

2007년 2월
박사학위논문

철에 의한 패혈증 비브리오팀균
용혈소/세포용해소 생산의 조절

조선대학교대학원
의 학 과
이 준 영

철에 의한 패혈증 비브리오균
용혈소/세포용해소 생산의 조절

Regulation of *Vibrio vulnificus* Hemolysin/Cytolysin
Production by Iron

2007년 2월 일

조선대학교 대학원
의 학 과
이 준 영

철에 의한 패혈증 비브리오팀균
용혈소/세포용해소 생산의 조절

지도교수 유 재 원

이 논문을 의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2006년 10월 일

조선대학교대학원

의 학 과

이 준 영

이준영의 박사학위 논문을 인준함

위원장:	조선대학교	교수	하 상 호	印
위 원:	영남대학교	교수	안 면 환	印
위 원:	조선대학교	교수	이 상 홍	印
위 원:	조선대학교	교수	신 성 희	印
위 원:	조선대학교	교수	유 재 원	印

2006년 12월 일

조선대학교 대학원

2007년 2월 박사학위논문
철에 의한 패혈증 비브리오패균
용혈소 / 세포용해소
생산의 조절
이준영

목 차

표 목 차	ii
도 목 차	iv
영문 초록	1
1. 서론	3
2. 재료 및 방법	7
3. 연구 결과	20
4. 고찰	46
5. 결론	56
6. 참고 문헌	57
한글 초록	65
감사의 글	67
저작물 이용 허락서	68

표목차

Table 1. Bacterial strains used in this study.-----15

Table 2. Plasmids used in this study.-----16

Table 3. Primers used in this study.-----17

도목차

Figure 1. Relative genetic organization in <i>Vibrio vulnificus</i> CMM2101, CMM2103 and CMM2305 strains.-----	18
Figure 2. Schematic illustration for the construction of <i>Vibrio vulnificus</i> <i>pilD</i> -deletional mutant RC104 strain.-----	19
Figure 3. Schematic illustration for the construction of <i>Vibrio vulnificus</i> <i>pilD</i> -complemented RC108 strain.-----	20
Figure 4. A putative Fur-binding site in the regulatory region of the <i>vvhA</i> gene.-----	22
Figure 5. Iron represses transcription of the <i>vvhA</i> gene but stimulates extracellular production of VvhA.-----	25
Figure 6. Iron decreases the amount of intracellular VvhA but increases the amount of extracellular VvhA.-----	27
Figure 7. Iron triggers extracellular production of VvhA.-----	30
Figure 8. Effect of the mutation of the <i>fur</i> gene on transcription of the <i>vvhA</i> gene.-----	33
Figure 9. Effect of mutation of the <i>pilD</i> gene on extracellular secretion of VvhA.-----	37
Figure 10. Effect of iron on transcription of the <i>pilD</i> gene.-----	41
Figure 11. A putative Fur-binding site in the regulatory region of the <i>pilD</i>	

gene.-----43

Figure 12. Effect of mutation of the *fur* gene on transcription of the *pilD* gene.-----44

Figure 13. Theoretical vicious cycle formation of VvhA production by iron.-----55

ABSTRACT

Regulation of *Vibrio vulnificus* Hemolysin/Cytolysin Production by Iron

Jun-Young Lee

(Directed by Jae-Won You, M.D. & Ph.D.)

Departement of Medicine

Chosun University Medical School

Vibrio vulnificus is a gram-negative estuarine bacterium that opportunistically causes fatal septicemia in susceptible patients. Elevation of serum and tissue iron is the most reliable predisposing factor to *V. vulnificus* septicemia. Hemolysin/cytolysin (VvhA) is known to be the most potent exotoxin produced by *V. vulnificus*. However, VvhA is controversially more profoundly produced in iron-sufficient media than in iron-deficient media despite the presence of a putative Fur box in the regulatory region of the *vvhA* gene, which encodes for VvhA. Accordingly, we attempted to determine the differential regulatory effect of iron on transcription of the *vvhA* gene and extracellular secretion of VvhA. Transcription of the *vvhA* gene was repressed in a dose-dependent manner by iron, and de-repressed by mutation of the *fur* gene, which encodes for a transcription repressor (Fur) regulating expression of a variety of genes in response to intracellular iron level. In contrast, extracellular secretion of VvhA in a dose-dependent manner by iron and by mutation of the *fur* gene. Extracellular secretion of VvhA was decreased by mutation of the *pilD*

gene, which encodes type IV leader peptidase/N-methyltransferase associated with the type II general secretion system, and the decreased VvhA secretion was recovered by *in trans*-complementation of the wild type *pilD* gene. Transcription of the *pilD* gene was increased in a dose-dependent manner by iron and mutation of the *fur* gene. These results indicate that iron represses transcription of the *vvhA* gene via the transcription repressor Fur, but rather triggers extracellular secretion of VvhA via the facilitation of the expression of the type II general secretion system, and that elevated serum and tissue iron can eventually deteriorates pathophysiological changes in *V. vulnificus* septicemia patients by facilitating the extracellular secretion of VvhA.

Key words: *Vibrio vulnificus*, Hemolysin/cytolysin, Iron, Fur, Type II general secretion system

서 론

패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*)은 증식하기 위해 높은 염분농도를 필요로 하는 호염성 그람음성 간균이다. 주로 강하구나 연안해역에 서식하며 감수성이 있는 환자에게 피사성 창상감염과 함께 치명율이 50%가 넘는 패혈증을 일으킨다[Park *et al.*, 1991; Tacket *et al.*, 1984; Chuang *et al.*, 1992]. 패혈증 비브리오균에 오염된 해산물을 섭취한 후 발생하는 일차적인 비브리오 패혈증(primary *V. vulnificus* septicemia)은 갑작스런 열과 오한을 시작으로 구토, 설사, 복통, 사지동통 등의 증상을 보이며, 이러한 증상이 발생한 후 24시간 이내에 연조직염(cellulitis), 물집(bullae), 출혈반(ecchymosis) 등의 이차적인 피부증상이 사지에서 나타난다. 일차적인 비브리오 패혈증 환자의 대부분에서 혈액이나 피부병소로부터 균을 분리할 수 있으며 약 60%의 환자에서 쇼크 증상을 경험한다. 패혈증 비브리오균에 오염된 바닷물이나 갯벌 등에 노출된 후 발생하는 창상감염은 피사성 피부병변을 보이며 속발성 패혈증(secondary septicemia)으로 진행하기도 한다. 피사성 근막염을 비롯한 피사성 피부병변은 외과적인 처치를 필요로 하거나 심한 경우 사지를 절단하여야 하는 경우도 있다[Strome & Paranjpye, 2000].

용혈소/세포용해소(hemolysin/cytolysin; VvhA), RTX 독소, 단백분해효소(metalloprotease), 인지질분해효소(phospholipase A2), 철흡수기전들(iron-uptake systems), 캡슐다당체(capsular polysaccharide), 지질다당체(lipopolysaccharide) 등 여러 가지 독력인자들(virulence factors)이 패혈증 비브리오균 감염에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[Gulig *et al.*, 2005; Strome & Paranjpye, 2000; Linkous & Oliver, 1999].

패혈증 비브리오균은 시데로포아 매개성 철흡수기전(siderophore-mediated iron-uptake system)과 헴 수용체를 통한 철흡수기전(heme re-

ceptor-mediated iron-uptake system) 등 여러 가지 고친화성 철흡수기전을 가지고 있으며[Litwin & Calderwood, 1993; Webster & Litwin, 2000; Litwin & Byrne, 1998; Litwin *et al.*, 1995; Tanabe *et al.*, 2005; Aso *et al.*, 2002], 이러한 철흡수기전들은 패혈증 비브리오균의 독력의 발현과 병인에 매우 중요한 역할을 담당하고 있다[Litwin & Calderwood, 1993; Webster & Litwin, 2000; Litwin & Byrne, 1998; Litwin *et al.*, 1995]. 그러나 이러한 다양한 고친화성 철흡수기전들이 존재함에도 불구하고 패혈증 비브리오균은 혈청 또는 조직 내 철농도가 상승된 환자들에게 주로 감염을 일으킨다. 패혈증 비브리오균은 주로 혈색소침착증(hemochromatosis), 간질환, 알코올 중독, 신부전, 기타 면역이 결핍된 환자들에게 감염을 일으키며 이러한 환자들의 대부분은 혈청 또는 조직 내 철농도가 상승되어 있다[Brennt *et al.*, 1991; Bullen *et al.*, 1991; Hor *et al.*, 2000]. 철을 과부하 시킨 실험용 생쥐(iron-overloaded mice)가 패혈증 비브리오균에 가장 민감한 동물모델로 알려져 있다[Wright *et al.*, 1981; Hor *et al.*, 1999]. 패혈증 비브리오균은 혈청 철포화도(iron-saturation)가 30% 내외인 정상 혈청에서는 증식할 수 없으나, 혈청 철포화도를 인위적으로 50% 이상으로 상승시킨 경우 증식할 수 있다[Aso *et al.*, 2002]. 상승된 철농도는 사람혈액 내에서 패혈증 비브리오균의 생존을 연장시킬 수도 있으며[Hor *et al.*, 2000], 철은 패혈증 비브리오균의 독력인자 중 하나인 단백분해효소의 생산을 증가시킨다[Shin *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006].

패혈증 비브리오균이 생산하는 외독소 중 가장 강력한 외독소로 알려진 용혈소/세포용해소는 매우 적은 양으로도 실험용 생쥐를 죽일 수 있으며 적혈구를 용혈 시키고 다른 세포들도 파괴시킬 수 있다[Gray & Kreger, 1985 & 1987; Rhee *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2004]. 동물모델에서, 국소적 또는 전신적으로 정제된 용혈소/세포용해소를 주사하면 살아있는 패혈증 비브리

오균을 주사했을 때와 같은 패혈증의 임상적 또는 병리학적 소견을 보인다 [Gray & Kreger, 1987; Rhee *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1996]. 그럼에도 불구하고, 용혈소/세포용해소의 병인론적 중요성에 대한 심각한 의문이 제기되어 왔다. 왜냐하면 용혈소/세포용해소를 암호화하는 유전자(이하 *vhA*)를 불활성화 시킨 돌연변이 균주를 실험용 생쥐에 주사하였을 때 돌연변이 시키지 않은 야생균주에 비해 실험용 생쥐를 죽일 수 있는 능력이 약화되지 않기 때문이다[Fan *et al.*, 2001; Wright & Morris, 1991]. 그러나 적은 양만 생산되고 쉽게 불활성화 되기는 하지만 용혈소/세포용해소는 실험동물 몸 안에서 그리고 사람 체액 내에서 분명하게 생산 된다[Lee *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2005]. 또한 용혈소/세포용해소는 아주 적은 양으로도 혈관을 이완시킬 수 있으며, 적혈구를 비롯한 다양한 세포들을 파괴할 수 있으며[Lee *et al.*, 2004; Kook *et al.*, 1996], 중앙괴사인자(TNF- α)를 비롯한 항염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)의 분비를 촉진시킬 수 있고[Park *et al.*, 1996 & 1998], 과산화물(superoxide anion)을 형성시켜 혈관내피세포의 세포고사(apoptosis)를 유발할 수 있다[Kwon *et al.*, 2001]. 뿐만아니라, 용혈소/세포용해소를 생산하지 못하는 돌연변이 균주를 실험용 생쥐의 위장관에 투여하였을 때에는 약간의 울혈(congestion) 소견 이외에 별다른 소견을 보이지 않은 반면, 용혈소/세포용해소를 생산하는 야생균주를 투여하였을 때에는 점막 또는 점막하 울혈, 용모의 소실, 상피세포의 괴사 및 탈락 등 심한 괴사성 장염의 소견을 보인다[Fan *et al.*, 2000]. 이러한 연구결과를 종합적으로 판단하였을 때, 용혈소/세포용해소는 실험용 생쥐의 치사율(mouse lethality)을 결정짓는 독립인자는 아닐지라도 패혈증 비브리오팀의 감염증에서 관찰되는 여러 가지 병태생리학적인 변화를 초래하는 독립인자들 중 하나로 생각된다.

용혈소/세포용해소를 암호화하는 유전자 *vhA*의 전사(transcription)는 여

러 가지 환경적 인자들에 의해 조절된다고 알려져 있으며[Bang *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003], 용혈소/세포용해소의 세포외 분비는 제 IV 형 prepilin peptidase(PilD라 불림)에 의해 매개되는 제 II 형 단백질 분비체계(type II general secretion system)를 통해 조절된다고 알려져 있다[Paranjpye *et al.*, 1998]. 그러나 철농도가 패혈증 비브리오균에 대한 숙주의 감수성을 결정하는 가장 신뢰할 만한 인자임에도 불구하고, 또한 용혈소/세포용해소가 패혈증 비브리오균이 생산하는 가장 강력한 외독소임에도 불구하고, 철과 유전자 *vwhA*의 전사 또는 용혈소/세포용해소의 세포외 생산 또는 분비 사이의 연관성에 관한 연구결과는 없다. 대부분의 병원성 세균들에서, 철농도에 따라 조절되는 유전자들의 전사와 그 최종 산물들의 생산은 전사억제자(transcription repressor)인 Fur를 통해 조절된다. 즉, 철에 의해 조절되는 유전자들은 철과 결합할 수 있는 Fur를 통해 철농도에 반비례하게 발현된다[Litwin & Calderwood, 1993]. 패혈증 비브리오균에서 유전자 *vwhA*의 앞쪽 전사조절부위에는 전사억제자인 Fur가 결합할 수 있는 특정 염기서열(이하 Fur-결합부위)이 있으며[Yamamoto *et al.*, 1990], 이러한 사실은 유전자 *vwhA*의 전사와 그 최종산물인 용혈소/세포용해소의 생산 또는 분비가 Fur를 통해 철농도에 반비례하여 조절될 수 있음을 시사한다. 그러나 이러한 예상과는 반대로 세포외 용혈소/세포용해소는 철이 결핍된 조건에서 보다 철이 풍부한 조건에서 더 많이 생산 또는 분비된다. 이러한 모순은 철농도에 따라 조절되는 대부분의 다른 유전자들이나 단백질들과는 다르게 유전자 *vwhA*의 전사와 용혈소/세포용해소의 생산 또는 분비는 철에 의해 서로 다르게 조절될 수 있음을 시사한다. 따라서 본 연구에서는 철농도가 유전자 *vwhA*의 전사와 용혈소/세포용해소의 세포외 생산 또는 분비에 미치는 서로 다른 영향을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 사용된 균주, 플라스미드, 프라이머, 배지, 시약

본 연구에 사용된 균주, 플라스미드, 프라이머는 Table 1, 2, 3에 정리하였다. Ampicillin(20 µg/ml), kanamycin(300 µg/ml), tetracycline(2 µg/ml) 또는 chloramphenicol(2 µg/ml)을 포함한 Luria-Bertani(BD, MD, USA) 액체배지 또는 고체배지를 유전자 재조합 대장균을 선별하기 위해 사용하였다. 유전자 재조합 패혈증 비브리오균을 선별하기 위해서는 전술한 항생제들이 포함된 Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose (TCBS; BD) 고체배지와 10% sucrose를 포함한 Heart Infusion (HI, BD) 고체배지를 사용하였다. 2.0% NaCl와 적절한 양의 항생제를 포함한 HI 고체배지와 액체배지는 패혈증 비브리오균의 계대 배양을 위한 기본 배지로 사용하였다. 철이 결핍된 HI 액체배지를 만들기 위해, 철착화제(iron-chelator)인 8-hydroxyquinoline을 이용하여 HI 액체배지로부터 철을 제거하였다[Leong & Neilands, 1982]. 철을 제거하고 난 후 잔류 철농도는 1.0 µg/dl 이하였으며, 이와 같은 철농도에서는 패혈증 비브리오균이 증식할 수 없었고 0.25 µM 이상의 수용성 무기철인 ferric chloride(이하 FC)를 첨가하였을 때 비로소 증식할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 0.25 µM FC가 포함된 배지를 철결핍배지로 사용하였다. 특별히 언급하지 않은 경우 모든 시약은 Sigma(MO, USA)로부터 구입하였다.

2. 염기서열 분석

이미 보고된 유전자 *vwhA*와 *pilD*의 전사조절부위에서 대장균의 Fur-결합부위, 즉 염기서열 TATAATGATACGCATTAT와 상동성을 보이는 염기서열을 찾고자 유전자 *vwhA*(accession no. NC 004460 와 NC 005140)와 *pilD*(accession no. VV11623)의 염기서열을 분석하였다[Zhang *et al.*, 2005]. 컴

퓨터 프로그램 DNAassist(DNAssist ver. 2.2; <http://www.dnassist.org>)를 사용하여 염기서열을 분석하였고 절반이상의 염기서열이 일치하는 경우를 Fur-결합부위가 있는 것으로 판단하였다.

3. *lacZ*-결손(deletion)돌연변이 균주와 부분접합(merozygotic) $P_{vvhA}::lacZ$ 전사리포터 균주 구축

전사리포터 균주를 구축하기 위해 먼저 자연돌연변이(spontaneous mutation)에 의해 streptomycin에 내성을 보이는 MO6-24/O 균주를 이용하여 패혈증 비브리오균의 β -galactosidase 유전자, 즉 *lacZ* 유전자의 일부를 결손 시킴으로써 결손돌연변이 균주인 CMM2101 균주를 구축하였다. 결손돌연변이 균주를 구축하기 위해서는 자살벡터(suicide vector)인 pKAS32를 사용하였다[Kim *et al.*, 2003]. 이와 같이 구축된 CMM2101 균주를 이용하여, 염색체성 $P_{vvhA}::lacZ$ 전사리포터(chromosomal $P_{vvhA}::lacZ$ transcriptional reporter) 균주인 CMM2105 균주를 구축하였다[Kim *et al.*, 2003]. 이 전사리포터 균주의 구축을 위해서도 자살벡터인 pKAS32를 사용하였다. CMM2105 균주를 구축하는 과정에서, ampicillin과 kanamycin을 포함하고 있는 TCBS 고체배지에서 부분접합 $P_{vvhA}::lacZ$ 전사리포터 균주 즉, CMM2103 균주를 선별하였다. 배양액(culture aliquots)에서 β -galactosidase 활성을 측정하고, 배양상청액(culture supernatants)에서 용혈활성을 확인함과 동시에, 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-PCR)를 이용하여 *vvhA* mRNA를 확인함으로써 $P_{vvhA}::lacZ$ 접합과 동시에 야생형 *vvhA* 유전자의 존재를 확인하였다. 역전사 중합효소 반응을 위해서는 *vvhA* 유전자에 특이적인 프라이머쌍, 즉 Vvh-1 와 Vvh-2를 사용하였다[Lee *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2006]. CMM2101 균주와 CMM2103 균주의 상대적인 유전자 구성은 Figure 1에 간략하게 나타내었다.

4. *fur* 유전자가 결손된 $P_{vvhA}::lacZ$ 전사리포터 균주 구축

먼저 유전자 *fur*가 결손된 돌연변이 균주인 CMM2303 균주는 교차 중합효소 연쇄반응(crossover PCR)을 이용하여 앞에서 언급한 CMM2101 균주에 구축하였다. 유전자 *fur*의 양쪽 말단부분을 중합효소 연쇄반응을 통해 증폭하기 위해 두 쌍의 프라이머들 즉, Fur-1와 Fur-2, Fur-3와 Fur-4를 사용하였다. 이와 같이 얻어진 두 개의 중합효소 연쇄반응 산물들을 두 번째 교차 중합효소 연쇄반응을 위한 주형(template)으로 사용하였다. 두 번째 교차 중합효소 연쇄반응을 위해서는 제한효소 *SacI*의 인식부위(recognition site)가 달린 Fur-1 프라이머와 제한효소 *XbaI*의 인식부위가 달린 Fur-4 프라이머를 사용하였다. 교차 중합효소 연쇄반응 산물은 유전자 클로닝 벡터(vector)인 pCR[®]2.1-TOPO[®](Invitrogen)에 삽입하여 플라스미드 pCMM236을 구축하였다. 플라스미드 pCMM236으로부터 *SacI-XbaI* 분절을 분리하여 자살벡터인 pDM4에 삽입하였고[McGee *et al.*, 1996] 이를 pCMM237로 명명하였다. 플라스미드 pCMM237은 자살벡터 pDM4의 숙주인 대장균 SY327 λpir 와 접합(conjugation)을 위한 숙주인 대장균 SM10 λpir 에 전기충격을 가하여 삽입하였고[Miller & Mekalanos, 1988], 이어 접합을 통해 패혈증 비브리오균인 CMM2101 균주에 삽입하였다. 유전자 재조합에 의해 유전자 *fur*가 결손된 돌연변이 균주 즉, CMM2303 균주를 항생제 chloramphenicol이 포함된 TCBS 고체배지와 10% sucrose가 포함된 HI 한천배지에서 선별하였다. CMM2303 균주에서 *fur* 유전자의 결손은 프라이머 Fur-1 와 Fur-4를 이용한 중합효소 연쇄반응에 의해 확인하였고 Arnow test를 이용하여 시데로포아인 vulnibactin의 생산이 증가함을 관찰함으로써 기능적으로 *fur* 유전자가 돌연변이 되었음을 확인하였다[Arnow, 1937].

유전자 *fur*가 결손된 CMM2303 균주를 이용하여 *fur* 유전자가 결손된

부분접합 $P_{vwhA}::lacZ$ 전사리포터인 CMM2305 균주를 구축하였고 그 방법은 전술한 바와 같다. 배양액에서 β -galactosidase 활성을 측정하고, 배양상청액에서 용혈활성을 확인함과 동시에, 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용하여 *vwhA* mRNA를 확인함으로써 $P_{vwhA}::lacZ$ 접합과 동시에 야생형 *vwhA* 유전자의 존재를 확인하였다. 역전사 중합효소 연쇄반응을 위해서는 *vwhA* 유전자에 특이적인 PCR 프라이머쌍, 즉 Vvh-1 와 Vvh-2를 사용하였다(Table 3)[Lee *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2006]. CMM2305 균주의 상대적인 유전자 구성은 Figure 1에 간략하게 나타내었다.

5. *pilD*-결손돌연변이 균주와 *in trans pilD*-보충균주의 구축

교차 중합효소 연쇄반응을 이용하여 유전자 *pilD*가 결손된 돌연변이 균주 RC104 균주를 구축하였다. 두 쌍의 프라이머들 즉, PiID-1와 PiID-2, PiID-3와 PiID-4를 *pilD* 유전자의 양쪽 말단부위를 증폭하기 위해 사용하였다. 얻어진 두 개의 중합효소 연쇄반응 산물들은 교차 중합효소 연쇄반응을 위한 주형으로 사용하였고 프라이머들로는 제한효소 *Bam*HI의 인식부위가 달린 PiID-1과 제한효소 *Spe*I의 인식부위가 달린 PiID-4를 사용하였다. 결손된 *pilD* 유전자를 가진 *Bam*HI-*Spe*I 분절을 분리하여 자실벡터인 pDM4에 삽입하였고[McGee *et al.*, 1996] 이를 pRC104로 명명하였다. 플라스미드 pRC104는 전기충격을 통해 대장균 SY327 λ *pir*와 대장균 SM10 λ *pir*에 삽입하였고[Miller & Mekalanos, 1988], 이어 접합에 통해 패혈증 비브리오균인 MO6-24/O 균주로 삽입하였다. 유전자 재조합에 의해 형성된 유전자 *pilD*가 결손된 돌연변이 균주인 RC104 균주는 chloramphenicol을 함유한 TCBS 고체배지와 10% sucrose를 함유한 HI 고체배지에서 선별하였다. 결론에 의한 유전자 *pilD*의 돌연변이는 프라이머 PiID-1와 PiID-4를 사용한 중합효소 연쇄반응을 통해 확인하였다(Table 3). 유전자 *pilD*가 결손된 패혈증 비브리오

RC104 균주를 구축하는 과정은 Figure 2에 간략하게 나타내었다.

야생형 *pilD* 유전자 즉, 결손이 없는 완전한 염기서열을 가지고 있는 *pilD* 유전자를 RC104 균주에 보충해 주기 위하여, 870개의 염기로 구성된 온전한 *pilD* 유전자를 포함하고 있는 1,810개의 염기로 구성된 *Bam*HI-*Hind*III 분절을 제한효소 *Bam*HI의 인식부위가 달린 PiID-1 프라이머와 제한효소 *Hind*III 인식부위가 달린 PiID-5 프라이머를 사용하여 증폭하였고 이를 광범위숙주벡터(broad host range vector)인 pLAFR3II에 클로닝하였고 이를 pRC108이라 명명하였다. 플라스미드 pLAFR3II는 플라스미드 pLAFR3의 *Bgl*II 인식부위에 pUTKm1에서 유래한 *bla* 유전자를 포함한 *Bam*HI-*Bgl*II 분절을 클로닝하여 만들어졌다[Herrero *et al.*, 1990; Staskawicz *et al.*, 1987]. 플라스미드 pRC108은 접합 보조 플라스미드인 pRK2013의 도움을 받아 삼중접합(triparental mating)을 통해 RC104 균주로 삽입하였다[Ditta *et al.*, 1980]. 유전자 재조합에 의해 형성된 RC108 균주는 ampicillin과 tetracycline을 함유한 TCBS 고체배지에서 선별하였다. 야생형 *pilD* 유전자의 존재는 프라이머쌍인 PiID-1과 PiID-5를 이용한 중합효소 연쇄반응을 통해 확인하였다(Table 3). 야생형 *pilD* 유전자가 보완된 RC108 균주 구축과정은 Figure 3에 간략하게 나타내었다.

6. 균 배양 조건, 그리고 균중식과 β -galactosidase 활성 측정

철이 결핍된 환경에 적응시킴과 동시에 균들이 저장하고 있는 세포 내 철을 고갈시키기 위해, 패혈증 비브리오균들을 철착화제인 dipyriddy (100 μ M)를 함유한 HI 액체배지에서 12시간 동안 배양시킴으로써 전처리하였다. 이와 같이 전처리 된 패혈증 비브리오균들을 FC가 0.25에서 20.0 μ M까지 포함된 철결핍배지에 접종하고 37°C에서 24시간 동안 220 rpm의 속도로 진탕 배양하였다. 배양 중에, 균중식과 β -galactosidase 활성을 측정하기 위

해 배양액을 적절한 시간 간격으로 얻었다. 균중식은 배양액의 흡광도 (OD₆₀₀)를 측정함으로써 관찰하였고 β-galactosidase 활성은 Miller가 기술한 방법을 사용하여 측정하였다[Miller, 1992].

7. 용혈소/세포용해소 측정

용혈소/세포용해소의 세포의 생산 또는 분비를 측정하기 위해, 배양 중에 얻은 배양액을 10,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 함으로써 배양상청액을 얻었다. 얻어진 배양상청액에서 용혈활성을 측정하기 위해서는 전통적으로 사용되어 왔던 시험관법을 사용하였다. 적혈구는 건강한 사람으로부터 얻은 신선한 적혈구를 사용하였고 1% 적혈구 용액이 되도록 생리식염수로 희석하여 사용하였다[Fan *et al.*, 2001]. 간략하게 기술하면, 100 μl의 배양상청액을 400 μl의 적혈구 부유액과 혼합하여 잘 섞은 다음 37°C에서 한 시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 파괴되지 않은 적혈구와 세포 찌꺼기는 10,000 rpm에서 5분간 원심분리 함으로써 제거하였고 상청액만을 이용하여 흡광도(OD₅₄₀)를 측정하였다. 같은 실험을 3번 반복하여 얻은 평균값을 이용하여 용혈활성을 계산하였다. 용혈활성은 다음과 같이 백분율로 계산하였다. 배양상청액의 OD₅₄₀ 값 ÷ Triton X-100에 의해 완전히 용혈 되었을 때의 OD₅₄₀ 값 x 100.

배양상청액에서 용혈소/세포용해소의 양을 측정하기 위해서는 Dot 또는 Slot blot 방법을 사용하였고 항체로는 전에 사용된 바 있었던 토끼에서 얻은 polyclonal anti-VvhA-body를 사용하였다[Shin *et al.*, 2005]. Bio-Dot (or Slot) Microfiltration Apparatus (BioRad, CA, USA)를 이용하여 배양상청액 20 μl를 직접 nitrocellulose membrane에 흡착시킨 다음 실온에서 일차항체인 anti-VvhA-body와 반응시켰고 이어 이차항체인 horseradish peroxidase가 표지된 거위로부터 얻은 anti-rabbit-IgG (Fc)-body와 반응시켰다. 최종적으로

diaminobenzidine과 hydrogen peroxide을 기질로 사용하여 발색시켰다[Shin *et al.*, 2005].

세포내에 존재하는 용혈소/세포용해소의 양을 측정하기 위해, 배양액을 10,000 rpm에서 5 분간 원심분리 함으로서 세균세포를 모았다. 모아진 세균 세포를 lysis buffer (10 mM Tris, 10 mM EDTA, 0.5% SDS)와 반응시켜 파괴하였다. 원심분리 함으로써 찌꺼기를 제거한 다음 상청액을 얻었다. 상청액 20 μ l을 Bio-Dot Microfiltration Apparatus를 이용하여 nitrocellulose membrane막에 직접 흡착시키거나 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 한 다음 nitrocellulose membrane에 흡착시켰다. 단백질이 흡착된 membrane은 실온에서 일차항체인 anti-VvhA-body와 반응시켰고 이어 이차항체인 horseradish peroxidase가 결합된 anti-rabbit-IgG (Fc)-body과 반응시켰다. 최종적으로 diaminobenzidine과 hydrogen peroxide을 기질로 사용하여 발색시켰다.

8. 역전사 중합효소 연쇄반응 [Reverse transcriptase (RT)-PCR]

배양 중에 배양액을 10,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 함으로써 세균 세포를 모았다. Easy-Blue™ reagent (iNtRon Biotechnology, Korea)를 이용하여 모아진 세균세포로부터 전체 RNA분리하였다. 분리된 전체 RNA에서 DNA오염을 막기 위해 DNase (Qiagen)를 처리한 다음 One-Step RT-PCR Premix (iNtRon Biotechnology)와 RNA 10 ng을 이용하여 역전사 중합효소 연쇄반응을 유도하였다(MasterCycler, Eppendorf, Germany). 역전사 중합 연쇄반응을 위한 프라이머로는 *pilD* 유전자에 특이적인 PiID-6 과 PiID-7을 사용하였고 대조를 위해 16s rRNA에 특이적인 프라이머 Cont-1 과 Cont-2를 사용하였다. 역전사 중합효소 연쇄반응의 조건을 간략하게 기술하면 다음과 같다. 45°C에서 30분간 역전사 중합효소 반응을 유도하였고, 94°C에서 5분

간 pre-denaturation 반응을 유도하였다. 총 30 cycles의 중합효소 연쇄반응을 유도하였고 조건은 다음과 같았다. 94°C에서 30초 동안 de-naturation, 60°C에서 30초 동안 annealing, 72°C에서 30초 동안 extension. 마지막으로 72°C에서 5분 동안 post-extension 반응을 유도하였다. 증폭된 산물은 agarose gel에서 ethidium bromide로 염색한 다음 관찰하였다.

Table 1. Bacterial strains used in this study.

Strains	Relative characteristics	Sources
<i>V. vulnificus</i>		
MO6-24/O	Highly virulent clinical isolate	J.G. Morris, Jr.
CVD707	<i>vvhA</i> -insertion mutant	J.G. Morris, Jr.
CMM2100	MO6-24/O with spontaneous streptomycin resistance	Kim <i>et al.</i> , 2003
CMM2101	CMM2100 with <i>lacZ</i> -deletion mutation	Kim <i>et al.</i> , 2003
CMM2103	CMM2101 with merozygotic <i>PvvhA::lacZ</i> transcriptional fusion	Kim <i>et al.</i> , 2003
CMM2303	CMM2101 with <i>fur</i> -deletion mutation	This study
CMM2305	CMM2303 with merozygotic <i>PvvhA::lacZ</i> transcriptional fusion	This study
RC104	MO6-24/O with <i>pilD</i> -deletion mutation	This study
RC108	RC104 with <i>in trans pilD</i> -complementation	This study
<i>E. coli</i>		
SY327 λ <i>pir</i>	$\Delta(lac\ pro)\ argE(Am)\ rif\ nalA\ recA56$ λ <i>pir</i> lysogen; Host for suicide vector	Miller & Mekalanos, 1988
SM10 λ <i>pir</i>	<i>thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc^r</i> :: Mu Km ^r λ <i>pir</i> lysogen: Conjugation donor	Miller & Mekalanos, 1988
DH5 α	Host for pRC108 used in triparental mating	Lab. stock
HB101	Host for pRK2013 used in triparental mating	Ditta <i>et al.</i> , 1980

Table 2. Plasmids used in this study.

Plasmids	Relative characteristics	Sources
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	PCR cloning vector	Invitrogen
pDM4	Suicide vector with R6K origin; Cm ^r	McGee <i>et al.</i> , 1996
pLAF3	IncP cosmid vector; Tc ^r	Staskawicz <i>et al.</i> , 1987
pLAF3II	pLAFR3 with <i>bla</i> inserted at the cos site; Ap ^r Tc ^r	This study
pRK2013	IncP, Km ^r , Tra Rk2 ⁺ <i>repRK2</i> <i>repE1</i>	Ditta <i>et al.</i> , 1980
pUTKm1	Tn5-based insertion delivery plasmid, Ap ^r	Herrero <i>et al.</i> , 1990
pCMM236	pCR [®] 2.1-TOPO [®] with 1.8-kb fragment containing an <i>in-frame</i> deletion of <i>V. vulnificus fur</i> gene	This study
pCMM237	pDM4 with <i>SacI-XbaI</i> fragment of pCMM236	This study
pRC104	pDM4 with 1.94-kb <i>BamHI-SpeI</i> fragment containing an <i>in-frame</i> deletion of <i>V. vulnificus pilD</i> gene	This study
pRC108	pLAFR3II with 1.81-kb <i>BamHI-HindIII</i> fragment containing <i>pilD</i> gene	This study

Table 3. Primers used in this study.

Primers	Sequences	Sources
Vvh-1	5'-gctatttcaccgccgctcac-3'	Lee <i>et al.</i> , 1998
Vvh-2	5'-ccgcagagccgtaaaccgaa-3'	Lee <i>et al.</i> , 1998
Fur-1	5'-[gagctc] ^a -cgtcggttatgcattgatgaagttcg-3'	This study
Fur-2	5'-cgtcgatattacatatacttcccgttgatc-3'	This study
Fur-3	5'-ggaaagtatatgtaatatcgacgctcgatagatc-3'	This study
Fur-4	5'-[tctaga] ^b -ctcgacaacatcaccattgattgcc-3'	This study
Cont-1	5'-cgggatccgcatatcccaaatgccgatg-3'	This study
Cont-2	5'-cggaattctcaatattgtagcttaacgtcac-3'	This study
PiID-1	5'-cg-[ggatcc] ^c -gcatttatgtgacttagtcgcc-3'	This study
PiID-2	5'-aaagccatattacatataatcgctgcttctcttg-3'	This study
PiID-3	5'-gacgattatatgtaatatggcttagtgattggattg-3'	This study
PiID-4	5'-g-[actagt] ^d -atcgctgacgaattgagctgag-3'	This study
PiID-5	5'-cccaagcttatccaatcactaaagccatattacgc-3'	This study
PiID-6	5'-tgaatacaacatcacaccaccgac-3'	This study
PiID-7	5'-ccttcttcctgtcagcaatctg-3'	This study

a: *Sac*I-recognition sequence

b: *Xba*I-recognition sequence

c: *Bam*HI-recognition sequence

d: *Spe*I-recognition sequence

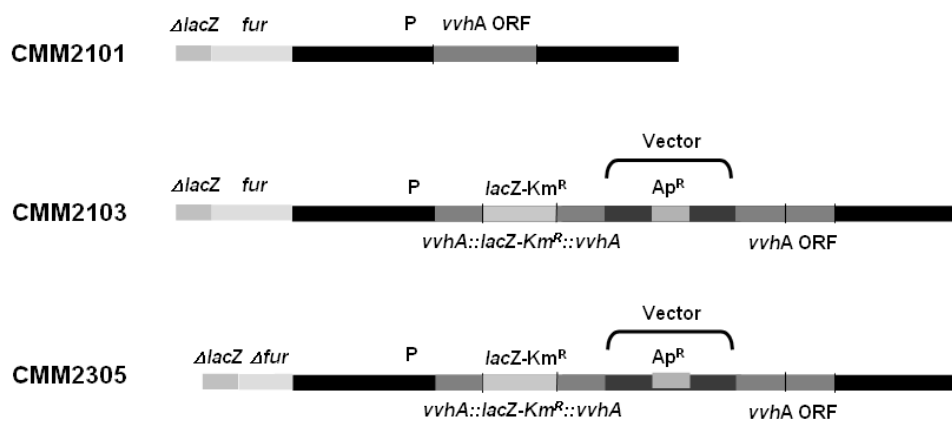


Figure 1. Relative genetic organization in *Vibrio vulnificus* CMM2101, CMM2103 and CMM2305 strains. Δ : deletional mutation, P: promoter, ORF: open reading frame, Km[®]: kanamycin-resistance gene, Ap[®]: ampicillin-resistance gene, *lacZ*: gene encoding for β -galactosidase, *fur*: gene encoding for Fur, *vvhA*: gene encoding for hemolysin/cytolysin, Vector: suicide pKAS32 with Ap[®].

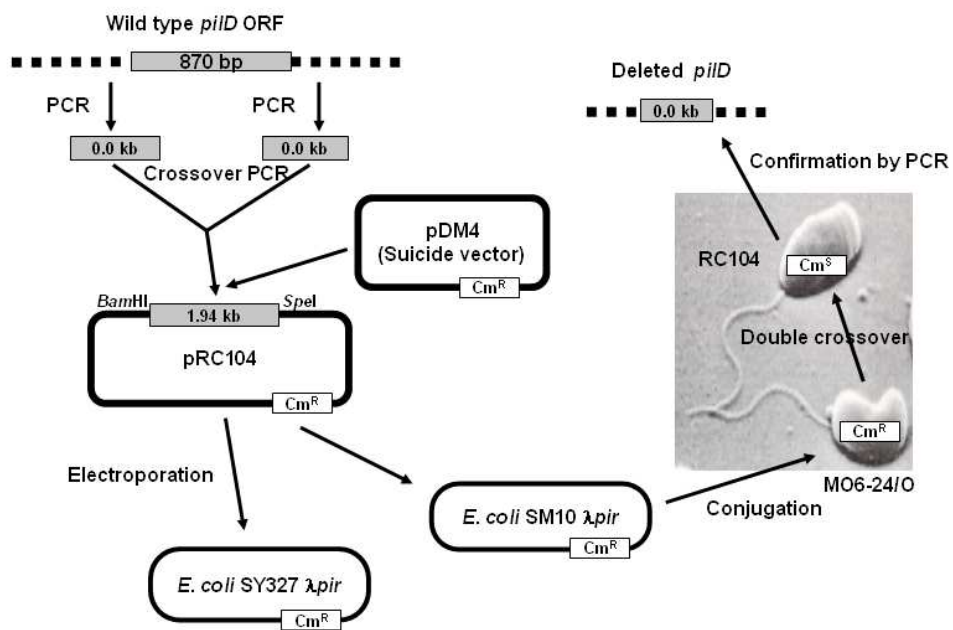


Figure 2. Schematic illustration for the construction of *Vibrio vulnificus* *pilD*-deletional mutant RC104 strain. bp: base pair, kb: kilobase, PCR: polymerase chain reaction, *Cm*[®]: chloramphenicol-resistance gene.

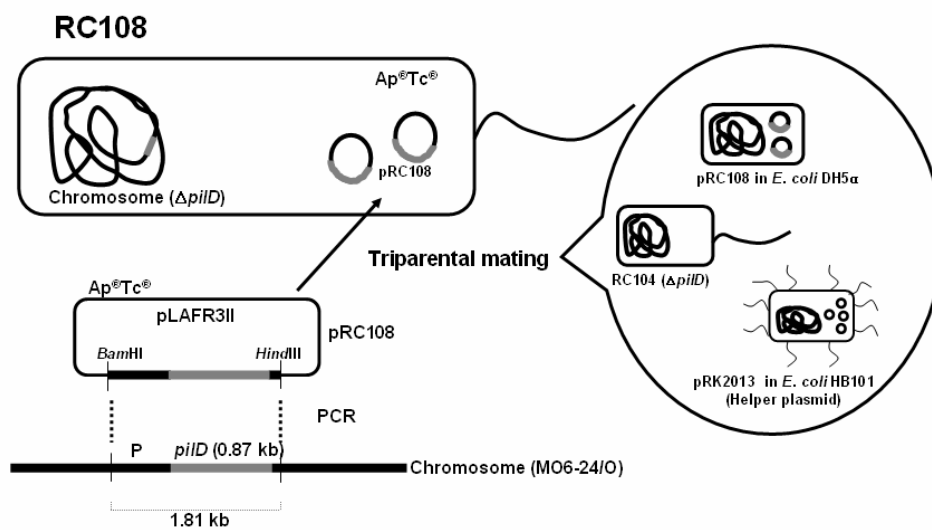


Figure 3. Schematic illustration for the construction of *Vibrio vulnificus* *pilD*-complemented RC108 strain. Δ : deletional mutation, kb: kilobase, PCR: polymerase chain reaction, $Ap^R Tc^R$: ampicillin and tetracycline-resistance genes, P: promoter.

연구결과

1. 유전자 *vwhA* 전사조절부위의 염기서열 분석

패혈증 비브리오균 EDL174 균주에서 *vwhA* 유전자의 전사조절부위에 염기서열의 상동성에 기초한 즉 아직 그 존재가 확실히 증명되지 않은 Fur-결합부위가 존재한다는 보고에 기초하여[Yamamoto *et al.*, 1990], 본 연구자들은 이러한 Fur-결합부위가 다른 패혈증 비브리오균의 *vwhA* 유전자 전사조절부위에서도 발견되는지를 조사하였다. 이를 위해 이미 지놈 염기서열이 완전히 밝혀져 인터넷에서 염기서열 정보를 쉽게 얻을 수 있는 두 패혈증 비브리오 균주들 즉, CMCP6 균주(대한민국)와 YJ016 균주(대만)를 대상으로 하였다. 두 균주에서 유래한 *vwhA* 유전자를 다운로드 받아 컴퓨터 프로그램인 DNassist를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 두 균주에서 유래한 *vwhA* 유전자 전사조절부위에는 대장균에서 Fur-결합부위로 알려진 염기서열 [Zhang *et al.*, 2005] 즉, TATAATGATACGCATTAT와 50% 이상의 상동성을 보이는 부위 즉, TTTATTTATATGAAATAT를 가지고 있었다(Figure 4). CMCP6 균주와 YJ016 균주 사이에 이 염기서열의 차이는 없었다. 이러한 결과는 패혈증 비브리오균의 특정 균주에서만 *vwhA* 유전자 전사조절부위에 Fur-결합부위가 존재하는 것이 아니라 모든 패혈증 비브리오균의 *vwhA* 유전자 전사조절부위에 Fur결합부위가 존재한다는 것을 나타내 주며 *vwhA* 유전자의 전사가 철과 Fur에 의해 조절될 수 있음을 강력하게 시사한다.

TATAATGATACGCATTAT

vvh(yj016) 60 TGACAGTGAGCCAAAAAATACTTTTATTTTATTTTATTTATATGAAATAATTTTCAGGATTATTA 118

TATAATGATACGCATTAT

vvh(CMCP6) 63 TGAGCCAAAAAATACTTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTTCAGGATTATTAATAAATA 122

Figure 4. A putative Fur-binding site in the regulatory region of the *vvhA* gene in *Vibrio vulnificus* YJ016 and CMCP6 strains. Sequence analysis was conducted using the program DNAssist. *E. coli* Fur-binding consensus was shown in the upper case. The matching sequences were shown as the gray boxes.

2. 철은 *vwhA* 유전자의 전사를 억제하나 용혈소/세포용해소의 세포의 생산은 촉진한다

사용된 균주들 사이의 편차를 줄이고 패혈증 비브리오균의 증식, *vwhA* 유전자의 전사, 용혈소/세포용해소의 세포의 생산을 한 균주에서 동시에 관찰하기 위하여 부분접합 $P_{vwhA}::lacZ$ 전사리포터 균주인 CMM2103 균주를 실험에 사용하였다. CMM2103 균주를 0.25, 0.5, 1.0, 10.0, 20.0 μM FC를 함유한 배지에서 배양하였다. CMM2103 균주의 증식은 FC에 의해 촉진되었으며 용량의존적인 반응을 보였다(Figure 5A). FC에 의한 균증식의 촉진 현상은 초기 지수증식기(exponential growth phase) 보다는 후기 지수증식기에 주로 관찰되었다. 비슷한 결과가 다른 패혈증 비브리오균 즉, MO6-24/O, CMM2100, CMM2101, CVD707 균주들을 같은 조건에서 배양하였을 때에도 관찰되었다 (data not shown).

배양 중 얻은 배양액에서 유전자 *vwhA*의 전사 정도를 측정하기 위해 β -galactosidase의 활성을 측정하였다. *vwhA* 유전자의 전사는 FC에 의해 억제되었고 용량의존적인 반응을 보였다(Figure 5B). 그러나 20 μM FC가 포함되어 철농도가 매우 높아진 경우에도 여전히 상당한 수준의 *vwhA* 유전자 전사가 관찰되었고 더 많은 FC를 첨가한 경우에도 *vwhA* 유전자 전사는 완전히 억제되지 않았다(data not shown). 또한 균증식 결과와는 다르게 FC에 의한 *vwhA* 유전자 전사억제는 초기 지수증식기 때부터 관찰되었다. 트랜스페린에 결합된 철(transferrin-bound iron)이나 헤모글로빈과 같은 유기철(organic iron)을 무기철(inorganic iron)인 FC 대신에 사용하였을 때에도 비슷한 결과를 관찰할 수 있었다(data not shown). 이러한 결과들은 공급된 철의 종류에 상관없이 철이 *vwhA* 유전자의 전사를 억제한다는 것을 분명하게 나타낸다.

용혈소/세포용해소의 세포의 생산을 측정하기 위해 배양 중 얻은 배양

상청액에서 사람 적혈구를 파괴하는 용혈활성을 측정하였다. 매우 흥미롭게도 용혈소/세포용해소의 세포외 생산은 FC에 의해 증가되었고 용량 의존적 반응을 보였다(Figure 5C). 용혈소/세포용해소 세포외 생산은 *vwhA* 유전자의 전사수준과는 반대의 결과를 보였다(Figure 5B). 이러한 결과는 유기철인 트랜스페린에 결합된 철과 헤모글로빈을 무기철인 FC 대신에 사용하였을 때에도 관찰할 수 있었다(data not shown). FC에 의한 용혈소/세포용해소 세포외 생산촉진은 초기 지수증식기부터 관찰되었다(Figure 5A). 또한 다른 패혈증 비브리오균인 MO6-24/O, CMM2100, CMM2101 균주들을 같은 조건에서 배양하여 얻은 배양상청액에서도 비슷한 결과가 관찰되었다(data not shown). 유전자 *vwhA*에 돌연변이가 유발된 CVD707 균주를 배양한 배양상청액에서는 용혈활성이 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 배양상청액에서 측정된 용혈활성이 생산된 용혈소/세포용해소 때문임을 나타낸다. 따라서 위의 결과들은 *vwhA*의 전사와는 다르게 용혈소/세포용해소의 세포외 생산은 철에 의해 촉진된다는 것을 나타내 준다.

유전자 *vwhA*의 전사와는 다르게 철에 의해 용혈소/세포용해소 생산이 철에 의해 촉진되는 지 아니면 생산된 용혈소/세포용해소의 세포외 분비가 철에 의해 촉진되는 지를 알아보기 위해 세포외로 분비되지 않고 세포내에 남아있는 용혈소/세포용해소의 양과 세포외로 분비된 용혈소/세포용해소의 양을 anti-VvhA-body를 사용한 Slot blot 방법에 의해 동시에 비교하였다. 세포내 남아 있는 용혈소/세포용해소의 양은 첨가된 FC 농도에 반비례하였고 세포외로 분비된 용혈소/세포용해소의 양은 첨가된 FC 농도에 비례하였다 (Figure 6A 와 B). 이러한 결과는 용혈소/세포용해소의 생산 자체가 철에 의해 촉진되는 것이 아니라 생산된 용혈소/세포용해소의 세포외 분비가 철에 의해 촉진됨으로써 세포내 남아 있는 용혈소/세포용해소의 양은 감소하였고 세포외로 분비된 용혈소/세포용해소의 양은 증가하였다는 것을 나타낸다.

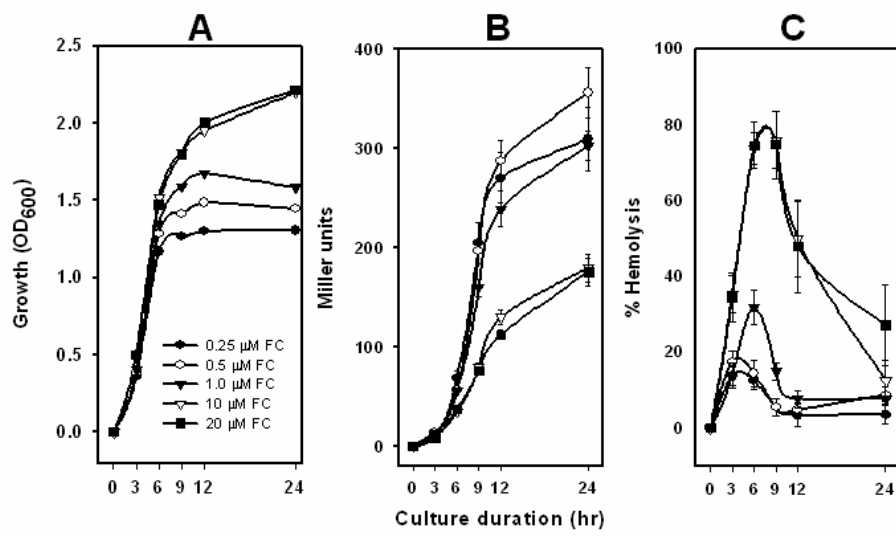


Figure 5. Iron represses transcription of the *vvhA* gene but stimulates extracellular production of VvhA. *V. vulnificus* CMM2103 strain was cultured in HI broth containing 100 μ M dipyrityl for 12 h in order to adapt it to iron-limited conditions and to reduce intracellular iron stores. This pre-conditioned CMM2103 was inoculated into ID-HI broths containing various concentrations of FC (0.25 to 20.0 μ M), and cultured with vigorous shaking (220 rpm) at 37°C for 24 h. During culture, culture aliquots were withdrawn to monitor bacterial growth and measure β -galactosidase activity, and culture supernatants were obtained by the centrifugation of culture aliquots at 10,000 rpm for 5 min to determine extracellular production of VvhA. (A) Bacterial growth was monitored by measuring the OD₆₀₀ of the culture aliquots. (B) β -Galactosidase activity was measured by the Miller method. (C) Hemolytic activity in culture supernatants was measured by the conventional tube hemolysis assay using 1% human RBC suspension. β -Galactosidase and hemolytic activities are expressed as the means and standard errors of values measured in triplicate.

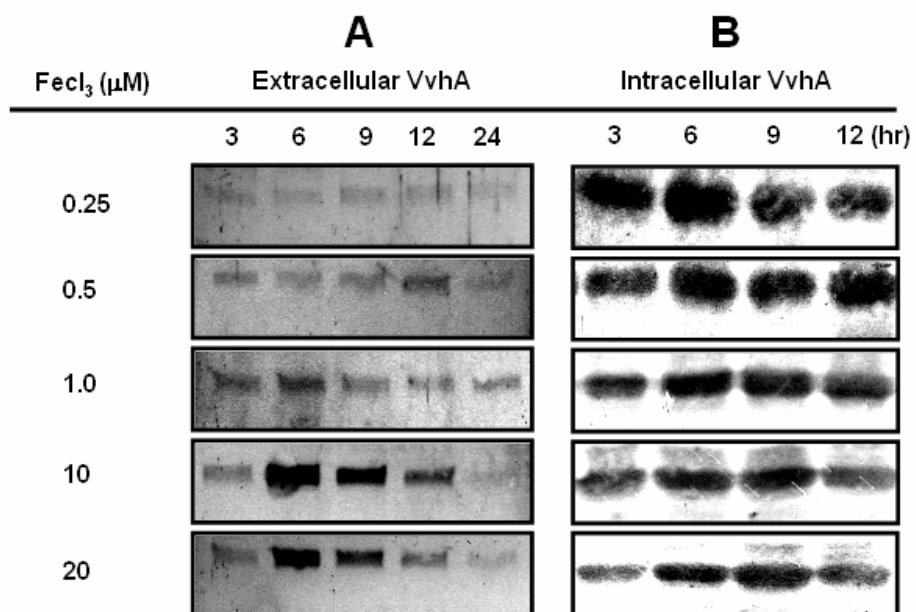


Figure 6. Iron decreases the amount of intracellular VvhA but increases the amount of extracellular VvhA. (A) In order to determine the amount of extracellular VvhA, equal volumes (20 μ l) of the culture supernatants described in Figure 1 were directly blotted onto nitrocellulose membranes using Bio-Slot Microfiltration Apparatus (BioRad). (B) In order to measure the amount of intracellular VvhA, bacterial cells were harvested by the centrifugation of the culture aliquots described in Figure 1 at 10,000 rpm for 5 min. The bacterial cells were lysed with the digestion buffer, and cell debris were removed by centrifugation. The resulting supernatants was electrophoresed on SDS-polyacrylamide gel (10%) and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were reacted with rabbit polyclonal anti-VvhA-body, and subsequently with anti-rabbit-IgG (Fc)-body conjugated with horseradish peroxidase, and finally developed with diaminobenzidine and hydrogen peroxide.

3. 철은 용혈소/세포용해소의 세포외 분비를 촉진한다

철이 용혈소/세포용해소의 세포외 분비를 촉진하는지를 실험적으로 검증하기 위하여, MO6-24/O 균주를 철결핍배지에서 배양하면서 배양하는 도중에 적절한 시간 간격으로 20 μ M FC를 첨가하였고 이에 따른 세포내외 용혈소/세포용해소 양의 변화를 관찰하였다. MO6-24/O 균주의 증식은 배양 도중에 첨가된 FC에 의해 촉진되었고(Figure 7A), 배양상청액에서 측정된 용혈활성 또한 배양 도중에 첨가된 FC에 의해 증가되었다(Figure 7B). 유기철인 트랜스페린에 결합된 철과 헤모글로빈을 무기철인 FC 대신에 첨가하였을 때에도 비슷한 결과가 관찰되었다(data not shown). 같은 배양상청액을 이용하여 dot-blot를 실시하였을 때, 세포외로 분비된 용혈소/세포용해소의 양은 배양 도중에 첨가된 FC에 의해 증가되었다(Figure 7C). 세균세포를 깨뜨린 후 세포내 남아 있는 용혈소/세포용해소의 양을 dot blot으로 측정하였을 때 세포외로 분비된 용혈소/세포용해소의 양과는 반대로 세포내 남아 있는 용혈소/세포용해소의 양은 배양 도중에 첨가된 FC에 의해 감소되었다. 따라서 이러한 결과는 철이 용혈소/세포용해소의 세포외 분비를 촉진함을 나타낸다.

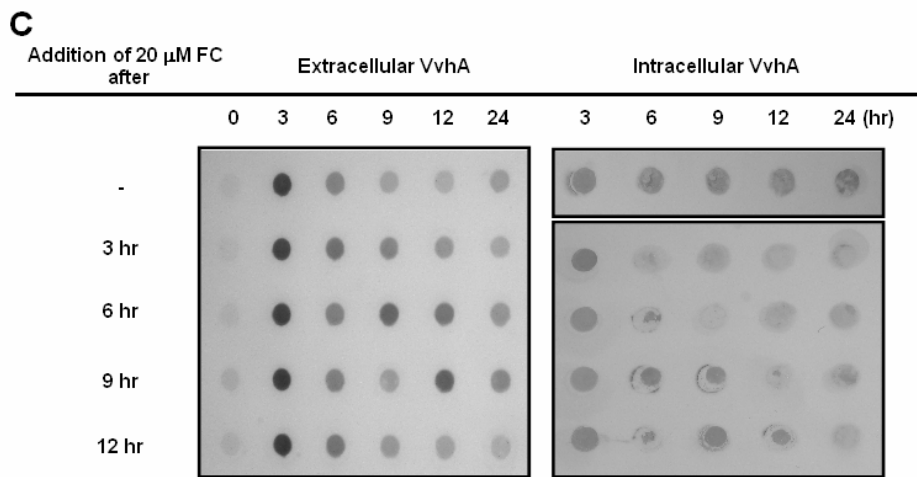
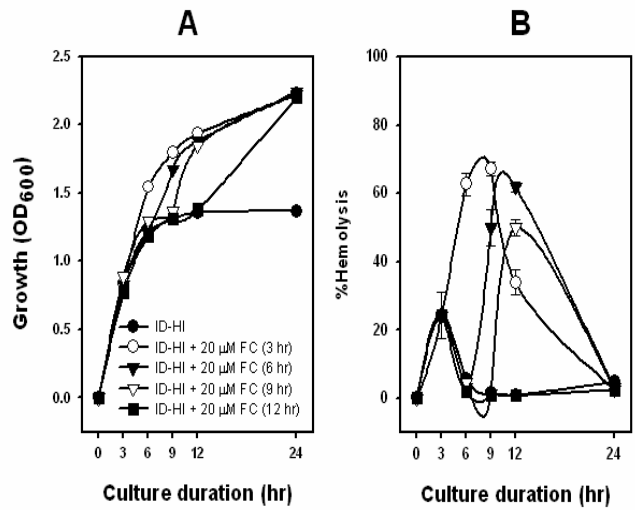


Figure 7. Iron triggers extracellular production of VvhA. *V. vulnificus* MO6-24/O strain was cultured in HI broth containing 100 μ M dipyriddy for 12 h in order to adapt it to iron-limited conditions and to reduce intracellular iron stores. This preconditioned MO6-24/O was inoculated into ID-HI broths containing 0.25 μ M FC, and cultured with vigorous shaking (220 rpm) at 37°C for 24 h. During culture, 20 μ M FC was additionally added at 3, 6, 9 and 12 h after culture initiation. Culture aliquots were withdrawn to monitor bacterial growth, and culture supernatants and bacterial pellets were obtained by the centrifugation of the culture aliquots at 10,000 rpm for 5 min to determine extracellular and intracellular amounts of VvhA. (A) Bacterial growth was monitored by measuring the OD₆₀₀ of the culture aliquots. (B) Hemolytic activity in culture supernatants was measured by the conventional tube hemolysis assay using 1% human RBC suspension. (C) In order to determine the amount of extracellular VvhA, equal volumes (20 μ l) of the culture supernatants were directly transferred onto nitrocellulose membranes using Bio-Dot Microfiltration Apparatus. In order to measure the amount of intracellular VvhA, The bacterial cells were lyzed with the digestion buffer, and cell debris were removed by centrifugation. The resulting supernatants were directly transferred onto nitrocellulose membranes using Bio-Dot Microfiltration Apparatus. The membranes were reacted with rabbit polyclonal anti-VvhA-body, and subsequently with anti-rabbit-IgG (Fc)-body conjugated with horseradish peroxidase, and finally developed with diaminobenzidine and hydrogen peroxide. Hemolytic activities are expressed as the means and standard errors of values measured in triplicate.

4. 유전자 *vwhA*의 전사는 전사억제자인 *Fur*를 통해 철에 의해 억제된다

유전자 *vwhA*의 전사가 철과 반응하여 전사억제자로 작용하는 *Fur*에 의해 조절되는지를 관찰하기 위해 $P_{vwhA}::lacZ$ 전사리포터 균주인 CMM2103과 유전자 *fur*가 돌연변이 된 $P_{vwhA}::lacZ$ 전사리포터 균주인 CMM2305를 0.25, 0.5, 1.0, 10.0, 20.0 μM FC가 포함된 배지에서 배양하였고 β -galactosidase의 활성을 측정함으로써 유전자 *vwhA*의 전사수준을 비교하였다. 두 전사리포터 균주는 증식에 차이를 보이지 않았다(data not shown). 사용된 모든 FC 농도에서 유전자 *vwhA*의 전사수준은 CMM2103 균주에서 보다 CMM2305 균주에서 더 높았다(Figures 8AB). 두 균주 사이에 유전자 *vwhA*의 전사수준의 상대적인 차이는 FC 농도에 비례하여 증가하였다(Figure 8C). 이러한 유전자 *vwhA*의 전사수준과 일치하여 모든 FC 농도에서 용혈소/세포용해소의 세포의 생산 역시 유전자 *fur*를 돌연변이시켰으므로써 증가되었다(Figure 8D). 따라서 이러한 결과들은 전사억제자인 *Fur*는 철과 반응하여 유전자 *vwhA*의 전사를 억제한다는 것을 나타내며, 철이 낮은 환경에서 보다 철이 높은 환경에서 유전자 *vwhA*의 전사에 더 큰 영향을 미치고 있음을 나타낸다. 또한 흥미롭게도 유전자 *vwhA*의 전사는 유전자 *fur*가 돌연변이 된 CMM2305 균주에서도 FC에 의해 여전히 억제되었다(Figure 8B). 이러한 결과는 *Fur* 이외의 다른 전사억제기전이 철과 관련하여 유전자 *vwhA*의 전사를 조절하고 있음을 나타낸다.

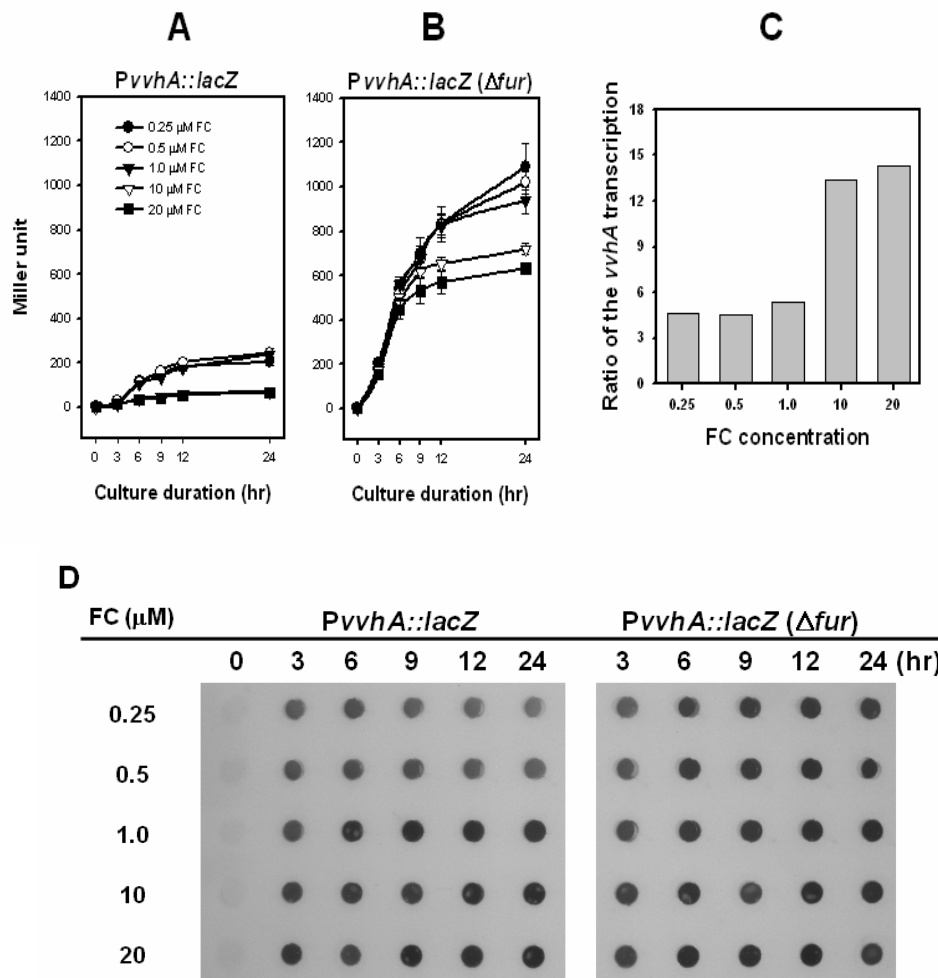


Figure 8. Effect of the mutation of the *fur* gene on transcription of the *vvhA* gene. The preconditioned *V. vulnificus* CMM2103 and CMM2305 strains in HI broth containing 100 μ M dipyriddy were inoculated into ID-HI broths containing various concentrations of FC (0.25 to 20.0 μ M), and cultured with vigorous shaking (220 rpm) at 37°C for 24 h. During culture, culture aliquots were withdrawn to monitor bacterial growth and to measure β -galactosidase activity, and culture supernatants and bacterial pellets were obtained by the centrifugation of the culture aliquots at 10,000 rpm for 5 min to determine extracellular and intracellular amounts of VvhA. No significant growth difference was observed between the two strains (data not shown). (A and B) β -Galactosidase activity was measured by the Miller method. (C) Relative β -galactosidase activities were calculated by dividing the β -galactosidase activities of CMM2305 by those of CMM2103. (D) In order to determine the amount of extracellular VvhA, equal volumes (20 μ l) of the culture supernatants were directly transferred onto nitrocellulose membranes using Bio-Dot Microfiltration Apparatus. In order to measure the amount of intracellular VvhA, The bacterial cells were lyzed with the digestion buffer, and cell debris were removed by centrifugation. The resulting supernatants were directly transferred onto nitrocellulose membranes using Bio-Dot Microfiltration Apparatus. The membranes were reacted with rabbit polyclonal anti-VvhA-body, and subsequently with anti-rabbit-IgG (Fc)-body conjugated with horseradish peroxidase, and finally developed with diaminobenzidine and hydrogen peroxide. β -Galactosidase activities are expressed as the means and standard errors of values measured in triplicate.

5. 용혈소/세포용해소는 제 II 형 단백질 분비체계를 통해 분비된다

많은 그람음성 세균들에서 PiiD(또는 VvpD)라 불리는 제 IV 형 leader peptidase/*N*-methyltransferase는 제 II 형 단백질 분비체계를 통한 세포의 단백질들의 분비를 위해 반드시 필요한 효소로 알려져 있다. 용혈소/세포용해소의 세포의 분비 또한 이 효소의 조절을 받는 것으로 알려져 있다 [Paranjpye *et al.*, 1998]. 따라서 본 연구에서는 철에 의해 촉진된 용혈소/세포용해소의 세포의 분비가 PiiD에 의해 매개되는 제 II 형 단백질 분비체계를 통해 이루어지는지를 증명하기 위해, 야생균주인 MO6-24/O 균주, 유전자 *pilD*가 돌연변이 된 RC104 균주, 야생형 유전자 *pilD*가 보완된 RC108 균주를 이용하여 세 균주 사이에 용혈소/세포용해소의 세포의 분비를 비교하였다. 세 균주를 0.25 μ M FC와 20 μ M FC를 함유한 배지에 배양하였고 배양을 시작한 후 3 시간째에 20 μ M FC를 0.25 μ M FC를 함유한 배지에 첨가하고 첨가된 FC에 의해 용혈소/세포용해소의 세포의 분비가 촉진되는지를 관찰하였다. 세 균주 사이에 증식의 차이는 관찰되지 않았다(data not shown). MO6-24/O 균주는 0.25 μ M FC가 포함된 배지에서 보다 20 μ M FC가 포함된 배지에서 더 많은 양의 용혈소/세포용해소를 세포외로 분비하였고, 배양 도중에 첨가된 FC에 반응하여 용혈소/세포용해소의 세포의 분비가 촉진하였다(Figure 9A). 이에 반해, RC104 균주에서는 20 μ M FC가 포함된 배지에서도 용혈소/세포용해소의 세포의 분비는 배양시작 후 12시간까지 지연되었고 배양시작 후 3시간째에 20 μ M FC를 첨가하였을 경우에도 용혈소/세포용해소의 세포의 분비는 촉진되지 않았다(Figure 9B). RC108 균주에서는 FC에 의한 용혈소/세포용해소의 세포의 분비는 야생균주인 MO6-24/O 균주의 수준으로 회복되었고 배양 도중에 첨가된 FC에 의해서 용혈소/세포용해소의 세포의 분비가 촉진되었다(Figure 9C). 유전자 *pilD*의 돌연변이 또는 보완은 유전자 *vwhA*의 전사에는 아무런 영향을 미치지 않았

다(data not shown). 따라서 이러한 결과는 철이 PiID에 의해 매개되는 제 II형 단백질 분비체계를 통해 용혈소/세포용해소의 세포외 분비를 촉진한다는 것을 나타낸다.

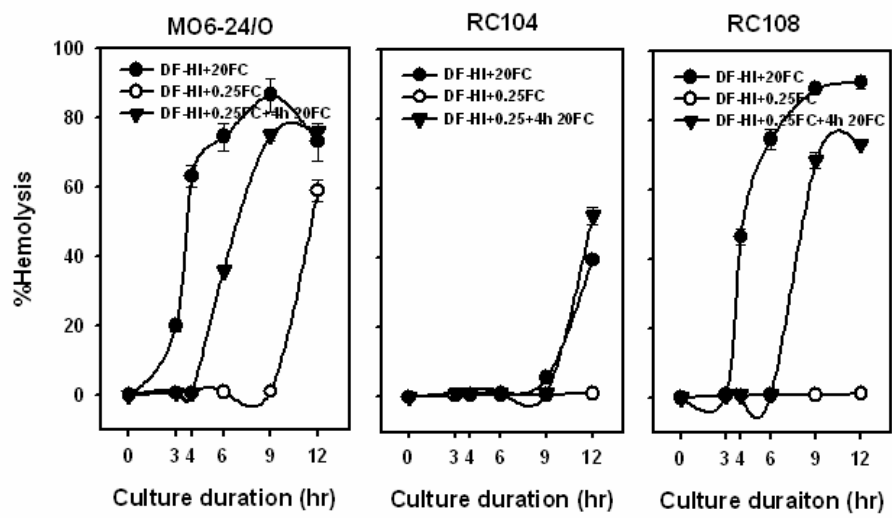


Figure 9. Effect of mutation of the *pilD* gene on extracellular secretion of VvhA. *V. vulnificus* MO6-24/O (A), RC104 (B) and RC108 (C) strains were cultured in HI broth containing 100 μ M dipyriddy for 12 h in order to adapt it to iron-limited conditions and to reduce intracellular iron stores. These preconditioned strains were inoculated into ID-HI broths containing 0.25 μ M FC or 20 μ M FC, and cultured with vigorous shaking (220 rpm) at 37°C for 12 h. In the middle of culture, 20 μ M FC was additionally added into ID-HI broth containing 0.25 μ M FC at 4 h after culture initiation. Culture aliquots were withdrawn at the indicated times to monitor bacterial growth, and culture supernatants and bacterial pellets were obtained by the centrifugation of the culture aliquots at 10,000 rpm for 5 min to determine extracellular production of VvhA. Bacterial growth was monitored by measuring the OD₆₀₀ of the culture aliquots. No significant growth differences were observed among the three strains (data not shown). Hemolytic activity in culture supernatants was measured by the conventional tube hemolysis assay using 1% human RBC suspension. Hemolytic activities are expressed as the means and standard errors of values measured in triplicate.

6. 유전자 *pilD*의 전사는 철에 의해 촉진되지만 Fur에 의해 억제된다

철이 유전자 *pilD*의 전사를 촉진하는지를 알아보기 위해 MO6-24/O 균주를 0.25 μM FC와 20 μM FC를 함유한 배지에 각각 배양하였고 배양을 시작한 후 3 시간째에 20 μM FC를 0.25 μM FC를 함유한 배지에 첨가하였다. MO6-24/O 균주의 증식은 배양액의 흡광도(OD_{600})를 측정함으로써 관찰하였고(Figure 10A), VvhA의 세포외 분비는 배양상청액에서 용혈활성을 측정함으로써 관찰하였다(Figure 10B). 유전자 *pilD*의 전사수준을 측정하기 위하여 6 시간 동안 배양한 균으로부터 전체 RNA를 분리하였고 유전자 *pilD*에 특이적인 프라이머(PilD-6 와 7)를 이용하여 역전사 중합효소 반응을 유도하였다. 유전자 *pilD*의 전사수준은 0.25 μM FC를 포함한 배지에서 보다 20 μM FC를 함유한 배지에서 더 촉진되었다. 또한 배양 도중에 첨가된 20 μM FC에 반응하여 유전자 *pilD*의 전사가 촉진되었다(Figure 10C). 이러한 유전자 *pilD*의 전사수준은 배양상청액에서 측정된 용혈활성 정도와 일치하였다(Figure 10B). 무기철인 FC 대신에 유기철인 트랜스페린에 결합된 철 또는 헤모글로빈을 첨가하였을 때에도 비슷한 결과가 관찰되었다(data not shown). 따라서 위의 결과들은 철이 유전자 *pilD*의 전사를 촉진함을 나타내 준다.

철과 반응하여 전사억제자로서 작용하는 Fur에 의해 유전자 *pilD*의 전사가 조절되는지를 알아보기 위해 먼저 유전자 *pilD*의 전사조절부위에 Fur-결합부위가 존재하는지를 조사하였다. 유전자 *pilD*의 전사조절부위에는 대장균의 Fur-결합부위와 상동성을 보이는 염기서열을 가지고 있었다(Figure 11). 총 20개의 염기서열 중 12개의 염기서열이 대장균 Fur-결합부위의 염기서열과 일치하였다. 따라서 유전자 *pilD*의 전사조절부위에 Fur-결합부위가 존재한다는 사실은 *pilD* 유전자의 전사가 철에 의해 촉진되었을 지라도 철과 반

응하여 전사억제자로 작용하는 Fur에 억제될 수 있음을 시사한다.

유전자 *fur*를 돌연변이 시켰을 때 유전자 *pilD*의 전사가 어떻게 달라지는지를 알아보기 위해 MO6-24/O 야생균주와 유전자 *fur*가 돌연변이 된 CMM2303 균주를 0.25에서 20.0 μM 까지의 FC를 함유한 배지에서 배양하였다. 두 균주 사이에 증식의 차이는 관찰되지 않았다(data not shown). 6시간 배양한 균으로부터 전체 RNA를 분리하였고, 유전자 *pilD*에 특이적인 프라이머(PilD-6과 7)를 사용하여 역전사 증합효소 반응을 유도하였다 (Figure 12). 유전자 *pilD*의 전사는 철에 의해 농도 의존적으로 촉진되었으나 모든 FC 농도에서 MO6-24/O 균주에서 보다 CMM2303 균주에서 더 촉진되었다. 이러한 결과는 유전자 *pilD*의 전사가 철에 의해 촉진될지라도 철과 반응하여 전사억제자로 작용하는 Fur에 의해서는 억제되고 있음을 나타낸다.

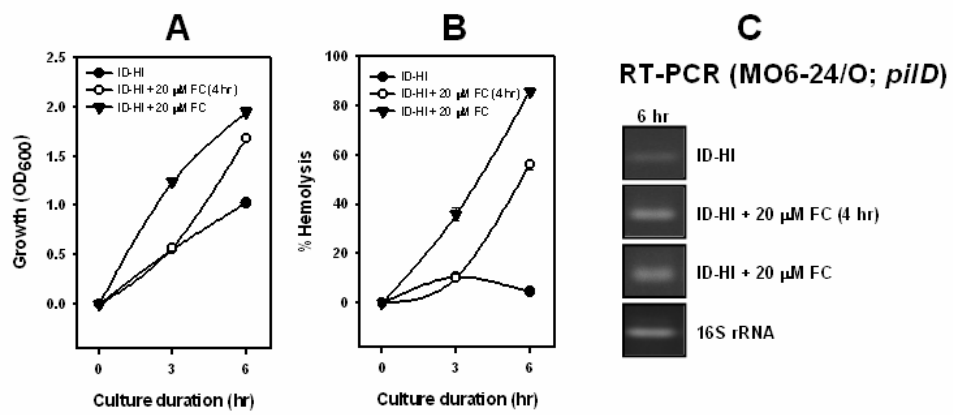


Figure 10. Effect of iron on transcription of the *pilD* gene. *V. vulnificus* MO6-24/O strain was cultured in HI broth containing 100 μM dipyriddy for 12 h in order to adapt it to iron-limited conditions and to reduce intracellular iron stores. This preconditioned MO6-24/O was inoculated into ID-HI broths containing 0.25 μM FC or 20 μM FC, and cultured with vigorous shaking (220 rpm) at 37°C for 6 h. In the middle of culture, 20 μM FC was additionally added into ID-HI broth containing 0.25 μM FC at 4 h after culture initiation. Culture aliquots were withdrawn at the indicated times to monitor bacterial growth, and culture supernatants and bacterial pellets were obtained by the centrifugation of the culture aliquots at 10,000 rpm for 5 min to determine extracellular amounts of VvhA and *pilD*-mRNA levels. (A) Bacterial growth was monitored by measuring the OD₆₀₀ of the culture aliquots. (B) Hemolytic activity in culture supernatants was measured by the conventional tube hemolysis assay using 1% human RBC suspension. (C) In order to determine *pilD*-mRNA levels, total RNA was isolated from the bacterial pellets obtained 6 h after culture initiation. After treatment with DNase, 10 ng of total RNA was reverse-transcribed and amplified using the *pilD*-specific primer sets (PiID-6 and 7) and the 16s rRNA-specific primer set (Cont-1 and Cont-2) as the control, as described in the section of materials and methods. Amplified products were stained with ethidium bromide on agarose gels. Hemolytic activities are expressed as the means and standard errors of values measured in triplicate.

pilD (ACCESSION NO. VV11623)

```
ATAGATACCGACCAGATCACAAAACGGGAGCTTCAGGCTCCCGTTTTTATTTGAGCTGCGA  
  
AATTTTGGGGCAGCATCGCATCTTGTAAGTAACCAGATGTAAATAAAGCGCAAAGAATTTT  
TATATGATACGCATTAT  
AAATCACTCGAGTGATGCTCTGGTGTGATTTCCACTCGTCTACTCCTTGCAATAATCTAGC  
  
CGCAAGCTCGCGGAGCGAATTTGATAGATTAAAGGAAATCATG
```

Figure 11. A putative Fur-binding site in the regulatory region of the *pilD* gene. Sequence analysis was conducted using the program DNAssist. *E. coli* Fur-binding consensus was shown in the upper case. The matching sequences were shown as the gray boxes.

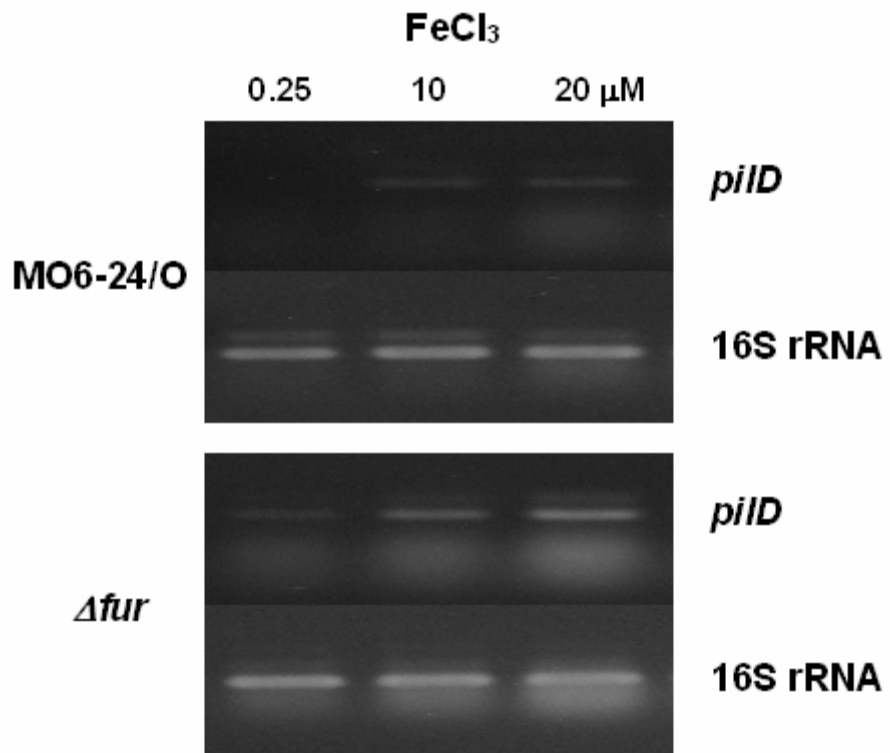


Figure 12. Effect of mutation of the *fur* gene on transcription of the *pilD* gene. *V. vulnificus* MO6-24/O and CMM2303 strains were cultured in HI broth containing 100 μ M dipyriddyI for 12 h in order to adapt it to iron-limited conditions and to reduce intracellular iron stores. These preconditioned MO6-24/O and CMM2303 were inoculated into ID-HI broths containing various concentrations of FC (0.25 to 20.0 μ M), and cultured with vigorous shaking (220 rpm) at 37°C for 6 h. During culture, culture aliquots were withdrawn to monitor bacterial growth, and bacterial pellets were obtained by the centrifugation of the culture aliquots at 10,000 rpm for 5 min to determine *pilD*-mRNA levels. No significant growth difference was observed between the two strains (data not shown). In order to determine *pilD*-mRNA levels, total RNA was isolated from the bacterial pellets obtained 6 h after culture initiation. After treatment with DNase, 10 ng of total RNA was reverse-transcribed and amplified using the *pilD*-specific primer sets (PiID-6 and 7) and the 16s rRNA-specific primer set (Cont-1 and Cont-2) as the control, as described in the section of materials and methods. Amplified products were stained with ethidium bromide on agarose gels.

고 찰

유전자 *vwhA*의 전사 또는 용혈소/세포용해소의 생산은 탄수화물의 농도에 반응하여 유전자들의 발현을 조절하는 cAMP-CRP 복합체[Bang *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2006], 온도와 염분농도에 반응하여 유전자의 발현을 조절하는 ToxRS 신호전달체계(signal transduction system) [Lee *et al.*, 2000], 세균의 밀도에 반응하여 유전자의 발현을 조절하는 LuxS-quorum sensing system[Kim *et al.*, 2003] 등 여러 가지 다양한 전사 조절인자들에 조절되는 것으로 알려져 있다. 이러한 전사조절인자들은 유전자 *vwhA*의 전사를 촉진하거나 억제함으로써 궁극적으로 용혈소/세포용해소의 생산을 조절한다. 즉, 생산된 용혈소/세포용해소의 양은 유전자 *vwhA*의 전사수준과 일치한다.

이러한 전사조절인자들 외에, 유전자 *vwhA*의 전사조절부위에 철농도에 반응하여 유전자들의 발현을 조절하는 전사억제자로서 알려진 Fur와 결합할 수 있는 염기서열이 존재한다는 보고가 있는 후[Yamamoto *et al.*, 1990], 유전자 *vwhA*의 발현이 Fur를 통해 철농도에 의해서도 조절될 가능성이 제기되어 왔다. 그러나 아직까지 철에 의한 유전자 *vwhA*의 전사 조절이나 용혈소/세포용해소의 생산 조절에 관한 연구보고는 없었다. 많은 연구자들은 철이 결핍된 배지에서 보다 철이 풍부한 배지에서 용혈소/세포용해소가 더 풍부하게 생산된다는 것을 경험적으로 알고 있었기 때문에, 철농도에 의해 유전자 *vwhA*의 발현이 조절되고 용혈소/세포용해소의 생산이 조절될 수 있음을 고려하지 않고, 효과적인 용혈소/세포용해소의 생산을 위해 철이 풍부한 배지들을 사용하여 왔다. 본 연구자들 또한 실재로 철이 결핍된 배지에서 보다 철이 풍부한 배지에서 용혈소/세포용해소가 풍부하게 생산됨을 경험적으로 알고 있었기 때문에 여러 연구에서 효과적인 용혈소/세포용해소 생산

을 위해서 철이 풍부한 배지를 사용하였다.

유전자 *vwhA*의 전사조절부위에 **Fur**-결합부위가 존재함에도 불구하고 왜 철이 결핍된 배지에서 보다 철이 풍부한 배지에서 용혈소/세포용해소가 더 풍부하게 생산될까? 이와 같은 모순을 설명하기 위해 본 연구자들은 ‘유전자 *vwhA*의 전사와 용혈소/세포용해소의 세포의 생산 또는 분비가 철에 의해 다르게 조절될 가능성을 있다’는 가설을 세우고 본 연구를 진행하였다.

본 연구를 위해 먼저, 한 패혈증 비브리오균, 즉 **EDL174** 균주에서 유전자 *vwhA*의 전사조절부위에 **Fur**-결합부위가 존재한다는 보고에 기초하여 [Yamamoto *et al.*, 1990], 다른 패혈증 비브리오균에서도 유전자 *vwhA*의 전사조절부위에 **Fur**-결합부위가 존재하는지를 조사하였다. 이를 위해 **CMCP6** 균주와 **YJ106** 균주에서 보고된 *vwhA* 유전자들의 염기서열을 이용하여 대장균 **Fur**-결합부위[Zhang *et al.*, 2005]와 염기서열의 상동성을 비교 분석하였던 바 두 균주의 보고된 유전자 *vwhA*의 전사조절부위에서 대장균 **Fur**-결합부위와 상동성을 보이는 염기서열을 관찰할 수 있었다(Figure 4). 이러한 사실은 유전자 *vwhA*의 전사가 전사억제자인 **Fur**를 통해 철농도에 의해 조절될 가능성을 강력하게 시사한다.

본 연구에서의 결과에 따르면, 유전자 *vwhA*의 전사는 철에 의해 농도 의존적으로 억제되었고(Figure 5), 유전자 *fur*를 돌연변이 시킴으로써 촉진되었다(Figure 8). 또한 철이 풍부한 배지에서도 유전자 *vwhA*의 전사는 완전히 억제되지 않았고 상당한 수준으로 여전히 발현되었다(Figure 5 와 8). 이러한 결과는 유전자 *vwhA*의 전사가 전사억제자인 **Fur**를 통해 철에 의해 억제됨을 분명하게 나타내 주며, 유전자 *vwhA*의 전사조절부위에 존재하는 **Fur**-결합부위가 염기서열로써 뿐만 아니라 기능적으로도 **Fur**-결합부위로서 작용하고 있음을 나타내 준다. 또한 전사억제자인 **Fur**는 유전자 *vwhA*의 전사를 완전히 억제할 수는 없고 오직 전사를 양적으로 조절하는 역할만을 담당하

고 있음을 알 수 있다. 그러나 **electrophoretic mobility shift assay** 또는 **DNA footprinting**과 같은 실험을 통해 전사억제자인 **Fur**와 **Fur-결합부위**의 직접적인 결합을 확인할 필요가 있다.

이에 반해, 용혈소/세포용해소의 세포외 분비는 오히려 철에 의해 농도의존적으로 촉진되었고 또한 유전자 *fur*를 돌연변이 시킴으로써 촉진되었다 (**Figures 5, 6** 와 **8**). 게다가 철이 결핍된 배지에서 억제되었던 용혈소/세포용해소의 세포외 분비는 배양 중간에 첨가된 철에 반응하여 다시 회복되었다(**Figure 7**). 이러한 결과는 철이 전사억제자인 **Fur**를 통해 유전자 *vwhA*의 전사를 억제하는 것과는 반대로 다른 기전을 통해 용혈소/세포용해소의 세포외 분비를 촉진한다는 것을 나타내 준다. 따라서 "유전자 *vwhA*의 전사조절부위에 **Fur-결합부위**가 존재함에도 불구하고 왜 철이 결핍된 배지에서 보다 철이 풍부한 배지에서 용혈소/세포용해소가 더 풍부하게 생산될까?"라는 모순에 대해서는 본 연구결과를 근거로 다음과 같이 설명할 수 있다. (가) 유전자 *vwhA*의 전사는 전사조절억제자인 **Fur**를 통해 철에 의해 일부 억제될지라도 완전히 억제되지 않기 때문에 철이 풍부한 배지에서도 상당한 수준으로 여전히 발현되고 있다. (나) 용혈소/세포용해소의 세포외 분비는 철에 의해 촉진된다.

본 연구에서 얻어진 흥미로운 결과 중 한 가지는 유전자 *vwhA*의 전사가 유전자 *fur*를 돌연변이 시켰음에도 불구하고 여전히 철에 의해 농도의존적으로 억제되었다(**Figure 8**). 이러한 결과는 철이 **Fur** 이외의 아직 밝혀지지 않은 다른 전사조절기전을 통해 유전자 *vwhA*의 전사를 조절하고 있음을 나타낸다. 유전자 *vwhA*의 전사 또는 용혈소/세포용해소의 세포외 생산은 전술한 바와 같이 탄수화물의 농도에 반응하여 유전자의 발현을 조절하는 **cAMP-CRP** 복합체 [Bang *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2006], 온도와 염분농도에 반응하여 유전자의 발현을 조절하는 **ToxRS** 신호

전달체계 (signal transduction system) [Lee *et al.*, 2000], 세균의 밀도에 반응하여 유전자의 발현을 조절하는 LuxS-quorum sensing system [Kim *et al.*, 2003] 등 여러 가지 다양한 전사조절인자들에 조절되는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 전사조절인자들 중에서, 오직 세균세포의 밀도에 반응하는 LuxS-quorum sensing system만이 유전자 *vwhA*의 전사를 억제하는 것으로 알려져 있다. 본 연구 결과에서 확인할 수 있듯이 철은 패혈증 비브리오균의 증식을 촉진한다(Figure 5). 이러한 결과에 기초하여 판단할 때 철은 균 증식을 촉진하여 세균의 밀도를 증가시킴과 더불어 세균의 밀도에 반응하는 LuxS-quorum sensing system의 활성을 증가시킬 수 있으며 이와 같이 활성이 증가된 LuxS-quorum sensing system에 의해 유전자 *vwhA*의 전사가 억제되었을 가능성이 있다. 그러나 아직까지 LuxS-quorum sensing system과 철농도 사이에 관련성은 알려지지 않고 있다. 따라서 철농도에 반응하여 유전자 *vwhA*의 전사를 억제할 수 있는 전자억제인자들을 찾기 위한 지속적인 연구가 필요하다.

많은 그람음성 세균에서 제 II 형 단백질 분비체계가 발견되었고 이 분비체계는 또한 제 IV 형 섬모 생합성과 밀접하게 관련되어 있다. 제 II 형 단백질 분비체계를 통해 분비되는 세포외 단백질들은 전형적으로 양하전을 띠고 있는 leader peptide를 가진 형태로 합성된다. 이 leader peptide는 세포막에 단백질을 고정하는 닻(anchor)과 같은 역할을 하며 단백질이 세포외로 분비되기 전에 반드시 제 IV 형 leader peptidase로 불리는 단백질 분해효소에 의해 분해되어야 한다 [Nunn, 1999]. 제 IV 형 섬모 생합성과 연관된 제 II 형 단백질 분비체계가 패혈증 비브리오균에서도 존재함이 확인되었고 이 체계에 관여하는 제 IV 형 leader peptidase는 PilD로 명명되었다[Paranjpye *et al.*, 1998]. 패혈증 비브리오균에서 유전자 *pilD*를 돌연변이 시킴으로써 용혈소/세포용해소를 비롯한 몇 가지 세포외 단백질이 세포외로 분비되지

않으며 동시에 섬모를 합성하지 못해 마우스를 죽이는 능력 또한 저하된다고 알려져 있다.

본 연구결과에 따르면, 용혈소/세포용해소의 세포의 분비는 철에 의해 농도 의존적으로 촉진되었다(Figure 5, 6 와 7). 또한 유전자 *pilD*를 돌연변이 시킨 경우에는 용혈소/세포용해소의 세포의 분비가 지연되었고 철을 첨가한 경우에도 촉진되지 않았다(Figure 9). 이에 반해, 야생형 유전자 *pilD*를 보완하여 준 경우, 용혈소/세포용해소의 세포의 분비는 야생형 MO6-24/O 균주 수준으로 회복되었다. 게다가 유전자 *pilD*의 전사가 철에 의해 농도 의존적으로 촉진되었으며 유전자 *fur*를 돌연변이 시킴으로써 촉진되었다(Figure 10 와 12). 또한 유전자 *pilD*의 전사조절부위에 Fur-결합부위가 존재하였다(Figure 11). 따라서 이러한 결과들은 용혈소/세포용해소의 세포의 분비가 제 II 형 단백질 분비체계를 통해 분비되고 이 단백질 분비체계의 활성이 철에 의해 농도 의존적으로 증가함으로써 용혈소/세포용해소의 세포의 분비를 촉진하는 것으로 생각된다.

전술한 바와 같이 제 IV 형 섬모 생합성과 제 II 형 단백질 분비체계가 밀접하게 연관되어 있기 때문에 위의 결과들은 섬모의 생합성 또한 철농도에 의해 조절됨을 시사한다. 섬모를 구성하는 단백질 즉 pilin은 leader peptide를 가진 prepillin 형태로 생합성 된다. 이러한 prepillin의 leader peptide는 세포외로 분비되기 전에 분해되어야 한다. 이 leader peptide를 분해하는 효소가 leader peptidase 즉, PilD이다. 그러나 본 연구에서는 철과 섬모의 생합성의 관계를 직접적으로 관찰하지는 않았다. 또한 아직까지 철과 섬모의 생합성의 관계를 밝힌 연구보고도 없다. 따라서 이에 대한 지속적인 연구가 필요하다. 또한 본 연구결과에 따르면 유전자 *pilD*의 전사조절부위에 Fur-결합부위가 존재하였고 유전자 *pilD*의 전사가 유전자 *fur*를 돌연변이 시킴으로써 증가되었다(Figure 11 & 12). 그럼에도 불구하고 유전자 *pilD*의 전사는

철에 의해 농도 의존적으로 촉진되었다(Figure 10). 이러한 결과는 유전자 *pilD*가 철에 의해 전사가 촉진되기는 하나 철과 반응하는 전사억제자인 Fur에 의해서는 전사가 억제되는 유전자 발현의 새로운 모형이 될 수 있음을 나타낸다. 따라서 이에 대한 계속적인 연구가 필요하다.

폐혈증 비브리오균에 대한 생쥐의 감수성은 철에 의해 증가한다. 따라서 철을 과부하 시킨 생쥐는 폐혈증 비브리오균에 대한 동물실험 모델로 널리 사용되어 왔다. 이와 같이 폐혈증 비브리오균에 대한 생쥐의 감수성이 철에 의해 증가되는 이유를 본 연구결과에 의해 부분적으로 설명이 가능하게 되었다. 철은 폐혈증 비브리오균의 증식을 촉진함과 동시에 용혈소/세포용해소의 세포외 분비를 촉진함으로써 폐혈증 비브리오균의 독력을 증가시켰다. 또한 철은 용혈소/세포용해소 외에 다른 독력인자의 생산도 증가시키는 것으로 보고되고 있다. 폐혈증 비브리오균의 독력인자 중 하나인 단백분해효소의 생산도 철에 의해 증가됨이 확인되었다[Shin *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Kawase *et al.*, 2004]. 이러한 현상은 혈청 및 복수 등 사람 체외실험체계(human *ex vivo* experimental systems)를 통해 확인되었고 생쥐의 체내에서도 일어나리라고 생각된다. 따라서 철을 과부하 시킨 생쥐가 폐혈증 비브리오균에 민감한 이유는 철이 폐혈증 비브리오균의 증식을 촉진함과 동시에 용혈소/세포용해소와 단백분해효소 등 폐혈증 비브리오균의 독력인자들의 생산을 촉진하기 때문으로 생각된다.

용혈소/세포용해소는 실험용 생쥐를 죽일 수 있는 결정적인 독력인자는 아닐지라도 폐혈증 비브리오균의 감염증에서 관찰되는 여러 가지 다양한 병태생리학적인 변화를 초래하는 독력인자로 여전히 그 중요성이 강조되어 왔다. 정제된 용혈소/세포용해소는 폐혈증 비브리오균이 생산하는 외독소 중 가장 강력한 외독소로 알려져 왔으며 적은 양만으로도 실험용 생쥐를 죽일 수 있으며 더욱 적은 양으로 적혈구를 용혈 시키고 여러 가지 세포들을 과

괴할 수 있다[Gray & Kreger, 1985 & 1987; Rhee *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2004]. 실험용 생쥐에 국소적 또는 전신적으로 주사된 용혈소/세포용해소는 살아있는 패혈증 비브리오균을 주사하였을 때와 같은 패혈증의 전형적인 임상적 또는 병리학적인 변화들을 유발한다[Gray & Kreger, 1987; Rhee *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1996]. 또한 용혈소/세포용해소는 사람의 체액 즉, 혈청이나 복수에서 적은 양으로 생산되거나 쉽게 불활성화 되기는 하나 분명하게 생산된다[Lee *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2005]. 용혈소/세포용해소는 아주 적은 양으로 혈관내피세포에 작용하여 혈관을 확장시키며[Lee *et al.*, 2004; Kook *et al.*, 1996], TNF- α , IL-1, IL-6 등을 비롯한 항염증성 사이토카인들의 분비를 촉진시키며[Park *et al.*, 1996 & 1998], 혈관내피세포에 작용하여 과산화물의 생성을 증가시켜 세포고사를 유발한다[Kwon *et al.*, 2001]. 더군다나, 용혈소/세포용해소를 생산하지 못하는 돌연변이 균주를 생쥐의 위장관에 투여하였을 때에는 약간의 울혈 이외에 별다른 변화를 보이지 않으나 용혈소/세포용해소를 생산하는 야생형 균주를 투여하였을 때에는 점막 및 점막하 울혈, 용모의 소실, 상피세포의 탈락 등 심함 괴사성 장염을 일으킨다[Fan *et al.*, 2000]. 이러한 정제된 용혈소/세포용해소의 다양한 활성에도 불구하고 용혈소/세포용해소를 생산하지 못하는 돌연변이 균주와 야생형 균주 사이에 생쥐를 죽일 수 있는 능력에 차이가 없다는 보고가 있는 후 용혈소/세포용해소의 병인론적 역할에 대한 많은 의심들이 있어 왔다[Fan *et al.*, 2001; Wright & Morris, 1991]. 따라서 아직 밝혀지지 않은 VvhA의 병인론적 역할을 밝히기 위해서는 기존의 연구방법이나 개념을 뛰어넘은 새로운 패러다임이 필요하다고 생각된다.

본 연구를 통해 밝혀진 사실 즉, 용혈소/세포용해소의 세포의 분비가 철에 의해 촉진된다는 사실은 패혈증 비브리오균 감염증의 진행과정에서 용혈소/세포용해소에 의해 초래되는 병태생리학적 변화가 점점 악화되는 악성

순환 고리(vicious cycle)를 형성할 수 있음을 시사한다. 패혈증 비브리오균은 혈청 또는 조직 내 철농도가 높아진 환자들 잘 감염시킨다[Brennt *et al.*, 1991; Bullen *et al.*, 1991; Hor *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 1981; Hor *et al.*, 1999; Aso *et al.*, 2002]. 일단 사람 체내로 들어온 패혈증 비브리오균은 비록 적은 양이지만 용혈소/세포용해소를 생산하여 적혈구를 비롯한 여러 가지 세포를 파괴하고 헤모글로빈을 비롯한 세포내 철을 유리시킬 수 있다 [Lee *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2005]. 또한 용혈소/세포용해소는 TNF- α 와 같은 항염증성 매개물질들의 생산을 촉진함으로써 세포를 파괴하고 세포내 철을 유리시킬 수도 있으며[Park *et al.*, 1996 & 1998] 과산화물의 생성을 촉진함으로써 세포를 죽일 수 있으며 궁극적으로 세포내 철을 유리시킬 수도 있다[Kwon *et al.*, 2001]. 본 연구결과에 의하면, 철은 용혈소/세포용해소의 세포외 생산 또는 분비를 촉진한다. 따라서 철에 의해 생성이 증가된 용혈소/세포용해소는 더욱 더 많은 세포를 파괴하고 세포내 철을 유리시켜 혈청 또는 조직 내 철농도를 급격하게 상승시킬 수 있다. 이렇게 증가된 혈청 또는 조직 내 철은 패혈증 비브리오균의 증식을 더욱 촉진하고 용혈소/세포용해소의 세포외 분비를 더욱 촉진할 수 있다. 이러한 악성 순환은 패혈증 비브리오균 감염증에서 병태생리학적 변화를 점점 더 악화시킬 수 있다. 따라서 이러한 악성 순환 고리의 형성은 다른 세균에 의한 감염증 보다 패혈증 비브리오균에 의한 감염증의 진행이 매우 빠르고 전격적이며 치명적인 진행을 보이는 이유가 될 수 있다(Figure 13). 더욱이 이와 같은 악성 순환 고리 형성은 다음의 두 가지 이유에서 더욱 가속화될 수 있다. (가) 패혈증 비브리오균은 다양한 철흡수기전을 가지고 있음에도 불구하고 증식을 위해 높은 농도의 가용철(available iron)을 필요로 하는 호철성 세균(ferrophilic bacterium)이다. (나) 패혈증 비브리오균은 혈청을 비롯한 세포외액에 주로 존재하는 트랜스페린에 결합된 철보다는 헤모글로빈을 비롯한 세포 내에서

유리된 철이나 기타 트랜스페린에 결합되지 않은 철을 더 쉽게 이용할 수 있다[in press].

일반적으로 단백질의 생합성은 해당 유전자의 전사조절을 통해 조절된다. 즉, 생성된 단백질의 양은 그 단백질을 암호화하는 유전자의 전사수준을 반영한다. 이러한 일반적 개념은 패혈증 비브리오균의 단백질 생합성에서도 적용된다. 그러나 본 연구에서 관찰된 용혈소/세포용해소의 생산은 이러한 일반적 개념을 벗어나 있다. 또한 철이 용혈소/세포용해소의 생산을 촉진한다는 사실 또한 매우 예외적이다. 왜냐하면 다른 비브리오 속 세균들에서 생산되는 용혈소들은 모두 다 철에 의해 생산이 억제된다[Wong & Lee, 1994; Stoebner & Payne, 1988; Dai *et al.*, 1992]. 콜레라균의 용혈소(HlyA)의 경우 해당 유전자(*hlyA*)의 염기서열은 패혈증 비브리오균의 용혈소/세포용해소를 암호화하는 유전자 *vwhA*의 염기서열과 상당히 높은 상동성을 보임에도 불구하고 HlyA의 생성은 철에 의해 억제된다[Yamamoto *et al.*, 1990]. 장염비브리오균의 용혈소(thermostable direct hemolysin) 생산도 철 농도에 의해 억제된다[Wong *et al.*, 1994; Dai *et al.*, 1992].

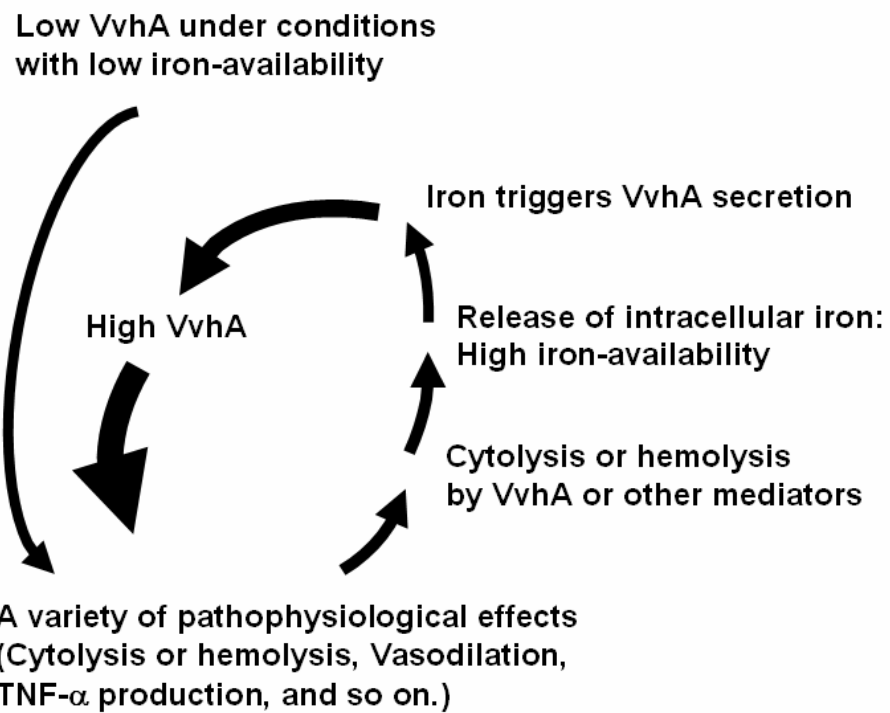


Figure 13. Theoretical vicious cycle formation of VvhA production by iron.

결 론

본 연구를 통하여 철농도에 따른 패혈증 비브리오균의 용혈소/세포용해소 생산은 유전자의 전사단계와 단백질의 세포외 분비 단계에서 다르게 조절됨을 알 수 있었다. 유전자 *vwhA*의 전사는 전사억제자인 **Fur**와 아직 밝혀지지 않은 전사억제기전을 통해 철에 의해 억제되는 반면 용혈소/세포용해소의 세포외 분비는 **PilD**-매개성 제 II 형 단백질 분비체계를 통해 철에 의해 촉진되었다. 이와 같은 철과 용혈소/세포용해소의 세포외 생산의 관계는 패혈증 비브리오균 감염증에서 관찰되는 여러 가지 병태생리학적인 변화를 더욱 악화시키는 악성 순환 고리가 형성할 수 있음을 나타낸다.

참고문헌

Arnow LE. (1937) Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. *J Biol Chem* **118:531-537.**

Aso H, Miyoshi S, Nakao H, et al. (2002) Induction of an outer membrane protein of 78 kDa in *Vibrio vulnificus* cultured in the presence of desferrioxamine B under iron-limiting conditions. *FEMS Microbiol Lett* **212:65-70.**

Bang YB, Lee SE, Rhee JH, et al. (1999) Evidence that expression of the *Vibrio vulnificus* hemolysin gene is dependent on cyclic AMP and cyclic AMP receptor protein. *J Bacteriol* **181:7639-7642.**

Brennt CE, Wright AC, Dutta SK, et al. (1991) Growth of *Vibrio vulnificus* in serum from alcoholics: association with high transferring iron saturation. *J Infect Dis* **164:1030-1032.**

Bullen JJ, Sparding PB, Ward CG, et al. (1991) Hemochromatosis, iron and septicemia caused by *Vibrio vulnificus*. *Arch Intern Med* **151:1606-1609.**

Choi HK, Park NY, Kim DI, et al. (2002) Promotor analysis and regulatory characteristics of *vvhBA* encoding cytolytic hemolysin of *Vibrio vulnificus*. *J Biol Chem* **277:47292-47299.**

Choi MH, Park RY, Sun HY, et al. (2006) Suppression and inactivation of *Vibrio vulnificus* hemolysin in cirrhotic ascites, a human *ex vivo* experimental system. *FEMS Immunol Med Microbiol* **47:226-232**.

Chuang YC, Yuan CY, Liu CY, et al. (1992) *Vibrio vulnificus* infection in Taiwan: Report of 28 cases and review of clinical manifestations and treatment. *Clin Infect Dis* **15:271-276**.

Ditta G, Stanfield DC, Helinski DR. (1980) Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* **77:7347-7351**.

Fan JJ, Shao CP, Ho YC, et al. (2001) Isolation and characterization of a *Vibrio vulnificus* mutant deficient in both extracellular metalloprotease and cytolysin. *Infect Immun* **69:5943-5948**.

Gray LD, Kreger AS. (1985) Purification and characterization of an extracellular cytolysin produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **48:62-72**.

Gray LD, Kreger AS. (1987) Mouse skin damage caused by cytolysin from *Vibrio vulnificus* and by *V. vulnificus* infection. *J Infect Dis* **155:236-241**.

Gulig PA, Bourdage KL and Starks AM. (2005) Molecular pathogenesis of

Vibrio vulnificus. **J Microbiol** **43:118-131**.

Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN. (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. **J Bacteriol** **172:6568-6572**.

Hor LI, Chang YK, Chang CC, et al. (2000) Mechanisms of high susceptibility of iron-overloaded mouse to *Vibrio vulnificus* infection. **Microbiol Immunol** **44:871-878**.

Hor LI, Chang TT, Wang ST. (1999) Survival of *Vibrio vulnificus* in whole blood from patients with chronic liver diseases: association with phagocytosis by neutrophils and serum ferritin levels. **J Infect Dis** **179:275-278**.

Kawase T, Miyoshi S, Sultan Z, et al. (2004) Regulation system of protease production in *Vibrio vulnificus*. **FEMS Microbiol Lett** **240:55-59**.

Kim SY, Lee SE, Kim YR, et al. (2003) Regulation of *Vibrio vulnificus* virulence by the LuxS quorum-sensing system. **Mol Microbiol** **48:1647-1664**.

Kim CM, Park RY, Park JH, et al. (2006) *Vibrio vulnificus* vulnibactin, but not metalloprotease VvpE, is essentially required for iron-uptake from human holotransferrin. **Biol Pharm Bull** **29: 911-918**.

Kook H, Lee SE, Baik YH, et al. (1996) *Vibrio vulnificus* hemolysin dilates rat thoracic aorta by activating guanylate cyclase. *Life Sci* **59:PL41-PL47**.

Kwon KB, Yang JY, Ryu DG, et al. (2001) *Vibrio vulnificus* cytolysin induces superoxide anion-initiated apoptotic signaling pathway in human ECV304 cells. *J Biol Chem* **276:47518-47523**.

Lee SE, Kim SY, Kim SJ, et al. (1998) Direct identification of *Vibrio vulnificus* in clinical specimens by nested PCR. *J Clin Microbiol* **36:2287-2292**.

Lee SE, Ryu PY, Kim SY, et al. (2004) Production of *Vibrio vulnificus* hemolysin *in vivo* and its pathogenic significance. *Biochem Biophys Res Comm* **324:86-91**.

Lee SE, Shin SH, Kim SY, et al. (2000) *Vibrio vulnificus* has the transmembrane transcription activator ToxRS stimulating the expression of the hemolysin gene *vvhA*. *J Bacteriol* **182:3405-3415**.

Leong SA, Neilands JB. (1982) Siderophore production by phytopathogenic microbial species. *Arch Biochem Biophys* **218:351-359**.

Linkous DA, Oliver JD. (1999) Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Lett* **174:207-214**.

Litwin CM, Calderwood SB. (1993) Cloning and genetic analysis of the

Vibrio vulnificus fur gene and construction of a *fur* mutant by *in vivo* marker exchange. ***J Bacteriol* 175:706-715.**

Litwin CM and Byrne BL. (1998) Cloning and characterization of an outer membrane protein of *Vibrio vulnificus* required for heme utilization: regulation of expression and determination of the gene sequence. ***Infect Immun* 66:3134-3141.**

Litwin CM, Rayback TW and Skinner J. (1996) Role of catechol siderophore synthesis in *Vibrio vulnificus* virulence. ***Infect Immun* 64:2834-2838.**

McGee K, Horstedt P, Milton DL. (1996) Identification and characterization of additional flagellin genes from *Vibrio anguillarum*. ***J Bacteriol* 178:5188-5198.**

Miller JH. (1992) A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. ***Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.***

Miller V, Mekalanos JJ. (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. ***J Bacteriol* 170:2575-2583.**

Nunn D. (1999) Bacterial type II protein export and pilus biogenesis: more than just homologies? *Trends in Cell Biol* **9:402-408**.

Paranjpye RN, Lara JC, Pepe JC, et al. (1998) The type IV leader peptide/*N*-methyltransferase of *Vibrio vulnificus* controls factors required for adherence to Hep-2 cells and virulence in iron-overloaded mice. *Infect Immun* **66:5659-5668**.

Park SD, Kim JS, Cha SH. (1998) Changes of serum cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6) in toxemic mice induced by *Vibrio vulnificus* cytotoxin. *Korean J Dermatol* **36:23-29**.

Park JH, Park SD. (1996) The therapeutic effect of anti-inflammatory agents on the lethal effect of toxemia evoked by *Vibrio vulnificus* cytotoxin. *Korean J Dermatol* **34:561-571**.

Park JW, Ma SN, Song ES, et al. (1996) Pulmonary damage by *Vibrio vulnificus* cytotoxin. *Infect Immun* **64:2873-2876**.

Park SD, Shon HS and Joh NJ. (1991) *Vibrio vulnificus* septicemia in Korea: clinical and epidemiologic findings in seventy patients. *J Am Acad Dermatol* **24:397-403**.

Rhee JH, Lee SE, Kwon HC, et al. (1994) A study on the pathogenic activity of the protease and hemolysin produced by *Vibrio vulnificus*. I.

Biological properties of the hemolysin produced by *Vibrio vulnificus*. **J Kor Soc Microbiol** 29:381-398.

Shin SH, Sun HY, Choi MH, et al. (2005) Inactivation of *Vibrio vulnificus* hemolysin by oligomerization but not proteolysis. **Biol Pharm Bull** 28:1294-1297.

Shin SH, Sun HY, Park RY, et al. (2005) *Vibrio vulnificus* metalloprotease VvpE has no direct effect on the iron-assimilation from human holotransferrin. **FEMS Microbiol Lett** 247:221-229.

Staskawicz B, Dahlbeck D, Keen K, Napoli C. (1987) Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. **J Bacteriol** 169:5789-5794.

Storm MS, Paranjpye RN. (2000) Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. **Microbes Infect** 2:177-188.

Tacket CO, Brenner F and Blake PA. (1984) Clinical features and an epidemiological study of *Vibrio vulnificus* infections. **J Infect Dis** 149:558-561.

Tanabe T, Naka A, Aso H, et al. (2005) A novel aerobactin utilization cluster in *Vibrio vulnificus* with a gene involved in the transcription regulation of the *iutA* homologue. **Microbiol Immunol** 49:823-834.

Webster ACD and Litwin CM. (2000) Cloning and characterization of *vuuA*, a gene encoding the *Vibrio vulnificus* ferric vulnibactin receptor. *Infect Immun* **68:526-534**.

Wright AC, Morris JG Jr. (1991) The extracellular cytolysin of *Vibrio vulnificus*: inactivation and relationship to virulence to mice. *Infect Immun* **59:191-197**.

Wright AC, Simpson LM, Oliver JD. (1981) Role of iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections. *Infect Immun* **34:503-507**.

Yamamoto K, Wright AC, Kaper JB, et al. (1990) The cytolysin gene of *Vibrio vulnificus*: sequence and relationship to the *Vibrio cholerae* El Tor hemolysin gene. *Infect Immun* **58:2706-2709**.

Zhang Z, Gosset G, Barabote R, et al. (2005) Functional interactions between the carbon and iron utilization regulators, Crp and Fur, in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187:980-990**.

한글초록

철에 의한 패혈증 비브리오균 용혈소/세포용해소 생산의 조절

이 준 영

(지도교수: 류 재 원)

조선대학교 대학원 의학과

패혈증 비브리오균은 호염성 그람음성 세균으로써 바닷물 주로 강하구에 서식하며 감수성이 있는 환자들에게 괴사성 근막염을 비롯한 치명적인 패혈증을 유발하는 기회감염세균이다. 혈청 또는 조직내 철농도의 상승은 비브리오 패혈증을 유발하는 가장 유력한 숙주인자로 알려져 있다. 용혈소/세포용해소(VvhA)는 패혈증 비브리오균이 생산하는 가장 강력한 외독소이며 다양한 생물학적 활성을 나타낸다. 그러나, 용혈소/세포용해소를 암호화하는 유전자(vvhA)의 조절부위에는 철농도에 따라 유전자의 발현을 조절하는 전사억제자인 Fur와 결합할 수 있는 염기서열을 가지고 있음에도 불구하고 용혈소/세포용해소는 철이 낮은 경우보다 철이 높은 경우에 더 많이 생산된다. 본 연구에서는 철에 의한 vvhA 유전자발현과 용혈소/세포용해소 세포의 생산 사이에 존재하는 이러한 모순점을 확인하고 그 기전을 밝히고자 하였다. vvhA 유전자의 발현은 철에 의해 용량 의존적으로 억제되었고 전사억제자인 Fur를 암호화하는 유전자를 돌연변이시킴으로써 억제가 해제되었다. 이에 반해, 용혈소/세포용해소 세포의 생산은 철에 의해 용량 의존적으로 촉진되었다. 또한 전사억제자인 Fur를 암호화하는 유전자를 돌연변이 시켰을 때 용혈소/세포용해소의 세포의 생산은 촉진되었다. 용혈소/세포용해소 세포의 생산은 제 II 형 단백질 분비체계의 구성요소 중 하나인 제 IV 형 leader

peptidase/N-methyltransferase (PilD) 효소를 암호화하는 유전자(*pilD*)를 돌연변이 시켰을 때 감소되었다. 또한 *pilD* 유전자를 플라스미드를 통해 다시 복원하였을 때 용혈소/세포용해소 세포의 생산은 회복되었다. *pilD* 유전자의 발현은 철에 의해 용량 의존적으로 촉진되었으며 전사억제자인 Fur를 암호화하는 유전자를 돌연변이 시켰을 때 *pilD* 유전자의 발현은 촉진되었다. 이러한 결과는 철이 전사억제자인 Fur를 통해 *vwhA* 유전자의 발현은 억제하나 제 II 형 단백질 분비체계의 활성화를 통해 용혈소/세포용해소 세포의 생산을 촉진함을 나타낸다. 따라서 상승된 혈청 또는 조직 내 철농도는 궁극적으로 용혈소 또는 세포용해소의 생산을 촉진함으로써 비브리오 패혈증의 병태생리학적인 변화를 악화시킬 수 있다.

핵심어: 패혈증 비브리오균, 용혈소/세포용해소, 철, Fur, 제 II 형 단백질 분비체계

감사의 글

먼저 이렇게 변화할 수 있게 도와주신 제 주위에 모든 분들께 감사의 말씀을 드립니다.

무엇보다도 늘 잘 챙겨주시고 실수 투성이인 저에게 가르침을 주신 하상호 교수님, 부족한 제가 질문할 때마다 항상 자상하게 대답해 주시는 유재원 교수님 그리고 젠틀한 웃음과 여유로 항상 남자답게 살라하시는 이상홍 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 논문이 완성되기까지 싫은 소리 한마디 안하며 실험과 논문작성을 도와주신 신성희 형님께도 진심으로 감사의 맘을 전합니다.

마지막으로 옆에서 행복한 가정을 유지할 수 있게 해준 내 마누라, 김현정 그리고 나랑 꼭 닮은 내 딸 윤선이, 늘 저를 믿어주시고 항상 투자를 아낌없이 해주신 어머니, 아버지, 장인 장모님께 마음 깊이 감사 드리고 부족하지만 대학원 생활의 마지막 결실인 이 논문을 바치고 싶습니다.

항상 지금까지 해왔던 것처럼 주위에 모든 분들 실망시키지 않고 후회 없는 삶을 살도록 하루 하루 노력하는 사람이 되겠습니다. 감사합니다.

2006년 12월

이준영 올림

저작물 이용 허락서

학 과	의학과	학 번	20057460	과 정	박사
성 명	한글: 이 준 영 한문: 李 浚 瑛 영문: Lee, Jun-Young				
주 소	광주 북구 용봉동 쌍용아파트 106동 1104호				
연락처	062-220-3147				
논문제목	한글 : 철에 의한 패혈증 비브리오팀 용혈소/세포용해소 생산의 조절 영어 : Regulation of <i>Vibrio vulnificus</i> Hemolysin/Cytolysin Production by Iron				
<p>본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.</p> <p style="text-align: center;">- 다 음 -</p> <ol style="list-style-type: none">1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함. <p style="text-align: center;">동의여부 : 동의(<input checked="" type="radio"/>) 반대(<input type="radio"/>)</p> <p style="text-align: center;">2007 년 2 월 일</p> <p style="text-align: center;">저작자: 이 준 영 (서명 또는 인)</p> <p style="text-align: center;">조선대학교 총장 귀하</p>					