

## *Synechococcus* sp.의 광합성이 Cyanophage 증식에 미치는 영향

김 민\* · 최영길

한양대학교 자연과학대학 생물학과, 서울대학교 분자미생물학 연구센터

*Synechococcus* sp.의 cyanophage는 early, late viral function 모두 빛을 필요로 하는 것으로 나타났으며 증식 초기 2시간 동안 암처리한 경우 200%의 burst size를 나타내었다. Dark 상태에서의 *Synechococcus* sp.의 cyanophage 증식은 대조군에 비해 11%의 burst size를 나타내었다. 광합성 억제제인 DCMU를  $10^{-6}$  M로 처리했을 때 virus yield가 2%로 감소했으며  $10^{-4}$  M의 CCCP는 cyanophage의 증식을 거의 중지시켰다. 또한 이러한 숙주세포의 광합성 의존도는 LPP-1, N-1과 AS-1보다는 크나 SM-1보다는 작은 것으로 나타났다.

**KEY WORDS** *Synechococcus* sp., cyanophage, viral function, ATP, CO<sub>2</sub> photoassimilation, DCMU, CCCP, burst size

Cyanophage는 bacteriophage와 유사한 형태와 감염경로를 가지나 지금까지 알려진 cyanophage 모두 linear double stranded DNA를 유전자로 보유하고 넓은 범위의 pH, 이온 농도와 염분도에 분포한다(12). 또한 숙주세포가 광합성을 수행하며 남조류의 형태가 사상성, 단세포성, 군체성으로 다양한 까닭에 숙주세포와의 상호작용에 있어서 다양성을 가지며, 세대시간이 짧은 박테리아에 비해 남조류는 6.5~24시간의 doubling time을 가짐으로써(14) 남조류를 숙주로 하는 cyanophage 또한 bacteriophage에 비해 느린 증식률을 보인다.

Cyanophage가 숙주로 하는 남조류의 세포벽은 L<sub>I</sub>-L<sub>IV</sub>로 구성되며 L<sub>II</sub>는 전체 세포벽의 22~52%에 해당하는 peptidoglycan층이며 L<sub>IV</sub>는 lipopolysaccharide(LPS)층이다. 세포내 함유물로는 광합성 색소가 부착된 photosynthetic lamellae, glycogen granule, polyhedral body(carboxysome), cyanophycin granule, polyphosphate granule 등이 있으며 고등식물과 마찬가지로 산소를 발생하는 호기성의 광합성을 수행한다. 광합성 색소로는 chlorophyll a와 carotenoid, 그리고 thylakoid 막 바깥쪽으로 부착되어 있는 phycobilisome 안에 phycoerythrin과 phycocyanin이 다른 단백질들과 혼합되어 phycobiliprotein으로 존재한다. 이들의 광합성은 thylakoid막에 존재하는 photosystem I(PS I)과 photosystem II(PS II)에 의한 noncyclic photophosphorylation과 PS I만에 의한 cyclic photophosphorylation으로 나누어진다. 정상적인 조건하에서 전자에 의해 O<sub>2</sub>와 ATP, 그리고 CO<sub>2</sub> photoassimilation과 세포내 생합성에 필요한 NADPH가 생성된다. PS II의 cytochrome b로부터 plastocyanin으로의 전자전달을 억제함으로써 PS I에 의한 cyclic photophosphorylation

을 유도시키는(10) DCMU와 같은 uncoupling agent 처리시에는 noncyclic photophosphorylation의 2분의 1 정도에 해당되는 ATP만이 생성된다(11).

남조류를 light 상태에서 dark 상태로 옮겼을 때 세포내 ATP 농도가 갑자기 감소하며 CO<sub>2</sub> photoassimilation 또한 정지되었다가, 빛이 차단된 상태에서 계속 배양하면 빛을 주었을 때 세포내 축적해온 glycogen과 같은 다당류를 oxidative pentose phosphate cycle을 통해 분해시킴과 동시에 호흡을 통해 세포내 ATP 농도를 유지한다. 남조류에서는 이러한 dark-endogenous respiration rate가 특히 낮다고 알려져 있고 *Anabaena* 7122의 경우 photophosphorylation의 10%에 해당되며 이때 *Synechococcus* 6301의 세포내 NADPH 양이 감소된다고 알려져 있다. 또한 dark period가 12시간 이상으로 유지되는 diurnal cycle에 의한 성장에서 growth polymer 합성은 초기 dark 상태 몇 시간 동안만 지속된다고 한다. 반대로 남조류가 dark 상태에서 배양되다가 light 상태로 전환이 되면 *Euglena gracilis*의 세포내 전체 ATP 농도가 10~21% 증가되며 *Anacystis nidulans*의 경우도 유사한 양상을 띤다고 알려져 있다(8).

본 연구에서는 광합성 억제제인 DCMU와 CCCP를 사용하여 숙주세포인 남조류 *Synechococcus* sp.의 성장을 조절함으로써 cyanophage 증식의 광합성에 대한 의존성 여부를 조사하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 균 주

본 연구에 사용된 남조류 *Synechococcus* sp.(1)와 cyanophage(2)는 1991년에 경기도 백운 저수지에서

분리되었다.

#### 남조류의 배양

남조류는 modified Hughes(3) 배지를 이용하여 31~32°C, cool white fluorescence light 아래에서  $40 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ 의 조도로 배양하였다.

#### Cyanophage의 순수정제 및 보관

Cyanophage의 순수정제는 crude lysate 12~20 l를 Amicon XM-300을 이용하여 100배 농축시키고  $16,000 \times g$ 에서 2시간 원심분리한 후  $80,000 \times g$ 에서 40분간 sucrose density gradient centrifugation을 시행하였다(2).

Cyanophage의 plaque 형성은 숙주세포( $10^9$  cells/ml)와 0.1 ml의 phage 현탁액을 0.65% molten agar (top agar)에 최종 volume이 6.5 ml 되도록 섞은 후 modified Hughes 고체배지(bottom agar)위에 부어 굳힌 후 3일간 배양시켜 phage plaque 형성을 유도하였다(5).

Cyanophage의 보관은 상기와 같이 phage plaque가 형성된 평판배지에 5 ml의 CP(5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM NaCl, 10 mM N-tris(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethane sulfonic acid, pH 7.0) 완충용액을 첨가시켜 4°C에서 1일간 방치하였다. 그 후  $9,000 \times g$ , 4°C에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액에 0.2%의 chloroform을 첨가시켜 4°C에서 저장하되 phage titer는  $2 \times 10^7 \sim 4 \times 10^9$  PFU/ml로 하였다(9).

#### 증식곡선

숙주세포를  $3 \times 10^7$  cells/ml로 배양시켜 최종 MOI (multiplicity of infection)가 0.01이 되도록 순수정제된 cyanophage를 첨가시켜 30분간 31~32°C에서

cool white fluorescent light를 광원으로 하여  $40 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$  정도의 빛으로 배양시켰다. 이 배양액 25 ml를 20°C에서 30분간  $9,000 \times g$ 로 원심분리한 후 침전물을 새로운 modified Hughes 배지 25 ml에 현탁하여 다시 새 modified Hughes 배지 25 ml에  $10^{-2}$  vol.으로 접종시켜 1시간 내지 2시간 간격으로 24시간 동안 배양액을 취하여 plaque assay하였다(6).

#### Cyanophage 증식에 미치는 빛의 효과

증식곡선 측정 방법과 같이 실행하되 암처리에는 aluminum foil로 flask를 싸서 수행하였으며 시료는 2시간 간격으로 채취하였다.

#### 광합성 억제제의 처리

3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea(DCMU)의 stock solution은 5% ethanol에 녹여  $10^{-4}$  M로 만들어 사용하였다. Carbonyl-cyanide, m-chlorophenyl hydrazone(CCCP)의 stock solution은 4% ethanol에 녹여  $10^{-3}$  M로 하였다. 대조군 또한 해당량의 ethanol을 포함하도록 하였다(13).

## 결 과

#### Cyanophage 증식에 미치는 빛의 효과

빛이 cyanophage 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 phage 접종 후 빛의 조사시간을 조절하여 다음과 같은 결과를 얻었다. Cyanophage 접종 후 계속 dark 상태에서 배양하였을 때 light 상태에서 배양된 대조군에 비해 11%의 virus yield를 나타내었으며 latent period가 길어지는 현상이 나타났다(Fig. 1). 분리된 cyanophage의 rise period 말기인 12시간째에 빛을 제거한 경우 latent period는 대조군과 마찬가지로 5~6시간이었으나 감염된 세포로부터 방출되는 virus의 양은 감소하여(Fig. 1) 61%의 burst size를 나타내었다(Table 1). Cyanophage의 latent period인 2, 4시간과 rise period 중기에 해당되는 7시간째에 감염된 세포를 light에서 dark 상태로 옮긴 결과 virus 증식률이 현저하게 감소되었으며(Fig. 1) burst size는 각각 대조군의 3, 1, 5% 밖에 되지 않았다(Table 1).

반대로 여러 시간별로 phage가 접종된 숙주 배양액을 dark 상태에서 전배양한 후 light 상태로 옮겨 배양하였을 때 Fig. 2와 Table 2와 같았다. 암처리를

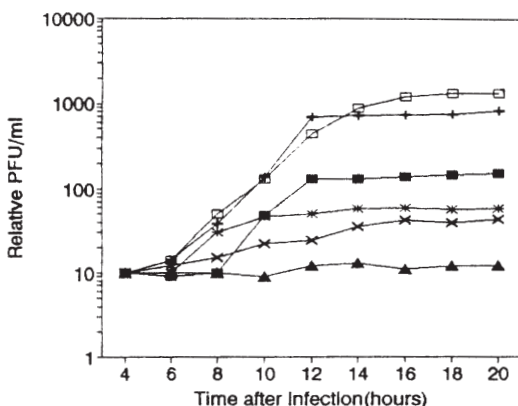


Fig. 1. Effect of light withdrawal on the growth of cyanophage of *Synechococcus* sp.

Symbols are the times at which the cultures were transferred from light to dark. □, continuous illumination; +, 12 hr; \*, 7 hr; ▲, 4 hr; ×, 2 hr; ■, continuous dark incubation.

Table 1. Effect of light withdrawal on the growth of cyanophage of *Synechococcus* sp.

Time after infection light withdrawn (hr)	Burst size (% of control)
0	11
2	3
4	1
7	5
12	61

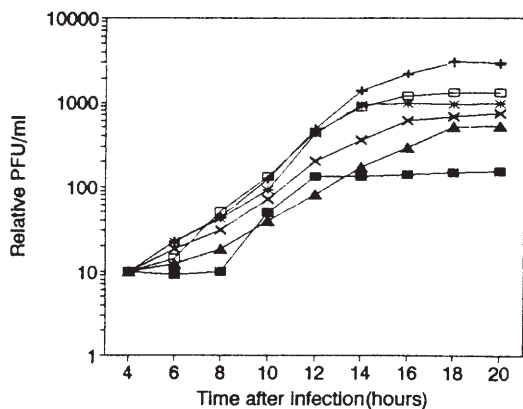


Fig. 2. Effect of dark pretreatment on the growth of cyanophage of *Synechococcus* sp.

Symbols are the times at which the cultures were transferred from dark to light. □, Continuous illumination; +, 2 hr; \*, 4 hr; x, 7 hr; ▲, 12 hr; ■, continuous dark incubation.

Table 2. Effect of pretreated darkness on the growth of cyanophage of *Synechococcus* sp.

Duration of darkness before illumination (hr)	Burst size (% of control)
2	213
4	77
7	63
12	39

2시간 한 경우 Fig. 2에서 보는 바와 같이 virus 증식률이 대조군보다 증가하여 대조군의 200% 되는 burst size를 나타내었으며(Table 2), 4, 7, 12시간 암처리하였을 때는 phage의 증식률이 감소하여(Fig. 2) 각각 대조군의 77, 63, 39%의 virus yield를 나타내었다(Table 2).

#### 광합성 억제제의 처리

숙주세포 광합성에 대한 cyanophage의 의존성 여부를 조사하기 위하여 DCMU와 CCCP를 상기와 같이 처리하였을 때 Fig. 3과 4에서 보는 바와 같이 virus 증식의 현저한 감소가 있었다. DCMU를  $10^{-6}$  M로 처리하였을 때 대조군의 2%에 해당하는 virus yield를 내었고,  $10^{-5}$  M의 DCMU를 처리하였을 때 빛이 있는 경우와 없는 경우 모두 burst size는 대조군의 1.8% 밖에 안되는 결과를 나타내었다(Table 3).

CCCP를  $10^{-4}$  M로 첨가시켜 light 상태와 dark 상태에서 virus를 증식시키려한 결과 burst size가 대조군의 0.5%에 그치는 것을 관찰하였다(Table 3).

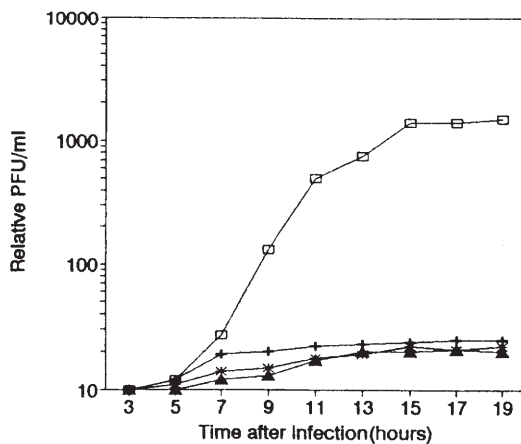


Fig. 3. Growth of cyanophage of *Synechococcus* sp. in the presence of photosynthetic inhibitor DCMU.

□, control; +,  $10^{-6}$  M DCMU; \*,  $10^{-5}$  M DCMU; ▲,  $10^{-5}$  M DCMU in dark.

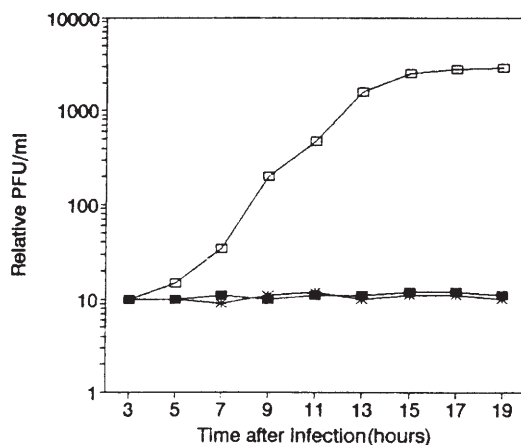


Fig. 4. Growth of cyanophage of *Synechococcus* sp. in the presence of photosynthetic inhibitor CCCP.

□, control; ■,  $10^{-4}$  M CCCP; \*,  $10^{-4}$  M CCCP in dark.

#### 고찰

Dark 상태에서 남조류는 세포내 축적된 glycogen과 같은 다당류를 이화시키고 호흡을 통하여 세포내 ATP를 유지하는데 본 *Synechococcus* sp.의 미세구조를 관찰했을 때 이러한 저장물이 관찰되지 않아 후자에 의한 ATP 형성이 dark 상태에서의 에너지 대사를 주도하는 것으로 보인다. Dark 상태에서의 *Synechococcus* sp. cyanophage의 증식은 대조군에 비해 11%의 burst size를 나타내었다. 이는 oxida-

**Table 3.** Effect of photosynthetic inhibitors on the growth of cyanophage of *Synechococcus* sp.

Concentration of inhibitor	Burst size (% of control)
$10^{-6}$ M DCMU	2
$10^{-5}$ M DCMU	1.8
$10^{-5}$ M DCMU, in dark	1.8
$10^{-4}$ M CCCP	0.5
$10^{-4}$ M CCCP, in dark	0.5

tive phosphorylation이 photophosphorylation에 비해 효율이 낮다는 것과  $\text{CO}_2$  photoassimilation이 중요한 역할을 한다는 것을 뜻한다. 그러나 dark 상태에서 5일 이상 phage의 증식이 중지되는 SM-1(11)이나 2%의 burst size를 나타내는 AS-1(4)에 비해 높은 증식률을 보이는 것은 AS-1과 SM-1의 각각의 숙주인 *S. cedrorum*이나 *S. elongatus*보다 본 *Synechococcus* sp.의 호흡에 의한 ATP 생성률이 높다는 것을 의미한다.

한편 빛을 분리된 cyanophage의 증식 초기인 2, 4, 7시간 동안 준 것이 dark 상태에서 증식시킨 것보다 더 낮은 burst size를 나타내었는데 이는 초기 증식기 동안에 light로 부터 dark 상태로의 전환으로 인한 숙주세포의 생리적 대사의 변화가 중요한 영향을 미친 것으로 보여진다. 즉 light에서 dark 상태로 전환이 되면 phycobilisome이 membrane energy transfer system으로부터 떨어져 나오고 ATP와  $\text{CO}_2$  고정에 갑작스럽게 중단되었다가 인산화가 매우 낮은 율로 진행되어 서서히 회복된다고 알려져 있는데(14), 이러한 일종의 세포내 대사의 chaos가 virus 증식에 있어서 결정적인 순간에 제한요소로 작용한 것이 아닌가 생각된다.

빛을 주어 virus를 증식시키기 전에 dark 상태에서 전배양한 결과 2시간의 짧은 전배양의 경우 그렇지 않은 대조군보다 200% 이상 burst size가 증가되었으며 이는 virus particle의 전구체 축적으로 인한 것이거나 숙주세포의 synchronization이 유도되었기 때문이라 사료된다. Cyanophage 접종 후 4, 7, 12시간 암처리한 경우는 대조군보다 저조한 burst size를 나타내었으며 light에서 dark 상태로의 전환의 경우보다는 높은 burst size를 나타내었다. 이는 dark 상태에서 light 상태로의 전환이 그 반대의 경우와는 달리 *Euglena gracilis*나 *Anacystis nidulans*에서 증명된 바와 같이 dark 상태에서 계속 배양했을 때보다 세포내 ATP가 10~20% 증가(14)하기 때문으로 사료된다.

이와 같이 빛의 조사시간과 때를 달리한 결과 virus의 early, late viral function 모두 빛을 필요로 하나 증식 전기 2시간까지는 관계없는 것으로 보인다.

광합성 억제제에 의한 영향은 사상성 남조류의

cyanophage인 LPP-1이나 N-1보다 컸으나 단세포성 남조류의 cyanophage인 SM-1보다는 작았고 AS-1보다는 컸다. DCMU는 PS II를 억제함으로써 NADPH와  $\text{O}_2$ 의 생성을 중지시키고 PS I에 의한 cyclic photophosphorylation을 유도하여 낮은 효율로 ATP를 생성시키는데 Table 3과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 2% 정도의 virus yield를 나타낸다는 것은 cyclic photophosphorylation에 의해 공급되는 ATP양이 cyanophage 증식에 부족하다는 것 뿐만 아니라 NADPH를 필요로 하는  $\text{CO}_2$  고정에 의존적이라는 것을 나타낸다. 따라서 cyanophage 감염에 있어서 광합성은 단지 ATP 공급만을 위한 것이 아니라  $\text{CO}_2$  photoassimilation을 위해서라는 결론이 나온다.

CCCP는 생체막의 proton conductivity를 증가시킴으로써 빛에 의한 전자전달의 결과로 기인된 수소이온 농도 구배를 소멸시킴으로써 ATP 합성을 중단시킨다(7). 뿐만 아니라 생체막 위에서 유지되는 이온농도 구배와 기질 수송이 coupling되어 있으므로 CCCP 처리는 생리적 기질과 그 analogue의 uptake를 방해한다(14). 암처리에 낮은 수준으로 일어나는 virus 증식이 electron transport level에서의 phosphorylation을 요구하느냐를 증명하기 위하여 위와 같은 기능의 CCCP를 처리하여 Fig. 4와 Table 3과 같은 결과를 얻었다. CCCP를  $10^{-4}$  M로 처리하였을 때 cyanophage의 증식이 거의 중지되었으며 이는 phage particle의 합성이 electron transport level에서의 phosphorylation을 요구한다는 사실을 시사한다.

앞에서도 언급했듯이 사상성 남조류의 cyanophage인 N-1과 LPP-1은 암처리에 의해 cyanophage 형성이 완전히 억제되지 않으며 DCMU는 단지 부분적으로 virus yield를 감소시키며 CCCP는 virus의 성장을 완전히 억제한다. 반면에 단세포성 남조류의 cyanophage인 SM-1은 숙주의 광합성으로 인한  $\text{CO}_2$  photoassimilation을 필요로 하며 암처리, DCMU, CCCP에 의해 virus 증식의 완전한 억제가 유도된다. 결론적으로, 본 *Synechococcus* sp.의 cyanophage는 숙주세포 광합성을 통한 ATP 생성과  $\text{CO}_2$  고정으로 virus 합성에 필요한 것들을 얻으며 이 의존도는 사상성 남조류의 cyanophage인 LPP-1이나 N-1과 단세포성 남조류의 cyanophage인 AS-1보다는 크나 또다른 단세포성 남조류의 cyanophage인 SM-1보다는 적은 것으로 나타났다.

### 감사의 말씀

본 연구는 1992년도 한국과학재단 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학 연구센터) 연구비 지원에 의해서 수행되었으므로 한국과학재단에 감사드립니다.



## 참 고 문 헌

1. 김 민, 최영길, 1992. 경기도 5개 저수지에 우점하는 남조류의 순수분리. 한국육수학회지 **25**, 113-119.
2. 김 민, 최영길, 1992. 부영양화 수역에서의 cyanophage의 분리와 동정. 한국미생물학회지 **30**, 524-527.
3. Allen, M.M., 1968. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *J. Phycol.* **4**, 1-4.
4. Allen, M.M. and F. Hutchison, 1976. Effect of some environmental factors on cyanophage AS-1 development in *Anacystis nidulans*. *Arch. Microbiol.* **110**, 55-60.
5. Currier, T.C. and C.P. Wolk, 1979. Characteristics of *Anabaena variabilis* influencing plaque formation by cyanophage N-1. *J. Bacteriol.* **139**, 88-92.
6. Dzelzkalns, V.A., M. Szekeres, and B.J. Mulligan, 1988. The molecular biology of cyanobacteria. p. 277-299. In C.H. Shaw (ed.), Plant molecular biology. IRL Press, Oxford.
7. Foyer, C.H., 1984. Photosynthesis. Wiley-Interscience Publication, New York.
8. Ho, K.K. and D.W. Krogmann, 1982. Photosynthesis, p.191-214. In N.G. Carr and B.A. Whitton (eds.), The biology of cyanobacteria. University of California Press, Berkeley and Los Angeles.
9. Hu, H.-T., T. Thiel, and T.H. Giddings, Jr., 1981. New *Anabaena* and *Nostoc* cyanophages from sewage settling ponds. *Virology* **114**, 236-246.
10. Krogmann, D.W., 1973. Photosynthetic reactions and components of thylakoids, p.80-98. In N.G. Carr and B.A. Whitton(eds.), The biology of blue-green algae. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
11. Mackenzie, J.J. and R. Haselkorn, 1972. Photosynthesis and the development of blue-green algal virus SM-1. *Virology* **49**, 517-521.
12. Padan, E. and M. Shilo, 1973. Cyanophages-viruses attacking blue-green algae. *Bacteriol. Rev.* **37**, 343-370.
13. Sherman, L.A. and R. Haselkorn, 1971. Growth of the blue-green algae virus LPP-1 under conditions which impair photosynthesis. *Virology* **45**, 739-746.
14. Smith, A.J., 1982. Modes of cyanobacterial carbon metabolism, p.47-85. In N.G. Carr and B.A. Whitton(eds.), The Biology of cyanobacteria. University of California Press, Berkeley and Los Angeles.

(Received October 25, 1993)

(Accepted January 19, 1994)

---

**ABSTRACT : Influence of the Photosynthesis of *Synechococcus* sp. on the Development of its Cyanophage**

**Kim, Min\* and Yong-Keel Choi** (Department of Biology, Hanyang University, Seoul 133-791, and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

Light appears to be needed in the early and late function of the cyanophage of *Synechococcus* sp. and dark treatment during the first 2 hr of the replication cycle increased the virus yield to 200%. The burst size of the cyanophage multiplied in *Synechococcus* sp. in dark was 11% of that of control. The viral multiplication was reduced 2% in the presence of photosynthetic inhibitor, DCMU of  $10^{-6}$  M, and nearly blocked in  $10^{-4}$  M CCCP. These data suggested that the photosynthetic dependence of the cyanophage is greater than those of LPP-1 and AS-1, and smaller than SM-1.