

<단보>

## Immuno Gold 표지법을 이용한 대장균내 *Vibrio fluvialis* MotX 단백질의 존재 부위 결정

이중희 · 박제현 · 김선희 · 안선희 · 공인수\*  
부경대학교 생물공학과

### Detection of the Recombinant MotX Protein of *Vibrio fluvialis* in *Escherichia coli* with Immuno-Gold Labeling Method

Jong-Hee LEE, Je-Hyun PARK, Sun-Hoi KIM, Sun-Hee AHN  
and In-Soo KONG\*

Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University,  
Busan 608-737, Korea

The rotation of the flagellar motor is powered by the electrochemical gradient of specific ions across the cytoplasmic membrane. Recently, the genes of the Na<sup>+</sup>-driven motor have been cloned from marine bacterium of *Vibrio* sp. and some of the motor proteins have been purified and characterized. Also, *motX* gene encoding a channel component of the sodium type flagellar motor was identified from *Vibrio fluvialis* (KTCC 2473). The amino acid sequence of MotX protein from *V. fluvialis* shared 90, 85, 85% identity with *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, respectively. We have studied the localization of the expressed MotX protein in *Escherichia coli* by immuno-gold labeling of ultra-thin frozen section. Our observation of the expressed protein indicated that MotX protein could be existed as attachment to inner membrane in *E. coli*.

Key words: *Vibrio fluvialis*, MotX, Sodium channel, Immuno-gold labeling

*Vibrio fluvialis*는 호염성 미생물로 위장염과 관련된 병원성 미생물로 주로 해산물의 섭취를 통해 인간에게 감염을 일으키며 이로 인한 증상은 열을 동반한 설사, 구토, 복통을 일으키는 것으로 보고되고 있다 (Lee et al., 1981). *V. fluvialis*를 비롯한 여러 *Vibrio* sp.는 그람 음성 박테리아로서 일반적으로 다른 생물의 생체 내에 침투하여 증식을 위한 에너지원을 찾아 이동하기 위한 수단으로 편모 운동성을 가지고 있다 (Yomohiro and Michio, 2001). *V. cholerae*는 극성 편모를 회전시키기 위해 Na<sup>+</sup> 이온을 동력으로 사용하는 반면에 *V. alginolyticus*와 *V. parahaemolyticus*는 Na<sup>+</sup> 이온과 H<sup>+</sup> 이온 둘 다를 사용하여 편모 운동을 하는 것으로 보고되고 있다 (Atsumi et al., 1992; Kawagishi et al., 1995; McCarter and Silverman, 1990).

여러 *Vibrio* sp.로부터 편모 모터와 관련된 여러 유전자가 보고되어 있으며 (Yomohiro and Michio, 2001), *V. parahaemolyticus*에서는 편모 모터에 관한 유전자로 *motX*, *motY*, *motA*, *motB* (Jaques et al., 1999; McCarter, 1994a; 1994b), *V. alginolyticus*의 경우에는 *motX*, *motY*, *pomA*, *pomB*, *motA*, *motB* (Asai et al., 1997; Yorimitsu et al., 1999)의 유전자가 보고되어 있다. *V. alginolyticus*의 *motX* 유전자의 경우 *V. parahaemolyticus*의 *motX* 유전자와 80%의 유사성을 가지고 있다 (Okunishi et al., 1996). *V. cholerae*에서 보고된 유전자로 *pomA*, *pomB*, *motX*, *motY*가 밝혀져 있는데, 이 유전자들은 *V. parahaemolyticus*의 유전자들과 높은 유사성을 가지고 있다 (Yomohiro et al., 2001).

*V. fluvialis* MotX 단백질의 211개의 아미노산 서열을 *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*의 아미노산 서열들과 유사도를 조사해 본 결과, *V. cholerae*와는 90%, *V. alginolyticus*와는 85%, *V. parahaemolyticus*와는 85%의 높은 유사성을 가지고 있었다 (Fig. 1). 이들 네 가지 MotX 단백질의 아미노산 서열들은 전반적으로 높은 유사성을 가지지만, 반면 같은 *Vibrio* sp.에서도 *V. fluvialis*의 MotX 단백질은 *V. cholerae*와 좀 더 높은 유사성을 보였으며 *V. alginolyticus*의 경우 *V. parahaemolyticus*와 좀 더 높은 유사성을 보였다. MotX 단백질의 N말단 부분에 29개의 아미노산으로 이루어진 membrane spanning region이 있는 것으로 알려져 있으며 multi-alignment 결과, 이 부분에서의 유사도는 상당히 낮게 나타났다. 기존의 보고에 의하면 MotX 단백질은 세포 내막을 통과하여 존재하면서 1개의 막 통과 부위를 가지고 있고 N말단이 세포 내막 안쪽에, C말단이 세포 내막 바깥쪽에 위치하여 전하를 띠면서 channel 구성요소나 회전기의 구성요소를 형성하는 것으로 알려져 있다 (McCarter, 1994a). Multi-alignment 결과에서 보듯이 전반적으로 높은 아미노산 서열의 유사성에도 불구하고 이 막 통과 부위로 추정되는 곳에서 높은 아미노산 변이 정도를 보이는데 이는 내막에 파묻혀서 통로의 기능만 하는 putative spanning region을 구성하는 아미노산 서열은 약간의 변이가 있어도 미생물 편모 운동성의 에너지를 제공하는 역할을 수행하는 데는 별다른 지장이 없는 것으로 생각된다.

Park et al. (2001)에서 *V. fluvialis*의 *motX* 유전자를 클로닝하여 형질전환 후에 IPTG로 유도하여 과발현시킨 *E. coli*는 유도 30분 이후부터 성장이 현저히 저해를 받았으며 이때 생육은 100 mM의

\*Corresponding author: iskong@mail.pknu.ac.kr

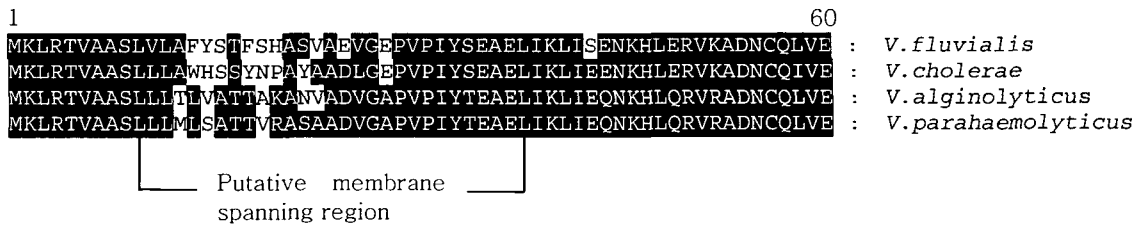


Fig. 1. Alignment of amino acid around the putative membrane spanning region of *V. fluvialis* MotX (211 aa) with known MotX amino acid sequences of *Vibrio* sp. Alignment was performed by the ClustalW program.

염 농도에서보다 200 mM 염 농도에서 더 큰 영향을 보였다. 또한 sodium channel의 저해제인 amiloride의 존재 하에서 MotX 단백질의 과발현시 *E. coli*의 성장저해가 극복된다는 것을 확인하였다. 또한 MotX가 과발현된 *E. coli*의 세포막 단편을 각각 분리하여 MotX 단백질 항체를 이용하여 western을 수행한 결과 내막 단편에서 MotX 단백질의 신호를 확인하였다. 이는 기존의 *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*의 MotX 단백질의 결과와 유사한 양상을 나타낸 것으로 *V. fluvialis*의 경우도 다른 *Vibrio* sp.들과 비슷한 편모 모터의 성분을 가지고 있으며 클로닝한 *motX* 유전자의 기능도 sodium channel의 구성요소 중 한 부분으로 추정된다. 본 연구에서는 또한 이를 더욱 확실히 증명하고자 MotX 단백질을 *E. coli* 내에서 대량발현 시킨 후에 존재해 있는 위치를 MotX 단백질 항체를 이용, Immuno-gold 표지법을 사용하여 전자현미경으로 관찰하여 확인하였다. MotX 단백질의 대량발현은 Park et al. (2001)에서 구축한 pVFMX6 plasmid를 이용하여 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질전환 시킨 다음, ampicillin (50 µg/mL)이 첨가된 LB 액체 배지에 배양하였으며 OD<sub>600</sub>에서 약 0.6 정도를 나타낼 때 IPTG (최종농도 1 mM)를 첨가하여 MotX 단백질의 과발현을 유도하였다. 전자현미경을 통한 MotX 단백질의 발현 후 *E. coli* 내 위치의 관찰은 Gold conjugated anti-rabbit IgG (Sigma, USA)를 이용하였다. 이 때 MotX 단백질에 대한 항체는 anti-rabbit polyclonal 항체를 사용하였다 (Park et al., 2001). 전자현미경 시료를 위해 IPTG 유도 2시간 후 형질전환 *E. coli* BL21 (DE3)을 Wagenaar 방법을 사용하여 초미세분획 (100 nm)으로 준비하였다. 이것을 TEM (Transmission Electro Microscope)을 사용하여 80 kV의 전압으로 관찰하였다 (Wagenaar et al., 1993). 그 결과 대량 생산된 단백질이 세포 내막에 존재하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 이 결과는 *V. parahaemolyticus*나 *V. alginolyticus*의 sodium channel 구성요소인 MotX, MotY의 발현 위치와 같은 것으로 *V. fluvialis*의 MotX도 *E. coli*에서 발현시 세포 내막에 존재한다는 것을 보여주고 있으며 Park et al. (2001)에서 IPTG로 유도된 pVFMX6를 함유한 *E. coli*의 세포 내막과 외막을 분리하여 MotX의 항체를 사용한 western에서 확인했던 결과와 일치하는 것을 보여주고 있다

편모 모터의 구성성분은 *V. parahaemolyticus*에서 처음으로 *motX*와 *motY*라는 두 가지 유전자가 보고되었다 (McCarter, 1994a; 1994b). MotX 단백질은 sodium channel의 화학적 구성 물질이고, MotY 단백질은 MotX의 지지적 구조 물질로 MotX의 안정성에

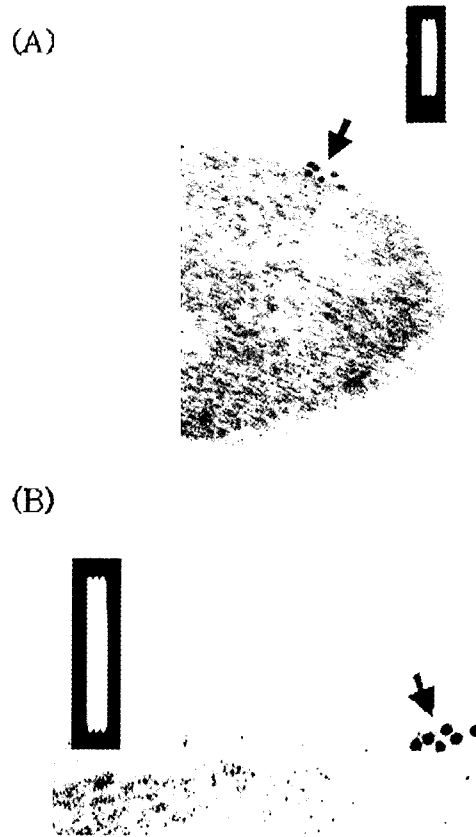


Fig. 2. Transmission electron micrographs of *E. coli* harboring pVFMX6 (A and B). MotX was detected by immuno-gold conjugated anti-rabbit IgG followed by anti MotX antibody after 2 h from IPTG induction. Arrows indicate the MotX protein. Bars, 100 µm.

기여를 하는 것으로 알려져 있으며 *V. parahaemolyticus*에 있어서 MotX의 과발현시에는 세포 성장율의 감소를 야기하지만, MotY의 과발현시에는 세포 성장율에 영향을 주지 않는다고 한다. 또한 *V. alginolyticus*의 MotX에 관한 최근의 연구에서도 MotX가 편모의 운동성에 중추적인 역할을 담당하고 있으며 MotY의 경우 그 보조적인 역할을 수행하고 있는 것으로 보고하고 있다 (Okabe, 2001). *V. fluvialis*의 경우 약간의 염 농도를 함유한 액체 배지에서 운동성을 가지므로, 이것 역시 Na<sup>+</sup> 이온을 이용한 편모 모터를 사용하는 것으로 생각되어지고 있으며 이러한 특성을 바탕으로 본 연구실

에서는 *V. fluvialis*로부터의 *motX* 유전자를 클로닝하여 DNA 염기 서열을 밝혀내었고 그 유전자 산물인 MotX 단백질의 과발현으로 인한 *E. coli* host의 사멸에 관해 연구하였다 (Park et al., 2001). 본 연구에서도 *V. fluvialis*의 MotX 단백질이 *E. coli*에서 발현시 내막에서 존재함을 밝혀 내었다. 이러한 결과는 *V. fluvialis*의 MotX 단백질이 편모 모터의 에너지원을 공급하기 위한 sodium channel의 구성요소로서, 내막에 존재하여 그 기능을 적절히 수행할 수 있는 것으로 생각된다.

### 감사의 글

이 논문은 부경대학교 해양산업개발연구소의 연구비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

- Asai, Y., S. Kojima, H. Kato, N. Nishioka, I. Kawagishi and M. Homma. 1997. Putative channel components for the fast-rotating sodium-driven flagellar motor of a marine bacterium. *J. Bacteriol.*, 179, 5104~5110.
- Atsumi, T., L. McCarter and Y. Imae. 1992. Polar and lateral flagellar motors of marine *Vibrio* are driven by different ion-motive forces. *Nature*, 355, 182~184.
- Jaques, S., Y.K. Kim and L. McCarter. 1999. Mutations conferring resistance to phenamil and amiloride, inhibitors of sodium-driven motility of *Vibrio parahaemolyticus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 5740~5745.
- Kawagishi, I., Y. Maekawa, T. Atsumi, M. Homma and I. Yasuo. 1995. Isolation of the polar and lateral flagellum-defective mutants in *Vibrio alginolyticus* and identification of their flagellar driving energy sources. *J. Bacteriol.*, 177, 5158~5160.
- Lee, J.V., P. Shread, L. Furness and T.N. Bryant. 1981. Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. nov. (synonymo group F vibrios, group EF 6). *J. Appl. Bacteriol.*, 50, 73~94.
- McCarter, L. 1994a. MotX, the channel component of the sodium-type flagellar motor. *J. Bacteriol.*, 176, 5988~5998.
- McCarter, L. 1994b. MotY, a component of the sodium-type flagellar motor. *J. Bacteriol.*, 176, 4219~4225.
- McCarter, L. and M. Silverman. 1990. Surface-induced swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol. Microbiol.*, 4, 1057~1062.
- Okunishi, I., I. Kawagishi and M. Homma. 1996. Cloning and characterization of *motY*, a gene coding for a component of the sodium-driven flagellar motor in *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.*, 178, 2409~2415.
- Okabe, M., T. Yakushi, Y. Asai and M. Homma. 2001. Cloning and characterization of *motX*, a *Vibrio alginolyticus* sodium-driven flagella motor gene. *J. Biochem.*, 130, 879~884.
- Park, J.H., J.H. Lee, Y.S. Kim, Y.K. Hong and I.S. Kong. 2001. Molecular cloning and expression of a sodium-driven flagella motor component gene (*motX*) from *Vibrio fluvialis*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 11, 973~978.
- Wagenaar, F., G.L. Kok, J.M.B. Davies and J.M.A. Pol. 1993. Rapid cold fixation of tissue samples by microwave irradiation for use in electron microscopy. *Histochem. J.*, 25, 719~725.
- Yomohiro, T. and H. Michio. 2001. Na<sup>+</sup>-driven flagella motor of *Vibrio*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1505, 82~93.
- Yorimitsu, T., K. Sato, Y. Asai, I. Kawagishi and M. Homma. 1999. Functional interaction between *pomA* and *pomB*, the sodium-driven flagellar motor components of *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.*, 181, 5103~5106.

2002년 4월 27일 접수

2002년 7월 30일 수리