

*Chlamydomonas*에서 분리한 DNA Methylase와 엽록체 DNA Methylation

金南坤·金載潤·李舜熙·李康吾*·金榮敏·朴基榮**
(延世大學校 理科學 生物學科, *三育大學校 生物學科, **順天大學校 生物學科)

DNA Methylase and Chloroplast DNA Methylation in *Chlamydomonas*

Kim, Nam Gon, Jae Yoon Kim, Sun Hi Lee, Kang Oh Lee*,
Young Min Kim and Ky Young Park**

(Department of Biology, Yonsei University, Seoul,

*Department of Biology, Sahmyook University, Seoul and

***Department of Biology, Suncheon National University, Suncheon)

ABSTRACT

Two kinds of DNA methylases were purified from *Chlamydomonas* 21 gr(mt⁺) gametic cells to determine the DNA methylases related to chloroplast DNA methylation and to examine their affinities for various DNAs. Two DNA methylases had distinct physical properties under the same condition of pH and ionic strength, and had different molecular weights as determined on a non-denatured gradient polyacrylamide gel electrophoresis. As the two enzymes had similar enzymatic activities on λ phage DNA and non-methylated λ DNA, it is suspected that they may act on cytosine methylation. In contrast with DNA methylase I, DNA methylase II showed a higher methyl-incorporation rate into poly(dG-dC)·poly(dG-dC) than poly(dA-dC)·poly(dG-dT). Therefore, it may have a greater affinity for (G-C) sequence than (A-C). When chloroplast DNA was isolated from *Chlamydomonas* in the vegetative and gametic stages and the activities of DNA methylase I and II were examined on these DNAs, they revealed 20% and 10% lower rates, respectively, of methyl-incorporation into the gametic chloroplast DNA than into the vegetative DNA.

서론

일반적으로 DNA methylation은 생물학적으로 매우 중요한 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. 원핵생물에 있어서 DNA methylation의 역할은 외부로부터 도입된 DNA와 자신의 DNA를 구별 인지하여 보호하는, modification-restriction system에 의한 보호기작으로 알려져 있으며(Messer and Noyer-Weidner, 1988), DNA 복제의 mismatch repair 기작에 있어 old strand(parental strand)와 new strand(daughter strand)를 구별 인지하게 하는 기능을

한다고 보고되어 있다(Barrus and Marinus, 1989). 또한 진핵생물의 핵 DNA methylation은 원핵생물에 비하여 알려진 것이 많지 않으나 transcription 억제를 통한 유전자 발현의 조절(Razin and Riggs, 1980; Cedar, 1988)이나, 이분 통한 세포 분화 등에 관여하리라 생각되고 있으며(Holliday and Pugh, 1975; Devajothi and Brahmachari, 1989) DNA 복제시 initiation을 조절할 것이라는 가설도 제안되어 있다(Aharon and Freidman, 1981). 이렇게 생물체의 발생, 분화, 유전 등의 과정에 중요하게 관여하는 DNA methylation은 DNA methylase에 의하여 methyl기 공여체인 S-adenosylmethionine(SAM)으로부터 DNA 염기중 adenine의 6-이나 4-amino기에, cytosine의 경우 5-carbon으로 methyl기가 전달됨으로써 일어나는데 그러한 methy-

본 연구는 1991년도 문교부 기초과학육성연구비 지원에 의한 것임.

lation의 경향은 종에 따라 특이적이다.

원핵생물의 경우에는 DNA 염기종 cytosine과 adenine에서 methylation이 발견되나 진핵생물에서는 핵 DNA의 경우 일반적으로 cytosine에서만 methylation이 발견되며 (Aharan and Freidman, 1981), mitochondrial DNA에서는 원핵생물과 마찬가지로 adenine에서도 발견된다 (Vanyushin *et al.*, 1988). 이러한 염기특이성 뿐만 아니라 sequence(또는 site) 특이성도 존재함으로 (Selker, 1990; Vanyushin, 1988) 그 생물학적인 중요성도 크나 하겠다. 진핵생물에 있어서, 핵 DNA에서 발견되는 이러한 DNA methylation은 분화 단계의 chromoplast나 amyloplast에서 발견되는 것을 제외하고 (Ngernprasirtsiri *et al.*, 1988; Kobayashi *et al.*, 1990) 일반적으로 plastid DNA에서는 일어나지 않으나 예외적으로 *Chlamydomonas*에 있어서는 5-methylcytosine의 검출과 함께 제한효소를 가지고 수행한 연구에서 염록체 DNA에 methylation이 되어 있다고 확인되었다 (Dyer, 1982; Royer and Sager, 1979).

한편, 단세포성 녹조류인 *Chlamydomonas reinhardtii*는 광합성을 연구하는 재료인 뿐만 아니라 동형배우체를 형성하는 종에 있어 cytoplasmic gene 특히, 염록체 DNA의 모성유전을 설명하는 모델로서 많은 연구가 행하여져 왔다 (Gillham, 1974; Sager, 1981; Kuroiwa, 1988). *Chlamydomonas*에 있어 염록체 DNA의 모성유전은 1954년, streptomycine에 대한 저항성을 가지는 세포질 유전인자의 비멘델성(모성) 유전을 통하여 최초로 보고된 이래로 (Sager, 1954) 모성유전의 기작은 아마도 효소반응에 근거를 둔 음성 기원 염록체 DNA의 우선적인 파괴에 의하여 이루어지는 것으로 생각되고 있다 (Sager, 1984; Kuroiwa, 1986). 이러한 생각을 이끌어내는 가설로 그중 타당성있게 받아들여지고 있는 것은 원핵생물에서 존재하는 modification-restriction system이 진핵생물인 *Chlamydomonas*의 생활 시기에 따라 존재하여, 즉 영양 성장기의 세포가 배우체가 될 때 선택적으로 자성 배우체의 염록체 DNA에 methylation이 일어나서 접합체 형성시, 활성화된 제한효소의 공격으로부터 보호되고 methylation이 일어나지 않는 음성 배우체의 염록체 DNA는 파괴되어, 결과적으로 모성 기원의 염록체 DNA가 딸세포로 전달되는 염록체 DNA의 모성유전이 일어난다는 것이다 (Sager, 1981).

이러한 가설은 자성 배우체의 염록체 DNA에 특이적으로 methylation이 일어난다는 관찰에 근거한 것이며 (Burton *et al.*, 1979), *Chlamydomonas*의 mating type과 생활시기 별로 상이한 활성도를 나타내는 DNA methylase의 존재를 확인함으로써 제기되었다 (Sano, 1981). 또한, 염록체 DNA의 모성유전에 대한 돌연변이체를 사용한 실험에서의 결과도 위에서 제기된 가설을 뒷받침하고 있다. 즉, 음성세포에 UV를 조사하여 인위적으로 양성유전을 나타내는 돌

연변이체 mat-1(mating type minus)을 유도시킨 경우, 그 음성 배우체의 염록체 DNA에 methylation이 일어난다는 것이 보고되었고 (Sager *et al.*, 1982), 영양생장기의 음성과 자성의 염록체 DNA 모두에 이미 광범위한 methylation이 일어나 있음에도 불구하고, 정상적인 모성유전이 일어남으로써 모성유전에 modification-restriction system이 관여할 것이라는 가설에 반대되는 근거를 제시하던 me-1 돌연변이체의 경우 (Bolen *et al.*, 1982), 자성의 배우체에서만 선택적으로 methylation이 더 일어난다는 사실이 밝혀지면서 modification-restriction system 가설을 더욱 가능성 높게 해 주었다 (Sager and Grabowy, 1983). 그러나, 한편으로는 methylation inhibitor(5-azacytidine, L-ethionine)를 처리한 결과, 약 70% 정도 염록체 DNA의 methylation이 억제되었음에도 불구하고 정상적인 모성유전이 일어나므로, modification-restriction 가설에 반대되는 결과도 보고되었다 (Feng and Chiang, 1984). 그렇지만 이 보고는 methylation의 70% 억제는 제한 때문에, me-1 돌연변이체의 경우와 더불어 모성유전에 자성배우체의 염록체 DNA에서 일어나는 광범위한 methylation이 관여하는 것이라기 보다는 특정 부위에서 일어나는 특이적인 DNA methylation이 모성유전에 관여할 것이라는 가능성을 제시해 준다고도 볼 수 있겠다 (Feng and Chiang, 1984; Sager and Grabowy, 1983).

그러나, 아직 자성 배우체에 특이적으로 일어나는 DNA methylation에 민감한 제한효소가 발견되지 않고 있으며, 전체 세포내에서 추출한 DNA methylase가 염록체 DNA의 methylation에 관여하리라는 근거가 미흡하며 또한 methylase의 특성도 명확하게 밝혀져 있지 않기 때문에 이러한 가설에 의해 모성유전을 설명하기에는 아직 미흡하다. 따라서, 본 실험에서는 먼저 *Chlamydomonas*의 배우체 시기에 존재하는 두 종류의 methylase를 분리하고, 그 염기(또는 sequence) 특이성과 여러가지 기질 DNA에 대한 친화력을 알아보았으며, 생활시기별로 분리한 염록체 DNA에 대한 methyl기의 incorporation 정도를 알아보았다.

재료 및 방법

실험재료. *Chlamydomonas reinhardtii*의 strain 21 gr (mating type +)을 미국의 Duke대학에서 분양받아 사용하였다. 합성 DNA인 poly(dG-dC)·poly(dG-dC), poly(dA-dC)·poly(dT-dG), poly(dI-dC)·poly(dI-dC)는 Pharmacia, S-adenosyl-L-[methyl-³H]-methionine(specific activity 88.7 Ci/mmole)은 Amersham, calf thymus DNA(type XV), calf thymus single strand DNA, *Micrococcus luteus* DNA는 Sigma에서 구입하여 사용하였으며, Hydroxylapatite는 Bio-rad에서 구입하였다.

세포의 배양. *Chlamydomonas reinhardtii*의 stock culture 및 영양생장기, 배우체시기의 유도과 배양은 Sager의 방법(1954)을 변형한 Snell(1982)의 방법을 이용하였으며, 배양장치로는 공기공급기와 공기여과기가 연결된 플라스크를 사용하여, 여과된 공기를 계속해서 공급하면서 12시간 간격으로 안조건, 광조건을 교대로 유지하면서 배양하였다.

완충용액의 제조. 완충용액은 Sano(1980)의 방법과 Lee와 Lee(1989)의 방법을 변형하여 사용하였다. 완충용액 I은 50 mM Tris-HCl(pH 7.6), 0.15 M potassium chloride, 1 mM β -mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 10% glycerol로 조성하였고, 완충용액 II는 20 mM potassium phosphate (pH 7.2), 20 mM sodium chloride, 1 mM β -mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 10% glycerol로 완충용액 III은 10 mM potassium phosphate(pH 6.0), 1 mM β -mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 10% glycerol로 조성하여 사용하였다. 이 완충용액들은 사용전에 고압멸균기로 멸균하여 사용하였다. 단, β -mercaptoethanol은 고압멸균 후에 첨가하였다.

DNA methylase의 분리. *Chlamydomonas*의 배우체시기에서 DNA methylase의 분리는 Lee and Lee(1989)와 Sano 등(1981)의 방법을 변형하여 사용하였다. *Chlamydomonas reinhardtii* 21 gr(mt⁻)을 영양생장기 배지 5 Liter에서 여과된 공기를 공급하면서 12시간 광조건, 12시간 안조건을 교대로 하여 4×10^6 cell/ml이 되도록 배양한 후, 원심분리(1500×g, 5분)로 세포를 모은 뒤 배우체 유도배지 700 ml에 재현탁하여 24시간동안 2000 lux의 빛을 조사하여 배우체를 유도하였다. 이 배우체 세포를 원심분리(1500×g, 5분)로 수확하여 완충액 I에 2 ml/g·cell이 되도록 현탁하여 초음파 파쇄기로 2회/g·cell의 횡수로 세포를 파쇄하였다. 이것을 원심분리(15,000×g, 30분)하여 상정액을 취하고 다시 초원심분리(100,000×g, 2시간)하여 상정액을 취하였다. 이 상정액을 ammonium sulfate 분획을 하여 완충액 II에서 20시간 투석을 하고, 미리 완충액 II에 평형시킨 DEAE-cellulose column(2.3×15 cm)에 적용하였다. 22.5 ml/시간의 속도로 완충액 II를 흘려준 후 0.02-0.5 M NaCl linear gradient로 용출시켰다. 이때 완충액 II에 흘러 나온 효소 활성분획을 DNA methylase I이라 하고, NaCl linear gradient에 의해 용출된 효소 활성분획을 DNA methylase II로 하였다(Fig. 1).

DNA methylase I의 분리. DNA methylase I의 효소 활성분획을 모아 YM-30 ultramembrane filter를 이용하여 여과한 후, 이것을 완충액 III에서 20시간 투석하고 미리 완충액 III에 평형시킨 phospho-cellulose column에 적용시켰다. 20 ml/시간의 속도로 완충액 III을 흘려서 흘러나온 효소 활성분획을 모아 amicon 농축기로 농축하고 완충액 II에 20시간 투석하여, 미리 완충액 II에 평형시킨 hydroxy-

lapatite column(1.7×10 cm)에 적용하였다. 완충액 II로 용출시켜 흘러나온 효소 활성분획을 모아 DNA methylase I의 효소원으로 사용하였다(Fig. 1).

DNA methylase II의 분리. NaCl linear gradient로 용출시킨 DNA methylase II 활성분획을 모아 YM-30 ultramembrane filter로 여과한 뒤, 완충액 II 2 Liter에 20시간 투석시켰다. 위 효소원을 완충액 II에 미리 평형시킨 hydroxylapatite column에 적용하고 완충액 II를 20 ml/시간의 속도로 용출시켜 흘러나온 효소 활성분획을 모으고 이것을 다시 DEAE-cellulose column(1.2×10 cm)에 loading하여 0.02-0.5 M NaCl linear gradient로 다시 한번 용출시켰다. 여기서 흘러나온 효소 활성분획을 모아 DNA methylase II의 최종 효소원으로 사용하였다(Fig. 1).

DNA methylase 활성도 측정. DNA methylase 활성의 측정법은 Lee and Lee(1989)의 방법에 따라 수행하였으며, 1시간 반응시 1 pmole의 methyl기를 calf thymus DNA에 incorporation 시키는 양을 1 unit로 정하였다. 효소 활성도 측정에 사용되는 표준 반응용액은 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 6 mM dithiothreitol, 10 mM EDTA, 0.8 μ Ci S-adenosylmethionine(specific activity 88.7 Ci/mmmole), 2 μ g calf thymus DNA로 하였으며, 여러가지 기질 DNA에 대한 효소 활성을 본 경우는 calf thymus DNA 대신에 *Micrococcus luteus* DNA, calf thymus single stand DNA, λ phage DNA, non-methylated λ phage DNA를 각 1 μ g 처리하였고, 최종 부피가 20 μ l가 되게 하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 이 반응용액 전체를 DE-81 paper에 점적하여 20분간 건조시킨 후, 광량의 0.2 M ammonium bicarbonate 용액으로 세척하고 ethanol로 2회, ethyl ether로 1회 세척한 후 건조시켜 이 paper를 cocktail 용액 5 ml에 넣고 liquid scintillation counter로 방사능을 측정하였다.

***Chlamydomonas* 엽록체 DNA의 분리.** 엽록체 DNA의 분리는 Show 등(1988)과 Palmer(1982)의 방법을 변형하여 수행하였다. 지수 성장기 직전까지 배양한 영양생장기 세포 500 ml과 배우체기의 세포 500 ml을 각각 원심분리(6000×g, 5분)로 수확하여 20 ml의 증류수에 현탁하고 0.5 M EDTA 2 ml, β -mercaptoethanol 0.5 ml을 첨가하여 상온에서 15분간 방치한 후, 원심분리(12,000×g, 5분)하여 상정액을 버리고 freeze-thaw 방법을 여러번 반복하여 파쇄하였고 그 후 용액 A(0.2 M EDTA, pH 9.5-10, 0.15 M NaCl, 4% SDS, 50 μ g RNase)를 처리하여 50°C에서 10분간 반응시키고, 최종농도가 1 mg/ml이 되도록 pronase를 처리하여 50°C에서 5시간 방치하였다. Phenol/chloroform/isoamylalcohol(25 : 24 : 1)을 10 ml 첨가하여 살며시 10분 동안 섞어준 후 원심분리(12,000×g, 10분)하여 상층부를 취해서, 미리 냉각시킨 ethanol을 2배 부피로 첨가하여 DNA를 침전시킨 뒤 TE 완충액(10 mM Tris-HCl, 1 mM

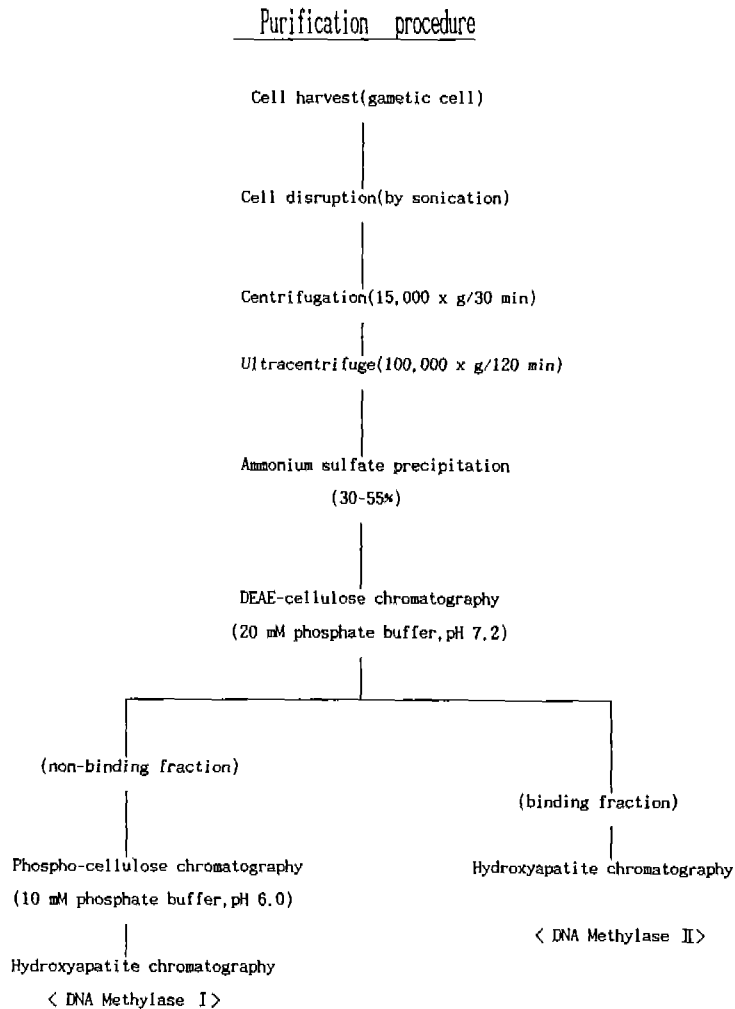


Fig. 1. Purification scheme of DNA methylase I and II from *Chlamydomonas reinhardtii*. All purification steps were carried out at 4°C.

EDTA, pH 8.0) 1 ml에 녹여 cesium chloride 밀도구배 초원심 분리법(60,000 rpm, 24시간, 20°C)에 의해 염록체 DNA를 분리하였고 TE 완충액에 녹여 영양생장기와 배우체기의 염록체 DNA 원으로 사용하였다.

합성 DNA에 대한 DNA methylase I, II의 활성도 측정. 각각의 합성 DNA에 대하여, 분리한 DNA methylase의 활성도를 측정하기 위하여 표준 반응용액에서 기질인 calf thymus DNA 대신에 TE 완충액에 녹인 poly(dG-dC)·poly(dG-dC)와 poly(dA-dC)·poly(dG-dT), 그리고 poly(dI-dC)·poly(dI-dC)를 1 µg 첨가하여 30분간 반응시켜 methyl기의 incorporation 정도를 측정하였다.

***Chlamydomonas*의 염록체 DNA에 대한 methylase I, II의 활성도 측정.** *Chlamydomonas*의 염록체 DNA에 대한 DNA methylase I, II의 활성도를 조사하기 위하여 표준 반응용액에서 calf thymus DNA 대신에 염록체 DNA 3 µl(1/100로 희석시 $A_{260}=0.03$)를 첨가하고 30분간 반응시킨 뒤 효소 활성측정법에 따라 methyl기의 incorporation 정도를 측정하였다.

DNA methylase I II에 대한 nondenatured gradient polyacrylamide gel 전기영동. Walker(1984)의 방법을 이용하여 *Chlamydomonas*에서 분리한 DNA methylase I, II를 비교 조사하였다.

결과 및 고찰

DNA methylase I, II의 분리 및 정제. Lee와 Lee (1989)의 방법에 따라 *Chlamydomonas* 21 gr(mt⁻) strain의 배양액에서 DNA methylase를 분리하였다. DEAE-cellulose chromatography 수행시 column에 binding되지 않고 흘러 나오는 분획과 0.1 M NaCl 농도에서 용출되어 나오는 분획 모두에 DNA methylase 활성도가 존재하였으며(Fig. 2), 두 분획을 Nondenatured gradient polyacrylamide gel 전기영동을 통하여 비교하여 본 결과 서로 다른 종류로 확인되었다(Fig. 4). 이것은 Lee와 Lee(1989)의 결과와 동일하며, 또한 column에 binding하지 않고 흘러 나오는 분획을 보아, 동일한 조건의 DEAE-cellulose column에 다시 적용하였을 때에도 binding하지 않으므로 두 종류의 DNA methylases는 동일 pH와 ionic strength에서 서로 다른 물리적 성질을 가진다고 생각된다. 따라서, DEAE-cellulose column에 binding하지 않은 분획과 0.1 M NaCl 농도에서

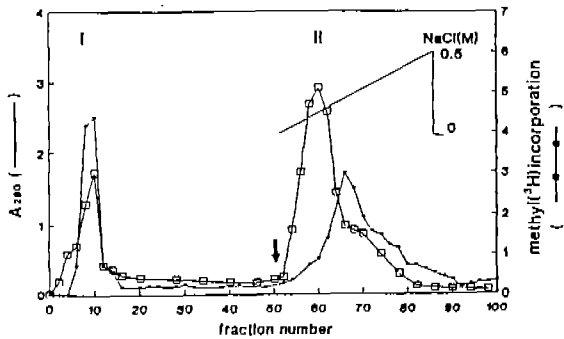


Fig. 2. Fraction patterns of DNA methylase I, II from DEAE-cellulose chromatography. Arrow indicates elution point.

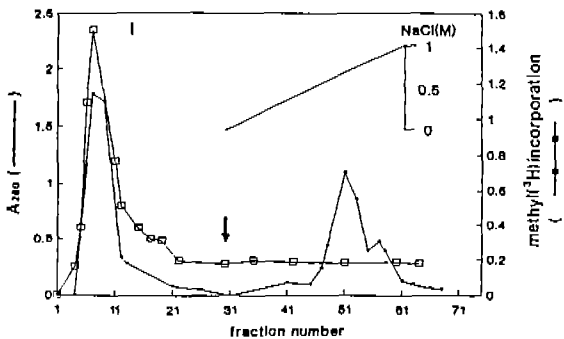


Fig. 3. Fraction patterns of DNA methylase I from phospho-cellulose chromatography. Arrow indicates elution point.

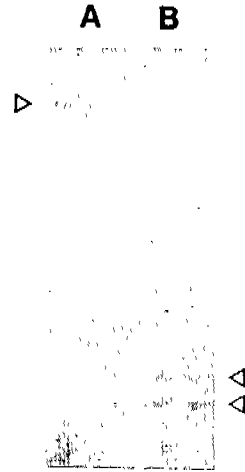


Fig. 4. Nondenatured gradient polyacrylamide gel electrophoresis of DNA methylase I, II. Gradient gel containing 5-20% acrylamide was run according to Walker (1984). A, DNA methylase I; B, DNA methylase II.

흘러나오는 효소 활성분획을 각각 DNA methylase I, II라 정하고 다음 단계로 진행하였다.

DNA methylase I의 분리. DEAE-cellulose column에 binding하지 않는 효소 활성분획을 모아서 동일 조건의 cationic ion exchanger chromatography인 phospho-cellulose column에 적용하였을 때 binding하지 않았다. 따라서 10 mM potassium phosphate(pH 6.0) 그리고 NaCl을 제거하여 pH와 ionic strength를 낮춘 phospho-cellulose column에 적용하였다(Fig. 3). 그 결과 단백질의 양은 50% 감소하였으나 효소 활성도 40% 감소함으로 specific activity는 1.2배 증가하는데 그쳤다. 이러한 결과는 binding하여 흘러나온 분획에서는 완충액 II로 투석한 뒤에도 전혀 효소 활성이 나타나지 않은 것으로 보아 phospho-cellulose column을 수행하는 중에 효소가 불안정하여 그 활성을 잃었기 때문이라고 생각된다. 이후 이 효소 활성분획을 모아 hydroxylapatite column에 적용하여 흘러나온 효소 활성분획을 모아 nondenatured gradient(5-20%) polyacrylamide gel 전기영동을 수행한 결과 1개의 major band와 1개의 minor band가 확인되었다(Fig. 4). 여기서는 DNA methylase II와 동일한 band가 나타나지 않았으므로 최종 DNA methylase I의 효소원으로 사용하였다.

DNA methylase II의 분리. DEAE-cellulose chromatography에서 0.1 M NaCl 농도에서 용출되어 나오는 효소 활성분획을 모아 Lee와 Lee(1989)의 방법에 따라 specific activity 25 units/mg·protein까지 분리하였다. Nondenatured gradient polyacrylamide gel 전기영동으로 확

Table 1. Enzymatic methylation of various substrate DNA by DNA methylase I and II. Data are expressed as methyl-incorporation (cpm). The values in parentheses are the percent of calf thymus DNA (double strand)

DNA	DNA Methylase	DNA Methylase I	DNA Methylase II
Calf thymus DNA (double strand)		1853 (100)	5102 (100)
Calf thymus DNA (single strand)		1832 (99)	3116 (61)
<i>Micrococcus luteus</i> DNA		3655 (197)	6099 (120)
λ phage DNA		1667 (90)	4368 (86)
Non-methylated λ phage DNA		1532 (83)	4641 (90)

인한 결과 2개의 major band와 3개의 minor band들을 확인한 후, 이것을 최종 DNA methylase II 효소원으로 사용하였다(Fig. 4).

여러가지 기질 DNA에 대한 DNA methylase I, II의 활성도. Calf thymus double strand DNA에 methyl기가 incorporation되는 양을 100%로 하여 calf thymus single strand DNA, *Micrococcus luteus* DNA, λ phage DNA, Non-methylated λ phage DNA를 기질로 하여 *Chlamydomonas*의 DNA methylase의 활성을 측정하였다(Table 1). 일반적으로 원핵생물에서 발견되는 DNA methylase는 double strand에서 그 활성도가 높은 반면 몇가지 진핵생물의 DNA methylase는 denatured(single strand) DNA에 더 높은 경우도 발견된다(Razin and Friedman, 1981). *Chlamydomonas*에서 부분 정제된 DNA methylase의 경우, DNA methylase I은 동일한 DNA 농도에서 double strand와 single strand calf thymus DNA에 거의 유사한 효소 활성을 나타내었으나, DNA methylase II는 single strand DNA에서 double strand DNA의 약 60% 정도로 더 낮은 methyl기의 incorporation을 나타내었다(Table 1). 또한 adenine에 methylation 되어 있는 λ phage DNA와 non-methylated λ phage DNA의 경우, DNA methylase I, II에 의한 methyl기의 incorporation 정도가 거의 유사한 것으로 보아 두 methylase는 DNA 염기중 adenine에는 효소 활성에 나타내지 않는 것으로 생각된다. 또한 G+C content가 calf thymus DNA에 비해 높고, cytosine에 methylation이 안 되어 있는 *Micrococcus luteus* DNA의 경우, DNA methylase I은 100%, DNA methylase II는 20% 더 높게 나타났으므로(Table 1), 두 종류 모두 adenine 보다는 cytosine에 methylation을 수행하는 것으로 생각된다.

합성 DNA에 대한 DNA methylase I, II의 활성도. 분 리한 methylase의 DNA sequence에 대한 특이성을 알아

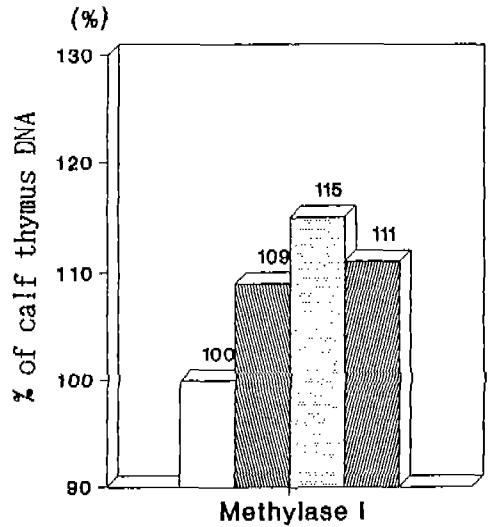


Fig. 5. Methyl- ^3H -incorporation into synthetic oligonucleotide by DNA methylase I. The values are percent the of calf thymus DNA (double strand). Symbols: □, calf thymus DNA; ▨, poly(dG-dC)·poly(dG-dC); ▩, poly(dI-dC)·poly(dI-dC); ▧, poly(dA-dC)·poly(dG-dT).

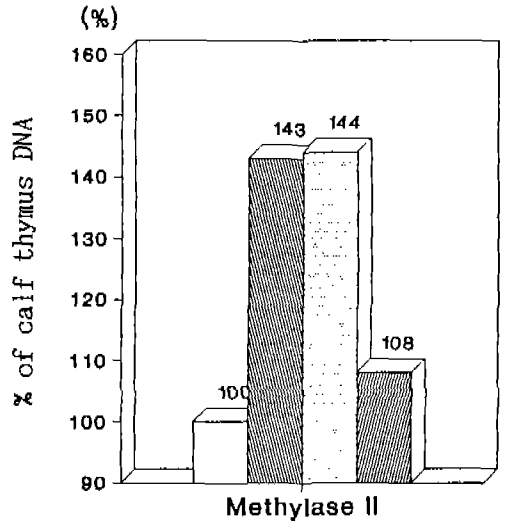


Fig. 6. Methyl- ^3H -incorporation into synthetic oligonucleotide by DNA methylase II. The values are percent the of calf thymus DNA (double strand). Symbols: □, calf thymus DNA; ▨, poly(dG-dC)·poly(dG-dC); ▩, poly(dI-dC)·poly(dI-dC); ▧, poly(dA-dC)·poly(dG-dT).

보기 위하여 일정한 염기의 반복으로 이루어진 poly(dG-dC)·poly(dG-dC), poly(dA-dC)·poly(dG-dT), 그리고 poly(dI-dC)·poly(dI-dC)의 합성 oligonucleotide를 기질로 하여

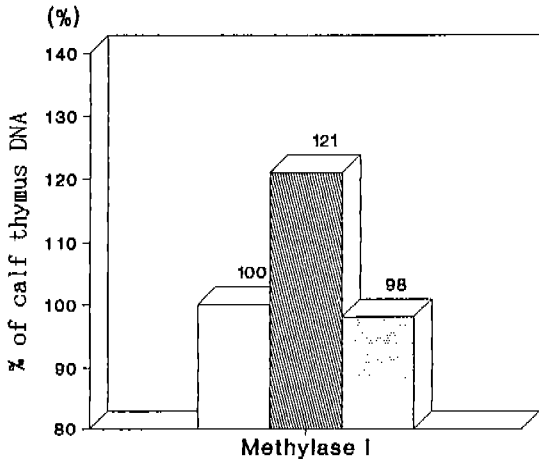


Fig. 7. Methyl-³H-incorporation into chloroplast DNAs of *Chlamydomonas* by DNA methylase I. The values are percent the of calf thymus DNA (double strand). Symbols: □, calf thymus DNA; ▨, vegetative chloroplast DNA; ▩, gametic chloroplast DNA.

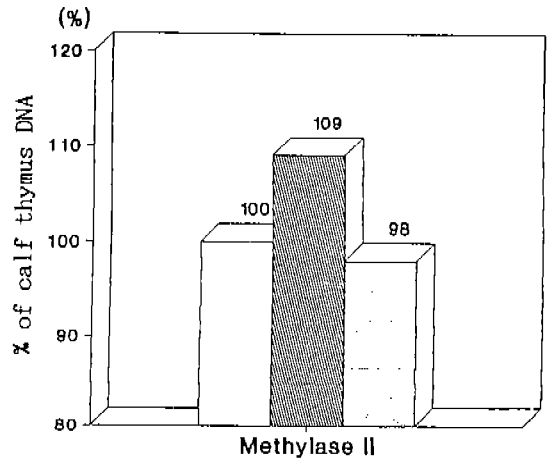


Fig. 8. Methyl-³H-incorporation into chloroplast DNAs of *Chlamydomonas* by DNA methylase II. The values are percent the of calf thymus DNA (double strand). Symbols: □, calf thymus DNA; ▨, vegetative chloroplast DNA; ▩, gametic chloroplast DNA.

DNA methylase I, II에 의한 methyl기의 incorporation 정도를 측정하여 보았다(Figs. 5 and 6). 일반적으로 포유류의 DNA methylase의 경우, poly(dI-dC)·poly(dI-dC)의 oligonucleotide는 다른 어떠한 기질 DNA보다 methyl기가 incorporation되는 정도가 10배 이상 높다고 알려져 있으며 (Pfeifer and Drahovsky, 1986), 진핵생물의 핵 DNA에서 발견되는 cytosine methylation의 대부분은 C-G dinucleotide의 cytosine에서 발견된다고 보고되어 있다(Grueubaum, 1982; Adams, 1990). *Chlamydomonas*에서 분리한 DNA methylase I에 의한 methyl-incorporation 정도는 동량의 calf thymus DNA를 기준으로 하였을 때 poly(dI-dC)·poly(dI-dC)에서 가장 높으나 poly(dG-dC)·poly(dG-dC)와 poly(dA-dC)·poly(dG-dT)에서는 별 차이가 나타나지 않았다. 그러나 DNA methylase II의 경우에는 calf thymus DNA를 기준으로 하였을 때, poly(dI-dC)·poly(dI-dC)와 poly(dG-dC)·poly(dG-dC)가 poly(dA-dC)·poly(dG-dT)보다 약 44% 정도 더 높은 methyl-incorporation을 나타내었다. 또한 이것은 poly(dG-dC)·poly(dG-dC)가 poly(dA-dC)·poly(dG-dT)보다 1.3배 더 높은 methyl-incorporation을 나타낸 것을 의미하며, 이것으로 보아 DNA methylase II는 A-C의 DNA 서열 보다는 G-C 서열을 더 선호한다고 생각할 수 있다.

***Chlamydomonas* 엽록체 DNA에 대한 DNA methylase I, II의 활성도.** *Chlamydomonas reinhardtii*의 자성 strain인 21 gr(mt⁻)의 영양생장기와 배우체기에서 추출한 엽록체 DNA에 대하여 DNA methylase의 활성도를 알아

보았다(Figs. 7 and 8). DNA Methylase I, II 모두 영양생장기에 비해 배우체 시기의 엽록체 DNA에 더 낮은 methyl-incorporation을 나타내었다. 이것은 자성 배우체의 엽록체 DNA에 methylation이 일어나 있기 때문에 영양생장기의 엽록체 DNA에 methylation이 더 많이 되는 것으로 생각되며 엽록체 DNA의 methylation은 cytosine에서만 발견된다는 보고(Royer and Sager, 1979)와 앞서의 여러가지 기질 DNA에 대한 효소 활성도를 측정한 실험(Table 1)의 결과를 함께 생각하여 볼 때, 분리한 DNA methylase I과 II는 cytosine methylation에 관여하리라 생각된다. 또한 calf thymus DNA에 methyl기를 incorporation시키는 양을 기준으로 하였을 때, DNA methylase II에 비해 DNA methylase I이 영양생장기의 엽록체 DNA보다 배우체기의 엽록체 DNA에서 methyl-incorporation시키는 정도가 20%로 그 감소하는 폭이 더 크게 나타났다(Figs. 7 and 8). 이러한 결과에 따라 *Chlamydomonas* 엽록체 DNA methylation에 관여하는 효소는 DNA methylase I이라고 추측할 수 있으나, 그러기 위해서는 DNA methylase I의 세포내 분포, 즉 엽록체 내에 존재여부를 확인하는 것이 먼저 이루어져야 하며, 또한 합성 DNA를 기질로 하여 수행한 실험의 결과를 고려한다면 DNA methylase I의 경우, 어떠한 DNA sequence 특이성을 찾아볼 수 없었기 때문에 (Fig. 5), 그에 대한 결론은 더 많은 연구가 행하여진 후에야 논의될 수 있을 것이다.

적 요

Chlamydomonas reinhardtii 21 gr(mt⁺) strain의 배우체로부터 두 종류의 DNA methylase를 부분 분리하여 몇가지 기질 DNA에 대한 효소 활성을 측정하였다. DNA methylase I과 II는 동일한 pH와 ionic strength에서 서로 상이한 물리적인 성질과 서로 다른 분자량을 가지며 DNA methylase I과 II는 모두가 DNA 염기 중 adenine보다는 cytosine에 methylation을 수행하는 것으로 생각된다. 합성 DNA를 사용한 실험에서 DNA methylase I과는 달리 DNA methylase II는 poly(dA-dC)·poly(dG-dT)에서 보다 poly(dG-dC)·poly(dG-dC)의 oligonucleotide에서 더 높은 효소 활성을 나타내었다. *Chlamydomonas reinhardtii*에서 추출한 염록체 DNA를 기질로 사용하였을 때 DNA methylase I과 II 모두가 배우체가 보다는 영양생장기의 염록체 DNA에 더 높은 활성을 나타내었다.

참 고 문 헌

- Adams, R.L.P. 1990. DNA methylation. *Biochem. J.* **265**: 309-320.
- 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.
- Cedar, H. 1988. DNA methylation and gene activity. *Cell* **53**: 3-4.
- Devajothi, C. and V. Brahmachari. 1989. Modulation of DNA methyltransferase during the life cycle of a mealybug *Planococcus lilacinus*. *FEBS Lett.* **250**: 134-138.
- 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.
- Gillham, N.W. 1974. Genetic analysis of the chloroplast and mitochondria genomes. *Ann. Rev. Genetics* **8**: 347-391.
- Grant, D.M., N.W. Gillham and J.E. Boynton. 1980. Inheritance of chloroplast DNA in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 6067-6071.
- Gruenbaum, Y., H. Cedar and A. Razin. 1982. Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase. *Nature* **295**: 620-622.
- Holliday and J.E. Pugh. 1975. DNA modification and gene activity during development. *Science* **187**: 226-232.
- Kobayashi, H., J. Ngernprasirtsiri and T. Akazawa. 1990. Transcriptional regulation and DNA methylation in plastids during transitional conversion of chloroplasts to chromoplasts. *EMBO J.* **9**: 307-313.
- Kuroiwa, T. 1985. Mechanisms of maternal inheritance of chloroplast DNA: an active digestion hypothesis. *Microbiol. Sci.* **2**: 267-270.
- Kuroiwa, T., S. Kawano and S. Nishibayashi. 1982. Epifluorescent microscopic evidence for maternal inheritance of chloroplast DNA. *Nature* **298**: 481-483.
- Kuroiwa, T., S. Nakamura, C. Sato and Y. Tsubo. 1985. Epifluorescent microscopic studies on the mechanism of preferential destruction of chloroplast nucleoids of male origin in zygotes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protoplasma* **125**: 43-52.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lee, M.M. and S.H. Lee. 1989. Effects of polyamines on the purified DNA methyltransferase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Korean J. Bot.* **32**: 331-342.
- Messer, W. and M. Noyer-Weidner. 1988. Timing and targeting: The biological functions of *Dam* methylase in *E. coli*. *Cell* **54**: 735-737.
- Nakamura, S., C. Sato and T. Kuroiwa. 1988. Polypeptides related to preferential digestion of male chloroplast nucleoids in *Chlamydomonas*. *Plant Science* **56**: 129-136.
- Ngernprasirtsiri, J., H. Kobayashi and T. Akazawa. 1988. DNA methylation as a mechanism of transcriptional regulation in non-photosynthetic plastids in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 4750-4754.
- Palmer, J.D. 1982. Physical and gene mapping of chloroplast DNA from *Atriplex triangularis* and *Cucumis sativa*. *Nucl. Acids Res.* **10**: 1593-1605.
- Pfeifer, G.P. and D. Drahovsky. 1986. Preferential binding of DNA methyltransferase and increased *de novo* methylation of deoxyinosine containing DNA. *FEBS Lett.* **207**: 75-78.
- Razin, A. and A.D. Riggs. 1980. DNA methylation and gene function. *Science* **210**: 604-610.
- Royer, B.D. and R. Sager. 1979. Methylation of chloroplast DNAs in the life cycle of *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 5794-5798.
- Sager, R. 1954. Mendelian and non-mendelian inheritance of streptomycin resistance in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **40**: 356-363.
- Sager, R. 1981. The application of DNA methylation studies to the analysis of chloroplast evolution. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **361**: 209-218.
- Sager, R. and C. 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., C. Grabowy and H. Sano. 1982. The *mat-1* gene in *Chlamydomonas* regulates DNA methylation during gametogenesis. *Cell* **24**: 41-47.
- Sager, R., H. Sano and C. Grabowy. 1984. Control of mater-

- nal inheritance by DNA methylase in *Chlamydomonas*. *Curr. topics Microbio. Immunol.* **108**: 157-173.
- Sano, H. and R. Sager. 1980. Deoxyribonucleic acid methyltransferase from the eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* **105**: 471-480.
- 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.
- Selker, E.U. 1990. DNA methylation and chromatin structure: a view from below. *TIBS.* **15**: 103-107.
- Show, C.H. 1988. *In Plant Molecular Biology: a Practical Approach*, C.H. Shaw (ed.). IRL Press. pp. 253-275.
- Snell, W.J. 1982. Study of the release of cell wall degrading enzyme during adhesion of *Chlamydomonas* gametes. *Exp. Cell Res.* **138**: 109-119.
- Vanyushin, B.F., N.I. Aleksandrushikina and M.D. Kirnos. 1988. N⁶-methyladenine in mitochondrial DNA of higher plants. *FEBS Lett.* **223**: 397-399.
- Vanyushin, B.F. and M.D. Kirnos. 1988. DNA methylation in plants. *Gene* **74**: 117-121.
- Walker, J.M. 1984. *Methods in Molecular Biology*. Volume 1: Proteins. J.M. Walker (ed). Humana Press, Clifton, New Jersey. pp. 57-62.
- William, G.B., C.T. Grabowy and R. Sager. 1978. Role of methylation in the modification and restriction of chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 1390-1394.

(1992. 10. 29 接受)