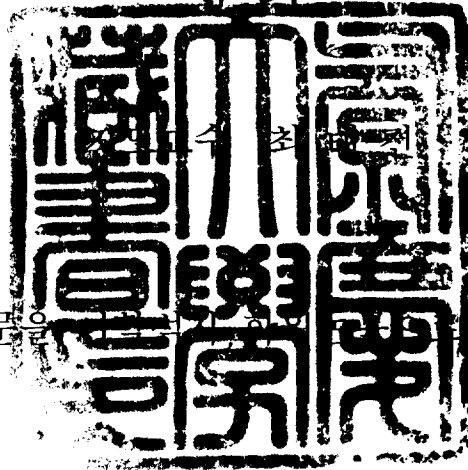


이학석사 학위논문

클로렐라 바이러스 SS-2의 genome
분석과 미세조류 형질전환 promoter의

부리



이 논문을 제출함.

2006년 2월

부경대학교 대학원

미생물학과

장재경

장재경의 이학석사 학위논문을 인준함

2006년 2 월 24 일

주 심 이학박사

이 명 숙



위 원 이학박사

이 훈 구



위 원 이학박사

최 태 진



CONTENTS

요 약	1
서 론	2
재료 및 방법	4
바이러스 증폭	4
바이러스 정제	4
바이러스 genomic DNA 분리	5
바이러스 genomic DNA 의 염기서열 분석	5
PCR에 의한 gap 염기서열 확인	5
클로렐라 바이러스 초기 유전자 promoters의 PCR 증폭	5
초기 유전자 promoters의 pGEM-T vector cloning 과 sequencing ..	10
클로렐라 형질전환 벡터	10
벡터 구축과 클로렐라 형질전환을 위한 준비	11
클로렐라 균주와 배지	14
Protoplast 준비	14
클로렐라 형질전환	14
형질전환체 선별 및 GFP 유전자의 발현 관찰	15
결과 및 고찰	17
SS-2 genome DNA 크기의 측정	17
SS-2 genomic DNA의 염기서열 분석	19
PCR을 통한 염기서열 확인	24
클로렐라 바이러스 초기 유전자 promoter들의 PCR 증폭	27
다섯 개의 초기 유전자 promoters의 cloning 과 sequencing	29
클로렐라 형질전환 벡터를 이용한 클로렐라 형질전환	29
GFP 유전자 발현량의 측정	32
고 찰	35
국문 초록	37
감사의 글	39
References	40

클로렐라 바이러스 SS-2의 genome 분석과

미세조류 형질전환 promoter의 분리

장 재 경

부 경 대 학 교 대 학 원 미 생 물 학 과

요 약

Chlorella viruses are large icosahedral, plaque-forming, dsDNA viruses that belong to the *Phycodnaviridae* family. The genomic DNA of over 300kb contains many useful genes and promoters. The genomic DNA of chlorella virus strain SS-2 that has been isolated in Korea was partially analyzed to isolate strong promoters which can be used in chlorella transformation system. The genome of SS-2 was estimated to be 340kbp, and over 300kbp nucleotide sequence was analyzed except for about 20kbp from each end of the linear DNA genome. Among the 372 open reading frames identified from PBCV-1, the prototype of chlorella virus, 331 were identified from SS-2, which suggest that SS-2 is very similar to PBCV-1. Based on the analyzed sequence, five putative early gene promoter regions were cloned from the open reading frames A67R, A312L, A342L A548L and A158L that encode the procyclin precursor, aspartyl-tRNA synthetase, regulatory protein, helicase and an unknown protein, respectively. Sequence analysis of these promoter regions indicated the presence of many cis-acting elements for transcription factors including TATA box, CAAT box, GAGA box and CCAAT. Chlorella transformation vectors containing the green fluorescence protein (GFP) gene fused to these promoters were constructed and introduced in chlorella protoplasts. Compared to GFP intensity from chlorella cells transformed with CaMV 35S-GFP fusion (100%), cells transformed with the A67R, A158L, A312L, A342L and A548L promoter-GFP fusion construct showed 131.5%, 135.19%, 116.79%, 110.29%, 105.18% intensity, respectively.

서 론

클로렐라는 건강식품 및 양식업에서 초기먹이로 에서 널리 이용되어 왔으며 에너지원으로 적당량의 햇빛과 이산화탄소만 필요로 하기 때문에 저렴하게 배양이 가능하다. 클로렐라는 태양빛을 이용해서 탱크에서 대규모로 배양될 수 있으며, 성장속도가 빨라 온도와 빛의 세기에 따라 하루에 2~9번까지 분열한다 (Serokin and Krauss, 1958). 또한 식물에 비하여 간단한 세포로 이루어진 진핵생물이기 때문에 재조합 단백질을 발현하였을 때 이들의 순수분리가 용이하며, 클로렐라는 진핵생물이기 때문에 활성을 가지기 위하여 post-translational modification을 필요로 하는 복잡한 단백질의 생산에 적절하다. 이러한 특징은 외부 단백질 발현을 위한 bioreactor로 클로렐라 사용의 가능성을 제공하며, 실제로 어류성장호르몬이 형질전환된 클로렐라에서 생물학적 활성을 가진 형태로 발현된바 있다 (Kim et al., 2002).

형질전환된 미세조류를 이용하여 재조합 단백질을 생산하기 위해서는 다양한 요소가 고려되어야하는데, 그 중에 하나가 재조합 단백질의 대량생산에 필요한 강력한 프로모터이다. Kim 등 (2002)의 연구에서는 프로모터로 Cauliflower mosaic virus (CaMV)의 35S 프로모터가 이용되었으나 이 프로모터의 경우 특허권에 따른 산업적 이용의 한계가 있다. 본 연구에서는 CaMV 35S 프로모터를 대체할 수 있는 새로운 프로모터를 찾기 위하여 국내에서 분리된 클로렐라 바이러스 SS-2의 genome을 분석하고 이로부터 유용 프로모터를 탐색하였다.

적조 및 녹조현상을 일으키는 다양한 종류의 조류에 대한 연구와 더불어 최근에는 조류에 기생하는 바이러스에 대한 연구도 세계 각국에서 활발히 이루어지고 있으며 현재 44종 이상의 미세조류로부터 바이러스가 확인되고 있다 (Van Etten *et al.*, 2002). 이들에 따르면 해수 1ml 당 $10^2 \sim 10^5$ 개의 바이러스 입자가 존재한다. 일부 바이러스의 경우 *Chrysochromulina*를 비롯한 여러 적조 원인균을 사멸시키는 것으로 알려지면서 이들 바이러스에 대한 연구에 많은 노력을 기울이고 있는데, 바이러스의 기주 특이성을 이용하여 적조를 방제하려는 연구가 일본을 비롯한 여러 나라에서 수행되고 있다.

대표적 미세조류 바이러스로는 짚신벌레에 공생하는 것으로 알려진 Chlorella 류에 기생하는 Paramecium bursaria chlorella virus type 1(PBCV-1)이다. PBCV-1은 *Phycodnaviridae* family의 *Chlorovirus* genus에 속하는 바이러스로 330,744개의 염기쌍으로 구성되어 있는 이중나선의 DNA genome에 약 700개의 ORFs 를 포함하고 있으며, 이중 약 375개가 실제 단백질을 만드는 유전자인 것으로 추측되고 있다. PBCV-1외에도 EsV와 FIRRV 등의 genome 분석이 최근에 이루어졌다(Delaroque *et al.*, 2003; 2001). 조류 바이러스의 genome에 암호화되어 있는 각종 유용 유전자 외에 이들 유전자 발현에 관여하는 프로모터들도 유용한 것으로 여겨지며 실제로 클로렐라 바이러스 PBCV-1의 adenine methyltransferase 유전자의 upstream 부분은 식물과 박테리아에서 강한 promoter 기능을 하는 것으로 확인되었다(Mitra *et al.*, 1994).

클로렐라 바이러스 SS-2는 충남 서산의 담수로부터 분리한 바이러스로서, phycodnaviridae family에 속하는 icosahedral, plaque 형성, dsDNA 바이러스로 genome 크기는 300kb이상으로 추측되었다 (Cho *et al.*, 2002).

본 연구에서는 클로렐라 발현 시스템을 개선시킬 수 있는 유용한 프로모터를 탐색하기 위하여 한국에서 분리된 클로렐라 바이러스인 SS-2의 genome의 전체 염기서열의 분석을 시도하였으며, 추가적인 바이러스 단백질 없이 기주의 DNA dependent RNA polymerase에 의하여 발현되는 초기 발현 유전자 (early gene) 5개의 프로모터 부분을 분리하여 이들 프로모터와 green fluorescence gene (GFP)을 연결한 후 형질전환된 클로렐라를 이용하여 이들 프로모터의 활성을 CaMV 35S 프로모터의 활성과 비교하였다.

재료 및 방법

바이러스 증폭

본 연구에 이용된 클로렐라 바이러스 SS-2는 1999년에 충남서산의 담수 하천에서 분리한 것이다. 바이러스는 클로렐라 바이러스의 증식에 일반적으로 이용되는 *chlorella-like green algae* NC64A를 이용하여 증폭하였다. NC64A는 modified Bold's basal medium (MBBM)에서 배양하였다(Van Etten *et al.*, 1983). 100ml의 클로렐라 NC64A에 *moi* 0.01~0.001의 바이러스가 접종되었으며, 150rpm의 교반과 꾸준한 빛이 있는 상태에서 완전히 lysis될 때까지 배양하였다 (Cho *et al.*, 2002).

바이러스 정제

Lysate는 Sorvall GS-3 rotor로 4℃에서 5분간 5,000 rpm에서 원심 분리하였다. 상등액에 Triton-X100를 최종농도가 0.1%가 되게 첨가하고, 4℃에서 20분간 교반하였다. 바이러스 입자는 Sorvall T-880 rotor에서 60분간 20,000rpm에서 원심 분리하여 pellet으로 만들었다. Pellet을 50mM Tris-HCl, pH7.8에 재 현탁시켰고, 10-40% discontinuous sucrose gradient (20,000 rpm, 20 min, 4℃)를 통해 원심 분리하였다. 바이러스 band를 30-40% interface에서 확인할 수 있었고, T-880 rotor 27,000 rpm에서 3시간동안 원심분리 후 pellet으로 모았다. Pellet은 50 mM Tris-HCl, pH 7.8 에서 재 현탁하였다.

바이러스 genomic DNA 분리

분리된 바이러스(400 μ l)를 10X TEN (100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM EDTA, 1 M NaCl) buffer (60 μ l), 1% Na-sarcosyl (60 μ l), 60% (w/w) CsCl (0.6ml) 그리고 미량의 EtBr에 혼합하였다. 75°C에서 15분간 가열한 후에, 혼합액은 준비된 40-60%(w/w) CsCl gradient에서 loading하였고, Sorvall TH-641 rotor로 25°C, 35,000 rpm에서 18시간동안 원심분리하였다(Van Etten *et al.*, 1981). DNA band를 모아서 butanol 추출을 통해 EtBr을 제거하였으며 에탄올로 DNA를 침전시킨 후 건조시키고 1X TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA)로 재 현탁시켰다. 재 현탁된 바이러스 genome DNA는 pulsed filed gel electrophoresis (PFGE)를 통하여 크기를 확인하였다.

바이러스 genomic DNA 의 염기서열 분석

바이러스 genomic DNA library 제작 및 염기서열 분석은 (주)마크로젠에 의뢰하여 수행하였다. 순수분리된 genomic DNA는 nebulization에 의하여 단편화시켰으며, klenow enzyme처리를 통해서 말단을 blunt 화 및 dephospholyzation 시켰다. 전기영동을 하여 원하는 크기로 단편화된 영역을 elution하였고 blunt end DNA 클로닝 벡터인 pCR blunt-TOPO를 이용하여 단편을 클로닝하여 library를 제작하였다. 제작한 library의 target insert의 염기서열을 확인하기 위하여 벡터의 universal primer와 ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Kits를 이용하여 PCR(MJ Research 사의 PTC-225)한 후, ethanol을 이용하여 반응에 참여하지 않은 dNTP와 반응물을 분리해 내었으며, 정제된 PCR product는 3차 증류수에 다시 녹여 automatic sequencer(ABI PRISM[®] 3730XL Analyzer)를 이용하여 각 클론 insert의 염기서열분석을 하였다.

PCR에 의한 gap 염기서열 확인

Genomic DNA의 염기서열 분석 후 PBCV-1의 genomic DNA의 염기서열과 비교하여 homology가 확인되지 않은 부분은 PCR을 수행하고 얻어진 산물의 염기서열 분석을 수행하여 최종적으로 염기서열을 검정하였다. PCR을 위하여 제작된 primer의 염기서열은 Table 1에 제시하였으며, 크기가 큰 2,3,5,6째 gap은 4~5개의 product를 만들기 위해 좀 더 구체적인 primer를 제작하였다(Table 2). PCR 반응은 5 μ l의 10X buffer (100 mM Tris.Cl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2.5 mM dNTP, 4 μ l의 Taq DNA polymerase(5u/ μ l), 그리고 100pmol의 forward primer와 reverse primer를 이용하여 증폭하였다. PCR 반응 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 predenaturation, 그 후 95 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 각각의 primer에 맞는 Tm값 온도에서 1분간 annealing, 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension과정을 35 cycle에 걸쳐 진행하였고 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 postextension 하였다. PCR 산물은 1.0% agarose gels에서 전기영동한 후 UV irradiation하여 확인하였다.

클로렐라 바이러스 초기 발현 유전자 promoter들의 PCR 증폭

PBCV-1의 초기 발현 유전자 분석 후, 클로렐라 바이러스 SS-2의 초기 발현 유전자의 염기서열들을 기초로 하여 제작한 primer들로 클로렐라 바이러스 SS-2의 초기 발현 유전자의 promoter 부분을 PCR하여 증폭하였다. 여기에 사용된 primer들은 Table. 3에 나타나있다. 초기 발현 유전자 promoter들은 5 μ l의 10X buffer (100 mM Tris.Cl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2.5 mM dNTP, 4 μ l의 Taq DNA polymerase(5u/ μ l), 그리고 100pmol의 forward primer와 reverse primer를 이용하여 증폭하였다. PCR 반응 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 predenaturation, 그 후 95 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 59.5 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension 하였다. 이 과정을 35 cycle에 걸쳐 진행하였고 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 postextension 하였다. PCR 산물은 1.2% agarose gels에서 분석하였다.

Table 1. Primers used PCR amplification of the small regions showing sequence difference between PBCV-1 and SS-2

Regions	Primers
1번(31008 ~ 35873)	F : CTT CAG CAT TCA AGG GTG AAC R : GGT TGC TTT GAT ATT TGA GAT AC
2번(118093 ~ 123687)	F : GAG GAA TTT TGA AAA CTT CAT CGC R : TGG AAA ACA ATG CAA GTA CTA CCC
3번(153157 ~ 155834)	F : GGT ACG ATA CTA CGA CTT GTA GA R : GAA TTG TGC CGA TGT AAG TAT CG
4번(175826 ~176706)	F : CAT CCA CAT CAG GAG ACT CGT A R : ACT TTT AGC ACC GCG CAT CGT GT
5번(229997 ~ 235330)	F : TCA AGA TCG TTT TCG AAG CTC R : GTT CGT CAA AGG CAT TAA CGA C
6번(262113 ~266424)	F : CTT CAT GGC TGC TTT GTA TTT CTG R : CCT TGT AAG TGT GTT TAG TGA TG
7번(281346 ~ 282689)	F : GGG AGG AAC ATT GTT TTT CCT G R : CTG TGA TAT AGA AGA AGT AGC CG

Table 2. Primers used PCR amplification of the larger regions showing sequence difference between PBCV-1 and SS-2

Gap 번호	Primers
1-1	F : CTT CAG CAT TCA AGG GTG AAC R : CGT GAA AAT GTT GAA CAA GCT TG
1-2	F : CAC GCA GCA AAT TAA AAC ATT TCA G R : GCT GTA GAA GAA TTT CTT GAG GCA A
1-3	F : ATA CCG TTT CTT CAG TTT CCA CTC R : TCT TCC GTT TCA TAT AGA TGG
1-4	F : GGG TAG AAT GTC ATG ATT TTC CC R : GAG CGA AGA TAG TCT TAG TAA GAG
2-1	F : GAG GAA TTT TGA AAA CTT CAT CGC R : CGG TGC ATA ATA ATG ATA CGT C
2-2	F : ACT CCT ACT ATT GTA CCA GGT G R : AGC ATA CAT GTC AAT TGG CTT ACC
2-3	F : TGC ACC TGA AAT TGT TCA TGG AT R : TCT AGA TTG GAC GGT GCA TCA
2-4	F : TGC CCA CTC GAG ATT CTT ATA ATG R : CTT TAG AAG TTT TGC GTT CCT TTG C
2-5	F : ACG ATG AAG GGT GGA AAG TGT R : TGG AAA ACA ATG CAA GTA CTA CCC
5-1	F : TCA AGA TCG TTT TCG AAG CTC R : CTA CTC TGT ACA GAT GGT AGA TTC
5-2	F : ATC TCC TGG TTT ATC ACC AGT TG R : CAG GTT GTA TTA TTT CCA GAG GG
5-3	F : TTT GTG ATC AAA GCT CTG ACG AC R : CAT TTG TAT TTG CTA CCA TAG CGC
5-4	F : CGA CAT TAT CCT TGT AAA TAA GCG C R : GGC CAT GTT GTA TAC CAT TAT C
5-5	F : ACC TTC TCG TTT GTT CGA CA R : GTT CGT CAA AGG CAT TAA CGA C
6-1	F : CTT CAT GGC TGC TTT GTA TTT CTG R : TGA ACG ATG ATA GTC TCT GTG TG
6-2	F : TCT AAT TCG GCA GAC AAC GTC R : GGA ACC AAC TTG ACC ACA AAA AG
6-3	F : GTT CCT TAT CAA TGA AGT CAG G R : GTT TCT TGC AGC GAT GAG TTC
6-4	F : AGT GAC GAC GCT GTT CAC AAA R : CCT TGT AAG TGT GTT TAG TGA TG

Table 3. Oligonucleotide primers used for the PCR amplification of the early gene promoters from SS-2

ORF	F/R	Primer	Enzyme
A67R	Forward	CCC AAG CTT GTC CTT GAA GAA TT	HindIII
	Reverse	GCG GAT CCT GTT GGT TGC TTT	BamH I
A158L	Forward	ATA AAG CTT CGC GGT TGA CTT TG	HindIII
	Reverse	GCG CGG ATC CTA TAG ATA TTT ATA AT	BamH I
A312L	Forward	CCC AAG CTT GTA GAA TTA GAG AAC GTT	HindIII
	Reverse	CGC GGA TCC AGT AAA TAT GTT CTT T	BamH I
A342L	Forward	GCC CAA GCT TCA TTT ACA AAC TAT G	HindIII
	Reverse	CCG CGG ATC CTT CTA TAC TAT TTG TAT	BamH I
A548L	Forward	ATA AAG CTT TTG CCC CGC GAT C	HindIII
	Reverse	GCG GAT CCG ATT TTG GTA TGT	BamH I

초기 발현 유전자 promoter들의 pGEM-T vector 클로닝과 sequencing

PCR 산물들은 염기서열 확인을 위해 agarose gel에서 Power gel elution kit (Takara)을 통해 elution하였다. Ligated DNA는 *E. coli* XL1-Blue strain에 형질 전환 후, X-gal, isopropylthio- β -D-galactoside(IPTG)가 있는 배지에서 선별하였다. 흰색의 colony는 ampicillin(100 μ g/ml)이 포함된 LB broth에 접종하였고, plasmid DNA는 alkaline lysis 방법을 통해 추출하였다. 정제된 DNA는 EcoR I 으로 잘라서 1% agarose gel에서 전기영동으로 확인하였다.

원하는 insert를 가지는 plasmid들은 plasmid purification kit (Bioneer, Korea)로 정제하였다. 클론의 염기서열을 확인하기 위해 sequencing PCR을 실시하였다. Sequencing reaction mixture (promoter : 1000ng template DNA, promoter를 위한 4 pmol 의 T3 primer 또는 T7 primer, 초기 발현 유전자 promoters들을 위한 T7 primer 와 sp6 primer, 2 μ l의 terminator ready reaction mix)를 준비한 후, Eppendorf Mastercycler 9600 (Germany)으로 96 $^{\circ}$ C에서 10초간 denaturation, 50 $^{\circ}$ C에서 7초간 annealing 그리고 60 $^{\circ}$ C에서 4분간 extension의 PCR 반응과정을 25cycle동안 진행하였다. Sequencing 산물들은 에탄올로 침전시켜 template suppressing reagent(Perkin Elmer) 25 μ l에 녹였다. DNA는 98 $^{\circ}$ C에서 2분간 denaturation된 후 얼음에서 식힌 후, ABI PRISMTM 310 분석기 (Perkin Elmer)로 분석하였다.

클로렐라 형질전환 벡터

형질전환 벡터 pMinGFP는 fGH (Kim *et al.*, 2002)의 발현을 위한 식물 형질 전환 벡터 pCTV를 변형시켜 만들었다. 이 벡터는 *E. coli* 와 *Agrobacterium* 둘다에서 복제할 수 있는 ori V, kanamycin 저항성에 대한 npt III 유전자, 복제 support를 위한 trf A, integration을 위한 T-DNA의 right and left border, 그리고 phleomycin을 이용하여 형질전환체 선별을 위한 Sh ble 유전자를 갖고 있다. Sh ble 유전자는 *Chlamydomonas*의 RBCS2 promoter의 제어 하에 있다.

벡터 구축과 클로렐라 형질전환을 위한 준비

형질전환 된 클로렐라에서 GFP 유전자의 발현으로 각각의 promoter들 (procyclin precursor 유전자, aspartyl-tRNA synthase 유전자, regulatory protein 유전자, helicase 유전자, 알려지지 않은 단백질의 유전자의 promoter)의 효과를 비교하기 위해 각각 다른 발현 벡터를 만들었다. pMinGFP (Kim *et al*, 2002)(Fig. 1)의 GFP 유전자를 pCTV에 존재하는 fGH 유전자와 대체하기 위해 BamHI 과 XhoI 으로 잘라서 pCTV에 ligation하였다. 그리고 pCTV에서의 CaMV 35S promoter를 대체하기 위해서 T-easy 벡터에 클로닝된 promoter들을 HindIII 와 BamHI으로 자른 후 pCTV에 ligation하였다(Fig. 2).

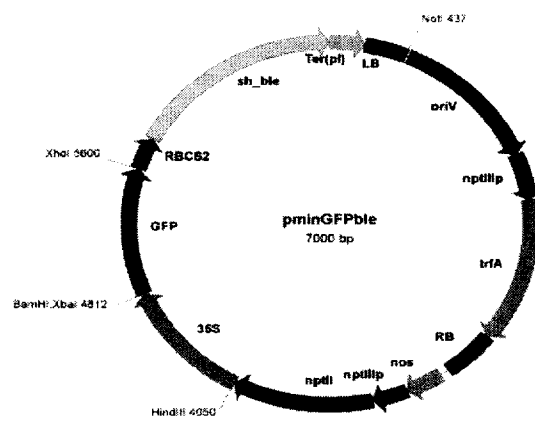


Figure 1. pMinGFP vector used for chlorella transformation

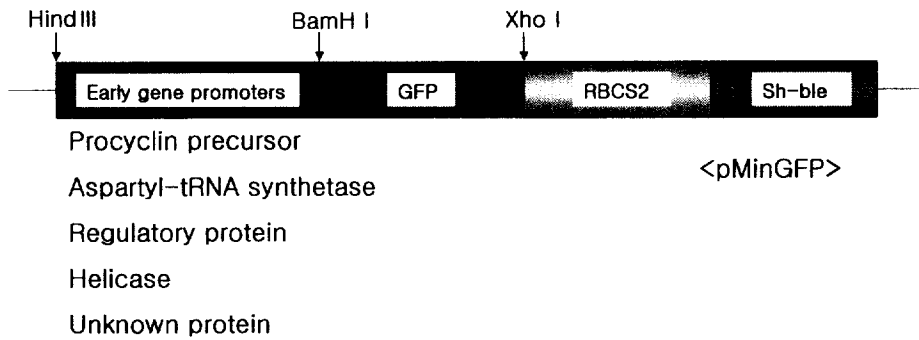


Figure 2. Vectors for chlorella transformation. The early gene promoters are transcriptional fused to the green fluorescence gene

클로렐라 균주와 배지

*Chlorella vulgaris*와 *Chlorella ellipsoidea*는 부경대학교의 한국미세조류은행으로부터 분양받았다(Strain No. KMCC FC-001 and KMCC C-20). 클로렐라들을 교반없이 chloramphenicol과 streptomycin이 각각 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 들어있는 f/2 배지 (Guillard and Ryther, 1962)에서 배양하였다. 처음에 1×10^6 cells/ ml 농도로 클로렐라들을 접종하였으며, 명기와 암기의 주기가 18:6이 되는 25°C 에서 3000 lux의 형광등하에서 배양하였다.

Protoplast 준비

클로렐라들은 접종 후 보통 8~9일 후, $1\sim 2\times 10^8$ cells/ ml 이 됐을 때 실험에 이용하였다. 배양된 클로렐라는 50ml씩 3,000×g에서 5분간 원심분리 하였다. 클로렐라는 25mM phosphate buffer (pH 6.0)로 washing한 후, 0.6M sorbitol, 0.6M mannitol, 4%(w/v) cellulase (Calbiochem), 2%(w/v) macerace (Calbiochem), 1% (w/v) pectinase (Sigma)가 들어있는 buffer 5ml에 현탁시켰다. 클로렐라 현탁은 암 조건에서 가벼운 교반과 함께 25°C 에서 16시간 동안 진행하였다.

클로렐라 형질전환

Protoplast는 400×g에서 5분간 원심분리시킨 후 상등액을 제거하였다. Protoplast는 0.6M sorbitol/mannitol이 포함 된 5ml의 f/2배지로 부드럽게 현탁시킨 다음 400×g에서 5분간 원심분리를 하여 washing하였다. Pellet은 1ml의 0.05M CaCl_2 가 들어있는 0.6M sorbitol/mannitol solution을 사용하여 현탁시켰다. $0.4\text{ml}(10^7\sim 10^8$ cells)의 protoplast를 새 원심분리 튜브에 옮기고 $5\mu\text{g}$ 의 vector

DNA와 DNA 운반체(Sigma)인 25 μ g calf thymus를 첨가한 다음, 실온에서 15분 배양 후에 200 μ l의 PNC(0.8M NaCl, 0.05M CaCl₂, 40% PEG 4000 (Sigma))를 첨가하고 살짝 섞어주었다. 실온에서 30분 배양 후에 0.6M sorbitol/mannitol, 1% yeast extract, 1% glucose를 포함한 0.6ml의 f/2 배지를 첨가하였다. 그리고 클로렐라는 25℃에서 12시간 동안 어두운 상태로 배양하였다. 형질전환 된 클로렐라를 1 μ g/ml의 phleomycin을 포함한 새 f/2배지에 옮겨서 25℃ 명기와 암기의 주기가 18:6이 되도록 3000 lux 형광등하에서 배양하였다(Fig. 3).

형질전환체 선별 및 GFP 유전자의 발현 관찰

형질전환체는 1 μ g/ml의 phleomycin을 포함한 f/2 배지에 옮겨져서 25℃ 명기와 암기의 주기가 18:6이 되도록 3000 lux 형광등하에서 배양하였다. 8일 동안 배양 후, 형질전환체를 선별하였으며 선별된 형질전환 클로렐라의 green fluorescence protein(GFP) 발현은 형광현미경을 통하여 관찰하였다.

10^7 - 10^8 protoplasts in 0.4ml 0.6M sorbitol/mannitol with 0.05M CaCl_2



Add 4ug vector DNA, 25ug carrier DNA



15 min incubation at room temperature



Add 200ul PNC buffer
(0.8M NaCl, 0.05M CaCl_2 , 40% PEG4000)



30 min incubation at room temperature



regeneration medium
(0.6M Sorbitol/mannitol, 1% Yeast extract, 1% glucose)



12hrs incubation (25°C, dark)



Transfer in f/2 Medium

Figure 3. Procedures for chlorella transformation

결과 및 고찰

SS-2 genome DNA 크기의 측정

1 liter의 클로렐라 배양액을 lysis 시켜 바이러스를 대량으로 얻었으며, 이로부터 약 1mg의 바이러스 DNA를 확보할 수 있었다. PFG 방법을 통해 SS-2 genome DNA 크기를 분석한 결과 SS-2 바이러스는 339.5kb 의 genome 을 가지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

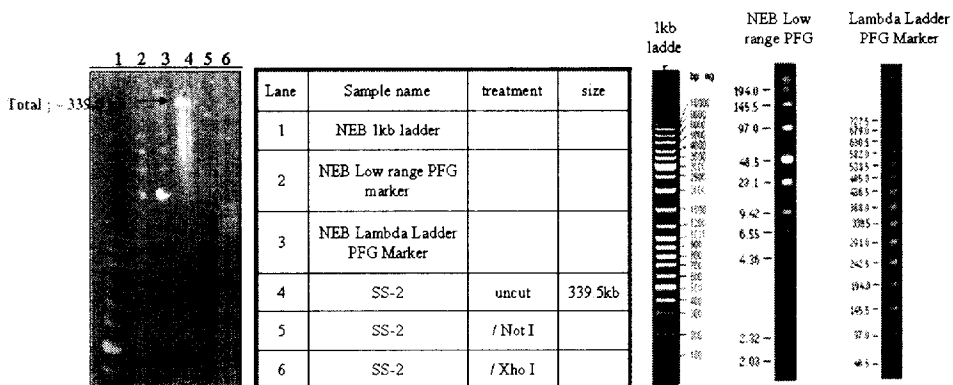


Figure 4. Size estimation of SS-2 genome using pulsed field gel electrophoresis.

SS-2 genomic DNA의 염기서열 분석

Nebulization을 통하여 2~2.5kb 크기로 단편화된 DNA를 확보하였으며, 이들 DNA를 gel에서 분리하여 genomic DNA library를 제작에 이용하였다(Fig. 6). Library로부터 약 12,000개의 클론 확보하였으며, 그 중 약100개의 insert size를 분석한 결과, 평균 1.5~1kb의 insert를 포함하고 있음을 확인하였다 (Fig. 7). 각 클론의 염기서열을 분석한 후, 큰 크기의 조각으로 재조합하여 양쪽 끝의 20kbp를 제외하고 약 310kb의 염기서열을 확보하였고(Fig. 8), 분석된 부분의 ORF를 검색한 결과 약 373개의 ORF를 확인할 수 있었다. 분석된 염기서열에 대하여 BLAST를 이용하여 유사 유전자를 검색한 결과 대부분이 같은 클로렐라 바이러스인 PBCV-1의 유전자와 유사한 것으로 확인되었다. SS-2의 331개의 ORF(79.77%)들은 PBCV-1의 ORF들과 상동성을 나타내었으나, 42개 ORF(20.23%)들은 PBCV-1 ORF들과 일치하지 않았다(Fig. 9).

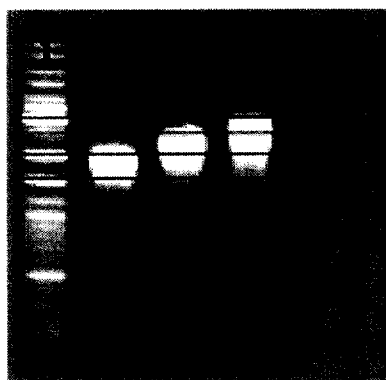


Figure 6. Size fractionation of nebulized genomic DNA for library construction. DNA fragments of 2-2.5kb were used. lane 1, 1kb DNA plus ladder; lane 2, 1.5-2kb inserts; lane 3, 2-2.5kb inserts; lane 4, 2-3kb inserts.

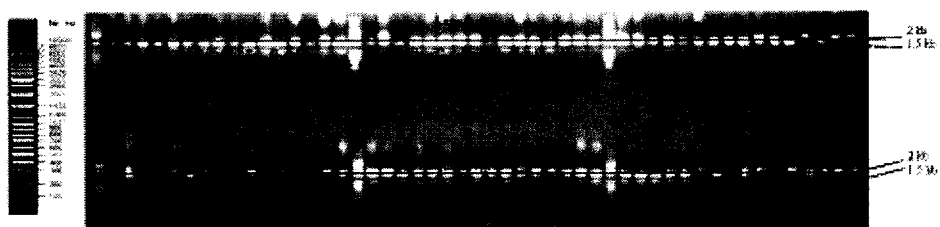


Figure 7. Size determination of the inserts from genomic DNA library by PCR amplification. The inserts were amplified with T3 and T7 promoter primers.

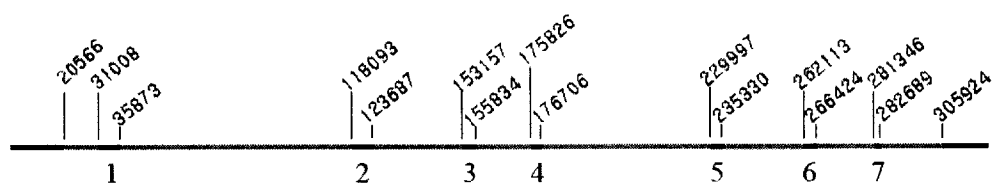


Figure 8. The members below the live indicates regions with no homology to corresponding regions of PBCV-1 genome.

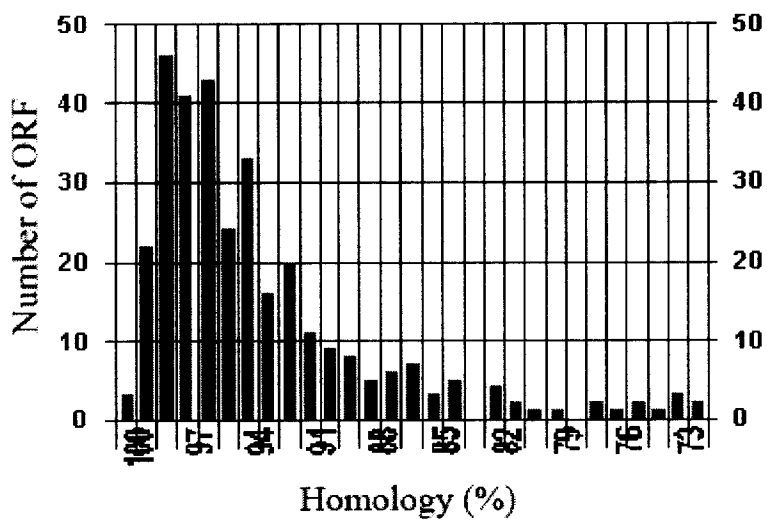


Figure 9. Comparison of the ORS of SS-2 and PBCV-1

PCR을 통한 염기서열 확인

7개의 gap 중에서 3개는 한번의 PCR로 확인하였고, 나머지 4개는 크기가 커서 PCR과 sequencing이 어려울 것으로 생각되어 4~5개의 primer set을 디자인하여 PCR 하였다. 그 결과는 Fig. 10과 같다. PCR 결과 예상되는 크기의 PCR 산물이 확인되어, 이 부분의 염기서열이 정확한 것임을 알 수 있었다. ORF에 대하여 blast 분석을 통하여 확인된 각종 유전자는 Table. 4에 요약하였다.

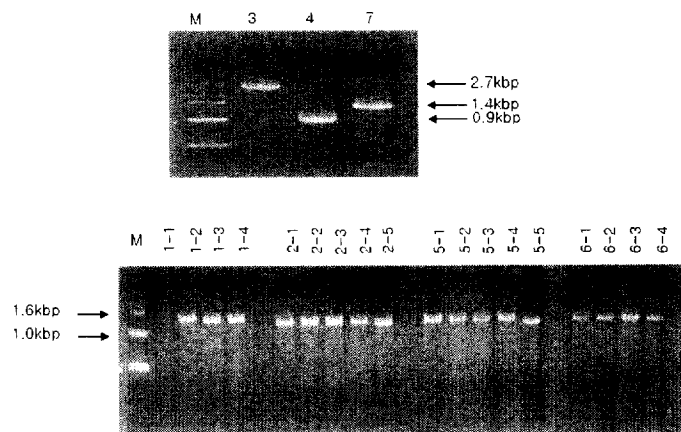


Figure 10. PCR amplification of regions with no sequence homology between PBCV-1 and SS-2. The numbers designate the gaps shown in Fig, 7.

Table 4. Summary of proteins encoded by the SS-2 genome

Biochemical Pathways	Proteins Encoded
Protein Synthesis, Modification and Degradation	Translation elongation factor-3, Prolyl 4-hydroxylase α -subunit, Thiol oxidoreductase, Protein disulfide isomerase, Ubiquitin C-terminal hydrolase, Ubiquitination of cell cycle protein, Zn metalloproteinase,
Nucleotide Metabolism	Aspartate transcarbamylase, Ribonucleotide reductase, Thioredoxin, Glutaredoxin, dUTP pyrophosphatase, dCMP deaminase, dG/dA kinase, Nucleotide triphosphatase, cytidine deaminase, Thymidylate synthase complement, ATPase
Lipid Manipulation	Glycerophosphoryl diesterase, 2-hydroxyacid dehydrogenase, Lysophospholipase, N-acetyltransferase
Signaling	Ser/Thr protein kinase, Tyr protein kinase, Tyr phosphatase, K ⁺ channel protein, Ligand-gated channel
Nerve Synapse-like Proteins	Potassium ion channel, NMDA glutamate receptor channel, AMPA glutamate receptor channel, Ornithine decarboxylase, Homospermidine synthase, Histidine decarboxylase, Tyrosine phosphatase
Glycosyltransferase	Glycosyltransferase, Fucosyltransferase, Glucosyltransferase
Sugar Manipulations	Hyaluronan synthase, Glucosamine synthase, UDP-glucose dehydrogenase, GDP-mannose dehydratase, Fucose synthase
Cell Wall Degrading Enzymes	β -1,3 glucanase, Chitinase, Alginate lyase, Endochitinase, Chitosanase
DNA Replication, Recombination & Repair	δ DNA polymerase, ATP dependent DNA ligase, DNA topoisomerase II, PCNA, Replication factor C, Rnase H, Superfamily III helicase, DNA binding protein, Exonuclease, Pyrimidine dimer-specific glycosylase
Miscellaneous	Ornithine decarboxylase, Homospermidine synthase, Monamine oxidase, O-alanine synthase, Fibronectin binding protein, Cu/Zn superoxide dismutase, Amidase, BCS1 protein, Histidine decarboxylase
Transcription	Transcription factor TF II B, Transcription factor TF II S, Transcription factor TF II D, VLTf2-type transcription factor, RNA guanylyltransferase, RNA triphosphatase, Superfamily II helicase, SWI/SNF helicase, SkiI helicase, RNase III

클로렐라 바이러스 초기 발현 유전자 promoter들의 PCR 증폭

초기 발현 유전자 procyclin precursor, aspartyl-tRNA synthetase, regulatory protein, helicase, unknown protein 유전자의 promoter로 예상되는 부분의 PCR 증폭을 위해 클로렐라 바이러스 SS-2를 농축하였다. 클로렐라 바이러스 SS-2의 초기 발현 유전자 염기서열을 토대로 하여, SS-2 초기 발현 유전자의 ATG codon에서 약 420bp 이전을 PCR 증폭할 위치로 보고, forward와 reverse primer들을 제작하여 PCR 하였다(Fig. 11). PCR 산물들의 크기는 대략 400bp 정도로 각각이 비슷하였다.

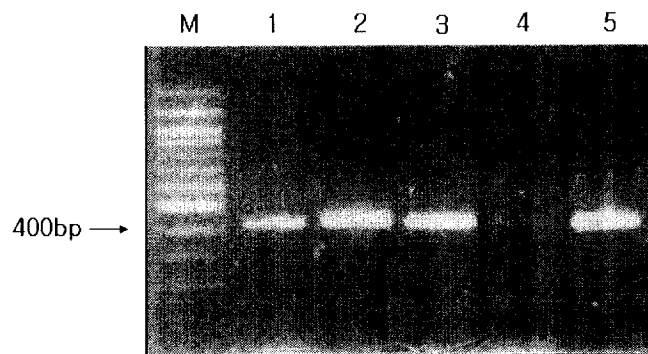


Figure 11. PCR amplification of early gene promoters from SS-2. M: 100bp DNA marker (bioneer) ; 1: Procyclin precursor gene promoter ; 2: Aspartyl-tRNA synthetase gene promoter ; 3: Regulatory protein gene promoter ; 4: Helicase gene promoter ; 5: Unknown protein gene promoter.

다섯 개의 초기 발현 유전자 promoter들의 클로닝과 sequencing

초기 발현 유전자 promoter들은 클로렐라 바이러스 SS-2에서 분리한 것으로부터 증폭시켰다. 분리된 PCR 산물은 pGEM T-Easy 벡터로 클로닝하였고, 그것의 염기서열을 확인하였다(Fig. 12). 초기 발현 유전자 promoter들의 염기서열 분석 결과 SS-2의 염기서열과 거의 일치한다는 것을 알 수 있었다.

"TATA-box"처럼 5'-ATGACAA-3'와 5'-TATAAAT-3'인 두개의 sequence elements가 초기 발현 유전자에서 공통적으로 발견되었다.

클로렐라 형질전환 벡터를 이용한 클로렐라 형질전환

T-easy 벡터의 초기 발현 유전자 promoter들을 HindIII와 BamHI으로 잘랐고, CaMV 35S promoter를 대체하기 위해 HindIII, BamHI로 자른 pCTV에 클로닝하였다(Fig. 13).

A67R

```
TGGGCGTACATCGGAGGTAAACGACCGGAACACGAATGGAATGTATTTGCAAAGCAATGGGATATACAGGTGCCGTAACAACTTTTACGGTGGGCTAT 100
CTCTCAGACGTCGTGATGCTATGCTCAGAGTCCTTGAAGAATTTCCACCAAGTATCACTCAATTTAATAGCACCGTCCACACCGAGATGCCGGAAGATGC 200
ATATTTTGTATTGGAGTATTAACTTGGTCTTAAACATAGGGGAAACGATCCTGCTGCAAGATACTTTTGTGTTTCACAATGACTATACGAGTTTCGAA 300
TATGATTTTGTAGCAGCGCACAAACATTTTCAGAGATTTCCATGGCTAGAGAATATTTTCCACCTATACCCAATGGCAAGGCAGAACAGATACCTAT 400
AATGTCAATTTTACCAAGGTAGAATGTCAATTTTACCAAGGTAGATGACAAATGACAAATGACATTTCTTTAGTATAAATAAGGTGTTTGTATAATTGAATG 500
TATCTCAAATATCAAAGCAACCAACAATG
```

A158L

```
GTCTCAGTCTTCACCGTCTCAGTCTTCACCGTCTCAGTCTTAATGTATTTTTTAAACCCGCGGTTGACTTTGGTGCAGGGGCGTTCAAGACGACAGCGC 100
GGGTCTTGGCATTATCGATCGCTCGCTCGAAAGACGCCTTCATCTTGGCAATGCTTGGCTCCATCTTGGCCTTGTGGCAGCGATAGTAGCGACGTTGGTGTT 200
CATTTATGGCTTTGGGATTTGTTTGGCTTTGGGGTTTGGTTGCTTTGAAAAATGGTAAAGAAATATCAGTTTTCATGAACCTCATATACACTTCTTTGAAATGA 300
CAATACTGGGTCAAAATGACACAAAAATGACACAAAAATGACACAAAAATGACACAAAAATGACACAAAAATGACACAAAAATGACACAAAAATGACATTTT 400
AATAGACATAAAAGGAGCGTCTTGGTACACCTAACATCAAATTATAAATATCTATAATG
```

A312L

```
ATAAATATTGTGATTTCTCATACACTATAAAACATTTTCGTATCGACAAAAAATAATTTGGTAGTGTAGATGAATAGAGTAGAATTAGAGAACGTTTTG 100
AGACCTGTTTATATAACTTCGGTGTGGTAGGAAAAACGAGGTCCAGTACCCGGTTGGGATTTGCCGGCGACGATAGCATCCGTGTTTGTGGTTCTTA 200
TATTGATTACCTTGATCAAAATTTACGAGAGTATCACCAGTGGAAAGTGCATGATGTGTGGGACAATACATAAAATGACAAATGACAAATAAATGACAA 300
CCGTCAATCAACAAGAAAAAGCATTTAAGCAACTGTTTTCACACTAACTCATCTTCTCCTTCGGGACTACCATCTGAACAACTACTGAACAAACAAA 400
GAAACAAACAAACAAACGCTCTCCGTAAACAAACCTCAATAACCCCTCAACAAACCTCCCAAGAAAAAGAACATATTTACTATG
```

A342L

```
TATAAAGGACAAATGAATAGAAATATCCCCGCCATGGCAGACGGAAGATCATTTACAAACTATGTGTCCAGCGGCTCGGATAACAACTATCTCGAAGGTA 100
AATTCGAAACCCCGAAGATTCCGATTACCGACTGCATTCCTCTAAAGAACGCAAGGAGGTGCAAAAAACTGGCAACGCTCTCACTGTGTACTACGTA 200
AAACCCCTGTGATGCCGAGGGTGAACCTGAATGTGACCGGCGATGCCAACGCAAGATGACTGCCGCTCCTGTTGATTACAACCCAGAGAAATACCTGGACG 300
ACAGTTACACAGATACTATGACTAAATTCGAAAGGGGACTCGGTAATCATTTTATAACATTTTTATAGTATTTTACAGCACATTAATATCATACAAATG 400
ACGTGAATGTAAATTTAATTTATTTTATATACAAATAGTATAGAAATG
```

A548L

```
GGGACGTATCGCCGTTTCTACAGGTATTTCTATTGCGGTTCCAAATGGGACATATGGTGAATTGCCCGCGATCAGGCCCTCGCTTATAAATATGGTATT 100
GATGTACTTGCCTGTGATTGATGAAGATTATACCGGTGAAGTAAAGCAATCCTTTACAACTACAGAACGTGATTATATTATAAAAAGGTGACC 200
GCATCGCTCAGCTTATCTTGAACAGATTGTTACCCCGGGAGTTGCCGTTGTACTTGATCTTTCTGACACTGCCCGAGGCTCTGGAGGGTTTGGAAAGTAC 300
GGGAATCTGATTATCGTGACCTGTAGAAAGTTCTTTCAAGAAAGAAATGACAAATGACAAATGACAAATGACAAATATGTATAAATGTATTTTGTAT 400
TTCATTGTTTATTATCTCAAAATACAAACACACAAAGCACAAAGCACAAAGCACATACCAAATCATG
```

Figure 12. Nucleotide sequence of early gene promoters isolated from SS-2 genome.

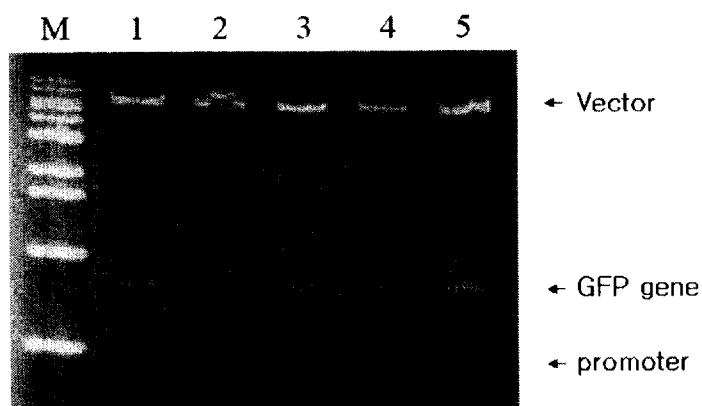


Figure 13. Confirmation of cloned promoter and GFP gene by restriction enzyme digestion. Purified plasmid DNAs were digested with BamHI, XhoI and HindIII. M, size marker; Lane1, procyclin precursor gene promoter; Lane2, aspartyl-tRNA synthetase gene promoter; Lane3, regulatory protein gene promoter; Lane4, helicase gene promoter; Lane5, unknown protein gene promoter

GFP 유전자 발현량의 측정

초기 발현 유전자 promoter들과 CaMV 35S promoter가 들어있는 여섯 개의 클로렐라 형질전환 벡터를 클로렐라에 형질전환하였다. 형광현미경에서 형질전환하지 않은 클로렐라는 붉은색으로 관찰되었으며, 형질전환한 클로렐라들은 녹색으로 관찰되었다(Fig. 14).

GFP의 발현 세기는 CaMV 35S-GFP fusion(35S 100%) vector를 형질전환시킨 클로렐라를 기준으로 하여 값을 비교하였다(Table. 3).

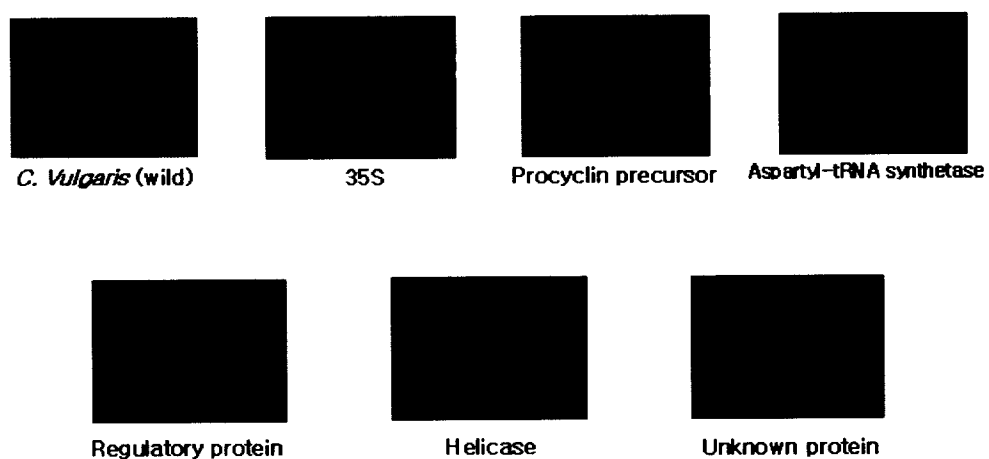


Figure 14. *Chlorella* cells transformed with vectors containing early gene promoter-GFP fusion.

Table 3. Comparison of promoter activity in transformed chlorella cells.

ORF as early gene promoter region	GFP intensity (%)
35S promoter	100
Procyclin precursor gene	131.5
Unknown protein gene	135.19
Aspartyl-tRNA synthetase gene	116.79
Regulatory protein gene	110.29
Helicase gene	105.18

고 찰

클로렐라는 많은 면에서 외부 단백질을 발현 할 수 있는 시스템으로서 많은 장점을 가지고 있다. 그러나 발현 시스템으로서의 이 생물의 연구는 적절한 형질 전환 벡터의 부재 등에 의해 활발하지 않았다. 최근에, 넙치 성장 호르몬(FGH)이 형질전환 된 클로렐라에서 발현된 사례가 있었다 (Kim *et al.*, 2002). 형질전환 된 클로렐라는 동물성 플랑크톤을 통해 작은 고기에게 직접 공급하였을 때 넙치치어의 성장을 촉진했다. 그것은 생물학적 활성을 발현하였다는 것을 말해준다.

의학적으로 중요한 단백질의 상업적 생산을 위한 이러한 시스템의 적용을 위해서 개선되어야할 여러 가지 것들 중 하나가 바로 강하고 구조적인 promoter의 개발이다. CaMV 35S promoter는 미세조류의 형질전환에 이용되고 있으며, 미세조류의 세포에서도 활성이 있다는 것이 밝혀졌다 (Mitra *et al.*, 1994). 그러나 외래 단백질의 대량 생산을 위해서는 지속적이고 강력한 promoter의 개발이 필요하다.

클로렐라 바이러스는 heterologous 단백질에서 사용될 수 있는 많은 유용유전자나 promoter들을 담고 있으며, 약 330~380kb의 큰 이중나선 DNA 바이러스이다. 예를 들면, 클로렐라 바이러스 adenine methyltransferase 유전자의 upstream 부분은 식물과 박테리아에서 강한 promoter로 작용한다(Mitra *et al.*, 1994).

바이러스의 유전자들은 초기유전자와 후기 유전자로 나누어질 수 있는데, 그것들은 각각 바이러스 복제와 바이러스 입자의 형성에 관여한다. PBCV-1의 초기 유전자는 초기 접종 후 5~10분 또는 그 즉시 숙주 cells에서 발현된다(Schuster *et al.*, 1996). 알려진 바에 의하면 PBCV-1은 그 자신의 DNA dependent RNA polymerase를 암호화하지 않는데, 이것은 아마도 숙주의 효소를 이용할 것이다 (Van Etten, 2003). 따라서 클로렐라 바이러스의 세 가지 초기 promoter들의 유전자인 DNA polymerase, ATP-dependent DNA ligase, chitinase 유전자는 DNA 복제를 위해 필수적이라고 알려져 있으며(Van Etten, 2003), 연구를 통해 클로닝되었고 형질전환 된 클로렐라에서 그들의 활성이 시험되어졌다.

본 연구에서는 클로렐라 바이러스 SS-2의 전체 genome에 대한 분석을 시도하였다. SS-2의 genome은 340kbp로 예상되나, 선형의 DNA genome의 양끝부분 약 20kbp가 제외된 약300kbp의 염기서열에 대한 분석을 완료하였다. 클로렐라 바이러스의 prototype인 PBCV-1과 비교하였을 때 372개의 PBCV-1 ORF들과 SS-2는 331개가 상동성을 갖는 것으로 확인되었으며, 그것은 SS-2가 PBCV-1과 매우 유사하다는 것을 나타내준다. 분석한 염기서열에 기초하여, 다섯 개의 초기 발현 유전자 promoter 부분은 procyclin precursor 유전자, aspartyl-tRNA synthetase 유전자, regulatory protein 유전자, helicase 유전자, unknown protein 유전자를 암호화하고 있는 open reading frame인 A67R, A312L, A342L A548L, A158L로부터 각각 클로닝하였다. 각각의 초기 발현 유전자 promoter들을 특이적으로 디자인 된 primer를 이용하여 증폭하였으며, promoter들의 활성은 형질전환된 클로렐라들로부터 GFP의 발현 세기를 측정하여 분석하였다. Fig. 14에서 보는 것처럼, 형질전환 되지 않은 클로렐라는 붉은색의 형광을 나타내는 반면 GFP를 포함하는 벡터로 형질전환한 클로렐라는 녹색의 형광을 나타내어 형질전환되지 않은 세포와 구별되었다. CaMV 35S-GFP fusion (100%)으로 형질전환 시킨 클로렐라와 GFP 발현 세기를 비교하였을 때, procyclin precursor 유전자, aspartyl-tRNA synthetase 유전자, regulatory protein 유전자, helicase 유전자, unknown protein 유전자 promoter-GFP fusion으로 형질전환 된 각각의 클로렐라에서 131.5%, 116.79%, 110.29%, 105.18%, 135.19%의 발현 정도를 보여주었다. 이는 초기 발현 유전자 promoter들은 식물 형질전환에 있어 새로운 강한 promoter라는 것을 말해주며 이것은 식물 형질전환에 있어 더욱 강한 새로운 promoter들로 대체될 것이라는 것을 말해준다.

Analysis of the genome of a chlorella virus SS-2 and isolation of promoters for microalgae transformation

장 재 경

부 경 대 학 교 대 학 원 미 생 물 학 과

요 약

클로렐라 바이러스는 phycodnaviridae에 속하는 큰 20면체의 구조이며, 플라크를 형성하는 이중 나선의 DNA 바이러스이다. 300kb 이상의 genomic DNA는 많은 유용한 유전자와 promoter들을 포함한다. 본 연구에서는 클로렐라 형질전환 시스템에 사용될 수 있는 강한 promoter를 분리하기 위하여 한국에서 분리된 클로렐라 바이러스 SS-2의 genomic DNA의 분석을 수행하였다. SS-2의 genome은 펄스 필드 겔(PFG) 전기영동 결과 약 340kbp로 추정되었으며 이로부터 제작된 genomic DNA의 분석을 통하여 300kbp 이상의 뉴클레오타이드 염기서열을 확보하였다. 클로렐라 바이러스의 원형체인 PBCV-1으로부터 확인된 372개의 ORF 중에서 331개는 SS-2와 상동관계가 확인되었는데, 그것은 SS-2는 PBCV-1과 매우 유사하다는 것을 말해준다. 분석된 염기서열을 기초로 하여, procyclin precursor, aspartyl-tRNA synthase, regulatory protein, helicase, 그리고 기능이 알려지지 않은 단백질을 암호화하는 ORF 등 총 5개의 초기 발현 유전자 promoter 부분을 클로닝 하였다. 이러한 promoter 부분은 TATA box, CAAT box, GAGA box, CCAAT 등 전사 요소가 결합할 수 있는 cis-acting elements를 포함하고 있었다. 이들 promoters에 fusion 된 green fluorescence protein (GFP) 유전자를 포함하는 클로렐라 형질전환 벡터를 제작하여 클로렐라를 형질전환한 후 GFP의 발현세기를 조사한 결과 CaMV 35S-GFP fusion 벡터로 형질전환된 클로렐라에서의 형광세기를 100%로 하였을 때 procyclin precursor 유전자, aspartyl-tRNA synthase 유전자, regulatory protein 유전자,

helicase 유전자, 그리고 알려지지 않은 단백질의 유전자의 promoter-GFP로 형질전환 한 클로렐라들은 각각 131.5%, 116.79%, 110.29%, 105.18%, 135.19% 강도를 나타내었다. 이러한 결과는 클로렐라 바이러스의 genome은 다양한 유용 유전자 및 강력한 promoter의 원천이 될 수 있다는 것을 제시한다.

감사의 글

이 논문을 쓰기까지 실험실생활이 벌써 5년이 지났네요. 그동안 칭찬과 꾸짖음으로 저를 여기까지 오게 해주신 최태진 교수님께 진심으로 감사드리며, 학과장이신 이원재 교수님이하 김진상 교수님, 이훈구 교수님, 송영환 교수님, 김영태 교수님, 이명숙 교수님, 김군도 교수님께도 감사의 말씀을 전하고 싶습니다.

실험실 생활 처음부터 이것저것 가르켜 주고 챙겨준 선배들, 은영이 누나, 종오형, 현화누나, 현향이 누나부터 지연이, 선미도 고마웠고, 실험실에서 이것저것 잔일들 열심히 해가며 실험 뒷바라지 해준 후배들도 무척 고맙네요. 또, 우리 실험실은 아니지만, 실험에 대해 많은 얘기도 해주고 때론 술친구도 되어준 대성이형, 용배형, 윤숙이, 성주한테도 많이 고맙구요. 제가 지금 이렇게 좋은데서 일하게 해준 (주)바이오니아 박한오 사장님을 비롯한 회사 식구들에게도 감사드립니다.

지금은 비록 일찍 취직해서 학교에 없어서인지 벌써부터 학교가 그리워지네요. 그 긴 시간이 어떻게 지나갔는지 모르겠네요. 생각해보면 재밌었던 일도 많았고, 기분상한 일도 있었지만, 지금의 나를 만들기 위한 과정이 아니었나 싶습니다.

졸업 한 후에도 잊을 수 없을 것이며, 제가 선배들에게 도움을 받았던 것처럼 제 일을 하면서도 후배들을 위해 많이 신경쓰는 선배가 되겠습니다.

끝으로, 키워주시고 공부시켜주신 부모님께 가장 고맙게 생각한다고 말씀드리고 싶네요. 감사합니다.

REFERENCE

Cho, H. H., Park, H. H., Kim, J. O. and Choi, T. J. (2002). Isolation and characterization of *Chlorella* viruses from freshwater sources in Korea. Mol. Cells 14:168-176

Delaroque, N., Boland, W., Muller D. G. and Knippers, R. (2003). Comparisons of Two Large Phaeoviral Genomes and Evolutionary Implications. J. Mol. Evol. 57:613-22

Delaroque N., Muller D. G., Bothe G., Pohl T., Knippers, R. and Boland, W. (2001). The Complete DNA Sequence of the Ectocarpus siliculosus Virus EsV-1 Genome. Virology 287:112-32

Guillard, R. R. and Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Can J Microbiol. 8:229-39.

Kim, D. H., Kim, Y. T., Cho, J. J., Bae, J. H., Hur, S. B., Hwang, I., and Choi, T. J.. (2002). Stable integration and functional expression of flounder growth hormone gene in transformed microalga, *Chlorella ellipsoidea*. Mar. Biotechnol. 4:63-73

Kawasaki, T., Nishida, K., Fujie, M., Usami, S. and Yamada, T. (2000). Characterization of immediate early genes expressed in chlorovirus infection. Nucleic Acids Symp Ser. 44:161-2

Kawasaki, T., Tanaka, M., Fujie, M., Usami, S. and Yamada, T. (2004).

Immediate early genes expressed in chlorovirus infections. *Virology*. 318:214-23.

Mitra, A. and Higgins, D. W. (1994). The chlorella virus adenine methyltransferase gene promoter is a strong promoter in plants. *Plant Mol. Biol.* 26:85-93.

Mitra, A., Higgins, D. W. and Rohe, N. J. (1994). A chlorella virus gene promoter functions as a strong promoter both in plants and bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 204:187-194.

Nishida, K., Kawasaki, T., Fujie, M., Usami, S. and Yamada, T. (1999). Aminoacylation of tRNAs encoded by chlorella virus CVK2. *Virology* 263:220-229.

Schuster, A. M., Burbank, D. E., Meister, B., Skrdla, M. P., Meints, R. H., Hattman, S., Swinton, D. and Van Etten, J. L. (1986). Characterization of viruses infecting a eukaryotic Chlorella-like green alga. *Virology* 150:170-177.

Van Etten, J. L. (2003). Unusual life style of giant chlorella viruses. *Annual Review of Genetics* 37:153-195

Van Etten, J. L., Burbank, D. E., Kuczmarski, D. and Meints, R. H. (1983). Virus infection of culturable Chlorella-like algae and development of a plaque assay. *Science* 219:994-996.

Van Etten, J. L., Johnson, J. K. and Burbank, D. E. (1985). A survey for viruses from fresh water that infect a eukaryotic Chlorella-like green alga.

Appl. Environ. Microbiol. 49:1326-1328.

Van Etten, J. L., Burbank, D. E., Schuster, A. M. and Meints, R. H. (1985).
Lytic viruses infecting a *Chlorella*-like alga. *Virology* 140:135-143.

Van Etten, J. L., Burbank, D. E., Xia, Y. and Meints, R. H. (1983). Growth
cycle of a virus, PBCV-1, that infects *Chlorella*-like algae. *Virology*
126:117-125.

Van Etten, J. L., Meints, R. H., Burbank, D. E., Kuczmarski, D., Cuppels, D.
A. and Lane, L. C. (1981). Isolation and characterization of a virus from the
intracellular green alga symbiotic with *Hydra viridis*. *Virology* 113:704-711.

Yamada, T., Shimomae, A., Furukawa, S. and Takehara, J. (1993). Widespread
distribution of *Chlorella* viruses in Japan. *Biosci Biotechnol Biochem.*
57:733-739.