

Differentially Up-expressed Genes Involved in Toluene Tolerance in *Pseudomonas* sp. BCNU106

Woo Hong Joo^{1*}, Yun-Ui Bae¹, Da Som Kim¹ and Dong Wan Kim²

¹Department of Biology and Chemistry, Changwon National University, Changwon 51140, Korea

²Department of Biohealth Science, Changwon National University, Changwon 51140, Korea

Received November 27, 2019 / Revised December 24, 2019 / Accepted December 26, 2019

Using a random arbitrarily primed polymerase chain reaction, messenger RNA expression levels were assessed after exposure to 10% (v/v) toluene for 8 hr in solvent-tolerant *Pseudomonas* sp. BCNU 106. Among the 100 up-expressed products, 50 complementary DNA fragments were confirmed to express repeatedly; these were cloned and then sequenced. Blast analysis revealed that toluene stimulated an adaptive increase in the gene expression level in association with transcriptions such as LysR family of transcriptional regulators and RNA polymerase factor sigma-32. The expression of catalase and Mn²⁺/Fe²⁺ transporter genes functionally associated with inorganic ion transport and metabolism increased, and the increased expression of type IV pilus assembly PilZ and multi-sensor signal transduction histidine kinase genes, functionally categorized into signal transduction and mechanisms, was also demonstrated under toluene stress. The gene expression level of beta-hexosaminidase in association with carbohydrate transport and metabolism increased, and those of DNA polymerase III subunit epsilon, DNA-3-methyladenine glycosylase II, DEAD/DEAH box helicase domain-containing protein, and ABC transporter also increased after exposure to toluene in DNA replication, recombination, and repair, and even in defense mechanism. In particular, the RNAs corresponding to the ABC transporter, Mn²⁺/Fe²⁺ transporter, and the β -hexosaminidase gene were confirmed to be markedly induced in the presence of 10% toluene. Thus, defense mechanism, cellular ion homeostasis, and biofilm formation were shown as essential for toluene tolerance in *Pseudomonas* sp. BCNU 106.

Key words : BCNU 106, defence mechanism, differential expression, *Pseudomonas*, solvent tolerance

서 론

극한세균에는 호산성 세균, 호알칼리성 세균, 호염성 세균, 호열성 세균, 저온성 세균 및 내건성 세균(xerophiles)들이 포함되며, 최근에는 내생 세균(endoliths), 내압성 세균(piezophiles, barophiles) 및 독성 내성(toxitolerant) 미생물도 극한 미생물로서 활발한 연구의 대상이 되고 있다[7]. 극한미생물들이 극한 환경(산성, 알칼리성, 고염, 고온, 건조 그리고 심해 및 고농도의 유기용매 존재하의 환경 등)에서 생존하기 위해서는 특별한 적응 전략이 요구되며, 이러한 이유 때문에 극한 미생물들은 많은 생리생화학적 특성이 일반 미생물과는 상이하다[23, 27].

유기용매 내성 세균은 독성내성 미생물의 한 구성원일 뿐만 아니라 극한미생물의 한 구성원으로서 고농도의 톨루엔과 같

은 유기용매에서 생존할 수 있는 특성을 가지고 있는 점에서 일반 세균과 다르게 취급되고 있으며, 이들이 고농도의 톨루엔과 같은 유기용매에서 생존할 수 있으려면 특정한 적응반응과 적응메커니즘을 가지고 있어야 한다[23, 27]. 톨루엔과 같은 유기용매는 0.1% (v/v)의 매우 낮은 농도에서도 모든 유형의 세포에 매우 유독하며 세포의 생존에 악영향을 미친다. 이러한 유기용매는 세포막을 파괴하고 세포에 스며 들어 세포의 구조 및 기능적 통합성을 손상시킨다[10]. 그러나, 유기용매 내성 세균은 고농도의 유기용매에 의한 세포 손상으로부터 자신을 보호할 수 있다. 유기용매 내성 세균에서 유기용매가 축적되면 다인자의 방어반응이 유도되며[23, 27], 다인자 방어 반응에는 지질 유동성의 변화, 일반 스트레스 반응 시스템의 활성화, 에너지 생성에서의 향상 및 특정 유기용매 배출 펌프의 유도 등이 포함된다. 10% (v/v) 톨루엔의 존재 하에서도 유기용매 내성 세균인 *Pseudomonas* sp. BCNU 106균주는 정상적으로 생육하는 것으로 밝혀져 있으며 배양 후 0.5, 1, 2 그리고 8시간에도 생육이 저해되지 않았고 나아가 24시간까지도 톨루엔이 첨가되지 않은 대조구와 비교하여 큰 차이없이 생육하는 것으로 보고되었다[15]. 그러나, 유기용매에 대한 최고 수위의 내성을 보이는 유기용매 내성 세균인 *Pseudomonas* sp. BCNU 106에서의 유기용매에 대한 다인자의 방어반응은 거의

*Corresponding author

Tel : +82-55-213-3453, Fax : +82-55-213-3459

E-mail : whjoo@changwon.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.

밝혀지지 않았다. 따라서 다면적 연구가 필요하며 이를 통해 유기 용매에 대한 전반적인 반응 및 적응 시스템을 이해할 수 있을 것이다.

그러므로 본 연구에서는 우리나라에서 분리된 유기용매 내성 세균인 *Pseudomonas* sp. BCNU 106의 톨루엔에 대한 내성 메커니즘을 연구하고자, BCNU 106를 대상으로 Random arbitrarily primed polymerase chain reaction (RAP-PCR) 기법을 사용하여 유기용매 미처리 대조구와 비교하여 10% (v/v) 톨루엔의 존재 하에서 생육시킨 BCNU 106 균주에서 차별적으로 발현된 유전자를 분석하였다. 이렇게 도출한 유전자 발현 프로파일링 결과를 토대로 *Pseudomonas* sp. BCNU 106의 톨루엔 내성 메커니즘에 대하여 토의하였다.

재료 및 방법

세균 배양

대구 상당천 침전물에서 분리된 유기용매 내성 세균[3]인 *Pseudomonas* sp. BCNU 106을 10 mM MgCl₂가 첨가된 Luria-Bertani (LB, Difco, MD, USA) 배지 100 ml에서 180 rpm으로 진탕하면서 37°C에서 하룻밤 전배양하였다. 전배양액을 최종 농도가 1% (v/v)가 되게 본배양 배지인 LB 배지 100 ml에 접종하여 대수증식기 중반 단계(OD 600 nm = 0.6)에 도달할 때까지 180 rpm으로 진탕하면서 37°C에서 배양한 후, 배지에 10%(v/v) 톨루엔을 첨가하여 추가 배양하였다. 추가 배양 직전, 0.5, 1, 4 또는 8시간 배양 후 배양액 10 ml 씩을 회수하여 드라이 아이스/에탄올 배스에서 즉시 냉장하였다. 10% (v/v) 톨루엔을 첨가하지 않은 LB 배지 100 ml에서 배양한 *Pseudomonas* sp. BCNU 106 배양액을 대조구로 사용하였다.

RNA 준비

RNA는 핫페놀 추출방법에 의해 분리하였다[20]. RNA는 3M sodium acetate/ chilled ethanol (0.25:3, v/v)로 침전시켰다. 침전된 RNA를 diethylpyrocarbonate (DEPC; Aldrich Chemical Co., WI, USA)-treated water 80 µl에 용해시킨 후, DNA를 제거하기 위해 제조사의 메뉴얼에 따라 RNase-free DNase I (Promega, Madison, WI, USA)로 처리하였다. 최종 RNA 스톱의 농도는 전기영동으로 동일한 농도로 조정하였다.

Random arbitrarily primed polymerase chain reaction (RAP-PCR)

RAP-PCR은 Fislage 등의 방법에 준하여 수행하였다[6]. RNA 시료 15 µg을 DEPC로 처리된 물에 용해시킨 후 70°C에서 10분 동안 변성시켜 얼음으로 냉각시켰다. 첫 번째 상보적 DNA (complementary DNA, cDNA) 가닥 합성은 40 unit RNase 억제제(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 25 µM dNTP 및 6.3 µM 11 mer anchor (reverse transcription;

RT) primer를 포함하는 총 부피 20 µl의 반응액에서 200 unit Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)를 사용하여 시행하였다. 첫 번째 상보적 DNA 가닥 합성은 30°C에서 5분 동안 초기 반응을 실시하고 이어서 37°C에서 1시간 동안 합성을 더 실시하며 95°C에서 10분 동안 변성시켜, -80°C에서 7일 동안 보관하였다. 차별적으로 발현되는 제 2 가닥 합성은 제 1 가닥 시료 2 µl, 2 µM dNTP, 5 µM 11 mer anchor (RT) primer, 0.5 µM 10 mer arbitrary (PCR) primer, 2.5% DMSO, *Taq* polymerase (Takara, Tokyo, Japan), 2.5 mM MgCl₂ 그리고 1.5 µCi [α -³²P]dATP (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 포함하는 총 부피 20 µl에서 수행하였다. Thermal cycling의 조건은 다음과 같다: low stringency cycle; 94°C(5분), 40°C(5분), 72°C(5분), 이어서 30 high stringency cycles; 94°C(1분), 60°C(1분) 그리고 72°C(2분). PCR 생성물을 변성시킨 후 5% polyacrylamide sequencing gel에서 전기영동을 실시하고 겔을 진공 하에서 건조시켰다. 이후 X선 필름(Fujifilm, Japan)을 사용하여 방사선 자동 사진법(autoradiography)에 의해 RAP-PCR 생성물을 확인하였다.

RAP-PCR 산물의 re-amplication 및 염기서열 결정

차별적으로 발현되는 것으로 확인된 단편을 회수하여 10 µl의 멸균수에 재용해시켰다. 이어서 제 2 가닥 합성에 사용된 PCR parameter로 상보적 DNA를 재증폭시켰다. 개별적으로 RAP-PCR 실험을 3번 시행한 후, 3번의 실험에서 항상 발현되어 재현성이 확인된 DNA 밴드만을 차별적으로 발현되는 전사산물 후보로 간주하였다. 후보 PCR 산물을 pGEM-T 벡터 (Promega, Madison, WI, USA)에 라이게이션시키고, *Escherichia coli* XL Blue 균주를 형질전환시켰다. 형질전환된 대장균의 플라스미드는 제조사의 메뉴얼에 기초하여 플라스미드 분리 키트 (Takara, Tokyo, Japan)를 사용하여 양성 클론의 액체 배양액 3 ml로부터 분리하였다. 플라스미드 inserts의 양방향 염기서열은 SP6 또는 T7 primer와 함께 Big dye Terminator v1.1 cycle sequencing 키트(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 결정하였다. 염기서열 데이터는 블라스트 검색을 사용하여 *Pseudomonas* 게놈 데이터베이스(<http://www.pseudomonas.com>)에서 분석하였다

결 과

RAP-PCR

독립적으로 배양과 RNA 분리 그리고 RAP-PCR는 3번 반복 실험을 실시하였고(Fig. 1), 3번의 반복실험 모두에서 밴드가 확인되고 나아가 밴드가 2배 이상 증가한 경우만 차별적으로 발현된 유전자로서 추정하였다. 톨루엔 존재하에서 차별적으로 발현되는 유전자들 중 상향발현된 유전자들이 적응 메커

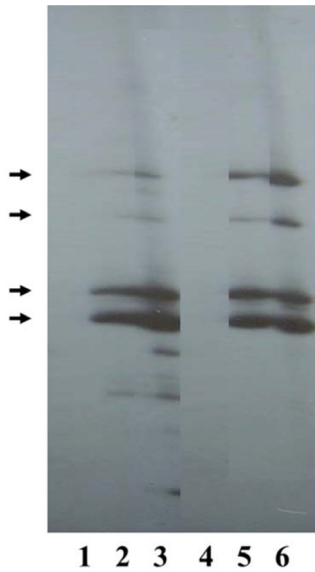


Fig. 1. Representative differential display profiles of RNA samples from *Pseudomonas* sp. BCNU 106 cultured on LB with 10% (v/v) toluene for 0.5 hr (lane 2 and 5) or 1 hr (lane 3 and 6). The cells were grown on LB without toluene for 1 hr as a control (lane 1 and 4). Lane 1-3, profile with primer combination of Ea2 and Es11. Lane 4-6, profile with primer combination of Ea10 and Es3. Arrow represents differentially amplified bands.

니즘에서 주도적인 역할을 할 것으로 판단되어 본 연구에서는 상향발현 유전자들에 한하여 연구 대상으로 하였다.

RAP-PCR products의 재증폭 및 DNA 염기배열 결정

RAP-PCR에 의한 재증폭에 의해 다수의 유전자들이 *Pseudomonas* sp. BCNU 106에서 차등적으로 발현됨을 재확인하였다. 10% (v/v) 톨루엔에 노출되었을 때 *Pseudomonas* sp. BCNU 106에서 차별적으로 상향 발현되는 후보 유전자는 50개임이 시험결과 확인되었다. 그 중에서 22개의 후보자는 상동 유전자가 알려져 있는 것으로 확인되었고, 10개는 가상 기능을 가지고 있으며 18개는 상동성이 있는 유전자가 보고되어 있지 않아, 앞으로 기능이 밝혀져야 할 유전자임이 확인되었다(Table 1). 차별적으로 상향 발현된 유전자들을 기능성 범주로 정리하면 Fig. 2와 같으며, 기능이 알려져 있지 않은 경우가 32%로 가장 많았다. *Pseudomonas* sp. BCNU 106에서 10% (v/v) 톨루엔의 존재 하에서 상향 발현된 전체 유전자들의 10%는 LysR 패밀리를 전사 조절인자와 RNA polymerase sigma-32 인자와 같이 전사 기능 범주로 대별되었으며, 상향 발현된 10%의 유전자들은 catalase와 Mn²⁺/Fe²⁺ transporter와 같이 기능적으로 무기이온 수송 및 대사 범주에 속하는 것으로 확인되었다. 이어서 상향 발현된 6%의 유전자들은 IV형 필러스 어셈블리 PilZ와 같이 신호 전달 메커니즘에 해당하였으며, 또 다른 상향 발현된 6%의 유전자들은 다중 센서 신호 전달 histi-

dine kinase와 β-hexosaminidase와 같이 탄수화물 수송과 대사 기능 범주에 속하는 것으로 확인되었다(Fig. 2).

고 찰

유기용매 내성 세균 *Pseudomonas* sp. BCNU 106은 우리나라 하천 퇴적물에서 분리되어 다양한 유기용매에 대하여 내성을 가지고 있는 것으로 밝혀져 있다[3]. 본 연구실에서는 *Pseudomonas* sp. BCNU 106를 사용하여 독성 유기용매에 대한 용매 내성 메커니즘을 규명하는 과정에서, 톨루엔 스트레스에 대하여 트레할로스가 축적되어 내성을 보이는 것을 입증하였다[14]. 또한 항산화 방어시스템이 *Pseudomonas* sp. BCNU 106에서의 톨루엔 내성 메커니즘에 중요한 역할을 한다는 것을 제시하였다[4].

유기 용매와 관련된 독성을 극복하고 독성 유기 용매에 적응하는 다양한 적응 메커니즘은 정리되어 보고되고 있으나 [23, 27, 29], 전반적인 용매 내성 메커니즘은 아직 명확히 밝혀져 있지 않다, 그리고 유기용매 내성 및 적응 메커니즘은 균주에 따라 특이하며 상이할 수 있기 때문에 다각적인 연구가 요구된다. 유기용매에 대한 적응 및 내성 메커니즘은 특히 유전자 전사의 재프로그래밍 및 발현에 의할 수 있다. 초기 적응 단계(최대 1시간)에서 상향 발현된 LysR 패밀리를 전사 조절인자는 항생제 내성 및 병원성 세균의 병원성 모두에 중요한 주요 배출 펌프의 조절에 관여함으로써[2], 톨루엔을 방출하여 톨루엔의 세포 독성을 회피할 수 있게 하는 것으로 예측된다. 시그마 인자 32- 매개 열충격 반응은 *Pseudomonas putida*에서 유기용매 내성에서 역할을 하는 것으로 입증되었다[11]. *Pseudomonas* sp. BCNU 106에서도 이들 유전자가 동일한 역할을 할 것으로 예상된다. IV형 필러스 어셈블리 PilZ 역시 BCNU 106에서 초기에 상향 발현되었으며, IV형 필러스가 생물막 형성에 필요하며[5, 18], 다중 약물 내성도 나타낸다는 보고[25]에서 톨루엔 내성에 대해서도 기여할 수 있음이 시사된다. 톨루엔 스트레스에 대한 또 다른 초기 반응으로 catalase가 상향 발현됨이 확인되어, 톨루엔 존재 하의 혹독한 환경에서 생존하기 위한 조건으로서의 항산화 방어 시스템의 중요성[4]이 본 연구에서도 재확인되었다. 초기 상향 발현된 DNA 중합효소 III의 엡실론 서브유닛은 SOS반응과 같은 DNA 복구에 관여하는 것으로 보고되고 있고[17], β-헥소사미니다제 활성의 상향 발현은 생물막 형성에 영향을 미친다고 보고되고 있으므로[19]. 유기용매 내성 세균이 유기용매 스트레스를 극복하기 위해서 DNA 복구 반응과 바이오 필름 형성을 필요로 한다고 예상된다.

톨루엔에 노출된 후 후기 적응단계(2시간 내지 8시간)에서 상향발현된 aminodeoxychorismate lyase는 아미노산, 코엔자임 Q, 지방산 및 테우시리보 핵산 합성에 사용되는 p- 아미노벤조익산 합성에 필수적이다[8, 12, 14]. Aminodeoxychoris-

Table 1. Up-regulated RAP-PCR products in solvent-tolerant *Pseudomonas* sp. BCNU 106 after exposure to toluene

RAP-PCR products	Primer set anchor/arbitrary	Locus tag	Gene product	Protein name	Functional category	Length of cDNA obtained (bp)
A2T	Ea1/Es3-2	PP_0036	LysR family transcriptional regulator	DsdC	Transcription	356
A3T	Ea2/Es5-1	PP_0182	hypothetical protein		Function unknown	411
A4T	Ea2/Es11-1	PP_4397	type IV pilus assembly PilZ		Signal transduction mechanisms	305
A6T	Ea3Es5-1	PPS_2671	transcriptional regulator		Transcription	400
A7T	Ea3/Es5-2	PP_1405	hypothetical protein		Function unknown	449
A8T	Ea10/Es1-1	PP_0481	catalase		Inorganic ion transport and metabolism	326
A12T1	Ea10/Es3-1	PP_0353	DNA polymerase III subunit epsilon	PolC	DNA replication, recombination, and repair	V ¹
A12T2	Ea10/Es3-1	PP_0481	catalase		Inorganic ion transport and metabolism	348
A13T	Ea10/Es6-1	PP_5108	RNA polymerase factor sigma-32	RpoH	Transcription	214
A17T	Ea7/Es2-1	PP_2145	beta-hexosaminidase		Carbohydrate transport and metabolism	423
A20T	Ea7/Es5-1	PP_0182	hypothetical protein		Function unknown	407
A21T	Ea7/Es5-2	PP_0182	hypothetical protein		Function unknown	391
B1T2	Ea5/Es3-1	PP_1918	aminodeoxychorismate lyase		Coenzyme transport and metabolism	98
B2T1	Ea5/Es3-2	PP_5340	histone deacetylase superfamily protein		Chromatin structure and dynamics / Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism	448
B4T1	Ea5/Es5-2	T1E_3781	hypothetical protein		Function unknown	448
B5T2	Ea5/Es5-3	PP_1350	multi-sensor signal transduction histidine kinase	TorS	Signal transduction mechanisms	218
B6T2	Ea5/Es5-4	PP_1243	hypothetical protein		Function unknown	V ¹
B10T1	Ea5/Es6-4	PP_2179	peptidase C26	GuaA	General function prediction only	260
B11T1	Ea5/Es7-1	PP_0705	DNA-3-methyladenine glycosylase II		DNA replication, recombination, and repair	232
B12T2	Ea5/Es7-2	PP_4379	beta-ketoacyl-ACP synthase	FabH	acyl-carrier-protein	389
B13T2	Ea5/Es7-3	PP_1890	pili assembly chaperone		Cell motility and secretion / Intracellular trafficking and secretion	277
B15T1	Ea6/Es2-1	PP_2145	beta hexosaminidase	BglX	Carbohydrate transport and metabolism	771
B16T2	Ea6/Es2-2	PputW619_0233	Mn ²⁺ / Fe ²⁺ transporter	Nramp	Inorganic ion transport and metabolism	423
B17T2	Ea6/Es2-3	PputW619_0233	Mn ²⁺ / Fe ²⁺ transporter	Nramp	Inorganic ion transport and metabolism	463

Table 1. Continued

RAP-PCR products	Primer set anchor/arbitrary	Locus tag	Gene product	Protein name	Functional category	Length of cDNA obtained (bp)
B18T2	Ea6/Es2-4	PP_4980	DEAD/DEAH box helicase domain-containing protein	RecQ	DNA replication, recombination, and repair / Transcription / Translation, ribosomal structure and biogenesis	542
B18T3	Ea6/Es2-4	PputW619_0233	Mn ²⁺ /Fe ²⁺ transporter of the NRAMP family		Inorganic ion transport and metabolism	423
B19T	Ea6/Es2-5	PP_1243	hypothetical protein		Function unknown	272
B23T3	Ea6/Es3-3	PP_1887	hypothetical protein		Function unknown	V ¹
B24T3	Ea6/Es5-1	PP_0182	hypothetical protein		Function unknown	V ¹
B26T1	Ea6/Es5-3	T1E_2218	hypothetical protein		Function unknown	V ¹
B27T1	Ea6/Es5-4	PP_2628	ABC transporter, ATP-binding protein		Defense mechanisms	238
B28T2	Ea6/Es7-1	PP_1890	pili assembly chaperone		Cell motility and secretion / Intracellular trafficking and secretion	278

1. variable.

mate lyase의 상향 조절은 세포막의 강화 및 에너지 효율의 개선이 용매 스트레스에 대처하기 위한 긴급한 과정임을 보여 준다. Histone deacetylase superfamily protein 상동체도 10% 톨루엔 존재 하에서 상향 발현되었다. 비소에 민감한 *S. cerevisiae* 균주는 아세틸화 또는 탈아세틸화 과정에 관여하는 단백질질을 가지고 있지 않다는 실험 결과[32]에서 BCNU 106에서 톨루엔에 대한 내성을 나타내는 한 요인이 히스톤 아세틸화 및 탈아세틸화임을 추정할 수 있다. 또 다른 유전자, 다중 센서 신호 변환 histidine kinase도 상향 조절되었으며, furfural을 처리한 *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052에서 이 유전자가 억제된다는 보고[30]와는 대조적이었으나, 톨루엔의 존재하에서도 two-componet 신호전달 시스템이 정상적으로 작동하고 있었기 때문에 BCNU 106은 고농도의 톨루엔에서 생존 가능한 것으로 판단된다. Peptidase C26 (γ -glutamyl hydrolase)도 상향 조절되었다. γ -glutamyl hydrolase와 약제 내성과의 관련성에 대한 보고[22]에서 유기용매 내성의 기여를 추측할 수 있다. DNA 손상은 주로 후기 적응 단계에서 DNA polymerase III subunit epsilon 대신에 3-methyladenine DNA glycosylase II를 사용하여 복구되며, 3-methyladenine DNA glycosylase II가 *Deinococcus radiodurans*에서의 DNA 수복에서 중요한 역할을 하는 실험결과에 기초하여 유기용매에서의 상향발현이 설명된다[13]. 상향 발현된 β -ketoacyl-ACP synthase는 지방산 생합성의 연장 단계에서 중요한 효소이다[9, 31]. 지방산 합성 연장반응의 증가와 함께 증가된 acyl-carrier 단백질은 상향발현된 aminodeoxychorismate lyase와 협동으로 지방산 합성을 증가시킴으로써 톨루엔의 세포손상에 대항

하는 것으로 예상된다[8]. 또한, 상향발현된 필리스 어셈블리 샤페론은 필리스 서브 유닛에 결합하여 필리스 어셈블리를 촉진하고 바이오 필름을 최종적으로 형성하게 하여 유기용매에서도 내성을 나타나게 할 수 있다[26]. 톨루엔 스트레스에 대한 또 다른 현저한 반응은 Mn²⁺/Fe²⁺ transporter를 포함하는 무기 이온 수송에 관여하는 단백질의 상향조절이다. *Deinococcus radiodurans* 에서 Mn²⁺/Fe²⁺ transporter와 catalase를 포함한 항산화 시스템의 협력적인 조절로 이산화 방사선에 대한 특별한 저항성을 나타내는 것으로 밝혀져 있는 바 [1]. 유기용매 내성 세균에서도 유기용매 내성을 가지기 위해서는 Mn²⁺/Fe²⁺ transporter에 의한 이온 항상성이 유지되어야 하는 것 같다. *E. coli*와 *Bacteroides fragilis*에서 각각 포름알데히드와 메트로니다졸 노출 후 RecQ helicase가 세포 생존에 관여하는 것 같이[16], BCNU 106 균주에서 RecQ helicase는 톨루엔에 노출된 후 세포 생존에 관여함을 예측할 수 있다. ATP-결합단백질인 ABC transporter가 상향조절되는 점에서 세포에 축적될 수 있는 독성 톨루엔의 강제적인 배출이 시사되며, *P. putida* DOT-T1E에서의 보고된 유기 용매에 대한 배출과 동일한 메커니즘을 BCNU 106균주도 가지고 있는 것으로 판단된다[23].

본 연구에서는 다각적인 유기용매 내성 메커니즘을 연구하는 일환으로서, RAP-PCR기법을 사용하여 10% 톨루엔에 노출된 유기용매 내성 세균 BCNU 106균주에서 차등적인 발현 프로파일을 조사 분석하였다. 추후 연구에서는 본 연구를 토대로 Knock-out 기법 등을 도입하여 차등 발현되는 유전자들의 기능과 유기용매 내성 메커니즘에서의 역할에 대한 심층적인

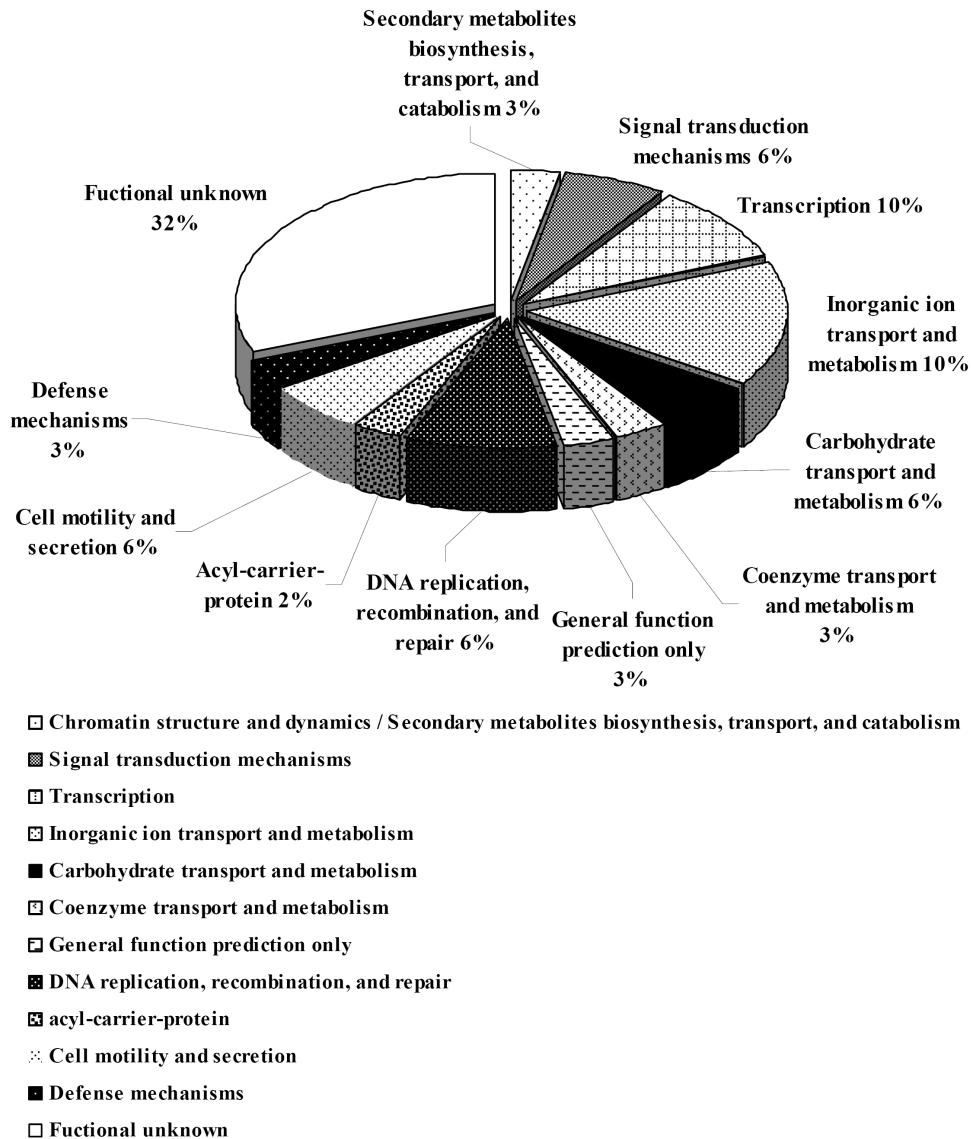


Fig. 2. Distribution of the genes increased in *Pseudomonas* sp. BCNU 106 by 10% toluene stress, according to biological function.

연구가 필요하다. 본 연구에서는 톨루엔에 대한 적응 메커니즘에 한정하여 연구하였으나 다양한 유기용매에서의 반응 및 적응 메커니즘도 추가적으로 연구를 할 예정이다. 현재 고농도의 유기용매에 대한 내성 세균은 *Pseudomonas putida* DOT-T1E 및 S12 그리고 *Pseudomonas* sp. BCNU 106균주가 분리되어 보고되어 있다. 이들에 대한 유전체 및 단백질체 연구에서 일반적인 유기용매 내성 메커니즘은 알려져 있다[28]. 특히 단백질체 연구에서 S12 또는 DOT-T1E 균주가 톨루엔에 노출되면 거의 90개 정도의 단백질이 상향조절됨이 밝혀져 있어 본 실험에서 상향 발현된 유전자들과 비교하면 수치적으로는 유사하나 완전히 일치하지는 않았다[28]. 그러나 세포막의 유동성에 영향을 미치는 지질조성의 변화를 일으키는 등 세포막에 변화를 일으키며, 톨루엔을 배출시키고 산화적인 스트레스에서 세포를 보호하며, 에너지효율을 개선시킴이 확인되어 기능

적으로는 다소 일치하는 유기용매 내성 메커니즘으로 유기용매 내성세균 *Pseudomonas* sp. BCNU 106균주도 톨루엔 존재하의 환경에서 생존하는 것으로 판단된다[28]. 한편 유기용매 내성 세균은 유기용매-물 이상계에서 물에 불용성 기질들의 생물변환반응에서 매우 가치있는 생물촉매로 이용가능하며, 이를 통하여 공정시간과 폐수처리량을 줄일 수 있는 이점이 있다[21, 27]. 또한 유기용매 등 난분해성 물질을 분해하는 미생물은 다수 분리 보고되고 있으나, 저농도로 물질을 공급할 때만 분해할 수 있으므로 고농도의 유기용매에 대하여 내성을 보이는 세균을 이용하면 유기용매 등으로 심하게 오염된 지역의 오염정화에도 중요한 역할을 할 수 있다[21, 27]. 그러므로 생존력이 높으면서 생물변환과 생물분해 등의 기능이 있는 유기용매 내성 세균은 생물공학적으로 매우 의미있는 생물자원이다. 앞으로 유기용매 내성 세균을 활용하여 보다 광범위

한 생물변환 및 생물분해 반응 등에서의 적용 가능성을 검토할 필요성이 있다.

감사의 글

이 논문은 2019~2020년도 창원대학교 교내연구비 지원으로 수행된 연구결과임.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Chen, H., Wu, R., Xu, G., Fang, X., Qui, X., Guo, H., Tian, B. and Hua, Y. 2010. DR2539 is a novel DtxR-like regulator of Mn/Fe ion homeostasis and antioxidant enzyme in *Deinococcus radiodurans*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **396**, 413-418.
- Chen, S., Wang, H., Katzianer, D. S., Zhong, Z. and Zhu, J. 2013. LysR family activator-regulated major facilitator superfamily transporters are involved in *Vibrio cholerae* antimicrobial compound resistance and intestinal colonisation. *Int. J. Antimicrob. Agents* **41**, 188-192.
- Choi, H. J., Seo, J. Y., Hwang, S. M., Lee, Y. I., Jeong, Y. K., Moon, J. Y. and Joo, W. H. 2013. Isolation and characterization of BTEX tolerant and degrading *Pseudomonas putida* BCNU 106. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **18**, 1000-1007.
- Choi, H. J., Yoo, J. S., Jeong, Y. K. and Joo, W. H. 2014. Involvement of antioxidant defense system in solvent tolerance of *Pseudomonas putida* BCNU 106. *J. Basic Microbiol.* **54**, 945-950.
- Conrad, J. C. 2012. Physics of bacterial near-surface motility using flagella and type IV pili: implications for biofilm formation. *Res. Microbiol.* **163**, 619-629.
- Fislage, R., Berceanu, M., Humboldt, Y., Wendt, M. and Oberender, H. 1997. Primer design for a prokaryotic differential display RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* **25**, 1830-1835.
- Horikoshi, K. and Bull, A. T. 2011. Prologue: Definition, Categories, Distribution, Origin and Evolution, Pioneering Studies and Emerging Fields of Extremophiles, pp 4-15. In: Horikoshi, K., Antranikian, G., Bull, A. T., Robb, F. T. and Stetter, K. O. (eds.), *Extremophiles handbook*. Springer: Tokyo, Japan.
- Huang, G., Zhang, L. and Birch, R. G. 2000. Characterization of the acyl carrier protein gene and the fab gene locus in *Xanthomonas albilineans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **193**, 129-136.
- Huynh, K. H., Natarajan, S., Song, N. H., Ngo, P. T. H., Ahn, Y. J., Kim, J. G., Lee, B. M., Eo, Y. D. and Kang, L. W. 2009. Cloning, expression, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of β -ketoacyl-ACP synthase III (FabH) from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Acta Crystallogr. Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **65**, 460-462.
- Inoue, A. 2011. Discovery and taxonomy of organic solvent tolerant microorganisms, pp. 938-943. In: Horikoshi, K., Antranikian, G., Bull, A. T., Robb, F. T. and Stetter, K. O. (eds.), *Extremophiles Handbook*. Springer: Tokyo, Japan.
- Kobayashi, Y., Ohtsu, I., Fujimura, M. and Fukumori, F. 2011. A mutation in *dnaK* causes stabilization of the heat shock sigma factor σ_{32} , accumulation of heat shock proteins and increase in toluene-resistance in *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* **13**, 2007-2017.
- Marbois, B., Xie, L. X., Choi, S., Hirano, K., Hyman, K. and Clarke, C. F. 2010. para-Aminobenzoic acid is a precursor in coenzyme Q6 biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **285**, 27827-27838.
- Moe, E., Hall, D. R., Leiros, I., Monsen, V. T., Timmins, J. and Mcsweeney, S. 2012. Structure - function studies of an unusual 3-methyladenine DNA glycosylase II (AlkA) from *Deinococcus radiodurans*. *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* **68**, 703-712.
- O'Rourke, P. E. F., Eadsforth, T. C., Fyfe, P. K., Shepherd, S. M. and Hunter, W. N. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* 4-amino-4-deoxychorismate lyase: spatial conservation of an active site tyrosine and classification of two types of enzyme. *PLoS One* **6**, e24158.
- Park, H. C., Bae, Y. U., Cho, S. D., Kim, S. A., Moon, J. Y., Ha, K. C., Kim, D. W., Lee, K., Jeong, Y. K., Kwack, D. O., Heo, J. S., Lee, Y. G. and Joo, W. H. 2007. Toluene-induced accumulation of trehalose by *Pseudomonas* sp. BCNU 106 through the expression of *otsA* and *otsB* homologues. *Lett. Appl. Microbiol.* **44**, 50-55.
- Paul, L., Patrick, S., Nord, C. E. and Abratt, V. 2011. The role of *Bacteroides fragilis* RecQ DNA helicases in cell survival after metronidazole exposure. *FEMS Microbiol. Lett.* **319**, 125-132.
- Pohlhaus, J. R., Long, D. T., O'Reilly, E. and Kreuzer, K. N. 2008. The ϵ subunit of DNA polymerase III is involved in the nalidixic acid-induced SOS response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **190**, 5239-5247.
- Pratt, L. A. and Kolter, R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* **30**, 285-293.
- Roy, S., Phansopa, C., Stafford, P., Honma, K., Douglas, C. I., Sharma, A. and Stafford, G. P. 2012. Beta-hexosaminidase activity of the oral pathogen *Tannerella forsythia* influences biofilm formation on glycoprotein substrates. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **65**, 116-120.
- Sambrook, J. and Russel, D. W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, USA.
- Sardesai, Y. N. and Bhosle, S. 2004. Industrial potential of organic solvent tolerant bacteria. *Biotechnol. Prog.* **20**, 655-660.
- Schneider, E. and Ryan, T. J. 2006. Gamma-glutamyl hydrolase and drug resistance. *Clin. Chim. Acta* **374**, 25-32.
- Segura, A., Molina, L., Fillet, S., Krell, T., Bernal, P., Muñoz-Rojas, J. and Ramos, J. L. 2012. Solvent tolerance in Gram-

- negative bacteria. *Curr. Opin. Biotech.* **23**, 415-421.
24. Sikkema, J., de Bont, J. A. and Poolman, B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **59**, 201-222.
 25. Taguchi, F. and Ichinose, Y. 2011. Role of type IV pili in virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605: correlation of motility, multidrug resistance, and HR-inducing activity on a nonhost plant. *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**, 1001-1011.
 26. Tomaras, A. P., Dorsey, C. W., Edelman, R. E. and Actis, L. A. 2003. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* **149**, 3473-3484.
 27. Torres, S., Pandey, A. and Castro, G. R. 2011. Organic solvent adaptation of gram positive bacteria: applications and biotechnological potentials. *Biotechnol. Adv.* **29**, 442-452.
 28. Udaondo, Z., Duque, E., Fernández, M., Molina, L., de la Torre, J., Bernal, P., Niqui, J. L., Pini, C., Roca, A., Matilla, M. A., Molina-Henares, M. A., Silva-Jiménez, H., Navarro-Avilés, G., Busch, A., Lacal, J., Krell, T., Segura, A. and Ramos, J. L. 2012. Analysis of solvent tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E based on its genome sequence and a collection of mutants. *FEBS Lett.* **586**, 2932-2938.
 29. Weber, F. J., Isken, S. and de Bont, J. A. 1994. *Cis/trans* isomerization of fatty acids as a defense mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene. *Microbiology* **140**, 2013-2017.
 30. Zhang, Y. and Ezeji, T. C. 2013. Transcriptional analysis of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 to elucidate role of furfural stress during acetone butanol ethanol fermentation. *Biotechnol. Biofuels* **6**, 66.
 31. Zhang, Y. M., Rao, M. S., Heath, R. J., Price, A. C., Olson, A. J., Rock, C. O. and White, S. W. 2001. Identification and analysis of the acyl carrier protein (ACP) docking site on β -ketoacyl-ACP synthase III. *J. Biol. Chem.* **276**, 8231-8238.
 32. Zhou, X., Arita, A., Ellen, T. P., Liu, X., Bai, J., Rooney, J. P., Kurtz, A. D., Klein, C. B., Dai, W., Begley, T. J. and Costa, M. 2009. A genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* reveals pathways affected by arsenic toxicity. *Genomics* **94**, 294-307.

초록 : 유기용매 내성 세균 *Pseudomonas* sp. BCNU106 균주에서 차별적으로 상향 발현되는 유전자군의 톨루엔 내성과의 연관성

주우홍^{1*} · 배윤위¹ · 김다솜¹ · 김동원²

(¹창원대학교 생물화학융합학부, ²창원대학교 생명보건학부)

유기용매 내성 세균인 *Pseudomonas* sp. BCNU 106을 10%(v/v) 톨루엔에 노출시킨 후 8시간 동안 random arbitrarily primed polymerase chain reaction (RAP-PCR)기법을 이용하여 메신저 RNA 발현 레벨을 조사하였다. 총 100개의 상향발현된 발현 산물 중에서 50개의 상보적인 단편들이 반복적으로 재현성있게 발현되는 것으로 확인되어, 이들을 클로닝을 하였으며 나아가 유전자 염기서열을 결정하였다. Blast analysis 결과, 톨루엔은 LysR family transcriptional regulator 그리고 RNA polymerase factor sigma-32같은 전사와 관련된 유전자들의 발현 레벨을 적응적으로 증가시키는 것으로 확인되었다. 그리고 톨루엔 스트레스 존재 하에서 inorganic ion 수송과 대사와 관련된 catalase와 Mn^{2+}/Fe^{2+} transporter 유전자의 발현이 증가되었으며, 신호전달과 대사와 기능적으로 관련된 type IV pilus assembly PilZ와 multi-sensor signal transduction histidine kinase 유전자들의 발현 증가도 확인되었다. 한편 톨루엔 노출 후 탄수화물 수송과 대사와 관련된 beta-hexosaminidase 유전자발현 레벨이 증가하였다. 나아가 DNA polymerase III subunit epsilon, DNA-3-methyladenine glycosylase II와 DEAD/DEAH box helicase domain-containing 유전자들과 같은 DNA 복제, 재조합 그리고 수복에 관련성이 있는 유전자들의 발현 레벨 그리고 심지어는 ABC transporter 유전자와 같은 방어 메커니즘에 관련성이 있는 유전자들의 발현 레벨이 적응적으로 증가되는 것으로 밝혀졌다. 특히 10% 톨루엔 존재하에서 ABC transporter, Mn^{2+}/Fe^{2+} transporter 및 β -hexosaminidase 유전자에 해당하는 RNA들이 괄목하게 유도되는 것이 확인되었다. 그러므로 유기용매 내성 세균 *Pseudomonas* sp. BCNU 106이 유기용매에 대하여 내성을 나타내는데 있어서 방어 메커니즘, 세포내 이온 항상성 그리고 바이오 필름 형성이 필수적인 것으로 확인되었다.