



ARTICLE

Salmonella Enteritidis와 *Salmonella* Gallinarum의 세균막 스트레스를 인식하는 *spy-gfp* 오페론 융합체

강보경 · 방일수*

조선대학교 치과대학 구강미생물학 교실

The *spy-gfp* Operon Fusion in *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum Senses the Envelope Stress

Bo Gyeong Kang and Iel Soo Bang*

Dept. of Microbiology and Immunology, Chosun University School of Dentistry, Gwangju, Korea



Received: December 15, 2018
Revised: December 24, 2018
Accepted: December 25, 2018

*Corresponding author :
Iel Soo Bang
Dept. of Microbiology and Immunology,
Chosun University School of Dentistry,
Gwangju, Korea
Tel : +82-62-230-6872
Fax : +82-62-232-6896
E-mail : isbang@chosun.ac.kr

Copyright © 2018 Korean Society of Milk Science and Biotechnology.
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.

ORCID
Bo Gyeong Kang
0000-0003-3883-8418
Iel Soo Bang
0000-0001-5284-9709

Abstract

Emergence of drug resistant strains of *Salmonella enterica* threatens milk processing and related dairy industries, thereby increasing the need for development of new anti-bacterials. Developments of antibacterial drugs are largely aimed to target the bacterial envelope, but screening their efficacy on bacterial envelope is laborious. This study presents a potential biosensor for envelope-specific stress in which a *gfp* reporter gene fused to *spy* gene encoding a periplasmic chaperone protein Spy (spheroplast protein y) that can sense envelope stress signals transduced by two major two-component signal transduction systems BaeSR and CpxAR in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and *S. Gallinarum*. Using *spy-gfp* operon fusions in *S. Enteritidis* and *S. Gallinarum*, we found that *spy* transcription in both serovars was greatly induced when *Salmonella* cells were forming the spheroplast and were treated with ethanol or a membrane-disrupting antibiotic polymyxin B. These envelope stress-specific inductions of *spy* transcription were abrogated in mutant *Salmonella* lacking either BaeR or CpxR. Results illustrate that induction of Spy expression can be efficiently triggered by two-component signal transduction systems sensing envelope stress conditions, and thereby suggest that monitoring the *spy* transcription by *spy-gfp* operon fusions would be helpful to determine if developing antimicrobials can damage envelopes of *S. Enteritidis* and *S. Gallinarum*.

Keywords

Salmonella Enteritidis, *Salmonella* Gallinarum, envelope stress, *spy-gfp* operon fusion

서론

장내세균과의 일종인 살모넬라균은 통성혐기성 그람 음성 간균으로 사람이나 동물 숙주에 침투하여 단순한 장염부터 생명을 위협하는 장티푸스(Typhoid)성 질환까지 다양한 살모넬라증(salmonellosis)을 일으킨다(Grassl and Finlay, 2008). 낙농 제품과 유제품 및 유가공 제품의 생산과 유통에 있어서 살모넬라균 감염에 의한 피해는 매우 빈번하며, 오염된 제품에 의한 대대적인 식중독 발병의 경우 또한 세계적으로 빈번하다(Ryan *et al.*, 1987; Kousta *et al.*, 2010). 특히, 유가공 제품의 생산에 쓰이는 시설과 기구들에서 발생하는 생균막(biofilm)이 큰 위험인자인데, 생균막내에도 많은 살모넬라균의 존재가 확인되고, 이들에 의해 발생하는 감염사례 또한 살모넬라균 제어의 필요성을 보여준다(Chmielewski and Frank, 2003; Oliver *et al.*, 2005). 살모넬라균은 감염 숙주 동물이 다양한 약 2,500종류의 혈청형을 가진 *Salmonella enterica* 종에서 비롯되며, 인간 숙주에 한정적으로 장티푸스를 일으키는 Typhi와 Paratyphi 를 제외한 모든 혈청형이 유가공 산업에 직·간접적으로 위협이 될 수 있다(Staff, 2002).

살모넬라균의 항미생물 제제에 대한 내성은 세계적으로 증가하는 추세이며, 이에 따른 새로운 항미생물 제제의 개발은 살모넬라균 감염 조절에 필수적이다(Wales *et al.*, 2010; Hur *et al.*, 2012). 많은 항미생물 제제들은 세균의 막과 막 외부 주변 공간의 훼손을 목표로 하는데, 그것은 세균 막의 직접적인 훼손뿐 아니라, 세균 생존에 필수적인 세균의 외부환경 신호 전달체계를 훼손함으로써 효과적으로 세균의 증식을 제어할 수 있기 때문이다. 하지만 개발되는 항미생물 제제가 세균 막 및 막 외부 주변 공간에 효과적으로 작용하는지를 검색하는 것은 여전히 많은 노력과 비용을 수반한다(Wolf and Mascher, 2016).

본 연구에서는 인간과 동물 모두에게 중요한 인수공통 감염성 혈청형인 Enteritidis와 가끔류의 주요 병원성 혈청형인 Gallinarum의 세균 막 훼손을 인지할 수 있는 바이오센서(biosensor)로서 *spy* 유전자 전사의 활용가능성을 조사하였으며, 두 혈청형 모두에서 효용성을 확인하였다.

Spheroplast protein Y(Spy)는 138개의 아미노산을 가진 작은 주변세포질(periplasm) chaperone 단백질로서, Spy 단백질은 *E. coli*가 여러 자극에 의해 spheroplast가 형성될 때 세포질내에는 존재하지 않고 반드시 주변세포질 공간 내에서만 위치하는 단백질로 처음 확인되었다(Hagenmaier *et al.*, 1997; Quan *et al.*, 2011). Spy는 4개의 α -helix의 긴 hairpin과 같은 구조로 독특한 접힘구조를 형성함으로써, 유연성을 지니고 있기 때문에 많은 종류의 단백질의 구조 안정화에 기여할 수 있을 것으로 예상되고 있다(Quan *et al.*, 2011). 다른 주변세포질 chaperone 단백질들과 달리, Spy발현은 *E. coli*와 *S. Typhimurium*에서 spheroplast를 형성하거나 원형질막 외부 스트레스에 의해 그 발현이 유도되는 것으로 알려졌으며, 그 유도는 세균 막 스트레스의 신호전달 역할을 하여 세균 막의 안전한 형태 유지에 필요한 많은 유전자 발현에 관여하는 이인자 신호전달체계(two component signal transduction system) 조절자들인 BaeR과 CpxR을 필요로 한다(Srivastava *et al.*, 2014; Jeong *et al.*, 2017). 본 연구에서는 살모넬라의 *spy* 유전자 프로모터 부위와 전체 유전자에 *gfp*(green fluorescence protein) 리포터 유전자가 각각 융합된 플라스미드를 이용하여, *S. Enteritidis*와 *S. Gallinarum*내 *spy* 유전자 전사의 세균 막 스트레스 인식 가능성과, BaeR과 CpxR의 조절 관계가 이 두 혈청형에서도 보존되는지 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 사용 균주 및 균주 배양조건

본 연구에서는 인수공통 감염을 일으키는 *Salmonella enterica* serovar Enteritidis(*S. Enteritidis*)와 *Salmonella enterica* serovar Gallinarum(*S. Gallinarum*)을 사용하였고, 이 실험에 사용된 돌연변이 균주는 Table 1에 정리하였다. 균주 배양을 위한 배지로는 Luria-Bertani(LB) 영양배지를 사용하였다. 사용한 모든 균주는 모두 진탕 배양기(HST, Korea)에서 37°C, 220 rpm 조건으로 배양하여 사용하였으며, 항생제는 ampicillin(200 µg/mL, AP), chloramphenicol(20 µg/mL, CM)을 배지에 넣어 사용하였다. 본 연구에 사용한 화학제들은 따로 표기하는 경우를 제외하곤 모두 Sigma-Aldrich사(Sigma-aldrich, Korea)로부터 구입하여 사용하였다.

2. *spy* 프로모터-*gfp* 오페론 융합 플라스미드 제작

spy-gfp 오페론 융합 플라스미드를 만들기 위해 먼저 PCR 증폭을 통해 원하는 유전자 산물을 얻었다. PCR 증폭에 사용된 주형은 *S. Typhimurium* 14028s 염색체이고, 전체 살모넬라 게놈에서 *spy* 프로모터 부분에 해당하는 유전자를 증폭시키기 위해 제한효소 자리 염기를 붙인 *spy* linker SacI Forward-2 프라이머와 *spy* linker BamHI Reverse-2 프라이머를 사용하였다 (Table 1). i-pfu DNA 증합효소(iNtRON Biotechnology Inc, Korea)를 이용해 PCR 증폭을 시켰다. 이 PCR 산물은 *spy* 유전자 개시코돈의 앞쪽 326 bp와 뒤쪽 34 bp를 포함한다. 증폭된 PCR 산물은 PCR 정제키트(GeneAll Biotechnology Co. Ltd, Korea)를 사용하여 정제하였고, 프라이머 부분에 붙인 SacI과 BamHI(NEB Inc, USA) 부위를 제한효소를 이용하여 잘라냈다. SacI 과 BamHI 제한효소 처리를 한 pFPV25 벡터와 함께 정제키트(GeneAll)

Table 1. Bacteria strains, plasmids and DNA oligomers used in this study

Strains	Genotype	Source or references
FB248	<i>Salmonella enterica</i> serovar Gallinarum(S. Gallinarum) WT	Cho <i>et al.</i> , 2015
FB254	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis(S. Enteritidis) WT	Sun and Hahn, 2012
IB2126	<i>S. Gallinarum</i> I_p spy-gfp1	This study
IB2129	<i>S. Enteritidis</i> I_p spy-gfp1	This study
IB2203	<i>S. Gallinarum</i> Δ cpxR :: CM I_p spy-gfp1	This study
IB2204	<i>S. Enteritidis</i> Δ cpxR :: CM I_p spy-gfp1	This study
IB2205	<i>S. Gallinarum</i> Δ baeR :: CM I_p spy-gfp1	This study
IB2206	<i>S. Enteritidis</i> Δ baeR :: CM I_p spy-gfp1	This study
Plasmids	Characteristics	Source or References
pFPV25	<i>gfp</i> fusion vector	Gift from Raphael Valdivia (Valdivia and Falkow, 1996)
$p_{spy-gfp}$ 1	<i>gfp</i> fusion containing the entire <i>spy</i> gene	Jeong <i>et al.</i> ,2017
$p_{spy-gfp}$ 2	<i>gfp</i> fusion containing the <i>spy</i> promoter	This study
DNA oligomers		Sequences (5'-3')
<i>spy</i> linker <i>SacI</i> Fw-1	TATGAGCTCTGCTATATCATGCTGTTGTA	
<i>spy</i> linker <i>Bam</i> HI Rev-1	TATGGATCCAGGACGGCTATAGAATTCTCTG	
<i>spy</i> linker <i>SacI</i> Fw-2	TATGAGCTCTGCTATATCATGCTGTTGTA	
<i>spy</i> linker <i>Bam</i> HI Rev-2	TATGGATCCTACCTTTATGCTG CATCATT	

로 정제 후 T4 DNA ligase(NEB)를 이용하여 결합시켜 *E. coli* DH5 α 에 형질전환시켰다. 형질전환된 콜로니들의 플라스미드를 분리하고, 삽입유전자의 염기서열을 확인한 후 살모넬라 균주들에 형질전환하였다.

3. 세균 성장 측정

LB 영양배지에서 하룻밤 배양한 *spy-gfp* 오픈론 융합 플라스미드를 보유하는 *S. Enteritidis*와 *S. Gallinarum* 균주를 PBS(phosphate buffer saline, pH 7.0)에 O.D_{600nm}=1.0 이 되도록 희석시켰다. 이들 균주 현탁액을 8 μ g/mL, 6 μ g/mL, 4 μ g/mL, 2 μ g/mL 농도의 polymyxin B가 포함되거나 포함되지 않은 LB 영양배지에 O.D_{600nm}=0.02가 되도록 동일한 양으로 Microplate에 접종하였다. 접종된 Microplate는 Bioscreen C Microplate Reader(Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finland)에서 37°C의 온도에서 24시간 동안 교반하여 배양하였고, 30분 간격으로 O.D_{600nm} 값을 측정하였다.

4. Spheroplast 형성

살모넬라균의 spheroplast 형성은 기존에 알려진 방법을 변형하여 사용하였다(Birdsell and Cotarobles, 1967). *spy-gfp* 융합 플라스미드를 보유하는 *S. Enteritidis*와 *S. Gallinarum*을 LB 영양배지에서 밤새 배양한 다음, 새로운 LB 영양배지에 4:1로 접종하여 37°C, 220 rpm의 진탕 배양기에서 O.D_{600nm}=0.8이 될 때까지 배양한 후 25°C, 5,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액을 버리고 1 M Tris-HCl(pH 8.0)을 0.01M으로 희석시킨 용액으로 같은 양을 첨가하여 한번 세척시켰다. 다시 한 번 원심분리하여 상층액을 제거 후 0.5 M sucrose(Bioshop, Canada)가 포함된 Tris-buffer로 같은 양으로 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 lysozyme(200 μ g/mL)을 첨가하고 10분 반응시킨 후 Tris-HCl (10 mM, pH8.0) buffer을 1:1 비율로 첨가한 후에 20 mM의 EDTA를 처리하여 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. Spheroplast가 형성되는 각 과정은 일부 세균을 떨어내 1% agarose 로 코팅한 후 Axioscope A1(Carl zeiss, Germany) 현미경으로 관찰하고 현미경에 연결된 CCD 카메라로 촬영하였다.

5. *spy-gfp*의 전사량 측정

spy-gfp 융합 플라스미드를 보유하는 *S. Enteritidis*와 *S. Gallinarum*을 LB 영양배지에서 밤새 배양



한 다음, 새로운 LB 영양배지에서 1:1,000으로 희석해 접종하여 37°C, 220 rpm의 진탕 배양기에서 대수기인 O.D_{600nm}=0.4이 될 때까지 배양한 후, 세포를 4% 에탄올(ethanol)과 각 균주에서 가장 높은 *spy-gfp* 유도를 보여주는 농도로 polymyxin B를 처리 후 1시간 추가로 더 배양하였다. 4% 에탄올이나 polymyxin B를 처리하기 전 배양액과 처리한 후의 배양액을 원심분리하여 PBS(phosphate buffer saline, pH 7.0)로 2번 세척 후 Black 96-well plate(SPL, Korea)에서 각 세균액(OD_{600nm}=1.0)의 형광 강도를 DTX 880 microplate reader(485 nm excitation과 535 nm emission; Beckmna Coulter, USA)로 측정하였다.

결 과

1. *spy-gfp* 오페론 융합 플라스미드의 특성

살모넬라내에서 *spy* 유전자 전사를 조사하기 위한 *spy-gfp* 오페론 융합 플라스미드를 제작하였다. 기존에 제작된 *spy-gfp* fusion 1은 *spy* 유전자의 promoter 부위와 구조유전자 전체를 포함한 반면(Jeong et al., 2017), 본 연구에서 제작된 *spy-gfp* fusion 2는 재료 및 방법에서 서술한 것처럼 *spy* 유전자의 promoter 부위만을 포함하였다. 먼저 *S. Typhimurium* 14028s 에 *spy-gfp* fusion 1, 2를 각각 형질전환시켜 이들의 대수기와 정지기에서 *spy-gfp* 전사의 발현량을 통한 차이를 확인 할 수 있었다. *spy-gfp* 1에 비해 *spy-gfp* 2는 균주의 대수기와 정지기 모두 발현량이 큰 것으로 확인되었다(Fig. 1). 이 결과는 *S. Enteritidis*와 *S. Gallinarum*에서도 마찬가지로 나타났으며, 이것은 이 살모넬라 형질형들 사이에 유사한 *spy* 유전자 전사 체계를 가지고 있음을 보여준다. *spy-gfp* fusion 2가 포함된 균주는 대수기와 정지기에서 모두 큰 발현량을 나타내기 때문에, 이후 세포막 스트레스에 대한 *spy* 유전자 전사의 유도를 관찰하기가 어려웠으며, *spy-gfp* fusion 1을 사용하여 이 후 연구에 사용하였다.

2. Polymyxin B는 *S. Enteritidis*와 *S. Gallinarum* 내의 *spy* 전사를 유도한다.

세균 막을 훼손하는 항생제인 polymyxin B에 대한 *S. Enteritidis*와 *S. Gallinarum* *spy* 유전자의 전사 유도를 측정하기 위해 *spy-gfp* 오페론 융합 플라스미드를 가진 *S. Enteritidis*와 *S. Gallinarum* 균주들의 polymyxin B에 대한 감수성을 먼저 측정하였다. LB 영양배지에서 polymyxin B를 농도 별로 처리하

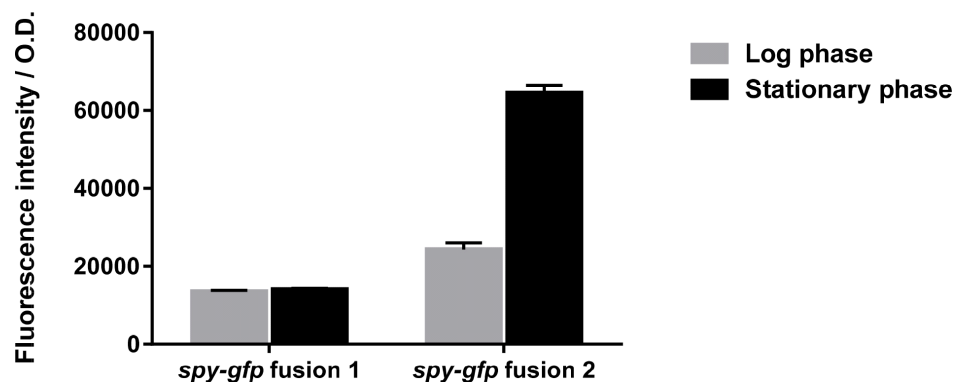


Fig. 1. The *spy* transcription monitored by GFP fluorescence expressed in *S. Typhimurium* harboring *spy-gfp* operon fusions. *Salmonella* cells cultured to log-phase (O.D_{600nm}=0.4) and stationary phase (24hr) were washed with PBS before measuring the fluorescence intensity. The fluorescence of same amount of cells (O.D_{600nm}=1.0) were measured by a microplate reader as described in the materials and methods section. Data shown are the means with standard deviation from three independent experiments.

여 성장 곡선을 관찰하였고, 그 결과 균주별로 성장이 지연되는 농도가 달랐다. *S. Enteritidis* 는 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서(Fig. 2A), *S. Gallinarum*에서는 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때(Fig. 2B), 균주의 성장률이 크게 감소하는 것을 확인하였고, 더 높은 농도에서는 모든 세균의 성장이 관찰되지 않았다. 세균 성장이 지연되는 농도를 *spy* 유전자 전사량 측정에 사용하였다. *spy-gfp* 오페론 융합 플라스미드를 가진 *S. Enteritidis/p_{spy-gfp}* 와 *S. Gallinarum/p_{spy-gfp}* 에서 형광도를 측정 한 결과, 각 LB 영양배지에서 대수기($\text{OD}_{600\text{nm}}=0.4$)까지 배양한 균주에서는 발현하지 않는 것을 확인하였고, 아무것도 처리하지 않은 균주에 비해 polymyxin B 를 처리한 균주들에서 *spy-gfp*의 발현이 크게 증가하는 것을 하였다(Fig. 3). *S. Enteritidis*의 경우 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 polymyxin B에 의해 각각 3.9배, 13.8배, *S. Gallinarum*의 경우 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 polymyxin B에 의해 1.6배, 2배 증가하는 것을 확인하였다.

3. *S. Enteritidis*와 *S. Gallinarum* 의 spheroplast 형성시 *spy* 전사가 크게 유도된다.

*S. Enteritidis*와 *S. Gallinarum*균주들이 spheroplast를 형성할 때 *Sp_y*의 발현이 유도되는지 확인하기

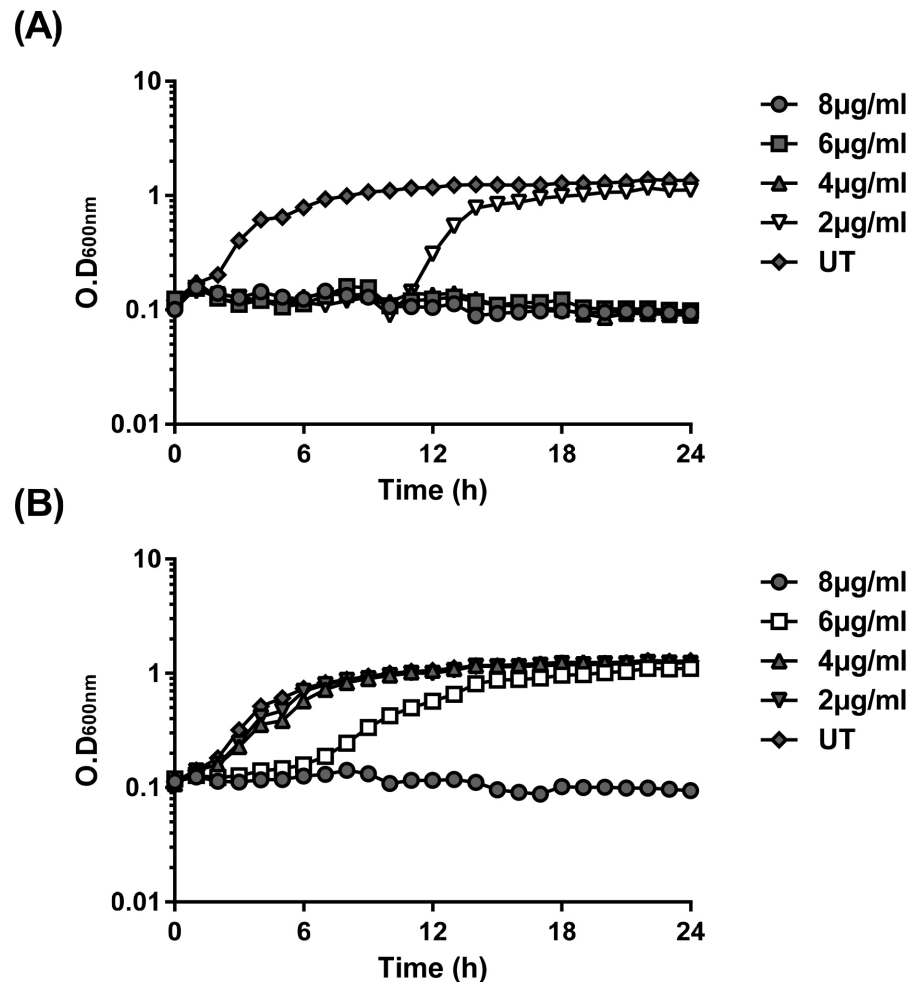


Fig. 2. The effect of polymyxin B on the growth rates of *S. Enteritidis* (A) and *S. Gallinarum* (B) harbouring *spy-gfp* fusion. The growth of *Salmonella* cells were monitored in the absence (UT) and presence of various concentrations of polymyxin B. Data are representatives of three independent experiments.

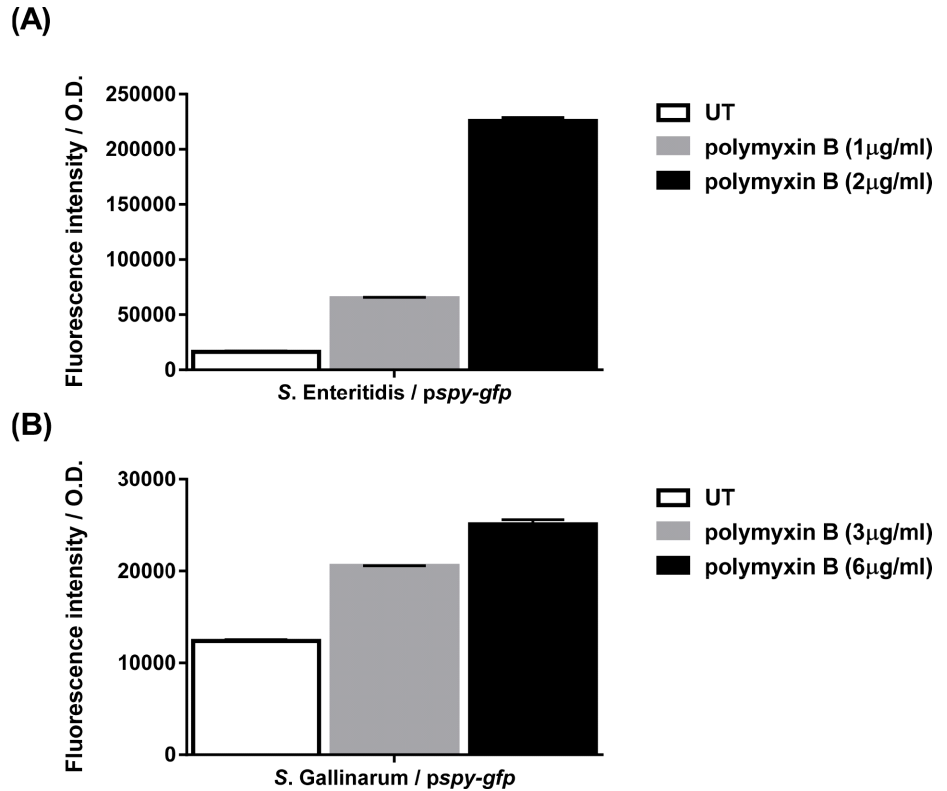


Fig. 3. Induction of the *spy-gfp* transcription in *S. Enteritidis* (A) and *S. Gallinarum* (B) by the polymyxin B treatment. *Salmonella* cells cultured to log-phase ($O.D_{600nm}=0.4$) were treated with various concentrations of polymyxin B for one hour. Polymyxin B treated and untreated (UT) cells were washed with PBS and same amount of cells ($O.D_{600nm}=1.0$) were subjected to measurement of their fluorescence intensities.

위해 *spy-gfp* 오페론 융합 플라스미드를 보유하는 *S. Enteritidis*와 *S. Gallinarum*을 이용하여 spheroplast 형성시 GFP의 발현을 확인하였다. Spheroplast 형성 과정중, sucrose와 lysozyme 처리까지 하였을 때는 spheroplast가 뚜렷하게 형성되지 않았고, sucrose, lysozyme, EDTA를 모두 처리한 경우 spheroplast가 형성되었으며, 이때에 GFP 발현이 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4A와 Fig. 5A). 하지만, sucrose와 lysozyme 및 EDTA를 각각 처리했을 때는 GFP의 발현을 볼 수 없었다(data not shown). 이 결과는 sucrose에 의한 삼투압에 대한 노출, lysozyme에 의한 펩티도글리칸의 용해, 그리고 EDTA에 의한 세포막의 약화를 통한 순차적 spheroplast형성이 완성될 때만 *S. Enteritidis*와 *S. Gallinarum*에서 *spy* 전사가 유도될 수 있음을 보여준다.

4. *S. Enteritidis*와 *S. Gallinarum* 의 세균 막 스트레스에 의한 *spy* 전사 유도는 CpxR과 BaeR에 의존적이다.

*E. coli*와 *S. Typhimurium*의 *spy* 유전자 전사 유도는 이인자 신호전달 체계인 CpxRA와 BaeSR에 의해서 조절이 되는 것으로 알려졌다(Bury-Mone *et al.*, 2009; Jeong *et al.*, 2017). *S. Enteritidis*와 *S. Gallinarum*에서도 이들 체계가 관련되는지 확인하였다. 두 혈청형 모두 *cpxR*과 *baeR*이 결손된 돌연변이 균주에 polymyxin B를 처리했을 때 대조군(WT)에 비해서 *spy-gfp* 발현이 거의 되지 않는 것을 확인하였다(Fig. 6). 이 실험에서는 세균 막에 스트레스를 주는 두 번째 요인으로 4% 에탄올을 처리하여 *S. Enteritidis*와 *S. Gallinarum*에서 *spy* 전사가 증가하는 것을 확인하였고, 이 전사 유도는 *cpxR*과 *baeR*

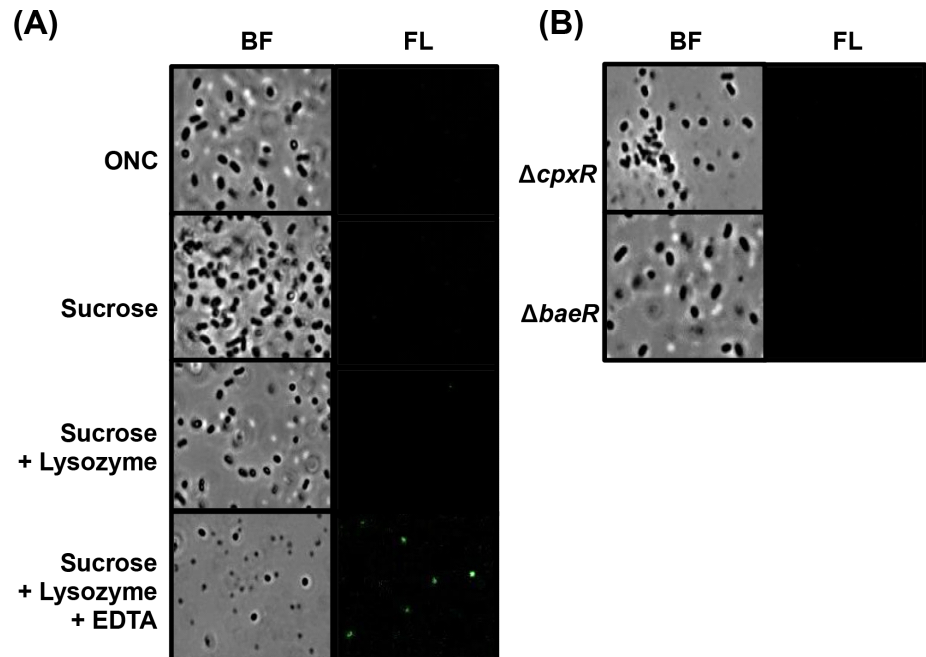


Fig. 4. Induction of the *spy-gfp* transcription in the spheroplasts of *S. Enteritidis*. (A) To visualize WT *S. Enteritidis* harboring the *spy-gfp* fusion during spheroplast formation, cell aliquots were collected at each step during cumulative treatments with sucrose, lysozyme, and EDTA, respectively. To normalize the incubation time for all samples, cell aliquots collected before EDTA treatment were further incubated to reach the same time as taken for the complete spheroplasting prior to microscopy. (B) Bacterial images from the spheroplast of *baeR* and *cpxR* mutant *S. Enteritidis* harboring *spy-gfp* fusions. All images are representatives of at least three independent experiments.

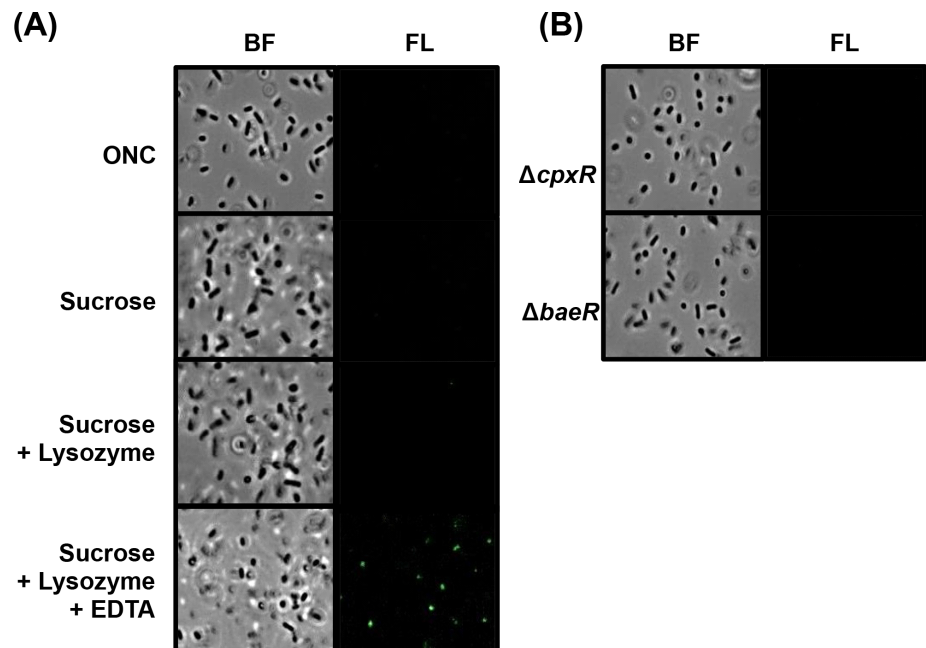


Fig. 5. Induction of the *spy-gfp* transcription in the spheroplasts of *S. Gallinarum*. All experiments and data presentation were performed essentially as described in the legend for Fig. 4.

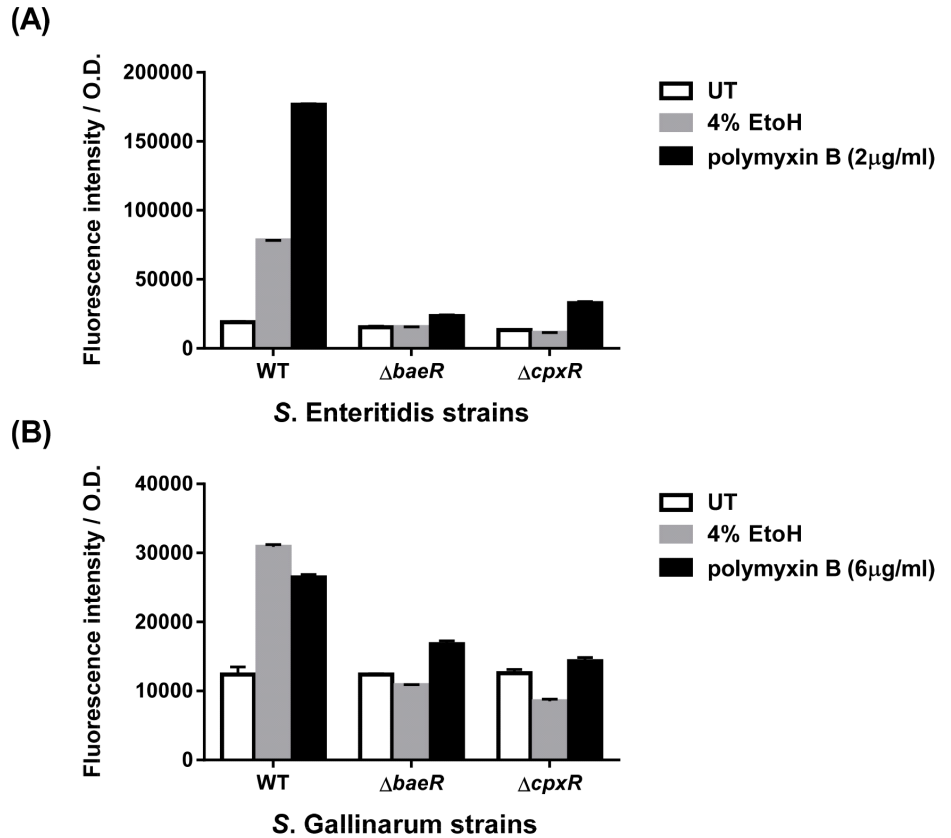


Fig. 6. BaeR and CpxR dependent *spy* transcription in *S. Enteritidis* (A) and *S. Gallinarum* (B) under membrane disrupting conditions. *Salmonella* cells cultured to log-phase (O.D._{600nm}=0.4) were treated with ethanol (4%) and polymyxin B [2 μg/mL for *S. Enteritidis* (A) and 6 μg/mL for *S. Gallinarum* (B)] for one hour, respectively. Measurement of their fluorescence intensities were performed essentially as described in the legend for Fig. 1.

이 결손된 돌연변이 균주들에서 일어나지 않았다. 또한, *cpxR*과 *baeR*이 결손된 돌연변이 균주들의 spheroplast 형성과정에서도 *spy* 유전자 전사 유도는 관찰되지 않았다(Fig. 4B 와 Fig. 5B). 이 결과들은 polymyxin B와 에탄올 등의 세균 막 훼손 요인과 spheroplast 형성과정 동안 생기는 막 스트레스들에 의해 *S. Enteritidis*와 *S. Gallinarum* 의 *spy* 유전자 발현이 크게 증가하고, 이 유도과정에 CpxR과 BaeR의 역할이 필수적임을 보여준다.

고 찰

본 연구에서는 낙농업 및 유가공 제품생산과 유통에서 주요한 살모넬라 감염원으로 작용하는 혈청형들 중 *S. Enteritidis* 과 *S. Gallinarum*의 Spy 발현과정중 *spy* 유전자 전사의 유도에 있어, 막 스트레스의 필요성 및 유전자 전사 유도에 참여하는 조절 단백질의 필요성을 처음으로 확인하였다. *spy* 유전자 전사의 유도를 확인하기 위해 제조한 *spy-gfp* 융합체들 중 promoter 부위만을 포함한 것은 promoter뿐 아니라, *spy* 구조유전자 전체를 포함한 것에 비해서 대수기와 정지기에서 모두 발현량이 크게 나타나는 것으로 나타났다(Fig 1). 이 결과는 *spy* 유전자 전사 유도과정에 있어서 *E. coli*에서 알려진 Cpx와 Bae시스템 이외에 다른 조절 인자의 존재가능성을 시사하지만, 후속연구를 통해 밝혀야 할 것으로 생각된다. 본 연구에서는 GFP 발현량을 모니터링으로써 보다 손 쉽게 *S. Enteritidis* 과 *S. Gallinarum*의 막 스트레스-특

이적 신호를 인식할 수 있는 바이오센서의 목적으로써 *spy-gfp* 융합 플라스미드를 활용하고자 하였다. 때문에 *spy* 유전자 전체를 포함하는 *gfp* 융합체의 막 스트레스 반응 능력의 발견은 의미가 크다고 볼 수 있다.

*E. coli*에서 처음 발견된 주변세포질내로의 Spy 단백질의 발현현상은 이 단백질의 chaperone 기능의 발견으로 더욱 주목 받고 있다(Hagenmaier *et al.*, 1997; Quan *et al.*, 2011). 대부분 세균들은 단백질의 활성을 복구할 수 있는 chaperone 단백질들을 생산하는데, 보통 이 단백질들은 세균이 스트레스에 노출되었을 때 세포질내에서 발현이 크게 증가하여 세포질내 변성된 단백질의 복구에 기여하고, 세균 병원성 발현에도 중요한 역할을 한다(Henderson *et al.*, 2006). 주변세포질 공간내에서 발현하는 chaperone 단백질들 또한 숙주 세포 내의 다양한 환경에서 세균의 세포 외부 및 숙주 세포내로 병원성 효과 단백질(effector protein)을 분비하는 과정을 돕고 병원성 발현을 증진시킨다(Burkinshaw and Strynadka, 2014). 하지만, 이 경우는 주변세포질내 특정 분비 체계의 확립을 위한 단백질들에 한정되어서 기능을 한다. 이들 외에 LolA, SurA, Skp, DegP 등의 chaperone 단백질이 주변세포질내 단백질들의 구조 안정화에 기여하는 것으로 알려졌는데, 수선이나 복구할 수 있는 대상 단백질들의 종류가 비교적 제한적이어서, 이들은 세균 병원성 발현에서 그 역할이 미미한 것으로 알려졌다(Rowley *et al.*, 2006). 하지만 단백질 구조 연구를 통해 확인한 Spy는 광범위한 기질 단백질들의 구조 안정화에 기여할 가능성이 클 것으로 예상된다. 실제로, *E. coli*의 필수 외막 단백질인 LptD는 Skp와 FkpA chaperone 단백질들에 의해서 특이적으로 그 구조가 안정되는 것으로 알려졌는데, *skp*와 *fkpA*가 결손된 균주에서도 Spy가 LptD의 기능적인 구조를 복원하는 데 충분히 작용하는 것으로 보고되었다(Goemans *et al.*, 2014). 현재까지 병원성세균의 병독성 발현에 Spy의 역할이 보고되지 않고 있으나, 보통 *E. coli*가 생산하는 단백질중 약 20% 정도가 주변세포질에 위치하고, 넓은 범위의 기질 단백질들을 수선할 것으로 예상되는 Spy의 발현이 세균 막 스트레스에 특이적으로 유도된다는 점을 상기하면, 세균 병독성에서 Spy의 역할이 작지 않을 것으로 예상할 수 있다.

이러한 이유로 본 연구에서 살모넬라의 막 스트레스 인식을 위해 선택하고 확인한 살모넬라균의 *spy* 전사 유도현상의 발견은 그 중요성이 작지 않다고 할 수 있다. 실제로 *spy-gfp* 발현은 살모넬라균에 처리된 polymyxin B의 양에 비례하여 증가하였으며(Fig. 3), spheroplast 형성시에도 모든 스트레스가 귀결되는 마지막 과정에서 발현이 크게 유도되는 것을 볼 수 있다(Fig. 4와 Fig. 5). 따라서 이 결과들은 *S. Enteritidis*와 *S. Gallinarum*의 막 스트레스 정도를 분석하는데 있어서, 본 연구에서 사용한 *spy-gfp* 오픈론 융합 플라스미드가 유용하게 사용될 수 있음을 시사한다.

*E. coli*와 *S. Typhimurium*에서 Spy의 발현은 Cpx과 Bae 두 가지 스트레스 반응 시스템에 의해 전사적으로 유도되는 것으로 알려졌는데(Srivastava *et al.*, 2014; Jeong *et al.*, 2017), *S. Enteritidis*와 *S. Gallinarum*에서도 이 두 시스템이 *spy* 전사 유도에 필요한 것으로 확인되었다(Fig. 4~Fig. 6). 다만 *S. Gallinarum*의 경우 *cpxR*과 *baeR*의 결손 돌연변이 균주에서도 polymyxin B에 대한 *spy*의 유전자 전사가 일정 부분 남아 있었다(Fig. 6). 이는 아마도 *S. Gallinarum*의 polymyxin B 반응성의 차이로 판단되며, 더 정교한 조절 시스템의 존재가능성 또한 배제할 수 없다.

병원성 세균의 막 스트레스에 대한 적응이나 내성에 참여하는 유전자들은 많이 존재하고, 이들의 발현은 전사단계에서 유도된다. 이들의 전사 유도는 Cpx와 Bae 및 세포막외부 기능(extracytoplasmic function)의 시그마 인자인 RpoE의 세가지 전사 조절 체계들이 주도하는 것으로 알려졌다(Rowley *et al.*, 2006). *E. coli*의 Cpx와 Bae 시스템은 막 스트레스를 감지하는 히스티딘 인산화 효소로 작용하는 내막 단백질인 BaeS와 CpxA가 막 스트레스에 의해 활성화 되어 인산화되고, 그들의 인산기를 반응 조절 인자 BaeR 및 CpxR로 각각 전달하여 고유의 표적 유전자들의 전사를 활성화시킨다. CpxAR은 세균의 막 스트레스를 받을 때, BaeSR은 구리(Cu), 아연(Zn) 등과 같은 금속 이온스트레스에 의한 막 스트레스로 활성화 된다. RpoE는 세포질막에 위치하는 RseA 단백질에 붙잡혀 있는 상태로 존재하다가, 세포질막 외부의 변성된 단백질들의 증가에 의해 DegS와 RseP 두 세포질막 단백질분해효소에 의해 RseA가 분해됨으로써



세포질내로 이동하여 표적 유전자들의 전사를 활성화시킨다. 본 연구에서는 *cpxR*과 *baeR* 결손 돌연변이는 성공적으로 제조하였으나, *rpoE* 돌연변이를 제조하지 못하였다. 하지만, *S. Typhimurium*을 이용한 이전 연구에서 *rpoE* 돌연변이가 *spy* 전사를 오히려 증가시켰는데, 이는 *rpoE* 돌연변이에 의해 더욱 증가된 막 스트레스에 의한 것으로 판단되었고, Cpx와 Bae 체계와는 달리 *spy* 전사 유도과정에 직접적인 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다(Jeong *et al.*, 2017).

병원성 세균의 막 스트레스 적응반응을 크게 조절하는 Cpx와 Bae 체계 모두 *S. Enteritidis*와 *S. Gallinarum*의 *spy* 전사 유도에 필요하다는 발견은 두 혈청형의 막 스트레스 적응반응 또한 두 체계에 크게 의존함을 보여준다. 또한, 이 결과는 Spy의 발현과 역할이 두 체계가 모두 활성화될 정도의 세균막 훼손이 필요함을 시사하며, 이때 *spy-gfp* 오페론 융합 플라스미드는 그 정도를 파악하는데 크게 유용할 것으로 사료된다.

요 약

낙농업 및 유가공 제품의 생산과 유통에서 살모넬라 감염에 의한 살모넬라증의 발생은 빈번하며, 이 세균의 항미생물 제제에 대한 내성 증가 현상 또한 지속되고 있어 새로운 항미생물 제제의 수요는 감소하지 않는다. 세균막의 훼손은 세균 생존을 쉽게 위협할 수 있기 때문에 개발되는 항미생물 제제들은 주로 세균의 막을 표적으로 삼지만, 개발되는 제제들이 실제로 세균막의 훼손을 초래하는지 구별하는 것은 많은 노력과 비용을 수반한다. 본 연구에서는 *E. coli* 세포막 스트레스에 의해 발현이 유도되고, 세균막 외부공간에서만 위치하며, 그 구조상 많은 단백질의 구조 안정화에 기여할 것으로 예상되는 chaperone 단백질 Spy(spheroplast protein Y)의 유전자에 상응하는 살모넬라 *spy* 유전자에 *gfp*(green fluorescence protein) 오페론 융합체를 제조하여, 이 융합체가 *Salmonella enterica*의 두 혈청형 Enteritidis와 Gallinarum의 세포막 스트레스를 인지하여 GFP 발현량이 크게 증가하는 것을 확인하였다. 또한 세균막 스트레스 신호를 특이적으로 인지하는 이인자 신호전달 체계(two component signal transduction system)인 Bae와 Cpx들이 두 살모넬라 혈청형의 *spy* 유전자 전사 유도에 필수적임을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 사용한 *spy-gfp* 오페론 융합체는 *S. Enteritidis*와 *S. Gallinarum*의 세포막 훼손을 특이적이고 신속하게 인식하는 biosensor로서 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구에 사용한 pFPV25를 제공한 Dr. Raphael H. Valdivia께 감사드립니다. 본 논문은 2016학년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었습니다.

References

- Birdsell, D. C. and Cota-Robles, E. H. 1967. Production and ultrastructure of lysozyme and ethylenediaminetetraacetate-lysozyme spheroplasts of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 93: 427-437.
- Burkinshaw, B. J. and Strynadka, N. C. 2014. Assembly and structure of the T3SS. Biochim. Biophys. Acta. 1843:1649-1463.
- Bury-Mone, S., Nomane, Y., Reymond, N., Barbet, R., Jacquet, E., Imbeaud, S., Jacq, A. and Bouloc, P. 2009. Global analysis of extracytoplasmic stress signaling in *Escherichia coli*. PLoS. Genet. 5:e1000651.

- Chmielewski, R. A. N. and Frank, J. F. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2:22-32.
- Cho, Y., Park, Y. M., Barate, A. K., Park, S. Y., Park, H. J., Lee, M. R., Truong, Q. L., Yoon, J. W., Bang, I. S. and Hahn, T. W. 2015. The role of *rpoS*, *hmp*, and *ssrAB* in *Salmonella enterica* Gallinarum and evaluation of a triple-deletion mutant as a live vaccine candidate in Lohmann layer chickens. *J. Vet. Sci.* 16:187-194.
- Goemans, C., Denoncin, K. and Collet, J. F. 2014. Folding mechanisms of periplasmic proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1843:1517-1528.
- Grassl, G. A. and Finlay, B. B. 2008. Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 24:22-26.
- Hagenmaier, S., Stierhof, Y. D. and Henning, U. 1997. A new periplasmic protein of *Escherichia coli* which is synthesized in spheroplasts but not in intact cells. *J. Bacteriol.* 179:2073-2076.
- Henderson, B., Allan, E. and Coates, A. R. 2006. Stress wars: The direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection. *Infect. Immun.* 74:3693-3706.
- Hur, J., Jawale, C. and Lee, J. H. 2012. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. *Food Research International* 45:819-830.
- Jeong, S. M., Lee, H. J., Park, Y. M., Kim, J. S., Lee, S. D. and Bang, I. S. 2017. Inducible spy transcription acts as a sensor for envelope stress of *Salmonella typhimurium*. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 37:134-138.
- Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P. and Drosinos, E. H. 2010. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control* 21:805-815.
- Oliver, S. P., Jayarao, B. M. and Almeida, R. A. 2005. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens and Disease* 2:115-129.
- Quan, S., Koldewey, P., Tapley, T., Kirsch, N., Ruane, K. M., Pfizenmaier, J., Shi, R., Hofmann, S., Foit, L., Ren, G., Jakob, U., Xu, Z., Cygler, M. and Bardwell, J. C. 2011. Genetic selection designed to stabilize proteins uncovers a chaperone called Spy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18:262-269.
- Rowley, G., Spector, M., Kormanec, J. and Roberts, M. 2006. Pushing the envelope: Extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:383-394.
- Ryan, C. A., Nickels, M. K., Hargrett-Bean, N. T., Potter, M. E., Endo, T., Mayer, L., Langkop, C. W., Gibson, C., McDonald, R. C., Kenney, R. T., Puhr, N. D., McDonnell, P. J., Martin, R. J., Cohen, M. L. and Blake, P. A. 1987. Massive outbreak of antimicrobial-resistant salmonellosis traced to pasteurized milk. *JAMA.* 258:3269-3274.
- Srivastava, S. K., Lambadi, P. R., Ghosh, T., Pathania, R. and Navani, N. K. 2014. Genetic regulation of spy gene expression in *Escherichia coli* in the presence of protein unfolding agent ethanol. *Gene* 548:142-148.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods Staff. 2002. *Salmonella* in dried milk. *Microbiological Testing in Food Safety Management*. Boston, MA: Springer US, pp. 273-284.



- Sun, J. S. and Hahn, T. W. 2012. Comparative proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Typhimurium and Gallinarum. *J. Vet. Med. Sci.* 74:285-291.
- Valdivia, R. H. and Falkow, S. 1996. Bacterial genetics by flow cytometry: Rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. *Mol. Microbiol.* 22:367-378.
- Wales, A. D., Allen, V. M. and Davies, R. H. 2010. Chemical treatment of animal feed and water for the control of *Salmonella*. *Foodborne Pathog. Dis.* 7:3-15.
- Wolf, D. and Mascher, T. 2016. The applied side of antimicrobial peptide-inducible promoters from Firmicutes bacteria: Expression systems and whole-cell biosensors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100:4817-4829.