

*Salmonella typhimurium*의 금속이온에 대한 유전적 반응

정주리 · 박경량 · 고상균* · 박용근** · 이인수†

한남대학교 미생물학과
*대전대학교 미생물학과
**고려대학교 생명공학원

Genetic Responses to Metal Ion in *Salmonella typhimurium*

Ju-Ri Jung, Kyeong-Ryang Park, Sang-Kyun Koh*, Yong-Keun Park** and In-Soo Lee†

Dept. of Microbiology, Han Nam University, Taejon 300-791, Korea

*Dept. of Microbiology, Taejon University, Taejon 300-716, Korea

**Graduated School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract

Metal ion-induced and its regulatory genes were screened in virulent *Salmonella typhimurium* UK1 and tested cross-regulation with various stresses. Using the technique of P22-MudJ(Km, lacZ)-directed lacZ operon fusion, LF40 *cuiA*::MudJ and LF153 *cuiD*::MudJ which were induced by copper were selected. *cuiA* and *cuiD* were determined anaerobic copper inducible and copper tolerance response gene, respectively. Also *cuiA* and *cuiD* locus were determined at 81 and 8min, respectively, on *Salmonella* Genetic Map. The two regulators were identified as *cuaR*, and *cudR*, which controls *cuiA* and *cuiD*, respectively. *cuaR* and *cudR* appeared as negative regulators because the expression of *cuiA-lacZ* and *cuiD-lacZ* were increased. Copper adapted UK1 showed high resistance to H₂O₂, but *cuiD* did not. The product of the *cudR* locus was responsible for decreasing the tolerance to copper and H₂O₂. Furthermore *cuiA* and *cuiD* locus were found to be part of a regulon under the control of a trans-acting regulators, *rpoS*, *oxyR* and *relA*. Therefore, the results suggest CTR participate with oxidative stress on *Salmonella*.

Key words : *salmonella*, copper, stress, oxidative

서 론

*Salmonella typhimurium*은 병원성 세균으로서 생활사 동안 다양한 환경 stress를 경험하며, 더 나아가 변화된 환경을 감지하고 적절하게 반응함으로써 자연계 및 숙주생명체 내에서 그들의 생명현상을 유지한다. 이러한 외부 환경 stress 요인들은 자외선 조사, 영양분의 결핍, 산소배양조건에서 무산소 상태로의 전이, 열충격 및 pH의 변동 등이 그

주요한 stress 라고 할 수 있으며, 이에 대한 연구는 *Escherichia coli*와 *S. typhimurium*을 중심으로 주로 연구되어 왔다^{12,16,19,20,22,24}. 특히 Gottesman은¹⁶ 이런 다양한 환경 stress에 반응하는 현상들을 하나의 유전자군(regulon)으로 묶어서 유전적 및 생리적 변화와 그 조절기전을 밝히고 있다. *Salmonella*의 환경 stress에 관련한 많은 연구결과에도 불구하고 지금까지 밝혀지지 않고 있는 분야중 하나가 세포 외부의 금속이온에 대한 세균의 유전적 반응성에 대한

† Corresponding author

것이다. 일반적으로 금속이온들은 미생물을 포함한 생명체들의 성장저해, 세포형태의 변형 및 물질대사에 관여하는 효소반응의 저해 등의 강한 독성을 나타낸다고 알려져 있다^{4,5,7,9,17}). 특히 중금속 폐수에 의한 카드뮴 및 수은장애 등은 널리 알려진 사실이며²⁹), 이들 금속원소들 이외에 산화-환원 반응에 필수효소의 보조인자 또는 보결 분자단들을 구성하는 금속원소들 역시 높은 농도에서는 독성을 나타내는 것으로 알려져 있고⁸), 현재 이러한 금속원소들을 대상으로 금속이온과 효소활성도 및 무독화와 관련한 연구들이 진행되고 있다. 최근에 Thorvaldsen 등은³²) beta-galactosidase (*lacZ*) report 유전자를 이용하여 *Candida glabrata*에서 copper와 관련한 AMT1 metalloregulatory trans-acting factor를 보고하여 금속이온들에 발현하는 유전자들의 특성에 관련한 연구를 수행하였다. 또한 미생물들의 병원성과 연관하여 *Corynebacteria diphtheriae*에서 diphtheria toxin의 Tox operon은 *dtxR* 유전자에 의하여 조절되는데, 이러한 유전자는 Fe²⁺와 Ni²⁺ 등의 금속이온의 존재하에서 활성화되는 metalloregulatory 기능을 소유하고 있으며³¹), 그 외에 *Salmonella*의 병원성의 발현은 Fe²⁺와 밀접한 관계가 있음이 보고되었고¹¹), copper와 zinc가 cofactor로 작용하는 *S. typhimurium*의 [Cu, Zn]-superoxide dismutase 돌연변이체는 포유동물의 간과 이차에서 각각 생존율의 감소가 나타나, *sodC*는 oxygen radical에 관련한 숙주 방어기전의 극복에 관련한 유전자로서 최근에 알려졌다¹⁰). 그러므로 금속이온은 세균의 성장 및 형질발현에 주요한 기능을 소유하며, 또한 세균의 병원성에 대한 signal의 기능도 갖는 것으로 여겨진다. 일반적으로 copper는 호기성 호흡을 수행하는 미생물들의 성장 및 생리적 활성화에 관여하는 필수 미량원소로 알려져 있으나¹⁵), 이같은 금속이온들도 과량으로 존재할 경우에는 세포를 치사한다. 따라서 생명체들은 금속이온들을 효과적으로 이용할 수 있도록 진화되어 왔다고 할 수 있다^{6,8,13,27,33}). copper가 소유한 고유의 기능은 세균뿐만 아니라 인간에게도 영향성을 갖는데, copper의 결핍 또는 감수성과 관련한 Wilson's disease 와 Menkes' disease는 그 좋은 예가 된다⁷). 또한 copper와 iron 등의 금속이온들은 간접적으로 산소의 환원을 촉매하는데, 그 결과 free radical과 같은 돌연변이원이 세포내에 생성되며, 결과적으로 DNA를 손상시키는 원인이 된다^{28,33}). 그러므로 금속이온들에 대한 세포의 유전적 반응에 관련한 연구는

다양한 금속이온들로 발생하는 생리적 현상의 이해에 도움을 줄 수 있다. 따라서 본 연구는 병원성 *Salmonella*를 대상으로 금속이온에 발현하는 유전자의 탐색과 유전적 반응을 조사한 결과, 구리에 특징적으로 발현하는 *cuiA*와 *cuiD* 유전자를 발견하였으며, 이 유전자들의 유전자와 특성, 조절유전자의 분리 그리고 다른 조절유전자들과의 상호 조절연계성에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 세균배양 배지

본 실험에 사용한 세균은 병원성 *Salmonella typhimurium* UK1이며, UK1을 대상으로 *MudJ*(Km, *lacZ*) 형질도입을 수행하여 형성된 돌연변이체들과 그 조절관계를 확인하기 위한 균주들은 Table 1에 표기하였다. 세균배양을 위한 증균배지는 Luria Bertani(LB)를 사용하였으며, 최소배지(salt glucose, SG)는 Vogel과 Bonner의³⁵) E 배지에 최종 농도가 0.4%가 되도록 glucose를 첨가하였고²⁰), 고형배지는 1.5% agar를 첨가하여 준비하였다. *MudJ*나 Tn10 균주 그리고 항생제에 저항성을 소유한 균주들은 ampicillin (50ug/ml), kanamycin (50ug/ml) 및 tetracycline (20 ug/ml) 등이 함유된 배지상에서 증균하였다. 무산소배양은 파라핀 오일을 배양액에 중층하는 방법³⁰) 사용하여 수행하였다.

돌연변이체의 준비

돌연변이 작업은 P22 HT 105/1-int를 이용한 Holly와 Foster¹⁸) 그리고 Aliabadi 등의^{1,2}) 형질도입 방법을 사용하였으며, 금속이온 유도 유전자들은 약 40,000개의 *MudJ* 형질도입체들을 대상으로 Cu, Mn, Co, Mg, Zn, Ni 및 Cr 등의 금속이온들이 각각 아치농도로 존재하는 MacConkey 배지상에서 *LacZ*의 발현 여부로 분리하였다(Fig. 1). 이때 사용한 금속이온들은 CuCl₂, MnCl₂, CoCl₂, MgCl₂, ZnCl₂, NiCl₂ 및 CrCl₃ 이었다. 금속이온들에 대한 minimal inhibitory concentration(MIC)은 금속이온이 농도별로 함유된 최소배지에 전배양액을 1/100의 농도로 접종하여 하루 밤 생장시키고 육안으로 세균의 생장 유무를 판단하여 치사농도를 구하였다. 조절유전자의 탐색은 돌연변이체들을 대상으로 *S. typhimurium* UK1의 Tn10 pool과 형질도입

Table 1. Bacterial strains

Strain	Source	Relevant genotype	Reference/Source
SF530(UK1)		virulent	Dr. J. Foster
JF2690	UK1	<i>rpoS</i> ::Ap	Dr. J. Foster
SF648	SL1344	<i>rpsL hisG colicin+</i> Xyl- <i>relA</i> ::Tn10 virulent	Dr. J. Foster
TT7542	LT2	<i>oxyR</i> ::Tn10	Dr. M. Spector
LF40	UK1	<i>cuiA</i> ::MudJ	P22(SF261)×UK1
LF54	UK1	<i>cuiA</i> ::MudJ <i>zxx</i> ::Tn10 90% linked to <i>cuiA</i>	Tn10 pool(LF40)×UK1
LF62	UK1	<i>zxx</i> ::Tn10 90% linked to <i>cuiA</i>	P22(LF54)×UK1
LF153	UK1	<i>cuiD</i> ::MudJ	P22(SF261)×UK1
LF171	UK1	<i>zxx</i> ::Tn10 100% linked to <i>cuiD</i>	Tn10 pool(LF153)×UK1
LF172	UK1	<i>cuiA</i> ::MudJ <i>oxyR</i> ::Tn10	P22(TT7542)×LF40
LF173	UK1	<i>cuiA</i> ::MudJ <i>rpoS</i> ::Ap ^r	P22(JF2690)×LF40
LF175	UK1	<i>cuiD</i> ::MudJ <i>oxyR</i> ::Tn10	P22(TT7542)×LF153
LF176	UK1	<i>cuiD</i> ::MudJ <i>rpoS</i> ::Ap ^r	P22(LF153)×JF2690
LF178	UK1	<i>cuiA</i> ::MudJ <i>relA</i> ::Tn10	P22(SLF32)×LF40
LF179	UK1	<i>cuiD</i> ::MudJ <i>relA</i> ::Tn10	P22(SLF32)×LF153
LF186	UK1	<i>cuiD</i> ::MudJ <i>zxx</i> ::Tn10	Tn10 pool(UK1)×LF153
LF190	UK1	<i>cuiA</i> ::MudJ <i>zxx</i> ::Tn10	Tn10 pool(UK1)×LF40
LF194	UK1	<i>cudR</i> ::Tn10	P22(LF186)×UK1
LF257	UK1	<i>cuiD</i> ::MudJ pLJ4(<i>cuiD</i> clone)	Kredrich pool×LF153
SLF32	UK1	<i>relA</i> ::Tn10	Dr. J. Foster
SF464	SF1	pNK972 transposase(Ap ^r)	Dr. J. Foster
SF463	SF1	mini Tn10tet(Tet ^r)	Dr. J. Foster

Isolation of metal ion induced mutants

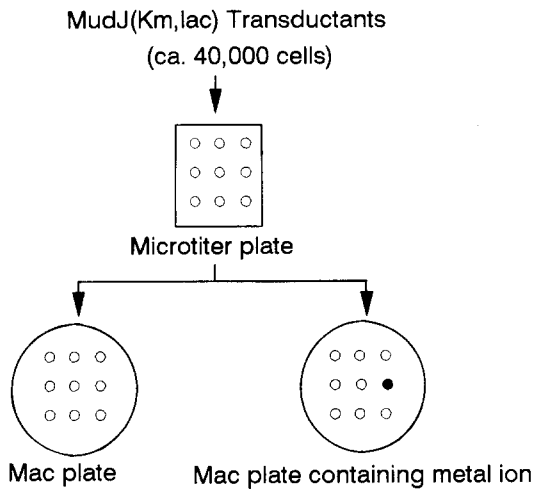


Fig. 1. The screening strategy for isolation of metal-ion induced mutants. Transductants were cultured in microtiter plates at 37°C for overnight and then inoculated on MacConky plate which was contained metal ion. Solid circle was showed red color on MacConkey plate containing metal ion.

하여 copper가 함유된 MacConkey 평판배지에 도말하여, 본래 돌연변이체가 소유한 형질(붉은색 콜로니)이 억제되거나 증가되는 콜로니를 선별하는 방법으로 진행하였다.

돌연변이 균주의 Tn10tet pool 제조

MudJ가 삽입된 위치에 Tn10을 삽입 또는 치환하기 위하여 필수적으로 사용되는 돌연변이체들의 mini Tn10 pool은 Aliabadi 등의^{1,2)} 방법을 변형하여 사용하였다. transposase 유전자를 갖는 플라스미드 pNK972를 소유한 SF 464의 highly transducing phage를 사용하여 MudJ 돌연변이체에 플라스미드를 형질도입하고, 이 균주에 mini Tn 10tet을 함유한 SF463의 phage와 형질도입하여 생성된 콜로니들을 5ml의 LB broth에 현탁(약 10¹⁰cells/ml)하였다. 현탁액 전량을 500ml의 LB broth에 접종하여 1시간 진탕배양(37C, 250rpm)하고, 여기에 1ml의 HT SF1 phage 용액을 첨가하여 20시간 진탕배양하였다. 배양후 1/100의 농도로 chloroform을 넣고 현탁하여 세균세포들을 파쇄한 다음, 원심분리(3,000rpm, 30min)하여 각 돌연변이체들의 Tn10tet pool을 제조하였다.

유전자의 mapping과 발현

MudJ가 삽입된 유전좌의 확인은 Tn10이 MudJ에 인접

하거나 또는 *MudJ* 내부에 삽입된 균주를 대상으로 Youderian 등³⁶⁾ 그리고 Benson과 Goldman의³⁾ 방법을 변형하여 수행하였다. *MudJ*의 인접한 위치에 Tn10이 삽입된 균주의 확보는 각각의 돌연변이체 Tn10 pool과 UK1의 형질도입을 통하여 kanamycin과 tetracycline 모두에 저항성을 소유한 콜로니들을 선별하고, 선별된 균주들을 대상으로 highly transducing phage를 제조한 다음, 이 phage와 UK1의 형질도입을 수행하여 *MudJ*와 Tn10이 약 90% 이상 연관된 균주를 선택함으로써 이루어졌다. 선별된 *MudJ* 인접 Tn10 또는 *MudJ*내 Tn10 균주의 배양액 1ml을 원심분리(12,000rpm, 2min)하고 세균세포들을 E 완충용액으로 세척한 다음 1ml의 동일한 완충용액에 현탁하였다. 준비된 현탁액 0.1ml을 Nunn 평판배지(tryptone : 10g, yeast extract : 5g, NaCl : 10g, glucose : 2g, chlorotetracycline hydrochloride : 0.05g, NaH₂PO₄ · H₂O : 10g, fusaric acid (2mg/ml) ; 6ml, zinc chloride(20uM) ; 5ml, agar : 15 g, dDW ; 1L)에 도말하고, *Salmonella* 염색체상에서 약 3 min 간격으로 이미 유전좌의 위치가 알려진 *MudP*와 *MudQ* phage들을 약 5-10ul씩 떨어뜨려 Tn10이 *MudP*/*Q*와 교차된 콜로니들의 생장을 육안으로 확인하여 유전좌를 결정하였다. *MudP*/*Q* mapping set에 사용되는 균주들은 *Salmonella* Genetic Stock Center(SGSC)로부터 분양 받았으며, phage의 준비는 Benson과 Goldman의³⁾ 방법을 사용하였다. *MudJ*(Km, lacZ)의 발현은 β-galactosidase의 활성도로 결정하였으며²⁶⁾, 특히 무산소조건에서 copper에 대한 유전자의 발현도 측정은 균주를 OD600nm=0.4 까지 성장시킨 다음 copper(25ug/ml)를 첨가하여 1시간 동안 재배양한 배양액을 사용하여 β-galactosidase assay를 수행하였다.

Metal Tolerance Response 조사

분리한 Cu 유도성 돌연변이체들을 대상으로 구리에 대한 내성도를 조사하기 위하여 Copper Tolerance Response (CTR) 조사를 수행하였다. 돌연변이균주의 SG 최소배지(pH 7.7) 전배양액을 1/300의 농도로 동일한 배지에 접종하여 OD600nm=0.4가 되도록 진탕배양한 다음, CuCl₂가 mg/ml이 되도록 첨가하고 시간별로 세균의 생존율을 조사하여 CTR을 조사하였다. 금속이온에 대한 반응성과 다른 환경요인들과의 상호 교차발현은 CTR 조사와 같은

방법으로 돌연변이 균주를 OD600nm=0.4까지 배양한 후, copper를 0.6mg/ml의 농도로 첨가하여 copper 충격을 실시하고, 충격하에서 하룻밤 진탕배양하였다. 다음날 배양액 1ml을 원심분리(12,000rpm, 5min)하여 균체를 회수하고, SG 최소배지(pH 7.7)로 세척한 다음 20mM의 농도로 H₂O₂가 첨가된 SG 최소배지에 OD600nm=0.4가 되도록 현탁한 후, 시간별로 생존율을 조사하여 상호 교차 발현 여부를 결정하였다.

curD 유전자의 클로닝

Salmonella DNA 절편들이 플라스미드 pBR322상에 존재하는 Kredrich pool 용액 0.1ml과 LF153 *curD*::*MudJ* 배양액 0.1ml을 혼합하고 LB 평판배지(Ap, Km)에 도말하여 배양하였다. 형질도입체들을 대상으로 copper에 대한 내성능을 조사함으로써 *CuiD*형질을 갖는 클론을 얻었다. Kredrich pool은 U. of S. Alabama의 Dr. Foster로부터 분양받아서 사용하였다.

결과 및 고찰

금속이온들에 대한 *S. typhimurium*의 생장

S. typhimurium UK1을 대상으로 minimum inhibitory concentration(MIC)을 조사한 결과는 Table 2에 나타나 있다. Table 2의 결과를 바탕으로 MIC보다 한단계 낮은 아치농도에서 산소와 무산소 조건에서 각각 생장능을 조사한 결과 copper를 제외한 Mn, Co, Mg, Zn, Ni, 및 Cr 등의 금속이온 존재하에서는 대조구와 비교하여 유사한 생장능을 나타내었다(data not shown). 그러나 copper를 첨가하여 산소와 무산소 조건에서 각각 배양한 결과, 무산소 조건에서는 UK1이 생장되지 않아, copper는 무산소조건에서 *S. typhimurium*의 생장저해요인으로 작용함이 밝혀졌다(Fig. 2). 즉, *S. typhimurium*의 anaerobiosis는 copper에 의하여 제한되었으며, 이 같은 결과는 동일한 장내세균에 속하며 또한 세균간의 유전적 상동성이 매우 높다할지라도 *Salmonella*의 copper에 대한 반응성은 Lee 등이²¹⁾ 보고한 *E. coli*와는 서로 상이함을 의미한다.

돌연변이체의 copper와 pH에 대한 반응

P22 HT 105/1-int를 이용하여 *MudJ*를 형질도입시킨

Table 2. The minimal inhibitory concentration to various metal ions on *S. typhimurium* UK1

Metals	Conc.						
	6.25	12.5	25	50	100	200	400 ^a
Cu	+	+	+	+	-	-	-
Mn	+	+	+	-	-	-	-
Co	+	+	+	+	-	-	-
Mg	+	+	+	+	+	+	-
Zn	+	-	-	-	-	-	-
Ni	+	+	+	+	-	-	-
Cr	+	+	+	+	-	-	-

a ; Unit was ug/ml, + ; growth, - ; no growth

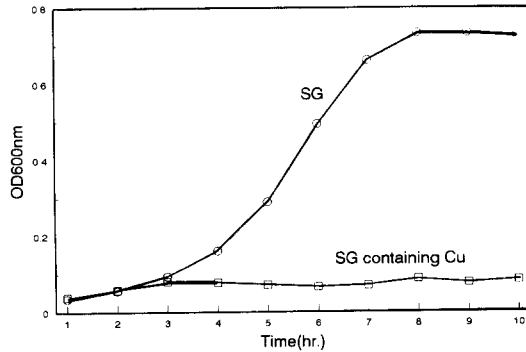


Fig. 2. Anaerobic growth rate of *S. typhimurium* UK1. Cultures were grown overnight at 37C in minimal glucose medium and then diluted 1/100 in minimal glucose medium containing copper(25ug/ml). Anaerobiosis was achieved by overlaying a tube of broth with 1ml of sterile paraffin oil.

약 40,000개의 돌연변이체들을 Fig. 1의 전략으로 Mn (12.5ug/ml), Co(25ug/ml), Mg(100ug/ml), Zn(3.12ug/ml), Ni(25ug/ml), Cr(25ug/ml) 및 Cu(25ug/ml)의

금속이온들을 대상으로 조사한 결과, copper에 유도되는 *cuiA*::MudJ(Km, lacZ)와 *cuiD*::MudJ(Km, lacZ)을 찾아내었다. 분리한 돌연변이체들을 대상으로 산소 및 무산소조건 그리고 pH 변동효과를 조사한 결과는 Table 4에 나타나 있다. Table 4에서 보는 바와 같이 산소와 알칼리 조건 하에서 copper에 대한 *cuiA*와 *cuiD*의 발현도는 copper를 처리하지 않은 대조구와 비교할 때 각각 70배와 7.4배 증가하였으며, 산성조건과의 교차효과는 존재하지 않는 것으로 나타났다. 무산소와 알칼리 조건하에서 copper에 대한 *cuiA*와 *cuiD*의 발현도는 각각 대조구의 2.8배와 226배로 나타났다. 따라서 *cuiA*는 무산소 조건에 유도되는 유전자 이면서, copper의 존재하에서 더욱 발현도가 급격히 상승하여 copper와의 상호 조절관계가 있는 것으로 보여졌다. *cuiD*는 산소와 알칼리 조건에서 발현하는 유전자이면서, 특징적으로 무산소와 산성조건에서 발현도가 증가하는 현상을 나타내었다. 이미 보고된 무산소조건에서 유도되는 유전자들이 copper에 대하여 교차발현여부가 존재하는지를 Aliabadi 등이^{1,2)} 발표한 *aniC*, *aniA*, *aniG*, *aniH* 및 *aniI* 들을 대상으로 copper 유도성을 조사한 결과(data not shown), 상기의 유전자들은 copper에 대한 반응성이 전혀 없는 것으로 나타나, 본 연구에서 발견된 *cuiA*는 새로운 anaerobic inducible 유전자로 확인되었다.

*cuiA*와 *cuiD*의 mapping

LF40 *cuiA*::MudJ와 LF153 *cuiD*::MudJ의 Tn10det pool을 이용하여 *cuiA*와 약 90% 연관된 위치에 Tn10이 존재하는 LF54와 *cuiD*에 Tn10이 삽입된 LF171을 만들었다. 또한 LF54 균주의 P22 lysate를 사용하여 Tn10만 존재하는 LF62균주를 얻었으며, 이 LF54와 LF62를 대상으로 MudP/Q rapid mapping을 시도한 결과, 두 균주 모두 81min에서 Tn10det이 MudP와 MudQ로 치환되어 콜로니를 형성하였으며, LF171의 경우에는 약 8min의 위치에서 콜로니가 형성되었다. 그러므로 *Salmonella*의 유전자지

Table 3. β-galactosidase activity of *cuiA-lacZ* and *cuiD-lacZ* with various metal ions

Genotype	Aerobic								Anaerobic							
	None	Cu	Cr	Co	Ni	Mg	Mn	Zn	None	Cu	Cr	Co	Ni	Mg	Mn	Zn
<i>cuiA</i> ::MudJ	0	82	29	15	27	29	22	29	222	948	233	42	133	178	241	107
<i>cuiD</i> ::MudJ	98	784	65	33	56	73	69	59	0	446	73	41	71	79	115	72

Table 4. Expression of *cuiA-lacZ* and *cuiD-lacZ* in aerobic and anaerobic condition

Genotype	Aerobic				Anaerobic ^a			
	pH7.7		pH5.8		pH7.7		pH5.8	
	with Cu	w/o Cu	with Cu	w/o Cu	with Cu	w/o Cu	with Cu	w/o Cu
<i>cuiA</i>	70	0	0	0	1529	539	402	64
<i>cuiD</i>	784	106	683	90	226	0	260	520

a ; For anaerobic culture with copper, cells were grown upto OD600nm=0.4 and added copper. And then cells were cultured for an hour and assayed for β-galactosidase activity. Values are averages for triplicate assay.

도에서 *cuiA*와 *cuiD*는 각각 약 81과 8min의 위치에 존재 함이 밝혀졌다. 최근에 Gupta 등이¹⁴⁾ *E. coli*의 *cutA*, *cutC*, *cutE*, *cutF*와 유사한 기능을 갖는 *scs* 유전좌를 *S. typhimurium*에서 발견하였으며, 이 유전자는 *Salmonella* genetic map상의 약 25.4min에 위치하는 것으로 보고되었으나, 본 연구에서 발견된 *cuiA*와 *cuiD*는 각각 81과 8min에 위치 하여, 기존에 알려진 copper 내성유전자들과는 상이한 유전자로 밝혀졌다.

*cuiA*와 *cuiD*에 대한 *rpoS*, *oxyR* 및 *relA* 효과

*S. typhimurium*의 산성 및 starvation stress에 조절유전자로서 알려진 *rpoS* 및 *relA* 그리고 산소조건에서 *Salmonella*의 hydrogen peroxide I(*katG*) 조절유전자로서 알려진 *oxyR*의^{23,25)} 상호조절관계를 알아보기 위하여 LF40 *cuiA*와 LF153 *cuiD*를 대상으로 *rpoS*, *relA* 및 *oxyR*과 각각 이중 돌연변이체를 만들어 LacZ 발현여부를 조사하였다. Table 5에서 보는 바와 같이 *cuiA*는 *rpoS*, *relA* 그리고

*oxyR*의 영향하에 있는 것으로 나타났으며, 특히 pH7의 산소조건에서 LacZ의 활성도가 증가하였다. *cuiD*의 경우에는 단독의 무산소 조건에서 각각 LacZ 발현의 증가를 보였다. 그러므로 *rpoS*, *oxyR*와 *relA* 등의 조절유전자들은 *cuiA*와 *cuiD* 유전자의 발현을 조절하는 기능을 소유하는 것으로 확인되었다. 따라서 *katE*와 *katG*의 조절에 관여하는 *rpoS*와 *oxyR* 등의 조절유전자들은 *cuiA*와 *cuiD*의 조절에도 관여한다고 할 수 있다. 즉 oxidative stress와 copper의 상호 조절연계성을 의미하며, 이같은 결론은 copper가 H₂O₂에 대한 저항도를 증가시킨다는 CTR의 결과와도 일치하는 것이다.

*cuiA*와 *cuiD*의 조절유전자

S. typhimurium UK1의 Tn10 pool을 *cuiA*와 *cuiD*에 형질도입하여 copper가 함유된 MacConkey 평판배지상에서 조절유전자를 탐색한 결과 LF190 *cuiA*::MudJ *cuarR*::Tn10과 LF186 *cuiD*::MudJ *cuDR*::Tn10을 발견하였

Table 5. The effect of *rpoS*, *oxyR* and *relA* on *cuiA-lacZ* and *cuiD-lacZ*

Genotype	Aerobic		Anaerobic	
	with Cu	w/o Cu	with Cu	w/o Cu
<i>cuiA</i> ::MudJ	81	0	1819	548
<i>cuiA</i> ::MudJ <i>rpoS</i> ::Ap'	225	53	1902	1089
<i>cuiA</i> ::MudJ <i>oxyR</i> ::Tn10	377	95	766	478
<i>cuiA</i> ::MudJ <i>relA</i> ::Tn10	308	36	521	1166
<i>cuiD</i> ::MudJ	798	110	246	2
<i>cuiD</i> ::MudJ <i>rpoS</i> ::Ap'	784	88	260	112
<i>cuiD</i> ::MudJ <i>oxyR</i> ::Tn10	793	54	316	109
<i>cuiD</i> ::MudJ <i>relA</i> ::Tn10	786	89	218	88

Values are averages for triplicate assay.

다. 이들 조절유전자들의 Tn10돌연변이체들은 *cuiA-lacZ*와 *cuiD-lacZ*를 활성화하는 것으로 나타나(Table 6), *cuaR*과 *cudR*은 *cuiA*와 *cuiD*에 대하여 각각 음성적 조절 작용이 있는 것으로 밝혀졌다. LF186을 P22를 이용하여 highly transducing phage를 만들고, 이를 야생형 UK1과 형질도입하여 조절유전자에 Tn10이 삽입된 돌연변이체 LF194에 대한 CTR 조사 결과는 Fig. 3에 나타나 있다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 LF194는 야생형 UK1과 비교하여 t6에서 약 10배의 생존을 증가를 나타냄으로서 copper에 대한 높은 발현도를 보여주었다. 따라서 *cudR*은 copper sensitive에 관여하는 유전자임이 밝혀졌다.

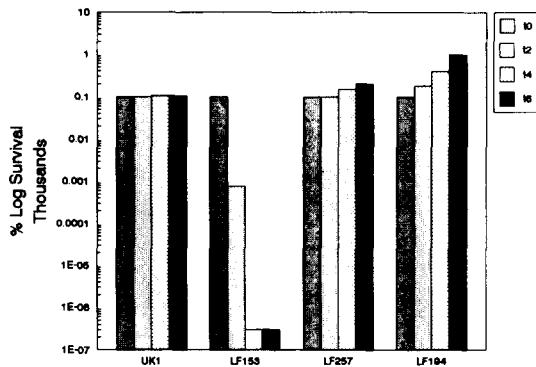


Fig. 3. Log-phase copper tolerance responses of *S. typhimurium* UK1, LF153 *cuiD*::MudJ, *cuiD* clone that located in LF153, and regulatory mutant(LF194) of *cuiD*. Cells grown to mid-log phase in salt minimal glucose medium were challenged at copper condition(mg/ml). The bars represent average percent survival (+/-0.5 times the stated value) at copper condition after 0, 2, 4, and 6h.

*S. typhimurium*의 CTR

분리한 copper 유도유전자 *cuiA*와 *cuiD*를 대상으로 CTR 조사를 수행한 결과, *cuiA*는 copper inducible gene으로, *cuiD*는 copper tolerance response에 관여하는 유전자로 판명되었다. 즉 Fig. 3에서 보는 바와 같이 야생형 UK1은 대수성장기에서 copper에 대하여 6시간까지도 생존율의 감소없이 높은 내성도를 보여주었으나, LF153 *cuiD*::MudJ는 2시간후 대조구와 비교하여 약 100배, 4시간후에는 약 106배의 생존율 감소를 보여주어, CuiD는 copper tolerance response에 필수적 기능을 담당하는 것으로 밝혀졌다. *cuiA*에 대한 CTR은 그 내성양태가 UK1과 동일하게 나타나 copper 유도성 유전자로 확인되었다(data not shown). Kredrich pool로부터 획득한 *cuiD* 클론을 갖는 플라스미드 pLJ4를 함유한 LF257에 대한 CTR 조사 결과, 야생형 UK1과 유사하게 copper에 대한 내성능을 회복하는 것으로 관찰되어, pLJ4에는 *cuiD* 유전자가 존재하는 것으로 확인되었다.

*cuiD*와 oxidative stress의 교차발현 효과

copper에 대한 *Salmonella*의 내성과 다른 환경 stress와의 교차효과에 대하여 조사한 결과 독특하게 CTR은 oxidative stress와 밀접한 관계가 존재하는 것으로 밝혀졌다. 즉 copper에 적용된 *Salmonella*는 H₂O₂에도 우수한 저항능을 나타내며, 그 결과는 Fig. 4와 5에 나타나 있다. 대수성장기 세균세포에 copper(600ug/ml) 적용을 유도하여 하룻밤 배양한 UK1은 H₂O₂에 대하여 높은 저항도를 나타내며, H₂O₂ 충격후에도 계속적으로 성장량 증가를 보여주었다. 그러나 copper에 적용하지 않은 UK1은 H₂O₂충격 2시간 후에 약 10,000배의 세균수 감소를 나타냈다. 이는 *E. coli*에서 copper의 자극은 결국 세포내 superoxide의 유도를 증가시켜 oxidative stress를 제공한다는 결과의³⁴⁾ 작용과 유

Table 6. β-galactosidase activity of regulatory mutants

Genotype	Aerobic		Anaerobic	
	with Cu	w/o Cu	with Cu	w/o Cu
<i>cuiA</i> ::MudJ	85	0	1529	539
<i>cuiA</i> ::MudJ <i>cuaR</i> ::Tn10	1581	1761	1480	1609
<i>cuiD</i> ::MudJ	787	112	243	5
<i>cuiD</i> ::MudJ <i>cudR</i> ::Tn10	1791	2851	4105	4163

Values are averages for triplicate assay.

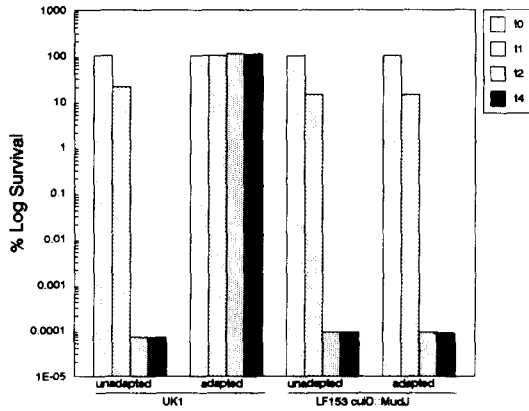


Fig. 4. Effect of cross protection to hydrogen peroxide. Cells grown to mid-log phase in minimal glucose medium were subjected to adaptation protocol with copper(0.6mg/ml) and then cultured for overnight. Adapted cells were collected and challenged in minimal glucose medium containing 20 mM H₂O₂. Unadapted cells were challenged directly to 20mM H₂O₂. The bars represent average percent survival(+/-0.5 times the stated value) at copper condition after 0, 1, 2, and 4h.

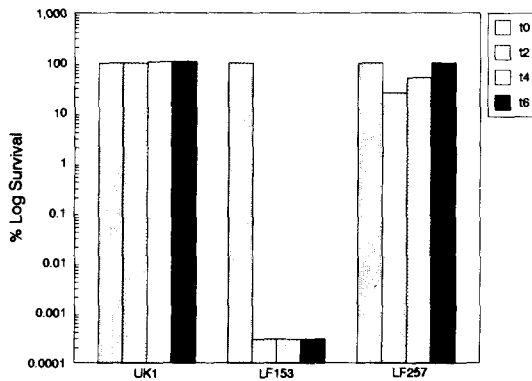


Fig. 5. The repair of CuiD in LF257 containing *cuiD* clone. Cells grown to OD_{600nm}=0.4 in salt minimal glucose medium were treated with copper(0.6mg/ml) and cultured for overnight. Adapted cells were collected and challenged in 20 mM.

사한 것으로 해석될 수 있다. *cuiD*의 경우에는 예상대로 oxidative stress에 대한 저항능이 없는 것으로 나타나, copper와 oxidative stress에 관여하는 중요 유전자로 밝혀졌다. *cuiD* 클론을 갖는 플라스미드 pLJ4를 함유한 LF257의 교차발현은 야생형과 유사한 내성도를 회복함으로써, pLJ4는 CuiD를 생성하는 것으로 확인되었다(Fig. 3 and 5). 결론적으로 copper는 단순히 효소의 활성화에 관여하는 cofactor 또는 성장 저해요인뿐 아니라 *Salmonella*의 통합적 조절계의 주요한 signal로서의 기능을 소유하는 것으로 보여지며, copper에 발현하는 *cuiA*와 *cuiD*들은 *scs* 유전자의 위치와는 상이하므로 *S. typhimurium*의 새로운 copper 유도 유전자로서 밝혀졌다. 특히 이들 유전자들이 *rpoS*와 *oxyR* 등의 조절유전자의 조절하에 존재한다는 것은 *Salmonella*의 병독성에도 연관지어 생각해 볼 수 있는 사항이다.

적 요

병원성 *Salmonella typhimurium* UK1을 대상으로 다양한 환경 stress들 중에서 금속이온에 발현하는 유전자와 그 조절유전자를 탐색하고, 다른 stress 조건과의 교차효과를 조사하였다. P22를 사용하여 *MudJ*(Km, *lacZ*)가 DNA상에 삽입된 돌연변이체들을 다양한 금속이온들이 함유된 Mac-Conkey 배지상에서 선별한 결과 copper에서 발현하는 LF 40 *cuiA::MudJ*와 LF153 *cuiD::MudJ*를 얻었다. *cuiA*는 anaerobic copper inducible gene으로 밝혀졌고, *cuiD*는 copper tolerance response에 관여하는 유전자로 확인되었으며, 이들 유전자는 *Salmonella*의 유전자지도의 81과 8 min에 각각 위치하는 것으로 조사되었다. *cuiA*와 *cuiD*의 조절유전자 *cuaR*과 *cudR*은 모두 *cuiA-lacZ*와 *cuiD-lacZ*를 증가시킴으로서 negative 조절유전자로 확인되었다. copper에 적응한 UK1이 H₂O₂에 높은 저항능이 존재하는 것과는 달리, *cuiD*는 H₂O₂에 저항성이 존재하지 않는 것으로 나타났다. *CudR*은 copper와 H₂O₂에 대한 내성도의 감소에 관여하는 유전자 산물로 보여지며, 또한 *cuiA*와 *cuiD*들은 *rpoS*, *oxyR*과 *relA* 등의 조절유전자들과 상호조절연계성이 발견되어, *Salmonella*에서 CTR은 oxidative stress 반응과 상호 연계성이 있는 것으로 보여진다.

감사의 글

이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비(O1FO456)에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Aliabadi, Z., Warren, F., Mya, S. and Foster, J. W. : Oxygen regulated stimulons of *Salmonella typhimurium* identified by MudJ(Ap, lacZ) operon fusions, *J. of Bacteriol.*, **165**, 780-786(1986).
2. Aliabadi, Z., Park, Y. K., Slonczewski, J. L. and Foster, J. W. : Novel regulatory loci controlling oxygen and pH regulated gene expression in *S. typhimurium*, *J. of Bacteriol.*, **170**, 841-851(1988).
3. Benson, M. R. and Goldman, B. S. : Rapid mapping in *Salmonella typhi* with Mud-P22 prophages, *J. of Bacteriol.*, **174**, 1673-1681(1992).
4. Beveridge, T. J. and Doyle, R. J. : *Metal ions and bacteria*, pp.31-90, John Wiley and Sons, Inc.(1989).
5. Brown, N. L., Lee, B. T. O. and Silver, S. : *Bacterial transport of and resistance to copper*, pp.405-430. In H. Sigel and A. Sigel(ed.), *Metal ions in Biological systems*, **30**, Springer-Verlag KG, Heidelberg, Germany.(1994).
6. Brown, N. L., Rouch, D. A. and Lee, B. T. O. : Copper resistance determinants in bacteria, *Plasmid*, **27**, 41-51(1992).
7. Bull, P. C. and Cox, D. W. : Wilson disease and Menkes disease : new handles on heavy metal transport. *Transds Genetics*, **10**, 246-252(1994).
8. Duxbury, T. : Toxicity of heavy metals to soil bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, **11**, 217-220(1981).
9. Duxbury, T. and Bicknell, B. : Metal-tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soils, *Soil Biol. Biochem.*, **15**, 243-250(1983).
10. Farrant, J. L., Sansone, A., Canvin, J. R., Pallen, M. J., Langford, P. R., Wallis, T. S., Dougan, G. and Kroll, J. S. : Bacterial copper- and zinc-cofactored superoxide dismutase contributes to the pathogenesis of systemic salmonellosis, *Molecular Microbiology*, **25**(4), 785-796(1997).
11. Foster, J. W. and Hall, H. K. : Effect of *Salmonella typhimurium* ferric uptake regulator(*fur*) mutation on iron-and pH-regulated protein synthesis, *J. of Bacteriol.*, **174**, 4317-4323(1992).
12. Foster, J. W., Park, Y. K., Bang, I. S., Karem, K., Bettes, H., Hall, H. K. and Shaw, E. : Regulatory circuits involved with pH-regulated gene expression in *Salmonella typhimurium*, *Microbiol.*, **140**, 341-352(1994).
13. Gupta, S. D., Lee, B. T. O., Camakaris, J. and Wu, H. W. : Identification of *cutC* and *cutF(nlpE)* genes involved in copper tolerance in *Escherichia coli*, *J. of Bacteriol.*, **177**, 4207-4215(1995).
14. Gupta, S. D., Wu, H. C. and Rick, P. D. : A *Salmonella typhimurium* genetic locus which confers copper tolerance on copper-sensitive mutants of *Escherichia coli*, *J. of Bacteriol.*, **179**, 4977-4984(1997).
15. Goldstein, S. and Czapski, G. : The role and mechanism of metal ions and their complexes in enhancing damage in biological systems or in protecting these systems from the toxicity of O₂·, *J. Free. Rad. Biol. Med.*, **2**, 3-11(1986).
16. Gottesman, S. : Bacterial Regulation : Global regulatory networks, *Ann. Rev. Genet.*, **18**, 415-441(1984).
17. Herchins, S. R., Davidson, M. S., Brierley, J. A. and Brierley, C. L. : Microorganisms in reclamation of metal, *Ann. Rev. Microbiol.*, **40**, 311-336(1986).
18. Holly, E. A. and Foster, J. W. : Bacteriophage P22 as a vector for Mu mutagenesis in *Salmonella typhimurium* : isolation of *nad-lac* and *pnc-lac* gene fusions, *J. Bacteriol.*, **152**, 959-962(1982).
19. Kiley, P. J. and Reznikoff, W. S. : Fnr mutants that activate gene expression in the presence of oxygen, *J. of Bacteriol.*, **173**, 16-22(1991).
20. Kim, J. S., Yoo, Y. D., Park, J. H., Kim, Y. K., Lee, I. S. and Park, Y. K. : A study of aerobic and anaerobic inducible genes using MudJ(Km, lacZ)opereon fusion in *Salmonella typhimurium*, *Kor. J. Microbio.*, **27**, 201-209(1989).
21. Lee, B. T. O., Brown, N. L., Rogers, S., Bergemann, A., Camakaris, J. and Zouch, D. A. : *Metal Speciation in the Environment*, pp.625-632, Springer-Verlag, (1990).
22. Lee, I. S., Slonczewski, J. L. and Foster, J. W. : A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*, *J. of Bacteriol.*, **176**, 1422-1426(1994).
23. Lee, I. S., Lin, J., Hall, H. K., Bearson B. and Foster, J. W. : The stationary-phase sigma factor σ^s (RpoS) is required for sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella typhimurium*, *Molecular Microbiology*, **17**, 155-167(1995).

24. Lee, Y. J., Bang, I. S., Lee, I. S., Lee Y. N. and Park, Y. K. : Characterization and cloning of regulatory genes for anaerobic environment inducible gene expression in *Salmonella typhimurium*, *Korean J. Environ. Biol.*, **11**, 161-168(1993).
25. Lin, J., Lee, I. S., Frey, J., Slonczewski, J. L. and Foster, J. W. : Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*, *J. of Bacteriol.*, **177**, 4097-4104(1995).
26. Miller, J. H. : *A Short Course in Bacterial Genetics*, pp. 71-80, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York(1992).
27. Rouch, D., Camakaris, J. and Lee, B. T. O. : *Copper transport in Escherichia coli*, pp.467-477, In Hamer, D. H. and Winge, D. R.(ed.), *Metal ion homeostasis : molecular biology and chemistry*, Alan R. Liss, New York(1989).
28. Sagripanti, J. L. and Kraemer, K. H. : Site-specific oxidative in DNA damage at polyguanosines produced by copper plus hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.*, **264**, 1729-1734(1989).
29. Silver, S., Nucifora, G. and Phung, L. T. : Human Menkes X-chromosome disease and the staphylococcal cadmium-resistance ATPase ; a remarkable similarity in protein sequences, *Mol. Microbiol.*, **10**, 7-12(1993).
30. Spector, J., Aliabadi, Z., Gonzalez, T. and Foster, J. W. : Global control in *Salmonella typhimurium* ; Two dimensional electrophoretic analysis of starvation, anaerobiosis, and heat shock inductive proteins, *J. of Bacteriol.*, **168**, 420-424(1986).
31. Tao-X, and Murphy J. R. : Binding of the metalloreulatory protein Dtx to the diphtheria tox operator requires a divalent heavy metal ion and protect the palindromic sequence from DNase I digestion, *J. Biol. Chem.*, **267**, 21761-21764(1992).
32. Thorvaldsen, J. L., Sewell, A. K., McCowen, C. L. and Winge, D. R. : Regulation of metallothionein genes by the ACE1 and AMT1 transcription factor, *J. Biol. Chem.*, **268**, 12512-12518(1993).
33. Tkeshelashvili, L. K., McBride, T., Spence, K. and Loeb, L. A. : Mutation spectrum of copper-induced DNA damage, *J. of Biol. Chem.*, **266**, 6401-6406(1991).
34. Tsuyoshi, K. and Hajime, N. : Intracellular generation of superoxide by copper sulphate in *Escherichia coli*, *Mutation Res.*, **389**, 237-242(1997).
35. Vogel, H. J. and Bonner, D. M. : Acetylornithase of *Escherichia coli* ; partial purification and some properties, *J. Biol. Chem.*, **93**, 237-244(1956).
36. Youderian, P., Braier, P., Sugino, K. L., Higgins, N. P. and Elliot, T. : Packaging specific segments of the *Salmonella* chromosome with lacked in Mud-P22 prophages, *Genetics*, **118**, 581-592(1988).