

Pleurotus속 균주들의 미토콘드리아 플라스미드 특성

김은경 · 구용범 · 차동렬¹ · 하영철 · 노정혜*

서울대학교 자연과학대학 미생물학과, 서울대학교 분자미생물학연구소
¹농촌진흥청 농업기술연구소 균이과

백색 부후균인 *Pleurotus ostreatus*의 4가지의 균주로부터 각각 10.2 kb와 7.2 kb(NFFA 2), 두 종류의 10.2 kb(NFFA 4001), 11.2 kb(NFFA 4501), 10.2 kb와 11.2 kb(KFCC 11635) 크기의 미토콘드리아 플라스미드들을 분리해 내었다. NFFA 2의 변종인 NFFA 2m1과 NFFA 2m2에서는 이들 플라스미드가 관찰되지 않았다. 분별 원심분리에 의해 얻은 미토콘드리아에서 핵산을 추출하여 agarose gel에서 전기 영동시키면 플라스미드가 관찰되지 않았으나 proteinase K를 처리하고 핵산을 추출하여 전기 영동한 결과 이들 플라스미드가 관찰되었는데, 이는 플라스미드 상에 단백질이 결합되어 있음을 시사한다. Proteinase K를 처리한 플라스미드 DNA와 exonuclease를 반응시킨 결과, 이들 플라스미드들은 5' 말단에 단백질이 결합된 선형 이중가닥 DNA의 구조를 가진 것을 확인하였다. 각 플라스미드들의 상호관계를 조사하기 위하여 Southern hybridization을 수행한 결과 최소 3가지 종류의 플라스미드들로 분류할 수 있었다. 이중 한 그룹(group 1)은 모든 *P. ostreatus* 균주들에서 공통적으로 발견되었다. *Pleurotus*속의 5가지 다른 종(*P. cornucopiae*, *P. florida*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju*, *P. spodoleucus*)의 균주들로부터도 미토콘드리아 플라스미드들을 분리하였다. 이들은 한 균주당 1~4개까지의 플라스미드를 가지며, 플라스미드의 크기는 7.2 kb~14 kb 범위에 있었다. *P. ostreatus*의 NFFA 2의 10.2 kb(group 1) 플라스미드와 hybridization을 수행한 결과 *P. cornucopiae* ASI 2011을 제외한 다른 모든 균주들이 유사한 염기서열의 플라스미드를 갖고 있음을 알았다.

KEY WORDS □ *Pleurotus ostreatus*, mitochondrial plasmid, linear plasmid, terminally associated protein, *P. cornucopiae*, *P. florida*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju*, *P. spodoleucus*

일부 새균과 식물, 특히 병원성 식물 그리고 많은 곰팡이류에서 염색체외적 선형 DNA가 발견된 바 있다. 이러한 선형 DNA 플라스미드는 *Streptomyces* spp.에서 발견되었고(9), 이어 효모의 일종인 *Kluyveromyces lactis*에서 발견되었다(7). *Streptomyces*에서 분리한 선형 플라스미드 pSLA1, pSLA2는 서로 다른 균주에 존재하면서 lankacidin이라는 항생제를 형성한다(9). *Kluyveromyces lactis*의 경우에는 pGK1 1, pGK1 2의 두 가지 선형 DNA 플라스미드가 공존하면서 *Saccharomyces cerevisiae*나 *S. italicus* 또는 다른 *Kluyveromyces* spp.에 대한 killer성을 나타내는 것으로 알려져 있다(7). 또한 *K. lactis*의 선형 플라스미드는 플라스미드가 존재하는 위치가 핵이나 미토콘드리아가 아닌 세포질이라는 점에서는 *S. cerevisiae*의 2 μm 원형 플라스미드와 같지만, 선형과 원형이라는 구조적인 면에서는 구별된다. 옥수수(*Zea mays*)의 경우에는 미토콘드리아 안의 두 개의 선형 DNA 플라스미드가 분리되었으나 그들의 구조에 대한 증거가 불분명하다(15). 그외 식물체 중 *Brassica campestris*에서도 선형 플라스미드의 존재가 보고되었다(5). 곰팡이의 경우 자낭균류인 *Ascobolus immer-sus*(6)와 *Claviceps purpurea*(21), 병원성 식물 곰팡이

인 *Rhizoctonia solani*(8)와 *Fusarium oxysporum*(13)에도 선형 플라스미드가 존재함이 보고되었다. *Neurospora*의 미토콘드리아에는 원형의 형태인 *Mauriceville*과 *Varkud* 플라스미드(1), 선형의 형태인 *Kalilo* 플라스미드(23)가 존재한다.

이들 염색체외적 선형 DNA들은 대부분 cohesive end나 terminal repetition, hairpin 구조나 DNA 5' 끝쪽에 단백질이 공유결합적으로 결합된 구조 등의 특장을 가지는데, 이는 복제시 DNA 중합효소가 primer를 필요로 하기 때문이다. 특히 5' 끝에 단백질이 결합되어 있고, 양 말단이 반복서열로 되어 있는 선형 플라스미드의 구조는 *Bacillus subtilis* phage φ 29(11, 18), *streptomyces*의 플라스미드(10)와 포유동물 바이러스인 adenovirus(2, 16) 등에서 관찰되었는데, 이는 단백질이 DNA 5' 끝에 결합함으로써 3'-OH 기를 제공하여 DNA 합성시 primer의 역할을 하는 것으로 제시되었다(16). 또, 대부분의 곰팡이나 식물 플라스미드의 경우 모성유전(maternal inheritance)을 나타내는데, 이는 이러한 플라스미드가 미토콘드리아 내에 존재하기 때문인 것으로 풀이된다. 자낭균류인 *Claviceps purpurea*의 미토콘드리아 선형 플라스미드의 경우 ORF1과 ORF2에서 각각 잠재적

DNA 중합효소와 RNA 중합효소가 생성되고, 그의 4개 정도의 소수 ORF들이 존재하는데 이들의 단백질 산물에 대한 보고는 아직 되어 있지 않다(12). 담자 균류인 *Agaricus bitorquis*의 선형 플라스미드 경우에도 RNA 중합효소와 바이러스성 DNA 중합효소의 유전자를 가지는 것으로 보고되어 있다(17). *Neurospora intermedia*의 *Kalilo* 선형 플라스미드는 미토콘드리아 genome안으로 끼어들어가 불규칙한 성장과 살지 못하는 포자(conidia)를 형성하거나 cytochrome aa₃와 b의 소실을 유발함으로써 *Neurospora*의 노화 (senescence)를 일으킨다(3, 23).

느타리 버섯(*Pleurotus ostreatus*)의 미토콘드리아 플라스미드에 대한 Yui 등(22)의 보고에 의하면 10.0 kb와 9.4 kb의 선형 플라스미드가 야생형 균주의 미토콘드리아 내에 공존하는데 각 DNA 5' 끝에 단백질이 결합되어 있으며 hybridization 실험 결과 이들 간에는 서로 유사성이 없고 핵이나 미토콘드리아 게놈 DNA와도 유사성이 없다고 알려져 있다. Nakaya 등(14)은 일본산 *P. ostreatus*의 32가지 균주들을 위 두개의 플라스미드가 함께 있는 균주들과 각각 하나의 플라스미드만을 가지는 균주들로 분류하였다.

본 논문에서는 국내에서 분리한 6가지의 *Pleurotus ostreatus* 균주들에서 미토콘드리아 플라스미드를 분리하여 이들간의 상호 유사성을 살펴보고, *Pleurotus* 속속속하는 5가지 다른 종의 균주들에서 미토콘드리아 플라스미드들의 존재와 이들의 유사성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

균주와 배양

실험에 사용한 균주들은 한국산림조합연합회에서 분양받은 느타리버섯 *Pleurotus ostreatus* (strains NFFA 2, NFFA 4001, NFFA 4501), 한국종균협회에서 분양받은 *P. ostreatus*(KFCC 11635), 농촌진흥청이 보관하고 있는 여름 느타리버섯 *P. sajor-caju* (ASI 2139), 사철 느타리버섯 *P. florida*(ASI 2013), 산 느타리버섯 *P. pulmonarius*(ASI 2091), 노랑 느타리버섯 *P. cornucopiae*(ASI 2011), 참 느타리버섯 *P. spodoleucus*(ASI 2104)이다. *P. ostreatus* NFFA 2 ml과 2m2는 서울대학교 강사육 교수 연구실로부터 분양 받았다. Malt 한천평판배지(1l 수용액 당 malt extract 10g, dextrose 10g, bactopectone 5g, yeast extract 5g, 2% agar)에서 배양한 균주를 직경 0.8 cm 콜크 천공기(corkborer)로 8개의 원형시료(plug)를 따서 100 ml malt 배지에서 28°C로 3일간 진탕배양 후, Omni-mixer(Omni international)로 마쇄하여 그 현탁액을 2%(v/v)되게 malt 액체배지에 접종하여 28°C에서 5일간 진탕 배양하였다.

미토콘드리아의 분리

Specht 등(20)과 Yui 등(22)의 방법을 변형하여

사용하였다. Malt 배지 2l를 배양하여 얻은 균체(중량 약 120g)를 거어조로 수확하여 미토콘드리아용 삼투 안정 용액(0.4 M sucrose, 0.05 M KH_2PO_4 , 0.025 M EDTA(pH 8.0), pH 6.8) 200 ml를 넣은 Omni-mixer에 옮겨 얼음에서 5,000 rpm으로 1분간 마쇄하였다. 마쇄된 균체에 삼투 안정 용액 20 ml를 더 넣어 잘 섞은 후 4°C에서 1,770g로 15분간 원심분리하여 균체파편을 제거하였다. 상등액을 4°C에서 21,000g로 25분간 원심분리하여 미토콘드리아 침전물을 얻었다. 미토콘드리아의 수득을 높이기 위하여 1,770g에서 얻어지는 균체로 위와 같은 방법을 4회 반복하였다. 얻어진 미토콘드리아 침전물을 미토콘드리아 용해 용액인 TNE(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 4~8 ml에 녹여 -20°C에 보관하였다.

미토콘드리아 플라스미드의 순수 분리

Yui 등(22)의 방법을 변형하여 사용하였다. TNE 용액의 미토콘드리아를 실온으로 녹인 후 lauryl sarcosine(Sigma)을 2% 되게 넣어 잘 섞은 다음 0°C에서 3시간 방치 후, 65°C에서 30분간 열처리하였다. 실온까지 용액을 식힌 후 1,100g에서 미량원심분리기로 10분간 2회 원심분리하여 침전물을 제거한 후 상등액에 α -amylase를 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 25°C에서 1시간 처리하였다. 이후 RNase A(Sigma)를 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 37°C에서 1시간 처리하였다. Proteinase K(Boehringer Mannheim)는 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 37°C에서 1시간 반응시켰다. 미토콘드리아 게놈 DNA로부터 플라스미드를 순수 분리하기 위하여 CsCl-bisbenzimidazole 밀도 구배 원심분리를 수행하였다. 8 ml의 DNA 용액에 7.84g의 CsCl을 넣어 섞은 후 1 mg의 bisbenzimidazole(Sigma)을 넣고 Beckman L7-55 원심분리기의 Ti50 rotor를 사용하여 15°C에서 10,500g로 40시간 초원심분리를 실시하였다. 긴 파장 UV lamp로 DNA의 분리를 확인한 후 가장 위에 형성된 플라스미드 DNA 띠를 25 게이지 주사바늘로 뽑아내었다. 플라스미드 용액을 4 M NaCl로 포화된 이소프로필알콜로 5회 추출하고 1.5배 부피의 멸균된 증류수로 희석한 다음 2배 부피의 에탄올을 넣어 4°C에서 30분간 방치시켰다. 4°C 미량원심분리기에서 12,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 DNA 침전물을 얻은 후 70% 에탄올로 씻고 말린 후 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0) 400 μl 에 녹였다. 그 후 페놀/클로로포름으로 1회 추출하고, 클로로포름/이소아밀알콜로 1회 추출하여 다시 에탄올 침전시킨 다음, TE 완충용액 40 μl 에 녹여 -20°C에 보관하여 사용하였다.

제한효소 및 exonuclease의 처리와 확인

사용한 제한효소들은 *EcoRI*(KOSCO), *Bgl/II*(Boehringer Mannheim), *EcoRV*(Boehringer Mannheim), *HindIII*(KOSCO) 등이며, 각 회사에서 제시한 적정조건으로 반응시켰다. 반응이 끝난 후 0.8% agarose gel(TBE 완충용액)에서 반응용액을 전기영

동시켜 ethidium bromide로 염색하여 절단양상을 확인하였다.

Exonuclease III(NEB)와 lambda exonuclease (BRL)는 각각 10 U/ μ g DNA와 1 U/ μ g DNA의 농도로 37°C에서 1시간 반응시켰다.

Southern hybridization

사용한 모든 탐침은 Sambrook 등(19)의 방법을 따라 random primer와 *E. coli* Klenow 효소를 이용하여 [α - 32 P] dATP로 표지하였다. 탐침용 DNA인 NFFA 2의 10.2 kb와 7.2 kb 플라스미드는 0.6% agarose gel(TBE 완충용액)에서 오려낸 해당 gel 조각을 dialysis bag에서 전기용출하여 사용하였다. DNA 시료를 0.6~0.8% agarose gel(TBE 완충용액)에서 전기영동한 후 변성 용액(0.5 M NaOH, 0.15 M NaCl)에 1시간 담갔다가 증류수로 잠깐 씻은 후 중화 용액(0.5 M Tris-HCl, pH 7.7, 0.15 M NaCl)에서 1시간 동안 담가두었다가 이 gel을 3 MM Whatman 여과지위에서 gel 건조기로 60°C로 1시간 말렸다. Hybridization bottle(Hybaidd)에 말린 gel을 펴 넣고 hybridization 용액(5×SSC, 0.1% SDS, 100 μ g 변성된 Herring sperm DNA 조각) 6 ml를 넣은 다음 탐침을 10⁶~10⁷ cpm/ml이 되도록 넣고 65°C에서 18시간 동안 hybridization시켰다. 2×SSC, 0.1% SDS 용액으로 실온에서 5분씩 4회 세척하고 0.1×SSC, 0.1% SDS 용액으로 실온에서 5분씩 1~2회 세척하였다. 세척 후 X-ray film과 intensifying screen을 덮어 -70°C에서 20~24시간 감광시켰다.

결과 및 고찰

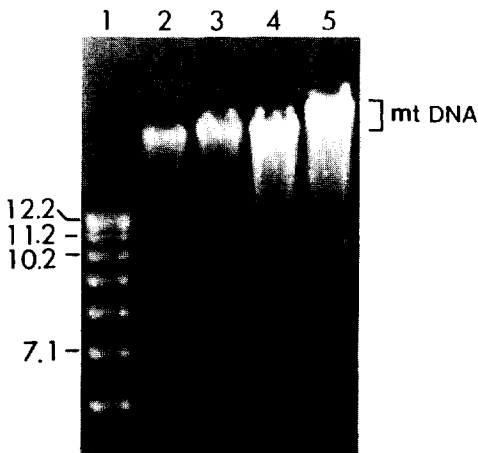


Fig. 1. The presence of mitochondrial plasmids in various strains of *P. ostreatus*.

Lane 1: 1 kb ladder DNA marker with sizes shown in kb. Lane 2~5: mitochondrial DNAs from NFFA 4001 (lane 2), NFFA 4501 (lane 3), NFFA 2 (lane 4), KFCC 11635 (lane 5).

P. ostreatus 균주들로부터 분리한 미토콘드리아 플라스미드 DNA들

*P. ostreatus*의 6가지 균주 NFFA 2, NFFA 4001, NFFA 4501, KFCC 11635, NFFA 2m1, NFFA 2m2에서 미토콘드리아를 분리하여 용해시킨 다음 proteinase K를 처리하여 agarose gel 상에서 전기영동을 실시한 결과 NFFA 2m1과 NFFA 2m2를 제외한 4개의 균주들에서 미토콘드리아 게놈 DNA 외의 플라스미드 band를 관찰하였다(Fig. 1). 플라스미드의 크기는 NFFA 4001의 경우 10.2 kb, NFFA 4501의 경우 11.2 kb이고, NFFA 2의 경우 10.2 kb와 7.2 kb 두 가지의 DNA가 존재하고 KFCC 11635의 경우 10.2 kb와 11.2 kb 두 종류의 DNA가 존재하였다. Proteinase K를 처리하지 않은 경우에는 이러한 플라스미드 band들을 전혀 관찰할 수 없었다(결과 미 제시).

플라스미드의 구조 분석

Proteinase K의 처리에 따라 플라스미드 band가 관찰되는 현상은 *P. ostreatus*의 미토콘드리아 플라스미드도 *Brassica* 플라스미드(5)나 여러 다른 선형 플라스미드들처럼 5' 말단에 단백질이 결합되어 있는 구조를 가지는 것을 시사한다(4, 22, 23). 이러한 가능성을 확인해 보기 위하여, 5'→3'의 exonuclease 활성을 가진 lambda exonuclease와 3'→5'의 exonuclease 활성을 가진 exonuclease III를 proteinase K로 처리하여 순수분리한 *P. ostreatus* 플라스미드들과 반응시켰다. 그 결과, exonuclease III에 의해 *P. ostreatus*의 플라스미드들이 완전히 분해되고, lambda exonuclease에 의해서는 전혀 영향을 받지 않음을 관찰하였다(Fig. 2). 따라서 본 결과로부터 이

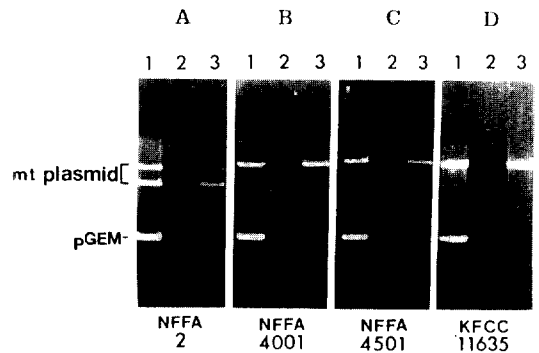


Fig. 2. Degradation of mitochondrial plasmids by exonuclease treatment.

Plasmid DNAs from NFFA 2 (panel A), NFFA 4001 (panel B), NFFA 4501 (panel C) and KFCC 11635 (panel D) were treated with either exonuclease III (lanes 2) or lambda exonuclease (lanes 3). DNAs in lanes 1 were not treated with exonucleases. All the DNA samples contained linearized pGEM 7Z(+) DNA for reaction control.

Table 1. Restriction fragments obtained from mitochondrial plasmids of four *P. ostreatus* strains.

fragments	NFFA 2				NFFA 4001				NFFA 4501				KFCC 11635			
	EI	EV	BII	HIII	EI	EV	BII	HIII	EI	EV	BII	HIII	EI	EV	BII	HIII
1	6.79	4.10	5.10	6.10	5.58	10.20	3.33	10.20	5.58	4.10	4.10	7.10	5.58	11.20	3.69	6.30
2	6.10	2.91	4.10	5.33	3.00	4.10	3.00	6.10	2.69	3.94	3.00	4.92	3.40	4.10	3.33	6.10
3	2.00	*2.31	3.33	4.62	2.50	2.75	2.52	4.62	1.65	2.31	2.52		*3.00	2.60	3.00	5.58
4	1.66	1.50	2.60	2.56	2.48	2.31	2.45		0.59	1.11	0.95		2.00	2.31	2.45	4.92
5	0.59	1.45	2.52		1.94	1.11	1.75						1.65	1.11	2.12	
6		1.11			1.65		*1.33						0.85		1.75	
7					0.85		1.15						0.77		1.33	
8					0.77		0.95						0.59		1.15	
9					0.59		0.69								0.69	
10					0.56		0.66								*0.63	
11							0.63									
Total	17.14	15.69	17.65	18.61	19.92	20.47	19.79	20.92	10.51	11.46	10.57	12.02	20.84	21.32	20.77	22.90

The size of fragments was represented as kb.

EI, *EcoRI*; EV, *EcoRV*; BII, *BglII*; HIII, *HindIII*

*: doublet DNA fragments

들 플라스미드들이 선형 이중가닥 DNA이며, 각각의 단선 5' 끝에 단백질이 결합되어 있는 구조임을 알 수 있었다.

제한효소들에 의한 플라스미드들의 절단 양상

분리된 플라스미드들의 유전적 구조를 알아내고, subcloning을 수행하기 위하여 여러 제한 효소들을 처리하였다. Agarose gel 상에서 전기영동을 수행한 후 결정된 각 플라스미드의 절단양상은 Table 1과 같다. NFFA 4001은 절편들의 크기와 종류를 고려하면 1개의 DNA가 아니라 10.2 kb의 같은 크기를 가진 2개의 플라스미드를 가진 것으로 여겨진다. 또한 비슷한 크기를 갖는 플라스미드간의 절단 양상은 다르게 나타났다. 예를 들면 10.2 kb를 가지는 NFFA 2와 NFFA 4001의 경우 *EcoRI*과 *BglII* 처리시 NFFA 4001에서 보여지는 DNA 절편들이 NFFA 2에서는 보이지 않았다. KFCC 11635의 경우에도 NFFA 4001, 4501, 2와는 다른 절단 양상을 보였다. 하지만 각 제한 효소처리시 같은 크기의 DNA 절편들이 일부 포함되어 있는 것으로 보아 4개의 균주에서 분리된 플라스미드간의 유사성을 배제할 수는 없다.

P. ostreatus 미토콘드리아 플라스미드간의 유사성 비교

분리된 플라스미드들의 DNA 크기를 비교해 보았을 때 비슷한 크기의 플라스미드가 서로 다른 균주에 분포되어 있었기 때문에 이들간의 유사정도를 알아보기 위하여 hybridization 실험을 수행하였다. NFFA 4001의 2개의 10.2 kb 플라스미드를 탐침으로 하여 Southern hybridization을 수행한 결과 NFFA 2의 7.2 kb를 제외한 모든 다른 플라스미드들과 hybridization되는 것으로 나타났다(Fig. 3B). NFFA 4501의 11.2 kb 플라스미드를 탐침으로 하여 hybridization시켰을 때에는 NFFA 2의 7.2 kb 및 KFCC 11635의 11.2 kb와 hybridization되지 않는

것으로 나타났다(Fig. 3C). NFFA 2의 10.2 kb 플라스미드를 탐침으로 hybridization시켰을 때에도 NFFA 2의 7.2 kb와 KFCC 11635의 11.2 kb와는 hybridization되지 않았다(Fig. 3D). NFFA 2의 7.2 kb 플라스미드를 탐침으로 hybridization시켰을 때에는 NFFA 2의 10.2 kb와도 아주 약하게 hybridization되는 것으로 보이나, 자기자신과의 hybridization이 가장 두드러지게 나타났다(Fig. 3E).

위 결과에서 NFFA 4001의 2개의 플라스미드는 NFFA 2의 7.2 kb를 제외한 다른 플라스미드와 염기서열상으로 유사한 부분이 많으나, 2개의 플라스미드는 서로 다른 염기서열을 가진 것으로 보인다. 이는 2개의 섞인 NFFA 4001 플라스미드를 탐침으로 할 경우, KFCC 11635의 10.2 kb, 11.2 kb와 모두 유사성을 가진 것으로 나타나, 실제로 KFCC 11635의 두 플라스미드 간에는 유사성이 없다는 결과로부터 추정할 수 있다(Fig. 3C, 3D). NFFA 2의 10.2 kb와 NFFA 4501의 플라스미드는 KFCC 11635의 11.2 kb와 NFFA 2의 7.2 kb를 제외한 다른 플라스미드와 유사한 부분을 가지며, NFFA 2의 7.2 kb는 다른 플라스미드와 상대적으로 유사성이 적은 것으로 사료된다. KFCC 11635의 11.2 kb 플라스미드는 NFFA 4001의 두 플라스미드 중 1개와 유사성을 갖고 다른 플라스미드들과는 유사성이 없는 것으로 여겨진다. 이상의 결과로부터 *P. ostreatus* 균주들에는 유전적 유사성의 관점에서 적어도 3가지의 플라스미드 group이 분포되어 있음을 발견하였다. 이중 1가지 group(group 1)은 연구한 모든 균주들에 존재하는 공통적 염기 서열을 가지고 있음을 확인하였다(Table 2).

*Pleurotus*속의 다른 종 균주들의 미토콘드리아 플라스미드

*Pleurotus*속에 속하는 5가지 다른 종의 균주로부터

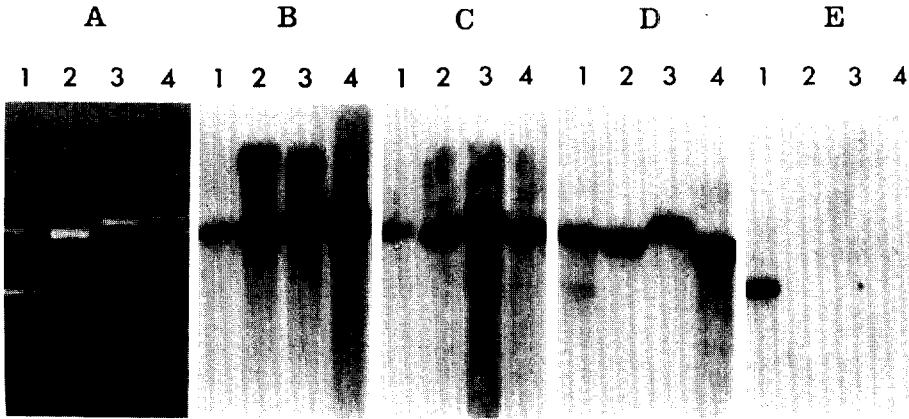


Fig. 3. Southern hybridization analysis of mitochondrial plasmids from *P. ostreatus*. Panel A: agarose gel electrophoresis before hybridization, lanes 1-4 contains plasmid DNAs from NFFA 2 (lane 1), NFFA 4001 (lane 2), NFFA 4501 (lane 3), KFCC 11635 (lane 4). Panel B-E: electrophoresed plasmid DNAs as in panel A were hybridized with radiolabeled probe, 10.2 kb DNAs from NFFA 4001 (panel B), 11.2 kb DNA from NFFA 4501 (panel C), 10.2 kb DNA from NFFA 2 (panel D) and 7.2 kb DNA from NFFA 2 (panel E).

Table 2. Homology groups of mitochondrial plasmids from four strains of *P. ostreatus*.

	NFFA 2	NFFA 4001	NFFA 4501	KFCC 11635
group I	10.2 kb	10.2 kb	A	10.2 kb
group II		10.2 kb	B	11.2 kb
group III	7.2 kb			

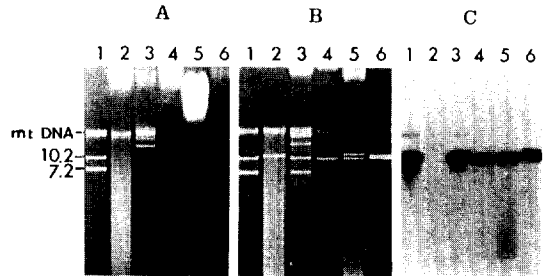


Fig. 4. The presence of mitochondrial plasmids in 5 different *Pleurotus* spp.

Panel A: agarose gel electrophoresis of mitochondrial DNAs without proteinase K treatment except lane 1. The size of the plasmids were shown in kb. Panel B: same as panel A except proteinase K treatment. Panel C: DNAs in the agarose gel of panel B was hybridized with radiolabeled 10.2 kb DNA from NFFA 2. Lane 1~6: mitochondrial DNAs from *P. ostreatus* NFFA 2 (lane 1), *P. cornucopiae* ASI 2011 (lane 2), *P. florida* ASI 2013 (lane 3), *P. pulmonarius* ASI 2091 (lane 4), *P. sajor-caju* ASI 2139 (lane 5), *P. spodoleucus* ASI 2104 (lane 6).

미토콘드리아를 분리하고 이로부터 플라스미드를 추출하였다. 이 경우에도 proteinase K 처리 후에 플라스미드 band를 관찰할 수 있었다(Fig. 4B). 특히하게 *P. florida*의 경우 proteinase K를 처리하지 않아도 2개의 새로운 플라스미드가 관찰되었다(Fig. 4A와 4B 비교). 이 두 플라스미드는 exonuclease III 처리시에도 그대로 남아있는 것으로 보아 선형이 아닌 원형의 플라스미드인 것으로 여겨진다(결과 미제시). *P. ostreatus* 미토콘드리아 플라스미드와의 염기서열상의 유사정도를 알아보기 위해 group I의 플라스미드인 NFFA 2의 10.2 kb DNA를 탐침으로 이용하여 Fig. 4 B의 gel에 Southern hybridization을 수행한 결과, *P. cornucopiae* ASI 2011을 제외한 모든 균주들에서 약 10~11 kb 크기의 플라스미드들과 강하게 hybridization하는 것으로 나타났다(Fig. 4C). 따라서 *P. ostreatus*의 4개의 균주에서 분리한 미토콘드리아 플라스미드들은 *Pleurotus*속의 다른 균주들의 플라스미드와도 상당히 유사한 염기서열을 가진 것으로 보인다.

이들 플라스미드를 Yui 등(22)과 Nakaya 등(14)이 보고한 일본산 *P. ostreatus*의 플라스미드와 비교해 볼

때, 존재하는 DNA의 크기와 수, 그리고 제한효소 절단 양상이 상이하다. 따라서 이들 플라스미드의 염기서열이 본 논문에서 보고하는 플라스미드들의 염기서열과 매우 다를 것이라 생각된다. 또한 이들이 보고한 *P. ostreatus*는 모두 1~2개의 플라스미드를 가지는 반면, 본 연구에서는 미토콘드리아 플라스미

드를 전혀 가지고 있지 않은 *P. ostreatus*(NFFA 2m1, 2m2)를 확인하였다. 이 두 균주는 NFFA 2의 돌연변이체로서, 자실체를 형성하지 못한다는 보고가 있다(강사욱 교수, 사적 의견교환). 따라서, *P. ostreatus*의 미토콘드리아 플라스미드의 기능이 자실체 형성과 연관되어 있으리라는 추측을 가능케 한다. 이에 대한 직접적 증거는 없으므로, 이 연관성에 대한 생리, 유전학적인 연구가 필요하다.

사 사

본 논문의 연구는 과학재단 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학연구센터) 연구비의 지원을 받아 수행되었다. 균주를 제공한 강사욱 교수와 본 논문의 결과에 대해 유익한 토론을 해 준 최형태, 김영호 교수들에게 감사사를 드린다.

참 고 문 헌

- Akins, R.A. and A.M. Lambowitz, 1990. Analysis of large deletions in the *Mauriceville* and *Varkud* mitochondrial plasmids of *Neurospora*. *Curr. Genet.* **18**, 365-369.
- Carusi, E.A., 1977. Evidence for blocked termini in human adenovirus DNA. *Virology* **71**, 380-394.
- Court, D.A., A.J.F. Griffiths, S.R. Kraus, P.J. Russell, and H. Bertrand, 1991. A new senescence-inducing mitochondrial linear plasmid in field-isolated *Neurospora crassa* strains from India. *Curr. Genet.* **19**, 129-137.
- Daniel, R.C., and L.W. Parks, 1988. Purification and characterization of plasmid-like DNA from the antimycotic producing fungus, *Scytalidium flavo-brunneum*. *Plasmid* **20**, 175-181.
- Erickson, L., W.D. Beversdorf, and K.P. Pauls, 1985. Linear mitochondrial plasmid in *Brassica* has terminal protein. *Curr. Genet.* **9**, 679-682.
- Framcpos Francou, 1981. Isolation and characterization of a linear DNA molecule in the fungus *Ascobolus immersus*. *Mol. Gen. Genet.* **184**, 440-444.
- Gunge, N., A. Tamaru, F. Ozawa, and K. Sakaguchi, 1981. Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *J. bacteriol.* **145**, 382-390.
- Hashiba, T., Y. Homma, M. Hyakumachi, and I. Matsuda, 1984. Isolation of a DNA plasmid in the fungus *Rhizoctonia solani*. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 2067-2070.
- Hayakawa, T., T. Tanaka, K. Sakaguchi, N. Otake, and H. Yonehara, 1979. A linear plasmid-like DNA in *Streptomyces* spp. producing lankacidin group antibiotics. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **25**, 255-260.
- Hirochika, H., K. Nakamura, and K. Sakaguchi, 1984. A linear DNA plasmid from *Streptomyces rochei* with an inverted terminal repetition of 614 base pairs. *EMBO J.* **3**, 761-766.
- Ito, J., 1978. Bacteriophage ϕ 29 terminal protein: Its association with the 5' termini of the ϕ 29 genome. *J. Virol.* **28**, 895-904.
- Katrin, G.-U. and P. Tudzynski, 1992. Transcripts and translation products of a mitochondrial plasmid of *Claviceps purpurea*. *Curr. Genet.* **21**, 249-254.
- Kistler, H.C. and S.A. Leong, 1986. Linear plasmidlike DNA in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum f. sp. conglutinans*. *J. bacteriol.* **167**, 587-593.
- Nakaya, M., T. Sato, F. Terami, J. Ohinata, J. Aoshima, and H. Nishikawa, 1991. Distribution of mitochondrial plasmid-like DNA in *Pleurotus ostreatus*. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **32**, 291-297.
- Pring, D.R., C.S. Levings, III, W.W.L. Hu, and D.H. Timothy, 1977. Unique DNA associated with mitochondria in the "S"-type cytoplasm of male-sterile maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 2904-2908.
- Rekosh, D.M.K., W.C. Russel, A.J.D. Bellett, and A.J. Robinson, 1977. Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell* **11**, 283-295.
- Robinson, M.M., J.C. Royer, and P.A. Horgen, 1991. Homology between mitochondrial DNA of *Agaricus bisporus* and an internal portion of a linear mitochondrial plasmid of *Agaricus bisporus*. *Curr. Genet.* **19**, 495-502.
- Salas, M., R.P. Mellado, E. Vinuela, and J.M. Sogo, 1978. Characterization of a protein covalently linked to the 5'-termini of the DNA of *Bacillus subtilis* phage ϕ 29. *J. Mol. Biol.* **119**, 269-291.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1987. Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press, New York.
- Specht, C.A., C.C. Dirusso, C.P. Novotny, and R. C. Ullrich, 1982. A method for extrating high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Anal. Biochem.* **119**, 158-163.
- Tudzynski, P., A. Duvell, and K. Esser, 1983. Extrachromosomal genetics of *Claviceps purpurea*. I. Mitochondrial DNA and mitochondrial plasmids. *Curr. Genet.* **7**, 145-150.
- Yui, Y., Y. Katayose, and K. Shishido, 1988. Two linear plasmid-like DNA elements simultaneously maintained in *Pleurotus ostreatus*. *Biochimica et Biophysica Acta.* **951**, 53-60.
- Vierula, P.J., C.K. Cheng, D.A. Court, R.W. Humphrey, D.Y. Thomas, and H. Bertrand, 1990. The *kalilo* senescence plasmid of *Neurospora intermedia*. *Curr. Genet.* **17**, 195-201.

(Received April 3, 1993)

(Accepted April 12, 1993)

ABSTRACT: Characterization of Mitochondrial Plasmids from *Pleurotus* spp.

Kim, Eun Kyoung, Yong Bom Koo, Dong-Yeul Cha¹, Yung Chil Hah, and Jung-Hye Roe (Department of Microbiology and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul 151-742, Korea. ¹Applied Mycology and Mushroom Division, Agricultural Sciences Institute, R.D.A. Suweon 441-707, Korea)

Plasmid DNAs were detected from the mitochondrial fraction of four strains of white-rot fungus, *Pleurotus ostreatus*. The size of the plasmids were 10.2 and 7.2 kb in strain NFFA 2, 10.2 kb in NFFA 4001, 11.2 kb in NFFA 4501, and 10.2 and 11.2 kb in KFCC 11635. The two strains, NFFA 2m1 and NFFA 2m2, which are mutant derivatives of NFFA 2, did not contain any plasmids. The cleavage by proteinase K indicated that these plasmids have DNA ends associated with proteins. In digestion with proteinase K, all the plasmids remained resistant to lambda exonuclease which hydrolyzes DNA from 5' ends and were sensitive to exonuclease III which hydrolyzes DNA from 3' ends. This suggests that the plasmids are linear double-stranded DNA and the terminal proteins are covalently linked to 5' ends of plasmids. In order to find relationship between these plasmids, hybridization of plasmids by each separate plasmid DNA was done. The result indicated that the plasmids can be classified into at least 3 groups. Plasmids of group I were present in all the *P. ostreatus*. More mitochondrial plasmids were detected in *P. cornucopiae*, *P. florida*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju*, and *P. spodoleucus*. The size of plasmids ranged between 7.2 kb and 14 kb. All the species except *P. cornucopiae* contained plasmids of approximately 10 kb which hybridized with the 10.2 kb plasmid (group I) of *P. ostreatus* NFFA 2.