

해조류 방사무늬김 (*Porphyra yezoensis*) 엽체로부터 산 유도 유전자의 분리

Long-Guo JIN · 강세은 · 최재석 · 박선미 · 박종연¹ · 진덕희² · 홍용기*
부경대학교 생물공학과, ¹국립수산과학원 생물공학과, ²강릉대학교 해양생물공학부

Differential Display Detection of Acid-inducible Genes from *Porphyra yezoensis* Thalli

Long-Guo JIN, Se-Eun KANG, Jae-Suk CHOI, Sun-Mee PARK, Jung-Youn PARK¹, Duck-Hee JIN² and Yong-Ki HONG*

Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

¹Biotechnology Division, National Fisheries R&D Institute, Busan 626-900, Korea

²Faculty of Marine Biotechnology, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

Genetic responses of the edible seaweed *Porphyra yezoensis* tissue to acid shock have been compared using differential display technique. The tissue was challenged in seawater containing 0.05% hydrogen chloride (pH 3.0) for 5 min, then rehabilitated in normal seawater for 10 min, 30 min, 60 min and 4 hrs. Total RNA extracted by the LiCl-guanidium method was reverse transcribed and amplified by PCR with arbitrary primers. The amplified fragment responded by the acid shock was selectively isolated from agarose gel and sequenced with DNA auto sequencer. Sequence (1056 bp) of the cDNA contained at least two genes for ASP7K (MW 7418) and ASP5K (MW 5512) proteins.

Key words: Acid inducible gene, Acid shock protein, Differential display, *Porphyra yezoensis*

서 론

해조류는 우리나라를 비롯한 일본 중국 등지에서 식용으로 서의 해조류 양식 및 동남아 등지에서는 유용 다당류의 생산 목적으로 대량 양식을 통한 생산을 행하고 있다 (Critchley and Ohno, 1998). 해조류 중 특히 방사무늬김 (*Porphyra yezoensis*)의 양식기술은 인공채묘기술이 개발된 이래 양식 및 가공분야의 많은 기술적 진보를 거듭해 오고 있으며, 2003 년도의 경우 우리나라 전체 양식 수산물 생산고의 12%로서 단위 생물 중 당 생산단가가 가장 높은 품종중의 하나이다 (<http://fs.fips.go.kr>). 대부분의 김 양식장은 천해 해역으로 하 천수의 유입으로 인한 풍부한 영양염류의 공급을 받고 있는 지역에 있다. 이러한 영양염류는 김의 성장촉진에 도움을 주는 반면에 여러 가지 미생물, 미세조류, 부착조류 등의 증식도 함께 촉진하여 결과적으로 김 성장에 대한 영양분의 경쟁관계, 질병유발, 품질 저하 등의 문제점들을 동시에 유발하고 있다. 따라서 최근에는 김을 양식하는 과정에서 각종 병해와 여러가지 부착생물들의 제거를 위하여 유기산제제 등을 직접 처리하기도 한다. 이로써 이들 산 처리제들의 김에 대한 안정성, 이차적인 해양오염 등 사회적 논란의 대상이 되어 왔다. 이들 산 처리시의 부착생물에 대한 제거 효능에 대해서는 국내에서도 많은 연구가 발표되어 있다 (Chung et al., 1989; Park et al., 1990; Gong et al., 1992; Chung et al., 1992). 그러나 김 엽체 자체의 산 처리시에 받는 생리적 영향 및 유전자

수준에서의 형질표현의 변화 등 분자생물학적 연구는 전무한 실정이다. 짧은 시간동안의 산처리에 따른 스트레스는 유전자전사 과정에서 새로운 mRNA 및 단백질을 생산할 수 있으므로 이들 반응유전자들은 RNA-PCR 방법으로 찾을 수 있다 (Kawasaki, 1990). 그러나 해조류의 경우는 현재까지 세포내부 혹은 외부 환경변화에 따라 나타나는 유전자표현의 mRNA들에 대한 정보가 거의 없는 상태이므로, 유전정보를 전혀 모르면서도 단순히 arbitrary primer들에 의한 PCR 생성물들을 비교함으로써 그 유전정보를 추후 찾아낼 수 있는 differential display (DDRT-PCR 혹은 RNA arbitrary primed PCR) (Liang and Pardee, 1992; Hong et al., 1995) 방법을 사용하면 가능할 것으로 여겨진다.

본 연구는 방사무늬김을 대상으로 유전자 형질표현의 differential display 기법을 이용하여 김 엽체에 대한 산 스트레스를 일시적으로 가한 후 이때 특이적으로 유도 반응하는 유전자를 분리하여 그 구조를 조사하였다.

재료 및 방법

해조체 시료

실험에 사용한 김은 양식용 김 망에 부착된 냉동 김발 상태의 방사무늬김 (*P. yezoensis*) 엽체로서 수분함량이 약 30% 정도로 건조된 상태에서 -70℃에 보관하면서 사용하였다. 필요할 경우 냉동 김발 일부를 PES 배지 (Provasoli, 1968)에 하루 동안 10℃에서 정치배양한 후, 건강한 엽체만을 초음

*Corresponding author: ykhong@pknu.ac.kr

파처리, betadine 처리 등으로 무균처리를 행하였다 (Park et al., 1998). 다음 약 0.2 cm 크기로 자른엽체들을 15 mL cap tube에 넣은 후 바늘구멍이 뚫린 뚜껑을 닫고 50 mL tube에 거꾸로 넣어서 1000 rpm에서 1분간 원심분리시켜 탈수한 후 얻은 조직들을 습중량으로 무게를 달았다.

산처리 조건

김의 양식 과정 중 부착생물의 오염을 제거하기 위하여 사용하고 있는 산 처리제는 구연산이 주종을 이루고 있지만, Gong et al. (1992)에 의하면, 각종 산 처리제의 효과를 비교한 결과, 산의 종류에 관계없이 동일 pH에서는 거의 동일하게 부착생물을 제거하였다. 따라서 본 실험에서는 오직 산에 의한 순수한 반응유전자를 찾고자 산처리제로서 0.05% 염산이 첨가된 해수 즉 pH 3.0의 해수에서 5분간 처리로 산 충격을 가한 후, 즉시 멸균 해수로 충분히 세척한 다음 멸균해수 내에서 정치배양 (10분, 30분, 60분, 4시간)후 각각의 총 RNA를 추출하였다. 대조구로써는 동일조건하에서 산처리하지 않은 김 엽체로부터 RNA를 추출하였다. 김 엽체의 활력측정은 TTC 방법 (Nam et al., 1998)에 따라 행하였다.

RNA 추출

산 충격에 의하여 특이적으로 유도 반응하는 유전자의 분리를 위하여 우선 총 RNA는 LiCl-guanidinium 방법 (Hong et al., 1995)으로 추출하였다. 즉 김 엽체 600 mg (습중량)을 액체 질소로 급랭시켜 미세하게 파쇄한 후, RNA 추출용액 (0.8M LiCl, 0.6% Sarcosyl, 10 mM EDTA, 0.2% PVPP, 5% 2-mercaptoethanol, 4 M Guanidium thiocyanate, pH 9.0) 2 mL를 첨가하여 55°C에서 10분간 가열한 다음, 4°C에서 1시간 동안 서서히 흔들어준다. 엽체를 제거한 상층액에 phenol/chloroform을 2회 처리한 후, 이 상층 수용액에 0.1배의 3 M sodium acetate, pH 5.4 및 2.5배량의 100% isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 1시간 방치한 다음, 원심분리 (1.5×10⁴ rpm, 10분, 4°C)하여 핵산 침전을 침전시켰다. 이 침전된 핵산을 DEPC-H₂O 200 μL에 녹인 후 동량의 4 M LiCl를 첨가하여 4°C에서 1시간 처리 후 재차 원심분리하여 핵산 침전을 회수하였다.

DNase 처리

침전된 핵산에 RNasin (1 unit/μL) 600 μL를 첨가한 후, DNA를 제거시키기 위하여 RNase-free DNase I (1 unit/μL) 4 μL, 10×DNase I buffer (500 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol) 20 μL, RNasin (1 unit/μL) 10 μL, DEPC-H₂O 66 μL를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다 (Ausubel et al., 1987). 다음 0.1 M EDTA 20 μL 및 2% SDS 20 μL를 첨가하여 반응을 중지시키고, DNase를 제거시키기 위해서는 phenol/chloroform 처리하였다. 그리고 남은 RNA를 회수하기 위하여 0.1배의 3 M sodium acetate, pH 5.4 및 3배량의 100% ethanol (-20°C)을 첨가하여 원심분리시켰으며, 재차 100% ethanol (-20°C)로 조심스럽게 세척한 후 RNA량을 측정하기 위하여 100 μL TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA,

pH 7.6)에 녹였다.

RNA 정량

총 RNA를 정량하기 위하여 RNA를 TE buffer에 100배 희석한 후 GeneQuant (Pharmacia Biotech Co.)를 이용하여 측정하였다. 그리고 다음 cDNA 합성을 위하여 총 RNA 농도를 0.5 μg/μL되게 RNasin (0.5 unit/μL) 함유 DEPC-H₂O로 조정하였다.

cDNA 합성

5 μL의 총 RNA 즉 2.5 μg을 cDNA 합성 protocol (Invitrogen Co.)에 따라 20 μL의 반응혼합액에 사용하였다. 우선 총 RNA 5 μL에 DEPC-H₂O 3 μL를 넣은 다음, 100 mM methyl mercury hydroxide 2 μL를 첨가하여 mRNA의 2차구조가 변성되도록 5분 동안 실온에 두었다 (Payvar and Schimke, 1979). 다음 0.7 M 2-mercaptoethanol 2.5 μL를 첨가하여 RNA로부터 methyl mercury hydroxide를 분리시켰다. 이 RNA에 random hexamer (1 μg/μL) 1 μL를 가하여 65°C에서 5분간 둔 후 얼음 위에 10분간 둬서 상보적인 위치에 수소결합되게 만들었다. 그리고 cDNA 합성은 placental RNA inhibitor (20 unit/μL) 1 μL, 5×RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 700 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol) 4 μL, 25 mM dNTPs 1 μL, avian reverse transcriptase (10 unit/μL) 0.5 μL를 첨가하여 42°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 반응을 충분히 시키기 위하여 한번 더 reverse transcriptase 0.5 μL를 가하여 42°C에서 1시간 더 반응을 시켰다. 이 cDNA 합성을 종결시키기 위하여는 95°C에서 3분간 가열 처리하였다.

PCR 증폭반응

PCR 증폭반응은 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus Co.)를 이용하여 10-base oligonucleotide인 arbitrary primer들 (Operon Technology Co.)을 구입하여 사용하였다. Primer는 OPA 1-20, OPB 1-20, OPC 1-20 모두 60개의 primer들을 사용하였다. PCR 반응 혼합물 (25 μL)은 cDNA 용액 1 μL, arbitrary primer 5 pM, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 0.5% Tween 20, 0.1 mM dNTP (United States Biochemical Co.), 그리고 Taq DNA polymerase (Promega) 1 unit로 구성되었다. PCR 반응조건은 먼저 95°C에서 5분간 둔 다음, 95°C에서 5초, 36°C에서 1분, 72°C에서 2분간씩으로 45회 반복 반응시켰다 (Yu and Pauls, 1992).

Agarose gel 전기영동 및 DNA 회수

PCR 생성물 10 μL를 loading dye (20% Ficoll 400, 0.025% bromophenol blue) 1 μL와 섞은 후, 전기영동은 ethidium bromide (0.5 μg/mL)가 포함된 3% agarose gel에 주입하여 TAE buffer (20 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) 하에서 50 볼트 전압으로 1시간 반 동안 분리하였다 (Sambrook et al., 1989). 전기영동을 한 다음, 원하는 DNA 부분만을 agarose gel에서 오래내어 DNA 추출 kit (Boehringer Mannheim Co.)의

방법에 따라 DNA를 회수하였다.

PCR 생성물의 cloning

산 처리된 엽체에서 특이적으로 나타난 cDNA의 differential display 생성물을 agarose gel 전기영동상에서 분리한 후, DNA ligation과 형질전환은 Invitrogen사의 Topo TA cloning kit를 사용하여 수행하였다. DNA ligation은 PCR 생성물 5 μ L, 10 \times ligation buffer 1 μ L, PCR 2.1 Topo vector (25 ng/ μ L) 1 μ L, 증류수 2 μ L, T4 DNA ligase (4.0 Weiss units) 1 μ L씩 첨가하여 총부피가 10 μ L로 되게하여 실온에서 5분 동안 반응시켰다. 형질전환은 *Escherichia coli* competent cell (INV α F')에 vector 1 μ L를 첨가하여 얼음상에서 30분간 반응시키고, 42 $^{\circ}$ C에서 30초간 반응종결하였다. 그런 후 ampicillin과 X-Gal이 포함된 LB 배지에 도말하여 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 배양하였다. Plasmid 추출은 High Pure Plasmid Isolation Kit (Boehringer Mannheim Co.)를 사용하여 추출하였다. 그리고 원하는 PCR 생성물이 삽입되었는지의 여부를 확인하기 위하여 *Eco*RI 제한효소처리는 추출한 plasmid 3 μ L, 10 \times 반응용액 1 μ L, *Eco*RI (5000 unit/ μ L) 1 μ L, 증류수 5 μ L로서 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시키고 전기영동하여 DNA 삽입여부를 확인하였다.

염기서열 조사

염기서열은 DNA Auto Sequencer (ABI PRISM 377, Perkin Elmer Co.)로 결정하였으며, 염기 상동성 및 ORF (Open Reading Frame)은 NCBI의 BLAST 프로그램을 이용하여 조사하였다. 그 외 아미노산의 조성 및 소수성점증 등은 Genetyx 프로그램을 사용하였다.

결과 및 고찰

산 처리 조건

김의 양식과정 중 부착생물들의 오염을 제거하기 위하여 사용하고 있는 산 처리제의 효과는 Gong et al. (1992)에 의하면 산의 종류에 관계없이 동일 pH에서는 동일하게 부착생물을 제거하였으며 김의 세포사멸율은 pH 3.0에서 5분 처리 경우 13%에 불과한데 비해, 규조류의 경우 90% 이상이 탈락되었으며, 파래의 세포사멸율 또한 90% 이상이었다. 이에 본 연구에서는 0.05% 염산을 첨가한 해수 즉 pH 3.0에서 5분간 처리 시 김의 활력정도를 측정 한 결과는 산 처리를 하지 않은 김과 비교할 때 90% 이상 활력이 유지되었다. 따라서 본 실험에서의 산 처리조건은 0.05% 염산을 첨가한 해수에서 5분간 산 충격을 가하였을 때 이에 반응하는 유전자를 분리하였다.

RNA 추출

위에서 설정한 산처리 조건하에서 김 엽체를 처리한 후 RNA를 추출하여 formaldehyde agarose gel 상에서 RNA의 상태를 조사한바 모든 추출 RNA들은 large subunit의 26S rRNA 및 small subunit의 18S rRNA, chloroplast의 large rRNA, chloroplast의 small rRNA 등 4개 band들이 분해되지 않은 상태

로 선명하게 추출되어져 나왔다 (data not shown). 이로 미루어 볼 때 추출된 mRNA들의 상태도 역시 상대적으로 분해가 되지 않은 것으로 고려되어 다음 단계의 cDNA 합성 주형으로서 사용하였다.

cDNA 합성 및 differential display

추출 RNA 2.5 μ g으로부터 cDNA를 합성한 후, 60종류의 각 arbitrary primer들을 이용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 그 결과 산처리를 한 경우 OPA 5 (AGGGGTCTTG) primer를 사용하였을 경우, 산 처리 후 김 엽체를 멸균 해수내에서 30분간 정치 배양하면서 유전형질 표현을 유도한 결과 산 충격에 의하여 약 1,056 bp 크기의 산에 유도되는 유전자가 발견되는 것을 발견하였으며 1시간, 4시간 후에도 계속 유지되는 것으로 보였다 (Fig. 1). 이와같이 김 엽체로부터 외부 충격에 의한 유전 형질의 표현변화를 조사하기 위하여는 위와 같은 조건하에서 최소한 30분 동안의 형질표현 즉 RNA 합성에 소요되는 시간이 지난 후에 그 유전자의 differential display를 조사해야 할 것으로 나타났다.

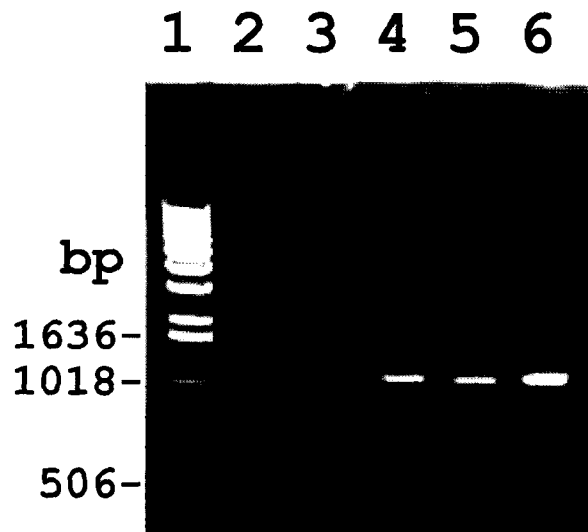


Fig. 1. Pattern of differential display detected in cDNAs from *Porphyra yezoensis* tissues treated by acid. Tissues were shocked in seawater of pH 3.0 for 5 min and rehabilitated in normal seawater for 10 min (lane 3), 30 min (lane 4), 60 min (lane 5) and 4 hrs (lane 6). Reverse transcribed cDNAs were amplified using the arbitrary primer OPA 5 (AGGGGTCTTG). The control reaction (lane 2) followed the same procedure without acid shock. The molecular size marker (lane 1) is the 1 kb DNA ladder from BRL/Gibco.

이와같이 산 충격에 의하여 만들어진 산유도유전자의 differential display 생성물을 대량 얻기 위하여, 대장균의 TA cloning vector인 pCR 2.1을 사용하여 산유도유전자를 cloning 한 후 대장균 INV α F' 숙주 균주에 형질전환시켰다. 이들 형질 전환된 집락들 중에서 1,056 bp 크기의 외부 유전자가 삽입되어 있는 집락을 선별하기 위하여, 각 집락들로부터 plasmid를

추출한 후, 제한효소 *EcoRI*로 분해시켜서 확인하였다 (Fig. 2).

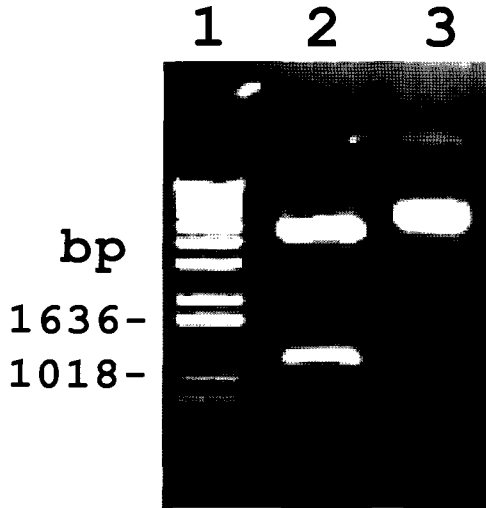


Fig. 2. Cloning of a differential display product using TA cloning vector. The product was ligated in the TA cloning vector of pCR 2.1 and transformed to *E. coli* INVaF' host cell. The recombinant plasmid was extracted by alkaline lysis and digested with the restriction enzyme *EcoRI*. Lane 1, the molecular size marker of 1 kb DNA ladder from BRL/Gibco. Lane 2, the *EcoRI* digested-plasmid. Lane 3, the transformed recombinant plasmid.

염기서열 분석

TA cloning vector에 삽입된 산유도유전자에 대한 구조를

```

0001 AGGGGCTCTG CTGTAAAATT AAATCttgaa tagagttcaa agaattgaaa 0050
0051 ataaaatGGG GATTCATTTG AGATTTTAAC GCCTTTAAGT TGGAAGCAGC 0100
0101 CAACTCATAG CGCTTACTTT CTTGAGTAA TTCGTAGGCT TTATCTAGTT 0150
0151 CTCTTTTTTG TTTTCTGATG AGTTTAAATC GATTAATAAT AATAAATAGT 0200
0201 AAAAGGGCTA CAATCCAGC AAATACTACC GCTCCTATAA ACCTTTCTG 0250
0251 GCTATTTTCA GCTCTTTGGT TGGCAATCAG CTCGTTTGCT TCTGCTTCT 0300
0301 CTTTTTCTCT TAAATTTTTC TCAGTTTCGT ACTTCGTTTC CATCTCAAGC 0350
0351 ACGGCTTCTC TCATTTCTTG ATTAATAAAT GAATCATTA TTTGGGTCAC 0400
0401 TTTTTTGTA TAAAACAAGG CTTTTCTG CTTCTATT TTTTCGTACA 0450
0451 AAATGGATAA ATATTGATAA TTATACCTG CAGAAGGAAA ATAATTATAA 0500
0501 TTATCGCTTT TGCTGATAAA TGGCTCCGC TTTCAACAAA TATTCTCGG 0550
0551 CTTTAGTAAA TTGATTAAGA GAGGTATACG GTACTTCCTA AATTATTGTA 0600
          3' AATTCT CTCCATATGC CATGAAGGAT TTAATAACAT
0601 AGACTTTATA ATCCCTCAG AATTTTCAAG ATTTTGATAA TTTCCCAAGG 0650
          TCTGAAATAT TAAGGGAGTC TTAAAAGTTC TAAAACATAT AAAGGGTTCC
0651 CTTTATTGAA ATAATTTATT GCCTCTTTGT ACTCTTTCTT TTTGTCAAAA 0700
          GAAATAACTT TATTAAATAA CCGAGAAACA TGAGAAAGAA AAACAGTTTT
0701 AGAGTCCCA TATTGGTACT CAAATTTGCT AAATCAGTT TGTGCGTTAT 0750
          TCTCAAGGGT A5'
0751 GATACCTTCT GCTTTTTTTC CGTATCCAA TCCTTCGTCT ACTTCTCCTG 0800
0801 TCTTGGTATG AAATGCTACC AAATTAATAC AAGTTTTTGC GTATAACCGT 0850
0851 ttggtCTTTA TGGTGAGTGG GttttcaatT ATTTCTTTGC TCAACTTTAT 0900
0901 TCCTTTATCG TATTCCTTA GAAACAAATA AACTCCAGCC AAATTAACCT 0950
0951 TAGTAATCAA TGCACCTGTT TGAATTTTGC GTTTCAGTCTT AGATTCAAAA 1000
1001 TATTCAATC CCCTACTCAA ATAGTTCACC GCTTGTGTTGT AATCGCCAAG 1050
1051 ACCCCT-3' 1056
  
```

Fig. 3. Nucleotide sequence of an acid-inducible gene fragment (1,056 bp). The gene was expressed in the *Porphyra yezoensis* tissues by acid treatment at pH 3.0 for 5 min. The ORF sequences are shown in italic uppercase letters. The palindrome sequences and the inverted and complementary repeats are underlined. The potential promoter sequences are in lowercase letters.

알기 위하여, DNA Auto Sequencer를 이용하여 그 염기서열을 조사한 바 Fig. 3과 같이 1,056개의 염기로 구성되어 있으며 G+C% 함량은 33%인 것으로 나타났다. 이 유전자의 염기서열을 바탕으로 가능한 ORF를 조사한바 2개의 ORF를 발견하였다. 우선 168번 염기에서 374번 염기까지의 206개 염기로 구성된 ORF는, 35%의 G+C% 함량을 가졌고, melting temperature는 84°C이며, 174-TTTTAATCGATTAATAA-189 및 313-AAA-TTT-318의 palindrome sequence들을 가진 특징이 있다. 그리고 이 유전자는 26-TTGAAT-31 (-35 region)과 52-TAAAAAT-57 (-10 region) 사이의 20염기로 구성된 promoter consensus sequence와 homology가 높은 염기서열을 발견할 수 있었다. 이 유전자의 염기서열을 아미노산으로 전환하면 Fig. 4A와 같이 67개의 아미노산으로 구성된 분자량 7418의 단백질 (ASP7K)을 구성하는 것으로 볼 수 있다. 이를 BLAST program을 이용하여 기존의 알려진 단백질들과의 상동성을 검색하였을 때에 *Magnetospirillum magnetotacticum*의 hypothetical protein (Accession No. ZP 00056593)과 31 bit의 score와 E 값이 5.4 (40% identity 및 56% positive)로서 매우 낮은 유사성을 보였다. 다른 ORF는 711번 염기에서 562번 염기까지의 149개 염기로서, 29% G+C% 함량을 가졌고, melting temperature는 81°C이며, 101-TTATAA-106 및 133-GTATAC-138의 palindrome sequence들과, 115-AATAATTTA-123과 52-44번사이 그리고 44-TAAATTATT-52과 123-115번사이의 inverted complementary repeat들을 가진 특징이 있다. 그리고 이 유전자는 179-TTGAAA-184 (-35 region)과 202-AACAAA-207 (-10 region) 사이의 17염기로 구성된 promoter consensus sequence

(A):
 01 MSFNRLKIIN SKRATIPANT TAPINLFWLF SALWLAISSF ASAFSFLKF 50
 51 FSVSYFVSIS STASLIS* 67

(B):
 01 MGTLFDKKKE YKEAINYFNK ALGNYQNLEN SEGIKSYNN LGSTVYLS* 48

Fig. 4. Deduced amino acid sequences of 206 bp ORF (A) and 149 bp ORF (B) from the acid resistant gene fragment of 1,056 bp. Symbol (*) indicates the termination codon TGA or TAA.

와 homology가 높은 염기서열을 볼 수 있었다. 이 유전자의 염기서열을 아미노산으로 전환하면 Fig. 4B와 같이 48개의 아미노산으로 구성된 분자량 5512의 단백질 (ASP5K)을 구성하는 것으로 보여진다. 이를 기존의 알려진 단백질들과의 상동성을 검색하였을 때에 *Trichodesmium erythraeum*의 hypothetical protein (Accession No. ZP 00072386)과 35 bit의 score와 E 값이 0.4 (35% identity 및 61% positive)로서 매우 낮은 유사성을 보였다. 또 다른 ORF는 1056염기에서 565염기까지의 5' 염기영역이 없는 부분적 단편이었으므로 data에는 포함시키지 않았다. 또한 단편상태이지만 이의 상동성도 역시 *Bacteroides thetaiotaomicron*의 signaling protein (Accession No. NP 810231)과 49 bit의 score와 E 값이 $3e-5$ (38% identity 및 61% positive)로서 매우 낮은 유사성을 보였다.

그리고 이 67 아미노산으로 구성된 ASP7K 단백질은 Phe-Ala-Leu-Ile같은 소수성 아미노산들이 전체의 45%를 차지하며, 모든 소수성 아미노산들은 38개로서 전체의 55%를 차지하며 친수성 아미노산은 9%를 차지하는 특징을 가지고 있으며, 등전점은 11.7로 나타났다. 또한 48 아미노산으로 구성된 ASP5K 단백질은 Lys-Tyr-Glu같은 친수성 아미노산들이 전체의 30%를 차지하며 등전점은 9.1로 나타났다. 이들 단백질들의 특성을 조사하고자 hydrophobicity profile을 그려본 바 ASP7K 단백질은 Fig. 5 (top)와 같이 전반적으로 높은 소수성 pattern을 보이므로 세포막 구성 단백질 혹은 내부 folding이 심한 단백질인 것으로 보여진다. 산에 대한 내성을 나타내는

단백질들의 일부는 최소한 산의 전달에 관여하는 막 구성 단백질도 필요할 것으로 여겨지므로 이 단백질이 막구성 단백질일 것으로 유추되나 현재로서는 단정지을 수가 없다. ASP5K 단백질은 Fig. 5 (bottom)와 같이 전반적으로 친수성을 띠는 세포질 단백질로 여겨진다. 이들의 2가지 단백질 모두 기존의 일반 고등식물로부터 널리 알려진 76 아미노산으로 구성된 acid shock protein인 ubiquitin (Garbarino et al., 1992) 등과도 아미노산 서열 및 hydrophobicity profile상에 유사성이 전혀 없었다. 이같은 이유는 해조류에 대한 유전자 database가 많이 부족하여 그럴 수도 있으며 또한 해조류가 육상식물들과 유전적 거리가 멀어 유사성이 적은 것으로도 보인다. 그러나 이 실험을 통하여 differential display 기법을 통한 해조류 김에 대한 산 충격에 따른 반응유전자들을 쉽게 분리 확인할 수 있었으며, 이 유전자의 역할은 산에 대한 스트레스 관련 단백질인 것으로 여겨지나 더 많은 확인 연구가 필요하다.

사 사

본 논문은 2003년도 부경대학교 기성회 학술연구비 지원 및 2004년도 Brain Busan 21사업에 의하여 지원되었음.

참 고 문 헌

- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl. 1987. Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, pp. 414-416.
- Chung, Y.K., J.I. Choi and G.J. Kim. 1992. Studies on the control of diseases and diatoms on laver using mixed solutions of organic acids and trace metals. Bull. Natl. Fish. Res. Dev. Agency, 96, 215-226.
- Chung, Y.K., S.K. Cho and G.J. Kim. 1989. Studies on the control of the *Licmophora abbreviata* on laver leaves. Bull. Natl. Fish. Res. Dev. Agency, 73, 180-195. (in Korean)
- Critchley, A.T. and M. Ohno. 1998. Seaweed Resources of the World. Japan International Cooperation Agency. Japan. pp. 431.
- Garbarino, J.E., D.R. Rockhold and W.R. Belknap. 1992. Expression of stress-responsive ubiquitin genes in

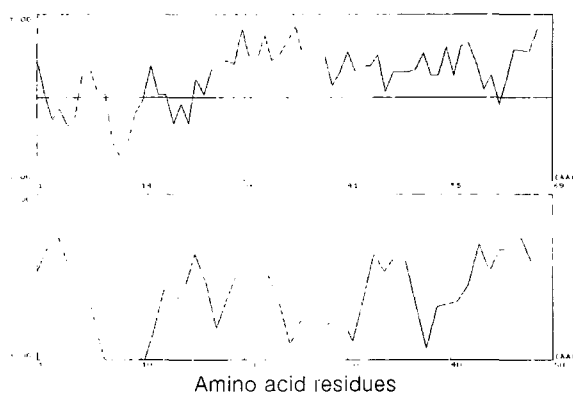


Fig. 5. Hydrophobicity profiles of acid shock proteins of ASP7K (top) and ASP5K (bottom). The profiles were obtained by the method of Kyte and Doolittle in the Genetyx program. Areas above the median line are hydrophobic, and areas below are hydrophilic.

- potato tubers. *Plant Mol. Biol.*, 20, 235-244.
- Gong, Y.G., S.C. Cheong, D.Y. Lee, S.W. Kim, J.W. Chang, Y.G. Jeong, J.I. Choi, H.G. Kim and C.K. Lee. 1992. Studies on the control of fouling organism on the laver *Porphyra*. *Bull. Natl. Fish. Res. Dev. Agency*, 96, 178-191. (in Korean)
- Hong, Y.K., C.H. Sohn, M. Polne-Fuller and A. Gibor. 1995. Differential display of tissue-specific messenger RNAs in *Porphyra perforata* (Rhodophyta) thallus. *J. Phycol.*, 31, 640-643.
- Kawasaki, E.S. 1990. Amplification of RNA. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White, eds. Academic Press, San Diego, pp. 21-27.
- Liang, P. and A.B. Pardee. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257, 967-971.
- Nam, B.H., H.J. Jin, S.K. Kim and Y.K. Hong. 1998. Quantitative viability of seaweed tissues assessed with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. *J. Appl. Phycol.*, 10, 31-36.
- Park, J.W., Y.C. Cho, B.H. Nam, H.J. Jin, C.H. Sohn and Y.K. Hong. 1998. RAPD identification of genetic variation in the seaweed *Hizikia fusiformis*. *J. Mar. Biotechnol.*, 6, 62-64.
- Park, Y.J., S.K. Kim, G.J. Kim and S.K. Cho. 1990. Studies on the control of the green algae, *Enteromorpha linza* from the cultivating purple-laver net. *Bull. Natl. Fish. Res. Dev. Agency*, 44, 77-85. (in Korean)
- Payvar, F. and R.T. Schimke. 1979. Methylmercury hydroxide enhancement of translation and transcription of ovalbumin and conalbumin mRNAs. *J. Biol. Chem.*, 254, 7636-7642.
- Provasoli, L. 1968. Media and prospects for cultivation of marine algae. In: *Cultures and Collections of Algae*, Watanabe, A. and A. Hattori, eds. *Jap. Soc. Plant Physiol.*, pp. 63-75.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 18.88.
- Yu, K. and K.P. Pauls. 1992. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucl. Acids Res.*, 20, 2606.

2004년 6월 19일 접수
2004년 8월 21일 수리