

***Staphylococcus aureus* DH1에서 분리된 R-plasmid pSBK203의 복제조절 유전자 *cop*의 Cloning, 염기서열 결정 및 상동성 분석**

박승문 · 변우현*

강원대학교 자연과학대학 미생물학과

Staphylococcus aureus DH1에서 분리된 R-plasmid pSBK203상의 복제개시 인자인 *rep* 유전자 산물의 발현이 어떻게 조절되는가를 밝히기 위해 관련 부위를 확인하고 cloning한 후 그 염기서열을 결정하였으며 이를 같은 계열에 속하는 pT181족 plasmid들의 서열과 그 상동성을 비교 분석하였다. 복제 조절 관련 부위에 염기 삽입 및 염기 결손을 유도함으로써 얻어진 변이체들의 copy수를 측정하여 그 복제 조절 기능에 초래된 변화를 확인하였다.

KEY WORDS □ *Staphylococcus aureus*, R-plasmid, replication control, *cop*

Staphylococcus aureus 유래의 plasmid들중 비교적 크기가 작으면서 여러개의 copy로 존재하는 plasmid에 관한 연구들이 광범하게 진행되고 있으며 (20) 그 중에서도 숙주세포 내에서 각 plasmid가 몇개의 분자로 존재하는가를 결정하는 복제조절 기구에 관한 연구는 각 plasmid에 의한 항생물질 저항성 인자의 전파, 확산과 깊이 연관된 과제들이다.

*S. aureus*로부터 유래된 plasmid들의 복제개시 유전자들로서 지금까지 밝혀진 것들은 pLSI의 *repB* (8), pC194의 *repH* (1), pUB110의 *repU* (13), pT181의 *repC* (10), pC221의 *repD* (19) 및 pE194의 *repF* (9) 등이며 염기서열상 서로 간에 상당한 상동성을 갖고 있다. 이 유전자들의 산물인 Rep 단백질 즉 복제개시 단백질은 각 해당 plasmid의 복제개시 부위인 *ori*를 인식, plasmid DNA 복제개시를 주관하기 때문에 이 복제개시 단백질의 발현 정도에 따라 각 plasmid DNA의 세포내 존재 개수가 좌우되는 것으로 알려져 있다. 이 복제개시 단백질의 발현 정도를 조절함으로써 궁극적으로 세포내 plasmid DNA 분자수를 일정한 개수로 유지하는데 관여하는 것이 *cop* 유전자 산물인 것으로 알려져 있다.

지금까지 알려져 있는 plasmid의 복제 조절기구는 첫째 initiator 단백질의 oligonucleotide interon 결합에 의한 방법 (interon-binding system)과 둘째 plasmid가 만들어낸 복제 저해분자의 target 부위에 대한 결합에 의한 방법 (inhibitor-target system)의 두 가지가 있으며 이중 후자는 다시 inhibitor가 복제 과정을 직접 저해하는 직접조절 (direct regulation)과 inhibitor가 복제 과정에 참여하는 물질의 합성을 저해하는 간접조절 (indirect regulation)의 두 방법으로 나누고 있다 (8, 14, 23).

*S. aureus*에서 분리된 R-plasmid pSBK203은 chloramphenicol 저항성 인자인 chloramphenicol acetyltransferase (CAT)인자를 가지고 있는 3.7 Kb 크기의 plasmid로서 같은 *S. aureus* 유래의 plasmid들 중 pT181족 plasmid들과 유전자적 구성이 비슷한 것으로 밝혀지고 있을 뿐만 아니라 이 plasmid의 *rep* 유전자 염기서열 및 이로부터 예측된 아미노산 서열도 pT181족 plasmid들의 것과 높은 상동성을 갖는 것으로 밝혀진 바 있다 (17). pT181족 plasmid의 복제 조절 기작에 관한 연구는 *rep*의 mRNA의 leader 부위에서 역방향으로 전사된 counter transcript가 mRNA와 결합하여 그 해독과정을 조절하는 것으로 짐작되고 있으며 이에 대한 실험적 증거가 발표되고 있다 (2, 5, 6). Antisense RNA에 의한 coupling을 통해 직접적으로 Rep 단백질의 발현조절을 조절함으로써 plasmid의 복제를 조절하는 기구는 대장균에 유래된 R1과 *Streptococcus agalactiae*에서 유래된 pIP501에서 좀더 구체적으로 밝혀져 있다 (3, 16).

본 연구는 *S. aureus*에서 분리된 R-plasmid pSBK203의 복제개시 유전자인 *rep* 유전자 염기서열 결정에 이어 수행된 연구로서 Rep 발현을 조절하는 유전자들의 확인 및 그 조절 기작을 밝히고자 수행되었다.

실험재료 및 방법

균주 및 plasmid

본 실험에 사용된 균주와 plasmid는 Table 1에 나타난 바와 같다 (Table 1).

제한효소 및 시약

복제 조절 관련 부위의 cloning을 위한 재조합

Table 1. Bacterial strains and plasmids.

Strains and Plasmids	Descriptions
<i>S. aureus</i> DH1	Original host of pSBK203 (4)
<i>B. subtilis</i> BD170	<i>thr5 trpC2</i> . Transformable host for plasmids (7)
<i>E. coli</i> HB101	F ⁻ <i>recA13 ara14 proA2 galK2</i> . Transformable host for plasmids
MV1190	F' <i>thi supE44 proAB lac^PZΔM15 Δ (srl-rec)306::Tn10</i> . Transformable host for plasmids
Plasmids	
pSBK203	Original plasmid for this study (4)
pHW33	<i>E. coli-B. subtilis</i> shuttle vector (12)
pBK424	<i>E. coli-B. subtilis</i> shuttle vector (12)
pSR203	<i>Hind</i> III-B fragment of pSBK203 deleted plasmid (17)
pSR18	pSBK203::pUC119 recombinant plasmid (17)
pSR28	pSBK203::pUC119 recombinant plasmid (17)
pSR204	Low-copy mutant pSBK203; 3bp added at <i>Xba</i> I site (this work)
pSR205	High-copy mutant pSBK203; 2bp deleted at <i>Xba</i> I site (this work)
pSR206	High-copy mutant pSBK203; 3bp deleted at <i>Xba</i> I site (this work)
pSR207	High-copy mutant pSBK203; 8bp deleted at <i>Xba</i> I site (this work)

DNA 구성에 사용된 제한효소들 및 T4-DNA ligase 등은 New England Biolabs에서 구입하여 사용하였고 DNA 분리와 정제 및 완충용액에 사용된 시약과 항생물질, lysozyme, 및 RNase 등은 Sigma Chemical Co.에서, 세균의 배양을 위한 배지 구성 성분들은 Difco Lab.에서 각각 구입하여 사용하였다. DNA 염기서열 분석을 위한 [α -³⁵S]dATP는 Amersham에서, DNA sequencing kit와 Klenow fragment는 New England Biolabs에서, 또한 X-gal, IPTG, urea, 및 acrylamide는 Sigma Chemical Co.에서 각각 구입하여 사용하였다.

전기영동 및 DNA 절편의 추출

재조합 DNA 및 DNA 단편들은 agarose gel 전기영동 방법의 시행을 통해 확인되었으며 agarose gel로부터 DNA 절편추출은 Hoefer Scientific Instruments의 electroeluter를 사용하였다.

염기서열 결정

DNA 염기서열 결정을 위해 만들어진 DNA 단편들은 M13mp18 vector에 cloning한 후 Sanger 등 (22)의 dideoxy chain termination 방법에 따라 염기서열을 결정하였다.

복제수의 결정

복제 관련 유전자의 변화에 의한 각 plasmid의 *B. subtilis* 내에서의 복제수를 결정하기 위해 Projan 등 (18)의 방법을 변형하여 세포당 각 plasmid의 복제수를 결정했다.

결과 및 고찰

복제 조절 부위의 확인 및 cloning

Plasmid pSBK203 내에 있는 제한효소 *Xba*I의 단일 인식부위는 *rep* 유전자의 발현을 위한 coding

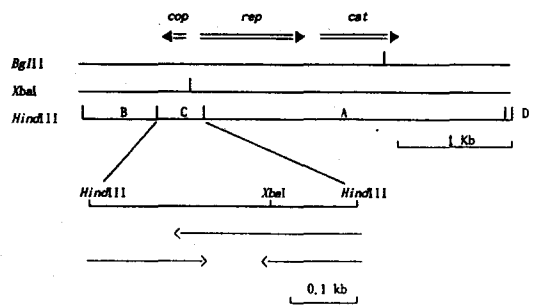


Fig. 1. Genetic organization of copy control region of pSBK203.

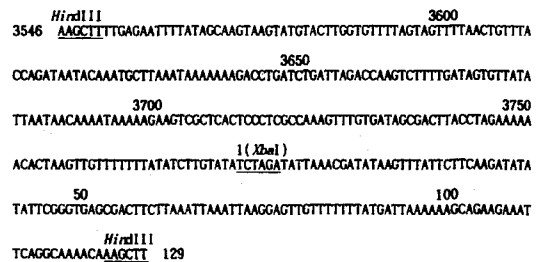


Fig. 2. Nucleotide sequence of *cop* region containing *Hind*III-C fragment of pSBK203.

Bases are numbered from the *Xba*I (3.78 kb coordinate of pSBK203) as position 1.

부위 바깥에 있음에도 불구하고 이 부위가 손상받았을 경우 plasmid의 복제기능에 이상이 초래되었다. pSR203은 *Hind*III B와 D절편을 결실한 plasmid로서

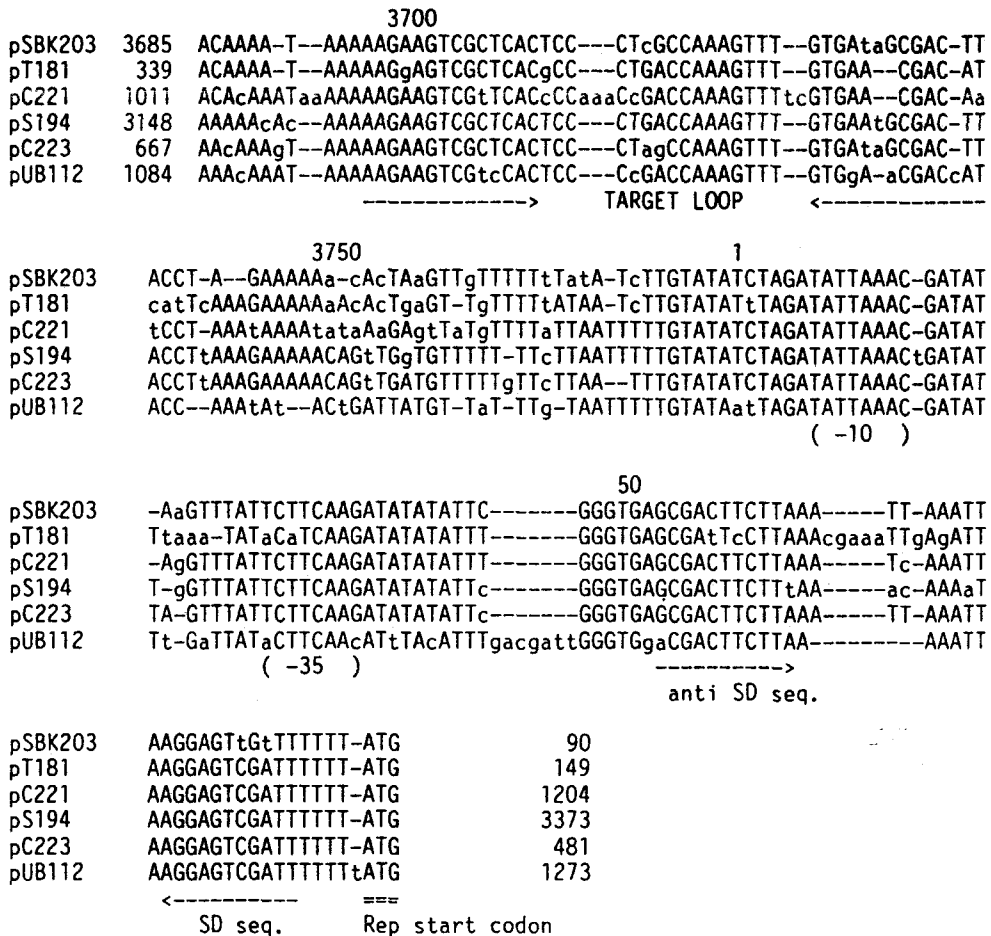


Fig. 3. The untranslated leader region of the proposed Rep mRNAs for pSBK203, pT181, pC221, pS194, pC223, and pUB112 were aligned on the basis of homologies. The -10 and -35 sequences for the counter transcript RNA (cop) are indicated as well as anti-SD, SD, and target loop of the Rep mRNAs.

복제 기능이 정상이었다. 이 plasmid에서 HindIII C 절편마저 결손된, HindIII A 절편만의 plasmid는 형질전환체가 얻어지지 않았고 이 절편을 분리, pBR 322를 주축으로 한 vector에 재조합시켜 얻은 pHW33의 경우에도 *E. coli* 내에서와 달리 *B. subtilis*에 대해서는 형질전환체가 얻어지지 않았다. 이에 비해 HindIII C 절편의 대부분을 포함하는 절편을 그람 음성의 vector에 재조합시킨 pBK424는 *Bacillus* 내에서 정상적인 copy수를 유지하였다(17). 이 XbaI 인식 부위를 포함하는 HindIII C 절편내에 복제 조절 관련 부위가 존재함을 확인, 이 절편을 분리, cloning하여 그 염기서열을 결정하였다(Fig. 1, 2).

염기서열의 상동성 비교

*S. aureus*에서 분리된 R-plasmid들 중 pT181속에

속하는 plasmid들의 복제 조절 부위 염기서열을 pSBK203의 것과 비교하여 상동성이 높은 염기서열 기준으로 나열한 것이 Fig. 3이다. Rep protein의 해독을 위한 ribosome 결합부위(SD sequence)는 어느 plasmid에서나 잘 보존되어 있을 뿐만 아니라 그 상류에 이들 서열과 상보적 결합을 할 것으로 예측되는 역방향반복서열(inverted repeat sequence)인 anti-SD도 공통적으로 보존되어 있다. Rep mRNA와 역방향으로의 전사를 위한 promoter 부위들도 보존적인 서열로 확실하게 나타나 있다.

pSBK203 rep 구조 유전자의 염기서열은 이미 결정되어 발표된 바 있는데 이 rep 구조 유전자의 leader 부위내에 rep 전사체 합성방향과 반대방향으로의 전사를 위한 promoter 부위가 존재하고 있고 이 부위의

Table 2. Base sequences, construction procedure, and the copy number of pSBK203 and of its *Xba*I site modified derivatives

Plasmid	Base Sequence ^a	Description	Construction	Copy No.
pSBK203	5' TTGTATATCTAGATATTTAA 3' 3' AACATATAGATCTATAATTT 5'			20 + 2
pSR204	5' TTGTATATCTactAGATATTTAA 3' 3' AACATATAGAtgaTCTATAATTT 5'	+ACT	dNTP + Klenow →ligation	6 + 2
pSR205	5' TTGTATATCGATATTTAA 3' 3' AACATATAGCTATAATTT 5'	-TA	S1 nuclease →ligation	120 + 10
pSR206	5' TTGTATATGATATTTAA 3' 3' AACATATACTATAATTT 5'	-CTA	S1 nuclease →ligation	90 + 10
pSR207	5' TTGTATATTTAA 3' 3' AACATATAATTT 5'	-TCTAGATA	S1 nuclease →ligation	90 + 10

^aBold characters, *Xba*I recognition sequence in pSBK203

염기서열이 pT181 족의 여타 plasmid 들의 것들과 광범한 상동성을 보여주고 있어서 이들 plasmid에서 주장되고 있는 counter transcript에 의한 Rep 단백질 합성 조절기작(11)이 pSBK203의 경우에도 적용될 수 있을 것으로 생각된다. pT181족 plasmid인 pT181과 pC221의 *cop* 부위와 역방향 반복부위에서 약간의 차이가 있기는 하나 염기서열상 각 83%, 78%의 높은 상동성을 나타내고 있다.

Copy 변이주의 유도, 분리 및 copy수 결정

*Xba*I로 pSBK203내의 이 효소 단일 인식부위를 절단한 후 일중쇄 부위를 S1 nuclease로 잘라 내거나 혹은 Klenow 효소로 채운 뒤 도로 연결하여 염기쌍 삽입 내지 결손 변이주들을 얻었으며 이들에 의해 형질전환된 균주들로부터 다시 plasmid를 분리하는 과정에서 plasmid의 copy수 변화 변이주들을 선별 하였다. 얻어진 변이주들에서 *Xba*I 인식부위 염기서열이 실제로 변화되었는지 또 변화가 일어났다면 구체적으로 그 변화상태가 어떤지를 다시 염기서열결정 과정을 통해 확정하였다. 염기서열상의 변화와 이에 따른 copy수를 Table 2에 나타내었다. pSBK203가 세포당 약 20개의 plasmid DNA 분자를 유지하는데 비해 *Xba*I 인식부위에 -ACT-의 세 염기쌍이 삽입된 변이주인 pSR204는 세포당 약 6분자의 적은 copy 수를 갖는 것으로 확인되고 있고 *Xba*I 인식부위에서 각각 -TA-, -CTA- 및 -TCTAGATA-의 염기서열들이 결손된 세 변이주들인 pSR205, pSR206, 및 pSR207은 pSBK203에 비해 많은, 세포당 약 120, 90, 및 90 분자 정도의 plasmid를 갖는 high copy 변이주들로 분석되고 있다. 표에서 보여주고 있는 변이주들의 *Xba*I 부위에서의 염기서열상 변화와 copy수의 증감 관계는 아직 확실하게 해석되고 있지 않다.

복제개시 단백질 Rep의 발현 조절기구

pSBK203와 유사한 유전적 구성을 갖는 pT181 족 plasmid에서 제기되고 있는 plasmid copy수 조절 기구에는 두 종류의 RNA 분자 즉 *rep* mRNA 분자와 *rep* mRNA leader sequence 부위의 역방향 전사체인

antisense RNA 분자가 함께 참여하는 것으로 알려져 있다. Fig. 2에서 표시된 target loop를 통한 두 mRNA의 결합으로 Rep 발현을 위한 SD 서열의 노출과 은폐를 조절함으로써 궁극적으로 plasmid의 copy수를 조절하게 된다는 것이다. 본 실험에서 분리된 copy수 변이주들의 경우 도입한 염기서열상의 변화가 counter transcript의 전사에 영향을 미쳤는지 아니면 Rep mRNA leader sequence의 2차구조에 영향을 미쳤는지에 대한 분자적 수준에서의 분석은 차후 규명될 것이다.

사 사

본 연구는 1990년도 교육부 대학부설 유전공학연구 구소 학술연구 조성비 지원(과제명: *Staphylococcus aureus* DH1에서 분리된 plasmid pSBK203상의 DNA 복제 관련 *rep* 유전자의 발현에 관한 연구)에 의하여 수행되었음.

참 고 문 헌

- Alonso, J.C. and R.H. Taylor, 1987. Identification of plasmid pC194 replication and its control in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **210**, 476-484.
- Bargonetti, J., P.-Z. Wang, and R.P. Novick, 1993. Measurement of gene expression by translational coupling: Effect of copy mutant on pT181 initiator synthesis. *EMBO J.* **12**, 3659-3667.
- Brantl, S., E. Birch-Hirschfeld, and D. Behnke, 1993. RepR protein expression on plasmid pIP501 is controlled by an antisense RNA-mediated transcription attenuation mechanism. *J. Bacteriol.* **175**, 4052-4061.
- Byeon, W.-H., Y.S. Kim, E.H. Cho, D.H. Kwon, H.Z. Lea, and S.J. Hong, 1985. R-Plasmids in *Staphylococcus aureus*. *Kor. J. Microbiol.* **23**, 282-290.
- del Solar, G. and M. Espinosa, 1992. The copy

- number of plasmid pLS1 is regulated by two *trans*-acting plasmid products: The antisense RNAII and the repressor protein, RepA. *Molecular Microbiol.* **6**, 83-94.
6. del Solar, G.H., A.G. dela Campa, J. Perez-Martin, T. Choli, and M. Espinosa, 1989. Purification and characterization of RepA: A protein involved in the copy number control of plasmid pLS1. *Nucl. Acids Res.* **17**, 2405-2420.
 7. Dubnau, D., R. Davidoff-Abelson, B. Scher, and C. Cirigliano, 1973. Fate of transforming deoxyribonucleic acid after uptake by competent *Bacillus subtilis*: Phenotypic characterization of radiation-sensitive recombination deficient mutants. *J. Bacteriol.* **114**, 273-286.
 8. Grindley, N.D.F., J.N. Grindley, and W.S. Kelley, 1978. Mutant plasmid with altered replication control. p. 71. In D. Schlessinger (ed.). *Microbiology-1978*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 9. Gryczan, T., J. Hahn, S. Contente, and D. Dubnau, 1982. Replication and incompatibility properties of plasmid pE194 in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **152**, 722-735.
 10. Khan, S.A. and R.P. Novick, 1983. Complete nucleotide sequence of pT181: A tetracycline-resistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **10**, 251-259.
 11. Kumar, C.C. and R.P. Novick, 1985. Plasmid pT181 replication is regulated by two counter-transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 638-642.
 12. Kwon, D.H., J.D. Suk, and W.-H. Byeon, 1987. Cloning of *ori* region of R-plasmid pSBK203 and construction of new shuttle-vector for *E. coli* and *Bacillus subtilis* using cloned fragment. *Kor. J. Microbiol.* **25**, 262-273.
 13. Maciag, I.E., J. Viret, and J.C. Alonso, 1988. Replication and incompatibility properties of plasmid pUB110 in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **212**, 232-240.
 14. Novick, R.P., 1987. Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* **51**, 381-395.
 15. Novick, R.P., 1989. Staphylococcal plasmids and their replication. *Ann. Rev. Microbiol.* **43**, 537-565.
 16. Ohman, M. and G.H. Wagner, 1991. Regulation of replication of plasmid R1: An analysis of the intergenic region between *copA* and *repA*. *Mol. Gen. Genet.* **230**, 321-328.
 17. Park, S.-M., D.-H. Kwon, and W.-H. Byeon, 1993. Cloning and base sequence determination of replication initiation gene (*rep*) isolated from *Staphylococcus aureus* DH1 R-plasmid pSBK203. *Kor. J. Microbiol.* **31**, 44-47.
 18. Projan, S.J., S. Carleton, and R.P. Novick, 1983. Determination of plasmid copy number by fluorescence densitometry. *Plasmid* **9**, 182-190.
 19. Projan, S.J., J. Kornblum, S.L. Moghazeh, I. Edelman, M.L. Gennaro, and R.P. Novick, 1985. Comparative sequence and functional analysis of pT181 and pC221: Cognate plasmid replication from *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* **199**, 452-464.
 20. Projan, S.J. and R.P. Novick, 1988. Comparative analysis of five related staphylococcal plasmids. *Plasmid* **19**, 203-221.
 21. Puyet, A., G.A. del Solar, and M. Espinosa, 1988. Identification of the origin and direction of replication of the broad-host range plasmid pLS1. *Nucl. Acids Res.* **16**, 115-133.
 22. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
 23. Xia, G., D. Manen, Y. Yu, and L. Caro, 1993. *In vivo* and *in vitro* studies of a copy number mutation of the RepA replication protein of plasmid pSC101. *J. Bacteriol.* **175**, 4165-4175.

(Received February 6, 1994)

(Accepted March 14, 1994)

ABSTRACT: Cloning, Base Sequence Determination and Homology Analysis of Replication Controlling *cop* Gene of R-plasmid pSBK203 Isolated from *Staphylococcus aureus* DH1

Park, Seung Moon and Woo-Hyeon Byeon* (Department of Microbiology, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea)

Replication control region of pSBK203, a chloramphenicol acetyltransferase conferring plasmid from *Staphylococcus aureus* was cloned and its nucleotide sequence has been determined. Base sequence homology of this copy control region with those of plasmids belonging to pT181 family was obtained and analyzed. Copy number of four copy mutants derived by addition or deletion of nucleotides in unique *Xba*I recognition site in copy control region of pSBK203 was also determined.