

# Tn5 Insertions in the Agrocin 84 Plasmid the Conjugal Nature of pAgK84 and the Locations of Determinants for Transfer and Agrocin 84 Production

沈 在 燮

忠北大学校 農科大学 農生物学科

## 序 言

*Agrobacterium tumefaciens*의 研究는 遺傳工學 時代를 맞이하여 많은 연구자들의 커다란 注目을 끌고있다. 植物細胞內에 外部 遺傳子를 導入시키는, 확실히 믿을 수 있는 vector로 등장된 때문이다. 원래 이 세균은 식물 줄기나 뿌리에 癌腫을 誘發시키므로서 암발성 原因 構明 연구로 흥미를 끌게 되었다. 연구결과는 암 발생 예방 및 치료에 目的을 뒀은 당연할 것이다. 많은 약제가 시험되었으나 별로 進進을 보지 못하던중 비 병원성 *Agrobacterium radiobacter*, strain84에 의한 생물학적 방제의 성공으로 유일한 방제법을 갖게되었다. 뒤이어 癌腫發生 機作도 밝혀졌다. *Agrobacterium*의 世界는 온통 유전공학 기술로 채워져 있다. 癌腫發生에서 防際原理에 이르기까지 수없이 먼 옛날부터 이미 익혀오던 DNA 조작기술이었던가? 암종을 유발시키는 병원성 *Agrobacterium*을 죽이기 위하여 agrocin 84 plasmid를 갖는 비 병원성 *Agrobacterium*을 찾아 생물학적 방제법을 확립하였다. 그후 병원성 *Agrobacterium*은 이에 대하여 어떻게 살아남을 것인가? 실로 놀라운 일이라 아니할 수 있을까? 이 병원성 *Agrobacterium*은 비병원성 *Agrobacterium* 속에 있는 agrocin 84 plasmid를 탈취하여 자신이 agrocin 84를 생성 분비하며 癌腫誘發을 계속하여 간다. 아니면 비병원성 *Agrobacterium*이 병원성 *Agrobacterium*에게 agrocin 84 plasmid를 넘겨주었을까? 왜 넘겨 주었을까?

共存을 위하여서일까? 우리의 유전공학 기술은 이것을 막아줄 수 있을까? 생물학적 방제의 재성공을 위하여 논제의 연구는 왜 필요했던가? 그 전후를 여기에 서술해 본다.

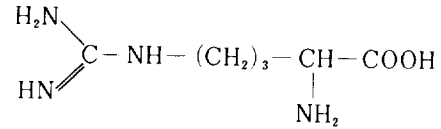
## 根頭癌腫病的 發病狀況 및 機作

근두암중병(crown gall)은 주로 식물의 뿌리나 지하부 줄기에 암종(tumor)을 형성시키는 토양 세균병으로서 주요기주식물로서는 복숭아 등 핵과류(1), 사과나무 배나무 및 포도나무(32), 그리고 관상식물(2) 등으로 알려져 있고 주로 온대지방에 널리 분포한다. 본병의 병원인 *Agrobacterium tumefaciens*는 토양으로부터 쉽게 분리할 수 있으며 병원성인 것과 비병원성인 것으로 양분된다. 병원성 *Agrobacterium*은 많은 나자식물(gymnosperms)과 쌍자엽성 피자식물(dicotyledonous angiosperms)의 상처부위를 통하여 침입한 후 인접세포에 암종을 유발시키며(29), 어떤 strain들은 거의 대부분의 쌍자엽식물들을 감염시킨다(5, 6).

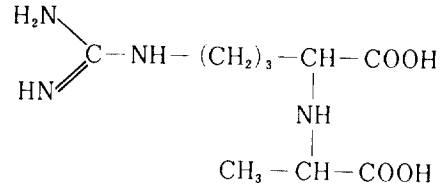
Crown gall의 발병기작을 이해하는 것은 생물학적 방제기작을 이해하기 위하여 불가피한 일이다. 이 병에 대하여 최초의 역사적 기록에서부터 현대의 분자 생물학적 수준에 이르는 많은 연구결과들이 하나의 책으로 편집되었다. (17). 약 80여년이 지난 오늘날까지 이 암중병에 관한 연구는 상당한 주목을 끌어들였다. 그 이유를 세가지로 나누어 볼 수 있는데 첫째 암발생 원인 구명, 둘째 생물학적 방제, 셋째 식물의 유전공학을 위한 유전자 운반(vector) 등이 다. 일찍이 1907년 Smith와 Townsend(38)는

복숭아 뿌리에 발생한 암종으로부터 최초로 병원세균을 분리하고 *Agrobacterium tumefaciens* 라고 명명하였다. 그들은 상처를 낸 복숭아 뿌리에 분리한 세균을 접종하여 암종(tumor)을 유발시켜 보였으며 모든 *Agrobacterium* 이 전부 병원성을 갖거나 암종을 형성시키는 것이 아님을 밝혔다. 미국 록웰러 연구소의 (3, 4) Broun은 이 암종을 실험실내에서 조직배양하는데 최초로 성공하였다. 일단 한번 세균에 의하여 유발된 암종조직은 자발적으로 계속 키워나갈 수 있었다. 또한 살균시킨 암조직은 식물 hormone 을 별도로 첨가하지 않아도 매우 빠른 속도로 증식됨을 확인하였다. 이러한 결과로 미루어 보아 이 *Agrobacterium* 은 암발생원리(TIP; tumor inducing principle)를 식물세포내로 전달하므로써 암종을 유발시킨다는 결론을 내렸다. 1969년 불란서의 베르 사이유 국립농업연구소의 Morel (27) 과 그의 공동연구자들은 암종세포들만이 합성하는 일종의 신기한 화합물(opine류)들을 발견하였다. 이 opine류들은 일반 중간대사 산물의 유도체로서 두 종류의 opine류 즉 octopine과 nopaline 등이 가장 많이 연구되었으며 이들은 아미노산의 일종인 arginine 유도체 화합물들이다. Octopine은 arginine 과 pyruvic acid 그리고 nopaline은 arginine과 alpha-ketoglutaric acid의 화합물로 알려졌다(Fig. 1). 그 이후로부터 Morel 연구팀은 하나의 암종(tumor)이 octopine을 합성하느냐 아니면 nopaline을 합성하느냐를 결정하는 것은 기주식물이 아니고 *Agrobacterium* 간의 strain에 의존함을 발견하고 암종발생의 TIP는 세포유전자 DNA임이 틀림없다고 예측하였다.

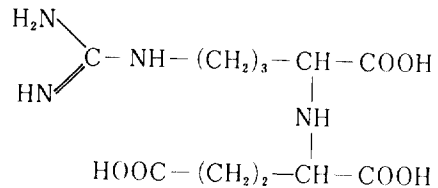
Adelaide 대학의 Kerr (19, 20)는 병원성과 비병원성인 *Agrobacterium* 을 동일 식물에 계속 접종하였고 수주 후에는 발암성(oncogenicity)이 병원성 strain에서 비병원성 strain으로 전이(transfer)되어가는 것을 발견하였다. 그는 이 발암성 유전자가 세균 염색체(chromosome)상에 있는 것이 아니고 이동이 가능한 세균 바이러스(bacteriophage)나 플라스미드(plasmid)상에 존재함을 확신하였다. 뒤이어 펜실베이니아 대학의 Hamilton과 Fall (15)들은 두종



ARGININE



OCTOPINE



NOPALINE

Fig. 1. Structure of arginine and the opines, octopine and nopaline.

의 *Agrobacterium* strains C58과 Ach5가 비교적 고온인 37°C에서 연속하여 배양하면 암종 유발 능력이 상실되며 재생되지 않음을 확인하였다. 이것 또한 암발생 유전자가 virus나 plasmid상에 존재함을 시사해 준다. 벨지움의 Ghent대학의 Schell 및 동등 연구자들은 병원성 세균내에서 커다란 plasmid를 추출하였고 비병원성 세균내에서는 이들 plasmid가 존재하지 않음을 밝혔다. 그리하여 plasmid가 암종 발생과 밀접한 관계가 있음을 확인하고 Ti(tumor inducing) plasmid라 부르게 되었다. 한편 병원성 strain C58을 37°C에 배양하므로써 Ti plasmid가 소실되고 암종형성이 되지 않음을 확인하였다(33, 41). 이로써 Kerr가 예측하였던 병원성의 이동요인(mobile element)이 바로 Ti plasmid라는 것이 판명되었다. Ti plasmid는 그 분자량의 크기가 약  $120 \times 10^6$ 으로 추정

되었으며 (43) Ti plasmid 종류는 최소한 3 종 즉 octopine plasmid, nopaline plasmid (Fig. 2), 그리고 agropine plasmid로 나뉘어진다 (14, 35). Octopine Ti plasmid는 암종조직내의 octopine 합성작용을 그리고 세균내에서 octopine 분해 이용 작용을 지배한다; nopaline Ti plasmid는 nopaline 합성과 분해를 지배한다 (14). Octopine Ti plasmid를 갖는 세균은 octopine strain이라 부르고 이 strain에 의하여 형성된 암종은 octopine gall이라 부른다면 nopaline Ti plasmid 경우도 마찬가지다. Nopaline strain, nopaline gall. 이와같이 Ti plasmid (tumor inducing plasmid)는 문자 그대로 암종 형성의 사령탑으로서 1) 식물세포로 하여금 종류별 암종 유발을 지시하고, 2) 세균들로 하여금 해당 opine 류를 분해 이용케 하여 그들의 생육을 돕고, 3) 해당 plasmid를 갖고있지 않은 비병원성 세균내로 옮겨가서 병원성 세균으로 만든다. Ti-plasmid는 이와같이 고도로 분화된 기술로서 자신의 생존전파를 위하여 숙주인 *Agrobacterium*과 식물세포들을 얼마나 교묘히 잘 이용하는가? 만약 Ti plasmid에 의하여 암종 (tumor)이 생겨난다면 암종조직세포 내에서 그 plasmid 상에 있는 어떤 동일한 유전자가 발견되어야 할 것이다.

*Agrobacterium*에서 식물암종 세포로 전이된 유전자를 찾기 위한 연구는 Schilperoort (34)로 부터 시작하여 많은 연구팀들이 노력하였다. 그러나 Chilton 팀이 1974년부터 연구를 시작하여 1977년에 이르러 암종세포 내에서 두 조각의 Ti plasmid 부분을 발견하고 T-DNA (transferred-DNA)라 부르게 되었다 (8). 생태적으로 고도의 진화를 보여주는 이 신비스런 Ti plasmid는 식물세포 속으로 자기의 작은부분인 T-DNA를 넘겨주는 것이다. Octopine T-DNA는 octopine 합성 유전자를 싣고 nopaline T-DNA는 nopaline 합성 유전자를 싣고 있다. 이들 T-DNA가 식물세포 내의 염색체와 결합하여 세포의 이상분열과 이상비대를 일으켜 암종을 발생시키며 이들은 해당 opine 류들을 생성한다.

이것으로서 암종형성 기작이 완전히 밝혀진 것이다.

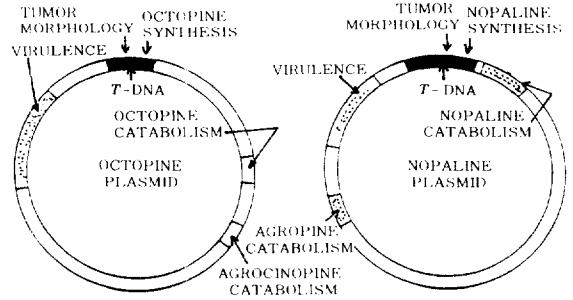


Fig. 2. GENETIC MAPS are beginning to be built up for an octopine Ti plasmid (left) and a nopaline one (right). The T-DNA has been defined. Within it gene loci governing synthesis of octopine or nopaline have been mapped. So have genes affecting tumor morphology, which are revealed by the "rooty," "shooty" and "large" mutations. In both plasmids a region to the left of the T-DNA governs the virulence functions that enable the plasmid to induce a tumor. Regions outside the T-DNA also govern the catabolism of octopine or nopaline and other opines. (mapped from Chilton, M.-D.)

### 生物学的 防除의 始初

Australia의 Adelaide 대학교수 Allen Kerr는 핵과류의 등두암종 (crown gall)으로 부터 많은 strain의 *Agrobacterium*을 분리하였다 (18). 이들중 비병원성 *Agrobacterium radiobacter*, strain 84의 발견은 오늘날 식물병의 생물학적 방제에 새로운 장을 열었다. Kerr 교수와 공동 연구자는 이 비병원성 *Agrobacterium* strain 84를 사용하여 종자처리, 또한 운실과 포장에서 유묘에 처리하여 생물학적 방제를 꾀하였다 (21, 30). 이러한 생물학적 방제에 관한 연구는 계속되었고 마침내 방제기작이 정립되어서 (16, 23), 이미 1973년에는 Australia의 핵과류 및 장미 농장들에서 실용화 되었다 (22). 그후 이 미생물 농약인 strain 84는 날로 산업화되어 세계 여러 선진국으로 파급되었고 그의 생물학적 방제효과를 높이 인정받게 되었다 (26). Strain 84의 사용방법은 매우 간단하여 세균 희석액 (약  $10^7$  cells/ml)에 유묘뿌리를 잠시 침지 (dipping method)시키는 것이다. 이렇게 점종된 세균은 5~6개월이 지난 후에도 뿌리 또는 주변 토양으로부터 검출 분리할 수 있다. 본 제품의 산업화된 공급방법은 한천배지 상에

**Table 1. Biological control of crown gall in naturally infested soli.**

Treatment	Mean dry wight of gall tissue per plant <sup>1</sup> (g)	Con-trol <sup>2</sup> (%)
None	11.64	7 -
Seed inoculation with strain 84	2.50	78.5
Root inoculation with strain 84	0.59	94.9
Seed and root inoculation with strain 84	0.14	98.8

<sup>1</sup>Least significant difference of mean dry weight 0.97(P=0.05).

<sup>2</sup>Percentage control is the difference between the weight of gall tissue on inoculated and noninoculated plants expressed as a percentage of the weight of gall tissue on non-inoculated plants (Kerr, A., 1980).

또는 토탄(peat)에 섞기도 한다. Table 1은 strain 84의 생물학적 방제효과를 나타내주고 있다(22).

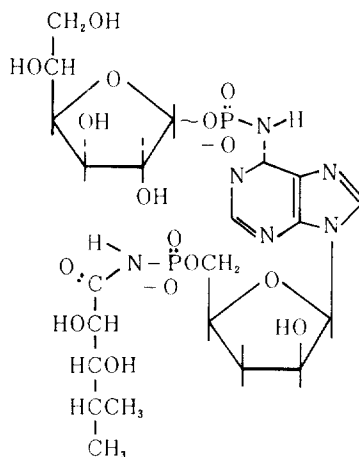
종자와 뿌리에 거름 처리하였을 경우 98.8%의 방제효과를 보여 거의 완전한 효과를 기할 수 있다. 이러한 방법은 New Zealand, South Africa, U. S. A., Canada, France, Greece, Hungary, 그리고 Italy 등지에서 포장시험을 통하여 방제효과가 제 확인 되었으며 방제 수준도 100%나 이에 가까웠다(9, 24, 25).

#### 生物学的 防除機作

방제세균 *Agrobacterium radiobacter*, strain 84는 진기한 유사항생 물질을 분비하여 암종을 일으키는 병원성 *Agrobacterium tumefaciens* 들중 단지 nopaline 계 strain만을 선택적으로 저지시킨다(16, 23).

생물학적 방제기작의 핵심물질인 agrocin 84는 새로운 무리의 항생물질에 속하는 nucleotide bacteriocin이며(39), 두 물질이 대치된 일종의 fraudulent analog of adenine nucleoside로서 Fig. 3와 같은 구조를 갖는다(28). Agrocin 84의 생성은 그 크기가 47.7-kb인 agrocin plasmid(pAg K84)에 의하여 조절된다(11, 37). Agrocin 84에 대한 감수성은 특정 계통의 Ti plasmid에 나타나며 이들은 opine류의 일종인 agrocinopine들을 분해하는 능력을

#### AGROGIN 84



**Fig. 3.** The structure of agrocin 84 (Murphy *al.*, 1981).

갖고 있다(12). Nopaline계 crown gall은 nopaline 이외에 agrocinopine A와 B를 합성 분비하며, nopaline strain들은 이들 agrocinopine들도 흡수 이용하는데 이때에 이에 관여하는 permease의 도움을 받게된다. 이러한 permease가 agrocinopine A를 세균체 내로 흡수시킬때 주위에 있는 agrocin 84도 함께 흡수하여, Ti plasmid는 독작용을 받고 파괴되거나 그 기주인 세균체가 생육이 저지되는 것이다. 그러나 octopine 계 crown gall은 octopine 뿐 아니라 agropine과 mannopine을 분비하며(39) agrocin 84를 취할 수 있는 Ti plasmid에 코드된 permease가 없으므로 agrocin 84에 대하여 저항성을 나타낸다(12).

Strain 84는 agrocin 84 plasmid(pAg K84) 뿐 아니라 Ti plasmid와 크기가 비슷한 nopaline catabolic plasmid(pNoc 또는 pAr84b)를 갖고 있다. 이 plasmid는 주로 nopaline을 분해 이용하는 기능을 가지며 암종을 유발시키지 않는다(10, 11). 이러한 pNoc의 특성은 strain 84로 하여금 nopaline gall 상에서 nopaline 계 병원성 *Agrobacterium*과 영양섭취를 위하여 경쟁하면서 이들에게 독작용을 일으키는 항생물질인 agrocin 84를 분비한다. 다시 말하면 이 strain 84는 병원성 *Agrobacterium*이 식물

체로부터 영양분을 착취하기 위하여 만들어 놓은 암종 위에서 이들 병원세균을 죽이고 그들의 생존을 위하여 착취한 자를 재착취하는 자연속의 한 장면인 것이다. 생물학적 방제는 이러한 자연의 원리를 이용하는 것이다.

### 生物学的 防除의 問題点 發生

매우 진기하게 탄생된 strain 84는 그 찬란한 성세를 기울여 가야만 했는가? 아직은 심각한 정도가 아닐지라도 장래에는...

Greece에서 strain 84를 사용하는 생물학적 방제효과의 감소보고가 있어 왔다(31). Strain 84의 원산지인 Australia에서는 이에 관한 문제점이 없을지라도(10) Kerr는 이 문제점을 간파하기 위하여 바로 연구에 착수했다. 이들은 agrocin 84에 대한 저항성 돌연변이주인 병원성 *Agrobacterium*을 재확인하였다. 이 mutant들은 내부에 Ti plasmid와 agrocin 84 plas-

mid (pAg K84)를 함께 갖고 있는 병원성 *Agrobacterium*들이었다(Fig. 4). 그렇다면 과연 strain 84내의 pAg K84가 병원성 *Agrobacterium*내로 전이되어 간 것일까? 그렇다면 이 pAg K84가 스스로 접합에 의하여 전이되었을까? 아니면 또 하나의 커다란 pNoc(nopaline catabolic plasmid)가 전이될 때 이와함께 이동화(mobilize) 되었을까?(10). 왜 이 병원성 *Agrobacterium*은 strain 84와 접합될 때 사멸되지 않았을까? Panagopoulos(31)는 매우 높은 농도의 strain 84와 병원성 *Agrobacterium*을 섞어 실험하던중 문제의 mutants(transconjugant pathogen)들을 용이하게 발견할 수 있었을 것이다. 자연조건 또는 생물학적 방제하에서는 그보다 낮은 농도로 두 세균들은 접촉된다. 그러나 이 필연적인 위험은 먼훗날이라도 자연발생할 것으로 보아 이 문제는 중요하게 다루어져야 한다. 앞으로도 계속 agrocin 84 plasmid가 병원성 *Agrobacterium*에게로 모두 전이되어 간다고 하면 strain 84를 이용한 생물학적 방제는 기대하기 어렵다. 이에 대한 대책연구는 매우 시급하다고 보겠다.

### 問題点 解決을 위한 論題 研究의 概略

Kerr 교수는 이러한 생물학적 방제체계에 있어서 커다란 문제점을 안고 있었지만 그래도 생물학적 방제는 공해방지 및 자연보호에 가장 현실적인 노력의 산물이라는 집념에 차있었다. 필자는 1978년 항생물질을 사용한 생물학적 방제에 관한 연구계획서를 colombo plan을 통하여 Australia로 제출하였고, 1980년에 Kerr 교수에 의하여 초청되어 가서 공동연구가 시작되었다. Chicago의 Loyola 의과대학 미생물분야 부교수인 Farrand는 미국의 암연구센터로부터 이에 관한 연구비 수락을 받고 Siota와 함께 연구에 착수하였고, 1983년에는 6개월간 호주에 방문하여 연구를 하게 되었다. Kerr 교수도 호주의 연구비를 받아 연구하던중 미국과 불란서에도 방문하여 연구를 하였다. 공동연구의 주제는 "Tn5 DNA 삽입에 의한 Agrocin 84 plasmid의 접합성과 항생물질 Agrocin 84의 생합성에 관여하는 유전자 결정"이다.

생물학적 방제의 가장 기본이 되는 것은 st-

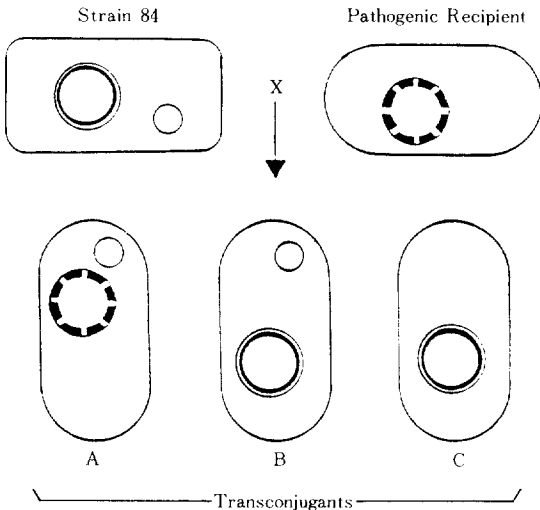


Fig. 4. Diagrammatic representation of a cross between strain 84 and a pathogenic recipient of *Agrobacterium tumefaciens*. Chromosomes are not shown. Strain 84 contains two plasmids. One(single line) coding for agrocin 84 production and for resistance to agrocin 84 and the other (double line) coding for nopaline catabolism and for conjugation. The pathogen has one plasmid (broken line) that codes for pathogenicity and for agrocin 84 sensitivity. The most common transconjugants are shown. Strain A combines pathogenicity with resistance to agrocin 84 (Kerr, 1980).

rain 84 세포내의 agrocin 84 plasmid가 bacteriocin의 일종인 agrocin 84를 생합성하는데 있다(28, 11, 37). 이러한 agrocin 84 plasmid에 관하여 많은 특성연구가 진행되어 왔다. 그러나 현재 취하고 있는 생물학적 방제의 문제점을 보완하기 위하여는 agrocin plasmid의 어떤 물리적 유전적 특성을 찾고 이들을 유전적으로 변경 또는 조작하므로써 저항성 병원 *agrobacterium*의 발생을 억제하고자 한다. 이러한 목적으로 slota와 Farrand(37) 양씨에 의하여 pAgk 84의 물리적 특성인 physical map이 상세히 연구되었다. 그러나 selective marker가 없어서 이 plasmid의 유전적 연구가 어려웠다. 우리는 이제 이 agrocin 84 plasmid에 선별 marker (Tn 5)를 도입하여(7), 유전적 특성을 연구하였으며 또한 항생물질 agrocin 84 합성 및 접합 전이성에 관여하는 유전자를 결정하였으므로 여기에 보고한다(13). 표 2는 실험에 사용한 세균의 종류이다.

### pAgK84상의 Tn5 - DNA插入

Agrocin 84 plasmid(pAgK84) 상에 선별 marker인 transposon Tn 5를 도입시키기 위하여 대장균인 *Escherichia coli*를 공여균주(donor)로 사용하였다. *E. coli* strain 1830은 pJB4JI라는 plasmid를 갖고 있다. 이 pJB4JI는 Mu phage와 Tn5-DNA를 함께 보유하고 있다. 짝지움(mating)을 해주면 Mu 화지와 Tn 5가 함께 접합(conjugation)에 의해 다른 세균 내로 전이(transfer)되어 간다. Mu 화지는 다른 세균세포내에서 생존을 계속할 수 없어 파괴되고 이때에 Tn5-DNA 조각은 그 세포내의 염색체(chromosome)나 다른 plasmid에 뛰어들어 삽입된다. 이때에 Tn5-DNA가 어느 유전자 배열속에 꽂히면 그 기능이 없어지거나 또는 감소현상을 갖는 Tn5삽입변이주(Tn5 insertion mutants)가 생겨난다. Tn5의 삽입은 어느 한정된 DNA sequence에 관계없이 임의로 행해진다. Tn5는 항생물질 kanamycin에 저항성

Table 2. Bacterial Strains.

Strain	Relevant plasmids	Other relevant traits	Source or reference
<i>Agrobacterium</i>			
A136	pAtC58	Rif <sup>R</sup> , Nal <sup>R</sup>	(Watson, et al., 1975)
K 84	pAgK84, pAtK84b	Nontumorigenic, agrocin producer	(Slota and Farrand, 1982)
SA101	pTi15955	Strain 15955 rif-101	This laboratory
C58C1RS	pAtC58	Rif <sup>R</sup> Str <sup>R</sup>	(Ellis et al., 1982)
C58C1RS-1	pTiC58, pAtC58	Rif <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup>	This laboratory
439	pTiC58 Tra <sup>c</sup>	Tra constitutive pTiC58 in C58C1CE. Supersensitive to agrocin 84	(Ellis et al., 1982)
NT1	pAtC58	Ti plasmid-cured C58	(Watson et al., 1975)
<i>Escherichia coli</i>			
1830	pJB4JI	met-63, pro-22, nal, Km <sup>R</sup>	(Beringer et al., 1978)
HB101	-	pro, leu-6, thi-2, hsdR, recA, rpsL	(Maniatis et al., 1982)
1231	-	serB, leu-6, thi-2, hsdR, lacY	(Pischl and Farrand, 1983)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO403	-	trp-54, res-1, chl-13, sm-6, mod-1	A. Chakrabarty
<i>Rhizobium meliloti</i> AK631-1	-	Rif <sup>R</sup> , Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup> , 5-Fu <sup>R</sup>	A. Kondorosi

<sup>a</sup>Abbreviations: *Chl*, chloramphenicol; *Fix*, nitrogen fixation; 5-Fu, 5-fluorouracil; *hsd*, host specificity determinant; *Kim*, kanamycin; *lac*, lactose; *leu*, leucine; *met*, methionine; *mod*, modification; *Nal* and *nal*, nalidixic acid; *Nod*, nodulation; *pro*, proline; *rec*, recombination; *res*, restriction; *Rif* and *rif*, rifampin; *rps*, ribosome small subunit protein; *ser*, serine, *Str* and *sm*, streptomycin; *thi* thiamine; *Tra*, conjugal transfer; *trp*, tryptophan (Farrand et al., 1985).

유전자를 갖고 있어 이 Tn5의 세균 체내로의 전이 및 유전자 DNA배열속에 삽입된 위치를 찾기 위하여 좋은 선별 marker로 사용된다(7)

수어자(recipient) 세균은 유전적으로 순수하게 agrocin 84 plasmid만을 갖는 *Agrobacterium tumefaciens* strain A136(42)을 사용하였다. 20개의 nutrient agar(NA) 배양접시속에 각각 *E. coli* 1830과 *A. tumefaciens* A136을 접합시켰다. 사용된 NA배지에는 kanamycin과 rifampin 두종류의 항생물질을 포함하고 있다. 이

배지상에서 얻어진 transconjugants (변이 접합균) 들은 Tn5의 kanamycin 저항성을 가지며 동시에 rifampin에 저항성을 갖게 된다. 후자인 공시균 *A. tumefaciens*는 rifampin 저항성이 있기 때문이다. 20개의 배양 접시로부터 매 접시당 200~300개의 접합 환로니들을 취하여 이들을 모두 합쳐 포자부유액을 만들고 plasmid 추출에 사용하였다. 추출된 plasmid DNA는 cesium chloride-Ethidium bromide gradients 상에서 순화시켰다. 이를 순화 DNA는 다시 *A.*

**Table 3. Conjugal Transfer of pAgK84 and Characteristics of the Transconjugants.**

Donor <sup>a</sup>	Agrocin phenotype	Recipient	Km Transfer frequency <sup>b</sup>	Agrocin phenotype of transconjugant	Opine utilization <sup>c</sup>	Tumorigenicity <sup>d</sup>	
NT1(III-2)	Agr <sup>+</sup>	<i>A. tumefaciens</i>					
		A136	10 <sup>-7</sup>	Agr <sup>+</sup>	None	-	
		SA101	10 <sup>-7</sup>	Agr <sup>+</sup>	Octopine	+++	
		C58CIRS-1	10 <sup>-7</sup>	Agr <sup>+</sup>	Nopaline	++	
		<i>R. meliloti</i>					
		AK631-1	10 <sup>-8</sup>	Agr <sup>+</sup>	NT	NT	
		<i>E. coli</i>					
		HB101	<10 <sup>-9</sup>	-	-	-	
		1231	<10 <sup>-9</sup>	-	-	-	
		<i>P. aeruginosa</i>					
		PAO403	<10 <sup>-9</sup>	-	-	-	
		NT1(III-1)	Agr <sup>-</sup>	<i>A. tumefaciens</i>			
A136	10 <sup>-8</sup>			Agr <sup>-</sup>	None	-	
SA101	10 <sup>-7</sup>			Agr <sup>-</sup>	Octopine	+++	
C58CIRS-1	10 <sup>-8</sup>			Agr <sup>-</sup>	Nopaline	++	
<i>R. meliloti</i>							
AK631-1	10 <sup>-8</sup>			Agr <sup>-</sup>	NT	NT	
<i>E. coli</i>							
HB101	<10 <sup>-9</sup>			-	-	-	
1231	<10 <sup>-9</sup>			-	-	-	
<i>P. aeruginosa</i>							
PAO403	<10 <sup>-9</sup>			-	-	-	

<sup>a</sup>The numbers in parentheses indicate the Tn5 insertion derivative of pAgK84 present in the donor strain.

<sup>b</sup>Expressed as the number of kanamycin-resistant transconjugants selected per input donor.

<sup>c</sup>Determined on solid basal medium with octopine or nopaline (2mg/ml) as sole source of carbon and nitrogen. NT=not tested.

<sup>d</sup>Determined on carrot disks as described by Farrand *et al.*, (1981). N=not tested (Farrand *et al.*, 1985).

*tumefaciens* strain NT1 (42) 에 넣어 주므로써 형질전환(transformation) 시켰다. Kanamycin을 포함한 NA 배지상에서 291개의 형질전환균(transformants)을 분리하여 agrocin 84 합성능력을 검정하였다. 이는 MG배지상에서 strain C 58을 지시균으로 bioassay를 하여 agrocin 84의 합성 능력을 잃지않은 202개 균수와 agrocin 84를 분비하지 않는 89개 균수를 선별하였다.

### pAgK84의 接合性 轉移

병원성 *Agrobacterium*이 pAgK84를 획득하는 것은 agrocin 84를 사용하는 생물학적 방법에 실패를 가져온다(31). pAgK84가 pAtK-84b 및 pNOC와 같은 다른 전이성 plasmid에 의하여 이동화(mobilization)되어 전이(transfer)될 수 있다(10, 11). 그러나 pAgK84는 스스로도 접합에 의하여 전이될 가능성이 있다. 우리는 이제 Tn5를 삽입시켜 유전적 특성을 선별할 수 있는 marker를 도입하므로써 접합 실험을 행하였다. 두 개체의 Tn5 삽입 변이주 *A. tumefaciens*, strain NT1 (pAgK84::Tn5) agrocin 84 합성변이균(Agr<sup>+</sup>)과 비합성 변이균 각각 4가지 다른 세균들에 접합시켜 보았다. (Table 3). 결과적으로 pAgK84::Tn5는 *A. tumefaciens*와 *Rhizobium meliloti*들에게 전이되어간다. 그러나 그들 접합 빈도는 매우 낮아  $10^{-7} \sim 10^{-8}$  이었다. 이들 접합 변이균(transconjugants)들도 역시 agrocin 84를 합성 분비하였다. 이와 반대로 pAgK84::Tn5는 *E. coli*와 *Pseudomonas aeruginosa*들에게는 전이되지 않았다.

### 유전자 기능분석

92개의 Tn5 삽입변이주(insertion mutants)들을 제한효소(restriction enzyme)로 처리하여 Tn5 삽입부위를 찾으므로써 유전자 기능지도(functional map)를 작성하였다(Fig. 5, 6, 7, 8). 이때 사용한 제한효소는 전부 3종이었으며 먼저 *Hpa* I 을 사용하여 Tn5가 삽입된 밴드(band)를 찾고 그 band위에 2개의 삽입 가능부위를 설정한다. 두번째 제한효소는 *Bam* H I 을 사용하여 *Hpa* I 에 의한 2개의 부위중 실제 삽입부위 하나를 찾게 된다. 2개의 제한

효소를 사용하여 Tn5 삽입부위가 불확실할 경우가 있는데 이때에는 *Pst* I 으로 보충하였다. *Bam* H I 으로 plasmid DNA를 자를 경우 Tn5의 효소작용 부위가 비대칭이므로 극성(polarity)도 가능한한 표시하였다. Tn5-DNA가 유전자 배열속에 삽입되므로 유전자의 배열이 끊기게 되고 그 유전자는 그 기능을 상실케 된다. 이런 부위가 바로 그 유전자의 삽입위치가 된다. 먼저 Tn5 삽입변이주(Agr<sup>+</sup>)들을 택하여 Tn5 삽입위치를 결정하였다. Fig. 5, 6에서 등위 32.8부터 *Xba* I의 0점을 지나 등위 4.9에 이르는 약 20-kb 정도 커다란 부위를 찾았다. 이 부위가 agrocin 84 생합성 유전자의 배열부위가 되겠다. 48개의 Tn5 삽입변이주(Agr<sup>+</sup>)를 택하여 접합실험을 한 결과 14개의 비접합성 변이주(transfer negative-Tra<sup>-</sup>)를 선별하였다. 이들을 제한효소 처리후 분석한 결과 그 plasmid 전이 유전자(transfer gene)의 위치를 찾았다. Fig. 5, 7에서 등위 2.8과 31.2사이의 위치한 약 3.5-kb가 그 부위

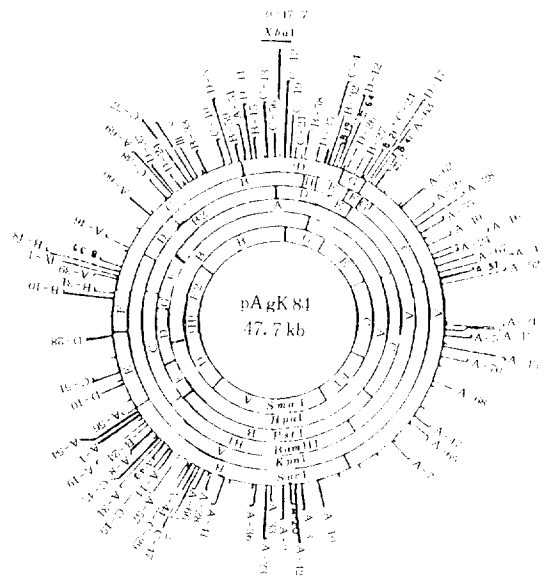
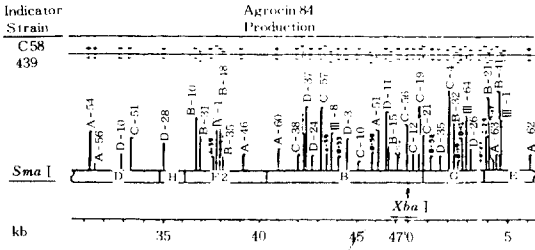
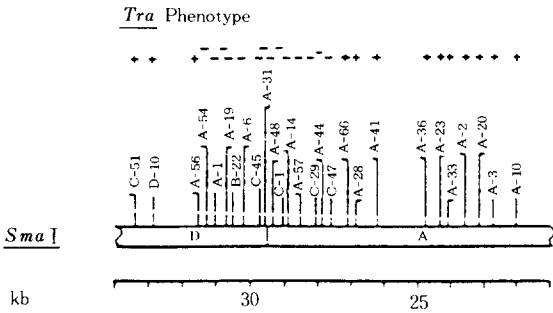


Fig. 5. Map of pAgK84 showing the sites of 92 independent Tn5 insertions. Mapping was performed as described in the text. Where determined, the crossbar on each insertion shows the polarity with respect to the 2.8-kb *Bam*H I arm of Tn5(Farrand *et al.*, 1985).



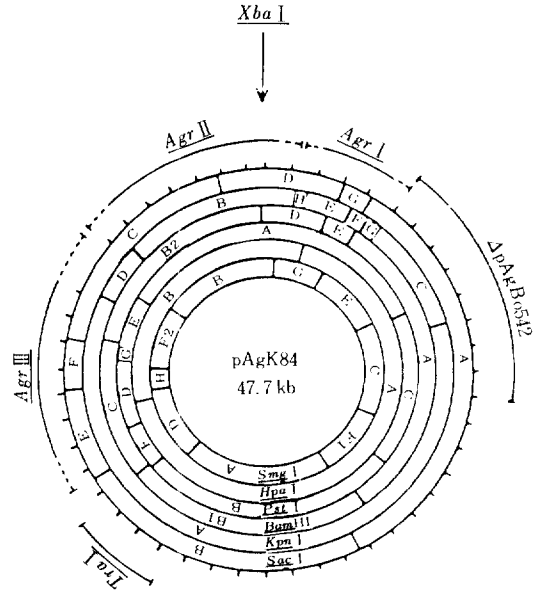


**Fig. 6.** Map positions of Tn5 insertions affecting agrocin 84 production. The insertion mutants were all assayed against *A. tumefaciens* strain C58 and its agrocin supersensitive derivative, 439 as described in the text. +, Produces agrocin 84; -, no agrocin 84 detected (Farrand *et al.*, 1985).



**Fig. 7.** Map positions of Tn5 insertions affecting conjugal transfer to *A. tumefaciens* strain NT1. Mappings and matings were performed as described in the text (Farrand *et al.*, 1985).

이나 나머지 Tn5 삽입 변이주(Agr<sup>+</sup>, Tra<sup>+</sup>)는 등위 6.2로부터 시계방향으로 등위 27.2에 이르기까지 배열되어 있었고 이들 사이에 커다란 공백이 2-3개 나타난다. 이들중 최소한 하나의 공백부위는 증식유전자(replication gene) 배열부위가 되어야 한다. 이곳에 Tn5가 삽입된 변이주는 그 plasmid를 증식시킬 수 없기 때문이다. agrocin 84생합성 유전자 부위중 2개의 변이주(Ag<sup>+</sup>, Tra<sup>-</sup>), B-58과 A-60은 20-kb의 agrocin 84 유전자 배열부위 중간에 위치하여 이 유전자 배열을 3등분하여 준다. 이로서 agrocin 84 유전자의 연쇄는 최소한 3군 이상인 것이다.



**Fig. 8.** Functional map of pAgK84. Regions defined by consecutive Tn5 insertions are shown in solid lines. Dotted lines represent distances between the last insertion affecting a phenotype and the nearest insertion having no effect on that trait. ◇ pAgBo542 represents that portion of pAgK84 absent in the closely related agrocinogenic plasmid, pAgBo542 (Slota and Farrand, 1982; Farrand *et al.*, 1985).

### 結 言

이상의 결과로 얻어진 14개의 Tn-5 변이주(Agr<sup>+</sup>, Tra<sup>-</sup>)는 연구 목적에 따라 성공적으로 얻어진 신종 *Agrobacterium tumefaciens*, strain K84로서 (발표논문(미국 식물병리학회지 "phytopathology"에 게재 신청중)-Shim(36)에 의해서 pAgK84::Tn5의 이동화(mobilization) 시험을 행하였다. 그 결과를 요약하면 1) pAgK84::Tn5 Agr<sup>+</sup>, Tra<sup>-</sup>는 pAtK84b(일명 pNO-C)에 의하여 이동화할 수 없었고, 2) 이 pAgK84::Tn5 Agr<sup>+</sup>, Tra<sup>-</sup>, Mob<sup>-</sup>는 *Agrobacterium rhizogenes*에 형질전환(transformation) 시켜서 원래의 *Agrobacterium radiobacter*, strain K84와 방제시험을 비교한 결과 strain

K84와 손색없는 효과를 얻게 되었다. 3) 이 pAgK84::Tn5는 hydroxylamine을 처리하여 얻어진 Agrocin 84 overproducing mutant을 얻게 되었으며 이들도 strain K84와 비슷한 결과 비슷한 방제효과를 얻게 되었다. 이들 신종 *Agrobacterium* (pAgK84::Tn5 Agr<sup>+</sup>, Tra<sup>-</sup>, Mob<sup>-</sup>)들을 직접 포장에 사용하기 위하여 대량 생산 이전에 몇가지 고려해야 할점이 있다. 첫째로는 Tn5 DNA의 삽입부위로부터 Tn5 DNA 탈락으로 인한 전이유전자 기능회복, 둘째는 Tn5 DNA가 갖고있는 kanamycin저항성 유전자를 가지므로서 토양에 처리되었을때 다른 토양미생물과의 관계(kanamycin 저항성 전파) 등을 들 수 있다. 이러한 결점은 그 정도를 헤아릴 수 없으므로 이들 신종 방제세균은 이점들을 보완하기 위하여 Kerr교수팀은 deletion method에 의한 이 해당부위를 삭제할 연구를 계속중이다. 다시 이어지는 생물학적 방제를 위한 신종 세균의 산업화의 성공을 기다리면서 신종 strain K84는 어떤 이름으로 불리워질까?

## REFERENCES

- Alconero, R. (1980). Crown gall *Agrobacterium tumefaciens* of peaches *Prunus persica* from Maryland, South Carolina and Tennessee USA and problems with biological control. *Plant Dis.* **64**, 835-838.
- Bazzi, C., and Rosciglione, B. (1982). *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3 causal agent of crown gall on *Crysanthemum* in Italy. *Phytopathol. Z.* **103**, 280-284.
- Braun, A.C. (1947). Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation on crown gall. *Am. J. Bot.* **34**, 234-240.
- Braun, A.C. (1953). Bacterial and host factors concerned in determining tumor morphology in crown gall. *Bot. Gaz.* (Chicago) **114**, 363-371.
- Braun, A.C. (1978). Plant tumours. *Biochim. Biophys. Acta* **516**, 167-191.
- Braun, A.C. (1982). A history of the crown gall problem, in *Molecular Biology of Plant Tumours*, ed. G. Kahl and J. Schell, pp.155-210.
- Beringer, J.E., Beynon, J.L., Buchanon-Wollaston, A.V., and Johnston, A.W.B. (1978). Transfer of the drug resistance transposon Tn5 to *Rhizobium*. *Nature*(London) **276**, 633-634.
- Chilton, M. -D., Drummond, M. H., Merlo, D.J., Sciaky, D., Montoya, A.L., Gordon, M.P., and Nester, E.W. (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* **11**, 263-271.
- Dhanvantari, B.N. (1976). Biological control of crown gall of peach in south-western Ontario. *Plant Dis. Rep.* **60**, 549-551.
- Ellis, J.G., and Kerr, A. (1979). Transfer of agrocin 84 production from strain 84 to pathogenic recipients: A comment on the previous paper. In "Soil-Borne Plant Pathogens" (B. Schippers and W. Gams, Eds.), pp.579-583. Academic Press, New York.
- Ellis, J.G., Kerr, A., Van Mongtagu, M., and Schell, J. (1979). *Agrobacterium*: Genetic studies on agrocin 84 production and the biological control of crown gall. *Physiol. Plant Pathol.* **15**, 311-319.
- Ellis, J.G., and Murphy, P.J. (1981). Four new opines from crown gall tumors, their detection and properties. *Mol. Gen. Genet.* **181**, 36-43.
- Farrand, S.K., Slota, J.E., Shim, J.-S., and Kerr, A. (1985). Tn5 insertions in the agrocin 84 plasmid: The conjugal nature of pAgK84 and the locations of determinants for transfer and agrocin 84 production. *Plasmid* **13**, 106-117.
- Guyon, P., Chilton, M.-D., Petit, A., and Temp'e, J. (1980). Agropine in "null type" crown gall tumors: Evidence for the generality of the opine concept. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 2693-2697.

15. Hamilton, R.H., and Fall, M.Z. (1971). The loss of tumor-initiating ability in *Agrobacterium tumefaciens* by incubation at high temperature. *Experientia* **27**, 229-230.
16. Htay, K., and Kerr, A. (1974). Biological control of crown gall: Seed and root inoculation. *J. Appl. Bacteriol.* **37**, 525-530.
17. Kahl, G., and Schell, J. (1982). *Molecular Biology of Plant Tumours*, pp.615.
18. Kerr, A. (1969a). Crown gall of stone fruit. I. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* and related species. *Australian Journal of Biological Sciences* **22**, 111-116.
19. Kerr, A. (1969b). Transfer of virulence between isolates of *Agrobacter*. *Nature*(London) **223**, 1175-1176.
20. Kerr, A. (1971). Acquisition of virulence by non-pathogenic isolates of *Agrobacterium radiobacter*. *Physiol. Plant. Pathol.* **1**, 241-246.
21. Kerr, A. (1972). Biological control of crown gall: Seed inoculation. *J. Appl. Bacteriol.* **35**, 493-497.
22. Kerr, A. (1980). Biological control of crown gall through production of agrocin 84. *Plant Dis.* **64**, 25-30.
23. Kerr, A., and Htay, K. (1974). Biological control of crown gall through bacteriocin production. *Physiol. Plant. Pathol.* **4**, 37-44.
24. Matthee, F.N., Tomas, A.C., Du Plessis, H.J. (1977). Biological control of crown gall. *Decid. Fruit. Grow.* **27**, 303-307.
25. Moore, L.W. (1977). Prevention of crown gall on *Prunus* roots by bacterial antagonists. *Phytopathology* **67**, 139-144.
26. Moore, L.W. (1979). Practical use and success of *Agrobacterium radiobacter* strain 84 for crown gall control. In "Soil-Borne Plant Pathogens" (B. Schippers and W. Gams, eds.), pp.553-561. Academic Press, New York.
27. Morel, G.M., Goldmann, A., Petit, A., and Temp'e, J. (1969). Evidence for the transmission of a permanent information from *A. tumefaciens* to the plant cell during tumoral transformation. *Proc. Int. bot. Congr.*, 11th, 1969 Abstracts, p.151.
28. Murphy, P.J., Tate, M.E., and Kerr, A. (1981). Substituents at N6 and C-5' control selective uptake and toxicity of the adenine-nucleotide bacteriocin, agrocin 84, in agrobacteria. *Eur. J. Biochem.* **115**, 539-543.
29. Nester, E.W., and Kosuge, T. (1981). Plasmids specifying plant hyperplasias. *Ann. Rev. Microbiol.*, **35**, 531-565.
30. New, P.B., and Kerr, A. (1972). Biological control of crown gall: Field measurements and glass-house experiments. *J. Appl. Bacteriol.* **35**, 279-287.
31. Panagopoulos, C.G., Psallidas, P.G., and Alivizatos, A.S. (1979). Evidence of a breakdown in the effectiveness of biological control of crown gall. In "Soil-Borne Plant Pathogens" (B. Schippers and W. Gams, eds.), pp.569-579.
32. Perry, K.L., and Kado, C.I. (1972). Characteristics of Ti plasmids from broad host range and ecologically specific biotype 2 and 3 strains of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **151**, 343-350.
33. Schell, J. (1975). The role of plasmids in crown gall formation by *A. tumefaciens*. In *Genetic Manipulations with Plant Materials* (L. Ledoux, ed.), pp.163-181. Plenum, New York.
34. Schilperoord, R.A., Veldstra, H., Warnaar, A.O., Mulder, G., and Cohen, J.A. (1967). Formation of complexes between DNA isolated from tobacco crown gall tumours and RNA complementary to *Agrobacterium tumefaciens* DNA. *Biochem. Biophys. Acta* **145**, 523-525.
35. Sciaky, D., Montoya, A.L., and Chilton, M.-D. (1978). Fingerprints of *Agrobacterium* Ti plasmids. *Plasmid* **1**, 238-253.
36. Shim, J.-S., Farrand, S.K., and Kerr, A. (1986-1987? In Publishing). Biological control of crown gall: Construction and

- testing of new biocontrol agents. *Phytopathology* ---.
37. Slota, J.E., and Farrand, S.K. (1982). Genetic isolation and physical characterization of pAgK84, the plasmid responsible for agrocin 84 production. *Plasmid* **8**, 175-186.
  38. Smith, E.F., and Townsend, C.O. (1907). A plant-tumor of bacterial origin. *Science* **25**, 671-673.
  39. Tate, M.E., Eillis, J.G., Kerr, A., Temp'e, J., Murray, K., and Shaw, K. (1982). Agropine: a revised structure. *Carbohydr. Res.* **104**, 105-120.
  40. Tate, M.E., Murphy, P.J., Roberts, W.P., and Kerr, A. (1979). Adenine N6-substituent of agrocin 84 determines its bacteriocin-like specificity, *Nature* (London) **280**, 697-699.
  41. Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A., and Schell, J. (1974). Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature*(London) **252**, 169-170.
  42. Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chilton, M. -D., and Nester, E.W. (1975). Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **123**, 255-264.
  43. Zaenen, I., Van Larebeke, N., Teuchy, H., Van Montagu, M., and Schell, J. (1974). Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.* **86**, 109-127.