

***Lactobacillus casei* Phage J1 Genome의 Cohesive End Site 염기배열**

김영창* · 성학모 · 강현삼¹

충북대학교 자연과학대학 미생물학과, ¹서울대학교 자연과학대학 미생물학과

*Lactobacillus casei*에 감염하는 bacteriophage J1 게놈의 cohesive end site (cos)의 염기배열을 결정하였다. 또한 환형 cos와 선형 J1 DNA의 왼쪽 말단 염기배열을 비교한 결과 terminase가 절단하는 위치는 다음과 같았다.

5'- GGTCTGGCC ↓ -3'
3'- ↑ CCAGCCGG -5'

J1 게놈의 cohesive end는 3' 말단이 돌출되어 있으며 8개의 뉴클레오티드로 이루어져 있고 G+C 함유율이 87.5%이었다. cos 부위는 선형 DNA의 왼쪽 5' 말단 뉴클레오티드의 위치를 +1로 정하였을 때 -33부터 +25까지 대칭이었다. 지금까지 보고된 phage들의 cos 부위 사이에 상동성은 발견되지 않았다.

KEY WORDS □ *Lactobacillus casei*, bacteriophage J1, cohesive end site

최근 분자유전학 분야의 괄목할만한 발전에도 불구하고 발효, 식품 및 의료 분야에서 많이 이용되고 있는 유산균의 일종인 *Lactobacillus casei*에 대한 연구는 매우 더딘 실정이다. 그 이유는 아직 효율적인 클로닝 vector와 이의 세포내 도입 방법이 개발되어 있지 못하기 때문이다. 현재 *L. casei*에서는 다른 속이나 종에서 개발된 플라스미드 vector들을 주로 이용하고 있으며 이들을 *L. casei*에 형질전환할 때는 spheroplast, liposome (17) 또는 electroporation (2) 등의 방법을 이용하고 있으나 아직 형질전환 빈도가 낮은 문제점이 있다. 이는 *L. casei*가 많은 양의 DNase를 분비하기 때문인 것으로 알려져 있다 (17). 그러므로 phage vector 또는 cosmid vector를 이용한 *in vitro* packaging 방법을 개발하는 것이 필요하다.

*L. casei*에 감염하는 phage J1 (5)은 대장균에 감염하는 phage λ와 형태적으로 매우 유사하다 (8). J1 게놈은 약 42 kbp의 선형의 두가닥 DNA로서 λ에 비해 약간 작은 편이며 제한효소지도가 작성되어 있다 (7). 전자현미경으로 관찰하면 선형 DNA 뿐만 아니라 원형 DNA도 확인할 수 있으며 (6), 또한 제한효소로 절단한 J1 DNA 시료를 가열 처리하느냐 하지 않느냐에 따라 전기영동할 때 양쪽 말단의 절편이 다르게 전개되기 때문에 (7) λ와 마찬가지로 J1 DNA의 양쪽 말단에도 cohesive end가 존재하는 것으로 보고된 바 있다.

본 연구에서는 *L. casei*에 이용하기 위한 cosmid vector와 *in vitro* packaging 방법을 개발하기 위하여 일차적으로 J1 phage DNA의 cohesive end site

(cos)의 염기배열과 terminase의 절단위치 (nicking site)를 결정하고 그 구조를 분석하였다.

재료 및 방법

Phage 및 숙주균

L. casei S-1을 phage J1의 숙주균으로 사용하였다. Phage DNA의 분리정제

Phage를 증식시키기 위한 MRT 배지의 조성, 숙주균의 배양조건, phage의 감염비율, CsCl gradient 원심분리법에 의한 phage의 순수분리 및 DNA의 분리정제 등은 전보 (7)의 방법을 그대로 사용하였다.

DNA 조작

제한효소 *AccI*, *EcoRI*, *PstI*은 Biolabs에서, *TaqI*, T4 DNA ligase는 제철화학에서 구입하였다. Phage DNA의 제한효소 절단, 시료의 열처리 및 전기영동 등은 전보 (7)의 방법을 그대로 사용하였다. 플라스미드 DNA의 추출, 제한효소 절편의 회수, M13mp19를 이용한 subcloning 및 형질전환 등의 DNA 조작은 기본적으로 Sambrook 등 (15)의 방법에 따랐다.

염기배열 결정

환형의 cos 부위 염기배열은 Sequenase version 2.0 kit (United States Biochemical Co.)와 [α -³²S] dATP (New England Nuclear Co.), forward/reverse primer를 사용하여 Sanger 등 (16)의 dideoxy-mediated chain termination 방법으로 결정하였다. 염기배열은 양쪽 DNA 가닥을 2회 이상 확인하여 결정하였다.

선형 DNA의 왼쪽 말단 염기배열은 다음과 같이 두 가지 방법으로 결정하였다. 아랫가닥의 왼쪽 말단 염기배열은 terminal deoxynucleotidyl transferase와 [α - 32 P] cordycepin 5'-triphosphate (New England Nuclear Co.)로 3' 말단에 표지하고 Maxam과 Gilbert (12)의 화학적인 방법에 따라 결정하였으며, 윗가닥의 왼쪽 말단 염기배열은 Silver sequence kit (Promega Co.)와 위에서 밝혀진 배열을 토대로 화학합성한 primer를 사용하여 결정하였다.

염기배열의 컴퓨터 분석

NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA)의 RETRIEVE E-mail Server를 이용하여 다양한 phage의 cohesive end 부위의 염기배열에 관한 자료를 얻었다. 이 자료를 분석이 가능한 형태의 자료로 가공하기 위하여 GENet (Y.C. Kim, Chungbuk National University, Korea)를 이용하였으며, 염기배열의 분석은 DNASIS (Hitachi Co.)와 NCBI의 BLAST E-mail Server (1)를 이용하였다.

염기배열 수납번호

본 논문에서 결정한 염기배열을 GenBank, EMBL, DDBJ에 수납번호 (accession number) U 04272로 등록하였다.

결과 및 고찰

cos 부위의 염기배열과 terminase의 절단위치

cos 부위의 염기배열과 terminase의 절단위치를 결정하는데 사용한 전략을 Fig. 1에 나타내었다. 먼저 환형 cos 부위의 염기배열을 결정하였는데, cos DNA는 pJE804 (9)에서 얻었다. pJE804는 phage J1 DNA를 제한효소 *EcoRI*로 처리하여 왼쪽 cohesive end site (cosL)를 포함하는 2.65 kbp 절편과 오른쪽 cohesive end site (cosR)를 포함하는 1.15 kbp 절편이 연결된 상태로 삽입되어 있는 플라스미드이다. 전보 (9)의 제한효소지도를 토대로 pJE804

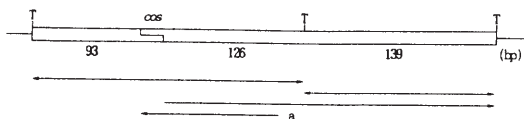


Fig. 1. Restriction map and sequencing strategy of the cos site.

The box represents the region of which the nucleotide sequence was determined. Restriction sites used for subcloning into M13mp19 DNA are indicated by vertical lines. Horizontal arrow-headed lines indicate the extent and the direction of sequencing. The letter 'a' indicates the synthetic oligonucleotide primer. T, *TaqI*; cos, cohesive end site.

DNA를 *Bam*HI과 *Pst*I로 절단하여 1.18 kbp 절편을 회수하고, 이를 *Taq*I으로 다시 절단하여 cos 부위를 포함하는 219 bp 절편과 바로 오른쪽에 위치한 139 bp 절편을 각각 M13mp19 RF DNA의 *Acc*I 위치에 클로닝하였다. 이 재조합 phage DNA들을 주형으로 사용하고 forward primer와 reverse primer를 사용하여 Sanger 등 (16)의 dideoxy chain termination 방법에 따라 염기배열을 결정하였다.

Terminase가 cos를 인식하여 절단하는 위치를 알아보기 위하여 선형 J1 DNA의 왼쪽 말단 염기배열을 결정하였다. Phage J1 입자에 존재하는 선형 DNA를 추출한 다음 제한효소 *EcoRI*으로 처리하여 cosL을 포함하는 2.65 kbp 절편을 회수하였다. 먼저 아랫가닥의 염기배열을 알아보기 위하여 분리한 cosL 절편을 3' 말단에 표지한 다음 *Bam*HI으로 절단하고 cosL을 포함하는 580 bp 절편을 분리하였다. 이를 화학적인 방법으로 염기배열을 결정한 결과 선형 J1 DNA에서 아랫가닥의 3' 말단 염기배열은 3'-CCA-GCCGG-5'로 밝혀졌다. 그리고 219 bp *Taq*I 절편과 139 bp *Taq*I 절편이 게놈 상에서 바로 인접하여 있다는 사실을 확인할 수 있었으며, 두 절편의 염기배열을 제대로 연결할 수 있었다 (Fig. 2). 다음에는 J1 DNA에서 윗가닥의 5' 말단 염기를 확인하기 위하여 뉴클레오티드 번호 117부터 101까지에 해당하는 올리고뉴클레오티드 primer (5'-TTGCAACACTTT-GTATT-3')를 합성하고, 분리한 cosL 절편의 윗가닥

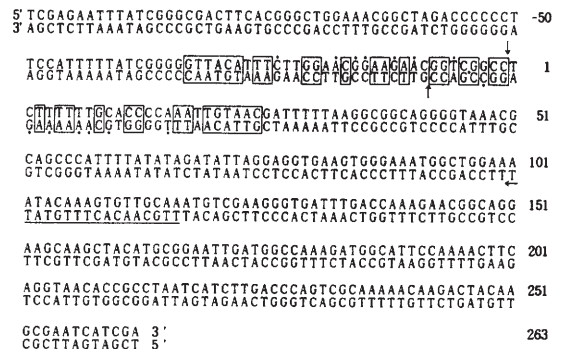


Fig. 2. The nucleotide sequence of the cohesive end site of the circular J1 DNA.

The site where terminase introduces nicks are indicated with arrows. Nucleotide number 1 corresponds to the 5' terminus of the left end of linear J1 DNA. Base pairs in the nicking site showing two-fold rotational symmetry are boxed and base pairs showing conserved purines or pyrimidines are dotted. The symmetry axis is noted with a dot between -5 and -4 bp. The nucleotide sequence that was used to design the primer is indicated as a horizontal arrow-headed line.

Table 1. Comparison of cohesive ends among various bacteriophages.

Host	Phage	Nucleotide sequence and nicking sites	Size (nt)	mol% G + C	References
<i>Escherichia coli</i>	λ	↓ GGGCGGCGACCT CCCCCGCTGGA ↑	12	83.8	18
<i>Escherichia coli</i>	P2, P4	↓ GGCGAGGCGGGAAAGCAC CCGATCCGCCCTTTCTGTG ↑	19	73.7	19
<i>Bacillus subtilis</i>	ϕ 105	GCGCTCC ↓ ↑ CGCGAGG	7	85.7	3
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	L5	GGTCGGTTA ↓ ↑ CCAGCCAAT	9	55.6	14
<i>Streptomyces</i>	ϕ C31	CCCGGCCCCA ↓ ↑ GGGCCGGGGT	10	90.0	10
<i>Streptomyces lividans</i>	R4	CGCCGTGTCTT ↓ ↑ GCGGCACAGAA	11	63.6	13
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	ϕ LC3	GTGACGGCGTGAA ↓ ↑ CACTGCCGCACTT	13	61.5	11
<i>Lactobacillus casei</i>	J1	GGTCGGCC ↓ ↑ CCAGCCGG	8	87.5	This work

을 주형으로 중합반응하였다. 이 시료를 환형 *cos* DNA를 주형으로 sequencing 반응을 시킨 시료들과 나란히 전기영동하여 5' 말단 염기가 T임을 알 수 있었으며, 이를 J1 계놈의 뉴클레오티드 번호 1로 정하여 Fig. 2에 나타내었다.

이와같이 결정된 선형 J1 DNA의 왼쪽 말단 염기 배열과 환형 *cos*의 염기배열을 비교하여 보면 J1 phage의 terminase가 *cos*를 인식하여 절단하는 위치는 윗가닥이 -1과 +1 사이이고 아랫가닥이 -9와 -8 사이임을 알 수 있다 (Fig. 2).

cos 부위의 구조적 특징

J1 DNA의 cohesive end를 지금까지 보고된 다른 종류의 phage들과 비교하였다 (Table 1). J1의 경우는 λ phage와는 달리 3' 말단이 돌출되어 있으며 뉴클레오티드가 8개로 비교적 짧은 형태이었다.

cos 부위의 구조적 특징은 2가지 측면에서 의미를 생각해 볼 수 있다. 첫째, DNA를 복제할 때는 반드시 primer가 필요하기 때문에 linear replicon에서는 양쪽 3' 말단 부위를 복제할 수 없는데 *cos*를 지닌 phage들은 세포 안에서 양쪽 말단의 cohesive end가 결합하여 환형을 이루기 때문에 복제가 가능하게 된다. 그러므로 cohesive end가 서로 잘 결합되도록 G+C 함유율이 일반적으로 높다. J1의 G+C 함유율은 87.5%로서 다른 종류의 phage들에 비해 높은 편이었다. 이것은 J1의 cohesive end 크기가 작은 것을 보완하기 위한 것으로 사료된다.

둘째, DNA가 복제된 다음 concatemeric DNA는 정확히 계놈 크기로 절단되고 항상 일정한 방향으로 prohead에 주입되는 데 이는 terminase가 *cos* 부위를

인식함으로써 가능해진다는 점이다. 즉 phage λ 의 연구에서 밝혀진 바에 의하면 terminase의 작용에 필요한 *cos*는 *cosN* (nicking)과 *cosB* (binding)로 구성되어 있는데 *cosN*은 환형 λ 계놈에서 cohesive end의 중앙을 기점으로 -22에서 +24 뉴클레오티드 사이에 위치하고 *cosB*는 +51에서 +120 뉴클레오티드 사이에 위치한다 (4). 이와같이 *cos*가 비대칭적 구조를 갖고 있기 때문에 λ DNA가 항상 *NuI*에서 *Rz* 유전자 쪽으로 packaging될 수 있는 것이다. λ 의 *cosN*을 이루는 -22에서 +24 뉴클레오티드 사이에서 대칭을 보이는 부분은 cohesive end의 중앙을 축으로 22 bp에 지나지 않는다. 이에 비해 J1의 *cosN* 부위는 cohesive end의 중앙을 축으로 -33부터 +25까지 58 bp가 대칭으로 되어 있다 (Fig. 2). 이와 같이 커다란 대칭구조를 갖는 것은 매우 특이하다.

지금까지 보고된 여러 종류의 phage들에 있어서 *cos* 부위의 염기배열들 간에 유사성이 발견되지 않았기 때문에 terminase와 *cos*간의 상호작용은 매우 다양하게 진화되어온 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 과학재단의 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

참 고 문 헌

- 1 Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman, 1990. Basic local alignment

- search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
2. Chassy, B.M. and J.L. Flickinger, 1987. Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **44**, 173-177.
 3. Ellis, D.M. and D.H. Dean, 1985. Nucleotide sequence of the cohesive single-stranded ends of *Bacillus subtilis* temperate bacteriophage ϕ 105. *J. Virol.* **55**, 513-515.
 4. Feiss, M., W. Widner, G. Miller, G. Christiansen, and S. Johnson, 1983. Structure of the bacteriophage lambda cohesive end site: Location of the sites of terminase binding (*cosB*) and nicking (*cosN*). *Gene* **24**, 207-218.
 5. Hino, M. and N. Ikebe, 1965. Studies on the lactic acid bacteria employed for beverage production: Part II. Isolation and some properties of a bacteriophage infected during the fermentation of lactic acid beverage. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **39**, 472-476.
 6. Khosaka, T., 1977. Physicochemical properties of a virulent *Lactobacillus* phage containing DNA with cohesive ends. *J. Gen. Virol.* **37**, 209-214.
 7. Kim, Y.C. and H.S. Kang, 1985. Classification and characterization of bacteriophages of *Lactobacillus casei*: Analysis of restriction patterns of phage DNA. *Kor. J. Microbiol.* **23**, 115-121.
 8. Kim, Y.C., M.C. Park, K.H. Kang, Y.H. Yoon, and K.W. Lee, 1979. Classification and characterization of bacteriophages of *Lactobacillus casei*. *Kor. J. Microbiol.* **17**, 165-178.
 9. Kim, Y.C., Y.S. Gil, and K.S. Youn, 1991. Construction of cosmids containing cohesive end sites of *Lactobacillus casei* phage J1 and *in vitro* assay of terminase. *Genet. Eng. Res.* **5**, 17-25.
 10. Kobler, L., G. Schwertfirm, H. Schmieger, A. Bolotin, and I. Sladkova, 1991. Construction and transduction of a shuttle vector bearing the *cos* site of *Streptomyces* phage ϕ C31 and determination of its cohesive ends. *FEMS Microbiol. Lett.* **78**, 347-354.
 11. Lillehaug, D., B.H. Lindqvist, and N.K. Birkeland, 1991. Characterization of ϕ LC3, a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* temperate bacteriophage with cohesive single-stranded DNA ends. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3206-3211.
 12. Maxam, A.M. and W. Gilbert, 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 560-564.
 13. Mitsui, H. and H. Takahashi, 1992. Delimitation of cohesive ends site (*cos*) of *Streptomyces* temperate bacteriophage R4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 1663-1668.
 14. Oyaski, M. and G.F. Hatfull, 1992. The cohesive ends of mycobacteriophage L5 DNA. *Nucl. Acids Res.* **20**, 3251.
 15. Sambrook, J., F. Fritsch, and T.E. Maniatis, 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York.
 16. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
 17. Shimizu-Kadota, M. and S. Kudo, 1984. Liposome-mediated transfection of *Lactobacillus casei* spheroplast. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 1105-1107.
 18. Wu, R. and E. Taylor, 1971. Nucleotide sequence analysis of DNA: II. Complete nucleotide sequence of the cohesive ends of bacteriophage λ DNA. *J. Mol. Biol.* **57**, 491-511.
 19. Ziermann, R. and R. Calendar, 1990. Characterization of the *cos* sites of bacteriophages P2 and P4. *Gene* **96**, 9-15.

(Received April 12, 1994)

(Accepted April 25, 1994)

ABSTRACT: Nucleotide Sequence of the Cohesive End Site of *Lactobacillus casei* Phage J1 Genome

Kim, Young-Chang*, Hark-Mo Seong, and Hyen-Sam Kang¹ (Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, and ¹Department of Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

The nucleotide sequence of the cohesive end site (*cos*) of *Lactobacillus casei* phage J1 genome was determined. Comparison between the nucleotide sequences of the circular *cos* and the left end of the linear J1 DNA showed that the nicking sites of the terminase were as follows:



The cohesive single-stranded ends of J1 were found to be 3'-protruding and composed of 8 nucleotides. The mol% G+C of the cohesive ends was 87.5. The *cos* site shows dyad symmetry from -33 to +25 bp if the 5' terminal nucleotide of the left end of the linear J1 DNA is numbered +1. No homology was found among the *cos* sites of phages reported so far.