

Galactose epimerase결손 *Salmonella pullorum* 변이주의 효소활성

김 중 배

연세대학교 보건과학대학 임상병리학과
(1994년 8월 30일 접수)

Characterization of enzymatic activity of galactose epimerase-less mutant of *Salmonella pullorum*

Jong-bae Kim

Department of Medical Technology,
College of Health Science, Yonsei University
(Received Aug 30, 1994)

Abstract : Uridine diphosphate(UDP)-galactose-4-epimerase-less mutants of *Salmonella pullorum* were isolated after mutagenic treatment with ethidium bromide. When isolated gal E mutants of *S. pullorum* A2 and D1 were grown in the presence of galactose(0.1 W/V), they exhibited marked bacteriolysis in heart infusion broth. The mutant strains were further investigated the characteristics of enzymatic activities in the Leoloir galactose pathway. Isolated A2 and D1 strains were completely deficient in UDP-galactose-4-epimerase activity. And the activity of other enzymes involved in galactose metabolism were reduced significantly.

Key words : *Salmonella pullorum*, gal E mutant, enzymatic activity

서 론

양계 산업에 지대한 경제적인 손실을 초래하는 추백리증(bacillary white diarrhea, *Salmonella pullorum* disease)은 현재까지도 효과적인 예방 백신이 개발되지 못하고 있는 까닭에, 이 질병의 관리는 주로 원인세균에 대한 계군의 혈중 항체를 응집반응으로 검색하여 양성인 닭을 도태시키는 방법에 의존하고 있는 실정이다.

그러나 다른 동물에서의 *Salmonella* spp에 의한 감염증은 여러가지 종류의 백신이 개발되어 감염증의 예방에 적절히 활용되고 있다. *Salmonella*증의 예방에 이용

되고 있는 백신은 크게 사균백신(killed vaccine)과 무독화 생균백신(live attenuated vaccine)으로 구분할 수 있으나, 최근까지의 실험동물을 이용한 연구결과를 종합하면 일반적으로 무독화 생균백신의 질병방어 효과가 뛰어난 것으로 판단되고 있다^{1,2}. 특히 사람의 장티푸스 예방에 사용되고 있는 경구투여용 생균백신은 Egypt에서 1978년부터 1981년까지 32,388명에 투여하여 실험한 결과 95% 이상의 질병방어 효과가 인정된³ 이후로 그때까지 사용되고 있던 사균 장티푸스 백신을 대체하여 현재는 경구투여용 생균백신이 전세계적으로 장티푸스의 예방에 이용되고 있다.

* 이 논문은 1993년도 연세대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구된 것임.

사람의 경구용 장티푸스의 예방백신에 사용되고 있는 *S typhi* Ty21a 균주는 UDP-Gal-4-epimerase 효소의 합성을 조절하는 *gal E* 유전자 부분에 돌연변이가 유발되어 epimerase 효소의 합성이 완전히 결여된 변이주이다⁴. UDP-Gal-4-epimerase는 *Salmonella* spp에서 lipopolysaccharide(LPS) 생합성에 필요한 galactose의 전구체인 UDP-galactose를 합성하는 대사과정인 Leloir pathway에 관여하는 효소계 중의 하나로서, 이 효소의 생합성을 지배하는 유전자에 돌연변이가 유발된 *gal E* 변이주는 galactose 발효능을 상실하며, galactose를 energy원으로서 이용하지 못하는 특징을 나타낸다. 한편 galactose가 포함되지 않은 배지에서 이런 변이주를 배양하면 galactose 대사계에 관여하는 효소계의 결손에 의하여 LPS의 O-side chain에 galactose가 결여된 Rc형의 LPS가 생합성 된다⁵. 또한 epimerase에 돌연변이가 있는 균주는 외부로부터 높은 농도의 galactose를 공급하면 galactose의 대사과정이 완전히 이루어지지 못하므로 균체내에 galactose-1-phosphate 또는 UDP-galactose가 축적됨으로써 galactose에 감수성을 보여 배지에 함유된 galactose 농도가 높은 경우에 균체가 용균현상(bacteriolysis)을 나타내게 된다⁶.

이와 같은 성상을 지닌 경구투여용 장티푸스 생균백신을 투여하였을 경우 인체에 병원성을 보이지 않으면서도 면역원성을 유지할 수 있는 까닭은 이 세균주가 생체내에 정상적으로 분포하고 있는 galactose 농도 하에서 면역학적으로 중요한 smooth형의 LPS를 생합성하여 생체의 면역기관을 자극한 후, *gal E* 유전자의 결손변이로 인하여 세균체에 축적되는 UDP-galactose 또는 galactose-1-phosphate의 농도가 증가하면서 저절로 용균현상이 나타나게 되는 UDP-Gal-4-epimerase 효소 결손에 수반되는 특징이 전형적으로 나타나기 때문이다.

이상과 관점에서 볼 때 닭에 추백리를 유발하는 *Salmonella pullorum* 균주의 경우에도 사람에서의 장티푸스와 유사한 병인학적인 특성을 지니고 있으므로 *gal E* 유전자의 결손변이주는 효과적인 백신 균주로 이용될 수 있는 가능성이 높을 것으로 판단된다. 저자는 *S pullorum*의 *gal E* 유전자의 결손변이주를 돌연변이원 처리 후 선발하여 분리변이주의 세균학적인 변화를 확인하는 제반 실험을 실시한 바 있으며⁷, 이 실험결과를 토대로 본 연구에서는 분리변이주를 이용한 galactose 유도 용균시험, UDP-galactose를 합성하는 대사과정인 Leloir pathway에 관여하는 효소계에 포함되어 있는 각각의 효소에 대한 효소활성 등을 대조균주와 비교검토하여 분리한 *S pullorum gal E* 변이균주의 생균백신 제조

가능성에 관한 지견을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

S pullorum 세균의 돌연변이 처리 : 돌연변이원으로 ethidium bromide를 60µg/ml의 농도로 첨가한 brain heart infusion 배지에 *S pullorum* A0150 세균을 접종하고 37°C에서 배양을 실시하였다. 돌연변이원 처리 세균을 1% galactose 첨가 EMB agar 또는 Endo agar에 도말접종한 다음 증식한 집락중 galactose 분해능이 없는 집락들을 선발함으로써 변이주를 얻었으며, 실험균주를 동결건조하여 보관하면서 실험에 사용하였다.

생화학적 성상 검사 : 변이주의 생화학적인 성상 변화를 조사하기 위하여 Ewing⁸방법에 준하여 미생물의 동정에 이용하는 통상적인 검사를 실시하였으며, 필요에 따라 장내세균 동정용 생화학적 성상 검사 Kit(API 20E Kit, Bio Merieux, France)를 이용하여 동정하였다.

Galactose 유도 용균 실험 : *S pullorum gal E* 변이주를 heart infusion broth에 진탕 배양하면서 550nm의 spectrophotometer를 이용하여 세균의 증식상을 검사하였다. 즉, 이들 시험균주가 대수증식기에 도달하였을 때 최종농도가 0.1(W/V)이 되도록 galactose를 첨가하고 세균을 배양하면서 흡광도의 변화를 조사함으로써 용균현상을 검사하였다. 한편 동일한 조건으로 galactose를 첨가한 배지에서 돌연변이원 처리하지 않은 *S pullorum* A0150 세균을 접종하고 배양성 및 증식 정도를 조사하여 변이주의 배양성 및 galactose에 대한 감수성을 비교하였다.

Leloir pathway 효소계의 효소활성 검사 : Galactose 대사에 관여하는 효소의 활성도를 검사하기 위하여 분리한 *gal E* 변이주와 대조균주인 A0150 균주를 Nikaido⁹의 방법에 준하여 동결 및 용해를 3회 반복하고, ultrasonicator를 이용하여 초음파 파쇄를 실시한 후 원심분리하여 고형성분을 제거한 다음 얻은 상청액의 단백질 함량을 정량한¹⁰ 후 효소 용액으로 이용하였다. 이렇게 하여 준비한 세균파쇄 상청액의 각 효소 활성은 된 Maxwell et al¹¹의 방법에 따라 UDP-Gal-4-epimerase, Gal-1-P transferase 및 galactokinase 활성을 검사하였다. 한편 galactose permease 효소 활성은 Germanier와 Fürer⁶의 방법에 따라 ¹⁴C-galactose를 대수증식기의 세균배지에 첨가하고 세포내로 흡수된 ¹⁴C-galactose의 양을 측정함으로써 검사하였다.

결 과

S pullorum gal E 변이주의 분리 : *S pullorum* A 0150 균주를 돌연변이원으로 처리한 후 1% galactose 첨가 EMB agar 또는 Endo agar에 도말접종하여 증식한 집락중 galactose 분해능이 없는 집락을 집균함으로써 변이주를 분리할 수 있었다. 분리변이주와 대조균주는 galactose 분해능의 차이로 집락의 성상이 뚜렷한 차이를 보여 1% galactose가 첨가된 Endo agar에서의 집락형태는 A0150의 경우 붉은 자주색의 집락을 형성하였으나, 본 실험에서 분리한 *gal E* 변이주는 7일간의 배양기간 중 무색의 집락이 형성되었으며 배양기간이 경과할 수록 세균의 용해가 진행되어 집락 변연부는 얇게 나타났다. 또한 A0150 균주는 Klingler iron agar 사면배지의 아랫부분(butt position)에 검은 침전을 형성하여 유화수소 생성능이 확인되었으나, 분리변이주는 배지의 아랫부분에 변화가 없어 유화수소 생성능이 음성으로 판정되어 유화수소 생성능에도 차이가 관찰되어 본 실험에서 분리한 *gal E* 변이주는 유화수소 생성능을 소실한 것으로 밝혀졌다.

Galactose 농도에 따른 *S pullorum gal E* 변이주의 용균현상 : 돌연변이원 처리에 의하여 분리한 변이주의 galactose에 의한 용균현상을 0.1(W/V) 농도로 galactose를 첨가한 heart infusion 배지에서 세균의 증식상 및 용균현상을 조사하였다. 대조균주인 *S pullorum* A

0150의 경우에는 배지에 첨가한 galactose에 의하여 세균의 증식이 억제됨을 확인할 수 없었다(Fig 1). 그러나 본 실험에서 분리한 *gal E* 변이주 A2 및 D1 균주의 경우에는 galactose를 첨가하지 않은 배지에서의 증식 정도는 galactose를 첨가한 배지에서의 A0150 균주에 비하여 다소 완만한 것으로 나타났다. 한편 galactose를 세균 접종과 동시에 첨가한 경우에는 분리변이주 A2 및 D1의 증식이 상당히 억제되었다. 또 세균 접종 5시간 후 대수증식기에 도달하였을 때 배지에 galactose를 첨가한 경우에는 1시간 이내에 흡광도가 감소하여 분리한 변이주 A2와 D1 모두 galactose에 감수성이 있어 세균의 용균 현상이 나타남을 관찰할 수 있었다.

분리변이주의 galactose 대사에 관여하는 효소계 활성도 : 분리변이주 중에서 galactose 유도 용균현상이 뚜렷한 것으로 인정되는 A2와 D1 균주를 대상으로 하여 galactose 대사에 관여하는 각각의 효소 활성을 조사하여 parent strain인 A0150과 비교한 결과는 Table 1과 같다. Galactose에 대한 감수성이 높은 분리균주인 A2와 D1은 모두 UDP-Gal-4-epimerase의 활성을 완전히 소실한 것으로 밝혀졌다. 이에 비하여 Leloir pathway의 다른 효소 활성은 parent strain에 비하여 감소하기는 하였으나 완전히 소실되지는 않은 것으로 나타났다. 즉, galactokinase, Gal-1-P transferase, galactose permease 활성도는 A0150균주의 각 효소활성에 비하여 A2 균주의 경우 46.8%, 36.8%, 78.9%로, D1 균주의 경우에는 11.8%, 25.1%, 79.5%에 해당하는 것으로 밝혀졌다.

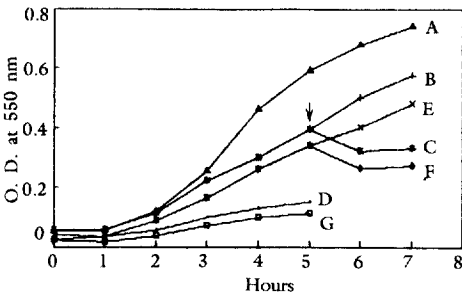


Fig 1. Growth curves of *S pullorum* A0150 and its *gal E* mutant strains of A2 and D1 in heart infusion broth with or without galactose. A, *S pullorum* A0150 galactose added at time 0; B, mutant D1 strain without galactose; C, mutant D1 strain galactose added at 5 hrs; D, mutant D1 strain galactose added at time 0; E, mutant A1 strain without galactose; F, mutant A1 strain galactose added at 5 hrs; G, mutant A1 strain galactose added at time 0. The arrow indicates the time at which galactose was added to the growing culture.

Table 1. Enzymatic activities of the Leloir pathways in *gal E* mutant strains of A2 and D1 of *Salmonella pullorum*

	A2	D1
UDP-Gal-4-epimerase	0	0
Galactokinase	46.8	11.8
Gal-1-P transferase	36.9	25.1
Galactose permease	78.9	79.5

* Enzymatic activities of *S pullorum* A0150 were taken as 100.

UDP-Gal-4-epimerase : 100 = 12.1 μ moles of per mg of protein per hr.

Galactokinase : 100 = 5.1 μ moles of per mg of protein per hr.

Gal-1-P transferase : 100 = 19.5 μ moles of per mg per hr.

Galactose permease : 100 = 2778 cpm of ¹⁴C-galactose.

고 찰

사균 또는 생균 형태의 장내세균을 경구투여함으로써 장관계 감염증을 예방하기 위한 시도¹²는 오래전부터 행하여진 바 있으며, 최근에는 소화기계 감염증을 유발하는 장내세균의 병인작용에 관한 지식이 발전함에 따라 장내세균 감염증을 예방하기 위한 vaccine 개발이 더욱 활발히 진행되고 있다. 특히 Germanier와 Fürer⁴가 개발한 사람의 장티푸스를 예방하기 위한 경구투여용 *S typhi* Ty21a 균주의 경우에는 안전성 및 질병 방어효과가 탁월한 것으로 인정되어 지금까지 사용하고 있던 비경구투여용 사균 장티푸스 백신을 대체하여 전세계적으로 널리 사용되고 있는 실정이다.

Salmonella증의 효과적인 예방 방법을 강구하기 위한 실험의 일환으로서, 생균 또는 사균 형태의 *S tyhimurium*을 이용한 실험동물에서의 질병 예방효과에 관한 많은 연구결과는¹³⁻¹⁵ 대개 숙주동물에서 질병의 방어효과가 인정된다는 점이 일치하고 있다. 그러나 많은 수의 연구자들은 면역기간의 지속 정도 및 질병 방어효과면에서 사균 vaccine보다는 생균 vaccine의 방어효과가 우수한 것으로 보고하고 있으며¹⁵⁻¹⁷, 이와 같은 이유로서는 장내세균 감염증의 방어에는 혈중에 존재하는 항체의 역할보다는 장관계 자체에서의 국소면역 현상 또는 세포매개성 방어 기전이 더욱 중요한 것으로 판단하고 있다.

이상과 같은 관점에서 저자는 현재 우리나라의 양계 산업에 지대한 경제적인 손실을 초래하는 추백리증의 예방 vaccine 제조용 균주를 개발하기 위한 기초실험으로서 *S pulluorm* A0150 균주를 ethidium bromide 처리하여 galactose 분해능을 소실한 변이주를 분리하였다⁷. 본 실험에서는 이들 분리변이주의 생화학적 성상 변화 여부, galactose에 대한 감수성 및 galactose 유도 용균시험을 실시하였으며, 또한 galactose 대사에 관여하는 효소계의 활성을 비교검토하여 분리균주의 생균 vaccine 제조용 균주로서의 이용가능성을 검토하고자 하였다.

본 실험에서 분리한 A2와 D1 변이균주는 7일 이상의 배양기간 중 galactose 분해능이 나타나지 않았으며 전형적인 gal E 변이주의 집락형태를 유지하였다. 또 유화수소 생성능 소실한 점 등이 사람에서 생균 vaccine의 형태로 장티푸스 예방에 사용하는 gal E 변이주인 *S typhi* Ty21a 균주의 성상⁴과 모두 일치하는 것으로 나타났다. 또 A2와 D1 변이주의 galactose에 의한 용균현상도 뚜렷이 나타나 galactose에 대한 감수성을 확인할 수 있었다. 그런데 gal E 변이주의 galactose에 대한 저항성은 그 세균의 병원성과 밀접한 관련이 있어 galactose에 대한 저항성 정도가 증가함에 따라 그 세균

의 병원성도 높아지는 것⁶으로 밝혀져 있으므로, gal E 변이주의 galactose 저항성과 밀접한 관계가 있는 Leloir pathway 효소계에 포함되어 있는 각각의 효소에 대한 효소활성을 조사하였다. 분리균주인 A2와 D1은 모두 UDP-Gal-4-epimerase의 활성을 완전히 소실한 반면 Leloir pathway의 다른 효소 활성은 parent strain에 비하여 galactokinase, Gal-1-P transferase, galactose permease 활성도는 A0150 균주의 각 효소활성에 비하여 A2 균주의 경우 46.8%, 36.8%, 78.9%로, D1 균주의 경우에는 11.8%, 25.1%, 79.5%에 해당하는 것으로 나타났다. 세계보건기구¹⁸에서 발표한 사람의 장티푸스 vaccine 제조용 *S typhi* Ty21a 균주의 효소활성도는 야외균주인 *S typhi* Tpy2균주의 효소활성을 100%로 하였을 때 UDP-Gal-4-epimerase 0%, galactokinase 5-20%, Gal-1-P transferase 25-50%, galactose permease 40-50% 이내 범위에 해당하여야 한다고 명시하고 있다. 이것과 비교할 때 본 실험에서의 분리균주 A2와 D1은 UDP-Gal-4-epimerase의 경우는 위의 조건을 만족하지만, A2의 경우에는 galactokinase, galactose permease의 활성도가 위의 조건을 충족하지 못하며, D1의 경우에는 galactose permease의 활성도에 차이가 있는 것으로 밝혀졌다. 이와 같은 결과는 본 실험에서 분리한 gal E 변이주가 생균 vaccine 제조용 균주로 이용하기에는 안전성의 문제가 있을 가능성도 있다는 것을 시준한다. 그러나 이 기준은 *S typhi* Ty21a균주의 경우에 해당하는 것이므로 본 실험에서의 분리한 *S pulluorm*의 경우에는 gal E 변이주를 이용한 생균 vaccine 제조용 균주의 안정성 확인을 위한 새로운 효소활성도 기준이 마련되어야 할 필요가 있는 것으로 판단된다.

소화기 감염 세균의 예방을 위한 생균백신이 구비하여야 할 조건으로는 안전하고, 부작용이 없으면서, 질병에 대한 방어효과가 탁월하여야 하며, 백신 투여 후 백신균주가 소화기계에서 쉽게 제거되어야만 하는 것 등을 들 수 있다¹⁹. 이와 같은 관점에 비추어 볼 때 본 실험에서 분리한 gal E 변이주는 우수한 생균백신 제조용 균주로의 이용가능성이 매우 높다고 할 수 있다. 그러므로 본 실험에서 분리한 A2 및 D1 균주에 대하여 숙주동물에 대한 병원성, 외부에서 공급하는 galactose의 세균세포내 분포도 등에 관한 체계적인 연구를 계속 추진하여야 할 것으로 사료된다.

결 론

Salmonella spp 감염증에 대한 생균백신 제조용 균주의

특성에 관한 기초실험의 일환으로 *S pullorum* A0150을 ethidium bromide 처리하여 galactose 분해능이 없는 돌연 변이주를 분리하였다. 이와 같이 분리한 변이주 중에서 UDP-Gal-4-epimerase 효소 결손 변이주의 가능성이 높은 세균주를 선택한 후 galactose에 의한 유도용균시험, galactose를 합성하는 대사과정인 Leloir pathway에 관하여는 효소계의 활성도 등에 관한 실험을 실시하였다.

분리변이주인 *S pullorum* A2 및 D1 균주는 돌연변이 처리에 의하여 galactose 분해는 H₂S 생성능을 소실하여 일부 생화학적인 성상이 변화하였으며, galactose에 의한 용균현상이 나타남으로써 galactose에 대한 감수성이 높은 것을 알 수 있었다. 한편 galactose 대사에 관여하는 Leloir pathway의 효소계중 UDP-Gal-4-epimerase의 활성은 완전히 소실되었으며, galactokinase, Gal-1-P transferase, galactose permease 활성도는 A 0150균주에 비하여 상당히 감소한 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

1. Germanier R. Immunity in experimental salmonellosis. III. Comparative immunization with viable and heat-inactivated cells of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1972; 5: 792-797.
2. Collins FM, Carter PB. Comparative immunogenicity of heat-killed and living oral salmonella vaccines. *Infect Immun* 1972; 6: 451-458.
3. Wahdan MH, Sérié C, Cerisier Y, et al. A controlled field trial of live *Salmonella typhi* Ty 21a oral vaccine against typhoid: three-year results. *J infect Dis* 1982; 145(3): 292-295.
4. Germanier R, Fürer E. Isolation and characterization of Gal E mutant Ty21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *J Infect Dis* 1975; 131: 553-558.
5. Krishnapillai V, MacPhee DG, Stocker BAD. Properties of a *Salmonella typhimurium* mutant with an incomplete deficiency of uridine diphospho galactose-4-epimerase. *J Bacteriol* 1971; 107: 155-161.
6. Germanier R, Fürer E. Immunity in experimental salmonellosis. II. Basis for the avirulence and protective capacity of gal E mutants of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1971; 4(6): 663-673.
7. 김중배, 안준환, 엄용빈. Galactose epimerase결손 *Salmonella pullorum* 변이주의 분리와 특성확인.

연세대학교 보건과학논집 1994; 4: 47-52.

8. Ewing WH. Differentiation of Enterobacteriaceae by biochemical reactions. In *Identification of Enterobacteriaceae*, 4th ed. New York: Elsevier Science Publishing Co, 1986; 47-72.
9. Nikaido H. Galactose-sensitive mutants of *Salmonella*. I. Metabolism of galactose. *Biochim Biophys Acta* 1961; 48: 460-469.
10. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
11. Maxwell ES, Kuruhashi K, Kalcar HM. Enzymes of Leloir pathway. 1. Quantitative determination of enzymatic activity in broken cell preparations. *Methods Enzymol* 1962; 5: 174-179.
12. Lewin W, Gear JHS, Landau DA. A comparative study of the formation of antibodies in the serum of persons treated with three types of typhoid vaccines. *S Afr Med J* 1937; 11: 629-634.
13. Collins FM. Immunity to enteric infection in mice. *Infect Immun* 1970; 1: 243-250.
14. Collins FM, Carter PB. Comparative immunogenicity of heat-killed and living oral salmonella vaccines. *Infect Immun* 1972; 6: 451-458.
15. Angerman CR, Eisenstein CK. Correlation of the duration and magnitude of protection against *Salmonella* infection afforded by various vaccines with antibody titers. *Infect Immun* 1980; 27: 435-443.
16. Hohmann A, Schmidt G, Rowley D. Intestinal and serum antibody responses in mice after oral immunization with *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Salmonella-Escherichia* hybrid strains. *Infect Immun* 1979; 25: 27-33.
17. Svenson SB, Lindberg AA. Artificial salmonella vaccines: *Salmonella typhimurium*0-antigen specific oligosaccharide-protein conjugates elicit protective antibodies in rabbits and mice. *Infect Immun* 1981; 32: 490-496.
18. Germanier R, Joo I, van Ramshorst JD. Requirements for typhoid vaccine live attenuated(Ty21a, oral). *WHO BS* 1983; 82. 1389 Rev.1: 1-17.
19. Gilman RH, Hornick RB, Woodward WE, et al. Evaluation of UDP-glucose-4-epimerase mutant of *Salmonella typhi* as a live oral vaccine. *J Infect Dis* 1977; 136: 717-723.