

## *Escherichia coli* K12의 막단백질 형성과 페니실린 민감성에 대한 산소의 능동적 역할

박현근 · 한홍의

인하대학교 이과대학 생물학과

### Active Role of Oxygen on Penicillin Sensitivity and Formation of Membrane Protein in *Escherichia coli* K12

Park, Hyun-Kun and Hong-Eui Han

Department of Biology, College of Sciences, Inha University

**Abstract:** Membrane proteins of facultatively anaerobic *Escherichia coli* K12 which was logarithmically grown in aerobiosis and anaerobiosis were compared on 5 to 10% linear gradient gel electrophoresis (Na Dod SO<sub>4</sub>-PAGE). Membrane proteins were formed as different patterns between aerobiosis and anaerobiosis. Among them, 91Kdal protein (*pbp1a*) was not synthesized in aerobiosis and 60Kdal protein (*fts* cluster), in anaerobiosis. Thereby cells cultured aerobically were differentiated as diversiform cell shape, comparing cells cultured anaerobically and the latter were resistant to penicillin G. Thus it is believed that in facultative anaerobes atmospheric oxygen regulated the synthesis of membrane proteins and even the expression of equivalent genes, and moreover alleviated the resistance to an antibiotic penicillin.

**Key words:** aerobiosis, anaerobiosis, membrane protein, penicillin sensitivity

원핵생물인 *E. coli*는 통성혐기성 세균으로서 호기성생활과 혐기성생활에서 세포질내의 단백질합성에 차이가 있다 (Smith et al., 1983<sup>a</sup>; 1983<sup>b</sup>). 특히,  $\beta$ -galactosidase의 분해산물의 억제도 호기성생활에서 혐기성생활로 천이될 때 억제가 해제되며, 이와 같은 상태는 cAMP 합성의 정도에 연관되고 있다 (Lee et al., 1983)

진핵생물에 있어서도, 중국산 쥐의 난세포들은 대기환경에서 혐기성상태로 천이되면 열충격 단백질 (heat-shock proteins) 들이 유도되며, 이 혐기성상태를 지속하면 이 단백질의 유도가 없어지고 새로운 단백질이 합성된다 (Sciandra et al., 1984). 효모의 유전자 발현도 산소 수준에 의하여 조절된다 (Lowry et al., 1984).

이와 같은 결과는 진핵과 원핵생물의 단백질

합성과 그 유전자발현이 대기중의 산소에 의하여 조절되고 있음을 시사하고 있다. 따라서 *E. coli*의 막단백질도 환경적인 요인으로서 대기중의 산소에 의하여 그 발현 정도에 차이가 생길 가능성이 높다.

본 연구는 막단백질 중에서 페니실린결합 단백질 (penicillin-binding protein/PBP)의 발현에 대한 산소에 의한 영향과 이에 대응하는 penicillin 저항성을 검토하였다. 실제로 *E. coli*는 자연 서식처가 장내이므로 혐기성상태에서 번식한다. 그러나 대부분의 페니실린결합 단백질의 기능에 대한 실험은 호기성 상태에서 이루어지고 있으며 혐기성상태에서의 연구는 보고된 바가 없다.

본 연구를 통하여 페니실린 결합 단백질은 산

소의 유무에 따라서 합성이 조절되며, 페니실린 처리시 호기성 생활에서는 세포형태가 다양하며 항생제 내성이 상당히 감소되었으나, 이에 반하여 혐기성생활에서는 세포형태는 별로 변화가 없었고, 항생제 내성이 높았음을 알았다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양조건

본 연구에 사용된 균주는 *E. coli* K12 이며 LB사면배지에 계대배양하여 사용하였다(Schleif et al., 1981).

배양배지는 M9배지(증류수 1L 당 포도당, 5g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 6g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3g;  $\text{NaCl}$ , 0.5g;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1g; 1M  $\text{MgSO}_4$ , 2ml; 1M  $\text{CaCl}_2$ , 0.1ml)를 사용하였다. 혐기성배양을 실시하기 위하여 상기 배양배지 1L에 산화환원 전위차의 지시약으로 methylene blue, 6.5mg, 환원제로 cystein-HCl, 0.025%, 성장촉진제로 ferric citrate, 10  $\mu\text{M}$ , 미량원소로  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ , 1 $\mu\text{M}$ 과  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 1 $\mu\text{M}$ , 전자수용체로 fumarate, 0.1%를 첨가한 후 NaOH를 사용하여 pH 7.0으로 맞추었다.

호기성배양시는 정체배양으로 인한 혐기성화를 방지하기 위하여 기포발생기로 계속적으로 공기를 공급하였고, methylene blue의 푸른색이 유지되는 것을 확인하며 실험하였다. 혐기성배양은 배지성분중의 환원제인 cystein-HCl로 배양액내의 산소를 제거하고, 배양시험관의 공간에 있는 산소는 pyrogallol acid-sodium hydroxide법(Cappuccino et al., 1983)을 변형하여 다음과 같이 실시하였다. 큰 시험관(2.5 × 20cm)에 pyrogallol 1g과 20% KOH 10ml를 첨가한 후 곧 배지가 들어 있는 작은 시험관(1.0 × 10cm)을 넣었다. 이때 작은 시험관은 솜마개를 사용하여 오염을 막고 공기의 유통을 용이하게 하였으며, 큰 시험관은 고무마개로 밀봉하여 외부와의 공기유통을 차단하였다.

### 균수의 측정

균수측정은 분광광도계(Baush & Lomb, USA)로 흡광도를 측정하여 표시하였다. 배양액

에 포함된 methylene blue에 의한 흡광도의 간섭을 피하기 위하여 950nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Penicillin 저항성 시험

Penicillin에 대한 저항성 시험은 액체배지로 호기성 및 혐기성조건하에서 각각 실시하였다. 균주는 멸균생리식염수로 현탁액을 만들어 4ml의 배양배지가 들은 배양관에 0.1ml씩 접종하였다. 호기적 혹은 혐기적조건으로 37°C에서 대수증식기가 될 때까지 배양한 후 막여과법으로 멸균된 Penicillin G(Sigma)를 농도별로 희석하여 1ml씩 분주하였다. 그리고 8시간 이후에 950nm에서 흡광도 감소를 측정하여 저항성을 비교하였다.

### 형태관찰

Penicillin에 의한 세포의 형태변화를 관찰하기 위하여, 호기생활과 혐기생활로 대수증식기가 될 때까지 배양한 후 penicillin G를 40Unit/ml되게 각각 첨가하였다. 그리고 37°C에서 8시간 방치한 후 crystal violet로 염색하여 현미경으로 형태를 관찰하였다.

### 막단백질의 분리

호기성 및 혐기성조건에서 키운 2-3L의 배양액을 각각 4°C에서 10,000 × g로 5분간 원심분리(Sorvall RC-5B, Dupont Instruments, USA)하여 균체를 회수하였다. 이 균체를 140mM의 2-mercaptoethanol이 함유된 10mM 인산 완충액(pH 7.0) 160ml에 현탁시켰다. 균체분해는 초음파분쇄기(Sonic dismembrator Model 300, Fisher Scientifics, USA)로 30초씩 5분간 실시하였다. 분해된 세포현탁액을 4°C에서 8,000 × g로 10분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다.

세포막을 분리하기 위하여 위의 상층액을 4°C에서 100,000 × g로 2회에 걸쳐 30분간 초원심분리(Preparative Ultracentrifuge, Model L8-70, Beckman, USA)시켰다. 침전물을 10mM 인산완충액 27ml에 재현탁시키고 sarkosyl에 불용성인 세포벽을 제거하기 위하여 4°C에서 100,000 × g로 30분간 초원심분리시켰다(Spratt, 1975). 상층액을 회수하여 Coomassie brillia-

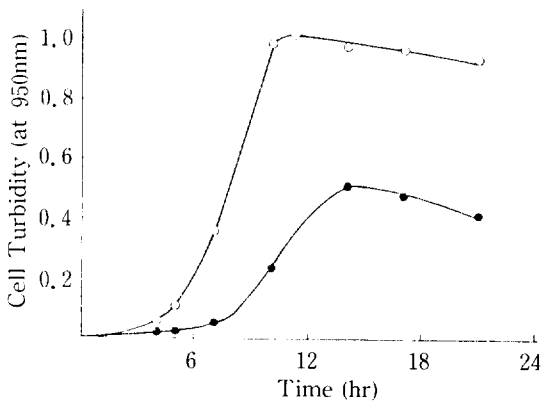
nt blue G-250 (Sigma) 으로 단백질을 정량하였다 (Marion, 1976). 그리고 상층액내의 염을 제거하기 위하여 투석낭 (Sigma) 을 이용하여 24 시간 투석한 후 냉동건조 (Freeze dryer, Labconco Corp., USA) 시켰다. 시료는  $-20^{\circ}\text{C}$  에서 보관하며 사용하였다.

### 전기영동

0.125M Tris-HCl (pH 6.8) 용액에 Sodium dodecyl sulfate (SDS) 를 0.1%, acrylamide 를 3.3% 되제한 stacking gel 과 0.375M Tris-HCl (pH 8.8) 용액에 SDS 를 0.1%, 그리고 acrylamide 를 10% 함유한 separating gel 을 만들어 30V 전압에서 4-5 시간 동안 전기영동을 실시하였다. 그리고 separating gel 의 농도 구배는 5%에서 10%까지 하여, 상기 방법으로 전기영동을 실시하였다 (Laemmli, 1970).

전기영동이 끝난 gel 은 Coomassie brilliant blue R250 (0.1% CBB, 7% acetic acid, 45% methanol) 으로 24 시간 실온에서 염색하였다. 그 후 acetic acid와 methanol 혼합용액 (7% acetic acid, 40% methanol) 으로 탈색시킨 후 촬영하였다.

분자량측정 표준단백질은 phosphorylase (97.4 Kdal), ovalbumin (45Kdal) 그리고 carbonic anhydrase (29Kdal) 를 사용하였다.



**Fig. 1.** Growth kinetics of aerobic (○) and anaerobic cultures (●) in *Escherichia coli* K12.

Aerobic cultures were performed by aeration at  $37^{\circ}\text{C}$  and anaerobic cultures at  $37^{\circ}\text{C}$  by standing in the chamber containing pyrogallol-KOH (20%).

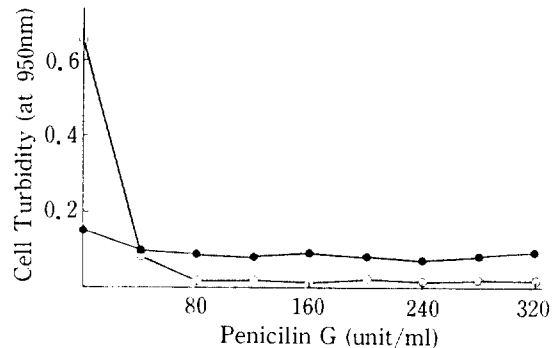
## 결과 및 고찰

### 생장 비교

호기성배양과 혐기성배양을 하였을 때 생장 곡선은 Fig. 1 에서 보는 바와 같다. 14시간 배양 후에 균수는 호기성배양일 때 흡광도가  $1.0$  ( $10^{13}$  cells/ml 에 해당), 혐기성배양일 때 흡광도가  $0.5$  ( $10^{10}$  cells/ml 에 해당) 이었다. 혐기성 배양시 균수는 호기성배양의 균수보다 1000 배 정도 감소되었다. methylene blue 의 색은 통기에 의한 호기성배양중에서 청색으로 나타났으나 통기를 중단하면 무색으로 변하였다. 반면에 혐기성배양에서는 계속 무색으로 유지되었다. 이는 호기성배양을 실행한다 할지라도 배양액은 균체가 증식함에 따라 혐기성상태로 변화됨을 알 수 있다. 따라서 통기에 의하지 않은 진탕 배양이나 정체배양은 배양액내에 혐기성 및 호기성배양이 모두 일어남을 추측할 수 있다. 그러므로 산소에 의한 막단백질의 형성을 구별하기 위하여 통기에 의한 호기성배양을 하여야 한다고 생각할 수 있다.

### Penicillin에 대한 저항성

막단백질 형성의 변화를 부분적으로 관찰하기 위하여 항생제 처리에 의한 저항성과 세포분열 실험을 하였다. *E. coli* K12와 penicillin G 에 대한 내성에 관한 것은 Fig. 2에서 보는 바



**Fig. 2.** Resistance response of *Escherichia coli* K12 to penicillin G under the aerobic (○) and anaerobic condition (●).

A portion of cell suspension was removed at log-phase and then various concentrations of penicillin G were added into the removed cell suspensions. Cell turbidity was read after 8hr-incubation.

와 같다. 호기성 및 혐기성배양의 대수증식기에 해당하는 시간(8 시간) 후 배양액에 penicillin G를 첨가하였을 때, 호기성배양균은 용해(lysis)속도가 신속하여 8 시간만에 모두 용해되어 거의 투명하게 되었으나, 혐기성배양균은 용해되는 속도가 완만하였다. 그리고 80Unit/ml 이상에서는 거의 변화되지 않고 있었다. 이것은 호기성배양균이 혐기성배양균보다 penicillin G에 대한 저항성이 낮음을 나타내는 것이다. 이와 같은 결과는 혐기성배양에서 세균의 생장속도가 완만한데도 이유가 있겠지만(Rose-berg et al., 1983), 그외에도 penicillin 처리에 의한 세포의 형태적 변화에 따른 것으로도 예측할 수 있다.

#### 세포형태변화

세포의 형태적 변화는 penicillin G를 처리하였을 때 호기성과 혐기성배양균에 상당한 차이를 보여주었다(Fig. 3). 대수증식기에 있는 세포현탁액을 사용하였을 때, 혐기성배양균은 세포의 형태적 변화가 단간균(short rod), 장간균(bacillus) 형태로 penicillin 비 처리균과 별로 차이가 없었으며(Fig. 3 C, D), 세포가 용해된 상태가 관찰되지 않았다. 그러나 호기성배양균은 세포의 형태적 변화가 다양하게 나타났다(Fig. 3A, B). Penicillin비 처리균은 단

간균과 장간균인데 반하여, penicillin 처리균은 많은 세포의 용해현상이 관찰되었고, 세포의 형태적 변화는 팽창된(swelling) 장·단간균이거나, 생땅콩이나, 콩깍지 모양, 그리고 장·단간균의 양쪽 끝 점부위에 세포가 신장된 형태 등으로 나타났다. 이 결과로부터 호기성배양균이 혐기성배양균보다 penicillin에 의한 심한 형태적 영향을 받고 있음을 알 수 있었다.

#### 내막단백질(Inner membrane protein)

전기영동에 의한 내막단백질의 분리양상은 호기성생활과 혐기성생활에서 많은 차이를 나타내었다. 내막단백질은 10% SDS-PAGE에 의하면 혐기성생활에서 20 Kdal 이하의 작은 분자량의 단백질이 많이 발현되었다(Fig. 4, A). 그리고 penicillin의 저항성에 관여되는 단백질(44 Kdal에서 91Kdal 분자량에 해당하는)의 발현에 차이를 알기 위하여 5-10% SDS-PAGE 농도구배법으로 내막단백질을 분리하였을 때, 호기성생활에서는 86.5, 84, 66, 60, 44 Kdal 분자량의 단백질이 발현되었고, 혐기성 생활에서는 91, 86.5, 84, 66, 44Kdal 분자량의 단백질이 발현되었다(Fig. 4, B). 즉, 호기성 생활에서는 혐기성생활에서 발현된 91Kdal 분자량의 단백질이 형성되지 않았고 반면에, 혐기성 생활에서는 호기성생활에서 발현된 60 Kdal 분

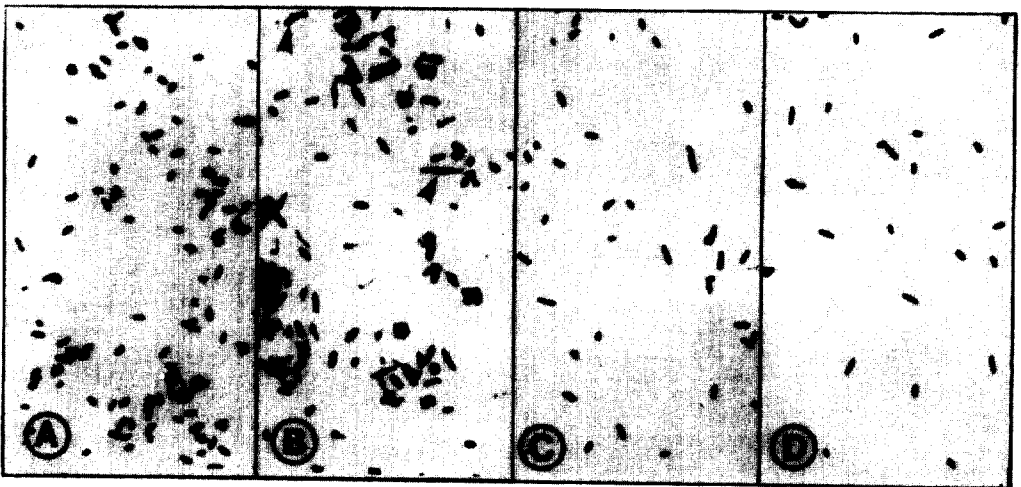
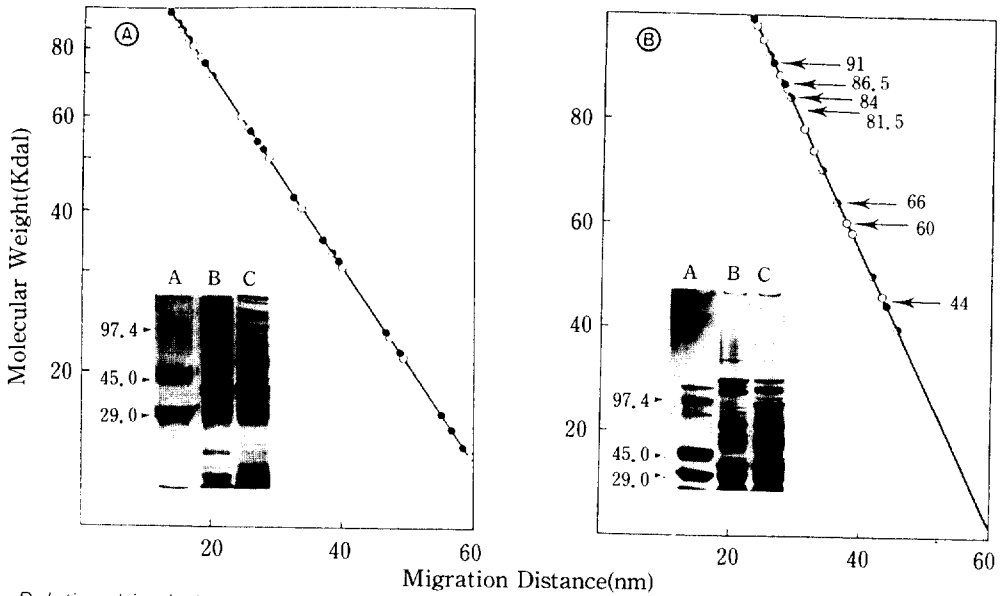


Fig. 3. Morphological changes of *Escherichia coli* K12 at 8hr after addition of penicillin G into aerobic and anaerobic cultures ( $\times 1000$ ).

The tests were carried out in logarithmically grown cells. A, aerobic culture; B, aerobic culture with penicillin G; C, anaerobic culture with penicillin G; D, anaerobic culture.



**Fig. 4.** Relationship between molecular weight and migration distance of inner membrane proteins on 10% SDS-PAGE(A) and 5-10% linear gradient SDS-PAGE(B) in *Escherichia coli* K12 cultured aerobically (○) and anaerobically (●). Inset: lane A, standard authentic proteins, 29Kdal (carbonic anhydrase), 45 Kdal(ovalbumin, 97.4 Kdal (phosphorylase) lane B, inner membrane proteins in aerobically cultured cells lane C, inner membrane proteins in anaerobically cultured cells.

자량의 단백질은 형성되지 않았다. 91Kdal 분자량에 해당하는 유전자는 *pbp1a*, *ponA*, *pbpA* 로 알려져 있고, peptidoglycan층을 합성하는 transpeptidase로 알려져 있다(Russel et al., 1983). 이 유전자가 저해되었을 때는 sphaeroplast나 세포용해가 일어난다고 보고 하였다(Ishino et al., 1980). 이와 같은 사실은 본 실험에서도 같은 결과를 얻었다(Fig. 4, B). 91 Kdal 분자량 단백질의 발현 (*pbp1a*, *ponA*, *pbpA*) 이 상실되었을 때는 정상적인 세포로 성장하게 된다(Suzuki et al., 1978). 그 이유는 81.5, 86.5Kdal에 해당하는 *ponB*, *pbpB*, *pbp1b* 의 유전자산물인 transpeptidase가 형성되어 있기 때문이다(Ishino et al., 1980).

그리고 66 Kdal (*rodA*, *pbp2*) 분자량의 단백질은 호기성 및 혐기성생활 모두 발현되었다(Fig. 4, B). 91Kdal이나 혹은 66Kdal 단백질 중의 어느 하나만이 발현되지 않을지라도 세포는 원형으로 성장하여 분열하게 되며 그 결과 팽창된 구형과 땅콩, 그리고 콩각지 모양을 한 세포로 분열하게 된다(Begg et al., 1985). 본

실험에서도 이와 같은 형태의 세포가 관찰되었다.

그리고 60Kdal 분자량의 단백질에 해당하는 유전자는 *pbp3*, *fts* 유전자군(cluster) (Begg et al., 1980) 으로 이 유전자가 저해되면 감온성의 세포생장을 하며, 42°C에서 사상(filament)형으로 성장하며 penicillin에 내성을 갖게 된다(Suzuki, 1978). 본 실험에서는 42°C에서 배양을 행하지 않았기 때문에 세포의 사상형을 관찰할 수 없었다.

항생제를 처리하지 않았던 세포와 이를 처리한 세포는 혐기성 상태에서 형태가 유사하였다(Fig. 3C, D). 형태의 유사성은 혐기성생활에서 penicillin에 대한 내성이 있음을 알 수 있었다(Fig. 2). 혐기성생활에서장·단균만이 관찰되었던 이유는 91Kdal(*pbp1a*, *ponA*, *pbpA*) 과 66 Kdal의 (*rodA*, *pbp2*) 단백질은 발현되었기 때문에 간균형으로 세포분열을 하게 되며, 이 때 60 Kdal(*fts* cluster, *pbp3*) 단백질이 발현되지 않으면 짧고, 긴 간균의 세포분열이 일어난다고 보고하였다(Begg et al., 1985). 이상

에서 토론한 바와 같이 혐기성생활에서는 penicillin G에 대한 저항성이 있었으며 세포의 다양한 형태적 변화로부터, 호기생활에서는 91 Kdal (*pbp1a*, *ponA*, *pbpA*) 분자량의 단백질, 혐기성생활에서는 60 Kdal (*fts cluster*, *pbp3*) 단백질이 각각 형성되지 않았으며, 호기성 및 혐기성생활에서는 66 Kdal (*rodA*, *pbp2*) 분자량의 단백질이 모두 발현되었음을 알 수 있었다. 흥미있는 것은 감온성 돌연변이를 재료로 한 실험에서는 유전자와 세포분열에 의한 형태적 변화와 일치한다는 것이다. 환언하면 감온성 돌연변이와 산소에 의한 효과가 페니실린 저항성에 유사한 영향을 준다고 볼 수 있다.

요약하면 penicillin 결합단백질(PBP)의 발현에 있어서 산소가 있으면 PBP-1a (*pbpA*)를,

산소가 없으면 PBP-3 (*fts cluster*)를 형성하지 않았고 그외의 PBP는 산소의 존재 여부에 관계없이 모두 발현되었다. PBP-1a나 PBP-3가 형성되지 않은 관계로 항생제내성의 증가는 물론 세포의 형태도 다양하게 변화되었다. 즉 대기중의 산소에 의하여 이들 현상이 조절되고 있음을 알 수 있었다. 이 사실로써 항생제 내성을 감소시키기 위하여서는 유전적 연구 이외에도 세균의 생태학적 연구가 수행되어야 한다고 볼 수 있다. 실제로 *E. coli* K12는 혐기성인 장내에서 서식함으로 항생제 내성이 증가하게 된다고 볼 수 있다. 따라서 혐기성조건에서도 항생제내성을 감소시키기 위해서는 PBP-3가 발현될 수 있는 기작의 생태학적 연구가 필요하다.

## 적 요

호기생활과 혐기생활에서 대수증식기까지 자란 통성혐기성 세균인 *Escherichia coli* K12의 막단백질을 5-10% 농도구배를 준 전기영동상(Na Dod SO<sub>4</sub>-PAGE)에서 비교하였다. 막단백질은 호기생활과 혐기생활간에서 다른 양상을 나타냈으며, 이들 중에서 91 Kdal에 해당하는 단백질(*pbp 1a*)은 호기생활에서 합성되지 않았고, 60 Kdal에 해당하는 단백질(*fts cluster*)은 혐기생활에서 합성되지 않았다. 그리고 호기성조건으로 배양된 세포들은 혐기성조건으로 배양된 세포들보다 다양한 형태를 나타냈고, 혐기성조건으로 배양된 세포들은 penicillin G에 내성을 갖고 있었다. 따라서 통성혐기성 세균에 있어서 대기산소는 막단백질의 합성 뿐만 아니라 이에 해당하는 유전자들의 발현을 조절했고, 더우기 항생제인 penicillin에 대한 내성을 감소시켰다고 믿어진다.

## REFERENCES

1. Begg, K.J., G.F. Hatfall, and W.D. Donachie, 1980. Identification of new genes in a cell envelope-cell division gene cluster of *E. coli*: Cell division gene *ftsQ*. *J. Bacteriol.* **144**, 435-437.
2. Begg, K.J., and W.D. Donachie, 1985. Cell shape and division in *E. coli*: Experiments with shape and division mutations. *J. Bacteriol.* **163**, 615-622.
3. Cappuccino, J.G., and N. Sherman, 1983. Microbiology: a laboratory manual. Addison-Wesley Publishing company Inc., pp.117-119.
4. Ishino, F., K. Mitsui, S. Tamaki, and M. Matsubashi, 1980. Dual enzyme activities of cell wall peptidoglycan synthesis, peptidoglycan transglycosylase and penicillin-sensitive transpeptidase, in purified preparations of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 1a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **97**, 287-293.
5. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.
6. Lee, J.H., and W.J. Dobrogosz, 1983. Effects of aerobic and anaerobic shock on catabolite repression in cyclic AMP suppressor mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **154**, 992-994.
7. Lowry, C.V., and R.S. Zitomer, 1984. Oxygen regulation of anaerobic and aero-

- bic genes mediated by a common factor in yeast *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 6129-6133.
8. Marion, M.B., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
  9. Rosenberg, E., and I.R. Cohn, 1983. *Microbial biology*. Saunders college publishing. pp.280-305.
  10. Russel, A.D., and L.B. Quesnel, 1983. *Antibiotics: Assessment of antimicrobial activity and resistance*. Academic Press Inc. pp.161-179.
  11. Schleif, R.F., and P.C. Wensink, 1981. *Practical methods in molecular biology*. Springer-Verlag New York Inc. pp. 196-197.
  12. Sciandra, J.J., J.R. Subjeck, and C.S. Hughes, 1984. Induction of glucose-regulated proteins during anaerobic exposure and heat-shock proteins after reoxygenation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 4843-4847.
  13. Smith, M.W., and F.C. Neidhardt, 1983<sup>a</sup>. Proteins induced by anaerobiosis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **154**, 336-343.
  14. Smith, M.W., and F.C. Neidhardt, 1983<sup>b</sup>. Proteins induced by aerobiosis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **154**, 344-350.
  15. Spratt, B.G., 1975. Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *E. coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 2999-3003.
  16. Suzuki, H., Y. Nishimura, and Y. Hirota, 1978. On the process of cellular division in *E. coli*: A series of *E. coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 664-668.

(Received May 1, 1986)