

## *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*의 독소생성에 미치는 Phage의 영향

전홍기 · 유진삼 · 성영림 · 백형석\*  
부산대학교 자연과학대학 미생물학과

### Influence of Phage on Production of Tabtoxin by *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

Jun, Hong-Ki, Jin-Sam You, Yeong-Lim Seong and Hyung-Suk Baik\*

Department of Microbiology, college of Natural sciences,  
Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

**Abstract** — *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*(Pa45)  $Tox^-$  cells were infected with phage Ps90 strain isolated from the natural source, and the Ps90 lysogenized bacterial cells were then obtained. The lysogenized cells produced tabtoxin and the phage induction occurred when the cells treated with mitomycin C. The Southern hybridization analysis of the four *Eco*RI-treated plasmid fragments and the *Eco*RI-digested genomic DNA of  $Tox^+$  and  $Tox^-$  strains using phage DNA as a probe showed that only those DNA fragment of  $Tox^+$  strain were related to the Ps90 phage DNA. Based on these results, the tabtoxin producing DNA fragments of the bacteria are presumed to have originated from the same phage DNA, and to be responsible for the pathogenicity of the bacterial strains.

*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*와 그 유연종들은 세포외 독소인 tabtoxin을 생성하여 대두, 완두콩, 귀리, 옥수수, 담배와 같은 여러가지 작물에 심각한 야화병을 야기시킴으로써(18, 24, 26) 작물수확에 많은 피해를 준다. Tabtoxin의 구조 및 작용기작은(10, 11, 25, 29) 잘 알려져 있으나 병원성을 나타내는 독소의 유전적 성질에 대한 연구는 아직 미흡하다. Piwowarski와 Shaw는 식물병을 일으키는 *Pseudomonas*의 plasmid의 특성을 연구했고(20), Turner와 Taha(27)는 독소생산과 병원성의 상호관계를 연구하였으며 Salch와 Shaw는 *P. syringae* pv. *tabaci*의 병원성 유전인자의 분리 및 특성에 대해 연구한 바가 있다(21).

병원성이란 복합적인 특성이며, 주된 관심사는 *in vivo*에서의 미생물의 거동에 있으며(22) 병원성에 대한 필요조건은 숙주세포 내에서 증식하고 숙주의 방어기구를 교란시켜 숙주에 손상을 입히는 능력이다. 병원성에 관한 연구의 목적은 이들 필요조건이 구체적으로 무엇인지 알아내어 그들의 화학구조와 생물학적 기능간의 관련성을 알아보는 것이며, 밝혀진 바에 의하면 *in vivo*에서의 환경은 독성결정 인자의

생성과 미생물 및 바이러스의 성장을 변화시키므로써 세균의 병원성에 영향을 끼친다. 최근의 연구로는 세균의 독성인자를 coding하고 있는 operon은 통합 조절을 받으며, 감염주기 동안의 다양한 환경적 신호에 반응가능한 조절기작을 가지고 있다고 한다(15). 또한, 세균의 병원성 조절에 관여하는 환경적 신호에 대해 균마다 반응하는 인자가 다른데 *Corynebacterium diphtheria*의 경우 철 농도에 따라 lysogen 상태에서 Corynephage  $\beta$  gene의 독소생산발현이 달라지고(22) 사람의 병원균인 *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*의 경우는 온도와 calcium 농도에 따라, *Escherichia coli*와 *Vibrio cholera*는 온도, pH, 삼투압 및 amino acid의 변화에 따라(19) 독성이 조절되며 세균에서 병원성 발현과정에 관여하는 환경적 신호 중에서 주된 것은 온도이다(15). *P. syringae* pv. *tabaci*도 온도에 따라 phage의 감염상태가 달라지며, 이것이 병원성 유발에 큰 영향을 끼침에도 불구하고 연구된 예가 아직 없다. 잘 알려진 것처럼 독성인자의 생성유전정보를 수록하고 있는 plasmid, bacteriophage, transposon과 같은 accessory genetic element들은 숙주의 조절계와 상관이 있다(12). 또한 *Pseudomonas* phage D3112는 Mu에 의해 사용되는 transposition mechanism을 사용한다

**Key words:** *Pseudomonas syringae*, lysogenization, pathogenicity

\*Corresponding author

는 일부 증거가 있다. 즉 용원화에 의해 많은 숙주 염색체 부위에 바이러스의 유전자가 삽입된다(2). 이로 말미암아 숙주는 바이러스의 유전적 성질을 발현할 것이다.

*P. syringae* pv. *tabaci*에서 온도에 따라 phage life cycle이 조절되며, 또 lysogen이 될 때에는 phage gene의 영향으로 독소생산이 더 증가된다고 가정할 수 있다. 본 연구에서는 자연계에서 분리한 Ps90 바이러스의 감염이 숙주세포의 병원성 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보고 숙주와 바이러스의 유전적 연관성에 대해 알아 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 phage

본 실험에서 사용한 균주는 Wisconsin University의 Richard D. Durbin으로부터 제공받은 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* Tox<sup>+</sup>(pt113) 균주와 Tox<sup>-</sup>(pa 45) 균주이며 King'B broth와 NBYE broth(Nutrient powder 0.8%, yeast extract 0.5%)에 진탕배양하여 사용하였다. 또한 미생물학적 독성검사에서 indicator strain으로 사용한 균주는 *Agrobacterium tumefaciens* IAM 1526이었으며 이때 사용되는 최소배지는 minimal A agar 배지(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.5 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g, sodium citrate·2H<sub>2</sub>O 0.5 g, MgSO<sub>4</sub> 0.2 g, glucose 2 g, agar 15 g/1000 ml)였다. *P. syringae* pv. *tabaci*를 숙주로 하여 토양으로부터 분리한 phage는 Ps90이라고 명명하여 사용하였다(9).

### 미생물학적 독성검사

Test strain을 NBYE 액체배지에서 하룻밤 진탕배양한 후 이 균을 minimal A agar medium에 20  $\mu$ l씩 spotting하여 20°C에서 24~48시간 배양시켰다. 균 성장이 확인되면 전배양된 *Agrobacterium tumefaciens* IAM 1526 균현탁액 2 ml과 2% molten agar 동량을 섞어 overlay한 다음 30°C에서 하룻밤 배양 후 tabtoxin에 의한 저지환을 관찰하였다.

### Phage 정제와 phage DNA 분리

Ausubel(1)과 Nordeen(16)이 사용한 plate lysate 법에 의해 phage lysate를 얻어 PEG(polyethylene glycol 6000)로 침전시킨 뒤 CsCl 밀도구배 초원심분리하여 분리 정제하였다. 이와같은 방법으로 얻은 phage 농축액은 Nordeen(16) 등의 방법에 의해서 phage DNA를 정제하였다. 먼저 phage액에 최종 농도가 20 mM인 EDTA와 0.3% NaCl에 녹인 0.3%

SDS를 처리하여 얻은 상등액에 buffered phenol, buffered phenol/chloroform을 처리, 단백질을 제거하고 2배 부피의 absolute ethanol을 넣어 -70°C에서 15분간 방치하여 DNA를 침전시켰다.

### Lysogen의 형성과 prophage induction

Bacteriophage Ps90을 Tox<sup>+</sup> 균주에 감염시켜 증폭시킨 후 Tox<sup>-</sup> 균주에 감염시켜 서로 분리된 뚜렷한 turbid plaque를 형성시켰다(23). Bacteriophage Ps90 DNA를 probe로 하여 plaque hybridization을 실시하여 lysogen cell을 확인하였다. 형성된 turbid plaque에서 lysogen cell을 분리하여 미생물학적 독성검사를 하였으며 UV를 처리하여 phage를 induction시켰다(6). Tox<sup>+</sup>와 Tox<sup>-</sup> 균주의 phage induction은 Uchimi(28) 등에 의한 mitomycin C를 처리하는 방법을 이용하였다.

### Plasmid와 genomic DNA의 분리

*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*의 Tox<sup>+</sup>와 Tox<sup>-</sup> 균주 각각은 Birnboim과 Doly(4)의 방법에 의해 배양액 500 ml로부터 얻은 cleared lysate를 ethidium bromide/cesium chloride를 포함하는 밀도구배 초원심분리에 의해 plasmid를 정제하였다. 또한 Coleman(6) 등의 방법으로 대수증식기의 균배양액 50 ml로부터 얻은 각 균주의 total DNA는 CsCl 밀도구배 초원심분리에 의해 정제하였다.

### 전자 현미경적 관찰

200메시의 구리 그리드에 콜로디온 지지막을 입히고 진공증착기(JEOL JEE 4 Vacuum Evaporator, Japan)로 탄소를 증착한 후 농축정제된 phage액 3  $\mu$ l를 묻혀서 2분간 유지시킨 후 2% uranyl acetate 용액으로 30~60초간 염색을 하고 3회 수세하여 건조시킨 후 전자현미경(JEOL 100S Electron microscope, Japan) 80 kV 하에서 형태를 관찰하고 촬영을 하였다(5).

### Phage의 구조단백질 분석

Phage의 구조단백질의 분석은 Laemmli(13)의 방법에 의하여 하였으며 이때 표준 분자량 표시는 SIGMA사 제품인  $\alpha$ -lactalbumin(MW 14,200), bovine albumin(66,000) 등으로 전기영동하여 비교측정하였고, 염색은 Oakley(17) 등의 방법을 이용하였다.

### Southern hybridization and general procedures

Probe는 photobiotin으로 labelling하여 만들었으며, 다른 일반적인 DNA 조작은 Maniatis의 방법에 따라

하였다(14).

**결과 및 고찰**

**Phage DNA의 유전적 특성의 검토**

Phage DNA를 small scale로 분리한 뒤  $\lambda$ /HindIII를 size marker로 하여 전기영동한 결과 약 30 kb의 분자크기를 가지는 것으로 추정할 수 있었다.

**Tox<sup>-</sup> Ps90 lysogen 균주의 성질 검토**

Ps90 phage를 Tox<sup>-</sup>에 감염시켜 30°C에서 12~16시간 배양하여 turbid plaque를 형성시키고 turbid plaque를 toothpick하여 NBYE 액체배지에 배양한 후 단일 콜로니를 분리하여 미생물학적 검색방법에 의하여 검토한 결과 Tox<sup>+</sup> 균과 동일한 저지환을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 이것으로 보아 Ps90 phage가 Tox<sup>-</sup>에 감염되어 용원 상태에 있을 때 바이러스 유전자의 발현으로 말미암아 독성이 증가되었다고 추측할 수 있었다. 또한 용원화 상태가 확실한 지 알아보기 위해 UV를 처리하여 용균화를 유도하였을 때 바이러스가 방출됨을 전자현미경을 통해 알 수 있었다(Fig. 2).

**Tox<sup>+</sup>, Tox<sup>-</sup> 균주의 plasmid와 phage DNA간의 유전적 연관성**

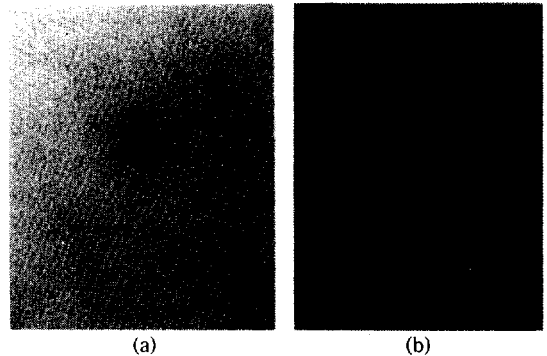
Tox<sup>+</sup> 균의 플라스미드는 보통의 NBYE 배지에서 30°C 진탕배양하여 분리할 수 없었고 tabtoxin이 생성되는 환경, 즉 minimal A 배지에서 20°C 진탕배양하였을 때 분리되었다. 이것으로 보아 tabtoxin을 만들어 내는 효소는 유도효소로 추정할 수 있었으며 독소생성환경에서 그 유전자가 증폭되었다. 또한 Tox<sup>+</sup>와 Tox<sup>-</sup> 균주의 플라스미드의 restriction pat-

tern이 상당히 다른 것으로 보아 이들은 아주 다른 유전적 구성요소로 되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 3).

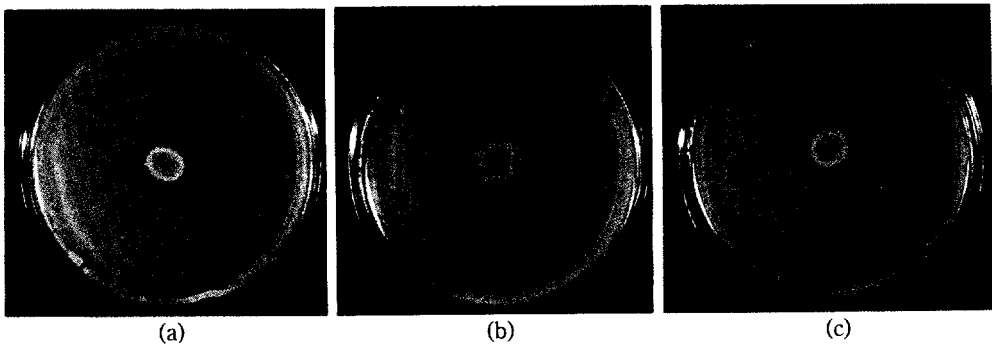
Phage DNA를 photobiotin으로 labelling한 다음, EcoRI을 처리한 각각의 플라스미드와 southern hybridization을 실시한 결과 Tox<sup>+</sup> 유래의 플라스미드만이 phage DNA와 상동성이 있는 것으로 나타났다.

**Phage DNA과 Tox<sup>+</sup>, Tox<sup>-</sup> genomic DNA의 유전적 상관관계**

Tox<sup>+</sup>와 Tox<sup>-</sup> 균주의 genomic DNA를 분리하여 EcoRI을 처리한 후 agarose gel 상에 전개시키고 photobiotin으로 label된 phage DNA와 southern hybridization시킨 결과 Tox<sup>+</sup> 균주에서만 연관성을 나타내었다(Fig. 4). 또한 각 균주를 mitomycin C에 의한 phage induction을 실시해 본 결과 Tox<sup>+</sup> 균주에서는 mitomycin C에 의해 바이러스가 유도되는 것으로 나타났다(Fig. 5). 또한 구조단백질 분석을 해 본 결과 방출된 phage는 Ps90과는 다른 것 같았다(Fig. 6).



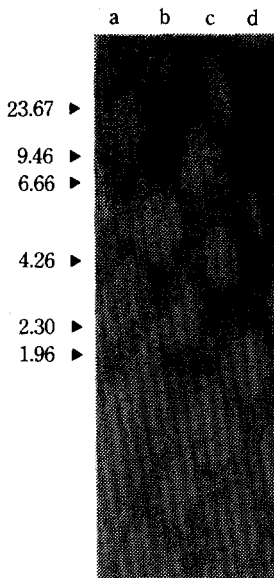
**Fig. 2. Electron microscopic morphology of phage(Magnification, +650,000).**  
(a): Induction phage of Tox<sup>-</sup> lysogen, (b): Ps90



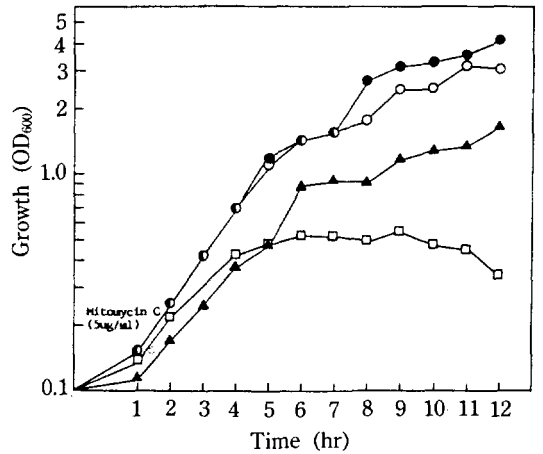
**Fig. 1. Microbiological assay of tabtoxin of *P. syringae* pv. *tabaci* by *Agrobacterium tumefaciens* in minimal A agar medium.**  
(a): Tox<sup>+</sup>, (b): Tox<sup>-</sup>, (c): Tox<sup>-</sup> lysogen



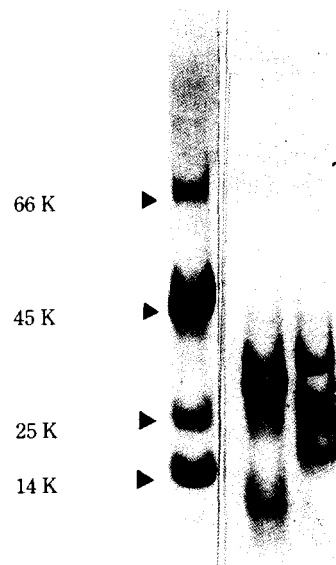
**Fig. 3. Restriction pattern for cryptic plasmid DNA isolated from *Tox*<sup>+</sup> and *Tox*<sup>-</sup> strains.**  
 Lane a: *Tox*<sup>-</sup> plasmid digested with *Hind*III, Lane b: *Tox*<sup>+</sup> plasmid digested with *Hind*III, Lane c: *Tox*<sup>-</sup> plasmid digested with *Eco*RI, Lane d: *Tox*<sup>+</sup> plasmid digested with *Eco*RI, Lane e: λDNA digested with *Hind*III



**Fig. 4. Southern hybridization between photobiotin labelled phage DNA and *Eco*RI digested *Tox*<sup>+</sup> and *Tox*<sup>-</sup> genomic DNA.**  
 Lane a: *Eco*RI digested *Tox*<sup>-</sup> genomic DNA, Lane b: *Eco*RI digested *Tox*<sup>+</sup> genomic DNA, Lane c: λDNA digested with *Hind*III, Lane d: *Eco*RI digested phage DNA



**Fig. 5. Effect of Mitomycin C on the growth of *Tox*<sup>+</sup> and *Tox*<sup>-</sup> strains.**  
 ○ *Tox*<sup>+</sup> control, □ *Tox*<sup>+</sup> in the presence of mitomycin C, ● *Tox*<sup>-</sup> control, ▲ *Tox*<sup>-</sup> in the presence of mitomycin C



**Fig. 6. Pattern of structure proteins of two phages separated by SDS-PAGE.**  
 Lane a: Molecular weight markers, Lane b: Induction phage of *Tox*<sup>+</sup> strain, Lane c: Ps90. Molecular weight standards are indicated by Bovine albumin 66 KD, Obalbumin 45 KD, α-Chymotrypsinogen 25 KD, and Lysozyme 14KD

이러한 결과로 보아 phage DNA가 *Tox*<sup>+</sup> genomic DNA 혹은 *Tox*<sup>+</sup> plasmid DNA에 끼어 들어 가 있으면서 독소의 생성에 영향을 미치는 것으로 추측이 되었다.

*Agrobacterium tumefaciens*(3)와 *A. rhizogenes*(7)의 발암성과 *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*의 병원성을 발현이 각 세균 고유의 플라스미에 기인한다는 보고가 있으며 *P. syringae* pv. *phaseolicola*에 있는 150 kb의 pMC7105 또한 세균 chromosome에 삽입 가능한 것으로 알려져 있는데(8), 본 실험의 결과도 plasmid에 phage DNA 연관성이 있는 부분이 chromosome에 나타나는 것을 보아 이 단편 역시 가동성이 있어서 integration이나 excision을 할 가능성을 시사한다.

## 요 약

자연계에서 분리한 bacteriophage Ps90을  $Tox^-$  균주인 *Pseudomonas syringae* Pa45에 감염시켜 용원화 하였다.  $Tox^-$  Ps90 lysogen은 tabtoxin 생성능을 나타내었으며 UV나 mitomycin C로 induction시켰을 때 phage를 방출하였다. 또한 phage DNA를 probe로 하여  $Tox^-$ 와  $Tox^+$  plasmid DNA 및 genomic DNA를 southern blotting시킨 결과  $Tox^+$  균주의 plasmid와 genomic DNA에서만 상동성을 나타내었으며  $Tox^+$  균주에서만 phage가 induction되는 것으로 보아 Toxin 생성관련 DNA 단편이 DNA임을 시사해 주며, phage DNA가 병원성 유발과 깊은 관계가 있음을 추론할 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 1991년도 SRC 지원에 의한 것이며 이에 감사를 드립니다.

## 참고문헌

1. Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Strul. 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc.
2. Berg, D.E. and Martha M. Howe. 1989. Mobile DNA. *ASM*. 44-45.
3. Bevan, M.W. and Chilton, M.D. 1982. T-DNA of agrobacterium Ti and Ri plasmids. *Ann. Rev. Genet.* **16**: 357-384.
4. Birnboim, H.C. and I. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513.
5. Bradley, D.E. 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* **31**: 230.
6. Coleman, D.C., Arbuthnott, J.P., Pomeroy, H.M. and Birkbeck, T.H. 1986. Cloning and expression in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* of beta-lysin determinant from *Staphylococcus aureus*: evidence that bacteriophage conversion of beta-lysin activity is caused by insertional inactivation of the beta-lysin determinant. *Microbial Pathogenesis* **1**: 549-564.
7. Comai, L. and Kosuge T. 1980. Involvement of plasmid deoxyribonucleic acid in indolacetic acid synthesis in *Pseudomonas savastanoi*. *J. Bacteriol.* **143**: 950-957.
8. Curiale, M.S. and Mills D. 1980. Integration and partial excision of a cryptic plasmid in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Bacteriol.* **152**: 797-802.
9. Jun, H.K., T.I. Kim, J.S. You, and H.S. Baik. 1994. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* Phage. *Kor. J. Microbiol.* **32**: 1, 60-64.
10. Kinght, T.J., R.D. Durbin, and P.J. 1986. Role of glutamine synthetase adenylation in the self-protection of *Pseudomonas syringae* subsp. *tabaci* from its toxin, tabtoxin- $\beta$ -lactam. *J. Bacteriol.* **166**: 224-229.
11. Kinght, T.J., R.D. Durbin, and P.J. 1987. Langston-Unkefer, selfprotection of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* from its toxin, tabtoxin- $\beta$ -lactam. *J. Bacteriol.* **169**: 1954-1959.
12. Knapp, S. and J.J. Mekalanos. 1988. Two trans-acting regulatory genes(*vir* and *mod*) control antigenic modulation in *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* **170**: 5059.
13. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680.
14. Maniatis, T., E. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Cold spring Harbor, New York.
15. Miller, J.F., John J. Mekalanos, and Stanley Falkow. 1989. Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. *Science* **243**: 916-922.
16. Nordeen, R.D. and T.C. Currier. 1983. Isolation and partial characterization of bacteriophages of the phytopathogen *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 90-98.
17. Oakley, B.R., Kirsh D.R., and Morris N.R. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain method for detecting proteins in polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* **105**: 361.
18. Obukowicz, M. and P.D. Shaw. 1985. Construction of Tn3-containing plasmids from plant pathogenic *Pseudomonads* and an examination of their biological properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 468-473.
19. Perry, R.D., P.A. Harmon, W.S. Bowmer, and S.C.

- Straley. 1986. *Infect. Immune*. **54**: 428.
20. Piwowarski, J.M. and P.D. Shaw. 1982. Characterization of plasmids from plant pathogenic *Pseudomonas*. *Plasmid* **7**: 85-94.
21. Salch, Y.P. and P.D. Shaw. 1988. Isolation and characterization of pathogenicity genes of *Pseudomonas* genes of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *J. Bacteriol.* **170**: 2584-2591.
22. Smith, Harry. 1990. Pathogenicity and the microbe *in vivo*. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 383.
23. Swamstrom and Adams. 1951. Agar layer method for production of high titre phage stocks. *Proceedings of the Society for Experimental biology and Medicine* **78**: 372-375.
24. Taylor, P.A. and R.D. Durbin. 1972. The production and properties of chlorosis-inducing toxins from a Pseudomonad attacking timothy. *Physiol. Plant Pathol.* **3**: 9-17.
25. Thomas, M.D., P.J. Langston-Unkefer, T.F. Uch-  
ytil, and R.D. Durbin. 1983. Inhibition of glutamine synthetase from pea by tabtoxinine- $\beta$ -lactam. *Plant physiol.* **71**: 912-915.
26. Thomas, M.D. and R.D. Durbin. 1985. Glutamine synthetase from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*; properties and inhibition by tabtoxinine- $\beta$ -lactam. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1061-1067.
27. Turner, T.J. and R.R. Taha. 1984. Contribution of tabtoxin to the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Physiol. Plant Pathol.* **25**: 35-69.
28. Uchiumi and Toshiki. 1989. Phage induction of lysogenic *Rhizobium leguminosarum* biovar. *trifolii* in both the free-living and the symbiotic form. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 3133-3141.
29. Unkefer, C.T., R.E. London, R.D. Durbin, T.F. Uchytill, and P.J. Langston-Undefer. 1987. The biosynthesis of tabtoxinine- $\beta$ -lactam. *J. Biol. Chem.* **262**: 4994-4999.

(Received March 31, 1994)