

## *Helicobacter pylori*의 전사조절인자인 Fur 단백질과 Metronidazole 저항성

Douglas E. Berg · 최성숙\*<sup>#</sup>

School of Medicine, Washington University in St. Louis, MO 63110-1093, U.S.A.

\*삼육대학교 약학대학

(Received April 14, 2008; Revised May 8, 2008)

### Transcriptional Regulatory Protein Fur of *Helicobacter pylori* and its Role in Metronidazole Resistance

Douglas E. Berg and Sung-Sook Choi\*<sup>#</sup>

School of Medicine, Washington University in St. Louis, MO 63043, U.S.A.

\*School of Pharmacy, Sahmyook University, 26-21 Gongneung-dong, Nowon-gu, Seoul 139-742, Korea

**Abstract** — To clarify effects of the structural changes of Fur protein on the resistance to metronidazole (Mtz), the mutational analysis of structure and function of the protein in *Helicobacter pylori* (Hp) was undertaken. It was identified that some changes in Hp Fur protein resulted in increase of resistance to Mtz, and other changes resulted in decrease of resistance. Increase of Mtz resistance came from the enzyme's decreased ability of reducing prodrug Mtz to the form of bactericidal agent. Some sites that affects Mtz resistance (i) in Fur's N terminal extension, and (ii) in its central region, which links DNA binding and Fe-binding modules were identified. It was also found that the addition of FLAG tag to Fur's C terminus also significantly impairs Fur function.

**Keywords** □ *H. pylori*, Fur protein, metronidazole resistance

*Helicobacter pylori*(Hp)는 그람 음성 미호기성 간균으로 유전적으로 매우 다양한 병원성균이다. 특히 만성적으로 전세계인구의 50%가 감염되어 그 결과 위궤양, 위염을 일으키며 위암의 원인균으로 주목 받고 있다.<sup>1-3)</sup> Hp는 미호기성 균으로 고농도의 산소 농도에는 견디지 못하지만 최소한 2% 이상의 산소는 존재하여야 생존이 가능하며 최적의 성장을 위해서는 5~8%의 산소 농도가 최적이다. Hp가 숙주인 사람의 위점막 세포에 정착하는 과정에서 숙주는 방어기작으로 강력한 염증반응을 일으키며 주로 호중구나 대식세포가 이러한 반응을 매개하여 이 과정에서 다량의 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS)이 발생된다.<sup>4,5)</sup> Hp가 숙주 세포내에 질병을 유발하기 위하여 정착하는 과정에서 유도된 다량의 ROS는 모순되게도 Hp 균주에게 치명적인 산화적 스트레스로 작용한다. 그러나 이러한 ROS의 생성에도 불구하고 Hp는 숙주의 위점막에 반영구적으로 정착하여 질병을 유

발할 수 있다는 것은 Hp가 이러한 산화적 스트레스에 대항하는 방어기전을 갖고 있기에 가능하며 그중에는 iron-cofactored superoxide dismutase(SodB), catalase(KatA), hydroperoxide reductase(AhpC) 등이 알려져 있다.<sup>6)</sup> 철분은 모든 미생물의 생존에 필수적인 영양소로서 호흡과 전자전달계에 관여하고 여러 가지 효소의 cofactor로서 기능을 하는 것으로 알려졌으나 철이 온은 산소의 존재하에서 매우 독성이 강한 반응성 산소종을 생성한다.<sup>7)</sup> 따라서 일반적으로 세균들은 세포내 철분 농도의 항상성을 유지하기 위하여 전사반응을 조절하거나 mRNA 분해반응 등을 이용하며 세균의 경우 ferric uptake regulator(Fur)을 이용해 항상성을 유지하는 것으로 알려졌다.<sup>8,9)</sup> Hp는 사람이 섭취하는 음식물에 따라 다양한 농도의 철분에 노출될 수밖에 없으며 따라서 Hp의 경우 세포내 철분 농도의 항상성을 유지하여 산화적 스트레스로부터 스스로를 보호하는 것은 이 균주의 생존에 매우 중요하다. 이 과정에서 *E. coli*와 마찬가지로 Fur 단백질이 중요한 역할을 담당한다.<sup>10,11)</sup> Fur 단백질은 세균의 주요 전사조절인자(Transcriptional regulator)로서 주로 철분대사, 산화적 스트레스에 대한 방어기전등에 관여하는 유전자의 조절을 담당한다.<sup>12)</sup>

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-3399-1606 (팩스) 02-3399-1617  
(E-mail) sschoi@syu.ac.kr



Fig. 1 – Unique and conserved sequence of *Helicobacter pylori* Fur protein.<sup>13)</sup>

Hp의 Fur 단백질은 150 aa로 구성된 단백질로 대장균이나 슈도모나스의 Fur 단백질과 약 53% 정도의 유사성을 갖고 있으며 구조적으로, 기능적으로 어느 정도의 차이가 있는 것으로 알려져 있다(Fig. 1). Hp Fur 단백질의 N-terminal 영역은 DNA binding에, C-terminal 영역은 dimerization에 관여하는 것으로 알려져 있으며 특히 대장균이나 슈도모나스와 비교해 볼 때 특징적인 차이점의 하나는 Hp의 Fur 단백질의 N-말단이 대장균 등과 비교해서 약 9~10개 정도의 아미노산 사슬이 길게 신장되어 있는 것이다.<sup>13)</sup> 한편 Albert 등은 Hp 치료제인 metronidazole (Mtz)에 내성인 Hp 26695 중 Fur 단백질의 N말단의 3번째 아미노산인 Arginine이 Isoleucine으로 변이된 균주를 확인하였으며 야생형과 비교시 Mtz에 대한 내성이 증가된 것을 보고하였다.<sup>14)</sup> 이러한 현상은 아마도 Fur 단백질의 변이의 결과 pro-drug인 Mtz를 환원시켜 bactericidal hydroxylamine으로 활성화시키는 과정에 관여하는 효소의 작용을 억제한 결과로 사료된다.<sup>15)</sup> 즉 Hp의 Fur 단백질은 redox potential 조절에 관여하는 효소작용의 조절에 관여하는 것으로 사료되며 따라서 본 연구에서는 Fur 단백질의 N-말단의 3번째 아미노산의 변이가 Mtz에 대한 내성을 증가시키는 것에 착안하여 다양한 N-말단 돌연변이를 도입

하고 그 효과를 Mtz에 대한 내성의 변화로 표현형을 확인하여 Fur 단백질의 N-말단의 기능을 알아보고자 하였다.

실험 방법

Hp 균주 및 배양방법

본 실험에 사용한 균주는 Hp 26695모균주 및 그 유도체로서 Table I에 나타내었으며 각 균주의 배양에는 기본적으로 brain heart infusion agar(Difco) 배지에 horse blood(Invitrogen) 7%, Isovitalex(BBL) 0.4%, vancomycin(6 µg/ml), amphotericin B (8 µg/ml), Trimethoprim(5 µg/ml)을 첨가하여 사용하였다(이하 BHI agar라 칭함). 돌연변이체 선발을 위해 필요에 따라 BHI agar 배지에 chloramphenicol은 15 µg/ml 농도, kanamycin은 20 µg/ml 농도로 가하여 배양하였으며 감수성 시험을 위해 Mtz은 필요에 따라 다양한 농도로 첨가하여 사용하였다. 균주의 배양환경은 37°C 배양기에 5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> 및 85% N<sub>2</sub> 가스를 공급하여 미호기성 상태를 유지하며 균주를 배양하였다. 특히 본 실험에서는 돌연변이의 위치에 따라 Mtz에 대한 저항성/감수성의 spectrum을 다양하게 하기 위하여 이미 Mtz에 대한 내성관

Table I – The strains that used in this study

Strains	Genotypes	Phenotypes	ref.
Hp 26695 #1.4 wt fur	<i>rdxA-</i> , <i>frxA-</i> , <i>mdaB-</i> , <i>ribF-</i>	190R/220S	14,17
Hp 26695 #1.4(delata-fur)	Delta <i>fur::kan</i> was introduced into #1.4	160R/190S	this study
Hp 26695 # 1.4 wt fur-cat	<i>cat</i> was introduced into #1.4	190R/220S	this study
Hp 26695 #1.4 wt fur←R3I	Hp 1027(R3I)	220R/250S	14,17

**Table II** – Primers used for *H. pylori* gene amplification. Italicized means complementary sequences that served as a tail for 3 fragment assembly. Complementary to the Pylori Gene coordinates listed

Target site	Primer name	Pylori gene coordinates (5'→3')	Sequences (5'→3')
<i>fur</i> flanking region	x5K-F	1089716-1089740	cct taa ttt agc cgc ttc ttg ttt g
	x4-R	1091135-1091115	ctg tag agt tgc attg gaa ttt gtc a
<i>fur-cat</i>	C1x2	1090706-1090682	atc cac ttt tca atc tat atc cca tta aag ata gcc cta tct aag c
	C2x3	1090682-1090706	ccc agt ttg tgc cac tga taa gct tag ata ggg cta tct tta atg g
$\Delta fur$ -kan	kanF x6	1090210-1090184	atg gtt cgc tgg gtt tat cct gat atc ttc ctt atc cgt aaa atg a
	aphaR x3	1090682-1090706	tta ctg gat gaa ttg ttt tag tac cgc tta gat agg gct atc ttt aat gg
Arg3 random	R3n-F	1090193-1090239	gga taa gga aga tat cag cat gaa aVN Btt aga aac ttt gga atc ca
	R3n-R	1090239-1090193	tgg att cca aag ttt cta aVN Ntt tca tgc tga tat ctt cct tat cc
Flag tag	R2A	1090661-1090640	ttt atc atc gta atc ttt ata atc aca ttc act ctc ttg gca ttc t
	F3A	1090662-1090697	gat tatt aaa gat gac gat gat aaa taa aag att tta aaa aag aag ctt aga tag ggc tat
<i>aphA</i> gene	kanF		gat aaa ccc agc gaa cca ttt ga
	kanR		ggt act aaa aca att cat cca gta a
<i>cat</i> gene	camF		gat ata gat tga aaa gtg gat aga ttt a
	camR		tta tca gtg cga gaa act ggg

런 유전자가 변이된 유전적 배경을 갖고 있는 Hp 26695 #1.4 (*rdxA*<sup>-</sup>, *fixA*<sup>-</sup>, *mdaB*<sup>-</sup>, *ribF*<sup>-</sup>, 190R/220S)를 사용하였다.<sup>16,17)</sup>

### Hp 26695의 유전자 조작

Hp의 중요 전사조절인자인 Fur 단백질의 기능을 알기 위해 야생형 *fur* 유전자를 knockout 시킨 돌연변이체를 만들어 형질전환 실험의 recipient cell 로 사용하였으며 Fur 단백질 N-말단에 random mutation 도입 및 C-말단에 FLAG tag 도입을 하기위한 야생형 유전자의 경우는 형질전환체의 선발을 쉽게 하기 위한 목적으로 chloramphenicol 내성 유전자인 *cat* gene을 marker 유전자로 wild type *fur* 유전자의 down stream 위치에 삽입하여 사용하였다. 본 실험에 사용한 primer 는 Invitrogen(CA, U.S.A.)사에서 합성하여 사용하였으며 Table II에 사용한 primer를 나타내었다.

**Hp 26695  $\Delta fur::kan$  돌연변이체의 제조** – Tan<sup>18,19)</sup> 등의  $\Delta ure AB :: cat$  제조와 유사한 방법을 이용하여 제한효소를 사용하지 않고 PCR 기법을 이용하여 제조하였다. *fur* 유전자 (HP1027)를 완전히 제거하고 kanamycin resistance cassette (*aphA*, plasmid pIP 1433)을 도입하기 위하여 *fur* 유전자 flanking region에 해당하는 primer x5K-F와 x4-R, *aphA* 유전자를 도입하기 위해 primer kanFx6와 aphAR x3 및 kanF와 aphAR(1402 bp of kanamycin resistance cassette)를 사용하여 PCR 산물 A(upstream region of *fur*), B(*aphA*) 및 C(downstream region of *fur*)를 각각 증폭 후 3개의 PCR 산물을 한꺼번에 primer x5K-F와 x4-R을 이용하여 재 증폭하여 조합하였다.

**Hp 26695 wild type *fur-cat* 돌연변이체의 제조** – 야생형 *fur* 유전자에 돌연변이를 유도 후 돌연변이체의 효율적인 선발을 하기 위하여 marker 유전자로 chloramphenicol resistance cas-

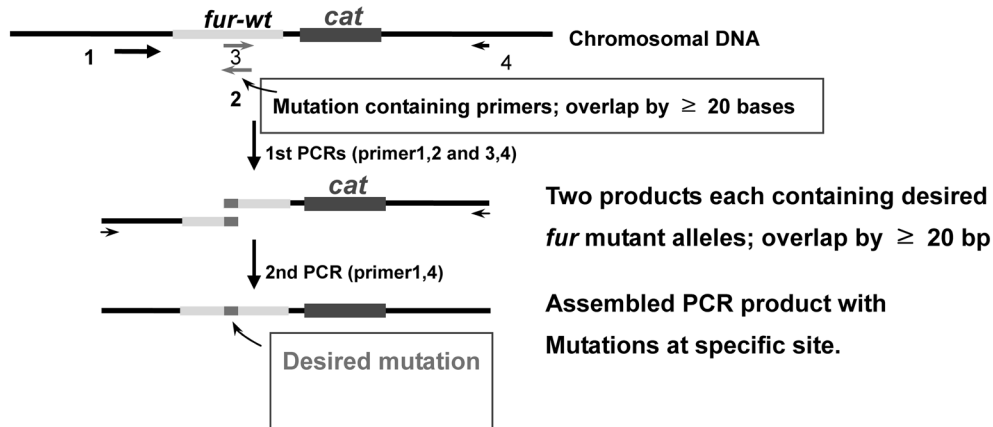
sette을 *fur* 유전자 downstream 방향에 삽입하고자 하였다. 사용한 primer는 *fur* 유전자 flanking region에 해당하는 primer x5K-F와 x4-R와 *cat* 유전자를 증폭하기 위하여 camF와 camR (*Campylobacter coli* plasmid C589) 및 c1x2와 c2x3를 사용하였다. PCR 산물 A(from 500 bp upstream of *fur* to entire *fur* region), B(*cat* region) 및 C(downstream region of *fur*)를 각각 증폭 후 3개의 PCR 산물을 primer x5K-F와 x4-R을 이용하여 한꺼번에 재 증폭하여 조합하였다.

### Error prone PCR

*fur* 유전자에 특정위치가 아닌 전체유전자에 무작위 돌연변이를 유발하고 각 변이체의 Mtz 내성의 변화를 확인하기 위하여 error prone PCR을 다음과 같이 실시하였다.<sup>20)</sup> PCR 반응은 20 f mol wild type genomic DNA(wt *fur-cat*), 각각 30 pmole의 primer(x5k-F, x4-R), 5 unit *Taq* polymerase, 0.2 mM dGTP, 0.2 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dTTP, 0.5 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 × PCR Buffer [1× buffer는 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl(pH 8.3)]을 함유하도록 하였으며 94°C 10분간 denaturaiotn 후, 94°C 40초, 55°C 40초, 72°C 2 min 과정을 30 회 반복 실시 후 72°C에서 10분간 반응 후 종결하였다.

### PCR 반응에 기초한 Fur 단백질 N-말단의 돌연변이 및 C-말단 Flag tag 도입

Random mutation 뿐 아니라 *fur* 유전자의 특정부위를 지정하여 돌연변이를 도입하고자 하였으며 그 목적부위로는 N 말단에 해당하는 3번째 아미노산인 arginine을 선택하였다. 이미 3번째 아미노산인 Arg가 Ile로 변이된 경우 야생형 균주보다 Mtz 내성이 증가한 것이 확인되었고,<sup>14,17)</sup> 따라서 획득형질로 알려진 R3I



**Fig. 2** – PCR-based site specific mutagenesis of *fur*. The following four primers were used; primer1 (x5K), 2 (R3n-R for codon 3 and R2A for flag tag) 3 (R3n-F for codon 3 and F3A for flag tag), 4 (x4).

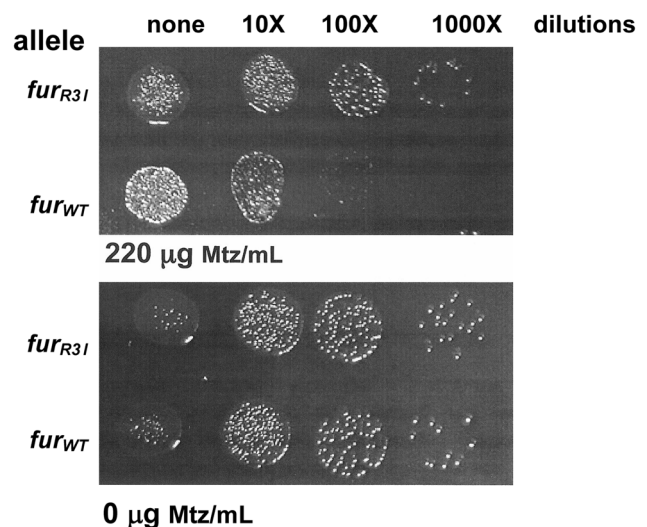
를 기초로 코돈 3에 다양한 아미노산의 변화로 Mtz에 대한 내성의 변화를 확인하고자 하였다. Random mutation을 도입하고자 *fur* 유전자의 flanking 영역에 해당하는 primer x5K-F와 x4-R와 mutagenic primer인 R3n-F 및 R3n-R을 사용하였다. 이때 codon 3이 nonsense mutation이 되는 것을 가능한 방지하기 위하여 3번째 codon을 NNB(forward)/VNN(reverse)로 디자인 하였으며 Fig. 2에서 보는 것과 같은 PCR 방법으로 돌연변이체를 만들었다. 한편 Hp Fur 단백질의 분리 정제를 목적으로 FLAG tag를 *fur* 유전자의 C-말단에 삽입한 돌연변이체도 만들었으며 이 변이체를 이용해 C-말단 변형과 Mtz 내성을 비교하여 C-말단의 기능도 알아보려고 하였다. Flag tag 삽입을 위한 primer는 x5k-F와 x4-R 및 R2A와 F3A를 사용하였다.

#### Hp 26695의 자연 형질 전환

Hp의 형질전환은 다음과 같이 Israel<sup>21)</sup>의 방법을 변형하여 자연형질전환을 실시하였다. -70°C에 보관하고 있던 recipient 균주(Hp 26695  $\Delta fur:kan$ )를 BHI agar에 도말하고 미호기성 상태에서 3일간 배양하였다. 잘 자란 균주를 새로운 배지에 옮기고 하룻밤 전 배양하였다. 다음날 전 배양한 균주를 loop으로 긁어 모은 후 새로운 BHI agar plate의 중앙에 4~5 cm 직경 크기로 도말 후 4~6시간 정도 배양하여 exponential phase까지 배양 후 목적하는 genomic DNA나 PCR 산물인 mutated DNA ~1  $\mu$ g을 competent cell과 잘 혼합 후 over night 배양하였다. 다음날 균주를 적절한 항생제를 함유한 선택 배지에 도말 후 2~3일 정도 배양하면서 형질전환체 집락의 생성을 관찰하였다.

#### Mtz 저항성의 측정

Mtz에 대한 저항성은 EOP 방법에<sup>16)</sup> 따라 실시하였다. -70°C에 보관하고 있던 Hp 균주를 Mtz를 함유하고 있지 않은 BHI agar에 3일 동안 배양 후 새로운 drug-free 배지에 다시 계대하



**Fig. 3** – Semi-quantitative tests of Mtz resistance: efficiency of colony formation by single cells. ~20-fold difference in efficiency colony formation (eop) on Mtz 220 agar. No such difference in eop on Mtz 190 agar (not shown).

여 하룻밤 더 배양하여 감수성 검사에 사용하였다. 대수기 정도로 자란 Hp 균주를 PBS buffer에 10배 계열 희석하여 모든 희석계열의 균을 일정농도의 Mtz를 함유한 배지에 10  $\mu$ l씩 접종하여 미호기성 배양환경에서 배양하였다. 감수성과 저항성의 판정은 균의 각 희석계열을 spotting한 Mtz 함유 plate에서 자란 colony 숫자가 10배 감소한 Mtz 농도를 감수성 농도로 판정하였다(Fig. 3).

#### 결과 및 고찰

##### Error prone PCR 법에 의해 만들어진 *fur* 돌연변이체

Hp *fur* 유전자에 무작위적으로 돌연변이를 유발하고 *fur* 돌연

변이체와 그 Mtz 내성의 관계를 비교하기 위하여 error prone PCR을 실시하였다. *fur* 유전자 upstream 영역 500 bp, downstream 영역 500 bp 정도의 염기서열 유사성을 갖고 있는 Error prone PCR 산물을 Hp 26695 #1.4  $\Delta fur::kan(160R/190S)$  균주에 염기유사성에 기초한 자연형 질전환 후 chloramphenicol을 15  $\mu\text{g/ml}$  함유하는 배지에 3일간 배양 하였다. chloramphenicol 배지에서 자란 집락 30개를 무작위로 선별 후 kanamycin을 (20  $\mu\text{g/ml}$ ) 함유한 배지와 chloramphenicol을 15  $\mu\text{g/ml}$  함유한 배지 및 Mtz을 200  $\mu\text{g/ml}$  농도로 함유한 배지에 streaking 후 kanamycin 배지에서는 자라지 못하고 chloramphenicol 배지에서만 자란 집락 중 Mtz 200  $\mu\text{g/ml}$  이상에서 자란 균주를 *fur* 유전자의 돌연변이에 의한 Mtz 저항성의 증가의 결과로 판단하고 다음 실험에 사용하였다. 무작위로 선별된 집락의 99% 이상이 kanS/CamR의 표현형을 나타내어 염기서열 유사성에 기초한 형질전환의 효율성이 우수함을 알 수 있었다. Error prone PCR 법에 의해 Mtz에 대한 저항성이 증가한 돌연변이체를 선별하고자 하였으며 따라서 야생형 *fur* 균주가 나타내는 Mtz 내성 보다 높은 농도(190  $\mu\text{g/ml}$ )에서 자라는 균주를 선별하여 DNA 염기 서열의 변화를 확인하였다. 그 결과 Fig. 4와 같은 돌연변이체를 얻었으며 각 균주의 Mtz에 대한 phenotype은 220~250  $\mu\text{g/ml}$  정도의 범위를 나타내는 것을 알 수 있었다. 따라서 Fur 단백질의 특정부위의 돌연변이는 Mtz에 대한 저항성을 증가시키는 것을 알 수 있었다. 특히 목적인 target site인 N-terminal arm영역의 경우 기존 R3I mutant와 동일한 R3I 돌연변이체가 error prone의 결과에서도 1균주가 획득되었으며 흥미롭게 E8K(220R/250S)의 변이체도 얻었다. 한편 본 실험의 결과 Mtz 내성이 증가한 돌연변이체중 Fur의 DNA binding domain으로 알려진 코돈 57 (K57T), Fe-binding domain으로 알려진 코돈38(R38H), 40 (G40D), 41(T41A) 및 95(E95G) 번째 아미노산이 변한 돌연변이체를 얻었으며 이는 *fur*의 돌연변이가 직접 DNA결합에 영향을 미치든지 또는 Fe-binding 여부에 따른 DNA-binding 효율의 변화에 기인하여 Mtz 활성화에 관여하는 효소의 활성을 조절한 것으로 사료된다.<sup>13,22,23)</sup>

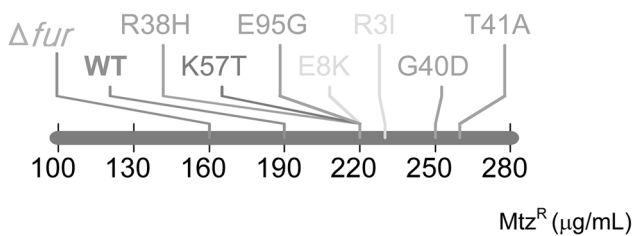


Fig. 4 – Error prone PCR mutagenesis of *fur* and selected for hyperresistance in many steps. Fur alleles have varied quantitative effects on Mtz resistance. Mutations located near: Fe-binding site (R38H, G40D, T41A, E95G), N-terminal arm (R3I, E8K), DNA-binding domain (K57T).

Fur 단백질의 N 말단 codon 3 및 C 말단 Flag tag 도입

Mtz 감수성 및 저항성에 미치는 Fur 단백질의 N-terminal 및 C-terminal의 영향을 보기 위하여 PCR 방법을 이용하여 fur 유전자 N 말단과 C-말단 특정부위에 site-specific mutation을 실시하였다. Hp Fur 단백질은 기존의 대장균이나 슈도모나스균에서 볼 수 없는 약 9개의 아미노산을 더 갖고 있는 신장된 N-terminal arm을 갖고 있고 따라서 본 연구에서는 이러한 N-terminal arm이 어떠한 역할을 하는지를 확인하기 위하여 돌연변이를 유발하고 그 phenotype을 Mtz에 대한 저항성의 변화로 확인하고자 하였다. Error prone PCR을 통한 random mutation의 결과 N-terminal 영역에 다양한 돌연변이체를 얻지 못하였으며 획득형질 돌연변이체인 R3I의 경우 코돈3의 Arg이 Ile으로의 변화가 Mtz에 대한 내성의 변화를 나타내었기에(220R/250S vs 190R/220S)<sup>14,17)</sup> 우선 3번째 아미노산인 Arg을 target으로 돌연변이를 실시하였다. 우선 codon 3의 arginine 위치가 stop codon을 제외한 모든 아미노산이 허용되도록(AGA→NNB) mutagenic primer를 제작 하였다(forward primer의 R3는 NNB, reverse primer는 VNN으로 design하여 stop codon의 형성을 가급적 억제하였다). wt *fur-cat* DNA를 template로 PCR 반응을 실시 후 *fur* 유전자 upstream 영역 500 bp, downstream 영역 500 bp 정도의 염기서열 유사성을 갖고 있는 PCR 산물을 Hp 26695 #1.4  $\Delta fur::kan(160R/190S)$  균주에 염기유사성에 기초한 자연형 질전환 후 CamR/KanS 집락을 무작위 선별하여 야생형 균주와 함께 Mtz에 대한 감수성 시험을 실시하고 유의성 있는 균주의 염기서열을 확인하였다. 그 결과 R3S(130R/160S)처럼 내성이 현저히 감소한 돌연변이체와, R3G(160R/190S), R3D(160R/190S), R3T(160R/190S) 등 null mutant와 동일한 내성을 나타내는 돌연변이체를 얻었다. 또한 R3P(190R/220S), R3L(190R/220S)는 wild type과 동일한 내성을, R3K(220R/250S), R3I(220R/250S) 등은 wild type 보다 내성이 증가한 것을 확인하였다. 각 N-terminal 돌연변이체의 genotype과 phenotype은 Fig. 5에 나타내었다. 즉 N-terminal 영역의 3번째 아미노산의 변화는 Mtz 내성에 크게 영향을 나타내는 것을 알 수 있었다. 한편 Fur 단백질의 순수 분리 정제를 목적으로 C-terminal에 Flag tag을 도입하고자 하였다. 또한 이를 이용하여 C-terminal과 Mtz 내성의 상관성을 보고자 하였다. Fur 단백질의 C-terminal은 Fur

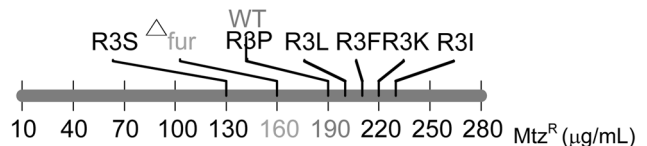


Fig. 5 – Spectrum of MtzR values for several R3 *fur* alleles. MtzR values ( $\mu\text{g/ml}$ ) were determined as described in materials and methods.

단백질이 dimerization되어 고유한 기능을 나타내는데 결정적이 역할을 하며<sup>24)</sup> 따라서 C-terminal의 변이가 어떻게 Fur의 기능에 영향을 미치는지 Mtz 저항성으로 비교하였다. 그러나 Flag tag 삽입의 결과 delta-fur과 동일한, fur 야생형보다 내성이 감소한 것을 확인할 수 있었으며(160R/190S, data not shown) 이는 flag tag 삽입에 의해 Fur 단백질의 dimerization에 영향을 받은 것으로 사료된다. 앞으로 본 연구자들은 지금까지의 결과를 바탕으로 PCR법에 기초한 다양한 돌연변이체를 제조하고(DNA binding site, iron binding site 등) 구조변화와 기능의 관계를 연구하여 Hp Fur의 새로운 조절경로(reductive potential 등) 등을 밝혀 Hp 균주가 사람의 위점막 세포에 정착하고 질병을 유발하는 과정에서 Fur 단백질과의 상관성을 보고자 한다.

## 결 론

Hp의 전사조절인자인 Fur 단백질은 그 구조에서 기존 대장균이나 슈도모나스 또는 살모넬라균과는 구조적으로 다른 특징으로 갖고 있으며 본 연구에서는 이러한 특징적인 영역중 N-말단의 기능을 보고자 하였다. Random mutation 및 site-specific mutation을 통한 돌연변이체 제조 및 Mtz 내성으로 확인한 표현형의 분석을 통하여 이 영역의 특정 아미노산의 변화는 Fur 단백질의 유전자 조절 기전에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 즉 Fur 단백질의 변이가 pro-drug인 Mtz를 환원시켜 bactericidal hydroxylamine으로 활성화시키는 과정에서 redox potential과 관여하는 유전자의 조절에 관여하고 있음을 확인하였다.

## 참고문헌

- Westblom, J. U., Czinn, S. J. and Nedrud, J. G. (ed.) : Current topics in microbiology and immunology, vol. 241, gastro-duodenal disease and *Helicobacter pylori*: pathology, diagnosis and treatment. Springer Press, Berlin, Germany (1999).
- Parsonnet, J. : Helicobacter and gastric adenocarcinoma, pp. 372-408. In J. Personnet (ed.). Microbes and malignancy: Infection as a cause of human cancer. Oxford University Press, New York, N.Y. (1999).
- Blaser, M. J. and Berg, D. E. : *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J. Clin. Investig.* **107**, 767 (2001).
- Ramarao, N., Gray-Owen, S. D. and Meyer, T. F. : *Helicobacter pylori* induces but survives the extracellular release of oxygen radical from professional phagocytes using catalase activity. *Mol. Microbiol.* **38**, 103 (2000).
- Nardone, G., Rocco, A. and Malfertheiner, P. : *Helicobacter pylori* and molecular events in precancerous gastric lesions. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **20**, 261 (2004).
- Hazell, S. L., Harris, A. G. and Trend, M. A. : Evasion of the toxic effects of oxygen. In *Helicobacter pylori*; physiology and genetics. Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. and Hazell, S. L. (eds.). Washington DC; American Society for Microbiology Press, pp. 167-175 (2001).
- Tourati, D. : Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* **373**, 1(2000).
- Andrew, S. C., Robinson, A. K. and Rodriguez-Quinones, F. : Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 215 (2003).
- Bagg, A. and Neidland, J. B. : Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **26**, 5471 (1987).
- Hanke, K. : Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 172 (2001).
- Florian, D. E., Stefan, B., Barbara, W., Jeroen, S., Ulrike, M., Johannes, G. K., Ernst, J. K., Manfred, K., Aronoud, H. M. van V. and Gerg, H. : Transcriptional profiles of *Helicobacter pylori* Fur- and iron regulated gene expression. *Microbiology* **151**, 533 (2005).
- Hall, H. K. and Foster, J. W. : The role of Fur in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically separable from its role in iron acquisition. *J. Bacteriol.* **178**, 5683 (1996).
- Pohl, E., Haller, C. J., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E. and Vasil, L. M. : Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Molecular Microbiology* **47**(4), 903 (2003).
- Albert, D. T., Dailidien, D., Dalidien, G., Jason E. N., Awdhesh, K., Todd, A. R., Michale, M., Jaz, S., Roland, D. G. and Berg, D. E. : Mutational discovery in bacterial genomes: metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Nature Meth.* **2**, 951 (2005).
- Garry, S., Avery, G., Ausra, R., Nicky, J. H., Asish, K. M., Berg, D. E. and Hoffman, S. P. : Enzymes associated with reductive activation and action of nitrozoamide, nitrofurans, and metronidazole in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **146**(7), 2116 (2002).
- Jeong, J. Y., Mukhopadhyay, A. K., Dailidien, D., Wang, Y., Velapatino, B., Gilman, R. H., Parkinson, A. J., Nair, G. B., Wong, B. Y., Lam, S. K., Mistry, R., Segal, I., Yuan, Y., Gao, H., Alarcon, T., Brea, M. L., Ito, Y., Kersulyte, D., Lee, H. K., Gong, Y., Goodwin, A., Hoffman, P. S. and Berg, D. E. : Sequential inactivation of *rdxA* (HP0954) and *frxA* (HP0642) nitroreductase genes cause moderate and high-level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **182**(18), 5082 (2000).

- 17) Dailidien, D., Chang, D., Dailidien, G. and Berg, E. D. : Finding mutations implicated in Mtz hyperristance. Unpublished data.
- 18) Tan, S. and Berg, E. D. : Motility of urease-deficient derivatives of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **186**(3), 885 (2004).
- 19) Dailidien, D., Tan, S., Zhang, O. K., Lee, A. H., Severinor, K. and Berg, E. D. : Urea sensitization caused by separation of *Helicobacter pylori* RNA polymerase beta and beta' subunit. *Helicobacter* **12**(2), 103 (2007).
- 20) Vartanian, J. P., Henry, M. and Wain-Hobson, S. : Hypermutagenic PCR involving all four transition and a sizeable proportion of transversion. *Nucleic Acids Resch.* **24**, 2627 (1996).
- 21) Israel, D. A., Lou, A. S. and Blaser, M. J. : Characteristics of *Helicobacter pylori* natural transformation. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**, 275 (2000).
- 22) Vasil, L. M. and Ochsner, A. U. : The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol. Microbiol.* **34**(3), 399 (1999).
- 23) Peredo, A. G., Saint-Pierre, C., Latour, J. M., Michaud-Soret, I. and Forest, E. : Conformational changes of the ferric uptake regulation protein upon metal activation and DNA binding; first evidence of structural homologies with the diphtheria toxin repressor. *J. Mol. Biol.* **310**, 83 (2001).
- 24) Delany, I., Sophon, G., Rappuoli, R. and Scarlato, V. : The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **42**, 1297 (2001).