

## 세균의 Stress Response

이인수<sup>1</sup> · 박용근

<sup>1</sup>한남대학교 미생물학과, 고려대학교 생물학과

*Salmonella*를 포함하는 많은 종류의 병원미생물들은 자연계를 비롯하여 숙주(host)내에서 그들의 생활사동안 외부환경의 다양한 변화로 야기된 생리적 Stress를 경험하게 된다. 자외선 조사, 풍부한 영양분의 존재와 영양분의 결핍(starvation), 산소 상태에서 무산소 상태로의 전이, 열충격(heat shock), 삼투농도의 변화, 숙주에서 생성된 antimicrobial peptides, oxidative Stress 및 pH의 변동들이 그 주요한 Stress라 할 수 있다. 그러므로 각 미생물들은 외부환경으로부터 밀려드는 다양한 Stress들에 적응하여 생존할 수 있는 보호기작(protective mechanism)을 갖게 되는데, 이러한 보호 또는 방어기작은 각각의 Stress에 특이적 성격을 갖거나 혹은 다양한 Stress에 대한 교차방어(cross protection) 효과를 나타내기도 한다. 본 총설에서는 *Salmonella typhimurium*을 대상으로 다양한 Stress에 대항하는 세균의 생존전략에 관련한 내용에 대하여 언급할 것이다. 일반적으로 병원성 *S. typhimurium*이 숙주로부터 분리되어 자연환경에 놓이게 되면 맨먼저 온도 Stress를 경험하며, 이어서 가용한 영양분의 결핍에 의한 starvation이 점진적으로 진행된다. 또한 숙주생체보다 낮은 osmolarity 그리고 pH변동에 당면하게 되고, 결국 각종의 Stress 조건하에서 *S. typhimurium*은 viable-but-nonculturable state로 진입하여 오랜기간동안 생존하게 된다(61,71,74). 오염된 음식물이나 또는 어떤 감염기회로 말미암아 *Salmonella* sp가 숙주내로 감염되었을 경우에도 역시 세균은 다양한 Stress를 경험하게 된다. *Salmonella*가 접하는 맨처음의 Stress는 위에서 분비되는 강한 산성 pH(pH 1-2)의 분비물에 의한 산성충격이며, 이어서 세균은 소장내의 염기성 체장분비물에 의한 일시적인 알칼리 충격(pH 12)의 맛을 보게 된다. 통상 소장의 pH는 약알칼리(pH 7.2)의 상태를 유지하게되어 다양한 미생물들의 대사작용이 활발하게 진행되는데, 이 경우에서도 세균들은 낮은 산소조건, 담즙산, 장내세균들의 탄수화물 발효과정에서 형성된 weak acids, 증가된 osmolarity 및 다양한 장내세균들과의 영양원에 대한 경쟁적 상호관계 등의 많은 Stress에 접한다. 만일 *Salmonella*가 다양한 Stress들에 대하여 적절한 대응전략하에서 반응하였다면, 세균들은 집락을 형성하고 소장의 상피세포를 경유, macrophage로 침투하여 새로운 환경을 경험하게 된다. macrophage는 낮은 pH 조건, Oxidative Stress, starvation 및

defensin이라고 불리는 다양한 antimicrobial peptides 등과 같은 Stress들을 감염된 세균들에게 공급하는데, 세균들은 이와 같은 다양한 치사적 조건하에서 생존하기 위하여 독특한 생존전략을 세우게 된다. 숙주를 비롯한 자연환경에서 필연적으로 생성되었거나, 또는 우연한 기회에 형성된 여러 가지 Stress 요인들에 대한 미생물들의 인지 및 반응은 미생물의 생존 및 종의 유지에 필수조건이 된다. 지금까지 알려진 바에 따르면, 한 종류의 Stress 반응 및 방어전략은 여러 일반적인 Stress의 극복에도 상호연관성이 보여지므로 Stress에 대한 세균의 반응은 일종의 환경 Stress 유전자발현조절군에 의하여 진행될 것이라고 예견할 수 있다. 그러므로 미생물들의 Stress Response에 관련한 연구내용들에 대한 결과들은 우리가 예상하지 않았던 새로운 물질대사 현상을 탐색할 수 있는 기회를 줄 수 있으며, 아울러 생물공정에서 예견되지 않았던 사실들에 대한 해결의 실마리를 제공하거나 또는 공정의 최적화에 적용될 수 있을 것이다. 이같은 맥락에서 본 총설에서는 영양물질의 결핍(starvation), 열충격(heat shock), 삼투농도의 변화, antimicrobial peptides, 금속이온, oxidative stress 및 pH의 변동 등의 Stress에 대한 *Salmonella*의 유전적 반응에 대하여 언급하려고 한다.

## 본 론

### Starvation Stress

*Salmonella* sp.는 영양분의 고갈이 진행되거나 또는 유용한 영양원이 결핍된 환경조건하에서 생존하기 위하여 starvation에 대하여 반응하고, 그 결과 적절한 대응전략을 사용하기 때문에 starvation에 어느정도의 내성을 갖게 되는데, 이러한 *Salmonella*의 starvation에 관련한 연구들은 주로 phosphate(P)와 carbon(C) 그리고 nitrogen(N)을 대상으로 진행되고 있다(33). 일반적으로 starvation을 비롯하여 다양한 Stress에 관련한 세균의 유전적 반응을 탐색하기위한 연구들은 Mud-lac gene fusion을 이용한 유전자의 확인을 통하여 용이하게 진행될 수 있다. 최근의 starvation에 관련한 연구들에서 나타난 바와같이 Starvation Stress에 관여하는 유전자들은 탄소원, 질소원 그리고 인산원 등의 결핍에 각각 독자적으로 반응하는 경우도 있

지만, 대부분의 경우에서 다양한 영양원들의 결핍에 통합적으로 반응하는 일종의 overlapping set을 형성하고 있는 것으로 나타났다(24,63,65). starvation 유도유전자들의 표기는 *sti*로 하며, 특히 그 중에서 탄소원의 결핍에 의하여 유도되는 것들은 *csi*로 표기한다. Mud-lac gene fusion을 통하여 확인된 starvation 유도유전자들중에서 *stiA*, *stiB* 및 *stiC* 등의 유전자들은 또한 starvation survival에도 관여하는 것으로 확인되었다(64). starvation 유도유전자들은 탄소원의 결핍에 따른 세균의 성장 양태에 따라서 그 생리적 반응이 독특하게 나타나 다음과 같이 대별해 볼 수 있다. 즉 starvation-induced stationary phase의 바로 전에서, 즉 late log phase에서 유도되는 *stiK*, *csiG*, *csiM* 등의 유전자들은 phase 0 그룹에 속하는 유전자들이며, *stiB*와 같은 phase 1 그룹의 유전자는 starvation-induced stationary phase로 진행되는 초기에 유도되는 유전자이고, 그외에 phase 2와 phase 3 유전자들은 stationary phase로 진행된 후, 각각 1~2시간과 4~5시간이 진행되는 과정에서 유도되는 유전자들이다. starvation 유도유전자들의 조절은 cyclic AMP receptor protein(CRP), alternate sigma factor로 알려진 *RpoS*( $\sigma^s$ ) 및 ppGpp 등에 의하여 복합적으로 조절된다. 즉 starvation 조건에서 세균의 생존에 관련한 유전자들인 *stiA*, *stiB*와 *stiC*들은 starvation에 노출되지 않은 *Salmonella*에서 CRP에 의하여 negative하게 조절되며, 더욱이 *stiB*는 cAMP에 대하여 독립적으로 작용한다(64).  $\sigma^s$ 는 *stiA*와 *stiC*를 positive하게 조절하지만, phase I 그룹의 유전자 *stiB*와 phase 0 그룹의 유전자 *csiG* 및 *csiM* 등은 negative하게 조절한다. 또한 대부분의 *sti*와 *csi* 유전자들은 CN(carbon and nitrogen) starvation 조건에서 stringent factor로서 알려진 ppGpp에 의하여 조절되는 것으로 알려져 있다(64). 그러므로 starvation 조건에서 Stress 유도단백질들의 합성은 세균의 중요한 생존전략이 되며, 이에 관련한 *rpoS*, *stiA*, *stiB* 및 *stiC* 등은 *S. typhimurium*을 starvation 조건하에서 생존가능케 하는 필수유전자들이다(56,64). 그러므로 이같은 돌연변이체들은 야생형 균주에 비하여 약 50~100배 정도의 생존율의 감소를 보여준다. *rpoS*를 제외한 다른 유전자들간의 이중돌연변이체들은 약 500~2000배 정도의 생존율 감소를 보여주지만, *rpoS*를 포함하는 이중돌연변이체의 경우에는 *sti* 단일 돌연변이체에서 나타나는 생존율보다 약간의 감소가 나타나는 것으로 보아 *rpoS* 배경에서 *stiA*, *stiB*와 *stiC*들은 starvation survival을 유지하는데 필수적인 산물임을 알 수 있다(56,64). 또한 starvation에 노출된 세균은 다른 환경 Stress에 대하여도 교차효과(cross protection)가 존재한다(49). 즉 starvation에 노출되었던 *S. typhimurium*은 열(55°C for 20 min)과 oxidative condition(15 mM hydrogen peroxide for 60 min) 그리고 osmotic challenge (2.5 M sodium chloride for 55 h)에 상당한 내성을 갖게 된다(44). 더욱이 이와 같은 cross protection은 *rpoS*의 산물에 의해서도 조절되어진다(43,48).

생물산업

*Salmonella*의 병원성과 연계하여 *spv* 유전자의 발현은 stationary phase sigma factor *RpoS*에 의하여 조절되어 병독성을 나타내므로, *Salmonella*의 병독성유전자의 발현과 starvation Stress반응에는 어떤 상호조절의 관계를 시사해준다(31). 종합적으로 starvation은 자연계의 microcosm과 숙주의 microenvironment에서 *S. typhimurium*의 생존전략을 작동시켜, 세균을 오랜 기간 동안 생존할 수 있도록 하며, 특히 C starvation은 다양한 환경 Stress를 비롯하여 숙주의 방어작용에 대한 일종의 protective mechanism을 갖게 한다.

### 금속이온 Stress

일반적으로 금속이온들은 미생물을 포함한 생명체들의 성장저해, 세포형태의 변화 및 물질대사에 관여하는 효소반응의 저해 등의 강한 독성을 나타낸다고 알려져 있으나, 반면에 생체의 산화-환원반응을 비롯하여 효소의 활성화에 필수적인 원소이기도하다. 여러 가지 금속이온들중에서 철(iron)은 *S. typhimurium*과 *Pseudomonas* sp. 등의 병독성발현 및 조절에 관련되었기 때문에, 철에 대한 많은 연구들이 주로 병원성 세균들을 대상으로 연구되고 있다(42,56). 감염된 숙주생물체는 세균들의 병독성 발현을 억제하기 위하여 가용한 철의 농도를 낮추고자 한다. 즉 extracellular free iron은 iron과 매우 높은 친화력을 갖는 transferrin과 lactoferrin 등의 glycoprotein에 의하여 결합되어 있기 때문에 free iron의 농도는 대략  $10^{-18}$ M이 된다. 이것은 세균들의 성장을 위한 철의 농도가  $10^{-6}$ M인 것과 비교하면 약 1/3 수준이기 때문에 상대적으로 숙주내에서 *Salmonella*는 iron Stress 조건하에 놓이게 된다. 이러한 숙주 생명체의 전략은 감염성 미생물들에 대한 일종의 방어기전이라고 할 수 있다(60). 상대적으로 미생물들은 iron을 효과적으로 획득하기 위하여 iron chelator의 기능을 소유한 enterochelin(79) 또는 hydroxamate siderophore로서의 aerobactin(72) 등을 생성하여 iron의 결핍에 대항하는 생존전략을 기획한다. 효과적인 iron의 획득에 관여하는 이와같은 물질들은 숙주내에 존재하는 transferrin과 lactoferrin 등의 물질들과 상호경쟁적으로 작용하며, 또한 자연환경에서는 mineral complex로부터 iron을 용해시킴으로써 철의 이용을 가능하게 한다(1,52). *S. typhimurium*의 염색체상 13 min 위치의 *ent* gene cluster에 encode된 enterochelin은 철과 결합하여 ferric-enterochelin complex를 형성하고, 이 복합체는 세포막을 경유하여 세균세포내로 이동된다(6). iron 획득을 위한 세균들의 또다른 방법은 hemolysin의 분비(HylA)이다(77). 일반적으로 *S. typhimurium*은 hemolysis 능력이 없는 것으로 알려져 있지만, 임상적으로 드물게 hemolysis를 나타내는 경우가 있는데, 이는 *slyA* 유전자산물인 salmolyisin에 의한 현상으로 알려져 있다. salmolyisin은 DNA 염기서열상 hemolysin과 높은 상동성을 나타내지 않으며, 더욱이 salmolyisin의 양태는 HylA와는 다른 양상

을 보이기 때문에, 현재 새로운 형태의 hemolysin으로 추정되고 있다. *S. typhimurium*에서 iron uptake의 조절은 FUR(ferrous iron uptake regulator)의 중재에 의하여 이루어지는 것으로 알려져 있다(5,15). 즉 *E. coli*의 경우, FUR는 cofactor로서 Fe(II)와 결합하고, 이어서 조절유전자의 upstream에 위치하는 iron box의 특이적 DNA 염기서열에 결합한다(3). 전통적으로 FUR는 단순히 세균세포내의 Fe(II)의 농도를 감지하여 iron uptake에 대하여 repress의 기능을 갖는 regulator로서 알려져 있으나, 최근에 FUR는 global regulation의 broad impact 조절에도 관여하는 것으로 알려지기 시작하였다(21,32,41). iron이 최적농도 이상으로 존재하거나 또는 제한적 조건의 Stress에서 *S. typhimurium*을 대상으로 2D SDS-PAGE의 결과들을 분석한 결과, FUR는 iron에 관련된 유전자들을 positive 및 negative하게 조절할 수 있는 기능을 모두 갖는 것으로 나타났으며, 이런 특성은 *Vibrio cholerae*에서 보여지는 현상들과 유사하게 나타났다(41). *S. typhimurium*의 virulence와 연계하여볼 때 병원성 SR-11의 *ent* 돌연변이체들은 mice에서 병독성의 감소를 보여주어, iron의 획득에 관여하는 유전자들은 세균의 병독성 조절과도 상호 관련된 것으로 나타났으나(76), 또다른 virulent *S. typhimurium*인 SL1344에서는 전혀 virulence 효과를 관찰할 수 없었다(4). 따라서 *S. typhimurium*에서 enterochelin은 숙주세포내의 생존에 필수적인 역할을 하지는 않으나, iron의 획득에 어느정도 관여하는 것으로 여겨진다.

### Oxidative Stress

superoxide와 hydrogen peroxide는 DNA와 단백질에 손상을 주는 반응성 산소계 물질로 알려져 있으며, 따라서 산소가 존재하는 환경을 비롯하여(25) phagocytosis에 의한 oxidative burst(2) 등의 조건들에서 *S. typhimurium*은 생존전략의 일환으로서 일련의 유전자들을 발현시키게 된다. 예를 들면 *S. typhimurium*을 sublethal 수준의 비교적 낮은 농도의  $H_2O_2$  (60  $\mu$ M)에 노출시키면 hydrogen peroxide stress에 반응하여 일련의 단백질을 합성하며, 이렇게 합성된 단백질들은 월등히 높은 농도의  $H_2O_2$  (15 mM) 조건에서 세균의 생존률을 증가시킨다. *S. typhimurium*의 이와 같은 adaptive response는 hydrogen peroxide와 superoxide라는 두개의 stimulon에 의하여 조절되며, sublethal의 oxidative stress 조건에서 각각의 stimulon에 의하여 유도된 단백질들의 일부는 서로 중복발현의 양상을 보여 주었다(27,51). 확인된 단백질들의 대부분은 아직 그 기능이 잘 알려지지 않은 상태이지만, 그러나 현재  $H_2O_2$  Stress에 의하여 9개 단백질유도에 관여하는 *oxyR*(10)과 superoxide Stress에 의한 10개의 단백질유도에 관여하는 *soxRS* 등의 regulon들에 대하여는 많은 연구들이 진행되었다(28,78). *OxyR*은 hydrogen peroxide의 무독화에 관여하는 catalase(*katG*)와 glutathione reductase(*gorA*), 그리고 NADPH-dependent alkyl

hydroperoxidase(*ahpFC*)에 관련된 유전자의 transcriptional activator로서 알려져 있다(51,69). *S. typhimurium*에는 *KetE*와 *KetG*의 isozyme이 존재하는데 이중 오직 *ketG*만이 *OxyR*에 의하여 조절된다. *GorA*는 세포의 단백질들을 환원상태로 유지시킬 수 있는 glutathione pool을 형성하는데 관여하며, alkyl hydroperoxide reductase는  $H_2O_2$ 에 의한 손상된 lipid hydroperoxide를 비독성의 알콜로 전환하여 oxidative stress에 의한 손상을 극복하도록 한다(68). 일반적으로 *soxR* regulon은 *sodA*(manganese containing superoxide dismutase, *rfo*(DNA repair enzyme endonuclease IV), *zwf*(glucose-6-phosphate dehydrogenase), *micF* 등을 비롯하여 아직 그 기능이 알려지지 않은 약간의 단백질들을 조절할 수 있는 일종의 multilevel defense로서의 기능을 소유하고 있다(27,28,70). superoxide나 nitric oxide는 *soxRS* regulon을 유도하는데, 특히 macrophage내에서 세균들에 대한 방어작용으로 생성되는 nitric oxide에 대항하여 *Salmonella*의 *SoxRS*는 세균의 생존에 중요한 부분을 차지한다(54). *SoxR*은 세포내 redox signal을 인지하며, 또한 *soxS*의 transcription을 활성화시키는 기능을 갖는다. 따라서 *SoxS*의 수준이 증가되면 다양한 *soxRS*에 관계한 regulon들의 transcription을 활성화 시키게 된다(40,55,75). *soxRS*의 활성화는 또한 redox stress와는 관계 없는 항생물질에 대한 저항성을 증가시켜줄 수 있는데, 이것은 *OmpF*의 합성이 감소되기 때문인 것으로 여겨진다(28).

### Heat Stress

세균들이 최적 생장온도보다 높은 온도에 노출되었을 경우에는 열충격단백질들의 합성을 진행하게 된다. 이러한 단백질의 존재하에서는 보다 높은 heat challenge에 대한 저항능이 증가하여 thermotolerant 현상을 나타내어 oxidative stress에서 보여준 adaptative mechanism이 존재한다. *S. typhimurium*의 thermotolerance 현상에 관련된 일련의 연구들에서(8,45,46) 보면, 열충격(heat shock) 이외의 Stress에 의하여도 heat shock protein이 생성됨을 관찰할 수 있으며, 이런 cross protection에 관여하는 Stress는 현재 starvation과 산성충격만이 알려져 있다(38,39). *E. coli*에서 발견된 heat shock protein들은 chaperonins GroEL, GroES, DnaK, DnaJ, GrpE, RpoE 및 RpoD (house keeping sigma factor  $\sigma^{70}$ ) 등으로서, 이들은 모두 열에 의하여 유도되는  $\sigma^{32}$ (RpoH)와 상호작용하여 heat stress에 대항하게 된다(80). 특히 RpoE는 다양한 환경 Stress에 대하여 세균의 저항능을 향상시키는데 주요한 기능을 담당하는 것으로 알려져 있다(66). 열충격에 대한 HSP들의 양태는 변성된 단백질에 결합하여 단백질의 계속적인 변성에 대하여 보호작용을 갖거나(59) 또는 proteolysis(Lon과 Clp protease)에 관여하기도 한다. 또 high temperature resistance(*htr*) 유전자들의 일부는 열유도 유전자들로서 알려져 있다(13). *Salmonella*

*typhimurium*에서 thermotolerance에 관련한 많은 유전자들의 기능들이 아직 완벽하게 규명되지는 않았으나, 대부분의 경우 *E. coli*에서 보여지는 특성들과 유사할 것이다.

### Osmotic Stress

*S. typhimurium*은 자연계를 비롯하여 숙주생명체에서 다양한 형태의 삼투 Stress를 경험하는데, 이러한 Stress는 일반적으로 세포막을 경계로 세포안과 밖의 osmolarity의 변동에 기인한다. 따라서 세포는 고유한 형태를 유지하기 위하여 최소한의 turgor를 유지하여야 한다. 만일 환경의 삼투농도가 증가하였을 경우, 세균들은 증가한 외부삼투농도에 대항하기 위하여 homeostatic mechanism을 작동하고, 이어서 potassium ion, proline, glycine-betaine, glutamate 또는 trehalose 등의 물질들을 이용하여 평형을 유지하고자 한다. 여기에서 glycine-betaine과 proline들은 외부환경으로부터 세포내로 이동되어 일종의 osmoprotectant로서 작용하지만, glutamate와 trehalose는 *Salmonella* 세포내에서 합성된다(11). glycine-betaine과 proline을 이용한 삼투조절은 *proU* system에 의하여 진행되며(12, 67,70), 그외에 *proV*, *proW* 및 *proX* 등의 유전자들도 이러한 삼투조절에 관여하고 있다. 흥미로운 것은 *proU*의 발현이 삼투농도의 변화뿐 아니라 pH와 같은 다른 종류의 Stress에도 발현된다는 것이다(26,34,36). potassium의 흡수는 turgor에 의하여 유도되는 *kdp* operon 작동의 결과로 이루어지며, 이런 현상은 *E. coli*에서 잘 알려져 있으며, *S. typhimurium*에서도 이 유전자의 존재가 확인되었다(73). 삼투농도 변동에 따른 세균 세포의 생존전략들 중에서 세포막에 관련된 OmpC와 OmpF는 outer membrane의 porins으로서 osmolarity의 변동에 대하여 서로 반비례적 관계로 조절된다(53). 즉 장내의 높은 삼투농도에서 OmpC는 증가하지만 OmpF의 수준은 감소한다. 이와같은 특성은 *S. typhimurium*의 숙주의 장내에서의 성장에 매우 중요한 기능을 담당하며, 실제로 이런 돌연변이체들은 virulence가 감소한 attenuated strain으로서 간주된다(9,14). OmpC는 장에 존재하는 분자량이 작은 bile salt와 같은 생장 저해 물질들을 세포밖으로 방출하는데 주요한 기능을 담당하고 있다. OmpC와 OmpF의 조절은 세포막의 sensor인 EnvZ와 OmpR에 의하여 조절된다(11). osmotic Stress에 대항하는 세균들의 방어기전은 결국 세포의 항상성 유지를 위한 조절작용으로 이해될 수 있으며, 특히 이런 조절양태는 세균의 병독성과 oxidatives stress 그리고 산성충격과도 상호연계성이 나타난다.

### Cationic Peptide Stress

동물들은 세균들의 침입에 대항하기 위하여 분자량이 작은 cationic peptide를 합성하는데, 따라서 *S. typhimurium*이 숙주 내에서 pathogenesis를 나타내기 위해서는 장에서 분비되는 다양한 종류의 antimicrobial peptide들에 대한 생존전략이 요구

된다(57). 또한 *S. typhimurium*이 병독성의 유지를 위하여 macrophage내에서 발현하는 유전자들중에서 많은 연구가 진행된 대표적인 것으로는 *phoP*이다(17). 이 유전자는 초기에 *phoQ*와 함께 phosphate starvation에 관여하는 유전자로 알려졌다(37). PhoP와 PhoQ는 최소한 약 40여개의 polypeptide의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있으며(7,50), 특히 세균들이 antimicrobial peptide에 대한 내성을 갖는데 필수적인 유전자들이다. 즉 *phoP* 또는 *phoQ*의 null 돌연변이체는 defensin에 대하여 약 100배 정도의 감수성의 증가를 나타냈다(16,29). antimicrobial peptide에 관련한 또 다른 조절양태는 *pmrA*와 *pmrB*에 의한 것으로써(62), 원래 이 유전자들은 polymyxin E에 저항성을 갖는 특성으로 분리되었다(47). 현재 *pmrAB*의 기능은 polymyxin 또는 cationic peptide과 같은 물질에 대한 outer membrane의 결합능을 감소시키는 것으로 알려져 있다. antimicrobial peptide에 대한 세균의 전략중 흥미로운 것은 *sap*(sensitivity to antimicrobial peptide) system에 속한 유전자들의 작용이다(30). *S. typhimurium*은 *sapABCDF* operon을 작동하여 숙주생명체로부터 형성된 melittin과 protamine 등의 antimicrobial peptide들을 분해함으로써 숙주의 방어전략을 무산시키며, 결국 세균의 병독성을 유지하여 숙주를 공격하게 된다(30,58). cationic peptide stress에 대항하는 방어기전에 관련한 유전자들중에서 특히 macrophage내에서 *Salmonella*의 생존전략을 위한 필수적인 유전자들은 숙주생명체내에서 세균유전자의 발현양태를 관찰할 수 있는, 즉 *in vivo* gene expression의 연구를 위한 도구가 될 수 있다.

### pH Stress

미생물계에서 가장 빈번하게 이용되는 Stress 조건중의 하나는 산성 pH 변동효과에 관련한 연구들이다. 미생물에 의해서 생성된 weak acid와 acid mine drainage 그리고 acid rain등은 모두 산성 Stress를 줄 수 있는 조건들이다. 이러한 조건하에서 생존할 수 있는 전략은 미생물 병독성의 해결뿐만 아니라 공업적으로 그 이용가능성이 충분히 존재한다. 어떤 미생물들(acidophiles)은 극한 산성 환경에서 독특한 생태적 지위를 갖도록 진화되었지만, 중성 pH 영역에서 성장하는(neutralophiles) 미생물들에게 있어서는 생존에 위협을 주는 강력한 Stress 조건으로 작용된다. *S. typhimurium*은 낮은 pH 조건에서 성장할 수 있는 다수의 생존전략을 갖게 되는데, 이것은 acid tolerance response의 결과 형성된다. 또한 이 반응은 log phase와 stationary phase에서 각각 독특하게 진행되어지기 때문에 starvation 조건에서 반응하는 조절유전자들과의 어떤 상관관계를 생각해볼 수 있다. *S. typhimurium*의 최저성장 pH는 glucose minimal 배지에서 약 pH 4.3이다. *E. coli*(pH 4.6)와 비교해 볼 때, 상대적으로 약간 낮은 pH수준을 보여주며, 이것은 *S. typhimurium*이 낮은 pH에서 적응할 수 있는 고유의 생존

전략을 갖고 있다는 것을 시사한다(35). 더욱이 pH 4.3에서 적응된, 즉 산성충격에 대항할 수 있는 단백질들을 소유한 *S. typhimurium*은 severe acid 조건(pH 3.0)에서 생존할 수 있는데, 이것은 acid tolerance response system이 작동되었을 경우에 가능하며(23,38), 이러한 산성충격에 대한 반응전략은 log phase 그리고 stationary phase acid tolerance response의 두 system에 의하여 각각 고유한 양태로 진행된다. 중성 pH 조건에서 성장한 대수생장기의 세포들을 대상으로 산성충격(pH 4.3) 조건에서 단백질분해를 수행한 결과 약 50개의 acid shock protein(ASP)들이 형성되었으며, 이중에서 약 20여 단백질은 산성 충격에 대한 보호작용이 있는 단백질들로서 여겨진다(18,19). stationary phase 세포들을 대상으로 pH 4.3에서 산성충격을 주었을 경우에는 15개의 ASP들이 발견되었으며, 산성충격을 받은 세포들은 역시 severe acid에 대하여 생존능이 존재하였다. 이와같은 산성 Stress에 작용하는 유전자는 acid tolerance에 관여하는 유전자들과(19,20,22), iron metabolism에 영향을 주는 *fur*, *ent*와 *atrD*, proton pumping에 관여하는 *atp* 또는 DNA repair 기능을 갖는 *polA* 등이 알려져 있다. 산성 조건에 대한 생존전략에 관여하는 regulon은 dinitrophenol과 낮은 pH 조건에서 산성저항성감소돌연변이체의 확보를 통하여(20) 연구될 수 있는데, *atrB*와 그 조절유전자 *atbR*이 그 대표적인 예이다. *atbR* 돌연변이체를 대상으로 2D SDS-PAGE를 수행한 결과, 약 10개의 단백질들이 over expression 되어, *atbR*이 *S. typhimurium*을 산성조건하에서 생존케 하는 중요한 regulon으로 볼 수 있다. 또 다른 조절계로서는 alternative sigma factor  $\sigma^E$ 에 의한 log phase ATR이다. *rpoS*는 산성 충격에 대하여 transient induction을 하여, 강산에 대하여 약간의 저항성만을 보여 주지만, *rpoS*\* 균주와 비교해 볼 때 이런 저항성은 acid sensitive 하다고 할 수 있다. 즉 acid shock protein은 *rpoS* dependent protein이라고 할 수 있다(39). 산성 충격을 준 *S. typhimurium*은 열, oxidative stress 및 osmotic stress에 대하여 cross protection을 나타내는데, 여기에는 물론 RpoS가 관여한다. 반대로 열충격 또는 삼투충격은 acid tolerance에 대한 cross protection 효과는 나타나지 않아 산성충격이 상위의 조절계에 위치하는 것으로 여겨진다. 이같은 산성화 방어전략은 산성의 가수분해효소생산을 소유한 macrophage내에서 *Salmonella*의 필수적인 생존전략이 되며(39), 따라서 산성 pH 유도유전자들은 세균의 병독성유전자의 발현과도 상호연계성이 보인 것으로 보여진다.

## 결 론

영양물질의 결핍(starvation), 열충격(heat shock), 삼투농도의 변화, antimicrobial peptides, 금속이온, oxidative stress 및 산성 pH변동 등의 다양한 Stress에 대항하는 *S. typhimurium*

의 생존전략들은 각 Stress에 대하여 독자적인 발현양태가 나타나는 경우도 있으나, 흥미로운 사실은 교차발현의 양상이 나타나기도 한다는 것이다. 즉 하나의 Stress에 대항하는 방어 전략은 또 다른 Stress의 해결에도 적용될 수 있다는 것이다. 이것은 *S. typhimurium*을 비롯한 많은 병원성세균들에서도 공통적으로 나타나는 현상이다. 즉 이런 공통현상은 병원성 미생물들이 오랜기간동안 숙주생명체와의 상호작용결과 형성된 진화적 산물로 해석될 수 있으며, 따라서 Stress 유도유전자 및 그 단백질들의 분석은 세균의 진화를 추적하는데 이용될 수 있는 가능성을 시사한다. 더욱이 Stress Response에 관련한 연구결과들은 지금까지 세균의 global network상에서 예견되지 못했던 새로운 생리.생화학적 현상들을 탐색할 수 있는 기회를 줄 수 있으며, 아울러 이러한 결과들은 생물공정에서 예견되지 않았던 사실들에 대한 해결의 실마리를 제공하거나 또는 공정의 최적화에 적용될 수 있을 것이다.

## 참고문헌

1. Aznar R., Amaro C., Alcaid E., and Lemos M. L. 1989. Siderophore production by environmental strains of *Salmonella* species. *FEMS Microbiol. Lett.*, **57**, 7-12.
2. Babior B. M. 1992. The respiratory burst oxidase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **65**, 49-95.
3. Bagg A., and Neilands J. B. 1987. Ferric uptake regulation protein acts as a processor, employing iron(II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **26**, 5471-77.
4. Benjamin W. H., Turnbough C. L. J., Posey B. S. J., and Briles D. E., 1985. The ability of *Salmonella typhimurium* to produce the siderophore enterobactin is not a virulence factor in mouse typhoid. *Infect. Immun.* **50**, 392-97.
5. Bennett R. L., and Rothfield L. I., 1976. Genetic and physiological regulation of intrinsic proteins of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **127**, 498-504.
6. Briat J. F., 1992. iron assimilation and storage in prokaryotes. *Microbiology* **138**, 2475-83.
7. Buchmeier N. A., and Heffron F., 1990. Induction of *Salmonella* Stress proteins upon infection of macrophage. *Science*. **248**, 730-32.
8. Bunning V. K., Crawford R. G., Tierney J. T., and peeler J. T., 1990. Thermotolerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* after sublethal heat shock. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3216-19.
9. Chatfield S. N., dorman C. J., Hayward C., and Dougan G., 1991. Role of ompR-dependent genes in *Salmonella typhimurium* virulence: Mutants deficient in both OmpC and OmpF are attenuated in vivo. *Infect. Immun.* **59**, 449-52.

10. Christman M., Morgan R., Jacobson F., and Ames B., 1985. Positive control of a regulon for defenses against oxidative Stress and some heat shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* **41**, 753-62.
11. Csonka L. N., and Hanson A. D., 1991. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 569-81.
12. Csonka L. N., Ikeda T. p., Fletcher S. A., and Kustu S., 1994. The accumulation of glutamate is necessary for optimal growth of *Salmonella typhimurium* in media of high osmolaity but not induction of the *proU* operon. *J. Bacteriol.* **176**, 6324-33.
13. Delaney J. M., Wall D., and Georgopolous C., 1993. Molecular characterization of the *Escherichia coli htrD* gene: cloning, sequence, regulation and involment with cytochrome d oxidase. *J. Bacteriol.* **175**, 166-75.
14. Dorman C. J., Chatfield S., Higgins C. F., Hayward C., and Dougan G., 1989. Characterization of porin and *ompR* mutant of a virulent strain of *Salmonella typhimurium*: *ompR* mutant are attenuated *in vivo*. *Infect. Immune.* **57**, 2136-40.
15. Ernst J. F., bennet R. L., and Rothfield L. I., 1978. Constitutive expression of the iron enterochelin and ferrichrome uptake systems in a mutant strain of *Salmonella typhimurium*. *J. Microbiol.* **135**, 928-34.
16. Fields P. I., Groisman E. A., and Heffron F., 1989. A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science* **243**, 1059-62.
17. Fields P. I., Swanson R. V., Haidaris C. G., and Hefron R., 1986. Mutant of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 5189-93.
18. Foster J. W., 1993. The acid tolerance Response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins. *J. Bacteriol.* **175**, 1981-87.
19. Foster J. W., 1991. Samolella acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance Response. *J. Bacteriol.* **173**, 6896-902.
20. Foater J. W., and Bearson B., 1994. Acid sensitive mutants of *Salmonella typhimurium* identified through a dinitrophenol selection strategy. *J. Bacteriol.* **176**, 2596-602.
21. Foster J. W., and Hall H. K., 1992. Effect of *Salmonella typhimurium* ferric uptake regulator (*fur*) mutations on iron and pH-regulated protein synthesis. *J. Bacteriol.* **174**, 4317-23.
22. Foster J. W., and Hall H. K., 1991. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance Response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **173**, 5129-35.
23. Foster J. W., and Hall H. K. 1990. Adaptive acidification tolerance Response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **172**, 771-778.
24. Foster J. W., and Spector M. P. 1986. Phosphate-starvation regulon of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **166**, 666-669.
25. Fridovich I., 1983. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **23**, 239-257.
26. Graeme-Cook K. A., May G., Bremer E., and Higgins C. F., 1989. Osmotic regulation of protein expression: a role for DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* **3**, 1287-1294.
27. Greenberg J. T., and Demple B., 1989. A global Response induced in *Escherichia coli* b redox cycling agents overlaps with that induced by peroxide Stress. *J. Bacteriol.* **171**, 3933-3939.
28. Greenberg J. T., Monach P., Chou J. H., Josephy P. D., and Demple B., 1990. Positive control of global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agent in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 6181-6185.
29. Groisman E. A., Heffron F., and Solomom F. 1992. Molecular genetic analysis of the *Escherichia coli* *phoP* locus. *J. Bacteriol.* **173**, 486-491.
30. Groisman E. A., Parra-Lopez C A., Salcedo M., Lipps C. J., and Heffron F. 1992. Resistence to host antimicrobial peptides is necessary for *Salmonella virulce*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 11939-11943.
31. Guiney D. G., Fang F. C., Krause M., Libby S., Buchmeier N., and Fierer J. 1995. Biology and clinical significance of virulence plasmids in *Salmonella serovars*. *Clin. Infect. Dis.* **21**, 146-151.
32. Hantke K., 1987. Selection procedure for deregulated iron transport mutants(*fur*) in *Escherichia coli*: *fur* not only affects iron metabolism. *Mol. Gen. Genet.* **210**, 135-139.
33. Harder W., and Dijkhuizen L. 1983. Physiological Response to nutrient limitation. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**, 1-23.
34. Higgins C. F. Dorman C. J., Stirling D. A., Waddell L., Booth L. R., and *et al.* 1988. A Physiological role DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *Salmonella typhimurium* and *E. coli*. *Cell* **52**, 569-584.
35. Huttanen C. N., 1975. Use of pH gradient plates for increasing the acid tolerance of *Salmonella*. *Appl. Environ. Microbiol.* **29**, 309-312.
36. Karem K., and Foster J. W. 1993. The influence of DNA topology on the environmental regulation of a pH regulated locus in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **10**, 75-86.
37. Kier L. D., Weppelman R. M., and Ames B. N. 1979. Regulation of a nonspecific phosphatase in *salmonella*: *phoN* and *phoP* gene. *J. Bacteriol.* **138**, 155-161.
38. Lee I. S., Slonezewski J. L., and Fosrer J. W. 1994. A low pH inducible stationary phase acid tolerance Response in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacreiol.* **176**, 1422-1426.
39. Lee I. S., Lin J., Hall H., Bearson B., and Foster J. W., 1995, The stationary-phase sigma factor  $\sigma^R$ (RpoS) is required for a sustained acid tolerance Response in virulent

- Salmonella typhimurium*, *Molecular Microbiology*, **17**, 155-167.
40. Li Z., and Demple B., 1994. SoxS, an activator of superoxide Stress genes in *Escherichia coli*. Purification and interaction with DNA. *J. Bio. Chem.* **269**, 18371-18377.
  41. Litwin C. M., and Calderwood S. B., 1994. Analysis of the complexity of gene regulation by Fur in *Vibrio cholera*. *J. Bacteriol.* **176**, 240-248.
  42. Litwin C. M., and Calderwood S. B., 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**, 137-49.
  43. Loewen P. C., von Ossowski J., Switala J., and Mulvey M. R. 1993. *KatF*( $\sigma^S$ ) synthesis in *Escherichia coli* is subject to post-transcriptional regulation. *J. Bacteriol.* **175**, 2105-2113.
  44. McLeod G. I., and Spector M. P., 1996. Starvation- and stationary- phase induced resistance to the antimicrobial peptide polymyxin B in *Salmonella typhimurium* is RpoS( $\sigma^S$ ) independent and occurs through both *phoP*-dependent and -independent pathways. *J. Bacteriol.* **178**, 3683-3688.
  45. Mackey B. M., and Derrick C., 1990. Heat shock protein synthesis and thermotolerance in *Salmonella typhimurium*. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 373-383.
  46. Mackey B. M., and Derrick C. M., 1986. Elevation of the heat resistance of *Salmonella typhimurium* by sublethal heat shock. *J. Appl. Bacteriol.* **61**, 389-93.
  47. Makela P. H., Sarvas M., Calcagno S., and Lounatmaa K., 1978. Isolation and characterization of polymyxin-resistance mutant of *Salmonella*. *FEMS Microbiol. Rev.* **3**, 323-326.
  48. McCann M. P., Fraley C. D., and Matin A., 1993. The putative  $\sigma$  factor *KatF* is regulated posttranscriptionally during carbon starvation. *J. Bacteriol.* **175**, 2143-2149.
  49. McCann M. P., Kiwell J. P., and Matin A., 1993. The putative sigma factor *KatF* has a central role in development of starvation -mediated general resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**, 4188-4194.
  50. Miller S. I., and Mekalanos J. J., 1990. Constitutive expression of the *phoP* regulon attenuates *Salmonella* virulence and survival within macrophage. *J. Bacteriol.* **172**, 2485-2490.
  51. Morgan R. W., Christman M. F., Jacobson F. S., Styrz G. and Ames B. N., 1986. Hydrogen peroxide- inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other Stress proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8059-8063.
  52. Mulvey M. R., Loewen P. C., 1993. Nucleotide sequence of *katF* of *Escherichia coli* suggest *KatF* protein is a novel  $\sigma$  transcription factor. *Nucleic Acids Res.* **17**, 9979-9991.
  53. Neilands J. B., 1981. Microbial iron compounds. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 715-731.
  54. Nikaido H., and Vaara M., 1987. Outer membrane. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, pp. 7-27. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol.
  55. Nunoshiba T., De Rojas-Walker T., Wishnok J. S., Tannebaum S. R., and Demple B., 1993. Activation by nitric oxide of an oxidative-Stress Response that defends *Escherichia coli* against activated macrophage. *Proc. Acad. Sci. USA*. **90**, 9993-9997.
  56. Nunoshiba T., Hidalgo E., Cuevas C. F. A., and Demple B., 1992. Two stage control of an oxidative Stress regulon: the *Escherichia coli* SoxR protein triggers redox inducible expression of the *soxS* regulatory gene. *J. Bacteriol.* **174**, 6054-6060.
  57. O'Neal C. R., Gabriel W. M., Turk A. M., Libby S. J., Fang F. C., and Spector M. P., 1994. RpoS is necessary for both the positive and negative regulation of starvation survival genes during phosphate, carbon, and nitrogen starvation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**, 4610-4616
  58. Otto B. R., Verweij-van Vught A. M. J. J., and Manlaren D. M., 1992. Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **18**, 217-233.
  59. Ouellette A. J., Lualdi J. C. 1990. A novel mouse gene family coding for cationic, cysteine-rich peptide regulation in small intestine and cells of myeloid origin. *J. Bacteriol.* **265**, 9831-9837.
  60. Parra-Lopez C., and Baer M. T., 1993. Molecular genetic analysis of a locus required for resistance to antimicrobial peptides in *Salmonella typhimurium*. *EMBO J.* **12**, 4053-4062.
  61. Parsell D. A., and Lindquist S. 1993. The functions of heat shock proteins in Stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* **27**, 437-496.
  62. Pollack J. R., and Neilands J. B., 1970. Enterobactin, an iron transport compound from *Salmonella typhimurium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**, 982-989
  63. Puschmann M., and Ganzoni A. M., 1977. Increased resistance of iron-deficient mice to *Salmonella* infection. *Infect. Immun.* **17**, 663-664.
  64. Roszak D. B., Grimes D. J., and Colwell R. R., 1984. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in a aquatic system. *Can. J. Microbiol.* **30**, 334-338.
  65. Rowland K. L., Martin L. E., Esther C. R., and Spitznagel J. K., 1993. Spontaneous *pmrA* mutants of *Salmonella typhimurium* LT2 define a new two component regulatory system with a possible role in virulence. *J. bacteriol.* **175**, 4154-4164.
  66. Schurr M. J., Yu H., Boucher J. C., Hibler N. S., and Deretic V. 1995. Multiple promoters and induction by heat shock of the gene encoding the alternative sigma factor AlgU (sigma super(E)) which controls mucoidy in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **177**,

- 5670-5679.
67. Spector M. P., Aliabadi Z, Gonzalez T., and Foster J. W., 1986. Global control in *Salmonella typhimurium*: two-dimensional electrophoretic analysis of starvation-, anaerobiosis-, and heat shock-inducible proteins. *J. Bacteriol* **168**, 420-424.
  68. Spector M. P., and Cubitt C. L., 1992. Starvation-inducible loci of *Salmonella typhimurium*: regulation and roles in starvation survival. *Mol. Microbiol.* **6**, 1467-1476.
  69. Spector M. P., Park Y. K., Tigrari S., Gonzalez T., and Foster J. W., 1988. Identification and characterization of starvation-regulated genetic loci in *Salmonella typhimurium* by using Mud-directed *lacZ* operon fusions. *J. Bacteriol.*, **170**, 345-351.
  70. Stirling D. A., Hulton C. S. J., Waddell L., Park S. F., Stewart G. S. A. B., and *et al.* 1989. Molecular characterization of the *proU* loci of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* encoding osmoregulated glycine betadine transport systems. *Mol. Microbiol.* **3**, 1025-1038.
  71. Storz G., Christman M. F., Sies H., and Ames B. N., 1987. Spontaneous and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 8917-8921.
  72. Tartaglia L. A., Storz G., Brodsky M. H., Lai A., and Ames B. M., 1990. Alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. Sequence and homology to thiorodoxin reductase and other flavoprotein disulfide oxidoreductases. *J. Biol. Chem.* **265**, 10535-10540.
  73. Tsaneva I. R., and Weiss B., 1990. *soxR*, a locus governing a superoxide Response regulon in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **172**, 4197-4205.
  74. Turpin P. E., Maycraft K. A., Rowlands C. L., and Wellington E. M. H., 1993. Viable but nonculturable salmonellas in soil. *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 421-427.
  75. Visca P., Filetici E., Ananstasio M. P. Vetriani C., Fantasia M., and *et al.* 1991 Siderophore production by species isolated from different sources. *FEMS Microbiol. Lett.* **79**, 225-232.
  76. Walderhaug N. O., Litwack E. D., and Epstein W., 1989. Wide distribution of *Escherichia coli* Kdp K<sup>+</sup>-ATPase among gram negative bacteria. *J. Bacteriol.* **171**, 1192-1195.
  77. Welch R., 1991. Pore-forming cytolysins of gram negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **5**, 521-528.
  78. Wu J., and Weiss B., 1992. Two-stage induction of the *soxRS*(superoxide Response) regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 3915-3920.
  79. Yancey R. J., Breeding S. A. L., and Lankford C. E. 1979. Enterochelin (enterobactin): virulence factor for *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **24**, 174-180.
  80. Yura T., Nagai H., Mori H. 1993. Regulation of the heat shock Response in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 321-350.