

Internal Transcribed Spacer와 5.8S ribosomal DNA의 염기서열 분석에 의한 *Agaricus blazei*와 근연종에 대한 계통분류학적인 연구

김기영 · 하명규¹ · 이태호 · 이재동*

부산대학교 자연과학대학 미생물학과, ¹기초과학지원 연구소, 부산분소

*Agaricus*속의 계통분류학적 유연관계를 알아보기 위하여 Internal Transcribed Spacers (ITS) 1, 2와 5.8S rDNA에 해당하는 부위를 PCR기법으로 증폭하여 염기서열을 비교 조사하였다. 본 실험에 사용되었던 *Agaricus*속 5균주에 대한 염기서열을 분석한 결과, 이들 속은 크게 두 개의 군으로 분류되었다. 첫번째 분류군은 *Agaricus blazei* ATCC 76739, 현재 우리나라에서 배양중인 *Agaricus blazei*, *Agaricus arvensis* IMSNU 32049, 그리고 *Agaricus campestris* VPI-OKM 25665로 이루어 졌다. 특히, *Agaricus blazei* ATCC 76739와 현재 우리나라 농가에서 배양중인 *Agaricus blazei*는 ITS부위에서 5개의 염기서열에서 변이가 발견되었다. 이러한 변이는 지리적 또는 배양상의 변이로 인하여 특정염기서열에서 변이가 발생한 것으로 간주되므로 이들은 상호 동일종일 것으로 추정된다. 또한, *Agaricus arvensis* IMSNU 32049와 *Agaricus campestris* VPI-OKM 25665는 *Agaricus blazei*의 하위 분류군을 형성하였다. 두 번째 분류군은 *Agaricus bisporus* CH 3004와 *Agaricus porcillator* DUKE-J 173으로 이루어 졌다.

Key words □ *Agaricus*, ITS, Phylogeny, rDNA

*Agaricus blazei*는 처음에 브라질 상파울로의 교외에 위치한 피에다테지방에서 발견되었으며, 그곳의 평균기온은 낮에는 35°C까지 올라가고, 밤에는 20°C까지 떨어지는 등으로 일교차가 심하고, 습도는 80%정도로 일정하다(10). 일본에서는 Himematsutake로 알려진 *Agaricus blazei*는 식용과 약용이 동시에 가능한 것으로 더욱 유명하다. 특히, *Agaricus blazei*가 가지고 있는 α -1,6-glucan과 α -1,4-glucan은 cytotoxic T-cell과 마찬가지로 lymphocyte를 자극하여 면역증가효과를 나타내며(7), β -1,6-D-glucan-protein 복합체는 tumor cell의 저해제로 작용한다(5). 또한, 자실체 추출물은 강력한 항돌연변이원이며, 항박테리아 물질로서 작용하고(8), 피부염증, 설사, 고혈압 등의 치료에도 사용되고 있다(2). 이러한 이유로 최근에는 전세계적으로 *Agaricus blazei*의 소비가 급격히 증가하고 있음에도 불구하고, 이 종에 대한 분류체계는 형태학적인 특징이나 균사체의 모양에만 의존하고 있으므로 여러가지의 분쟁을 야기하고 있는 실정이다.

본 연구에서는 *Agaricus blazei*와 근연종간의 분자생물학적인 계통분류를 확립하기 위해서 ribosomal RNA gene(rDNA)의 염기서열을 분석하여 분류체계를 확립하는 새로운 해석 방법을 모색하였다(3, 9). 최근 rDNA의 염기서열은 중간 및 속간 계통분류에 많이 이용되고 있는데, 그 주된 이유는 모든 생물체내에 분포되어 있으며(6, 13), coding region과 non-coding region으로 나뉘어 종에 따라 수백내지 수천개의 반복배열이 존재할 뿐만 아니라, coding region은 염기배열이 보존적인 반면, non-

coding region은 속 및 종간에 다양성을 보이므로 계통분류에 적합한 분류지표로 간주되기 때문이다.

본 연구에서는 국내 농가에서 재배중인 *Agaricus blazei* 및 근연종과 GenBank에 등록된 균주와의 상호비교를 통하여 *Agaricus blazei*를 위시한 근연종간의 정확한 분류학적 위치를 분자생물학적 방법으로 규명하고자 하였으며, 이에 non-coding region인 ITS1, 2, 그리고 coding region인 5.8S rDNA의 염기서열을 조사, 비교하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 실험에 사용된 균주는 Table 1에 나타낸 바와 같다. 사용된 배지는 PDB(potato dextrose broth)로서 Difco Co.의 제품을 이용하였으며, 25°C에서 15일간 정치배양된 균사를 실험에 사용하였다.

Genomic DNA의 분리

각 균주의 genomic DNA의 분리를 위해서는 Heng 등(1)의 방법을 사용하였다. PDB에 배양한 배양물을 Whatman No.1 filter paper로 여과한 후 TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)로 세척하였다. 균체 1g당 0.5 ml extraction buffer(100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 40 mM EDTA), 0.3 ml benzyl chloride, 0.1 ml 10% SDS를 첨가하고, vortexing하여 50°C에서 30분간 열처리하여 다당체를 제거하였다. 상등액과 동량의 phenol : chloroform : isoamylalcohol(25 : 24 : 1)을 넣고 30분간 실온에서 방치한 후 15,000 rpm에서 15분간 원심분리한 상

*To whom correspondence should be addressed
Tel. 82-051-510-2269, Fax : 82-051-510-2269
E-mail jdllee@hyowon.cc.pusan.ac.kr

등액에 2.5배의 에탄올을 부가하여 DNA를 침전시켰다. 원심분리하여 침전된 DNA pellet를 70% 에탄올로 세척하고, 20 µl TE buffer(pH 8.0)에 용해시켜 사용하였다.

PCR(polymerase chain reaction) 및 primer합성

분리한 DNA로부터 ITS1과 5.8S, 그리고 ITS2 부분을 증폭하기 위해서 한국생공에서 구입한 20 µl용 PCR premix를 사용하였으며, 증폭을 위한 DNA농도는 40 ng으로 조절하였다. 반응용액은 PCR premix에 DNA 1 µl, forward primer(20 pmols/µl) 1 µl, reverse primer(20 pmols/µl) 1 µl, 3차 증류수 17 µl를 넣어서 섞은 후에 10초간 원심분리를 한 후 mineral oil 20 µl를 첨가하였다. PCR반응조건은 96°C에서 30초간 denaturation, 52°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 30회 반복하였다. ITS의 증폭에 사용된 primer는 ITS5F-ITS4R이 사용되었으며, primer들의 부착부위는 Fig. 1에 표시하였다.

PCR product의 정제

PCR product의 정제는 1% agarose gel에 PCR product를 100 V의 전압으로 25분간 전기영동한 뒤 EtBr로 염색하여 원하는 band를 잘라 QIAEX II Gel Extraction Kit로 다음과 같이 제조자의 설명에 따라 DNA를 용출하였다.

DNA를 함유하는 gel의 무게를 측정하고 3.0배의 buffer QX I 넣고 vortexing한 후 QX II 10 µl를 넣고 50°C에서, 10분간 반응시키는 동안 매 2분마다 vortexing하였다. 원심분리한 후에 상등액을 제거하고 1회의 500 µl buffer QX I, 2회의 500 µl PE buffer로 처리하여 상등액을 제거하고, 남은 pellet을 speed vac에서 건조시키고 20 µl 멸균수에 용해시켰다.

Auto-sequencing

PCR product를 ABI 377기종의 auto-sequencer를 사용하여 Dye Terminator Sequencing 기법으로 실시하였다. Terminator 반응액 4.0 µl, 정제한 PCR product 반응액 3 µl와 primer 5 pmol을 섞어 전체 반응액을 20 µl로 조절하였다. PCR의 반응조건은 96°C 10초, 50°C 5초, 60°C 4분의 과정을 25회 반복하여 실시하였다. Long range gel을 사용하였으며, 이 반응액을 90°C에서 열처리한 후 0°C에서 10분간 방치한 후에, loading하였다.

염기서열을 이용한 유연관계 분석 및 염기서열 등록

계통분류도의 작성을 위해 이용된 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 부위의 염기서열은 Clustal W 프로그램(12)을 이용하여 정렬(alignment)하였다. Distance matrix는 Jukes and Cantor(4)의 방법으로 작성되었으며, 계통분류도는 MEGA(Molecular Evolutionary Genetics Analysis)의 neighbor-joining program(11)에 의해 작성되었으며, *Phellinus linteus* KCTC 6190(accession number: AF077678)을 out-group으로 사용하였다. 또한, *Agaricus blazei* ATCC 76739(AF081464, AF080441), *Agaricus campestris*(AJ133389)와 *Agaricus pocillator*(U85308)의 동부위의 염기서열은 GenBank(National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov)로부터 얻었다. 결정된 ITS1-5.8S

Table 1. List of *Agaricus* species and their GenBank accession numbers

Fungal species	Species no ^{a)}	Database accession no.
<i>A. blazei</i>	CJ 3001	AF161013
<i>A. blazei</i>	JB 3002	-
<i>A. blazei</i>	JE 3003	-
<i>A. bisporus</i>	CH 3004	AF161014
<i>A. arvensis</i>	IMSNU 32049	AF161015

^{a)} CJ (CheungJeung Farming), JB (JamBi Farming), JE (JoEon Farming), CH (ChunCheun), and IMSNU (Culture Collection Center, Institute of Microbiology, Seoul National University). Hyphens represent identical sequences with that of *Agaricus blazei* CJ 3001.

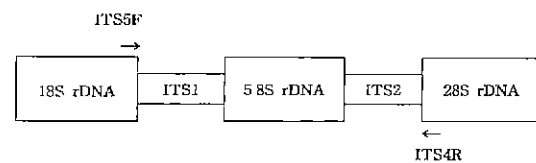


Fig. 1. Map of the ribosomal DNA region containing ITS1, ITS2 and 5.8S rDNA genes. Arrows indicate positions of the primers used for PCR and sequence analysis.

rDNA-ITS2 염기서열은 GenBank에 등록하였으며, 등록번호(accession number)는 Table 1에 나타난 바와 같다.

결과 및 고찰

ITS1-5.8S rDNA-ITS2 영역의 구조분석 및 계통분석

고등균류의 rDNA gene cluster는 Fig. 1과 같으며, 본 실험에서 증폭된 부위는 18S rDNA와 28S rDNA의 사이에 존재하였다. 실험에 사용된 전체 종의 염기서열의 길이는 688 bp-731 bp 사이의 분포를 보였다(Table 2). 결정되어진 염기서열의 길이가 가장 긴 *Agaricus blazei*는 731 bp이고, 길이가 가장 짧은 *Agaricus bisporus*는 688 bp이었으며, *Agaricus arvensis* IMSNU 32049는 692 bp의 길이를 나타내었다. 청정농산, 잠비농산, 조은농산에서 재배중인 *Agaricus blazei*는 염기길이가 모두 731 bp로 동일하였다. 일반적으로 ITS1이 ITS2보다 84-92 bp 정도 길었으며, 그 중에서도 *Agaricus blazei*의 ITS1부위가 307 bp로 가장 길고, ITS2 염기서열의 길이보다는 92 bp 길게 나타났다. 염기서열의 길이에서 가장 적은 차이를 나타낸 종

Table 2. Nucleotide length of ITS1, ITS2, and 5.8S rDNA sequences

Fungal species	ITS1	5.8S rDNA	ITS2	Total
<i>A. blazei</i> CJ 3001	307	209	215	731
<i>A. blazei</i> JB 3002	307	209	215	731
<i>A. blazei</i> JE 3003	307	209	215	731
<i>A. bisporus</i> CH 3004	281	211	196	688
<i>A. arvensis</i> IMSNU 32049	284	208	200	692

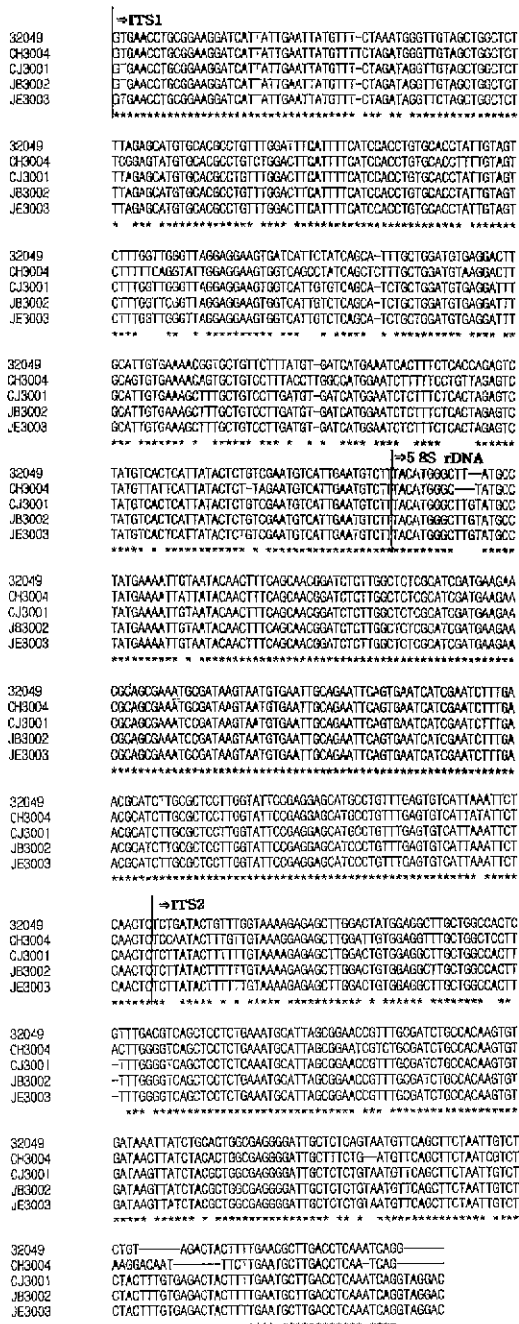


Fig. 2. Alignment of ITS1, 5.8S rDNA and ITS2 sequences. The alignment was generated by the multiple alignment program Clustal W using a gap weight of 5.0 and a gaplength weight of 0.1. Hyphens represent gaps and asterisks represent bases identical to those of the top sequence.

은 *Agaricus arvensis* IMSNU 32049로 84 bp의 차이를 보였다. 또한, 5.8S rDNA에서는 *Agaricus arvensis*가 208 bp로 209 bp인 *Agaricus blazei*나 210 bp인 *Agaricus bisporus*보다는 각각 1-2 bp 짧은 것이 확인되었다(Fig. 2).

Fig. 3의 계통도에서 나타난 바와 같이 각각의 균종이 독립된 cluster를 형성하는 점으로 비추어 볼 때, *Agaricus*속은 진화적

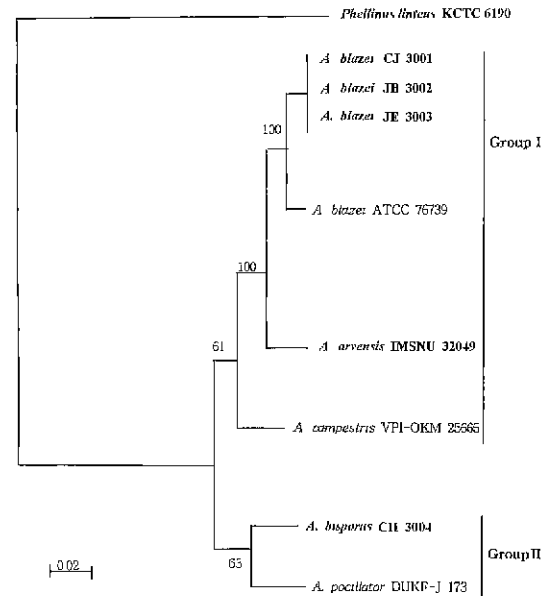


Fig. 3. Phylogenetic tree showing the relationship between *Agaricus blazei* and related taxa. The bar represented 2 nucleotide substitutions per 100 nucleotides in ITS1, 2 and 5.8S rDNA sequences. Bootstrap probabilities were indicated at branch points.

으로 비교적 유연관계가 먼 종들이 하나의 속을 이루는 것으로 추정된다. *Agaricus blazei* ATCC 76739와 현재 우리나라의 농가에서 배양중인 *Agaricus blazei*는 ITS1, 2 영역의 길이에서 5 bp의 차이를 보였으나, 하나의 cluster를 이루었다. 이러한 정도의 차이는 동일종으로 간주되지만 이들 상호간에는 배양상, 또는 지리적인 격리로 인한 변이가 발생된 것으로 추정된다. 또한, *Agaricus arvensis* IMSNU 32049가 본 실험에 사용된 균주 중에서 *Agaricus blazei*와 가장 유연관계가 가까운 종으로 subcluster를 형성하였으며, *Agaricus campestris*와 함께 하나의 분류군(Fig. 3의 Group I)을 이루었다. *Agaricus bisporus*는 Genbank에 등록되어 있는 *Agaricus pocillator* DUKE-J173과 또 다른 분류군(Fig. 3의 Group II)을 형성하였다.

ITS1-5.8S rDNA-ITS2 영역의 염기서열을 이용한 상동성 분석

본 실험에 사용된 3종 5균주에 대한 균주간 염기서열은 Fig. 2와 같으며, 이들 *Agaricus*속 균종들 상호간의 염기서열은 균주 간 89.9% 이상의 상동성을 보여주었다. 현재 우리나라에서 배양중인 *Agaricus blazei*는 100% 염기서열이 일치하는 동일종으로 모두 농업진흥청에서 분양된 것으로 생각된다. *Agaricus blazei*의 subgroup을 형성하는 *Agaricus arvensis* IMSNU 32049는 *Agaricus blazei*와 비교했을 때, GenBank에 등록되어 있는 어떤 종보다도 높은 95.5%의 염기서열 상동성을 나타내었다. 이들과는 다른 cluster를 형성하는 *Agaricus bisporus*는 *Agaricus blazei*와는 91.8%, *Agaricus arvensis* IMSNU 32049와는 89.9%로 유연관계가 멀게 나타났다. 염기서열의 상동성을 토대로하여 현재 우리나라에서 재배중인 *Agaricus blazei*와 미국

Table 3. Similarity index matrix based on ITS1-5.8S rDNA-ITS2 sequences

	1	2	3	4
1				
2	100			
3	100	100		
4	95.8	95.8	95.8	
5	91.8	91.8	91.8	89.9

1. *A. blazei* CJ 3001; 2. *A. blazei* JB 3002; 3. *A. blazei* JE 3003; 4. *A. arvensis* IMSNU 32049; 5. *A. bisporus* CH 3004.

의 공시 균주센터에 보관중인 *Agaricus blazei* ATCC 76739를 비교한 결과 이들은 상호간에 99.4%의 상동성을 나타내는 동일 종으로 간주되지만 지리적, 배양적 조건, 또는 환경적인 영향으로 인하여 다소간의 변이가 발생된 것으로 추정된다.

적 요

*Agaricus*속의 계통분류학적 유연관계의 조사를 위해 3종 (*Agaricus blazei*, *Agaricus bisporus*, *Agaricus arvensis*) 5균주의 ITS1-5.8S rDNA-ITS2에 해당하는 부위를 PCR로 증폭하여 염기서열을 결정하였다. 현재 NCBI에 등록되어 있는 3종 (*Agaricus blazei* ATCC 76739, *Agaricus campestris* VPI-OKM 25665, *Agaricus pocillator* DUKE 1173)과 out-group으로는 *Phellinus linteus* KCTC 6190(Korean Collection for Type Cultures, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon, Korea)의 밝혀진 염기서열과 비교, 조사하였다.

*Agaricus*속 중에서 본 실험에서 결정되어진 전체 염기서열의 길이는 688-731 bp로 분포하였고, 종간 상동성은 89.9-95.8%로 조사되었다. 계통도를 분석한 결과는 각각의 종이 독립된 군(cluster)을 형성하였고, 현재 동일한 염기서열을 가지는 우리나라에서 재배 중인 *Agaricus blazei*와 미국의 균주센터의 *Agaricus blazei* ATCC 76739는 종간 변이를 나타내며, 동일한 군을 형성하였다. 이는 원산지인 브라질의 자생균주를 인위적으로 배양하면서 생긴 지리적 또는 배양상의 변이로 인하여 특정염기서열에서 변이가 발생한 것으로 간주되므로 이들은 상호 동일 종일 것으로 추정된다.

감사의 글

본 논문은 (1998)년 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 수행된 연구결과입니다.

참고문헌

1. Heng, Z., F. Qu, and L.H. Zhu. 1993. Isolation of genomic

DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucl. Aci. Res.* **21**, 5279-5280.

2. Higaki, M., F. Eguchi, and Y. Watanabe. 1997. A stable culturing method and pharmacological effects of the *Agaricus blazei*. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **110**, 98-103.

3. Hseu, R.S. and H.H. Wang. 1998. A new system for identifying cultures of *Ganoderma* species. *In mushroom Science XIII*. Vol 1. Michael J. Maher. A. A. Balkema, Netherland. p. 442

4. Juke, T.H. and C.R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules, pp. 21-132. In H. N. Munro (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press. New York, N. Y.

5. Kawagishi, H., R. Inagake, T. Mizuno, K. Shimura, H. Ito, T. Hagiwara, and T. Nakamura. 1989. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydr. Res.* **186**(2), 267-273.

6. Michell, J.I., P.J. Robert, and S.T. Moss. 1995. Sequence or Structure? A short review on the application of nucleic acid sequence information to fungal taxonomy. *Mycologist* **9**(2), 67-75.

7. Mizuno, M., M. Morimoto, K. Minato, and H. Tsuchida. 1998. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**(3), 434-437.

8. Osaki, Y., T. Kato, K. Amamoto, J. Kubo, and T. Mizaki. 1994. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a Basidiomycete *Agaricus blazei*. *Yakugaku Zasshi*, **114**(5), 342-350.

9. Park, D.S., J.M. Sung, Y.S. Kim, Y.B. Yoo, Y.J. Ryu, and D.Y. Cha. 1994. Analysis of interspecific allozyme variation within the genus *Ganoderma* by polyacrylamide gel isoelectric focusing. *RDA. J. Agr. Sci.* **36**(1), 212-221.

10. Park, S.G., Y.G. Park, and S.G. Choi. 1997. Mushroom: *Agaricus blazei*. Seo Il Press. 11-20.

11. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Bio. Evol.* **24**: 189-204.

12. Thomson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequences alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Aci. Res.* **22**. 4673-4680.

13. White, T., J. Burns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In PCR protocols: a guide to methods and applications*. Eds. Innis, M. A. D. H. Gelfand. J. J. Sninsky, and T. J. White. Eds. Innis, Academic Press, San Diego, California. p. 482.

(Received July 7, 1999/Accepted August 25, 1999)

ABSTRACT : Phylogenetic Analysis of *Agaricus blazei* and Related Taxa by Comparing the Sequences of Internal Transcribed Spacers and 5.8S rDNA

Gi-Young Kim, Myung-Gyu Ha¹, Tae-Ho Lee, and Jae-Dong Lee* (Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea, ¹Korea Basic Science Institute, Pusan 609-735, Korea)

Molecular systematics of *Agaricus* species was investigated on the base of the sequences of the internal transcribed spacer(ITS) regions in ribosomal DNA (rDNA). The sequences of the ITS region in 5 species and two group of *Agaricus* genus were resolved. In the phylogenetic trees, the species generally divided into two subclusters, referred to here as the group I and group II. The group I consisted of *Agaricus blazei* ATCC 76739, *Agaricus blazei* species cultivated in Korean farmings, *Agaricus arvensis* IMSNU 32049 and *Agaricus campestris* VPI-OKM 25665. Between *Agaricus blazei* ATCC 76739 and the *Agaricus blazei* species cultivated in Korean farmings had the variation in the 5 nucleotide on the ITS regions. These varieties were presumed the variation by the geographic and cultivated conditions. In addition the subgroup of group I was formed by *Agaricus arvensis* IMSNU 32049 and *Agaricus campestris* VPI-OKM 25665. The group II included *Agaricus bisporus* CH 3004 and *Agaricus pocillator* DUKE-J 173.