

# 운동성 세균의 환경오염물질 감지를 위한 주화성 분자 기구

김혜은 · 카토준이치<sup>1</sup> · 이상호<sup>2</sup> · 심현우<sup>3</sup> · 이창수\*

충남대학교 화학공학과, <sup>1</sup>히로시마대학 선단물질연구과, <sup>2</sup>한국생산기술연구원, <sup>3</sup>한국과학기술연구원

## The molecular mechanism of bacterial chemotaxis to environmental pollutants

Hye-Eun Kim, Junichi Kato<sup>1</sup>, Sang-Ho Lee<sup>2</sup>, Hyun-Woo Shim<sup>3</sup>, and Chang-Soo Lee\*

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea.

<sup>1</sup>Department of Molecular Biotechnology, Hiroshima University, Hiroshima 739-8530, Japan.

<sup>2</sup>Korea Institute of Industrial Technology (KITECH), Ansan 426-791, Korea.

<sup>3</sup>Korea Institute of Science and Technology (KIST), Seoul, 136-791, Korea.

**Abstract** Chemotaxis is the movement of an organism toward chemical attractant and away from chemical repellents. Several bacteria are known to cometabolically degrade some pollutants and attracted to the pollutants. The chemotactic responses to these compounds influence the efficiency of bioremediation because the first precondition of pollutant degradation is definitely confrontation between microorganisms and pollutants. In this review, we summarize present knowledge of about the chemotactic mechanism to environmental pollutants of *Pseudomonas* species.

**Keywords:** chemotaxis, pollutant, *Pseudomonas*, bioremediation

### 서 론

많은 세균들은 운동성을 가지고 있다. 운동성 세균은 단지 아무 의미없이 떠돌아 다니는 것이 아니라 항상 자기 주변의 화학물질의 농도를 모니터링하면서 자신에게 이익이 된다고 판단하는 화학물질에는 모이고, 이익이 되지 않는다고 판단되는 화학물질로부터는 도망을 가는 행동학적 응답을 보이는데 이를 주화성이라고 한다(1). 주화성 연구가 가장 잘 진행되어 있는 *Escherichia coli*의 경우, Amino acids (Ala, Gly, Asp, Glu, Ser 그리고 pepton), Sugars (Galactose, Sucrose, Maltose 그리고 Glucose), O<sub>2</sub>등을 감지하여 유인반응 (정주화성)을 보이는 반면, 중금속 (Co<sup>2+</sup>와 Ni<sup>2+</sup>), 약산염 (Sodium benzoate과 Sodium acetate) 그리고 소수성물질 (Indole, Leu, 그리고 phenol)에는 기피응답 (부주화성)을 보인다. 세균의 주화성에서 유인물질은 기본적으로 증식기질에 해당하고 기피물질은 대체로 유해

물질이라고 알려져 있으며 특히, 식물공생세균 혹은 병원 세균인 *Rhizobium*속 세균이나 *Agrobacterium*속 세균은 기생할 숙주를 결정하기 위하여 주화성을 이용하기 때문에 식물유래의 화학물질에 강한 유인반응을 보인다(2-5).

여러 세균 중에서 Bioremediation에 이용가능하다고 평가된 환경오염물질 분해세균의 상당수는 *Pseudomonas*속과 그 유사균으로 운동성을 가지고 있다. 이들의 특징은 환경오염물질에 대하여 정이나 부의 주화성 응답을 보이는 것인데 특히 자신이 분해가 가능한 오염물질에 대해서는 정주화성을 보이는 경우가 상당수 보고되어 있다(Table 1). 이 사실이 흥미를 모으는 까닭은 오염물질에 대한 정주화성이 Bioremediation 또는 In situ bioremediation의 효율을 향상시킬 수 있는 중요한 인자가 될 수 있기 때문이다(13, 19).

오염물질의 생물학적 분해라는 작업은 무엇보다도 먼저 세균이 오염물질과 만나는 것에서부터 시작된다 하여도 과언이 아니다. 오염물질 자체가 난용성이거나 혹은 세균이 토양이나 지하수 층에서 난이동성 층과 같은 장애에 부딪힐 경우, 분해세균의 오염물질에 대한 조우는 제한을 받게 되고 만다. 그러나 만약 이런 상황에 부딪혔

### \*Corresponding author

Tel: +82-42-821-5896, Fax: +82-42-822-8995

e-mail: rhadum@cnu.ac.kr

**Table 1.** Chemotaxis to pollutant of microorganisms

Strain (Degradable chemical)	Chemotactic chemical <sup>a</sup>	Referenses
<i>Burkholderia cepacia</i> G4 (Toluene, TCE)	TCE, PCE, cis-DCE, 1,1-DCE, VC, toluene	(6)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	TCE, PCE, TCA, <u>Dichloromethane, Chloroform, Thiocyanicacidethyl, iso-thiocyanicacidethyl</u> TCE, PCE, TCA, dichloromethane, chloroform, Toluene, 2,4-D, 2,4,5-T	(7),(8),(9)
<i>Pseudomonas putida</i> F1 (Toluene, TCE)	TCE, PCE, cis-DCE, trans-DCE, 1,1-DCE, benzene, Toluene, ethylbenzene, isopropylbenzene, naphthalene	(6),(10)
<i>P. putida</i> G7 (naphthalene)	Naphthalene, biphenyl	(11),(12)
<i>P. putida</i> PRS2000	hydroxyl-benzonic acid, chlorobenzonic acid, tolyl acid	(13),(14)
<i>P. putida</i> RKJ1 (naphthalene)	Naphthalene	(15)
<i>Pseudomonas stutzeri</i> OX1 (Toluene, TCE)	TCE, PCE, cis-DCE, trans-DCE, 1,1-DCE, VC, toluene	(6)
<i>Pseudomonas</i> sp. NCIB9816-4 (naphthalene)	Naphthalene	(11)
<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134 (pJP4) (2,4-D)	2,4-D	(16)
<i>Ralstonia</i> sp. SJ98 (3-methy-4-nitrophenol)	3-methyl-4-nitrophenol, 4-nitrophenol	(17),(18)

<sup>a</sup>: The chemicals with underline are repellents. 2,4-D : 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2,4,5-T : 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid, 1,1-DCE : 1,1-Dichloroethylene, cis-DCE : cis-Dichloroethylene, PCE : tetrachloroethylene, TCA : Trichloroethane, TCE : Trichloroethylene, VC : vinyl chloride.

을 때 세균이 그 물질에 대하여 정주화성을 가지고 있다면 오염물질이 존재하는 영역까지 적극적으로 접근하여 분해를 진행시킬 수 있을 것이다. 역으로 세균이 오염물질을 기피물질로 인식하고 만다면 설사 분해세균이 강력한 오염물질 분해활성을 지니고 있다고 할지라도 오염물질의 고농도 영역에서 멀리 도망쳐 버려 결국 미분해 영역이 그대로 남고 말 것이다. 그렇다면 실제로 주화성은 환경에 존재하는 오염물질의 분해효율에 영향을 미칠 수 있을 것인가? 이 문제에 대한 현장적 검토사례는 아직 없다. 그러나 실험실 수준에서 실제로 주화성이 분해효율을 높인 사례가 Mark와 Aitken(20)에 의하여 보고된 바 있다. 그들은 naphthalene 분해균인 *Pseudomonas putida* G7균의 야생주와 naphthalene에 대한 주화성 변이주 그리고 운동성 변이주 각각의 균체 현탁액에 naphthalene을 넣은 유리 모세관을 함께 봉입하여 정치계에서 naphthalene 분해율을 조사하였다. 그 결과, naphthalene의 정주화성이 정상인 야생주에 의한 naphthalene 분해속도가 주화성 혹은 운동성을 잃어버린 균주보다 높다는 것을 밝혀냈다. 이 사실은 오염물질의 정화를 위하여 환경오염물질에 대한 주화성이 강화되도록 세균을 육종시킬 가치가 있음을 증명했다고 하겠다. 본문에서는 운동성 세균의 환경오염물질에 대한 주화성의 연구가 분자적 수준에서는 어디까지 해명되었는가를 소개하고자 한다.

### 주화성의 분자기구

먼저 주화성의 일반적인 분자기구의 설명으로부터 시작하려 한다. 세균의 주화성의 분자기구에 대해서는 대장균인 *Escherichia coli*와 쥐 치푸스균 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium을 통하여 상당히 상세하게 연구가 이루어져 있다(21). *E. coli*에서 외부의 화학적 자극은 먼저

주화성 센서단백질 혹은 메틸 수용 주화성 단백질 (methyl-accepting chemotaxis protein, MCP)이라 불리는 막 단백질에 의하여 수용된다(Fig. 1 (a)). 전형적인 MCP는 2개의 막 통과 도메인을 가지고 있고 이 사이의 영역은 페리플라즈 도메인을 형성하고 나머지 부분은 세포질 도메인을 형성한다. 이 세포질 도메인에는 메틸화 및 탈메틸화가 가역적으로 수식이 이루어지는 Gln과 Glu가 풍부한 2개의 메틸화 도메인이 존재하는데, 이 두 개의 메틸화 도메인 사이에 다시 시그널 도메인이 존재하는 구조로 되어 있다. 이 시그널 도메인은 모두 44아미노산 잔기로 이루어져 있는데 원핵생물의 MCP들은 이 서열이 상당히 높게 보존되어 있어서 이 시그널 영역을 다른 이름으로는 HCD (high-conserved domain)라고도 한다. MCP의 페리플라즈 도메인에서 화학적 자극을 감지하면 HCD가 세포내의 6종류의 주화성 단백질 (Che 단백질)로 구성된 주화성 시그널 전달계에 신호를 전달한다. 주화성 시그널 전달계는 다시 Che 단백질의 인산화 릴레이를 통하여 신호가 6종류의 단백질을 차례로 통과하게 되며, 최종적으로 그 신호는 편모로 전달되어 편모모터의 회전방향을 바꾸게 된다(Fig. 1 (b)). 다소 차이가 있기는 하지만 다른 운동성 세균의 주화성도 같은 종류의 분자 기구로 기능할 것이라고 생각되고 있다.

모든 운동성 세균들은 복수 종의 MCP를 가지고 있고, 각각의 MCP는 특유의 주화성물질을 인식하는 것으로 생각되고 있다. 즉, 어떤 운동성 세균이 인지하는 주화성 물질의 종류는 각 균이 가지고 있는 MCP에 규정된다. MCP의 HCD배열은 진정세균 혹은 원시균에서 고도로 보존되고 있으므로, HCD배열을 probe로 하여 tblastn 또는 blastp 해석을 통하여 MCP유전자나 MCP단백질을 탐색할 수 있다. *E. coli*는 모두 5개의 MCP를 보유하고 있으며 이를 통하여 상당히 많은 종류의 화학물질을 감지

하여 유인반응과 기피반응을 모두 보이고 있으며, 물리적인 인자들까지 감지하는 것으로 알려져 있다. *E. coli*가 5개의 MCP밖에 보유하지 않는 것에 비하여 식중독균인 *Vibrio vulnificus*는 52개, 식물병원균인 *Pseudomonas syringae*는 49개, 훌륭한 환경오염물질 분해균인 *Pseudomonas putida*는 27개, 그리고 면역력이 약한 사람에게 감염되면 치명적인 폐녹농증을 유발하는 *Pseudomonas aeruginosa*는 26개나 되는 MCP를 가지고 있다. 이러한 사실은 이들의 세균이 인식할 수 있는 화학물질의 종류가 얼마나 다양할 것인가와 그 응용 가능성을 생각하게 한다. 단지 한 가지 유감스러운 것은 위에서 기술한 바와 같이 MCP유전자를 찾아내는 것은 다른 연구 과정에 비한다면 그리 어렵지 않다 할 수 있으나 이 MCP가 과연 어떤 물질을 감지하는가를 밝혀내는 것은 상당히 어려운 일이다. 사실 주화성 연구가 시작된 이래 인식하고 있는 물질이 무엇인지 그 기능이 확실하게 밝혀진 MCP는 20개에도 채 미치지 못하며 거의 대부분의 MCP는 그 기능이 불명의 상태에 있다.

환경정화세균의 환경오염물질에 대한 주화성을 강화하도록 분자육종하기 위해서는 가장 먼저 감지대상이 되는 환경오염물질을 확인할 수 있는 MCP의 동정이 되겠다. 환경오염물질에 대하여 정주화성에 관여하는 MCP의 유전자가 얻어진다면 이 MCP의 유전자를 강력한 환경정화능력을 가진 세균에 도입함으로써 자발적으로 환경오염원에 까지 이동하고 스스로의 정화능력으로 오염원을 정화시키는 균주를 개발할 수 있다. 또한, 환경오염물질에 대하여 부주화성에 기여하는 MCP가 특정된다면 그 MCP유전자를 파괴함으로써 세균이 환경오염원으로부터 도망가는 것을 막을 수 있고 세균의 토착율을 높일 수 있다. 이하에 환경오염물질을 감지하는 MCP가 동정된 연구 예를 소개한다.

#### 나프탈렌분해세균 *P. putida* G7의 Naphthalene 주화성

*P. putida* G7은 naphthalene 분해세균으로써 분리동정되었다(22). naphthalene 분해능력이 *P. putida* G7이 본래 보유하고 있던 plasmid상에 있는 것이 알려지면서 방향족 탄화수소 분해계의 유전학과 분해유전자의 신호전달기능의 분자생물학적 기구의 기능해명을 위한 모델로써 넓게 연구되고 있다(23). 이 *P. putida* G7이 naphthalene에 관하여 주화성을 나타낸다는 것이 밝혀진 것은 비교적 최근으로 Grimm과 Horwood(11)이 naphthalene을 단일의 탄소원으로 하여 *P. putida* G7을 생육하자 naphthalene에 대한 정주화성이 유도되는 것을 밝혀내었다. naphthalene의 대사산물인 salicylate을 증식기질로 했을 경우에도 naphthalene주화성은 유도되지만 cosamino acid에 배양한 *P. putida* G7은 naphthalene주화성을 보이지 않았다. *P. putida* G7은 83kb 길이의 plasmid NAH7을 가지고 있으며 이 plasmid상에 naphthalene 분해유전자가 존재한다(24). Plasmid NAH7을 소거한 *P. putida* G7은 salicylate에 증식시켜도 naphthalene

에 대한 주화성응답을 보이지 않았다. 이 결과로부터 *P. putida* G7의 naphthalene주화성에는 NAH7이 필수라는 것이 나타났다.

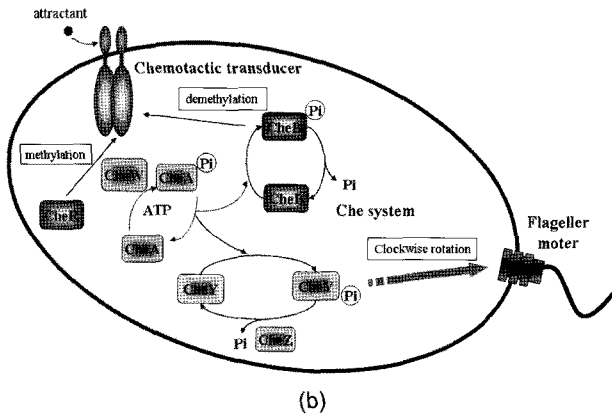
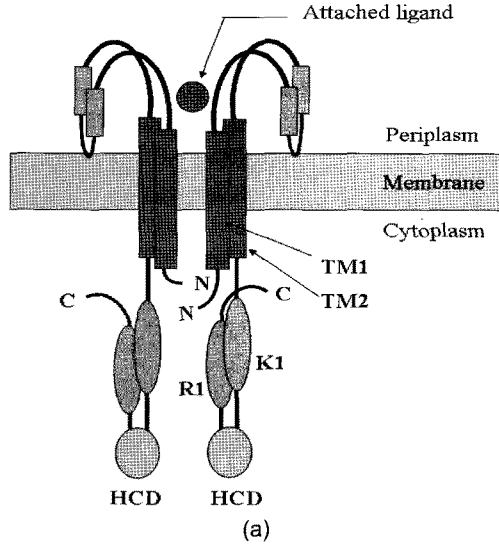
Grimm과 Horwood(11)는 또한 유전자적 해석을 진행하여 NAH7상의 naphthalene 분해경로에 포함되는 효소들을 생산하는 유전자 오페론의 하류에서 MCP유전자 *nahY*를 발견하였다. 이 *nahY*의 파괴주는 naphthalene 주화성을 나타내지 않은 것으로부터 *NahY*가 naphthalene 주화성의 MCP라는 것을 증명하였다. 그러나, 재미있게도 *nahY* 하나만으로는 *P. putida* G7의 plasmid NAH7를 제거한 균주의 naphthalene에 대한 주화성이 복구되지 않았다. 대신 naphthalene 분해경로의 상류경로에 해당하는 오페론과 하류경로에 해당하는 오페론을 동시에 도입해 줌으로써 처음으로 상보되었다. 이는 *NahY*가 감지하는 물질은 naphthalene 그 자체가 아니라 그 분해과정에서 나오는 대사물질일 가능성을 시사한다. 현재까지의 연구 결과로는 *NahY*가 실제로 무엇을 감지하는 것은 불분명하다.

#### Benzoate 관련물질 분해세균 *P. putida* PRS2000의 4-hydroxy benzoate 주화성

*P. putida* PRS2000은 benzoate와 4-hydroxy benzoate (4HBA)의 분해균으로써 분리동정 되었다(25). *P. putida* PRS2000은 benzoate, 4HBA, Chlorobenzoate 그리고 toluate 등의 benzoate 관련 화합물에 주화성을 보인다(13). Harwood(14)등은 4HBA의 대사경로의 유전학적 해석의 도중에 4HBA의 도입에 관여하는 막 관통형 단백질 *PcaK*가 4HBA에 대한 주화성에 필수적인 요소라는 것을 밝혀냈다. *PcaK*는 12회 막 통과형의 단백질로써 benzoate 관련 화합물 및 H<sup>+</sup>공역 전송계 단백질 패밀리에 속하지만 HCD를 가지는 MCP는 아니다. 위치 특이적으로 변이를 도입한 *pcaK* 유전자 변이균주를 가지고 실험한 결과, 4HBA의 세포 내로의 취입속도가 감소하면 그 감소의 정도에 대응하여 4HBA에 대한 주화성 응답 역시 감소하는 것과 또한 미발표의 데이터지만 4HBA의 대사에 주화성은 의존하지 않고 있는 것으로부터 Harwood(26)등은 *PcaK*가 4HBA의 센서 단백질이라는 견해를 제시하고 있다.

이와 같이 물질취입계가 주화성에 관여하고 있는 예가 몇 가지 있다. 예를 들면 *P. aeruginosa*의 인산에 관한 주화성에 있어서 저농도의 인산에 대한 주화성은 인산 특이적 막전송계 (phosphate specific transport, Pst)가 필수이다. 이 주화성에는 CtpL이라는 MCP가 필수적이고, CtpL과 Pst계가 복합체를 형성하여 세포 외부의 인산농도에 관한 정보를 세포내의 주화성 시그널 전달계에 전달하고 있는 것으로 고려되고 있다. 또한 *E. coli*에 있어서는 당의 막전송계인 phosphoenolpyruvate transferase system이 직접 기질이 되는 당 (PST)에 대한 주화성 센서로서의 기능을 담당하고 있다(28). *E. coli*의 PST에 대

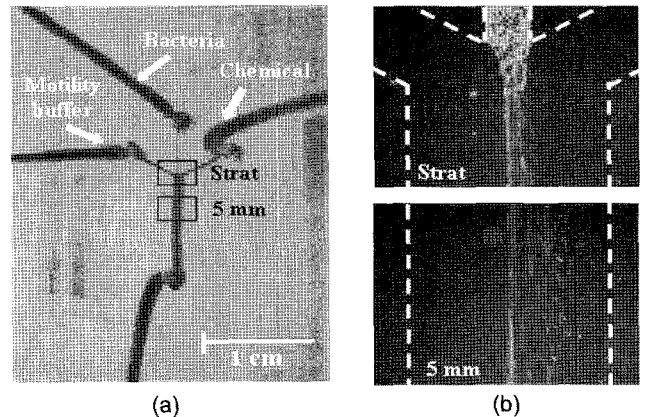
한 주화성은 PST가 직접 주화성 시그널 전달 기구에 신호를 보내어 MCP에 독립적으로 주화성이 일어난다. 그러나 *P. putida* PRS2000의 PcaK가 관여하는 4HBA에 대한 주화성이 MCP에 의존적인지 아닌지에 대해서는 아직 그 해답이 나와 있지 않다.



**Fig. 1.** The structure of typical MCPs and Model of chemotactic signaling and adaptation pathway in bacteria. (a) Typical MCPs have two transmembrane regions (TM1 and TM2) in the N-terminal domain and two potential methylation regions (K1 and R1) in the C-terminal domain. MCPs from phylogenetically diverse bacteria have been shown to possess the highly conserved domain (HCD), which is likely to be important for the interaction between MCPs and CheW as well as CheA. (b) The MCPs detect a chemoeffector and modulate the activity of the protein kinase CheA via CheW. Activated CheA phosphorylate CheY and CheB. Phosphorylated CheY promotes CW rotation of the flagellar motors and is dephosphorylated by CheZ. CheR transfers methyl groups from S-adenosylmethionine to MCPs. Activated CheB through phosphorylation by CheA removes these groups.

***P. aeruginosa* PAO1의 Trichloroethylene (TCE) 주화성**

*P. aeruginosa*는 상당히 넓은 생존영역을 가진다. 토양이나 수 환경뿐만이 아니라 감염균으로서 동식물 모두를 숙주로 하여 살아간다. *P. aeruginosa*는 단극 편모에 의하여 헤엄치고, 20종류의 천연아미노산(29, 30), 당류(31), 유기산(32), 무기인산(33)에 정주화성을 보인다. 환경오염 물질에의 주화성으로는 trichloroethylene (TCE), trichloroethane (TCA), tetrachloroethylene (PCE), chloroform, dichloroethylene 등의 휘발성유기염소화합물 그리고 thiocyanate esters에 의 기피반응(7, 9), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 그리고 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)에의 정주화성 등이 알려져 있다. *P. aeruginosa* PAO1의 모든 게놈 서열은 이미 해독이 끝나 2000년에 웹상에 공포되어 있는 상태이다(34). 우리는 그 *P. aeruginosa* 게놈 해석 프로젝트를 통하여 *P. aeruginosa*가 *E. coli*를 상당히 뛰어넘는 다양한 주화성 관련유전자를 가지고 있는 것을 발견하였다. *E. coli*는 6종의 Che단백질로 구성된 세포내부의 주화성 시그널 전달계의 che유전자 homologue를 단지 1세트만 가지고 있는 것에 반하여, *P. aeruginosa* PAO1은 모두 4세트의 che유전자 homologue가 5개의 cluster에 나누어져 존재하고 있다. 또한 26개의 MCP로 추정되는 유전자가 게놈 위에 산재해 있다(35).



**Fig. 2.** Microfluidic device to detect bacterial chemotaxis. (a) Finally assembled microfluidic device. (b) Distribution of bacterial cells under chemoeffector injection. The real images of bacterial cells in the detection channel at start and 5 mm position.

우리는 이들 주화성 관련 유전자군의 파괴주를 제작하여 기능 해석을 진행하고 있다. che유전자에 관해서는 cheY, cheZ, cheA, cheB 그리고 cheW를 코딩하는 Che cluster 1 과 cluster 2내의 cheR이 주화성 응답에 필수요소임을 판명하였다(35-37). MCP에 관해서는 각각의 MCP유전자를 파괴한 26의 유전자 파괴주를 제작하여 그 기능을 조사한 결과, PctA, PctB 그리고 PctC는 아미노산 센서, CtpH

그리고 CtpL은 각각 고농도의 인산과 저농도의 인산(27), Aer 그리고 Aer-2는 주기성 (O<sub>2</sub>에 대한 주화성)센서라는 것을 알았다(35). MCP단백질인 PilJ는 주화성과의 관련성이 무엇인지는 알려지지 않았지만 대신에 편모의 합성에 관여하고 있다는 것이 유전자적 해석으로부터 밝혀졌다(38). 환경오염물질에 관련한 주화성의 센서 역시 이 유전자 파괴주 라이브러리를 이용한다면 간단히 발견할 수 있을 것이라 예상했지만 의외로 난항하였다. 그 이유는 여러가지가 있는데 첫째는 주화성 시스템의 복잡성이고 둘째는 그 복잡성을 보완해 줄 실험 방법이 부재하다는 것이다. 이를 보완하기 위하여 현재 때 실험마다 동일하고 정밀한 화학물질 농도구배를 제공해 줄 수 있는 Microfluidic device(39)를 도입하여 주화성 연구를 진행 중에 있다(Fig. 2).

지금까지 연구결과를 보면 *P. aeruginosa*의 주화성에는 한 개의 주화성 물질에 대하여 복수의 MCP가 동정되고 있다. 여기에서 환경오염물질의 감지에 관한 MCP 역시 복수 존재할 것이라고 가정하고 MCP유전자 파괴주의 주화성을 세밀하게 조사한 결과 아미노산에 대한 정주화성을 담당하는 MCP유전자인 *pctA*, *pctB* 그리고 *pctC*의 각각의 파괴주들에서 TCE에 대한 기피반응이 감소하였다(8). 그러나, 이 3개의 유전자 모두를 파괴한 삼중파괴주에서 더욱 더 TCE에 대한 기피반응이 약해지긴 했지만 그렇다고 완전히 없어지는는 않았다. 이는 PctA, PctB 그리고 PctC 이외에도 TCE를 감지하는 MCP가 존재하는 것을 시사한다. 그러나 *pctA*, *pctB*, *pctC*이외의 MCP유전자 파괴주에서는 눈에 띄는 기피응답의 감소는 검출되지 않은 것으로 보아서 PctA, PctB 그리고 PctC가 주요 TCE 주화성센서라고 판단된다. 이 3개의 MCP유전자 변이주 중에서도 *pctA*의 변이주의 TCE에 대한 기피응답이 가장 약해졌다는 것과, *pctA pctB pctC* 삼중파괴주의 TCE 주화성 응답의 복귀실험에서 *pctA*를 도입한 균주에서 가장 크게 나타났다. 점(8)으로부터 TCE에 대한 부주화성에 관하여는 PctA가 가장 강력한 주화성 시그널을 보내는 것으로 고찰된다. 또한, 이들 *pctA*, *pctB*, *pctC*의 단독 파괴주들을 이용하여 chloroform과 thiocyanate esters에 대한 기피반응을 조사한 결과, 이들 물질에 대한 응답 역시 약해졌다. 이 결과들로부터 PctA, PctB 그리고 PctC는 TCE를 포함하여 chloroform과 thiocyanate esters의 감지에도 관여하고 있는 것으로 보인다.

주화성 분석을 위하여 지금까지 가장 일반적으로 실험자들이 사용하는 방법은 크게 두 가지가 있다. 하나는 주화성 응답을 미시적 영역에서 관찰하는 컴퓨터 지원형 Capillary assay(40)와 또 하나는 거시적 영역에서의 응답을 관찰하는 Agarose-plug assay(10)이다. 이 두 가지 방법을 이용하여 *P. aeruginosa* PAO1의 TCE에 대한 주화성을 측정하였다(Fig. 3). 위에서 언급한 바와 같이 *P. aeruginosa* PAO1은 TCE에 강한 기피응답을 보인다. 그리고 *pctA pctB pctC* 삼중파괴주의 고농도의 TCE (3.8 mM)에 대한 응답은 야생주보다 약했다. 그런데 예상외의 것

로, *pctA pctB pctC* 삼중파괴주가 저농도의 TCE (1 mM)에 대하여 유인응답을 보였다 (Fig. 3(d)). 그 결과는 *P. aeruginosa* PAO1은 TCE에 대하여 기피와 유인 응답체계를 둘 다 보유하고 있다는 것을 시사하며, 일반적인 상황에서는 기피응답의 시그널이 강하게 드러나고, 유인응답은 기피응답이 제어되어있는 상황에서 (즉, *pctA pctB pctC* 삼중파괴주와 같이 PctA PctB PctC의 발현이 억제되어 있는 상황) 비로서 감지되는 것을 시사한다. 여기에서 다시 한번 MCP유전자 파괴주 라이브러리를 정밀하게 조사한 결과, CttP (유전자등록번호 PA0180)가 TCE의 정주화성 센서단백질이라는 것을 찾아냈다. *cttP*유전자의 파괴주는 야생주보다 TCE에 대한 강한 기피반응으로 보이고 또한 기피반응이 제어되어 있는 *pctA pctB pctC* 삼중파괴주에 이 *cttP*유전자를 도입하면 고농도의 TCE에 대해서도 유인반응을 보이도록 되었다(Fig. 4).

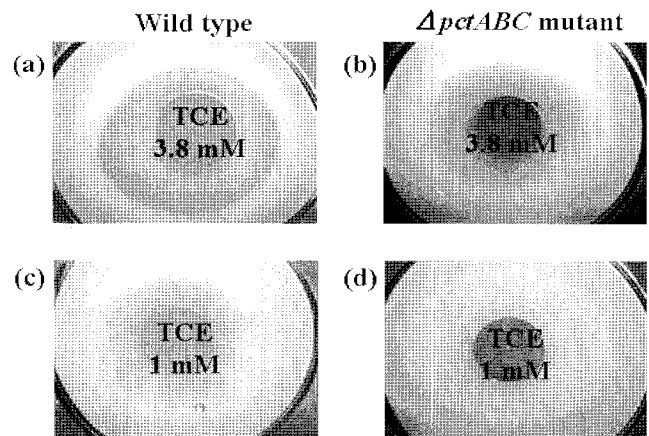


Fig. 3. Chemotactic responses of *P. aeruginosa* strains to TCE in agarose-plug assays. Photographs were taken at 10 min after addition of cells around agarose-plug. (a),(c) The wild-type *P. aeruginosa* PAO1 shown repellent response to TCE. (b) the *pctA pctB pctC* triple mutant shown weak repellent response to 3.8 mM TCE than that of wild type. (d) the *pctA pctB pctC* triple mutant shown attractant response to 1 mM TCE.

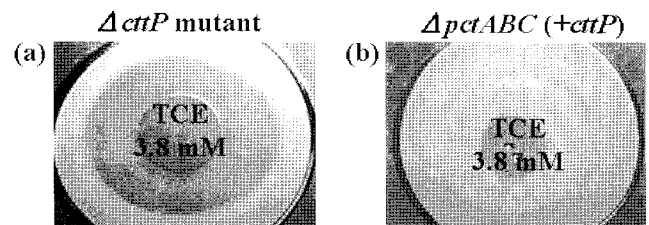
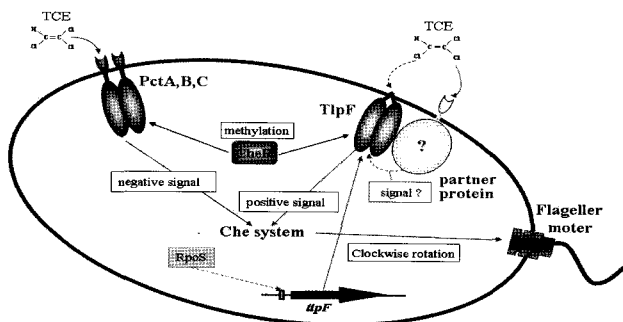


Fig. 4. Chemotactic responses of  $\Delta$ *cttP* mutant and  $\Delta$ *pctABC* triple mutant (over expression of *cttP*) to TCE in agarose-plug assays. Photographs were taken at 10 min after addition of cells around agarose-plug. (a) The  $\Delta$ *cttP* mutant shown strong repellent response to TCE than that of wild type. (b)  $\Delta$ *pctABC* triple mutant harboring a plasmid (pUCP18 carrying *cttP*) shown attractant response to 3.8 mM TCE.

흥미롭게도 TCE 분해균주인 *P. putida* F1와 *P. stutzeri* OX1는 TCE에 대하여 정주화성을 보인다(6, 10). 이들 TCE 분해세균들의 TCE에 대한 유인반응은 toluene을 기질로 하여 배양하였을 때 나타나므로 toluene에 의한 유도발현에 의한 것이라고 알려져 있다. 이 *P. putida* F1에 *P. aeruginosa*의 *cttP*유전자를 도입하는 것으로, 유인기질인 toluene이 없는 조건에서 배양한 균체에서도 TCE에 대한 유인반응을 보이도록 되었다. 이와 같이, *cttP*유전자를 이용하여 이중의 운동성 세균의 TCE 주화성을 기여할 수 있다는 것을 알았다. 또한 이 균주를 이용하여 TCE와 구조가 비슷한 다른 chloroethylenes의 물질에 대한 반응을 살핀 결과 CttP는 TCE뿐만 아니라 PCE와 DCEs를 역시 감지하여 유인신호를 보내는 센서단백질을 알았다(41). 그러나 유전자서열해석을 통하여 분석한 결과 *cttP*는 화학물질과 결합하는 영역이 존재하지 않으며 대신 이 유전자의 상류에 RpoS에 의하여 발현이 조절되는 서열을 가지는 것으로 드러났다. 이는 *cttP*가 직접적으로 TCE와 결합하여 Che system에 신호를 전달하는 것이 아니라 실제로 세포 외부의 TCE를 감지하는 단백질이 따로 존재하며 하여 이 단백질로부터 전달받은 신호를 처리하고 하고 있음을 시사한다. 현재 우리는 이 파트너 단백질을 찾기 위해 연구를 진행 중이다. 본 연구를 통하여 Fig. 5에 나타내듯이 하나의 화학물질의 감지에 여러 개의 MCP가 작용하며 어떤 MCP가 그 화학물질을 감지하느냐에 따라서 기피반응을 보이기도 하고 유인반응을 보이기도 하며 또한 그 반응들은 농도에 매우 의존적임을 알 수 있다. 이러한 복잡성이야 말로 주화성 연구를 어렵게 하는 점이다.



**Fig. 5.** Putative model for chemotaxis to TCE of *P. aeruginosa*. PctA, PctB and PctC acts as chemosensory protein mediating negative chemotaxis to TCE. CttP is chemosensory protein for positive chemotaxis to TCE. CttP has only one hydrophobic sequence in N-terminus, suggesting required unknown partner protein.

## 결론

세균의 주화성을 Bioremediation에 적용하고자 하는 연구는 1980년대에 들어서면서부터 활발하게 진행되고

있으며 그 환경오염물질에 대한 감지를 담당하는 센서단백질의 동정과 이들 물질에 대한 주화성응답의 분자기구의 해명이 되어가고 있다. 우리는 *P. aeruginosa*의 주화성 연구를 1990년대 초부터 개시하여 단순히 분자생물학적 주화성 분자기구의 기능해명뿐만 아니라 인류의 삶에 기여할 수 있도록 공학적인 응용을 목적으로 하여 이들 운동성 세균의 환경오염물질 감지기능을 강화한 레이더 탑재형 슈퍼 환경정화 미생물의 창제를 표방하였고 다년간의 연구를 통하여 환경오염물질에 대한 주화성응답의 분자기구를 해명하여 이 목표를 실험적으로 검증해 가고 있다. 우리는 또한 매 실험마다 동일하고 정밀한 화학물질 농도구배를 제공해 줄 수 있는 Microfluidic device의 도입으로 지금까지와는 비교할 수 없을 만큼 빠르고 정확하게 주화성에 대한 정보를 얻을 수 있으리라 기대하며 이에 대한 실험을 진행 중이다. 우리는 *P. aeruginosa* PAO1의 환경오염물질 인식기구의 해명을 시작으로 하여 다양한 환경오염 정화세균이 환경오염물질 인식기구를 가지도록 육종하여 레이더 탑재형 슈퍼 환경정화 미생물의 창제가 가능하도록 실험적인 검증을 하여 나가 고자 한다.

## 국문요약

일반적으로 운동성세균은 영양분에 대하여 유인반응(정주화성)을 보인다는 것은 100여년의 주화성 연구 역사를 통하여 잘 알려져 있다. 그 중에 일부 환경오염물질을 분해 가능한 운동성 세균은 환경오염물질에 까지 유인반응을 보인다. 이 환경오염물질 감지 기능을 잘 활용한다면 '환경오염원까지 자발적으로 이동하여 그 화학물질을 분해하는 레이더 탑재형 환경정화세균의 개발이 가능할 것이다. 본 고에서는 지금까지 알려진 환경오염물질 감지를 위한 주화성 분자기구를 정리하고 향후 전망을 논하고자 한다.

## 감사

본 연구는 과학기술부 특정기초연구사업 (과제번호 : R01-2008-000-11260-0)의 지원에 의한 것이며, 이에 감사드립니다.

접수 : 2008년 12월 5일, 게재승인 : 2009년 1월 16일

## REFERENCES

1. Adler, J. (1966), Chemotaxis in bacteria, *Science*,

- 153, 708-716.
2. Aguilar, J. M. M., A. M. Ashby, A. J. M. Richards, G. J. Loake, M. D. Watson, and C. H. Shaw (1988), Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli towards flavonoid inducers of symbiotic nodulation genes, *J. Gen. Microbiol.* **134**, 2741-2746.
  3. Ashby, A. M., M. D. Watson, G. J. Loake, and C. H. Shaw (1988), Ti plasmid-specified chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 toward vir-inducing phenolic compounds and soluble factors from monocotyledonous and dicotyledonous plants, *J. Bacteriol.* **170**, 4181-4187.
  4. Parke, D., M. Rivelli, and L. N. Ornston (1985), Chemotaxis to aromatic and hydroaromatic acids: comparison of *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium trifolii*, *J. Bacteriol.* **163**, 417-422.
  5. Parke, D., L. N. Ornston, and E. W. Nester (1987), Chemotaxis to plant phenolic inducers of virulence genes is constitutively expressed in the absence of the Ti plasmid in *Agrobacterium tumefaciens*, *J. Bacteriol.* **169**, 5336-5338.
  6. Vardar, G., P. Barbieri, and K. T. Wood (2005), Chemotaxis of *Pseudomonas stutzeri* OX1 and *Burkholderia cepacia* G4 toward chlorinated ethenes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 696-701.
  7. Shitashiro, M., J. Kato, T. Fukumura, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, and H. Ohtake (2003), Evaluation of bacterial aerotaxis for its potential use in detecting the toxicity of chemicals to microorganisms, *J. Biotechnol.* **101**, 11-18.
  8. Shitashiro, M., H. Tanaka, C. S. Hong, A. Kuroda, N. Takiguchi, H. Ohtake, and J. Kato (2005), Identification of chemosensory proteins for trichloroethylene in *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Biosci. Bioeng.* **99**, 396-402.
  9. Ohga, T., A. Masduki, J. Kato, and H. Ohtake (1993), Chemotaxis away from thiocyanic and isothiocyanic esters in *Pseudomonas aeruginosa*, *FEMS Microbiol. Lett.* **113**, 63-66.
  10. Parales, R. E., J. L. Ditty, and C. S. Harwood (2000), Toluene-degrading Bacteria are chemotactic towards the Environmental pollutants Benzene, Toluene, and Trichloroethylene, *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4098-4104.
  11. Grimm, A. C. and C. S. Harwood (1997), Chemotaxis of *Pseudomonas* spp. to the polyaromatic hydrocarbon naphthalene, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4111-4115.
  12. Grimm, A. C. and C. S. Harwood (1999), NahY, a Catabolic Plasmid-Encoded Receptor Required for Chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the Aromatic Hydrocarbon Naphthalene, *J. Bacteriol.* **181**, 3310-3316.
  13. Harwood, C. S., M. Rivelli, and L. N. Ornston (1984), Aromatic acids are chemoattractants for *Pseudomonas putida*, *J. Bacteriol.* **160**, 622-628.
  14. Harwood, C. S., N. N. Nichols, M. K. Kim, J. L. Ditty, and R. E. Parales (1994), Identification of the *pcaRKF* gene cluster from *Pseudomonas putida*: involvement in chemotaxis, biodegradation, and transport of 4-hydroxybenzoate, *J. Bacteriol.* **176**, 6479-6488.
  15. Samanta, S. K. and R. K. Jain (2000), Evidence for plasmid-mediated chemotaxis of *Pseudomonas putida* towards naphthalene and salicylate, *Can. J. Microbiol.* **46**, 1-6.
  16. Hawkins, A. C. and C. S. Harwood (2002), Chemotaxis of *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) to the Herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetate, *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 968-972.
  17. Bhushan, B., S. K. Samanta, A. Chauhan, A. K. Chakraborti, and R. K. Jain (2000), Chemotaxis and Biodegradation of 3-Methyl-4-Nitrophenol by *Ralstonia* sp. SJ98, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**, 129-133.
  18. Samanta, S. K., B. Bhushan, A. Chauhan, and R. K. Jain (2000), Chemotaxis of a *Ralstonia* sp. SJ98 toward Different Nitroaromatic Compounds and Their Degradation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 117-123.
  19. Samanta, S. K., O. V. Singh, and R. K. Jain (2002), Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation, *Trends Biotechnol.* **20**, 243-248.
  20. Marx, R. B. and M. D. Aitken (2000), Bacterial Chemotaxis Enhances Naphthalene Degradation in a Heterogeneous Aqueous System, *Environ. Sci. Technol.* **34**, 3379-3383.
  21. Stock, J. B. and M. G. Surette (1996), *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umberger, 2nd ed., p1103, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
  22. Stanier, R. Y., N. J. Palleroni and M. Doudoroff (1966), The aerobic pseudomonads: a taxonomic study, *J. Gen. Microbiol.* **43**, 159-271.
  23. Dunn, N. W. and I. C. Gunsalus (1973), Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*, *J. Bacteriol.* **114**, 974-979.
  24. Yen, K. M. and I. C. Gunsalus (1982), plasmid gene organization: Naphthalene/salicylate oxidation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 874-878.
  25. Ornston, L. N. and D. Parke (1976), Properties of an inducible uptake system for beta-keto adipate in *Pseudomonas putida*, *J. Bacteriol.* **125**, 475-488.
  26. Ditty, J. L. and C. S. Harwood (2002), Charged Amino Acids Conserved in the Aromatic Acid/H<sup>+</sup> Symporter Family of Permeases Are Required for 4-Hydroxybenzoate Transport by PcaK from *Pseudomonas putida*, *J. Bacteriol.* **184**, 1444-1448.

27. Wu, H., J. Kato, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, and H. Ohtake (2000), Identification and Characterization of Two Chemotactic Transducers for Inorganic Phosphate in *Pseudomonas aeruginosa* **182**, 3400-3404.
28. Armitage, J. P. (1993) Signal transduction, J. Kurjan & B. L. Taylor, p43, Academic Press, San Diego.
29. Kuroda, A., T. Kumano, K. Taguchi, T. Nikata, J. Kato, and H. Ohtake (1995), Molecular cloning and characterization of a chemotactic transducer gene in *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* **177**, 7019-7025.
30. Taguchi, K., H. Fukutomi, A. Kuroda, J. Kato, and H. Ohtake (1997), Genetic identification of chemotactic transducers for amino acids in *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology*, **143**, 3223-3229.
31. Moulton, R. C. and T. C. Montie (1979), Chemotaxis by *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* **137**, 274-280.
32. Moench, T. T. and W. A. Konetzka (1978), Chemotaxis in *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* **133**, 427-429.
33. Kato, J., A. Ito, T. Nikata, and H. Ohtake (1992), Phosphate taxis in *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* **174**, 5149-5151.
34. Stove, C. K., X. O. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrenner, M. J. Hickey, F. S. L. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K.-S. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. W. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson (2000), Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen, *Nature*, **406**, 959-964.
35. Hong, C. S., M. Shitashiro, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, H. Ohtake, and J. Kato (2004), Chemotaxis proteins and transducers for aerotaxis in *Pseudomonas aeruginosa*, *FEMS Microbiol. Lett.* **231**, 247-252.
36. Kato, J., T. Nakamura, A. Kuroda, and H. Ohtake (1999) Cloning and Characterization of Chemotaxis Genes in *Pseudomonas aeruginosa*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**, 155-161.
37. Masduki, A., J. Nakamura, T. Ohga, R. Umezaki, J. Kato, and H. Ohtake (1995), solation and characterization of chemotaxis mutants and genes of *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* **177**, 948-952.
38. Darzins, A. (1994), Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene cluster involved in pilus biogenesis and twitching motility: sequence similarity to the chemotaxis genes of the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*, *Mol. Microbiol.* **11**, 137-153.
39. Mao, H., P. S. Cremer, and M. D. Manson (2003), A sensitive, versatile microfluidic assay for bacterial chemotaxis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 5449-5454.
40. Nikata, T., K. Sumida, J. Kato, and H. Ohtake (1992), Rapid Method for Analyzing Bacterial Behavioral Responses to Chemical Stimuli, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2250-2254.
41. Kim, H. E., M. Shitashiro, A. Kuroda, N. Takiguchi, H. Ohtake, and J. Kato (2006), Identification and Characterization of the Chemotactic Transducer in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 for Positive Chemotaxis to Trichloroethylene, *J. Bacteriol.* **188**, 6700-6702.