

Article

## 2배체 대장균의 제조와 그 특성

정혜임 · 임동빈\*

송실대학교 의생명시스템학부

# Construction and characterization of heterozygous diploid *Escherichia coli*

Hyeim Jung and Dongbin Lim\*

School of Systems Biomedical Science, Soongsil University, Seoul 06978, Republic of Korea

(Received December 2, 2016; Revised December 26, 2016; Accepted December 26, 2016)

**ABSTRACT:** Among 6 leu codons, CUG is the most frequently used codon in *E. coli*. It is recognized by leu-tRNA(CAG) encoded by four genes scattered on two chromosomal loci [*leuT* and *leuPQV*]. In the process of constructing a strain with no functional leu-tRNA (CAG) gene on chromosome, we made two mutant strains separately, one on *leuPQV* locus [ $\Delta leuPQV$ ], and the other on *leuT* locus [*leuT*\*[GAG]], where the anticodon of *leuT* was changed from CAG to GAG, thereby altering its recognition codon from CUG to CUC. We attempted to combine these two mutations by transduction using *leuT*\*[GAG] strain as a donor and  $\Delta leuPQV$  strain as a recipient. Large and small colonies appeared from this transduction. From PCR and DNA sequencing, large colony was confirmed to be the reciprocal recombinant as expected, but the small colonies contained both mutant *leuT*\*[GAG] and wild type *leuT*(CAG) genes in the cell. This heterozygous diploid strain did not show any unusual morphology under microscopic observation, but, interestingly, it showed a linear growth curve in rich medium with much slower growth rate than wild type cell. It always formed homogenous small colonies in the selection medium, but, when there was no selection, it readily segregated into *leuT*\*[GAG] and *leuT*(CAG). From these observations, we suggested that the strain with both *leuT*\*[GAG] and *leuT*(CAG) genes was not a partial diploid (merodiploid), but a full diploid cell having two different chromosomes. We proposed a model explaining how such a heterozygous diploid cell was formed and how and why its growth showed a linear growth curve.

**Key words:** *Escherichia coli*, codon usage, CUG codon, diploid, leuT

일반적으로 유전자의 코돈이 아미노산 서열에 변화를 일으키지 않는 동의코돈(synonym codon)으로 돌연변이가 일어난다 해도 단백질의 기능에는 영향을 끼치지 않는 것으로 믿어왔다. 그러나 최근에 이런 숨은돌연변이(silent mutation)에 의해 일어나는 유전질환들이 발견되었고, 이에 따라 아미노산의 서열을 변화시키지 않는 유전자 변이도 단백질의 기능을 잃게 만들 수도 있음을 알게 되었다(Zuben and Kimchi-Sarfaty, 2011). 예를 들어 어떤 코돈이 다른 동의코돈으로 바뀌게 되면 원래의 코돈과 돌연변이 코돈에 대응하는 tRNA의 세포 내 농도가 각기 다르기 때문에 mRNA의 번역속도가 달라지게 된다. 이에 따라 단백질 접힘동력학(folding kinetics)에 변화가

일어나게 되고, 단백질의 접힘(folding)이 잘못 일어나 기능을 잃은 단백질이 생성될 수 있는 것이다(Shabalina *et al.*, 2013). 인간단백질을 대장균에서 생산할 때, 잘못된 접힘으로 인한 비기능성 단백질을 생성하는 경우가 많은데, 대장균과 인간세포의 동의코돈에 대한 tRNA 빈도가 달라 접힘동력학이 다른 것도 이에 대한 하나의 이유가 될 것이다.

일반적으로 대량 생산되는 단백질의 유전자는 풍부한 전달 tRNA에 의하여 읽히는 코돈(abundant codon)을 많이 포함하며, 이러한 코돈에 대응하는, 즉 수요가 많은 tRNA의 유전자는 염색체 내에 복수로 존재한다(Sharp *et al.*, 1988). 대장균의 경우 가장 흔한 아미노산인 류신은 6개의 코돈을 가지고 있으며, 이중 가장 많이 사용되는 것은 CUG codon이다. 이 CUG 코돈을 인식하는 leu-tRNA 유전자는 염색체 상에 4개나(*leuP*,

\*For correspondence. E-mail: [dblim@ssu.ac.kr](mailto:dblim@ssu.ac.kr);  
Tel.: +82-2-820-0452; Fax: +82-2-824-4383

*leuQ*, *leuV*, *leuT*) 존재하는데 반해서, 다른 5개의 *leu* 코돈 (CUU, CUC, CUA, UUA, UUG)을 읽는 *leu*-tRNA는 각각 하나의 유전자에 의하여 생산된다. 일반적으로 유전자 ORF 내의 각종 코돈의 빈도와 분포, 이들 코돈을 읽는 tRNA들의 세포 내 농도, 이에 따른 리보솜에 의한 mRNA 번역 속도, 생성되는 단백질접힘 등은 mRNA로부터 최적의 단백질 생산이 이루어지도록 모두 함께진화(co-evolution)하였다.

번역속도와 단백질 접힘이 함께진화(co-evolution)하여 각각의 생명체에 최적화돼 있다면, 한 생명체의 유전자를 다른 생명체에서 번역할 경우, 단백질의 접힘이 잘못 일어날 수도 있을 것이다. 예를 들어 대장균 리보솜의 mRNA 번역속도는 인간의 그것에 비해 10배 정도 빠르며, 각종 tRNA의 상대적 농도에서도 두 생명체 사이에 차이를 보이기 때문에, 인간 유전자를 대장균이 번역할 경우 단백질의 합성 속도와 접힘동력학(folding kinetics)의 차이로 인해 문제가 발생할 수 있다 (Quax *et al.*, 2015). 어쩌면 두 생명체 사이에서의 접힘동력학의 차이가 대장균을 이용한 인간 단백질 생산시 종종 부닥치는 접힘문제의 한 원인이 될 수도 있을 것이다. 이러한 관점에서 우리는 단백질 합성에 관여하는 tRNA의 양을 최소로 제한할 경우, 단백질 합성과 접힘에 어떤 변화가 일어나며, 이런 변화가 대장균의 생리 및 성장에 어떤 영향을 끼치는지 알아보는 연구를 진행하고 있다.

류신(leucine) 아미노산을 암호화하고 있는 6개의 대장균 코돈들 중에 사용빈도가 가장 높은 것은 CUG 코돈이다. 우리는 이 CUG를 인식하는 leucine tRNA [*tRNA<sup>leu</sup>(CAG)*] 유전자 하나를 plasmid에 삽입한 후, 염색체상에 있는 모든 *tRNA<sup>leu</sup>(CAG)*를 삭제한 균주를 만들고, *tRNA<sup>leu</sup>(CAG)*의 양을 조절하면서 단백질 합성을 관찰하는 연구를 진행하고 있다. 이러한 연구의 일환으로 P1 transduction을 하였는데, 이 때 서로 다른 2개의 염색체를 보유한 2배체(heterozygous diploid) 대장

균 균주를 발견하였다. 우리는 본 논문을 통해 이러한 2배체 균주의 제조 과정과 생리적 특징을 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 유전자, 플라스미드 및 균주의 제조

실험에 사용한 모 균주는 *E. coli* BW25113이며, 본 실험에서 변형시킨 파생 균주들은 Table 1에 제시되어 있다. 염색체상의 유전자를 제거한(knock-out) 균주는 Datsenko와 Wanner (2000)의 방법을 이용하였다. 이때 선별 표지로 사용한 Km 저항성 유전자는 필요에 따라 Km<sup>R</sup> 유전자 양 옆에 존재하는 FRT 인식 염기 서열(FLP recognition target)과 FLP recombinase를 이용하여 제거하였다. 플라스미드 pSC101 origin을 가지며 chloramphenicol (이하 Cm) 저항성 유전자를 갖는 pSU106 플라스미드 선별을 위해 배양온도 30°C에서 25 µg/ml의 Cm을 사용하였다. Ampicillin (이하 Amp) 저항성 유전자를 갖는 pSU107 플라스미드 선별을 위해 50 µg/ml의 Amp를 사용하였으며, 이 때 배양온도는 37°C를 유지하였다. 플라스미드를 통한 가외적 tRNA<sup>leu</sup> (CAG) 공급을 위해 사용한 arabinose의 최종 농도는 0.02%이다. *E. coli* 유전체에 삽입된 kanamycin 저항성 유전자 선별을 위해 사용한 Km 최종 농도는 25 µg/ml이다.

### P1 transduction

P1 transduction은 다음과 같이 수행하였다(Thomason *et al.*, 2007). Donor로 사용할 균주에서 콜로니 하나를 따 5 mM CaCl<sub>2</sub>와 0.2% 포도당이 첨가된 LB 액체배지에 OD<sub>600</sub>이 0.1~0.2 될 때까지 배양했다. 여기에 파지액(phage stock) 100 µl를 첨가한 후 37°C에서 3시간 정도 진탕배양했다. 2~3방울의 클로

Table 1. Strains used in this study

Name	Genotypes or Characteristics	Reference or Method
BW25113	F-, Δ( <i>araD-araB</i> )567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), λ-, <i>rph-1</i> , Δ( <i>rhaD-rhaB</i> )568, <i>hsdR514</i>	Datsenko and Wanner (2000)
SSU0723	Km <sup>R</sup> insertion at <i>cydB</i> of BL21(DE3)	P1 transduction. Donor, JW0723; Recipient, BL21(DE3)
SSU500K	BW25113(DE3)	P1 transduction. Donor, SSU0723; Recipient, BW25113
SSU305K	<i>leuT</i> *(GAG), Km <sup>R</sup>	This study
SSU503K	Km <sup>R</sup> , Δ <i>leuQPV</i>	This study
SSU503	Δ <i>leuQPV</i>	This study
SSU306K	Km <sup>R</sup> , Δ <i>leuQPV</i> , <i>leuT</i> *(GAG)	This study

로포름 첨가하여 잘 섞은 후, 5,000 rpm로 5분간 원심분리하여 상등액을 모아 phage lysate를 만들었다. Recipient 균주를 5 mM CaCl<sub>2</sub>와 0.2% 포도당이 첨가된 LB 액체배지에 OD<sub>600</sub>이 0.8~1.0 될 때까지 진탕배양한 후, 5,000 rpm에서 5분 원심분리하여 세포를 모았다. 이 세포를 5 mM CaCl<sub>2</sub>와 100 mM MgSO<sub>4</sub> 첨가된, 배양액 부피의 1/4 정도의 LB 액체배지에 녹였다. 이 세포액 100 µl에 phage lysate 원액 100 µl, 1/10 희석한 것 100 µl, 희석에 사용한 용액(5 mM CaCl<sub>2</sub>와 100 mM MgSO<sub>4</sub> 첨가된 LB) 100 µl를 각각 넣은 것과, recipient 없이 phage lysate 만 넣은 것을 37°C에 30분 방치하였다. 각각의 튜브에 200 µl의 1 M NaCitrate pH 5.5를 첨가하고 섞어 반응을 중지시킨 후, 전체 반응액을 4 ml의 LB 가 들어있는 시험관에 각각 옮겼다. 37°C에서 한 시간 진탕배양 후, 1 ml를 따 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 세포를 모았다. 이 세포를 100 mM NaCitrate이 들어있는 100 µl LB에 녹인 후 20 µg/ml의 Km이 들어있는 배지에 갈아 37°C에서 14시간 배양한 후 관찰하였다.

### LeuQPV가 삭제된 균주와, *leuT*\*(GUG) 변이 균주 만들기

유전자 변형 실험에 사용한 올리고 서열은 Table 2에 제시하였다. *LeuQPV*의 삭제는 올리고 LeuPQVDelFor와 LeuPQVDelRev를 primer로, pKD4를 template로 사용하여 PCR한 후 이 PCR 조각을 *E. coli* BW25113 (pKD46)에 transformation하여 Km 저항성 콜로니를 얻은 후 PCR 후 sequencing으로 확인하였다. *leuT*\*(GUG) 균주의 제조는 먼저 *leuT*의 anticodon CUG를 GUG로 바꾸었다. *leuT*\*(GUG) 균주는 세 과정으로 제조하였다. 우선 올리고 LeuTGAG1202와 argXIntRev를 사용하여 PCR하고, 다음에 LeuTGAG1203과 argXUP1202로 PCR한 후, 이 둘을 올리고 argXUP1202와 argXIntRev로 PCR하여 두 조각을 연결하였다. 이렇게 하면 *leuT*의 CUG가 GUG로 바뀐 DNA 조각을 얻을 수 있다. 이 조각을 제한효소 Not 자리를 이용하여 *leuT*\*(GUG) 조각과 *yifK*-Km 조각을 연결하여 *yifK*-Km-*argX*-*hisR*-*leuT*\*-*proM*를 만든 후, lambda Red system을

이용하여 이 조각을 chromosome에 삽입하였다. Km 접시에 나온 콜로니를 PCR한 후 DNA sequencing하여 *leuT*\*(GAG) 여부를 확인하였다.

### 이배체 특성 분석

이배체 균주의 생장곡선을 그리기 위하여 25 µg/ml의 Km이 첨가된 배양 접시에서 자란 단일 콜로니를 선택하였다. 이 콜로니를 25 µg/ml의 Km이 들어있는 LB에 접종하여, 배양 온도 37°C에서 180 rpm으로 밤새 배양하였다. 밤새 자란 배양액의 OD<sub>600</sub>의 값을 새로운 배양액에 OD<sub>600</sub>의 값이 0.05가 되도록 희석하여 접종하여 배양했다. OD<sub>600</sub>의 값이 0.05를 시작(0 시간)으로 1시간 이후부터 20분 간격으로 13시간까지 OD<sub>600</sub>의 값을 측정하여 기록하였다. 2배체 균주의 세포 모양 및 크기 관찰을 위하여 그람 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

## 결 과

### *LeuT*의 CAG 코돈이 GAG로 치환된 균주 제작

대장균의 leucine tRNA[tRNA<sup>leu</sup>(CAG)] 유전자는 4개가 있는데, 염색체 상에 *leuQPV* 부위와 *leuT* 부위 등 두 자리에 위치한다. 우리 실험은 우선 이 두 부위가 각각 삭제된 균주를 만든 후 이 두 균주의 염색체를 합치는 방식으로 진행하였다.

*LeuT* 유전자는 다른 필수 tRNA 유전자(*argX*, *hisR*, *proM*)들과 근접해 있고, 각 tRNA 유전자의 크기는 100 bp 정도로 길이가 매우 짧기 때문에 *LeuT* 유전자만의 삭제는 간단하지 않았다. 따라서 *leuT*의 삭제보다는 이 유전자의 대응코돈 CAG 서열만을 GAG로 변형시키기로 하였다. 우선 대응코돈 CAG 서열 부분을 GAG로 변형된 점돌연변이 primer를 제작한 후 이를 사용하여 *leuT* 대응코돈 CAG가 GAG로 치환된 *argX*-*hisR*-*leuT*\*(GAG)-*proM* 유전자 조각을 제조하였다(Fig. 1 위). 다음에 *yifK*와 *argX* 유전자 사이에 Km<sup>R</sup> DNA를 넣어 *yifK*-

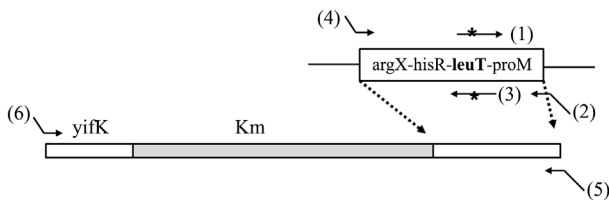
Table 2. Oligos used in this study

Name	Sequence	Use
LeuPQVDelFor	5'-ATACCAAACCTGCACGCTAGTTTCTGATGGACATTTTTCAGCAATTACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Construction of $\Delta$ <i>LeuQPV</i>
LeuPQVDelRev	5'-GAACCCACCGTCCGTAAGGACACTAACACCTGAAGCTAGCGCGTCTACCCATATGATATCCTCCTTAG	Construction of $\Delta$ <i>LeuQPV</i>
LeuTGAG1202	5'-CGTAGCTTgagGTGTTAGTGTCTTACGG	<i>leuT</i> *(GAG) construction
LeuTGAG1203	5'-GGACACTAACACcctAAGCTAGCGCGTC	<i>leuT</i> *(GAG) construction
argXUP1202	5'-GCGGCCGCACAAACCGTAACCAAACG	<i>leuT</i> *(GAG) construction
argXIntRev	5'-TCCTTCAATACGTTAAGGGCG	<i>leuT</i> *(GAG) construction

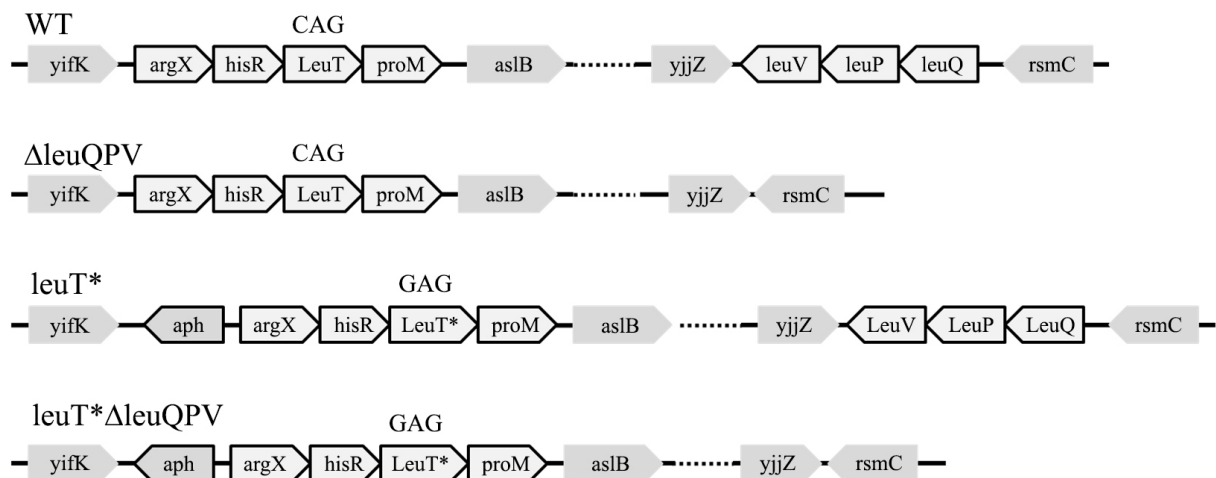
Km-argX를 만든 후, 이 둘을 연결하여 *yifK-Km-argX-hisR-leuT\*(GAG)-proM* DNA 조각을 제조하였다(Fig. 1 아래). 이 조각을 Red recombinase를 이용하여 BW25113 균주의 염색체에 삽입하였다. Km 저항성인 두 콜로니를 선택하여 PCR 후 sequencing을 통해 *leuT*의 CAG 대응코돈 서열이 GAG 서열로 치환되었는지를 알아 보았는데, 모두 *leuT*의 CAG가 GAG로 치환된 Fig. 2의 세번째 구조를 가짐을 확인하였다. 이렇게 *leuT*의 anticodon CAG가 GAG로 변이되어 tRNA<sup>leu</sup>(CAG)를 공급하지 못하는 균주를 SSU305K라 명명하였다.

### LeuQPV 제거 균주 제작

*LeuQPV* 부위는 Datsenko 등의 방식으로 제거하였다(Datsenko and Wanner, 2000). *LeuQPV*를 제거하기 위해 제작한 PCR 조



**Fig. 1. Construction of a strain with *leuT\*(GAG)*.** This strain was made by three steps. First, *leuT*(CAG) was changed to *leuT\*(GAG)* as follows. The *leuT* gene with GAG was made by PCR with primer 1 & 2, or 3 & 4. Next the two fragments were joined by PCR with primer 2 & 4. Second, the PCR fragment with *leuT\*(GAG)* was joined to the DNA fragment with *yifK-Km* using restriction enzyme NotI and ligase. Finally, the DNA fragment containing *yifK-Km-argX-hisR-leuT\*-proM* was amplified with primers 5 & 6, and it was integrated into chromosome by lambda Red recombinase. Colonies appeared Km plate was confirmed by PCR and DNA sequencing.



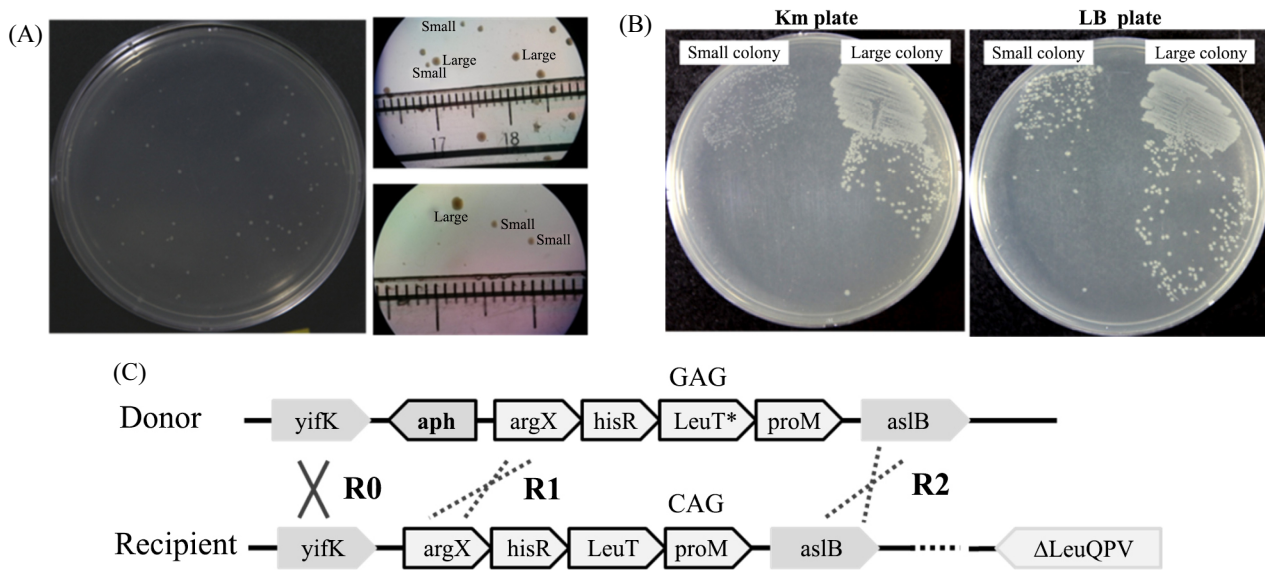
**Fig. 2. Chromosomal structures of four strains described in this paper.** The gene *leuT* encodes for a leu-tRNA with anticodon CAG. *LeuT\** indicates a mutant *leuT* gene with anticodon GAG. The last strain (*leuT\**,  $\Delta$ *leuQPV*) does not carry on chromosome any genes for tRNA for CUG codon.

각은 양 끝이 *leuQ* 또는 *leuV* 유전자와 약 50 bp homologous sequence를 가지고 있으며, PCR 조각 중심에는 pKD4 플라스미드에서 유래된 FRT (FLP recognition target) 서열로 둘러싸인 Km 저항성 유전자가 위치하고 있다. 이렇게 제작된 PCR 조각을 SSU500K strain에 형질 전환시키면 phage  $\lambda$  Red recombinase에 의해 recombination을 시도했다(Datsenko and Wanner, 2000). Km 저항성을 띤 균주를 선별한 후 Km<sup>R</sup> 유전자는 Km<sup>R</sup> 유전자의 양 끝에 존재하는 FRT 서열을 인식할 수 있는 FLP recombinase를 통해 제거하였다. 이렇게 제조된 균주는 Fig. 2의 두 번째 구조와 같이 *leuQPV*가 모두 제거된 구조임을 PCR과 DNA 서열 분석을 통해 확인하고(Fig. 5A: lane 3), 이를 SSU503이라 명명하였다.

### 염색체상의 모든 tRNA<sup>leu</sup>(CAG)가 삭제된 돌연변이 균주 제작

*leuQPV*가 삭제된 균주와 *leuT* 대응코돈 CAG가 GAG로 치환된 균주를 합쳐서 tRNA<sup>leu</sup>(CAG) 공급이 모두 차단된 균주를 제조하고자 하였다. 이를 위해 CAG 대응코돈에 점 돌연변이가 일어난 SSU305K 균주(Km 저항성)를 공여자(donor)로, *leuQPV*가 제거된 SSU503을 수혜자(recipient)로 사용하여 P1 transduction을 시도하였다. 수혜자 균주에는 가외적 tRNA<sup>leu</sup>(CAG) 공급할 수 있는 pSU106 (CmR) 플라스미드를 포함하고 있어 재조합체가 tRNA<sup>leu</sup>(CAG)가 없어 죽어 죽는 것을 방지하였다.

그런데 기대와는 달리 tRNA<sup>leu</sup>(CAG) 공급용 플라스미드를 넣지 않은 대조군에서도 다양한 크기의 콜로니들이 형성되었다. 육안으로 관찰한 콜로니들은 대(large) 그리고 소(small) 두 종류 크기의 콜로니로 분류할 수 있었다(Fig. 3A). 크거나



**Fig. 3.** P1 transduction using SSU305K[Km<sup>R</sup>, *leuT\**(GAG)] as a donor and SSU503( $\Delta$ *leuQPV*) as a recipient. Recombinants with both *leuT\**(GAG) and  $\Delta$ *leuQPV* could not grow because they totally lack tRNA<sup>leu</sup>(CAG). (A) Colonies on the Km-plate observed by unaided eye and by anatomical microscope. (B) Each colony type on A was re-streaked on an LB/Km or an LB plate. Note that cells from small colony formed mixed-sized colonies on LB plate. (C) Two possible recombinations during the P1 transduction. The cross with R0 and R2 results in a strain with Km<sup>R</sup>, *leuT\**(GAG) and  $\Delta$ *leuQPV*, but the cross with R0 and R1 results in a strain with Km<sup>R</sup>, *leuT* wild type and  $\Delta$ *leuQPV*. DNA amplification by PCR showed that the large colonies of Km plate were recombinants at R0 and R1, but the cells in small colonies contained chromosomes of both the recipient itself and the recombinant at R0 and R2. The gene *aph* encodes for aminoglycoside-3'-phosphotransferase for Km-resistance.

작은 콜로니들이 실제로 Km 저항성을 갖고 있는지를 확인하고자, 소 콜로니와 대 콜로니를 항생제(Km)를 포함한 고체배지와 항생제를 포함하지 않은 고체배지에 배양해 보았다. 그 결과 소 콜로니(SSU308K로 명명)와 대 콜로니(SSU309K) 모두 Km 접시에서 잘 자랐으나, 작은 콜로니는 항상 작은 콜로니를 큰 콜로니는 항상 큰 콜로니를 형성하여 표현형이 안정적으로 유지됨을 확인하였다(Fig. 3B). 반면에 Km 들어 있지 않은 배지에서는 재미있는 결과를 보여주었다. 대 콜로니 SSU309K는 고체 LB 배지에서 콜로니가 균일한 크기로 자랐으나, 소 콜로니 SSU308K는 대, 소 두 종류의 콜로니로 분리되는 것을 발견하였다(Fig. 3B). 항상 균일하게 큰 콜로니를 형성하는 SSU309K의 경우, PCR한 후 DNA 서열 분석 결과, *yifK*와 *argX* 유전자 사이에 Km<sup>R</sup> 유전자만 삽입되고 *leuT*는 야생형(CAG)로 남아있음을 발견하였다. 즉 대 콜로니 SSU309K는 Fig. 3C의 R0/R1의 재조합으로 얻어진 균주로, 우리가 원했던 tRNA<sup>leu</sup>(CAG)의 돌연변이는 아니었다.

### SSU308K 균주의 유전적 분석

작은 콜로니를 형성하는 SSU308K 균주는 Km 배지에서 오랫동안 계대 배양해도 표현형이 변하지 않았다. 즉 이 균주는 항상 Km 배지에서는 작고 균일한 콜로니를, 항생제 선별 없는

고체 LB 배지에서 크고 작은 콜로니를 형성하였다(Fig. 3B). 고체 LB 배지에서 형성된 크고 작은 균주를 각각 SSU308KL, SSU308KS로 명명하고, 이들을 Km 배지와 LB 배지에 재차 스트리킹 한 결과, SSU308KL 균주는 Km 배지에서는 자라지 못하고, LB 배지에서만 성장하였다. 반면, SSU308KS 균주는 Km 배지와 LB 배지에서 모두 자랐으나, Km 배지에서는 Fig. 3B처럼 작은 콜로니를, LB 배지에서는 또 다시 크고 작은 콜로니를 형성하였다. 즉 SSU308KS는 모균주 SSU308K와 같은 표현형을 보였으나, SSU308KL은 Km 저항성을 잃은 것이었다.

SSU308K 균주의 유전형을 알기 위해 *leuQPV*와 *leuT* 유전자 부위를 증폭한 후 DNA 서열 분석을 하였다. Figure 4A는 *leuQPV* 부위, 4B는 *leuT* 부위를 분석한 결과이다. Transduction의 모 균주 SSU500K와 제공균주(donor) SSU305K는 *leuQPV* 부위가 야생형으로, 증폭된 DNA 크기는 약 690 bp이다(Fig. 4A: lanes 1 and 2). 받는균주(recipient) SSU503의 경우 *leuQPV*가 삭제되었기 때문에, 증폭된 DNA 크기는 약 430 bp이다(Fig. 4A: lane 3). Transduction하여 얻은 SSU308K와 SSU308KL 균주들은 *leuQPV* 부위가 받는균주 유전형을 따르기 때문에, 기대 한대로 430 bp로 증폭되었다(Fig. 4A: lanes 4 and 5). 따라서 이 transduction의 경우 *leuQPV* 부위는 예상한 결과대로

잘 나왔다.

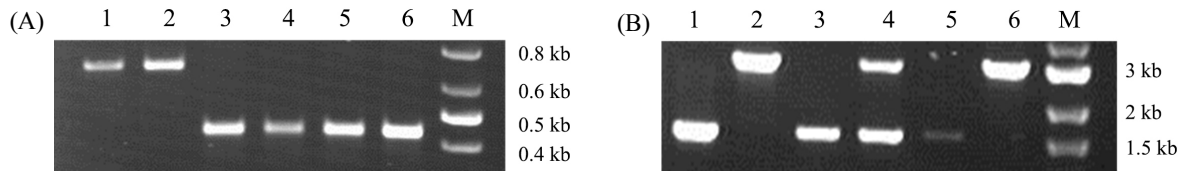
다음으로 *LeuT* 대응코돈 CAG의 치환 여부를 확인하기 위해 *leuT* 부위를 증폭하였다(Fig. 4B). *ArgX-hisR-leuT-promM* locus가 야생형인 모균주 SSU500과 받는균주 SSU503 경우 둘 다 약 1.5 kb DNA 조각이 증폭되었다(Fig. 4B: lanes 1 and 3). 제공균주 SSU305K의 경우 *yifK*와 *argX* 유전자 사이에 약 1.5 kb 크기의 Km 유전자가 삽입되었기 때문에, 약 3 kb의 PCR 조각이 예측되는데, 실제 결과도 이대로 나왔다(Fig. 3B: lane 2). 재조합균주 SSU308K가 donor SSU305K의 DNA를 reciprocal recombination으로 전달받아 Km 저항성을 갖게 된 거라면 약 3 kb 조각이 증폭되어야 한다. 하지만, PCR 결과 1.5 kb와 3 kb의 2 조각이 만들어졌다(Fig. 3B: lane 4). 증폭된 2 조각을 각각 분리 정제한 후, DNA 서열 분석을 해보니, 3 kb 조각은 *Km-argX-hisR-leuT\*(GAG)-promM*였고, 1.5 kb 조각은 야생형 그대로 *argX-hisR-leuT(CAG)-promM*임을 알게 되었다. 이는 SSU308K 균주가 *leuT* 부위를 두 개[야생형 *leuT*와 Km<sup>R</sup>-*LeuT\*(GAG)* 형] 모두 가지고 있는 2배체임을 보여준다. 이 2배체 균주에서 분리되면서 Km 저항성을 잃어버린 균주 SSU308KL은 예측대로 *argX-hisR-leuT(CAG)-promM* (1.5 kb)

로 확인되었다. Figure 4, lane 6에 사용된 SSU306K는 우리가 원래 제작하고자 했던  $\Delta leuQPV$ 와 Km<sup>R</sup>-*LeuT\*(GAG)* 유전자형을 갖는 균주로, PCR 대조균으로 사용하였다. 이 SSU306K는 염색체 상의 *leu-tRNA(CAG)* 유전자가 모두 없어진 균주로, 플라스미드 pSU106에 있는 arabinose promoter에 의하여 조절 받는 *leuPV*에 의하여 *leu-tRNA(CAG)*가 공급받는다. 이 균주를 이용한, tRNA 제한 공급하에서의 단백질 합성 특성에 대해서는 독립된 논문으로 발표할 예정이다.

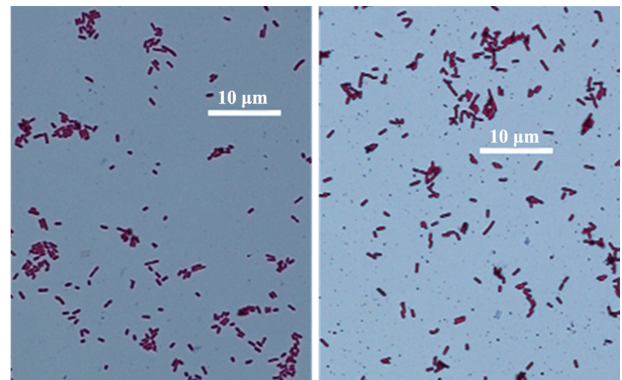
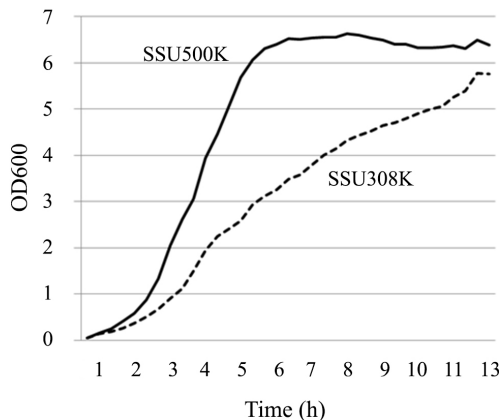
### SSU308K 균주의 생리적 특성 분석

PCR 조각의 크기 및 이 DNA 조각의 서열분석으로 SSU308K 균주의 *leuT* 부위가 2배체임을 확인할 수 있었으나, 이 부위만을 증폭으로 가지고 있는 부분적 2배체인지, 아니면 염색체 전체가 중복돼 있는 2배체인지는 알 수 없다. 이 균주의 특성을 알아보기 위해 성장 곡선을 그리고, 현미경 관찰도 수행하였다(Fig. 5).

모균주 SSU500K는 유도기를 거쳐, 개체수가 폭발적으로 증가되는 대수기, 더 이상 개체수가 배증되지 않고 유지하는 정지상에 도달하는 전형적인 미생물 성장 곡선을 보여준다



**Fig. 4.** PCR amplification of *leuT* and *leuQPV* loci. (A) *leuQPV* locus. (B) *leuT* locus. PCR templates were as follows. Lanes: 1, SSU500 (parent); 2, SSU305K (donor); 3, SSU503 (recipient); 4, SSU308K, a small colony from P1 transduction; 5, SSU308KL, a large colony derived from SSU308K; 6, SSU306K, a derivative of SSU308K with  $\Delta leuQPV$  and Km<sup>R</sup>-*LeuT\*(GAG)*; M, size marker. Note the two bands in lane 4 of B, indicating that it had both *leuT(CAG)* and *leuT\*(GAG)*. Unlike its parent SSU308K (lane 4), a single band appeared in SSU308KL (lane 5 of B) with a size of 1.5 kb, showing that it had *argX-hisR-leuT(CAG)-promM*.



**Fig. 5.** Growth curves of parent SSU500K and diploid SSU308K, and their microscopic observations. For microscopic observations, samples were taken at 5 h after inoculation.

(Fig. 5). 하지만, 2배체 균주 SSU308K는 이러한 유도기, 대수기, 그리고 정지상의 뚜렷한 구분이 관찰되지 않으면서, 흡광도는 접종 후 11시간까지 증가하였다(Fig. 5). 시료내의 살아 있는 세포를 알아보기 위해 콜로니 형성 단위를 세어보아도 흡광도 증가와 비슷한 경향을 보였다. 세포의 형태에서 차이가 나는지 알아보기 위해, 접종 후 5시간 시료를 그림 염색 후 현미경 관찰을 하였으나, 크기나 모양에서 특별한 차이를 발견하지 못했다(Fig. 5).

## 고찰

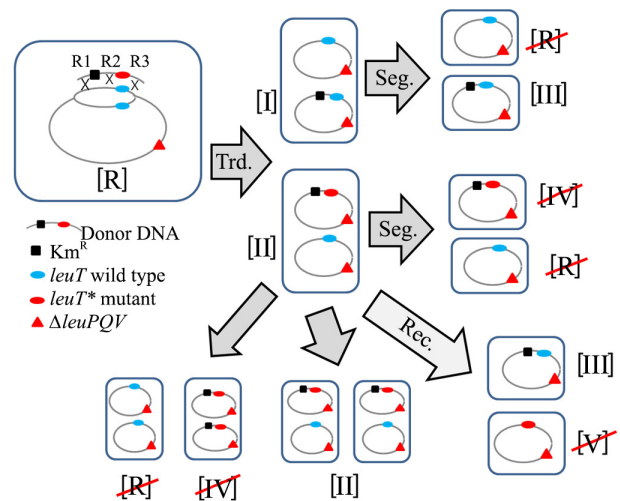
대장균에서 Leu 코돈 CUG를 인식하는 tRNA는 4개의 유전자에 의해 합성되는데, 이들은 염색체에 *leuPQV*와 *leuT* 2개의 locus로 나누어져 있다. 이 CUG를 인식하는 tRNA가 결핍된 균주를 만들기 위해, 우선 *leuPQV*가 삭제된 균주( $\Delta leuPQV$ )와, *leuT*의 anticodon이 돌연변이 된 균주[ $Km^R$ , *leuT*\*(GAG)]를 각각 만들었다. 이 두 돌연변이 유전자를 모으기 위해  $\Delta leuPQV$  균주를 recipient로, *leuT*\*(GAG) 균주를 donor로 하는 transduction을 수행하였는데, 이 실험 중에 돌연변이 유전자[*leuT*\*(GAG)]와 야생형 유전자[*leuT*(CAG)]를 모두 가진 diploid 균주를 얻었다.

자연계에서는 원핵세포의 염색체는 단수체(monoploid)로 존재한다고 믿어져 왔다. 하지만 영양분이 충분한 최적 인공 배지에서 배양할 때는, 세포당 여러 개의 염색체가 존재하는 polyploid 상태인 세균도 보고돼 있다. 예를 들어 *Azotobacter vinelandii*를 영양배지에서 배양할 경우 성장곡선상의 phase에 따라 세포당 염색체의 개수가 100까지 도달했다가 정지상(stationary phase)에 도달하면 급격히 감소한다고 알려져 있다(Maldonado *et al.*, 1994). 또한 고세균 *H. salinarum*의 경우 세포당 염색체의 개수가 18 copies/cell 이내에서 growth phase에 따라 조절 받는다고 보고되어 있다(Breuert *et al.*, 2006). 대장균의 경우에도 오래 전에, 영양요구(auxotroph) 혹은 파지 저항성 돌연변이 균주를 교배할 때 heterozygous diploid가 형성됨을 관찰한 바 있다(Lederberg, 1949). Lederberg가 만든 2배체는 안정적으로 유지되지 않고, 두 염색체 사이의 recombination 후 단수체로 분리가 일어났다. 그런데 유전자의 분리 비율이 일반적인 reciprocal recombination과는 다른 결과를 보여주었다(Zelle and Lederberg, 1951). 또한 Zelle 등은 대장균이 방사성 조임에 대한 저항성(radiation-resistance) 정도를 비교하여, 대장균이 조건에 따라 polyploid를 형성하며, polyploid는 보통 대장균에 비해 세포 크기가 훨씬 크다고 보고하였다(Zelle

and Ogg, 1957). 이러한 육질십년 전의 연구는 다배체 존재를 DNA 혹은 RNA의 상대적인 양, 방사성에 대한 저항성 등으로부터 시료내의 대장균이 2배체 혹은 다배체일 것이라 유추한 결론이었다. 따라서 이들의 결과와 본 실험의 결과를 직접 비교하기는 힘들지만, 세균도 다배체를 형성할 수 있다는 가능성은 오래 전부터 제기돼 왔음을 알 수 있다.

Zenn 등이 얻은 polyploid 대장균은 monoploid 대장균에 비해 세포의 크기가 크다고 보고되어 있어 우리가 얻은 2배체 세포의 크기를 야생형과 비교해 봤으나, 우리의 현미경 관찰에서는 2배체 균주와 모 균주 사이의 특별한 차이점을 발견하지 못했다(Fig. 5). 하지만, 성장그래프에서는 중요한 특징을 발견하였다(Fig. 5). 우선 2배체 균주는 모 균주에 비해 성장 속도가 현저하게 늦었다. 또한 모 균주가 박테리아의 전형적 성장 그래프를 따르는데 반해, 2배체 균주는 개체수가 기하급수적으로 늘어나는 대수기가 관찰되지 않고, 오랜 기간 선형적으로 흡광도가 증가하였다. 이러한 선형적 성장은 이분법에 의한 증식으로는 설명하기 힘든 성장 패턴이다.

우리는 transduction 과정 중에 2배체를 생성하는 기작과 선형적 성장 특성을 설명하는 모델을 Fig. 6에 제시하였다. 이 모델에 따르면, transduction에 따른 유전자 재조합시, recipient 세포는 염색체의 복제가 진행 중에 있어야 한다. 파지에 의하여 운



**Fig. 6. A model for the formation and growth of heterozygous diploid cell.** Recombination takes place on a daughter DNA of replicating chromosome during P1 transduction. Depending on the recombination sites, transductants would form [I] (R1 and R2 recombination) or [II] (R1 and R3 recombination). Cell [I] may segregate to cell [III] and recipient [R]. Cell [II] may segregate into [IV] and recipient [R]. Red slash indicates the cells which cannot grow in Km-containing medium. For the growth of cell [II] in Km-medium, heterozygous diploid must be maintained by replication and proper segregation. Cell [II] may produce surviving  $Km^R$  cell [III] by recombination between the two chromosomes, which we never observed.

만된 donor DNA는 복제가 이미 이루어진 부분에 reciprocal recombination으로 들어간다. Donor와 recipient DNA의 재조합은 R1과 R2 (세포 [I] 형성), 또는 R1과 R3의 재조합(세포 [II] 형성) 등, 두 가지가 가능하다(Fig. 6). 재조합이 일어난 후 DNA 복제가 완료되면, 세포는 한시적으로 recipient와 recombinant 두 종류의 염색체를 가지게 된다. 세포 [I]이 염색체 분리(segregation)와 세포 분열을 일으키면 recipient 염색체를 가진 세포 [R]와 재조합 세포 [III]를 형성하는데, Km 배지에서는 재조합 세포 [III]만 자랄 수 있다. Figure 3A의 큰 콜로니가 바로 이들이다.

반면에 R1/R3 재조합에 의해 생성된 세포 [II]가 염색체 분리(segregation)와 세포 분열을 일으키면, recipient형 세포 [R]과 재조합 세포 [IV]가 만들어 지는데, 세포 [R]은 Km 저항성이 없어서, 재조합세포 [IV]는 leu-tRNA(CAG)를 공급하는 유전자가 없기 때문에, Km 배지에서 둘 다 생존을 못한다. 하지만 세포 [R]은 Km 없는 배지에서는 모균처럼 잘 자라는데, Fig. 3B의 LB plate 왼쪽 streaking에서 큰 콜로니 형성하는 것이 바로 이들이다. 결국 R1/R3 재조합이 일어날 경우, recombinant와 recipient 두 염색체가 하나의 세포에 공존하는 heterozygous diploid (세포 [II])만이 Km 배지에서 자랄 수 있고, 두 염색체가 segregation되면 모두 죽게 되는 것이다.

2배체 세포 [II]의 생장이 느리며, 세포수가 선형으로 늘어나는 것처럼 보이는 이유(Fig. 6)는 두 가지로 설명할 수 있다. 첫째, 세포 [II]가 성장하면서 단속적으로 segregation이 일어날 경우이다. 이때 딸 세포는 leu-tRNA(CAG)의 공급이 없거나, Km 저항성 유전자가 없기 때문에, 둘 다 Km 배지에서 자라지 못한다. 따라서 세포 [II]에서 단속적으로 염색체 분리가 일어나면 전체적으로 생장이 느리고, 성장 그래프는 선형으로 나타날 수 있다. 둘째, 2배체 세포 [II]가 염색체 복제를 한 후 분열을 일으켜 계속 2배체를 유지하지만, 복제된 염색체의 segregation이 정확하지 않아 homozygous diploid를 형성하는 경우이다. 복제 후 4개로 늘어난 염색체의 segregation이 정확하게 일어나도 균주와 동일한 diploid를 형성해야 Km 배지에서 자랄 수 있는데, segregation으로 homozygous diploid가 형성되면 leu-tRNA(CAG)의 공급이 없거나, Km 저항성이 없는 세포를 만들게 되어 Km 배지에서 자라지 못하게 된다(Fig. 6). 두 가지 경우 모두 사멸하는 세포가 지속적으로 만들어지기 때문에, 성장 그래프가 선형을 띠는 것으로 생각되나, 이 두 가설 중 어느 것이 맞는지 혹은 둘 다 작동하는지는 현재로서는 알 수 없다. 한가지 이상한 것은, 세포 [II]는 재조합과 segregation으로 세포 [III]를 형성할 수도 있는데, 우리는 이런 결과를 관찰하지 못했다는 점이다. 즉 heterozygous diploid인 세포 [II]의 두 염색체 사

이에 R1/R2 재조합이 일어나면 세포 [III]과 [V]를 형성하게 되는데, 세포 [III]은 Km 배지에서 자라는 데 아무 문제가 없다. 그런데 이상하게도 transduction에서는 recombinant 세포 [III]를 쉽게 얻을 수 있었으나, 세포 [III]를 길러서는 세포 [III]을 얻을 수 없었다. 왜 diploid cell [II]에서 이러한 recombination이 관찰 되지 않는지는 향후 더 연구해볼 필요가 있다. 또한 2배체 세포의 두 염색체가 분리되지 않고 복제하는 이유와 기작, 세균에서 서로 다른 염색체의 segregation 등도 향후 밝혀야 할 과제이다.

## 적 요

대장균에서 6개의 Leu 코돈중 가장 흔한 코돈은 CUG이다. 이 코돈을 인식하는 tRNA는 4개의 유전자에 의해 합성되는데, *leuPQV*와 *leuT* 2개의 locus로 나누어져 있다. 이 CUG를 인식하는 모든 tRNA가 결핍된 균주를 만들기 위해, 우선 *leuPQV*가 삭제된 균주( $\Delta leuPQV$ )와, *leuT*의 anticodon CAG를 GAG로 돌연변이시킨 균주[Km<sup>R</sup>, *leuT*\*(GAG)]를 각각 만들었다. 이 두 돌연변이 유전자를 모으기 위해  $\Delta leuPQV$  균주를 recipient로, *leuT*\*(GAG) 균주를 donor로 하는 transduction을 수행한 결과, 콜로니 크기가 큰 것과 작은 것 두 종류의 transductant를 얻었다. PCR 후 염기서열 분석 결과 큰 콜로니는 예측한 recombinant로 판명됐으나, 작은 콜로니는 donor와 recipient 염색체 간의 상호교환재조합(reciprocal recombination)으로는 설명이 되지 않는, 돌연변이 유전자[*leuT*\*(GAG)]와 야생형 유전자(*leuT*(CAG))를 모두 가진 균주로 밝혀졌다. 이 heterozygous diploid는 광학현미경으로 관찰시 세포의 형태와 크기에서 특이점이 발견되지 않았으나, 영양배지에서 야생형에 비해 생장이 한참 느리면서, 선형성장곡선(linear growth curve)이라는 예측하지 못한 성장특성을 보였다. 이 2배체 균주는 선택배지에서는 항상 작은 균일한 콜로니를 형성하였으나, 배지에 선택항생제 없을 경우, *leuT*\*(GAG) 유전자형 세포와 *leuT*(CAG) 유전자형 세포로 분리가 일어났다. 우리의 결과를 종합해볼 때, 이 2배체 균주는, *leuT*\*(GAG)와 *leuT*(CAG) 부분만 2배체로 갖는 부분이배체(merodiploid)라기 보다는, *leuT*\*(GAG)와 *leuT*(CAG)가 서로 다른 염색체에 있는 완전이배체라는 모델을 지지했다. 우리는 이러한 2배체가 어떻게 생성되었으며, 어떻게 분리되는지, 또 이 균주는 왜 선형성장곡선을 보이는지 등에 대한 모델을 토론하였다.



## 감사의 말

This work was supported by the Soongsil University Research Fund.

## References

- Breuert, S., Allers, T., Spohn, G., and Soppa, J.** 2006. Regulated polyploidy in halophilic archaea. *PLoS One* <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000092>.
- Datsenko, K.A. and Wanner, B.L.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6640–6645.
- Lederberg, J.** 1949. Aberrant heterozygous in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **35**, 178–184.
- Maldonado, R., Jimenez, J., and Casadesusi, J.** 1994. Changes of ploidy during the *Azotobacter vinelandii* growth cycle. *J. Bacteriol.* **176**, 3911–3919.
- Quax T.E.F., Claassens, N.J., Söll, D., and van der Oost, J.** 2015. Codon bias as a means to fine-tune gene expression. *Mol. Cell* **59**, 160–167.
- Shabalina, S.A., Spiridonov, N.A., and Kashina, A.** 2013. Sounds of silence: synonymous nucleotides as a key to biological regulation and complexity. *Nucleic Acids Res.* **41**, 2073–2094.
- Sharp, P.M., Cowe, E., Higgins, D.G., Shields, D.C., Wolfe, K.H., and Wright, F.** 1988. Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a review of the considerable within-species diversity. *Nucleic Acids Res.* **16**, 8207–8211.
- Thomason, L.C., Costantino, N., and Court, D.L.** 2007. *E. coli* genome manipulation by P1 transduction. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 1.17.1–1.17.8. DOI: 10.1002/0471142727.mb0117s79.
- Zelle, M.R. and Lederberg, J.** 1951. Single-cell isolation of diploid heterozygous *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **61**, 351–355.
- Zelle, M.R. and Ogg, J.E.** 1957. Radiation resistance and genetic segregation in a large cell possibly polyploid strain of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **74**, 485–493.
- Zuben, E.S. and Kimchi-Sarfaty, C.** 2011. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat. Rev. Gen.* **12**, 683–691.