

## 열 및 에탄올 shock이 *Vibrio vulnificus*의 막단백질에 미치는 영향

허문수<sup>†</sup> · 정초록\*

제주대학교 해양과학대학 해양생산과학부, \*부산대학교 자연과학대학 자연과학부

*V. vulnificus* ATCC 27562균주의 배양 온도를 42°C, 20분간 및 6% 에탄올, 10분간으로 반응시켰을 때 SDS-PAGE상에서 새로운 16가지의 heat shock protein(hsps)과 10가지의 ethanol shock protein이 나타났다. Lethal temperature에 노출하기전에 미리 열 충격을 가한 경우 thermo tolerance가 유도되었다. 균체면역에 의해 생성된 항혈청과 열 충격 세포에서 분리된 막단백질과의 ELISA에서는 Outer Membrane Protein(OMP)에서 높은 면역반응을 나타냈으며 western blotting으로는 Inner Membrane Protein(IMP)에서는 62 kDa, OMP에서는 69 kDa단백이 높은 면역원성을 나타냈다. ethanol 충격 반응에서는 IMP에서는 48 kDa, OMP에서는 오직 major밴드에서만 면역반응성이 확인되었다. anti-*V. vulnificus*혈청에 대한 균체 응집시험에서는 열 충격 반응 후의 균체가 정상 균체에 비해 응집반응성이 높았다.

**Key words:** *Vibrio vulnificus*, Heat shock, Ethanol shock, ELISA, Western blotting

*Vibrio vulnificus*의 감염과 그 병원성에 관여하는 인자로는 hemolysin(Shinoda *et al.*, 1985) 세포외 cytolyisin(Gray and Kreger, 1985), collagenase(Smith and Merkel, 1982), protease(Miyoshi *et al.*, 1987), siderophore(Simpson and Oliver, 1983), phospholipase(Testa *et al.*, 1984), 혈액내의 철이온 농도(Wright *et al.*, 1981) 항식균성 표면항원 등(Fiore *et al.*, 1992)이 보고된 바 있다. 특히 최근에는 이러한 병원성을 야기하는 요인중에서 *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*(Young *et al.*, 1988), *Legionella pneumophila*(Hoffman *et al.*, 1989), *Coxiella burnetii*(Vodkin and Williams, 1988), *Borrelia burgdorferi*(Carreri *et al.*, 1990)등과 같은 병원성 세균들은 heat shock proteins(Hsps)라는 열 충격 단백질이 숙주 감염에 대하여 면역학적으로 중요한 항원으로 작용하고 있음이 밝혀졌다. 이러한 병원성 세균들은 일반적인 서식 환경에서 효과적으로 숙주의 세포조직에 도달하여 병원성을 일으키기 위해서는 숙주로부터 야기되는 여러 가지 새로운 환경적인 변화를 접하게 되는데 이 과정에서 이들 세균들은 자신들의 생존에 알맞게 변화하여

적응하게 된다. 이러한 적응 과정에서 일련의 Hsps 단백질들이 세균내에서 일시적으로 합성이 되며 이들 단백질이 숙주에게 또다른 중요한 병원성을 나타나게 하는 것으로 보고되고 있다. 이들 병원성 세균들이 숙주로부터 접하게 되는 대표적인 환경적인 변화 요인으로는 일반적으로 잘 알려져 있는 갑작스런 온도의 변화 이외에도 위(stomach)에서의 낮은 pH, bile salt, nutrient의 결핍, anaerobiosis, ethanol, heavy-metal ions, viral infection 등과 같은 여러 가지가 있다. 최근의 연구에 의하면 Hsps는 원핵세포에서부터 진핵세포에 이르기까지 광범위하고 다양하게 나타나고 있음이 밝혀졌다(Bowdre *et al.*, 1983; Morimoto *et al.*, 1994; Neidhardt *et al.*, 1984; Yura *et al.*, 1993). 이처럼 Hsps는 새로운 환경 변화에 대한 stress로부터 자신의 세포를 보호하여 생존함과 동시에 숙주의 특이적 면역방어 체계를 자극하여 병원성의 발현과 인체 면역계에 있어서 주요한 항원으로 작용하는 것으로 보고되었다(Watson *et al.*, 1990). 또한 Hsps는 기능적인 특성을 반영하기 위하여 molecular chaperone으로 불리지도 하며 여러 stress에 의해 변성된 단백질들이 재원형화되는것을 도와준다. 그리고 non-stress 조건하에서의 Hsps는 다음과 같은 정상적인 세포의 생리적 대사에 매우

<sup>†</sup>Corresponding author

중요한 역할을 하는 것으로 밝혀지고 있는데 첫째는 세포 내의 여러 다른 단백질들과 결합하여 단백질의 folding 및 unfolding을 촉진하며 단백질이 folding될때의 중간상태(intermediate state)를 안정화시키고, 둘째는 세포내 다른 receptor와 결합하여 세포내의 다른 단백질의 기능 조절 및 세포내 단백질의 소기관 사이의 이동에도 관여하는 것으로 보고되고 있다(Testa *et al.*, 1984; Yamamori *et al.*, 1978). Chaperonins(chaperonin 60, chaperonin 10), Hsp70, Hsp90 등과 같은 stress proteins로서 간주되는 대부분의 단백질들이 molecular chaperone으로 판명이 되었으며 stress가 없는 경우에도 세포내에 풍부하게 존재한다(Morimoto *et al.*, 1994). *Escherichia coli*와 *Salmonella typhimurium*등과 같은 세균에서 알려진 Hsps는 약 17개 정도로 이중 대표적인 것으로 GroEL, GroES, DnaK, DnaJ, GrpE 등이며 세포의 생존을 위한 thermotolerance, DNA replication(DnaK, DnaJ, GrpE), RNA synthesis( $\delta 70$ ), protein synthesis(LysU), protein processing(GroEL, GroES)와 protein degradation(Lon)에 관여하는 것으로 밝혀졌다(Neidhardt *et al.*, 1987). 이와같이 Hsps에 대한 세포의 생리학적 중요성이 부각됨에 따라 *Vibrio*의 Hsps에 관한 연구는 비교적 최근에 시작되었으며 *Vibrio cholerae*를 중심으로 특징과 기능이 점차 밝혀지고 있다(Jeevanjyot and Ghosh, 1995; Sahu *et al.*, 1994). 그러나 *V. vulnificus*의 병원성과 관련된 Hsps의 세포 생리학적 특성과 역할등은 불분명하며 국내에는 지금까지 이와 관련하여 발표된 연구 보고가 거의 없는 실정이다. 이에 본 실험은 *V. vulnificus*의 열 충격 반응에 대한 적정 온도의 설정과 이에 대한 Hsps의 위치를 파악하여 그 특성을 확인하였으며 *V. vulnificus* 균체 면역 과정중에서 열 충격 반응에 대한 항체 생산 여부를 ELISA와 western blotting방법을 통해 검토하였다. 또한 인위적으로 면역하여 생성된 항혈청이 *V. vulnificus* 열 충격 후의 균체에 대하여 중화효과를 나타내는지의 여부를 응집시험을 통해 확인하였다. 그리고 열 충격 반응에 의한 Hsps를 다른 stress 요인중의 하나인 ethanol 충격 반응과의 연관성을 서로 비교하였다. 이 결과를 토대로 *V. vulnificus*에 대한 열 충격 반응 연구가 숙주(host)의 여러 환경 변화에 대한

기생체(parasite)인 병원성 균주가 어떻게 새로운 생존에 대한 적응력을 획득하여 병원성의 발현에 관여하는가를 숙주-기생체 상호간의 관점에서 파악하여 기본적인 측면을 이해하는데 도움이 되고자 하였고 숙주의 새로운 환경 변화에 의해 변화된 균주에 대한 효과적인 백신생산을 위한 정보를 제공하기 위하여 본 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배양

1985년 일본의 국립 위생 연구소의 Shimada, T. 박사로부터 분양받아 보관해 오던 *V. vulnificus* ATCC 27562 균주(이하 *V. vulnificus*)를 API 20E kit로 생화학적 성상을 검토하고 재확인한 후 사용하였다. 본 균주의 배양에는 전배양시 1%의 NaCl이 첨가된 brain heart infusion(Difco, 이하 BHI)배지를 사용하여 30°C의 shaking incubator에서 배양하였고 본배양시에는 1.5% NaCl이 첨가된 BHI에서 전배양균액을 2% 접종한 후 optical density(O.D. at 600 nm)가 약 0.6일때까지 30°C에서 배양하였다.

### 열 충격과 에탄올 충격 후의 균체 생존율

*V. vulnificus*의 열 충격 반응과 ethanol 충격 반응과의 연관성을 검토하기 위하여 균액의 균수를 mid-exponential phase일때의 optical density(O.D. at 600 nm)를 0.6으로 조정한 다음 MacFarland 수가 1 ml당  $3 \times 10^9$  CFU/ml가 되도록하였다. 조정된 균액을 각각 42°C, 45°C, 50°C의 온도로 옮기면서 열 충격을 가하였으며 또한 5%, 6%, 7%, 10%의 ethanol 농도로 옮기면서 ethanol 충격을 가한 후 시간에 따른 생균수를 조사하였다.

### 균체 막단백질의 분리와 SDS-PAGE

열 충격과 ethanol 충격 반응에 의해서 새롭게 합성된 균체 막단백질을 inner membrane protein(IMP)와 outer membrane protein(OMP)로 분리하였다. 분리과정은 Sahu *et al.*의 방법을 약간 변형하였다. 전배양 균액 2%를 접종하여 약 2시간 30분 후 mid-exponential phase 일때에 optical density(O.D. at 600 nm)를 0.6으로 하여 1 ml당  $3 \times 10^9$  CFU/ml로 조정하였다. 열 충격의 경우 조

정된 균액을 42°C에서 20분간 열 충격을 가하였으며 에탄올 충격의 경우 6% ethanol 농도로서 10분간 ethanol 충격을 가한 다음 각각 집균하여 Tris(pH 8.0)-EDTA-NaCl(TEAN) buffer로 2회 세척하였다. 다시 TEAN buffer로 현탁시킨 후 ultrasonic homogenizer로 sonication을 1분 30초 동안 7회 반복하였고 파쇄되지 않은 균체는 4,500 g에서 20분간 원심침전하여 제거하였다. 이후 얻어진 상청액을 45,000 g에서 1시간 동안 원심 분리하여 상청액의 원형질 단백질과 침전물인 막단백질을 회수하였다. 이중 막단백질이 포함된 침전물을 1% sarkosyl이 함유된 TEAN buffer로 현탁하여 25°C에서 1시간 동안 방치하였다. 이것을 100,000 g에서 1시간 원심분리하여 가용성인 IMP과 불용성인 OMP를 분리하였다. 분리된 각 membrane protein은 Lowry법으로 정량하였다. 또한 SDS-PAGE 전기영동을 실시하여 laser densitometer를 사용하여 분석하였다.

### 항원의 제조와 면역

항원의 제조에는  $3 \times 10^9$  CFU/ml로 조정된 균액을 42°C에서 20분간 열 충격을 가한 후 균체를 파쇄하고 원심분리하여 상청액을 열 충격의 항원으로 사용하였고 대조군으로는 조정된 균수로 열 충격을 받지 않은 균체를 파쇄한 후 원심 분리한 상청액을 대조군 항원으로 사용하였다. 제조된 항원을 건강한 뉴질랜드산 숫토끼에게 1주일 간격으로 4회 면역하여 얻은 항 혈청을 아래의 실험에 사용하였다.

### ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)

*V. vulnificus*를 42°C에서 20분간의 열 충격 반응 후와 6%의 ethanol에서 10분간 에탄올 충격 반응 후의 균체 믹서 분리한 각각의 막단백질인 IMP, OMP중에서 면역원성에 기여하는 것에 대한 친화 가능성을 확인하기 위하여 위에서 제조된 항혈청으로 각 막단백질과 ELISA반응을 실시하였다. 우선 Lowry법에 의하여 각 단백질을 정량하여 동일량의 단백질을 코팅(coating) 완충액에 혼합한 후 96 microtiter plate well에 100  $\mu$ l씩 분주하였고 4°C에서 24시간 방치하여 pH 9.6-carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )의 완충액에 coating시켰다. Coating된 well에 3%의 bovine serum albumin(BSA)이 첨

가된 0.05% Tween-20의 PBS(phosphate buffered saline)-T 완충액을 100  $\mu$ l씩 분주하여 실온에서 2시간 동안 blocking하였다. 0.05%의 tween-20이 첨가된 washing 완충액인 PBS-T로 plate를 3회 씻은 후 위에서 제조된 항혈청중 열충격을 받지 않은 균주의 항원으로 만들어진 항체를 1차 항체로 하여 PBS-T로 100배 희석하고 100  $\mu$ l씩 well에 분주하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 이 후 washing 완충액으로 다시 plate를 3회 씻은 후 2차 항체인 anti-rabbit IgG(whole molecule) alkaline phosphatase(AP)conjugate을 1000배 PBS-T로 희석하여 100  $\mu$ l씩 분주하고 1시간 실온에서 반응시켰다. 다시 PBS-T로 plate를 3회 세척한 후 p-NPP(p-nitrophenyl phosphate)가 첨가된 기질용액을 100  $\mu$ l씩 well에 넣고 반응시켰다. 상온에서 10분간 반응시킨 후 반응 정지 용액인 3M NaOH을 100  $\mu$ l씩 첨가하여 반응을 정지시키고 난 후 ELISA reader로 410 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### Western blotting

각 열 충격과 에탄올 충격 반응 후에 균주로부터 얻은 OMP로 SDS-PAGE를 실시한 후 NC (nitrocellulose) filter에 Bio-Rad transfer module (miniprotein-II)로 옮겨 western blotting을 실시하였다. NC filter를 Tris-citrate 완충액에 1%의 BSA과 0.05% NP-40이 첨가된 washing buffer로 세척한 다음 3%의 BSA가 첨가된 Tris-citrate 완충액으로 1시간동안 담그었다. ELISA에서 사용한 동종의 1차 항체를 incubation buffer로 100배 희석하여 2시간동안 상온에서 NC paper에 반응시켰다. 이 후 5회 washing buffer로 paper를 세척한 다음 1000배 희석한 anti-rabbit IgG(whole molecule) peroxidase conjugate인 2차 항체를 2시간 동안 반응시켰다. 다시 5회 washing buffer로 세척한 후 DAB peroxidase substrate를 가하여 NC paper를 반응시켜 검출하였다.

### 혈청학적 시험

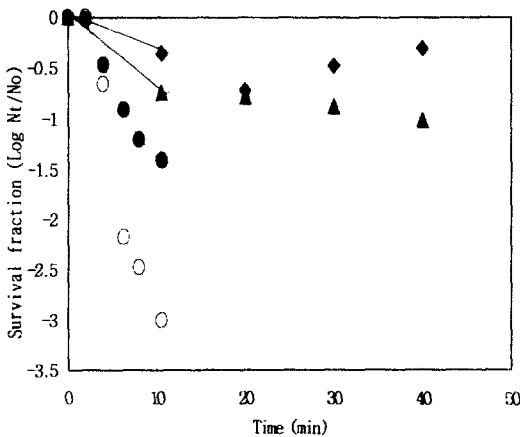
상기에서 제조된 항혈청에 대한 *V. vulnificus*의 응집반응을 실시하였다. 먼저 BHI에 2%로 접종한 본배양 균액의 optical density(O.D.)가 0.6일때까지 30°C에서 진탕배양한 다음 42°C로 20분간 열

충격을 가하여 원심 분리한 후의 침전된 균체와 열 충격을 가하지 않고 원심 분리하여 침전된 대조 균체를 준비하였다. 이후 TEN 슬라이드에 PBS를 50  $\mu$ l씩 각각 분주하였고 O형혈청을 50  $\mu$ l씩 첨가하여 2단계 회석하였다. 여기에 PBS buffer에 부유시킨 균 부유액을 50  $\mu$ l씩 첨가하여 응집여부를 확인하였다. 그리고 열 충격을 가한 균체의 cell lysate으로 제조된 항혈청과 정상 균체와의 응집반응과 또한 열 충격을 받은 균체와 준비된 정상 균체의 cell lysate로 제조된 항혈청과의 응집반응을 비교하였다.

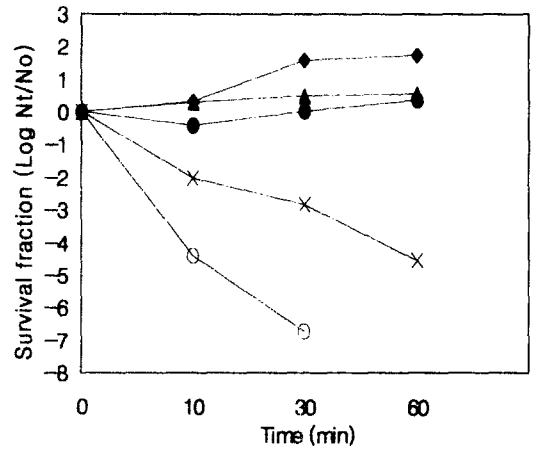
**결 과**

**열 충격과 에탄올 충격 후의 균체 생존율 비교**

42°C, 45°C, 50°C로 옮겨 각각 열 충격을 가한 후 10분 간격으로 균체의 생존율을 조사하였다. 그 결과 42°C에서 열 충격을 가한 경우는 옮긴 후 시간이 지남에 따라 20분까지는 생존율이 점차로 감소하였고 20분후에 최저 생존율을 나타내었다. 또한 그 이후에는 세균수가 다시 증가되는 것이 관찰되었으며 세포분열의 시간도 30°C에서는 40분이었으나 42°C에서는 15분으로 짧아졌다. 이와는 대조적으로 45°C로 열 충격을 가한 경우는 50°C 충격세균보다 훨씬 높은 생존율을 나타냈으나 42°C



**Fig. 1.** Survival profiles of *Vibrio vulnificus* ATCC 27562 after heat shock treatment. Cells on mid-exponential phase ( $3 \times 10^9$  cells/ml) grown at 30°C were heat-shocked at each different time. -◆-, 42°C; -▲-, 45°C; -○-, 50°C; -●-, shift-up a temperature from 30°C to 42°C for 20 min prior to the exposure at 50°C.

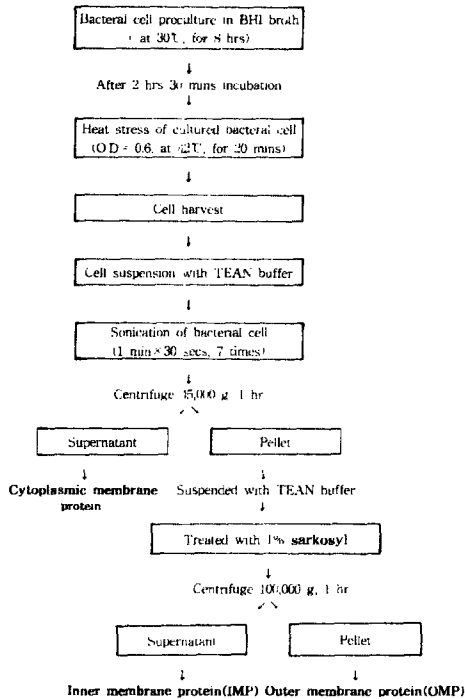


**Fig. 2.** Survival profiles of *Vibrio vulnificus* ATCC 27562 after stimulation with ethanol. Cells cultured at 30°C to mid-exponential ( $3 \times 10^9$  cells/ml) stage were shocked with different concentrations of ethanol. -◆-, 0% ethanol; -▲-, 5% ethanol; -●-, 6% ethanol; -×-, 7% ethanol; -○-, 10% ethanol.

충격세균과 같은 균체의 회복성은 다시 관찰되지 않았고 점차로 생존율이 감소하였다. 50°C로 옮겨 열 충격을 가한 경우에는 5분을 전후하여 생존율이 대단히 많이 감소하였으며 시간이 지남에 따라 생존율의 관찰이 거의 불가능하였다(Fig. 1). 5%, 6%, 7%, 10%의 ethanol 충격후 시간에 따른 세균의 생존율을 조사한 결과 6%의 ethanol 농도로 충격 후 10분을 전후하여 생존율의 감소를 나타내다가 시간이 지남에 따라 점차 균체의 회복성이 관찰되었으며 ethanol 농도 7%, 10%에서는 균체의 생존수가 급격히 감소하였으며 균체의 회복성은 관찰되지 않았다. 특히 10% 농도에서는 30분 후에는 생존수가 거의 관찰되지 않았다. 위의 결과를 토대로 본 균주에 대하여 예상되는 열 충격 반응시의 적정온도는 42°C에서 20분으로 나타났으며 ethanol 충격에 대한 적당한 농도와 시간은 6%에서 10분간 충격으로 확인되었다 (Fig. 2).

**막단백질의 SDS-PAGE**

Sahu *et al.*의 방법을 약간 변형하여 분리하였다 (Fig. 3). 42°C에서 20분간의 열 충격을 가한 세포와 6% 에탄올로 10분간 충격을 가한 세포를 homogenizer로 파쇄한 후 각각을 세균의 세포막 위치별로 membrane protein을 회수하였다. 회수된 각 막단백질을 Lowry방법으로 정량한 후 전기영동



**Fig. 3.** General scheme for isolation of heat shock proteins (Hsps) in membrane of *Vibrio vulnificus* ATCC 27562.

을 실시하여 겔 상에 나타난 단백질밴드를 열 충격 반응 후와 에탄올 충격 후에 나타난 밴드와 서로 비교하였다(Fig. 4 and 5). 또한 SDS-PAGE 전기영동된 겔상의 IMP 부분과 OMP 부분을 densitometric scan을 사용하여 paper상의 peak로서 구체적으로 확인하였다. 그 결과 IMP 부분은 열 충격을 받지않은 막단백질보다 열 충격 후의 막단백질에서 88, 66, 62, 58, 36, 35, 31, 28, 18, 16, 13 kDa의 분자량의 새로운 단백질을 확인하였고 OMP부분의 막단백질에는 69, 58, 31, 26 kDa의 Hsps가 새롭게 생성되었음을 확인하였다. 한편 에탄올 충격세포의 IMP 부분을 비교했을때 열 충격 반응 세포에 나타난 62, 35, 28, 18, 16, 13 kDa는 나타났으며 또한 84, 60 kDa가 새롭게 합성되어 나타났다. 그러나 열 충격 반응세포에서 나타난 88, 66, 58, 36, 31 kDa의 단백질은 나타나지 않았다. 그리고 열 충격 OMP에서는 세포에 나타난 69, 58, 31, 26 kDa은 에탄올 충격세포에서 생성되지 않았으며 단지 21, 19 kDa인 저분자량의 단백질만이 새롭게 생성됨을 확인하였다(Fig. 6).

**Fig. 4.** SDS-PAGE analysis of heat shock protein (Hsps) localized intracellularly in the *V. vulnificus* ATCC 27562 shifted the 42°C after culture at 30°C. Lanes: A: Molecular weight marker; Phosphorylase B (97,400), Bovine Serum Albumin (66,200), Glutamate dehydrogenase (55,000), Ovalbumin (42,700), Aldolase (40,000), Carbonic anhydrase (31,000), Soybean trypsin inhibitor (21,500), Lysozyme (14,400). a, cytosolic proteins of cells grown at 30°C; c, inner membrane proteins of cells grown at 30°C; e, outer membrane proteins of cells grown at 30°C; b, cytosolic proteins of cells grown at 42°C; d, inner membrane proteins of cells grown at 42°C; f, inner membrane proteins of cells grown at 42°C.

**Fig. 5.** Comparison to the SDS-PAGE analysis of intracellular localization of heat shock proteins (Hsps) and ethanol shock proteins that cells grown at 30°C were transferred to 42°C and were 6% ethanol concentration in *V. vulnificus* ATCC 27562.

Lanes: A: Molecular weight marker; Phosphorylase B (97,400), Bovine Serum Albumin (66,200), Glutamate dehydrogenase (55,000), Ovalbumin (42,700), Aldolase (40,000), Carbonic anhydrase (31,000), Soybean trypsin inhibitor (21,500), Lysozyme (14,400). a, cytosolic proteins of cells grown in 6% ethanol; c, inner membrane proteins of cells grown in 6% ethanol; e, outer membrane proteins of cells grown in 6% ethanol; b, cytosolic proteins of cells grown at 42°C; d, inner membrane proteins of cells grown at 42°C; f, inner membrane proteins of cells grown at 42°C.

**Table 1.** Comparative ELISA reactivity each of intracellular localizational heat shock membrane proteins (Hsps) and ethanol shock membrane proteins with rabbit anti-*Vibrio vulnificus* ATCC 27562 serum

Antigen	ELISA reactivity & affinity(%)		
	IMP***	OMP***	Cell lysate***
Normal cell	0.623(27)	1.073(46)	1.113(48)
Heat shock cell	1.604(69)	2.316(100)	1.12(48)
Ethanol shock cell	1.773(76)	1.488(64)	1.022(44)

Second antibody used was anti-rabbit IgG (whole molecule) alkaline phosphatase conjugate and diluted with  $10^{-3}$  by PBS buffer. Absorbance at 410 nm. Abbreviations: IMP, inner membrane protein; OMP, outer membrane protein\*\*\*Loaded 100  $\mu$ l of each preparation.

## ELISA와 western blotting을 이용한 면역원성 관찰

### 1) ELISA

열 충격 및 에탄올 충격 균체에서 회수된 각 막 단백질과 O항원의 면역원성을 시험하기 위하여 ELISA법을 실시한 결과, 정상 균체와 열 충격세포의 cell lysate을 각각 O항혈청과 반응시켰을때는 거의 같은 48%의 반응성을 나타냈다. 또한 정상 균체와 열 충격 균체 모두 IMP보다는 OMP의 면역원성이 높았으며 열 충격 세포에서 분리된 IMP와 OMP를 비교했을때는 각각 69%와 100%로 OMP에서 면역원성이 높게 나타났다. 한편 에탄올 충격 cell lysate와 O항혈청의 면역 반응은 정상균체의 cell lysate와 비슷하게 나타났다. 그리고 정상 균체 IMP나 OMP보다 대체로 ethanol 충격 세포의 IMP나 OMP가 높은 면역원성을 나타냈다. ethanol 충격 세포에서 분리된 IMP는 OMP보다 높은 면역원성을 나타냈다(Table 1).

### 2) Western blotting

열 충격 및 에탄올 충격 세포를 SDS-PAGE 전기영동하여 나타난 겔상의 각각의 total cell lysate에서 분리된 cytosolic protein과 침전된 membrane protein에서 분리된 IMP, OMP의 단백질 밴드를 니트로셀룰로스막에 blotting 시킨 후 준비된 O항혈청과 반응시켜 면역학적 연관성을 검토한 결과 열 충격 반응 후의 cytoplasmic membrane protein 영역의 IMP에서는 62kDa에서 강한 면역 반응이 나타났다. 또한 OMP에서의 면

**Fig. 6.** Comparison to densitometric scans and integrations of the SDS-PAGE gel stained with Coomassie brilliant blue R-250 of heat shock proteins (Hsps) and ethanol shock proteins shown in Fig. 5. a: Phosphorylase B (97,400), b: Bovine Serum Albumin (66,200), c: Glutamate dehydrogenase (55,000), d: Ovalbumin (42,700), e: Aldolase (40,000), f: Carbonic anhydrase (31,000), g: Soybean trypsin inhibitor (21,500), h: Lysozyme (14,400). A, B : Outer membrane proteins of 6% ethanol-shocked, of 42°C heat-shocked, respectively.

역반응은 major 밴드이외에 69kDa에서 강한 면역 반응성이 나타남을 확인하였다(Fig. 7). 한편 에탄올 충격 반응 후 SDS-PAGE 전기영동하여 나타난 겔상의 각각의 IMP, OMP의 단백질 밴드를 니트로셀룰로스막에 blotting 시킨 후 준비된 O항혈청과 반응시켜 면역학적 연관성을 검토한 결과 48kDa의 IMP 단백질 밴드에서 주요한 면역학적 반응을 나타냈으며 OMP 부분의 단백질 밴드에서는 major 밴드이외에는 면역학적 반응성이 관찰되지 않았다(Fig. 8).

### 혈청학적 실험

열 충격 반응 후의 균체가 정상 균체가 *V. vulnificus*를 면역하여 얻은 항혈청에 대하여 응집 시험한 결과, 열 충격을 받은 균체는 정상 균체와 비교하여 항혈청을 2배까지 희석한 농도까지 응집

**Fig. 7.** Western blotting of the intracellular heat shock proteins (Hsps.) with rabbit anti-*Vibrio vulnificus* ATCC 27562 serum. a, c and e, heat-shocked (42°C) proteins of outer and inner and cytosolic membrane and b, d and f, cells grown at 30°C (control), respectively.

반응이 나타났다. 그리고 열 충격을 받은 균체와 정상 균체의 cell lysate의 상청액으로 면역하여 준 비된 각각의 항혈청으로 정상 균체와 열 충격 반응 후의 균체를 서로 cross-reaction하여 응집반응을 확인한 경우 정상 균체의 cell lysate의 상청액으로 면역하여 생성된 항혈청이 열 충격 균체에 대하여 응집원성이 높은 것으로 나타났다(Table 2).

## 고 찰

*V. vulnificus*가 인체에 일으키는 감염으로는 피부상처 침입으로 인한 피부의 괴사로 진행되는 상처감염과 혈류중에서 증식함으로써 혈구 파괴와 독소 중독증에 의한 사망률이 높은 비브리오 패혈증의 두가지로 크게 나눌수 있다(Gray and Kreger, 1985). 특히 간기능 이상자나 기타 만성질환자들은 정상인보다 치사율이 높다. 특히 남해안지방에서는 매년 여름철에 본 균에 의한 감염 및 사망자들이 속출하고 있다(Chung *et al.*, 1997; Edwin, 1991). 이와 같이 *V. vulnificus*의 기본적인 질병의 원인을 규명하고 위생학적인 측면에서 감염을 예방하기 위하여 많은 연구가 진행되고 있으며 그 결과 *V. vulnificus*의 수동면역에 의한 항체생성과 사균을 이용한 백신개발에까지 도달하였다(Fiore *et al.*, 1992; Kreger *et al.*, 1984). 본 연구에서는

**Fig. 8.** Western blotting of the intracellular heat shock proteins (Hsps) and ethanol shock proteins with rabbit anti-*Vibrio vulnificus* ATCC 27562 serum.

a, c and e, cytosolic and inner and outer membrane ethanol-shocked (6%) proteins of cells grown in 30°C and b, d and f, heat-shocked (42°C), respectively.

*V. vulnificus*가 인체감염시 숙주에서 수많은 새로운 환경에 노출될 때, 어떻게 적응하여 생존하는지를 알아보고자 하였다. 특히 열(heat)에 대한 변화와 그 반응성을 중심으로 새로운 적응과정에서 야기될 수 있는 병원성 감염의 가능성에 대하여 *in vivo* 실험을 통하여 확인하였다. 37°C는 사람체온이기 때문에 *V. vulnificus*에 대하여 정상적인 성장 온도인 30°C에서 37°C로 7°C의 온도상승 후에 열 충격에 대한 반응을 유도하는지 검토하였으나 생균수나 Hsps 생성등의 차이가 대체로 나타나지 않았다. 그러나 42°C 노출 20분에서 생균수 감소와 함께 최서의 생존율이 관찰되었고 이후 점차로 균체의 회복성을 나타냈다. 이는 *Escherichia coli* 경우에서 밝혀진 온도 상승 후 5분이내에 최대의 Hsps가 생성되는 것과는 비교적 다른 결과를 나타냈으나(Yamamori *et al.*, 1978) Sahu *et al.* (1994)가 연구한 *V. cholerae*에서의 42°C, 20분간의 열 충격 반응과는 거의 일치하였다. 또한 lethal temperature로 *V. vulnificus*에 열 충격을 가하기 전에 미리 42°C에서 20분간 pre-heat shock에 노출시키면 lethal temperature에 대하여 thermotolerance가 이미 균체내에 형성되어 원래의 생존율보다 높아졌다. 결국 이 현상은 lethal temperature에 대한 내성 획득을 위한 어떤 요인이 *V. vulnificus*에 존재하기 때문으로 사려되며 *E. coli* B 균주에서 밝혀진 thermal stress에 대한

**Table 2.** Agglutination test of heat-shocked and normal cells with rabbit anti-normal *V. vulnificus* and rabbit anti-heat shocked *V. vulnificus* serum

Cell	Antiserum <sup>a)</sup>	Two fold dilution of antiserum					
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Normal cell	Normal cell	+++ <sup>b)</sup>	+++	++	+	+	— <sup>c)</sup>
	Heat shocked cell	+++	++	+	+	+	—
Heat shocked cell	Heat shocked cell	+++	+++	+++	++	+	+
	Noraml cell	+++	+	+	+	+	+

<sup>a)</sup>Rabbit antiresum against Normal cell and heat shocked cell,

<sup>b)</sup>Agglutination,

<sup>c)</sup>Nonagglutination.

tolerance와 비슷한 양상을 나타내고 있다(Pardasani and Fitt, 1989) 그리고 Jeevanjyot가 열 충격 반응 후의 세포에서는 정상 세포와 비교하여 thermal stress에 대한 균체 사멸 효과가 훨씬 낮아졌음을 보고한 것과 거의 일치하고 있음을 나타내고 있다(Jeevanjyot and Ghosh, 1995). 열 충격 반응 후에 새롭게 합성된 단백질 확인을 위해 42°C, 20분간 노출 후 막단백질을 sarkosyl로 처리하여 분리한 다음 생성된 Hsps를 확인하였다. 그 결과 88, 62, 58, 48, 36, 31 kDa의 분자량을 가진 6가지의 막단백질이 total cell lysate에 의한 whole membrane protein에서 확인되었다. 이것을 세포내 위치별로 IMP와 OMP로 각각 분리하여 관찰하였을 때 IMP에서는 88, 66, 62, 58, 36, 35, 31, 28, 18, 16, 13 kDa의 막단백질이 관찰되었고 OMP에서는 IMP와 비교해 볼 때 비교적 적은 가짓수의 69, 58, 31, 26 kDa의 Hsps가 새롭게 생성되었다. 이와같은 결과는 Sahu(Sahu *et al.*, 1994) 등이 연구한 *V. cholerae*에서의 열 충격 반응의 결과 16가지의 새로운 단백질의 생성과 비교하여 볼 때 분자량은 다르지만 거의 비슷한 가짓수의 열 충격 단백질이 합성되고 동일하였다. 새롭게 합성된 각 IMP, OMP와 균체 면역에 의해서 생성된 O항혈청을 ELISA, western blotting을 통해 면역원성 시험을 행하였을 때, ELISA의 경우 정상 균체에서 분리된 IMP나 OMP보다도 열 충격 세포에서 분리된 IMP나 OMP가 훨씬 높은 면역원성을 나타내었다. 열 충격 세포에서 분리된 IMP와 OMP의 비교에서도 OMP가 IMP보다도 면역원성이 높은것으로 나타났다. 그러므로 열 충격 균체가 정상 균체보다 병원성이 클 가능성이 있다고 사려

되었으며 IMP보다 OMP가 보다 높은 면역 epitope로서 작용할 가능성을 보여주었다. ELISA의 결과를 토대로 열 충격 세포에서 새로이 합성되어 나타난 IMP와 OMP를 western blotting을 실시한 결과 침전된 막단백질에서 분리된 IMP는 62 kDa 단백질이 강한 반응을 나타냈다. 그리고 OMP는 major 밴드 이외에 특이하게 69 kDa가 강한 면역 반응을 나타냈다. *V. vulnificus* O항원에 의하여 생성된 O항혈청으로 행한 열 충격 균체와 정상 균체의 응집시험에서는 열 충격 균체에서 응집 역가가 높았으며 정상 균체보다도 적은양으로도 균체 응집효과가 있었다. ELISA와 western blotting에 대한 높은 면역원성과 세균응집 효과 등을 고려해볼 때 열 충격 반응 후의 *V. vulnificus*가 인체에 감염했을 때 숙주의 열 충격 변화에 대하여 이것은 인위적으로 생성된 *V. vulnificus*의 O항혈청의 백신 효과와 그 가능성에 대하여 대단히 큰 암시성을 나타내는 것으로 여겨진다. 특히 western blotting에서 열 충격 세포에서 생성된 OMP에서의 major 밴드이외에 69 kDa 단백질의 강한 반응은 OMP부분이 *V. vulnificus*가 숙주 감염시 또다른 면역체계를 자극하게 되어 면역학적으로 중요한 항원으로서의 역할을 할 것으로 사료된다. 이는 또한 *V. cholerae* 환자의 혈청과 *V. cholerae* Hsps중에서 분자량 23 kDa의 OMP에서 강한 면역반응성과 유사한 결과를 나타내고 있음을 보여준다(Sahu *et al.*, 1994). 뿐만아니라 IMP와 OMP의 62, 69 kDa단백의 강한 western blotting 반응은 *E. coli*에서 밝혀진 Hsps중 62.9 kDa-GroEL, 68 kDa-DnaK와 homologue을 나타내는 결과로 사료된다(Neidhardt *et al.*, 1987). 특히 지금까지의 연구결



과에 의하면 *Mycobacterium* spp.(Young *et al.*, 1988), *L. pneumophila*(Hoffman *et al.*, 1989), 1988), *C. burnetii*(Vodkin and Williams, 1988), *B. burgdorferi*(Carreriro *et al.*, 1990)을 포함하여 대부분의 병원성 세균들에서는 GroEL analogs가 매우 높은 항원성 인자로서 밝혀졌다.

한편 열 충격 반응과 더불어 에탄올 충격 균체의 생존율을 확인한 결과 6%농도로 10분 충격한 경우 열 충격시와 비슷한 양상을 나타냈다. 에탄올 충격으로 새롭게 생성된 IMP를 열 충격 IMP와 비교한 결과 열 충격 반응때와는 다른 84, 60 kDa가 새롭게 합성되어 나타났으며 62, 35, 28, 18, 16, 13 kDa는 열 충격시와 마찬가지로 에탄올 충격후에도 나타났다. 그러나 열 충격 반응에 나타난 88, 66, 58, 36, 31 kDa의 단백질은 나타나지 않았다. OMP중에는 21, 19 kDa의 저분자의 단백질만이 새롭게 생성됨을 확인하였고 열 충격후에 나타난 69, 58, 31, 26 kDa은 에탄올 충격 세포에서는 생성되지 않았다. 결국 열 충격 세포의 16가지의 단백질과 비교할때 에탄올 충격 세포에서는 10가지의 단백질만이 생성되었다. 이는 Sahu 등이 연구한 6% 에탄올로 20분간 충격한 *V. cholerae* 세포에서 생성된 7가지의 단백질과는 조금의 차이가 있었다. 또한 에탄올 충격 세포를 ELISA로 면역원성 시험한 결과를 열 충격 세포에서 분리된 IMP, OMP와 비교했을 때 IMP에서는 열 충격 반응 때보다 반응성이 높았으며 OMP에서는 열 충격 반응 후보다 반응성이 낮았다. 그리고 전체적으로는 ethanol 충격 세포에서 생성된 IMP와 OMP는 정상 균체의 IMP와 OMP보다 비교적 높은 면역반응성을 나타냈다. Ethanol 충격 반응에 의해 나타난 IMP와 OMP의 western blotting의 결과에서는 IMP밴드에서는 48 kD단백이 강한 면역학적 반응성을 나타냈으나 OMP는 major 밴드 이외에는 열 충격 반응때에 나타난 69 kDa단백에서 강한 면역학적 반응성이 관찰되지 않았다. 이와 같이 *V. vulnificus*가 인체내에 침투하여 열에 적응, 생존한 *V. vulnificus* 균체는 정상 균체와는 또 다른 인체 병원성 감염의 가능성이 있을 것으로 사료되어진다. 이 연구에서 *V. vulnificus*의 열 충격 반응과 그에 대한 전반적인 특성 등을 검토하여 다음과 같은 사실을 관찰할 수 있었다. 첫째는 숙주의 열 충격 변화에 대한 본 균의 새로운 적응

과 생존능력이 확인되었으며 둘째는 인위적으로 생성된 O항혈청으로 균체 응집능력을 시험하였을 때, 열 충격 후의 균체에 대한 균체응집능력이 정상 균체에 대한 응집능보다도 더 큰것으로 나타났다. 그러므로 이러한 경우 열 충격 반응에 의해서 면역원성이 증가된 *V. vulnificus*로 백신을 개발하여 사용하는 것이 더욱 효과적일 것으로 사료되었다. 지금까지 알려진 *E. coli*, *S. typhimurium*와 같은 다른 병원성 세균들과 비교하여 볼때 *V. vulnificus*에서는 아직까지 이와같이 새롭게 합성된 Hsps의 기능과 특성 및 그 역할 등이 분명하게 밝혀지지 않았으므로 분자생물학적 응용과 유전학적인 기법으로서 이에 관한 구체적이고 포괄적인 연구는 원핵에서 부터 진핵에 이르기까지 광범위하고 다양하게 나타나는 Hsps의 영역을 보다 더 넓혀 숙주-기생체 상호간의 관계뿐만 아니라 미생물의 진화적인 측면과 분류분야에서도 크게 기여할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- Bowdre, J.H., Hull, J.H. and Cocchetto, D.M.: Antibiotic efficacy against *Vibrio vulnificus* in the mouse : Superiority of tetracycline. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 225: 595-598, 1983.
- Carreiro, M.M., Laux, D.C. and Nelson, D.R.: Characterization of the heat shock response and identification of heat shock protein antigens of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immunol.*, 58: 2186-2191, 1990.
- Chung, M.S., Rim, B.M., Uhm, T.B. and Park M.K.: A detection method for *Vibri vulnificus* using monoclonal antibodies. *J. Microbiol.*, 35: 87-91, 1997.
- Edwin, H.L.: *Manual of clinical microbiology*. 5th ed., pp. 1105-1125, *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., 1991.
- Fiore, A., Hayat, V. and Wright, A.C.: Interaction with *Vibrio vulnificus* elicits an antibody response to capsular polysaccharide. *Clin. Res.*, 40: 428A, 1992.
- Gray, L.D. and Kreger, A.S.: Purification and characterization of an extracellular cytolysin produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immunol.*, 48: 62-72, 1985.
- Hoffman, P.S., Butle,r C.A. and Quinn, F.D.: Cloning and temperature-dependent expression in *Escherichia coli* of a *Legionella pneumophila* gene coding for a genus-common 60-kilodalton antigen. *Infect. Immunol.*, 57: 1731-1739, 1989.
- Jeevanjyot, G.A.: Induction of heat shock response in *Vibrio cholerae*. *Microbiology*, 141: 2101-2109, 1995.

- Kreger, A.S., Cray, L.D. and Testa, J.: Production of mice against *Vibrio vulnificus* disease by vaccination with surface antigen preparation and anti-surface antigen antisera. *Infect. Immunol.*, 45: 537-543, 1984.
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227: 680-685, 1970.
- Lowry, O.H., Rosebrough, A.L., Farr R.J. and Randall: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
- Miyoshi, N., Shimizu, C. and Miyoshi, S.: Purification and characterization of *Vibrio vulnificus* protease. *Microbiol. Immunol.*, 31: 13-25, 1987.
- Morimoto, R.I., Tissieres, A. and Georgopoulos, C., Eds. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY., 1994.
- Neidhardt, F.C. and Van Bogelen, R.A.: Heat shock response, *In* Neidhardt F.C., Ingraham J.L., Low K.B., Magasanik B., Schaechter M. Umbarger H.E. (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. pp. 1334-134. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1987.
- Neidhardt, F.C., Van Bogelen, R.A. and Vaughn, V.: Genetics and regulation of heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 18: 295-329, 1984.
- Pardasani, D. and Fitt, P.S.: Strain dependent induction by heat shock of resistance to ultraviolet in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.*, 18: 99-103, 1989.
- Sahu, G.K., Chowdhury, R. and Das, J.: Heat shock response and heat shock protein antigens of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immunol.*, 62: 5624-5631, 1994.
- Shinoda, S., Miyoshi, S. and Yamanaka, H.: Some properties of *Vibrio vulnificus* hemolysin. *Microbiol. Immunol.*, 29: 583-590, 1985.
- Simpson, L.M. and Oliver, J.D.: Siderophore production by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immunol.*, 41: 644-649, 1983.
- Smith, G.C. and Merkel, J.R.: Collagenolytic activity of *Vibrio vulnificus*: potential contribution to its invasiveness. *Infect. Immunol.*, 35: 1155-1156, 1982.
- Testa, J., Daniel, L.W. and Kreger, A.S.: Extracellular phospholipase A<sub>2</sub> and lysophospholipase in *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immunol.*, 45: 458-463, 1984.
- Vodkin, M.H., Williams, J.C.: A heat shock operon in *Coxiella burnetii* produces a major antigen homologous to a protein in both mycobacteria and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 170: 1227-1234, 1988.
- Watson, K.: Microbial stress proteins. *Adv. Microb. Physiol.*, 31: 183-216, 1990.
- Wright, A.C., Simpson, L.M. and Oliver, J.D.: Role of iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infection. *Infect. Immunol.*, 34: 501-507, 1981.
- Yamamori, T., Ito, K., Nakamura, Y. and Yura, T.: Transient regulation of protein synthesis in *Escherichia coli* upon shift-up of growth temperature. *J. Bacteriol.*, 134: 1133-1140, 1978.
- Young, D., Lathigra, R., Hedrix, R., Sweeter, D. and Young, R.A.: Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 4267-4270, 1988.
- Yura, T., Nagai, H. and Mori, H.: Regulation of the heat shock response in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 47: 321-350, 1993.

## Effects of heat and ethanol shock on the membrane proteins of *Vibrio vulnificus*

Moon-Soo Heo<sup>†</sup> and Cho-Rok Jung\*

Faculty of applied Marine Science, College of Marine Science,  
Cheju National University, Cheju 690-756,

\*Division of Biological Science, College of Natural Science,  
Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

New sixteen heat shock proteins (Hsps) and ten ethanol shock proteins were appeared on the analysis with SDS-PAGE when cultivation temperature for the *Vibrio vulnificus* ATCC 27562 strain was shifted-up to 42°C from 30°C for 20 mins and treated with of 6% ethanol for 10 mins, respectively. Even the induction of thermotolerance in *V. vulnificus* was coincided with the induction of Hsps if the pre-shock was adjusted to thermal temperature. Outer membrane proteins (OMPs) that were purified from the membrane of cells after heat shock showed more immunodominant pattern to the immunized rabbit anti-*V. vulnificus* O serum in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). On the western immunoblot analysis it was confirmed that both 62 kDa IMP and 69 kDa OMP in the Hsps and 48 kDa IMP a major OMP in the ethanol shock proteins were reacted with rabbit anti-*V. vulnificus* O sera. Agglutination titer of the heat shocked *V. vulnificus* with rabbit anti-*V. vulnificus* O serum was higher than that of the untreated bacteria.

---

*Key words* : *Vibrio vulnificus*, Heat shock, Ethanol shock, ELISA, Western blotting