



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

해양 환경에서 분리한 *Celeribacter*
marinus IMCC12053의 핵산염기 외향고
리 메틸화 효소 연구

2017년 8월 25일

부경대학교 과학기술융합전문대학원

해양바이오융합과학전공

김 정 희

이 학 석 사 학 위 논 문

해양 환경에서 분리한 *Celeribacter*
marinus IMCC12053의 핵산염기 외향고
리 메틸화 효소 연구

지도교수 오 현 명

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2017년 8월 25일

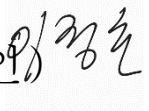
부경대학교 과학기술융합전문대학원

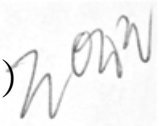
해양바이오융합과학전공

김 정 희

김정희의 이학석사 학위논문을 인준함



위 원 장 이학박사 이 정 호 (인) 

위 원 이학박사 조 영 근 (인) 

위 원 이학박사 오 현 명 (인) 

목 차

Abstract

I. 서 론	- 1 -
II. 재료 및 방법	- 5 -
1. 메틸화 유형 분석 (Methylation pattern analysis)	- 5 -
2. 사용 균주 및 배지	- 5 -
3. Genomic DNA 추출 및 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction; PCR)	- 6 -
4. pQE30 벡터 클로닝을 위한 제한 효소 처리(Restriction digestion)	- 7 -
5. Induction, Genomic 및 Plasmid DNA 추출.....	- 8 -
6. 메틸화에 민감한 제한 효소 처리 (Methylation sensitive restriction digestion).....	- 9 -
III. 결과 및 고찰.....	- 10 -

1. SMRT(single-molecule real-time)를 이용한 알파프로테오박테리아(Alphaproteobacteria) 두 균주들의 DNA 염기서열 분석	- 10 -
2. 두 균주간 DNA 메틸전이효소 비교.....	- 12 -
3. <i>C. marinus</i> IMCC12053의 아미노산 염기서열을 이용한 계통 분석-	13 -
4. <i>C. marinus</i> IMCC12053 및 <i>N. pentaromativorans</i> US6-1의 클로닝 및 발현	- 15 -
IV. 결론	- 17 -
참고문헌	- 20 -



표 목차

Table 1. Lists of gene sequence.	- 23 -
Table 2. Gene-specific primers used for PCR for cloning open reading frames for methylases in this study	- 25 -
Table 3. Thermal cycles in the PCR for cloning inserts in the experiment	- 26 -
Table 4. Characteristics of restriction enzyme sites	- 27 -
Table 5. Methylation sensitive restriction enzyme for genomic DNA preparations	- 28 -
Table 6. Methylation sensitive restriction enzyme for plasmid DNA preparations	- 29 -
Table 7. Sequence motif elements flanking m4C (N ⁴ -methylcytosine) and m6A (N ⁶ -methyladenosine) modifications in the IMCC12053 genome	- 30 -
Table 8. Sequence motif elements flanking m4C (N ⁴ -methylcytosine) and m6A (N ⁶ - methyladenosine) modifications by in the US6-1 genome	- 31 -
Table 9. Comparison of DNA methyl transferases among some strains from Alphaproteobacteria subdivision	- 34 -

Table 10. Methylation sensitive restriction digestion of genomic DNA preparation

..... - 35 -

Table 11. Methylation sensitive restriction digestion of plasmid DNA preparation

..... - 35 -



그림 목차

Fig. 1. DNA insert site of pQE30 vector	36 -
Fig. 2. Phylogeny of CcrM methyltransferases from Alphaproteobacteria with other groups of bacteria and archaea	37 -
Fig. 3. Bayesian Inference Tree of Protein-encoding DNA sequence of IMCC12053_18853 (GenBank Accession : ALI55832)	38 -
Fig. 4. Genomic DNA isolated before and after IPTG Induction	39 -
Fig. 5. Methylation sensitive digestion of genomic DNA preparations of wild-type (Eberhard, et al., 2001) <i>dam</i> ⁻ / <i>dcm</i> ⁻ Competent <i>E. coli</i> , <i>C. marinus</i> IMCC12053_1885 (ALI55832) and <i>N. pentaromativorans</i> US6-1 AIT78768	40 -
Fig. 6. Methylation sensitive digestion of plasmid DNA preparations of wild-type <i>dam</i> ⁻ / <i>dcm</i> ⁻ Competent <i>E. coli</i> , <i>C. marinus</i> IMCC12053	41 -

Characterization of Enzymes Methylating Exocyclic Amine Group of Nucleoside Bases in the Marine Bacterium *Celeribacter marinus* IMCC12053

Jung Hee Kim

Specialized Graduate School Science & Technology Convergence

Pukyong National University

Abstract

DNA methylation is involved in diverse processes in bacteria, including maintenance of genome integrity and regulation of gene expression. CcrM, the DNA methyltransferase conserved in Alphaproteobacterial species, has N⁶-adenine or N⁴-cytosine methyltransferase activities using S-adenosyl methionine as a co-substrate.

Celeribacter marinus IMCC12053 and *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1 isolated from the marine environment are alphaproteobacteria. Both strains replace the methyl groups of the exocyclic amines of CpG and GpC cytosines to produce N4-methyl cytosine.

Using single molecule real-time sequencing method (SMRT), methylation patterns of *C. marinus* IMCC12053 and *N. pentaromativorans* US6-1 were compared using Gibbs motif sampler program. Both strains showed conversion of adenosine of 5'-GANTC-3' to N⁶-methyladenosine, and N⁴-cytosine of 5'-CpG-3' (IMCC12053) and 5'-GpC-3' (US6-1) to N⁴-methylcytosine. Exocyclic DNA methyltransferases from both of the species were chosen for cloning using phylogenetic analysis.

IPTG induction were performed to confirm the methylation activity of the ORF's from the two strains when they were cloned into pQE30 vector. The genomic DNA and plasmid carrying methylase-encoding sequences were extracted and cleaved with restriction enzymes sensitive to methylation to confirm the methylation activity. These methylases protected the restriction enzyme site by IPTG induced changes in the DNA. Thus the recognition sequences cleaved by restriction enzymes are decreased and DNA fragments protected by methylation increased in accordance with the cytosine methylation.

In this study, characteristics of cloned exocyclic DNA methylases are investigated for potential uses of novel type of CpG methylase for molecular biology and epigenetics.

I . 서 론

세균에 있어서 DNA 메틸화(methylation)는 유전체의 무결성(genome integrity) 유지 및 유전자 발현의 조절 기작에 관여한다(Gonzalez, *et al.*, 2014). DNA 메틸화는 메틸화 효소에 의해 DNA에 메틸기가 부가되는 과정으로 메틸화 염기로서 N⁶-메틸아데닌(N⁶-methyladenine)과 5-메틸사이토신(5-methylcytosine)등이 존재한다. DNA methyltransferase (MTase)에 의해 변형된 DNA methylation은 유전자 전사(gene transcription), 세포 성장(cell growth) 및 증식(proliferation)을 조절하는데 중요한 역할을 한다(Li, *et al.*, 2017). DNA methylation 및 DNA methyltransferases (MTases)에 관여하는 유전자는 거의 70년동안 연구되어왔다(Jurkowska and Jeltsch, 2016).

유전자 조절에 관여하는 두 개의 메틸전이효소로는 Dam과 세포주기-조절 메틸전이효소(cell cycle-regulated methyltransferase; CcrM)가 있으며, 대장균의 Dam methyltransferase(메틸전이효소)는 *pap* operon과 같은 특정 유전자 발현에 중요하며, DNA 복제 개시(DNA replication initiation) 및 DNA repair과 같은 과정에도 중요하다고 알려져 있다(Adhikari and Curtis, 2016).

CcrM 유전자는 대부분의 알파프로테오박테리아(Alphaproteobacteria)에서 공통적으로 보존되어 있으며(Gonzalez, *et al.*, 2014), 지난 몇 년 동안 세포

주기-조절 유전자(CcrM)의 발현에 메틸화(Methylation)가 중요하다는 사실이 드러났다(Mohapatra, *et al.*, 2014). CcrM 단백질은 *Caulobacter crescentus* NA1000 등의 모델 미생물에서 유전자 발현을 조절하는 주요 기능 단백질 모델로 연구 되었으며(Kozdon, *et al.*, 2013), CcrM 관련 DNA-(adenine N⁶)-메틸전이효소(methyltransferases)는 다른 알파프로테오박테리아의 생물학에서 매우 중요한 역할을 한다(Maier, *et al.*, 2015). CcrM 단백질은 또한 N⁶-및 N⁴-메틸라아제(methylase) 활성을 가지며, S-아데노실메티오닌(adenosyl methionine)을 기질로 하여 5' -GATC-3' 의 DNA 염기 서열상의 아데닌(adenine)을 N⁶-메틸 아데노신(methyl adenosine)으로 변환할 뿐 아니라 어떤 경우에 사이토신 염기를 N⁴-메틸 사이토신(methyl cytosine)으로 메틸화 할 수 있다(Jeltsch, *et al.*, 1999). CcrM 형식의 N⁶-및 N⁴-메틸라아제 활성은 염기의 탄소 고리에 달려있는 아민 그룹에 메틸기를 수식하기 때문에 5-메틸사이토신을 형성하는 메틸 트랜스퍼라아제와 구분하여 외향고리의 아미노 메틸화(exocyclic amino modification)이라 불린다(Loenen and Raleigh, 2014).

Celeribacter marinus IMCC12053 및 *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1은 각각 해양환경에서 분리 동정되었으며, *C. marinus* IMCC12053(Baek, *et al.*, 2014)은 박테리오파지 P12053L을 분리하는 숙주로 사용된다(Kang, *et al.*, 2012). *Celeribacter* 속은 해양에서 발견된 주요 계통 군집 중 하나로 *Alphaproteobacteria* 계열의 *Rhodobacteraceae* 계통 구성원이며, 그람 염색

음성(Gram-staining-negative), 비 운동성(non-motile), 비 착색(non-pigmented) 및 막대모양(rod-shaped)의 박테리아이다(Baek, et al., 2014). *Alphaproteobacteria C. marinus* IMCC12053 균주의 메틸화 효소는 아데노신에 특이적인 메틸화 효소(adenosine-specific DNA methylase)인 동시에 N⁴-cytosine에 특이적인 메틸화 효소 (N⁴-cytosine specific DNA methylase)임이 예측된다.

N. pentaromativorans US6-1는 해양 유류 분해 세균(Sohn, et al., 2004)으로 draft genome을 분석하여 고분자의 방향성 탄화수소 분해유전자(aromatic-hydrocarbon-degrading genes)를 밝혀낸 바 있다(Luo, et al., 2012).

C. marinus IMCC12053의 IMCC12053_18853 (Genbank acc. ALI55832)은 CpG 및 CpG 근처의 사이토신의 외향고리의 아민(exocyclic amine)을 메틸기(methyl group)로 치환하여 N⁴-메틸사이토신을 생성하며, 5' -GATC-3' 염기서열의 아데노신의 외향고리의 아민(exocyclic amine)에 메틸기(methyl group)를 치환하여 N⁶-메틸아데노신을 생성하는 것을 확인하였으며, 이러한 내용으로 보아 아데노신 및 사이토신에 특이적을 가진다고 보여진다.

N. pentaromativorans US6-1의 AIT78768은 GpC 및 GpC 근처의 사이토신의 외향고리의 아민(exocyclic amine)에 메틸기(methyl group)를 치환하여 N⁴-메틸사이토신을 생성한다는 것을 확인하였다.

이러한 메틸라아제는 제한 효소 자리 보호하고 DNA의 물리적 물성 변화를 유도하여 제한 효소 인식 서열을 감소시킴으로써 효소의 특이성을 증가시키는 효과를 제공한다. 다른 메틸라아제 활성을 가진 유전자들은 사이토신 또는 아데노신을 각 하나만 메틸화 하는 반면, *C. marinus* IMCC12053은 사이토신 및 아데노신의 외향고리를 모두 가지고 있기 때문에 다른 유전자들에 비해 특이성을 가지며, 이러한 장점으로 보아 CpG 또는 GpC 관련 효소로 이용될 수 있다.

이에 본 연구에서는 신규 DNA 메틸전이효소를 가지고 있다고 보고된 *C. marinus* IMCC12053 및 *N. pentaromativorans* US6-1 두 균주의 메틸라아제 활성 및 특성에 대해 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. 메틸화 유형 분석 (Methylation pattern analysis)

실험에 사용된 *C. marinus* IMCC12053 및 *N. pentaromativorans* US6-1 두 균주는 각각 이전 연구에서 실시한 PacBioRS II 서열 분석의 결과를 활용하였다(Choi, *et al.*, 2015, Yang, *et al.*, 2017). 두 균주에 대한 염기서열 정보는 Table 1에 기술하였다.

2. 사용 균주 및 배지

C. marinus IMCC12053 및 *N. pentaromativorans* US6-1의 유전자는 pGEM T-Easy, pGEM T Vector Systems (Promega, Madison, USA) 및 DH5 α Chemically Competent *E. coli* (Enzymonics, Daejeon, Republic of Korea) 를 활용하여 클로닝했으며, HiYield Plus™ Plasmid Mini Kit (RBC, Taipei, Taiwan) 를 이용하여 plasmid DNA를 추출 하였다. 발현분석을 위한 서브 클로닝은 pQE30 벡터를 활용하였다.

DNA methylase 활성을 위해서 *dam-/dcm-* 인 *E.coli* K12 strain (HIT™-GM2163 Value 10⁸, RBC, Taipei, Taiwan)을 사용 하였다.

대장균 배양용 배지로는 100 µg/ml의 ampicillin이 포함된 Luria-Bertani (LB) broth를 사용했으며, 37°C shaking incubator에서 15시간 이상 배양되었다. Agar plate 또한 100 µg/ml 농도의 ampicillin이 포함된 Luria-Bertani (LB) broth agar plate를 사용했다.

3. Genomic DNA 추출 및 증합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction; PCR)

Genomic DNA는 PureHelix Genomic DNA Prep Kit (Column type) (NanoHelix, Daejeon, Republic of Korea)를 사용하여 추출하였다. Genomic DNA는 PCR을 위한 template로 사용되었으며, *C. marinus* IMCC12053 및 *N. pentaromativorans* US6-1 두 균주의 sequence-specific primers를 Table 2와 같이 설계하였다.

증폭은 30초 동안 95°C에서 핵산 변성 25 cycles을 SimpliAmp Thermal cycler(life technologies, Carlsbad, USA)에서 실시하였고, 30초 동안 각각의 primer에 대해 지시된 온도에서 annealing 하고, 72°C에서 1분간 각각 신

장하였다(Table 3). 증폭된 PCR 산물을 1% agarose gel에서 전기영동으로 분석하였고, SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, USA) 으로 시각화하였다. 증폭된 DNA 단편들은 pGEM T-Easy 또는 pGEM T 벡터 키트를 이용하여 클로닝하였으며, T7 및 SP6 프라이머를 사용하여 서열 분석 및 서브 클로닝에 사용하였다.

4. pQE30 벡터 클로닝을 위한 제한 효소 처리(Restriction digestion)

Celeribacter marinus IMCC12053의 ALI55832를 코딩하는 유전자 단편의 제한 효소처리는 Kpn I 과 Pst I 을 이용하였으며, *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1의 AIT78768을 코딩하는 유전자는 Sph I 과 Sal I 을 사용하였다(Table 4). Digestion은 2시간동안 37℃에서 이루어졌으며, 1% agarose gel에 의해 전기영동으로 확인되었다.

pQE30 vector 또한 Kpn I /Pst I 및 Sph I /Sal I 으로 처리하였고(Fig. 1), Shrimp Alkaline Phosphatase를 37℃에서 30분간 처리 후 65℃에서 5분간 가열하여 불활성화하였다. 제한 효소 처리 후 T4 DNA ligase (Promega cat.

M180A)를 이용해 벡터와 삽입 DNA를 ligation 한 뒤, 대장균 DH5 α 에 형질 전환하였다.

5. Induction, Genomic 및 Plasmid DNA 추출

C. marinus IMCC12053 및 *N. pentaromativorans* US6-1의 유전자 ALI55832(IMCC12053_18853)와 AIT78768을 각각 pQE30에 서브 클로닝 후 100 μ M IPTG로 처리하여 3시간 동안 37 $^{\circ}$ C shaking incubator에서 배양되었다.

메틸화 된 Genomic DNA 및 메틸화가 되지 않은 Genomic DNA는 PureHelix Genomic DNA Prep Kit (Column type) (NanoHelix, Daejeon, Republic of Korea)를 사용하여 추출하였으며, 4mL의 cell에서 추출되었다.

또한 메틸화 된 plasmid DNA 및 메틸화가 되지 않은 plasmid DNA는 HiYield plus plasmid mini Kit (RBC, Taipei, Taiwan)를 사용하여 추출하였으며, 3mL의 cell에서 추출되었다.

6. 메틸화에 민감한 제한 효소 처리 (Methylation sensitive restriction digestion)

Methylation sensitive restriction digestion에 사용된 효소로는 Mbo I , Msp I , Mlu I , Pvu I 이 있으며(Table 5,6), control으로 *dam-/dcm- E. coli*를 사용하였다.

앞서 추출한 메틸화 된 Genomic DNA와 메틸화가 되지 않은 Genomic DNA 및 plasmid DNA를 사용해 메틸레이션에 민감한 효소로 2시간동안 37℃에서 digestion하였으며, 1%, 1.2% agarose gel에 의해 전기영동으로 확인되었다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. SMRT(single-molecule real-time)를 이용한 알파프로테오박테리아(Alphaproteobacteria) 두 균주들의 DNA 염기서열 분석

SMRT(single-molecule, real-time) 방법(Eid, *et al.*, 2009)을 이용하여 알파프로테오박테리아에 속하는 두 균주의 유전체 염기서열을 분석하였다. US6-1 및 IMCC12053의 유전체 분석 결과를 이용하여 DNA 염기 서열상의 아데노신 및 사이토신 염기 서열이 각각 N⁶-메틸아데노신 및 N⁴-메틸사이토신으로 메틸화 되는 것을 기록하고 그 패턴을 Gibbs motif sampler program (Lawrence, *et al.*, 1993)을 이용하여 분석한 결과를 활용하였다 (Yang, *et al.*, 2017).

C. marinus IMCC12053의 IMCC12053_18853 (Genbank acc. ALI55832) 은 5' - GATC-3' 염기 서열의 아데노신의 외향고리의 아민(exocyclic amine)에

메틸기(methyl group)를 치환하여 N⁶-메틸아데노신을 생성하였다. *C. marinus* IMCC12053의 IMCC12053_18853 (Genbank acc. ALI55832)은 CpG 및 CpG 근처 사이토신의 외향고리의 아민(exocyclic amine)에 메틸기(methyl group)를 치환하여 N⁴-메틸사이토신을 생성하였다 (Table 7).

N. pentaromativorans US6-1의 AIT78768은 5-GANTC-3' 염기 서열의 아데노신의 외향고리의 아민(exocyclic amine)에 메틸기(methyl group)를 치환하여 N⁶-메틸아데노신을 생성하였다. *N. pentaromativorans* US6-1의 AIT78768은 GpC 및 GpC 근처의 사이토신의 외향고리의 아민(exocyclic amine)에 메틸기(methyl group)를 치환하여 N⁴-메틸사이토신을 생성하였다 (Table 8).

2. 두 균주간 DNA 메틸전이효소 비교

위의 두 균주를 유전체의 염기 서열상의 N⁶-메틸아데닌, 5-메틸사이토신, 그리고 N⁴-메틸사이토신의 특이적 키네틱 시그니처(specific kinetic signature)를 이용하여 염기 서열상의 아데노신 및 사이토신의 메틸화 양상을 관찰할 수 있었다(Clark, *et al.*, 2012).

C. marinus IMCC12053 및 *N. pentaromativorans* US6-1는 유전체 분석 결과 5' -GATC-3' 의 아데노신을 N⁶-메틸아데노신으로 변조하는 유전자를 가지고 있으며, NCBI Conserved Domain Database의 CDD search(Marchler-Bauer, *et al.*, 2015)를 통해서 CcrM을 포함 하는 유사 서열을 구분할 수 있었다(Table 9).

3. *C. marinus* IMCC12053의 아미노산 염기서열을 이용한 계통 분석

C. marinus IMCC12053의 염기서열을 이용해 두 가지 계통 분석 수형도를 작성하였다. 먼저 *C. marinus* IMCC12053의 외향 고리 DNA 메틸라아제 아미노산 염기서열을 계통적으로 분석하기 위하여, 박테리아(bacteria)와 고세균(archaea)의 다른 그룹 및 알파프로테오박테리아(alphaproteobacteria)로부터 세포주기-조절 메틸전이효소(CcrM)의 계통 발생 수형도를 RAxML(ver. 7.3.4)(Stamatakis, 2006)을 이용해 작성하였다. (Fig. 2).

RAxML(ver. 7.3.4)은 Randomized Accelerated Maximum Likelihood의 약자로, 계통 발생 수형도를 순차적으로 그린 뒤 parallel maximum likelihood에 기반을 둔 inference 프로그램이다.

N. pentaromativorans US6-1과 *C. marinus* IMCC12053을 포함한 3개의 *Celeribacter* sp., *Thioclava* sp., *Brucella abortus*, *Caulobacter crescentus*, *Haemophilus influenza*, *Moraxella bovis*를 포함한 상위 9개의 DNA 메틸라아제 염기서열들은 알파프로테오박테리아 CcrM 서열로 *Caulobacter crescentus* NA1000과 같은 그룹을 형성하였으며, 이는 94%의 높은 boot strap 값을 나타낸다. EC 2.1.1.113인 다른 단백질들은 Rebase database(Roberts, *et al.*, 2015)에 의해 N⁴-cytosine methyltransferase 활성을 갖는 효소로 판명되었

다.

다음으로 IMCC12053_18853의 단백질의 코돈 DNA 서열을 이용해 Bayesian inference tree를 만들었다(Fig. 3). *Caulobacter crescentus*, *Novosphingobium pentaromativorans us6-1*, *Brucella abortus*, *Celeribacter marinus*, *Celeribacter baekdonensis*를 포함하는 상위 5개의 서열은 68%의 확률로 분류된 *Caulobacter crescentus* NA1000의 알파프로테오박테리아 CcrM을 나타낸다. CcrM 서열은 높은 확률(probability)값을 갖는 다른 제한효소/메틸라아제와 명확히 구분되는 자매 그룹(sister clade)을 형성하였으며, 다른 그룹은 N⁴-cytosine methyltransferase 활성을 갖는 메틸라아제들이다. 수형도는 29개의 DNA 서열을 MrBayes 3.2를 사용해 그렸으며, 분지점(node)의 확률은 숫자로 표시하였다 (Fig. 3)

4. *C. marinus* IMCC12053 및 *N. pentaromativorans* US6-1의 클로닝 및 발현

100 μ M IPTG에 의해 3시간 동안 37°C에서 진탕 배양된 *C. marinus* IMCC12053 및 *N. pentaromativorans* US6-1 두 균주의 genomic(Fig. 4) 및 plasmid DNA를 추출하였다. 이를 이용하여, 선택한 제한 효소를 처리 후 발현을 확인하였다(Fig. 5).

대조 균으로 IPTG를 투여하지 않은 것과 dam-/dcm- Competent *E. coli*를 사용하였다. 메틸라아제를 발현하지 않는 dam-/dcm- 형질의 대장균 숙주를 이용한 IMCC12053_1885 (ALI55832; *C. marinus* IMCC12053)를 가진 pQE30 벡터의 경우 제한 효소 Mbo I 및 Msp I에서 genomic DNA가 모두 절단되었으며, *N. pentaromativorans* US6-1 AIT78768을 발현한 pQE30 벡터의 경우 IPTG induction 후에도 Mbo I 이 절단되지 않는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 5). 이러한 결과로 보아 *N. pentaromativorans* US6-1의 메틸라아제 활성이 존재하였고, GATC 서열의 아데닌에서 메틸화가 일어났다고 보여진다.

또한 IPTG 인덕션 된 *C. marinus*의 plasmid DNA를 메틸레이션 활성을 확인하기 위해 Mlu I/Pvu I 과 Mlu I/Pst I 으로 각각 두 개의 효소를 사용해 절단하였다. Mlu I/Pvu I 과 Mlu I/Pst I 로 절단한 밴드 중 Mlu I/Pvu I 조합에서

헤미메틸레이션(Hemi-methylation) 된 밴드를 확인 할 수 있었으며 이는 Pvu
I 의 CGATCG에서 CpG 메틸레이션이 일어났다고 보여진다.



IV. 결론

본 연구에서는 유전자 전사와 세포 성장 및 증식을 조절하는데 중요한 메틸화 유전자를 가지고 있는 균주를 이용하여 메틸화 효소에 관해 연구를 시도하였다. 이를 위해 아데노신 및 사이토신 메틸화 유전자를 가지고 있다고 밝혀진 *Celeribacter marinus* IMCC12053 및 *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1 두 균주를 이용하여 메틸화 효소의 특성을 연구하였다.

이전 보고서들을 보면, *Spiroplasma* sp. strain MQ1(M.SssI)로부터 DNA 메틸화 효소를 coding하는 유전자의 대장균에서 클로닝 및 발현(Renbaum, *et al.*, 1990)이 보고되었으며, *Chlorella* virus NYs-1로부터 dinucleotide GpC를 인식하는 cytosine-5-DNA methyltransferase(사이토신-5-DNA 메틸전이효소)가 *E.coli*(대장균) 및 *Saccharomyces cerevisiae*에서 발현되었다(Xu, *et al.*, 1998). M.SssI 효소는 사이토신을 메틸화 하는 메틸트랜스퍼라아제에 관한 것으로 CpG의 모든 사이토신을 메틸화 하는 반면 본 연구에서 사용된 *Celeribacter marinus* IMCC12053의 메틸화 효소는 5'-GANTC-3'의 아데노신을

포함하여 염기 탄소고리의 아민 그룹을 메틸화 한다. 또한 *Chlorella virus* NYs-1는 GpC의 사이토신을 메틸화 하는 GpC 메틸트랜스퍼라아제이나 본 연구의 메틸화 효소는 N⁶-메틸아데노신 또는 N⁴-메틸사이토신을 생성하는 효소이다.

이전 특허 또는 보고서에서는 바이러스나 *Spiroplasma* 에서 메틸라아제 효소의 특성을 연구하였으나 알파프로테오박테리아의 메틸라아제에 관한 연구는 보고되지 않았다. 본 연구에서는 *Celeribacter marinus* IMCC12053 균주에서 N⁶-메틸아데노신 또는 N⁴-메틸사이토신을 생성하는 메틸트랜스퍼라아제를 클로닝 하였고, 이는 종래의 5-메틸사이토신을 메틸화하는 CpG/GpC 메틸라아제와 차별화할 수 있는 효소이다.

이를 증명하기 위해 pQE30 vector에 클로닝 하여, Linearized 시켜준 뒤, 메틸레이션에 민감한 효소를 사용 해 절단하였다. Mlu I /Pvu I 과 Mlu I /Pst I 로 절단한 밴드 중 Mlu I /Pvu I 조합에서 헤미메틸레이션(Hemi-methylation)된 밴드를 확인 할 수 있었다. Mlu I 과 Pvu I 모두 CpG blocked 효소이나 Mlu I /Pst I 조합에서는 밴드가 보이지 않았고, Mlu/Pvu I 조합에서만 밴드를 확인 할 수 있는 것으로 보아 Pvu I 에서 CpG 메틸레이션 활성을 확인할 수 있는 것으로 보여진다.

이러한 DNA 메틸트랜스퍼라아제는 제한 효소 자리를 보호하고, DNA의 물리적 물성 변화를 유도하여 제한 효소 인식 서열을 감소시킴으로써 효소의 특

이성을 증가시키는 효과를 가져올 수 있다. 본 연구에 사용된 균주의 신규 DNA 메틸트랜스퍼라아제는 제한 효소 자리를 보호하고 DNA의 물리적 변화를 유도하여 제한 효소 인식 서열을 감소시킴으로써 효소의 특이성을 증가시키며, 이로 인해 CpG 또는 GpC 메틸화 관련 유전자 발현 조절 연구, DNA 메이저 그루브(major groove)의 염기서열 특이적 탐침 연구, 메틸화를 이용한 DNA의 3중 수소 표시(tritium-labeling)에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.



참고문헌

- Adhikari, S. and Curtis, P. D. 2016. DNA methyltransferases and epigenetic regulation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 40, 575-591.
- Baek, K., Choi, A., Kang, I., and Cho, J. C. 2014. *Celeribacter marinus* sp. Nov., isolated from coastal seawater. *Int J Syst Evol Microbiol.* 64, 1323-1327.
- Choi, D. H., Kwon, Y. M., Kwon, K. K., and Kim, S. J. 2015. Complete genome sequence of *novosphingobium pentaromativorans* us6-1(t). *Stand Genomic Sci.* 10, 107.
- Clark, T. A., Murray, I. A., Morgan, R. D., Kislyuk, A. O., Spittle, K. E., Boitano, M., Fomenkov, A., Roberts, R. J., and Korlach, J. 2012. Characterization of DNA methyltransferase specificities using single-molecule, real-time DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 40, e29.
- Eberhard, J., Oza, J., and Reich, N. O. 2001. Cloning, sequence analysis and heterologous expression of the DNA adenine-(n6) methyltransferase from the human pathogen *actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Microbiology Letters.* 195, 223-229.
- Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., Peluso, P., Rank, D., Baybayan, P., Bettman, B., Bibillo, A., Bjornson, K., Chaudhuri, B., Christians, F., Cicero, R., Clark, S., Dalal, R., Dewinter, A., Dixon, J., Foquet, M., Gaertner, A., Hardenbol, P., Heiner, C., Hester, K., Holden, D., Kearns, G., Kong, X., Kuse, R., Lacroix, Y., Lin, S., Lundquist, P., Ma, C., Marks, P., Maxham, M., Murphy, D., Park, I., Pham, T., Phillips, M., Roy, J., Sebra, R., Shen, G., Sorenson, J., Tomaney, A., Travers, K., Trulson, M., Vieceli, J., Wegener, J., Wu, D., Yang, A., Zaccarin, D., Zhao, P., Zhong, F., Korlach, J., and Turner, S. 2009. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science.* 323, 133-138.
- Gonzalez, D., Kozdon, J. B., McAdams, H. H., Shapiro, L., and Collier, J. 2014. The functions of DNA methylation by *ccrm* in *caulobacter crescentus*: A global approach. *Nucleic Acids Res.* 42, 3720-3735.

- Jeltsch, A., Christ, F., Fatemi, M., and Roth, M. 1999. On the substrate specificity of DNA methyltransferases. Adenine-n6 DNA methyltransferases also modify cytosine residues at position n4. *J Biol Chem.* 274, 19538-19544.
- Jurkowska, R. Z. and Jeltsch, A. 2016. Mechanisms and biological roles of DNA methyltransferases and DNA methylation: From past achievements to future challenges. *Adv Exp Med Biol.* 945, 1-17.
- Kang, I., Jang, H., Oh, H. M., and Cho, J. C. 2012. Complete genome sequence of celeribacter bacteriophage p12053I. *J Virol.* 86, 8339-8340.
- Kozdon, J. B., Melfi, M. D., Luong, K., Clark, T. A., Boitano, M., Wang, S., Zhou, B., Gonzalez, D., Collier, J., Turner, S. W., Korch, J., Shapiro, L., and McAdams, H. H. 2013. Global methylation state at base-pair resolution of the *caulobacter* genome throughout the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110, E4658-4667.
- Lawrence, C. E., Altschul, S. F., Boguski, M. S., Liu, J. S., Neuwald, A. F., and Wootton, J. C. 1993. Detecting subtle sequence signals: A gibbs sampling strategy for multiple alignment. *Science.* 262, 208-214.
- Li, Y., Zou, X., Ma, F., Tang, B., and Zhang, C. Y. 2017. Development of fluorescent methods for DNA methyltransferase assay. *Methods Appl Fluoresc.* 5, 012002.
- Loenen, W. A. and Raleigh, E. A. 2014. The other face of restriction: Modification-dependent enzymes. *Nucleic Acids Res.* 42, 56-69.
- Luo, Y. R., Kang, S. G., Kim, S. J., Kim, M. R., Li, N., Lee, J. H., and Kwon, K. K. 2012. Genome sequence of benzo(a)pyrene-degrading bacterium *novosphingobium pentaromativorans* us6-1. *J Bacteriol.* 194, 907.
- Maier, J. A., Albu, R. F., Jurkowski, T. P., and Jeltsch, A. 2015. Investigation of the c-terminal domain of the bacterial DNA-(adenine n6)-methyltransferase ccrm. *Biochimie.* 119, 60-67.
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L. Y., Geer, R. C., He, J., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Lanczycki, C. J., Lu, F., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zheng, C., and Bryant, S. H. 2015. Cdd: Ncbi's conserved domain database. *Nucleic Acids Res.* 43, D222-226.
- Mohapatra, S. S., Fioravanti, A., and Biondi, E. G. 2014. DNA methylation in

- caulobacter and other alphaproteobacteria during cell cycle progression. *Trends Microbiol.* 22, 528-535.
- Renbaum, P., Abrahamove, D., Fainsod, A., Wilson, G. G., Rottem, S., and Razin, A. 1990. Cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for the cpG DNA methylase from *Spiroplasma* sp. Strain mq1(m.Ssi). *Nucleic Acids Res.* 18, 1145-1152.
- Roberts, R. J., Vincze, T., Posfai, J., and Macelis, D. 2015. REBASE--a database for DNA restriction and modification: Enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 43, D298-299.
- Sohn, J. H., Kwon, K. K., Kang, J. H., Jung, H. B., and Kim, S. J. 2004. *Novosphingobium pentaromativorans* sp. nov., a high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from estuarine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54, 1483-1487.
- Stamatakis, A. 2006. Raxml-vi-hpc: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics.* 22, 2688-2690.
- Xu, M., Kladde, M. P., Van Etten, J. L., and Simpson, R. T. 1998. Cloning, characterization and expression of the gene coding for a cytosine-5-DNA methyltransferase recognizing gpc. *Nucleic Acids Res.* 26, 3961-3966.
- Yang, J.-A., Kwon, K. K., and Oh, H.-M. 2017. Complete genome sequence of flavobacteriales bacterium strain uj101 isolated from a xanthid crab. *Genome Announcements.* 5.

Table 1. Lists of gene sequence.

> cl CP012023.1_cds_IMCC12053_1885_1885 [gene=IMCC12053_1885] [protein=modification methylase] [protein_id=ALI55832.1] [location=1851233..1852333] [<i>Celeribacter marinus</i> IMCC12053]
ATGACGACGAAAAACAGTGAGGCAGCCACAGAGCTGCCGCTAAACCAGATTCTTGGTGGCGA TTGCATCGAGATTATGAACAGCCTTCCCGAAGGATCTGTTGACCTGATCTTTGCAGATCCCCCG TATAACCTACAGCTGCGCGGTGATCTTCACCGCCCTGACAATTCCAAAGTTGACGCCGTTGAC GACGATTGGGATCAGTTCGATAGCTTTAAGGTCTATGACAACTTTACCCGCGATTGGCTTGCCG CCGCGCGCCGTGTCCTCAAACCGAACGGTGCGATTGGGCGATTGGCTCATATCACAACGTGT ACCGCATGGGCGCCGAGCTCCAGAACCAAGGTTTCTGGATTCTGAATGACGTTGTGTGGCGC AAATCGAATCCGATGCCGAACCTTCGGGGCAAACGATTACCAATGCCACGAAACCATATC TGGGCGTCCAAAAACGAAGCCGCGAAATACACGTTCAACTATGAGGCGCTCAAGTCGTTGAA TGAGGGTATTGAGATGCGCTCCGATTGGGTCTTGCCGATTTGTAACGGTGGCGAACGTCTCAA AAATGAAGACGGCGAAAAAGCGCACCCAACGCAAAAACCCGAAAGCTTGTTGCACCGTATT CTGGTTGGCAGCACCAATCCCGCGCATGTGGTGCTTGACCGGTTCTTTGGCAGGGGCACAAC CGGCGCTGTGGCCAAAATGCTAGGCCGTGAGTTCATCGGCATCGAGCGCGAATCCAAATACCG CGAAGTTGCTCAAAAACGCATCGACGCCGTGCGCAAGTTCGACAAAGACGCGTTGCGTGTCT CCACGTCCAAGCGCGCCGAACACGTGTGCCGTTGCGCCAGTTGGTTGAGCGTGGCATGTTG CGTCCGGGTGAGGAGTTGTCTCCCTGAACGGTCGTCGCACGGCAAAGGTACGCGCAGATGG AACTCTTGTGTCCAACGATGTCAAAGGGTCCATTCATCAGGTCGGTGCACATCTTGAGGGCGC GCCCTCGTGCAATGGCTGGACGATTGGACGTTCAAACGGGATGGAAAACAGGTTCCGATTG ATGTGCTTCGTCAACAAATCCGCGCGGAGATGAAGTAG
>g 937545064 g ALI55832.1 modification methylase [<i>Celeribacter marinus</i> IMCC12053]
MTTKTREAA TELPLNQILGGDCIEIMNSLPEGSVDLIFADPPYNLQLRGDLHRPDNSKVDVAVDDD WDQFDSFKVYDNFTRDWLAAARRVLKPNGAIWAIGSYHNVYRMGAELQNQGFWILNDVVWRK SNPMPNFRGKRFTNAHETIIWASKNEAAKYTFNYEALKSLNEGIQMRSDWVLPICNGGERLKNE DGEKAHPTQKPESLLHRILVGTTPGDDVLDPPFGTGTGAVAKMLGREFIGIERESKYREVAQKR IDAVRKFDKDALRVSTSKRAEPRVPFGQLVERGMLRPGEELSSLNGRRTAKVRADGTLVSNDVKG SIHQVGAHLEGAPSCNGWTYWTFKRDGK QVPIDVLRQQIRAEMN
> cl CP009291.1_cds_J159_02550_448 [gene=J159_02550] [protein=modification methylase] [protein_id=AIT78768.1] [location=548358..549491] [<i>Novosphingobium pentaromativorans</i> US6-1]
ATGGGGCAGGTACTCGTCAAGGAAAGAATTCGTGCGCGCGCGCTGCGCCGACGCCGAAGG AACTGCTGCCGCTGGGTCA GATCATTCCCGGTGACTGCATCGAGGCGATGCGTACCATTCCC GATGCTTCGGTGGACATGGTCTTCGCCGATCCGCCGTACAACCTGCAGCTGGGAGGCGATCT

TTCGCGGCCGGATGGCAGCCACGTCGATGCCGTGACCGACGACTGGGACAAGTTCTCCAGCT
TCGCCGCCTATGACAAGTTTACGCGAGACTGGTGACCGAAGCACGCCGCGTGCTCAAGCCG
GAAGGCTCGCTGTGGGTGATCGGTTCTGACCACAACATCTTCCGCCTCGGCGCGATCATGCA
GGACATGGGCTTCTGGATCCTCAACGACATCGTGTTGGCGCAAGGCCAACCCGATGCCGAACT
TCAAGGGGACCCGCTTACCAACGCGCACGAGACGCTGATCTGGGCCTCGATGGGCGAGAA
GTCGAAGTACACCTTCAATTACCGCGCGATGAAGACCCTCAACGACGAACTGCAGATGCGTT
CGGACTGGGTGCTGCCGATCTGTGGCGGGCAGGAGCGGCTCAAGAAAGGTGGCCGCAAGGT
TCACCCGACGCAGAAGCCAGAAGCGCTGCTCTACCGCGTGATGCTGGCCACGACCAACAAG
GGCGACGTCGTGCTCGACCTTCTTCGGTACCGGCACCAACCGGCGCTGTCGCCAAGCGCCTG
GGCCGCGACTGGATCGGTTGCGAGCGGGAATCCGACTATCGCGATGCGGCCATGGAACGCA
TCGAGATGGCGCTGGAACCTCGACGAGTCGGCGCTCAAGACGATGCAGTCCAAGCGCAGTGC
ACCCAAGGTTGCCTTCGGAACGCTGGTCGAAACCGGCTGGATTGCGCCGGGCACGCAGATCT
TCGACAAGAAGCGCCGTTTCACCGCCACCGTGCGCGCCGACGGCTCGCTCGTCGCGGGCGAT
GCCAACGGTTTCGATCCATGGCGTGGGTGCCCAGCTTCAAGGGCGCGCCCTCGTGCAATGGCTG
GACGTTCTGGCATCTCGAGCATGAGGGCGAGATCAAGCCGCTGGATTTCGATCCGCCAGCTCT
ACCTGCTTGCCACCGAGCCGTGA

>gi|698179243|gb|AIT78768.1| modification methylase [*Novosphingobium pentaromativorans* US6-1]

MGQVLVKERIRARAPAPTPKELLPLGQIIPGDCIEAMRTIPDASVDMVFADPPYNLQLGGDLSPD
GSHVDAVTDDWDKFSSFAAYDKFTRDWLTEARRVLKPEGSLWVIGSYHNIFRLGAIMQDMGFWI
LNDIVWRKANPMPNFKGTRFTNAHETLIWASMGEKSKYTFNYRAMKTLNDELQMRSDWVLPIC
GGQERLKKGGRKVHPTQKPEALLYRVMLATTNKGDVVLDPPFGTGTGAVAKRLGRDWIGCER
ESDYRDAAMERIEMALELDESALKTMQSKRSAPKVAFGTLVETGWIAPGTQIFDKRRFTATVRA
DGSLVAGDANGSIHGVGAQLQGAPSCNGW TFWHLEHEGEIKPLDSIRQLYLLATEP

Table 2. Gene-specific primers used for PCR for cloning open reading frames for methylases in this study.

Gene	Direction	Sequence	Size (bp)
<i>Celeribacter marinus</i> IMCC12053	Forward	5'-TGACGACGAAAACACGTGAGGC-3'	1,098
	Reverse	5'-AGTTCATCTCCGCGCGGATTG-3'	
<i>Novosphingobium pentaromativorans</i> US6-1	Forward	5'-TGGGGCAGGTACTCGTCAAGG-3'	1,131
	Reverse	5'-ACGGCTCGGTGGCAAGCAGG-3'	

Table 3. Thermal cycles in the PCR for cloning inserts in the experiment.

Temperature	Time	Cycles
95°C	5 min	
95°C	30 sec	25 cycles
58,60°C	30 sec	25 cycles
72°C	1 min	25 cycles
72°C	10 min	

Table 4. Characteristics of restriction enzyme sites.

Gene	Restriction enzyme	Site
<i>Celeribacter marinus</i> IMCC12053	KpnI	5'-GGTACC-3'
		3'-CCATGG-5'
	PstI	5'-CTGCAG-3'
		3'-GACGTC-5'
<i>Novosphingobium</i> <i>pentaromativorans</i> US6-1	SphI	5'-GCATGC-3'
		3'-CGTACG-5'
	SalI	5'-GTCGAC-C'
		3'-CAGCTG-5'

Table 5. Methylation sensitive restriction enzyme for genomic DNA preparations.

Methylation sensitive restriction enzyme	Site	Methylation Sensitivity
Mbo I	5'-GATC-3' 3'-CTAG-5'	dam methylation: Blocked
		dcm methylation: Not Sensitive
		CpG Methylation: Impaired by Overlapping
Msp I	5'-CCGG-3' 3'-GGCC-5'	dam methylation: Not Sensitive
		dcm methylation: Not Sensitive
		CpG Methylation: Not Sensitive

* Msp I can cleave the sequence when the internal C residue is methylated.

Table 6. Methylation sensitive restriction enzyme for plasmid DNA preparations.

Methylation sensitive restriction enzyme	Site	Methylation Sensitivity
Mlu I	5'-ACGCGT-3' 3'-TGC GCA-5'	dam methylation: Not Sensitive
		dcm methylation: Not Sensitive
		CpG Methylation: Blocked
Pvu I	5'-CGATCG-3' 3'-GCTAGC-5'	dam methylation: Not Sensitive
		dcm methylation: Not Sensitive
		CpG Methylation: Blocked

Table 7. Sequence motif elements flanking m4C (N⁴-methylcytosine) and m6A (N⁶-methyladenosine) modifications in the IMCC12053 genome.

Gibbs program (v3.1) was used for collecting DNA sequences (10 base pairs long window size) and motif elements occurring greater than 50% of the time was used for visualization of the patterns. Methylated bases are shown in black letters.

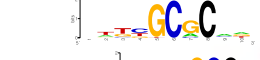
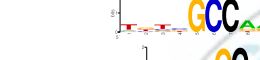
Motif Element	Left End	Right End	No. Motifs	Avg. Score (-10 LogP)
	-9	0	43	25.7
	-8	1	44	24.7
	-7	2	70	25.1
	-6	3	10	23.4
	-5	4	439	25.4
	-3	6	172	25.7
	-2	7	19	25.3
	-1	8	9	28.1
	0	9	19	27.8
	-9	0	65	51.9
	-8	1	35	51.9
	-4	5	1537	59.8
	-3	6	1110	59.3
	-2	7	11	26.2
	-1	8	9	21.8
	0	9	8	25.5

Table 8. Sequence motif elements flanking m4C (N⁴-methylcytosine) and m6A (N⁶-methyladenosine) modifications by in the US6-1 genome.

Gibbs motif elements (10 base pairs long window size) occurring greater than 50% of the time was used for visualization of the patterns.

Motif	Left	Right	No.	Avg. Score
Element	End	End	Motifs	(-10 LogP)
	-19	0	22	24
	-18	1	22	22.5
	-17	2	49	23.2
	-16	3	34	22.9
	-15	4	12	22.1
	-14	5	20	22.6
	-13	6	28	23.4
	-12	7	69	23.4
	-11	8	7	24
	-9	10	16	23.2
	-8	11	21	23.6

	-7	12	13	23
	-6	13	7	20.7
	-5	14	17	21.8
	-4	15	11	22.1
	-3	16	18	24.6
	-2	17	28	23.4
	-1	18	13	23.5
	0	19	20	22.8
	2	21	82	35.5
	3	22	76	33.8
	4	23	63	31.9
	5	24	100	37.8
	6	25	42	34.7
	7	26	43	36.1
	8	27	35	32.3
	9	28	2157	39.9
	10	29	6	25.7

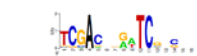
	13	32	13	25.2
	14	33	10105	36.5
	15	34	24	24.4
	16	35	11	25.3
	17	36	28	32.9
	18	37	34	33.8
	19	38	30	32.9
	20	39	25	35.3
	21	40	34	32.9

Table 9. Comparison of DNA methyl transferases among some strains from Alphaproteobacteria subdivision.

Organism	Locus tag	Description	CDD result	Comment
<i>Caulobacter vibrioides</i> NA1000	CCNA_00382	adenine-specific methyltransferase		CcrM
	CCNA_00869	Type II restriction enzyme, methylase subunits		adenine methyltransferase with an associated restriction enzyme domain
	CCNA_01085	DNA-cytosine methyltransferase		
	CCNA_03741	DNA-cytosine methyltransferase		
<i>Novosphingobium pentaromativorans</i> US6-1	AIT78768	DNA modification methylase		restriction endonuclease subunit M
	AIT79233	Type II restriction enzyme, methylase subunit YeeA		Annotated as "lactate dehydrogenase"
<i>Celeribacter marinus</i> IMCC12053	IMCC12053_1885	DNA modification methylase		
	IMCC12053_605	Predicted N ⁶ -adenine-specific DNA methylase		
	IMCC12053_2040	DNA modification methylase		
	IMCC12053_3116	DNA modification methylase		
<i>Celeribacter baekdonensis</i> B30	B30_03115	adenine-specific methyltransferase		
	B30_06546	Predicted N ⁶ -adenine-specific DNA methylase		
<i>Celeribacter indicus</i> P73	P73_0385	adenine-specific methyltransferase		
	P73_4804	DNA-cytosine methyltransferase		
	P73_2233	Predicted N ⁶ -adenine-specific DNA methylase		
	P73_4799	C-5 cytosine-specific DNA methylase		

Table 10. Methylation sensitive restriction digestion of genomic DNA preparation.

	Restriction digestion	
	Mbo I	Msp I
<i>Celeribacter marinus</i> IMCC12053	-	-
<i>Novosphingobium pentaromativorans</i> US6-1	+	-

Table 11. Methylation sensitive restriction digestion of plasmid DNA preparation.

	Digestion with	
	Mlu I/Pvu I	Mlu I/Pst I
<i>Celeribacter marinus</i> IMCC12053	+	-

Celeribacter marinus IMCC12053



Novosphingobium pentaromativorans US6-1



Fig. 1. DNA insert site of pQE30 vector.

IMCC12053 and US6-1 were cloned using respective restriction enzymes.

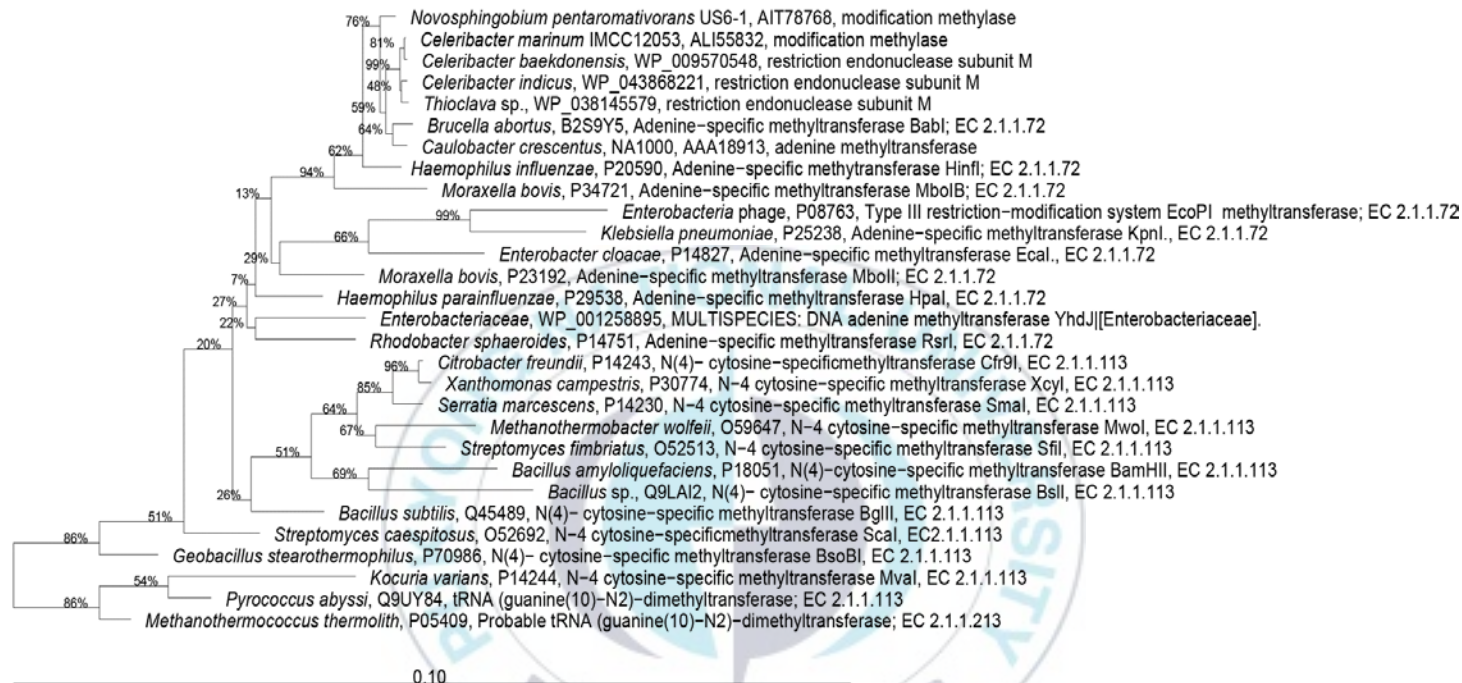


Fig. 2. Phylogeny of CcrM methyltransferases from Alphaproteobacteria with other groups of bacteria and archaea.

Nine uppermost enzyme sequences represents Alphaproteobacterial CcrM sequences and they grouped with high boot strap value (94%) with CcrM from *Caulobacter crescentus* NA1000; others with EC number 2.1.1.113 are methylases with N⁴-cytosine methyltransferase activities and they are listed in Rebase database (Roberts, et al., 2015). Tree was drawn with RAxML (version 7.3.4) with 29 amino acid sequences with 431 distinct alignment patterns with 100 rapid bootstrap for ML search. Gaps and undetermined characters were 62.69% and 161 amino acids were used for each sequence. Substitution matrix was LG using fixed base frequencies was exploited for the calculation of to an accuracy of 0.1000000000 Log Likelihood units.

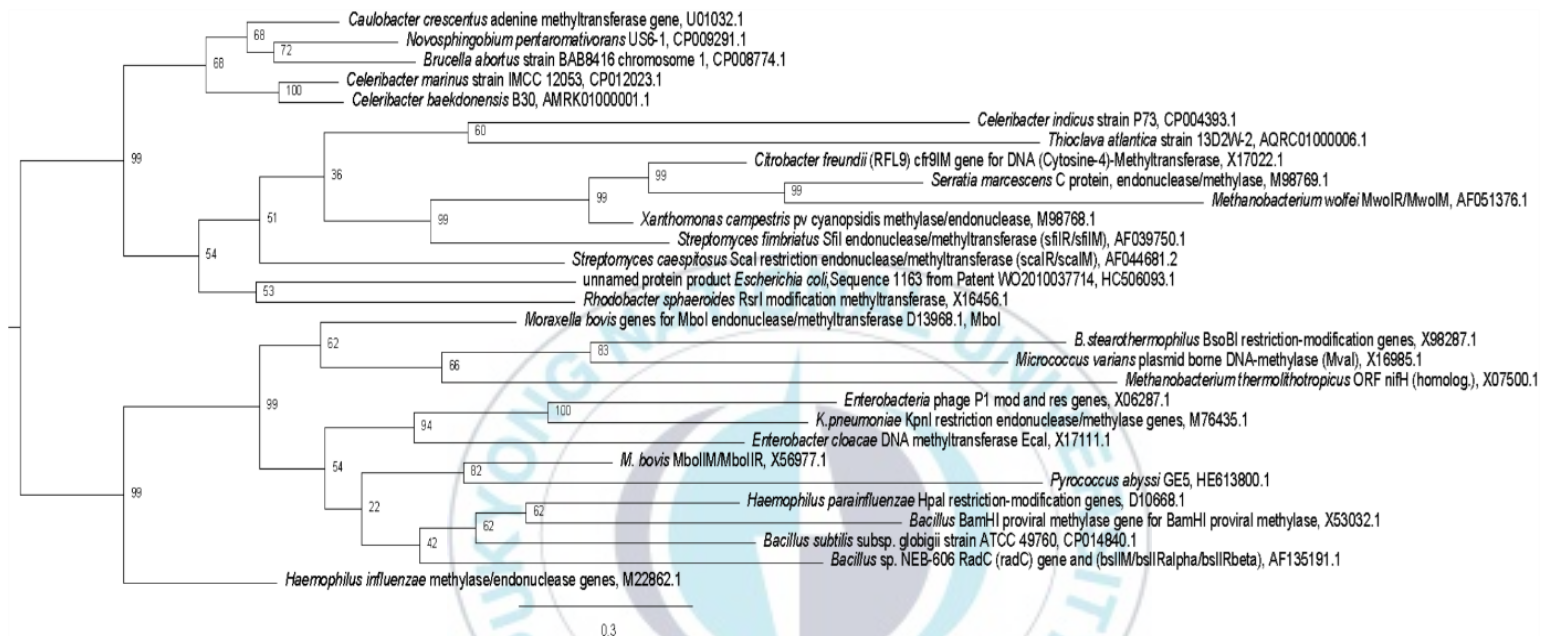


Fig. 3. Bayesian Inference Tree of Protein-encoding DNA sequence of IMCC12053_18853 (GenBank Accession : ALI55832).

Five uppermost enzyme sequences represents Alphaproteobacterial CcrM grouped with *Caulobacter crescentus* NA1000 (68% probability). CcrM sequences formed a distinct sister clade of other restriction endonucleases/methylases with high probability value of 99%; Others group are methylases with N4-cytosine methyltransferase activities. Tree was drawn with MrBayes 3.2 with 29 DNA sequences and probabilities in percentage are shown at nodes.

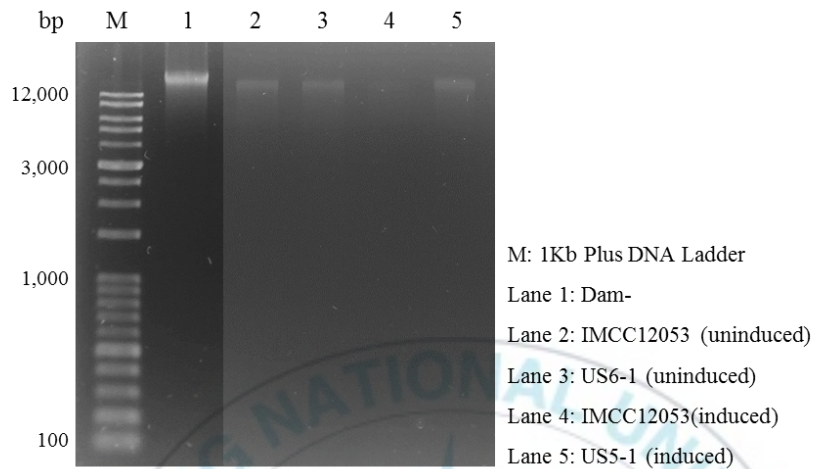


Fig. 4. Genomic DNA isolated before and after IPTG Induction.

Samples was purified using the PureHelix Genomic DNA Prep Kit (Column type) (cat. GCTN50, NanoHelix Co. Ltd), and each sample was analyzed on a 1% agarose gel.

1kb Marker from DM3200 (SMOBIO, Hsinchu, Taiwan).

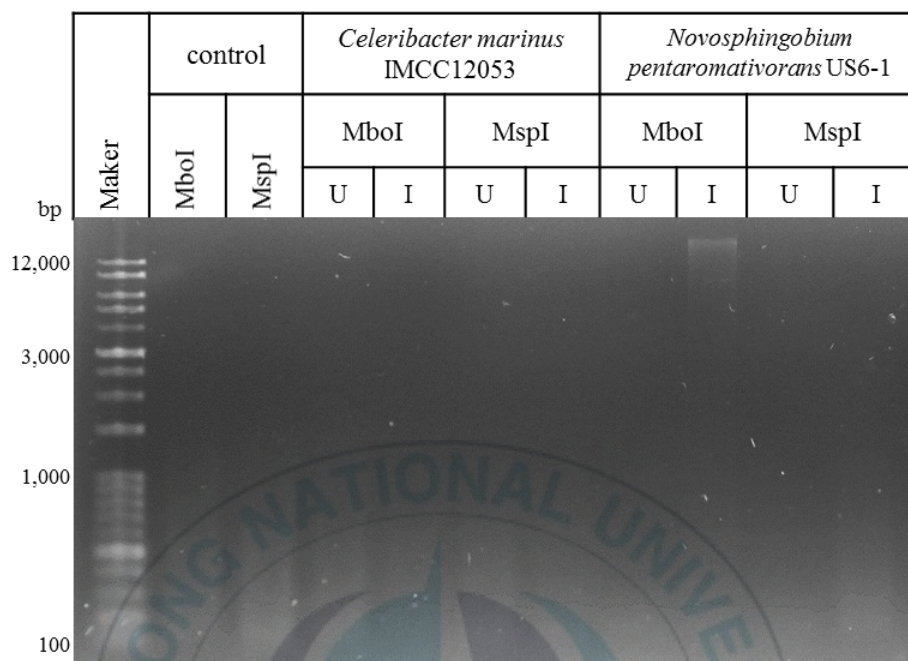


Fig. 5. Methylation sensitive digestion of genomic DNA preparations of wild-type (Eberhard, et al., 2001) *dam*-/dcm- Competent *E. coli*, *C. marinus* IMCC12053_1885 (ALI55832) and *N. pentaromativorans* US6-1 AIT78768.

Dam- strain was used as a control. *N. pentaromativorans* US6-1 clearly indicates the adenine methylation activity of the cloned gene. SYBR stained 1% agarose gel.

1kb Marker from DM3200 (SMOBIO, Hsinchu, Taiwan).

*U: Uninduced, I: Induced

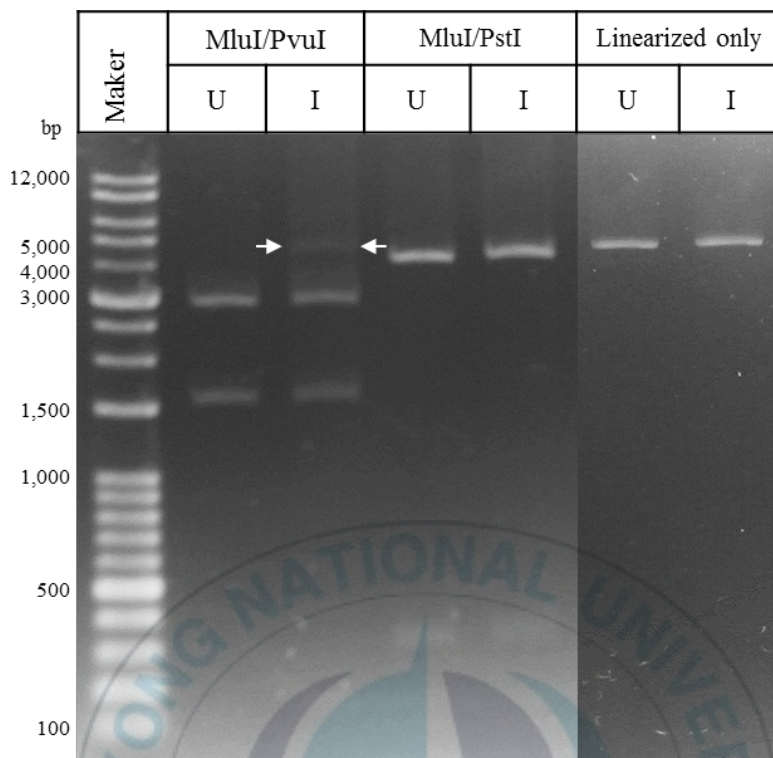


Fig. 6. Methylation sensitive digestion of plasmid DNA preparations of wild-type *dam*⁻/*dcm*⁻ Competent *E. coli*, *C. marinus* IMCC12053.

For linearization, two enzymes were used for digestion. Hemi-methylated or partially methylated bands can be identified in Mlu I/Pvu I and CpG methylation occurred in CGATCG (Pvu I).

Pst I was used for linearized only. SYBR stained 1.2% agarose gel.

1kb Marker from DM3200 (SMOBIO, Hsinchu, Taiwan).

*U: Uninduced, I: Induced

Acknowledgement

직장생활을 하다가 그만두고 다시 학생이 되어 석사학위를 선택하기까지 수없이 많은 생각과 고민이 있었는데 어느덧 2년이라는 시간이 흘러 석사 학위를 수여받게 되었습니다. 결코 쉽지는 않은 선택이었지만, 현재의 선택을 후회 없이 이끌어 갈 수 있게 해 주신 저의 지도교수님이신 오현명 교수님께 감사의 말씀 드리고 싶습니다. 실험에 어려움을 겪을 때마다 교수님께서 무한한 피드백을 해주신 덕분에 이렇게 졸업을 하게 되었습니다. 다시 사회에 나가 직장생활을 할 때 교수님의 조언을 바탕으로 이전보다 나은 직장생활을 할 수 있을 것 같습니다.

저의 대학원 생활 동안 수업시간에 많은 논문을 접하고 발표하기까지 많은 도움을 주신 제재영 교수님께도 감사의 말씀 전합니다. 교수님 덕분에 더 많은 논문을 접하게 되었습니다.

또한 논문이 완성되기까지 아낌없는 격려와 조언으로 심사를 해주신 조영근 교수님과 이정호 박사님께도 감사의 말씀 드립니다.

제가 졸업하기까지 옆에서 많이 힘이 되어준 동기 준학오빠와
정안오빠에게도 감사의 말씀을 전합니다.

힘들 때마다 거제에서 부산까지 찾아와주고 힘이 되어준 친구
들 제쑈, 지애 그리고 민지야 고마워 너희 덕에 내가 여기까지
올 수 있었어.

마지막으로 우리 가족들 너무 감사합니다. 끝까지 믿고 지켜봐
준 우리 엄마와 아빠, 오빠 모두 감사합니다.

논문이 나오기까지 도와주신 모든 분들에게 감사의 말씀 전합
니다. 앞으로도 더 나은 사람이 되도록 노력하겠습니다. 감사합
니다.

