

*Chlamydomonas*의 엽록체 DNA 모성유전에 관한 연구

이 순 희

연세대학교 생물학과

서론

단세포성 녹조류인 *Chlamydomonas reinhardtii*는 광합성을 연구하는 재료로써 뿐만아니라 엽록체 DNA의 모성유전에 대한 모델로 많은 연구가 이루어지고 있다. 모성유전은 *Chlamydomonas*에서 일어나는 streptomycin에 대한 저항성을 가지는 세포질 유전인자의 비멘델성(모성)유전을 통해서 증명되었다(Sager, 1954). 그 이후 이와 비슷한 현상들이 보고되었으며(Gillham, 1974), 이러한 보고들에 의해 *C. reinhardtii*에서 밝혀진 중요한 가설은, 모성유전의 메카니즘들이 아마도 효소반응에 근거를 두고 있을 것이라는 것이다(Sager, 1981).

세포화학적, 생화학적 연구(Sager and Ishida, 1963)에 의하면 *C. reinhardtii*의 엽록체는 자신의 DNA를 가지고 있어서 엽록체 유전자의 모성유전은 엽록체 DNA(cpDNA)와 연관성이 있다고 하였다. 자손세대에서 자성의 엽록체 유전자의 선택적인 발현은 응성의 엽록체 유전자의 전사나 번역의 억제나 응성의 엽록체 DNA의 파괴(Sager and Ramanis, 1973), 또는 접합 이후 자성의 cpDNA의 선택적인 복제에 의해 일어날 것(Gillham, 1974)이라고 추측할 수 있다. 그런데, 생화학적인 연구에 의하면, 자성기원의 cpDNA는 접합체 형성 이후 6시간이 지난 접합체에서 계속 유지되지만, 응성기원의 cpDNA는 사라진다(Sager and Lane, 1972). 이러한 사실은 *C. reinhardtii*의 엽록체 DNA의 모성유전 메카니즘에 응성 cpDNA의 우선적인 파괴가 큰 역할을 담당하고있는 것으로 보여지고 있다. 이러한 응성 cpDNA의 우선적인 파괴를 설명하고자 cpDNA의 모성유전이 세균에서와 비슷한 modification과 restriction system에 의해 조절된다고 하는 한 가설이 제안되었다(Sager and Ramanis, 1973). 그러나 이 가설은 엽록체 DNA의 모성유전에 직접적으로 관여할 것으로 가정되는 제한효소가 아직 밝혀지지 않고 있으며, 모성유전에 관여할 DNA methyltransferase의 분리와 그 특성이 정확하게 규명되지 않고 있어 위의 가설이 확실히 입증되지 못하고 있는 상황이다. 이와 더불어, 최근 "The coupled endo- and exonuclease" 일명, "Active digestion hypothesis"라는 새로운 가설이 제안되었으나(Ogawa and Kuroiwa, 1985a, b, c, 1986), 이

가설은 자성의 엽록체 DNA의 methylation과 nuclease C와의 상호연관성이 뚜렷하지 못한 점이 미비점으로 나타나고 있다.

이상에서와 같이 *C. reinhardtii*의 엽록체 DNA의 모성유전 메카니즘에는 효소반응이 참여할 가능성이 매우 크게 나타나고 있으나, 옹성의 cpDNA에 대한 자성의 cpDNA의 선택적인 methylation과 더불어 옹성의 cpDNA의 우선적인 파괴에 작용할 nuclease가 밝혀지지 않고 있으며, 또한 엽록체 DNA methyltransferase의 존재는 밝혀졌으나 그 특성이 규명되고 있지 못한 상황에서, 본 연구에서는 엽록체 DNA의 모성유전에 관여할 물질(들)의 규명에 좀 더 접근하고자 하며, 현재까지 제안된 cpDNA의 모성유전에 대한 가설들과 아직 충분치는 못하지만 이에 접근하고자 하는 몇가지 실험결과들을 소개하고자 한다.

본 론

1. Modification-Restriction System 가설에 대한 접근

일반적으로 DNA methylase는 매우 중요한 생물학적인 기능을 나타낸다. 원핵생물에 있어서 DNA methylation의 역할은 외부로 부터 도입된 DNA로 부터 자신의 DNA를 구별 인지하여 보호하는 보호 메카니즘으로도 알려져 있으며 transposon activity의 조절에도 관여하며, DNA 복제시 mismatch repair의 strand의 특이성도 결정한다(Messer and Noyer-Weidner, 1988; Barrus and marinus, 1989). 또한 진핵생물의 핵 DNA에 있어서의 methylation은 DNA복제, 유전자 발현, 세포분화등을 조절한다고 생각되고 있다(Mohandas et al., 1981; Razin and Riggs, 1980).

그러나, 일반적으로 진핵생물의 organelle DNA에는 이러한 methylation이 일어나지 않으나 *Chlamydomonas*의 엽록체 DNA에는 methylation이 일어나며(Dyer, 1982), 이것은 *Chlamydomonas*의 mating type과 생활시기에 따라 상이한 경향을 나타낸다. 이러한 근거에 의해 *Chlamydomonas*에 있어 엽록체 DNA의 모성유전을, 원핵생물에서 존재하는 modification-restriction system으로 설명하는 가설이 제안되었다(Sager and Ramanis, 1974; Burton et al., 1979). 즉, 영양생장기의 세포가 배우체가 될때 선택적으로 자성배우체의 엽록체 DNA에 methylation이 일어나서 접합체 형성시, 제한효소의 공격으로 부터 보호되고 methylation이 일어나지 않는 웅성 배우체의 엽록체 DNA는 파괴되어, 결과적으로 엽록체 DNA의 모성 유전이 일어난다는 것이다(Fig. 1) (Sager et al., 1984).

이러한 자성배우체의 특이적인 methylation은 영양생장기, 배우체가 그리고 접합체기에서 CsCl 밀도구배 초원심분리법에 의한 엽록체 DNA의 buoyant density의 변화(Sager and Lane, 1972; Burton et al., 1979)와 자성 배우체의 엽록체 DNA를 추출, 가수분해하여 HPLC를 사용하여 5-methylcytosine을 검출 확인 하였다(Burton et al., 1979). 또한 상이한 methylation 경향을 연구하는데 유용한 방법인 제한효소 MspI과 HpaII에 의한 절단양상을 비교한 결과에서도 자성배우체

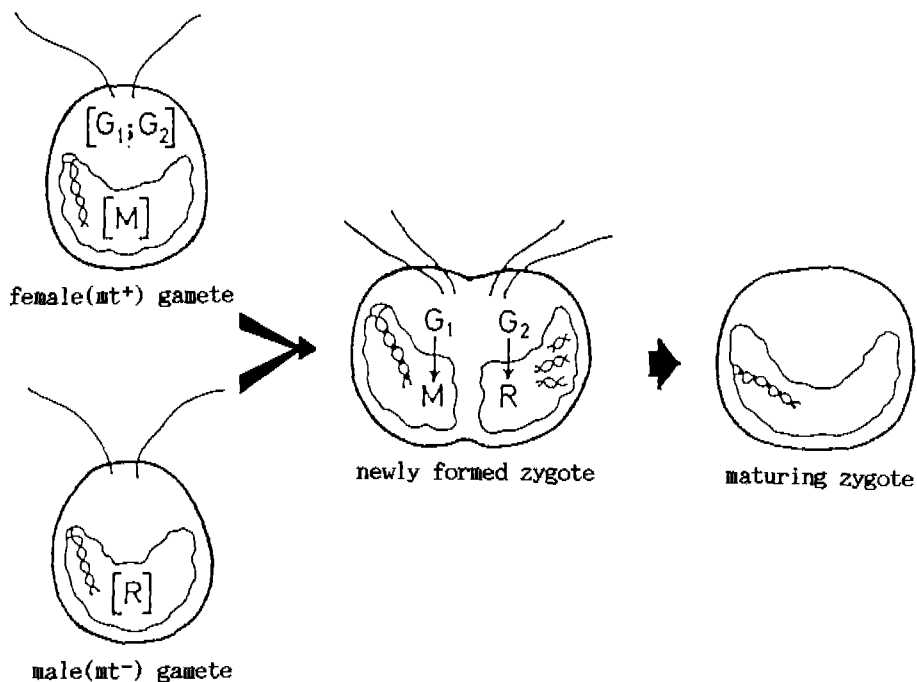


Fig. 1. Postulated control of maternal inheritance of chloroplast DNA(cpDNA) in *Chlamydomonas* by a methylation-restriction mechanism. Female(mt^+) gamete contains inactive modification enzyme M in chloroplast, and two regulatory substances, G_1 and G_2 , in the cell sap. The male(mt^-) gamete contains inactive restriction enzyme R in its chloroplast. Before fusion of chloroplasts, the methylase is activated by G_1 to modify cpDNA in the female chloroplast, and the restriction enzyme is activated by G_2 to degrade cpDNA in the male chloroplast. The two chloroplasts then fuse, and only the cpDNA from the female parent is available for replication.(Nuclei are not shown for sake of clarity.)

에만 특이적으로 cytosine methylation이 일어난다는 것을 확인하였다(Royer and Sager, 1979). 이와 더불어, 두 종류의 methyltransferase의 존재도 확인되었고(Sano and Sager, 1980; Sano et al., 1981), 이들 분자량 60 KD와 200 KD 두 종류의 효소중 200 KD가 mating type과 생활시기에 특이적인 methylation을 수행할 것이라고 보고되었다(Table 1) (Sano et al., 1981). 그 이유는 웅성과 자성의 영양생장기, 배우체에 모두 존재하는 60 KD의 methylase와 달리 200 KD의 methylase는 자성의 배우체기와 접합체 시기에만 존재하고 있기 때문이다. 이와같은, 생활 시기와 mating type에 특이적인 methylation과 methylase의 존재 외에도 엽록체 DNA의 모성유전을 설명하는 근거들로서 여러 돌연변이체를 이용한 연구들도 수행되었다. 웅성세포에 UV를 조사하여 인위적으로 양성유전을 나타내는 돌연변이체 *mat-1*을 유도시킨 경우, 그 웅성 배우체의 엽록체 DNA에 methylation이 일어난다는 것이 보고되었고(Sager et al., 1982). 영양생장기의 웅성과 자성의 cpDNA에 이미 광범위한 methylation이 일어나 있음에도 불구하고, 정상적인 모성유전이 일어남으로써 모성유전에 modification과 restriction

Table 1. DNA methyltransferase activity at various stages in life cycle of *Chlamydomonas*.

Stage in life cycle	No. of exps.	Enzyme, units per 10 ⁹ cells (% of total)		
		Total	M _r 60,000	M _r 200,000
<i>mt</i> ⁺ vegetative	6	3.4	2.8 (86)	0.6 (14)
<i>mt</i> ⁺ gamete	2	3.1	1.7 (55)	1.4 (45)
<i>mt</i> ⁻ gamete	2	1.8	1.8 (100)	— —
<i>mt</i> ⁻ <i>mat-1</i> gamete	2	6.7	5.1 (76)	1.6 (24)
Zygote	3	22.8	— —	22.8 (100)

Total activity was estimated from elution profiles of enzymes from DEAE-cellulose column chromatography in replicate experiments.

Table 2. Purification of DNA methyltransferase from *Chlamydomonas*.

	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Purification (fold)	Recovery (%)
Crude supernatant	1840	414	0.23	1	100
Ultra supernatant	532.9	380	0.71	3.08	91.8
Ammonium sulfate fraction	202.6	310	1.53	6.65	74.9
DEAE-cellulose fraction	442	344	7.78	33.83	83.1
Hydroxyapatite fraction	4.4	286	65	282.61	69.1

note: The protein concentration was estimated from Lowry's method(1951).

system이 관여할 것이라는 가설에 반대되는 근거를 제시하던 me-1돌연변이체의 경우(Bolen et al., 1982), 자성의 배우체에서만 선택적인 methylation이 계속 더 일어난다는 사실이 밝혀지면서 modification- restriction system 가설을 더욱 가능성 높게 해 주었다(Sager and Grabowy, 1983). 그러나, 한편으로는 methylation inhibitors(5-Azacytidine, L-Ethionine)를 처리한 결과, 약 70% 정도의 methylation이 억제됨에도 불구하고 정상적인 모성유전이 일어나므로써, modification-restriction가설에 반대되는 결과도 보고되었다(Feng and Chiang, 1984). 그렇지만 이 보고는 methylation의 70%억제라는 제한때문에, me-1돌연변이체의 경우와 더불어 모성유전에 자성배우체의 cpDNA에서 일어나는 광범위한 methylation이 관여하는 것이라기 보다는 site-specific methylation이 모성유전에 관여할 것이라는 가능성을 제시해 준다고도 볼 수 있겠다(Feng and Chiang, 1984; Sager and Grabowy, 1983).

한편 이와같은 근거를 토대로 하여 본 연구실에서는 *C. reinhardtii* 21gr(mt⁺)배우체로 부터 모성유전에 관여할 것으로 보이는 methylase를 282.6배로 분리하였다(Table 2) (Lee and Lee, 1989). Sano와 Sager(1980)의 methylase 분리방법은 재현성이 없어서 몇가지 방법상의 변화를 주어 수행하였으며, SDS-PAGE결과 분자량 60 KD정도의 methylase를 확인하였다(Fig.2) (Lee and Lee, 1989). 따라서 본 실험에서 분리한 methylase는 분자량 60 KD의 monomer이거나 60 KD의 subunits로 이루어진 polymer일 것으로 추정되며, 이는 Sano 등(1981)이 glycerol 밀도구배 원심분리로 측정한 60 KD와 200 KD의 methylases와 일치할 것으로 생각되나, 정확한 결과는 methylases의 순수정제가 이루어진 후에 확인될 것으로 생각된다.

2. Active digestion가설에 의한 접근

최근에는 염색체 DNA의 모성유전양상을 DNA-specific fluorochrome인, 4'-6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)를 사용한 형광현미경을 이용하여 *C. reinhardtii*의 접합체에서 cpDNA의 파괴를 직접 확인할 수 있었으며(Kuroiwa et al., 1982), "the coupled endo- and exonuclease" 일명 "Active digestion

Table 3. Inhibition of preferential destruction of chloroplast DNA after treatment of zygotes for the first 90min after mixing of female and male gametes

Treatment	Inhibition (%)	Treatment	Inhibition (%)
Control	0	Aurintricarboxylic acid ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$)	100
Ethidium bromide ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$)	100	4'-6-Diamidino-2-phenylindole ($0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$)	100
Cycloheximide ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$)	100	Erythromycin ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$)	1
Chloramphenicol ($80 \mu\text{g ml}^{-1}$)	0	α -Amanitin ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$)	66
Actinomycin D ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$)	100	EGTA ($500 \mu\text{M}$)	92
Rifampicin ($80 \mu\text{g ml}^{-1}$)	1	EDTA ($500 \mu\text{M}$)	0
Temperature (10°C)	100	*UV ($2300 \text{ erg s}^{-1}\text{cm}^{-2}$; 5 min; mt ⁺)	100
(15°C)	100	*UV ($2300 \text{ erg s}^{-1}\text{cm}^{-2}$; 5 min; mt ⁻)	3
(23°C)	0		
(30°C)	84		

*Each female and male gamete was subjected to UV irradiation just before mating.

hypothesis"라는 새로운 가설이 제안되었다(Ogawa and Kuroiwa, 1985 a, b, c, 1986). 이 가설은 접합체 형성시 일시적인 세포내의 Ca^{2+} 의 증가(Bloodgood and Levin, 1983)에 의해서 활성화된 "Nuclease C(=Calcium dependent nucleases)"가 그 endonuclease의 작용에 의해 환상의 염색체 DNA를 선상의 DNA절편으로 절단시키고 그 이후의 exonuclease기능에 의해 염색체 DNA를 완전히 절단시킬 수 있다는 가설이다. Kuroiwa는 분자량 16 KD, 18 KD, 20 KD, 22 KD, 25 KD, 26 KD의 총 6가지로 구성된 nuclease C를 분리하였으며 이들은 접합체 그리고 응성과 자성의 영양생장기, 배우체시기의 세포 모두에서 존재하는 것으로 밝혀졌다(Ogawa and Kuroiwa, 1985a). 그러나 이들 중 어떤 종류의 nuclease C가 cpDNA를 절단하는데 직접적으로 관여하는지는 아직 확인되지 않고있다. 자성과 응성의 영양생장기와

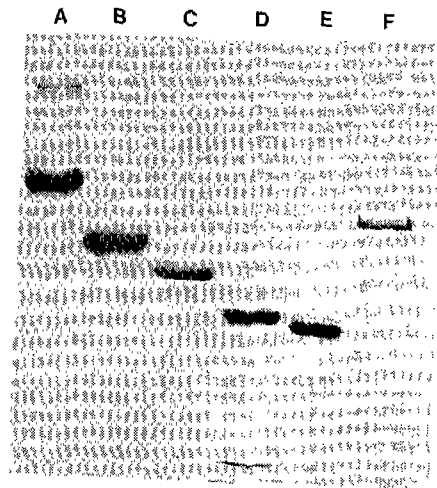


Fig. 2. The migration pattern of DNA methyltransferase from *Chlamydomonas* on 12.5% polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of 0.1% sodium dodecyl sulfate. Symbols: (A), BSA(67KD); (B) ovalbumin(45KD); (C), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36KD); (D), carbonic anhydrase(29KD); (E), trypsinogen(24KD); (F), partial purified methyltransferase.

배우체시기의 세포에서 각기 분리한 cpDNA와 nuclease C와의 반응실험에서는 자성과 음성 cpDNA 모두가 완전히 절단되는 것으로 나타나서(Ogawa and Kuroiwa, 1985b), 음성기원의 cpDNA의 우선적인 파괴는 DNA수준자체에서만으로는 설명할 수 없다고 결론을 지으면서, 그는 *C. reinhardtii*의 어린 접합체에 염록체 translational inhibitors(chloramphenicol, erythromycin), 세포질 translational inhibitor(cycloheximide), nucleases inhibitors(aurintricarboxylic acid, ethidium bromide), 염록체 transcriptional inhibitor(rifampicin), 세포질 transcriptional inhibitors(actinomycin D, α -amanitin), 온도변화, chelating agents(EDTA, EGTA) 그리고 UV조사등을 처리한 실험결과인, 즉, 음성 cpDNA의 선택적인 파괴에 관여할 물질이 자성의 세포핵에서 접합체 형성시 유도될 것이라는 결과로부터, 이 물질이 nuclease C가 음성 cpDNA를 선택적으로 파괴하는데 도움을 주는 하나의 활성인자로 작용할 것으로 보고 있다(Table 3) (Kuroiwa et al., 1983a, b; Kuroiwa, 1985; Nakamura et al., 1988). 그리고, 배우체형성시기가 진행됨에 따라 음성 cpDNA와는 달리 자성 cpDNA가 nuclease C에 대하여 높은 저항성을 나타낸다는 결과(Ogawa and Kuroiwa, 1985b)로부터, 염록체 기질이나 자성 cpDNA를 둘러싸고 있는 염록체막과 같은 부위에서 자성 cpDNA를 보호할 수 있는 미지의 보호 메카니즘이 있을 것이라고 제안하므로써, DNA methylation에 의해 자성 cpDNA가 보존된다는 Sager의 가설과는 다른 방향으로 해석을 하고있다(Fig. 3).

본 연구에서는 이상 위의 두가지 가설에 근거를 두고 *dam*⁻, *dcm*⁻ *E. coli* strain HB101에서부터 정제한 unmethylated pYK322 plasmid DNA를 사용하여, 분자량 37 KD정도의 non-specific endonuclease를 *C. reinhardtii* 2lgr (*mt*⁺)과 5177D(*mt*⁻)와의 접합체로 부터 순화, 분리하였다(Fig. 4, 5, 6, Table 4). 소단위의 조사결과 이 효소는 monomer로 확인되었으며, 최적반응온도는 37°C, 최적pH는 pH 4.5~6.5사이에서 높은 활성을 나타내었다. 그리고, 금속 양이온이 없는 경우에도 효소활성을 나타내므로써, 효소활성에는 cofactor로써의 금속 양이온의 요구성은 없었다. 그러나 분리된 이 endonuclease가 *Chlamydomonas*의 cpDNA의 모성 유전에 직접적으로 관여하는지의 여부는 아직 확실치 않으나, Sager의 cpDNA의 모성유전에 대한 modification-restriction가설을 바탕으로 하여, 분리된 endo-

nuclease가 cytosine methylated DNA와 상호 어떠한 연관성을 가지는가를 조사해 보고자 하며 현재 연구중에 있다.

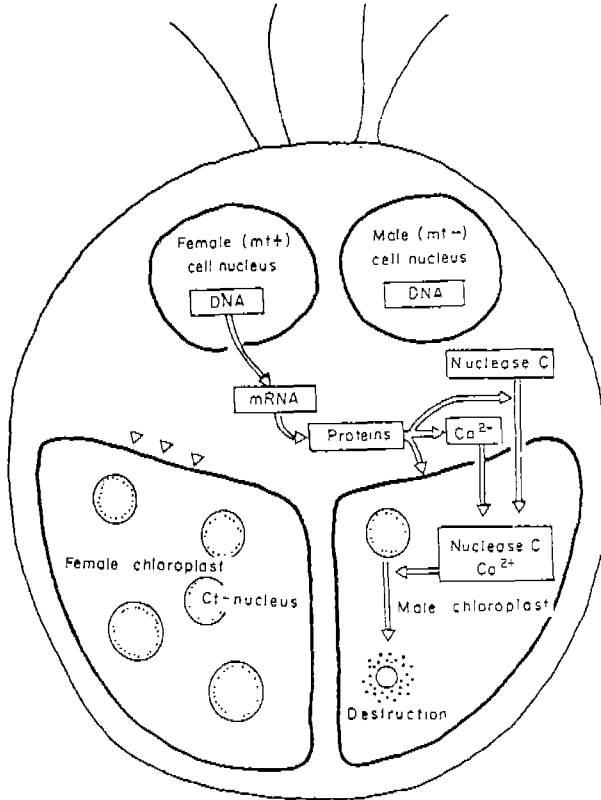
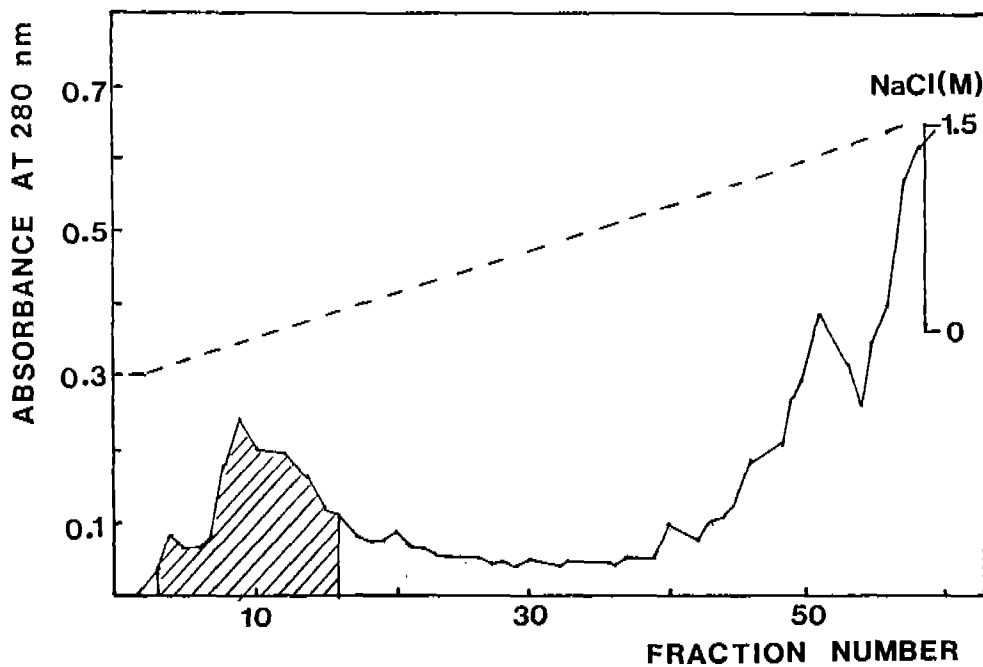


Fig. 3. Postulated mechanism for the regulation of maternal inheritance of chloroplast DNA(cpDNA) in young zygotes by the active digestion hypothesis. Female gametes(Δ) have the ability to protect their cpDNA against Nuclease C during gametogenesis by changing the domains surrounding female cpDNA. Soon after mating of male and female gametes, specific mRNAs are synthesized in a cell nucleus of female origin in the newly formed zygote. Then proteins which are coded by the mRNAs are synthesized *de novo* in the cytoplasm and directly or indirectly activate Nuclease C. Nuclease C preferentially digests cpDNA in the chloroplast of male origin. Since cpDNA of female origin remains, and is transmitted into the progeny, maternal inheritance occurs.



fraction C 1 3 5 7 9 11 13 15 17 19

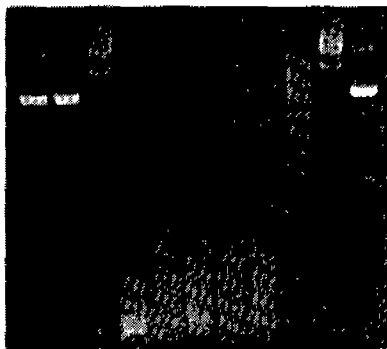


Fig. 4. Elution profile of the endonuclease on a heparin-agarose column. The enzyme activity was measured by agarose gel electrophoresis(below). Symbols: absorbance at 280nm(- —-), NaCl gradient(- - -).

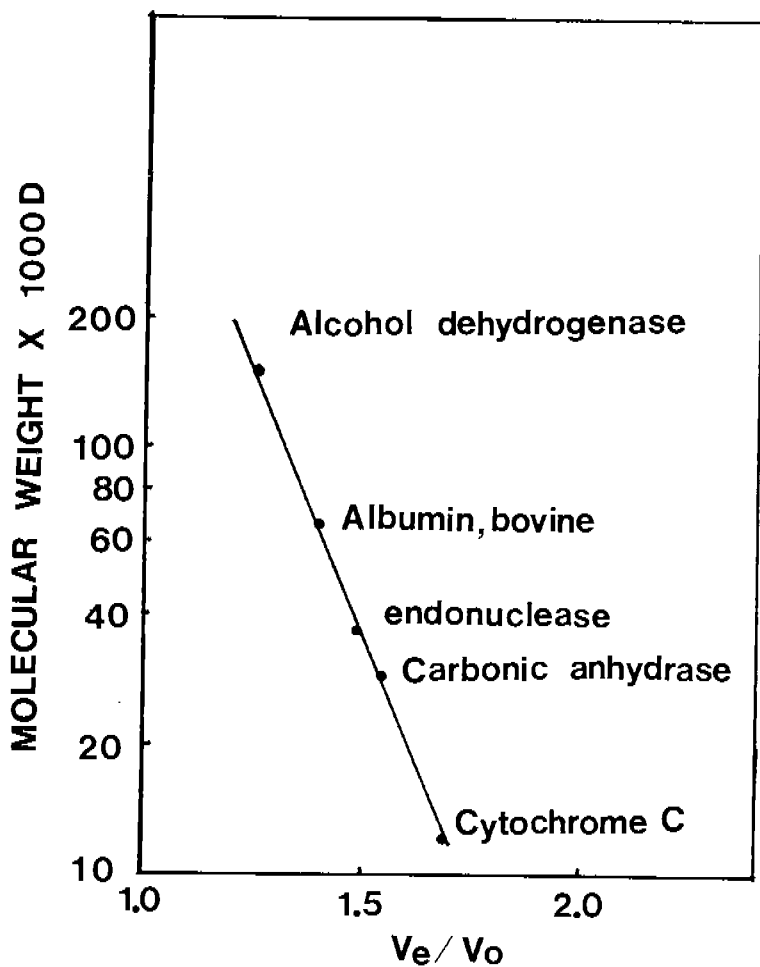


Fig. 5. Determination of molecular weight by Sephadex G-150 gel filtration. Molecular weight of the endonuclease was determined from a plot of ratio of elution volume(V_e) to void volume(V_o) of the Sephadex G-150 column(1.3x70cm) vs. log. molecular weight for reference proteins of known molecular weight.

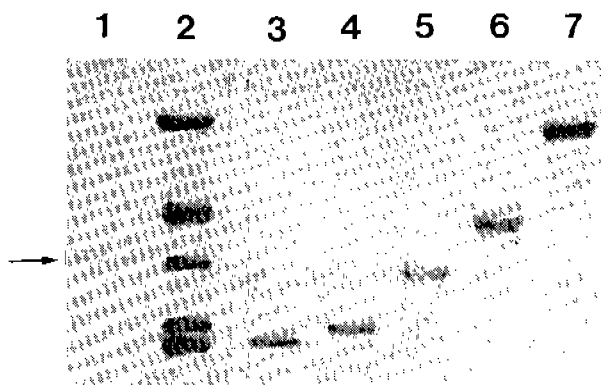


Fig. 6. The migration pattern of endonuclease from *Chlamydomonas* on 10% polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of 0.4% sodium dodecyl sulfate. Symbols: (1), purified endonuclease; (2), 3+4+5+6+7; (3), trypsinogen(24KD); (4), carbonic anhydrase(29KD); (5), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36KD); (6), ovalbumin(45KD); (7), BSA(66KD).

Table 4. Purification of the endonuclease from the zygotes of *Chlamydomonas reinhardtii*.

	Total protein ^a (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Recovery (%)	Purification (-fold)
Crude extract	1269.5	N.D. ^b	-	-	-
PEI	1172.0	N.D.	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	1060.4	N.D.	-	-	-
Heparin-agarose	47.3	12420	262.6	100	1
Phospho-cellulose	7.5	10384	1384.5	83.6	5.27
Hydroxyapatite	5.8	9856	1699.3	79.35	6.47
Sephadex G-150	0.97	4362	4495.0	35.1	17.12

^a: Lowry method. ^b: not determined.

결 론

원핵생물에서의 제한-변형효소의 발견으로 그 중요성이 커지기 시작한 DNA methylation은 진핵생물에서 유전자 발현, 세포분화 등으로까지 그 역할이 확대되고 있는데, 식물의 엽록체 DNA에는 methylation이 일어나지 않는다는 사실과는 예외적으로, *Chlamydomonas*에서 methylation이 모성유전에 관련될 수 있다는 사실은 DNA methylation과 제한효소가 유전현상에 복합적으로 관련되어 있다는 점을 시사한다고 볼 수 있겠다. 앞서서와 같이, Sager는 처음으로 진핵생물에 modification-restriction system을 적용시켰는데, 이 원리가 원핵생물에서처럼 외부에서 도입되는 외래 유전자에 대한 방어역할로 사용된 것이 아니라, 유전 양상에 이용되었다는 면에서 그 의미가 큰것으로 나타나고 있다. 그러나, 현재까지 엽록체 DNA의 모성유전을 완전하게 입증시킬 수 있는 제한효소나 methylase의 순화와 분리가 확실하게 이루어지지 못한점이 문제점으로 나타나고 있다. Sager의 가설과 더불어 Kuroiwa의 active digestion 가설도 자성의 엽록체 DNA의 지속적인 보존을 설명할 수 있는 새로운 메카니즘을 제시하지 못하고 있는 것이 같은 문제점으로 나타나고 있다.

앞으로의 과제는 무엇보다도 모성유전에 크게 관여할 것으로 보이는 엽록체 DNA methylase의 순화와 분리에 있으며, 그 결과 그 methylase와 특이적으로 상호 반응할 수 있는 nuclease의 분리도 함께 수행되어야 할 과제라 본다. 또 다른 연구과제의 대상이 될 수 있는 사항은 모성유전에 관여하는 물질의 합성장소와 그 이동경로에 대한 조사라 할 수 있겠다. *Chlamydomonas*의 cpDNA의 methylation과 응성 cpDNA의 파괴는 모두 엽록체내에서 일어나는 과정이기 때문에, 이 과정에 관여하는 DNA methylase와 응성 cpDNA의 파괴에 관여하는 물질의 세포내에서의 합성장소와 엽록체내로의 이동경로가 새로운 과제라 할 수 있겠다. CpDNA methylase의 합성장소와 이를 coding하는 유전자의 위치에 대한 정확한 보고는 아직 없으나, 응성 cpDNA의 파괴에 관여할 물질에 대한 보고는 제시되었다

(Kuroiwa *et al.*, 1983a, b; Nakamura *et al.*, 1988). 따라서, 자성의 세포핵에서 유도되는 것으로 예상되는 모성유전에 관여하는 물질이 어떠한 메카니즘에 의하여 세포질에서 엽록체내로 특이하게 도입되는지를 조사하며, 아울러 그 물질의 합성장소와 유전자를 식별해야 할 것이다.

참고 문헌

- Barras, F. and M. G. Marinus. 1989. The great GATC: DNA methylation in *E. coli*. *Trends in Genetics* 5:139-143.
- Bloodgood, R. A. and E. N. Levin. 1983. Transient increase in calcium efflux accompanies fertilization in *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* 97:397-404.
- Bolen, P. L., D. M. Grant, D. Swinton, J. E. Boynton and N. W. Gillham. 1982. Extensive methylation of chloroplast DNA by a nuclear gene mutation does not affect chloroplast gene transmission in *Chlamydomonas*. *Cell* 28: 335-343.
- Burton, W. G., C. T. Grabowy and R. Sager. 1979. Role of methylation in the modification and restriction of chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5794-5798.
- Cavalier-Smith, T. 1970. Electron microscopic evidence for chloroplast fusion in zygotes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature* 228:333-335.
- Dyer, T. A. 1982. Methylation of chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. *Nature* 298:422-423.
- Feng, T. Y. and K. S. Chiang. 1984. The persistence of maternal inheritance in *Chlamydomonas* despite hypomethylation of chloroplast DNA induced by inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3438-3442.
- Gillham, N. W. 1974. Genetic analysis of the chloroplast and mitochondrial genomes. *Ann. Rev. Genetics* 8:347-391.
- Kim, J. Y. 1990. *Chlamydomonas reinhardtii*에서 추출한 nuclease의 특성과 polyamines의 영향. 연세대학교. 이학석사논문.

- Kuroiwa, T., S. Kawano and C. Sato. 1983a. Mechanisms of maternal inheritance. I. Protein synthesis involved in preferential destruction of chloroplast DNA of male origin. *Proc. Japan Acad.* 59:177-181.
- Kuroiwa, T., S. Kawano and C. Sato. 1983b. Mechanisms of maternal inheritance. II. RNA synthesis involved in preferential destruction of chloroplast DNA of male origin. *Proc. Japan Acad.* 59:182-185.
- Kuroiwa, T., S. Kawano and S. Nishibayashi. 1982. Epifluorescent microscopic evidence for maternal inheritance of chloroplast DNA. *Nature* 298:481-483.
- Kuroiwa, T., S. Nakamura, C. Sato and Y. Tsubo. 1985. Epifluorescent microscopic studies on the mechanism of preferential destruction of chloroplast nucleoids of male origin in zygotes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protoplasma* 125:43-52.
- Lee, M. M. and S. H. Lee. 1989. *Chlamydomonas reinhardtii*로부터 분리, 정제된 DNA methyltransferase활성에 대한 polyamines의 영향. *한국식물학회지*. 32:332-341.
- Messer, W. and M. Noyer-Weidner. 1988. Timing and targeting: The biological functions of *Dam* methylase in *E. coli*. *Cell* 54:735-737.
- Mohandas, T., R. S. Sparkes and L. J. Shapiro. 1981. Reactivation of an inactive human X chromosome : evidence for X inactivation by DNA methylation. *Science* 211:393-396.
- Nakamura, S., C. Sato and T. Kuroiwa. 1988. Polypeptides related to preferential digestion of male chloroplast nucleoids in *Chlamydomonas*. *Plant Science* 56:129-136.
- Ogawa, K. and T. Kuroiwa. 1985a. Nuclease C polymorphism of calcium-dependent nucleases in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* 26:481-491.

- Ogawa, K. and T. Kuroiwa. 1985b. Destruction of chloroplast nuclei of the male gamete by calcium and nuclease C in a cell model of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* 26:493-503.
- Ogawa, K. and T. Kuroiwa. 1985c. Purification of major isozymes of nuclease C and production of active fragments by trypsin. *Plant Cell Physiol.* 26:1478-1484.
- Ogawa, K. and T. Kuroiwa. 1986. Base-specific endo-exonucleolytic activity of *Chlamydomonas* nuclease C1 & 2. *Plant Cell Physiol.* 27:701-710.
- Razin, A. and A. D. Riggs. 1980. DNA methylation and gene function. *Science* 210:604-610.
- Royer, B. D. and R. Sager. 1979. Methylation of chloroplast DNAs in the life cycle of *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5794-5798.
- Sager, R. 1954. Mendelian and non-mendelian inheritance of streptomycin resistance in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 40:356-363.
- Sager, R. 1981. The application of DNA methylation studies to the analysis of chloroplast evolution. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 361:209-218.
- Sager, R. and C. Grabowy. 1983. Differential methylation of chloroplast DNA regulates maternal inheritance in a methylated mutant of *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3025-3029.
- Sager, R. and D. Lane. 1972. Molecular basis of maternal inheritance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2410-2413.
- Sager, R. and M. Ishida. 1963. Chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50:725-730.
- Sager, R. and Z. Ramanis. 1973. The mechanism of maternal inheritance in *Chlamydomonas*: biochemical and genetic studies. *Theoretical and Applied Genetics* 43:101-108.

- Sager, R., H. Sano and C. Grabowy. 1984. Control of maternal inheritance by DNA methylase in *Chlamydomonas*. *Current topics in Microbiology and Immunology*, 108:157-173.
- Sano, H. and R. Sager. 1980. Deoxyribonucleic acid methyltransferase from the eukaryote *Chlamydomonas reinhardi*. *Eur. J. Biochem.* 105:471-480.
- Sano, H., C. Grabowy and R. Sager. 1981. Differential activity of DNA methyltransferase in the life cycle of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:3118-3122.