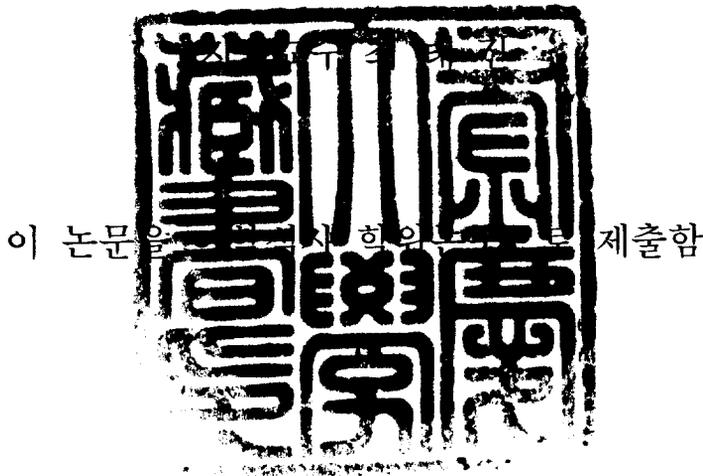


이학석사 학위논문

암상태에서 배양한 *Chlorella vulgaris*의 DEGs  
(Differentially Expressed Genes) 분석



2006년 2월

부경대학교 대학원

미생물학과

이 경 규

# 이경규의 이학석사 학위논문을 인준함

2005년 12월

주 심 농학박사 이 원 재 

위 원 이학박사 김 군 도 

위 원 이학박사 최 태 진 

# 목 차

<b>Abstract</b> .....	1
<b>I. 서론</b> .....	2
<b>II. 재료 및 방법</b> .....	4
<i>Chlorella vulgaris</i> FC001의 서로 다른 조건에서의 배양 .....	4
Total RNAs의 분리 .....	4
First-strand cDNAs의 합성 .....	5
ACP-based GeneFishing™ PCR .....	6
DEGs의 Cloning 과 Sequencing .....	6
<b>III. 결과</b> .....	7
<i>Chlorella vulgaris</i> 의 배양과 Total RNAs의 분리 .....	7
ACP-based GeneFishing™ PCR .....	10
DEGs의 Cloning 과 Sequencing .....	14
DEGs의 분석 .....	14
<b>IV. 고 찰</b> .....	36
<b>V. 요약</b> .....	39
<b>VI. 감사의 글</b> .....	40
<b>VII. 인용 문헌</b> .....	41

Differentially expressed gene (DEG) analysis of *Chlorella vulgaris*  
cultured under dark condition

.Kyoung Gyu Lee

Department of Microbiology, Graduate School,  
Pukyong National University

Abstract

*Chlorella* is an unicellular green algae that shares many metabolic pathways with higher plants, which offers many advantages as an expression system of foreign protein. Recent expression of fish growth hormone in biologically active form using transformed *Chlorella* suggested possible application of the system. However, thick cell wall of *Chlorella* hinder the purification of expressed recombinant protein. As one approach to solve this problem, a transformation vector containing signal peptide in front of target genes were desirable. As the first step to find a signal peptide from *Chlorella*, differentially expressed genes (DEGs) were screened from *Chlorella vulgaris* cultured in the dark condition using GeneFishing™ system. From the analysis, 34 units of DEGs were discovered and 14 of them were specific in *Chlorella* cultured in dark condition. Among the 14 DEG products, 10 showing clear difference were cloned and sequenced. Comparison of these sequences with those in the GeneBank revealed that the cloned DEGs have high homology to the chloroplast inner envelope protein, serine:glyoxylate aminotransferase, phenylalanine-tRNA synthase, rubisco binding-protein alpha subunit, ATP-dependent Helicase, Ribosome-associated protein precursor, oxidoreductase, enoyl-CoA hydratase/isomerase, phenylalanyl-tRNA synthetase, classIIc, chloroplast omega-6 desaturase.

# I. 서론

클로렐라는 단세포의 진핵 녹조류로 최근 들어서 가장 각광받고 있는 생물이며 식품뿐만 아니라 의약품등의 여러 분야에서 이용 또는 연구가 활발히 진행되고 있다. 클로렐라는 광합성을 통하여 에너지를 생산하기 때문에 일정량의 빛과 탄소원만 있으면 값싸게 대량 배양이 가능하여 다른 진핵생물보다 경제적이며, 배양공정이 간단하고 환경에 대한 영향도 많이 받지 않아 배양이 용이하다.

진핵생물인 클로렐라는 glycosylation과 같은 post-transcriptional modification과정을 거치기 때문에 당단백질이나, 크고 복잡한 구조를 가진 단백질의 발현에 한계가 있는 원핵생물보다 우수하며, 이종 진핵생물의 단백질을 형질 전환 시킬 경우 생물학적 활성을 지닌 단백질을 만들 수 있다. 클로렐라의 형질전환은 오래전부터 연구되어왔고, 동종 또는 이종 단백질의 일시적인 발현은 1990년대부터 보고 되었으며 인간의 성장호르몬을 클로렐라에 일시적으로 발현시킨 보고도 있었다 (Hawkins and Nakamura. 1999). 최근에는 일시적인 발현이 아닌 안정적으로 낚치의 성장 호르몬을 *Chlorella ellipsoideae*에서 발현시킨 연구가 보고 되었다 (Cannons *et al.* 1991, Dawson *et al.* 1997, Kim *et al.* 2002).

일반적으로 세포 내에서 발현된 단백질은 목적하는 기관으로 이동하거나 세포 밖으로 분비되어 그 기능을 수행하게 되는데, 이런 일을 할 수 있도록 하는 것이 signal sequence (peptide), 혹은 leader sequence (peptide)이다. 이것은 발현되는 단백질의 N-terminal 앞부분에 위치하는 18 ~ 30개 정도의 아미노산으로 N-domain, H-domain 그리고 C-domain으로 구성되어 있으며, N-domain은 arginine이나 lysine과 같은 양전하를 띄는 아미노산으로 구성되어 극성을 나타내는 domain이며, H-domain은 alanine이나 leusine으로 구성된 소수성 domain으로  $\alpha$ -helix를 이루어 막전이가 용이하게 도와주는 domain이며, C-domain은 signal

peptidase가 인식하여 signal peptide와 발현단백질을 분리하는 역할을 한다.

클로렐라는 단단한 세포벽구성 성분인 셀룰로즈 때문에 내부에 발현된 외래 단백질의 분리와 정제가 까다롭고 (Ozaki *et al.* 2003), 장시간 발현하더라도 세포 내부에 발현된 외래 단백질의 수율은 높아지지 않는 단점이 있다. 따라서 앞에서 언급한 signal peptide를 외래 단백질의 발현에 적용하면 발현된 외래단백질은 쉽게 분리할 수 있고, 발현된 단백질이 세포 내부에 축적되지 않고 외부로 분비되기 때문에 수율도 높일 수 있는 장점이 있다. 이미 signal peptide를 적용하여 진핵 생물 뿐만 아니라, 원핵생물 등에서도 외래 단백질의 발현과 분비에 관한 연구가 보고 되어있다 (Heng *et al.* 2005, Johnson *et al.* 2003, Kikuchi *et al.* 2004).

클로렐라의 signal peptide에 관한 연구의 첫 단계로 *Chlorella vulgaris*를 이용하여 Differentially Expressed Gene(DEG) 분석을 실시하였다 . DEG는 서로 다르게 발현되는 유전자를 말하며 같은 생물이라 하더라도 다른 조건 하에서는 발현되는 유전자의 차이가 나타나며, 이는 mRNA의 발현에 차이를 보이게 된다 (Kim *et al.* 2004). 예를 들어 항생제나 중금속 같은 물질이 있는 환경에서 배양된 클로렐라는 일반적인 환경에서 자란 클로렐라와는 달리 항생제나 중금속에 견디기 위해서 특별한 물질을 생산할 것이며 (Al-Qunaibit *et al.* 2005), 배양 온도나 CO<sub>2</sub>의 농도 등을 달리하면 이에 관련된 유전자가 발현될 것이며 (Fukuzawa *et al.* 1990, Huner *et al.* 1993), 빛이 없는 곳에서 자란 클로렐라는 광합성을 하지 못하기 때문에 광합성에 관련된 유전자의 발현은 줄어들고, 광호흡에 관련된 유전자의 발현이 증가할 것이다 (Bajguz and Asami. 2004, Falk and Samuelsson. 1992, Greer *et al.* 1986).

본 연구에서는 클로렐라의 signal peptide를 밝히기 위한 연구의 첫 단계로 *C. vulgaris*를 암배양하여 발현의 차이를 보이는 유전자를 GeneFishing™ PCR system을 이용하여 DEGs를 선별하여 염기서열을 밝히고 분석하였다.

## II. 재료 및 방법

### *Chlorella vulgaris*의 명배양과 암배양

*C. vulgaris* (strain No. KMCC FC-001)는 부경대학교에 소재하는 한국해양 미세조류은행에서 분양받았다. 명배양은 MBM (modified Bold's medium)배지에서 광 : 암 비율을 16 : 8 시간으로 조절하였고 광량은 2000 Lux, 배양온도는 25℃로 설정하였다 (Kim *et al* 2002). 암배양은 MBBM (modified Bold's basal medium, MBM배지에 0.5% sucrose와 0.1% bactopectone을 첨가)배지에서 암상태에서 24시간동안 배양하고 나머지 배양조건은 명배양과 동일한 조건으로 배양하였다 (Cho *et al.* 2002).

### Total RNAs의 분리

*C. vulgaris* FC-001의 DEG 분석을 위해서 total RNA분리는 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하였다. 배양한 *C. vulgaris* FC-001을 원심분리하고 균체만 수거하여 액체질소와 glass bead를 혼합하여 막자와 사발을 이용하여 균체를 파쇄한 후 1.5 ml tube에 100 mg씩 담고 각 tube에 1 ml의 TRIzol reagent를 첨가하고 피펫으로 잘 혼합시켰다. 상온에서 5 분간 반응 후 Chloroform 200  $\mu$ l를 첨가하고 15 초간 잘 혼합하고 12,000 rpm에 20 분간 원심분리 하였다. 원심분리하면 3가지 층이 생기며, 가장 위에 있는 맑은 상층액을 조심스럽게 새 tube에 옮기고 0.5 volume의 isopropanol을 첨가하고 가볍게 혼합해준 후 12,000 rpm에 10 분간 원심분리한 후, pellet만 남기고 상층액을 제거하

였다. 여기에 70% Ethanol을 300  $\mu$ l 첨가하여 12,000 rpm에 5 분간 원심분리하고, 공기 중에서 말려준 후 50  $\mu$ l의 DEPC가 처리된 멸균증류수에 녹였다.

암배양과 명배양한 *C. vulgaris*를 같은 방법으로 total RNA를 분리하였으며 실험은 따로 진행했고  $6.0 \times 10^8$  cell로 같은 수의 cell을 사용하였다. 실험에 사용한 실험기구와 시약은 건열멸균과 DEPC 처리를 하여 RNase free한 기구와 시약을 사용하였다. 분리된 total RNAs는 formaldehyde RNA gel 전기영동으로 확인하였다.

## First-strand cDNAs의 합성

*C. vulgaris*에서 분리된 total RNAs에서 first-strand cDNAs를 만들기 위해서 reverse transcriptase를 사용하였으며 reverse transcription은 전체 반응액 20  $\mu$ l중에 분리된 3  $\mu$ g의 total RNA과 4  $\mu$ l의 5  $\times$  reaction buffer (Promega, Madison, WI, USA), 5  $\mu$ l의 dNTPs (each 2 mM), 2  $\mu$ l의 10  $\mu$ M dT-ACP<sup>TM</sup> (5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIIIIT(18)-3'), 0.5  $\mu$ l의 RNasin<sup>®</sup> RNase Inhibitor (40 U /  $\mu$ l; Promega), 그리고 1  $\mu$ l의 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (200 U /  $\mu$ l; Promega)를 넣고 42 $^{\circ}$ C에서 1 시간 30 분간 반응하여 first-strand cDNAs를 합성하였다. 암배양과 명배양한 *C. vulgaris*는 같은 방법으로 first-strand cDNA를 합성하였고, 실험은 각각 따로 수행하였다. GeneFishing<sup>TM</sup> PCR을 하기 전까지 80  $\mu$ l의 ultra-purified water를 첨가하여, 희석된 반응액을 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

## ACP-based GeneFishing™ PCR

Differentially expressed genes은 ACP™-based PCR방법을 사용한 GeneFishing™ DEG kits (Seegene, Seoul, South Korea)으로 선별하였다 (Kim *et al.* 2004). Second-strand cDNA의 합성은 전체 반응액 20  $\mu$ l중에서 50 ng의 희석된 first-strand cDNA, 1  $\mu$ l의 dT-ACP (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ l의 10  $\mu$ M arbitrary ACP, 그리고 10  $\mu$ l의 2  $\times$  Master Mix (Seegene)를 사용하여 합성하였다. Second-strand cDNA를 합성하기 위한 first-stage PCR은 94  $^{\circ}$ C 에서 1 분 반응 후, 50  $^{\circ}$ C에서 3 분, 그리고 72  $^{\circ}$ C에서 1 분간 반응하였다. Second-strand cDNAs를 합성이 끝난 후 second-stage PCR은 94 $^{\circ}$ C에서 40 초간 반응, 65  $^{\circ}$ C에서 40 초, 그리고 72  $^{\circ}$ C에서 40 초간 40 cycles를 합성하였고, final extension은 72  $^{\circ}$ C에서 5 분 간 반응했다. 모두 40 가지의 ACP™ primer sets를 사용하였고 암배양과 명배양을 같은 ACP™ primers를 사용하여 같은 조건으로 PCR하여 2 % agarose gel에서 전기영동하여 DEGs를 선별하였다.

## DEGs의 Cloning 과 Sequencing

전기영동하여 확인된 DEG bands를 GENCLEAN® II Kit (Q-BIO gene, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 gel extraction하였고, TOPO TA cloning vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 cloning하였다. Cloning된 DEGs는 ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 sequencing하여 확인하였으며, 이 과정은 SeeGene에 의뢰하였다.

### III. 결과

#### ***Chlorella vulgaris*의 배양과 Total RNAs의 분리**

MBM배지에서 명배양한 *C. vulgaris*는  $6.8 \times 10^8$  cell이었고 MBBM배지에서 암상태에서 암배양한 *C. vulgaris*는  $9.5 \times 10^8$  cell이었다. TRIzol reagent (Invitrogen)를 이용하여 total RNAs를 분리하였고 흡광도를 측정하여 total RNAs의 농도를 계산하였으며 (Table 1), formaldehyde RNA gel 전기영동 total RNAs를 확인하였다 (Fig. 1).

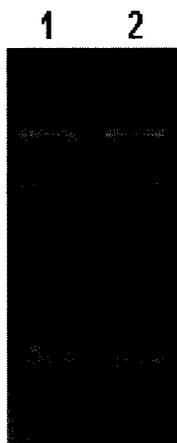


Figure 1. Formaldehyde gel electrophoresis of total RNAs.

Lane 1, total RNA isolated from *Chlorella vulgaris* cultured under dark condition, lane 2, total RNA isolated from *Chlorella vulgaris* cultured under light condition.

Table 1. Quality of RNAs isolated from *C. vulgaris* grown in the different conditions

No.	Condition	A260	A260/A280	Concentration ( $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ )	Total ( $\mu\text{g}$ )
1.	Light	19.325	1.98	0.773	46
2.	Dark	22.120	2.08	0.884	250

## ACP-based GeneFishing™ PCR

GeneFishing™ PCR에 사용한 40 sets의 ACP™ primers를 이용하여 PCR하고 2% agarose gel에서 결과를 확인했다. 40개의 primer sets는 20개의 primer sets로 나누어 2회 GeneFishing™ PCR을 수행했으며 1차 GeneFishing™ PCR의 결과를 agarose gel에서 확인하였다 (Fig. 2). 명배양에서만 발현된 DEGs 1, 2, 3, 6, 8 그리고 16번 band였고 명배양과 암배양에서 모두 나타났지만 명배양에서 상대적으로 발현양이 많은 DEGs 10과 13번 band였다. 암배양에서만 발현된 DEGs는 4, 5, 7, 12, 14, 그리고 15번 band였고 명배양과 암배양에서 모두 나타났지만 암배양에서 상대적으로 발현양이 많은 DEGs는 9과 11번 band였다. 이것들 중에서 암배양에서만 발현되는 DEGs와 암배양에서 더 많이 발현된 DEGs를 선별하였으며 이렇게 선별된 DEG bands 4, 5, 7, 9, 11, 12, 14 그리고 15번을 염기 서열 분석을 실시하였다.

2차 GeneFishing™ PCR의 결과를 agarose gel에서 확인 하였다 (Fig. 3). 명배양에서만 발현된 DEGs는 21, 23, 25, 26, 그리고 32번 band였고 명배양과 암배양에서 모두 나타났지만 명배양에서 상대적으로 발현양이 많은 DEG 산물은 20, 22, 27, 29, 31 그리고 34번 band였다. 암배양에서만 발현된 DEGs는 17번과 28번 band였고 명배양과 암배양에서 모두 나타났지만 암배양에서 상대적으로 발현양이 많은 DEGs는 18, 19, 24 그리고 30번 band였다. 이것들 중에서 암배양에서만 발현되는 DEGs와 암배양에서 더 많이 발현된 DEGs를 선별하였으며 이렇게 선별된 DEGs 17번과 28번 band를 염기 서열 분석을 실시하였다.

1차와 2차 GeneFishing™ PCR의 결과를 다시 정리하면, 전체 34개의 DEG bands가 확인 되었고 명배양에서 나타난 DEGs는 1차에서 8개와 2차에서 12개, 합해서 20개의 DEGs가 나타났고, 암배양에서 나타난 DEGs는 1차에서 8개 2차에

서 6개, 합해서 14개의 DEGs가 나타났으며 발현의 차이를 보기위해 암배양에서 나타난 14개의 DEGs 중에서 차이가 확실히 나는 10개의 DEGs를 선별하여 염기 서열을 분석하였다.

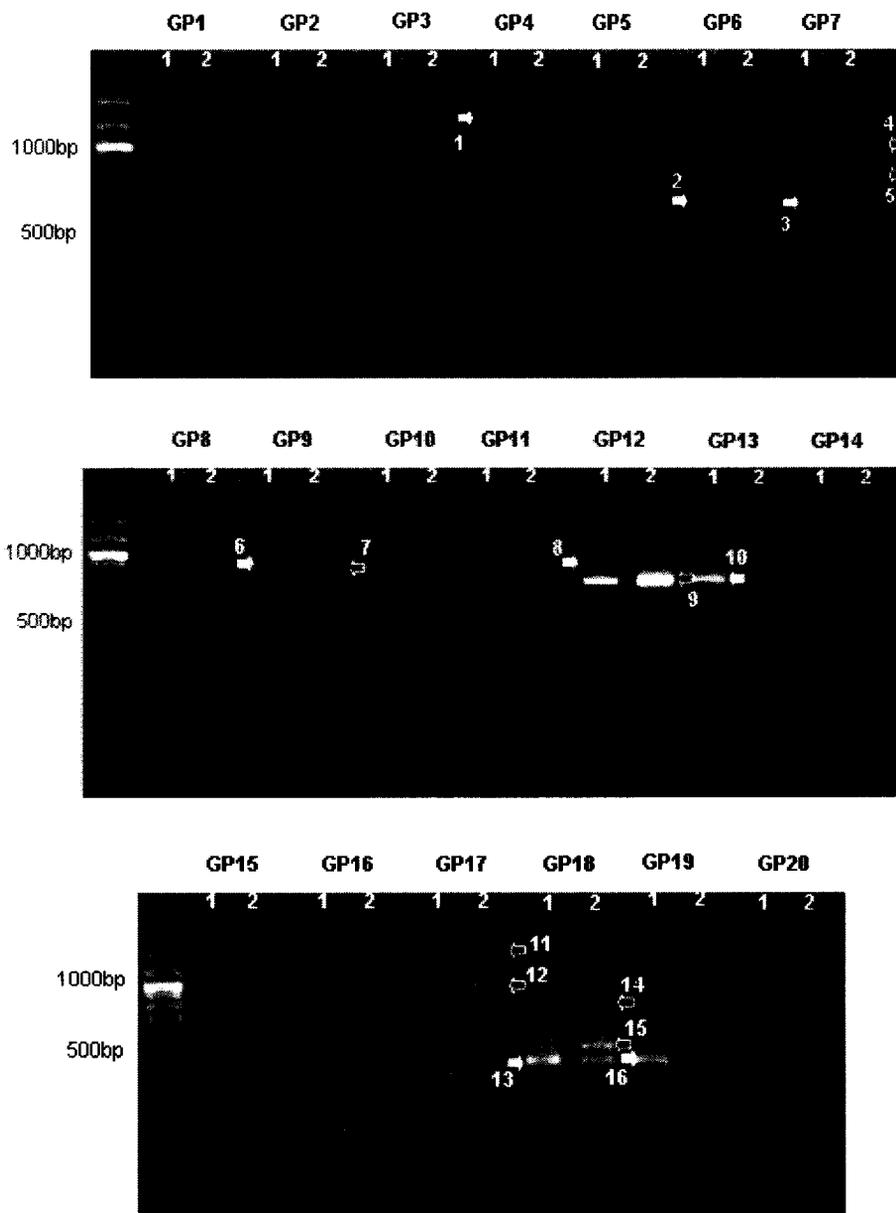


Figure 2. **Results of the first GeneFishing PCR for the identification of DEGs.**

The numbers designate name of specific primers after GP, lane 1, PCR products from RNA isolated from *Chlorella* cell cultured under light. Lane 2, PCR products from RNA isolated from *Chlorella* cell cultured under dark condition.

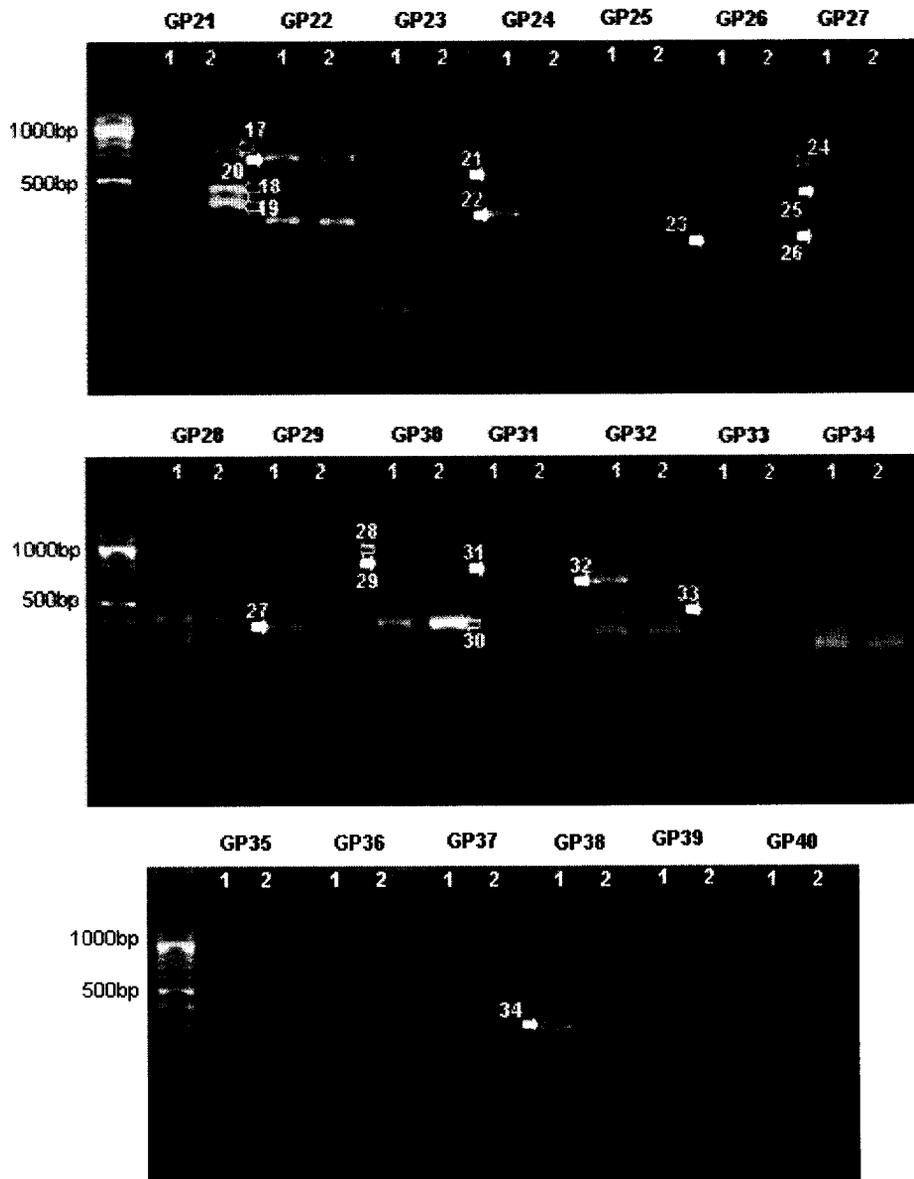


Figure. 3. Results of the second GeneFishing PCR for the identification of DEGs.

The numbers designate name of specific primers after GP, lane 1, PCR products from RNA isolated from *Chlorella* cell cultured under light. Lane 2, PCR products from RNA isolated from *Chlorella* cell cultured under dark condition.

## DEGs의 Cloning과 Sequencing

염기서열을 분석한 10개의 DEGs는 NCBI에서 제공하는 Blast X와 Blast N을 이용하여 GeneBank의 database와 alignment하여 각각의 DEG가 어떤 기능을 가진 유전자인지 분석을 실시했다 (Altschul *et al.* 1990). 서론에서 언급했듯이 클로렐라에 대한 연구가 많이 이루어지지 않아서 클로렐라의 유전정보와 DEGs의 유전정보를 직접 비교하여 분석할 수는 없었지만 DEGs와 높은 상동성을 나타내는 유전자들만 선택하여 분석하였다 (Maki *et al.* 2000). 높은 상동성을 나타내는 유전자들과 DEGs는 GENEDOC 프로그램을 이용하여 multiple alignment를 하였다.

## DEGs의 분석

DEG 4는 953bp의 염기서열이 분석되었으며 3' 부분에 poly A tail이 있으며 Blast X에서 분석한 결과는 Rice Chromosome 10 Sequencing Consortium (2003)에서 보고된 *Oryza sativa* (japonica cultivar-group)의 chloroplast inner envelope protein과 가장 높은 상동성을 보였다 (Fig. 4). Chloroplast inner envelope protein의 전체 길이는 988 amino acid이고 이중에서 824번째 아미노산부터 988번째 아미노산까지가 DEG 4의 2번째 핵산부터 493번째 핵산이 translation된 164개의 아미노산이 일치하였다. 이뿐만 아니라, *Pisum sativum*, *Arabidopsis thaliana*, *Xanthomonas axonopodis* 등의 chloroplast inner envelope protein과 높은 유사성을 보였으며 GENEDOC 프로그램을 이용하여 multiple alignment를 하여 높은 상동성을 확인할 수 있었다. 따라서 DEG 4는 chloroplast inner envelope protein이라고

분석되었으며, 이것은 chloroplast inner envelope protein이지만 특이하게도 chloroplast 자체에서 유전정보로 가지고 있는 것이 아니라 chromosome이 유전정보를 암호화 하고 있음이 밝혀져 있는 protein이다. DEG4는 GeneFishing™ PCR에서 명배양에서도 소량 발현되지만 암배양에서 발현되는 양이 증가함을 알 수 있다 (Fig. 2). DEG 4는 암배양에서 증가하는 이유는 광합성을 하지 않는 암배양 상태에서 클로렐라는 분열하기 때문에 chloroplast를 합성하기 위해서 암배양에서 발현양이 증가 했다고 판단되어진다.

**A**

```

GGATGTGGCGTGGCTGCTGGGCGACGACGTGGGGGCGCAGCTCTACCGCGCCGAGGTGGTGGAGCGCCTGTCCGACGGCA      80
CCGGCAACTTCTCCGGGAGCGCATGCTGCAGGAGCTGCCGGAGCAGCTGGGGCTGGACGCCAGCAAGGCGCAGAAGGTG      160
GTGACCGAGCTCGCCAAGGACAAGAAGCACACCACGCTGGTGCAGGCGGTGGCGTGCCTGCGGCAGAAGAAGGTGGGCGA      240
CACCGCCAAGCAGCTCAACAACCTGCTGTCTCGGAGACAGCGGTGCCAGCGGCAAGGCCAGGAGTGGAAAGGAGAAGG      320
ATGAGATTGCCGACCTCTCTCCGCTACGCTCCAAGGAGGCGGCGGGGAGAAGCAGGACGCGGTGCAGCGCATCTGTG      400
GGCCTGTCCGACTTTGGAGCCGACGGCCTGCCGCCATCGTGCAGGAGGCGGGCTGGAAGCTGGCGGCGAGGAGCAGCA      480
GGAGACTGCCTTTTTTAAGGCAGCCGCCCTGCATGCCAAGCGCAAGTGAAGTACTGCTTGGACAGTGGTCTGTGCAG      520
CCGCTGGGCCGGGAGCCCTGCCACCGCCTGGTAGGGCAACCAACGCTCGGAGCGCCGCCATTAGTGCACCTCCCGGC      640
CCAGGCTTGCCCTTACACCGGCGGCGCCGTGCCATTGCGCGGCCCGCTCTGCTGCCCCCTGCCGATTTTATTGC      720
CTCTTTCCGCTCTGTGTTGCTGGCTCCCATTCTTCTTACCCAGCTGCCTGTGCGGCACGGCTTGTGCCCCACACA      800
GACTCCCATGGCAGCGGAATGCGATGGCATGCACCCCCACATACTCTTTGTCTGCGGTGAACACACCCCTCGGACA      880
CGTCTGTCTTACGCACCGCAGCCATACCACAGCACTGTAAACACAGCATAACGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

**B**

```

      *           20           *           40           *           60
_1DEG4   : DNAS LGDD GAQLY AENVRLSDTGNFSASRRLQELLEC G---- DASH --- QK : 52
_2Oryza  : QDLS LAEP LNLY AVEE S EDC E E P VVKI E A I ---- N A S --- S : 52
_3Pisum  : DLDS VSVS RETIF AVGDI S GTC F E P VYK I E L N ---- N K S --- S : 52
_4Arabidop : SLDL IAVS LRKKE L E VSD I S ETC E E T V Y G T I E S L S ---- D V E --- S R : 52
_5Xanthomo : SALP YQRI L T L A P D T D A L E G R E D A L T D L L A A R M A L A R D E L G E A S A L A A A R Y D A G H : 60
      s6 6 4 v s g t g f y p L 6 K A

      *           80           *           100          *           120
_1DEG4   : VVTE AKDKKHTT V E ---- V A C E Q R V G D T A K O E N S C E T A V F S G K A Q E E K E K D : 108
_2Oryza  : EVQD AKTF E D N A V ---- V A L E Q R N K D E V A R L D A A C D A A V P A S K P T P M P T E G : 108
_3Pisum  : VYCE A N F S S E I ---- V A L E Q R N H K G V S E L N A A C K A V E S - Q T S M E V S E E : 107
_4Arabidop : VVHD A S K S S V ---- V A L E Q R N S K G V L E L D A A C D K A V E A - E P T M E V S E E : 107
_5Xanthomo : V D M P T E G Q Y H R V E E R R Q R Q D E R G L A P A A R D F M A A A E P -- D D G A A Q -- R G R D : 116
      6v 6a L Q AvALLRq LN 6Lac avp w 2

      *           140          *           160           *
_1DEG4   : A A L S A V S K E A R E H O D A V R I L S E F E D G R R I V E E G W K L A E R Q O E T A F : 164
_2Oryza  : I D E L G L Y K T I K K E R S E L Q L N I S E E K G Q I R D A A S A C T L V A T E R E D E L V F : 164
_3Pisum  : S L L T I A K D S E R S L D L I N E S T A A L R D S E D S L L E A E E K F V F --- : 160
_4Arabidop : L S E A L S K E D P A S K V L R L L L I D E S T A L R E H E D C A L S A A E G N E V F - : 161
_5Xanthomo : V A L E A A Q A S R Q A A D F H F D D A L Q S E Q A Q L L P G A A S I V Q A Q A I A R A R D A Q R P - : 171
      6 D15 y ek q LG d A r g e
    
```

Figure 4. Nucleotide sequence of DEG clone number 4 (A) and Comparison of amino acid sequence deduced from DEG clone number 4 with proteins in data base (B). *Oryza* : *Oryza sativa* (japonica cultivar-group), *Pisum* : *Pisum sativum*, *Arabidop* : *Arabidopsis thaliana*, *Xanthomo* : *Xanthomonas axonopodis*, amino acid sequence alignment.

DEG 5는 739bp의 염기서열이 분석되었으며 3' 부분에 poly A tail이 있으며 Blast X에서 분석한 결과는 *Methylococcus capsulatus*의 serine:glyoxylate aminotransferase와 가장 높은 상동성을 보였다 (Ward *et al.* 2003). Serine:glyoxylate aminotransferase의 전체 길이는 394 amino acid이고 이중에서 312번째 아미노산부터 394번째 아미노산까지가 DEG 5의 2번째 핵산부터 250번째 핵산이 translation된 82개의 아미노산이 일치하였다 (Fig. 5). 이 외에도 *Methylobacterium dichloromethanicum*, *Fritillaria agrestis*, *Glycine max* (soybean), *Rubrivivax gelatinosus* 등의 serine:glyoxylate aminotransferase와도 높은 유사성을 보였으며 GENEDOC 프로그램을 이용하여 multiple alignment를 하여 높은 상동성을 확인할 수 있었다. 따라서 DEG 5는 serine:glyoxylate aminotransferase이라고 분석되었으며, 광호흡과정의 key enzyme으로 밝혀졌으며 기능은 L-serine과 glyoxylate를 hydroxypyruvate와 glycine으로 전환시키는 기능을 한다. DEG 5는 명배양에서는 나타나지 않다가 암배양에서 발현됨을 GeneFishing™ PCR에서 확인할 수 있다. 이것은 광합성을 할 때에는 발현되지 않다가 광호흡을 하게 되면 발현된다고 해석할 수 있으며 암배양에서 특이적으로 발현되는 가장 핵심 DEG라고 할 수 있다.

A

```

GGACTCGCAGAAGGTGGTGGACGTGGCATAACCAAGTACAACCTGTCCCTGGGCATCGGCCTGGCGGATGTCAAGGGCA 80
AGGTGTTCCGCATCGGCCACCTGGGCAACATGGACGAGCTCATGCTCTCCTCTGCGCTCTGCGGC GCGGAGATGGCGCTG 160
ATCGACGCGGGCGTGCCGGTACAGCCAGCGAGCGGGCGTGTCCGGCGCCATTGAGTACTGGCAGCAGACCTCCAAGCCAT 240
CCCCACCCGGGAGCACATGCTGGCGTGAGGCCCCAGCAGGGACACACGCACCTAAACTTGCACTGCTATGCTGCCGGCG
CACGGACCAGCTCGGGTGCCTTGACAGCAGTGCACCCCGCCGCGAGCGTGACGCCACACCGGGCGCCGCTGGCCCGC 400
AAACTAATGGCTTTGCCTCTCTTTCTCCTCTCCCTTGCTAAGATCCGCGGCACGTATGCCCCCTCCCCAGCTCTCTCCCT
TCAGTTAATGCACCCTCTGACTGCTATGCTCTGGTGAATTCGTTGAGATGCAATGCACCCGCCACAACCAACACACAC 520
ACCCCATCTGCTCCCCCTGCACGTCGGCTCGCCATGTGTGCGATTTTCATCCCGCCGCTTCAGAACACTGTGGGCCCT
GTTATTTGCATACCTACCCTGCGCCACCCTCTTTCTGCTCACTGTTGTACAACAACGCTCCGCTGTAACCTGACAGAAT 720
TGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

B

```

      *           20           *           40           *           60
_1DEG5   : DQK  DV  A  S  A  AD  K  M  SS  C  A  A  A  : 60
_2Methylob : LAAK  H  V  A  A  SQ  A  S  DE  H  S  N  K  : 60
_3Fritilla : DSE  R  S  N  A  Q  CC  S  V  V  K  Y  : 60
_4Glycine : DTE  R  S  N  A  Q  LC  V  I  K  Y  : 60
_5Rubriviv : HVID  DV  S  A  S  A  M  LE  A  S  R  : 60
      d 66 A5 4YNLsLG GL VaGKVFRIGH6G161EL 61g 6 G EM 6 D G 6

      *           80
_1DEG5   : T  SR  IE  W  Q  SK  P  E  : 83
_2Methylob : T  AA  SS  I  REN  PLAKA  -- : 81
_3Fritilla : KL  AA  AT  L  ON  ST  PM  E  R  : 83
_4Glycine : KL  AA  SA  L  D  HI  P  M  E  E  : 83
_5Rubriviv : E  AA  Q  K  F  R  HD  N  V  E  K  : 82
      GSGVaaA Y p

```

Figure 5. Nucleotide sequence of DEG clone number 5(A) and Comparison of amino acid sequence deduced from DEG clone number 5 with proteins in data base (B). Methylob : *Methylobacterium dichloromethanicum*, Fritilla : *Fritillaria agrestis*, Glycine : *Glycine max* (soybean), Rubriviv : *Rubrivivax gelatinosus* amino acid sequence alignment.

DEG 7은 736bp의 염기서열이 분석되었으며 3' 부분에 poly A tail이 있으며 Blast X에서 분석한 결과는 *Arabidopsis thaliana*의 tRNA synthetase protein과 가장 높은 상동성을 보였다 (Duchene *et al.* 2005). tRNA synthetase protein의 전체 길이는 435 amino acid이고 이중에서 257번째 아미노산부터 435번째 아미노산까지가 DEG 5의 1번째 핵산부터 537번째 핵산이 translation된 179개의 아미노산이 일치하였다 (Fig. 6). 이 외에도 *Oryza sativa*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Bos taurus* 등의 tRNA synthetase protein과도 높은 유사성을 보였으며 GENEDOC 프로그램을 이용하여 multiple alignment를 하여 높은 상동성을 확인할 수 있었다. 따라서 DEG 7은 tRNA synthetase protein이라고 분석되었으며, 암배양에서만 나타나는 특이적 DEG임을 GeneFishing™ PCR에서 확인할 수 있다.

**A**

```

CCCTTCACAGAGCCCTCCTATGAGCTGGAGATCTTCTTCAACGGCGAGTGGCTGGAGGTGCTGGGGTGC GGCGTGATGCA 80
GCAGCCCATCCTGGACAAGAACCTGGGGCCCGGCCAGAAAGCGTGGGCTTTCGGCCTGGGCGCTGGAGCGTCTGCCATGG 160
TGCTGTTTGACATCCCCGACATCCGCCTCTTCTGGACCGCCGACCAGCGCTTCTCAAGCAGTTCAAGGCGGGGGACCTC 240
ACCACCAAGTTCAAGCGGTACAGCAAGTACCCGCCCTGCTACAAGGACGTGGCCTTCTGGATCTCGGATGCCTTACC 320
GAACAACCTGTGCGAATTGTGCGCAGCGTGGCGGGCGACCTGGCGGAGGAGGTGAAGCTCATCGACAACCTCACGCACC 400
CCAAGACGGGCGCCACCAGCCACTGCTACCGCATCGCGTACCGCAGCATGGACCGGTGCTAACGGATGAGGAGATCAAC 480
GCGCTGCAGGAGGAGTCCGACGACCAATTGCCGACAAGCTCAAGGTGGAGCTGCGGTGAGGGCAAGGCCAGCAGCGT 520
CCCCTCCACTTGTAGCCTCGCTTGTCTCCAATCATTGCGCGCTGCGTACACATCCCGTTTTGGCCTTGTACTCTCC 640
CCTCCGTGCCTCTACTCTTCTTCTTCTCTGCTCTCGAGGCCCAACGGCTGCTTGTCAAAAAAGATGGAGACAAAA 720
AAAAAAAAAAAAAAAA

```

**B**

```

          *          20          *          40          *          60
_1DEG7 : [REDACTED] NGE [REDACTED] DKNLGGGQK [REDACTED] : 60
_2Arabidop : [REDACTED] KED [REDACTED] QSGLENNV [REDACTED] : 60
_3Oryza : [REDACTED] QDD [REDACTED] NNRIINNV [REDACTED] : 60
_4Schizosa : [REDACTED] DKKK [REDACTED] GASLNNYTG [REDACTED] : 60
_5Bos : [REDACTED] NHE [REDACTED] NSAGAOERIG [REDACTED] : 60
PFT PS526EI 5 WLE6LGC GV 2q 66 g WAFG6GLERLAM6L5dIPD

          *          80          *          100          *          120
_1DEG7 : [REDACTED] QFELERKAD [REDACTED] TTKKYPN [REDACTED] CYKQARH [REDACTED] SDA [REDACTED] LGEVFS [REDACTED] AGI : 120
_2Arabidop : [REDACTED] ERFSS [REDACTED] SEGRGELGVK [REDACTED] K [REDACTED] CYKQ [REDACTED] SDA [REDACTED] LGEVFS [REDACTED] AGI : 120
_3Oryza : [REDACTED] KRFSS [REDACTED] SESEK [REDACTED] GVRK [REDACTED] K [REDACTED] CYKQ [REDACTED] SDA [REDACTED] LGEVFS [REDACTED] AGI : 120
_4Schizosa : [REDACTED] ERFSS [REDACTED] FLPNK [REDACTED] ST [REDACTED] E [REDACTED] A [REDACTED] K [REDACTED] A [REDACTED] N [REDACTED] N [REDACTED] D [REDACTED] N [REDACTED] E [REDACTED] N [REDACTED] E [REDACTED] Y [REDACTED] E [REDACTED] D [REDACTED] C [REDACTED] Q [REDACTED] I : 119
_5Bos : [REDACTED] ERFSS [REDACTED] L [REDACTED] ERV [REDACTED] D [REDACTED] N [REDACTED] Q [REDACTED] K [REDACTED] O [REDACTED] L [REDACTED] L [REDACTED] S [REDACTED] A [REDACTED] V [REDACTED] I [REDACTED] N [REDACTED] L [REDACTED] S [REDACTED] E [REDACTED] R [REDACTED] E [REDACTED] N [REDACTED] T [REDACTED] E [REDACTED] R [REDACTED] L [REDACTED] Y [REDACTED] D [REDACTED] V [REDACTED] T [REDACTED] G [REDACTED] G [REDACTED] I : 120
IRLFW3 D RP QF 6 kFkP SK5P c kd6 FW6 SteN1 e66R 6 gD

          *          140          *          160          *
_1DEG7 : [REDACTED] NETH [REDACTED] H [REDACTED] A [REDACTED] S [REDACTED] D [REDACTED] T [REDACTED] D [REDACTED] E [REDACTED] N [REDACTED] A [REDACTED] Q [REDACTED] E [REDACTED] R [REDACTED] S [REDACTED] T [REDACTED] A [REDACTED] [REDACTED] L [REDACTED] E : 179
_2Arabidop : [REDACTED] Q [REDACTED] I [REDACTED] N [REDACTED] K [REDACTED] K [REDACTED] E [REDACTED] L [REDACTED] H [REDACTED] [REDACTED] V [REDACTED] S [REDACTED] E [REDACTED] S [REDACTED] T [REDACTED] D [REDACTED] E [REDACTED] N [REDACTED] D [REDACTED] S [REDACTED] K [REDACTED] R [REDACTED] D [REDACTED] E [REDACTED] V [REDACTED] Q [REDACTED] K [REDACTED] N [REDACTED] L [REDACTED] E : 179
_3Oryza : [REDACTED] V [REDACTED] [REDACTED] I [REDACTED] N [REDACTED] I [REDACTED] N [REDACTED] K [REDACTED] M [REDACTED] H [REDACTED] [REDACTED] A [REDACTED] S [REDACTED] E [REDACTED] S [REDACTED] T [REDACTED] D [REDACTED] E [REDACTED] N [REDACTED] D [REDACTED] L [REDACTED] W [REDACTED] N [REDACTED] R [REDACTED] E [REDACTED] V [REDACTED] Q [REDACTED] K [REDACTED] N [REDACTED] L [REDACTED] E : 178
_4Schizosa : [REDACTED] V [REDACTED] S [REDACTED] N [REDACTED] A [REDACTED] Q [REDACTED] T [REDACTED] A [REDACTED] S [REDACTED] L [REDACTED] N [REDACTED] S [REDACTED] E [REDACTED] R [REDACTED] N [REDACTED] E [REDACTED] R [REDACTED] N [REDACTED] E [REDACTED] K [REDACTED] Q [REDACTED] K [REDACTED] E [REDACTED] N [REDACTED] R [REDACTED] V [REDACTED] A [REDACTED] N [REDACTED] S [REDACTED] N [REDACTED] L [REDACTED] E : 177
_5Bos : [REDACTED] V [REDACTED] E [REDACTED] K [REDACTED] D [REDACTED] L [REDACTED] I [REDACTED] K [REDACTED] E [REDACTED] H [REDACTED] P [REDACTED] H [REDACTED] H [REDACTED] N [REDACTED] H [REDACTED] V [REDACTED] T [REDACTED] E [REDACTED] R [REDACTED] E [REDACTED] L [REDACTED] L [REDACTED] S [REDACTED] Q [REDACTED] R [REDACTED] E [REDACTED] G [REDACTED] G [REDACTED] H [REDACTED] Q [REDACTED] A [REDACTED] Q [REDACTED] E [REDACTED] A [REDACTED] A [REDACTED] V [REDACTED] R [REDACTED] O [REDACTED] G [REDACTED] V [REDACTED] E [REDACTED] G [REDACTED] E : 179
6vE V LID 5t K g TShCYR6 5RsMer3L eE6 6q 6r L VE1R

```

Figure 6. Nucleotide sequence of DEG clone number 7(A) and Comparison of amino acid sequence deduced from DEG clone number 7 with proteins in data base (B). Arabidop : *Arabidopsis thaliana*, Oryza : *Oryza sativa*, Schizosa : *Schizosaccharomyces pombe*, Bos : *Bos taurus* amino acid sequence alignment.

DEG 9는 665bp의 염기서열이 분석되었으며 3' 부분에 poly A tail이 있으며 Blast X에서 분석한 결과는 *Chlamydomonas reinhardtii*의 rubisco subunit binding- protein alpha subunit과 가장 높은 상동성을 보였다 (Thompson *et al.* 1995). Rubisco subunit binding- protein alpha subunit의 전체 길이는 580 amino acid이고 이중에서 479번째 아미노산부터 580번째 아미노산까지가 DEG 9의 3번째 핵산부터 308번째 핵산이 translation된 102개의 아미노산이 일치하였다 (Fig. 7). 이 외에도 *Oryza sativa*, *Canavalia lineata*, *Pisum sativum* 등의 rubisco subunit binding-protein과도 높은 유사성을 보였으며 GENEDOC 프로그램을 이용하여 multiple alignment를 하여 높은 상동성을 확인할 수 있었다. 따라서 DEG 9는 rubisco subunit binding- protein alpha subunit이라고 분석되었으며, rubisco (ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase)는 캘빈회로에서 5탄당 (ribulose bisphosphate, RuBP)에 CO<sub>2</sub>를 결합시켜 2개의 3탄당 (3-phosphoglycerate, 3-PGA)을 만드는 효소로 암반응에서는 가장 흔하고, 대표적인 효소이다.



DEG 11는 1305bp의 염기서열이 분석되었으며 3' 부분에 poly A tail이 있으며 Blast X에서 분석한 결과는 *Arabidopsis thaliana*의 ATP-dependent RNA helicase와 가장 높은 상동성을 보였다 (Kaneko *et al.* 1998). ATP-dependent RNA helicase의 전체 길이는 558 amino acid이고 이중에서 230번째 아미노산부터 390번째 아미노산까지가 DEG 11의 66번째 핵산부터 557번째 핵산이 translation된 179개의 아미노산이 일치하였다 (Fig. 8). 이 외에도 *Oryza sativa*, *Tetraodon nigroviridis*, *Bos taurus* 등의 ATP-dependent RNA helicase과도 높은 유사성을 보였으며 GENEDOC 프로그램을 이용하여 multiple alignment를 하여 높은 상동성을 확인할 수 있었다. 따라서 DEG 11는 ATP-dependent RNA helicase라고 분석되었다.

**A**

```

CTGTGGCGCTGGCGCAAGGAGAGGGGGCACAACCCGAGCGCGCCAGCAAGGCGCTGCACCCAGCGAGTATGGTCCAG 80
CGCACACCTAGCACGCTGCAGATCCAGTACACCGTGAGCGAAGCAGGGATGAAGCTGCCACAGCTGTTGCGTTCCTCCA 160
GGACCATCGGGCGGAGAAGCATTGTTTACTTCTTACCTGTGCCTGCGTGGACTTTGTTTCAGCTGTGCTGCCGCGGC 240
TGCCACAGTGAAGATGCTTTCTGTGAAGGCACTGCATGGCAAGATGAAGCAGGCAGCCCGTCTGCCACGCTATCTTCA 320
TTTGAGAGGGACCCCTCGGTGTGCTGCTGTGCACAGACGTGGCGGCACGGGGCCTGGACATTCAGATGTGCAGTGGAT 400
TGTGCGATTCGACCCACCACAGGACCCGAGTGCCTTTGTGCACAGAGTGGGGCGCACAGCCCGCATGGGACGCGCGGCA 480
ACGGCGTGGTGTACCTGCTACCACATGAAGTCAAGTACGTGCGACTTCTCCGAGTGGCGAAGATCCCCTGCAACAAGGG 520
CGCGCGCTGCAGAACTTGCCAAACATACAGCCAACCCCTACAGCGGCTGGCAGAGACTGACCGGGCTGATCATGGAGGCA 640
GGCACCAGGGCGTTGTGAGCTACGTGCGCGCTACAAGGAGCACCCTGCAAGTTCATCTTCAGGCCACAGGACCTGGC 720
ACTTGCCCGGCTGGCCTCAGCATTGCGCTGCTTAGGCTGCCACGCATGCCTGAGATCAAGCAGGGGGGAAGGGCTTG 800
AAGGCTTACCCCTCGGAGTGGACCCAGACAGTCCGGTTTCGAGACAAGGCACGAGAGAAACAGGCCAGGCCGTT 880
TGCAAGCAGCAGGCAAGAAGCAGCAGGCAGCATTGGAGCAGCCGAGGCCAGCAGCGACCCGACAGGCAGCGCTGCA 960
GCCCGAGGTGCACCTGCCAGTGCCAAGCGCGCAAGCAGCGGGAGCGGGAGGACATGGCTGAGATGGAGAGAGGCTGGG 1140
CTTTGCTGCGCGGCTGCCGCGGGGGCCCTTTCAGAGGCTGAATGGCGCGGAGATGGGGCGACAGCAGCGACTGA 1220
AGCGGTACCCGCGCCAGCAGCGCTGCCTCATCGCGCGCATCCTGGTCAAAGGTGCATCAAGGTGCTGCCAACTGCATG 1300
CAGCACAGAGGTAGCAGTCCGAGTTTTTATTTGCTGTTATTCCTGGCAGACTTGCCTGCACACCCTGCTGAATAG
CCCAAGCATGAAAAAAAAAAAAA

```

**B**

```

      *           20           *           40           *           60
_1DEG11 : EGAQPERGQOGAAPPASMVCSPTFTQIQITWSEAGMLLPDIAEIQDAAETPTVYLL : 60
_2Arabidop : AVADLAKAGLRNAMEPESKSPSSGYCKEKADQFSSQIHLITENNKPLVYFPM : 60
_3Oryza : DGAQQELGPS-----FTLGLRLKATLCAASNSSQIDFVGNNGKIPVYAT : 50
_4Tetraodo : ITVKEKGAEKGA--EAAVGTEGRSNYTIQRSEDFNHIAEIRGKHEINLWFS : 58
_5Bos : LRNPVIRISVKEKGVAAASSTGPTPSRENHIVCKKDEFPNKHHEIRNKQEHVHFS : 60
      a          4Tps L Y c a K qLV FL K 6V5F T

      *           80           *           100          *           120
_1DEG11 : AAVQVSAVPRIPQCMEISKALITPKAAIAATLSEAEAP : 120
_2Arabidop : AGLVSKPTLSSEFFSTVADNGETALAEAEAS : 120
_3Oryza : AVQVPAIVPLDSLGSPIIPYPTFNGPEKALASALS : 110
_4Tetraodo : EYGRRAIET--LKANVCCVPRKDE--NKIIEFRSEK : 115
_5Bos : AAEGKALLET--VGVKMCVPRKYK--NKIIFMERKIQ : 117
CACV 5 L 6 K HGRmk R F SG6L6CTDV ARG6D

      *           140          *           160          *
_1DEG11 : IIDQQTVEPDTQDPSAPVHEVPTAFHRSVAWVITLHEVSTDFINVKKPLQ : 179
_2Arabidop : IEGEYVQVYVDFQDDVETHEVSEAFMERQRAVYVTKTDVDFIPLRVVLO : 179
_3Oryza : IYHRELQVDFEQLNVFVHFAVFAFYDQVAVKQKEDVDFEYRKGVELT : 169
_4Tetraodo : IIDENNYVDFEISSANFVHFCVPTAFINQVNDVDFVDMEESTNFFSINQKCP : 174
_5Bos : IIEENNYVDFEISSANFVHFCVPTAFINQVNDVDFVDMEESTNFFSINQKCP : 176
IP 6 66Q5DPP F6HR GRTAR G A6V5L6P E Y6 F6 2

```

Figure 8. Nucleotide sequence of DEG clone number 11(A) and Comparison of amino acid sequence deduced from DEG clone number 11 with proteins in data base (B). Arabidop : *Arabidopsis thaliana*, Oryza : *Oryza sativa*, Tetraodo : *Tetraodon nigroviridis*, Bos : *Bos taurus* amino acid sequence alignment.

DEG 12는 812bp의 염기서열이 분석되었으며 3' 부분에 poly A tail이 있으며 Blast X에서 분석한 결과는 *Chlamydomonas reinhardtii*의 ribosome-associated protein precursor와 가장 높은 상동성을 보였다 (Yamaguchi *et al.* 2003). ribosome-associated protein precursor의 전체 길이는 493 amino acid이고 이중에서 168번째 아미노산부터 369번째 아미노산까지가 DEG 12의 3번째 핵산부터 583번째 핵산이 translation된 183개의 아미노산이 일치하였다 (Fig. 9). 이 외에도 *Synechococcus elongatus*, *Nostoc punctiforme*, *Anabaena variabilis* 등의 ribosome-associated protein precursor와도 높은 유사성을 보였으며 GENEDOC 프로그램을 이용하여 multiple alignment를 하여 높은 상동성을 확인할 수 있었다. 따라서 DEG 12는 ribosome-associated protein precursor이라고 분석되었다.

A

```

GGGTGGAGGAGTACCTGGCGGCCAGGACCTGCCCTTACCCTGTTCCAGCCGCTCTACATCTACGGCCCCACACCGCC 80
AAGGACTGCGAGCAGTGGTTTATGGACCGGGTCTTCGCGACCGGCCTGTGCCATCCCCGGCCCCGGCATCCAGCTGAC 160
CAGCCTGAGCAACGTTGAGGACCTGGCTGACATGATGGCGCGGGTCCCGGCAACCCCGGGCCGTGCAGCAGCACTTCA 240
ACCTGTGCGAGCAGCGCTGCATCACCTTTGACGGCATCGTCAAGGCGGTGGCGGCAGCGGGGGCAAGGAGCCAAAGATT 320
GTGCACTACGACCCCAAGGCGCTGAAGCTGGGCAAGGAGAGGGCTTCCCTTCCGTGCGGTGCATCTTTCCTCTGC 400
GGACAAGGCCAAGCGCTGCTGGCTGGCAGCCGACCACTTCTCAAGGACGTGAACGAGCTGGTGGCGACTACA 480
TCGCCAGCGGCCCTGGACAAGGACATCGACTTCTCAGTGCAGACAAGATCCTTGGCGGGTGGCAAGTAACGACC 520
AATCAACTTTGCAACGCCACGCTTTTGGGGATAGCCAGCCGACGTGGCACATCACTGTCCACATGACATGCGACAGCCC 640
TCGGTCTAGTCAATGCCACCACCACCCCGTTTTCCCTCCTGCCCTCTGCCATCCGAGCACTGTTATTTGCTGCCCC 720
ACCCATCAGGTGCCAATCACTGATTTGATCTGGGCCCTGCCTGCGGCTTTGCCCTGTGAACACATGATGCCCAANAAAA 800
AAAAAAAAAAAA

```

B

```

_1DEG12 : V E S A R Q D V V Q V H T A K D C V M P P P C S S N : 60
_2Chlamydo : V T A E K A R V V Q V N T A K D C V M P P P C S S N : 60
_3Synechoc : - N S A O C A A G P G P P P P P P P P P P P P P P : 59
_4Nostoc : - E A L T G L S S I N T T T R R E C G P P P P P P P P P : 59
_5Anabaena : - E A L O O T G L P S I N T T T R R Y N D L S P P P P P P P P P : 59
      E 5L LP5T P YIYGP E WF DR66RDRP6p6Pg G6 6T L hv D

_1DEG12 : S A D M I A R M P P P A A C Q H E R I C S E C I T S D I V E X X X X X X X P E R K --- L V H D L K A I --- : 114
_2Chlamydo : S A S M L A A M P E P R A A S G H E R I C S E C I T S D I A F A I G K L L D D E --- L L S E E V G T G : 117
_3Synechoc : S A T A V A A K P R A A S G H E R I C S E C I T S D I A F A I G K L L D D E --- L L S E E V G T G : 116
_4Nostoc : S A K A T O H G T Q A G C G H E R I C S E C I T S D I A F A S A V A A P S E D A T K P H D K P E --- : 116
_5Anabaena : S A M I S O V E T Q A G C G H E R I C S E C I T S D I A F A C Q L L S A D D I K P H D K P E --- : 116
      6A 6 gN A6gQ 5N6 DR 63FdG6a4a a G4 p 66hYdk

_1DEG12 : K L S G E G P F A V I F A S A K R V G C Q H H F I K D N E L V R Y I A S G R L D D I D F S V D : 174
_2Chlamydo : K S S A E G P F T V V F A S A K R R G G K K H D F Q K D S G L N Y K A N G R D K E V D F S V D : 177
_3Synechoc : N L S S S A A D S I T A T C Q Q D E V R F S I D C S N S L S Y L A R G L L Q Q A V D F E L : 176
_4Nostoc : D F S R K A S V V H F E A S K K Q T E N H E Y L S G S N S L S Y L I N A K I Q A D V D E V : 176
_5Anabaena : D F S R K A S V V H F E A S K K Q T E N H E Y L S G S N S L S Y L A D A Y E D V A S G R L S E I D E S V : 176
      GK FP R HFFas lKA L W P 6 1 dk

_1DEG12 : L K I L A A V G K : 183
_2Chlamydo : L K I L A A L G K : 186
_3Synechoc : L E S L A A V S : 185
_4Nostoc : L E S L Q A L : 184
_5Anabaena : L E S L K A E S : 185
D 6

```

Figure 9. Nucleotide sequence of DEG clone number 12(A) and Comparison of amino acid sequence deduced from DEG clone number 12 with proteins in data base (B). Chlamydo : *Chlamydomonas reinhardtii*, Synechoc : *Synechococcus elongatus*, Nostoc : *Nostoc punctiforme*, Anabaena : *Anabaena variabilis* amino acid sequence alignment.

DEG 14는 651bp의 염기서열이 분석되었으며 3' 부분에 poly A tail이 있으며 Blast X에서 분석한 결과는 *Oryza sativa* (japonica cultivar-group)의 기능이 밝혀지지 않은 단백질 중 하나와 가장 높은 상동성을 보였다 (Fig. 10). 아직 기능이 밝혀지지 않은 이 단백질의 전체 길이는 239 amino acid이고 이 중에서 94번째 아미노산부터 231번째 아미노산까지가 DEG 9의 8번째 핵산부터 423번째 핵산이 translation된 139개의 아미노산이 일치하였다. 이 외에도 *Arabidopsis thaliana*, *Guillardia theta*에서도 높은 유사성을 보였으며 GENEDOC 프로그램을 이용하여 multiple alignment를 하여 높은 상동성을 확인할 수 있었다. 따라서 DEG 14는 다른 종에서도 염기서열은 분석되었지만 아직 기능이 밝혀지지 않은 단백질을 암호화하고 있다.

**A**

```

GGTGAAGGTGAACATGGACATCGACAAGGAGGTGTCCAAGTTTGC GCGGAACGCGGCCACCCACCTTTGCGCCGCGGCCA 80
GCGGGTCCACGGGAAGAACCCCGCTACAAGGGCAGCCTGCTGTACACCATCTTCGAGGTCCAGGCGTGGCCGCGCTG 160
GCTGTGGGCGGCTCCTGTCCCTTCAACCTGCTGCTACCTCGGATGAGCCCAACATCGCGCGCCTCATGGGCATGTGGTC 240
CATCTGGATGTTACCATCCCTCGCTGCGCGCCCGGAGTGCACCCAGGCCGAGAAGGATGCGCTCAACCTGCTGTTCC 320
TGGCCGTCCCCTGCTCAACGTGGCCCTGCCCTTTGTGTGGAAGTCCTTCCATTTCATCTTACCGCGGACTGCGCACTC 400
ATGGCGGGCGTGTATGCGTGAAGGGCTGATCCCGGCTCCCGGCGCGGCGAGCGGCGAGGAGGGCGAGCAGCAGAG 480
CTGAGGCTTGC GCGCGCTCACCACCCTGCGCAGTGACTTGATTTGCTATTTGGCCGCTCTTGTTCGACCCGCTCGCT 520
TCCCTTGTCTGTATTTTATACCTACTCCAGTCAACAGTTCAGTCATATGAGTGTAAAGGCTGANAACGAAAAAAAAA 640
AAAAAAAAAA
  
```

**B**

```

          *           20           *           40           *           60
_1DEG14 : VMIDDRVSRFARNATTFAPRASGKGNFAYKPSLLYEVWAAALLS : 60
_2Oryza : VPKIEKLNKAVQATTFAPRATAKNEASTALYEVGVASLSP : 59
_3Arabidop : SSSAVGKDLKVNKLALEAPRASKASNEASTPLKYEVLASFLV : 59
_4Guillard : -----gtrlRGALISL : 23
          k k a tfapas knpa g ly 6FevQ as6 6GG Ls5N

          *           80           *           100           *           120
_1DEG14 : LLESEDEPNRLMGHSTWHTTIPSLRARETQAEKXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXK : 120
_2Oryza : LVESEEDRLMGHSTWHTTIPSLRARETQAEKXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXK : 119
_3Arabidop : LLESEEDRLMGHSTWHTTIPSLRARETQAEKXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXK : 119
_4Guillard : VEPLTLDVPLAARAFGRWMLFTTIPSLRAVKPLGYPALGKPKGKKAALAFVITPL : 83
          6 ps ep 6 rlmgm5siwmfttipslrar c eke n k3

          *
_1DEG14 : EPELPTADCALMAGVYAWK : 139
_2Oryza : EYVWSDALWATVYAWK : 138
_3Arabidop : EYVWSDALWATVYAWK : 138
_4Guillard : tilpftkdpqilysvnl : 102
          f 6 Ad yawk
  
```

Figure 10. Nucleotide sequence of DEG clone number 14(A) and Comparison of amino acid sequence deduced from DEG clone number 14 with proteins in data base (B). *Oryza* : *Oryza sativa* (japonica cultivar-group), *Arabidop* : *Arabidopsis thaliana*, *Guillard* : *Guillardia theta* amino acid sequence alignment.

DEG 15는 336bp의 염기서열이 분석되었으며 3' 부분에 poly A tail이 있으며 Blast X에서 분석한 결과는 *Arabidopsis thaliana*의 enoyl-CoA hydratase/isomerase와 가장 높은 상동성을 보였다 (Fig. 11). Enoyl-CoA hydratase/isomerase의 전체 길이는 378 amino acid이고 이중에서 307번째 아미노산부터 378번째 아미노산까지가 DEG 15의 2번째 핵산부터 217번째 핵산이 translation된 72개의 아미노산이 일치하였다. 이 외에도 *Oryza sativa*, *Photobacterium luminescens*, *Chlorobium tepidum* 등의 enoyl-CoA hydratase/isomerase와도 높은 유사성을 보였으며 GENEDOC 프로그램을 이용하여 multiple alignment를 하여 높은 상동성을 확인할 수 있었다. 따라서 DEG 15는 enoyl-CoA hydratase/isomerase이라고 분석되었다. Enoyl-CoA hydratase/isomerase는 지방산 대사에 관여하는 효소로 명배양할 때에는 전혀 나타나지 않다가 암배양 시 나타나는 것을 알 수 있다.

**A**

```

GACGTTGCAGTGGTGCCGCGAGATCCTCAAGAACAGCCACCACCGCGCTGCGCGTGCTCAAGTCGGCGCTGAATGCGGCGG 80
AGGACGGGCAGGCGGGCATCCAGCAGCTGGGCGGGATGCCACACTGCTCTTCTACCAGAGCGAGGAGGGCAACGAGGGG 160
CGGCAGGCGTACCTGGACAAGCGGCCGCCGACTTCTCCCGCTTCAAGCGCCTGCCCTGAGCTGGCTGCTGTCTCGGCTG 240
GGCACCAGCTGGTGCATGGTTGCTTAGGCAGGCGCACGCAGCTCGGTGGTGGCCAGCTGCCTTGCTTACATGGGAGCT 320
TTGCGTATTGCAGTATGTAATTTGATGCATCAAAAAAAAAAAAAA
  
```

**B**

```

          *           20           *           40           *           60
_1DEG15   : T Q E E E K F S A A E A A Q Q Q N Q C A C D I : 60
_2Arabidop : T Q E E E K F S A A E V D H A G G G G A T E T A H I : 60
_3Oryza   : T Q E E E K F S A A E A D H A E E G G A K E E E A S : 60
_4Photorha : T Q E E E K F M C S A A D C S E A A M E E Q E E A E A : 60
_5Chlorobi : T Q E E E A E L C S A A D C A A E A A A A M E E Q E E A E A : 60
          T6 WCR e6L NSP A6R LK ALNA DG aG6Q L G1AT665Y 3EE EG4 A56 4

          *
_1DEG15   : P P E E E K L L : 72
_2Arabidop : P P E E E H L L : 72
_3Oryza   : R R E E E P L L : 72
_4Photorha : H H E E E K N L : 72
_5Chlorobi : R K L P P E P P R : 72
          R PDFS4F 4 P
  
```

Figure 11. Nucleotide sequence of DEG clone number 15(A) and Comparison of amino acid sequence deduced from DEG clone number 15 with proteins in data base (B). Arabidop : *Arabidopsis thaliana*, Oryza : *Oryza sativa*, Photorha : *Photorhabdus luminescens*, Chlorobi : *Chlorobium tepidum* amino acid sequence alignment.

DEG 17은 678bp의 염기서열이 분석되었으며 3' 부분에 poly A tail이 있으며 Blast X에서 분석한 결과는 *Schizosaccharomyces pombe*의 Phenylalanyl-tRNA synthetase, class IIc 과 가장 높은 상동성을 보였다 (Fig. 12). Phenylalanyl-tRNA synthetase, class IIc의 전체 길이는 499 amino acid이고 이중에서 Frame +3에서 365번째 아미노산부터 405번째 아미노산까지가 DEG 17의 3번째 핵산에서 125번째 핵산까지가 translation된 41개의 아미노산과 Frame +2에서 409번째 아미노산부터 450번째 아미노산까지가 DEG 17의 134번째 핵산에서 259번째 핵산까지가 translation된 42개의 아미노산과 Frame +1에서는 452번째 아미노산부터 491번째 아미노산까지가 DEG 17의 262번째 핵산에서 381번째 핵산까지가 translation된 40개의 아미노산과 일치하였다. 이는 Phenylalanyl-tRNA synthetase, class IIc가 한 유전자에 여러 개의 tRNA synthetases가 암호화되어 있기 때문이다. 이 외에도 *Candida glabrata*, *Arabidopsis thaliana*, *Aspergillus fumigatus* 등의 phenylalanyl-tRNA synthetase과도 높은 유사성을 보였으며 GENEDOC 프로그램을 이용하여 multiple alignment를 하여 높은 상동성을 확인할 수 있었다. 따라서 DEG 17은 Phenylalanyl-tRNA synthetase이라고 분석되었다.

**A**

```

GCACGCACCTGGCGGAGTTCCACCAGATAGAGGGCGTGGTGTGCGACTATGGGCTCACGCTGAGCGACCTGATCGGCCTG 80
CTGCAGGAGTTCTTCGACCGCTGGGCTCAGCAAGCTGCGCTTCAACCGGCTTCGACCCCTACACCGAGCCGTCATG 160
GAGATTTTCAGTACTCGGAGCAGCTGGGCAAGTGGATCGAGGTGGGCAACAGCGGCATGCTCCGGCCCGAGATGCTGCG 240
GCCCATGGGCTGCAGAGGGCGTGAATGTCATCGCATGGGCTGGGCTGGAGCGGCCAACCATGATCCTGTACAACAT 320
CGACAACATCCGGACCTGTTTGGCCACGAGGTGTCGCTCAGCATGGTGAAGAAGAACCCTCTGCCGACTGGGCTCTG 400
AGGGCGCAGCTGATGCAGCAGCTGAGGCAGAGGGCATCCACTCCTCGCAGCCTTCGGGTGCGCGGCAGCAGCCAGTGG 480
CGGGCTTGCCTCCAGGCTGTGCAGCGGCCAGGCGGGCAGGATTGGCGACATGGCACTCCGCTGCATGCCTCACCGGG 520
ATGCAACTTGACCAGCAGCTTGAAGTGTTCATTTGATTCTTTGTGGCCGCCAGGGGCCAGCCATGATTCTTTGG 640
CCCTTGTAGTCTCACCTGACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
  
```

**B**

```

          *           20           *           40
_1DEG17   : EDDTEPANEIPISTISEQLREMVENIRISNLILEEMIREMILQR : 42
_2Schizosa : INDTTEPANEIPISTIHEKLREMVENIRISNLILEEMIREMILPK : 42
_3Candida  : INEYTEPANEIPISTIHEKLREMVENIRISNLILEEMIREMILPR : 42
_4Arabidop : INDTTEPANEIPISTIHEKLREMVENIRISNLILEEMIREMILPE : 42
_5Aspergil : INEYTEPANEIPISTIHEKLREMVENIRISNLILEEMIREMILPR : 42
          51PYTEPS6E6Fs5he LGKW6E6GN8GMfRPEML PMG6p
  
```

Figure 12. Nucleotide sequence of DEG clone number 17(A) and Comparison of amino acid sequence deduced from DEG clone number 17 with proteins in data base (B). Schizosa : *Schizosaccharomyces pombe*, Candida : *Candida glabrata*, Arabidop : *Arabidopsis thaliana*, Aspergil : *Aspergillus fumigatus* amino acid sequence alignment.

DEG 28은 918bp의 염기서열이 분석되었으며 3' 부분에 poly A tail이 있으며 Blast X에서 분석한 결과는 *Arabidopsis thaliana* (thale cress)의 chloroplast omega-6 desaturase과 가장 높은 상동성을 보였다 (Arondel *et al.* 1992, Falcone *et al.* 1994). Chloroplast omega-6 desaturase의 전체 길이는 418 amino acid이고 이 중에서 197번째 아미노산부터 364번째 아미노산까지가 DEG 28의 1번째 핵산부터 507번째 핵산이 translation된 167개의 아미노산이 일치하였다 (Fig. 13). 이 외에도 proplastid *Brassica napus*, *Brassica napus*, *Spinacia oleracea*등의 chloroplast omega-6 desaturase과 높은 유사성을 보였으며 GENEDOC 프로그램을 이용하여 multiple alignment를 하여 높은 상동성을 확인할 수 있었다. 따라서 DEG 28은 chloroplast omega-6 desaturase이라고 분석되었으며, 이것은 chloroplast와 관련 있는 단백질이며 암배양에서만 특이적으로 나타났다 (Fig. 3).

**A**

```

ATCTACCCCTTCGAGCCCTGGCGCATCAAGCACACGTCACCACGCACACCAACAAGCTGGTGGAGGACACGGCCTG 80
GCACCTGTGGAGCGGAGAAGATGGAGAAGTGGAGCCCTGTGGAGCGCCATGTACAAGCTGTTCTGGGACCCCGCT 160
GAAGCTGTGGGCTCAATCGGCCACTGGTGGATCTGGCACTTTGACCTGAGCAAGTACTCCGAGCAGCAGAAGCCGCGG 240
TGCTTGTCAGCCTTCAGCAGTGGGCTGTTCATGGCCGTGGGCTGGCCGCTGATTGTGTACTACACCGGCTGGGCAGGCT 320
TCGTCAAGTTCGGCTCATGCCGTGGCTGGGCTACCACCTTCTGGATGAGCACCTTCACTGTGTGCACCACACCGCGCCG 400
ACATCCCTTCAAGCCCGCGGGGAGTGAACGCGGCCAAGGCACAGCTGCCGGCACCGTGCCTGCGACTACCCGCGG 480
TGGGTGGAGTTCCTGTGCTTTGACATCAGTGCAGTGCAGTGCAGTGCAGTGCAGTGCAGTGCAGTGCAGTGCAGTGCAG 520
GCTGCCACCGACAGCCTGCCAGAACTGGGCGGACTACATGACGGAGGCCACCTTCACTGGCGCATGCTCAAGACATC 640
TTCACCCACTGCCACGTGCATGACTCCAATCCAATATGTGCCATTGACGAGGGCAAGCCGGAGCCGTTGTTGAGT 720
CCAGCGGCGCGGCTCACAGATACGATGTAAACCTGTGGGATTTGATTGCCGCGCACACCACCGACAGCGCTGCTGCG 800
TGTACACCGCATCGCGGGCCCGCCGCGCCCATGCTCGTTTGTCTCAGCGAGAGTGAATGTGGTCACTGCAATTTGAGC 880
TGTATGTAATCAAGCAACAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
  
```

**B**

```

      *           20           *           40           *           60
_1DEG28 : [REDACTED] I V A H K V E H E R K M K W E A P C T S C S A [REDACTED] R * S C G P Q X X X X : 62
_2Arabidop : [REDACTED] F A K N V [REDACTED] D S V L R K A I I E G [REDACTED] V R R A L I F G : 51
_3 : [REDACTED] F A K N V [REDACTED] D S V L R K A I I E G [REDACTED] I R P W L S I A H V V N W H F N : 67
_4 : [REDACTED] F A K N V [REDACTED] D S V L R K A I I E G [REDACTED] V L R K A I I E G : 51
_5 : [REDACTED] F Q T K H A R E [REDACTED] L M K D I S [REDACTED] G L R K A I I A S I [REDACTED] : 51
      GYPSEPWRFKH1 HHakTnmLv DTAW P6 E s SPv rka i 5gP

      *           80           *           100          *           120           *
_1DEG28 : XXXXXX*XXXXXXXXXXC[S]A[S]SGGP[GHGRG]A[AD]LHR[L]GRLRQ[L]AHANAG[REDACTED] L L D E : 121
_2Arabidop : --LRP[LS]IAHWV[N]WHEN[K]K[AS]SNRVK[SL]AC[AT]AN[GR]E[IK]YGL[SN]K[IN] : 117
_3 : LRKFRPSEVNRVKISLAC[FA]MA[REDACTED]GWPLIYK[GL]GW[KE]L[REDACTED] : 117
_4 : --LRP[LS]IAHWV[N]WHEN[K]K[AS]SNRVK[SL]AC[AT]AN[GR]E[IK]YGL[SN]K[IN] : 117
_5 : --LNT[WS]IAHWLKVHFN[K]D[RO]SEYK[RA]T[SL]AA[FA]V[IG]E[IL]K[TC]I[SW]IK[PL] : 117
      6 F v 6 6 6 6 6 6 PwLgy

      140           *           160           *           180
_1DEG28 : LHC[REDACTED] D A G [REDACTED] K S [REDACTED] R E E : 167
_2Arabidop : E W M S T E T H [REDACTED] E A [REDACTED] I H : 168
_3 : E W M S T E T H [REDACTED] E A [REDACTED] I H : 168
_4 : E W M S T E T H [REDACTED] E A [REDACTED] I H : 168
_5 : E W M S T E T I [REDACTED] S S K I [REDACTED] S I R I H : 168
      Hfwmstft VHHTAPHIFPKpa EWNAAqAQL GTVHCDYP W6EiLChDI
  
```

Figure 13. Nucleotide sequence of DEG clone number 28(A) and Comparison of amino acid sequence deduced from DEG clone number 28 with proteins in data base (B). Arabidop : *Arabidopsis thaliana* (thale cress), 3 : *proplastid Brassica napus*, 4 : *Brassica napus*, 5 : *Spinacia oleracea* amino acid sequence alignment.

Table 2. Sequence alignment of DEGs with Known ESTs

DEGs	GeneBank <sup>®</sup> accession No.	Blast search		Identity
		size (aa)	align (aa)	
<b>DEG 4</b>	AAG13554	988	828-988	Chloroplast inner envelope protein
<b>DEG 5</b>	YP_113864	395	312-394	serine:glyoxylate aminotransferase
<b>DEG 7</b>	AAL34237	429	257-435	phenylalanine- tRNA synthase
<b>DEG 9</b>	Q42694	580	478-580	rubisco binding-protein alpha subunit
<b>DEG 11</b>	NP_177293	558	230-393	ATP-dependent Helicase
<b>DEG 12</b>	AAO22241	439	168-364	Ribosome - associated protein precursor
<b>DEG 14</b>	AAT85221	239	153-226	Unknown
<b>DEG 15</b>	AE006470	395	307-378	TLS hydratase / isomerase
<b>DEG 17</b>	CAA15915	491	452-491	Phenylalanyl-tRNA synthetase, class IIc
<b>DEG 28</b>	AAA92800	418	197-364	Omega-6 desaturase

## IV. 고찰

Signal peptide를 이용하여 클로렐라에서 외래 단백질의 발현을 하기 위해서 Kohara (1992)가 보고한 general signal peptide, plant-specific signal peptide (Hawkins and Nakamura. 1999), *Chlamidomonas reinhardtii*의 signal peptide (Fukuzawa *et al.* 1990)를 이용하여 형질 전환된 외래 단백질의 분비를 유도하였다. 그러나 general signal peptide와 다른 종의 signal peptide는 클로렐라의 형질 전환에 적용되지 않았고, 클로렐라 자체의 signal peptide가 필요했지만, 클로렐라의 genome에 대한 연구가 많이 이루어지지 않아서 signal peptide에 관한 정보를 얻을 수 없었다.

따라서 클로렐라의 유전정보를 얻기 위해서 암배양 특이적인 DEG analysis는 Annealing Control Primer™ (ACP)를 이용하여 서로 다르게 발현된 유전자를 선별하는 GeneFishing™ PCR system을 이용하였다 (Hwang *et al.* 2003). ACP는 3'-target sequence 부위와 5'-universal (non-target) sequence 부위, 그리고 두 부위를 연결 및 조절 역할을 하는 조절 (regulator)부위 로 구성되어 있고, 온도 차이에 따라서 서로 다르게 작용한다. ACP의 3'-target sequence 부위는 낮은 온도에서 명배양과 암배양에서 나타난 DEG의 cDNA와 특이적으로 결합하여 ACP가 특정한 DEG만을 인식하여 증폭 시키는 기능을 하며 (Hwang *et al.* 2004), 이렇게 증폭된 DEG는 agarose gel에서 확인하여 선별하였고, 선별된 DEG는 앞서 사용한 ACP로부터 DEG의 염기서열을 밝힐 수 있었다.

*C. vulgaris*를 명배양과 암배양을 통해서 ACP primer 40 sets를 이용하여 GeneFishing™ PCR을 실시하여 agarose gel에서 확인한 결과, 암배양과 명배양에서 뚜렷한 차이를 나타내는 DEGs가 있었다. 명배양에서 나타난 DEGs가 암배양에서 나타나지 않은 것과 명배양에서 나타나지 않던 DEGs가 암배양에서만 나

타나는 것은 광합성이나 광호흡 그리고 이에 수반되는 대사과정에만 제한적으로 사용되는 유전자 등이 발현되어서 DEG가 어느 한 쪽에서만 발현됨을 확인할 수 있었다. 그리고 명배양과 암배양에서 같은 DEGs가 나타나더라도 발현양의 차이를 보이는 경우도 있었다. 이는 DEG의 발현의 차이라고 볼 수도 있겠지만 GeneFishing™ PCR은 PCR과정을 이용한 DEGs의 선별 실험이기 때문에 같은 농도의 total RNAs에서 같은 조건으로 cDNAs를 합성하고 PCR을 하였더라도 처음 mRNA의 발현빈도와 최종 PCR products의 양이 비례한다고 할 수 없다. 따라서 확실하게 차이를 나타내는 DEGs만을 선별하여 염기서열을 분석하였다.

전체 34종의 DEGs를 분석하였고, 암배양에서 나타난 DEGs는 14개였으며 이 중에서 발현의 차이가 뚜렷하게 나타나는 10개의 DEG를 선택하여 염기서열을 밝히고, 이를 Gene bank의 database와 alignment하여 분석하였다 (Table. 2). 10종의 DEG는 chloroplast inner envelope protein, serine: glyoxylate aminotransferase, phenylalanine-tRNA synthase, rubisco binding-protein alpha subunit, ATP-dependent helicase, Ribosome - associated protein precursor, oxidoreductase, enoyl-CoA hydratase/isomerase, phenylalanyl-tRNA synthetase, class IIc, chloroplast omega-6 desaturase로 분석되었다.

*C. vulgaris*의 암배양에 특이적이 DEGs중에서 DEG 4와 DEG 28은 chloroplast inner envelope protein (Rice Chromosome 10 Sequencing Consortium 2003)과 chloroplast omega-6 desaturase (Falcone *et al.* 1994)이었으며, 이는 chloroplast와 관련이 있었으며, DEG 5는 serine:glyoxylate aminotransferase (William *et al.* 2001)는 광호흡 과정의 key enzyme으로 L-serine과 glyoxylate를 hydroxypyruvate와 glycine으로 전환시키는 기능을 하며, DEG 12인 ribulose biphosphate carboxylase/ oxygenase (Taylor and Andersson. 1997)는 암반응 중에서 캘빈회로에서 5탄당 (ribulose

bisphosphate, RuBP)에  $\text{CO}_2$ 를 결합시켜 2개의 3탄당 (3-phosphoglycerate, 3-PGA)을 만드는 효소이다. 이들 DEGs는 암배양에서 특이적으로 발현되었고, 분석한 결과도 암배양 특이적인 유전자임을 알 수 있었다.

## V. 요약

클로렐라는 고등식물과 물질 대사 경로를 공유할 수 있는 단세포 녹조류로, 이들은 외래의 단백질을 발현하기 위한 system으로서 많은 장점을 가지고 있다. 최근 형질 전환된 클로렐라로부터 생물학적으로 활성을 가지는 어류 성장 호르몬을 발현하는데 성공하였으며, 이는 이 system이 외래의 단백질을 발현할 수 있는 생물반응기로서 이용이 가능하다는 것을 제시한다. 그러나 클로렐라는 단단한 세포벽 성분 때문에 발현된 외래 단백질의 분리가 어렵다.

클로렐라의 형질전환에 signal peptide를 적용하여 발현된 외래 단백질이 세포 밖으로 분비되도록 유도하기 위해서 클로렐라의 signal peptide를 밝히기 위하여 클로렐라의 유전자 분석을 선행 연구로 암배양에서 발현된 *Chlorella vulgaris*의 DEGs (Differentially Expressed Genes)를 GeneFishing™ system을 이용하여 선별하고 염기서열을 분석하였다.

분석결과 34개의 DEGs를 분석하였고, 암배양에서 나타난 DEGs는 14개였으며, 이 중에서 발현의 차이가 뚜렷하게 나타나는 10개의 DEG를 선택하여 염기서열을 밝히고, GeneBank의 database와 alignment하여 분석하였다. 이들 중에서 chloroplast inner envelope protein과 chloroplast omega-6 desaturase는 chloroplast와 관련이 있었으며, serine:glyoxylate aminotransferase와 ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase는 광호흡과 캘빈회로에서 중요한 효소임으로 암배양 특이적인 DEGs임을 알 수 있었다.

## VI. 감사의 글

많이 부족한 제자를 부모님처럼 항상 배려하고 가르쳐 주신 최태진 교수님께 깊은 감사드립니다. 그리고 바쁘신 일정 속에서도 논문을 검토해 주신 이원재 교수님과 김군도 교수님께도 감사드립니다. 대학원 생활 동안 많은 관심과 가르침을 주신 김진상 교수님, 이훈구 교수님, 송영환 교수님, 이명숙, 김영태 교수님께도 감사드립니다.

실험실 생활의 기초를 가르쳐 주고 지금까지 많은 의지가 되어준 은영이 누나, 현향이 누나, 정말 많은 도움과 가르침을 준 홍목이 형, 부족한 후배를 항상 걱정해 주고 도움을 준 종오형, 선생님 안 계신 동안 큰 버팀목이 되어준 현화 누나, 많은 것들을 챙겨주고 힘이 되어 준 분들 모두모두 감사합니다. 그리고 실험실 생활을 재밌게 잘 할 수 있도록 도와준 재경이, 지연이 굿은 일 마다 알고 도와준 후배 경우, 많이 도와주지 못했는데 실험실 생활에 힘이 되어준 혜경이, 혜진이, 다영이 공부하면서 실험실 일하느라 고생한 미영이, 연호, 정현이, 지은이, 소영이, 기욱이 모두에게 고마운 마음을 전합니다.

대학원 생활동안 멀리서 힘이 되어준 동기 상욱이, 동욱이, 그리고 윤숙이, 혜영이, 지현이, 주연이, 미영이, 대성이형, 재광이형, 용배형 모두 고맙고 앞날에 좋은 일이 있길 바랍니다. 그리고 부족한 후배에게 많은 조언과 도움을 주신 정민선배, 종규선배, 재형선배, 지희선배님께 감사드립니다.

그리고 회사생활하며 졸업 논문을 무사히 쓸 수 있도록 격려해주신 장정수 소장님, 박유수 과장님, 전경동 대리님, 손철훈 계장님, 박순원 주임, 그리고 반정화씨, 손영옥씨 그리고 이름들 다 올리지 못한 많은 분들 감사드립니다.

## VII. 인용 문헌

- Al-Qunaibit, M., Khalil, M., and A. Alwassil. (2005). The effect of solvents on metal ion adsorption by the alga *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere* 60(3), 412-418.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and D. J. Lipman. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.
- Aronel, V., Lemieux B., Hwang I., Gibson S., Goodman H., and C. R. Somerville. (1992). Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in *Arabidopsis*. *Science* 258, 1353-1355.
- Bajguz, A., and T. Asami (2004). Effects of brassinazole, an inhibitor of brassinosteroid biosynthesis, on light- and dark-grown *Chlorella vulgaris*. *Planta* 218(5), 869-877.
- Cannons, A. C., Iida, N., and L. P. Solomonson. (1991). Expression of a cDNA clone encoding the haem-binding domain of *Chlorella* nitrate reductase. *Biochemical Journal* 278(1), 203-209.
- Cho, H. H., Park, H. H., Kim, J. H., and T. J. Choi. (2002). Isolation and characterization of *Chlorella* viruses from freshwater sources in Korea. *Molecular Cell* 14, 168-176.
- Dawson, H. N., Pedleton, L. C., Solomonson, L. P., and A. C. Cannons. (1996). Cloning and characterization of the nitrate reductase-encoding gene from *Chlorella vulgaris* : structure and identification of transcription start points and initiator sequences. *Gene* 171, 139-145.

- Duchene, A. M., Giritch, A., Hoffmann, B., Cognat, V., Lancelin, D., Peeters, N.M., Zaepfel, M., Marechal-Drouard, L., and I. D. Small. (2005). Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(45), 16484-16489.
- Falk, S., and G. Samuelsson. (1992). Recovery of photosynthesis and photosystem II fluorescence in *Chlamydomonas reinhardtii* after exposure to three levels of high light. *Physiologia Plantarum* 85, 61-68.
- Falcone, D. L., Gibson, S., Lemieux, B., and C. Somerville. (1994). Identification of a gene that complements an *Arabidopsis* mutant deficient in chloroplast omega 6 desaturase activity. *Physiologia Plantarum* 106(4), 1453-1459.
- Fukuzawa, H., Fujiwara, S., Yamamoto, Y., Dionisio-Sese ML., and S. Miyachi. (1990). cDNA cloning, sequence, and expression of carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*: regulation by environmental CO<sub>2</sub> concentration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 87, 4383-4387.
- Greer, D. H., Berry, J. A., and O. Bjorkman. (1986). Photoinhibition of photosynthesis in intact bean leaves : role of light and temperature and requirement of chloroplast-protein synthesis during recovery. *Planta* 168, 253-260.
- Hawkins, R. L., and M. Nakamura. (1999). Expression of human growth hormone by the eukaryotic alga, *Chlorella*. *Current Microbiology* 38(6), 335-341.
- Heng, C., Chen, Z., Du, L., and F. Lu. (2005). Expression and secretion of an acid-stable alpha-amylase Gene in *Bacillus Subtilis* by SacB Promoter and Signal Peptide. *Biotechnology Lett* 27(21), 1731-1737.
- Huner, N. P. A., Oquist, G., Hurry, V. M., Krol, M., Falk, S., and M. Griffith. (1993). Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation in cold tolerant plants. *Photosynthesis Research Millennium Issue* 37, 19-39

- Hwang, I. T., Kim, Y. J., Kim, S. H., Kwak, C. I., Gu, Y. Y., and J. Y. Chun. (2003) Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. *Biotechniques* 35(6):1180-4.
- Hwang, K. C., Cui, X. S., Park, S. P., Shin, M. R., Park, S. Y., Kim, E. Y., and N. H. Kim. (2004). Identification of differentially regulated genes in bovine blastocysts using an annealing control primer system. *Molecular Reproduction and Development* 69, 43-51.
- Johnson, H., Whiteford, J. R., Eckert, S. E., and P. D. Spanu. (2003). Production and secretion of *Aspergillus nidulans* catalase B in filamentous fungi driven by the promoter and signal peptide of the *Cladosporium fulvum* hydrophobin gene *hcf-1*. *Current Genetics* 44(3), 155-163.
- Kaneko, T., Kotani, H., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Miyajima, N., and S. Tabata. (1998). Structural analysis of *Arabidopsis thaliana* chromosome 5. Sequence features of the regions of 1,381,565 bp covered by twenty one physically assigned P1 and TAC clones. *DNA Research* 5(2), 131-145.
- Kikuchi, M., Kitamoto, N., and K. Shishido. (2004). Secretory production of *Aspergillus oryzae* xylanase XynF1, xynF1 cDNA product, in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63(6), 728-733.
- Kim, D. H., Kim, Y. T., Cho, J. J., Bae, J. H., Hur, S. B., Hwang, I. H., and T. J. Choi. (2002). Stable integration and functional expression of flounder growth hormone gene transformed microalga, *Chlorella ellipsoideae*. *Biotechnology* 4, 63-73.
- Kim, Y. J., Kwak, C. I., Gu, Y. Y., Hwang, I. T., and J. Y. Chun. (2004). Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. *BioTechniques* 36, 424-426.

- Kohara, A., Yamamoto, Y., and M. Kikuchi. (1992). Conformation and length of the signal sequence affect processing of secretory protein. *Federation of European Biochemical Societies* 311(3), 226-230.
- Maki, S., Ohta, Y., Noutoshi, Y., Fujie, M., Usami, S., and T. Yamada. (2000). Mapping of cDNA clones on contig of *Chlorella* chromosome I. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90(4), 431-436.
- Ozaki, T., Kimura, T., Ohnuki, T., Yoshida, Z., and A. J. Francis. (2003). Association mechanisms of Europium(III) and Curium(III) with *Chlorella vulgaris*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(11), 2800-2805.
- Rice Chromosome 10 Sequencing Consortium (2003). In-depth view of structure, activity, and evolution of rice chromosome 10. *Science* 300(5625), 1566-9.
- Taylor, T. C., and I. Andersson. (1997). Structure of a product complex of spinach ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Biochemistry* 36(13), 4041-4046.
- Thompson, M. D., Paavola, C. D., Lenvik, T. R., and J. S. Gantt. (1995). *Chlamydomonas* transcripts encoding three divergent plastid chaperonins are heat-inducible. *Plant Molecular Biology* 27(5), 1031-1035.
- William, E., Karsten, T., Ohshiro, Y. I., and F. C. Paul. (2001). Initial velocity, spectral, and pH studies of the serine-glyoxylate aminotransferase from *Hyphomicrobacterium methylovorum*. *Archive Biochemistry Biophys* 388(2), 267-275.
- Yamaguchi, K., Beligni, M. V., Prieto, S., Haynes, P. A., McDonald, W. H., Yates, JR. 3rd., and S. P. Mayfield. (2003). Proteomic characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast ribosome. Identification of proteins unique to the e70 S ribosome. *Journal of Biology and Chemistry* 278(36), 33774-33785.