(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0131309
(43) 공개일자 2009년12월29일

(51) Int. Cl.
C12N 15/52 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12N 15/64 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0057115
(22) 출원일자 2008년06월18일
심사청구일자 2008년06월18일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교
(72) 발명자
박연일
대전 유성구 지족동 919 열매마을 7단지 705동 401호
김수연
부산광역시 부산진구 범전동 63-31 18/1
(74) 대리인
최규환

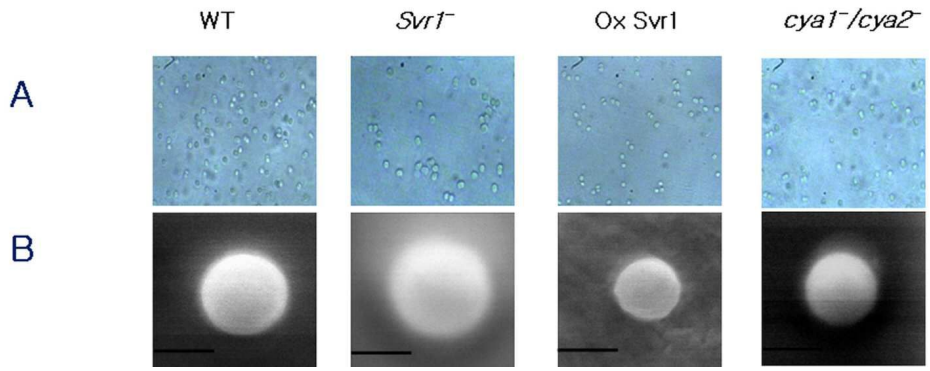
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 남세균의 세포 크기 조절 유전자 s v r 1, 및 이를 이용한남세균의 세포 크기 조절 방법

(57) 요 약

본 발명은 남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.)의 세포 크기를 조절하는 svr1(Synechocystis 4-vinyl reductase 1) 유전자, 상기 svr1 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포, 남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.)에서 svr1(Synechocystis 4-vinyl reductase 1) 유전자의 발현을 조절하여 남세균 시네코시스티스의 세포 크기를 조절하는 방법 및 svr1 유전자가 결실된 남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.) PCC6803 돌연변이주를 제공한다.

대 표 도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.)의 세포 크기를 조절하는 svr1(Synechocystis 4-vinyl reductase 1) 유전자.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 3

제1항의 svr1 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

제3항의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 숙주세포는 남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.)인 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 숙주세포는 남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.) PCC6803인 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 7

남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.)에서 svr1(Synechocystis 4-vinyl reductase 1) 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 남세균 시네코시스티스의 세포 크기를 조절하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.)에서 svr1 유전자를 과발현하여 남세균 시네코시스티스의 세포 크기를 감소시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.)에서 svr1 유전자의 발현을 억제하여 남세균 시네코시스티스의 세포 크기를 증가시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 남세균 시네코시스티스의 세포 크기는 포도당 대사에 의한 호흡을 통해서 조절되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, svr1 유전자는 남세균 시네코시스티스의 호흡을 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, svr1 유전자는 플라스토퀴논 풀(PQ pool)로 전자 유입을 억제함으로써 호흡을 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, svr1 유전자에 의해 코딩되는 Svr1 단백질은 NTR(NADPH thioredoxin reductase) 단백질의 효소 활성을 억제함으로써 호흡을 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 Svr1 단백질의 4VR (4-vinyl reductase) 도메인을 포함하지 않는 N 말단 부위가 NTR 단백질과 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제7항에 있어서, 남세균 시네코시스티스의 세포 크기는 번역 후 수준에서 조절되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제7항에 있어서, 남세균 시네코시스티스는 남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.) PCC6803인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

svr1 유전자가 결실된 남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.) PCC6803 돌연변이주.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 남세균, 더욱 구체적으로 남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.) PCC6803의 세포 크기 조절 유전자 svr1, 및 이를 이용한 남세균의 세포 크기 조절 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 세포의 크기는 생장과 대사율 (metabolic rate)에 의해 결정된다. 이렇게 세포 크기의 생장과 대사율의 관계는 동물, 광합성 원핵세포, 녹조류에서 연구되었다. 그러나, 세포크기 조절 인자에 대한 연구는 최근에 시작되어 선충 (*C. elegans*)에서 개체 크기를 조절하는 유전자와 효모, 그리고 원핵 세균인 *Bacillus subtilus*에서 세포 크기를 조절하는 경로가 일부 알려졌다. 그러나 남세균이나 조류 등에서도 세포의 크기에 호흡율의 상관 관계에 대한 보고는 있으나, 그 분자유전학적인 기작은 아직 알려져 있지 않다.

<3> 남세균은 11개의 진정 세균 문(phyta) 중에 가장 큰 집단이다. 그 중에 남녹색 원형 단세포 *Synechocystis* sp. PCC 6803이 대표적인 종이다. *Synechocystis* 세포 내부에 여러 겹으로 에워 쌓인 틸라코이드 막에서 빛을 흡수하고 전자를 전달하는 광합성 전자 전달계 구성원이 존재하여 고등 식물이나 조류에서와 같이 산소 발생 광합성이 일어난다. 그리고 고등식물에서 엽록소 a, b로 구성된 광 수확 복합체 (light harvesting complexes) 와는 달리 *Synechocystis*는 500-650 nm 파장을 흡수할 수 있는 피코빌리좀 (phycobilisome)을 보조색소로 가지고 있다. 또한 틸라코이드 막에는 NAD(P)H dehydrogenase (NDH), succinate dehydrogenase (SDH), 시토크롬 c553과 말단 산화효소 (terminal oxidase)가 있어서 틸라코이드 막에서도 산화적 인산화 반응이 일어난다. 그러나 빛이 있을 때 틸라코이드 막에서 광합성 전자 전달과 호흡적 전자 전달계 간의 활성 조절에 대해서는 아직 명료하게 밝혀지지 않았다.

<4> *Synechocystis*는 광합성을 이용한 광독립영양 생장 조건에서 생장이 가능할 뿐 아니라 빛이 존재하며 배지에 탄소원인 포도당이 첨가된 광종속 영양 생장 조건과 암상태에 포도당이 첨가된 암종속 영양 생장 조건에서도 생장이 가능하다. 외부에서 유입된 포도당은 인산화되어 해당과정이나 산화적오탄당 인산 경로 (oxidative pentose phosphate pathway, OPPP)를 거쳐 피루브산 (pyruvate)을 생성하게 되고, 피루브산은 트리카르복실산 (tricarboxylic acid, TCA) 회로를 거치며 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD(P)H)와 ATP를 더 생성하는 단계를 거친다. 이렇게 생성된 NAD(P)H는 산소를 이용한 호흡 전자 전달 과정에 쓰이게 되는데, 호흡 전자 전달은 양성자 농도 기울기 (proton gradient)를 야기하며 이와 짝지어 ATP 생성 효소 (ATP synthase)를 통해 ATP가 생성된다.

<5> 이와 같이 광합성 기구를 가지고 있으면서도 외부에서 주어진 탄소원에 의존하여 살아갈 수 있는 점과 함께 상동 재조합 (homologous recombination)에 의한 높은 형질 전환 효율을 가져 느린 세대교번의 식물에서 연구되기 어려운 광합성 효소나 그 메커니즘을 탐색할 수 있다는 장점이 있다. 또한, 1996년 *Synechocystis*의 게놈 염기

서열 분석이 완료되어, 데이타베이스 상 유전자의 탐색이 용이해져 (http://www.kazusa.or.jp/cyanobase) 광합성 관련 연구뿐만 아니라 빛 적응이나, 스트레스 반응 연구, 세포 주기와 분열, poly hydroxybutyrate (PHB)나 토코페롤 (tocophenol) 같은 특정 생합성 물질 등의 다양한 연구에 이용된다.

<6> *Synechocystis*은 포도당 이화작용을 통하여 외부에서 주어지는 포도당을 이용하여 생장할 수 있다. 광독립 영양생장 조건에서 배양한 야생종 세포에 10 mM의 포도당을 첨가한 뒤, 2일째 엽록소 *a* 함량이 5배 이상 증가함을 보였다. Doubling time 또한 광독립 영양 생장조건은 22 시간인데 비해 광종속 영양 생장일때는 7시간으로 빨라졌다. 이는 에너지원인 포도당이 이용되어 많은 에너지와 전구물질의 생성이 증가한 결과로 예상된다. 또한 포도당은 OPPP와 해당과정, TCA 회로를 거치며 NAD(P)H를 생산하기에 세포내 NAD(P)H의 함량이나 비율의 차이를 유발한다. NADPH에 의해서 시작되는 호흡 전자 전달은 산소 소비량으로 측정할 수 있는데 포도당이 첨가되면 산소 소비량은 3배 이상 증가하는 반면에 광합성률은 약 10% 감소한다. 그러나 조류에서와 같이 포도당에 의해 야기되는 호흡률과 세포 생장률의 상관 관계에 대한 연구는 전혀 보고된 바 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<7> 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 남세균 *Synechocystis* 에서의 포도당 처리에 의해서 증가하는 호흡율이 세포 크기와 상관관계가 있는지를 규명한 후, 세포 크기 신호조절 경로가 무엇인지를 규명하고자 한다. 먼저 1,200 여개의 무작위 Tn5 돌연변이주를 이용하여 광독립 영양생장과 광종속 영양생장 조건에서 야생종과 비교하여 세포 크기 차이를 보이는 돌연변이주를 선발하였다. 이 중에서 광종속 영양생장 조건에서 야생종 세포에 비해 30% 이상 세포크기가 증가하였으나 기능이 알려져 있지 않은 *slr0144* 유전자를 선발하여 이 유전자가 결실된 돌연변이주와 과발현된 형질전환 균주를 만들어 포도당에 의한 세포크기 증가에서 그 기능을 밝히고자 하였다.

<8> 동시에 효모와 선충에서 세포 크기 조절에 관여하는 cAMP가 *Synechocystis* 세포 크기 조절에도 관여하는지를 조사하고자, 이를 합성하는 효소 *cya1* 유전자와 더불어 cGMP 생성에 관여하는 *cya2* 유전자가 결실된 이중 돌연변이주를 제작하여 그 표현형을 분석함으로서 세포 크기 조절에 cAMP 또는 cGMP의 역할을 규명하고자 하였다.

과제 해결수단

<9> 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.)의 세포 크기를 조절하는 svr1(Synechocystis 4-vinyl reductase 1) 유전자를 제공한다.

<10> 또한, 본 발명은 svr1 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

<11> 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

<12> 또한, 본 발명은 남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.)에서 svr1(Synechocystis 4-vinyl reductase 1) 유전자의 발현을 조절하여 남세균 시네코시스티스의 세포 크기를 조절하는 방법을 제공한다.

<13> 또한, 본 발명은 svr1 유전자가 결실된 남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.) PCC6803 돌연변이주를 제공한다.

효 과

<14> 본 발명의 svr1 유전자 또는 cya1 및 cya2 유전자를 이용하면 남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.)의 세포 크기를 조절할 수 있다. 또한, 본 발명은 다른 세균의 세포 크기 조절 연구에도 도움을 줄 수 있을 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<15> 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.), 더욱 구체적으로 남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.) PCC6803의 세포 크기를 조절하는 svr1(Synechocystis 4-vinyl reductase 1) 유전자를 제공한다.

<16> svr1(Synechocystis 4-vinyl reductase 1) 유전자는 신규 유전자로서, 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 유전자의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 변이체는 염기 서열은 변화되지만, 서열번호 1의 염기 서열과 유사한 기능적 특성을 갖는 염기 서열이다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기

서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다.

<17> 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

<18> 본 발명은 또한, svr1 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

<19> 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다.

<20> 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예컨대, pLλ프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, T7 프로모터, tac 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 리보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 대장균(E. coli)가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위, 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터 (pLλ프로모터)가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

<21> 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예: pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHC79, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예: λgt4·λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

<22> 한편, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

<23> 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있으며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

<24> 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다. 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, E. coli JM109, E. coli BL21, E. coli RR1, E. coli LE392, E. coli B, E. coli X 1776, E. coli W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다. 상기 숙주세포는 바람직하게는, 남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.)이며, 더욱 바람직하게는 남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.) PCC6803 이다.

<25> 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 효모(Saccharomyce cerevisiae), 곤충 세포, 사람 세포 (예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다.

<26> 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, $CaCl_2$ 방법 (Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법 (Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법 (Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법(Capecchi, M.R., Cell, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법 (Graham, F.L. et al., Virology, 52:456(1973)), 전기 천공법 (Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)), 리포좀-매개 형질감염법(Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980)), DEAE-덱스트란 처리법(Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트 (Yang et al., Proc.Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990)) 등에 의해 벡터를 숙주 세포 내로 주입할 수 있다.

<27> 본 발명은 또한, 남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.)에서 svr1(Synechocystis 4-vinyl reductase 1) 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 남세균 시네코시스티스의 세포 크기를 조절하는 방법을 제공한다.

<28> 본 발명의 방법에서, 남세균 시네코시스티스는 바람직하게는 남세균 시네코시스티스 PCC6803 이다. 남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.)에서 svr1 유전자를 과발현하여 남세균 시네코시스티스의 세포 크기를 감소시킬 수 있다. 실시예에서 알 수 있는 바와 같이, svr1 과발현주인 Ox Svr1 균주는 야생형보다 세포 크기가 감소한 것을 알 수 있다.

<29> 또한, 남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.)에서 svr1 유전자의 발현을 억제하여 남세균 시네코시스티스의 세포 크기를 증가시킬 수 있다. 실시예에서 알 수 있는 바와 같이, svr1 돌연변이주인 $svr1^-$ 균주는 야생형보다 세포 크기가 증가한 것을 알 수 있다.

<30> 본 발명의 방법에서, 남세균 시네코시스티스의 세포 크기는 포도당 대사에 의한 호흡을 통해서 조절될 수 있다. 탄소원으로 L-glucose와 3-O-methylglucose 포도당 유사체를 이용한 결과, 세포 크기 증가를 볼 수 없었다. 또한, 전자전달억제제인 6-아미노니코틴아미드, KCN 및 $HgCl_2$를 사용하여 호흡과 세포 크기간의 연관성을 조사한 결과, 세포 크기 증가 현상을 볼 수 없었는데, 이 결과는 포도당 대사에 의한 세포 내 호흡을 통해서 세포 크기 증가가 결정됨을 의미하는 것이다.

<31> 본 발명의 방법에서, svr1 유전자는 남세균 시네코시스티스의 호흡을 억제하는 것을 특징으로 한다. svr1 유전자는 플라스토퀴논 풀(PQ pool)로 전자 유입을 억제함으로써 호흡을 억제한다.

<32> svr1 유전자에 의해 코딩되는 Svr1 단백질은 NTR(NADPH thioredoxin reductase) 단백질의 효소 활성을 억제함으로써 호흡을 억제하며, 상기 Svr1 단백질의 4VR (4-vinyl reductase) 도메인을 포함하지 않는 N 말단 부위가 NTR 단백질과 결합한다. 남세균 시네코시스티스의 세포 크기는 번역 후 수준에서 조절되는 것을 특징으로 한다.

<33> 본 발명은 또한, svr1 유전자가 결실된 남세균 시네코시스티스 (Synechocystis sp.) PCC6803 돌연변이주를 제공한다.

<34> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

<35> **실시예**

<36> **재료 및 방법**

<37> **균주 배양 조건**

<38> 남세균 *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*)의 야생종, 3,500 여종의 트랜스포존 (Tn5) 돌연변이주 (SMCC로부터 분양받음), *svr1* 유전가 결실된 *svr1 (slr0144)* 돌연변이주 (*$svr1^-$*), svr 과별현 형질전환체 (OxSvr), *$cya1^-/2^-$* 이중 돌연변이주를 본 발명의 실험 재료로 사용하였다. 이들의 세포 크기 변화와 이에 따른 영향을 분석하기 위해, 각 균주를 5 mM pH 완충액 N-tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane-sulfonic acid (TES)-NaOH (pH 8.0)가 포함된 무기 배지 BG-11(Rippka et al., 1979, J. Gen. Microbiol. 111:1-61)에 1.5% (w/v) bacto 아가 (agar)와 0.3% (w/v) 티오황산나트륨 (sodium thiosulfate)이 첨가된 고체 배지에 배양하였다. *svr1-*, OxSvr, *cya1-/2-* 및 Tn 5 돌연변이주의 유지를 위해서는 고체 배지에 20 μgml^{-1} 스펙티노마이신 (*svr1-*, *cya1-/2-*) 와 30 μgml^{-1} 클로람페니콜 (*$cya1^-/2^-$*), 20 μgml^{-1} 카나마이신 (OxSvr, Tn5)의 항생제를 첨가하였다. 고체 배지에서 유지되는 균주는 28℃, 습도 60%, 10 - 30 μmol photons $m^{-2}s^{-1}$의 광이 유지되는 저온 배양기 (Hanback, Korea)에서 배양하였다. 세포 크기 측정실험시 지수 생장기 (A_{750} = ~0.6)에 있는 야생종과 돌연변이주들은 광독립 영양생장 조건이나 10mM 포도당이 첨가된 광종속 영양생장 조건, 10mM 포도당이 첨가되었으나 빛이 차단된 암종속 영양상태의 세포를 사용하였다. 전자전달 억제제로 NDH 에서 PQ로 전자 유입을 억제하는 0.5 μM $HgCl_2$, 포도당의 이화과정 첫 단계인 glucose 6-p dehydrogenase 억제를 통해 NADPH 생성을 억제하는 1 mM 6-aminonicotinamide (6AN), 말단 산화 효소에서 산소로 전자 전달을 억제하는 50 μM KCN을 사용하였다. 또한, 포도당 및 포도당 유사체 (L-glucose, LGlc; 3-O-methylglucose, OMG) 설탕의 농도는 최종 10 mM을 사용하였다.

<39> **DNA 추출**

<40> 지수 생장기의 세포를 원심분리하여 (3,000×g, 15분, 4℃) 세포를 수확하였다. 수확된 세포를 200 ㎕ TEN 버퍼 (10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 100 mM EDTA)에 현탁한 뒤, 10 ㎕ lysozyme (20 mg/ml)을 첨가하여 37℃에서 15분 반응시켜 세포를 파괴한 뒤, 10% SDS 5 ㎕ 을 첨가하여 흔들어 주었다. 이 반응물질에 5 ㎕ protease K (20 mg/ml)을 첨가하여 60℃에서 1시간 반응시켰다. 반응 후, 400 ㎕ 페놀을 첨가한 뒤, 원심분리(3,500 rpm, 3분, 상온)하여 상등액을 새 튜브에 옮겼다. 상등액과 동일량의 페놀:클로로포롬:이소아밀알코올을 첨가하여 상온에서 3-5분 흔들어 주었다. 다시 원심분리(3,500 rpm, 3분, 상온) 후, 얻어진 상등액은 20 ㎕ 3M sodium acetate (pH5.2), 400 ㎕ 에탄올과 혼합한 뒤, 원심분리 (3,500 rpm, 3분, 상온)를 통해 DNA만 얻었다.

<41> **역중합 효소 반응(inverse PCR)**

<42> 트랜스 포존이 삽입된 부위의 염기서열을 알기 위해, 대장균에서 수행된 방법 (Ochman *et al.*, 1988, Genetics, 120, 621-623)을 변형한 역중합 효소 반응을 수행하였다. *Synechocystis* DNA를 제한효소 *Taq*I (5 units/ug DNA)을 이용하여 완전히 잘랐다. 잘려진 DNA는 T4 DNA ligase (Promega, USA) 효소를 이용하여 자기결합을 한 뒤, 이것을 주형으로 하여 프라이머 (주형 프라이머 5'-GCACGATGAAGAGCAGAAGT-3'(서열번호 2), 역주형 프라이머 5'-GGATAAATCCCGCGGATGG-3'(서열번호 3))를 사용하여 중합 효소 반응을 수행하였다 (95℃에서 30 초, 58℃에서 30 초, 72℃에서 2 분 조건 사이클은 36회 반복). PCR 반응물은 1.0% 아가로스 젤에서 QIA quick gel extraction kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 분리한 뒤, 염기서열을 분석하였다 (PE Applied Biosystems). 얻어진 염기서열은 PSI-blast 와 ClustalW 프로그램을 이용하여 비교 분석하였다.

<43> ***Synechocystis*의 돌연변이주 및 형질전환체 제작**

<44> *Synechocystis*의 돌연변이주 제작을 위해 주형으로 사용된 염색체 DNA는 Porter 방법(Porter R. (1988) Methods. Enzymol. 167, 703-712)으로 추출하였다. *svr1* 유전자가 결실된 돌연변이주를 제작하기 위해 두 단계의 fusion PCR 방법(Guo et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 12158-12163)을 이용하였다. *slr0144* 유전자의 각각 상위 유전자 지역과 하위 유전자 지역을 프라이머(UF, 5'-AGGGTTGTGACTGGTTGAGAGATT-3'(서열번호 4); UR+271, 5'- GGCGAGCATCGTTTGTTCGCCCAGATCAGTTTGGCTTGGCAGGTAA-3'(서열번호 5) 및 DF+271, 5'-TAATGTCTAACAATTCGTTCAAGCGCCACCAAACTCGTCAAAGG-3'(서열번호 6); DR, 5'-CAATCAATGCCCCGACAAAA-3'(서열번호 7))를 이용하여 PCR을 수행하였다. 이때, UR +271과 DF+271 프라이머에는 pBSL271 벡터의 항생제 스펙티노마이신 (SP) 염기 서열이 포함되어 있다. PCR 반응물과 pBSL271 벡터를 주형으로 하여 얻은 항생제 반응물을 함께 넣어 PCR 을 수행하였다. 이때, 사용되는 프라이머는 UF 와 DR 을 이용하였다. 모든 PCR 반응은 Pfx Taq polymerase (Invitrogen. CA. USA)을 사용하였다. 이렇게 얻어진 3.2 kb 돌연변이 카세트는 pCR-blunt TOPO 벡터 (Invitrogen, CA, USA)에 클로닝하였다.

<45> Adenylate cyclase와 guanylyl cyclase를 암호화하는 유전자 *cya1* 과 *cya2* 의 경우, *Synechocystis* 염색체 DNA를 주형으로 하고, R1991S, 5'-GGGGTACCCCGGGATTTGTTGGGGTTT-3'(서열번호 8) 과 R1991AS, 5'-GGGGTACCCCTTTATCGGCAATGACCTCC-3'(서열번호 9); L0646S, 5'-GGGGTACCCGGGGTATTTGGATTGCGAA-3'(서열번호 10) 과 L0646AS, 5'-GGGGTACCCCCCTTTAGCGGAGATTTGC-3'(서열번호 11) 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 1.6 kb 와 1.9 kb 의 PCR 반응물을 pGEM-T easy vector (Promega, USA)에 클로닝하였고, 유전자가 클로닝된 벡터를 유전자 내부에만 존재하는 제한 효소로 잘라 유전자의 일부를 제거한 뒤 선별 표지된 항생제 저항성 유전자 (스펙티노마이신과 클로람페니콜)를 삽입하였다.

<46> *svr1* 유전자를 과발현시키기 위해, 포도당에 의해 과발현되는 유전자 *sigE* 의 프로모터에 의해 발현되게 제작하였다. 이때, 이용한 프라이머는 sigEF- AACTGCAGGATTTCAGCAGGAAACTAGGGTTA(서열번호 12), sigER-GGGGTACCAGCCTGCCATTGGTCAACGGCAC(서열번호 13)이였다. 이때 이용한 벡터는 카나마이신 저항성 유전자가 첨가된 염색체 내로 삽입 가능한 pIGA (Kunert, 2000, J. Micorobiol. Methods., 41, 185-194)였다.

<47> 이렇게 만들어진 벡터를 *Synechocystis* 야생종에 Porter (1988)의 방법에 근거하여 형질전환하였다. 지수 생장기의 *Synechocystis* 야생종을 2 ml (3-5 ㎍Chl a) 수확하여 200 ㎕의 액체 BG-11 배지로 재현탁시키고 최종 1 μgml^{-1}가 되도록 항생제 카세트가 삽입된 플라스미드 DNA를 섞어준 후 28-30℃ 암소에서 4-6시간 방치하여 형질전환시켰다. 형질 전환이 이루어진 세포를 포함한 현탁액은 40℃ 이하로 식힌 3 ml의 0.5% bacto 아가가 포함된 BG-11과 섞어 10 mM 포도당이 포함되거나 (+Glc) 포함되지 않은 (-Glc) BG-11 고체 배지 위에 얹고 균주 유지용 저온 배양기에서 배양하였다. 36시간 (+Glc)이나 48시간 (-Glc) 배양 후 최종 농도 5 μgml^{-1}가 되도록 항생제를 고체 배지 아래쪽에 항생제 농도 구배가 생기도록 도말하여 항생제 저항성 콜로니 (colony)가 나올 때까지 약 2

주간 배양하였다. 각 형질전환체는 항생체 첨가 배지에서 8번 이상의 단일 콜로니가 생성되는 분리(segregation) 과정을 거친 후 유전자와 전사체 수준에서 PCR과 역전사 효소-PCR (reverse transcriptase-PCR, RT-PCR)로 전체 게놈상 야생종 형질 유전자가 존재하지 않음을 확인하였다 (도 1).

<48> **RNA 추출과 역전사 중합 효소 연쇄 반응 (RT-PCR)**

<49> *Synechocystis*의 RNA 추출은 Mohamed와 Jasson의 뜨거운 페놀을 이용한 방법(Mohamed and Jasson, 1989, Plant Mol. Biol. 13, 693-700)을 변형하여 수행하였다. RNA 추출을 위해 A_{750} = 약 0.4-0.6에 있는 *Synechocystis* 세포가 포함된 배양액 20-40 ml을 원심분리하여 (3,000×g, 15분, 4℃) 세포를 수확하였다. 수확된 세포는 냉장(4℃) 처리된 400 ㎕의 STE 버퍼 (1 M Tris-Cl, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 20% SDS)으로 완전히 다시 풀고 65℃에서 미리 가열된 500 ㎕의 산성 페놀 (pH4.3)을 첨가하여 섞어 준 후 65℃에서 15분간 배양하였다. 이때 3분마다 세게 흔들어 다시 페놀과 상등액을 완전히 섞어 주었다. 처리된 시료는 원심분리한 (12,000×g, 15분, 4℃) 후 상등액을 500 ㎕의 trizol과 섞어 10분간 상온에 방치한 뒤 200 ㎕의 클로로포름을 첨가하여 vortex로 완전히 섞어 주고 다시 원심분리 (10,000×g, 15분, 4℃)하였다. 수용성 상등액을 새 튜브로 옮겨 상등액의 0.4 부피의 이소프로판올과 high salt (0.8M Sodium citrate, 1.2M NaCl)을 넣고 상온에서 10분간 방치하여 핵산을 침전시켰다. 침전된 핵산이 있는 튜브를 원심분리하여 (12,000×g, 15분, 4℃) 침전물을 얻고 0.8 ml의 75% (v/v) 수용 에탄올로 씻어 준 후 다시 원심분리 하여 얻은 침전물을 상온에서 건조시켰다. 건조된 침전물에 0.1% (v/v)의 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 처리된 멸균 증류수를 넣어 녹였다. 추출된 RNA 시료에 잔존할 수 있는 DNA 제거를 위해 DNase I (TaKaRa, Japan)과 0.5 ㎍ ribonuclase inhibitor (TaKaRa, Japan)을 37℃에서 30분간 처리하였다. 정제를 위해 동일 부피의 페놀:클로로포름 (1:1)을 첨가하여 15초 이상 완전히 섞어주고 원심분리하여 (12,000×g, 5분, 상온) 상등액을 취하였고, 상등액과 동일 부피의 클로로포름을 섞어 원심분리하여 잔여 페놀을 제거하였다. 다시 원심분리하여 얻은 상등액에 에탄올과 3 M 아세트산나트륨 (sodium acetate), pH5.3 용액을 2.5:0.1 (v:v)으로 섞은 후 -70℃에서 최소 30분 이상 방치하여 RNA를 침전시켰다. 그 후 원심분리하여 (12,000×g, 15분, 4℃) 정제된 침전물을 얻었고, 70% (v/v)의 에탄올로 잔존한 염을 씻어내고 건조한 후 20-50 ㎕ 의 0.1% DEPC 처리된 멸균 증류수로 녹여 RNA를 얻었다.

<50> 발현된 mRNA 수준 분석을 위한 RT-PCR은 cDNA와 특정 프라이머들을 사용하였다. cDNA 합성은 Reverse Transcription system (Promega, USA)를 이용하였다. 1 ㎍의 추출된 전체 RNA를 주형으로 6개의 dNTP로 합성된 무작위 프라이머 (random primer)와 함께 역전사 효소 (reverse transcriptase)로 42℃에서 1시간 동안 역전사시켰다. 총 20 ㎕의 반응액은 끓는 물에 5분간 처리하여 효소를 불활성화시킨 후 neclease-free 물을 첨가하여 100 ㎕로 희석하여 사용하였다. 그 중 5 ㎕ 를 취하여 주형으로 삼고 15 pmole의 유전자 프라이머를 Taq-polymerase Mixture (Bioneer, Korea)에 첨가하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 MJ Research Minicycler (German)를 이용하였다. PCR 반응물은 1.4% 아가로스 젤에서 분리하여 GELDOC2000 densitometer 와 computer-aided image analysis system (Bio-Rad Lab., Hercules, California. USA)으로 확인하였다.

<51> **DNA 함량**

<52> 세포 현탁액에 lysozyme (3 ㎍/ml)을 함께 넣어 30분간 배양한 뒤, phosphate-buffered saline (0.85% NaCl, 10mM Na_2HPO_4, pH 7.2)로 두 번 세척하였다. 4% 파라포름알데히드를 이용하여 4℃에서 한 시간 고정을 한 후, 다시 phosphate-buffered saline로 두 번 세척하였다. DAPI (4'-6-diamnidino-2-phenylindole, 2 μgml^{-1}) 을 10분간 첨가한 뒤 FACSCalibur의 FL-2 채널 (BD Biosciences)를 이용하여 DNA 양을 측정하였다. 분석은 Win MDI version 2.8 program (Scripps Research Institute, La Jolla, CA) 을 이용하였다.

<53> **투과 전자 현미경 (Transmission electron microscopy)을 이용한 미세구조 분석**

<54> Negative 염색을 위해, *Synechocystis* 야생종과 다양한 돌연변이주를 0.1% phosphotungstic acid로 1분간 염색한 후, 0.02% phosphotungstic acid로 세척하였다. 이렇게 염색된 세포를 Carl Zeiss EM912-omega 현미경 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA)을 이용하여 관찰하였다. 초밀도 절편을 제작하기 위해, 세포를 2.5% 파라포름알데히드와 2.5% 글루타르알데히드가 첨가된 중성 0.1M 인산염 완충액에 2시간 동안 고정하였다. 조직을 phosphate-buffered saline에 용해되어 있는 1% (w/v) osmic acid 에 1시간 동안 고정하였다. 이어 에탄올로 탈수시킨 후, 저점도 spurr (Pelco International, CA, USA)에 끼워두었다. 초밀도 절편을 만들어서, 니켈 그리드에 올려 놓은 다음 uranyl acetate 로 두 번 염색하였다. 이렇게 제작된 절편은 Zeiss LIBRA120 TEM (Carl Zeiss, Germany)로 관찰하였다.

<55> **주사 현미경 (SEM)을 이용한 세포크기 측정**

<56> 광종속 영양 생장으로 배양한 야생종 세포와 *svr* 결실 돌연변이주, 과발현 돌연변이주, *cya1* 과 *cya2* 이중 돌연주를 멸균수에 현탁시킨 후, 적당량의 세포를 상온에서 12시간 건조시켰다. 금입자 코팅을 위해 7분간 IB-3 기계에 둔 뒤 (IB-3, Japan) 주사 현미경으로 관찰하였다 (HITACHI S-800, Japan).

<57> **항원항체 반응을 이용한 단백질 정량 (Immunoblot analysis)**

<58> 특정 단백질의 발현을 확인하기 위해, *Synechocystis* 야생종과 다양한 돌연변이주의 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질을 PVDF membrane 에 이동시킨 후 5% (w/v) nonfat dried milk가 첨가된 TBS 버퍼에 각종 항체 PilA1 (Kim *et al.*, 2004, Biochem. Biophys. Res. Comm. 315, 179-186), FtsZ (Jeong *et al.*, 2002), psaA/B (Agrisera, Sweden), D1 (Agrisera, Sweden), D2 (Agrisera, Sweden) 을 1시간 동안 붙였다. 이때, 각각 항체의 농도는 1:1000, 1:5000, 1:10000 그리고 1:500 이였다. TBST 버퍼를 이용하여 세 번 세척 후, horseradish peroxidase (Sigma, Mo, USA)가 접합된 goat anti-rabbit 이차 항체를 1:10,000의 비율로 1시간 동안 결합시켰다. 다시 TBST 버퍼로 세 번 세척 후, 결합된 항체는 ECL (Amersham Biosciences, NJ, USA)을 이용하여 검출하였다.

<59>

<60> **엽록소 함량과 형광, NADPH 형광, P700 흡광도, 세포질 pH, 플라스트퀴논(plastoquinone)의 환원 및 산소 교환율 정도 측정**

<61> *Synechocystis*에서 세포 밀도 및 엽록소 *a* 함량은 살아있는 세포를 UV-VIS 분광기 (Shimadzu UV mini 1240, Japan)를 이용하여 측정하였다. 엽록소 a 함량은 다음의 계산법에 따라 산출하였다 (Myers *et al.*, 1980, Plant Physiol. 66, 1144-1149).

<62> Chl a (μgml^{-1}) = $[1.0162(A_{750}-A_{678})-0.063(A_{750}-A_{625})]\times 893/68$

<63> *Synechocystis*에서 광계2에 의해 유도되는 엽록소 *a* 형광과 세포 내 존재하는 NADPH 형광, acridine yellow 형광 및 플라스토퀴논의 산화환원 정도는 emitter-detector-cuvette assembly unit ED-101US/D, PAM Data Acquisition System (PDA-100)과 온도 조절기(unit US-T)가 갖추어져 있는 pulse amplitude modulated fluorescence measuring system (Xe-PAM, Heinz Walz, GmbH, Effeltrich, Germany)을 이용하여 2 ml의 살아있는 세포를 석영 큐벳에 담아 측정하였다.

<64> 엽록소 *a* 형광 측정은 emitter에 BG39와 10% 필터, detector에는 R65, RG9과 25% 필터를 이용하여 측정하였고, NADPH 형광은 emitter와 detector 각각 자외선 통과 UG11 필터와 청록색광 특정 파장 KV418+ BG18 필터를 사용하여 측정하였다. 엽록소 *a* 형광과 NADPH 형광 측정시 actinic light은 695 nm 이상의 파장이 제거된 할로겐 램프로 각각 400 또는 40 μmol photons m^{-2} s^{-1}의 광을 주었다. 형광 측정을 위해 사용된 총 엽록소 *a* 함량은 각각 1.5 μgml^{-1}와 20 μgml^{-1} 이었다.

<65> *Synechocystis*의 광계1 반응 중심 P700의 흡광도 변화는 dual-wavelength emitter-detector uint EDP700DW를 갖춘 PAM-101 modulated fluorometer를 이용하여 측정하였다. 암 상태에서 P700의 산화된 비율 (P700+)은 근적외선광 (> 715 nm)에 의해 야기되는 810-830 nm 파장에서 흡광도 증가 비율로 산출하였다.

<66> *Synechocystis*에서 산소 교환율은 liquid phase O_2 electrode unit (DW3)과 광원으로 white light 공급원 (source) (LS2, 100W halogen photo optic lamp, Osram xenophot HLX)을 이용하여 electrode control unit (Oxygraph system, Hansatech)을 이용하여 상온에서 측정하였다. 엽록소 *a* 함량이 1-2 μgml^{-1} 이 되는 지수 생장기의 세포를 12 ml 사용하였다. 호흡에 해당하는 산소 소비량은 암상태에서 5분, 생장광 50 μmol photon $m^{-2}s^{-1}$ 광도에서 4분간 측정된 산소 발생의 기울기로 산출하였다. 충분한 CO_2의 공급을 위해 50 mM sodium bicarbonate (Na_2HCO_3-Na_2CO_3, pH8.0)를 측정 전에 첨가하여 주었다.

<67> Acridine yellow (AY)는 *Synechocystis* 에서 에너지화되는 세포질의 pH 감지자로 가장 잘 알려져 있다. AY 형광은 emitter에 배경 신호를 감소시키기 위하여 자외선 파장 필터 UG11에 자외선 A를 제거시키는 BG18 필터를 추가 사용하였고, detector에 청록색 파장을 투과하는 BG18+KV418 필터를 갖춘 Xe-PAM (Walz, Effeltrich, Germany)을 이용하여 측정하였다. AY의 형광율은 60 μg의 엽록소 함량에 해당하는 세포를 수확하여 pH 완충액이

첨가되지 않은 2 ml의 BG-11 배지로 재현탁한 후 최종 농도 5 μM의 AY와 함께 30분간 30℃에서 적응시켰고, 10 mM의 포도당이나 40 μmol photon $m^{-2}s^{-1}$의 광도로 세포질의 pH 증가를 유도하여 측정하였다.

<68> 플라스토퀴논(PQ)의 환원력은 2분간 암적응된 세포를 이용하여 Cooley 등 방법(Cooley, J.W., and Vermaas. W.J.F. (2000) J. Bacteriology 183, 4251-4258)을 변형하여 Xe-PAM 을 사용하였다. 저광을 통해 유도되는 형광을 측정하기 위해, 저광 조사후, 3분 뒤에 1 mM KCN, 60 μM DBMIB, 5 mM sodium ascorbate 을 첨가하여, PQ에 전자가 빠져나가는 것을 막아주었다. 저광을 10 초 간격의 펄스를 10분간 주었다. 얻어진 데이터는 초기값 F0로 나누어 주어 PQ 에 전자가 쌓이는 정도를 측정하였다.

<69> **77K 엽록소 형광 방출 스펙트럼**

<70> 77K 엽록소 형광 방출 스펙트럼을 조사하기 위해 고체 배지에서 키운 *Synechocystis* 야생종과 각종 돌연변이주를 수확 후, 암 상태에서 15분간 적응시켰다. 암적응된 세포는 Jobin Yvon FluoroMax-2-spectrofluorometer (ISA Jobin Yvon Instruments S.A.) 장비를 이용하여 측정하였다.

<71> **효소 활성도 측정**

<72> 효소 활성도 측정은 지수 생장기의 약 100 $\mu g ml^{-1}$의 엽록소 함량을 포함한 양의 세포를 사용하였다. 원심분리 (3,200×*g*, 4℃, 5분간)로 수확한 세포들을 4℃에서 미리 냉장된 0.9 ml의 완충액 (breakage buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10% (v/v) glycerol)으로 다시 풀어 같은 완충액으로 적셔진 zirconia/silica beads (직경 100 μm)가 들어있는 튜브로 옮겼다. 이 튜브를 bead beater로 30초간 6번 흔들어 세포를 파괴하였다, 이때, 반복 사이마다 1분간 얼음에 두어 마찰로 인하여 발생하는 열을 제거하였다. 완전히 부서진 세포는 원심분리 (12,000g, 10분, 4℃)를 통해 beads와 분리시켰다. 상등액을 새 튜브에 옮긴 후 정량하였고, 50 ng의 단백질을 반응에 사용하였다. 반응 완충액 (50mM HEPES-KOH, pH 8.0, 1mM DTT, 10 mM $MgCl_2$)에 각각의 효소 활성도 측정을 위해서 다음과 같은 조성을 사용하였다. glucose-s-phosphate dehydrogenase (6PGD); 0.4 mM $NADP^+$, 5 mM 6-P-gluconate, phosphoglucose isomerase (PGI); 1.7 mM NAD^+, 2 mM F6P, 5units ml^{-1} G6PD, phosphoenol pyruvate carboxylase (PEPC); 0.15 mM NADH, 10 mM $KHCO_3$, 4 mM PEP, 10 units ml^{-1} malate dehydrogenase, 및 pyruvate dehydrogenase complex (PDC); 2.6 mM cysteine, 2.5 mM NAD^+, 2 mM thiamine pyrophosphate, 1 mM $MgCl_2$, 0.13 mM CoASH, 2 mM sodium pyruvate, 50 mM KH_2PO_4 (pH 7.4). 이들 반응액에 분리된 상징액을 섞어 준 후 30분간 37℃ 암소에서 반응시켰다. 효소 활성도는 340nm에서 NADPH의 몰흡광계수(molar extinction coefficiency)를 이용하여 산출하였다.

<73> $Z\ (mol/s, kat) = c \times v / \Delta t$

<74> $C\ (mmol/l) = \Delta A / \varepsilon \times d$, ($\varepsilon$=0.63 $\ell (mmol)^{-1} (mm)^{-1}$)

<75> v = volume of the assay in ℓ

<76> t = time (sec)

<77> A = absorbance

<78> d = length of cuvette

<79> NTR 활성도는 NADPH 을 이용하여 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)가 5-thio-2-dinitrobenzoic acid (TNB)로 환원되는 원리를 이용한 thioredoxin reductase assay kit (Cyaman, USA)을 이용하여 측정하였다.

<80> 대장균에서 *svr1* 유전자를 과발현시키기 위해 isoprophyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)에 의해 유도되는 glutathione S-transferase (GST) 유전자가 첨가된 pGEX4T-1 벡터에 클로닝하였다. *Synechocystis* 염색체 DNA에서 *svr1* 유전자를 *BamH*I 과 *Xho*I 효소가 붙여진 프라이머 (svrFB; 5' CGCGGATCCATGGGTTACCTGCCAAGCCAAAC-3'(서열번호 14) 과 svrRX; 5' CCGCTCGAGTCATTTCAGGTATTCCCCTTTGAC-3'(서열번호 15))이용하여 PCR로 클로닝하였다. *svr1* 유전자가 삽입된 과발현 벡터를 대장균에 형질전환한 후 0.2mM IPTG을 첨가하여 3시간 동안 유전자를 과발현시켰다. 과발현된 세포는 원심분리하여 (3,500 rpm, 10분, 4℃) 세포를 수확한 뒤, 800 ul 용해 버퍼 (50mM Tris-HCl, pH 7.8, 20 mM dithiothreitol, 10% glycerol, 및 protease inhibitors cocktail)에 현탁시

켰다. 이 현탁액을 4℃에서 초음파를 이용하여 세포를 용해시켜 과발현 된 Svr1 단백질을 얻었다.

<81> **Yeast two hybrid를 이용하여 상호작용하는 단백질 선발 및 단백질 상호작용**

<82> Svr1 단백질과 상호 작용하는 단백질을 선발하기 위해서, pGBKT7 벡터에 svr1 유전자를 클로닝한 뒤, *Sacharomyces cerevisiae* AH109 (*MATa, trp1-901, leu2-3, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1*$_{UAS}$*-GAL1*^{TATA}*-HIS3, GAL2*$_{UAS}$*-GAL2*$_{TATA}$*-ADE2, ura3::MEL1*$_{UAS}$*-MEL1*$_{TATA}$*-lacZ*)에 형질전환하였다. Svr1이 삽입된 형질전환체는 트립토판 (Clontech, USA)이 결핍된 배지에 유지하였다. 상호 작용 단백질을 선별하기 위해 *Synechocystis* 야생종의 염색체 DNA pool 을 pGAD424 에 클로닝하여 라이브러리를 만들었다. 라이브러리 제작 방법은 다음과 같다. *Synechocystis* 염색체 DNA를 제한 효소 *Sau3A*I 을 이용하여 부분 조각을 만든 뒤, 0.8% 아가로즈 젤에서 400 에서 1,100 bp 와 1,000 에서 3,000bp 의 크기의 DNA 조각을 각각 분리하여 pGAD424, pGAD424(+1), pGAD424(+2) 벡터에 클로닝한 다음 각각 대장균에 형질전환하였다. 제한 효소 Tsp509I도 동일한 방법으로 처리하여, 400-800 bp 와 800-2,000 bp 의 염기서열 조각을 얻어 pGAD424, pGAD424(+1), pGAD424(+2) 벡터에 클로닝한 뒤, 각각 대장균에 형질전환 하였다. 이렇게 얻어진 라이브러리를 대장균에서 증식시킨 후 Qiagen maxi-prep kit을 이용하여 플라스미드 DNA을 얻었다. 얻어진 라이브러리 플라스미드 DNA 500 ug 을 svr1이 형질전환된 AH109 효모에 형질전환 하였다. 형질전환 방법은 Lithium acetate (LiAc)방법으로 Clonthech 설명서대로 수행하였다. 형질 전환 세포는 최소 선별 배지에서 30℃에서 6일간 배양하였다. 상호결합하는 단백질을 선별하기 위해 *lacZ* 리포터 유전자의 발현을 확인하였다. 최소 선별 배지에 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) 기질을 첨가하여 만든 배지에서 파란색으로 변화되는 균주가 svr1 과 상호작용하는 단백질이 클로닝된 유전자를 가지고 있는 균주이기에 선별하였다. β-Galactosidase 활성도를 정량화하기 위해 Schneider *et al*., (1996) 방법과 Clonthech 설명서를 참조하였다. 상호작용하는 단백질의 상호결합 정도를 확인하기 위해 히스티딘과 경쟁하는 3AT (3-amino-1,2,4-triazole)를 다양한 농도로 첨가하여 만든 배지에서 균주의 생장 정도를 확인하였다.

<83> 이렇게 선별된 효모 균주의 플라스미드 DNA를 추출하여 라이브러리에 삽입된 유전자를 확인하였다.

<84> svr 유전자와 ntr 유전자, ferredoxin thioreductase (ftr) 유전자에 의해 만들어지는 단백질의 상호 결합을 확인하기 위해, 각각의 유전자를 pGADT7와 pBAKT7 벡터에 클로닝하였다. 이때, svr 유전자는 4VR 도메인을 기점으로 앞 부분(N term) 과 뒷 부분(C term) 을 나누었으며, ftr 유전자는 catalytic 도메인을 암호화하는 유전자 *(sll0554)*와 variable 도메인을 암호화하는 유전자 *(ssr0330)*를 각각 클로닝하였다. *Synechocystis* 야생종 세포는 3 종류의 m 유형의 TrxA (*slr0642*), x 유형의 TrxB (*slr1139*), y 유형의 TrxQ (*slr0233*)의 thioredoxin 이 존재한다. 이 유전자 각각도 클로닝하였다. 다양한 조합을 통해 각각의 유전자의 단백질 상호 결합 정도를 확인하였다.

<85> **실시예 1: Svr1와 cya1/cya2 돌연변이주, Svr1 과량발현주에서 세포 크기와 호흡**

<86> **1.1 무작위 돌연변이 집단으로부터 세포 크기 조절관련 유전자 svr1 선발**

<87> *Synechocystis*은 이화작용을 통하여 외부에서 주어지는 포도당을 이용하여 생장할 수 있다. 포도당 이용을 통한 세포 크기를 조절하는 유전자를 밝히기 위해 1,200 여종의 무작위 Tn5 돌연변이주를 광학 현미경을 이용하여 세포 크기를 관찰 한 뒤 BMI plus 프로그램을 이용하여 세포 크기를 수치화하였다. 10 mM 포도당이 첨가된 광종속 영양 생장조건에서 야생종 세포와 비교하여 세포 크기가 30% 이상 증가하거나 감소한 37 종의 무작위 Tn 돌연변이주와 포도당이 첨가되지 않은 생장조건인 광독립 영양 생장 조건에서 23 종의 Tn 돌연변이주를 선발하였다. 선발된 균주에서 역중합 효소 반응 (inverse PCR)을 이용하여 Tn 5가 삽입된 유전자의 염기서열을 확인하였다. 총 60여 개의 유전자를 CyanoBase (http://bacterai.kazusa.or.jp/cyano/Synechocystis/cgibin/category_cyano.cgi)에서 제공된 카테고리에 근거하여 분류하였다. 광독립 영양생장조건에 선별된 균주는 총 5개 카테고리, 광종속 영양생장조건에서 선발된 균주는 총 6개 카테고리에 해당하는 유전자로 분류되었다. 이 중 세포 크기 조절에 관여할 것으로 예상되는 DNA mismatch repair 단백질을 암호화하는 *mutS* 유전자와 광종속 영양생장 조건에서 포도당을 저해하는 단백질을 암호화하는 유전자가 선발된 것을 보면 이 선발 방법을 신뢰할 수 있다. 이러한 결과는 광독립 또는 광종속 영양생장조건에서 *Synechocystis* 세포 크기 조절에 관여하는 유전자가 다양하다는 것을 시사한다.

<88> 선발된 Tn 돌연변이 균주 중에서 *slr0144* 유전자는 small molecule binding domain (SMBD)의 일종인 4-vinyl reductase (VR) 도메인 (IPR004096 참고)이 포함된 단백질을 암호화하고 있다. SMBD는 물질대사, 막을 통한 물질수송 그리고 신호전달 경로에 관여하므로, 세포 크기와 밀접한 연관성이 있을 것으로 추정되어 그 기능을 밝

히고자 하였다. *Synechocystis*에는 Slr0144 이외에 VR 도메인을 가진 Slr0147이 추가로 존재하기에 이와 구분하기 위해서 Svr1 (*Synechocystis* 4-VR 1)으로 명명하였으며, 그 기능을 알기 위해 fusion PCR 방법을 이용하여 *svr* 유전자가 결실된 돌연변이주와 포도당에 의해 과발현되는 *sigE* 프로모터를 이용하여 과발현 형질전환주를 만들었다 (도 1).

<89> **1.2 *svr1*⁻, *cya1*⁻/*2*⁻ 돌연변이주, 과발현 형질전환주의 세포크기**

<90> Svr1에 Tn 이 삽입되었을 때 세포크기가 증가한 결과에 의거하여 *svr1* 결실 돌연변이주를 바탕으로 세포크기 조절에서 이 유전자의 기능을 조사하였다. 더불어 효모와 선충의 세포크기 조절에 cA(G)MP가 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한, 남세균 *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 에서 cAMP 생성 효소인 adenyly cyclase 유전자에 돌연변이가 일어날 경우 세포크기 변화가 유도된다. *Synechocystis* 역시 adenylyl cylase를 암호화하는 *cya1* 유전자와 guanylyl cylase를 암호화하는 *cya2* 유전자가 존재하므로 이 두 유전자가 세포의 크기에 관여하는지를 알기 위해 두 유전가 모두 결실된 돌연변이주를 만들었다 (도 1).

<91> BG11 고체 배지에 10 mM 포도당이 첨가된 광종속 영양 생장 조건에서 Tn 돌연변이주에서와 같이 야생종 세포에 비해 *svr1*⁻ 세포의 크기가 현저히 증가하였는데 (도 2A), 이는 주사현미경 (SEM)을 통해서도 재확인되었다 (도 2B). 야생종 세포와 *svr1*⁻ 세포 5,000여 개 중 분열 중인 세포를 제외하고 지름을 측정하면 야생종의 세포 크기는 3.41 ± 0.01 μm 인 반면, *svr1*⁻ 세포 크기는 4.31 ± 0.01 μm 로서 43 % 증가하였다. 반면에 Svr1이 과발현된 형질전환균주 OxSvr1의 세포 크기는 1.67 ± 0.01 μm 로 야생종 세포에 비해 30 % 작았다. cA(G)MP의 생성이 억제된 *cya1*⁻/*2*⁻ 이중 돌연변이주에서는 야생종과 비교하여 포도당이 존재함에도 불구하고 세포크기가 증가하지 않았다. 이러한 현저한 세포크기의 차이는 광독립 영양생장 조건에서는 볼 수 없었고 광종속 영양생장 조건에서만 관찰되었다. 이는 *Synechocystis* 에서 광독립 영양생장에서 광종속 영양생장으로 바뀌면 세포 크기가 증가하며 이 과정에 *svr1*, *cya1* 또는 *cya2* 가 관여함을 의미한다.

<92> **1.3 포도당 특이적 세포크기 증가**

<93> 포도당에 의한 *Synechocystis* 세포크기 증가가 포도당의 삼투압에 따른 효과인지 혹은 대사활동의 결과인지를 조사하기 위해, L-glucose (L-Glu)와 3-*O*-methylglucose (OMG) 포도당 유사체를 사용하였다. 포도당의 이성질체인 L-Glu는 세포 안으로 수송되지 못하며, OMG는 세포 안으로 수송되나 헥소카이네제에 의해 인산화되지 못해 결국 세포 내에서 이용되지 않는다. 표 1에서와 같이 세포 크기 증가는 포도당에 의해서만 관찰되었다. 더불어 세포내로 포도당을 수송하는 transporter가 결실된 *gtr*⁻ 돌연변이주와 포도당의 수송은 가능하나 글루코카이네제가 결실되어 포도당을 이용하지 못하는 *glk*⁻ 돌연변이주를 광독립 및 광종속 영양생장시킨 후 세포 크기를 측정해 보았다 (표 1). 두 돌연변이주에서 포도당에 의한 세포크기 증가를 볼 수 없었는데, 이는 세포 크기 증가에 포도당이 호흡에 의해서 대사되는 과정이 필요함을 제시한다.

<94> 표 1. 세포 크기에 대한 포도당 및 이의 유사체의 효과

	Light				Dark
	Control	D-Glucose	L-glucose	3-O-Methylglucose	D-Glucose
WT	2.35 ± 0.01	3.41 ± 0.01 (145%)	2.68 ± 0.02	2.49 ± 0.09	3.46 ± 0.08 (147%)
svr1⁻	2.29 ± 0.01	4.31 ± 0.01 (188%)	2.62 ± 0.02	2.78 ± 0.07	4.70 ± 0.05 (205%)
Ox Svr1	2.30 ± 0.01	1.67 ± 0.01 (73%)	2.78 ± 0.01	2.39 ± 0.08	1.44 ± 0.05 (63%)
cya1⁻/*2*⁻	2.27 ± 0.01	2.24 ± 0.01 (98%)	2.40 ± 0.01	2.01 ± 0.01	2.53 ± 0.02 (111%)

<95>

<96> *svr1*⁻ 돌연변이 균주와 OxSvr1 균주의 경우 포도당에 의한 세포크기 증가 및 감소가 LGlu나 3-OMG에 의해서 재현되지 않았다. 이러한 결과는 Svr1에 의한 세포크기 증가가 포도당에 특이적이라는 것을 의미한다. 반면에 cA(G)MP 생성이 일어나지 않는 *cya1*⁻/*2*⁻ 이중 돌연변이 균주에서는 포도당 첨가에 의한 세포 크기 증가를 볼 수 없었다. 이 때 포도당에 의한 세포크기 증가에 빛이 관여하는지를 조사하고자 세포를 암소에서 포도당이 첨가된 배지에서 생장시켰다. 그 결과 Svr1과 cA(G)MP 효과는 빛의 존재 유무에 상관없었다.

<97> 이상의 결과는 포도당에 의한 *Synechocystis* 세포 크기 증가에 cA(G)MP가 관여하며, Svr1은 세포크기의 한계를 결정하는 역할을 수행함을 의미한다.

<98> **1.4 포도당 유도성 세포크기 증가와 호흡율**

<99> 남세균에서 포도당은 글루코카이네제 Sll0593에 의해 인산화된 후 산화적오탄당 인산 경로 (oxidative pentose phosphate pathway), 호흡, 시트르산 회로에 의해 대사되므로 빛에 의존하지 않는 포도당 특이적 세포크기 증가 결과는 포도당 대사가 세포크기 증가와 밀접하게 연관되어 있음을 시사한다. 조류에서도 물질대사 중 호흡이 세포 크기에 비례하는 것으로 알려졌으므로 야생종과 *svr1*$^-$, OxSvr 그리고 *cya1*$^-$*/2*$^-$ 균주에서 Clark type O2 electrode를 이용하여 호흡율을 측정하였다. 광독립 영양생장 조건에서 야생종과 다른 균주사이에 호흡율에는 큰 차이가 나지 않았다. 그러나 광종속 영양 생장 조건에서는 광독립 영양 생장 조건과 비교하여 호흡율이 야생종에서는 329%, *svr1*$^-$ 균주에서 472%, OxSvr 균주에서 195.1%, 그리고 *cya1*$^-$*/2*$^-$ 균주에서 674.5 %가 증가하였다. 이는 남세균에서도 포도당에 의한 호흡 증가가 세포크기 증가와 밀접한 관련이 있음을 의미한다. 암종속 영양 상태(10일간 배양)에서 야생종 세포와 다른 균주 사이에 호흡율 또한 광종속 영양 상태에 비해서 현저하게 증가하였으나, 균주 간의 증가양상은 유사하였다 (도 3).

<100> 포도당이 세포 내로 유입된 후 glucose 6-p로 인산화된 후 산화적 오탄당 인산화 경로로 유입되어 glucose 6-P dehydrogenase에 의해 산화되는데 6-aminonicotiamide (AN)은 이 과정을 억제한다. 호흡 말단 산화 효소에서 산소로의 전자 전달과 NDH에서 PQ로 전자 유입은 KCN과 $HgCl_2$을 이용하여 억제 가능하다. 호흡율과 세포 크기가 연관이 있다는 위 실험 결과를 뒷받침하기 위해 전자전달 억제제인 6AN, KCN 및 $HgCl_2$를 사용하여 호흡과 세포 크기 간의 연관성을 조사하였다. 예상한 바와 같이 이들 전자전달 억제제에 의해서 야생종과 *svr1*$^-$ 균주, OxSvr 형질전환주, *cya1*$^-$*/2*$^-$ 균주에서의 포도당에 의한 세포 크기 증가 현상을 볼 수 없었다 (표 2).

<101> 표 2. 포도당 유도된 세포 크기의 호흡 전자 전달 저해제의 효과

		WT	*svr1*$^-$	Ox Svr	*cya1*$^-$*/2*$^-$
- Glucose		2.35 ± 0.01	2.29 ± 0.01	2.30 ± 0.01	2.27 ± 0.01
+ Glucose		3.41 ± 0.01 (145%)	4.31 ± 0.01 (188%)	1.67 ± 0.01 (73%)	2.24 ± 0.01 (98%)
+Glucose	+1 mM 6AN	2.33 ± 0.02	2.33 ± 0.01	2.42 ± 0.02	2.31 ± 0.01
	+0.5 μM Hg^{2+}	1.81 ± 0.02	1.78 ± 0.01	1.69 ± 0.03	1.80 ± 0.01
	+50 μM CN^-	2.31 ± 0.01	2.30 ± 0.01	2.51 ± 0.01	2.38 ± 0.01

<102>

<103> 이 결과는 포도당 대사에 의한 세포 내 호흡을 통해서 세포 크기가 증가가 결정됨을 의미한다.

<104> **1.5 플라스토퀴논 풀 (PQ pool) 환원**

<105> 포도당 대사에 의한 호흡 증가는 *Synechocystis*의 틸라코이드 막에 존재하는 엽록소 *a* 형광 변화로 측정할 수 있다. 따라서, Svr1이 호흡을 조절함으로써 세포 크기를 결정할 경우 *svr1* 유전자가 결실 또는 과발현된 경우 실온 엽록소 *a* 형광 유도양상이 야생종과 차이를 보여야 할 것이다. 광독립 영양생장 조건에서 배양된 *Synechocystis*의 엽록소 *a* 형광 유도 후 actinic light을 꺼주면 엽록소 *a* 형광은 초기 형광 (Fo) 수준까지 떨어졌다가 그 후 다시 증가한 후 감소한다. 이러한 광 조사 후 유도되는 엽록소 *a* 형광 피크는 광합성에 의해 생성된 NADPH가 NDH에 의해 산화되어 전자가 PQ로 전달되며, 그 결과 환원된 PQ pool 에 의해서 광계2에서의 광화학반응이 억제되는 것에서 기인한다. 반면, 포도당 첨가에 의해서는 피크에서 엽록소 *a* 형광은 감소하지 않고 지속적으로 유지된다 (도 4). 이는 포도당 대사과정에서 생성된 NAD(P)H가 지속적으로 전자를 PQ pool 로 공급함을 의미한다. 광독립 영양생장 조건에서 배양된 *svr1*$^-$ 균주와 OxSvr 세포의 엽록소 형광 *a* 는 야생종 세포와 동일하게 나타났으나 포도당 첨가에 의해서 *svr1*$^-$ 균주에서의 엽록소 *a* 형광의 최대값이 더 높았다. 반면에, OxSvr에서는 포도당의 첨가에도 불구하고 엽록소 형광 *a* 형광이 높은 상태로 유지되지 않고 포도당이 처리되지 않은 야생종과 비슷한 양상을 보여주고 있다. 이러한 돌연변이주와 과량발현 균주에서의 엽록소 *a* 형광 유도의

차이는 Svr1 이 PQ pool로의 전자전달을 억제하고 있음을 나타낸다.

<106> 호흡 전자전달에 의한 틸라코이드 막에 존재하는 PQ pool의 환원 정도는 광합성 전자전달이 일어나지 않을 정도의 약한 광 (measuring beam)을 간헐적으로 조사하였을 때 유도되는 엽록소 *a* 형광 변화를 모니터링하여도 측정 가능하다. 광독립 및 광종속 영양생장 조건에서 배양한 야생종 세포와 *svr1*⁻, OxSvr 균주를 엽록소 *a* 가 2 μg이 되게 수확한 후 5분 동안 암 적응시켰다. 이 후 초기 엽록소 형광값 F0을 측정한 뒤 Hamilton 주사기를 이용하여 전자 전달 억제제 DBMIB, KCN, ascorbate 을 첨가한 뒤 10초 간격으로 광원을 turn on/off를 시켜 Fo 형광값을 측정하였다. 이때 PQ pool에서 $cytb_6f$로의 전자 전달과 말단 산화 효소에서 산소로의 전자전달은 DBMIB와 KCN으로 억제하였다. 야생종에서 PQ pool은 약 5분 후에 포화되었으나 *svr1*⁻ 돌연변이주에서는 PQ pool 환원이 초기에는 야생종과 비슷하게 빠르게 되었으나 포화되지 않고 천천히 지속적으로 상승하였다. 반면 OxSvr1 에서는 야생종에 비해 초기 환원속도뿐 아니라 포화 값도 50% 수준에 머문 낮은 PQ pool 환원을 보였다 (도 4). 광독립 영양 조건에서 생장한 세포에서는 PQ pool 환원이 광종속 영양 조건에서 자란 균주들보다 미비하였다. 돌연변이 균주와 과량발현주에서 야생종에 비해 PQ pool 환원이 현저히 증가 혹은 감소한 결과는 Svr1이 PQ pool로 전자유입을 억제함으로써 호흡을 조절함을 시사한다.

<107> **실시예 2: Svr1의 호흡 억제 경로**

<108> **2.1 포도당 반응 중 호흡에 관여하는 유전자의 발현**

<109> Svr1이 포도당에 의한 세포크기 증가를 연속적인 생장기에 영향을 미치는 것으로 밝혀진 위 결과에 따라 세포호흡과 산화적 인산화에 관련된 유전자의 발현을 야생종과 *svr1*⁻, OxSvr, *cya1*⁻*/2*⁻ 균주에서 조사하였다. 포도당 이화과정 중 해당과정에 관여하는 포스포글루코스 이성질화 효소 (phosphoglucose isomerase)를 암호화하는 *pgi* 유전자, PEP 카르복실라아제 (PEP carboxylase)를 암호화하는 *ppc* 유전자, 파이루베이트 탈수소 효소(pyruvate dehydrogenase)를 암호화하는 *pdh* 유전자, 산화적 오탄당인산 대사의 트랜스케톨라아제 (transketolase)를 암호화하는 *tkt* 유전자, 트리카르복실산 (TCA) 회로의 이소시트르산 탈수소 효소 (isocitrate dehydrogenase)를 암호화하는 유전자 *icd*, 호흡 전자 전달에 관여하는 NAD(P)H 탈수소 효소(NAD(P)H dehydrogenase)를 암호화하는 *ndb* 유전자, 시토크롬 c 산화효소 (cytochrome c oxidase)를 암호화하는 *cyd* 유전자, 그리고 화학삼투에 관여하는 ATP 생성 효소 (ATP synhthase)를 암호화하는 *atp* 유전자의 발현 정도를 조사하였다. 포도당 유무에 상관없이 호흡이 증가한 *svr1*⁻ 돌연변이주나 감소한 svr 과발현 형질전환주, *cya1*⁻*/2*⁻ 이중 돌연변이주 모두 야생종 세포와 동일한 유전자 발현 수준이 나타났다 (도 5). 이러한 결과는 영양상태가 변화하는 전이단계 이외의 경우에는 호흡이 번역 후 조절에 의해서 조절된다는 보고 (Yang et al. (2002) Appl. Microbiol. Biotechnol. 58, 813-822)와 일치하는 것으로서 세포크기 조절 또한 번역 후 수준에서 조절될 것임을 시사한다.

<110> **2.2 Yeast two hybrid를 이용한 Svr 단백질과 상호결합하는 단백질 선발**

<111> 호흡이 주로 번역 후 수준에서 조절되므로 Svr1 단백질의 표적 단백질을 선발하고자 yeast two hybrid (YTH) 방법을 사용하였다. pGBKT7 벡터에 클로닝된 *svr1* 유전자가 형질전환된 효모에 pGADT7 벡터에 *Synechocystis* 라이브러리가 클로닝된 플라스미드를 삽입하였다. Svr1 단백질과 상호결합하는 단백질이 암호화된 균주가 존재할 경우 리포터 유전자인 히스티딘과 아데노신이 발현되는 원리를 이용하여 His 와 Ade가 결핍된 최소 배지에서 자라는 세포를 선발하였다. 이 중에서 Svr1 단백질과 상호결합 정도를 확인하기 위해 lacZ 유전자 발현을 확인하였다. 80 mM X-gal이 첨가된 배지에 배양 후 푸른색으로의 색 변화를 통해 Svr1과 상호결합하는 균주를 선발하였다. 이렇게 선발된 균주 내 유전자를 동정하기 위해 효모의 플라스미드를 분리한 후 대장균에 형질전환 후 pGADT7 벡터의 항생제 선별 유전자인 암피실린 배지에 배양하였다. 암피실린에 내성을 갖는 콜로니를 찾아 염기서열 분석을 통해 pGADT7 벡터에 클로닝된 유전자를 동정한 결과, 10개의 단백질이 Svr 단백질과 상호결합하는 것으로 나타났다. 이 중 NADPH thioredoxin reductase (NTR)은 포도당 대사 관련 효소와 결합하여 포도당 대사를 조절하는 thioredoxin (Trx)을 환원시키므로 Svr1의 작용에 매우 중요한 역할을 할 것으로 판단되었다. 따라서, NTR을 암호화하는 *slr0600* 유전자를 pGADT7와 pGBKT7 벡터에 클로닝하여 Svr1과의 상호결합 유무를 재확인하였다. 더불어, 상호결합 정도를 정량화하기 위해 β-galactosidase 분석을 수행하였다. 그 결과, Svr 과 Ntr 두 단백질이 결합하는 것은 확인할 수 있었다.

<112> Svr 단백질을 4VR 도메인을 기준으로 N-말단과 4VR 도메인을 포함하는 C-말단으로 나누어 어느 도메인이 동성이합체 (homodimer)인 Ntr 단백질과 결합하는지 조사하였다. 그 결과 4VR 도메인을 포함하지 않는 N 말단 부위가 Ntr 단백질과 결합하였다. Svr1의 4VR 도메인은 엽록소 *a* 생합성에도 관여하지 않으며 Svr 표적 단백질인 Ntr과

의 결합에도 관여하지 않는다.

<113> **2.3 Svr과 상호결합하는 NADPH thioredoxin reductase (NTR)과 ferredoxin thioredoxin reductase (FTR)**

<114> *Synechocystis* 의 thioredoxin은 다양한 막 단백질 뿐아니라, 세포질 단백질과 결합하여 세포 내 환경을 조절한다. *Synechocystis*는 NADPH/Trx 경로와 Ferredoxin/Trx 경로에 의해 Trx가 세포 내 산화/환원을 조절한다. Ntr과 결합하는 Svr1이 Ftr 과도 상호결합할 것이라 예상되어 FTR 단백질의 가역단위체 (variable subunit) 및 촉매단위체 (catalytic subunit)와 Svr1 단백질 결합을 조사하였다. 그 결과, Svr1 단백질은 Ftr 가역단위체와 상호결합하였다. 가역 단위체 (variable subunit; Ftrv)와 촉매 단위체 (catalytic subunit; Ftrc)로 구성된 이성이합체 FTR 효소는 광합성 세균에서만 존재한다. 먼저, FTR의 촉매 단위체 부위에 ferredoxin (Fdx)이 결합하여 전자를 전달한 후 FTR의 가역 단위체 부위의 이성이황 (heterodisulphid) 분리를 통해 Trx 가 결합하여 완전한 Fdx-FTR-Trx 복합체를 형성하여 산화/환원 신호 경로를 조절한다. Svr1과 Ftrv 와의 상호결합은 호흡 등에 의해 세포 내 NAD(P)H 가 많아진 환원 상태가 되면 Svr1 단백질이 활성화되어 FTR 가역 단위체 부위에 결합하여 Fdx-FTR-Trx 복합체의 기능을 조절할 수 있음을 의미한다 (도 6).

<115> **2.4 Svr에 의한 Ntr 활성도 억제**

<116> YTH를 통해 Svr 단백질과 Ntr 단백질이 상호작용함을 밝혔는데, 이는 Svr이 NTR의 효소활성도를 억제하고 있음을 시사한다. 따라서, 야생종 세포와 *svr1*$^{-}$, OxSvr 균주에서 Ntr 활성도를 측정하였다. Ntr 활성도는 5,5'-dithiobis(2-dinitrobenzoic acid) (DNTB)에 의해 변화되는 NADPH의 양을 측정함으로써 알 수 있다. 광독립 영양생장 조건에서는 세 균주 모두 NTR 활성도가 차이가 없었다. 그러나, 광종속 영양생장 조건에서는 야생종과 *svr1*$^{-}$ 균주의 Ntr 활성도가 3배, 4.5배 증가하였다 (도 7A). 이는 포도당에 의해서 NTR의 활성도가 증가하며, Svr1은 NTR 활성도 증가를 억제함을 의미한다. 이러한 결과는 *svr* 유전자가 과발현된 형질전환주 OxSvr 에서 Ntr 활성도가 포도당에 의해서 증가하는 것이 현저히 저해되는 결과에서도 알 수 있다.

<117> 이 결과를 좀더 구체화하기 위해, glutathione S-transferase (GST) 유전자가 삽입되어 있으며 isopropyl β-D-thiogalactopyraniside (IPTG)에 의해 삽입 유전자가 과발현되는 pGEX4T 벡터를 이용하여 대장균에서 *svr* 유전자를 과발현시켰다. *svr* 유전자 발현유도 3시간 후 (도 7B) 대장균에서 수용성 단백질을 추출한 뒤 *svr1*$^{-}$ 돌연변이주에서 추출한 단백질에 첨가하여 Ntr 활성도 변화를 조사하였다. 도 7C에서와 같이 Svr1 이 과발현된 단백질이 포함된 단백질의 농도가 42 ㎍인 경우 Ntr 활성도가 100% 억제되었는데 이 결과는 Svr 단백질이 Ntr 단백질의 활성도를 억제함을 보여주는 또 다른 증거가 된다.

<118> **실시예 3: 세포 크기와 호흡에 영향을 미치는 cA(G)MP**

<119> 세포 내 cA(G)MP는 원핵과 진핵세포에서 잘 알려진 세포 내 2차 메신저로서의 신호 전달 물질이다. cA(G)MP 신호 경로는 효소의 활성 혹은 유전자 발현 조절 등을 통한 다양한 생물학적 활동에서 중요한 역할을 한다. 진핵세포의 경우, cAMP가 결합 가능한 cAMP 의존적인 단백질 카이네이제가 존재하며 원핵세포의 경우는 cAMP 인지 단백질이 존재한다. 이러한 단백질은 세포의 생장, 스트레스 저항, 대사물질 조절, 분화 등에 중요한 역할을 한다. 장내 세균의 cAMP 는 설탕 물질대사 중 *de novo* 생성에 관여하는 효소와 연관되어 있으며 광합성 세균의 cA(G)MP는 빛의 유무, pH 농도, 산소의 유무와 질소의 결핍 유무 같은 외부 환경 요인의 변화에 관여한다. cAMP를 합성하는 adenylate cyclase (*cya1*) 유전자는 편모성, 원핵성 남세균 모두에 존재한다. 그러나 남세균의 신호 경로에 관여하는 cAMP의 기능적에 관한 연구는 미비하다. 남세균 *Anabaena* sp. PCC7120 은 adenylate cyclase 유전자를 암호화하는 여러 개의 유전자가 있다. 그 중 *cyaB1*$^{-}$, *cyaB2*$^{-}$ 결실 돌연변이주는 야생종 세포와 크기가 비슷한 반면, *cyaD*$^{-}$ 균주는 야생종 세포에 비해 크기가 커졌다. 편모성 세균 *Spirulina platensis* 의 경우, cAMP는 호흡률과 상관관계가 있다.

<120> *cya1*$^{-}$*/2*$^{-}$ 이중 돌연변이에서의 세포 크기와 호흡율 결과에 의하면 *Synechocystis*에서의 cA(G)MP는 포도당에 의한 호흡율 증가를 억제하는 기능과 세포가 임계질량에 도달하는 활성자 기능을 하는 것으로 예상된다 (표 3 및 도 3).

<121> 표 3. YTH에 의해 스크리닝된 svr1 상호작용 파트너

ORF	Encoding protein	Classifications
slr0600	**NADP thioredoxin reductase**	Biosynthesis cofactors, prosthetic groups, and carriers
slr1841	probable porin; major outer membrane protein	Cell envelope
slr6001	two-component hybrid sensor and regulator	Regulatory functions
slr1575	probable potassium efflux system	Transport and binding proteins
sll1085	glycerol-3-phosphate dehydrogenase glpD	Fatty acids, phospholipid and sterol metabolism
slr0877	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	Translation
sll1174	hypothetical protein	Unknown
slr0199	hypothetical protein	Unknown
sll7028	hypothetical protein	Unknown
sll1372	hypothetical protein	Hypothetical

<122>

<123> **실시예 4: 세포 크기와 호흡에 관련하는 유전자 발현**

<124> 지금까지 세포 크기, 호흡에 관련하여 다양한 유전자가 언급되었다. 세포의 호흡 억제에 관여하는 *svr1*, *cya1* 또는 *cya2*, 세포 산화/환원을 조절하는 *trxA*, *trxB*, *trxQ*, 이를 조절하는 *ntr*, *ftrv* 와 *ftrc* 유전자가 광독립 영양생장과 광종속 영양생장 조건에서의 발현량 차이를 조사해 보았다. 야생종 세포의 광독립 및 광종속 영양생장조건에서 이 유전자들의 발현은 차이가 없었다. 이는 이들 유전자는 포도당 유입에 직접적으로 반응하지 않음을 의미하며 *svr1*$^-$ 돌연변이주, OxSvr 과발현 형질전환균주와 *cya1*$^-$*/2*$^-$ 이중 돌연변이주에서도 유전자 발현이 차이 없음을 볼 때 포도당에 의한 세포 크기와 호흡을 조절하는 유전자는 번역 후 변형에 의해 조절됨을 시사한다.

도면의 간단한 설명

<125> 도 1은 *svr*, Svr 과발현 트랜스제닉스 및 adenylate cyclase (*cya1*) 및 guanylyl cyclase (*cya2*) 유전자의 특성을 보여준다. (A) Svr1, Svr2, cya1 및 cya2의 도메인 구조. (B) svr1 및 ntr 돌연변이체의 융합 PCR 돌연변이유발, Svr1 과발현 및 cya1/cya2의 구축물 제작.

<126> 도 2는 photomixotrophic 조건하에 자란 *Synechocystis* 야생형 (WT) 세포, Svr1-결핍 돌연변이주 (*svr1*$^-$), Svr1 과발현주 (Ox Svr1), cya1 및 cya2 이중 돌연변이주 (*cya1*$^-$*/2*$^-$)의 광학현미경 (A) 및 SEM (B) 이미지를 보여준다.

<127> 도 3은 photoautotrophic, photomixotrophic 및 heterotrophic 성장 조건하에 키운 *Synechocystis* 야생형 (WT), Svr1-결핍 돌연변이주 (*svr1*$^-$), Svr1 과발현 돌연변이주 (OxSvr1) 및 cya1, cya2 이중 돌연변이주 (*cya1*$^-$*/2*$^-$)의 호흡율을 보여준다.

<128> 도 4는 photoautotrophic 및 photomixotrophic 조건하의 야생형, *svr1*$^-$ 및 OxSvr의 PQ 풀 유도 역학을 보여준다.

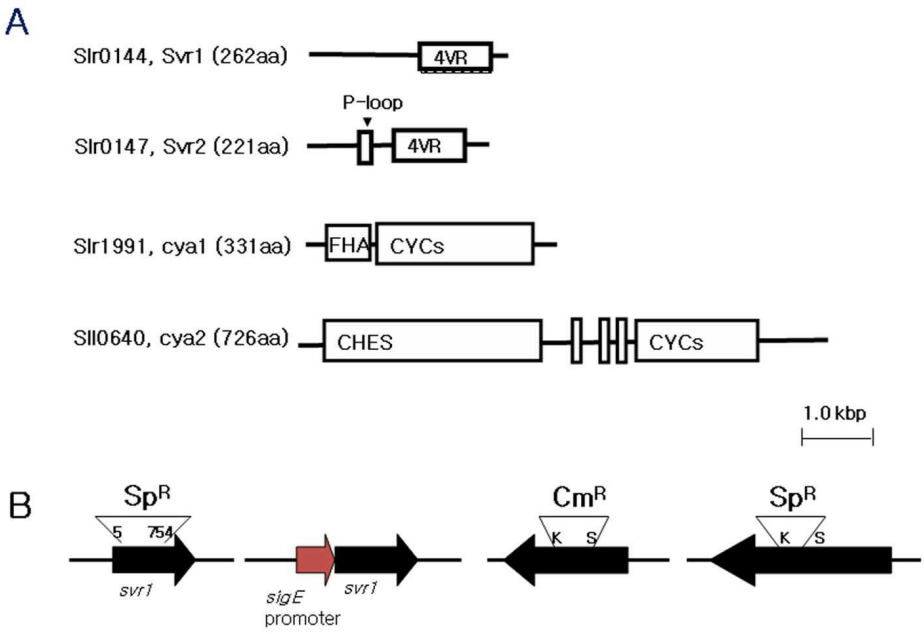
<129> 도 5는 성장 배지(40 μmol photon m^{-2} s^{-1}) 중에 10mM 포도당의 존재 또는 부재하에 키운 *Synechocysits* 야생형 (WT), Svr1-결핍 돌연변이주 (*svr1*$^-$), Svr1 과발현 돌연변이주 (OxSvr) 및 cya1, cya2 이중 돌연변이주 (*cya1*$^-$*/2*$^-$)에서 호흡 관련 유전자의 전사체 수준을 보여준다.

<130> 도 6은 Svr1-매개된 호흡 활성을 통한 세포 크기의 조절을 나타내는 모식도이다.

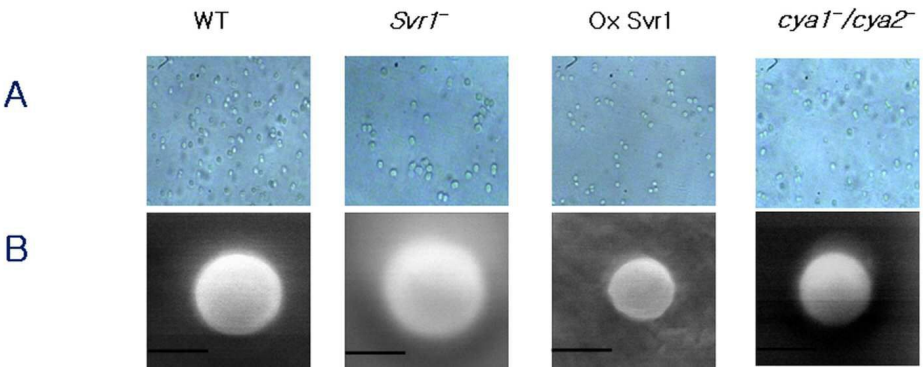
<131> 도 7. (A) 야생형, *svr1*⁻ 및 Ox Svr 돌연변이주에서 *Synechocytis* NTR 활성. 효소 활성은 autotrophic 및 photomixotrophic 조건 (40 μmol photon m^{-2} s^{-1})에서 키운 분리된 세포의 조 추출물에 대해 측정하였다. (B) 대장균에서 Svr 과발현의 유도 조건 (상단 패널). 레인 1: size marker, 레인 2; 대조군, svr 유도 조건 레인 3; 0.2 mM IPTG (3hr, 37℃), 레인 4; 1 mM IPTG (3hr, 37℃), 레인 5; 0.2 mM IPTG (3hr, 30℃), 레인 6; 1 mM IPTG (3hr, 30℃), 레인 7; 0.2 mM IPTG (6hr, 30℃), 레인 8; 1 mM IPTG (6hr, 30℃). 항-GST 항체를 이용한 대장균에서 각 조건에 대한 면역블롯팅 (하단 패널). (C) 대장균 OxSvr1 돌연변이주 세포로부터 분리된 가용성 조 효소 추출물에 의한 Svr1-결핍 돌연변이주의 *Synechocysits* NTR 활성의 저해 (평균 + SE, n=3-4).

도면

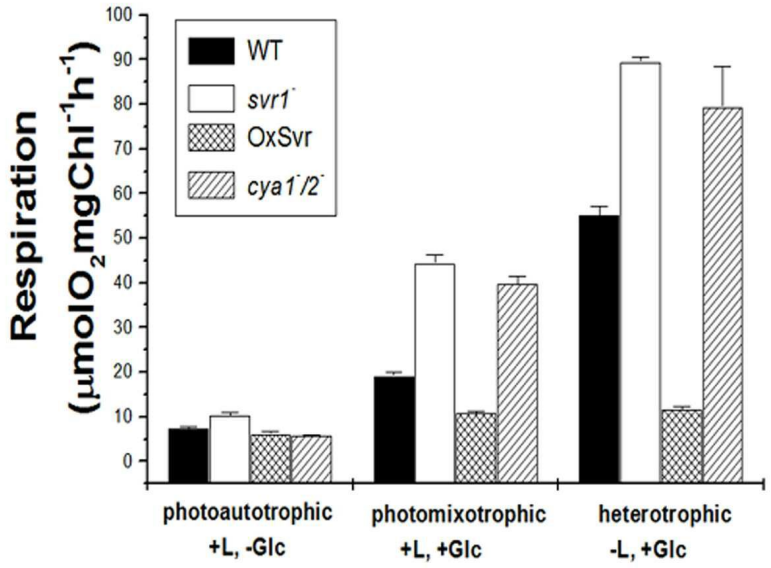
도면1



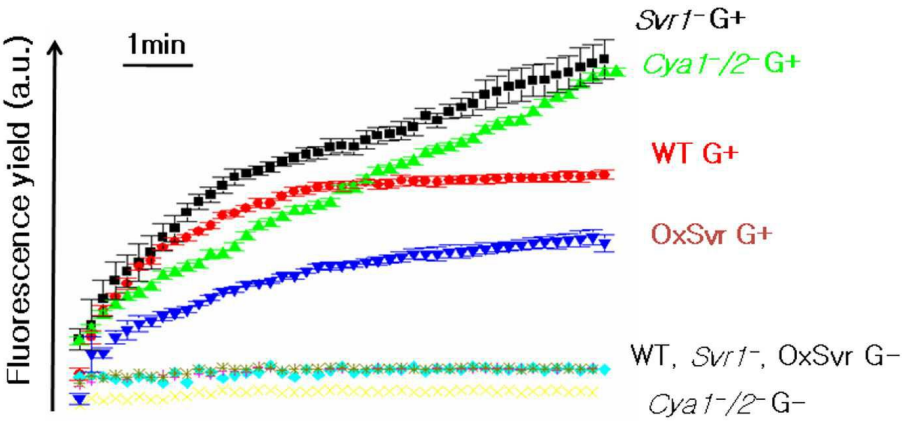
도면2



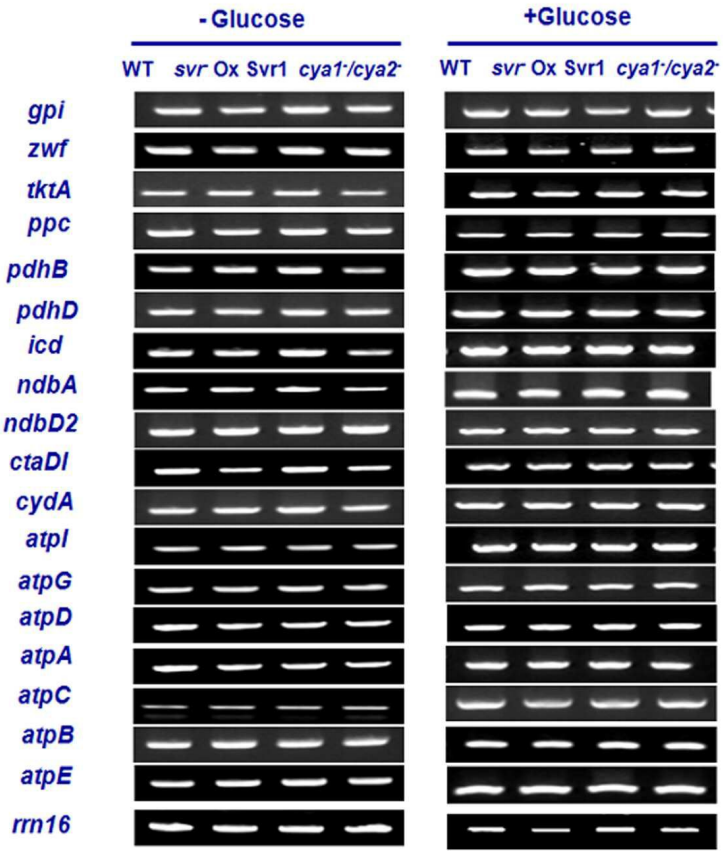
도면3


Respiration
(μmolO2mgChl-1h-1)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
WT
svr1-
OxSvr
cya1-/2-
photoautotrophic
+L, -Glc
photomixotrophic
+L, +Glc
heterotrophic
-L, +Glc

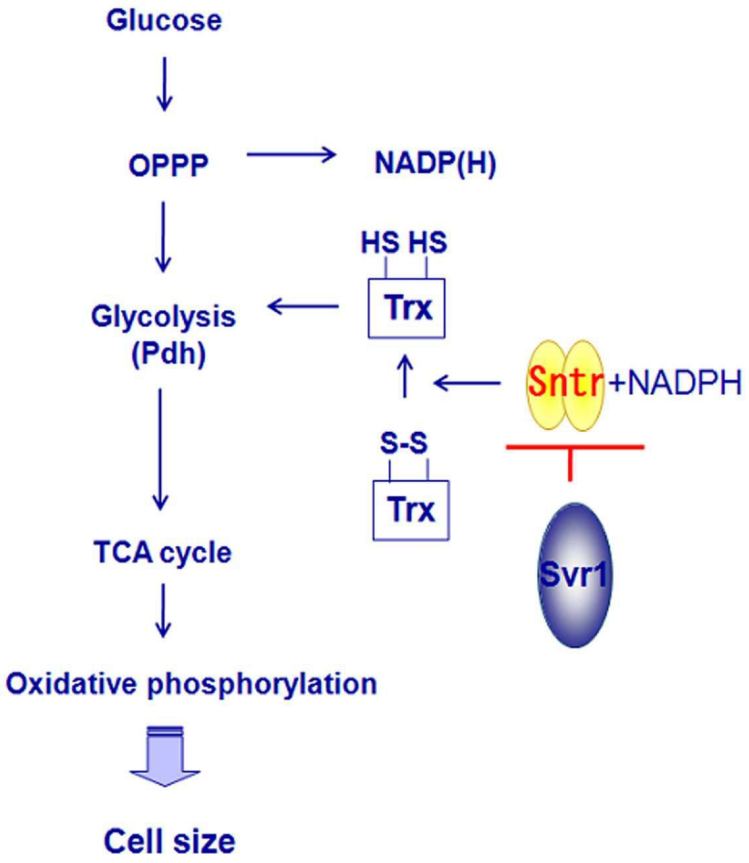
도면4


Fluorescence yield (a.u.)
1min
Svr1- G+
Cya1-/2- G+
WT G+
OxSvr G+
WT, Svr1-, OxSvr G-
Cya1-/2- G-

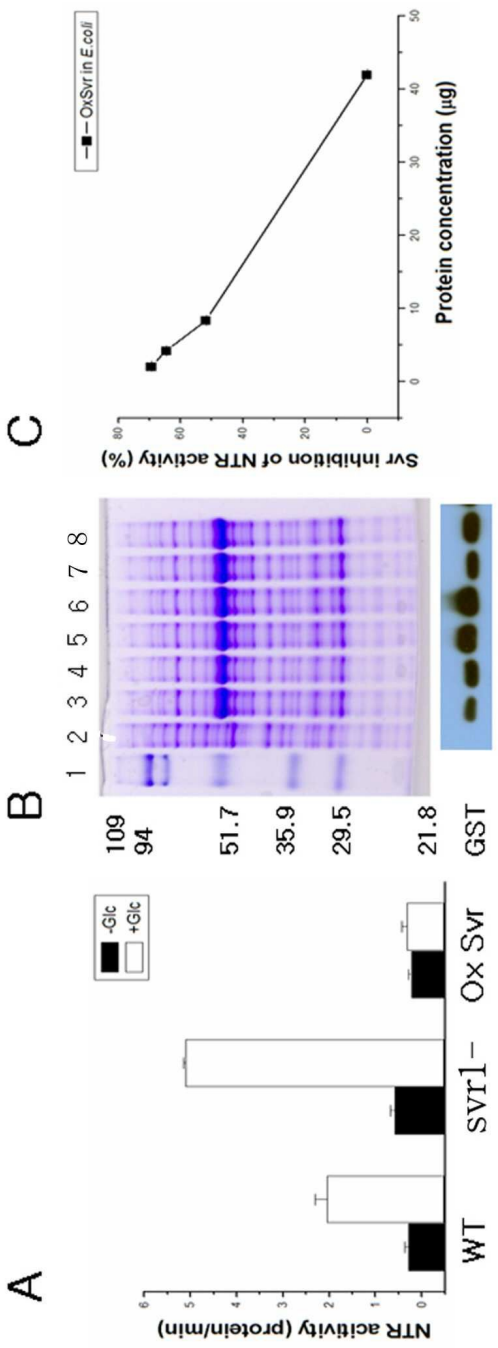
도면5


-Glucose
+Glucose
WT
svr Ox
Svr1
cya1-/cya2-
gpi
zwf
tktA
ppc
pdhB
pdhD
icd
ndbA
ndbD2
ctaDI
cydA
atpI
atpG
atpD
atpA
atpC
atpB
atpE
rrn16

도면6


Glucose
OPPP
NADP(H)
HS HS
Trx
Glycolysis
(Pdh)
Sntr
+NADPH
S-S
Trx
Svr1
TCA cycle
Oxidative phosphorylation
Cell size

도면7



서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Svr1 gene controlling cell size of Cyanobactria, and method for controlling cell size of Cyanobactria using the svr1 gene

<130> PN08097

<160> 15

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 789
<212> DNA
<213> Synechocystis sp. PCC6803

<220>
<221> gene
<222> (1)..(789)
<223> svr1 gene

<400> 1
atgggttacc tgccaagcca aactgatttt ttcaccatac ctaaggggat gtcgtccatg 60

gttttaactt ccattagtac atcaaatatt ccggctaagg tcaaaggatc taacttgttg 120

gaacatagtt taagaaaggt tcatcccagc aaacatcacc actatcaagt agaagacttc 180

ttttgttttc aaatgaattc cggttccatt gtggactgga ataactgccg caatgttctt 240

accagcgaag attttatcgt cggtttaatt gacggcttgc aggaagaagt gggcaacgcc 300

tccagtgtgg tgatgtacaa catcggcaag gagtggggcc attacgatgc cgaatttttt 360

aaccagtggt tcccgacgga atttggctat accagttctt tgagcgagct caatcttaac 420

tatgtgctag aaggttggtg gtggcccttc accgcccagg gctggggtaa ctgggccatt 480

gacctcagtg aacagaaaaa cggctttttg tttgtggata ttttcgactc cgctgtggcc 540

cggacgttgg gggatgtggg taagcctgtt tgccatattt acgctggcct gttggcaggt 600

ttctttagcc gcctggtgaa taagtccctc aactgcattg aaattcagtg ctacgccatg 660

ggggaaacct attgcaagtt tctgattggt aagcaagacc gcattgatgc cgccactttc 720

tggcaaaacg aaggggccaa tgccaacgat attgccacca aactcgtcaa aggggaatac 780

ctgaaatga 789

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 2
gcacgatgaa gagcagaagt 20

<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 3
ggataaatcc cgcggatgg 19

<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> UF primer

<400> 4
agggttgtga ctggttgaga gatt 24

<210> 5
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> UR+271 primer

<400> 5
ggcgagcatc gtttgttcgc ccagatcagt ttggcttggc aggtaa 46

<210> 6
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DF+271 primer

<400> 6
taatgtctaa caattcgttc aagcgccacc aaactcgtca aagg 44

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DR primer

<400> 7
caatcaatgc cccgacaaaa 20

<210> 8
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> R1991S primer

<400> 8

ggggtacccc gggatttgtt ggggttt 27

<210> 9
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> R1991AS primer

<400> 9
ggggtacccc tttatcggca atgacctcc 29

<210> 10
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> L0646S primer

<400> 10
ggggtacccg gggtatttgg attgcgaa 28

<210> 11
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> L0646AS primer

<400> 11
ggggtacccc cctttagcgg agatttgc 28

<210> 12
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sigEF primer

<400> 12
aactgcagga tttcagcagg aaactagggt ta 32

<210> 13
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sigER primer

<400> 13
ggggtaccag cctgccattg gtcaacggca c 31

<210> 14
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> svrFB primer

<400> 14
cgcggatcca tgggttacct gccaagccaa ac 32

<210> 15
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> svrRX primer

<400> 15
ccgctcgagt catttcaggt attccccttt gac 33