

*In vitro*에서 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*와 *Vibrio* 속 세균의 병원성 비교

권문경[†] · 김명석 · 조병열^{*} · 김진우 · 박수일^{**}

국립수산과학원 병리연구팀, ^{*}울산지방해양수산청, ^{**}부경대학교 수산생명의학과

Comparative study of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* and *Vibrios* on pathogenicity *in vitro*

Mun-Gyeong Kwon[†], Myoung Sug Kim, Byoung-Youl Cho^{*}, Jin-Woo Kim and Soo-Il Park^{**}

Pathology Team, National Fisheries Research and Development Institute, ^{*}Ulsan Regional Maritime Affairs and Fisheries office, ^{**}Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University

Photobacterium damsela subsp. *damsela* and 4 *Vibrio* spp. (*V. anguillarum*, *V. splendidus*, *V. harveyi* and *V. ordalii*) were isolated from the diseased olive flounders, *Paralichthys olivaceus*. The isolates were tested on the pathogenicity *in vitro*. The properties of extracellular products (ECPs) were investigated with enzymatic activities, hemolytic activities toward the sheep and olive flounder erythrocytes, and cytotoxicity activities on the cell-line. And potential signal transduction pathways of the bacterial internalization were detected by using signal transduction inhibitors.

P. damsela was high in phospholipase activity, hemolytic activity to olive flounder erythrocytes and cytotoxicity activity. And *P. damsela* had diversified internalizing pathways as compared to isolated vibrios. Therefore, these activities may be related with pathogenicity of *P. damsela*.

Key words: *Photobacterium damsela*, *Vibrio*, Pathogenicity, ECPs, Cytotoxicity

비브리오병 원인균 중의 하나로 알려진 *V. damsela*는 다른 *Vibrio* 속 세균과 DNA homology가 낮아 (Grimes *et al.*, 1984), MacDonell and Colwell (1985)에 의해 *Vibrio* 속에서 *Listonella* 속으로 분류된바 있으나, 최종적으로는 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (이하 *P. damsela*)로 재분류되었다 (Smith *et al.*, 1991; Trüper and De'Clari, 1997). 그러나, 일반적으로 *P. damsela*의 감염에 의한 질병도 비브리오병으로 분류되고 있다 (Austin and Austin, 1999; Wang *et al.*, 1998).

*P. damsela*는 *Vibrio* 속 어병 세균과 분류학적

위치뿐만 아니라 감염 방법, 병원성 발현 인자 및 기전에서 차이가 있을 것으로 예상된다. 즉, 비브리오병은 병원성에 관여하는 인자가 haemolysin (Munn, 1978; Toranzo and Barja, 1993), protease (Norqvist *et al.*, 1990), capsule (Yoshida *et al.*, 1985; Wright *et al.*, 1990)과 iron transport protein (Actis *et al.*, 1995) 등 다양한 것으로 보고되고 있으나, 이들도 감염 어종 및 병원성 인자에 대한 감염 경로나 병원성 발현 기작에 대해서는 불명확한 점이 많다 (Santos *et al.*, 1991). 특히, *P. damsela*의 경우 넙치에 대한 감염 특성, 병원성 인자 및 발현 기작 등에 관한

[†]Corresponding Author : Mun-Gyeong Kwon, Tel : 051-720-2492,
Fax : 051-720-2498, E-mail : mgkwon@momaf.go.kr

연구 결과가 없어, 본 연구에서는 *P. damsela*와 *Vibrio* 속 어병 세균의 병원성 인자로서 extracellular products (ECPs)의 성장과 세포내 감염 경로를 비교하였다.

재료 및 방법

실험 균주

동해안 넙치 양식장에서 분리된 *P. damsela*와 *Vibrio* 균주를 병원성 비교에 사용하였다. *P. damsela*, *V. anguillarum*, *V. splendidus*, *V. harveyi*와 *V. ordalii*는 권 등 (2005)에 의하여 상법에 따라 생화학적 성장과 16s rRNA homology로 동정하여 -70°C에 보존된 균주로 1.5% NaCl 첨가 TSA 배지에서 25°C, 24시간 계대 배양하여 사용하였다.

Extracellular products (ECPs) 분리

ECPs는 Austin 등 (1998)의 cellophane overlay 방법에 따라 Tryptic Soy Broth (TSB, Difco)에 전 배양한 균액 200 µl를 멸균 membrane 위에 분주 후 27°C, 48시간 배양하였다. Cellophane membrane 위의 배양균은 0.1 M 멸균 phosphate buffer solution (PBS, pH 7.2)로 집균하여 12,000 ×g, 4°C, 15분간 원심 분리한 후 상정액은 0.45 µm pore size의 syringe filter (Corning Inc.)로 여과 멸균하여 ECPs 액으로 사용하였다.

ECPs의 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA, Sigma)을 표준으로 하여 Bradford (1976)에 의한 방법으로 측정하고 -70°C에 보관하면서 사용하였다.

ECPs의 효소 활성 및 용혈능

API zym kit에서 효소 활성

분리 균주 ECPs의 API zym kit에서의 효소 활성은 ECPs의 단백질 농도를 0.1 M PBS (pH 7.2)로 20 µg/ml로 조정한 후 API zym kit (Bio-Merieux, Spain)를 사용하여 상법에 따라 결과를

판정하였다.

Caseinase activity

Caseinase activity는 Austin 등 (1998)에 따라 azocasein (Sigma, Co. USA)을 기질로 하여 측정하였다. 즉, 0.1 M PBS (pH 7.2)에 1% (w/v) azocasein 용액을 제작한 후 azocasein 450 µl와 ECPs 50 µl를 잘 혼합하여 28°C, 30분간 반응시켰다. 반응 후 10% trichloroacetic acid (TCA; Sigma, Co. USA)를 500 µl 첨가하여 30분간 실온에 방치한 다음, 4°C에서 14,000 ×g, 5분간 원심 분리로 분리해낸 상정액 500 µl에 1 M sodium hydroxide 500 µl를 첨가하여 유리되는 azodye를 흡광도로서 측정하였으며, 1 unit는 A₄₅₀에서 0.001 증가하는 것으로 하였다.

Gelatinase activity

Gelatinase activity는 Zhang and Austin (2000)에 따라 caseinase activity 법을 변형하여 측정하였다. 즉, 0.1 M PBS (pH 7.2)에 0.8% (w/v) gelatine (Oxoid) 용액을 제작한 후 gelatin 용액 450 µl와 ECPs 50 µl를 잘 혼합하여 28°C, 30분간 반응시켰다. 반응 후 30% (w/v) TCA 1.5 ml를 첨가하여 반응을 정지시켰으며, 1 unit는 A₂₈₀에서 0.001 증가하는 것으로 하였다.

Phospholipase and lipase activity

Phospholipase와 lipase activity는 Liu 등 (1996)에 따라 1% (w/v) agarose에 egg yolk 또는 1% (v/v) Tween 80을 첨가하여 직경 4 mm wells을 만든 후 ECPs를 20 µl씩 분주하고 습윤 상자에서 28°C, 48시간 반응시킨 다음 well 주위의 clear zone을 측정하였다.

Haemolytic activity

적혈구 용혈능은 Austin 등 (1998)에 따라 넙치 적혈구와 양적혈구에 대하여 조사하였다.

용혈소가는 96-well microtiter plate (Nunc; Life sciences)에서 ECPs를 2배 단계 희석한 후 동량의 1% 넙치 적혈구와 양적혈구를 잘 혼합한 다음 37°C, 1시간 반응하여 용혈을 나타내는 최대

희석 배수를 용혈소가로 하였다.

Cytotoxicity

분리된 균주에서 생성된 ECPs의 세포 독성은 어류 유래 주화세포인 CHSE-214 (Chinook salmon embryo)와 EPC (Epithelioma papillosum cyprini)를 이용하여 측정하였다.

위의 각 cell-line을 1×10^6 cells/ml의 농도가 되도록 조정하여 Eagle's minimum essential medium (EMEM, Sigma)에서 단층 배양하였다. 각 시험 균주의 ECPs는 단백질 농도가 $200 \mu\text{g/ml}$ 이 되도록 준비하여 각 well에 $200 \mu\text{l}$ 씩 주입한 다음 20°C 에서 24시간 배양하였다. 배양된 plate는 Ho and Chou (2001)에 따라 cell line을 2% formalin-PBS로 10분간 고정한 후 0.4% crystal violet-PBS로 10분간 염색하였다. Well은 50% ethanol (Merck)과 % sodium-dodecyl sulfate-PBS에 현탁하여 ELISA reader (630nm)로 흡광도 값을 측정하였으며, 대조구의 흡광도 값에 대한 ECPs 접종 well과 흡광도 값의 차이로 cytotoxicity를 계산하였다.

Adhesion and invasion assay

TSB에 배양된 균주는 monolayer에 접종하였으며, 접종된 균주는 TSA에서 plate counting으로 계수하였다. 배양 후 monolayer에 adhesion된

세균수는 plates를 Hank's balanced salt solution (HBSS)으로 6회 세척한 다음 1% (v/v) Triton X-100-PBS로 EPC를 lysis하여 plate counting으로 계수하였으며 (Elsinghorst, 1994), invasion된 세균수는 monolayer를 HBSS로 3회 세척 후 gentamicin (Sigma)이 $100 \mu\text{g/ml}$ 함유된 MEM에 2시간 반응시켜 세포 외 세균을 killing하였다. 배양된 plates는 HBSS로 2회 세척한 후 EPC는 1% Triton X-100-PBS로 lysis시켜 분리된 균을 멸균 PBS로 희석한 다음 plate counting으로 계수하였다.

Cytoskeleton and signal transduction inhibitors

세포 내 감염 경로를 어류 유래 주화세포인 EPC에서 여러 가지 inhibitor를 이용하여 minor modification (Leung and Finlay, 1991; Elsinghorst, 1994)으로 조사하였으며, 사용된 inhibitor의 종류, 농도와 기능은 Table 1과 같다. EPC를 24 well cell culture plates에서 24시간 배양하여 well plates에 100% 채운 다음, DMSO에 용해된 inhibitor를 MEM으로 농도를 조정한 후 well plate에 접종하여 25°C , 30분간 반응시켜 준비하였다.

Table 1. Effects of bacterial invasion inhibitors on internalization of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* by EPC

Inhibitor	Concentration	Class
None		Control
DMSO	0.4%	Solvent
MEM without Ca^{2+} and serum		Medium control
Genistein	$150 \mu\text{M}$	Protein tyrosine kinase inhibitor
Staurosporine	$0.005 \mu\text{M}$	Protein kinase C inhibitor
Calphostin C	$0.5 \mu\text{M}$	Protein kinase C inhibitor
PD098059	$20 \mu\text{M}$	MAPK kinase inhibitor
BAPTA/AM	$50 \mu\text{M}$	Intracellular Ca^{2+} chelator
Cytochalasin D	$0.1 \mu\text{g/ml}$	Microfilament inhibitor
Vincristin	$5 \mu\text{g/ml}$	Microtubule inhibitor

결 과

ECPs의 효소 활성 및 용혈능

분리된 *P. damsela*와 vibrio 균의 ECPs의 효소

활성 및 용혈능 검사 결과는 Table 2와 같다. *P. damsela*의 ECPs는 caseinase와 phospholipase에 대하여 다른 균주들에 비하여 높은 활성을 나타내었다. Sheep RBCs와 넙치 RBCs에 대한 용혈

Table 2. Enzymatic and hemolytic activities in extracellular products of isolates after for 48 hrs incubation

Enzyme	ECPs				
	D**	A	S	H	O
Negative control	-	-	-	-	-
Alkaline phosphatase	+	+	-	-	+
Esterase (C 4)	+	+	+	+	+
Esterase Lipase (C 8)	+	+	+	+	+
Lipase (C 14)	-	-	-	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+	+	-
Valine arylamidase	-	-	-	-	-
Cystine arylamidase	-	-	-	-	-
Trypsin	-	-	-	-	-
α -chymotrypsin	-	-	-	-	-
Acid phosphatase	+	+	+	-	+
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	-	+	+	+	+
α -galactosidase	-	-	-	-	-
β -galactosidase	-	-	-	-	-
β -glucuronidase	-	-	+	-	-
α -glucosidase	-	-	-	-	+
β -glucosidase	-	-	-	-	-
N-acetyl- β -glucosaminidase	-	+	+	+	-
α -mannosidase	-	-	-	-	-
α -fucosidase	-	-	-	-	-
Gelatinase	+	+	-	-	-
Caseinase	+++	++	+	+	++
Gelatinase	++	++	+	+	+
Phospholipase	+++	+	+	+	++
Lipase	+	+	+	+	+
Hemolytic activity					
Sheep RBCs	8	8	4	2	2
Flounder RBCs	64	32	16	4	16

* White area : (-), negative; (+), positive

Gray area : (-), no zone of clearing; (+), clearing or opalescence of ≤ 3 mm; (++) , clearing or opalescence between 3.5~6 mm; (+++) , clearing or opalescence above 6.5 mm.

** D, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*; A, *Vibrio anguillarum*; S, *Vibrio splendidus*; H, *Vibrio harveyi*; O, *Vibrio ordalii*.

능 조사 결과, *P. damsela*의 용혈능이 64배 희석 시까지 나타나 시험균 중에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

Cytotoxicity assay

어류 유래의 cell-line 2종에 대하여 분리 균주

별 ECPs의 cytotoxicity를 관찰한 결과는 Fig. 1, 2와 같다. 병원성이 높았던 *P. damsela*는 4시간 만에 세포 변성 효과 (Cytopathic effect, CPE)가 나타났으며, CHSE-214에서는 세포가 길어진 후 well plate에서 탈락되었으나 EPC에서는 세포가 둥글게 된 후 well plate에서 탈락되는 현상을

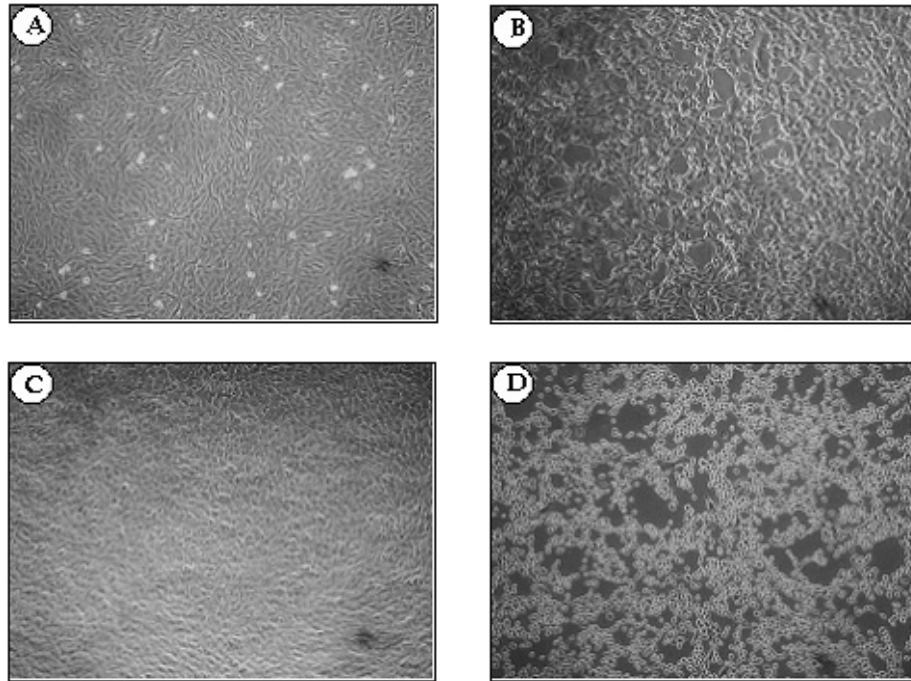


Fig. 1. Phase-contrast micrographs of cell lines, CHSE-214 (A and B) and EPC (C and D) administrated with ECPs from *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. The left columns (A and C) were controls and the right columns (B and D) were incubated with ECPs (200 µg/ml) for 4 hrs.

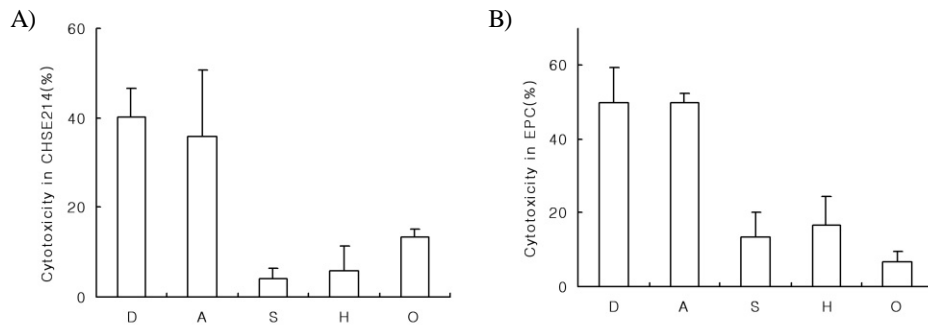


Fig. 2. Cytotoxicity in CHSE 214 (A) and EPC (B) of ECPs from *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* and vibrios for 24 hrs. D, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*; A, *Vibrio anguillarum*; S, *Vibrio splendidus*; H, *Vibrio harveyi*; O, *Vibrio ordalii*.

나타내었다. 또한 다른 비브리오 균에서는 24시간째에도 이와 같은 변성 효과가 약하게 관찰되었다.

*P. damsela*의 cytotoxicity는 CHSE-214에 대해서 $40.2 \pm 6.5\%$, EPC에 대해서 $50 \pm 9.5\%$ 로 나타났다. *V. anguillarum*의 cytotoxicity는 CHSE-214에 대해서 $35.8 \pm 15\%$, EPC에 대해서 $50 \pm 2.3\%$ 로 나타났다. *V. splendidus*, *V. campbelli* 및 *V. ordalii*에서는 두 종류의 cell line에서 세포독성이 $5.9 \pm 5.4 \sim 13.5 \pm 6.5\%$ 로 낮게 나타났다.

Adhesion and invasion assay

시험균들의 EPC에 대한 부착율을 조사한 결

과는 Table 3과 같다. *P. damsela*의 부착율이 $70.5 \pm 4.7\%$ 로 시험균 중 가장 높았다. *V. anguillarum*은 $60.4 \pm 3.6\%$ 로 다른 vibrio 균들에 비하여 유의적으로 높은 부착율을 나타내었으며 ($p < 0.05$), invasion rate도 5.5 ± 1.6 과 4.7 ± 2.1 로 다른 균들에 비하여 유의적으로 높은 결과가 나타났다 ($p < 0.05$).

Cytoskeleton and signal transduction inhibitors

Wang 등 (1998)에 따라 시험균들이 EPC 내로 침입 시 이용하는 cellular cytoskeleton과 signal transduction pathway를 조사한 결과는 Table 4와 같다. Genistein은 protein tyrosine kinase의

Table 3. Proportions of the adherence and the invasion of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* and vibrios to EPC

Strain	Inoculum ($\times 10^5$)	Adherence (%) ¹⁾	Invasion (%) ²⁾
<i>P. damsela</i>	20.5 ± 3.4	70.5 ± 4.7^a	5.5 ± 1.6^a
<i>V. anguillarum</i>	16.4 ± 5.2	60.4 ± 3.6^a	4.7 ± 2.1^a
<i>V. splendidus</i>	20.9 ± 3.6	20.5 ± 3.9^b	1.8 ± 0.4^b
<i>V. harveyi</i>	18.4 ± 6.4	18.5 ± 2.1^b	1.9 ± 0.7^b
<i>V. ordalii</i>	17.8 ± 2.3	19.6 ± 4.3^b	2.3 ± 0.4^b

¹⁾ Adherence is expressed as percentage of adherent bacteria after washing without gentamicin treatment ($n=3$).

²⁾ Invasion is expressed as percentage of surviving bacteria after gentamicin treatment for 2 h ($n=3$).

Alphabetic superscripts indicate statistic significant between treatments ($P < 0.05$).

Table 4. Effects of invasion inhibitors on the internalization of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* and vibrios into EPC

Inhibitor	<i>P. damsela</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. splendidus</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. ordalii</i>
None (Control)	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
DMSO (Solvent)	96.4 ± 10.5^a	105.0 ± 5.4^a	96.5 ± 9.3^a	97.8 ± 16.7^a	101.7 ± 7.9^a
Genistein	53.5 ± 10.4^b	50.7 ± 6.8^b	90.3 ± 11.7^a	101.7 ± 6.9^a	89.4 ± 13.7^a
Staurosporine	123.3 ± 16.8^a	106.5 ± 10.8^a	111.4 ± 14.8^a	108.4 ± 20.4^a	110.4 ± 9.4^a
Calphostin C	95.7 ± 6.8^a	94.3 ± 13.3^a	94.6 ± 9.4^a	105.4 ± 7.6^a	88.4 ± 13.7^a
PD098059	82.6 ± 17.0^{ab}	106.0 ± 11.7^a	94.7 ± 13.5^a	112.5 ± 16.4^a	104.1 ± 8.0^a
BAPTA/AM	30.4 ± 5.6^c	84.3 ± 18.4^a	60.4 ± 11.8^b	80.4 ± 12.7^{ab}	95.7 ± 18.2^a
Cytochalasin D	23.4 ± 8.1^c	42.9 ± 10.7^c	61.5 ± 22.1^b	79.5 ± 12.2^b	55.8 ± 14.7^b
Vincristin	33.8 ± 6.4^c	50.9 ± 11.1^c	90.4 ± 20.1^a	96.1 ± 18.1^a	102.1 ± 16.3^a

Value represent the ratio of bacteria in the presence of inhibitor to bacteria without additional inhibitor and are expressed as percentages (mean \pm SE). Alphabetic superscripts indicate statistic significance among treatments ($P < 0.05$).

inhibitor이며 vincristin은 microtubulin의 inhibitor로 두 inhibitor 모두 *P. damsela*와 *V. anguillarum*의 EPC 내로의 침입을 유의적으로 억제시켰다.

Cytochalasin D는 microfilament의 inhibitor로 분리된 모든 균에서 EPC 내로 침입에 유의적인 억제 효과가 나타났으며 다른 균들에 비하여 *P. damsela*와 *V. anguillarum*에 미치는 영향이 더 높은 것으로 나타났다. 모든 시험균은 EPC에 침입할 때 EPC의 actin microfilament system의 재배열이 주요 경로로 생각되며, *P. damsela*는 microtubule system의 rearrangement 및 protein kinase C에 영향을 미쳐 actin based cytoskeleton rearrangement를 침입 경로로 이용하는 것으로 생각된다.

고 찰

P. damsela subsp. *damsela*는 *Vibrio* 속 세균과는 병원성 발현 인자 및 숙주로의 감염 경로가 다를 것으로 예상되어 본 연구에서는 넙치에서 분리된 균주를 이용하여 감염 경로 및 EPCs의 병원성을 비교하였다.

EPCs의 효소 활성을 조사한 결과, *P. damsela*는 alkaline phosphatase와 acid phosphatase가 양성 반응을 나타내었으며, *V. anguillarum*도 같은 결과를 나타내었다. 특히, *P. damsela*는 caseinase activity, elastase activity 및 phospholipase activity에서 높은 활성을 나타내어 Kreger 등 (1987)이 *P. damsela*는 phospholipase activity를 나타내는 damselysin이라는 독소를 분비한다는 것과 같은 결과를 나타내었다. 또한 용혈능 시험 결과 넙치 적혈구에 대해서는 위의 효소들과 유사한 결과를 나타내었다. *V. harveyi*의 효소 활성 관찰에서 Liu 등 (1996)은 protease, phospholipase, haemolysin 또는 exotoxin이 병원성에 중요한 영향을 미친다고 하였으며, Lee 등 (1996, 1997)과 Liu 등 (1997)은 cystein protease가 주요한 exotoxin이라고 하였다. 따라서 이 효소들이 병원성 발현에 영향을 미칠 것으로 보이지만 좀 더 많

은 조사가 이루어져야할 것으로 생각된다.

병원성 세균이 양식장에 출현하여 어류에 감염되어 질병을 발생시키기까지는 여러 가지 경로를 거쳐야한다. 즉, 세균은 어류의 생체 방어 기능과 생존 경쟁을 벌여 살아남은 세균은 어류의 적절한 조직이나 부위에 부착하여 증식한다. 이때 균체는 균체의 세포벽 성분과 여러 가지 독소를 이용하여 숙주로부터 자신을 보호하면서 숙주의 조직이나 장기에 손상을 입혀 질병을 유발하게 된다.

Wang 등 (1998)은 높은 adherence가 항상 높은 invasion rate를 나타내지는 않지만 adherence rate가 낮은 종은 invasion rate가 낮게 나타난다고 하였다. 본 연구에서 *P. damsela*는 다른 균주들에 비하여 EPC에 대한 adherence rate와 invasion rate가 높게 나타났으므로 감염 초기의 높은 부착과 침입율이 병원성에 관여할 가능성이 높은 것으로 생각되었다.

Cytochalasin D는 actin polymerization에 특이적이고 중요한 inhibitor로 microfilament 기능을 억제하고, vincristin은 microtubule을 depolymerize하여 microtubule의 기능을 억제하여 침입하는 것으로 알려져 있다 (Rosenshine *et al.*, 1994). 본 연구에서도 cytochalasin D는 모든 분리 균주가 EPC에 invasion하는 것을 억제하여, microfilaments의 재배열이 *P. damsela*와 vibrio 균의 감염에 필수적인 것으로 생각되었다. Vincristin은 *P. damsela*와 *V. anguillarum*에 특이적으로 억제하므로 숙주의 microtubule polymerization은 *P. damsela*와 *V. anguillarum*의 감염에서만 나타나는 것으로 생각된다.

세균은 protein tyrosine kinase와 phospholipase C 등의 signaling pathway를 이용하여 세포내 Ca^{2+} level과 protein kinase C 활성을 높여 그들의 uptake 활성을 증가 시키는 것으로 보고되고 있다 (Kobayashi *et al.*, 1989, Fig. 3). 본 연구에서 사용한 genistein은 protein tyrosine kinase의 특이적인 inhibitor (Akiyama *et al.*, 1987)로 *P. damsela*와 *V. anguillarum*의 invasion을 억제하였다.

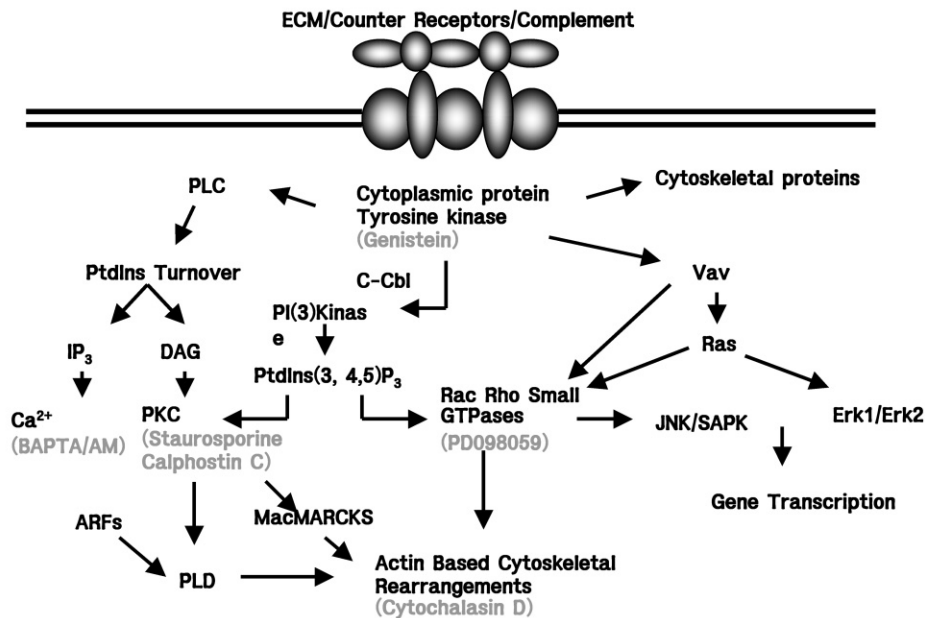


Fig. 3. Integrin signalling pathways in cells: a working hypothesis. Integrin clustering activates cytoplasmic tyrosine kinase by unidentified mechanism. PLC (phosphoinositidase C), PKC (Protein kinase C), PLD (phospholipase D), PI(3) kinase (phosphoinositide-3-OH kinase).

이와 같은 결과는 일반적인 어병 세균의 internalization mechanism으로 *Vibrio* spp. (Wang *et al.*, 1998), *Aeromonas hydrophila* (Tan *et al.*, 1998) 및 *Edwardsiella tarda* (Ling *et al.*, 2000)에서도 보고된 바가 있다. Staurosporine은 protein kinase C의 비특이적 inhibitor (Tamaoki *et al.*, 1986)이며 Calphostin C는 protein regulatory domain과 작용하여 protein kinase C를 특이적으로 억제하지만 (Kobayashi *et al.*, 1989), 본 연구에서 사용된 균주의 invasion에는 영향을 미치지 않았다.

BAPTA/AM은 막투과 Ca^{2+} 의 chelator (Weiss and Insel, 1991)로 본 연구에서 *P. damsela*와 Wang 등 (1998)의 *V. anguillarum* G/Virus(3)의 invasion을 유의적으로 감소시켰다. 세포내의 Ca^{2+} 의 levels은 단백질의 상호작용에 영향을 미쳐 villin과 gelsoin와 같은 filament 구조를 변화시켜 (Korn, 1982), 세균의 invasion을 가능하게 하는 것으로 생각된다.

본 연구에서 *P. damsela*는 감염 시 vibrio 균

주에 비하여 숙주 세포의 이용 경로가 다양하였으며, 다양한 경로를 이용하여 adherence와 invasion을 높여 높은 병원성을 나타낸 것으로 생각된다.

Vibrio 속 세균은 어류의 위장관 (Horne and Baxendale, 1983; Kano *et al.*, 1989; Olsson *et al.*, 1996), 아가미 (Baudin-Laurencin and German, 1987)와 피부 (Grimes *et al.*, 1985; Kano *et al.*, 1989)를 통해서 감염되지만 감염 route에 관계없이 상피세포에 부착, 침입하여 전신적으로 감염되는 것이 필수적이다 (Wang and Leung, 2000). 이 때 internalization과 cytotoxicity가 중요한 virulence mechanism이 되나 (Wang *et al.*, 1998), *P. damsela*의 주요 이용 경로에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서 *P. damsela*는 일반적인 어병 세균의 감염 경로인 숙주 microfilament를 이용하는 것 외에도 microtubule polymerization과 막투과 Ca^{2+} 농도를 이용하여 invasion할 수 있었으며, 이 결과 *P. damsela*는 다른

Vibrio 속 세균에 비하여 높은 invasion rate와 함께 높은 cytotoxicity를 나타내었다.

*P. damsela*는 *P. damsela*의 특이적인 독소인 damselysin을 분비하여 높은 phospholipase 활성과 용혈능을 나타내며, 숙주내로 감염 시 다양한 감염 경로와 높은 cytotoxicity가 병원성 발현에 관여할 것으로 생각된다.

요 약

넙치, *Paralichthys olivaceus* 병어에서 분리된 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*와 *Vibrio* spp. (*V. anguillarum*, *V. splendidus*, *V. harveyi* and *V. ordalii*)의 병원성을 in vitro에서 조사하였다. Extracellular products (ECPs)의 성상은 효소 활성, 양과 넙치 적혈구에 대한 용혈능과 cell-line에 대한 세포 독성을 조사하였다. 그리고 세균의 internalization에서 signal transduction pathways를 signal transduction inhibitor를 이용하여 조사하였다.

*P. damsela*는 phospholipase 활성, 넙치 적혈구에 대한 용혈능, 세포독성이 높게 나타났으며, 분리된 vibrios 군주에 비하여 internalization에서 다양한 경로를 나타내었다. 따라서 이러한 활성은 *P. damsela*의 병원성과 관련이 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 국립수산물품질관리원 (양식생물질병 모니터링 및 역학연구, RP-2007-AQ-001)의 지원에 의해 운영되었습니다.

참 고 문 헌

Actis, L. A., Tolmasky, M. E., Crosa, L. M. and Crosa, J. H.: Characterization and regulation of the expression of FatB, and iron transport protein encoded by the PJM1 virulence plas-

mid. Mol. Microbiol., 17: 197-204, 1995.

Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. and Fukami, Y.: Genistein, a specific inhibitors of tyrosine-specific protein kinases. J. Biol. Chem., 262: 5592-5595, 1987.

Austin, B. and Austin, D. A.: Bacterial fish pathogen. Diseases of farmed and wild fish, 3rd, ed. Springer-Praxia, Godalming, 1999.

Austin, B., Austin, D. A., Dalsgaard, I., Gudmundsdottir, B. K., Thornton, S. H, Pie, Larsen, J. L., O'Hici, B. and Powell, R.: Characterization of atypical *Aeromonas salmonicida* by different methods. Sys. Appl. Microbiol., 21: 50-64, 1998.

Baudin-Laurencin, F. and German, E.: Experimental infection of rainbow trout, *Salmo gairdneri* R., by dipping in suspensions of *Vibrio anguillarum*, ways of bacterial penetration; influence of temperature and salinity. Aquaculture, 67: 203-205, 1987.

Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72: 248-254, 1976.

Elsinghorst, E. A.: Measurement of invasion by gentamicin resistance. Methods Enzymol., 236: 405-420, 1994.

Grimes, D. J., Colwell, R. R., Stemmler, J., Hada, H., Maneval, D., Hetrick, F. M., May, E. B., Jones, R. T. and Stoskopf, M.: *Vibrio* species associated with mortality of sharks held in captivity. Microb. Ecol., 10: 271-282, 1984.

Grimes, D. J., Gruber, S. H. and May, E. B.: Experimental infection of lemonsharks, *Negaprion brevirostris* (Poey), with *Vibrio* species. J. Fish Dis., 8: 173-180, 1985.

Ho, W.-L. and Chou, C.-C.: Effects of carbon and nitrogen sources, sodium chloride and cul-

- ture conditions on cytotoxin production by *Salmonella choleraesuis*. Inter. J. Food Microbiol., 67: 81-88, 2001.
- Horne, M. T. and Baxendale, A.: The adhesion of *Vibrio anguillarum* to host tissues and its role in pathogenesis. J. Fish Dis., 6: 461-471, 1983.
- Kano, T., Nakai, T. and Muroga, K.: Mode of transmission of vibriosis among Ayu, *Plecoglossus altivelis*. J. Aquat. Anim. Health, 1: 2-6, 1989.
- Kobayashi, E., Nakano, H., Morimoto, M. and Tamaoki, T.: Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. Biochem. Biophys. Res. Commun., 159: 548-553, 1989.
- Korn, E. D.: Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. Physiol. Rev., 62: 672-737, 1982.
- Kreger, A. S., Bernheimer, A. W., Etkin, L. A. and Daniel, L. W.: Phospholipase D activity of *Vibrio damsela* cytolysin and its interaction with sheep erythrocytes. Inf. Immun., 55: 3209-3212, 1987.
- Lee, K. K., Liu, P. C. and Chen, S. N.: Studies on the virulence factors of vibrio for tiger prawn, *Penaeus monodon* and immunization trials. Reports on Fish Dis. Res., 17: 1-13, 1996.
- Lee, K. K., Liu, P. C., Kou, G. H. and Chen, S. N.: Investigation on the major exotoxin of *Vibrio harveyi* 770527 isolated from diseased *Penaeus monodon*. Reports on Fish Dis. Res., 18: 33-42, 1997.
- Leung, K. Y. and Finlay, B. B.: Intracellular replication is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 11470-11474, 1991.
- Ling, S. H. M., Wang, X. H., Xie, L., Lim, T. M. and Leung, K. Y.: Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* in vivo and vitro fish models. Microbiol., 146: 7-19, 2000.
- Liu, P. C., Lee, K. K. and Chen, S. N.: Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* from diseased Kuruma prawns *Penaeus japonicus*. Curr. Microbiol., 33: 129-132, 1996.
- Liu, P. C., Lee, K. K., Chen, C. C. and Chen, S. N.: Purification and characterization of a cysteine protease produced by pathogenic luminous *Vibrio harveyi*. Curr. Microbiol., 35: 32-39, 1997.
- MacDonell, M. T. and Colwell, R. R.: Dot matrix analysis of nucleic acid sequence: and interactive microcomputer program. J. Microbiol. Methods, 3: 247-254, 1985.
- Munn, T. W.: Haemolysin production by *Vibrio anguillarum*. FEMS Microbiol. Lett., 3: 265-268, 1978.
- Norqvist, A., Norman, B. and Wolf-Watz, H.: Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Inf. Immun., 58: 3731-3736, 1990.
- Olsson, J. C., Joborn, A., Westerdahl, A., Blomberg, L., Kjelleberg, S. and Conway, P. L.: Is the turbot, *Scophthalmus maximus*(L.), intestine a portal of entry for the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. J. Fish Dis., 19: 225-234, 1996.
- Rosenshine, I., Ruschkowski, S. and Finlay, B. B.: Inhibitors of cytoskeletal function and signal transduction to study bacterial invasion. Methods Enzymol., 236: 467-476, 1994.
- Santos, Y., Bandin, I., Nuñez, S., Gravningen, K. and Toranzo, A. E.: Protection of turbot,

- Scophthalmus maximus* (L.), and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Richardson), against vibriosis using two different vaccines. J. Fish Dis., 14: 407-41, 1991.
- Smith, S. K., Sutton, D. C., Fuerst, J. A. and Reichelt, J. L.: Evaluation of the genus *Listonella* and reassignment of *Listonella damsela*(Love *et al.*). MacDonell and Colewell to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* comb. nov. with an emended description. Int. J. System. Bacteriol., 41: 529-534, 1991.
- Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M. and Tomita, F.: Stauroporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺ dependent protein kinase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 135: 397-402, 1986.
- Tan, E., Low, K. W., Wong, W. S. F. and Leung, K. Y.: Internalization of *Aeromonas hydrophila* by fish cells can be inhibited with tyrosine kinase inhibitor. Microbiol., 144: 299-307, 1998.
- Toranzo, A. E. and Barja, J. L.: Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish. Annu. Rev. Fish Dis., 3: 5-36, 1993.
- Trüper, H. G. and De'Clari, L.: Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) 'in apposition', Int. J. System. Bacteriol., 41: 529-534, 1997.
- Wang, X. H. and Leung, K. Y.: Biochemical characterization of different types of adherence of *Vibrio* species to fish epithelial cells. Microbiol., 146: 989-998, 2000.
- Wang, X. H., Oon, H. L., Ho, G. W. P., Wong, W. S. F., Lim, T. M. and Leung, K. Y.: Internalization and cytotoxicity are important virulence mechanism in vibrio fish epithelial cell interactions. Microbiol., 144: 2987-3002, 1998.
- Weiss, B. A. and Insel, P. A.: Intracellular Ca²⁺ and protein kinase C interact to regulate α -adrenergic- and bradykinin receptor-stimulated phospholipase A2 activation in madin-darby canine kidney cells. J. Biol. Chem., 266: 2126-2133, 1991.
- Wright, A. C., Simpson, L. M., Oliver, J. D. and Glenn-Morris, J. Jr.: Phenotypic evaluation of a capsular transposon mutants of *Vibrio anguillarum*. Inf. Immun., 58: 1769-1773, 1990.
- Yoshida, S. I., Ogawa, M. and Mizuguchi, Y.: Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. Inf. Immun., 47: 446-451, 1985.
- Zhang, X.-H. and Austin, B.: Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. J. Fish Dis., 23: 93-102, 2000.
- 권문경, 박상언, 방종득, 박수일: 넙치, *Paralichthys olivaceus*에서 병원성 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*의 분리. 한국어병 학회지, 18(3): 205-214, 2005.

Manuscript Received : January 10, 2007

Revision Accepted : January 28, 2007

Responsible Editorial Member : Joon-Ki Chung
(Pukyong Univ.)