Journal of Life Science **2004**, Vol. 14. No. 2. 362~367 ©JLS

Vibrio parahaemolyticus collagenase 불활성화 돌연변이체의 제조 및 특성

이재원 · 전인준 · 강호영 · 차재호*

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Received February, 2004 / Accepted March 5, 2004

Construction and Characterization of the *Vibrio parahaemolyticus* Collagenase Inactivated Mutant. Jae-Won Lee, In-Joon Jun, Ho Young Kang and Jaeho Cha*. *Department of Microbiology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea* – For better understanding of the host infection mechanism of *Vibrio*, a *Vibrio parahaemolyticus* collagenase mutant was generated by insertional inactivation of a *vppC* gene encoding extracellular collagenase. A recombinant DNA containing *vppC::nptII* was cloned into a suicide plasmid pDMS197, resulted in pVCM03. The recombinant suicide plasmid pVCM03 contained in *E. coli* χ7213 was transferred to a wild-type *V. parahaemolyticus* 04 through conjugation. The recombinant *vppC::nptII* DNA in pVCM03 was exchanged with wild-type allele by homologous recombination resulting *vppC* mutant, *V. parahaemolyticus* CM. The mutant was selected and screened on TCBS media containing 10% sucrose and kanamycin. The mutation by allele exchange was confirmed with the comparison of the size of DNAs amplified by PCR. *V. parahaemolyticus* CM showed at least 4-fold less collagen-degrading activity than those of wild-type, and the mutant exhibited less cytotoxicity than that of wild-type in MTT assay.

Key words – *V. parahaemolyticus*, *vppC*, conjugation, allelic exchange

장염비브리오균인 *Vibrio parahaemolyticus*는 위장관염의 주 원인균으로 특히 해산물의 소비가 많은 지역에서 식중독을 일으키는 대표적인 균으로 알려져 있다[4,5]. 이 균은 해수와 담수에서 패류에 부착하여 공생관계를 유지하거나 어선의 표면과 숙주 생물체에 부착하는 등 다양한 환경에서 생육하는 특성을 갖고 있다. 장염비브리오균은 최적 생육환경에서 8~12분 정도의 극히 짧은 doubling time을 가지며 병원성 유발 인자로는 주로 헤모라이신이 연구되어져 왔으나, 최근 들어 헤모라이신이외에 다른 인자들도 병원성 유발에 관여한다는 보고가 발표될 뿐만 아니라 이들 병원성인자들의 자세한 병원성 유발 기작에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중에서 세포외 단백질 분해효소들이 인간 또는 어패류의 병원성 유발에 관여하는 중요한 인자라는 보고가 있으며[12,25], 이들은 *Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens, Clostridium perfringenes* 병원균의 질병 유발에 관여하는 주요한 독성인자로 작용하는 것으로 알려져 있다[6].

병원성균인 *Vibrio cholerae* O1가 생산하는 hemagglutinin/protease는 생리적으로 중요한 숙주세포 단백질인 mucin, fibrionectin, lactoferrin들을 분해하는 능력을 보유한다고 보고되었고[3], 패혈증을 일으키는 원인균인 *Vibrio vulnificus*도 elastase 활성을 지닌 단백질분해효소를 생산하는 것으로 알려져 있다[10,24]. 비브리오가 생산하는 세포외 효소들의 저해제로 작용하는 α-macroglobulin이라는 단백질을 세포외 효소들에 처리하면 그 활성이 저해되어 비브리오균의 병원성이 약화된다는 보고들이 이러한 효소들의 중요성을 뒷받침 해 주고 있다[14-16]. 어패류에 병을 일으키는 *Vibrio anguillarum*도 protease를 세포외로 분비하며[2,13], 이 protease의 아미노산 서열과 상동성을 나타내는 Open Reading Frame (ORF)이 *V. cholerae*와 *V. vulnificus*에서도 존재하며, 아울러 elastase 활성을 나타내므로 이들은 비브리오균의 숙주세포 침입에 관여하는 것으로 추측되어진다[17]. 장염원인균인 *V. parahaemolyticus*도 다양한 단백질 분해효소들을 생산하는 것으로 알려져 있다[8,11,27].

선행연구에서 *V. parahaemolyticus*가 생산하는 콜라겐분해효소에 대한 유전자, *vppC*를 클로닝하였고, 이 효소의 분자생물학적인 특성을 검토하였다[7]. *vppC*의 염기서열은 *V. alginolyticus* 유래의 콜라겐분해효소 유전자와 88%의 유사성을 보였으며다[26], *V. alginolyticus* 콜라겐분해효소의 분자량은 82 kDa으로 대략 90 kDa의 분자량을 가지는 *V. parahaemolyticus* 04 유래의 콜라겐 분해효소와 유사하였다. 콜라겐 분해 효소는 콜라겐을 분해하여 여러 피부 및 골격에 손상을 주는 것으로 보고되어졌다[6,22].

이번 연구의 목적은 병원성 인자로서 장염비브리오균 유래의 콜라겐분해효소의 역할을 알아보기 위하여 콜라겐분해효소가 불활성화된 *V. parahaemolyticus* 04 돌연변이체를 allelic exchange 방법으로 구축하는 것이다. 이 돌연변이체는 병원성인자로서의 콜라겐분해효소의 역할을 연구하는데 필요한 중요한 도구로서 사용될 것이다.

***Corresponding author**
Tel : +82-51-510-2196, Fax : +82-51-514-1778
E-mail : jhcha@pusan.ac.kr

재료 및 방법

사용균주와 배지 및 플라스미드

실험에 사용된 균주와 플라스미드는 Table 1에 나타내었다. *E. coli*는 플라스미드 DNA의 복제나 접합에 사용되었고, 액체배양은 Luria-Bertani (LB, Difco, Detroit, USA)배지에, 고체배양은 LB배지에 1.5% (w/v) agar이 포함된 배지에서 각각 수행되었다. *V. parahaemolyticus* 04는 LB배지에 2.0% NaCl이 첨가된 LBS 배지나 tryptic soy broth (TSB medium, Accumedia manufacturer, Inc.)배지를 사용하여 배양하였다. 돌연변이체의 선별은 TCBS (thiosulfate citrate bile salts, Difco, Detroit, USA)에 sucrose 10%를 첨가한 배지에서 수행하였으며, 항생제를 필요로 하는 경우 ampicillin, tetracycline 또는 kanamycin을 각각 100 μg/ml, 15 μg/ml, 50 μg/ml씩 첨가하여 배양하였다.

사용시약 및 효소

Oligonucleotide primer는 Bioneer Co. (Cheongwon, Korea)에서 제작하였고, 사용된 oligonucleotide의 염기서열은 Table 2에 나타내었다. 제한효소와 Taq polymerase는 Kosco Biotech Co. (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였고, 콜라겐분해효소의 활성을 보기 위하여 사용된 콜라겐은 bovine achielles tendon에서 추출한 insoluble collagen (type I, Sigma)을 구입하여 사용하였다.

콜라겐 분해효소 유전자 (*vppC*)의 subcloning

V. parahaemolyticus 04의 콜라겐 분해효소 유전자 *vppC*는 *V. parahaemolyticus* 04 chromosomal DNA를 주형으로 COL3F와 COL3R primers를 이용하여 PCR방법으로 증폭하여 2.6 kb의 DNA 단편을 얻었다. PCR은 PerkinElmer Cetus Thermal cycle (Gene Amp PCR 9600)을 사용하여 AccuPower PCR premix (Bioneer) 20 μl에 첨가하여 PCR을 시행하였다. 얻어진 PCR 산물은 TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)buffer를 사용한 0.8% agarose gel에 전기영동을 통해 확인하였다. 증폭된 2.6 kb 콜라겐분해효소 유전자단편을 *Cla*I과 *Hin*dIII 제한효소로 절단 후 클로닝벡터인 pGEM7Zf(+)에 클로닝하였다.

재조합 *vppC::nptII DNA* 제작

VppC를 불활성화 시키기 위해 *vppC* 유전자의 내부에

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
Strains		
V. parahaemolyticus 04	produces various proteases; conjugational recipient	NID, Japan
V. parahaemolyticus CM	Km^r, collagenase defective mutant	This study
E. coli		
DH5 α	*supE44 ⊿lacU169 (Ø80 lacZ ⊿M15) hadR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*	Lab collection
DH5 α (λ *pir*)	*supE44 ⊿lacU169 (lacZ ⊿M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1* λ*pir*; host for π-requiring plasmids	20
χ 7213	*thi-1 thr-1 leu B6 fhuA21 lac Y1 glnV44⊿asdA4 recA1 Rp4-2-Tc::Mu*[λ*pir*]; Km^r	20
Plasmids		
pGEM7Zf(+)	pMB1*ori*; Ap^r	Promega
pBSL86	pBSL with *nptII*; Apr, Km^r	23
pDMS197	R6K*ori*, *sacB*, Tc^r	1
pVCM01	pGEM7Zf(+) with *vppC*; Ap^r	This study
pVCM02	pVCM01 with *vppC::nptII*; Ap^r, Km^r	This study
pVCM03	pDMS197 with *vppC::nptII* ; Tc^r, Km^r	This study

NID, National Institute of Infectious Disease; Ap^r, ampicillin-resistant; Km^r, kanamycin-resistant; Tc^r, tetracycline-resistant

Table 2. Nucleotide sequences of the primers used in this study

Primer	Sequence (5′→3′)	Characteristics
COL3F	CTTCGTTGTAGCGTCTTTAAGTG	Forward primer preceding the *Cla*I recognition site for 2.6 kb *vppC* fragment
COL3R	TCTCCGCTCGAGCTCTCTCGGCAAGCT	Reverse primer containing an artificial *Xho* recognition site for 2.6 kb *vppC* fragment
COL4F	GGCATCGATTTTAATAAAGTTCG	Forward primer for recognition of an allelic exchange mutant
COL4R	AAGCTTCCGCGTCAAAATC	Reverse primer for recognition of an allelic exchange mutant

vppC indicates the gene encoding for collagenase from *V. parahaemolyticus* 04.

kanamycin에 저항성을 갖는 neomycin phosphotransferase II 를 코딩하는 *nptII* 유전자를 삽입하였다[18,23]. *nptII*를 포함하고 있는 pBSL86를 *Sma*I 효소로 절단하여 얻어진 1.2 kb kanamycin 내성 유전자를 *vppC* 유전자 내부에 존재하는 *Eco*RV site에 삽입하여 재조합 DNA를 제작하였다. 클로닝에 사용된 벡터는 self-ligation을 막기위해 Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP)를 37℃와 56℃에서 각각 30분 처리하여 벡터의 인산기를 제거하여 사용되었다. Gene replacement를 위한 suicide vector는 pDMS197이었으며, pDMS197을 *Sac*I과 *Kpn*I으로 처리한 후 3.8 kb의 재조합 *vppC*::*nptII* *Sac*I-*Kpn*I DNA 단편과 ligation시켜 allelic exchange를 위한 재조합 suicide plasmid를 구축하였다.

*Homologous recombination*에 의한 콜라겐 분해효소 불활성화 돌연변이체의 선발

E. coli 7213은 재조합 suicide plasmid의 공여체로, 원 균주인 *V. parahaemolyticus* 04는 수용체로 각각 사용하였다. 공여체와 수용체를 각각 배양한 후(OD_{660nm} = 0.8) 원심분리하여(12,000 rpm, 4℃, 5분) cell pellet을 얻었다. 각 pellet에 1.5% NaCl이 첨가된 TSB배지 1 ml을 첨가하여 균을 현탁하고, 각 현탁액의 30 μl를 잘 섞어서 diaminopimelic acid (DAP)가 첨가된 LB 고체배지의 중심에 접종 후, 37℃에서 18시간 배양하였다. 혼합 배양된 균은 1.5% NaCl이 첨가된 TSB배지 1 ml에 집균한 뒤 선별 배지에 100 μl씩 도말하여 37℃에서 18시간 배양시켰다. Single crossover 돌연변이체는 kanamycin과 tetracycline이 첨가된 선택배지를 사용하여 선발하였으며, double crossover 돌연변이체는 suicide plasmid에 포함되어 있는 *SacBR* counter-selection system을 적용하여 분리하였다. Kanamycin과 10% sucrose가 첨가된 TCBS배지에 도말하여 성장한 colony들은 kanamycin이 들어있는 LB배지와 tetracycline이 들어있는 LB배지에 접종하여 항생제 감수성 여부로서 1차 screening을 하였고, PCR방법으로 DNA를 증폭하여 증폭된 DNA 단편의 크기 비교로서 allele exchange를 확인하였다.

콜라겐 분해효소의 역가 측정

V. parahaemolyticus 균을 배양한 후(OD_{660nm} ≈ 1.0), 배양액을 원심분리하여 균체를 제거한 배양상등액이 효소활성 측정에 사용하였다. 기질인 collagen (type I) 10 mg을 4 mM $CaCl_2$가 첨가된 50 mM Tris-HCl 완충액 0.8 ml에 녹인 뒤, 효소용액 0.2 ml을 잘 섞어 30℃에서 30분간 반응시켰다. 1 ml의 0.1 N acetic acid를 첨가하여 실온에서 20분간 방치하면서 반응을 정지시켰다. 생성된 α-유리 아미노산의 측정은 ninhydrin방법을 이용하였다[21]. 반응이 정지된 시료를 다시 원심분리하여 얻어진 상등액 0.1 ml에 0.2 M citrate-sodium citrate buffer (pH 5.5), 1.4 ml과 ninhydrin buffer (2% ninhydrin, 0.05% $SnCl_2 \cdot H_2O$을 methylcellosolve에 녹여서 사용) 1.0 ml를 넣어서 섞어 준 뒤 100℃에서 15분간 반응시키고, 반응이 끝난 시료를 얼음에서 5분간 처리한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 1분 동안 1 μg의 leucine의 생성에 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

In vitro 세포 독성 검사

콜라겐 분해효소의 세포독성효과는 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 방법을 사용하여 vero cell을 대상으로 관찰하였다. Vero cell은 10% fetal bovine serum이 함유된 DMEM (Dulbeccos modified Eagless medium)배지에 5% CO_2 배양기에 37℃에서 24시간 배양하였다. 배양 후 PBS (phosphate-buffered saline)로 두 번 세척하고 2 ml의 trypsin-versin 용액을 2분간 처리하여 cell을 회수하여 96 well microplate에 각각 150 μl씩 넣고 (10^4~10^6 cells/ml), 5% CO_2 배양기에서 37℃, 24시간 배양하였다.

초기농도 1.0×10^7 CFU/ml의 *V. parahaemolyticus*는 단계별로 희석하여 vero cell이 들어있는 96 well microplate에 100 μl씩 넣고 24시간 배양한 후 상등액을 제거하고, 각 well에 DMEM배지로 희석된 MTT 용액 (5 mg/ml) 50 μl를 첨가하였다. 5% CO_2 배양기에서 4시간 배양한 후, 상등액을 제거하고 100~150 μl dimethylsulfoxide를 첨가하여 피펫으로 20분 정도 용해 시켜준 다음, 37℃ 배양기에서 5분간 배양해서 공기 기포를 없애준 후, ELISA reader로 생성된 formazan의 흡광도를 570 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

재조합 *suicide plasmid pVCM03*의 구축

장염 비브리오균이 생산하는 콜라겐 분해효소의 병원성 인자로서의 역할을 조사하고자 allelic exchange 방법을 이용하여 콜라겐 분해효소가 불활성화된 균주를 얻고자 하였다. *V. parahaemolyticus* 04 염색체 DNA를 이용하여 PCR을 통해 증폭된 2.6 kb의 콜라겐 분해효소 유전자 *vppC*를 pGEM7Zf (+) 벡터에 cloning하여 pVCM01를 구축하였다. 이 DNA를 *Cla*, *Hin*dIII, *Eco*RV, *Hin*cII등의 제한효소를 처리하여 DNA 단편들의 절단 형태로서 클로닝된 DNA가 *vppC* 임을 확인하였다. 재조합 suicide plasmid pVCM03의 구축에 대한 전 과정은 Fig. 1에 나타내었다. Plasmid pVCM01에 cloning된 *vppC* 유전자를 불활성화 시키기 위하여 kanamycin 저항성 유전자를 *vppC* 유전자에 삽입하였다. 약 1.2 kb의 kanamycin 내성 유전자는 pBSL86 plasmid에서 *Sma*I 제한효소로 절단하여 분리하였고 *vppC*를 포함하는 pVCM01 DNA는 *Eco*RV 제한효소로 처리하여 blunt-end로 만든 후 CIAP효소를 처리하여 5'의 인산기를 제거하였다. 1.2 kb kanamycin 내

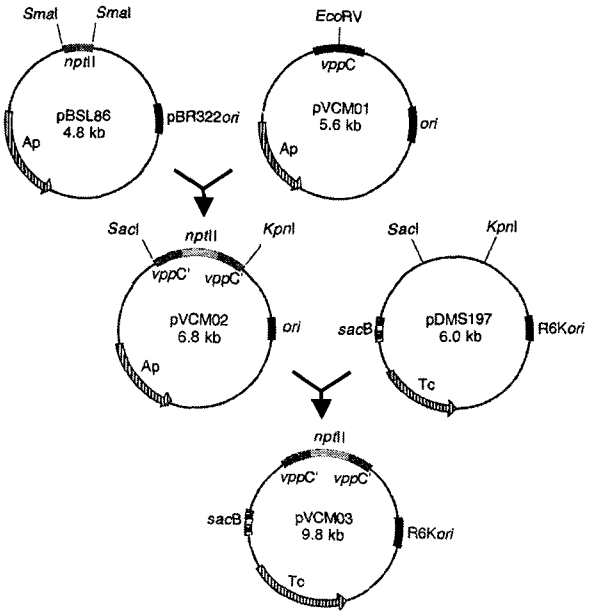
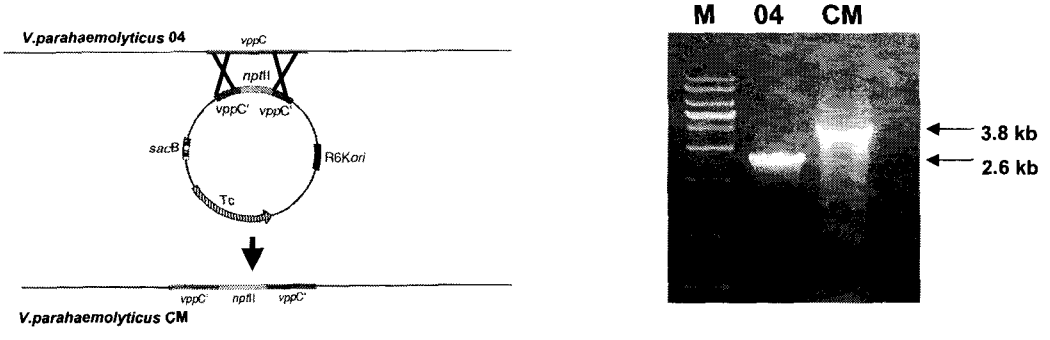


Fig. 1. Overall scheme for the construction of a recombinant suicide plasmid pVCM03.

성 유전자를 *Eco*RV로 처리된 pVCM01에 클로닝하여 얻어진 재조합 플라스미드를 pVCM02라 명명하였다. pVCM02를 *Cla*I으로 처리하여 6.8 kb 크기의 DNA조각을 확인하였고 *Hin*dIII 처리 시 4.5 kb, 1.2 kb 그리고 1.1 kb의 단편을 확인하였고, *Sac*I과 *Kpn*I을 동시에 처리하여 3.8 kb와 3.0 kb의 DNA 단편의 존재를 확인하여 pVCM02가 목적으로 하는 재조합 플라스미드임을 확인하였다. pVCM02 유래의 kanamycin 내성 유전자를 갖는 *vppC* 유전자(*vppC::nptII*)를 최종적으로 suicide vector인 pDMS197에 클로닝하기 위해 pVCM02를 *Sac*I과 *Kpn*I 제한효소로 처리하여 얻어진 3.8 kb DNA를 insert로, *Sac*I과 *Kpn*I 제한효소를 처리하여 얻어진 6.0 kb pDMS197 DNA를 vector로 사용하여 ligation 시킨 후, 제조된 재조합 suicide 플라스미드를 pVCM03이라 명명하였다. 구축된 pVCM03는 *Sac*I과 *Kpn*I으로 처리하여 3.8 kb와 6.0 kb의 DNA 단편을 얻음으로 확인하였다. pDMS197은 vibrio에서 suicide 기능을 하는 R6K origin을 가지고 있으며, sucrose가 함유된 배지에서 counter-selection을 용이하게 하는 *SacBR*유전자를 포함하고 있다[9]. pVCM03를 *E. coli* χ7213에 형질전환하여 allelic exchange 실험에 사용하였다.

V. parahaemolyticus vppC 돌연변이체의 구축

E. coli 7213에 존재하는 pVCM03는 접합에 의해 *V. parahaemolyticus* 04로 전달되어졌고, 이동된 suicide plasmid는 homologous recombination에 의해 *V. parahaemolyticus* 04 염색체 DNA에 삽입되어졌다(Fig. 2A)[19]. Allele exchange가 이루어진 transconjugant는 kanamycin과 10% sucrose가 첨가된 TCBS배지에서 선별되었다. 선별된 transconjugant들의 allele exchange 여부는 kanamycin과 tetracycline이 각각 들어있는 배지에서의 생육여부로서 확인하였다. 즉, double-crossover에 의해 allele exchange가 일어난 transconjugant는 kanamycin이 있는 배지에서는 자랄 수 있지만 pDMS197 유래의 DNA는 실활과 더불어 tetracycline 저항성 유전자를 유실하게 되어 tetracycline이 첨가된 배지에서는 자랄 수 없다. 이러한 과정을 통하여 확인된 transconjugant를 *V. parahaemolyticus* CM이라 명명하였다. 이 돌연변이체의 *vppC* 유전자내에 kanamycin 내성 유전자의 삽입을 유전적으로 확인하기 위하여 COL4F와 COL4R primer (Table 2)를 이용하여 PCR로 *vppC*를 증폭하였다. 그 결과 원 균주인 *V. parahaemolyticus* 04로부터 2.6 kb DNA 단편이 증폭되었고, 돌연변이체인 *V. parahaemolyticus* CM으로부터 3.8 kb DNA 단편이 증폭되었다. 3.8 kb DNA 단편은 *vppC* (2.6 kb)와 kanamycin cassette인 *nptII* (1.2 kb)를 합친 크기로 예상된 크기와 일치하였다(Fig. 2B). 상기의 결과들을 종합하여 볼 때, *V. parahaemolyticus* CM은 콜라겐 분해효소 유전자가 불활성화된 돌연변이체임을 최종 확인하였다.



(A) (B)

Fig. 2. Construction of *vppC* insertion mutant *V. parahaemolyticus*. (A) Homologous recombination between *V. parahaemolyticus* 04 chromosome and suicide plasmid pVCM03. Recombination interrupted *vppC* gene with *nptII* gene, resulting in mutant *V. parahaemolyticus* CM. Abbreviations: *sacB*, levansucrase gene. (B) PCR analysis of genomic DNA from 04 and CM with primers COL4F and COL4R. Lane M: 1kb DNA ladder.

원 균주인 *V. parahaemolyticus* 04와 돌연변이체인 *V. parahaemolyticus* CM의 콜라겐 분해효소 활성 비교

콜라겐 분해효소는 콜라겐의 repeating unit인 아미노산서열-Pro-X-Gly-Pro-에서 X 다음을 절단하는 효소로 알려져 있고, 또한 강한 기질 특이성을 가진다. 콜라겐 분해효소는 특히 type I collagen에 대해서 높은 효소 활성을 보인다[6]. Allelic exchange방법에 의하여 얻어진 *V. parahaemolyticus* CM의 콜라겐 분해능을 원 균주인 *V. parahaemolyticus* 04와 비교하였다. 재료 및 방법에서 설명한 것과 같이 type I collagen을 기질로 사용하여 콜라겐 분해 능력을 비교한 결과 돌연변이체 *V. parahaemolyticus* CM은 원균주에 비하여 약 4배 이상 콜라겐 분해능이 감소됨을 보여주었다(Fig. 3). 이와 같은 결과는 allelic exchange법에 의한 콜라겐 분해효소 유전자가 돌연변이되어 기능적으로 효소가 불활성화 되었다는 것을 의미한다. 그러나 돌연변이체에서 낮은 분해능을 보이긴 하지만 여전히 잔존 콜라겐 분해능이 존재하였는데, 이는 아마도 *V. parahaemolyticus* CM에는 *vppC* 유전자가 coding하는 콜라겐 분해 효소 외에 다른 종류의 콜라겐 분해 효소가 있다고 추정할 수 있다. 효소의 활성을 비교해 보면, 만일 다른 종류의 콜라겐 분해 효소가 존재하더라도 *vppC*유전자가 coding하는 콜라겐 분해 효소가 *V. parahaemolyticus*에는 주요한 활성을 나타낸다.

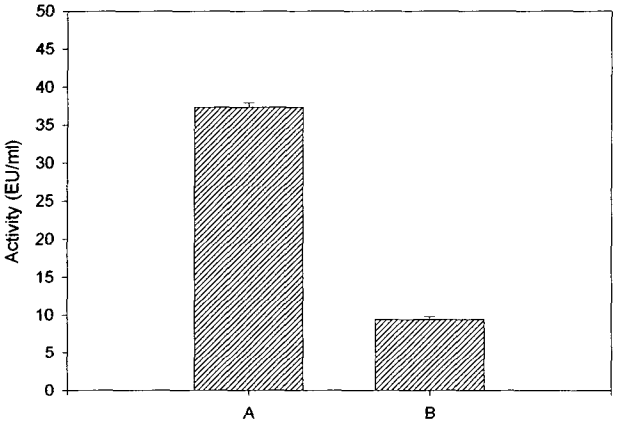


Fig. 3. Comparison of the collagen-degrading activity of *V. parahaemolyticus* 04 (A) and mutant *V. parahaemolyticus* CM (B).

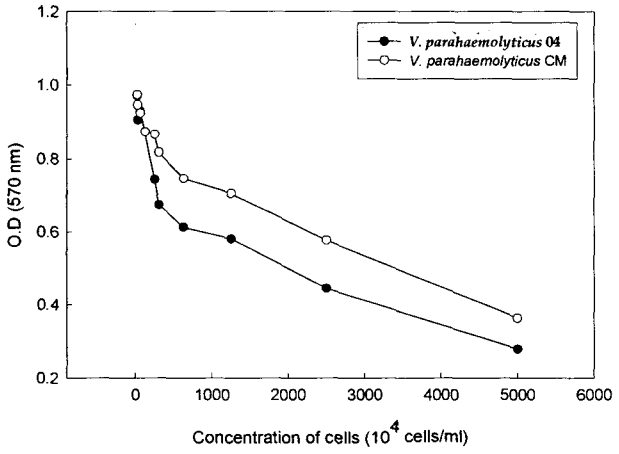


Fig. 4. MTT assay of *V. parahaemolyticus* 04 and mutant *V. parahaemolyticus* CM. A 150 μl of 1×10^7 vero cells/ml grown in 96-well microplate were exposed to 100 μl of appropriate *V. parahaemolyticus* cells for 4 hrs at 37℃.

돌연변이체 *V. parahaemolyticus* CM의 세포 독성 조사

VppC의 세포독성 효과를 조사하기 위해 원 균주 *V. parahaemolyticus* 04와 돌연변이체 *V. parahaemolyticus* CM를 vero cell에 처리하여 MTT assay를 통하여 독성효과를 관찰한 결과 동일한 세포 농도에서 원균주인 *V. parahaemolyticus* 04는 상대적으로 *V. parahaemolyticus* CM보다 약 25% 정도 낮은 흡광도를 보였다(Fig. 4). 이러한 낮은 흡광도는 vero cell이 vibrio에 감염되어 세포들이 궁극적으로 사멸하게 되어 나타난 결과라고 사료된다. 그러므로 원 균주와 비교하여 낮은 흡광도를 보이는 돌연변이체는 vero cell에 대한 약한 세포독성 효과에 기인한 것으로 판단되며, 이는 콜라겐 분해효소가 병원성 인자로서의 가능성을 보이는 것으로 생각할 수 있다. 그러나 보다 자세한 역할은 여러 종류의 세포를 이용한 세포독성 실험과 동물 실험을 통하여 얻어진 결과들을 토대로 하여 결정하여야 할 것으로 사료된다.

요 약

장염비브리오균의 숙주내 감염을 일으키는 기작을 이해하기 위하여 세포외효소 중의 하나인 콜라겐분해효소의 유전자가 불활성화된 돌연변이체를 제작하였다. 콜라겐분해효소의 유전자인 *vppC* 유전자에 항생제 내성 유전자인 *nptII*를 삽입하여 제작된 재조합 DNA를 suicide vector인 pDMS197에 클로닝하여 pVCM03이라 명명하였다. 재조합 suicide 플라스미드 pVCM03을 *E. coli* 7213에 형질전환하여 접합을 통하여 원 균주인 *V. parahaemolyticus* 04에 전달하였다. 전달된 pVCM03 유래의 재조합 *vppC::nptII* DNA는 homologous recombination에 의해 wild-type allele와 교환되어 돌연변이체를 형성하게 되고, 돌연변이체는 10% sucrose가 함유된 TCBS 배지에서 선별되었다. Allele exchange는 PCR에 의한 증폭된 DNA의 크기 비교로 확인하였다. 돌연변이체인 *V. parahaemolyticus* CM은 원 균주와 비교하였을 때 약 4배 정도 낮은 콜라겐 분해 활성을 나타내었고, vero cell을 이용한 MTT assay에서도 원 균주에 비하여 낮은 세포독성을 보였다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (02-PJ1-PG3-22099-0002).

참 고 문 헌

1. Edwards, R. A., L. H. Keller and D. M. Schifferli. 1998. Improved allelic exchange vectors and their use to analyze 987P fimbriae gene expression. *Gene* **207**, 149-157.
2. Farrell, D. H. and J. H. Crosa. 1991. Purification and characterization of a secreted protease from the pathogenic marine bacterium *Vibrio anguillarum*. *Biochemistry* **30**, 3432-3436.
3. Finkelstein, R. A., M. Boesman-Finklestein, and P. Holt. 1983. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/lectin/protease hydrolyzes fibrionectin and ovomucin: F. M. Burnet revisited. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**, 1092-1095.
4. Fujino, T., Y. Okuno, D. Nakada, A. Aoyama, K. Fukai, T. Mukai, and T. Ueho. 1953. On the bacteriological examination of shirasu food poisoning. *Med. J. Osaka Univ.* **4**, 299-304.
5. Joseph, S. W., R. R. Cowell and J. B. Kaper. 1982. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios. *Crit. Rev. Microbiol.* **10**, 77-124.
6. Harper, E. 1980. Collagenases. *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 1063-1078.
7. Kim, S. K., J. Y. Yang and J. Cha. 2002. Cloning and sequence analysis of a novel metalloprotease gene from *Vibrio parahaemolyticus* 04. *Gene* **283**, 277-286.
8. Kim, Y. H. and J. Cha. 2001. Distribution of extracellular proteases from various *Vibrio* sp. *Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 222-227.
9. Kolter, R. M., M. Inuzuka and D. R. Helinski. 1978. Trans-complementation dependent replication of low molecular weight origin fragment from plasmid R6K. *Cell* **15**, 1199-1208.
10. Kothary, M. H. and A. S. Kreeger. 1987. Purification and characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus*. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 1783-1791.
11. Lee, C. Y., S. C. Su, and R. B. Liaw. 1995. Molecular analysis of an extracellular protease gene from *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology* **141**, 2569-2576.
12. Lim, D. V., R. J. Jackson and C. M. Pull-VonGruenigen. 1993. Purification and assay of bacterial collagenases. *J. Microbiol. Methods* **18**, 241-253.
13. Milton, D. L., A. Norqvist, and H. Wolf-Watz, 1992. Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **174**, 7235-7244.
14. Miyoshi, S. and S. Shinoda. 1989. Inhibitory effect of alpha 2-macroglobulin on *Vibrio vulnificus* protease. *J. Biochem.* **106**, 299-303.
15. Miyoshi, S. and S. Shinoda. 1991. Alpha-macroglobulin-like plasma inactivator for *Vibrio vulnificus* metalloprotease. *J. Biochem.* **110**, 548-552.
16. Narukawa, H., S. Miyoshi, and S. Shinoda. 1993. Chemical modification of *Vibrio vulnificus* metalloprotease with activated polyethylene glycol. *FEMS Microbiol. Lett.* **108**, 43-46.
17. Norqvist, A., B. Norman, and H. Wolf-Watz. 1990. Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.* **58**, 3731-3736.
18. Oka, A., H. Sugisaki and M. Takanami. 1981. Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903. *J. Mol. Biol.* **147**, 217-226.
19. Reyrat, J. M., V. Pelicic, B. Gicquel and R. Rappuoli. 1998. Counterselectable Markers: Untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infect. Immun.* **66**, 4011-4017.
20. Rolands, K., R. Curtiss III and D. Sizemore. 1999. Construction and evaluation of a *Δcya Δcrp Salmonella typhimurium* strain expressing avian pathogenic *Escherichia coli* O78 LPS as a vaccine to prevent airsacculitis in chickens. *Avian Dis.* **43**, 429-441.
21. Ross, G. F., J. Meuth, B. Ohning, Y. Kim, and J. A. Whitsett. 1986. Purification of canine surfactant-associated glycoproteins A. Identification of a collagenase-resistant domain. *Biochim. Biophys. Acta* **870**, 267-278.
22. Sasagawa, Y., Y. Katsubara, Y. Matslbara, K. Suzuki, H. Kojima and K. Izaki. 1993. Purification and properties of collagenase from cytophaga sp. L43-1 strain. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 1894-1898.
23. Simon, R., U. Priefer and A. Puhler. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* **1**, 784-791.
24. Smith, G. C. and J. R. Merkel. 1982. Collagenolytic activity of *Vibrio vulnificus*: potential contribution to its invasiveness. *Infect. Immun.* **35**, 1155-1156.
25. Stewart-Tull, D. E. S., R. A. Ollar and S. Tamara. 1986. Studies on the *Vibrio cholerae* mucinase complex I. Enzymic activities associated with the complex. *J. Med. Microbiol.* **22**, 325-333.
26. Takeuchi, H., Y. Shibano, K. Morihara, J. Fukushima, S. Inami, B. Keil, A.-M. Gilles, S. Kawamoto and K. Okuda. 1992. Structural gene and complete amino acid sequence of *Vibrio alginolyticus* collagenase. *Biochem. J.* **281**, 703-708.
27. Tong, N. T., A. Tsugita, and V. Keil-Dlouha. 1986. Purification and characterization of two high molecular mass forms of *Acromobacter* collagenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **874**, 296-304.