

박테리오파이지 P2의 *sir* 변이를 억제하는 새로운 박테리오파이지 P4 유도체인 P4 *ost2*의 분리와 동정

김 경 진

선문대학교 응용생물과학부 응용분자생물학전공

P2의 *sir* 변이를 억제하는 변이체 박테리오파이지 P4를 얻기 위하여, P4 *ash8 sid71 kmr intS*를 박테리오파이지 P2 *sir3* 용원소에 plating하여 플라크를 형성하는 P4 *ost2*를 분리하였다. P4 *ost2*는 1단계 성장실험에서 P2의 *sir* 변이를 억제하는 P4 변이체로 나타났다. 제한효소 절단 반응으로 유전체 DNA의 재배열이 일어난 단편을 찾아 cloning과 sequencing을 거쳐 P4 *ost2*의 구조를 규명하였다. P4 *ost2*의 DNA는, 6.9 kb의 결실을 가진 P4 *ash8 sid71 kmr intS*의 불완전한 trimer로 2개의 *cos*-cleavage 부위를 가지는 28.8 kb의 유전체로 밝혀졌다. CsCl 부양균등밀도 편차실험으로 P4 *ost2*의 DNA 크기를 확인하였고 파아지 머리 안에 packaging된 DNA에 대한 기초적인 구조를 파악하였다. P4 *ost2*의 분리 동정을 통해, P4 유전체 상의 *cos*-cleavage 부위의 개수가 Sir-type 파아지 머리의 packaging 반응과는 관련이 없다고 추정할 수 있었다.

Key words □ bacteriophage P2-P4, *cos*-cleavage, *Escherichia coli*, packaging

대장균(*Escherichia coli*)에 기생하는 박테리오파이지 P2와 P2에 기생하는 위성파아지(satellite phage)인 P4는, capsid 조립과정과 packaging 연구를 위한 뛰어난 실험 소재가 된다. 박테리오파이지 P2는 대장균에 감염하는 전형적인 temperate 파아지이며, 박테리오파이지 lambda와는 달리 자외선에 의해 induction되지 않는다. 박테리오파이지 P4는 P2를 prophage로 갖고 있는 대장균에 감염하거나 실험실에서 P2와 같이 공동 감염하면 lytic cycle로 가게 된다. 그러나 P2 파아지 없이 P4 파아지가 단독으로 대장균에 감염하면 P4 genome은 플라스미드 상태로 증식 유지되거나 또는 다른 temperate 파아지와 마찬가지로 prophage 상태로 있게 된다(3).

박테리오파이지 P4는 머리나 꼬리를 만드는 유전자를 갖고 있지 않으며 그 대신 P2가 생산하는 capsid 단백질들을 이용하여 자신의 genome을 집어넣을 수 있는 능력을 갖고 있다. 유전학적인 연구를 통해 P4의 *sid* (size determination) 유전자가 그러한 역할을 하는 것으로 밝혀졌으며(12), Sid 단백질은 capsid 조립과정 중 작은 머리(small, P4-size head) 조립을 위한 outer-scaffolding protein(외부 지지 단백질)으로 작용한다(9). 그러므로 P4가 없을 경우, P2 파아지는 자신의 genome을 집어넣을 수 있는 triangulation number가 7($T=7$)에 해당하는 큰 머리(large, P2-size head)를 조립하지만, P4 존재 하에서 조립된 대부분의 파아지 머리는 triangulation number가 4($T=4$)인 P4 크기의 작은 머리가 된다(4). 이와 같이 P2-P4 박테리오파이지 시스템은 동일한 capsid 단백질을 가지고 외부 지지 단백질의 존재 여부에 따라 전혀 크

가 다른 파아지 머리를 형성하는 파아지이므로, virus의 머리 조립 과정을 연구하는 좋은 실험 대상이 된다.

P2의 genome 크기는 33.3 kb이고, P4의 genome은 11.6 kb인 까닭에 P2의 genome은 P4 크기의 머리에 packaging 될 수 없으므로 생성되는 파아지는 거의 전부가 P4 파아지이다(3). P4 파아지의 *sid* 유전자에 변이가 생겨 2개 또는 3개의 P4 genome이 P2 크기의 머리 안에 packaging 되어있는 형태로 분리된 P4 *sid* 변이체의 경우, 역시 P2 genome이 packaging 되어있는 파아지는 거의 나타나지 않았다(12).

한편 P4의 *sid* 유전자 존재 하에서도 P2 크기의 머리를 조립할 수 있는 P2 변이체가 분리 동정되어 P2 *sir* (*sid* responsiveness)라고 명명되었고, 현재까지 분리 동정된 13개의 *sir* 변이는 대부분이 P2의 capsid 단백질 유전자인 *N* 유전자에 변이가 일어난 것이었다(14). P2 *sir* 변이체 파아지는 항상 P2 크기의 머리를 생성하게 되므로, 이러한 P2를 prophage로 갖고 있는 용원소는 P4 *sid*의 좋은 숙주세포가 될 것으로 생각되었다. 그러나 P2와 P2 *sir* 용원소를 숙주세포로 하여 얻어진 P4 *sid*의 burst size를 비교하면, P2 *sir* 보다 오히려 P2 용원소에서 10배 내지 20배 많게 나타났다(5). 즉 P2 *sir* 파아지는 P4 *sid** 나 P4 *sid*의 성장을 잘 도울 수 없다는 것이 알려졌고, 이 현상을 'P2 *sir*의 helper inefficiency'라고 부른다. 이는 P2-P4 system의 파아지 머리 조립과 packaging 과정에서 우리가 알지 못하는 다른 작용 기작이 존재한다는 것을 의미한다.

'P2 *sir*의 helper inefficiency'의 작용 기작을 유전학적인 방법으로 연구하기 위해, 우리는 강력한 Sir 표현형을 보이는 P2 *sir3* 용원소에서 잘 성장할 수 있는 변이체 P4 *ost1* (overcome *sir* three)을 분리 동정하였다(5). P4 *ost1*은, P4 trimer에

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 041-530-2273, 016-412-7649, Fax: 041-530-2917
E-mail: kjkim@sunmoon.ac.kr

integrase-mediated recombination을 통한 유전자 결실이 일어나 한 개의 *cos*-cleavage 부위만을 갖게 된 P4 변형체로 밝혀졌다. P2-P4 system에서, packaging 효율은 전체 유전체의 *cos*-cleavage 부위의 개수와 관련이 있다는 것이 P4 *ost1* 연구에서 제안될 수 있었다.

본 연구에서는, 새로운 Ost 표현형을 보이는 변이체 P4를 얻기 위하여 integrase가 결핍된 P4 유도체를 출발물질로 하여 P4 *ost2*를 분리하였다. P4 *ost2* 유전체의 구조 규명을 통하여, 두 개의 이상의 *cos*-cleavage 부위를 가진 P4 변이체도 P2 *sir*가 만드는 파아지 머리에 잘 packaging 될 수 있다는 사실을 알게 되었으며, 이는 P2-P4 system의 머리 조립과 packaging 과정 규명을 위한 새로운 연구 방향을 제시하는 것이다.

재료 및 방법

균주, 박테리오파아지, 플라스미드

플라스미드 P4 유도체의 숙주세포로는 *Escherichia coli* C1a (type strain of *E. coli* C strain)가 쓰였고(11), 박테리오파아지 P4 유도체의 숙주세포로는 P2를 prophage로 갖고 있는 C strain인 C295와 C353을 사용하였다(13, 14). Ost 표현형 P4 유도체 분리를 위해 P2 *sir3* 를 prophage로 갖고 있는 C2163을 지시숙주세포로 사용하였다(14). 분리된 P4 유도체가 P2-P4 hybrid인지를 확인하기 위해, *E. coli* C8 (P2 Qam34)를 지시숙주세포로 사용하였다.

새로운 Ost 표현형 P4 유도체 분리를 위한 출발 물질로 P4 *ash8 sid71 kmr intS*를 사용하였다 (1).

일반적인 cloning 실험을 위해 벡터 플라스미드로 pUC19을 썼다(15).

DNA 조작 시약 및 recombinant DNA technique

P4 유도체의 파아지 DNA는 Lindqvist의 방법에 따라 페놀 추출법으로 얻었다 (7).

여러 종류의 제한효소(NEB, Beverly, USA), T4 DNA ligase (Gibco-BRL, Gaithersburg, USA)는 생산자가 권고하는 조건에 맞추어 사용하였다. 본 실험에 사용된 일반적인 유전자 재조합 기법은 Sambrook 등이 저술한 실험서에 따라 행하였다(10).

DNA 염기배열순서 결정은 제노텍(대전, 대한민국)에 의뢰하여 수행하였다.

박테리오파아지 stock 준비

C2163 lawn 위에 형성된 P4 *ost2*의 플라크를 멸균된 파스퇴르 피펫으로 agar plug 전체를 들어내어 1 ml의 LB 배양액에 옮기고 5분 간 방치하여 agar plug와 함께 옮겨진 파아지가 용출되도록 하였다. 이 용출액을 P4 지시숙주세포인 C353에 plating하여 단일 플라크(single 플라크)를 얻었다. 이때 C2163에도 plating하여 Ost 표현형이 유지되는지를 계속 확인 하였다. 한편 분리된 P4 *ost2* 의 P2-P4 hybrid 여부를 확인하기 위하여 C8 (P2 Qam34) lawn에 plating하여 플라크 형성 여부를 조사하였다.

단일 플라크를 25 ml 숙주세포 배양액으로 옮긴 후 37°C에서 계속 진탕배양하며 흡광도를 측정하였다. 흡광도가 감소하는 시점에서 최종농도가 0.05 M 되게 EDTA를 가하여 더 이상 파아지가 숙주세포에 붙지 못하게 하였다. 흡광도의 감소가 멈출 때까지 배양한 후 배양액을 원심 분리하여 균체를 제거하였다. 파아지가 떠있는 상층액을 취하여 Beckman사의 L3-40 초고속 원심분리기로 47,000 × g (type 35 rotor)로 2시간 원심 분리하여 파아지 침전물을 얻었다. 이 침전물에 0.075 M MgCl₂를 1 ml 가한 후 4°C에서 2일 정도 방치하여 파아지가 서서히 완충용액에 용해되도록 하였다(1).

1단계 성장실험(One-step growth experiments)

박테리오파아지의 burst size를 결정하기 위하여 Six와 Klug의 표준적인 방법에 따라 1단계 성장실험을 행하였다(13). 즉 숙주세포를 2 × 10⁸ cells/ml 의 농도까지 배양한 후 이를 원심분리하여 칼슘이 5 mM 함유된 LB 배지에 녹였다. M.O.I. (multiplicity of infection) 값이 3 정도 되도록 실험하고자 하는 박테리오파아지를 파아지 stock으로부터 가해주고 7분간 흡착하도록 하였다. LB 배양액으로 100배 희석하여 37°C에서 배양하며, 원래 배양액의 흡광도 측정을 통해 파아지에 의한 완전 용해가 일어날 때까지 배양을 계속하였다. 완전 용해된 배양액의 플라크 assay를 통해 얻은 후손 파아지의 역가를, 처음 감염된 숙주세포의 수로 나누어 burst size로 삼았다.

CsCl 부양 균등밀도 편차실험(CsCl buoyant equilibrium density gradient)

박테리오파아지 P4 stock의 머리 크기 분포를 알아보기 위해 파아지 stock의 일부(0.1 ml 이하)를, 평균 밀도가 1.38 g/ml 로 맞추어진 CsCl 용액이 함유된 원심분리 튜브에 가하였다. 이 튜브를 Beckman L3-40 초고속 원심분리기를 사용하여 4°C에서 55,000 × g (SW41.1 rotor)로 60시간 동안 원심분리 하였다. 원심분리 후 튜브의 밑에 구멍을 내어 8방울을 한 분획(fraction)으로 하여 모았다. 각 분획의 박테리오파아지 역가를 P4 지시숙주세포를 상대로 플라크 assay를 통해 결정하여 밀도 변화에 따른 파아지 분포도(density gradient profile)를 구하였다

결과 및 고찰

P4 *ost2*의 분리

강력한 Sir 표현형을 나타내는 P2 *sir3* 용원소를 숙주세포로 하여 플라크를 형성할 수 있는 Ost (overcome *sir* three) 표현형을 보이는 변이체 P4 *ost*는, P2-P4 박테리오파아지 시스템의 머리조립과 packaging 과정의 연구를 위한 중요한 연구 수단이다. 최초로 분리된 P4 *ost1*의 경우, integrase-mediated recombination에 의한 P4 유전체의 결실로 *cos*-cleavage 부위를 하나만 가지는 불완전한 P4 trimer로 동정되었다. 이를 통해 Sir-type 파아지 머리(P2 *sir* 변이체에서 조립되는 P2 크기의 파아지 머리)에 packaging되는 전체 DNA가 가지고 있는 *cos*-cleavage 부위의 개

수가 하나일 때 효율적으로 packaging이 일어난다는 결과를 얻을 수 있었다(5).

본 연구에서는 P4 *ost1*과 다른 형태의 Ost 표현형 변이체를 얻기 위하여, *in vitro*에서 integrase를 불활성화 시킨 P4 *ash8 sid71 kmr intS* 유도체를 출발물질로 하였다. 이전 연구에서 조성된 P4 *ash8 sid71 kmr intS* 유도체는 플라스미드 상태로 유지되며 쉽게 선택될 수 있는 항생제 내성 유전자인 kanamycin 내성 유전자(*kmr*)가 도입되었고, integrase 중간에 있는 *SalI* site의 절단 후 남겨진 cohesive ends의 제거와 blunt-end ligation을 통해 frame shift 변이를 일으켜 integrase의 기능을 없앤 P4 유도체였다.

10⁸에서 10⁹의 P4 *ash8 sid71 kmr intS* 파아지 stock을 P2 *sir3* 용원소인 C2163에 plating하여 드물게 나타나는 플라크들을 잠정적인 Ost 표현형 변이체로 얻었다. 얻어진 잠정적인 플라크들은 일단 C8 (P2 *Qam34*)에 plating하여 플라크 생성 여부를 조사하였다. 현재까지 알려진 바로는 P2와 P4 파아지가 혼재된 *in vivo* 상황에서 recombination이 일어나 P2-P4 hybrid 파아지가 생성되는데, 이때 P2의 *cos*-cleavage 부위에 인접한 *Q* 유전자는 항상 P2-P4 hybrid에 남아 있게 된다(8). P2 파아지의 *Q* 유전자는 packaging에 관여하는 필수 유전자 중 하나로 이것이 결여되면 플라크를 형성할 수 없게 된다. 그러므로 P2-P4 hybrid는 P2 *Qam34* 파아지를 prophage로 가진 용원소에서 플라크를 형성하지만, P4 파아지는 *Q* 유전자의 결여로 플라크를 형성할 수 없다. C8 (P2 *Qam34*)를 숙주세포로 하여 플라크를 형성하는 잠정적인 플라크 형성 변이체는 P2-P4 hybrid이므로 더 이상 연구 대상이 아니었다.

C8 (P2 *Qam34*) lawn에서 플라크를 형성하지 못하는 잠정적인 플라크 형성 변이체를 골라 P4 *ost2*로 명명하고, 여러 차례의 분리과정을 거쳐 단일 플라크를 얻은 다음 phage stock을 만들었다. 이 phage stock을 사용하여 P2 *sir⁺* 용원소 숙주세포와 두 종류의 P2 *sir* 용원소 숙주세포들과 1단계 성장 실험을 수행하여 P4 *ost2*의 burst size를 얻었다. Table 1에서 보듯이, P4 *ost2*는 P2 *sir⁺* 용원소 숙주세포뿐 아니라 P2 *sir* 용원소 숙주세포들에서도 높은 burst size를 나타내어 P4 *ost1* 보다 강한 Ost 표현형을 나타냈다.

박테리오파아지 P4 *ost2* 유전체의 구조 동정

분리된 P4 *ost2* 유전체의 구조를 동정하기 위하여 phage stock

으로부터 phage DNA를 뽑아내어 제한효소의 절단 실험을 통해 분석하였다. 여러 종류의 제한효소 절단에서 얻어진 단편 양상은, 출발물질인 P4 *ash8 sid71 kmr intS* 유도체의 절단 실험에서 얻어진 단편 양상과 다를 바가 없었다. 그러나 제한효소 *SphI* 절단 반응 후 나타난 단편들 중 약 1 kb의 희미한 단편 조각은, P4 *ash8 sid71 kmr intS* 유도체의 *SphI* 절단 반응에서는 나타나지 않는 단편이었다. 이 단편을 통해 P4 *ash8 sid71 kmr intS* 유도체에 DNA 재배열(rearrangement)이 일어나 P4 *ost2*가 형성되었다는 추정이 가능하였다.

우선 1 kb 크기를 가진 P4 *ost2*의 *SphI* 단편을 gel로부터 추출하여 pUC19 플라스미드에 cloning하였고, 이 재조합 플라스미드 insert의 염기 배열 순서를 결정하였다. 염기 배열 순서의 분석을 통해, cloning된 약 1 kb 크기의 단편은 P4 *ash8 sid71 kmr intS* 유전체에 결실이 일어나 생성되었다는 것을 알게 되었다. 결실은, P4 *ash8 sid71 kmr intS* 유전체의 염기 배열 순서 8,096부터 시작되어 *sid*, *delta*, *psu* 유전자들을 거쳐 직렬로 연결된 다른 P4 *ash8 sid71 kmr intS* 유전체의 *cos*-cleavage 부위, *kmr*, 그리고 *int* 유전자 끝부분인 P4 *ash8 sid71 kmr intS* 유전체의 염기 배열 순서 3,080 (dimer로 계산할 경우 14,989)까지 계속되어, 총 6,893 bp가 빠진 것이었다(Fig. 1). 결실이 일어난 각 부위의 DNA 염기 배열 순서를 배열하였으나, 유사성을 보이는 염기 배열 순서를 찾을 수 없었다(Fig. 2). P4 *ost1*의 경우 DNA의 결실이 일어난 부위에서, P4의 *att* 부위와 다른 플라스미

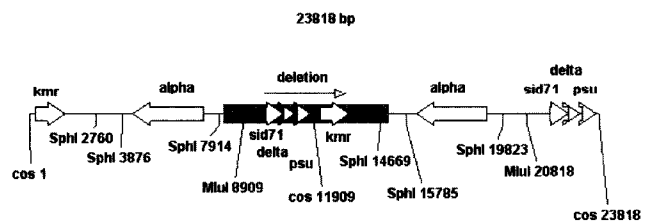


Fig. 1. Schematic linear genetic map of dimeric P4 *ash8 sid71 kmr intS* indicating deletion event in P4 *ost2*. The positions of restriction enzyme cleavage sites are given in bp according to the dimeric P4 *ash8 sid71 kmr intS*. The deleted region in P4 *ost2* is shown as a gray box in the middle of the map. It includes *sid*, *delta*, *psu*, *cos*-cleavage site and *kmr*. The *SphI* fragment (from 7,914 to 15,785), which is left after deletion event, shows up as a 1 kb long band on the gel in *SphI* digestion of P4 *ost2* DNA.

8,061 atgtccgggc agcggtagcg catttccac ggaataccgt cttccagaat gcgcaccagc

3,051 tcggaggatg gatatatgc cgcagctaca ttatlagct ctgagtagct cagttgcctc

Fig. 2. The sequences encompassing the deletion joint in P4 *ost2*. The thick and underlined sequences indicate the remaining ones after deletion event. The deletion starts at nucleotide number 8,096 of the P4 *ash8 sid71 kmr intS* DNA sequence, extending past *cos* and *kmr*, and ends at nucleotide number 3,080 of the P4 *ash8 sid71 kmr intS* DNA sequence. Total 6,893 bp of the P4 *ash8 sid71 kmr intS* DNA are deleted. No homology is found between two sequences adjacent to the deletion joint.

Table 1. Burst size of P4 and its derivatives with various P2 lysogens

Phage	Burst size with C1a lysogenic for ^{a)}		
	P2 <i>sir⁺</i>	P2 <i>sir²</i>	P2 <i>sir³</i>
P4	111 ± 4	1.4 ± 0.4	0.2 ± 0.04
P4 <i>sid71</i>	41 ± 3	4.4 ± 0.5	2.0 ± 0.2
P4 <i>ost1</i>	91 ± 2	93 ± 4	22 ± 3
P4 <i>ost2</i>	105 ± 4	144 ± 3	35 ± 4

a) All burst size data are the mean ± standard deviation of more than two independent experiments

드 간의 *in vivo* recombination이 일어날 때에 관여하는 공통적인 염기 배열 순서가 나타났고 그것은 integrase에 의해 일어난 반응이라고 쉽게 단정지을 수 있었다(5). P4 *ost2*의 경우, integrase에 의한 DNA 재배열을 방지하기 위하여 integrase가 결핍된 P4 *ash8 sid71 kmr intS*를 출발물질로 사용하였던 것이고, 나타난 결실도 integrase의 작용에 의한 결실은 아니었다. P4 *ost2*에서 나타난 DNA 결실은 현재 그 형성 기작을 추정할 아무런 단서가 없다.

SphI 이외의 다른 제한효소 절단 단편 양상과 결실의 규명을 통해, P4 *ost2* 유전체의 구조는 결실을 가진 P4 *ash8 sid71 kmr intS* 직렬 dimer 와 또 하나의 P4 *ash8 sid71 kmr intS* 유전체가 합쳐진 불완전한 P4 *ash8 sid71 kmr intS*의 trimer로 밝혀졌다 (Fig. 3). 전체 P4 *ost2*의 유전체 크기는 28,834 bp로 계산되었고, 2개의 *cos*-cleavage 부위를 가지고 있는 것으로 규명되었다. 이는 P4 *ost1*의 연구를 통해 추정된, 하나의 *cos*-cleavage를 가진 dimer 또는 trimer 크기의 P4 유도체가 Sir-type 파아지 머리에 효율적으로 packaging 될 수 있다는 것에 반하는 사실이었다. 이에 대한 연구는 아래 CsCl 부양 균등밀도 편차실험을 통해 수행하였다.

박테리오파아지 P4 *ost2*의 packaging

Burst size 결정을 통해 이미 강한 Ost 표현형을 나타내는 것으로 관찰된 P4 *ost2*가 실제로 어떠한 형태로 P2 크기의 머리에 packaging되는 지 알아보기 위하여, P4 *ost2* 파아지 stock의 CsCl 부양 균등밀도 편차실험을 수행하였다. 한편 P4 *ost2*의 출발물질이 되는 P4 *ash8 sid71 kmr intS* 파아지 stock의 CsCl 부양 균등밀도 편차실험도 수행하여 분석을 위한 대조(control)로

삼았다.

Fig. 4-A는 파아지 P4 *ost2*의 분포도이며, 하나의 정점이 8번 분획에서 나타났다. 이는 P4 *ost2*가 가지고 있는 2개의 *cos*-cleavage 부위 중 하나에서만 절단이 일어나고 packaging되는 것을 보여주고 있다. P2 *ost2*가 가지고 있는 2개의 *cos*-cleavage 부위중 하나가 제대로 기능하지 않을 수 있다는 점을 배제할 수 없지만, 전체 P4 *ash8 sid71 kmr intS*의 DNA 구조 등을 통해 볼 때, 2개의 *cos*-cleavage 부위는 모두 기능을 하는 것으로 보이고 그 중 하나만이 terminase에 의해 잘라져 P2 크기의 머리에 packaging된 것으로 나타났다.

Fig. 4A의 8번 분획에서 나타난 정점을 통해 구조 규명으로부터 얻어진 P4 *ost2*의 유전체 크기를 확인할 수 있었다. 대조인 파아지 P4 *ash8 sid71 kmr intS*의 분포도(Fig. 4B)에서 하나의 뚜렷한 정점(10번 분획)과 그 보다 밀도가 높은 쪽으로 작은 정점(6번 분획)이 나타났다. 이 중 10번 분획은 dimer 형태의 P4 *ash8 sid71 kmr intS*가 P2 크기의 머리에 packaging되어 나타난 것이고, 6번 분획은 trimer 형태의 P4 *ash8 sid71 kmr intS*가 P2 크기의 머리에 packaging되어 나타난 것이었다. 각각의 packaging된 유전체의 크기는 23.8 kb (dimer) 와 35.7 kb (trimer)였으며, trimer의 크기인 35.7 kb는 P2 크기의 머리에 packaging 될 수 있는 한계점에 가까웠기 때문에 packaging이 원활히 일어나지 않아 낮은 정점으로 나타난 것이다. 이보다 약 0.6 kb 큰 trimer 형태의 P4 *ash8 sid71 tetR*의 경우 CsCl 부양 균등밀도 편차실험 분포도에서 정점이 관찰되지 않았다(2). 그러므로 동일

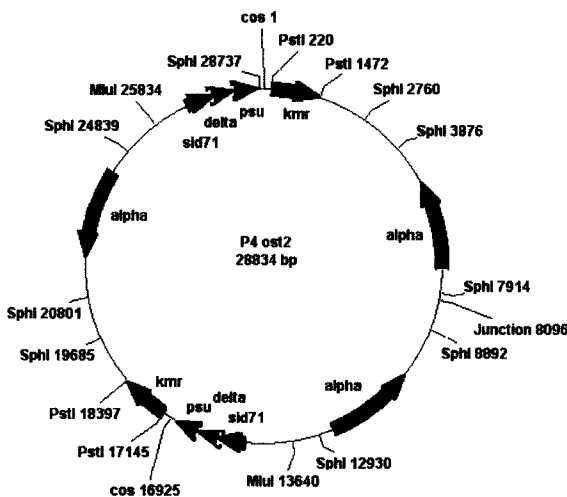


Fig. 3. The physical and genetic map of P4 *ost2*. This map shows the *SphI*, *MluI* and *PstI* sites. The deletion junction and *cos* sites are also shown. Deleted dimeric P4 *ash8 sid71 kmr intS* is shown from *cos1* through junction to *cos* at 16,925. One complete P4 *ash8 sid71 kmr intS* genome is shown in the left part of the map (i.e.: from *cos* 16,925 to *cos1*, clockwise). The calculated size of P4 *ost2* DNA is 28,834 bp.

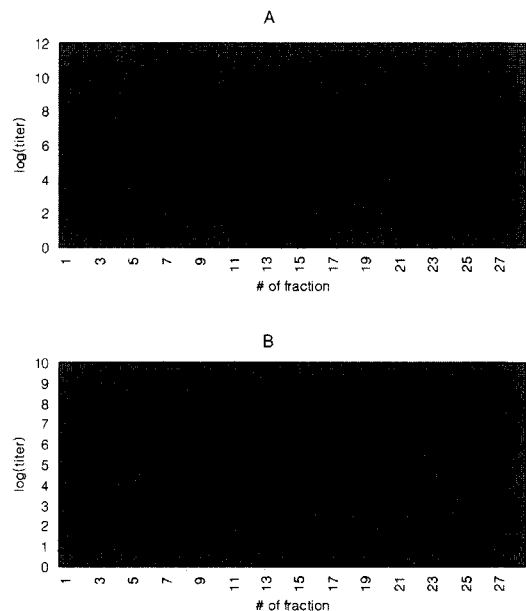


Fig. 4. CsCl buoyant equilibrium density gradient profiles of P4 *ost2* (panel A) and P4 *ash8 sid71 kmr intS* (panel B). The ordinate of this profile shows the P4 titer of each fraction expressed in log scale, and the abscissa shows the number of fraction. The fraction number 1 is the heaviest one (the bottom of the tube) and appears at the left end of the profile.

한 조건에서 얻어진 P4 *ost2*의 8번 분획의 유전체 크기는 P4 *ash8 sid71 kmr intS*의 dimer와 trimer 사이의 값을 가지게 되며, 구조의 규명으로부터 얻어진 28.8 kb의 값은 타당한 것이었다.

P4 *ost1*은 두 가지 점에서 Ost 표현형을 보이지 않는 P4 *ash8 sid71*의 dimer 또는 trimer와 차이가 있었는데, 첫째는 오직 하나의 *cos*-cleavage 부위를 가지는 것이고 다른 하나는 그 전체 DNA의 크기가 P4 dimer와 trimer의 중간이라는 것이었다. 이 중 하나의 *cos*-cleavage 부위를 가지는 성질이 P4 *ost1*이 Ost 표현형을 나타내는 이유일 것이라고 추정하였고, 그러한 추정을 입증하기 위하여 본 연구에서는 또 다른 Ost 표현형을 나타내는 P4 유도체의 분리 동정을 시도한 것이었다. 그러나 이번 연구에서 얻어진 P4 *ost2*는 *cos*-cleavage 부위를 2개 가지고 있는 구조로 판명되었고, 1단계 생장실험 결과 P2 *sir* helper에서 P4 *ost1* 보다 더 높은 burst size를 나타내었다. 이러한 결과는 *cos*-cleavage 부위의 개수가 Sir-type 파아지 머리에 효율적으로 packaging 되는데 중요할 것이라는 종래의 추정을 배제하는 것이다.

P4 *ost1*과 P4 *ost2*의 공통점은 그 DNA의 크기가 각각 26.6 kb, 28.8 kb로 P4의 dimer와 trimer의 중간 크기라는 것이다. 이미 P4 *ost1*의 연구 당시 제기한 바와 같이, P4 *ost1*과 P4 *ost2*의 DNA 크기 자체가 Ost 표현형을 나타내는 요인이 된다는 추정을 할 수 있다. 즉 Sir-type 파아지 머리는 원형의 P2가 생성한 파아지 머리와는 그 용적 또는 외형이 달라서, packaging될 DNA 크기의 제한을 갖게 되고 선호하는 크기가 P4 *ost2* 유전체 크기일 것이라는 추정이다. 이는 P4 *ost2*의 burst size가 P4 *ost1* 보다 높게 나타났기 때문에 가능하였다.

위의 추정을 가능하게 하는 연구 결과들이 이미 알려져 있다. P2 *sir*의 경우 capsid 단백질을 encoding하는 유전자인 *N* 유전자에 변이가 생겨 변형된 capsid 단백질이 생성되어 파아지 머리로 조립되는데, 그 조립과정에서 외부지지 단백질로 작용하는 P4의 Sid 단백질과 상호작용하지 못하므로 항상 P2 크기의 파아지 머리가 만들어졌다(9). 반면 원형의 P2가 생성한 capsid 단백질은 조립과정 중 P4의 Sid 단백질과 상호 작용하여 P4 존재 하에서는 항상 P4 크기의 작은 파아지 머리가 만들어졌다(3). 이는 P2 *sir*에서 만들어진 capsid 단백질 및 조립 중간단계 물질과 원형의 P2에서 만들어진 capsid 단백질 및 중간단계 물질은 P4의 Sid 단백질들이 구분할 수 있을 정도로 다르다는 것을 의미한다. 한편 Kim 등은 P2 *sir*에서 만들어진 capsid 단백질에도 작용하여 작은 P4 크기의 파아지 머리를 형성하게 하는 P4 *nms* (*N* mutation sensitive) 변이체를 분리하여 그 변이가 *sid* 유전자에 있음을 보임으로, Sir-type 파아지 머리는 원형의 P2 크기의 파아지 머리와는 다르다는 것을 입증하였다(6). 이 결과들은 왜 P4 dimer 또는 trimer가 Sir-type 파아지 머리에 효율적으로 packaging 되지 못하는지에 대한 우리의 추정을 뒷받침 하는 것이다.

본 연구에서는 P2 *sir* 변이체가 생성하는 파아지 머리에 효율적으로 packaging 되는 P4 유도체 파아지를 분리하고, 그 유전체의 구조 규명을 통해 전체 유전체 DNA의 크기가 packaging에

영향을 끼친다는 사실을 알아내었다. 이를 근거로 Sir-type 파아지 머리의 용적이 P4 *ost1* 또는 P4 *ost2* 크기의 DNA가 packaging 되기에 알맞다는 추정을 하게 되었다. 만일 이 추정이 옳다면, 27 내지 29 kb 크기로 P2-P4 system의 *cos*-cleavage 부위를 하나 이상 가진 P4 유도체 DNA는 효율적으로 Sir-type 파아지 머리에 packaging될 수 있을 것이다. 앞으로의 연구는 이러한 P4 유도체의 분리 동정 및 *in vitro* 생성을 통해, Sir-type 파아지 머리 내로 packaging될 때에 일어나는 DNA 크기에 의존하는 *cos*-cleavage와 packaging 과정 규명에 초점을 맞추어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 2001학년도 선문대학교 교내 학술연구비 지원에 의하여 수행되었음.

참고문헌

1. 김정진. 1998. 박테리오파아지 P2-P4 시스템을 위한 벡터 플라스미드 개발과 안정성. 미생물학회지 34, 236-242.
2. 김정진. 2003. 박테리오파아지 P2-P4 시스템을 위한 tetracycline resistance marker 함유 P4 유도체 벡터 플라스미드 조성. 미생물학회지 39, 118-122.
3. Bertani, L.E. and E.W. Six. 1988. The P2-like phages and their parasite, P4, vol. 2, p. 73-143. In R. Calendar (ed), The Bacteriophages. Plenum Press, New York.
4. Dokland, T.B., B.H. Lindqvist, and S. Fuller. 1992. Image construction from cryo-electron micrographs reveals the morphoietic mechanism in the P2-P4 bacteriophage system. *EMBO J.* 11, 839-846.
5. Kim, K-J., M.G. Sunshine, and E.W. Six. 1998. Characterization and identification of the bacteriophage P4 mutant suppressing *sir* mutations of bacteriophage P2. *J. Microbiol.* 36, 262-265.
6. Kim, K-J., M.G. Sunshine, B.H. Lindqvist, and E.W. Six.. 2001. Capsid size determination in the P2-P4 bacteriophage system: suppression of *sir* mutations in P2's capsid gene *N* by supersid mutations in P4's external scaffold gene *sid*. *Viol.* 283, 49-58.
7. Lindqvist, B.H. 1974. Expression of phage transcription in P2 lysogens infected with helper-dependent coliphage P4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 2752-2755.
8. Lindqvist, B.H. 1981. Recombination between satellite phage P4 and its helper P2 I. *In vivo* and *in vitro* construction of P4::P2 hybrid satellite phage. *Gene* 14, 231-242.
9. Marvik, O.J., T. Dokland, R. Nokling, E. Jacobson, T. Larsen, and B.H. Lindqvist. 1995. The capsid size-determining protein Sid forms an external scaffold on phage P4 procapsids. *J. Mol. Biol.* 251, 59-75.
10. Sambrook, J., and D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning: a laboratory manual (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
11. Sasaki, I. and G. Bertani. 1965. Growth abnormalities in Hfr derivatives of *Escherichia coli* strain C. *J. Gen. Microbiol.* 40, 365-376.
12. Shore, D., G. Deho, J. Tsipis, and R. Goldstein. 1978. Determination of capsid size by satellite bacteriophage P4. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA 75, 400-404.

13. Six, E.W. and C.A.C. Klug. 1973. Bacteriophage P4: A satellite virus depending on a helper such as prophage P2. *Virology* 51, 327-344.
14. Six, E.W., M.G. Sunshine, J. Williams, E. Haggard-Ljungquist, and B.H. Lindqvist. 1991. Morphoietic switch mutations of bacteriophage P2. *Virology* 182, 34-46.
15. Yanisch-Perron, C., C.J. Viera, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.

(Received November 14, 2003/Accepted December 2, 2003)

ABSTRACT: Isolation and Identification of the Bacteriophage P4 Mutant, P4 *ost2*, Suppressing *sir* Mutations of Bacteriophage P2

Kyoung-Jin Kim (Department of Applied Molecular Biology, Division of Applied Biology, Sunmoon University, Asan 336-708, Korea)

Bacteriophage P4 *ost2* which is the P4 mutant suppressing *sir* mutations of bacteriophage P2, was isolated as a plaque-former by plating P4 *ash8 sid71 kmr intS* on the lawn of P2 *sir3* lysogen. P4 *ost2* turned out to be the P4 mutant suppressing *sir* mutations of P2 in one-step growth experiments. With restriction enzyme digestion experiments, we could find the DNA rearrangement in P4 *ost2*. Subsequent cloning and sequencing of the rearranged fragment revealed the structure of P4 *ost2*. The genome of P4 *ost2* was imperfect trimer of P4 *ash8 sid71 kmr intS* containing 6.9 kb deletion and having 2 *cos*-cleavage sites. Its size was calculated as 28.8 kb long. The CsCl buoyant equilibrium density gradient experiments of P4 *ost2* confirmed the genome size of P4 *ost2* and the basic structure of packaged DNA in the particles of P4 *ost2*. The isolation and identification of P4 *ost2* suggested that the number of *cos*-cleavage site in P4 genome did not affect the packaging efficiency with Sir-type phage heads.