

폐염균의 형질전환 및 *recP* 유전자의 클로닝

성균관대학교 약대

이 동 권

폐염균의 특징은 폐염, 류마티스성 심장병, 수막염 등의 질병을 일으키는 병원균이라는 것과 아주 높은 효율로 형질전환을 할 수 있다는 사실이다(10⁸개의 균에 염색체 DNA 1 μ g을 써서 실험하였을 때 10⁶개의 transformant를 얻을 수 있음). 폐염균이 자연상태에서 이렇게 높은 효율의 형질전환을 할 수 있는 이유는 정상생리의 일부로서 형질전환에 관계된 유전자가 형질전환을 할 때 발현되기 때문이다. 그러나 폐염균 형질전환에 대한 연구는 아직도 초기단계라고 할 수 있으며 그 이유는 현재 전세계적으로 극소수의 연구자들만이 연구를 수행하고 있기 때문이다. 즉, 미국 Brookhaven National Laboratory의 Lacks와 프랑스 CNRS의 Claverys는 mismatch repair에 대한 연구를, Illinois 대학의 Morrison은 competence(아래 1항 참고)에 대해, 미국 Rockefeller 대학의 Hotchkiss와 Tomasz는 DNA binding을 연구하고 있을 뿐이다. 본 논문에서는 폐염균 형질전환에 대해 지금까지의 연구 상태와 문제점, *recP*의 클로닝에 대해 소개하고자 한다.

1. Competence⁽¹⁻⁵⁾

Competence란 균이 DNA를 흡수하여 DNA 분해효소에 저항성인 형태로 변화시킬 수 있는 능력을 갖고 있는 상태 즉, 형질전환 능력을 갖고 있는 시기를 말한다. 폐염균에서 competence는 competence factor에 의해 유도되며 균이 대수기에 이르렀을 때 약 10분간 나타났다가 없어진다. Competence factor는 배양액 중에 분비되어 균이 10⁸개/ml의 농도에 이르렀을 때 가장 효과적으로 competence를 유도한다. 그러나 10⁸

개/ml 이하의 농도에서 pH를 높여줌으로써 쉽게 competence를 유도할 수 있는 방법도 최근 개발되었다. Competence 때에는 거의 모든 단백질의 생합성이 중단되고 최소한 10가지 이상의 새로운 단백질이 합성되기 때문에 이런 단백질(competence specific protein)들이 형질전환에 직접 관여하고 있으리라고 예상되고 있다. 그러나 이런 competence specific protein이 세포의 어느 부위에 존재하는지만 밝혀졌을 뿐 각각의 competence specific protein이 어떤 역할을 하는지는 밝혀지지 않았다.

2. Competence 때의 DNA processing⁽⁶⁻¹⁴⁾

일단 noncompetence 상태에서 competence 상태로 전환되면 DNA가 5~10분내에 급속히 receptor에 단단하게 달라붙으면서 약 6kb 정도의 간격으로 nick을 형성하게 된다. DNA가 달라붙는 receptor는 약 30~80개로 추정되며 어떤 double-stranded DNA든지 전부 달라붙을 수 있으나 single-stranded DNA, RNA, DNA-RNA hybrid는 달라붙지 않는다. 변성된 DNA는 달라붙기는 하지만 형질전환 효율이 아주 낮다. Nick된 DNA가 세포안으로 흡수(uptake)되기 위해서는 endonuclease에 의해 짧은 DNA 조각으로 잘라져야 하며 이 때 한가닥은 세포안으로 흡수되고 다른 한가닥은 oligonucleotide로 분해된다(Fig. 1). DNA 흡수에는 양이온이 필요하며 두가닥의 DNA 중 아무가닥이나 임의로 들어가게 된다. 일단 세포 안으로 들어간 한가닥의 DNA는 곧 19.5 kilodalton의 single strand DNA binding protein과 결합하여 nuclease의 공격으로부터 보호된다. 한가닥의 DNA가 single

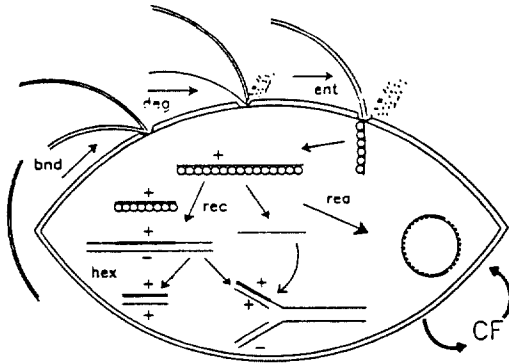


Fig. 1. A DNA processing by competent *S. pneumoniae*. At competence, competence factor (CF) is released and it interacts with a cell-surface receptor and competence specific proteins are induced. A single long DNA molecule is bound to several sites on the cell surface. A different stage of binding and uptake is illustrated at each site: bnd, binding and nicking by membrane bound nuclease; deg, degradation of a single-strand of double-stranded DNA and simultaneous release of a small oligonucleotides into the medium; ent, one strand is taken up while the other is degraded; rec, the single strand becomes associated with a competence specific protein, to form the eclipse complex and it is integrated into a homologous chromosome by replacing a recipient strand with the donor strand; rea, in case of plasmid DNA transformation, the single strands, are taken up by the same mechanism, and are reassociated to form a functional replicon; hex, after integration, a mismatched region is corrected by mismatch repair system.

strand DNA binding protein과 결합된 형태를 eclipse complex라고 하며 이 eclipse complex의 역할은 single strand DNA의 보호와 운반에 관여하고 있으리라고 추측된다. 형질전환의 마지막단계는 single strand DNA가 recombination enzyme에 의해 homologous DNA에 통합되는 것이며 single strand DNA가 세포 안으로 흡수된 후 통합되기까지는 약 10분이 소요된다. 통합되는 반응은 single strand DNA가 recipient cell DNA의 두가닥 중 한가닥과 치환되는 반응이며 치환된 recipient cell DNA는 곧 분해되게 된다. 그러나 세포 안으로 들어간 single strand DNA가 recipient cell DNA와 유사성이 없을 때에는 분해되어 DNA 복제 때 핵산원료로 사용되게 된다(Fig. 1).

3. 형질전환에 대한 유전학적 연구 및 클로닝의 문제점⁽¹⁵⁻²⁶⁾

폐염균 형질전환에 관계된 mutant의 분리 및 클로닝은 Table 1에 나타난 바와 같다. 유전학적인 연구나 클로닝에 큰 진전이 없었던 이유는 첫째, 폐염균 plasmid vector가 최근에 와서 이용 가능하게 되거나 그 특성이 밝혀졌으며 둘째, 폐염균이 혐기성균이며 대수기를 지나면 곧 자가분해되고 셋째, 폐염균 plasmid를 분리 정제하는 것이 힘들고 또 수율도 낮았기 때문이다. 이런 문제점을 타개하기 위하여 대장균 vector를 이용한 클로닝이 시도되었으나 폐염균 DNA가 대장균 vector에서는 탈락되거나 vector 자체가 원래의 크기보다도 작게되는 불안정성이 발견되었다. 그 이유는 폐염균 DNA가 대장균에서는 강한 promoter 활성을 나타내기 때문이라고 밝혀졌으며 강한 promoter 활성으로 인한 plasmid vector의 불안정성을 억제하기 위해 transcription terminator를 함유하는 vector(예를 들면 pKK 232-8이나 pJDC 9)가 *com*과 *recP*의 클로닝에 이용되었다.

4. *recP* 유전자의 클로닝⁽²⁰⁾

*recP*를 클로닝하기 위해 *recP* 유전자의 일부인 pXF 301을 radioactive probe로 사용하여 Southern blot을 하여 wild type에서 *recP* 유전자의 제한효소지도를 작성하였다(Fig. 2). pXF 301을 radioactive probe로 하여 *Dra* I, *Kpn* I, *Pst* I, *Pru* II, *Ssp* I 등의 큰 절편을 함유하는 library를 pKK 232-8이나 pJDC 9 plasmid에 만든 후 in situ colony hybridization을 하여 클로닝하려 하였으나 실패하였다(Fig. 2의 점선으로 표시된 부분). 따라서 작은 절편의 DNA를 클로닝하려 하였으며 그 결과 1.2 kb의 *Hind* III 절편을 클로닝하여 pXF 402라고 명명하였다. Insertion mutagenesis 방법을 사용하여 *recP*의 범위를 확인하였을 때 pXF 402가 *recP* 유전자의 오른쪽 끝(2.6 kb 부근의 *Taq* I과 2.7 kb 부근의 *Asu* II 자리사이)을 함유하고 있지만 *recP* 유

Table 1. Summary of genetic studies on transformation in *S. pneumoniae*.

Gene	Gene product kilodalton	Functions	Reference
<i>end</i>	-	DNA uptake	27
<i>ntn</i>	-	DNA binding	28
<i>noz</i>	-	Degradation, entry	10, 28
<i>hex</i>	-	Mismatch repair	12, 29
<i>hexA*</i>	94	Mismatch repair	21, 22
<i>hexB*</i>	83	Mismatch repair	23
<i>trt</i>	-	Competence induction	6
<i>ent-9, ent-11, ent-12, ent-13, ent-14, ent-16, ent-17, ent-22,</i>	-	DNA uptake	31
<i>rec-5, rec-6, rec-7, rec-8, rec-10, rec-18, rec-19, rec-20, rec-23,</i>	-	DNA recombination	31
<i>recP*</i>	72	DNA recombination	20
<i>com</i>	-	Competence induction	30
<i>comA*</i>	77	Competence induction	18, 19
<i>comB*</i>	49	Competence induction	18, 19

*; These genes are cloned

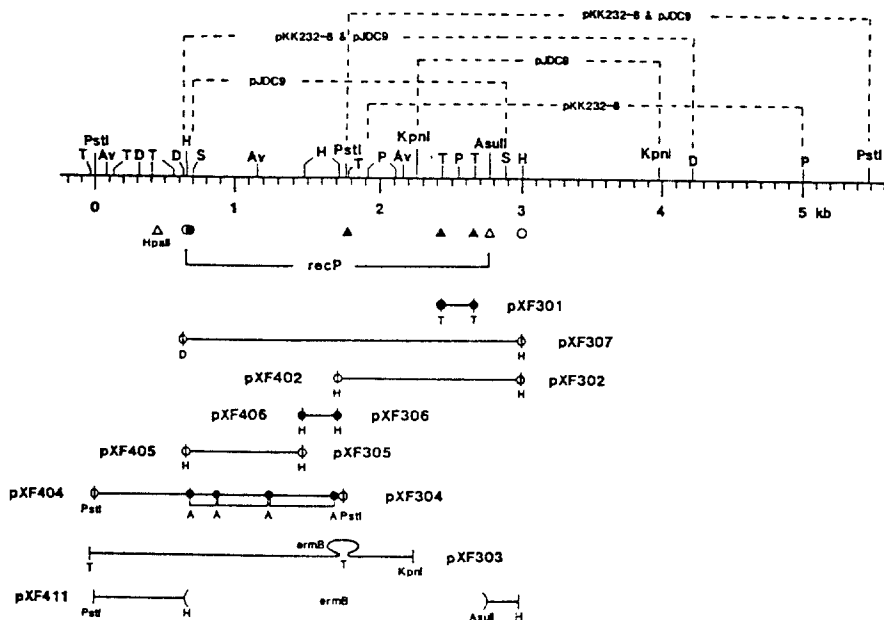


Fig. 2. Physical map of the *recP* locus (top) and several cloned fragments (bottom).

---, Pieces for which cloning in the terminator vectors pKK232-8 or pJDC9 failed. For each cloned fragment, the vector for the clone indicated at the right was pJDC9, whereas that for the one indicated at the left was pKK232-8. pXF301 was cloned in the terminator vector pJDC6. The locations and phenotypes of *ermB* insertion mutations created in vitro and characterized after transfer into the pneumococcal chromosome are indicated as follows: ▲, Rec⁻; △, Rec⁺. Also shown are the endpoints of fragments used for insertion duplication mutagenesis: ●, Rec⁻; ○, Rec⁺; three consecutive *AluI* fragments from pXF304 were mutagenic, but pXF305, containing an end just outside the *AluI* site (at bp 700), was not mutagenic. Restriction enzyme abbreviations: A, *AluI*; Av, *AvaII*; D, *DraI*; H, *HindIII*; P, *PvuII*; S, *SspI*; T, *TaqI*.

전자를 전부 함유하지는 않았다. *recP* 유전자의 왼쪽을 클로닝하기 위해 Fig. 2의 1.78 kb 위치에 있는 *Taq* I 자리에 erythromycin에 저항성을 갖고 있는 *ermB* 유전자를 삽입한 mutant로부터 염색체 DNA를 분리하여 *Kpn* I으로 완전히 자르고 *Taq* I으로 부분분해한 후 *Kpn* I과 *Cla* I으로 자른 pJDC9 vector(erythromycin에 저항성을 나타내는 유전자가 탈락된 것을 사용)와 ligation하여 대장균에 형질전환시킨 후 erythromycin에 저항성인 집락을 얻었다. 이 집락은 pXF 303을 함유하고 있었으며 이 pXF 303으로부터 pXF 304, pXF 305, pXF 306을 subcloning하였다. *recP*의 왼쪽 끝을 알기위해 insertion duplication mutagenesis 방법을 사용하여 Fig. 2의 630 bp에 있는 *Dra* I 자리가 왼쪽 끝을 포함하고 있음을 알았다. 따라서 *recP*는 630 bp의 *Dra* I에서 2770 bp의 *Asu* II 자리까지 계속되는 약 2.1 kb의 크기임을 알 수 있었다. 그러나 *recP*를 전부 함유하는 pXF 307을 왼쪽 반과 오른쪽 반을 ligation하여 만들었을 때 매우 불안정하여 pXF 307을 함유하는 대장균을 12시간 배양한 후 pXF 307의 크기를 측정하였을 때 아주 작은 구조로 변화되었다.

5. *recP*의 특성⁽²⁰⁾

*recP*의 거의 모든 부분을 탈락시키고 대신 그 자리에 erythromycin에 저항성을 나타내는 유전자로 치환시킨 *recP* deletion mutant는 염색체 DNA의 형질전환 효율이 약 1% 정도였지만 plasmid DNA의 형질전환 효율은 wild type과 같았다. 클로닝된 *recP* 절편을 *in vitro*에서 transcription-translation하여 polyacrylamide gel electrophoresis와 fluorography로 실험한 결과 *recP*가 72 kilo dalton의 단백질을 만들며 transcription은 왼쪽에서 오른쪽으로 진행됨을 알았다. 대장균 RecA 단백질을 토끼에 투여하여 얻은 anti-RecA 혈청과 Western blot을 하였을 때 RecP 단백질이 반응하지 않아 *recP*가 대장균 *recA* 유사체가 아니라고 결론지었다.

6. 결 론

지금까지 밝혀진 *recP*의 특성은 *recP*가 *in vitro*에서 72 kilodalton의 단백질을 만들며 염색체 DNA의 recombination에 관여하고 있다는 사실 뿐이며 *recP*가 DNA repair 기능을 갖고 있는지, competence specific protein 중의 하나인지, 또 *in vivo*에서도 72 kilodalton의 단백질을 만드는지는 아직도 규명되어야 할 과제이다. 또한 *recP*는 지금까지 클로닝된 폐염균유전자 중에서 가장 불안정하였으므로 폐염균 DNA를 대장균 vector에 클로닝할 때 recombinant plasmid가 불안정하게 되는 현상을 규명하기 위해서는 *recP*를 이용한 안정성연구가 바람직할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Tomasz, A. and R.D. Hotchkiss, 1964. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 480-486.
2. Chen, J.D. and D.A. Morrison, 1987. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 1959-1967.
3. Morrison, D.A. and M.F. Baker, 1979. *Nature*, **282**, 215-217.
4. Morrison, D.A., 1981. pp.39-54. In H. Posinelli and G. Mazza (ed.), *Transformation-1980*. Cotswald Press, Oxford.
5. Vijayakumar, M.N. and D.A. Morrison, 1986. *J. Bacteriol.* **165**, 689-695.
6. Lacks, S. and B. Greenberg, 1976. *J. Mol. Biol.* **101**, 255-275.
7. Lacks, S., 1979. *J. Bacteriol.* **138**, 404-409.
8. Tomasz, A., 1973. pp.81-88. In L.J. Archer (ed.), *Bacterial Transformation*. Academic Press, New York.
9. Miao, R. and W.R. Guild, 1970. *J. Bacteriol.* **101**, 361-364.
10. Lacks, S., B. Greenberg and M. Neuberger, 1975. *J. Bacteriol.* **123**, 222-232.
11. Seto, H. and A. Tonasz, 1976. *J. Bacteriol.* **126**, 1113-1118.
12. Claverys, J.P., M. Roger and A.M. Sicard,

1980. *Mol. Gen. Genet.* **178**, 191-201.
13. Morrison, D.A., B. Mannarelli and M.N. Vijayakumar, 1982. pp.136-138. In D. Schlessinger (ed.), *Microbiology-1982*. ASM, Washington, D.C.
14. Smith, H.O., D.B. Danner and R.A. Deich, 1981. *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 41-68.
15. Burdett, V., 1980. *Antimicrob. Agents Chemother.* **18**, 753-760.
16. Lacks, S.A., P. Lopez, B. Greenberg and M. Espinosa, 1986. *J. Mol. Biol.* **192**, 753-765.
17. Prats, H., B. Martin, P. Pognonec, A.C. Burger and J.P. Claverys, 1985. *Gene* **39**, 41-48.
18. Chandler, M. and D.A. Morrison, 1987. *J. Bacteriol.* **169**, 2005-2011.
19. Chandler, M. and D.A. Morrison, 1988. *J. Bacteriol.* **170**, 3136-3141.
20. Rhee, D.K. and D.A. Morrison, 1988. *J. Bacteriol.* **170**, 630-637.
21. Martin, B., H. Prats and J.P. Claverys, 1985. *Gene* **34**, 293-303.
22. Balganesh, T.S. and S.A. Lacks, 1985. *J. Bacteriol.* **162**, 979-984.
23. Prats, H., B. Martin and J.P. Claverys, 1985. *Mol. Gen. Genet.* **200**, 482-489.
24. Rhee, D.K. 1988. Ph.D. Thesis. University of Illinois at Chicago, Chicago.
25. Chen, J.D. and D.A. Morrison, 1987. *Gene.*, **55**, 179-187.
26. Chen, J.D. and D.A. Morrison, 1988. *Gene.*, **64**, 155-164.
27. Lacks, S. and M. Neuberger, 1975. *J. Bacteriol.* **124**, 1321-1329.
28. Lacks, S., B. Greenberg and M. Neuberger, 1974. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* **71**, 2305-2309.
29. Lacks, S., 1970. *J. Bacteriol.* **101**, 373-383.
30. Morrison, D.A., M.C. Trombe, M.K. Hayden, G.A. Waszak and J.D. Chen, 1984. *J. Bacteriol.* **159**, 870-876.
31. Morrison, D.A., S.A. Lacks, W.R. Guild, and J.M. Hageman, 1983. *J. Bacteriol.* **156**, 281-290.