ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science 2015 Vol. 25. No. 2. 214~222 DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2015.25.2.214

A Potent Tissue Destructive Activity of Secreted Proteins of *Aeromonas hydrophila*

Kyu Lee Kim, Yunjeong Choe and Ho Young Kang*

Department of Integrated Biological Science, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

Received February 10, 2015 / Revised February 25, 2015 / Accepted February 25, 2015

Aeromonas hydrophila is the most common water fish pathogen and cause diseases such as hemorrhagic septicemia, dropsy, ulceration and asymptomatic septicemia. *A. hydrophila* secretes many extracellular products (ECPs) which contribute to effective infection, wide distribution and great adaptability to environmental changes. Crude ECPs of *A. hydrophila* CK257, a strain used in this study, exhibits a toxic activity to the animals including mouse, rabbit and fish. Toxic symptoms were indicated by tissue damage and skin injuries in animal. When ECPs were subcutaneously injected to animals, skin damages were observed, appearing like necrosis. Preliminary research demonstrated that the active factors are protein component. The crude ECPs were collected after ammonium sulfate precipitation of cell-free culture supernatant. ECPs were fractionated with the use gel filtration chromatography. Five ECP fractions were obtained, of which one fraction was found to be toxic to goldfish. MALDI-TOF analyses provided two interesting proteases called M35 and M28. Both M35 and M28 are known as metalloprotease. Accordingly, proteins in an active fraction exhibited caseinolytic activity. These proteins were difference of caseinolytic activity under different metallic ions. Also active fraction has elastolytic activity. These results suggested that peptidase M28 and M35 may be a candidate factor for tissue necrosis activity about infection with *A. hydrophila*.

Key words : *Aeromonas hydrophila*, metalloprotease, necrosis

서 론

*Aeromonas*는 Aeromonadaceae과에 속하는 통성 혐기성 그람 음성의 간균이다[1]. 운동성을 가지는 *Aeromonas hydrophila, A. caviae, A. veronii* biovar sobria 등은 사람에게 장내 질환을 일으키며, 주로 상처부위를 통해 감염한다[2]. 이들 중 *A. hydrophila*는 사람과 동물 모두에 감염하는 병원균으로 사람에게 위장염, 상처 감염 그리고 패혈증을 일으킨다. *A. hydrophila*는 다양한 세포 외 물질(Extracellular Products, ECP)을 분비하는데 여기에는 S-layer, flagella, 단백질 분해효소, glycerophospholipid-cholesterol acyltransferase (GCAT), hemolysin, aerolysin, lipase 등의 감염에 관여하는 다양한 요소들이 포함 된다[3, 4]. 그러나 얼마나 많은 종류와 양의 ECP가 세포 외로 분비되며 어떻게 작용하는지는 알려진 바 없다[5]. 주로 상처부위를 통해 감염하는 *A. hydrophila*는 조직에 존재하는 단백질성 물질을 에너지원으로 이용한다. 조직에 존재하는 에너지가 고갈되면 고농도의 단백질이 존재하는 더 깊은 조직으로 침투하고 심각한 질병을 일으키게 되는데, 이때 관여하는 요소가 바로 분비되는 단백질 분해 효소이다. 그 종류에는 금속촉매효소(metalloprotease), serine protease, aminopeptidase 등이 포함된다[6]. 본 연구에서는 아주 강한 병원성을 지닌 *A. hydrophila* 균주를 다루었으며, 균이 분비하는 세포 외 물질 가운데 어류와 포유류 동물 모델에 피하로 주사하였을 경우 괴사와 유사한 강한 조직 파괴 활성을 나타내는 현상에 주목하였다. 조직 파괴 활성의 원인이 되는 인자를 동정하여 그 단백질의 기능 및 특성을 알아보고자 하였다.

***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.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양 조건

본 연구에서 사용된 *Aeromonas hydrophila*는 Tryptic soy broth (TSB)와 0.5% glucose를 첨가한 M9 (0.5% w/v sugar, 33.7 mM Na_2HPO_4, 22.0 mM KH_2PO_4, 8.55 mM NaCl, 9.35 mM NH_4Cl) 액체배지 또는 1.5% (w/v) agar를 첨가한 고체배지를 사용하여 28℃에서 배양하였다[7, 8]. 연구에 사용된 세균은 생물안전 2등급 승인을 받은 연구시설(제 LML10-88호)에서 연구를 수행하였다.

Ammonium sulfate를 이용한 분비 단백질의 침전

28℃에서 30시간 동안 정치배양 하여 600 nm 에서의 흡광도 값이 약 1.0에 도달한 *A. hydrophila* 배양액을 7,000 × g의 속도로 원심분리하여 균체를 제거한 상등액만을 취하였다. 분비 단백질을 침전시키기 위해 ammonium sulfate (Duksan)

침전법을 이용하였다[9]. 배양 상등액에 ammonium sulfate를 농도별로 포화시켜 4℃에서 7,000 × g의 속도로 30분간 원심분리 하여 침전물을 수거하였다. 수거한 침전물을 PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7.4)에 현탁하고 염을 제거하기 위하여 PBS 용액을 사용하여 4℃에서 10시간 이상 투석을 진행하였다. 이후 Centrifugal filter units (Millipore)를 이용하여 2배 가량 농축한 후 정제 단계에 사용하였다.

겔 거르기 크로마토그래피(Gel filtration chromatography)

HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade (120-124 ml, GE, USA)를 PBS로 평형화시켜 사용하였다. Ammonium sulfate로 침전시킨 후 농축한 분비 단백질 시료 5 ml을 PBS로 완충된 HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade column에 통과시켰다. 유속은 1.5 ml/min 로 행하였으며 300 µl/tube 씩 분취하여 이후 실험에 사용하였다.

단백질 정량

단백질 시료의 정량 분석을 위해 Bradford assay (Biorad)를 수행하였다[8]. 먼저 BSA (Bovine serum albumin, Sigma) 표준용액을 제조하여 흡광도를 측정하여 표준곡선을 만든 후, 단백질 시료의 흡광도를 측정하여 정량 하였다. 각각 0, 2, 4, 6, 8, 10 µg/µl 농도의 BSA 표준 용액을 제조한 후, 흡광도를 측정하여 표준곡선을 만든다. 단백질 시료는 PBS에 희석시킨 후, 각각 1 µl씩 넣은 샘플과 5 µl씩 넣은 샘플을 준비하여 흡광도를 측정하였다. 두 가지 샘플을 준비한 이유는 더 정확한 정량을 하기 위함이며, 흡광도를 측정한 후 표준곡선을 근거로 하여 단백질 시료의 양을 추정하였다.

어류 실험을 통한 단백질 활성 확인

10 l 크기의 수조에 24℃의 온도를 유지하고 금붕어(9.7 g ± 0.5 g, 9.8 cm ± 0.67 cm)를 사육하여 실험에 이용하였으며 금붕어는 부산 근교의 수족관(못골 수족관)에서 공급받아 사용하였다. 정량한 단백질 시료 40 µg을 금붕어의 피하에 주사하였으며 대조군으로 100 µl의 PBS를 피하 주사 후, 3일간 관찰하였다. 이후 주사 부위의 피부 괴사 정도를 확인하여 단백질의 활성을 추정하였으며, *A. hydrophila* CK257 접종 시 나타나는 괴사 정도가 단백질 접종 부위에 0.5 cm 이상 나타나는 것을 조직 괴사 활성의 기준으로 설정하였다. 동물실험수행을 위하여 부산대학교 동물실험윤리위원회(PNU-IACUC)에서 승인을 받았으며, 동물 실험 시 모든 실험 과정에서 PNU-IACUC의 규정에 따라 동물실험에 관한 윤리 과정을 준수하여 연구를 진행하였다.

Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

단백질 시료들을 2× 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. 용해된 단백질 시료들을 95℃에서 5분 동안 가열한 후, 비연속적 SDS-PAGE에 의해 분리하였다. 분리된 단백질들을 silver staining kit (Biorad)를 사용하여 염색한 후 단백질 밴드를 확인하였다.

Matirx-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) assay 및 데이터베이스 분석

단백질을 동정하기 위해 목적 단백질이 포함된 polyacrylamide gel 부분을 잘라내어 MALDI-TOF (Microflex LRF 20, Bruker Daltonics) assay system을 이용 해 분석하였다(Genomine). MALDI-TOF assay에서 얻어진 각 펩타이드들에 관한 정보들은 MASCOT프로그램을 통해 최근의 NCBI *Aeromonas hydrophila* 데이터베이스로부터 정보를 탐색하는데 사용되었으며, 이러한 분석을 통해 목적 단백질을 동정 하였다[10].

카제인 분해 활성 측정

분비 단백질의 단백질 분해 활성을 확인하기 위한 방법으로 1%의 agar와 2%의 탈지유를 첨가하여 불투명한 고체 agar를 만들어 사용하였다. 만들어진 배지의 중앙에 시료를 3 µl 떨어뜨리고 37℃에서 6시간 배양 후, 생성된 투명환의 직경을 측정하여 카제인 분해 정도를 확인하였다. 양성 대조군으로 1 mg/ml의 트립신(Sigma) 3 µl를 사용하였으며, 음성 대조군으로 PBS 3 µl를 사용하였다.

엘라스틴 분해 활성 측정

분비 단백질의 엘라스틴 분해 활성을 확인하기 위한 방법으로 Lynn 등에 의해 기술되어 있는 방법을 수정하여 수행하였다[11]. 1.5%의 agar가 포함된 TSA에 1%의 엘라스틴(Elastin from bovine neck ligament, Sigma)과 1%의 agar를 첨가하여 불투명한 고체 agar를 만들어 사용하였다. 만들어진 배지의 중앙에 시료를 3 µl 떨어뜨리고 37℃에서 18 시간 배양한 후 투명환의 직경을 측정하여 엘라스틴 분해 정도를 확인하였다. 양성 대조군으로 1 mg/ml 의 엘라스타아제(elastase, Sigma) 3 µl를 사용하였으며, 음성 대조군으로 PBS 3 µl를 사용하였다. 또 다른 엘라스틴 분해 활성 측정 방법으로 Elastin-Congo red (Sigma)를 사용하였다. 마찬가지로 양성 대조군으로 1 mg/ml의 엘라스타아제 3 µl를 사용하였고, 1 mg/ml의 Elastin-Congo red에 각각의 시료를 첨가한 후 37℃에서 12시간 배양한 다음 1,200 × g의 속도로 10분간 원심분리 하여 분해되지 않은 Elastin-Congo red를 제외한 상등액을 취하였다. 이후, 495 nm에서 흡광도를 측정하여 엘라스틴 분해 정도를 비교하였다.

결과 및 고찰

Aeromonas hydrophila CK257 균주와 분비 단백질의 조직 파괴 활성

*Aeromonas hydrophila*는 숙주에 감염하여 감염 부위를 괴사시키는 것으로 잘 알려진 병원균이다. 감염 부위의 괴사 증상을 확인하기 위해 CK257 균주와 ECP (Extracellular Products)를 동물 모델(Goldfish, BALB/c)에 피하로 주사한 후, 그 증상을 관찰하였다. 대조군으로 PBS를 사용하였으며, 균주의 경우 LD_{50}보다 높은 1.56×10^8 CFU/100 µl를 피하에 주사하였다. ECP의 경우 균을 배양한 후, 균체를 제거한 상등액을 centrifugal filter units를 이용해 40배 가량 농축하여 40 µg을 주사하였다. 24시간 후 관찰한 결과, 균주와 농축한 ECP 모두 동물의 피부에 아주 강한 괴사를 일으켜 조직이 손상되는 모습을 확인하였다(Fig. 1). 대조군인 PBS와 비교해 보면 균체를 주사하였을 때, 금붕어의 비늘이 벗겨지고 아래의 피부가 손상되어 출혈이 생긴 모습을 볼 수 있으며 BALB/c 역시 피부가 손상되어 출혈이 생기고 피가 응고 되어 있는 모습을 볼 수 있었다. ECP를 농축하여 주사한 결과 역시 마찬가지였으며 심한 출혈이 나타나는 모습을 관찰 할 수 있었다. 본 연구에서는 위와 같은 현상이 균이 분비하는 물질인 ECP에서 나타나는 것을 확인하였고 이에 주목하여 본 연구를 진행하였다.

분비 단백질의 특성 확인

A. hydrophila CK257이 분비하는 요소 가운데 강한 괴사 활성을 지니는 요소의 분리와 정제를 위해 먼저 ECP의 특성을 확인 해보고자 하였다. LPS는 외막을 구성하는 성분 중의 하나이며 내독소로 감염에 관여하는 것으로 잘 알려져 있다[5]. 비교적 열에 안정하며 지용성의 LPS가 괴사 활성을 지니는 요소인지 확인하기 위해 다음의 실험을 진행하였다. Centrifugal filter units를 이용해 40배 농축한 ECP를 100℃에서 10분 동안 가열한 후 동물 모델에 주사하여 괴사 활성을 나타내는지 확인해 보았다(Table 1). 그 결과, 가열한 ECP는 괴사 활성을 나타내지 않았으며 가열하지 않은 ECP만이 피부를 괴사시키는 활성을 나타냈다. 이를 통해 괴사 활성을 일으키는 요소가 열에 의해 변성되어 성질을 잃는 특성을 가진다는 것을 확인할 수 있었다. 마찬가지로 40배 농축한 ECP를 chloroform을 처리하여 LPS만을 추출하여 동물 모델에 주사하여 괴사 활성을 나타내는지 확인해 보았다(Table 1). 그 결과, 아무런 활성이 나타나지 않았으며 괴사 활성을 일으키는 요소가 chloroform에 의해 추출되는 지용성의 성분이 아니라고 추정하였다. 이후 열에 약하며 ECP에 많이 존재하는 단백질에 주목하여 실험을 진행하였다. ECP 상의 단백질을 얻기 위해서 아세톤과 ammonium sulfate를 이용하여 단백질을 침전시켜 회수하였다. 침전시켜 얻은 단백질을 동물 모델에 피하로 주사하여 괴사 활성을 확인하였고 그 결과, ammonium sulfate를 이용하여 얻은 단백질만이 그 활성을 나타냄을 관찰 할 수 있었다(Table 1). 이를 통해 ammonium sulfate를 이용한 침전법이 가장 효율적이며 단백질의 활성에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.

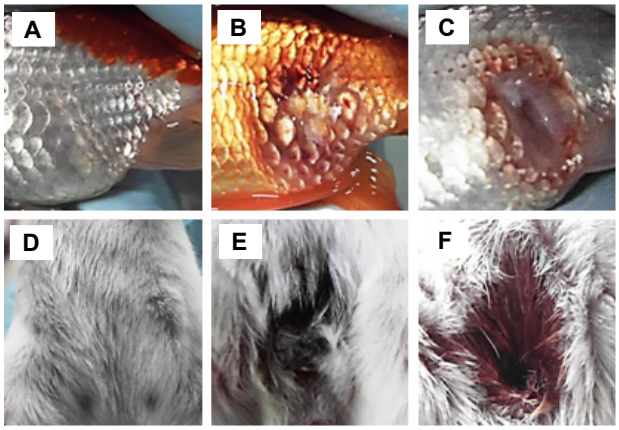

Fig. 1. Pathology of infection with *A. hydrophila* CK257 and crude ECPs of *A. hydrophila* CK257. Goldfish and BALB/c are infected with *A. hydrophila* CK257 and crude ECPs of *A. hydrophila* CK257 by subcutaneously injection. (A), (D) Negative control of infection with PBS; (B), (E) Goldfish and BALB/c are infected with 1.56×10^8 CFU/100 µl *A. hydrophila* CK257; (C), (F) Goldfish and BALB/c are infected with crude ECPs (40 µg) of *A. hydrophila* CK257.

Ammonium sulfate 농도에 따라 침전된 분비 단백질의 양상과 조직 파괴 활성

ECP상에 존재하는 다양한 단백질을 분획화 하기 위하여 ammonium sulfate를 다양한 농도로 처리하여 단백질을 침전시킨 결과, ammonium sulfate 농도에 따라 침전되는 단백질의 양상이 다름을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 30~60% 농도의

Table 1. Tissue destructive activity by crude ECPs

Samples	Number of concentration	Activity
Cell-free culture supernatant	1×	-
Amicon (centrifugal filter units) concentration	40×	+

Treatment	Activity
Heat (100℃, 10min)	-
Chloroform extraction	-

Precipitation	Activity
Acetone (50%)	-
Ammonium sulfate (80%)	+

The fractionated ECPs were subcutaneously injected to goldfish, skin damages were observed.

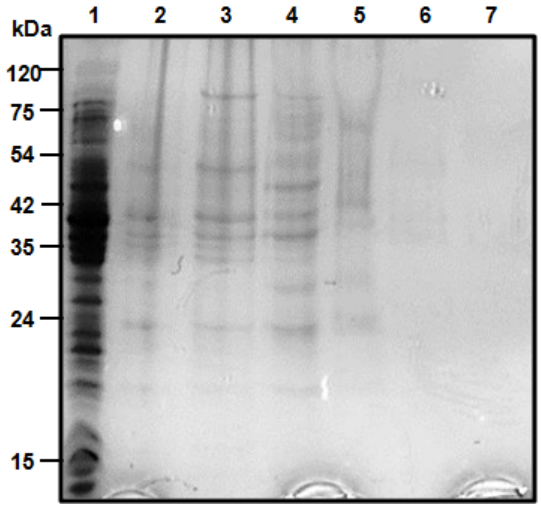

Fig. 2. Precipitated protein profiles depending on the various concentration of ammonium sulfate. The crude ECPs were fractionated by ammonium sulfate under various concentration. Crude ECPs prepared from *A. hydrophila* CK257 grown M9 media were subjected to SDS-PAGE analysis on 12% polyacrylamide gel. Separated proteins were precipitated according to the ammonium sulfate concentration and visualized by Coomassie staining. Lanes; 1, crude total ECPs (20 μg); 2, 3, 4, 5, 6 and 7, ECPs were precipitated to 30%, 40%, 50%, 60%, 70% and 80% ammonium sulfate concentration (5 μg).

ammonium sulfate를 처리하였을 경우 가장 많은 양의 단백질이 침전되었으며, 40%와 50%에서 침전된 단백질의 경우 몇 가지 뚜렷한 밴드를 관찰할 수 있었다. 70%와 80% 농도에서 침전된 단백질은 그 양이 적어 뚜렷한 밴드를 확인할 수 없었다.

앞서 ammonium sulfate 침전법을 통해 얻은 단백질을 이용해 괴사 활성을 확인해보았다. 단백질 정량을 통해 각각 30, 40, 50, 60 μg의 단백질을 금붕어에 피하 주사하여 다음날 관찰하였다. 그 결과, 40~70%의 농도에서 침전된 단백질 40 μg 이상일 경우, 하루 만에 괴사 활성을 나타냈다(Table 2). 50%와 70%에서 침전된 단백질을 주사하였을 경우 가장 심한 피부 손상을 나타냈으며, 많은 양의 단백질을 주사할수록 심한 괴사 반응이 일어났다. 결과를 토대로 이후 실험에서 괴사 활성을 측정하는 기준의 단백질 양을 40 μg으로 정하였다.

Table 2. Tissue destructive activity of ECP fractions separated by differential ammonium sulfate precipitation

		Ammonium sulfate concentration (%)					
		30	40	50	60	70	80
Protein amount (μg)	30	-	-	-	-	-	-
	40	-	+	+	+	-	-
	50	-	+	+	+	++	-
	60	-	++	++	++	++	-

The fractionated ECPs were subcutaneously injected to goldfish, skin damages were observed.

Gel filtration chromatography를 이용한 분비 단백질의 정제 및 조직 파괴 활성 확인

Ammonium sulfate를 이용해 침전시킨 단백질 중 괴사 활성에 관여하는 요소를 분리하기 위해 크로마토그래피 방법을 이용하였다. 가장 먼저 Anion exchange chromatography를 이용해 단백질을 정제하고자 하였다. 하지만 ammonium sulfate 침전법으로 인해 배지 상에 존재하는 단백질이 함께 침전되어 목적하는 단백질을 정제하기에 어려움이 있었다. 단백질을 더 세분화하기 위해 gel filtration chromatography를 실시하였다. Gel filtration chromatography 역시 배지상의 단백질이 함께 침전되어 분획화에 어려움이 있었고 배지를 교체하기로 결정 하였다. 배지 상에 목적하고자 하는 단백질 외의 단백질을 최소로 하기 위해 M9 최소 배지를 사용하였다. 이후 gel filtration chromatography를 다시 수행하였다.

M9 배지 상에서 ammonium sulfate를 이용해 단백질을 침전시킨 후 gel filtration chromatography를 수행한 결과, 총 5개의 분획을 획득하였다. 얻은 분획을 SDS-PAGE 후 silver staining을 통해 확인하였다(Fig. 3). 첫 번째 분획에서 관찰할 수 있는 단백질 밴드는 약 10개이며 두 번째 분획에서 관찰할 수 있는 단백질 밴드 역시 약 10개로 첫 번째 분획과 중복되는 밴드는 없었다. 세 번째 분획에서는 4개의 단백질 밴드를 확인할 수 있었으며 그 중 약 19 kDa 크기의 단백질이 가장 많은 양 존재하였다. 그 외의 분획에서는 단백질 밴드를 관찰할 수 없었다.

분획한 단백질 가운데 괴사 활성을 지니는 분획을 찾기 위해 분획한 단백질을 농축하여 금붕어의 피하에 주사하였다. 그 결과, 세 번째 분획의 단백질을 주사한 금붕어만이 피부 손상을 나타냈으며(Table 3), 세 번째 분획에 존재하는 단백질 밴드 4가지 중 피부 괴사를 일으키는 요소가 존재 할 것이라 추정하였다.

19, 33 kDa의 *A. hydrophila* 분비 단백질의 동정: Peptidase M28, Peptidase M35

SDS-PAGE를 통해 확인한 33 kDa 크기의 목적 단백질을 동정하기 위해 목적 단백질이 포함된 polyacrylamide gel 부분을 잘라내어 그 속에 포함된 단백질을 MALDI-TOF assay system을 통해 분석하였다. 이렇게 분석한 펩타이드들의 분자량 정보를 *Aeromonas*의 데이터베이스에 탐색, 비교하였다.

Table 3. Tissue destructive activity of ECP fractions

Fraction	1	2	3	4	5
Necrosis activity	-	+	+	+	-

The fractionated ECPs (40 μg) were subcutaneously injected to goldfish, skin damages were observed.

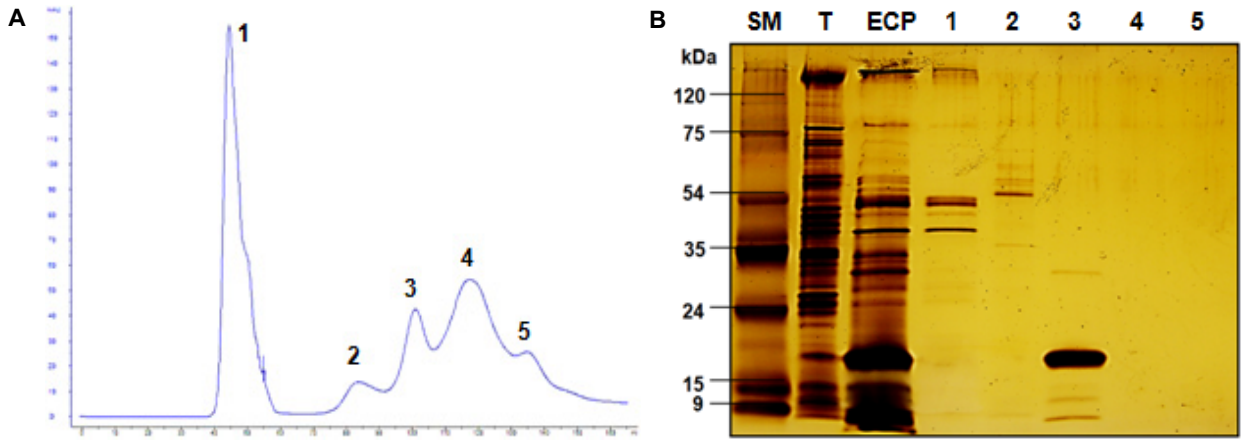

Fig. 3. The crude ECPs fractionated by gel filtration chromatography. (A) Gel filtration chromatography on HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade (120-124 ml, GE, USA) using an ÄKTA FPLC (GE, USA). 5 ml crude ECPs were applied to the column, which was eluted with size at a flow rate of 1.5 ml/min. Peak 1, 2, 3, 4 and 5 were collected. (B) SDS-PAGE analysis on 12% polyacrylamide gel. These proteins were visualized by silver staining. Lanes; SM, molecular mass markers (values at left are in kilo-daltons); T, toal lysate of *A. hydrophila* CK257; ECP, crude ECPs of *A. hydrophila* CK257; 1-5, Peak 1-5.

Trypsin에 의해 잘려진 펩타이드 중에서 탐지가능한 분자량을 가지는 펩타이드는 총 14개였다(Data not shown). 14개의 펩타이드 중에서 11개의 펩타이드와 일치하는 아미노산 서열을 가지는 단백질은 *A. hydrophila* Peptidase M28 단백질과 *A. media* Peptidase M28 단백질이었으며 34%의 높은 일치도를 보이는 Peptidase M28 단백질을 동정하고자 하였던 단백질일 것이라 예측하였다(Fig. 4A). Peptidase M28은 총 393개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 분자량은 약 43,230 Dalton으로 polyacrylamide gel 상에서 확인한 크기와 유사하였다. Peptidase M28은 Family M28에 속하는 효소이며 aminopeptidase와 carboxypeptidase로 알려져 있다. 이는 곰팡이에서 가장 먼저 발견되었으며 곰팡이와 효모 등의 진핵 생물에서 연구가 활발히 진행되고 있다. Family M28은 subfamily M28 A, B, C, D, E 5개로 나뉘며 이들은 각기 다른 생물에서 발견 후 분리되어 특성에 따라 나뉘어졌다. Peptidase M28과 같은 aminopeptidase는 일반적으로 활성부위에 하나 혹은 두 개의 아연 이온 결합 자리를 가진다[23]. *A. hydrophila*와 같은 속인 *A. proteolytica*의 aminopeptidase는 두 개의 아연 이온 결합 부위를 가지며 펩티드말단 가수분해효소로 폴리펩티드의 N-말단 잔기를 분해하며 효소의 결정 구조가 밝혀진 이후 아연 이온 결합과 함께 촉매 작용이 일어나는 것이 규명되었다[12].

앞선 동정과 마찬가지로 9, 13, 19 kDa 크기의 목적 단백질을 동정하였다. 이렇게 분석한 펩타이드들의 분자량 정보를 *Aeromonas*의 데이터베이스에 탐색, 비교하였다. Trypsin에 의해 잘려진 펩타이드 중에서 탐지가능한 분자량을 가지는 펩타이드는 각각 총 10개, 10개, 9개였다(Data not shown). 10개, 10개, 9개의 펩타이드 중에서 7개, 9개, 7개의 펩타이드(Fig. 4B)와 일치하는 아미노산 서열을 가지는 단백질은 *A. hydrophila* Peptidase M35 단백질이었으며 27%의 높은 일치도를 보이는 Peptidase M35 단백질을 동정하고자 하였던 단백질일 것이라 예측하였다(Fig. 4B). Peptidase M35는 *Aspergillus flavus* 에서 가장 먼저 발견되었으며, fungal metalloendopeptidase 를 포함하는 family M35 에 속한다. Family M35에 속하는 효소들의 일반적인 특징은 2개의 아연 결합 부위와 HEXXH motif를 가진다는 점이다[13]. *A. hydrophila*와 같은 속에 속하는 *A. salmonicida* 는 다양한 종류의 단백질 분해 효소를 분비하는데, 그 중 두 개의 효소가 독성을 가지는 것으로 확인되었다. 이들 중 하나는 64 kDa의 serine peptidase로서 AspA (P1)이라 명명되어 대서양 연어(*Salmo salar* L.)의 무게 1 g당 2.4 g의 비율로 LD_{50}를 나타냈다[15]. 또 다른 요소로 *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* protease 1 (AsaP1)이 있다. 이는 *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*가 분비하는 단량체 효소로 약 20 kDa의 크기를 가지며 이 균의 주요 독성 인자이다. AsaP1을 분리 정제하여 연어와 쥐에 낮은 농도로 주사한 이후, 24시간 이내에 동물 모델이 죽는 것을 관찰할 수 있었으며, 특히 포유류인 쥐보다 어류인 연어에 더 적은 양으로 치명적으로 작용한다고 알려져 있다[15, 16]. 또한, 정제한 AsaP1을 연어에 반수치사량보다 적게 근육 내 주사하였을 경우, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*를 감염시켰을 때와 같은 병리학적 증상을 나타냈다[15]. AsaP1은 카제인 분해 활성과 약한 젤라틴 분해 활성을 가지며 용혈성을 가지지 않는다[17]. AsaP1은 M35 계열의 aspzincin metalloendopeptiase로 확인되었으며 이는 37 kDa의 크기로 전구체 형태를 가지며 19 kDa 크기의 활성을 가지는 효소 형태를 가진다[15, 18]. 전구체 형태일 때의 단백질은 분자 내에서 자가 촉매를 통해 활성화되는 것으로 알려졌으며[19], 뿐만 아니라 단백질 분해효소의 활성을 억제하는 역할을 하는 것으로 확인되었다[20]. 그러나

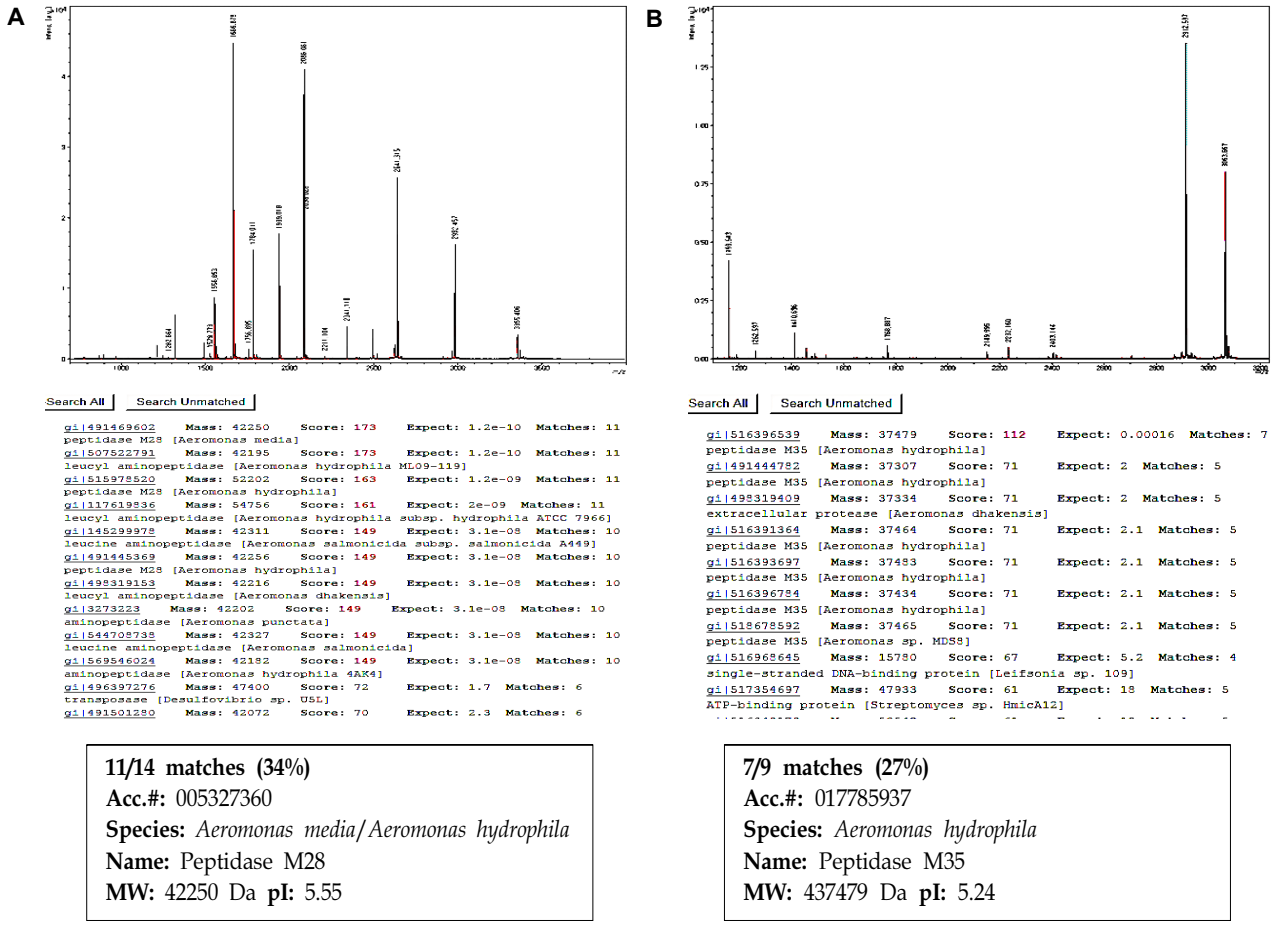

Fig. 4. Identification of the secreted proteins expressed in *A. hydrophila* CK257. Profiles obtained from MALDI-TOF analysis were presented. Mass informations of peptide fragments digested by trypsin were used for data mining (shown in the middle panel) from *A. hydrophila* database (WP_017785937). Database-searching result was presented in the box panel. (A) The 32 kDa protein is Peptidase M28 which is in fraction 3 by gel filtration chromatography (Fig. 3B). (B) These 9, 13, and 19 kDa proteins are Peptidase m35 which were infraction 3 by gel filtration chromatography (Fig. 3B).

AsaP1을 포함하는 많은 단백질 분해 효소들의 전구체 상태일 때의 정확한 기능과 이후의 maturation 기작은 알려진바 없다.

단백질 동정을 통해 괴사 활성을 일으키는 분획에 존재하는 단백질이 Peptidase M28과 M35라고 추측할 수 있었으며 피부와 조직에 존재하는 단백질을 분해시킴으로써 동물 모델에게 괴사 반응을 일으키는 것이라 예상할 수 있었다. 또한 *A. hydrophila*의 실제 감염 과정에 단백질 분해 효소가 관여하는 것으로 알려져 있어 병원성에도 큰 기능을 할 것이라 생각할 수 있다.

카제인 분해 활성 확인

Gel filtration chromatography를 이용하여 단백질을 정제한 이후, 괴사 활성을 나타내는 분획에서 특정 단백질 2개를 동정하였다. 이들은 Peptidase M28과 M35로 추정할 수 있으며 이들이 분비된 이후 단백질 분해 효소로서의 기능을 가지는지 확인 해보고자 하였다. 단백질 가수분해 효소는 탈지유(skim milk) 속에 존재하는 카제인(casein)과 같은 단백질을 분해 할 수 있다. 따라서 2%의 탈지유를 첨가한 agar plate에 단백질 가수분해 효소로 추정되는 단백질을 포함한 분획을 떨어뜨려 카제인이 분해되며 불투명 했던 agar plate가 투명해지면서 형성되는 투명환의 크기로 단백질 가수분해 효소로서의 활성을 확인 할 수 있다. 그 결과, gel filtration chromatography를 통해 얻은 5개의 분획 중 괴사 활성을 나타냈던 세 번째 분획만이 카제인 분해 활성을 나타냈다(Fig. 5A). *A. hydrophila* CK257 역시 카제인 분해 활성을 나타냈으며, 이는 동정한 단백질을 분비함으로써 나타나는 결과라 추측하였다.

또한 동정 결과에 따르면 Peptidase M28과 M35는 아연 이온 결합 부위를 가지며 금속 이온에 의해 촉매를 받는 효소로 확인할 수 있었다. 따라서 금속 이온의 종류와 농도에 따라 단백질 분해 활성의 차이를 카제인 분해 활성을 통해 확인하고자 하였다. Gel filtration chromatogrpahy를 통해 얻은 괴사 활성을 가진 분획의 단백질에 아연, 철, 마그네슘을 포함한

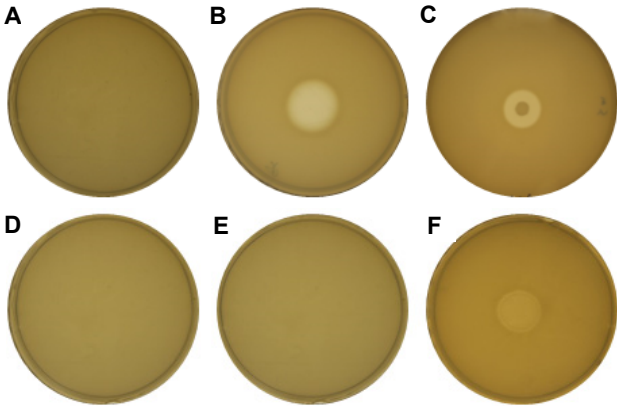

Fig. 5. Caseinolytic activity of *A. hydrophila* CK257. *A. hydrophila* CK257 and fraction of ECPs were injected in 2% skim milk agar plates. The plates were incubated for 6 hr at 37℃ Caseinolytic activity was determined by comparing to a clear zone. (A) Negative control, PBS (B) Positive control, Trypsin 0.3 mg (C) *A. hydrophila* CK257 2.54×10^7 CFU/10 µl (D)-(F) Proteins in fraction 1-3 obtained from gel filtration chromatography (Proteins in fraction 4, 5 has no caseinolytic activity, data not shown) Caseinolytic activity was observed in triplicate.

금속염을 각각 1 mM, 5 mM로 처리한 이후 2% 탈지유를 첨가한 agar plate 상에 생성되는 투명환의 직경을 측정하여 분해 활성의 정도를 관찰하였다. 그 결과, 마그네슘을 처리한 경우 분해 활성이 1.3배 가량 더 증가되는 현상을 관찰할 수 있었다. 반면에 아연과 철을 처리하였을 때는 분해 활성이 감소되는 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 아연을 1 mM 처리하여 반응시킨 후 분해 정도를 보았을 때, 활성이 반으로 줄어들었으며 고농도인 5 mM로 처리하여 반응시킨 후에는 활성이 없어지는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 철은 낮은 농도로 처리하였

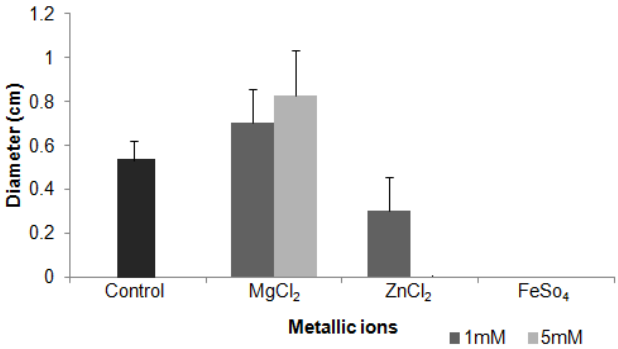

Fig. 6. Effect of metal ions on the caseionolytic activity. Fraction 3 of ECPs treated metallic ions were injected in 2% skim milk agar plates. The plates were incubated for 6 hours at 37℃. The activity was determined by measuring the diameter of clear zone according to diverse metallic ions. Control was not treat metallic ions. Caseinolytic activity was observed in triplicate.

음에도 불구하고 활성이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.

위의 결과를 통해 분획하여 얻은 괴사 활성을 지닌 단백질 분획은 금속 이온의 종류와 농도에 따라 활성의 차이를 나타냈고 이는 금속 촉매 효소로서의 특징을 보여주었다. 아연 이온 결합 부위를 가짐으로 인해 아연 이온에 의해 촉매를 받을 것이라 예상하였지만 오히려 활성의 저해를 받았으며 마그네슘 이온에 의해 활성이 더욱 증가하는 현상을 관찰할 수 있었다. 이는 알려진 바와 달리 분비된 단백질이 또 다른 특성을 가질 수 있을 것이라 생각 할 수 있다.

엘라스틴 분해 활성 확인

조직은 다양한 단백질로 이루어져 있으며 그 중 엘라스틴(elastin)은 콜라겐(collagen)과 함께 결합조직에 다량 존재하며 고무와 같은 탄력성이 있는 단백질이다[21]. 동정 결과 확인한 단백질 Peptidase M28과 M35의 조직 괴사 능력을 간접적으로 확인해 보고자 엘라스틴 분해 정도를 확인해 보았다. 먼저 *A. hydrophila* CK257 균주의 엘라스틴 분해능력을 엘라스틴 1%를 포함한 agar plate상에서 확인해 보았다(Fig. 7A, B, C). *A. hydrophila* CK257 균주 1.84×10^7 CFU/10 µl를 엘라스틴

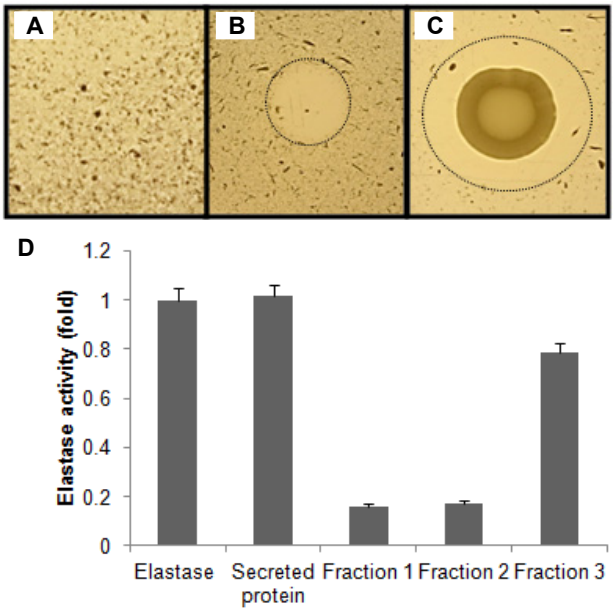

Fig. 7. Elastolytic activity of *A. hydrophila* CK257. *A. hydrophila* CK257 and elastase were injected in 1% elastin agar plates. The plates were incubated for 18 hours at 37℃. Elastolytic activity was determined by comparing to a clear zone. (A) Negative control, PBS (B) Positive control, Elastase 10 µg (C) *A. hydrophila* CK257 1.84×10^7 CFU/10 µl (D) Elastolytic activity of ECPs were measured using elastin-Congo red as a substrate, as described in Materials and Methods. Positive control, Trypsin 3 The degradation of elastin was elucidated by the increase of optical density at 450 nm. The experiments were performed in triplicate.

agar plate에 분주한 후 37℃에서 18시간 배양한 결과, 양성 대조군인 elastase와 마찬가지의 엘라스틴 분해능을 보였다. Gel filtration chromatography를 통해 얻은 Peptidase M28과 M35가 포함된 분획 역시 엘라스틴 agar plate 상에서 약한 엘라스틴 분해능을 보였다(Data not shown). Peptidase M28과 M35가 포함된 분획에서의 엘라스틴 분해능을 확실히 관찰하기 위하여 elastin-congo red를 기질로 사용하여 엘라스틴 분해능을 확인해 보았다. 마찬가지로 양성 대조군으로서 elastase를 사용하였으며 단백질에서 나타난 엘라스틴 분해능을 이에 대한 비율로 표시하여 그래프로 나타내었다(Fig. 7D). Ammonium sulfate 침전을 통해 얻은 crude ECP의 경우 elastase와 비슷한 정도의 엘라스틴 분해능을 나타냈으며 Peptidase M28과 M35가 포함된 분획(Fraction 3)에서는 elastase의 약 80% 정도의 엘라스틴 분해능을 확인할 수 있었다. 이로써 조직 괴사의 원인 물질로 추정되는 Peptidae M28과 M35가 엘라스틴 분해능을 가짐으로써 조직에 존재하는 단백질을 분해하여 괴사 반응을 일으키는 것이라 추정 할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)의 지원으로 이루어짐.

References

1. Altarriba, M., Merino, S., Gavin, R., Canals, R., Rabaan, A., Shaw, J. G. and Tomas, J. M. 2003. A polar flagella operon (*flg*) of *Aeromonas hydrophila* contains genes required for lateral flagella expression. *Microb. Pathog.* **34**, 249-259.
2. Bertani, G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**, 293-300.
3. Gao, X., Wang, J., Yu, D. Q., Bian, F., Xie, B. B., Chen, X. L., Zhou, B. C., Lai, L. H., Wang, Z. X., Wu, J. W. and Zhang, Y. Z. 2010. Structural basis for the autoprocessing of zinc metalloproteases in the thermolysin family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 17569-17574.
4. Garrity, G. M., Bell, J. A. and Lilburn, T. G. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer, New York, Berlin, Heidelberg.
5. Gudmundsdóttir, B., Hastings, T. and Ellis, A. 1990. Isolation of a new toxic protease from a strain of *Aeromonas salmonicida* subspecies *achromogenes*. *Dis. Aquat. Org.* **9**, 199-208.
6. Gudmundsdottir, B. K., Hvanndal, I., Bjornsdottir, B. and Wagner, U. 2003. Analysis of exotoxins produced by atypical isolates of *Aeromonas salmonicida*, by enzymatic and serological methods. *J. Fish Dis.* **26**, 15-29.
7. Gudmundsdottir, S. and Gudmundsdottir, B. 2001. Induction of inflammatory cytokines by extracellular products and LPS of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* ssp. *achromogenes* in mice and mouse cell cultures. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **81**, 71-83.
8. Hase, C. C. and Finkelstein, R. A. 1993. Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. *Microbiol. Rev.* **57**, 823-837.
9. Janda, J. M. and Abbott, S. L. 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 35-73.
10. Janda, J. M. and Abbott, S. L. 1998. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding Panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin. Infect. Dis.* **27**, 332-344.
11. Janda, J. M., Guthertz, L. S., Kokka, R. P. and Shimada, T. 1994. *Aeromonas* species in septicemia: laboratory characteristics and clinical observations. *Clin. Infect. Dis.* **19**, 77-83.
12. Lai, E. M., Nair, U., Phadke, N. D. and Maddock, J. R. 2004. Proteomic screening and identification of differentially distributed membrane proteins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **52**, 1029-1044.
13. Lee, C. C., Chi, C. H., Lee, N. Y., Lee, H. C., Chen, C. L., Chen, P. L., Chang, C. M., Wu, C. J., Ko, N. Y., Tsai, M. C. and Ko, W. C. 2008. Necrotizing fasciitis in patients with liver cirrhosis: predominance of monomicrobial Gram-negative bacillary infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **62**, 219-225.
14. Pemberton, J. M., Kidd, S. P. and Schmidt, R. 1997. Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**, 1-10.
15. Pridgeon, J. W., Klesius, P. H., Song, L., Zhang, D., Kojima, K. and Mobley, J. A. 2013. Identification, virulence, and mass spectrometry of toxic ECP fractions of West Alabama isolates of *Aeromonas hydrophila* obtained from a 2010 disease outbreak. *Vet. Microbiol.* **164**, 336-343.
16. Roschenthaler, R., Kindler, P., Herrlich, P. and Igbokwe, J. 1970. The action of nitrofurantoin: inhibition of growth of *Escherichia coli* K 12 and of IPTG-induced beta-galaotosidase synthesis. *Zentralbl. Bakteriol. Orig.* **215**, 203-211.
17. Rust, L., Messing, C. R. and Iglewski, B. H. 1994. Elastase assays. *Meth. Enzymol.* **235**, 554-562.
18. Sambrook, J., Russell, D. W. and Russell, D. W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set). Cold spring harbor laboratory press Cold Spring Harbor, New York.
19. Schwenteit, J., Bogdanovic, X., Fridjonsson, O. H., Aevarsson, A., Bornscheuer, U. T., Hinrichs, W. and Gudmundsdottir, B. K. 2013. Toxoid construction of AsaP1, a lethal toxic aspzincin metalloendopeptidase of *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes*, and studies of its activity and processing. *Vet. Microbiol.* **162**, 687-694.
20. Shirirat, T., Intuseth, J., Chanphong, J., Thompson, K., Chinabut, S. and Adams, A. 1999. Characterisation of *Aeromonas hydrophila* extracellular products with reference to toxicity, virulence, protein profiles and antigenicity. *Asian Fish. Sci.* **12**, 371-379.
21. Takahashi, E., Kobayashi, H., Yamanaka, H., Nakanishi, M., Tateishi, A., Abe, T., Arimoto, S., Negishi, T. and Okamoto, K. 2013. Analysis of carboxy terminal domain of metalloprotease of elastolytic *Aeromonas hydrophila*. *Biol. Pharm. Bull.* **36**, 1174-1182.

초록 : 조직 괴사 활성을 지닌 *Aeromonas hydrophila*의 분비 단백질에 관한 연구

김규리 · 최윤정 · 강호영*
(부산대학교 생명시스템학과)

*Aeromonas hydrophila*는 수생계에 흔히 존재하는 병원체로서 출혈성 패혈증, 수종, 궤양 등의 질병을 유발한다. *A. hydrophila*는 효과적인 감염과 다양한 환경에서 적응하기 위해 세포 외 물질(Extracellular products, ECPs)을 분비한다. 본 연구에서 사용한 *A. hydrophila* CK257은 매우 독성이 강한 균주로 균이 분비하는 ECP 역시 쥐, 토끼, 금붕어를 포함한 동물 모델에게 조직 손상을 일으키며 독성을 보였다. 이러한 괴사 반응을 일으키는 원인 요소를 찾기 위해 ECP의 특성을 분석하였고 그 결과, 원인 요소가 단백질이라는 것을 확인하여 이후 단백질 분리 및 정제에 초점을 맞추어 실험을 진행하였다. 균체를 제거한 배양액 상의 분비 단백질을 얻기 위하여 ammonium sulfate 침전법을 사용하였고, 이후 겔 거르기 크로마토그래피(Gel filtration chromatography)를 이용하여 단백질을 정제하였다. 정제 후 단백질은 다섯 개의 분획으로 나뉘었고 이 중 한 개의 분획이 동물 모델에 괴사와 같은 피부 손상을 일으키는 것을 확인하였다. 괴사 활성을 가진 분획의 단백질 4개의 밴드를 MALDI-TOF 시스템을 통해 분석한 결과, Peptidase M35와 Peptidase M28로 밝혀졌으며 이들은 각각 금속촉매효소(metalloprotease)임을 확인할 수 있었다. Peptidase M35와 Peptidase M28의 단백질 분해 효소로써의 기능을 확인하기 위해 카제인 분해 활성을 확인하였고, 다양한 금속 이온을 처리함에 따라 그 활성이 달라지는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 조직에 존재하는 단백질의 한 종류인 엘라스틴(elastin) 분해능 역시 확인해 보았다. 본 연구에서는 *A. hydrophila*가 분비하는 물질 가운데 조직 괴사 활성을 일으키는 것으로 추정되는 Peptidase M35와 Peptidase M28의 두 가지 인자를 확인하여 동정하였다. 이후 두 가지 인자를 결손 시킨 돌연변이주를 구축하여 조직 괴사에 이들이 직접적으로 작용하는지 확인 할 예정이다.