

어병 세균 *Lactococcus garvieae* KG- 균주 특이 단백질 생산 유전자의 해석

박찬일 · 박수일
부경대학교

서론

연쇄구균증은 1974년 일본 방어(*Seriola quinqueradiata*) 양어장에서 처음 발생 보고된 이래 우리 나라에서도 매년 하절기를 중심으로 전국 각지의 양어장에 큰 경제적 손실을 입히는 중요한 어병 세균으로 알려져 있다(Kusuda *et al.* 1976, Kitao *et al.* 1979). 본 균의 혈청형에 대해서는 KG7409(Kusuda, 1974) 균주의 항혈청에 대하여 응집 반응을 보이는 균을 KG+, 응집 반응이 일어나지 않는 균주를 KG-로 구분하고 있다. KG-균주의 항원구조는 KG+항혈청에 대하여 응집저해작용을 나타내는 특이적인 단백질과 KG+균주와의 공통항원을 모두 가지는 것으로 알려져 있다. 그리고 KG+와 KG-균주의 병원성을 비교한 결과 KG-균주가 더욱 높은 병원성을 가지는 것이 확인되었다(Kitao, 1983). 본 균의 KG-균주가 정상 방어의 혈청에 의한 opsonize가 저하되고 두신 macrophages의 식작용에 저항성을 나타내는 것으로 보아 헤파과 유사한 물질을 가질 가능성과 이런 물질이 본 균의 중요한 병원성 인자로 생각된다(Yoshida *et al.*, 1996).

본 연구의 목적은 *L. garvieae* KG-균주가 가지는 특이적 단백질의 병원성을 해명 할 목적으로 *L. garvieae* KG-균주의 염색체 library를 작성하여 KG-균주가 가지는 특이적 단백질을 생산하는 유전자를 cloning하고, 염색체 library screening을 통해 특이적 단백질을 생산하는 유전자의 전장을 밝혀 KG-균주의 특이적 단백질을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

유전자 library 제작 및 *L. garvieae* KG-균주 특이적 항원생산 유전자의 screening : 항 *L. garvieae* 토끼 혈청을 제작하여 항혈청을 이용한 응집실험으로 KG+균주와 KG-균주를 구별하고 항 KG-균주 특이적 토끼혈청 제작을 위해 KG+균주로 흡착시켰다. Library 제작을 위해 *L. garvieae* SA8201균주의 염색체 DNA를 추출 및 정제하고 염색체 DNA를 *Sau3A* 제한효소로 부분소화의 적정조

건을 결정하고 소화시켰다. 약 1,000-2,000bp 정도의 단편을 cloning하기 위해 pUC119 vector에 연결시키고 host cell인 대장균 JM109에 transformation시켜 특이 KG-항혈청을 이용해 colony hybridization으로 screening하였다. 나타난 positive clone이 KG-균주에서만 발현되는 유전자를 확인하기 위해 RT-PCR을 행하였다.

RT-PCR : *L. garvieae* KG-주 특이적 항원생산 유전자의 발현을 확인하기 위하여 KG+균주와 KG-균주의 total RNA를 분리하고 single strand cDNA를 합성하였다. 이것을 주형으로 RT-PCR을 실시하였다.

DNA 염기배열 결정 : 위의 colony hybridization에서 얻어진 positive clone을 cycle sequence 법에 의해 염기서열을 결정하였다.

KG-균주 특이적 항원 생산 유전자의 전장해석 : 양성 clone을 probe로 이용하여 plaque hybridization으로 complete sequence를 밝혀내고자 하였다.

결과 및 요약

L. garvieae KG-균주 특이적 항원 생산 유전자 5개의 clone을 얻었다. 다섯 개의 clone은 SA1B05, SA1B10, SA2F01, SA8A11 및 SA9H10으로 부분 및 전체 염기배열을 결정하였다. 이 다섯 개의 clone을 해석한 결과 아미노산 배열에서 SA1B05는 *Bacillus subtilis* hypothetical processing protease와 28.1%, SA1B10은 *Neisseria meningitidis* dihydropteroate synthase와 30.9%, SA2F01은 *B. subtilis* trigger factor와 46.2%, SA8A11은 *Vibrio cholerae* N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase와 36.4% 그리고 SA9H10은 *Streptococcus pyogenes* serotype 49M protein과 17.6%의 상동성을 보였다.

KG- 및 KG+균주에서 이 다섯 개의 유전자의 발현을 확인하기 위하여 RT-PCR을 행한 결과 KG-균주에는 강한 발현을 나타내었지만 KG+균주에서 발현이 어려운 것으로 밝혀졌으며 이상과 같은 이유로 *L. garvieae* KG-균주가 협막 구조를 가질 것이라 생각되고 숙주의 면역 반응에 저항성과 병원성을 가질 것으로 추정된다.

참고문헌

- Kitao T, Aoki T and Sakoh R (1981) Epizootic Caused by β -hemolytic *Streptococcus* Species in cultured Freshwater Fish. *Fish pathology* 15(3/4), 301-307
- Kusuda R, Kawai K, Toyoshima T and Komatsu I (1976) A new Pathogenic Bacterium Belonging to the Genus *Streptococcus* Isolated From an Epizootic of Cultured Yellowtail. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 42(12), 1345-1352