



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2018 년 2 월

석사학위 논문

**The Study on the Changes of Bacterial
Inorganic Phosphate Metabolism in
Interactions between Nitric Oxide and
Salmonlla enterica serovar Typhimurium**

조선대학교 대학원

치의생명공학과

정 선 미

The Study on the Changes of Bacterial Inorganic Phosphate Metabolism in Interactions between Nitric Oxide and *Salmonlla enterica* serovar Typhimurium

산화질소와 살모넬라의 상호작용에서 발생하는
세균 무기 인산 대사의 변화 연구

2018 년 2 월 23 일

조선대학교 대학원

치의생명공학과

정 선 미

The Study on the Changes of Bacterial Inorganic Phosphate Metabolism in Interactions between Nitric Oxide and *Salmonlla enterica* serovar Typhimurium

산화질소와 살모넬라의 상호작용에서 발생하는

세균 무기 인산 대사의 변화 연구

지도교수 방 일 수

이 논문을 이학 석사학위 신청 논문으로 제출함

2017년 10월

조선대학교 대학원

치의생명공학과

정 선 미

정선미의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이창훈 (인)

위원 조선대학교 교수 이성행 (인)

위원 조선대학교 교수 방일수 (인)

2017년 11월

조선대학교 대학원

목 차

목 차	i
표 목 차	iv
도 목 차	v
ABSTRACT	vii
I. 서 론	1
II. 실험 재료 및 방법	6
1. 사용 균주 및 균주 배양조건	6
2. <i>pstS</i> 클론(Clone) 제작	7
3. 산화질소 (NO) 처리	7
4. RNA(Ribonucleic Acid) 추출	8
5. cDNA (complementary DNA) 합성 및 정량 PCR 과 real-time (RT) PCR	9

6. 세포 내 자유 무기인 측정	10
7. ICP-MS (Inductively coupled plasma mass spectrometry).....	10
8. ³¹ P-NMR (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy).....	11
9. 원형질체 (Spheroplast) 형성	12
10. 세균 성장 곡선 측정 (Bioscreen).....	12
Ⅲ. 표	13
Ⅳ. 결 과	15
1. NO 에 의해 세포 내 무기인산 (inorganic orthophosphate) 농도가 줄어든다.....	15
2. <i>S. Typhimurium</i> 에 NO 를 처리하면 <i>pstS</i> 의 전사량이 증가한다.....	17
3. NO 를 처리하면 <i>S. Typhimurium</i> 의 ³¹ P NMR spectra 가 변화한다....	19
4. NO 에 의한 <i>S. Typhimurium</i> 의 ³¹ P NMR spectra 변화는 cytoplasm 에서 관찰되지 않는다.....	23
5. <i>S. Typhimurium</i> 에서 NO 에 의한 ³¹ P NMR spectra 의 변화는 periplasm 에서 관찰된다.....	25

6. 무기인 수송체인 *pst operon* 이 돌연변이 된 *S. Typhimurium* 에서는 NO 에 의한 ^{31}P NMR spectra 변화가 관찰되지 않는다..... 28

7. *pstS* 가 돌연변이된 *S. Typhimurium* 에서도 NO 에 의한 ^{31}P NMR spectra 변화가 관찰되지 않는다..... 31

V. 고 찰 35

VI. 참 고 문 헌 38

초 록 42

표 목 차

Table 1. Bacteria strains used in this study.....	13
Table 2. Primer used for construction of clone and quantitative, real-time PCR analysis.....	14

도 목 차

Figure 1. <i>Pst</i> operon structure and model.	3
Figure 2. Intrabacterial Pi concentration and total phosphorous contents in <i>S. Typhimurium</i>	16
Figure 3. <i>pstS</i> transcription in <i>S. Typhimurium</i>	18
Figure 4. ³¹ P NMR spectra of <i>S. Typhimurium</i> wild type.	20
Figure 5. Orthophosphate region of ³¹ P NMR spectra of <i>S. Typhimurium</i> wild type.	21
Figure 6. New phosphorous compounds detected in ³¹ P NMR spectra of <i>S. Typhimurium</i> wild type treated with sperNO.	22
Figure 7. ³¹ P NMR spectra of cytoplasm in <i>S. Typhimurium</i> wild type.	24
Figure 8. ³¹ P NMR spectra of periplasmic extracts from <i>S. Typhimurium</i> wild type.	26
Figure 9. Comparison of ³¹ P NMR spectra of <i>S. Typhimurium</i> wild type.	27
Figure 10. ³¹ P NMR spectra of <i>S. Typhimurium</i> Δ <i>pst</i> operon <i>pitA</i> mutant.	29
Figure 11. Comparison of ³¹ P NMR spectra of <i>S. Typhimurium</i> mutant.	30

Figure 12. ^{31}P NMR spectra of *S. Typhimurium* $\Delta pstS$ mutant..... 32

Figure 13. Comparison of ^{31}P NMR spectra of *S. Typhimurium* $\Delta pstS$ mutant..... 33

Figure 14. Growth curves of *S. Typhimurium* treated with sperNO or not..... 34

ABSTRACT

The Study on the Changes of Bacterial Inorganic Phosphate Metabolism in Interactions between Nitric Oxide and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Jeong, Seon Mi

Advisor : Prof. Bang, Iel-Soo, PhD

**Department of Dental Bioengineering,
Graduate School of Chosun University**

For successful infection of pathogenic bacteria, tolerance to nitric oxide (NO) stress produced by host macrophages is essential. Previous studies have shown that inorganic phosphate (Pi) homeostasis is important for nitric oxide tolerance of *Salmonella*. In this study, I have found that, when *S. Typhimurium* were treated with NO, the concentration of intrabacterial free phosphate is reduced while levels of total phosphorous contents in *Salmonella* are unchanged. This result suggest that NO and inorganic phosphate may interact in *Salmonella in vivo*. ³¹P NMR spectroscopy was employed to observe the phosphorous compounds in *Salmonella* during NO treatment. The result spectra present chemical shift of peaks corresponding orthophosphate and also presents new peaks of phosphorous compound unidentified so far. In order to check where these new peaks of unidentified phosphorous compounds come from inside the cell, contents of cytoplasm and periplasm were isolated by cold osmotic shock procedure. The result shows that these new peaks of NMR spectra are derived from periplasmic space in *Salmonella*. In order to get increased amount of these new phosphorous compounds

for further study, I have used Δpst operon *pitA* mutant *Salmonella* lacking major orthophosphate transporter Pst and Pit systems. Because it has been known that most of free phosphate in periplasmic space are transported in to cytoplasm by Pst and Pit. Unexpectedly, these new NO specific peaks disappear in the Δpst operon *pitA* double mutant, but in the $\Delta pitA$ single mutant, these peaks were observed, suggesting that these phenomenon is related with Pst transport system. In Pst transport system, PstS is the Pi binding protein that transport Pi in periplasm into Pst transport complex, so expected to play an important role in forming the new NO specific peaks in periplasm. ^{31}P NMR spectra of $\Delta pstS$ mutant also did not present the new peaks. However, $\Delta pstS$ mutant harboring complementing *pstS* clone was not able to present these NO specific peaks. This seems to be related to the not yet identified mechanism of the Pst transport complex. In conclusion, I have found that Pst transport system is associated with the new phosphorous compounds formed by NO in periplasmic space of bacteria. Future research will be needed to characterize these phosphorous compounds and related mechanisms.

I. 서론

*Salmonella enterica*는 감마프로테오박테리아강에 속하는 장내세균의 일종이다. 현재까지 *S. enterica*의 2,500가지 이상의 혈청형이 보고되었으며 사람이나 동물 숙주에 침투하여 장염에서 장티푸스성 질환까지 다양한 질병을 야기한다. 그 중 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*)는 생쥐에서 전신감염을 일으킬 수 있는 병원성 발현 기작의 모델 균주로 이용되고 있다 [1]. *Salmonella*는 막대모양 형태로 주모성 편모에 의한 운동성을 가지며 일반적으로 오염된 음식물이나 물을 섭취해 감염된다. *Escherichia coli*와 더불어 대표적인 그람음성균으로 유전학적 기술이 다른 세균에 비해 잘 적용되어 기초 미생물 연구에도 좋은 모델로 이용되고 있다.

세균은 숙주 감염 과정에서 다양한 문제를 극복해야 하는데, 성공적인 감염을 위해서는 병원균이 숙주 환경의 변화에 적절하게 대응할 수 있어야 한다. *Salmonella*를 포함하는 세균에 감염된 숙주는 자체 방어 메커니즘에 의해 세균의 증식을 억제한다. 선천적 면역은 병원성 미생물 침입에 대한 최초 방어선이며 먼저 더 이상 증식하지 못하도록 식세포를 이용하여 숙주 내 균을 제거시킨다 [2]. 활성화된 식세포에서는 유도성 일산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase ; iNOS)에 의해 산화질소(nitric oxide ; NO)가 생성된다 [3]. NO는 병원성 균류, 바이러스, 기생충 및 박테리아의 효율적인 제거를 위해 요구되는 선천 면역계의 필수 구성 성분 중에 하나이다 [4]. NO의 노출은 핵 단백질, 단백질 티올, 지질 이중층 및 DNA를 비롯한 다양한 세포 내 표적을 변형시켜 박테리아의 성장을 억제할 수 있다 [5-9]. NO나 NO의 화학작용을 통해 만들어지는 nitrogen oxide (NO₂),

peroxynitrite (ONOO⁻), dinitrogen trioxide (N₂O₃), 그리고 S-nitrosothiols (RSNO)와 같은 다양한 활성질 소종 (reactive nitrogen species ; RNS)은 대식세포에 의해 만들어지는 superoxide (O₂^{-·}) 나 hydrogen peroxide (H₂O₂) 등의 활성산소종 (reactive oxygen species ; ROS)와 함께 세균에 대한 주요 방어 메커니즘이다 [10, 11].

*S. Typhimurium*의 Flavohemoglobin Hmp는 세균 내의 NO를 해독하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NO가 처리된 *Salmonella*에서는 호흡 억제가 나타나는데 [12], Hmp가 NO에 의한 호흡 억제를 막고 대식세포에서 *Salmonella*의 증식을 돕는다. Hmp는 NO를 호기성, 미세호기성 조건에서는 O₂-의존성 denitrosylase 메커니즘으로 질산염 (NO₃⁻)으로 해독하며 혐기성 조건에서는 O₂- 독립적 deoxygenase 메커니즘으로 아산화질소 (N₂O)로 환원시킨다 [13].

Hmp 이외의 또 다른 NO 저항 기작을 알아보기 위한 선행연구의 결과로 NO 저항성에 무기인 (inorganic phosphate ; Pi)의 수송이 관여한다는 것을 발견했다 [14]. 인 (phosphorous)은 세균 내 인지질, 인단백질, 탄수화물, 핵산 등의 중요한 생분자 합성을 위한 세포 생존에 필수적인 영양분이다. 인산화와 탈 인산화를 통한 세포간 대사, 단백질과 유전자를 조절하는 생화학적 반응, 에너지 대사, 세포 신호 전달 과정 등 세균의 기능과 생존에 중요한 역할을 한다. 자연에서 흔히 발견되며, 주로 Pi 형태로 세포 내에 흡수된다. 세균은 외적 및 내적인 여러 가지 변화에 대응하여 내부 항상성을 유지하는 것이 굉장히 중요한데, Pi의 항상성 유지 또한 세균 대사에 필수적이다. *E. coli*에서 Pi의 조절과 직, 간접적으로 연관되어 있는 유전자만 400개 정도이며, 이는 전체 proteome의 10%에 해당하는 숫자이다 [15]. *E. coli*에서 Pi를 조절하는데 주로 관여하는 Pho regulon의 유전자 구성원은 적어도 40개이며 Pho regulon의 핵심 멤버는 *eda*, *phn*CDEFGHIJKLMNOP, *phoA*, *phoBR*, *phoE*, *phoH*, *psiE*, *pst*SCAB*phoU* 및 *ugp*BAECQ로 9개의 전사단위 등이다 [16]. Pho regulon 유전자의

GlpT (glucose-6-phosphate transporter), UlpT (*sn*-glycerol-3-phosphate transporter) 시스템 등이 있다 [18]. Pst 수송 시스템은 *pstSCAB-phoU* operon에 의해 발현되며 PstS는 periplasm 내 Pi와 결합하는 용질결합 단백질로 Pst 수송 시스템에 Pi를 운반하는 기능을 한다. PstC와 PstA는 PstS가 운반한 Pi를 세포질 내로 이동시키는 역할을 하고 PstB는 Pi 수송을 위한 에너지를 전달하며 PhoU는 Pi 농도에 따른 신호를 *phoBR*에 전달하는 것으로 알려져 있다 [16].

세포 외부의 Pi 농도가 풍부할 때에는 Pi와 결합한 PstS가 periplasm에 축적되면서 세포막의 PstCAB 복합체와 결합하고 이 신호는 PhoU에 의해 PhoR에 전달되어 PhoR의 포스파타아제 활성을 촉진함으로써 반응 조절자인 PhoB를 탈인산화시킨다. PhoB가 불활성화되면 관련 유전자들의 전사 유도가 일어나지 않는다 [19]. 이러한 높은 Pi 조건에서는 Pst 시스템의 발현은 비활성화되고 Pi-금속 복합체로 Pi를 수송하는 Pit 시스템의 발현은 유지된다 [20]. 반대로 세포 외부 Pi 농도가 4μM 미만일 때는 PhoU가 PhoR의 ATPase 도메인과 반응함으로써 PhoR의 히스티딘 잔기가 자기인산화 (autophosphorylate) 되고 인산기는 PhoB의 아스파르테이트 잔기로 옮겨져 PhoB-P가 축적된다. 이런 인산기의 이동은 PhoB를 활성화시키고 PhoB-P 형태로 Pho box의 프로모터에 결합하여 유전자의 전사를 촉진시킨다 [17].

선행연구 결과 Pi 수송체인 *pst* operon과 *pit*이 결손된 돌연변이 균주가 NO에 감수성을 가지고 Pi를 공급해주면 NO에 대한 내성이 다시 회복되는 것이 확인되었다 [14]. 이는 Pi가 *S. Typhimurium*의 NO 저항성에 필요한 아주 중요한 요소라는 것이다. 본 연구에서는 ³¹P NMR spectroscopy를 사용하여 실험하였는데 NMR이란 핵자기공명분석법이라고도 하며 용액 또는 고체 상태에서 작은 분자와 거시 분자 모두의 구조와 형태를 설명하기 위한 매우 강력하고 다양한 도구이다 [21]. 또한 NMR 분석법은 분자의 회전 및 병진 확산 계수와 내부 운동을 결정하여 광범위한

범위 또는 시간 범위에 걸쳐 분자 및 내부 역학에 대한 자세한 정보를 제공할 수 있다 [22]. 본 연구에서는 세균 내 NO와 Pi 상호작용 과정에서 인산염 대사에 NO가 어떠한 영향을 주는지 인 화합물의 변화를 ^{31}P NMR spectroscopy를 통해 관찰하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 사용 균주 및 균주 배양조건

본 연구에서는 야생형 균주 (WT)로 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028s를 사용하였고, 이 실험에 사용된 돌연변이 균주는 Table 1에 정리하였다. 균주의 배양을 위한 배지로는 Luria-Bertani (LB) broth 영양 배지와 0.2 % glucose를 포함하는 E 최소배지 (2.35 g/L MgSO₄, 50 g/L citric acid monohydrate, 87.5 g/L NaNH₃PO₄, 327.5 g/L K₂HPO₄) 그리고 0.4 % glucose를 포함하는 MOPS (3-N-morpholino propanesulfonic acid) 최소배지 (8.37 g/L MOPS, 0.72 g/L Tricine, 0.0028 g/L FeSO₄·7H₂O, 1.9 M NH₄Cl 5 ml/L, 0.276 M K₂SO₄ 1 ml/L, 0.02 M CaCl₂·2H₂O 0.025 ml/L, 5 M NaCl 10 ml/L, Micronutrient stock 0.02 ml/L)를 사용하였다. MOPS 배지는 10배 농도로 먼저 만든 후 0.2 µm sterile syringe filter (Corning Inc, Germany)로 여과한 후 -20°C에 보관 하여 사용할 때 마다 멸균수 (distilled water)에 녹여 사용하였다. 낮은 무기인 조건에서는 0.1 mM이나 1 mM K₂HPO₄를 넣어 사용하였고, 높은 무기인 조건에서는 10 mM K₂HPO₄를 넣어 사용하였다.

사용한 균주는 모두 진탕 배양기에서 37°C, 220 rpm 조건으로 배양하여 사용하였으며 항생제는 chloramphenicol (20 µg/ml ; CM), ampicillin (200 µg/ml ; AP)을 배지에 넣어 사용하였다.

2. *pstS* 클론(Clone) 제작

pstS clone (1,317bp)을 만들기 위해 먼저 PCR 증폭을 통해 원하는 유전자 산물을 얻었다. PCR 증폭에 사용된 주형은 *S. Typhimurium* 14028s 염색체이고, Table 2에 표기된 *pstS* Forward 프라이머와 *pstS* Reverse 프라이머를 사용하였다. i-pfu DNA 중합효소 (iNtRON Biotechnology Inc, Korea)를 이용해 PCR 증폭을 시켰다. 증폭된 PCR 산물은 PCR 정제키트 (GeneAll Biotechnology Co. Ltd, Korea)를 사용해 정제하였고, 프라이머 부분에 부착한 XbaI과 HindIII (NEB Inc, USA) 부위를 제한효소를 사용하여 잘라냈다. XbaI과 HindIII 제한효소 처리를 한 pBAD30 벡터와 같이 gel 정제키트 (GeneAll)로 정제한 후 T4 DNA ligase (NEB)를 사용하여 하룻밤 동안 결찰시켜 *E.coli*인 DH5 α 에 형질전환 시켰다. 형성된 콜로니를 *pstS* Forward, Reverse 프라이머로 PCR을 시행해 컨트롤과 다른 사이즈를 골라 다시 LB broth 영양 배지에 하루 동안 배양한 후 플라스미드를 순수분리 하였다. 분리한 플라스미드에 다시 XbaI과 HindIII를 처리하여 *pstS* 클론을 최종 확인하였다.

3. 산화질소 (NO) 처리

SpermineNONOate [(Z)-1-[N-[3-aminopropyl]-N-[4-(3-aminopropyl ammonio)butyl]-amino diazen-1-ium-1,2-diolate ; sperNO] (Cayman chemical, USA)를 산화질소 공여체로 사용하였다. sperNO는 0.01 N NaOH에 녹여 500 mM로 제조한 후 -80 $^{\circ}$ C 에 보관해 사용할 때마다 희석하여 사용하였다.

4. RNA(Ribonucleic Acid) 추출

하루 동안 배양한 *S. Typhimurium* 야생형 균주를 1 mM Pi 조건과 10 mM Pi 조건의 MOPS 배지에 1:200으로 접종한 후 O.D_{600nm} 값이 0.5가 될 때까지 배양하였다. 각 조건의 튜브에서 아무것도 처리하지 않은 (untreated ; UT) 균 3ml씩을 먼저 회수하고, 3 ml에 sperNO 500 μM을 처리하였다. 이 때 10 mM Pi 조건의 균 3 ml은 0.1 mM Pi MOPS 배지로 세척하고 0.1 mM Pi의 조건의 MOPS 배지로 1시간 동안 같이 배양한 후 회수하였다.

회수한 균주에 5 % phenol (95 % EtOH) 600 μl (1:5)을 넣고 vortexing 해 얼음에서 30분간 처리한다. 4 °C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리 한 후 phenol을 제거하고 pellet에 10 mg/ml로 제조한 lysozyme (Sigma Aldrich Inc, Germany) 100 μl를 넣고 상온에서 2분에 한번씩 10초 동안 총 30분 vortexing 하였다. 그런 다음 RNA iso Plus (TAKARA Biomedical Inc, Japan) 1 ml을 넣고 vortexing 후 상온에서 5분간 정치시키고 400 μl의 chloroform을 넣고 다시 상온에서 5분간 정치시킨 후 4°C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리 시켜 500 μl정도의 상층액만 조심스럽게 새 튜브로 옮겼다. 그 상층액에 250 μl의 isopropanol을 넣고 inverting 후 10분간 정치시키고 다시 원심분리해 상층액을 제거하였다. 그렇게 분리한 RNA에 750 μl의 차가운 70% EtOH를 넣고 세척한 후 건조시켜 DNase free water (GeneAll)에 용해시켰다. 남아 있는 DNA는 DNase I (Sigma)을 상온에서 2시간 처리해 제거하였다.

5. cDNA (complementary DNA) 합성 및 정량 PCR 과 real-time (RT) PCR

cDNA 합성은 1 μ g 의 RNA 에 Rnasin Ribonuclease Inhibitor, Random primer, M-MLV reverse transcriptase (Promega Co. Ltd, USA)를 사용하였다. cDNA 의 합성 조건은 25 $^{\circ}$ C;10 분, 37 $^{\circ}$ C;60 분, 90 $^{\circ}$ C;5 분으로 설정하였다. 정량 PCR 은 e-Taq DNA polymerase (SolGent Co. Ltd, Korea)를 사용하여 95 $^{\circ}$ C;5 분, 95 $^{\circ}$ C;40 초, 52 $^{\circ}$ C;30 초, 72 $^{\circ}$ C; 1 분, 72 $^{\circ}$ C;7 분의 조건으로 25cycle 로 시행하였다. real-time PCR 은 cDNA 를 가지고 GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega)를 사용해 진행하였다. Rotor-Gene Q (QIAGEN, Germany)를 이용한 real-time PCR 의 조건은 95 $^{\circ}$ C;2 분, 95 $^{\circ}$ C;15 초, 60 $^{\circ}$ C;1 분으로 40cycle 을 시행하였다.

사용된 프라이머는 Table 2 에 따로 정리하였으며 정량 PCR 과 real-time PCR 에 사용한 control 프라이머는 housekeeping 유전자인 *rpoD* 이다. 프라이머는 mbiotech 사에서 제작하여 이용하였다.

6. 세포 내 자유 무기인 측정

야생형 균주를 E 최소배지에서 O.D_{600nm} 0.5가 될 때까지 배양한 후 UT 균주를 따로 회수하고 1 mM sperNO와 3 mM sperNO를 각각 처리하고 1시간 더 배양하였다. 그런 다음 차가운 멸균수로 2번 세척하고 원심분리 하여 얻은 pellet에 0.5 M의 perchloric acid 100 μ l를 넣고 5분마다 10초씩 총 30분 vortexing 해 세포를 깨고 12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C의 조건에서 10분간 원심분리 해 상층액 50 μ l를 회수하였다 [23].

무기인 측정은 Malachite Green Phosphate Assay kits (BiosAssay Systems, U.S.A)를 사용하였다. 먼저 96 well cell culture plate (SPL, Korea)에 0, 4, 8, 12, 16, 24, 32, 40 μ M의 인산염 standard 용액과 샘플 80 μ l씩을 분주하고, Reagent A와 B를 100:1로 혼합하여 Working Reagent를 만들어 20 μ l씩 분주한 후 pipetting으로 섞어주었다. 30분 정도 반응 시킨 후 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Inc, USA)에서 620nm 파장의 값을 측정하였다. 그런 다음 Graphpad Prism을 이용하여 standard curve를 구하고 그 농도를 기준으로 샘플의 농도를 구하였다.

7. ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)

S. Typhimurium 야생형 균주를 0.2 % glucose를 포함하는 E 최소배지에서 배양하고 O.D_{600nm} 값이 0.5가 되면 UT 균주를 따로 회수하고 1 mM의 sperNO를 각각 1시간, 2시간 처리하였다. 멸균수로 2번 세척하고 원심분리 하여 얻은 pellet에 Nitric acid 1 ml을 넣고 vortexing 한 후 85 $^{\circ}$ C에서 45분간 boiling 하고 16,000 g, 20분의 조건으로 원심분리 하여 샘플을 수득하였다. ICP-MS는 한국기초과학지원연구원의 환경과학연구부의 지원을 받아 실험하였다.

8. ^{31}P -NMR (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy)

물질은 원자로 구성되어 있고, 원자는 원자핵과 전자로 구성되어 있다. 원자핵과 전자는 자기모멘트라는 물리적 특성을 가지고 있는데, 이 때문에 자기장에 영향을 받게 된다. 자기장을 가해주지 않았을 때는 물질 속에서 임의의 방향을 띤 자기모멘트가 자기장이 강하면 강할수록 더 많은 수의 원자핵이 자기장의 방향과 일치하게 정렬하게 된다. 이 원리로 시료를 자기장 안에 넣으면 여러 방향으로 난잡하게 있던 원자핵들이 자기장에 영향을 받아 정렬되고 이 때 라디오 파를 조사하면 자기모멘트가 라디오파 에너지를 공명적으로 흡수함으로써 스펙트럼을 얻을 수 있다. 이를 분석하여 물질의 정보를 얻을 수 있다.

하룻밤 배양한 균주를 0.2 % glucose 를 포함하는 E 최소배지 80 ml 에 1:200 으로 다시 접종한 후 $\text{O.D}_{600\text{nm}}$ 0.7 까지 진탕 배양하였다. sperNO 를 처리할 시 1 시간을 더 배양하였다. 그런 다음 4,000 rpm, 4 °C 의 조건에서 10 분동안 원심 분리한 후 100 mM 의 MOPS Buffer (20.9 g/L MOPS, pH 7.0)로 3 번 세척하였다. 상층액을 모두 제거한 pellet 에 Deuterium oxide (D_2O) (Sigma) 600 μl 를 넣고 vortexing 하였다. 모든 샘플을 5 mm NMR tube (NORELL Inc, USA)에 넣어 20 °C 에서 데이터를 측정하였다. Observation frequency 121.5 MHz, Acquisition time 0.3 초, delay time 2 초, scan 25,000 번의 조건으로 Lambda AL300 (Jeol Ltd, Japan) spectrometer 를 통해 기록하였다. Chemical shift 는 85 % Phosphoric acid solution (H_3PO_4) (Sigma) external reference 를 사용하여 조정하였다.

9. 원형질체 (Spheroplast) 형성

세척까지 끝낸 NMR 샘플에 0.5 M Sucrose, 0.03 M Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM EDTA를 첨가하고 vortexing 하였다. 그리고 상온에 있는 교반기에서 180 rpm으로 10분간 shaking한 후 12,000 rpm, 4 °C의 조건에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 차가운 D₂O 1 ml로 vortexing 하고 4 °C의 조건에서 rotator로 10분동안 shaking 하였다. 다시 12,000 rpm, 4 °C의 조건에서 30분간 원심분리 하고 상층액을 회수하거나 pellet을 D₂O로 vortexing 시켜 실험하였다.

10. 세균 성장 곡선 측정 (Bioscreen)

LB broth 배지에서 하룻밤 배양한 *S. Typhimurium* 야생형 균주, $\Delta pstS$ 돌연변이 균주 그리고 pBAD30 벡터와 *pstS* 클론 벡터가 들어간 $\Delta pstS$ 돌연변이 균주를 원심분리해 PBS (phosphate buffer saline, pH 7.0)로 3번 세척한 후 O.D_{600nm} 값이 10이 되도록 희석시켰다. 그리고 500 μ M의 sperNO가 포함되거나 포함되지 않은 E 최소 배지에 O.D_{600nm} 값이 0.02가 되도록 Microplate (Honey comb)에 접종하였다. Microplate는 Bioscreen C Microbiology Microplate Reader (Transgalactic Ltd, Europe)를 사용하여 37°C에서 24시간 동안 교반하면서 30분 간격으로 O.D_{600nm} 값을 측정하였다.

III. 표

Table 1. Bacteria strains used in this study.

Strains	Genotype	Source
IB1	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium 14028s	ATCC
IB1134	$\Delta pstS$:: CM	[14]
IB1187	$\Delta pitA$:: CM	[14]
IB1195	Δpst operon <i>pitA</i> :: CM	[14]
IB1320	Δpst operon <i>pitA</i> :: CM / pUC19- <i>pst</i> operon :: AP	[14]
IB2063	$\Delta pstS$ (no AB)	This study
IB2122	$\Delta pstS$ (no AB) / pBAD30- <i>pstS</i> :: AP	This study
IB2136	$\Delta pstS$ (no AB) / pBAD30 :: AP	This study

Table 2. Primer used for construction of clone and quantitative, real-time PCR analysis.

Primer name	Primer sequence (5' – 3')
Clone	
<i>pstS</i> Fw	TGCTCTAGAACATGTGATGC
<i>pstS</i> Rev	TATAAGCTTTTAATACAGCGCCTTA
qRT, real-time PCR	
<i>rpoD</i> Fw	GTGAAATGGGCACTGTTGAACTG
<i>rpoD</i> Rev	TTCCAGCAGATAGGTAATGGCTTC
<i>pstS</i> Fw	GGTCTGGGCGGTAAAGGTAA
<i>pstS</i> Rev	CAGGTTTCTTCTGCGCTTTG

IV. 결 과

1. NO 에 의해 세포 내 무기인산 (inorganic orthophosphate) 농도가 줄어든다.

NO를 처리하였을 때 세포내의 Pi 농도를 알아보기 위해 다음과 같이 실험하였다. 먼저 *S. Typhimurium* 야생형 균주 (WT)를 E 최소배지에서 배양한 다음 1 mM과 3 mM의 sperNO를 각각 처리하였다. 세포가 유실되지 않게 세척한 후 perchloric acid (HClO₄)를 처리해 불용성인 세포막의 지질을 포함한 생체 고분자들을 원심분리하여 제거하고 산에 용해되는 이온들만 남은 상층액으로 malachite green assay를 수행하여 세포 내 자유 Pi의 농도를 관찰하였다. 그 결과 sperNO를 처리하지 않은 것보다 sperNO를 처리한 것에서 Pi 농도가 더 적게 나왔다 (**Figure 2A**). 결과 값은 sperNO를 처리한 값을 처리하지 않은 값으로 나눠 백분율로 나타내었으며 근소하지만 1 mM 보다 3 mM의 sperNO를 처리한 세포에서의 Pi 농도가 더 적었다. 또한 세포 전체에서의 Pi 농도를 측정하기 위해 ICP-MS를 수행하였다. 그 결과 sperNO를 처리 유무에 상관없이 세포 전체의 Pi 농도는 일정한 것을 알 수 있었다 (**Figure 2B**). 따라서 NO를 처리하면 세포 내 산-용해 Pi 의 농도가 줄어드는 것을 알 수 있다.

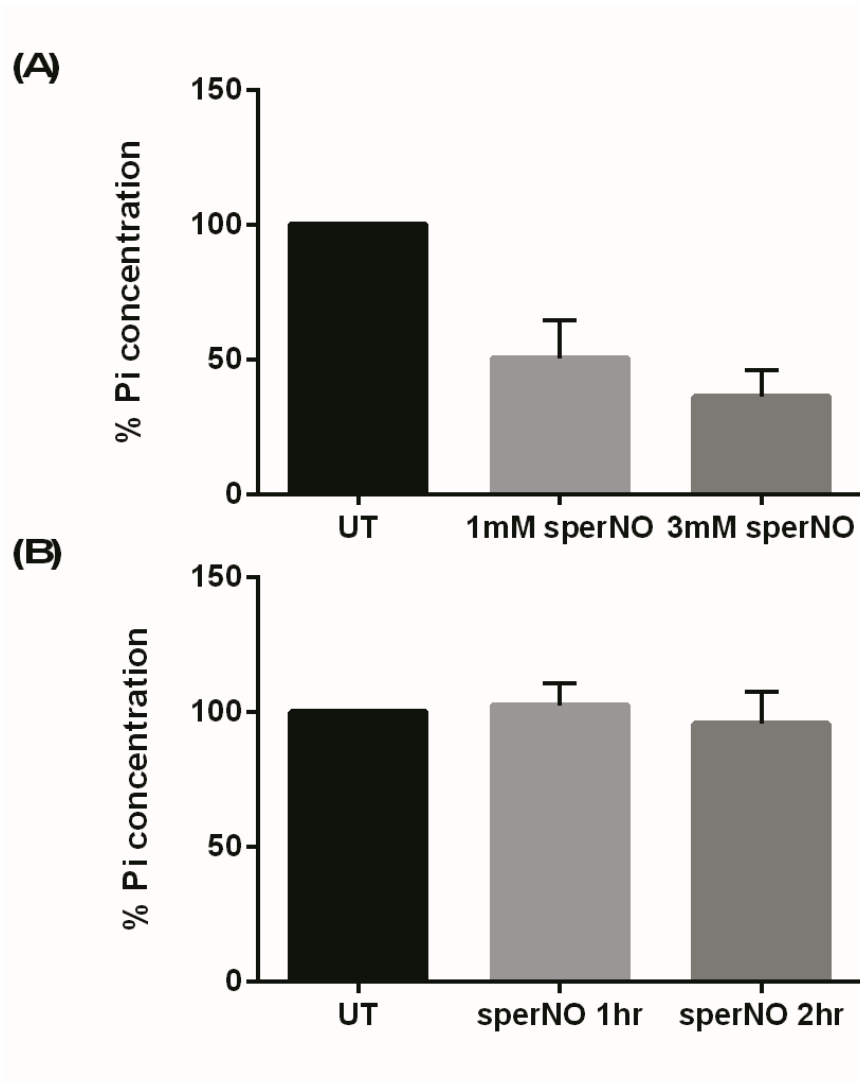


Figure 2. Intrabacterial Pi concentration and total phosphorous contents in *S. Typhimurium*.

Wild type cell were cultured in the E minimal media with or without sperNO. Cells were treated percloric acid after washing. Inorganic phosphate levels measured by malachite green assay. **(A)** The intracellular inorganic orthophosphate concentration of wild type treated or not with sperNO. **(B)** Through ICP-MS, phosphorous contents in the whole cell by sperNO is constant.

2. *S. Typhimurium* 에 NO 를 처리하면 *pstS* 의 전사량이 증가한다.

pst operon 의 NO 에 의한 발현량 변화를 알아보기 위해 operon 의 첫 번째 유전자인 *pstS* 의 전사량을 측정해보았다. 1 mM Pi MOPS 배지와 10mM Pi MOPS 배지 각각에서 log phase 인 O.D_{600nm} 0.5 까지 배양하고 500 μM 의 sperNO 를 처리하거나 10mM Pi MOPS 배지에서 0.1mM Pi MOPS 배지로 바꿔 1 시간을 더 배양하였다. RNA 를 추출하고 역전사효소를 사용하여 cDNA 를 합성한 후 정량 PCR 을 하였다. 세포의 생명 활동에 필수적인 기능을 수행해 항상 발현되는 housekeeping 유전자인 *rpoD* 를 대조 유전자로 사용하였다. *rpoD* 는 모든 조건에서 일정하게 발현되는 것에 비해 sperNO 를 처리한 균주에서의 *pstS* 전사량은 처리하지 않은 균주에 비해 발현량이 증가했다. 또 10 mM Pi MOPS 배지에서 키운 균주의 *pstS* 는 거의 전사되지 않았지만 0.1 mM Pi MOPS 배지로 바꿔 배양하였더니 *pstS* 전사량이 크게 증가하였다 (Figure 3A). 더 정확하게 확인하기 위해 real-time PCR 을 통한 전사량을 측정하였다. 정량 PCR 의 결과와 마찬가지로 sperNO 가 처리되면 그렇지 않을 때보다 *pstS* 전사량이 증가하였고 Pi 가 줄어든 MOPS 배지에서도 *pstS* 전사량이 증가하였다 (Figure 3B).

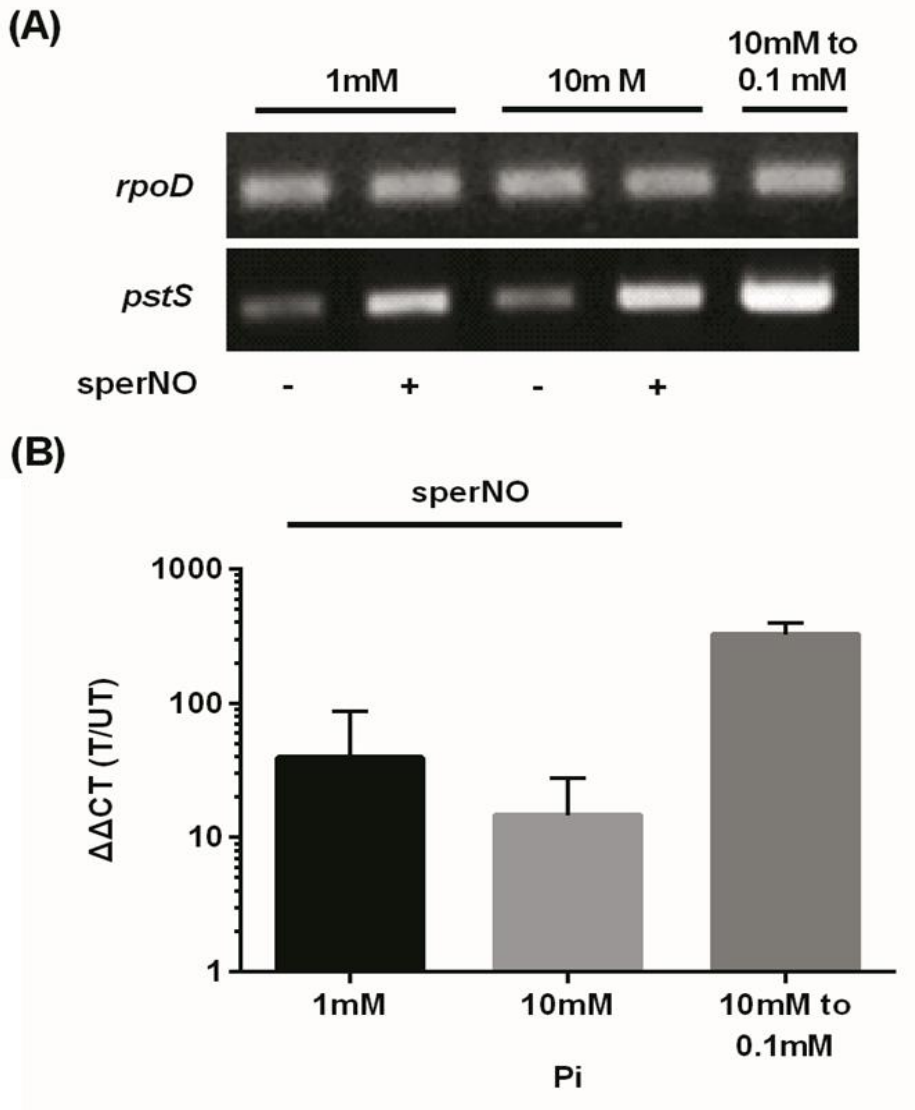


Figure 3. *pstS* transcription in *S. Typhimurium*.

Wild type cells were culture in the 1 mM or 10 mM Pi MOPS media. And Treated with 500 μ M sperNO or transferred into 0.1 mM Pi MOPS meida. *pstS* mRNA levels were measured by quantitative reverse transcriptase PCR assay **(A)** and real-time PCR assay **(B)** using total RNA purified from cultures. *rpoD* were housekeeping gene that used as normalization control for qRT PCR and real-time PCR assay.

3. NO 를 처리하면 *S. Typhimurium* 의 ^{31}P NMR spectra 가 변화한다.

NO를 처리하였을 때 *S. Typhimurium*의 ^{31}P NMR spectra를 확인하기 위해 먼저 야생형 균주를 E 최소배지에서 배양한 후 NMR을 측정하고 (**Figure 4A**) 같은 조건에서 1 mM의 sperNO를 처리해 1시간 더 배양하고 난 후에 NMR을 측정하였다 (**Figure 4B**). sperNO를 처리 하였더니 처리하지 않았을 때와 다르게 변화된 피크들을 볼 수 있었다. 혹시 Pi가 sperNO가 아닌 sperNO에서 리간드로 사용되는 polyamine spermine와 상호작용하여 이런 결과가 나오는지 확인하기 위해 1 mM의 spermine을 처리하여 NMR을 측정하였는데 이 결과는 sperNO를 처리하지 않았을 때의 결과와 같았다 (**Figure 4C**). 더 자세하게 살펴보기 위해 확대하여 보면 sperNO를 처리하였더니 무기인산 orthophosphate에 해당하는 2-4ppm 쪽에 두 갈래였던 피크가 하나로 합쳐졌으며 (**Figure 5**) -8.7ppm, -8.9ppm, -12.7ppm, -12.9ppm쪽에 새로 생긴 피크를 볼 수 있었다 (**Figure 6**). 따라서 *Salmonella*의 인화합물들이 NO에 의해 변화하는 현상을 발견하였다.

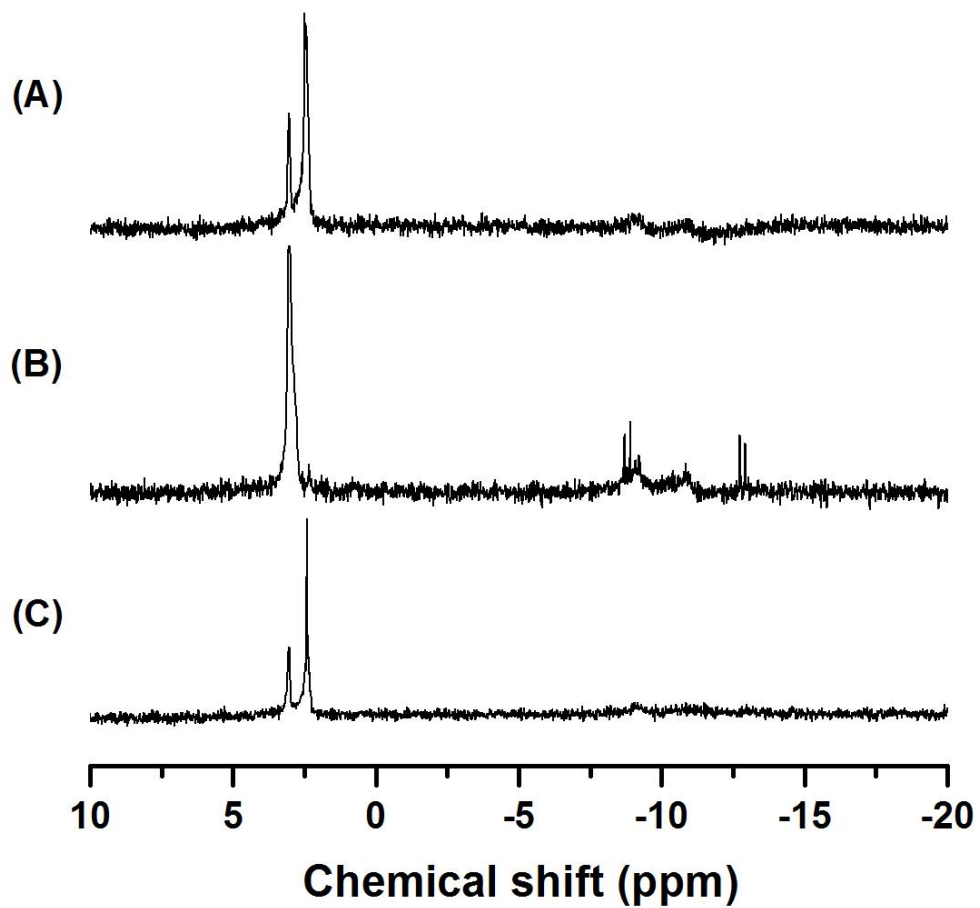


Figure 4. ^{31}P NMR spectra of *S. Typhimurium* wild type.

S. Typhimurium wild type were cultured in E minimal media with (B) or without (A) 1 mM sperNO. (C) is treated with 1 mM spermine, a ligand of sperNO used as control.

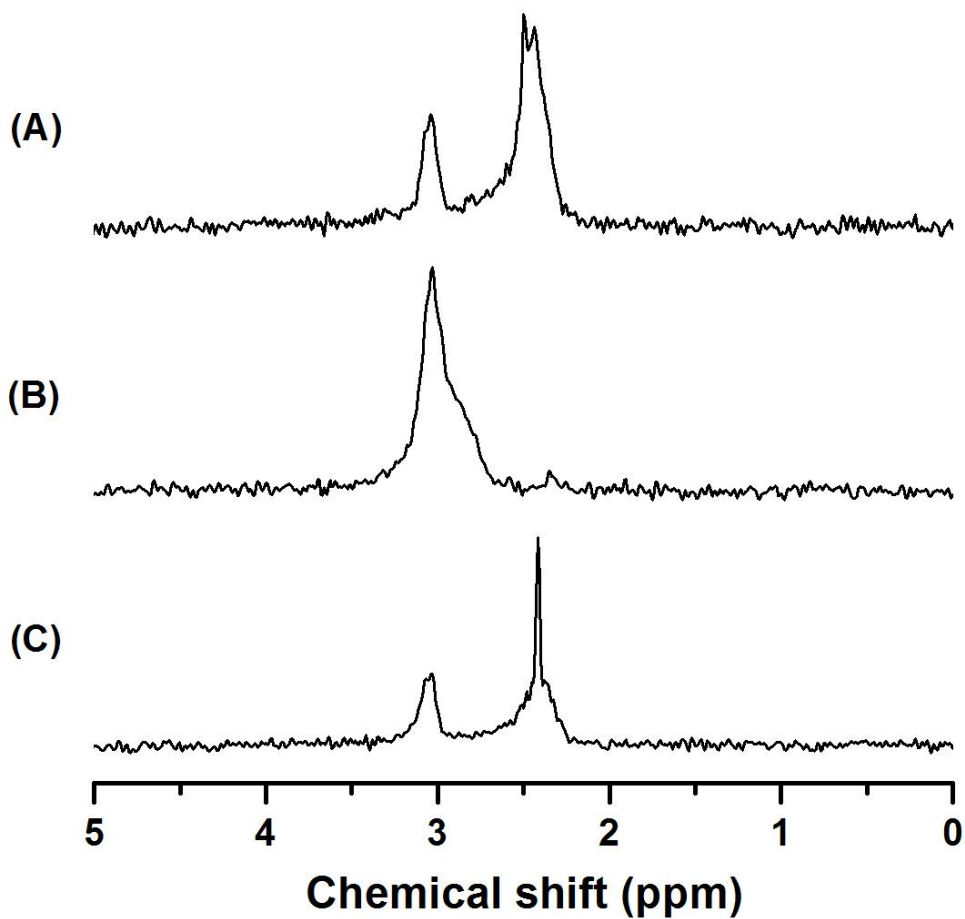


Figure 5. Orthophosphate region of ^{31}P NMR spectra of *S. Typhimurium* wild type.

Front part peaks in **Figure 4** were enlarged. Expanded the peakss from 5ppm to 0ppm, and the peaks divided into two bifurcation (3ppm, 2.5ppm) in UT (**A**) were combined after sperNO treatment (**B**). ^{31}P NMR spectra treated with spermine (**C**) is the same as the UT.

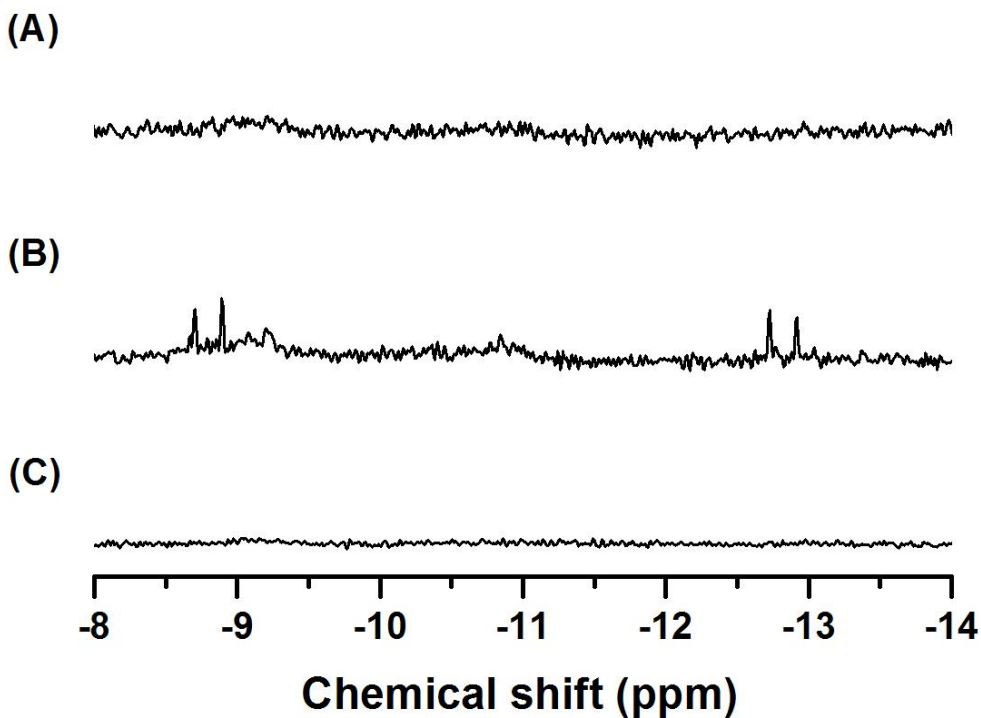


Figure 6. New phosphorous compounds detected in ^{31}P NMR spectra of *S. Typhimurium* wild type treated with sperNO.

Rear part peaks in **Figure 4** were enlarged. Expanded the peaks from -8ppm to -14ppm, and nothing at UT (**A**), but when treated sperNO (**B**) generated a new peaks (-8.7ppm, -8.9ppm, -12.7ppm, -12.9ppm). Peaks of treated with spermine (**C**) is nothing as like UT (**A**).

4. NO 에 의한 *S. Typhimurium* 의 ^{31}P NMR spectra 변화는 cytoplasm 에서 관찰되지 않는다.

*Salmonella Typhimurium*의 야생형 균주에서 sperNO에 의해 ^{31}P NMR spectra가 변화한다는 것을 NMR을 통해 알게 되었는데 (**Figure 4-6**) 이는 세포 전체를 상대로 한 결과이다. *Salmonella*와 같은 Gram-negative 균의 막은 외막, peptidoglycan, 세포질막으로 이루어져 있고 외막과 세포질막 사이인 세포주변질 (periplasm)과 세포질 (cytoplasm)이 존재한다. NO와 Pi의 상호작용이 주로 이루어지는 위치를 알아보기 위해 먼저 cytoplasm에서의 변화를 관찰하였다. 삼투압 충격으로 spheroplast를 형성시키고 원심분리한 후 얻은 cytoplasm으로 NMR을 측정하였다. 그 결과 sperNO를 처리하거나 하지 않거나 같은 피크가 관찰되었고 야생형 균주에서 sperNO를 처리했을 때의 변화된 피크는 보이지 않았다 (**Figure 7**).

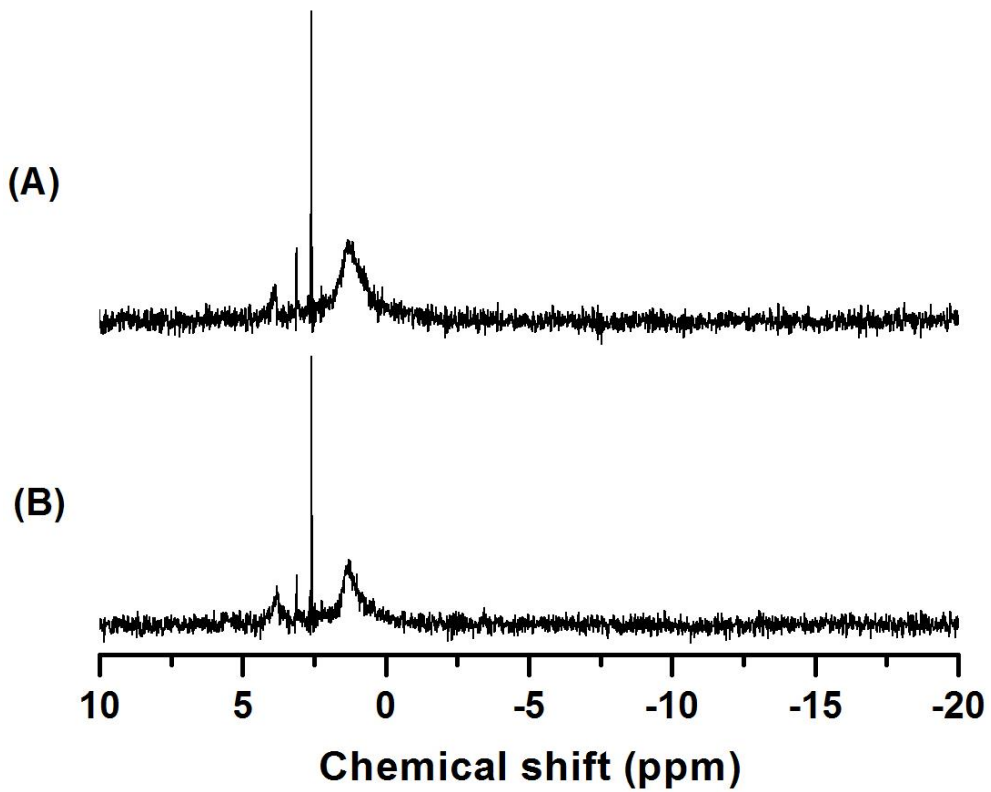


Figure 7. ^{31}P NMR spectra of cytoplasm in *S. Typhimurium* wild type.

S. Typhimurium wild type cultured E minimal media with (B) or without (A) 1mM sperNO. Cytoplasm of *S. Typhimurium* was obtained of the cold osmotic shock as described in methdos.

5. *S. Typhimurium* 에서 NO 에 의한 ^{31}P NMR spectra 의 변화는 periplasm 에서 관찰된다.

*Salmonella Typhimurium*의 야생형 균주에서 sperNO를 처리했을 때 cytoplasm에서의 ^{31}P NMR spectra의 변화는 보이지 않았다. 그렇다면 일정한 농도의 Pi가 존재하는 periplasm에서 NO와의 상호작용이 일어나는지 알아보기 위해 삼투압 충격으로 spheroplast를 형성시키고 원심분리한 후 그 상층액인 periplasm으로 NMR을 측정하였다. 그랬더니 cytoplasm에서는 관찰되지 않았던 sperNO를 처리했을 때의 변화된 피크가 관찰되었다 (**Figure 8**). 따라서 *S. Typhimurium* 전체 세포에서 관찰된 sperNO에 의한 ^{31}P NMR spectra의 변화는 cytoplasm이 아닌 periplasm에서만 관찰되므로 (**Figure 9**) periplasm에서 NO와 phosphorous의 어떠한 상호작용이 일어나는 것으로 예상할 수 있다.

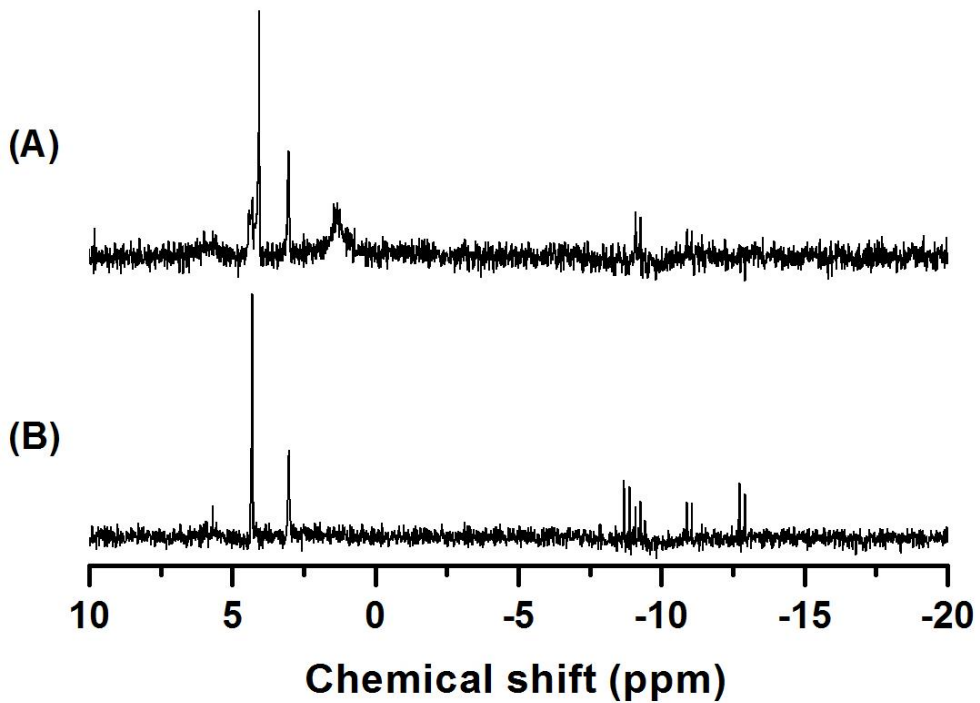


Figure 8. ^{31}P NMR spectra of periplasmic extracts from *S. Typhimurium* wild type.

S. Typhimurium wild type cultured E minimal media with (B) or without (A) 1mM sperNO. Periplasmic extracts of *S. Typhimurium* were obtained by cold osmotic shock procedure.

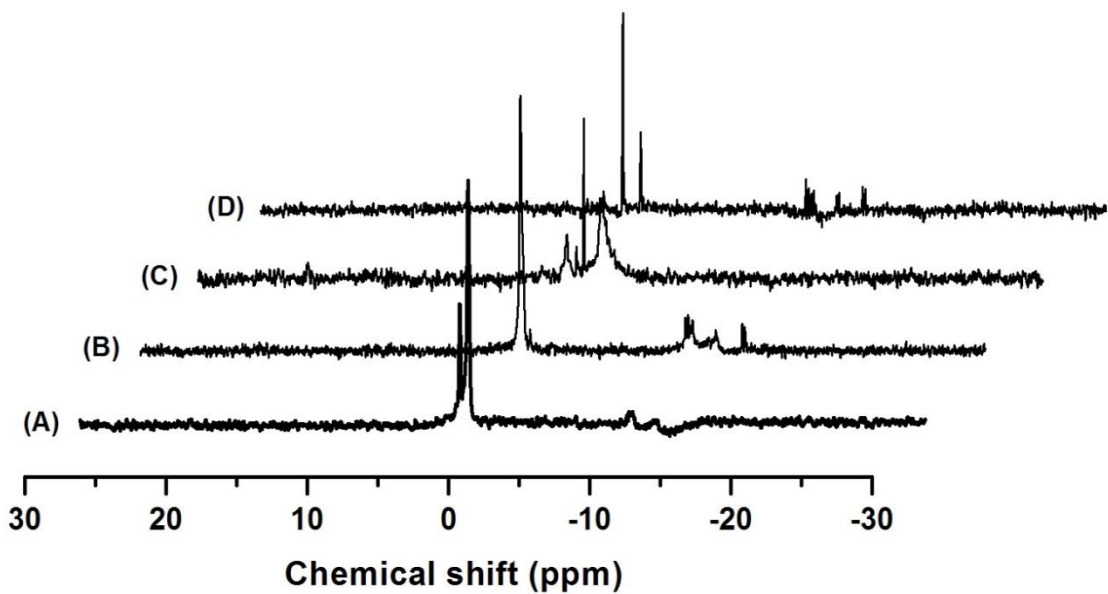


Figure 9. Comparison of ^{31}P NMR spectra of *S. Typhimurium* wild type.

The ^{31}P NMR spectra of the cytoplasm and periplasm separated by cold osmotic shock and whole cells were compared. ^{31}P NMR spectra of whole cell with sperNO (**B**) or not (**A**). Cytoplasm (**C**) and periplasmic extracts (**D**) sperNO were treated.

6. 무기인 수송체인 *pst operon* 이 돌연변이 된 *S. Typhimurium*에서는 NO에 의한 ^{31}P NMR spectra 변화가 관찰되지 않는다.

무기인의 수송을 담당하는 유전자가 돌연변이 된 *S. Typhimurium*에서도 변화가 관찰되는지 알아보기 위해 주요 무기인 수송체인 *pst operon*과 *pitA*가 돌연변이 된 균주로 NMR을 측정하였다. 그 결과 3ppm 부근에서 두 갈래였던 피크가 NO 처리에 의해 하나로 합쳐지긴 했지만 -8.7ppm, -8.9ppm, -12.7ppm, -12.9ppm에서 관찰되었던 피크들은 보이지 않았다 (**Figure 10**). 사라진 피크와 Pst, Pit 시스템이 연관이 되어 있다고 생각해 먼저 *pitA*만 돌연변이 된 균주로 NMR을 측정해보았다. 그랬더니 작지만 야생형 균주와 같은 NO에 의한 새로운 피크가 관찰되었다 (**Figure 11C**). 이 결과로 NO에 의한 ^{31}P NMR spectra 변화는 *pitA*가 아닌 *pst operon*과 연관이 되어 있을 가능성이 높다고 생각되었다. 그래서 Δ *pst operon pitA* 균주에 *pst operon* 클론 플라스미드를 형질전환 시킨 균주로 NMR을 측정해 보았더니 Δ *pitA* 돌연변이 균주로 측정했을 때와 같은 피크를 보였다 (**Figure 11D**). 이 결과는 NO에 의해 생기는 새로운 인 화합물들의 형성과정에 Pst 수송시스템이 관여한다는걸 보여준다.

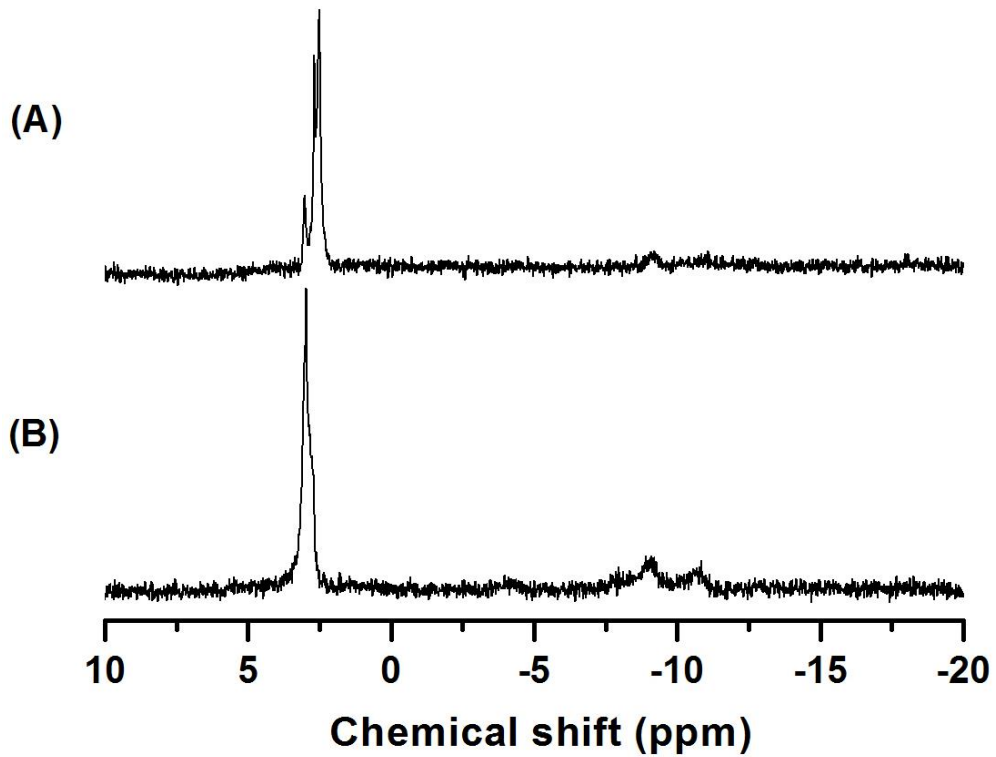


Figure 10. ^{31}P NMR spectra of *S. Typhimurium* Δpst operon *pitA* mutant.

S. Typhimurium Δpst operon *pitA* mutant cultured E minimal media treated with (B) or without (A) 1mM sperNO.

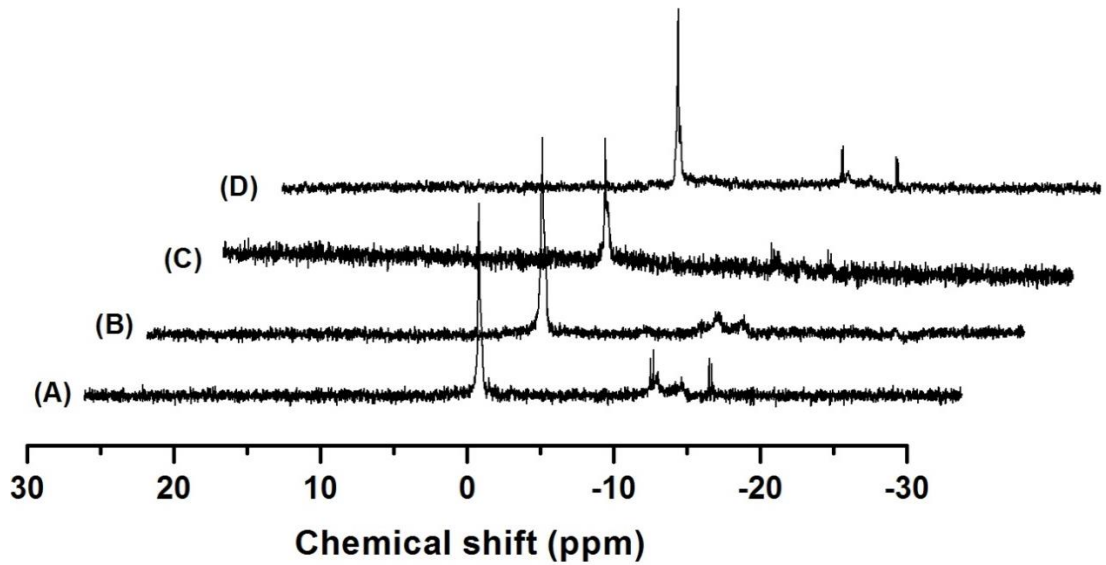


Figure 11. Comparison of ^{31}P NMR spectra of *S. Typhimurium* mutant.

The ^{31}P NMR spectra of the Δpst operon *pitA* mutant were compared. (A) ^{31}P NMR spectra of wild type whole cell treated with sperNO. (B) ^{31}P NMR spectra of Δpst operon *pitA* treated with sperNO. (C) ^{31}P NMR spectra of $\Delta pitA$ mutant were treated with sperNO. (D) ^{31}P NMR spectra of Δpst operon *pitA* mutant harboring complementing *pst* operon clone treated with sperNO.

7. *pstS* 가 돌연변이된 *S. Typhimurium* 에서도 NO 에 의한 ^{31}P NMR spectra 변화가 관찰되지 않는다.

이전까지의 결과로 sperNO에 의해 *Salmonella*의 ^{31}P NMR spectra가 변화되며 *pst* operon과 연관되어 있는 것을 알았다 (**Figure 11**). *pst* operon은 다섯 가지 유전자로 이루어져 있는데 이 중 PstS만 periplasm에 존재하는 단백질이다. 그러므로 NO에 의한 ^{31}P NMR spectra 변화가 *pstS* 유전자와 관련 있는 것으로 생각하고 다른 operon 유전자들의 전사에 영향을 끼치지 않게 항생제 부위를 제거한 $\Delta pstS$ 돌연변이 균주에 sperNO를 처리하여 NMR을 측정해보았다. 그 결과, sperNO 처리 유무에 상관없이 같은 피크 양상을 보였다 (**Figure 12**). *pstS*가 클론된 플라스미드를 제작해 $\Delta pstS$ 돌연변이 균주에 형질전환시켜 NMR을 측정하였으나 sperNO를 처리하여도 피크는 관찰되지 않았다 (**Figure 13C**). *pstS*가 클론된 플라스미드가 형질전환된 $\Delta pstS$ 돌연변이 균주는 complement 클론으로 야생형 균주와 같아야 하는데 같지 않았다. 야생형 균주와 complement 클론 균주를 E 최소배지에 서 500 μM 의 sperNO를 처리하여 야생형 균주만큼 성장을 회복하는지 생장곡선을 살펴보았지만 자라지 못했다 (**Figure 14**).

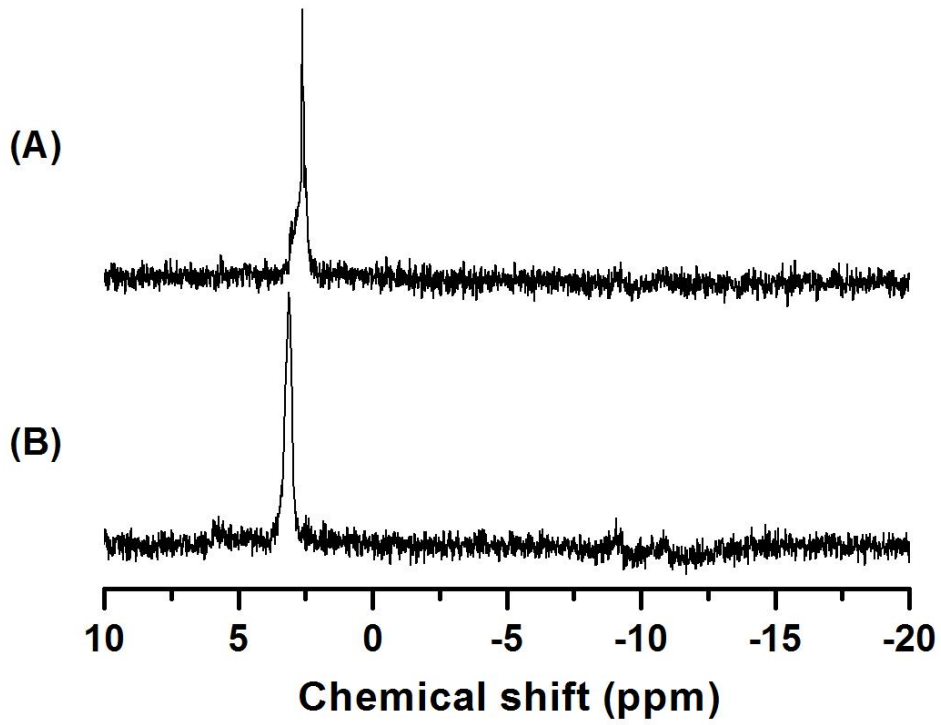


Figure 12. ^{31}P NMR spectra of *S. Typhimurium* ΔpstS mutant.

The first gene of *S. Typhimurium* *pst* operon, ΔpstS mutant cultured E minimal media with (B) or without (A) 1mM sperNO.

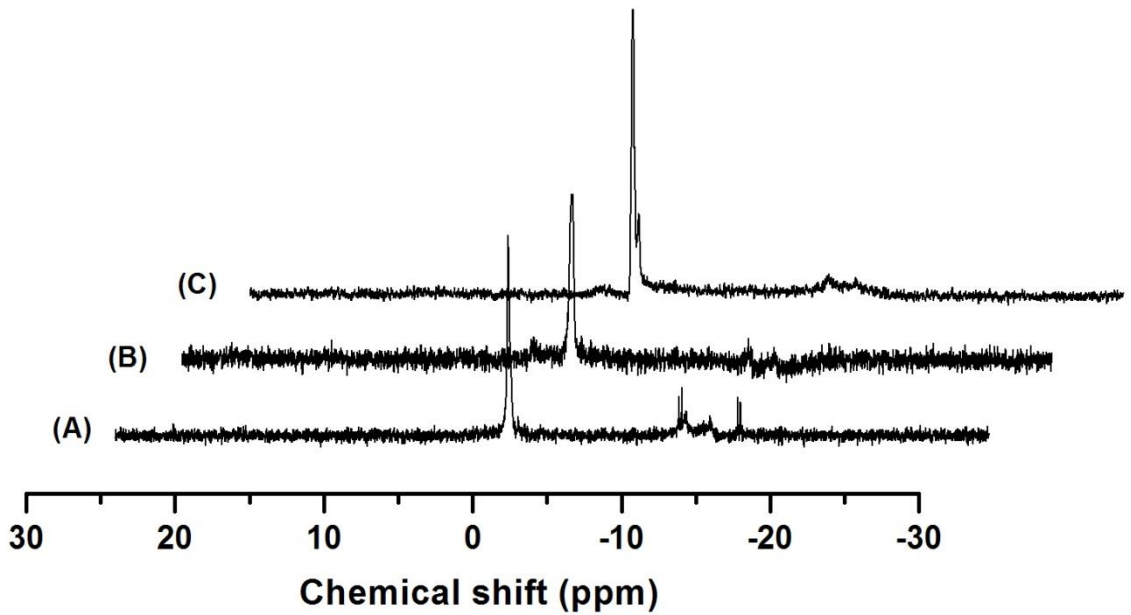


Figure 13. Comparison of ^{31}P NMR spectra of *S. Typhimurium* $\Delta pstS$ mutant.

The ^{31}P NMR spectra of the $\Delta pstS$ mutant were compared. (A) ^{31}P NMR spectra of wild type whole cell treated with sperNO. (B) ^{31}P NMR spectra of $\Delta pstS$ treated with sperNO. (C) ^{31}P NMR spectra of $\Delta pstS$ mutant harboring complementing *pstS* clone treated with sperNO.

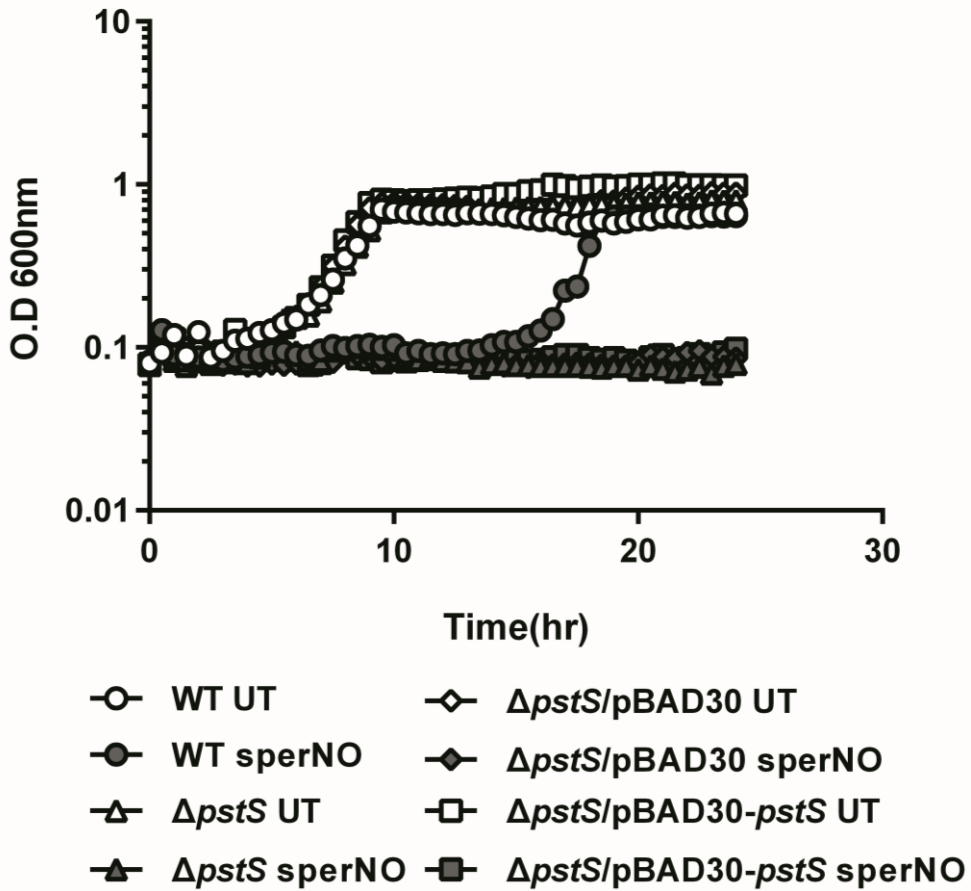


Figure 14. Growth curves of *S. Typhimurium* treated with sperNO or not.

S. Typhimurium wild type, $\Delta pstS$, $\Delta pstS / pBAD30$, and $\Delta pstS / pBAD30-pstS$ strains were measured O.D_{600nm} in E minimal media cultures by treating 500 μ M of sperNO.

V. 고찰

NO는 반응활성이 높은 활성질소이며 지질친화력이 높아 세균막을 쉽게 통과해 세균의 성장을 저해한다. 따라서 *Salmonella*는 세포 내에서 생존하고 병독성을 일으키기 위해서는 NO 내성이 필수적이다. 그런데 *S. Typhimurium*에 sperNO를 처리하였더니 세포 내 Pi의 농도가 줄어드는 것을 확인하였다 (**Figure 2**). 이러한 현상은 NO에 의한 Pi의 직접적인 변형 때문일 수도, Pi 항상성에 참여하는 효소들의 활성 변화 때문일 수도 있다. 이를 확인하기 위해 먼저 인 화합물을 분석하기에 가장 적합한 방법인 ^{31}P NMR로 실험을 하였고 *S. Typhimurium*의 야생형 균주에서 sperNO에 의한 ^{31}P NMR spectra의 변화가 관찰되었다 (**Figure 4**). 변화된 spectra를 살펴보면 크게 두 부분으로 나뉘었는데 3ppm 부분과 -9ppm, -13ppm 부분이다. 3ppm 부분의 피크는 sperNO를 처리 하지 않았을 때는 두 갈래로 갈라져 있다가 sperNO를 처리하니 크게 하나로 합쳐지면서 위치가 이동하였다 (**Figure 5**). 두 갈래의 피크 중 왼쪽 피크는 cytosolic Pi, 오른쪽 피크는 external Pi 피크로 알려져 있다 [24]. 그리고 -8.7ppm, -8.9ppm, -12.7ppm, -12.9ppm 부분의 피크는 이전에 따로 알려지지 않은 새로운 피크인 것 같다 (**Figure 6**). 이 피크는 sperNO를 처리했을 때만 나오는 피크로 sperNO (SpermineNONOate)의 리간드인 spermine을 처리한 결과로 다시 확인하였다 (**Figure 6C**).

그리고 NO와 Pi의 상호작용이 주로 이루어지는 위치를 알아보기 위해 삼투압 충격을 주어 spheroplast를 형성시키고 원심분리 해 periplasm과 cytoplasm 각각에서의 ^{31}P NMR spectra를 관찰하였더니 cytoplasm에서는 피크 변화가 보이지 않았고 (**Figure 7**) periplasm에서만 관찰되었다 (**Figure 8**). 즉 periplasm에서 NO와 Pi의

어떠한 상호작용이 일어나며 그로 인해 세포 내 Pi의 농도가 줄어드는 것이다. 새로이 확인되는 피크를 분석하기 위해 periplasm에 존재하는 대사물질을 중심으로 metabolomics를 수행하려 계획하였고 Pi 수송체를 돌연변이 시켜 세포 내로 Pi가 들어오지 못하게 하면 periplasm에 NO에 의한 새로운 인 화합물의 양이 증가할 것으로 예상하였다. 그래서 *S. Typhimurium*의 주요 Pi 수송체들인 Pst 및 Pit의 유전자들인 *pst operon*과 *pitA*를 돌연변이 시킨 균주로 ³¹P NMR spectra 변화를 살펴보았지만 예상과 다르게 야생형 균주에서 확인했던 새로운 피크가 사라졌고 3ppm 부근의 두 갈래였던 피크만 하나로 합쳐졌다 (**Figure 10**). Pi 수송체가 돌연변이 된 균주는 세포 안으로 Pi가 들어오지 못하니 [14] 두 갈래의 피크가 합쳐지지 않아야 하는데 sperNO를 처리하니 야생형 균주와 같이 합쳐졌다. 이는 이미 알려진 orthophosphate의 피크가 아니고 sperNO에 의해 변화된 피크로 보인다. 그래서 $\Delta pitA$ 돌연변이 균주로 NMR을 측정해보았더니 야생형 균주와 같은 변화가 관찰되었다 (**Figure 11C**). 정확히 확인하기 위해 Δpst operon *pitA* 돌연변이 균주에 *pst operon* 클론 플라스미드를 형질전환 시킨 균주로 다시 NMR을 측정해보았더니 $\Delta pitA$ 돌연변이 균주로 측정했을 때와 같은 피크를 보였다 (**Figure 11D**).

따라서 NO에 의한 ³¹P NMR spectra의 변화는 *pst operon*과 관련이 있는 것 같다고 생각하였으며, 그 중 periplasm에서만 존재하고 세포 내로 Pi를 수송하며 sperNO를 처리할 때 전사량이 증가하는 (**Figure 3**) *pstS* 유전자를 돌연변이 시킨 $\Delta pstS$ 균주에 sperNO를 처리해도 변화된 피크를 보이지 않았다 (**Figure 12**). *pstS*가 클론된 플라스미드를 형질전환 시킨 $\Delta pstS$ 균주도 마찬가지였다 (**Figure 13C**). Complement 클론은 야생형 균주와 같은 결과를 보여야 하므로 sperNO에 의한 새로운 인 화합물 피크가 다시 관찰될 것이라고 생각했지만 그렇지 않았다. 또한 야생형 균주와 complement 클론 균주에 sperNO를 처리해 생장 곡선을 측정해보았지만

complement 클론 균주는 야생형 균주만큼 생장을 회복하지 못하였다 (Figure 14). $\Delta pstS$ 균주는 무슨이유에서 인지 complement를 해도 되지 않았다. *pstS*는 *pst* operon 중 제일 첫번째 유전자로, 돌연변이 되면 다른 operon 유전자의 전사에 영향을 미칠까 싶어 $\Delta pstS$ 균주 내 다른 operon 유전자 전사량을 측정 한 결과, 다른 유전자들은 문제 없이 전사가 잘 되었다 (Data not shown). 이 Pst 수송 복합체는 아직은 밝혀지지 않은 분자적 수준에서의 문제인 것 같아 앞으로 더 연구해 볼 가치가 있다.

*pstS*에 의한 새로운 인 화합물 형성 가능성을 확인하기 위해, PstS 단백질을 정제하였다. 야생형 균주의 periplasm 추출액에 열을 처리하여 단백질들을 변성시키고, 여기에 정제된 PstS 단백질을 첨가한 후, sperNO를 처리해 NMR로 분석해 보았지만 아무런 피크도 관찰되지 않았다 (Data not shown). 이는 NMR spectroscopy 가 phosphorous 신호를 측정할 수 있을 정도의 조건이 갖춰지지 않아서 그런 것 같아 향후에 다시 조건을 조정해 연구를 할 필요가 있다.

지금까지 연구의 결론은 *Salmonella Typhimurium*에 NO를 처리하면 ^{31}P NMR spectra의 변화가 생기며 이는 periplasm에서만 관찰되었고 NO의 저항성에 Pi 수송체를 필요로 해 Pi 수송체를 결손 시켜 확인해 본 결과 ^{31}P NMR spectra의 변화는 *pst* operon과 관련이 있었다. 앞으로의 연구에서는 관찰된 NMR spectra를 규명하고 이에 관련된 메커니즘을 밝혀야 할 것이다.

VI. 참고 문헌

1. Grassl, G.A. and B.B. Finlay, *Pathogenesis of enteric Salmonella infections*. Current Opinion in Gastroenterology, 2008. **24**(1): p. 22-26.
2. Lahiri, A., P. Das, and D. Chakravorty, *The LysR-type transcriptional regulator Hrg counteracts phagocyte oxidative burst and imparts survival advantage to Salmonella enterica serovar Typhimurium*. Microbiology, 2008. **154**(Pt 9): p. 2837-46.
3. Espey, M.G., et al., *Nitrosative capacity of macrophages is dependent on nitric-oxide synthase induction signals*. J Biol Chem, 2000. **275**: p. 11341-11347.
4. Fang, F.C., *Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies*. N. R. micro, 2004. **2**: p. 820-832.
5. Butler, A.R. and I.L. Megson, *Non-heme iron nitrosyls in biology*. Chem Rev, 2002. **102**(4): p. 1155-1165.
6. Cooper, C.E., *Nitric oxide and iron proteins*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1411**(2-3): p. 290-309.

7. Radi, R., et al., *Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide*. Arch Biochem Biophys, 1991. **288**(2): p. 481-487.
8. Schopfer, F.J., P.R. Baker, and B.A. Freeman, *NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response?* Trends Biochem Sci, 2003. **28**(12): p. 646-54.
9. Wink, D.A., *DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors*. Science, 1991. **254**: p. 1001-1003.
10. Prior, K., et al., *All stressed out. Salmonella pathogenesis and reactive nitrogen species*. Adv Microb Physiol, 2009. **56**: p. 1-28.
11. Stevanin, T.M., et al., *Flavo-hemoglobin Hmp protects Salmonella enterica serovar typhimurium from nitric oxide-related killing by human macrophages*. Infection and Immunity, 2002. **70**(8): p. 4399-4405.
12. McCollister, B.D., et al., *Nitric oxide protects bacteria from aminoglycosides by blocking the energy-dependent phases of drug uptake*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(5): p. 2189-96.
13. Bang, I.S., et al., *Maintenance of nitric oxide and redox homeostasis by the Salmonella flavohemoglobin hmp*. J Biol Chem, 2006. **281**(38): p. 28039-47.

14. Lim, N.R., *The Role of the Inorganic Phosphate in Salmonella Resistance to Nitric Oxide*. 2011.
15. Crepin, S., et al., *The Pho regulon and the pathogenesis of Escherichia coli*. *Vet Microbiol*, 2011. **153**(1-2): p. 82-8.
16. Samuel Mohammed Chekabab, Josee Harel, and C.M. Dozois, *Interplay between genetic regulation of phosphate homeostasis and bacterial virulence*. *Virulence*, 2014. **5**(8): p. 786-793.
17. Lamarche, M.G., et al., *The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008. **32**(3): p. 461-473.
18. Jiang, W., et al., *Molecular cloning, mapping, and regulation of Pho regulon genes for phosphonate breakdown by the phosphonatase pathway of Salmonella typhimurium LT2*. *J Bacteriol*, 1995. **177**(22): p. 6411-6421.
19. Park, Y.M. and I.S. Bang, *Bacterial Phosphate Homeostasis Role of Phosphate Transporters*. *Korean J Microbiol*, 2012. **48**(2): p. 57-65.
20. Gebhard, S., N. Ekanayaka, and G.M. Cook, *The low-affinity phosphate transporter PitA is dispensable for in vitro growth of Mycobacterium smegmatis*. *BMC Microbiology*, 2009. **9**: p. 254-254.

21. Lane, A.N. and T.W. Fan, *NMR-based Stable Isotope Resolved Metabolomics in systems biochemistry*. Arch Biochem Biophys, 2017. **628**: p. 123-131.
22. Palmer, A.G., 3rd, *Enzyme dynamics from NMR spectroscopy*. Acc Chem Res, 2015. **48**(2): p. 457-65.
23. Harold, F.M., *ACCUMULATION OF INORGANIC POLYPHOSPHATE IN AEROBACTER AEROGENES I. : Relationship to Growth and Nucleic Acid Synthesis*. Journal of Bacteriology, 1963. **86**(2): p. 216-221.
24. Beauvoit, B., et al., *Differential sensitivity of the cellular compartments of Saccharomyces cerevisiae to protonophoric uncoupler under fermentative and respiratory energy supply*. Biochemistry, 1991. **30**(47): p. 11212-20.

초 록

산화질소와 살모넬라의 상호작용에서 발생하는 세균 무기 인산 대사의 변화 연구

정 선 미

지도교수 : 방 일 수

조선대학교 대학원

치의생명공학과

병원성 세균의 성공적인 감염을 위해서는 숙주 식세포에 의한 산화질소 스트레스의 내성이 필수적이다. 이전 연구에서 *Salmonella*의 산화질소 내성에 세균 내부의 무기인 항상성이 중요하다는 사실이 밝혀진 바 있다. 본 연구에서는 *S. Typhimurium*에 산화질소(NO)를 처리하였을 때 전체 세포의 인 함량은 변함 없지만 세포 내 자유 무기인의 농도가 감소하는 현상을 발견하였다. 이는 세균 세포 내부에서 NO와 무기인이 상호작용하고 있음을 시사한다. 이러한 NO와 무기인의 상호작용에서 세포 내부 인 화합물의 변화를 관찰하기 위해 ^{31}P NMR spectroscopy를 수행하였다. 먼저 *S. Typhimurium*의 야생형 균주에 산화질소 공여체인 sperNO를 처리하여 ^{31}P NMR spectra를 관찰하였다. 그 결과 알려지지 않은 NO에 의한 새로운 인 화합물의 존재를 확인하였다. 이러한 NMR spectra 변화가 세포 내부 어디에서 일어나는지 알아보기 위해 spheroplast를 형성시켜 cytoplasm과 periplasm에서의 ^{31}P

NMR spectra를 확인해보았고 그 결과 새로운 인 화합물은 periplasm에 존재하는 것으로 확인되었다. 세포질 내로 무기인을 원활히 수송하지 못하는 Δpst operon *pitA* 결손 돌연변이주로 ^{31}P NMR spectra를 확인했을 때 야생형 균주에서 확인된 인 화합물은 관찰되지 않았고 $\Delta pitA$ 결손 돌연변이주에서는 다시 관찰되었다. 이 결과는 *pst* operon에 의존적인 변화라고 판단된다. periplasm에 존재하며 무기인 수송을 담당하는 무기인 결합 단백질 PstS가 주요한 역할을 할 것으로 판단되어 $\Delta pstS$ 결손 돌연변이주로 ^{31}P NMR spectra를 확인하였고 인 화합물이 관찰되지 않는 것을 확인하였다. 그러나 $\Delta pstS$ 돌연변이주에 *pstS* 클론을 도입해 확인해 본 결과 새로운 인 화합물의 존재는 다시 나타나지 않았다. 이것은 아직 규명되지 않은 Pst 수송 복합체의 메커니즘이 연관되어 있는 것으로 보인다. 종합해보면 *pst* operon이 NO에 의한 새로운 인 화합물의 존재와 연관되어 있음을 확인하였고 이 인 화합물은 현재까지 알려지지 않았다. 향후 연구를 통해서 이 인 화합물의 특성을 규명하고 관련 메커니즘을 연구할 필요가 있다.