

자연 생태계에서 형질 전환에 의한 세균들 간의 유전 물질의 전이

이건형 · G. Stotzky¹

군산대학교 자연과학대학 생물학과,

¹Dept. of Biology, New York University, New York, NY, U.S.A.

1928년 Griffith는 *Streptococcus pneumoniae* 간에 유전자 전이가 일어나는 것에 대하여 처음으로 언급하였지만 그 기작을 이해하지는 못하였다. 1932년 Alloway가 *Pneumococci*의 추출물로 형질 전환(transformation)에 대하여 증명하였고, 1944년 Avery, MacLeod, 그리고 McCarty는 세포외(extracellular) DNA는 세균의 표현형을 전이하고 변화시킬 수 있다는 것을 발표하였다. 이러한 전이요소(DNA)의 규명 이후 세균들 간의 접합(conjugation) (40, 41)과 박테리오파지에 의한 transduction(42, 86)이 계속되어 발견되었다. 그 이후 세균들 사이의 유전물질 전이에 대한 이러한 세 가지 기작은 폭넓게 연구되었고, 실험실 조건하에서 유전물질 전이에 일반적으로 사용되었다. 계속하여 또 다른 유전물질의 전이, 예를 들어, 작은 파지와 같은 구조에 의한 유전자 전이인 capsiduction(33, 69), 원형질 융합(53), 그리고 원핵세포와 진핵세포 간의 transposition이 규명되었다(5, 6, 39). 하지만, 자연 생태계에서 유전물질의 전이에 관한 연구는 최근에 들어서야 연구되기 시작하였다(45).

자연계에서 세균들 간의 일어나는 주요한 유전자 전이 기작으로 (1) 세포외 DNA(extracellular DNA)가 수여체(recipient) 세균에 의해 받아들여지는 형질 전환(transformation), (2) 세포와 세포 간의 접촉에 의해 유전물질이 한 세균에서 다른 세균으로 전이되는 접합(conjugation), (3) 박테리오파지를 매개로 하여 세균들 간의 유전정보가 전이되는 형질 도입(transduction) 등이 알려져 있는데, 본 글에서는 이러한 기작 중 형질 전환에 대하여 정리하였다.

형질 전환은 가장 먼저 연구된 유전물질 전이 기작으로 (3, 29, 36), 자연적 형질 전환과 인위적 형질 전환으로 구별할 수 있다. 자연적 형질 전환은 세균에게서만 일어나며, 이때 수여체 세균은 적정 조건, 즉, 형질 전환 능력이 있는 생리적 상태(competence)가 되면 능동적으로 세포외 DNA를 받아들여 그들 유전 정보에 합치게 된다. 하지만 재조합 DNA 기술이 발달된 이후로 인위적 형질 전환이 원핵세포와 진핵세포에서 사용되었다(48). 자연적 형질 전환은 DNase와의 반응이 민감하다는 점에서 접합과 형질 도입과 구별된다. 형질 전환에 의한 유전자 전이가 세포외 DNA에 의해서 일어나는 한 DNase가 공격할 수 있고, DNA는 분해되어 형질 전환이 방해될 수 있다. 하지만, 형질 도입되는 DNA는 파지의 단백질막(capsid)에 보호되어 세포외로 절대 노출되지 않아 DNase에 의해서 영향을 받지 않고, 접합에서도 DNA는 세포와 세포의 접촉에 의해서 전이되어 공여체에서

수여체로 DNA가 전이될 때 역시 DNase에 노출되지 않고 일어날 수 있다.

형질 전환 기작

환경에서 형질 전환 과정은 Lorenz와 Wackernagel(48), Mazodier와 Davies(54)에 의해서 자세히 설명되었는데 그 주요 과정은 다음과 같다.

1) 세포로부터 DNA의 방출

세포외 DNA는 죽은 세포나 살아있는 세포로부터 유래된다. 세균의 죽음은 환경에서 생물학적이거나 무생물학적인 요인에 의해서 생길 수 있다. 무생물학적인 요인으로는 이온결합, chelator의 존재, 염분, pH, 그리고 온도를 들 수 있고(59), 생물학적인 요인으로는 박테리오파지(8)나, 원생동물에 의한 공격(30)과 세균에 의한 섭식(68), 세균의 autolysis(43) 등을 들 수 있다. 많은 살아있는 세균들은 세포의 autolysis가 없이도 DNA를 방출하는데(48), 이는 방출이 세균의 정상적인 기능임을 암시한다. 하지만, 살아있는 세포로부터의 DNA의 방출 기작은 밝힐 필요가 있다.

2) 환경으로 방출된 DNA의 전파

환경에서, 세균이나 자유롭게 노출되는 DNA(free DNA) 또는 부착된 DNA는 물에 의해 이동될 수 있고(52, 84), 지렁이 등에 의해 분산되거나, 원생동물에 의해서 이동될 수도 있고(31), 공기나 먼지, 바람에 의해서도 운반될 수 있다. 많은 양의 free DNA가 해양(15, 61)과 육수(15), 토양과 퇴적토(57, 74)에서 발견되고, 각 수계환경에서도 지역에 따라 0.2~44 µg/l의 세포외 DNA가 발견되었다(48). 이러한 DNA의 기원은 대부분이 미생물로부터 유래되는 것 같고, free DNA는 대부분의 모든 환경에 분포되어 있는 것 같다. 하지만, 환경에서 이러한 DNA의 분포를 좀 더 명확히 파악하려면 더 많은 연구가 요구된다.

3) 환경으로 방출된 DNA의 지속성

이론적으로, 형질 전환은 DNA의 전이에 있어서 아마도 가장 일반적이고 보편적인 방법일 것이다. 하지만, 그 것은 자연 환경에서 여러 제약 받기 때문에 이제까지 그리 중요한 기작이 아닌 것으로 생각되었었다. 자연 환경에서는 DNase가 산재되어 있기 때문에 free DNA는 환경 내에서 DNase에 의해 신속히 분해될 것이다. 환경 내에서 free DNA의 반감기는 Lorenz와 Wackernagel(48)의 연구에 의하면, 수계 환경에서는 0.017~235 시간이고, 육상 환경에서는 9.1~28.2 시간이라고 했다. 하지만, DNA는 모래와 점토입자

(23, 37, 50), 다른 결정체(석영, 장석), 죽은 세포물질, 그리고 토양과 퇴적토(48)에 신속히 흡수되어 달라붙는다. 달라붙은 DNA는 nuclease에 의한 분해로부터 보호되어 수여체에 게 전이될 수 있다(23, 37, 50). 또한 세포 접촉에 의한 형질 전환(80)은, 비록 이러한 방법이 부분적으로는 DNase에 민감하지만(78), 효소에 의한 분해로부터 형질 전환되는 DNA를 보호할 수 있는 방법을 제공해 준다.

4) 잠재적 수여체 세균에서 형질 전환 능력의 발달

형질 전환 능력(competence)이란 세균이 세포의 DNA를 받아들여 그 것을 세포질 내로 전달할 수 있는 생리적 상태를 말한다. 형질 전환 능력의 발달은 복잡한 과정이고, 세포 유전자에 의해 조절된다(77). 모든 세균이 자연계에서 모두 전이 능력을 갖는 것은 아니다. 전이 능력이 있는 세균들 중에서 조차도 전이 능력의 발달과 지속기간이 다양하다. *Neisseria gonorrhoeae*(72), *Bacillus subtilis*(17)와 *Streptococcus pneumoniae*(83)가 형질전환 능력이 있는 것으로 알려져 있고, *Haemophilus influenzae*(73)나 *Azotobacter vinelandii*(58)가 형질 전환 능력을 조절하는 것으로 알려져 있다. 비록 형질 전환 능력과 관련된 기작은 불분명하지만, 그러한 현상은 일반적으로 영양분의 고갈이나 이용할 수 있는 에너지의 고갈에서 기인하는 것 같고 항상 DNA 합성의 감소나 차단과 연관이 있다(33). 환경에서 전이 능력의 발달은 아직 명확하게 이해되지 않고 있다. 형질 전환 능력에 대한 실험실 연구로 자연환경에 적용할 수 있으리라 추측된다. 몇몇 환경인자(예, 제한된 영양분)도 불균형한 성장과 기아를 유도하여 형질 전환 능력을 촉진시킬 가능성이 있다(76).

5) 수여체와 방출된 DNA의 접촉

DNA를 감는(binding) 과정은 형질 전환을 할 수 있는 세균들 간에 다양하다. 세포의 DNA는 세포의 외부표면과 관계 있는 단백질에 감길 수 있다. 이러한 DNA 감김 단백질의 특이성은 형질 전환할 수 있는 세균들 간에 다르다. *B. subtilis*와 *S. pneumoniae*같은 그람양성 세균들은 이중나선 DNA를 받아들이고 감는데 특이성이 없다(즉, 감기고 들어갈 때 동일한 DNA를 요구하지 않으며, 어떤 DNA라도 이들 세균들에 감겨서 들어갈 수 있다). 하지만, 효과적인 형질 전환에는 이중나선 DNA가 요구된다(55). 단사 DNA나 RNA, RNA-DNA 복합체, 그리고 glycosylated DNA는 감기지 않거나 감기는 자리에 대한 경쟁력이 약하다(71). *H. influenzae*와 *N. gonorrhoeae*같은 세균들은 DNA 감김 과정에서 특이성을 나타낸다. *H. influenzae*는 이중나선 DNA를 동일하거나 아주 가까운 중일 때에만 감거나 받아들이고, 이때 이중나선 DNA의 특이 인식부위는 11-bp DNA 서열이다(13). *N. gonorrhoeae*의 세포 표면의 감김과 받아 들임 체제는 10-bp DNA 서열로 인식된다(25). 이들 두 그람양성 세균들은 이중나선과 단일나선 DNA를 감아서 받아들일 수 있다(64, 75). 하지만, 단지 *N. gonorrhoeae*만 단사 DNA와 이중나선 DNA를 유사한 효율로 형질 전환시킬 수 있다(75). 자연환경에서 세포의 DNA 감김에 대한 연구는 아직까지 안되어 있다. 실험실 조건하에서 DNA의 감김은 이온 간의 힘, 양이온, nuclease의 농도, 다른 DNA와의 경쟁(12, 60, 77) 등에 의해 영향을 받을 수 있고, 이런 요인들은 DNA의 감김 단계에 영향을 주므로서 자연계에서 형질 전

환에 영향을 줄 수 있다.

6) 세포의 DNA의 받아 들임과 세포내로의 진입

DNA의 받아 들임(uptake)은 세포의 표면에 붙어 있는 DNA가 DNase에 내성이 있는 상태로 전이되는 단계이다(48). 형질 전환이 잘 연구되어진 *S. pneumoniae*(7, 33)에서, 이중나선 DNA는 세포벽에 감긴 후 세포막에 달라 붙을 수 있는 15-kb의 단편으로 잘린다. 달라붙은 위치 인근에 있는 competence factor의 endonuclease에 의해 15-kb의 단편으로 잘려 세포질 막에 붙게 된다. 그 다음 절편화된 이중나선 DNA는 두 번째 과정으로 진행된다. 즉, 형질 전환된 DNA의 한쪽의 나선은 세포질 막에 위치한 exonuclease에 의해 가수분해되고, 다른 한 쪽의 가수분해되지 않은 나선은 역시 세포질 막에 위치한 단백질에 의해 덮혀서 세포질로 들어가는 소멸체(eclipse complex)를 형성한다. 소멸체가 형성될 때(형질 전환의 소멸 단계라고 함), 이런 세포에서 분비되는 세포의 DNA의 단편들은 형질 전환 능력이 없다(71). 왜냐 하면, DNA는 단일나선이고 감김에 필요한 이중나선이 결여되어 있기 때문이다.

*H. influenzae*와 *H. parainfluenzae*와 같은 몇몇 그람음성 세균들은 다른 양상의 받아 들임을 한다. 형질 전환 능력이 있는 단계가 발달하는 동안, *H. influenzae*는 세포 밖으로 돌출된 수많은 작은 막구조(transformasome)를 형성하여 외부 DNA와 내부 염색체 간의 접촉을 증가시킨다(35). 세포 외 DNA는 첫 번째로 transformasome의 표면에 있는 특수한 수용체에 가역적으로 감기고, 그 다음 비가역적으로 소낭(vesicle) 속으로 들어가게 된다(7, 24). 이러한 이중나선 DNA는 매우 신속하게 transformasome내에 있는 폴리펩티드에 감김으로서 보호받게 된다. 그리고 그 다음 5' 말단의 나선이 퇴화되므로서 소낭으로부터 세포질로 자리바꿈이 된다(33). 이러한 단일 나선의 DNA가 세포질로 침투된 후, 그것은 매우 신속하게 수용체 세포에 끼여들게 된다(34).

DNA의 받아 들임에는 에너지 뿐만 아니라 그람양성 균에서는 Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} 의 역치 농도가, 그람음성 균에서는 Ca^{2+} 와 Na^+ 의 역치 농도가 요구된다(66, 70, 71). 받아 들일 때 EDTA를 첨가하면 방해될 수 있는데, 그것은 이들 몇몇의 양이온들을 chelate시킨다(56). 그러므로, 자연 환경에서 에너지원과 양이온의 농도, 그리고 chelating agent의 존재는 형질 전환 DNA에 영향을 줄 수 있고, 그 결과 형질 전환의 효율에도 영향을 줄 수 있다.

7) 수여체 DNA내로 세포의 DNA의 삽입 및 그 유전자의 발현

형질 전환된 DNA가 수여체의 염색체 DNA 속으로 끼여 들어 가는 것은 모든 형질 전환할 수 있는 세균들에서 유사하다. 들어가는 단사 DNA는 숙주 염색체의 DNA와 짝을 지어서 불안정한 세 가닥의 공여체-수여체 DNA 복합체를 형성한다. 염색체 DNA의 한 가닥과 상동교차가 일어나고 들어가는 단사 DNA는 유전적 재결합을 이루게 된다. 그리고 그 과정에서 일련의 Rec 단백질이 관여한다(16). 염색체와 공유 결합된 후 형질 전환된 DNA는 endogenote 염색체의 대치된 가닥을 되돌려 놓아 유전될 수 있게 하고 형질 전환된 유전자는 발현될 수 있다(71).

플라스미드에 의한 형질 전환

일반적으로 플라스미드에 의한 형질 전환은 염색체 DNA 보다 더 낮은 형질 전환율을 나타낸다. 이것은 아마도 플라스미드의 공유 환상구조 때문일 것이다. 그람양성 균의 플라스미드에 의한 형질 전환에서는 검사 DNA가 세포 밖에서 단사 DNA로 변환되어야 한다. 단사 DNA가 수여체로 들어간 후 단사 플라스미드는 다시 환상구조가 되어 복제된다는 것은 거의 불가능한 것 같다. 하지만 상호 보완 관계가 있는 두 개의 단사 플라스미드가 각각 따로 들어가서 완전한 플라스미드로 재조합되는 경우는 종종 있는 것 같다(4). 더욱이, 단사 플라스미드 DNA와 반대편의 더 짧은 절편(DNA 합성성 primer로 사용 됨)이 동시에 세포 속으로 들어가면 이 플라스미드는 분자간의 재결합을 완성시킨 후 완전한 이중의 플라스미드가 재구성 될 수 있다(67). 플라스미드가 성공적으로 형질 전환을 할 수 있는 또 다른 방법으로는 공여체 플라스미드가 수여체 플라스미드 분자와 상동 부위를 갖고 있을 때이다(11). 이러한 단사 플라스미드에 의한 형질 전환은 매우 비효율적이며 *B. subtilis*에서만 나타나는 것 같다(11). 반면에 그람음성 균에서 플라스미드가 형질 전환이 가능한 세포 내로 들어갈 때, 그것은 transformosome에 갇힌 채로 머물고 있어 세포질로 침투하지 못한다. 그리고, transformosome내에서 그 것의 복제는 방해된다. 더욱이, 환상구조 때문에 플라스미드 DNA는 transformosome 소낭에서 선형 분자만큼 쉽게 방출되지 못할 수 있는데 그러한 사실이 그람음성 세균의 플라스미드 DNA에 의한 형질 전환율이 더 낮은 원인을 설명해 준다(85).

세포 접촉에 의한 형질 전환

세포 접촉에 의한 형질 전환(cell-contact transformation)은 특수한 형태의 형질 전환이다. 세포들 간에 접촉이 이루어지는 동안 염색체와 플라스미드 유전자들은 접합보다는 형질 전환에 더 가까운 양상의 방법으로 전달된다. 이 과정은 세포와 세포 간의 접촉이 필요하지만 전이는 부분적으로 DNase에 민감하고 양방향성(bidirection)을 나타낸다. 이러한 과정에 대한 기작은 잘 알려져 있지 않다. Ephrati-Elizur(19)가 이러한 현상을 *Bacillus subtilis* 세포 사이에서 처음으로 관찰하였고, 그러한 현상은 *Haemophilus*(2), *Pseudomonas*(80), *Streptococcus*(9), *Acinetobacter*(65), *Vibrio* 그리고, *E. coli* (63)에서도 종종 관찰되었다. Stewart 등 (80)은 이러한 현상을 *Pseudomonas stutzeri*에서 공여체와 수여체 간의 DNase I에 민감한 염색체 유전자의 전이가 일어나는 것을 보고하였다. 이때 박테리오파지는 감지되지 않았다. 세포 접촉에 의한 형질 전환은 플라스미드나 염색체 DNA에서 생길 수 있고 열치사된 공여체 세포에 의해서도 일어날 수 있다(9, 14). 결과적으로 이러한 형태의 형질 전환은 자연 생태계 내의 모든 세포들 사이에서 유전물질의 전이가 일어날 때 중요할 수 있다.

Transfection

형질 전환의 드문 변형의 하나로 transfection이 있는데 이 기작은 박테리오파지에 감염된 세포의 DNA는 바이러스의 DNA이다(7). Transfection은 Földes와 Trautner(20)에 의해서

처음으로 발표되었다. Transfection은 형질 전환 능력이 있는 세포를 필요로 한다는 점에서 형질 전환과 근본적으로 유사하지만, transfection의 기작은, 최소한 DNA 받아 들임 과정 면에서, 형질 전환의 기작과는 다를 수 있다(7). 자연계에서 transfection의 중요성에 대해서는 연구된 바가 없다.

자연계에서의 형질 전환

비록 형질 전환은 제일 먼저 알려진 유전물질 전이 기작이지만 몇몇 제한된 환경 내에서 제한된 미생물들로 연구되었다.

1) 토양 및 육상 환경

Graham과 Istock(26-28)에 의해 멸균된 토양에서 *B. subtilis*가 형질 전환에 의해 염색체 유전자가 교환된다는 사실을 처음으로 보고하였다. 이러한 유전자 전이는 DNase에 민감하지 않았고 송아지의 흉선으로부터 얻은 DNA의 첨가에 의해서 감소되지 않았다. Graham과 Istock(27)은 DNase는 토양 입자에 흡착되거나 형질 전환된 DNA가 단백질에 붙어 DNase에 의해 분해되는 것을 막는다고 했다.

Lorenz와 그의 동료들(1, 46, 49, 50)도 역시 *B. subtilis*를 이용하여 실험실내 퇴적토에서 형질 전환에 대한 연구를 하였다. 그들은 DNA는 퇴적토 내의 모래와 다른 성분에 흡착되어 free DNA보다 DNase의 분해에 대해 더 높은 내성을 갖는다는 것을 알았다. 모래에 흡착된 DNA는 형질 전환 능력이 있는 세포를 형질 전환시킬 수 있고, 또한 흡착된 DNA는 형질 전환 능력이 있는 세포가 모래에 붙는 것을 촉진 시켰다. 그들의 이러한 결과는 고체와 물의 비율이 높은 서식지에서 형질 전환은 고체와 액체의 계면에서 선호적으로 일어난다는 개념을 뒷받침해 준다(50, 81, 82). 하지만 이러한 연구들이 흥미있고 또 많은 정보를 줄 수는 있어도 그것이 토양에서의 형질 전환과의 관계는 명확하지 않다. 왜냐하면, 이러한 실험들은 "깨끗한" 모래로 수행되었기 때문이다(82). 그러므로 형질 전환은 자연 생태계에서 유전물질 전이 기작을 이해하기 위해서는 좀 더 복잡한 자연 상태의 토양(nonsterile soil)에서 연구되어야 한다. 자연 상태의 토양에서 형질 전환과 관련된 연구는 Lee와 Stotzky(44)에 의해서 처음으로 이루어졌다. *B. subtilis*를 재료로 하여 아미노산 합성과 항생제 내성에 관련된 유전자의 형질 전환을 멸균된 토양과 자연 상태의 토양에서 관찰하였고, 분리 배지로는 고농도의 항생제를 사용하여 토착세균의 성장을 억제하였다. 그들의 결과에서 멸균된 토양과 자연 상태의 토양에서의 형질 전환율은 순수 배양시의 형질 전환율 보다 낮았다.

Khanna와 Stotzky(37)는 점토 입자에 부착되어 DNase에 의한 분해로부터 보호되는 DNA에 대하여 더욱 연구하였다. 그들은 서로 다른 조건하에서 *B. subtilis*의 DNA가 montmorillonite(M)와 Kaoline(K)에 부착되는 연구를 하였는데, 그 때 M은 K보다 DNA에 대하여 더 잘 달라붙는 친화력을 보였고, 탈착된 DNA뿐만 아니라 부착된 점토와 DNA의 복합체는 항생제 내성과 아미노산 합성에 관련된 유전자를 형질 전환할 수 있었다. X선 회절분석기에 의하면, DNA는 점토(clay)사이에 끼어 들어가지 않았다. 그 것은 TEM과 SEM으로 확인되었는데, 그 결과에 의하면 DNA는 비록 일

부는 점토의 옆면에도 달라붙어 있었지만 대부분은 주로 점토의 끝부분에 부착되었다(38).

Gallori 등(23)도 자연 상태의 토양에서 점토에 부착된 *B. subtilis* DNA의 형질 전환을 보고하였다. 염색체 DNA와 여러 가지 형태의 플라스미드 DNA가 M에 부착되어 단단히 달라붙어 있었다. 선형 단량체 플라스미드 DNA(linear monomeric plasmid DNA)를 제외한 다양한 DNA는 형질 전환 능력이 있는 DNA를 형질 전환시킬 수 있었다. 그들의 결과는 또한 3차 구조와 DNA 분자 크기는 모두 점토에 부착되어 달라붙는데 영향을 줄 수 있다는 것을 시사하였다. 더욱이, 달라붙은 DNA는 제한효소의 활동에 대해 보호받고 자연 상태의 토양에서 견딜 수 있었으며 토양에 첨가된 형질 전환 능력이 있는 세포를 형질 전환 시켰다.

*B. subtilis*와 *B. licheniformis* 간의 염색체 marker의 형질 전환은 멸균된 토양에서 나타났다(18). 비록 이들 두 세균들 간의 교배는 다양한 표현형상의 안전성이 있지만, 이러한 연구는 중간의 형질 전환이 자연 환경에서 일어나고 있음을 시사한다.

토양에 서식하는 그람양성의 *Bacillus*와 그람음성의 *P. stutzeri*와 *Acinetobacter calcoaceticus*는 모래와 토양 추출물에서 형질 전환이 일어나고 있음을 보여준 적이 있다(10, 47, 51). *P. stutzeri*의 형질 전환은 세포와 DNA가 액체보다는 고체 표면에 있을 때 더 효과가 있었다(10). 모래에 부착된 DNA에 의한 *P. stutzeri*의 형질 전환(47)은 토양에서 *P. stutzeri*에 의해 입자에 달라붙어 있는 DNA를 받아들일 수 있는 것이 가능하다는 것을 시사하였다. *A. calcoaceticus* 플라스미드의 형질 전환이 높은 효율로 일어나고 있는 것을 자연 상태의 토양으로부터 감지한 바가 있는데, 그것은 *A. calcoaceticus*의 형질 전환 능력이 있는 세포는 자연 상태의 토양과 퇴적토 환경에서 세포의 DNA를 받아들일 수 있음을 보여준다(51).

2) 수계 환경

해양 환경에 많은 양의 세포의 DNA가 존재한다는 것은 해양 환경에서 형질 전환이 일어날 수 있음을 시사한다(15, 60). Jeffrey 등(32)은 형질 전환이 가능한 해양 세균 *Vibrio* sp.(DP-9)를 수여체로, 그리고 숙주 범위를 넓게 갖고 있는 비접합성 플라스미드(nonconjugative plasmid) pKT230을 형질 전환시키는 DNA로 사용하였다. 플라스미드는 멸균된 퇴적토의 미세 환경 내에서 수여체 DI-9에 형질 전환되었다. 형질 전환율은 형질 전환되는 플라스미드 DNA가 다양한 형태로 있을 때 증가되었다. Paul 등(62)은 형질 전환은 형질 전환율이 높은 DI-9 변이체(WJT-1C)와 숙주 범위가 광범위한 플라스미드(pQSR50)에 의해서 해양 환경에서도 일어난다고 했다. 가상의 형질 전환체에서 플라스미드 DNA의 존재는 콜로니 교잡으로 증명하였다. 형질 전환은 멸균된 퇴적토의 미세환경에서는 관찰되었지만 자연상태의 퇴적토에서는 관찰되지 않았다. 이러한 결과들은 자연계에서는 퇴적토보다는 물 속에서 더 잘 일어나는 것을 시사한다(85).

Paul 등(63)은 또한 멸균된 연안수와 자연 상태의 연안수에서 해양미생물 *Vibrio* 간에 그리고, *E. coli*와 *Vibrio* 간에도 일어난다고 보고하였다. 비접합성 플라스미드에 의한 형질 전환은 세포와 세포 간의 접촉이 요구되는 DNase에 민

감한 기작이다.

Stewart와 Sinigalliano (79)는 멸균된 해양 퇴적토와 자연 상태의 해양 퇴적토에서 rifampin 내성을 갖는 해양미생물 *P. stutzeri*의 염색체 내의 유전자가 형질 전환되는 것을 보여 주었다. 그들은 또한 토양과 해양 환경으로부터 분리한 *P. stutzeri* 간에 세포 접촉을 통해 염색체 유전자들이 전이되는 것을 관찰하였다(76).

Frischer 등(21)은 토착성 해양 미생물 군집들 간에 형질 전환을 통해 세포의 플라스미드 DNA의 전이가 일어난다고 보고하였는데, 이것은 자연계의 혼합 미생물 군집에서 일어나는 형질 전환에 대한 최초의 보고이다. 해수와 다양한 무척추 동물에서 추출한 자연 상태의 혼합 미생물 군집들도 형질 전환된다. 이때 형질 전환체로 *Vibrio*와 *Pseudomonas*가 알려져 있고 동정되지 않은 균들도 다수 포함되는데 이때의 가상의 형질 전환체들은 콜로니 교잡과 PCR로 확인할 수 있다. 퇴적토에서는 형질 전환이 감지되지 않았는데, 그것은 퇴적토 환경에서는 형질 전환이 유도되지 않는 것을 보여 주는 것이다(85). 연구자들은 형질 전환은 수계 환경에서 작은 플라스미드를 전파시켜 해양미생물들 간에 유전적 구조를 변화시킬 수 있는 것과 관련이 있는 기작일지도 모른다고 제안하였다.

3) 강의 epilithon

Epilithon이란 수계 환경에 있는 돌 표면에 발달한 점막에 있는 미생물 군집을 말한다(22). Rochelle 등(65)은 강의 epilithon에서 두 종의 *A. calcoaceticus*에서 동일한 7.8-kb의 비접합성이며 수는 내성이 있는 플라스미드를 보고한 적이 있다. 이들 두 종에서 분리한 플라스미드는 실험실 내에서 DNase에 감성이 있는 과정을 통해 토양에서 분리된 자연계의 형질 전환 능력이 있는 *A. calcoaceticus*로 성공적으로 전이되었다.

환경에서 유전자 전이에 대한 연구의 전망

이 분야에 대한 연구에서 활발하게 촉진되는 중요한 관심사 중의 하나는 생태학적인 안전성이다. 유전공학과 생명공학은 기초과학의 여러 분야의 발전에 많은 기여를 하였고, 이들 학문의 신속한 성장으로 유전적으로 변형된 미생물들(genetically engineered microorganisms: GEMs)이 산업과 농업, 의학, 그리고 여러 연구 분야에서 더 많이 사용되기 시작하였다. 하지만, 그 응용은 경제적으로 많은 이득을 줄 수 있는 잠재력을 갖고 있지만, 한편으로는 GEMs가 우발적으로 방출될 경우 자연 생태계에 예기치 않은 결과를 초래할 지도 모른다. 따라서, 잠재적으로 위험한 유전자를 갖는 GEMs가 자연 생태계에서 토착 세균들에게 전이되고 잘 적응되어 나타날 수 있는 생태학적 위험 가능성에 대해서는 평가되어야 한다(82). 하지만 세균은 생태계에서 혼합 군집을 이루고 있으므로 형질 전환과 접합, transduction과 같은 유전자 전이 기작은 독립적이라기보다는 서로 혼합된 형태로 나타날 수 있다. 또한 GEMs는 그들의 유전자를 토착세균에게 전이할 수 있을 뿐 아니라 토착 세균으로부터 유전자를 전이 받을 수도 있다. 그러므로, 생태계에서의 유전자 전이는 현재 알려진 것 보다 더 복잡할 수 있다. 따라서, GEMs의 방출 결과를 평가하는 것은 생각보다 더 어렵고

복잡할 수 있다. 세균들 간의 유전자 전이에 대한 연구는 지난 오십년 동안 전세계의 여러 연구실에서 이루어지고 있지만 그들의 중요성과 기작은 아직까지 더 많은 연구가 필요하다. 이러한 연구들의 대부분은 환경 요인을 조절할 수 있는 실험실이나 제한된 환경에서 이루어졌다. 이제 이러한 연구는 개방된 자연 생태계에서 이루어질 필요가 있고 토착 세균에 직접 전이되어 나타날 수 있는 영향에 대한 연구가 이루어져야 한다. 그리고 이러한 GEMs가 방출될 경우에는 그에 따른 영향 평가(risk assessment)를 반드시 수행되어야 한다. 그러기 위해서는 이러한 유전자 전이를 좀더 정확히 측정할 수 있는 방법과 기준이 확립되어야 한다.

감사의 말

본 연구는 1995년도 LG연암문화재단의 연암해외연구교수 연구비의 지원으로 수행되었음.

참고문헌

- Aardema, B.W., M.G. Lorenz, and W.E. Krumbein. 1983. Protection of sediment-adsorbed transforming DNA against enzymatic inactivation. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 417-420.
- Albritton, W.L., J.K. Setlow, and L. Slaney. 1982. Transfer of *Haemophilus influenzae* chromosomal genes by cell-to-cell contact. *J. Bacteriol.* **152**, 1066-1070.
- Avery, O.R., C.M. MacLeod, and M. McCarty. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation in pneumococcal types. *J. Exp. Med.* **79**, 137-159.
- Behnke, D. 1981. Plasmid transformation of *Streptococcus sanuis* (Challis) occurs by circular and linear molecules. *Mol. Gen. Genet.* **181**, 490-497.
- Berg, D.E. 1989. Transposable elements in prokaryotes. In Levy, S.B. and Miller, R.V. (eds) *Gene Transfer in the Environment*, pp. 99-137. McGraw-Hill, New York.
- Berg, D.E. and M.M. Howe. 1989. *Mobile DNA*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Birge, E.A. 1994. *Bacterial and Bacteriophage Genetics* (Third ed.). Springer-Verlag, New York.
- Börshiem, K.Y. 1993. Native marine bacteriophages. *FEMS Microbiol. Ecol.* **102**, 141-159.
- Buu-Hoi, A., G. de Cespedes, and T. Horaud. 1985. Deoxyribonuclease-sensitive transfer of an R-plasmid in *Streptococcus pyogenes* (group A). *FEMS Microbiol. Lett.* **30**, 407-410.
- Carlson, C.A., L.S. Pierson, J.J. Rosen, and J.L. Ingraham. 1983. *Pseudomonas stutzeri* and related species undergo natural transformation. *J. Bacteriol.* **153**, 93-99.
- Canosi, U., A. Iglesias, and T.A. Trautner. 1981. Plasmid transformation in *Bacillus subtilis*: effects of insertion of *Bacillus subtilis* DNA into plasmid pC194. *Mol. Gen. Genet.* **181**, 434-440.
- Ceglowski, P., M. Kawczynski, and W.T. Dobrzanski. 1980. Purification and properties of deoxyribonucleic acid binding factor isolated from the surface of *Streptococcus sanguis* cells. *J. Bacteriol.* **141**, 1005-1014.
- Danner, D.B., H.O. Smith, and S.A. Narang. 1982. Construction of DNA recognition sites active in *Haemophilus* transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2393-2397.
- Day, M.J. and J.C. Fry. 1992. Microbial ecology, genetics and risk assessment. In Fry, J.C. and Day, M.J. (eds) *Release of Genetically Engineered and other Microorganisms*, pp. 160-167. Cambridge University Press, Cambridge.
- DeFlaun, M.F., J.H. Paul, and W.H. Jeffrey. 1987. Distribution and molecular weight of dissolved DNA in subtropical estuarine and oceanic environments. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **38**, 65-73.
- de Vos, W.M. and G. Venema. 1983. Transformation of *Bacillus subtilis* competent cells: Identification and regulation of the *recE* gene product. *Mol. Gen. Genet.* **190**, 56-64.
- Dooley, D.C., C.T. Hadden, and E.W. Nester. 1971. Macromolecular synthesis in *Bacillus subtilis* during development of the competent state. *J. Bacteriol.* **108**, 668-679.
- Duncan, K.E., C.A. Istock, J.B. Graham, and N. Ferguson. 1989. Genetic exchange between *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*: variable hybrid and the nature of bacterial species. *Evolution* **43**, 1585-1609.
- Ephrati-Elizur, E. 1968. Spontaneous transformation in *Bacillus subtilis*. *Gen. Res.* **11**, 83-96.
- Földes, J. and T.A. Trautner. 1964. Infectious DNA from newly isolated *Bacillus subtilis* phage. *Z. Vererbungsl.* **95**, 57.
- Frischer, M.E., G.J. Stewart, and J.H. Paul. 1994. Plasmid transfer to indigenous marine bacterial populations by natural transformation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **15**, 127-136.
- Fry, J.C. and M.J. Day. 1990. Plasmid transfer in the epilithon. In Fry, J.C. and Day M.J. (eds) *Bacterial Genetics in Natural Environments*, pp. 55-80. Chapman and Hall, London.
- Gallori, E., M. Bazzicalupo, L. Dal Canto, R. Fani, P. Nannipieri, C. Vettori, and G. Stotzky. 1994. Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on clay in non-sterile soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **15**, 119-126.
- Goodgal, S.H. 1982. DNA uptake in *Haemophilus* transformation. *Annu. Rev. Genet.* **16**, 169-192.
- Goodman, S.D. and J.J. Scoocca. 1988. Identification and arrangement of the DNA sequence recognized in specific transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 6982-6986.
- Graham, J.B. and C.A. Istock. 1978. Genetic exchange in *Bacillus subtilis* in soil. *Mol. Gen. Genet.* **166**, 287-290.
- Graham, J.B. and C.A. Istock. 1979. Genetic exchange and natural selection cause *Bacillus subtilis* to evolve in soil culture. *Science* **204**, 637-639.
- Graham, J.B. and C.A. Istock. 1981. Parasexuality and microevolution in experimental populations of *Bacillus subtilis*. *Evolution* **35**, 954-963.
- Griffith, F. 1928. Significance of pneumococcal types. *J. Hyg.* **27**, 113-159.
- Heijnen, C.E. and J.A. van Veen. 1991. A determination of protective microhabitats for bacteria introduced into soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85**, 73-80.
- Heynen, C.E., J.D. van Elsas, and P.J. Kuikman. 1988. Dynamics of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* introduced into soil; the effect of bentonite clay on predation by protozoa. *Soil Biol. Biochem.* **20**, 483-488.

32. Jeffrey, W.H., J.H. Paul, and G.J. Stewart. 1990. Natural transformation of a marine *Vibrio* species by plasmid DNA. *Microb. Ecol.* **19**, 259-268.
33. Joset, F and J. Guespin-Michel. 1993. *Prokaryotic Genetics: Genome Organization, Transfer and Plasticity*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
34. Kahn, M.E. and H.O. Smith. 1984. Transformation in *Haemophilus*: A problem in membrane biology. *J. Membr. Biol.* **81**, 89-103.
35. Kahn, M.E., F. Barany, and H.O. Smith. 1983. Transformosomes. Specialized membrane structures that protect DNA during *Haemophilus* transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**, 6927-6931.
36. Katz, L.S. and J.K. Marquis. 1991. The toxicology of genetically engineered microorganisms. In Levy, M.A. and Strauss, H.S. (eds) *Risk Assessment in Genetic Engineering*, pp 51-63. McGraw-Hall, New York.
37. Khanna M. and G. Stotzky, 1992. Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effect for DNase on the transforming ability of bound DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1930-1939.
38. Khanna M., M. Yoder, L. Calamai, and G. Stotzky. 1995. X-ray diffractometry and electron microscopy of DNA from *Bacillus subtilis* bound on clay minerals *Soil*(submitted).
39. Kingsman, A.J., K.F. Chater, and S.M. Kingsman. 1988. *Transposition*. The Society of General Microbiology, Cambridge University Press, Cambridge.
40. Lederberg, J. and E.L. Tatum. 1946a. Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **11**, 113-114.
41. Lederberg, J. and E.L. Tatum. 1946b. Gene recombination in *E. coli*. *Nature* **158**, 558.
42. Lederberg, J., E.M. Lederberg, N.E. Zinder, and E.R. Lively. 1951. Recombination analysis of bacterial heredity. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **16**, 413-443.
43. Leduc, M., R. Kasra, and J. van Heijenoort. 1982. Induction and control of the autolytic system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **152**, 26-34.
44. Lee, G.H. and G. Stotzky. 1990. Transformation is a mechanism of gene transfer in soil. *Korean J. Microbiol.* **28**, 210-218.
45. Levy, S.B. and R.V. Miller. 1989. *Gene Transfer in the Environment*. McGraw-Hill, New York.
46. Lorenz, M.G. and W. Wackernagel. 1987. Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. *App. Microbiol.* **53**, 2948-2952.
47. Lorenz, M.G. and W. Wackernagel. 1990. Natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* by sand-adsorbed DNA. *Arch. Microbiol.* **15**, 380-385.
48. Lorenz, M.G. and W. Wackernagel. 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Res.* **58**, 563-602.
49. Lorenz, M.G., B.W. Aardema, and W.E. Krumbein. 1981. Interaction of marine sediment with DNA and DNA availability to nucleases. *Mar. Biol.* **64**, 225-230.
50. Lorenz, M.G. B.W. Aardema, and W. Wackernagel. 1988. Highly efficient genetic transformation of *Bacillus subtilis* attached to sand grains. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 107-112.
51. Lorenz, M.G., K. Reipschlagser, and W. Wackernagel. 1992. Plasmid transformation of naturally competent *Acinetobacter calcoaceticus* in nonsterile soil extract and ground water. *Arch. Microbiol.* **157**, 355-360.
52. Madsen, E.L. and M. Alexander. 1982. Transport of *Rhizobium* and *Pseudomonas* through soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **46**, 557-560.
53. Matsushima, P. and R.H. Baltz. 1986. Protoplast fusion. In Demain, A.L. and Solmon, N.A. (eds) *Industrial Microbiology and Biotechnology*, pp. 170-183. American society for microbiology, Washington, DC.
54. Mazodier, P. and J. Davies. 1991. Gene transfer between distantly related bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **25**, 147-171.
55. Morrison, D.A. 1977. Transformation in *Pneumococcus*: existence and properties of a complex involving donor deoxyribonucleate single strands in eclipse. *J. Bacteriol.* **132**, 576-583.
56. Noteborn, M., G. Venema, and J. Kooistra. 1981. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid on deoxyribonucleic acid entry and recombination in transformation of a wild-type strain and a *rec-1* mutant of *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* **145**, 1189-1195.
57. Ogram, A., G.S. Saylor, and T. Barkay. 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbial Methods* **7**, 57-66.
58. Page, W.J. 1982. Optimal conditions for competence development in nitrogen fixing *Azotobacter vinelandii*. *Can. J. Microbiol.* **28**, 389-397.
59. Paul, J.H. and A.W. David. 1989. Production of extracellular nucleic acids by genetically altered bacteria in aquatic-environment microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1865-1869.
60. Paul, J.H., W.H. Jeffrey, and M.F. DeFlaun. 1987. Dynamics of extracellular DNA in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 170-179.
61. Paul, J.H., M.F. DeFlaun, and W.H. Jeffrey. 1988. Mechanisms of DNA utilization by estuarine microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1682-1688.
62. Paul, J.H., M.E. Frischer, and J.M. Thurmond. 1991. Gene transfer in marine water column and sediment microcosms by natural plasmid transformation. *Appl. environ. Microbiol.* **57**, 1509-1515.
63. Paul, J.H., J.M. Thurmond, M.E. Frischer, and J.P. Cannon. 1992. Intergenetic natural plasmid transformation between *E. coli* and a marine *Vibrio* species. *Mol. Ecol.* **1**, 37-46.
64. Postel, E.H. and S.H. Goodgal. 1966. Uptake of a single stranded DNA in *Haemophilus influenzae* and its ability to transform. *J. Mol. Biol.* **16**, 317-327.
65. Rochelle, P.A., M.J. Day, and J.C. Fry. 1988. Occurrence, transfer and mobilization in epithic strains of *Acinetobacter* of mercury-resistance plasmids capable of transformation. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 2933-2941.
66. Romanowski, G., J.C. Lorenz, and W. Wackernagel. 1993. Plasmid DNA in a groundwater aquifer microcosm-adsorption, DNase resistance and natural genetic transformation of *Bacillus subtilis*. *Mol. Ecol.* **2**, 171-181.
67. Saunders, C.W. and W.R. Guild. 1981. Monomer plasmid DNA transforms *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* **181**, 57-62.

68. **Schlegel, H.G.** 1986. *General Microbiology* (Sixth ed.) Cambridge University Press, Cambridge.
69. **Scolnik, P.A. and B.L. Marrs.** 1987. Genetic research with photosynthetic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**, 703-726.
70. **Seto, H. and A. Tomasz.** 1976. Calcium-requiring step in the uptake of deoxyribonucleic acid molecules through surface of competent pneumococci. *J. Bacteriol.* **126**, 1113-1118.
71. **Smith, H.O., D.B. Danner, and R.A. Deitch.** 1981. Genetic transformation. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 41-68.
72. **Sparling, P.F.** 1966. Genetic transformation of *Neisseria gonorrhoeae* to streptomycin resistance. *J. Bacteriol.* **92**, 1364-1371.
73. **Spencer, H.T. and R.M. Herriott.** 1965. Development of competence of *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* **90**, 911-920.
74. **Steffen, R.J., J. Gokoyr, A.K. Bej, and R.M. Atlas.** 1988. Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2908-2915.
75. **Stein, D.C.** 1991. Transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: physical requirements of the transforming DNA. *Can. J. Microbiol.* **37**, 345-349.
76. **Stewart, G.J.** 1992. Transformation in natural environments. In Wellington, E.M.H. and van Elsas, J.D. (eds) *Genetic Interaction among Microorganisms in the Natural Environment*, pp. 216-234. Pergamon Press, Oxford.
77. **Stewart, G.J. and C.A. Carlson.** 1986. The biology of natural transformation. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**, 211-235.
78. **Stewart, G.J. and C.D. Sinigalliano.** 1989. Detection and characterization of natural transformation in the marine bacterium *Pseudomonas stutzeri* strain ZoBell. *Arch. Microbiol.* **152**, 520-562.
79. **Stewart, G.J. and C.D. Sinigalliano.** 1990. Detection of horizontal gene transfer by natural transformation in native and introduced species of bacteria in marine and synthetic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1818-1824.
80. **Stewart, G.J., C.A. Carlson, and J.L. Ingraham.** 1983. Evidence for an active role of donor cells in natural transformations in *Pseudomonas stutzeri*. *J. Bacteriol.* **56**, 30-35.
81. **Stotzky, G.** 1986. Influence of soil mineral colloids on metabolic processes, growth, adhesion, and ecology of microbes and viruses. In Huang, P.M. and Schintzer, M. (eds) *Interaction of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes*, pp. 305-428. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.
82. **Stotzky, G.** 1989. Gene transfer among bacteria in soil. In Levy, S.B. and Miller, R.V. (eds) *Gene Transfer in the Environment*, pp. 165-222. McGraw-Hill, New York.
83. **Tomasz, A.** 1966. Model for the mechanism controlling the expression of competent state in *Pneumococcus* culture. *J. Bacteriol.* **94**, 562-570.
84. **Trevors, J.T., J.D. van Elsas., L.S. van Overbeek, and M.E. Starodub.** 1990. Transport of genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* strain through a soil microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 401-408.
85. **Yin, X. and G. Stotzky,** 1997. Transfer of genetic information among bacteria in soil. *Adv. Appl. Microbiol.* (in press).
86. **Zinder, N.D. and J. Lederberg.** 1952. Genetic exchange in *Salmonella*. *J. Bacteriol.* **64**, 679-699.