

Mannose Permease가 변형된 대장균 변이주에 대한 Coliphage N 4 감염의 저해

김기태·유옥준

한국과학기술원 생물공학과

Inhibition of Coliphage N4 Infection to *Escherichia coli* Mutant Defective in Mannose Permease

Kim, Ki Tae and Ook Joon Yoo

Department of Biological Science & Engineering, Korea Advanced Institute of Science and
Technology, P.O.Box 150, Cheongryang, Seoul, Korea 131

ABSTRACT: Evidences that the mannose permease of *Escherichia coli* mediates the infection of N4 in early steps, were obtained as follows. First, A mutant strain of *Escherichia coli* which was resistant to both wild type N4 and lambda whose genome is Charon 4A containing human genomic fragments in its EcoR I site, could not use mannose efficiently. Second, N4 could not infect *pel* mutant strains which lack one or all of intact components of mannose permease. However, unknown alterations in N4 made it possible for the phage to infect *pel* mutant of *E. coli*. It also turned out to be clear that the receptor of N4 was different from that of lambda.

KEY WORDS □ N4 phage, *pel* mutant, mannose permease, host range mutant phage

Coliphage N4는 72Kb의 double strand DNA를 genome으로 갖고 있는 lytic phage로서, 다음과 같은 독특한 특징을 갖고 있다. N4가 감염할 수 있는 숙주의 범위는 *E. coli* K-12 strain으로 제한되고 있으며, 숙주세포에 감염한 후 progeny phage들이 숙주세포 밖으로 산출되기까지 3시간 가량의 오랜 성숙과정을 요하고, burst size도 3,000에 이르는 특징을 보여준다(Schito, 1973). 특히 이 phage는 초기 및 중기의 전령 RNA 합성에 숙주세포의 RNA polymerase를 이용하지 않고 viral specific RNA polymerase를 사용한다는 점은 매우 관심을 끌고 있는 특징이다(Rothman-Denes *et al.*; 1974; Falco *et al.*; 1977; Vander Laan *et al.*; 1977, Falco *et al.*; 1980, Zehring *et al.*; 1983). 이렇듯 N4 phage의 물리·화학적 성질에 대한 많은 관심에 비해서, 이 phage 감염의 첫단계에 속하는 phage의 흡착(adsorption)과 genome의 생체막을 통한

유입과정에 대해서는 그 연구가 미흡한 상태에 있다.

Bacteriophage의 흡착에 필요한 수용체(receptor)와 phage genome을 숙주세포내로 유입시키는 과정에 대한 연구는 bacteria의 세포벽 또는 원형질막을 구성하는 성분들에 대한 이해를 넓혀주고 있다(Schwartz, 1980; Goldberg, 1980). 이러한 예들 중의 하나인 *E. coli*의 mannose permease는 mannose를 비롯한 여러 당류의 group translocation을 중재하는 효소군인데, 이는 chemotaxis를 위한 수용체로서의 역할과 함께 bacteriophage lambda DNA가 숙주세포내로 유입되는 통로로서도 기능하는 것으로 알려져 있다. *E. coli* mannose permease는 III, II-P, II-M이라고 명명된 세가지의 subunit들로 구성이 되고 있는데, II-P와 II-M은 원형질막에서 transmembrane channel을 형성하고 있는 것으로 여겨지며, 이 두 단백질이 lambda DNA의 유입에 요구되고

있다(Erni *et. al.* ; 1987).

본 연구는 숙주세포의 어떤 돌연변이에 의해 일종의 lambda와 N4 phage의 감염이 동시에 저해되는 현상을 관찰하고, 이를 바탕으로 mannose permease가 N4의 감염과정에 필요하다는 결과를 얻게 되어 보고한다.

재료 및 방법

균 주

본 연구에 사용된 균주는 Table 1에 정리하였다.

Phage 및 그의 증식

Coliphage N4는 Chicago 대학의 Rothman-Denes 박사로부터 선사받아 Falco 등(1980)의 방법에 따라 분리 정제하였다. K10은 Pasteur Institute의 Roa 박사로부터 선사받았고, virulent mutant인 lambda와 T4는 한국과학기술원의 박찬규 박사로부터 선사받아서 직접 사용하였다. Human genomic library를 포함하는 Charon 4A를 genome으로 갖고 있는 lambda(λ_{lib})는 유전공학센터의 김지영 박사로부터 선사받아서 plate lysate 방법으로 증식하였다.

배 지

LB 배지: 1% NaCl, 1% Difco Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract. Tryptone 배지: 1% Difco Bacto tryptone, 0.5% NaCl. 평판배지를 만들기 위해서는 1.5%의 Bacto agar를 넣었으며, phage 용반(plaque)형성을 위한 상층 agar는 0.65%의 Bacto agar를

넣어 만들었다. TMMg: tryptone 배지+0.1% maltose+0.01% MgSO₄. 이 배지는 phage를 감염시킬 목적의 bacteria를 배양키 위해서 사용하였다. Mannose 또는 Maltose가 첨가된 MacConkey 평판배지는 Difco Bacto MacConkey agar base의 조성에 따라 준비하였다. mannose나 maltose를 첨가할 때는 Milipore filter(pore size 0.22 um)를 통과한 20%의 용액을 최종농도 0.4%가 되도록, 평판에 붓기직전에 첨가하였다.

Phage 감염도의 조사

Phage의 감염도는 평판효율(efficiency of plating), 즉 모균에서 계산된 각 phage의 titer에 대해 비교 균주에서 상대적으로 얻어진 phage 용반의 비율에 의해 결정하였다. *E. coli* pop2502의 경우에는 spot test로서 phage의 감염여부를 검사하였다(결과 및 고찰 참조).

대장균의 mannose permease에 대한 표현형 검사

0.4% mannose가 포함된 MacConkey 평판배지에서 침전·발색반응을 관찰하였다.

결과 및 고찰

Coliphage N4에 내성을 보이는 돌연변이주 *E. coli* NLR 191의 성질

E. coli WDT87의 N4에 내성을 갖는 변이주들 중, human genomic fragment를 포함한 Charon 4A를 genome으로 갖는 lambda(이후 λ_{lib})에 대해서도 내성을 보여주는 변이주를 찾아서 NLR 191이라고 명명하였다. 따라서, NLR 191의

Table 1. Bacterial strains

| Strain | genotype or relevant phenotype | source |
|-------------------------|---|------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| WDT87 | <i>tna</i> , <i>trpR</i> ^{-ts} , Δ <i>trpEA2</i> a derivative of W3110 strain | laboratory stock |
| NLR191 | <i>N4</i> ^r , * λ_{lib} ^r mutant of WDT87 | in this paper |
| WA921 | <i>rk</i> ⁻ , <i>mk</i> ⁻ , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>met</i> , <i>lac</i> , <i>supE</i> ⁺ , resistant to adsorption by ϕ 80 | Arber (11) |
| WA2127 | <i>peI</i> ⁻ mutant of WA921 | Arber (11) |
| WA3155 | <i>peI</i> ⁻ mutant of WA921 | Arber (4) |
| pop2502 | K-12 MM294 Δ <i>malB101</i> | Bloch (2) |

* λ_{lib} is the lambda with a genome of Charon4A containing human genomic fragment at EcoR I site.

lambda 감염과정에 관련된 여러가지 형질을 검토하게 되었는데, NLR 191은 maltose를 공급한 MacConkey 평판배지에서 붉은색의 침전·발색반응을 보여주었음을 물론, phage K 10에 잘 감염되었던 것으로 볼 때 (Roa, 1979), λ의 수용체인 LamB protein에는 이상이 생기지 않았음을 알 수 있었다. 더욱이 NLR 191은 λ vir에도 잘 감염되었다는 사실은 이러한 결론을 더욱 뒷받침해 주었다 (Table 2).

λ DNA의 유입에 요구되는 mannose permease의 변이 여부를 검토하기 위해서, NLR 191을 mannose를 공급한 MacConkey 평판배지에 도말해 보았는데, 매우 불완전한 발색반응을 보여 주었다. 따라서 NLR 191이 N4 및 λ lib에 내성을 갖는 이유가 mannose permease의 어떤 변형에 의한 것일 수 있다는 시사를 받게 되었다.

N4 phage의 pel 돌연변이주에 대한 감염도

Mannose permease의 전부 또는 일부가 변형됨으로 인해, lambda가 감염하지 못하는 pel 돌연변이주에 대한 여러 phage들의 감염도를 검토하여, Table 3에 정리하였다. N4는 λ vir과 λ lib와 같이 pel 돌연변이주들에 감염하지 못하는 것으로 나타났다. 특히, WA 3155는 mannose permease의 세 component중에서 II-P가 결핍되어 있는 것이므로, II-P protein은 N4의 감염과정에 절대적으로 필요하다는 결론을 내릴 수 있다(Erni et al. ; 1987). 그러나 아직 N4의 수용체가 규명되어 있지 않기 때문에 mannose permease가 N4 감염과정에서, lambda에서처럼 genome의 유입을

Table 2. Infectivity of various coliphages into E. coli NLR191

| strain | phenotype | infectivity of phage ^a | | | |
|--------|-------------------------|-----------------------------------|------------------|-----|------------------|
| | | N4 | λ _{lib} | K10 | λ _{vir} |
| W3110 | mal+ man+ * | 1 | 1 | 1 | 1 |
| NLR191 | mal+ man ^o # | 0 ^b | 0 | 1 | > 0.85 |

a Infectivity of phage was determined by efficiency of plating (see Materials and Methods).

b 0 means <10⁻⁵

* mal+ man+ means that the strain can utilize maltose and mnnose.

man^o means that the strain cannot utilise mannose efficiently.

Table 3. Infectivity of various coliphages into pel strains.

| strain | genotype* | | infectivity of phage ^a | | | | | |
|--------|-----------|------|-----------------------------------|------------------|------------------|----|------|-------------------|
| | III | II-P | II-M | λ _{vir} | λ _{lib} | N4 | K10 | N4hp [#] |
| WA921 | + | + | + | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| WA2127 | - | - | - | 0 ^b | 0 | 0 | >0.9 | >0.9 |
| WA3155 | + | - | + | 0 | 0 | 0 | >0.9 | >0.9 |

a Infectivity was determined by efficiency of plating (see Materials and Methods).

b 0 means <10⁻⁵

* Genotypes for mannose permease are described. III, II-P and II-M are the components of mannose permease.

N4hp means N4 mutant with an extended host range for pel bacteria.

중개하는지는 단정지을 수가 없다. lambda의 경우에는, LamB protein에 일단 비가역적으로 흡착된 후 mannose permease에 의해 형성되어 있는 transmembrane channel을 통하여 genome을 유입하는 것으로 알려져 있다(Schwartz, 1980 ; Goldberg, 1980). 그리고 이때 mannose permease는 lambda가 자신의 수용체에 흡착하는 과정에는 어떤 역할을 하지 않는 것으로 알려져 있다(Scandella et al. ; 1974). 따라서 N4의 경우에는, 어떠한 기작으로 mannose permease가 감염 과정에 참여하게 되는지 lambda의 경우와 비교 검토하는 것이 필요하다.

pel 돌연변이주에 감염하는 N4 변이의 발견

pel 돌연변이주의 모균뿐 아니라, pel 돌연변이주에도 잘 감염하는 변이된 N4가, 감염도 실험 수행중 상당수 나타남이 관찰되었다. 이 돌연변이 N4는 보통의 돌연변이 발생율보다는 100배 정도 낮은 발생율(10⁻⁸)로 나타났다. 이 돌연변이 N4가 오염된 phage가 아님은, 그 phage로 부터 DNA를 분리하여 Hpa I 제한효소로 절단시켜봄으로써 확인하였다 (data not shown, for ref., Zivin et al. ; 1980). pel 돌연변이주에 잘 감염하는 이 N4를 N4 hp로 명명하였다 (Table 3). 이 변이된 N4 phage는 NLR 191 strain에도 잘 감염하였다 (data not shown). lambda의 경우에도 pel 돌연변이주에 감염하는 phage 변이가 알려져 있는데 (Scandella et al. ; 1974), lambda의 tail protein인, gpV와 gpH에 변형이 생김으로써 감염

능이 회복되는 것으로 알려져 있다(Scandella *et al.*; 1976). 아직 N4의 유전자에 대한 연구가 미진한 상태이므로, N4의 어떤 유전자가 변이됨으로써 이러한 결과를 나타내는지는 N4에 대한 더 많은 연구가 진행된 후에 밝혀질 수 있을 것이다.

N4 phage의 *lamB* 돌연변이주에 대한 감염도

감염의 첫단계에 있어서 N4는 이미 연구가 많이 되어 있는 lambda와 공통점을 갖고 있다는 시사는 보고된 바 있다(Chae *et al.*; 1987). 따라서, N4의 수용체마저도 lambda와 같은 LamB protein인가를 확실히 검토하기 위해서, *lamB* 유전자가 포함되어 있는 *malB* operon이 결실되어서 LamB protein을 전혀 생성하지 못하는 돌연변이주인, pop2502(Bloch *et al.*; 1985)에 N4를 감염시켜 보았다. Spot test에서 λ vir와 λ lib, K10은 모두 전혀 감염하지 못했으나, N4는 효과적으로 감염하는 것을 관찰하였다(Table 4). pop2502의 모균에 대한 N4의 상대적인 감염도는 알 수 없었지만, 이러한 결과는 N4 및 lambda가 그들의 감염에 숙주세포의 mannose permease를 요구한다는 면에서 공통점이 있을지라도, 숙주세포에 있는 수용체를 이용하는 방식은 동일하지 않음을 알 수 있다. SS1(Beher *et al.*; 1981) 또는 TP1(Wandersman *et al.*; 1978) phage처럼, LamB protein과 또 다른 세포벽의 단백질 성분중 어떤 것도 수용체로 이용할 수 있는 경우가 보고되어 있다. 그러나 N4에 내성을 갖는 돌연변이주들을 수천개 검토해보아도,

Table 4. Infectivity of various coliphages into *E. coli* pop2502

| phase | infectivity ^a |
|---------------|--------------------------|
| λ vir | - ^b |
| λ lib | - |
| K10 | - |
| N4 | + ^c |

a Infectivity of phages was determined by spot test. The spot test was carried out as follows. 100 μ l of a bacterial culture which was grown to late logarithmic phase in TMMg broth, was added to 2 ml of soft agar and poured on the tryptone agar plate. An appropriate amount of phage particle with 5 μ l of 10mM Tris buffer (pH 7.5) containing 10mM MgCl₂ was spotted on the surface of top agar, hardened and dried, and incubated overnight at 37°C.

b - means that the phage cannot infect to host cells.

c + means that the phage can infect efficiently to host cells.

maltose를 이용하는 능력과 N4의 감염능 사이에는 아무런 관련성이 없음을 미루어 볼 때(Thirion *et al.*; 1972), N4는 LamB protein외의 다른 세포벽의 성분을 수용체로서 이용하는 것으로 생각된다(data not shown). Phage K10의 경우처럼, lambda와 같이 LamB protein을 수용체로 이용하면서도 *pel* 돌연변이주에는 잘 감염되는 예도 있다(Roa, 1979). 이러한 결과는 세포벽에 있는 phage의 수용체와 원형질막에서 phage genome의 유입을 매개하는 성분간에 어떤 독특한 연관성이 있는 것은 이점을 시사한다.

적 요

*Escherichia coli*의 mannose permease가 coliphage N4의 감염초기를 증대한다는 가설을 뒷받침하는, 다음과 같은 결과들을 얻었다. 첫째, N4와 human genomic fragment를 포함하는 Charon 4A를 genome으로 갖는 lambda에 동시에 내성을 갖는 대장균의 돌연변이주가 mannose를 효과적으로 성장에 이용하지 못했다. 둘째, mannose permease의 component들중 하나 또는 전부가 결핍되어 있는 *pel* 돌연변이주들에 N4가 감염하지 못했다.

그러나, N4에 어떤 변이가 일어나면 *pel* 돌연변이주에도 잘 감염할 수 있었다.

감염초기의 공통점에도 불구하고 N4와 lambda의 수용체는 서로 다름이 *lamB* 돌연변이주에 의해 확인되었다.

REFERENCES

1. Beher, M.G., and A.P. Pugsley, 1981. Col-

iphage which Requires Either the LamB Protein or the OmpC Protein for Adsorption to *Escherichia coli* K-12. *J. Virology* 38, 372-375.

2. Bloch, M., and C. Desaymard, 1985. Antigenic Polymorphism of the LamB Protein among Members of the Family *Enterobacteriaceae*. *J. Bacteriol.* **163**, 106-110.
3. Chae, K.S., S.J. Kim, C.S. Kim, and O. Joon Yoo, 1987. Studies on the Receptor for Bacteriophage N4 Infection. *Kor. Jour. Microbiol.* **25**, 52-56.
4. Elliott, J., and W. Arber, 1976. *E. coli* K-12 *pel* Mutants, which Block Phage Lambda DNA Injection, Coincide with *ptsM*, which Determines a Component of a Sugar Transport System. *Molec. gen. Genet.* **161**, 1-8.
5. Erni, B., B. Zanolari, and H.P. Kocher, 1987. The Mannose Permease of *Escherichia coli* Consists of Three Different Proteins. *J. Biol. Chem.* **262**, 5238-5247.
6. Falco, S.C., K. Vander Laan, and L.B. Rothman-Denes, 1977. Virion-associated RNA polymerase required for bacteriophage N4 development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 520-523.
7. Falco, S.C., W. Zehring, and L.B. Rothman-Denes, 1980. DNA-dependent RNA polymerase from Bacteriophage N4 Virions. *J. Biol. Chem.* **255**, 4339-4347.
8. Goldberg, E., 1980. Bacteriophage Nucleic Acid Penetration. (in Virus Receptors, receptors and recognition, Series B, Vol. 7, ed. L.L. Randall and L. Philipson), pp 115-141. London, Chapman and Hall.
9. Roa, M., 1979. Interaction of Bacteriophage K10 with its Receptor, the *lamB* Protein of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **140**, 680-686.
10. Rothman-Denes, L., and G.C. Schito, 1974. Novel Transcribing Activities in N4-Infected *Escherichia coli*. *Virology* **60**, 65-72.
11. Scandella, D., and W. Arber, 1974. An *Escherichia coli* Mutant which Inhibits the Injection of Phage Lambda DNA. *Virology* **58**, 504-513.
12. Scandella, D., and W. Arber, 1976. Phage Lambda DNA Injection into *Escherichia coli pel* Mutants is Restored by Mutations in Phage Genes V or H. *Virology* **69**, 206-215.
13. Schito, G.C., 1973. The Genetics and Physiology of Coliphage N4. *Virology* **55**, 254-265.
14. Schwartz, M., 1980. Interaction of Phages with Their Receptor Proteins. (in Virus Receptors, receptors and recognition, Series B, Vol. 7, ed. L.L. Randall and L. Philipson), pp 59-114. London, Chapman and Hall.
15. Thirion, J.P., and M. Hofnung, 1972. On some Genetic Aspects of Phage Lambda Resistance in *E. coli* K-12. *Genetics* **71**, 207-216.
16. Vander Laan, K., S.C. Falco, and L.B. Rothman-Denes, 1977. The Program of RNA Synthesis in N4-Infected *Escherichia coli*. *Virology* **76**, 596-601.
17. Wandersman, C., and M. Schwartz, 1978. Protein Ia and *lamB* Protein can replace each other in the constitution of an active receptor for the same coliphage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 5636-5639.
18. Zehring, W.A., S.C. Falco, C. Malone, and L.B. Rothman-Denes, 1983. Bacteriophage N4-Induced Transcribing Activities in *E. coli*. III. A Third Cistron Required for N4 RNA Polymerase II Activity. *Virology* **126**, 678-687.
19. Zivin, R., C. Malone, and L.B. Rothman-Denes, 1980. Physical Map of Coliphage N4 DNA. *Virology* **104**, 205-218.

(Received Aug. 5, 1987)