

단 보

DNA 형태 적응을 거쳐 P2*sir*-관련 도움파지 비효율성을 극복하는 박테리오파지 P4 *sid*⁺ 유도체 정성 연구

김경진*

선문대학교 건강보건대학 BT-융합제약공학과

Characterization of the bacteriophage P4 *sid*⁺ derivative overcoming P2*sir*-associated helper inefficiency through DNA conformational adaptation

Kyoung-Jin Kim*

Department of BT-Convergent Pharmaceutical Engineering, College of Health Sciences, Sunmoon University, Asan 31460, Republic of Korea

(Received February 25, 2016; Revised March 21, 2016; Accepted March 21, 2016)

ABSTRACT: A certain size of DNA (28–29 kb long) to be packaged into P2-size head and the mutation in *sid* gene of bacteriophage P4 are the major factors to overcome “P2 *sir*-associated helper inefficiency”. To clarify whether the presence of *sid* mutation is essential to overcome “P2 *sir*-associated helper inefficiency” or not, we tested the P4 derivative, P4 *delRI::kmr*, which is *sid*⁺ and whose genome size supposed to be 28.5 kb long in the case of being packaged into P2_{*sir3*}-sized large head. As P4 *delRI::kmr* showed the low EOP with P2 *sir3* lysogen, P4 *delRI::kmr* phage stock was prepared in P2 *sir3* lysogen host to increase the EOP with P2 *sir3* lysogen. Through this process, P4 *delRI::kmr* had been adapted for P2 *sir3* lysogen. With a CsCl buoyant equilibrium density gradient experiment and gel electrophoresis of the isolated DNA, it was evident that the adaptation of P4 *delRI::kmr* for P2 *sir3* lysogen was caused by the conformational change of DNA to be packaged into large head. The burst size determination experiments with P4 *delRI::kmr* phage stock adapted for P2 *sir3* lysogen and normal P4 *delRI::kmr* phage stock showed that not the *sid* mutation but the size of DNA to be packaged (28–29 kb long) was essential to overcome “P2 *sir*-associated helper inefficiency”.

Key words: adaptation, bacteriophage P2-P4, DNA conformation, *sid* mutation, *sir* mutation

박테리오파지 P4는 머리와 꼬리를 생성하는 유전자를 갖고 있지 않으므로, *Escherichia coli* 세포 내에 플라스미드 상태로 있다가 도움파지(helper phage)인 박테리오파지 P2가 존재할 때만 파지로 증식할 수 있는 위성파지(satellite phage)이다 (Bertani and Six, 1988). 박테리오파지 P4는 박테리오파지로 증식할 때 박테리오파지 P2의 머리와 꼬리 생성 유전자를 이용하는데, 박테리오파지 P2의 유전체 보다 1/3 정도 작은 자신의 유전체를 packaging하기에 알맞게 작은 머리 생성을 위해 머리 크기 결정 유전자인 *sid* (size determination)를 갖고 있다

(Shore *et al.*, 1978). 그러므로 박테리오파지 P4와 박테리오파지 P2가 같이 존재할 때 증식되어 생성된 후손파지(progeny phage)들은 대부분 작은 머리를 가진 P4이다. 박테리오파지 P2와 P4의 독특한 생활상은 박테리오파지 머리 조립 및 크기 결정 과정을 연구하는 좋은 연구 시스템이 되어왔다(Dokland *et al.*, 1992; Dearborn *et al.*, 2012).

박테리오파지 P4의 머리 크기 결정 유전자인 *sid*에 변이가 생긴 P4 *sid*⁺가 분리 되었고, 이 변이체는 박테리오파지 P2의 유전체가 packaging 될 수 있는 큰 머리를 생성하며 그 안에 2개 또는 3개 분량의 박테리오파지 P4 유전체 DNA가 들어 있다는 것을 CsCl 부양 균등밀도 편차실험(CsCl buoyant equilibrium density gradient experiment)을 통해 알아냈다(Shore *et al.*,

*For correspondence. E-mail: kjkim@sunmoon.ac.kr;
Tel.: +82-41-530-2273; Fax: +82-41-530-2939

1978). 이러한 P4 *sid* 변이체 머리 안에는 P4 유전체의 dimer 또는 trimer가 packaging 되어 있을 것이라 추정하여 왔으나, 큰 머리 속에 들어있는 DNA를 분리하여 전기영동한 결과 P4 유전체의 dimer, trimer 외에 monomer도 존재하는 것으로 확인 되어 2개 또는 3개의 P4 monomer가 큰 머리 속에 packaging 될 수 있다는 것이 알려졌다(Song and Kim, 2006).

유전자 *sid*는 머리 조립 과정 중 외부지지(outer scaffolding) 역할을 수행하는 단백질을 coding하는 것으로 밝혀졌다(Marrvik *et al.*, 1995). 박테리오파지 P2의 주요 캡시드 단백질은 유전자 *N*에 의해 coding되며 triangulation number가 7 ($T=7$) 인 P2 크기의 머리를 조립하게 되는데, 박테리오파지 P4가 존재하게 되면 *sid*에 의해 coding되는 단백질인 Sid가 머리 조립 과정 중 외부지지 단백질로 작용하여 triangulation number가 4 ($T=4$)인 작은 크기의 머리가 조립된다(Dokland *et al.*, 1992).

한편 박테리오파지 P4 존재 하에서도 P4의 Sid 기능에 반응하지 않으며 박테리오파지 P2가 packaging될 수 있는 큰 머리를 생성하는 변이체들이 분리되었고 이것을 P2 *sir* (*sid* responsiveness)라 명명하였는데, 분리된 10여 개의 *sir* 변이들은 *N* 유전자 상에 존재하였다(Six *et al.*, 1991). 박테리오파지 P4 유전체는 P2 유전체의 1/3 정도 되므로, 이론상 2개 또는 3개의 P4 유전체가 P2 *sir* 가 생성하는 큰 머리에 packaging될 수 있으나, 실제 그 burst size (1 이하)와 plating 할 때의 EOP (Efficiency Of Plating)는 대단히 낮게 나타났다(Six *et al.*, 1991). 반면에, 박테리오파지 P4 *sid* 변이체는 2개 또는 3개의 P4 유전체를 큰 머리에 packaging하여 증식하므로, 큰 머리만을 생성하는 P2 *sir* 변이체가 도움파지로 있을 때 활발히 증식할 것으로 예상되었으나 burst size 결정 실험을 통해 사실이 아닌 것으로 나타났다(Kim *et al.*, 1998). 이 현상을 “P2 *sir*-관련 도움파지 비효율성(P2 *sir*-associated helper inefficiency)”이라는 용어로 불러왔다(Kim, 2003). 이러한 “P2 *sir*-관련 도움파지 비효율성”이 어떠한 기작에 의해 나타나는지 규명하기 위해, P2 *sir* 도움파지 용원소 숙주세포에서 활발히 증식하는 P4 유도체와 변이체들을 선별하고 동정하는 연구를 통해 DNA의 크기가 28–29 kb 정도 되며 *sid* 유전자의 변이를 가진 P4 유도체가 “P2 *sir*-관련 도움파지 비효율성”을 극복하는 것을 알아냈다(Kim, 2015). 현재까지는 packaging되는 DNA 크기와 *sid* 유전자의 변이가 “P2 *sir*-관련 도움파지 비효율성”을 극복하는 공통 요인으로 나타났다.

본 연구에서는 *sid* 유전자의 변이가 “P2 *sir*-관련 도움파지 비효율성”을 극복하기 위해 반드시 필요한 요인인지를 규명하기 위해, 정상적인 *sid* 유전자를 가지며 packaging될 DNA 크기가 28–29 kb 정도 되는 박테리오파지 P4 유도체의 “P2 *sir*-

관련 도움파지 비효율성” 극복 여부를 조사하였다.

이러한 실험 목적에 부합하는 P4 유도체로, 이전 연구에서 조성된 P4 *delRI::kmr* 이 사용되었다. 이것은 P4-크기의 작은 머리에 packaging될 수 있는 최소 크기의 P4 유도체 연구를 위해 만들어진 것으로, 그 조성 과정은 이전 연구에 자세히 설명되어 있다(Kim and Song, 2006). 간단히 설명하면, P4 유전체의 DNA 중 박테리오파지로 증식하는데 필요하지 않은 부분을 제한효소 반응을 거쳐 잘라내고 대신 선별이 용이한 항생제 내성 유전자를 집어넣어 전체 유전체 크기가 9.495 kb가 되도록 만든 *in vitro* 재조합 P4 유도체로, 3개의 유전체($9.495 \text{ kb} \times 3 = 28.485 \text{ kb}$)만이 P2 *sir*가 생성하는 큰 머리 속에 들어갈 수 있다.

P4 *delRI::kmr*은 정상적인 *sid* 유전자를 가지고 있으므로 P2 *sir3* 용원소에 plating 하였을 때 대단히 낮은 EOP (7.4×10^{-3})를 보였다. 이 EOP는 특정 파지 stock을 정상적인 숙주세포(P2 *sir*⁺ 용원소)에 plating 하였을 때 얻어진 플라크(plaque) 수를 분모로 삼고, P2 *sir3* 용원소에 plating 하였을 때 얻어진 플라크 수를 분자로 하여 얻어진 ratio로, 특정 파지가 바뀌진 숙주나 환경에 얼마나 잘 적응(adaptation)하는지를 나타내는 척도가 될 수 있다. 정상적인 숙주세포에서 준비된 P4 *delRI::kmr* 파지 stock은 작은 머리 속에 약 9.5 kb의 유전체가 packaging된 파지 입자들로 이루어져 있고, 숙주세포인 P2 *sir3* 용원소는 P2 *sir3*-크기의 큰 머리만을 생성하고 도움파지라도 비효율적이므로 파지와 숙주세포 사이의 적응이 일어나지 않아 plating의 효율은 매우 낮았다. Bertani와 Weigle이 박테리오파지 λ 의 EOP 변화를 통해 제한과 변형(restriction and modification) 현상을 발견했을 때와 같이, 일단의 적응 단계를 거치면 EOP가 높아지는 것이 알려져 있다(Bertani and Weigle, 1953). P4 *delRI::kmr* 파지를 P2 *sir3* 용원소 숙주세포에 plating하여 얻은 플라크는 새로운 숙주세포에 적응하여 만들어진 아주 드문 후손파지들이므로, 이 플라크로부터 시작하여 P2 *sir3* 용원소 숙주세포에서 증식을 반복하여 만들어진 새로운 파지 stock은 높은 EOP를 보일 것이라 예상하였다. 파지 stock의 제조는 기존의 실험방법과 동일하게 수행하였다(Kim and Song, 2006). P4 *delRI::kmr* 파지를 P2 *sir3* 용원소 숙주세포에 plating하여 드물게 얻은 단일 플라크를 멸균된 파스퇴르 피펫을 사용해 agar plug 전체를 들어내어 25 ml의 P2 *sir3* 용원소 숙주세포 배양액으로 옮긴 후 37°C에서 흡광도를 측정하며 진탕 배양하였다. 파지 증식이 일어남에 따라 흡광도가 감소하기 시작하고, 흡광도 감소가 정지하였을 때 원심분리를 거쳐 균체를 제거하였다. 파지가 떠있는 상층액을 47,000 × g로 2시간 초고속 원심분리(Beckman사 LE-80K 초고속 원심분리기, Type 35 rotor)하여 파지 침전을 얻고 이를 1 ml 이하의 0.075 M

MgCl₂ 완충액에 녹여 파지 stock을 준비하였다. P2 *sir3* 용원소에서 얻어진 P4 *delRI::kmr* stock은 P2 *sir3* 용원소에 적응하여 예상대로 높은 EOP를 보였다(Table 1). P4 *delRI::kmr*이 P2 *sir3* 용원소 숙주세포에서 반복 증식되며 파지 stock으로 만들어지는 과정에서 P2 *sir3* 용원소에 대해 완전한 적응이 일어난 것을 EOP 실험으로 확인할 수 있었다. P2 *sir3* 용원소에 적응한 파지 플라크를 분리하여 다시 P2 *sir⁺* 용원소를 숙주세포로 하여 파지 stock을 제조하였는데, 이것은 P2 *sir3* 용원소에 적응한 파지를 다시 P2 *sir⁺* 용원소에서 증식 적응하게 하여 원래대로 돌아가게 할 목적으로 만든 것이다. 이렇게 제조된 파지 stock의 EOP를 측정하였더니, 예상한 대로 P2 *sir3* 용원소에 대한 적응이 사라져 원래의 낮은 EOP를 보였다(Table 1).

P2 *sir⁺* 용원소에서 만들어진 파지 stock이 P2 *sir3* 용원소 숙주세포에 대해 적응을 보이는 기작에 대한 연구는 발표된 것이 없으나, 박테리오파지 P2와 P4의 생활상과 상호관계에 따라 다음과 같이 추론할 수 있다. 즉 P4 *delRI::kmr*의 파지 입자들은 P4-크기의 작은 파지 머리 안에 약 9.5 kb의 유전체가 들어 있으므로, P2 *sir3* 용원소 숙주세포 안에 감염 후 주입된 유전체 DNA의 형태(conformation)는 monomer일 것이며 증식과 정 중 그로부터 복제되어 만들어진 유전체의 형태도 monomer가 대부분일 것이다. 그러나 P2 *sir3* 용원소 숙주세포는 P2_{*sir3*}-크기의 큰 머리만을 생성하므로, 복제된 monomer 형태의 P4 유도체 유전체 DNA가 큰 머리에 3개가 한꺼번에 또는 trimer가 packaging되어야 하는 과정(Pruss *et al.*, 1975; Six *et al.*, 1991)에서 효율이 떨어져 낮은 EOP를 보였을 것으로 생각된다. P2 *sir3* 용원소 숙주세포에 plating 하였을 때 낮은 빈도로 드물게 얻어진 플라크는 P2_{*sir3*}-크기의 큰 머리 안에 trimer 또는 3개의 P4 *delRI::kmr* 유전체가 packaging된 파지 입자들로 이루어진 것이었고, 이를 선별하여 P2 *sir3* 용원소 숙주세포에서 만들어진 파지 stock은 P2_{*sir3*}-크기의 큰 머리에 적응하여 trimer 또는 3개의 P4 *delRI::kmr* 유전체가 들어 있는 파지 입자들로 대부분 구성되었을 것이다. 그러므로 이 stock의 파지 입자들이 P2 *sir3* 용원소에 plating되면, 감염 후 주입된 파지 입자들의 유전체 DNA는 바로 P2_{*sir3*}-크기의 큰 머리에 packaging될 수 있는 형태를 갖고 있으므로 EOP가 높아진 것으로 추정된다. 한편, 이렇게 P2 *sir3* 용원소에 적응된 파지 stock을 P2 *sir⁺* 용원소에 plating하였을 때는 별도의 적응 과정 없이 효율적으로 plaque를 형성하여 EOP 값을 정하는 분모로 삼았다. P2 *sir3* 용원소에서 만들어진 P4 *delRI::kmr*의 plaque를 얻어 다시 P2 *sir⁺* 용원소에서 키워 얻은 stock의 경우, P2_{*sir3*}-크기의 큰 머리에 packaging될 수 있는 형태의 DNA를 가진 파지 입자를 다시 P2 *sir⁺* 용원소 숙주세포에 감염시켜 P4-크기의 작은

머리가 생성되는 환경으로 옮겨 적응시켜 만들어진 stock이므로 P2 *sir3* 용원소 지시 균주(indicator strain)에 적응하지 못하여 낮은 EOP를 보이게 된 것으로 생각된다.

파지 stock 제조 과정에 사용된 숙주세포가 가진 P2 용원소의 *sir* 변이 여부에 따라 packaging된 DNA의 형태가 실제로 달라지는지를 확인하기 위해, 각기 다른 숙주세포에서 제조된 파지 stock을 CsCl 부양 균등밀도 편차실험(CsCl buoyant equilibrium density gradient experiment)을 통해 분석하였다. CsCl 부양 균등밀도 편차실험은 기존의 실험방법에 따라 수행하였다(Nilssen *et al.*, 1996). 즉 파지 stock의 일부를 평균 밀도가 1.38 g/ml로 맞추어진 CsCl 용액이 들어있는 원심분리 튜브에 가하고, 4°C에서 55,000 × g로 60시간 동안 초고속 원심분리(Beckman사 LE-80K 초고속 원심분리기, SW41.1 Ti rotor)하였다. 원심분리 후 튜브 아래쪽에 구멍을 내어 8방울을 1분획(fraction)으로 하여 모은 다음, 각 분획의 밀도는 refractometer (Atigo model DR-A1)를 사용하여 측정하고 각 분획의 파지 역가(titer)는 P4 지시 균주를 상대로 플라크 assay를 통해 결정하여 밀도 변화에 따른 파지 분포도(density gradient profile)를 얻었다.

P2 *sir⁺* 용원소에서 얻은 P4 *delRI::kmr* 파지 stock과 P2 *sir3* 용원소에서 얻은 P4 *delRI::kmr* 파지 stock의 CsCl 부양 균등밀도 편차실험을 거쳐 밀도 변화에 따른 파지 분포도를 얻었다(Fig. 1). P2 *sir⁺* 용원소에서 만들어진 파지 stock은 P4-크기의 작은 머리에 1 개의 유전체만이 packaging된 파지 입자들의 밀도와 일치하는 밀도에서 하나의 peak를 보였다. 반면에 P2 *sir3* 용원소에서 만들어진 파지 stock은 P2_{*sir3*}-크기의 큰 머리에 3 개의 유전체가 packaging된 파지 입자들의 밀도와 일치하는 밀도에서 하나의 peak를 보였다.

각 파지 stock에서 Lindqvist의 방법(1981)에 따라 DNA를 추출하였다. 2회에 걸쳐 페놀 추출하고 페놀/클로로포름 혼합액으로 1회 추출한 후 ethanol 침전법으로 파지 DNA의 침전물을 얻고 이를 적당량의 멸균 증류수에 녹였다. 각 stock의 파지 DNA를 0.7% agarose gel에서 전기영동하여 Fig. 2를 얻었다. P2 *sir3* 용원소에서 얻은 P4 *delRI::kmr* 파지 stock의 DNA (lane 3)에서는 trimer에 해당하는 진한 band와 monomer 크기의 얇은 band가 나타났는데, 이는 P2 *sir⁺* 용원소에서 얻은 P4 *delRI::kmr* 파지 stock의 DNA (lane 2)에서 나타나는 진한 band와 크기가 일치하였다. Lane 3에서 나타난 monomer band는 큰 머리 속에 3개의 P4 *delRI::kmr* 유전체 monomer가 packaging된 파지 입자들이 P4 *delRI::kmr* 유전체 trimer가 packaging된 파지 입자들에 섞여 있다는 것을 보여 준다. 이것은 Song과 Kim (2006)이 P4 *sid71*의 큰 머리에 packaging된

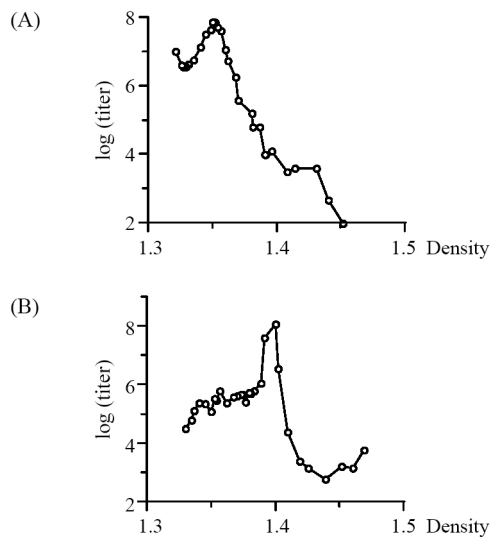


Fig. 1. CsCl buoyant equilibrium density gradient profiles of P4 *delRI::kmr* stock prepared using the P2 *sir*⁺ lysogen (A); P4 *delRI::kmr* stock prepared using the P2 *sir3* lysogen (B). The ordinates of the profiles show the P4 titer of each fraction expressed in log scale, and the abscissas show the density of each fraction measured with a refractometer.

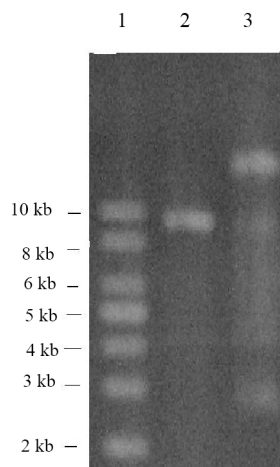


Fig. 2. Identification of the phage DNA isolated from two different P4 *delRI::kmr* stocks on 0.7% agarose gel. Lanes: 1, 1 kb ladder size marker (Enzymomics, Korea); 2, DNA isolated from P4 *delRI::kmr* stock prepared using the P2 *sir*⁺ lysogen; 3, DNA isolated from P4 *delRI::kmr* stock prepared using the P2 *sir3* lysogen.

DNA를 agarose gel에서 분석하였을 때 얻은 결과와 일치한다.

앞에서 추론한 바와 같이, 파지 stock이 제조된 숙주세포가 가진 P2 용원소의 *sir* 변이 여부에 의해 생성되는 파지 머리 크기에 맞추어, packaging된 유전체 DNA의 형태가 적응되는 것을 알 수 있었다. Table 1이 보여주는 EOP 변화는 결국 숙주세포가 제공하는 파지 머리 크기에, packaging되는 P4 유도체 파지의 DNA 형태가 적응되어 나타난 것이었다.

본 연구의 목적인, “P2 *sir*-관련 도움파지 비효율성”을 극복

Table 1. EOP of various P4 *delRI::kmr* phage stocks

Phage	EOP (P2 <i>sir3</i>) ^a
P4 <i>delRI::kmr</i> · (P2 <i>sir</i> ⁺ lysogen) ^b	7.4±1.3 × 10 ⁻⁴
P4 <i>delRI::kmr</i> · (P2 <i>sir3</i> lysogen) ^c	7.5±1.1 × 10 ⁻¹
P4 <i>delRI::kmr</i> · (P2 <i>sir3</i> lysogen) · (P2 <i>sir</i> ⁺ lysogen) ^d	2.6±0.4 × 10 ⁻³

^aEOP (Efficient of Plating) was expressed as the ratio of the number of plaques appeared on P2 *sir3* lysogen helpers to the number of plaques appeared on P2 *sir*⁺ lysogen helper. All EOP data were the mean± standard deviation of more than three independent experiments.

^bThe phage stock was prepared using the P2 *sir*⁺ lysogen.

^cThe phage stock was prepared using the P2 *sir3* lysogen.

^dStarting from the plaque of P4 *delRI::kmr* · (P2 *sir3* lysogen) stock, the phage stock was prepared using the P2 *sir*⁺ lysogen.

하는데 P4의 *sid* 변이가 반드시 필요한 요소 인지를 확인하기 위해, P2 *sir3* 용원소 숙주세포에 완전히 적응된 P2 *sir3* 용원소에서 얻어진 P4 *delRI::kmr*과 적응되지 않은 P2 *sir*⁺ 용원소에서 얻어진 P4 *delRI::kmr*을 사용하여 1단계 성장 실험(one-step growth experiment)을 거쳐 burst size를 결정하고 비교하였다. 1단계 성장 실험은 Six와 Klug의 표준적인 방법에 따라 수행하였다(Six and Klug, 1973). 간단히 기술하면, 숙주세포에 M.O.I. (multiplicity of infection) 값이 3 이상 되도록 파지를 가하고 7분 간 흡착하도록 하였다. LB (Luria-Bertani) 배양액으로 100배 희석하여 37°C에서 파지에 의한 완전 용해가 일어날 때까지 배양한 후, 완전 용해된 배양액의 플라크 assay를 거쳐 얻은 후손 파지의 역가를 처음 감염된 숙주세포의 수로 나누어 burst size를 결정하였다.

결정된 각 파지 stock의 burst size를 비교하면, P2 *sir3* 용원소에 적응된 P4 *delRI::kmr* stock에서는 P2 *sir3* 용원소에 대해 “P2 *sir*-관련 도움파지 비효율성”을 극복할 만큼 큰 burst size를 보였으나, 적응되지 않은 stock에서는 P2 *sir3* 용원소를 숙주세포로 하여 거의 증식하지 못하는 것으로 나타났다(Table 2). P2 *sir3* 용원소를 숙주세포로 하여 얻어진 적응된 P4 *delRI::kmr* stock의 P2 *sir3* 용원소에 대한 burst size (15)는, 최근 발표된 동일한 유전체 크기의 *sid* 변이체 version인 P4 *sid71 delRI::kmr*의 P2 *sir3* 용원소에 대한 burst size (38)에는 미치지 못하였다(Kim, 2015). 그러나 P2 *sir3* 용원소에 적응되지 않은 P4 *delRI::kmr* stock의 P2 *sir3* 용원소에 대한 burst size

Table 2. Burst size of P4 *delRI::kmr* phage stocks

Phage stock	Burst size with <i>E. coli</i> lysogenic for ^a	
	P2 <i>sir</i> ⁺	P2 <i>sir3</i>
P4 <i>delRI::kmr</i> · (P2 <i>sir</i> ⁺ lysogen)	51.6 ± 10.5	0.003 ± 0.0007
P4 <i>delRI::kmr</i> · (P2 <i>sir3</i> lysogen)	28.5 ± 6.1	15.2 ± 4.3

^aAll the burst size data were the mean±standard deviation of more than three independent experiments.

(0.003) 보다는 약 5,000배 정도 증가된 것으로 나타나, 충분히 “P2 *sir*-관련 도움파지 비효율성”을 극복하는 것을 보여 주었다. Table 2의 data로부터, *sid* 유전자의 변이 여부는 “P2 *sir*-관련 도움파지 비효율성”을 극복하는데 필수적인 요소가 아니라는 사실을 알 수 있다. 정상적인 *sid* 유전자를 가진 P4 유도체 파지라도, packaging될 유전체 DNA의 크기가 28–29 kb 정도 되고 P2-크기의 큰 머리 속에 들어갈 수 있게 적응을 거치면 P2 *sir* 용원소 숙주세포에서도 활발히 증식할 수 있다는 것을 Table 2에서 볼 수 있었다.

본 연구를 통해, P4-크기의 작은 머리에 들어있는 정상적인 P4 *sid*⁺ 파지의 경우에도 P2 *sir3* 용원소 숙주세포에서 증식 시키면 packaging되는 DNA의 형태가 P2_{*sir3*}-크기의 큰 머리에 잘 packaging될 수 있도록 적응되는 현상을 EOP 실험과 CsCl 부양 균등밀도 편차실험 그리고 분리된 파지 DNA의 전기영동을 통해 확인할 수 있었다. 연구에서 사용한 P4 *delRI::kmr*은 P2_{*sir3*}-크기의 큰 머리에 packaging될 유전체 DNA의 크기가 28–29 kb 정도되므로, 이러한 적응 과정을 거쳐 “P2 *sir*-관련 도움파지 비효율성”을 극복하며 강한 *Sir*⁻ 표현형을 보이는 P2 *sir3* 숙주세포에서도 큰 burst size를 보이며 증식하였다. 결론적으로, *sid* 유전자의 변이와 상관없이 P2_{*sir3*}-크기의 큰 머리에 packaging될 DNA의 크기(28–29 kb)가 “P2 *sir*-관련 도움파지 비효율성”을 극복하는 데 가장 중요한 요소라는 것이 명확해졌다.

적 요

P2-크기 머리에 packaging 될 특정 DNA 크기(28–29 kb long)와 박테리오파지 P4 유전자 *sid*의 변이가 “P2 *sir*-관련 도움파지 비효율성”을 극복할 수 있는 요소로 압축되었다. 유전자 *sid*의 변이 여부가 필수적인지를 확인하기 위해, 정상적인 *sid* 유전자를 가지며 P2_{*sir3*}-크기의 큰 머리에 packaging 될 DNA 크기가 28.5 kb되는 P4 *delRI::kmr*을 사용하여 실험하였다. P4 *delRI::kmr*이 P2 *sir3* 용원소에 대해 낮은 EOP를 보이므로, 이를 증가시키기 위해 P2 *sir3* 용원소를 숙주세포로 하여 파지 stock을 제조하였다. 이 과정에서 P4 *delRI::kmr*이 P2 *sir3* 용원소에 대해 적응하는 것을 관찰하고, CsCl 부양 균등밀도 편차실험과 분리된 DNA의 전기영동을 통해 그것이 packaging 될 머리 크기에 따른 DNA 형태 변화에 의한 적응이라는 것을 알아냈다. P2 *sir3* 용원소에 적응된 P4 *delRI::kmr*과 적응되지 않은 P4 *delRI::kmr* stock의 burst size 결정 실험은, *sid* 유전자 변이에 상관없이 packaging 될 DNA 크기에 의해 “P2 *sir*-관련 도움파지 비효율성”이 극복된다는 것을 보여주었다.

References

- Bertani, L.E. and Six, E.W. 1988. The P2-like phages and their parasite, P4, pp. 73–143. In Calendar, R. (eds.), The bacteriophages, vol. 2. Plenum Press, New York, USA.
- Bertani, G. and Weigle, J.J. 1953. Host controlled variations in bacterial viruses. *J. Bacteriol.* **65**, 113–121.
- Dearborn, A.D., Larunimaki, P., Chandramouli, P., Rodenburg, C.M., Wang, S., Butcher, S.J., and Dokland, T. 2012. Structure and size determination of bacteriophage P2 and P4 procapsids: Function of size responsiveness mutations. *J. Struct. Biol.* **178**, 215–224.
- Dokland, T., Lindqvist, B.H., and Fuller, S. 1992. Image construction from cryo-electron micrographs reveals the morphopoietic mechanism in the P2-P4 bacteriophage system. *EMBO J.* **11**, 839–846.
- Kim, K.J. 2003. Isolation and identification of the bacteriophage P4 mutant, P4 *ost2*, suppressing *sir* mutations of bacteriophage P2. *Kor. J. Microbiol.* **39**, 277–282.
- Kim, K.J. 2015. Construction and characterization of the bacteriophage P4 derivatives whose genome size suitable for packaging into a P2_{*sir3*}-sized head. *Kor. J. Microbiol.* **51**, 1–6.
- Kim, K.J. and Song J. 2006. Isolation and characterization of the smallest bacteriophage P4 derivatives packaged into P4-size head in bacteriophage P2-P4 system. *J. Microbiol.* **44**, 530–536.
- Kim, K.J., Sunshine, M.G., and Six, E.W. 1998. Characterization and identification of the bacteriophage P4 mutant suppressing *sir* mutations of bacteriophage P2. *J. Microbiol.* **36**, 262–265.
- Lindqvist, B.H. 1981. Recombination between satellite phage P4 and its helper P2. *In vivo* and *in vitro* construction of P4::P2 hybrid satellite phage. *Gene* **14**, 231–242.
- Marrvik, O.J., Dokland, T., Hanoa, R.N., Jacobse, E., Larson, T., and Lindqvist, B.H. 1995. The capsid size determining protein Sid forms an external scaffold on phage P4 procapsids. *J. Mol. Biol.* **251**, 59–75.
- Nilssen, O., Six, E.W., Sunshine, M.G., and Lindqvist, B.H. 1996. Mutational analysis of the bacteriophage P4 capsid-size-determining gene. *Virology* **219**, 432–442.
- Pruss, G.J., Wang, J.C., and Calendar, R. 1975. *In vitro* packaging of covalently-closed circular monomers of bacteriophage DNA. *J. Mol. Biol.* **98**, 465–478.
- Shore, D., Deho, G., Tsipis, J., and Goldstein, R. 1978. Determination of capsid size by satellite bacteriophage P4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 400–404.
- Six, E.W. and Klug, C.A.C. 1973. Bacteriophage P4: A satellite virus depending on a helper such as prophage P2. *Virology* **51**, 327–344.
- Six, E.W., Sunshine, M.G., Williams, J., Haggard-Ljungquist, E., and Lindqvist, B.H. 1991. Morphoietic switch mutations of bacteriophage P2. *Virology* **182**, 34–46.
- Song, J. and Kim, K.J. 2006. Analysis of DNA conformation in the particles of bacteriophage P4 mutant, P4 *ash8 sid71*. *Kor. J. Microbiol.* **42**, 62–66.