

박테리오파지 E3의 Major Capsid Protein을 만드는 유전자의 Mapping 및 염기서열 분석

배수진 · 명희준*

한국외국어대학교 생명공학과

박테리오파지 E3가 만드는 plaque은 그 지름이 약 1 cm 정도이고 대단히 빠르게 성장한다. 구조 단백질 중 가장 많은 copy를 가지는 major capsid 단백질을 발현하는 유전자를 조절하는 promoter가 가장 효율적일 것이라 생각되며, 이 promoter를 찾기 위하여 먼저 이 유전자를 mapping하였다. 정제된 파지 입자로부터 major capsid 단백질을 분리하여 그 N-terminal amino acid 서열을 확인하였고, 그에 해당하는 degenerate oligonucleotide probe를 이용하여 E3의 genomic library로부터 major capsid 단백질을 발현하는 유전자를 함유하는 clone을 찾았다. 이 clone의 DNA 서열 분석을 통하여 major capsid 단백질을 발현하는 유전자를 확인하였으며, 이는 E3 genome에서 약 72%에 mapping되었다. 이 gene을 조절하는 promoter의 성질을 고찰하기 위하여 E3의 성장이 rifampicin에 의하여 영향을 받는지 확인한 결과 E3는 자기 고유의 RNA polymerase를 가지고 있음을 알 수 있었다.

Key Words □ Bacteriophage E3, genetic mapping, major capsid protein, strong promoter

하천에서 분리한 박테리오파지 E3는 icosahedral head와 긴 flexible tail을 가지며, 그 genome은 49 kbp의 linear double stranded DNA로 구성되어 있다(1). E3 입자는 최소한 7개 이상의 구조 단백질을 가지는 것으로 알려져 있으며, 그 중 가장 많은 copy를 가지는 것은 33 KDa의 major capsid 단백질이다. E3는 *E. coli*를 specific하게 infection하며, 만들어지는 plaque의 크기는 그 지름이 약 1 cm 정도로 대단히 크고 성장이 빠르다. 따라서, E3내에 어떤 strong promoter가 존재할 것으로 추정된다. 본 연구에서는 이러한 strong promoter를 찾기 위한 초기 단계로 이러한 promoter에 의해 조절 받을 가능성이 가장 큰 major capsid 단백질을 발현하는 유전자를 genome내에서 mapping 하였다. 이러한 strong promoter의 예를 다른 박테리오파지(e.g. T7, T3, SP6)에서도 찾아볼 수 있다(7,8,9). T7의 경우 host인 *E. coli*의 RNA polymerase에 의해서 조절 받는 early promoter(A1)와 T7 자신의 고유한 RNA polymerase에 의하여 조절 받는 late promoter(gene 10 promoter)를 가지고 있다(3). 이러한 promoter를 이용한 유전자 발현 system을 이용할 때, A1의 경우에는 유전자 발현이 constitutive하게 일어나게 되므로 그 발현을 조절하기가 힘들다. 반면에, gene 10 promoter의 경우, 같은 host내에서 T7 RNA polymerase가 발현되지 않으면 전사가 일어나지 않기 때문에 조절 가능한 system으로 많이 쓰이고 있다. 본 연구에서는 이러한 late promoter를 찾고 이 promoter를 조절하는 RNA polymerase가 *E. coli*의 것일지 아니면 E3 자신의 것일지를 예측할 수 있는 간접적인 증거를

antibiotic인 rifampicin을 이용하여 제시한다.

재료 및 방법

Bacterial strains and plasmids

본 실험에 사용된 균주는 *E. coli* HB101과 JM109이다. T7의 실험을 위해서는 *E. coli* B1 strain이 쓰여졌다. Cloning에 사용된 plasmid는 high copy number를 가지는 pKF3와 pBlue-ScriptSK, midium copy number를 가지는 pBR322, 그리고 low copy number를 가지는 pHSG575, pHSG576이다. E3의 조작에는 standard phage technique(4)이 쓰였다.

Media and buffers

Luria-Bertani(LB) medium(10 g tryptone, 5 g Yeast extract, 10 g NaCl/L)과 top agar(0.8%)를 사용하였고, phage buffer로는 TM buffer(50 mM Tris-Cl, pH 7.4)가 쓰였다.

Phage particle의 분리

Standard phage isolation technique(4)이 쓰였다. 숙주인 *E. coli* JM109를 밤새 배양한 뒤 500 ml의 새 LB broth에 접종하고 early exponential phase에서 m.o.i.가 5가 되도록 E3로 infection 시켰다. Complete lysis가 일어난 후에 centrifugation(ss34 rotor, 10,000 rpm, 10 min, 4°C)으로 supernatant를 취한 뒤 polyethylene glycol(PEG) precipitation으로 phage particle층을 분리하고, TM buffer에 resuspension시켰다. 0.75 mg/ml의 cesium chloride gradient를 이용하여 Beckman Tla 100.3 rotor를 이용하여 42,000 rpm에서 24 시간 동안 ultracentrifugation

*To whom correspondence should be addressed
Tel: 0335-330-4098, Fax: 0335-333-1696
E-mail: hjmyung@maincc.hufs.ac.kr

한 후 phage band를 분리하여 dialysis로 CsCl을 제거하였다.

SDS-PAGE와 protein transfer

SDS-PAGE는 Laemmli의 방법(2)을 이용하였다. 8% polyacrylamide gel을 이용하여 electrophoresis 한 후 staining solution(0.125% coomassie brilliant blue R-250)으로 염색하고, destaining solution(50% methanol, 10% acetic acid)으로 탈색하였다. Protein의 N-terminal amino acid sequencing을 위하여 SDS-PAGE후에 gel상의 protein band를 PVDF membrane에 electrophoretic transfer하고, major capsid protein에 해당하는 band를 분리하여 기초과학 지원 연구소(KBS I, Milligen 6600B)에서 amino acid sequence를 분석하였다. 그에 해당하는 degenerate oligonucleotide probe는 KOMA Biotech에서 합성하였다.

E3의 genomic library의 제작

E3의 genomic DNA를 분리하여 각각 *EcoRI*, *EcoRI+BglIII*, *EcoRI+EcoRV*로 digestion한 다음에 plasmid vector인 pKF3, pBlueScriptSK, pHSG576에 ligation 시킨 후 CaCl₂ 방법을 이용하여 *E. coli*에 transformation 시켰다.

Southern hybridization

합성된 oligonucleotide를 terminal transferase를 이용하여 DIG-ddUTP(Boehringer Mannheim Co.)로 labeling하였다. 앞에서 만들어진 genomic DNA의 library를 agarose gel에 electrophoresis시키고 alkaline denaturation, neutralization 과정을 거쳐 capillary 방법으로 HyBond nylon membrane(Amersham)에 transfer하여 fixation한 후, 위의 probe를 넣고 65°C에서 16시간 동안 incubation 하였다. 그런 다음 membrane에 anti-DIG-alkaline phosphatase conjugate를 넣어 color developing substrate로 발색하여 band의 위치를 확인하였다.

DNA sequencing

Probe와 반응한 band에 해당하는 DNA를 분리하여 Sanger의 dideoxynucleotide termination 방법(6)으로 염기서열을 결정하였다.

Rifampicin test

박테리오파지 E3를 host인 *E. coli*에 infection시킨 30 ml의

Ala-Ser-Asp-Met-Gly-Ile-Trp-Thr-Ala-Gln

```

GAT ATG GGT ATT TGG AC
      C      C      C
          A
          G
    
```

Fig. 1. N-terminal amino acid sequence of the major capsid protein and the design of degenerate oligonucleotide probe.

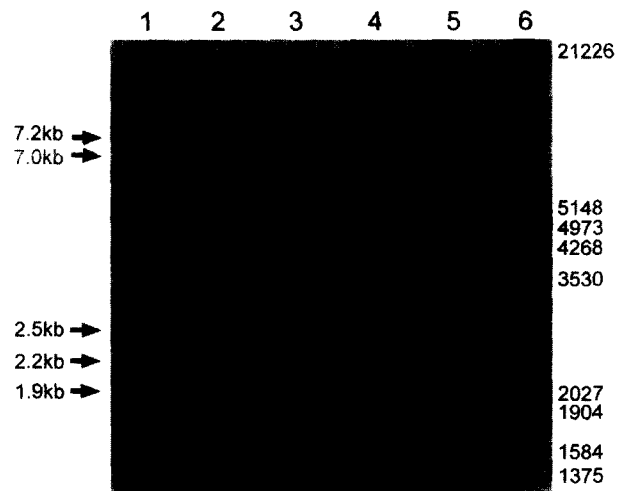


Fig. 2. Southern hybridization of the genomic DNA fragments using degenerate oligonucleotide probe. Lane 1; *EcoRI+BglIII* fragment, lane 2; *BglIII* fragment, lane 3; *EcoRI+EcoRV* fragment, lane 4; *EcoRV* fragment, lane 5; *EcoRI* fragment, lane 6; molecular weight marker. Arrows at the left indicate probe-bound fragments.

culture에 각각 0, 5, 10 min p.i.에 rifampicin을 200 µg/ml이 되도록 처리하였다. 각 culture에서 5분에 한 번씩 1 ml를 분리하여 5 µl의 chloroform을 넣어 lysis시킨 후에 plate에서 titer를 측정하였다.

결과 및 고찰

E3의 major capsid 단백질 band를 분리하여 그 N-terminal amino acid 서열을 조사한 결과는 Fig. 1에 나타났다. 이 10개의 amino acid 서열에 기초하여 Fig. 1에 나타난 것과 같은 17mer의 degenerate oligonucleotide probe를 제작하였다. 여기서 특이한 점은 이 protein의 첫 번째 codon이 methionine이 아닌 alanine이라는 점이다. 이것은 아마도 이 protein이 만들어지고 나서 posttranslational cleavage를 통하여 다른 minor capsid 단백질이 N-terminus에서 proteolytic cleavage에 의해서 분리되었기 때문이라고 추측된다. 이러한 현상은 작은 size의 genome을 가지는 virus에서 자주 관찰되는 사실이다(4). 이 probe를 이용하여, 각각 *EcoRI*, *EcoRV*, *EcoRI* 과 *EcoRV*, *EcoRI*과 *BglIII*로 digestion한 E3의 genomic DNA 단편을 hybridization시킨 결과, 각각 7.0, 7.2, 2.2, 1.4, 1.9 kbp의 단편에 band가 형성되었다(Fig. 2). 이 크기의 단편들을 E3의 physical map(1)에서 확인한 결과, 49 kbp의 전체 genome중 72%에 major capsid 단백질을 발현하는 유전자가 위치함을 알 수 있었다.

이 중 1.4 kbp의 *EcoRI*과 *EcoRV* 단편을 low copy number plasmid vector인 pHSG576에 cloning한 후 pSL1으로 명명하였다. 이 1.4 kbp fragment의 nucleotide sequence의 일부를 Fig. 3에 나타내었다. 총 1,400 bp 중에 720 bp 부분에서 단백질의 N-terminal amino acid 서열에 해당하는 염기서열을 찾을 수 있었다. 232 bp에서 첫 번째 methionine으로 추정되는 start

AGG ATA TTC CAT CGT ATA AAG ATC CTG TTT 10
 TTG TTA AAG TCA ATG GCT CTA TAT GAC CAA 20
 GTG ATT TCC TAC CAG TTG GTT TTT TAC TGG 30
 CGA ATA CGT AAG ATA TTC ACG CGG ATA TAT 40
 TTT ACT ATC AGT TCA GTT GTA GCG TGC TAA 50
 CAC AAA AAA CAC **TTG AAC** GTT TAA CAA AAA 60
 ATG CTA TAT TAA AGC GCT TAT TGT GAC GGC 70
 TTT TCT ATG *AGG GGA* AAT ATT ATG TGT AAA 80
 GAA ATT AAA TAT GAT GAA TTT GAA GCA AAC 90
 GTG ATC GCC AAC CAT ATG GAG TTA CGC GGC 100
 A S D M G I
 GCT AAA AAC GAC GCA TCT GAT ATG GGT ATT 110
 W T A E
 TGG ACG GCT CAA GAG GTT CAT AAA ATT AAG 120
 GCT CAA GCC TAT GAA AAA GAA TAT CCG GCA 130
 GGT TCC GGA GTG CGT GTA TTC CCT ATA TCG 140
 TCC GAG CTT TCC GAT ACA GAT AAA ACC TTT 150

Fig. 3. DNA sequence of the control region of the gene encoding major capsid protein. N-terminal amino acid sequence is indicated above the corresponding nucleotide sequence. Putative -10 and -35 regions are indicated with bold letters. Putative Shine-Dalgarno sequence is indicated with italic letters. Putative 1st methionine codon is underlined.

codon을 발견할 수 있었고, 그 upstream으로 -7번째에 Shine-Dalgarno sequence로 추정되는 AGGGGA를 확인할 수 있었다. 따라서, major capsid protein의 N-terminal amino acid가 methionine이 아닌 것은, 많은 bacteria에서 보여지는 것처럼 translation 이후에 첫 번째 methionine이 제거된 것이 아니고, 27개의 amino acid로 이루어진 작은 peptide가 제거된 것으로 보인다.

Rifampicin의 존재 하에서 E3가 성장에 영향을 받는지를 실험한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. E3에 infection 후 5분 단위로 rifampicin을 처리한 결과 0분에 처리한 실험에서는 바이러스 입자의 증가가 관찰되지 않았다. 이는 early transcription에 필요한 host의 RNA polymerase가 방해받았기 때문일 것이라고 추정된다. 5분과 10분의 처리에서는 titer의 증가가 관찰되었다. 따라서 bacteriophage E3도 T7과 유사하게 late transcription이 숙주가 아닌 자신의 고유한 RNA polymerase에 의해 조절 받는 것을 유추할 수 있다. 그러나, rifampicin의 처리 후에 약간의 성장감소가 E3에서 보여진다. 이것은 이 phage의 major capsid 단백질을 만드는 유전자가 자신의 RNA polymerase와 숙주의 RNA polymerase에 의하여 모두 발현되는 dual promoter system을 가질 수 있음을 암시한다. 실제로 DNA sequence 결과는 promoter 부분에 host의 -10과 -35 region에 해당하는 sequence를 보인다(Fig. 3).

결론적으로, 대단히 빠른 성장을 보이는 bacteriophage E3는

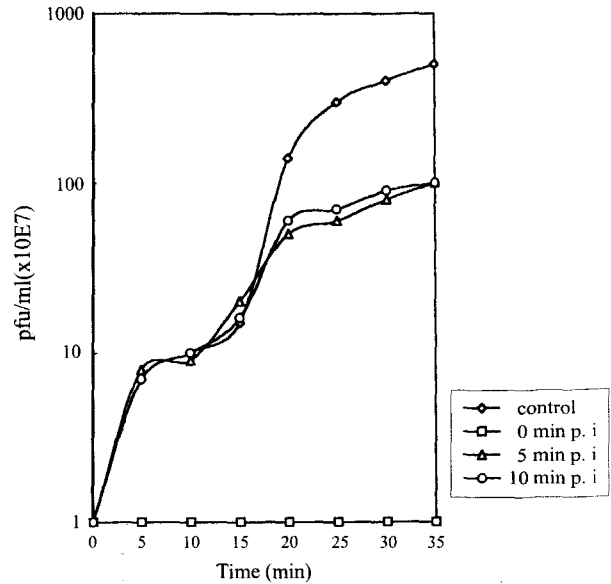


Fig. 4. The effect of rifampicin on the growth of E3. Rifampicin was added to the culture medium at the indicated times and the phage titer was measured every 5 minutes.

자신의 고유한 RNA polymerase에 의하여 인식되는 strong promoter를 가지고 있으며, 이는 아마도 major capsid 단백질을 발현하는 유전자가 위치한 72% 부근의 upstream에 존재할 것으로 예상된다. 앞으로 primer extension 등을 통하여 이 promoter의 위치를 확인하고, 이로부터 transcription을 일으킬 수 있는 RNA polymerase를 발현하는 유전자를 mapping한다면, T7에서와 같은 조절 가능한 expression system을 개발할 수 있을 것으로 보인다. 또한 dual promoter를 가지고 있다면 그 발현이 어떤 상황에서 각각 이루어지는지를 밝히는 것도 흥미로운 일이다.

감사의 글

본 연구는 교육부 학술연구조성비(유전공학 1996, 1997)에 의하여 이루어 졌습니다.

참고문헌

- Hong, H., N. Cho, and G. Jeong. 1994. Isolation and partial characterization of a new *Escherichia coli* bacteriophage E3. *Kor. J. Microbiol.* **32**, 464-470.
- Laemli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Molineux, I. 1994. T7 bacteriophage. In *Encyclopedia of Virology*, vol. 3, pp. 1388-1396. (Webster, R. and Granoff, A. eds.). Academic Press, San Diego, CA, U.S.A.
- Myung, H. and J. Cronan, Jr. 1994. Lipid selection in the assembly of lipid-containing bacteriophage PR4. *Virology* **198**, 25-30.
- Myung, H., Vanden Boom, T., and J. Cronan, Jr. 1994. The

- major capsid protein of the lipid-containing bacteriophage PR4 is the precursor of two other capsid proteins. *Virology* **198**, 17-24.
6. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **74**, 5463-5468.
7. **Studier, F. W. and B. Moffatt.** 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
8. **Tabor, S.** Expression using the T7 RNA polymerase/promoter system. In *Current Protocols in Molecular Biology* pp. 16. 2. 1.-16. 2. 11. Greene Publishing and Wiley Interscience, New York.
9. **Tabor, S. and C.C. Richardson.** 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled expression of specific genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **82**, 1074-1078.

(Received November 23, 1999/Accepted December 8, 1999)

ABSTRACT : Genetic Mapping and Sequence Analysis of the Gene Encoding the Major Capsid Protein of Bacteriophage E3

Soojin Bae and Heejoon Myung (Department of Bioscience and Biotechnology, Hankuk University of Foreign Studies, Yong-In, Kyung-Gi Do 449-850, Korea)

Bacteriophage E3 grows very rapidly and forms a large size plaque with a diameter of 1 cm. The promoter controlling the expression of the gene encoding the major capsid protein is thought to be most efficient. To find out this promoter, this gene was mapped in the genome according to the following procedure. The major capsid protein was purified from phage particle and the N-terminal amino acid sequence was revealed. Based on this sequence, a degenerate oligonucleotide probe was designed and used for screening of the genomic DNA fragments. From the DNA sequence of the selected clone, the gene encoding the major capsid protein was mapped at 72% of E3 genome. The expression of this gene was not sensitive to rifampicin which indicated the presence of E3's own RNA polymerase.