

정지기 *Salmonella typhimurium* 세포에서 특이적으로 발현되는 세포질 단백질의 동정 및 발현조절에 대한 연구

유아영 · 김영희 · 유종언 · 김삼웅 · 백형석 · 강호영*

부산대학교 생명과학부 미생물학과

Received February 5, 2007 / Accepted February 15, 2007

Identification and Characterization of Stationary-phase Specific Cytosolic Protein in *Salmonella typhimurium*. Ah Young Yoo, Young Hee Kim, Jong Earn Yu, Sam Woong Kim, Hyung Suk Baik and Ho Young Kang. *Division of Biological Sciences, Pusan National University, Busan 609-735, Korea* – *Salmonella* is facultative intracellular pathogen that can survive and replicate in macrophages even though these cells are equipped with a plethora of anti-microbial mechanisms. To survive in this hostile intracellular environment, *Salmonella* has evolved numerous defense mechanisms. An approximately 20 kDa protein was detected as a stationary-phase specific protein band in cytosolic fraction. It was identified as a DNA binding protein in stationary phase (Dps) by analysis of MALDI-TOF assay. It has been known that Dps, the protein produced in the stationary phase of bacteria, allows DNA to form chromatin by binding to DNA nonspecifically and protects DNA from reactive oxidative species (ROS). For further study, Dps specific polyclonal antibodies were generated by injection of purified Dps protein into rabbit. To examine the influence of several regulatory proteins in the expression *dps* gene, Dps protein level in various *S. typhimurium* mutants defecting regulatory proteins were investigated by Westernblot using Dps specific polyclonal antibodies.

Key words – *Salmonella typhimurium*, stationary phase, Dps

서 론

*Salmonella*는 그람 음성균의 장내 세균으로 동물 또는 사람에게 감염하여 위염, 설사, 장티푸스열 등의 질병을 유발한다 [1]. 대표적인 intracellular pathogen의 하나인 *Salmonella*는 숙주 세포의 대표적인 면역 세포인 macrophage 내에서 살아남아 이러한 phagocyte를 매개로 숙주의 몸 전체를 이동해 가면서 전신성 감염을 일으키게 된다 [9,20]. Phagocyte는 포획한 외부 물질을 분해하기 위하여 NADPH 산화효소에 의해 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)을 생성하고, 생성된 활성산소종은 *Salmonella*의 여러 가지 세포 물질을 파괴한다. *Salmonella*는 숙주 세포 내의 극한 환경에서 살아남기 위해서 수많은 방어 기작들을 발전시켜왔다. *Salmonella*가 숙주의 phagocyte 내에서 살아남아 증식하는 것은 *Salmonella*의 독성 (virulence)에 필수적이며 [7], phagocyte의 NADPH 산화효소에 의해 생성된 HO·, O₂⁻, H₂O₂와 같은 활성산소종은 *Salmonella*에 대한 숙주의 선천적 면역에서 중요한 역할을 한다 [17,18,30]. 이것은 산화적 스트레스에 높은 감수성을 가지는 *Salmonella* 돌연변이주들이 macrophage 내에서 생존하는 능력이 감소한다는 여러 연구 결과들을 통해 잘 알려져 있다 [5,10,15,28]. 또한 활성산소종 생성을 유발하는 물질 (paraquat, H₂O₂)에 *Salmonella*를 노출시키면 단백질 발현 패턴에 변화가 나타난다. *E. coli*에서는 H₂O₂에 노출된 이후 140개의 유전자의 발현이 유도된다는 연구 결과가 있다 [21,34]. 이 유전자들은 주로 활성산소종을 감소시키거나 파괴된 물질들을 복구하는데 필요한 효소들을 암호화하고 있는 유전자들이다 [6]. 본 연구에서는 산화적 스트레스, 영양분 고갈과 같은 복합적인 스트레스가 작용하는 정지기의 *Salmonella*에서 특이적으로 발현되는 단백질에 주목하였으며, 이 단백질을 동정하고, 단백질 특이적인 항체를 제조하고 이를 이용하여 유전자의 발현에 미치는 조절자를 찾고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주, 플라스미드 및 배양 배지, 균주 배양 조건

본 연구에서 사용된 균주와 플라스미드들을 Table 1에 열거하였다. *Salmonella typhimurium* 와 *Escherichia coli*는 Luria-Bertani (LB) 액체배지 또는 1.5% agar를 첨가한 고체 배지를 사용하여 37°C에서 배양하였다 [4]. 항생제는 필요한 경우 각각의 배양 조건에 다음과 같은 농도로 첨가하였다: ampicillin, 100 µg/ml; streptomycin, 50 µg/ml.

일반적인 DNA 조작

본 연구에서 이루어진 대부분의 DNA 조작은 Sambrook 등에 의해 기술된 방법에 준하여 수행하였다 [25]. Rubidium chloride 용액에 의해 제조된 *E. coli* competent 세포들은 heat-shock 방법으로 형질전환 시켰다. 유전자 클로닝에 사

*Corresponding author

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

E-mail : hoykang@pusan.ac.kr

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

	Relevant characteristics	Reference or Source
Strains		
<i>Escherichia coli</i>		
<i>E. coli</i> DH5a	Transformation host for cloning vector, F ⁻ , Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺) <i>phoA supE44 l thi</i> ⁻¹ <i>gyrA96 relA1</i>	promega
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Host for overexpression, F <i>ompT hsdS_B</i> (r _B m _B) <i>gal dcm</i> (DE3)	promega
<i>Salmonella</i>		
<i>S. typhimurium</i> χ 3339	SL1344 <i>hisG</i> , Str ^r , wild-type	12
<i>S. typhimurium</i> χ 4659	χ 3339 derivative, <i>hisG fur::Tn10</i> , Tet ^r	Lab collection
<i>S. typhimurium</i> CK24	χ 3339 derivative, <i>hisG</i> Δ <i>dps</i>	Lab collection
<i>S. typhimurium</i> CK27	χ 3339 derivative, <i>hisG</i> Δ <i>sitA</i>	Lab collection
<i>S. typhimurium</i> CK30	χ 3339 derivative, <i>hisG</i> Δ <i>ompR</i>	Lab collection
<i>S. typhimurium</i> CK31	χ 3339 derivative, <i>hisG</i> Δ <i>cpxR</i>	Lab collection
<i>S. typhimurium</i> CK32	χ 3339 derivative, <i>hisG</i> Δ <i>rpoS</i>	Lab collection
<i>S. typhimurium</i> CK38	χ 3339 derivative, <i>hisG</i> Δ <i>lon</i>	Lab collection
<i>S. typhimurium</i> CK56	χ 3339 derivative, <i>hisG</i> Δ <i>baeR</i>	Lab collection
<i>S. typhimurium</i> CK59	χ 4659 derivative, <i>hisG fur::Tn10</i> Δ <i>rpoS</i> , Tet ^r Km ^r	Lab collection
<i>S. typhimurium</i> Δ <i>crp</i>	χ 3339 derivative, <i>hisG</i> Δ <i>crp</i>	Lab collection
<i>S. typhimurium</i> Δ <i>phoP</i>	χ 3339 derivative, <i>hisG</i> Δ <i>phoP</i>	Lab collection
Plasmids		
pGEM-T vector	Cloning vector for PCR product, ColE1ori, Ap ^r	Promega
pPROEX TM HTb	Overexpression vector Lac I ^r , ColE1ori, Ap ^r	Invitrogen
pBP128	0.5 kb <i>dps</i> DNA in pGEM-T vector, Ap ^r	This study
pBP131	0.5 kb <i>dps Bam</i> HI- <i>Hind</i> III product from pBP128 in pPROEX TM HTb, Ap ^r	This study

용하기 위한 DNA 단편을 얻기 위해서 PCR 증폭기법을 사용하였고, 이는 염색체상의 돌연변이를 확인하는데도 사용하였다.

Salmonella 세포 성분의 분석

생육 단계의 정지기까지 배양한 *S. typhimurium* 세포들을 17,000 ×g에서 5분간 원심분리하여 수거하였다. 수거한 세포들을 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 현탁한 후 French Pressure (Thermo Electron Cooperation)를 사용하여 18,000 psi에서 파쇄하였다. 파쇄된 세포물질을 27,000 ×g에서 한 시간 동안의 원심분리로 단백질을 포함하는 용해성 부분과 세포의 envelop 부분에 해당하는 비용해성 부분으로 분류하였다.

SDS-PAGE

단백질 시료들을 2× digestion buffer [20% (v/v) glycerol, 4% (w/v) SDS, 0.2% (w/v) bromophenol blue, 200 mM β -mercaptoethanol, 100 mM Tris-HCl buffer, pH 6.8]에 용해하였다[24]. 용해된 단백질 시료들을 95°C에서 5분 동안 가열한 후, 비연속적 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 의해 분리하였다. 분리된 단백질을 Coomassie brilliant blue G-250 (Sigma)을 통한 염색과 2 시간 동안의 탈색 과정을 통해 밴드로서 확인하였다.

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) assay 및 데이터베이스 분석

SDS-PAGE와 염색, 탈색 과정을 통해 목적 단백질을 확인한 후, 그 단백질을 동정하기 위해 목적 단백질이 포함된 polyacrylamide gel 부분을 잘라내어 MALDI-TOF assay system (The Applied Biosystems, Voyager-DESTR, USA)을 통해 분석하였다 (경상대학교 공동실험관). MALDI-TOF assay에서 얻어진 각 펩타이드들에 관한 정보들은 MS-FIT 프로그램의 통해 최근의 NCBI *Salmonella* 데이터베이스로부터 정보를 탐색하는데 사용되었으며, 이러한 분석을 통해 목적 단백질을 동정하였다[14].

Dps 단백질의 과발현을 위한 재조합 플라스미드의 구축

6개의 histidine (His₆) 잔기들로 표지되어진 Dps 단백질을 대량 생산하기 위해서 대장균을 활용한 인위적인 단백질 과발현 체계를 이용하였다. 단백질 발현을 위한 완전한 *dps* 유전자는 *S. typhimurium* χ 3339 염색체 DNA를 주형으로 하여 DN(*Bam*HI)과 WC(*Hind*III) primer 쌍을 사용한 PCR을 통해 0.5 kb의 DNA를 증폭한 후, 그 DNA를 pGEM-T vector (Promega)에 클로닝하여 pBP128 재조합 플라스미드를 구축하였다. pBP128로부터 얻은 0.5 kb *Bam*HI-*Hind*III DNA 단편을 단백질의 발현에 사용되는 발현 vector인 pPROEXTMHTb (Invitrogen)에 삽입하여 재조합 플라스미드 pBP131을 구축

하였다. pBP131을 가지는 *E. coli* BL21 (DE3)을 1 mM의 IPTG가 들어있는 배양 조건에서 배양하였을 경우, 과량의 Dps 단백질이 발현되는 것을 SDS-PAGE를 통해 확인하였다 [23,25].

Immunoblotting

SDS-PAGE를 통해 단백질 시료를 분리한 후, transfer 장치 (BioRad)와 Towbin's Buffer (TB) [25 mM tris, 192 mM glycine, 20% (v/v) methanol, pH 8.3]를 사용하여 polyacrylamide gel 내의 단백질들을 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell)으로 이동시켰다. Towbin 등에 의해 기술된 바와 같이 5% skim milk를 함유하는 Towbin's Saline Buffer (TBS) [0.9% NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4]에서 3 시간 동안 membrane을 blocking시킨 후, 100배 희석한 Dps 특이적인 다클론성 1차 항체와 함께 2 시간 반응시켰다 [27]. TBS로 수 회 세척한 membrane에 2차 항체인 horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit Ig (Amersham)를 5% skim milk/TBS에 1:1000의 비율로 희석하여 2 시간 동안 반응시켰다. TBS로 수 회 세척한 membrane의 Dps 단백질 밴드를 H₂O₂ (Sigma)와 4-chloro-1-naphthol (Sigma)이 포함된 용액에서 자주색의 침착물이 생성되는 것으로 확인하였다. 반응은 다량의 증류수 세척을 통해 중지시켰다.

결 과

정지기 *Salmonella*의 세포 성분 분획과 세포질 단백질의 조사

정지기의 *Salmonella*는 영양분이 고갈되고 산화적 스트레스와 철이온 스트레스를 포함한 여러가지 스트레스에 노출되며, 이러한 환경 조건에 반응하여 스스로를 보호하기 위해서 새로운 유전자 세트를 발현한다 [26]. 생육 단계의 대수증식기 및 정지기의 *Salmonella*에서 각각 발현되는 단백질들을 분석하기 위하여 wild-type인 *S. typhimurium* χ3339를 Luria-Bertani (LB) 액체배지에서 배양하였다. 생육 단계의 대수증식기 및 정지기까지 배양한 *Salmonella*에서 발현된 전체 단백질을 SDS-PAGE를 통해 확인하였다 (Fig. 1A). 대수증식기와 정지기의 *S. typhimurium*에서 발현되는 단백질 패턴을 비교를 통해 정지기에서 특이적으로 발현되는 단백질들을 확인할 수 있었으며, 그 중에서 20 kDa과 25 kDa 부위에 존재하는 두 단백질들은 생육 단계에 따라 그 발현이 주목할만한 차이를 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1A). 단백질의 세포 내 분포에 따른 미세한 분석을 위해 생육 단계의 정지기까지 배양한 *S. typhimurium* 세포 성분을 세포질과 세포막 부분으로 분획한 후 SDS-PAGE를 통해 각 부분의 단백질들을 확인하였다 (Fig. 1B). 수많은 종류의 세포질 단백질들이

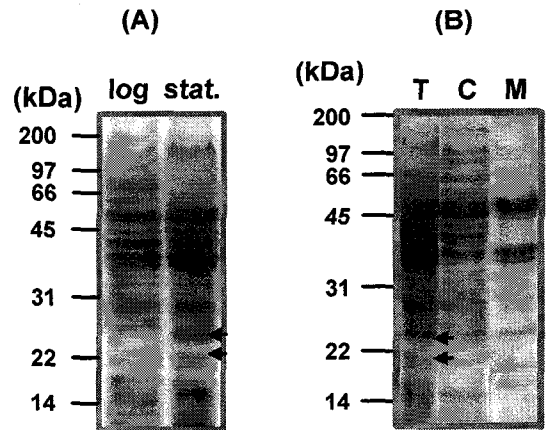


Fig. 1. Detection of proteins expressed in *Salmonella typhimurium* grown to stationary phase. *S. typhimurium* cells were cultured in LB broth to the stationary phase. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE analysis on 12% polyacrylamide gel. Proteins were visualized by Coomassie staining. (A) Proteins expressed in the *S. typhimurium* χ3339 strain grown to log- or stationary-phase. Arrows indicate the proteins expressed specifically in stationary-phase *S. typhimurium*. (B) Analyses of proteins located in different subcellular fractions. Subcellular fractions were prepared from stationary-phase *S. typhimurium* χ3339 cells by the procedures described in Material and Methods. Lanes: T, total cell lysates; C, cytoplasm; E, total envelope; O, outer membrane. Arrows indicate the position of cytosolic proteins expressed specifically in stationary-phase *S. typhimurium*.

존재하였으며 앞에서 정지기의 *S. typhimurium*에서 특이적으로 관찰되었던 약 20 kDa의 크기를 가지는 것으로 예상되는 단백질 역시 세포질 부분에 존재하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1B). 25 kDa의 단백질은 세포내 존재에 있어서 특이성이 낮았기 때문에 이후에 이에 대한 연구를 진행하기로 하고 본 연구에서 배제되었으며, 20 kDa 인자는 세포질에 특이적으로 존재했기 때문에 이 인자를 이용하여 본 연구를 실시하였다.

20 kDa의 *Salmonella* 세포질 단백질의 분리 및 동정: Dps

SDS-PAGE를 통해 확인한 20 kDa의 목적 단백질을 동정하기 위해 목적 단백질이 포함된 polyacrylamide gel 부분을 잘라내어 그 속에 포함된 단백질을 MALDI-TOF assay system을 통해 분석하였다. 이렇게 분석한 펩타이드들의 분자량 정보를 *Salmonella*를 포함한 그람 음성 세균의 데이터베이스에 탐색, 비교하였다. Trypsin에 의해 잘려진 펩타이드 중에서 탐지가능한 분자량을 가지는 펩타이드는 총 45개였다 (data not shown). 45개의 펩타이드 중에서 14개의 펩타이드

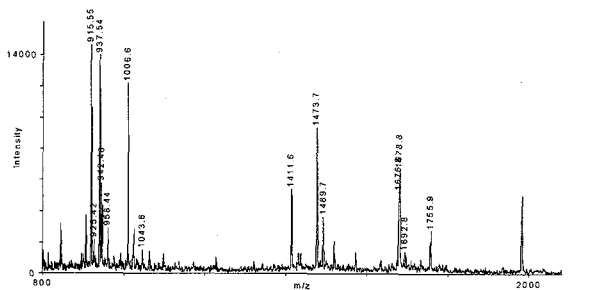
와 일치하는 아미노산 서열을 가지는 단백질은 *S. typhimurium* LT2 DNA binding protein in stationary phase (Dps) 단백질이었으며, 31%의 높은 일치도를 보이는 Dps 단백질을 동정하고자 하였던 단백질일 것이라 예측하였다 (Fig. 2). Dps는 167 개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 분자량은 18,717 Dalton으로 polyacrylamide gel 상에서 확인한 크기와 매우 유사하였다. Dps에 대한 연구는 *Salmonella*를 포함하는 그람 음성세균 뿐만 아니라 그람 양성세균 및 극한 환경에서 생존하는 호열성 세균이나 고세균에서도 활발히 진행되고 있다[11,22,32]. 다양한 균에 존재하는 Dps 단백질의 아미노산 서열의 유사도를 분석한 결과, *E. coli*, *Shigella*, *Yersinia*와 같은 장내 그람 음성세균의 Dps 단백질 아미노산 서열과는 95% 이상의 높은 일치도를 보인다 (data not shown).

Kolter 등에 의해 *E. coli*에서 정지기 동안에 세포 내에 축적되고 DNA에 비특이적으로 결합하는 Dps 단백질이 최초로 알려졌다[2]. *E. coli*의 Dps 단백질은 *in vitro*에서 정제된 DNA와 함께 결정형의 구조를 형성하며[31], 이것은 Dps 단

백질이 산화적 스트레스를 포함하는 각종 스트레스로부터 DNA를 격리하여 물리적으로 보호하는 기능을 가지는 것을 의미한다. 최근에는 Dps의 결정 구조가 철 이온을 저장하는 단백질인 ferritin과 유사하다는 것이 밝혀졌다[8,33]. 특히 Zhao 등은 Dps 단백질이 물리적인 DNA 보호 기능뿐만 아니라 Fe(II)과의 결합을 통해 활성 산소종의 형성을 막는 기능을 가진다고 제시하였다[33]. *S. enterica*의 병원성에 있어서 Dps의 역할은 아직 알려진 것이 많지 않으나 *dps* 유전자의 발현이 macrophage에 의한 섭취 이후에 유도된다는 것은 알려져 있으며[29], *dps* 유전자 결손 돌연변이주의 macrophage 내에서의 생존율이 저하되는 것으로 보아 병원성에도 기능을 할 것이라 여겨지고 있다[19].

Dps 단백질의 과발현, 정제 및 Dps 특이적인 다클론성 항체의 생산

Dps 단백질의 *Salmonella*내에서의 역할 규명 및 유전자 발현 조절에 대한 이후의 연구를 위하여 Dps 특이적인 다클론성 항체를 생산하기로 하였다. 항체를 생산하기 위해서 항원인 Dps 단백질을 대량 생산하였으며, 정제한 Dps 단백질을 토끼에 주사하였다. 토끼로부터 얻은 혈액으로부터 혈청을 분리하고 immunoblotting을 통해 Dps 단백질에 대한 다클론성 항체가 생성되었는지를 확인하였다. 항체 생산을 위한 항원인 6개의 histidine (His₆) 잔기들로 표지되어진 Dps 단백질을 대량 생산하기 위해서 대장균을 활용한 인위적인 단백질 과발현 체계를 이용하였다. 단백질 발현을 위한 완전한 *dps* 유전자를 가지는 *dps* 과발현 플라스미드 pBP131을 구축하였다 (Fig. 3A). pBP131을 가지는 *E. coli* BL21 (DE3)을 1 mM의 IPTG가 들어있는 배양 조건에서 배양하였을 경우 전체 단백질의 5%보다 많은 양을 차지하는 His₆-Dps 단백질이 발현되는 것을 SDS-PAGE를 통해 확인하였다 (Fig. 3B). 다양한 생화학적인 과정을 통해서 과량 생성된 His₆-Dps 단백질이 세포질 부분에 일부 존재하고, 대부분의 Dps 단백질은 불용성의 inclusion body를 형성하고 이들이 쉽게 가라앉는 것을 볼 수 있었다 (data not shown). 8 M urea를 통해 불용성의 Dps를 가용화하였으며, His₆-Dps 단백질은 Ni²⁺-sepharose를 이용한 친화성 정제 크로마토그래피를 통해 정제하였다. SDS-PAGE를 통해 확인한 결과 정제한 시료에는 Dps 단백질 이외에 소량의 다른 단백질이 포함되어 있었으므로 이들을 제거한 Dps 단백질을 확보하기 위해 Dps 단백질이 포함된 polyacrylamide gel 부분을 잘라내어 electro-elution법으로 Dps 단백질을 용출하였다. 용출된 단백질 용액에 포함된 SDS를 제거하기 위해 4 회의 투석을 진행하였다. 정제한 단백질의 순도는 SDS-polyacrylamide gel 상의 단일 단백질 밴드로 확인할 수 있었으며, bovine serum albumin (BSA, Sigma)를 표준 단백질로 하여 정량한 단백질의 농도는 2 µg/µl 였다 (Fig. 3B).

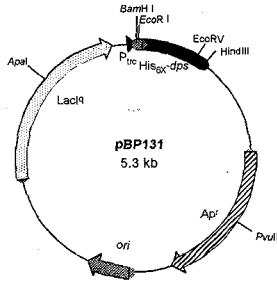
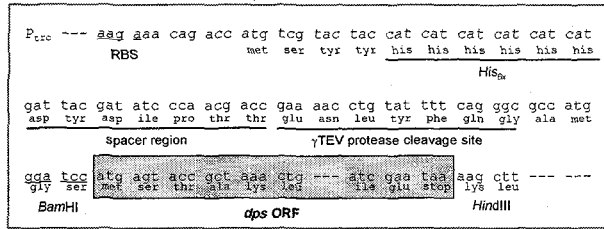


m/z Submitted	MH ⁺ Matched	Delta ppm	Start	End	Database Sequence
915.5304	915.5264	4.4	28	35	(K) <u>ATVELLNR</u> (Q)
925.3990	925.4103	-12	49	55	(K) <u>QAHWNMR</u> (G)
937.5121	937.5107	1.5	11	18	(K) <u>ASNLLYTR</u> (N)
942.4334	942.4368	-3.6	49	55	(K) <u>QAHWNMR</u> (G)
958.4595	958.4317	29	49	55	(K) <u>QAHWNMR</u> (G)
1006.5519	1006.5322	20	125	133	(R) <u>YAVVANDVR</u> (K)
1043.6196	1043.6213	-1.6	27	35	(K) <u>KATVELLNR</u> (Q)
1411.6135	1411.6341	-15	141	153	(K) <u>DEDTADIFTAASR</u> (D)

14/45 matches (31%).
 Acc. #: 16419337
 Species: SALMONELLA TYPHIMURIUM LT2
 Name: Dps, stress response DNA-binding protein; starvation induced resistance to H₂O₂
 Index: 346005
 MW: 18717 Da
 pI: 5.7

Fig. 2. Identification of the 20 kDa cytosolic protein expressed in *S. typhimurium*. Profiles obtained from MALDI-TOF analysis were presented. Mass information of peptide fragments digested by trypsin were used for data mining (shown in the middle panel) from *S. typhimurium* database (NC003197). Database-searching result was presented in the boxed panel.

(A)



(B)

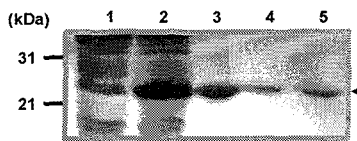


Fig. 3. Overexpression of the *dps* gene. (A) Physical map of the recombinant plasmid pBP131. The map of the pBP131 plasmid carrying a *dps* gene is presented. Regions for the Trc promoter and the His₆X-tagged in-frame fusion of *dps* in pBP131 are enlarged. (B) SDS-PAGE analysis of overexpressed Dps. The His₆-tagged Dps expression in *E. coli* BL21 (DE3) harboring pBP131 was induced by addition of 1 mM IPTG into LB cultures media. The protein was purified through Ni²⁺-sepharose affinity chromatography. The purified proteins were subjected for SDS-PAGE. Lanes: 1, *E. coli* BL21 (DE3)/pP_{ROEX}TMHTb vector control; 2, *E. coli* BL21 (DE3)/pBP131; 3, 5 µl of protein sample purified through Ni²⁺-sepharose affinity chromatography; 4 and 5, 5 and 10 µg of electroeluted protein, respectively.

Dps 특이적인 다클론성 항체의 생산에는 New Zealand White (NZW) 토끼를 이용하였다. 1차 항원 주입을 하기 전에 토끼로부터 혈액을 얻었으며 이것은 이후 음성 대조구로 사용하였다 (data not shown). 약 500 µg에 해당하는 정제 Dps 단백질을 동량 (v:v)의 complete Freund's adjuvant (Sigma)와 잘 혼합하고 여과하여 1차 면역의 항원으로 사용하였다. 준비한 항원은 NZW 토끼 몸의 각기 다른 부위에 3~4회로 나누어 피하 주사하였다. 1차 면역 후 3주가 지난 후에 토끼 귀의 정맥으로부터 혈액을 얻었으며, 동시에 1차

면역 때와 같은 양의 항원을 incomplete Freund's adjuvant (Sigma)와 혼합하여 같은 방법으로 피하 주사하였다. 토끼로부터 얻은 혈액을 2000 rpm에서 5 분 동안 원심분리하여 혈구 성분을 제거하고, Dps 특이적인 항체가 포함되어 있는 상등액인 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 항체 생성을 확인하기 위한 immunoblotting의 1차 항체로 사용되었다. Immunoblotting 결과, 한 번의 Dps 단백질 주입만으로도 매우 많은 양의 항체가 생성되었음을 확인하였으며, 이는 Dps 단백질이 매우 높은 항원성을 가지고 있다는 것을 의미한다 (data not shown). 충분한 양의 항체가 생성되었음을 확인한 후, 토끼를 해부하여 다량의 혈액을 확보하였다. Dps 특이적인 항체의 대략적인 농도를 알기 위해서 각각 다른 비율로 희석한 1차 항체 (토끼로부터 얻은 최종 혈액으로부터 분리한 혈청)를 같은 양의 Dps 단백질에 같은 조건으로 처리하여 immunoblotting을 수행한 결과, 혈청을 1:1000 (v:v)으로 희석한 경우에도 검출이 가능한 면역 활성을 가진다는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

Dps의 발현에 있어서 다양한 조절자들의 역할에 관한 연구

제조한 Dps 특이적인 다클론성 항체를 이용하여 Dps 단백질의 발현 조절에 작용하는 조절자를 알고자 하였다. *dps* 유전자의 발현조절에는 여러 가지 조절자가 작용하는 것으로 알려져 있다. 정지기의 *S. typhimurium* 세포는 RNA 중합효소의 한 부분인 sigma factor로서 σ^{70} 대신 σ^S (sigma S, RpoS)를 가지는데, RpoS가 *dps* 유전자의 -10 영역을 인지하여 전사를 유도하게 된다[16]. 또한 *S. typhimurium*의 *dps* 유전자 프로모터 영역에는 잘 알려진 IHF 결합 영역이 존재하고, IHF의 결합에 의해 유전자의 발현이 조절되는 것으로 알려져 있다. 한편 *E. coli*의 *dps* 프로모터 영역에는 OxyR 결합 영역과 CRP 결합영역이 존재한다[3,13]. *E. coli*와 *S. typhimurium*의 *dps* 유전자 전체와 추정 프로모터 영역의 염기서열을 CLUSTAL W (v.1.83) Multiple Sequence Alignments 프로

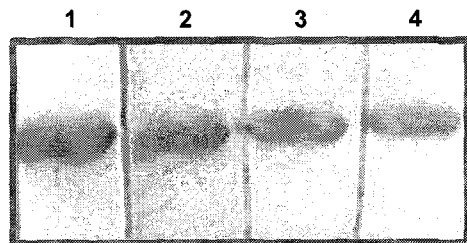


Fig. 4. The confirmation of produced polyclonal antibody. To confirm the production of Dps-specific antibody, 5 µg of purified Dps was subjected to immunoblot analysis as described in Material and Methods with rabbit sera (obtained from the 2nd immunization of Dps) diluted to the different ratio. Lanes: 1, diluted to 1:100 (v:v); 2, 1:200 (v:v); 3, 1:500 (v:v); 4, 1:1000 (v:v).

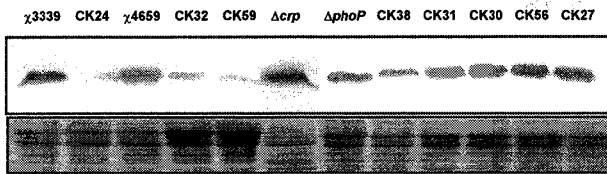


Fig. 5. Immunoblot analyses for the detection of Dps in various regulatory mutant strains of *Salmonella*. *Salmonella* strains were cultured in LB broth to stationary phase. Collected cells were subjected to immunoblot analyses with Dps specific antibody. *S. typhimurium* Strains: χ 3339, wild-type; CK24, *dps* deletion mutant, χ 4659, *fur* mutant; CK32, *rpoS* deletion mutant; CK59, *fur* and Δ *rpoS* double mutant; Δ *crp*, *crp* deletion mutant; Δ *phoP*, *phoP* deletion mutant; CK38, *lon* deletion mutant; CK31, *cpxR* deletion mutant; CK30, *ompR* deletion mutant; CK56, *baeR* deletion mutant; CK27, *sitA* deletion mutant.

그램을 통해 비교한 결과 두 염기서열은 높은 일치도를 보이는 것으로 나타났다 (data not shown). 위에서 언급한 조절자 이외에 Dps 단백질의 발현에 영향을 미치는 새로운 조절자를 알기 위하여 생육 단계의 정지기까지 배양한 다양한 종류의 *S. typhimurium* 돌연변이주들에서 발현되는 Dps 단백질의 양을 비교하였다 (Fig. 5). *dps* 유전자 결손 돌연변이주인 CK24에서 Dps 단백질 밴드를 확인할 수 없었으며 이를 통해 토끼로부터 생성한 항체가 *S. typhimurium*의 Dps 특이적인 항체임을 확인할 수 있었다. Dps 단백질의 발현은 이미 알려진 양성적 조절자인 *rpoS* 유전자가 결손된 균주 (CK32)에서 현저히 낮은 정도를 보였으며, 철 조절에 관여하는 *fur* 유전자가 기능을 하지 못하는 균주 (χ 4659)에서 약간 낮은 정도를 보이는 것을 확인할 수 있었으며, 이에 대한 정확한 연구가 필요할 것이라 생각된다. 일반적으로 유전자 발현의 활성화로서 작용하는 것으로 알려진 CRP 단백질이 결여된 균주에서는 오히려 Dps 단백질의 발현이 약간 증가한 것을 확인할 수 있었는데, 이는 *S. typhimurium*에서 전반적인 유전자의 조절에 영향을 미치는 CRP 단백질의 부재로 인한 2차적인 영향일 것이라는 판단을 할 수 있었으며, 자세한 분석이 이루어져야 할 것이다. 또한 ATP-의존적인 protease로서 번역후의 단계에서 단백질의 발현을 조절하는 것으로 잘 알려진 Lon 단백질이 결손된 균주에서 Dps 단백질의 양이 약간 감소하는 것으로 보아 Lon 단백질 역시 Dps 단백질의 발현에 기능을 할 수도 있을 것이라는 예상을 할 수 있었으며 면밀한 분석이 이루어져야 한다.

요 약

*Salmonella*는 대표적인 intracellular pathogen으로 숙주의 면역 세포인 macrophage 내에서 살아남아 이들을 매개로 숙

주의 몸 전체를 이동해 가면서 전신성 감염을 일으킨다. 살모넬라는 숙주 세포 내부의 이러한 극한 환경을 극복하기 위해서 다양한 방어 기작을 가진다. 본 연구에서는 복합적인 스트레스가 작용하는 정지기 *Salmonella*에서 특이적으로 발현되는 단백질에 주목하였다. 정지기 상태의 *Salmonella*에서 약 20 kDa의 단백질이 특이적으로 많이 발현되었으며, 세포질 분획을 통해 이 단백질이 세포질 부분에 존재함을 알 수 있었다. MALDI-TOF 분석을 통해 이 단백질이 DNA binding protein in stationary phase (Dps) 단백질임을 확인하였다. Dps 단백질은 스트레스가 주어진 상황에서 DNA에 비특이적으로 결합하여 DNA가 안정한 형태를 유지하도록 하여 스트레스로부터 염색체를 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이후의 연구를 위하여 과발현하여 정제한 Dps 단백질을 토끼에 주사하여 Dps 특이적인 항체를 제조하였다. *dps* 발현에 영향을 미치는 조절자 단백질을 알기 위하여 다양한 *S. typhimurium* 돌연변이주들 내에서의 Dps 단백질양을 조사하였다.

감사의 글

본 연구는 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)의 지원으로 이루어짐.

참 고 문 헌

1. Abigail A. S. and D. D. Whitt. 2002. *Salmonella* Species, pp. 381-397. In Abigail A. Salyers and Dixie D. Whitt (ed.), *Bacterial pathogenesis: A molecular approach*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Almiron, M., A. J. Link, D. Furlong and R. Kolter. 1992. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **6**, 2646-2654.
3. Altuvia, S., M. Almiron, G. Huisman, R. Kolter and G. Storz. 1994. The *dps* promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and sigma S in stationary phase. *Mol. Microbiol.* **13**, 265-272.
4. Bertani, G. 1951. Studies on lysogeny. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**, 293-300.
5. Buchmeier, N. A., C. J. Lipps, M. Y. So and F. Heffron. 1993. Recombination-deficient mutants of *Salmonella typhimurium* are avirulent and sensitive to the oxidative burst of macrophages. *Mol. Microbiol.* **7**, 933-936.
6. Farr, S. B. and T. Kogoma. 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* **55**, 561-585.
7. Fields, P. I., V. Swanson, C. G. Haidaris and F. Heffron. 1986. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 5189-5193.

8. Grant, R. A., D. J. Filman, S. E. Finkel, R. Kolter and J. M. Hogle. 1998. The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 294-303.
9. Groisman E. A. and H. Ochman. 1997. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol.* **5**, 343 - 349.
10. Groote, M. A., U. A. Ochsner, M. U. Shiloh, C. Hathan, J. M. McCord, M. C. Dinauer, S. J. Libby, A. Vazquez-Torres, Y. Xu and F. C. Fang. 1997. Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 13997-14001.
11. Grove, A. and S. P. Willinson. 2005. Differential DNA binding and protection by dimeric and dodecameric forms of the ferritin homolog Dps from *Deinococcus radiodurans*. *J. Mol. Biol.* **347**, 495-508.
12. Gulig, P. A. and R. Curtiss III. 1987. Plasmid-associated virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **55**, 2891-2901.
13. Jeong, K. C., D. J. Baumler and C. W. Kaspar. 2006. *dps* expression in *Escherichia coli* O157:H7 requires an extended -10 region and is affected by the cAMP receptor protein. *Biochim. Biophys. Acta.* **1759**, 51-59.
14. Lai, E. M., U. Nair, N. D. Phadke and J. R. Maddock. 2004. Proteomic screening and identification of differentially distributed membrane proteins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **52**, 1029-1044.
15. Libby, S. J., W. Goebel, A. Ludwig, N. Buchmeier, F. C. Fang, D. G. Guiney, J. G. Songer and F. Heffron. 1994. A cytolysin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 489-493.
16. Loewen P. C., B. Hu, J. Strutinsky and R. Sparling. 1998. Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **44**, 707-17.
17. Mastroeni, P., A. Vazquez-Torres, F. C. Fang, Y. Xu, S. Khan, C. E. Hormaeche and G. Gougan. 2000. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. II. Effects on microbial proliferation and host survival in vivo. *J. Exp. Med.* **192**, 237-248.
18. Miller, R. A. and B. E. Britigan. 1997. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clinic. Microbiol. Rev.* **10**, 1-18.
19. Nair, S. and S. E. Finkel. 2004. Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. *J. Bacteriol.* **186**, 4192-4198.
20. Parry C. M., T. T. Hien, G. Dougan, N. J. White and J. J. Farrar. 2002. Typhoid fever. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1770 - 1782.
21. Pomposiello, P. J., M. H. Bennik and B. Demple. 2001. Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. *J. Bacteriol.* **183**, 3890-3902.
22. Reindel S., C. L. Schmidt, S. Anemuller and B. F. Matzanke. 2005. Expression and regulation pattern of ferritin-like DpsA in the Archaeon *Halobacterium salinarum*. *BioMetals.* **18**, 387-397.
23. Roschenthaler, R., P. Kindler, P. Herrlich and J. Igbokwe. 1970. The action of nitrofurantoin: inhibition of growth of *Escherichia coli* K 12 and of IPTG-induced beta-galactosidase synthesis. *Zentralbl. Bakteriol.* **215**, 203-11.
24. Sambrook, J. and David W. Russel. 2001. Molecular Cloning a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
25. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
26. Spector, M. P. The starvation-stress response (SSR) of *Salmonella*. *Adv. Microb. Physiol.* **40**, 233-279.
27. Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 4350-4354.
28. Tsolis, R. M., A. J. Baumler and F. Heffron. 1995. Role of *Salmonella typhimurium* Mn-superoxide dismutase (SodA) in protection against early killing by J774 macrophages. *Infect. Immun.* **63**, 1739-1744.
29. Valdivia, R. H. and S. Falkow. 1996. Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. *Mol. Microbiol.* **22**, 367-378.
30. Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, P. Mastroeni, H. Ischiropoulos and F. C. Fang. 2000. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *J. Exp. Med.* **192**, 227-236.
31. Wolf, S. G., D. Frenkiel, T. Arad, S. E. Finkel, R. Kolter and A. Minsky. 1999. DNA protection by stress-induced biocrystallization. *Nature.* **400**, 83-85.
32. Zeth, K., S. Offermann, L. O. Essen and D. Oesterhelt. 2004. Iron-oxo clusters biomining on protein surfaces: Structural analysis of *Halobacterium salinarum* DpsA in its low- and high-iron states. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 13780-13785.
33. Zhao, G., P. Ceci, A. Ilari, L. Giangiacomo, T. M. Laue, E. Chiancone and N. D. Chasteen. 2002. Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 27689-27696.
34. Zheng M., X. Wang, L. J. Templeton, D. R. Smulski, R. A. LaRossa and G. Storz. 2001. DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* **183**, 4562-4570.