

Acetic Acid Recovers Microtubule Disassembly Caused by *Clostridium difficile* Toxin A in Human Colonocytes through Increased Tubulin Acetylation

I Na Yoon and Ho Kim*

Division of Life Science and Chemistry, College of Natural Science, Daejin University, Pocheon, Gyeonggido 487-711, Korea

Received April 10, 2018 / Revised April 23, 2018 / Accepted August 8, 2018

Clostridium difficile (*C. difficile*) toxin A is known to cause acute gut inflammation in humans and animals by triggering cytoskeletal disorganization in gut epithelial cells. In human colonocytes, toxin A blocks microtubule assembly by directly increasing the enzymatic activity of histone deacetylase-6 (HDAC-6), a tubulin-specific deacetylase, thereby markedly decreasing tubulin acetylation, which is essential for microtubule assembly. Microtubule assembly dysfunction-associated alterations (i.e., toxin A-exposed gut epithelial cells) are believed to trigger barrier dysfunction and gut inflammation downstream. We recently showed that potassium acetate blocked toxin A-induced microtubule disassembly by inhibiting HDAC-6. Herein, we tested whether acetic acid (AA), another small acetyl residue-containing agent, could block toxin A-induced tubulin deacetylation and subsequent microtubule assembly. Our results revealed that AA treatment increased tubulin acetylation and enhanced microtubule assembly in an HT29 human colonocyte cell line. AA also clearly increased tubulin acetylation in murine colonic explants. Interestingly, the AA treatment also alleviated toxin A-induced tubulin deacetylation and microtubule disassembly, and MTT assays revealed that AA reduced toxin A-induced cell toxicity. Collectively, these results suggest that AA can block the ability of toxin A to cause microtubule disassembly-triggered cytoskeletal disorganization by blocking toxin A-mediated deacetylation of tubulin.

Key words : Acetic acid, *Clostridium difficile* toxin A, colitis, microtubule assembly, tubulin acetylation

서 론

Clostridium difficile (*C. difficile*)은 그람양성균으로서 급성 위막성대장염(Pseudomembranous colitis) 질환의 원인균으로 알려져 있다[7-9, 15, 17-19, 23]. *C. difficile*이 분비하는 독신 A가 장내 염증을 유발하는 것으로 알려져 있다. 독신 A는 점막 상피세포의 세포골격을 파괴하여 극단적인 세포형태 변형(세포원형화)을 일으킨다[6, 13, 15, 16, 19, 22, 24]. 독신 A는 액틴 필라멘트 형성에 관여하는 Rho, Rac, cdc42 단백질들을 불활성화시킨다고 알려져 있다. 최근 연구에 의하면 독신 A는 미세소관 형성 과정도 억제한다고 알려져 있다[10, 13-16, 23]. 독신 A가 HDAC-6 (histone deacetylase-6) [5] 효소의 활성을 촉진시켜 튜블린 단백질의 탈아세틸화를 촉진시키고 이로 인해 미세소관 형성이 감소한다고 알려져 있다[28]. 독신 A가 활성화시키는 HDAC-6를 제어하는 것이 점막 상피세포의 극단적인 세포모양 변형을 막고 이를 통해 장염 치료가 가능함을

보여준다. 실제로 아세틸기를 포함하는 간단한 구조의 potassium acetate가 HDAC-6 효소를 억제하여 독신 A가 유발하는 미세소관 불 형성을 회복시킨다고 알려져 있다[25]. 이들 결과들은 *C. difficile* 독신 A의 세포독성을 차단하는 과정에서 HDAC-6 효소가 주요 표적분자임을 보여준다. 이상의 보고를 바탕으로, 연구자 등은 초산(acetic acid)이 HDAC-6 효소에 작용하여 튜블린 아세틸화에 영향을 미치는지 확인해보고자 하였다.

초산은 세포막 투과성이 높으며[1] 구조적으로 아세틸 잔기를 포함하는 다른 화학물질들과 비교해서 입체장애가 가장 적은 것으로 알려져 있다[30]. 초산은 음식을 통해 유입되거나 또는 장내 미생물에 의해 생산되는 것으로 알려져 있다[20]. 그리고 소장과 대장 상피세포의 분열과 분화와 같은 활동에 필요한 에너지원으로 활용된다고도 알려져 있다[4, 33]. 실제로 초산은 소화관과 혈관 속에서 높은 농도로 관찰된다[20]. 많은 연구에서 초산은 이미 장염을 억제하거나 소화기 점막 상피세포의 장벽기능을 강화시켜준다고 알려져 있다[11]. 예를 들어 초산은 Flagellin에 의해 증가하는 IL-8을 유의하게 억제한다[12]. 하지만 장염을 억제하는 초산의 작용기작은 아직 명확하게 규명되어 있지 않다.

본 연구에서 연구자 등은 초산이 인간 대장상피세포 속 튜블린 아세틸화를 유의하게 증가시킴을 확인하였다. 초산 자극은 생쥐 대장의 점막 상피세포 속 튜블린의 아세틸화도 유의

*Corresponding author

Tel : +82-31-539-1855, Fax : +82-31-539-1850

E-mail : hokim@daejin.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.

하게 증가시켰다. 더욱이 초산은 독신A에 의해 야기되는 튜블린 단백질의 탈아세틸화 현상과 미세소관 불 형성 과정도 유의하게 회복시켰다. 이와 같은 초산의 효능이 독신에 의한 세포독성도 차단할 수 있음을 확인하였다. 이상의 결과들은 초산이 *C. difficile* 독신A가 유발하는 세포골격 파괴현상을 억제함은 물론 세포독성까지 차단할 수 있는 탁월한 치유 효능이 있음을 보여준다.

재료 및 방법

시약

아세틸화된 튜블린 항체, 초산, MTT (3-[4,5-dimethyl-thiazole-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) dye 등은 Santa Cruz 사(CA, USA)와 Sigma Aldrich 사(St. Louis, Mo, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다.

세포배양

인간 대장 상피 세포주인 HT29는 ATCC 사(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 분양 받았으며 McCoy's 5A 배지(Invitrogen, Carlsbad, CA)에 10% FCS (fetal calf serum, Invitrogen, USA)와 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Gland Island, NY)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다[25].

Immunoblot analysis

약물을 처리한 세포는 lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40)를 넣고 초음파를 이용 파쇄하였다. 단백질을 분리하기 위하여 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 단백질들은 nitrocellulose membrane으로 다시 transfer하고 5% skim milk 속에서 1차 항체를 12시간 반응하였다. 그 후 2차 항체를 상온에서 2시간 동안 추가 반응하고 New England Biolabs 사의 LumiGlo reagent를 이용하여 발색을 유도한 다음 chemiluminescence image analyzer (Fusion FX; Vilber Lourmat, Germany)를 이용하여 이미지화하였다[27].

세포독성 평가

96 well plate에 HT29세포를(10^3 cell/well) 준비하고 초산을 48시간 동안 처리한 다음 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium) dye를 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 상등액을 제거하고 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 넣은 후 570 nm에서 ELISA reader (Model 3550, Bio-Rad, Canada)를 이용하여 측정하였다[22].

Confocal laser scanning microscope

형광면역염색(immunofluorescent staining)을 위해서 멸균

된 cover glass를 12 well plate에 넣고 그 위에 HT29 세포를 분주하였다. 50% 정도의 세포 밀집도를 나타낼 때, 5 mM 초산을 1시간 동안 전 처리한 다음 독신A(3 nM)를 처리하고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 세포를 4% PFA (Paraformaldehyde)를 이용하여 고정된 다음 Triton-X 100을 처리하여 세포막을 천공시켰다. 그 후 아세틸화된 튜블린 항체를 처리하고 (100:1), 4°C에서 24시간 동안 반응하였다. 수세 후 FITC가 conjugation된 2차 항체를 상온에서 30분간 반응한 다음 공초점레이저현미경을 이용하여 미세소관을 검출하였다[28].

적출한 생쥐 대장 배양 실험(mouse colonic explants)

본 연구는 대전대학교 동물실험위원회(Animal Care and Use Committee of Daejin University)의 방침 및 범규에 따라 진행되었다(승인번호: 2013-03). 고농도 마취제(avertin)를 이용 희생시킨 생쥐에서 대장을 적출하였다. 대장 내 미생물을 제거하기 위하여 항생제(kanamycin, ampicillin)가 포함된 배양액에서 3회 수세하였다. 대장은 반으로 잘라 펼쳐진 모양으로 6 well plate에서 넣은 다음 초산을 각각 50 mM, 500 mM 농도로 처리하고 37°C 인큐베이터에서 5시간 동안 배양하였다. 그 후 슬라이드글라스를 이용 대장 점막을 긁어 모아서 점막 상피세포 추출액을 얻은 다음 튜블린 단백질의 아세틸화 변화를 분석하였다[21].

Statistical analysis

모든 실험은 3회 반복으로 행하여 표준오차로 나타내었고 SIGMA-STAT professional statistics software program (Jandel Scientific Software, USA)의 t-테스트를 이용하여 유의성을 검정하였다[31].

결과 및 고찰

초산은 대장상피세포 속 튜블린 단백질의 아세틸화를 증가 시킴

이전 연구에서 연구자 등은 *C. difficile* 독신A가 대장상피세포 속 튜블린의 탈아세틸화를 증가시켜 미세소관의 형성을 억제한다고 보고하였다[28]. 독신A에 의한 튜블린의 탈아세틸화는 HDAC-6 효소 활성화와 연관이 있다[28]. 연구자 등은 potassium acetate가 HDAC-6를 억제하여 독신A에 의한 미세소관 불 형성 과정을 회복시킬 수 있음을 확인하였다[25]. 본 연구에서는 초산(acetic acid)이 HDAC-6 효소를 억제하여 튜블린 단백질의 아세틸화를 증가시키는지 확인해보고자 하였다. 이를 위해, 인간 대장상피세포(HT29)에 초산(5 mM)을 시간 별로 처리한 뒤 아세틸화된 튜블린의 양을 확인하였다. 초산 처리 후 1시간부터 아세틸화된 튜블린 양이 유의하게 증가하였으며 9시간까지 유지됨을 확인하였다(Fig. 1A). 다음으로 연구자 등은 초산을 농도 별로 처리하고 튜블린 아세틸화 변화

를 확인하였다. Fig. 1B에서처럼, 초산 농도에 비례하여 아세틸화된 튜블린 양이 증가함을 확인하였다. 1 mM 초산 농도에서 튜블린 단백질의 아세틸 양이 유의하게 증가하였으며 10 mM까지 유지됨을 확인하였다(Fig. 1B). 하지만 많은 연구에서 고농도의 초산이 세포 독성을 나타낸다고 알려져 있다[29]. 실제로 고농도의 초산에 의한 점막손상 현상을 이용하여 급성

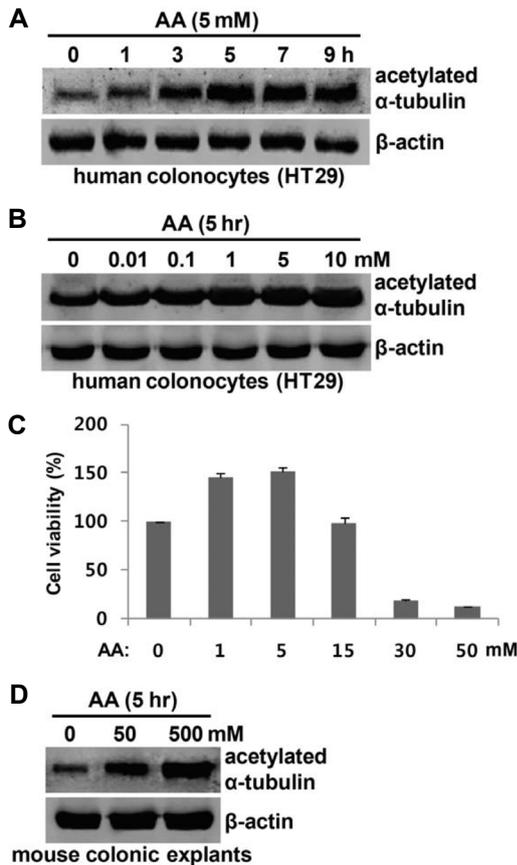


Fig. 1. Acetic acid increases the acetylation of α -tubulin in human colonocytes. A. HT29 human colonocytes were incubated with acetic acid (AA, 5 mM) for the indicated durations. Cell lysates were subjected to 10% polyacrylamide gel electrophoresis, and blots were probed with antibodies against acetylated α -tubulin and β -actin. The presented results are representative of three independent experiments. B. HT29 cells were incubated with 0, 0.01, 0.1, 1, 5, and 10 mM AA for 5 hr. C. Cells were incubated with AA (0, 1, 5, 15, 30, and 50 mM) for 48 hr. Cell viability was measured by MTT assay and is expressed as a percentage of the results from untreated controls. The bars represent the mean \pm SE of three experiments performed in triplicate. D. Mouse colonic explants were incubated with medium (con) or AA (50 and 500 mM) for 5 hr, and the level of acetylated tubulin in colonic epithelial cells was measured by immunoblot analysis. The presented results are representative of three independent experiments.

장염 동물모델을 확립하기도 한다[26]. 따라서 연구자 등은 먼저 인간 대장상피세포에 대한 초산의 독성 농도를 확인하였다. 이를 위해 초산을 HT29 세포에 농도 별로(1, 5, 15, 30, 50 mM) 처리하고 MTT assay를 실시하여 세포독성을 평가하였다. Fig. 1C에서처럼, 15 mM 초산의 경우, 인간 대장상피세포에 대해서 세포독성이 전혀 없음을 확인하였다. 하지만 30 mM 농도의 초산 자극은 약 80%의 세포독성을 야기하였다. 본 연구에서 사용한 초산 농도가 5 mM인 점을 감안하면(Fig. 1A), 초산에 의한 튜블린 아세틸화 증가가 독성에 의해 초래된 현상이 아님을 보여준다. 동물의 대장에서 초산의 효능을 재확인하기 위해 생쥐 대장을 적출하고 초산(50 mM과 500 mM)을 6시간 동안 처리하였다. 그리고 생쥐의 대장 점막-상피세포 속 튜블린 단백질의 아세틸화 변화를 확인하였다. 흥미롭게도 초산의 농도에 비례하여 상피세포 속 아세틸화된 튜블린의 양이 증가함을 확인하였다(Fig. 1D). 이 결과는 초산이 동물의 대장 상피세포 속 튜블린 단백질의 아세틸화를 증가시키는 효능이 있음을 보여준다. 또한 초산이 대장 점막에 대해 높은 투과성을 가지고 반응함을 보여준다.

인간 대장상피세포에서 튜블린 단백질의 아세틸화를 증가시키는 농도가 potassium acetate (50 mM)에 비해 초산(5 mM)이 상대적으로 낮게 나타났다. 이는 세포막을 통과하는 투과도 차이에 기인한다고 추정하고 있다. 실제로 초산은 구조적으로 아세틸 잔기를 포함하는 화학물질 중 입체장애가 가장 적은 것으로 알려져 있고[30] 또한 상대적으로 높은 세포 투과도를 보인다고 알려져 있다[1].

초산은 인간 대장상피세포 속 미세소관 형성을 촉진함

미세소관 구성 단백질인 튜블린의[2, 3, 28] 아세틸화는 미세소관 조립과정에 있어서 가장 중요하다[28, 32]. 따라서 초산 자극에 의해 증가한 튜블린 아세틸화가 미세소관 형성 촉진으로 이어지는지 확인이 필요하다. 이를 위해, HT29 세포에 초산(5 mM)을 24시간 동안 처리하고 아세틸화된 튜블린 항체를 이용하여 세포 속 미세소관을 시각화하였다. Fig. 2에서처럼, 섬유 구조의 미세소관이 대조군 대장상피세포 속에서 관찰되었다(왼쪽 위 그림). 하지만 5 mM 초산을 처리한 대장상피세포에서는 대조군에 비해 굵고 강하게 염색된 미세소관이 관찰되었다(왼쪽 아래 그림). 3차원 이미지에서는 증가된 미세소관을 더 명확하게 확인할 수 있었다(오른쪽 위/아래 그림). 이 결과는 초산에 의해 증가한 튜블린의 아세틸화가 미세소관-중합과정 증가로 이어졌음을 보여준다.

초산은 독신A에 의한 튜블린 탈아세틸화와 미세소관 불형성을 억제함

연구자 등은 초산이 세포독성 없이 인간 대장상피세포 속 튜블린의 아세틸화를 증가시켜 미세소관 형성을 촉진시킴을 확인하였다(Fig. 1, Fig. 2). *C. difficile* 독신A가 튜블린의 탈아

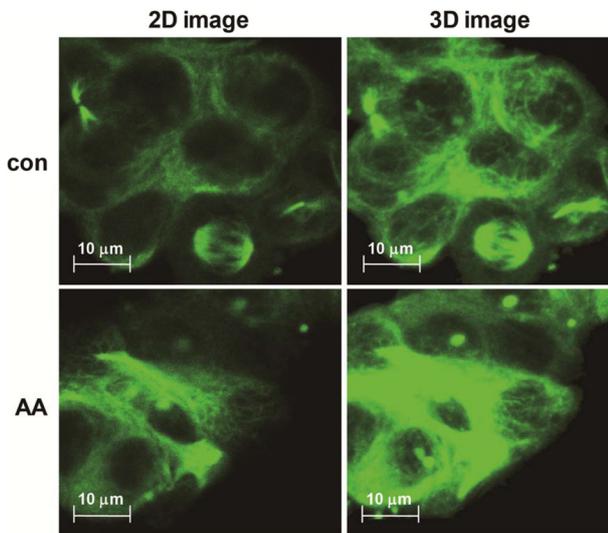


Fig. 2. AA increases microtubule assembly in human colonocytes. HT29 human colonocytes were grown on coverslips, incubated with medium without (con) or with AA (5 mM) for 24 hr, fixed, and immunostained with an anti-acetylated α -tubulin antibody. Microtubule organization was visualized by confocal microscopy (left lanes show 2D images; right lanes show 3D images composed of 20 sections). The results shown are representative of three independent experiments.

세틸화를 통해 미세소관 형성을 차단하고 이를 통해 세포독성을 야기한다고 알려져 있다[25, 28]. 따라서 연구자 등은 초산이 독신의 세포독성을 억제할 수 있는지 확인해보고자 하였다. 이를 위해, HT29 세포에 초산(5 mM)을 1시간 동안 전 처치한 다음 독신A(3 nM)를 5시간 처치하고 튜블린 단백질의 아세틸화 변화를 확인하였다. Fig. 3A에서처럼, *C. difficile* 독신A는 인간 대장상피세포 속 튜블린 단백질의 탈아세틸화를 증가시켰다. 그러나 초산을 전 처치한 세포에서는 독신A가 초래하는 튜블린 탈아세틸화가 유의하게 감소함을 확인하였다(Fig. 3A). 대조군 세포에서 검출되는 아세틸화된 튜블린 양보다도 많은 양이 초산과 독신 처치군에서 관찰되었다(Fig. 3A). 이는 튜블린 단백질의 아세틸화에 대한 초산의 영향이 매우 크다는 것을 보여준다. 다음으로 세포 속 미세소관 변화를 평가해보았다. Fig. 3B에서처럼, 미세소관이 강하게 염색되어 관찰되는 대조군과는 달리 독신A가 처치된 세포에서는 미세소관이 희미하게 검출되었다. 둥그랗고 작아진 세포 모양(세포원형화)이 관찰되었으며 이는 전형적인 독신A 세포 독성을 보여준다[14, 15, 22]. 그러나 초산을 처치한 세포에서는 독신A 자극에 의한 미세소관 불 형성이 유의하게 회복됨을 확인하였다(Fig. 3B). 독신A 자극으로 나타나는 소형화된 세포 크기도 초산에 의해 정상 크기로 회복됨을 확인하였다. 이상의 결과는 초산에 의한 미세소관 형성 촉진 과정이 독신A가 야기하는 세포골격계 파괴를 회복시킬 수 있음을 보여준다.

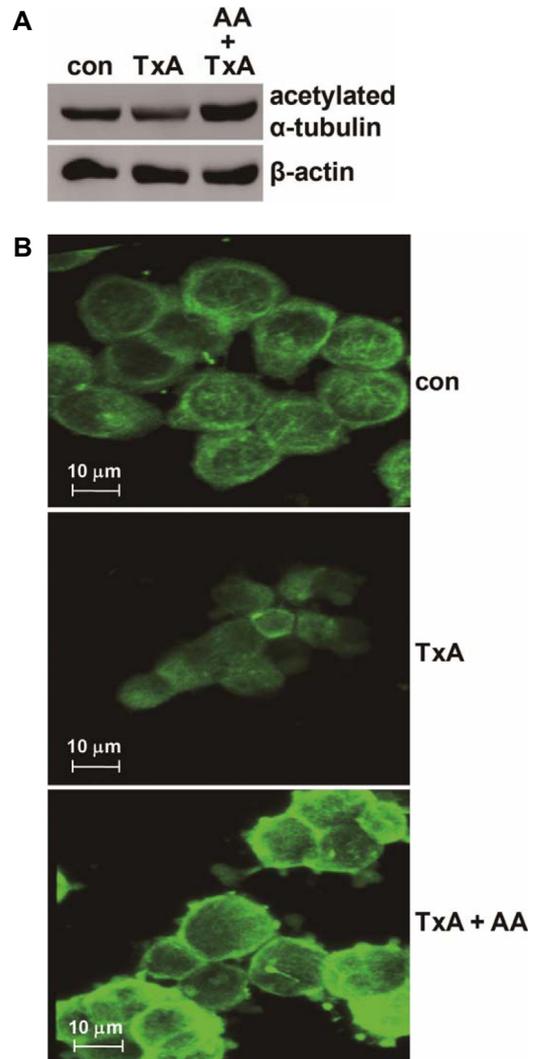


Fig. 3. AA recovers toxin A-induced α -tubulin deacetylation and microtubule disassembly. A. HT29 cells were incubated with 5 mM AA for 1 hr and then exposed to toxin A 5 hr. Cell lysates were subjected to 10% polyacrylamide gel electrophoresis, and blots were probed with antibodies against acetylated α -tubulin and β -actin. The presented results are representative of three independent experiments. B. HT29 cells were grown on coverslips, pretreated with AA (5 mM) for 1 hr, incubated with medium (con), toxin A (3 nM, TxA), or toxin A plus AA (TxA + AA) for 24 hr, and then immunostained with anti-acetylated α -tubulin. The presented results are representative of three independent experiments.

초산은 독신A가 야기하는 세포독성을 회복시킴

인간 대장상피세포에서 *C. difficile* 독신A는 세포골격계를 파괴시켜 세포독성을 초래한다고 알려져 있다[16, 22-24]. 독신A가 초래하는 미세섬유와 미세소관 파괴과정이 극단적인 세포 원형화를 야기하고 이로 인해 세포독성이 나타난다[16,

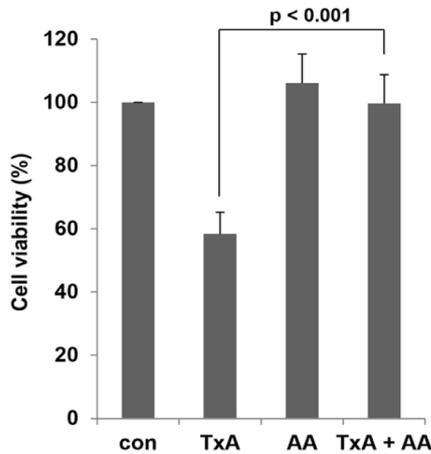


Fig. 4. AA recovers toxin A-induced cell toxicity in human colonocytes. HT29 colonocytes were incubated with 5 mM AA for 1 hr and exposed to toxin A for 48 hr. Cell viability was measured by MTT assay and is expressed as a percentage of the results from untreated controls. The bars represent the mean \pm SE of three experiments performed in triplicate.

22-24]. 따라서 독신A가 유발하는 세포골격계 변형을 감소시키는 것이 세포독성을 차단함은 물론 장염까지 완화시킬 수 있는 주요 치료 전략이 될 수 있다. 이를 바탕으로 연구자 등은 미세소관 조립을 촉진시키는 초산이 독신A의 세포독성도 감소시키는 지 확인하였다. 이를 위해, HT29 세포에 초산(5 mM)을 1시간 동안 전 처치한 다음 독신A(3 nM)를 48시간 처치하고 MTT assay를 수행하여 세포독성을 평가하였다. Fig. 4에서 처럼, 독신A는 인간 대장상피세포에 대해 강한 세포독성을 야기하였다(~40%). 그러나 초산을 처치한 세포에서는 독신A에 의한 세포독성이 유의하게 회복됨을 확인하였다(~5%). 이는 초산에 의한 미세소관 형성 촉진이 독신A가 야기하는 세포독성 유발 경로들을 효과적으로 차단할 수 있음을 보여준다.

지금까지 연구에 의하면 독신A에 의한 미세섬유 변형이 세포독성의 주요 원인으로 보고되어 왔다[13, 14, 16]. 하지만 초산에 의한 미세소관 형성 강화가 독신A에 의한 세포독성을 90% 이상 회복시킴을 확인하였다. 이는 독신A에 의한 세포독성 유발과정에서 미세소관 파괴 과정이 핵심적인 경로임을 보여준다고 할 수 있다. 결론적으로 볼 때, 미세소관 형성을 촉진하는 초산이 *C. difficile* 독신A가 유발하는 세포골격 파괴와 세포독성을 유의하게 억제함으로써 장염을 효과적으로 완화시키는 물질임을 보여준다.

감사의 글

이 논문은 2018학년도 대전대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

References

1. Alger, J. R. and Prestegard, J. H. 1979. Nuclear magnetic resonance study of acetic acid permeation of large unilamellar vesicle membranes. *Biophys. J.* **28**, 1-13.
2. Arregui, L. C., Munoz-Fontela, C., Serrano, S., Barasoain, I. and Guinea, A. 2002. Direct visualization of the microtubular cytoskeleton of ciliated protozoa with a fluorescent taxoid. *J. Eukaryot. Microbiol.* **49**, 312-318.
3. Bicek, A. D., Tuzel, E., Demtchouk, A., Uppalapati, M., Hancock, W. O., Kroll, D. M. and Odde, D. J. 2009. Anterograde microtubule transport drives microtubule bending in LLC-PK1 epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* **20**, 2943-2953.
4. Finnie, I. A., Dwarakanath, A. D., Taylor, B. A. and Rhodes, J. M. 1995. Colonic mucin synthesis is increased by sodium butyrate. *Gut* **36**, 93-99.
5. Haggarty, S. J., Koeller, K. M., Wong, J. C., Grozinger, C. M. and Schreiber, S. L. 2003. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 4389-4394.
6. Han, Y., Malak, H., Chaudhary, A. G., Chordia, M. D., Kingston, D. G. and Bane, S. 1998. Distances between the paclitaxel, colchicine, and exchangeable GTP binding sites on tubulin. *Biochemistry* **37**, 6636-6644.
7. He, D., Hagen, S. J., Pothoulakis, C., Chen, M., Medina, N. D., Wamy, M. and LaMont, J. T. 2000. *Clostridium difficile* toxin A causes early damage to mitochondria in cultured cells. *Gastroenterology* **119**, 139-150.
8. Hecht, G., Pothoulakis, C., LaMont, J. T. and Madara, J. L. 1988. *Clostridium difficile* toxin A perturbs cytoskeletal structure and tight junction permeability of cultured human intestinal epithelial monolayers. *J. Clin. Invest.* **82**, 1516-1524.
9. Henriques, B., Florin, I. and Thelestam, M. 1987. Cellular internalisation of *Clostridium difficile* toxin A. *Microb. Pathog.* **2**, 455-463.
10. Ho, J. G., Greco, A., Rupnik, M. and Ng, K. K. 2005. Crystal structure of receptor-binding C-terminal repeats from *Clostridium difficile* toxin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 18373-18378.
11. Hou, J. K., Abraham, B. and El-Serag, H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am. J. Gastroenterol.* **106**, 563-573.
12. Ishiguro, K., Ando, T., Maeda, O., Watanabe, O. and Goto, H. Suppressive action of acetate on interleukin-8 production via tubulin-alpha acetylation. *Immunol. Cell Biol.* **92**, 624-630.
13. Just, I., Fritz, G., Aktories, K., Giry, M., Popoff, M. R., Boquet, P., Hegenbarth, S. and von Eichel-Streiber, C. 1994. *Clostridium difficile* toxin B acts on the GTP-binding protein Rho. *J. Biol. Chem.* **269**, 10706-10712.
14. Just, I., Selzer, J., von Eichel-Streiber, C. and Aktories, K. 1995. The low molecular mass GTP-binding protein Rho is affected by toxin A from *Clostridium difficile*. *J. Clin. Invest.* **95**, 1026-1031.
15. Just, I., Selzer, J., Wilm, M., von Eichel-Streiber, C., Mann,

- M. and Aktories, K. 1995. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* **375**, 500-503.
16. Just, I., Wilm, M., Selzer, J., Rex, G., von Eichel-Streiber, C., Mann, M. and Aktories, K. 1995. The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. *J. Biol. Chem.* **270**, 13932-13936.
 17. Kelly, C. P. and LaMont, J. T. 1998. *Clostridium difficile* infection. *Annu. Rev. Med.* **49**, 375-390.
 18. Kelly, C. P. and LaMont, J. T. 2008. *Clostridium difficile*--more difficult than ever. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1932-1940.
 19. Kelly, C. P., Pothoulakis, C. and LaMont, J. T. 1994. *Clostridium difficile* colitis. *N. Engl. J. Med.* **330**, 257-262.
 20. Kim, C. H., Park, J. and Kim, M. Gut microbiota-derived short-chain Fatty acids, T cells, and inflammation. *Immune Netw.* **14**, 277-288.
 21. Kim, D. H., Hwang, J. S., Lee, I. H., Nam, S. T., Hong, J., Zhang, P., Lu, L. F., Lee, J., Seok, H., Pothoulakis, C., Lamont, J. T. and Kim, H. The insect peptide CopA3 increases colonic epithelial cell proliferation and mucosal barrier function to prevent inflammatory responses in the gut. *J. Biol. Chem.* **291**, 3209-3223.
 22. Kim, H., Kokkotou, E., Na, X., Rhee, S. H., Moyer, M. P., Pothoulakis, C. and Lamont, J. T. 2005. *Clostridium difficile* toxin A-induced colonocyte apoptosis involves p53-dependent p21(WAF1/CIP1) induction via p38 mitogen-activated protein kinase. *Gastroenterology* **129**, 1875-1888.
 23. Kim, H., Rhee, S. H., Kokkotou, E., Na, X., Savidge, T., Moyer, M. P., Pothoulakis, C. and LaMont, J. T. 2005. *Clostridium difficile* toxin A regulates inducible cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis in colonocytes via reactive oxygen species and activation of p38 MAPK. *J. Biol. Chem.* **280**, 21237-21245.
 24. Kim, H., Rhee, S. H., Pothoulakis, C. and Lamont, J. T. 2007. Inflammation and apoptosis in *Clostridium difficile* enteritis is mediated by PGE2 up-regulation of Fas ligand. *Gastroenterology* **133**, 875-886.
 25. Lu, L. F., Kim, D. H., Lee, I. H., Hong, J., Zhang, P., Yoon, I. N., Hwang, J. S. and Kim, H. Potassium acetate blocks *Clostridium difficile* toxin A-induced microtubule disassembly by directly inhibiting histone deacetylase 6, thereby ameliorating inflammatory responses in the gut. *J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 693-699.
 26. Maduzia, D., Matuszyk, A., Ceranowicz, D., Warzecha, Z., Ceranowicz, P., Fyderek, K., Galazka, K. and Dembinski, A. The influence of pretreatment with ghrelin on the development of acetic-acid-induced colitis in rats. *J. Physiol. Pharmacol.* **66**, 875-885.
 27. Na, X., Zhao, D., Koon, H. W., Kim, H., Husmark, J., Moyer, M. P., Pothoulakis, C. and LaMont, J. T. 2005. *Clostridium difficile* toxin B activates the EGF receptor and the ERK/MAP kinase pathway in human colonocytes. *Gastroenterology* **128**, 1002-1011.
 28. Nam, H. J., Kang, J. K., Kim, S. K., Ahn, K. J., Seok, H., Park, S. J., Chang, J. S., Pothoulakis, C., Lamont, J. T. and Kim, H. *Clostridium difficile* toxin A decreases acetylation of tubulin, leading to microtubule depolymerization through activation of histone deacetylase 6, and this mediates acute inflammation. *J. Biol. Chem.* **285**, 32888-32896.
 29. Ogawa, N., Satsu, H., Watanabe, H., Fukaya, M., Tsukamoto, Y., Miyamoto, Y. and Shimizu, M. 2000. Acetic acid suppresses the increase in disaccharidase activity that occurs during culture of caco-2 cells. *J. Nutr.* **130**, 507-513.
 30. Ouyang, B. and Howard, B. J. 2009. The monohydrate and dihydrate of acetic acid: a high-resolution microwave spectroscopic study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**, 366-373.
 31. Pothoulakis, C. and Lamont, J. T. 2001. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions II. The integrated response of the intestine to *Clostridium difficile* toxins. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280**, G178-183.
 32. Southwood, C. M., Peppi, M., Dryden, S., Tainsky, M. A. and Gow, A. 2007. Microtubule deacetylases, SirT2 and HDAC6, in the nervous system. *Neurochem. Res.* **32**, 187-195.
 33. Topping, D. L. and Clifton, P. M. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol. Rev.* **81**, 1031-1064.

초록 : *C. difficile* 독신이 야기하는 대장상피세포 미세소관 변형에 대한 초산의 억제 효능

윤이나 · 김 호*

(대전대학교 과학기술대학 생명화학부 생명과학전공)

급성위막성대장염(Pseudomembranous colitis)은 *C. difficile* 세균이 분비하는 독신A에 의해 유발되는 것으로 알려져 있다. 독신A에 의한 점막 상피세포의 장벽기능 감소가 발병 원인으로 알려져 있다. 최근 연구에 의하면 독신A는 대장상피세포 속 HDAC-6의 활성을 높여 튜블린의 탈아세틸화를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 튜블린 단백질의 탈아세틸화는 미세소관 불 형성을 초래하여 점막 상피세포의 극단적인 세포 형태 변형을 야기하게 되며 결국 상피세포의 고유기능인 장벽 기능이 파괴된다고 알려져 있다. 최근 연구자 등은 potassium acetate가 독신A에 의한 튜블린 탈아세틸화와 미세소관 불 형성을 회복시켜 장염을 유의하게 억제함을 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 아세틸기를 포함하는 또 다른 간단한 화학구조의 초산을 적용하여 독신A의 세포독성을 억제하는지 확인해보고자 하였다. 인간 대장상피세포에서 초산 자극은 튜블린 단백질의 아세틸화를 유의하게 증가시켰다. 또한 초산은 대장상피세포 속 미세소관 형성과정도 강하게 촉진시킴을 확인하였다. 초산은 독신A에 의한 튜블린 탈아세틸화와 미세소관 불 형성 그리고 세포독성 모두를 유의하게 회복시켰다. 이상의 결과는 초산에 의한 미세소관 형성 촉진이 독신A에 의해 초래되는 세포골격계 파괴와 그로 인한 세포독성을 억제할 수 있음을 보여준다. 따라서 초산이 독신A의 작용을 차단하여 위막성대장염 증상을 완화시킬 수 있는 치료제로서 개발 가치가 있음을 보여준다.