

***E. coli* DNA 회복에 미치는 플라스미드 pKM101과 pSL4의 mutator 기능**

전홍기 · 이상률 · 백형석

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Mutator Effects of Plasmid pKM101 and pSL4 to *E. coli* DNA Repair

Jun, Hong-Ki, Sang-Yull Lee and Hyung-Suk Baik

Department of Microbiology, College of Natural Sciences,

Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

ABSTRACT: The mutagenesis-enhancing plasmid pKM101 and its mutant pSL4 were introduced into *Escherichia coli* B/r strains possessing different DNA repair capacities (*phr*⁻, *recA*⁻, *uvrA*⁻, *uvrB*⁻) and determined the protection effect and mutagenecity for UV and MNNG. The mutability and protection effect of plasmid pKM101 and pSL4 were affected by different DNA repair capacity. The mutagenecity and resistance of two plasmids were increased against UV and MNNG, and plasmid pSL4 had a higher effect than pKM101. We suggest that the functional differences between pKM101 and pSL4 is due to the variety of mutator gene.

KEY WORDS □ pKM101; pSL4; mutator genes; *muc* gene; DNA repair

어떤 플라스미드들은 숙주에 걸여된 유전자 기능을 보완하여 주고 숙주에 항생제 내성들을 갖게 하며(Hardy, K., 1981) 또한 이들은 숙주에 존재할 때 UV조사에 대한 저항성을 증가시킬 뿐만 아니라 돌연변이 유발능도 증가시키는 것으로 알려져 있는데 이러한 플라스미드에는 R46(Drabble 등, 1968)과 이의 유도체 pKM101, R-utrecht(Macphee, 1972), colEI(Howarah, 1965, 1966) 등이 있고 이들 중 R46과 pKM101는 phage의 생존률과 돌연변이율 뿐만 아니라 자발적 돌연변이율도 증가시키는 것으로 보고되어 있다(Mortelmans 등, 1976). 그런데 플라스미드 pKM101은 임상적으로 분리된 R46의 유도체이며(Motelmans 등, 1976) 약 35.4 Kilobase의 N-incompatibility group이고(Datta 등, 1971) 유전자지도와 그 기능이 대략 알려져 있는데 *muc*, *bla*, *sto*, *tra* 유전자 등이 기능을 가지고 있다(Langer 등, 1981). 돌연변이원에 대한 저항성과 돌연변이율의 증가에 관련된 유전자는 *muc* 유전자이며(Shanabruch 등, 1980) pKM101은 *Salmonella typhi-*

murium LT-2(McCann 등, 1975)나 *Escherichia coli* K12(Goze 등, 1979; Waleh 등, 1979; Walker, 1977)의 error-prone repair 기능을 유발하며 관련유전자들 중 특히, *recA*와 *lexA*에 상호작용을 한다고 알려져 있다.

한편 플라스미드 pK101의 돌연변이체 pSL4는 *Salmonella typhymurium* 에서 MMS(methylmethanesulfonate)와 4-NQO(4-nitroquinoline-1-oxide)에 대한 돌연변이 유발능 뿐만 아니라 자발적 돌연변이율도 pKM101 보다 더 증가시키는 것으로 보고되어 있는데(Baik 등, 1982) 이는 pKM101의 어떤 부위에 돌연변이가 일어나 pKM101의 mutator 기능을 좀 더 높인 것이라 생각된다.

본 실험에서는 pKM101이 DNA 회복과 돌연변이율에 영향을 미치는 기작을 조사하기 위해 pKM101과 이의 돌연변이체 pSL4를 DNA 회복 기능이 걸여된 *Escherichia coli* B/r 균주들(*phr*, *recA*, *uvrA*, *uvrB*)에 도입하여 돌연변이원 UV와 MNNG를 처리했을 때 나타나는 보호효과와 돌연변이 유발양상을

Table 1. Bacterial strains used

Strain	DNA repair genotype	Other genotype Chromosome/plasmid	Source
1) <i>E. coli</i> B/r			
H/r30R	<i>uvr⁺ rec⁺</i>	<i>argFamb</i>	Haruko Ryo
H/r30	<i>uvr⁺ rec⁺</i>	<i>argFamb phr</i>	Haruko Ryo
HS30R	<i>uvrA⁻</i>	<i>argFamb tonB phr</i>	Haruko Ryo
HS30	<i>uvrB⁻</i>	<i>argFamb tonB phr</i>	Haruko Ryo
NG30	<i>recA⁻</i>	<i>argFamb tonB phr</i>	Haroko Ryo
2) <i>S. typhimurium</i> LT-2			
TA98	<i>uvrB⁻</i>	<i>hisD3052 rfa/pKM101</i>	B.N. Ames
SL464	<i>uvr⁺ rec⁺</i>	<i>hisG36/pSL4</i>	This work

조사하여 DNA 회복유전자의 플라스미드 pKM101과 pSL4의 mutator의 기능적 차이 및 상호관계를 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

실험에 사용한 균주와 그 특성을 Table 1과 같았고 DNA 회복기능이 결여된 *Escherichia coli* B/r 균주들은 Haruko Ryo(Osaka university)로부터 분양 받았고 *Salmonella typhimurium* LT-2 TA98과 SL464는 플라스미드 pKM101과 pSL4를 *E. coli* B/r균주에 도입하는데 사용하였다.

배지

균 배양과 conjugation에 의해서 플라스미드를 전달하는데 sodium chloride 0.5%가 첨가된 Difco Nutrient broth를 사용하였고 survival test에 이용된 Nutrient agar는 NB에 1.5% agar를 첨가하였다. 최소배지는 Vogel-Bonner medium(1956)을 사용하였고 돌연변이율 분석에는 Kondo 등(1970)의 방법에 따라 Semienrichment medium agar(VB minimal medium에 0.4% glucose, 0.5% NaCl, 5% Nutrient broth, 1.5% agar가 첨가된 배지)를 사용하였다.

UV와 chemical

UV조사는 2573 Å를 발산하는 15 W lamp(UVP Inc., CA 91178, USA)로 60cm 떨어진 곳에서 행하였다. UV sensor로 측정된 에너지 비율은 9.1erg/mm²sec이었다. 화학돌연 변이원인 MNNG(N'-Methyl-N-Nitro-N'-Nitrosoguanidine)은 Sigma 제품(ST Louis, MO, 63178, U.S.A.)을 사용하였다.

플라스미드 pKM101과 pSL4의 *E. coli* B/r 균주 내로의 도입

균의 conjugation은 nutrient broth에 정지상태에서

37°C에 하룻밤 배양한 donor cell 0.1 ml과 recipient cell 1 ml를 nutrient broth 9 ml에 각각 접종하여 37 °C에서 48시간 동안 정지 배양한 후 arginine(22 μg/ml)과 ampicillin(50 μg/ml)이 첨가된 VB minimal medium에 접종하여 37°C에서 48시간 배양시킨 뒤 colony를 관찰하였다.

돌연변이율과 생존률 측정

사용된 돌연변이원은 UV와 MNNG였고 돌연변이율과 생존률의 측정은 Kondo 등(1970)의 방법에 따라 실시하였다. 하룻밤 배양한 균주는 1/15M sodium phosphate buffer(pH 6.8)에 두번 세척하고 동일 buffer에 현탁한 후 30°C에서 1시간 동안 방치하였다. 이 현탁액을 에너지 비율에 따라 UV에 조사되거나 MNNG를 농도별로 처리한 후 1시간 동안 상온에 두고 1/15 M sodium phosphate로 두번 세척하여 MNNG를 제거한 것을 sample로 하였다. 돌연변이율 분석에서는 이 sample 0.1ml를 SEM agar에 접종하여 37°C에서 48시간 동안 배양한 후 영양요구주와 구별되는 Arg⁺ 복귀 돌연변이주의 큰 colony를 조사하였고 생존률의 측정은 적당히 희석된 sample 0.1 ml를 nutrient agar에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양한 후 colony를 측정하였다.

결과 및 고찰

플라스미드 pKM101과 pSL4를 DNA 회복기능이 다른 *Escherichia coli* B/r 균주에 도입하였고 두 플라스미드는 도입된 균주들에서 안정하였다. *recA* 유전자는 SOS repair 기작에서 repressor LexA 단백질을 절단하는 protease의 기능을 가지며 DNA 회복계에 중요한 역할을 한다고 알려져 있는데(Roberts 등, 1979) 이 유전자의 기능을 상실한 균주(NG 30)는 MNNG에 매우 민감하였으며 *recA* 균주에 도입된 pKM101과 pSL4는 UV와 MNNG에 대하여 wild type(H/r30R) 수준으로 보호효과를 나타내었고 UV와는 다르게 MNNG에 대하여 pSL4는 pKM101보다 높은 보호효과를 나타내었다(Fig. 1a와 Fig. 2a).

*Escherichia coli*에서 excision repair에 관계하는 *uvrA*와 *uvrB* 유전자는 *uvrC*와 더불어 UV에 손상받은 DNA의 절단에 필요한 endonuclease를 활성화시킴으로써 error-free repair에 중요한 역할을 하는데(Seeborg, 1978) 이들의 기능이 결핍된 *uvrA* (HS30R)와 *uvrB* (HS30R) 균주들은 UV에 매우 민감하였으며 도입된 pKM101과 pSL4는 UV에 보호효과를 나타내었다(Fig. 1b와 c). R46과 pKM101이 *uvrA* 와 *uvrB* 의 *E. coli* KI2균주에서 UV에 대하여 저항성을 보인 것처럼(Whleh 등, 1979) pKM101과 pSL4 Fig. 1b와 c에서 알 수 있듯이 UV에 보호효과를 나타내었고 특히, *uvrA* 균주에서 pKM101은 UV에 대하여 낮은 저항

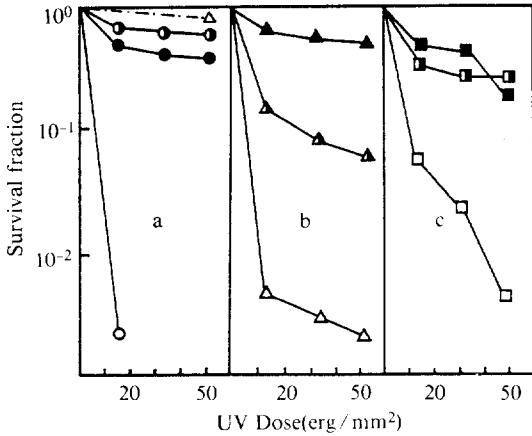


Fig. 1. Log-survival vs. UV-dose for *H/r30R* (△-△), *NG30* (○-○), *NG30/pKM101* (●-●), *NG30/pSL4* (●-●), *HS30R* (△-△), *HS30R/pKM101* (▲-▲), *HS30R/pSL4* (▲-▲), *HS30* (□-□), *HS30/pKM101* (■-■), and *HS30/pSL4* (◼-◼).

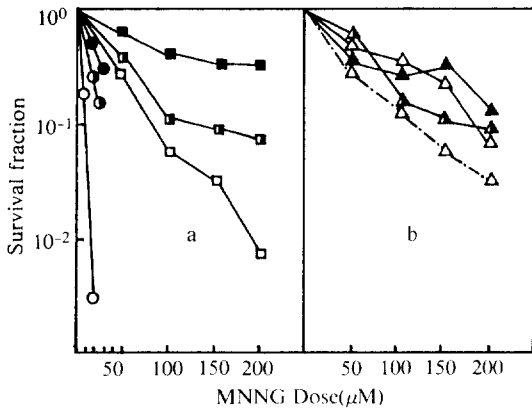


Fig. 2. Log-survival vs. MNNG-dose for *NG30* (○-○), *NG30/pKM101* (●-●), *NG30/pSL4* (●-●), *HS30* (□-□), *HS30/pKM101* (◻-◻), *HS30/pSL4* (■-■), *H/r30R* (△-△), *HS30R* (△-△), *HS30R/pKM101* (▲-▲), and *HS30R/pSL4* (▲-▲).

성을 보였지만 pSL4는 높은 보호효과를 나타내었다 (Fig. 1b와 c). 돌연변이원 MNNG는 *uvrB* 균주에 대하여 치사효과를 나타낼 반면에 *uvrA* (*HS30R*) 균주는 Wild type(*H/r30R*)과 비슷하게 MNNG에 높은 저항성을 보였다(Fig.2a와 b). *uvrB* 균주에서는 MNNG에 대하여 pKM101과 pSL4는 저항성을 보였고 pSL4는 pKM101 보다 높은 보호효과를 나타내었다 (Fig.2a)

Fig. 3.4는 UV 조사시 유발되는 돌연변이율에 비

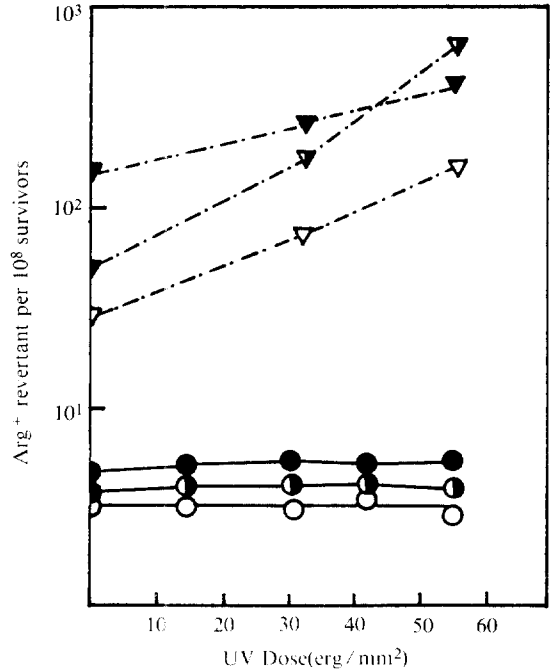


Fig. 3. UV-induced reversion of *H/r30* (▽-▽), *H/r30/pKM101* (▼-▼), *H/r30/pSL4* (▽-▽), *NG30* (○-○), *NG30/pKM101* (◐-◐), and *NG30/pSL4* (●-●) to Arg⁺.

치는 플라스미드 pKM101과 pSL4의 영향을 나타낸 것이다. Photoactivating 효소가 결합된 *phr* (*H/r30*)에 도입된 두 플라스미드는 UV에 대하여 돌연변이율을 증가시켰다(Fig. 3). *recA* (*NG30*) 균주는 UV에 대한 돌연변이능의 확실히 억제되었고 이 결과는 Kondo 등 (1970)의 보고와 일치하였다. 그리고 플라스미드 pKM101과 pSL4는 *recA* 균주에서 UV의 돌연변이 유발능을 회복시키지 못하였다(Fig. 3). R46과 pKM101은 *recA* 유전자의 손상이기 때문에 (Venturini 등 1978; Walker, 1978b) pSL4는 *recA* 유전자에 의존함을 나타내었다. *HS30R(uvrA)* 균주와 *HS30R(uvrB)* 균주는 UV에 대하여 돌연변이율이 급격히 증가하였고 두 균주에 도입된 플라스미드 pKM101과 pSL4는 돌연변이 유발능을 억제시켰으며 pSL4는 pKM101보다 돌연변이 유발억제 효과가 낮았다(Fig. 4). 이 결과는 error-free repair계가 결합된 두 균주들에서 UV에 유발되는 돌연변이가 급격히 증가한 것은 error-prone repair 기능을 활성화하는 pKM101과 pSL4가 이들의 기능을 억제함으로써 Arg⁺ 복귀돌연변이율을 감소시켰다고 생각된다.

MNNG에 유발되는 돌연변이에 미치는 pKM101과 pSL4의 영향을 조사한 결과를 보면 *recA* (*NG30*), *uvrA*

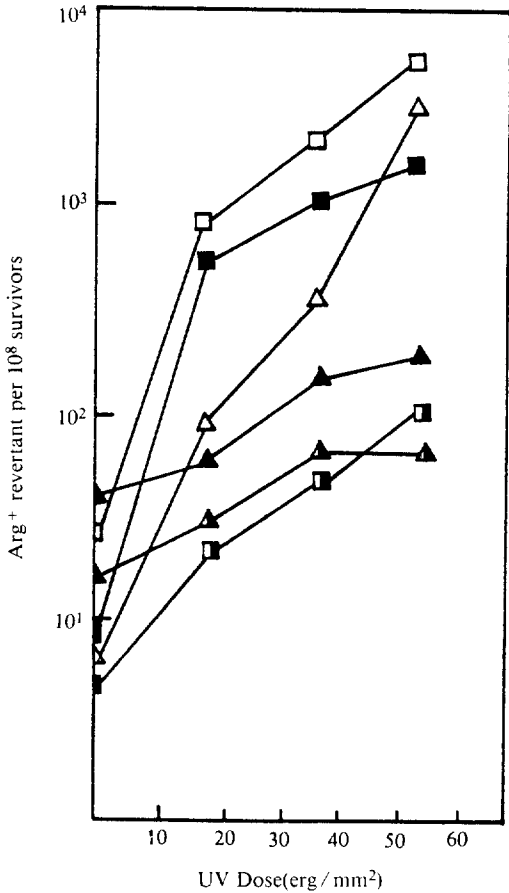


Fig. 4. UV-induced reversion of HS30R ($\Delta-\Delta$), HS30R/pKM101 ($\blacktriangle-\blacktriangle$), HS30R/pSL4 ($\blacktriangle-\blacktriangle$), HS30 ($\square-\square$), HS30/pKM101 ($\blacksquare-\blacksquare$), and HS30/pSL4 ($\blacksquare-\blacksquare$) to Arg⁺

(HS30R)과 *uvrB*(HS30) 균주들은 MNNG에 대하여 돌연변이율이 증가하였다(Fig. 5). *recA* 균주에 도입된 pKM101과 pSL4는 약간의 증가를 보였지만 큰 영향을

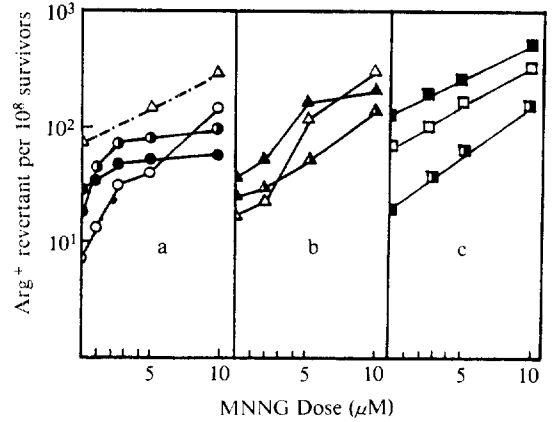


Fig. 5. MNNG-induced reversion of H/r30R ($\Delta-\Delta$), NG30 ($\circ-\circ$), NG30/pKM101 ($\bullet-\bullet$), NG30/pSL4 ($\bullet-\bullet$), HS30R ($\Delta-\Delta$), HS30R/pKM101 ($\blacktriangle-\blacktriangle$), HS30R/pSL4 ($\blacktriangle-\blacktriangle$), HS30 ($\square-\square$), HS30/pKM101 ($\blacksquare-\blacksquare$), and HS30/pSL4 ($\blacksquare-\blacksquare$) to Arg⁺

미치지 못하였고(Fig. 5a) *recA* 균주에 도입된 두 플라스미드는 돌연변이 유발능에 별다른 영향을 못 미쳤지만(Fig. 5b) *recB* 균주에 도입된 두 플라스미드는 돌연변이율을 증가시켰고 플라스미드 pSL4는 pKM101보다 높은 효과를 나타내었다(Fig. 5c).

DNA 회복 능력이 다른 *Escherichia coli* B/r 균주들에서 돌연변이원 UV와 MNNG에 대한 치사효과와 돌연변이 유발에 대한 실험결과는 Kondo 등(1970)의 보고와 거의 일치하였으며 도입된 pKM101과 pSL4의 영향은 DNA 회복능에 따라 상호관련성이 달랐고 pSL4는 pKM101보다 전반적으로 기능이 강화되었음을 알 수 있었다. 이와 같은 차이점은 두 플라스미드에 존재하는 mutator 유전자의 조절부위 또는 구조부위의 변화로 보여주기 때문에 이들 mutator 유전자에 대한 분자 유전학적 연구가 계속되어야 그 상호관련성이 밝혀지리라 생각된다.

적 요

Mutator 기능을 가지는 플라스미드 pKM101과 이의 돌연변이체 pSL4를 DNA 수복능력이 다른 *Escherichia coli* B/r (*phr*, *recA*, *uvrA*, *uvrB*) 균주들에 도입하여 돌연변이원인 UV와 MNNG에 대한 보호효과와 mutagenicity를 조사하였다. pKM101과 pSL4의 mutator 기능과 보호효과는 repair 기능에 따라 다르나 전반적으로 두 플라스미드의 UV와 MNNG에 대한 저항성과 돌연변이율을 증가시켰고 pSL4는 pKM101보다 그 효과가 높았다. 이러한 pSL4와 pKM101의 기능적 차이는 이들 플라스미드의 mutator 유전자상에 일어난 변이에 의한 것이라고 생각되었다.

사 사

본 연구는 1987년도 문교부 대학 부설 유전공학연구소 연구지원에 의한 것임.

참고문헌

1. **Baik, H.S., S.H. Kang and S.Y. Lee**, 1982. Induction and characterization of pKM101 mutants in *Salmonella typhimurium*. *Kor. Jour. Microbiol.* **20**, 89-97.
2. **Datta, N. and P. Kontomichalou**, 1965. Penicillinase synthesis controlled by infection R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature* **208**, 239-241.
3. **Drabble, W.T. and B.A.D. Stocker**, 1968. R(transmissible drug-resistance) factors is *Salmonella typhimurium*: pattern of transduction of phage P22 and ultraviolet-protein effect. *J. Gen. Microbiol.* **53**, 109-123.
4. **Goze, A. and R. Devoret**, 1979. Repair promoted by plasmid pKM101 is different from SOS repair. *Mutat. Res.* **6**, 163-179.
5. **Hardy, L.**, 1981. Bacterial plasmids. Thomas Nelson and Song Ltd. (Hong Kong) 3-20.
6. **Howarth, S.**, 1965. Resistance to the bactericidal effect ultraviolet radiation conferred on enterobacteria by the colicin factor Coll. *J. Gen. Microbiol.* **40**, 43-55.
7. **Howarth, S.**, 1966. Increase in frequency of ultraviolet induced mutation brought about by the colicin factor Coll in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.* **3**, 129-134.
8. **Kondo, S., H. Ishizawa, K. Iwo and T. Kato**, 1970. Base change mutagenesis and prophage induction is strains of *Escherichia coli* with different repair capacities. *Genetics* **66**, 187-217.
9. **Langer, P.J., W.G. Shanabruch and G.C. Walker**, 1981. Functional organization of plasmid pKM101. *J. Bacteriol.* **145**, 1310-1316.
10. **MacPhee, D.G.**, 1972. Effect of an R factor on resistance of *Salmonella typhimurium* to radiation and chemical treatment. *Mutant. Res.* **14**, 450-453.
11. **McCann, T., N.E. Spingarn and B.N. Ames**, 1974. Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 9790-983.
12. **Mortelmans, K.E. and B.A.D. Stocker**, 1976. Ultraviolet light protection, enhancement of ultraviolet light mutagenesis and mutator effect of plasmid R46 in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **128**, 271-282.
13. **Roberts, J. W., C.W. Roberts, N.L. Craig and E. Phizichy, E.**, 1979. Activity of the *Escherichia coli* *recA* gene product. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **43**, 917-920.
14. **Seeberg, E.**, 1978. Reconstitution of an *Escherichia coli* repair endonuclease activity from the separated *uvrA*⁺ and *uvrB*⁺ / *uvrC*⁺ gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2569-2573**.
15. **Shanabruch, W.G. and G.C. Walker**, 1980. Localization of the plasmid (pKM101) gene(s) involved in *recA*⁺ *lexA*⁺ dependent mutagenesis. *Mol. Gen. Genet.* **179**, 280-197.
16. **Venturini, S. and C. Monti-Bragadin**, 1978. R plasmid-mediated enhancement of mutagenesis in strains of *Escherichia coli* deficient in known repair functions. *Mutat. Res.* **50**, 1-8.
17. **Vogel, J.K. and D.M. Bonner**, 1956. Acetylornithase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.* **218**, 97-106.
18. **Waleh, N.S. and B.A.D. Stocker**, 1979. Effect of host *lex*, *recA*, *recF* and *uvrD* genotypes on the ultraviolet light-protecting and related properties of plasmid R46 in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **137**, 830-838.
19. **Walker, G.C.**, 1977. Plasmid (pKM101)-mediated enhancement of repair and mutagenesis: dependence on chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **152**, 93-103.
20. **Walker, G.C.**, 1978b. Lack of effect on recombination of mutagenesis-enhancing plasmids in *Escherichia coli* K-12 and *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Gen. Microbiol.* **180**, 321-323.

(Received April 21, 1990)

(Accepted May 25, 1990)