

살모넬라가 발현하는 *stf* 오페론의 조절과 병원성 인자로서의 기능

김삼웅 · 김영희 · 강호영*

부산대학교 생명과학부 미생물학과

Received May 6, 2005 / Accepted June 22, 2005

Regulation of *stf* Operon Expression and Its Virulence. Sam Woong Kim, Young Hee Kim and Ho Young Kang*. *Division of Biological Sciences, Pusan National University, Busan 609-735, Korea* – The *stf* (*Salmonella typhimurium* fimbriae) operon consisting of *stfACDEFG* assumes to encode putative fimbriae. The complete *stf* operon is existed in *S. typhimurium* and *S. choleraesuis*, whereas it is absent in *S. typhi*. Analyses of the amino acid residues between major subunit StfA of the Stf fimbriae and those of known other fimbriae suggested that Stf belongs to class I type fimbriae. Through comparison of StfD chaperone with the other fimbrial chaperones, and of C- terminus in subunits of Stf fimbriae, it belongs to FGS (with a short F1-G1 loop) subfamily. In order to investigate the expression of *stf* operon, we have constructed a *Salmonella* strain containing a chromosomal *stfA::lacZYA* transcriptional fusion, resulting in *S. typhimurium* χ 8532. The strain χ 8532 lacked the expression of β -galactosidase under normal culture conditions. However, with longer incubation time of the *S. typhimurium* χ 8532, we have isolated 21 individual strains exhibiting Lac⁺ phenotype. Lac⁺ phenotype was appeared as approximately 0.03 frequency per generation. All isolates expressed lacZ constitutively in the various environmental conditions. Various global regulatory proteins including RpoS, OmpR, and CpxR were not involved in the regulation of the *stf* operon. A *S. typhimurium* χ 8661 mutant lacking *stfAC* function attenuated 6.7 folds more than that of wild type χ 3761 in the mouse virulence test, suggesting in the somehow involved in the *Salmonella* pathogenesis.

Key words – *S. typhimurium*; *stf* operon; Stf fimbriae; StfA; StfD chaperone; β -galactosidase.

섬모는 세균의 표면에 단백질로 구성된 직경이 2~8 nm 정도인 사상체의 부속기관이다[5]. *Escherichia coli*와 *Salmonella*는 서로 다른 결합 특이성을 가진 다양한 섬모들을 가지고 있다. 최초로 완전히 분석된 유전체 정보에 따르면 *S. typhimurium*에는 13개의 잠재적인 섬모를 암호화하는 오페론을 가지고 있는데 이들은 *agf* (*csg*), *fim*, *pef*, *lpf*, *bcf*, *saf*, *stb*, *stc*, *std*, *stf*, *sth*, *sti*와 *stj*등이다[12]. 잘 알려진 *fim* 오페론은 type I 섬모를 암호화하고 있는데[15], 효모나 적혈구와 반응하면 응집현상을 일으키는 특성이 있다. 이 현상은 type I 섬모가 숙주세포의 mannose 잔기에 특이적으로 부착하기 때문에 생기는 현상이다[4]. *Salmonella*를 저온(26°C 이하)에서 배양하면 얇고 구부러진 형태의 섬모를 생성하는데[9,28], 이 섬모는 mannose 잔기에 부착 특이성이 없으며[7,8] fibronectin에 결합하는 특이성이 있다[3]. 그 외 Lpf와 Pef 섬모들은 숙주세포에 대한 부착에 관여하는 것으로 알려져 있다[20,21]. *S. typhimurium*의 나머지 9개의 섬모성 오페론들의 생물학적 기능 및 섬모로서의 발현에 관한 정보가 아직까지 부족한 실정이다[12].

그람음성세균의 독성에 영향을 미치는 표면구조체를 형성하는 많은 단백질들은 chaperone-usher 단백질과 관련된 구

조체들로 알려져 있다[29]. 이 구조체들은 *E. coli* Pap 펠리의 PapD chaperone-PapC usher를 기준으로 분류한다[29]. PapD family는 chaperone의 갈라진 틈에 보존된 아미노산 서열의 차이와 도메인 1의 선단에 F1과 G1 선을 연결하는 고리 길이의 차이에 따라 FGL과 FGS의 두 subfamilies로 나눌 수 있다[13]. FGL subfamily는 F1과 G1사이에 긴 고리를 가지고서 일반적으로 간상구조의 펠리를 형성하는데 이 chaperone들에 의해 형성되는 단위체들은 C- 말단에 보존된 β zipper 모티프를 소유한다. FGS subfamily는 F1과 G1사이에 짧은 고리를 가진다. 이 chaperone들에 의해 형성되는 단위체들은 수식된 C- 말단의 모티프를 가지며 세포 표면에 짧은 중합체(올리고 펩타이드)의 형태나 아주 가는 구조체를 형성한다.

최근 연구에서는 알려진 adhesin 외에 *Salmonella*의 장내부착을 위한 다른 adhesin이 있을 가능성이 있으며 특정 adhesin의 결핍이 다른 adhesin으로 보완될 수 있는 가능성을 보인다는 것이 밝혀지고 있다[16,1]. 예로서, *S. typhimurium*의 *lpfC*와 *invA*가 결손된 돌연변이주는 구강으로 섭취되었을 때 LD₅₀ (50% lethal dose)를 150배 증가시킨 반면, *lpfC* 또는 *invA*가 각각 독립적으로 결손된 돌연변이주는 5 또는 15배의 약독화를 보였다[1]. 다른 예로서는 운동성 인자와 *fim* 오페론을 각각 결손시킨 경우에는 미미한 독력을 보였지만, 두 가지를 동시에 돌연변이시킨 경우에는 약 150배의 약독화를 나타내었다[16]. 그러므로 *S. typhimurium*에 적어도 13개의 섬모를 암호화하는 오페론이 존재한다는 것은 어떤 특정 섬모에 의해

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2266, Fax : +82-51-514-1778

E-mail : hoykang@pusan.ac.kr

나타나는 기능적 결합이 다른 형태의 섬모에 의해 보완될 수 있는 가능성을 보여준다.

stf 섬모 오페론은 1999년에 Morrow 등에 의해서 다양한 분자생물학적 기법을 통해 *S. typhimurium*에서 발견되었다[17]. 본 연구에서는 StfD chaperone과 비교한 결과들을 바탕으로 Stf 섬모가 FGS subfamily에 속하며, *lacZYA* reporter 유전자를 이용하여 *stf* 오페론이 구성적으로 발현되는 조건을 조사하였다. 또한, Stf 섬모가 병원성에 기여하는 정도를 조사한 결과를 나타내었다.

재료 및 방법

균주, 플라스미드, 배지 및 배양 조건

본 연구에 사용된 균주와 플라스미드들은 Table 1에 표시되어 있다. *E. coli* 와 *S. typhimurium*는 37°C에서 Luria-Bertani (LB) 액체배지 또는 LB 고체배지를 사용하여 배양하였다[2]. Lactose를 함유하는 MacConkey agar (Difco)는 *Salmonella*의 Lac⁺ 표현형을 검정하는데 사용되었다. 형질전환이나 플라스미드의 선택을 위해 필요한 경우에 다음의 농도로 항생제를 첨가하였다; ampicillin; 100 µg/ml, chloramphenicol; 30 µg/ml, tetracycline; 15 µg/ml. DAP (diaminopimelic acid)는 Asd⁺

(aspartate semialdehyde dehydrogenase 유전자의 결손) 균주의 배양을 위해 50 µg/ml로 첨가하였다. 5%의 sucrose를 함유하는 LB 고체배지는 돌연변이 유발을 위한 allelic exchange에서 *sacB* 유전자에 근거를 둔 선택과정에서 사용되었다[6].

유전자 조작

일반적인 유전자조작은 Sambrook 등의 방법에 따라 실시하였다[26]. 구축된 재조합 플라스미드를 *E. coli*로 형질 전환할 때에는 RbCl₂ 법을 따랐다[10]. *Salmonella*로 재조합 suicide 플라스미드의 도입은 플라스미드 donor로서 *E. coli* χ7213 (Asd⁺) [24]을 사용하여 접합에 의해 실시하였다. PCR 증폭은 *S. typhimurium* isolate들의 확인, 클로닝 또는 돌연변이의 검증 등을 위한 DNA 단편들을 얻을 필요가 있을 때 사용하였다.

Chromosomal *stfA::lacZYA* transcriptional fusion 구축과 Lac⁺ 표현형을 가진 균주의 선별

stfA 유전자의 promoter 부분과 구조유전자의 일부를 포함하는 1.5kb *EcoRI-HindIII* DNA 단편을 *S. typhimurium* χ 3339로부터 얻어 Klenow fragment (NEB Lab)를 처리하여 DNA 단편의 끝을 blunt로 만든 후 플라스미드 pRS415의 *SmaI* 부위에 클로닝하여 *stfA::lacZYA* transcriptional fusion

Table 1. Bacterial strains and plasmids used for this study.

Strains or plasmids	Genotypes or phenotypes	References or sources
Bacterial strains		
<i>E. coli</i> DH5α		Lab stock
<i>E. coli</i> χ7213		Lab stock
<i>S. typhimurium</i> χ3761	wild type, UK1	Lab stock
<i>S. typhimurium</i> χ3339	wild type, SL1344, <i>hisG rpsL</i>	Lab stock
<i>S. typhimurium</i> χ8661	UK1/Δ(<i>stfAC</i>)	Lab stock
<i>S. typhimurium</i> χ8532	<i>stfA::lacZYA</i> , parent type	This study
<i>S. typhimurium</i> isolate 1-21	<i>stfA::lacZYA</i> , Lac ⁺	This study
CK30	<i>S. typhimurium</i> χ3339::Δ <i>ompR</i>	This study
CK31	<i>S. typhimurium</i> χ3339::Δ <i>cpxR</i>	This study
CK32	<i>S. typhimurium</i> χ3339::Δ <i>rpoS</i>	This study
CK33	<i>S. typhimurium</i> χ8532::isolate 21 promoter	This study
CK34	<i>S. typhimurium</i> χ8532::Δ <i>rpoS</i>	This study
CK35	<i>S. typhimurium</i> χ8532::Δ <i>ompR</i>	This study
CK36	<i>S. typhimurium</i> χ8532::Δ <i>cpxR</i>	This study
Plasmids		
pGEM-T vector	Cloning vector	Promega
pMEG-375	Suicide vector	Lab stock
pBP106	pMEG-375 containing 1.3 kb <i>stf</i> promoter DNA	This study
pBP202	pMEG-375 carrying Δ <i>rpoS</i> DNA	This study
pBP209	pMEG-375 carrying Δ <i>ompR</i> DNA	This study
pBP210	pMEG-375 carrying Δ <i>cpxR</i> DNA	This study
pRS415	Carrying <i>lacZYA</i> cassette	Lab stock
pYA3524	Carrying pRS415:: <i>stfA::lacZYA</i>	
pYA3525	Carrying pRS415:: <i>stfA::lacZYA::stfC(partial)DEFG</i>	This study
pYA3526	pMEG-375:: <i>stfA::lacZYA::stfC(partial)DEFG</i>	This study
pYA3578	pMEG-375::Δ <i>stfAC</i>	This study

이 되도록 하였다(Table 1). 클로닝된 *stfA* DNA 단편이 올바른 방향으로 위치하였는지의 여부는 *EcoRI*-*Acc65I*과 *BamHI* 제한 효소들을 사용한 DNA의 크기 비교로서 확인하였다. 이후, *stfA* 유전자의 downstream에 해당하는 3.3 kb *SalI* DNA 조각을 *S. typhimurium* χ 3339 chromosomal DNA로부터 확보하여 *stfA::lacZYA*의 3' 부분에 flanking 시켰다. 모든 클로닝된 재조합 DNA의 정확성은 위에서 설명한 바와 같이 제한 효소를 사용한 DNA 조각들의 크기 비교로서 하였다. 재조합 플라스미드인 pRS415::*stfA::lacZYA::stfCDEFG*에 제한효소인 *NotI*과 *XhoI*을 처리하여 fusion 부분을 포함하는 11 kb *NotI*-*XhoI* DNA를 잘라내어 Klenow fragment를 처리하여 blunt end로 만든 후 suicide 플라스미드인 pMEG-375의 *SmaI* site에 클로닝하여 재조합 suicide 플라스미드를 제작하였다.

stf 오페론을 구성적으로 발현하는 S. typhimurium 균주들의 구축

stf 오페론을 구성적으로 발현하는 *S. typhimurium* 돌연변이주를 구축하기 위하여 *fhuB* 유전자의 중간 부분에 해당하는 *fhuB*-L-*KpnI*-1 primer (GGTACCGCGTGA GCAGAAA-CGTGAA)와 *stfA* 유전자의 중간 부분에 해당하는 *stfA*-R-*EcoRI* primer (GAATTCGCCGGTATCGATAGTG)를 사용하여 *S. typhimurium* isolate 21의 chromosomal DNA를 template DNA로 하여 PCR로 1.3 kb 크기의 DNA를 증폭하였다. 증폭된 1.3 kb DNA를 T-vector (Promega)에 클로닝한 후 다시 1.3 kb 크기의 DNA 단편을 잘라내어, suicide vector pMEG-375에 클로닝하여 재조합 suicide 플라스미드 pBP106을 제작하였다(Table 1). 플라스미드 pBP106을 *S. typhimurium* χ 8532로 도입하여 allelic exchange 방법에 의해 돌연변이주를 구축하였고 돌연변이주 내의 구획한 결손은 PCR을 이용하여 증폭된 DNA 크기의 비교로서 확인하였다. 그 외 재조합 suicide 플라스미드들인 pBP202, pBP209, pBP210을 *rpoS*, *ompR*, *cpXR*의 결손을 위해 사용하였다.

Mouse virulence assay

S. typhimurium χ 3761과 χ 8661의 독성 검사를 위해 6~8 주가 된 BALB/c female mouse를 사육장에서 순응을 위해 구입 후 1주일 경과된 다음에 실험을 실시하였다. 실험에 사용된 *S. typhimurium*은 LB 액체배지에서 전배양을 한 후 1/100에 해당하는 양을 새로운 LB 액체배지에 접종을 하였다. OD_{600nm}에서 0.8이 되었을 때 배양을 종료하고 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체는 BSG (buffered saline with gelatin)로 약 5×10^{10} colony forming units (CFU)로 재현탁하였고 연속적으로 10배씩 희석하였다. 희석된 일정량의 *Salmonella*를 쥐의 구강을 통해 투여하였다. 투여된 균체의 양을 계산하기 위해서 적정양의 희석액을 LB 고체배지에 도말하여 CFU를 측정하였다. 감염시킨 뒤 28일 후에 Reed와 Muench 방법으로 LD₅₀을 계산하였다[23].

사용된 computer 프로그램

*Salmonella*의 염색체 분석을 위해 사용된 program은 NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/gquery.fcgi>)을 사용하였다. 각 단백질들을 비교하기 위한 program은 MULTALIN (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_multalin.html)을 사용하였다.

결과 및 고찰

Salmonella 균주에서 stf operon의 존재와 비교

stf 오페론은 1999년에 다양한 *S. typhimurium* 혈청형에 특이적으로 존재한다고 보고되었고 *S. typhimurium*에서만 존재한다는 의미로 명칭이 주어졌다[17]. 당시에는 *Salmonella*의 유전체 염기서열이 완전히 분석되지 않았기 때문에 더 많은 정보를 알 수가 없었다. 현재 NCBI gene bank을 통한 조사 결과로부터 *S. typhimurium* 뿐만 아니라 다른 *S. enterica* serotype들에서도 *stf* 오페론이 존재하는 것이 확인되었다(Fig. 1). *S. choleraesuis*의 chromosome에는 *S. typhimurium*과 동일하게 *stf* 오페론을 가지고 있었으나 *S. typhi*에서는 Morrow 등의 결과[17]와 일치하게 *stf* 오페론이 없었다. 그러나 특이적으로 *S. paratyphi A*에서는 *stf* 오페론이 존재하였는데, outer membrane usher인 *stfC*가 419 아미노산(전체 885 아미노산 중)으로 구성된 짧은 ORF를 이루는 것으로 나타났다. 반면에, *S. typhi*와 *S. paratyphi A*는 *stf* 오페론과 유사한 *ste* (*Salmonella typhi* fimbriae) 오페론을 가지고 있었다[30]. *S. paratyphi A*의 *SteA*가 195 아미노산으로 구성되어 완전한 *ste* 오페론을 가지고 있는데 비교하여 *S. typhi*는 88 아미노산으로 구성된 짧은 *SteA* ORF를 이루고 있었다(Fig. 1). 이들 *stf*와 *ste* 오페론의 유전자들 간에는 41.1~55.9%의 상동성을 보였다. 이와 같은 결과는 이 두 개의 오페론이 유사한 역할을 할 것으로 추정할 수 있으며 *S. paratyphi A*에서는 *stfC*의 결손에 의한 *stf* 오페론의 기능적 결손을 *ste* 오페론이 보완할 수 있을 것으로 추정할 수 있다. 그러나 *S. typhi*는 *steA*에 돌연변이가 존재하고 보완적인 기능을 할 수 있는 유전자가 존재하지 않기 때문에 이들 섬모의 기능을 할 수 없을 것으로 판단된다. 이러한 결과들은 지금까지 유전체 염기서열이 완전히 해독된 혈청형을 중심으로 비교 분석하였기 때문에 앞으로 더 많은 혈청형에서 동일하거나 유사한 오페론이 발견될 것으로 추정된다.

Stf 섬모의 분류와 형태

현재까지 밝혀진 많은 세균 섬모들은 이를 구성하는 주요 단위체(major subunit)의 구조에 따라 몇 개의 범주로 나눌 수 있는데[18], Stf 섬모는 이들의 범주 중 class I에 해당한다는 것을 알 수 있었다. 즉, StfA는 두 개의 보존된 Cys 잔기

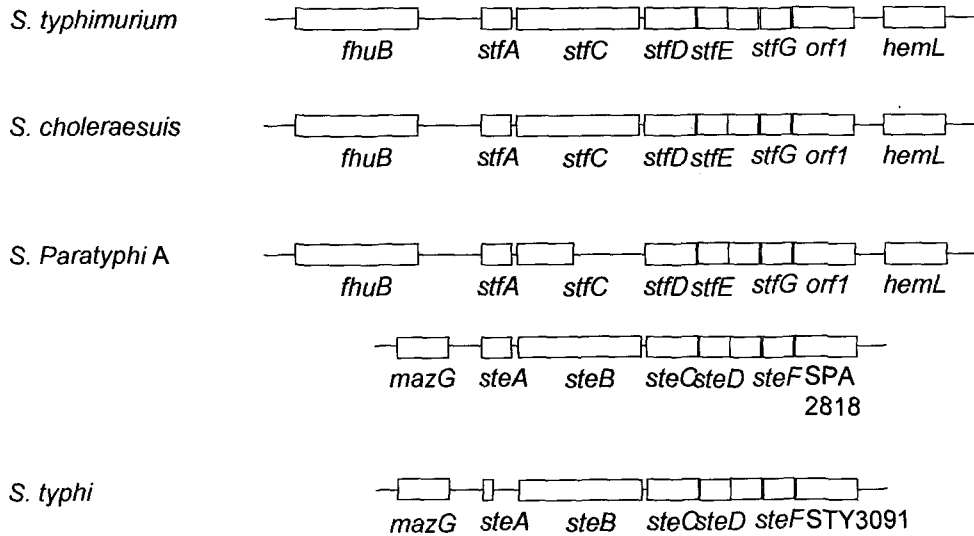


Fig. 1. Comparison of *stf* operon between *S. typhimurium* and other serotypes. All compared *Salmonella* serotypes except for *S. typhi* contain *stf* operon. In contrast of those of other serotypes, *stf* operon of *S. typhi*, named *ste*, is located at different place as well as composed of different upstream nucleotide sequence. *S. typhi* was interrupted by stop codon in *steA* gene. *S. typhimurium* and *choleraesuis* are composed of normal *stf* operon, whereas *S. paratyphi* A are mutated by stop codon in *stfC* gene.

를 가지며, 이들 중 N-말단에 있는 Cys로부터 8잔기 상류영역에 Phe가 존재하며, C- 말단에서 2번째 잔기가 Tyr로 존재하는데(data not shown), 이는 전형적인 class I 형태의 섬모와 일치하는 구조를 보여주었다.

Chaperone인 StfD를 몇 가지 다른 섬모 오페론들과 비교한 결과 Fig. 2A에서 점선으로 표시된 box와 같이 StfD는 Caf1M과 다르게 그 영역에 해당하는 잔기들이 결여되어 있는 것으로 나타났다. 또한, signal sequence가 제거된 matured form일 경우 N-말단의 Ala (A)로부터 보존적인 Arg (R)까지 7개의 아미노산 잔기를 가지는 것으로 나타났다. Fig. 2B에서 보는 것과 같이 Stf를 구성하는 각 단위체들은 다양한 C- 말단으로 구성된 것을 볼 수 있다. 이들 결과는 StfD가 PapD와 같은 FGS subfamily에 포함된다고 할 수 있다. 따라서 Stf 섬모는 세포 표면에 중합체의 형태나 아주 가느다란 짧은 섬모를 형성할 것으로 추정된다. 사실, TEM (transmission electron microscope) 또는 StfA에 특이적인 항체를 이용한 immuno-gold labeled TEM으로 관찰한 결과에서 Stf 섬모를 관찰하는 데 실패했다. 그러나 살아있는 *S. typhimurium* 세포를 이용한 dot blot의 결과로부터 세포 표면에 StfA가 존재하는 것으로 나타났다(data not shown). 이것으로 볼 때 이 Stf 섬모는 *S. typhimurium* 세포 표면에 짧은 중합체 형태로 존재할 것으로 추정된다.

stf 오페론의 발현 조건과 조절

stf 오페론의 발현조건을 알아보기 위해서 재료 및 방법에서 언급한 바와 같이 *stfA* 유전자에 *lacZYA*를 fusion시킨 재조합 DNA를 야생형 *S. typhimurium* chromosome에 도입시

켜 *S. typhimurium* χ8532라고 명명하였다. *S. typhimurium* χ8532는 lactose가 함유된 MacConkey 고체배지에서 Lac⁻ 표현형을 나타내었다. *S. typhimurium* χ8532를 MacConkey 고체배지에서 장기간(48 시간 정도) 배양하면 Fig. 3에서 보여주는 바와 같이 집락 내부에 붉은 색깔의 새로운 집락(Lac⁺ 표현형)이 발생하기 시작하고 약 56시간 이후에는 대부분 집락에서 이와 같은 현상이 발생하는 것을 볼 수 있었다. 이들 중 21개의 Lac⁺ 표현형을 분리하고 isolates 1-21로 명명하였다. Lac⁺ 표현형을 나타내는 균주는 34 세대 당 0.28~1.75의 빈도로 발생하였다.

분리균주들을 새로운 MacConkey 고체배지로 도말하여 관찰한 결과에서 Lac⁺ 표현형을 계속해서 유지하는 *S. typhimurium* isolate 21의 *stf* 오페론의 promoter 부분을 allelic exchange에 의해 *S. typhimurium* χ8532로 도입했을 경우도 원래의 균주와 마찬가지로 Lac⁺ 표현형을 유지하고 있는 것으로 미루어볼 때 *S. typhimurium* isolate 21의 *stf* promoter 부분은 *stf* 오페론을 구성적으로 발현시킬 수 있다고 볼 수 있다.

지금까지 알려진 많은 섬모 오페론들의 발현은 RpoS, OmpR, CpxR 및 global regulatory 단백질들에 의해 조절되는 예가 많았다[25,14,22,19]. Stf 섬모의 발현이 이와 같은 요소들에 의해 조절을 받는지를 확인하기 위해 RpoS, OmpR, 또는 CpxR들의 결손 돌연변이를 *S. typhimurium* χ8532로 도입하여 *S. typhimurium* CK34 (Δ*rpoS*), *S. typhimurium* CK35 (Δ*ompR*) 및 *S. typhimurium* CK36 (Δ*cpxR*)을 구축하였다. Table 2에서 보여지는 것과 같이 이들 중 어떤 요소도 *stf* 오페론의 발현에 영향을 미치지 못하는 것을 확인할 수 있다. 따라서 *stf* 오페론의 발현은 어떤 다른 요소에 의해서 조절될 것으로 추정된다.

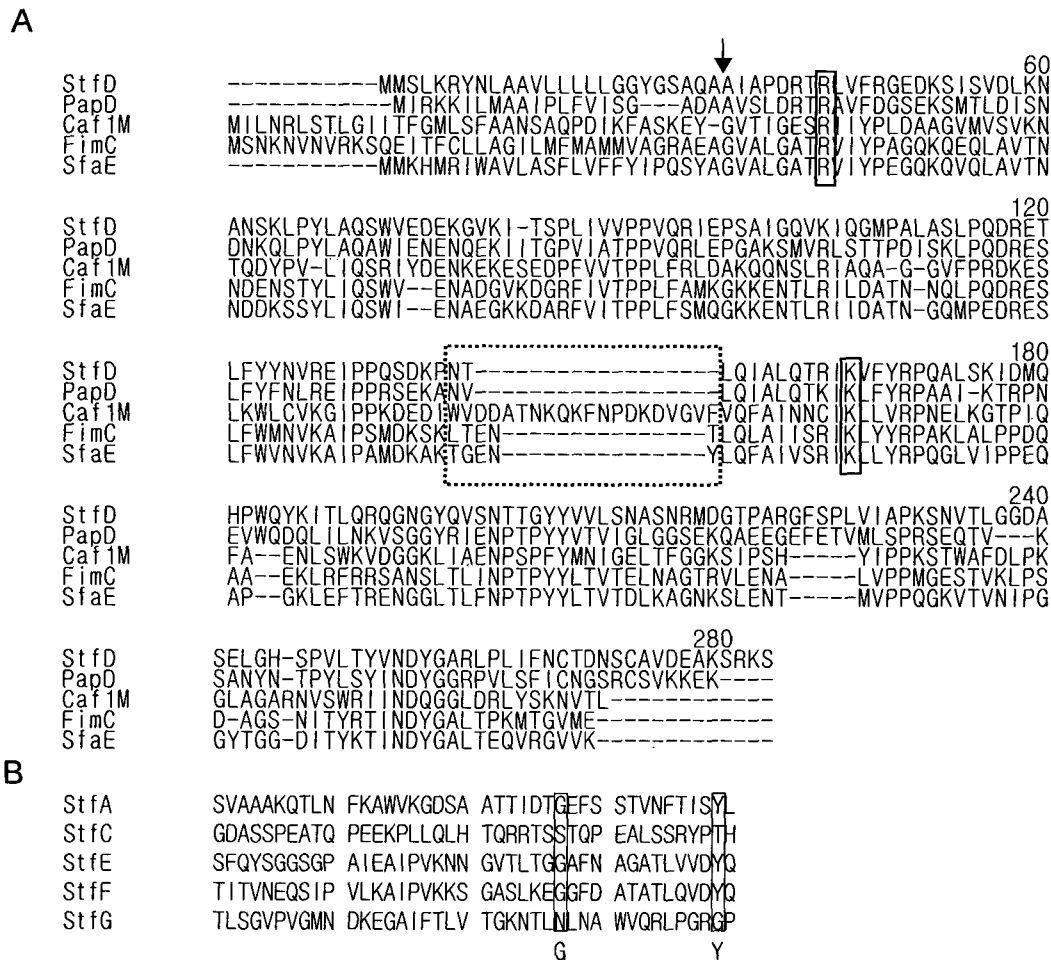


Fig. 2. Comparison of StfD and other fimbrial chaperones and C-terminal analyses of *stf* fimbrial subunits. (A); Since StfD contains a short F1-G1 loop, it includes FGS family. Subunits assembled by FGS chaperones have an altered carboxy-terminal motif and are often assembled on the bacterial surface as simple oligomers or very thin threads. Boxed regions are critical residues for binding with pilus subunits. Dotted line box indicates the loop that connects the F1 and G1 strands. (B); C- terminal comparison of each subunits of *Stf* fimbriae components. These compared regions generally contain a tyrosine and a glycine at positions 2 and 14 from the COOH-terminus, respectively.

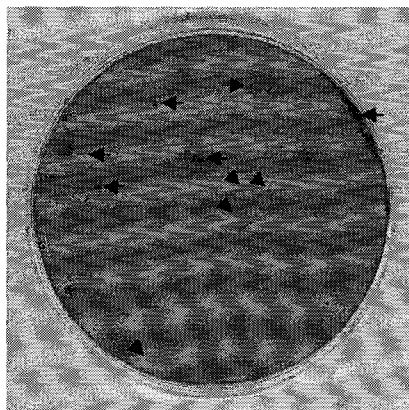


Fig. 3. Appearance of Lac⁺ phenotype. The strain χ 8532 was incubated for 56 h at 37°C. Arrows indicate positions of derivatives showing Lac⁺ phenotype from parental strain χ 8532.

Table 2. Regulation of *stf* operon expression by RpoS, OmpR, and CpxR.

Strains		Appearance of Lac ⁺ phenotypes
Wild type χ 3761		-
Parental strain χ 8532		+
RpoS	CK32	-
mutants	CK34	+
OmpR	CK30	-
mutants	CK35	+
CpxR	CK31	-
mutants	CK36	+

Each strain was incubated on MacConkey agar. CK30, CK31, and 32 are χ 3339:: Δ ompR, χ 3339:: Δ cpxR and χ 3339:: Δ rpoS deleted mutants, respectively. CK34, 35, and 36 are χ 8532:: Δ rpoS, χ 8532:: Δ ompR and χ 8532:: Δ cpxR deleted mutants, respectively. +, appearance of Lac⁺ -, not appearance of Lac⁺.

Mouse virulence assay

*S. typhimurium*의 병원성 유발에서 *stf* 오페론의 기능을 조사하기 위해 실험동물에서 독성(LD₅₀) 실험을 실시하였다. *stf* 오페론에서 *stfAC*의 기능이 결여된 *S. typhimurium* 돌연변이 균주를 allelic exchange 방법으로 제조하여 *S. typhimurium* χ8661 (*ΔstfAC*)라고 명명하였다(Fig. 4). 야생형 *S. typhimurium* χ3761과 돌연변이주 χ8661을 이용하여 mouse 독성 실험을 실시한 결과, *S. typhimurium* χ3761의 경우에는 mouse가 6.65×10⁴ CFU에서 1 마리가 죽었고 6.65×10⁵ CFU에서 모두 죽었다(Table 3). *S. typhimurium* χ8661의 경우에는 2.52×10⁵ CFU까지는 모두 생존하였지만, 2.52×10⁶ CFU에서는 모두 죽었다(Table 3). 평균적으로 mouse가 죽는 날짜는 투여 후 7일에서 10일 사이에 해당하였다. 따라서 *S. typhimurium* χ3761의 LD₅₀은 1.19×10⁵ CFU인 반면에, *S. typhimurium* χ8661은 1.26×10⁶ CFU으로 6.7배 정도의 약독화된 상태로 나타났다(Table 3).

이상의 결과를 종합하면, Stf 섬모는 class I 형태의 섬모일 것으로 추정되며 FGS subfamily에 속하는 것으로 사료된다. *stf* 오페론은 장기간의 배양기간에 발생하는 밝혀지지 않은 어떤 인자들에 의해 *stf* promoter 부분의 변화에 의해 발현이 가능하며 이들의 발현에는 일반적으로 알려진 환경적 인자들과 global regulatory 단백질들은 관여하지 않는 것으로 나타났다. Mouse 독성 실험에서는 야생형과 비교할 때 Stf 섬모가 결손된 돌연변이 균주에서 약 6.7배의 약독화를 보였다.

Table 3. Virulence in BALB/c mice by *S. typhimurium* χ8661.

Strain	Dose (CFU)	Mice tested	Mice survived	Mean day of death	LD ₅₀ (CFU)
χ3761	6.65×10 ⁵	3	0	10	1.19×10 ⁵
	6.65×10 ⁴	3	2	7	
	6.65×10 ³	3	3	-	
	6.65×10 ²	3	3	-	
χ8661	2.52×10 ⁸	3	0	8.3	1.26×10 ⁶
	2.52×10 ⁷	3	0	9.3	
	2.52×10 ⁶	3	0	8.6	
	2.52×10 ⁵	3	3	-	
	2.52×10 ⁴	3	3	-	
	2.52×10 ³	3	3	-	

요 약

stf 오페론은 *stfACDEFG*로 구성되며, *S. typhimurium*과 *S. choleraesuis*에서는 완전하게 존재한다. 그러나 *S. typhi*에서는 이 오페론이 결여되어 있고 *S. paratyphi A*에서는 *stfC*의 유전자가 돌연변이되어 있다. 이 섬모는 class I 형태의 섬모로 분류되며, StfD chaperone을 다른 섬모를 구성하는 chaperone들과 비교할 때 각 subunit들의 C-말단 잔기의 분석은 StfD chaperone이 FGS subfamily와 유사한 특성을 보였다. *stf* 오페론이 *lacZYA* 유전자와 fusion된 *S. typhimurium* 돌연변이 균주를 사용하여 MacConkey 고체배지에서 장시간 배양한

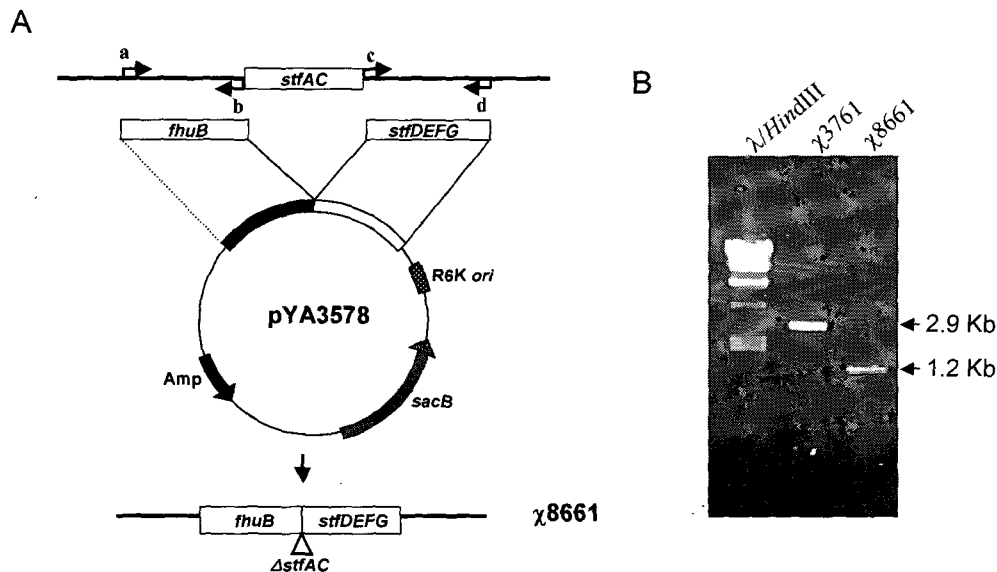


Fig. 4. Construction of *S. typhimurium* χ8661. (A); Outline for construction of χ8661. The χ8661 was constructed by allelic exchange between χ3761 and pYA3578. The χ8661 was deleted from nucleotide 13186 to 14846 of χ3761, which deleted in all *stfA* and the two thirds of *stfC*. (B); Identification by PCR of the χ8661. In order to identify the 1662-bp deletion, DNA from wild type χ3761 and χ8661 was amplified using primers a and d. When amplified, χ3761 produce a 2.9 kb DNA fragment (upper arrow), while χ8661 produce a 1.2 kb fragment (lower arrow), indicating that the deletion is present in χ8661.

후 Lac⁺ 표현형을 보이는 21 isolate들을 분리하였다. Lac⁺ 균주들은 34 세대 당 0.28-1.75의 빈도로 발생하였다. 21 isolate들은 구성적으로 *stf* operon을 발현했지만, 범용의 조절자인 RpoS, OmpR, CpxR 등에 의해 조절되지 않았다. Mouse 독성 실험에서 *S. typhimurium* χ 8661은 야생형인 χ 3761에 비교하여 6.7배의 약독화를 보였다.

Acknowledgement

This work was supported by Korea Research Foundation Grant (KRF-2004-002-C00169). Y. H. Kim is the recipient of a graduate student fellowship supported by the Brain Busan 21 project.

참고 문헌

- Baumler, A. J., R. M. Tsolis, P. J. Valentine, T. A. Ficht, and F. Heffron. 1997. Synergistic effect of mutations in *invA* and *lpfC* on the ability of *Salmonella typhimurium* to cause murine typhoid. *Infect. Immun.* **65**, 2254-2259.
- Bertani, G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**, 293-300.
- Collinson, S. K., P. C. Doig, J. L. Doran, S. Clouthier, T. J. Trust, and W. W. Kay. 1993. Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. *J. Bacteriol.* **175**, 12-18.
- Duguid, J. P., E. S. Anderson, and I. Campbell. 1966. Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *J. Pathol. Bacteriol.* **92**, 107-138.
- Duguid, J. P., I. W. Smith, G. Dempster, and P. N. Edmunds. 1955. Non-flagellar filamentous appendages (fimbriae) and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. *J. Pathol. Bacteriol.* **70**, 335-348.
- Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, T. Berkelman, and C. I. Kado. 1985. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **164**, 918-921.
- Grund, S., and A. Seiler. 1993. [Electron microscopic studies of fimbriae and lectin phagocytosis of *Salmonella typhimurium* variety copenhagen (STMVC)]. *Zentralbl. Veterinarmed B.* **40**, 105-112.
- Grund, S., R. Helmuth, R. Stephan, and R. Meyer. 1988. [Fimbrial formation, antibiogram, plasmid content, lysotype and biotype of *Salmonella*]. *Zentralbl. Veterinarmed B.* **35**, 138-151.
- Grund, S., and A. Weber. 1988. A new type of fimbriae on *Salmonella typhimurium*. *Zentralbl. Veterinarmed B.* **35**, 779-782.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hohmann, A. W., G. Schmidt, and D. Rowley. 1978. Intestinal colonization and virulence of *Salmonella* in mice. *Infect. Immun.* **22**, 763-770.
- Humphries, A. D., M. Raffatellu, S. Winter, E. H. Weening, R. A. Kingsley, R. Droleskey, S. Zhang, J. Figueiredo, S. Khare, J. Nunes, L. G. Adams, R. M. Tsolis, and A. J. Baumler. 2003. The use of flow cytometry to detect expression of subunits encoded by 11 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium fimbrial operons. *Mol. Microbiol.* **48**, 1357-1376.
- Hung, D. L., S. D. Knight, R. M. Woods, J. S. Pinkner, and S. J. Hultgren. 1996. Molecular basis of two subfamilies of immunoglobulin-like chaperones. *Embo J.* **15**, 3792-3805.
- Hung, D. L., T. L. Raivio, C. H. Jones, T. J. Silhavy, and S. J. Hultgren. 2001. Cpx signaling pathway monitors biogenesis and affects assembly and expression of P pili. *Embo J.* **20**, 1508-1518.
- Lockman, H. A., and R. Curtiss, 3rd. 1992a. Isolation and characterization of conditional adherent and non-type 1 fimbriated *Salmonella typhimurium* mutants. *Mol. Microbiol.* **6**, 933-945.
- Lockman, H. A., and R. Curtiss, 3rd. 1992b. Virulence of non-type 1-fimbriated and nonfimbriated nonflagellated *Salmonella typhimurium* mutants in murine typhoid fever. *Infect. Immun.* **60**, 491-496.
- Morrow, B. J., J. E. Graham, and R. Curtiss, 3rd. 1999. Genomic subtractive hybridization and selective capture of transcribed sequences identify a novel *Salmonella typhimurium* fimbrial operon and putative transcriptional regulator that are absent from the *Salmonella typhi* genome. *Infect. Immun.* **67**, 5106-5116.
- Neidhardt, F. C., R. Curtiss, 3rd, J. L. Ingraham *et al.* 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*; Cellular and Molecular biology, 2nd ed. ASM Press, 146-157.
- Nevesinjac, A. Z., and T. L. Raivio. 2005. The Cpx envelope stress response affects expression of the type IV bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**, 672-686.
- Nicholson, B., and D. Low. 2000. DNA methylation dependent regulation of *pef* expression in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **35**, 728-742.
- Nicholson, T. L., and A. J. Baumler. 2001. *Salmonella enterica* serotype typhimurium elicits cross-immunity against a *Salmonella enterica* serotype enteritidis strain expressing LP fimbriae from the *lac* promoter. *Infect. Immun.* **69**, 204-212.
- Otto, K., and T. J. Silhavy. 2002. Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2287-2292.
- Reed, L. J., and H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The American Journal of Hygiene.* **27**, 493-497.
- Roland, K., R. Curtiss, 3rd, and D. Sizemore. 1999. Construction and evaluation of a delta *cya* delta *crp* *Salmonella typhimurium* strain expressing avian pathogenic *Escherichia coli* O78 LPS as a vaccine to prevent airsacculitis in chickens. *Avian Dis.* **43**, 429-441.
- Romling, U., Z. Bian, M. Hammar, W. D. Sierralta, and S. Normark. 1998. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J. Bacteriol.* **180**, 722-731.

26. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis 1989. Molecular Cloning, A laboratory manual. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY,.
27. Simons, R. W., F. Houman, and N. Kleckner. 1987. Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene*. **53**, 85-96.
28. Stolpe, H., S. Grund, and W. Schroder. 1994. Purification and partial characterization of type 3 fimbriae from *Salmonella typhimurium* var. copenhagen. *Zentralbl Bakteriol.* **281**, 8-15.
29. Thanassi, D. G., E. T. Saulino, and S. J. Hultgren. 1998. The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. *Curr Opin Microbiol.* **1**, 223-231.
30. Townsend, S. M., N. E. Kramer, R. Edward, S. Baker, N. Hamlin, M. Simmonds, S. Kim, S. Maloy, J. Parkhill, G. Dougan, and A. J. Bäumler. 2001. *Salmonella enterica* Serovar Typhi Possesses a Unique Repertoire of Fimbrial Gene Sequences. *Infect. Immun.* **69**, 2894-2901.