

Pseudomonas 균주에 있어서 R₂ Plasmid 획득에 의한 γ -ray 耐性增強

조 봉 금

건국대학교 자연과학대학 생화학과

(1989. 7. 16 접수)

Ps. aeruginosa 의 DNA repair 기구 결손변이주인 rec^- , Hcr^- 그리고 R931 plasmid 를 가진 R₂(Carbenicillin, Kanamycin, Streptomycin) plasmid transconjugants 가 R₂ plasmid 획득에 의해서 γ 선 및 돌연변이제 (4NQO, NTG) 에 대해서도 내성을 증강시키는지를 검토함으로써 방사선에 대한 내성화 기구를 해명하고자 했다. 그리고, DNA repair 기구에 작용하는 DNA polymerase I 생산에 관여하는 유전자가 R₂ plasmid 에 code 되어 있는지를 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) *Ps. aeruginosa* PAO 균주의 R₂ plasmid transconjugants 는 R₂ plasmid 획득에 의해 자외선, γ 선 및 돌연변이제에 대한 내성을 부여받았으나 transconjugants 균주에 따라 다른 종류의 내성결과가 얻어졌다.

2) R₂ plasmid transconjugants 중 Hcr^- 및 Hcr^+ 균주는 R₂ plasmid 획득에 의해 UV 에 대해서는 shoulder 및 slope 의 변화를 통하여 내성을 부여받았으나 γ 선에 대해서는 Hcr^+ 균주만이 선량생잔곡선의 shoulder 를 통하여 내성을 부여받았고, 돌연변이제 (4NQO, NTG) 에 대해서는 Hcr^- 균주만 내성을 부여받았다.

3) R₂ plasmid 는 rec^- 균주에 대해서는 내성을 부여하지 않았으므로 숙주의 rec gene 에 상당하는 정보를 갖고 있지 않으며 R₂ plasmid 의 내성발현에는 숙주의 rec gene product 가 관여함이 시사되었다.

4) R₂ plasmid 획득에 의하여 DNA polymerase I 생산은 특히 상승되지 않았다. 따라서 R₂ plasmid 획득에 의한 내성증강은 rec dependent 의 DNA SOS repair mechanism 에 의한 가능성은 있으나 아직 확실치 않다.

5) 약제내성 plasmid 의 획득으로 자외선 및 방사선 내성화가 일어난다는 사실은 앞으로 식품, 병원, 연구소에서의 방사선 살균처리 이용 및 분해계 plasmid 를 이용한 공장폐수 및 汚泥처리 등에 한계성이 있음을 나타내었다.

서 론

획득한 plasmid 정보에는 자외선 및 전리방사선에 대해 耐性を 증가시키는 것과 반대로 감소시키는 것이 있다(Siccardi, 1969; Howarth, 1965; Drabble & Stoker, 1968; Macphee, 1972; Jacoby, 1974; Krishnapillai, 1975). *Samonella* 에서의 내성증가는 DNA repair mechanism 에 작용하는 DNA polymerase I 생산에 관여하는 유전자가 plasmid 에 code 되어 있다고 한다(Krishnapillai, 1975; Macphee, 1973, 1974). 또 *Samonella* 를 14회 반복 照射하면서 한 단계씩 선량을 높여 6 단계로 반복 조사했을 때 (14×6) 耐性化되어 선량생잔곡선은 shoulder 가 커졌고, 야생균주의 20 배의 내성균주로 되었으며 세포 크기도 커졌고, DNA polymerase I 과 DNA ligase 양이 상승되었다. 20배로의 내성화는 plasmid 에서 유래했다(Davies & Sinskey, 1973; Davies *et al.*, 1973).

Plasmid 획득에 의한 방사선 내성화는 미생물이 처해 있는 환경에서 유전정보를 증폭시킨 적응 선택 결과로 볼 수 있다. Plasmid 에 삽입된 미지의 유전정보를 검색하고 자외선 및 방사선에 대한 내성화기구를 해명할 목적으로 세균이 가지고 있는 plasmid 가 자외선에 대해 내성을 증가시켰고 (Cho, 1984), 특히 3種약제 (cb, km, st) 내성인자 R₂는 상당히 높은 내성을 주므로 R₂ 인자가 발견된 original 균주로부터 R₂를 PAO 38, Ps 2-72, Ps 33-72, Hcr⁻ 균주 및 R 931 을 가진 균주에 접합 전달시킨 후 얻어진 transconjugants 안에서도 R₂ 인자가 UV 에 대해 내성을 증가시켰다 (Cho, 1948b).

본 논문은 전리방사선 및 돌연변이제에 대해서도 내성을 증가시키는지의 여부를 검토함으로써 방사선에 대한 내성화기구를 해명하고자 했고 DNA repair mechanism 에 작용하는 DNA polymerase I 생산에 관여하는 유전자가 R₂ plasmid 에 code 되어 있는지 검토한 결과를 보고 하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용된 균주는 *Ps. aeruginosa* PAO 38과 약제내성 전달인자 R₂(cb, km, st)를 가진 PAO 38/R₂, DNA repair 기구결손주 PAO 937(Hcr⁻)과 PAO 2003(rec⁻) 그리고 이미 자외선 내성을 부여하는 약제내성인자로 알려진 PAO 2/R 931(St, TC, Hg) 균주는 표 1에서 처럼 분양 받았고, PAO 937/R₂, PAO 2003/R₂ 및 PAO²/R 931·R₂는 前報(Cho, 1984b)에서 R₂ plasmid 의 original 균주 Ps 2-72를 공여균으로 한 실험을 통해 얻은 transconjugants 들이다. 이들 각 균주의 B-broth(Okazawa & Matsuyama, 1967, meat extract 10g, bactopecton 10g, yeast extract 5g, glucose 2g/H₂O 1000ml) 배양액에 glycerin 을 10% 포함되게 첨가하여 -80°C에서 보존한 것을 실험에 제공하였다.

γ-線 照射

균주들은 B-broth 로 37°C에서 overnight 진탕배양후 새로운 B-broth 에 50배 희석, 대수기까지 생육후, 원심분리로 균체를 모아 완충액(Tris 및 인산 1/30M pH=7.4)으로 2회 세척, 같은 완충액으로 재현탁(2×10^8 /ml) 한 후 뚜껑달린 test tube 에 외부 공기와 용존 공기의 평형이 유지될 정도의 시료액 3ml 씩 넣고 25°C 에서 ⁶⁰Co- γ선 조사선량을 5.83×10^4 rad/min 와 1.1×10^4 rad/min 의 장소를 이용해 조사했다. 조사후 같은 완충액으로 단계적으로 희석, B- 한천배지에 0.1ml 씩 도말, 37°C에서 3일 배양후 출현하는 균수를 계측, 비조사 시료 중의 균수와 비교, 조사선량에 따른 생잔곡선을 구해 R₂ plasmid 획득에 의한 방사선 내성 증가여부를 검토했다.

γ-線源: 東京大学 原子力 연구종합센터 ⁶⁰Co- γ선원 6000Ci 를 이용했다.

선량을 측정: 鐵線量計 및 cerium 선량계(重松, 1968) 을 따랐다.

돌연변이제 4NQO 및 NTG 에 대한 감수성

4NQO(4-nitro-quinoline-1-oxide) 는 ethyl alc에 2mg/ml 로 용해시키고, NTG(N-methyl-N'-nitro-Nitrosoguanidine) 는 완충액에 1mg/ml 용해한 후(Kondo *et al.*, 1976), 각각에서 0.1ml 씩을 취해 각각의 4.4ml 의 Tris (pH=7.4) 완충액에 첨가후, 0.5ml 의 균체액 (2×10^5 /ml) 을 각각의 tube 에 넣었을 때 4NQO 의 경우의 최종처리 농도는 100 μM 이고, NTG 의 경우는 (20 μg/ml) 이었다. 처리온도는 30°C 였으며 시간별로

일부를 취해 그대로 혹은 같은 완충액으로 희석해서 B-한천배지에 0.1ml씩 도말, 37°C에서 3일 배양후 출현 균수를 비교하여 조사선량에 따른 생산곡선을 구해 R₂ plasmid 획득이 돌연변이체에 대한 내성을 증강시키는지 여부를 검토했다.

DNA polymerase I 활성

Ps. aeruginosa PAO 38(Hcr⁺), PAO 38/R₂(Hcr⁺) 및 PAO 937(Hcr⁻), PAO 937·R₂(Hcr⁻) 균주에 있어서 plasmid에 의한 (R₂=cb. km. st), 방사선 및 자외선 내성증강이 Macphee, 1974와 Davies & Sinskey, 1973년 보고와 같이 DNA polymerase I의 활성상승에 의한 것인지 아닌지 여부를 검토했다. 균주들의 대수기균체를 원심분리로 모아 세척(2회), 완충액(Tris pH=7.4)로 재현탁(10⁹~10¹⁰/ml)한 후, 5분간 초음파 처리후 1000×g 10분 원심분리 여액을 조효소로 이용, 그중 0.9ml를 완충액으로 녹여 초음파 처리한 Calf thymus DNA 0.1ml (final 농도 20μg/ml)에 넣어 5분(25°C) 후, triphosphate solution (final 농도 100nmol/ml)의 dGTP, dCTP, dATP와 0.6nmol/ml의 ³H TTP 0.3ml를 넣은 반응 혼합물에서 0, 2, 4, 6, 8, 10 분별로 0.02ml를 채취, cold 5% TCA로 반응을 정지시키고, 이것을 glass filter disk 위에 부어, 3미 같은 TCA로 세척, 95% alc 2ml로 3미 세척후 disk를 건조, 5ml의 toluene scintillator (2.5-diphenyloxazole(PPO scintillation, Grade Mwt=221.25) 5g+1.4-bis-2-(5-phenyloxazole)-benzene 0.3g+1000ml toluene)을 넣어서 Packard 액체 scintillation counter로 측정했다. Desoxythymidine-5'-triphosphate (C₁₀H₁₃N₂O₁₄P₃Na₄)는 Boehringer Mannheim GmbH에서 deoxy-CTP-3Na, deoxy-ATP-2Na 및 deoxy-GTP-3Na는 Yamasa 醬油 K. K에서 구했다.

단백질 측정

Phenol 시약과 단백질 중의 방향족 아미노산과의 사이의 착색반응과 peptide 결합에 대한 Biurete 반응의 복합으로, 비교적 단백질의 종류에 의해 착색도가 변하지 않고 감도도 높으므로 이 Lowry 법(Lowry, 1951)을 이용했다.

시약

- 1) 2% Na₂CO₃(0.1N NaOH 수용액중)
- 2) 0.5% CuSO₄·5H₂O(1% 주석산 나트륨중) : CuSO₄, 주석산염은 각각 2배농도의 보존 용액을 만들어 사용전 1 : 1로 혼합사용
- 3) 시약 1) 50ml를 사용 직전에 시약 2) 1ml와 혼합할 것.
- 4) 2% Na₂CO₃ 수용액 50ml와 시약 2) 1ml와 혼합한 것.
- 5) Folin 시약 : 산농도가 1N 이 되도록 물로 희석(약 2배).

PAO 937 Hcr⁻ 균주, PAO 937/R₂(Hcr⁻) 株, PAO 38 Hcr⁺ 및 PAO 38/R₂(Hcr⁺) 균주의 각각을 5분간 초음파 처리후 1000g 10분 원심분리여액 0.4ml를 취해 시약3) 3ml를 첨가 혼합하고 실온 10분 방치후, 시약 5) 0.3ml를 첨가 재빨리 혼합한다. 30분이상 경과후 750nm에서 비색 정량했다. Bovine serum albumin 단백질 30~300μg 포함 시료를 이용해 구한 표준곡선에서 단백질량을 계산했다.

결 과

γ -線에 대한 내성증강

Table 1. Bacterial strains used

Strains	Markers	Source
<i>Ps. aeruginosa</i>		
PAO 38	FP ⁻ leu ⁻	Nakazawa, T.
PAO 38/R ₂	FP ⁻ leu. R ₂ (Cb. St. Km)	
PAO 937	met ⁻²⁸ ilv ²⁰² St Hcr ⁻⁶ FP ₂	Krishnapillai, V.
PAO 2003	arg ⁻³² St ⁻³⁹ Cm ⁻² rec ⁻² FP ²	
PAO 2/RP31	Ser ⁻³ R ⁹³¹ (St.Tc.Hg)	Original
PAO 937/R ₂	met ⁻²⁸ ilv ²⁰² St Hcr ⁻⁶ FP ² . R ²	
PAO 2003/R ₂	arg ⁻³² St ⁻³⁹ Cm ⁻² rec ⁻² FP ² . R ²	
PAO 2/R931. R ₂	Ser ⁻³ R ⁹³¹ (St.Tc.Hg). R ₂	

Abbreviation of Symbols

ser = Serin	Hg = Mercury
leu = leucine	rec = recombination
arg = arginine	Hcr = Host cell reactivation
met = methionine	Tc = tetracycline
ilv = isoleucine plus valine	Cm = chloramphenicol
FP = sexfactor of <i>Ps. aeruginosa</i>	Cb = Carbenicillin
St = Streptomycin	Km = Kanamycin

γ 선에 의한 DNA 손상 그 자체가 DNA 사슬의 절단이므로 dark repair 기구의 excision 에 필요한 endonuclease 가 결손되어 있어도 DNA polymerase 이후의 기능이 있으면 되고 또 post replication repair 기능이 정상이면 repair 되므로 Hcr⁻ 균주는 γ 선에는 민감하지 않다. Hcr⁺ 균주인 PAO 38에서는 R₂의 획득에 의해 내성을 증강시키는 shoulder 가 생존곡선에 생겼다(표 2, 그림1). 또 PAO 2/R931·R₂에서는 내성증강에 의해 shoulder 가 1.7배 더 넓어졌다(그림2, 표2). 그러나 Hcr⁻인 PAO 937에서의 R₂인자 획득균주 PAO 937/R₂는 그것의 R₂균과 같은 감수성을 나타냈다(그림3). 그리고 Hcr⁺ 균주인 PAO 38과 같은 감수성을 나타낸 점으로부터 일부의 excision repair(DNA polymerase 이후) 및 post replication repair 기능이 정상인 것을 알 수 있다.

rec⁻ 균주인 PAO 2003의 R₂ 획득균의 방사선 감수성은 UV 와 같은 상태로 민감했다(그림 4). 이곳에서 Hcr⁺에서의 R₂에 의한 내성 부여가 rec⁻에서 보이지 않는 것은 rec⁺ gene 에 관여하고 있음을 나타내고 있는 것이다. Hcr⁻ 혹은 rec⁻에서는 R₂에 의한 내성은 발현되지 않았으나, Hcr⁺에서는 R₂를 획득한 쪽이 shoulder 가 증강됐다.

Table 2. Increase in radiation resistance by acquisition of plasmid-

Strain	Markers	*10 ₁₀ (Krad)	*Dq (Krad)
PA0 2/R931	St.Tc.Hg	4.94	2.73
PA0 2/R931.R2	St.Tc.Hg.Cb.Km	4.94	4.42
PA0 2003	Rec ⁻ .Cm	2.97	
PA0 2003/R2	Cb.Km.St.Cm	2.97	
PA0 38		3.65	
PA0 38/R2	Cb.Km.St	3.65	2.27
PA0 937	Ncr ⁻	4.1	
PA0 937/R2	Cb.Km.St	4.1	2.91

*D₁₀ = dosage required to survive microbes by 10% on the exponential part of the survival curve.

*Dq = quasithreshold dose (Induction dose)

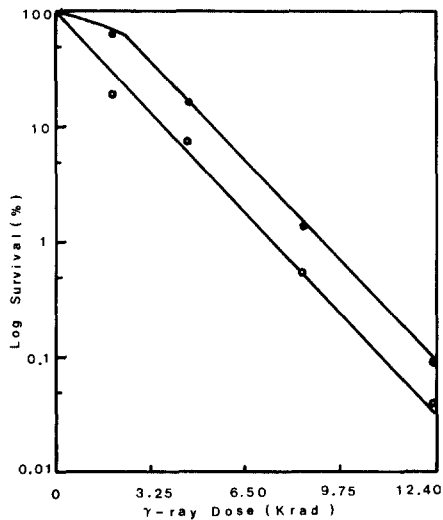


Fig. 1. Survival curves of PAO 38 with and without R2 factor after γ -irradiation; \circ , PAO 38; \bullet , PAO 38/R2.

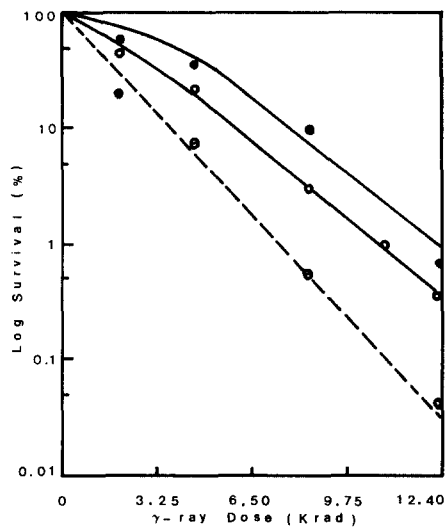


Fig. 2. Survival curves of PAO 2/R931 with and without R2 factor and PAO 38 after γ -irradiation; \circ , PAO 38; \circ , PAO 2/R931; \bullet PAO 2/R931.R2.

4NQO 및 NTG 에 관한 R₂의 거동

발암성 화학물질의 대부분은 DNA 에 상처를 주며 X선형(NTG 등의 손상도 포함) 손상의 repair 에는 endonuclease 는 불필요(손상이 DNA 사슬 절단이므로) 하므로 제거 수복과정의 polymerase 이 후의 기능만 있으면 충분하다. Hcr⁻ 균주 PAO 937에 R₂를 넣어주면 4NQO 및 NTG 에 대해 내성을 부여했다(그림 5, a, b). Hcr⁺ 균주 PAO 38, Ps 33-72 및 Ps 2-72에서의 R₂는 이들 변이제에 대한 내성을 증가시키지 않았다(data 는 보이지 않았다).

DNA polymerase 활성 측정

R₂에 의한 방사선, 자외선 및 돌연변이제 4NQO 와 NTG 에 대한 내성부여도 DNA polymerase I

Table 3. The reported plasmids conferred resistance to UV and enhanced mutagenesis.

Strains	Plasmids	Phenotype	Reference
<i>Salmonella</i>	col Ib (colicin Ib)	mutation, UV	8
	R-Brighton(Tc.St.Su.Pn)	UV	7
	R-Utrecht(Tc.Su.Pn)	alkylating agents, UV, γ , mutation	15 16,9
	R-46(Amp.St.Su.Tc)	mutation	14
<i>E. coli</i>	R2(Tc.St.Su)	UV	19
	R-Munich(Tc.St.Su.Cm.Km)	UV	7
	Hfr H	X-ray	1
<i>Pseudomonas</i>	R931(St.Tc)	UV. mutation	9
	FP 15, FP50, FP58	UV. mutation	12
<i>Ps. putida</i>	CAM	UV	10
<i>Pseudomonas</i>	R2(Cb.St.Km)	UV. γ . 4NQO, NTG	3, *)
	R38(St.Tc.Hg)	UV	3
	R68(Km.Tc.Cb)	UV	3
<i>Ps. putida</i>	TOL	UV	3
<i>E. coli</i>	HfrC	UV	3

Hfr = high frequency of recombination

Col Ib (colicin Ib)

Su = Sulfonamide

Pn = Penicillin

Amp = Ampicillin

CAM = Camphor

TOL = Degradative plasmid of Toluene

*) in this paper

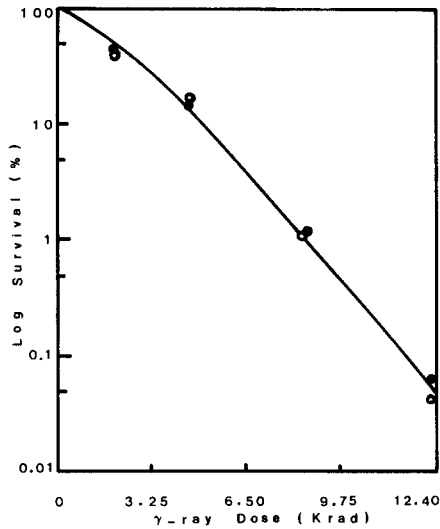


Fig. 3. Survival curve of PAO 937 (Hcr⁻) with and without R₂ factor after γ -irradiation.

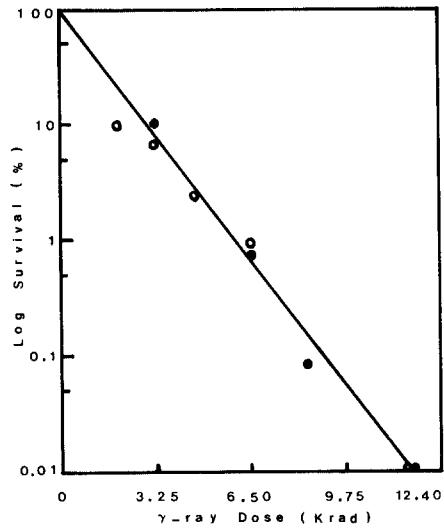


Fig. 4. Survival curve of PAO 2003 (Rec⁻) with and without R₂ factor after γ -irradiation.

의 상승에 의한 것인지 아닌지를 검토했다. Hcr⁻인 PAO 937과 PAO 937/R₂ 및 Hcr⁺의 PAO 38과 PAO 38/R₂ 사이의 DNA polymerase I의 활성의 차이는 볼 수 없었고 오히려 떨어졌다(그림6). 그래서 균수와 단백질 농도를 보통 측정에 쓰는 농도조건보다 10배 농축한 결과에 있어서도 차이는 없었다.

토 론

전리방사선에 의한 DNA 손상인 double strand 및 single strand 절단 등의 repair가 Hcr⁻ 균주처럼 dark repair가 될 수 없는 균주에 있어서도 일어난다(Kondo *et al.*, 1970; Bridges & Munson, 1966). 즉, 절단된 single strand의 repair가 일어난다는 것을 보여준다. Rec⁻ 균주는 X선 및 UV에도 상당히 예민하다. Hcr⁻인 PAO 937은 UV에 의한 pyrimidine dimer 절단에 필요한 endonuclease가 없어서 dimer를 제거하지 못해 UV에 상당히 민감하나 R₂ plasmid를 획득함으로써 UV에 대한 내성이 증강됐다(Cho, 1984b). 그러나 γ 선에 의해 절단된 DNA 사슬은 endonuclease가 없어도 repair되므로 γ 선에는 민감하지 않으며 R₂ plasmid를 획득한 PAO 937/R₂ 균주는 R₂⁻균주와 같은 반응을 보였다. 이것에 비해 R₂인자를 획득한 Hcr⁺ 균주는 UV 및 γ 선에 대해 내성을 증강시켰다.

R 931(Sm, Tc, Hg) 인자와 R₂인자를 공존시켰을 때 거동을 본 것이 그림 2인데 compatibility,

incompatibility는 plasmid의 기본적인 제어기구와 관련이 있으며 2종류의 plasmid가 같은 세포 내에 안정하게 공존될 때 양자의 증식제어 기구는 간섭이 없고 compatibility이며, 서로 같은 증식 제어기구를 가지고 있으면 서로 간섭해서 안정하게 공존될 수 없어 양쪽은 incompatibility이다. 이 incompatibility를 plasmid 분류에 이용하는 것이 최근 일반화 되었다. *Pseudomonas*에는 P₁, P₂, P₃, P₄ 외에 W, N group이 있으나(Jacoby, 1975), R₂에 관해서는 보고가 없다. P₂ group에 속하는 R₉₃₁ plasmid를 가진 균에 R₂ plasmid를 집합 전달시켜서 carbenicillin과 kanamycin 내성을 부여해서 유전정보를 더욱 증폭시킨 2重 plasmid 획득균의 UV 내성 획득 여부를 보면 R₉₃₁ plasmid는 UV에 대해 내성을 부여한다는 것이 이미 알려져 있으나(Jacoby, 1974), 더욱 R₂ plasmid 획득은 UV에 대해 한층 내성을 증강시켰고(Cho, 1984b), 본 논문에서는 γ 선에 대해서도 더욱 내성을 증가시켰다. 일반적으로 기존의 plasmid가 있으면 나중엔 삽입된 plasmid는 제거되기 쉬우나 내성으로 보면 공존하고 있다. Plasmid 상호의 재조합, 2개의 replicon이 공유결합으로 복합 replicon으로 났을 가능성, 혹은 일시적인 hetero 집합체가 될 수도 있으나 이들에 관해서는 검토하지 않았다.

발암성 화학물질의 대부분은 DNA에 상처를 주며 4NQO는 자외선에 의한 thymine dimer와 같

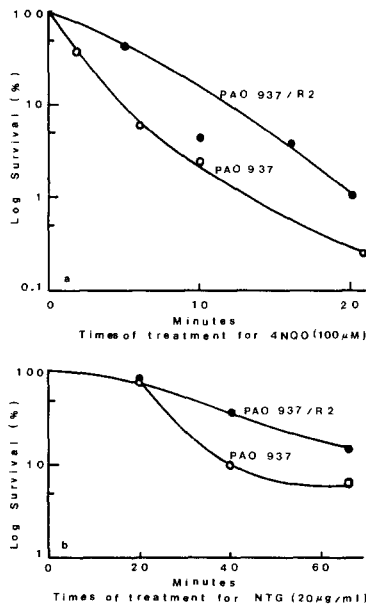


Fig. 5. a. Survival of PAO937 (Hcr⁻) with and without R2 factor after treatment with 4NQO (100 μM).
b. Survival of PAO937 (Hcr⁻) with and without R2 factor after treatment with NTG (20 μg/m).

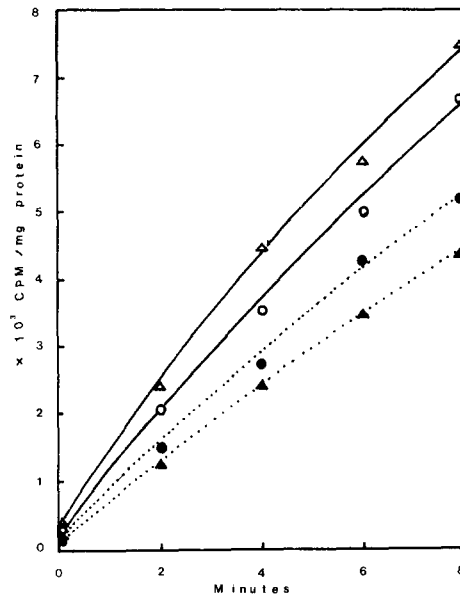


Fig. 6. Assays for DNA polymerase activities/1 mg of protein of strains; ○, PAO 38 (Hcr⁺); ●, PAO 38/R2; △, PAO 937 (Hcr⁻); ▲, PAO 937/R2.

은 손상을 주나 정상세포는 thymine dimer 처럼 DNA 복제전에 제거수복되고 *uvrA*⁻ 세포에서는 죽기 쉽다(Kondo *et al.*, 1970). 또한 발암원인 NTG에 대해 *pol A*⁻와 *rec*⁻A 세포는 과민증상을 보이나 *uvrA*⁻ 세포는 민감하지 않고, X선에 의한 손상과 닮은 것으로 보고 되고 있다(Kondo *et al.*, 1970). *Hcr*⁻균주 PAO 937에 R₂ 획득은 4NQO 및 NTG에 대해 내성을 부여했다.

Plasmid R-Utrecht를 *Sal. typhimurium*의 DNA polymerase 결손주에 부여하면 γ 선 혹은 UV에 조사된 phage의 생산율을 증가시켰다. 즉 R-Utrecht에 의해 DNA polymerase I의 활성이 증가됨을 알았다(Macphee, 1974). 또 R-Utrecht에 의한 효과 발현이 *rec*⁻A주에서는 볼 수 없으므로 *E. coli*의 *recA*⁺에 상당하는 *Salmonella*의 유전자산물(Macphee, 1973)에 의존함을 알았다. 이 같은 내성부여는 plasmid에 code된 DNA polymerase에 의하나 숙주세포의 *recA*⁺유전자 산물에 의존한다. 또 *Sal. typhimurium*의 반복조사에 의한 내성화(Davies & Sinskey, 1973; Davies *et al.*, 1973)가 DNA polymerase 및 ligase 등의 활성증가때문이라고 보고하고 있다. R₂ plasmid 획득에 의한 내성증강이 DNA polymerase I의 상승에 의한 것인지 아닌지를 본 결과는 *Hcr*⁻균주 및 *Hcr*⁺균주에서 DNA polymerase I의 활성차이는 볼 수 없었다. 이곳에서 사용한 *Hcr*⁻주는 아직 엄밀한 유전해석이 되어있지 않은 것이나 적어도 *E. coli*에서의 *pol A*에 상당한 것은 아닌 것 같다. 따라서 이 조건하에서는 내성부여기구가 *E. coli*의 DNA polymerase I에 상당하는 효소에 의한 것이 아니라고 단언할 수 없으나 가능성은 매우 희박하며 현재 이 이상 상세한 것은 알 수 없다.

rec⁻균주의 R₂ plasmid 획득균은 UV(Cho, 1984b) 및 방사선 처리에 대한 감수성이 R⁻균과 같은 것으로 보아 숙주 *rec* gene에 상당하는 정보를 R₂ 인자는 갖고 있지 않으며 내성발현에는 숙주의 *rec* gene product가 관여함을 시사해 주고 있다. 환경요인의 하나로 최근 전세계에 널리 전파된 약제내성인자 R plasmid 혹은 공장 폐수 등의 난분해성 유기물의 분해계인자(degradative plasmid) 등 세균의 염색체외에 있는 유전정보인 plasmid의 획득으로 *Ps. aeruginosa*에서 UV 및 γ 선 내성을 증가시킨다는 사실을 확인했다(표 3). 표 3에서와 같이 방사선 이외의 factor, 즉 항생물질 같은 약제내성 plasmid 혹은 Benzene 핵을 가진 난분해성 유기물의 분해계 plasmid에 의해 방사선 내성화가 일어나는 것은 흥미롭다. 이러한 내성화는 미생물이 처해 있는 환경에서 유전정보를 증폭시킨 적응선택 결과로 볼 수 있다. 식품살균, 병원, 연구소에서 방사선 살균효과를 기대하고자 할 때 이들의 사실은 중요하고, 또 유전자 증폭에 의해 더욱 高度로 耐性化할 가능성을 시사하는 것이다.

REFERENCES

1. Axelrod, D.E., and H.I. Adler, (1969): Influence of the fertility episome on the survival of X-irradiated *E. coli*. *J. Bacteriol.* 98(1): 329.
2. Bridges, B.S., and R.J. Munson, (1966): Excision-repair of DNA damage in an autotrophic strain of *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22: 268-273.
3. Cho, B.G., (1984a): Increase of ultraviolet resistance by acquisition of plasmids in bacteria. *Kor. J. Aool. Microbiol. Bioene.* 12(2): 119-124.
4. Cho, B.C., (1984b): Increase of ultraviolet resistance by *Pseudomonas* strains. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioene.* 12(3): 179-183.
5. Davies, R., and A.J. Sinskey, (1973): Radiation-resistants of *Sal. typhimurium* LT2: Devoelpment and Characterization. *J. Bacteriol.* 114(1): 357-366.

6. Davies, R., A.J. Sinskey, and D. Botstein, (1973): Deoxyribonucleic acid repair in a highly radiation resistant strain of *Sal. typhimurium*. *J. Bacteriol.* 114(1): 357-366.
7. Drabble, W.T., and B.A.D. Stoker, (1968): R (transmissible drug resistance) factors in *Sal. typhimurium*: Pattern of transduction by phage p 22 and ultraviolet-protection effect. *J. Gen. Microbiol.* 53: 109-123.
8. Howarth, S., (1965): Resistance to the bactericidal effect of ultraviolet radiation conferred on Enterobacteria by the colicine factor *Col. I*. *J. Gen. Microbiol.* 40: 43-55.
9. Jacoby, G.A., (1974): Properties of R plasmids determining gentamycin resistance by acetylation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobiol. Agents and Chemotherapy* 6(3): 239-252.
10. Jacoby, G.A., (1975): Properties of R plasmids in *pseudomonas aeruginosa*. In: Microbiology- viology (1974) pp. 36-42 Washington DC: *Am. Soc. Microbiol.*
11. Kondo, S., H. Ichikawa, K. Iwo, and T. Kato, (1970): Base-change mutagenesis and prophage induction in strains of *E. coli* with different DNA repair capacities. *Genetics*, 66: 187-217.
12. Krishnapillai, V., (1975): Resistance to ultraviolet light and enhanced mutagenesis conferred by *pseudomonas aeruginosa* plasmids. *Mutation, Res.* 29: 363-372.
13. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
14. McCann, J., N.E. Spingarn, J. Kobori, and B.N. Ames., (1975): Detection of carcinogens as mutagens: Bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 72(3): 979-983.
15. Macphee, D.G., (1972): Effect of an R factor on resistance of *Salmonella typhimurium* to radiation and chemical treatment. *Mutation Res.* 14: 450-453.
16. Macphee, D.G., (1973): Effect of rec mutations on the ultraviolet protecting and mutation-enhancing properties of the plasmid. R-Utrecht in *Sal. typhimurium*. *Mutation, Res.* 19: 357-359.
17. Macphee, D.G., (1974): DNA polymerase activity determined by the ultraviolet protecting plasmid, R-Utrecht. *Nature.* 251: 432-434.
18. Okazawa, Y, and A. Matsuyama, (1967): A Note on Radiation Resistance of *Micrococcus radiodurans*. *Agric Biol. Chem.* 31: 1505-1508.
19. Siccardi, A.G., (1969): Effect of R factors and other plasmids on ultra-violet susceptibility and host cell reactivation property of *E. Coli*. *J. Bacteriol.* 100(1): 337-346.
20. 重松友道, (1968) :放射線測定法(大線量 γ 線測定 I, II). *Radioisotopes* 17(3): 47-56.

Increase of Ionizing Radiation Resistance by Acquisition of Drug Resistance Factor R₂ (Cb, Km, St) in *Pseudomonas* Strains

Bong-Gum Cho

Department of Biochemistry, College of Natural Science,
Kon-kuk University, Seoul, Korea

This study was carried out to examine the relation of acquiring R₂ (carbenicillin, kanamycin, streptomycin) plasmid in R₂ plasmid transconjugants of rec⁻, Her⁻ or R₉₃₁ plasmid and increasing of resistance to γ -ray and mutagens (4NQO, NTG) in *Pseudomonas aeruginosa*, and further to examine whether the genes which produce a DNA polymerase I is to be encoded in R₂ plasmid or not.

The results were as follows.

1. R₂ plasmid transconjugants were endowed with the resistance to UV, γ -ray and mutagens by acquiring R₂ plasmid in *Pseudomonas aeruginosa* PAO strain. But a different kind of the resistance was obtained from a variety of the transconjugants strains.
2. The Her⁻ and Hcr⁺ strains were endowed with the UV-resistance by acquiring R₂ plasmid through the changing of the shoulder and slope in dose-response survival curve. And Hcr⁺ strain only was endowed with γ -ray resistance through the shoulder, whereas Hcr⁻ strain only was endowed with mutagens (4NQO, NTG).
3. The fact that R₂ plasmid did not endow the host cells deficient of the recombination repair ability with the resistances suggests that the plasmid is not carrying any genetic information corresponding rec gene and rec gene products of host cells were involved in the development of the R₂-mediated resistances.
4. The production of DNA polymerase I was not elevated by acquiring R₂ plasmid in Hcr⁻ and Hcr⁺ strains. In accordance with this result, it may be possible that increasing of resistance by acquiring R₂ plasmid is to be attributed to DNA repair mechanism of rec gene product dependent.
5. The fact that the acquisition of resistance to UV and γ -ray is due to acquisition of drug resistant plasmid suggests that there are limits to make use of radiation sterilization in foodstuffs, hospitals and laboratories and degradative plasmid in industrial sewage and sludge disposal.