

Cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain 6803 광합성의 분자생물학적 연구의 모델 system

박 영 목

한국표준과학연구원 기초과학지원센터 생명과학실

머리말

광합성은 태양에서 대기중으로 들어오는 빛에너지를 화학에너지로 바꾸어 주는 과정으로, 이때 생긴 화학에너지는 지구상에 사는 모든 생명체의 에너지원이 되고있다. 광합성을 하는 생물은 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 고등식물, algae 및 cyanobacteria와 같이 물을 분해하여 광합성하는 생물을 식물성 광합성생물이라고 하고, purple bacteria나 green bacteria와 같이 H_2S 와 같은 화합물을 이용하여 광합성을 하는 생물을 세균성 광합성생물이라 한다. 식물성 광합성생물은 photosystem I(PS I)과 photosystem II(PS II)를 이용하여 광합성을 수행한다. PS II는 물에서 전자를 분리하여 전자전달계를 통하여 PS I에 전달해 주고, 그러면 PS I에서는 전자를 다시 산화환원 전위가 낮은 수용체인 $NADP^+$ 로 전달하여 환원시킨다. 세균성 광합성 생물의 경우는 하나의 photosystem 밖에 없는데 이는 식물성 광합성 생물의 PS II와 거의 비슷하지만 충분한 산화환원 전위를 만들어 H_2S 에서 전자를 분리하고, 이때 생긴 전자를 전자전달계를 통하여 $NADP^+$ 로 전달하여 환원시킬 수 있다.

고등식물의 광합성기구 전반을 연구하려면 물을 분해하여 광합성을 하는 생물을 재료로 연구를 해야하는데 식물이나 algae 등의 진핵생물을 이용하여 광합성의 분자생물학적 연구를 하자면 여러가지 여건의 제약이 따르지만 특히 진핵세포의 chloroplast DNA를 형질전환을 하기는 현재로서 거의 불가능하거나 극히 제한적인 연구만이 실행될 수 밖에 없다. 따라서 형질전환이 가능한 몇몇의 cyanobacteria를 이용하여 광합성의 분자생물학적 연구가 되어 왔다. 현재 광합성연구에 사용되고 있는 cyanobacteria는 단세포와 사상체를 이루고 있는 여러 균주들이

있는데, 그 중에서도 최근에 와서 개발된 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803이 광합성의 분자생물학적 혹은 분자유전학적 연구에 가장 많이 이용되고 있다. Cyanobacteria 전반의 최근 연구 동향에 대해서는 본지 제 17권에 이미 김영창이 발표하였기에(제 2호, PP2-10), 이 글에서는 주로 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803의 분자유전학적 연구 및 이균주를 이용한 광합성과 광합성생물의 생명현상에 대한 분자생물학적 연구에 대해 기술해 보고자 한다.

Cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803

Cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803(S. 6803)은 1968년 담수에서 채집되었으며 처음에는 다른 cyanobacteria처럼 blue-green algae로 불리다가 1979년에 와서야 원핵생물로 분류된 단세포 gram-negative 박테리아로, 크기는 대장균보다 약 10배 정도가 큰 구형의 생물이다(Rippka 등, 1979). Genome의 크기는 약 2800 Kb 정도이며(Herdman 등, 1979), 세포당 genome의 수는 성장조건에 따라 약 3개에서 10개 정도 갖고 있으며(Labarre 등, 1989; Armbrust 등, 1981), 적어도 네 개의 endogeneous plasmid들을 보유하고 있다(Chauvet 등, 1986; Hounmard 등, 1988).

S. 6803은 광합성의 분자생물학적 연구에 아주 이상적인 생물이다. 우선 S. 6803은 다른 cyanobacteria와 같이 식물성 광합성을 하므로 광합성 기구들이 고등식물과 같고, 광독립영양, 광중속영양 및 혼합영양 등의 다양한 방법으로 배양이 가능하므로 광합성의 명반응 및 암반응에 걸쳐 다양한 돌연변이들을 분리할 수 있을 뿐만 아니라, 형질전환이 아주 수월하며 recombination(homologous와 no-

nhomologous)의 빈도가 높고 형질전환을 분석하기에 필요한 여러가지 marker들이 있기 때문에 광합성의 분자생물학적 연구에 필요한 여러 조건을 잘 갖추고 있다. 이러한 좋은 조건 때문에 UV, chemicals, 또는 transposon 등을 이용한 random 돌연변이 또는 site-directed 돌연변이들을 이용하여 광합성 과정에 필요한 유전자들이나 유전자 산물들에 대한 연구가 S. 6803을 대상으로 활발히 진행되고 있다.

Cyanobacterium *Synechocystis* 6803의 유전자 조작

광합성 뿐만 아니라 광합성생물의 다른 생명현상을 분자생물학적으로 연구하기에 S. 6803은 아주 좋은 genetic alternation system을 갖추고 있다. S. 6803은 자연적으로 외부의 DNA를 uptake하여 형질전환 할 수 있는 능력이 있으며(Grigovieva and Shestakov, 1982), linear 혹은 circular DNA를 homologous 혹은 non-homologous recombination에 의해 형질전환을 아주 잘 할 수 있는 능력(5×10^7 transformants/ μg 의 DNA)을 갖추고 있다(Dzelzkans와 Bogorad, 1986 ; 1988). 이외에도 비용이 적게드는 무기 배지에 다량의 세포를 손쉽게 키울 수 있고(Rippka 등, 1979), 박테리아의 여러 항생물질저항성 marker들을 사용할 수 있기 때문에 형질전환을 통해 여러 돌연변이의 분리가 가능하다. 아래에서는 이러한 S. 6803의 특성을 이용하여 형질전환과 돌연변이에 관해서 논의해 보고자 한다.

1. 형질전환

S. 6803에 있어서 형질전환은 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 첫째는 S. 6803의 endogenous plasmid를 이용하여 *E. coli*와 shuttle vector를 만들거나 conjugation을 할 수 있는 plasmid를 만들어 형질전환시키는 것이고, 둘째는 이 생명체의 높은 recombination 빈도를 이용하여 형질전환시키는 방법이다.

(1) Plasmid vector를 이용한 형질전환

지금까지 S. 6803을 형질전환시키기 위한 plasmid shuttle vector에 관한 연구는 Chauvat의 연구실에 주로 이루어져왔다. S. 6803에는 세포내 자연적으로 존재하는 endogenous plasmid가 적어도 4개가 있는데 이 plasmid들의 자가복제방법과 *E. coli*의 plasmid를 이용하여 *E. coli*와 S. 6803에서

함께 자가복제하여 사용할 수 있는 shuttle vector를 만들었다(Chauvet 등 1986 ; 1988a,b). 이 shuttle vector system은 shuttle plasmid의 kanamycin과 chloramphenicol resistant marker들과 S. 6803의 endogenous plasmid에 삽입한 streptomycin의 resistant marker를 이용하여 이들 두 plasmid들간의 recombination을 유도하여 형질전환을 하는 방법이다. 최근에 또 같은 연구실에서 λ phage의 P, promoter와 그 repressor를 이용한 S. 6803의 expression vector를 만들었다(Ferino와 Chauvet, 1989). 이 expression vector는 *E. coli*의 promoter probe plasmid와 S. 6803의 endogeneous plasmid간의 homologous recombination을 이용하여 recipient 세포내에서 replication하며, λ phage의 promotor와 repressor를 이용하여 clone된 유전자의 발현을 적절히 조절할 수 있도록 고안된 vector system이다. 이러한 expression vector에 현재 S. 6803를 포함한 cyanobacteria에 쓰이고 있는 CAT(chloramphenicol acethyl transferase), *lac Z* 및 *lux* 유전자 등의 reporter gene들을(Friedverg, 1988) 함께 사용할 수 있을 것이다. 하지만 이들 plasmid vector들은 S. 6803이나 *Synechococcus*에서 stability에 문제되고 있어(Chauvet 등, 1988a ; Kuhlemeier 등, 1985) 앞으로 이점에 보완의 여지가 있다.

(2) Recombination을 이용한 형질전환

1982년 Grigorieva와 Shestakov 등은 S. 6803가 자연적으로 외부의 DNA를 uptake하여 homologous recombination에 의해 높은 빈도로 형질전환할 수 있다는 것을 발표하였다. 이때 저자들은 erythromycin resistant(Eth^r)한 균주의 DNA를 erythromycin sensitive(Eth^s)한 균주와 섞어주면 이 균주가 Eth^r 한 형질을 획득한다고 발표하였는데, 이는 Eth^r 한 cyanobacteria의 DNA와 Eth^s 한 균주의 Chromosomal DNA가 homologous recombination에 의해 형질전환을 일으켜 Eth^r 한 형질이 안정되게 유지하게 되는 것이다.

이러한 연구를 바탕으로 다른 생물의 DNA를 S. 6803에 안정되게 형질전환시키는 연구가 시도되어 왔다. 그 한 예로 S. 6803의 chromosomal DNA의 임의의 한 절편을 flanking sequence로 이용하고 그 사이에 다른 생물의 DNA를 삽입하여, 이 flanking sequence를 homologous recombination 부위로 이

용하여 S. 6803의 chromosomal DNA에 형질전환 시키는 방법이 사용되었다. 이와 같은 homologous recombination을 이용한 형질전환 방법으로 S. 6803의 여러 mutant를 complementation하여 특정유전자를 찾아내는 연구나(Dzelzkans와 Bogorad, 1987, 1988, 1989), gene interruption 연구(Pakarasi 등, 1987; Philbrick와 Zilinski, 1988; Vermaas 등, 1986), site-directed 돌연변이 연구가 수행되었다.

Homologous recombination을 이용한 형질전환 중에서 S. 6803에서만 특별히 이용될 수 있는 in situ "dot" transformation 방법을 간단히 소개해 볼까 한다. Dot transformation 방법은 S. 6803 균주에서 광합성 돌연변이가 일어났을 때 그 돌연변이유전자를 찾아내기 위해 고안된 것인데(Dzelzkans와 Bogorad, 1988), 광합성 돌연변이가 일어난 균주는 광독립 영양 상태에서 자랄 수 없기 때문에 glucose가 들어있는 액체배지에 광종속영양 상태로 키운 후 0.8% top agar와 잘 섞은 후에 미리 만들어 둔 1.5% agar의 정상적인 고체배지 위에 뿌려준다 (Fig. 1). 이에 앞서 wild type S. 6803의 chromosomal DNA을 특정 제한효소로 자른 후 low melting point agarose gel에서 전기영동하여 이때 나타난 전기영동상의 wild type chromosomal DNA의 restriction fragment들은 차례로 잘라내어 aliquot을 만들어 놓는다. 각각의 aliquot에 들어있는 restriction DNA fragment들을 돌연변이 균주가 들어있는 top agar 표면에 한 방울씩 떨어뜨려 주면, 광합성 돌연변이를 complement할 수 있는 DNA fragment가 들어있는 aliquot가 떨어진 부위에서는 광독립 영양으로 살아갈 수 있는 형질전환체를 1-2주 정도면 볼 수 있다. 이때 광합성 돌연변이를 complement할 수 있는 aliquot를 찾아 여기에 들어있는 restriction DNA fragment들을 이용하여 shotgun cloning을 하고 이들을 *E. coli*에 형질전환하고 이렇게 하여 나타난 형질전환체들을 키워 mini-prep을 통해 shotgun clone된 plasmid들을 분리하여 다시 dot transformation을 하면 어떤 plasmid가 이 광합성 돌연변이를 complementation할 수 있는가를 찾아낼 수 있다.

Dot transformation에서 특이하게 보아야 할 점은 top agar 속에 들어있는 S. 6803의 균주에서도 외부의 DNA uptake가 일어나는 형질전환이 될 수

있는 것이다. Mid-log 단계에($OD_{730}=1.0$)있는 왕성하게 자라는 S. 6803는 *E. coli*처럼 $CaCl_2$ 처리에 의한 protoplast를 만들지 않아도 자연적으로 외부 DNA를 uptake하여 homologous recombination에 의해 아주 높은 빈도로(5×10^7 transformants/ μg 의 DNA) 형질전환한다. 이 dot transformation을 이용하여 현재 많은 연구실에서 신속하게 광합성 돌연변이를 screening하는 방편으로 사용하고 있다.

2. Mutagenesis

Mutagenesis는 화학물, X-rays나 UV 등과 같은 돌연변이원에 의한 random mutagenesis와 어떤 유전자를 *in vitro*에서 임의적으로 조작하여 연구하고자 하는 생물에 형질전환을 시키는 site specific 돌연변이로 대별될 수 있고, site specific 돌연변이는 다시 gene interruption 및 deletion 방법과 site-directed mutagenesis로 나누어 설명할 수 있다. S. 6803를 대상으로 돌연변이를 얻고자 할 때 한 가지 꼭 염두에 두어야 할 점이 있다. 앞에서 언급하였듯이 S. 6803는 여러 copy의 gemomic DNA를 갖고 있기 때문에 얻고자 하는 돌연변이가 열성이거나 wild type에 비해 생장이 늦어지는 돌연변이종이 되면은 wild type의 성장을 저해할 수 있는 selective agent들을 사용하여 모든 genomic DNA가 완전히 돌연변이 DNA로 segregation될 때까지 여러 세대 동안 selection 배지에서 배양을 해야한다(Astier 등, 1984; Dzelzkans와 Bogorad, 1987; Smart 등, 1991 b). Selection agent로는 wild type을 선택적으로 죽이는 p-hydroxymercuribenzoate와 PS II에서 PS I으로 전자가 전달되는 것을 막아 광독립영양성장을 막아주는 3- 3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) 등 여러 화학물들이 있다(Joset, 1988).

(1) Random mutagenesis

Random mutagenesis 방법은 생체물질의 생화학적 경로나 단백질의 기능 혹은 효소들의 작용 등의 연구를 위해 많이 도입되고 있는데, S. 6803를 재료로 제초제의 작용과정 연구(Gingrich 등, 1988), PS II의 biogenesis 연구(Astier 등, 1984; Chauvet 등, 1989; Dzelzkans와 Bogorad, 1986, 1988; Jansson 등, 1988; Labarre 등, 1989), 광합성의 암반응 과정의 돌연변이연구(Su와 Bogorad, 1991), 불포화 지방산에 관한 연구(Gombos 등, 1991) 등의 많은 연구가 되어 있고, 그 외에도 glucose transport 기

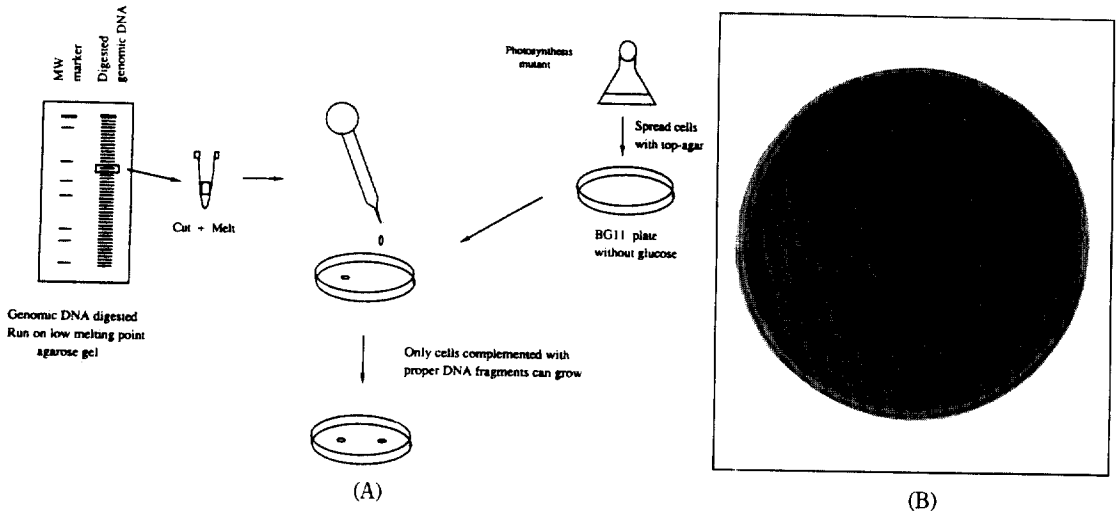


Fig. 1. In situ "dot" transformation of *Synechocystis* 6803. (A) A photosynthesis mutant grown on a photoheterotrophic liquid media was plated on a BG11 plate without glucose for selective photoautotrophic growth. Each aliquot of DNA fragments was dotted onto a lawn of the photosynthesis mutant plated on a selective glucose lacking plate. Only dot with complementary DNA can support the growth of the mutant. (B) Identification of clone complement the photosynthesis mutant. (Top row) Wild type genomic DNA supports the growth of photosynthesis mutant. (Bottom six rows) Only two out of thirty dots complement the mutant.

작이나 아미노산 transport에 관한 연구 등에서와 같이 생명 현상의 다양한 분야에서 연구가 발표되어 있다. 이들 연구에 사용된 random mutagenesis 방법 또한 다양하여, UV(Su와 Bogorad, 1991) 및 chemicals(Astier 등, 1984; Dzelzkans와 Bogorad, 1988)을 생체에 직접 사용하는 고전적 방법들과 transposon을 이용한 연구 또는 genomic DNA를 균주에서 추출한 뒤 특정 제한효소로 절단한 뒤 항생물질저항성 marker를 ligation하는 등 *in vitro*에서 조작한 후 다시 *S. 6803*로 형질전환 하는 방법 등 (Chauvet 등, 1989; Labarre 등, 1989) 많은 기술적인 변화가 분자유전학의 기술의 발전과 함께 과거 수년간에 이루어졌다.

이와 같이 random mutagenesis 방법을 통해 많은 연구가 이루어졌고 앞으로도 광합성 뿐만 아니라 제반 생명현상 연구에 이 방법을 통한 돌연변이가 많이 사용될 것으로 기대된다. 하지만 이 방법에 의해서 생성된 돌연변이주는 때에 따라서 순수분리 하는데 많은 시간이 필요로 할 뿐만 아니라 돌연변이 형질을 wild type 형질에서 구별하기가 쉽지 않고 돌연변이 형질이 종종 pleiotropic effect를 보이기 때문에 이점들을 고려하여 연구 계획을 수립해야

한다.

(2) 유전자 interruption 및 deletion

유전자 interruption 및 deletion은 어떤 특정 유전자를 inactivation 하기 위해 특정 유전형질을 지닌 DNA로(항생제 저항을 나타내는 유전자나 식별이 용이한 유전자)치환하는 방법을 말한다. 현재 cyanobacterium *S. 6803*에 돌연변이를 선택 식별하기 위해 쓰이는 항생물질 저항 유전자로는 kanamycin, chloramphenicol 및 spectinomycin 유전자 등이 있다.

광합성에 관계되어 있는 여러 복합체의 기능이나 구조 또는 복합체 형성의 연구를 위해 *S. 6803*을 이용해서 유전자 interruption 및 deletion 방법을 사용하여 많은 연구가 이루어져 왔다(Chitinis 등, 1989a,b; Dzelzkans and Bogorad, 1988; Jansson 등, 1987; Pakarai 등, 1988; Philbrick and Zilinskas, 1988; Smart 등, 1991b; Vermaas 등, 1987a, b). 현재까지 여러 PS II core 단백질의 유전자 interruption 및 deletion에 의한 inactivation은 *S. 6803* 광독립영양 성장 기능을 상실케하였다. *psbC* gene을 inactivation했을 때, thylakoid 막의 CP47, D1, 그리고 D2 단백질의 양을 상당히 감소시켰으며, *psbB*

gene을 interruption 했을 때 단지 CP43 단백질만이 상실된 것을 Western blot으로 밝혀낼 수 있었다 (Vermaas *et al.*, 1988).

S. 6803을 이용한 PS I 복합체 단백질의 gene interruption 및 deletion 연구는 두 개의 peripheral 단백질(*psaD*와 *psaE* 단백질)과 한 개의 core 단백질(*psaA*)에서 성공된 것이 발표되었다. *psaD* 유전자를 inactivation 하였을 때, 광독립영양 상태에서 세포의 성장속도가 감소되었으나 광종속영양 상태에서는 wild type 균주와 같은 조건으로 성장하였다(Chitinis 등, 1989a). 8 kDa 단백질을 생성하는 *psaE* 유전자를 inactivation 시켰을 때는 단지 미세한 양의 *psaE* 전자전달 능력만 변화하였을 뿐 광독립 영양시 성장속도의 변화는 발견할 수 없었다(Chitinis 등, 1989b). PS I의 P700-chlorophyll apoprotein 중의 하나를 만드는 *psaA* 유전자를 inactivation 시켰을 때는 electron spin resonance 실험을 통해서 P700의 signal을 측정할 수 없었고, 세포가 광종속영양으로만 자라게 되며 chlorophyll의 양이 상당히 줄어 세포의 색깔이 turquoid의 푸른색을 나타나게 되었다(Smart 등, 1991b). 이렇게 유전자 interruption 및 deletion 실험을 통해 유전자의 산물인 특정 단백질의 기능을 결정하기에 도움이 되긴 하지만, 특정 단백질의 어떤 아미노산 부위가 그 단백질의 작용 부위가 되는지를 파악하기에는 부족함이 있다.

(3) Site-directed mutagenesis

Site-directed mutagenesis를 통해 한 개 혹은 몇 개의 특정유전자의 염기를 바꿔서 해당 단백질의 아미노산에 변화를 주던가 유전자의 promoter나 enhancer 부위 등을 변화시켜 단백질의 작용부위 및 유전자 발현의 조절기작을 연구할 수 있다. S. 6803에서 이 방법을 통하여 연구된 사례를 들면 아래와 같다. PS II 복합체의 D2 단백질의 histidine 아미노산이 두 개 있는데 이들은 Q_4 과 결합부위라고 추측을 하였던 곳이다. D2 단백질의 두 개의 histidine들이 실제로 Q_4 의 결합부위인가를 확인하기 위해 이들을 tyrosine이나 asparagine으로 치환(His-197-Tyr과 His-214-Asn) 했을 때, 이때 나타난 돌연변이주는 PS II 복합체의 구조와 기능을 상실하였다(Vermaas *et al.*, 1987a). 이 연구는 site-directed mutagenesis를 통하여 특정 단백질의 한 부위가 다른 단백질과 직접결합하여 특정 기능을 수행하고

있다는 것을 직접 보여준 좋은 예이다. 이 밖에도 site-directed mutagenesis를 통하여 S. 6803에서 광합성에 사용되는 전자전달계의 donor나 acceptor들을 밝혀내는데 기여한 연구들이 있다. 가령 PS II의 D2 단백질의 tyrosine 아미노산(Tyr-160)은 고등식물을 포함한 여러 생물에서 conservation 되어 있는데, 이 부위를 mutagenesis하여 Tyr-160이 전자전달계의 D인 것을 밝혀냈다(Barry 등, 1988; Takahashi 등, 1986), 또 다른 연구에서는 S. 6803에서 *psbC* 유전자의 start codon이 시금치에서는 AUG인 것과 달리 GUG로 되어 있다는 것을 발견하였다(Chitinis and Williams, 1988). 위에서 본 바와 같이 site-directed mutagenesis는 S. 6803에서 광합성 기구의 기능 및 구조를 연구하는데 많은 도움을 주었으며 앞으로도 이를 이해하는데 상당한 기여를 할 것으로 기대된다.

Cyanobacterium *Synechocystis* 6803를 이용한 광합성의 분자생물학적 연구

식물성 광합성생물은 물을 분리하여 나온 전자를 전자전달계를 거쳐서 $NADP^+$ 로 전달한다. 광합성 과정 중 빛에 의한 전자의 전달과 광인산화는 thylakoid 막안에 존재하는 네 개의 단백질 복합체들과 이 막에 붙어 있는 전자 carriers들간의 상호 유기적인 조절에 의해 이루어지고 있다. 이 때에 사용되고 있는 네 개의 복합체는 photosystem II, cytochrome b_6-f complex, photosystem I, 그리고 ATP synthetase이다(Fig. 2). 이들 각각의 복합체는 여러 개의 단백질 subunit들로 구성되어 있으며, 두 개의 photosystem들은 광수용체에 둘러싸여 있다. 광수용체를 제외한 다른 네 개의 복합체들은 고등식물과 cyanobacteria가 구조나 기능면에서 동일하지만 cyanobacteria와 몇몇의 algae에서는 광수용체로 phycobilisome을 갖고 있다. Phycobilisome에 관한 연구는 아직 S. 6803에서는 아직 미미한 상태이고 다른 cyanobacteria에서 잘 연구되어 있고, 또 본지 제 17호 2권에 김영창이 잘 기술하였기에 이 글에서는 지금까지 S. 6803를 재료로 하여 발표된 두 photosystem에 관한 연구를 중점으로 살펴보겠다.

1. Photosystem II

Table 1. Genes and Proteins Isolated and Sequenced from *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803.

Gene	Product	Mol. Weight (KDa)	Reference
Photosystem II			
psbA I	D1	32	Ravnikar 등, 1989
psaA II	D1	32	Osicwacz and McIntosh, 1987
psaA II-1	D1	32	Osicwacz and McIntosh, 1987
psbB	CP 43	43	Vermaas 등, 1987
psbC	CP 47	32	Vermaas 등, 1987
psbD I	D2	32	Williams and Chishom, 1987
psbD II	D2	32	Williams and Chishom, 1987
psbE	Cytb 559	10	Pakrai 등, 1988
psbF	Cytb 559	4	Pakrai 등, 1988
pabG	PS II component	25	Steinmuller 등, 1989
psbH	Phosphoprotein	10	Mayes and Barber, 1990 ; Abdel-Mawgood and Dilley, 1990
psbI	Reaction center complex component	48	Philbrick 등, 1988
psbK	PS II component	2	Zhang 등, 1990
psb1	Manganes stablizing protein	32	Zhang 등, 1990
Photosystem I			
psaA	Core pretein	82	Smart 등, 1991a
psaB	Core pretein	83	Smart 등, 1991a
psaC	Subunit VII	16	Anderson and McIntosh, 1991b
psaD	Subunit II	8.9	Reilly 등, 1988
psaE	Subunit IV	8	Chitnis 등, 1989a
Others			
cpn 60	Chaperonin	6	Chitnis and Nelson, 1991
desA	Fatty acid desaturation	?	Wada 등, 1990
dnaK	Heat-shock protein	70	Chitnis and Nelson, 1991
gtr	Glucose transporter	50	Schmetterer, 1990
ndhC	NADH dehydrogenase	6	Steinmuller 등, 1989
ndhD	NADH dehydrogenase	?	Anderson and McIntosh, 1991b
ndhE	NADH dehydrogenase	?	Anderson and McIntosh, 1991b
petE	Plastocyanin	10	Briggs 등, 1990

copy가 존재하는데 반해 S. 6803에서는 두 copy가 (*psbD-I*과 *psbD-II*) 존재한다. 한 copy로 존재하는 *psbC* 유전자는 고등식물과 S. 6803에서 모두 *psbD-I*과 부분적으로 중복되어 있다.

구리를 함유하고 있는 분자량이 10 KDa인 Plastocyanine은 PS II에서 PS I으로 이동하면서 전자를 전달한다. Cu^{2+} plastocyanin은 thylakoid 막속에 있는 cytochrom b_6-f 복합체를 산화하고 전자를 받아 PS I 반응중심으로 이동하며 PS I의 P700⁺를 환원시키며 Cu^+ 가 된다. Briggs 등은(1990) S. 6803에서 plastocyanin은 생성하는 single copy 유전자인

*petE*를 clone하였고, plastocyanin이 구리를 넣어 준 배지에서 많이 생성되는 것을 관찰하였다. 이들은 Northern blot 실험을 통해 구리의 농도에 따라 plastocyanin의 mRNA의 양이 변화하지 않는 것을 관찰하고, plastocyanin은 transcription 수준에서 유전자 발현이 조절되는 것이 아니라 translation 수준이나 posttranslation 수준에서 조절이 되는 것을 발표하였다.

2. Photosystem I

Photosystem I 반응중심에는 8개의 다른 단백질을 지니고 있다. 분자량이 가장 큰 두 단백질인(약

80 KDa) Subunit Ia와 Ib는 서로 약간의 homology를 지니며 core protein complex를 형성한다. 이 PS I core 단백질 복합체는 chlorophyll과 carotenoid와 같은 색체들의 결합장소이며, 또한 전자전달계의 구성원인 P700, A₀, A₁ 및 F_x 등과 같은 6개의 subunit들의 (II-VII)의 결합장소이기도 하다. 하지만 PS I 반응중심과 그에 결합하고 있는 subunit들의 기능 및 구조배열에 대하여 현재까지 밝혀진 것이 거의 없다. PS II의 반응중심과는 달리, 현재 많은 PS I 반응중심의 subunit들은 아미노산의 1차 구조조차 밝혀지지 않고 있는 실정이다. 이제야 겨우 PS I 반응중심 복합체의 crystalization이 5 Å 정도까지 결정되어 있으며(Ford와 Holzenburg, 1988; Witt 등, 1987), 이에 따라 PS I의 크기와 symmetry group 등이 보고되어 있다. 지금까지 밝혀진 바로는 PS I의 subunit II는 아마도 ferredoxin과 ferredoxin oxidase의 결합부위로 되어 있으며(Zanetti와 Merati, 1987; Ziber와 Malkin, 1988), subunit III는 plastocyanin과 작용하는 것으로 추측되고 있다. 화학적 cross-linking 연구조사와 subunit 재조합 연구 및 subunit VII과 ferredoxin 단백질 homology 조사 결과들은 subunit VII이 secondary electron acceptor들을 보유하고 있고, ferredoxin A와 B 결합부위인 것으로 설명하고 있다. 현재까지 그 밖의 다른 subunit 역할에 대해서는 전혀 밝혀진 바가 없다. 현재까지 고등식물과 S. 6803에서 PS I을 분리하였는데, subunit들의 구성이나 광화학적 특성에서 차이점을 볼 수 없었다. 순수분리한 PS I 복합체를 통해서 S. 6803는 적어도 10개의 subunit들이 있다는 것을 Rogner 등(1990)이 밝혔는데 고등식물에서는 PS I 복합체가 8-10개가 있는 것이 알려져 있다.

현재까지 S. 6803에서 PS I 복합체 subunit의 유전자가 cloning되어 DNA sequence가 밝혀진 것들은 Table 1에 수록되어 있다. PS I의 core protein을 생성하는 psaA-psaB mRNA는 높은 광도에서 자란 S. 6803가 낮은 광도나 암소에서 자란 세포보다 많이 축적되어 있는 것이 밝혀졌다(Smart와 McIntosh, 1991a). 하지만 *psbD*, *psaD* 및 *rbcLS*의 mRNA는 낮은 광도나 암소에서 자란 S. 6803와 높은 광도에 자란 균주사이에 별차이가 없었다. 또한 Smart와 McIntosh(1991)는 S. 6803를 암소에서 키울 때도 이들 광합성 유전자가 mRNA를 만들고

있음을 밝혔고, 따라서 이 생물체에서는 암소에서도 PS I과 PS II 복합체를 계속해서 만들고 있다고 주장하고 있다.

Cyanobacteria *Synechocystis* 6803를 이용한 광합성생물의 생명현상 연구

현재 우리가 알고 있는 생명현상에 대한 분자생물학적 지식의 많은 부분은 종속영양을 하는 생물체를 재료로 한 연구에서 얻은 것이다. 그 예로 아미노산이나 탄수화물의 생합성에 관한 많은 지식은 주로 *E. coli*나 *Salmonella typhimurium*을 재료로 한 실험에서 얻고 있다. 그래서 광합성을 하는 독립영양생물의 생명현상을 이해하기 위한 방편으로 S. 6803를 실험재료로 하여 조사하고자 하는 시도가 일고 있다. 다음에서 그 몇 가지 예를 살펴보고자 한다.

식물의 냉해에(chilling) 대한 민감도나 내성의 기작에 대하여는 아직도 논란이 많이 되고 있다. 이러한 기작의 설명하는 여러 가지 학설 중 하나는 냉해가 생체막의 지질성분의 phase transition을 일으켜 식물체에 손상을 준다고 설명하고 있다.

S. 6803를 재료로 냉해에 민감한 돌연변이주를 만들어 그 원인이 되는 유전자를 clone하여 조사하였다니 불포화 지방산을 만드는 유전자에 결함이 있다는 것을 밝혀내고, 이 지방산 불포화 유전자(*desA*)를 cyanobacteria의 한 균주인 *Anacystis nidulans*에 형질전환하였다니 냉해에 내성이 있는 돌연변이주가 되는 것을 발견하였다(Wada 등, 1990). Labarre 등은(1984) S. 6803에서 아미노산 운반체의 돌연변이주를 분리하여 그 특성을 조사하였더니 이 균주의 아미노산 흡수에 관여하는 운반체계가 종속영양을 하는 *E. coli*에는 여러가지 있는 것과는 달리 단지 세 가지가 있다는 것을 알아냈다.

S. 6803는 fructose가 들어있는 배지에서는 자랄 수 없는데 fructose가 있는 배지에서는 자라는 돌연변이주를 찾아 분석하여 보니 종속영양하에서는 자라지 못하고 광독립영양하에서만 자라는 것이 발견되었다(Flores 등, 1986). 그 기작을 조사하였더니 fructose와 glucose가 한 운반체계로 흡수가 되는 것을 알아냈고, 그 유전자(*gtr*)를 분리하여 DNA sequence를 비교하였더니, *E. coli*의 xylose 운반체와 포유동물의 포도당 운반체와 비슷한 것이 발견되었

다. 이 균주는 고농도의 염류가(0.5 M) 있는 배지에서 서도 잘 자라는데 고농도에서 자리지 못하는 돌연변이주를 분리하여 조사하였더니 호흡률이 낮은 것을 알아냈고 그 원인이 cytochrome oxidase에 결함이 있다는 것을 밝혀냈다(Jeanjean 등, 1990). NADH dehydrogenase 복합체의 유전자들도(*ndhC*, *ndhD* 및 *ndhE*) S. 6803에서 clone되었다. 그 유전자의 upstream과 downstream 부위를 조사하였더니 유전자의 배열이 *ndhC-psbG-ORF157/159*(Steinmuller emd, 1989)와 *ndhE-psaC-ndhD* (Anderson과 McIntosh, 1991) 등으로 되어 있고, 이들은 고등식물의 chloroplast DNA의 유전자 배열과 같은 것을 알아내었다. 이 연구를 통하여 고등식물의 chloroplast와 S. 6803가 광합성 체제만 같다는 것이 아니라 적어도 몇몇의 유전자들은 그들의 genome 내에서의 배열까지도 같다는 것을 알 수 있었다.

맺음말

Cyanobacteria *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803는 광합성을 비롯한 여러 생명현상을 연구하기에 아주 좋은 유전자 조작 system을 갖추고 있다. Table 1과 이 글의 참고문헌을 통해서 알 수 있듯이, S. 6803는 1982년 Shestakov group의 연구에 의해 분자생물학계에 처음 알려지게 되었고 1984년에 처음으로 광합성 돌연변이가 발견됨으로써 광합성을 연구하는 학자들의 관심을 받게 되었다.

과거 몇년간 S. 6803를 대상으로 한 연구는 주로 광합성을 중심으로 진행되다가 앞에서 설명한 바와 같이 최근에 들어서는 생명현상의 다양한 분야에서 각종의 돌연변이가 발견되어 이를 분자생물학 및 분자유전학 수준에서의 연구가 시작되고 있다. 현재 광합성의 여러 복합체를 이루는 몇몇의 유전자의 배열이 chloroplast의 유전자 배열과 일치한다는 발표도 있고(Anderson과 McIntosh, 1991b; Steinmuller 등, 1989), 또 S. 6803와 고등식물의 chloroplast간에 Photosystem들을 이루는 여러 단백질들이 면역학적으로 차이가 없다는 연구보고들도 있다. 이와 때를 맞추어 cyanobacteria의 phage가 발견되고 S. 6803에 conjugation할 수 있는 plasmid가 (Kreps 등, 1990) 만들어져서 앞으로 이 균주의 genetic map을 작성할 수 있는 날이 멀지 않으리라

예측된다. 이밖에도 *Synechococcus*의 다른 두 균주 사이의 상호관계를 조사한 연구에서처럼(Golden 등, 1989), S. 6803도 NotI 제한효소를 써서 유전자들의 physical map을 작성할 수도 있을 것이다. 이러한 방법을 통하여 S. 6803의 유전자 배열이 밝혀지면 고등식물의 chloroplast의 유전자 배열과 비교하여 광합성이 분자생물학 수준에서 어떻게 조절되고 있는지를 이해하는데 더욱 도움이 될 것이고 광합성을 통해 독립영양을 하는 생물의 여러 생명현상을 이해하는데 많은 도움이 될 것이라고 생각된다.

REFERENCES

1. Anderson, S.L., and McIntosh L. 1991a. Light activated heterotrophic growth of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light-requiring process. *J. Bacteriol.* **173**: 2761-2767.
2. Anderson, S.L., and McIntosh L. 1991b. Partial conservation of the 5'*ndhE-psaC-ndhD* 3' gene arrangement of chloroplasts in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: implications for NDH-D function in cyanobacteria and chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* **16**: 487-499.
3. Abdel-Mawgood, A.L., and Dillely R.A. 1990. Cloning and nucleotide sequence of the *psbH* gene from cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol. Biol.* **14**: 445-446.
4. Astier, H., Elmoriani, K., Meyer, I., Joset, F., and Herdman, M. 1984. Photosynthetic mutants of the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strains PCC 6714 and PCC 6803: sodium p-Hydroxymercuribenzoate as a selective agent. *J. Bacteriol.* **158**: 659-664.
5. Armbrust, E.V., Bowen, J.D. Olson, R.J., and Chisholm, S.W. 1989. Effect of light on the cell cycle of a marine *Synechococcus* strain. *Appl. Environml. Microbiol.* **55**: 425-432.
6. Barry, B.A., Sithole, I., Babcock, G.T., and McIntosh, L. 1988. Directed mutagenesis indicates that the donor to P⁺ 680 in photosystem II is tyrosine-161 of the D1 polypeptide. *Biochemistry.* **27**: 9071-9074.
7. Briggs, L.M., Pecoraro, V.L., and McIntosh, L. 1990. Copper-induced expression, cloning, and

- regulatory studies of the plastocyanin gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol. Biol.* **15**: 633-642.
8. Butos, S.A., Schaefer, M.R., Golden, S.S. 1990. Different and rapid responses of four cyanobacterial *psbA* transcripts to changes in light intensity. *J. Bact.* **172**: 1998-2004.
 9. Carpenter, S.D., Charite, J., Eggers, B., and Vermaas, W.F.J. 1990. The *psbC* start codon in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.* **260**: 135-137.
 10. Carpenter, S.D., and Vermaas, W.F.J. 1989. Directed mutagenesis to probe the structure and function of photosystem II. *Physiol. Plant.* **77**: 436-443.
 11. Chauvet, F., Labarre, J., and Ferino, F. 1988a. Development of gene transfer systems for the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Physiol. Biochem.* **26**: 629-637.
 12. Chauvet, F., Labarre, J., and Ferino, F. 1988b. Gene transfer systems in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Physiol. Biochem.* **26**: 629-637.
 13. Chauvet, F., Rouet, P., Bottin, H., and Boussac, A. 1989. Mutagenesis by random cloning of an *Escherichia coli* kanamycin resistance gene into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: Selection of mutants defective in photosynthesis.
 14. Chauvet, F., Vries, L.D., Ende, A.V., and Van Arkel, G.A., 1986. A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Mol. Gen. Genet.* **204**: 185-191.
 15. Chitinis, P.R., and Nelson, N. 1991. Molecular cloning of the genes encoding two chaperone proteins of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **266**: 58-65.
 16. Chitinis, P.R., Reilly, P.A., Miedel, M.C., and Nelson, N. 1989a. Structure and targeted mutagenesis of the gene encoding 8-kDa subunit of photosystem I from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **264**: 18374-18380.
 17. Chitinis, P.R., Reilly, P.A., and Nelson, N. 1989 b. Insertional inactivation of the gene encoding subunit II of photosystem I from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **264**: 18381-18385.
 18. Debus, R.J., Barry, B.A., Babcock, G.T., and McIntosh, L. 1988a. Site-directed mutagenesis identifies a tyrosine radical involved in the photosynthetic oxygen-evolving system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 427-430.
 19. Debus, R.J., Barry, B.A., Sithole, I., Babcock, G.Y., and McIntosh, L. 1988b. Directed mutagenesis indicates that the donor to P⁺ in photosystem II is tyrosine-161 of the D1 polypeptide. *Biochemistry.* **27**: 9071-9074.
 20. Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H. 1985. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature.* **318**: 618-624.
 21. Dzelzkans, V.A., and Bogorad, L. 1986. Stable transformation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 induced by UV irradiation. *J. Bacteriol.* **165**: 964-971.
 22. Dzelzkans, V.A., and Bogorad, L. 1987. Genetic and biochemical analysis of cyanobacteria defective in photosynthetic oxygen evolution. *Progress in Photosynthesis Research.* **4**: 841-844.
 23. Dzelzkans, V.A., and Bogorad, L. 1988. Molecular analysis of a mutant defective in photosynthetic oxygen evolution and isolation of a photosynthetic oxygen evolution and isolation of a complementing clone by a novel screening procedure. *EMBO J.* **7**: 333-338.
 24. Dzelzkans, V.A., and Bogorad, L. 1989. Spectral Properties and composition of reaction center and ancillary polypeptide complexes of photosystem II deficient mutant of *Synechocystis* 6803. *Plant Physiol.* **90**: 617-623.
 25. Ferino, F., and Chauvet, F. 1989. A promoter-probe vector-host system for the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803. *Gene.* **84**: 257-266.
 26. Ford, R.C., and Holzenbure, A. 1988. Investigation of the structure of rimeric and monomeric photosystem I reaction centre complexes. *EMBO J.* **7**: 2287-2293.
 27. Friedberg, D. 1988. Use of Reporter Genes in Cyanobacteria. *Methods Enzymol.* **167**: 736-747.
 28. Gombos, Z., Wada, H., and Murata, N. 1991.

- Direct evaluation of effects of fatty-acid unsaturation on the thermal properties of photosynthetic activities, as studied by mutation and transformation of *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* **13**: 367-370.
29. Grigorieva, G., and Shestakov, S. 1982. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* **13**: 367-370.
 30. Herdman, B.M., Janvier, M., Rippka, R., and Stanier, R.Y. 1979. Genome size of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiology.* **111**: 73-85.
 31. Hounmard, J., and Maarsac, N.R. 1988. Cyanobacterial Genetic Tools: Current status. *Methods Enzymol.* **167**: 808-847.
 32. Jansson, C., Debus, R.J., Osiewacz, H.D., Gurevitz, M., and McIntosh, L. 1987. Construction of an obligate photoheterotrophic mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Physiol.* **85**: 1021-1025.
 33. Jeanjean, R., Onana, B., Peschek, G.A., and Joeset, F. 1990. Mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 impaired in respiration and unable to tolerate high salt concentrations. *FEMS. Microbiol. Lett.* **68**: 125-130.
 34. Kreps, S., Ferino, F., Mosrin, Christine., Gerits, J., Mergeay, M., and Thuriaux, P. 1990. Conjugative transfer and autonomous replication of a promiscuous IncQ plasmid in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Mol. Gen. Genet.* **221**: 129-133.
 35. Kuhlemeier, C.J., Hardon, E.M., Arker, G.A.V., Vate, V.D. 1985. Self-cloning in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2: fate of a cloned gene after reintroduction. *Plasmid.* **14**: 200-208.
 36. Labarre, J., Chauvat, F., and Thuriaux, P. 1989. Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* Strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **171**: 3449-3457.
 37. Labarre, J., Thuriaux, P., and Chauvat, F. 1987. Genetic analysis of amino acid transport in the facultatively heterotrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain 6803. *J. Bacteriol.* **196**: 4668-4673.
 38. Mayes, S.R., and Barber, J. 1990. Nucleotide sequence of the *psbH* gene of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Nuc. Acids Res.* **18**: 194.
 39. Meng, B.Y., Tanaka, M., Wakasugi, T., Ohme, M., Shinozaki, K., Sugiura, M. 1988. Co-transcription of the genes encoding two P700 chlorophyll a apoproteins with the gene for ribosomal protein CS14: determination of the transcriptional initiation site by *in vitro* capping. *Curr Genet.* **14**: 395-400.
 40. Michel, H., and Deisenhofer, J. 1988. Relevance of the photosynthetic reaction center from purple bacteria to the structure of photosystem II. *Biochemistry.* **27**: 1-7.
 41. Mohamed, A., and Jansson, C. 1989. Influence of light on accumulation of photosynthesis-specific transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol. Biology.* **13**: 693-700.
 42. Mullet, T.E., 1988. Chloroplast development and gene expression. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **39**: 475-502.
 43. Osiewacz, H.D., McIntosh, L. 1987. Nucleotide sequence of a member of the *psbA* multigene family from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Nucl. Acids. Res.* **15**: 10585.
 44. Pakrasi, H.B., Williams, J.G.K., and Arntzen, C.J. 1988. Targeted mutagenesis of the *psbE* and *psbF* genes blocks photosynthetic electron transport: evidence for a functional role of cytochrome b in photosystem II. *EMBO J.* **7**: 325-332.
 45. Pakrasi, H.B., Williams, J.G.K., and Arntzen, C.J. 1987. Genetically engineered cytochrome B559 mutants of the cyanobacterium, *Synechocystis* 6803. *Progress in Photosynthesis Research.* **4**: 813-816.
 46. Philbrick, J.B., and Zilinskas, B.A. 1988. Cloning, nucleotide sequence and mutational analysis of the gene encoding the photosystem II manganese-stabilizing polypeptide of *Synechocystis* 6803. *Mol. Gen. Genet.* **212**: 418-425.
 47. Ravnkar, P.D., Debus, R., Sevrinck, J., Sae-taert, P., and McIntosh, L. 1989. Nucleotide sequence of a second *psbA* gene from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Nuc. Acids. Res.* **17**: 3991.
 48. Reilly, P. Hulmes, J.D., Pan, Yu-Ching E., and

- Nelson, N. 1988. Molecular cloning and sequencing of the *psaD* gene encoding subunit II of photosystem I from the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. of Biol. Chem.* **263**: 17658-17662.
49. Rippka, B.R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., and Stanier, R.Y., 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Gen. Microbiol.* **111**: 1-61.
50. Rogner, M., Nixon, P.J., and Diner, B.A. 1990. Purification and characterization of photosystem I and photosystem II core complexes from wild-type and phycocyanin-deficient strains of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *J. of Biol. Chem.* **265**: 6180-6196.
51. Schaefer, M.R., and Golden, S.S. 1989a. Differential expression of members of a cyanobacterial *psbA* gene family in response to light. *J. Bact.* **171**: 3973-3981.
52. Schaefer, M.R., and Golden, S.S. 1989b. Light availability influences the ratio of two forms of D1 in cyanobacterial thylakoids. *J. Biol. Chem.* **264**: 7412-7417.
53. Schmetterer, G.R. 1990. kSequence conservation among the glucose transporter from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and mammalian glucose transporters. *ant Mol. Biology.* **14**: 697-706.
54. Smart, L.B., and McIntosh, L. 1991a. Expression of photosynthesis genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: *psaA-psaB* and *psbA* transcripts accumulate in dark-grown cells. *Plant Mol. Biology.* **17**: 959-971.
55. Smart, L.B., and Anderson, S.L., and McIntosh, L. 1991b. Targeted genetic inactivation of the photosystem I reaction center in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *EMBO J.* **10**: 3289-3296.
56. Steinmuller, K., Ley, A.C., Steinmetz, A.A., Sayer, R.T., and Bogorad, L. 1989. Characterization of the *ndhC-psbG-ORF157/159* operon of maize plastid DNA and of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Gen. Genet.* **216**: 60-69.
57. Su, X., and Bogorad, L. 1991. Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 light sensitive mutant caused by mutation on phosphoribulose kinase. *J. Biol. Chem. In press.*
58. Vermaas, W.F.J., Williams, J.G.K., and Arntzen, C.J. 1987a. Sequencing and modification of *psbB*, the gene encoding the CP-47 protein of photosystem II, in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol. Biol.* **8**: 317-326.
59. Vermaas, W.F.J., Williams, J. G.K., Chisholm, D.A., and Arntzen, C.J. 1987b. Site-directed mutagenesis in the photosystem II gene *psbD*, encoding the D2 protein. *Progress in Photosynthesis Research.* **4**: 805.
60. Vermaas, W.F.J., Williams, J. G.K., Rutherford, A.W., Mathis, P., and Arntzen, C.J. 1986. Genetically engineered mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 lacks the photosystem II chlorophyll II-binding protein CP-47. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 9474-9477.
61. Wada, H., Gombos, Z., and Murata, N. 1990. Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation. *Nature.* **347**: 200-203.
62. Williams, J. G.K. and Chisholm, D.A. 1987. Nucleotide sequences of both *psbD* genes from the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Progress in Photosynthesis Research.* **4**: 809-812.
63. Witt, I., Witt, H.T., Gerken, S., Saenger, W., Dekker, J.P., and Rogner, M. 1987. Crystallization of photoactive protein complex from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. *FEBS Lett.* **221**: 260-264.
64. Zanetti, G., and Merati, G. 1987. Interaction between photosystem I and ferredoxin: Identification by chemical cross-linking of the polypeptide which binds ferredoxin. *Eur. J. Biochem.* **169**: 143-146.
65. Zhang, Z.H., Mayes, S.R., and Barber, J. 1990. Nucleotide sequence of the *psbK* gene of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Nuc. Acids Res.* **18**: 1284.
66. Zilber, A., and Malkin, R. 1988. Ferredoxin cross-links to a 22 kDa subunit of photosystem I. *Plant Physiol.* **88**: 810-814.
67. Zilber, A., and Malkin, R. 1988. Ferredoxin cross-links to a 22 kDa subunit of photosystem I. *Plant Physiol.* **88**: 810-814.