

Salmonella typhimurium 외막 단백질 OmpW의 발현조절 및 기능에 관한 연구

유아영 · 유종언 · 양지선 · 김영희 · 백창호¹ · 오정일 · 강호영*

부산대학교 생명과학부 미생물학전공, ¹아리조나주립대학교 바이오디자인연구소

Received September 16, 2008 / Accepted November 18, 2008

Regulation of an Outer Membrane Protein, OmpW, Expression and Its Biological Function in *Salmonella typhimurium*. Ah Young Yoo, Jong Earn Yu, Jiseon Yang, Young Hee Kim, Chang Ho Baek¹, Jeong-Il Oh and Ho Young Kang*. *Division of Biological Sciences, Pusan National University, Busan 609-735, Korea, ¹The Biodesign Institute, Arizona State University, Tempe, AZ85287, USA* - Outer membrane proteins (OMPs) expressed in the Gram negative bacteria such as *Salmonella* play multiple functions including material transports, adhesive factors and reception of external signals. This study has been focused on an OmpW protein known as a protein required to form a hydrophobic porin in outer membrane. We have constructed a *S. typhimurium* CK10 mutant deleting an *ompW* gene on chromosome. The CK10 strain was more tolerant to SDS than the wild-type strain did. As increase of salt concentration in the culture media, significantly decreased amount of OmpW protein in cells were detected. The maximum OmpW protein was expressed in the absence of salt supplement. However, the growth of CK10 strain was indistinguishable compared to that of the wild-type strain at the variable osmotic conditions. The biological role of differential OmpW expression in response to osmotic conditions remains to be investigated.

Key words : *Salmonella typhimurium*, OmpW, outer membrane protein

서 론

*Salmonella*는 그람 음성의 장내 세균으로 동물 또는 사람에게 감염하여 위염, 설사, 장티푸스열 등의 질병을 유발한다[1]. 대표적인 세포내 기생 병원체의 한 종류인 *Salmonella*는 숙주 세포의 대표적인 면역 세포인 macrophage의 식균작용에서도 살아남아 macrophage내에 포함된 채로 숙주의 몸 전체에 퍼지면서 전신성 감염을 일으킨다[2,3]. 이러한 일련의 감염과정 동안에 *Salmonella*는 다양한 환경조건에 직면하게 되는데, *Salmonella*를 포함한 다양한 병원균들은 이러한 환경 조건들을 인식하고 그들의 생존에 불리한 환경을 극복할 수 있는 메커니즘을 가진다. 특히 그람 음성 세균의 외막 단백질들은 이러한 외부 환경 조건에 따라 그 발현에 변화가 생기는 경우가 많으며, 이렇게 발현된 외막 단백질들은 수송에 관여하는 통로, 외부 물질의 인지, 병원체의 부착인자 등으로 작용하게 된다. 몇몇 연구들에서 외부 환경 조건 중에서도 삼투환경 변화에 따른 외막 단백질의 발현 조절에 관한 연구가 수행되었다. 특히 Xu 등은 호염성 그람음성 세균의 한 종류인 *Vibrio parahaemolyticus*의 각기 다른 염농도에 따른 외막 단백질의 발현을 비교하였다[4]. 이 연구에서 언급되었던 OmpW는 *Escherichia coli* colicin S4의 수용체라고 알려져 있지만 *Salmonella*에서의 자세한 기능에 대해서는 잘 연구되어

있지 않다[5]. 또한 OmpW는 외막 단백질에 위치하는 소수성 porin 단백질임이 알려졌으며 이러한 OmpW 단백질의 소수성은 숙주 세포의 부착인자로서도 작용할 수 있다는 것을 의미한다[6].

본 연구에서는 현재까지 정확한 기능과 유전자 발현 조절이 알려져 있지 않은 *Salmonella*의 OmpW 단백질이 결손된 돌연변이주를 구축하여 야생주와 대별되는 특징들을 파악하고자 하였다. 또한 OmpW 특이적인 항체를 제조하고, 이를 이용하여 *ompW* 유전자의 발현 조절에 관여하는 세포 외부 환경 인자를 알고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주, 플라스미드 및 사용 배지, 균주 배양 조건

본 연구에서 사용된 균주와 플라스미드들을 Table 1에 열거하였다. *Salmonella typhimurium*과 *Escherichia coli*는 Luria-Bertani (LB) 액체배지 또는 1.5% agar를 첨가한 고체배지를 사용하여 37°C에서 배양하였다[7]. 항생제는 필요한 경우 각각의 배양 조건에 다음과 같은 농도로 첨가하였다: ampicillin, 100 µg/ml; streptomycin, 50 µg/ml. Asd^r 균주의 배양을 위하여 diaminopimelic acid를 50 µg/ml의 농도로 첨가하였다[8]. Allelic exchange 과정에서 suicide 플라스미드 내에 있는 *sacB* 유전자를 이용하여 suicide 플라스미드 DNA 결손 균주의 선별을 위해 5% sucrose를 포함하는 LB 고체배지를 사용하였다[9].

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2266, Fax : +82-51-513-4532

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> DH5 α	Transformation host for cloning vector, F ⁻ , Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ ,m _k ⁺) <i>phoA supE44</i> l ⁻ <i>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>E. coli</i> χ 7213	<i>E. coli</i> DH5 α derivative (Δ <i>asd</i>), Km ^r , DAP required	16
<i>Salmonella</i>		
<i>S. typhimurium</i> χ 3339	SL1344 <i>hisG</i> , Str ^r , wild-type	15
<i>S. typhimurium</i> CK10	χ 3339 derivative, <i>hisG</i> Δ <i>ompW</i>	This study
Plasmids		
pGEM-T vector	Cloning vector for PCR product, ColE1ori, Ap ^r	Promega
pMEG 375	Suicide vector, R6Kori, Ap ^r Cm ^r	Megan Health Inc.
pPROEX TM HTb	Overexpression vector Lac I ^q , ColE1ori, Ap ^r	Invitrogen
pBP22	0.6 kb <i>ompW</i> BamHI-HindIII product in pPROEXHTb, overexpressing <i>OmpW</i> , Ap ^r	This study
pBP29	1.8 kb DNA ligated 5'-flanking and 3'-flanking of <i>ompW</i> in pGEM 5ZT, Ap ^r	This study
pBP31	pMEG-375 derivative recombinant suicide plasmid for Δ <i>ompW</i> , Ap ^r Cm ^r	This study

일반적인 DNA 조작

본 연구에서 이루어진 대부분의 DNA 조작은 Sambrook 등에 의해 기술된 방법에 준하여 수행하였다[10]. Rubidium chloride 용액에 의해 제조된 *E. coli* competent 세포들은 heat-shock 방법으로 형질전환 시켰다. 유전자 클로닝에 사용하기 위한 DNA 단편을 얻기 위해서 PCR 증폭기법을 사용하였고, 이는 염색체상의 돌연변이를 확인하는데도 사용하였다.

SDS-PAGE

단백질 시료들을 2 \times digestion buffer에 용해하였다[11]. 용해된 단백질 시료들을 95°C에서 5분 동안 가열한 후, 비연속적 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 의해 분리하였다. 분리된 단백질들을 Coomassie brilliant blue G-250 (Sigma)을 통한 염색과 2시간 동안의 탈색 과정을 통해 밴드로서 확인하였다.

OmpW 단백질의 과발현을 위한 재조합 플라스미드의 구축

6개의 histidine (His₆) 잔기들로 표지되어진 OmpW 단백질을 대량 생산하기 위해서 대장균을 활용한 인위적인 단백질 과발현 체계를 이용하였다. *ompW* 유전자는 *S. typhimurium* χ 3339 염색체 DNA를 주형으로 하고 primer 쌍[5'-gcggatcccacgaagccggagaa-3'과 5'-gcaagcttagaacgatagcc-3']을 이용한 PCR을 통해 0.6 kb의 DNA를 증폭한 후, 그 DNA를 pGEM-T vector (Promega)에 클로닝하여 중간단계의 재조합플라스미드를 구축하였고, 이로부터 얻은 0.6 kb BamHI-HindIII DNA 단편을 단백질의 발현에 사용되는 발현 vector인 pPROEXTMHTb (Invitrogen)에 삽입하여 재조합 플라스미드 pBP22을 구축하였다(Fig. 1A). pBP22을 가지는

E. coli BL21 (DE3)을 1 mM의 IPTG가 들어있는 배양 조건에서 배양하였을 경우, 과량의 OmpW 단백질이 발현되는 것을 SDS-PAGE를 통해 확인하였다[12].

S. typhimurium χ 3339에 *ompW* 유전자를 결손시키기 위한 재조합 suicide 플라스미드의 구축

ompW 유전자의 5' flanking DNA를 *S. typhimurium* 염색체 DNA를 주형으로 하여 primer 쌍[5'-gctctagagtcacggtaaacggactt-3'과 5'-gcggatccgtcattatgtaaacgccagtgc-3']을 사용한 PCR 증폭에 의해 얻었다. 0.9 kb의 증폭된 DNA 단편을 pGEM-T vector (Promega)에 클로닝하였다. 같은 방법으로 *ompW* 유전자의 3' flanking DNA를 primer 쌍[5'-gcggatccgggtgactcgcgtgattgtg-3'과 5'-gcgcggccgctgccc-3']을 사용한 PCR을 통해 증폭하여 얻은 DNA 조각을 5' flanking이 들어있는 plasmid에 클로닝하여, 그 결과 0.6 kb의 완전한 *ompW* ORF가 결손되고 *ompW* 유전자의 5' flanking DNA와 3' flanking DNA가 붙어 있는 형태의 재조합 DNA 단편을 가지는 플라스미드 pBP29이 구축되었다. pBP29로부터 얻은 1.8 kb의 *Xba*I-*Not*I DNA 단편을 suicide 플라스미드인 pMEG375의 MCS에 클로닝 하였으며, 이 재조합 suicide 플라스미드를 pBP31로 명명하였다 (Table 1).

Immunoblotting

SDS-PAGE를 통해 단백질 시료를 분리한 후, transfer 장치 (BioRad)와 Towbin's Buffer (TB)를 사용하여 polyacrylamide gel 내의 단백질들을 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell)으로 이동시켰다[13]. Towbin 등에 의해 기술된 바와 같이 5% skim milk를 함유하는 Towbin's Saline Buffer (TBS)

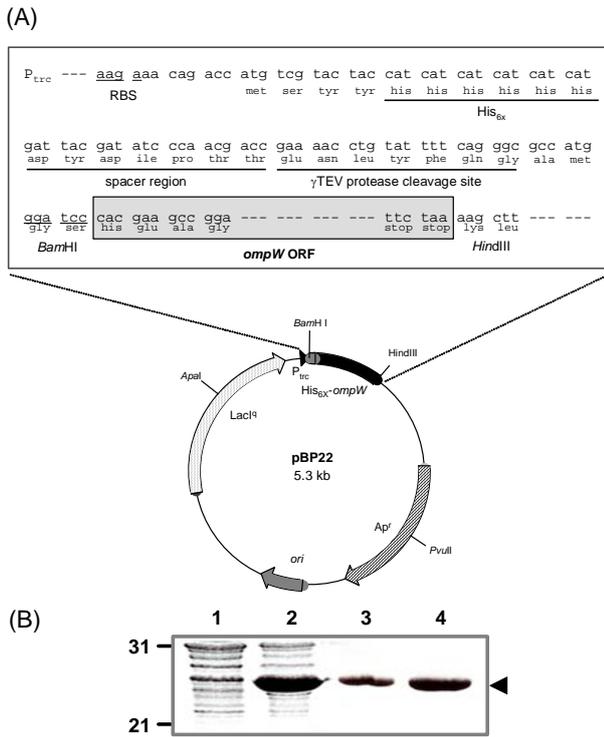


Fig. 1. Overexpression of the OmpW. (A) Physical map of the recombinant plasmid pBP22. The map of the pBP22 plasmid carrying a *ompW* gene is presented. Regions for the Trc promoter and the His_{6x}-tagged in-frame fusion of *ompW* in pBP22 are enlarged. (B) SDanalysis of overexpressed OmpW. The His_{6x}-tagged OmpW expression in *E. coli* BL21 (DE3) harboring pBP22 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)/pPROEXTMHTb vector control; 2, *E. coli* BL21 (DE3)/pBP22; 3, 0.3 μl of protein sample purified through Ni²⁺-sepharose affinity chromatography; 4, 1 μl of purified protein.

에서 3 시간 동안 membrane을 blocking시킨 후, 적절히 희석된 OmpW 특이적인 다클론성 1차 항체와 함께 2 시간 반응시켰다. TBS로 수 회 세척한 membrane에 2차 항체인 horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit Ig (Amersham)를 5% skim milk/TBS에 1:1,000의 비율로 희석하여 2 시간 동안 반응시켰다. TBS로 수 회 세척한 membrane의 OmpW 단백질 밴드를 H₂O₂ (Sigma)와 4-chloro-1-naphthol (Sigma)이 포함된 용액에서 자주색의 침착물이 생성되는 것으로 확인하였다. 반응은 다량의 증류수 세척을 통해 중지시켰다.

세포 표면 특성 분석

Salmonella 세포 표면전하와 소수성은 zeta-potential 측정을 통해 결정될 수 있다[14]. *Salmonella* 배양액을 원심분리를

통해 얻어 0.85% NaCl로 2회 세척하였다. 적절히 희석한 세포 현탁액의 zeta-potential을 ELS-8000 (Otsuka electronics)로 측정하였다.

SDS에 대한 내성 분석

LB 액체배지에서 25 시간 배양한 *Salmonella* 세포를 수거하여 생리식염수로 세척한 후 0.5%의 SDS에 10분간 노출하였다. 처리가 끝난 샘플 내에 살아남은 균은 생균수 측정법을 통해 확인하였다. 결과는 SDS를 처리하지 않은 세포에 대한 SDS-처리한 세포의 생존비율로 나타내었다.

결 과

OmpW 단백질의 과발현, 정제 및 OmpW 특이적인 다클론성 항체의 생산

OmpW 단백질의 *Salmonella*내에서의 역할 규명 및 유전자 발현 조절에 대한 이후의 연구를 위하여 우선 OmpW 특이적인 다클론성 항체를 생산하기로 하였다. 항원의 대량생산 및 합성된 항원단백질의 수월한 정제를 위하여 대장균을 이용한 인위적인 단백질 과발현 체계를 이용하여 6개의 histidine (His_{6x}) 잔기들로 표지되어진 OmpW 항원을 발현하는 체계를 활용하였다. 재료 및 방법에서 설명한 바와 같이 단백질 발현을 위한 완전한 *ompW* 유전자를 가지는 *ompW* 과발현 플라스미드 pBP22을 구축하였다 (Fig. 1A). pBP22을 가지는 *E. coli* BL21 (DE3)을 1 mM의 IPTG가 들어있는 배양 조건에서 배양하였을 경우 전체 단백질의 5% 이상의 양을 차지하는 His_{6x}-OmpW 단백질이 발현되는 것을 SDS-PAGE를 통해 확인하였다(Fig. 1B). 과량 생성된 His_{6x}-OmpW 단백질이 세포질 부분에 일부 존재하고, 대부분의 OmpW 단백질은 불용성의 inclusion body를 형성하고 이들이 쉽게 가라앉는 것을 볼 수 있었다(data not shown). 항체 생성에는 변성된 형태의 단백질 사용이 무방하므로 변성조건인 8 M urea를 처리하여 불용성의 OmpW 단백질을 가용화하였으며, His_{6x}-OmpW 단백질은 Ni²⁺-sepharose를 이용한 친화성 정제 크로마토그래피를 통해 총 375 mg의 His_{6x}-OmpW를 얻었다(Fig 1B).

OmpW 특이적인 다클론성 항체의 생산에는 New Zealand White (NZW) 토끼를 이용하였다. 1차 항원 주입을 하기 전에 토끼로부터 혈액을 얻었으며 이것은 이후 음성 대조구로 사용하였다. 약 500 μg에 해당하는 정제 OmpW 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 피하주사하였다. 1차 면역 후 3주가 지난 후에 토끼 귀의 정맥으로부터 혈액을 얻었으며, 동시에 1차 면역 때와 같은 양의 항원을 incomplete Freund's adjuvant (Sigma)와 혼합하

여 같은 방법으로 피하주사하였다. 토끼로부터 얻은 혈액을 2,000 rpm에서 5 분 동안 원심분리하여 혈구 성분을 제거하고, OmpW 특이적인 항체가 포함되어 있는 상등액인 혈청을 분리하였다. Immunoblotting 결과, 수 회의 항원 접종이 이루어진 이후에야 OmpW 특이적인 항체가 생성된 것을 확인할 수 있었으며, OmpW 단백질은 비교적 항원성이 낮다고 판단할 수 있었다(data not shown).

ompW 유전자 결손 돌연변이주의 구축

OmpW 단백질의 역할 조사에 필요한 ompW 결손 돌연변이주를 생성하기 위하여 약 600 nt의 ompW 유전자가 결손된 재조합 suicide 플라스미드 pBP31을 구축하였다(Table 1). ompW 유전자를 결손시키기 위해서 *E. coli* χ 7213 (Asd) 균주에 들어있는 pBP31을 *S. typhimurium* 균주로 접합을 통해 이동시켰다. 1차 crossover를 통해서 *Salmonella*의 염색체 DNA로 suicide 플라스미드가 끼어들어간 균주들은 ampicillin 항생제 내성의 특성을 이용하여 선별하였다. 2차 crossover에 의해 염색체 DNA로부터 재조합 suicide 플라스미드를 결손한 균주는 suicide 플라스미드에 포함된 positive selection marker인 sacB 유전자의 특성을 활용하여 5% sucrose가 포함된 배지에서 자라는 세포들로부터 분리할 수 있었다. 5% sucrose에 내성을 가지는 하나의 돌연변이주를 선택하였으며, 선택된 돌연변이주 내의 ompW 유전자 결손은 parental 균주인 χ 3339와 돌연변이주의 ompW 부분에 해당하는 PCR 산물 크기 비교를 통해 확인하였다. ompW 유전자에 대한 primer 쌍 [5'-gctctagatgcacggtaaacggactt-3'과 5'-gcgeggccgctgccgc-3']을 이용하여 PCR을 수행한 후 증폭된 DNA의 크기를 비교한 결과 χ 3339 균주의 염색체 DNA로부터 약 2.4 kb, Δ ompW 돌연변이주의 염색체 DNA로부터 약 1.8 kb의 DNA를 얻을 수 있었다(Fig. 2A). 이 균주가 *S. typhimurium*인지를 확인하기 위해서 원래 균주가 가지는 streptomycin 항생제에 대한 내성을 조사한 결과 이 항생제에 내성을 나타내므로 이 균은 오염균이 아님을 확인할 수 있었다. 다양한 종류의 primer쌍을 이용하여 증폭한 PCR 산물들의 크기를 비교하여 확인한 Δ ompW 돌연변이주를 CK10으로 명명하였다(Table 1). 앞에서 제조한 OmpW 특이적인 항체를 이용한 immunoblotting 결과, CK10 균주에서는 OmpW 단백질 특이적인 immuno-reactive 밴드를 관찰할 수 없었으므로 이를 통해 allelic exchange법을 이용한 *S. typhimurium* ompW 결손 돌연변이주의 구축이 분명하다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2B).

ompW 유전자 결손 돌연변이주의 세포 표면 특성 확인

ompW 유전자 결손 돌연변이주의 일반적인 특성을 파악하기 위하여 야생주와의 성장 양상을 비교하였다. 영양배지인 LB 배지와 최소배지 모두에서 CK10의 생장은 야생주와 큰 차이를 보이지 않는 것으로 보아 ompW 유전자의 결손은

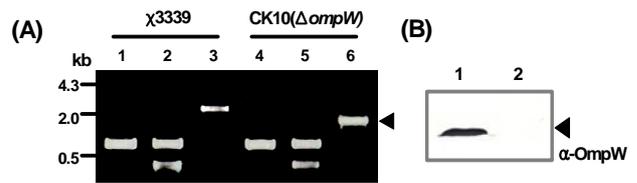


Fig. 2. Construction of a deletion mutant of the ompW gene. (A) Genetic confirmation of ompW deletion. DNA fragments were amplified from the chromosomal DNA of the wild-type (χ 3339) and CK10 (Δ ompW) strain by PCR. Lanes: 1 and 4, 5' flanking DNA of ompW; 2 and 5, 3' flanking DNA of ompW; 3 and 6, 5' flanking-ompW-3 flanking DNA. (B) Confirmation of ompW deletion by immunoblot analysis. *Salmonella* cells were cultured in LB broth to stationary phase. Cell pellets were subjected to immunoblot analysis as described in Material and Methods with rabbit sera (obtained from the 5th immunization of OmpW) diluted to 1:200 (v:v). Lanes: 1, *S. typhimurium* χ 3339; 2, *S. typhimurium* CK10.

*Salmonella*의 *in vitro* 생장에 있어서 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단할 수 있었다(data not shown). 일반적으로 그람 음성 세균의 외막 단백질을 제거하면 표면전하를 포함한 다양한 세포표면 특징들에 변화가 일어나는 경우가 있다. 한 연구에서는 외막 단백질의 한 종류인 OmpX가 결손된 *E. coli*의 zeta-potential에 변화가 일어났음을 보고한 바가 있다 [14]. CK10은 야생주에 비해 더 높은 zeta-potential 수치를 나타내었으며, 이는 야생주에 비해 전하값이 더 낮다는 것을 의미한다(Table 2A). 이러한 세포 표면전하의 변화는 SDS와 같이 음성전하를 가지는 물질들과의 교차상호반응에 영향을 미칠 수도 있다. 이를 확인하기 위하여 야생주와 CK10 *Salmonella*를 0.5% SDS에 10분간 노출시킨 후, 적당한 농도로 희석하고 LB 고체배지에서 배양하여 살아남은 균의 수를 측정하였다. SDS에 노출되었을 때 야생주는 노출시키지 않았을 때와 비교하였을 때 10% 정도의 생존율 감소를 보였다(Table 2B). 반면, SDS에 노출된 CK10 균주는 SDS에 노출되지 않았을 때와 그 생존율이 거의 비슷한 것으로 보아 ompW 유전자가 SDS 내성에 다소 영향을 끼친다고 추측할 수 있었다. 이러한 영향은 OmpW 단백질과 SDS와의 직접적인 작용이라기보다도 OmpW의 유무에 따른 세포표면구성의 변화로 인한 SDS와의 상호작용의 변화 때문이라고 판단된다.

NaCl의 농도에 따른 OmpW의 발현 변화

그람 음성 세균의 외막 단백질은 세포의 최외곽에 위치하면서 다양한 역할을 수행하게 되는데 이러한 외막 단백질의 발현은 세포 외부의 환경 조건에 따라 다르게 조절된다. 그 중에서도 삼투 환경과 OmpW의 발현에 관한 가능성이 제시되어 오고 있다. *Salmonella*에서 OmpW 단백질의 발현이 이러한 삼

Table 2. Characteristics of *ompW* deletion mutant

(A) Measurement of Zeta-potential

Strain ¹	Relevant genotype	Zeta-potential ² (mV)
χ3339	wt	-2.4
CK10	Δ <i>ompW</i>	-1.13

¹*S. typhimurium* cells, χ3339 and CK10 grown in iron-replete growth conditions were appropriately diluted in saline and then subjected to measurement.

²Zeta-potential presents the index of dispersion of particle thus, indicates the charge of surface on *Salmonella* cells. The lower value demonstrates the better dispersibility.

(B) Influence of OmpW on *Salmonella* tolerance to SDS

Strain	0.5% SDS stressed conditions	Survival of <i>Salmonella</i>		
		AV	SD	Ratio (%)
χ3339	N	57.2	9.7	100
	S	50.4	10.8	88
CK10	N	43.3	8.8	100
	S	43.5	8.8	100

The viability of cells was determined by counting colonies after culture of appropriately diluted *Salmonella* suspensions exposed to saline or 0.5% SDS for 10 min. Abbreviations: N, non-exposed to SDS; S, exposed to SDS; AV, average; SD, standard deviation.

투 환경에 의해 조절되는지 여부를 알아보기 위하여 *ompW* promoter에 *lacZ* reporter 유전자를 융합시킨 재조합균주를 제작한 후, 다양한 농도의 NaCl가 첨가된 MacConkey + lactose 배지에 배양하여 reporter 유전자의 발현을 조사하고자 하였다. 하지만 MacConkey 배지에 과량의 NaCl이 첨가되면 *Salmonella* 균주의 성장 자체가 저해되는 현상이 관찰되어 이러한 방법으로는 *ompW* 유전자의 발현을 확인할 수 없었다(data not shown).

Reporter 유전자를 사용한 간접적인 방법 대신에 직접적으로 OmpW의 발현 변화를 관찰하기 위하여 0 M과 1 M의 NaCl이 첨가된 LB에서 생육 단계의 정지기까지 배양한 *Salmonella* 야생주에서의 OmpW 단백질 발현을 immunoblotting을 통해 확인하였다. 1 M의 NaCl이 첨가되었을 때 OmpW의 발현이 급격히 감소하는 것을 확인하였으며 이를 통해 *ompW* 유전자의 발현에 NaCl의 농도 즉, 삼투 환경이 중요한 인자라고 판단할 수 있었다(Fig 3A). 이를 토대로 각기 다른 삼투 환경에서의 생육에 OmpW 단백질이 영향을 미칠 수도 있을 것이라 추측하고, 야생주와 CK10 *Salmonella* 균주를 0.1 M과 1 M의 NaCl이 첨가된 LB 액체배지에서 배양하면서 600 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 생육을 관찰하였다(Fig. 3B). 두 균주 모두 높은 농도의 NaCl이 첨가되었을 때 그 생장이 다소 지연되는 것을 확인하였으나, 야생주와 CK10 돌연변이주 사이의 생육 양상 차이는 관찰할 수

(A)



(B)

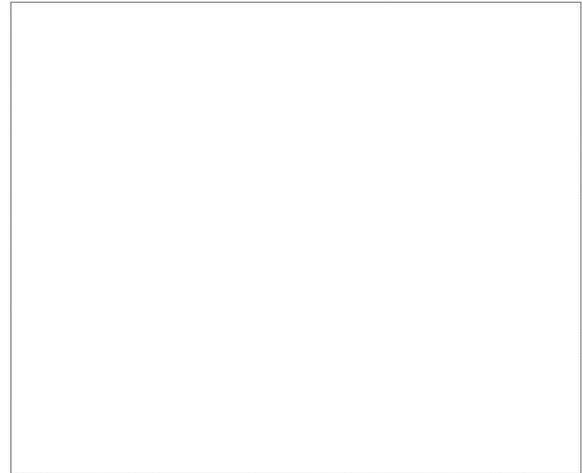


Fig. 3. Effect of NaCl on growth and OmpW expression. (A) OmpW expression in *S. typhimurium* grown in different NaCl condition. *S. typhimurium* wild-type cells were cultured in LB broth containing 0 or 1 M NaCl to stationary phase. Cell pellets were subjected to immunoblot analysis as described in Material and Methods. (B) Growth of *S. typhimurium* strains under different salt condition. *S. typhimurium* χ3339(circles) and CK10(triangles) cells were grown in 100 ml LB broth containing 0.1 M(open symbols) and 1 M NaCl concentration(solid symbols) at 37°C for 18hr with shanking. The growth was measured at every 2 hr incubation by optical density at OD₆₀₀. The data is average of triplicated samples.

없었다. 이를 통해 OmpW 단백질의 발현은 NaCl의 농도에 의해 조절되지만, *Salmonella*의 생육에는 큰 영향을 미치지 않는다고 판단하였다. 이러한 결과들을 토대로 향후 세포 외부의 삼투와 관련하여 OmpW 단백질의 정확한 기능 규명이 이루어져야 할 것으로 판단된다. 무엇보다도 어떠한 조절 기작을 통해 *ompW* 유전자의 발현을 조절하는지를 규명하기 위해서는 *ompW* promoter 부위에 작용하는 조절인자를 찾는 후속연구가 필요하다.

요 약

*Salmonella*를 포함한 그람 음성 세균의 외막 단백질들은 외부 환경 조건에 따라 그 발현에 변화가 생기는 경우가 많으며, 이렇게 발현된 외막 단백질들은 수송에 관여하는 통로, 외부 물질의 인지, 병원체의 부착인자 등 다양한 기능을 가진다. 본 연구에서는 이러한 외막 단백질 중 소수성 porin으

로 알려진 OmpW 단백질에 주목하였다. *ompW* 유전자가 결손된 돌연변이주를 구축하여 CK10으로 명명하였으며, 야생주와 그 표현형적 특징을 비교한 결과 SDS에 대한 내성이 다소 증가함을 확인할 수 있었다. OmpW 특이적인 다클론성 항체를 조제하여 OmpW 단백질의 발현연구에 사용하였다. NaCl의 농도가 높아질수록 OmpW 단백질의 발현이 감소하였으며, OmpW의 발현이 최대인 조건은 NaCl이 배지에 첨가되지 않았을 경우이다. 따라서 OmpW는 *Salmonella* 균이 삼투환경에 대응하는데 관여할 것으로 예상되어 일차적으로 균의 생육을 조사한 결과, 다양한 삼투환경 하에서 *Salmonella*의 생육에는 OmpW 단백질의 결손이 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. 삼투환경 변화에 따른 OmpW 발현의 변화가 지니는 생물학적 의미는 앞으로 연구해야 할 숙제로 남는다.

감사의 글

이 논문은 2004년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2004-202-E00079).

References

1. Abigail, A. S. and D. D. Whitt. 2002. *Sallmonella* Species, pp. 381-397. In Abigail A. Salyers and Dixie D. Whitt (eds.), Bacterial pathogenesis: A molecular approach. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Groisman, E. A. and H. Ochman. 1997. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol.* **5**, 343-349.
3. 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.
4. Xu, C., H. Ren, S. Wang and X. Peng. 2004. Proteomic analysis of salt-sensitive outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus*. *Res. Microbiol.* **155**, 835-842.
5. Pilsel, H., D. Smajs and V. Braun. 1999. Characterization of colicin S4 and its receptor, OmpW, a minor protein of the *Escherichia coli* outer membrane. *J. Bacteriol.* **181**, 3578-81.
6. Hong, H., D. R. Patel, L. K. Tamm and B. van den Berg. 2006. The outer membrane protein OmpW forms an eight-stranded β -barrel with a hydrophobic channel. *J. Biol. Chem.* **281**, 7568-7577.
7. Bertani, G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**, 293-300.
8. Nakayama, K., S. M. Kelly and R. Curtiss III. 1988. Construction of an ASD⁺ expression-cloning vector: stable maintenance and high level expression of cloned genes in a *Salmonella* vaccine strain. *Biotechnol.* **6**, 693-697.
9. Gay, P., D. le Coq, M. Steinmetz, T. Berkelman and C. I. Kado. 1985. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **164**, 918-921.
10. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
11. Sambrook, J. and D. W. Russel. 2001. Molecular Cloning a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
12. Rosenthaler, R., P. Kindler, P. Herrlich and J. Igboke. 1970. The action of nitrofurantoin: inhibition of growth of *Escherichia coli* K 12 and of IPTG-induced beta-galactosidase synthesis. *Zentralbl. Bakteriologie.* **215**, 203-211.
13. 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.
14. Otto, K. and M. Hermansson. 2004. Inactivation of ompX causes increased interactions of type 1 fimbriae of *Escherichia coli* with abiotic surfaces. *J. Bacteriol.* pp. 226-234.
15. Gulig, P. A. and R. Curtiss III. 1987. Plasmid-associated virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **55**, 2891-2901.
16. Roland, K., R. Curtiss III. and D. Sizemore. 1999. Construction and evaluation of a Δ *cya* Δ *crp* *Salmonella typhimurium* strain expressing avian pathogenic *Escherichia coli* O78 LPS as a vaccine to prevent airsacculitis in chickens. *Avian Dis.* **43**, 429-441.