

분리 대장균 O139의 Shigatoxin2e A 유전자의 효소 활성부에 대한 결손변이 유발 및 변이 단백질의 발현

조은정* · 김도경* · 김상현** · 김영일*** · 이철현*** · 이우원**** · 손원근***** · 신종욱 · 김용환¹

경상대학교 수의과대학 생명과학연구소, *경상남도 축산진흥연구소

**캐나다 구엘프 대학교 수의과대학,

수의과학검역원, *부산시 보건환경연구원

*****제주대학교 농과대학 수의학과

Induction of Deletion Mutation for the Enzymatic Domain in the Shigatoxin2e A Subunit Gene of *Escherichia coli* O139 Isolates and Expression of Mutated Protein

Eun-jung Cho*, Do-kyong Kim*, Sang-hyun Kim**, Yeong-il Kim***,
Chul-hyun Lee****, Woo-won Lee*****, Won-geun Son*****, Jong-Uk Shin and Yong-hwan Kim¹

College of Veterinary Medicine, Research Institute of Life Science, Gyeongsang National University

*Gyongnam Livestock Promotion Institute

**Department of Laboratory Medicine and Pathology, Biochemistry, University of Toronto

***National Veterinary Research and Quarantine Service

****Busan Institute of Health and Environment

*****Department of Veterinary Medicine, Jeju National University

Abstract: This study was done to produce a mutated protein inactivated cytotoxicity of Shigatoxin 2e (Stx2e) of *E. coli* O139 isolates by deletional mutagenesis of Stx2e A subunit gene encoding active-site cleft of enzymatic domain in ST2e holotoxin. Cytotoxicity of the toxoid expressed from the mutant Stx2e gene was compared with wild type Stx2e for development of vaccine candidate. A recombinant plasmid pED18 containing Stx2e gene of *E. coli* O139 isolates was used to generate mutation plasmid. Deletion mutagenesis was conducted for Stx2e A subunit gene encoding enzymatically active domain by polymerase chain reaction (PCR) using of designed primer to induce deletional mutation. DNA sequence analysis was confirmed that the pentamer (Typ 202- Ser 206) that lies within the proposed active-site cleft in the second region was completely deleted. A DNA fragment of 1.1 kb that encode the new mutant Stx2eA gene was inserted into plasmid pRSET vector digested with *EcoRV-HindIII* and named pEDSET. The pEDSET was transformed in *E. coli* for expression of mutant protein and the protein was confirmed by SDS-PAGE and Western-blotting. The protein expressed by the mutant was tested to confirm the reduction of cytotoxic activities on Vero cell using microcytotoxicity assay compared with wild type Stx2e, the cytotoxicity of deletional mutant protein was at least reduced by 3,000-fold on Vero cell.

Keywords : Shigatoxin2e, enzymatic domain, deletion mutagenesis PCR, DNA sequence.

서 론

병원성 대장균은 독소와 부착인자의 생산능력과 감염기전에 따라 entero-pathogenic *Escherichia coli* (EPEC), enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC), enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC), entero-hemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)의 5가지 유형으로 분류된다. 이들 중 EPEC, ETEC 및 EHEC에 속하는 50여종의 대장균은 Shigatoxin (Stx)을 생산하며 사람에서 설사, 출혈성 결장염, 용혈성 요독 증후군을 일으키고 돼지에서는 부종병을 유발한다^{9,10}. 돼지의

부종병은 Shigatoxin 2e를 생산하는 대장균에 의하여 유발되며, 주요 혈청형은 O138:K81, O139:K82, O141:K85로 알려져 있다^{4,17}. 돼지 부종병은 이유 후 자돈에 다발하는 질병으로 눈과 체표의 부종, 기립불능, 신경증상, 마비 등의 증상을 나타내고 위와 대장 점막 하 조직 및 임파절의 수종과 출혈반을 보이는 것이 특징이며, 감염된 자돈은 대부분 위축돈이 되거나 폐사하므로써 양돈농가에 큰 경제적인 손실을 주고 있는 질병중의 하나이다^{12,13}.

Stx2e의 유전자는 bacteriophage에서 유래하는 Stx1 및 Stx2와는 달리 염색체 DNA에 존재하는 것으로 알려져 있다. Weinstein 등¹⁸과 Gyles 등⁷은 부종병에 감염된 돼지에서 분리한 대장균으로부터 유전자를 클로닝하여 Stx2e 유전자에 대한 염기서열을 보고하였고, Frankel 등³은 건강한 돼지에서 분리한 O-101 균주로부터 Stx2e variant

¹Corresponding author.

E-mail : yho157@nongae.gsnu.ac.kr

gene을 보고한 바 있다. Shigatoxin은 분자량이 32 kDa의 A subunit와 7.7 kDa인 5개의 B subunit로 구성되어 있다. 세포 내에서 A subunit는 단백질 분해 효소에 의하여 A1 (27KD)과 A2 (5KD) polypeptide로 분해되고 이들은 단일 disulfate결합에 의하여 연결되어 있고, A1 polypeptide는 A와 B subunit를 연결하는데 관여한다^{8,9}. 또한 A subunit는 N-glycosidase로 작용하여 진핵세포의 60 S ribosomal subunit인 28S rRNA에서 4,323번부터 4,325번까지 염기의 발현 아미노산인 adenine을 특이적으로 절단함으로써 elongation factor을 억제하여 단백질 합성을 차단한다. B subunit는 세포 수용체와의 결합 및 세포독성의 특이성, 세포의 정착성 및 항체형성에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{5,16}. Deresiwicz 등²은 x-ray crystallography를 이용하여 Shiga toxin family에 속하는 독소들에 대하여 3차원적 구조를 분석한 결과 Shiga toxin, Shiga-like toxin 및 ricin에는 효소단백질의 active-site cleft를 구성하는 특이적인 아미노산이 공통적으로 존재한다고 하였다. Active-site cleft를 구성하는 아미노산들은 A subunit에 두 영역으로 나누어져 잘 보존되어 있으며, 첫 번째 영역은 167번 glutamic acid부터 171번 phenylalanine 까지이고 두 번째 보존영역은 202번 tryptophan부터 206번 serine까지라고 하였다. Hovde 등⁶은 첫 번째 보존영역의 167번 glutamic acid가 Stx1의 효소활성기능에 중요한 아미노산 잔기라고 하였고, Frankel 등²과 Yamasaki 등¹⁹은 첫 번째 영역의 170번 arginine도 중요한 역할을 한다고 보고한 바 있다. 또한 Jackson 등⁸은 Stx2 A subunit의 효소 활성부에 대한 변이를 유발하여 첫 번째 영역인 glutamic acid 167번을 aspartic acid로 치환한 결과 변이주의 변성 독소는 wild type에 비하여 세포독성이 1,000배로 감소하였다고 하였다. 두 번째 영역인 pentamer (WGRLS)에 대하여 결손변이를 유발한 경우의 변성독소는 Vero cell에 대한 세포독성이 거의 소실되었다고 하였다. Kim 등¹⁰은 국내분리 Stx2A subunit gene의 효소 활성부에서 위치 특이적 변이를 유발한 결과 변성독소는 wild type에 비하여 세포독성이 2,000배 정도 감소하였다고 보고 하였다.

본 연구에서는 분리균 Stx2e 유전자 A subunit의 효소 활성영역에 결손변이를 유발한 변이 유전자를 pRSET vector에 융합하여 대장균에 형질 전환하였다. 형질 전환균을 배양하여 제조할 변이 유전자를 발현시킨 다음, Western blotting에 의하여 발현 단백을 확인하고, 세포 독성의 감소를 검사하여 백신 후보균으로서의 사용가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

공시재료

균주 및 plasmid. 본 연구에 사용한 균주는 BL21(Host cell for cloning and expression, Stratagene Co, USA)과

DH5'FIQ(Host cell for transformation, Pharmacia Co, Sweden)을 사용하였으며 plasmid는 pRSET(Expression vector for mutant toxoid, Stratagene Co, USA)과 분리대장균 O139의 Stx2e 유전자를 cloning 한 pED18(Stx2e clone in pUC18/BamHI - HindIII, 김 등²⁰)을 사용하였다.

PCR에 의한 결손변이 유발

결손 변이용 primer. 분리균에서 이 유전자의 Stx2e A subunit gene의 염기서열을 참고하여²⁰ 효소활성 영역의 active-site cleft를 구성하는 아미노산 WGRIS를 encoding 하고 있는 염기 16번부터 30번까지를 결손 변이 시키기 위하여 이 부위를 결손 시킨 primer를 제작하여 사용하였으며 그 염기서열은 다음과 같다.

```

                    16                30
5-GAC-CTC-ACT-CTG-AAC-(TGG-GGG-AGA-ATC-AGC)-AAT-GTG-CTT-
                    W  G  R  I  S
CCG-GAC-3
  
```

결손변이를 위한 PCR 조건. 유전자의 증폭을 위한 PCR은 DNA template 100 ng에 PCR buffer 5 µl, dNTP mix. 4 µl, 10 pmol의 결손변이용 primer, *pfu* DNA polymerase (Promega, USA) 2.5 unit를 가하여 최종량이 50 µl가 되도록 하여, thermal cycler(Perkin Elmer, USA)를 이용하여 증폭하였다. PCR은 94°C에서 5분간 예열한 다음 94°C target temperature에서 50초간 denaturation, 58.5°C에서 50초간 annealing한 후 72°C에서 6분간 extension을 한 과정으로 하여 18 cycle로 증폭하였고, final extension은 72°C에서 10분간 실시하였다.

변이된 ST2e 유전자에 대한 DNA염기 서열 분석

PCR에 의한 결손 변이 된 Stx2e 유전자에 대한 DNA 염기 서열 분석은 경상대학교 공동실험 실습관에 의뢰하여 수행하였다. 결손 변이 된 Stx2e유전자를 DH5'FIQ cell에 형질을 전환하고 DNA mini-prep kit (Qiagen Co, Germany)를 이용하여 DNA를 정제한 다음 Genetic analyser(Model 310, ARI PRISM, USA)에서 DNA염기 서열을 분석하였다.

발현 plasmid pEDSET의 작성

결손 변이가 확인된 Stx2e유전자를 동일한 제한효소 *EcoRV*와 *HindIII*로 절단한 1.1 kb의 절편을 동일한 제한 효소로 절단한 발현 vector pRSET에 삽입하여 pEDSET를 작성하였다. 발현 plasmid pEDSET를 DH5'FIQ competent cell에 형질전환 시킨 후 Amp-LB(LB: 1% Bactotryptone, 0.5% yeast extract 1%, NaCl, 1.5% agar, ampicillin 100 µg/ml) plate에 도말 하여 37°C에서 16시간 배양하였다. 다음 단일 집락을 선발하여 LB-Amp broth에 배양한 후 alkaline lysis법으로 plasmid를 분리하여 제한효소 *EcoRV*와 *HindIII*로 절단하여 insert의 삽입 여부를 확인하였다.

재조합 plasmid의 발현

재조합 발현 plasmid pEDSET를 대장균 BL21에 형질 전환하여 선발한 균을 37°C에서 16시간 배양하여 얻은 단일 집락을 LB broth (0.5% glucose, Amp 100 µg/ml)에 접종하여 37°C에서 220 rpm으로 3-4시간 진탕 배양하였다. 균의 농도가 A600에서 흡광도가 0.6-0.8되었을 때 *lac* promoter의 유도물질인 IPTG용액을 최종 농도가 0.5 mM이 되게 첨가하여 매 시간별로 6시간까지 균배양액을 채취하였다. 이것을 4°C, 7000 rpm에서 5분간 원심 침전하여 얻은 펠렛을 50 mM Tris (pH8.0)용액으로 재부유 시키고 ultrasonic processor (Dan-bury, USA)를 이용하여 파쇄한 후 4°C, 7000 rpm으로 5분간 원심 침전하였다. 다음 상층액을 4°C에서 13,000 rpm으로 원심 침전하고, 이 상층액을 Ni-NTA column(Pharmacia Biotec, Sweden)으로 단백질을 분획, 정제하였다.

Western blotting에 의한 변이단백질의 확인

발현된 단백질에 대한 anti-His antibody (IgG) 및 goat anti mouse IgG conjugate를 이용하여 Western blotting 방법으로 변이단백질의 존재 여부를 확인하였다. 발현 단백질을 정제하여 5X SDS sample buffer와 혼합하고 100°C에서 5분간 가열한 후 12.5% SDS-polyacrylamide gradient gel을 이용하여 50 V에서 20분, 100 V에서 150분간 전기 영동 하였다. 전기 영동 한 gel을 10°C의 transfer buffer (39 mM glycine, 48 mM Tris base, 10% methanol)에 정지한 다음 gel을 nitrocellulose filter (0.45 µm, Millipore Co, USA)에 얹고 transfer buffer를 electrotransfer kit에 채운 후 90분간 전사하였다.

단백질 분획을 전사한 nitrocellulose filter를 용기에 넣고 20 ml의 blocking buffer (5% skim milk, 1X TB [1/당 Tris 2.42 g, glycine 10.81 g], 20 mM Tris base, 144 mM glycine, 25% methanol, 0.01% SDS, 0.05% Tween20)를 채운 후 orbital shaker를 사용하여 20-30 rpm에서 2시간 동안 진탕하였다. TBST용액(1X TB [1/당 Tris 2.42 g, glycine 10.81 g], 20 mM Tris base, 144 mM glycine, 25% methanol, 0.01% SDS, 0.05% Tween 20)으로 세척한 filter에 blocking buffer로서 anti-His antibody 20 ml (1:1,000)을 가하여 90분간 진탕 반응시킨 다음 다시 filter에 TBST용액 20 ml를 가하여 세척하는 과정을 반복하였다. 다음 blocking buffer에 goat anti-mouse IgG conjugate용액 20 ml (1:2,000)을 가하여 실온에서 90분동안 반응시킨 다음 20 ml의 TBST용액을 첨가하고 5회 반복하여 세척하였다. 여기에 ECLTM (Enhanced Chemoluminescence, Amersham Bioscience, Sweden) Western blotting detection 용액을 가하여 결과를 확인하였다.

변이 유전자, EDSET의 발현 및 세포독성 시험

S2txe-pRSET는 Vero cell (African green monkey kidney cell)과 5% 소 태아 혈청, 100 µg/ml의 gentamicin 및

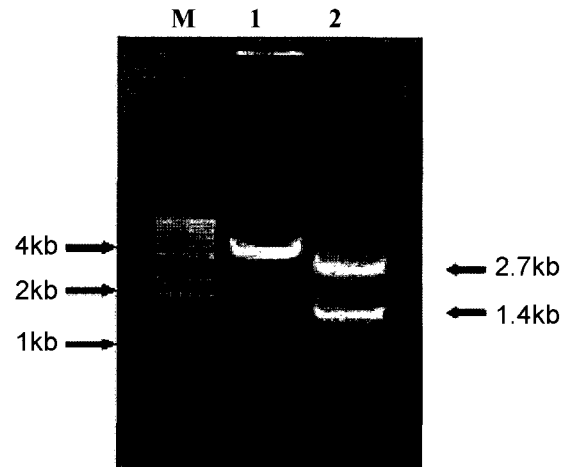


Fig 1. Construction of recombinant DNA clone between enzyme-active cleft site-deleted Stx2e A gene and pUC18 plasmid. : 1, recombinant DNA(4.1 kb) digested by *EcoRV*; 2, enzyme-active cleft site-deleted Stx2e A gene(1.4 kb) and pUC18 plasmid vector(2.7 kb) digested from recombinant DNA by *EcoRV* and *HindIII*.

100 µg/ml penicillin을 첨가한 minimal essential medium (MEM: Gibco BRL)에 계대 배양하여 사용하였다. 세포독성 시험은 mutant 및 wild type Stx2e 각 50 µl를 10배 계단 희석하여 96 well microplate에 단층 배양한 Vero cell에 각각 접종하였다. 접종한 plate는 37°C의 5% CO₂ 조건에서 3일간 배양하면서 매일 cytopathic effect (CPE)를 현미경으로 관찰하였고, 배양 3일 후 50%의 세포를 사멸시키는 (CD₅₀)시료의 가장 높은 희석 배수를 endpoint로 하여 mutant와 wild type Stx2e 활성의 정도를 결정하였다. CD₅₀의 판정은 배양한 plate를 조심스럽게 진탕하여 사멸한 세포와 배양액을 제거하고, 2% formalin을 첨가한 0.067 M phosphate buffered saline (2% formalin-PBS, pH 7.2)으로 1분간 고정시킨 후 0.13% crystal violet (5% ethanol- 2% formalin-PBS)로 20분간 염색하였다. 염색한 세포를 실온에서 50분간 건조한 후, 50% ethanol 200 µl를 가하여 용출된 용액 100 µl를 0.9 ml의 PBS에 희석하여 spectrophotometer 595 nm에서 흡광도를 측정하여 CD₅₀를 정하였다.

결 과

Plasmid의 결손변이 확인

Stx2e 유전자를 보유한 pED18 (4.1 kb)을 PCR하여 효소 활성부위의 결손변이를 유발하고 제한효소로 절단하여 전기영동 한 결과는 Fig 1에서 보는 바와 같다. Lane 1은 결손변이가 확인된 plasmid를 제한효소 *EcoRV*으로 절단하여 전기영동 한 것으로 4.1 kb의 DNA band가 확인되었고, lane 2는 *EcoRV*과 *HindIII*로 절단한 것으로 1.4 kb의 insert와 2.7 kb의 vector가 확인되었다.

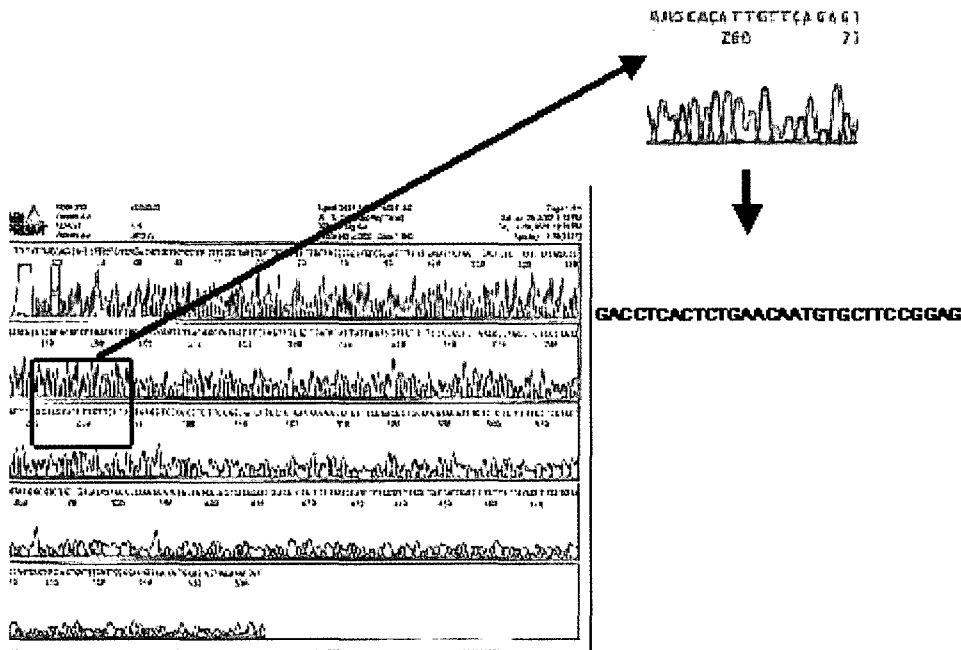


Fig 2. Confirmation of deleted nucleotide sequence in Stx2e A.

변이 도입 유전자의 염기서열

PCR에 의한 결손 변이 된 유전자를 대장균에 형질 전환하고 DNA mini-prep kit를 사용하여 DNA를 정제한 후 염기서열을 분석하였다. 염기 서열 분석한 결과 원래의 염기 서열인 GAC CTC ACT CTG AAC TGG GGG AGA ATC AGC AAT GTG CTT CCG GAG에서 분리균 Stx2e A subunit gene의 효소활성 영역 아미노산 WGRIS(TGG GGG AGA ATC AGC)를 암호화하는 염기 15개가 결손된 것으로 확인되었다(Fig 2.).

발현 plasmid pEDSET의 작성 및 확인

결손변이 된 plasmid를 *EcoRV*와 *HindIII*로 절단하여 insert 1.1 kb를 수집하고 동일한 제한효소로 절단한 vector pRSET 2.9 kb에 삽입하여 발현 플라스미드 pEDSET를 작성하고, insert 삽입 여부를 확인하기 위하여 *EcoRV*와 *HindIII*로 절단한 결과는 Fig 3에서 보는 바와 같다. Lane 1은 발현 plasmid pEDSET을 제한효소 *HindIII*로 절단한 것으로 4.0 kb의 DNA band를 확인할 수 있었으며, lane 2는 발현 plasmid pEDSET을 *EcoRV*와 *HindIII*로 절단한 것으로서 2.9 kb의 vector와 1.1 kb의 insert band가 확인되었다.

발현 plasmid pEDSET의 발현

발현 plasmid pEDSET를 BL21에 형질전환 시킨 후 IPTG (최종농도 0.5 mM)로 유도하여 단백질을 발현 시키고 배양액을 1시간별로 회수하여 분획을 확인하였다. 수집한 액을 SDS-PAGE로 전개하여 염색한 결과 약 34 kDa

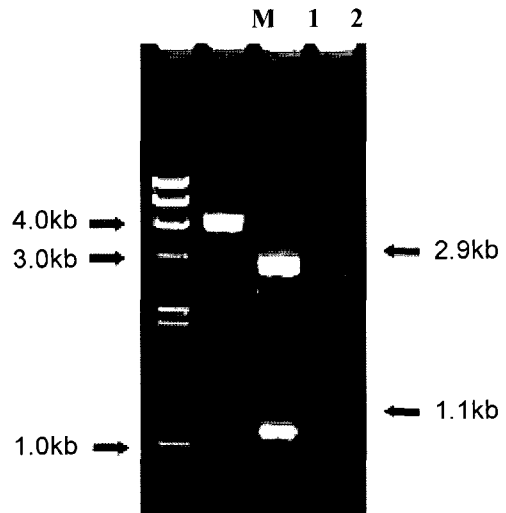


Fig 3. Identification of recombinant DNA pEDSET (ST2e-pRSET): 1, recombinant DNA pEDSET (4.0 kb) digested by *HindIII*; 2, Stx2e A gene (1.1 kb) and pRSET plasmid vector (2.9 kb) divided from recombinant DNA by *EcoRV* and *HindIII*.

의 단백질 분획이 확인되었고 약 3-5시간 내에 단백질 발현이 가장 강한 것으로 확인되었다(Fig 4).

Western blotting에 의한 변이단백질의 확인

발현 plasmid pEDSET을 IPTG유도로 발현하고 시간별로 회수하여 추출 정제한 발현 단백질을 SDS-PAGE로 전개한 것을 nitrocellulose filter에 전사하여 Western

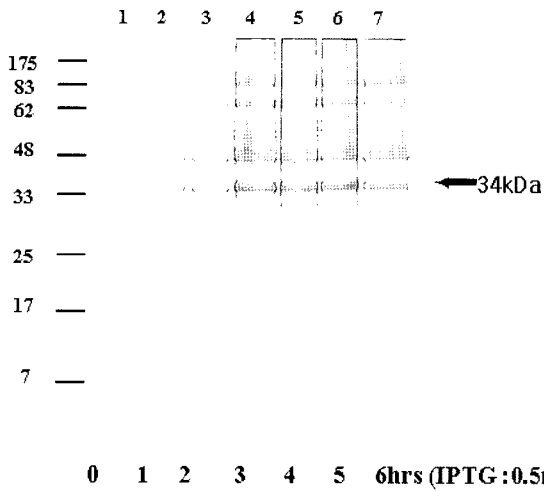


Fig 4. Plasmid pEDSET expressed in *E. coli* BL21 cells induced by IPTG (final conc. 0.5 mM) by different time course.

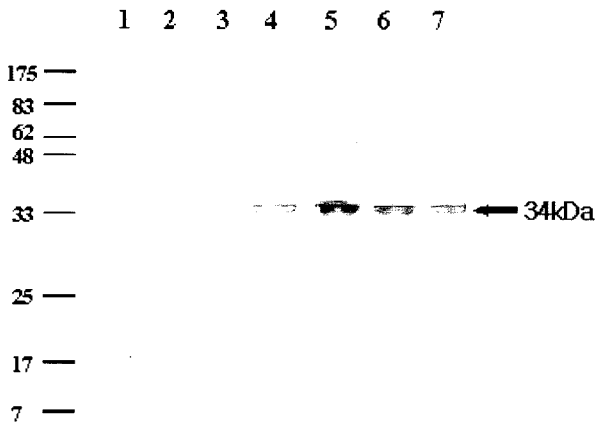


Fig 5. pEDSET protein determined by Western-blotting of fusion protein Stx2e A.

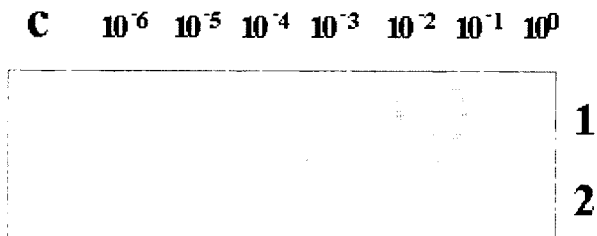


Fig 6. Reduced cytotoxicity of deletion-mutated Stx2e A-pRSET in Vero cells. : 1, Deleted mutant Stx2e protein; 2, Wild type Stx2e

blotting법으로 확인한 결과 약 34 kDa의 융합 단백질이 검출되었다(Fig 5).

Stx2e-pRSET 변이단백질의 Vero cell에 대한 세포 독성 발현 plasmid pEDSET을 배양하여 IPTG (최종 농도

0.5 mM)로 변이를 유발한 독소 단백질을 발현시키고 동시에 wild type Stx2e의 제조할 균주를 동일한 조건으로 발현시켜 Vero cell에 대하여 세포독성을 비교한 바 Fig 6에서 보는 바와 같이 wild type의 배양 여액은 10^{-4} 희석액에서 세포독성을 나타내었고 변이주의 배양 여액은 10^{-1} 희석액에서도 세포독성을 나타내지 않았다.

고 찰

본 연구에서는 부종병 감염 돼지에서 분리한 대장균 O139유래 Stx2e A 유전자의 효소 활성부에 대하여 위치 특이적 변이를 유발하여 형질전환하고, 형질 전환균으로부터 변이 단백질을 발현하므로써 이를 이용한 단 클론성 항체생산 및 백신개발 가능성을 확인 하였다.

본 연구에서는 분리균 Stx2e유전자를 지닌 plasmid (pED18)를 분리 정제하고 PCR을 통하여 결손변이를 유발한 다음 제한효소 *HindIII*와 *EcoRV*으로 절단하여 1.1 kb의 Stx2e A 유전자를 확보하고, 동일한 제한효소로 절단한 vector plasmid pRSET 2.9 kb에 삽입하여 4.0 kb의 변이 도입용 발현 plasmid pEDSET을 작성할 수 있었다. Insert Stx2e A 유전자의 삽입 여부를 확인하기 위하여 pEDSET를 제한효소 *HindIII*와 *EcoRV*로 절단한 결과 2.9 kb의 vector plasmid와 1.1 kb의 insert plasmid band가 확인되었다. 본 연구에서 작성한 발현 plasmid pEDSET은 차후 제2의 효소활성영역 Glu 167에 대한 유전자에 point mutation을 추가 도입하여 세포독성이 더 약화된 안정성 있는 백신의 개발에 이용할 수 있으리라 생각 된다. 그러나 결손 변이가 도입된 mutant Stx2e는 wild type Stx2e의 분자량과 거의 비슷하여 식별이 어려웠고 세포독성이 약하여 affinity column을 사용하여 세포독성을 나타내는 분획만 수집하는 wild type 독소정제 방법을 사용할 수 없었다. 따라서 본 실험에서는 변이 도입된 Stx2e A 유전자를 *HindIII*와 *EcoRV*로 절단하여 동일제한 효소로 처리한 pRSET유전자에 삽입하여 Stx2e A-pRSET 융합 단백질을 발현시키고, SDS-PAGE로 전개하여 nitrocellulose filter에 전사한 것을 immunoblotting법으로 확인한 결과 Stx2e A 변이 단백질과 pRSET단백질이 융합된 약 34 kDa의 분획을 확인할 수 있었다. 본 실험 결과 변이 단백질의 세포 독성은 결손변이 단백질의 경우 wild type에 비하여 3,000배 이상 감소시킬 수 있었다. 이러한 결과는 Kim 등¹⁰과 Jackson 등⁸이 Stx2e 유전자와 염기서열이 유사한 Stx2 A 유전자의 동일한 영역에 대하여 결손 변이를 유발하여 얻은 변이 단백질은 세포독성이 10^3 배 감소하였다는 결과와 유사하였다. 이상과 같은 결과를 통하여 볼 때 Stx2e는 다른 Shigatoxin 들과 같이 효소 활성 영역에 active-site cleft가 존재하며, 이를 구성하는 아미노산들에 대한 결손변이의 유도가 효과적으로 수행된 것으로 생각된다. 따라서 변이 Stx2e유전자에서 발현된 단백질은 Stx2e의 검출과 진단에 필요한 단 클론성 항체 및

백신 개발을 위한 재료로 사용 할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

돼지 부종병의 원인으로 작용하는 Shigatoxin에 대한 변이 단백질을 생산하기 위하여 Stx2e의 두 번째 활성영역에 해당하는 Trp 202번에서 Ser 206번까지를 결손변이 시키고 변이 유전자에 대한 발현 plasmid를 제작하였다. 분리균 Stx2e A subunit의 효소 활성 부위에 결손변이를 유발하여 변이 된 plasmid pEDSET을 작성하였다. 결손 변이가 유발된 Stx2e A subunit gene의 염기 서열을 분석한 결과 효소 활성부위의 두 번째 영역인 Trp 202번에서 Ser 206번까지 결손 된 것을 확인되었다. 변이 유발 Stx2e 유전자의 발현을 위하여 변이 유전자를 pRSET vector에 융합하여 ST2e-pRSET fusion plasmid(pEDSET)를 구축하였다. pEDSET 를 대장균에 형질 전환한 것을 IPTG유도로 발현하여 Western blotting법으로 발현한 단백질을 확인하였다. 발현 단백질의 Vero cell에 대한 세포독성은 wild -type에 비하여 3,000배 이상 감소하였다.

감사의 글

이 논문은 2000년 경상남도 생명공학 산업화 연구비 (과제번호 20000483) 지원에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

1. Deresiewicz RL, Calderwood SB, Robertus JD, Collier RL. Mutations affecting the activity of the Shiga-like toxin A chain. *Biochemistry* 1992; 31: 3272-3280.
2. Frankel A, Welsh P, Richardson J and Robertus JD. Role of arginine 180 and glutamic acid 177 of ricin toxin A chain in enzymatic inactivation of ribosomes. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 6257-6263.
3. Frankel S, Harmsen D, Caeprioli A, Pierard D, Wieler LH, Carch H. Clonal relatedness of Shiga-like toxin production *Escherichia coli* O101 strains of human and porcine origin. *J Clin Micro* 1995; 33: 3174-3178.
4. Frydendahl K. Prevalence of serogroups and virulence in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhea and edema disease in pigs and comparison of diagnostic approaches. *Vet Microbiol* 2002; 85: 169-182.
5. Haddad JE, AL-Jaufy AY and Jackson MP. Minimum domain of the Shiga toxin A subunit required for enzymatic activity. *J Bacteriol* 1993; 175: 4970-4978.
6. Hovde CJ, Calderwood SB, Mekalanos JJ, Collier RJ. Evidence that glutamic acid 167 is an active-site residue of Shiga-like toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2568-2572.
7. Gyles CI, DeGrandis SA, Mackenzie C, Brunton CJ. Cloning and nucleotide sequence analysis of the genes determining Verocytotoxin production in a porcine edema disease isolates of *E.coli*. *Microbial Pathog* 1988; 5: 419-426.
8. Jackson MP, Deresiewicz RL, Calderwood SB. Mutational analysis of the Shiga toxin and Shiga -like toxin enzymatic subunit. *J Bacteriol* 1990; 172: 3346-3350.
9. Kim YH, Kim SH, Cha IH, Cho HH. Induction of Mutation for Verotoxin2 A gene by single base substitution and development of vaccine for mouse model. *Kor J Vet Publ Hlth* 1997; 21: 9-14.
10. Kim YH, Kim SH, cha IH, KIM KS, Lee YC, Site specific and deletion mutagenesis for two regions of Verotoxin-2A gene encoding enzymatically active domain. *Korean J Vet Res* 1997; 37: 541-564
11. Lingwood CA. Role of Verotoxin receptors in pathogenesis. *Trends in microbiology* 1996; 46: 147-152.
12. Lingwood MA, Thompson JM. Verocytotoxin production among porcine strains of *E.coli* and its association with edema disease., *J Med Microbial* 1987; 25: 359-362.
13. MacLeod DL, Gyles CL and Wilcock BP. Reproduction of edema disease of swine with Purified Shiga-like toxin variant. *Vet Pathol* 1991; 28: 66-73.
14. Montfort W, Villafranca JE, Monzingo AF, Ernst SR, Katzin B, Rutenber E, Xuong NH, Robertus JD. The three-dimensional structure of ricin at 2.8Å. *J Biol Chem* 1987; 262: 5398-4303.
15. Saxena SK, O'Brien AD, Ackerman EJ. Shiga toxin, Shiga-like toxin variant, and ricin are all single-site RNA N-glycosidases of 28S rRNA when micro injected into *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 1989; 264: 596-601.
16. Schlossman D, Withers D, Welsh P, Alexander A, Robertus JD, Frankel A. Role of glutamic acid 177 of ricin toxin A chain in enzymatic of ribosomes. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 5012-5021.
17. Silva AS, Valadares GF, Penatti MPA, Brito BG, Leit DS. *Escherichia coli* strains from edema disease : O serogroup and genes for Shigatoxin, enterotoxin, and F18 fimbriae. *Vet Microbiol* 2001; 80: 227-233.
18. Weinstein DL, Jackson MP, Samuel JE, Holmes RK, O'Brien AD. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type Variant from an *Escheichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J Bacteriol* 1988; 170: 4223-4230.
19. Yamasaki S, Furutani M, Ito K, Igarashi K, Nishibuchi M, akeda Y. Importance of arginine at position 170 of the A subunit of verotoxin 1 produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* for toxin activity. *Microb Pathog* 1991; 11: 1-9.
20. 김종희, 차인호, 김용환. 부종병 감염돼지 유래 대장균 O139로부터 Verotoxin-E 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석. *한국수의공중보건학회지*. 1997; 21: 281-288.