

Staphylococcus aureus DH1에서 분리한 R-plasmid pSBK203상의 복제개시 부위 ori에 관한 연구

민경일 · 변우현*

강원대학교 자연과학대학 미생물학과

*Staphylococcus aureus*로부터 분리한 R-plasmid pSBK203의 복제개시 단백질인 Rep의 작용부위인 ori 및 dsDNA로의 전환을 위해 요구되는 minus origin부위를 밝히고자 시도하였다. *Escherichia coli* vector를 이용하여 pSBK203의 복제관련 부위를 최소한도로 포함하는 재조합 *E. coli-Bacillus subtilis* shuttle vector를 구성, 분리하고 여기에 포함된 pSBK203부위의 염기 서열을 분석함으로써 ori를 확인하였다. pSBK203의 복제개시 부위 ori는 rep의 구조 유전자 ORF내에서 약 50 bp의 크기로 발견되었으며 지금까지 알려진 staphylococcal plasmid들중에서 pT181족 plasmid들의 ori와 높은 상동성을 갖는 것으로 분석되었다. 복제 과정에서 ssDNA로 먼저 만들어진 (+)쇄가 dsDNA로 전환되기 위해 필요한 신호로 작용하는 것으로 알려져 있는 minus origin (M-O)인 긴 palindrom 구조, 즉 pal 부위가 rep 유전자의 상류에서 2개 연이어 존재하는 것이 발견되었다. 이 중에서 pOX6, pC194, 및 pE194 등과 같은 다른 staphylococcal plasmid들의 pal 부위와 비교적 높은 상동성을 갖는 palA는 plasmid 유지에 별 영향을 미치지 못하는 반면 다른 plasmid에서 유사 서열이 보고되지 않은 palA'는 plasmid 유지에 필수적이라는 사실이 밝혀졌다.

KEY WORDS □ *Staphylococcus aureus*, ori, pal, replication

R-plasmid 상의 복제관련 유전자 및 그 관련 부위들인 rep, ori, cop 등에 대한 연구는 plasmid의 복제효소의 종류와 그 작용 개시 부위, copy 수 조절기구 등을 밝히는 기초 분자 생물학적 연구분야 중에서도 비중이 큰 영역의 하나로 간주되고 있다(2, 3, 5, 17). R-plasmid의 복제는 기본적으로 plasmid 유래의 복제 개시 단백질(Rep 단백질)이 숙주 세포 유래의 몇몇 복제 관련 단백질의 도움을 받아 수행하는 것으로 밝혀져 있다. 이 복제 개시 단백질인 Rep이 plasmid상의 특정 염기서열인 ori 부위를 인식하여 DNA 두가닥 중의 한 사슬을 절단함으로써 rolling circle replication 기구에 의해 ssDNA (plus strand)가 만들어지며 이 ssDNA상의 긴 palindrom 부위인 palA가 2차구조를 형성함으로써 신호로 작용하여 숙주 세포가 갖고 있는 복제기구에 의해 dsDNA로 전환되는 것으로 밝혀져 있다(8, 16). 한편 복제 개시 단백질의 발현은 cop 유전자 산물에 의해 억제적으로 조절되어 plasmid의 숙주 세포내 존재 copy 수가 plasmid의 종류에 따라 일정하게 조절되는데 이들 유전자의 종류 및 그 작용 기구에 따라 plasmid들의 incompatibility가 결정된다(18).

본 연구실에서 *Staphylococcus aureus*로부터 분리한 R-plasmid pSBK203은 이를 구성하고 있는 유전자의 종류, 특징 및 그 유전적 배치에 대한 연구가 전체적으로 진행중에 있다(4, 13, 19, 20). 본 연구는 이 pSBK203의 복제에 참여하는 유전자들 중에서 Rep

작용부위인 ori 및 dsDNA로의 전환을 위해 요구되는 신호인 pal 부위를 확인한 후 분리 하여 그람 양성 균에서 유래된 동계열 plasmid들의 동기능 유전자들과 비교 분석함으로써 이와 같은 계열에 속한 plasmid들의 복제 관련 현상을 밝히고자 시도하였다.

실험재료 및 방법

균주 및 plasmid

본 실험에 사용된 균주와 plasmid는 표 1에 나타난 바와 같다.

제한효소 및 시약

실험에 사용된 제한효소들 및 T4-DNA ligase 등은 제철화학과 New England Biolabs 에서 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 - 35 S] 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

Table 1. Bacterial strains and plasmids.

Strains or Plasmids	Descriptions
<i>S. aureus</i> DH1	original host of pSBK203 (Byeon <i>et al.</i> , 1985)
<i>B. subtilis</i> BD170	<i>thr5 trpC2</i> , transformable host for plasmids (Dubanu <i>et al.</i> , 1973)
<i>E. coli</i> HB101	F ⁻ <i>recA13 ara14 proA2 galk2</i> , transformable host for plasmids
MV1190	F' <i>this supE44 proAB lacI^qΔ(srl-rec)306::Tn10</i> , transformable host for plasmids
Plasmids	
pSBK203	original plasmid for this study (Byeon <i>et al.</i> , 1985)
pSR203	<i>Hind</i> III-B fragment of pSBK203 deleted plasmid (Park <i>et al.</i> , 1993)
pSR300	pSBK203 (<i>Hind</i> III partial)::pUC119 (<i>Hind</i> III) recombinant plasmid. <i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> shuttle vector (Min <i>et al.</i> , 1993)
pSR321	<i>palA'</i> -mutant; <i>Hind</i> III- <i>Tth</i> 1111 fragment deleted pSR300 (This study)
pSR323	<i>palA'</i> -mutant; 49 bp deleted pSR300 at <i>Rsa</i> I site (This study)
pSR324	<i>palA'</i> -mutant; 57 bp deleted pSR300 at <i>Rsa</i> I site (This study)

gel로부터 DNA 절편 추출은 International Biotech. Inc.의 electroeluter를 사용 하였다.

*Bacillus subtilis*의 형질전환

제조합 plasmid를 사용한 *B. subtilis*의 형질전환은 Dubnau 등의 방법 (7)에 의해 제조된 competent cell을 이용하여 수행되었다.

염기서열 결정

DNA 염기서열 결정을 위해 만들어진 DNA 단편들은 M13mp18 vector에 cloning 한 후 Sanger 등 (21)의 dideoxy chain termination 방법에 따라 염기서열을 결정 하였다.

염기서열 분석

언어진 DNA 염기서열을 대상으로, 해독을 위한 ORF 포함여부, 2차구조 존재여부, 제한효소 인식부위의 확인, 및 부분적 상동성 등의 컴퓨터에 의한 분석은 Hitachi Co.의 DNASIS program을 이용하였다.

결과 및 고찰

복제 개시 부위 및 주위의 염기서열

pSBK203의 *Hind*III 절편을 이용한 *E. coli*-*Bacillus* shuttle vector 제조의 시도에서 세번째 크기의 C 절편을 포함하는 제조합 plasmid pHW25가 *B. subtilis*내에서 증식된다는 사실이 확인된 바 (14) 이 절편의 염기서열을 결정하였고 이 염기서열과 다른 계열 plasmid의 *ori*와의 상동성 여부를 분석하였다. pT181족 plasmid들의 유전적 구조분석 및 이를 pSBK203의 구조와 비교 분석한 바로는 *ori*부위가 *rep* 구조 유전자 ORF내의 5'쪽 가까이 있는 것으로 밝혀졌다.

Fig. 1에는 pSBK203와 본 연구 수행을 위해 구성된 제조합 plasmid들의 개략적인 제한효소 인식부위 및 지금까지 밝혀진 유전자 내지 ORF들이 표시되어 있다. *ori*를 포함하고 있는 부위의 염기서열은 그림 2에서 보여주고 있는데 *Xba*I에 의한 단일

인식부위를 1번 염기로 하였을 때 88번 염기가 *rep* 유전자의 개시 코돈으로서 ORF가 시작되는 지점이며 *ori*는 136번 염기부터 시작되고 있다. 이 136번 염기는 *rep* 유전자를 구성하고 있는 전체 942개 염기중 5' 쪽으로부터 49번째 염기인데 *ori*와 *rep*의 구조 유전자 부위가 겹쳐 있음을 의미한다. *ori*는 49번 염기에서 203번까지 약 50염기에 걸쳐 존재하고 있는 것으로 분석되고 있다 (Fig. 1, 2).

pT181족 *ori*들과 pSBK203 *ori*와의 상동성 비교

지금까지 밝혀진 pT181족 *ori*들과 pSBK203 *ori*와의 상동성을 비교한 결과는 Fig. 3에서 보여주고 있다. Rep 단백질과의 결합 및 직접적인 작용여부에 따라 *ori*의 부위는 몇가지로 세분화된다. 개시 부위 (initiation region)는 동족의 plasmid 사이에서는 상동성이 비교적 엄격하게 유지되고 있는 부위이며 특이성 부위 (specificity region)는 plasmid에 따라 변이가 인정되는 부위이다. 보존적인 개시부위내에는 Rep 단백질의 작용으로 DNA 두가닥중 하나가 끊어지는 절단부위 (nick site)가 존재하고 있다 (Fig. 3). 전체에 걸쳐 4개의 역방향반복서열 (IRP)이 산재하고 있으며 그중 가장 긴 3-3' 상보적 서열도 보존적 부위내에 존재하고 있다.

pT181족 plasmid들의 선도사슬 복제 개시 부위들은 높은 상동성이 유지되는 개시부위 (initiation region)를 포함 전체적으로 보존성이 강했으며 같은 족의 plasmid들 중에서는 pS194와 pSW7의 두 *ori*와 상동성이 높은 것으로 분석되었다. *Staphylococcus*속에서 분리된 여러 plasmid들 중에서 class I으로 분류된 것들은 rolling circle 복제기구에 의해 일단 ssDNA가 만들어 지는 것들인데 (3, 10) 본 pSBK203의 *ori*가 이 class I 중에서도 pT181족 (family)에 속한 plasmid들의 *ori*와 거의 같은 점으로 미루어 일단 pSBK203의 복제에서도 ssDNA로 만들어지는 과정에 *ori*가 관여하는 것으로 생각된다.

palA

복제 과정에서 ssDNA로 먼저 만들어진 (+)쇄가

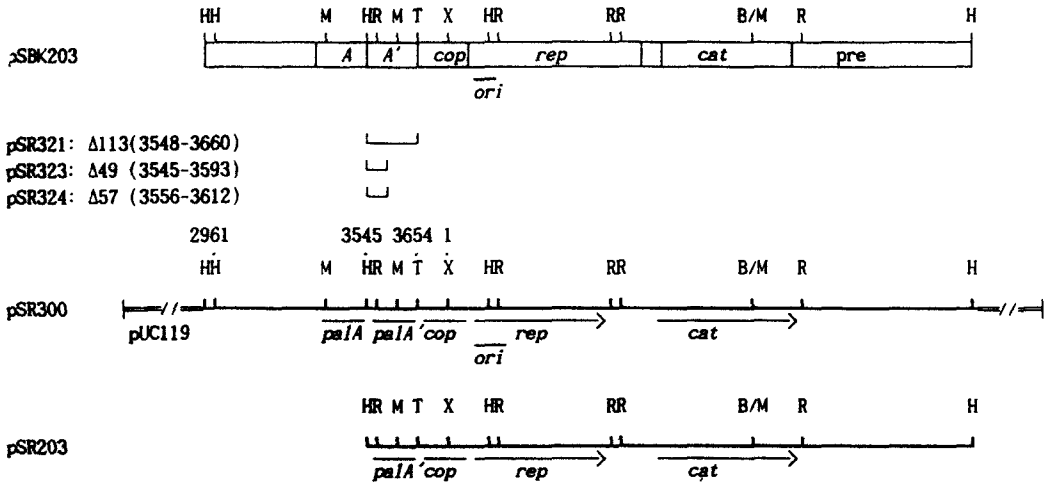


Fig. 1. Restriction map and genetic organization of pSBK203 and its derivatives. Lines above the restriction map of pSR300 indicate the deleted region in the *pala'* minus derivatives and the numbers followed by Δ denote numbers of deleted base pairs in derivatives. Numbers in parentheses and above the restriction enzyme recognition sites are nucleotide co-ordinates in pSBK203. B, *Bgl*II; H, *Hind*III; M, *Mbo*I; R, *Rsa*I; X, *Xba*I.

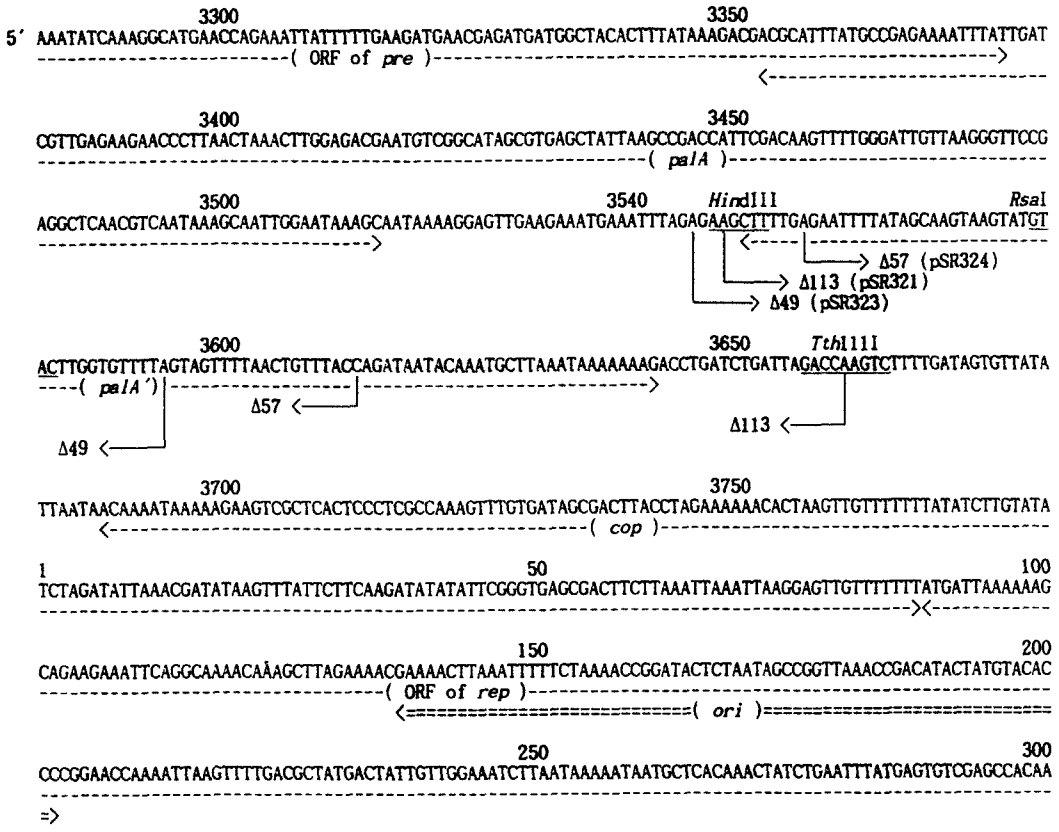


Fig. 2. Nucleotide sequence of replication origin (plus origin) and the flanking *pala*, *pala'*, *cop*, and 5' end of *rep* gene. Deleted regions in three *pala'*-derivative plasmids (pSR321, pSR323, pSR324) are also indicated.

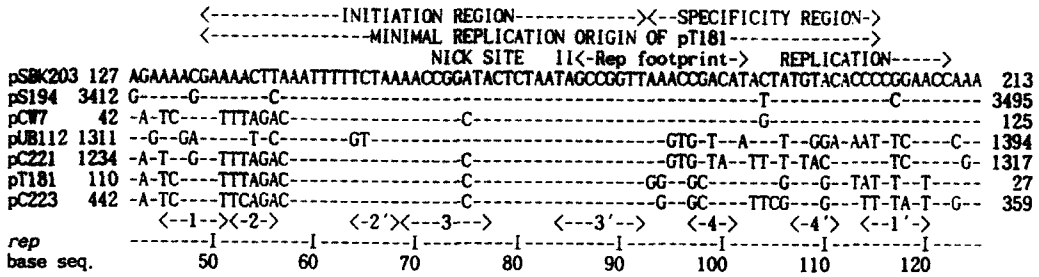


Fig. 3. Nucleotide sequence homology of leading strand origin among plasmids of pT181 family. Inverted complementary repeat sequences (ICRS) are shown below and numbered. Sequences are aligned according to the identities and the bases identical with that of pSBK203 are designated as '-'. The nucleotide numbering of rep gene is shown at the bottom.

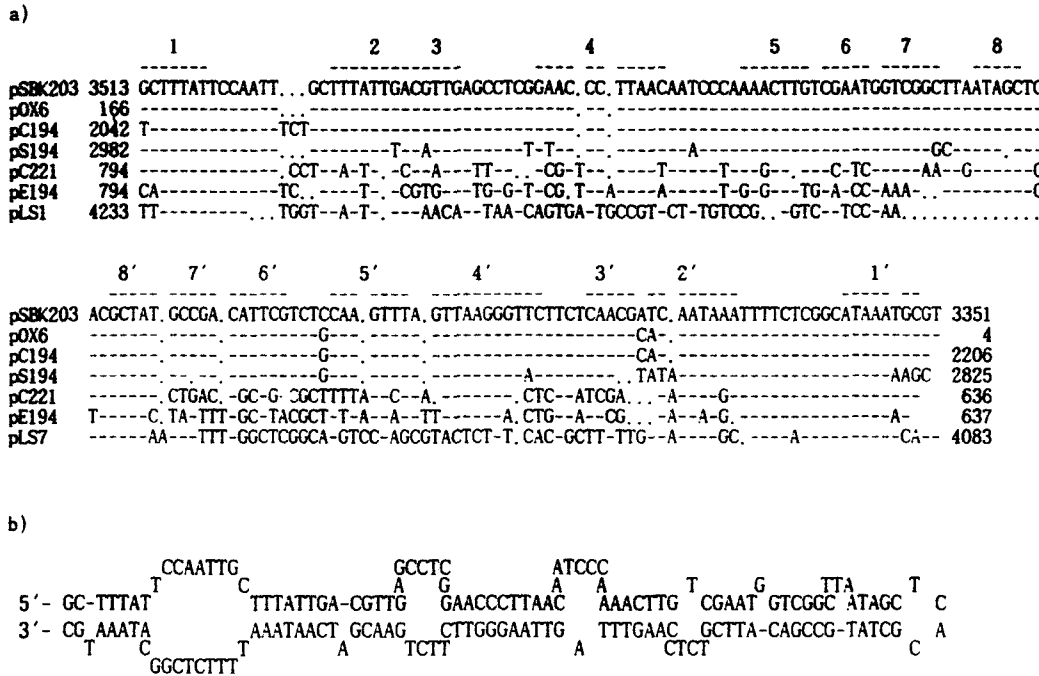


Fig. 4. Nucleotide sequence homology of *palA* with those of staphylococcal plasmids (a) and predicted secondary structure (b).

(a) Sequences are aligned according to the identities and the bases identical with that of pSBK203 are designated as '-'. Inverted complementary repeat sequences (ICRS) are shown above and numbered. (b) Predicted *palA* secondary structure for pSBK203.

dsDNA로 전환되기 위해 (-)쇄의 복제가 뒤따라야 하며 이를 위한 신호 (conversion signal)로 작용하는 것으로 알려진 것이 긴 palindrome 구조를 하고 있는 *palA* 이다(6). pC194와 pE194 에서 처음 보고된 뒤 (11, 12) 그람 양성균 유래 10 kb 미만의 소형 plasmid 거의 모두에서 발견되고 있으며 pSBK203의 *palA* 부위는 대략 9개의 상보성 염기서열 부분으로 *rep* 유전자의 상류에 약 240 bp에 걸쳐 존재하고 있었다

(Fig. 4). *palA* Fig. 2에서 보는 바와 같이 *rep*의 5'쪽 상류에 plasmid의 copy수 조절에 직접 관여하는 *cop* 유전자 존재하며 이 *cop*과 *palA* 사이에 또 다른 긴 palindrome 구조가 위치하고 있는 것이 확인되고 있다. 이와 같은 두 palindrome의 연이은 구조는 다른 plasmid에서 발견되지 않는 구조일 뿐만 아니라

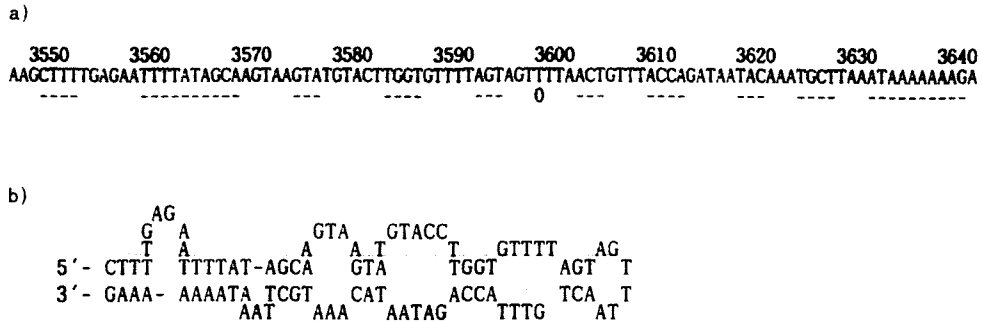


Fig. 5. Nucleotide sequence of *palA'* (a) and predicted secondary structure (b). (a) Inverted complementary repeat sequences (ICRS) are shown above and numbered. (b) Predicted *palA'* secondary structure for pSBK203.

palA 염기서열과의 상동성도 없었으며 pC194에서 *rep* 유전자의 3' 쪽에서 발견된, leading strand 복제 종결 신호로 알려져 있는 *palB* 구조 (1)와도 상동성이 없었다 (Fig. 5).

pal 결여 변이주의 구성 및 그 복제능

앞에서 언급한 바처럼 pSBK203의 *palA*가 다른 plasmid들의 *palA*와 상당한 상동성을 유지하고 있었기 때문에 이 구조가 M-O로 작용할 것이라는 사실을 의심하지 않았으나 *palA*를 포함하고 있는 *Hind*III B절편이 결여된 pSR203이 *Bacillus* 내에서 정상적인 복제를 한다는 사실 (20)로 미루어 아마도 *palA'*는 *palA* 기능에 문제가 초래되었을 때 단순히 *palA*의 역할을 대신 할 수도 있는 것으로 생각하였다. 이를 확인하기 위하여 pUC119와 pSBK203을 조합하여 *E. coli*-*B. subtilis* shuttle vector pSR300을 조성한 후 *palA'* 결여 변이주를 다시 유도하고 이들의 *Bacillus*내 복제여부를 확인코자 하였다. 조성된 *palA'* 결여 변이주 pSR321, pSR323, 및 pSR324는 모두 *Bacillus*내에서 복제되지 못했다 (Fig. 1, 2).

추종사슬(lagging strand)의 복제

*palA*와 *cop* 사이에 존재하는 palindrome구조 *palA'*는 기 발표된 plasmid들이 갖고 있는 minus origin (M-O)의 어느 것보다도 상동성을 갖고 있지 않았으며 pSBK203내에 존재하는, pT181족 plasmid들 및 기타 몇몇 staphylococcal plasmid들에서 보편적으로 발견되고 있는 *palA*의 기능에 우선하여 M-O의 역할을 하는 것으로 확인된다.

Plasmid의 복제의 기본 단계인 *rep* 유전자 산물인 Rep에 의한 *ori*의 인식은 어느 한쪽에 초래된 사소한 변이에 의해서도 그 plasmid의 복제가 당장 절대적으로 영향을 받기 때문에 서로의 변이를 용납하지 않을 것이며 따라서 동족의 plasmid들이 갖고 있는 이 두 유전자의 염기서열은 plasmid 서로 간에 높은 상동성이 유지되고 있는 것으로 이해되고 있다. 이에 비해 M-O의 인식에 뒤이은 ssDNA로부터 dsDNA로의 전환은 pT181족 plasmid들의 *palA*가 pT181족

에 속하지 않는 plasmid들인 pOX6, pC194, 및 pE 194들의 *palA*와 높은 상동성을 유지하고 있다는 점 (Fig. 4)으로 미루어 선도사슬의 복제와는 별도의 기구, 즉 숙주의 복제기구에 의해 진행되는 것으로 주장되고 있다 (9, 15). 본 실험 결과에서 보여주는 바와 같이 전혀 새로운 종류의 M-O의 확인은 pSBK203이 이 서열을 어디에서 취득했으며 이 M-O를 이용한 복제기구는 다른 plasmid들의 것과 어떤 차이가 있는가 등에 대한 새로운 문제점들을 제시하고 있다.

사 사

본 연구는 1991년도 교육부 대학부설 유전공학 연구소 학술연구 조성비 지원 (과제명: *Staphylococcus aureus* DH1에서 분리한 plasmid pSBK203상의 DNA복제 개시 유전자 *ori*에 관한 연구)에 의하여 수행되었음.

참 고 문 헌

1. Alonso, J.C. and T.A. Trautner, 1985. A gene controlling segregation of the *Bacillus subtilis* plasmid pC194. *Mol. Gen. Genet.* **198**, 427-431.
2. Birch, P. and S.A. Khan, 1992. Replication of single-stranded plasmid pT181 DNA *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 290-294.
3. Boes, L., M.-F. Gros, H.te Riele, S.D. Ehrlich, and A. Gruss, 1989. Replication origins of single-stranded-DNA plasmid pUB110. *J. Bacteriol.* **171**, 3366-3372.
4. 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.
5. del Solar, M. Moscoso, and M. Espinosa, 1993. *In vivo* definition of the functional origin of replication (*ori*(+)) of the promiscuous plasmid pLS1. *Mol. Gen. Genet.* **237**, 65-72.

6. del Solar, G.H. Puyet, and M. Espinosa, 1987. Initiation signals for the conversion of single stranded to double stranded DNA forms in the streptococcal plasmid pLS1. *Nucl. Acids Res.* **14**, 5561-5579.
7. Dubnau, D. and R. Davidorff-Aberlson, 1971. Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*: I. Formation and properties of the donor-recipient complex. *J. Mol. Biol.* **56**, 209-221.
8. Gros, M., H. te Riele, and D.S. Ehrlich, 1987. Rolling circle replication of the single-stranded plasmid pC194. *EMBO J.* **6**, 3863-3869.
9. Gruss, A. and D.S. Ehrlich, 1989. The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmids. *Microbiol. Rev.* **53**, 231-241.
10. Gruss, A., H.F. Ross, and R.P. Novick, 1987. Functional analysis of a palindromic sequence required for normal replication of several staphylococcal plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2165-2169.
11. Horinouchi, S. and B. Weisblum, 1982a. Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin type B antibiotics. *J. Bacteriol.* **150**, 804-814.
12. Horinouchi, S. and B. Weisblum, 1982b. Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. *J. Bacteriol.* **150**, 815-825.
13. Kwon, D.H. and W.-H. Byeon, 1989. Nucleotide sequence and inducibility analysis of chloramphenicol acetyltransferase gene from *Staphylococcus aureus* R-plasmid pSBK203. *Kor. J. Microbiol.* **27**, 194-200.
14. 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.
15. Majumder, S. and R.P. Novick, 1988. Intermediates in plasmid pT181 DNA replication. *Nucl. Acids Res.* **7**, 2897-2912.
16. Noirot, P., J. Bargonetti, and R.P. Novick, 1990. Initiation of rolling replication in pT181 plasmid: Initiator protein enhances cruciform extrusion at the origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8560-8564.
17. Novick, R.P., 1989. Staphylococcal plasmids and their replication. *Ann. Rev. Microbiol.* **43**, 537-565.
18. Novick, R.P., 1987. Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* **51**, 381-395.
19. Park, S.M. and W.-H. Byeon, 1994. Replication controlling *cop* gene of R-plasmid pSBK203 isolated from *Staphylococcus aureus* DH1. *Kor. J. Microbiol.* **32**, (in press).
20. 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.
21. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.

(Received March 21, 1994)

(Accepted May 3, 1994)

ABSTRACT: Replication origin (*ori*) of R-plasmid pSBK203 Isolated from *Staphylococcus aureus* DH1

Min, Kyung Il and Woo-Hyeon Byeon* (Department of Microbiology, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea)

The origin of the leading strand replication (*ori*) and of lagging strand replication (M-O) of R-plasmid pSBK203 was identified and its base sequence was determined. About 50 bp of *ori* sequence residues overlapped with the structural gene of *rep*. Sequence comparison reveals that pSBK-*ori* shares obvious identities with those of pT181 family and consists of two regions, one is conserved and the other is variable region. Of two palindrome sequence located one after another in upstream region of *rep* gene, *pala'* instead of *pala* which shares sequence homology with diverse family of plasmids such as pOX6, pC194, and pE194 seems to act as a signal for conversion of primarily replicated ssDNA to dsDNA (minus origin (M-O)).