

녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)의 퀴럼 센싱 수용체인 QscR의 활성에 영향을 미치는 아미노산 잔기 분석

박수진 · 김수경 · 이준희*

부산대학교 약학대학 약학과 미생물학 연구실

Analysis of Amino Acid Residues Affecting the Activity of QscR, a Quorum Sensing Receptor of *Pseudomonas aeruginosa*

Su-Jin Park, Soo-Kyoung Kim, and Joon-Hee Lee*

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Pusan National University, Busan 609-735, Republic of Korea

(Received August 31, 2012 / Accepted September 12, 2012)

Pseudomonas aeruginosa, a Gram-negative bacterium, is an ubiquitous and opportunistic human pathogen, which expresses many virulence factors through quorum sensing (QS) regulation. QscR, one of the QS signal receptors of *P. aeruginosa*, has unique features that make it possible to distinguish QscR from other QS receptors. In the present study, we focused on amino acid residues responsible for such a broad signal specificity of QscR. Thus we constructed mutant QscRs: QscR_{T72L}, QscR_{R132M}, and QscR_{T140I} by substituting 72nd threonine, 132nd arginine, and 140th threonine residues with isoleucine, methionine, and isoleucine, respectively by site-directed mutagenesis. When we examined the activity of these mutant QscRs, QscR_{R132M} failed to respond to *N*-3-oxododecanoyl homoserine lactone (3OC12-HSL), but QscR_{T72L} and QscR_{T140I} remained the ability to respond to 3OC12-HSL despite much reduction of the sensitivity. When we treated a variety of acyl-HSLs with different structure, QscR_{T72L} and QscR_{T140I} showed better responsiveness to *N*-decanoyl HSL (C10-HSL) or *N*-dodecanoyl HSL (C12-HSL) that has no oxo-moiety at 3rd carbon of acyl group than to 3OC12-HSL, and QscR_{R132M} showed no responsiveness to any acyl-HSLs tested here. In addition, QscR_{T72L} and QscR_{T140I} were inhibited by 5f, a QscR inhibitor as similarly as wild type QscR was. These results suggest that while the 130th arginine is crucial in both activity and acyl-HSL binding of QscR, the 72nd and 140th threonines are important in the activity, but they are little responsible for the discrimination of acyl-HSLs or competitive inhibitor.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, QscR, quorum sensing, quorum sensing receptor

그람 음성균인 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)은 다양한 환경에 존재할 수 있으며, 선충, 곤충, 식물, 동물 등 넓은 범위의 생물에 감염할 수 있는 감염균이다(Page and Heim, 2009). 특히 사람에게서는 낭포성 섬유증(cystic fibrosis) 등의 호흡기 질환이나 화상을 가진 환자에게 치명적 감염을 일으키며 정상인에게서도 각막, 요도 등에도 감염하는 대표적 기회감염성 병원균으로 작용한다(Page and Heim, 2009; Hurley *et al.*, 2012). 녹농균이 생성하는 병독인자(virulence factors)에는 편모, 섬모, lipopolysaccharide 등 기본 세포 구성 성분들이나, 특정 환경에서 생성되는 독소, 각종 프로테아제, 용혈소, rhamnolipid 등이 알려져 있는데, 이들 중에는 항상 발현되는 것들도 있지만, 숙주 내에 감염할 때에 특이적으로 발현이 유도되는 것들도 많으며, 이러한 병독인자들의 발현을

인지하고 조절하는 단백질 들은 감염력 제어를 위한 좋은 타겟으로 여겨져 왔다(Coggan and Wolfgang, 2012; Jimenez *et al.*, 2012).

많은 다른 세균들처럼 녹농균에서도 병독성에 관여하는 많은 인자들이 퀴럼 센싱(quorum sensing; QS)이라는 세포간 신호전달 기전에 의해 그 발현이 조절된다고 알려져 왔다(Fuqua *et al.*, 2001; Welch *et al.*, 2005; Coggan and Wolfgang, 2012). 일반적으로 QS 기전은 확산 가능한 신호물질, 이를 합성하는 효소, 그리고 이를 수용하는 수용체 단백질에 의해 조절된다(Henke and Bassler, 2004; Welch *et al.*, 2005). QS 신호물질은 세균에 따라 그 구조와 종류가 매우 다양하여, 그람 양성균의 경우 작은 펩타이드 종류를 신호물질로 사용하고, 그람 음성균은 대부분 acyl homoserine lactone (acyl-HSL) 계열의 물질을 주로 사용하며, 일부 비브리오(*Vibrio*) 균들과 장내세균들은 AI-2 (furanosyl borate diester)라는 furanone 계열의 물질을 사용하기도 한다(Fuqua *et al.*, 2001; Henke and Bassler, 2004; Reading and

*For correspondence. E-mail: joonhee@pusan.ac.kr; Tel.: +82-51-510-2821; Fax: +82-51-513-6754

Table 1. Plasmids used in this study

Name	Genotype	References
pQF50	Broad-host-range <i>lacZ</i> fusion plasmid, Ap ^R	Farinha and Kropinski (1990)
pJL101	<i>PA1897</i> promoter- <i>lacZ</i> fusion in pQF50, Ap ^R	Lee <i>et al.</i> (2006)
pJN105	<i>araC</i> -pBAD cloned in pBBR1MCS-5, Gm ^R	Newman and Fuqua (1999)
pJN105Q	Wild type <i>qscR</i> in pJN105, Gm ^R	Lee <i>et al.</i> (2006)
pJN105Q _{T172I}	Mutant <i>qscR</i> _{T172I} in pJN105, Gm ^R	This study
pJN105Q _{RI132M}	Mutant <i>qscR</i> _{RI132M} in pJN105, Gm ^R	This study
pJN105Q _{T140I}	Mutant <i>qscR</i> _{T140I} in pJN105, Gm ^R	This study

Ap, ampicillin; Gm, gentamicin

Sperandio, 2006).

*Vibrio fischeri*에서 처음 밝혀진 그람 음성균의 acyl-HSL에 의한 QS 신호전달은, LuxI 유사 단백질에 의해 합성된 acyl-HSL이 세포간을 이동하여 다른 세포에서 LuxR 유사 단백질에 의해 수용되는 방식으로 이루어진다(Fuqua *et al.*, 2001; Reading and Sperandio, 2006). 녹농균의 경우, LasI와 RhlI라는 LuxI 유사 단백질들에 의해 각각 *N*-3-oxododecanoyl homoserine lactone (3OC12-HSL)과 *N*-butyryl homoserine lactone (C4-HSL)이 주로 생성되며, 3OC12-HSL은 LasR과 QscR이라는, C4-HSL은 RhlR이라는 LuxR 유사 단백질들에 의해 각각 수용된다(Welch *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Schuster and Greenberg, 2006; Jimenez *et al.*, 2012). 또한 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (*Pseudomonas* quinolone signal; PQS)이라는 acyl-HSL과 구분되는 QS 신호물질을 생성하기도 하는데, 이 신호전달 역시 전체 녹농균의 QS에서 매우 중요한 역할을 담당한다(Jimenez *et al.*, 2012).

LuxR 형태의 QS 신호 수용체 단백질들은 N-말단에 acyl-HSL과 결합하는 부위를, C-말단에 특정 유전자의 프로모터에 존재하는 특이적인 염기서열에 결합할 수 있는 DNA 결합부위를 가지고 있어, 신호물질과 결합하여 활성화 되면 특정 유전자의 프로모터에 결합하여 전사 활성을 조절한다(Fuqua *et al.*, 2001). 녹농균의 경우 C4-HSL과 PQS에 의한 신호전달은 3OC12-HSL에 의한 신호전달 이전에 의존적인데, 3OC12-HSL의 두 수용체 단백질 중 LasR은 성장 초기에 3OC12-HSL을 수용하여 여러 병독인자들을 발현시키며, C4-HSL 및 PQS 신호전달 기전을 활성화 시키는 역할도 한다(Jimenez *et al.*, 2012). 또 다른 3OC12-HSL 수용체인 QscR은 아직 그 조절군이 충분히 규명되어 있지 않으나, 발견 초기에는 LasR과 RhlR의 활성을 저해하는 기능을 한다고 보고되었으며(Chugani *et al.*, 2001), 이후 QscR이 독자적으로 PA1897과 자기 자신 유전자(PA1898)의 발현을 조절하는 전사 조절 단백질로 기능한다는 것이 밝혀졌다(Lee *et al.*, 2006; Lequette *et al.*, 2006). 초기 연구에서 QscR은 기존의 다른 LuxR 유사 단백질들과는 구별되는 특이적인 성질을 가진다는 것이 밝혀져 많은 관심을 끌었었는데, 여기에는 넓은 신호물질 특이성(broad signal specificity), 신호물질과의 가역적 결합(reversible signal binding), 단량체(monomer)로 존재 등이 있다(Lee *et al.*, 2006). 최근의 연구에서는 QscR이 단량체로 존재하는 것은 농도가 낮은 경우이며, 높은 농도에서는 다른 LuxR 유

사 단백질들처럼 이량체(dimer)로 존재한다는 것과, 초기에 보고된 것 보다 더 강하게 3OC12-HSL과 결합하고 있다는 보고가 있었으나(Oinuma and Greenberg, 2011), 여전히 QscR이 3OC12-HSL이 아닌 다른 acyl-HSL과 결합할 수 있고, 접힘(folding)이 일어난 후에도 다른 acyl-HSL들과 치환이 가능하며, acyl-HSL 없이도 접힘이 적절히 일어날 수 있음이 제시되어(Oinuma and Greenberg, 2011), QscR이 다른 LuxR 유사 단백질과는 차별되는 독특한 QS 수용체 단백질임이 확인되었다.

이 때문에 QscR의 이러한 특징을 가능하게 하는 분자적 기전에 대한 많은 관심이 있어 왔으며, 최근 QscR 결정의 3차 구조가 밝혀짐에 따라(Lintz *et al.*, 2011), 보다 직접적인 연구가 가능하게 되었다. 본 연구에서도 QscR의 독특한 특성에 대한 분자 수준의 분석을 위해 QscR의 특정 아미노산 잔기에 돌연변이를 도입하여 그 활성과 여러 다른 구조의 acyl-HSL에 대한 반응성을 조사해 보았다. 이전에도 QscR의 아미노산 잔기에 돌연변이를 도입하여 QscR의 활성에 중요한 영향을 미치는 잔기를 찾으려는 시도가 있었으나, 기존 연구는 주로 잘 보존된 잔기를 타겟으로 하였다는 한계가 있었다(Lequette *et al.*, 2006). 보존된 잔기의 경우 대체로 QscR의 활성에 중요하였으며, 돌연변이를 일으켰을 경우 QscR의 활성이 대부분 사라졌다. 본 연구에서는 LuxR 유사 단백질의 보편적 활성에 중요할 것으로 예상되는 잘 보존된 부위보다는, 보존되지 않은 잔기에 돌연변이를 도입함으로써 다른 LuxR 유사 단백질들과 구분되는 QscR의 특이적인 활성에 중요하게 작용하는 아미노산 잔기를 찾고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양 조건

본 연구에 사용된 QscR 및 돌연변이 QscR 발현용 플라스미드의 제조와 이들을 이용한 리포터 균주 제조에는 대장균 (*Escherichia coli*) 균주 중 하나인 DH5 α (*supE44 lacU169*(ϕ 80 *lacZAM15*) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*)가 사용되었다. DH5 α 및 이를 이용하여 제조된 모든 리포터 균주들은 Luria-Bertani (LB) 배지에서 37°C, 호기적으로 진탕배양되었다. 플라스미드를 가진 균주를 선택적으로 배양하기 위하여 LB 배지에 ampicillin과 gentamicin을 각각 100 μ g/ml과 12 μ g/ml의 농도로 첨가하였으며, 실험에 따라 표시된 농도로 합성된

acyl-HSL들과 QS inhibitor들을 첨가하였다.

돌연변이 QscR 발현 플라스미드의 제조

돌연변이 QscR들은 QuikChagne® multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)을 이용하여 야생형 QscR의 특정 코돈의 염기를 치환하는 방법으로 제조되었다. 이전의 연구에서 제조된 야생형 QscR을 발현시키는 플라스미드인 pJN105Q (Lee et al., 2006)을 주형으로 하여(Table 1), Fig. 1에서 보이는 것처럼 돌연변이를 시키고자 하는 72번째, 132번째, 140번째 코돈상에 돌연변이를 포함하는 프라이머들을 제작하였다. 각 프라이머에 정확히 상보적인 염기서열로 반대방향의 프라이머를 제작한 후, 두 개의 상보적인 프라이머 각 100 ng과 주형인 pJN105Q 플라스미드 100 ng을 사용하여 QuikChagne® multi Site-Directed Mutagenesis Kit에 따른 사용자 매뉴얼에 따라 돌연변이를 진행하였다. PCR 반응에서 Denaturation은 95°C에서 50초간, annealing은 60°C에서 50초간, extension은 68°C에서 10분간 총 18회 반복하였으며, 반응 후 주형으로 쓰인 pJN105Q 플라스미드는 *DpnI* 제한

효소로 37°C에서 1시간동안 절단하였다. 돌연변이 프라이머로부터 합성된 플라스미드는 *DpnI*에 의해 절단되지 않으므로 이를 대장균 DH5α에 형질전환으로 도입하여 배양 후 정제 하였으며, 정확한 돌연변이 여부를 염기서열 분석을 통해 확인하였다.

리포터 균주의 제조

야생형 혹은 돌연변이 QscR들의 활성을 측정하기 위하여 본 실험에서는 대장균에 QscR 혹은 돌연변이 QscR을 발현시키는 플라스미드들(pJN105Q, pJN105Q^{T72I}, pJN105Q^{R132M}, pJN105Q^{T140I}) 중의 하나와, QscR의 조절을 받는 PA1897 유전자의 프로모터에 β-galactosidase를 코딩하고 있는 *lacZ* 유전자가 결합된 리포터 플라스미드(pJL101)를 동시에 도입하여 리포터 균주로 사용하였다(Table 1). 이들 재조합 플라스미드의 모 플라스미드 (parental plasmid)들인 pJN105와 pQF50은 서로 공존가능한 플라스미드(compatible plasmids)들이며, 각각 gentamicin과 ampicillin에 대한 내성 유전자를 가지고 있기 때문에, 두 플라스미드를 동시에 대장균으로 형질전환(co-transformation) 한 후, 두 항생제

```

M H D E R E G Y L E I L S R I T T E E E 20
TTCTTCTCCCTGGTTCGAGATATGCGGTAATTATGGATTGCAATTCCTTTTCATTCGGT 120
F F S L V L E I C G N Y G F E F F S F G 40
GCGCGGGCGCCTTTCCCGCTGACCGCGCCTAAATATCATTTCTGTCCAATTACCCAGGG 180
A R A P F P L T A P K Y H F L S N Y P G 60
    
```

Mutagenic primers; TCTCCGAAGACTACATATCCATCGACCCGAT

```

I
GAATGGAAAAGCAGATATATCTCCGAAGACTACACATCCATCGACCCGATCGTGCGCCAT 240
E W K S R Y I S E D Y T S I D P I V R H 80
GGTCTCCTGGAATACACCCCGCTGATCTGGAATGGCGAAGACTTCCAGGAGAACCGTTTC 300
G L L E Y T P L I W N G E D F Q E N R F 100
TTCTGGGAGGAAGCGCTGCATCACGGCATCCGTCACGGCTGGTCGATCCCGGTCCGCGGC 360
F W E E A L H H G I R H G W S I P V R G 120
    
```

Mutagenic primers; TGCTGTCCCTGGTGATGTCCAGCGAGAGCAT

```

M AGAGCATCGCCGCCATC
I
AAGTACGGGCTGATCAGCATGCTGTCCCTGGTGCCTTCCAGCGAGAGCATCGCCGCCACG 420
K Y G L I S M L S L V R S S E S I A A T 140
    
```

```

GAAATCCTGGAGAA
GAAATCCTGGAGAAGGAATCCTTCTGCTCTGGATCACCAGCATGCTGCAGGCTACCTTC 480
E I L E K E S F L L W I T S M L Q A T F 160
GGCGACCTGCTGGCGCCGCGCATCGTCCCGAAAGCAATGTGCGCCTGACCGCCAGGGAA 540
G D L L A P R I V P E S N V R L T A R E 180
ACCGAGATGCTCAAGTGGACCGCGGTGGGCAAGACCTACGGCGAGATCGGCCTGATCCTG 600
T E M L K W T A V G K T Y G E I G L I L 200
TCGATCGACCAGCGCACGGTGAAGTTCATATCGTCAATGCGATGCGCAAGCTCAACTCC 660
S I D Q R T V K F H I V N A M R K L N S 220
AGCAACAAGGCGGAGGCCACCATGAAGGCTTACGCCATCGGCCTGCTCAACTGA 714
S N K A E A T M K A Y A I G L L N * 237
    
```

Fig. 1. Construction of the mutant QscRs by single amino acid substitution at 72nd, 132nd, and 140th amino acids. The amino acid substitutions were achieved by site-directed mutagenesis using double strand synthesis method as described in 'Materials and Methods'. The mutation sites and mutagenic primers were indicated in boxes and above the cognate sequences. The correct mutations were confirmed by sequencing.

를 모두 갖는 배지에서 리포터 균주들을 선택하였다.

β -Galactosidase 활성 측정

β -Galactosidase 활성 측정은 이전에 보고된 바와 같이 Galacto-Light Plus™ kit (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 수행되었다(Lee *et al.*, 2006). 먼저 하룻밤 배양된 리포터 균주를 새 배지에 1% 접종하여 600 nm에서의 광학적 밀도(optical density at 600 nm; OD₆₀₀)가 0.2–0.3 정도가 될 때까지 배양하였다. 여기에 표시된 농도의 acyl-HSL과 QscR 억제제, 0.4%의 L-arabinose를 첨가하여 다시 1.5시간 동안 배양한 후, 이 중 100 μ l를 덜어내어 CHCl₃을 10 μ l 넣고 강하게 섞어주었다. 15분간 가만히 두어 CHCl₃ 층을 완전히 분리시킨 후, 상층의 10 μ l만을 취하여 96-well plate에 옮기고 여기에 Galacto-light plus™ 기질 0.6 μ l를 diluents buffer 100 μ l에 희석한 용액을 각 well에 첨가하여 어두운 곳에서 1시간 동안 반응시켰다. 이어 accelerator2 용액 150 μ l을 각 well에 넣고 β -galactosidase에 의해 발생하는 luminescence를 Tristar LB941 multimode microplate reader (Berthold, Germany)로 측정하였다. 발생한 luminescence를 세포의 양으로 보정해 주기 위하여, 측정된 luminescence값을 나머지 배양액으로 측정된 OD₆₀₀값으로 나누어 최종 β -galactosidase 활성으로 제시하였다(luminescence/OD₆₀₀).

결과 및 고찰

돌연변이 QscR의 제조 및 돌연변이 잔기의 위치

본 연구에서는 야생형 QscR 단백질의 72번째 threonine, 132번째 arginine, 140번째 threonine 잔기를 염기 치환을 통해 각각 isoleucine, methionine, isoleucine 잔기로 치환한 돌연변이 QscR을 제작하였다(Fig. 1). 이 잔기들은 QscR의 신호물질 결합

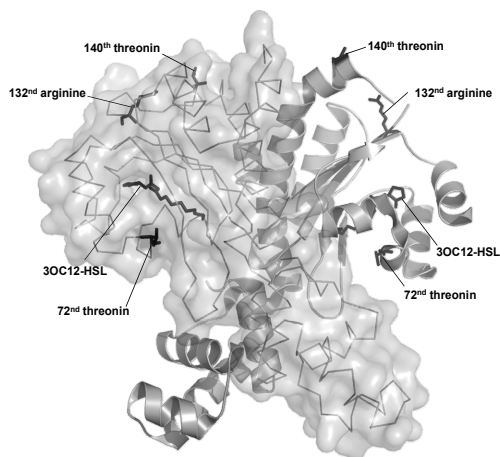


Fig. 2. Location of the amino acid substitutions and 3OC12-HSL, the ligand. 3D structure of QscR was drawn with PDB ID code 3SZT (Lintz *et al.*, 2011). Two monomers in the homodimeric structure were distinctly presented; one in surface mode and the other in ribbon mode. The locations of 72nd threonine, 132nd arginine, 140th threonine, and 3OC12-HSL, the ligand of QscR are indicated.

합 부위에 존재하며, 다른 LuxR 유사 단백질들간에 잘 보존되어 있지 않아, 132번째 arginine만 RhlR이나 *R. solanacearum*의 SolR 등 일부 LuxR 유사 단백질들에 보존되어 있고, 72번째와 140번째 threonine은 거의 보존되어 있지 않다(Chugani *et al.*, 2001). 최근에 QscR의 3차 구조가 보고되었으므로(Lintz *et al.*, 2011), 3차 구조상 돌연변이 잔기들의 위치와 QscR의 리간드인 3OC12-HSL의 결합 위치를 함께 표시하였다(Fig. 2). 그림에서 보듯 세 돌연변이 잔기 모두 3OC12-HSL을 둘러싸고 있는 포켓 주변에 위치하고 있는데, Lintz 등(2011)이 보고한 구조 모델에 따르면, 72번째 threonine의 경우 신호물질 결합 부위의 α helix 중 $\alpha 3$ 과 $\alpha 4$ 사이에 위치하며, 132번째 arginine과 140번째 threonine은 β -sheet인 $\beta 5$ 와 α helix인 $\alpha 6$ 사이에 위치한다.

돌연변이 QscR의 3OC12-HSL에 대한 반응성

앞에서 제조한 세 돌연변이 QscR들의 3OC12-HSL에 대한 수용성을 조사해 보았다. 50 nM로 동일하게 합성된 3OC12-HSL를 처리하였을 때 야생형 QscR 보다 더 강한 활성을 보이는 것은 없었으며, QscR_{R132M}은 3OC12-HSL에 대한 반응성이 거의 사라졌다(Fig. 3). QscR_{T72I}와 QscR_{T140I}는 각각 50 nM 3OC12-HSL에서 야생형 QscR 활성의 10%와 22% 정도를 유지하고 있었다. 이 정도의 활성으로도 Fig. 3의 작은 그래프에서 보듯 각각 21배, 10배 정도의 활성 증가를 보이기 때문에 3OC12-HSL에 대한 활성이 유지되고 있다고 판단되며, 특히 Fig. 4에서 3OC12-HSL의 농도를 100 nM로 처리한 경우 QscR_{T72I}는 100배, QscR_{T140I}는 60배 이상으로 그 활성이 증가했기 때문에 이들은 여전히 3OC12-HSL에 대한 충분한 활성을 보이고 있다고 사료된다. 그러나 50 nM 농도에서의 상대적으로 낮은 활성은 QscR_{T72I}와 QscR_{T140I}에서 3OC12-HSL에 대한 민감성이 의미있게 감소하였음을 나타낸다.

초기 QscR의 몇몇 아미노산 잔기에 대한 돌연변이 분석결과에서는 66번째 tyrosine 잔기를 histidine 잔기로 치환한 경우, 75번째 aspartic acid를 glutamic acid로 치환한 경우, 76번째 proline을 leucine으로 치환한 경우 모두 3OC12-HSL에 대한 QscR의 활성이 거의 사라졌는데(Lequette *et al.*, 2006), 본 연구에서 조사된 72번째 threonine 치환 돌연변이 QscR의 경우는 위의 세 잔기들과 가까운 위치임에도 불구하고 여전히 3OC12-HSL에 대한 활성을 가지고 있었다는 점이 특이하다. 최근 3차 구조 연구에서는 다른 LuxR 유사 단백질들에서는 보존되어 있지 않지만 QscR의 이량체화(dimerization)와 DNA 결합에 관여할 것으로 예측된 79번째 arginine을 alanine으로 치환한 경우, 본 연구의 72번째 threonine 치환처럼 3OC12-HSL에 대한 활성이 많이 감소하면서도 여전히 의미있게 활성이 남아 있음을 보여주었다(Lintz *et al.*, 2011). 앞서의 두 연구에서 105번째 alanine, 113번째 glycine, 121번째 lysine의 치환이 모두 QscR의 활성을 거의 없앤다는 결과를 보여주었는데(Lequette *et al.*, 2006; Lintz *et al.*, 2011), 본 연구에서는 132번째 arginine 또한 QscR의 활성에 매우 중요함을 보여주었다. 흥미로운 것은 이 132번째 arginine이 140번째 threonine과 3차 구조상에서 비슷한 위치에 있는데(Fig. 2), 이 140번째 threonine의 치환은 QscR

의 활성에 상대적으로 적은 영향을 주었다는 점이다(Fig. 3). 사실 132번 arginine은 140번째 threonine의 바로 옆 잔기인 141번째 glutamate와 상호작용을 할 가능성이 높는데, 거리상으로도 가깝고, 서로 반대 전하를 띠고 있기 때문이다. 이 부분에 대한 추가 연구가 필요하다고 하겠다.

돌연변이 QscR의 여러 다른 종류의 acyl-HSL들에 대한 반응성

최근 *Agrobacterium tumefaciens*의 acyl-HSL 수용체 단백질인 TraR에 대한 연구에서, 특정 아미노산 잔기의 치환이 수용하는 acyl기의 길이나 3번째 탄소의 oxo-moiety의 유무에 대한 특이성에 영향을 줄 수 있다는 보고가 있었기 때문에(Chai and Winans, 2004), 본 연구에서는 3개의 돌연변이 QscR에 대해서 다양한 길이와 3번째 탄소에 oxo-moiety를 갖거나 가지지 않는 다양한 구조의 acyl기를 갖는 acyl-HSL에 대한 반응성을 조사해보았다. 야생형 QscR의 경우 자기 자신의 신호물질인 3OC12-HSL보다 *N*-decanoyl HSL (C10-HSL)이나 *N*-dodecanoyl HSL (C12-HSL)처럼 10개 혹은 12개의 탄소 사슬을 가지면서 3번째 탄소에 oxo-moiety가 없는 acyl-HSL에 대해 더 높은 반응성을 보였다(Fig. 4A). 이는 QscR에 대한 초기 연구 결과에서도 비슷한 양상으로 관찰된 바 있다(Lee *et al.*, 2006). 앞에서 제조한 세 돌연변이 QscR들 중 QscR_{T72I}와 QscR_{T140I}는 이러한 야생형 QscR의 특징을 그대로 가지고 있었다(Figs. 4B and 4D). 이들은 C8-HSL에 대해서 매우 약한 반응성을 보이는 야생형 QscR의 특징도 그대로 가지고 있었으며, 탄소수가 6이하인 매우 짧은 acyl기나 탄소수가 16인 매우 긴 acyl기를 가지는 acyl-HSL들에 대해서는 반응성이 없는 야생형 QscR의 특징도 그대로 가지고 있었다

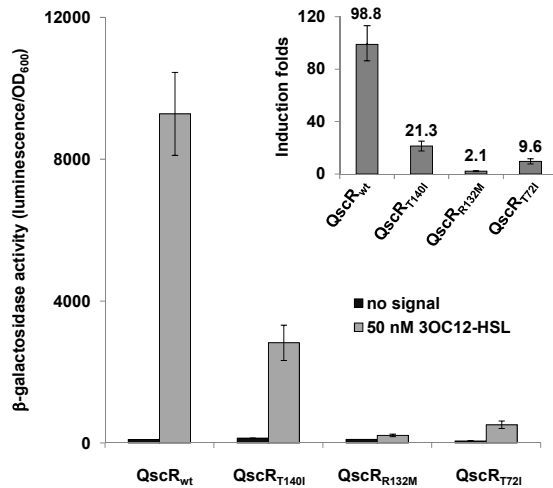


Fig. 3. Responsiveness of the mutant QscRs to 3OC12-HSL. The plasmids overexpressing the mutant QscRs were co-transformed into *E. coli* with the PA1897-*lacZ* fusion plasmid pJL101 to make reporter strains. The mutant QscRs were overexpressed by 0.4% arabinose and treated with 50 nM of 3OC12-HSL for 1 h. β -Galactosidase assay was performed to measure the activity of the mutant QscRs. The small graph shows the induction folds by the 3OC12-HSL treatment relative to the basal levels of the mutant QscRs.

(Figs. 4B and 4D)(Lee *et al.*, 2006). QscR_{R132M}은 3OC12-HSL 뿐만 아니라 본 연구에서 사용된 어떤 acyl-HSL에도 반응성을 보이지 않았다(Fig. 4C). 이로부터 132번째 arginine은 acyl-HSL의 종류에 관계없이 QscR의 활성에 전반적으로 매우 중요하다는 것과, 72번째와 140번째 threonine들은 QscR의 활성에 중요하면서도 여러 다른 구조의 acyl-HSL과의 결합에 대한 선택성에는 의미있게 관여하지 않는다는 것을 알 수 있다.

QS 저해제에 대한 돌연변이 QscR의 민감성

지금까지 많은 QS 신호물질 유사체들이나 QS 수용체 단백질에 결합할 수 있는 물질들이 QS 신호전달에 대한 경쟁적 억제제로 발굴된 바 있는데, 그 중에 QscR에 특이적인 저해효과를 가지는 것으로 5f 물질이 보고된 바 있다(Kim *et al.*, 2008, 2011). 이 물질을 3OC12-HSL과 경쟁적으로 처리하였을 때, 돌연변이 QscR들이 3OC12-HSL에 대해 서로 다른 정도의 경쟁적 억제 효과를 보여주는지 알아보기 위해 서로 다른 비율로 5f의 농도를 높여가며 활성 억제 효과를 측정해보았다. QscR_{R132M}은 어떤 acyl-HSL에도 반응하지 않았기 때문에 본 실험에서 제외하였다. QscR_{T72I}와 QscR_{T140I}는 야생형 QscR과 비슷한 수준과 양상으로 5f에 의해 활성이 억제되었다(Fig. 5). 이 결과는 앞서 여러 다른 종류의 acyl-HSL에 대한 반응성 테스트 결과와 더불어 72번째와 140번째 threonine의 경우 3OC12-HSL에 대한 민감성에는 의미있게 중요하지만, 다른 구조의 acyl-HSL에 대한 선택적 결합이나, 혹은 경쟁적 억제자들의 결합 간섭에는 관여하지 않

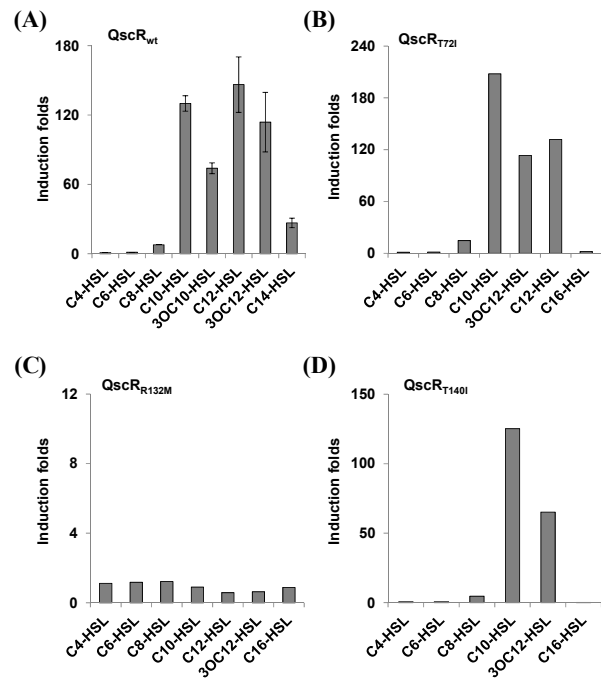


Fig. 4. Responsiveness of the mutant QscRs to various acyl-HSLs. The reporter strains for the mutant QscRs were treated with various synthetic acyl-HSLs which have different lengths and structures of acyl groups. The acyl-HSLs were treated at 100 nM concentration. (A) wild type QscR, (B) QscR_{T72I}, (C) QscR_{R132M}, (D) QscR_{T140I}.

음을 의미하는 것이다. 이는 72번째와 140번째 threonine들이 비록 다른 LuxR 유사 단백질들과의 아미노산 서열 유사성 비교 분석이나, 혹은 최근의 QscR 3차 구조 결과로부터 신호물질 결합 부위 주변에 위치한다고 알려져 있음에도 불구하고, QscR의 신호물질과의 결합에 직접적으로 관여한다기 보다는 DNA와의 결합이나 전사 활성화에 관여할 가능성이 있음을 시사하는 것이다.

기회 감염을 하는 병원균은 숙주내에 있을 때 보통의 상태와 질병을 일으키는 상황을 인지하여 병원성과 관련된 인자들을 발현시켜야 한다. 특히 녹농균과 같이 낭포성 섬유증 환자의 기관지 감염과 같은 만성 감염과 폐렴, 혹은 화상 감염과 같은 급성 감염을 모두 일으킬 수 있는 병원균의 경우 급성 또는 만성 감염에로의 방향 결정, 혹은 상호 전환을 위해 숙주의 생리적 상황을 인지해야 한다. QS 기전의 여러 수용체들 중에서 녹농균의 QscR은 이러한 역할을 효과적으로 수행할 수 있는 분자적 특성들을 가지고 있다. 다른 LuxR 유사 단백질들보다 더 넓은 신호 특이성을 가지기 때문에 보다 다양한 구조의 물질을 인지할 가능성이 높고, 다른 수용체들과는 달리 신호 물질과 가역적 결합을 할 가능성이 있기 때문이다(Lee *et al.*, 2006; Oinuma and Greenberg, 2011). 특히, QscR은 병독인자의 발현에 매우 중요한 LasR과 RhlR의 활성을 억제한다고 보고된 바 있기 때문에(Chugani *et al.*, 2001), QscR의 독특한 특성에 대한 분자적 기전의

이해는 매우 중요하다고 할 수 있다. 더욱이 QscR의 이러한 특징들은 세균의 이중간 신호전달에서도 중요한 역할을 할 것으로 제안된 바 있다(Ha *et al.*, 2012). 따라서 이러한 QscR의 분자적 특성에 중요한 역할을 하는 아미노산 잔기의 결정은 본 연구에 이어 앞으로라도 반드시 수행되어야 할 중요한 연구라 할 수 있다.

적요

그람 음성균인 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)은 다양한 환경에 존재하는 기회감염성 병원균으로, 병원성의 발현에 퀴럼 센싱(QS) 기전이 중요한 역할을 담당한다. 녹농균의 여러 QS 신호물질 수용체들 중 하나인 QscR은 다른 QS 수용체들과는 구분되는 특별한 특성들을 가진다. 본 연구에서는 이러한 특성들 중 특히 넓은 신호물질 특이성을 QscR에 부여해 주는 아미노산 잔기가 무엇인지 알아보기 위해, QscR의 72번째 threonine, 132번째 arginine, 140번째 threonine 잔기가 각각 isoleucine, methionine, isoleucine 잔기로 치환된 돌연변이 QscR들(QscR_{T72I}, QscR_{R132M}, QscR_{T140I})을 제조하였다. 이들의 활성을 측정해 보았을 때 QscR_{R132M}은 *N*-3-oxododecanoyl homoserine lactone (3OC12-HSL)에 대한 반응성이 사라졌고, QscR_{T72I}와 QscR_{T140I}는 민감성이 많이 감소하기는 하였으나 여전히 3OC12-HSL에 대한 반응성을 가지고 있었다. 이들 돌연변이 QscR들에 다양한 구조의 acyl-HSL을 처리해 보았을 때, QscR_{T72I}와 QscR_{T140I}는 야생형 QscR처럼 자기 자신의 신호물질인 3OC12-HSL 보다 *N*-decanoyl HSL (C10-HSL)이나 *N*-dodecanoyl HSL (C12-HSL)처럼 10개 혹은 12개의 탄소 사슬을 가지면서 3번째 탄소에 oxo-moiety가 없는 acyl-HSL에 대해 더 높은 반응성을 보였으며, QscR_{R132M}은 3OC12-HSL 뿐만 아니라 본 연구에서 사용된 어떤 acyl-HSL에도 반응성을 보이지 않았다. 또한 QscR_{T72I}와 QscR_{T140I}는 QscR 억제제인 5f에 의해 야생형 QscR과 비슷한 수준으로 활성이 억제되었다. 이러한 결과들은 130번째 arginine의 경우 QscR의 활성과 acyl-HSL들과의 결합에 중요한 역할을 하는 반면, 72번째와 140번째 threonine들의 경우 QscR의 활성에는 중요하지만, 다른 구조의 acyl-HSL들에 대한 선택적 결합이나, 경쟁적 억제자들의 결합 간섭에는 영향을 주지 않음을 시사하는 것이다.

감사의 말

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- Chai, Y. and Winans, S.C. 2004. Site-directed mutagenesis of a LuxR-type quorum-sensing transcription factor: alteration of autoinducer specificity. *Mol. Microbiol.* **51**, 765–776.
- Chugani, S.A., Whiteley, M., Lee, K.M., D'Argenio, D., Manoil, C., and Greenberg, E.P. 2001. QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 2752–2757.

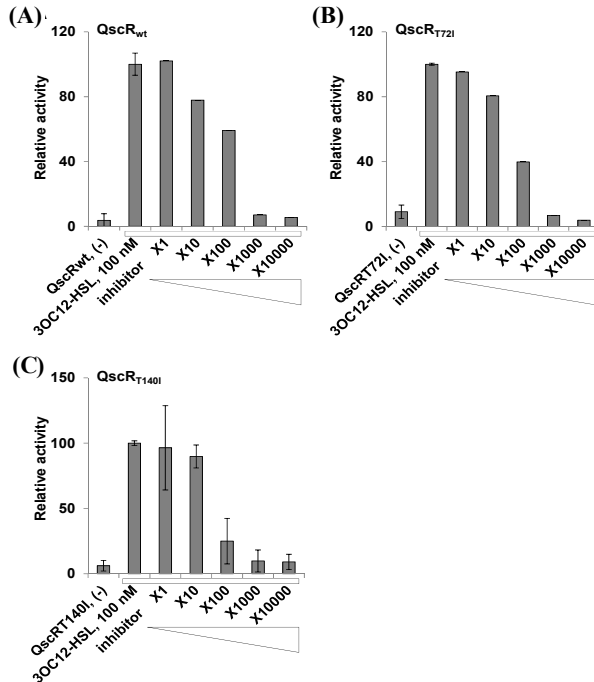


Fig. 5. Inhibition of the mutant QscRs by QS inhibitor. The mutant QscRs in the reporter strains were activated by the addition of 100 nM 3OC12-HSL and simultaneously inhibited by co-addition of a QS-inhibitor, 5f. The molar excess of 5f over 3OC12-HSL was indicated below. The activities were relatively presented as percent activity where the fully activated level without inhibitor was set to 100. (A) wild type QscR, (B) QscR_{T72I}, (C) QscR_{T140I}.

- Coggan, K.A. and Wolfgang, M.C.** 2012. Global regulatory pathways and cross-talk control *Pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype. *Curr. Issues Mol. Biol.* **14**, 47–70.
- Farinha, M.A. and Kropinski, A.M.** 1990. Construction of broad-host-range plasmid vectors for easy visible selection and analysis of promoters. *J. Bacteriol.* **172**, 3496–3499.
- Fuqua, C., Parsek, M.R., and Greenberg, E.P.** 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 439–468.
- Ha, C., Park, S.J., Im, S.J., and Lee, J.H.** 2012. Interspecies signaling through QscR, a quorum receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Cells* **33**, 53–59.
- Henke, J.M. and Bassler, B.L.** 2004. Bacterial social engagements. *Trends Cell. Biol.* **14**, 648–656.
- Hurley, M.N., Camara, M., and Smyth, A.R.** 2012. Novel approaches to the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* doi: 10.1183/09031936.00042012
- Jimenez, P.N., Koch, G., Thompson, J.A., Xavier, K.B., Cool, R.H., and Quax, W.J.** 2012. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 46–65.
- Kim, C., Kim, J., Park, H.Y., Park, H.J., Lee, J.H., Kim, C.K., and Yoon, J.** 2008. Furanone derivatives as quorum-sensing antagonists of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **80**, 37–47.
- Kim, S.-K., Kim, C., Yoon, J., and Lee, J.-H.** 2011. Inhibition of quorum sensing and biofilm formation by synthetic quorum signal analogues in *Pseudomonas aeruginosa*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 29–36.
- Lee, J.H., Lequette, Y., and Greenberg, E.P.** 2006. Activity of purified QscR, a *Pseudomonas aeruginosa* orphan quorum-sensing transcription factor. *Mol. Microbiol.* **59**, 602–609.
- Lequette, Y., Lee, J.H., Ledgham, F., Lazdunski, A., and Greenberg, E.P.** 2006. A distinct QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit. *J. Bacteriol.* **188**, 3365–3370.
- Lintz, M.J., Oinuma, K., Wysoczynski, C.L., Greenberg, E.P., and Churchill, M.E.** 2011. Crystal structure of QscR, a *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 15763–15768.
- Newman, J.R. and Fuqua, C.** 1999. Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* *araBAD* promoter and the *araC* regulator. *Gene* **227**, 197–203.
- Oinuma, K. and Greenberg, E.P.** 2011. Acyl-homoserine lactone binding to and stability of the orphan *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal receptor QscR. *J. Bacteriol.* **193**, 421–428.
- Page, M.G. and Heim, J.** 2009. Prospects for the next anti-*Pseudomonas* drug. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**, 558–565.
- Reading, N.C. and Sperandio, V.** 2006. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **254**, 1–11.
- Schuster, M. and Greenberg, E.P.** 2006. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**, 73–81.
- Welch, M., Mikkelsen, H., Swatton, J.E., Smith, D., Thomas, G.L., Glansdorp, F.G., and Spring, D.R.** 2005. Cell-cell communication in Gram-negative bacteria. *Mol. Biosyst.* **1**, 196–202.