

Bacteriophage N4의 Receptor에 대한 연구

채건상 · 김선정 · 김창수 · 유욱준*

한국과학기술원 생물공학과

Studies on the Receptor for Bacteriophage N4 Infection

Chae, K.S., S.J. Kim, C.S. Kim, and O. Joon. Yoo

Department of Biological Science and Engineering, Korea Advanced
Institute of Science and Technology P.O. Box 150,
Cheongryangni, Seoul, Korea 131

ABSTRACT: The evidences that Lam B protein of *E. coli* is used as a receptor for infections of bacteriophage N4 as well as bacteriophage lambda were obtained from the following experimental results. First, all of the isolated lambda resistant clones possessing foreign DNA fragments in the plasmids were also resistant to bacteriophage N4, but not to bacteriophage $\phi 80$, T4 and T7. Second, when the plasmid DNA was treated with various restriction enzymes and ligated to delete the total or a portion of the foreign DNA fragments, the deleted plasmids lost the resistant activities to lambda and N4, simultaneously. Third, after amplification of Lam B protein about 200 times by inducing the protein using maltose as a sole carbon source, the host *E. coli* became sensitive to both lambda and N4.

KEY WORDS □ N4 receptor, lambda receptor, Lam B protein.

Bacteriophage N4는 host range가 매우 좁아 *E. coli* K-12 strain에만 국한되게 감염하는 phage로 알려져 있다(Satta 등, 1969). 지금까지의 연구결과 N4 phage의 물리·화학적 특성은 많이 알려져 있는데(Schito 1966, Schito 등 1966a, Schito 등 1966b), 그 infection 기작, 특히 receptor에 대한 연구는 보고된 바가 없다.

Phage의 receptor는 phage가 숙주에 감염하기 위해 숙주 박테리아에 흡착할 때 가장 먼저 필요한 것으로서, phage와 숙주와의 관계를 이해하는 면에서 중요하다. 또한 phage receptor의 돌연변이주를 찾아 원래의 숙주와 비교함으로써, 박테리아 cell wall이나 cell membrane 성분의 합성에 대해 이해하는 데에도 이용될 수 있다(Ryter 등, 1975). 그뿐 아니라 지금까지 많은 phage의

receptor가 알려져 있는데 protein으로 보고된 phage receptor 거의 전부가 phage receptor로서의 역할외에 cell에 필수적인 다른 역할도 동시에 하는 protein임이 밝혀지고 있다(Schwartz, 1980).

본 논문에서는 지금까지 lambda의 receptor로 알려진 Lam B protein이 bacteriophage N4의 infection에도 필수적이라는 결과를 얻어 보고한다.

재료 및 방법

박테리아 및 그 증식과 phage의 증식

본 실험에 사용된 박테리아와 phage의 배양 방법은 이미 발표한 논문과 같다(Chae and Yoo, 1986).

* To whom all correspondences should be addressed.

Plasmid DNA 의 분리

많은 양의 pUC9 및 pUC9 replication origin 을 갖는 재조합 plasmid 의 분리는 amplification 을 하지 않고 Clewell and Helinski(1972) 방법 에 따랐다. 적은 양(~5µg)의 plasmid 를 얻기 위해서는 Birnboim and Doly(1979)의 방법에 따랐다.

박테리아의 전체 DNA 분리

박테리아의 전체 DNA 는 Marmur(1961)의 방법 을 변형하여 분리하였다. 100 ml 의 saline -EDTA 용액(NaCl, 0.15 M, EDTA, pH 8, 0, 0.1 M)에 있는 0.2g 의 cell 에 10 mg 의 lysozyme 을 넣어 37°C에서 30-60분간 반응시켰다. 25%의 SDS-용액 10 ml 를 천천히 섞어주고 65°C에서 10분간 방치했다. 그후 phenol 과 chloroform 이 동량 섞인 용액으로 단백질을 제거 하였는데 수용액 층과 유기용매 층사이에 흰 침전 이 보이지 않을 때까지 여러번 계속 하였다. 수용액층에 2 배양의 ethanol 을 넣고 유리병으로 DNA 를 감아올려 10 ml 의 희석된 saline citrate 완충용액(NaCl 0.015 M, Na₃citrate, pH 7.0, 0.0015 M)에 녹였다. 65°C에 다시 방치하여 DNA 에 강하게 붙어 떨어지지 않은 단백질을 다시 제거하고 RNA 는 RNase 로 분해시켜 최종적 으로 DNA 를 냉각된 ethanol 로 침전시킨 후

TE 완충용액에 녹여 다음 실험에 사용하였다.

유전자 bank 의 제조 및 lambda 에 내성을 갖 는 균주의 분리

Brevibacterium albidum 과 *Proteus vulgaris* 의 유전자 bank 의 제조방법과 lambda 에 내성을 갖는 균주의 분리는 이미 발표된 논문과 같다 (Chae and Yoo, 1986).

Lambda 에 대해 내성을 갖게하는 유전자의 subcloning

1~2 µg 의 재조합 plasmid(Chae and Yoo, 1986)를 제한 효소로 절단한 후 원하는 DNA 절편만을 agarose gel 로 전기영동하여 분리하였다. 동시에 같은 양의 벡터 plasmid 를 제한효소로 절단한 뒤 calf intestinal phosphatase 를 사용하여 5' end 의 phosphate 를 제거하였다. 위의 두 DNA 절편들을 cohesive end ligation 인 경우에는 15°C에서, blunt end ligation 인 경우에는 20°C에서 T4 DNA ligase 를 사용하여 6 시간 내지 20시간 동안 반응을 시켰다. Ligation 된 DNA sample 을 사용하여 *E. coli* JM83 혹은 HB101을 형질 변환시키고, 이어 얻은 형질 변환 체에서 plasmid 를 분리하여 제한효소 지도를 만들어 얻어진 plasmid 가 원하였던 DNA 절편을 가지고 있음을 확인하였다. Subcloning 의 전체적 인 실험 경로는 Fig.1에 도시하였다.

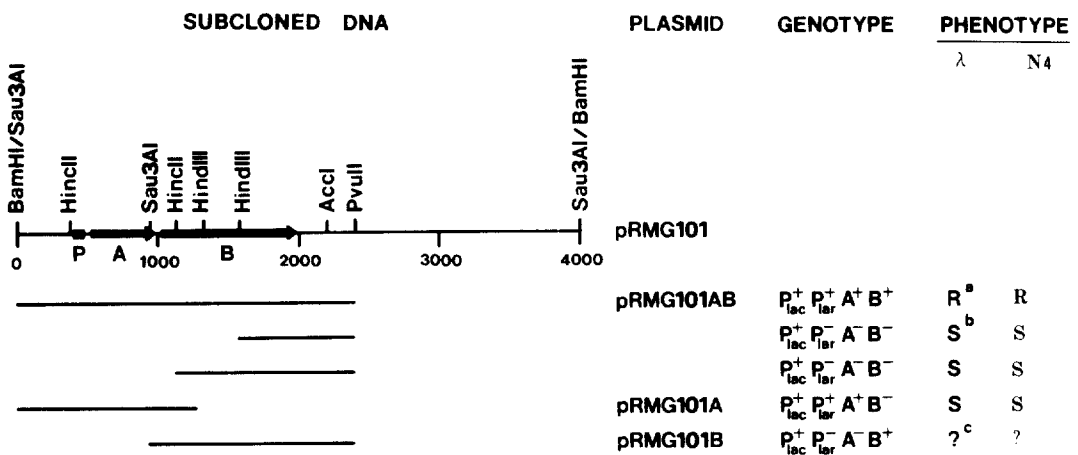


Fig.1. Subcloning of pRMG 101AB and phenotypes of the subcloned plasmids.

Left part represents the subcloned DNA fragments(light lines), localization of the genes(heavy arrows), and restriction map. Right part shows the genotypes and phenotypes of the subcloned plasmids. P: promoter, A: open reading frame A, B: open reading frame B, lac(subscript): lac operon, lar(subscript): lambda resistant operon. a: resistant to the phage, b: sensitive to the phage, c: unknown.

단백질 Lam B의 증폭과 증폭 후의 phage 감염 정도의 조사

Bacteriophage lambda의 receptor로 알려져 있는 단백질인 Lam B는 maltose에 의해 200배 까지 증폭됨이 보고되어 있는데(Schwartz, 1976), 그 방법에 따라 단백질 Lam B를 증폭시킨 상태에서 N4 phage를 감염시켰다. 200 μ l의 *E. coli* K-12(pUC9), *E. coli* K-12(pRMG 101 AB)(Chae and Yoo, 1986) 그리고 *E. coli* K-12(pRMG 216)(Chae and Yoo, 1986)의 배양액을 M9 배지에 0.4%의 glucose(for uninduced state)나 0.4%의 maltose(for induced state)와 0.8%의 한천이 들어있는 배지용액 2.5 ml와 섞어 한천배지에 뿌렸다. 한천 배지는 M9 배지에 0.4%의 glucose(for uninduced state)나 0.4%의 maltose(for induced state)와 1.7%의 한천을 넣어 제조하였다. 박테리아 용액이 뿌려진 한천 배지위에 1/100씩 단계적으로 희석된 lambda와 N4 phage의 suspension 5 μ l씩을 접종하고 37°C에서 배양하였다. 배양후 phage suspension이 접종된 부위에서의 박테리아의 분해 혹은 생장 억제 현상을 관찰하였다.

결과 및 고찰

*B. albidum*과 *P. vulgaris*의 chromosomal DNA를 재료로 하여 얻은 재조합 plasmid를 사용하여 lambda phage가 감염하지 못하는 45가지의 *E. coli* clone들을 분리하였는데, 이들이 갖고 있는 재조합 plasmid의 크기와 그 plasmid의 제한효소 Hinf I에 의한 절단 양식에 따라 7가지의 group으로 나누었다. 이들 7가지 group중 일부에 대해 N4 phage를 감염시켜 내성을 갖는지의 여부를 관찰하였다(Table 1). 여기에서 보듯, lambda가 감염하지 못하는 모든 clone들은 N4 phage 역시 감염하지 못한다는 사실을 확인하였다. Lambda phage가 이 7가지의 clone에 감염하지 못하는 것은 lambda phage가 clone의 세포막에 존재하는 receptor에 붙지 못하기 때문인 것으로 사료되기 때문에(Chae and Yoo, 1986) Table 1의 결과로 보아 N4 phage의 receptor는 lambda의 receptor와 같을 것임을 알 수 있

Table 1. Phenotypes of *E. coli* clones having various recombinant plasmids

plasmid in <i>E. coli</i> HB101	group	phenotype				
		N 4	lambda	ϕ 80	T 4	T 7
pRMG 101	A	R	R	S	S	S
pRMG 101AB*	A	R	R	S	S	S
pRMG 108	C	R	R	S	S	S
pRMG 114	D	R	R	S	S	S
pRMG 116	B	R	R	S	S	S
pRMG 117	E	R	R	S	S	S
pRMG 119	D	R	R	S	S	S
pRMG 122	A	R	R	S	S	S
pRMG 204	F	R	R	S	S	S
pRMG 213	C	R	R	S	S	S
pRMG 214	G	R	R	S	S	S
pRMG 216	B	R	R	S	S	S
pRMG 221	A	R	R	S	S	S
pUC 9		S	S	S	S	S

Each phage was directly mixed to the transformants after incubation of the final broth of transformation for an hour at 37°C with shaking. 3.7×10^8 phages(see Chae and Yoo, 1986) were added to 0.5 ml of the broth with 10 mM MgSO₄ and 10 mM Tris-Cl, pH 7.5. They were incubated for 20 minutes, mixed with 2.5 ml of soft agar(0.8% agar in LB broth) and incubated overnight at 37°C on the agar plates containing 30 mg/ml ampicillin. R and S mean resistant and sensitive to the phage, respectively. * : a subcloned plasmid of pRMG101.

었다. 또한 이들 7가지의 clone들은 lambda와 N4 phage에만 내성을 보였고 ϕ 80, T4, T7등에 대해서는 민감하였다(Table 1). 이 결과는 두 clone은 lambda와 N4에만 특이하게 내성을 보이고 있을 뿐이고 감염방법이 lambda와 다른 phage들에 대해서는 내성을 보이지 않고 있음을 시사하고 있다.

pRMG 101AB에 cloning된 유전자의 염기 서열을 밝혀 본 결과 한개의 promoter 아래에 두개의 open reading frame을 갖고있는 구조를 하고 있는 것으로 나타났다(Chae, et al., unpublished data). Fig.1에 있는 바와 같이 유전자 A만을 subcloning 하든지 또는 어느 다른 부분을 subcloning 하였을 경우에도 lambda와 N4에 대

Table 2. Phenotypes of the lambda resistant clones against the phages after the induction of the lambda receptor by maltose.

phage	induction	phenotype of <i>E. coli</i> K-12 having		
		pUC 9	pRMG101AB	pRMG216
lambda	-	S	R	R
	+	S	S	S
N4	-	S	R	R
	+	S	S	S

- : uninduced

+ : induced

R: resistant to the phage

S: sensitive to the phage

한 내성을 유지하지 못하게 됨을 관찰하였는데 이때 두가지 phage에 대한 내성을 동시에 잃는 경우만 발견 되었을 뿐 한가지에 대한 내성만을 잃은 경우는 찾아지지 않았다. 이러한 결과로 보아 오직 두개의 유전자(유전자 A, 유전자 B)가 같이 있을 때에만 lambda와 N4에 동시에 내성을 보일 수 있음을 알 수 있었다. 따라서 lambda의 receptor와 N4의 receptor가 같다는 것을 추정할 수 있다.

위와같은 가정을 뒷받침하기 위하여 maltose를 유일한 탄소원으로 사용하여 *E. coli* K-12

(pRMG 101AB)와 *E. coli* K-12(pRMG 216)의 maltose transport system을 증폭시켜 보았다. 이결과 두가지의 clone 모두가 lambda와 N4 phage에 더 이상 내성을 보이지 못하였다(Table 2). 그런데 lambda receptor는 maltose transport system의 한 구성 성분으로서, maltose로 증폭시키면 한 세포당 약 200배 가량 그 수가 증가하는 것으로 알려져 있다(Schwartz, 1976, Thirion and Hofnung, 1972). 따라서 maltose transport system을 증폭시킨 후에는 한 cell에, cloning된 유전자의 산물보다 receptor의 수가 상대적으로 많아져 cloning된 유전자의 산물이 효과적으로 receptor의 작용을 방해시키지 못하게 됨으로 말미암아 Table 2와 같은 결과가 나타났 것으로 생각된다. 이때 lambda에 대한 내성만 없어지는 것이 아니고, N4 phage에 대한 내성도 동시에 없어지는 결과는, 적어도 N4 phage의 receptor가 maltose로써 증폭되는 maltose transport system의 한 구성 성분일 것이라는 가정을 뒷받침 해주고 있다. 또한 maltose transport system의 구성 성분 각각의 박테리아에서의 작용 위치를 고려하면 그중 유일한 outer membrane protein인 Lam B protein이 lambda뿐만 아니라 N4에 대해서도 receptor로 작용하고 있는 것으로 결론지을 수 있다.

적 요

*E. coli*의 단백질 Lam B는 lambda phage의 감염뿐 아니라 N4 phage의 감염에 있어 receptor로서의 기능을 한다는 결과를 다음과 같이 얻었다. 첫째, plasmid에 외부 DNA 절편들을 갖고 있으면서 lambda에 내성을 보이는 clone들을 분리하였는데 이들은 모두 N4에 대해서도 내성을 보였으나 다른 phage인 ϕ 80, T4, T7에 대해서는 내성을 나타내지 않았다. 둘째, 외부 DNA 절편을 갖고있는 plasmid에서 외부 DNA의 전부 혹은 일부를 제거한 plasmid는 lambda와 N4 phage에 대한 내성을 동시에 상실했고, 두 유전자가 모두 있을 때에만 두가지 phage에 대한 내성을 동시에 보여줌이 관찰되었다. 셋째, maltose를 단일 탄소원으로 하여 단백질 Lam B를 증폭시킨 상태에서 phage를 감염시키면 내성을 보이던 *E. coli* 균주들이 lambda와 N4에 더 이상 내성을 보이지 않았다.

참고문헌

1. Birnboim, H.C. and J. Doly, 1979, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **7**, 1513-1523.
2. Chae, K.S. and O.J. Yoo, 1986, Cloning of the lambda resistant genes from *Brevibacterium albidum* and *Proteus vulgaris*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **140**, 1101-1105.
3. Clewell, D.S. and D.R. Helinski, 1972,

- Effect of growth condition on the formation of the relaxation complex of supercoiled Col EI deoxyribonucleic acid and protein in *Escherichia coli*. *J. Bact.* **110**, 1135-1146.
4. Marmur, J. 1961, A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms, *J. Mol. Biol.* **3**, 208-218.
 5. Rist, J.K., D.R. Guinta, A. Sugino, J. Stambouly, J. Falco, S.C. Falco, L.B. Rothman-Denes, 1983. In Mechanisms of DNA replication and recombination. New York, Alan R. Liss, Inc., pp.245-254.
 6. Satta, G., A. Pesce, and G.C. Schito, 1969, Fate of the host chromosome during N4 coliphage replication. *G. Microbiol.* **17**, 131-139.
 7. Schito, G.C., 1966, A rapid procedure of the purification of bacterial viruses. *Virology* **30**, 157-159.
 8. Schito, G.C., G. Rialdi, and A. Pesce, 1966a, Biophysical properties of N4 coliphage. *Biochem. Biophys. Acta.* **129**, 482-490.
 9. Schito, G.C., G. Rialdi, and A. Pesce, 1966b, The physical properties of the deoxyribonucleic acid from N4 coliphage. *Biochem. Biophys. Acta.* **129**, 491-501.
 10. Schwartz, M., 1976, The adsorption of coliphage lambda to its host: Effect of variations in the surface density of receptor and in phage-receptor affinity. *J.M.B.* **103**, 521-536.
 11. Schwartz, M., 1980, Interaction of phages with their receptor proteins. In Virus Receptors, receptors and recognition, Series B. Vol.7, L.L. Randall and L. Philipson(ed), London, Chapman and Hall, pp.59-114.
 12. Thirion, J.P., and M. Hofnung, 1972, On some genetic aspects of phage resistance in *E. coli* K-12, *Genetics*, **71**, 207-216.

(Received Feb. 12, 1987)