

유기용매 내성균주의 단백질 발현조사를 통한 heat shock와 oxidative stress의  
유기용매내성과의 연관성

최승태, 이지아\*, 배기정\*, 문자영\*\*, 정영기\*\*\*, 주우홍\*

창원대학교 유전공학연구소, 창원대학교 생물학과\*, 창원대학교 보건생화학과\*\*, 동의대학교  
미생물학과\*\*\*

전화 (055) 279-7443, FAX (055) 279-7449

Abstract

3~5 types of proteins were expressed by toluene and heat during 30~60min. Generally it is reported that proteins below 10kDa function as transcription factor. In this study we certified that 7kDa was induced by organic solvent and the rate of expression was 2 folds at 30~45min.

서론

주요 환경오염원인 방향족 화합물에 내성을 갖는 유기용매 내성균주는 1989년 Inoue 와 Horikoshi에 의해 처음 분리 보고되었으며, Cruden, Weber 와 de Bont 그리고 Ramos 등에 의해 분리 보고되고 있다. 최근에는 *Pseudomonas* 속 이외의 균종에서 toluene 내성세균이 발견되고 있으며, benzene 내성세균도 보고되고 있다. 한편 *E. coli*, *Salmonella typhimurium*에서 heat, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 중금속의 존재, starvation 등에서 오는 다양한 환경 스트레스에 대한 적응 및 방어기작이 많이 연구되고 있는데, 이러한 환경 스트레스 정상적인 생명활동을 저해하는 스트레스로 작용한다고 보고되고 있다. Isken과 de Bont은, 유기용매 내성세균의 생존은 다양한 내성기작의 combination에 의해 이루어지고 있으며, 유기용매 내성균주는 다른 해로운 환경적인 요인에 대하여 강한 내성을 나타내므로, 유기용매 내성기작에 관여하는 다양한 반응체계는 일반적인 스트레스와도 연관되어 있음이 시사되고 있다. 일반적인 스트레스 반응 중 원핵세균에서 가장 많이 연구된 것은 Heat shock이다. 이러한 heat shock 단백질은 중금속, 에탄올, 산화적인 스트레스 등의 다양한 스트레스 요인에 의해서도 유도되며, Chemical pollutant에 의해서도 몇 가지 종류의 heat shock 단백질이 유도 합성된다는 것이 보고되고 있다. 한편 호기성미생물은 호흡활동 중에 물에서 4개의 활성 산소분자 즉, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superoxide anion(O<sup>2-</sup>), singlet oxygen(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), hydroxyl radical(OH)을 방출한다. 이러한 활성 산소들은 지질 과산화물을 생성하여 세포막 지방산과 단백질을 손상시키고 DNA를 손상시킨다. 세균은 산화적인 손상으로부터 세포를 방어하기 위해 여러 항산화 효소를 보유하고 있으며, 이러한 항산화효소의 유도는 저농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>처리, 혐기성에서 호기성 조건으로의 전환 등의

조건에서도 확인되고 있다.

본 연구는 유기용매 내성 세균인 그람양성 *Micrococcus* sp. 121균주와 그람음성 *Pseudomonas* sp. BCNU171을 공시하여 heat shock 반응과 oxidative stress반응과 유기용매내성의 관련성을 규명하였다.

## 재료 및 방법

### 배지 및 시약

Toluene 내성 *Pseudomonas putida* BCNU 171 균주의 stress 내성 test는 1% Bacto tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 0.1% Glucose, 0.25% MgSO<sub>4</sub> (pH7.0)의 조성으로 되어 있는 LBM 배지를 사용하였으며, *Micrococcus* BCNU 121 균주의 배양에는 nutrient 배지를 사용하였다.

### 단백질 추출 및 정량

대조구와 처리구 세포를 30분, 60분에서 5000rpm으로 10분 냉각 원심분리하여 pellet을 10mM Tris-HCl pH 8.0으로 수회 세정하고, sonicater(Insonator 201M, Kubota, Japan)로 120W에서 10분 세포를 파쇄하고, 5000rpm에서 5분 원심분리하여 total protein을 추출하였다. 단백질 농도는 standard로 bovine serum albumin (BSA)을 이용하였으며, 추출한 단백질은 Bradford<sup>(6)</sup>의 방법을 조금 개량한 방법으로 조제된 Bio-Rad protein assay kit를 사용하여 정량하였다.

### 2차원 전기영동에 의한 단백질 pattern 변화 조사

2차원 전기영동은 O'Farrell<sup>(36)</sup>의 방법에 따라 수행하였다. Isoelectric focusing gel에서 2% carrier ampholytes(1.6% pH 5~7, 0.4% pH 3~10)로 total 7200 volt로 17시간 전기영동하여 단백질을 등전점(isoelectric point; pI)에 따라 분리시킨 후, 분자량에 따른 2차원 전기영동은 Gradient SDS-PAGE<sup>(28)</sup>를 수행하였다. 전기영동 후 단백질 확인은 silver staining법으로 행하였으며, spot의 비교는 densitometer (Molecular Dynamics, U.S.A)의 ImageQuaNT analysis program 의해 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### Ps. putida BCNU 171

#### 1. Toluene 과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 적응농도

Toluene에 대한 치사농도를 10%농도에 준하여 실험하였다. 0분에서 대조구의 세포 수는  $5\sim 6\times 10^9/\text{ml}$ 이며, 30분 동안 10% toluene 처리시 생존율은 0.05%로 나타났다. 적응농도를 알아보기 위해 0.01~0.1% 농도로 각각 30분 전처리하여 적응시킨 후 challenge 농도(10% toluene)에 30분 처리한 결과, toluene 0.05% 농도에서 전처리시 가장 뚜렷한 내성효과가 관찰되었다(Table 1).

#### 2. Heat에서 적응온도

Table 1. Cross-tolerance and cross-protection in adapted cells of *Pseudomonas putida* BCNU 171

Adaptation for 30 min	challenge						toluene overlaid
	Toluene 10%				H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.15M		
	1.5 min	3.0 min	1.5 min	3.0 min	1.5 min	3.0 min	
Control	0.043	0.05	1.5	0.02	2	0.09	0.013
Toluene (0.05%)	1.6	7.3	9.6	0.36	0.001	0.002	1.7
48°C	0.34	0.24	7.7	0.35	0.0007	0.0004	0.015
3 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.9	1	1.7	0.24	25.1	10	0.02

\* Data are expressed as % survival rate

48°C에 30분 동안 전처리한 세포는 치사온도(51°C)에서 0.6%의 세포가 생존하였다 (Table 1).

### 3. 적응된 cell에서 cross-tolerance 와 cross-protection

toluene(10%), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.15M), heat (51°C)에 가장 강하게 내성을 보이는 적응농도 및 온도는 toluene 0.05%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3mM, 온도는 48°C로 나타났다(Table 1). 이상의 결과 heat shock 반응과 oxidation stress 반응은 유기용매 첨가시에도 유도될 것으로 예상되며, heat shock 반응과 oxidation stress 반응이 유기용매 내성에도 기여할 것으로 판단되며, stress 반응은 상호 연관되어 있어 상호 cross-protection하고 있음이 증명되었다.

### 4. 이차원 전기영동에 의한 단백질 pattern 변화

대조구(non-adapted cell)와 처리구(adapted cell)의 30분, 60분에 따른 단백질 합성 발현을 O'Farrell의 방법에 준하여 2D-PAGE를 실행하였다. Silver staining하여 비교 분석한 결과 대조구에서는 약 300개 이상의 단백질이 detect되었다. 0.05% toluene에 적응시킨 세포로부터 추출된 total 단백질은 단백질의 양상이 대조구와 비교하여 많은 변화가 관찰되었고, 특히 pI 4.5~5.0범위에서 단백질의 발현이 많이 유도되었다. 30분 후의 단백질발현 유도를 보면, 약 18개의 단백질이 toluene 스트레스에 의해 유도되었고 heat 와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 스트레스에서는 각각 6개 와 3개가 유도되었다(Fig. 1).

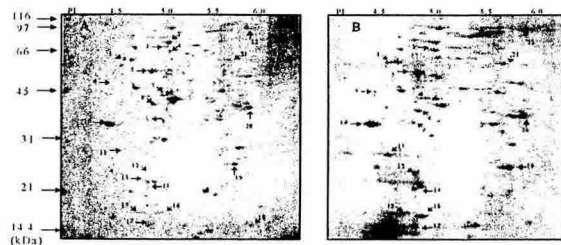


Fig. 1. 2D-PAGE of whole-cell protein extracts of *Pseudomonas* sp. BCNU171 at 60 min after cultivation. Control (A), Toluene (B), Heat at 48°C (C), 3mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (D)

### Micrococcus sp. BCNU 121

### 3. 적응된 cell에서 cross-tolerance와 cross-protection

각각의 toluene 농도 (0~0.1%)에서 1시간 적응처리, 준치사 온도 60℃에서 30분 치사 후 세포의 생존율은 대조구 0%와 비교하여 0.05%와 0.07% 농도에서 약 2배 이상의 내성 효과를 보인 반면, 0.1% 적응처리시에는 대조구와 차이를 보이지 않았다. 이것은 toluene 준치사 농도 3%에서 가장 높은 내성 효과를 보인 것과는 상반된 결과를 보였다.

#### 요약

Toluene으로 30~60분 스트레스를 주어 5회 이상 단백질의 pattern을 조사한 결과, toluene과 heat에 의해서 3~5개 정도의 단백질이 중복되게 발현됨을 알 수 있었다. 일반적으로 10kDa 이하의 단백질들은 transcription factor로서 작용하는 것으로 보고되고 있는데, 본 실험에서는 약 7kDa인 단백질이 유기용매에 의해서 유도됨이 확인되었으며, 30~45분에서 단백질 발현율이 2배 이상 증가하였다.

(본 연구는 한국학술진흥재단의 연구비로 진행되었음. KRF-99-005-D00012)

#### 참고문헌

- Blom, A., Harder, W., Matin, A.(1992) Unique and overlapping pollutant stress proteins of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol* 58:331-334.
- Boutibonnes, P., Giard, J.C., Hartke, A., Thammavongs, B., Auffray, A.(1993) Characterization of the heat shock response in *Enterococcus faecalis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 64:47-55.
- Demple, B., Hllbrook, J.(1983) Inducible repair of oxidative damage in *Escherichia coli*. *Nature* 304:466-468.
- Flahaut, S., Hartke, A., Giard, J.C., Benachour, A., Boutibonnes, P., Auffray, Y.(1996) Relationship between stress response towards bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 138:49-54.
- Inoue, A., Horikoshi, K.(1989) A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature* 338:264-266.
- Weber, F.J., de Bont, J.A.M.(1996) Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 286:225-245.