

과산화수소 제독 과정에서의 탄저균 전사체 분석

김상훈¹⁾ · 김세계¹⁾ · 정경화¹⁾ · 윤성녀²⁾ · 김윤기²⁾ · 김민철²⁾ · 류삼곤³⁾ · 이해완³⁾ · 채영규^{*,1),4)}

¹⁾ 한양대학교 분자생명과학과

²⁾ 삼양화학공업(주) 분석기기연구소

³⁾ 국방과학연구소 제5기술연구본부 화생방부

⁴⁾ 한양대학교 생명나노공학과

Whole Transcriptomic Analysis of *Bacillus anthracis* during Hydrogen Peroxide Decontamination

Sang Hoon Kim¹⁾ · Se Kye Kim¹⁾ · Kyoung Hwa Jung¹⁾ · Sung Nyo Yoon²⁾ · Yun Ki Kim²⁾ · Min Cheol Kim²⁾ · Sam Gon Ryu³⁾ · Hae Wan Lee³⁾ · Young Gyu Chai^{*,1),4)}

¹⁾ Department of Molecular and Life Science, Hanyang University, Korea

²⁾ Samyang Chemical Co., Ltd., Korea

³⁾ The 5th Research and Development Institute, Agency for Defense Development, Korea

⁴⁾ Department of Bionanotechnology, Hanyang University, Korea

(Received 4 February 2015 / Revised 13 July 2015 / Accepted 24 July 2015)

ABSTRACT

Decontamination of biological agents utilizes hydrogen peroxide(H₂O₂) for its effectiveness and safeness. *Bacillus anthracis* is a major target for H₂O₂ decontamination. To assess the effect of H₂O₂ on *B. anthracis* and identify biomarkers for decontamination, whole transcriptomic profiling of H₂O₂-treated *B. anthracis* was performed. Here we identified deregulation in stress response genes, transcription factors and cellular homeostasis genes. We also found that expression of antisense RNAs increased in *B. anthracis* during decontamination. We postulate that *B. anthracis* prioritizes survival and adaptation in response to H₂O₂ treatment by changing its gene expression pattern.

Key Words : *Bacillus anthracis*(탄저균), Transcriptome(전사체), Hydrogen Peroxide(과산화수소), Decontamination(제독)

1. 서론

탄저는 인수공통질병으로 감염경로에 따라 그 증상

및 치사율이 달라진다. 피부 감염의 경우, 수포와 피부 궤양을 일으키며, 위장 감염의 경우, 열을 동반한 복통, 내출혈 및 구토 등의 증상을 볼 수 있다. 폐탄저는 호흡기를 통한 감염으로 앞서 언급한 두 종류의 감염보다 치사율이 높으며 그 증상이 감기와 유사하여 조속한 발견에 어려운 점이 있다.

* Corresponding author, E-mail: ygchai@hanyang.ac.kr

Copyright © The Korea Institute of Military Science and Technology

이러한 탄저병을 일으키는 탄저균은 원통형 그람양성균이다. 탄저균의 독성은 온도 및 이산화탄소 농도에 따라 변하며, 이는 탄저 독소 활성인자 *AtxA*에 의해 조절된다^[1]. 이 인자에 의해 조절되는 삼자 독소로는 방어 항원(PA : Protective Antigen), 치사 인자(LF : Lethal Factor) 그리고 부종 인자(EF : Edema Factor)가 있다^[2]. 치명적인 독소 외에도 탄저균의 생존 능력과 저항성 역시 독성에 큰 기여를 하는 것으로 알려져 있다. 탄저균은 아포를 형성하는 균으로 성장 요건 불충족 또는 외부 스트레스 증가 시 영양세포에서 아포를 형성한다^[3]. 이 아포는 펩티도글리칸 및 당단백질 층으로 이루어져 있어 외부로부터 세포를 보호하며 특히 펩티도글리칸 층은 열, 산성, 산화 및 화학물질에 강한 저항성을 띄게 해준다. 일반적으로 탄저균은 환경에서 아포 상태로 존재하며 숙주에 감염되기 전까지 지속적으로 아포 상태를 유지할 수 있다. 이러한 특성 때문에 생물테러 활용의 위험이 있으며 실제로 2001년 미국에서 일어난 탄저균 테러로 인해 사회적 불안과 경제적 손실을 야기했다. 이에 대한 대응책으로 아포를 제거하는 다양한 제독제들이 개발되었고 오염된 시설 및 장비로 인한 감염을 최소화하는 제독 방법에 대한 연구가 진행되고 있다^[4]. 현재 사용되고 있는 제독제로는 포름알데히드, 이산화염소 및 과산화수소 등이 있다^[5].

과산화수소는 오랫동안 살균력 및 제독제로서의 효과를 입증되어 사용되어졌다^[4]. 과산화수소는 열역학적으로 불안정한 산화제로서 자유 수산화기(Free Hydroxyl Radicals)를 만들며 이 수산화기가 미생물의 DNA, 세포막 지질 그리고 다른 필수 세포 기관을 공격하여 살균효과를 가지게 된다. 이러한 살균력을 가진 과산화수소를 통한 탄저균 아포 제독 연구가 활발히 이루어지고 있다^[6]. 이전 연구의 경우, 과산화수소를 통한 제독 효율에 관한 연구가 주를 이루며 과산화수소에 반응할 것으로 예상되는 세포 벽, 항산화 방어기전 단백질 등에 대한 기능 분석 연구가 행해졌다. 그러나 과산화수소 제독 시 탄저균 내 유전자 발현의 변화 또는 과산화수소에 대한 저항성 발현에 대한 지표는 제공되어 있지 않았다. 따라서 본 연구는 일정량의 과산화수소가 처리된 탄저균의 전사체 분석을 통하여 과산화수소 처리 시 탄저균 내 유전자의 발현 변화에 대한 포괄적인 분석 및 탄저균 내 과산화수소 제독 관련 마커를 발굴하고자 하였다. 특히 본 연구는 최근에 각광받고 있는 차세대 서열분석 기술을 사용하

여^[7] 유전자의 mRNA 외에 다른 종류의 RNA 또한 분석하여 탄저균 내 전반적인 전사 변화를 관찰하였다.

2. 실험 방법

2.1 균주 및 배지

본 실험에서는 국내에서 분리한 탄저균 HYU01 (pXO1⁺, pXO2⁻)을 사용하였다. HYU01은 Luria-Bertani (LB) 액체 배지(Becton, New Jersey, USA)에 접종하여 37 °C 배양기에 넣어 흡광도(OD₅₄₀ : Optical Density at 540 nm)가 0.3이 될 때까지 배양하였다. 이후, 과산화수소 용액을 최종 농도가 0.3 mM이 되도록 첨가한 후 2시간 배양하였다. 배양한 탄저균은 원심분리를 통해 침전시켜 분리하였고 이후 실험에 사용하기 전까지는 RNAprotect Bacteria Reagent(Qiagen, Hilden, Germany)에 현탁하여 -80 °C 초저온 냉동고에 보관하였다.

2.2 RNA 추출

배양한 탄저균 HYU01의 RNA는 RNeasy Mini Kit (Qiagen)를 사용하여 제조사에서 제공하는 실험방법에 따라 추출하였다. 현탁된 탄저균에 RLT buffer를 넣고 균질화시키고 여기에 70 % 에탄올을 첨가 후 피펫으로 혼합하였다. 이 혼합액을 제공된 스피ن컬럼(Spin Column)에 옮겨 원심분리와 세척을 반복하였고, 마지막에 핵산가수분해효소가 없는(Nuclease-free) 증류수에 녹여 추출하였다. 추출한 RNA는 정량 후 -80 °C 초저온 냉동고에 보관하였다.

2.3 RNA 서열 분석(RNA-sequencing) 및 결과 분석

과산화수소가 처리된 탄저균 HYU01의 RNA 서열 분석은 마크로젠(서울, 대한민국)을 통해 진행하였다. 서열 분석에 앞서 전체 RNA에서 23S 및 16S rRNA를 Ribo-Zero Removal Kit(Epicentre Biotechnology, Madison, USA)로 제거하였고 Agilent 2100 Bioanalyzer 및 RNA6000 Chip(Agilent, Santa Clara, USA)을 사용하여 정성적 분석을 하였다. 이후, 남은 mRNA는 온도 및 이가 양이온을 이용하여 짧은 가닥으로 잘랐고 Illumina TruSeq RNA Sample Preparation Kit(Illumina Inc., San Diego, USA)를 사용하여 cDNA 라이브러리(cDNA Library)를 제작하였다. 제작된 라이브러리는 차세대 서열분석기인 HiSeq2000(Illumina Inc.)으로 분석하였다.

얻은 서열분석 결과는 미생물 전용 전사체 분석 프

로그랩인 Rockhopper를 사용하여 분석하였다⁸⁾. 분석에 사용한 참고 서열 균주로는 탄저균 *Stern* 균주 (GenBank AE017225.1)를 사용하였다. 분석 후 유전자 발현 변화가 증가 또는 감소한 수치가 1보다 크거나 -1보다 작은 유전자를 선택하였고, 선택된 유전자의 기능 분석으로는 선정한 유전자 리스트를 생물 정보 분석용 프로그램 DAVID 내에 있는 GO(Gene Ontology) 분석, KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 경로 분석 창에 입력하여 분석을 진행하였다⁹⁾.

3. 실험결과 및 고찰

2.1 실험 조건

과산화수소에 의한 탄저균 내 유전자 발현 변화를 분석하는 실험으로써 이전 과산화수소에 의한 탄저균 내 단백질체 변화와 동일한 0.3 mM의 과산화수소를 처리하였다. 이는 과산화수소에 의한 세포 사멸이 나타나는 최소 농도로 전사체 분석을 위해 충분한 세포 수를 확보하기 위하여 본 농도를 사용하였다¹⁰⁾. 또한 과산화수소에 의한 초기 사멸 과정에서 일어나는 발현 변화를 확인하는 실험으로써 과산화수소를 2시간 처리 후 샘플을 채취하였다.

2.2 RNA 추출

배양한 탄저균 HYU01에서의 RNA 추출은 선행연구와 동일한 과정으로 실험하였다⁹⁾. 추출한 탄저균 HYU01의 RNA 농도는 대조군, 실험군 각각 26 ng/μl, 10 ng/μl이다.

2.3 RNA 서열 분석(RNA-sequencing) 및 결과 분석

과산화수소가 처리된 탄저균 HYU01의 RNA 서열 분석에는 총 100 μl의 RNA를 사용하였으며 서열 분석 라이브러리에 사용한 색인 서열은 대조군은 TAGCTT, 실험군은 CGATGT을 사용하였다. 서열 분석한 초기 서열 결과는 Rockhopper 프로그램을 통해 발현 변화가 있는 유전자를 구별하였다.

그 결과, 다수의 전사인자, 세포 항상성 및 스트레스 반응 유전자의 발현이 감소했음을 확인하였다(Table 1). 전사인자의 경우, 항생제 저항성 등 외부 인자에 대한 저항성에 관여하는 *marR* family transcription factor가 주를 이루었다. 또한 열충격 유전자(Heat Shock Gene) 및 긴축 반응 유전자(Stringent Response Gene)의 발현이 감소하였다. 이외에도 다수의 대사과 관련된 유전자의 발현 감소가 확인되었다(자료 미제시).

이와는 반대로 다수의 안티센스(antisense) RNA, 기능이 알려지지 않은 추정 유전자 및 산화환원 반응 유전자의 발현이 증가하였다(Table 2). 대다수 유전자의

Table 1. Top ten down-regulated genes by H₂O₂ treatment to *B. anthracis* HYU01

Gene name	NCBI gene ID*	Log ₂ fold-change**	Putative function
BAS5039	2851946	-5.42	Ribosomal subunit surface interface protein
BAS2582	2849163	-4.71	<i>rrf2</i> family protein
BAS3818	2851236	-4.42	Fosfomycin resistance protein FosB
BAS2213	2851168	-4.39	DNA-binding protein HU
BAS1801	2851270	-4.31	<i>marR</i> family transcription regulator
BAS1871	2851330	-4.30	General stress protein
BAS4938	2849888	-4.19	SET domain-containing protein
BAS2089	2848750	-4.12	TatCD protein
BAS3021	2852167	-4.09	Cell wall anchor domain-containing protein
BAS0650	2851192	-3.92	Methyl-accepting chemotaxis protein

* 미국 국립생물정보센터 내 유전자은행 GenBank 유전자 번호.

** 로그 수 유전자 발현 변화폭. 양수의 경우 증가, 음수의 경우 감소를 의미함.

Table 2. Top ten up-regulated genes by H₂O₂ treatment to *B. anthracis* HYU01

Gene name	NCBI gene ID*	Log ₂ fold-change**	Putative function
BAS0441	2847888	3.98	Prophage LambdaBa04, DNA binding protein
BAS3709	2852787	3.77	50S ribosomal protein L28
BAS4240	2852953	3.75	50S ribosomal protein L33
BAS0430	2848653	3.35	Prophage LambdaBa04 transactivating regulatory domain-containing protein
BAS0365	2853017	2.95	Methyl-accepting chemotaxis protein
BAS0448	2848320	2.94	Prophage LambdaBa04, DNA packaging protein
BAS1392	2849415	2.91	Ferredoxin
BAS0437	2853048	2.85	ArpU family phage transcriptional regulator
BAS0025	2848525	2.79	Sigma-k factor processing regulatory protein BofA
BAS0457	2848449	2.72	Phage minor structural protein

* 미국 국립생물정보센터 내 유전자은행 GenBank 유전자 번호.

** 로그 수 유전자 발현 변화폭. 양수의 경우 증가, 음수의 경우 감소를 의미함.

기능이 밝혀지지 않았으나 발현 정도가 크게 증가한 것을 미루어 볼 때 과산화수소 및 다른 요소에 의한 제독 과정에서 반응하는 유전자로 유추할 수 있다.

위에서 언급된 발현 변화가 있는 유전자의 기능 및 생물학적 경로 관여에 대한 분석을 진행하였다. 발현이 감소된 유전자의 경우 주로 세포 항상성, 전사 및 전사 조절, 당 대사 과정 등의 기능을 가진 것으로 확인되었다(Table 3). 이 유전자들이 관여하는 생물학적 경로로는 해당 작용 및 당신합성(Gluconeogenesis), 지방산 대사 및 단백질 이동 등이 있다(Table 4).

발현이 증가된 유전자의 경우 안티센스 RNA이거나 기능이 알려지지 않은 유전자가 주를 이루었기에 많은 정보를 얻을 수 없었다. 이는 돼지 유행성폐렴균 (*Mycoplasma hyopneumoniae*)에 과산화수소 처리 시 볼 수 있는 유전자의 발현 양상과 유사하다^[11].

과산화수소에 의한 탄저균 제독 과정에서 탄저균의 유전자의 발현에 변화가 생김을 알 수 있었고, 이는 주로 전사 조절 및 외부 스트레스 요인에 관한 유전자들이 영향을 받았음을 알 수 있었다. 본 연구에서 적용한 과산화수소 농도보다 높은 농도를 처리 시 탄저균의 성장이 저하되면서 사멸 정도가 높은 점^[10] 과 대다수의 전사 조절 인자의 경우 그 발현의 정도가 낮아진 점을 미루어 볼 때, 전사인자 발현 감소에 따

Table 3. Gene Ontology functional analysis of H₂O₂ affected genes in *B. anthracis* HYU01

	Term*	Count**	Fold enrichment***
1	Cellular homeostasis	5	6.3
2	Homeostatic process	5	5.3
3	Glucose metabolic process	4	5.2
4	Hexose metabolic process	4	4.7
5	Monosaccharide metabolic process	4	3.8
6	Transcription	13	2.3
7	Regulation of transcription	15	1.8
8	Regulation of transcription, DNA-dependent	14	1.8
9	Regulation of RNA metabolic process	14	1.8

* 선택된 유전자의 예상되는 일반적 기능

** 예상되는 기능에 포함된 유전자 수

*** 예상 기능을 포함한 전체 유전자 비율에 대한 예상 기능을 포함한 본 연구의 유전자 비율. 값을 높일수록 유의성이 있음.

Table 4. KEGG pathway analysis of H₂O₂ affected genes in *B. anthracis* HYU01

	Term	Count	Fold enrichment
1	3-Chloroacrylic acid degradation	7	39.9
2	Glycolysis/gluconeogenesis	3	26.8
3	Fatty acid metabolism	3	23.9
4	1- and 2-methylnaphthalene degradation	3	23.5
5	Tyrosine metabolism	2	22.2
6	Starch and sucrose metabolism	2	19.9
7	Protein export	2	19.9
8	Butanoate metabolism	2	15.3
9	Pyruvate metabolism	2	12.0

른 세균 내 대사 작용 조절이 떨어지게 되며 이는 성장에 영향을 준 것으로 보인다. 이는 발현이 감소한 유전자의 기능 양상을 통해 알 수 있는데, 대다수의 유전자는 에너지 생성 및 생체 내 물질 합성에 작용하는 효소와 조효소들이다. DNA 수리 요소 및 스트레스 인자들 역시 그 발현이 감소한 것을 확인할 수 있으며 이는 폐렴균 연구에서도 유사한 결과를 보여 주고 있다¹¹.

또한 제독 과정에서 발현이 증가한 대다수의 유전자는 아직까지 기능이 밝혀지지 않은 점을 미루어 볼 때, 추정 유전자의 기능 내에 탄저균의 제독 저항에 관련된 기능이 존재할 수 있음을 가늠케 한다. 안티센스 RNA의 발현 증가 역시 과산화수소 제독에서 비롯된 현상으로, 이전 다른 균에서도 안티센스 RNA는 스트레스 인자로 여겨졌다¹². 본 실험에서 발견된 안티센스 RNA의 경우 rRNA를 목표로 하는 것과 전사 인자 및 물질 수송 관련 유전자의 발현이 감소하는 점을 미루어 볼 때, 탄저균은 과산화수소를 이용한 제독에 대한 저항성 향상을 위해 무분별한 유전자 발현을 억제하는 동시에, 외부와의 물질 교환을 차단하고, 생존 관련 유전자 발현에 치중한다고 볼 수 있다. 이 현상은 일전의 대장균 관련 연구에서 유사한 형태를 확인할 수 있다¹³. 본 연구에서 제시한 안티센스 RNA

및 스트레스 인자의 발현 변화가 큰 점을 이용해 추가 기능 연구 및 검출 기술 개발이 이루어질 수 있다고 사료된다. 다만 본 연구의 전사체 분석에 사용된 RNA 서열분석의 경우, 국내 분석 단가가 비싸고 생물정보학 분석이 가능한 연구원이 필요하기에 이전 분석에 비해 소요되는 분석 시간이 길어질 수 있다. 또한 RNA 발현과 단백질 발현이 반드시 일치하지 않기에, 여기서 증가 또는 감소한 유전자가 반드시 단백질 발현의 변화에 영향을 주었다고 할 수 없다. 추가적인 단백질 동정 기법을 통해 본 연구에서 확인한 유전자 및 안티센스 RNA의 기능을 확인함으로써 확고한 결과를 얻을 수 있을 것이라 기대한다.

4. 결론

과산화수소를 이용한 탄저균 제독 과정에서의 탄저균 유전자의 발현 변화 양상을 분석함으로써, 제독 과정 동안 탄저균 내에서는 유전자 발현이 생존과 저항을 위한 양상으로 바뀌며 다양한 안티센스 RNA와 스트레스 인자의 발현이 바뀌는 것을 확인하였다. 감소되는 유전자는 주로 전사인자이며, 증가하는 유전자는 안티센스 RNA 및 기능이 밝혀지지 않은 추정상의 유전자들이었다. 이를 통해 과산화수소를 이용한 제독 과정 동안 탄저균의 유전자 전사 기작이 훼손되며 성장 방해로 인한 사멸에 이르게 되며, 이를 극복하고자 스트레스 반응 관련 유전자와 안티센스 RNA의 발현을 증가시킨다고 추정할 수 있다. 추가적으로 증가한 유전자 및 안티센스 RNA의 기능 분석을 시행할 시 탄저균의 제독 저항 기작의 이해 및 제독 관련 마커 발굴이 가능할 것으로 기대한다.

후 기

본 연구는 방위사업청과 국방과학연구소 건식제독기술사업(UC13002320)의 지원을 받아 수행하였으며 이에 감사드립니다.

References

[1] Z. Dai, J. C. Sirard, M. Mock and T. M. Koehler,

- “The *atxA* Gene Product Activates Transcription of the Anthrax Toxin Genes and Is Essential for Virulence,” *Mol Microbiol*, Vol. 16, No. 6, pp. 1171-1181, 1995.
- [2] M. Mock and A. Fouet, “Anthrax,” *Annu Rev Microbiol*, Vol. 55, pp. 647-671, 2001.
- [3] L. Bailli, S. Hibbs, P. Tsai, G. L. Cao and G. M. Rosen, “Role of Superoxide in the Germination of *Bacillus anthracis* Endospores,” *FEMS Microbiol Lett*, Vol. 245, pp. 33-38, 2005.
- [4] N. A. Klapes and D. Vesley, “Vapor-Phase Hydrogen Peroxide as a Surface Decontaminant and Sterilant”, *Appl Environ Microbiol*, Vol. 56, pp. 503-506, 1990.
- [5] T. L. Buhr, A. A. Young, Z. A. Minter, C. M. Wells, D. C. McPherson, C. L. Hooban, C. A. Johnson, E. J. Prokop, and J. R. Crigler, “Test Method Development to Evaluate Hot, Humid Air Decontamination of Materials Contaminated with *Bacillus anthracis* Sterne and *Bacillus thuringiensis* AI Hakam Spores”, *J Appl Microbiol*, Vol. 113, pp. 1037-1051, 2012.
- [6] J. V. Rogers, C. L. Sabourin, Y. W. Choi, W. R. Richter, D. C. Rudnicki and K. B. Riggs, “Decontamination Assessment of *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, and *Geobacillus stearothermophilus* Spores on Indoor Surfaces Using a Hydrogen Peroxide Gas Generator”, *J Appl Microbiol*, Vol. 99, pp. 739-748, 2005.
- [7] A. C. Pinto, H. P. Melo-Barbosa, A. Miyoshi, A. Silva and V. Azevedo, “Application of RNA-seq to Reveal the Transcript Profile in Bacteria,” *Genet Mol Res*, Vol. 10, No. 3, pp. 1707-1718, 2011.
- [8] R. McClure, D. Balasubramanian, Y. Sun, M. Bobrovskyy, P. Sumby, C. A. Genco, C. K. Vanderpool and B. Tjaden, “Computational Analysis of Bacterial RNA-Seq Data,” *Nucleic Acids Res*, Vol. 41, pp. 140, 2013.
- [9] W. Huang da, B. T. Sherman and R. A. Lempicki, “Systematic and Integrative Analysis of Large Gene Lists Using DAVID Bioinformatics Resources,” *Nat Protoc*, Vol. 4, pp. 44-57, 2009.
- [10] S. H. Kim, S. K. Kim, K. H. Jung, Y. K. Kim, H. C. Hwang, G. R. Sam and Y. G. Chai, “Proteomic Analysis of the Oxidative Stress Response Induced by Low-Dose Hydrogen Peroxide in *Bacillus anthracis*,” *J Microbiol Biotechnol*, Vol. 23, No. 6, pp. 750-758, 2013.
- [11] E. R. Schafer, M. J. Oneal, M. L. Madsen, F. C. Minion, “Global Transcriptional Analysis Of *Mycoplasma Hypopneumoniae* Following Exposure to Hydrogen Peroxide” *Microbiology*, Vol. 153, pp. 3785-3790, 2007.
- [12] S. Altuvia, D. Weinstein-Fischer, A. Zhang, L. Postow and G. Storz, “A Small, Stable RNA Induced by Oxidative Stress : Role as a Pleiotropic Regulator and Antimitator,” *Cell*, Vol. 90, No. 1, pp. 43-53, 1997.
- [13] N. Delibas and S. Forst, “MicF : an Antisense RNA Gene Involved in Response of *Escherichia coli* to Global Stress Factors,” *J Mol Biol*, Vol. 313, No. 1, pp. 1-12, 2001.