

산화적 스트레스에 대한 *Bacillus subtilis*의 thiol peroxidase 유전자의 생리적인 기능

김성진, 김하근*
배재대학교 유전공학과

Physiological Roles of *Bacillus subtilis* thiol peroxidase gene in response to oxidative stress

Sung-Jin Kim, Ha-Kun Kim
Department of Genetic Engineering, Paichai University

산화적 스트레스에 대한 *Bacillus subtilis*의 thiol peroxidase 유전자의 생리적인 기능을 연구하기 위해 thiol peroxidase 유전자의 기능이 손상된 녹아웃 돌연변이주를 상동성 재조합에 의해 제조하였다. 호기적 조건에서 배양할 때 야생형과 녹아웃 돌연변이주 사이에는 성장속도에서 차이를 관찰할 수 없었다. 그러나 paraquat 처리할 때와는 달리 H₂O₂와 cumene hydroperoxide (CHP) 처리에 의한 산화적 스트레스를 받았을 때 녹아웃 돌연변이주의 성장속도가 저하되는 현상을 관찰할 수 있었는데, 이는 thiol peroxidase가 H₂O₂와 cumene hydroperoxide (CHP)에 의한 산화적 스트레스에 대해 역할을 하고 있음을 시사하는 결과이다.

In order to investigate the physiological role of thiol peroxidase in *Bacillus subtilis*, a thiol peroxidase (*btpx*) knock-out mutant was generated by homologous recombination. The growth of *btpx* knock-out mutant in aerobic condition showed a similar pattern with that of wild type of *Bacillus subtilis* 168. But *btpx* knock-out mutant showed a retarded growth in response to oxidative stress such as H₂O₂, cumene hydroperoxide (CHP) treatments.

I. 서 론

생리 대사 과정 중 superoxide anion radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 등과 같은 활성산소종의 생성과 제거 과정이 균형을 이루지 못하는 불균형 상태인 산화적 스트레스(oxidative stress)는 노화, 암 발생, Alzheimer's disease 등의 질병들과 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (1). 또한 산화적 스트레스는 식균과정 중 미생물을 죽이는 수단으로 이용되기도 한다. 식물에서 병원균에 감염된 세포에서 일어나는 oxidative burst에 의해 생성되는 H_2O_2 가 이웃한 세포가 병원균에 대해 내성을 갖게 하는 신호 전달 물질로 작용하기도 한다 (2). 이러한 산화적 스트레스는 이온화선, 자외선 등에 의해 일어날 수도 있고 H_2O_2 , paraquat, plumbagin 등과 같이 세포내에서 superoxide 음이온을 생성하게 하는 화학물질 등에 의해 인위적으로 만들어질 수도 있다. 활성 산소종에 의해 세포는 세포막, DNA, 단백질 등이 손상될 수 있으므로 이러한 산화적 스트레스에 대처하기 위해 세포는 여러 방어기작을 가지고 있다. 세포가 활성산소종의 영향으로 보호 받기 위해 가지고 있는 항산화 단백질은 H_2O_2 를 H_2O 와 O_2 로 분해시키는 catalase, H_2O_2 를 H_2O 로 산화시키는 peroxidase, O_2 를 H_2O_2 로 변환시키는 superoxide dismutase, 그리고 organic hydroperoxide를 환원시키는 alkyl hydroperoxide reductase 등이 알려져 있다 (3-5). 세포가 산화적 스트레스를 받으면 박테리아를 비롯하여 효모, 포유류 세포 등에서 방어기작에 관여하는 여러 유전자들의 발현정도가 변화하는데 대장균의 경우, 적어도 13종류 이상의 다른 유전자들이 유도되어 발현되는 것으로 보고되고 있다 (6).

최근 항산화 단백질중 하나인 새로운 thiol peroxidase의 존재가 대장균에서 유전자의 분리와 단백질의 정제 등의 실험을 통하여 밝혀졌다. 이 단백질은 대장균이 산화적 스트레스를 받을 때 합성이 증가 되고, 주로 대장균의 주변세포질 공간에 존재하며 thioredoxin과 연계하여 peroxidase 활성을 보이는 것으로 밝혀졌다 (9).

본 연구는 대장균으로부터 단백질 정제 및 유전자의 클로닝 실험을 통해 밝혀진 20KDa 크기의 thiol peroxidase의 상동유전자를 *Bacillus subtilis*로부터 클로닝하고, 이를 이용하여 이 유전자에 대한 녹아웃 돌연변이주를 제조하여 야생형 균주와 함께 여러 다양한 산화적 스트레스 상태에 처했을 때 성장률을 측정함으로써 스트레스에 대한 thiol peroxidase의 역할을 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 효소 및 시약

유전자 조작에 사용한 각각의 제한효소 및 T4 DNA ligase, Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP), Klenow fragment 등은 Boehringer Mannheim, Promega, 그리고 Gibco BRL 사로부터 구입하였다. Non-isotopic DNA detection kit는 Boehringer Mannheim 사로부터 구입하였다. 기타 실험에 필요한 케미컬들은 Sigma사와 Junsei사 제품을 사용 하였으며, 효소 및 시약 그리고 각종 키트들은 제조 회사에서 제공하는 사용 방법에 따라 사용하였다.

2. 형질전환을 위한 competent 세포의 조제

E. coli 세포의 형질전환은 Hanahan의 방법 (7)을 사용하였다. *Bacillus subtilis*를 형질전환하기 위해서 Hardy의 방법 (8)을 변형하여 사용하였으며, electrocompetent cell 조제 방법도 병행하여 사용하였다.

3. thiol peroxidase 유전자 녹아웃 돌연변이주의 제조.

pBluescriptII SK(+) 플라스미드를 제한효소 EcoRV와 HincII로 처리한 후 T4 DNA ligase로 연결시켜 HindIII 부위가 제거된 pSK(H) 플라스미드를 제조하였다. pSK(H) 플라스미드를 EcoRI 효소로 처리한 후, *Bacillus*의 thiol peroxidase 유전자가 들어 있는 1.6Kb EcoRII DNA 단편과 연결시켜 pSK(H)-btpx 플라스미드를 제조하였다. pSK(H)-btpx 플라스미드를 HindIII로 처리하고, Klenow를 이용하여 절단 부위가 blunt-end인 선형 플라스미드 DNA로 만들었다. 클로람페니콜 내성 유전자가 들어 있는 pUCCm19을 EcoRI 처리에 의해 1.8Kb 크기의 클로람페니콜 아세틸기전이효소 (cat) 유전자를 방출시키고, Klenow를 처리하여 유전자의 말단을 blunt-end로 만들었다. 이들을 T4 DNA ligase로 연결시켜 btpx 유전자내에 cat 유전자가 삽입되어 기능이 손상된 새로운 재조합 플라스미드 DNA인 pSK(H)-btpxCAT을 만들고 이를 제한효소 Scal으로 처리해 선형 DNA로 만들었다. 이 선형 상태의 pSK(H)-btpxCAT 플라스미드를 *Bacillus subtilis* 168 야생균주에 형질전환 시킨 후, 클로람페니콜이 5ug/ml의 농도로 함유된 LB 평판 한천배지에 도말하여 btpxCAT 유전자와 야생균주 내의 btpx 유전자와 상동성 재조

합이 일어난 *btpx* 녹아웃 돌연변이주를 선별했다. 선별된 돌연변이주는 Southern 혼성화 방법에 의해 *btpx* 녹아웃 돌연변이주를 확인하였다.

4. *Bacillus subtilis*의 성장률 측정

성장률 측정시 충분한 산소공급을 위하여 1ℓ 삼각플라스크에 50ml의 배지를 넣고 각각 1%(v/v)의 종배양액을 접종하여 배양하였으며, 배양 조건은 37℃에서 300rpm으로 8시간 배양하였고, 시료 채취는 1시간 간격으로 실시하였다. 이 때 채취 후 박테리아가 더 이상 성장을 할수 없도록 하기 위해 얼음에서 시료를 급격히 냉각시켰다. 성장률은 모두 600nm에서의 O.D 값으로 측정하였다.

산화적 스트레스를 주기 위해서 10-40mM의 hydrogen peroxide (H₂O₂)를 처리하였고, 산화적 스트레스에 대한 적응능력을 측정하기 위해서는 접종과 동시에, 그리고 민감성을 측정하기 위해서는 A₆₀₀=0.4 까지 성장시킨 후 적절한 농도의 H₂O₂를 처리하였다.

5. 산화적 스트레스에 따른 *Bacillus subtilis*의 생존력 측정

Bacillus subtilis 168 야생균주와 *btpx* 녹아웃 돌연변이주의 배양액을 각각 100μℓ씩 0.8%(w/v)의 Bacto-agar가 함유된 LB 배지와 혼합한 후, LB 평판 한천배지에 부어 굳히고, 그 위에 적절한 농도의 화학물질로 적신 종이 디스크를 올려놓고, 37℃에서 12시간 배양하였다. 이 때, 사용한 화학물질은 5, 10, 50, 100μM의 cumene hydroperoxide (CHP)와 0.25, 0.5, 1, 2M의 paraquat을 종이 디스크 당 각각 10μℓ씩 적셔 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. *Bacillus subtilis* thiol peroxidase 유전자의 돌연변이체 제조 및 확인

*Bacillus subtilis*로부터 유래한 thiol peroxidase 유전자 내부에 선별할 수 있는 유전자 표식인 *cat* 유전자가 삽입되어 있는 1.6kb DNA 단편을 상동성 재조합 방법을 이용하여 야생형 *Bacillus subtilis* 168 균주의 염색체에 있는 *btpx* 유전자로 삽입시켜 *btpx* 유전자의 기능이 손상

된 돌연변이주를 제조하였다. 그림 1은 이런 과정을 도식화 한 것이다. 이런 방법을 통해 *cat* 유전자가 삽입되어 *btpx* 유전자의 기능이 손상된 *Bacillus subtilis*의 녹아웃 돌연변이주를 만들 수 있었다. 클로람페니콜에 대해 내성을 갖는 Cat^+ 형질전환체들은 클로람페니콜이 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 함유된 LB 평판 한천배지를 이용하였다. 형질전환체들 내에 존재하는 *btpx* 유전자의 돌연변이 여부는 야생형과 녹아웃 돌연변이주 각각으로부터 염색체 DNA를 분리하고 이를 *EcoR* I으로 충분히 처리한 후, 0.8% 아가로스 젤 전기영동을 이용하여 전개시키고 이를 나일론 막으로 옮겨 *Dig*으로 표식한 *btpx* 유전자와 *Dig*으로 표식한 *cat* 유전자를 각각 probe로 사용하여 Southern 혼성화 실험을 수행하여 확인하였다. *Dig*으로 표식한 *btpx* 유전자를 probe로 사용하였을 때 녹아웃 돌연변이주의 염색체에서 반응하는 *btpx* 유전자는 야생형보다 *cat* 유전자의 크기인 1.8Kb 정도 더 큰 크기에서 나타났으며, *cat* 유전자를 probe로 사용하였을 때는 *cat* 유전자는 야생형의 염색체 DNA와는 반응하지 않고, 녹아웃 돌연변이주로부터 분리한 염색체에서만 반응을 나타내었다 (data not shown). 이 결과는 Cat^+ 형질전환체가 *Bacillus subtilis* 168이 지니고 있는 *btpx* 유전자가 상동성 재조합에 의해 *cat* 유전자가 삽입된 녹아웃 돌연변이주임을 가리킨다.

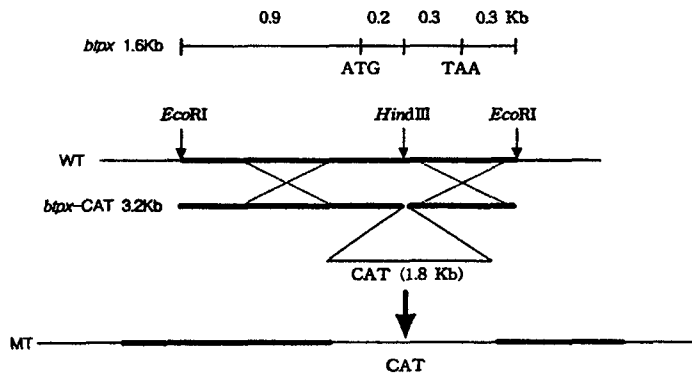


Fig. 1. Schematic representation for disruption of *Bacillus subtilis* thiol peroxidase gene by homologous recombination.

2. 녹아웃 돌연변이가 성장률에 미치는 영향

LB배지를 이용하여 호기적 조건 하에서 *Bacillus subtilis* 야생형과 녹아웃 돌연변이주에 대해 성장률 측정을 각각 실시하였다. 야생형과 녹아웃 돌연변이주를 각각 12시간 이상 배양하여 종 배양액을 만들어 이를 LB 배지에 $A_{600}=0.1$ 정도가 되도록 접종한 후, 배양을 시작하면서 각각에 대해 1시간 간격으로 시료를 수집하여 OD_{600} 값을 측정하였다. 그 결과 호기적 조건에서 야생형과 녹아웃 돌연변이주 사이에는 성장속도에 있어서 차이를 거의 발견할 수 없었다 (Fig. 2). 이는 *tpx* 유전자가 녹아웃된 *E. coli*의 경우와는 다른 결과인데 (9), 이와 같은 현상은 *Bacillus*가 산화적 스트레스에 처해지면 thiol peroxidase 유전자의 발현 이외에도 catalase와 같은 또 다른 종류의 항산화 단백질 그룹이 발현이 유도되어 작용한다는 것을 시사하는 결과이다.

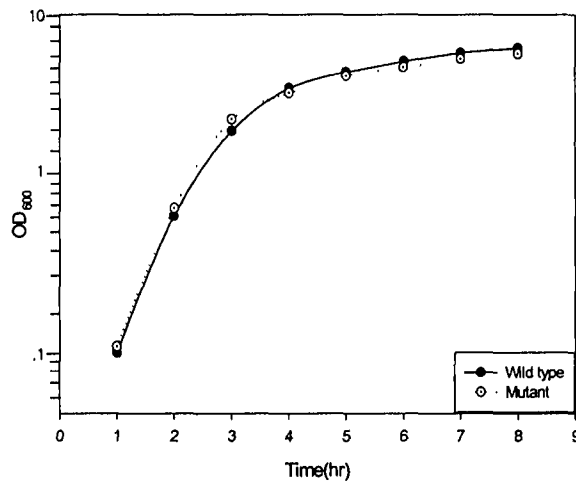


Fig. 2. Growth curves of *Bacillus subtilis* wild type and *btpx* knock-out mutant.

동일한 성장 조건 하에서 인위적으로 H_2O_2 와 같은 활성 산소종을 처리해 산화적 스트레스를 부여해 주면서 성장률을 측정하였다. 균 접종시 10mM의 H_2O_2 를 같이 처리하여 배양한 결과 배양 초기에는 *btpx* 녹아웃 돌연변이주가 야생형보다 낮은 성장률을 보이지만 대수 증식기를 지나 정체기에 이르면서 점점 야생형과 비슷한 성장률을 보였다 (Fig. 3).

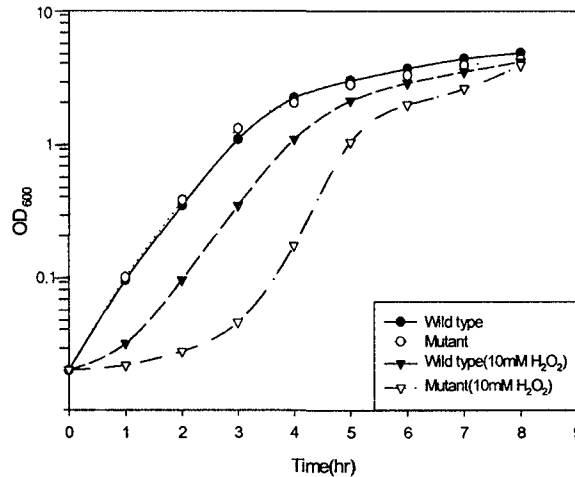


Fig. 3. Adaptation to oxidative stress of *Bacillus subtilis* wild type and *btpx* null mutant.

야생형과 녹아웃 돌연변이주가 대수 증식기 초기에 진입하는 시점에 10mM의 H₂O₂를 각각 처리하였을 때, 동일한 성장기에 있는 H₂O₂를 처리하지 않은 대조구와 달리 H₂O₂에 의한 스트레스에 의해 두 균주 모두 급격히 OD₆₀₀ 값이 감소했으나 점차적으로 산화적 스트레스에 적응하여 대수 증식기를 지나 정체기에 도달하였을 때 H₂O₂에 대한 적응성을 보이면서 H₂O₂를 처리하지 않은 대조구와 유사한 성장률을 보였다 (Fig. 4). 이 때 정체기에서 H₂O₂에 대해 적응할 수 있는 것은 H₂O₂를 분해할 수 있는 catalase 효소의 합성이 유도되어 이루어지는 것으로 추정할 수 있다. 그러나 Dowds 등의 실험 결과 *Bacillus subtilis*의 대수증식기와 정체기 사이에는 catalase 활성에 차이가 없는 것으로 보고하고 있으므로 (13), H₂O₂에 대한 *B. subtilis*의 적응은 catalase 이외의 항산화 단백질의 작용에 의해 이루어지는 것으로 추론할 수 있다. 더욱 높은 농도 (20-40mM)의 H₂O₂를 야생형과 녹아웃 돌연변이주에 처리하였을 때의 성장 양상도 10mM H₂O₂를 처리했을 때와 거의 유사함을 보였다.

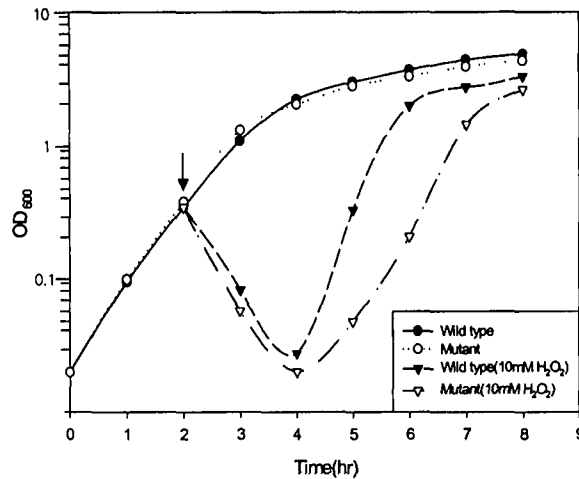


Fig. 4. Sensitivity to oxidative stress of *Bacillus subtilis* wild type and *btpx* knock-out mutant. The added time of the hydrogen peroxide is indicated by the arrow.

3. 녹아웃 돌연변이가 산화적 스트레스를 받았을 때 생존력에 미치는 영향

*Bacillus subtilis*의 야생형과 녹아웃 돌연변이주가 산화적 스트레스를 받았을 때의 생존력에 미치는 영향은 LB 평판 한천배지 위에 H₂O₂ 보다 더욱 강력하고 긴 반감기를 갖는 cumene hydroperoxide (CHP)와 paraquat를 처리하여 측정하였다. 야생형과 녹아웃 돌연변이주의 lawn cell 위에 각기 다른 농도 (5-100 μ M)의 CHP를 적신 종이 디스크를 올려놓고 배양하면서 종이 디스크 주변에 생성되는 clear zone의 크기를 측정하여 생존에 미치는 영향을 평가하였다. 그 결과 야생형 보다 *btpx* 녹아웃 돌연변이주의 lawn cell에서 더 큰 clear zone이 형성되었음을 관찰할 수 있었다 (Fig. 5). 이는 CHP 처리에 의한 산화적 스트레스에 대해 녹아웃 돌연변이주가 야생형보다 더 많은 영향을 받고 있음을 가리키는 결과이다. 또한 동일한 방법으로 paraquat을 처리 하였을 때는 두 균주 사이에서 두드러진 차이점을 발견할 수 없었다 (data not shown).

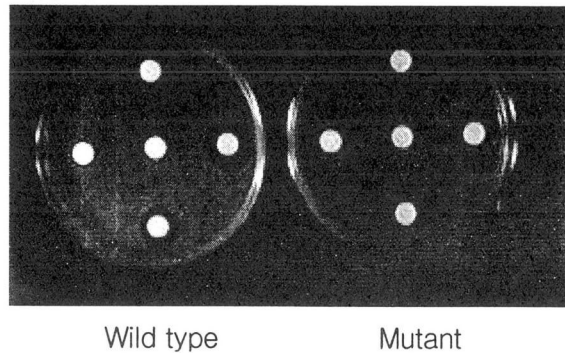


Fig. 5. Effect of cumene hydroperoxide (CHP) on viability of *Bacillus subtilis* wild type and *btpx* knock-out mutant. The panel shows the results of a disk assay demonstrating the growth inhibition exerted by CHP. Disks containing 10 ul of (counterclockwise, from top) 5, 10, 50, and 100 uM CHP were placed on lawn cells of wild type and *btpx* knock-out mutant. Disk placed center indicated control.

IV. 결 론

본 연구는 504bp의 뉴클레오타이드로 구성되어 167개의 아미노산으로 이루어진 폴리펩타이드를 암호화하는 *Bacillus subtilis* 168의 thiol peroxidase 유전자를 재조합 방법에 의해 녹아웃 돌연변이주를 제조하여 야생형과의 생리학적 차이점을 비교 검토하여 thiol peroxidase 유전자의 기능을 확인하였다.

*Bacillus subtilis*의 *btpx* 유전자에 *cat* 유전자를 삽입시키고 이를 *Bacillus subtilis* 168에 형질 전환시켜 재조합이 일어나 클로람페니콜에 내성을 갖는 균주를 스크리닝하여 녹아웃 돌연변이주를 제조하였다. 돌연변이주와 야생형주에 인위적인 산화적 스트레스를 처리하여 이들의 성장 곡선을 비교함으로써 BTPX 단백질이 *Bacillus subtilis*에 미치는 생리학적 특성을 검토하였다. 그 결과 산화적 스트레스가 없는 경우에는 야생형과 녹아웃 돌연변이주 간에는 성장 곡선의 차이를 관찰할 수 없었는데, 이는 *btpx* 유전자 이외의 다른 스트레스 관련 유전자 발현이 증가되어 두 균주 사이의 성장률 차이가 없는 것으로 판단된다. 각각의 균주들에 비교

적 높은 농도의 H_2O_2 를 이용하여 강한 산화적 스트레스를 주었을 때에는 야생형은 스트레스에 적응을 잘하였으나, *btpx* 녹아웃 돌연변이주는 적응하는데 야생형보다 약간 더 많은 시간을 필요로 하는 양상을 보였으며, 이는 녹아웃 돌연변이주가 야생형보다 이런 종류의 스트레스에 더욱 민감한 면을 보인다고 할 수 있다. H_2O_2 에 의해 *B. subtilis*에서 catalase, alkyl hydroperoxide reductase, Dps 패밀리에 속하는 DNA 결합 단백질인 MrgA 등의 합성이 유도된다고 보고되었다 (12). 따라서 H_2O_2 처리시 *btpx* 돌연변이주에서도 이와 유사한 항산화 단백질들이 합성이 유도되어 H_2O_2 에 기인한 산화적 스트레스에 적응할 수 있는 것으로 추정된다. 또한 각각의 균주에 cumene hydroperoxide (CHP)를 이용한 산화적 스트레스 처리를 하였을 때는 야생형이 *btpx* 녹아웃 돌연변이주보다 더욱 높은 생존력을 보였다. 그러나 세포내에 superoxide radicals (O_2^-) 생성을 유도하는 paraquat 처리를 하였을 때에는 야생형과 녹아웃 돌연변이주 간에는 두드러진 생리학적 차이를 발견할 수 없었다. *Bacillus*의 *ahpC* 돌연변이주가 대수 성장기에서 야생형보다 CHP에 대해 더 민감해 진다는 사실이 보고되어 있고 (11), 이는 *B. subtilis*의 alkyl hydroperoxide reductase가 성장하는 세포가 산화적 스트레스를 받을 때 불포화 지방산 및 핵산으로부터 생성되는 유기 hydroperoxide의 해독과정에 관여하기 때문일 것으로 추정되고 있다. 따라서 본 실험에서 관찰한 *btpx* 돌연변이주가 야생형보다 CHP에 대해 높아진 민감성을 나타내는 것은 thiol peroxidase가 *ahpC*와 함께 유기 hydroperoxide의 해독과정에 관여하고 있을 것으로 추정할 수 있다.

참 고 문 헌

1. Fridovich, I. Science 1978 201:875-880
2. Hoch, J. A., Silhavy, T. J. Two-component signal transduction. American Society for Microbiology Press, 1995
3. Christman, M. F., Morgan, R. W., Jacobson, F. S., and Ames, B. N. Cell 1985 41:753-762
4. Jacobson, F. S., Morgan, R. W., Christman, M. F., and Ames, B. N. J. Biol. Chem. 1989 264:1488-1496

5. Morgan, R. W., Christman, M. F., Jacobson, F. S., Stortz, G., and Ames, B. N. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986 83: 8059-8063
6. Neidhardt, F. G. Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology Press, 1987 p.1313-1317
7. Hanahan, D., DNA cloning: A Practical Approach (vol. II), IRL Press, 1985 p. 109-135
8. Hardy, K. G. DNA cloning: A Practical Approach (vol. II), IRL Press, 1985 p. 1-17
9. Cha, M. K., Kim, H. K., and Kim, I. H. J. Bacteriol. 1996 178: 5610-5614
10. Cha, M. K., Kim, H. K., and Kim, I. H. J. Biol. Chem. 1995 270: 28635-28641
11. Antelmann, H., Engelmann, S., Schmid, R., and Hecker, M. J. Bacteriol. 1996 178: 6571-6578
12. Bsat, N., Chen, L., and Helmann, J. D. J. Bacteriol. 1996 178: 6579-6586
13. Dowds, B., C., A., Murphy, P., McCornell, D., J., and Devine K., M. J. Bacteriol. 1987 169:5771-5775