

DNA Microarray를 이용한 *Deinococcus radiodurans*의 구리이온 특이 반응 유전자 탐색 및 특성 분석

조민호 · 임상용 · 정선옥 · 송두섭 · 최영지 · 김동호*

한국원자력연구원 방사선생명공학연구부

대표적인 방사선저항성 미생물인 *Deinococcus radiodurans*의 구리이온(CuCl_2 , 250 μM)에 대한 발현체 분석을 DNA microarray를 이용하여 수행하였다. 총 3,187개의 open reading frame 중 70개의 유전자 발현이 2배 이상 증가(64개) 또는 감소(6개)하였다. 이들 중 흥미롭게도 철이온 흡수 관련 유전자들로 추정되는 두 개 operon (DRB0014-DRB0017과 DRB0121-DRB0125)의 발현이 가장 높게 증가하였다. 두 operon의 첫 번째 유전자인 DRB0014와 DRB0125의 발현을 실시간 정량 PCR을 이용하여 분석한 결과, 두 유전자 모두 구리이온(CuCl_2 , 250 μM) 또는 철이온 킬레이트화합물(2,2'-dipyridyl, 250 μM)을 첨가하였을 경우 발현이 10배 이상 증가하였으나 철이온(FeCl_3 , 250 μM) 또는 구리이온 킬레이트화합물(bathocuproine disulphonate, 250 μM)이 존재할 때에는 발현이 변화하지 않았다. 따라서 *D. radiodurans*의 구리 대사는 철 흡수 시스템과 관련이 있는 것으로 추정된다. 그러나 DRB0014와 DRB0125의 변이는 *D. radiodurans*의 구리 저항성 및 방사선 저항성에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다.

Key words □ copper, *Deinococcus radiodurans*, iron, microarray

구리는 진핵생물과 원핵생물 모두에게 필요한 미량원소이며, Cu-Zn superoxide dismutase, cytochrome c oxidase, lysyl oxidase, tyrosinase 등과 같은 다양한 효소의 보조인자 역할을 한다(17). 그러나 세포 내 과량 존재할 경우 hydroxyl radical과 같은 활성 산소 종을 형성하여 세포손상 심지어는 세포의 사멸까지도 야기할 수 있는 세포독성 또한 갖고 있다(7). 따라서 생물체는 구리로 인한 세포손상을 억제하기 위해서는 적절한 세포 내 구리 농도를 유지하는 것이 필수적이다.

원핵생물은 구리이온의 항상성을 유지하기 위해 다양한 기작을 발전시켜 왔다. 그람음성 세균의 경우 세포 내의 구리이온을 능동적으로 세포 외부로 배출시키는 메커니즘이 많이 알려져 있다(12, 20). *Enterococcus hirae*는 *cop* operon 내에 두 개의 P-type ATPase인 CopA와 CopB 그리고 두 종류의 조절유전자인 CopY와 CopZ를 이용하여 세포 내 구리 농도를 제어하고 있다(15, 22). CopA는 구리흡수를 하는 반면 CopB는 Cu(I)/Ag(I) 배출펌프 역할을 한다. CopY와 CopZ는 각각 *cop* operon 발현을 억제 또는 활성화시키는 조절 단백질로 작용한다(14, 15). *Pseudomonas syringae*의 구리 저항성은 주변세포질에 위치한 구리 격리 단백질인 CopA와 CopC 그리고 세포외막 단백질인 CopB에 의해서 이루어진다(2). *Escherichia coli*의 구리 항상성은 구리 배출을 담당하는 P-type ATPase인 CopA와 multicopper oxidase인 YacK 그리고 *cusCFBA* 유전자 산물에 의해 이루어지

며, 조절 단백질인 CueR은 *copA*와 *yacK*의 발현을 제어하여 세포 내 구리이온의 항상성을 유지한다(6, 16, 19).

진핵생물 중에는 *Saccharomyces cerevisiae*의 구리 항상성이 많이 연구되고 있는데, *S. cerevisiae*의 구리대사는 철 이용능과 밀접한 관련을 갖고 있는 특성을 가지고 있다(24). 구리와 철은 세포 내로 흡수되기 전 세포표면의 Fe(III)/Cu(II) reductase인 Fre1p/Fre2p에 의해 환원된다(5). 환원된 구리이온(Cu^+)은 구리와 친화력이 높은 수송단백질인 Ctr1과 Ctr3을 통해 세포 내로 이동되며, 구리 흡수체계는 구리를 감지하는 조절단백질인 Mac1p에 의해 전사수준에서 조절된다(3, 27). 세포 내로 수송된 구리이온은 목적단백질로 이동되기 전 구리 chaperone과 결합한다. 대표적인 구리 chaperone 중 하나인 Atx1p는 구리이온을 골지체의 Ccc2p ATPase에 전달하여 cuproenzyme인 Fet3p와 Fet5p에 결합시킨다(18). 이들 paralogous 단백질들은 multicopper oxidase이면서 ferrous oxidase 활성도 갖고 있으며, 각각 Ftr1p 그리고 Fth1p와 결합하여 철과 친화력이 높은 수송체를 형성한다(23).

*D. radiodurans*는 적색소를 생산하고, 비병원성인 그람양성 절대호기성 세균이다. 또한 이온화 방사선, 자외선, 그리고 과산화수소 등 다양한 DNA 손상물질에 강한 저항성을 갖고 있는 polyextremophile이다(13). 심각한 DNA 손상을 정교하고 효과적으로 수선하며, 특히 이온화 방사선에 대한 저항성은 이 미생물의 대표적인 독특한 표현형이다. 전체 유전체 서열은 1999년에 밝혀졌으며(25), 최근 이를 활용하여 발현체 분석연구가 활발히 진행 중에 있다. *D. radiodurans*에 대한 연구는 방사선 저항성 및 DNA 복구 메커니즘과 관련하여 활발히 연구가 진행되고 있

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-63-570-3140, Fax: 82-63-570-3149
E-mail: fungikim@kaeri.re.kr

으나 반응성 산소 종을 유발하는 구리와 같은 전이 금속이온에 대한 연구는 아직 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는, *D. radiodurans*의 구리에 대한 항상성 및 저항성 연구를 위해 발현체 분석을 하였고, 일부 유전자의 기능을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주, 배지, 시약 및 생장조건

D. radiodurans R1 균주(ATCC13939^T)는 American Type Culture Collection (USA)에서 구입하였다. 배지는 TGY 배지(0.5% tryptone, 0.3% yeast extract, 0.1% glucose)를 이용하였으며, 필요에 따라 한천(1.5%) 및 chloramphenicol (3 µg/ml)을 첨가하여 30°C에서 배양하였다. 액체 배양시 세포농도는 분광광도계(Beckman Coulter, USA)를 이용하여 600 nm에서 측정하였다. 유전자 조작을 위한 *Escherichia coli* 균주는 Promega 사(USA)의 JM109를 사용하였다. 배양은 Luria-Bertani 배지(Difco, USA)를 사용하였으며, 필요에 따라 한천(1.5%), ampicillin (100 µg/ml), isopropyl-β-D-1-thiogalactoside (0.5 mM), 그리고 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (80 µg/ml)을 첨가하였다. 대장균의 형질전환은 일반적인 CaCl₂ 방법으로 하였다(22). 실험에 사용된 모든 화학물질은 Sigma and Aldrich chemical company (USA)의 제품을 사용하였다.

DNA microarray 제작

본 연구에 사용된 DNA microarray는 반도체 기술을 기반으로 실리콘 wafer를 이용하여 slide 위에서 probe를 합성한 CustomArray™ 12K Microarray로, CombiMatrix 사(USA)에 의뢰하여 제작하였다. Microarray slide는 *D. radiodurans*의 3,187 ORF (open reading frame)를 대상으로 만들어졌으며, slide 상에는 각 ORF 별로 4개의 서로 다른 서열의 oligonucleotide probe가 집적되어있다.

RNA 추출, cDNA 합성, hybridization 및 결과 분석

TGY 한천배지에서 자란 *D. radiodurans* R1 단일 집락을 5 ml의 TGY 액체 배지에 접종하여 24시간 동안 진탕(200 rpm)배양하였다. 배양액을 100 ml의 TGY 액체 배지에 희석(1/100)하여 대수증식기(OD₆₀₀≈1.0)가 될 때까지 본 배양하였다. 본 배양액을 다시 50 ml씩 나누어 실험군에는 250 µM의 CuCl₂를 처리하고 30분 동안 진탕 배양하였다. 세포는 4°C 4,000×g에서 10분 동안 원심 분리하여 회수하였다. RNA는 TriZol-reagent (Invitrogen, USA)을 사용하여 추출하였고, RNeasy Mini Kit (QIAGEN, USA)와 RNase-Free DNase I set (QIAGEN)를 이용하여 정제하였다. 정제된 RNA는 정성 및 정량 분석을 하여 (2100 Bioanalyzer, Agilent Biotechnologies, USA) 16S/23S rRNA의 integrity가 1.6 이상인 것을 사용하여 cDNA 합성을 진행하였다. 정제된 10 µg의 RNA와 Amino Alkyl MessageAmp™ aRNA Kit (Ambion Inc., USA)를 이용하여 Cy5로 표지된 cDNA를 제조하였다. Hybridization은 CombiMatrix사에서 제공하는 사용법(http://www.combimatrix.com/support_docs.htm)에

따라 Fisher Scientific 사(USA)의 Isotemp hybridization incubator를 이용하여 45°C에서 18시간 동안 진행하였다. Microarray의 image는 GenePix 4000B Array Scanner (Axon Instruments, USA)를 이용하여 16 bit TIFF 형식으로 생성하였다. 본 이미지를 토대로 GenePix 6.0 software (Axon Instruments)를 사용하여 signal intensity를 획득하였고, 표준화 및 통계학적 분석은 Genespring software package (Agilent, USA)를 이용하여 진행하였다. Microarray 실험은 서로 다른 두 개의 시료를 이용하여 반복 실험 하였다.

실시간 정량 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)

대수증식기(OD₆₀₀≈1.0)까지 자란 본 배양액에 CuCl₂ (250 µM), CdCl₂ (50 µM), ZnCl₂ (250 µM), NiCl₂ (250 µM), FeCl₃ (250 µM), bathocuproine disulphonate (250 µM, BCS), 그리고 2, 2'-dipyridyl (250 µM, Dip)을 각각 첨가하여 30분 동안 배양하였다. 세포는 4°C 4,000×g에서 10분 동안 원심 분리하여 회수하였으며, microarray 실험과 동일한 방법으로 RNA를 추출하였다. cDNA는 Maxime RT Premix Kit (Intron Biotechnology, Korea)를 사용하여 제작회사의 매뉴얼에 따라 합성하였다. qRT-PCR 반응용액은 SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa, Japan)을 사용하여 제작회사의 매뉴얼에 따라서 준비하였고, 7300 Real time PCR system (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 95°C에서 15초간 denaturation, 55°C에서 15초간 annealing, 72°C에서 15초간 extension 과정을 40회 반복하였다. SYBR Green의 형광신호는 PCR cycle 중 신장반응이 종료된 후 매번 측정하였다. PCR 산물의 정량지표인 형광도가 직선적으로 증가하는 성질을 보이는 증폭 초기에 기본 형광도(horizontal line)를 넘어서는 PCR cycle의 횟수를 "Threshold cycle (Ct)"이라고 한다(26). 본 실험에서도 Ct값을 이용하여 유전자의 발현 변화를 측정하였고 샘플양의 변이를 보정해 주는 reference 유전자로는 DR1343 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, gap)을 사용하였다. PCR 반응 종료 후 증폭된 PCR 산물이 목적한 DNA 단편인지 알아보기 위하여 60°C에서 99°C에서 초당 0.2°C씩 온도를 상승시키며 증폭된 PCR 산물의 용해곡선을 측정하여 확인하였다. 실험에 이용된 primer 서열은 Table 1에 기술하였다.

돌연변이균주 제작

돌연변이균주는 Funayama 등(4)의 방법을 참고하여 제작하였다. DRB0014의 상위지역(~1.1 kb)은 DRB0014-UF와 *SnaI* 인식 염기서열을 가지도록 변이된 DRB0014-UR primer를 이용하여 증폭하였고 하위지역(~1 kb)은 *SnaI* 인식 염기서열을 가진 DRB0014-DF와 정상적 염기서열을 가진 DRB0014-DR primer로 증폭하였다(Table 1). 이후 증폭된 두 종류의 PCR 산물을 주형으로하고 DRB0014-UF와 DRB0014-DR primer를 사용하여 DRB0014 내부에 *SnaI* 인식 염기서열이 도입된 약 2.1 kb의 PCR 산물을 획득하였다. 이 PCR 산물을 pCR4-TOPO4 (Invitrogen)에 클로닝하여 pDMT-DRB0014를 제작하였다. Chloramphenicol 저항성 유전자(*cat*)를 포함한 약 0.9 kb 크기의 *HincII* 절편을

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers used in this study.

| Primer | Sequence (5' → 3') |
|--------------------------------|---|
| Construction of DRB0014 mutant | |
| DRB0014-UF | CGAGGCTCAGACCATAAG |
| DRB0014-UR ^a | GCGAATCGAGITGTCCACAGGCCTAGTCTTCTGCTTGCCCAG |
| DRB0014-DF ^a | CTGGGCAAGCAGAAGACTAGGCCTGTGGACAACTCGATTTCGC |
| DRB0014-DR | CTAGCACCAGCAATGCTG |
| DRB0014-C | GTCAGCACATCCAGCTTCAG |
| Construction of DRB0125 mutant | |
| DRB0125-F | CATTTACCTTGTCCAGCAG |
| DRB0125-R | TGTTACGGTGTCTTAGCAAC |
| DRB0125-C | ATCGCTGAACAGCTGGCGC |
| Quantitative real time PCR | |
| DRB0014-F | GGCTTTTCTGTCCACGTT |
| DRB0014-R | CCAGGCGGTAGATCATT |
| DRB0125-F | TGGTGGCTTTGGTGTTC |
| DRB0125-R | GGCGGTGTGTTC |
| DR1343-F | GTGGAGIACGACGAAAGCAG |
| DR1343-R | GTGGATTTCGATCACGATGTC |

^a *Sst*I sites are underlined.

pKatCAT (13)으로부터 분리한 후, 이를 *Sst*I로 처리한 pDMT-DRB0014에 삽입하여 DRB0014 유전자 사이에 *cat* 유전자가 삽입된 pDMT-CAT-DRB0014를 제작하였다. DRB0014-UF와 DRB0014-DR primer를 사용하여 pDMT-CAT-DRB0014로부터 DRB0014 변이용 PCR 산물(disruption cassette, DRB0014::cat)을 획득하였고, 이를 *D. radiodurans* R1 균주에 형질전환하여 chloramphenicol 저항성 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 DRB0014-C/DRB0014-DR primer set로 diagnostic PCR을 통하여 돌연변이 형성을 확인하였다. DRB0125 유전자를 변이시키기 위하여 DRB0125를 포함하는 약 1.6 kb의 서열을 DRB0125-F/DRB0125-R primer set로 이용하여 PCR 증폭하였고, 이를 pCR4-TOPO4 (Invitrogen)에 클로닝하여 pDMT-DRB0125를 제작하였다. pDMT-DRB0125를 *Nru*I로 처리하고 pKatCAT의 *Hinc*II 단편(*cat*)을 삽입하여 pDMT-CAT-DRB0125를 제작하였다. 이후 방법은 사용된 primer를 제외하고는 위와 동일하게 수행하였다. 실험에 사용된 primer 서열은 Table 1에 기술하였다. 산물의 정제는 QIAquick MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN)를 사용하였고, plasmid 추출은 alkaline lysis 방법(21)을 이용하였다. 염색체 DNA는 100% 에탄올을 처리하여 세포외막을 제거한 후 DNeasy Tissue Kit (QIAGEN)을 이용하여 추출하였다.

구리 및 방사선 저항성 측정

D. radiodurans 야생형의 구리 저항성은 대수증식기(OD₆₀₀ ≈ 1.0)까지 성장한 세포에 0.5 mM에서 5 mM의 CuCl₂를 첨가하여 2, 4, 6시간 마다 배양액 10 μl를 회수하여 회석한 뒤 TGY

한천배지에 배양하고 72시간 후 세포의 수를 계수하여 구리 저항성을 측정하였다. 돌연변이 균주의 구리 저항성은 대수증식기(OD₆₀₀ ≈ 1.0)까지 성장한 본 배양액에 CuCl₂ (3 mM)을 첨가한 후 위와 동일한 방법으로 측정하였다. 방사선 조사는 한국원자력 연구원의 선원 300 kCi, Co-60 감마선 조사 시설(AECL, IR-79, Nordion)을 이용하여 실시하였다. 감마선 조사는 대수증식기(OD₆₀₀ ≈ 1.0)까지 성장한 세포를 회수하여 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 세척하여 4°C에서 분당 70 Gy 선량율로 각각 3, 6, 9, 12, 15 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였으며, 총 흡수선량의 오차는 ±5% 이내가 되도록 하였다. 이 때 흡수선량의 측정은 5-mm-diameter alanine dosimeter (Bruker Instruments, Germany)로 측정하였다. 방사선 조사 후 세포를 회석한 뒤 TGY 한천배지에 배양하고 72시간 후 세포의 수를 계수하여 저항성을 측정하였다.

결과 및 고찰

구리 처리에 따른 발현체 분석

세포의 성장에 영향을 주지 않는 구리 농도를 결정하기 위해 0.5 mM에서 5 mM의 구리 농도에서 *D. radiodurans*의 저항성을 측정하였다(Fig. 1). *D. radiodurans*는 1 mM의 농도에서부터 성장에 영향을 받기 시작했으며, 3 mM 농도에서는 시간에 따라 점진적으로 세포의 수가 감소하였고, 5 mM 농도에서는 4시간 배양 후 완전히 사멸하였다. 따라서 본 연구에서는 대수증식기까지 자란 *D. radiodurans*의 배양액에 250 μM의 CuCl₂를 30분 동

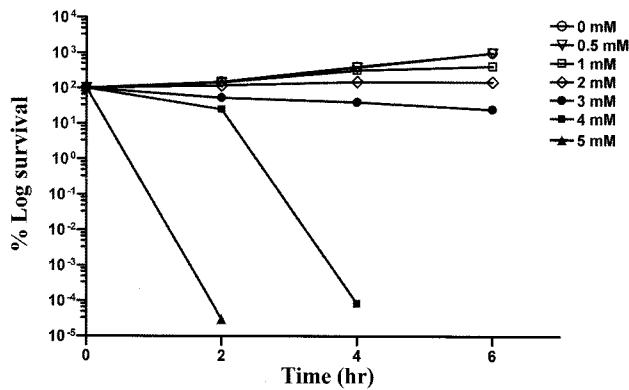


Fig. 1. Copper resistance response of *D. radiodurans*. Cells were grown up to mid-exponential phase and copper chloride was added. The value of 100% survival represents 1×10^8 to 3×10^8 cells/ml. The viable counts were taken at 0, 2, 4, and 6 hr after copper treatment. The data represent the means of triplicate experiments with variations ranging less than 50% of the stated percent log survival value.

안 처리하여 구리이온 반응 발현체를 분석하였다.

분석 결과 통계적으로 의미가 있게 발현이 변화된 70개의 유전자 중 64개는 발현이 2배 이상 증가하였으며 6개는 2배 이상 감소하였다. Ribosomal 단백질, chaperonin, ribonucleotide reductase, alcohol dehydrogenase 등 6개의 유전자의 발현이 감소한 반면에 트립토판 생합성, 세포대사, 조절 단백질, 그리고 수송단백질 등 다양한 범주에 속하는 유전자들의 발현이 2배 이상 증가 하였으나 발현이 증가된 64개의 유전자 중 대부분의 유전자(34개)는 아직 기능이 밝혀지지 않은 hypothetical protein이었다(Table 2). 기대와 달리 진행생물의 구리 chaperon인 Cox17의 ortholog로 추정되는 DR1885의 유전자 발현은 변화하지 않았으나(1), 철 흡수 및 이용에 관여하는 것으로 추정되는 두 개의 operon (DRB0014~DRB0017, DRB0125~DRB0121)의 발현이 높게 증가 하는 것을 확인할 수 있었다(Table 2 and Fig. 2A) (10).

최근 *Deinococcus* 속에서 두 번째로 전체 염기서열이 밝혀진 *D. geothermalis*의 경우 게놈 상에 구리 저항성과 관련된 *copC*

Table 2. *D. radiodurans* genes regulated by more than two-fold after copper shock for 30 min

| Gene | Fold change (>2) | | Gene description |
|--|------------------|------------|---------------------------------------|
| | Induction | Repression | |
| Amino acid biosynthesis | | | |
| <i>trpG</i> | 2.1 | | anthranilate synthase component II |
| <i>trpE-2</i> | 2.0 | | anthranilate synthase component I |
| Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers | | | |
| <i>ribE</i> | 2.0 | | riboflavin synthase subunit alpha |
| Cell envelope | | | |
| <i>treY</i> | 2.1 | | maltooligosyl trehalose synthase |
| Cellular process | | | |
| <i>bacA</i> | 2.1 | | bacitracin resistance protein |
| DR0415 | 2.5 | | carboxyl esterase, |
| <i>ftsH-1</i> | 2.2 | | cell division protein FtsH |
| DR1330 | 2.1 | | antibiotic biosynthesis protein |
| DRA0352 | 2.1 | | methyl-accepting chemotaxis protein |
| Central intermediary metabolism | | | |
| <i>nspC</i> | 2.5 | | carboxy norspermidine decarboxylase |
| DRA0203 | 2.0 | | oxidoreductase |
| DRA0224 | 2.1 | | homoprotocatechuate 2' 3-dioxygenase |
| DR2279 | | 2.2 | alcohol dehydrogenase |
| DNA metabolism | | | |
| DR2356 | 2.2 | | MutT/nudix family protein |
| DRB0107 | | 2.2 | ribonucleotide reductase; NrdI family |
| Energy metabolism | | | |
| DR0702 | | 2.2 | v-type ATP synthase; D subunit |
| Protein fate | | | |
| DR1536 | 2.0 | | serine protease; subtilase family |
| <i>groES</i> | | 2.1 | chaperonin |
| Protein synthesis | | | |
| <i>prfA</i> | 2.0 | | peptide chain release factor 1 |
| <i>rplC</i> | | 2.1 | ribosomal protein L3 |
| <i>rpmJ</i> | | 2.5 | ribosomal protein L36 |

Table 2. Continued

| Gene | Fold change (>2) | | Gene description |
|---------------------------------------|------------------|------------|--|
| | Induction | Repression | |
| Regulatory function | | | |
| DR2518 | 2.1 | | serine/threonine protein kinase |
| DRA0335 | 2.3 | | serine/threonine protein kinase |
| Transport and binding proteins | | | |
| DR2453 | 2.0 | | cation-transporting ATPase |
| DRB0014 | 3.4 | | hemin ABC transporter |
| DRB0015 | 3.1 | | hemin ABC transporter |
| DRB0016 | 3.6 | | hemin ABC transporter |
| DRB0017 | 4.0 | | iron-chelator utilization protein |
| DRB0121 | 3.8 | | iron ABC transporter |
| DRB0122 | 3.9 | | iron ABC transporter; permease protein |
| DRB0123 | 3.4 | | iron ABC transporter |
| DRB0124 | 3.4 | | iron-chelator utilization protein |
| DRB0125 | 3.9 | | iron ABC transporter |
| Unknown function | | | |
| DR2333 | 2.5 | | hypothetical protein |
| DRC0003 | 2.2 | | hypothetical protein |
| DR0040 | 2.3 | | hypothetical protein |
| DR0202 | 2.2 | | hypothetical protein |
| DR0228 | 2.1 | | hypothetical protein |
| DR0308 | 2.2 | | hypothetical protein |
| DR0351 | 2.1 | | hypothetical protein |
| DR0688 | 2.0 | | hypothetical protein |
| DR0792 | 2.1 | | hypothetical protein |
| DR0820 | 2.2 | | hypothetical protein |
| DR0854 | 2.2 | | hypothetical protein |
| DR0931 | 2.2 | | hypothetical protein |
| DR0942 | 2.2 | | hypothetical protein |
| DR1010 | 2.6 | | hypothetical protein |
| DR1047 | 2.2 | | hypothetical protein |
| DR1092 | 2.0 | | hypothetical protein |
| DR1254 | 2.2 | | hypothetical protein |
| DR1528 | 2.1 | | hypothetical protein |
| DR1584 | 2.4 | | hypothetical protein |
| DR1761 | 3.2 | | hypothetical protein |
| DR1783 | 2.1 | | hypothetical protein |
| DR1888 | 2.1 | | hypothetical protein |
| DR2103 | 2.1 | | hypothetical protein |
| DR2200 | 2.0 | | hypothetical protein |
| DR2230 | 2.0 | | hypothetical protein |
| DR2282 | 3.0 | | hypothetical protein |
| DR2297 | 2.1 | | hypothetical protein |
| DR2411 | 2.1 | | hypothetical protein |
| DR2450 | 2.3 | | hypothetical protein |
| DR2520 | 2.2 | | hypothetical protein |
| DR2604 | 2.9 | | hypothetical protein |
| DR2628 | 2.2 | | hypothetical protein |
| DRA0101 | 2.7 | | hypothetical protein |
| DRA0302 | 2.0 | | hypothetical protein |

(Dgeo1130), P type copper transporter (Dgeo0089), 그리고 두 개의 multicopper oxidase (Dgeo2558, Dgeo2590) 등의 유전자들이 다수 발견되었으나 *D. radiodurans*의 경우 염기서열 분석만으로는 구리 대사와 관련된 일반적인 단백질들을 발견할 수가 없었다(11). 또한, 구리 이온에 반응하여 유전자 발현의 증감을 보인 70개의 유전자 중 약 50%에 해당하는 34개의 유전자는 기능이 밝혀지지 않은 hypothetical protein들이어서 *D. radiodurans*의 구리 대사 관련된 반응을 면밀히 해석하기가 불가능하였다. 하지만 *D. radiodurans*의 3,187 ORF 중 약 1,000개 이상이 hypothetical protein이고(25) Vacuolar (V)-type H⁺-ATPase, uracil DNA glycosylase, G/T mismatch-specific thymine DNA glycosylase 등 진핵생물 계열의 단백질들이 상당부분 존재한다는 사실(10)을 감안한다면 기존의 밝혀진 구리 대사 시스템과는 상이한 *D. radiodurans*만의 고유한 시스템이 존재할 수도 있다는 추정을 가능하게 한다. Microarray 분석 결과 흥미롭게도 철 대사에 관여하는 것으로 추정되는 두 개의 operon 유전자들이 과량의 구리 이온 존재 시 발현이 증가하였다(Table 2). 이는 *D. radiodurans*의 구리 대사 시스템이 철 이온의 이용과 관련되어 있다는 것을 보여주며 진핵생물인 *S. cerevisiae*의 경우와 같이 구리와 철의 대사가 연관되어 있음을 확인 할 수 있었다(24). 따라서 이후 연구는 이들 유전자를 대상으로 진행하였다.

금속이온에 따른 DRB0014와 DRB0125 유전자의 발현 변화

구리, 카드뮴, 아연, 니켈, 철, 망간 등의 금속 이온과 구리(BCS) 및 철(Dip) 킬레이트화합물을 첨가하여 두 operon의 첫 번째 유전자의 발현량을 야생형 균주에서 qRT-PCR로 확인하였다(Fig. 2). 발현도는 comparative method (2^{-ΔΔCt}) 방법을 이용하여 금속 및 킬레이트화합물 첨가 후 30분 동안 배양하여 비처리 세포의 유전자 발현량을 기준으로 삼아 상대적으로 계산하였다(9). DRB0014의 발현은 고농도의 구리와 철 고갈 조건에서 발현이 각각 11배 증가하였다(Fig. 2B). 그리고 DRB0125의 발현 역시 고농도의 구리와 철 고갈 조건에서 각각 8배 그리고 13배 증가 하였다(Fig. 2B). 두 유전자의 전체적인 발현 양상은 유사하였으며, 철을 제외한 카드뮴, 아연, 니켈, 그리고 망간 등의 금속에 대해서도 2~4배 가량 발현이 증가하였다. 그러나 구리 킬레이트화합물인 BCS를 처리했을 경우 두 operon의 발현량의 변화는 없었다. 따라서 두 operon의 산물은 철의 흡수 및 세포 내 구리 대사기작과 관련이 있을 것으로 생각되며, 다양한 전이금속의 대사에도 일부 관여할 것으로 추정된다.

*S. cerevisiae*에는 서론에서 언급한 바와 같이 구리 의존성 철 수송체가 존재하며 이로 인해 철과 구리의 대사는 서로 밀접한 관련을 맺고 있다(24). BCS와 같은 구리 킬레이트화합물을 처리하였을 경우 세포 내 구리 농도가 감소됨에 따라 *CTR1*과 *FRE1*과 같은 구리 흡수에 관련된 유전자들의 발현이 증가된다. 또한 동시에 *Ftr1p*와 *Fth1p* 같은 구리 의존성 철 수송체의 감소로 인해 세포 내 철 또한 고갈되어 철 흡수에 관련된 *FRE2*와 *CCC2* 등의 유전자들의 발현도 증가된다(24). 즉, *S. cerevisiae*의 *FRE2*와 *CCC2* 등의 유전자들은 구리 및 철 이온의 킬레이트화합물을

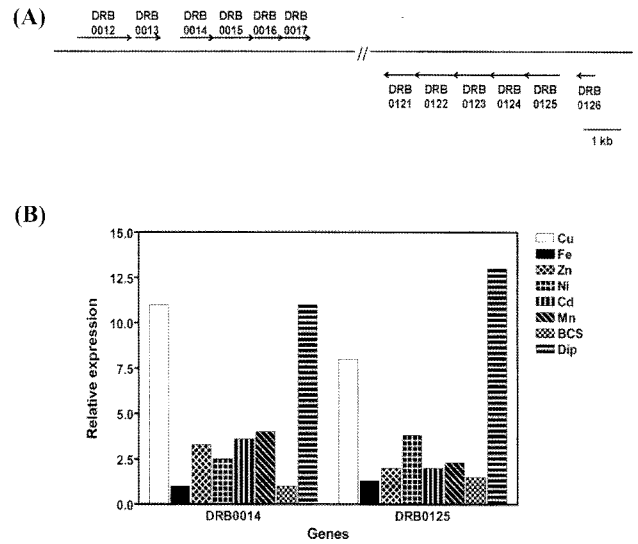


Fig. 2. Genomic organization and differential expression in response to various transition metal cations of DRB0014 and DRB0125. (A) Schematic representation of the two operon regions. (B) Effect of various transition metal cations on the gene expression of DRB0014 and DRB0125. When cells were grown to mid-exponential phase, various transition metal cations cells were treated for 30 min; CuCl₂ (250 μM), CdCl₂ (50 μM), ZnCl₂ (250 μM), NiCl₂ (250 μM), FeCl₃ (250 μM), bathocuproine disulphonate (250 μM), and 2,2'-dipyridyl (250 μM). Transcriptional level of the individual gene was analyzed by qRT-PCR. The level of each transcript was normalized to that of *gap* (DR1343). The induction of the transcripts in each sample is expressed relative to the amount of the transcripts from non-treated sample. This result is a representative of three independent experiments.

처리하였을 경우, 다시 말해서, 구리 및 철의 고갈조건에서 발현이 증가한다. 그러나 *D. radiodurans*의 DRB0014와 DRB0125는 철 고갈조건에서 발현이 증가되는 면에서는 *S. cerevisiae*의 *FRE2*와 *CCC2*과 같은 구리 의존성 철 수송 관련 유전자들과 유사하나 구리 고갈조건이 아닌 고농도 구리 조건에서 발현이 오히려 증가한다는 면에서는 발현 양상이 서로 다르다는 것을 알 수 있었다.

돌연변이균주의 구리 및 방사선 저항성 변화

일반적으로 세포 내 구리 농도가 높을 경우 구리 무독화 및 배출에 관련된 유전자들의 발현이 증가되고 이들 유전자의 결손은 구리 저항성의 감소를 유발한다(8, 19). 발현체 분석과 qRT-PCR 결과에서처럼 DRB0014와 DRB0125의 발현은 과량의 구리가 존재하였을 경우 발현이 증가하였으므로 두 operon의 구리 저항성 관련 여부를 조사하기 위하여 DRB0014와 DRB0125 유전자 변이균주를 제작하였다. 변이균주는 pKatCAT (13)으로부터 유래된 chloramphenicol 저항성 유전자(*cat*)를 DRB0014와 DRB0125 유전자 내부에 각각 삽입하여 제작하였다. 변이균주의 genomic DNA를 주형으로 하여 DRB0014와 DRB0125 유전자의 PCR을 수행한 결과 증폭된 PCR 산물이 야생형 보다 약 1 kb

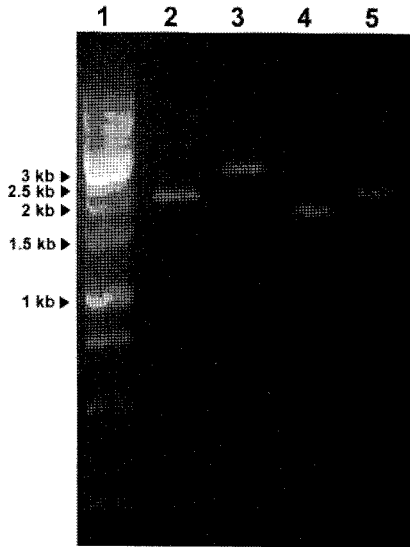


Fig. 3. Disruption of DRB0014 and DRB0125. Gene disruption was verified using diagnostic PCR. Lane 1, 1 kb DNA ladder marker (Fermentas, USA); lane 2, Wild type; lane 3, KDH003 (DRB0014::Cm^r); lane 4, Wild type; lane 5, KDH004 (DRB0125::Cm^r).

정도 더 큰 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 제작된 변이균주를 각각 KDH003 (DRB0014::cat)과 KDH004 (DRB0125::cat)로 명명하였다. 야생형 균주의 구리 저항성 측정 결과 3 mM의 CuCl₂ 농도에서 시간이 지남에 따라 점진적으로 생존 세포의 수가 감소하므로(Fig. 1), 변이균주들의 구리 저항성을 3 mM의 CuCl₂ 농도에서 측정하여 야생형과 비교하였다. 그러나 예상과는 달리 KDH003과 KDH004 균주의 구리 저항성은 야생형과 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 4A). 따라서 이들 유전자는 구리의 배출 및 무독화와 같은 구리 저항성과 관련된 직접적인 기작과 연관이 없음을 알 수 있었다.

세포 내 구리 항상성 메커니즘은 생명체마다 다르지만 일반적으로 복잡한 시스템을 형성한다. 대장균의 경우 CopA와 CusABC 구리 배출 펌프가 존재하며, 각각 CueR과 CusR 조절 단백질의 제어를 받는다(28). 또한 이들 시스템은 은과 같은 다른 중금속의 수송에 이용되기도 한다. 그리고 *S. cerevisiae*의 경우 앞서 언급한 바와 같이 여러 종류의 구리 수송체들과 chaperone들이 구리 대사에 관여한다(24). 따라서 DRB0014와 DRB0125 유전자의 변이가 구리 저항성에는 영향을 미치지 않는다는 사실은 *D. radiodurans* 역시 구리 대사에 하나 이상의 시스템이 존재한다는 것을 시사한다고 볼 수 있다.

세포 내 구리는 hydroxyl radical 형성을 촉진시켜 DNA와 단백질과 같은 분자의 산화적 손상을 유발한다(7). *Salmonella* Typhimurium은 저농도(0.1 mg/ml)의 구리에 적용할 경우 과산화수소에 대한 저항성이 증가하며, multicopper oxidase의 유전자인 *cuiD*가 결손될 경우 구리 저항성은 물론 과산화수소에 대한 저항성도 감소되는 것으로 보고된 바 있다(8). 이온화 방사선 역시 세포에 산화적 스트레스를 유발하므로, 본 연구에서는 고농도의

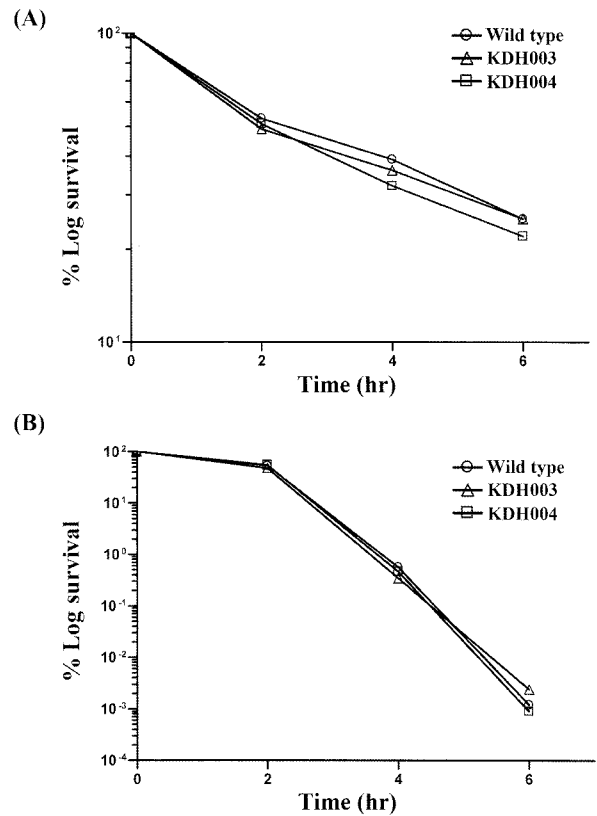


Fig. 4. Copper (A) and radiation (B) resistance of wild type, KDH003, and KDH004. (A) Copper resistance was measured as described above. (B) Radiation resistance was measured after gamma irradiation using a Co-60 irradiator (AECL, IR-79, Nordion) at a rate of 70 Gy/min. Irradiated cultures were diluted, plated in triplicate on TGY agar plates, and incubated for 3 days at 30°C before scoring for survivors. The data represent the means of triplicate experiments with variations ranging less than 50% of the stated percent log survival value.

구리에 반응하는 이들 두 operon이 이온화 방사선에 의해 유발되는 산화적 스트레스에도 관여하는지 조사하기 위하여 방사선 저항성을 측정하였다. 그러나 KDH003과 KDH004 돌연변이균주의 방사선 저항성은 야생형과 거의 유사하였다(Fig. 4B). 따라서 DRB0014과 DRB0125는 transition metal 이온인 철을 세포 내로 수송하고 고농도의 구리이온에 반응하지만 이온화 방사선에 의해 유도되는 산화적 스트레스와는 무관함을 알 수 있었다.

결론적으로 발현체 분석을 통해 선별된 DRB0014~DRB0017과 DRB0125~DRB0212 operon은 과량의 구리와 철 고갈 조건 특이적으로 발현의 높은 증가를 보였으나, 구리 고갈 조건과 고농도의 철 조건에서는 발현의 변화가 없었다. 또한 DRB0014과 DRB0125 돌연변이균주들은 구리와 방사선 저항성과는 관련이 없었다. 따라서 이들 operon들은 철 고갈시 철의 세포내 흡수 및 이용과 구리 대사에도 일부 연관 있을 것으로 사료되나, 명확한 기능을 규명하기 위해서는 추가 연구가 수행되어야 할 필요가 있을 것으로 판단된다.

감사의 말

본 연구는 교육과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었습니다.

참고문헌

- Banci, L., I. Bertini, S. Ciofi-Baffoni, E. Katsari, N. Katsaros, K. Kubicek, and S. Mangani. 2005. A copper(I) protein possibly involved in the assembly of CuA center of bacterial cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 3994-3999.
- Cha, J.S. and K.A. Cooksey. 1991. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8915-8919.
- Dancis, A., D. Haile, D.S. Yuan, and R.D. Klausner. 1994. The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in copper uptake. *J. Biol. Chem.* 269, 25660-25667.
- Funayama, T., I. Narumi, M. Kikuchi, S. Kitayama, H. Watanabe, and K. Yamamoto. 1999. Identification and disruption analysis of the *recN* gene in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mutat. Res.* 435, 151-161.
- Georgatsoy, E., L.A. Mavrogiannis, G.S. Fragiadakis, and D. Alexandraki. 1997. The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *J. Biol. Chem.* 272, 13786-13792.
- Grass, G. and C. Rensing. 2001. Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183, 2145-2147.
- Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge. 1999. Free radicals in biology and medicine, 3rd ed., p. 105-112. Oxford University Press, NY, USA.
- Lim, S.Y., M.H. Joe, S.S. Song, M.H. Lee, J.W. Foster, Y.K. Park, S.Y. Choi, and I.S. Lee. 2002. CuiD is a crucial gene for survival at high copper environment in *Salmonella entericaserovar* Typhimurium. *Mol. Cells* 14, 177-184.
- Livak, K. and T. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25, 402-408.
- Makarova, K.S., L. Aravind, Y.I. Wolf, R.L. Tatusov, K.W. Minton, E.V. Koonin, and M.J. Daly. 2001. Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 44-79.
- Makarova, K.S., M.V. Omelchenko, E.K. Gaidamakova, V.Y. Matrosova, A. Vasilenko, M. Zhai, A. Lapidus, A. Copeland, E. Kim, M. Land, K. Mavrommatis, S. Pitluck, P.M. Richardson, C. Detter, T. Brettin, E. Saunders, B. Lai, B. Ravel, K.M. Kemner, Y.I. Wolf, A. Sorokin, A.V. Gerasimova, M.S. Gelfand, J.K. Fredrickson, E.V. Koonin, and M.J. Daly. 2007. *Deinococcus geothermalis*: the pool of extreme radiation resistance genes shrinks. *PLoS ONE* 2, 2(9):e955.
- Nies, D.H. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 313-339.
- Nishida, H. and I. Narumi. 2002. Disruption analysis of DR1420 and/or DR1758 in the extremely radioresistant bacterium *D. radiodurans*. *Microbiology* 148, 2911-2914.
- Odermatt, A., H. Suter, R. Krapf, and M. Solioz. 1993. Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* 268, 12775-12779.
- Odermatt, A. and M. Solioz. 1995. Two *trans*-acting metalloregulatory proteins controlling expression of the copper-ATPase of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* 270, 4349-4354.
- Oутten, F.W., C.E. Outten, J. Hale, and T.V. O'Halloran. 2000. Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, CueR. *J. Biol. Chem.* 275, 31024-31029.
- Pena, M.M.O., J. Lee, and D.J. Thiele. 1999. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J. Nutr.* 129, 1251-1260.
- Pufahl, R.A., C.P. Singer, K.L. Peariso, S.J. Lin, P.J. Schmidt, C.J. Fahrni, V.C. Culotta, J.E. Penner-Hahn, and T.V. O'Halloran. 1997. Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science* 278, 853-856.
- Rensing, C., B. Fan, R. Harma, B. Mitra, and B.P. Rosen. 2000. CopA: an *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 652-656.
- Rensing, C. and G. Grass. 2003. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 197-213.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Solioz, M. and A. Odermatt. 1995. Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* 270, 9217-9221.
- Spizzo, T., C. Byersdorfer, S. Duesterhoeft, and D. Eide. 1997. The yeast FET5 gene encodes a FET3-related multicopper oxidase implicated in iron transport. *Mol. Gen. Genet.* 256, 547-556.
- Van Bakel, H., E. Strengman, C. Wijmenga, and F.C. Holstege. 2005. Gene expression profiling and phenotype analyses of *S. cerevisiae* in response to changing copper reveals six genes with new roles in copper and iron metabolism. *Physiol. Genomics* 22, 356-367.
- White, O., J.A. Eisen, J.F. Heidelberg, E.K. Hickey, J.D. Peterson, J.D. Robert, H.H. Daniel, L.G. Michelle, C.N. William, L.R. Delwood, S.M. Kelly, Q. Haiying, J. Lingxia, P. Wanda, C. Marie, S. Mian, J.V. Jessica, L. Peter, M. Lisa, U. Terry, et al. 1999. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* 286, 1571-1577.
- Wilhelm, J. and A. Pingoud. 2003. Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem.* 4, 1120-1128.
- Yamaguchi, I.Y., M. Serpe, D. Haile, W. Yang, D.J. Kosman, R.D. Klausner, and A. Dancis. 1997. Homeostatic regulation of copper uptake in yeast via direct binding of MAC1 protein to upstream regulatory sequences of FRE1 and CTR1. *J. Biol. Chem.* 272, 17711-17718.
- Yamamoto, K. and A. Ishihama. 2005. Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. *Mol. Microbiol.* 56, 215-227.

(Received August 19, 2008/Accepted September 18, 2008)

ABSTRACT : Identification and Characterization of External Copper Responsive Genes of *Deinococcus radiodurans*

Min-Ho Joe, Sang-Yong Lim, Sun-Wook Jung, Du-Sub Song, Young-Ji Choi, and Dong-Ho Kim* (Radiation Research Center for Biotechnology, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongseup 580-185, Republic of Korea)

Global gene expression of *Deinococcus radiodurans*, a highly radiation resistant bacterium, in response to excess copper was analyzed by using oligonucleotide microarray chip. Among 3,187 open reading frames of *D. radiodurans*, seventy genes showed a statistically significant expression ratio of at least 2-fold changes under growth conditions of excess copper; 64 genes were induced and 6 genes were reduced. Especially, two operons (DRB0014~DRB0017 and DRB0125~DRB0121) presumably involved in the iron transport and utilization were the most highly induced genes by excess copper. A quantitative real-time PCR assay revealed that DRB0014 and DRB0125 are highly transcribed responding to excess copper and 2,2'-dipyridyl, an iron chelator. In addition, the transcription of both genes was not changed by excess iron and bathocuproine disulphonate, a copper chelator. These results suggested that the copper metabolism may be closely connected with the iron transport and utilization in *D. radiodurans*. However, the disruption of each gene, DRB0014 and DRB0125, did not affect the copper and radiation resistance, the most well-known character of this organism.