

## *Pleurotus ostreatus* 미토콘드리아의 7.2 kb 선상 플라스미드 염기서열 분석

윤혜숙 · 구용범\* · 노정혜<sup>1</sup>

인제대학교 의생명공학대학 생명공학부, 서울대학교 자연과학대학 생명과학부<sup>1</sup>

*Pleurotus ostreatus*에서는 10.2 kb와 7.2 kb의 미토콘드리아 선상 플라스미드 DNA가 존재함이 발견되었다. 이 플라스미드 DNA의 양쪽 5' 말단에는 단백질이 공유 결합되어있다고 알려져 있다. 최근에 *P. ostreatus*의 10.2 kb 미토콘드리아 선상 플라스미드 DNA를 다른 곰팡이의 선상 플라스미드 DNA에 존재하는 open reading frame(ORF)와 비교 분석하여 *Podospira anserina*의 플라스미드 pAL2의 DNA polymerase 및 RNA polymerase 암호부위와 유사성이 있음이 확인되었다. 본 연구에서는 7.2 kb 선상 DNA를 *Hind*III로 잘라서 얻은 2 조각의 절편(4.7 kb, 2.3 kb)을 클로닝하고 염기 서열을 분석하였다. 클로닝된 7 kb 절편에는 3개의 ORF, 즉 ORF1(2982 bp, 993 amino acids), ORF2(2703 bp, 900 amino acids), ORF3(771 bp, 256 amino acids)가 존재함을 확인하였다. 또한, 이들의 ORF를 분석한 결과, DNA polymerase와 RNA polymerase 암호부위와 유사성이 있음을 확인하였다.

**Key words** □ mitochondrial linear plasmid, open reading frame, *P. ostreatus*

선형 플라스미드는 *Streptomyces* spp.(12)를 비롯한 일부 세균, *Kluyveromyces lactis*(11) 등의 효모에도 존재하며, 옥수수 등의 식물(23,24), *Ascobolus immersus*(7), *Claviceps purpurea*(5) 등의 곰팡이류 등의 mitochondria에서도 발견되었다. 이러한 선형 플라스미드의 양쪽 5' 말단에는 단백질이 공유결합으로 부착되어 있으며, 양 말단이 수백 염기쌍의 반복 서열로 되어 있다. 이러한 특징은 *Adenovirus*(1,4)와 *Bacillus subtilis*의 phage  $\phi$ 29(16, 29)등과 같은 바이러스 계통의 특징과 일치한다.

선형 DNA들은 DNA 중합효소를 이용한 복제시 5' 말단에 공유 결합되어 있는 단백질을 primer로 이용한다. *Adenovirus*와 *B. subtilis* phage  $\phi$ 29등과 같은 바이러스들은 말단 단백질의 serine 이나 threonine 같은 잔기의 OH group이 DNA 복제시에 시발체로서 기능을 하는 protein priming에 의해 DNA가 복제된다(29). 현재, 이들 선형 플라스미드 DNA의 기원이나 복제 기작 등에 관하여 정확하게 알려져 있지 않으며, 이러한 균주의 미토콘드리아 플라스미드들의 기능에 대해서도 알려진 바가 거의 없다. *C. purpurea*에 존재하는 미토콘드리아 염기서열로부터 추론된 아미노산 배열을 조사해 본 결과, DNA 중합효소와 RNA 중합효소의 보존서열이 있음이 밝혀진 바 있고(17,27), *Physarum polycephalum* 미토콘드리아 플라스미드의 오른쪽 말단부분에 DNA 중합효소의 보존서열이 있으며(31), *P. anserina* 미토콘드리아 플라스미드에는 DNA 및 RNA 중합효소 보존서열이 존재함이 알려졌다(14,15).

담자균류인 *Pleurotus* 속에 속하는 *P. ostreatus* (느타리 버섯)와

*P. florida* (사철 느타리 버섯)의 미토콘드리아 선형 플라스미드 DNA가 존재하고 있음이 이미 보고되었던 바 있고(19,32), 그 외 *Pleurotus* 속에 속하는 대부분의 다른 균주들도 미토콘드리아 내에 한 종류 이상의 선형 플라스미드 DNA가 존재하고 있는 것으로 밝혀져 있다(19). 이들의 선형 플라스미드들은 그 크기가 7-14 kb 정도이며, *P. ostreatus*와 *P. florida*에는 크기가 10.2 kb와 7.2 kb인 2 종류의 미토콘드리아 선형 플라스미드가 존재하며(19), 10.2 kb 플라스미드의 경우는 DNA와 RNA 중합효소 보존서열이 존재함이 밝혀져 있다(21).

본 연구에서는 *P. ostreatus*의 미토콘드리아 선형 플라스미드 중 7.2 kb 플라스미드의 염기서열을 분석하고 ORF를 조사하여 DNA 중합 효소와 RNA 중합 효소의 보존서열이 존재하는지 살펴보고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 플라스미드

*P. ostreatus* NFFA 2는 국립임업연구원에서 분양 왔으며, 클로닝에 사용한 플라스미드는 Promega 제품인 pGEM 7Z f(+) 플라스미드를 사용하였다.

형질전환 숙주 세포로 *E. coli* DH5 $\alpha$ 와 *E. coli* JM 109를 사용하였다.

#### 사용 시약 및 효소

Malt extract, yeast extract, agar, MacConky agar, tryptone 등은 Difco 제품을 사용하였고, peptone, dextrose, NaCl, NaOH, glacial acetic acid, EDTA, 100% 에탄올등은 일제 특급시약을

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel : 055-320-3266, Fax : 055-336-7706  
E-mail : mbkooyb@ijnc.inje.ac.kr

이용하였다. Sucrose, boric acid, acrylamide, urea, chloroform, N,N-methylenebisacrylamide, TEMED 등은 Merk 제품을 이용하였고, agarose, Trizma base, sodium lauryl sarcosine, bromophenol blue, xylene cyanol, SDS, ammonium persulfate, bisbenzimidazole와 MOPS 등은 Sigma 품을, HEPES는 Gibco 제품을 이용하였다.

그의 에탄올, 메탄올등 기타 일반 시약은 국내 시판 일급 이상의 분석용 시약을 이용하였으며, spin-column과 sephacryl S-400은 Promega에서 구입하여 사용하였다.

DNA 순수 분리를 위하여 Promega에서 Wizard Minipreps DNA Purification System과 Wizard Maxipreps DNA Purification System을 구입하여 사용하였으며, DNA 염기 서열 분석을 위한 단일방향 결손에는 Erase-a-Base System (Promega)을 이용하였다.

DNA 염기 서열 분석에는 Sequenase™ Version 2.0 DNA Sequencing Kit(USB)과 CircumVent™ Thermal Cycle Dideoxy DNA Sequencing Kit(NEB)을 구입 사용하였고, [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP (> 800 Ci/mmol)와 [ $\alpha$ - $^{35}$ S]dATP (> 1000 Ci/mmol) 등의 방사선 동위원소는 Amersham 제품을 사용하였다.

실험에 사용한 HindIII 및 T4 DNA polymerase 등 수식효소들은 Promega에서 구입하여 사용하였고, pronase E, amylase와 RNase A는 Sigma에서 구입하여 사용하였다. Sequencing용 primer는 SP6 primer와 T7 primer (Promega)와 주문 합성된 몇 종류의 oligomer (Bio-Synthesis Inc.)를 이용하였다.

### 미토콘드리아 선형 플라스미드의 순수 분리

Yui 등(32)의 방법에 따라 미토콘드리아 선형 플라스미드를 분리하였다. *P. ostreatus*는 Malt 한천배지(malt extract 10 g, dextrose 5 g, yeast extract 5 g, agar 1.5 g, chloramphenicol 34  $\mu$ g/ $\mu$ l)에서 한달 주기로 28°C에서 계대 배양하여 4°C에서 보관하고, 미토콘드리아 분리에 사용한 균사체는 Malt 한천 배지에서 배양한 균주를 직경 1.0 cm 코르크 천공기(cork borer)로 3 개의 원형 시료(plug)를 따서 200 ml Malt 액체 배지에서 28°C, 130 rpm으로 7일간 진탕 배양한 것(late log phase)을 사용하였다.

미토콘드리아 게놈 DNA로부터 플라스미드를 순수 분리하기 위하여 CsCl-bisbenzimidazole 밀도구배 원심 분리를 수행하였다. 3.5 ml의 DNA 용액에 bis-benzimidazole을 120  $\mu$ g/ml되게 넣고, CsCl를 1 g/ml 되게 넣고 녹인 다음, 초고속 원심분리기를 이용하여 300,000 $\times$ g로 15°C에서 15 시간 동안 초원심분리 하였다. 긴 파장 UV lamp로 DNA 분리를 확인한 후 가장 위에 형성된 플라스미드 DNA 띠를 1 ml 주사기를 이용하여 뽑아 내었다. TE(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) 완충용액에서 4°C로 하룻밤동안 투석한 다음, 에탄올 침전으로 농축하여 사용하였다.

### Agarose gel 전기영동에 의한 플라스미드 DNA 절편 회수

순수 분리한 선형 플라스미드를 각각 분리하기 위하여 0.7% Agarose gel에서 전기영동 하였다. *P. ostreatus*가 갖는 크기가 다른 2 종류 플라스미드 DNA(10.2 kb와 7.2 kb)중 7.2 kb 절편을 포함하는 Agarose gel을 절단 분리하여 QIAquick Gel

Extraction Kit(Qiagen)을 이용하여 주어진 실험 방법대로 DNA를 추출하였다.

### *P. ostreatus* 플라스미드 DNA의 클로닝

Agarose gel에서 분리한 7.2 kb 미토콘드리아 플라스미드 DNA로부터 양쪽 5' 말단에 붙어 있는 아미노산을 Escarmis 등(8)의 방법에 따라 제거한 다음, HindIII로 처리하여, HindIII와 SmaI로 처리된 pGEM7Z에 클로닝하였다.

### 형질전환체의 선별 및 플라스미드 DNA 순수 분리

형질전환체는 rapid screening 법(1)에 따라 플라스미드를 추출하고 0.7% Agarose gel에 전기영동 하여 선별하였다.

선별된 형질전환체로부터 플라스미드 DNA는 Wizard minipreps DNA purification system을 사용하여 주어진 방법대로 순수 분리하여 사용하였다.

### 단일방향 결손

염기서열 결정을 용이하게 하기 위하여 클로닝된 DNA의 연속 결손을 Erase-a-Base System을 이용하여 만들었다. 5' overhang을 생성하는 EcoRI 혹은 XhoI 등으로 절단하고, 3' overhang을 생성하는 SphI과 BstXI 등으로 절단한 다음, 주어진 방법대로 시행하였다.

### DNA 염기서열 분석

DNA 염기서열 분석은 주로 Sequenase™ Version 2.0 DNA Sequencing Kit을 이용하고, 이차구조 등으로 인하여 염기서열 분석이 어려운 부분은 CircumVent™ Thermal Cycle Dideoxy DNA Sequencing Kit을 이용하여 주어진 방법대로 수행하였다.

## 결 과

### *P. ostreatus* 미토콘드리아 선형 플라스미드의 클로닝

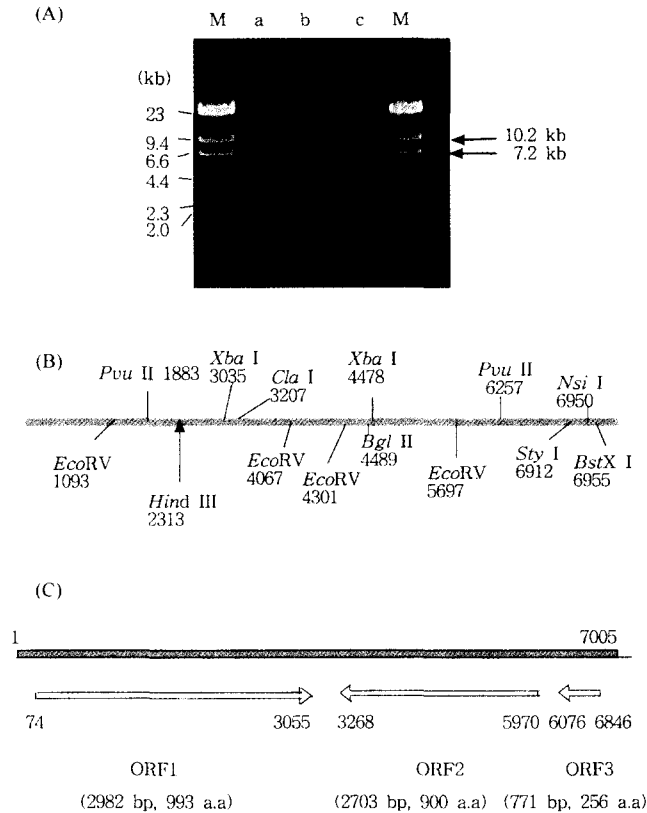
*P. ostreatus*의 미토콘드리아 선형 플라스미드 DNA의 말단 부위를 포함하는 DNA 절편을 클로닝하기 위해, 말단에 부착된 아미노산을 알칼리 처리에 의해 제거하고 HindIII로 처리하여 생성된 절편을 HindIII와 SmaI로 자른 pGEM 7Z에 클로닝 하였다. 그 결과, 약 4.7 kb와 2.3 kb의 DNA를 가지는 클론 2개를 최종적으로 분리하였다(Fig. 1).

### *P. ostreatus* 7.2 kb 미토콘드리아 플라스미드 DNA의 subclone의 선별

클로닝된 4.7 kb와 2.3 kb의 DNA를 Erase-a-Base system을 이용하여 연속결손 하였으며, rapid screening 법(1)을 이용하여 결손된 정도를 전기영동 하여 겔에서 비교 분석하였다. 순차적으로 결손된 각각의 클론들을 선별하여 염기배열을 조사하였다.

### DNA 염기 서열 분석

연속결손된 클론들의 염기서열을 서로 연결함으로써 4.7 kb와 2.3 kb의 DNA 염기서열을 전부 결정하였다. 분석 결과, 클로닝



**Fig. 1.** Restriction digestion of linear plasmid from *P. ostreatus* (A). Plasmid DNA was purified and digested with *Cla*I (lane a) and *Pvu*II (lane c). M,  $\lambda$ -*Hind*III marker; lane b, undigested plasmid. No recognition sites of *Cla*I and *Pvu*II were found in 10.2 kb plasmid. Restriction map of 7.2 kb plasmid (B). The positions of restriction sites and ORFs were based on the nucleotide sequence of 7.2 kb plasmid.

된 4.7 kb와 2.3 kb의 크기는 4691 bp 와 2314 bp 임을 확인하였으며, 7.2 kb 미토콘드리아 플라스미드 중에서 양쪽 말단의 200 bp 내외를 제외한 7005 bp의 염기서열을 확인하였다 (GenBank accession no. AF355103).

**ORF 분석 및 비교**

7.2 kb 선형 플라스미드의 염기서열을 아미노산 서열로 전환시켜 ORF를 조사하였다. 그 결과, 3 개의 큰 ORF를 확인할 수 있었다. ORF1은 7005 bp 중에서 2982 bp의 크기로서 993 개의 아미노산을 암호화하고, ORF2는 ORF와는 반대방향이며, 2703 bp로서 900개의 아미노산에 해당한다. ORF3는 ORF2의 바깥쪽에 위치하며, ORF2와 같은 방향으로 771 bp로서 비교적 작은 크기이며, 256개의 아미노산을 암호화 하는 것으로 나타났다(Fig. 1C).

7.2 kb의 ORF를 BLAST search를 하여, 다른 균주들의 미토콘드리아 플라스미드와 비교 분석하였다. 그 결과, *P. ostreatus*의 7.2 kb 미토콘드리아 플라스미드는 *Neurospora. intermedia* (5), *A. immersus* (18), *Neurospora. crassa* (GenBank accession

	Exo I	Exo II	Exo III
Po 7.2	SKNFITMDLET-RNINCK	KYLHNFYSYFDGI FLL	YETIKYCELDIC11L
Pa	NSRIGTFDLETRFDYNSN	YFTHNLGGYDI IFIL	KQTLHYLERDLSL
Ai	LKSLSTLDLETRMDTNNR	FYVHNLAFHDSVFI L	KELKNYCEIDCLAL
Nc	DKKILAFDIETFDVPTGN	VYCHNFSKFDINFII	KETII YLEKDI KAL
Ni	NPKIITLDLETRSVPIHP	VYTHNFYSYFDGI FII	KELIKYCEIDTIAL

	Region I	Region II-a
Po 7.2	PFSKENKEIKRYDANSLYPYAMKIYMPVGYPT	KESKKDSDYLI SKMLLSNLYGRMGSP
Pa	PYQKN--LRYYDANSLYPFVAKNTPMGHECKY	KANSEGEK-LITKFLSNLLGRFGMSI
Ai	PEQKN--IHSYDINSLYPSAMAKFDMPGTGPL	YTPDDPMYF-IA-KILNLSLYGRFGMDP
Nc	PIINN--IFSDFNSLYPTAMMM-PMPVGI PV	DNTKSGKKQ-MA-KLLNLTLYGRGMND
Ni	PFQVN--IKSYDANSLYPFAMKYFKMPGSGIPK	SPKESPWYY-IS-KLLNLSLYGRGLNS

	Region II-b	Region III	Region IV
Po 7.2	XXXXXXXXVTASARIYMSKF	KKFSLNIIYYTDTDSIDVDQEL	EHTFKEAIFLAPKVYGGITDKYEV
Pa	AVSIAA-VTAYARIFMAQT	ILKNGNLYYTDITDSIVTDIDL	EFKLKEGFFISAKTYCLMLEKEYM
Ai	NIAIASAITAYSRIQMSKF	KNNPNFKLYSDTDSVYISKEL	EYTFKEAVFVAPKVYGGFDKPKYK
Nc	STSIAATASWSRI LMYKH	MYKHI NSAYTDTDSIFVEKPL	GQLIKRAI FMSGKLYLDLDFGGKLE
Ni	SVPISSAIAAYSRIHMSHF	LTKYSNNIYYITDTGKIVDIDL	EYVFEYTSLGPVYGGILYDKKG

**Fig. 2.** Comparison of the putative ORF1 of *P. ostreatus* 7.2 kb mitochondrial plasmid with the conserved motifs of primitive DNA polymerases. The domains(Exo: 3'-5' exonuclease, Region : 5'-3' DNA polymerase) are numbered according to reference 3. Po 7.2, *P. ostreatus* 7.2 kb mitochondrial plasmid; Pa, *P. anserina*; Ai, *A. immersus*; Nc, *Neurospora crassa*; Ni, *Neurospora intermedia*.

	I	II	III	IV
Po 7.2	GEDLIYEIYI IPHNLFER	PSTLPMKCPNFWSENSYGGF	LYKVINLVSSTKFINSNLFNAY	
Pa	SK-KLEANGR MCKVLVEN	PKKIPMIVKPKPYTTTANGDY	IFDLVNLSSIGYKINTDVLDF	
Nc	AQ-EIIEREW IMESLVIS	TIELPMIIPPLEWKIDDNEXI	LYDAVAEKSKIPYTIINLKLDF	
Ni	GY-SITRKIY PLNPIFER	PKALPMVCPPIPWGIRGGN	LYNIVKLNAPKPKINQDLSY	
T3	GK-AIEDEAR LIEMLIES	PMFQPCVPPKPIWATITGGY	VYKAVNLAQNTAKWIKNKVLA	

	VI	VII	VIII
Po 7.2	ADNPPTFATFCLN	TPVFLDATCSG1QH LAAMLQDIELGSNVNLKKQYKDEPG	KLNRNLIKRSIMTKVYN
Pa	AKKELFLACFIE	LP1QMDATCNGFQHL SLLSLSLSDSNLSESTWDDVPK	KIIREI IKGIMTIPYN
Nc	ADEPLFLACALE	LP1LMDATCNGLQHL SAMVDFVLAEKVNLLKSTENDNPR	NVERCLVKRGLMTIYQ
Ni	AESPTLFAACFL	NP1FLDATCSGVQHFAMLLDLELQKYNVNLINSGE--SVN	SLNRSLLKVKIMTKSYN
T3	QDSPFCFLACFCE	LPLAFDGCSCG1QHFSAMLREDEVGRAVNLPSSE--TVQ	GVTRSVTKRSVMFLAY

	IX	X	XI
Po 7.2	XXLWFTPNGLK1TQHY	NTQKQKQAIIPNIHSLDASHL	XXXXXXYVHDCFGT
Pa	IITW-LPTGLVVRQSY	NNSKGIITAPMPNIVHSLDASL	DKNIIYTHDCFAV
Nc	VAVW-TPYGLV1QKQY	SKOKGIQAFIPNFVHSDGNI	RKINFASTHDCFAT
Ni	LSSW-TPDGLLELTRY	DSRREVQAIIPNIHSLDASHL	WDSYIIPHECFGT
T3	VHTW-TPDGFVWQY	DAIKQESGIAPNFVHSDGSHL	GIESFALIHDSFGT

**Fig. 3.** Comparison of the putative ORF2 of *P. ostreatus* 7.2 kb mitochondrial plasmid with the conserved motifs of primitive RNA polymerases. The domains are numbered according to the Oeser and Tudzynski (1989). Po 7.2, *P. ostreatus* 7.2 kb mitochondrial plasmid; Pa, *P. anserina*; Nc, *Neurospora crassa*; Ni, *Neurospora intermedia*; T3, bacteriophage T3.

no. X55361), *P. anserina* (15) 등의 미토콘드리아 플라스미드의 DNA polymerase 암호부위와 아미노산 서열상 50% 이상의 유사성이 있으며, 알려진 3개의 DNA 중합효소의 motif와 유사성을 비교 분석하였다(Fig. 2). 또한, 7.2 kb의 염기서열 중 일부는 *N. intermedia*, *N. crassa* 등의 미토콘드리아 플라스미드의 RNA 중합효소 암호부위와도 50% 이상의 아미노산 서열상의 유사성을 보였으며, RNA 중합효소의 11개의 motif와도 유사성이 있는 것으로 나타났다(Fig. 3).

**고 찰**

현재 *P. ostreatus*의 10.2 kb 선형 플라스미드 DNA에 대한 염기서열이 보고되어진 바 있다(21). 본 연구에서는 *P. ostreatus*에

서 10.2 kb와 공존하는 또 다른 선형 플라스미드인 7.2 kb를 클로닝 하고 염기서열을 분석하였으며, 다른 종류의 곰팡이 등에서 보고된 DNA 중합효소나 RNA 중합효소의 보존서열이 *P. ostreatus*의 7.2 kb에도 존재하는 것으로 나타났다.

다른 곰팡이에서 발견된 선형 플라스미드들도 주로 DNA 중합효소와 RNA 중합효소의 보존된 서열(motif) 갖고 있는 것으로 알려져 있다. *C. purpurea*의 pCIK1(27), 옥수수 S1(23), *K. lactis*의 pGIK11와 pGIK12(11), bacteriophage  $\phi$ 29(29), Adenovirus(1) 등에서 발견된 DNA 중합효소의 염기 서열 motif는 3가지 정도이며(27), 옥수수의 S2(24), bacteriophage SP6(22), *Saccharomyces cerevisiae*의 mitochondrial RNA polymerase 유전자(25), bacteriophage T3(26) 등에서는 RNA 중합효소의 motif 11개가 보고된 바 있다(27). 지금까지 알려진 DNA 및 RNA 중합 효소의 아미노산 서열과 *P. ostreatus* 7.2 kb 선형 플라스미드 DNA 중 클로닝된 7 kb의 상동성을 비교한 결과, ORF1은 DNA polymerase 보존서열이 있고, ORF2는 RNA polymerase의 보존 서열이 있음을 확인하였다(Fig. 2, 3). 반면, ORF3는 *Plasmodium* 속의 phosphatase(10), *Mycoplasma*의 adhesine(13) 등과 유사성이 있는 것으로 나타났으나, 이 유전자의 동정과 기능을 밝히기 위해서는 더 연구가 필요한 것으로 판단된다.

5' 말단에 공유된 단백질은 pronase를 처리하면 제거가 되지만 DNA와 결합되어 있는 아미노산 잔기는 제거되지 않는다. Escarmis 등(8)에 의하면 serine이나 threonine이 5' 말단에 연결되어 있는 경우 알칼리 가수분해에 의하여 DNA로부터 아미노산이 분리될 수 있으나, tyrosine이 결합된 phosphodiester bond나 lysine이 결합된 phosphodiamine bond를 형성할 때는 알칼리에 안정하다고 하였다.

말단에 붙은 아미노산만을 제거할 수 있다면 완전한 길이의 염기서열을 명확히 확인할 수 있는 바, Escarmis 등(8)에 의한 방법을 참고하여 알칼리를 처리하여 *Pleurotus* 속 균주의 DNA 말단에 붙은 아미노산의 제거를 시도하였으나 성공하지는 못하였다.

말단 단백질의 크기는 Kim 등(20)의 보고에 의하면 10.2 kb 플라스미드의 경우 70 kDa 이고 7.2 kb 플라스미드의 경우 73 kDa이며, 이들은 각각의 선형 플라스미드의 DNA polymerase 유전자에 의해 만들어지는 것으로 보여진다. 그러나, DNA에 결합된 아미노산 잔기의 종류 및 결합 방법 등은 현재로서는 알려져 있지 않다.

## 참고문헌

- Aleström, P., G. Akusjarvi, and U. Peterson. 1982. DNA sequence analysis of the region encoding the terminal protein and the hypothetical N-gene product of Adenovirus type 2. *J. Biol. Chem.* 257, 13492-13498.
- Barnes, W.M. 1977. Plasmid detection and sizing in single colony lysate. *Science* 195, 393-394.
- Blanco, L., A. Bernad, M.A. Blasco, and M. Salas. 1992. A general structure for DNA-dependent DNA polymerases. *Gene* 100, 27-38.
- Carusi, E.A. 1977. Evidence for blocked termini in human adenovirus DNA. *Virology*. 71, 380-394.
- Chan, B.S., D.A. Court, P.J. Vierula, and H. Bertrand. 1991. The kalilo linear senescence-inducing plasmid of *Neurospora* is an invertron and encodes DNA and RNA polymerases. *Curr. Genet.* 20, 225-37.
- Desiderio, S.V. and T.J. Kelly Jr. 1981. Structure of the linkage between Adenovirus DNA and the 55,000 molecular weight terminal protein. *J. Mol. Biol.* 145, 319-337.
- Duvell, A., H. Hessberg-Stutzke, B. Oeser, P. Rogmann-Backwinkel, and P. Tudzynski. 1988. Structural and functional analysis of mitochondrial plasmids in *Claviceps purpurea*. *Mol. Gen. Genet.* 214, 128-34.
- Escarmis, C., A. Gomez, E. Garcia, C. Ronda, R. Lopez, and M. Salas. 1984. Nucleotide sequence at the termini of the DNA of *Streptococcus pneumoniae* phage Cp-1. *Viol.* 133, 166-171.
- Francou, F. 1981. Isolation and characterization of linear DNA molecule in the fungus *Ascobolus immersus*. *Mol. Gen. Genet.* 184, 440-444.
- Gardner, M.J. 1998. Chromosome 2 sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 282, 1126-1132.
- 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.
- Hayakawa, T., T. Tanaka, K. Sakaguchi, and N. Otake. 1979. A linear plasmid-like DNA in *Streptomyces* spp. producing lankacidin group antibiotics. *J. Gen. Microbiol.* 25, 255-260.
- Henrich, B., K. Lang, A. Kitzerow, C. MacKenzie, and U. Hadding. 1998. Truncation as a novel form of variation of the p50 gene in *Mycoplasma hominis*. *Microbiology*, 144, 2979-2985.
- Hermanns, J. and H.D. Osiewacz. 1994. Three mitochondrial unassigned open reading frame of *Podospira anserina* represent remnants of a viral-type RNA polymerase gene. *Curr. Genet.* 25, 150-157.
- Hermanns, J. and H.D. Osiewacz. 1992. The linear mitochondrial plasmid pAL2-1 of long-lived *Podospira anserina* mutant is an invertron encoding a DNA and RNA polymerase. *Curr. Genetics* 22, 491-500.
- Ito, J. 1978. Bacteriophage  $\phi$ 29 terminal protein.: Its association with the 5' termini of the  $\phi$ 29 genome. *J. Virol.* 28, 895-904.
- Kartrin, G.U. and P. Tudzynski. 1992. Transcripts and translation products of a mitochondrial plasmid of *Claviceps purpurea*. *Curr. Genet.* 21, 249-254.
- Kempken, F., F. Meinhardt, and K. Esser. 1989. In organello replication and viral affinity of linear, extrachromosomal DNA of the ascomycete *Ascobolus immersus*. *Mol. Gen. Genet.* 218, 523-530.
- Kim, E.K., Y.B. Koo, D.L. Cha, Y.C. Hah, and J.H. Rho. 1993. Characterization of mitochondria plasmids from *Pleurotus* spp. *Kor. J. Microbiol.* 31, 141-147.
- Kim, E.K., J.H. Jeong, H.S. Youn, Y.B. Koo, and J.H. Roe. 2000. The terminal protein of a linear mitochondrial plasmid is encoded in the N-terminus of the DNA polymerase gene in white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Curr. Genet.* 38, 283-290.
- Kim, E.K., H.S. Youn, Y.B. Koo, and J.H. Rho. 1999. The genetics organization of the linear mitochondrial plasmid mlp1 from *Pleurotus ostreatus* NFFA2. *J. Microbiol.* 35, 264-270.
- Kotani, H., Y. Ishizaki, N. Hiraoka, and A. Obayashi. 1987. Nucleotide sequence and expression of the cloned gene of bacteriophage SP6 RNA polymerase. *Nucl. Acids Res.* 15, 2657-2664.

23. Kuzmin, E.V. and J.V. Levchenko. 1987. S1 plasmid from cms-S-maize mitochondria encodes a viral type DNA-polymerase. 1 *Nucl. Acids Res.* 15, 6758.
24. Kuzmin, E.V., I.V. Levchenko, and G.N. Zaitseva. 1988. S2 plasmid from cms-S-maize mitochondria potentially encodes a specific RNA polymerase. *Nucl. Acids Res.* 16, 4177.
25. Masters, B.S., L.L. Stohl, and D.A. Clayton. 1987. Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7. *Cell.* 51, 89-99.
26. McGraw, N. J., J.N. Bailey, G.R. Cleaves, D.R. Dembinski, C.R. Gocke, L.K. Joliffe, R.S. MacWright, and W. T. McAllister. 1985. Sequence and analysis of the gene for bacteriophage T3 RNA polymerase. *Nucl. Acids Res.* 13, 6753-6766.
27. Oeser, B. and P. Tudzynski. 1989. The linear mitochondrial plasmid pCIK1 of the Phytopathogenic fungus *Claviceps purpurea* may code for a DNA polymerase and an RNA polymerase. *Mol. Gen. Genet.* 237, 1-9.
28. Pring, D.R., C.S. Levings III, and W.W.W. Hu. 1977. Unique DNA associated with mitochondria in "S"- type cytoplasm of male-sterile maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 2904-2908.
29. Rokosh, D.M.K., W.C. Russel, and A.J.D. Bellett. 1977. Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell.* 11, 283-295.
30. Salas, M., R.P. Mellado, and E. Vinuela. 1987. Characterization of a protein covalently linked to the 5'-termini of the DNA of *Bacillus subtilis* phage  $\phi$ 29. *J. Mol. Biol.* 119, 269-291.
31. Specht, C.A., C.C. Dirusso, and C.P. Novotny. 1982. A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Anal. Biochem.* 119, 158-163.
32. Takano, B., S. Kawano, and T. Kuroiwa. 1994. Complex terminal structure of a linear mitochondrial *Physarum polycephalum*: the terminal inverted repeats and an ORF encoding DNA polymerase. *Curr. Genet.* 25, 252-257.
33. Yui, Y., Y. Katayose, and K. Shishido. 1988. Two linear plasmid-like DNA elements simultaneously maintained in *Pleurotus ostreatus*. *Biochim Biophys Acta.* 951, 53-60.

(Received February 16, 2000/Accepted March 5, 2001)

---

**ABSTRACT : Nucleotide Sequence of 7.2 kb Mitochondrial Linear Plasmid DNA in *Pleurotus ostreatus***

**HyeSook Youn, Yong Bum Koo\*, and Jung-Hye Roe<sup>1</sup>**(School of Biotechnology & Biomedical Science, Inje University, Kimhae 621-749, and <sup>1</sup>School of Biological Sciences, Seoul National University, Seoul 151-747, Korea)

Two linear plasmid-like DNAs, 10.2 kb and 7.2 kb were found in the mitochondria of *P. ostreatus*. They have covalently linked 5'-terminal proteins in both ends. Two continuous fragments of 4.7 kb and 2.3 kb from 7.2 kb DNA were cloned and sequenced. Two long open reading frames(ORF1; 2982 bp, 993 a.a and ORF2; 2703 bp, 900 a.a) and one short open reading frame(ORF3; 771 bp, 256 a.a) were found in the 7.2 kb plasmid. The putative ORF1 and ORF2 have conserved motifs of DNA polymerases and RNA polymerases, respectively, while the ORF3 has homologous regions with phosphatase from *Plasmodium*, and also with adhesine from *Mycoplasma*.