

dicA promoter DNA에 붙는 H-NS 단백질에 의한 *dicA* 유전자의 발현 조절

윤상훈^{1,2†} · 이연호^{1†} · 임현만^{1*}

¹충남대학교 생명시스템과학대학 생물과학과, ²(주)알테오젠

H-NS binding on *dicA* promoter DNA inhibits *dicA* gene expression

Sang Hoon Yun^{1,2†}, Yonho Lee^{1†}, and Heon M. Lim^{1*}

¹Department of Biological Sciences, College of Biological Sciences and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea

²Alteogen Inc., Daejeon 34054, Republic of Korea

(Received July 5, 2019; Revised August 9, 2019; Accepted August 26, 2019)

H-NS binds to promoter DNA and works as a general transcription silencer. DicA protein, by binding to the promoter DNA of *dicA*, activates *dicA* expression and at the same time inhibits expression of *dicF* and *dicB*, thus, exerting cell division control in *Escherichia coli*. H-NS complexed with a nucleoid protein Cnu was known to be involved in *dicA* expression. However, the exact nature of H-NS binding to *dicA* promoter DNA and the consequences of H-NS binding in expression of *dicA* is not clear. In this study, we explored the DNA binding activity of H-NS on the promoter DNA of *dicA* and found that H-NS binding occurs exclusively to the *dicA* promoter DNA. We never observed, however, H-NS binding at the vicinity of the *dicA* promoter. Temperature dependent oligomerization of H-NS was observed during DNA binding and the Cnu protein enhances the oligomerization process of H-NS binding. *In vivo* measurement of *dicA* expression in an *hms* deleted strain showed that *dicA* expression increased. These results demonstrated that H-NS binds specifically to *dicA* promoter DNA and functions as a transcription silencer.

Keywords: *Escherichia coli*, Cnu, *dicA*, filamentous growth, H-NS, temperature-dependent DNA binding

H-NS는 대장균에서 histone-like nucleoid-structuring protein으로 DNA에 결합하는 기능으로 처음 발견되었다(Cukier-Kahn *et al.*, 1972). 이후 *Escherichia coli* (Pon *et al.*, 1988), *Enterobacteriaceae* (La Teana *et al.*, 1989), *Salmonella* Typhimurium (Marsh and Hillyard, 1990) 등에서 H-NS의 유전자서열과 genomic DNA에서 위치가 확인되었다. 박테리아에서 H-NS의 역할은 전사의 조절에서 억제자로서 많이 알려져 있다. 대표적으로 H-NS는 *Salmonella* pathogenic island-2에 관여하고 있는 유전자의 발현을 억제하고 있다(Coombes *et al.*, 2005; Silphaduang *et al.*, 2007). 또한 H-NS는 *rnb*, *proU* (*E. coli*), *virF* (*Shigella*) 등 유전자의 발현을 억제하는 것이 보고되어 있다(Rajkumari *et al.*, 1996; Prosseda *et al.*, 1998; Afflerbach *et al.*, 1999; Dame *et al.*, 2002; Prosseda *et al.*, 2004). H-NS는 비특이적으로 DNA에 결합하는 것으로 알려져 있으며, DNA 결합 특이성에 관하여 많이 밝혀져 있지 않다. 다만 AT가 연속적으로 나타나는 curved DNA와 37°C보다 25°C에서 DNA에 잘 결합하는 것이 알려져 있다(White-Ziegler *et al.*, 1998; Azam and Ishihama, 1999). 온도에 의존적인 H-NS의 DNA 결합 특이성은 일반적으로 감염성 미생물의 독성 유전자 발현에 밀접하게 관련되어 있다(Coombes *et al.*, 2005; Silphaduang *et al.*, 2007).

대장균의 분열에 관여하는 *dicA* 유전자는 *dicB*, *dicF*의 연구에서 시작되었다(Bejar and Bouche, 1985). DicB 단백질은 MinC와 결합하여 대장균이 분열할 때 격벽 링을 형성하는 단

[†]These authors contributed equally to this work.

*For correspondence. E-mail: hmlim@cnu.ac.kr;
Tel.: +82-42-821-6276; Fax: +82-42-822-9690

백질인 FtsZ의 Z-ring 형성을 방해한다(de Boer *et al.*, 1990). 그리고 small RNA인 *dicF*는 *ftsZ*의 mRNA에 결합하여 FtsZ의 단백질 합성을 방해한다(Bouche and Bouche, 1989). DicA 단백질은 Oc (Operator of *dicC*)로 명명한 20 bp로 이루어진 염기서열과 결합한다. *dicA*와 *dicC* 유전자 사이에는 83 bp의 DNA 염기서열이 존재하며 이 *PdicAC* (*dicA*와 *dicC* 유전자의 프로모터 지역) 안 Oc에 DicA가 결합하면 *dicC* 방향으로의 전사는 억제되며 *dicA* 방향으로 전사가 이루어진다. 이렇게 두 유전자의 발현은 한쪽으로는 진행될 수 있다(Yun *et al.*, 2012). DicA 단백질은 *dicC*, *dicB*, *dicF*의 억제자로서, *dicA*의 발현이 억제되면, 과발현된 *dicF*, *dicB*에 의해 대장균이 분열하지 못하고 길게 자라는 사성성 생육(filamentous growth) 현상이 나타난다.

Cnu/H-NS 복합체가 *dicA* 발현에 미치는 영향은 Cnu 단백질의 9번째 아미노산인 라이신이 글루탐산으로 치환된 돌연변이인 CnuK9E의 발견으로 처음 보고되었다(Yun *et al.*, 2012). CnuK9E가 발현된 대장균은 25°C에서 정상적으로 분열하지만, 37°C에서는 분열하지 못하고 길게 자라는 사성성 생육이 유발된다. 선행 연구의 *in vivo* 실험결과로부터 CnuK9E/H-NS 복합체는 25°C보다 37°C에서 DicA의 Oc-DNA 결합을 억제하기 때문으로 보고되었다(Yun *et al.*, 2012). H-NS가 37°C보다 25°C에서 DNA에 더 잘 결합한다고 알려져 있음에 불구하고(White-Ziegler *et al.*, 1998), H-NS가 CnuK9E와 복합체를

형성하면 25°C보다 37°C에서 *dicA*의 발현을 더 잘 억제하는 이 현상은 기존에 알려진 H-NS의 온도 의존적 DNA 결합특성만으로는 명확하게 설명되지 않는다.

본 연구를 통해 *in vivo*와 *in vitro*에서 *dicA*와 *dicC* 유전자의 프로모터 지역인 *PdicAC*에서 Cnu와 H-NS의 역할을 분석하였다. Competitive gel shift assay를 통하여 H-NS가 *PdicAC* DNA에 염기서열 특이적으로 결합하며, H-NS가 Cnu와 복합체를 이루어 온도 의존적인 DNA 결합을 하는 것을 EMSA를 통해 분석하였다. 그리고 *in vivo* transcription assay와 real time PCR을 이용하여 H-NS가 대장균의 분열 초기에 *dicA*의 억제자로서 기능하는 것을 확인하였다.

재료 및 방법

사용균주와 플라스미드 및 배양조건

실험에 사용한 균주는 MG1655 또는 HB101으로부터 λ -Red recombinase를 이용한 유전자 제거 방법(Datsenko and Wanner, 2000)을 이용하여 *cmu*, *hns*를 제거한 균주(Kim *et al.*, 2005)를 사용하였으며 그 내용은 Table 1에, 사용한 플라스미드는 Table 2에 명시하였다. LB 배지는 DW 1 L 당 10 g Bacto trypton (BD Bioscience), 5 g Bacto yeast extract (BD Bioscience), 10 g NaCl을 넣어 121°C에서 20분 동안 멸균하여 사

Table 1. *E. coli* strains used in this study

Strain	Genotype	Reference or source
MG1655	Wild type, <i>F-λ-ilvG-rfb-50 rph-1</i>	CGSC#: 6300
MG1655 <i>hns</i>	Wild type, <i>F-λ-ilvG-rfb-50 rph-1 Δhns</i>	Kim <i>et al.</i> (2005)
MG1655 <i>cmu</i>	Wild type, <i>F-λ-ilvG-rfb-50 rph-1 Δcmu</i>	Kim <i>et al.</i> (2005)
HB101	<i>F- mcrB mrr hsdS20(rB-mB-) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(SmR) glnV44 λ-</i>	CGSC#: 12554
HL100	HB101 Δ <i>dicF</i> Δ <i>dicB</i>	Yun <i>et al.</i> (2012)
HL100 <i>cmu</i>	HB101 Δ <i>cmu</i>	In this study
HL100 <i>hns</i>	HB101 Δ <i>hns</i>	In this study
HL100 <i>dicA</i>	HB101 Δ <i>dicA</i>	In this study
BL21(DE3)	<i>F- dcm ompT hsdS(rB-mB-) gal λ(DE3)</i>	Novagen
BL21(DE3) <i>hns</i>	<i>F- dcm ompT hsdS(rB-mB-) gal λ(DE3) Δhns</i>	In this study

Table 2. Plasmid DNA used in this study

Name	Plasmid information	Usage	Reference or source
pHL 1125	pHL1038 [EcoRI & BamHI] + <i>PdicA</i> 103 bp	<i>In vivo</i> transcription assay	Yun <i>et al.</i> (2012)
pHL 1292	pCC1BAC [NotI] + <i>dicC</i> ~ <i>ydfD</i>	<i>PdicAC</i> cloning	Yun <i>et al.</i> (2012)
pET15b- <i>cmu</i>	pET15B [BamHI & NdeI] + <i>cmu</i>	Cnu purification	In this study
pET15b- <i>hns</i>	pET15B [BamHI & NdeI] + <i>hns</i>	H-NS purification	In this study

용하였다. 항생제 Ampicillin (Amp; Affymetrix)은 100 µg/ml, Kanamycin (Kan; Affymetrix)은 50 µg/ml, Chloroamphenicol (Cm; Boehringer Ingelheim)은 15 µg/ml 농도로 배양액에 희석하여 사용하였다.

Cnu 단백질과 H-NS 단백질 정제

H-NS 단백질 정제는 pET15b-hns/BL21(DE3) Δ hms를 LB (Amp) 액체배지 50 ml에 접종하여 37°C에서 16시간 동안 키운 배양액을 새로운 500 ml LB (Amp) 액체배지에 OD 0.05가 되도록 희석한 후 37°C에서 OD 0.6이 될 때까지 배양하였다. 이때 IPTG 농도가 0.1 mM이 되도록 한 후 18°C에서 16시간 동안 배양하였다. 배양한 대장균을 6000 G, 4°C에서 30분간 원심분리하여 수집한 후 Lysis 버퍼[50 mM Tris-HCl; pH 7.5, 500 mM NaCl, 10 mM β -Mercaptoethanol (MCE), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10% Glycerol] 50 ml에서 음파파쇄(Sonication)하여 세포를 부수었다. Cell lysate를 6000 G, 4°C에서 30분간 원심분리하여 상층액을 분리하고, 0.22 µm 필터에 여과시켰다. 여과한 상층액을 Ni-NTA affinity chromatography column (Qiagen)에 여과시킨 후 세척버퍼 A (50 mM Tris-HCl; pH 7.5, 1 M NaCl, 5 mM MCE, 1 mM PMSF, 10% Glycerol) 30 ml로 첫번째 세척을, 세척버퍼 B (50 mM Tris-HCl; pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM MCE, 1 mM PMSF, 10% Glycerol) 30 ml로 두번째 세척을 수행하였다. 이후 용출버퍼(50 mM Tris-HCl; pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM MCE, 1 mM PMSF, 10% Glycerol, 500 mM imidazole)를 7~80%의 농도 구배를 주면서 FPLC 기기(Amersham AKTA Prime, GE Healthcare)의 프로그램을 이용하여 6Xhis-H-NS를 분획별로 0.5 ml씩 40번에 나누어 용출시켰다. SDS-PAGE를 통해 H-NS 단백질이 포함된 분획을 확인 후, 확인된 6Xhis-H-NS 분획들을 모아 6~8 kDa 투석막에 넣고 투석버퍼(20 mM Tris-HCl; pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM MCE, 5% Glycerol) 5 L 안에서 24시간 동안 회전시켜 imidazole과 염을 제거하였다. 이후 정량된 6Xhis-H-NS의 단백질 100 µg당 thrombin (Thermo) 1 unit 비율로 4°C에서 18시간동안 처리하여 his-tag을 제거한 후 gel filtration column (Sephacryl™ S-100 HR, Sigma Aldrich)을 이용하여 his-tag이 제거된 H-NS를 정제하였다.

Cnu 단백질은 pET15b-cnu로 형질 전환시킨 BL21(DE3) Δ hms 균주를 H-NS와 같은 조건으로 배양한 후 50 ml LB (Amp) 배양액으로부터 수집한 세포를 음파파쇄하여 부수었다. Cell lysate에 Ni-NTA magnetic agarose beads (Ni-NTA magnetic beads, Bioneer) 100 µl를 넣고, 회전교반기에서 20분간 회전시켰다. 이후 상층액을 제거하고, 세척버퍼(50 mM Tris-HCl; pH

7.5, 200 mM NaCl, 10 mM MCE, 1 mM PMSF, 10% Glycerol) 1 ml로 풀어주고 다시 magnetic bead를 침전시킨 후 상층액을 제거하는 방식으로의 세척을 3회 반복하였다. 이후 용출버퍼 (50 mM Tris-HCl; pH 7.5, 200 mM NaCl, 200 mM imidazole, 10 mM MCE, 1 mM PMSF, 10% Glycerol) 50 µl로 2회에 나누어 용출시킨 단백질을 SDS-PAGE를 통해 확인하였다.

Competitive gel shift assay

Genomic DNA 10 ng, 0.5 µM CGRA-F (5'-GTTTCTGGC ATATCCCCG-3') primer, 0.5 µM CGRA-B (5'-CTTTCAGT AAACGTGCAGTTCCG-3') primer, 1 Unit phusion DNA polymerase (Thermo), 200 µM dNTP, 1X PCR 버퍼를 반응액에 첨가하여, 98°C 20초, 58°C 30초, 72°C 90초 반응을 35회 반복하여 *E. coli* genomic DNA의 1645081~1647173 (*ydfW*, *ydfX*, *dicC*, *dicA*, *ydfA*, *ydfB*, *ydfC* 유전자 포함) 부분을 증폭하였다. 증폭 후 PCR purification kit (Qiagen)을 이용하여 정제하였으며, 이를 TspRI (NEB) 10 unit으로 65°C에서 3시간 처리하여, 294 bp, 192 bp, 696 bp, 519 bp, 405 bp로 절단하였다. *dicA*와 *dicC*의 promoter를 포함하는 696 bp 부분을 138 bp, 334 bp, 224 bp로 나누는 DNA를 얻기 위해 PCR 방법을 이용하였다. 138-F (5'-GCTTCAGTGATTAATATCGT-3'), 138-B (5'-GATGAATATCGTAAGACGAAGC-3'), 334-F (5'-AT AAACTTGGGATCATACTGA-3'), 334-B (5'-AGAGACC TTTGGGTGTGTTG-3'), 224-F (5'-TGCTAAAGCCCTG AAAATC-3'), 224-B (5'-CTGGCAGTGCATTAACAG-3') primer를 사용하여 각 부분을 증폭하고, PCR purification kit (Qiagen)을 이용하여 정제하였다. 3개의 DNA를 100 nM이 되도록 혼합하여 결합 실험에 사용하였다. DNA와 H-NS 결합은 총 10 µl 반응액에 1X binding 버퍼(20 mM Tris-Cl; pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT), 다양한 농도의 H-NS를 넣고, 각 온도(25°C 또는 37°C)에서 10분 동안 반응시켰다. 5X 로딩버퍼(50% glycerol, 10 mM Tris-Cl; pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM MgCl₂)를 첨가한 후, 2% agarose 젤에서 50 V로 2시간 동안 25°C 또는 37°C에서 전기영동하였다.

EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)

*PdicAC*를 포함하는 334 base pair의 DNA는 Genomic DNA 10 ng, 0.5 µM CGRA-F (5'-GTTTCTGGCATATCCCCG-3') primer, 0.5 µM CGRA-B (5'-CTTTCAGTAAACGTGCAGT TCCG-3') primer, 1 Unit phusion DNA polymerase (Thermo), 200 µM dNTP, 1X PCR 버퍼를 반응액에 첨가하여, 98°C 20

초, 58°C 30초, 72°C 90초 반응을 35회 반복하여 증폭하였다. 증폭한 DNA를 10 nM로 희석하여 1X T4 polynucleotide kinase (PNK) 버퍼, PNK (TaKaRa) 5 Unit, 2 µl [r-32P]ATP (6000Ci/mmol) (PerkinElmer)으로 37°C에서 30분, 65°C에서 10분 반응 시킨 후 G-50 칼럼(GE Healthcare)으로 용출시켰다. 방사선동위원소로 표지된 DNA 0.4 nM, 1X EMSA 버퍼 (40 mM HEPES; pH 8.0, 8 mM MgCl₂, 60 mM potassium glutamate, 5 mM DTT, 0.05% NP-40), salmon sperm DNA (250 ng)과 정제된 단백질을 정해진 온도에서 10분간 반응 시킨 뒤 EMSA 로딩버퍼(50% glycerol, 1X EMSA 버퍼, 0.5% Bromophenol Blue, 0.5% Xylene cyanol)와 섞어 5% polyacrylamide 겔에 1X TBE를 이용하여 100 V의 전압으로 2시간 또는 3시간 동안 전기영동하였다.

Kanamycin IC₅₀ 측정을 통한 *dicA* 프로모터의 활성분석

IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration)는 효소나 세포, 미생물과 같은 숙주의 생장이나 활성을 50% 저해하는 저해제의 농도이다. *dicA* 유전자의 프로모터 활성을 알아보기 위하여 *dicA* promoter의 down stream에 Kanamycin 저항유전자를 위치시킨 pHL1125를 제작하였다(Fig. 4). pHL1125를 *cmu*, *hms* 유전자가 제거된 HL100 균주에 형질전환 시킨 후 Chloroamphenicol이 들어있는 액체배지에 37°C의 조건으로 16시간동안 배양한 후 Chloroamphenicol과 0, 20, 60, 80, 100 µg/ml의 서로 다른 농도의 Kanamycin이 들어있는 새로운 액체배지에 OD₆₀₀이 0.05가 되도록 희석한 뒤 25°C 또는 37°C, 200 rpm에서 3시간동안 배양한 후 OD₆₀₀의 수치를 측정하였다. Kanamycin의 농도증가에 의해 생장이 억제된 대장균의 OD₆₀₀의 값으로부터 생장이 50% 저해되었을 때의 Kanamycin의 농도를 Kanamycin IC₅₀로 결정하였다.

RNA 분리 및 정제

MG1655 혹은 MG1655 *cmu*, MG1655 *hms* 대장균을 LB 액체배지 3 ml에 접종하여 37°C에서 16시간동안 배양하였다. 배양된 대장균을 새로운 LB 액체배지 50 ml에 OD₆₀₀이 0.05가 되도록 희석하여 37°C에서 OD₆₀₀이 0.1, 0.2, 0.4가 될 때까지 배양하였다. 각각의 OD₆₀₀ 수치에 도달한 대장균 배양액으로부터 6 ml, 3 ml, 1.5 ml을 원심분리하여 배지를 제거하고 세포를 채집하였다. Protoplasting 버퍼(30 mM Tris-HCl; pH 8.0, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 20% Sucrose) 50 µl 넣어 대장균을 풀어준 뒤, lysozyme (50 mg/ml) 5 µl를 사용하여 25°C에서 5분동안 세포의 외벽을 파괴하였다. 파괴된 세포에 tri-reagent

(Solgent) 1 ml을 넣고 vortex로 충분히 섞어준 후 25°C에서 5분동안 반응시켰다. 200 µl chloroform를 첨가하고 25°C에서 10분동안 단백질을 DNA 와 RNA 층으로 분리되도록 하였다. 11,000 rpm, 4°C, 15분 원심분리하여 RNA가 포함되어 있는 상층액 500 µl를 조심스럽게 새로운 1.5 ml 튜브에 옮기고, isopropanol 500 µl를 넣고 잘 섞은 뒤 25°C에서 10분동안 반응하였다. 11,000 rpm, 4°C, 15분 원심분리하여 상층액을 조심스럽게 제거하고, 75% (ice cold) 에탄올 1 ml로 세척한 뒤, 11,000 rpm, 4°C, 15분 원심분리하여 상층액을 조심스럽게 제거한 후 상온에서 10분동안 건조시켰다. 완전히 건조된 RNA에 50 µl RNA storage 버퍼(Ambion)을 넣어 준 뒤 -70°C에 보관한다. 25°C에서 배양한 대장균의 RNA 분리 정제시 모든 배양조건을 25°C로 하였으며, 세포수집 이후 RNA 분리 및 정제 과정은 37°C와 동일한 방법으로 진행하였다.

Real time RT-qPCR

대장균의 OD₆₀₀ 수치에 따라 분리 정제된 각 RNA는 역전사 효소(Quantiscript Reverse Transcriptase, Qiagen)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 분리 정제된 RNA 2 µg, 0.5 mM dNTP mix, 10 µM random nonamer (TaKaRa), RNasin (Promega) 0.25 µl, RTase (Qiagen) 1 µl, 1X RT 버퍼를 총 20 µl 반응액에서 37°C, 2시간 동안 반응시켰다. 역전사 과정으로 만들어진 cDNA 1 µl, 200 nM *dicA*-RT-F (5'-GGAAACAAAAAATTTAACTATCG-3'), *dicA*-RT-B (5'-TCACTATCACCCCGTTC-3') primer, 1X CYBR (Bio-Rad)을 총 10 µl 반응액에 넣어 95°C 10초, 56°C 20초, 72°C 15초 반응을 40회 반복하여 결과를 수집하였다. 모든 결과는 RNA 분리 정제를 시작으로 real-time PCR까지를 4회 반복하여 수집하였다.

결 과

H-NS의 *PdicAC* 염기서열 특이적 결합

H-NS의 *PdicAC*에서의 영향을 조사하기 위해, H-NS 단백질을 이용하여 competitive gel shift assay를 수행하였다. 이는 H-NS 단백질이 어떤 특정한 DNA 단편에 염기서열 특이적으로 결합할 수 있는 능력이 있는지 agarose 겔을 이용하여 확인한 것이다. H-NS의 특이적인 DNA 결합을 알아보기 위해 *dicC*, *dicA* 유전자와 *PdicAC*를 포함하는 696 bp를 각각의 구역으로 나누어 PCR로 증폭한 서로 다른 크기의 4가지 DNA 단편들을 이용하였다(Fig. 1A). 이 DNA 단편들을 각각 100 nM의 동일

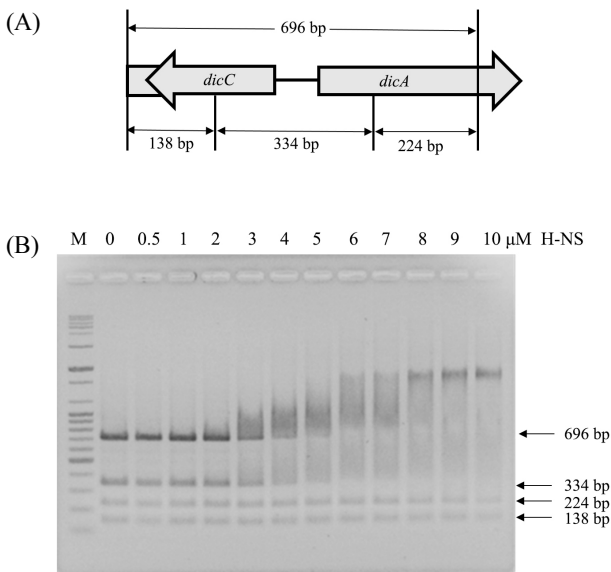


Fig. 1. Competitive gel binding assay of H-NS. Substrate DNA was prepared by PCR. 696-bp and each divided DNA fragments size is 138-bp, 334-bp, and 224-bp (A). And using purified H-NS protein with its concentration increased, competitive DNA binding assay was performed (B).

한 농도로 섞은 뒤, 0.5 μM에서부터 10 μM로 서서히 증가시킨 농도의 H-NS와 25°C에서 결합시킨 뒤 agarose 젤에서 전기영동 하였다. 그 결과, 696 bp와 334 bp 두 종류의 DNA 단편이 H-NS의 농도가 증가함에 따라 3 μM의 농도에서 서서히 up-shift 되다가 8 μM의 농도에서 안정된 밴드를 형성하는 것을 확인하였다. 하지만 나머지 138 bp와 224 bp의 DNA 단편들은 H-NS 농도가 증가함에도 전기영동에 의한 이동속도가 변하지 않았다(Fig. 1B). 이것은 H-NS가 696 bp와 334 bp 존재하는 염기서열에 특이적으로 결합하여 나타난 결과로 보여지며,

H-NS가 *dicA*와 *dicC* 유전자의 프로모터를 포함하는 334 bp의 *PdicAC*에 결합한다는 것을 의미한다.

H-NS의 *PdicAC* 온도의존적 결합

H-NS에서 334 bp를 substrate DNA로 25°C와 37°C에서 EMSA를 수행하였다. 25°C에서 H-NS는 4가지의 다른 mobility를 형성하는 단백질-DNA 복합체를 만드는데, mobility가 빠른 순서에 따라 I, II, III, IV로 명명하여 구분하였다(Fig. 2A). 이러한 mobility가 다른 그룹의 형성은 H-NS의 농도에 따라 변한다. 다수의 H-NS 분자가 DNA와 복합체를 이루어 molecular weight가 증가하는 oligomerization은 H-NS 분자의 특성 중 하나이다(Azam and Ishihama, 1999). 따라서 그룹 II, III, IV로 갈수록 mobility가 감소하는 현상은 점차 많은 H-NS 분자가 oligomerization에 참여하여 나타나는 현상이라고 생각된다.

H-NS의 농도가 0.05 μM에서부터 0.3 μM까지 증가함에 따라 H-NS/DNA 복합체는 mobility가 감소하는 I, II, III 그룹을 형성하는 패턴을 보이다가, 0.3 μM 이상이 되면 mobility가 가장 느린 IV 그룹을 형성하는 패턴에서 안정화된다(Fig. 2A). 하지만, 37°C에서는 H-NS 농도가 0.25 μM까지 변화가 없다가 0.3 μM이 되어야 빠른 mobility를 형성하는 I 그룹이 나타나기 시작해, 0.5 μM에서도 II 그룹만이 형성되는 것이 관찰되었다(Fig. 2B).

Cnu에 의한 H-NS의 중합 상태의 변화

H-NS가 *PdicAC*를 포함하는 334 bp에 특이적으로, 그리고 25°C에서 37°C 보다 강하게 결합하는 것을 확인한 실험 이후에, Cnu 단백질의 역할을 알아보기 위해 앞에서 기술한 실험

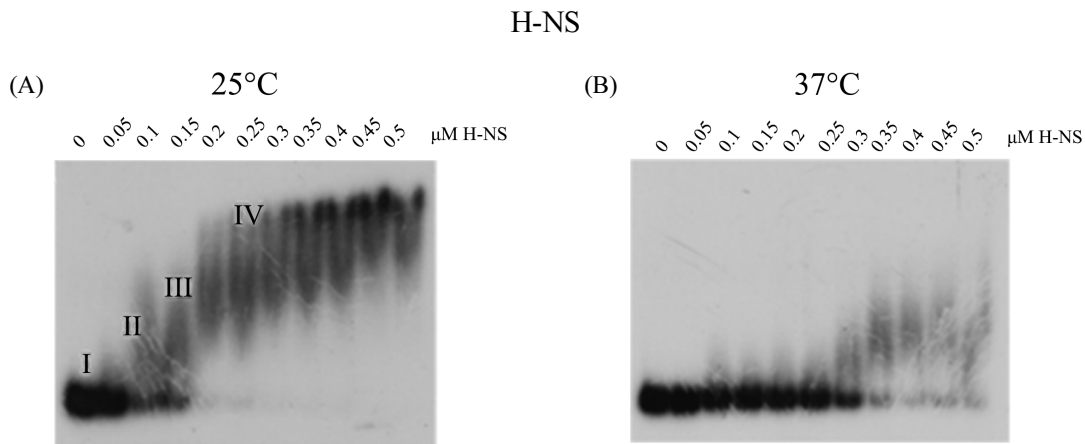


Fig. 2. EMSA used H-NS with DNA fragment 334-bp temperature dependently. H-NS concentration increasing from 0.05 μM to 0.5 μM 334-bp DNA fragment at 25°C (A), and 37°C (B).

Cnu / H-NS complex

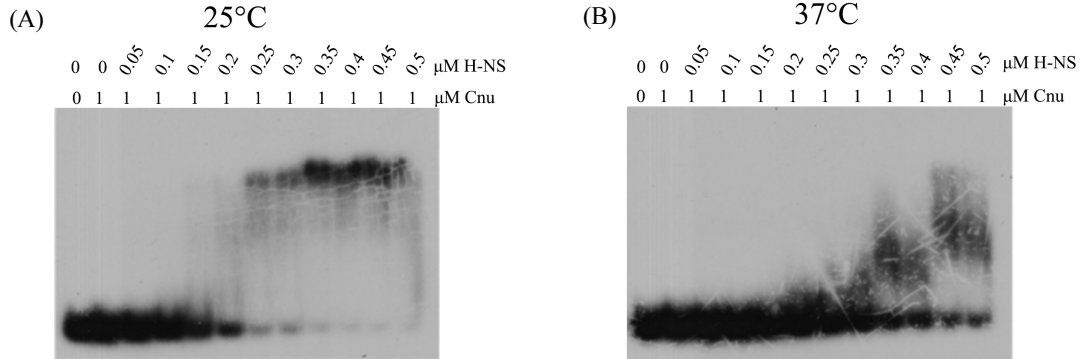


Fig. 3. EMSA used H-NS and Cnu with DNA fragment 334-bp temperature dependently. Fixed amount (1 μM) of Cnu with H-NS concentration increasing from 0.05 μM to 0.5 μM 334-bp DNA fragment at 25°C (A), and 37°C (B).

과 같은 농도구배의 H-NS에 Cnu를 추가하여 EMSA를 수행하였다. 실험결과 Cnu가 존재하면, H-NS만 홀로 존재할 때 보여지던 DNA-단백질 복합체들의 mobility가 변화하는 것을 관찰하였다(Fig. 3). 25°C에서 H-NS만 존재할 때 H-NS의 oligomerization에 의해 형성되던 I, II, III 그룹들이 Cnu 단백질 1 μM과 함께 존재하는 상태에서는 형성되지 않다가 oligomerization에 의해 IV 그룹을 형성하는 H-NS의 농도인 0.3 μM 이상이 되면 IV 그룹과 같은 mobility를 가지는 DNA-단백질 복합체를 형성하는 것을 확인하였다(Fig. 3A). 37°C에서는 Cnu가 존재할 경우 II, III 그룹의 mobility를 갖는 DNA-단백질 복합체 밴드가 형성되는 것을 관찰하였다(Fig. 3B).

H-NS에 의한 *dicA*의 전사억제

*PdicAC*에서 *dicA* 유전자의 전사가 이루어지기 위해서는, Oc에 DicA의 결합이 필요하다(Yun *et al.*, 2012). 다른 온도 의존적인 전사인자인 RovA (Quade *et al.*, 2012)나 SlyA (Lithgow *et al.*, 2007)처럼, DicA 또한 그 자신의 유전자 전사를 촉진하는 인자로 작용한다(Yun *et al.*, 2012). *dicA* 유전자의 전사를 조절하는데, Cnu, H-NS의 역할을 알아보기 위해, pHL1125를 이용하여 *in vivo*에서 *dicA* promoter의 transcription assay 실험을 수행하였다.

pHL1125는 *dicA*의 promoter를 포함하는 *PdicAC* DNA 단편의 down stream에 kanamycin 저항 유전자를 클로닝한 plasmid DNA이다. *PdicAC*에서 *dicA* promoter의 활성도에 따라 kanamycin 저항 유전자의 발현량이 달라질 것이고, 이는 kanamycin이 존재하는 배지에서 대장균의 성장을 결정한다. IC₅₀-kan 수치는 pHL1125를 가지고 있는 대장균이 생장이 절반으로 줄어들 때의 Kanamycin 농도이며, *dicA* 유전자의 promoter가 강하게

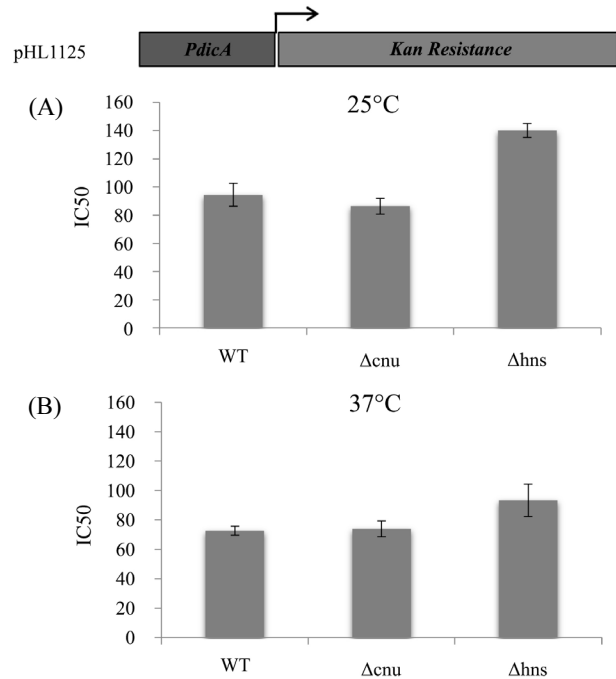


Fig. 4. Half maximal inhibitory concentration for kanamycin. Higher value means more *dicA* transcription (IC₅₀kan; μg/ml). IC₅₀kan at 25°C, WT is 94 ± 8.1, Δ*cnu* is 86 ± 5.5, Δ*hns* is 140 ± 5.0 (A). IC₅₀kan at 37°C, WT is 73 ± 3.1, Δ*cnu* is 74 ± 5.3, Δ*hns* is 93 ± 11.0 (B).

작동할수록 IC₅₀kan의 수치는 높아진다. 따라서 pHL1125를 가지고 있는 각각의 KO mutant 대장균으로 25°C와 37°C 두 온도 조건에서 IC₅₀kan의 수치를 측정하였다.

37°C에서 실험결과 MG1655 Δ*cnu*의 경우, 74 ± 5.3의 수치로 wild type인 MG1655의 73 ± 3.1의 수치와 큰 변화가 없는 반면, MG1655 Δ*hns*의 경우 93 ± 11.0의 수치로 MG1655 보다 127%로 증가한 IC₅₀kan값을 나타내었다(Fig. 4B). 25°C

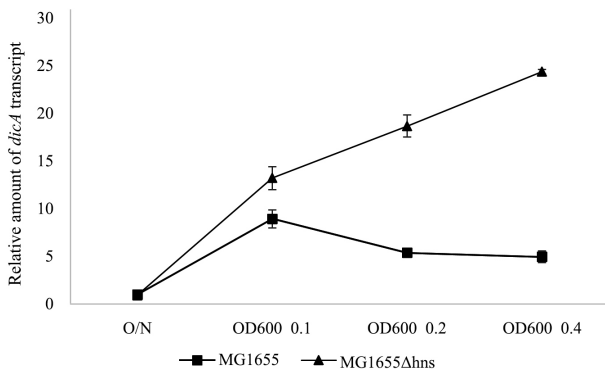


Fig. 5. Relative concentration of *dicA* transcripts. Relative concentration of *dicA* transcripts in WT strain and Δhms strain from OD₆₀₀ 0.05 to 0.4 (early log phase).

에서는 MG1655 Δcnu 의 경우 86 ± 5.5 의 수치로 WT의 94 ± 8.1 의 수치에서 91%로 감소한 반면, MG1655 Δhms 의 경우 140 ± 5.0 의 수치로 WT보다 149%로 증가한 IC50kan값을 나타내었다(Fig. 4A). 온도의 변화와 H-NS가 제거된 대장균의 IC50kan값의 수치변화는 H-NS가 없을 때, *dicA* 유전자의 발현이 증가했다는 것을 말해주며, 특히 25°C에서 H-NS가 없을 때 큰 폭으로 증가한다. 이는 H-NS가 37°C보다 25°C에서의 DNA 결합활성이 높았던 EMSA 실험결과(Fig. 3)와 함께, H-NS가 DNA에 결합함으로써 *dicA* 전사에 억제 인자로서 작용함을 보여준다.

부가적으로 *dicA* 유전자의 발현량을 real time qPCR을 이용하여 측정하였다. WT인 MG1655와 MG1655 Δhms 균주를 O/N으로 배양하여 새로운 배지에 OD₆₀₀이 0.5이 되도록 희석하였다. 그리고 첫 분열을 시작하는 시점인 OD₆₀₀이 0.1일 때와, 두번째 분열 시점인 OD₆₀₀이 0.2일 때, 그리고 세번째 분열 시점인 OD₆₀₀이 0.4일 때 대장균에서 *dicA* mRNA의 상대적인 양을 측정하였다. WT에서 첫분열 시점에서 8배 증가하였다가 두번째 이후 분열에서부터는 5배로 일정한 *dicA* 전사량이 나타났으나 *hms*가 없을 때에는 첫 분열 시점에서 13배, 그리고 두번째부터 네번째 분열까지 22배로 상대적 *dicA* 전사량이 감소하지 않고 계속 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 5). 이 결과는 *in vivo* transcription assay의 결과(Fig. 4)와 함께 H-NS가 *dicA*의 전사를 억제한다는 사실을 뒷받침한다.

고찰

대장균의 증식과 분열에서 대장균의 분열기작은 시간적, 공간적 조절이 필요하다. 정상적인 환경에서라면 대장균의 분

열기작은 잘 작동해야 하겠지만, 그렇지 못한 상황일 때, 대장균은 분열을 조절함으로써 생존에 유리한 조건을 만들어야 한다. 본 연구에서 알아본 *dicA* 유전자의 발현량은 대장균 분열하는 첫번째 분열시점에서 10배까지 증가했다가 두번째 분열에서 5배로, 세번째 분열단계에서도 5배로 큰 변화를 보이지 않았다(Fig. 5). 이는 대장균이 정상적으로 분열할 때 첫 분열을 시작으로 필요한 DicA의 양을 안정적으로 유지하는 것으로 보인다. 필요 이상의 *dicA* 발현을 막기 위한 H-NS의 억제 기능은 대장균의 분열 초기에 두드러지게 확인된다. *hms*가 제거된 대장균에서 *dicA* 발현은 감소하지 않고 계속 증가하여 세번째 분열시점에서도 20배 이상으로 계속 증가한다(Fig. 5). 대장균이 증식하여 분열할지, 증식만 하고 분열하지 말아야 할지 결정해야 하는 시점은 자연계에서 시시각각으로 변한다. Cnu 단백질의 정확한 기능은 밝혀지지 않았지만, H-NS의 oligomeric state를 변화시키며(Fig. 4A), CnuK9E 돌연변이의 경우에서처럼 온도에 따라 *dicA*의 발현을 억제하여 대장균의 분열을 조절할 수 있다(Yun *et al.*, 2012). 이러한 예를 통해 대장균은 변화하는 환경에 대해 대처할 수 있는 다양한 분자적 기작을 갖추고 있음을 알 수 있다.

적요

H-NS는 대장균에서 DNA 결합 단백질로 수많은 유전자의 발현에 영향을 주는 것으로 잘 알려져 있다. DicA 단백질은 *dicF*, *dicB*의 발현을 억제하여 대장균의 분열을 조절한다. *dicA*의 발현에 Cnu, H-NS의 관여 여부는 CnuK9E 돌연변이가 37°C에서 *dicA*의 발현을 억제하여 대장균이 길게 자라는 현상을 일으키며 처음 알려졌다. 하지만 Cnu와 H-NS 두 단백질이 어떻게 *dicA*의 발현을 조절하는지에 대한 분자적인 기작 연구는 잘 되어있지 않다. 본 연구에서 H-NS가 *dicA*와 *dicC* 유전자의 프로모터 부근에 염기서열 특이적으로 결합하며, 37°C보다 25°C에서 DNA 더 잘 결합하는 것을 확인하였다. 그리고 EMSA를 통해 Cnu는 H-NS의 DNA 결합의 oligomeric state를 변화시키는 방식으로 작용하는 것을 보여주었다. *In vivo* transcription assay와 real time PCR을 통해 H-NS가 제거된 대장균에서 *dicA* 프로모터 활성이 높아지고, 분열 초기 *dicA*의 발현이 조절 받지 못하고 증가하는 것으로 보아, H-NS는 *dicA*의 발현에 억제자로서 기능한다.

감사의 말

이 논문은 2016년 충남대학교 학술연구지원사업(2016-1456-01)에 의하여 연구되었음.

References

- Afflerbach H, Schroder O, and Wagner R.** 1999. Conformational changes of the upstream DNA mediated by H-NS and FIS regulate *E. coli* *rrnB* P1 promoter activity. *J. Mol. Biol.* **286**, 339–353.
- Azam TA and Ishihama A.** 1999. Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J. Biol. Chem.* **274**, 33105–33113.
- Bejar S and Bouche JP.** 1985. A new dispensable genetic locus of the terminus region involved in control of cell division in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **201**, 146–150.
- Bouche F and Bouche JP.** 1989. Genetic evidence that DicF, a second division inhibitor encoded by the *Escherichia coli* *dicB* operon, is probably RNA. *Mol. Microbiol.* **3**, 991–994.
- Coombes BK, Wickham ME, Lowden MJ, Brown NF, and Finlay BB.** 2005. Negative regulation of Salmonella pathogenicity island 2 is required for contextual control of virulence during typhoid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 17460–17465.
- Cukier-Kahn R, Jacquet M, and Gros F.** 1972. Two heat-resistant, low molecular weight proteins from *Escherichia coli* that stimulate DNA-directed RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 3643–3647.
- Dame RT, Wyman C, Wurm R, Wagner R, and Goosen N.** 2002. Structural basis for H-NS-mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at the *rrnB* P1. *J. Biol. Chem.* **277**, 2146–2150.
- Datsenko KA and Wanner BL.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6640–6645.
- de Boer PA, Crossley RE, and Rothfield LI.** 1990. Central role for the *Escherichia coli* *minC* gene product in two different cell division-inhibition systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1129–1133.
- Kim MS, Bae SH, Yun SH, Lee HJ, Ji SC, Lee JH, Srivastava P, Lee SH, Chae H, Lee Y, Choi BS, Chattoraj DK, and Lim HM.** 2005. Cnu, a novel oric-binding protein of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**, 6998–7008.
- La Teana A, Falconi M, Scarlato V, Lammi M, and Pon CL.** 1989. Characterization of the structural genes for the DNA-binding protein H-NS in Enterobacteriaceae. *FEBS Lett.* **244**, 34–38.
- Lithgow JK, Haider F, Roberts IS, and Green J.** 2007. Alternate SlyA and H-NS nucleoprotein complexes control *hlyE* expression in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **66**, 685–698.
- Marsh M and Hillyard DR.** 1990. Nucleotide sequence of *hns* encoding the DNA-binding protein H-NS of *Salmonella typhimurium*. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3397.
- Pon CL, Calogero RA, and Gualerzi CO.** 1988. Identification, cloning, nucleotide sequence and chromosomal map location of *hns*, the structural gene for *Escherichia coli* DNA-binding protein H-NS. *Mol. Gen. Genet.* **212**, 199–202.
- Prosseda G, Falconi M, Giangrossi M, Gualerzi CO, Micheli G, and Colonna B.** 2004. The *virF* promoter in *Shigella*: More than just a curved DNA stretch. *Mol. Microbiol.* **51**, 523–537.
- Prosseda G, Fradiani PA, Di Lorenzo M, Falconi M, Micheli G, Casalino M, Nicoletti M, and Colonna B.** 1998. A role for H-NS in the regulation of the *virF* gene of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* **149**, 15–25.
- Quade N, Mendonca C, Herbst K, Heroven AK, Ritter C, Heinz DW, and Dersch P.** 2012. Structural basis for intrinsic thermosensing by the master virulence regulator RovA of *Yersinia*. *J. Biol. Chem.* **287**, 35796–35803.
- Rajkumari K, Kusano S, Ishihama A, Mizuno T, and Gowrishankar J.** 1996. Effects of H-NS and potassium glutamate on sigmaS- and sigma70-directed transcription *in vitro* from osmotically regulated P1 and P2 promoters of *proU* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**, 4176–4181.
- Silphaduang U, Mascarenhas M, Karmali M, and Coombes BK.** 2007. Repression of intracellular virulence factors in *Salmonella* by the Hha and YdgT nucleoid-associated proteins. *J. Bacteriol.* **189**, 3669–3673.
- White-Ziegler CA, Angus Hill ML, Braaten BA, van der Woude MW, and Low DA.** 1998. Thermoregulation of *Escherichia coli* *pap* transcription: H-NS is a temperature-dependent DNA methylation blocking factor. *Mol. Microbiol.* **28**, 1121–1137.
- Yun SH, Ji SC, Jeon HJ, Wang X, Kim SW, Bak G, Lee Y, and Lim HM.** 2012. The CnuK9E H-NS complex antagonizes DNA binding of DicA and leads to temperature-dependent filamentous growth in *E. coli*. *PLoS One* **7**, e45236.