



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](#)

2024년 2월

석사학위 논문

**Study of the Relationship between
Bacterial Motility and Inorganic
Phosphate Metabolism Regulation**

조선대학교 대학원

치의생명공학과

배 지 은

Study of the Relationship between Bacterial Motility and Inorganic Phosphate Metabolism Regulation

세균의 운동성과 무기인산 대사 조절의 관련성 연구

2024년 2월 23일

조선대학교 대학원

치의생명공학과

배 지 은

Study of the Relationship between Bacterial Motility and Inorganic Phosphate Metabolism Regulation

지도교수 방 일 수

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2023년 10월

조선대학교 대학원

치의생명공학과

배 지 은

배지은의 석사학위논문을 인준함

위원장 이 성 행 (인)

위 원 국 중 기 (인)

위 원 방 일 수 (인)

2023년 12월

조선대학교 대학원

목차

목차	i
표목차	iv
도목차	v
ABSTRACT	vii
I. 서론	1
II. 실험 재료 및 방법	7
1. 사용 균주 및 배양 배지와 배양 조건	7
2. Bacteria Growth curve 측정	8
3. 세균 운동성 측정	8
4. RNA 추출, cDNA 합성 및 실시간 정량 PCR (qRT-PCR)	9
5. 녹색 형광 단백질(Green Fluorescence Protein; GFP)을 이용한 세균 관찰	10

6. 세포 내 자유 무기인의 농도 측정	10
7. DNA추출 및 <i>Hin</i> 단백질 매개 DNA 전도에 의한 상변이 검사 ...	11
8. Western Blot	12
9. Competitive invasion assay	13
10. Statistical Analysis	13
III. 표	14
IV. 결과	17
1. 세균 무기인산 대사 핵심 조절 단백질 <i>PhoU</i> 돌연변이는 세균의 성장을 억제한다.	17
2. <i>phoU</i> 유전자 결손으로 인해 세균의 운동성이 감소한다.	19
3. <i>phoU</i> 결손 돌연변이로 인해 활성화된 세균 전사 조절자 <i>PhoB</i> 는 무기인산 수송 유전자의 발현을 촉진한다.	21
4. 무기인산 수송 유전자 <i>pstSCAB</i> 오페론의 증가된 발현은 세포 내에 과도한 인산 축적을 유발한다.	23
5. <i>phoU</i> 및 <i>phoB</i> 는 <i>hin</i> invertible DNA segment의 전도를 조절하여 Flagellar Phase Variation을 유발한다.	25

6. <i>phoU</i> 및 <i>phoB</i> 돌연변이 균주에서 Flagellin 단백질 FliC의 발현이 감소한다.	27
7. 무기인산 대사 조절 관련 유전자는 Flagellar assembly Class II, III 편모 생합성 유전자들의 발현을 조절한다.	29
8. <i>Salmonella</i> 의 <i>phoU</i> 돌연변이는 HeLa cell에 대한 침입 능력이 저하된다.	31
V. 고찰	33
VI. 참고문헌	37

표목차

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study..... **14**

Table 2. Oligonucleotides used in this study **16**

도목차

Figure 1. Transmembrane Signaling Model for Modulating the Pho regulon.....	5
Figure 2. Flagellar phase variation mechanism in <i>S. Typhimurium</i>	6
Figure 3. Effect of <i>phoU</i> on <i>S. Typhimurium</i> growth.	18
Figure 4. The absence of <i>phoU</i> incapacitate the motility of <i>S. Typhimurium</i>	20
Figure 5. Expression of <i>phoB</i> and <i>pstS</i> by <i>phoU</i> and <i>phoB</i>	22
Figure 6. Measurement of the inorganic phosphate in <i>Salmonella</i> strain.	24
Figure 7. Analysis of the inversion state of <i>hin</i> invertible DNA segments in <i>phoU</i> and <i>phoB</i> mutant strains.	26
Figure 8. The decrease in FliC protein expression in <i>phoU</i> and <i>phoB</i> mutant strains.....	28

Figure 9. Transcription levels of flagellar assembly-related Class I, II, and III group genes. **30**

Figure 10. The *phoU* mutation of *Salmonella* has a reduced ability to invade HeLa cells. **32**

Figure 11. Genes regulated by the transcriptional regulatory protein PhoB of the phosphate regulon.....**36**

ABSTRACT

Study of the Relationship between Bacterial Motility and Inorganic Phosphate Metabolism Regulation

Ji Eun Bae

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

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

Phosphorus is the essential nutrient for cellular function including energy metabolism and the maintenance of genome stability. Cells acquire phosphorous in the form of inorganic phosphate, and this uptake is regulated by the bacterial Pst system, a high-inorganic phosphate affinity transporting system. This transport system manages bacterial phosphate metabolism to maintain optimum levels of inorganic phosphate within the cell. The most of bacterial Pst systems are encoded by the *pst* operon, consisting of *pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB* and *phoU* genes. They encode the PstS periplasmic binding protein, PstC and PstA membrane-spanning proteins forming the permease complex, PstB ATP-binding protein, and the regulatory protein PhoU. According to *E. coli* model, the regulation of this system expression is mediated by histidine kinase PhoR and response regulator PhoB two component signal transduction system. In this regulatory mechanism, under conditions of high extracellular phosphate concentration, PhoU interacts with PhoR, inhibiting its autophosphorylation activity. This interaction prevents phosphorylation of PhoB, thus inhibiting the transcription of genes in PhoB regulon, including

the *pst* operon. Conversely, when the extracellular phosphate concentrations are low, the decrease in PhoU and PhoR interactions allow PhoR to autophosphorylate and subsequently phosphorylate PhoB.

This study found by chance that *phoU* mutation abrogates bacterial motility in an enteric pathogen *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Functions related to bacterial motility, adhesiveness, and cell invasion depend on flagella. In *S. Typhimurium*, flagella formation follows a hierarchical activation of Class I, II, and III genes for flagella biogenesis. Additionally, bacteria cause changes in gene expression of flagellins FliC (H1 antigen) and FljB (H2 antigen) through flagellar phase variation. The effect of regulation of inorganic phosphate metabolism on bacterial motility remains not explored. Based on the finding of PhoU-dependent *Salmonella* motility, this study has studied the relationship between the regulation of inorganic phosphate metabolism and bacterial motility. The *phoU* mutant strain significantly inhibited bacterial growth, while there was no significant difference in bacterial growth of *phoB* mutant, compared to WT strain. Additionally, in contrast to *phoU* mutant, *phoB* mutant strain showed similar motility to WT. Considering the fact that, in *E. coli phoU* mutant, activated PhoB increased the expression of the inorganic phosphate transport genes, which resulted in an increase in intracellular inorganic phosphate, these results suggest that activated PhoB due to *phoU* mutation can reduce bacterial growth and motility. In an analysis observing Hin-mediated flagellar phase variation, there were changes in the orientation of Hin-specific DNA segment in chromosomes of both *phoU* and *phoB* mutants, suggesting that phosphate metabolism may be involved in Hin-dependent phase variation. However, analysis on mRNA levels of genes for flagellar biogenesis were not consistent with the results from Hin-dependent phase variation, rather exhibited decrease in transcription of flagella class II genes, as well as class III genes. This suggest that there are the phosphate metabolism-related regulatory mechanisms for flagella biogenesis at the transcriptional level in addition to Hin-mediated

phase variation. Additionally, *phoU* mutant could not invade to epithelial cells, suggesting that PhoU-dependent motility may affect bacterial invasion ability.

This study demonstrates important roles of PhoU regulator in relating inorganic phosphate metabolism to flagella biogenesis. Further study is necessary to identify new genes regulated by PhoB to understand in more detail their effects on flagellar biogenesis and bacterial motility.

1. 서론

*Salmonella enterica*는 그람 음성의 장내세균이다[1]. 일반적으로 오염된 물이나 음식을 섭취함으로써 감염이 되며 인간과 다양한 동물에게 장염부터 장티푸스까지 넓은 범위의 식중독 증상을 보이는 질병을 유발한다. 현재까지 *S. enterica*의 혈청형은 약 2,500종 이상으로 보고되어 있으며, 그 중 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*)은 사람과 소에서는 장염을 일으키지만 생쥐에서는 전신 감염을 일으킨다[2]. *Escherichia coli*만큼 유전자 재조합 기술이 잘 알려져 있어서 기초 미생물의 병원성 연구에도 많이 쓰이는 모델이다.

인은 세균의 생존과 세포 기능에 필수적인 요소로 생물체 내에서는 무기인산(inorganic phosphate; Pi) 또는 인산염 에스테르(phosphate esters) 형태로 존재한다[3]. 무기인산은 세포 내에서 주요 구성 성분으로 작용하여 DNA 골격 형성, ATP 합성과 같은 에너지 대사를 담당한다. 또한, 세포막을 형성하고 세포 구조를 유지하여 세균의 운동성을 지원하는 중요한 역할을 한다. 세균의 무기인산 수송은 대표적으로 GlpT, UhpT, YjbB, Pit, Pst 시스템 총 5가지 수송체를 통해 이루어진다. GlpT 시스템과 UhpT 시스템은 세포질 내로 유기인산을 운반함과 동시에 무기인산 이온을 방출시킨다[4]. YjbB 시스템은 YjbB가 과발현되어 무기인산을 세포 외로 방출하면서 세포 내의 Poly-Pi를 감소시킨다[5]. Pit 시스템은 low affinity 무기인산 수송 시스템으로 금속이온과 복합체로 무기인산을 수송한다[6]. 마지막으로 Pst 시스템은 인산 항상성을 유지하기 위한 주요한 무기인산 대사 조절 체계 중 하나이며, 이 시스템은 세균이 주변 환경에서 이용 가능한 인산염을 흡수하여 세균의 인산 대사를 조절하는데 중요한 역할을 한다. Pst

시스템은 Pi 에 높은 친화성을 갖는 시스템으로 *pst* 오페론에 의해 합성되는 PstS, PstC, PstA, PstB 그리고 PhoU 단백질로 구성되어 있다[7]. *pst* 오페론의 발현은 세포 외부의 인산염 농도에 따라 조절되며, PstS와 PstCAB 수송 복합체 및 이들의 유전자 발현을 조절하는 PhoB/PhoR 두 단백질로 이뤄진 two-component 신호 전달 시스템이 이 과정에 참여한다[8]. PstS는 periplasm에서 Pi 포획을 담당하고 PstCA는 PstS가 운반한 Pi를 세포질로 이동시키는 수송체로 알려져 있다[9]. PstB는 Pi 수송을 위한 에너지를 전달하며 PhoU는 Pi 수송에 직접적으로 관여하진 않지만, *pst* 오페론 유전자 발현에 음성조절자 역할을 한다. 세포 외부 Pi의 농도가 낮을 때는 PhoU가 PhoR의 ATPase 도메인과 상호작용하여 PhoR의 히스티딘 잔기가 자기인산화되고, 그 후 인산기는 PhoB의 Asp 잔기로 옮겨져 인산화된 phoB가 축적된다. 이 인산화로 인해 Phosphate (Pho) regulon 유전자들의 전사가 유도된다[10]. 반대로, 세포 외부 Pi의 농도가 높을 때는 Pi와 결합한 PstS가 periplasm에 축적되면서 세포막의 PstCAB 복합체와 결합한다. 이 신호는 PhoU를 통해 PhoR에 전달되어 PhoR의 phosphatase 활성을 촉진함으로써 PhoB는 탈인산화되고 불활성화 상태로 전환시킨다. 이러한 변화로 인해 Pho regulon 유전자들의 전사 유도가 억제된다(Figure 1) [11].

*Salmonella*는 숙주세포에 감염하는 과정에서 비식세포성 장상피세포에 침입하여 생존하고, 세포 내에서 증식한 후 상피세포를 침투하여 더 깊은 조직내로 이동한다. 이는 숙주의 선천성 면역 체계에 의해 인식되어 다양한 면역 방어를 촉발할 수 있으며 숙주 면역을 회피하기 위한 메커니즘을 발전시켰다[12]. 숙주 세포 침입을 포함한 박테리아의 운동성, 주화성 및 병독성은 상당 부분 편모에 의존한다. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium은 정교한 편모 구조를 조립한다. 편모 조립은 유전자 발현이 단백질의 조립과 밀접하게 진행되는 고도로 체계적인

과정이다[13, 14]. 이 과정에는 50개가 넘는 유전자들의 발현이 필요하며, 이를 통해 편모의 구조와 기능이 구축된다. 편모 *regulon*의 프로모터는 세 가지 클래스로 구성될 수 있다[15]. Class I 유전자들은 Flagellar assembly의 초기 단계에서 관여하며 flagellar master regulators를 조절하는 역할을 한다. 이 클래스에 속하는 유전자들은 *flhDC*같은 유전자들로 다른 편모 생합성 유전자들의 발현을 조절하고 Flagellar assembly cascade를 시작한다[16]. Class II 유전자들은 Class I에서 조절된 편모 유전자들의 발현을 담당한다. 이 클래스에는 몸체(Basal-Body), 갈고리(Hook), 및 필라멘트(Filament) 등의 편모 구성 요소를 형성하는데 필요한 Class III 유전자들의 발현을 조절하는 *fliA*, *flgM* 등이 포함된다[17, 18]. Class III에 속하는 유전자들은 편모 단백질들을 세포 내에서 정확한 위치에 조립하고, 편모모터의 작동을 조절한다. 대표적으로 *fliC*, *fliB* flagellin subunit 유전자가 속해 있는 클래스이다. 이러한 유전자들의 단계적 활성화에 의해 편모가 형성된다. 편모의 구성 요소들은 정확한 조립이 필요하며, 이것이 박테리아가 움직이고 외부 환경에서 생존하는 데 필수적이다. Flagellar Phase variation은 유전자 발현의 변화를 통해 박테리아 편모에 영향을 주며, 이로 인해 박테리아의 특성이나 운동성이 변화할 수 있다. 이러한 변화는 세균이 다양한 환경 조건에 신속하게 적응할 수 있게 한다.

Flagellar Phase variation은 두 가지 다른 항원 단백질인 FliC (H1 항원) 및 FliB (H2 항원)가 교대로 발현한다[15, 19]. 편모 내 두 항원의 교대 발현은 편모 상변이로 정의되며, 이러한 상변화의 조절 메커니즘에 대한 연구는 많이 보고되어 왔다[20]. *S. Typhimurium*에서 *fliB*를 촉진하는 유전자는 가역적인 DNA 세그먼트에 의해 절단되며, 이는 두 개의 반복 서열인 *hixL* 및 *hixR*에 의해 끼워져 있다[15]. 이

DNA 조각이 정방향일 때는 *FliB* 편모가 발현되고 *fliA*와 *fliC* 프로모터의 직접적인 결합에 의해 *fliC*가 전사 수준에서 억제된다. 이와는 반대로 *Hin* recombinase가 가역적 세그먼트를 역방향으로 전도시키면 *fliB*나 *fliA*가 전사되지 않으며 *FliC* 편모가 박테리아에서 지배적이다(Figure 2). Phase variation은 Flagellar assembly에 영향을 미칠 수도 있다[21]. 특정 유전자의 발현이나 DNA 서열의 변화로 인해 Flagellar 조립에 관련된 유전자의 조절이 변화하여 세균의 움직임이나 환경 적응 능력이 변화할 수 있기 때문이다.

*S. Typhimurium*의 병원성과 생존 전략에 있어 무기인산 대사 조절과 세균의 운동성 간의 상호작용이 중요한 역할을 할 것으로 예상된다. 이에 본 연구는 무기인산 조절 체계 중 하나인 *Pst* 시스템을 통해 조절되는 무기인산 대사가 세균의 운동성에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

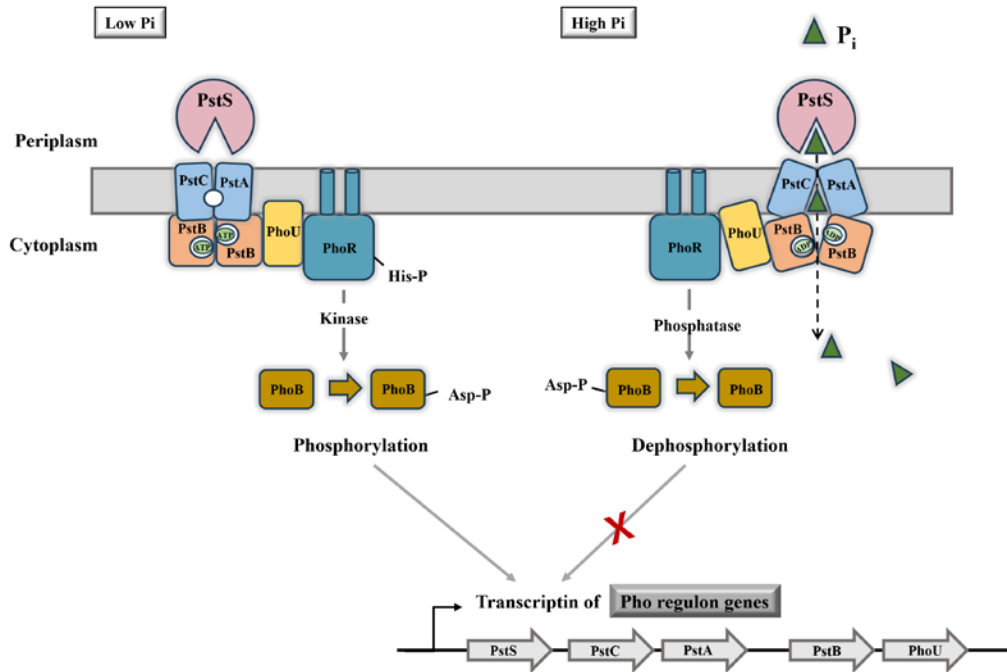


Figure 1. Transmembrane Signaling Model for Modulating the Pho regulon.

When the extracellular Pi concentration is low, the histidine residue of PhoR is autophosphorylated and the phosphoryl group is then transferred to the aspartate residue of PhoB a response regulator. As a result, phosphorylated PhoB accumulates and induces the transcription of the Pho regulon. When the concentration of Pi outside the cell is high, PstS bound to Pi binds to the PstCAB complex in the cell membrane, and this signal is transmitted by PhoU to PhoR to promote the phosphatase activity of PhoR. This dephosphorylates PhoB and changes it to an inactivated state. As a result, transcriptional induction of Pho regulon genes stops.

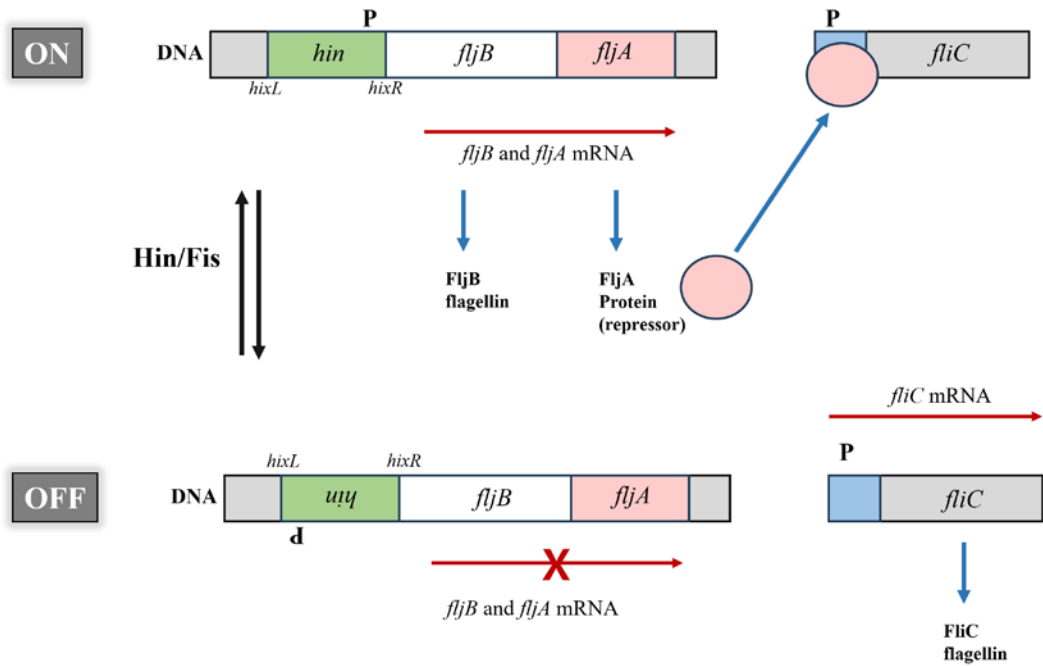


Figure 2. Flagellar phase variation mechanism in *S. Typhimurium*.

Hin-mediated rearrangements in *S. typhimurium* chromosomal segments cause inversion of the promoters that regulate both the *fljB* flagellin gene and *fljA*, a repressor protein that acts to repress the alternative flagellin gene *fliC*. In cooperation with Fis proteins, Hin recombinase promotes site-specific recombination between *hixL* and *hixR* recombination sites. In the (ON) state, transcription of *fljBA* generates FljB flagellin and FljA. Conversely, in the (OFF) state, the promoter of the *fljBA* transcript is inverted, resulting in exclusive *fliC* expression.

II. 실험 재료 및 방법

1. 사용 균주 및 배양 배지와 배양 조건

본 연구에서 사용된 균주는 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028s이며, 박테리오파지 λ -Red 매개 재조합 방법을 통해 돌연변이 균주를 제작하였다[22-24]. 모든 돌연변이 구조물은 Table 2에 기재된 유전자 관련 프라이머를 활용하여 PCR 분석을 거쳐 확인하였으며, 이후 P22 파지를 이용하여 WT 균주에 형질 도입하였다. 실험에 사용한 균주와 플라스미드는 Table 1에 기입하였다. 균주 배양 시 Luria-Bertani (LB) Broth 배지와 0.2% glucose를 포함하는 MOPS (3-(N-Mopholino) 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)에 10 mM K₂HPO₄를 첨가하여 사용하였다. MOPS 배지는 10배 농도로 제조한 후 0.2 μ M sterile syringe filter (Corning Inc, Germany)를 사용하여 여과하고, -20°C에서 보관한 뒤 사용시 멸균수 (Distilled water)로 희석하여 사용하였다. 사용한 균주는 37°C, 230rpm의 조건으로 배양하여 사용하였고 배지에는 Ampicillin (AP; 200 μ g/ml), Chloramphenicol (CM; 20 μ g/ml), Tetracycline (TC; 20 μ g/ml) 항생제를 첨가하여 사용하였다.

2. Bacteria Growth curve 측정

37 °C에서 LB에 밤새 배양한 야생형 균주 *S. Typhimurium*, *phoU* 및 *phoB* 돌연변이 균주, *phoU* 및 *phoB* 유전자 발현 플라스미드를 넣긴 균주들을 PBS (phosphate buffer saline, PH7.0)에 $OD_{600nm}=1$ 로 조절한 후 원심분리하여 MOPS로 세척해 주었다. 이후 MOPS 최소배지에 $OD_{600nm}=0.01$ 이 되도록 Microplate에 접종하였다. Labsystems Bioscreen C (Labsystems, Europe) 장비를 이용하여 37°C에 30분 간격으로 24시간 동안 교반하여 OD_{600nm} 값을 측정하였다.

3. 세균 운동성 측정

37 °C에서 LB에 밤새 배양한 각 균주를 1.5 ml tube에 200 μ l씩 옮긴 후 원심분리 (13,000rpm, 2min) 하여 pellet을 제외한 상층액을 제거하고 MOPS 최소배지 200 μ l로 세척해 주었다. 이후 MOPS 배지 10 μ l를 넣어 pellet이 완전히 용해될 때까지 파이펫팅하고 MOPS swimming Agar plate (10 mM K_2HPO_4 , 0.3% Bacto Agar)에 5 μ l 드롭 하여 8시간 후 생성된 지름을 관찰하고 측정하였다.

4. RNA 추출, cDNA 합성 및 실시간 정량 PCR (qRT-PCR)

LB Broth 배지에서 밤새 배양한 각 균주를 MOPS 최소배지에 1:50비율로 다시 접종하여 $OD_{600nm}=0.70$ 이 될 때까지 배양하였다. 2 ml tube에 배양균을 1.5 ml씩 옮겨 총 4.5 ml을 회수하고 5% phenol을 1:5비율로 넣은 후 얼음에 30분 동안 반응하여 전사를 중단시켰다. 그런 다음, 원심분리($4^{\circ}C$, 12,000rpm, 10min)하여 phenol을 완전히 제거하고 pellet에 50 μ l의 10 mg/ml lysozyme (Sigma Aldrich, Germany)를 첨가하여 2분에 한 번씩 10초 동안 30분간 vortex하여 세포벽을 파괴하였다. 이후 RNA isoPlus (TAKARA Biomedical, Japan) 1 ml과 chloroform 200 μ l를 넣어 vortex하고 상온에서 5분간 반응시킨 후 원심분리($4^{\circ}C$, 12,000rpm, 10min)하여 투명한 상층액만 조심스럽게 새로운 tube에 옮겨주었다. 회수한 상층액에 isopropanol 250 μ l를 넣고 부드럽게 invert한 뒤 상온에 10분동안 두었다가 다시 원심분리하여 isopropanol을 제거하고 잔여물 없이 RNA를 깨끗하게 씻기 위해 75% cold Ethanol 750 μ l를 넣어 invert한 후 원심분리하여 상층액을 제거하였다. Pellet을 완전히 건조시킨 후 DNase-free water (GeneAll) 50 μ l를 넣어 RNA를 용해시키고 DNase I (NEB, UK)을 처리하여 남아있는 DNA를 제거해주었다. 마지막으로 DNA 오염 여부를 확인하기 위해 housekeeping gene중 하나인 *rpoD*를 표적으로 PCR을 수행하였다.

cDNA 합성을 위해 2 μ g의 RNA에 0.5 μ g Random primers, M-MLV Reverse Transcriptase (Promega Co. Ltd, USA)를 처리하였다. Real-time PCR은 GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, USA)를 사용하고 Roter-Gene Q (QIAGEN, Germany) 장비를 이용하여 진행하였다. qRT-PCR에 사용된 프라이머는 Table 2에 정리하였으며, 이 실험에서는 housekeeping Gene인 *rpoD*를 대조군으로 사용하였다.

5. 녹색 형광 단백질(Green Fluorescence Protein; GFP)을 이용한 세균 관찰

pstS-gfp(ova) 플라스미드를 포함하는 각 균주를 37°C LB Broth 배지에서 밤새 배양한 후 MOPS 최소배지에 1:50으로 다시 접종하여 최종 광학밀도가 log phase ($OD_{600nm}=0.7$)가 되도록 하였다. 이후 슬라이드 글라스에 1 μ l drop 후 형광현미경(Axioscope A1; Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 세균이 나타내는 형광을 brightfield (BF) 및 fluorescein (FITC)에서 관찰하고 이미지를 시각화하였다.

6. 세포 내 자유 무기인의 농도 측정

각 균주를 37°C의 LB Broth 배지에서 밤새 배양한 후 MOPS 최소배지에 1:50으로 다시 접종하여 $OD_{600nm}=0.7$ 이 될 때까지 배양하였다. 이후에 차가운 멸균수로 2회 세척하고 원심분리하여 얻은 pellet에 0.5 M perchloric acid ($HClO_4$) 200 μ l를 넣고 5분간격으로 10초씩 총 30분 동안 vortex하여 세포를 깨고 12,000rpm, 4 °C의 조건에서 10분간 원심분리하여 상층액 180 μ l를 회수하였다. 무기인 측정은 Malachite Green Phosphate Assay kits (BiosAssay, U.S.A)를 이용하여 진행하였다. 먼저 0, 4, 8, 12, 16, 24, 32, 40 μ M의 농도로 준비한 인산염 표준용액과 샘플 80 μ l를 96 well plate (SPL, Korea)에 분주하고 Reagent A, B를 혼합한 혼합액 (100:1) 20 μ l를 파이펫팅하여 상온에서 30분 정도 반응 후 620nm 파장에서의 값을 측정하여 샘플의 농도를 구하였다.

7. DNA추출 및 Hin 단백질 매개 DNA 전도에 의한 상변이 검사

LB Broth 배지에서 밤새 배양한 각 균주를 MOPS 최소배지에 1:50비율로 다시 접종하여 $OD_{600nm}=0.7$ 이 될 때까지 배양하였다. 이후 배양된 균을 3 ml 회수하고 gDNA 추출을 위해 Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA)를 사용하였다. 추출된 DNA는 nano drop (Thermo Fisher, USA)을 이용하여 정량하였고 농도를 2 ng/ μ l로 조정하였다. Table 2에 기재된 *hixL* 및 *hixR* 특정 부분의 프라이머를 활용하여 PCR을 수행하고 Hin invertible DNA segment의 전도 상태를 확인하였다. 또한, housekeeping 유전자인 *rpoD*는 실험의 정확성을 위한 대조군으로 사용되었다. Hin PCR의 primer pair는 On : *hixL* - *hinr4* & HLr1, *hixR* - *hinr4* & *hixR*-RV / Off: *hixL*-HLr1 & *hinr4* , *hixR* - *hinr4* & *hixR*-RV 로 조합하여 사용하였고 PCR은 95°C 에서 5분 가열 후 변성(95°C 30초), 결합(56°C 30초), 신장(72°C 1분 10초), 72°C 5분, 4°C ∞ 조건으로 총 25 cycle 진행하였다. Off: *hixL*의 조건만 primer 온도를 고려하여 결합 온도 62°C에서 수행하였다.

8. Western Blot

각 균주를 37°C에서 LB Broth 배지에 밤새 배양한 후 MOPS 최소배지에 1:50비율로 다시 접종하고 OD_{600nm}=0.7이 되었을 때 15 ml 원심분리하여 pellet을 회수했다. 이 후 Pellet에 PBS 200 µl를 넣어 sonicator로 세포를 깬 후 단백질을 추출하였다. 단백질 농도는 Bradford protein assay (Bio-Rad, USA)를 사용하여 정량하였고 12% SDS-PAGE gel에 단백질을 크기별로 분리한 후 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane으로 Transfer하였다. Membrane은 5% skim milk (in TBST)를 이용하여 2시간 30분동안 Blocking후 1차 항체인 monoclonal anti-FliC antibody (Abcam, UK) 1:5,000 또는 Anti-*E. coli* RNA Polymerase antibody (β-subunit; BioLegend, USA) 1:100,000 + 5% skim milk를 밤새 처리하였고 다음날 membrane을 TBST로 3번 세척 후 2차 항체 goat anti-mouse IgG-HRP (1:5,000; Santa Cruz, USA)를 1시간 30분동안 처리 후 다시 세척하였다. 그런 다음 Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 단백질을 검출하였다. 이미지는 ChemiDoc™ Imaging System (Bio-Rad, USA)을 사용하여 시각화하였다.

9. Competitive invasion assay

HeLa cell은 10% Fetal Bovine Serum (FBS; Welgene, Korea)가 보충된 Minimum Essential Medium Eagle 배지(MEM; Welgene, Korea)에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양되었다. HeLa cell을 1 X 10⁵으로 seeding한 후 세포 밀도가 약 80-90% 정도에 이르면 침입 분석 실험을 실시하였다. WT 및 각 균주를 37°C LB Broth에서 OD_{600nm}=1이 될 때까지 배양한 후 1:1비율로 혼합하고 MOI=10이 되도록 조정하여 HeLa cell에 넣어 1시간 동안 배양하였다. 감염 후 세포 외에 존재하는 세균을 제거하기 위해 10% FBS 와 Gentamicin (final conc. 50 µg/ml)을 포함하는 MEM 배지에서 30분간 추가로 반응시켰다. 이 후 HeLa cell을 PBS로 세척 후 0.1% Triton X-100을 사용하여 용해시키고 세포 용해물을 serial dilution한 후 각 균주에 맞는 항생제 LB Agar plate에 drop하여 CFU를 계산하였다. 모든 결과값은 mutant / WT 의 값으로 표현하였다.

10. Statistical Analysis

모든 실험은 3회 이상 수행되었으며, 실험 데이터는 mean ± Standard Deviation (SD)로 표현되었다. 다중 그룹 비교를 위해 일원배치 분산분석(One-way ANOVA)을 사용하여 통계적 유의성을 분석하였다. 통계분석은 Prism 프로그램 (version 6; Graph Pad Software, USA)을 사용하여 수행되었으며 p -value < 0.05는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

III. Ⅱ

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain	Genotype	Source or reference
FB411	DH5 α / pCP20 :: AP	[24]
IB1	<i>S. Typhimurium</i> 14028s, Wild-type	ATCC
IB1255	Δ <i>phoU</i> (no AB)	This study
IB1124	Δ <i>phoU</i> :: CM	This study
IB2738	Δ <i>phoB</i> :: CM	This study
IB2739	Δ <i>phoU</i> Δ <i>phoB</i> :: CM	This study
IB2764	Δ <i>phoU</i> / pBAD18- <i>phoU</i> :: AP	This study
IB2781	Δ <i>phoB</i> ::CM / pBAD18- <i>phoB</i> :: AP	This study
IB2766	Δ <i>phoU</i> Δ <i>phoB</i> ::CM / pBAD18- <i>phoU</i> :: AP	This study
IB2382	Δ <i>phoU</i> Δ <i>phoB</i> ::CM/ pBAD18- <i>phoB</i> :: AP	This study
IB2198	Δ <i>fliGHI</i> :: TC	This study
<i>pstS</i>-gfp 발현		
IB2163	WT / <i>pstS</i> -gfp (<i>ova</i>) :: AP	This study
IB2166	Δ <i>phoU</i> / <i>pstS</i> -gfp (<i>ova</i>) :: AP	This study
IB2778	Δ <i>phoB</i> / <i>pstS</i> -gfp (<i>ova</i>) :: AP	This study
IB2779	Δ <i>phoU</i> Δ <i>phoB</i> / <i>pstS</i> -gfp (<i>ova</i>) :: AP	This study

Plasmid	Genotype	Source or reference
pBAD18	Expression vector containing the arabinose operon P _{BAD} promoter, Ap ^R	[25]
pKD3	Plasmid carrying the FRT-Cm ^R -FRT-cassette	[22]
pCP20	Plasmid expressing the FLP recombinase	[24]
<i>pstS</i> -gfp(<i>ova</i>)	Expressing Green Fluorescent Protein (GFP) OVA fusion plasmid containing the <i>pstS</i> promoter, Ap ^R	This study

Table 2. Oligonucleotides used in this study

Primer Name	5'-Bases-3'	Primer temperature
RT-PCR		
<i>rpoD</i> _RT_Fw	GTG AAA TGG GCA CTG TTG AAC TG	56.9°C
<i>rpoD</i> _RT_Rev	TTC CAG CAG ATA GGT AAT GGC TTC	56.7°C
<i>phoB</i> _RT_Fw	CGT TTT CCC CCA AGG AGT TG	56.3°C
<i>phoB</i> _RT_Rev	AGG CTC AGT CCC TGC ATC TC	59°C
<i>pstS</i> _RT_Fw	CGG TAT TCG CGG TGA TTT GTT	56°C
<i>pstS</i> _RT_Rev	TGT ATG CCA AAT GGG CGG A	57.3°C
<i>flhC</i> _RT_Fw	TCG AAA ATG GCA GCA TCC CT	57.2°C
<i>flhC</i> _RT_Rev	ATG CTG GAA AGC GAA ACA CAG	56.2°C
<i>flhD</i> _RT_Fw	CTC CGC CAG TTT GAC CAT CT	57.4°C
<i>flhD</i> _RT_Rev	CCA GGA CAA AGC ATC TGC GA	57.8°C
<i>fliA</i> _RT_Fw	AGC AGA TCG TCC AGT TCC AC	57°C
<i>fliA</i> _RT_Rev	ATA AAC ACT CGC TGT GGC AG	55.5°C
<i>flgM</i> _RT_Fw	TAA CGT TAC GCT GGC GCT CG	60.2°C
<i>flgM</i> _RT_Rev	ACC CGT TAG CAC TGT CCA GA	58.3°C
<i>fliC</i> _RT_Fw	ACA ACA CCC TGA CCA TCC AG	59.6°C
<i>fliC</i> _RT_Rev	TTC AGC GTA TCC AGA CCC AG	56.1°C
<i>fljB</i> _RT_Fw	ATC TGG GTG CGG TAC AAA AC	58.4°C
<i>fljB</i> _RT_Rev	ATC TGG GTG CGG TAC AAA AC	58.6°C
Hin PCR		
hinf 4	AGT GTA ACG CGC TCA CGA TA	56.3°C
HLr 1	AGG TAA ACG TAC CGA CAG CA	56.1°C
hnr 4	TAT CGT GAG CGC GTT ACA CT	56.3°C
hixR-RV	TCA AAC AAC TGC CGG TGT ATC T	56.7°C

IV. 결과

1. 세균 무기인산 대사 핵심 조절 단백질 PhoU 돌연변이는 세균의 성장을 억제한다.

무기인산 대사 조절의 불안정성이 세균의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위해 *S. Typhimurium* 야생형 균주(WT)와 *phoU* 및 *phoB* 돌연변이 균주를 LB에서 하룻밤 배양 후 MOPS최소배지에 $OD_{600nm}=0.01$ 이 되도록 접종하고 30분 간격으로 24시간 동안 교반하면서 OD_{600nm} 를 측정하였다. 결과 값은 배양물의 성장 곡선을 기준으로 OD_{600nm} 가 최대값의 절반에 도달하는 시간을 기록하고 성장 곡선과 함께 그래프로 표시하였다. 실험 결과 대조군인 WT에 비해 *phoU* 돌연변이 균주의 성장이 현저하게 감소하였으며 *phoU* 유전자 발현 플라스미드를 통해 성장속도가 다시 회복되었다. 반면, *phoB* 돌연변이 균주에서는 세균 성장에 유의한 차이가 나타나지 않았다(Figure 3A). 성장 속도를 분석한 결과 WT에 비해 *phoU* 돌연변이의 성장은 약 2배 이상 느려짐을 확인하였다(Figure 3B). 이를 통해 세균의 성장에 있어 무기인산 대사 조절 시스템 중 *phoU*의 중요한 역할을 확인할 수 있었다.

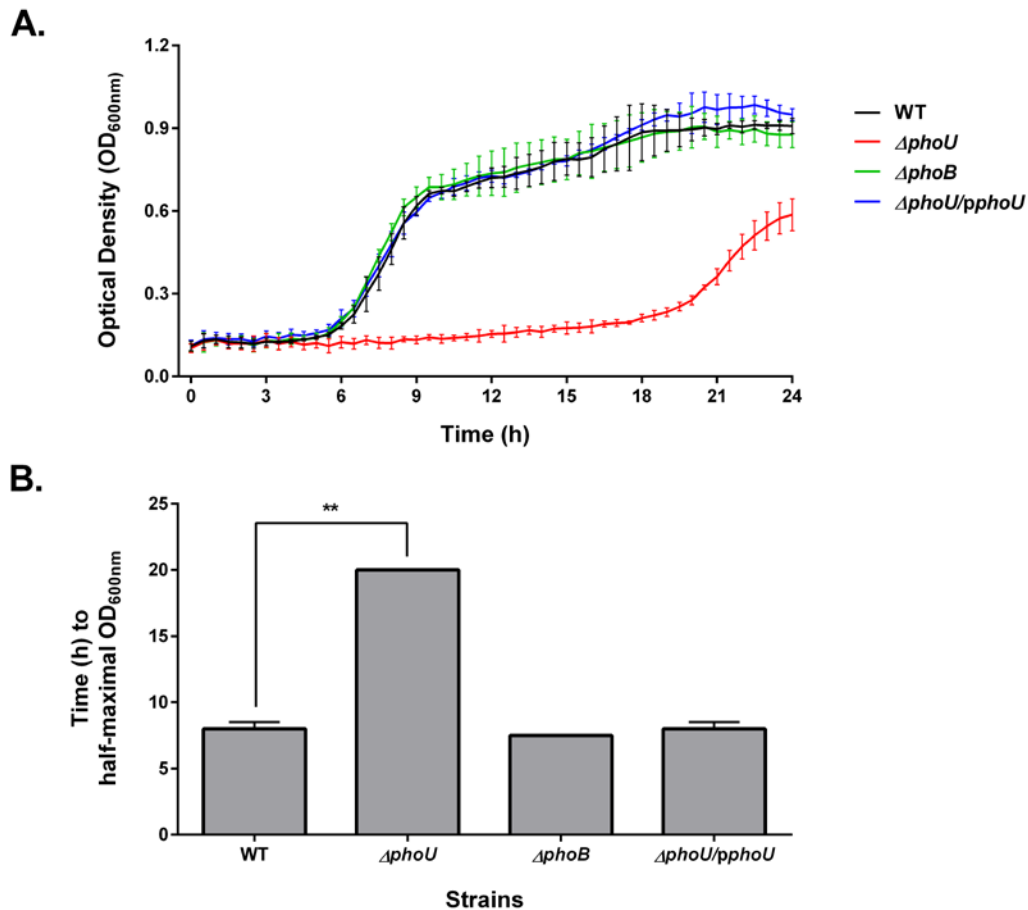


Figure 3. Effect of *phoU* on *S. Typhimurium* growth.

The effect of *phoU* on bacterial growth was examined by measuring the OD_{600nm} of cultures grown in MOPS at 37°C for 24 hours. (A) Growth curve of each culture. (B) Graph showing the time for OD_{600nm} to reach half of its maximum value based on the growth curve. The data were independently replicated three times and presented as mean \pm SD.

2. *phoU* 유전자 결손으로 인해 세균의 운동성이 감소한다.

앞서 확인한 세균의 성장지연과 관련하여 성장과 밀접한 관련이 있는 세균의 운동성을 확인하기 위해 다음과 같이 실험을 수행하였다. LB에서 하룻밤 배양한 각 균주를 원심분리하여 상층액을 제거하고 1X MOPS 완충용액에 풀어 swimming Agar plate에 drop 하였다. 각 균주의 운동성을 명확히 확인하기 위해 37°C에 8시간 동안 반응 후 환의 지름을 측정하였다. 결과 *phoU* 돌연변이 균주에서 운동성이 크게 감소하였다. WT에 비해 운동성이 거의 관찰되지 않았으며 *phoU* 및 *phoB* 유전자 발현 플라스미드를 통해 회복되었다. *phoB* 돌연변이 균주는 세균 성장의 결과와 유사하게 대조군과의 유의한 차이가 없었다. 그러나, *phoU* 및 *phoB* 두 가지 유전자가 돌연변이 된 균주에서는 운동성이 회복되었는데 이는 *phoU*의 결손으로 인해 활성화된 *phoB*가 세균의 운동성을 감소하는데 관여할 수 있음을 추측케 한다(Figure 4A, 4B). 이 결과는 성장 지연과 이동성 감소가 상호 연관되어 있음을 보여준다.

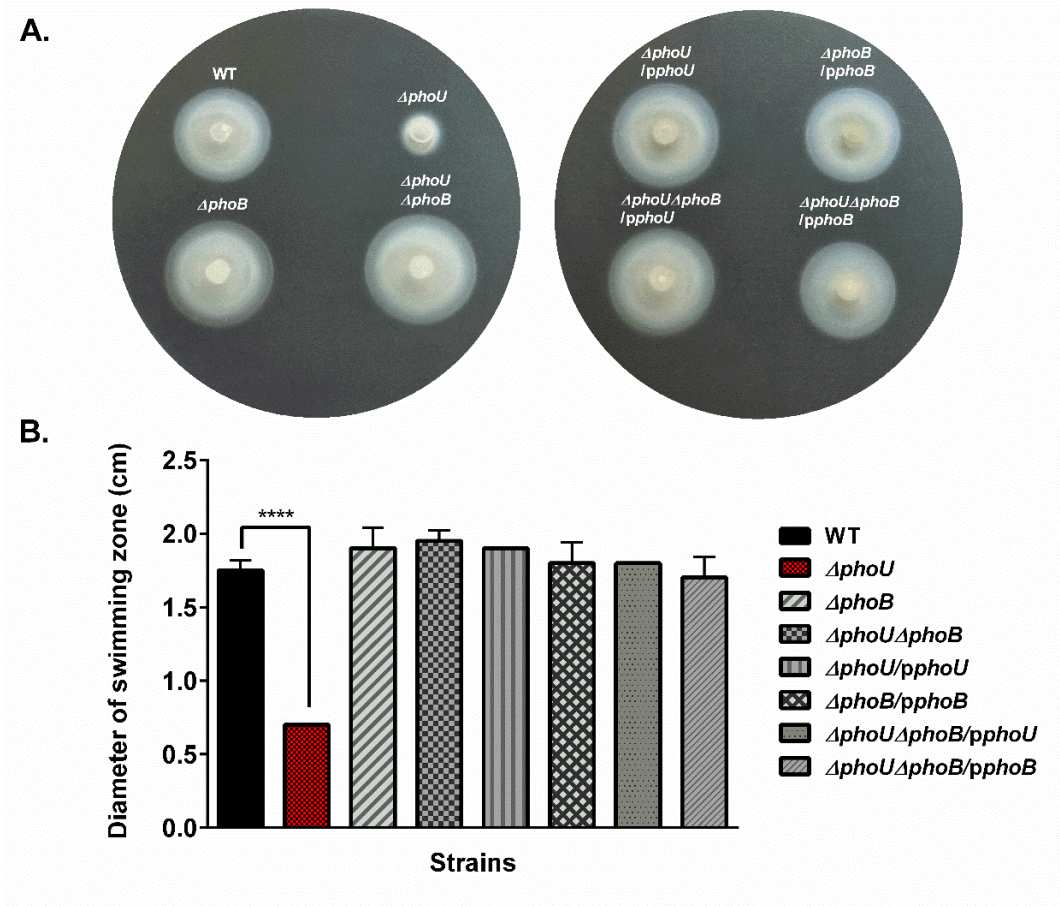


Figure 4. The absence of *phoU* incapacitate the motility of *S. Typhimurium*.

(A) The swimming motility of all strains was evaluated on 0.3% agar MOPS plates and observed after 8 hours of reaction in a 37°C incubator after dropping each strain. (B) The diameter of the swimming zone was measured after 8 hours of reaction in a 37°C incubator. Data were independently replicated three times and are expressed as mean ± SD.

3. *phoU* 결손 돌연변이로 인해 활성화된 세균 전사 조절자 **PhoB**는 무기인산 수송 유전자의 발현을 촉진한다.

세포 외부 무기인의 농도가 높을 때 세포막의 PstCAB 복합체가 무기인과 결합하여 결합 신호를 생성한다. 이 신호는 PhoU를 통해 PhoR에 전달되어 PhoR phosphatase를 활성화하고, 이는 반응 조절자인 PhoB의 탈인산화를 유도하여 *pho* regulon내의 전사를 억제한다. PhoU는 음성 조절자의 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있는데, 이러한 기능을 상실하는 경우 PhoB/PhoR two-component system과 *pho* regulon내의 유전자 발현이 어떻게 변하는지 알아보기 위한 실험을 수행하였다. *phoU* 결손으로 인한 *phoB* 및 *pstS* 유전자의 발현 변화를 확인하기 위해 MOPS 최소배지에서 OD_{600nm}=0.7까지 배양한 후 qRT-PCR분석을 수행하였다. 실험 결과 *phoU* 돌연변이 균주에서 *phoB* 유전자의 전사량은 WT 대비 약 12배 증가하였으며, *pstS*는 약 200배 정도의 증가된 발현을 보였다(Figure 5A). 또한 *pstS*의 발현을 다른 표현형으로 확인하기 위해 *pstS*에 *gfp*를 융합하여 형광 발현을 측정한 결과 *pstS*가 대조균인 WT에 비해 과발현됨을 추가적으로 확인하였다(Figure 5B).

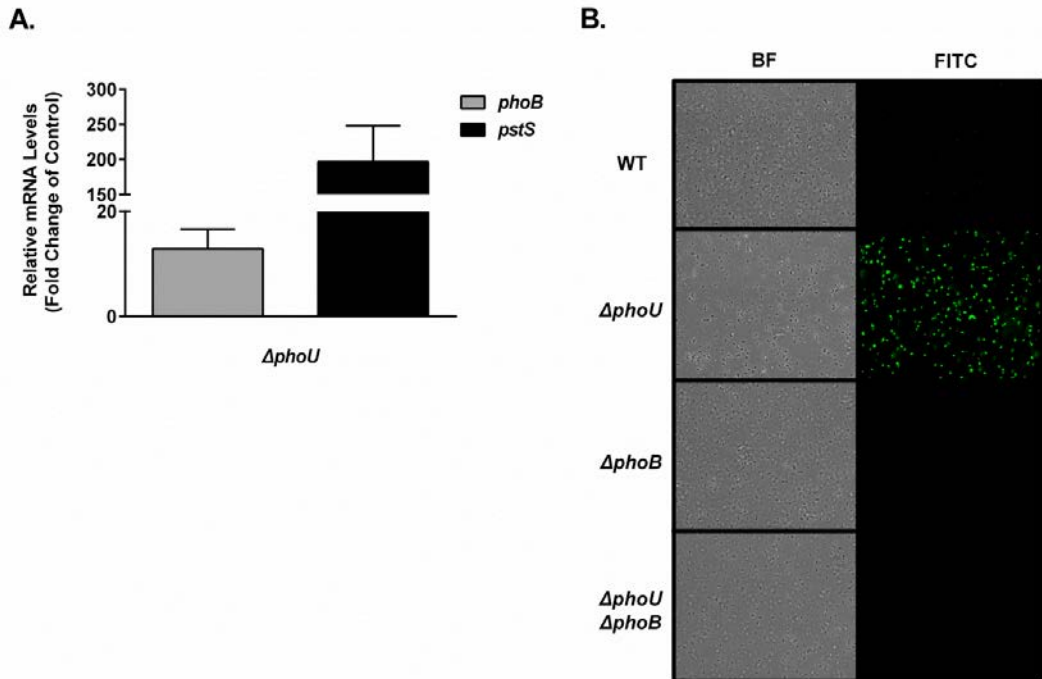


Figure 5. Expression of *phoB* and *pstS* by *phoU* and *phoB*.

Following overnight incubation in LB medium at 37°C, the strains were subsequently recultured in MOPS medium until reaching the log phase ($OD_{600nm}=0.7$). (A) The relative mRNA levels of the *phoB* and *pstS* genes. Expression levels were normalized to the housekeeping gene *rpoD* and presented as fold changes relative to that of WT control strain. The experimental data were independently replicated three times and are depicted as mean \pm standard deviation (SD). (B) Bacterial *pstS*-gfp expression was observed in BF (Brightfield) and FITC (fluorescein isothiocyanate) using a fluorescence microscope.

4. 무기인산 수송 유전자 *pstSCAB* 오페론의 증가된 발현은 세포 내에 과도한 인산 축적을 유발한다.

이전 결과에서 확인한 *pstS*의 과발현은 세포 내로 과도한 phosphate를 수송하여 인산독성을 유발할 수도 있다는 가정 하에 다음 실험을 수행하였다. 세균 추출 후 상층액의 무기인 농도를 측정된 결과 *phoU* 돌연변이 균주에서는 세포 내 무기인의 축적이 예상대로 증가되었다. Malachite Green과 30분 반응한 *phoU* 돌연변이 균주에서는 WT 균주와 비교했을 때 인산 농도가 약 2배 이상 증가하였고(Figure 6A), 24시간 반응 후에는 약 10배 이상 증가하였다(Figure 6B). 이는 *phoU* 돌연변이로 인해 *pstS* 유전자가 과발현되어 무기인산 수송이 과도하게 활성화되었음을 나타낸다. 또한, Pho regulon의 전사를 조절하는 *phoB* 돌연변이 균주에서는 세포 내의 무기인산 농도가 감소한 것으로 확인되었는데 이는 Pho regulon 조절 기작의 변화와 관련이 있음을 보여준다.

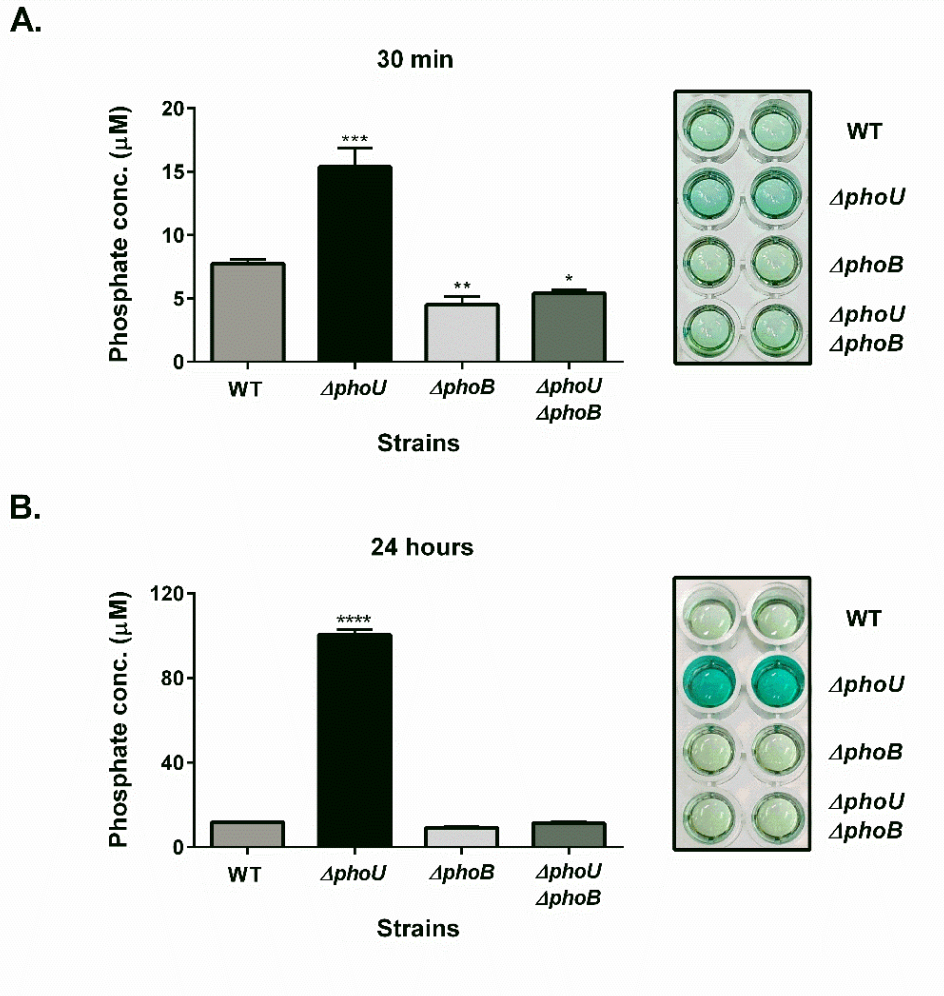


Figure 6. Measurement of the inorganic phosphate in *Salmonella* strain.

Each strain was cultured overnight in LB medium at 37°C, then reinoculated in MOPS to log phase ($OD_{600nm}=0.7$). After washing, cells were treated with 0.5 M perchloric acid to lyse the cells. The intracellular inorganic phosphate concentration was then measured using the malachite green phosphate assay. Data for reaction time (A) 30 minutes and (B) 24 hours. Data were repeated three independently and are expressed as mean \pm SD.

5. *phoU* 및 *phoB*는 *hin* invertible DNA segment의 전도를 조절하여 Flagellar Phase Variation을 유발한다.

이전에 확인한 *phoU* 돌연변이 균주의 운동성 변화(Figure 3)를 바탕으로, 세균의 움직임에 영향을 주는 Flagellar와의 관련성을 알아보기 위해 Flagellar Phase Variation을 유발하는 *hin* invertible DNA segment의 상태를 분석하는 실험을 진행하였다. Phase variation은 세균의 유전자 발현에서 발생하는 변화를 의미하며, FliC 및 FljB flagellin 합성과 관련된 유전자의 발현을 통해 세균의 운동성을 조절하는 데 중요한 역할을 한다. *hin* invertible DNA segment는 *hixL*과 *hixR*이라는 두 개의 전도 가능한 염기 서열로 구성되어 있으며, 이들은 Hin recombinase 효소의 표적 서열 인식에 의해 전도될 수 있다. 일반적으로 *hin* invertible DNA segment의 on state에서는 *fljB*의 발현이 증가되고, *fliC*의 발현이 감소하는 경향이 있다. 반대로, off state에서는 *fljB*의 발현이 감소하고 *fliC*의 발현이 증가하는 경향을 보인다(Figure 2). 본 실험을 위해 MOPS 최소 배지에서 성장한 균을 회수한 후, 추출한 DNA는 정량 후 *hixL* 및 *hixR* 특정 부분의 프라이머를 활용하여 PCR을 수행하고, *hin* invertible DNA segment의 전도 상태를 확인하였다. 분석 결과 모든 균주는 on state에서 유의한 차이를 보이지 않았으나, *phoU* 및 *phoB* 돌연변이 균주에서는 off state의 PCR 산물이 WT 대비 유의하게 증가함을 확인하였다(Figure 7). 이는 세포의 Flagellar 구성 요소인 *fliC*의 예상 발현량이 증가하고, *fljB*의 발현량이 감소한다는 가능성을 보여준다.

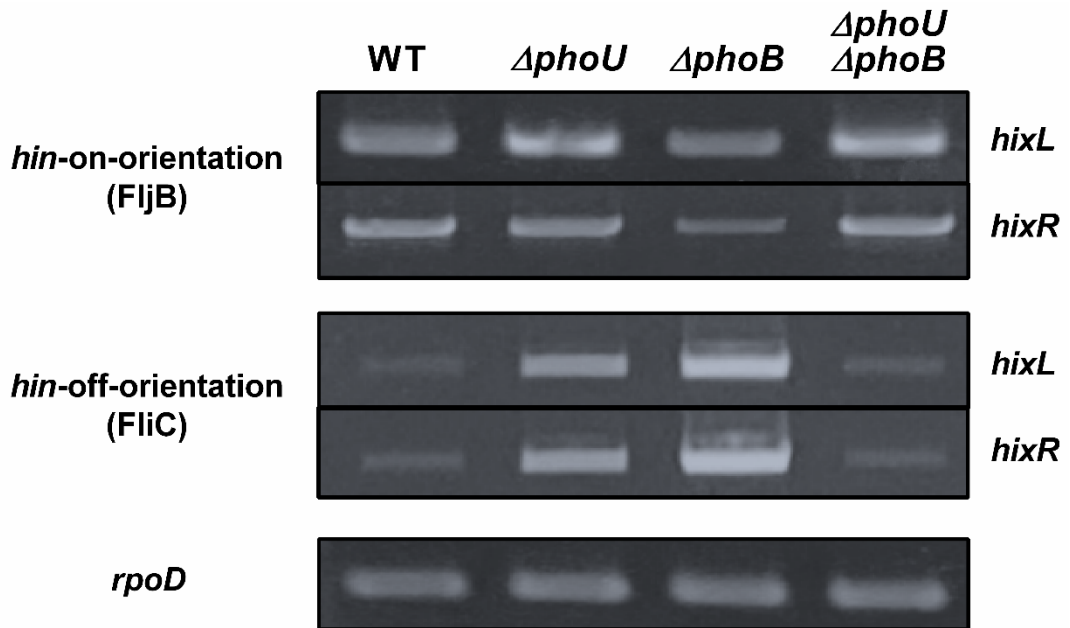


Figure 7. Analysis of the inversion state of *hin* invertible DNA segments in *phoU* and *phoB* mutant strains.

Genomic DNA extracted from the bacterial strains was utilized to conduct PCR on two *hix* sites (*hixL* and *hixR*), representing the on (top) or off (bottom) orientations, to confirm their directionalities. *rpoD* was used as a control housekeeping gene.

6. *phoU* 및 *phoB* 돌연변이 균주에서 Flagellin 단백질 FliC의 발현이 감소한다.

Hin PCR 분석 결과를 바탕으로 *hin* invertible DNA segment의 변화가 단백질 수준에서의 FliC 발현에 미치는 영향을 확인하였다. 이전 DNA 추출과 동일한 배양 조건에서 균을 회수한 후 단백질을 추출하였다. *phoU* 및 *phoB* 돌연변이 균주에서 FliC의 발현량은 현저히 감소하였다(Figure 8). 이전 Hin PCR 결과로는 DNA 수준에서 off state에서의 증가로 인해 *fliC* 유전자의 발현이 증가할 것으로 예상되었으나, 단백질 수준에서는 상반된 결과를 보였다. 이러한 결과는 FliC 단백질 수준의 변화가 *hin* invertible DNA segment의 상태 변화와는 별개의 조절 메커니즘에 영향을 받을 수 있음을 보여준다.

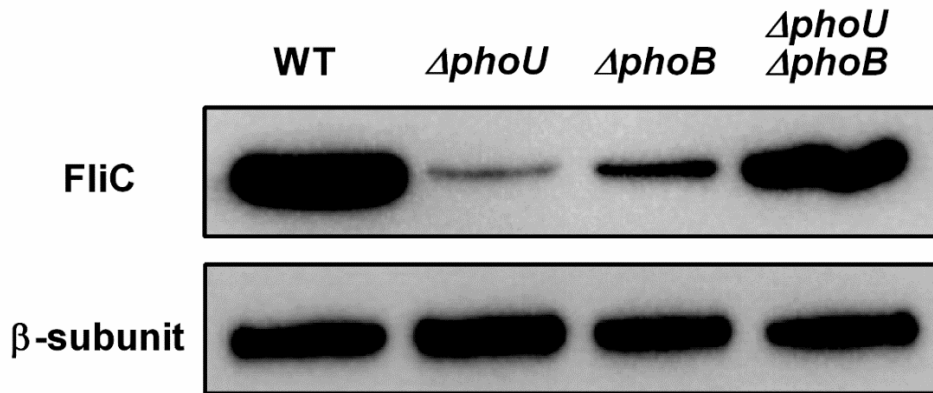


Figure 8. The decrease in FliC protein expression in *phoU* and *phoB* mutant strains.

Strains were cultured in MOPS at 37°C until reaching $OD_{600nm}=0.7$, then proteins were extracted and western blotting was performed. Expression of proteins was detected using anti-FliC antibody. Anti-RNA polymerase beta (β -subunit) antibody was used as a loading control.

7. 무기인산 대사 조절 관련 유전자는 **Flagellar assembly Class II, III** 편모 생합성 유전자들의 발현을 조절한다.

Flagellar assembly 관련 Class I, II, III의 유전자는 세균의 flagellum의 구조와 기능 형성 및 유지를 위해 여러 단계에서 협력한다. *fliC*와 *fliB*는 Class III 유전자들로서 flagellar filament의 주요 구성 단백질인 flagellin을 인코딩하는 유전자이며, 이는 편모 생합성 완성에 결정적인 역할을 한다. 본 실험은 무기인산 대사 조절과 관련된 유전자 돌연변이로 인한 Flagellar assembly 관련 유전자의 전사 수준 변화를 조사하였다. WT과 각 균주는 MOPS 최소배지에서 성장 후 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하였으며, Flagellar assembly 관련 각 Class의 대표 유전자의 primer를 이용하여 qRT-PCR을 수행한 결과 Flagellar assembly 관련 *fliA*를 포함하는 Class II 유전자들의 전사량이 현저하게 감소한 것으로 나타났다. 특히, Class III 그룹에 속하는 유전자인 *fliC*의 전사량은 *phoU* 돌연변이 균주에서 약 600배, *phoB* 돌연변이 균주는 약 50배 감소하였다(Figure 9). 또한 *phoU* 및 *phoB* 두 가지 유전자가 결손된 돌연변이 균주에서는 약 5배 감소하였다. 이는 western blot으로 확인한 FliC의 단백질 발현 패턴과 일치한다. 이 결과에서 주목할 만한 점은 *phoB* 돌연변이 균주에서 *fliB*의 전사량이 WT에 비해 높은 수준으로 발현된다는 것이다. 이는 *fliC*의 감소를 대체하여 세균의 운동성에 도움을 줄 수 있는 가능성을 나타낸다.

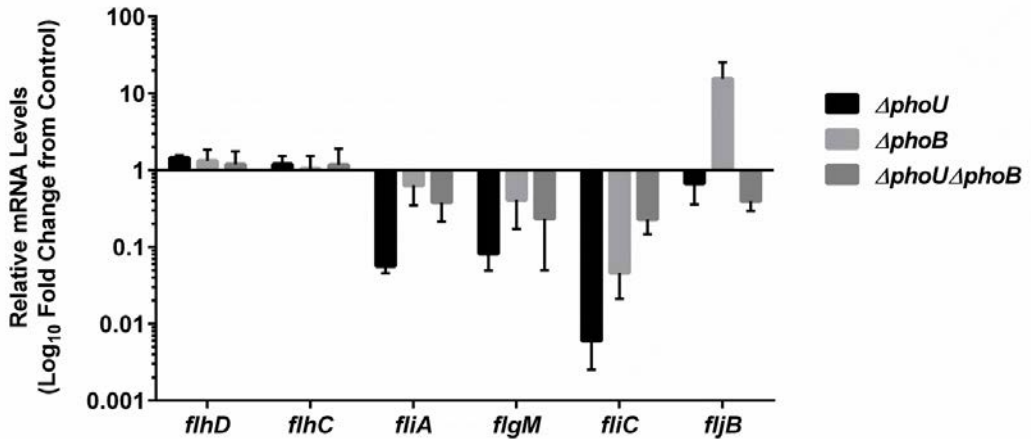


Figure 9. Transcription levels of flagellar assembly-related Class I, II, and III group genes.

The bacterial strains grown in LB Broth at 37°C and were recultured in MOPS until reaching the log phase ($OD_{600nm}=0.7$). (A) Quantitative real-time PCR was utilized to evaluate the mRNA expression levels of genes involved in flagellar biogenesis, encompassing Class I, II, and III genes. Normalization of target gene expression levels was performed using the *rpoD* housekeeping gene and results were expressed as fold relative to the control strain WT. The experimental data were independently replicated three times and are represented as mean \pm SD.

8. *Salmonella*의 *phoU* 돌연변이는 HeLa cell에 대한 침입 능력이 저하된다.

*S. Typhimurium*의 무기인산 대사를 조절하는 유전자의 돌연변이로 인한 세균의 운동성 감소가 HeLa cell에 대한 침입에 미치는 영향을 확인하기 위해, 다음과 같은 실험을 수행하였다. Motility test는 invasion assay전 세균의 이동성을 확인하기 위해 negative control과 함께 진행하였다. 또한, 세포 침입 능력을 확인하기 위해 LB 배지에서 3시간 동안 키운 WT과 각 균을 배양한 후, HeLa cell에 감염시켜 1시간 동안 반응시켰다. 이후 Gentamycin protection assay를 통해 세포 외에 남아있는 Bacteria를 제거하였다. Flagellum의 움직임과 회전을 조절하는데 중요한 기능을 하는 *fliGHI* 유전자 돌연변이 균주는 negative control로 사용되었다. 이전 결과와 동일하게 *phoU* 돌연변이 균주는 운동성이 없었으며, 이는 negative control과 유사한 수준을 보였다(Figure 10A, 10B). 운동성이 감소한 *phoU*, *fliGHI* 돌연변이 균주는 HeLa cell에 대한 침입 능력 또한 WT과 비교하여 거의 없는 수준이었다(Figure 10C). 이는 세균의 운동성과 세포의 침입 능력이 서로 연관되어 있음을 시사하는 결과이다.

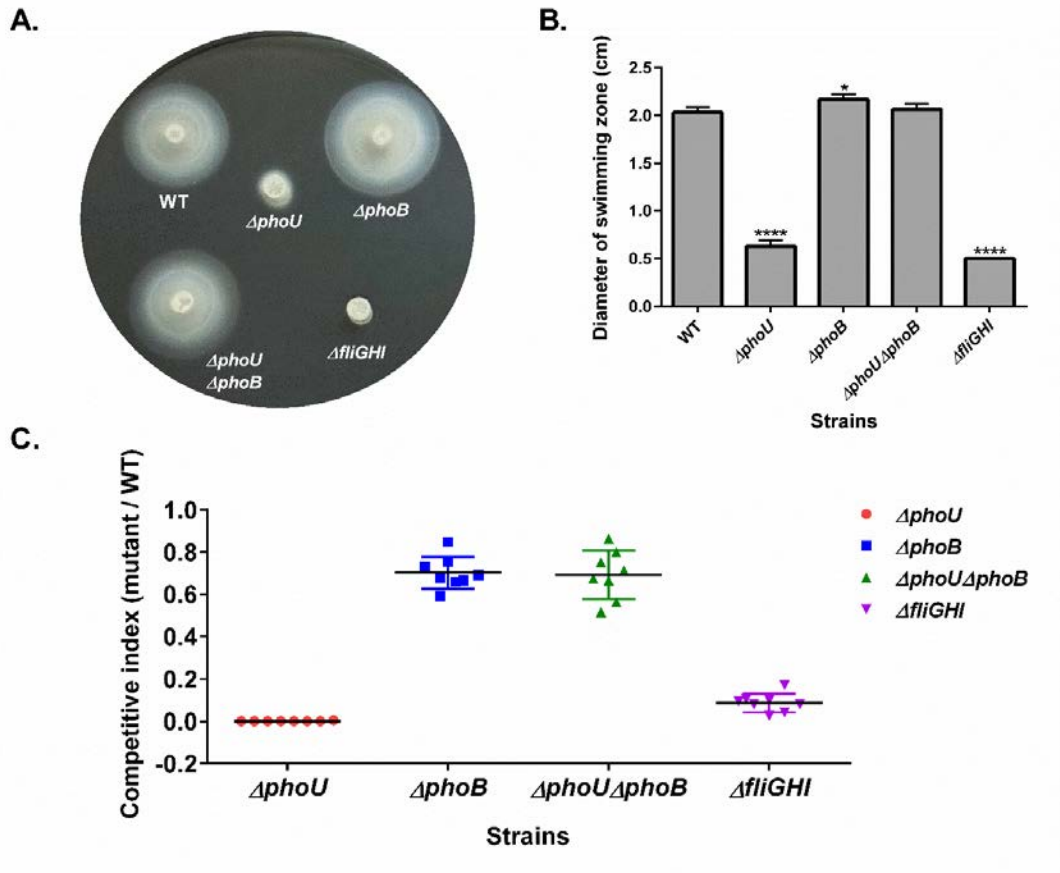


Figure 10. The *phoU* mutation of *Salmonella* has a reduced ability to invade HeLa cells.

(A) Swimming motility of each strain was investigated on the 0.3% agar MOPS plate, and (B) the diameters of the swimming zones were monitored after 8 h. Data were repeated three independently and are expressed as mean \pm SD. (C) Competitive invasion rate comparison between WT and each mutant strain. HeLa cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 10 using an equal mixture of non-antibiotic resistant WT strain and either chloramphenicol-resistant *phoU*, *phoB*, or tetracycline-resistant *fliGHI* strains. CFUs were determined 1 hour after infection. (n = 8).

V. 고찰

무기인산은 세포 내에서 중요한 역할을 하는 화합물로 세균의 생존, 성장, 유전자 발현에 필수적이다[26]. 무기인산은 세포 내에서 에너지를 생성하고 세포 구조를 유지하며 세균의 운동성을 유지하는 데 관여할 수 있다. 세균의 운동성은 환경 내에서의 위치 이동과 세포가 외부 조건에 빠르게 대응하는 데 중요하다. 한편, 세균은 무기인산 농도 항상성을 유지해야 하며 무기인산 농도를 조절하기 위해 *Pst* system과 같은 복잡한 대사 조절 시스템이 존재한다. 본 연구는 무기인산 대사 조절과 세균의 운동성 간의 관련성을 밝히고자 하였다.

세균의 무기인산 대사 조절과 관련된 핵심 조절 단백질인 *PhoU*의 돌연변이가 세균 성장에 미치는 영향을 조사한 결과, *phoU* 돌연변이 균주는 세균의 성장을 현저하게 억제하였다. 반면에 *PhoB* 돌연변이 균주에서는 세균 성장에 유의한 차이가 나타나지 않았는데, 이러한 결과는 무기인산 대사 조절 시스템에서 *PhoU*가 세균의 성장에 중요한 역할을 한다는 것을 제시한다(Figure 3). 이러한 세균의 성장 지연과 관련하여 *phoU* 유전자 결손이 세균의 운동성에 미치는 영향을 조사하였는데, *phoU* 돌연변이 균주는 WT에 비해 운동성을 보이지 않았고 *phoB* 돌연변이 균주에서는 WT과 비슷한 운동성을 보였다. 흥미로운 점은 *phoU*와 *phoB* 두 가지 유전자가 동시에 결손된 돌연변이 균주에서는 운동성이 회복된다는 점이다(Figure 4). 이러한 결과는 *phoU*의 결손으로 인해 활성화된 *phoB*를 통해 세균의 운동성을 감소시킬 수 있음을 시사한다. 이를 알아보기 위해 *phoU* 결손 돌연변이로 인한 *phoB*와 무기인산 수송 유전자 *pstS*의 발현 변화를 확인한 결과, 전사 수준에서 이 유전자들의 발현이 증가한 것을 확인했다(Figure 5). 이는

무기인산 농도가 높을 때, PhoU의 기능을 상실함으로써 PhoB가 무기인산 수송 유전자의 증가된 발현을 조절한다는 것을 보여준다. *pstS*의 과발현은 세포 내 과도한 phosphate를 수송하여 인산독성을 유발할 수 있다는 가정하에 세포 내 무기인산의 농도를 측정하였는데, *phoU* 돌연변이 균주에서는 세포 내 무기인의 축적이 예상대로 증가하였고(Figure 6), 이는 *phoU* 돌연변이로 인해 *pstS* 유전자가 과발현되어 무기인산 수송이 과도하게 활성화되었음을 나타낸다. 또한, Flagellar Phase Variation을 조절하는 *hin* invertible DNA segment의 상태를 분석한 결과 *phoU* 및 *phoB* 돌연변이 균주는 off state에서 유의한 증가가 확인되었다(Figure 7). 이 결과를 통해 두 유전자의 돌연변이가 Flagellar Phase Variation을 조절하는 *hin* invertible DNA segment의 상태 변화를 통해 세균의 운동성을 조절한다는 가설을 제시할 수 있다. 이 후 *hin* invertible DNA segment의 변화가 FliC 단백질 수준에 미치는 영향을 확인했는데, Hin PCR 분석에서는 DNA 수준에서의 변화로 인해 *fliC* 유전자의 발현이 증가할 것으로 예상되었으나, 단백질 수준에서는 상반된 결과를 보였다(Figure 8). 이는 FliC 단백질 발현 수준의 변화가 *hin* invertible DNA segment의 상태 변화와는 별개의 조절 메커니즘에 의해 조절될 수 있다는 가능성을 시사한다. 이 변화가 전사 수준에서 조절될 수도 있다는 가정을 기반으로 무기인산 대사 조절과 관련된 유전자 돌연변이가 Flagellar 생합성 관련 유전자의 전사 수준 변화에 미치는 영향을 확인하기 위해 qRT-PCR로 분석한 결과, Class II 이하 유전자들의 전사량이 현저하게 감소하였다(Figure 9). 특히, Class III 그룹에 속하는 유전자인 *fliC*의 전사량은 *phoU* 및 *phoB* 돌연변이 균주에서 크게 감소하였는데, 이러한 결과는 이전 실험에서 확인된 FliC 단백질 발현 패턴과 부합하였다. 또한, *phoB* 돌연변이 균주에서는 *fliB*의 전사량이 WT에 비해 높은 수준으로 발현되었다. 이는 *fliC*의 감소를 대체하여 *fliB*의 증가된 발현이 세균의 운동성에 영향을 줄 수

있는 가능성을 제시하며 *phoB* 돌연변이 균주의 정상적인 운동성을 뒷받침하는 것으로 판단된다. 이러한 세균의 운동성과 세포 침입 능력 간에 연관성을 조사하기 위해 invasion assay를 수행한 결과, *phoU* 돌연변이 균주는 HeLa cell에 대한 침입 능력이 거의 없는 것으로 확인되었다(Figure 10). 이 결과는 *Salmonella*의 무기인산 대사를 조절하는 *phoU* 돌연변이가 세포 침입 능력에 직접적인 영향을 미치며, *phoU* 돌연변이에 의한 세균 운동성 감소가 세포 침입에 관련된 중요한 요소로 작용할 수 있음을 보여준다.

본 연구에서는 세균의 무기인산 대사조절이 세균의 성장, 운동성, 그리고 세포 침입에 미치는 영향을 확인하였다. 이러한 변화는 세포 내 과도한 무기인산 수송으로 인한 인산독성 스트레스 외에도 Flagellar Phase Variation을 조절하는 DNA segment 전도 및 Flagellar assembly 관련 유전자의 전사 조절과도 밀접한 관련이 있다는 것을 발견하였다. *phoU* 및 *phoB* 돌연변이 균주에서 *fliC*의 유전자 수준과 단백질 수준은 상반된 결과를 보였는데, 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다. 현재까지의 연구에서 PhoB는 주로 *phoB* regulon 유전자들의 전사를 조절하는 역할로 알려져 있지만, *pst* 오픈론 외에도 PhoB가 조절하는 새로운 유전자들이 있을 것으로 추측된다(Figure 11). 이러한 유전자들을 식별하여 Flagellar assembly와 세균의 운동성에 미치는 영향을 자세히 파악하는 연구가 필요하다. 더불어, 이 유전자들이 *Salmonella*의 병원성 및 숙주와의 상호작용에 미치는 영향을 조사하고, 이들의 분자 수준에서의 상호작용 메커니즘을 규명하여 세균의 운동성과 무기인산 대사 조절 사이의 관련성을 보다 심층적으로 이해하는 연구가 필요할 것으로 판단된다.

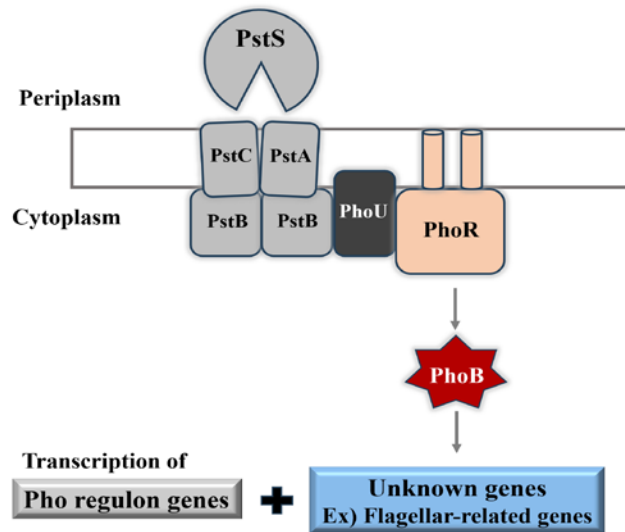


Figure 11. Genes regulated by the transcriptional regulatory protein PhoB of the phosphate regulon.

The response regulator PhoB controls gene transcription within the pho regulon and also influences transcriptional regulation of genes involved in flagellar biogenesis.

VI. 참고문헌

1. Chalker, R.B. and M.J. Blaser, *A review of human salmonellosis: III. Magnitude of Salmonella infection in the United States*. Rev Infect Dis, 1988. **10**(1): p. 111-24.
2. Grassl, G.A. and B.B. Finlay, *Pathogenesis of enteric Salmonella infections*. Curr Opin Gastroenterol, 2008. **24**(1): p. 22-6.
3. Lowry, O.H. and J.A. Lopez, *The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters*. J Biol Chem, 1946. **162**: p. 421-8.
4. van Veen, H.W., *Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms*. Antonie Van Leeuwenhoek, 1997. **72**(4): p. 299-315.
5. Motomura, K., et al., *Overproduction of YjbB reduces the level of polyphosphate in Escherichia coli: a hypothetical role of YjbB in phosphate export and polyphosphate accumulation*. FEMS Microbiol Lett, 2011. **320**(1): p. 25-32.
6. Beard, S.J., et al., *Evidence for the transport of zinc(II) ions via the pit inorganic phosphate transport system in Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett, 2000. **184**(2): p. 231-5.
7. Aguen, M., E. Yagil, and B. Spira, *Transcriptional analysis of the pst operon of Escherichia coli*. Mol Genet Genomics, 2002. **268**(4): p. 518-24.
8. 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.
9. Cox, G.B., D. Webb, and H. Rosenberg, *Specific amino acid residues in both the PstB and PstC proteins are required for phosphate transport by the Escherichia coli Pst system*. J Bacteriol, 1989. **171**(3): p. 1531-4.
10. Oganessian, V., et al., *Crystal structure of the "PhoU-like" phosphate uptake regulator from Aquifex aeolicus*. J Bacteriol, 2005. **187**(12): p. 4238-44.
11. 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.
12. Haraga, A., M.B. Ohlson, and S.I. Miller, *Salmonellae interplay with host cells*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(1): p. 53-66.

13. Chilcott, G.S. and K.T. Hughes, *Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in Salmonella enterica serovar typhimurium and Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(4): p. 694-708.
14. Kalir, S., et al., *Ordering genes in a flagella pathway by analysis of expression kinetics from living bacteria*. Science, 2001. **292**(5524): p. 2080-3.
15. Bonifield, H.R. and K.T. Hughes, *Flagellar phase variation in Salmonella enterica is mediated by a posttranscriptional control mechanism*. J Bacteriol, 2003. **185**(12): p. 3567-74.
16. Yanagihara, S., et al., *Structure and transcriptional control of the flagellar master operon of Salmonella typhimurium*. Genes Genet Syst, 1999. **74**(3): p. 105-11.
17. Ohnishi, K., et al., *Gene fliA encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in Salmonella typhimurium*. Mol Gen Genet, 1990. **221**(2): p. 139-47.
18. Gillen, K.L. and K.T. Hughes, *Transcription from two promoters and autoregulation contribute to the control of expression of the Salmonella typhimurium flagellar regulatory gene flgM*. J Bacteriol, 1993. **175**(21): p. 7006-15.
19. Horvath, P., et al., *Structure of Salmonella Flagellar Hook Reveals Intermolecular Domain Interactions for the Universal Joint Function*. Biomolecules, 2019. **9**(9).
20. Simon, M., et al., *Phase variation: evolution of a controlling element*. Science, 1980. **209**(4463): p. 1370-4.
21. Ikeda, J.S., et al., *Flagellar phase variation of Salmonella enterica serovar Typhimurium contributes to virulence in the murine typhoid infection model but does not influence Salmonella-induced enteropathogenesis*. Infect Immun, 2001. **69**(5): p. 3021-30.
22. 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 USA, 2000. **97**(12): p. 6640-5.
23. Poteete, A.R. and A.C. Fenton, *Lambda red-dependent growth and recombination of phage P22*. Virology, 1984. **134**(1): p. 161-7.
24. 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.

25. 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.
26. Goretti Penido, M. and U.S. Alon, *Phosphate homeostasis and its role in bone health*. Pediatr Nephrol, 2012. **27**(11): p. 2039-2048.