

바실러스 서브틸리스의 *fsrA* small RNA에 의한

TCA 회로의 유전자 조절

이 상 수

배재대학교 생명공학과

Control of Genes in TCA Cycle by *fsrA* Small RNA

in *Bacillus subtilis*

Sang Soo Lee

Department of Life Science and Technology, Pai-Chai University

요 약

바실러스 서브틸리스 *fsrA* 유전자는 대장균의 *ryhB* 유전자와 유사한 역할을 하는 유전자로 철 조절 유전자인 *fur* 유전자의 조절을 받는다. 철의 농도가 높을 때에는 *ryhB* 유전자의 전사가 *fur*에 의해 억제되지만 철의 농도가 낮아지면 세포내의 철을 보다 효율적으로 절약하기 위하여 *ryhB*의 전사 억제가 풀려 *ryhB* small RNA가 생성되고 이는 철을 함유하는 *sdhCDAB* (succinate dehydrogenase) 유전자의 발현을 억제한다. 본 연구에서는 바실러스에서 이에 상응하는 유전자인 *fur*와 *fsrA*의 결실 균주들을 대상으로 여러 TCA 회로의 유기산을 탄소원에서의 이들 균주들의 성장을 측정하였다. 실험 결과 대장균의 *fur/ryhB*와 마찬가지로 succinate를 탄소원으로 할 경우 바실러스 *fur* 결실 균주는 성장이 매우 적었지만 *fur/fsrA* 결실 균주는 정상적으로 성장하였다. 또한 succinate 이외에 citrate, fumarate의 경우도 succinate와 유사한 결과를 보이는 반면에 malate의 경우 *fur*나 *fur/fsrA*의 결실 균주들에서 성장이 큰 차이를 보이지 않았다. 이 결과 TCA 회로에서 succinate

Corresponding Author : Sang Soo Lee, Department of Life Science and Technology, Pai-Chai University, Daejeon, Korea, 302-735, E-mail: sslee@pcu.ac.kr

상부에 해당하는 유전자들은 *fsrA*에 의해 억제되나 succinate 하부에 해당하는 유전자들은 *fsrA*에 의해 억제되지 않는 것으로 생각된다.

Abstract

The *fsrA* gene in *Bacillus subtilis* has an analogous role of *ryhB* in *E. coli* and is controlled under *fur*, the iron regulator gene. At high concentration of iron the transcription of *ryhB* is repressed by *fur* and *ryhB* is transcribed under low concentration of iron. To spare iron produced *ryhB* small RNA represses the expression of *sdhCDAB* (succinate dehydrogenase). This study shows the growth rate of *Bacillus subtilis* strain of *fur* and *fur/fsrA* deletion mutants using organic acids of TCA cycle as carbon source. Mutant strain of *fur* does not grow well with succinate carbon source, but further deletion of *fsrA* regain to the growth of wild type strain. Also, nearly same results were observed with citrate and fumarate. These results are consistent to those of *E. coli* system. But *fur* and *fur/fsrA* deletion mutants grow well as much as the growth of wild type with malate carbon source. These results showed that upstream genes of succinate of TCA cycle are repressed by *fsrA*, but downstream of succinate are not repressed by *fsrA*.

Keywords: *Bacillus subtilis*, TCA cycle

I. 서 론

철은 대부분의 모든 세포에서 필요한 원소이지만 자연으로부터 쉽게 이용할 수 없다 (1). 박테리아는 철을 얻기 위하여 철 결합 물질인 시테로포어 (siderophore)와 철 수송 시스템을 만들어 이용하고 있다(2,3). 하지만 세포 내의 철의 농도가 높아지면 철과 산소활성종의 반응으로 반응성이 강한 라디칼이 생성되고 이는 세포 내의 단백질, 핵산 및 세포막의 성분인 지질등과 반응하여 이들을 파괴 한다 (Fenton 반응). 따라서 세포 내의 철 농도는 일정하게 유지하는 것이 매우 중요하고. 이와 관련되는 철 조절 유전자로 *fur*가 (Ferric Uptake Repressor) 대장균에서 처음으로 보고되었다 (1). 이후 *fur*와 같은 유전자가 수많은 그램 네가티브 박테리아뿐만 아니라 그램 포지티브 박테리아에서도 (*Bacillus* spp. *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) 발견되었다 (4). *Corynebacterium* spp.와 *Mycobacterium* spp.에서는 각각 *dtxR*과 *ideR*이라는 유전자가 같은 역할을 하는 것으로 알

려져 있다 (5, 6). *fur*는 세포내의 철 농도에 따라 조절되는 전사 억제제로 철의 수송 및 시데로포어 합성 유전자들의 프로모터 상위 DNA에 결합하여 작용한다. *fur*는 세포내 철의 농도가 높으면 철의 수송 및 시데로포어 합성 유전자들의 합성을 억제하고, 반면에 세포 내의 철의 농도가 낮아지면 이들 유전자들의 *fur*에 의한 전사 억제가 중단되어 철 수송 단백질 및 시데로포어가 생산된다. 이와 같은 *fur*의 작용으로 세포 내의 철의 농도는 일정 수준으로 유지할 수 있게 된다 (1).

*fur*는 대장균의 *ryhB* 유전자의 전사를 억제하는데 세포내 철의 농도가 낮아지면 억제가 중단되어 *ryhB* 유전자의 전사가 진행된다. *ryhB*는 90nt의 짧은 DNA 서열로 small RNA로 작용하여 목표 mRNA의 번역과정을 억제한다 (7). 억제 기작은 안티센스로 *ryhB* small RNA와 목표 mRNA와의 염기쌍 짝짓기에 의해 일어나며 목표 mRNA의 번역이 일어나는 과정을 방해하고 RNase E의 작용으로 mRNA의 안정성을 떨어뜨린다. 대장균의 small RNA가 목표 mRNA와 염기쌍 짝짓기를 할 때 이를 도와주는 *hfq*라는 RNA chaperone이 필수적이다 (8, 9). *hfq* 유전자가 없으면 *ryhB*의 작용이 일어나지 않아 목표 유전자의 발현이 억제되지 않는다. *ryhB* small RNA에 의한 발현억제 억제되는 유전자들은 철을 함유하고 있는 단백질들로서 세포내의 철이 부족할 때 외부의 철을 수송하려는 시도와 더불어 세포내에서 꼭 필요하지 않은 철 이용을 억제함으로써 경제적으로 철을 이용하려는 전략이다. 대장균의 *ryhB* small RNA에 의해 억제되는 유전자들은 적어도 56개의 단백질을 암호화하는 18 전사체이며 대부분이 철 대사와 관련된 유전자들이다 (7). 이들 중 *sdhCDABDAB* (succinate dehydrogenase), *acnB* (aconitase), *fumA* (fumarase)의 TCA회로의 효소와 *sodB* (superoxide dismutase)등이 있다. 따라서 *fur* 결실 돌연변이의 경우 *ryhB* small RNA가 항시 발현되어 TCA회로에 관여하는 효소의 생산을 억제하게 되고, TCA 회로에 있는 유기산을 탄소원으로 이용할 수 없어 성장이 거의 일어나지 않는다. 대장균 *fur* 결실 돌연변이 균주의 경우 succinate나 fumarate를 탄소원으로 이용할 수 없다.

대장균이외의 다른 박테리아에서도 대장균의 *ryhB*와 같은 small RNA에 의한 철 조절 기능이 있다. *Pseudomonas aeruginosa*는 *prfF1*과 *prfF2*의 두 small RNAs가 있다 (10). 여러 그램 네가티브 박테리아 (*Shigella*, *Vibrio*, *Anabaena*, *Synechocystis*)에서도 철이 고갈된 상태에서 조절에 대장균에서와 같은 small RNA에 의한 조절이 매우 중요하고 이들 균주의 병독성과도 관련이 있음이 알려졌다 (11). 한편 그램 포지티브 균주에서의 철 조절에 대장균과 마찬가지로 *fur* 유전자에 의해 대장균과 유사한 방법으로 철 조절을 하고 있다. 최근 대장균의 *ryhB* small RNA와 유사한 유전자인 *fsrA* (*fur* regulated small RNA)가 발견되었고, 이들에 대한 돌연변이 균주들이 제조되었다 (personal communication). 본 논문에서는 바실러스 서브틸리스의

fur, *fsrA* 결실 돌연변이 균주들을 확보하고 TCA 회로의 여러 유기산들을 탄소원으로 이들 균주들의 성장을 측정하여 *fsrA* 유전자의 생리적 기능에 대하여 알아보하고자 하였다.

II. 방 법

사용 균주

본 실험을 위하여 사용된 야생형 바실러스 서브틸리스로 CU1065 변종을 사용하였고 돌연변이 제조를 위하여 long-flanking-homology PCR 방법이 사용된다. 이 방법으로 *fur* 유전자가 결실된 HB2501 균주와 *fur*와 *fsrA* 유전자가 결실된 균주를 Helmman 박사로부터 얻어 사용하였다.

배지 및 성장조건

바실러스 서브틸리스의 일반적인 성장배지로는 LB agar 및 broth를 사용하였다. 성장 온도는 섭씨 37도에서 하였으며 돌연변이 균주의 성장에는 항생제로 kanamycin (25ug/mL)과 chloramphenicol (10ug/mL)를 사용하였다. TCA 회로의 유기산을 탄소원으로 하여 성장을 측정하는 실험을 위해 다음과 같은 배지는 최소배지를 이용하였으며 그 조성은 아래와 같다.

최소 배지의 조성

Bacillus salts (2g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1g/L sodium Citrate $2\text{H}_2\text{O}$, 1g/L Potassium glutamate), 2mM KPO_4 buffer (pH7.0), 0.01mg/mL Tryptophan, Micronutrient (3uM $(\text{NH}_4)_6(\text{Mo}_7)_{24}$, 0.4mM H_3BO_3 , 30uM CoCl_2 , 10uM CuSO_4 , 10uM ZnSO_4 , 80uM MnCl_2), 탄소원 (2% 글루코오스, 0.8% succinate, 0.8% malate, 0.8% fumarate, 0.8% citrate)

바실러스 서브틸리스 균주들을 (CU1065, Δfur , $\Delta fur/\Delta fsrA$) LB 배지에서 배양하여 $A_{600}=0.8-1$ 의 10uL를 최소배지 배양에 접종하는데 사용하였다. 최소 배지의 배양액은 탄소원으로 각각 2% 글루코오스, 0.8% succinate, 0.8% malate, 0.8% fumarate, 0.8% citrate들을 사용하였다. 최소 배지 배양액에서 17-20 시간 배양한 후 600nm에서 흡광도를 측정하여 각 균주들의 성장을 비교하였다. 최소 배지에서의 배양은 5번씩 반복하여 평균값과 표준편차를 산출하였다.

III. 결과 및 고찰

글루코오스와 succinate 최소 배지에서의 성장

글루코오스 최소 배지에서 바실러스 서브틸리스 균주들의 성장을 비교하였다. 야생형 (CU1065)의 성장이 A_{600} 이 0.86 ± 0.09 에 비해 Δfur 는 0.54 ± 0.09 , $\Delta fur/\Delta fsrA$ 는 0.81 ± 0.09 의 성장을 보였다. 글루코오스를 탄소원으로 배양할 경우 $\Delta fur/\Delta fsrA$ 는 야생형 (CU1065)과 유사한 성장을 보이나 Δfur 는 약간 성장이 덜 자라는 것을 알 수 있었다 (그림 1). 반면에 succinate를 탄소원으로 하여 succinate를 탄소원으로 하여 배양할 경우에는 야생형에 (0.56 ± 0.1) 비하여 $\Delta fur/\Delta fsrA$ 의 성장은 (0.67 ± 0.1) 유사하나 Δfur 는 (0.20 ± 0.1) 거의 성장이 일어나지 않는 것을 확인할 수 있었다 (그림 2). 최소 배지 배양액에서의 결과를 보다 명확히 확인하기 위하여 아가 고형 최소배지에서 이들의 성장을 확인한 결과 succinate 탄소원의 경우 Δfur 의 성장이 없는 것을 알 수 있었다 (그림 3). 이 결과 대장균의 *ryhB* small RNA에 의한 succinate dehydrogenase 억제 조절을 하는 것처럼 바실러스 서브틸리스에서도 *fsrA* small RNA에 의해서 succinate dehydrogenase 억제가 일어나는 것으로 보인다.

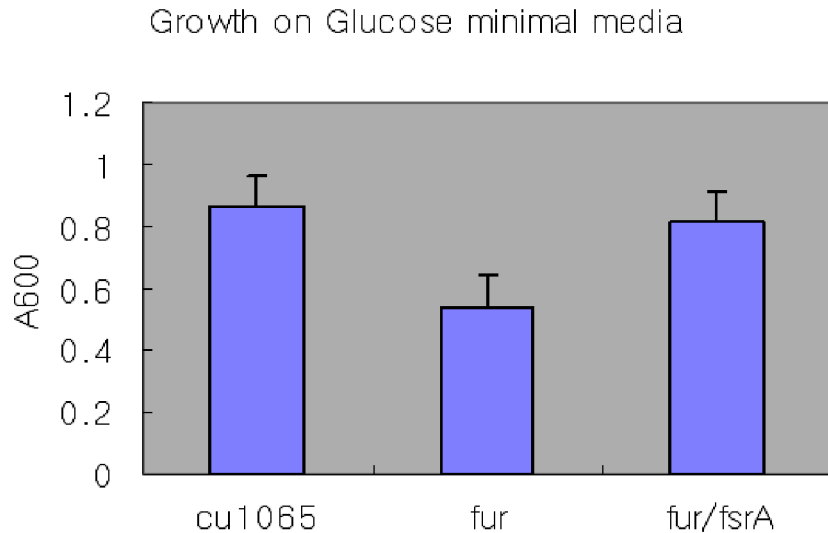


그림 1.

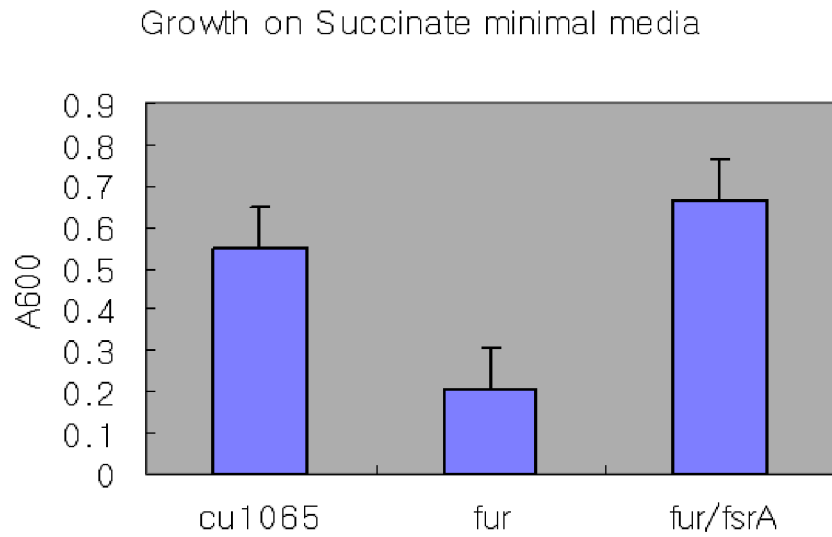


그림 2.

Growth on Succinate minimal media

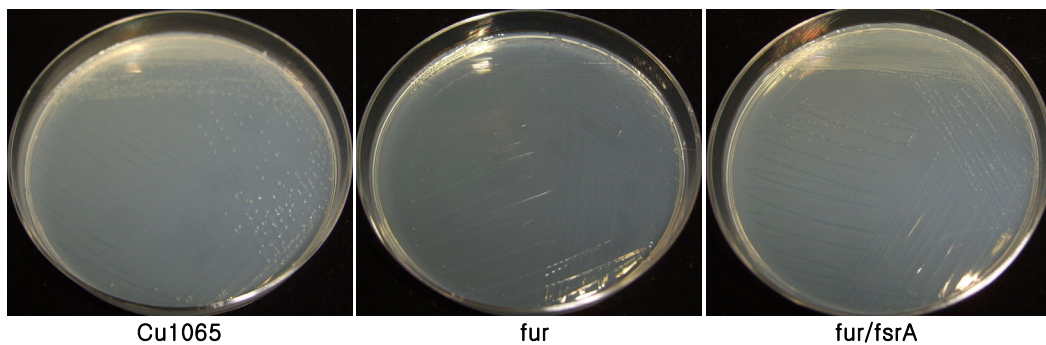


그림 3.

여러 TCA 회로 탄소원의 최소배지에서의 성장

TCA 회로에 있는 succinate이외의 다른 탄소원에서 바실러스 서브틸리스 균주들의 성장을 알아보았다 (그림4). succinate와 유사하게 citrate와 fumarate에서 Δfur 의 성장이 없는

것을 알 수 있었고 (citrate: $A_{600} = 0.06$, fumarate; $A_{600} = 0.04$). 야생형과 $\Delta fur/\Delta fsrA$ 의 성장은 citrate의 경우 야생형 0.22보다 $\Delta fur/\Delta fsrA$ 이 0.57로 보다 많이 성장하였다. fumarate를 탄소원으로 하였을 경우 야생형은 0.67 $\Delta fur/\Delta fsrA$ 는 0.6으로 비슷한 성장을 보였다. 반면에 malate의 경우 citrate와 fumarate와는 달리 이들 세 균주의 성장이 유사한 것을 알 수 있었다 (야생형; $A_{600} = 1.01$, Δfur : $A_{600} = 0.7$, $\Delta fur/\Delta fsrA$; $A_{600} = 0.84$). 이 결과 TCA 회로에서 succinate dehydrogenase 효소 유전자인 *sdhCDABDAB*의 상위 부분에 해당하는 citrate를 기질로 사용하는 aconatase와 fumarate를 기질로 하는 fumarase는 대장균에서처럼 바실러스 서브틸리스에서도 small RNA에 의해 억제 조절을 받을 가능성이 있다. 반면에 succinate dehydrogenase 하위에 있는 malate를 기질로 사용하는 malate dehydrogenase는 *fsrA*에 의해 억제조절 받지 않음을 확인 할 수 있었다.

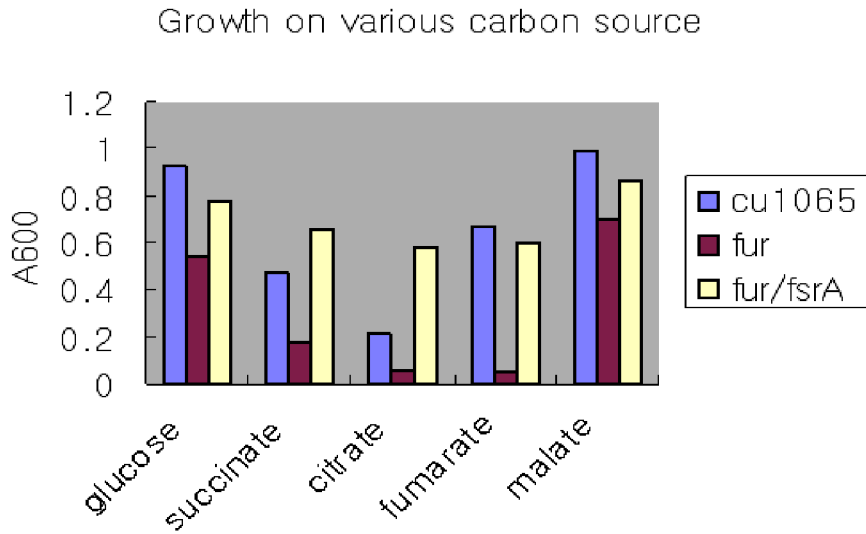


그림 4.

IV. 참고문헌

1. Andrews SC, Robinson AK, Rodriguez-Quinones F (2003) FEMS Microbiol Rev 27, 215-237.
2. Wandersman C, Delepelaire P (2004) Annu Rev Microbiol 58, 611-647.

3. Faraldo-Gomez JD, Sansom MS (2003) *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 105-116.
4. Lee JW, Helmann JD (2007) *Biometals* 20, 485-499.
5. Brune I, et al. (2006) *BMC Genomics* 7, 21.
6. Rodriguez GM (2006) *Trends Microbiol* 14, 320-327.
7. Masse E, Vanderpool CK, Gottesman S (2005) *J Bacteriol* 187, 6962-6971.
8. Masse E, Escorcia FE, Gottesman S (2003) *Genes Dev* 17, 2374-2383.
9. Geissmann TA, Touati D (2004) *EMBO J* 23, 396-405.
10. Wilderman PJ. et al. (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 9792-9797.
11. Masse E, Salvail H, Desnoyers G, Arguin M (2007) *Curr Opin Microbiol* 10, 140-145.