

시금치 엽록체와 *Chlamydomonas*로부터 추출한 제한효소 *EcoRI* 억제물질의 특성과 작용

黃成彬·李舜熙

(延世大學校 生物學科)

Character and Function of Restriction Enzyme, *EcoRI* Inhibiting Substance Extracted from Spinach Chloroplast and *Chlamydomonas*

Hwang, Seong Bin and Sun Hi Lee

(Department of Biology, Yonsei University, Seoul)

ABSTRACT

Restriction enzyme inhibiting substance (REIS) extracted from spinach chloroplast and *Chlamydomonas* seems not to be proteinaceous, because its inhibiting activity was not lost by heat or trypsin treatment. And it seems not to be lipid or polysaccharide, because its inhibiting activity was not lost by lipase or α -amylase treatment, respectively. In *Chlamydomonas*, putrescine, spermidine and spermine were present. The amount of putrescine was the smallest and that of spermine was the greatest. But only spermine was contained in REIS and the activity of REIS. It was proportional to the amount of spermine in REIS and it was hindered by Na^+ ion. So, the inhibiting activity of REIS seems to be deeply related to spermine contained in REIS. But restriction enzyme inhibiting activity remained to the some extent although salts and spermine were eliminated by dialysis.

서론

일반적으로 원핵생물과 진핵생물에서는 methylation에 의한 DNA modification이 일어나는데, 이는 restriction-modification system(원핵생물), DNA 복제, DNA 제조합, 유전자발현, 세포분화 등에서 중요한 역할을 한다(Razin and Friedman, 1981). 이처럼 핵 DNA에 발생하는 methylation은 보편적인 현상인 반면, 고등식물의 엽록체 DNA에는 전혀 methylation이 일어나지 않는다. 그러나 예외적으로 *Chlamydomonas*의 엽록체 DNA에는 methylation이 일어나는데(Dyer, 1982), 이것이 *Chlamydomonas* 엽록체의 모성 유전에 중요한 역할을 담당하고 있다고 주장되고 있다.

즉, 배우체 시기에 자성배우자(mating type+)에서만 methylation이 일어나고 음성배우자(mating type-)에서는 별로 일어나지 않아, 접합체를 형성할 때 음성배우자의 엽록체 DNA는 제한효소 같은 nuclease에 의해 제거됨으로써 "모성유전"이 발생한다는 것이다(Sager and Ramanis, 1970; Smith, 1970; Sager and Lane, 1972; Sano *et al.*, 1981; Kuroiwa *et al.*, 1982; Sager and Grabowy, 1983; Sager *et al.*, 1984). 이 가설은 처음으로 진핵생물에 restriction-modification 원리를 적용시켰고, 또 이 원리가 원핵생물에서처럼 방어역할에 사용된 것이 아니라 유전자 발현에 이용되었다는 면에서 그 의미가 큰 것으로, 이에 대해 반론이 제기되고 있지만(Bolen *et al.*, 1982; Feng and Chiang, 1984; Ogawa and Kuroiwa, 1985; Nakamura *et al.*, 1988), 최근 endonuclease가 발견되었고(Sklar *et al.*, 1986), 처음으로 진핵생물에서도 원핵생물에서와 같은 제한효소가 존재한다는 것이 보고되어(Xia *et al.*, 1987) 이

본 연구는 1987년도 한국 과학재단 연구비에 의하여 수행되었음.

가설의 타당성이 더욱 커지고 있다.

한편 Rochaix(1980)가 *Chlamydomonas*의 엽록체 DNA를 추출하는 과정 중에 에탄올 침전시 제한효소의 작용을 억제하는 물질이 함께 침전된다는 사실을 논문에서 간단하게 언급하였는데, 본 연구팀은 이 물질이 고등식물의 엽록체나 *Chlamydomonas*의 모성유전에서 제한효소같은 nuclease의 공격으로부터 DNA를 보호하는 역할을 할 것이라 가정하여, 시금치 엽록체와 *Chlamydomonas*로부터 제한효소 억제물질을 추출하여 그 특성을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료. 본 실험에 사용된 시금치(*Spinacia oleracea*)는 시장에서 구입한 것으로 4°C에서 2일간 암처리하여 있을 -20°C에 보관 사용하였으며, *Chlamydomonas reinhardtii*는 Duke University로부터 분양받아 사용하였다.

***Chlamydomonas reinhardtii*의 배양.** *Chlamydomonas*의 stock culture 및 영양생장기, 배우체기, 접합체기로의 유도배양은 R. Sager의 방법을 변형한 Snell(1982)의 방법을 사용하였다. 공기 공급기와 여과장치가 연결된 플라스크를 배양기로 이용해 25°C에서 6000 lux의 빛을 쬐어 12시간 간격으로 광-암처리를 반복하면서 성장시켰다.

시금치의 엽록체 핵산 및 제한효소 억제물질의 추출. 먼저 시금치의 잎으로부터 분별 원심분리기를 근간으로 하는 Tewari(1979)의 방법을 이용하여 crude chloroplast를 분리한 후, 삼투성이 낮고 밀도가 커서 세포기관을 완전하게 분리할 수 있는 percoll 용액을 Morgenthaler and Price(1974)의 방법으로 제조하여 isopycnic step gradient centrifugation을 근간으로 하는 Walbot(1977)의 방법을 사용하여 crude chloroplast 분획으로부터 intact chloroplast를 분리하였다. 이 엽록체로부터 Tewari(1979)와 Herrmann *et al.*(1975)의 방법을 이용하여 핵산을 추출한 후 Maniatis *et al.*(1982)의 방법으로 정제시켜 실험시에 사용하였다. 이 핵산 용액을 음이온 교환수지인 DEAE-sephacel column에 loading한 후, TE(Tris-EDTA)-0.3 M NaCl과 TE-1.6 M NaCl 용액으로 용출시켜 억제물질과 핵산을 분리하였다.

***Chlamydomonas*의 핵산 및 제한효소 억제물질의 추출.** Burton *et al.*(1979)의 방법대로 *Chlamydomonas*를 초음파 장치로 파쇄한 후 phenol-chloroform으로 전체 핵산을 추출하였으며, 이로부터 제한효소 억제물질을 분리하는 것은 시금치의 경우와 동일하게 수행하였다.

제한효소 억제물질에 대한 열처리, trypsin처리, lipase처리 및 α -amylase처리. 제한효소 억제물질에 대한 열처리의 영향을 조사하기 위해 제한효소 억제물질을 100°C에서 10분간 가열한 후, 증발된 양만큼 증류수를 채워 제한효소 억제기능의 유무를 측정하였다. Trypsin 처리는 제한효소 억제물질 40 μ 에 trypsin 5 μ (0.5 mg)와 10 \times trypsin 반응완충액(25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl₂)

5 μ 를 섞어 37°C에서 15분간 반응시킨 후 phenol-chloroform으로 추출하여 trypsin을 제거하고 ethanol 침전 후 원심분리하여 침전물을 TE 완충액 40 μ 에 녹여 사용하였다. 이 때 제한효소 억제물질이 trypsin 자체의 활성에 영향을 미치는가를 알아보기 위해 제한효소 억제물질 8 μ 와 trypsin 2 μ (0.1 mg)을 섞고 trypsin reaction buffer를 첨가한 후 37°C에서 15분간 반응시킨 다음 ovalbumin 10 mg을 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 12.5% SDS-PAGE를 통해 조사하였다. Lipase의 경우 제한효소 억제물질 40 μ 와 lipase 0.5 mg, lipase reaction buffer(20 mM potassium-phosphate, pII 8.5, 5 mM NaCl)와 섞어 37°C에서 1시간 반응시킨 후 phenol-chloroform처리 이후의 과정은 trypsin 처리의 경우와 동일하였다. α -Amylase의 경우 제한효소 억제물질 40 μ 와 α -amylase 0.2 mg, α -amylase reaction buffer(20 mM potassium-phosphate, pH 6.9, 6 mM NaCl)를 섞어 30°C에서 1시간 반응시킨 후 phenol-chloroform처리 이후의 과정은 trypsin 처리의 경우와 동일하였다.

Polyamine의 검출 및 정량. Goren *et al.*(1982)의 방법에 따라 thin layer chromatography(TLC)로 polyamine을 정량하였다.

제한효소 반응 및 전기영동. 기질 DNA로는 저장 완충액(10 mM Tris-HCl pH 7.2, 5 mM NaCl, 0.1 mM Na₂EDTA)에 녹인 phage λ DNA 1 μ (0.5 μ g), 제한효소는 저장 완충액(50% glycerol, 20 mM KPO₄ pH 7.4, 400 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5 mM mercaptoethanol, 0.15% triton X-100, 200 μ g/ml BSA)에 녹인 EcoRI 3 unit를, 반응 완충액은 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl을 함유하는 100 mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충액을 사용하였으며, 전체 반응부피는 10 μ 로서 37°C에서 1시간 반응시켰다. 제한효소 억제물질은 제한효소를 처리하기 전에 첨가하였다. 전기영동시 0.5% agarose gel을 사용하였다.

결과 및 고찰

시금치의 엽록체 핵산과 제한효소 억제물질의 분리. 추출한 핵산을 DEAE-sephacel column으로 chromatography하게 되면 핵산은 TE-0.6 M NaCl로 용출한 분획에만 존재하였으며, 제한효소 억제기능은 TE-0.3 M NaCl에서 훨씬 높았다. 따라서 제한효소 억제물질은 주로 첫번째 분획에 존재하는 것으로 추정되며 이것을 억제물질 용액으로 사용하였다(Fig. 1). 또 추출한 핵산을 column에 loading하였을 때 column에 결합하지 않고 흘러나온 분획에는 핵산이 전혀 없었으나 제한효소 억제기능은 약간 존재하였다(자료 미제시).

***Chlamydomonas*의 전체 핵산과 제한효소 억제물질의 분리.** 시금치의 경우와 마찬가지로 핵산은 TE-0.6 M NaCl로 용출한 분획에만 있었고, 제한효소 억제 기능은 TE-0.3 M NaCl로 용출시킨 분획에 더 많았다(Fig. 1).

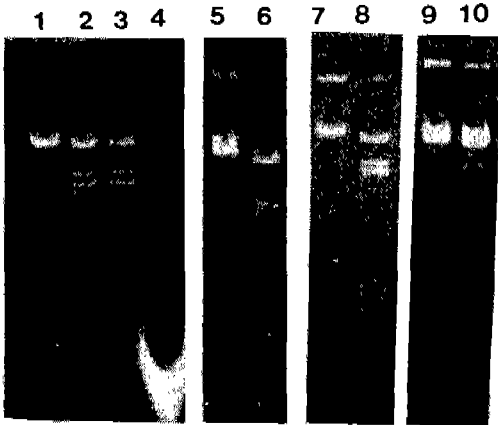
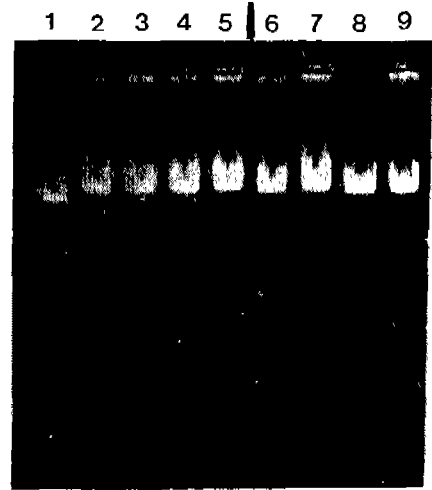


Fig. 1. Patterns of inhibition of *Eco*RI activity by 0.3 M NaCl elute (restriction enzyme inhibiting substance; REIS) and 0.6 M NaCl elute (nucleic acid; N.A.) extracted from *Chlamydomonas* and spinach chloroplast. 1, λ DNA; 2, control (λ DNA+*Eco*RI); 3, *Chlamydomonas* (21 gr, V)-REIS treat; 4, *Chlamydomonas* (21 gr, V)-N.A treat; 5, *Chlamydomonas* (21 gr, G)-REIS treat; 6, *Chlamydomonas* (21 gr, G)-N.A. treat; 7, spinach-REIS treat; 8, spinach-N.A. treat; 9, spinach-N.A. (extracted); 10, spinach-N.A. (extracted/dialysed) treat.

제한효소 억제물질에 대한 열처리, trypsin처리, lipase 처리와 α -amylase처리의 영향. 핵산을 추출하는 과정에서 모든 단백질은 거의 제거되었지만, 추출한 제한효소 억제물질에 대해 단백질의 존재 여부를 가리기 위해, 억제물질에 대해 열처리 및 trypsin 처리한 것을 3 μ 첨가하여 제한효소 억제기능을 조사하여 본 결과 전혀 제한효소 억제기능이 감소되지 않았다(Fig. 2). 또한 억제물질이 trypsin 자체의 활성을 억제하여 나타난 결과는 아닌 것으로 나타났다(Fig. 3). 이러한 결과는 제한효소 억제물질에 일반적인 단백질 성질이 거의 없다는 것을 시사한다. 이 억제물질이 lipid의 성질을 지니고 있는지를 조사하기 위해 lipase를 처리한 억제물질 2 μ 를 제한효소 반응 완충액에 첨가하여 제한효소 활성변화를 조사한 결과 억제기능에 전혀 변화가 일어나지 않았다(Fig. 4). 또한 polysaccharide의 특성을 지니고 있는지를 조사하기 위해 α -amylase를 처리한 억제물질 2 μ 를 첨가하여 조사하였을 때에도 억제기능에는 변화가 없었다(Fig. 4). 이것은 이 억제물질이 lipid나 polysaccharide의 특성을 지니고 있지 않음을 시사한다.

제한효소 억제물질내의 spermine 존재와 제한효소 억제기능의 상관성. 위의 결과를 근거로 억제물질이 단백질이나 lipid, polysaccharide일 가능성은 희박하다고 판단하여, 억제물질의 성분을 조사하는 과정 중에 polyamine의 일종인 spermine이 억제물질에서 검출되었고(Fig. 5), 생리적 농도에서 spermine이 제한효소를 억제한다는 보고



Heat Trypsin

Fig. 2. Effect of heat and trypsin on the activity of restriction enzyme inhibiting substance (REIS) extracted from spinach intact chloroplast and *Chlamydomonas*. 1, control (λ DNA+*Eco*RI); 2, 6, spinach (intact chloroplast)-REIS treat; 3, Heat-treated spinach-REIS treat; 4, 8, *Chlamydomonas*-REIS treat; 5, heat-treated *Chlamydomonas*-REIS treat; 7, trypsin-treated spinach (intact chloroplast)-REIS treat; 9, trypsin-treated *Chlamydomonas*-REIS treat.

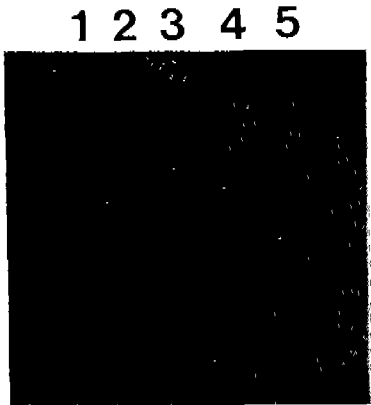


Fig. 3. Effect of restriction enzyme inhibiting substance (REIS) on the activity of trypsin. 1, ovalbumin+trypsin+spinach (intact chloroplast)-REIS; 2, ovalbumin+trypsin+*Chlamydomonas*-REIS; 3, ovalbumin+trypsin; 4, trypsin; 5, ovalbumin.

가 있었기에(Kuosmanen and Pösö, 1985; Hwang and Lee, 미발표) 제한효소 억제물질의 억제기능과 함유된 spermine에 밀접한 관계가 있을 것이라는 가정아래 그 상관

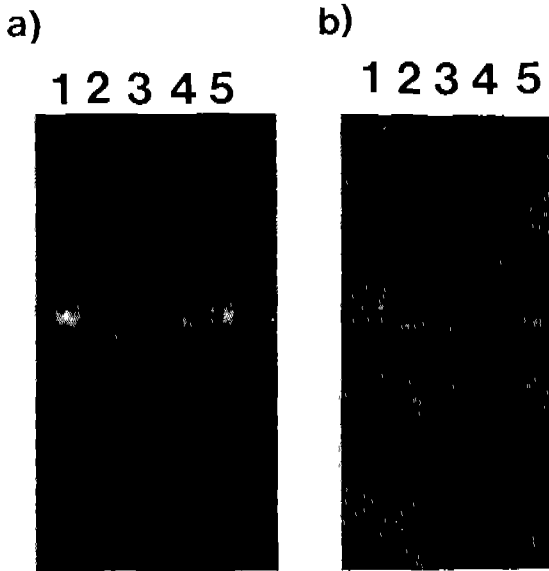


Fig. 4. Effect of lipase and α -amylase on the activity of restriction enzyme inhibiting substance (REIS). (a) *Chlamydomonas*-REIS, (b) spinach (intact chloroplast)-REIS. 1, λ DNA; 2, λ DNA+EcoRI 3, λ DNA+EcoRI+REIS; 4, λ DNA+EcoRI+REIS (lipase treated); 5, λ DNA+EcoRI+REIS (α -amylase treated).

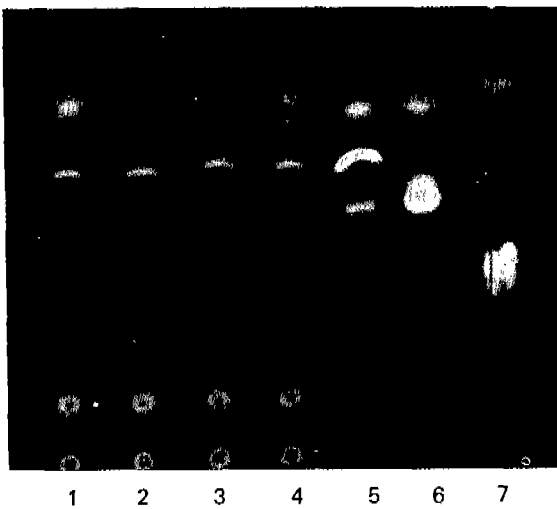


Fig. 5. Thin layer chromatography of restriction enzyme inhibiting substance (REIS) extracted from spinach chloroplast and *Chlamydomonas*. 1, spinach (intact chloroplast)-REIS; 2, *Chlamydomonas* (21 gr, V)-REIS; 3, *Chlamydomonas* (21 gr, G)-REIS; 4, *Chlamydomonas* (zygote)-REIS; 5, spermine; 6, spermidine; 7, putrescine.

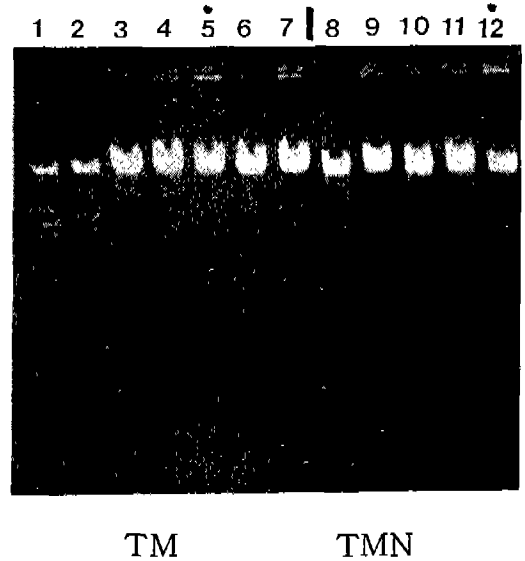


Fig. 6. Inhibition of *EcoRI* activity by *Chlamydomonas*-REIS at different reactions with TM/TMN buffers. 1-7: 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 (μ l) of REIS treat. 8-12: 1, 1.5, 2, 2.5, 3 (μ l) of REIS treat.

Table 1. Relation of Spermine to the inhibiting activity of *EcoRI* activity by *Chlamydomonas*-spinach-REIS or nucleic acid fraction

Sample	Inhibition activity	Flourescence density of Spm.
spm.(100 μ M)		403.5
21 gr(V)-I	N.I.	34.2
21 gr(V)-N	C.I.	71.7
21 gr(V)-I	C.I.	60.5
21 gr(V)-N	P.I.	51.2
S-I	C.I.	55.6
S-N	N.I.	45.3
S-N(ext)	C.I.	226.1
S-N(ext/d)	P.I.	24.9

Flourescence density was measured by the flourometer after the extraction of spermine (spm). from TLC plate. The amount of samples is 100 μ l. S, spinach chloroplast; V, vegetative cell; I, REIS fraction; N, nucleic acid fraction; 21 gr, *Chlamydomonas* strain 21 gr; N (ext), extracted nucleic acid fraction; N (ext/d), dialyzed N (ext); C.I., complete inhibition; P.I., partial inhibition; N.I., non-inhibition.

성을 밝히는데에 촛점을 맞추었다. 시금치의 염록체와 *Chlamydomonas*에는 spermine, spermidine, putrescine 등의 일반적인 polyamine이 모두 존재하였지만(Figs. 7 and 8)

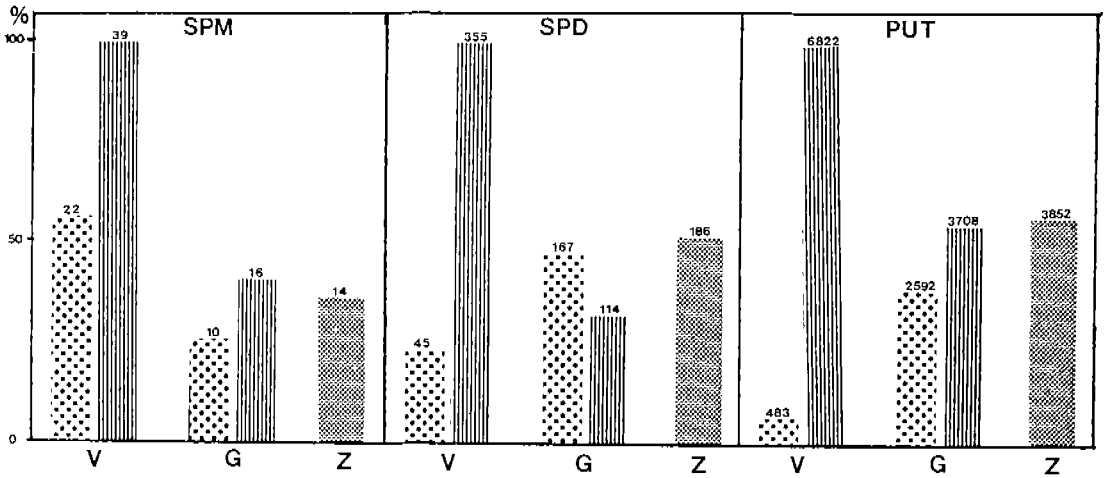


Fig. 7. Variation of polyamine concentration during the life cycle of *Chlamydomonas reinhardtii* strain 21 gr (mt+) / 137C (mt-). SPM, spermine; SPD, spermidine; PUT, putrescine; V, vegetative stage; G, gametic stage; Z, zygotic stage; ♦♦♦♦, strain 21 gr (mating type +); |||||, strain 137C (mating type-); ▒, zygote. Numerics above the bar indicate the fluorescence density of polyamines.

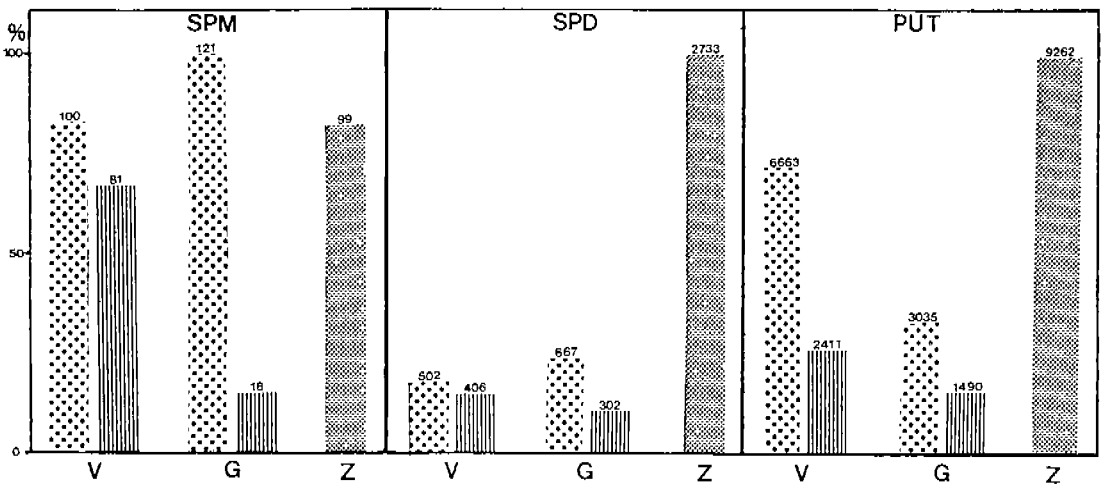


Fig. 8. Variation of polyamine concentration during the life cycle of *Chlamydomonas reinhardtii* strain mat-3-1 (mt+) / mat-3-1 (mt-). ♦♦♦♦, strain mat-3-1 (mating type +); |||||, strain mat-3-1 (mating type-); ▒, Zygote.

추출된 핵산과 제한효소 억제물질내에선 spermine만 주로 존재하였다(Fig. 5). *Chlamydomonas*의 경우 spermine이 가장 적은 양으로 존재하지만(Figs. 7 and 8) Fig. 5에서 보듯이 억제물질에서 spermine이 가장 많이 발견되는 것은 핵산에 결합하는 polyamine이 주로 spermine이라는 사실을 시사한다(Tabor and Tabor, 1984). 시금치와 *Chlamydomonas*에서 추출한 핵산과 제한효소 억제물질에 대해 제한효소 억제기능과 spermine의 양을 측정된 결과, 대개 핵산보다 억제물질에 제한효소 억제기능과 spermine양

모두가 높았다(Table 1; Fig. 5). 여기에서 역으로 제한효소 억제기능이 억제물질보다 핵산에서 더 높게 나타난 *Chlamydomonas* strain인 21 gr의 영양생장기에서 핵산에 더 많은 spermine이 존재하였다. 이상의 결과를 종합해볼 때, 제한효소 억제물질의 억제기능을 결정짓는 spermine의 억제농도는 명확치 않으나 대개 제한효소 억제물질내의 spermine의 양과 억제기능은 비례관계에 있는것 같다. 한편, *Chlamydomonas*에서 추출한 제한효소 억제물질의 경우 TMN(Tris-MgCl₂-NaCl) 완충용액보다 TM(Tris-MgCl₂)

완충액에서 더 낮은 농도로 제한효소를 억제하는 것이(Fig. 6) 관찰되었는데, 이는 *in vitro*에서 polyamine에 의해 나타난 결과와(Hwang and Lee, 미발표) 동일한 것으로서 제한효소 억제물질내의 spermine이 억제기능에 깊이 관여할 가능성을 일층 높이는 결과라 할 수 있다. 그러나 spermine이 억제물질의 제한효소 억제기능을 결정적으로 좌우한다고 쉽게 단정지를 수는 없다. 그 이유는 첫째, *in vitro*상 spermine은 최소한 수백 μM 의 농도에서 제한효소를 억제하지만(Hwang and Lee, 미발표), 실제 억제물질내의 spermine은 이보다 훨씬 적은 수십 μM 의 농도로 존재하기 때문이다(Table 1), 둘째, S-N(ext.)(D)의 경우(Table 1) 투석을 통해 spermine과 염류를 거의 제거시켰는데도 불구하고, 제한효소 억제기능이 부분적으로 남아 있었기 때문이다. 이러한 결과로 미루어 억제물질내에는 spermine 외에도 제한효소 억제기능에 깊이 관여하는 다른 인자가 존재할 것으로 추정된다.

적 요

시금치의 염록체와 *Chlamydomonas*에서 추출한 제한효소 억제물질은 열처리나 trypsin 처리에 의해 그 억제기능이 감소되지 않는 것으로 보아 단백질일 가능성은 극히 희박하였다. 또한 lipase나 α -amylase 처리에 의해 제한효소 억제기능이 감소하지 않는 것으로 보아 이 억제물질이 lipid나 polysaccharide일 가능성도 희박하였다. *Chlamydomonas*에는 putrescine, spermidine, spermine이 모두 존재하며, putrescine이 가장 많고, spermine이 가장 적게 존재하였다. 그러나 제한효소 억제물질에는 주로 spermine만이 존재하였는데, 억제물질의 제한효소 억제기능과 spermine의 양 사이에 비례적 상관관계가 있고, 억제물질의 작용에 Na^+ 이 부정적 영향을 끼치는 것으로 보아 이 억제물질의 제한효소 억제기능에는 함유된 spermine이 깊이 관련된 것으로 추정된다. 그러나 제한효소 억제물질을 충분히 투석시켜 spermine과 염류를 거의 제거시켰는데도 불구하고 제한효소 억제기능이 부분적으로 남아 있었다.

참 고 문 헌

- Bolen, P.L., D.M. Grant, D. Swinton, J.E. Boynton and N.W. Gillham. 1982. Extensive methylation of chloroplast DNA by a nuclear gene mutation does not affect chloroplast gene transmission in *Chlamydomonas*. *Cell* **28**: 335-343.
- Burton, W.G., C.T. Grabowy and R. Sager. 1979. Role of methylation in the modification and restriction of chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 1390-1394.
- Dyer, T.A. 1982. Methylation of chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. *Nature* **298**: 422-423.
- Feng, T.Y. and K.S. Chiang. 1984. The persistence of maternal inheritance in *Chlamydomonas* despite hypomethylation of chloroplast DNA induced by inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 3438-3442.
- Goren, R., P. Narcin, H. Flores and A.W. Galston. 1982. Change in polyamine titer in etiolated pea seedlings following red light treatment. *Plant Cell Physiol.* **23**(1): 19-26.
- Herrmann, R.G., H.J. Bohbnert, K.V. Kowallik and J.M. Schmitt. 1975. Size, conformation and purity of chloroplast DNA of some higher plants. *Biochem. Biophys. Acta* **378**: 305-317.
- Kuosmanen, M. and H. Pösö. 1985. Inhibition of the activity of restriction endonuclease by spermidine and spermine. *FEBS Lett.* **179**(1): 17-20.
- Kuroiwa, T., S. Kawano and S. Nishibayashi. 1982. Epifluorescent microscopic evidence for maternal inheritance of chloroplast DNA. *Nature* **298**: 481-483.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor, New York. 66 pp, 438 pp. 438.
- Morgenthaler, J.J. and C.A. Pricc. 1974. Photosynthetic activity of spinach chloroplasts after isopycnic centrifugation in gradients of silica. *Plant Physiol.* **54**: 532-534.
- Nakamura, S., C. Sato and T. Kuroiwa. 1988. Polypeptides related to preferential digestion of male chloroplast nucleoids in *Chlamydomonas*. *Plant Sci.* **56**: 129-136.
- Ogawa, K. and T. Kuroiwa. 1985. Nuclease C polymorphism of calcium dependent nucleases in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* **26**(3): 481-491.
- Razin, A. and J. Friedman. 1981. DNA methylation and its possible biological roles. *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **25**: 33-52.
- Rochaix, J.D. 1980. Restriction fragments from *Chlamydomonas* chloroplast DNA. *Methods Enzymol.* **65**: 785-795.
- Sager, R. and G. Grabowy. 1983. Differential methylation of chloroplast DNA regulates maternal inheritance in a methylated mutant of *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 3025-3029.
- Sager, R. and D. Lane. 1972. Molecular basis of maternal inheritance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 2410-2413.
- Sager, R., H. Sano and C.T. Grabowy. 1984. Control of maternal inheritance by DNA methylation in *Chlamydomonas*. *Current Topics Microbiol. Immunol.* **108**: 157-173.
- Sager, R. and Z. Ramanis. 1970. A genetic map of non-mendelian genes in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **65**: 593-600.
- Sano, H., C. Grabowy and R. Sager. 1981. Differential activity of DNA methyltransferase in the life cycle of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 3118-3122.
- Sklar, R., D. Altman and R. Sager. 1986. An endonuclease from *Chlamydomonas reinhardtii* that cleaved the se-

- quence TATA. *J. Biol. Chem.* **261**: 6806-6810.
- Smith, T.C. 1970. Electron microscopic evidence for chloroplast fusion in zygotes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature* **228**: 333-335.
- Snell, W.J. 1982. Study of the release of cell wall degrading enzymes during adhesion of *Chlamydomonas* gametes. *Exp. Cell. Res.* **138**: 109-119.
- Tabor, C.W. and H. Tabor. 1984. Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.* **53**: 749-790.
- Tewari, K.K. 1979. Chloroplast DNA: structure, transcription and replication. *In*, *Nucleic Acids in Plants*. Vol. 1, CRC press, Boca Raton, pp. 41-110.
- Walbot, V. 1977. Use of silica sol step gradients to prepare bundle sheath and mesophyll chloroplasts from *Panicum maximum*. *Plant Physiol.* **60**: 102-108.
- Xiz, Y., D.E. Burbaqnk, L.Uher, D. Rabussay and J.L. Van Etten. 1987. IL-3A Virus infection of a chlorella-like green algae induces a DNA restriction endonuclease with novel sequence specificity. *Nucl. Acids Res.* **15**: 6075-6090.
- (1989. 11. 27 接受)