

Effect of Glucose on Swarming Motility of *Paenibacillus* sp. CK214

Sung Wan Kang, Ah Young Yoo and Ho Young Kang*

Department of Microbiology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

Received February 15, 2013 / Revised February 18, 2013 / Accepted February 18, 2013

Paenibacillus is a gram-positive, spore-forming aerobes that was previously classified as a *Bacillus* species. *Paenibacillus* sp. CK214 was highly motile on LB agar plates and showed typical colonial morphology of *Paenibacillus*. However, its motility was defective in the absence of glucose. Electron microscopic observation revealed that the cells of CK214 cultured on LB agar plates were peritrichously flagellated but not flagellated in the presence of glucose. Flagellar filaments were purified by centrifugation after shearing off from the CK214 cells with vigorous pipetting. The purified protein was composed of a single flagellin with an apparent molecular size of 29 kDa. Recognition of the protein by anti-*Edwardsiella tarda* flagellin protein antibody demonstrates that the protein is a flagellin protein. A decreased level of flagellin protein was detected in CK214 cells grown under glucose-supplemented media.

Key words : Flagellin, glucose effect, *Paenibacillus*, swarming

서론

Swarming 운동은 표면 환경에서 박테리아의 집단 이동을 말하며, 자연 환경에서 미생물의 집락 형성에 중요한 역할을 담당한다[9, 10]. 편모 활성을 필요로 하며 *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* 등의 여러 박테리아 종에서 나타난다[9, 10, 15, 16, 18]. Swarming 운동을 하는 대부분의 박테리아는 주로 주모성 편모를 가지는데 이러한 주모성 편모 시스템에 대한 연구는 *E. coli*나 *S. typhimurium*에서 많이 이루어지고 있다[9, 10]. 편모는 구성 단백질들의 분비와 함께 basal body, hook, filament의 순차적인 조립으로 이루어지며, 양성자동력(Proton Motive Force, PMF)에 의한 시계/반시계 방향의 회전으로 운동방향을 결정한다[9, 17]. Swarming 운동은 주화성 시스템과 삼투압, 열 충격, acetylphosphate, glucose와 같은 여러 환경적 요인에 의한 편모 유전자의 발현 조절에 의해 영향을 받는다[5, 6, 9]. 그 중 glucose는 수많은 박테리아들이 주로 이용하는 대표적인 탄소원으로서 편모 유전자뿐만 아니라 여러 대사 관련 유전자의 조절에도 관여한다[8, 20].

*Paenibacillus*는 내생포자를 형성하는 그람 양성 박테리아로써 이전에는 *Bacillus*로 분류되었다[2, 12]. 대부분 서식지 환경에서 다양한 분해 효소를 생산하며 물질 순환에 중요한 역할

을 담당한다[15, 21]. *Paenibacillus*의 몇몇 종은 일반적인 다른 세균들과는 다르게 고체표면에서 소용돌이, 가지, 키랄 형태와 같은 특유의 swarming 운동 형태를 보이는데 *P. alvei*, *P. dendritiformis*, *P. vortex*가 대표적이다[7, 12, 22]. 환경에서 분리한 균주인 *Paenibacillus* sp. CK214 또한 agar 표면에서 특유의 소용돌이, 가지 형태를 나타내며 높은 swarming 운동 능력을 가진다는 것을 이전 연구에서 확인하였다[14]. 분리균주 *Paenibacillus* sp. CK214의 swarming 운동능력에 영향을 미치는 인자를 연구하던 중 glucose가 첨가된 조건에서 운동능력이 급격히 저하됨을 확인하였으며, glucose와 운동성 또는 운동성에 있어서 중요한 인자인 편모의 발현과의 상관관계를 파악하기 위한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 균주 배양 조건

본 연구에서 사용된 *Paenibacillus* sp. CK214는 Luria-Bertani (LB) 액체배지 또는 1.0-1.5% (w/v) agar를 첨가한 고체배지를 사용하여 37°C에서 배양하였다[3, 19]. CK214 swarming 운동을 확인하기 위해 각 농도의 agar가 첨가된 고체배지에 전배양액 10 µl를 떨어뜨린 후 37°C에서 20 시간 이상 배양하였다. Glucose는 배양조건의 필요성에 따라 0.05-1.0% (w/v)의 농도로 첨가하였다.

운동성 관찰

운동성은 2 ml LB 액체배지에서 12 시간 배양한 CK214 배양액 5 µl를 1.0% (w/v) LB agar 평판배지에 떨어뜨린 후 37°C에서 20 시간동안 배양하면서 관찰하였다. Glucose는 각각의 배양 조건에서 필요한 경우에 맞게 0.05-1.0% (w/v)의

*Corresponding author

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

E-mail : hoykang@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

농도로 첨가하였다. CK214 균주의 각 조건에 따른 운동성은 고체평판배지에서 이동한 지름의 길이(mm)를 재어 측정하였다. CK214 균주의 이동이 완전한 원형의 모습이 아닌 경우, 가장 멀리 이동한 거리를 측정하여 기록하였다.

투과전자현미경(Transmission Electron Microscope, TEM)

CK214 전배양액 10 μ l를 떨어뜨린 후 1.0% (w/v) LB agar 평판배지에서 배양하여 swarming 운동한 CK214 균체를 0.85% (w/v) NaCl 용액 1 ml에 부드럽게 현탁하였다. 균주 현탁액을 grid에 부착시키고 1% (w/v) uranyl acetate로 1 분간 염색한 후 투과전자현미경(TEM, H-7600, HITACHI, 부산대학교 공동실험 실습관)을 사용하여 균체를 관찰하였다 ($\times 10,000$ - $25,000$).

편모 단백질 서열 분석

각 균주의 flagellin-N과 flagellin-C 아미노산 서열은 NCBI Protein database에서 획득하였다. 각 flagellin 아미노산 서열의 상동성은 CLC Protein Workbench 5 소프트웨어(CLC bio, Denmark)를 이용하여 비교하였다.

SDS-PAGE

단백질 시료들을 2 \times digestion buffer [20% (v/v) glycerol, 4% (w/v) SDS, 0.2% (w/v) bromophenol blue, 200 mM β -mercaptoethanol, 100 mM Tris-HCl buffer, pH 6.8]에 용해하였다[19]. 용해된 단백질 시료들을 95 $^{\circ}$ C에서 5 분동안 가열한 후, 비연속적 SDS-PAGE에 의해 분리하였다. 분리된 단백질들을 Coomassie brilliant blue G-250 (Sigma)을 통한 염색과 2 시간 동안의 탈색 과정을 통해 밴드로서 확인하였다.

Immunoblotting

SDS-PAGE를 통해 단백질 시료를 분리한 후, transfer 장치 (BioRad)와 Towbin's Buffer (TB) [25 mM tris, 192 mM glycine, 20% (v/v) methanol, pH 8.3]를 사용하여 polyacrylamide gel 내의 단백질들을 nitrocellulose membrane (Whatman)으로 이동시켰다. Towbin 등에 의해 기술된 바와 같이 5% skim milk를 함유하는 Towbin's Saline Buffer (TBS) [0.9% NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4]에서 4 시간 동안 membrane을 blocking시킨 후, 300배 희석한 flagellin 특이적인 다클론성 1차 항체와 함께 2 시간 반응시켰다[24]. TBS로 수 회 세척한 membrane에 2차 항체인 peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Sigma)를 5% skim milk/TBS에 1:2000의 비율로 희석하여 2 시간 동안 반응시켰다. TBS로 수 회 세척한 membrane의 flagellin 단백질 밴드를 H₂O₂ (Sigma)와 4-chloro-1-naphthol (Sigma)이 포함된 용액에서 자주색의 침착물이 생성되는 것으로 확인하였다. 반응은 다량의 증류수

세척을 통해 중지시켰다.

결과 및 고찰

Glucose 첨가에 의한 CK214의 운동성 저해

Swarming 운동을 하는 대부분의 박테리아는 표면 환경에서 빠르게 이동하기 위해서 적정 수준의 습기를 필요로 한다. *Escherichia*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Yersinia*, *Pseudomonas* 와 같은 박테리아는 1% (w/v) 이상의 agar 평판배지에서 이동하기에 필요한 습기가 충분하지 않기 때문에 이동이 저해된다[9, 10, 11, 16]. 이전 연구 결과, *Paenibacillus* sp. CK214는 1.0% (w/v) LB agar 평판배지에서 가장 높은 swarming 운동 능력을 나타내었으며(지름 약 80 mm) *S. typhimurium*과 비교하였을 때 이동 거리가 약 5배로 매우 높은 운동성을 가진다는 것을 확인할 수 있었다[14]. CK214 균주의 운동성에 영향을 미치는 환경 인자를 알기 위해 다양한 조건에서의 운동성을 관찰하였다(data not shown). 그 결과, 0.05-1.0% (w/v) glucose가 첨가된 환경에서 그 운동성이 급격히 감소하고, 0.2% (w/v) 이상의 glucose 조건에서는 운동성을 완전히 상실한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 1). Glucose 첨가에 의한 CK214의 운동성 저해가 균체의 생육 정체에 의한 것은 아닌지 구별하기 위하여 glucose 조건에 따른 CK214의 생장 변화를 측정하였다. CK214 전배양액을 각 농도의 glucose가 포함된 0.1%의 농도로 접종한 후 37 $^{\circ}$ C (200 rpm)에서 배양하면서 6 시간 간격으로 파장 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 그 정도를 성장 정도로 판단하였다. Glucose 농도에 따라서 성장 정도는 약간 감소하였지만 전반적으로 일정 수준 이상의 성장 정도를 유지하였다(Fig. 2). 이는 glucose가 CK214의 생육 정체를 가져오는 것이 아니라 운동성에 직접적으로 영향을 미친다는 것을 보여준다.

편모형성의 변화

고체 표면에서의 swarming 운동 시에는 높은 표면마찰과 점성을 극복해야 하기 때문에 편모의 역할이 더욱 더 중요시된다[9]. 우리는 glucose에 의한 CK214 균주의 운동성 상실은 flagella와 연관되었을 것이라 생각하고 glucose 조건에 따른 CK214 균주의 flagellation을 투과전자현미경을 통해 관찰하였다. 1.0% (w/v) LB agar 평판배지에서 배양한 CK214 균주의 경우 단일 세포 주위에서 나타난 여러 개의 주모성 편모를 확인할 수 있었지만, 반면에 0.5% (w/v) glucose가 첨가된 조건의 CK214 균주에서는 주모성 편모가 거의 나타나지 않았다(Fig. 3). 이 결과를 통해 glucose에 의한 CK214 균주의 운동성 상실은 편모의 flagellation 저해에 의한 현상이라 예상할 수 있었으며, 편모를 구성하는 단백질 발현 변화에 대한 연구가 필요하다고 판단하였다.

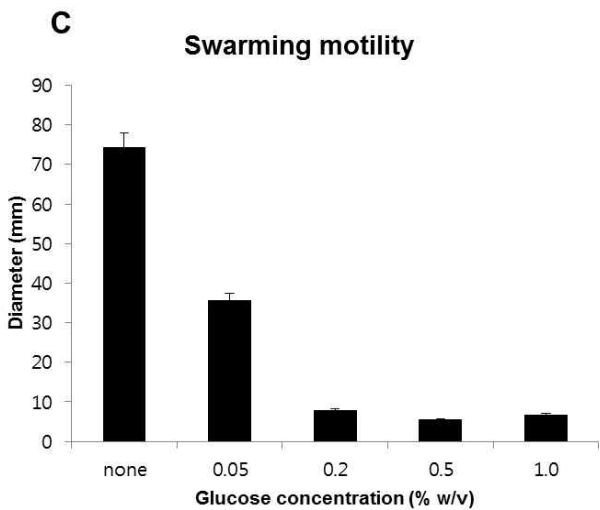
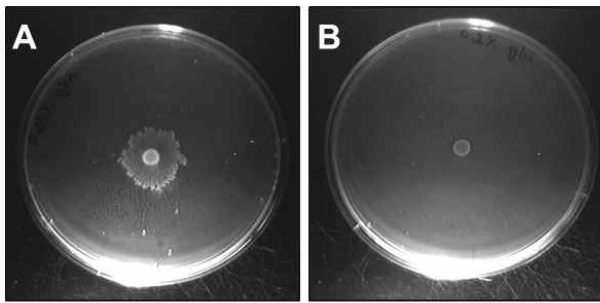


Fig. 1. Inhibition of swarming ability of *Paenibacillus* sp. CK214 strain in glucose added condition culture. (A-B) Gross morphology of *Paenibacillus* sp. CK214 on media containing 0.05 or 0.2% (w/v) of glucose. (C) *Paenibacillus* sp. CK214 was spotted on LB swarming plates containing 1.0% (w/v) agar, with or without 0.05-1.0% (w/v) glucose. The strain was incubated for 20 hr at 37°C. Swarm diameter measured in triplicate.

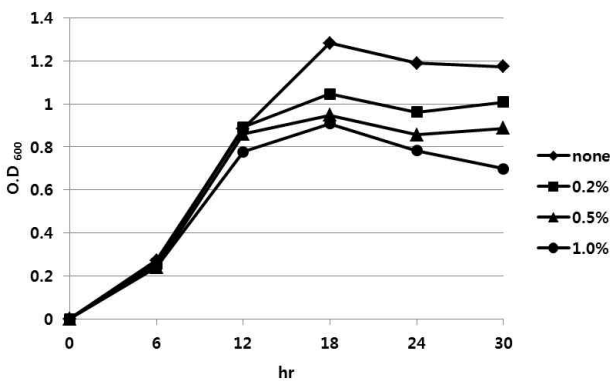


Fig. 2. Growth of *Paenibacillus* sp. CK214 under different concentration of glucose conditions. *Paenibacillus* sp. CK214 cells were cultured in LB broth containing 0.05-1.0% (w/v) glucose at 37°C with shaking (200 rpm). Optical density at 600 nm wavelength was measured at the time points indicated in the graph.

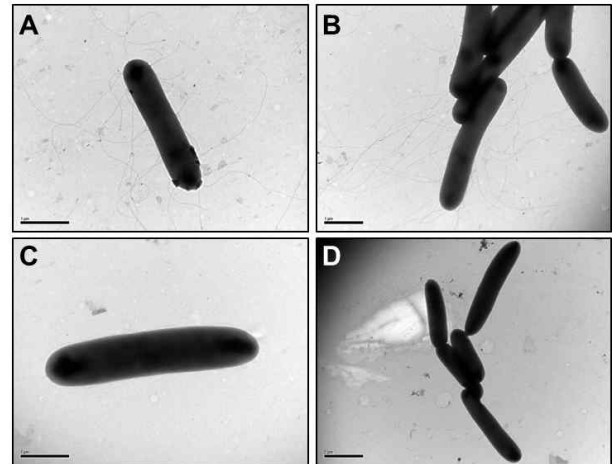


Fig. 3. Electron microscopic images of CK214 grown on LB (1.0% w/v) agar with 0.5% glucose. Cells extracted from agar plates were incubated at 37°C either in the absence (A-B) or presence of glucose (C-D). Strains diluted with 0.85% NaCl were dyed and dried for two minutes on the grid by 1% (w/v) uranyl acetate. Bars indicate 0.5 μm.

Flagellin 항체 단백질의 생산

일반적으로 *E. coli*나 *S. typhimurium*에서 잘 알려진 박테리아의 flagellation은 우선 hook-basal body 복합체가 형성되고 filament의 구성 단백질인 flagellin이 나선형 구조를 형성하며 hook-basal body 복합체에 결합한다[1, 9, 17]. 박테리아의 flagellation은 이러한 filament의 길이 신장을 의미한다. CK214 균주의 flagellin과 관련된 이후 연구를 위해 flagellin 특이적 다클론항체를 필요로 하였다. Flagellin은 여러 종류의 균주들에서 N-말단과 C-말단 쪽에 잘 보존된 나선형의 영역을 가지고 있기 때문에 유전자 정보가 알려지지 않은 CK214의 flagellin 특이적 다클론항체를 생산하기 보다는 유전자 서열이 잘 알려진 *Edwardsiella tarda*의 flagellin 특이적 다클론항체를 생산하기로 하였다. *E. tarda*의 flagellin 단백질에 특이적인 다클론항체를 생산하기에 앞서 *E. tarda* flagellin 서열과 여러 *Paenibacillus* 종들의 flagellin 단백질 서열의 N-말단과 C-말단 영역을 각각 CLC 소프트웨어를 통해 비교하여 각각의 flagellin N-말단과 C-말단 영역에서 높은 상동성을 보이는 부분을 확인하였다(Fig. 4). 또한 CLC 소프트웨어의 항원성 예측 프로그램을 이용하여 *E. tarda*와 여러 *Paenibacillus* 종들의 flagellin 서열을 분석하여 높은 항원성을 가지는 영역을 예측하였을 때 공통적으로 높은 항원성을 나타내는 N-말단 부분이 존재함을 확인하였으며, 이는 N-말단의 상동부분과도 일치하였다 (data not shown). 이러한 bioinformatics 결과는 N-말단 영역이 *E. tarda*와 *Paenibacillus* flagellin 단백질에 대한 항원-항체 반응에서 공통된 epitope으로써 작용할 가능성이 매우 높다는 것을 시사한다. *E. tarda* flagellin 특이적 다클론항체를 생산하기 위해서 항원인 flagellin 단백질을 대장균에서 대량 생산하

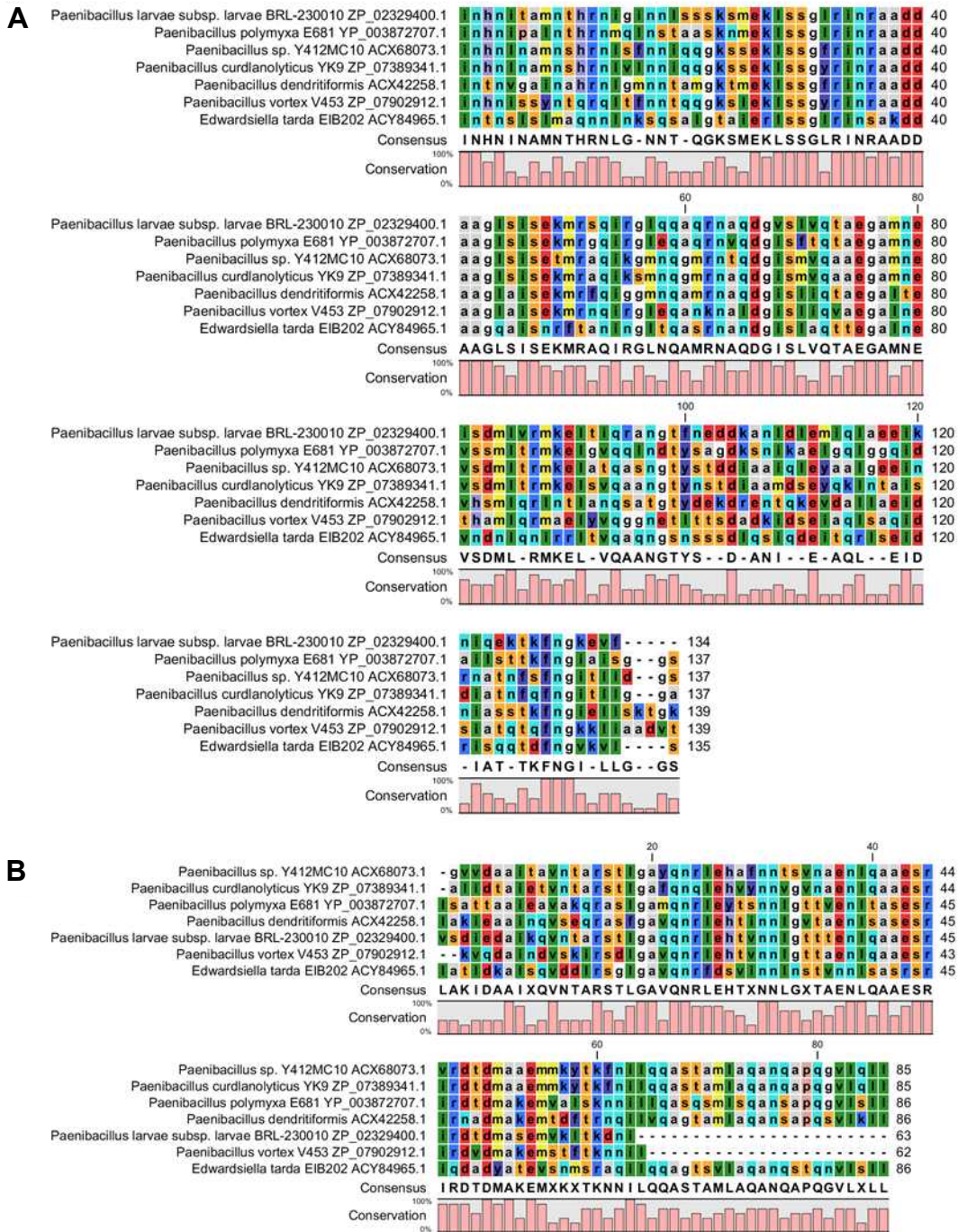


Fig. 4. Sequence alignment of flagellin protein with its homologs. The amino acid sequences are shown in the one-letter code. The flagellin protein sequences were obtained from NCBI's Entrez Protein database for *Edwardsiella tarda* EIB202 ACY84965.1; *Paenibacillus larvae* subsp. larvae BRL-230010 ZP_02329400.1; *Paenibacillus polymyxa* E681 YP_003872707.1; *Paenibacillus dendritiformis* ACX42258.1; *Paenibacillus* sp. Y412MC10 ACX68073.1; *Paenibacillus curdianolyticus* YK9 ZP_07389341.1; *Paenibacillus vortex* V453 ZP_07902912.1.

였으며, 여러 단계의 생화학적 분리과정을 통해 정제한 flagellin 단백질을 토끼에 피하 주사하였다. 토끼로부터 얻은 혈액으로부터 혈청을 분리한 후 immunoblotting을 통해 flagellin

단백질에 대한 다클론성 항체가 생성되었는지를 확인한 결과, immunoblotting에 사용할 수 있을 만큼 충분한 면역 활성을 가진다는 것을 확인할 수 있었다(data not shown).

CK214 균주에서 발현된 flagellin 단백질의 확인

CK214의 filament 구성 단백질인 flagellin을 확인하기 위해 1.5% (w/v) LB agar 평판배지에서 배양한 CK214 균체를 0.85% NaCl 용액에 현탁한 후 격렬한 pipetting으로 편모의 filament를 균체로부터 분리하였다. 분리된 filament 단백질은 원심분리 후의 상등액에 존재하며, 이를 SDS-PAGE로 확인한 결과, 약 29 kDa의 단일 단백질 밴드가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이 단백질 밴드가 CK214 균주의 flagellin 단백질인지 확인하기 위해 앞에서 언급한 과정을 통해 생산한 *E. tarda* flagellin 특이적 다클론항체를 이용하여 immunoblotting을 수행하였으며, 단일 단백질과 *E. tarda* flagellin 특이적 다클론항체간의 면역반응을 확인하였다(Fig. 5).

Flagellin 발현 조절에 미치는 glucose 영향

앞서 glucose가 CK214의 flagellation을 방해한다는 것을 확인하였으며, glucose가 편모를 형성하는 구성 단백질의 합성이나 분비, 조립과 관련한 유전자 조절에 직/간접적으로 관여할 것이라 예상하였다. 이를 확인하기 위해 glucose 조건에 따른 CK214 균주의 flagellin 단백질의 발현을 단백질 수준에서 관찰하였다. 배지 중의 glucose의 농도차이에 따른 CK214

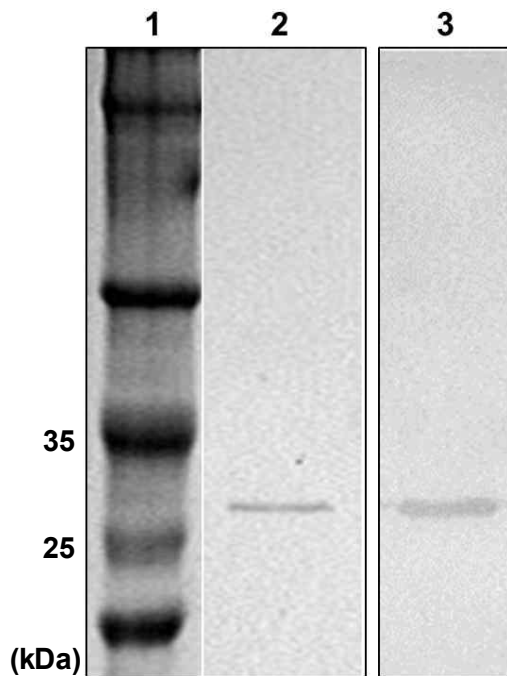


Fig. 5. Flagellin protein of *Paenibacillus* sp. CK214. *Paenibacillus* sp. CK214 cells were cultured on 1.5% (w/v) LB agar. Cell pellets were suspended to 0.85% NaCl. Flagellin proteins sheared off from cells by vigorous pipetting were purified by centrifugation. Purified protein was subjected to immunoblot analysis as described in Materials and Methods with rabbit sera. Lanes: 1, molecular size marker; 2, coomassie staining; 3, immunoblotting.

균주의 전체 단백질을 획득하기 위해 1.5% (w/v) LB agar 평판 배지와 0.5% (w/v) glucose를 첨가한 고체배지에서 CK214 균주를 배양하였다. 배양된 각각의 균체를 0.85% NaCl 용액에 현탁한 후 초음파발생장치(B. Braun Biotech)를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄된 균체로부터 획득한 CK214 전체 단백질을 SDS-PAGE로 확인하였으며, *E. tarda*의 flagellin 단백질 특이적 항체를 이용하여 각 조건에서 성장한 CK214 균주에서 발현되는 flagellin 단백질을 비교하였다. 그 결과, glucose가 첨가된 조건에서 성장한 CK214 균주에서의 flagellin 단백질 발현이 glucose가 없는 조건일 때에 비해 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 6). 예상했던 바와 같이 glucose 첨가 조건에서의 CK214 균주의 운동성 결여는 운동기관인 편모의 구성 단백질 발현 자체의 감소에 의한 것으로 확인되었다. 이는 아마도 glucose가 관여하는 carbon catabolite repression (CCR)이 작용하였을 것이라 생각된다. CCR은 당 이용성과 관련한 주요 유전자 조절 체계 중의 하나로써 phosphoenolpyruvate (PEP)

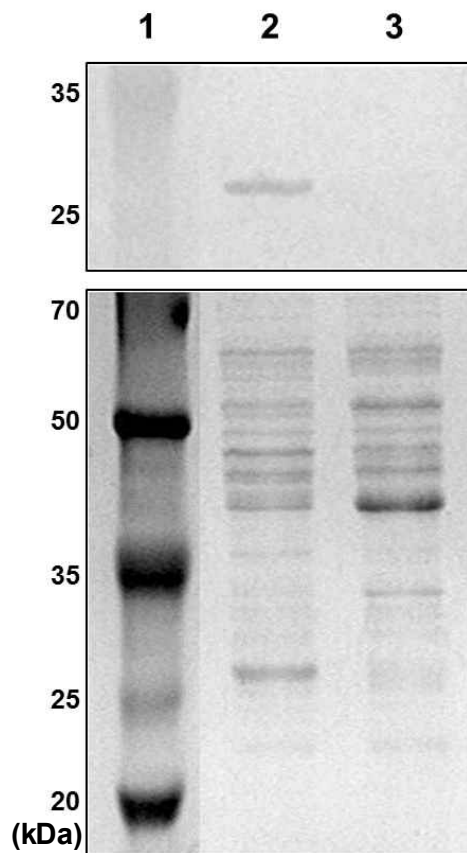


Fig. 6. Effect of glucose on expression of CK214 flagellin protein. *Paenibacillus* sp. CK214 cells were cultured on 1.5% (w/v) LB agar with or without 0.5% (w/v) glucose. Suspended cell lysates were subjected to immunoblot analysis as described in Material and Methods with rabbit sera. Lanes: 1, molecular size marker; 2, without glucose; 3, with glucose.

의 인산기가 중간 효소를 거쳐 최종적으로 당까지 전달되는 phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system (PTS) 신호 전달 경로가 중요하게 작용한다[4, 8]. CCR은 *E. coli*와 *Bacillus subtilis*에서 많이 연구되어 있는데 glucose가 존재할 때 PTS 경로의 중간 효소들은 PTS 경로의 활성화로 인해 glucose로 인산기의 전달이 증가하고 효소의 인산화 빈도는 감소하게 된다. *Bacillus*의 경우 중간 효소 중 Histidine protein (HPr)이 중요한 조절자로 작용한다. PTS 경로의 활성화로 인해 인산화 되지 못한 HPr은 Histidine protein kinase/phosphorylase (HPrK)에 의해 인산화 될 수 있다. HPrK에 의해 인산화 된 HPr은 CcpA 단백질과 결합하여 강력한 억제자로 작용하여 직접적인 음성 조절에 관여한다[8, 13, 23, 25]. *Bacillus*와 함께 Firmicutes에 속하는 *Paenibacillus* sp. CK214의 glucose에 의한 운동성의 감소와 flagellin 단백질의 발현 감소는 CcpA와 관련한 CCR 억제자에 의해 직접적인 음성 조절이 이루어 질 것이라 생각되며 이에 관한 차후 연구가 이루어져야 한다.

감사의 글

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

References

- Aldridge, P. and Hughes, K. T. 2002. Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol* **5**, 160-5.
- Ash, C., Priest, F. G. and Collins, M. D. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **64**, 253-260.
- Bertani, G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**, 293-300.
- Deutscher, J. 2008. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **11**, 87-93.
- Eberl, L., Molin, S. and Givskov, M. 1999. Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **181**, 1703-1712.
- Fraser, G. M. and Hughes, C. 1999. Swarming motility. *Curr Opin Microbiol* **2**, 630-635.
- Fujihara, M., Maeda, K., Sasamori, E., Matsushita, M. and Harasawa, R. 2009. Effects of chelating reagents on colonial appearance of *Paenibacillus alvei* isolated from canine oral cavity. *J Vet Med Sci* **71**, 147-153.
- Gorke, B. and Stulke, J. 2008. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* **6**, 613-624.
- Harshey, R. M. 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Ann Rev Microbiol* **57**, 249-273.
- Harshey, R. M. 1994. Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **13**, 389-394.
- Harshey, R. M. and Matsuyama, T. 1994. Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 8631-8635.
- Ingham, C. J. and Ben Jacob, E. 2008. Swarming and complex pattern formation in *Paenibacillus vortex* studied by imaging and tracking cells. *BMC Microbiol* **8**, 36.
- Jones, B. E., Dossomnet, V., Kuster, E., Hillen, W., Deutscher, J. and Klevit, R. E. 1997. Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA target is regulated by phosphorylation of its corepressor HPr. *J Biol Chem* **272**, 26530-26535.
- Kang, S. W., Yoo, A. H., Yu, J. E. and Kang, H. Y. 2012. Characterization and identification of an agar-degrading motile bacteria strain. *J Life Sci* **22**, 259-265.
- Ko, C. H., Tsai, C. H., Lin, P. H., Chang, K. C., Tu, J., Wang, Y. N. and Yang, C. Y. 2010. Characterization and pulp refining activity of a *Paenibacillus campinasensis* cellulase expressed in *Escherichia coli*. *Bioresour Technol* **101**, 7882-7888.
- Kohler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C. and Pechere, J. C. 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* **182**, 5990-5996.
- Madigan, T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V. and Clark, D. P. 2009. *Biology of Microorganisms*, 10th ed. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco.
- Rather, P. N. 2005. Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *Environ Microbiol* **7**, 1065-1073.
- Sambrook, J. and Russel, D. W. 2001. *Molecular Cloning a laboratory manual*, 3rd eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Seidl, K., Muller, S., Francois, P., Kriebitzsch, C., Schrenzel, J., Engelmann, S., Bischoff, M. and Berger-Bachi, B. 2009. Effect of a glucose impulse on the CcpA regulon in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* **9**, 95.
- Sudo, M., Sakka, M., Kimura, T., Ratanakhanokchai, K. and Sakka, K. 2010. Characterization of *Paenibacillus curdlandolyticus* intracellular xylanase Xyn10B encoded by the xyn10B gene. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**, 58-60.
- Tcherpakov, M., Ben-Jacob, E. and Gutnick, D. L. 1999. *Paenibacillus dendritiformis* sp. nov., proposal for a new pattern-forming species and its localization within a phylogenetic cluster. *Int J Syst Bacteriol* **1**, 239-246.
- Titgemeyer, F. and Hillen, W. 2002. Global control of sugar metabolism: a gram-positive solution. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**, 59-71.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4350-4354.
- Warner, J. B. and Lolkema, J. S. 2003. CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 475-490.

초록 : *Paenibacillus* sp. CK214의 swarming 운동성에 미치는 glucose의 영향

강성완 · 유아영 · 강호영*

(부산대학교 생명과학부 미생물학과)

*Paenibacillus*는 호기성의 내생포자를 형성하는 그람양성균으로써 이전에는 *Bacillus*로 분류되었다. *Paenibacillus* sp. CK214 균주는 LB agar 평판배지에서 높은 swarming 운동 능력을 가지고 *Paenibacillus* 특유의 집락 형태를 나타내었지만 glucose가 첨가된 평판배지에서는 운동 능력을 상실하였다. 투과전자현미경(TEM)을 이용하여 glucose 조건에 따른 CK214 균주의 편모를 관찰하면 LB agar 평판배지에서 배양한 CK214 균주는 주모성의 편모를 가지는 반면 glucose를 첨가한 평판배지에서 배양한 CK214 균주의 경우 주모성 편모가 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었다. 물리적 충격과 원심분리를 통해 분리한 CK214 균주의 filament 구성 단백질을 SDS-PAGE를 통해 확인하였으며, 약 29 kDa 크기의 단일 단백질 밴드가 나타났다. *Edwardsiella tarda* 균주의 flagellin 단백질에 특이적인 항체를 이용한 immunoblotting 수행 결과, 이 단일 단백질 밴드는 flagellin 단백질임이 확인되었다. Glucose 조건에 따른 CK214 균주의 flagellin 단백질의 발현을 단백질 수준에서 관찰한 결과, glucose가 첨가된 조건에서 성장한 CK214 균주에서의 flagellin 단백질 발현이 glucose가 없는 조건일 때에 비해 감소하는 것을 확인할 수 있었다.