

## Characterization of an Extracytoplasmic Chaperone Spy in Protecting *Salmonella* against Reactive Oxygen/Nitrogen Species

Yoon Mee Park, Hwa Jeong Lee, and Iel Soo Bang\*

Department of Oral Microbiology and Immunology, Chosun University School of Dentistry, Gwangju 501-759, Republic of Korea

(received November 18, 2014; revised December 9, 2014; accepted December 10, 2014)

Antimicrobial actions of reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) derived from products of NADPH oxidase and inducible nitric oxide (NO) synthase in host phagocytes inactivate various bacterial macromolecules. To cope with these cytotoxic radicals, pathogenic bacteria have evolved to conserve systems necessary for detoxifying ROS/RNS and repairing damages caused by their actions. In response to these stresses, bacteria also induce expression of molecular chaperones to aid in ameliorating protein misfolding. In this study, we explored the function of a newly identified chaperone Spy, that is localized exclusively in the periplasm when bacteria exposed to conditions causing spheroplast formation, in the resistance of *Salmonella* Typhimurium to ROS/RNS. A *spy* deletion mutant was constructed in *S. Typhimurium* by a PCR-mediated method of one-step gene inactivation with  $\lambda$  Red recombinase, and subjected to ROS/RNS stresses. The *spy* mutant *Salmonella* showed a modest decrease in growth rate in NO-producing cultures, and no detectable difference of growth rate in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> containing cultures, compared with that of wild type *Salmonella*. Quantitative RT-PCR analysis showed that *spy*

mRNA levels were similar regardless of both stresses, but were increased considerably in *Salmonella* mutants lacking the flavohemoglobin Hmp, which are incapable of NO detoxification, and lacking an alternative sigma factor RpoS, conferring hypersusceptibility to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Results demonstrate that Spy expression can be induced under extreme conditions of both stresses, and suggest that the protein may have supportive roles in maintaining proteostasis in the periplasm where various chaperones may act in concert with Spy, thereby protecting bacteria against toxicities of ROS/RNS.

**Key words:** chaperone, reactive nitrogen species, reactive oxygen species, *Salmonella*, Spy

### 서론

살모넬라균은 사람을 포함하는 많은 동물에서 경증의 위장관염에서 부터 장티푸스 열(Typhoid fever) 및 패혈증 등 심각한 질병을 일으킬 수 있고, 숙주세포 내부에서 기생 능력이 있는 병원균(intracellular pathogen)이다. 살모넬라균의 종명은 *Salmonella enterica* 이며, 주로 장관계와 관련된 살모넬라증(salmonellosis)을 일으킨다[1]. 세 가지의 대표적인 혈청형(serovar)이 주요한 병원균으로서, Typhi 혈청형(*Salmonella enterica* serovar Typhi, 혹은 줄여서 *S. Typhi* 로 표기)은 사람에게 장티푸스 열을 일으키며, Enteritidis 혈청형(*S. Enteritidis*)은 인체 및 동물에 위장관염을 일으키고, 특히 가금류에 심각한 주요 식중독 균이다. 마지막으로, Typhimurium 혈청형(*S. Typhimurium*)은 쥐

\*Correspondence to: Iel Soo Bang, Department of Oral Microbiology and Immunology, Chosun University School of Dentistry, Gwangju 501-759, Republic of Korea  
Tel: +82-62-230-6872, Fax: +82-62-232-6896,  
E-mail: isbang@chosun.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.

에서 장티푸스 유사 열병을 일으키고 사람엔 덜 심각한 위 장관염을 일으킨다[2]. *S. Typhimurium*과 실험용 쥐를 이용한 살모넬라 병원성 연구는 살모넬라균이 일으키는 살모넬라증의 기전을 밝히고 있으며, 더불어 숙주세포 내 기생 능력이 있는 병원균의 병원성을 이해하는데 큰 기여를 하고 있다.

살모넬라균의 숙주세포 내 기생능력은 이 세균의 병독성을 결정하는데 아주 중요하여, 특히 장 상피세포를 침입한 후 만나는 대식세포(macrophage)에 포식된 후, 이 안에서 대식세포가 생산하는 많은 종류의 항생물질에 대해 적응하거나 혹은 내성을 갖는 능력은 이 세균의 질병 유발 능력과 높은 상관관계가 있다[3]. 실제로 대식세포 내에서 생존하지 못하는 대부분의 *S. Typhimurium* 돌연변이주들은 쥐에 대한 병독성이 제한적이다. 대식세포 내에서 생존할 수 있는 살모넬라균은 대식세포를 따라 이동하여 숙주 동물 내 다른 표적 기관으로 퍼져나갈 수 있다[3].

대식세포에서 생산하는 항생 물질 중 살모넬라균의 생존과 번식을 제어하는 대표적인 물질로 알려진 것은 반응성 산소화합물들인 활성 산소종(reactive oxygen species) 혹은 활성 질소종(reactive nitrogen species)들로서 대식세포 내 phagosome 막에 위치한 NADPH oxidase (Phox)가 생산하는 superoxide ( $O_2^-$ ) 및 inducible nitric oxide synthase (iNOS)가 생산하는 nitric oxide (NO)에 의해 생화학적으로 파생된다[4,5]. 이들의 표적은 세균세포 내 핵산, 지질, 단백질 등 다양하며, DNA 및 단백질을 직접 훼손하거나, 특히 철(Fe) 이온과 같이 전자전달이 가능한 효소 보조인자들에 반응하여 세균세포 내 산화환원 반응들에 관여함으로써 많은 세균 대사를 비정상적으로 변화시킬 수 있다[5].

살모넬라를 포함하는 숙주세포 내 병원균들은 대부분 이러한 활성 산소/질소 종들을 해독할 수 있는 효소들을 갖고 있는데, superoxide dismutase, catalase/peroxidase 등은 활성산소종  $O_2^-$ 와  $H_2O_2$ 를 각각 해독할 수 있으며, flavohemoglobin Hmp 는 NO를 해독할 수 있다[6-8]. 이들 효소의 유전자가 결손된 살모넬라균은 대식세포 내 생존률이 현저히 저하되고, 쥐에서 병독성을 보이지 못한다[7-9]. 이 해독 효소들의 중요성은 다른 많은 병원성 세균에서도 입증되고 있어, 병원균의 병독성 발현 과정에서 숙주세포가 생산하는 활성 산소/질소 종들과 세균의 상호작용이 매우 중요함을 보여준다[10,11].

활성 산소/질소 종들에 대한 세균의 유전체 반응을 조사한 최근의 전사체 연구들은 위에서 언급한 해독효소들 유전자외에도 수많은 유전자들의 새로운 발현이 이루어지고 있음을 보여주고 있는데, 이것은 이들의 높은 반응성 특성 때문에 기존 해독 효소들 외에도 세균세포 훼손을 최소화할 수 있는 많은 복구 시스템들이 필요함을 보여준다

[12-14].

이들 활성 산소/질소 종들에 의한 단백질 훼손은 DnaK, DnaJ, GroELS 등의 많은 종류의 세포질 내 chaperone 단백질들이 복구할 수 있고, 이들 유전자가 결손된 돌연변이주는 산화적 스트레스에 민감하며, 병독성 또한 감소하는 것으로 알려졌다[15-17].

최근 연구에서 세균 세포질 외부의 단백질 구조 안정화에 특이적이고 필수적인 것으로 밝혀진 새로운 chaperone 단백질 Spy가 알려졌다[18], 활성 산소/질소 종들에 대한 세균의 내성에서 이 단백질의 역할은 아직 알려지지 않았다. 본 연구에서는 그 가능성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 균주 배양 조건

본 연구에서는 야생형 균주로 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028s (Chromosome RefSeq: NC\_016856.1)를 사용하였으며, 이 균주를 상대로 유전자 돌연변이를 제조하였다. 본 연구에서 사용한 균주들은 Table 1.에 명시하였다. 균주를 배양하는 배지로는 Luria-Bertani (LB; Difco) 영양 배지와 0.2% glucose를 포함하는 E 최소배지(1.66 mM  $MgSO_4$ , 9.5 mM citric acid monohydrate, 57 mM  $K_2HPO_4$ , 16.7 mM  $NaNH_4PO_4$ )를 사용하였다. 사용한 모든 균주는 37°C, 220 rpm 조건의 진탕 배양기에서 배양하여 사용하였으며, 필요시 항생제는 chloramphenicol(50 µg/ml; CM)과 kanamycin (50 µg/ml; KM) 을 배지에 넣어 사용하였다. 특별히 표기한 경우를 제외하고는 모든 화학제품은 Sigma-Aldrich사로 부터 구입하였다.

### 활성 산소종과 활성 질소종에 대한 세균의 민감도 측정

활성 질소종과 활성 산소종을 첨가하였을 때 세균의 성장곡선을 비교함으로써 돌연변이주들의 민감도를 확인하였다. 활성 산소종은  $H_2O_2$  (Samchun chemical, Korea)를 매

**Table 1.** Bacteria strains and plasmid used in this study

Strains	Genotype	Source
IB1	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium 14028s	ATCC
IB3	$\Delta hmp ::KM$	[8]
IB1006	$\Delta rpoS ::Tn10dCm$	[33]
IB1026	$\Delta spy :: CM$	This study
FB127	pTP233	[19]
Plasmid		
pKD3	cat cassette	[19]

번 신선하게 첨가하여 사용하였고, 활성 질소종은 산화질소 공여체인 S-nitrosoglutathione (GSNO)를 사용하였는데, glutathione와 Sodium nitrite를 사용하여 합성하였다. 하루 동안 LB 배지에서 키운 균주를 PBS (Phosphate Buffered Saline)에 희석하여 O.D<sub>600nm</sub> 값을 1로 맞춘 후, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 GSNO가 농도별로 첨가된 배지가 분주된 Microplate에 개시 O.D<sub>600nm</sub> 값이 0.01이 되도록 희석하여 접종하였다. Bioscreen C Microbiology Microplate Reader (Oy Growth Curves Ab Ltd) 를 이용하여 37°C에 24시간 동안 교반하며 30분에 한 번씩 O.D<sub>600nm</sub> 값으로 측정하였다.

### spy 결손 돌연변이주 제조

*spy* 유전자 결손 살모넬라 돌연변이주를 만들기 위해 Datsenko와 Wanner[19]의 방법을 사용하였다. 5-gttgcctcaccctggcgat ggggtgctgcg aatctcgtc gtgtagctgg agctgctc-3과 5-ttccgtcaga cgctctcaa aattagcgtt atattgctt catatgaata tcctcctag-3로 제작된 60mer의 primer들을 이용하여 chloramphenicol cassette를 가지는 pKD3 플라스미드를 주형가닥으로 PCR을 하여 증폭시켰다. 증폭된 PCR 생산물은 제한효소인 DpnI을 처리하고 λ-Red 재조합 효소(pTP223)를 발현시킨 균주에 형질전환 시킨 후 chloramphenicol을 포함한 LB 영양배지에 키워 항생제를 가지는 균락을 선별하였다. 선별한 균락은 P22 파아지를 통해 신선한 야생형균주에 형질 도입하였다. *spy* 유전자의 외부 DNA에 해당하는 primer인 5-ttaatcacga caacacggcg-3과 5-ag gacggctata gaattctctg-3 이용하여 PCR을 수행하였고 이 PCR로 chloramphenicol 카세트의 삽입을 확인하여 최종 선별하였다.

### RNA추출 및 quantitative real-time reverse transcription (RT) PCR

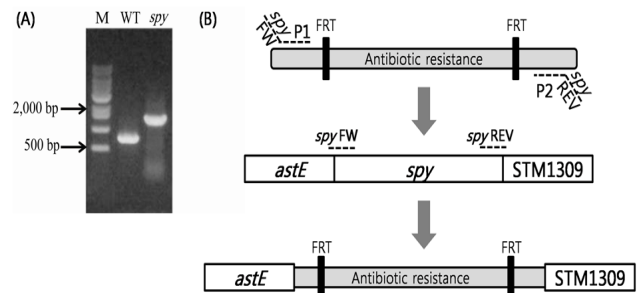
LB 영양배지에서 24 시간 배양한 균주를 E 최소배지 (0.2% glucose)에 1:500 희석 비율로 접종하여 O.D<sub>600nm</sub>에서 0.5 값이 될 때까지 배양한 후 배양액의 절반내 세균을 회수하였다. 나머지 절반은 GSNO (1mM)를 1시간 처리하거나, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM)를 30분간 더 처리한 후 세균을 회수하였다. 회수한 균주에는 5% phenol (95% EtOH)을 1:5 비율로 첨가하고 얼음에서 20분간 처리하여, 세균 전사 (transcription)를 정지시키고, 10분 간 원심분리(4°C, 4000 rpm) 하여 배양균주를 얻었다. 배양균주에 lysozyme (10 mg/ml)을 포함하는 TE buffer [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (ethylene diamine tetra acetic acid); pH 8.0]를 처리하여 37°C에서 10분에 한 번씩 교반하며 30분간 반응시켰다. RNA는 RNAiso Plus (TaKaRa)를 이용하여 추출한 후, DNase 를 이용하여 잔여 DNA를 제거 한 후, 전기영동 및 UV spectrophotometry를 통하여 DNA의 잔류여부를 확인

하였다. Quantitative real-time RT PCR은 2ug의 RNA를 이용하여 annealing 온도 57°C; 40 cycle 조건으로 QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen)를 이용하여 반응시켰으며, 그 산물은 RotoGene thermocycler (Qiagen)를 이용하여 분석하였다. 시료간 RNA 발현 표준화를 위해 살모넬라균에서 항상 같은 발현 양을 보이는 housekeeping 유전자 *gyrB* 를 사용하였다. *spy* mRNA 농도측정을 위해 사용된 primer는 5-caaatgaac gtccgctgct-3과 5-tttcgtaat tgcgcttcgg-3을 이용하였는데, *spy* 유전자의 개시코돈으로부터 각각 300 bp, 425 bp 뒤쪽에 위치하는 염기서열에 해당한다.

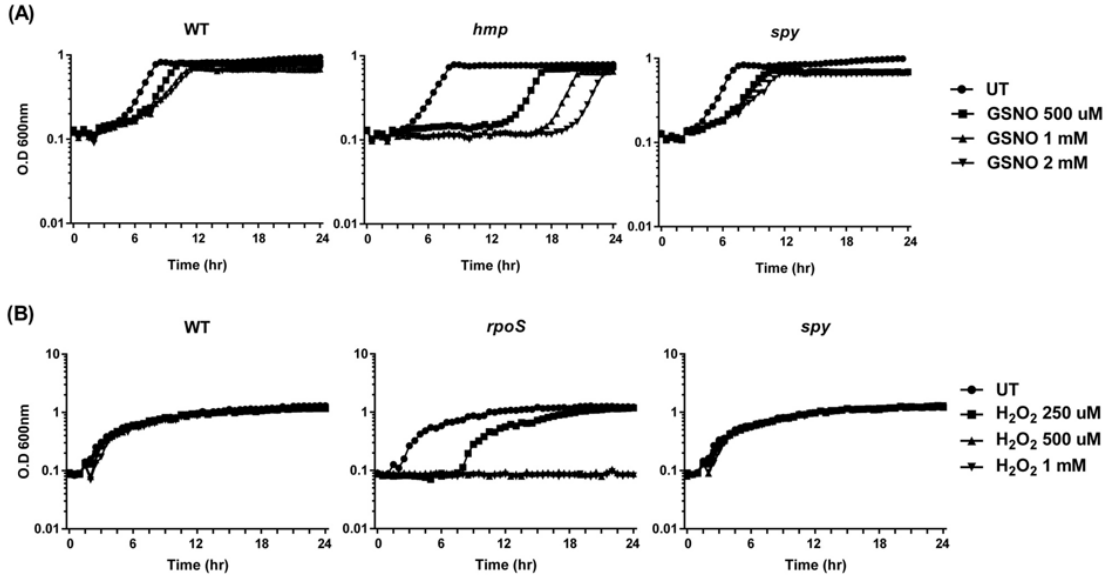
## 결과

세균 주변세포질내 공간(periplasmic space)에 존재하는 많은 단백질들의 안정화에 기여할 것으로 예상되는 단백질인 Spy가 살모넬라균의 활성산소종과 활성질소종에 대한 내성에서 어느정도의 역할을 담당하는지 알아보기 위해 Spy가 결손된 *spy* 유전자 돌연변이주의 제조 및 돌연변이주의 활성 산소/질소 종들에 대한 민감도를 측정하였으며, 또한 활성 산소/질소 종들에 대한 살모넬라균의 반응과정 동안 *spy* 유전자의 발현 정도를 측정하였다.

살모넬라균 염색체의 경우 *spy* 유전자는 1388541번째 염기부터 1389042번째 염기까지 501bp의 염기를 가진다. 재료 및 방법에서 기술한 파아지 λ Red recombinase를 이용한 단일 단계 유전자 돌연변이 방법을 사용하여, *spy* 유전자를 결손시켰다. *spy* 유전자의 N-말단 부위 300 bp가 결손되



**Fig. 1.** Construction of *spy* mutation in *S. Typhimurium* chromosome. **(A)** PCR products were obtained after PCR reaction with chromosomal DNA from WT and *spy* mutant using DNA oligomers as described in Materials and Method. The representative result was visualized after PCR products were electrophoresed in an 1% agarose gel and stained with ethidium bromide. M; a molecular size marker. **(B)** The strategy used for the construction of *spy* mutation. P1 and P2 refer to priming sites for PCR to obtain DNA product containing antibiotic cassette and FRT (FLP recombinase recognition target). The figure was modified from the paper of [19].



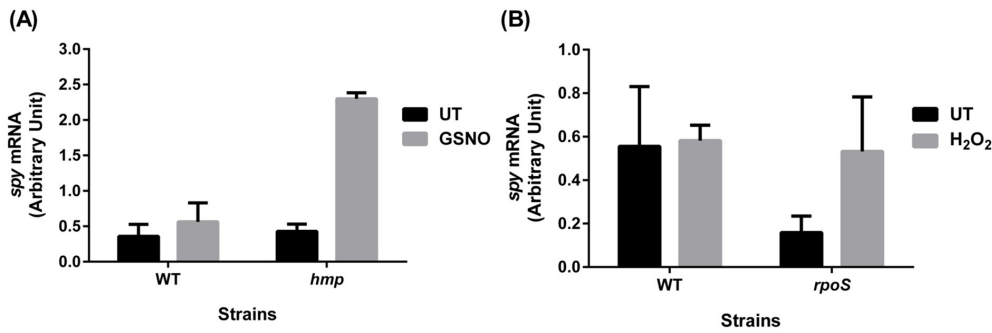
**Fig. 2.** Susceptibilities of *S. Typhimurium* strains to ROS/RNS stresses. The growth of mutants was measured by the Bioscreen C microplate reader observing optical density (O.D.600nm) of bacterial culture in minimal E media containing 0.2% glucose treated with varying concentrations of GSNO (A) and in the LB media treated with varying concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B). A representative out of three independent experiments is shown.

고 그 자리에 약 1 kbp 크기의 chloramphenicol cassette를 삽입하였다. 그 결과를 확인하기 위해 *spy* 유전자를 포함하는 외부 DNA primer를 이용하여 PCR을 시행하였다. PCR결과, 그 크기가 야생형균주는 850 bp이며 *spy* 결손 돌연변이주는 약 1.6 kbp의 PCR 산물을 생산하는 것을 확인하였다 (Fig. 1). 이 결과는 *spy*가 결핍된 살모넬라 돌연변이주가 정상적으로 만들어졌음을 보여준다.

*spy* 돌연변이주의 활성 질소종에 대한 성장률을 확인하기 위해 E 최소배지(0.2% glucose)에 GSNO를 농도별로 처리하여 성장곡선을 측정하였다. 실험 대조군으로 세균내부 산화질소를 대부분 해독하는 효소인 Flavohemoglobin Hmp가 결핍된 돌연변이주를 사용하였다. Hmp가 결여된

*hmp* 돌연변이주의 경우 NO를 해독하지 못하므로 GSNO가 첨가된 배지에서 성장이 억제되는 것을 확인할 수 있다. *spy* 돌연변이주의 경우 야생형균주과 비교하였을 때 대수기에서 정지기로 들어가는 시간이 한 시간 가량 지연되는 것으로 보아 GSNO에 비교적 민감한 것으로 볼 수 있다(Fig. 2A).

활성 산소종에 대한 성장률을 확인하기 위해 LB 영양배지에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 농도별로 첨가하여 성장곡선을 측정하였다. 실험 대조군으로는 살모넬라균의 활성 산소종에 대한 내성과 관련된 것으로 확인된 시그마인자인 RpoS가 결여된 *rpoS* 유전자 돌연변이주를 사용하였다. RpoS는 superoxide dismutase 및 catalase등의 효소 유전자 발현을 활성화시킨다



**Fig. 3.** The effect of ROS/RNS on *spy* transcription. The levels of *spy* mRNA were measured by quantitative real-time RT PCR, using total RNA purified from bacterial cultures under nitrosative [GSNO (1mM), 1 hour] (A) and oxidative [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM), 30 min] (B) stress conditions, respectively. The mRNA levels of a housekeeping gene *gyrB* were used as the normalization standard. Data shown are the means +/-SD from three independent experiments.

[20]. *rpoS* 돌연변이주의 경우 적은 농도의  $H_2O_2$ 에도 성장이 제한되는 것을 볼 수 있으나, 야생형 균주와 *spy* 돌연변이주는 그 성장률이 같은 것으로 확인되어, *spy* 돌연변이주의 활성 산소종에 대한 민감성은 거의 없는 것으로 확인되었다(Fig. 2B).

DnaK와 DnaJ 등의 세균 세포질 내 chaperone 단백질들은 살모넬라균이 대식세포에 포식되었을 때 그 발현이 크게 증가하며, 살모넬라 병독성에 필수적이다[17,21]. 활성 산소/질소 종들에 대한 살모넬라균의 반응과정 동안 Spy의 발현 변화를 조사하기 위해 각 스트레스에 노출된 살모넬라균의 *spy* mRNA의 발현량을 측정하였다. Fig. 3에 나타난 real-time RT PCR 결과는 야생형 균주와 각 스트레스에 민감한 돌연변이주들에서 상이한 *spy* 전사 발현 패턴을 보인다. *spy* mRNA의 발현량은 야생형 균주에서는 각 스트레스 노출 유무와 관계없이 일정한 반면, 산화질소를 분해하지 못하는 *hmp* 돌연변이주가 GSNO에 노출되면 약 5배 정도 증가하였으며, 활성 산소종에 민감한 *rpoS* 돌연변이주가  $H_2O_2$ 에 노출되면 5-6배 정도 증가하였다(Fig. 3). 주목할 점은  $H_2O_2$ 에 노출되지 않은 조건에서 *rpoS* 돌연변이주내 *spy* 전사가 야생형에 비해 감소한다는 점인데, 이것은 *spy* 전사가 일정 부분 RpoS에 의존적임을 보여준다.

## 고찰

리보솜에서 일어나는 번역(translation) 과정 동안 새로이 합성된 초기 폴리펩타이드(polypeptide)는 세포질, 세포막, 혹은 세포막 외부로 이동하여 고유의 기능을 하게 되는데, 이 과정에서 여러 종류의 chaperone 단백질들의 도움을 받아 기능을 하게 되며, 그렇지 못한 단백질은 단백질분해효소에 의해 분해된다[22,23].

숙주 면역체계는 다양한 항미생물 성분을 분비하며, 그 중 많은 성분들이 세균 단백질의 구조를 훼손할 수 있다. 대부분의 세균들은 단백질의 활성을 복구할 수 있는 chaperone 기능의 단백질들을 생산하고 있으며, 스트레스 환경에 노출되면 그 발현이 크게 증가하여[24,25], 세균 병원성 발현에 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다[26]. 특히 세균세포 외부 혹은 숙주 세포내로 다양한 병원성 효과 단백질(effector protein)을 분비하는 과정은 다양한 chaperone 단백질들의 역할이 필수적이다[27]. 따라서 그람 음성균의 주변세포질(periplasm)을 포함하는 세포질외부(extracytoplasm)로의 단백질들의 발현 및 분비는 병독성 세균의 병원성 발현에 필수적인데, 세포질외부에 노출되는 다양한 스트레스에 대해 적응하기 위해 세균은 필요 단백질들의 발현 조절과 항상성을 유지할 수 있는 체계를 갖

추고 있는 것으로 알려졌다[25]. 이 단백질들의 구조적 안정성에 많은 chaperone 단백질들이 참여할 것으로 예상되고 있다.

Spy 단백질의 존재는 대장균(*Escherichia coli*)이 spheroplast를 형성할 때 세포질에는 존재하지 않고 오직 주변세포질 내에서만 위치하는 단백질로 소개되면서 알려졌다[28]. 그람 음성 세균이 숙주세포 내 환경에서 만나는 여러 항미생물 성분 중에는 세균의 spheroplast 형성을 유도할 수 있는 성분들이 존재하기 때문에, 이러한 스트레스에 반응하여 발현되는 Spy의 기능은 전체 세포질 외부 단백질 항상성과 관계가 있을 것으로 예상되어 왔다. 이후 대장균을 상대로한 계속된 연구에서 Spy의 발현이 실제로 세균 외막(envelope) 스트레스 반응에 활성화 되는 Cpx 조절 시스템과 금속이온 스트레스에 반응하는 또 다른 세균 외막 항상성 조절 시스템 BaeSR을 필요로 한다는 사실이 알려졌다[29,30]. 살모넬라균의 주변세포질과 외막의 스트레스에 반응하여 신호전달 및 항상성에 기여하는 분자적 시스템은 크게 다섯 가지가 알려졌는데, 대체시그마 인자 RpoE, BaeSR, CpxRA, Rcs 인산전달(phosphorelay) 시스템, 파아지 쇼크(phage shock) 반응 시스템 등이다[25]. Spy의 발현이 BaeSR과 CpxRA에 의존한다는 사실은 Spy의 위치가 주변세포질에 국한된다는 발견과 함께 Spy의 기능이 외막 스트레스에 대한 주변세포질 항상성에 기여할 수 있다는 사실을 암시해 왔다. Spy의 기능이 세포질 외부 단백질의 구조 안정화에 기여한다는 최근 발견은, 기존에 알려진 세균 주변세포질 chaperone 단백질들과 함께 세균 고유의(진핵세포의 경우는 아직 확실하게 발견되지 않고 있음) 생존 전략에서 세포질 외부 분비 단백질들의 중요성을 보여준다[18].

본 연구를 통해, 살모넬라균의 활성 산소/질소 종에 대한 내성에서 Spy의 결손 효과는 거의 없는 것으로 확인되었다. 다만, *spy* 유전자의 발현이 세균세포 내에 활성 산소 종 혹은 활성 질소종 등이 많이 축적되는 *rpoS* 혹은 *hmp* 돌연변이주들에서 괄목할 정도로 증가된다는 발견은, 실제 표현형으로 나타나지 않았지만, Spy의 발현이 살모넬라균의 활성 산소/질소 종에 대한 내성에서 일정 부분 역할을 할 수 있다는 가능성을 시사한다. 즉, Spy의 기능이 결여되어 있는 *spy* 돌연변이주 내의 다른 주변세포질 chaperone들의 역할이 이 스트레스들에 대한 단백질 항상성을 유지하는데 충분하며, 이는 Spy를 포함하는 chaperone 단백질의 기능적인 과잉 현상일 가능성이 있다. 특히, 세균세포 외막 스트레스에 반응하는 대체시그마 인자 RpoE의 발현이 활성 산소종에 대한 살모넬라균의 내성에 필수적이고, 이것은 또한 RpoS의 발현에 필요하다는 사실들을 비쳐 보았을 때[31,32], *spy* 유전자 전사가 일정부분 RpoS에 의존한다는 본 연구결과는 Spy의 역할이 활성 산소종

내성과 관련될 가능성이 일부 존재할 것으로 예상된다. *rpoS* 돌연변이주에서 Spy 발현이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 다시 야생형 균주 정도로 증가되었는데(Fig. 3B), 이는 *spy* 유전자 발현 유도과정에 대장균과 마찬가지로 Cpx 및 BaeSR 등 다른 활성 조절자 단백질들이 관여하지만 RpoS가 존재하는 야생형 세균에서는 활성 산소종에 대한 세균 세포내 스트레스가 적거나 아직 알 수 없는 조절자간의 조절과정을 통해 큰 역할을 하지 못하는 것으로 생각된다. 향후 연구에서 세균 주변세포질 내 chaperone으로 알려진 유전자들과 *spy* 유전자의 중복 돌연변이주들의 표현형을 조사하고, Spy 발현에 관여하는 조절체계가 밝혀진다면, Spy 기능의 근본적인 역할을 보다 자세하게 해석할 수 있을 것으로 판단된다.

---

## 감사의 글

이 논문은 2013학년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

---

## Conflict of interest

Authors declare that there is no financial and commercial conflict of interest in this study.

---

## References

- Grassl GA, Finlay BB. Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. *Curr Opin Gastroenterol*. 2008;24:22-26.
- Maloy S, Edwards R. *salmonella.org*. San Diego State University. 1999.
- Hurley D, McCusker MP, Fanning S, Martins M. *Salmonella*-host interactions - modulation of the host innate immune system. *Front Immunol*. 2014;5:481.
- Fang FC. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature reviews Microbiology*. 2004;2:820-832.
- Vazquez-Torres A, Fang FC. Oxygen-dependent anti-*Salmonella* activity of macrophages. *Trends Microbiol*. 2001;9:29-33.
- Fang FC, DeGroot MA, Foster JW, Baumler AJ, Ochsner U, Testerman T, Bearson S, Giárd JC, Xu Y, Campbell G, Laessig T. Virulent *Salmonella typhimurium* has two periplasmic Cu, Zn-superoxide dismutases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:7502-7507.
- Hebrard M, Viala JP, Meresse S, Barras F, Aussel L. Redundant hydrogen peroxide scavengers contribute to *Salmonella* virulence and oxidative stress resistance. *J Bacteriol*. 2009;191:4605-4614.
- Bang IS, Liu L, Vazquez-Torres A, Crouch ML, Stamler JS, Fang FC. Maintenance of nitric oxide and redox homeostasis by the salmonella flavohemoglobin hmp. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281:28039-28047.
- Uzzau S, Bossi L, Figueroa-Bossi N. Differential accumulation of *Salmonella*[Cu, Zn] superoxide dismutases SodCI and SodCII in intracellular bacteria: correlation with their relative contribution to pathogenicity. *Mol Microbiol*. 2002;46:147-156.
- Forrester MT, Foster MW. Protection from nitrosative stress: a central role for microbial flavohemoglobin. *Free Radic Biol Med*. 2012;52:1620-1633.
- Dong T, Schellhorn HE. Role of RpoS in virulence of pathogens. *Infect Immun*. 2010;78:887-897.
- Karlinsey JE, Bang IS, Becker LA, Frawley ER, Porwollik S, Thomas VC, Urbano R, McClelland M, Fang FC.. The NsrR regulon in nitrosative stress resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol*. 2012;85:1179-1193.
- Shah DH. RNA sequencing reveals differences between the global transcriptomes of *Salmonella enterica* serovar enteritidis strains with high and low pathogenicities. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80:896-906.
- Lahiri A, Das P, Chakravorty D. The LysR-type transcriptional regulator Hrg counteracts phagocyte oxidative burst and imparts survival advantage to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*. 2008;154:2837-2846.
- Veinger L, Diamant S, Buchner J, Goloubinoff P. The small heat-shock protein IbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. *J Biol Chem*. 1998;273:11032-11037.
- Fredriksson A, Ballesteros M, Dukan S, Nystrom T. Defense against protein carbonylation by DnaK/DnaJ and proteases of the heat shock regulon. *J Bacteriol*. 2005;187:4207-4213.
- Takaya A, Tomoyasu T, Matsui H, Yamamoto T. The DnaK/DnaJ chaperone machinery of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is essential for invasion of epithelial cells and survival within macrophages, leading to systemic infection. *Infect Immun*. 2004;72:1364-1373.
- Quan S, Koldewey P, Tapley T, Kirsch N, Ruane KM, Pfizenmaier J, Shi R, Hofmann S, Foit L, Ren G, Jakob U, Xu Z, Cygler M, Bardwell JC. Genetic selection designed to stabilize proteins uncovers a chaperone called Spy. *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18:262-269.
- Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:6640-6645.
- Chiang SM, Schellhorn HE. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Arch Biochem Biophys*. 2012;525:161-169.
- Buchmeier NA, Heffron F. Induction of *Salmonella* stress

- proteins upon infection of macrophages. *Science*. 1990; 248:730-732.
22. Slonczewski JL, Foster JW. *Microbiology: An Evolving Science*. New York: W. W. Norton & Company, Inc. 2009.
  23. Pugsley AP, Francetic O, Driessen AJ, de Lorenzo V. Getting out: protein traffic in prokaryotes. *Mol Microbiol*. 2004;52:3-11.
  24. Ramos JL, Gallegos MT, Marques S, Ramos-Gonzalez MI, Espinosa-Urgel M, Segura A. Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Curr Opin Microbiol* 2001;4:166-171.
  25. Rowley G, Spector M, Kormanec J, Roberts M. Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens. *Nature reviews Microbiology* 2006;4:383-394.
  26. Henderson B, Allan E, Coates AR. Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection. *Infect Immun*. 2006;74:3693-3706.
  27. Burkinshaw BJ, Strynadka NC. Assembly and structure of the T3SS. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843:1649-1663.
  28. Hagenmaier S, Stierhof YD, Henning U. A new periplasmic protein of *Escherichia coli* which is synthesized in spheroplasts but not in intact cells. *J Bacteriol*. 1997;179: 2073-2076.
  29. Raivio TL, Laird MW, Joly JC, Silhavy TJ. Tethering of CpxP to the inner membrane prevents spheroplast induction of the cpx envelope stress response. *Mol Microbiol*. 2000;37:1186-1197.
  30. Appia-Ayme C, Hall A, Patrick E, Rajadurai S, Clarke TA, Rowley G. ZraP is a periplasmic molecular chaperone and a repressor of the zinc-responsive two-component regulator ZraSR. *Biochem J*. 2012;442:85-93.
  31. Bang IS, Frye JG, McClelland M, Velayudhan J, Fang FC. Alternative sigma factor interactions in *Salmonella*: sigma and sigma promote antioxidant defences by enhancing sigma levels. *Mol Microbiol*. 2005;56:811-823.
  32. Testerman TL, Vazquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J, Libby SJ, Fang FC. The alternative sigma factor sigmaE controls antioxidant defences required for *Salmonella* virulence and stationary-phase survival. *Mol Microbiol*. 2002;43:771-782.
  33. Lee IS, Lin J, Hall HK, Bearson B, Foster JW. The stationary-phase sigma factor sigma S (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol*. 1995;17:155-167.