

## 폐염균 *recP*와 *rec-8* 유전자의 비교

김승환 · 김수남 · 이동권\*

성균관대학교 약학대학

(Received October 15, 1992)

### Characterization of *Streptococcus pneumoniae* *recP* and *rec-8* Genes

Seung-Hwan Kim, Soo-Nam Kim and Dong-Kwon Rhee\*  
College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Su-Won 440-746, Korea

**Abstract**—*S. pneumoniae* *recP* mutant was compared with *rec-8* mutant to identify whether they are the same gene or not by determining sensitivity to DNA damaging agents. *recP* and *rec-8* mutant have almost same sensitivity to UV, ethylmethane sulfonate, and methylmethane sulfonate, suggesting that *recP* has the same function as the *rec-8* gene in DNA repair.

**Keywords** □ *S. pneumoniae*, transformation, *recP*, DNA damage.

폐염균(*Streptococcus pneumoniae*)은 폐염을 일으키는 세균(*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* 등) 중에서 전체 폐염 발생의 90% 이상을 차지하고 있는 그람 양성 비운동성 세균이다.<sup>7)</sup> 폐염균은 포자를 형성하지 않으나 다당류 협막을 갖고 있다. 이 균은 폐염 뿐만 아니라 수막염, 이염 등도 야기시키며 정상인의 기도부위에서 정상적인 균락의 일부로써 존재하지만 어떻게 질환을 나타내지는 알려져 있지 않다.<sup>8)</sup>

폐염균의 특징은 외부의 DNA를 세포안으로 끌어들일 수 있는 능력(competence)이 지수상(exponential phase)에 수분간 나타나는 것이다. Competence가 나타날 때에는 거의 모든 폐염균이 competent하게 되어 형질전환 됨으로써 유전자교환을 통한 환경적응에서 중요한 역할을 하고 있다. 폐염균에서 형질전환이 일어나는 과정<sup>9,10)</sup>은

첫째, competence factor에 의해 competence가 나타나도록 유도되어 10여개 이상의 새로운 단백질(competence specific protein)들이 생성되고,<sup>11)</sup>

둘째, DNA가 receptor에 부착하여 한가닥의 DNA는 oligonucleotide로 분해되면서 다른 한가닥의 DNA는 세포안으로 들어가며,<sup>12,14)</sup>

셋째, 세포안으로 들어간 한가닥의 DNA가 유사한 염기배열의 DNA와 재조합되어 새로운 형질전환체가 형성되는 것이다.<sup>15,16)</sup> 만약 세포안으로 들어간 한가닥의 DNA와 유사한 염기배열의 DNA가 없을 경우에는 nucleotide로 분해되어 DNA 복제에 사용되게 된다.<sup>17,18)</sup>

형질전환이 일어나는 과정은 많은 생화학적 연구 결과로 밝혀졌으나 그 각각의 과정에 관여하는 유전자에 관한 연구는 극히 미진한 상태이다. 즉 형질전환에 결함이 있는 많은 mutant가 분리되었으나<sup>19,25)</sup> 각각의 mutant의 특성 및 유전적 연구는 극히 미미하여 현재까지 cloning된 유전자는 competence factor에 관여된 유전자 *com*,<sup>26)</sup> mismatch repair에 관련된 유전자 *hexA*,<sup>27)</sup> *hexB*,<sup>28)</sup> DNA 재조합에 관련된 유전자 *recP*<sup>26)</sup> 뿐이다. 특히 DNA 재조합에 결함이 있는 mutant(*rec*<sup>-</sup>)들 중 *rec-8* mutant (CP1208 균주)는 DNA 재조합 활성에 있어서 *Bacillus subtilis*의 *recA* mutant와 유사한 특성(염색체 DNA의 형질전

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

**Table I**—List of strains and plasmids used in this study

<i>S. pneumoniae</i> strain	Genotype or Relevant Marker(s)	Reference or Derivation
CP1016	<i>ery-r2, nov-r1, str-r1, thy<sup>-</sup></i>	Morrison <i>et al.</i> , 1984
CP1200	<i>malM511, str-r1</i>	Morrison <i>et al.</i> , 1983
CP1208	<i>malM511, str-r1, rec-8</i>	Morrison <i>et al.</i> , 1983
SK4001	<i>malM511, str-r1, recP</i> Ω, <i>ermB</i> at <i>TaqI</i> [1134]	CP1200 Ω pXF402 Ω <i>ermB</i>
SK4002	<i>malM511, str-r1, recP</i> Ω, <i>ermB</i> at <i>TaqI</i> [1830]	CP1200 Ω pXF402 Ω <i>ermB</i>
Plasmid		
pMV158	5.3 kb, <i>tet<sup>r</sup></i>	Burdett <i>et al.</i> , 1980
pXF402	6.4 kb, <i>amp<sup>r</sup>, recP</i> [ <i>HindIII</i> ](1061)- <i>HindIII</i> (2400)]	Rhee and Morrison, 1988
<i>E. coli</i> strain DH1	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi1, supE44</i>	Low, 1968
Plasmid		
pR29	6.4 kb, <i>erm<sup>r</sup>, amp<sup>r</sup>, cat</i>	Mejean, 1981

환에는 결함이 있으나 plasmid DNA의 형질전환은 정상)을 갖고 있어서<sup>20)</sup> 관심의 대상이 되어 왔다. 폐염균에서 *recA* 유사체라고 생각되는 *rec-8* 유전자를 cloning 하기 위해 폐염균 plasmid인 pSP21을 사용하여 genomic library를 만들고 complementation test를 하여 야생형을 나타내는 clone을 확인하였다. 그러나 이 clone은 *rec-8* 유전자를 함유한 recombinant plasmid가 불안정하여 삽입된 DNA 뿐만 아니라 plasmid 부분도 탈락되었다. 따라서 *rec-8* 유전자를 함유하는 삽입된 DNA의 일부를 회수하여 방사성 동위원소로 표지된 탐침(radioactive probe)으로 사용하여 *in situ* colony hybridization 방법으로 탐색하여 *recP* 유전자를 cloning 하였다.<sup>5)</sup> 즉 *rec-8* 유전자를 함유하는 큰 DNA의 일부가 탐침으로 사용되어 *recP* 유전자가 cloning 되었기 때문에 *recP*와 *rec-8* 유전자가 같은지는 확인되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 *recP*와 *rec-8* mutant를 이용하여 염색체 DNA와 plasmid DNA가 형질전환되는 효율 및 UV, ethylmethane sulfonate(EMS), methylmethane sulfonate (MMS) 등에 의한 DNA 손상을 수리하는 능력 등의 차이를 비교함으로써 *rec-8* 유전자가 *recP*와 같은 유전자인지 확인하려 하였다.

**실험방법**

**세균 균주 및 Plasmid**—본 실험에 사용한 대장균 및 폐염균주와 플라스미드는 Table I과 같다.

**재료**—배지는 Difco사 제품을 사용하였으며 일반

시약은 Sigma 제품을 사용하였다. [<sup>3</sup>H]-thymidine과 제한효소는 각각 Amersham과 Kosco 제품을 사용하였다. DNA 분리 정제에 사용한 Gene clean kit는 Bio 101 제품(미국)을 사용하였다.

**배지 및 생장조건**—대장균의 배양은 LB배지<sup>21)</sup>를 이용하여 37°C 에서 진탕배양하였다. 폐염균은 CAT 배지(101)를 이용하여 37°C 에서 진탕 배양하였다. CAT 배지의 조성은 1l당 casitone 10g, 효모엑스 1g, tryptone 5g, NaCl 5g, choline 5 mg이었으며 45분간 멸균한 후 사용 직전에 글루코오스와 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 각각 0.2%와 0.167 M이 되도록 넣어 주었다. 형질전환에 사용한 배지(complete transformation medium : CTM)는 1l의 CAT 배지에 CaCl<sub>2</sub> 110 mg, bovine serum albumin 2g을 첨가하여 사용하였다.

**형질전환**—대장균 DH1 균주를 사용하여 형질전환 시키기 위하여 Morrison 방법<sup>29)</sup>을 이용하였으며 폐염균의 형질전환은 Chen과 Morrison의 pH 변화방법<sup>22)</sup>을 이용하였다. 즉 폐염균을 3 mM의 HCl을 첨가한 CTM 배지에서 O.D<sub>550</sub>가 0.05가 될 때까지 배양한 후 글리세린을 10%(v/v)가 되도록 넣고 잘 혼합하여 -70°C 에서 사용할 때까지 보관하였다. 사용 직전에 폐염균을 0°C 에서 녹이고 CTM 배지로 한번 세척하고 3 mM의 NaOH가 첨가된 CTM 배지에 현탁시킨후 DNA를 첨가하고 37°C 에서 60분 또는 90분 동안 배양하여 형질전환시키고 항생제를 함유한 적당한 배지에 pour plating 하여 형질전환체를 선별하였다.

**Plasmid DNA 분리**—대장균 plasmid DNA는 Bir-

nboim과 Doly의 alkaline-SDS lysis 방법<sup>24)</sup>을 이용하였으며 폐염균 plasmid DNA는 Saender와 Guild 방법<sup>23)</sup>을 이용하였다.

**액체배지 Competence Test**— 폐염균에서 competence가 나타날 때 DNA의 분해, 흡수 및 형질전환체의 형성 등을 측정하기 위해 Porter와 Guild 방법<sup>2)</sup> 및 Morrison 방법<sup>3)</sup>을 사용하여 다음과 같이 실험하였다. [<sup>3</sup>H] DNA는 이미 보도된 방법<sup>4)</sup>으로 폐염균 CP1016 균주(*nov-r*)로부터 분리 정제하여 competence가 발현되는 것을 측정하는데 사용하였다.

**1) DNA 분해**—10  $\mu$ l의 [<sup>3</sup>H] DNA를 폐염균을 함유한 9 ml의 CTM 배지에 첨가하여(최종 DNA농도 0.05  $\mu$ g/ml) 1시간 동안 37°C에서 배양한 후 0.1 ml을 취해 50  $\mu$ l의 ice-cold 30% trichloroacetic acid와 혼합하고 0°C에서 30분간 방치한 후 microfuge에서 2분간 원심분리하여 상등액 0.1 ml을 취하여 0.9 ml의 scintillation fluid(ppo 5.5g, popop 0.1g, toluene 667 ml, Triton X-100 333 ml)와 혼합한 후 scintillation counter(Beckman Model LS7500)로 방사능 양을 측정하였다.

**2) DNA 흡수**—1시간 동안 [<sup>3</sup>H] DNA와 반응시킨 1)의 반응액 0.8 ml을 취해 DNase I을 5  $\mu$ g/ml이 되도록 첨가한 후 37°C에서 10분간 반응시킨다. 이 반응액을 microfuge에서 2분간 원심분리하여 균체를 얻고 CTM 배지로 한번 세척한 후 0.1 ml의 CTM 배지에 현탁하여 방사능 양을 측정하였다.

**3) 형질전환체 Assay**—한 시간 동안 [<sup>3</sup>H] DNA와 반응시킨 1)의 반응액 5  $\mu$ l을 적절히 희석하여 novobiocin 10  $\mu$ g/ml을 함유하는 CAT 배지에 pour plating하고 37°C 배양기에서 18시간 배양하여 나타난 Nov-r한 집락의 수로서 형질전환체의 수를 세었다.

**In situ Colony Competence Test**—폐염균 배양액 내에서 형질전환이 일어나는 것을 측정하기 위해 배지에 DNA(*mal*<sup>+</sup>로서 말토오스를 이용할 수 있는 유전자)와 말토오스를 첨가하였다.<sup>12,9)</sup> 형질전환을 할 수 있는 폐염균(*Xfo*<sup>+</sup>)은 배지내에서 자라면서 *mal*<sup>+</sup> DNA를 흡수하여 *Mal*<sup>+</sup>로 전환됨으로써 배지내에 있는 말토오스를 이용하여 큰 집락을 형성하지만 형질전환에 관계된 여러 단계 중에 어느 한 단계라도 결함이 있는 폐염균(*Xfo*<sup>-</sup>)은 *mal*<sup>+</sup> DNA를 제대로 처리할 수 없어 *Mal*<sup>-</sup>로 남아 있으므로 말토오스를 이용하지 못하여 작은 집락으로 남아 있게 됨으로써

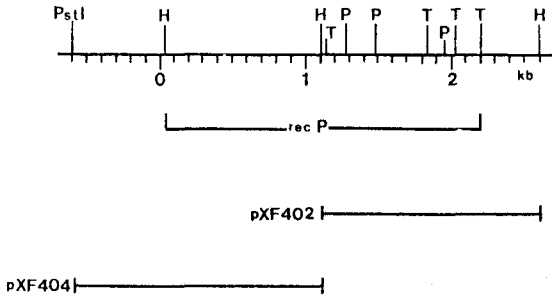
*Xfo*<sup>+</sup>와 *Xfo*<sup>-</sup>를 구분할 수 있다.

**UV 조사**—폐염균을 CAT 배지에서 O.D<sub>550</sub>가 0.2가 될 때까지 배양한 후 글리세린을 10%(v/v)가 되도록 넣은 후 잘 혼합하고 1 ml씩 분주하여 -70°C에 보관하였다. 사용직전 1 ml의 배양액을 0°C에서 녹이고 CAT 배지로 한번 세척한 후 10 ml의 CAT 배지에 현탁시켜 37°C에서 O.D<sub>550</sub>가 0.1이 될 때까지 배양하였다. 배양액을 CAT 배지로 적당배율 희석한 후 CAT agar위에 도말하고 15 W 자외선등(三共殺菌社, 일본) 아래에서 7.5 J/s의 강도(260 nm에서 UVX radiometer [UVP 회사제품, 미국]로 측정)로 자외선을 일정시간 조사하고 바로 CAT agar로 덮어서 폐염균이 CAT agar 사이에 함몰되도록 하였다. 모든 조작은 photo-reactivation에 의한 생균수 증가를 방지하기 위해 암실에서 실험하였다.

**EMS, MMS 처리**—EMS 또는 MMS에 대한 *rec* mutant의 감수성을 측정하기 위해서 배양액의 O.D<sub>550</sub>가 0.2인 폐염균에 EMS 또는 MMS를 0.1, 0.5, 2% (v/v)가 되도록 넣고 37°C에서 30분간 배양하였다. 30분 배양후 CAT 배지로 2번 세척한 후 균을 적절히 희석하여 CAT agar와 혼합한 후 pour plating하여 37°C에서 18시간 배양하여 생균수를 측정하였다.

## 실험결과

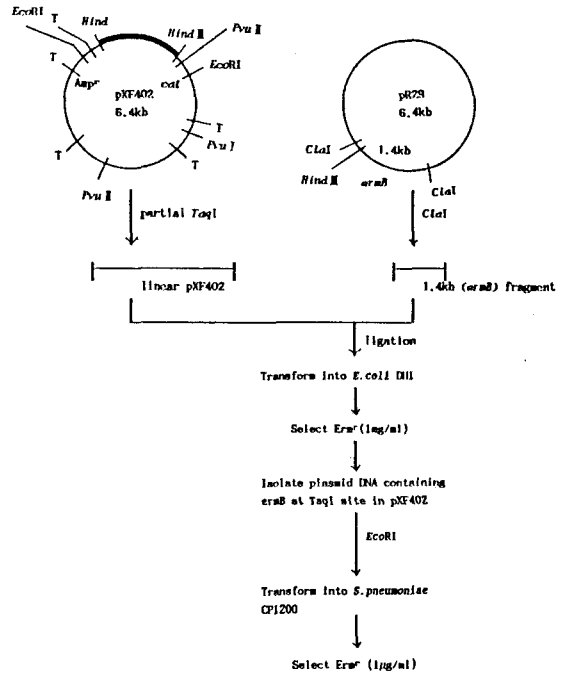
***recP*-mutant의 작제**—*recP*-mutant(SK4001과 SK4002)는 DNA 재조합을 이용한 삽입 돌연변이(insertion mutagenesis) 방법을 이용하였다. 즉, *recP* 유전자의 오른쪽 절반을 함유하고 있는 pXF402 plasmid DNA(Fig. 1)를 *Taq*I으로 부분적으로 가수분해한 후 0.7% agarose gel에서 전기영동하여 6.4 kb의 linear form으로 된 DNA 절편을 gene clean kit를 사용하여 분리 정제하였다. pR29(106)을 *Cla*I으로 절단하여 erythromycin(Erm)에 저항성인 유전자 *ermB*를 함유하는 1.4 kb DNA 절편을 gene clean kit를 사용하여 분리한 후 6.4 kb의 linear form pXF402와 ligation 하고 대장균 DH1에 형질전환시켜 Erm 1  $\mu$ g/ml을 함유하는 LB agar plate에 도말하였다(Fig. 2). Erm-r한 집락을 얻어서 alkaline-lysis 방법에 의해 plasmid DNA를 분리한 다음 제한효소 *Hind*III, *Pvu*II로 절단하였을 때 각각 *recP* map의 1134와 1830 bp 위치에 *ermB* 유전자가 삽입되었음을 확인하였으며 이



**Fig. 1**—Physical map of the *recP* locus. pXF402 and pXF404 were cloned in the terminator vector pKK232-8<sup>5)</sup>. Restriction enzyme abbreviations: H, *Hind*III; P, *Pvu*II; T, *Taq*I.

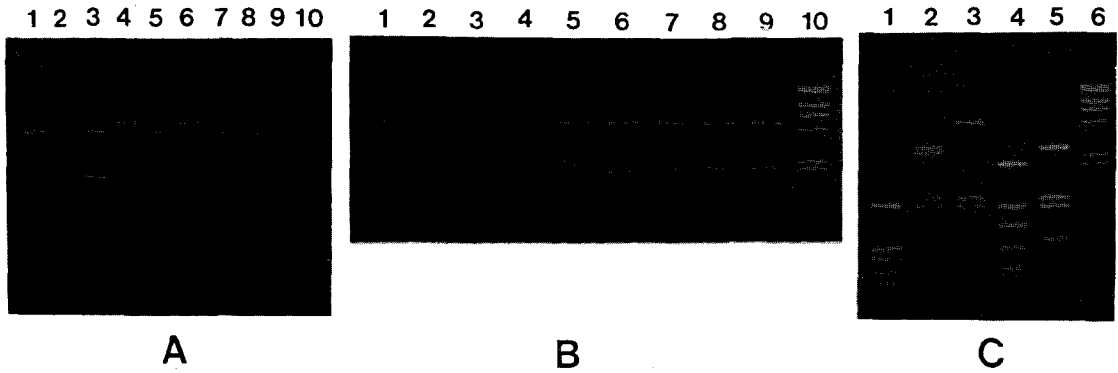
recombinant plasmid를 각각 pDKR302와 pDKR343으로 명명하였다(Fig. 3). 즉 Fig. 3은 *ermB*가 pXF402의 *Taq*I 자리에 삽입되어 *Erm-r* 하계된 clone으로부터 분리한 plasmid DNA를 *Hind*III로 절단하였을 때 얻은 결과로서 특히 panel A의 8번 lane은 2.4 kb와 0.64 kb의 DNA 절편과 담체(vector)로 사용된 pKK 232-8 plasmid의 절편(5.0 kb)을 나타내고 있으며 이것은 1830 bp에 위치한 *Taq*I 자리에 1.4 kb의 *ermB* 유전자가 삽입된 것을 나타내고 있다. Panel B의 6번 lane은 1.9 kb와 1.1 kb의 DNA 절편을 나타내고 있으며 이것은 1134 bp 위치에 있는 *Taq*I 자리에 *ermB*가 삽입되었음을 나타내고 있다. Panel C의 3번 lane은 *ermB*의 삽입방향이 Fig. 2에 표시된 것과 반대방향으로 삽입된 것을 나타내고 있다.

pDKR302와 pDKR343 plasmid DNA를 *Eco*RI으로 절단하고 야생형 폐렴균(CP1200)에 형질전환시켜 상동염색체 DNA 재조합(homologous DNA recombination)을 이용해 삽입되어 *Erm* 1 µg/ml에 저항성인 형질전환체를 형성하였다. 이들 *Erm-r* 형질전환체를 SK4001과 SK4002라 명명하고 *in situ* colony competence assay 하였을 때 형질전환에 결점이 있음을 확인하였다(Table II). 이들 폐렴균주가 형질전환의 어느 단계에 결함이 있는지 알기 위해 DNA 분해, 흡수 정도 및 형질전환체의 형성 등을 측정하였을 때 DNA의 분해 흡수는 정상이지만 형질전환체의 형성에는 결함이 있었다(Table III). 즉 *recP*<sup>-</sup>인 SK4001과 SK4002는 야생형(CP1200)과 비교할 때 세포안으로 흡수된 DNA의 약 2% 정도만이 DNA 재조합되어 형질전환체를 형성하였다.



**Fig. 2**—Construction of *recP*<sup>-</sup> insertion mutant. A linear 6.4 kb fragment of pXF402, prepared by partial digestion of *Taq*I was ligated to a 1.4 kb *Cla*I fragment of *E. coli* *ermB* gene from pR29. The ligated DNA was transformed into *E. coli* DH1 strain and *Erm-r* transformants were selected. Recombinant containing the *ermB* gene in pXF402 was digested with *Eco*RI and used for transformation into *S. pneumoniae* CP1200. *Erm-r* transformants were selected and used for determination of phenotype in liquid culture competence test. Filled line between two *Hind*III sites in pXF402 is a piece of *recP*. Abbreviations: *cat*, chloramphenicol acetyltransferase; T, *Taq*I restriction enzyme site.

**UV 조사에 대한 생존율의 측정**—지수상에 있는 폐렴균주에 UV를 40 J/m<sup>2</sup>과 80 J/m<sup>2</sup> 조사(照射)하였을 때 CP1200 균주는 생존수(生菌數)가 UV를 조사하지 않은 대조군 생존수의 0.2% 및 0.019%로 감소되었으나 CP1208 mutant는 UV를 조사하지 않은 대조군 생존수의 1.2% 및 0.0063%로 감소되었다. 즉 CP1208 mutant는 40 J/m<sup>2</sup>의 UV를 조사했을 때 CP1200 균주보다 오히려 생존율이 5배 증가되었으며 80



**Fig. 3**—Identification of *ermB* insertion in pXF402.

Plasmid DNA was prepared by a rapid alkaline-SDS lysis method from Erm-r *E. coli* transformants, and digested with *Hind*III(A and B) or *Pvu*II (C) followed by electrophoresis on a 0.7% (A and B) or 1.2% (C) agarose gel.

Panel A and B: DNA was digested with *Hind*III; lane 1, pXF402 DNA. Lane 2 through lane 9, recombinant DNA from Erm-r clones of *ermB* insertion in pXF402. Lane 10,  $\lambda$  DNA.

Panel C: lane 1, pDS1 DNA digested with *Hin*fl. Lane 2 through lane 4, recombinant DNA from Erm-r clones of *ermB* insertion in pXF402. Lane 5, pXF402 digested with *Pvu*II. Lane 6,  $\lambda$  DNA digested with *Hind*III.

**Table II**—Linkage of transformation deficiency to erythromycin resistance in transformation backcross to CP1200

<i>S. pneumoniae</i> strain	Erm-r subclone tested <sup>Ⓐ</sup>	Xfo <sup>+</sup> / Xfo <sup>-</sup> <sup>Ⓑ</sup>	Xfo <sup>+</sup> / total
CP1200 (Xfo <sup>+</sup> )	—	138/151	0.477
SK4001 (Xfo <sup>-</sup> )	1	2/80	0.024
SK4002 (Xfo <sup>-</sup> )	2	5/85	0.055
SK4002 (Xfo <sup>-</sup> )	1	8/102	0.072
SK4002 (Xfo <sup>-</sup> )	2	7/126	0.052

<sup>Ⓐ</sup> Two randomly selected Erm-r subclones derived from the strain SK4001 or SK4002 were characterized.

<sup>Ⓑ</sup> Transformable and nontransformable clones were abbreviated as Xfo<sup>+</sup> and Xfo<sup>-</sup>, respectively.

J/m<sup>2</sup>의 UV를 조사했을 때는 CP1200 균주보다 생존율이 67% 감소되었다(Fig. 4). 그러나 SK4001과 SK4002 mutant는 UV를 40 J/m<sup>2</sup> 조사하였을 때 CP1200 균주의 생존율보다 17배와 22배 증가되었다. UV를 40 J/m<sup>2</sup> 조사하였을 때 SK4001과 SK4002 mutant의 생존율을 CP1208 mutant의 생존율과 비교하면 SK4001과 SK4002 mutant가 CP1208 mutant의 생존율보다 3.9배 증가되었지만 UV를 80 J/m<sup>2</sup> 조사하였을

때는 SK4001과 SK4002 mutant가 CP1208 mutant의 생존율보다 감소함으로써 UV 조사에 대한 전체적인 생존율은 SK4001과 SK4002 mutant가 거의 같은 양상을 나타내었다. 그러나 UV를 160 J/m<sup>2</sup> 조사했을 때는 모든 폐염균에서 생균이 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 4).

**EMS 처리에 대한 생존율의 측정**—폐염균 CAT 배양액에 EMS를 0.1%, 0.3% 및 1.0%(v/v)가 되도록 가하고 37°C 에서 30분간 배양하였을 때 CP1200 균주의 생균수는 EMS를 처리하지 않은 대조군 생균수의 81%, 78%, 56%로 감소되었으나 CP1208 mutant는 대조군의 95%, 58%, 48%의 생존율을 나타내었다. 이 실험치는 CP1200 균주와 CP1208 mutant가 EMS 처리에 대한 생존율에서 거의 변화가 없음을 보여 준 것이다. 또한 SK4001과 SK4002 mutant도 EMS 처리에 대한 생존율에서 CP1200 균주와 큰 차이가 없었으며(Fig. 5) 결론적으로 CP1208 mutant는 SK4001과 SK4002 mutant와 EMS 처리에 대한 생존율에서 차이가 없었다.

**MMS 처리에 대한 생존율의 측정**—MMS를 0.1% 와 0.3%(v/v)가 되도록 폐염균 CAT 배양액에 첨가하고 37°C 에서 30분간 배양하였을 때 CP1200 균주는 MMS를 처리하지 않은 대조군 생균수의 5.2%, 0.056

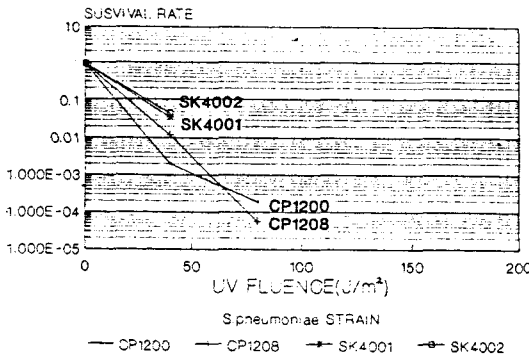
**Table III**—Transformation yields and DNA processing in *Rec<sup>-</sup>* mutants

Strain	[ <sup>3</sup> H] DNA processing <sup>(a)</sup>		Chromosomal transformation <sup>(b)</sup>		
	Acid soluble degradation (cpm)	Total uptake (cpm)	Nov-r/ $\mu$ l	Specific activity (Nov-r/uptake)	Relative to <i>Rec<sup>+</sup></i>
CP1200 ( <i>Rec<sup>+</sup></i> )	5906	4025	2100	0.52	1
SK4001 ( <i>RecP<sup>-</sup></i> )	5819	3208	40	0.12	0.023
	5560	3232	50	0.015	0.028
SK4002 ( <i>RecP<sup>-</sup></i> )	5695	3569	38	0.010	0.019
	5954	3420	36	0.010	0.019

<sup>(a)</sup> DNA at 0.05  $\mu$ g/ml, 60 min at 37°C.

DNA uptake was measured in washed cells after DNase treatment: DNA degradation was determined by adding trichloroacetic acid to 10% to a part of the culture and measuring acid-soluble <sup>3</sup>H.

<sup>(b)</sup> Transformation was determined from a sample treated with DNase in broth and then plated.



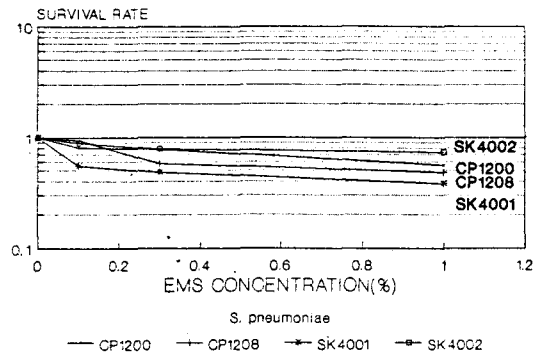
**Fig. 4**—UV sensitivity of *S. pneumoniae* strains.

The cells were grown in CAT media at 37°C. Exponential cultures were divided into 1 ml portions, diluted, spread on CAT agar plates, and irradiated with UV.

% 정도로 감소되었으나 CP1208 mutant는 대조군 생균수의 4.6% 및 0.073% 정도로 감소되었다. 이 실험치는 MMS에 대한 감소성에서 CP1208 mutant가 CP1200 균주와 거의 같은 생존율을 나타내고 있음을 보여주고 있다. 또한 SK4001과 SK4002 mutant와 CP1208 mutant도 MMS에 대해 유사한 생존율을 나타내었다(Fig. 6).

**고 찰**

*recP* 유전자의 cloning은 *rec-8* 유전자를 함유하는 큰 DNA 절편이 매우 불안정하여 탈락되거나(deleted) 재조합(rearranged) 되어 그 일부를 retriever vec-



**Fig. 5**—Survival of *S. pneumoniae* strains after EMS treatment.

*S. pneumoniae* strains were grown in CAT media at 37°C. Exponential cultures were divided into 1 ml portions and treated with the indicated amount of EMS. Cells were incubated for 30 min in the presence of EMS and then washed, diluted, and plated on CAT agar.

tor인 pJDC6에 삽입한 후 삽입복제 돌연변이 유발 방법(insertion duplication mutagenesis : 6, 31-33)을 사용하여 *rec* 유전자의 일부분을 찾아내어 다시 cloning 하였기 때문에 *rec-8*과 같은 유전자인지 확인되지 않았다. 즉 여러 개의 DNA 절편 중에서 225 bp의 *TaqI* 절편을 함유하는 pJDC6가 폐렴균에 삽입되었을 때 *Rec<sup>-</sup>*의 표현형으로 전환됨으로써 225 bp의 *TaqI* 절편이 *rec* 유전자의 일부임을 확인하고 이를 방사성 동위원소 탐침(radioactive probe)으로 사용하여 cloning한 것이며 이렇게 cloning된 유전자를 *recP*라고

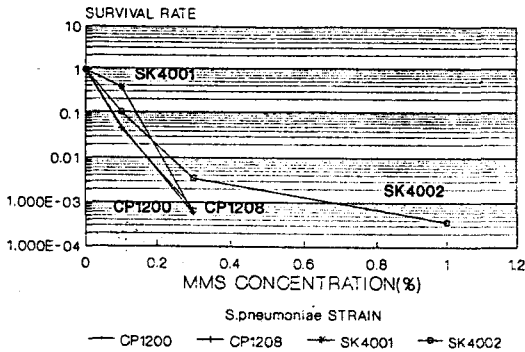


Fig. 6—Survival of *S. pneumoniae* strains after MMS treatment.

*S. pneumoniae* strains were grown in CAT media at 37°C. Exponential cultures were divided into 1 ml portions and treated with the indicated amount of MMS. Cells were incubated for 30 min in the presence of MMS and then washed, diluted, and plated on CAT agar.

명명하였다. *recP* 유전자는 일반적으로 대장균 plasmid(예를 들면 pACYC184, pBR322)에서 매우 불안정하여 대장균의 transcription terminator를 함유하는 plasmid인 pKK232-8 또는 pJDC9을 사용하여 cloning을 시도하였으나 이 vector에서도 불안정하여 *recP* 유전자의 반쪽씩 cloning 되었다.<sup>5)</sup> 현재까지 *recP*의 DNA 염기배열이 완전히 밝혀졌음에도<sup>30)</sup> 불구하고 *recP* 유전자는 크기가 2.2 kb 정도이며(72 kilodalton의 단백질을 만드는 유전정보를 함유) 두 개의 대장균 sigma 70 promoter sequence가 2개 중첩된 독특한 promoter 구조를 갖고 있다는 결과 외에는 밝혀지지 않았다.<sup>5)</sup>

본 실험에서 상동염색체 DNA 재조합(homologous DNA recombination)을 이용한 삽입돌연변이 유발방법(insertion mutagenesis)으로 작제한 *recP*<sup>-</sup> mutant는 염색체 DNA marker를 사용하여 실험하였을 때 야생형 폐염균의 형질전환 수율의 약 2% 정도만 형질전환체를 형성하였으나 plasmid DNA의 형질전환에는 야생형의 53~68% 정도를 나타내어 야생형과 거의 같은 효율을 나타내었다. 본 실험결과에서 나타낸 *recP*<sup>-</sup> mutant의 형질전환 수율은 이미 보고된 *rec-8* mutant의 형질전환 수율<sup>19)</sup>과 유사하였으며 이 결과는 두 유전자가 모두 형질전환의 DNA 재조합에 관여하고 있으며 염색체 DNA marker(*nor*<sup>+</sup>)와 plas-

mid DNA(*tet*<sup>r</sup>)의 형질전환에서 거의 같은 특성을 갖고 있음을 입증한 것이다.

UV에 대한 민감성 실험에서 *recP*와 *rec-8* mutant는 야생형(CP1200)과 거의 같은 민감성을 나타내었다(Fig. 5). 이 결과는 *recP*와 *rec-8* mutant에서 UV에 의한 DNA 손상(pyrimidine dimer 특히 thymidine dimer)을 제거하는데 관여하는 효소활성(photoreactivation enzyme, *uvr-A*, *-B*, *-C* 유전자산물[*gene product*])이 야생형과 같음을 나타낸 것이다. 또한 *recP*와 *rec-8* mutant는 EMS 및 MMS에 대한 감수성에서도 야생형과 큰 차이가 없으므로 DNA 알킬화(예를 들면 MMS는 7-methyl guanine 또는 O<sup>6</sup>-methyl guanine 등을 형성)로 인한 손상을 수리하는데 관여하는 효소(예를 들면 대장균의 경우 *polA*, *recA*, *-B*, *-C*: 34, 35)활성도 야생형과 같음을 보여 주고 있다(Fig. 5, Fig. 6). 본 실험결과는 *recP*와 *rec-8* mutant가 형질전환의 DNA 재조합에는 결함이 있지만 UV, EMS, MMS 등에 의해 손상된 DNA를 수리하는 활성에 있어서는 야생형과 큰 차이가 없음을 나타냈기 때문에 *recP*와 *rec-8* 유전자는 같은 유전자이거나 또는 같은 특성을 갖고 있는 유전자일 것으로 추정된다.

## 결론

폐염균 *recP*와 *rec-8* 유전자가 같은 유전자인지 확인하기 위하여 형질전환 수율과 DNA 손상제에 대한 감수성을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 삽입돌연변이 유발방법을 이용하여 *recP*<sup>-</sup> mutant를 작제하고 그 표현형이 *Rec*<sup>-</sup>임을 확인하였다.
2. *recP*와 *rec-8* mutant는 UV와 EMS, MMS 처리에 대한 감수성에서 차이가 없었다.
3. *recP*와 *rec-8* mutant는 DNA 재조합 기능 뿐만 아니라 알킬화된 DNA를 수리하는 효소활성 및 thymidine dimer를 수리하는 효소활성에서도 거의 같은 수준을 나타내어 동일한 기능을 갖고 있는 유전자일 것으로 추정된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 83-0401-007-2과 보사부 신약개발연구비의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 문헌

- 1) Porter, R. D. and Guild, W. R.: Characterization of some pneumococcal bacteriophages. *J. Virol.*, **19**, 659 (1976).
- 2) Porter, R. D. and Guild, W. R.: Number of transformable units per cell in *Diplococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **97**, 1033 (1969).
- 3) Morrison, D. A.: Transformation in pneumococcus: existence and properties of a complex involving donor deoxyribonucleate single strands in eclipse. *J. Bacteriol.*, **132**, 576 (1977).
- 4) 이동권: Competence factor에 의한 폐염균의 형질 전환능 유도. *성균약연논문집* **1**, 74 (1989).
- 5) Rhee, D. K. and Morrison, D. A.: Genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: Molecular cloning and characterization of *recP*, a gene required for genetic recombination. *J. Bacteriol.*, **170**, 630 (1988).
- 6) Mejean, V.: Claverys, J. P., Vasseghi, H. and Sicard, A. M.: Rapid cloning of specific DNA fragments of *Streptococcus pneumoniae* by vector integration into the chromosome followed by endonucleolytic excision. *Gene* **15**, 28 (1981).
- 7) Atlas, R. M.: In *Microbiology; Fundamentals and Applications*, pp. 594-595. MacMillan Co., New York (1984).
- 8) Storch, G.: The pneumococcus and bacterial pneumoniae; In *Mechanism of Microbial Disease*, eds. M. Schaechter, G. Medoff, D. Schlessinger, Williams & Wilkins Inc., pp. 218-227 (1989).
- 9) Smith, H. O., Danner, D. B. and Deich, R. A.: Genetic transformation. *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 41 (1981).
- 10) Morrison, D. A., Mannarelli, B. and Vijayakumar, M. N.: Competence for transformation in *Streptococcus pneumoniae*, An inducible high-capacity system for genetic exchange *Microbiology-82*, ed. by D. Schlessinger, pp. 136-138, *Amer. Soc. for Microbiol.*, Washington, D. C. (1982).
- 11) Morrison, D. A. and Baker, M.: Competence for genetic transformation in pneumococcus depends on synthesis of a small set of proteins. *Nature* **282**, 215 (1979).
- 12) Lacks, S. A. and Greenberg, B.: Competence for deoxyribonucleic acid uptake and deoxyribonuclease action external to cells in the genetic transformation of *Diplococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **114**, 152 (1973).
- 13) Lacks, S. A.: Molecular fate of DNA in genetic transformation of pneumococcus. *J. Mol. Biol.*, **5**, 119 (1962).
- 14) Lacks, S. A., Greenberg, B. and Carlson, K.: Fate of donor DNA in pneumococcal transformation. *J. Mol. Biol.*, **29**, 327 (1967).
- 15) Fox, M. S. and Allen, M. K.: On the mechanism of deoxyribonucleate integration in pneumococcal transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **52**, 412 (1964).
- 16) Gurney, T., Jr. and Fox, M. S.: Physical and genetic hybrids formed in bacterial transformation. *J. Mol. Biol.*, **a5/32**, 83 (1968).
- 17) Porter, R. D. and Guild, W. R.: Transfection in pneumococcus: single strand intermediates in the formation of infective centers. *J. Virol.*, **25**, 60 (1978).
- 18) Saunders, C. W. and Guild, W. R.: Pathway of plasmid transformation in pneumococcus: open circular and linear molecules are active. *J. Bacteriol.* **146**, 517 (1981).
- 19) Morrison, D. A., Lacks, S. A., Guild, W. A. and Hageman, J. M.: Isolation and characterization of three new classes of transformation deficient mutants of *Streptococcus pneumoniae* that are defective in DNA transport and genetic recombination. *J. Bacteriol.*, **156**, 281 (1983).
- 20) Contente, S. and Dubnau, D.: Characterization of plasmid transformation in *Bacillus subtilis*: Kinetic properties and the effect of DNA conformation. *Mol. Gen. Genet.*, **167**, 251 (1979).
- 21) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y. (1982).
- 22) Chen, J. D. and Morrison, D. A.: Modulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 1959 (1987).
- 23) Saunders, C. W. and Guild, W. R.: Monomer plas-



- mid DNA transforms *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.*, **181**, 57 (1981).
- 24) Birnboim, H. C. and Doly, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.*, **7**, 1513 (1979).
- 25) Morrison, D. A., Trombe, M. C., Hayden, M. K., Waszak, G. A. and Chen, J. D.: Isolation of transformation-deficient *Streptococcus pneumoniae* mutants defective in control of competence, using insertion-duplication mutagenesis with the erythromycin resistance determinant of *pAMβ1*. *J. Bacteriol.*, **159**, 870 (1984).
- 26) Chandler, M. S. and Morrison, D. A.: Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: Molecular cloning of *com*, a competence control locus. *J. Bacteriol.*, **169**, 2005 (1987).
- 27) Martin, B., Prats, H. and Claverys, J. P.: Cloning of the *hexA* mismatch repair gene of *Streptococcus pneumoniae* and identification of the product. *Gene* **34**, 293 (1985).
- 28) Prats, H., Martin, B. and Clavery, J. P.: The *hexB* mismatch repair gene of *Streptococcus pneumoniae*: Characterization, cloning, and identification of the product. *Mol. Gen. Genet.*, **200**, 482 (1985).
- 29) Morrison, D. A.: Transformation and preservation of competent bacterial cells by freezing. *Methods Enzymol.*, **68**, 326 (1979).
- 30) Radnis, B., Rhee, D. K. and Morrison, D. A.: Genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of *recP*. *J. Bacteriol.*, **172**, 3669 (1990).
- 31) 이동권: Retriever vector를 이용한 mutagenesis, gene cloning 및 DNA sequencing, 신물질 창출을 위한 생물활성 연구법, 한국생화학회, 201-213 (1990).
- 32) Ferrari, F. A.: Nguyen, A., Lang, D. and Hoch, J. A.: Construction and properties of an intergrable plasmid for *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **154**, 1513 (1983).
- 33) Niaudet, B. and Ehrlich, S. D.: Insertional mutagenesis: use in cloning of *Bacillus subtilis* genes, pp. 201-209, In *Transformation-1980*, ed. M. Polsinelli and G. Mazza. Cotswold Press, Oxford (1981).
- 34) Gross, J. and Gross, M.: Genetic analysis of an *E. coli* strain with a mutation affecting DNA polymerase. *Nature* **224**, 1166-1168 (1969).
- 35) Howard-Flanders, P. and Boyce, R. P.: DNA repair and genetic recombination: Studies on mutants of *Escherichia coli* defective in these processes. *Radiat. Res.*, **6** (suppl), 156-184 (1966).