

Vibrio fluvialis oligopeptide permease (*oppA*) 유전자 deletion에 의한 생리적 특성

안선희 · 이은미 · 김동균 · 홍경은 · 박은미 · 공인수*

부경대학교 생물공학과

Received November 26, 2005 / Accepted December 14, 2005

Characterization of Physiological Properties in *Vibrio fluvialis* by the Deletion of Oligopeptide Permease (*oppA*) Gene. Sun Hee Ahn, Eun Mi Lee, Dong Gyun Kim, Gyoung Eun Hong, Eun Mi Park and In Soo Kong*. *Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea* – Oligopeptide is known to be an essential nitrogen nutrient for bacterial growth. Oligopeptide can be transported into cytoplasm by a specific transport system, Opp system. Opp system is composed of five proteins, which are transcribed by an operon. These are responsible for oligopeptide binding protein (OppA), permease (OppB and OppC) and energy generation system (OppD and OppF), respectively. Previously, we isolated the opp operon from *Vibrio fluvialis* and constructed the *oppA* mutant by allelic exchange method. In this study, we investigated the growth pattern and biofilm production under the different growth condition. When the cells were cultivated using brain heart infusion(BHI) medium, the wild type was faster than the mutant in growth during the exponential phase. However, it showed that the growth pattern of two strains in M9 medium is very similar. The growth of wild type showed better than that of the mutant grown at pH 8. At pH 7, there was no an obvious difference in growth. After 5 mM H₂O₂ was treated to the cells (OD₆₀₀=1.2), the cell survival was examined. The *oppA* mutation did not affect in survivability. In the presence of 10 µg/ml polymyxin B, the biofilm production of the *oppA* mutant was higher than that of the wild type.

Key words – *Vibrio fluvialis*, *oppA* mutant

Peptide는 미생물의 생육에 있어서 amino acid의 공급원으로써 인식되는 매우 중요한 nutrient의 한 형태이다. Peptide의 세포막 통과는 세포외로 분비되는 단백질 분해효소에 의해서 세포의 단백질이 분해되어 di-, tri-, 혹은 oligo-peptide의 형태로 전달되어 세포질내로 전달된다[11]. 일반적으로 미생물에서는 당, 아미노산, potassium ion 또는 sodium ion 등과 같은 중요한 물질들은 active transport에 의해서 전달되는 것으로 알려져 있다[17]. 그러나 peptide의 경우 *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Lactococcus lactis* 등에서 밝혀진 사실에 의하면 di-, tri-, oligo-peptide의 세포내로의 전달은 ATP 사용에 의한 ABC (ATP-binding cassette) transporter에 의한 방법에 의존하고 있는 것으로 밝혀졌다[6]. Peptide 전달과정에 관여하고 있는 ABC transporter는 dipeptide transport (Dpp), tripeptide transport (Tpp)와 oligopeptide transport (Opp) 등이 알려져 있으며 이들 system은 dipeptide, tripeptide, oligopeptide와 binding할 수 있는 binding protein, binding protein에 결합된 peptide를 전달해 주는 permease, ATP 분해에 관여하는 protein들의 작용들에 의해서 세포질내로 peptide를 전달하고 있다. 특히 Dpp와 Tpp system에 존재하는 binding protein들은 peptide에 대한 특이성이 매우 높은 반면에 Opp system내의

binding protein은 자연적인 또는 인위적으로 변형된 매우 다양한 peptide와 binding 할 수 있는 것으로 보고되고 있다 [7]. 현재까지 밝혀진 미생물에 존재하는 Opp system들은 염색체 상에서 operon 형태의 gene cluster를 형성하고 있다 [2,10,12-14]. Opp operon은 5개의 유전자인 OppA, B, C, D, F로 구성되어 있다. OppA 단백질은 peptide binding protein을 coding하고 있으며, OppB와 OppC는 transmembrane protein들을 coding 하고 있다. OppD와 OppF 단백질은 ATP binding protein으로 보고되고 있다[2-5,9,15,16]. Opp system은 이와같은 영양물질의 uptake가 주요 역할이지만 이외에도 peptidoglycan의 생합성이나 cell wall peptide recycling에도 관여하고 있으며 gram positive bacteria에서는 conjugation, sporulation 및 competence의 초기단계에 extracellular molecule의 sensing에도 관여하는 등 cell signaling에 중요하게 작용하고 있음이 밝혀져 보고되고 있다[4]. 지금까지 gram negative bacteria의 Opp system에 관한 연구는 주로 *E. coli*와 *S. typhimurium*에서 이루어져 왔으며 gram positive bacteria에서는 *L. lactis*가 주요연구 대상이었다. 본 연구실에서는 최근에 대표적인 수해양 서식 세균의 하나인 *Vibrio fluvialis*로부터 Opp operon을 분리하여 유전자 염기서열 등을 밝혔으며 *oppA* 유전자가 deletion된 mutant를 제조하여 특히 조건하에서 *oppA* mutant가 병원성 인자의 하나인 biofilm생성이 wild type에 비하여 높은 사실을 보고하였다[8].

***Corresponding author**

Tel : +82-51-620-6185, Fax : +82-51-620-6180

E-mail : iskong@mail.pknu.ac.kr

본 연구에서는 *V. fluvialis*의 생육에 영향을 미치는 주요 인자에 대하여 *oppA* 유전자 변이에 따른 생육반응에 대한 연구 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에 사용된 *V. fluvialis* (KCTC2473)는 생명공학원 유전자은행에 보관된 균을 분양받아 사용하였다. *oppA* 유전자가 deletion 된 mutant는 본 연구실에서 allelic exchange 방법을 통해 제조 하였다[8]. 두 균 모두 생육을 위하여 BHI (brain heart infusion) 배지에 접종하여 37°C에서 진탕 배양하여 생육시켰으며 최소배지로는 M9 minimal medium을 사용하였다.

사용시약

사용된 항생물질 및 기타 일반시약은 Sigma Co.(USA)로부터 구입하여 사용하였다. BHI 배지는 Difco Co.(USA)사에서 구입하였다.

H₂O₂에 대한 감수성

V. fluvialis wild type과 *oppA* mutant의 H₂O₂에 대한 sensitivity를 조사하기 위하여 각각의 균주들을 BHI와 BHIC (10 µg/ml chloramphenicol 함유) 배지에 접종하여 37°C에서 OD₆₀₀ 1.2까지 키운 후 집균하고 이를 0.85% NaCl 용액 1 ml로 수세한 후에 fresh BHI 배지와 BHIC 배지에 다시 suspension 시킨 후 5 mM의 H₂O₂를 첨가하였다. 이후 경시적으로 배양액을 100 µl 취하여 0.85% NaCl 용액 900 µl에 희석하여 도말 한 후 12시간 배양 후 생성된 colony 수를 비교하였다.

항생제에 대한 내성

Streptomycin, tetracycline, polymyxin B 항생제들에 대한 wild type과 *oppA* mutant의 내성을 비교하기 위하여, 두 균주를 BHI 배지에서 하룻밤 배양한 후 각각의 항생제가 20, 10, 5, 2.5, 1.25 µg/ml로 첨가된 BHI 배지에 접종하여 배양하고 생육되는 농도를 관찰·비교하였다.

Biofilm production 측정

또한 polymyxin B에 의한 wild type과 *oppA* mutant의 biofilm 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 두 균주를 같은 농도의 polymyxin B가 첨가된 BHI 배지에서 배양후 biofilm production을 Lee 등의 방법[8]에 따라 측정하였다.

pH에 따른 성장 비교

V. fluvialis wild type과 *oppA* mutant의 pH에 따른 성장

에 대한 영향을 조사하기 위하여, BHI 배지에 HCl과 NaOH를 첨가하여 pH 7 과 pH 8 로 보정한 배지에 각각의 두 균주를 배양 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 성장을 비교하였다.

결과 및 고찰

배지조성에 따른 wild type과 *oppA* mutant의 생육비교

OppA protein의 생성이 불가능한 mutant를 사용하여 wild type와 함께 BHI 및 M9-minimal 배지에서 배양하여 생육도를 측정한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. BHI 배지와 같은 enrichment 배지에서 배양하였을 때 두 균은 모두 4시간 배양 후 stationary phase에 도달하는 것을 알 수 있었다. 그러나 4시간 이내의 배양에서는 wild type이 *oppA* mutant에 비해서 더 좋은 생육을 보여 주었다. BHI 배지에 존재하는 주요 질소원으로는 peptone이며 mutant의 경우는 이용 가능한 nitrogen을 배양 초기에는 잘 이용하지 못하고 있는 것으로 생각된다. 이미 알려진 3 종류의 *Vibrio* sp. (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus*) chromosome 전 염기서열 내에는 Opp system 이외에도 Dpp와 Tpp system에 관여되는 유전자가 존재하고 있는 것으로 밝혀졌다. *V. fluvialis*에서도 이러한 system이 존재하고 있는 것으로 추측된다. *oppA* mutant가 6시간 이후에 wild type과 생육이 비슷해지는 이유도 배지에 존재하는 주요 nitrogen source가 균이 생산하는 peptidase나 protease에 의해서 oligopeptide가 아닌 di- 또는 tri- peptide 형태로 충분히 만들어지는 시간까지는 wild type보다도 생육에 사용될 nitrogen source의 uptake와 이용이 늦어져 생육이 낮은 것으로 생각된다. 두 균을 모두

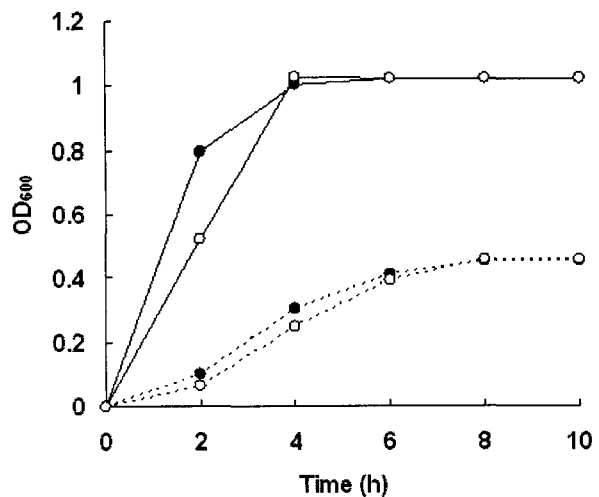


Fig. 1. Growth curve in BHI (solid line) and M9 (dotted line) medium. Closed circles represent the *V. fluvialis* wild type and open circles represent the *oppA* mutant.

nitrogen source가 유기물이 아닌 무기질소원으로 대체한 M9 minimal 배지를 사용하였을 때 mutant가 wild type에 비하여 다소 늦은 생육을 보이긴 하나, BHI 배지에서와 같이 큰 차이를 보이지 않고 두 균의 생육 pattern이 거의 같게 나타나는 것으로 미루어 위와 같은 추측을 뒷받침할 수 있다.

배양 pH에 따른 wild type과 oppA mutant의 생육비교

oppA 유전자가 *V. fluvialis*의 성장에 대한 pH에 따른 영향을 조사하기 위하여, *V. fluvialis* wild type과 oppA mutant 각각의 균주를 pH 7과 pH 8의 BHI 배지에서 배양하여 성장을 비교하였다. pH 7의 배지에서는 oppA mutant와 wild type의 생육이 어느정도 같게 나타나는데 비하여, pH 8 배지에서는 mutant가 wild type보다 성장이 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 특히, 두 균주의 pH별 성장의 차이가 pH 7에서보다 pH 8에서 현저하게 크게 나타나고 있음을 알 수 있었다.

H₂O₂에 대한 sensitivity

Stationary phase (OD₆₀₀=1.2)의 세포를 원심분리하고 PBS buffer에 현탁 시킨후 5 mM H₂O₂를 첨가하여 10 분 단위로 BHI 고체배지에 drop하여 viable cell number를 측정하였다. 그 결과 Fig. 3 에서와 같이 wild type에 비하여 mutant의 생존율이 약간 낮기는 하지만 비교적 비슷하게 나타났다. 특히, H₂O₂ 첨가 후 60 분 후에는 wild type과 mutant의 생존율이 각각 88%와 80%로 비교적 큰 차이를 보이지 않고 있다. 반면, logarithmic phase의 cell (OD₆₀₀=0.4)의 경우에는 mutant가 wild type에 비하여 5 mM H₂O₂에 대하여 생존율이 급격히 감소하여 60 분 후에는 wild type cell은 약 90%의 생존율을 유지하고 있는데 반해 mutant는 생존하는 cell이 전혀 나타나지 않는 것

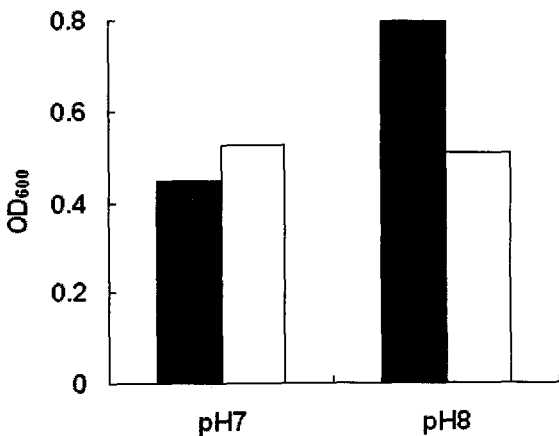


Fig. 2. Growth of *V. fluvialis* wild type and oppA mutant in BHI medium of adjusted to pH 7 or pH 8. Black bars represent the *V. fluvialis* wild type and white bars represent the oppA mutant.

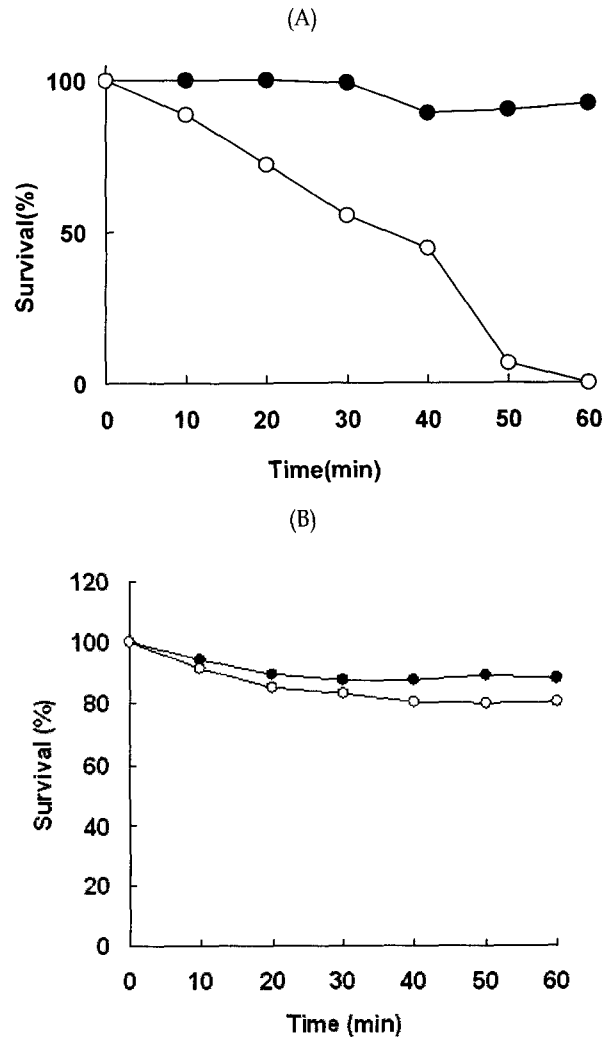


Fig. 3. Effect of H₂O₂ (5 mM) on *V. fluvialis* wild type and oppA mutant cells (A) exponential phase (optical density at 600 nm of 0.4). (B) stationary phase (optical density at 600 nm of 1.2). Closed circles represent the *V. fluvialis* wild type and open circles represent the oppA mutant.

을 확인하였다.

항생제에 대한 내성

*V. fluvialis*의 oppA 유전자가 deletion 됨에 따라 streptomycin, tetracycline, polymyxin B 항생제들에 대한 내성에 미치는 영향을 조사한 결과, streptomycin, tetracycline의 농도 1.25 µg/ml 농도 일때, wild type의 생육은 관찰되고 있으나, mutant는 자라지 않았다. 그에 비해, polymyxin B는 농도 10 µg/ml 농도에서 두 균주 모두 생육되고 있는 것을 확인하였다(Table 1). 이로써 oppA는 streptomycin과 tetracycline에 대한 내성에는 영향을 미치지 않지만, polymyxin B에 대한 내성에는 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

Table 1. Growth permission concentration of different antibiotics against *V. fluvialis* wild-type and *oppA* mutant.

Compounds	Wild-type	<i>oppA</i> mutant
Streptomycin	1.25 µg/ml	0
Tetracycline	1.25 µg/ml	0
Polymyxin B	10 µg/ml	10 µg/ml

Biofilm production 측정

Lee 등의 보고에 따르면 *V. fluvialis*에서 *oppA* 유전자를 mutation시켰을 때, biofilm productivity는 높게 나타났다 [8]. 본 연구에서는 그러한 biofilm production에 polymyxin B가 미치는 영향을 조사하고자, wild type과 *oppA* mutant가 자랄 수 있는 polymyxin B의 최소농도인 10 µg/ml이 첨가된 배지에서 두 균주를 배양하여 biofilm production을 비교하였다. 그 결과 *oppA* mutant의 biofilm production이 wild type에 비해 증가됨을 확인하였다(Fig. 4).

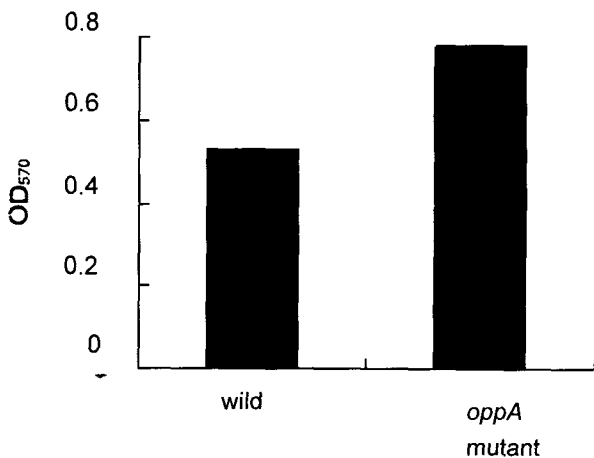


Fig. 4. Production of biofilm in *V. fluvialis* wild type and *oppA* mutant in BHI medium containing 10 µg/ml of polymyxin B.

요 약

미생물이 이용할 수 있는 nitrogen source는 di-, tri-, oligo-peptide 또는 amino acid의 형태로 세포내로 uptake되어 대사과정에 사용되고 있다. 이와같은 peptide는 특이한 transport system에 의해서 이동되고 있는데 oligo peptide(Opp) transport system에는 binding protein, permease protein, energy 생성을 위한 ATP 분해에 관여하는 protein이 관여하고 있으며 염색체 상에서 이들 단백질들은 operon 형태의 유전자로부터 발현되고 있다. 본 연구는 gram 음성 세균이며 수해양 서식 세균인 *V. fluvialis*로부터 얻어진 Opp

operon 유전자 가운데 oligopeptide binding protein을 coding하고 있는 *oppA* 유전자가 deletion된 mutant를 사용하여 여러 환경변화에 따른 생육을 wild type과 비교한 연구 결과이다. 생육을 위한 완전배지인 brain heart infusion (BHI) 배지와 최소배지인 M9 minimal 배지를 사용한 결과 OppA protein의 생성 결핍에 따라 초기 및 대수증식기 과정 중에는 mutant의 생육이 늦어지고 있으나 Opp system이 아닌 다른 peptide 전달 경로로 추정되는 system을 이용하여 대수증식기 후반에서는 wild type과 거의 같은 생육 형태를 보여 주고 있었다. pH의 변화에 따른 생육은 pH 7에서는 생육정도가 비슷하였으나 약알칼리 부근에서는 *oppA* mutant의 생육이 wild type에 비하여 낮아지고 있었다. 또한 5 mM H₂O₂를 사용하여 OD₆₀₀=1.2 농도의 세포들에 대한 영향을 검토한 결과 두 균 모두 높은 생존율을 보여 주었으며 이는 대수증식기 세포들을 사용한 결과와는 매우 다른 형태를 보여 주고 있었다. 항생제 내성에 대한 연구에서는 mutant가 streptomycin과 tetracycline에 대해서는 wild type과는 다르게 매우 낮은 농도에서도 생육이 되고 있지 않으나 polymyxin B에 대해서는 wild type과 같이 10 µg/ml의 농도에서도 잘 자라고 있었다.

감사의 글

이 논문은 2005학년도 부경대학교 기성회 학술 연구비 (PK-2005-020) 지원에 의해 수행되었으며, 박은미는 2005년도 Brain Busan 21 사업 장학금을 지원받았습니다.

참 고 문 헌

- Borezee, E., E. Pellegrini and P. Berche. 2000. OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. *Infect. Immun.* **68**, 7069-7077.
- Cundell, D. R., B. J. Pearce, J. Samderls, A. M. Naughton and H. R. Masure. 1995. Peptide permease from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eukaryotic cells. *Infect. Immun.* **63**, 2493-2498.
- Darmstadt, G. L., L. Mentele, A. Podbielski and C. E. Rubens. 2000. Role of group A Streptococcal virulence factors in adherence to keratinocytes. *Infect. Immun.* **68**, 1215-1221.
- Detmers, F. J. M., F. C. Lanfermeijer and B. Poolman, 2001. Peptides and ATP binding cassette peptide transporters. *Res. Microbiol.* **152**, 245-258.
- Goodell, E. W. and C. F. Higgins. 1987. Uptake of cell wall peptides by *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 3861-3865.
- Higgins, C. F. 1992. ABC transporters : from microorganisms to man. *Ann. Rev. Cell Biol.* **8**, 67-113.

7. Lazazzera, B. 2001. The intracellular function of extracellular signaling peptides. *Peptides* **22**, 1519-1527.
8. Lee, E. M., S. H. Ahn, J. H. Park, J. H. Lee, S. C. Ahn and I. S. Kong. 2004. Identification of oligopeptide permease(*opp*) gene cluster in *Vibrio fluvialis* and characterization of biofilm production by *oppA* knockout mutation. *FEMS Microbiol. Lett.* **240** 21-30.
9. Leonard, B. A., A. Podbielski, P. J. Hedberg and G. M. Dunny. 1996. *Enterococcus faecalis* pheromone binding protein, PrgZ, recruits a chromosomal oligopeptide permease system to import sex pheromone cCF10 for induction of conjugation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 260-264.
10. Lin, B., S. A. Short, M. Eskildsen, M. S. Klemperer and L. T. Hu. 2001. Functional testing of putative oligopeptide permease (Opp) proteins of *Borrelia burgdorferi* : a complementation model in *opp-* *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1499**, 222-231.
11. Payne, J. W. and M. W. Smith. 1994. Peptide transport by microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* **36**, 1-80.
12. Perego, M., C. F. Higgins, S. R. Pearce, M. P. Gallagher and J. A. Hoch. 1991. The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. *Mol. Microbiol.* **5**, 173-185.
13. Podbielski, A., B. Pohl, M. Woischnik, C. Korner, K. H. Schmidt, E. Rozdinski and B. A. Leonard. 1996. Molecular characterization of group A streptococcal (GAS) oligopeptide permease (Opp) and its effect on cysteine protease production. *Mol. Microbiol.* **21**, 1087-1099.
14. Renee, M. G., A. Seth and N. D. Connel. 2000. A peptide permease mutant of *Mycobacterium bovis* BCG resistant to the toxic peptides glutathione and s-nitrosoglutathione. *Infect. Immun.* **68**, 429-436.
15. Rudner, D. Z., J. R. LeDeaux, K. Ireton and A. D. Grossman. 1991. The Spo0K locus of *Bacillus subtilis* is homologous to oligopeptide permease locus and is required for sporulation and competence. *J. Bacteriol.* **173**, 1388-1398.
16. Solomon, J. M., R. Magnuson, A. Srivastava and A. D. Grossman. 1995. Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* **9**, 547-558.
17. Tam, R. and M. T. Saier. 1993. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**, 320-346.