



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](#)

2021년 2월

석사학위 논문

**Molecular Interactions between
Cytotoxic Nitric Oxide and Pst
Inorganic Phosphate Transport System
of *Salmonella* Typhimurium**

조선대학교 대학원

치의생명공학과

이 초 아

Molecular Interactions between Cytotoxic Nitric Oxide and Pst Inorganic Phosphate Transport System of *Salmonella* Typhimurium

세포독성 산화질소와 살모넬라 티피뮤리움 Pst
인산수송체계의 분자적 상호작용

2021년 2월 25일

조선대학교 대학원

치의생명공학과

이 초 아

**Molecular Interactions between
Cytotoxic Nitric Oxide and Pst
Inorganic Phosphate Transport System
of *Salmonella* Typhimurium**

지도교수 방 일 수

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2020년 10월

조선대학교 대학원

치의생명공학과

이 초 아

이초아의 석사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교	교수	이성행
위원	조선대학교	교수	국중기
위원	조선대학교	교수	방일수



2020년 11월

조선대학교 대학원

목차

목차	i
표목차	iii
도목차	iv
ABSTRACT	v
I . 서론	1
II . 재료 및 방법	6
1. 박테리아 균주, 배양 배지 및 배양 조건	6
2. TAP/SPA tagging 균주 제작	7
3. 녹색 형광 단백질 (Green Fluorescence Protein; GFP) 이용한 전사량 측정 및 관찰	8
4. RNA 추출, cDNA 합성 및 Real-time PCR (RT-qPCR)	9
5. Western Blot	10

6. Bacterial Two-Hybrid System.....	11
7. β -Galactosidase Assays	12
8. Site-directed mutagenesis	13
III. 표	14
IV. 결과	19
1. Pi 농도 저하에 따른 <i>pstS</i> 전사량 증가현상은 NO 에 의해 억제 된다.	19
2. Pi 농도 저하에 따른 PstS 번역량 증가현상 또한 NO 에 의해 억제된다.	24
3. PhoU 는 PstB 및 PhoR 과 모두 상호작용한다.	27
4. PhoU-PhoR 은 NO 에 의해 상호작용이 억제되며, PhoU-PstB 는 Cys 의 nitrosylation 에 의해 상호작용이 이루어진다.	32
V. 고찰	36
VI. 참고문헌	39
국문초록	42

표목차

Table 1. Bacteria strains and Plasmids	14
Table 2. Oligonucleotides	17

도목차

Figure 1. A simple model of bacterial phosphate transporter	2
Figure 2. The level of <i>pstS</i> transcription	20
Figure 3. Examination of gfp expression in <i>pstS</i> -gfp strains	22
Figure 4. Effect of PstS-TAP/SPA tag expression by low Pi.....	25
Figure 5. Principle of an <i>E. coli</i> two-hybrid system.....	28
Figure 6. In <i>vivo</i> interaction between PhoU, PstB and PhoR.....	30
Figure 7. Effect of NO stress on protein interaction	33
Figure 8. In <i>vivo</i> interaction between PhoU*, PstB and PhoR.....	34
Figure 9. The interaction model of Pst system.....	38

ABSTRACT

Molecular Interactions between Cytotoxic Nitric Oxide and Pst Inorganic Phosphate Transport System of *Salmonella* Typhimurium

Choa Lee

Advisor : Prof. Iel-Soo Bang, Ph.D.

Department of Dental Bioengineering,

Graduate School of Chosun University

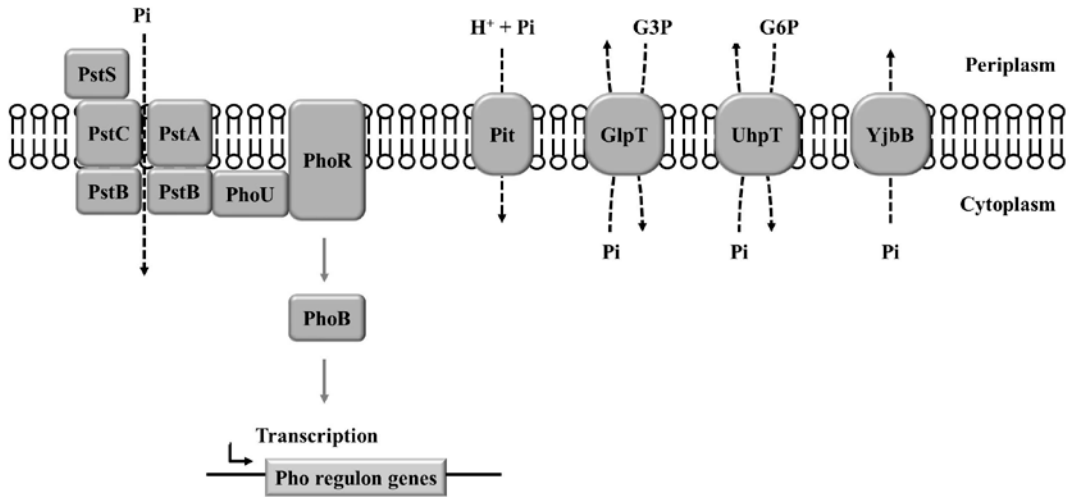
Phosphorus is an essential factor for bacteria life, and is mainly found in cells in the form of inorganic phosphate (Pi). Pathogens have phosphate-response (Pho) regulon to maintain Pi homeostasis in a variety of stress environments, such as inside hosts. Pho regulon is regulated through the PhoB/PhoR two-component signal transduction system and the Pi-specific Pst system, necessary for Pi transport in bacteria. The Pst system is expressed by *pst* operon composed of *pstSCAB-phoU*, and its expression is regulated by PhoB/PhoR system sensing the extracellular Pi concentration in a PhoU regulator-dependent manner. It has been known that, when the extracellular Pi concentration is high, expression of Pho regulon including *pst* operon is inhibited by dephosphorylation of PhoB, and when the extracellular Pi concentration is low, Pho regulon expression is actively induced by phosphorylated PhoB. However, molecular mechanisms by which proteins of Pst system interact for sensing Pi concentration and transduce their signals through interactions between PhoU and PhoB/PhoR are remained less understood. In addition, the maintenance of Pi homeostasis in bacteria plays a key role in

survival against nitric oxide (NO) stress, one of the antimicrobial agents produced by host immunity. This study has worked on the molecular interactions of the Pst system in the regulation of the Pi metabolism in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, a pathogen of the family Enterobacteriaceae, and on the effect of NO in Pst system interactions. When the extracellular Pi concentration was high, Pst expression was not affected by NO stress, but on the contrary, when the extracellular Pi concentration was low, the induced PstS expression, which must be highly expressed under Pi-limiting conditions, was largely suppressed by NO. However, NO treatment did not affect the expression of PstS in $\Delta phoU$ mutant, demonstrating the PhoU-dependence for the NO-mediated regulation of Pst expression. In order to find out which proteins interacting with PhoU are NO targets for suppressing PstS expression, the interactions between PhoU and PstB and between PhoU and PhoR were analyzed using a bacterial two hybrid system. Results showed that the interaction between PhoU and PhoR was significantly reduced by NO, while NO affected little to the PhoU-PstB interaction. And in the absence of NO, mutation of Cys residues in PhoU to Ser decreased PhoU-PhoR interaction at much higher rate than PhoU-PstB interactions, suggesting that thiols in these Cys residues in PhoU could be the target of NO. It further suggest that nitrosylation of these Cys may lead to potential conformational changes of PhoU to bind PstB more tightly, inhibiting transduction of low Pi signal to PhoR for regulating PhoB activation. Further studies about the NO-mediated regulation mechanism on the Pst system and about the interactome of PhoU associated with NO stress will shed light on the insight into the bacterial survival mechanism under Pi-limiting conditions in NO-producing animal hosts.

I . 서론

인(phosphorus)은 세균이 살아가는데 필수적인 영양분이다. 음이온 형태인 인은 반응성이 높아 자연에서 순수한 인의 형태로 발견되지 않고, 무기인산(inorganic orthophosphate; Pi) 형태로 세포 내에서 발견된다. 이렇게 세포 내 흡수된 Pi 는 유전정보 저장 및 처리를 담당하는 DNA 의 구조적 골격 형성, ATP 의 형태로 세포 내 에너지를 저장 및 이용할 수 있도록 하며, 또한 인지질 이중층 세포막을 구성하는 성분 등 세포 내 기능에 중요한 역할을 한다. 병원성 세균이 인산 항상성을 유지하기 위해 무기인산 조절 메커니즘인 Phosphate (Pho) regulon 을 갖는데, 이는 *Escherichia coli* 에서 처음 발견되었으며, *phnCDEFGHIJKLMNOP, ugpBAECQ, phoE, phoH, pstSCAB-phoU, phoBR, phoA* 그리고 *psiE* 등 여러 유전자로 구성되어 있다. 세균 내 Pi 수송은 Pst, Pit, GlpT, UhpT 그리고 YjbB 시스템 이 5 가지 수송체를 통해 이루어진다. Pit 시스템은 Pi 농도와 무관하게 금속이온과 혼합된 형태로 Pi 를 수송하며, GlpT 시스템 및 UhpT 시스템은 Glycerol-3-phosphate (G3P) 또는 Glucose-6-phosphate (G6P)와 같은 유기인산을 cytoplasm 내 수송하면서 monoesterase 또는 phosphatase 에 의해 Pi 를 periplasm 으로 배출한다. YjbB 시스템은 cytoplasm 내 Pi 가 과량으로 축적되었을 때 Pi 를 periplasm 으로 방출시켜 세포 내 Pi 균형을 이루는데 도움을 준다. 마지막으로, Pst 시스템은 4 가지 단백질들로 형성된 Pi 고 친화성 ABC 형 시스템으로 세균 내 Pi 수송에 핵심적인 역할을 한다 (Figure 1A) [1-3]. PhoB/PhoR two-component system (TCS) 중 PhoB 는 Pho regulon 유전자 상류에 있는 Pho box 프로모터의 DNA 서열에 결합하여 Pho regulon 의 전사를 직접적으로 조절하는 반응 조절자이며 [4, 5], 세포 밖 인산 농도에 따라

(A)



(B)

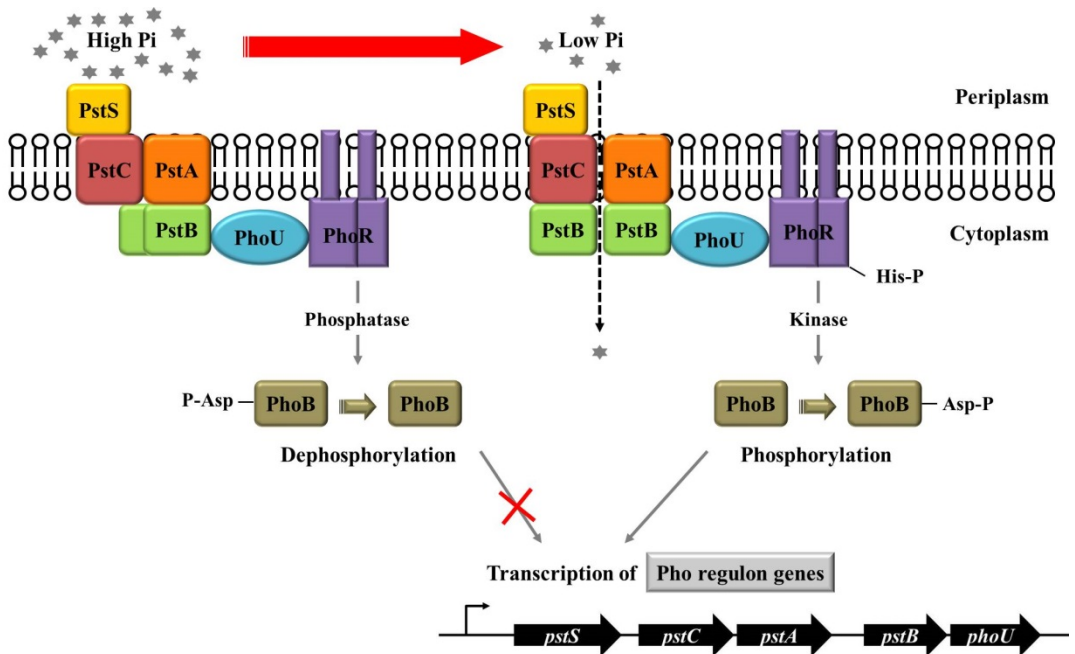


Figure 1. A simple model of bacterial phosphate transporter.

(A) Five systems responsible for transporting phosphate in bacteria. G3P, glycerol-3-phosphate; G6P, glucose-6-phosphate. (B) A model of signal transduction pathway that regulates the bacterial Pho regulon. When the extracellular Pi concentration is low, PhoR donates a phosphoryl group to PhoB to induce the transcription of Pho regulon, and when the concentration of Pi is high, it removes the phosphoryl group from phosphorylated PhoB (PhoB-P) and stops the transcription.

histidine autokinase 및 phospho-PhoB phosphatase 두 가지 작용을 하는 PhoR 이 있다 [6, 7]. Pst 시스템은 *pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB*, *phoU* 유전자로 이루어진 *pst* 오페론을 가지며, periplasm 에 존재하는 Pi 와 결합하는 용질결합 단백질인 PstS, PstS 가 운반한 Pi 를 cytoplasm 으로 이동시키는 내재성 막 단백질인 PstC 와 PstA, Pi 수송을 위한 에너지를 전달하는 PstB, 그리고 Pi 수송에 직접적으로 관여하지 않지만 *pst* 오페론 유전자 발현 조절에 음성 조절자 역할을 하는 PhoU 로 구성되어 있다 [2]. 최근 한 연구에서 *E.coli* PhoU 는 PhoR 의 PAS (Per-ARNT-Sim) 도메인 및 PstB 와 상호작용을 이루며, 이는 cytoplasm 에서 Pi 농도에 따라 신호전달 복합체 형성에 관여한다고 보고된 바 있다 [8]. 세균 내 Pi 가 없는 조건에서 *pst* 시스템은 인산 수송에 중요한 역할을 하는데, 세포 외부의 Pi 가 높은 경우, periplasm 에 축적된 Pi 를 PstSCAB 복합체가 cytoplasm 으로 통과하지 못하게 하고, 이러한 신호를 PhoU 가 PhoR 에 전달하여 PhoR 의 phosphatase 활성을 촉진함으로써 PhoB 를 탈인산화시켜 불활성 상태로 만들고, 그로 인해 Pho regulon 유전자들의 전사를 막는다. 반대로, 세포 외부의 Pi 농도가 낮은 경우 Pst 시스템을 통해 Pi 가 cytoplasm 내로 유입되고, PhoU 의 신호전달로 PhoR 의 히스티딘(His) 잔기가 자가 인산화되어 His-P 의 포스포릴기(-P)를 PhoB 의 아스파르트산(Asp)의 잔기에게 주어 인산화를 촉진하여 PhoB 활성화시켜 Pho regulon 의 전사를 유도한다 (Figure 1B) [9].

산화질소(nitric oxide; NO)는 체내 병원성 세균 감염으로부터 보호하는 방어 기작으로 선천면역에 필수적이다 [10]. 대식세포, 비만세포 등 면역세포 내 세균이 노출되면 유도성 산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase; iNOS)를 활성화하여 NO 분비를 유도한다 [11]. 이렇게 생성된 NO 는 peroxynitrite (ONOO⁻), nitrogen dioxide (NO₂·), dinitrogen trioxide (N₂O₃), hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radical (·OH)와 같은 반응성 질소종(reactive nitrogen species; RNS) 또는 반응성

산소종(reactive oxygen species; ROS)으로 전환시켜 DNA 또는 단백질 등 변형시켜 세균 성장에 영향을 주어 증식을 억제한다 [12]. 병원성 세균들이 이러한 RNS 항균작용으로부터 살아남기 위해 NO 를 해독할 수 있는 수많은 효소들을 갖는데, *S. Typhimurium* 의 경우 NO 를 해독하는데 flavohemoglobin Hmp 가 중요한 역할을 한다. 이는 호기성 또는 미세호기성 조건에서 denitrosylase 에 의해 NO₃⁻로, 혐기성 조건에서 NO₂ 를 N₂O 로 환원시킴으로써 NO 를 해독하여 체내 독성을 일으킨다 [13-16]. 또한 세균이 NO 항균작용으로부터 저항하는데 Pi 항상성 유지는 중요하다고 알려져 있다 [17].

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*)은 막대모양의 통용 혐기성 그람 음성균으로 발열, 두통 또는 설사 등의 위장질환 증상을 일으켜 다양한 감염과 사망을 초래하는 살모넬라증(salmonellosis)을 일으키는 장내세균이다 [18, 19]. 이 병원성 세균을 이용하여 본 논문에서는 Pst 인산수송 시스템 및 산화질소 간의 상호작용에 대하여 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. 박테리아 균주, 배양 배지 및 배양 조건

본 연구에서는 감염성 질병의 발병을 일으키는 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028s (*S. Typhimurium*)을 사용하였고, lambda red-mediated gene recombination 방법으로 돌연변이 균주 및 TAP/SPA tag가 태깅된 균주를 제작하였다. 또한 사용된 플라스미드 및 올리고뉴클레오타이드 모두 Table 1에 나타내었다 [20]. 균주 배양 시 37°C 220rpm의 shaking 조건에서 Luria-Bertani (LB) 복합배지 및 0.2% glucose가 첨가된 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid (MOPS) 최소배지를 사용하였다. 1mM 인산염(KH₂PO₄)이 함유된 배지를 고 인산염 MOPS 배지 (HiP_i MOPS), 0.1mM KH₂PO₄이 함유된 배지를 저 인산염 MOPS 배지 (LoPi MOPS)로 정의하였고 [21], 각각의 균주를 선별하기 위해 항생제 kanamycin (75µg/ml; KM), ampicillin (200µg/ml; AP) 그리고 chloramphenicol (20 µg/ml; CM)을 사용하였다. Bacterial two-hybrid system 균주는 30°C 220rpm의 shaking 조건에서 kanamycin (75µg/ml; KM), ampicillin (200µg/ml; AP) 그리고 chloramphenicol (20 µg/ml; CM), isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (0.5mM; IPTG)가 들어간 LB에 배양하였고, KM, AP, CM, IPTG, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (40µg/ml; X-Gal)가 모두 들어간 LB-X-Gal plate가 사용되었다.

2. TAP/SPA tagging 균주 제작

TAP/SPA tag 은 λ red recombination system 을 이용하여 TAP/SPA cassette 및 선택 가능한 kanamycin 항생제 내성을 갖는 특정 유전자 PCR 산물을 *S. Typhimurium* 유전자의 C-말단부분에 삽입하였다. PCR 에는 template 로 pJL148 을, 프라이머는 유전자의 종결 코돈 앞 40bp 의 염기서열에 TF tag (5'-TCCATGGAAAAGAGAAG-3')를, 종결 코돈 뒤 40bp 의 염기서열에 TR tag (5'-CATATGAATATCCTCCTTAG-3')를 갖도록 제작하였고, 이는 Table 2 에 나타내었다 [22]. PCR 은 다음과 같은 조건으로 진행되었다: 94°C 5min; 94°C 1min, 55°C 1min, 68°C 2min 10sec, 30 cycles; 68°C 10min; 4°C ∞. 생성된 PCR 산물을 Expin PCR SV mini (GeneAll, Korea)를 이용하여 PCR purify 하였다. 그 다음부터는 lambda red-mediated gene recombination 과 동일한 방법으로 제작하였고, 제작된 균주는 PCR 및 western blot 으로 확인하였다.

3. 녹색 형광 단백질 (Green Fluorescence Protein; GFP) 이용한 전사량 측정 및 관찰

37°C에서 LB 에 밤새 키운 *pstS-gfp(ova)* 플라스미드를 갖는 균주를 HiPi MOPS 에 1:100 으로 재접종하여 4 가지 조건 “대조군(untreated; UT); 1mM S-nitrosoglutathione 및 spermine NONOate 1 시간 처리 (+GSNO/sNO); HiPi MOPS 에서 LoPi MOPS 로 배지 교체 후 1 시간 (Media Change; MC); GSNO/sNO 30 분 처리 후 media change 와 동시에 GSNO/sNO 처리 1 시간 (MC+GSNO/sNO)” 에서 최종 광학 밀도가 log phase ($OD_{600} \approx 0.4 \sim 0.5$)가 되도록 하였다. 세균이 나타내는 형광을 현미경으로 관찰하기 위해 1ml cell down 시켜 1X Phosphate-Buffered Saline (PBS)으로 2 회 washing 후 PBS 100 μ l 에 풀어 형광 현미경(Axioscope A1; Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 brightfield (BF) 및 fluorescein (FITC)에서 사진을 촬영하였다. 또한 형광발현을 통한 전사량을 측정하기 위해 1ml cell down 시켜 PBS 로 2 회 washing 후 PBS 100 μ l 에 풀어준 cell 을 96-well black plate 에 100 μ l 를 넣고 DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter, USA)를 이용하여 형광 측정하였다.

4. RNA 추출, cDNA 합성 및 Real-Time PCR (RT-qPCR)

37°C에서 LB 에 밤새 키운 균주를 HiPi MOPS 에 1:100 으로 재접종하여
 형광측정과 동일한 4 가지 조건 (UT; +GSNO/sNO; MC; MC+GSNO/sNO) 에서 최종
 광학 밀도가 log phase ($OD_{600} \approx 0.4 \sim 0.5$)가 되도록 하였다. 준비된 cell 3ml 에 5%
 phenol (95% EtOH)을 1:5 비율로 넣고 ice 에서 30 분간 전사를 중단시키고,
 원심분리(12000rpm, 4°C, 10min)로 phenol 을 완전 제거하였다. 10mg/ml lysozyme 을
 100 μ l 을 넣고 30 분 동안 몇 차례의 vortex 를 통해 세포벽을 파괴시켰고, RNAiso
 Plus (TaKaRa, Japan) 1ml 및 chloroform 200 μ l 를 넣고 5 분간 상온에서 반응시킨 후
 원심분리(12000rpm, 4°C, 15min)하여 3 개의 층 중 투명한 상층액(RNA)을 새로운
 1.5ml microcentrifuge tube 에 옮겨주었다. 250 μ l 의 isopropanol 을 넣어 invert 후
 상온에 10 분 둔 후 원심분리(12000rpm, 4°C, 10min)하여 isopropanol 을 제거 후
 washing 하기 위해 750 μ l 의 75% cold EtOH 로 invert 후 원심분리(12000rpm, 4°C,
 10min)하여 상층액을 완전 제거하여 air dry 로 pellet 을 완전히 건조시킨 후 RNase-
 free water 100 μ l 에 pellet 을 녹여주었다. 마지막으로 남아있는 DNA 를 제거해주기
 위해 DNase I (NEB, UK)을 처리하였고, DNA contamination 이 되었는지 *rpoD* primer 를
 사용하여 PCR 로 확인하였다. cDNA 를 합성하기 위해 2 μ g RNA, 0.5 μ g Random
 Primers, M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, USA)를 사용하였다. Real-Time PCR
 (RT-qPCR)은 GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega, USA)에 제공된 방법으로 Roter-Gene
 Q (QIAGEN, Germany)를 이용하여 시행하였다. RT-qPCR 에 사용된 primer 는 Table
 2 에 나타내었으며, housekeeping Gene (HKG)인 *rpoD* 가 이 실험의 대조군으로
 사용되었다.

5. Western Blot

37°C에서 LB 에 밤새 키운 TAP/SPA tag 를 갖는 균주를 HiPi MOPS 에 1:100 으로 재접종하여 형광측정과 동일한 4 가지 조건 (UT; +GSNO/sNO; MC; MC+GSNO/sNO)에서 최종 광학 밀도가 log phase ($OD_{600} \approx 0.4 \sim 0.5$)가 되었을 때 단백질을 추출하였다. Bradford protein assay (Bio-Rad, USA)를 통해 단백질 농도를 결정하여 10% SDS-PAGE gel 에서 단백질을 분리하였고, polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane 으로 transfer 하였다. Membrane 은 5% skim milk (in TBS-T)를 이용하여 blocking 후 1 차 항체인 monoclonal anti-FLAG[®] M2 (1:5,000; Sigma, USA) 및 2 차 항체인 goat anti-mouse IgG-HRP (1:5,000; Santa Cruz, USA) 처리하였고, Pierce[™] ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 단백질을 detection 하였다. 이미지는 Kodak Image Station 4000 (Kodak, USA)을 사용하여 시각화하였다.

6. Bacterial Two-Hybrid System (BACTH system)

pT25 를 기반으로 한 PstB, PhoR 및 Zip 플라스미드는 Pst I 및 Kpn I 제한효소 부위를 갖도록 하고, pT18 을 기반으로 한 PhoU 및 Zip 플라스미드는 Kpn I 및 Hind III 제한효소 부위를 갖도록 프라이머를 디자인하여 PCR 생성물을 이용하여 클로닝하였다. 여기에 사용된 프라이머는 Table 2 에 나타내었다. 제작된 균주는 PCR 및 sequencing 분석을 통해 제작이 제대로 이루어졌는지 확인하였다. BACTH system 균주를 스크리닝하기 위해 KM, AP, CM 및 IPTG 를 넣은 LB 에 30°C에서 밤새 배양하여 OD₆₀₀=1 인 cell 을 LB-KM-AP-CM-IPTG-X-Gal plate 또는 MOPS-glucose-KM-AP-CM-IPTG-X-Gal plate 에 10ul 씩 drop 하여 색 변화가 나타날 때까지 30°C에서 키웠다. 또한 β -galactosidase assay 를 통해 단백질 간의 상호작용을 확인하였다.

7. β -Galactosidase Assays

β -galactosidase 분석은 유전자 발현을 측정하기 위해 사용되는 방법으로, Bacterial two-hybrid system 에서의 유전자 발현은 두 단백질 간의 상호작용과 관련이 있다. 본 연구에서는 β -Galactosidase 활성 분석에 흔히 사용하는 Miller Units 이 아닌 다른 활성 단위(units)를 이용하였다. 96-well plate 상의 β -Galactosidase 활성 분석법에 이용되는 다양한 활성 단위들은 다양한 논문에서 이미 보고된 바 있다 [23, 24]. KM, AP, CM, IPTG 를 처리한 LB 에 밤새 키운 배양물 200 μ l 를 800 μ l 의 D.W 에 희석하여 600nm 에서의 광학 밀도(OD₆₀₀)를 측정하였다. 새 1.5ml microcentrifuge tube 에 800 μ l 의 Z buffer (60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10mM KCl, 1mM MgSO₄, 50mM β -mercaptoethanol, pH7.0)에 200 μ l 의 배양물을 첨가하였다. 30 μ l 의 chloroform 및 10 μ l 의 0.1% SDS 를 첨가 후 15 초 동안 vortex 후 원심분리(13,000rpm, 1min)하여 펠렛화 한 세포 파편과 chloroform 을 건드리지 않고 200 μ l 의 상층액을 96-well plate 에 옮겨주었다. Z buffer 를 용매로 한 0.4% *o*-nitrophenol- β -D-galactoside (ONPG) 40 μ l 를 각 샘플과 섞어준 후 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek, USA)를 이용하여 420nm 에서의 광학 밀도 (OD₄₂₀)를 2 시간 동안 1 분에 한번씩 측정하였다. β -Galactosidase 활성 단위(units)는 다음과 같이 계산되었다 [8].

$$\text{Units} = \frac{1000 (\text{cell 양}) \times \text{OD}_{420} \text{ 기울기 (OD}_{420}/\text{min})}{0.2 (\text{희석배율}) \times 1:4 \text{ 비율로 측정한 OD}_{600} \text{ 값}}$$

8. Site-directed mutagenesis

PhoU 의 Cys (TGC) 코돈을 Ser (TCC) 코돈으로 전환하여 올리고뉴클레오타이드를 제작하여 point mutation 을 진행하였다. *S. Typhimurium* 14028s 을 template 로 이용하여 1 차 pfu PCR (phoU_Kpn_I_Fw + PhoU* C72S Rev, PhoU* C72S Fw + phoU_Hind_III_Rev)을 수행하였다. 생성된 PCR 산물을 Expin PCR SV mini (GeneAll, Korea)를 이용하여 PCR purify 후 PCR 산물을 섞어 95℃에서 10 분 denaturing 후 10 분마다 25℃까지 10℃씩 낮추어가며 annealing 하였다. 이를 template 로 이용하여 phoU_Kpn_I_Fw + phoU_Hind_III_Rev primer 를 이용하여 2 차 pfu-PCR 을 수행하였고, agarose gel loading 하여 *phoU* 크기와 일치하는 PCR 산물을 Expin Gel SV mini (GeneAll, Korea)를 이용하여 gel purify 하였다. 이 후 각각의 제한효소를 이용하여 절단 후 pT18 plasmid vector 에 ligation 하였다. 균주가 제대로 제작되었는지 PCR 및 sequencing 분석을 통해 확인하였다.

III. 표

Table 1. Bacteria strains and Plasmids

Strain	Genotype	Source or reference
EK395	Hfr D <i>Δcy</i> ₁₄₀₀ ::KM λ - e14- <i>relA1 spoT1 thi-1</i>	[25]
EF646	<i>Δcy</i> ₁₄₀₀ ::KM / pT18-Zip::AP / pT25-Zip::CM	[25]
FB336	<i>E. coli</i> K-12 (MG1655)	[20]
FB411	DH5α / pCP20::AP	[26]
IB1	<i>S. Typhimurium</i> 14028s, Wild-type	ATCC
IB2163	WT / <i>pstS</i> -gfp(<i>ova</i>)::AP	This study
IB2294	WT / <i>pstS</i> -gfp(<i>ova</i>)::AP, <i>AphoU</i> ::CM	This study
IB2363	<i>pstS</i> -TAP/SPA tag::KM	This study
IB2364	<i>pstS</i> -TAP/SPA tag::FRT	This study
IB2369	DH5α / pT18-Zip::AP	This study
IB2370	DH5α / pT25-Zip::CM	This study
IB2374	<i>pstS</i> -TAP/SPA tag::KM, <i>AphoU</i> ::CM	This study
IB2381	DH5α / pT25-Empty::CM	This study
IB2383	DH5α / pT25-PstB::CM	This study
IB2384	DH5α / pT25-PhoR::CM	This study
IB2385	DH5α / pT18-PhoU::AP	This study
IB2389	<i>Δcy</i> ₁₄₀₀ ::KM / pT25-PstB::CM	This study
IB2390	<i>Δcy</i> ₁₄₀₀ ::KM / pT25-PhoR::CM	This study
IB2391	<i>Δcy</i> ₁₄₀₀ ::KM / pT18-PhoU::AP	This study
IB2392	<i>Δcy</i> ₁₄₀₀ ::KM / pT18-PhoU::AP / pT25-Zip::CM	This study
IB2393	<i>Δcy</i> ₁₄₀₀ ::KM / pT18-PhoU::AP / pT25-Empty::CM	This study
IB2394	<i>Δcy</i> ₁₄₀₀ ::KM / pT18-PhoU::AP / pT25-PstB::CM	This study

IB2395	<i>Δcya</i> -1400::KM / pT18-PhoU::AP / pT25-PhoR::CM	This study
IB2434	DH5 α / pT18-PhoU* C72S::AP	This study
IB2435	DH5 α / pT18-PhoU* C110S::AP	This study
IB2436	DH5 α / pT18-PhoU* C195S::AP	This study
IB2437	DH5 α / pT18-PhoU* C206S::AP	This study
IB2438	DH5 α / pT18-PhoU* C210S::AP	This study
IB2450	<i>Δcya</i> -1400::KM / pT25-PstB::CM / pT18-PhoU* C72S::AP	This study
IB2451	<i>Δcya</i> -1400::KM / pT25-PstB::CM / pT18-PhoU* C110S::AP	This study
IB2452	<i>Δcya</i> -1400::KM / pT25-PstB::CM / pT18-PhoU* C195S::AP	This study
IB2453	<i>Δcya</i> -1400::KM / pT25-PstB::CM / pT18-PhoU* C206S::AP	This study
IB2454	<i>Δcya</i> -1400::KM / pT25-PstB::CM / pT18-PhoU* C210S::AP	This study
IB2455	<i>Δcya</i> -1400::KM / pT25-PhoR::CM / pT18-PhoU* C72S::AP	This study
IB2456	<i>Δcya</i> -1400::KM / pT25-PhoR::CM / pT18-PhoU* C110S::AP	This study
IB2457	<i>Δcya</i> -1400::KM / pT25-PhoR::CM / pT18-PhoU* C195S::AP	This study
IB2458	<i>Δcya</i> -1400::KM / pT25-PhoR::CM / pT18-PhoU* C206S::AP	This study
IB2459	<i>Δcya</i> -1400::KM / pT25-PhoR::CM / pT18-PhoU* C210S::AP	This study

Table 1. Bacteria strains and Plasmids (Continued)

Plasmid	Genotype	Source or reference
pBAD18	Expression vector containing the arabinose operon P _{BAD} promoter, Ap ^R	[27]
pKD4	Plasmid carrying the FRT-Km ^R -FRT-cassette	[20]
pCP20	Plasmid expressing the FLP recombinase	[26]
pJL148	Expressing C-terminal TAP/SPA fusion plasmid, Km ^R	[28]
pT18	pBluescript II KS containing T18 C-terminus of <i>B. pertussis cyaA</i>	[29]
pT25	pACYC184 containing T25 N-terminus of <i>B. pertussis cyaA</i>	[29]
pT18-Zip	pT18 containing leucine zipper domain	[29]
pT25-Zip	pT25 containing leucine zipper domain	[29]
pT18-phoU	<i>phoU</i> '-cyaA(T18) in pT18, Ap ^R	This study
pT25-pstB	<i>cyaA</i> (T25)'- <i>pstB</i> in pT25, Cm ^R	This study
pT25-phoR	<i>cyaA</i> (T25)'- <i>phoR</i> in pT25, Cm ^R	This study
<i>pstS</i> -gfp(ova)	Expressing Green Fluorescent Protein (GFP) OVA fusion plasmid containing the <i>pstS</i> promoter, Ap ^R	This study

Table 2. Oligonucleotides

Primer Name	5'-Bases-3'
TAP/SPA tag 용	
<i>pstS</i> -TF-Fw	GAA GAC CAG TAT AAA AGA CAG CAA CGG TAA GGC GCT GTA T TC CAT GGA AAA GAG AAG
<i>pstS</i> -TR-Rev	GTA GGG CGG ATA AGC GTA GCG CCA TCC GCC AAT TCG TTA ACA TAT GAA TAT CCT CCT TAG
RT-PCR 용	
<i>rpoD</i> _RT_Fw	GTG AAA TGG GCA CTG TTG AAC TG
<i>rpoD</i> _RT_Rev	TTC CAG CAG ATA GGT AAT GGC TTC
<i>pstS</i> _RT_Fw	CGG TAT TCG CGG TGA TTT GTT
<i>pstS</i> _RT_Rev	TGT ATG CCA AAT GGG CGG A
Bacterial two hybrid system 용	
<i>cyaA</i> (1-224a.a)_Fw	CGC AGT TCG GTG ACC AGC
<i>cyaA</i> (225-399a.a)_Rev	GCG CGA GCG ATT TTC CAC AAC
pACYC184_Rev	CGG AAG GAG CTA CCG GAC AG
<i>phoU</i> _Kpn I _Fw	TAT <u>GGT ACC</u> GAT GGA CAG TCT GAA CCT T
<i>phoU</i> _Hind III_Rev	TAT <u>AAG CTT</u> ATC TCT TTC GGA TCT TTC CC
<i>phoR</i> _Pst I _Fw	TAT <u>CTG CAG</u> GGG TGC TGG AAC GGC TG
<i>phoR</i> _Kpn I _Rev	TAT <u>GGT ACC</u> CGT TAA TCG CTA TTT TTG GCA ATT AAA CG
<i>pstB</i> _Pst I _Fw	TAT <u>CTG CAG</u> GGA TGA GTA TGG TTG AAA CTG CC
<i>pstB</i> _Kpn I _Rev	TAT <u>GGT ACC</u> CGT TAA CCG TAA CGA CCG GT
Site-directed mutagenesis 용	
PhoU* C72S_Fw	CAG GTT AAT ATG ATG GAA GTC GCC ATC GAT GAA GCC TCC GTG CGT ATT ATC GCC AAG CGC CAG CCG ACG GCG AGC GAT CT

PhoU* C72S_Rev	AGA TCG CTC GCC GTC GGC TGG CGC TTG GCG ATA ATA CGC ACG GAG GCT TCA TCG ATG GCG ACT TCC ATC ATA TTA ACC TG
PhoU* C110_Fw	GAA CTG GAG CGC ATT GGC GAC GTG GCG GAT AAA ATC TCC CGT ACC GCG CTG GAG AAA TTC TCC CAG CAG CAT CAG CCG CT
PhoU* C110_Rev	AGC GGC TGA TGC TGC TGG GAG AAT TTC TCC AGC GCG GTA CGG GAG ATT TTA TCC GCC ACG TCG CCA ATG CGC TCC AGT TC
PhoU* C195_Fw	TCG CGC ACC ATT CCC AGC GTG CTG ACC GCG TTA TTC TCC GCG CGC TCT ATC GAG CGT ATC GGT GAC CGT TGC CAG AAT AT
PhoU* C195_Rev	ATA TTC TGG CAA CGG TCA CCG ATA CGC TCG ATA GAG CGC GCG GAG AAT AAC GCG GTC AGC ACG CTG GGA ATG GTG CGC GA
PhoU* C206_Fw	TTC TGC GCG CGC TCT ATC GAG CGT ATC GGT GAC CGT TCC CAG AAT ATC TGC GAA TAC ATC TTC TAC TTC GTG AAG GGG CA
PhoU* C206_Rev	TGC CCC TTC ACG AAG TAG AAG ATG TAT TCG CAG ATA TTC TGG GAA CGG TCA CCG ATA CGC TCG ATA GAG CGC GCG CAG AA
PhoU* C210_Fw	TCT ATC GAG CGT ATC GGT GAC CGT TGC CAG AAT ATC TCC GAA TAC ATC TTC TAC TTC GTG AAG GGG CAG GAT TTC CGT CA
PhoU* C210_Rev	TGA CGG AAA TCC TGC CCC TTC ACG AAG TAG AAG ATG TAT TCG GAG ATA TTC TGG CAA CGG TCA CCG ATA CGC TCG ATA GA

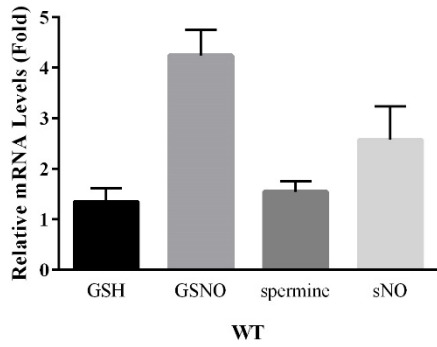
Underlined sequences indicate restriction sites

IV. 결과

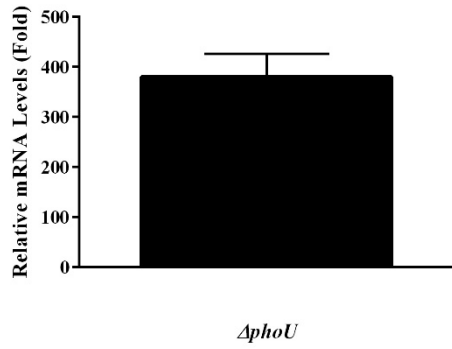
1. Pi 농도 저하에 따른 *pstS* 전사량 증가 현상은 NO 에 의해 억제된다.

S. Typhimurium 14028s (Wild-type; WT) 및 *phoU* 돌연변이 균주를 이용하여 세균의 활성이 가장 활발한 log phase 에서 Pi 농도 및 NO 처리에 따른 *pstS* 전사 수준을 확인하였다. 본 연구에서 NO 공급원으로 glutathione (GSH) 및 spermine 에 NO 가 결합한 형태인 1mM S-nitrosoglutathione (GSNO) 및 spermine NONOate (sNO)가 사용되었다. Pi 가 많은 조건(HiPi MOPS)에서 *pstS* 전사량은 아무것도 처리하지 않은 대조군(untreated; UT)과 비교해볼 때 NO 가 결합하지 않은 형태의 GSH 및 spermine 은 UT 와 거의 동일한 전사 발현을 나타냈고, GSNO 및 sNO 가 처리되었을 때 전사량이 다소 증가함을 볼 수 있었다 (Figure 2A). *phoU* 돌연변이 또는 Pi 가 적은 환경(LoPi MOPS)에서 PhoR 은 autokinase 로서 PhoB 를 활성화시켜 Pho regulon 유전자의 발현을 높은 수준으로 유도한다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다 (Figure 2B). HiPi MOPS 에서 NO 스트레스가 주어질 때 *pstS* 전사량에 미미한 영향을 주는 반면, LoPi MOPS 로의 환경 변화로 인한 높은 수준의 전사량은 NO 처리시 절반 이상이 억제되었다 (Figure 2C). 또한 *pstS* 에 *gfp(ova)*를 융합시켜 WT 및 Δ *phoU* 에 형질전환시킨 균주를 이용하여 형광발현을 통해 전사량을 본 결과 HiPi MOPS 에서 LoPi MOPS 로의 환경변화에 의해 *pstS-gfp* 발현이 GSNO 와 sNO 에 의해 억제되었음을 확인하였다 (Figure 3).

(A)



(B)



(C)

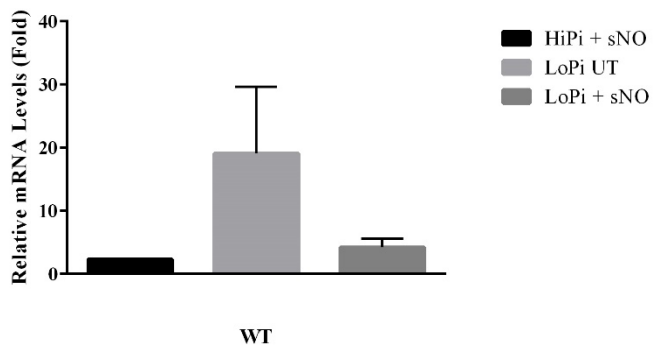
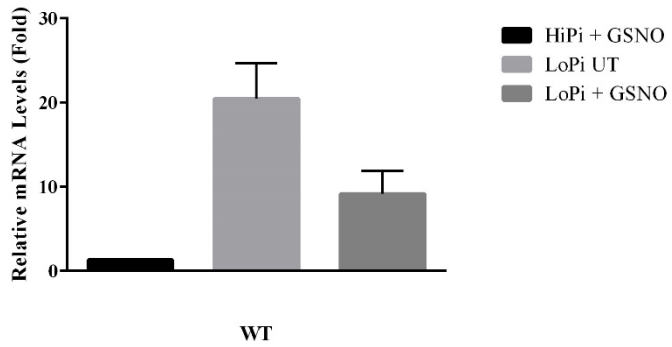
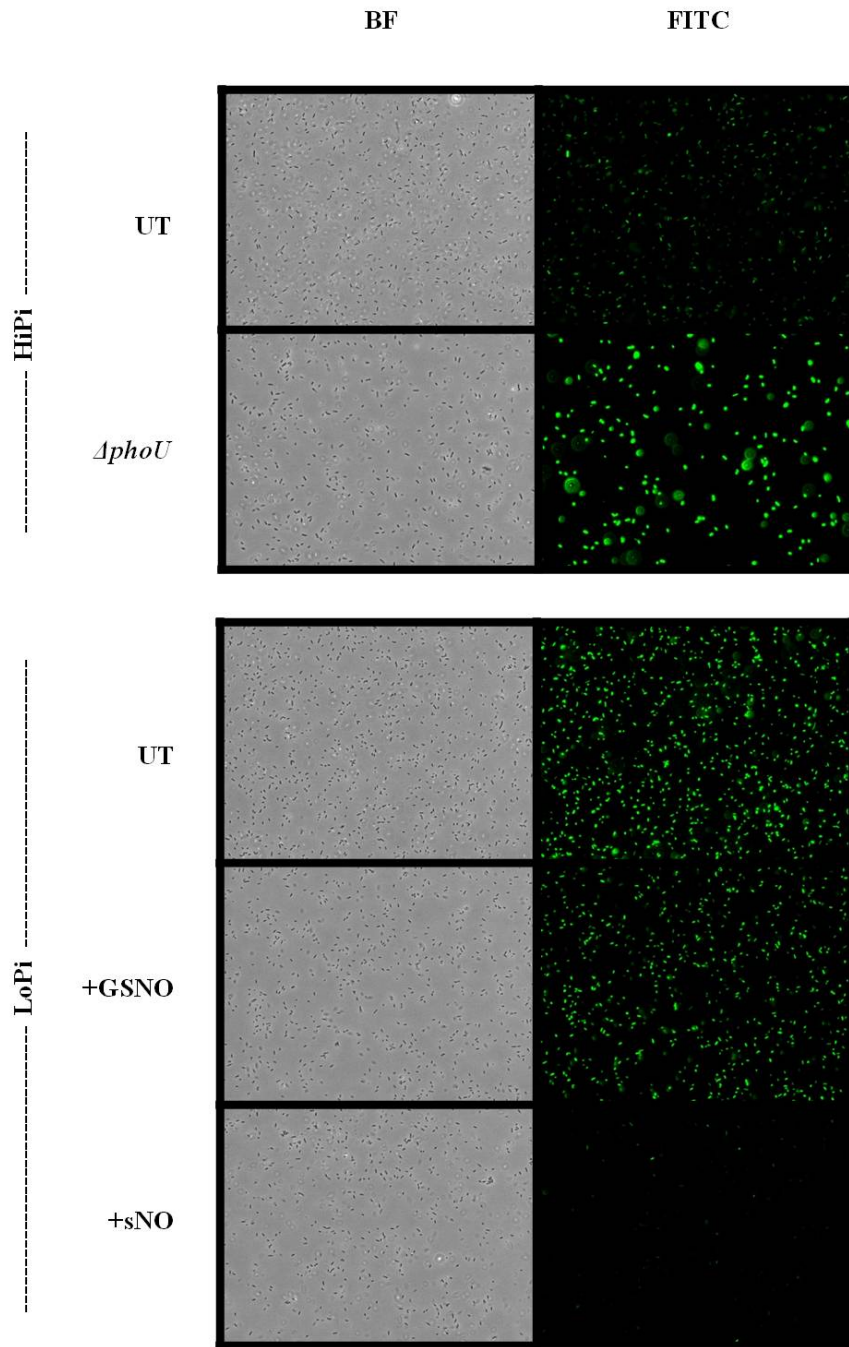


Figure 2. The level of *pstS* transcription.

(A) WT treated with 1mM GSH, GSNO, spermine and sNO respectively in HiPi MOPS. (B) *phoU* mutant shows a high level of *pstS* transcriptional expression. (C) WT were grown in LB overnight at 37°C and then reinoculated in HiPi MOPS to log phase ($OD_{600} \approx 0.5$), and treat (+) or untreat (-) with 1 mM GSNO/sNO for 1h at 37°C; or resuspended in LoPi MOPS then incubated at 37°C 1h. RNA was purified under the material and methods. The relative mRNA level of the *pstS* gene was measured by quantitative real-time PCR. The expression levels of target gene were normalized to that of the housekeeping gene *rpoD*, and shown in all data represent the fold value divided by the HiPi UT used as a control.

(A)



(B)

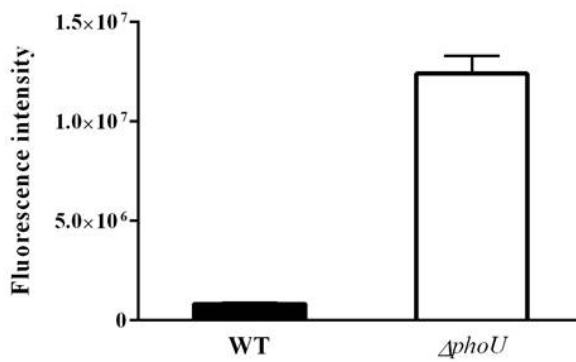
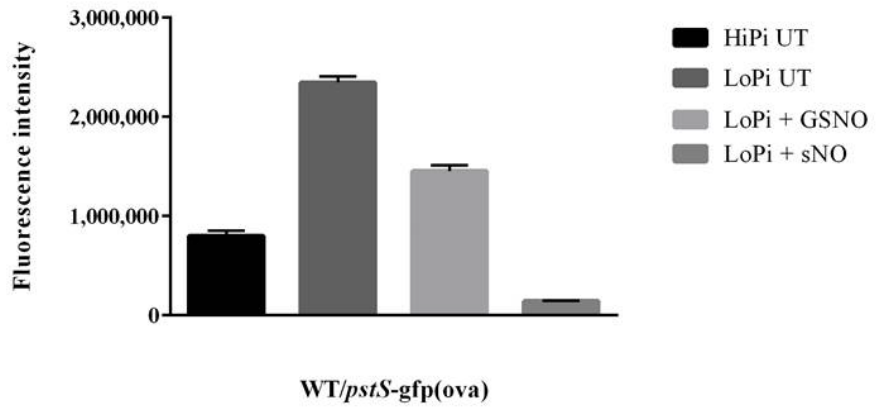


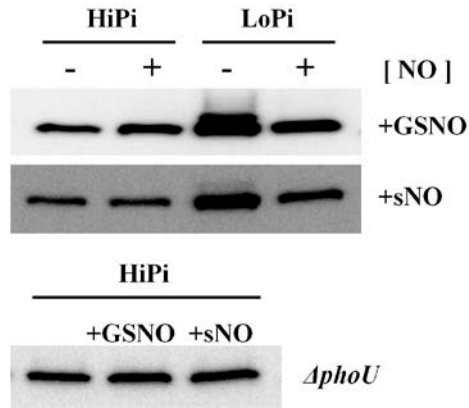
Figure 3. Examination of gfp expression in *pstS*-gfp strains.

The strains were grown in LB overnight at 37°C and then reinoculated in HiPi MOPS to log phase ($OD_{600} \doteq 0.5$), and resuspended in LoPi MOPS with(+) or without(-) 1mM GSNO/sNO for 1h. Gene expression in bacteria was detected (A) using BF and FITC by fluorescent microscopy, and (B) the fluorescence of cells washed with PBS was measured in a 96-well black plate.

2. Pi 농도 저하에 따른 PstS 번역량 증가현상 또한 NO 에 의해 억제된다.

Tandem affinity purification/Sequential Peptide Affinity (TAP/SPA) tag 는 3 개의 변형된 FLAG 서열 (3xFLAG), 및 TEV protease 절단부위에 의해 분리된 calmodulin binding peptide (CBP)를 갖는 C-terminal tag 이다. 이는 표적 단백질의 과도한 생산을 피함으로써, 순수 단백질의 효과적인 정제 및 식별을 가능하게 한다 [28]. 표적 단백질인 PstS 에 TAP/SPA tag 를 태깅하여 번역 수준에서 PstS 의 발현을 확인하였다. HiPi 일 때 PstS 는 NO 스트레스에 영향을 거의 받지 않았지만, LoPi 일 때 나타내는 높은 발현이 NO 처리로 인해 억제됨을 확인하였다 (Figure 4A). LoPi 일 때 외에도 *ΔphoU* 일 때 PstS 의 발현을 높은 수준으로 나타내는데, 강한 발현이 *ΔphoU* 에서도 NO 스트레스로 인한 억제가 동일하게 일어나는지 western blot 을 통해 확인하였으나, *ΔphoU* 에서는 NO 에 의한 억제가 일어나지 않았다. 이러한 단백질 억제가 C -terminal 에 결합된 TAP/SPA tag 로 인해 Pho regulon 조절을 담당하는 PhoB/PhoR two component system 또는 Pst 시스템이 작동하는데 TAP/SPA tag 가 단백질 번역에 영향을 미쳐 다른 결과가 나타나는지 확인하기 위해 *pstS*-TAP/SPA tag 를 이용하여 동일 조건에서 *pstS* 의 전사량을 확인하였고, 그 결과 *pstS* 번역 및 전사과정에 영향을 끼치지 않는다는 사실을 알 수 있었다 (Figure 4B).

(A)



(B)

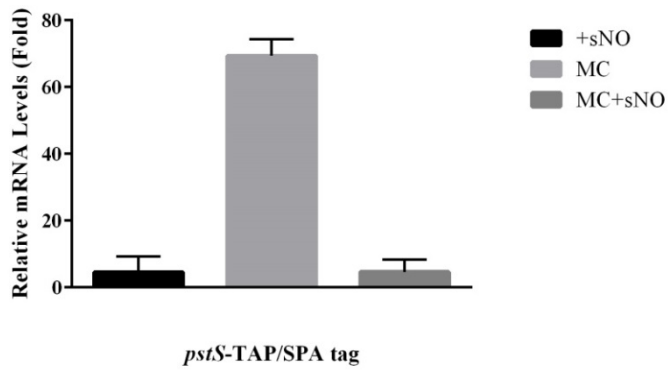
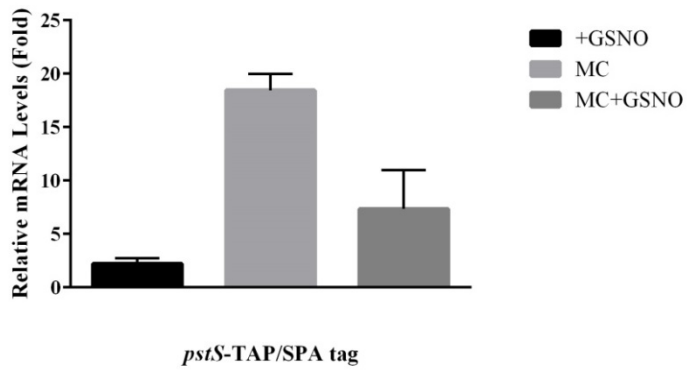


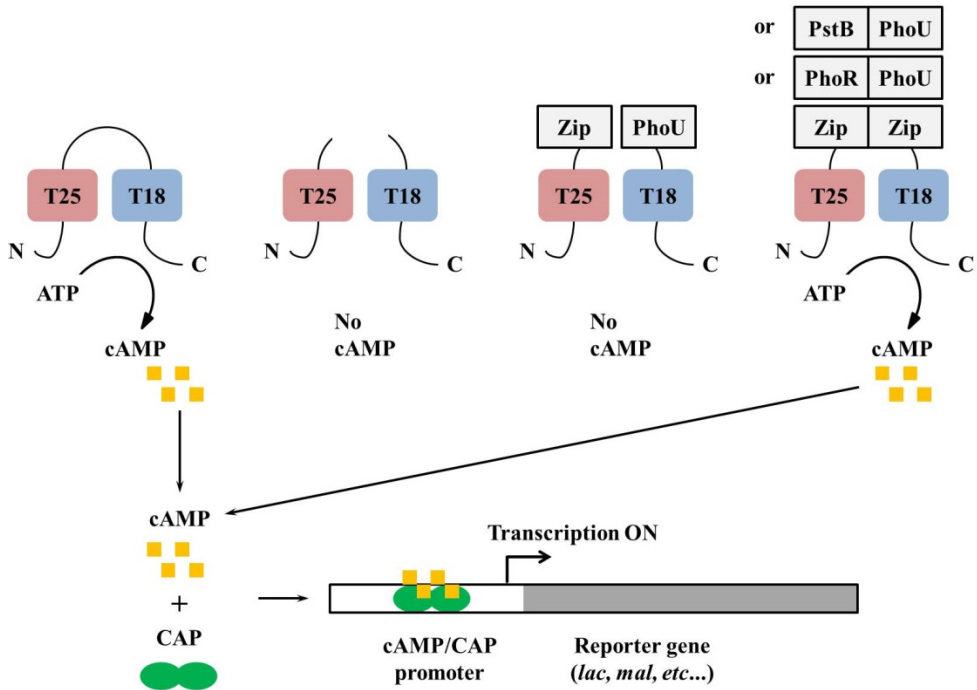
Figure 4. Effect of PstS-TAP/SPA tag expression by low Pi

(A) Western blot analysis of cell extracts prepared from PstS-TAP/SPA tag. Total cell extracts were grown in LB overnight 37°C and then reinoculated in HiPi MOPS to log phase ($OD_{600} \approx 0.5$), and treat (+) or untreat (-) with 1mM NO for 1h at 37°C; or resuspended in LoPi MOPS then incubated at 37°C 1h. The expression of TAP/SPA tagged proteins were detected by anti-FLAG M2 antibodies, and the predicted size is indicated in the figure. (B) The relative mRNA level of the *pstS* gene was measured by quantitative real-time PCR. The expression levels of target gene were normalized to that of the housekeeping gene *rpoD*, and shown in all data represent the fold value divided by the HiPi UT used as a control.

3. PhoU 는 PstB 및 PhoR 과 모두 상호작용한다.

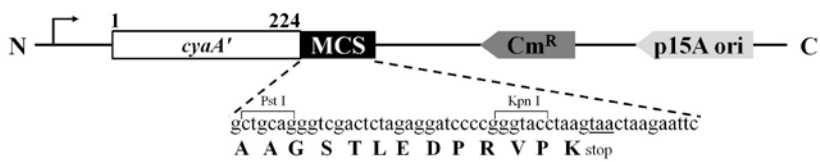
위 결과에서 바탕으로 NO 가 어떤 단백질의 기능을 저해함으로써 PstS 발현을 억제하는지를 확인하기 위해 Bacterial two-hybrid system (BACTH system)을 도입하여 cytoplasm 에 존재하는 PstB, PhoU, PhoR 의 상호작용을 in vivo 에서 확인하였다. BACTH system 은 *E. coli* adenylate cyclase (CyaA)의 활성을 통해 두 단백질 간의 상호작용을 알아보기 위한 방법으로, *Bordetella pertussis* CyaA 의 촉매 영역을 T25 및 T18 두 개의 단편으로 분리하여 그 사이에 유전적으로 융합시켜 사용하는 방법이다 (Figure 5A). pT25 는 T25 단편의 N-말단에 CyaA (1-224 번째 아미노산) C-말단에 MCS 를 가진 pACYC184 로부터 생성되었고, pT18 은 T18 단편의 N-말단에 MCS 와 C-말단에 CyaA (225-339 번째 아미노산)를 가진 pBluescript II KS (Stratagene)로부터 생성되었다 (Figure 5B) [29]. pT25-Zip 및 pT18-Zip 은 pT25 및 pT18 의 MCS 에 있는 Kpn I 부위로 GCN4 의 류신 지퍼가 삽입되었고 [29], 이는 아데닐산 고리화효소 활성이 결여된(*cya*⁻) *E. coli* 에 pT25-Zip 및 pT18-Zip 이 동시에 형질전환 될 때 T25 및 T18 단편에 붙여진 류신 지퍼 모티프가 T25 및 T18 단편 사이의 기능적 보완(*cya*⁺)을 일으켜 상호작용을 이루어 이 실험의 양성 대조군으로 사용되었다. LB-X-Gal indicator plate 에서 상호작용을 확인할 수 있는데 상호작용이 일어날 경우 blue colony 를, 그렇지 않은 경우는 white (or pale blue) colony 를 형성한다. 그 결과, PhoU 는 *E.coli* 와 동일하게 PstB 및 PhoR 과 상호작용을 이루었다 (Figure 6A). 이러한 상호작용을 좀 더 정확한 정량적 분석법으로 β -galactosidase assay 방법을 도입하여 상호작용 정도를 알아보았다. 그 결과, PhoU-PhoR 의 상호작용이 PhoU-PstB 보다 강하게 이루어짐을 확인하였다 (Figure 6B).

(A)



(B)

pT25



pT18

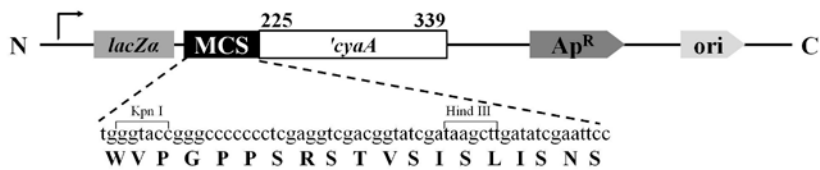
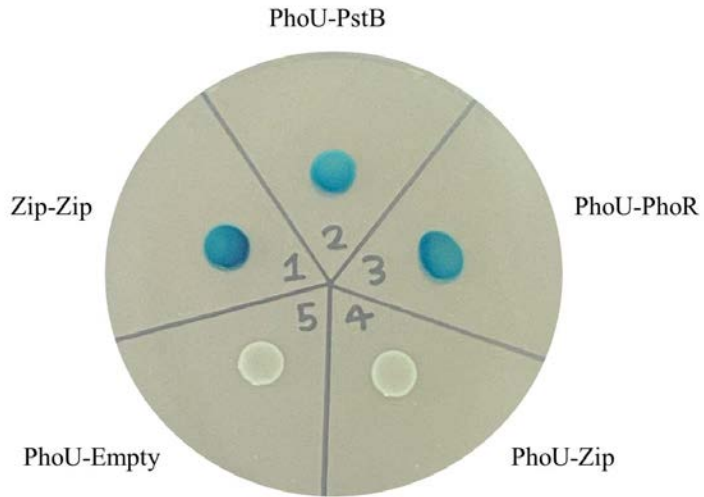


Figure 5. Principle of an *E. coli* two-hybrid system.

(A) In *E. coli* Δcya , cAMP synthesis occurs when it has a full-length catalytic domain (residues 1-399) or when two interacting proteins (e.g. Zip-Zip) are fused to two fragments. The synthesized cAMP binds to catabolite gene activator protein (CAP), and cAMP/CAP complex recognizes the specific promoter and transcription occurs. (B) The Structure describes pT25 and pT18 and indicates the restriction enzymes used in the multi cloning site sequences (MCS).

(A)



(B)

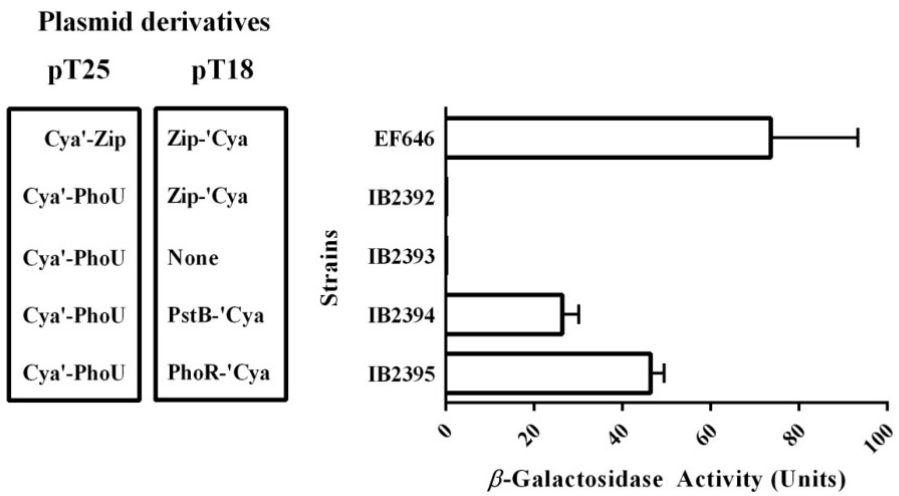


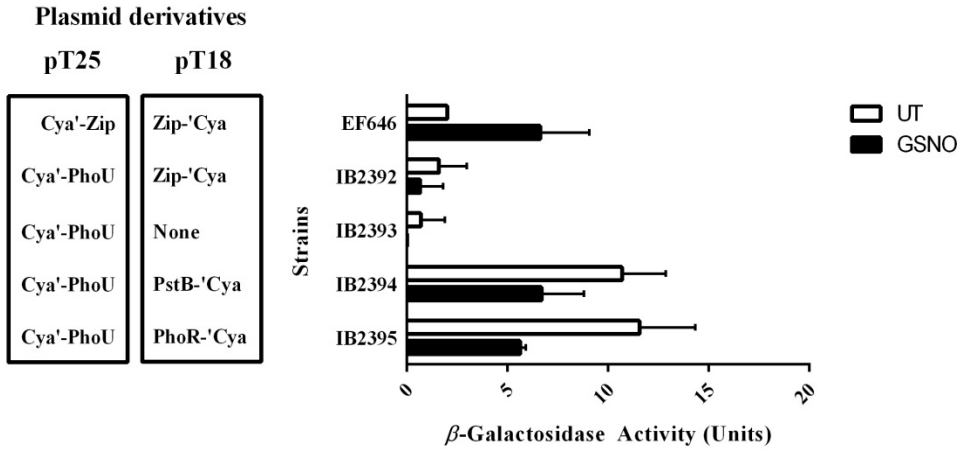
Figure 6. In vivo interaction between PhoU, PstB and PhoR.

The BACTH system was used to identify proteins that interact with PhoU. The strains were grown at 30°C in LB medium supplemented with appropriate antibiotics and 0.5mM IPTG. **(A)** For screening, the transformants was dropped 10µl on the LB-X-Gal indicator plate and incubated at 30°C until the color developed. The leucine zippers (Zip) fused to the adenylate cyclase domain was used as a positive control, while PhoU paired with the Zip plasmid or empty vector was used as a negative control. When hybridized proteins interact, all colonies form blue, whereas non-interaction they form white (pale blue). **(B)** For more quantitative analysis, β -galactosidase activity was assayed in stationary phase (O/N) cultures. The strains and plasmid constructions are shown in this Figure. Interaction between hybrid proteins induce *lacZ* expression by reconstructing the adenylate cyclase (CyaA) activity in *E. coli*.

4. PhoU-PhoR 은 NO 에 의해 상호작용이 억제되며, PhoU-PstB 는 Cys 의 nitrosylation 에 의해 상호작용이 이루어진다.

세균의 PhoU-PstB 및 PhoU-PhoR 의 상호작용이 박테리아가 활성을 갖는 log phase 및 stationary phase 일 때 NO 가 상호작용에 미치는 영향을 β -galactosidase assay 를 통해 확인하였다. 대조군인 Zip-Zip 은 NO 에 의해 상호작용이 증가하였다 라고 볼 때, PhoU-PstB 는 log phase 일 때 NO 에 의한 억제를 받다가 stationary phase 일 때는 오히려 NO 에 의한 증가현상을 보였다. 반면에, PhoU-PhoR 은 log phase 및 stationary phase 두 단계 모두 NO 의 억제를 받았다 (Figure 7). 이 결과를 바탕으로 NO 가 PhoU-PstB 및 PhoU-PhoR 의 상호작용에 미치는 영향이 S-nitrosylation 과 관련이 있는지 알아보기로 하였다. S-nitrosylation 은 단백질 내 Cysteine (Cys)의 thiol group (-SH)이 NO 와 공유결합에 의해 S-nitrosothiol (SNO)을 형성하는데, 이는 세포 신호전달 및 단백질 번역 후 변형(post-translational modification)에 중요한 역할을 한다 [30]. S-nitrosylation 이 되지 않도록 PhoU 의 Cysteine (Cys) 잔기를 구조적으로 비슷하지만 중성 성질을 갖는 Serine (Ser) 잔기로 치환하여 PhoU 돌연변이(PhoU*) 로 인한 PstB 및 PhoR 과의 상호작용을 LB-X-Gal indicator plate 및 β -galactosidase assay 를 통해 확인하였다. 그 결과 PhoU 의 Cys 잔기의 치환은 전반적으로 PhoR 과의 상호작용에 미미한 영향을 미치지만, PstB 와의 상호작용을 억제한다 (Figure 8). 이를 통해 NO 존재 하에 PhoU-PstB 는 Cys 잔기의 S-nitrosylation 에 의한 단백질 구조적 변형이 상호작용에 절대적으로 필요하며, 반대로 PhoU-PhoR 은 Cys 의 nitrosylation 과 무관하게 상호작용이 이루어지지만 상호작용의 정도는 감소한다는 것을 나타낸다.

Log phase



Stationary phase

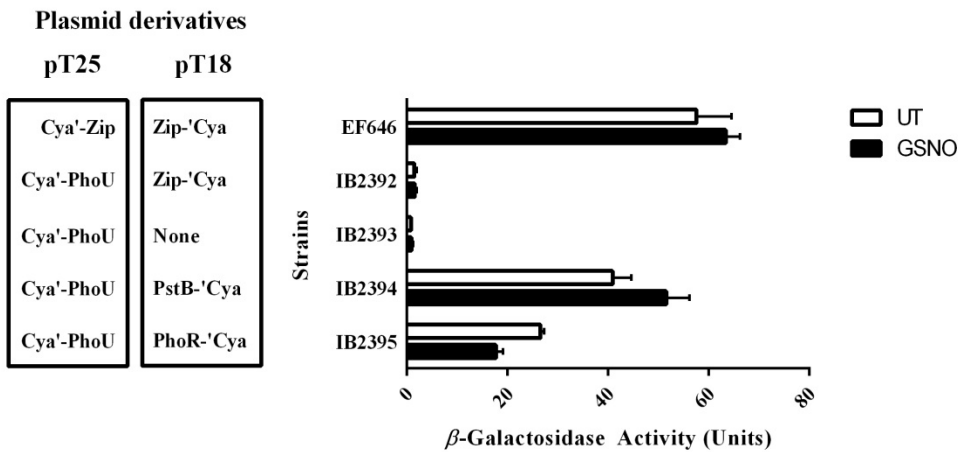
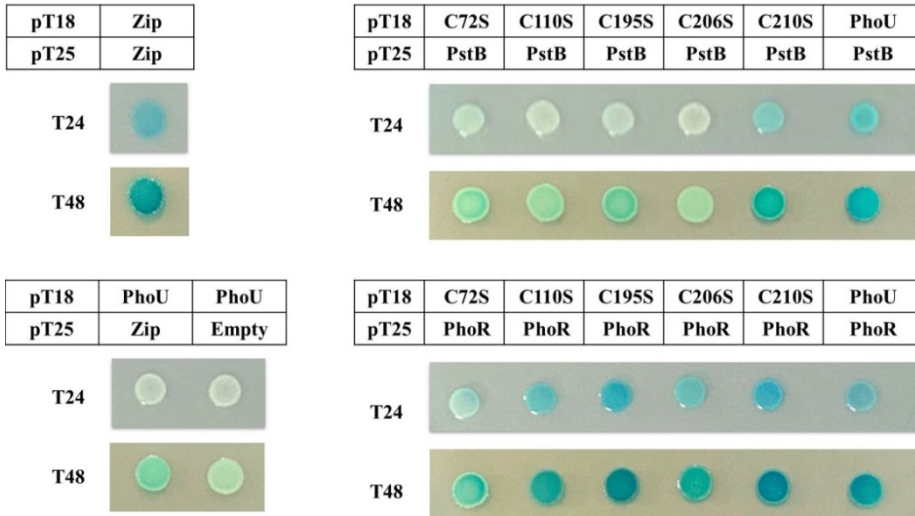


Figure 7. Effect of NO stress on protein interaction.

The strains were grown in LB medium supplemented with appropriate antibiotics and 0.5mM IPTG. β -galactosidase activity was assayed in log phase ($OD_{600} \approx 0.5$) and stationary phase (O.N) treated (+) or untreated (-) with 1 mM GSNO at 30°C.

(A)



(B)

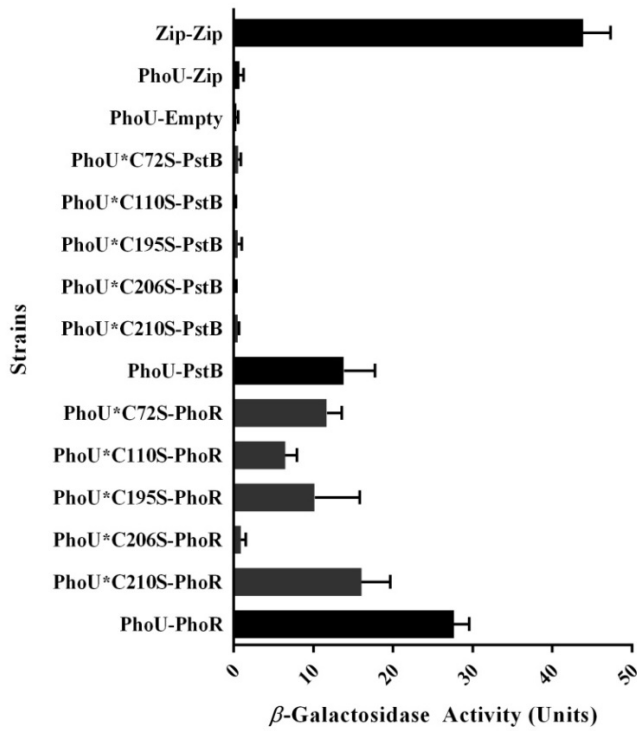


Figure 8. In vivo interaction between PhoU*, PstB and PhoR.

The strains were grown at 30 °C in LB medium supplemented with appropriate antibiotics and 0.5mM IPTG. **(A)** For screening, the transformants was dropped 2µl on the LB-X-Gal indicator plate and incubated at 30 °C until the color developed. All strains shown were dropped together in one plate. **(B)** For quantitative analysis, β -galactosidase activity was assayed in stationary phase (O/N) cultures. Zip-Zip was used as a positive control, and PhoU-Zip and PhoU-Empty were used as negative controls.

V. 고찰

병원성 세균이 살아가는데 무기인산(inorganic phosphate; Pi)의 섭취는 필수적이다. Pi 항상성 유지는 세균이 항균작용에 의한 산화질소(NO) 공격으로부터 저항하는데 중요하다. 세포 내 Pi 항상성을 유지하기 위한 메커니즘으로 Phosphate (Pho) regulon 을 갖는데, 이는 PhoB/PhoR two component system 및 Pi 에 특이적이며 세포 외부 Pi 농도에 따라 발현이 조절되는 Pi 고친화성 Pst system 을 갖는다 (Figure 1). 이를 기반으로 본 논문에서는 *S. Typhimurium* 내 Pi 농도 변화 및 NO 조절에 있어 Pi 수송시스템의 분자적 상호작용을 규명하고자 하였다.

pstS 의 전사 및 번역 수준에서 Pi 가 많을 때 NO 억제를 안받던 발현이 Pi 가 적어질 때 높은 수준의 발현이 NO 에 의해 억제되었다. 또한 낮은 Pi 농도에 의한 높은 수준의 발현이 NO 의 영향을 받는 것과 달리 Δ *phoU* 에서 PstS 발현에 NO 손상을 받지 않았다(Figure 2-4). 이를 기반으로 Pho regulon 발현 조절 과정에 있어서 NO 가 어떤 단백질의 기능을 저해함으로써 PstS 의 발현을 억제하는지 알아보기 위해 PhoU-PstB 및 PhoU-PhoR 의 상호작용 및 NO 스트레스로 인한 영향을 알아보았다. 그 결과, NO 가 없는 조건에서 PhoU 는 PstB 및 PhoR 과 원활한 상호작용이 이루어지고, NO 가 존재할 때 PstB 와는 그대로 상호작용하는 반면에 PhoR 과의 상호작용은 억제됨을 확인하였다 (Figure 6, 7). 이러한 NO 의 영향을 S-nitrosylation 과 연관지어 볼 때 nitrosylation 에 필요한 Cys 잔기의 기능을 제거함으로써 NO 가 활성을 가질 때 PhoU 와 상호작용하는 단백질인 interactome 이 인산 수송시스템에 어떠한 분자적 기능을 하는지를 알아보았다. PhoU-PstB 의 상호작용은 Cys 잔기가 존재할 때 NO 유무와 관계없이 상호작용이 원활하게 일어난다. 하지만

각각의 Cys 잔기를 돌연변이 시켰을 때 대부분의 상호작용이 억제됨으로써, PstS 와의 상호작용에서 nitrosylation 에 의한 단백질 변형이 중요한 역할을 한다. PhoU-PhoR 의 상호작용은 NO 스트레스에 의해 억제되는데, 이는 Cys 잔기의 nitrosylation 이 PhoU-PhoR 의 상호작용을 어느 정도 감소시킴에도 불구하고 일정하게 상호작용이 일어나는 것으로 보아 이는 Cys 의 S-nitrosylation 이 아닌 또 다른 조절 메커니즘에 의해 PhoR 과의 상호작용이 억제된다고 생각해 볼 수 있다 (Figure 7,8). 또한 이러한 상호작용의 억제는 PhoU 의 Cys 잔기의 thiol group 이 NO 표적이 될 수 있으며, 이 연구의 결과를 그림으로 나타내었다 (Figure 9). 이로써 첫 번째 가설로 Cys 가 단백질 접힘에 의해 NO 와 결합할 수 없는 형태일 경우 NO 의 S-nitrosylation 이 불가능하여 NO 억제를 받을 수 있다고 생각할 수 있다. 두 번째 가설은 Cys 는 자기들끼리 서로 결합하려는 성질이 강하며 disulfide bond 를 형성할 수 있다. Cys 가 서로 disulfide bond 쌍을 이루는 구조일 경우 NO 와 결합할 thiol group (-SH)이 없어 nitrosylation 일어나지 않는다. 그로 인해 NO 가 쌓여 억제를 받게 되고, disulfide bond 를 형성한 Cys 중 한 개의 Cys 를 돌연변이 시켰을 때 disulfide bond 쌍을 이루던 Cys 가 결합이 끊기면서 thiol group (-SH)이 생기게 되고, 이는 NO 와 만나 nitrosylation 이 일어나 NO 를 무력화시켜 상호작용이 일어날 수 있다는 것이다. 더 나아가 Pst 시스템에서 NO 및 PhoU interactome 에 의해 Pho regulon 의 발현에 미치는 영향 및 메커니즘 특성에 대해 향후 밝혀내야 할 과제라고 생각된다.

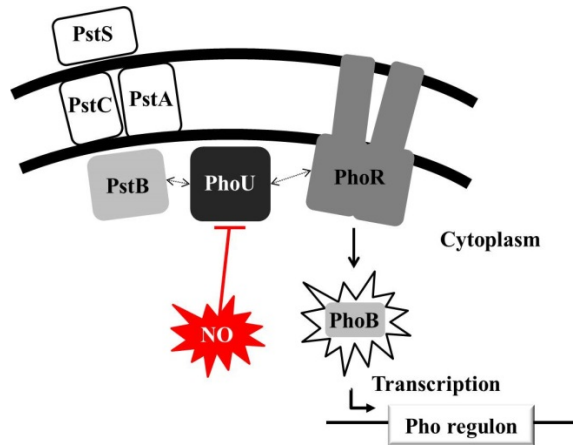


Figure 9. The interaction model of Pst system

PhoU interacts with PstB and PhoR, and the interaction with PhoR is reduced by NO.

VI. 참고문헌

1. Wanner, B.L. and B.D. Chang, *The phoBR operon in Escherichia coli K-12*. J Bacteriol, 1987. **169**(12): p. 5569-74.
2. Hsieh, Y.J. and B.L. Wanner, *Global regulation by the seven-component Pi signaling system*. Curr Opin Microbiol, 2010. **13**(2): p. 198-203.
3. Park, Y.-M. and I. Bang, *Bacterial Phosphate Homeostasis: Role of Phosphate Transporters*. The Korean Journal of Microbiology, 2012. **48**.
4. Makino, K., et al., *Role of the sigma 70 subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in Escherichia coli*. Genes Dev, 1993. **7**(1): p. 149-60.
5. Makino, K., et al., *Nucleotide sequence of the phoB gene, the positive regulatory gene for the phosphate regulon of Escherichia coli K-12*. J Mol Biol, 1986. **190**(1): p. 37-44.
6. Carmany, D.O., K. Hollingsworth, and W.R. McCleary, *Genetic and biochemical studies of phosphatase activity of PhoR*. J Bacteriol, 2003. **185**(3): p. 1112-5.
7. Makino, K., et al., *Nucleotide sequence of the phoR gene, a regulatory gene for the phosphate regulon of Escherichia coli*. J Mol Biol, 1986. **192**(3): p. 549-56.
8. Gardner, S.G., et al., *The PhoU protein from Escherichia coli interacts with PhoR, PstB, and metals to form a phosphate-signaling complex at the membrane*. J Bacteriol, 2014. **196**(9): p. 1741-52.
9. Santos-Beneit, F., *The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria*. Frontiers in Microbiology, 2015. **6**: p. 402.
10. Bogdan, C., *Nitric oxide and the immune response*. Nat Immunol, 2001. **2**(10): p. 907-16.
11. MacMicking, J., Q.W. Xie, and C. Nathan, *Nitric oxide and macrophage function*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 323-50.
12. Wei, X.Q., et al., *Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase*. Nature, 1995. **375**(6530): p. 408-11.

13. Hausladen, A., A.J. Gow, and J.S. Stamler, *Nitrosative stress: metabolic pathway involving the flavohemoglobin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(24): p. 14100-5.
14. Hausladen, A., A. Gow, and J.S. Stamler, *Flavohemoglobin denitrosylase catalyzes the reaction of a nitroxyl equivalent with molecular oxygen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10108-12.
15. Poole, R.K., *Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in bacteria*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 1): p. 176-80.
16. 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.
17. Lim, N.R., *The Role of the Inorganic Phosphate in Salmonella Resistance to Nitric Oxide*. 2011.
18. Neidhardt, F.C. and R. Curtiss, *Escherichia coli and Salmonella : cellular and molecular biology*. 1996, Washington, D.C.: ASM Press.
19. Chalker, R.B. and M.J. Blaser, *A Review of Human Salmonellosis: III. Magnitude of Salmonella Infection in the United States*. Reviews of Infectious Diseases, 1988. **10**(1): p. 111-124.
20. Datsenko, K.A. and B.L. Wanner, *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6640-5.
21. Neidhardt, F.C., P.L. Bloch, and D.F. Smith, *Culture medium for enterobacteria*. J Bacteriol, 1974. **119**(3): p. 736-47.
22. Babu, M., et al., *Identification of protein complexes in Escherichia coli using sequential peptide affinity purification in combination with tandem mass spectrometry*. J Vis Exp, 2012(69).
23. Griffith, K.L. and R.E. Wolf, Jr., *Measuring beta-galactosidase activity in bacteria: cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **290**(1): p. 397-402.
24. Thibodeau, S.A., R. Fang, and J.K. Joung, *High-throughput beta-galactosidase assay for bacterial cell-based reporter systems*. Biotechniques, 2004. **36**(3): p. 410-5.

25. Moreno, M., et al., *Regulation of sigma S degradation in Salmonella enterica var typhimurium: in vivo interactions between sigma S, the response regulator MviA(RssB) and ClpX*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2000. **2**(2): p. 245-54.
26. Cherepanov, P.P. and W. Wackernagel, *Gene disruption in Escherichia coli: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant*. Gene, 1995. **158**(1): p. 9-14.
27. Guzman, L.M., et al., *Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter*. J Bacteriol, 1995. **177**(14): p. 4121-30.
28. Zeghouf, M., et al., *Sequential Peptide Affinity (SPA) system for the identification of mammalian and bacterial protein complexes*. J Proteome Res, 2004. **3**(3): p. 463-8.
29. Karimova, G., et al., *A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(10): p. 5752-6.
30. Mannick, J.B. and C.M. Schonhoff, *NO means no and yes: regulation of cell signaling by protein nitrosylation*. Free Radic Res, 2004. **38**(1): p. 1-7.

국문초록

세포독성 산화질소와 살모넬라 티피유리움 Pst 인산수송 체계의 분자적 상호작용

이 초 아

지도교수 : 방 일 수

조선대학교 일반대학원

치의생명공학과

인(phosphorus)은 세균이 살아가는데 있어 필수적인 요소이며, 주로 무기인산 (phosphate; Pi)의 형태로 세포 내에서 발견된다. 병원성 세균은 숙주세포 내 다양한 스트레스가 주어진 조건에서 Pi 항상성을 유지하기 위해 Phosphate (Pho) regulon을 갖는다. Pho regulon은 PhoB/PhoR two-component system 및 Pi 특이적인 Pst system을 통해 발현이 조절되고, 이는 세균 내 Pi 수송에 절대적으로 필요하다. Pst system은 *pstSCAB-phoU* 유전자들로 구성된 *pst* 오페론이며, 세포 외 Pi 농도 감지에 따라 발현이 조절된다. 세포 외 Pi 농도가 높을 경우 *pst* 오페론을 포함한 Pho regulon의 발현이 PhoB의 탈인산화에 의해 억제되고, 세포 외 Pi 농도가 낮을 경우 인산화된 PhoB에 의해 Pho regulon 발현이 유도되는 것으로 알려져 있다. 그러나 Pst 시스템의 단백질이 Pi 농도를 감지하기 위한 상호작용 및 PhoU와 PhoB/PhoR 간의 상호작용을 통한 신호전달의 분자적 메커니즘은 잘 알려져 있지 않다. 또한 세균의

Pi 항상성 유지는 숙주 면역에 의해 생성되는 항균제 중 하나인 산화질소(nitric oxide; NO) 스트레스로부터 생존하는데 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 장내세균인 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium의 Pi 대사 조절에서 Pst 시스템의 분자적 상호작용 및 Pst 시스템 상호작용에서 NO의 영향에 대해 연구하였다. 전사 및 번역 수준에서 세포 외 Pi 농도가 높은 환경(HiPi MOPS)에서 PstS의 발현은 NO 스트레스의 영향을 받지 않았지만, 반대로 세포 외 Pi 농도가 낮은 환경(LoPi MOPS)에서 높은 수준으로 발현이 되어야 하는 PstS가 NO에 의해 발현이 억제되었다. 그러나 $\Delta phoU$ 돌연변이에 NO처리는 PstS의 발현에 영향을 미치지 않았으며, 이는 Pst 발현의 NO 조절에 대한 PhoU 의존성을 입증했다. 이에 NO가 PstS 발현을 억제하는데 PhoU와 상호작용하는 단백질이 NO 표적인지 확인하기 위해 PhoU와 PstB 상호작용 및 PhoU와 PhoR의 상호작용을 bacterial two hybrid system을 이용하여 분석하였다. 그 결과, PhoU와 PhoR 사이의 상호작용이 NO에 의해 크게 감소한 반면, NO는 PhoU와 PstB 사이의 상호작용에 거의 영향을 미치지 않음을 보여주었다. 또한 NO가 존재하지 않는 경우, PhoU의 Cys 잔기를 Ser 잔기로의 돌연변이는 PhoU-PstB 보다 PhoU-PhoR의 상호작용을 현저하게 감소시켰으며, 이는 PhoU의 Cys 잔기의 thiol group이 NO 표적이 될 수 있음을 나타냈다. 또한 이러한 Cys의 nitrosylation은 PhoB 활성화를 조절하기 위해 PhoR에 대한 낮은 Pi 신호전달을 억제하여 PstB와 더 단단히 결합하기 위해 PhoU의 잠재적인 형태 변화를 유발할 수 있음을 시사하였다. Pst 시스템의 NO 조절 메커니즘 및 NO 스트레스와 관련된 PhoU interactome에 대한 추가적인 연구는 NO를 생성하는 숙주 내 Pi 농도가 낮은 조건에서 세균 생존 메커니즘의 특성을 좀 더 연구할 필요가 있다고 생각된다.