

Chlamydomonas reinhardtii 엽록체 DNA의 Methylation에 미치는 Polyamine의 영향

朴元根·金載潤·李舜熙·姜濱求·李康吾*

(연세대학교 이과대학 생물학과, *삼육대학교 이과대학 생물학과)

Effect of Polyamines on Methylation of Chloroplast DNA Isolated from *Chlamydomonas reinhardtii*

Park, Won Kun, Jae Yoon Kim, Sun Hi Lee, Bin G. Kang and Kang Oh Lee*

(Department of Biology, Yonsei University, Seoul and

*Department of Biology, Sahmyook University, Seoul)

ABSTRACT

Polyamine levels in the male and female cells as well as DNA methyltransferase activity in the female cells during gametogenesis of *Chlamydomonas reinhardtii* indicated that both spermidine and spermine levels were decreased while DNA methyltransferase activity was markedly increased about 12 hours after the onset of gametogenesis. *In vitro*, putrescine and spermine at 1 mM inhibited methylation of chloroplast DNA isolated from vegetative female cells by 35% and 65%, respectively. Spermine was found to be more inhibitory than putrescine at all concentrations tested. The pattern of the inhibition by polyamines appeared different from that caused by cations. The results obtained in this work suggest that the polyamine inhibition of DNA methylation is due to an action of polyamines on the enzyme involved instead of on the DNA itself.

서론

*Chlamydomonas reinhardtii*는 동형 배우체를 형성하는 녹조류로서 진핵생물의 엽록체에서 일반적으로 나타나는 유전양상인 모성유전을 연구하는데 대표적으로 사용되는 실험재료이다(Sager, 1954, 1977; Gillham, 1974). *Chlamydomonas*의 자성(mating type +) 및 음성(mating type -) 배우체가 접합체를 형성할 때 음성의 엽록체 DNA는 접합 후 1시간 이내에 사라지는 반면 자성의 것은 그대로 보존되어 딸세포에 전달되는 모성유전 특성이 나타나는데(Kuroiwa *et al.*, 1982), 이 기작을 설명하는 것으로 자성 엽록체 DNA의 선택적인 methylation을 중요시한 restriction-modification 가설이 제안되었고(Sager and Ramani, 1973) 그 이후, Kuroiwa는 자성의 엽록체 자체가 제한효

소에 대해 특이적으로 방어능력을 갖는다는 가정하에 Active digestion 가설을 제안하였다(Kuroiwa, 1985). 그러나 전자의 경우 DNA methyltransferase가 분리되었으나(Sano and Sager, 1980) 아직 순화 및 특성화가 되지 않았으며 이것이 모성유전에 관여한다는 분명한 증거가 없고 또한 아직까지 methylation된 자성 엽록체 DNA에 민감한 제한효소가 발견되지 않고 있다. 그리고, 후자의 경우 endonuclease가 발견되었으나(Ogawa and Kuroiwa, 1985, 1986) 모성유전과 연관시킬 수 있는 근거가 부족하다. 단지, 자성 배우체의 엽록체 DNA에 특이적으로 일어나는 methylation이 모성유전 양상에 중요한 요인으로 작용한다는 것은 받아들일 만하다(Sager *et al.*, 1984). 그 이유로 wild type의 경우 생활시기 중 자성배우체의 엽록체 DNA에 특이적으로 methylation이 되며(William *et al.*, 1979), 음성 배우체의 엽록체 DNA에도 methylation이 일어나는 *mat-1* 돌연변이체에서는 양성유전 양상이 나타나고(Sager *et al.*, 1981), 모성유전 양상을 보이는 돌연변이체인 *me-1*은 응

본 연구는 1990년도 문교부 기초과학육성연구비 지원에 의한 것임.

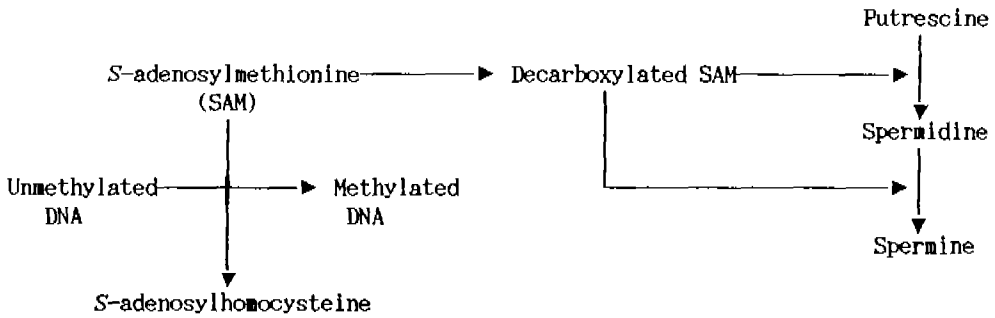


Fig. 1. Pathway of polyamine synthesis and DNA methylation via S-adenosylmethionine (Pegg and Williams, 1969; Kramer *et al.*, 1987).

성의 영양생장기 엽록체 DNA에 methylation이 많이 일어나 있지만(Bolen *et al.*, 1982) 배우체 형성기 동안에 특이적으로 자성의 엽록체 DNA에 methylation이 더 일어난다는 것(Sager and Grabowy, 1983) 등을 들 수 있다.

한편, 식물, 동물, 미생물 등 일반적으로 모든 생물에 널리 존재하는 polyamine은 생명현상 유지에 필수적이며, 또 이들의 성장 및 분화과정에 깊이 관련되어 있는 것으로 알려져 있다(Galston, 1983; Tabor and Tabor, 1984; Evans and Malmberg, 1989). Polyamine은 생리적 pH에서 다가 양이온이며 핵산과 결합하기 쉬운 형태이므로 DNA 및 RNA와 일단 구조적인 결합을 하여 복합체를 형성함으로써 핵산의 구조 및 기능적 안정화와 conformation의 변화를 가져오게 된다(Quigley *et al.*, 1978; Krasnow and Cozzarelli, 1982; Feuerstein *et al.*, 1986; Basu and Marton, 1987). 또한 *in vivo*에서 tRNA methyltransferase의 활성이 putrescine과 spermidine에 의해 증가된다고 보고되었으며(Mach *et al.*, 1982), *Chlamydomonas*에서 분리한 DNA methyltransferase의 활성이 *in vitro*에서 polyamine이 억제효과를 나타내는데 이것은 효소 및 DNA가 polyamine의 농도에 따라 상이한 영향을 받아 나타나는 복합적인 현상이라는 것이 제시되어 있다(Lee and Lee, 1989).

이러한 근거에 더하여 DNA methylation과 polyamine의 생합성 과정은 공통의 전구체인 S-adenosylmethionine (SAM)을 각각 methyl기의 공여체(Kramer *et al.*, 1987)와 aminopropyl기 공여체(Pegg and Williams, 1969)로 사용한다는 점에서 또 하나의 연관성을 찾아볼 수 있다(Fig. 1). 곰팡이류인 *Mucor rouxii*는 발달과정에 따라 핵 DNA의 methylation 정도가 상이하며 이 때 polyamine이 DNA methylation을 억제함으로써 결국 유전자를 활성화시켜 세포 분화에 관여할 것이라고 보고되었으며(Cano *et al.*, 1988), *in vitro*에서 쥐의 핵 DNA methylase의 활성이 spermidine과 spermine에 의해서 억제된다는 보고가 있다(Cox, 1979). 이러한 두 가지 과정에서의 연관성은 고등식물에서

polyamine 합성과 ethylene 합성과정이 S-adenosylmethionine을 공유하면서 조질된다는 사실(Miyazaki and Yang, 1987)과도 비교해 볼 수 있다.

본 실험에서는 *Chlamydomonas*에서 분리한 엽록체 DNA와 DNA methyltransferase를 사용하여 polyamine이 DNA methylation에 미치는 영향을 살펴봄으로써 polyamine과 *Chlamydomonas*의 엽록체 DNA methylation이 합성 경로면에서 또는 분자간의 상호 작용면에서 갖는 연관성에 대하여 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 배양. *Chlamydomonas reinhardtii* strain 중 자성인 21gr(+)와 음성인 5177D(-)를 미국의 Duke 대학에서 분양받아 계대배양하여 사용하였다. 세포의 배양은 Snell의 방법(1982)을 수정하여 사용하였다. 삼각 플라스크에 공기 공급기와 여과기를 연결하여 여과된 공기를 공급하면서 26°C가 유지되는 배양실에서 12시간 간격으로 광암저리를 반복하여(2,000 lux) 무균상태로 영양생장기 배양을 하였고 배우체의 유도는 질소를 제거한 배지에 계속적인 광조건에서 24시간 배양하여 수행하였다.

Cesium chloride, polyamine 및 calf thymus DNA(type XV)는 Sigma에서, S-adenosyl-L-[methyl-³H] methionine은 Amersham에서 구입하였다.

Polyamine의 정량. Goren 등(1982)의 방법을 수정하여 사용하였다. 배우체 유도기간 중 6시간별로 세포를 수확하고 3배 부피(v/w)의 perchloric acid를 첨가하여 초음파와 과쇄기로 쪼개 후(15초, 3번/ml), 원심분리(17,000×g, 30분)하여 얻은 상침액 200 μl에 dansylchloride(5 mg/ml acetone) 400 μl와 포화된 Na₂CO₃ 200 μl를 첨가하여 상온에서 16시간 반응시켰다. 그 후 100 μl의 proline(100 mg/ml)을 처리하여 반응을 멈추고 0.5 ml의 benzene으로 용출시켜 thin layer chromatography를 수행하였다. Chlo-

reform : triethylamine(100 : 9, v/v) 전개용매로 전개시킨 후 자외선하에서 표준시료와 비교해서 표출시킨 다음 ethylacetate로 용출시켜 photofluorimeter(Perkin Elmer LS-5)로 형광도를 측정하였다(excitation : 350 nm, emission : 500 nm).

Chlamydomonas 엽록체 DNA의 분리. 지수 성장기 까지 자란 영양생장기 세포(5×10^6 cells/ml) 배양액 1 l에서 Show(1988)의 방법을 이용하여 엽록체 DNA를 분리하였다.

DNA methylation 정도 측정. Lee와 Lee(1989)의 방법을 수정하여 사용하였다. 반응용액은 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 6 mM dithiothreitol, 10 mM EDTA 및 [3 H]-S-adenosylmethionine(specific activity, 88.7 Ci/mmol) 0.8 μ l를 기본조건으로 하였고, 효소와 기질은 배우체 유도기 동안의 효소활성 측정의 경우 crude-extracted DNA methyltransferase 5 μ l와 calf thymus DNA(2 μ g)를 polyamine 및 몇 가지 양이온(Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+})의 영향을 본 경우, 본 실험실에서 부분 분리된(Lee and Lee, 1989) *Chlamydomonas* DNA methyltransferase 5 μ l와 엽록체 DNA 3 μ l (1/100 희석시 $A_{260nm} = 0.03$)를 사용하여 각각의 처리구에서 최종부피가 20 μ l가 되도록 하여 37°C에서 1시간 반응하였다. 양이온의 경우엔 반응용액에 EDTA를 첨가하지 않았다. 반응이 끝난 후 이 반응용액을 DE 81 paper에 점적하여 건조시킨 뒤 과량의 0.2 M ammonium bicarbonate 용액으로 세척하고 ethanol로 2번, ethyl ether로 1번 세척하여 건조시킨 후 5 ml의 cocktail 용액에 넣고 liquid scintillation counter로 방사성을 측정하였다.

자성 배우체에서의 시간별 DNA methyltransferase 활성 측정. 배우체 유도기간 동안 4시간 별로 세포를 수확하여 3 ml의 완충액 A(50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.15 M potassium chloride, 1 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 5% glycerol)를 첨가해서 초음파 파쇄기로 세포를 파쇄한 후(2회/ml) 2번의 원심분리를 수행하여(10,000 \times g, 20분; 37,000 \times g, 30분) 상정액을 취해서 효소원으로 사용하였고, calf thymus DNA를 기질로 하여 위의 방법에 따라 DNA methylation 정도를 측정하였다.

Polyamine 및 양이온의 영향. 농도별 영향을 본 경우, putrescine과 spermine을 각각 0.01-30 mM, 0.005-20 mM 농도 범위에서 처리하였고 양이온(Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+})은 0.01-100 mM 범위에서 처리하여 DNA methylation 정도를 측정하였다. 시간에 따른 polyamine의 영향을 본 실험에서는 처리구를 3개로 나누어 대조구와 비교하였는데 처리구의 경우 DNA methyltransferase(II), 엽록체 DNA(III) 그리고 DNA와 DNA methyltransferase(IV)로 나누어 각각에 1 mM의 spermine을 처리하여 37°C에서 30분간 전 처리하였다. 그 후 [3 H]-S-adenosylmethionine과 전처리시

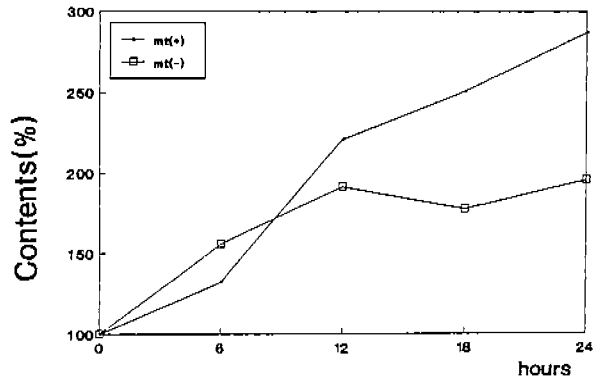


Fig. 2. Change of putrescine levels in female (mt⁺) and male (mt⁻) during gametogenesis. The values are percentage of time zero.

들어가지 않은 것, 즉 II에는 엽록체 DNA, III에는 DNA methyltransferase를 첨가하고 같은 온도에서 반응시키면서 30분 간격으로 총 2시간 동안 DNA methylation 정도를 상기의 방법에 따라 측정하였다.

엽록체 DNA에 미치는 polyamine의 영향. Krasnow and Cozzarelli(1982)의 방법을 변형한 Hwang(1990)의 방법에 따라 수행하였다. 이 방법은 DNA에 condensation/aggregation이 유발되면 단시간 microcentrifugation시 DNA가 쉽게 침전되는 원리를 이용한 것이다. 엽록체 DNA 5 μ l(1/100 희석시 $A_{260nm} = 0.03$)와 TMN 완충액(100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl)이 섞인 반응액을 기본조건으로 하여 농도별(0.01-20 mM)로 putrescine 또는 spermine을 처리해서 최종부피가 1 ml되도록 하여 260 nm에서 흡광도를 측정하고(Hitachi, U 2000) microcentrifugation(15,000 rpm, 2.5분) 한 다음 상정액 0.8 ml의 흡광도를 260 nm에서 측정하여 침전 정도를 판별하였다.

결과 및 고찰

배우체 유도기 동안의 polyamine 정량 및 DNA methyltransferase의 활성 측정. 영양생장기로부터 배우체가 유도되는 기간인 24시간 동안 자성(strain 21gr, mating type +)과 음성(strain 5177D, mating type -)에서 putrescine, spermidine, 및 spermine을 6시간별로 정량하고, 또한 자성에서 DNA methyltransferase의 활성을 같은 기간 동안 4시간 별로 측정된 결과, putrescine의 경우 자성 및 음성에서 모두 시간에 따라 증가하는 양상을 나타내었으나 자성이 음성의 경우보다 증가되는 정도가 더 컸다(Fig. 2). 한편 S-adenosylmethionine이 합성에 관여하는 spermidine

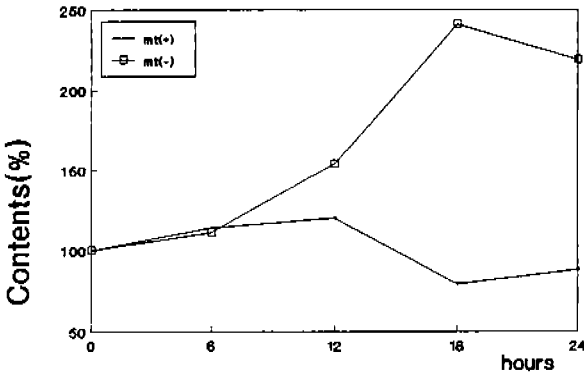


Fig. 3. Change of spermidine levels in female (mt^+) and male (mt^-) during gametogenesis. The values are percentage of time zero.

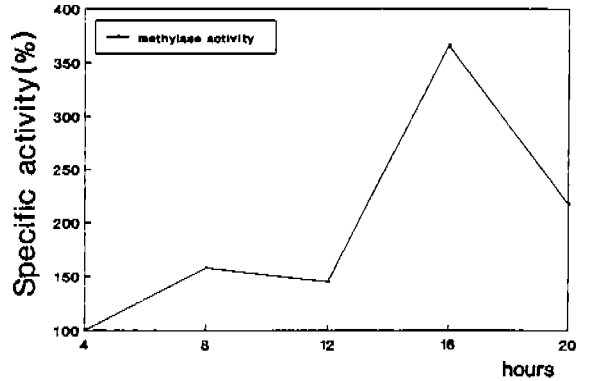


Fig. 5. Change of activity of DNA methyltransferase extracted from female (mt^+) during gametogenesis. The values are percentage of time 4.

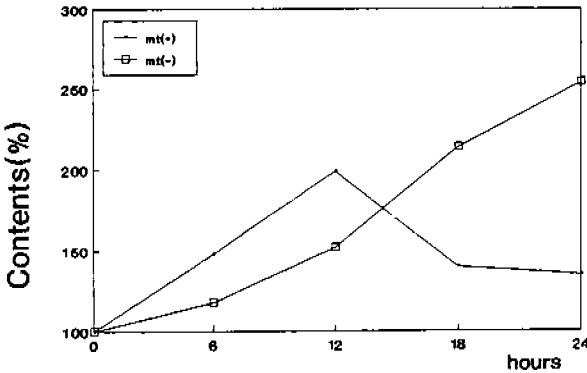


Fig. 4. Change of spermine levels in female (mt^+) and male (mt^-) during gametogenesis. The values are percentage of time zero.

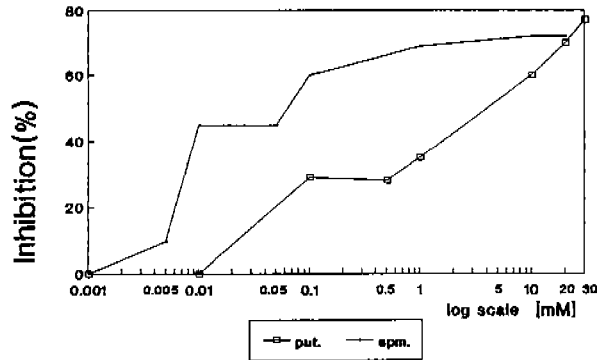


Fig. 6. Inhibition of chloroplast DNA methylation *in vitro* by putrescine and spermine. After indicated amounts of polyamines were added, reaction was run for 60 min.

(Fig. 3)과 spermine(Fig. 4)의 경우 12시간째에 자성에서 감소되는 양상을 나타낸 반면 웅성에서는 지속적인 증가 양상을 보였다. 따라서 웅성의 배우체에 비하여 자성 배우체의 상대적인 putrescine의 증가는 자성의 배우체 유도기간 동안에 spermidine과 spermine의 합성이 감소되어 결과적으로 putrescine이 축적되었기 때문인 것으로 생각할 수 있다. 그리고 DNA methyltransferase의 활성은 자성에서 12시간째에 급격히 증가하는 양상을 나타내었다(Fig. 5). 이것으로 보아 자성 배우체에서 엽록체 DNA methylation이 증가함으로써, S-adenosylmethionine이 DNA methylation에 이용되어 spermidine과 spermine으로의 유입이 감소하게 되어 결과적으로 두 polyamine의 양이 감소하였을 것으로 추론한다. 이것은 polyamine의 생합성 과정과 엽록체 DNA methylation 과정이 S-adenosylmethionine을 공유하면서 일어나고(Fig. 1) 이에 따라 합성 경로면에서

의 경쟁 관계를 갖고 있음을 시사해 준다고 하겠다(Cox, 1979).

Polyamine과 양이온이 엽록체 DNA의 *in vitro* methylation에 미치는 영향. 엽록체 DNA methylation에 미치는 polyamine의 농도별 영향을 알아보기 위하여 putrescine과 spermine을 각각 0.01-30 mM, 0.005-20 mM 범위에서 처리하여 본 결과, 1 mM에서 putrescine은 35%, spermine은 69%의 DNA methylation 억제효과를 나타내었고, 20 mM에서는 putrescine은 70%, spermine은 72%의 억제효과를 나타내었으며 각 농도에서 spermine이 putrescine에 비해 그 억제효과가 더 컸는데 이것은 calf thymus DNA를 기질로 하였을 때(Lee and Lee, 1989)와 전체적으로 유사한 결과이지만 본 실험에서는 저농도에서도 억제효과가 상당히 크게 나타났다(Fig. 6). 이것으로 보아 putrescine과 spermine은 *in vitro*에서 엽록체 DNA methylation을 억

Table 1. Condensation/aggregation of chloroplast DNA isolated from *Chlamydomonas reinhardtii* by putrescine in TMN buffer

Concentration of putrescine (mM)		0.00	0.01	0.10	1.00	10.00	20.00
$A_{260\text{ nm}}$	Before						
	Centrifuge	0.031	0.029	0.031	0.031	0.033	0.035
	After						
	Centrifuge	0.015	0.020	0.023	0.025	0.023	0.027
After/Before		0.48	0.69	0.74	0.81	0.70	0.77

Table 2. Condensation/aggregation of chloroplast DNA isolated from *Chlamydomonas reinhardtii* by spermine in TMN buffer

Concentration of spermine (mM)		0.00	0.01	0.10	1.00	10.00	20.00
$A_{260\text{ nm}}$	Before						
	Centrifuge	0.023	0.024	0.024	0.026	0.037	0.032
	After						
	Centrifuge	0.019	0.018	0.018	0.014	0.018	0.019
After/Before		0.83	0.75	0.75	0.54	0.49	0.59

제하며 putrescine보다 spermine에 의한 억제효과가 더 큰 것은 이 두 polyamine의 구조적 특성, 즉 다가 양이온적 특성이나 탄소 골격 크기의 차이에 기인한 것으로 생각할 수 있겠다(Feuerstein *et al.*, 1986; Basu and Marton, 1987). 그리고 calf thymus DNA를 기질로 사용했을 때보다 억제효과가 저농도에서부터 크게 나타난 것은 두 DNA에 미치는 polyamine의 영향이 상이하게 나타나거나 또는 두 실험에서 사용한 효소의 양과 DNA 종류가 상이하였기 때문에 나타난 것이라 생각할 수 있다. 한편 본 실험조건에서는 polyamine이 DNA에 구조적으로 큰 영향을 주지 않음을 알 수 있었는데(Tables 1, 2), 일반적인 경우 농도별로 polyamine을 처리하였을 때 좁은 농도 범위에서도 급격히 DNA의 condensation/aggregation이 일어났지만(Krasnow and Cozzarelli, 1982; Hwang, 1986), 본 실험에서 polyamine이 DNA methylation에 미치는 효과를 알아본 경우와 유사한 농도구간에서는(0.01-20 mM) putrescine을 처리한 경우(Table 1) 특별한 변화양상을 보이지 않았고 spermine(Table 2)을 처리한 경우엔 농도가 증가함에 따라 완만한 변화를 나타내었을 뿐이었다. 이것으로 보아 본 실험 조건에서는 polyamine에 의한 DNA의 condensation/aggregation으로 인한 침전이 유발되지 않은 것으로 볼 수 있으며 이것은 본 실험 농도구간에서의 poly-

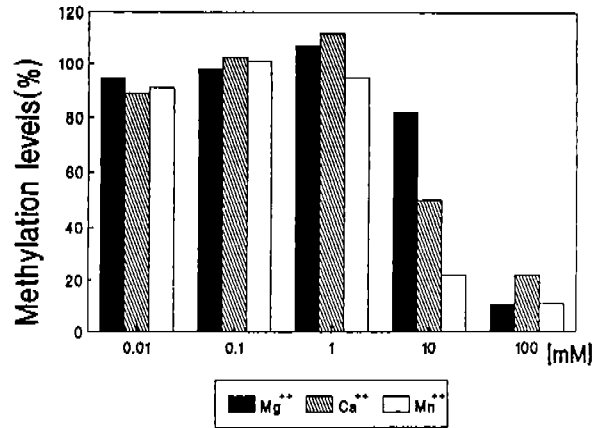


Fig. 7. Effects of cations on the methylation of chloroplast DNA isolated from *Chlamydomonas reinhardtii*. The values are percentage of control.

Table 3. Effects of spermine (1 mM) on the methylation of chloroplast DNA isolated from *Chlamydomonas reinhardtii*

Condition of preincubation (3 min.)	Reaction time after preincubation (min.)			
	30	60	90	120
I. Enzyme + DNA	3.8	4.4	5.2	7.2
II. Enzyme + Spm.	4.0	3.5	3.5	3.6
III. DNA + Spm.	4.7	4.9	4.8	3.6
IV. Enzyme + DNA + Spm.	4.0	3.7	3.5	3.7

Reaction was started after preincubation for 30 min. in each presented condition. The values are $\text{cpm} \times 10^{-3}$.

mine에 의한 염록체 DNA methylation 억제현상이 DNA의 condensation/aggregation에 따른 구조변화에 의한 것이 아님을 시사한다. 그리고 이 억제효과가 단순히 polyamine이 갖는 양이온적 특성 때문인지 알아보기 위하여 0.01 mM에서 100 mM까지 Mg²⁺, Ca²⁺ 그리고 Mn²⁺ 이온을 처리한 결과, 1 mM까지는 세 가지 양이온 모두 DNA methylation 정도가 대조구에 비해 유사하거나 촉진되는 경향을 나타내었으나 10 mM에서는 18, 50, 78%, 100 mM에서는 89.4, 78, 89% 정도의 억제효과를 각각 나타내었다(Fig. 7). 이러한 결과는 1 mM 이하의 저농도에서는 양이온이 DNA 구조의 안정화에 영향을 미치지 않지만 10 mM 이상의 고농도에서는 ionic strength에 의해 DNA의 methyltransferase에 대한 친화도가 낮아졌기 때문인 것으로 사료된다. 한편 *in vitro*에서 취 간에서 추출한 DNA methylase 활성에 미치는 NaCl의 효과를 본 실험에서 NaCl이 기질 DNA와 효소의 복합체 형성을 방해함으로써 DNA

methylation을 억제하며 NaCl의 농도에 따라 상이한 효과가 나타났다고 보고되었다(Drahovsky and Morris, 1971). 그러나 이러한 양이온의 효과와 polyamine에 의한 억제양상을 비교해 보았을 때 polyamine에 의한 엽록체 DNA methylation의 억제는 단순히 polyamine이 갖는 양이온적 특성에 의한 것으로는 생각되지 않는다. 그러면 이러한 엽록체 DNA methylation의 억제가 polyamine이 methyltransferase 자체에 영향을 주어서 나타난 것인지, 아니면 엽록체 DNA의 구조에 영향을 주어서인지를 좀 더 알아보기 위하여 처리구를 달리하여 전처리한 후 반응시간에 따른 DNA methylation 정도를 측정하였다(Table 3). 대조구의 경우 시간이 지남에 따라 methyl기의 DNA incorporation이 점차 증가하였으나 효소원과 spermine을 넣고 전처리한 경우와 효소원, DNA 및 spermine을 넣고 전처리하였을 때 60분째에 incorporation이 억제되어 그 후 증가하지 않았고, 반면에 DNA와 spermine을 넣고 전처리한 경우 60분까지는 대조구보다 증가하였다. 이것으로 보아 엽록체 DNA methylation에 polyamine이 억제효과를 나타내는 것은 효소자체에 영향을 주었기 때문에 나타난 결과이며, DNA에는 오히려 methylation이 잘 일어나도록 구조적 안정화를 유발시켜 초기에 증가양상을 보였지만 결국 효소의 활성이 억제됨으로써 DNA methylation이 억제되었다고 생각된다.

이상의 결과는 *Chlamydomonas reinhardtii*의 자성 배우체 유도기간 동안에 나타나는 엽록체 DNA methylation에 polyamine이 생합성 경로면에서 상호 경쟁성을 갖고 나타날 수 있음을 시사해 주며 또한 분자 수준에서도 DNA나 DNA methyltransferase에 polyamine이 영향을 끼칠 수 있음을 알려준다. 즉, S-adenosylmethionine이 methylation에 이용됨으로써 polyamine의 합성이 줄어들고 결과적으로 polyamine의 양이 감소되어 DNA methyltransferase의 억제정도가 감소됨으로써 methylation이 더 잘 일어날 수 있다. 이것은 polyamine이 *Chlamydomonas* 엽록체 DNA의 모성유전에 일련의 조절인자로 작용할 가능성을 제시해 준다. Polyamine의 이러한 효과를 좀 더 확실하게 하기 위하여 *in vivo*에서 polyamine 및 polyamine 생합성 억제물질을 처리하여 엽록체 DNA methylation의 변화 및 이에 따른 모성유전 양상을 비교, 측정해 봄으로써 그 역할을 좀 더 확실하게 규명할 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

Polyamine이 *Chlamydomonas reinhardtii*의 엽록체 DNA methylation에 미치는 영향을 조사하였다.

배우체 유도기간 동안 자성과 응성에서의 polyamine 함량 변화와 자성에서의 DNA methyltransferase 활성 변

화를 측정한 결과, spermidine과 spermine은 자성에서 12 시간 이후 감소되는 경향을 나타낸 반면, 같은 시간에서 DNA methyltransferase의 활성은 급격히 증가하였다. 자성 영양생장기의 엽록체 DNA를 분리하여 polyamine이 DNA methylation에 미치는 영향을 본 결과 putrescine과 spermine은 1 mM에서 각각 35%와 69%의 억제효과를 나타내었고, 전체 농도구간에서 spermine에 의한 억제효과가 더 컸으며, 이러한 억제양상은 양이온의 효과와는 상이하게 나타났다. 이러한 엽록체 DNA methylation에 미치는 polyamine의 억제효과는 polyamine이 DNA보다는 효소에 끼친 영향에 의해 나타난 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

Balestreri, E., P. Cioni, A. Romagonoli, S. Bernini, A. Fissi and R. Felicioli. 1987. Mechanism of polyamine inhibition of a leaf protease. *Arch. Biochem. Biophys.* **255**: 460-463.

Basu, H.S. and L.J. Marton. 1987. The interaction of spermine and pentamines with DNA. *Biochem. J.* **244**: 243-246.

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.

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.

Cox, R. 1979. Polyamines inhibit DNA methylation *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **86**: 594-598.

Drahovsky, D. and N.R. Morris. 1971. Mechanism of action of rat liver DNA methylase. I. Interaction with double-stranded methyl-acceptor DNA. *J. Mol. Biol.* **57**: 475-489.

Evans, P.T. and R.L. Malmberg. 1989. Do polyamines have roles in plant development? *Ann. Rev. Plant Physiol.* **40**: 235-269.

Fcuerstein, B.G., N. Pattabiraman and L.J. Marton. 1986. Spermine-DNA interactions: A theoretical study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 5948-5952.

Galston, A.W. 1983. Polyamines as modulators of plant development. *Bioscience* **33**: 382-388.

Gillham, N.W. 1974. Genetic analysis of the chloroplast and mitochondria genomes. *Ann. Rev. Genet.* **8**: 347-391.

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**: 19-23.

- 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.
- Hwang, S.B. and S.H. Lee. 1990. Character and function of restriction enzyme, EcoRI inhibiting substance extracted from spinach chloroplast and *Chlamydomonas*. *Korean J. Bot.* **33**: 217-223.
- Kaur-Sawhney, R., L.M. Shih, T. Cegielska and A.W. Galston. 1982. Inhibition of protease activity by polyamines. *FEBS Lett.* **145**: 345-349.
- Kramer, D.L., J.R. Sufrin and C.W. Porter. 1987. Relative effects of S-adenosylmethionine depletion on nucleic acid methylation and polyamine biosynthesis. *Biochem. J.* **247**: 259-265.
- Krasnow, M.A. and N.R. Cozzarelli. 1982. Catenation of DNA rings by topoisomerases. *J. Biol. Chem.* **257**: 2687-2693.
- Kuroiwa, T., S. Kawano and S. Nishibayashi. 1982. Epifluorescent microscopic evidence for maternal inheritance of chloroplast DNA. *Nature* **298**: 481-483.
- 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. Bot.* **32**: 331-342.
- Mach, M., H. Kersten and W. Kersten. 1982. Regulation of tRNA methyltransferase activities by spermidine and putrescine. *Biochem. J.* **202**: 153-162.
- Miyazaki, J.H. and S.F. Yang. 1987. The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. *Physiol. Plant.* **69**: 366-370.
- Ogawa, K. and T. Kuroiwa. 1985. Nuclease C polymorphism of calcium-dependent nuclease in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* **26**: 481-491.
- Ogawa, K. and T. Kuroiwa. 1986. Base-specific endo-, exonucleolytic activity of *Chlamydomonas* nuclease C1 & 2. *Plant Cell Physiol.* **27**: 701-710.
- Papazafiri, P. and H.B. Osborne. 1987. Effect of α -difluoromethylornithine on DNA methylation in murine erythro-leukaemic cells: Relationship to stimulation of induced differentiation. *Biochem. J.* **242**: 479-483.
- 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.
- Quigley, G.G., M.M. Teeter and A. Rich. 1978. Structural analysis of spermine and magnesium ion binding to yeast phenylalanine transfer RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 64-68.
- Sager, R. 1954. Mendelian and non-Mendelian inheritance of streptomycin resistance in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **40**: 356-363.
- Sager, R. 1977. Genetic analysis of chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. *Adv. Genet.* **19**: 287-340.
- Sager, R. and C. Grabowy. 1983. Regulation of maternal inheritance by differential methylation of chloroplast DNA in *me-1* mutant of *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 3025-3029.
- Sager, R. and Z. Ramanis. 1973. Maternal inheritance in *Chlamydomonas*. Biochemical and genetic studies. *Theor. Appl. Genet.* **43**: 101-108.
- Sager, R., C. Grabowy and H. Sano. 1981. 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 maternal inheritance by DNA methylase in *Chlamydomonas*. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **108**: 157-173.
- Sano, H. and R. Sager. 1980. Deoxyribonucleic acid methyltransferase from the eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* **105**: 471-480.
- Show, C.H. 1988. Molecular biology of *Chlamydomonas*. 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.
- Tabor, C.W. and H. Tabor. 1984. Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.* **53**: 749-790.
- William, G.B., 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.

(1991. 9. 3 接受)