

토양환경에서 Transformation에 의한 유전물질의 전이

이 건 형

군산대학 생물학과

현재 전세계적으로 10,000여개 이상의 실험실에서 생물공학적인 연구가 진행 중에 있고, 200여개 이상의 회사에서 생물공학을 이용한 제품이 만들어지고 있다(Saftlas, 1984). 이와 같은 제품으로 생물농약(예, 모기억제에 사용되는 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 등)이라든가 insulin, 성장호르몬, lymphotoxin 및 항암제 등의 의약품(Saftlas, 1984)과 식물품종개량제(예, 질소공정의 vector로 사용되는 *Agrobacterium tumefaciens*의 Ti Plasmid)(McDanial, 1981; Shaw, 1986) 등이 있다. 그러나 최근 미생물 생태분야에서는 이와 같이 만들어진 미생물들(genetically engineered microorganisms: GEMs)이 자연 생태계에 유출되었을 때 야기될 가능성이 있는 biohazard에 대하여 관심이 집중되고 있다(Curtiss, 1976; Sharples, 1983; Rissler, 1984). 토양환경에서 GEM이 유전물질을 전달할 수 있는 기작은 크게 conjugation, transduction, transformation 등이 알려지고 있다. 여기서는 주로 토양환경에서 transformation에 의한 유전물질의 전달과정에 대한 최근 연구동향을 간단히 기술하고자 한다.

1. 토양 환경

미생물 생태계 중의 하나인 토양환경은 일반적으로 고형물질과 수분으로 이루어진 조직적인 환경으로 이곳에서 미생물의 대사는 유용한 수분이 끊임없이 교류되는 microhabitat에 의해 제한을 받게되고 미생물의 분포도 sand나 silt 보다는 clay mineral이 함유된 microhabitat에 의해서 제한을 받게된다. Clay mineral에서는 자체적인 표면활성 때문에 수분은 중력으로부터 유지될 수

있고 이곳에 있는 수분은 clay에 존재하는 전하를 보상시킬 수 있는 이온에 의해 상당히 규칙적인 quasi-crystalline 구조를 이루고 있다. 또한 clay mineral은 토양내에서 단독으로 존재하지 않고 커다란 sand나 silt 입자에 혼합체로 존재하며 이 혼합체는 다시 유기물과 침전되어 있는 무기물에 의해 안정되어 있다. 이 때 각 microhabitat 간에는 pore space로 격리되어 진다. 또한 이러한 혼합체는 수분을 유지하며 이와 같은 수분에 의해 또 다른 혼합체간의 다리 역할을 한다. 이상을 간단히 도시하면 Fig. 1과 같다. 이 도표에서 추측할 수 있는 것은 토양환경에서 유전물질의 교환가능성은 수분이 연속적인 환경에서 보다 희박하다는 것이다. 장마가 지거나 눈이 녹거나 땅을 일구어서 수분이 포화되었을 때를 제외하고는 각각의 microhabitat는 주변의 pore space에 의해 격리되어 있고 그 사이에서 세균이나 transducing bacteriophage, transforming DNA의 이동은 수분에 의해서 다리가 놓아진 microhabitat로 제한을 받게된다. Pore space가 포화되었을 때도 microhabitat간의 이동은 제한을 받게되는데 이것은 각 혼합체 주위에서 수분의 표면장력이 너무 커서 세균의 수동적 이동이나 편모를 갖는 세균의 능동적 이동조차도 어렵게 하기 때문이다. 하지만 filamentous fungi는 microhabitat간의 pore space에 다리 역할을 할 수 있어 pore space가 수분에 의해 포화되지 않았을 때도 mycelium에 의해 microhabitat간을 연결시켜 준다. 하지만 이상에서 서술된 토양환경은 수계환경의 퇴적토에서는 적용하기 힘들다. 퇴적토에서도 clay mineral이 커다란 입자의 일부로 존재하지만 토양환경에서와 같이 엄밀한 의미에서의 microhabitat는 존재하지 않는다. 더욱이 퇴적토에서는

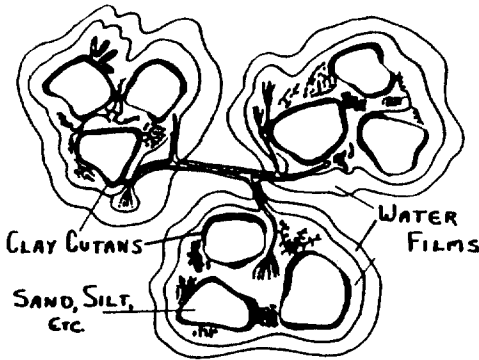


Fig. 1. Schematic representation of microhabitats in soil. The space between each microhabitat is the gas-filled pore space. Note the fungal hyphae growing through the pore space from one microhabitat to another; the hyphae are surrounded by water, which may contain bacteria cells and bacteriophages. (Not to scale). (Courtesy of G. Stotzky, New York University)

세균들은 clay 보다는 sand 나 silt 에 주로 군집을 형성하고 음이온화 되어 있는 clay 간의 전기적 반발력도 극복할 필요가 없게 된다.

2. Transformation

Transformation 은 많은 세균 사이에서 일어나고 있으며 세균간의 유전자 교환으로는 제일 먼저 알려진 기작이다. 그러나 "naked" DNA 는 미생물에 의해 분해되기 쉽기 때문에 토양이나 그 외의 자연생태계에서 세균간의 유전자 교환에 대한 보고는 거의 이루어지지 않았다(Stewart and Carlson, 1986; Stotzky and Babich, 1986). 멸균된 토양에서 *Bacillus subtilis* 의 transformation 에 대한 연구는 Graham 과 Istock (1978, 1979)에 의해 이루어진 적이 있다. 이 때 사용된 *B. subtilis* 는 각각 3개의 서로 다른 marker 를 갖는 균주로 이들은 멸균된 토양에 접종하여 8일 후 측정된 결과 무작위로 선택된 균체 중 79%가 두 균주의 특성을 모두 갖는 phenotype 을 나타냈다. 하지만 parental strain 은 배양한지 1주일 뒤에도 검출되지 않았다. 관찰된 유전물질 교환은 transformation 에 의해 이루어진 것으로 추측되는데 이는 *B. subtilis* 는 액체배지에서 transforming DNA 를 방출하는 것으로 알려져 있고, 또

이때 사용된 균주에서는 plasmid 나 transducing phage 가 검출되지 않았기 때문이다. 토양에서 얻은 triple transformant 의 빈도는 비교적 낮았으며 8일 후에는 2~4배가 감소되었다. 하지만 각각의 균주를 다른 균주에서 추출한 DNA 와 함께 접종하였을 때 transformation 의 빈도는 17% 증가하였다. 토양에서 형성된 triple transformant 의 수는 DNA 가 포화된 액체배지에서 형성된 transformant 에 비해 10~100배 정도 낮게 나타났다. 한편 토양에 bovine pancreatic DNase 나 heterologous calf thymus DNA 를 첨가하여도 triple transformant 의 수에는 영향이 없었는데 이는 DNase 가 토양입자에 부착되어 불활성화되었든가 방출된 DNA 가 단백질이나 세균막과 복합체를 형성하여 DNase 에 분해될 수 없게 되었기 때문으로 추측하였다.

Aardema 등(1983)은 DNase 는 *B. subtilis* 의 DNA 가 sea sand 에 부착되었을 때 보다 "free" DNA 상태일 때 transformation 을 더 감소시킬 수 있다는 것을 알았다. Lorenz 등(1981)도 역시 sea sand 에 부착된 DNA 는 DNase 에 의해 분해되는 것으로부터 보호될 수 있다고 했다. 이와 같은 보호기작은 해양퇴적토에서 *B. subtilis* 의 transformation 의 빈도가 더 높게 나타나는 것을 설명할 수 있다. 하지만 DNase 가 없을 때 부착된 DNA 의 transformation 빈도는 "free" DNA 의 60% 밖에 안되었다. *B. subtilis* 가 퇴적토에서 유출된 DNA 에 의해서 transformation 되었는지 부착된 DNA 에 의해서 이루어졌는지는 조사되지 않았다(Aardema et al., 1983). 최근 Lee 와 Stotzky(1989, 미발표)는 자연상태의 토양(12%의 montmorillonite 가 첨가된 토양)에서 Chloramphenicol, Kanamycin, Erythromycin 내성을 갖는 plasmid 를 각각 갖는 *B. subtilis* 의 transformation 에 대하여 연구하였다(Table 1). 이 때 Kanamycin 내성유전자의 transformation 빈도는 $7.0 \times 10^{-7} \sim 1.9 \times 10^{-6}$ 이었고, Erythromycin 내성유전자는 $3.1 \times 10^{-6} \sim 8.2 \times 10^{-6}$ 의 빈도를 나타냈다. 하지만 Chloramphenicol 내성 transformant 는 실험기간 중 검출되지 않았다. 자연상태의 토양에서 Kanamycin 이나 Erythromycin 에 내성을 갖는

Table 1. Transformation frequency of plasmid-borne antibiotic resistance in nonsterile soil.

Antibiotic resistance	Days			
	1	2	4	7
Chloramphenicol ¹	-	-	-	-
Chloramphenicol ²	-	-	-	-
Kanamycin	7.0×10^{-7}	$1.9 \pm 0.4 \times 10^{-6}$	7.0×10^{-7}	-
Erythromycin	$3.4 \pm 0.4 \times 10^{-6}$	$8.2 \pm 2.2 \times 10^{-6}$	$3.1 \pm 0.4 \times 10^{-6}$	-

¹transformants of BD54 (recipient) and BD364 (chl^r, donor).

²transformants of BD170 (recipient) and BD1512 (chl^r, donor).

plasmid의 transformation은 멸균된 토양에서의 빈도와 유사한 것으로 나타났다. 하지만 자연 상태의 토양에서 transformant의 검출은 멸균된 토양에서 보다 어려웠는데 이는 토양에 존재하는 미생물 중 많은 종이 항생제에 대하여 내성을 갖고 있었기 때문이다.

3. 결 론

GEM이 생태계에 고의적으로나 또는 우연히 빠져나왔을 때 생태계의 homeostasis에 미칠 수 있는 역효과는 아직까지 알려지지 않았다. 하지만 생태계에서도 실험실에서와 같이 conjugation, transformation, transduction 등에 의해 세포간에 유전자가 전달될 수 있고 유전자간의 재조합이 일어나 새로운 DNA가 생길 수 있다. 현재까지 알려진 자료로는 GEM이 생태계에 미치는 영향에 대하여 정확히 평가할 수 없다. 따라서 이 분야에 대한 구체적인 연구가 절실히 요구되며 생물공학적 방법으로 제품을 만드는 회사들도 제품을 생산하기 이전에 GEM의 생태계에서의 생존과 성장 조건 등을 반드시 확립시켜야 하며, 또한 생태계에 배출되었을 때 미칠 수 있는 위해여부에 대한 영향평가를 반드시 수행하여야 한다.

참고문헌

- Aardema, B. W., Lorenz, M. G. and Krumbein, W. E., 1983. Protection of sediment adsorbed transforming DNA against enzymatic inactivation, *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 417-420.
- Curtiss, R., III. 1976. Genetic manipulation of microorganisms: potential benefits and biohazards, *Ann. Rev. Microbiol.* **30**: 507-533.
- Graham, J.B. and Istock, C.A. 1978. Genetic exchange in *Bacillus subtilis* in soil, *Mol. Gen. Genet.* **166**: 287-290.
- Graham, J.B. and Istock C.A. 1979. Gene exchange and natural selection cause *Bacillus subtilis* to evolve in soil culture, *Science* **204**: 637-639.
- Lorenz, M.G., Aardema, B.W. and Krumbein, W.E. 1981. Interaction of marine sediment with DNA and DNA availability to nucleases, *Mar. Biol.* **64**: 225-230.
- McDaniel, R.G. 1981. *In Recombinant DNA* (A.G. Walton, ed.) Elsevier, Amsterdam. pp.245-257.
- Rissler, J.F. 1984. *Recomb. DNA tech. Bull.* **7**: 20-30.
- Sharples, F.E. 1983. *Recomb. DNA tech. Bull.* **6**: 43-56.
- Shaw, P.D. 1986. *In Plant-Microbe Interaction* (E. Nester and T. Kosuge, eds.) McMillan, New York.
- Stewart, G.J. and Carlson, C.A. 1986. The biology of natural transformation, *Ann. Rev. Microbiol.* **40**: 211-235.
- Stotzky, G. and Babich, H. 1986. Survival of, and genetic transfer by, genetically engineered bacteria in natural environments, *Adv. Appl. Microbiol.* **31**: 93-138.

1. Aardema, B. W., Lorenz, M. G. and Krumbein, W. E., 1983. Protection of sediment adsorbed transforming DNA against enzymatic inactivation, *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 417-420.