를 골라 멸균된 지

지대위에서 포자문을 형성시켰고, 이렇게 형성된 포자문의 크기와 밀도에 따라 0(포자 없음)부터 5(정상의 포자 형성량)까지 그 수준을 평가하였다 (Figure 1.4g to j). 첫 번째로 level 1 이하의 10개 균주가 선발되었고, 재 분석을 통해 5개의 소포자 균주가 선발되었다. 이 균주의 특성을 분석하기 위해서 균사 생장 속도와 자실체 형태를 분석하였다. 색특이 변이체인 UVM676을 제외하고 다른 변이균주는 배양적, 자실체 특성에서 거의 정상이었고, 갓색은 정상과 비교하여 대체적으로 약간 밝은 경향을 나타내었다. 이러한 균주 중에서 UVM676, 1799는 지지대에 포자가 없었으므로 무포자일 가능성을 가지고 있으나, 두 균주는 육안으로 분석되었기 때문에 무포자 균주로 확인을 위해서는 현미경적 또는 흡광도 분석이 이후 수행이 되어야만 한다. 또한 소포자 균주는 수율과 형태에서의 낮은 버섯 품질을 가지고 있기 때문에 이후 연구에서는 이 균주로부터 유래된 단포자를 분리하여 육종연구를 수행하여야 한다.

나. Uracil 영양요구성 균주에 대한 REMI 형질전환

느타리버섯의 형질전환을 위해서는 모균주로부터 uracil 영양요구성 균주 (ASI2029-34)를 먼저 선발하고, 영양요구성을 보완하는 유전자를 클로닝하여, 형질전환용 vector에 클로닝하였다. 형질전환은 전통적인 PEG 방법에 적당한 제한효소를 첨가함으로써 형질전환의 효율을 증가시키는 REMI (Restriction enzyme-mediated Integration) 법을 사용하였으며, 느타리버섯에서 REMI 형질전환 방법의 조건을 (1) 제한효소의 종류와 량, (2) DNA의 량, (3) 원형질체의 개수에 대해서 분석하였다.

(1) 제한효소의 종류와 량 (Figure 1.5) : REMI 형질전환에서는 효율 증가의 Key 역할을 담당하는 제한효소의 종류와 첨가량이 매우 중요하다. 그러므로, 느타리버섯의 영양요구성 균주와 pTRura3-2 vector를 사용할 경우, 적당한 제한효소의 종류와 량을 먼저 시험하였다. 형질전환은 pTRura3-2 vector 1 μ g과 느타리버섯의 영양요구성 균주의 원형질체 1 $\times 10^7$ 개의 조건에 대하여 수행하였으며, 제한효소는 pTRura3-2 vector내에 단 1개의 절단자리를 가지는 *Bam*HI과 *Hind*III를 사용하여 최적의 량을 시험하였다. 느타리버섯의 영양요구성 균주의 원형질체 1 $\times 10^7$ 개와 pTRura3-2 vector 1 μ g을 사용할 경우, 형질전환에 사용할 수 있는 적당한 제한효소는 *Bam*HI이며, 그 최적의 량은 10unit임을 알 수가 있었다.

(2) DNA의 량 (Figure 1.6) : 느타리버섯의 영양요구성 균주와 *Bam*HI를 사용하여 형질전환하는 경우, 적당한 pTRura3-2 vector의 량이 형질전환의 효율에 미치는 영향을 검사하였다. 형질전환은 느타리버섯 영양요구성 균주의 원형질체 1 $\times 10^7$ 개와 *Bam*HI 10unit의 조건에 대하여 수행하였다. 그 결과로써 형질전환체의 수를 증가시키는 것은 DNA 량을 변화시킴으로써 가능하다는 것과, 형질전환체를 얻기 위해서는 최소한 0.1 μ g 이상의 DNA 량이 필요하다는 것을 알 수 있다, 또한 같은 조건에 대하여 DNA의 형태가 형질전환 효율에 미치는 영향을 시험한 결과, 환형보다는 선형의

DNA가 효율이 더 높은 것을 알 수 있었다 (Figure 1.7).

(3) 원형질체의 개수 (Figure 1.8) : 느타리버섯 영양요구성 균주에 *Bam*HI과 pTRura3-2 vector를 사용하여 형질전환 할 경우, 적당한 원형질체의 개수를 시험하였다. 형질전환은 *Bam*HI 10unit와 pTRura3-2 vector 1 μ g를 사용하였고, 5 \times 10⁵개로부터 4 \times 10⁷개까지의 느타리버섯 영양요구성 균주의 원형질체에 대한 형질전환 효율을 분석하였다. 그 결과 원형질체의 가장 적당한 수는 1 \times 10⁷개이고, 원형질체수가 증가(4 \times 10⁷개)하더라도 형질전환체의 수는 오히려 감소하였다. 즉 제한효소와 DNA 량 등의 조건에 대한 적당한 원형질체 수가 존재하는 것을 알 수 있었다. 또한 1회 분리할 수 있는 원형질체 개수도 한계가 있으므로 느타리버섯 영양요구성 균주 형질전환에 가장 적당한 원형질체의 수는 1 \times 10⁷개이라는 결론을 얻었다.

영양요구성 돌연변이 균주는 최소배지에서 자라지 않지만, uracil이 존재할 경우에는 잘 자라는 성질을 가진다. 그러므로 영양요구성 균주를 대상으로 하여 제작한 형질전환체의 선발은 최소배지에서 수행하고, 잘 자라는 콜로니를 선발하게 된다. 모균주가 영양요구성일지라도 형질전환체는 Ura3 유전자에 의해 보완이되므로 최소배지에서도 uracil 없이 잘 자랄 수 있다. 그러므로 형질전환체만을 선발할 수 있는 것이다 (Figure 1.9). 이렇게 선발된 형질전환체는 게놈 DNA를 추출하고, 이 게놈 DNA를 주형으로 pTRura3-2 vector의 염기서열을 기초로 제작한 primer를 사용한 PCR증폭 반응을 통해 형질전환체가 확인되었다. 형질전환 과정에서 농축된 DNA를 사용하므로 선발된 형질전환체가 1개의 Ura3 유전자만이 삽입되지 않을 것이며, 만약 2개 이상의 유전자가 삽입이 된다면, 이 후의 분석에서 어려움을 겪을 수 있으므로, 삽입된 유전자의 개수가 중요하게 된다. 그러므로 선발된 형질전환체의 vector 삽입 형태와 삽입된 vector의 수는 Southern 분석을 통해 확인하였다 (Figure 1.10). Southern 분석은 REMI-형질전환체 중에서 제한효소를 매개해서 삽입된 경우(REMI event)가 48.4%이며, one copy로 삽입된 경우는 31.1%였다.

결론적으로 말하자면, REMI법에 의한 형질전환은 느타리버섯의 영양요구성 균주의 Tagging mutant를 만드는 적당한 방법이라고 할 수가 있으며, 그 REMI 형질전환의 최적의 조건은 원형질체 1 \times 10⁷개, 1 μ g의 pTRura3-2와 *Bam*HI 10unit를 첨가하는 것이다.

다. 유전 육종에 유용한 돌연변이체의 선발

1) 음성단핵 균주의 선발

버섯은 4개의 교배형을 가지며, 2개의 화합성 단핵균주 간의 교배에 의해서 이핵주가 된다. 이렇게 교배된 이핵주는 자실체 생성 조건을 주어진다면, 자실체를 생성하고, 성숙한 자실체는 포자를 생성하게 된다. 이러한 포자들은 다시 4개의 극성을 가지

는 단핵균사로 자라면서, 화합성 균주와의 접촉을 통해 자실체를 생성하는 생활사를 가진다. 그러나 유전 육종의 측면에서는 이러한 교배에 의한 유전형의 재조합은 육종된 균주에 대한 분석을 어렵게 한다. 특히 느타리버섯의 형질전환에서는 교배된 이핵주에서는 형질전환이 거의 이루어지지 않으며, 단지 단핵주에서 가능하다는 것을 본 연구팀의 연구 과정에서 알게 되었다. 그러므로 단핵균주를 대상으로 유전자의 형질전환을 수행을 한다면, 그 형질전환체에 대해서 자실체 이후 단계에서의 형질분석을 위해서는 정상의 화합성 균주와의 교배의 과정이 이루어져야만 하고, 이러한 교배의 과정은 유전자의 재조합과정을 유발하므로, 결국 tagging된 유전자의 분석에 커다란 영향을 주게 된다. 그리고 때론 삽입된 외래 유전자의 제거를 위한 세포작용을 하게 될 수도 있어 형질전환체의 형질이 사라지는 현상을 가져오기도 한다. 이러한 교배가 요구되는 균주에서의 세포 작용은 모두 안정된 형질전환과 tagging 돌연변이체 제작에서 큰 장애가 아닐 수 없으며, 실제로도 위에서 제작한 uracil 요구성 균주를 대상으로 제작한 형질전환체의 자실체상의 특성분석도 불가능하게 하는 요인이 되었다.

이러한 이유로 임성의 단핵균주, 즉 핵의 개수가 1개인 단핵균주이면서, 생육의 조건만 가하더라도 교배의 과정 없이 단핵주 자체가 자실체를 형성할 수 있는 균주를 제작, 선발하였다. 임성단핵균주의 선발은 인위적인 돌연변이 유발 없이, 다수의 포자에서 자연적으로 존재하는 돌연변이 균주를 선발하는 과정으로 수행하였다. 즉 다수의 포자를 채취하여, 배양시킨 균주에 대해서 생육의 조건만을 가하고, 자실체가 발생하는 균주를 선발하게 되었다 (이 과정은 충북대학교 차재순 교수님의 도움으로 수행되었다). 이에 다수의 임성단핵 균주를 선발하였으며, 그 형질이 안정적으로 유지되는 1개의 균주 (MB1)를 선발하여 유전육종 연구에의 사용을 위해서 특성분석을 수행하였다 (Figure 1.11 and Table 1.7).

선발된 임성단핵균주인 MB1은 균사의 배양과 원기생성 및 자실체의 발생이 이핵균주에 비해서 매우 늦는 단점을 가지고 있다. 그러므로 자실체의 발생까지의 시간이 생육 후 평균 3개월 이상이 소요됨을 알 수 있다. 그러나 이러한 특징은 본 연구가 자실체의 형성기작의 분석과 관련이 있으므로, 자실체 형성을 촉진하는 원인을 밝히는 실험대상으로서 사용하기에 큰 장점이라 할 수 있다. 또한 임성단핵 균주의 주목할 만한 특징은 생육 조건을 주어진 후 평균 10일에는 핵이 분열되어 2개로 나누어지며, 클램프를 생성하는 것과, MB1 균주의 담자기를 현미경으로 분석한 결과, 담자뿔이 4개의 특징을 가진다는 것이다. 이러한 특징으로 MB1 균주가 버섯의 발생연구에서 발생의 기작을 밝히기 위한 열쇠가 되는 중요한 균주로서의 중요성을 확인할 수 있다 (Figure 1.12 and 1.13).

2) 흑, 백색 변이주의 선발

느타리버섯의 품질은 다른 여러 가지 요인과 동시에 맛색에 의해 크게 좌우되므

로, 갓색은 버섯의 특성을 나타내는 가장 중요한 요인이 된다. 그러므로 현재의 버섯 재배는 주로 갓색이 진한 품종을 선호하여, 재배를 수행하고 있으나, 일반적으로 갓색이 진한 품종일수록 버섯의 성장이 느리며, 생산량이 적은 단점을 가지고 있거나, 재배과정 중 흑회색 버섯의 생산은 낮은 온도의 유지 등의 환경적 조절이 필수적이거나, 그에 따르는 고비용이 재배과정의 어려움이라 할 수 있다. 이에 안정적 유전형질을 가지는 고품질의 버섯 품종의 개량이 요구되고 있다. 또한 최근 연구 경향에 따르면 느타리버섯 가지고 있는 기능 중에 국외에서 주로 주목받는 것은 느타리버섯의 탈색의 능력이고, 이것은 주로 화장품의 원료로서 사용되고 있다. 그러므로 흑색이나 백색의 갓색을 가지는 느타리버섯 균주의 확보는 고품질, 고기능성 버섯품종 육성에서 매우 유리하게 작용한다.

원형느타리버섯은 원형질체 융합의 방법으로 그 품질이 개량된 품종으로서, 현재 국내의 농가에서 가장 많이 재배가 되는 품종이다. 그 기원을 확실히 알 수 있고, 성장이 빠르며, 생산량이 많은 장점을 가지는 원형느타리버섯은 그러나 갓색이 흐리다는 단점을 가지고 있다. 원형 느타리버섯으로부터 분리한 흑색변이체는 갓색이 진한 흑색을 띠며, 줄기의 색도 약간의 검은 색을 나타내는 특징을 가졌으며, 또한 원형 느타리버섯으로부터 분리한 백색변이체는 갓색과 줄기가 모두 백색의 특징을 가지고 있다 (Figure 1.14). 이에 우리는 이러한 흑, 백색 변이체를 육종모본으로 사용하기 위해 버섯특성분석을 수행하였으며, 이러한 유용한 돌연변이에 대한 좀더 객관적인 특성 분석을 위하여, 색차계 및 물성측정기를 사용하였다.

흑, 백색변이체는 원형 느타리버섯이나 ASI2029와 비교하여 균사성장과 자실체 형성 및 포자형성에서 큰 차이가 없으며, 단지 갓색에서만 차이를 보이는 특성 (Table 1.8)을 가지므로 버섯의 육종모본으로서 매우 유용한 가치를 이미 가지고 있다. 또한 유용한 육종모본의 특성은 좀더 객관적인 방법을 통해 분석을 수행함으로써, 기존의 품종과의 명확한 차이를 확인할 수 있었으며, 이 후 육종된 버섯품종의 특성에서도 기본적인 자료로의 사용이 가능하다.

라. Carboxin 저항성 유전자를 이용한 느타리버섯의 형질전환

느타리버섯의 형질전환의 체계는 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 그 중에서 영양요구성 균주를 통한 형질전환 체계는 먼저 정상의 균주로부터 돌연변이 처리를 통한 영양요구성 돌연변이를 처리해야하는 과정이 선행되어야 하며, 이러한 과정은 형질전환의 숙주를 선발된 영양요구성 돌연변이체에 한정되어야 하는 단점과, 이미 돌연변이 처리된 균주를 대상으로 형질전환 하였기 때문에 이후의 분석에도 근본적으로 미지의 변화요인의 문제를 가지고 있는 단점을 지니고 있다. 이에 비해서 다른 한 가지 체계인 항생제 저항성 형질전환은 사전의 돌연변이 처리가 없이, 정상의 균주를 대상으로, 목적하는 항생제 저항성 유전자만을 처리함으로써, 그 변화를 직접적으로 분석

이 가능하다는 장점을 가지며, 또한 연구목적에 따라 형질전환의 대상이 되는 숙주균주의 교체가 제한이 없다는 장점을 가진다고 할 수 있다. 그러나 항생제 저항성 형질전환 체계는 숙주 균주의 성장을 완벽하게 억제하는 항생제의 스크리닝과 그에 대한 저항성 유전자의 선발이 선행되어야 한다.

1990년대에는 느타리버섯의 형질전환은 영양요구성 균주를 이용한 형질전환 체계를 주로 이용하였으며, PEG법을 사용함으로써 그 효율 또한 적었었다. 1990년대 말에 형질전환의 효율을 높이는 REMI 방법이 진균류의 형질전환에 도입이 되기 시작하였으며, 느타리버섯에서는 본 과제를 통해, 본 연구팀에 의해 처음으로 도입이 되어, 보고 되었다. 그러나 영양요구성 형질전환 체계에 비해 큰 장점을 가지는 진균류에서의 항생제 저항성 형질전환은 hygromycin, phleomycin 등의 고가의 항생제를 사용하여 수행이 되기 시작하였으며, 그 저항성 유전자도 보고가 되었다. 본 연구팀도 이러한 항생제 저항성 형질전환의 체계를 느타리버섯에 도입하기 위해 부단히 노력을 하고 있었으며, 그러한 노력들은 세계 각국에서 이루어지고 있었다. 2000년 일본의 wood research 연구실에서 carboxin 저항성 유전자를 푸른곰팡이로부터 분리하고, 느타리버섯의 성장을 완벽하게 억제하는 carboxin을 이용한 형질전환체계를 확립하고 보고하였다. 그와 동시에 형질전환의 효율을 높이는 연구를 수행하였으며, 균사 상에서 manganese peroxidase의 과다발현 시키는 성과를 이루었다.

임성단핵 균주를 이용한 형질전환의 체계는 버섯의 발생과 자실체 형성 기작을 연구하는 면에서 매우 확실한 장점을 가지고 있다. 임성단핵균주는 발생 및 자실체 형성 과정에서, 정상의 균주에서 필수적으로 이루어지는 교배의 과정이 없이, 생육의 조건을 가해 주는 것만으로도 자실체를 형성하는 균주이다. 정상의 균주가 자실체의 형성을 위해서는 화합성 단핵균주 간의 교배를 수행하는데, 이 과정은 이후 선발된 형질전환체의 분석에서 유전형의 혼합, 수정, 교정의 문제로 인해 분석의 어려움을 겪게 한다. 즉 삽입된 외래 유전자의 발생 및 자실체 형성 과정에서의 직접적인 영향의 분석을 매우 난해하게 하는 원인이 된다. 그러나 임성단핵 균주에서는 단핵균주로 외래 유전자가 삽입되고, 다른 유전형과의 혼합 등의 과정이 없이, 직접 자실체의 발생이 이루어지므로 삽입 유전자와 버섯 균주의 형질변화와의 직접적인 상관관계를 분석할 수 있는 장점을 가지게 된다.

본 과제에서의 목표는 영양요구성 균주를 이용하여 형질전환 체계의 확립과 다수의 형질전환체의 분리였으며, 1, 2차년도에 과제의 수행을 통해 영양요구성 균주를 이용한 느타리버섯의 형질전환 체계가 이미 확립되고, 다수의 형질전환체가 제작되었으나, 최근의 형질전환의 기술의 발전과 동시에 본과제의 방법도 수정이 될 수밖에 없었다. 우리는 먼저 국내의 버섯 품종으로부터 임성단핵 균주를 분리하고, 특성분석을 수행하여, 형질전환 체계에서 유용하게 사용될 숙주를 확보하였다. 그리고, 일본의 연구자로부터 carboxin 저항성 유전자를 분양을 받아, 보고된 항생제 저항성 형질전환

체계를 국내의 품종으로부터 분리한 임성단핵균주에 대한 적용의 가능성을 시험하였다.

느타리버섯의 임성단핵 균주에 대한 carboxin 저항성형질전환은 uracil 요구성 형질전환에서 확립한 최적의 조건으로 수행을 하였다. 형질전환의 효율은 1 μ g의 pTM1 DNA에 대해서 5.6개의 형질전환체가 분리되어, 높지 않은 효율을 나타내었으나, 그 표현형은 매우 명확하였다. 2차, 3차의 선발 과정에서 형질전환체의 개수는 조금씩 줄어들어 다른 것과 마찬가지로, 형질이 복귀됨을 예측할 수 있었다. 3차의 선발과정을 거쳐 선발된 확실한 형질전환체는 PCR 증폭을 통해 carboxin 저항성 유전자를 특이적으로 증폭하고, 이 유전자에 인위적으로 만들어 놓은 Apa I site의 절단을 통해 pTM vector가 삽입이 되었음을 확인하였다 (Figure 1.15).

이러한 과정을 통해 제작된 형질전환체는 5.5kb의 pTM1 DNA가 숙주의 게놈 내로 삽입이 될 것을 예상하였고, 그렇게 삽입된 자리에서 파괴된 숙주의 본래의 유전자는 그 기능을 수행하지 못하며, 이것이 형질전환체의 발생 및 자실체 형성 과정에서 표현형으로 나타나리라는 예상으로 다수의 형질전환체를 선발하였다. 그리고 선발된 형질전환체를 모두 발생과정을 수행하였다. 그러나, 진핵균류에서는 외래 유전자가 게놈 내로 삽입될 확률이 30% 이하로 보고되었으며, 임성단핵 균주는 자실체 발생일 까지가 3-4개월이 소요되며, 자실체 발생율도 75% 정도인 문제점 등으로 예상되는 원인으로 인해, 아직 특이적인 표현형을 나타내는 형질전환체는 선발하지 못하였다. 즉 항생제 저항성 유전자, pTM1이 숙주의 게놈으로 임의로 삽입되어 나타내는 특이적인 형질을 찾는 연구에서는 각 과정, 과정에서의 수행 효율 및 시간적 문제 등으로 인해 유의한 결과를 얻지 못하였다. 그러나, 이러한 형질전환체계는 특정 유전자의 과발현과, 유전자 파괴 등의 방법으로 유전자의 기능 분석의 도구로 사용될 경우 매우 유용하게 사용될 것이며, 나아가 기능성 및 약용 물질의 생산과 변이체 생산에서도 유용할 것이라 예상된다.

마. 돌연변이 원인유전자의 분리와 구조결정

본 연구를 통해 분리된 유의한 돌연변이 종은 매우 다양하다. 그러나 그 중에서 유전 육종 및 형질전환 등에서 사용이 가능하며, 버섯 품종 개량 측면에서 관심이 대상이 되는 변이 품종에 대한 변이 원인 유전자 분석을 수행하였다.

변이 원인 유전자의 분석은 각 종에 따라 다양한 방법으로 접근하였다. 색과 관련된 변이체는 주로 단백질 수준에서의 변이 원인과 특이적인 표지인자의 개발을 목적으로 2D 분석을 수행하였으며, 발생단계에서 특이적이며, 형질전환에서 유용한 숙주로서 사용되는 임성단핵 균주는 주로 유전자 발현 분석을 이용하여 수행하였다. 이에 다수의 변이 원인에 대한 프로테오믹과 유전자를 선발하였다 (Figure 1.16-1.18).

1) 2D 분석을 통한 색변이체의 변이 원인 검정

가) UV 처리를 통해 분리한 푸른 갯색 버섯과 모균주의 분석

느타리버섯의 모균주 (ASI2029)로부터 분리한 원형질체에 대해 UV를 처리함으로써 임의로 생성된 돌연변이체를 다수 선발하였다(Table 1.2). 이렇게 선발된 UV 변이체 (UVM) 중에서 색변이체로서, 발생의 초기인 원기의 형성부터 색의 변이가 생겨, 성숙된 자실체가 될 때 까지 특이적인 푸른색을 나타내는 UVM1068에 대한 관심이 증가되었다. UVM1068을 갯색이 특이적인 변이로 선발을 하였고,, 변이가 유발된 기작에 대한 분자유전학적 연구를 수행하였다.

갯색의 변이는 주로 1, 2가지의 최종 산물의 변화에 의해 표현형으로 나타난다. 그러하므로, 우리는 직접적인 산물의 변화에 대한 원인 분석으로써 가장 적합한 1D와 2D 분석을 수행하였다. 아직 버섯에 대한 프로테오믹스의 database의 구축이 미비한 측면이 이 분석의 약점이라고 할 수 있으나, 하루가 다르게 변화되고, 개량되는 최근의 연구 추세에 따라 버섯의 연구도 뒤쳐지지 않기 위해서는 단기적인 성과보다는 장기적인 목적을 가지고 data 축적의 의미로 이 분석을 수행하는데 프로테오믹스 분석이 적용되었다. 색변이체에 대한 프로테오믹스의 분석은 갯의 색을 나타내는 껍질 부위를 분리하여 분석하였고, 1D와 2D 분석에 의해 프로테오믹스 발현 프로파일을 작성하였다 (Figure 1.16-1.17).

갯색 변이체인 UVM1068은 그 모균주인 ASI2029와 비교하여 분석하였다. 1D분석을 통해 다양한 단백질 밴드의 차이를 나타내는 발현 패턴 차이를 확인하였다 (Figure 1.16). 이러한 단백질 밴드 중에서 38.78 kDa의 단백질 밴드가 발현차이가 있음을 또한 확인하였고, 이러한 차이를 나타내는 단백질 밴드는 동일한 균주에서 유래된 두개의 균주에 대하여 선발의 표지인자로서의 가치를 가질 수 있다. 이렇게 발현 차이가 있는 두 균주에 대해서 2D 분석을 통한 프로테오믹스를 분석하였다 (Figure 1.17). 다수의 분석과정을 통해, 두개 균주에 대해 발현의 차이가 있는 9개의 프로테오믹스 스팟을 동정하였고, 이렇게 분리된 프로테오믹스 스팟은 색변이를 유발하는 변이 원인이 될 것이라 예상하였다. 이 프로테오믹스 스팟은 다양한 방법에 의해 동정이 시도되고 있으나, 아직은 database 미비 등의 근본적인 문제로서 정확한 동정에 어려움을 겪고 있다. 그러나 이러한 노력들이 이후의 버섯 프로테오믹스 연구 발전의 커다란 기초가 되리라고 예측하고 있다.

나) 흑백색 변이체의 변이 원인 분석

국내에서 농가에 의해서 재배되던 원형느타리버섯 품종으로부터 기존의 품종보다 특이적인 흑색의 갯색을 가지며, 형질이 안정적인 흑색변이체와 백색의 갯색을 가지

는 백색 변이체를 분리하였다. 이러한 특이적인 돌연변이 균주는 품질적, 기능적 버섯 품종 육성에 중요한 가치를 가지며, 품종 보호를 위한 측면과 나아가 버섯 형질의 분자유전학적 해석의 의미로도 매우 중요하다.

버섯의 특징 상 새로운 버섯 품종의 보호가 쉽지 않다. 그러므로 객관적인 자료를 확보하는 것이 선행되어야 할 문제이다. 그러므로 먼저 정밀 측정기계를 통해 표현형의 객관화를 시도되었으며, 이 후 조금 더 객관화된 정보의 획득을 위한 분자유전학적 분석을 통한 data의 축적이 요구되었다. 또한 발생학적 측면에서도 버섯 갓색 형성의 세포학적 기작과 의미의 해석을 위한 연구가 요구되었다. 이에 모균주와 매우 확연한 표현형의 차이를 나타내는 흑, 백색변이체에 대하여, 변이 원인을 밝히는 연구를 수행하였다. 푸른 버섯에서처럼 갓색의 분석을 위해서는 단백질 분석이 선행되었으며, 이에 우리는 일차적으로 1D 분석을 수행하였다.

흑백색 변이체에 대한 단백질 분석은 모균주와 각 변이체의 갓과 조직 부위에서 수행되었다 (Figure 1.18). 1D 분석을 통해 모균주와 각 변이체 간의 발현되는 단백질의 밴드는 매우 차이가 많은 것을 알 수 있었다 (Figure 1.19). 모균주에 비해 흑색의 변이체는 주로 발현이 감소되는 패턴을 다수 보이며, 백색의 변이체는 발현이 증가되는 패턴을 보이는 것을 알 수 있다. 그러므로 현재 우리는 2D를 통한 발현분석을 계획하여 수행하고 있다. 그러나 이러한 변이체 간의 유전자 발현을 측정하기 위해 수행한 DD-RT PCR 분석법에서는 흑색의 변이체에 다량 함유되었을 것이라 예상되는 멜라닌이 PCR 반응을 억제한다는 원인으로 인해 유의한 결과를 얻지는 못하였다. 그러나 2D 분석에 의한 연구를 통해 우리는 흑, 백의 갓색과 연관되는 많은 data를 현재 도출하고 있다.

2) 임성단핵균주의 변이 원인 분석

유전 육종의 측면에서 임성단핵균주의 중요성은 이미 위에서 역설하였다. 그러한 이유로 기존에 선발된 돌연변이체와 더불어 매우 중요한 돌연변이 균주임을 확인할 수 있다. 또한 임성 단핵균주는 발생관련 변이체로서 버섯의 발생, 균류의 발생 및 나아가 생물학적 발생의 기작을 해석할 수 있는 매우 중요한 열쇠를 가지고 있는 균주라고 할 수 있다.

이러한 중요한 임성단핵주에 대해, 우리는 임성단핵 균주의 변이원인을 밝히기 위해 다양한 실험법으로 분석하였다. 먼저 모균주와의 유전자 발현양상의 차이를 보기 위해 DD-RT PCR을 수행하였으며, 단백질의 수준에서의 차이를 또한 1D를 통해 분석하였다. 또한 협동연구를 통해 분석된 느타리버섯의 1,500개 EST clone에 대한 유전자 발현의 차이를 시험하는 reverse northern법을 이용하여, 임성단핵 균주의 세밀한 표현형간의 차이를 분석하는 연구를 시도하였다.

모균주와 임성단핵 균주간의 DD-RT PCR에 의한 유전자 발현 양상의 차이를 분

석한 실험에서는 40개의 random primer에 대한 분석을 마쳤으나, 아직까지는 의미 있는 유전자가 분리되지 않았다. 그것은 임의의 primer에 의한 임의의 유전자에 대한 PCR 증폭의 결과로써 분석되는 DD-RT PCR법에서, 아직은 확실적인 필요조건을 만족시키지 못하였기 때문이라 생각된다. 즉 본 분석에 적용된 임의의 프라이머 수가 아직은 적기 때문이므로, 계속적인 진행에 수행한다면 의미 있는 유전자를 동정할 것이라고 예상할 수 있다. 또한 1D를 통한 단백질 분석에서는 모균주와 다양한 단백질 밴드에서의 차이를 확인 할 수 있었다 (Figure 1.20). 이러한 차이는 단핵주와 이핵주간의 차이 뿐아니라, 모균주와 단핵주간의 유전형의 차이에 의한 단백질 발현을 모두 반영한 결과라 할 수 있다. 그러하므로 1D 분석을 통해서 모균주와 단핵주 간에 나타나는 밴드의 차이를 제외한 단핵주와 이핵주간의 차이만을 찾아내기는 어렵다는 것을 알 수 있었다.

우리는 임성단핵주가 생육의 조건을 가하면 이핵주가 되는 과정을 확인하고, 동일한 임성단핵주를 대상으로 단핵주와 이핵주를 분리하고, 이 균주간의 차이를 분석하였다. 이러한 차이는 느타리버섯의 1,500개 EST clone에 대한 유전자 발현의 차이를 reverse northern법을 이용하여 분석하였다 (Figure 1.21). 결과로서, 10개 내외의 EST clones에서 발현 차이를 보이는 것을 분석하였다. 이렇게 선발된 EST clone은 당시 수행 중인 자실체 발생단계에서 선발된 특이 발현 유전자 내에 포함되어 있으므로 현재 그 발현 정도를 심도있게 측정하고 있다. 분석이 종료된 후에는 자실체 발생과 임성단핵 균주의 원인에 대한 종합적 분석이 가능하게 될 것으로 예상된다. 이것은 발생 변이 원인을 밝히는 중요한 결과로 인정될 수 있을 것이다.

Table 1.2 Classification of U.V-induced mutants in *P. ostreatus*

Phenotype	Mutants
(1) Auxotrophic strains	UVM 10, 251, 293, 345, 534, 566, 592, 632, 647, 648, 677, 732, 733, 755, 913, 998, 1040, 1146, 1298, 1239, 1310, 1319, 1794, 1806, 1816
(2) Abnormal vegetative strains	UVM 491, 1032, 1623, 1807, 2101, 2683
(3) Primordiumless strains	UVM 831
(4) Maturationless strains	UVM 534, 790
(5) Specific colored strains	UVM 676, 1068
(6) Poorly spored strains	UVM 676, 1284, 1573, 1799, 2697



Figure 1.4 Basidiocarps of U.V-induced mutants. a: wild-type strain, ASI2029, b: UVM1068, specific color of pileus strain, c: primordium of UVM 1068, d: young fruiting body of UVM 1068 (left) and ASI2029 (right), e: UVM1032, abnormal vegetative strain, f: UVM1799, poorly spored strain, g: spore print of UVM1799 (level 0), h: spore print of UVM1068 (level 1), i: spore print of UVM2683 (level 3), j: spore print of ASI2029 (level 5).

Table 1.3 The characterization of auxotrophic strains in *P. ostreatus*

Strains	Mycelial growth					Genetic marker
	MCM	MM	MM+YE	MM+CAS	MM+NA	
ASI2029	L	L	L	L	L	–
UVM10	L	S	M	M	S	Arg
UVM251	M	S	L	S	S	Lys
UVM293	M	S	L	L	S	Lys
UVM345	M	S	M	M	S	Lys, Ino
UVM534	M	S	L	M	S	Ile, Lys
UVM566	L	S	M	S	S	Tyr
UVM592	L	S	M	S	S	Ile, Lys
UVM632	L	S	M	S	S	Tyr, Val
UVM647	M	S	L	S	S	Lys
UVM648	L	S	L	L	S	Ino, Ile, Lys
UVM677	M	S	M	M	S	Biotine, Ile
UVM732	L	S	M	S	S	Phe
UVM733	M	S	M	S	S	Arg
UVM755	S	S	M	M	S	Lys
UVM913	L	S	L	L	S	Lys, Tyr
UVM998	L	S	L	S	S	Gln, Folic acid
UVM1040	L	S	L	M	S	Gln, Lys, Asn
UVM1084	M	S	M	M	S	Arg
UVM1146	M	S	L	L	S	Folic acid
UVM1298	M	S	M	S	S	Ile
UVM1239	L	S	M	L	S	Tyr
UVM1310	L	S	M	M	S	Asn
UVM1319	L	S	M	S	S	Arg
UVM1794	L	S	L	M	S	Lys
UVM1806	M	S	M	S	S	Arg, Met
UVM1816	L	S	L	L	S	Ile, Lys

Mutants symbols: Arg (Arginine), Lys (Lysine), Ino (Inositol), Ile (Isoleucine), Tyr (Tyrosine), Val (Valine), Phe (Phenylalanine), Gln(Glutamine), Asn (Asparagine), Met (Methionine),

L: largely (over 40mm diameter) and densely growing colony

M: medium colony (from 25 to 40mm diameter of colony)

S: small colony (below 25mm diameter of colony)

Table 1.4 The characterization of abnormal vegetative strains in *P. ostreatus*

Strains	Mycelial growth		Days to Primordia	Color of Pileus		Formation of spore
	MCM	MM		Young	Mature	
ASI2029	L	L	3.5	dark grey	brownish grey	5.0
UVM491	S	S	6.7	dark grey	brownish grey	2.5
UVM1032	S	S	6.0	dark grey	dark grey	1.8
UVM1623	S	S	7.0	dark grey	brownish grey	2.5
UVM1807	S	S	5.7	brownish grey	light brown	4.3
UVM2101	M	S	6.0	brownish grey	light brown	2.3
UVM2298	M	S	4.3	dark grey	dark bluish grey	1.7
UVM2683	S	M	5.5	dark grey	bluish grey	2.7

- Values in parenthesis represent percentage of variants.

L: largely (over 40mm diameter) and densely growing colony

M: medium colony (from 25 to 40mm diameter of colony)

S: small colony (below 25mm diameter of colony)

Table 1.5 The characterization of primordiumless, maturationless and specific pileus-colored strains in *P. ostreatus*

Strains	Mycelial growth		Days to Primordia	Color of Pileus		Formation of spore
	MCM	MM		Young	Mature	
ASI2029 (3) primordiumless variants	L	L	3.5	dark grey	brownish grey	5.0
UVM 831 (4) maturationless variants	S	S	–	–	–	–
UVM 534	M	S	7.0	–	–	–
UVM 790 (5) specific color of pileus	M	M	6.8	–	–	–
UVM676	S	S	3.3	grey	bluish grey	0
UVM1068	L	L	4.7	bluish white	bluish white	1.7

– Values in parenthesis represent percentage of variants.

L: largely (over 40mm diameter) and densely growing colony

M: medium colony (from 25 to 40mm diameter of colony)

S: small colony (below 25mm diameter of colony)

Table 1.6 The characterization of poorly spored strains in *P. ostreatus*

Strains	Mycelial growth		Days to Primordia	Color of Pileus		Formation of spore
	MCM	MM		Young	Mature	
ASI2029	L	L	3.5	dark grey	brownish grey	5.0
UVM676	S	S	3.3	grey	bluish grey	0
UVM1284	L	L	4.3	dark grey	grey	0.3
UVM1573	L	L	4.7	dark brown	light brown	0.3
UVM1799	L	L	3.7	brownish grey	light grey	0
UVM2697	M	L	4.3	dark grey	brownish grey	0.2

- Values in parenthesis represent percentage of variants.

L: largely (over 40mm diameter) and densely growing colony

M: medium colony (from 25 to 40mm diameter of colony)

S: small colony (below 25mm diameter of colony)

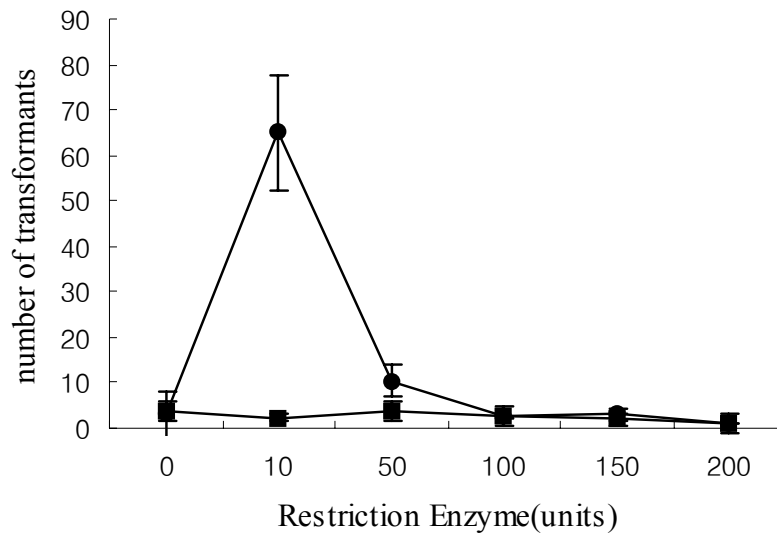


Figure 1.5 Effects of restriction enzymes on REMI transformation of *Pleurotus ostreatus*. Protoplasts of auxotrophic *P. ostreatus* were transformed with a range of amounts of *Bam*HI (●) or *Hind*III (■). Transformation was performed with 1 μ g of circular plasmid DNA for 1 \times 10⁷ protoplasts. Values represent the average of three independent experiments.

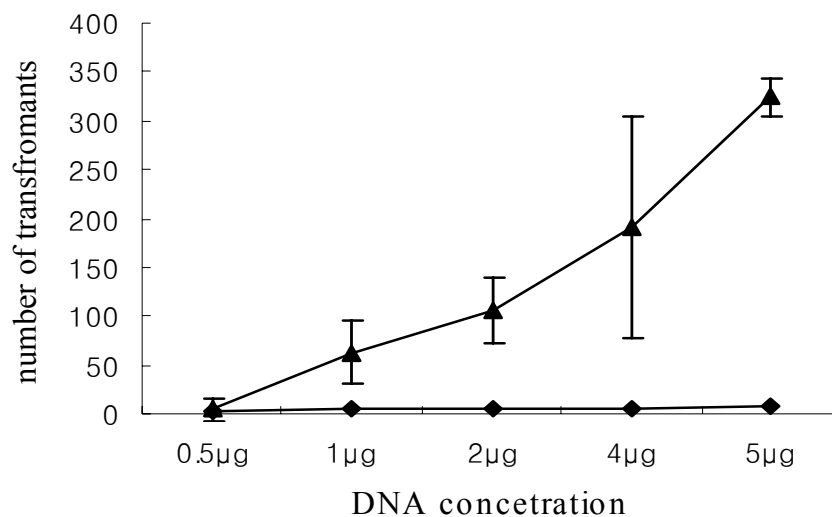


Figure 1.6 Effects of DNA concentration on transformation of *Pleurotus ostreatus*. Conventional PEG (◆) and REMI (▲) transformation was performed with circular plasmid DNA for 1×10^7 protoplasts and, in REMI transformation, using 10 units of *Bam*HI. All plasmid DNA was concentrated by Et-OH precipitation and was used in the same volume ($1 \mu\ell$). Values represent the average of three independent experiments in REMI transformation, but the numbers of transformants by PEG transformation were obtained in one or two experiments.

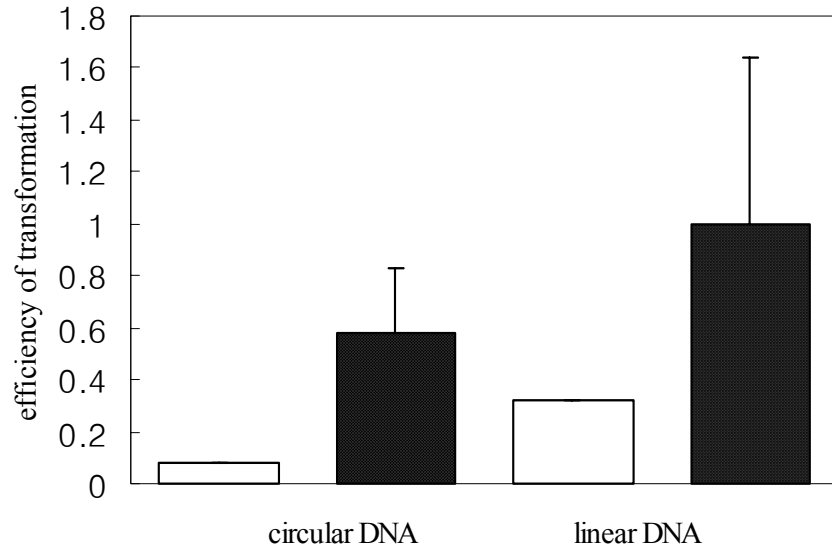


Figure 1.7 Effects of DNA conformation on REMI transformation of *Pleurotus ostreatus*. Conventional PEG (open column) and REMI (closed column) transformation was performed with 1 μ g of plasmid DNA for 1 \times 10⁷ protoplasts using the circular and linear DNA. In REMI transformation, 10 units of *Bam*HI were used. Values represent the average of three independent experiments in REMI transformation, but the numbers of transformants by PEG method were obtained in one experiment.

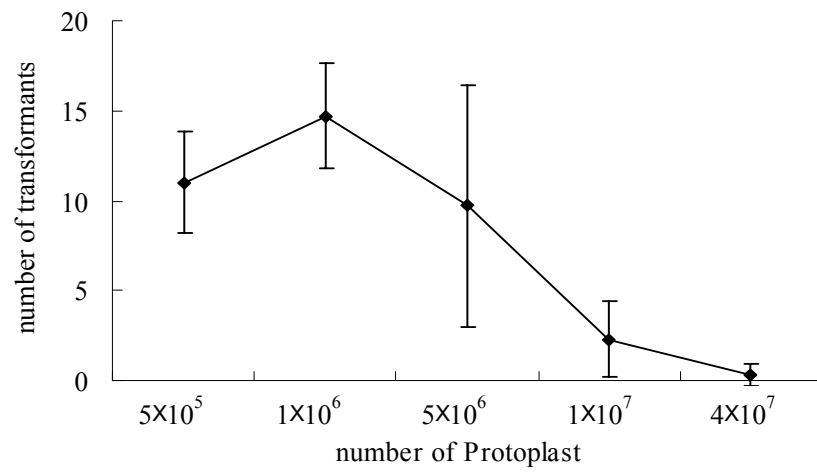


Figure 1.8 Effect of number of Protoplasts on REMI transformation of *Pleurotus ostreatus*. REMI transformation was performed with 1 μ g of plasmid DNA using 10 units of *Bam*HI. Values represent the average of three independent experiments in REMI transformation.

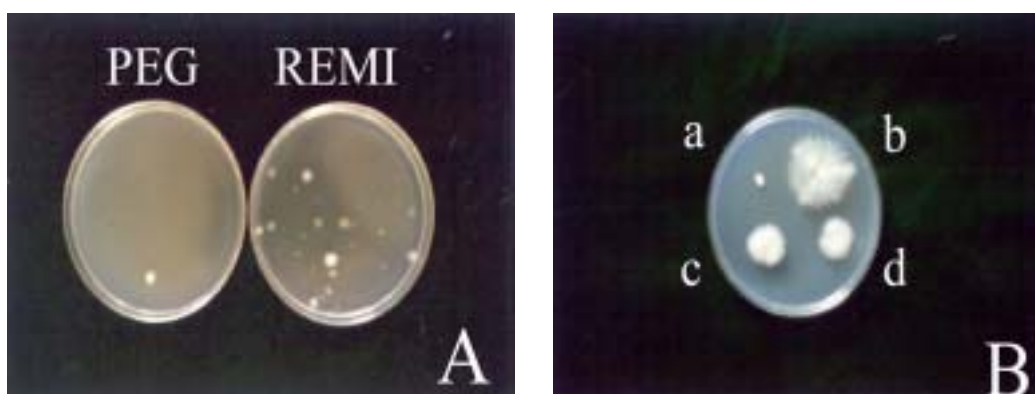


Figure 1.9 Growth phenotype of REMI transformants. The strains were grown on MM medium without uridine for approximately 4 days at 28°C (1st selection, A panel). And colonies were transferred to MM medium without uridine (2nd or 3rd selection, c and d of B panel). The transformants were compared with the wild type strain (ASI 2-107-o, b of B panel), and uracil auxotroph (a of B panel).

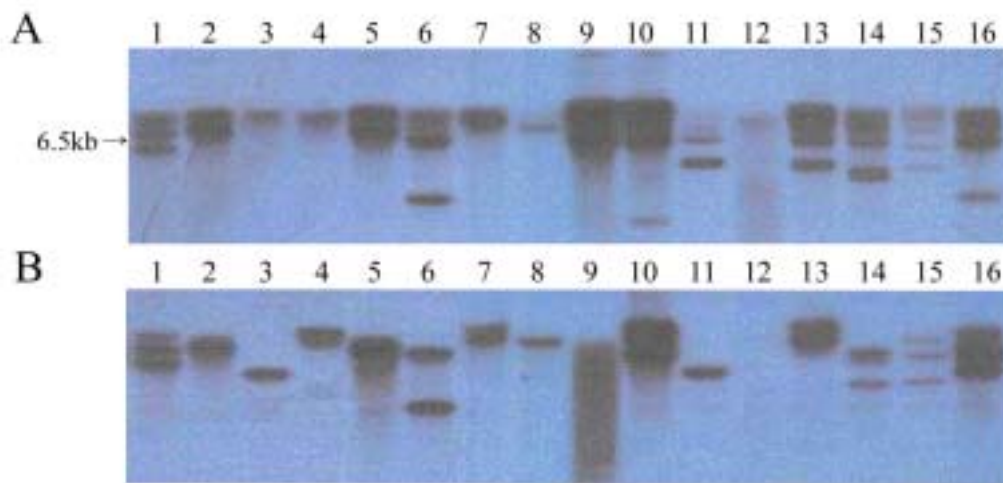


Figure 1.10 Southern hybridization analysis of *Bam*HI-mediated transformants. The probe DNA labelled α -³²P-dCTP was used with the 0.8kb fragment digested with *Bam*HI or *Eco*RI, containing *ura3* gene. (A) The genomic DNAs extracted from uracil mutant and transformants in *P. ostreatus* were digested with *Bam*HI to analyze the rate of *Bam*HI-mediated integration. Lane 1: transformant by PEG method, lanes 2-16: T1-T15 transformants by REMI method. (B) The genomic DNAs extracted from *P. ostreatus* transformants were digested with *Eco*RI to analyze the copy number of integration DNA. Lane 1: transformants by PEG method, lanes 2-16: T1-T15 transformants by REMI method.

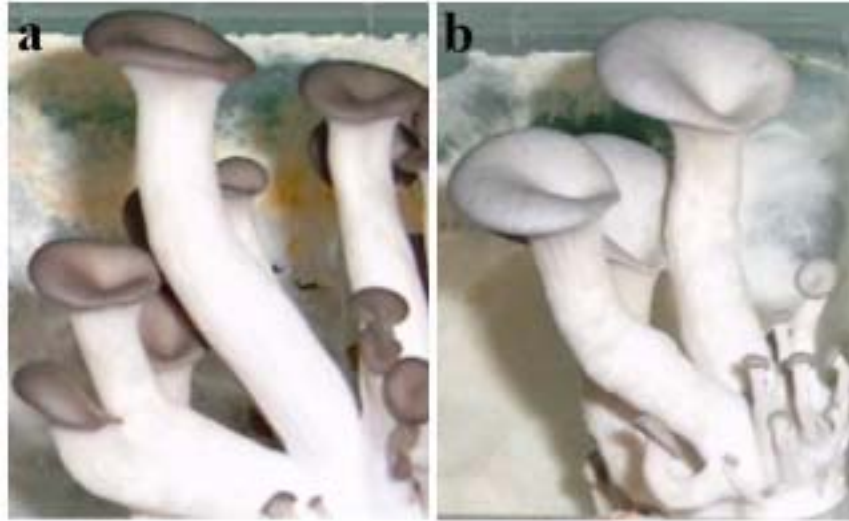


Figure 1.11 Basidiocarps of monokaryotic fruiting strain, MB1. a: wild-type and parental strain, ASI2706, b: the monokaryotic fruiting strain, MB1.

Table 1.7 The characterization of monokaryotic fruiting strains

Strains	Mycelial growth		Days to Primordia	Color of Pileus		Formation of spore
	MCM	MM		Young	Mature	
ASI2029	L	L	3.5	dark grey	brownish grey	5.0
ASI2706	L	M	3.9	dark brown	dark brown	4.9
MB1	M	S	35.7	dark grey	bright grey	4.0

- Values in parenthesis represent percentage of variants.

L: largely (over 40mm diameter) and densely growing colony

M: medium colony (from 25 to 40mm diameter of colony)

S: small colony (below 25mm diameter of colony)

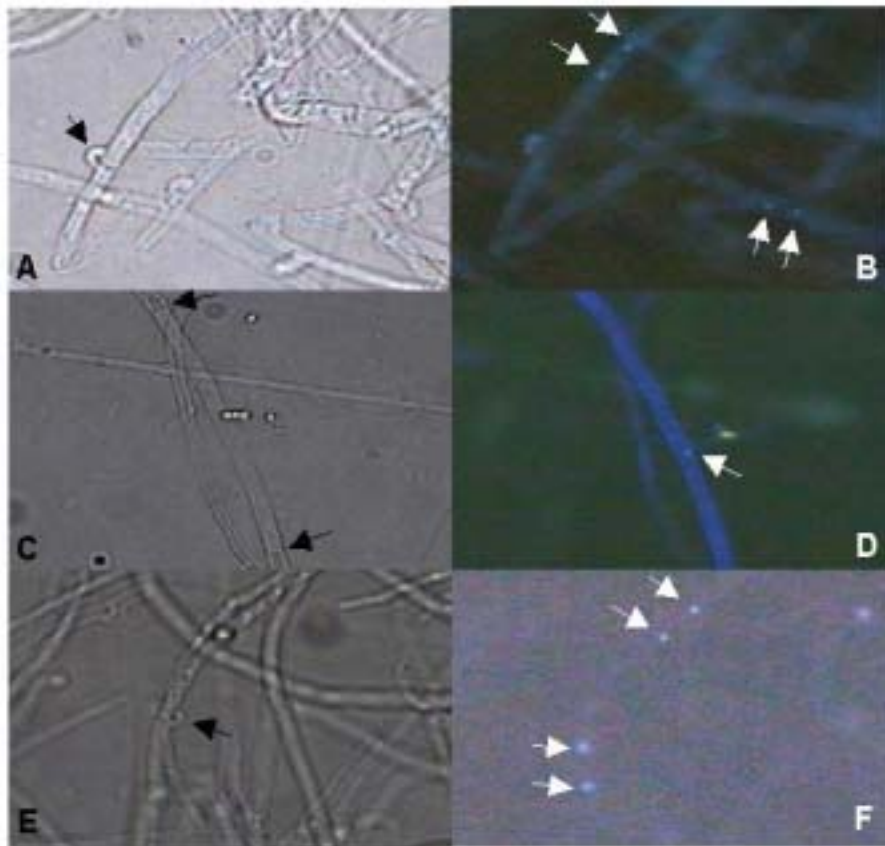


Figure 1.12 Mycelial morphologies of monokaryotic fruiting strain and its parental strain. A: ASI2706, parental dikaryon observed with light microscopy, and B: their nuclei staining. C: MB1, monokaryotic fruiting strain observed with light microscopy, and D: their nuclei staining. E: Clamped MB1, dikaryotic MB1 after 10 days fruiting, and F: their nuclei staining. Black arrows indicated septa and clamp connections. White arrows indicated nucleus.

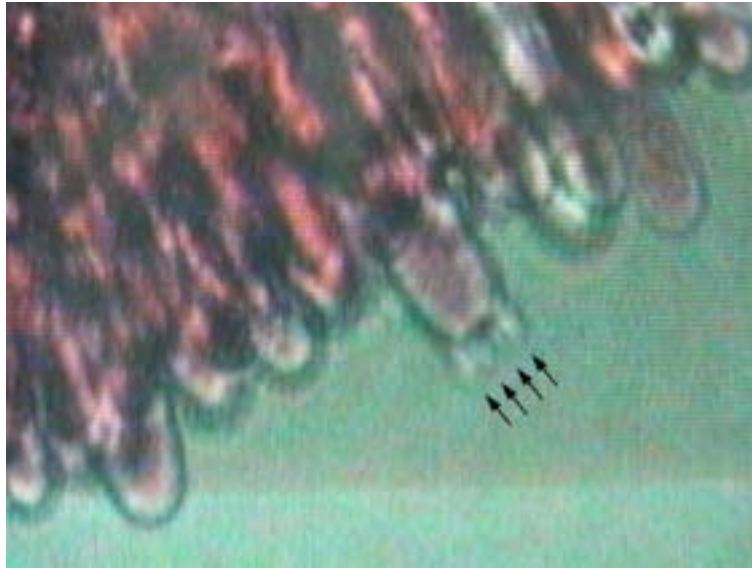


Figure 1.13 Basial morphologies of monokaryotic fruiting strain.



Figure 1.14 Basidiocarps of black and white mutant strains. a: wild-type and parental strain, wonhyong, b: the black mutant strain, c: the white mutant strain.

Table 1.8 The characterization of black and white mutant strains

Strains	Mycelial growth		Days to Primordia	Color of Pileus		Formation of spore
	MCM	MM		Young	Mature	
ASI2029	L	L	3.5	dark grey	brownish grey	5.0
Wonhyong	L	L	3.4	dark brown	brown	5.0
Black strain	L	L	3.7	black	black	5.0
White strain	L	L	3.7	white	white	5.0

- Values in parenthesis represent percentage of variants.

L: largely (over 40mm diameter) and densely growing colony

M: medium colony (from 25 to 40mm diameter of colony)

S: small colony (below 25mm diameter of colony)

Table 1.9 The color measurement of pileus surface by Minolta colorimeter

Strains	L*	a*	b*
Wonhyong	64.48	1.55	9.64
Black strain	38.60	3.72	6.40
White strain	84.25	-1.47	14.12

- The number can be defined by specifying its chromaticity coordinates.

Table 1.8. Searching test of fruit bodies by the texture analyzer.

Texture and Strains	Wonhyong		Black strain		White strain	
	pileus	stipe	pileus	stipe	pileus	stipe
Strength (g)	304	526	269	209	269	209
Total energy (erg)	2067	5578	1916	1304	1916	1304
Shearing Val (g/cm)	337	526	269	209	269	209
Shearing energy (erg/cm)	206719	557845	191614	130481	191614	130481
Height	1	1.5	0.5	0.7	0.5	0.7
Diameter	0.9	1.4	0.3	0.7	0.3	0.7

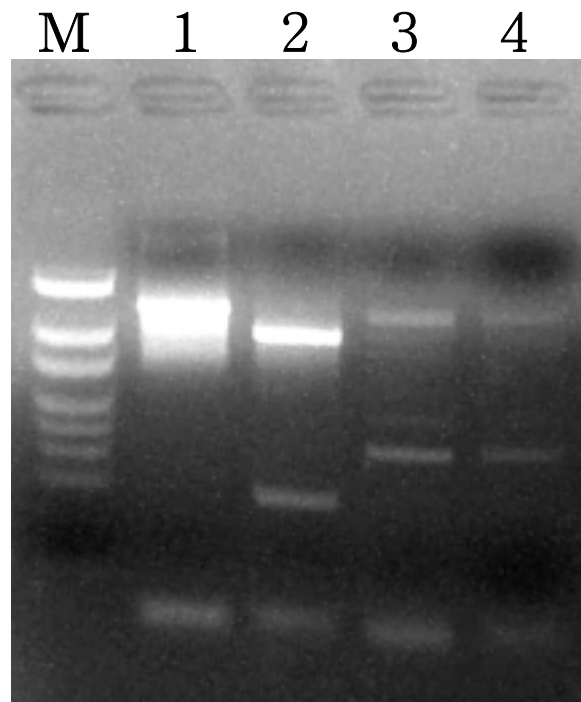


Figure 1.15 Detection of the introduced sequence in the transformants with **ApalI digestion**. Agarose-gel electrophoresis of the ApalI-digested 1.3-kb *sd11* fragments amplified from the transformant's (lane 1) and ASI2029's DNA (lane 3). The fragment amplified from the pTM1 sequence (lane1) is ApalI-sensitive and has been divided into 0.2- and 1.1-kb fragment (lane 2). Whereas the fragment amplified from the host ASI2029's DNA (lane 3) does not contain the ApalI site and showed resistance to ApalI digestion (lane 4).

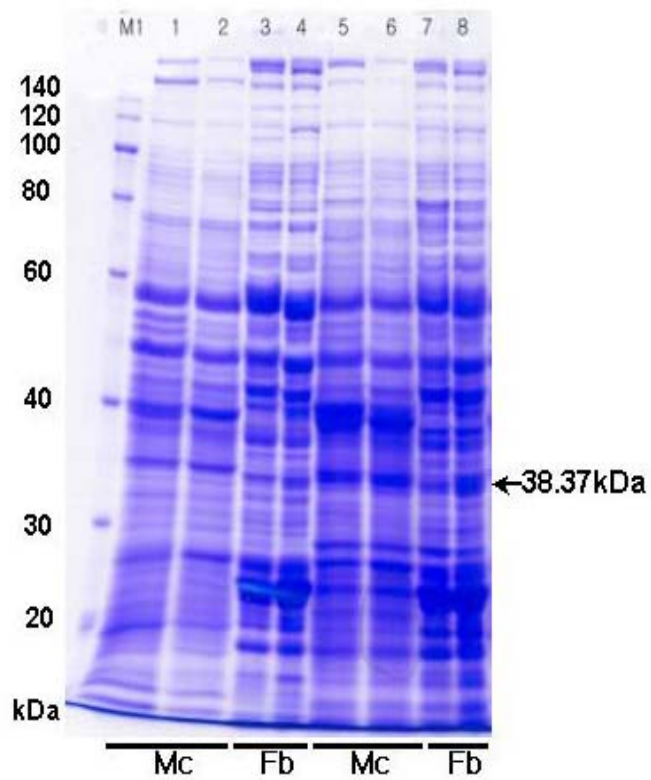


Figure 1.16 Protein banding pattern of color specific mutants. Protein bands were isolated after discontinuous SDS-PAGE (10%) and Coomassie staining. M1, protein size marker; Lane 1 and 2, UVM1068-hypha; Lane 3 and 4, UVM1068-fruiting bodies; Lane 5 and 6, ASI2029-hypha; Lane 7 and 8, ASI2029-fruiting bodies.

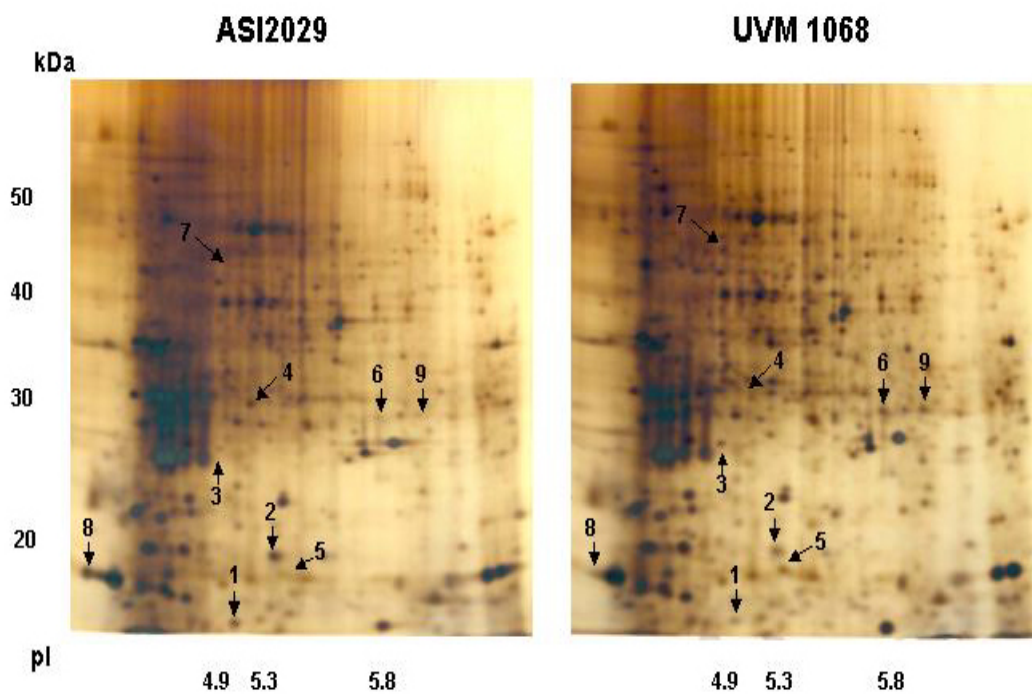


Figure 1.17 Comparative of color mutant analysis. Representative 2DE analysis of ASI2029 and UVM1068 by the UV-treatment. Protein (200ug) was load on each gel, and separation was performed in the pH range of 3-10NL. This figure shows only the part of the 2DE images that were useful for computer-assisted image analysis.

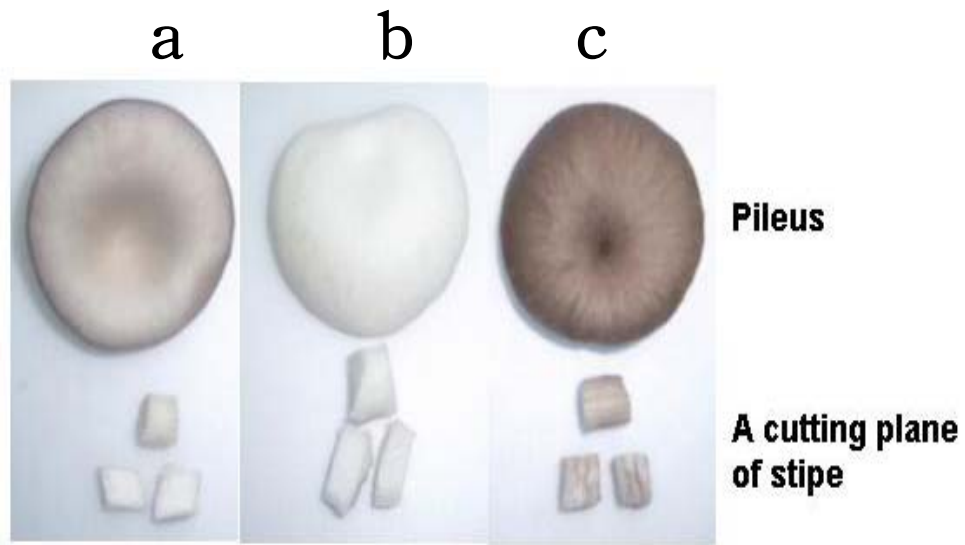


Figure 1.18 Basidiocarps of black and white mutant strains. a: wild-type and parental strain, wonhyong, b: the black mutant strain, c: the white mutant strain.

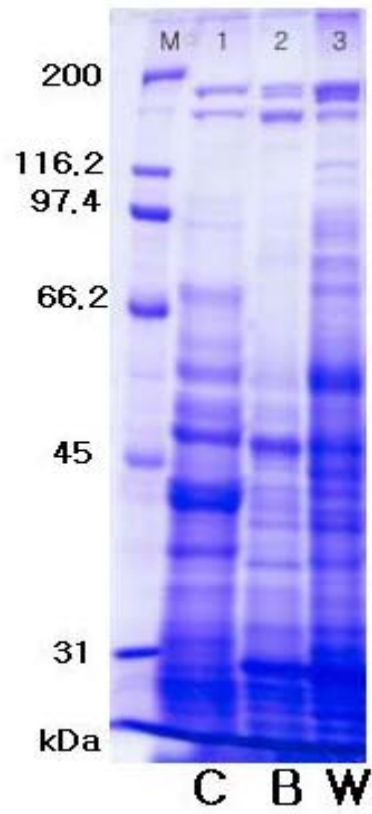


Figure 1.19 Protein banding pattern of color specific mutants. Protein bands were isolated after discontinuous SDS-PAGE (10%) and Coomassie staining. M, protein size marker; lane 1, wonhyong; lane2, black mutant strain, lane3: white mutant strain.

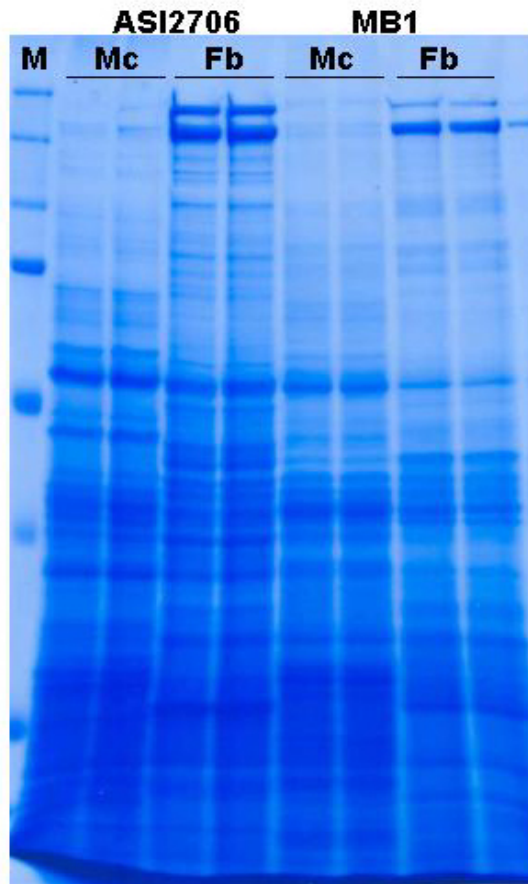


Figure 1.20 Protein banding pattern of monokaryotic fruiting strain. Protein bands were isolated after discontinuous SDS-PAGE (10%) and Coomassie staining. ASI2706 Mc and Fb, mycelia and fruiting bodies of wild-type parental strain of MB1; MB1 Mc and Fb, mycelia and fruiting bodies of monokaryotic fruiting bodies..

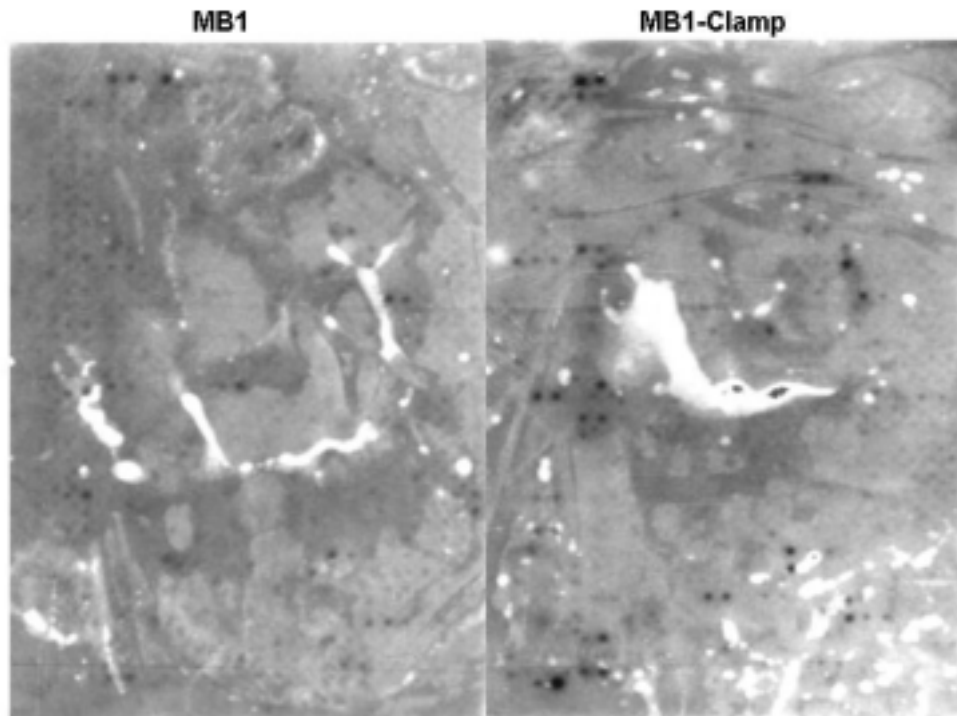


Figure 1.21 Gene expression profile of MB1 strain. cDNA low density macroarrays of the 1594 unigene to *P.ostreatus* hybridized with probes generated from total RNA extracted from liquid-culture mycelia of MB1 and MB1-clamped strains.

제2절 느타리버섯의 발생단계별 대량 유전자 분리 및 특이발현 유전자의 분석연구

1. 서론

국내에서 가장 중요한 버섯 작물인 느타리버섯의 국제 경쟁력의 지속적 유지를 위한 기술개발이 절실하게 필요하며, 또한 post-genome 시대에 요구되는 대량 유전자의 발굴 및 그 기능분석 기술이 국외의 연구들로 인해 양송이, 표고 등에서 계속 수행되었다. 대량 유전자의 연구와 기능분석은 식용버섯류에서 형질전환 등의 분자유전학적 연구를 가능하게 하였으며, 그 연구보고도 급속도로 증가하고 있다. 현재 느타리버섯에서의 계놈에 대한 분석은 스페인을 비롯한 유럽의 연구 그룹에서 주도적으로 수행하고 있으며, 최근 군사 성장에 대한 QTL 분석과 교배형과 관련한 유전자의 분석 등도 수행하였다. 그러나 자실체 발생관련 유전자 분석 및 형질전환을 통한 유전자 기능분석에 대한 연구는 한국과 일본의 연구팀에 의해 주로 수행되고 있으며, 본 연구과제에 의해 느타리버섯의 EST 분석이 최초로 연구되고 있으며, 이러한 연구는 형질전환 버섯의 실용화를 비롯한 느타리버섯의 유용유전자의 개발 및 이용이 증가하고 있으므로 학문적, 산업적으로 이용을 위한 기초연구로서 커다란 가치가 있다.

최근의 국내연구는 버섯 작물 중에서 가장 많은 생산량을 차지하는 느타리버섯을 주 대상으로 연구가 이루어지고 있다. 버섯 품질에 대한 관심은 버섯 생리대사의 분자수준의 이해가 요구되었다. 본 과제에 의한 느타리버섯에서의 EST (expressed sequence tag) 분석으로 인해 느타리버섯의 유전정보 분석이 다른 나라보다 국내 연구진이 앞서게 됨으로서, 느타리버섯 분야의 종주국으로서의 입지를 더 높이는 계기를 마련하였다. 또한 생명공학 분야에서 최근의 연구경향이 대량 유전자의 분석, 프로테오믹스 및 형질전환 등의 분석법을 이용하고 있으며, 국내 버섯연구에도 위와 같은 첨단 분석기법의 적극도입으로 세계적 연구 흐름에 맞춰가는 기틀을 마련한 상태라고 할 수 있다. 또한 느타리버섯에서의 이러한 연구성과는 다른 식용, 약용 버섯류에서의 연구에도 적용될 수 있기 때문에 전반적인 버섯 연구의 활성화에도 큰 영향을 미칠 수 있다.

국외에서의 버섯 연구는 주로 양송이, 표고 버섯을 대상으로 이루어졌으나 점차적으로 유전육종 및 생리적 특성분석 분야에서 느타리버섯에 대한 연구도 점차 증가되고 있다. 초기의 느타리버섯의 연구에서는 자실체에서 발현되는 물질(hydrophobin)에 대한 연구로부터 시작되었으나, 차츰 느타리버섯의 난분해 물질에 대한 분해능력에 대해 주목하기 시작하였다. 1990년대 말 이후로 시작된 난분해물질의 분해효소인 laccase 및 manganese peroxidase의 활성연구가 느타리버섯의 주요 연구과제로서 지

속적으로 연구되고 있고, 최근에는 이들 효소들의 미백효과와 환경쓰레기 처리능력 등에 대해서도 크게 관심을 보이고 있다. 느타리버섯의 형질전환 연구도 최근 활성화되기 시작하여 manganese peroxidase 등의 유전자 조작을 통한 과발현 등의 기능연구 등이 수행되고 있다. 2000년대 초기에 들어서서 수행된 느타리버섯 자체에 대한 분자 유전학적 연구는 균사 생장, 품질 및 생산형질에 관여하는 계놈상의 QTL 분석이 스페인의 연구팀에 의해 진행되고 있다. 일본의 연구팀들도 느타리버섯의 형질전환에 많은 관심을 가지고 있는 실정이다. 이와 같이 전 세계적으로 느타리버섯의 연구 활성화가 점차 높아지고 있는 반면에 식용으로만 인정되는 양송이버섯에 대한 연구 활동은 크게 감소하는 추세에 있다. 식용뿐만 아니라 약리효능이 있는 느타리버섯을 연구하는 나라는 유럽의 스페인, 그리스, 네덜란드, 독일, 체코로 기존 양송이버섯에 대한 관심이 점차 느타리버섯으로 이어지고 있으며, 미주국가에서는 멕시코가, 그 외에 아시아에서는 일본, 인도, 이스라엘 등의 나라에서도 느타리버섯에 대한 연구가 집중적으로 수행되고 있다. 약용 느타리버섯에 관심이 많은 중앙아시아와 동유럽 국가를 포함하면 이제 전체 버섯 시장에서 양송이버섯 다음의 2번째의 생산량을 가지는 느타리버섯에 대한 연구의 관심은 전 세계적이라고 할 수 있다. 버섯연구에서 누가 더 빠르게 유리한 위치를 차지하는가에 따라 양송이버섯 분야의 국제 정세에서처럼 느타리버섯에서도 국제적인 질서가 매겨지리라 생각되며, 본 과제가 우리나라의 국제 경쟁력에 크게 기여하고 있음을 자신할 수 있다.

2. 재료 및 방법

가. 버섯 자실체의 cDNA library 제작

톱밥 배지로부터 버섯 자실체를 발생시켜 채취한 후 Trizol (Invitrogen)을 이용하여 total RNA를 분리하고, 추출된 RNA로부터 poly A tail RNA를 분리한다. Promega사의 MMLV reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하고, 합성된 cDNA는 1-1.5kb 단편만을 분리하여, Clontech사의 SMART cDNA library construction kit manual에 따라 cloning을 수행한다. 버섯 자실체의 cDNA library 제작을 완료한다. 8단계에 대해서 제작된 cDNA library는 각 단계별 library의 titer를 측정한다.

나. EST 분석 및 기능별 분류

느타리버섯 자실체 발생단계별로 cDNA library를 제작한 후 이 중에서 1차적으로 액체 진동배양 균사체 (Lm)와 성숙 자실체 (Mfb), 그리고 포자 (P)의 단계에서 약 2,000개씩의 클론들을 분리한 후 총 6,000개의 플라스미드를 분리하여, 모두 부분 염기서열 분석하였다. 분석한 염기서열은 DNASTAR program을 이용하여, unigene을 분

석하였고, 이렇게 분석된 유전자들은 Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) database에 기초하여 이들에 대하여 기능별로 분류하였다.

또한 나머지 10,000개의 플라스미드를 더 분리하여 모두 염기서열 분석하였으며, 마찬가지로 DNASTAR program을 통해 unigenes을 분석하였고, 이렇게 분석된 모든 염기서열은 농진청 유전정보센터 database (www.niab.go.kr/nabic/index.html)에 제공하여, 공개하였고, 전체 염기서열 data에 대해서 Gene ontology assignments에 기초한 EST 염기서열의 기능적 분류를 수행하였다.

다. Unigene을 이용한 Reverse blotting과 발현 profile 제작

EST clone 중 1500개의 unigene clones를 사용하여 균사, 원기, 어린자실체, 자실체, 포자 각 생육단계별로 reverse northern 분석 후 발현 profile을 조사를 완료하였다. Reverse northern에 사용된 probes는 각 발생단계에서 추출한 total RNA로부터 cDNA의 합성과정에서 표지를 하여, Northern과 동일한 방법으로 수행하였고, 그 결과는 densitometer를 사용하여 정량하여 대조구와 상대적인 값으로 각 유전자의 발현량을 결정하고 이를 database화 하여 특이발현 유전자들을 유추하였다.

1) Reverse northern blot

각 EST clone을 정량하여 50ng/ul로 일치시킨 후 nylon membrane에 1ul 씩 점적한 후 denaturation 용액과 중화용액에서 1분씩 정치 후 UV cross linker를 사용하여 DNA를 고정시킨 filter를 사용하였다. Probe 제작에 사용된 RNA는 TRI Reagent를 사용하여 분리하였으며, 방사선 표지된 probe는 50ug total RNA와 reverse transcriptase와 oligo dT primer, 10mM dNTP, 70uCi [α -³²P] dCTP를 사용하여 37°C에서 1시간동안 반응시켜 제작되었다. 이들은 hybridization solution (6XSSC, 0.1%SDS, 5X Denhardt solution, 100ug salmon sperm DNA를 사용하여 65°C에서 overnight 반응 후, 1XSSC/0.1%SDS로 washing한 후 X-ray film에 exposure시켰다.

2) 발현 profile제작

현상한 X-ray film을 Agfa사의 ARCUSII 로 scanning한 후 TIFF image를 nonlining사의 Total lab software program을 사용하여 pixel density를 결정하였다. actin 유전자의 값을 100으로 하여 다른 clone들의 값을 상대적으로 결정하여 이를 excel에서 database화 하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 버섯 자실체의 cDNA library 제작

한국 특산의 느타리버섯 품종인 ASI2029 균주를 대상으로 8개의 발생단계별로 시료를 준비하였다. 9개의 발생단계는 아래와 같다. (1) Lm: 액체 진동배양 균사체, (2) Lfm: 액체 정지배양 균사체, (3) Sm: 톱밥 배양 균사체, (4) Pr: 원기, (5) Yfb: 어린 자실체, (6) Mfb: 성숙 자실체, (7) Afb: 노화 자실체, (8) P: 포자. 이렇게 세분화시킨 발생단계의 시료는 즉시 total RNA분리, poly A tailed mRNA 분리, cDNA 제작 및 cloning을 통해 library를 제작하였다. 제작된 library는 titer 측정을 통해 사용 여부를 가리게 되며, 사용이 확정된 library는 -80°C에서 보관하였다. Titer 측정 결과는 Table 2.1에 나타내었다.

나. cDNA random sequencing에 의한 균사, 자실체, 포자 단계별 발현 유전자 대량 분리

8개의 발생단계에서 제작된 library로부터 임의의 2,000개 클론을 분리하여, 총 16,000개의 plasmid를 추출하였다. 분리된 plasmid 중에서 1차적으로 6,000개의 클론의 염기서열 분석을 수행하였고, 이 염기서열 분석 data를 DNASTAR program을 이용하여 1592개의 unigenes을 분리하였다. Table 2.2 에서는 각 발생단계에서 중복된 염기서열의 개수를 나타내었다. 포자와 균사 그리고 성숙자실체에서 각각 312개 (61.9%), 559개 (58.7%), 그리고 568개 (53.1%)의 클론이 1번의 중복으로 염기서열이 분석되었으며, 각 192개, 393개, 그리고 501개의 클론이 2번에서 33번까지의 중복되는 염기서열로 분석되었다. 또한 각 발생 세 단계에서 8개 (0.5%)의 unigenes이 공통적으로 발현되었으며, 329개 (20.6%)는 포자에서 특이적으로, 587개 (36.8%)는 균사에서 특이적으로, 그리고 577개 (36.2%)는 성숙자실체에서 특이적으로 발현되는 것을 알 수 있었다 (Figure 2.1).

이렇게 분리된 unigenes은 Genbank nr database (all nonredundant GenBank CDS translations + PDB + SwissProt + PIR + PRF)에서 BLASTX algorithm으로 유전자의 homology를 분석하였으며, E value가 1×10^{-5} 이하와 이상으로 나누어서 분류하였다. 1,500개 unigenes 중에서 포자에서 173개 (34%), 균사에서 390개 (41%), 성숙자실체에서 531개 (50%)가 유의적인 상동성을 나타내었다 (Figure 2.2).

다. EST 염기서열의 기능별 분류

이렇게 분리된 unigene은 부분 염기서열 분석 후 Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) database에 기초하여 이들에 대하여 기능별로 분석하여 분류하였다 (Figure 2.3). Cellular organization에 관련된 유전자가 가장 많았으며, 그 다음으로는

metabolism에 관련된 유전자들이 많았으며, Protein fate와 Protein synthesis에 관련된 유전자들이 그 다음으로 많은 것을 알 수 있었다.

이 EST에 대한 분석은 농진청 유전자정보센터 (www.niab.go.kr/nabic/index.html)에 제공하여 database화 하였으며, 이들을 이용하여 EST빈도에 의해서도 특이발현 유전자 후보군들을 분리할 기초 자료로 사용하였다.

라. 발생 단계별 발현 Profile 분석

제작된 EST clone 중 1,500개의 unigenes을 골라 이들을 사용하여 nylon membrane 상에서 filter를 제작한 후, 액체정치배양, 원기, 어린자실체, 성숙자실체, 노화자실체, 포자에서 RNA를 분리하여 probe로 하여 reverse northern blot을 수행하였다 (Figure 2.4). Reverse northern 결과는 densitometer를 사용하여 정량하여 대조구와 상대적인 값으로 각 유전자의 발현량을 결정하고 이를 database화 하여 특이발현 유전자들을 유추 할 수 있었다. 또한 기존에 자실체 특이 발현 유전자로 알려져 있던 hydrophobin, priA1등이 reverse northern에서도 특이 발현되는 것으로 분리되었다.

특이발현 유전자 이외에도 각 발생단계별로 증가 혹은 감소하는 유전자 군을 규명할 수가 있었으며, 이들은 전체 clone의 약 40% 정도를 차지하였다. 따라서 자실체 발생과정은 수많은 유전자들이 참여하는 매우 dramatic한 세포 변화의 과정이라고 생각된다. 액체 정치배양한 균사체의 경우 vegetative mycelium 특이적인 hydrophobin과 uricase가 특이적으로 발현되며, hypothetical protein B5022.10과 snodprot precursor의 발현이 특이 높았다. 그외에도 특이발현 유전자의 약 절반정도는 기존에 알려진 유전자들과 상동성을 보이지 않았으며, 따라서 신규 유전자의 가능성이 높다고 하겠다 (Figure 2.5, Table 2.2).

Glycosylhydrolase, PEP carboxy kinase 등은 담자포자에서 특이적으로 발현되는 것으로 생각된다. 조사한 바에 따르면 아직까지 담자포자에서 특이발현되는 유전자에 대하여는 보고된 바가 없으며, 느타리버섯의 경우 다량의 담자포자의 비산과 알레르기인하여 농가에서 많은 문제가 발생하고 있으므로, 실용화 및 기초 연구에 중요한 정보가 될 것으로 생각된다(Figure 2.6, Table 2.3)

Reverse northern 분석결과 자실체 특이 발현 유전자들은 액체정치배양 균주나 담자포자 특이발현 유전자에 비하여 다수의 유전자가 분리되었다. 또한 이들 유전자들은 자실체 성장단계에 따라서 발현이 증가 혹은 감소하는 다양한 유전자 발현의 변화를 보였다. 아래 그래프와 표에서는 성숙자실체에서 특이 발현하는 유전자에 대하여만 정리를 하였다 (Figure 2.7, Table 2.4).

마. 전체 느타리버섯의 발생단계의 발현 유전자 대량 분리

8개의 발생단계에서 분리된 16,000개의 클론에서 이미 수행한 6,000개의 염기서열

분석 이후 계속적으로, 나머지 10,000개 클론의 염기서열을 분석하였다. 이것은 8개 발생단계에 대해서 2,000개 클론씩 임의로 추출하여 분석한 결과이다. 분석된 모든 16,000개 염기서열 data를 DNASTAR program을 이용하여 총 4,397개의 unigenes이 분석되었다. 4,397개의 unigenes은 전체 EST data에서 1개 반복 클론 3013개, 그리고 최대 291번 반복되는 클론이 존재하였다. (Table 2.5).

바. 느타리버섯 EST의 database 구축 및 website 자료공개

농진청 농생명 유전체 정보센터 (www.niab.go.kr/nabic/index.html)는 식물, 동물, 미생물 유전자원 및 유전자 정보 통합 관리 및 생물정보(Bioinformatics) 연구 및 활용능력강화 와 농업 생명공학 정보센터로서의 기능을 수행을 목적으로 확립되었다 (Figure 2.8). 느타리버섯에서 분석된 16,000개의 EST clone은 위의 정보센터에 제공하여, database를 구축하였다. 이렇게 제공된 EST data는 유전자의 염기서열의 검색을 통해 공개되도록 하였으며 (Figure 2.9), Gene Ontology Assignments에 기초한 EST 염기서열의 기능적 분류를 수행하였다. (Figure 2.10).

느타리버섯의 EST 염기서열의 database는 Nucleotide or Protein Sequence, Identifier (TC, ET, EST, GB), Keyword (GenBank Defination), Functional Classification based on the Gene Ontology Assignments 에 의한 정보검색이 가능하도록 구성되어, 본 연구를 통해 국내 및 국외의 버섯 연구자들의 기초 정보 자료가 될 버섯 (*Pleurotus ostreatus*)의 EST database를 구축하게 되었다. 이렇게 구축된 버섯의 연구 자료는 이후 느타리버섯에 대한 국제 경쟁력 확보에서 필수적인 첨단학문 연구에서도 유리한 위치를 점하게 하며, 우리나라가 느타리버섯 연구의 종주국으로서의 입지를 굳히는 계기를 마련하였다.

Table 2.1 Titer of cDNA library during nine developmental stages

	Lm	Lfm	Sm	Pr	Yfb	Mfb	Afb	P
Titer	1.4X10 ⁶	1.4X10 ⁶	1.3X10 ⁶	2.7X10 ⁶	1.0X10 ⁷	1.5X10 ⁶	3.1X10 ⁶	2.9X10 ⁶
Vector	λZAP	pTriplex	pTriplex	pTriplex	pTriplex	pTriplex	pTriplex	pTriplex

Lm: Shaking liquid cultured mycelia, Lfm: liquid cultured mycelia,
Sm: sawdust cultured mycelia, Pr: primordia, Yfb: young fruiting bodies,
Mfb: mature fruiting bodies, Afb: aged fruiting bodies, P: basidiospores

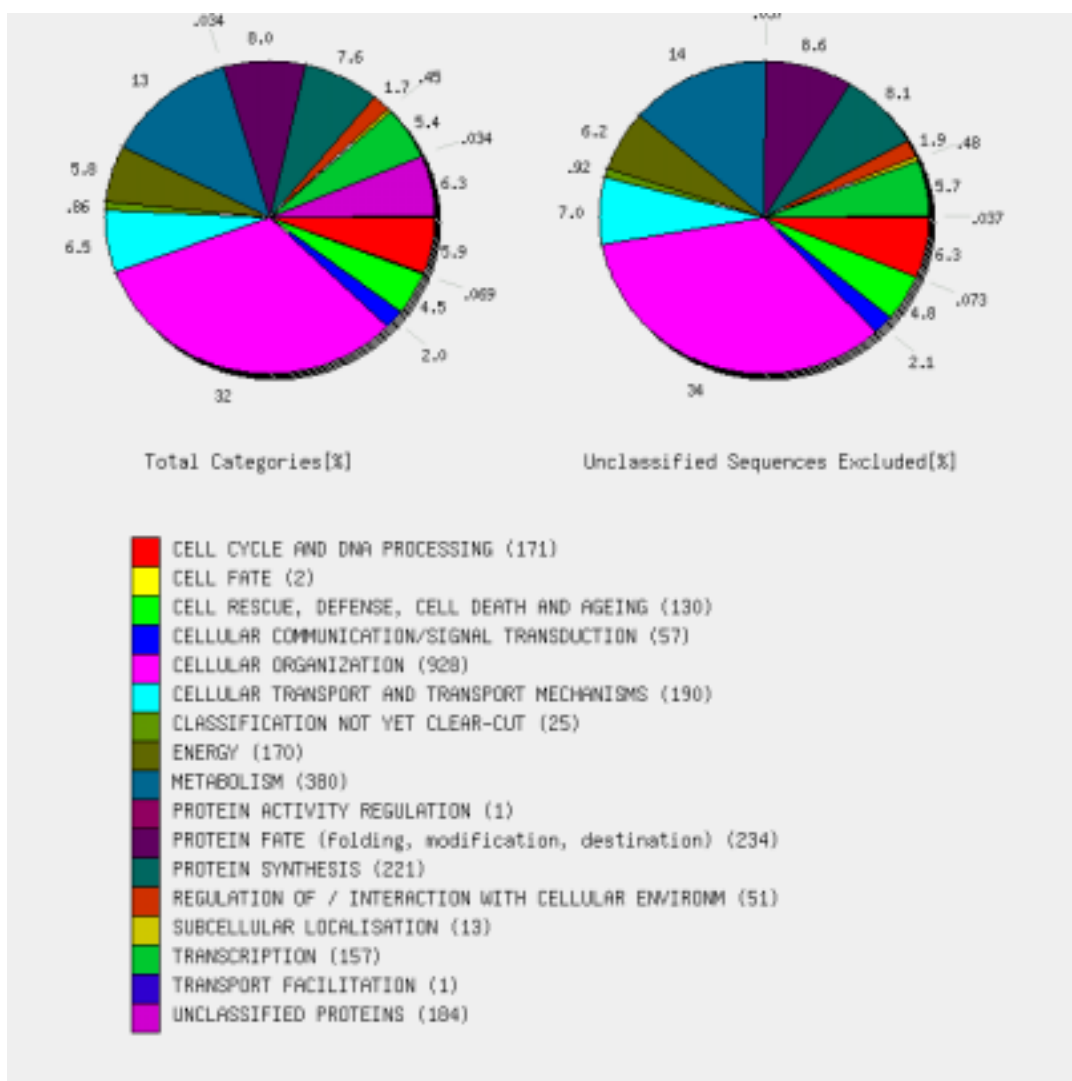


Figure 2.3 Functional classification of EST clones.

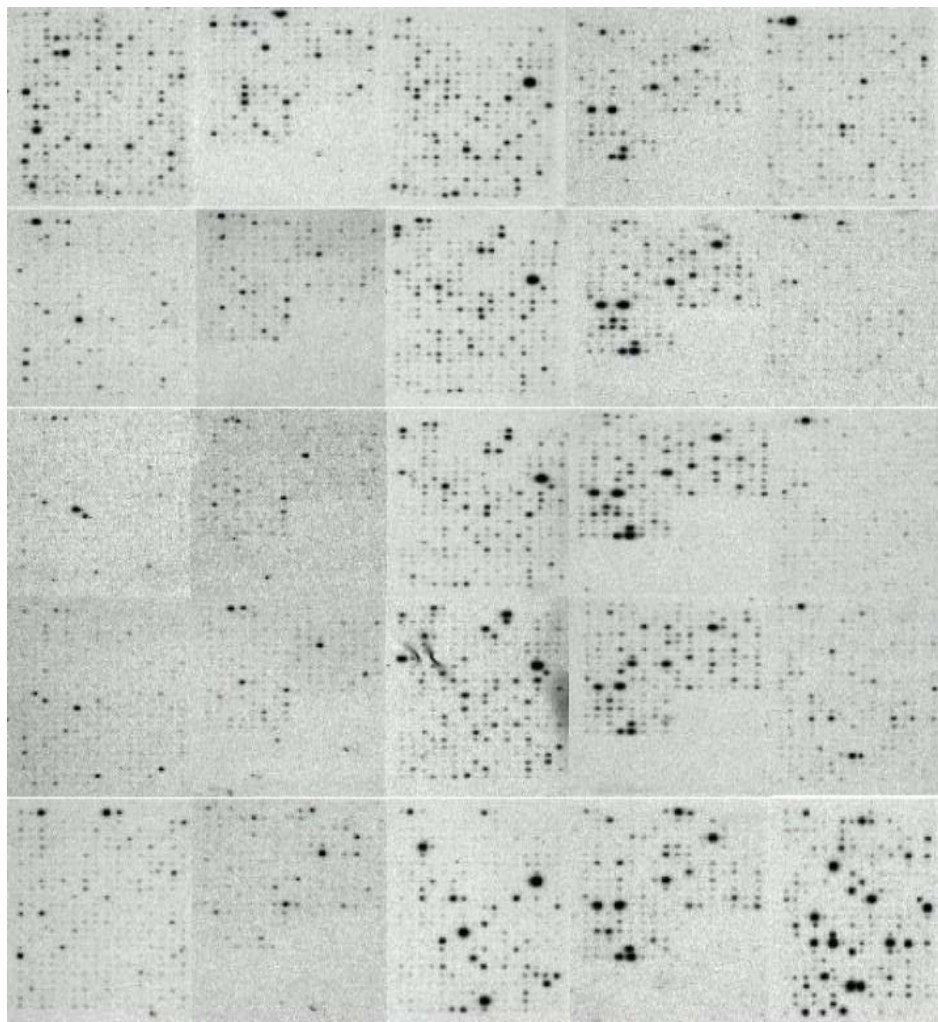


Figure 2.4 Gene expression profile of *P.ostreatus* during developmental stages. cDNA low density macroarrays of the 1594 unigene to *P.ostreatus* hybridized with probes generated from total RNA extracted from liquid-culture mycelia(A), Primordia (B), young fruit body(C), mature fruit body (D), basidiospore (E)

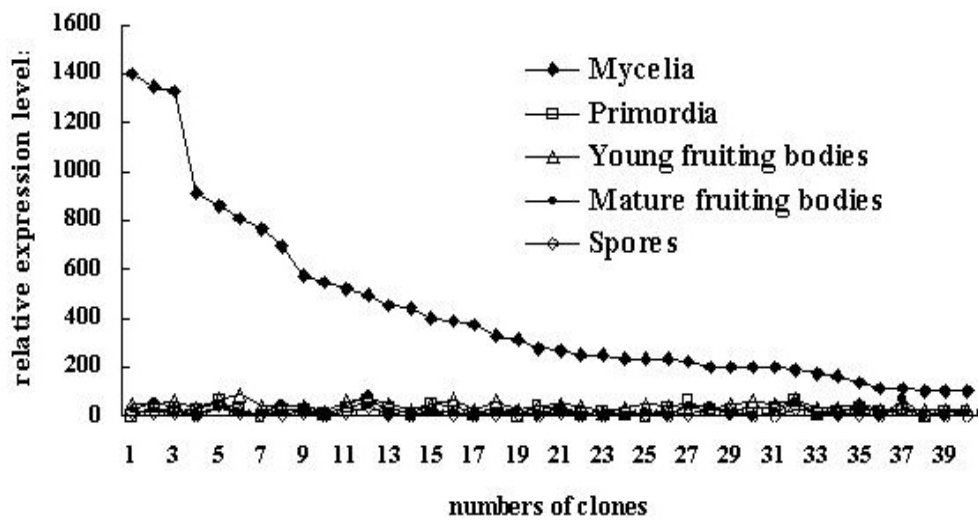


Figure 2.5 Specifically expressed genes in liquid-cultured mycelia

Table 2.2 Specifically expressed unigenes in liquid-cultured mycelia

Clone ID	Putative function	Gene identification	E-value	MC	PRI	YFB	MFB	SPO
01670LM	-	-	-	1494.3	53.1	70.5	136.2	46.2
01893LM	-	-	-	1403.4	1.6	55.4	30.3	15.5
00971LM	Novel	Hypothetical protein B5O22.10 [imported]- <i>Neurospora crassa</i>	8.00E-06	1348.3	38.2	50.5	58.7	21.6
01719LM	-	-	-	1327.7	13.6	59.9	35.4	13.2
00131LM	Novel	Protein SNODPROT1 precursor	2.00E-36	913.4	30.0	31.8	3.9	3.8
00703LM	-	-	-	858.3	57.4	73.5	33.0	41.4
00217LM	-	-	-	812.3	23.5	83.3	11.9	14.4
01846LM	-	-	-	766.3	2.1	43.5	7.7	10.4
01725LM	-	-	-	697.9	23.6	46.1	48.0	9.9
01934LM	Novel	Hydrophobin [<i>Pleurotus ostreatus</i>]	8.00E-36	575.1	29.3	47.5	36.3	17.6
00511LM	-	-	-	545.1	6.4	17.3	2.2	0.0
01940LM	-	-	-	522.2	33.0	60.8	40.0	13.5
00972LM	-	-	-	495.1	62.8	74.5	82.8	30.7
00316LM	-	-	-	453.4	35.1	52.9	3.7	5.0
00526LM	-	-	-	445.5	10.2	24.6	0.5	0.6
00283LM	Enzyme	Short chain dehydrogenase - fission yeast (<i>S. pombe</i>)	9.00E-22	396.1	48.9	50.6	6.8	26.1
00403LM	-	-	-	387.0	40.6	69.8	19.6	6.3
00371LM	-	-	-	375.8	11.3	26.2	0.3	1.1
00664LM	-	-	-	328.0	34.3	65.1	14.8	7.5
01654LM	-	-	-	316.6	1.1	23.2	28.8	9.6
00946LM	Novel	Hypothetical protein [Homo sapiens]	9.00E-11	282.3	39.3	42.7	4.1	2.5
01004LM	Enzyme	Uricase [<i>Paecilomyces tenuipes</i>]	3.00E-11	269.6	24.2	53.1	46.6	16.8
00547LM	Cell growth and death	Hypothetical protein SPAC29B12.10c - fission yeast (<i>S. pombe</i>)	3.00E-43	256.3	10.4	41.9	1.7	0.0
00133LM	-	-	-	252.6	17.8	19.9	0.4	0.8
00350LM	Cell growth and death	Putative transcription factor; Crz1p [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]	1.00E-15	237.7	12.3	35.3	0.2	13.5
01922LM	-	-	-	236.3	2.8	51.8	15.8	11.3
00947LM	Enzyme	Putative proteinase [<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)]	2.00E-09	232.7	34.5	45.6	2.9	0.5
00285LM	Novel	Hypothetical 37.7 KD protein C1F7.12 in chromosome I	1.00E-17	222.7	56.6	34.0	40.7	7.0
P10-C07	Cellular organization	Stress response homolog Hsp [<i>Bacillus subtilis</i>]	3.00E-13	200.9	27.7	26.5	39.4	22.8
00373LM	Cellular organization	Sea urchin Arp3 (SUArp3) [<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>]	3.00E-21	200.9	22.4	48.3	1.7	13.9
00633LM	-	-	-	198.8	38.8	62.6	1.0	3.3
00922LM	Energy and metabolism	High-affinity glucose transporter	9.00E-43	197.9	37.3	54.4	8.5	2.3
00841LM	Energy and metabolism	Acyl-coA-binding protein (ACBP) (DIAZEPAM binding inhibitor) (DBI) (ENDOZEPINE) (EP)	1.00E-17	188.3	60.7	67.4	61.7	25.8
00348LM	Cellular organization	Translation elongation factor 2 [<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i>]	6.00E-40	176.6	11.8	32.1	0.6	20.7
00396LM	-	-	-	166.2	14.7	32.9	1.0	7.3
01280LM	Enzyme	Delta-9 fatty acid desaturase [<i>Cryptococcus curvatus</i>]	5.00E-53	141.5	36.3	51.4	54.8	11.0
00139LM	-	-	-	115.6	14.2	25.3	0.2	0.8
MFB02-D12	-	-	-	112.9	22.9	29.6	66.5	35.0
00659LM	-	-	-	106.9	4.1	28.5	0.7	0.9
00320LM	Enzyme	Formate dehydrogenase [<i>Candida boidinii</i>]	5.00E-82	105.3	20.7	26.1	0.8	1.9
00532LM	-	-	-	104.5	17.1	26.8	5.6	3.2

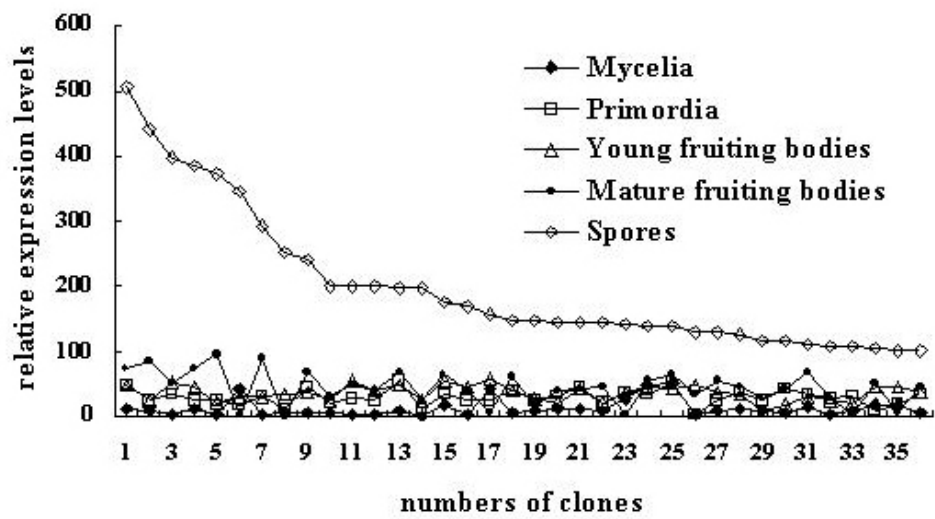


Figure 2.6 Sepcifically expressed genes in basidiospores

Table 2.3 Specially expressed genes in basidiospores

Clone ID	Putative function	Gene identification	E-value	MC	PRI	YFB	MFB	SPO
P03-E11	-	-	-	12.5	48.5	48.8	74.2	504.1
P01-E06	-	-	-	9.4	24.2	25.3	86.4	439.2
P03-B09	Enzyme	Putative secreted glycosyl hydrolase. [Streptomyces coelicolor A3(2)]	8.00E-12	4.5	33.6	51.3	53.6	397.3
P09-E07	-	-	-	11.6	25.6	46.9	73.3	386.0
P02-B08	-	-	-	4.6	26.0	21.0	94.6	372.9
00269LM	Cellular organization, metabolism	PEP carboxykinase (AA 1 - 553) [Saccharomyces cerevisiae]	2.00E-63	43.1	19.6	30.9	2.0	345.4
P02-E12	-	-	-	4.4	29.9	29.4	90.7	291.5
00177LM	-	-	-	5.9	12.7	32.6	0.2	252.3
P11-F09	-	-	-	6.0	45.3	38.0	66.5	240.1
P01-D03	-	-	-	7.2	22.5	25.6	31.0	200.1
P07-A07	Novel	Probable flavoprotein subunit - fission yeast (S. pombe)	6.00E-39	4.2	26.8	54.4	50.1	198.9
P11-F02	-	-	-	3.7	26.0	39.8	41.1	198.7
P05-H12	-	-	-	7.9	56.5	50.1	68.8	198.4
P06-B09	Novel	Chi35 [Streptomyces thermoviolaceus]	5.00E-08	1.0	11.8	24.0	25.5	197.5
P11-D12	-	-	-	19.1	35.0	54.0	63.1	175.0
P02-D04	-	-	-	3.6	23.9	45.6	41.0	170.6
00207LM	Cellular organization, metabolism	3-Ketoacyl-CoA thiolase, peroximal precursor (beta-ketothiolase) (Acetyl-CoA acyltransferase) (Peroximal 3-oxoacyl-CoA thiolase)	2.00E-60	43.9	23.6	59.1	6.6	157.7
P06-H08	-	-	-	5.4	40.3	40.2	62.4	148.1
00459LM	Cellular organization, transport	Phenylalanine ammonium lyase [Amanita muscaria]	9.00E-45	8.6	25.9	28.4	17.9	147.2
P03-E07	-	-	-	12.5	32.2	21.5	40.9	145.8
P11-G08	Enzyme	Putative 5'-amp-activated protein kinase [S. pombe]	6.00E-08	11.7	47.1	43.9	43.4	145.8
P03-C09	-	-	-	10.3	23.0	21.0	46.5	145.8
00126LM	-	-	-	28.5	37.0	36.8	2.2	141.2
P11-B07	-	-	-	50.5	35.2	47.5	55.7	139.9
P01-F02	Enzyme	Protein similar to yeast gas1 Glycophospholipid-anchored surface glycoprotein, putative glycosidase that regulates the crosslinking of beta-1,6-glucans in the cell wall [Schizosaccharomyces pombe]	1.00E-37	53.0	51.1	43.1	65.5	137.6
01528LM	Novel	annexin XIV [Neurospora crassa]	2.00E-46	2.8	2.3	49.4	35.2	129.4
P11-A05	-	-	-	8.9	25.8	37.6	55.2	127.9
P01-F01	-	-	-	12.7	35.7	33.4	45.0	125.8
P02-H03	-	-	-	8.0	23.5	9.0	28.6	117.6
P04-C02	-	-	-	6.1	42.1	17.8	42.6	115.9
P05-D03	-	-	-	15.4	33.5	32.3	66.4	111.5
P02-A12	Novel	Arginine transport system permease protein ARTQ	1.00E-17	4.2	28.5	23.1	27.6	109.1
00086LM	Cellular organization, transport	Probable caCA proton/calcium exchanger -fission yeast (S. pombe)	1.00E-15	9.9	30.7	23.1	3.1	107.7
01663LM	-	-	-	18.2	7.7	45.6	52.0	104.6
00182LM	-	-	-	19.6	19.7	47.5	7.4	100.6
P11-B09	-	-	-	5.7	34.6	37.8	45.0	100.2

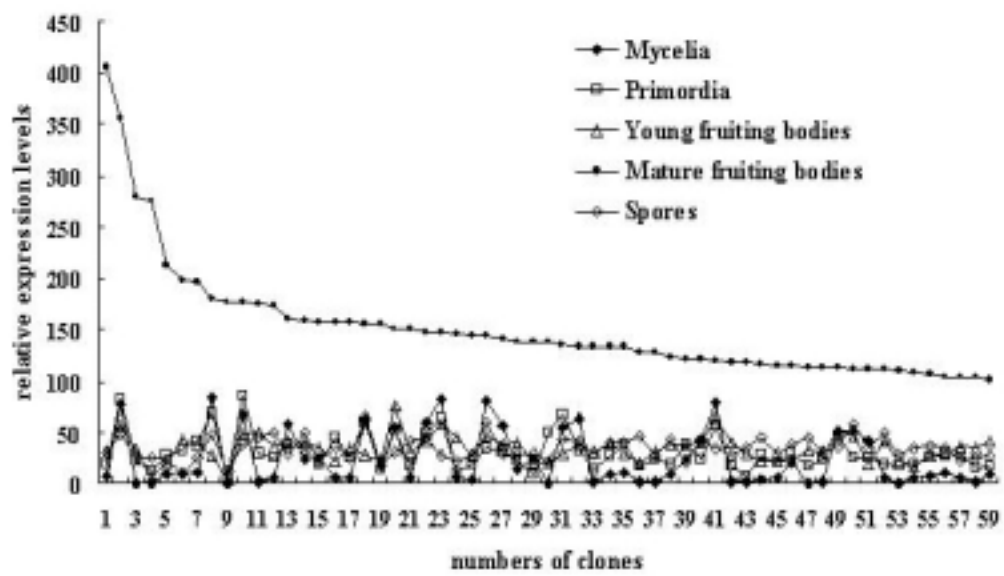


Figure 2.7. specifically expressed genes in mature fruit body

Table 2.4 specifically expressed genes in mature fruit body

Clone ID	Gene identification	E-value	MC	PRI	YFB	MFB	SPO	Folds
MFB01-B08	-	-	9.4	328.8	649.1	3637.4	83.9	5.6
MFB02-E09	12 kDa heat shock protein; Hsp12p [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]	3.00E-07	4.8	323.8	675.9	3178.2	63.1	4.7
MFB06-B06	-	-	3.0	325.4	615.9	2431.6	57.2	3.9
MFB01-F07	-	-	5.5	188.4	339.8	2231.6	64.6	6.6
MFB05-H03	Protein disulfide isomerase precursor (PDI)	2.00E-44	55.2	93.3	497.4	2140.5	187.8	4.3
MFB01-A01	Symbiosis-related protein [<i>Laccaria bicolor</i>]	6.00E-67	1.0	811.7	935.8	1578.9	32.5	1.7
MFB12-B10	-	-	14.3	77.5	519.8	1566.3	8.4	3.0
MFB03-C01	-	-	46.5	359.2	655.6	1415.8	100.8	2.2
MFB03-B05	Aa-Pri1 [<i>Agrocybe aegerita</i>]	7.00E-58	0.9	688.3	919.0	1381.3	26.5	1.5
MFB07-F11	-	-	12.6	52.2	126.7	1227.5	85.4	9.7
MFB09-A07	-	-	1.5	104.4	334.2	1027.8	31.8	3.1
MFB08-D01	-	-	2.2	65.3	238.5	1025.2	57.6	4.3
MFB08-B09	-	-	24.5	37.0	205.1	1016.9	59.7	5.0
MFB09-B01	-	-	35.3	65.3	194.6	993.8	57.5	5.1
MFB02-G01	-	-	141.7	84.3	78.0	959.6	91.1	6.8
MFB06-B07	Putative mitochondrial S4 ribosomal protein; Nam9p [<i>S. cerevisiae</i>]	5.00E-14	0.4	488.8	669.6	938.2	30.9	1.4
MFB08-F02	-	-	6.0	29.5	164.7	927.6	54.0	5.6
MFB05-H04	-	-	41.4	37.6	185.6	840.1	83.0	4.5
MFB05-H01	DNA repair helicase RAD15 (RHP3)	2.00E-45	1.8	120.9	175.7	764.2	39.8	4.3
MFB28-A04	ATP synthase delta chain, Mitochondrial precursor	4.00E-58	41.0	400.1	413.1	754.1	42.5	1.8
MFB08-G11	-	-	3.4	24.4	145.2	716.1	42.2	4.9
MFB28-A06	-	-	18.4	251.4	274.5	665.9	13.4	2.4
MFB32-A06	Metalloprotease MEP1 [<i>Metarhizium</i> <i>anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>]	5.00E-35	25.9	1005.9	798.4	635.0	26.9	0.6
MFB04-C09	Hypothetical protein [<i>A. bisporus</i>]	5.00E-12	14.3	116.4	177.7	604.7	33.5	3.4
MFB30-B04	Enolase (2-phosphoglycerate dehy- dratase) (2-phospho-D-Glycerate hydro-lyase)	5.00E-75	77.8	538.6	576.3	540.0	181.9	0.9
MFB04-C07	-	-	28.7	56.6	170.2	529.2	52.0	3.1
MFB04-E04	-	-	5.6	58.2	97.7	509.8	72.4	5.2
MFB06-H12	-	-	0.0	183.9	195.7	504.8	22.2	2.6
MFB10-F08	-	-	11.9	26.9	69.7	437.3	11.1	6.3
MFB28-D06	-	-	10.6	61.6	62.6	426.2	7.5	6.8
00655LM	Cytochrome C	4.00E-42	25.6	810.9	2012.9	425.6	20.0	0.2
MFB02-A07	Hypothetical protein aq_928 - <i>Aquifex aeolicus</i>	7.00E-15	18.0	53.4	71.4	419.1	79.2	5.3
MFB05-A07	Yhr100cp [<i>S. cerevisiae</i>]	8.00E-19	6.3	18.3	28.5	405.1	30.3	13.4
MFB01-G09	-	-	3.9	30.3	50.7	377.5	57.4	6.6
MFB05-A11	Eukaryotic translation initiation Factor 1A; eukaryotic translation initiation factor 4C [<i>Homo sapiens</i>]	1.00E-39	77.4	82.0	57.1	355.9	48.1	4.3
MFB04-D08	-	-	1.0	23.6	45.0	302.2	50.6	6.0
MFB05-A08	50S Ribosomal protein L17	2.00E-28	11.1	54.8	55.9	302.1	33.9	5.4
MFB28-C05	-	-	18.8	77.1	90.6	297.0	14.2	3.3
MFB03-F01	-	-	0.6	23.0	33.4	278.2	26.3	8.3
MFB02-A08	-	-	0.0	12.1	6.4	273.7	25.4	43.0
01936LM	UDP-glucose dehydrogenase [<i>Homo sapiens</i>]	2.00E-40	7.6	15.4	55.6	259.5	15.9	4.7
MFB11-A12	Laccase [<i>Phlebia radiata</i>]	6.00E-55	59.2	305.3	209.0	255.3	101.6	0.8
MFB05-A10	Probable multifunctional folic acid synthesis protein - (<i>S. pombe</i>)	6.00E-10	8.8	27.6	21.0	212.8	23.3	7.7
MFB33-G05	-	-	10.8	32.1	42.3	198.6	8.6	4.7

MFB07-H01	Probable oxaloacetate transport protein, mitochondrial - fission yeast (<i>S. pombe</i>)	1.00E-39	0.1	5.3	4.1	176.8	11.6	15.2
MFB08-D10	-	-	16.5	14.0	22.0	155.1	18.9	7.1
MFB05-F04	Ribosomal protein 22 of the small subunit [<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>]	4.00E-62	83.0	62.5	57.7	146.6	28.2	1.8
MFB04-B03	Carnitine/acyl carnitine carrier [<i>Emericella nidulans</i>]	5.00E-20	2.7	18.6	28.0	144.0	27.4	5.1
MFB02-G04	Chain A, crystal structure of <i>S. Cerevisiae</i> Eif6	1.00E-77	57.2	30.8	37.5	141.1	28.7	2.5
MFB08-D07	FLJ00061 protein [<i>Homo sapiens</i>]	4.00E-32	24.7	8.2	20.2	137.1	28.8	4.8
MFB02-E05	Ypl133cp [<i>S. cerevisiae</i>]	2.00E-35	7.9	28.0	39.2	132.9	38.5	3.4
MFB03-B07	Importin beta-1 subunit (karyopherin beta-1 subunit) (Importin 95)	2.00E-38	23.8	38.2	37.4	121.7	20.7	3.2
MFB08-A10	Hypothetical 28.5 Kda protein C1D4.08 in chromosome I	2.00E-42	42.6	24.8	38.8	121.1	41.7	2.8
MFB02-F04	Dihydroipoamide cetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial precursor (E2) (PDC-E2)	5.00E-42	78.3	56.0	65.7	119.6	35.0	1.5
MFB06-E08	Hydrophobin [<i>Pleurotus ostreatus</i>]	7.00E-34	2.1	16.6	39.2	118.6	27.7	3.0
MFB09-B04	WD-repeat protein [<i>Homo sapiens</i>]	1.00E-46	40.5	26.2	18.5	111.1	34.3	2.7
P02-G12	Arginine transport system permease protein ARTQ	2.00E-46	5.4	29.7	35.6	103.0	21.8	2.9

Table 2.5. 4,397 EST redundancy of developmental stages in *P. ostreatus*

Redundancy level																	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
3013	656	269	128	81	43	39	27	23	15	11	5	5	2	9	6	1	7
Redundancy level																	
19	20	21	23	24	25	26	27	29	31	35	36	37	38	40	41	42	45
7	1	6	2	1	2	3	2	1	3	2	1	1	2	1	1	1	1
Redundancy level																	
46	49	55	56	57	59	62	64	65	76	77	79	82	92	113	186	229	291
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1



Figure 2.8 Homepage of genetic information center in National Institute of Agricultural Biotechnology.

National Institute of Agricultural Biotechnology

Gene Clone Genetic Map Genome Project Gene Index Analysis Tools

• WEB BLAST • Gene Prediction • Promoter/TF Analysis • Repeat Sequence Analysis • SNP Analysis • Protein Structure Analysis

Gene Index

- Rice (*Oryza sativa*)
- Chinese Cabbage (*Brassica rapa*)
- Wheat (*Triticum aestivum*)
- Maize (*Zea mays*)
- Soybean (*Glycine max*)
- Barley (*Hordeum vulgare*)
- Mushroom (*Pleurotus ostreatus*)
- Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*)
- Hot Pepper (*Capsicum annuum*)
- Tomato (*Lycopersicon esculentum*)

The Gene Index is...

The Gene Index integrates research data from NIAB EST sequencing and gene research projects. It consist of Rice (*Oryza sativa*), Chinese Cabbage (*Brassica rapa*), Wheat (*Triticum aestivum*), Maize (*Zea mays*), Soybean (*Glycine max*), Barley (*Hordeum vulgare*), Mushroom (*Pleurotus ostreatus*), Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), Hot Pepper (*Capsicum annuum*) and Tomato (*Lycopersicon esculentum*)

The Gene Index menu aim is to represent a non-redundant view of all genes and data on their expression patterns, cellular roles, functions, and evolutionary relationships. The index can be searched by: nucleotide or protein sequence; identifier (TC, ET, EST, GB); Issue, cDNA library name or cDNA library identifier; gene product name; functional classification based on the gene ontology assignment; and an EST annotator.

If your search is unsuccessful, go back to the search window. Here again, you may get more than one result from your another search method.

We are continually genome project database is updated regularly, if you have trouble finding the information, you could contact a NIAB.

느타리버섯의 EST database

Figure 2.9 The EST database of *P. ostreatus* in Gene index

Table 2. Functional classification based on the Gene Ontology Assignments

BIOLOGICAL_PROCESS			
Category	Singleton/TC	% of 268 TCs of type biological_process	% of 1300 total TCs of type biological_process
Behavior	0		0
Biological_process Unknown	27	=	10.07
Cell Communication	0		0
Obsolete	0		0
Physiological Processes	0		0
Viral Life Cycle	0		0
Cell Growth And/or Maintenance	2		0.75
Development	0		0
Death	0		0

CELLULAR_COMPONENT			
Category	Singleton/TC	% of 268 TCs of type cellular_component	% of 1300 total TCs of type cellular_component
Obsolete	0		0
Unlocalized	0		0
Cell	0		0
Cellular_component Unknown	27	=	10.07
External Protective Structure	0		0
Extracellular	0		0

MOLECULAR_FUNCTION

Category	Singleton/TC	% of 268 TCs of type molecular_function	% of 1300 total TCs of type molecular_function
Cell Adhesion Molecule	0	0	0
Chaperone	1	0,37	0,08
Chaperone Regulator	0	0	0
Cytoskeletal Regulator	0	0	0
Defense/Immunity Protein	0	0	0
Enzyme	336	125,37	25,85
Anti-toxin	0	0	0
Anticoagulant	0	0	0
Antifreeze	0	0	0
Antioxidant	0	0	0
Apoptosis Regulator	0	0	0
Binding	0	0	0
Triplet Codon-amino Acid Adaptor	0	0	0
Structural Molecule	85	31,72	6,54
Surfactant	0	0	0
Toxin	0	0	0
Transcription Regulator	0	0	0
Translation Regulator	0	0	0
Transporter	0	0	0
Ice Nucleation	0	0	0
Lysin	0	0	0
Molecular_function Unknown	27	10,07	2,08
Motor	0	0	0
Nutrient Reservoir	0	0	0
Obsolete	0	0	0
Protein Stabilization	0	0	0
Protein Tagging	0	0	0
Regulator Of Establishment Of Competence For Transformation	0	0	0
Signal Transducer	0	0	0
Enzyme Regulator	0	0	0

제3절 자실체 형성관련 유전자들의 기능분석 및 육종소재 개발

1. 서론

자실체 형성에 대한 생체 기작의 이해는 벼의 재배자와 벼 연구자에게는 최대의 관심사이나, 아직 그 기작은 명확히 밝혀지지 않았다. 우리는 이러한 분석에 대한 연구를 위해 EST 분석을 수행하였으며, 느타리벼의 자실체 형성과정을 5개 단계로 세분화하여 reverse northern 분석을 수행함으로써, 각 발생단계에서의 발현 profile을 제작하였다. 이렇게 제작된 profile은 자실체 형성 뿐 아니라 포자의 형성, 성분화, 세포 신호전달 기작 등 다양한 연구 목적으로 이용이 가능한 중요한 data이며, 느타리벼에 대한 분자 유전학적 연구의 기초적인 data로서 매우 중요한 가치를 가진다고 할 수 있다. 이러한 중요한 data를 통해 다양한 유의한 특이적인 유전자를 분리하여, 그 기능을 유추하거나, 분석할 수 있다. 이에 우리는 선발된 다수의 유전자에 대해서 그 full cDNA를 동정하고, 유전자 구조분석을 수행하였으며, 유전자 과발현 연구를 통한 기능분석을 수행하였다. 이렇게 수행된 목적 유전자에 대한 발현 분석을 통한 기능 유추 및 느타리벼에서 발현 시스템의 확립과 형질전환의 체계는 다른 유전자에 대한 기능분석의 도구로써 사용될 수 있다.

또한 분리된 다양한 돌연변이체에 대한 분석을 마무리하여, 가장 유의한 변이체에 대한 육종소재로서의 가치를 평가하고, 추가적인 연구를 통한 보완을 고찰하였다.

2. 재료 및 방법

가. 자실체 형성관련 후보유전자의 클로닝 및 발생단계별 발현 특성분석

1) 후보유전자의 선발 및 발현분석

EST clone의 기능분류와 reverse northern에 의해 작성된 발현 profile을 토대로 하여 자실체 형성과 관련되어, 그 발현량이 자실체 형성과정에서 특이적인 50개의 후보유전자의 선발하였다. 또한 벼류에서 자실체의 갯색과 관련한 자료검토를 통해 색깔과 관련된 3개의 후보유전자를 선발하였고, 이 후보 유전자의 클로닝 및 유전자 발현양상을 체크하였다.

2) 선발 유전자의 full length cDNA 클로닝

대부분의 선발 유전자가 Poly(A) tail을 가지고 EST clone으로 준비되어 있으므로, 전체 유전자 염기서열을 얻기 위해서 5'-RACE 법을 사용하였으며, TaKaRa 사의

5'-RACE CORE PCR kit을 사용하여 manual에 따라 수행하였다.

3) 선발된 유전자의 정량 RT-PCR을 이용한 발현양상의 분석

정량 분석에 사용된 시료는 Trizol (Invitrogen사)을 이용하여 total RNA를 추출하였으며, cDNA의 합성은 1 μ g의 total RNA를 첨가하여, Improm II (Promega사) Reverse transcriptase를 이용하여 수행하였다. 이렇게 합성된 cDNA는 다시 한번 정량하여 그 양을 보정하였으며, 0.6 μ g의 cDNA가 RT-PCR에 사용되었다. 증폭된 PCR Products는 image 분석 장비를 통해 그 density를 비교 분석하였으며, 모든 과정의 실험의 보정을 위하여, 대조 유전자로써 18S rRNA, G3PDH가 사용되었다. 또한 몇 개의 유전자에 한하여 세밀한 정량분석을 위하여, real-time PCR법을 사용하였다.

나. 형질전환에 의한 자실체 형성관련 유전자들의 기능분석

1) 자실체 형성관련 유전자와 변이체 원인유전자의 재조합 vector 제작.

유전자 기능을 분석하기 위해서 먼저 과리발현 용 재조합 vector를 준비하였다. 과리발현용 재조합 vector에서는 느타리버섯의 beta-tubulin promoter와 terminator를 사용하였다. 느타리버섯의 genomic DNA를 분리하여, 기존에 분석된 beta-tubulin의 염기서열을 기초로하여 primer를 작성한 후 PCR을 통해 증폭 후 클로닝 하였다. 이렇게 증폭된 promoter와 terminator는 PCR 증폭 전략 (Figure 3.1)을 통해 promoter와 목적유전자 그리고 terminator가 fusion된 재조합 유전자를 제작하였으며, 발현 vector에 클로닝하였다.

2) 임성단핵 균주에의 재조합 vector의 형질전환

느타리버섯종인 ASI2706 균주로부터 분리한 임성단핵 균주인 MB1을 형질전환의 숙주로 사용하였다. 임성단핵 균주의 균사를 MCM (0.2% yeast extract, 0.2% bacto-peptone, 2% glucose, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.05% KH₂PO₄, and 0.1% K₂HPO₄, 50 μ g/ml uridine)에 접종하여 배양하였다. Lysing buffer (Novozyme; 5mg/0.6M Suc, β -Glucanase; 5 μ l/ml, β -Glucuronidase; 5 μ l/ml)를 이용하여 원형질체를 분리하여, 원형질체 수가 10⁷-10⁸개/0.2ml이 되도록 준비하였다. 원형질체(10⁷-10⁸ 개)와 plasmid DNA(1 μ g)와 적당량의 restriction enzyme을 이용하여 형질전환하고, 28 $^{\circ}$ C에서 대략 2-3주간 배양한 후 형질전환체를 선발한다. 같은 방법으로 3, 4회 선발을 수행하였고, PCR 방법을 통해 형질전환 여부를 최종 확인하였다.

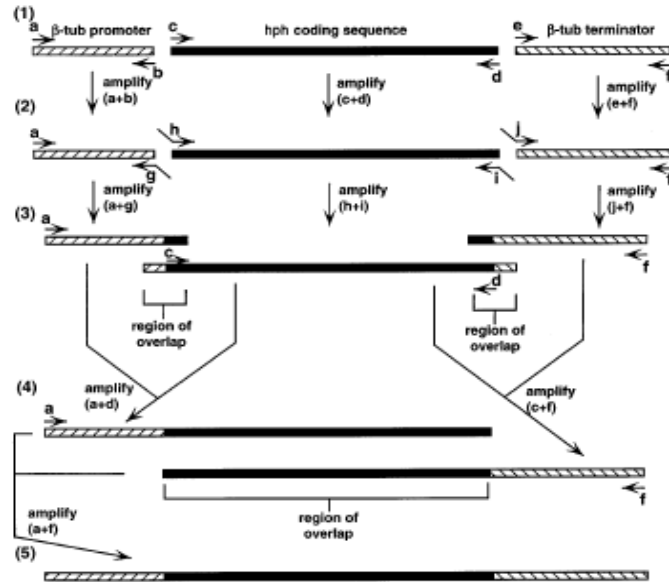


Figure 3.1 The strategy of over-expression vector construction with beta tubulin promoter and terminator. (Current genetics (1999) 36: 371-382)

3. 결과 및 고찰

가. 발생단계별 특이발현 유전자의 구조 및 기능유추

1,500개 unigenes을 대상으로 reverse northern 분석을 통해 버섯 발생과정 중 액체정치배양 균사체, 성숙자실체, 그리고 포자 단계에서 특이적으로 발현하는 것으로 예상되는 유전자들을 선발하였다. 다수의 유전자로부터 특이적인 유전자를 선발하기 위해서 다양한 통계분석이 사용되었다. 그리하여, 최종적으로 액체정치배양 균사체, 성숙자실체, 그리고 포자 단계에서 41개, 57개, 그리고 36개를 각각 선발하였다 (Table 2.2-2.4). 이렇게 선발된 특이 유전자 중에서 northern에 의한 발현량이 유의적으로 증가, 감소되는 유전자를 선발하였다. 위 발생단계에서 각각 8개, 37개, 그리고 7개를 선발하여, 먼저 특이적인 발현을 재확인하는 연구를 수행하였고, 아직도 수행중이다. 이러한 중요 발생단계에서의 대량의 유전자에 대한 발현 분석은 이 후 다양한 목적으로 수행될 연구에서 매우 귀중한 연구 자료가 될 것이다.

자실체의 형성은 많은 재배자와 연구자의 주된 관심사이며, 발생학적 측면에서도 드라마틱한 형태학적 변화를 보이는 점에서 많은 연구적인 대상이 되고 있다. 그러므로 우리는 먼저 성숙자실체의 형성과정에서 발현의 변화를 보이는 자실체 특이발현 유전자에 대한 분석을 실시하였다.

1) 느타리버섯에서 유전자의 발현분석을 위한 housekeeping 유전자의 분석

선발된 유전자의 정량 RT-PCR을 이용한 발현양상의 분석하기 위해서 먼저 발생단계에서의 대조군 유전자의 발현양상을 분석하였다. 대조군 유전자는 모두 느타리버섯의 EST database로부터 분리하거나, 기 보고된 정보를 바탕으로 선발된 18S rRNA, G3PDH, Beta Actin (AT), Beta tubulin (BT), 그리고 HSP104의 유전자가 사용되었으며, 또한 이미 발생단계에서 그 발현량의 차이가 밝혀진 Hydrophodin (HP) 유전자의 발현량도 동시에 시험하여, 신뢰도를 높였다 (Figure3.2). 본 연구에 사용된 house keeping gene은 모두 4개의 발생단계에서 큰 변화가 없는 것을 알 수 있으나, beta tubulin과 G3PDH의 경우 포자에서의 발현량이 약간 감소하는 것을 볼 수 있다. 또한 동일한 cDNA에서 HSP104는 포자에서의 발현량이 증가되며, HP의 경우는 자실체 형성이 시작되는 원기 상태에서 많은 발현량을 보이는 것을 알 수 있다.

이러한 결과로, 느타리버섯의 발생단계에서의 유전자 발현양상의 연구는 18S rRNA와 beta actin 유전자를 대조군으로 사용하는 것이 가장 좋다는 것을 알 수 있으며, 포자에서의 발현량의 검증을 위해서는 HSP104 유전자를 사용하는 것이 좋다는 것도 알 수 있다.

2) 자실체형성과정에서 특이적으로 발현되는 metalloprotease 유전자의 분석

가장 먼저 선발된 mfb06a06 clone의 경우 상동성검색결과 metalloprotease 유전자로 밝혀졌다. Metalloprotease는 느타리버섯의 성장과 기능에서 매우 중요한 효소 중의 하나라고 보고가 되었고, 예상되었다. 이에 우리는 아직 느타리버섯에서 보고가 되지 않은 metalloprotease의 full length cDNA의 염기서열을 RACE법을 통하여 수행하였고 (Figure 3.3), northern 분석과 RT-PCR법에 의한 발현량에 대한 세밀한 분석도 수행하였다. Reverse northern 분석과 마찬가지로 느타리버섯의 metalloprotease 유전자는 균사와 포자에서의 발현량이 많지 않으나, 원기와 자실체 상에서의 발현량은 매우 큰 것이 증명되었다 (Figure 3.4). 본 연구를 통해 분석된 metalloprotease는 기존에 보고된 metalloprotease와는 다른 새로운 종류의 metalloprotease로 밝혀졌다. 그러하므로, 그 기능에 대해 알 수가 없으나 자실체 형성의 과정에서 과다 발현되는 결과는 분명 이 metalloprotease가 자실체 형성과 관련이 있을 것이라 예상할 수 있다. 그러므로 재조합 DNA 작성 및 과다발현을 통한 기능분석의 대상으로 제일 먼저 metalloprotease을 선발 수행하였다.

3) 자실체형성과정에서 특이적으로 발현되는 CK-II 유전자의 분석

자실체 형성과정에서 특이적인 클론 중에 Casein kinase II (CK-II) - alpha subunit을 클로닝하는 염기서열이 존재하였다. CK-II는 두개의 subunit로 이루어져 있으며, 각 subunit 마다 2개의 type으로 존재하는 유전자로 보고되고 있으나, 본 느타리버섯의 EST 염기서열에서는 1개 subunit에 대한 1개 type의 염기서열만이 존재하였다. 이렇게 동정된 염기서열에 대해서 library screening을 통해, full length cDNA를 클로닝하였고, 그 사이즈는 1380bp에 달하였다 (Figure 3.5).

CK-II 유전자의 발생단계별 발현 분석은 northern과 RT-PCR을 통해서 수행되었다. Reverse northern에서와 마찬가지로, fruiting 과정에서 특이적인 발현 pattern을 보였으며, 특히 fruiting의 개시과정인 원기에서 과다 발현되는 것을 알 수 있었다 (Figure 3.6).

4) 자실체형성과정에서 특이적으로 발현되는 GPB 유전자의 분석

세포의 신호전달 과정에서 주된 역할을 담당하는 G protein 중에서 beta subunit의 기능은 많은 관심의 대상이다. 그러므로 느타리버섯의 발생에서도 중요한 역할을 담당할 것이라는 예상으로 EST data를 검색하여, 후보 유전자로 선발되었다. 이 유전자는 5'-RACE 법을 사용하여 full-length의 cDNA를 클로닝을 수행하였다 (Figure 3.7). 5'-RACE 법으로써, 상류로 350bp의 염기서열을 동정하여 염기서열을 분석하였으나, 5'-말단의 서열이 완전히 동정되지 않았음을 알 수 있으며, 대략 상류로 200-300bp 크기의 서열이 더 존재함을 예상할 수 있다. 또한 발생단계에서의 발현량도 분석되었으나 발생단계에서 차이가 전혀 없음을 알 수 있었다 (Figure 3.8). 이러

한 결과는 동시에 수행하여 검증한 northern 분석 뿐 아니라, real-time PCR 방법에 의해서도 확인할 수 있었다.

5) 자실체 형성과정에서 특이 발현하는 유전자의 발현 분석

위의 유전자들과 동시에 reverse northern 분석을 통해 자실체 형성과정에서 선발된 14개의 유전자들은 먼저 northern 분석을 통해 그 발현이 재확인 되었다. 선발된 모든 유전자가 자실체에서 과다 발현되는 것을 확인할 수 있었으며, 그 발현양상은 아래의 결과로서 확인할 수 있다 (Figure 3.9-3.13). 아래의 유전자 들은 모두 자실체 형성과정에서 특이적으로 발현되며, 그것은 기능적으로 자실체 형성과 연관이 있다는 것을 예상할 수 있도록 한다. 그러나 대부분의 유전자가 GenBank 상에서 homology 를 가지지 않는 unknown gene이므로 발현 후 세밀한 기능분석이 요구되고 있다.

나. 형질전환에 의한 자실체 형성관련 유전자의 기능분석

1) 자실체 형성관련 유전자와 변이체 원인유전자의 재조합 vector 제작.

유전자 기능을 분석하기 위해서 먼저 과리발현 용 재조합 발현 vector를 준비하였다. 발현 vector는 후보유전자를 형질전환 선발마커인 carboxin 저항성 유전자가 삽입된 vector에 연결하여 구축하거나, 새로운 발현 vector를 제작하여, 이 후의 형질전환 과정에서 co-transformation을 실시한다. Carboxin 저항성 유전자가 삽입된 발현 vector의 경우, 그 크기가 5.5kb에 달하므로, 주로 co-transformation의 전략으로 형질전환 분석을 계획하였다.

과리발현용 재조합 vector에서는 느타리버섯의 beta-tubulin promoter와 terminator를 사용하였다 (Figure 3.13). 느타리버섯의 genomic DNA로부터 클로닝 한 beta-tubulin의 promoter와 terminator는 PCR 증폭 전략 (Figure 3.1) 을 통해 promoter와 목적유전자 그리고 terminator가 fusion된 재조합 유전자를 제작하였으며, 발현 vector에 클로닝 하였다. 여기서 사용된 과리 발현 유도 목적 유전자는 가장 먼저 full length cDNA가 클로닝 되어 발현분석을 수행한 metalloprotease 유전자를 사용하였다.

2) 임성단핵 균주에의 재조합 발현 vector의 형질전환

형질전환용으로 제작된 재조합 DNA는 임성단핵의 성질을 가지는 정상균주에 형질전환 함으로써 교배과정 없이 다양한 형질전환체의 후보유전자 발현량과 표현형의 특성을 비교분석한다. 이로서 후보유전자의 발생단계별 다양한 수준의 발현양상과 이에 따른 버섯 표현형과의 연관성을 형질전환체 측면에서도 해석할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 유전 육종의 측면, 특히 형질전환에서 매우 유의한 균주인 임성단

핵균주를 분리하였다. 느타리버섯 ASI2706 균주로부터 분리한 임성단핵 균주인 MB1은 그 성장이 느리고 자실체의 형성이 불안정한 단점이 있으나, 단지 환경의 변화만으로 자실체를 형성하는 특징을 가지고 있다. 이에 우리는 자실체 형성 과정에서 자실체 특이적 발현이 증명된 metalloprotease 유전자를 beta-tubulin promoter, terminator와 재조합하여 형질전환을 수행하였다. 형질전환체는 3, 4회 선발을 수행하였고, PCR 방법을 통해 형질전환 여부를 최종 확인한다.

그러나 임성단핵균주가 자실체를 생성하기 위해서는 적어도 3-4개월이 소요되는 단점을 가지고 있으므로 아직은 유의한 형질전환체를 얻지 못하였다. 또한 이렇게 처리된 형질전환체들 중에서 많은 균주들이 제대로 성장을 못하는 문제점들이 생기기도 하였다. 이에 좀더 세밀한 조작과 분석이 요구된다. 그러나 이러한 임성단핵균주와 재조합 기술, 형질전환 체계의 확립은 이미 수행되었으므로 축적된 EST data의 기능 분석, 나아가 신물질 개발 등의 연구에서 매우 필수적인 과정임을 알 수 있다. 아직은 초기의 단계에서 불안정한 요인의 제거가 요구되나, 느타리버섯에서의 첨단연구의 주춧돌이 마련되었다고 할 수 있다.

다. 육종소재 개발

본 연구를 통해 제작된 돌연변이 균주는 무려 1만 여점에 달한다. 그러나 대부분의 돌연변이체가 유전 형질의 획득보다는 돌연변이원에 의한 형질의 손실이 주로 유발되었다. 이러한 손실된 형질에 대한 학문적인 목적의 연구에 매우 중요한 자료라고 할 수 있다. 예를 들어 원기 미생성 돌연변이 균주와 미성숙 균주에서 그 변이의 원인을 분석한다면 자실체의 형성의 발생과정을 밝힐 수 있는 최적의 균주라 할 수 있다. 또한 임성단핵 균주는 유전 육종의 중요한 숙주인 것과 동시에, 버섯류의 나아가 진균류의 영양식을 밝히는 중요 균주이며, 그러한 이유로 현재 변이원인을 밝히려는 노력이 계속되고 있다. 또한 다수로 선발된 영양요구성 균주는 버섯 유전형 연구 및 세포 생리연구에서 사용이 가능하다. 그러나 이러한 유전형질의 손실 균주는 버섯 균주의 육종의 측면에서의 활용이 어려운 한계를 가지고 있다. 이러한 변이체 외에 육종연구의 측면에서 소수의 중요한 균주가 선발되었고, 그에 대한 육종의 측면에서의 추가 연구가 지속적으로 요구되며, 일부는 수행 중이다.

1) 육종소재로서의 흑색변이체 균주

본 연구를 통하여 버섯의 품질에서 가장 중요한 요인으로 간주되는 갓색이 환경적인 영향에 크게 좌우되지 않으면서도, 진한 흑색을 나타내는 변이체가 선발되어 보존되었다 (Figure 1.4). 이 균주는 균사의 빠른 성장과 다량의 자실체를 생산하는 모균주가 가지는 유리한 특성과 동시에 갓색이 흐린 모균주의 단점을 정확히 보완하는 매우 육성할 가치가 높은 균주로 평가되고 있다. 이에 우리는 흑색 변이체의 객관적

지표의 측정을 통한 버섯 특성분석을 실시하였고, 분자 유전학적 측면에서 변이원인 분석을 통한 표지인자를 찾기 위한 노력을 진행하였으며, 단포자 분리를 통한 다양한 유전형질을 확보하였다.

이러한 노력은 ‘장미전쟁’이라는 말에서 보듯이 품종의 국제화, 보호화 시대에 국제적 경쟁력을 가지는 버섯 품종의 보호 및 육성의 면에서 매우 유리한 위치를 선점하였다고 할 수 있다. 지속적인 노력과 지원으로 빠른 성과를 얻기를 기대하고 있다.

2) 백색, 청색버섯의 이용

흑색의 버섯이 일반 버섯 품종의 육성에 중요한 균주라 한다면, 백색과 청색버섯은 고기능성 또는 특이적 버섯 품종 개발에서 사용이 가능하리라고 생각된다. 기술하였듯이 느타리버섯은 난분해성 물질의 분해능에 의해 크게 주목을 받고 있으며, 탈색 그리고 약리적으로는 혈전 용해능으로 전 세계적 주목을 받고 있다. 이에 그러한 기능들의 활성화 및 함량은 높이는 품종 개발의 측면과, 다양한 기호를 위한 버섯 품종의 개발에서 색변이체의 도입을 예상해 볼 수 있다. 특히 백색의 버섯은 미백의 효과를 가질 것이라는 예측에 의해 매우 주목 받는 돌연변이 균주라 생각된다. 이러한 균주는 모두 객관적으로 특성분석 되었으며, 단포자 분리를 통한 유전형의 다양화, 그리고 변이원인을 찾으려는 연구가 진행되었다.

3) 소포자 균주의 육종 소재로 이용의 어려움

버섯의 포자는 재배 농민의 건강에 알려지 질병을 일으키며, 균주의 오염 및 품질의 저하의 원인이 되는 재배적 측면에서는 매우 불필요하고, 제거되어야 할 요인이라는 사실은 무포자 버섯을 만들기 위한 전 세계적으로 매우 많은 노력들이 있어 왔다는 사실 만으로도 잘 알 수 있다. 그러나 대부분의 성과들은 단점을 지닌 품종의 개발에서 머물렀으며, 마찬가지로 본 연구에서 분리된 돌연변이 균주에도 커다란 장애를 발견할 수 있었다. 소포자 균주는 기본적으로 그 성장이나 자실체 형성이 느리며, 저품질의 자실체를 생산한다는 단점을 가진다. 그러나 더욱 문제되는 것은, 버섯의 본능이라는 면에서 이해할 수 있는지 모르겠으나, 포자의 양이 재배가 반복될 수록 늘어간다는 문제, 즉 특성의 회복이 대부분의 균주에서 일어난다는 점이다. 이로써, 현재 보존된 균주의 대부분이 소포자로서의 특성이 회복이 되었으며, 단지 소포자의 성질을 지녔을 당시의 단포자를 보존하고 있을 뿐이다.

4) 형질전환체의 이용을 위한 조건

형질전환체는 국내외적으로 GMO의 민감성으로 관리가 매우 중요하다. 그러한 측면은 형질전환체의 자실체 발생에 제약이 된다. 본 연구에서도 형질전환체의 발생은 매우 밀폐된 공간(컨테이너 생육실)에서 제한된 량에 대해서 발생을 시도하였다.

특히 임성단핵 균주의 경우 자실체의 발생이 매우 느리며, 자실체의 생성량이 적으므로, 적당하게 제어가 가능하였다. 이러한 제약을 가지는 형질전환체는 임성단핵주를 분리하기 전에는 균사상의 분석만을 시도하였다. 그러나 균사상의 버섯 특성은 크게 변화가 없으며, 변화의 정도를 확인하기도 쉽지 않았기 때문에 유의한 형질전환체는 선발이 되지 않았으며, 대부분 보류가 되었다. 그리하여, 임성단핵 균주의 필요성을 느끼게 되었으며, 현재의 분석은 모두 임성 단핵균주를 숙주로 하여 수행하였다. 그러나 마찬가지로 임성단핵 균주 자체의 특성상의 불안정성으로 인해 적절한 형질전환체의 선발이 어려움을 가지고 있다. 매우 시간이 오래 걸리는 문제와 그로 인해 버섯의 상태가 나빠지는 문제, 그래서 선발이 어렵다는 것이 현재 연구에서 형질전환체의 선발에서의 한계라고 할 수 있고, 그러므로 유의한 결과를 얻지 못하였다.

이에 우리는 더 좋은 형질의 임성단핵 균주의 육성을 위해 노력하고 있다. 형질전환체의 이용을 위해서는 먼저, 임성단핵 균주의 단핵균주와 정상의 고품질 버섯의 단핵균주와의 교배를 통해 고품질의 임성단핵 균주를 찾는 것이 선행되어야 한다. 이 작업은 현재 진행 중이며, 이러한 연구는 고기능성 또는 약용 버섯 등의 생산 및 육성에 매우 기초적인 연구가 될 것이다. 또한 좀더 세밀하게 제어되는 생육재배 시스템의 제어능력이 필요하며, 그 기술은 습득되고 있다. 이것은 앞으로 형질전환체의 안정성에 대비한 필수적인 요건이 될 것이다.

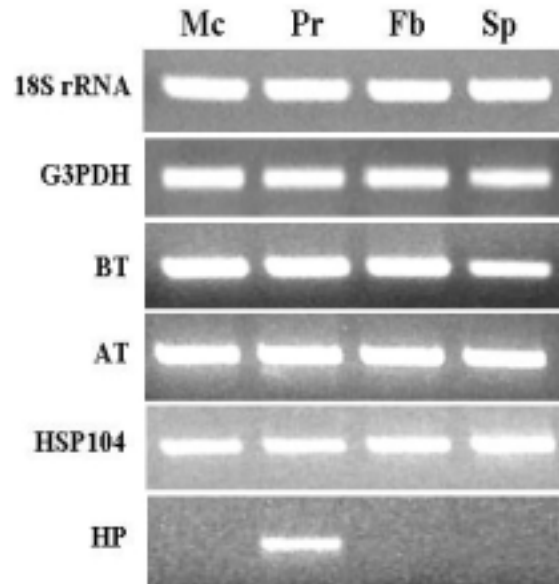


Figure 3.2 The expression levels of house keeping gene, heat shock protein, and hydrophobin genes during developmental process of *P. ostreatus*. AT, Beta Actin; BT, Beta tubulin; HSP104, heat shock protein 104; HP, hydrophobin gene of *P. ostreatus*.

```

                                5'-NTP----->
aggttgaagaagcaagggatctacgtacaccgtatataagaaggggggtcctcgatgtcg 60
gtcaaatattgctccttgatccccccgagtttgaccaaatgttgcgctccatcctgta 120
                                M L R S I L L
attgcactctctgctccgcctacgtgctggggagcacaccagaccagcaggcaagggtt 180
I A L S C S A Y V L G S T P R P R Q R V
tgcgggtcgcaaccaagccaagaaagtatccaaagggcggaggccatttgatggcctt 240
C G S Q P S Q E S I Q R A E A H F D G L
agaagcaacgtcagcctgaaaaaagagagttctttaccgctcgcagtgactggcatgtc 300
R S N V S L K K E S S F T V A V H W H V
                                MTPRQ-L----->
gtcagccagaattccacgggtccgtggcggaacatccccgattcccaattacggaccaa 360
V S Q N S T V R G G N I P D S Q I T D Q
atccaagtcttgaatgatgcgtacgcgtactcgggcttttcatttgagcttgcgggtacc 420
I Q V L N D A Y A Y S G F S F E L A G T
                                MTP-S2----->
acacgtacagtcacgctacatggtttggcaaggccgaaccggagagtatataccaagat 480
T R T V N A T W F G K A E P E S I Y Q D
gaaatgaaggcggccctcgcgaaagggaggagccgctcctaaacatttacagcgtaggg 540
E M K A A L R K G G A A A L N I Y S V G
                                MTP-S1-----<
tttacttctggttactactacgggcttctagatatacgcacggttcccatttgcataatggg 600
F T S G Y Y Y G L L G Y A T F P F A Y G
tacagtcgcaaggatgacgggtgttgatccattacgcctcgggttcggggggcaacttg 660
Y S P K D D G V V I H Y A S V P G G N L
gatacatacaacctcgggatgaccgcaacgcacgaagtcgggtcactgggttgacctctac 720
D T Y N L G M T A T H E V G H W F G L Y
                                MTP-A1----->
cacaccttccaaggaggttgcgacgaacctggagactatggtgatgataccccctctgag 780
H T F Q G G C D E P G D Y V D D T P S E
                                MTP-A2----->
tcgtacgaagccttggatgccccgttggctcgtgacacttgcgacggcgaaggctttgac 840
S Y E A F G C P V G R D T C D G E G F D
                                MTPRQ-R-----<
                                MTP-1----- (P)
cccatccataactacatggactacaccgatgatgagtgcatgaccgagttcaccgaaagg 900
P I H N Y M D Y T D D E C M T E F T E G
cagggtcagcgcagatgagagaacagtcctggacgtaccggggcgtcaggccagggtagca 960
Q G Q R M R E Q S W T Y R G V E A R V A
gcaccagtgtaaggaagcngaaagctgtagttgatgacagcagtggttggtaactcggc 1020
A P V
                                3'-NTP-----<
acttgcgatgtgaacgtggcatccgattcaatctattcatttggatctctggtgcccgaagt 1080
ctaattgtagagattatataatcgcgccctccaagggatttgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1140

```

Figure 3.3 Nucleotide sequence and deduced amino-acid sequence of *P. ostreatus* PoMTP-2. Full-length nucleotide sequence of PoMTP was constructed from EST sequence and by 5'-RACE PCR cloning. Lowercase letters indicate nucleotide sequence and uppercase letter indicate the amino acid sequence. The putative signal peptide is shown in bold. Oligonucleotide sequences and directions of the primers mentioned in the text are indicated by horizontal arrows. The putative polyadenylation site is marked by an vertical arrow.

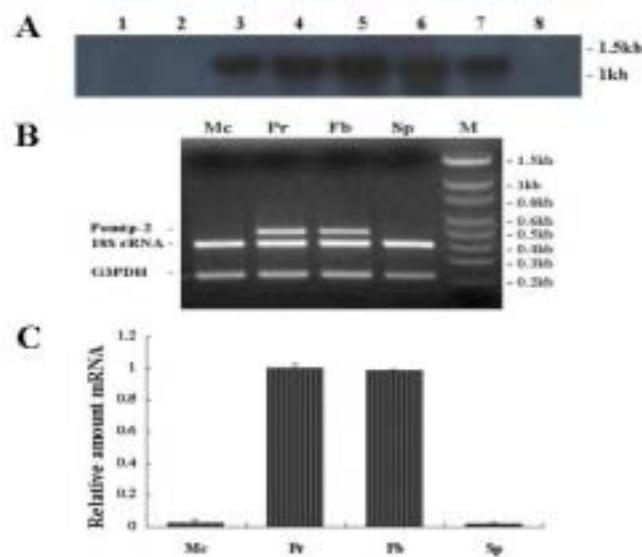


Figure 3.4 PoMTP-2 mRNA levels during developmental process of *P. ostreatus*. [A] The gene expression of PoMTP-2 during the fruiting was analyzed by Northern blotting. Total RNA (5ug/lane) isolated from mycelia, primordia, fruiting bodies and spores at different stages of the *P. ostreatus* life cycle were subjected to electrophoresis in a formaldehyde-agarose gel, transferred to Hybond N⁺ membrane, and probed with ³²P-labeled PCR-amplified fragment. Lanes 1, 45 days cultured mycelia; Lane 2, mycelia under 9 days fruiting; Lane 3, primordia (11 days); Lane 4 to 7, initial (14 days), young (16 days), middle (18 days), mature fruiting bodies (20 days); Lane 8, spores. [B] To verify the expression of PoMTP-2, quantitative RT-PCR was performed. cDNAs synthesized with AMV reverse transcriptase and random hexamer or oligo d(T) primer were used as template in a PCR reaction with two specific primers (MTPRQ-L, 5'-atccccgattcccaattac -3'; MTPRQ-R: 5'-gtccatgtagttatggatgg -3'). As a control, 18S rRNA and G3PDH gene were used. Mc, mycelia; Pr, primordia; Fb, fruiting bodies; Sp, spores. [c] Relative amount of PoMTP-2 mRNA, determined by Kodak 1D image analyzer, were calculated by the rates of intensity against the expression level of PoMTP gene in primordia and normalized with the expression of 18S rRNA and G3PDH.

```

GGCCATTATGGCCGGGGGCCAGCCACCTCCATCGTCCAGCATTGTTGGTCCCGGAGTGT 60
AGCTCCTCTGCGCTGCTACACCCCGCAGCTCATTGGCCATTGTACTACGTCCTCCGAAAC 120
CCATTTCATAAGTGTGATGGCTCGGGTTTATCGCGATGTAAACCAGAGGTTTGGGCTGTC 180
TTGGTATGACTATGAGGCCCTCCACATCGAATGGAGCCAAACCGAGCGATACGAAATTAC 240
TTGCCGAGTCCGTTGGTGGCAAGTACTCGGATGTTTTCCGGGCTTTGGATGTGGAAAAACA 300
TGACCCCTTGTGTGATCAAGGTCTTGAAGCCCGTCCGCTGCACGAAAGGTCAAGCGCGAGAT 360
CAAGATTCTCCGCAATCTCGCTGGAGGCCCAACGTTATTGGATTGCTGGACGTCGTTCCG 420
GGACTCCTCGAAGAGATACCACAGCTTGGTGTGATGGAGTATGTGGACAATGTGGAAATGGAA 480
ACTGTTGTTCCCAAAATGACAGAGGGGACATCAAACATTACAGCTTCCAACTATTGAA 540
GGCTTTGGACTTCACCCACTCGCATGGTGTATTTCACCGCGATGTTAAGCCAGGCAATGT 600
AATGATCAACCATTCTCGTGGAGAGCTTAAAGCTTATCGACTGGGGACTCGCGGAGTCTTA 660
CCACCCAGACACTGAATATCATATTCGCGTCCGTTCCGCGCTACTACAAGGCGCCAGAACT 720
GTTGGTCCGCTATAAAATGTACGATTACAGTCTCGACCTATGGAGCGTCCGTTGCATGTT 780
TGCAATCCATGATCTTTCGACGCGAACATTTTTTCCGCGGTTTGGATAATGACGATCAGCT 840
ATTGAAGATTATGAAAGTACTCGGACACCGAAAATTCGATCAGTATCTACAAAAATACTC 900
TATACACCTTGAAACGGACCATGAGGCCCTTCTTCAAGACTATTGAGGCTTGGCTGGAC 960
GCGATTTCATTACCGCCGACAACCAATCAGTAGCCTCAGTCCAGGCAATTGATCTACTGGA 1020
TAACTGCTCAGATATGATCATGAGGAACCGTTGACAGCCTCAGAGGCTCAGTCACATAT 1080
TTACTTCAATTCGGTTCGCTTGGAAAGCTTCATCCGAAAGAAGGAAGCAGTCAGTGAATC 1140
CGGATTCGTTCTACATGATATGGTATGCATGCGCTGATAAATTTGAACTATTATGTTTC 1200
TCTCCTTGATTCATTTCATTTATTACTCTCCCTGTAGGAGATAGAGCGTCTGGAGCT 1260
TGCTTGTAGACATGCCACCATCTGAATATGCCCTCGGGCCCTTGTACCTTTCTACTCATG 1320
TCGATTCGATTCAGTGTATTGATAAAACTCAACCTCAAGCTTGTAAAAAATAAAAAA 1380

```

```

M A R V Y R D V N Q R F G L S W Y D Y E A F H I E W S Q P E R Y E I T C R V G G
G K Y S D V F G A L D V E N N D P C V I K V L K P V A A R K V K R E I K I L R N
L A G G P N V I G L L D V V R D S S K R Y H S L V M E Y V D N V E W K L L F P K
M T E G D I K H Y T F Q L L K A L D F T H S H G V I H R D V K P G N V M I N H S
R G E L K L I D W G L A E F Y H P D T E Y H I R V G S R Y Y K A P E L L V G Y K
M Y D Y S L D L W S V G C M P A S M I F R R E H F P R G L D N D D Q L L K I M K
V L G T P K F D Q Y L Q K Y S I H L E T D H E A L L Q D Y S R L A W T R F I T A
D N Q S V A S V E A I D L L D K L L R Y D H E E R L T A S E A Q S H I Y F N S V
R L E A S S G K K E A V S D S G F C S T Stop

```

Figure 3.5 Nucleotide sequence and deduced amino-acid sequence of *P. ostreatus* Casein kinase II- alpha subunit (MFB09-D07). Full-length nucleotide sequence of PoMTP was constructed from EST sequence and by 5'-RACE PCR cloning. Lowercase letters indicate nucleotide sequence and uppercase letter indicate the amino acid sequence.


```

1 GATGCTTATA CCACCAACAA AGTTCACGCC ATTCCCTCTTC GATCTAGCTG GGTATGACT
61 TGCGCTTACT CGCCATCGGG GAACTTCGTTG GCGTGTGGTG GTCTCGACAA CATCTGTTCC
121 ATCTACAACG TCAACAACAA GGACGCTGGC GCTAGCGTAC GTGGCGCTCG GGAACCTAAGC
181 GCACACTCAG GTTATCTCAG CTGCTGTCCG TTCATCAACG ACCCGCAAAT CGTGAAGTAGT
241 TCTGGTGATA TGACGTGTAT GCTGTGGGAT ATTGAAGCTG GTGTCCGGGT GGTGAGTTG
301 AGCGACCATA CGGGTGATGT AATGAGCTTG TCTCTGGGGC CTAATCAGAA TGTCTTTGTA
361 TCCGGAGCCT CGCACGCAAC AGCAAAACTC TGGGATATCC GTAGCGGACG AGCAACACAG
421 ACCTTCAGTG GTCATGAGTC CGATATTAAC GCTGTCCAAT TCTTCCCTAA CGGTGATGCC
481 TTCGCTACAG GATCGGACGA TCGTCCCTGT CGCTTGTTTG ATATTCGAGC TGACCGGGAA
541 CTAACCGCGT TTACCCACGA TAATATTCTT TGTGGAATCA CCTCCGTTTC ATTCTCCATC
601 TCCGGGCGTA TTCTCTTCGG TGSTTATGAT GACTGGAGCT GCAATGTCTG GGACACGCTG
661 AAAGGTGAAC GTGTGGGTGT TCTCACTGGC CATGAGAACA GAGTCAGTTG TTTGGGTGTA
721 AGCCGAGACG GCATGGCTCT TTGCACAGGA AGTTGGGACA GTACGCTCCG AGTTTGGGCG
781 TAATCTCCCG TTACACATGG TATTCGCCCTT GCAA 814

```

```

D A V T T N K V H A I P L R S S W V M T C A Y S P S G N F V A C G G L D N I C S
I Y N L N N K D A G A S V R G A R E L S A H S G Y L S C C R F I N D R O I V T S
S G D M T C M L W D I E A G V R V V E F S D H T G D V M S L S L G P N O N V F V
S G A C D A T A K L W D I R S G R A T O T F T G H E S D I N A V O F F P N G D A
F A T G S D D A S C R L F D I R A D R E L N A F T H D N I L C G I T S V S F S I
S G R I L F G G Y D D W T C N V W D T L K G E R V G V L T G H E N R V S C L G V
S A D G M A L C T G S W D S T L R V W A Stop

```

Figure 3.7 Nucleotide sequence and deduced amino-acid sequence of *P. ostreatus* G protein beta-subunit gene (01277LM). Full-length nucleotide sequence of PoMTP was constructed from EST sequence and by 5'-RACE PCR cloning. Lowercase letters indicate nucleotide sequence and uppercase letter indicate the amino acid sequence.

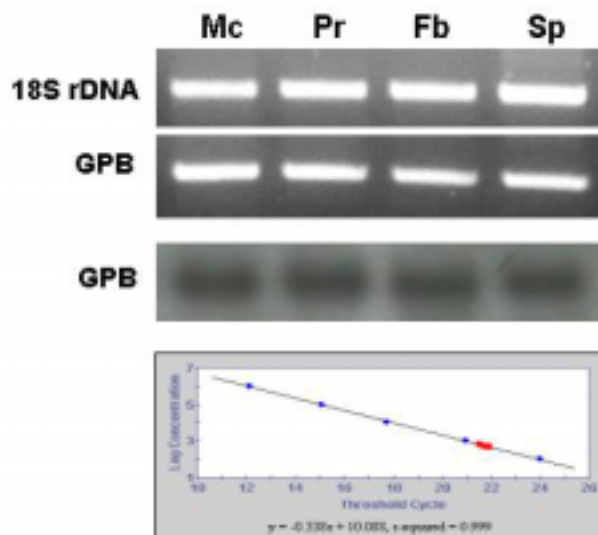


Figure 3.8 G protein beta subunit (MFB09-D07) gene expression during developmental process of *P. ostreatus*. The gene expression of G protein beta subunit (MFB09-D07) gene during the fruiting was analyzed by RT-PCR, northern analysis and real time PCR. Lanes 1, 45 days cultured mycelia; Lane 2, primordia (11 days); Lane 3, mature fruiting bodies (20 days); Lane 4, spores. As a control, 18S rRNA gene were used. Mc, mycelia; Pr, primordia; Fb, fruiting bodies; Sp, spores.



Figure 3.9 Northern blot analysis and sequence of mfb06a06 clone. Lane 1: mycelium (45 days after incubation), Lane 2: mycelium (9 days after cold shock), Lane 3: Primordia, Lane 4: young fruit body 1, Lane 5: young fruit body 2, Lane 6: young fruit body 3, Lane 7 : mature fruit body, Lane 8: basidiospore



Figure 3.10 Northern blot analysis and sequence of mfb08d01 clone. Lane 1: mycelium (45 days after incubation), Lane 2: mycelium (9 days after cold shock), Lane 3: Primordia, Lane 4: young fruit body 1, Lane 5: young fruit body 2, Lane 6: young fruit body 3, Lane 7 : mature fruit body, Lane 8: basidiospore

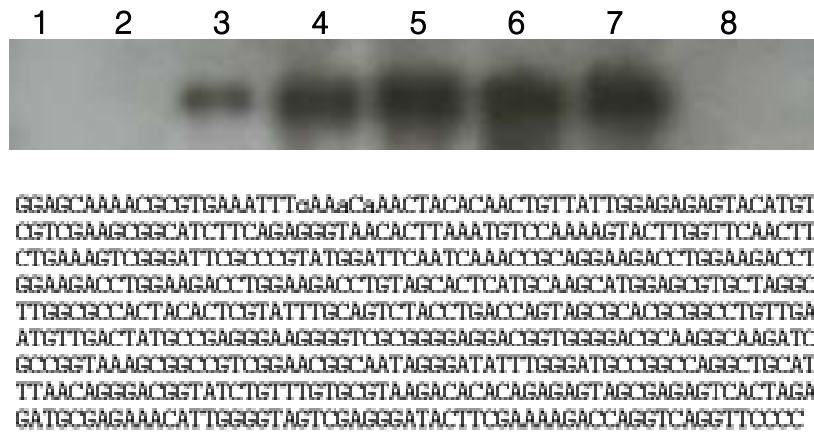


Figure 3.11 Northern blot analysis and sequence of mfb12b10 clone. Lane 1: mycelium (45 days after incubation), Lane 2: mycelium (9 days after cold shock), Lane 3: Primordia, Lane 4: young fruit body 1, Lane 5: young fruit body 2, Lane 6: young fruit body 3, Lane 7 : mature fruit body, Lane 8: basidiospore

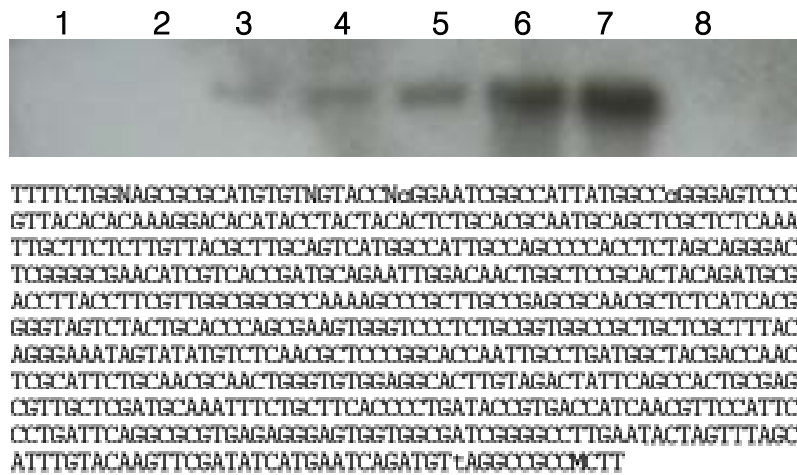


Figure 3.12 Northern blot analysis and sequence of mfb07f11 clone. Lane 1: mycelium (45 days after incubation), Lane 2: mycelium (9 days after cold shock), Lane 3: Primordia, Lane 4: young fruit body 1, Lane 5: young fruit body 2, Lane 6: young fruit body 3, Lane 7 : mature fruit body, Lane 8: basidiospore

Beta tubulin promoter

```

1 acctaacata ctcaattctt ttcccacccc ctaactttct tctccacagt cctctcatct
61 cccccccata ctccccatt ctaattctct aaaccaactac tttacataac gaactccgat
121 caaacctcat aatccctatt ttcccatcct caactctcac gatttatctc tacatacaca
181 ccttcaatcc actcttccct caacaaatcc ctcccccaat tcttctctct accctccctc
241 cctacatact acaccacaaa cctttaaccg atcccaaacg caaatatccc atcccacctt
301 taccaactct tactcactcc attcccacaa caaacattac atacttacc tcccctccac
361 ccttcaaccc caaccctcc caaccatcat caccatcctt tcaaacaca acaccttaca
421 tcaacactac atattttacc tcaacactca acccaaatat acatactccc cctctttaa
481 tttctcatcc ttctctctc ttatccact caaaaacatt caccacacat gattcccaag
541 actaataaca acacatacta cctctttaa ttaaccacaa cctccctcaa tattctctc
601 tcaaacacat cctcccaatt catcttatct acactcttaa tatactctc cactatcacc
661 acctccctcc aaccccatt ctcaacccc accctataaaa tttctctcc cctccctca
721 acaccttctc attaattctc tctctctct tcaaaccaa caaaccaat cctctctca
781 tctctctctc tataacttcc tcaatctac cctataattt ctctccctc tctcccaag
841 aacacccctc tctctcaca acaaaaacc gacttctcc caattctaaa acctaccact
901 tctgatatag aacggacta acaccttcc taccgtaga .....

```

Beta tubulin - terminator

```

2821 cactcacctc ccccaataaa tctcacctac tttctcaca te aatccattct ctctatcccc
2881 tcttcccttt catcatctca tctacacta tctcccaat ttactcttca cctcttctat
2941 ctctttcatt tetctatctc catctctaaa taattccct tcccttcat tacccttcat
3001 ctacccctat ctctaccta actctctctc tcaattctat cacataatcc ttctctctc
3061 atcaactctt caactctttt tcaatctatt caaacccaa ttcaaacccc ccaatccctc
3121 cctcaaacctc tttcaaccta ctctcaact acccttcaaa caaatcaacc ctactaatc
3181 tctattctct caaaaaaaa ctcttcaata tcaaccctt ctcccccac caatccctc
3241 actcctcac tcccaacacg tctctccac caactctctt aacttctct ttttcaatc
3301 ctccaatcca aataccatct ctcccaata tctccttcc caactacccc ctctctctc
3361 taatcacttt cactcaaaa ctaaatccc tcaatcaata catctctaac tcaattccac
3421 actaacccat ctacttcatg ccatttcatg ccttcaatta cacttccaa ccaactaca
3481 atctctatct aacccccac taacatctc caactcttca aataacccc caactaatat
3541 caaacacccc actcaactc catataaac actacctctc ttattctcc cccccctcc
3601 aatttcttt ccttatccc ccaatcccc caactcttcc taccactct tttcaaacg
3661 cctctctacc tttaaactc caaaccaaac caactctact atactcccc aatacttca
3721 ctctctctct cctcaaatc cctcccaat cctcccaacc ccatacacc tcaattccaa
3781 tctctctccc actctctccc accaactct caatttcaac ctttcaact ctaacttate
3841 ccacaaccaa caacaactc caacttaata ctcccactct atcaatcct caaacacat
3901 tctctgatg accgctctg cacacaacac ataacgaaga gttatttctg .....

```

Figure 3.13 Promoter and terminator sequence of beta tubulin gene in *P. ostreatus*.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연차별 연구개발 내용

연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
<p>1차 년도 (2001-2002)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 변이체 생산 조건확립 및 대량 분리 ○ 자실체 발생단계별 특이발현 cDNA의 분리 및 발현분석 	<ul style="list-style-type: none"> · REMI 형질전환 체계를 확립함 · U.V mutagenesis에 의한 돌연변이체 유발 최적조건을 확립함 · 6,000개의 UV 처리 돌연변이체를 분리함 · 형질전환체를 다수 분리함 · 8개 발생단계별 cDNA library를 제작함 · cDNA Random sequencing에 의한 자실체 발생단계별 16,000개 발현 유전자를 대량으로 분리함 · Genomic library를 제작함
<p>2차 년도 (2002-2003)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 느타리버섯 자실체 형성관련 돌연변이체 선발 ○ 돌연변이 원인유전자의 분리와 구조결정 ○ 발생단계별 특이발현 유전자의 구조 분석 	<ul style="list-style-type: none"> · 병재배에 의한 돌연변이체의 자실체 유지 · 버섯 특성분석을 통한 변이선발 수행함 · 임성단핵 균주를 선발함 · 색변이체를 분리, 특성분석함 · 단백질 분석을 통한 색변이의 원인을 분석함 · DD-RT PCR을 이용한 변이원인 분석함 · Reverse northern분석을 통한 임성단핵균주의 변이 원인 분석 · Reverse northern blot 분석에 의한 특이발현 유전자들의 발현 profile을 제작함 · 72개 발생단계 특이발현 유전자를 선발함 · 발생단계별 특이발현 유전자들의 상동성 검색 및 구조 분석에 의한 기능을 유추함

연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
<p>3차 년도 (2003-2004)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 형질전환에 의한 자실체 형성관련 유전자들의 기능분석 ○ 자실체 형성관련 유전자와 표현형과의 관련성 규명 ○ 육종소재 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • beta tubulin promoter를 이용한 과리발현용 재조합 vector를 제작함 • 자실체 형성관련 유전자의 과리발현 형질전환을 수행함 • 형질전환체의 표현형을 검정 중 • 느타리버섯의 8개 발생단계에서의 16,000개 EST 분석의 완료 • 4,397개의 unigene 분석 및 yeast database의 검색을 통한 유전자 기능 분석함 • 농진청 농생물 유전체 정보센터에 database 구축함 • 색변이체의 육종소재로 이용함 • 형질전환체 및 돌연변이체의 육종소재로의 이용을 위한 균주 제작

2. 연구 개발 목표의 달성도 및 기술발전의 기여도

본 연구과제의 연구개발 목표는 느타리버섯에서의 형질전환 체계 확립하고, 돌연변이체의 제작 및 선발을 수행하여, 육종소재를 개발하며, 8개 발생단계에서의 대량 유전자 분리, EST 분석 및 발생 단계에서의 특이적인 유전자의 선발과 분석을 통한 느타리버섯의 자실체 형성기작에 대한 분자 유전학적 수준의 이해를 목표로 하고 있다.

우리는 이러한 목표의 달성을 위해 우선적으로 대량의 유전자의 분리 및 염기서열 분석에 많은 역량을 투여하였다. 대량 유전자를 분석하기 위해서는 각 발생단계에 대한 cDNA library 및 genomic library를 우선 제작하였다. 이렇게 제작된 library들은 이 후의 연구에서도 매우 유용하게 사용될 중요 산물임이 틀림없다. 대량의 유전자들은 많은 노력과 비용이 소요 되에도 불구하고, 본 과제를 통해 16,000개의 방대한 data로서 분리되었으며, 컴퓨터 프로그램을 이용한 unigene의 분리 및 상동성 분석을 수행하였다. 또한 기능별 분류를 수행하여 대량 유전자에 대한 기능을 유추할 수 있도록 하였다. 이렇게 분석된 data는 농진청 농생물 유전체 정보센터를 통해 database를 구축하는 성과를 이루었고, 이 database는 느타리버섯 및 버섯류의 연구발전을 위해 일반적으로 공개되었다.

느타리버섯의 형질전환은 진균류의 형질전환과 동시에 발전이 되어 왔고, 그 관심은 점차적으로 증가되고 있는 상황이다. 과제 개시의 시점에서는 형질전환의 체계가 본 연구팀에서 개발한 영양요구주에 의한 체계가 우선적이었으나, 점차적인 기술개발을 통해 항생제 (carboxin) 저항성 형질전환 체계가 새롭게 개발되고, 새로운 체계의 우수한 유용성에 따라 본 과제로 도입하게 되었다. 기존의 계획대로 수행된 형질전환체계로부터 최적의 조건을 확립하였고, 새로운 기술의 도입은 일본 연구자의 협조로 수행이 가능하게 되었다. 또한 임성단핵 균주의 도입은 형질전환 기술을 한 단계 높이는 계기가 되었다고 할 수 있다. 마찬가지로 과제 개시의 시점에서는 임성단핵 균주의 불안정성으로 인해 사용이 불가능하였으나, 지속적인 개발을 통해 안정적 형질의 숙주로 사용될 균주를 개발하여 그 체계를 완성하였다.

돌연변이의 제작은 주로 UV 조사를 통해서 수행되었다. 이러한 작업은 버섯 균주의 특성상 매우 어려운 일이 아닐 수 없으나, 다수의 균주를 다루는 기술의 축적으로 가능하였다고 할 수 있다. UV가 조사되어 분리된 돌연변이체의 개수는 6,000개에 달하며, 모든 균주는 버섯 특성분석표에 의해 분석이 되었다. 이렇게 분석된 raw data는 이 후의 필요에 따라 사용이 가능할 중요한 근거 자료가 될 것이다. 다수의 변이체 균주에 대해서 우리는 형질의 변화가 확인한 버섯 균주 및 육종연구에 유용할 수 있는 균주를 선발하였고, 보고하였다. UV를 매개로한 돌연변이체의 선발과 동시에 자연 돌연변이의 선발에도 많은 노력을 기울였다. 그 중 우리는 형질전환 체계를 향상

시키는 균주로서 임성단핵 균주를 선발하였고, 현재도 더 안정적이며, 우수한 품질의 버섯을 지속적으로 선발하고 있다. 또한 색변이체의 선발은 아직 목표가 없고, 체계화 되지 않은 품종개발에 머무르는 국내 버섯 품종 개발 체계를 향상시킬 수 있는 중요한 균주의 획득의 의미로서 매우 중요한 성과를 얻었다고 할 수 있다. 색변이체는 현재 중요한 버섯 균주로서 육종연구가 진행이 되고 있다.

선발된 돌연변이체들은 유전적인 변화에 의해서 이루어졌다. 이러한 유전적 변이에 대한 원인의 검증은 학문적인 목적으로도 사용되는 방법이며, 나아가 품종 개발의 측면에서도 품종의 보호를 위해 사용될 표지의 개발을 위한 매우 중요한 분석이다. 현재로서는 변이 원인에 대한 전체적인 스크리닝이 가능하다. 그러므로 우리는 다양한 변이원인을 탐색하는 분자유전학적 방법을 적용하였다. 색변이체는 주로 최종 산물의 수준에서 원인 탐색이 가능한 단백질 분석법을 사용하였고, 다양한 생체 내 기작에 의한 유발이 예상되는 돌연변이 균주에 대해서는 다수의 유전자를 대상으로 분석하는 DD-RT PCR과 reverse northern 법을 사용하였다. 이에 우리는 다수의 변이 원인 관련 유전자 및 프로테오미를 선발하였다.

자실체 형성에 대한 생체 기작의 이해는 버섯의 재배자와 버섯 연구자에게는 최대의 관심사이다. EST 분석을 통해 분석된 다수의 유전자에 대해서 제일 먼저 자실체 형성기작을 밝히기 위한 목적으로 연구를 수행하였다. 느타리버섯의 자실체 형성 과정을 5개 단계로 세분화하여 reverse northern 분석을 수행함으로써, 1차 EST 분석 과정에서 분리된 1,500개 unigenes에 대해서 각 발생단계에서의 발현 profile을 제작하였다. 이렇게 제작된 profile은 자실체 형성 뿐만 아니라 포자의 형성, 성분화, 세포 신호 전달 기작 등 다양한 연구 목적으로 이용이 가능한 중요한 data이다. 많은 분자유전학적 연구는 기초적인 data의 부재로 연구가 어려움을 겪는 상황에서 본 과제를 통해 분석된 유전자 발현의 profile은 발생과정에서 일어나는 다양한 생리적인 작용에 대한 기작을 분석하는 reference data로서의 기능을 충실하게 수행할 것이며, 이것이 느타리버섯 연구에서의 빠른 성과를 가져올 것은 분명하다. 본 연구를 통해 우리는 느타리버섯 연구의 매우 귀중한 기초 연구 자료를 확립하였다고 평가할 수 있다.

각 단계에서 특이적으로 발현되는 유전자는 발생단계에서 제작된 1,500개 유전자의 발현 profile을 기초로 선발하였다. 41개의 액체정치배양 균사체 특이 발현 유전자, 57개의 자실체 형성과정 특이 발현 유전자 그리고 36개의 포자 특이 발현 유전자를 선발하였다. 이 발생단계 특이 발현 선발유전자는 모두 reverse northern 분석에 의한 각 발생단계에서의 발현량이 매우 크거나 차이가 확연한 유전자를 탐색하여 선발한 것이므로, 발생단계와 매우 관련성이 있을 것이라 예상하였다. 선발 유전자 중에서는 다시 각 단계별로 8개, 37개, 7개씩의 더 유의한 발현 양상을 보이는 유전자를 선발하여, northern 분석과 RT-PCR 법으로써, 세밀한 발현 분석을 수행하였다. 발현 연구와 동시에, 선발된 후보 유전자는 기능분석의 프로그램에 따라 full length cDNA의

클로닝을 수행하였다. 이에 우리는 metalloprotease, CK-II alpa subunit, G protein beta subunit를 코딩하는 유전자의 full length cDNA를 클로닝하였고, 다수의 full length라 예상되는 unknown 유전자를 탐색 확보하였다. 이 중에서 metalloprotease 유전자는 느타리버섯에서의 기능을 밝히기 위한 형질전환 연구의 목적 DNA로 사용하였다.

다양한 방법에 의해 선발된 목적 유전자의 기능을 분석하기 위해서는 형질전환 기법이 도입되었다. 먼저 목적 유전자의 발현을 증가시킬 발현 vector를 제작하였다. 발현 vector에서 사용되는 promoter와 terminator는 느타리버섯의 모든 발생단계에서 지속적으로 발현되는 것이 증명된 beta tubulin 유전자를 사용하였다. Full length cDNA가 준비되고 발현량의 분석이 완료되어 자실체 형성과정에서 관련하여 기능을 수행할 것이라 예상되는 metalloprotease를 목적유전자로 정하여 발현 vector 시스템을 제작하였다. 이렇게 제작된 발현 vector는 느타리버섯의 임성단핵 균주에 형질전환하여, 느타리버섯에서의 metalloprotease의 기능을 분석 시도하였다. 이러한 목적 유전자에 대한 발현 분석을 통한 기능 유추 및 느타리버섯에서 발현 시스템의 확립과 형질전환의 체계는 다른 유전자에 대한 기능분석의 도구로써 사용될 수 있다.

결론적으로 본 과제는 다양한 돌연변이체의 분리를 통해 육종소재의 개발과 다양한 목적에 맞는 유전형질의 확보를 수행하였으며, 또한 대량의 유전자를 분리하여, 분자 유전학적 연구의 기틀을 마련하였다. 또한 진균류인 느타리버섯에서의 형질전환의 체계를 크게 발전시켜, 이상적 목표에 근접하게 하는 성과를 이루었다. 자실체 발생과정에서의 대량 유전자 발현 profile의 작성과 발현 vector 시스템의 확립 및 적용은 위의 다른 모든 연구와 더불어 느타리버섯과 진균류에서의 분자 유전학적 연구의 귀중한 토대를 마련했음이 평가되고 있으며, 우리나라의 국제적 연구 경쟁력을 한층 높이는 계기가 되었다고 할 수 있다.

3. 논문 발표 및 활용 실적

성과	명칭	저널·학회명	발표일	비고
논문발표	Comparative analysis of sequence expressed during the liquid-cultured mycelia and fruit body stages of <i>P. ostreatus</i>	Fungal Genetics and Biology	2002. 9.	p115-134
논문발표	Efficient transformation of <i>Pleurotus ostreatus</i> using REMI method	Mycobiology	2003. 3.	p32-35
포스터발표	Characterization of Dikaryotic Mutants from <i>Pleurotus</i> by UV Irradiation	한국균학회	2003. 5.	
포스터 발표	EST analysis and gene expression profile of <i>Pleurotus ostreatus</i>	한국분자세포생물학 생화학분자생물학회 학술대회	2003. 8.	
포스터 발표	Proteome analysis of different colored mushroom cap in <i>Pleurotus ostreatus</i>	한국미생물학회 연합 국제 학술대회	2003. 10.	
포스터 발표	Cloning of G-protein beta subunit gene and its mRNA expression during the development of <i>Pleurotus ostreatus</i>	한국미생물학회 연합 국제 학술대회	2003. 10.	
국내특허출원	느타리버섯의 자실체 형성방법	대한민국	2004. 1.	
논문발표	느타리버섯의 기내 자실체 형성 및 그 유도조건에 관한 연구	한국버섯학회	2004. 3.	p15-20
포스터 발표	A putative metalloprotease of <i>Pleurotus ostreatus</i> is regulated during developmental stages	한국균학회	2004. 5.	
논문 발표	Isolation and Characterization of Dikaryotic Mutants from <i>Pleurotus ostreatus</i> by UV irradiation	Mycobiology	2004. 6.	p32-35
논문 accepted	A putative metalloprotease of <i>Pleurotus ostreatus</i> is regulated developmentally and belonged to metzincin superfamily	FEMS microbiology letter	2004. 6.	접수번호: FEMSLE-04-06-0549
포스터 발표	Cloning of casein kinase gene and its mRNA expression during the development of <i>Pleurotus ostreatus</i>	극동아세아 버섯 심포지엄	2004. 9.	
포스터 발표	Isolation and characterization of homokaryotic fruiting strain in <i>Pleurotus ostreatus</i>	극동아세아 버섯 심포지엄	2004. 9.	

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 추가 연구의 필요성

본 연구과제에서 산출한 결과로써, 느타리버섯 연구의 기초적 성과를 마련하였다. 이러한 연구 결과의 기반으로 매우 많은 분야에서의 후발연구를 통한 활용이 기대된다. 버섯의 대량 유전자의 분리 및 database 구축은 전 세계적으로도 중요한 연구 기반이며, 많은 관심의 대상이 되고 있다. 그러하므로, 중요한 유전자의 분석 및 이용 연구의 수행은 필수적으로 진행되기를 바라고 있다. 느타리버섯 연구가 우리나라에서 선두적으로 이루어지는 점을 감안한다면, 국내에서 구축한 유전자원의 활용한 추가 연구는 국가적으로 지속적인 지원을 해야 할 것이다. 또한 느타리버섯이 최근 식용, 약용으로 주목을 받고 있는 측면에서, 다수로 선발된 유의한 유전자의 구조분석과 기능분석, 유전자 재조합을 통한 물질생산 및 생산 물질의 활성측정 등의 연구는 추가적인 연구로서 크게 요구된다고 할 수 있다.

임성단핵 균주를 이용한 형질전환에서 유용한 균주의 선발의 어려움은 모균주로 사용된 임성단핵 균주의 특성상의 단점에 기인한다. 일반적으로 단핵 균주의 성장이 느리며, 오염에도 약하다. 그러하므로 형질전환 후 자실체를 발생시키는 과정은 매우 조심스럽고, 지루한 시간이라고 할 수 있다. 이러한 문제의 해결을 위한 임성단핵 균주의 육성을 목적으로 한 추가적인 연구가 수행되어야 한다. 조금 더 안정적인 성장 특성을 가진 임성단핵주가 선발된다면, 기존에 확립한 형질전환 체계와 더불어 매우 완전한 형질전환 체계를 확립할 것이라 예상된다.

국내의 육종소재가 고갈되었으며, 품종의 개발이 어려운 가운데, 돌연변이 균주를 육종 소재로 이용한 연구는 추가적으로 추진해야할 연구이다. 최근 국내에서의 품종 개발은 제대로 추진되지 않으며, 단지 외국 품종의 불법적인 도입이 주를 이루는 것과, 신품종 보호 조약에 의해 외국의 고품종이 보호 받으며, 국내 품종이 도태될 가능성이 높은 것 등은 심각한 국가적 사안임을 정확히 판단되어야 하며, 대비되어야만 한다. 그러므로 국제적 경쟁력을 가지는 버섯 품종의 개발을 위한 추가적인 연구과제의 추진이 요구된다.

2. 타 연구에의 응용

느타리버섯에서 발현되는 특정 유전자의 염기서열과 발생단계에서의 발현 패턴이 분석되어 있으므로, 대량의 유전자 data와 발생단계에서의 발현 양상은 세포내 신호 전달과 같은 버섯의 대사기작을 분석하는 연구에서 쉽게 응용할 수 있다. 또한 버섯의 약리 효과를 판단하고, 그 약리 효능을 높이기 위한 분자 유전학적 연구에서는 유전자 염기서열을 이용하는 것은 물론이고, 느타리버섯의 형질전환 체계가 응용될 수

있다.

본 연구 과제를 통해 제작된 돌연변이는 버섯의 품종개발을 위한 연구에서 유용한 육종소재로써의 이용이 가능하다. 다양한 형질을 가지고 있으며, 기원이 확실한 버섯 돌연변이 균주를 응용하여 신품종을 개발한다면, 이 후 버섯 품종 보호를 위한 표지 인자의 개발에서도 본 과제에서 분석한 기초 자료를 이용할 수 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. Real time PCR 법에 의한 유전자 발현량의 세밀한 분석

유전자의 발현 분석법은 일반적으로 northern 분석이 사용되며, 가장 정확한 방법은 in situ hybridization 법으로 알려져 있다. 그러나 두 가지 모두 유해한 물질이나 형광물질의 사용과 고도의 실험기술이 요구되는 단점을 가진다. 이에 일반적으로 정량 PCR법이 이용되며, 더 정확한 결과를 얻기 위한 실험적인 대조군 등에 의한 보정이 수행된다. 그러나 본래의 mRNA의 양보다 매우 많은 양으로 증폭된 산물에 대한 발현량의 차이를 체크하는 면에서, 그리고 이론상 100%인 PCR 증폭과정에서의 효율을 100%라고 가정하는 것 등에서의 문제점이 항상 발현량을 분석하는 문제점으로 지적이 되고 있다. 본래의 mRNA를 분석하는 증폭의 단계없이 분석하는 방법과의 차이는 있을 수 있으나 PCR이 가지는 문제점을 최대한 보완하는 방법으로서, 그리고 femto gram의 수준까지 발현량을 체크하는 세밀한 방법으로서, 최근 real-time PCR 법이 개발되었다. PCR의 end-point의 문제, 효율의 문제, 감도의 문제를 최대한 해결하는 놀라운 능력의 분석법이라 할 수 있다.

2. RNAi에 의한 유전자 기능분석

사상성 진균류에서 세포 내로 삽입된 유전자가 계놈 내로 삽입될 확률은 30% 이하라는 보고가 있다. 그러므로 gene disruption을 통해 유전자의 기능을 밝히려는 목적으로 연구를 수행할 경우, homologous gene을 이용한 유전자의 치환 및 파괴는 쉽지 않은 실험이 될 것이다. 그러나 목적 유전자에 대해서 부분적인 두 가닥의 RNA 단편을 제작하여, 세포내로 삽입을 수행한다면, 아직은 잘 알려지지 않은 기작에 의해 목적 유전자의 기능이 멈춰지는 gene silencing 법이 개발되었다. 이 방법은 매우 간단하며, 그 효율이 매우 높은 방법이라 알려져 있어, 버섯에서의 이용이 요구되고 있는 실정이다.

3. Carboxin 저항성 형질전환을 이용한 균사상의 manganese peroxidase의 과다 발현.

본 연구과제에서 사용되었던 carboxin을 이용한 형질전환은 일본의 연구자에 의해서 확립된 느타리버섯의 항생제 저항성 형질전환 체계이다. 일본 연구자들은 본 형질전환 체계를 이용해서 느타리버섯의 난분해 물질의 분해능을 가지는 핵심 효소 중에 하나인 manganese peroxidase의 과다 발현을 수행하여 보고하였다. 이러한 연구는 느타리버섯의 주요 물질에 대한 발현을 유도하여 물질을 생산하며, 이용할 수 있는 연구의 기초가 될 수 있는 중요한 연구이다. 본 연구에서도 일본 연구자들의 협조에

의해 형질전환 체계가 확립되었다.

4. 느타리버섯의 혈전 용해능 및 metalloprotease 연구

약용의 느타리버섯으로서 국외에서 가장 주목받는 느타리버섯의 생리활성은 혈전 용해능이다. 주로 체코의 연구자들에 의해서 그러한 연구들이 수행되었다. 국내에서는 버섯의 metalloprotease를 분리하여, 혈전용해 활성을 분석하였다. 동물에서의 Metalloprotease는 생리적으로 세포의 성장 초기에 matrix를 분해하는 matrix metalloprotease, collagenase, 발생에 관련된 meprin 등으로 다양한 종류가 존재하고, 균류에서는 주로 pathogenesis와 관련하여 기능하는 것으로 알려져 있다. 또한 이들은 공동적으로 zinc binding motif를 가지며 그 주위의 아미노산 서열에 의해 매우 다양한 family로 분류되고 있다. 느타리버섯에서는 PoMEP가 이미 보고 되었으나, 그 생리적 기능이 제대로 알려져 있지 않고, 단지 부분적인 아미노산 서열만이 보고 되었다. 본 연구를 통해서도 느타리버섯의 metalloprotease인 PoMTP가 보고 되어, 기존의 담자균과 자낭균에서 보고된 metalloprotease와의 상동성으로 인해 eucolecins으로 분류하였다.

5. 해외 느타리버섯의 연구경향

국외의 버섯 연구는 주로 양송이버섯에 집중되어 있다고 볼 수 있다. 작물로서의 품질관리 및 재배요령 등의 연구 및 버섯의 발생과 형태 그리고 버섯의 선발표지인자 개발에 이르는 분자유전학적 연구에도 양송이버섯에 집중되어 연구가 이루어졌다. 이러한 양송이 버섯에 대한 지속적인 연구에 의한 성과는 자국의 양송이버섯 산업을 발전시키는 결과를 가져왔다.

느타리버섯의 대한 국외의 연구는 초기의 자실체에서 발현되는 물질에 대한 연구로부터 시작되어 느타리버섯의 난분해 물질의 분해효소인 laccase 및 manganese peroxidase의 활성연구가 지속적으로 수행되었으며, 느타리버섯의 형질전환 연구를 통한 물질 발현 연구는 일본연구자에 의해 수행되었다. 2000년대 초기에 들어서서는 느타리버섯 자체의 균사 생장, 품질 및 생산형질에 관여하는 게놈상의 QTL 분석이 스페인의 연구팀에 의해 진행되었다. 최근 느타리버섯의 식용만이 아닌 약리효능에 대해서도 유럽의 스페인, 그리스, 네덜란드, 독일, 체코 그리고, 미주국가에서는 멕시코, 아시아에서는 일본, 인도, 이스라엘 등의 나라에서의 연구가 수행되고 있다. 약용 느타리버섯에 대한 연구가 주로 중앙아시아와 동유럽 국가에 의해 이미 수행되고 있다는 점은, 이제 느타리버섯이 전 세계적으로 연구되는 중요한 작물로 인식되고 있다는 것을 알 수 있다.

제 7 장 참고문헌

2001 농업생명공학 연구집, 농업과학기술원

버섯 정보 신문

장현오, 박순애, 조우식, 김영수, 이경남, 장현국 2003, 내손으로 재배하는 가정버섯, 문예마당

성재모, 유영복, 차동열, 1998, 버섯학

이영석 (1996) “버섯산업의 정책과제와 육성방향” 한국농촌경제연구원.

유영복 1995, 고등균류의 원형질체 I, II

“선진농업국의 첨단농업기술 개발동향” (1996) 농촌진흥청 기술협력관실

Adam Kuspa and William F. Loomis (1992) " Tagging developmenal genes in Dictyostelium by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA" Proc.Natl.Acad.Sci. USA 89 : 8803-8807

Alois A.B. and H.W. Michael 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. Ann. Rev. Phytopatol. 24, 411-451

A.J.Moore, M.P.Challen and T.J.Elliott (1995) "Ballistics for delivery of transforming DNA to mushrooms" Mushroom Science XIV 63-70.

Beom-Gi Kim, Yumi Magae, Young-Bok Yoo, and Suk-Tae Kwon (1999) "Isolation and transformation of uracil auxotrophs of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*" FEMS Microbiology Letters 181:225-228

Chae Oh Lim, Ho Yeon Kim and Moo Je Cho (1996) " Expressed Sequence Tags of Chinese Cabbage Flower Bud cDNA" Plant Physio 111: 577-588

Cho YS, Kim JS, Crowley DE, Cho BG. Growth promotion of the edible fungus *Pleurotus ostreatus* by fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003 Jan 28;218(2):271-6.

C.C.de Souza, M.H. de S.Goldman, G.H. Goldman (2000) " Tagging of genes involved In multidrug resistance in *Aspergillus nidulans*" *Mol Gen Genet* 263:702-711

C.T. Ingold, H.J. Hudson, 1996, *The biology of Fungi*, Champman & Hall Solomon P. Wasser 2002, *International Journal of Medicinal Mushrooms*

G.S.W.Leung, M.Zhang, H.S.Kwan (2000) "Identification by RNA fingerprinting of genes differentially expressed during the development of the basidiomycete *Lentinus edodes*" *Mol Gen Genet* 262:977-990

Hajime Muraguchi, and Takashi Kamada (1999) " Isolation and characterization of developmental variants in fruiting using a homokaryotic fruiting of *Coprinus cinereus*" *Mycoscience* 40 : 227-233

Hajime Muraguchi and Takashi Kamada (1998) " The *ich1* gene of the mushroom *Coprinus cinereus* is essential for pileus formation in fruiting" *Development* 125 : 3133-3141

Hajime Muraguchi and Takashi Kamada (2000) " A Mutation in the *eln2* Gene Encoding a Cytochrome P450 of *Coprinus cinereus* Affects Mushroom Morphogenesis" *Fungal Genetics and Biology* 29 : 49-59

Honda Y, Matsuyama T, Irie T, Watanabe T, Kuwahara M. Carboxin resistance transformation of the homobasidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. *Curr. Genet.* 2000 Mar;37(3):209-12.

Irie T, Honda Y, Hirano T, Sato T, Enei H, Watanabe T, Kuwahara M. Stable transformation of *Pleurotus ostreatus* to hygromycin B resistance using *Lentinus edodes* GPD expression signals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001 Sep;56(5-6):707-9.

Irie T, Honda Y, Watanabe T, Kuwahara M. Homologous expression of recombinant manganese peroxidase genes in ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001 May;55(5): 566-70.

Irie T, Honda Y, Watanabe T, Kuwahara M. Efficient transformation of filamentous fungus *Pleurotus ostreatus* using single-strand carrier DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001 May;55(5):563-5.

J.J.R.Baars, H.J.M. Opden Camp, C vander Drift and G.G. Vogels (1995) "The Nitrogen Metabolism of *Agaricus bisporus*" *Mushroom Science* XIV 811-818.

J.D. Granada, K. Kertesz-Chaloupkova, M. Aebi, U.Kues (1997) "Restriction enzyme-mediated DNA integration in *Coprinus cinereus*" *Mol Gen Genet* 256:28-36

J.W. Deacon 1998, 균학개론, 월드사이언스

John Keon, Andy Bailey and John Hargreaves (2000) " A group of Expressed cDNA Sequences from the Wheat Fungal Leaf Blotch Pathogen, *Mycosphaerella graminicola*" *Fungal Genetics and Biology* 29:118-133

Lee SH, Kim BG, Kim KJ, Lee JS, Yun DW, Hahn JH, Kim GH, Lee KH, Suh DS, Kwon ST, Lee CS, Yoo YB. Comparative analysis of sequences expressed during the liquid-cultured mycelia and fruit body stages of *Pleurotus ostreatus*. *Fungal Genet. Biol.* 2002 Mar;35(2):115-34.

L.J.L.D Van Griensven 2000, *Mushroom Science* XV; Science and cultivation of edible fungi.

Marques De Souza CG, Zilly A, Peralta RM. Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. *J. Basic Microbiol.* 2002;42(2):83-90.

M.D.Ospina-Giraldo, P.D. Collopy, C.P. Romaine and D.J.Royse (2000) " Classification of sequences Expressed during the Primordial and Basidiome Stages

of the cultivated Mushroom *Agaricus bisporus*" Fungal Genetics and Biology 29:81-94

Palmieri G, Giardina P, Marzullo L, Desiderio B, Nitti G, Cannio R, Sannia G. Stability and activity of a phenol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1993 Jul;39(4-5):632-6.

Peng M, Sing NK, Lemke PA (1992) "Recovery of recombinant plasmids from *Pleurotus ostreatus* transformants" Curr. Genet 22:53-59

R.M.Hu, H.D.Song, J.L.Chen (2000) " Gene expression profiling in the human hypothalamus-pituitary-adrenal axis and full-length cDNA cloning" PNAS 97 : 9543-9548

Sack U, Gunther T. Metabolism of PAH by fungi and correlation with extracellular enzymatic activities. J. Basic Microbiol. 1993;33(4):269-77.

Shunwen Lu, Linda Lyngholm, Ge Yang, and B. Gillian Turgeon (1994) " Tagged mutations at the Tox1 locus of *Cochliobolus heterostrophus* by restriction enzyme-mediated integration" Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:12649-12653

Sugimoto HH, Barbosa AM, Dekker RF, Castro-Gomez RJ. Veratryl alcohol stimulates fruiting body formation in the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. FEMS Microbiol. Lett. 2001 Jan 15;194(2):235-8.

Sunagawa M, Magae Y. Transformation of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* by particle bombardment. FEMS Microbiol. Lett. 2002 Jun 4;211(2):143-6.

Tedesco G, Marchi A, Gerola FM. Immunological study on the wall proteins of different fruiting portions in *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer and *Agaricus bisporus* (Lge.) Sing. Bacteriol. Virol Immunol. 1983 Jul-Dec;76(7-12):200-6.

Toshitsugu Sato, Kazuo Shishido and Hitoshi Enei " Transformation of the Edible Basidiomycete *Lentinus edodes* by Restriction Enzyme-mediated Integration of

Plasmid DNA" Biosci.Biotechnol.Biochem. 62:2346-2350

Tsioulpas A, Dimou D, Iconomou D, Aggelis G. Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresour. Technol.* 2002 Sep;84(3):251-7.

Upadhyay RC, Hofrichter M. Effect of phenol on the mycelial growth and fructification in some of basidiomycetous fungi. *J. Basic Microbiol.* 1993;33(5):343-7.

U.Kues and Y.Liu (2000) " Fruiting body production in basidiomycetes" *Appli Microbiol Biotechnol* 54:141-152

Xi Chen, Michelle Stone and C.Peter Romaine (2000) " A Fruiting Body Tissue Method for Efficient *Agrobacterium*-Mediated Transformation of *Agaricus bisporus*" *Applied and Environmental Microbiology* 66 : 4510-4513

Yukio Murata and Takashi Kamada (1998) " Molecular Analysis of *pcc1*, a Gene That Leads to A-Regulated Sexual Morphogenesis in *Coprinus cinereus*" *Genetics* 149:1753-1761

Zilly A, Souza CG, Barbosa-Tessmann IP, Peralta RM. Decolorization of industrial dyes by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* producing laccase as the sole phenol-oxidizing enzyme. *Folia Microbiol (Praha)*. 2002;47(3):273-7.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.