



KR0000550

KAERI/RR-2051/99

최 종 보 고 서

생물 방사선 저항성 증대 기술

Biological Improvement of Radiation Resistance

한국 원자력 연구소

31 / 47

**Please be aware that all of the Missing Pages in this document were
originally blank pages**

제 출 문

한국원자력연구소장 귀하

본 보고서를 1999년도 자체연구개발사업 “생물 방사선저항성 증대 기술” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 8 . .

연구기관명 : 한국원자력연구소

연구책임자 : 천 기 정

연구원 : 이 영 근

김 재 성

김 진 규

이 상 재

요 약 문

I. 제 목 : 생물 방사선저항성 증대기술

II. 연구개발의 목적 및 필요성

저선량 방사선의 유익한 이용과 방사선 피폭에 대한 방사선방어제 개발을 위한 기초연구로 방사선 저항성 관련 유전자의 기작에 대한 연구가 요망된다. 원핵세포와 진핵세포간 방사선 방호기작이 다를 것으로 알려져 있기 때문에, 방사선을 이용한 방사선 저항성 돌연변이체를 개발한 후 그 작용기작을 연구하고자 하였다. 또한 이의 발현정도를 파악하여 신기능의 방사선 방어제 개발에 기본기술을 제공 하고자 하였다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 가. 자연환경으로부터 방사선 저항성 관련 미생물 분리 (원핵세포, 진핵세포)
: 미생물의 방사선 감수성을 조사하고 돌연변이체 유도 적정 선량을 선정.
- 나. 방사선 이용 방사선 저항성 및 성능 증강 돌연변이체 개발
: 방사선 조사 후 영양요구주 선별 및 방사선 민감성, 방사선 저항성 돌연변이체 개발.
- 다. 방사선 저항성 관련 유전자 분석
: 방사선 저항성 돌연변이체에 특이한 유전자 부위를 선별하여, 클로닝을 하고 염기서열을 분석하여 대조군과 비교함으로써 방사선 저항성 증대 기작을 이론적으로 추정.
- 라. 유전자 발현 단백질 양상 분석
: 방사선 저항성 관련 유전자의 발현 산물인 단백질 양상을 분석하고, 기존에 알려진 단백질들과의 비교를 통하여 신규 유전자 발현물질 여부를 확인하고 방사선 저항성 기작을 간접적으로 해석.

IV. 연구개발결과

가. 방사선 조사에 의한 DNA 염기서열 특성변화

- ① Plasmid 형태에서는 3 kb 미만의 DNA 조각들이 선량에 비례하여 증가.
- ② 방사선 조사로 인하여 5 종류의 제한효소 절단부위에 특이적 변화.
- ③ 방사선에 의해 최소한의 점돌연변이 생성 가능성을 시사.

나. 원핵세포의 방사선 저항성 돌연변이체 개발.

- ① 극한환경으로부터 방사선저항성 미생물 분리.
- ② 방사선 조사를 통해 방사선 저항성 돌연변이체
(30.8% 저항성 증강Y67, D_{10} value: 911.4 Gy; YS1, D_{10} value: 696 Gy)
및 방사선 민감성 돌연변이체 (Y25, D_{10} value: 340 Gy) 개발

다. 방사선 조사에 의한 진핵세포의 방사선 저항성 돌연변이체 개발 및 유전자 탐색

- ① 방사선 저항성 P07 균주 분리 (D_{10} value : P01 : 625 Gy; P07 : 750 Gy)
- ② JM109에서 발현한 결과 방사선 저항성을 증가시키는 540 bp의 #18 유전자 조각을 cDNA로부터 클로닝하고 염기서열을 분석

V. 연구개발결과의 활용계획

가. 새로이 개발된 방사선 저항성 진핵세포 및 원핵세포는 특허 균주 기탁 후 지적재산권 확보하고, 클로닝된 염기서열은 Genbank 등의 데이터베이스에 등록하여 관련 연구의 활성화 기대.

나. 새로운 균주 개발이었기 때문에 이에 알맞은 유전자 조작을 위한 새로운 vector를 개발 한 후 대량 생산의 기틀 마련 (진핵세포의 경우 미개발 기술) .

다. 개발 과정중 확보된 제반 기술을 활용하여 각종 기능성이 더욱 향상된 신규 돌연변이체 개발 및 대량 생산이 이루어지면 방사선의 유익한 이용에 대한 선도사례가 될 것임.

S U M M A R Y

I. Title: Biological Improvement of Radiation Resistance

II. Objective

To investigate the mechanism of gene action related to the radiation resistance in microorganisms could be essentially helpful for the development of radiation protectants and hormetic effects of low dose radiation. Radiation mutants of eukaryotes and prokaryotes were induced by gamma-ray radiation and observed their characteristics physiologically and genetically. In addition, by the transformation experiments, genetic expression characteristics of radiation-resistant mutants were evaluated basically for the promising development of radiation protectants.

III. Scope and Contents

1. Isolation of radiation-resistant microorganisms (prokaryotes and eukaryotes).
2. Induction of radiation-resistant and functionally improved mutants by gamma-ray radiation.
3. Cloning and analysis of the radiation resistance related genes.
4. Analysis of the expressed proteins of the radiation resistant related genes.

IV. Results

1. DNA sequence changes by gamma-ray radiation
 - ① Concentration of small fragments of plasmids were increased dose-dependently by gamma-ray radiation.
 - ② Changes of the restriction enzyme sites on plasmid were specifically induced by gamma-ray radiation

- ③ It suggests that point mutation(s) is(are) induced sequence-specifically by gamma-ray.
- 2. Radiation resistance mutants from prokaryote induced by gamma-ray radiation.
 - ① Bacteria (YS1) isolation from the extreme environments (hot spring).
 - ② Radiation resistant mutant (Y67, D_{10} value: 911 Gy) and sensitive mutant (Y25, D_{10} : 340 Gy) were induced by gamma-ray radiation from YS1.
- 3. Radiation resistance mutants from *Pleurotus ostreatus* (eukaryote) induced by gamma-ray radiation
 - ① P07, radiation resistant (D_{10} value: 750 Gy), was induced from P01(D_{10} : 625 Gy).
 - ② Isolation #18 (540 bp) DNA fragment related to radiation resistance of P07.

V. Further Applications

- 1. It is expected that the new radiation-resistant eukaryote and prokaryote would deserve to get strain patent and that the cloned base sequences be submitted to Genebank and useful for the further related researches.
- 2. It is possible to develop a bioreactor that can produce large scale of radiation-resistant compounds by the new vector development technology.
- 3. Basic technologies of this study such as radiation mutation technology, genetic engineering, etc. could play a leading role of the promising radiation application.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	1
Chapter 2. State of the Arts	3
Chapter 3. Result and Discussion	7
Section 1. Specific Change of DNA Sequence by Radiation	7
Section 2. Radiation Resistant Factor in Prokaryote	21
Section 3. Radiation Resistant Factor in Eukaryote	73
Section 4. Discussion	107
Chapter 4. Evaluation of the Present Research	110
Chapter 5. Prospects and Recommendations	111
Chapter 6. References	112

목 차

제 1장 서 론	1
제 2장 국내·외 기술개발 현황	3
1. 국내·외의 기술개발현황	3
가. 방사선에 의한 DNA 손상 및 회복기작 연구:	3
(1) DNA 이중나선 절단(double strand break, DSB) 측정기술개발 및 응용	3
(2) 방사선자극 및 손상 인식기작 연구:	3
나. 방사선저항성 관련 인자 연구	4
2. 문제점	6
3. 전망	6
제 3장 연구개발수행 내용 및 결과	7
제 1절 방사선에 의한 DNA염기서열 특이적 변화조사	7
1. 재료 및 방법	8
2. 결과 및 고찰	13
가. 방사선에 의한 plasmid form의 변형	13
나. 방사선에 의한 제한효소 절단부위의 변화	14
제 2절 원핵생물의 방사선 저항성 인자 탐색	21
1. 재료 및 방법	21
가. 시료 채집	21
나. 시설재배지 토양의 염류집적 및 중금속 분포 측정	23

다. 미생물의 분리	24
라. 분리 균주의 방사선 감수성	25
마. 고체배지법을 이용한 미생물의 방사선 감수성 조사	25
사. 방사선 저항성 미생물 선별 및 특성 조사	26
아. 방사선 저항성 미생물로부터 방사선을 이용한 영양 요구성 미생물 유도	27
자. 방사선을 이용한 방사선 저항성 중, 감 미생물 선별	30
차. 방사선 저항성 증강 및 감소 미생물의 단백질 발현 양상 조사	30
카. Genomic DNA를 이용한 방사선 저항성 인자 탐색	30
타. cDNA를 이용한 방사선 저항성 인자 탐색	31
파. pQE 발현벡터를 도입한 <i>E. coli</i> JM109에서 도입 DNA의 발현양상 조사	31
하. 방사선 저항성 증가 인자의 염기서열 결정	31
2. 결과 및 고찰	32
가. 극한 환경 미생물 분리	32
나. 방사선 저항성 미생물 선별 및 특징	39
다. 방사선 이용 돌연변이체 유도	52
라. 영양요구주 선별	55
마. 방사선이용 방사선 저항성 증강 돌연변이체 개발	59
바. 방사선 저항성 증강 돌연변이체 특이적 단백질 탐색	71
제 3절 진핵생물의 방사선 저항성 인자 탐색	73
1. 재료 및 방법	73
가. 공시균주 및 배양	73
나. 방사선 처리	73
다. 단속적 방사선 조사에 의한 방사선 저항성 균주 유도	73
라. 단일 방사선 조사에 의한 저항성 균주 유도	74
마. 단일 방사선 조사 후 연속적인 방사선 조사에 의한 저항성 균주 유도	75
바. 방사선 저항성 관련 유전자 탐색	75

2. 결과 및 고찰	86
가. 단속적 방사선 조사에 의한 방사선 저항성 균주 유도	86
나. 저선량의 방사선 연속 조사에 의한 저항성 균주 유도	88
다. 느타리버섯의 방사선 민감도 및 방사선 저항성 균주	89
라. 방사선 저항성관련 유전자 탐색	89
제 4절 방사선 저항성 관련 인자 분석 결론	107
 제 4장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도	110
1. 연구개발 목표달성도	110
2. 대외기여도	110
 제 5장 연구개발결과의 활용계획	111
 제 6장 참고문헌	112

제 1 장 서 론

생물의 방사선저항성에 관한 연구는 그 중요도를 부연 설명할 필요도 없이 매우 중요하다. 특히 부존자원이 거의 없는 우리나라에서는 원자력을 이용한 에너지 개발이 매우 절실하다. 그럼에도 불구하고 원자력의 위험성 즉 방사선피폭에 대한 우려로 인하여 원자력의 이용을 반대하는 목소리가 팽배해 있는 실정이다. 따라서 자연방사선보다는 많지만 소량의 방사선피폭에 대해서 아무런 거부감 없이 원자력에너지의 개발/유익한 이용을 누릴 수 있게 된다면 매우 바람직하다고 하겠다. 이를 위해 방사선저항성 관련 유전자를 확보하여 그 특성을 파악하고, 이의 발현을 통한 방사선저항성 인자의 실질적인 이용을 가능케 하는 연구가 요구된다.

- 기존의 방사선저항성에 관한 연구가 원핵세포에 편중되어 있어서 사람에게 적용되기 위해서는 진핵세포(eukaryote)에 대한 연구가 필수이나 부진함.

； 실제로 방사선에 많이 노출되어 있는 환경하에서 생존하는 생물체를 분리/동정하는 연구에 많은 어려움이 있기 때문에, 방사선 및 유전공학기법을 이용한 진핵세포의 방사선저항성 돌연변이 유기를 통한 관련 유전자 및 인자에 대한 연구가 필요함.

- 심각해지는 환경오염에 기인한 각종 질병에 대한 고준위방사선요법(high dose radiation therapy) 및 유전자요법(gene therapy) 필요

； 나날이 발전하는 과학과 산업의 부흥으로 각종 질병에 쉽게 노출되는 오염된 환경이 심각한 지경에 이르렀으나, 병원균들이 항생제내성이 생기게 되어서 이의 치료가 의약품만으로는 어려운 상황이기 때

문에 고준위방사선요법이 요구되고 있고 근본적인 치료가 가능한 유전자요법이 요망되고 있음. 이를 위하여 방사선 돌연변이와 관련된 기초연구가 요구됨.

- 오존층의 파괴로 인한 자연방사선량의 증가로 방사선방어(radiation protection) 대책 절실
 - ； 오존층의 파괴는 물론 고산지대 및 하절기에 자연적인 방사선피폭 가능성이 제고되고 있기 때문에 이로 인한 피부암 등 각종 방사선유래 질병에 대한 예방/치료 연구가 요망됨.
- 방사선작업 종사자들에 대한 최소한의 피폭방지가 절실 필요
 - ； 다양한 목적과 관련 방사선작업 종사자들이 소량이나마 피폭 가능성이 있기 때문에 겪게 될 두려움을 최소화 해야함.
- 방사선의 유익효과 연구(hormesis) 및 방사선방어제(radioprotectant) 개발에 있어서 유전학적 기반연구가 필수
 - ； 저선량 방사선이 생체에 미치는 유익한 효과를 연구하는 것은 학문적으로 뿐만 아니라 대중의 원자력에 대한 이해를 높이는 데 크게 이바지할 수 있음. 방사선저항성 인자의 개발은 이러한 연구를 쉽게 촉진시키게 될 것임. 또한 본 연구가 성공적으로 수행된다면 방사선방어제 개발이 급진전될 것으로 기대됨.

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

1. 국내·외의 기술개발현황

가. 방사선에 의한 DNA 손상 및 회복기작 연구:

(1) DNA 이중나선 절단(double strand break, DSB) 측정기술개발 및 응용:

- o Neutral filter elution 방법개발 : DNA elution 방법에 따라 방사선 조사선량과 DSB의 생성정도간 선형관계를 측정 못하는 문제있음 (Blocher, 1990).
- o Clamped homogeneous electric field (CHEF) gel electrophoresis : pulsed field gel electrophoresis (PFGE)를 개선한 방법으로 DSB를 보다 정확히 측정할 수 있는 기술개발 (Blocher and Kunhi, 1990).
- o CHEF와 asymmetric field inversion gel electrophoresis (AFIGE)를 이용한 DSB의 생성과 회복도 측정법 : CHO cell을 대상으로 방사선 조사 직후와 일정 회복 시간 경과 후 DSB량 차이를 측정할 수 있는 방법개발(Iliakis et al., 1991).
- o 유전병인 근섬유무력증(Ataxia telangiectasia) 환자의 방사선 민감성연구 : DSB 회복능 상실이 그 원인 (Blocher et al., 1991).
- o Yeast의 DSB 생성도 측정: densitometry와 Southern hybridization 분석방법으로 0.93×10^{-9} - 1.7×10^{-9} /Gy/bp의 DBS 형성확인(Frield et al., 1993).
- o 분열 못하는 세포에서 DSB 형성도 측정방법 개발: SYBR Green I 염색법을 이용하여 정밀한 DSB 측정가능함(Kiltie and Ryan, 1997).

(2) 방사선자극 및 손상 인식기작 연구:

- *E. coli*에서 기존에 알려진 일련의 DNA 회복효소들이 DSB 회복기작 관여 가능성 제시 (Sargentini and Smith, 1986).
- 적응회복(adaptive response)기작 관여 가능성 제시(Seong and Kim, 1994; Zhou et al., 1994).
- 저선량 방사선 자극 특이적 단백질 형성 시사(Wolff et al., 1989; Ikushima, 1992).
- 방사선적응회복기작 존재 가능성 제시(Ikushima et al., 1996).
- p53 단백질에 DSB 인식부위 존재 가능성 제시(Reed et al., 1995).
- 방사선에 의한 PKC signaling pathway 활성화 기작 분석 태동(Uckun et al., 1993).
- 저선량 방사선 자극에 의한 생체활성기작 존재 제시(Stecca and Gerber, 1998).

나. 방사선저항성 관련 인자 연구

- 1980년대 최초로 일본의 과학자 Hitoshi Ito(현재 일본원자력연구소 다카사키연구소에 재직중)에 의해 방사선저항성 세균(5 - 30 kGy의 조사선량에서 생존)인 *Deinococcus radiodurans*를 자연상태에서 발견한 이래 방사선저항성을 갖게 되는 기작에 관한 연구가 현재에 이르고 있음.
- 현재까지 국내에서는 본 연구소를 제외하고는 위와 관련된 연구가 매우 미진한 상태임.
- 사람의 경우, 5Gy 정도의 선량이면 중국에는 죽음에 이르게 되나, 위 *Deinococcus radiodurans*는 30 kGy까지의 선량에서도 생존이 가능함. 이는 위 세균이 방사선조사 후 이중구조가 깨져서(DBS, double strand

break) 생겨나는 무수한 DNA 조각들을 모아 12 - 24시간 이내에 치료할 수 있는 능력을 갖고 있는 것으로 밝혀짐(recA-dependent recombinational pathway). 이는 주변에 동종의 유사한 염색체를 가지고 있다가(Holliday junctions, 수천개의 4가닥 구조) DNA가 손상되어 조각나면 주형으로 작용하는 것으로 알려짐. 위와 같은 능력을 갖게 된 것은 포자생성을 하지 않는 *Deinococcus radiodurans*로 하여금 방사선이 아닌 탈수에 의한 스트레스 때문일 것으로 추측되고 있음(Minton and Daly, 1995).

- 최근에 효모에 있어서의 연구결과는 손상된 DNA이중구조의 치유를 가능케 할 것으로 생각되는 DNA-PK(protein kinase)와 Ku(DNA end-binding protein)의 방사선저항에 대한 관련설을 제시하고 있음(Weaver, 1995; Jackson, 1997).
- 또한, 열이나 알코올, 중금속, 산화제 등의 악조건의 환경에 처했을 때 생체내에서 생성되는 hsp(heat shock protein) 혹은 stress protein이 방사선저항성과 관련이 있을 가능성이 제기되고 있음(Trautinger et al., 1996).
- 포유동물 세포에서 저선량 방사선으로 유도되는 방사선저항성에 관한 연구 활발 (Joiner et al., 1997).
- 고선량의 방사선에 의해서도 유전적인 변형이 거의 없이 생존하는 미생물인 *Deinococcus radiodurans*의 존재가 알려지면서 이 미생물의 유전자를 연구한다면 생물체에 대한 방사선의 유해 효과를 최소화 할 수도 있다는 가능성에 대한 기대치가 증가되었다(Moseler and Mattingly, 1971; Murray, 1992). 이에 미국의 DOE (The United States Department of Energy)의 지원하에 *D. radiodurans*의 genomic DNA 염기서열이 완전히 밝혀졌다(White et al., 1999). 그러나, 기대

에 못 미치게도 3백2십만개의 염기서열 중 어떠한 유전자가 방사선 저항성을 지니게 하는지는 밝혀 내지 못하고 있는 실정이다.

2. 문제점

- 현재까지 방사선에 대한 원핵세포의 손상치유 기작을 규명하려는 노력에만 치중한 결과, 방사선저항성 증진을 위한 연구는 미진한 상태임.
- 방사선저항성 관련 인자의 특성규명 및 개발에 관한 연구는 그 기작이 단순하지 않을 것으로 여겨지고 있기 때문에 다방면의 연구가 요구됨.

3. 전망

- 위의 기술현황에서 보는 바와 같이, adaptation(환경적응)에 의한 방사선저항성 인자의 발견 혹은 새로운 인자의 개발이 가능할 것으로 생각됨.
- 난이도가 높은 연구분야이나, 개발되었을 때의 그 유익한 파급효과는 그만큼 클 것으로 생각됨.
- 방사선저항성 진핵세포 돌연변이주의 유도 및 관련 유전자의 특성파악만으로도 학문적으로 괄목할만한 실적이 될 것임.
- 방사선저항성 관련 인자의 개발 후 실용화, 산업화 등을 통해 고부가가치의 실적이 될 수 있음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 방사선에 의한 DNA염기서열 특이적 변화조사

방사선은 DNA의 두가닥절단 (double-strand break, DSB)과 단일가닥절단 (single-strand break, SSB)을 유도하며(Von Sonntag et al., 1981; Galli and Schiestl, 1998) 다양한 DNA의 변형을 초래할 수 있는 것으로 보고되고 있다(Hutchinson, 1985). 특히 이러한 손상부위의 생성은 무작위 절단 모델 (random breakage model, RBM)로 설명되고 있다. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)를 이용한 거대 DNA분자의 분획 기술의 발달에 따라 DSB의 경우 정량측정이 가능하게 되었다(Kiltie and Ryan, 1997; Blocher et al., 1989). 세균(Mirabelli et al., 1985), 효모(Friedl et al., 1993)와 포유류 세포(Kraxenberger et al., 1998) 등에서 방사선에 의한 DSB 생성 정도를 측정하였다. 더불어 Non-Hodgkin's lymphoma (Hannan et al., 1991)와 ataxia telangiectasis (Blocher et al., 1991) 등의 유전적 질환자의 병변세포에서 방사선 감수성이 증가되는 현상을 발견하게 되었다.

비록 방사선에 의한 DNA 손상부위가 RBM으로 여겨지고 있으나, pyrimidine이 purine 보다 더 손상되는 것과 같이 DNA base의 종류에 따라 방사선 효과가 달리 나타나는 것으로 알려졌다(Hutchinson, 1985). 이는 방사선에 의한 탈염기 (apurine 또는 apyrimidine, AP) 혹은 염기분자 변화 등이 DNA의 염기서열에 의존적으로 생성될 가능성을 암시한다. 또한 생물학적인 기능에 있어서 그 효과가 나타나지 않는 부위가 있을 수 있을 것이다. 생물체의 DNA는 중요한 기능을 나타내는 단백질 coding 부위나 조절부위 염기서열이 온도 등의 물리적 환경변화에 대해 안정성을 높이하고자 보다 많은 GC를 지니도록 진화되어 왔다. 즉, GC의 비율이 non-coding 부위보다 높다 (Schisler and Palmer, 2000). Genomic DNA의 GC 농도는 종에 따라 매우 다

양하여 *Bacillus*속의 미생물은 32-62%의 GC를 지니고 있으나 *Micrococcus* 속은 64-75%의 GC를 지니고 있는 것으로 밝혀졌다. 더욱이 종의 구분에 있어 GC의 %가 주요 분류 key로 여겨지고 있는 실정이다. 방사선 감수성의 차이가 종에 따라 매우 다양한 양상을 보이므로 방사선 감수성의 한 원인으로 GC의 양적 차이를 고려할 필요가 있다. 따라서 특정 염기서열과 방사선 손상간 관계를 조사할 필요성이 있다.

1. 재료 및 방법

본 절에서는 생물체에 의한 radiation에 의해 손상되는 DNA 복구의 간섭 효과없이 순수히 방사선의 물리적인 요인에 의한 DNA 이중가닥의 변화양상을 일차적으로 파악하고, 이를 토대로 생물체내에서의 방사선 조사에 따른 DNA 염기서열의 변화양상을 비교하여 방사선저항성에 관련된 유전인자의 연구를 위한 기초자료를 얻고자 하였다. 이러한 목적으로 염기서열이 알려진 plasmid의 방사선 조사에 따른 변화양상을 guanine과 cytosine 염기를 특이적으로 인식하는 제한효소를 이용하여 플라스미드의 방사선에 의한 변화양상으로서 파악하고자 하였다.

사용된 Plasmid는 pGEM-7Zf(+)로 염기서열은 Fig. 1-1 및 1-2와 같다. 이 plasmid를 *E. coli* JM109 strain(Table 1-1)에 도입시킨 후, LB+Amp 배양을 이용하여 37℃에서, 16시간 동안 배양하였다. 배양세포를 수확한 후 Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System(Promega, USA)을 이용하여 plasmid를 추출하였고 Nuclease-free water에 녹여 -20℃에 보관하면서 사용하였다.

방사선 조사는 gamma-ray를 사용하였으며 방사선원은 Co-60(약 60,000 Ci 용량, Atomic Energy of Canada, Ltd.)였다. 조사선량은 500 Gy, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8 kGy으로 하였고 Fricke dosimetry로 측정한 조사선량은

350 Gy/hr과 0.36 Gy/hr이었다.

방사선 조사 후 제한효소절단을 시행하였다. 사용한 제한효소는 *Tru9* I(T[^]TAA), *Vsp* I(AT[^]TAAT), *Msp* I(C[^]CGG), *Hae* III(GG[^]CC)와 *EcoR* I(G[^]AATTC)이었다. 각 반응용액은 10x 반응완충액에 방사선 처리된 plasmid를 2ug 첨가하였고 10unit의 제한효소를 첨가하여 반응용액의 총량이 20ul가 되도록 하였다. 반응은 37℃에서 1시간동안 진행하였다. 절단한 DNA 조각을 ethidium bromide가 든 1.5% agarose gel를 사용하여 TAB 전개용액내에서 전기영동하였다. agarose gel상에 나타난 방사선조사에 의한 plasmid의 제한효소절단양상은 Gel-Doc System(Bio-Rad, USA)과 Quantity One software(Bio-Rad)를 이용하여 분석하였다.

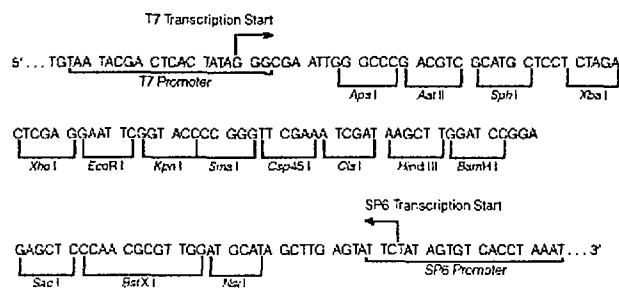


Fig. 1-1. pGEM 7Zf(+) Vector promoter and multiple cloning site sequence. The sequence shown corresponds to RNA synthesized by T7 RNA polymerase and is complementary to RNA synthesized by SP6 RNA polymerase. The strand shown is complementary to the ssDNA strand produced by this vector.

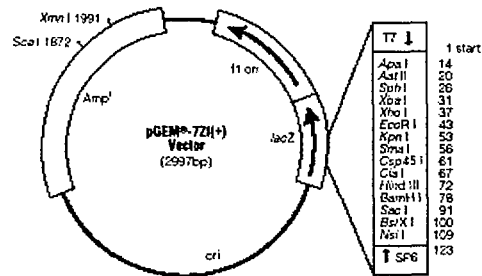


Fig. 1-2. pGEM® -7Zf(+) Vector circle map and sequence reference points.

pGEM® -7Zf(+) Vector sequence reference points.

T7 RNA polymerase transcription initiation site 1

SP6 RNA polymerase transcription initiation site 123

T7 RNA polymerase promoter (-7 to +3) 2981

SP6 RNA polymerase promoter (-7 to +3) 121-140

multiple cloning region 10-10

lacZ start codon 162

lac operon sequences 2818-2978; 148-177

lac operator 182-98

β -lactamase (Amp^r) coding region 1319-2179

phage f1 region 2362-2817

binding site of pUC/M13 Forward Sequencing Primer 2938-2954

binding site of pUC/M13 Reverse Sequencing Primer 158-174

Table 1-1. Genotypes of the *E. coli* strains used in this study

Strain	Genotype
DH5 α	F ⁻ ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169
JM109	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^{qZ} Δ M15]

2. 결과 및 고찰

가. 방사선에 의한 plasmid form의 변형

조사선량이 증가함에 따라 plasmid의 supercoiled form이 감소되는 반면, 약 10 kb 크기의 DNA와 DSB 형성 결과로 판단되는 3 kb 크기의 linear form의 plasmid는 증가하였다. 또한, 3 kb 미만의 DNA 조각들이 선량 의존적으로 증가되었다(Fig. 1-3, 1-4).

제한효소로 절단하지 않은 plasmid는 다양한 전기영동 양상을 나타낸다. 이는 supercoiled form, nick form 및 linear form 등 plasmid의 상태에 따라 원래 plasmid의 고유한 크기 보다 빠르거나 늦은 전개속도를 보이며 이에 따라 다양한 크기의 band를 나타낸다. 본 실험에서도 방사선을 처리하지 않은 대조군의 경우(Fig. 1-3, lane 1) 3개 이상의 다양한 크기의 band를 볼 수 있었다. 방사선을 조사하면 SSB가 나타나고, 이들에 의해 supercoiled form의 plasmid가 감소되고 nick form은 증가할 것으로 예상되었다. 실제로 500 Gy에 노출된 plasmid는 10 kb 크기의 nick form으로 판단되는 band가 대조군에 비해 증가되었고 방사선 조사 선량의 증가에 따라 비례하여 증가됨을 볼 수 있었다. 또한 방사선에 의해 생성되는 DSB에 의해 3 kb의 linear form plasmid를 볼 수 있다. 이 크기의 plasmid는 최소한 한 개의 DSB가 있었음을 의미하며 이들은 방사선 조사선량에 비례하여 증가되는 것으로 나타났다. 또한, 3 kb이하의 크기를 지닌 DNA 조각들이 lane를 따라서 퍼져있는 것을 볼 수 있으며 이들의 농도는 조사선량에 의존적으로 증가하며 구성되는 DNA 조각의 크기도 점점 작은 조각이 증가되는 양상을 보였다. 이들 DNA 조각은 방사선에 의해 DSB가 한 개 이상 생성되었음을 의미하며 조사선량이 증가할수록 더욱 많은 DSB가 plasmid에 생성되고 그 결과 더욱 많은 양의 작은 조각들이 생성되는 것으로 여겨진다. 방사선 조사 선량이 2 kGy와 4 kGy 사이에서 supercoiled form이 거의 없어지는 양상을

보여 in vitro에서 사용된 모든 plasmid의 전기영동상에 변화를 일으키는 방사선 선량은 2 kGy 이상일 것으로 판단되었다.

나. 방사선에 의한 제한효소 절단부위의 변화

Plasmid를 *EcoR* I(GAATTC)으로 절단하면 한 개의 DSB이 형성된다. 대조군의 경우 오직 3 kb 크기의 단편만이 전기영동에 의해 나타났다. 이는 제한효소로 절단하지 않은 plasmid의 다양한 전기영동상에도 불구하고 하나의 DSB에 의해 단일 크기의 plasmid가 될 수 있음을 보인 것이다. 방사선을 처리한 plasmid의 경우에는 조사선량이 높아질수록 단일 크기의 plasmid의 양이 감소하는 것을 확인할 수 있는 반면, 상대적으로 nick form의 plasmid는 조사선량이 높을수록 많이 남아있었다. 따라서 nick form의 plasmid가 남게 된 원인으로 두 가지 가정을 할 수 있다. 하나, *EcoR* I site가 방사선에 의해 변형되어 절단이 일어나지 않았으며 둘째, *EcoR* I 효소가 부착되는 부위에 변화가 있어 절단이 이루어지지 않았을 것이다. 또한 이 두 band외에 3 kb 이하의 작은 DNA 조각들을 볼 수 있었는데 조사선량의 증가에 비례하여 증가되며 작은 크기의 조각들이 생성됨을 알 수 있다. 이들 작은 DNA 조각은 제한효소로 절단하지 않은 대조군들에서 얻어진 것에 비해 크기와 양에 있어서 더욱 선명하게 나타났으며 이는 linear form의 plasmid가 제한효소에 의해 다양한 크기의 조각으로 절단된 때문으로 여겨진다. 앞으로 이들 조각의 생성 기원을 찾기 위해서는 *EcoR* I으로 절단하여 linear form의 plasmid를 만든 후 5'-end에 표지를 붙인 후, 방사선을 조사하여 표지된 조각의 전기영동양상을 조사할 필요가 있다.

Plasmid에는 *Tru9* I(TTAA) site가 18개 존재하여 DNA 조각 18조각이 형성된다. 방사선이 처리된 plasmid는 18조각으로 절단되는 양상을 보였으나 2 kGy 이상의 조사선량의 경우, 대조군에 비해 각 band의 intensity가 낮았

고 각 band 주변으로 희미한 DNA 조각들이 있는 것으로 나타났다. 이러한 DNA 조각들은 방사선에 의해 손상된 부위에서 *Tru9* I의 절단이 일어나지 않은 때문으로 여겨진다.

Plasmid에 *Vsp* I(ATTAAT) site는 3곳이 있으며 각각 1706 bp, 1235 bp와 55 bp의 DNA 조각이 형성된다. 이들 염기서열은 *Tru9* I의 site을 포함하고 있으므로 이들의 염기서열이 변화되었을 때는 1706 bp band보다 큰 band가 형성되므로 분명하게 변화를 확인할 수 있다. 방사선이 조사된 plasmid의 경우 4 kGy 조사군에서부터 3 kb의 band가 생성되어 있는 것으로 보아 3곳의 *Vsp* I site 중에 하나 만이 절단되고 다른 두 부분은 변화되어 절단되지 않은 것으로 여겨진다.

Plasmid 내에 *Msp* I(CCGG) site는 14곳이 있으며 14개의 조각이 나타나게 된다. 방사선 조사된 plasmid들은 조사선량에 비례하여 이들 band 사이에 희미한 band들이 형성되어 있음을 볼 수 있어 *Msp* I site가 변화되었음을 알 수 있었다. 8 kGy 조사군의 경우 이들 band가 비교적 분명하여 1.4 kb, 1.0 kb 그리고 650 bp의 band가 구분되었고, 상대적으로 500 bp 이하의 *Msp* I 절단 조각들의 양이 감소되었다.

Hae III(GGCC) site는 13 곳이 있으며 13개의 조각이 생길 수 있다. 대조군에 비해 방사선 처리군 중 2 kGy 이상에서는 조사선량에 비례하여 부분 절단된 band들이 나타났다. 특히 8 kGy 조사군에서는 약 0.9 kb와 600 bp의 band가 선명하게 나타났으며 220 bp이하의 band들은 매우 희미하였다. 따라서 방사선에 의해 *Hae* III site에 변화가 초래된 것으로 여겨진다.

Plasmid의 제한 효소 처리에 따른 전기영동양상을 비교한 결과로 보아 *EcoR* I에 의해서 절단되지 않는 nick form의 plasmid가 방사선 조사선량에 비례하여 생성되며 이에 비해 다른 4가지 제한 효소는 모든 nick form의 plasmid를 절단하지만 조사선량이 2 kGy 이상일 경우, 절단되지 않은 부위

들이 나타나는 것으로 보아 최소한 이들 제한 효소가 인식하는 염기서열이 있는 DNA 부위에서 변화가 있었음을 알 수 있었다. 특히 *Hae* III(GGCC)와 *Msp* I(CCGG)의 처리 결과, 8 kGy 처리군에서 200 bp 이하의 작은 DNA 조각들이 오히려 감소하는 양상을 보여주고 있어서 이들 DNA 조각을 만들 수 있는 염기서열이나 그 주변의 DNA 구조가 변성되는 것을 알 수 있었다. 비록 이들 작은 조각을 구성하는 제한효소 인식부위가 plasmid 내에 흩어져 있기 때문에 방사선의 손상 효과가 RBM을 따르는 것으로 해석할 수 있으나 한편으로는 특정 염기서열 즉, GGCC나 CCGG와 같은 염기서열에서 더욱 민감하게 변성을 일으킬 가능성도 배제할 수 없다. DNA를 사용하여 방사선 처리 후 염기의 변화를 조사한 결과를 보면 purine(A와 G)이 pyrimidine(T와 C)에 비해 덜 손상받는 것으로 알려져 전체적으로는 유사한 정도의 손상을 나타낼 것으로 여겨지지만 본 연구에서 특정 염기서열에 특이적인 제한 효소를 사용하므로써 이러한 방사선에 의한 손상부위가 생물학적인 기능 면에서 특정 유전자의 특정 부위에 우위적으로 나타날 가능성을 시사한다.

본 연구에 사용된 plasmid는 DNA binding resin을 사용하여 추출하였기에 phenol과 같은 유기용매에 의한 plasmid의 변형(예로 nick과 SSB 등)이 덜 일어난 비교적 균일한 것이다. 따라서 방사선 조사 후 전기영동 양상이 변화되는 nick form과 single DSB form의 plasmid를 생성한 연구결과는 처음이다. 기존의 연구에 의하면 lambda bacteriophage가 감염된 세포와 *E. coli*를 대상으로 실험한 결과, 약 5.0×10^{12} DSB/0.01 Gy/dalton개의 nick이 형성되는 것으로 알려졌다(Hutchison, 1985). 본 실험에 사용된 pGEM-7Zf(+) plasmid는 3000 kb로 약 2.0×10^6 dalton이다. 1 ug의 pGEM-7Zf(+)는 약 2.4×10^{17} dalton에 해당하며 plasmid의 DNA backbone내에 6000개의 nick이 생길 site를 지니고 있으므로 이는 1.5×10^{21} 개의 nick이 형성될 site를 지닌 것이다. 따라서 1 ug의 plasmid를 사용하여 500 Gy의 방

사선을 조사할 경우, 5.0×10^{24} 개의 nick이 형성될 수 있으므로 모든 backbone내에 nick이 생기는 결과를 초래하여 모든 plasmid가 분해되어 질 수 있을 것이다. 그러나 본 실험결과, 8 kGy의 조사군에서도 DSB이 한 개가 형성된 것으로 보이는 band가 30%정도 나타났고 nick form이 70%정도를 보이는 결과를 나타내었다. 따라서 in vitro의 결과이지만 in vivo에서 처리된 후, nick이 형성된 양을 측정한 결과에 비해 매우 적은 양의 nick과 DSB가 형성된 것이다. 특히, 수용액에서 DNA의 변화는 방사선의 직접적인 효과 외에도 DNA 분자 주위의 용매나 용질의 분자구성의 변화에 의한 이차적 영향을 받는다. 가장 중요한 방사선 효과는 물분자로부터 OH기를 생성하는 것이다. 형성된 OH기와 DNA구성분자간 상호작용이 가장 주요한 변화요인이 된다. 본 연구에서 plasmid를 녹여 놓은 water의 구성이 비록 세포질과는 다르지만, 세포를 대상으로 조사된 결과와 비교하여 볼 때, 본 연구결과는 in vitro에서 방사선 효과가 in vivo에서보다 약함을 알 수 있다. 그러나, in vivo 연구에서 사용된 분석방법에 상당한 오차가 있었음을 Hutchison(1985)의 review에서도 지적된 바 있다. 최근에 SSB와 DSB를 세포내 DNA에서 측정하기 위해 PFGE기기를 이용한 방법이 개발되었다. CHO cell에서의 조사결과를 보면 1.2 DSB/Gy/chromosome으로 알려졌다(Blocher et al., 1989). 또한 CHL cell인 V79 cell에서 측정한 결과, 450 Gy의 방사선 조사에 의해 2.38 DSB/Mbp가 형성됨이 보고된 바 있다(Kraxenberger et al., 1998). 따라서 1 ug의 plasmid가 지닌 총 bp는 약 3.6×10^{14} 개이며 이는 3.6×10^8 Mbp이므로 500 Gy의 방사선에 의해 최소 8.5×10^8 개의 DSB가 형성될 수 있다. 1 ug의 plasmid의 분자 수는 1.2×10^{11} 개이므로 plasmid당 6.0×10^{-3} 개의 DSB가 생기는 비율이다. 따라서 본 실험에서 얻은 결과는 세포내에서 얻은 결과와 거의 유사한 양상을 보이는 것으로 여겨진다.

이러한 결과는 세포간 방사선에 의한 DSB의 형성량 조사와 DSB 회복능을

조사하는 방법으로 활용할 수 있다. 즉, 세포질을 추출하여 plasmid와 혼합한 후 방사선을 조사하고 plasmid의 변화를 측정하는 단순하고 정밀한 방법으로 제시될 수 있다. 특히, 특정 염기서열에서의 변화양상을 연구할 때 in vitro 방법으로 사용될 수 있는 길을 열은 것으로 사료된다. 더욱이 방사선 조사후 선량별로 competent cell에 transfer함으로써 특정 유전자의 방사선에 의한 변화를 조사할 수도 있어 염기서열에 따른 알려진 유전자들의 세포 내 생물학적 활성 변화 정도를 측정할 수 있는 모델로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

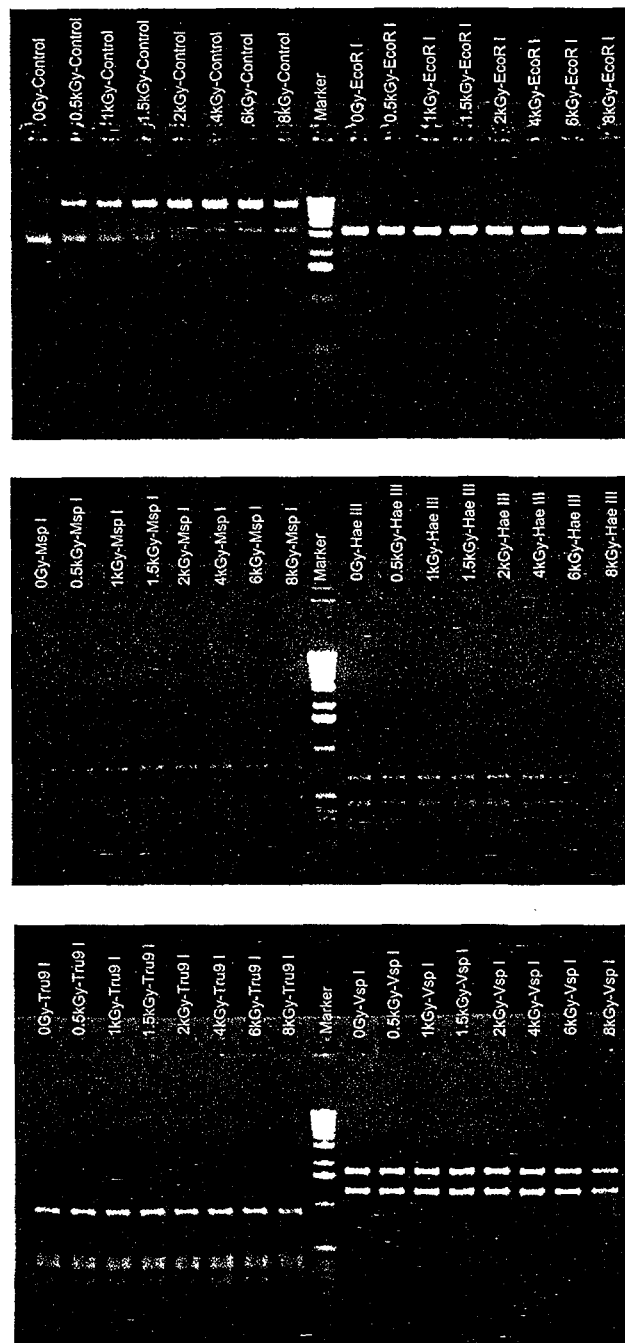


Fig. 1-3. Effects of gamma-ray radiation on the restriction enzyme sites of the plasmid DNA in water solution.

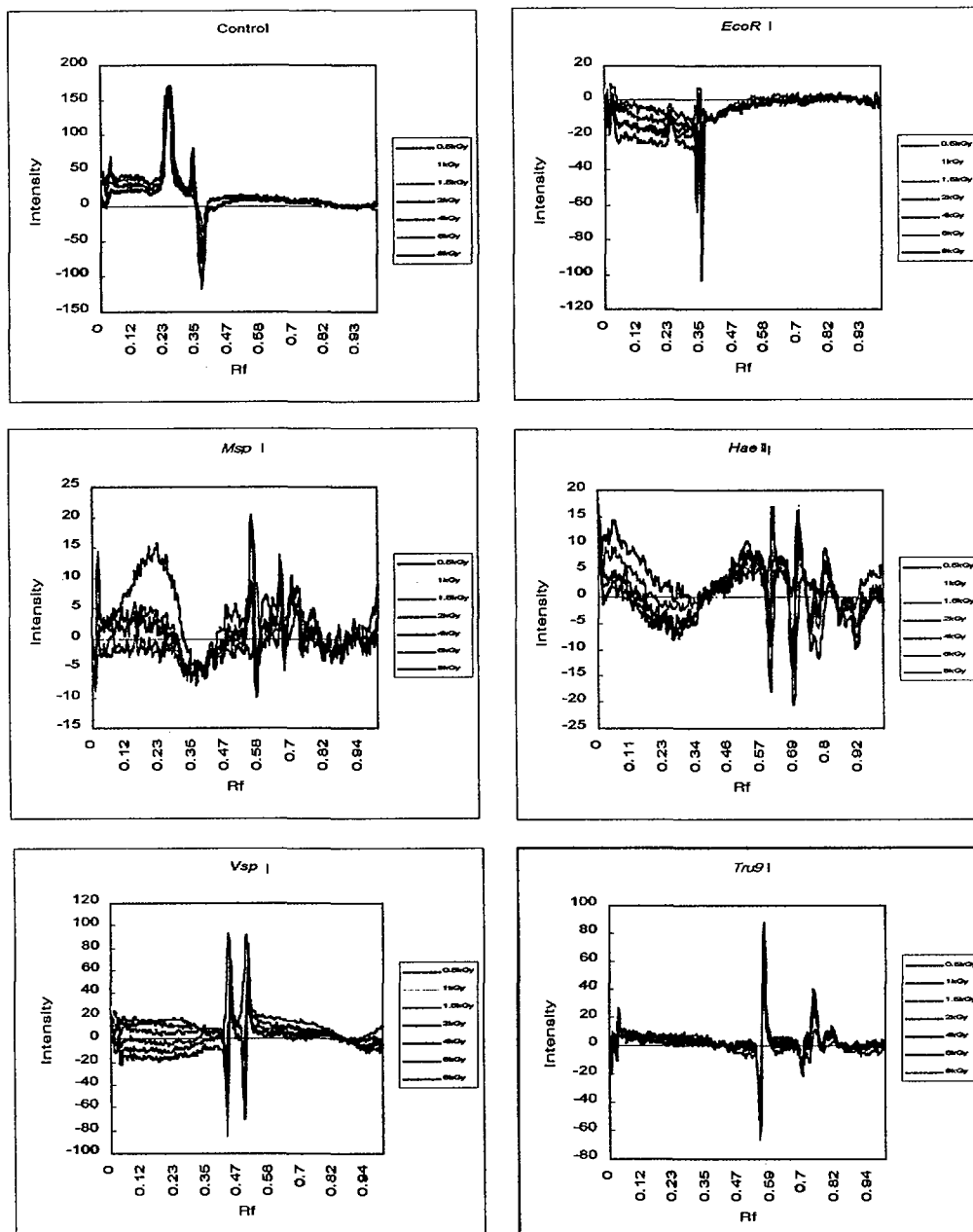


Fig. 1-4. Actual intensities of gel lanes with the restriction enzyme digested plasmid DNA after gamma-ray irradiation.

제 2 절 원핵생물의 방사선 저항성 인자 탐색

1. 재료 및 방법

가. 시료 채집

방사선은 물리적인 면에서 극한 환경요인이라 할 수 있어 자연상태에서도 극한 자연환경을 보이는 지역에 서식하는 방사선 저항성 미생물을 채집, 분리하고자 하였다.

염분도의 변화가 심한 간척지와 염전에서 토양 및 염전수를 채취하였다. 서해간척지의 시험농경지와 개간지에서 각각 무작위로 3 지점에서 상층(surface, 표층)과 중층(10-20cm, middle), 하층(30cm 이하, deep)의 토양을 채집하였다. 또한, 염전에서 25%와 18%의 염전수를 취수하였다.

각종 유기 및 무기질 비료를 사용하여 인 등의 특정 화학물질이 누적되어 척박해진 농토에서 토양을 채집하였다. 2000년 1월 26-27일, 충남 농촌진흥청의 시설재배지 염류집적 자료를 근거로 하여 충남 당진군 내, 염류집적 정도가 심한 4곳의 염류집적 시설재배지(Table 2-1)에서 각기 무작위로 3 지점을 선정하여 상층(surface, 표층)과 중층(10-20cm, middle), 하층(30cm 이하, deep)의 토양을 채집하였다.

고온의 환경이 유지되는 온천 원수를 취수하였다. 대전시 유성구의 온천 원수에서 유성구청의 도움을 받아 온천 원수를 취수하였다.

실험실로 운반된 토양은 2mm 체에 걸러 음건하였다. 이후, 음건된 2mm 이하의 토양시료를 각 실험 분석의 시료로 이용하였다.

Table 2-1. Sampling sites for the microbial isolation

Sampling site	Address	Period (year)	Cultivar
Green house 1	ChungNam Dangjin Jagae-Ri	8	Lettuce
Green house 2	ChungNam Dangjin Sulwhang-Ri	3	Red pepper
Green house 3	ChungNam Dangjin Seojung-Ri	4	Cucumber
Green house 4	ChungNam Dangjin Kumchun-Ri	5	Tomato
Reclaimed land 1	ChungNam Dangjin	2	Paddy
Reclaimed land 2	ChungNam Dangjin	1	Paddy
Solar evaporation pond	ChungNam Buan	5	-
Hot-spring	Taejon Yusung	-	-

나. 시설재배지 토양의 염류집적 및 중금속 분포 측정

시료 채취지의 각 토양내 염류집적 정도 및 중금속 오염정도를 측정하기 위하여 염류의 12종의 이온 농도와 6종의 중금속 농도를 아래와 같이 각각 이온크로마토그래피(IC)와 유도플라즈마결합분석기(ICP)를 이용하여 정량하였다.

(1) 이온크로마토그래피 분석을 위한 시료 전처리

토양 1g에 18 MΩ의 증류수 10 ml을 첨가하여 1일동안 진탕하였다. 이후 20분의 초음파 처리 및 10분 정체의 단계를 3회 반복하여 Whatman paper No.1에 여과하였다. 여과된 시료를 0.45 μm syringe filter에 재여과하여 이를 음이온 및 양이온의 분석시료로 이용하였다.

(2) 음이온(Anion) 분석

토양내 음이온중 F^- , Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^- , SO_4^- 등, 6종의 음이온을 분석 대상으로 하였다. Bio-LC DX-300(Dionex, USA) 시스템을 이용하였으며 분석 조건은 다음과 같다.

Column : IonPac AS4A-SC column(4.5 x 250mm, Dionex) with

AS4A-SC cartridge

Mobile phase : 1.7 mM $NaHCO_3$ /1.8 mM $NaCO_3$

Flow rate : 2.0 ml/min

Detection : conductivity (PED2)

(3) 양이온(Cation) 분석

토양내 양이온중 Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} 등, 6종의 양이온을 분석

대상으로 하였다. Bio-LC DX-300(Dionex, USA) 시스템을 이용하였으며 분석 조건은 다음과 같다.

Column : IonPac CS12 (4.5 x 250 mm, Dionex) with CS12
cartledge(4.5 x 50 mm)

Mobile phase : 20 mM HCl

Flow rate : 1.0 ml/min

Detection : conductivity (PED2)

Data analysis : AI-450 on-line software

(4) 중금속 농도

구경 2mm의 체에 거른 각 토양을 건열건조기에서 말린 후, 막자사발을 이용하여 약 100 ms되게 grinding 하였다. 분말 토양시료 1g에 붕산이 포함된 중금속 추출용액을 첨가하여 1일 동안 끓였다. 이를 0.45um의 filter로 걸러내어 ICP(dionex, USA)에 적용하였다. 여섯종류의 중금속(Cr, Zn, Cu, As, Cd과 Pb)의 농도를 측정하였다.

다. 미생물의 분리

토양시료 1 g에 Ringer's 용액을 첨가하여 1일 진탕하였고 filter로 여과하여 얻은 여과액을 희석평판법을 이용하여 NB 배지에 접종하여 30℃에서 배양하였고 배양된 균주를 분리하였다.

이들 균주를 대상으로, 염저항성 미생물은 각 농도의 NaCl이 첨가된 Na 배지에서 성장하는 균주를 분리하였다.

인산 가용성 세균은 CaH_2PO_4 가 함유된 최소배지에서 clear zone을 형성하는 세균을 대상으로 분리하였다.

염전수를 멸균하여 NA 배지를 만들었다. 여기에 염전수를 접종하였다. 30℃와 37℃에서 배양하여 배양된 균주를 분리하였다.

온천수는 0.2um의 filter에 생존하는 미생물을 수확하였다. 수확된 미생물을 NA 배지에 접종하여 50℃와 30℃에서 배양하였다. 배양된 균주를 분리하였다.

라. 분리 균주의 방사선 감수성

액체배지법을 이용한 미생물의 방사선 감수성을 조사하였다. 균주를 각각의 분리배지의 구성에 맞게 제조한 15 ml NB배지에 16시간 동안 전배양하였고 전배양체를 동량으로 1.5 ml effendorf tube에 분주한 후, gamma-ray를 조사하였다. 조사선량 범위는 5 kGy 단위로 0 - 25 kGy까지 조사하였다. 방사선이 조사된 균주를 평판희석법을 이용하여 접종하였다. 대조균주의 세포수와 비교하여 각 선량 구간별 생존 세포수(cfu)를 계수하였다. 각 균주의 방사선 감수성 및 멸균선량을 구하였다.

마. 고체배지법을 이용한 미생물의 방사선 감수성 조사

방사선 감수성 결과를 바탕으로 확보한 방사선 저항성 미생물을 대상으로 방사선 저항성 관련 인자 탐색을 위하여 고체배지에 접종한 미생물의 감수성을 재조사하고자 하였다.

액체배지에서 배양된 미생물을 적절한 세포 수로 희석하여 고체배지에 접종한 후 방사선을 조사하였다. 조사된 미생물을 배양하여 cfu를 측정하였다. 방사선 감수성과 D^{10} value를 구하였다.

사. 방사선 저항성 미생물 선별 및 특성 조사

분리한 미생물의 방사선 감수성 조사 결과를 토대로 타 종에 비하여 D_{10} value가 높아서 방사선 저항성이 월등한 미생물을 선택하였다. 선택한 미생물의 생장곡선과 colony 형태 및 특성, 광학현미경 하에서 미생물의 형태 및 Gram 염색, 그리고 Biolog system을 이용하여 종의 분류를 시도하였다.

분리균주의 최적 생장조건을 조사하고자 온도, pH, phosphate 농도, 질소원과 탄소 별로 100ml의 배양액을 제조하여 전배양한 균주 1 ml을 접종한 후, 각 시간별로 650nm에서 O.D.를 측정하여 생장곡선을 구하였다. pH에 대한 생장정도를 측정하기 위해 3, 5, 7, 9, 11의 pH를 갖는 NB배지를 제조하여 균주를 접종한 후, 37°C에서 배양하였다. 온도의 경우, 25°C, 30°C, 35°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C의 각 구간에서 시간별로 650 nm의 흡광도를 측정하였으며, 55°C 온도 구간에서는 1일 단위로 생장률을 측정하였다. 탄소원에 따른 생장 여부는 GM63 배지에 각각의 탄소원을 glucose 대신에 0.5%씩 첨가하여 사용하였고, 질소원 또한 GM63 배지에 0.5%씩 첨가하여 이용하였다. 인산의 농도에 따른 생장곡선을 구하기 위하여 Glu-MOPS 배지에 인 농도를 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM, 2 mM로 각각 농도를 달리한 배지를 이용하였다.

Colony의 형태는 고체배지에 배양하면서 관찰하였고 그 양상을 CCD camera로 기록하였다.

광학현미경하에서 생존 미생물의 형태 및 운동성 등을 관찰하였고 Gram staining을 시행하였다.

분리 균주의 동정은 Gram staining 결과 및 NaOH를 이용한 점성도 측정 결과를 토대로 생화학적 특성들을 기반으로한 Biolog System을 사용하였다. 분리균주를 BUGM (Biolog universal growth media)에서 2-3회 계대 배양한 후, 세포배양액의 탁도가 G(+), G(-) standard의 $\pm 3\%$ 이내가 되도록 조절

하였다. Multi-stepper를 이용해 150 μ l 씩 Biolog plate에 접종하고 30℃ 배양기에서 배양하면서 4시간 및 24시간 경과 후 Biolog reader로 발색량을 측정하였다. 측정값을 동 시스템의 데이터베이스에서 분석하여 동정하였다.

아. 방사선 저항성 미생물로부터 방사선을 이용한 영양 요구성 미생물 유도

선택한 방사선 저항성이 우수한 미생물을 NB 배지에서 배양하였다. 방사선 감수성 조사 결과에 의거하여 단일선량 조사, 반복 조사, 그리고 저선량 연속 조사 등 다양한 방법을 통해 배양된 선별 균주에 gamma-ray를 조사하였다. 방사선 조사 후 적정 미생물 수로 희석하여 NA 배지에 접종하고 배양하였다. 생존한 균주 colony를 GM63 최소배지(Table 2-2)에 접종하여 생존 여부를 확인하였다. GM63 최소배지에서 생존하지 못하는 방사선 조사된 균주 colony를 GM63 최소배지에 Table 3-3과 같은 영양원을 포함하는 11종류의 영양 요구성 미생물 선발 배지에 접종하여 배양하였다. 영양 요구성 미생물 선발 배지에 따른 생존 유무를 분석하여 어떠한 영양원에 대한 요구성을 갖는지 판별하였다. 영양 요구성을 재확인하고자 GM63 최소 배지에 요구 영양원만을 첨가하여 제조한 배지에 영양 요구성 미생물을 접종하여 그 생존 여부를 조사하였다.

Table 2-2. Composition of GM63 minimal medium

Reagent	Agent	Concentration (part/l)
5X stock for GM63	K ₂ HPO ₄	53.5 g
	KH ₂ PO ₄	26.2 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	10.0 g
	FeSO ₄	2.5 mg
GM63 agar	5X stock GM63	200 ml
	1M MgSO ₄	1 ml
	40% glucose	5 ml
	thiamine-HCl	1 ml
	1.6% agar	16 g

Table 2-3. Composition of diagnosis media of auxotrophs

	Sol 1	Sol 2	Sol 3	Sol 4	Sol 5
Sol 6	adenosine	guanine	cysteine	methionine	thiamine
Sol 7	histidine	leucine	isoleucine	lysine	valine
Sol 8	phenylalanine	tyrosine	tryptophan	threonine	proline
Sol 9	glutamine	asparagine	uracil	aspartic acid	arginine
Sol 10	thymine	serine	glutamic acid	DAP	glycine
Sol 11	pyridoxine, nicotinic acid, biotin, pantothenate, alanine				

자. 방사선을 이용한 방사선 저항성 중, 감 미생물 선별

NB 배지에 배양한 미생물을 NA 배지에 멸균 tip을 이용하여 점적종한 후 gamma-ray를 조사하였다. 점적종 후 형성되는 colony의 크기를 비교하여 방사선 저항성 증강 미생물과 감소 미생물을 선별하였다. 선별된 미생물의 방사선 감수성을 고체배지법으로 조사하여 방사선 저항성 중, 감을 확인하였다.

차. 방사선 저항성 증강 및 감소 미생물의 단백질 발현 양상 조사

미생물을 NB 배지에서 배양하여 lysis 용액(TE+Glucose)과 glass bead를 첨가하였다. 30분간 vortex를 하였고 반복하여 얼리고 녹였다. 12,000 rpm으로 원심분리하여 세포찌꺼기를 제거한 단백질을 수거하였다. SDS-PAGE에 전개하여 세포내 발현 단백질 양상을 조사하였다. 이로부터 방사선 저항성 증강 미생물 특이적 발현 단백질을 분리하였다. 이를 PVDF membrane에 옮겨 단백질의 N-말단 아미노산 서열 분석에 사용하였다. 또한, 특이적 발현 단백질을 SDS-PAGE에서 추출하여 HPLC를 이용해 순수 분리하여 N-말단 아미노산 서열분석을 시도하였다.

카. Genomic DNA를 이용한 방사선 저항성 인자 탐색

방사선 저항성 증강 미생물의 genomic DNA를 추출하여 사용하였다. 제한 효소로 GATC 염기서열을 인식하는 *Sau3AI*으로 genomic DNA를 절단하였고 이를 GATC말단을 지닌 cassette oligomer에 ligation하여 blunt-end DNA 조각을 만들었다. 이들을 *E. coli* 발현벡터, pQE의 *SmaI*에 삽입하였고 *BamHI* 부위에도 삽입하였다. 또한, 제한효소 *EcoRI*으로 절단하여 AATT말단을 지닌 cassette oligomer을 부착하여 blunt-end DNA 조각을 만들어 역시 pQE의 *SmaI*에 삽입하였다. *HindIII* 효소로 genomic DNA를 절단하여 pQE의 *HindIII*

부위에 삽입하였다. 완성된 pQE 발현벡터들을 *E. coli* JM109에 형질전환 시켰고 도입된 *E. coli* JM109를 방사선 조사하여 방사선 감수성이 증가되는가 조사하였다.

타. cDNA를 이용한 방사선 저항성 인자 탐색

방사선 저항성 증강 미생물의 total RNA를 추출하여 다양한 종류의 primer를 이용하여 RT-PCR을 통해 cDNA를 합성하였다. 대조군의 cDNA와 차이를 볼 수 있는 DDRT-PCR을 통해서 특이적 cDNA 조각을 pQE 발현벡터에 삽입하였다. PCR 산물을 cloning 하고자 pQE 벡터를 *Sma*I으로 절단한 후 5'-말단 부위에 T를 삽입하여 pQE-T벡터를 만들어 사용하였다. 합성된 pQE 벡터를 *E. coli* JM109에 도입하였고 이들의 방사선 감수성 변화를 고체배지법을 사용하여 조사하였다.

파. pQE 발현벡터를 도입한 *E. coli* JM109에서 도입 DNA의 발현양상 조사

방사선 저항성이 증가되는 양상을 보이는 *E. coli* JM109에서 단백질을 추출하여 SDS-PAGE에 전개하였다. 단백질 양상을 비교하여 증가양상을 보이는 단백질이 있으면 이를 Ni-NTA column을 사용하여 분리하였다.

하. 방사선 저항성 증가 인자의 염기서열 결정

방사선 저항성이 증가되는 양상을 보이는 JM109에서 도입된 pQE 벡터를 추출하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열을 Genebank에 등록된 서열과 비교하여 새로운 유전자인가 확인하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 극한 환경 미생물 분리

방사선 저항성 관련 인자를 원핵 미생물에서 탐색하고자 하였다. 방사선 조사는 물리적으로 극한 환경을 생물체에 제공하는 것과 유사하므로 극한 환경에서 생존하는 미생물군에서 방사선에 저항성을 보이는 미생물을 확보하기가 유리할 것으로 판단된다. 이에 극한 환경이라 평가받고 있는 염전, 간척지, 백화현상이 있는 경작지, 그리고 고온이 유지되는 온천에서 생존하는 미생물을 대상으로 하였다.

각 채집지의 특성을 Table 2-1에 나타내었다. 채집된 토양의 음이온, 양이온과 중금속 이온의 농도는 Table 2-4, -5와 -6에 나타내었다. 지역별로 이온의 농도가 다를 수 있었다. 표층에서의 염류 집적도가 일반적으로 높게 나타났다. 특이할 결과는 염류가 집적되어 있는 시설재배지에서 양이온 및 음이온의 농도가 매우 높게 나타남과 동시에 토양채집지의 인근 지역에 공장지대와 같은 중금속 오염원이 특별히 없음에도 불구하고 중금속의 농도가 매우 높은 것이다. 이는 화학비료의 연속적인 과대 사용으로 인한 농경지내 축적으로 인한 것으로, 화학비료 제조시 축매등으로 이용된 중금속이 완전히 제거되지 않은채 화학비료에 잔존한 결과로 추정된다.

시설재배지의 토양에 축적되어 있는 염류는 미생물의 세포외 환경에 높은 기질농도로 인한 삼투압의 영향 및 염류 자체의 물리적 영향에 의한 토양의 응집으로 유용한 영양원의 이용을 불가능하게 하여 미생물의 생장을 억제한다. 또한 water potential의 변화 또한 미생물의 생장에 매우 큰 영향을 미친다. 아울러 시설재배지에서 높은 농도로 존재하는 중금속들은 미생물의 대사를 방해하거나 치사인자로 작용한다. 이러한 미생물의 생장에 극한 환경을 갖는 시설재배지에서 생장하는 미생물들은 다른 자연환경에서

분리한 미생물에 비해 방사선저항성을 갖을 수 있는 확률이 높다. 이러한 예로, *Deinococcus radiodurans* R1은 3 megarad에서도 생존이 가능한 대표적인 방사선저항성 균주로 desiccation resistance 또한 갖고 있으며, 이 두 저항성은 유전자상에서 서로 밀접한 관계를 갖고 있는 것으로 알려져 있다(Billi et al., 2000). 따라서 본 실험에서 분리한 염류집적 환경과 고온의 환경에서 분리한 균주들은 방사선 저항성과 관련된 연구를 진행하는데 매우 유용한 균주로 기대되었다.

본 연구에서 염전수, 간척지, 염류집적토양과 온천으로부터 순수 분리된 균주는 각각 1, 7, 15, 1 균주였다. 이들의 방사선 감수성을 조사하였고 D_{10} 값과 멸균선량을 Table 2-7에 보였다. 총 24 종류의 미생물 중에 온천수에서 분리한 YS1의 D_{10} 값이 다른 미생물에 비해 높았기에(Fig. 2-1) 방사선 저항성이 있는 미생물로 판단하여 이 후의 실험에 사용하였다.

**Table 2-4. Concentration of anion in the soil of the green house
and the reclaimed lands**

Sampleing site	F ⁻ (ppm)	Cl ⁻ (ppm)	NO ₂ ⁻ (ppm)	PO ₄ ⁻ (ppm)	SO ₄ ⁻ (ppm)
Jagae-Ri A(S)	2.02	105.61	444.74	31.29	489.67
Jagae-Ri A(M)	0.58	21.91	41.11	14.32	43.71
Jagae-Ri A(D)	0.78	22.46	15.54	7.61	38.19
Jagae-Ri B	2.03	124.48	553.74	28.08	279.60
Jagae-Ri C	0.40	20.51	113.84	11.87	48.48
Sulwhang-Ri A(S)	0.45	46.95	276.99	91.07	68.49
Sulwhang-Ri A(M)	0.78	15.61	128.01	10.21	21.64
Sulwhang-Ri A(D)	0.91	9.80	62.04	4.43	11.98
Sulwhang-Ri B	0.55	35.14	215.50	24.90	40.53
Sulwhang-Ri C	8.42	59.31	68.27	22.32	21.81
Soujung-Ri A(S)	2.06	228.11	312.37	47.87	440.60
Soujung-Ri A(M)	1.99	198.99	299.37	4.75	354.41
Soujung-Ri A(D)	1.99	120.64	183.68	47.56	240.96
Soujung-Ri B	2.31	123.73	119.12	43.55	309.49
Soujung-Ri C	2.20	152.55	150.53	39.97	455.96
Kumchung-Ri A(S)	2.56	156.76	334.28	33.63	265.96
Kumchung-Ri A(M)	0.96	45.58	79.42	17.64	55.12
Kumchung-Ri A (D)	0.71	15.03	8.08	5.16	14.64
Kumchung-Ri B	1.03	16.21	14.79	15.42	174.86
Kumchung-Ri C	1.14	55.21	52.32	13.54	224.09
Reclaimed land 1	0.75	12.50	2.28	-	6.69
Reclaimed land 2	0.56	57.51	3.38	-	45.62

- : not determined

S: surface soil, M: Depth of 10-20 cm from S, D: Depth of 30 cm from S

**Table 2-5. Concentration of cation in the soil of the green house
and the reclaimed lands**

Sampling site	Ca ²⁺ (ppm)	Na ⁺ (ppm)	NH ₄ ⁺ (ppm)	K ⁺ (ppm)	Mg ²⁺ (ppm)
Jagae-Ri A(S)	342.83	43.76	15.64	70.16	89.35
Jagae-Ri A(M)	18.16	16.90	2.86	23.00	9.30
Jagae-Ri A(D)	17.58	19.74	3.28	11.36	8.95
Jagae-Ri B	280.72	40.36	8.13	50.96	96.37
Jagae-Ri C	38.15	11.19	-	6.43	15.56
Sulwhang-Ri A(S)	63.88	16.16	6.26	104.45	47.14
Sulwhang-Ri A(M)	36.06	9.11	-	16.13	9.67
Sulwhang-Ri A(D)	21.45	10.86	2.15	10.80	5.77
Sulwhang-Ri B	34.65	13.18	2.34	23.25	13.25
Sulwhang-Ri C	24.53	42.18	9.61	28.56	6.22
Soujung-Ri A(S)	177.81	90.77	20.04	226.38	86.97
Soujung-Ri A(M)	151.64	76.63	8.46	193.01	76.35
Soujung-Ri A(D)	8.67	56.35	7.96	147.51	46.37
Soujung-Ri B	115.65	58.67	-	75.36	47.51
Soujung-Ri C	191.61	77.10	-	92.16	66.69
Kumchung-Ri A(S)	158.78	109.68	-	57.89	82.43
Kumchung-Ri A(M)	18.09	38.79	4.33	22.68	11.96
Kumchung-Ri A (D)	2.89	15.56	5.42	5.54	1.99
Kumchung-Ri B	33.62	45.48	-	14.23	17.56
Kumchung-Ri C	41.26	80.94	-	16.90	27.62
Reclaimed land 1	0.37	23.66	3.62	5.41	0.86
Reclaimed land 2	1.03	69.86	7.39	10.18	1.99

- ; not determined

S: surface soil, M: Depth of 10-20 cm from S, D: Depth of 30 cm from S

Table 2-6. Concentration of heavy metal on the soils from the green house and the reclaimed lands

Sampling site	Cr (ppm)	Zn (ppm)	Cu (ppm)	As (ppm)	Cd (ppm)	Pb (ppm)
Jagae-Ri A(S)	122.0	94.6	44.0	5.17	0.20	14.9
Jagae-Ri A(M)	139.0	91.9	49.5	4.22	0.24	14.6
Jagae-Ri A(D)	127.0	85.0	45.1	3.72	0.14	14.9
Jagae-Ri B	115.0	89.6	41.4	3.90	0.14	15.8
Jagae-Ri C	119.0	84.7	43.5	4.15	0.17	13.8
Sulwhang-Ri A(S)	48.3	136.0	42.6	15.30	0.24	20.0
Sulwhang-Ri A(M)	56.5	110.0	37.5	15.00	0.24	23.6
Sulwhang-Ri A(D)	52.2	79.7	26.8	16.30	0.24	24.1
Sulwhang-Ri B	50.6	123.0	37.7	15.50	0.33	23.3
Sulwhang-Ri C	53.7	165.0	61.2	17.20	0.32	21.2
Soujung-Ri A(S)	36.2	114.0	27.7	9.87	0.28	22.1
Soujung-Ri A(M)	41.3	126.0	32.5	10.80	0.29	25.5
Soujung-Ri A(D)	39.2	112.0	27.0	9.07	0.30	242.2
Soujung-Ri B	42.2	123.0	31.3	12.20	0.36	22.7
Soujung-Ri C	35.7	116.0	25.9	10.60	0.26	25.0
Kumchung-Ri A(S)	33.4	123.0	23.2	8.03	0.26	28.1
Kumchung-Ri A(M)	37.3	111.0	24.2	7.93	0.34	29.4
Kumchung-Ri A (D)	27.1	82.7	16.0	4.96	0.19	32.9
Kumchung-Ri B	48.1	106.0	26.8	9.25	0.31	30.3
Kumchung-Ri C	22.1	102.0	21.0	4.03	0.25	25.2
Reclaimed land 1	60.6	57.6	14.8	8.48	0.24	21.2
Reclaimed land 2	61.4	63.9	16.7	14.50	0.28	27.2

Table 2-7. The D₁₀ values and sterilization dose of gamma-ray of the isolated bacteria

Strain	D ₁₀ value	sterilized dose
HG1	0.5311	5 kGy
HG2	0.5660	6 kGy
HG3	0.5228	5 kGy
HG4	0.5311	5 kGy
HG5	0.6064	5 kGy
HG6	0.6079	5 kGy
HG7	0.7966	5 kGy
HG8	0.6405	6 kGy
HG9	0.3807	4 kGy
HG10	0.4968	4 kGy
HG11	0.7942	5 kGy
HG12	0.5750	5 kGy
HG14	0.5031	4 kGy
HG15	0.4176	5 kGy
HG16	0.4995	5 kGy
H2		5 kGy
H3		2 kGy
H4		5 kGy
H5		5 kGy
H6		5 kGy
H7		4 kGy
H8		4 kGy

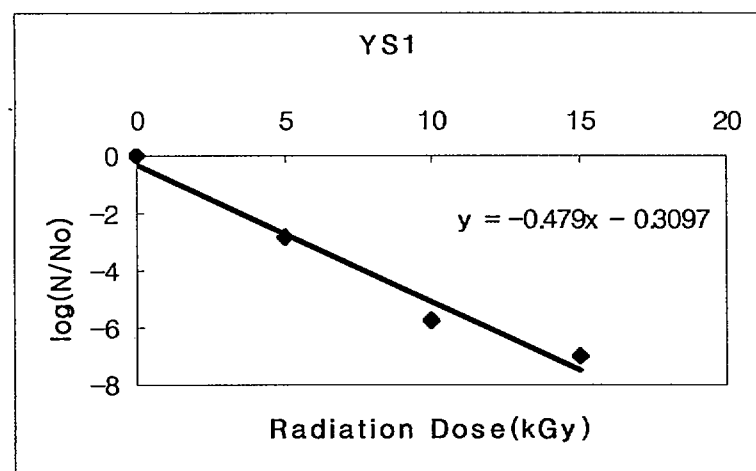
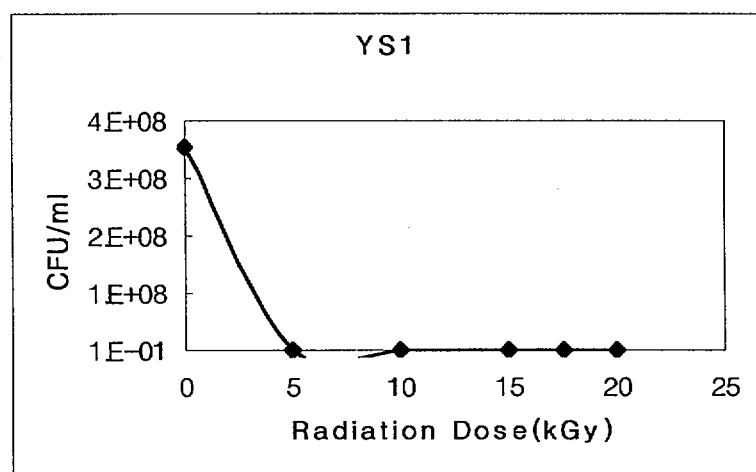


Fig. 2-1 Radiation sensitivity of YS1 isolated from hot spring.

나. 방사선 저항성 미생물 선별 및 특징

방사선 감수성 조사결과 분리한 미생물중 온천수에서 확보한 YS1의 D_{10} value가 2.08 kGy로써 다른 분리 균주에 비해 월등히 높았다. 이를 방사선 저항성 미생물, YS1로 판단하여 그 특징을 조사하였다.

온도에 따른 생장곡선은 Fig. 2-2와 같았다. 액체배양시 최적 온도는 50℃이었다. 그러나, 급격히 세포수가 감소하였다. 35℃에서 45℃에서 안정적으로 성장하는 양상을 보였다.

최적 pH는 7이었으며 알칼리성에 보다 잘 성장하는 양상을 보였다(Fig. 2-3).

인산의 농도에서 대해서는 농도의존적인 성장양상을 보였다(Fig. 2-4). 1mM-2mM의 농도가 최적 조건으로 판단되었다.

탄소원으로는 glucose와 sucrose가 생장에 알맞았다(Fig. 2-5). Lactose에 의해서는 생장이 거의 이루어지지 못하였다.

질소원으로는 tryptone과 yeast extract가 유용하였고 peptone과 urea는 적절하지 못하였다(Fig. 2-6).

생장곡선의 정체기에 도달 후 24시간 내에 액체배양액과 공기층 사이에 막이 형성되었으며 48시간 이 후에는 급격한 autolysis 현상을 보였다.

YS1의 고체배지에서의 colony는 흰색이며 원형이었고 접도가 있는 물질이 분비되어 colony를 구성하였다(Fig. 2-7A). 이 점성물질은 초기에는 빛을 반사하였으나 시간이 지남에 따라 불투명해지고 빛의 반사성도 감소되었다. Colony 형성 초기에 접촉된 colony 간에는 두 개의 colony들이 융합되는 것으로 보였으나 시간이 지난 colony 간에는 접촉억제 현상을 보였다. 고체배지에서 colony들은 공간이 충분할 경우 계속해서 커지며 원형에서 부정형으로 성장하였다.

YS1의 Gram's staining 결과는 Fig. 2-7B에 보였다. Gram (-)로 판명되

었으며 형태는 막대모양이고 중앙에 투명한 공간이 보였다. 세포의 길이는 평균 $2\mu\text{m}$ 이었다. 세포주변으로는 Safranin으로 붉게 염색되는 점액성 물질이 있었다. 세포들은 서로 말단이 연결된 chain을 만들고 있는 양상도 관찰되었다.

YS1의 Biolog system으로 평가한 결과는 Table 2-8에 나타내었다. Biolog System은 95종의 유일탄소원을 첨가한 96 well의 plate에서 미생물을 일정 시간 배양하였을 때 발생하는 탄소원의 부산물과 triphenyltetrazolium chloride(TTC)의 반응 정도를 지시하는 triphenylformazan(TPF)의 발색정도를 측정하는 System이다. 96 well에서의 유일탄소원에 대한 발색정도를 비교분석 결과를 database한 Biolog software를 이용하여 종의 동정이 가능하다. YS1의 반응결과를 database에서 상동성 검색을 행한 결과를 Table 2-9에 나타내었다. 일반적으로 유사성이 0.6 이상이어야 만 유의적으로 유사한 종이라고 판단 할 수 있다. YS1은 기존에 알려진 미생물과 상동성이 매우 낮았다.

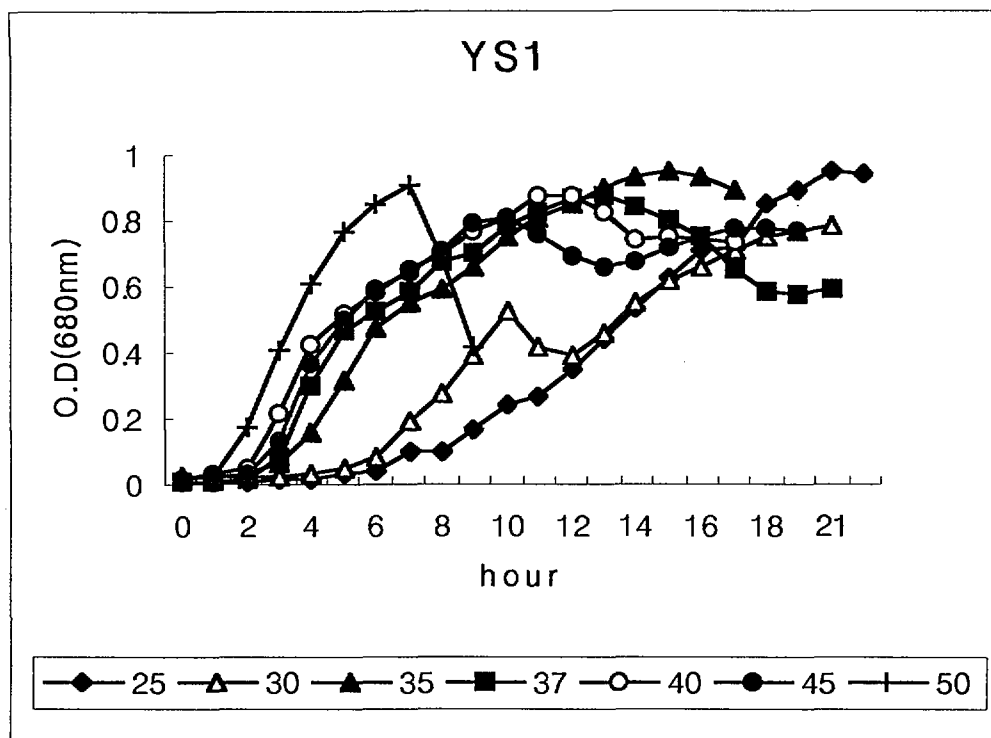


Fig. 2-2. Growth curves of the radiation resistant bacterium YS1 at various temperatures.

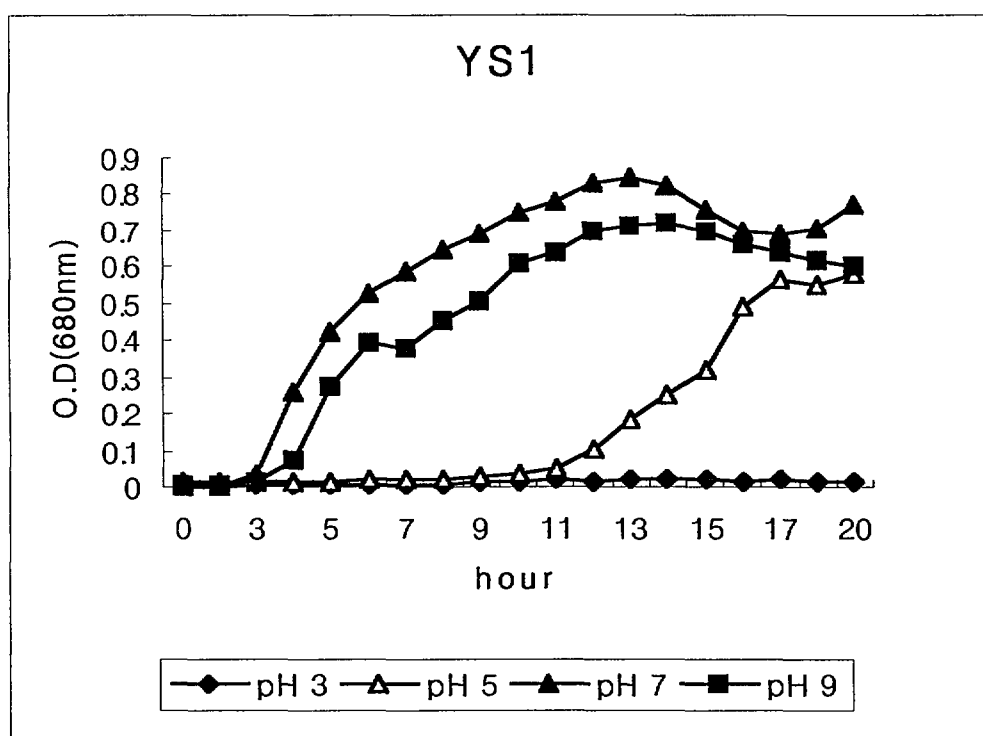


Fig. 2-3. Growth curves of the radiation resistant bacteria YS1 at various pH.

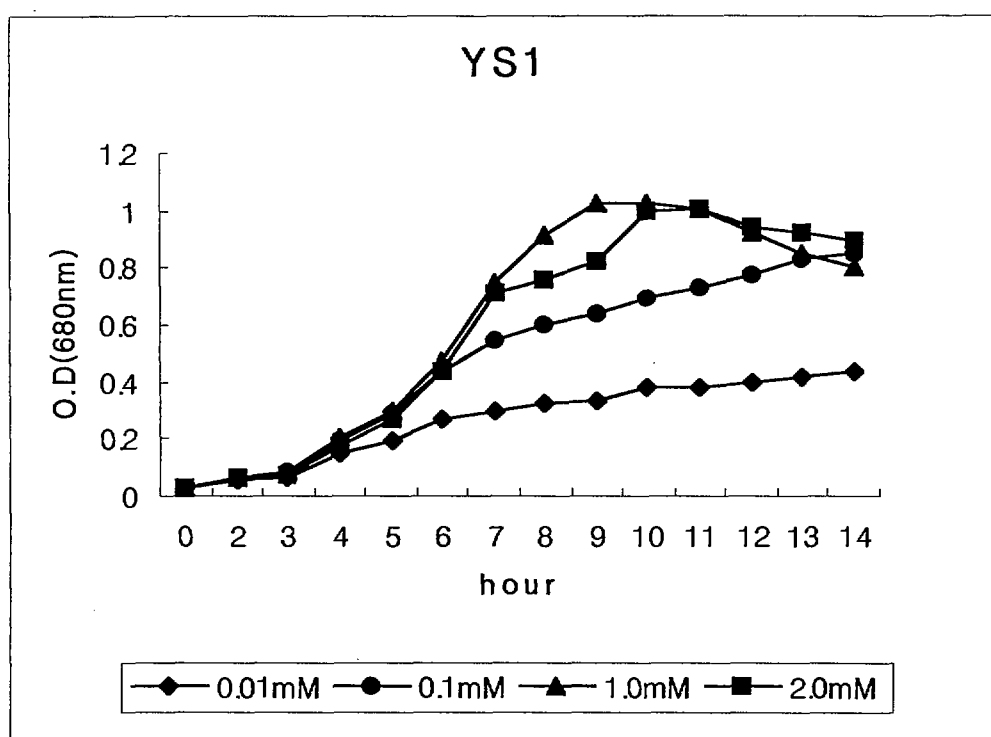


Fig. 2-4. Growth curves of the radiation resistant bacterium YS1 at various phosphate concentrations.

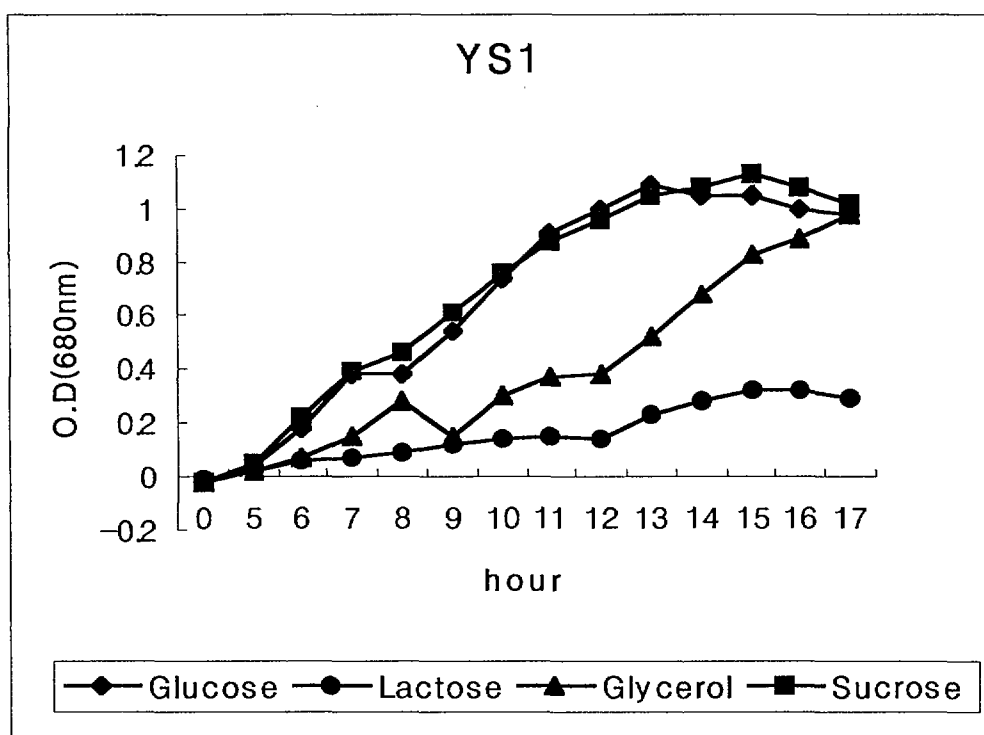


Fig. 2-5. Growth curves of the radiation resistant bacterium YS1 at various sole carbon sources.

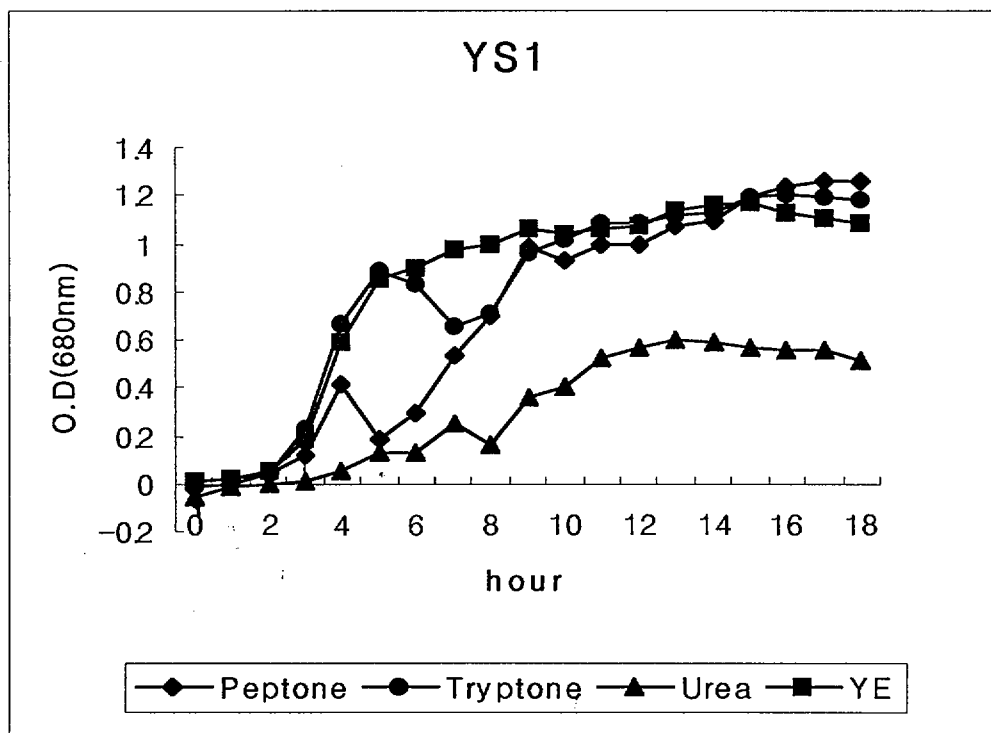
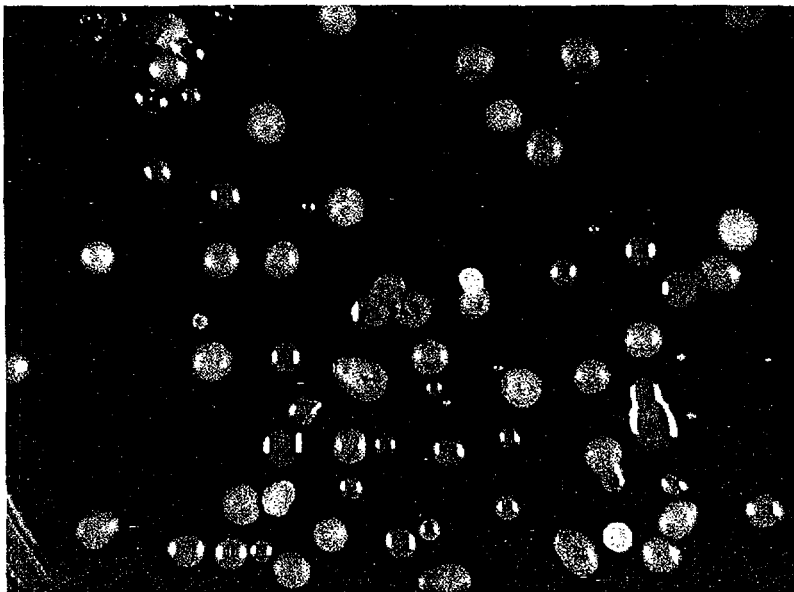


Fig. 2-6. Growth curves of the radiation resistant bacterium YS1 at various sole nitrogen sources.

A



B

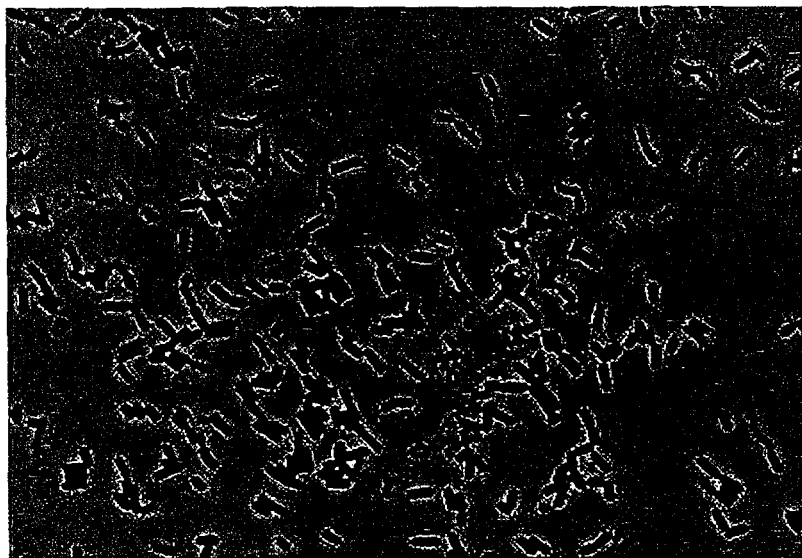


Fig. 2-7. Morphology of the radiation resistant bacteria YSI isolated from the hot spring. A. Colony, B. Gram staining

Table 2-8. The values of Biolog System test of YSI

A1 water	A2 α -cyclodextrin	A3 Dextrin	(0)	(73)	(67)
B1 I-Erythritol	B2 D-Fructose	B3 L-Fucose3	(59)	(84)	(21)
C1 D-Melibiose	C2 β -Methyl-D -glucoside	C3 D- Psicose	(29)	(69)	(<121)
D1 Acetic acid	D2 cis-Aconitic acid	D3 Citric acid	(-4)	(53)	51)
E1 ρ -Hydroxy phenylacetic acid	E2 Itaconic acid	E3 α -Keto butyric acid	(5)	(8)	(-11)
F1 Bromo succinic acid	F2 Succinamic acid	F3 Glucuronami de	(31)	(9)	(1)
G1 L-Histidine	G2 Hydroxy L-proline	G3 L-Leucine	(11)	(-1)	(34)
H1 Urocanic acid	H2 Inosine	H3 Uridine	(13)	(87)	(52)

Table 2-8. continued

A4 Glycogen	A5 Tween40	A6 Tween80	(53)	(84)	(93)
B4 D-Galactose	B5 Gentiobiose	B6 α -D-Glucose	(98)	(102)	(47)
C4 D-Raffinose	C5 L-Rhamnose	C6 D-Sorbitol	(54)	(62)	(34)
D4 Formic acid	D5 D-Galactonic acid lactone	D6 D-Galacturo nic acid	(-8)	(0)	(40)
E4 α -Keto glutaric acid	E5 α -Keto valeric acid	E6 D,L-Lactic acid	(-11)	(67)	(41)
F4 Alaninamide	F5 D-Alanine	F6 L-Alanine	(-2)	(49)	(79)
G4 L-Omithine	G5 L-Phenylala nine	G6 L-Proline	(5)	(-3)	(31)
H4 Thymidine	H5 Phenyl ethlamine	H6 Putrescine	(46)	(8)	(12)

Table 2-8. continued

A7 N-Acetyl-D-glactosamine	A8 N-Acetyl-D-glucosamine	A9 Adonitol	(8)	(50)	(53)
B7 m-Inositol	B8 α -D-Lactose	B9 Lactulose	(47)	(2)	(53)
C7 Sucrose	C8 D-Trehalose	C9 Turanose	(92)	(66)	(81)
D7 D-Gluconic acid	D8 D-Glucosaminic acid	D9 D-Glucuronic acid	(18)	(38)	(4)
E7 Malonic acid	E8 Propionic acid	E9 Quinic acid	(-2)	(-3)	(29)
F7 L-Alanyl-glycine	F8 L-Asparagine	F9 L-Aspartic acid	(44)	(37)	(35)
G7 L-Pyroglutamic acid	G8 D-Serine	G9 L-Serine	(36)	(36)	(63)
H7 2-Amino-ethanol	H8 2,3-Butanediol	H9 Glycerol	(15)	(25)	(-19)

Table 2-8. continued

A10 L-Arabinose	A11 D-Arabitol	A12 Cellobiose	(28)	(9)	(63)
B10 Maltose	B11 D-Mannitol	B12 D-Mannose	(68)	(52)	(97)
C10 Xylitol	C11 Methyl-pyruvate	C12 Mono-methyl-succinate	(22)	(94)	(63)
D10 α -Hydroxybutyric acid)	D11 β -Hydroxybutyric acid	D12 γ -Hydroxybutyric acid	(13)	(9)	(8)
E10 D-Saccharic acid	E11 Sebacic acid	E12 Succinic acid	(2)	(-22)	(15)
F10 L-Glutamic acid	F11 Glycyl-L-aspartic acid	F12 Glycyl-L-glutamic acid	(61)	(<152)	(8)
G10 L-Threonine	G11 D,L-Carnitine	G12 γ -Aminobutyric acid	(31)	(35)	(<114)
H10 D,L- α -Glycerol phosphate	H11 Glucose-1-phosphate	H12 Glucose-6-phosphate	(109)	(57)	(49)

Table 2-9. Classification of the YSI based on the Biolog System.

Species	SIM	DIST
<i>Vibrio metschnikov</i>	0.34	2.63
<i>Pasteurella lymphangitidis</i>	0.14	2.92
<i>Pasteurella volantium</i>	0.08	3.11
<i>Xanthomonas albiuncans</i>	0.07	3.14
<i>Xanthomonas campestris</i>	0.04	3.38
<i>Pasteurella caballi</i>	0.02	3.51
<i>Pasteurella anatis</i>	0.01	3.76

다. 방사선 이용 돌연변이체 유도

방사선 조사에 따른 방사선 저항성의 변화 유무를 확인하기 위하여 YS1을 고체배지에 접종한 후 방사선을 조사한 결과는 Fig. 2-8과 같다. 액체 배양액에서 방사선을 조사한 경우에 나타난 결과(D_{10} value: 2.0 kGy)에 비해 고체배지에서 조사한 결과는 D_{10} value가 696 Gy로 낮아진다. 이러한 원인은 명확히 설명할 수 없으나, 하나의 가능성은 액체배지의 어떤 성분이 방사선에 의한 radical의 생성을 억제하는 효과를 보이는 것으로 여겨진다. 그러나, 이러한 설명은 기존의 방사선에 의한 세포의 손상을 설명하는 이론에는 부합되고 있다. 즉, 용액에 방사선이 조사되면 H_2O 분자가 radical을 띄게 되고 이러한 radical에 의해 주변의 분자들이 여기상태가 되어 화학구조적 변화가 초래된다는 것이 중론이다. 따라서, 고체배지에 접종한 미생물은 공기중에 노출되므로써 오히려 액체배지에 있을 때보다 radical의 영향을 덜 받을 것으로 판단됨에도 방사선 감수성은 높아지는 현상을 보인 것이다. 이처럼, 고체배지에 접종한 후 방사선을 조사하는 방법은 액체배양액내에서 조사하는 방법에 비해 연구수단으로써 몇 가지 장점이 있다. 1) 동일한 조사효과를 보다 낮은 조사선량에서 확인할 수 있으며, 2) 방사선조사시간을 단축할 수 있고, 3) 이미 균일하게 접종되어 있으므로 방사선 조사시간 동안 대조군의 경우 세포분열에 의해 세포수가 증가하는 현상에서 오는 colony forming unit (cfu)의 차이를 원천적으로 제거할 수 있어 실험오차를 줄일 수 있다.

방사선을 이용하여 YS1 보다 방사선 저항성이 증감된 돌연변이체를 유도하고자 하였다. 이를 위해 YS1을 NB 배양액에 접종한 후, 500 Gy의 gamma-ray를 반복 조사하여 총 조사선량이 2 kGy가 되도록 하였다. 또한, 저선량으로 1개월간 연속 조사하여 총 조사선량이 158 Gy가 되도록 하였다. 이들의 방사선 감수성 변화를 고체배지 조사법에 의거하여 확인한 결과

(Fig. 2-8), 대조군인 YS1에서는 D_{10} value가 696 Gy였으나, 반복조사군은 D_{10} value가 1.008 kGy였고, 연속조사군은 D_{10} value가 1.037 kGy로 나타났다. 이러한 결과는 액체배양액내에서 대조군의 75%이상이 생존하는 조사선량으로 반복처리하거나, 생존에 거의 영향을 주지 않는 3.6 Gy로 장기간 연속처리하였을 때 방사선 저항성이 증가함을 의미하는 것이다. 이러한 방사선 저항성의 원인으로는 첫째, 방사선에 대한 방어능이 적응현상(adaptation)에 의해 일시적으로 배가되거나, 둘째, 방사선 저항성 관련 유전자의 변화가 누적되어 보다 유용한 유전적 돌연변이가 초래되었을 가능성이 있다. 그러므로, 방사선을 이용하여 방사선의 저항성이 증강된 돌연변이체를 유기할 수 있음을 시사한다.

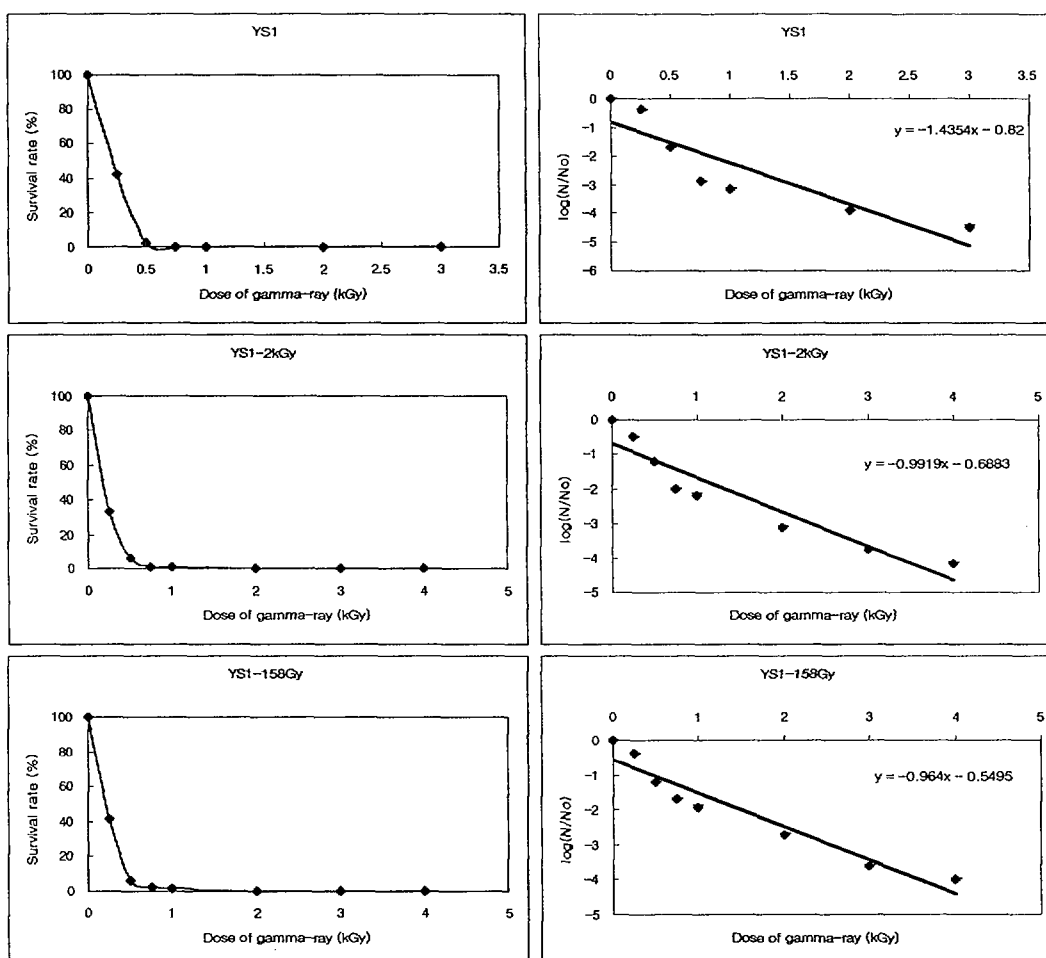


Fig. 2-8. Radiation sensitivities at various conditions of gamma-ray irradiation. A. Only one irradiation; B. Four times irradiation with 500 Gy of gamma-ray; C. Continuous irradiation with low dose of gamma-ray(158 Gy).

라. 영양요구주 선별

방사선에 의한 유전자 돌연변이체를 개발하기 위해서 다양한 방사선 조사기법을 이용하여 YS1에 방사선을 조사하였고 생존한 미생물을 대상으로 유전자 돌연변이가 있는지를 확인하고자 하였다. 유전자 돌연변이를 확인할 수 있는 유용한 방법 중의 하나는 영양요구주를 선별하는 것이다. 영양요구주는 특정한 영양원이 공급되지 않으면 최소배지에서 생존할 수 없으며, 손쉽게 유전적 back mutation이 일어나는 지를 확인할 수 있어, 안정된 돌연변이체를 선별하고 유지 할 수 있는 유용한 방법이다.

방사선 조사 후 생존한 YS1을 무작위로 300 colony를 선별하여 최소배지인 GM63 배지(Table 2-2)에 접종하고 배양하였다. 그 결과, GM63 최소배지에서 생존하지 못하는 2개의 colony (Y25, Y67)를 선별할 수 있었다. 대조군으로 YS1과 이두 돌연변이체를 11종류의 영양요구주 선별 배지(Table 2-3)와 GM63 최소배지 및 LA 배지에 접종하여 배양하였다. 배양 결과(Table 2-10), YS1은 영양요구주 선별 배지 중 Sol 2와 Sol 10배지에서만 생존하지 못하였다. 따라서, YS1은 Sol 2와 Sol 10의 공통적인 영양원인 serine에 대한 민감성 미생물임을 알 수 있었다. Y25와 Y67은 최소배지에서 생존하지 않았고 완전배지인 LA 배지에서 생존하였다. 영양요구주 선별배지에서는 Y25는 Sol 3와 Sol 8배지에서만 생존하였다. Sol 3과 Sol 8의 공통 영양원은 tryptophan이므로 Y25는 tryptophan 요구주임을 알 수 있었다. Y67은 Sol 3, Sol 5, Sol 8과 Sol 9에서만 생존하였다. Table 2-3에서 보듯이 Y67은 arginin과 uracil 또는 proline과 tryptophan이 동시에 첨가된 영양배지에서만 생존할 수 있음을 알 수 있었다. Y25와 Y67의 영양요구성을 재조사한 결과도 동일하였다(Table 2-11).

이상의 실험을 통해 방사선을 이용하여 방사선 저항성 YS1 균주에서 영양요구성 돌연변이체를 유도함으로써 방사선 저항성 미생물의 경우에도 방

방사선에 의해 유전적인 변화가 유도될 수 있음을 재차 확인하였고, 비록 현 시점에서 다양한 영양요구주를 확보하지 못하였으나 Y25와 Y67에서 유전자의 변이가 영양요구적인 부분만 아니라 방사선 저항성 관련 인자에도 변화가 초래되었을 가능성이 있기 때문에 이들을 대상으로한 방사선 감수성 조사의 필요성이 있다. 만약에 이들의 방사선 감수성이 대조군에 비해 월등한 차이가 있다면 방사선 저항성 관련 인자의 탐색에도 유용할 것이다. 특히, 영양요구주 선별 배지인 Sol 9에서 생존하는 미생물은 *pyrA* 유전자 돌연변이체인 것으로 알려져 있으며, *E. coli*는 pyrimidine 생합성에 관여하는 유전자들이 염색체상에 흩어져 있으나 *Bacillus subtilis*의 경우에 *pyr* operon을 구성하고 있어 구성 유전자 중 하나의 변화에 의해서도 operon 구성 유전자 대부분이 작동할 수 없게 된다. YS1의 경우에 *pyr* 유전자들이 operon을 형성하는 지에 관한 정보는 없으나 이의 영양요구주인 Y67에서 DNA의 전구물질인 pyrimidine의 합성에 관여하는 유전자에 변화가 있다는 것은 방사선에 대한 저항성에 있어서 변화가 초래되었을 가능성이 높을 것으로 기대된다. 물론, *pyrA* 유전자 발현에 UTP의 농도가 일차적인 원인이므로 Y67의 경우에 uracil을 요구하지만 uracil 단독첨가 만으로는 Y67의 생장을 촉진하지 못하므로(Table 2-11) 또 다른 유전자들이나 기존에 알려지지 않은 생체기작으로써 DNA 합성과 repair에 관여하는 유전자(들)의 작동과 밀접한 관련 인자에 변화가 초래되었을 가능성도 있을 것이다.

**Table 2-10. Auxotrophs induced by gamma-ray radiation from YS1
originated from the hot spring**

Strain	LA	GM63	Sol 1	Sol 2	Sol 3	Sol 4	Sol 5	Sol 6	Sol 7	Sol 8	Sol 9	Sol 10	Sol 11
YS1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Y25	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Y67	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-

Table 2-11. Growth of the auxotrophs on the required nutrients-added media

Strain	Tryptophan	Uracil	Arginine	Proline	Arginin Tryptophan	Proline Uracil	Uracil Arginine	Proline Tryptophan
YS1	+	+	+	+	+	+	+	+
Y25	+				+			+
Y67	-	-	-	-	-	-	+	+

마. 방사선이용 방사선 저항성 증강 돌연변이체 개발

영양요구주 Y25와 Y67외에 무작위로 선별된 5 균주(Y3, Y14, Y21, Y29와 Y140)를 대상으로 방사선 저항성 증강 여부를 조사하고자 고체배지조사법으로 방사선 감수성을 조사한 결과는 Fig. 2-9 ~ 2-16과 같았다. D_{10} value를 비교한 결과(Table 2-12), Y67이 911.4 Gy로 대조군과 여타의 돌연변이체에 비해 월등히 높았다. 이들을 고체배지에 점접종하여 방사선 조사 후 생장율의 변화를 조사한 결과는 Fig. 2-18과 Table 2-13과 같았다. 방사선 미처리군에서는 Y3의 생장율이 가장 높은 것으로 나타났으며(Fig. 2-17A), Y29가 가장 낮았다. 조사선량 250 Gy 조사군의 경우 Y140이 가장 빠르게 생장하였으며 역시 Y29가 가장 늦었다(Fig 2-17B). 그러나, 4 kGy 조사군에서는 Y67이 가장 빠르게 생장하였으며 그 외의 균주들은 거의 생장을 못하였다(Fig. 2-17C). 이러한 결과는 방사선 감수성 조사 결과와 일치하였다.

방사선을 이용하여 방사선 저항성이 증강된 돌연변이체로 Y67을 선별할 수 있었으며 이는 영양요구주이므로 차후의 연구에 유용할 것으로 기대된다. 또한, 방사선 저항성이 감소된 돌연변이체로 Y25를 선별하였으며 이는 tryptophan 요구주이므로 역시 방사선 저항성 인자 탐색에 매우 유용할 것으로 기대된다.

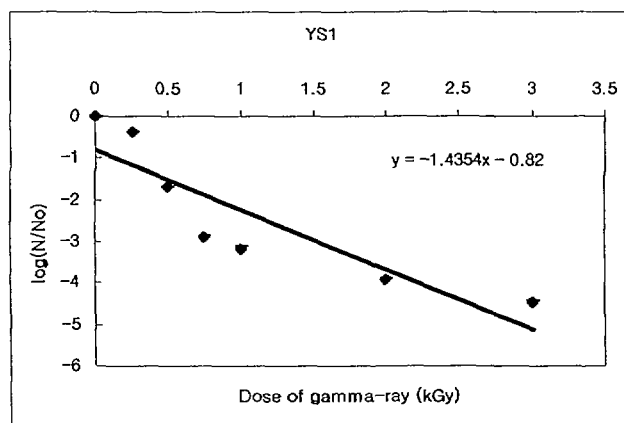
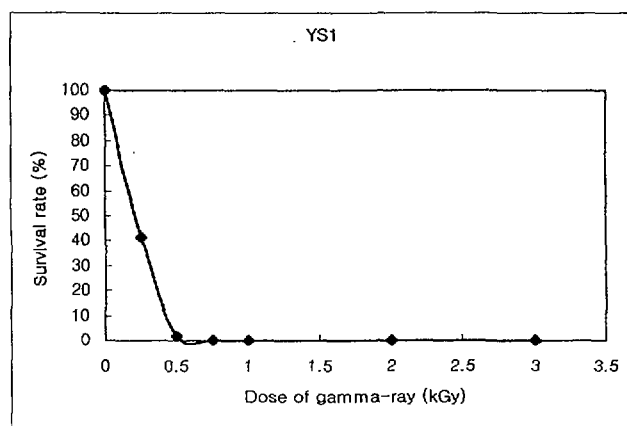


Fig. 2-9. Radiation sensitivity of YS1 irradiated on the solid media.

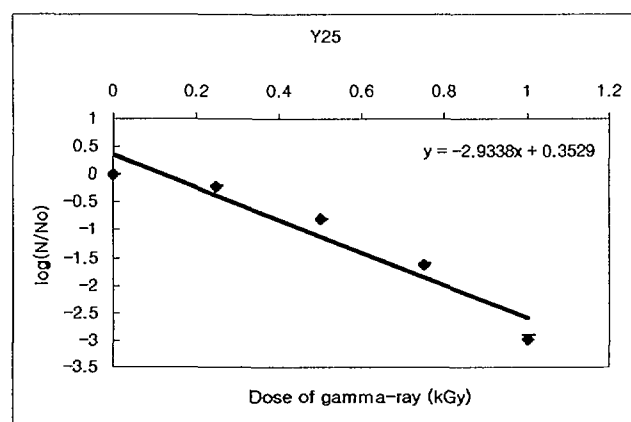
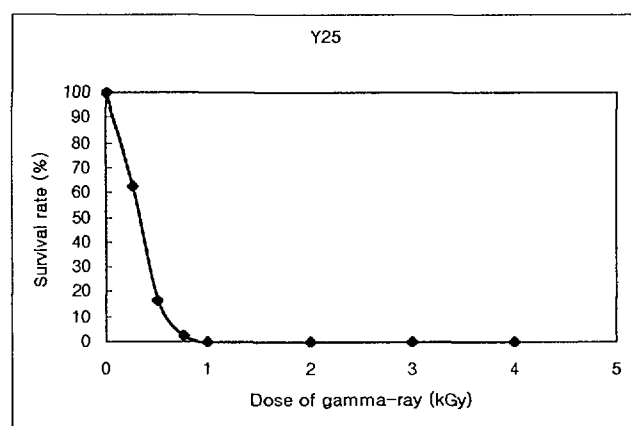


Fig. 2-10. Radiation sensitivity of the tryptophan auxotroph Y25 induced by gamma-ray radiation from YS1.

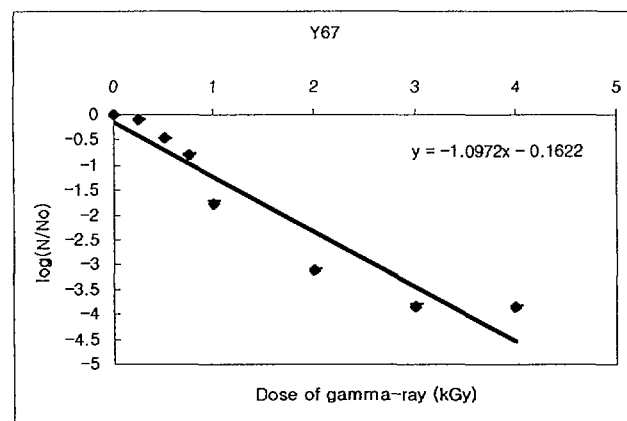
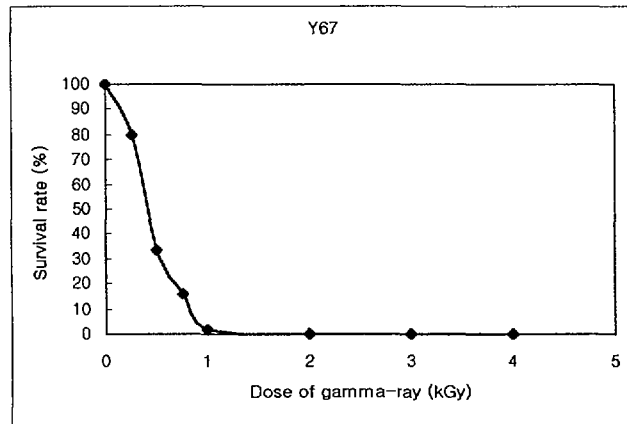


Fig. 2-11. Radiation sensitivity of the auxotroph Y67 induced by gamma-ray radiation from YSl.

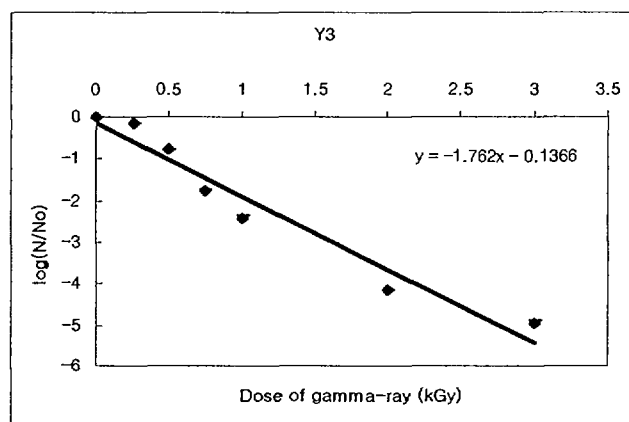
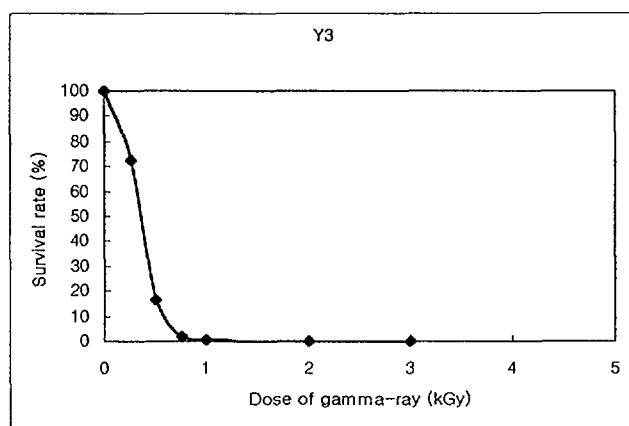


Fig. 2-12. Radiation sensitivity of Y3 induced by gamma-ray radiation from YS1.

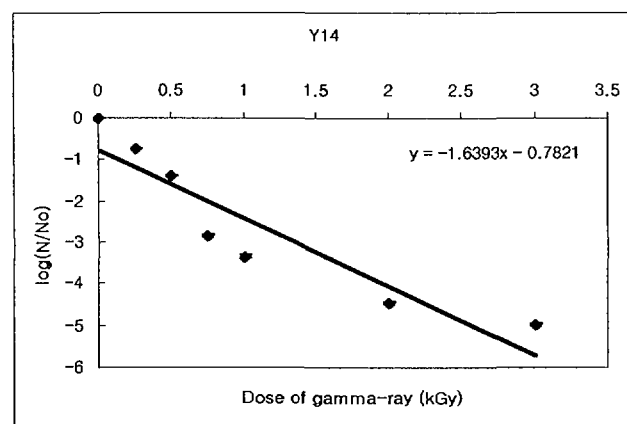
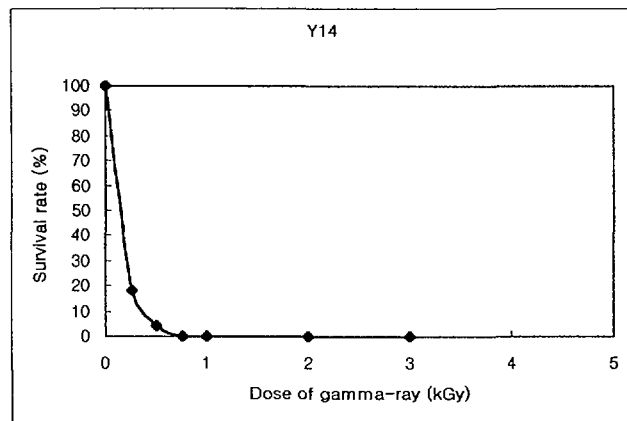


Fig. 2-13. Radiation sensitivity of Y14 induced by gamma-ray radiation from YS1.

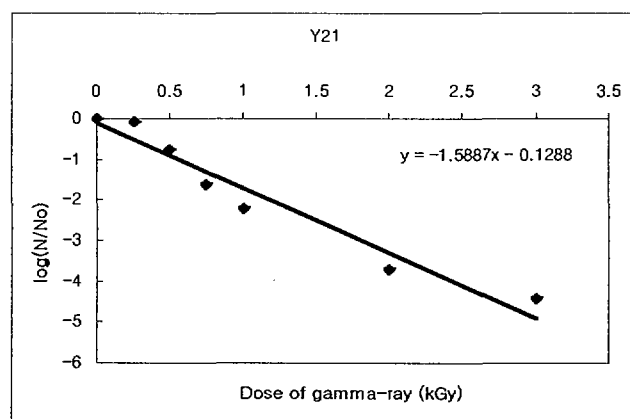
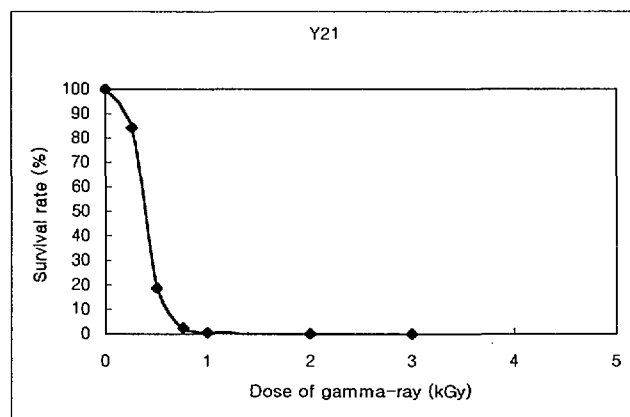


Fig. 2-14. Radiation sensitivity of Y21 induced by gamma-ray radiation from YS1.

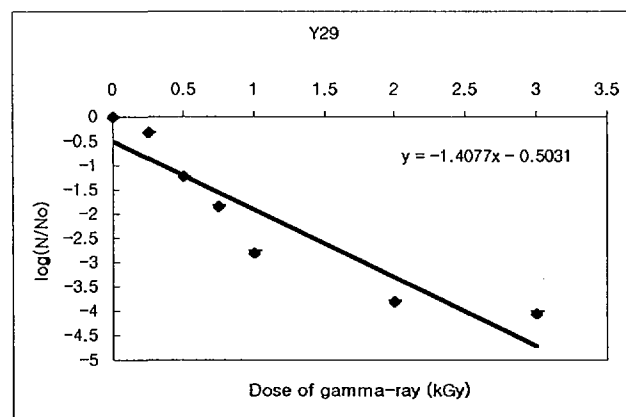
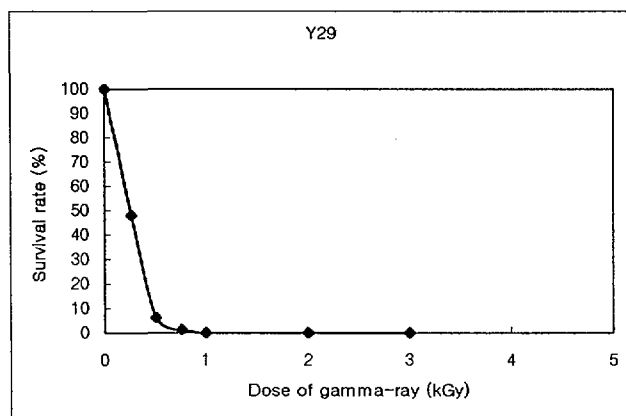


Fig. 2-15. Radiation sensitivity of Y29 induced by gamma-ray radiation from YS1.

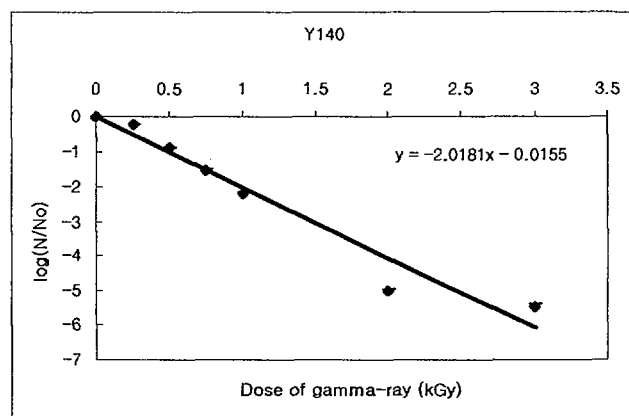
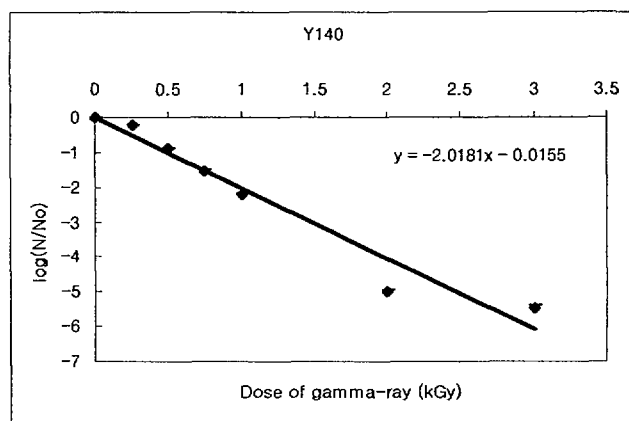


Fig. 2-16. Radiation sensitivity of Y140 induced by gamma-ray radiation from YS1.

Table 2-12. D₁₀ values of the auxotrophs and mutants induced by gamma-ray radiation

Strain	D ₁₀ value (Gy)
YS1	696
Y25	340
Y67	911
Y3	567
Y14	610
Y21	629
Y29	710
Y140	495

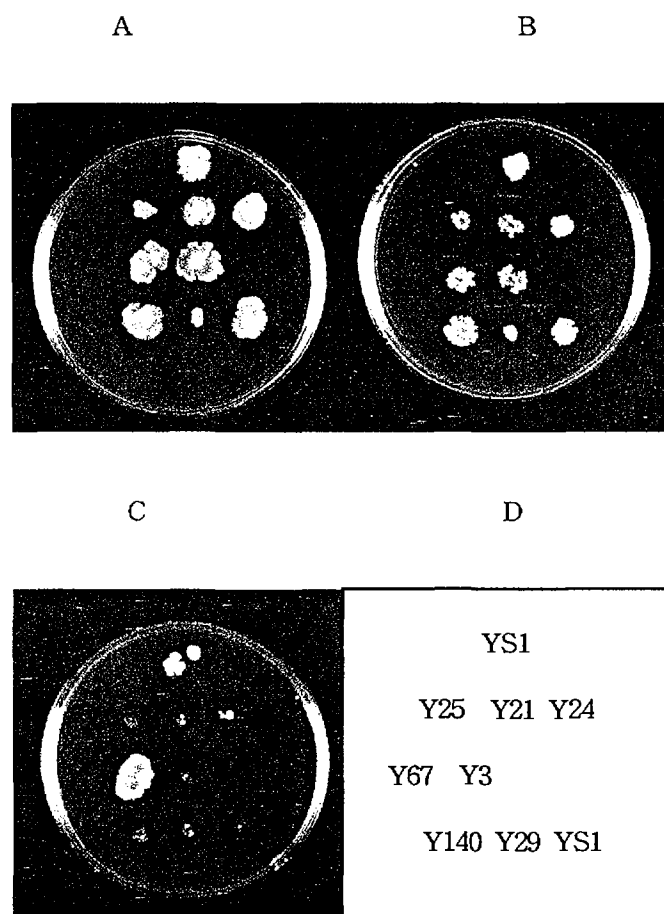


Fig. 2-17. Growth of colonies of the auxotrophs and mutants induced by gamma-ray radiation. A, 0 Gy; B, 250 Gy; C, 4 kGy; D, strains.

Table 2-13. Growth areas of the auxotrophs and mutants after gamma-ray irradiation

Strains	Area(mm ²)		
	Control	250 Gy	4 kGy
YS1	236	103	30
YS1	202	113	79
Y3	295	104	21
Y14	185	79	25
Y21	174	86	25
Y25	62	56	23
Y29	34	37	25
Y67	219	110	255
Y140	240	170	29

바. 방사선 저항성 증강 돌연변이체 특이적 단백질 탐색

선별한 방사선 저항성 증강 돌연변이체 Y67과 방사선 저항성 감소 돌연변이체 Y25의 세포내 단백질 양상을 대조군인 YS1과 비교하였다(Fig. 2-18). Y67와 Y25에서 분명히 구분되는 새로운 단백질들을 확인하였다. 이러한 특이적 발현 단백질들의 아미노산 서열을 결정하여 방사선 저항성 관련 인자의 가능성이 있는 지 확인하고자 한다.

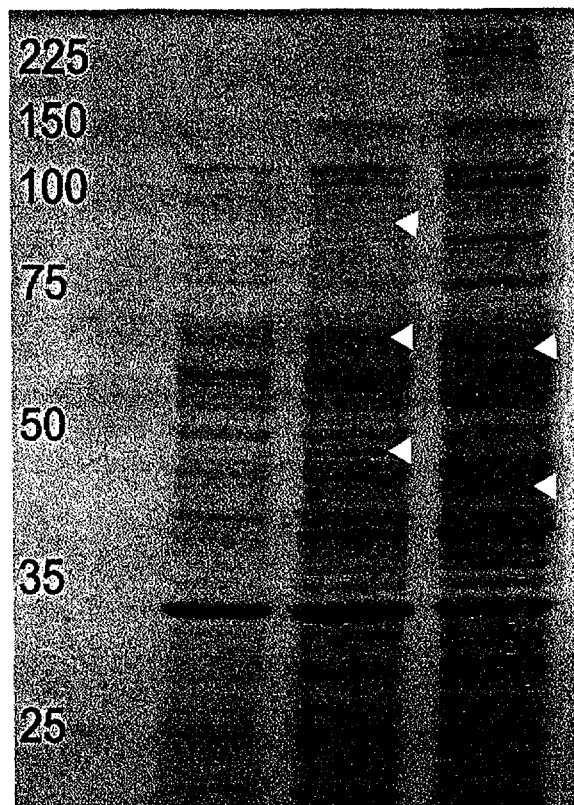


Fig. 2-18. Protein profiles of the radiation resistant auxotroph by SDS-PAGE. Lane 1: YS1, lane 2: Y67, lane 3: Y25. Arrow heads: specific protein bands. Molecular size was indicated left side.

제 3 절 진핵생물의 방사선 저항성 인자 탐색

1. 재료 및 방법

가. 공시균주 및 배양

담자균인 식용버섯 느타리(*Pleurotus*)속의 균주들 (*P. ostreatus*, *P. ostreatus* 여름, *P. ostreatus* 춘추, *P. ostreatus* 원형, *P. flavellatus*와 *P. sajor-caju*, *P. florid*와 *P. cornucopiae*을 대상으로 하였다. Potato-dextrose medium(Difco)를 사용하여 균사체를(Fig. 3-1) 평판 및 액체배양 하였다. 균사체의 계대배양은 평판배양된 균사체의 최외각 부위를 직경 6 mm의 유리관으로 절단하여 얻은 균사체 plug을 평판배지의 중앙에 균사체면이 배지에 접하도록 접종하였다. 접종 후 평판배지를 parafilm으로 봉한 후 25℃ 배양기에서 배양하였다. 액체배양은 유리관으로 절단하여 얻은 균사체 plug를 100 ml 당 1개씩 접종하여 150 rpm으로 25℃에서 진탕 배양하였다.

나. 방사선 처리

방사선은 이온화방사선인 gamma-ray를 사용하였으며 방사선원은 Co-60 (약 60,000 Ci 용량, Atomic Energy of Canada, Ltd.)였다. Fricke dosimetry로 측정한 조사선량율은 350 Gy/hr과 0.36 Gy/hr이었다.

다. 단속적 방사선 조사에 의한 방사선 저항성 균주 유도

느타리속의 *P. ostreatus*, *P. flavellatus*와 *P. sajor-caju*를 대상으로 3차에 이르기까지 방사선을 조사하여 생존한 균주의 생장율을 조사하여 유용한 방사선 저항성 균주를 유도하였다. 공시균주의 균사체를 PDA 배지에서 평판배양 한 후 최외각 부위를 유리관으로 절단한 후 이들 plug을 PDA 배지

에 접종하였다. 접종한 균사체를 2, 4 kGy의 선량으로 조사하였다. 조사 후 생존한 균사체 중 각 종별로 세 균주씩 무작위 선택하여 PDA 평판배지에 계대하였다. 계대한 균주의 균사체를 평판배지에 접종한 후 2차로 4, 5와 6 kGy의 방사선을 조사하였다. 조사 후 생존한 균주 모두를 선택하여 평판배지에 계대 배양하였다. 이들의 균사체를 평판배지에 접종한 후 3차로 4, 5, 6과 7 kGy의 방사선을 조사하여 생존한 균주를 확보하였다. 확보한 모든 균주는 PDA 평판배지에서 생장율을 측정하여 대조군과 비교하였다.

라. 단일 방사선 조사에 의한 저항성 균주 유도

느타리버섯(*P. ostreatus*; Fig. 3-1)의 균사체를 액체배양 한 후 배양액과 함께 믹서로 균일하게 갈고 구경이 0.062 mm인 stainless still filter를 통과하는 크기의 균사체 조각을 모은 후, 이들을 1.0×10^9 /ml이 되도록 배양액에 희석하였다(Fig. 3-2). 희석한 균사체 조각을 0 Gy에서 20 kGy의 방사선을 조사하였고 조사된 균사체 조각을 다시 배양액으로 적절히 희석하여 평판배지에 도말한 후, 25℃에서 배양하면서 형성되는 균사체 colony(Fig. 3-3) 수를 측정하여 조사선량별 생존율을 구하였다.

방사선 조사 후 생존한 균사체 colony를 평판배지에 계대 배양한 후 방사선 감수성의 변화를 조사하기 위하여 평판배양된 균사체의 최외각 부위에서 유리관으로 절단하여 얻은 균사체를 평판배지에 접종한 후 방사선을 조사하였고 조사 후 생장하는 균사체의 면적을 Gel-Doc System(Bio-rad)의 CCD camera로 촬영하여 화상분석 프로그램인 Quantity One Software(Bio-Rad)를 이용해 측정하였다(Fig. 3-4). 측정된 균사체의 생장 면적을 대조군과 비교하여 방사선 저항성이 증가된 균주를 결정하였다.

마. 단일 방사선 조사 후 연속적인 방사선 조사에 의한 저항성 균주 유도

느타리속의 *P. cornucopiae*, *P. ostreatus*, *P. ostreatus* 원형, *P. ostreatus* 여름과 *P. ostreatus* 춘추를 이용하여 단일 방사선 조사와 더불어 저선량의 방사선을 연속적으로 처리하였을 때 균사체의 생장에 미치는 영향을 조사하고 방사선 저항성 균주를 유도하고자 하였다. 공시균주의 균사체를 유리관으로 절단하여 PDA 평판배지에 접종 후 10, 100, 250, 500, 1000 Gy의 단일 방사선을 조사한 후 0.36 Gy/hr의 조사선량으로 10일간 더 조사하였다(총 조사선량은 92.4 Gy였다). 조사 과정중에 균사체의 생장율을 조사하였다.

바. 방사선 저항성 관련 유전자 탐색

느타리버섯으로부터 확보된 방사선 저항성 균주와 대조균주를 100 ml 액체 배양하였다. 50 ml의 액체배양 균사체에 1.5 kGy의 방사선을 조사한 후 대조균을 포함하여 Whateman paper에 여과하여 배지를 제거하였다. 액체질소로 급속 냉동하고 막자사발을 이용하여 균사체를 마쇄한 후, RNeasy Plant Mini Kit(Qiagen)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA로부터 PolyATtract mRNA Isolation System(Promega)를 이용하여 mRNA를 순수 분리하였다.

방사선 저항성의 원인이 되는 유전자가 있는지 알아보려고 대조균과 저항성 균주간에 유전자 발현 양상의 차이를 조사하기 위하여 Differential display reverse transcription-polymerase chain reaction (DDRT-PCR)을 실시하였다. RT/PCR PreMix 반응용액(Bioneer)에 분리한 mRNA를 첨가하고 polyT primer인 dT11N primer을 넣었다. 57℃에서 10 min간 열처리하여 mRNA를 linear form으로 만든 다음 42℃에서 1시간 동안 reverse transcription반응을 시행한 후, 94℃에서 5 min, 처리하여 reverse

transcriptase의 활성을 중지시켰다. 반응결과로 만들어진 cDNA를 주형으로 PCR을 수행하였다. 합성된 cDNA 2 μ l를 사용하였으며 10-mer의 arbitrary primer나 또는 몇 종류의 합성 primer를 각각 첨가한 반응용액을 만들었다. PCR 반응용액을 94°C, 30 sec, 38°C, 30 sec, 72°C, 30 sec로 35회 반응한 후 72°C에서 5 min간 DNA polymerization을 행하였다. 이렇게 만들어진 DDRT-PCR 산물을 TAE 전개완충액에서 1.5% agarose gel에 전기영동하였고 전기영동상을 비교하여 대조균주와 저항성 균주 간에 차이가 있는 DNA 조각을 회수하였다. 이 회수된 조각을 사용된 primer를 이용하여 PCR을 통해 재증폭하였다. PCR 재증폭 산물을 gene clean 용액으로 세척하고 회수하였다. pGEM-T Easy Vector (Fig. 3-5, 3-6) System(Promega)을 사용하여 cloning하였고(Fig. 3-7) 얻어진 white colony에서 Wizard Plus SV Minipreps Purification System(Promega)으로 plasmid를 순수 분리하였다. Cloning 된 DNA의 염기서열을 fluorescent sequencing을 통해 결정하였고 BLAST search를 통해 기존에 알려진 유전자 여부를 조사하였다.

얻어진 유전자가 방사선 저항성 관련 유전자인지 확인하기 위하여 bacterial expression vector에 도입하여 발현시킨 후, 방사선을 조사하였을 때 방사선 저항성 여부를 조사하고자 하였다(Fig. 3-7). 이를 위하여 우선 bacterial expression vector인 pQE(Fig. 2-8, Qiagen)를 *Sma*I(CCC⁺GGG)으로 절단한 후 *Eco*R I adaptor (5'-AATTCGGCTCGAG-3')를 ligation하였다. 이 vector와 T-easy vector에서 *Eco*R I으로 절단하여 유리한 insert 유전자를 ligation하여 expression vector를 만들었다. 이를 *lacI^q* 유전자가 들어있는 *E. coli* strain JM109에 transfer하여 LB+Amp 배지에 접종하여 생존한 colony를 대상으로 plasmid를 추출하였다. 추출된 plasmid 중에 insert가 들어있는 pQE 발현벡터를 선별하였다. 선별된 colony를 LB+Amp 배양액으로 16시간 동안 37°C에서 배양하였다. 배양된

JM109를 5%되도록 신선한 LB+Amp 배지에 접종하여 O.D.가 0.6-0.8사이가 되는 시기(약 3-4시간 후)에 최종 농도가 1 mM가 되도록 IPTG를 첨가하였다. IPTG 첨가 후, 4 시간 동안 배양하면서 도입된 유전자를 발현시켰다. 도입된 유전자를 발현되도록 처리한 JM109에 0 Gy에서 1 kGy에 이르는 다양한 선량의 gamma-ray를 조사하였다. 조사후 LA+Amp 배지에 접종하여 colony forming unit (cfu)을 조사하여 생존율을 측정하였다. 측정된 방사선 감수성 결과를 비교하여 도입된 유전자와 방사선 저항성의 관련 여부를 결정하였다. 대조군은 host인 *E. coli* JM109 strain과 insert가 없는 pQE vector를 형질전환시킨 *E. coli* JM109-qe를 사용하였고 negative 대조군으로 *P. ostreatus*의 mannganese peroxidase 유전자(MNP)의 cDNA가 존재하는 발현 vector를 도입시킨 *E. coli* JM109-mnp를 사용하였다.

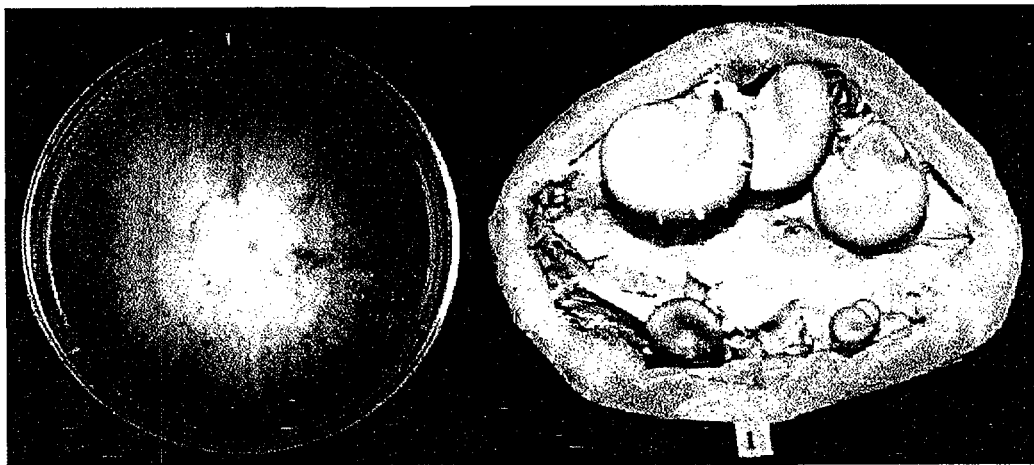


Fig. 3-1. The mycelial growth pattern and the fruiting body of *Pleurotus ostreatus*.

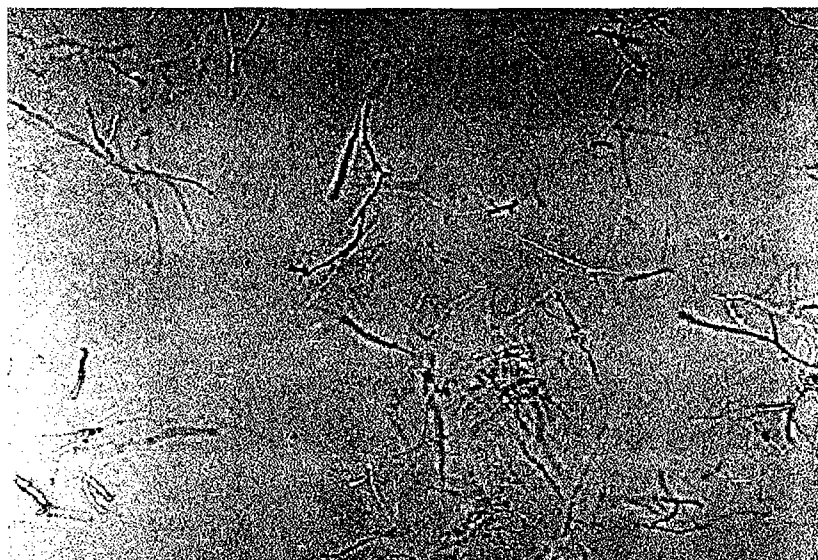


Fig. 3-2. The fragmented mycelia of *Pleurotus ostreatus* were used to induce the variants by gamma-ray radiation.



Fig. 3-3. The survival colonies of the fragmented mycelia of *Pleurotus ostreatus* after gamma-ray irradiation were used to isolate the radiation resistant variants. Left is the control and right is the 1.5 kGy irradiated.

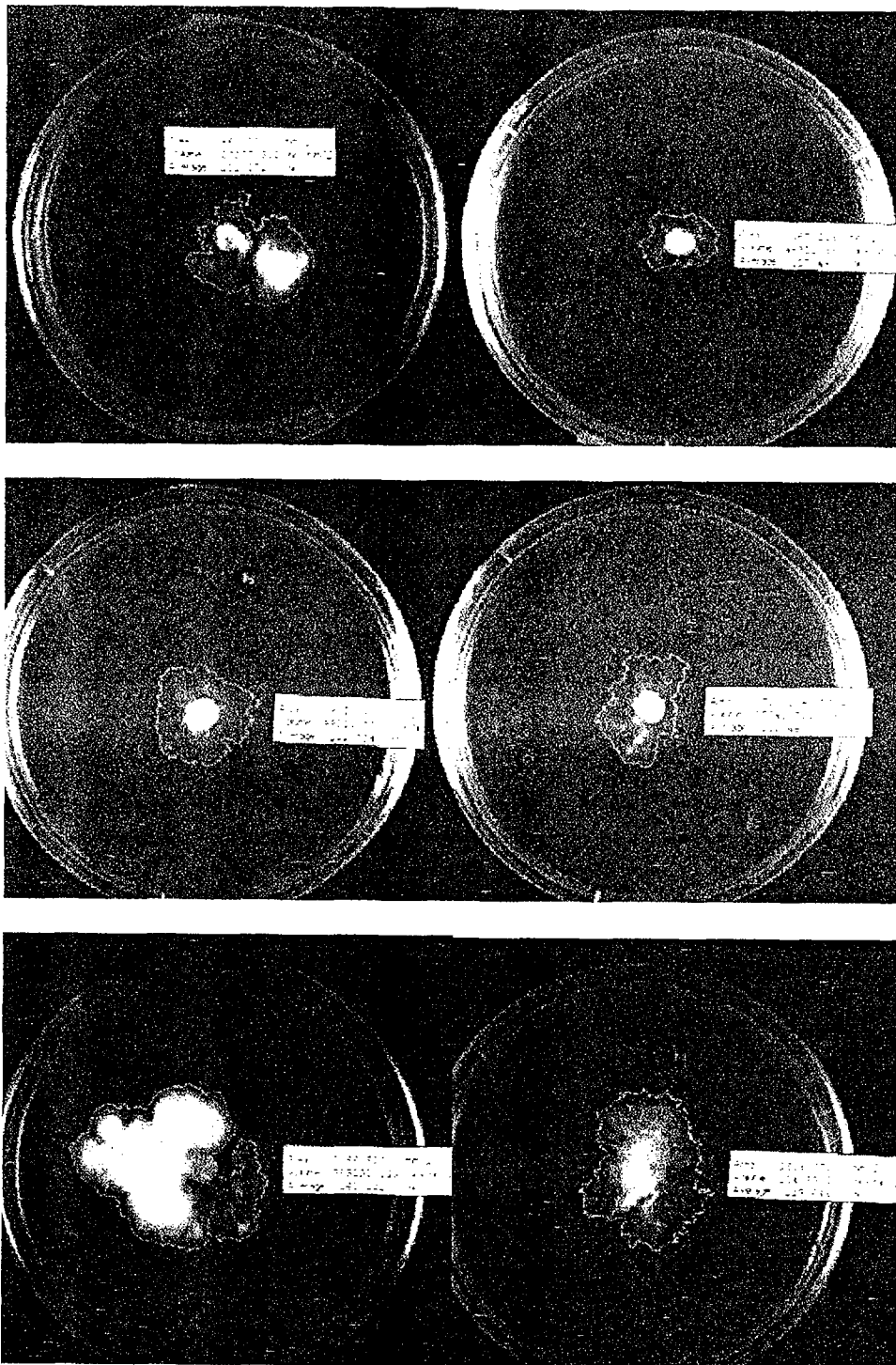


Fig. 3-4. The photography of the mycelial growth of the gamma-ray irradiated variants was used to measure the area of growth for the comparison of the radiation sensitivity.

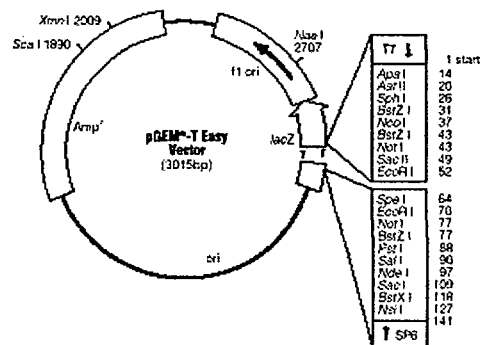


Fig. 3-6. pGEM®-T Easy Vector circle map and sequence reference points.

pGEM®-T Easy Vector Sequence reference points:

T7 RNA Polymerase transcription initiation site 1

SP6 RNA Polymerase transcription initiation site 141

T7 RNA Polymerase promoter (-7 to +3) 2999-

SP6 RNA Polymerase promoter (-7 to +3) 139-158

multiple cloning region 10-28

lacZ start codon 180

lac operon sequences 2836-2996, 166-195

lac operator 200-216

β -lactamase coding region 1337-2197

phage f1 region 2380-2835

binding site of pUC/M13 Forward Sequencing Primer 2956-2972

binding site of pUC/M13 Reverse Sequencing Primer 176-192

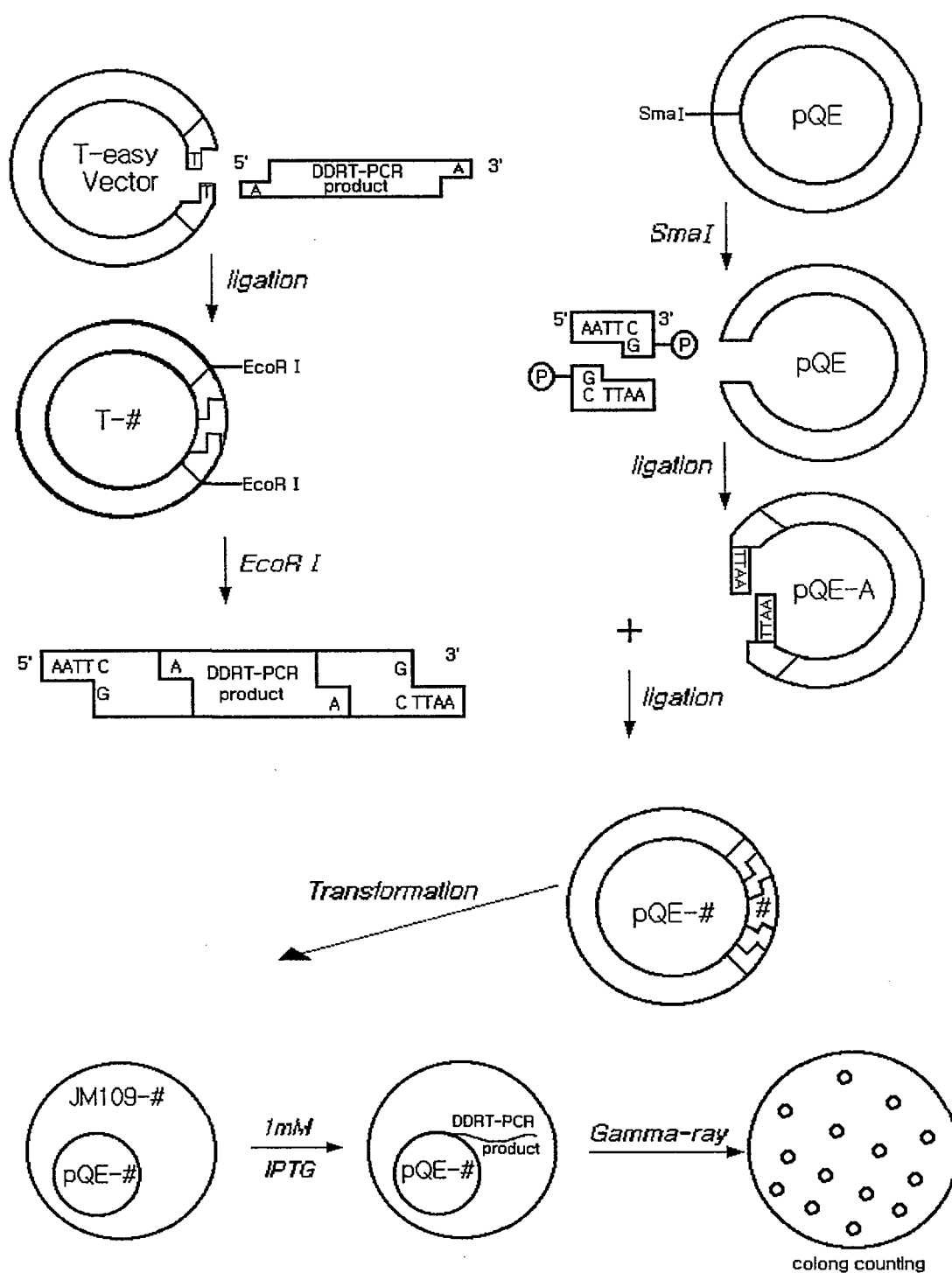


Fig. 3-7. The strategy of searching the radiation resistant-related genes.

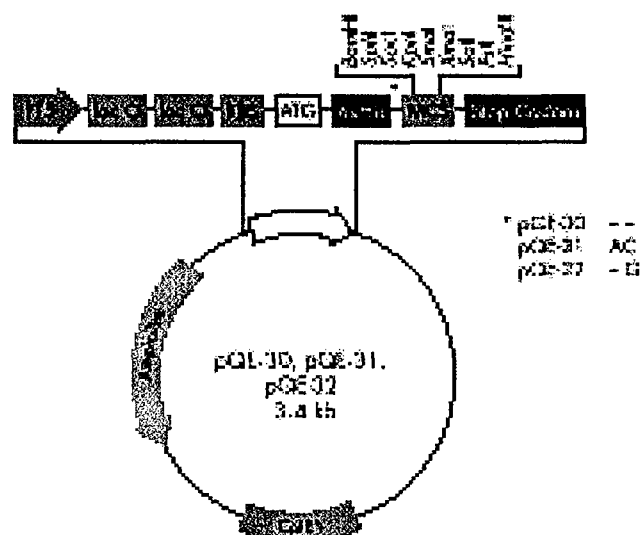


Fig. 3-8. pQE vectors for N-terminal 6xHis tag constructs. PT5:

T5 promoter, lac O: lac operator, RBS: ribosome-binding site, ATG: start codon, 6xHis: 6xHis tag sequence, MCS: multiple cloning site with restriction sites indicated (*Bam*HI *Sph*I *Sac*I *Kpn*I *Sma*I *Xma*I *Sal*I *Pst*I *Hind*III), Stop Codons: stop codons in all three reading frames, Col E1: Col E1 origin of replication, Ampicillin: ampicillin resistance gene, $lacI^q$: $lacI^q$ repressor gene.

2. 결과 및 고찰

가. 단속적 방사선 조사에 의한 방사선 저항성 균주 유도

고선량의 방사선을 계대하면서 조사한 결과는 Table 3-1과 같다. 조사선량의 증가에 따라 *P. ostreatus*의 경우는 2차 방사선 조사 후 사용된 3 종류의 균주 모두가 4 kGy에서 생존하였으며 2 균주는 5 kGy에서도 생존하였다. 이들 생존한 균주의 균사체 생장율은 대조군과 유사하거나 매우 낮은 특성을 보였다. 이들을 대상으로 3차로 4, 5, 6과 7 kGy의 방사선량을 조사하였을 때, 5, 6과 7 kGy에서는 생존하는 균주를 볼 수 없었고 4 kGy에서도 3 균주 만이 생존하였으며 이들로부터 5 균주를 얻을 수 있었다. 이들 중 3 균주는 균사체의 생장율이 대조군에 비해 월등히 낮았으며 두 균주가 유사하였다. 이러한 결과로 보아 *P. ostreatus*의 경우 방사선 조사에 대한 반응 특성을 알 수 있었다. 1) 단속적으로 방사선을 조사하였을 때 비록 5 kGy에서 생존했던 균주라 하더라도 4 kGy이상에서는 생존이 불가능하다. 2) 3차에 걸쳐 방사선에 조사되므로써 누적되는 유전자의 변화에도 불구하고 2 균주(P0-2C4A4A와 P0-2C4A4B)는 방사선에 대한 저항성이 증대된 균주로 여겨진다. 차후 이들을 대상으로 정밀한 방사선 감수성 조사가 필요하다. 3) 방사선 조사에 횟수가 증가할 수록 대부분의 생존한 균주의 균사체 생장율이 대조군에 비해 급격히 감소되는 양상을 보인다. 그러나, 3차 처리 후 생존한 2 균주(P0-2C4A4A와 P0-2C4A4B)는 1차 처리시기에 대조군에 비해 균사체 생장율이 낮았으나 2차 및 3차의 방사선 처리 횟수가 증가함에 따라 균사체 생장율이 증가되는 양상을 보였다. 따라서 이 두 균주는 유전적으로 안정된 방사선 저항성 특징을 지니고 있을 것으로 기대된다.

*P. flavellatus*의 경우는 2차시기에 6 kGy에서도 생존하는 균주(PF-2C6A)를 볼 수 있었다. 그러나, 3차 방사선 조사 후 이 균주는 4 kGy에서도 생존하지 못하였다. 3차 조사 후 생존한 균주는 4 균주였고 이들로부터

터 6 균주를 확보할 수 있었다. 그 중 5 kGy에서 2차 및 3차 조사 후에 생존한 균주(PF-2B5A5A)는 방사선 조사 횟수가 증가함에 따라 군사체의 생장율이 감소하는 경향을 보였다. 또한, 3차시기에 4 kGy에서 생존한 5 균주 중 4 균주도 역시 군사체 생장율의 감소를 확인할 수 있었다. 남은 한 균주인 PF-2A4A4A의 경우는 군사체 생장율이 거의 변하지 않았으며 대조군과 유사하였다. 이상의 결과로 보아 *P. flavelatus*는 1) 5 kGy에서도 생존이 가능할 수 있도록 저항성이 증대되었고, 2) 조사 횟수의 증가에 따라 대부분 생장율이 감소되는 경향을 보이나, 3) 방사선 조사에 대해 생장율의 변화없이 방사선저항성이 증가된 균주를 분리할 수 있었다. 앞으로 PF-2A4A4A와 PF-2B5A5A균주의 정밀한 방사선 민감도를 조사할 필요성이 있다.

*P. sajor-caju*의 경우도 위의 두 종과 유사한 양상을 보였으며 2차 조사 후 6 kGy에서 생존하는 균주가 있었으나 3차시기에는 4 kGy에서도 생존하지 못하였다. 또한, 2차 시기에 5 kGy에서 생존한 균주들 중 3차시기에 생존한 균주는 PS-2A5A 뿐 이었는데 그 균주도 3차시기에서는 4 kGy에서만 생존할 수 있었다. 3차시기 후 생존한 균주는 3종류였고 이들로부터 5 균주를 확보할 수 있었다. 특이한 것은 PS-2A4A균주인데 이 균주는 3차로 4 kGy에서만 생존하였고 이들로부터 3종류의 돌연변이 균주를 얻었으며, 이들의 군사체 생장율은 대조군에 비해 낮거나(PS-2A4A4A와 PS-2A4A4C)와 유사한(PS-2A4A4B) 양상을 보였다. 이상의 결과로 1) *P. sajor-caju*로부터 4 kGy에서 생존이 가능한 균주를 확보할 수 있었으며, 2) 방사선 조사 횟수가 늘수록 군사체 생장율이 변화되는 경향을 보임을 알 수 있었고 3) 방사선 저항성 연구에 유용할 것으로 여겨지는 두 균주(PS-2A4A4B와 PS-2A5A4A)를 확보할 수 있었다.

본 실험을 통해서 단속적이며 계속적인 방사선 조사 방법이 저항성 균주를 유도할 수 있는 유용한 한가지 방법임을 확인할 수 있었다.

나. 저선량의 방사선 연속 조사에 의한 저항성 균주 유도

단일한 방사선 조사 후 저선량의 방사선을 연속적으로 조사하였을 때 느타리 속 공시균주들의 생장을 변화를 조사한 결과는 Fig. 3-9와 같다. 공시균주들은 각기 고유한 특징을 보였다. *P. cornucopiae*의 경우 다른 공시균주들에 비해 매우 낮은 생장율을 보이는 균주이며 분명하게 조사선량에 의존적인 생장율의 감소를 나타내었고, 저선량 방사선 유익효과는 볼 수 없었다. *P. florida*의 경우 10 Gy의 단일 방사선 조사에서 생장율에 있어 방사선 유익효과가 있는 것으로 나타났다. 0 Gy chronic과 10 Gy chronic 조사군의 경우는 100 Gy에서 500 Gy의 단일 조사군과 유사한 정도의 생장율을 보였고 그이상의 단일 조사 후 연속 조사군들은 1 kGy의 단일 처리 효과와 유사하였다. *P. ostreatus*의 경우 역시 10 Gy 단일 처리는 방사선 유익효과를 보였다. 연속 조사를 병행한 실험군들은 250 Gy 단일 조사군과 유사하거나 그 이하의 생장율을 보였다. 국내에서 개량한 *P. ostreatus*의 3가지 아종들의 경우를 보면, *P. ostreatus*에 비해 모두 낮은 생장율을 나타내었다. 특히, *P. ostreatus* 춘추는 1/3정도에 불과하였다. 비록 *P. ostreatus*에 비해 낮은 생장율을 보이지만 저선량 연속 조사에 대한 영향은 위에 언급한 3종과는 매우 달랐다. *P. ostreatus* 원형의 경우는 단일 조사에서 10 Gy의 방사선 유익효과를 볼 수 있었다. 또한 0 Gy와 10 Gy의 단일 조사 후 연속 조사군들은 조사 후 7일 이후부터 급격히 생장율이 높아져서 대조군보다 높거나(0Gy chronic) 유사한(10Gy chronic) 양상을 보였다. 그외의 연속 조사군은 1 kGy의 단일 조사군에 유사한 양상을 나타냈다. *P. ostreatus* 여름의 경우에서도 *P. ostreatus* 원형과 유사하여 0G chronic과 10Gy chronic은 10일 후에는 단일 조사 대조군에 비해 2배 이상의 생장율을 나타내었다. *P. ostreatus* 춘추의 경우는 뚜렷한 10 Gy의 방사선 유익효과를 보였으며 이

경우 연속 조사에 의해서도 동일한 정도의 생장율을 보였다.

이상의 결과는 1) 저선량 연속 조사 효과는 방사선 유익효과의 측면에서 낮은 생장율을 보이는 *P. ostreatus* 아종들에서 더욱 분명하게 나타나며, 2) 생장율이 이들에 비해 월등한 종에서는 총 조사선량이 92 Gy인 저선량의 연속 조사에 의해 오히려 단일 조사 100 Gy보다 더 생장율을 저해하는 경향을 보이며 3) 100 Gy 이상의 단일 방사선 조사 후 연속 조사는 실험에 사용된 모든 공시균주에서 500 Gy 단일 조사 때보다 더 심하게 생장율이 저해되고 있음으로 보아서 100 Gy의 단일 조사 후 저선량 연속 조사 방법에 의해 다양한 방사선 저항성을 지닌 변이 균주를 확보할 수 있음을 암시한다.

다. 느타리버섯의 방사선 민감도 및 방사선 저항성 균주

느타리버섯의 균사체를 대상으로 방사선 감수성을 조사하여 Fig. 3-10의 결과를 얻었다. D_{10} value는 625 Gy였다. 방사선 저항성 균주를 확보하기 위하여 1 kGy - 2 kGy의 방사선량이 조사된 느타리버섯의 균사체로부터 생존한 균주들의 방사선 감수성을 조사하였다. 그 결과 Fig. 3-11과 같이 다양한 감수성의 변화를 보였으며 검색한 변이주 중 1.5 kGy의 방사선량으로 유기한 P07은 방사선 저항성이 대조군에 비해 증가되었음을 보였다(D_{10} value 750 Gy).

라. 방사선 저항성관련 유전자 탐색

방사선 저항성과 관련한 유전자 탐색을 위하여 대조군과 방사선 저항성이 증가된 균주, P07의 total RNA를 추출하였다. 이들로부터 DDRT-PCR 반응에 의해 대조군과 다른 11종류의 band를 선별하였으며, 이들을 추출하여 T-vector에 ligation하여 cloning하였고(Fig. 3-12), 이들의 염기서열을 결정하였다(Fig. 3-13). 확보한 유전자들을 bacteria 발현 vector에 cloning

하여 *E. coli* JM109에 도입하였다(Table 3-2). 발현 vector가 도입된 *E. coli* JM109 strain들과 대조군에 대한 방사선 감수성을 조사하여 Fig. 2-14의 결과를 얻었다. 세 종류의 대조군(*E. coli* JM109, 발현 vector만 도입한 *E. coli* JM109-qe와 *E. coli* JM109-qe-self)과 negative 대조군인 *E. coli* JM109-mnp의 방사선 감수성은 유사하였다. DDRT-PCR을 통해 얻어진 유전자를 지닌 발현 vector가 도입된 *E. coli* JM109 균주들은 대부분 이들 대조군과 유사한 양상의 방사선 감수성을 보였으나 두 가지 균주에서 방사선 감수성의 변화를 확인할 수 있었다. *E. coli* JM109-18의 경우 대조군에 비해 방사선 감수성이 유의하게 감소하여 방사선 저항성이 증가되는 양상을 보였으며, *E. coli* JM109-14의 경우는 오히려 방사선 감수성이 증가하였다.

E. coli JM109-18의 경우 540 bp의 유전자가 삽입되었는데 이의 염기서열을 Fig. 3-13에 나타냈고, BLAST 검색 결과 기존에 알려지지 않은 염기서열을 지닌 유전자(unknown gene)였다. 이 염기서열로부터 얻을 수 있는 아미노산 서열을 분석하여 stop codon이 없는 하나의 서열을 얻었는데 이를 BLAST검색한 결과, 사람과 효모 및 그 외의 생물체의 알려진 casein kinase와 MAP kinase의 아미노산 서열과 최대 40%에 이르는 상동성을 보였다. 이러한 아미노산 서열의 상동성으로 보아 이 유전자는 *P. ostreatus*에서 kinase의 역할을 수행하는 유전자의 일부로 판단된다. 현재 cloning된 #18 유전자는 full cDNA가 아닌 것으로 판단되나 그럼에도 불구하고 JM109에서 발현시켰을 때 방사선에 대한 저항성을 증가시키는 결과를 보였다. 따라서, 방사선 저항성 혹은 방사선 손상에 대한 회복 기작에 관련되는 유전자일 것으로 판단된다.

방사선에 보다 민감한 것으로 나타난 JM109-14는 약 2.2 kb 정도의 유전자가 들어있는 발현 vector를 도입한 것으로, 1399 개의 부분 염기서열을

결정하였다(Fig. 3-13). 이 염기서열을 BLAST 검색하였으나 알려지지 않은 유전자였으며 이들로부터 얻은 아미노산 서열로 BLAST 검색한 결과 역시 알려지지 않은 아미노산 서열이었다. 따라서, 이 유전자 조각이 든 발현 vector를 지닌 JM109-14가 방사선에 더 민감한 이유는 정확히 알 수 없었으나 아마도 이 유전자가 방사선 손상에 대한 회복 기작 등에 영향을 주는 유전자 일 것으로 판단된다.

앞으로 cloning된 #18 유전자와 # 14 유전자 조각을 이용하여 이들의 full cDNA와 genomic DNA의 구조를 규명하고, 이들 조각이 든 발현 vector로부터 얻은 단백질을 이용하여 방사선 저항성에 관련한 이들의 작용 기작을 조사한다면 향후 방사선 저항성 기작 관련 신물질로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 3-1. The survivals and growth rates of *Pleurotus* species after gamma-ray irradiation

Strains	First dose (kGy)	Survivals ^{a,p}	Growth (mm)	Second dose (kGy)	Survivals	Growth (mm)	Third dose (kGy)	Survivals	Growth (mm)
<i>P. ostreatus</i>	0 2 4	PO-0 PO-2A PO-2B PO-2C	71 70 70 58	0 4 5 6	PO-0	70	0 4 5 6 7	PO-0 PO-2A4B4A PO-2A4B4B PO-2B4B4A PO-2C4A4A PO-2C4A4B	70 15 13 12 74 76
					PO-2A4A	35			
					PO-2A4B	60			
					PO-2A4C	45			
					PO-2B4A	70			
					PO-2B4B	40			
					PO-2B4C	42			
					PO-2B5A	35			
					PO-2B5B	44			
					PO-2C4A	72			
					PO-2C4B	75			
					PO-2C5A	80			
					PF-0	70		PF-0	70
					PF-2A4A	70		PF-2A4A4A	77
<i>P. flavellatus</i>	0 2 4	PF-0 PF-2A PF-2B PF-2C	70 75 65 85	0 4 5 6	PF-2A5A	65	0 4 5 6 7	PF-2A4A4B	60
					PF-2B4A	63		PF-2B4A4A	41
					PF-2B5A	48		PF-2B5A5A	47
					PF-2C4A	48		PF-2C4A4A	35
					PF-2C6A	73		PF-2C4A4B	35
					PS-0	72		PS-0	72
					PS-2A4A	73		PS-2A4A4A	44
					PS-2A5A	70		PS-2A4A4B	80
<i>P. sajor-caju</i>	0 2 4	PS-0 PS-2A PS-2B PS-2C	72 75 75 75	0 4 5 6	PS-2A4A	70	0 4 5 6 7	PS-2A4A4C	50
					PS-2B4A	81		PS-2A5A4A	70
					PS-2B5A	54		PS-2B4A4A	58
					PS-2B6A	77			
					PS-2C5A	65		PS-2C5A	70
					PS-2C6A	70			

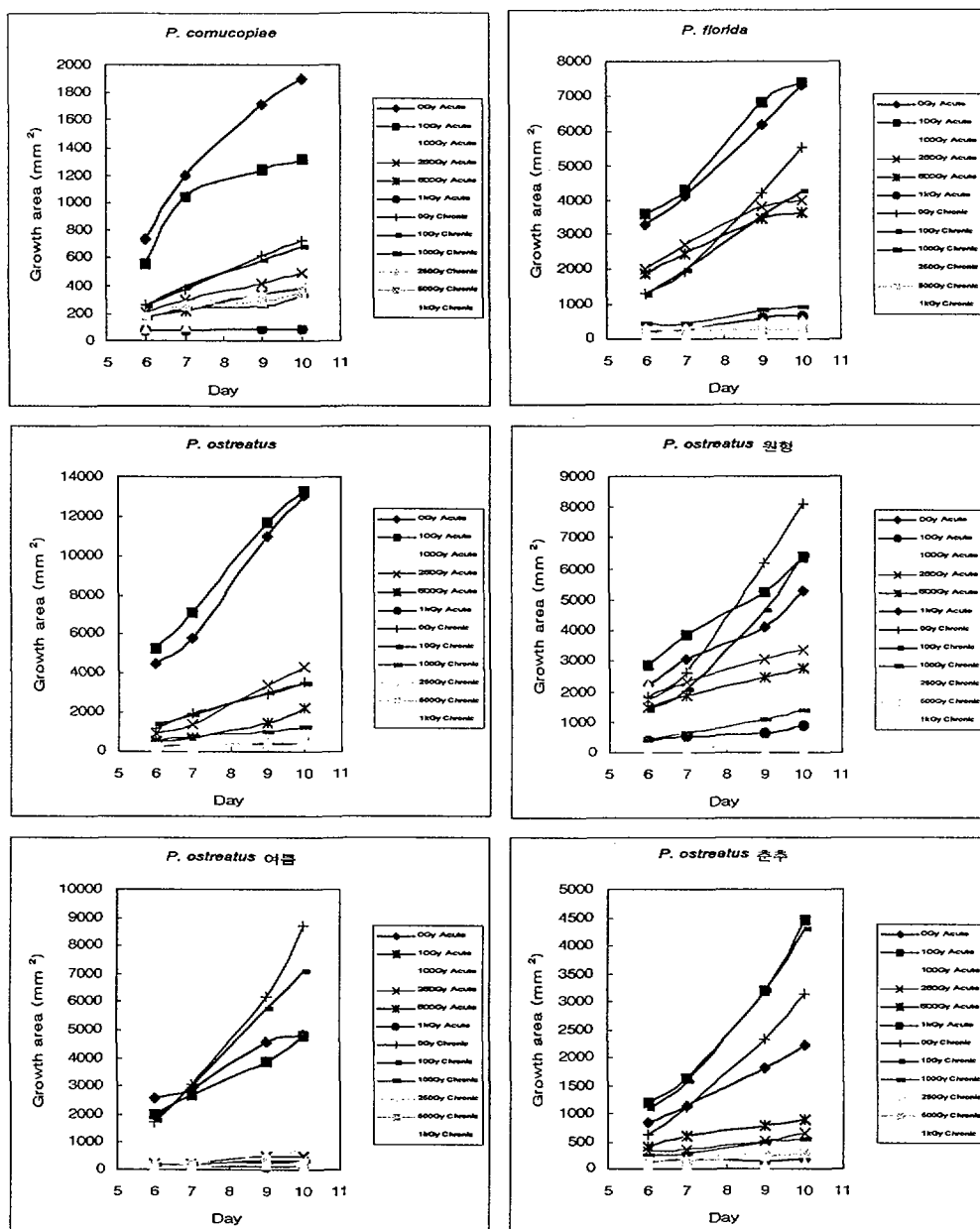


Fig. 3-9. Effects of the chronic irradiation (0.36 Gy/hr) for 10 days on mycelial growth of several *Pleurotus* spp. after acute irradiation of gamma-ray were measured by growth area.

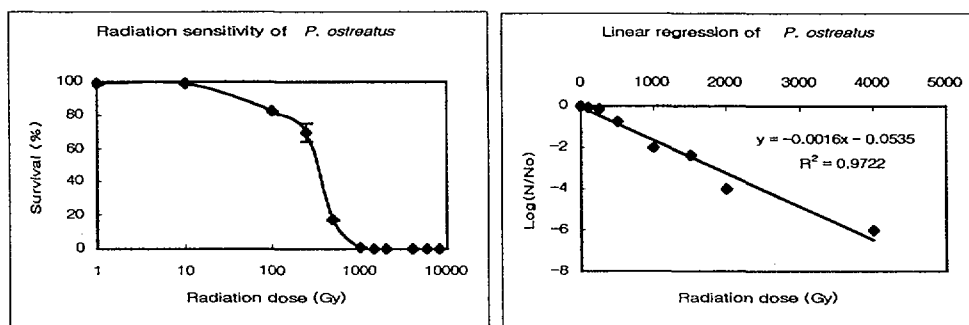


Fig. 3-10. The radiation sensitivity of the mycelia of *Pleurotus ostreatus*. A. The survival curve of mycelia. B. The linear regression curve of the $\log(N/N_0)$ values were converted from the survival values.

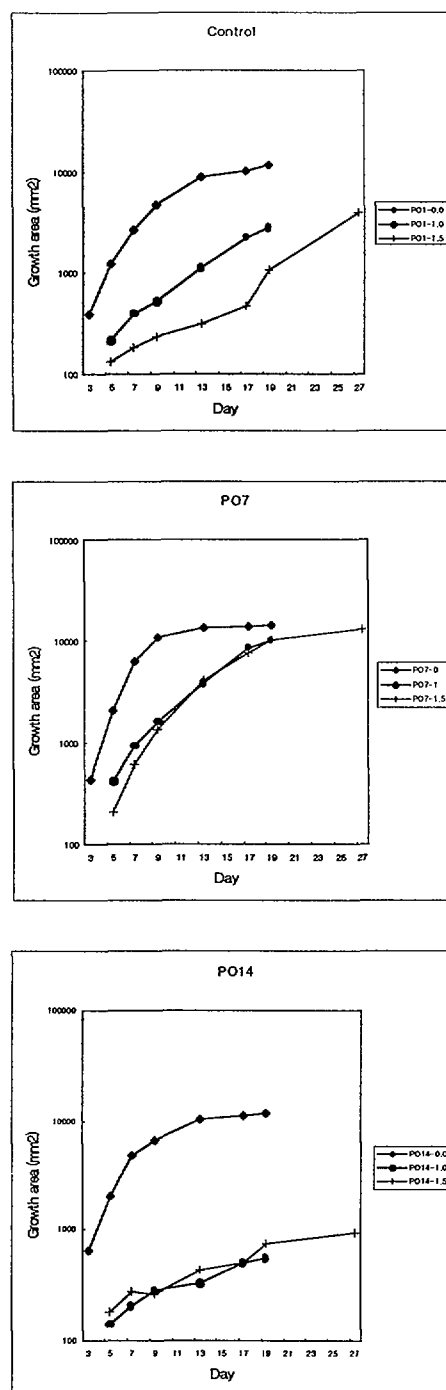
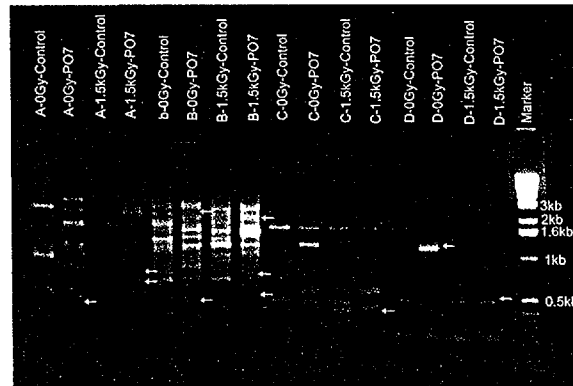


Fig. 3-11. The radiation sensitivities of the gamma-ray induced variants were measured by the growth area of mycelium after gamma-ray irradiation.

A'



B'

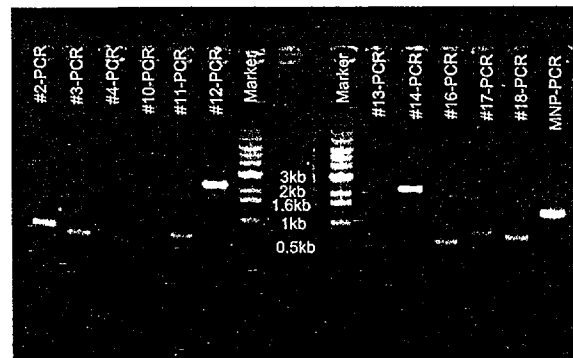


Fig. 3-12. A'. The agarose gel electrophoresis patterns of the DDRT-PCR products with 4 kind of primers(A, B, C and D). From this gel, the differential products(indicated by arrow) were eluted and cloned to T-easy vector and to bacterial expression vector. B'. To confirm, the cloned inserts were amplified by PCR from its cloning vectors.

#2

```
1  TATGGATGCATCATGGCCGACAGGTTATCCACGGAGACATCAAGCCAGCGAACTTCATCA
    W M H H G R Q V I H G D I K P A N F I I
61  TCACCAACAACGGCCTACACCTCATCGACCTCGGGTCGTCGATTTTAGCCAAGAATCCCG
    T N N G L H L I D L G S S I L A K N P A
121 CCGTTCGTGAACCTCACCCGGAGCTTCCCTACACTTCGTCCTTCGCCAGTCCACAGCGAT
    V R E P H P E L P Y T S S F A S P Q R L
181 TGTTACCGCAGAGATCTGCTGGGTCGATGACCTCATCAGCCTCGCATAACGGCTATAT
    F T A E I C W V D D L I S L A Y T A I S
241 CCCTGTTACGCGGTGGCTCCTTGCCCTGGGATGAATACGACGAGCCTGATCCTTGTGCAG
    L L R G G S L P W D E Y D E P D P C A D
301 ATGTTTATGCTTCCCATTTCACTAGGTTACTGTTTACCCCATCCGACCTCTGTGCGGGC
    V Y A S H F T R L L F T P S D L C R G L
361 TGCCAGCTGTCTACAGAGATTTTTTGACCTGTGTCCTTGATTGGAGCCTGACAAACAAT
    P A V Y R D F L T C V L D L E P D K Q F
421 TTGATTATTTTACCTACATTTCCCTTTTCCTAAAGTTACTCCCTCAAGATCTTTATTATT
    D Y F T Y I S F F L K L L P Q D L Y Y S
481 CTGTCCCGCAGTTCACATATGTAATTCCATGGTCGGCCATGATGCATCCATA
    V P Q F T Y V I P W S A M M H P X
```

Fig. 3-13. The nucleotide and putative amino acid sequences of the cloned DDRT-PCR products.

#3

```
1  TGGCATCTCGAGCTCGGACTGCTCAACGACAGGCGTTCCTCAGTCTCTACTTGTATACGC
    G I S S S D C S T T G V P Q S L L V Y A
61  AGCTGGATCAGTCCTCTTCCAAATCATCCTTTTCCTTCTCACAGTCGTGCGGTTTCGGCAT
    A G S V L F Q I I L F L L T V V R F G I
121 CGCTGTGCGCGCTGGGTGGGGGCGAATCCCTTTAGTGGAGCTAATTATGCGAGATGGTAC
    A V R A G W G R I P L V E L I M R D G T
181 CTGGGCATTCTTCGTCCTTGTCGCTATTGTTATCGCGGAGGCTGGACTGTTTCGGACTTGA
    W A F F V L V A I V I A E A G L F G L E
241 AAACCACGCACTGGCTGGGGTTCTCTATGGATGGCTGCTAACGACTTTTTCCTTCGTCGG
    N H A L A G V L Y G W L L T T F S F V G
301 ATACCGTGTTCTATTGAATCTCCAGAAAGTGGTCGTACGTACGCCCCACCCCAGCACGTC
    Y R V L L N L Q K V V V R T P H P S T S
361 GCGCTCCTCAAACGGGTACCGCTTCTCGACAGTCCGAGCTCGAGATGCCAA
    R S S N G Y R F S T V R A R D A X
```

Fig. 3-13. (continued).

#10 (partially sequenced)

```
1  TATGCTTTTACCGCGTCAATCAAAATGCGTCGAGCGCATCCCTATCACAAGGACAAGGAC
  Y A F T A S I K M R R A H P Y H K D K D
61  AAGGACAAACAAGCAGTACACAAACCCATAGCGATACTGCTAAAAAATCTTTTCCCTCCA
  K D K Q A V H K P I A I L L K N L F P P
121 AAGACACAAGCGCCCATTCAGGTTTCACGGGGATTGGCGGTACAGGCTTATGTTTATCGA
  K T Q A P I Q V S R G L A V Q A Y V Y R
181 TTGTTTATCAAATTTGTCAACAAGCCCATATCGATATTTATTTATGTCCTACGCAAGTGG
  L F I K F V N K P I S I F I Y V L R K W
241 TTGAGAATAACGCCCAAACCACTGCCACCACCCAAGGCTTATCGGTATCCTTGGTGTITT
  L R I T P K P L P P P K A Y R Y P W C F
301 AGCCTGCCTCAAAAACAACGTAATTTTATCAAATCTATCGCTGCTTTTTTTAAATCATTG
  S L P Q K Q R N F I K S I A A F F K S L
361 CTCAATCTAGTTTTCTCAAACGTATATTTGCGGTATAAAGTACAACAACATGCTTGGGT
  L N L V F S N V Y L R Y K V Q Q L C L G
421 AAAACGGAAGTCAACTTTACGATGTTTGATTTTATATTGAAAAAATAAAAAAATGCG
  K T E V N F T M F D F I L K K N K K N A
481 CTAGACTCAATGCATGACAAGCCATCGGGTGTGTTTAATAAACTGGTATTTTATAGCAGT
  L D S M H D K P S G V F N K L V F Y S S
541 TTA.....
  L . . . . .
1  TTAATCGTGCTTGGGCTTAATTTTATTGAGTTATTGAGTCAATATGTGCAAAAAGGTATA
  L I V L G L N F I E L L S Q Y V Q K G I
61  CGCTCAAAGCTTGTGCTCACGTTTGATTTGTCCATTGCTTTATTAGTTATTGCGCTATTA
  R S K L V L T F D L S I A L L V I A L L
121 GTGACACATTTTTTTGCCGATAATAGTTCTTTTTTATACAAATTCTTGTTTGAAAAATCG
  V T H F F A D N S S F L Y K F L F E K S
181 CTGATAAAAATTGCGTTGTGGTTTCTTTTATTCGTCAGTTATTGGTGATGGAATTTAGC
  L I K I A L L V S F I R Q L L V M E F S
241 TTTAAGATAGTCGTTGCGCACCCCTGCCAGTTGTTTATTTTAAGTTTTTTATTGCTTATT
  F K I V V A H P A Q L F I L S F L L L I
301 TTGCTCGGCACGTTTTTGTGATGATGCCAAATGCCACGTATGGTCATATTGCGTTTGT
  L L G T F L L M M P N A T Y G H I A F V
361 GATGCTTTATTTACTGCCACGAGTGCGGTGTGTATTACAGGTTTGGCGGTAAAAGCTT
  D A L F T A T S A V C I T G L A V K A
```

Fig. 3-13. (continued).

#11

```
1  TAAGCTTGATTGCCACACGGTACTGATTATTGCCTGTCCGTGTGCGCTGGGGCTGGCGA
    S L I A T T V L I I A C P C A L G L A T
61  CGCCGATGTCGATTATTTCCGGCGTCGGGCGGGCGGCTGAGTTTGGCGTGCTGGTGCGGG
    P M S I I S G V G R A A E F G V L V R D
121  ACGCTGACGCGCTGCAACGCGCCAGTACACTCGACACTGTAGTGTTTCGATAAAACCGGGA
    A D A L Q R A S T L D T V V F D K T G T
181  CGCTGACTGAAGGGAAGCCGCAGGTTGTGCGAGTGAAAACATTTGCTGATGTTGATGAAG
    L T E G K P Q V V A V K T F A D V D E A
241  CGCAGGCGTTGCGTCTGGCGGCGGCACTAGAGCAAGGTTCCAGCCATCCGCTGGCACGAG
    Q A L R L A A A L E Q G S S H P L A R A
301  CGATCCTCGATAAAGCAGGTGATATGCAGCTACCGCAGGTCAACGGTTTCCGCACATTGC
    I L D K A G D M Q L P Q V N G F R T L R
361  GCGGGCTGGGCGTGAGCGGTGAAGCTGAAGGTCATGCGTTATTGCTGGGCAATCAAGCTT
    G L G V S G E A E G H A L L L G N Q A X
421  A
```

Fig. 3-13. (continued).

#12 (partially sequenced)

```
1 TTATGGATGCATCATGGCCGACCAAATTCCTCAATAAGTTGGCGCCTGAGGCGCTTAAAAA
  Y G C I M A D Q I P N K L A P E A L K N
61 CACTAAGTGAAGATCATGCATAGAATCGTGTGGTTCGACGACCGCGACTCTATGGGTGG
  T N L K I M H R I V S V D D R D S M G G
121 TGCCATGAATTTGGACGATATTCAGAAGCGCCACGTTACAGCGTTAGGTGAGGGACGTGC
  A M N L D D I Q K R H V T A L G Q G R A
181 CCTAGTGTACGCAGAAAAGATGGAACAGCCCTATCATCTGCAGATCATGTTGATAAGAC
  L V Y A E K M E Q P Y H L Q I M F D K T
241 CAAAGAGGTGCCACCACCGAAACGCTGAAGAATCAGACAACGTTGTACGCGAAGCAAT
  K E V P P P E T P E E S D N V V R E A M
301 GAAAGGCCTCAACATCGTTGCCACTTTTGACAGACATCTGGGTTGCAAATTTTGCTTACA
  K G L N I V A T F D R H L G C K F C L H
361 TCGCTGCGATTGCGAGATACTCGATACGGCTGTTCTTGTGCGGACGACCCCTCTATTTCAG
  R C D S Q I L D T A V L V A D D P L F R
421 GCTTGTTTATAACCGCTATCTGCTTTGACTCTCAAAGACCTTACGCAGTTGGTGCAGTT
  L V Y N R Y L L S T L K D L T Q L V H F
481 TAGAGCGCAGATTATTCAGGAAATTCAGCGTGTGATTGGTGGTTCGAGCGCGAA.....
  R A Q I I H E I Q R V I G G R A R
1 CCAAACGAGGCACAGCCTCTCGCTGACGAACTGGGAGTGGAAGACATCTACGATCCAATT
  P N E A Q P L A D E L G V E D I Y D P I
61 GCTGCGAGGACGCGGGCGACTTTTTTCAACAGCGGGCAGAGATGCACCAATCGTTGAATTC
  A A G R G R L F S T A G R D A P I V E F
121 ACCGATGATTGCCTCGTCTTGATCCGCCGACGAGCCGTATCATGAAACAGACAAAGGC
  T D D C L V L H P P Q Q P Y H E T D K G
181 GAGCGAATTTCAATCTATGCCGACGATAACGGTGTCTGCTCGATGAATTTGGAGTTCAG
  E R I S I Y A D D N G V L L D E F G V Q
241 AAGAAGATGGGTGGTGGCGTTTCCATGGCCATGTTCTCTACTGGATGGCTGAACAGAAG
  K K M G G A R F H G H V L Y W M A E Q K
301 CCGGGAACCAAGACACCTGATTGCTTGGTTTCGATGAAACAATCGGCCCCACAAGCTA
  P G T T R H L I A W F D E N N R P H K L
361 TTTGTGCAAGGCGAACCTGTGACAACAGATATGGTCTATAAGTTTCGCAACAACACTCAC
  F V E G E P V T T D M V Y K F R N N T H
421 GATGGCGAAATATCGATTTTCCAGAACTCGAATCTGAGTATTTGTTTTTAGTCACTCAT
  D G E I S I F P E L E S E Y L F L V T H
481 TTTTATGTCACAAAAAAGGTTACTACCGAAGTTTATCCTTATTGGATCTCAGGATTCC
  F Y V T K K G Y Y R S F I L I G S Q D S
541 GCGATCAGACAGGCTGCTTATGAAAGCGGTGCGGATGCTCTTCCAGTTGTTTGAGAAAT
  A I R Q A A Y E S G R D A L P S C L R N
601 CGCTCTCCAGCATCTGGTGAATGGCCGCGCTCGGTAGCTCTAGAGGGAGTATTTCCGTAT
  R S P A S G E W P A S V A L E G V F R Y
661 CTCCATGCTCATTATGGCATTTCGCCAGCAGTTCCCTTCACTTATGTTGTACATCATAT
  L H A H T G I F A S S S L H L C C T S Y
721 CAGTATGCCACTCGCCGCTCGATTTACTTCTAGCTGTGCTTGATAGAGTCGGCCATGAT
  Q Y A T R R L D L L L A V L D R V G H D
781 GCATA
  A
```

Fig. 3-13. (continued).

#14 (partially sequenced)

```
1  TATGGATGCATCATGGCCGACAAGACCGGCGCGGTTCGATGGCGAAGCGTACCGGAAGACG
Y G C I M A D K T G A V D G E A Y R K T
61  CTGGATCGCCACGTCTGTCACGACCTGATCGTAGCCGCGCTGCAGGAAGGTTCGAGTCGAT
L D R H V V H D L I V A A L Q E G R V D
121 CGCGCAGAACGGCTTGAAACCTTCTGTCTGCGAGGCCGCGCGGAAGGTCACGGCATGCTG
R A E R L E T F C R E A G G E G H G M L
181 TTCGGCAATGCCGACATTGAAGGTGCGGTTCGGGGAACGCTTTGCCGAAAATATCGACGCC
F G N A D I E G A V G E R F A E N I D A
241 GGTGCCGCCCCGGCATCGCCGCGGTGATGGCGACGATCTTGTCTCCTTGCGCGCTTCCTT
G A A R H R R G D G D D L V V L A R F L
301 GACCAGGCTTTGGCCGAACACCGACGTATAGGACGGCGCGTTGGATTTTGCCTTGGCCTG
D Q A L A E H R R I G R R V G F C L G L
361 CGCGCCGCTTGCACGTGCAACTTTGGCGACGGCGTGATACTTGTCTGCGACGCTTCGGC
R A G C D V E L G D G V I L V V G R F G
421 GGGCGCGTAGCCCTTGCCCTTCTGCGTGACGACGTGAACCAGGATAGGTCCGGTTGGCGC
G R V A L A L L R D D V N Q D R S G W R
481 ATCGCGCACATTGGTCAGCACCGGCAGCAGGTGGTTCGAGGTTGTGGCCGTCGATCGGCCC
I A H I G Q H R Q Q V V E V V A V D R P
541 GACATAGAAGAAGCCGAGTTCTTGAACAGCGTGCCGCCGGTAACCATGCCGCGCGCATA
D I E E A E F F E Q R A A G N H A A R I
601 TTCCTCGGCGCGCAGCGCGGTCTCGAAGAATTTCGGAAGTTTGTGCGCGAGATTTTCA
F L G A Q R G P R R I S E V C A R D F S
661 GCGCTT.....
A L
1  CAGTGGTCA GTTTCGACCACGCCGAGGCCCTGCGCCGAAATGGCCGCTGTACCCGATACGG
Q W S V R P R R G L R R N G R L S P I R
61  TGTCTGATGGTCTCCAGCCGACGCTCATCGGCGAACTGGCGCAACTGCTCGGGCTTATGTT
C R W S P A A A H R R T G A T A R A Y V
121 GCGCAGCAGGTCCGGCGTCGGCGCGGCGTCGAGGAGGGGAGTCTTGCTCGAATTTATCAC
A Q Q V R R R R G V E E G S L A R I Y H
181 TTGAATATCCGCAATTATTTGGGGGCGCTCGGCCCCGGCATGGAAAGATGCCCGGAAAGGT
L N I R N Y L G A L G P A W K D A R K G
241 CCGAAACGGTCCCGTGGCTTATACCAATTCCAAAGTCATGCCAATCCGCCGGGCGGTGGC
P K R S R G L Y Q F Q S H A N P P G G G
301 CATAGGTCTCACGTTTGGGCATGACGGTGCCGGAACCGGGCGCAAACCGCTGATTGG
H R S H V L G M T V P E P G A K P L I W
361 CGCTATCGTGGTTACATCTGCGATGTCGTCCCCGCGAAGGCGGGACCTATAGCACCGAGC
R Y R G Y I C D V V P A K A G P I A P S
421 TATCGACCCAAAACAGATGCTCGATATC*T*AGTAAAATCCGACCACAGGGAGCATGGA
Y R P K N R C S I X X V K S D H R E H G
481 TCCGCGCTTTTCGCGGGGACGACGGCTGGGTATGTACGGTCTGTGACCGACTTACTGAAC
S A L S R G R R L G M Y G R L T D L L N
541 GTCGAGCGGCTCGGTGCCGACAGCGTGACCTATCGCGTCGGTGGTGATCTTGTGACACG
V E R L G A D S V T Y R V G G D L V D T
601 GGCTTCGGCCTGGCGCAGCAGTTCTTCGACGCGCGCTTCAGACGCTCGCCGCGCTCATA
G F G L A Q Q F F A A A L Q T L A A L I
661 GATCGCTACCGATTCTTCGAGCGGCACCTTGCCGTCCTCGAGGCGCTTGACGATGGATTG
D R Y R F L E R H L A V L E A L D D G F
721 CAATTCCTCGATCGCGGTTTGAAGCTGAGCTGCTTGACGTCCGCATGGGGAGTGTGCGG
Q F L D R A F E A E L L D V R M G S V G
781 CATGATGCATCCATA
H D A S I
```

Fig. 3-13. (continued).

#17

1 TGCATCATGGCCGACAAGGGCATGAACGATCTGATCGGCTCGAAGGTGCTGGGGCGTGAA
C I M A D K G M N D L I G S K V L G R E
61 CCGGAAGCGGGAGAACAGCCGAACATCCTGCAGGACTATGCCAATACGTCCTCTGCAGGA
P E A G E Q P N I L Q D Y A N T S S A G
121 TCGATCATCGCCTTCTCCCAATATTCCGACGACCTTDCACCGGGCAGTCTCGGCGTCATC
S I I A F S Q Y S D D L X P G S L G V I
181 TGCTCCTTCGGTGCCGGCTATTCCGTCGGCAGCGTGATTGTGAGGAAGGTGTATCTTGGC
C S F G A G Y S V G S V I V R K V Y L G
241 GGCATCAGAGCCTGTCACCACGGCGAAGACGTTGCGGCCCGATCCGTCGGAGTTCCAGTC
G I R A C H H G E D V A A R S V G V P V
301 AGGTATTTTTGTGTGGCCGAAGAAGCCGGGGGTTATCGTTCCCTATTCCGCGGCCTACGN
R Y F C V A E E A G G Y R S L F R G L X
361 NCTGACATGCGGCAGGTTCCAACCGATTTTTACGACAGGCAAAAATTCGAGACCGAGAAG
X D M R Q V P T D F Y D R Q K F E T E K
421 CGTGCTTACCTGGAGCAGGTGGCGAAATCCGATCCGGATTTACCGCAGCGGGAGACGCC
R A Y L E Q V A K S D P D F T A A G D A
481 CGGCTCCACAGGCTGGATTTTGAAGCGTTTCGCAAACTATATCACGGGCCGCAGAAGCTG
R L H R L D F E A F A K L Y H G P Q K L
541 ACTAAGGAGTCGTTGGGGACGGGATCAATCGTCTACGTCGGCCATGATGCATCCATAA
T K E S L G T G S I V Y V G H D A S I

Fig. 3-13. (continued).

#18

1 GTATTTATGGATGCATCATGGCCGACAGGTTATCCACGGAGACATCAAGCCAGCGAACTT
Y L W M H H G R Q V I H G D I K P A N F
61 CATCATCACCAACAACGGCCTACACCTCATCGACTTCGGGTCGTCGATTTTAGCCAAGAA
I I T N N G L H L I D F G S S I L A K N
121 TCCCGCCGTTTCGTGAACCTCACCCGGAGCTTCCCTACACTTCGTCCTTCGCCAGTCCACA
P A V R E P H P E L P Y T S S F A S P Q
181 GCGATTGTTACCCGAGAGGTCTGCTGGGTCGATGACCTCATCAGCCTCGCATACACGGC
R L F T A E V C W V D D L I S L A Y T A
241 TATATCCCTGTTACGCGGTGGCTCCTTGCCCTGGGATGAATACGACGAGCCTGATCCTTG
I S L L R G G S L P W D E Y D E P D P C
301 TGCAGATGTTTATGCTTCCCATTTCACTAGGTTACTGTTTACCCCATCCGACCTCTGTGC
A D V Y A S H F T R L L F T P S D L C R
361 CGGGCTGCCAGCTGTCTACAGAGATTTTTTGACCTGTGTCCTTGATTGGAGCCTGACAA
G L P A V Y R D F L T C V L D L E P D K
421 ACAATTTGATTATTTTACCTACATTCCTTTTTCTAAAGTTACTCCCTCAAGATCTTTA
Q F D Y F T Y I S F F L K L L P Q D L Y
481 TTATTCTGTCCCGCAGTTCACATATGTAATTCCATGGTCGGCCATGATGCA
Y S V P Q F T Y V I P W S A M M X

Fig. 3-13. (continued).

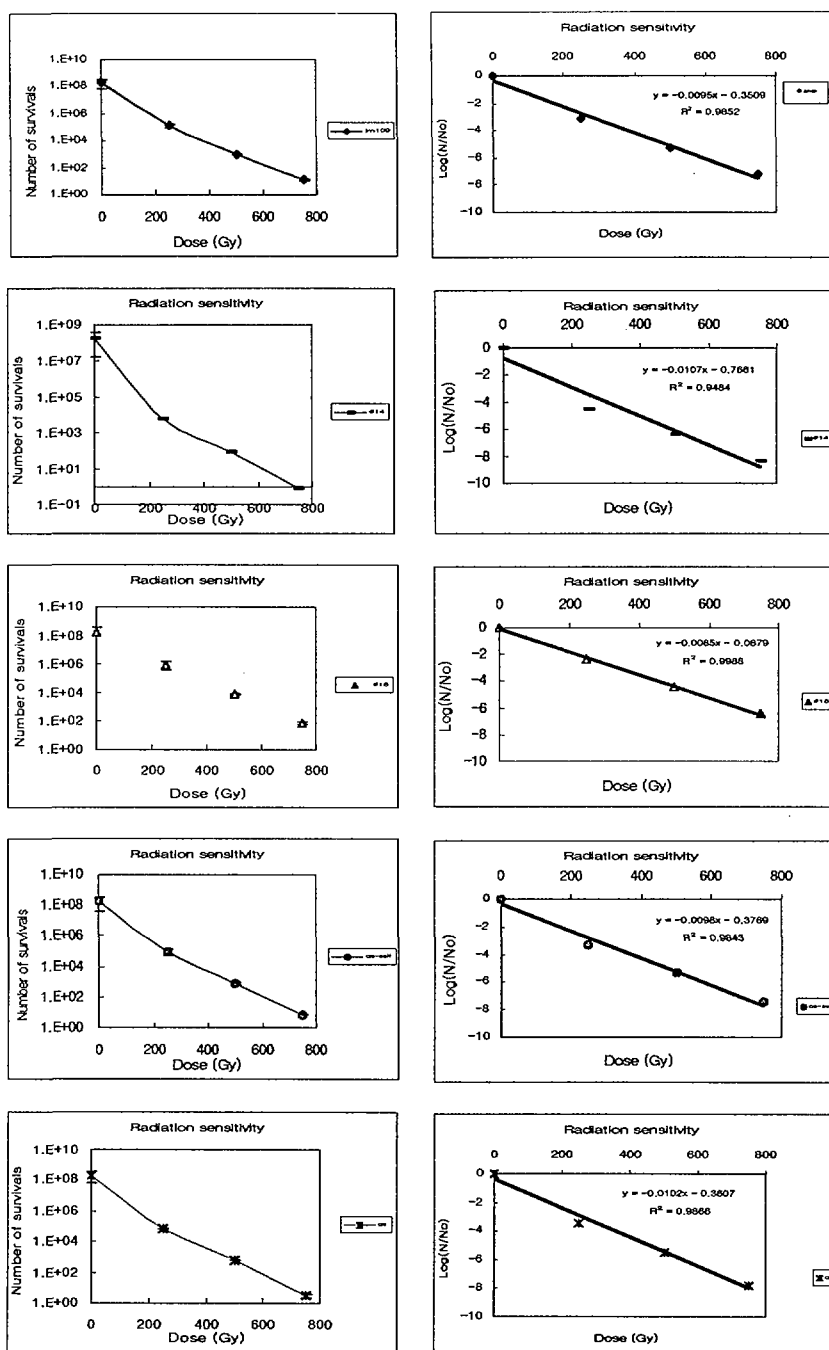


Fig. 3-14. The radiation sensitivities of the JM109 strains in which DDRT-PCR products inserted.

Table 3-2. Characteristics of the cloned DDRT-PCR products and D₁₀ values of transformed JM109

Strains	Source	Insert size (bp)	BLAST search		D ₁₀ value (Gy)
			Nucleotide	Amino acid	
JM109	-	-	-	-	105 Gy
JM109-2	PO7, 1.5 kGy	532	novel	novel(F3rd)	-
JM109-3	PO7, 1.5 kGy	411	novel	novel(F2nd)	-
JM109-4	PO7, 1.5 kGy	332	unknown	no correct frame	-
JM109-10	PO7, 0 Gy	1100	novel	novel(F3rd)	-
JM109-11	PO7, 0 Gy	416	ATPase	ATPase(F3rd)	-
JM109-12	PO7, 0 Gy	2200	novel	novel(F2nd)	-
JM109-13	PO7, 0 Gy	326	unknown	no correct frame	-
JM109-14	PO7, 1.5 kGy	2300	novel	novel(F1st)	93 Gy
JM109-17	PO7, 1.5 kGy	598	novel	novel(F1st)	-
JM109-18	PO7, 1.5 kGy	500	novel	40% homology to MAP kinase(F2nd)	117 Gy
JM109-mnp	-	1150	<i>P. ostreatus</i> MNP	<i>P. ostreatus</i> MNP	-
JM109-qe	-	-	-	-	98 Gy
JM109-qe-self	-	-	-	-	101 Gy

제 4 절 방사선 저항성 관련 인자 분석 결론

방사선은 생물학적인 측면에서 볼 때, 물리적인 힘으로 작용하므로써 생물을 구성하는 다양한 분자들 -단백질과 유전물질인 DNA, 그리고 세포를 구성하는 세포질 및 이의 구성분자- 의 변형을 초래한다. 특히, 유전물질인 세포내 DNA에 변형을 초래하는 즉, 유전자의 돌연변이를 유발하는 방사선의 효과는, 1900년대 초에 Muller에 의해 과일 초파리의 돌연변이체 유도 연구 이래로, 생물학 분야에서 그 응용성에 대한 연구의 필요성이 증폭되어 최근 10여년 전부터 생물학의 다양한 분야에서 방사선 응용 연구가 활발히 진행되고 있다. 식물을 대상으로 저선량 방사선 유익효과와 농작물의 품종 개량 분야의 응용, 방사선 노출에 대한 지표 식물의 개발 및 그 응용, 생물자원 유용성의 극대화를 목적으로 하는 유용 미생물의 개량 및 그 응용 연구들이 그 예라 할 수 있다.

이러한 일련의 생물학 분야에서 방사선 응용 연구와 더불어 본질적으로 방사선의 물리적인 힘에 대한 생물의 방어 내지 저항능력에 대한 연구의 필요성이 최근에 전 세계적으로 확산되고 있다. 특히, 방사선에 의한 생물오염원의 제거를 목적으로 하는 미생물의 방사선 감수성 및 멸균선량의 측정 연구과정 중에 고선량의 방사선에 의해서도 유전적인 변형이 거의 없이 생존하는 미생물인 *Deinococcus radiodurans*의 존재가 알려지면서 이 미생물의 유전자를 연구한다면 생물체에 대한 방사선의 유해 효과를 최소화 할 수도 있다는 가능성에 대한 기대치가 증가되었다(Moseler and Mattingly, 1971; Murray, 1992). 이에 미국의 DOE (The United States Department of Energy)의 지원하에 *D. radiodurans*의 genomic DNA 염기서열이 완전히 밝혀졌다(White et al., 1999). 그러나, 기대에 못 미치게도 3백2십만개의 염기

서열 중 어떠한 유전자가 방사선 저항성을 지니게 하는지는 밝혀 내지 못하고 있는 실정이다. 그럼에도 불구하고 생물체의 방사선 저항성 인자에 대한 연구의 필요성과 그 응용 가치에 대한 기대는 더욱 증폭되고 있다.

본 연구결과 분명하게 방사선 저항성을 높이거나 낮추는 유전자를 찾아 내지 못하였다. 다만, adaptive response와 같은 일시적인 저항성 증가를 유발하는 경우(Ikushima et al., 1996)와 달리 유전적으로 방사선 저항성이 증가된 *P. ostreatus* P07와 미동정 미생물인 Y67을 방사선을 이용하여 유도하였다. 또한, 방사선 감수성이 증가된 돌연변이체를 이 두 종에서 유도하였다.

진핵생물인 *P. ostreatus*에서 확보한 DNA 조각은 단백질 서열상 MAK와 유사한 domain을 지니고 있어서 일종의 stress protein이거나 signal을 전달하는 과정에 관여하는 protein의 한 종류로 여겨진다(Uckun et al., 1993).

극한환경이라 할 수 있는 온천원수에서 분리해낸 원핵생물인 YS1과 이의 방사선 저항성 증강 돌연변이체인 Y67의 단백질 발현양상의 차이를 확인 할 수 있었다. 이러한 Y67 특이적 혹은 발현된 양의 차이가 있는 protein 중에는 chaperon과 같은 stress induced protein도 있을 것으로 판단된다.

방사선에 의한 DNA 손상을 측정하는 효과적인 방법으로 세포배양시에 isotope을 부착한 thymidine 등을 첨가하여 방사선 표지를 하여 방사선을 조사한 다음 DNA를 추출하여 DBS등의 양을 평가하는 방법이 주종을 이루고 있으며 최근에는 DNA 조각을 보다 분명하게 염색하는 방법이 개발되고 있다(Kiltie and Ryan, 1997). 이러한 방법들은 방사선 저항성이 증강된 세포를 정확하게 찾아 낼 수 있으며(Iliakis et al., 1991), 아울러 증강에 관여하는 인자의 탐색에도 유용할 것이다(Blocher and Kunhi, 1990). 본 연구에서는 in vitro에서 plasmid를 대상으로 방사선의 염기서열에 따른 감수성 차

이를 조사한 결과 매우 유용하게 활용할 수 있다는 결론을 얻었다. 방사선 저항성 증강 세포의 추출물과 plasmid를 혼합한 뒤 방사선을 조사하였을 때 나타나는 plasmid의 절단율을 대조군과 비교함으로써 방사선 저항성 관련 인자를 탐색하는데 활용할 수 있으리라 기대된다.

방사선 저항성 관련인자에 대한 연구결과들은 단일한 protein이 작용하지 않고 다양한 인자들이 복잡하게 작용하는 것으로 알려졌다. 효모에 있어서의 연구결과는 DBS의 치유를 가능케할 것으로 생각되는 DNA-PK (protein kinase)와 Ku(DNA end-binding protein)가 방사선저항성과 밀접한 상관관계가 있을 것으로 주장하고 있다(Weaver, 1995; Jackson, 1997). 또한, 악조건의 환경에 처했을 때 생체내에서 생성되는 hsp(heat shock protein) 혹은 stress protein이 방사선저항성과 관련이 있을 가능성이 제기되고 있는 등 (Trautinger et al., 1996) 그 기작은 매우 복잡할 것으로 판단된다.

제 4장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

1. 연구개발 목표달성도

- 방사선 조사에 의한 원핵세포 및 진핵세포의 돌연변이체 개발 기본 기술이 확립되었음
- 방사선 이용 방사선저항성 중강 돌연변이체(원핵세포, Y67) 및 방사선 민감성 돌연변이체(Y25) 개발이 성공적이었으며, 생리학적 및 유전학적 특성을 분석하였음.
- 방사선이용 방사선저항성 중강 돌연변이체(진핵세포, P07)가 개발되었고, 관련 유전자조각(540 bp의 #18 유전자)을 클로닝하고 염기서열을 분석하였음.

2. 대외기여도

- 방사선을 이용한 돌연변이체 개발 기반 기술의 확립으로 유용물질 생산 미생물개발, 환경오염 정화용 미생물 개발 등의 광범위한 분야에 기술의 접목이 가능할 것으로 기대됨.
- 방사선 저항성 및 민감성 돌연변이체를 이용하여 생체에 대한 방사선의 영향 연구의 기본 모델로 응용이 가능할 것임.
- 방사선 저항성 관련 유전자 조각인 #18 DNA 조각을 근거로 전체 유전자를 해독한다면, 생물의 방사선 저항성 기작을 연구하는데 크게 기여할 것임.
- 저선량 방사선의 유익효과 및 방사선 방어제 개발 연구에 도움이 되는 기반 지식을 제공하게 됨.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 방사선이용 기능 증강 미생물 돌연변이체 개발기술을 활용하여 농약성 미생물제제 개발 및 기타 환경오염 정화용 미생물 제제를 개발할 계획임.
- 방사선 저항성 돌연변이체가 확보되었고 DNA 조각의 염기서열도 분석되었으나 대상 미생물에 특이한 vector 개발이 성공적으로 수행된다면 방사선저항성 관련 전체 유전자를 해독할 수 있고, 이에 따른 관련 발현물질의 대량 생산이 가능할 것으로 기대 됨.
- 방사선저항성 혹은 민감성 돌연변이체의 유전적·생리적 분석 결과는 저선량 방사선의 유익효과 및 방사선방어제 개발 연구를 추진하는데 기여할 것임.
- 확보된 방사선저항성 관련 유전자 정보 및 균주 정보는 특허를 출원하여 지적재산권을 보유하고 산업체와의 협의를 통하여 추가 연구 및 실용화 가능성을 타진할 것임.

제 6 장 참고문헌

- Billi, D, E Friefmann, KG Hofer, MG Caiola and R Ocampo-Friedmann, 2000. Ionizing-radiation resistance in the desiccation-tolerant cyanobacterium *Chroococcidipsis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:1489-1492.
- Blocher, D, D Sigut and MA Hannan, 1991. Fibroblasts from ataxia telangiectasia(AT) and AT heterozygotes show an enhanced level of residual DNA double-strand breaks after low dose-rate gamma-irradiation as assayed by pulsed field gel electrophoresis. *Int. J. Radiat. Biol.* 60: 791-802.
- Blocher, D, M Einspenner and J Zajachowski, 1989. CHEF electrophoresis, a sensitive technique for the determination of DNA double-strand breaks. *Int. J. Radiat. Biol.* 56: 437-448.
- Blocher, D, 1990. Dose response in neutral filter elution. *Radiat. Res.*, 123: 176-181.
- Blocher, D. 1990. In CHEF electrophoresis a linear induction of dsb corresponds to a nonlinear fraction of extracted DNA with dose. *Int. J. Daiat. Biol.*, 57: 7-12.
- Blocher, D and M Kunhi, 1990. DNA double-strand break analysis by CHEF electrophoresis. *Int. J. Radiat. Biol.*, 58: 23-34.
- Friedl, AA, W Beisker, K Hahn, F Eckardt-Schupp and AM Kellerer, 1993. Application of pulsed field gel electrophoresis to determine gamma-ray-induced double-strand breaks in yeast chromosomal molecules. *In. J. Radiat. Biol.* 63: 173-181.

- Galli, A and RH Schiestl, 1998. Effects of DNA double-strand and single-strand breaks on intrachromosomal recombination events in cell-cycle-arrested yeast cells. *Genetics* 149: 1235-1250.
- Hannan, MA, D Blocher, D Sigut and M Waghray, 1991. DNA double strand breaks in fibroblast cell lines, from non-Hodgkin's lymphoma patients, showing increased sensitivity to chronic gamma irradiation. *Cancer Lett.* 57: 137-143.
- Hutchison, F, 1985. Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 32: 115-154.
- Ikushim, T, 1992. Radio-adaptive response: Involvement of specific gene expression by low doses of ionizing radiation. *In: Low Dose Irradiation and Biological Defense Mechanisms.* T Sugahara, LA Sagan and T Aoyama (Eds.), pp. 255-258. Elsevier Science Publ., Amsterdam.
- Ikushima, T, H Aritomi and J Morisita, 1996. Radioadaptive response: Efficient repair of radiation-induced DNA damage in adapted cells. *Mutat. Res.*, 358: 193-198.
- Iliakis, G, D Blocher, L Metzger and G Pantelia, 1991. Comparison of DNA double-strand break rejoining as measured by pulsed field gel electrophoresis, neutral source gradient centrifugation and non-unwinding filter elution in irradiated plateau-phase CHO cells. *In. J. Radiat. Biol.*, 1991. 59: 927-939.
- Jackson, SP, 1997. DNA-dependent protein kinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29:935-938.
- Joiner, MC, P Lambin, KA Skov and B Marples, 1997. Induced

- radioresistance in mammalian systems. *Numero Special Radioprotection*, 32: C1-397.
- Kiltie AE and AJ Ryan, 1997. SYBR green I staining of pulsed field agarose gels is a sensitive and inexpensive way of quantitating DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 25: 2945-2946.
- Kraxenberger, F, KJ Weber, AA Friedl, F Echardt-Schupp, AM Flentje, P Quicken and AM Kellerer, 1998. DNA double-strand breaks in mammalian cells exposed to gamma-rays and very heavy ions. *Radiat. Environ. Biophys.* 37: 107-115.
- Minton, KW and MJ Daly, 1995. A model for repair of radiation-induced DNA double strand breaks in the extreme radiophile *Deinococcus radiodurans*. *Bioessays*, 17:457-464.
- Mirabelli, CK, C-H Huang, RG Fenwick and ST Crooke, 1985. Quantitative measurement of single- and double-strand breakage of DNA in *Escherichia coli* by the antitumor antibiotics bleomycin and talisomycin. *Antimicro. Agents Chemotherapy* 27: 460-467.
- Reed, M, B Weolker, P Wang, Y Wang, ME Anderson and P Tegtmeier, 1995. The C-terminal domain of p53 recognizes DNA damaged by ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 92: 9455-9459.
- Sargentini NJ and KC Smith, 1986. Quantitation of the involvement of the *recA*, *recB*, *recC*, *recF*, *recJ*, *recN*, *lexA*, *radA*, *radB*, *uvrD*, and *umuC* genes in the repair of X-ray-induced DNA double-strand breaks in *Escherichia coli*. *Radiat. Res.* 107: 58-72.
- Schisler, NJ and JD Palmer, 2000. The IDB and IEDB: Intron sequence

- and evolution databases, *Nucleic Acids Res.*, 28: 181-184.
- Seong, J and GE Kim, 1994. Adaptive response to ionizing radiation induced by low dose of gamma rays in human hepatoma cell lines. *Yonsei Med. J.*, 35: 77-83.
- Stecca, C and GB Gerber, 1998. Adaptive response to DNA-Damaging Agents. *Biochem. Pharmacol.*, 55: 941-951.
- Trautinger, F, I Kindas-Mugge, RM Knobler and H Honigsmann, 1996. Stress proteins in the cellular response to ultraviolet radiation. *J. Photochem. Photobiol. B*, 35:141-148.
- Uckun, FM, GL Schieven, LM Tuel-Ahlgren, I Dibirdik, DE Myers, JA Ledbetter and CW Song, 1993. Tyrosine phosphorylation is a mandatory proximal step in radiation-induced activation of the protein kinase C signaling pathway in human B-lymphocyte precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 252-256.
- Von Sonntag, C, U Hagen, A Schon-Bopp and D Schulte-Frohlinde, 1981. Radiation-induced strand breaks in DNA: chemical and enzymatic analysis of end groups and mechanistic aspects. *Adv. Radiat. Biol.* 9: 109-142.
- Weaver, DT, 1995. What to do at an end: DNA double-strand-break repair. *TIG*, 11:388-392.
- White, O, JA Eissen, JF Heidelberg, EK Hickey, JD Peterson, RJ Dodson, DH Haft, ML Gwinn, WC Nelson, and J Richardson. 1999. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* 286:1571-1577.
- Wolff, S, JK Wiencke, V Afzal, J Youngblom and F Cortes, 1989. The

adaptive response of human lymphocytes to very low doses of ionizing radiation: A case of induced chromosomal repair with the induction of specific proteins. *In: Low Dose Radiation: Biological Bases of Risk Assessment*. KF Baverstock and JW Stahler (Eds.), pp. 446-454. Taylor & Francis, London.

Zhou, PK, XQ Xiang, WZ Sun, XY Liu, YP Zhang and K Wei, 1994. Adaptive response to mutagenesis and its molecular basis in a human T-cell leukemia line primed with a low dose of gamma-rays. *Radiat. Environ. Biophysics.*, 33: 211-217.