

*Chlamydomonas*의 Polyamine 含量變化와 葉綠體 DNA Methylation

張光錫·金載潤·李舜熙*·金榮敏·李康吾¹

延世大學校 理科學科 生物學科, ¹三育大學校 自然科學大學 生物學科

Chlamydomonas reinhardtii 배우체 유도기 동안에 polyamine 생합성 억제제인 MGBG[methylglyoxal bis-(guanyldihydrazone); SAMDC 억제제] 1 mM 처리구와 정상 대조구에서의 polyamine 함량 변화와 *Chlamydomonas*의 ct-DNA methylation과의 상호 연관성을 조사한 결과, 전반적으로 137C(+)와 137C(-)의 정상 대조구에서의 polyamine 수준은 배우체 유도기 전반에 걸쳐서 감소추세로 나타났으나, 특히 137C(+)가 137C(-)보다 polyamine 함량이 많았으며 동시에 감소량도 컸다. 1 mM MGBG 처리구에서는 137C(+)의 spermidine 함량이 정상 대조구보다 증가하였다. *In vitro*에서 ctDNA methylation에 대한 MGBG의 영향은 정상 대조구에서보다도 1 mM MGBG 처리구에서 약 20-30%의 ctDNA methylation 감소를 나타내었다. 또한, MGBG는 *in vitro*에서 DNA methylase에 대하여 억제효과를 나타내었다.

주요어: *Chlamydomonas*, polyamine, MGBG, DNA methylase, SAM decarboxylase

단세포성 녹조류인 *Chlamydomonas reinhardtii*는 광합성을 연구하는 재료일 뿐만 아니라 동형배우체를 형성하는 종에 있어서 cytoplasmic gene 특히, ctDNA의 모성유전을 설명하는 모델로써 많은 연구가 행하여져 왔다(Sager and Ramanis, 1973; Gillham, 1974; Kuroiwa, 1985). ctDNA의 모성유전의 기작은 아마도 효소반응에 근거를 둔 음성 기원의 ctDNA의 우선적인 파괴에 의하여 이루어지는 것으로 생각되고 있는데 (Sager, 1984; Kuroiwa, 1985), 이러한 가설은 자성배우체의 ctDNA에 특이적으로 methylation이 일어난다는 관찰에 근거한 것이며(Burton *et al.*, 1979), *Chlamydomonas*의 mating type과 생활시기별로 상이한 활성도를 나타내는 DNA methylases의 존재를 확인함으로써 제기되었다(Sano, 1981).

모든 생물에 일반적으로 널리 존재하여 이들의 성장과 분화과정에 깊이 관련되어 있는 것으로 알려진 polyamine은 *Chlamydomonas*에서 부분 분리한 DNA methylase(Lee and Lee, 1989)와 접합체에서 분리한 nuclease(Kim and Lee, 1990)의 활성을 *in vitro*에서 각각 억제하였다. 이러한 근거에 더하여 DNA methylation과 polyamines의 생합성과정은 공통의 전구체인 S-adenosylmethionine(SAM)을 각각 methyl기의 공여체(Adams and Burdon, 1983)와 aminopropyl기 공여체(Pegg

and Williams, 1969)로 사용된다는 점에서 또 하나의 연관성을 찾아볼 수 있겠다. Polyamine과 DNA methylation과의 관련성을 보면 polyamine 생합성시 amino기의 donor로 사용되는 SAM이 대부분의 생물에서 methylation시 methyl기의 공여체로도 쓰인다는 점을 들 수 있으며, fungus인 *Mucor roussii*는 발달과정에 따라 핵 DNA의 methylation 정도가 상이하며, 이때 polyamine 변화수준이 DNA methylation에 영향을 미쳐 DNA methylation을 억제함으로써 결국 유전자를 활성화시켜 세포분화에 관여할 것으로 보고되어 있다(Cano *et al.*, 1988).

MGBG[methylglyoxal bis-(guanyldihydrazone)]는 SAM decarboxylase에 대한 효과적인 가역적 억제제로서 특히 putrescine-activated mammalian SAM decarboxylase에 대한 경쟁 억제제로 잘 알려져 있다(William-Ashman and Schenone, 1972). *E. coli*의 Mg²⁺-activated SAM decarboxylase나 식물의 SAM decarboxylase 등에는 상대적으로 덜 효과적인 억제제로 작용되지만 아직까지는 이들 효소에 대하여 대체로 효과적으로 작용한다(Pegg and Jacobs, 1983; Yamanoha and Cohen, 1985).

본 연구에서는 위의 보고들을 근거로하여 ctDNA에 methylation이 일어나는 배우체 시기에서의 polyamine 함량변화, polyamine 합성 억제제인 MGBG를 처리하여 일어나는 polyamine 함량변화 그리고 ctDNA methylation 변화양상을 비

*교신저자: Fax (02) 312-5657

교하여 봄으로써 polyamine 함량변화와 ctDNA methylation 과의 연관성 여부를 밝히고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 및 배양

Chlamydomonas reinhardtii strain 중 자성인 137C(mating type plus, +)와 음성인 137C(mating type minus, -)를 미국의 Duke 대학에서 분양받아 Tris-acetate-phosphate(TAP) 배지에서 Gorman 방법(1965)을 사용하여 배양하였다. 5L 플라스크에 여과된 공기를 공급하면서 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 가 유지되는 배양실에서 12시간 간격으로 광암처리를 반복하여(6,000 lux) 무균상태로 영양생장기 세포배양을 하였다. 배우체의 유도는 영양생장기 세포(5×10^6 cells/mL)를 수확하여 증류수로 세척한 후 질소원을 제거한 TAP 배지로 옮겨 지속적인 광조건에서 24시간 동안 배우체를 유도하였다. 배우체 유도시기에 있어서의 1mM MGBG 처리구는 영양생장기 배지에서 배우체유도기 배지로의 교환시기에 최종농도 1mM MGBG를 첨가하였다. 정상 대조구는 MGBG를 첨가시키지 않은 것이다.

Chlamydomonas 배우체 유도기간 중 시간별 집합을 조사

Chlamydomonas 137C(+)와 137C(-)에서 배우체 유도기간 중 3시간 별로 같은 시기에 암컷과 수컷 각각에서 세포를 취하여 각각의 세포수를 hemocytometer로 알아본 후 같은 세포수가 되도록 혼합하였다. 23°C , 암상태에서 1시간 방치한 후에 요오드 용액으로 염색을 한 후 현미경으로 집합체를 관찰하여 집합율을 조사하였다(Matsuda *et al.*, 1978).

Polyamine의 정량

Goren 등(1982)의 방법을 수정하여 사용하였다. *Chlamydomonas* 137C(+)와 137C(-) 배우체 유도기 동안의 polyamine 정량은 대조구와 1mM MGBG 처리구에서 6시간 간격으로 세포를 원심분리(500g, 4분)하여 수확하고 3배 부피(v/w)의 증류수를 첨가하여 초음파 파쇄기로 썬 후(15초, 3번), 최종농도가 5%가 되도록 60% perchloric acid를 첨가하여 4°C 에서 1시간 동안 방치한 후 원심분리(17,000g, 30분)하여 얻은 상정액 200 μL 에 400 μL 의 dansylchloride(5 mg/mL acetone)와 포화된 Na_2CO_3 200 μL 를 첨가하여 60°C 에서 암처리하여 1시간 반응시켰다. 그 후 100 μL 의 proline (100 mg/mL)을 처리하여 반응을 멈추고 상온에서 30분간 방치한 후에 0.5 mL의 benzene을 혼합하여 dansyl 유도체를 추출하여 thin layer chro-

matography를 수행하였다. Chloroform : triethylamine = 100 : 9 (v/v) 전개용매로 전개시킨 후, 자외선하에서 표준시료와 비교해서 표출시킨 다음 ethylacetate 3 mL로 용출시켜 photofluorimeter로 형광도를 측정하였다(excitation: 350 nm, emission: 495 nm).

Chlamydomonas 엽록체 DNA의 분리

ctDNA의 분리는 Show 등(1988)과 Palmer(1982)의 방법을 변형하여 수행하였다. 영양 생장기 세포(5×10^6 cells/mL) 배양액 450 mL과 배우체 유도기 동안의 대조구와 1mM MGBG 처리구에서 6시간 간격으로 세포 배양액 450 mL을 각각 원심분리(500g, 4분)로 수확하여 증류수로 세척한 후 완충용액(25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 20%(w/v) sucrose)에 5×10^8 cells/mL 비율로 현탁하고 50°C 에서 10분간 방치한 후에 -20°C 에서 얼린 후 다시 녹였다. 얼림과 녹임을 2번 반복한 후, 최종농도가 1%(w/v)가 되도록 SDS를 첨가하고 50°C 에서 10분간 방치하였다. 그 뒤에 최종농도가 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되도록 Pronase E(in 10 mM Tris-HCl, pH 7.0, 2시간 pre-digested at 37°C)를 첨가시키고 37°C 에서 1시간 반응시킨 후, 37°C 에서 1시간 간격으로 2회의 Pronase E를 더 첨가시키고 50°C 에서 18시간 반응시켰다. 동일 부피의 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25 : 24 : 1)을 첨가하여 조심스럽게 10분 동안 섞어준 후 원심분리(12,000g, 10분)하여 상층용액을 취한 다음, 다시 동량의 chloroform을 첨가하여 위의 방법을 반복하였다. 원심분리 후에 미리 냉각시킨 ethanol을 상층용액에 2배 부피로 첨가하여 원심분리(15,000g, 30분)시켜 DNA를 침전시킨 뒤 5 mL의 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)에 녹인 후 최종농도가 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되도록 RNase를 첨가하여 37°C 에서 1시간 반응시켰다. 이 후에 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25 : 24 : 1)을 첨가하여 나머지 불순물들을 제거하였다. 이를 cesium chloride 밀도구배 초원심분리법(60,000 rpm, 24시간, 20°C)에 의해 ctDNA를 분리하고 TE 완충액에 녹여 영양생장기와 배우체기의 ctDNA원으로 사용하였다.

Chlamydomonas 배우체에서의 시간별 DNA methylase 활성 측정

배우체 유도기 동안 자성과 음성의 대조구와 1mM MGBG 처리구 세포를 6시간별로 수확하여 3 mL의 완충용액(25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10% glycerol, 10 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.1%(v/v) Triton X-100)으로 현탁하고 초음파 파쇄기로 세포를 파쇄한 후(1회/mL), 2번의 원심분리(10,000g,

20분, 37,000g, 30분)를 수행하여 상층액을 취해서 효소원으로 사용하였다. DNA methylase 활성의 측정은 표준 반응용액을 25 mM Tris-HCl(pH 8.0), 2 mM DTT, 10 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 3.35 μ M S-adenosyl-[methyl-³H]-methionine(specific activity, 15 Ci/mmmole)와 3 μ g *M. luteus* DNA 그리고 crude extracted DNA methylase(10-20 μ g)로 조성하여 최종부피가 20 μ L가 되도록 하여 37°C 에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 이 반응용액 전체를 DE-81 paper에 점적하여 20분간 건조시킨 후, 0.5 M sodium phosphate 완충용액(pH 7.0)으로 세척하고 ethanol로 2회, ethyl ether로 1회 세척한 후 건조시켜 이 DE-81 paper를 cocktail 용액 5 mL에 넣고 liquid scintillation counter로 방사능을 측정하였다.

Chlamydomonas 배우체에서의 시간별 SAMDC 활성 측정

Cohen과 Kende의 방법(1986)을 수정하여 사용하였다. 배우체 유도기 동안 자성과 용성의 대조구와 1 mM MGBG 처리구 세포를 6시간별로 세포배양액 450 mL을 수확하여 3 mL의 완충용액(25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10% glycerol, 10 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.1%(v/v) Triton X-100)으로 현탁하고 초음파 파쇄기로 세포를 파쇄한 후(1회/mL), 2번의 원심분리(10,000g, 20분, 37,000g, 30분)를 수행하여 상층액을 취해서 효소원으로 사용하였다. Center well flask의 center well에 50 μ L의 2N KOH로 적신 Whatman No. 3 filter paper를 넣은 후, 완충용액(25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.1 mM EDTA, 15 mM mercaptoethanol)과 0.1 μ Ci S-adenosyl-L-[carboxyl-¹⁴C]-methionine(52 mCi/mmmol)을 넣고 효소원(0.5-1 mg)을 첨가한 후 총부피가 250 μ L가 되게 하였다. 37°C 에서 1시간 동안 서서히 흔들어 주면서 반응을 시킨 후 200 μ L의 5% perchloric acid로 반응을 정지시키고 다시 37°C 에서 1시간 동안 ¹⁴CO₂가 filter paper에 충분히 흡수되도록 하였다. Center well에 있던 filter paper를 꺼내어 scintillation solution 5 mL에 넣고 liquid scintillation counter로 방사능을 측정하였다.

In vitro 엽록체 DNA methylation 정도 측정

배우체 유도기 동안 *Chlamydomonas* 137C(+)와 137C(-) 배우체의 ctDNA의 분리는 대조구와 1 mM MGBG 처리구에서 6시간 간격으로 분리, 정제하였다. DNA methylase는 배우체 유도기 12시간째의 *Chlamydomonas* 137C(+) 정상대조구 세포에서 분리, 사용하였다. 반응용액은 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM DTT, 10 mM EDTA, 3.35 μ M S-adenosyl-[methyl-³H]-methionine(specific activity, 15 Ci/mmmole), 2 μ g의 ctDNA 및 crude-extracted DNA methylase(10-20 μ g)를 기본

조건으로 하였고 최종 부피가 20 μ L가 되게 하여 37°C 에서 1시간 반응시켜 ctDNA methylation 정도를 측정하였다.

In vitro DNA methylase 활성에 대한 MGBG의 영향

Chlamydomonas 137C(+) 배우체 유도기 기간 중 12시간째의 정상대조구 세포에서 분리한 DNA methylase의 표준 반응용액에 각각 최종농도가 1, 2, 5, 10, 25, 50 μ M이 되도록 MGBG를 첨가하여 37°C 에서 1시간 반응시켜 DNA methylase의 활성에 대한 MGBG의 영향에 대하여 조사하였다.

결 과

Chlamydomonas 배우체 유도기간 중 시간별 접합률 조사

Chlamydomonas 137C(+)와 137C(-)에서 배우체 유도기간 중 3시간 별로 같은 시기에 137C(+)와 137C(-) 각각에서 같은 수의 세포를 취하여 각 시간대에서의 세포의 접합률을 조사하여 배우체의 유도여부를 조사한 결과, 정상대조구와 1 mM MGBG의 처리구에서 배우체 유도 12시간 이후부터 동일하게 증가되는 접합률을 나타내었다(Fig. 1).

Chlamydomonas 배우체 유도기 동안의 polyamine 함량변화

Chlamydomonas 137C(+)와 137C(-)의 배우체 유도기 동

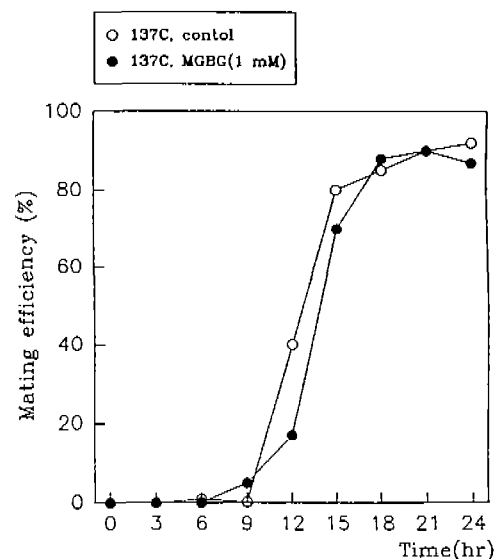


Fig. 1. Synchronously grown vegetative cells were transferred to TAP-N free medium in absence or presence of MGBG (1 mM) after six hours growth in the light period, and maintained in continuous light. At the times indicated, mating efficiency were determined.

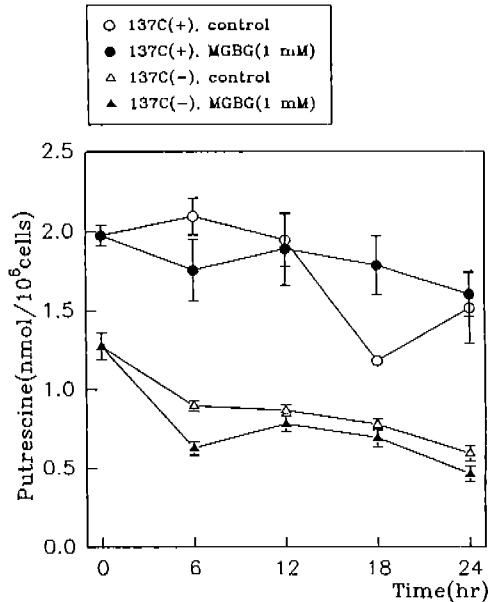


Fig. 2. Time course for change in putrescine content of *Chlamydomonas* 137(+), (-) in the absence or presence of MGBG (1 mM) during gametogenesis. The results are the means \pm SD of values from three experiments.

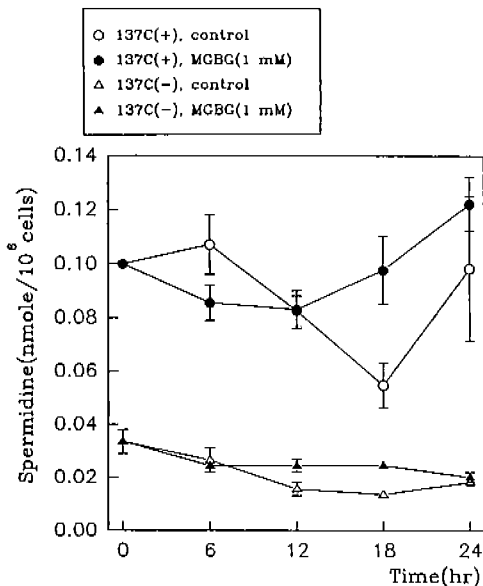


Fig. 3. Time course for change in spermidine content of *Chlamydomonas* 137(+), (-) in the absence or presence of MGBG (1 mM) during gametogenesis. The results are the means \pm SD of values from three experiments. Where no error bars are shown, they were smaller than the symbols.

안의 정상대조구와 1 mM MGBG 처리구에서 세포내 polyamine 함량변화를 조사한 결과, 각 polyamines(Put, Spd, Spm)의 함량은 137C(+) 정상대조구에서는 6-18시간대 사이에서

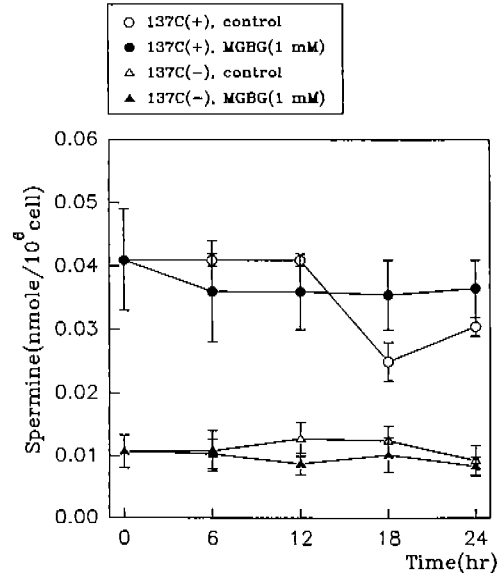


Fig. 4. Time course for change in spermine content of *Chlamydomonas* 137(+), (-) in the absence or presence of MGBG (1 mM) during gametogenesis. The results are the means \pm SD of values from three experiments.

감소되었다가 그 이후에 회복되는 경향을 나타내었으며, 137C(-) 정상대조구는 24시간의 배우체 유도기 동안에 put, spd이 감소추세를 보이는 반면 spm은 현상유지 추세를 보였다(Figs. 2-4). 1 mM MGBG 처리구에서는 137C(+)의 경우, 정상대조구의 6-18시간대에서의 각 polyamines 함량 감소와는 달리, put와 spm의 경우에 초기의 함량과 비슷하였고 spd의 경우에는 12시간 이후에 증가를 나타냈다. 137C(-) 경우, put은 정상대조구와 유사한 함량 감소변화를 나타냈고(Fig. 2), spd와 spm은 대체로 초기의 함량과 유사하게 나타났었다(Figs. 3, 4).

***Chlamydomonas* 배우체에서의 시간별 DNA methylase 활성 측정**

배우체 유도기 동안의 DNA methylase 활성도 변화를 조사한 결과, 137C(+)와 137C(-) 정상대조구의 경우 공통적으로 12시간에서 가장 높은 DNA methylase 활성도를 나타냈으며 12시간 이후의 배우체 유도시기에서는 크게 감소하였다(Figs. 5, 6). 1 mM MGBG 처리구에서의 DNA methylase 활성도는 137C(+)와 137C(-) 세포 모두에서 전체적으로 정상대조구의 효소 활성도보다도 낮은 효소 활성도를 나타내었다(Figs. 5, 6).

***Chlamydomonas* 배우체에서의 시간별 SAMDC 활성 측정**

배우체 유도기 동안의 6시간별 SAMDC 활성도 측정 결과는

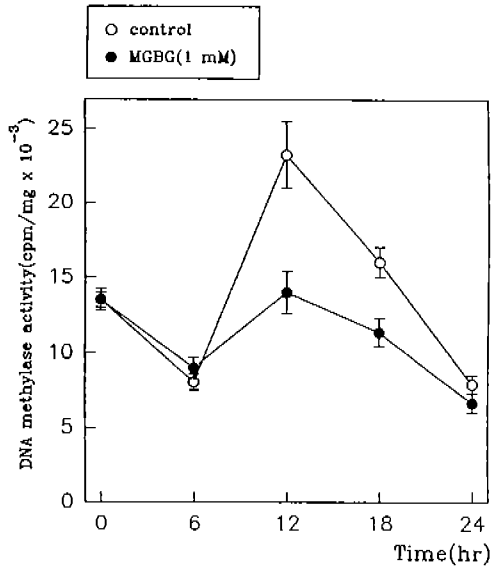


Fig. 5. Time course for changes in DNA methylase activity of *Chlamydomonas* 137(+) in the absence or presence of MGBG (1 mM) during gametogenesis. The results are the means \pm maximum ranges of two values from one representative experiment.

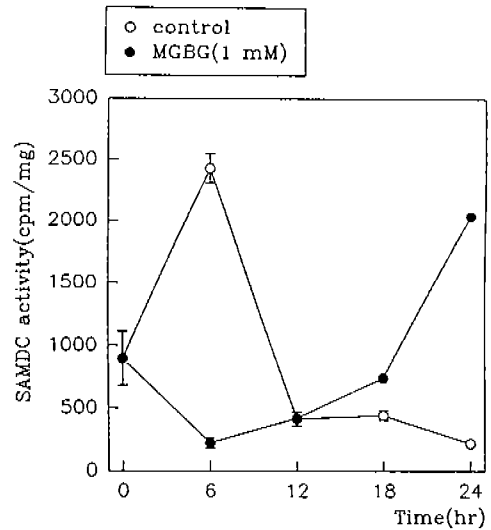


Fig. 7. Time course for change in SAMDC activity of *Chlamydomonas* 137(+) in the absence or presence of MGBG (1 mM) during gametogenesis. The results are the means \pm maximum ranges of two values from one representative experiment. Where no error bars are shown, they were smaller than the symbols.

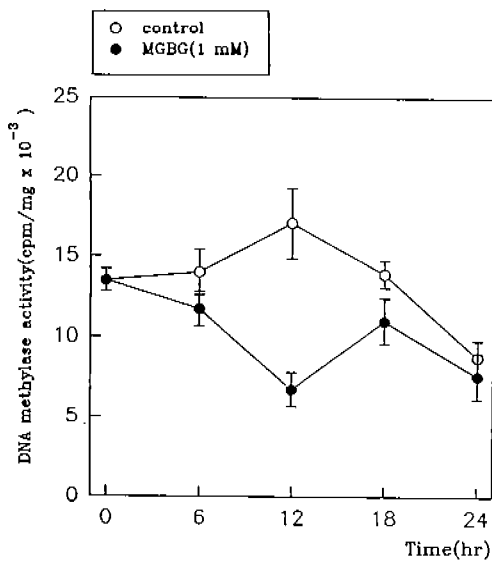


Fig. 6. Time course for changes in DNA methylase activity of *Chlamydomonas* 137(-) in the absence or presence of MGBG (1 mM) during gametogenesis. The results are the means \pm maximum ranges of two values from one representative experiment.

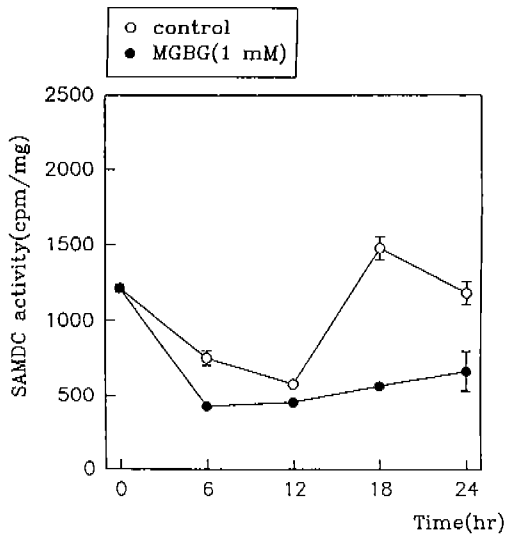


Fig. 8. Time course for change in SAMDC activity of *Chlamydomonas* 137(-) in the absence or presence of MGBG (1 mM) during gametogenesis. The results are the means \pm maximum ranges of two values from one representative experiment. Where no error bars are shown, they were smaller than the symbols.

정상대조구의 경우 137C(+)와 137C(-)를 비교해 보면 서로 상이한 활성도를 나타냈다(Figs. 7, 8). 137C(+) 정상대조구의 경우에는 배양체 유도기 6시간대에서 가장 높은 효소활성도를 나타내며, 그 이후에 감소되었으나(Fig. 7), 137C(-)의

정상대조구 경우에는 12시간 이후에 증가하기 시작하여 18시간대에서 가장 높은 효소 활성도를 나타냈다(Fig. 8). 1 mM MGBG 처리구에서의 SAMDC 활성도는 137C(+)와 137C(-)에서 모두 정상처리구에 비해 12시간대까지는 낮은 활성도를

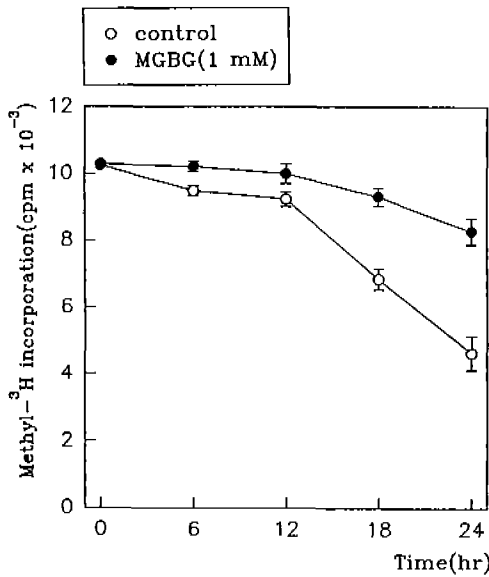


Fig. 9. Time changes in DNA methylation *in vitro* on ctDNA of *Chlamydomonas* 137(+) in the absence or presence of MGBG (1 mM) during gametogenesis. The results are the means± maximum ranges of two values from one representative experiment.

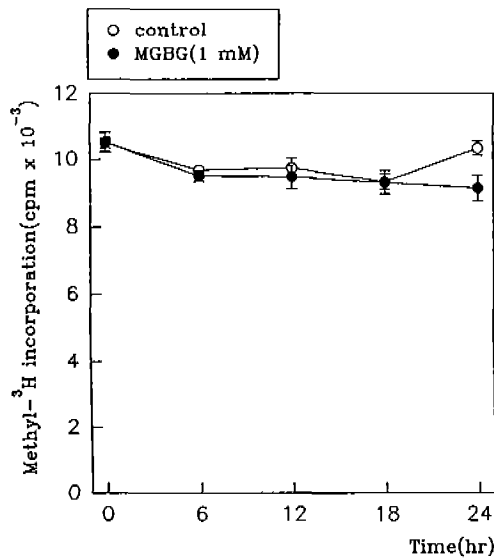


Fig. 10. Time changes in DNA methylation *in vitro* on ctDNA of *Chlamydomonas* 137(-) in the absence or presence of MGBG (1 mM) during gametogenesis. The results are the means± maximum ranges of two values from one representative experiment.

나타냈으나, 137C(+)의 경우에는 12시간대 이후 정상대조구에 비해 활성도가 급격히 증가되었다(Fig. 7). 137C(-)의 경우에도 마찬가지로 전반적으로 6시간대까지는 효소활성이 크게 감소되었으나 그 이후 시간대에서는 점차로 증가되고 있다. 그러나

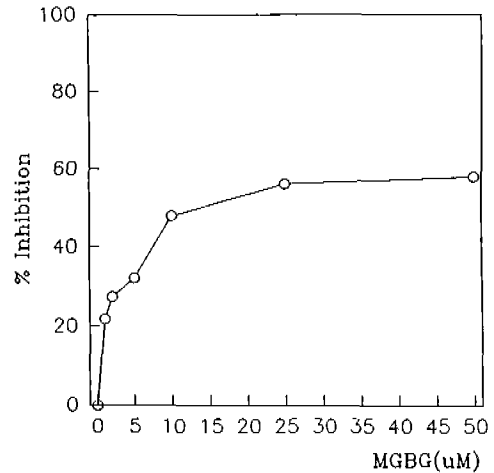


Fig. 11. Inhibition the activity of DNA methylase by MGBG *in vitro*.

정상대조구에 비해 전체적으로 효소 활성정도는 낮았다(Fig. 8).

***In vitro* Chlamydomonas** 염록체 DNA methylation 정도 측정

*Chlamydomonas*의 배우체 유도기 기간 중 137C(+)와 137C(-) ctDNA의 methylation 정도를 알아보기 위하여 137C(+)의 배우체 유도기 12시간대의 세포에서 얻은 DNA methylase를 이용하여 137C(+)와 137C(-)의 정상대조구와 1 mM MGBG 처리구에서 각각 6시간별로 ctDNA를 분리하여 이를 DNA methylase 반응의 기질로 사용하여 동위원소 SAM의 methyl-³H기의 ctDNA로의 결합 정도를 이용하여 6시간별 ctDNA의 methylation 정도를 측정하였다. 그 결과 137C(+)의 경우, methyl-³H의 ctDNA 결합정도는 정상대조구에서 12시간 이후에 초기의 결합정도보다 약 30% 정도까지의 낮은 결합을 나타낸 반면, 137C(-) 정상대조구의 경우에는 137C(+)와는 달리 배우체 유도기 전과정에 있어서 비슷한 결합정도를 나타내었다(Figs. 9, 10). 그리고 1 mM MGBG 처리구에서 137C(+)의 경우에는 methyl-³H의 ctDNA에 대한 결합정도가 정상대조구에 비해 12시간까지는 거의 같은 결합정도를 보였고 그 이후에는 약간의 감소를 나타내었을 뿐, 정상대조구와 같은 감소양상을 나타내지는 않았다(Fig. 9). 137C(-)의 경우는 배우체 유도 전시기에 있어 정상대조구의 ctDNA methylation 정도와 유사한 양상을 나타내었다(Fig. 10).

***In vitro* DNA methylase** 활성에 대한 MGBG의 억제효과

*Chlamydomonas*의 DNA methylase 활성에 대한 *in vitro* MGBG의 영향을 조사한 결과, DNA methylase 반응용액내의

MGBG의 농도가 증가할수록 DNA methylase 활성이 억제되었으며, 최종 MGBG의 농도가 25 μ M 이상의 농도에서는 DNA methylase의 활성을 최대 60% 정도로만 억제하는데 그쳤다(Fig. 11).

고 찰

*Chlamydomonas*의 ctDNA의 모성유전에 DNA methylation이 중요한 역할을 한다는 보고와(Sager and Ramanis, 1973) polyamine이 *Chlamydomonas*에서 분리한 DNA methylase와 nuclease의 활성을 *in vitro*에서 억제한다는 보고(Lee and Lee, 1989; Kim and Lee, 1990), 그리고 SAM이 DNA methylation의 methyl기 공여체로 사용되며 동시에 polyamine 생합성과정에서 aminopropyl기의 공여체로 함께 사용된다는 점에서 DNA methylation과 polyamine 생합성 과정은 SAM pool에 의해 조절된다고 볼 수 있겠다(Adams and Burdon, 1983; Pegg and Williams, 1969). 따라서 *Chlamydomonas* 배우체 유도시기에 일어나는 ctDNA의 methylation(Burton *et al.*, 1979)이 polyamine 함량변화와 일련의 연관성이 있을 것이라는 가정하에서 polyamine 생합성 억제제인 MGBG를 사용하여 인위적인 polyamine 함량변화에 따른 ctDNA의 methylation 변화 양상을 조사하였다. 먼저 *Chlamydomonas* 137C(+)와 137C(-)의 성장배지에 1 mM MGBG를 처리하였을 때, 영양생장기의 세포가 배우체로 유도되는지를 조사한 결과, 정상대조구의 세포들과 동일한 접합율을 나타내므로써 1 mM MGBG를 처리하여도 배우체 형성에는 아무런 영향이 없었다(Fig. 1). *Chlamydomonas* 137C(+)와 137C(-)의 각각 정상대조구와 1 mM MGBG 처리구에서의 polyamine 함량변화를 측정할 결과, 137C(+) 정상대조구의 polyamine 함량은 전체적으로 감소양상을 나타내었다(Figs. 2-4). 이러한 polyamine의 감소양상은 *Chlamydomonas* 137C(+) 배우체의 DNA methylase 활성에 있어서 효소활성이 12시간대에 가장 크게 나타나며(Fig. 5) 동시에 *in vitro* 137C(+) ctDNA methylation 정도 양상 실험결과, 12시간 이후에서 ctDNA methylation 정도가 감소한다는 점(Fig. 9)과 비교해 볼 때 137C(+) 정상대조구에서의 6-18시간대에서의 polyamines 함량의 감소양상은 polyamine 생합성의 aminopropyl기 공여체인 SAM의 이용이 DNA methylation으로 전환되어 나타난 결과라 생각할 수도 있겠다.

137C(-) 정상대조구의 polyamine 함량변화는 배우체 유도시기 초기와 24시간 후를 비교하였을 때 전체적으로 137C(+) 정상대조구와 같은 비율로 유사하게 감소하지만 137C(-)의 배우체에서는 DNA methylation이 거의 되어있지 않다는 보고(Burton *et al.*, 1979)와 비교해 보았을 때, 위의 137C(+)의 정상대조구의 polyamine 함량 감소와 DNA methylation 연

관성 설명에 모순이 있다고 볼 수 있겠으나, 같은 양의 세포에서 각 polyamine pool이 137C(+)가 137C(-)에 비해 전체적으로 2-5배에 이른다든 점(Figs. 2-4)에서 137C(+)나 137C(-)의 polyamine 함량의 감소비율이 비슷하더라도 polyamine 함량이 감소되는 절대량에서 137C(+)의 감소양이 137C(-)의 배우체 유도기 전체시기의 polyamine 감소량보다 크다는 점에서 현재까지는 확실한 증거가 없지만, 137C(-)의 polyamine 함량감소는 DNA methylation에 대하여 미치는 효과가 거의 없다고 추론할 수 있겠다.

1 mM MGBG 처리구에서 137C(+)와 137C(-)의 polyamine 함량 변화양상은 137C(+)의 경우 초반에는 감소양상을 보이다가 12시간 이후 정상대조구의 polyamine 함량보다는 높은 양상을 보여주고 있는데(Figs. 2-4) 이것은 MGBG가 SAMDC 억제제로 SAMDC의 활성을 억제하지만 그 효소에 대한 반응이 가역적이며 그 효과가 세포내에서 일시적이어서 시간의 경과에 따라 오히려 세포내에서 SAMDC의 양적증가와 더불어 세포내 효소분해에 대한 SAMDC의 안정화에 관여할 수 있다는 보고(Pegg, 1979; Shirahata and Pegg, 1985)와 비교하였을 때 초기의 spd의 감소는 MGBG의 일시적인 효과이며 12시간 이후의 spd의 증가는 시간대별 SAMDC 활성도 조사결과(Fig. 7)에서 나타난 것처럼, 1 mM의 MGBG 처리구의 세포에서 12시간 이후에 SAMDC의 활성도가 정상대조구보다 크게 증가한다는 것과 일치되고 있다. 1 mM MGBG 처리구에서 137C(-)의 경우에는 대체로 전체 polyamine 함량이 정상대조구보다 낮게 나타났으나 그 polyamine 함량 변화폭은 정상대조구와 함께 137C(+)에 비교해서 그렇게 크지는 않았다. 따라서 위의 결과들에 기초하였을 때, 137C(+) 1 mM MGBG 처리구에서 시간이 경과될수록 spd 함량이 정상대조구보다 높고 137C(-) 1 mM MGBG 처리구에서는 그 변화폭이 작다면, 137C(+) 정상대조구의 polyamine 함량감소가 SAM이 DNA methylation에 이용되었기 때문에 일어났다는 추론과 비교하였을 때, 137C(+)에서 1 mM MGBG를 처리하였을 때는 DNA의 methylation 정도가 정상대조구의 DNA methylation 보다 감소될 수도 있을 것으로 생각되므로 정상대조구와 1 mM MGBG 처리구에서 각 시간별 분리한 *Chlamydomonas* ctDNA의 methylation 정도 양상을 137C(+)의 12시간 배우체 세포에서 분리한 DNA methylase를 이용하여 동위원소 SAM의 methyl- 3 H기의 ctDNA에 대한 결합정도로 측정하여 간접적으로 DNA methylation 정도를 조사하였다. 그 결과 137C(+)의 각 시간별 배우체 세포에서의 ctDNA methylation은 정상대조구에서 시간이 경과함에 따라 12시간 이후 약 35% 정도로 크게 감소되는 양상을 보였는데(Fig. 9) 이것은 정상대조구에서 *Chlamydomonas* 배우체 유도과정시 ctDNA의 methylation이 일어난다는 보고(Burton *et al.*, 1979)와 일치하였다.

그러나 137C(+)의 1 mM MGBG의 처리구에서는 정상대조구와는 달리 ctDNA methylation 정도가 약 10% 정도 감소에 불과함으로써 ctDNA에 methylation이 적게 이루어진 것으로 나타났다(Fig. 9). 137C(-)의 경우에는 정상대조구와 1 mM MGBG의 처리구에서의 각 시간별로 분리된 ctDNA의 methylation 정도가 서로 유사한 양상을 보였는데(Fig. 10), 이것은 137C(-)의 ctDNA는 배우체 유도기 동안에 DNA methylation이 거의 일어나지 않는 것으로, 이는 배우체 시기에 있어서 *Chlamydomonas* 137C(-)의 ctDNA는 methylation이 이루어지지 않는다는 보고(Burton et al., 1979)와 일치한다. 137C(+)의 경우 1 mM MGBG 처리구에서 ctDNA의 methylation이 정상대조구에 비해 덜 일어났으므로 그 결과가 137C(+) 배우체 유도기의 12시간 이후의 spd의 증가에 의해 나타난 결과인지 아니면 MGBG의 DNA methylase에 대한 억제효과인지를 규명하기 위해 137C(+) 12시간 배우체에서 분리한 DNA methylase에 대하여 *in vitro* MGBG 영향을 조사한 결과, DNA methylase의 활성은 MGBG의 농도가 증가할수록 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 11). 이 결과는 1 mM MGBG 처리구의 137C(+) 배우체 유도기에서의 시간별 DNA methylase 활성이 정상대조구에 비해 감소되었던 이유를 설명해 주고 있다고 볼 수 있겠다. 그러나 MGBG의 DNA methylase에 대한 억제효과가 MGBG의 농도를 증가시켜도 약 60%의 억제효과 밖에 나타내지 못하므로, MGBG 처리구에서의 137C(+) 배우체 유도과정에서의 ctDNA methylation 감소는 아마도, MGBG의 DNA methylase에 대한 부분적인 억제효과나 MGBG의 SAMDC에 대한 안정화 효과 또는 효소단백질의 양적 증가에 의한 spd pool 증가에 따른 SAM의 DNA methylation에 대한 이용률의 감소 등의 복합적인 효과라고 볼 수도 있겠다.

Polyamine의 생합성경로와 DNA methylation과의 연관성에 대한 실험은 앞으로 polyamine 생합성 경로에 대하여 특이하게 비가역적으로 작용하는 polyamine 생합성 억제제를 사용함으로써 좀 더 정확한 연관성 여부를 조사해야 할 것이다.

사 사

본 연구는 1992년도 교육부 기초과학 육성연구비 지원에 의한 것임.

인 용 문 헌

- Adams, R.L.P. and R.H. Burdon. 1983. In, Enzymes of Nucleic acid synthesis and processing. Vol. 1, CRC Press, pp. 119-144.
- 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.
- Cano, C., L. Herrera-Estrella and J. Ruiz-Herrera. 1988. DNA methylation and polyamines in regulation of development of the fungus *Mucor rouxii*. *J. Bacteriol.* 170: 5946-5948.
- Cohen, E. and H. Kende. 1986. The effect of submergence ethylene and gibelline on polyamines and their biosynthetic enzymes in deep water-rice internodes. *Planta* 169: 498-504.
- Gillham, N.W. 1974. Genetic analysis of the chloroplast and mitochondrial genomes. *Ann. Rev. Genetics* 8: 347-391.
- Gorman, D.S. and R.P. Levine. 1965. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54: 1665.
- Goren, R., N. Palavan, H. Flores and A.W. Galston. 1982. Changes in polyamine titer in etiolated pea-seedlings following red-light treatment. *Plant Cell Physiol.* 23: 19-26.
- Kim, J.Y., S.H. Lee, B.G. Kang, Y.M. Kim and M.W. Kim. 1990. Characterization of and Polyamine Effect on Endonuclease from Zygotes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Korean J. Bot.* 33: 293-301.
- Kuroiwa, T. 1985. Mechanisms of maternal inheritance of chloroplast DNA: an active digestion hypothesis. *Microbiol. Sci.* 2: 267-270.
- Lee, M.M. and S.H. Lee. 1989. Effects of polyamines on the purified DNA methyltransferase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Korean J. Botany* 32: 331-342.
- Matsuda, Y., S. Tamaki and Y. Tsubo. 1978. Mating type specific induction of cell wall lytic factor by agglutination of gametes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* 19: 1253-1261.
- Palmer, J.D. 1982. Physical and gene mapping of chloroplast DNA from *Atriplex triangularis* and *Cucumis sativa*. *Nucleic Acids Res.* 10: 1593-1605.
- Pegg, A.E. and H.G. Williams-Ashman. 1969. On the role of S-adenosyl-L-methionine in the biosynthesis of spermidine by rat prostate. *J. Biol. Chem.* 244: 682-693.
- Pegg, A.E. 1979. Investigation of the turnover rat liver S-adenosylmethionine decarboxylase using a specific antibody. *J. Biol. Chem.* 254: 3249.
- Pegg, A.E. and G. Jacobs. 1983. Comparison of inhibitors of S-adenosylmethionine decarboxylases from different species. *Biochem. J.* 213: 495.
- Sager, R. and Z. Ramanis. 1973. The mechanism of maternal inheritance in *Chlamydomonas*: biochemical and genetic studies. *Theoretical and Applied Genetics* 43: 101-108.
- Sager, R., H. Sano and C. Grabowy. 1984. Control of maternal inheritance by DNA methylase in *Chlamydomonas*. *Current topics in Microbiology and Immunology* 108: 157-173.
- Sano, H., R. Sager, C. Grabowy and R. Sager. 1981. Differential activity of DNA methyltransferase in the life

- cycle of *Chlamydomonas reinhardi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 3118-3122.
- Shirahata, A. and A.E. Pegg. 1985. Regulation of S-adenosylmethionine decarboxylase activity in rat liver and prostate. *J. Biol. Chem.* **260**: 9583.
- Show, C.H. 1988. In, Plant Molecular Biology. A practical approach IRL Press, pp. 253-275.
- William-Ashman, H.G. and A. Schenone. 1972. Methylglyoxal bis(guanylhydrazone) as a potent inhibitor of mammalian and yeast S-adenosylmethionine decarboxylases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**: 288.
- Yamanoha, B. and S.S. Cohen. 1985. S-adenosylmethionine decarboxylase and spermine synthase from Chinese cabbage. *Plant Physiol.* **78**: 784-790.

(1994. 2. 7 接受)

Changes in Polyamine Level and Chloroplast DNA Methylation in *Chlamydomonas reinhardtii*

Chang, Kwang Suk, Jae Yoon Kim, Sun Hi Lee*, Young Min Kim and Kang Oh Lee¹

Department of Biology, Yonsei University, Seoul; and

¹*Department of Biology, Sahmyook University, Seoul*

ABSTRACT

Relationship between polyamine level and DNA methylation in the absence or presence of MGBG(1 mM), which is an enzyme-activated reversible inhibitor of SAMDC, has been investigated during gametogenesis of *Chlamydomonas*. In the absence of MGBG, polyamine levels decreased in *Chlamydomonas* 137C(+) and 137C(-) during gametogenesis. And polyamine level of 137C(+) was 2-5 times as much as that of 137C(-) and showed a significant decrease unlike that of 137C(-). *In vitro*, MGBG inhibited ctDNA methylation of 137C(+) by 20-30% but did not inhibited that of 137C(-). Also, MGBG inhibited DNA methylase by 60% *in vitro*. The results obtained in the present work suggest the possibility that the changes of polyamine level may be associated with ctDNA methylation during gametogenesis of *Chlamydomonas*.

Key words : *Chlamydomonas*, polyamine, MGBG, DNA methylase, SAM decarboxylase

*Corresponding author : Fax 82-2-312-5657