Journal of Life Science 2006 Vol. 16. No. 7. 1112~1118 ©JLS

*Bordetella bronchiseptica*의 alcaligin siderophore 생합성 유전자인 *alcA*에 관한 연구

황호순 · 김영희 · 김삼웅 · 유종언 · 유아영 · 강호영 · 이태호*

부산대학교 자연과학대학 생명과학부

Received August 14, 2006 / Accepted September 29, 2006

Studies of an *alcA* Gene Involved in Alcaligin Siderophore Biosynthesis in *Bordetella bronchiseptica*. Hwang, Ho Soon, Young Hee Kim, Sam Woong Kim, Jong Earn Yu, Ah Young Yoo, Ho Young Kang and Tae Ho Lee*. *Division of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 609-735, Korea.* – *Bordetella bronchiseptica*, the agent of swine atrophic rhinitis and kennel cough in dogs, is a mucosal pathogen and produces the hydroxamate type alcaligin siderophore under iron-limited conditions. Genes involved in alcaligin siderophore biosynthesis are contained in an *alcABCDE* operon. In order to provide direct evidence for the role of AlcA in alcaligin biosynthesis, we needed a *B. bronchiseptica* mutant carrying *alcA* gene deletion. A 0.6 kb *alcA* 5'-flanking and 0.7 kb 3'-flanking DNA fragments were PCR amplified with the use of pCP1.11 as a template DNA. The 5'-and 3'-flanking DNA fragments were joined in a suicide plasmid, resulting in a recombinant suicide plasmid pDM1. After introduction of pDM1 into *B. bronchiseptica* by conjugation, the allelic exchange technique was performed and a *B. bronchiseptica alcA* deletion mutant, named *B. bronchiseptica* H1, was obtained. The mutant strain produced reduced amount of siderophore as expected. When a plasmid containing complete *alcA* gene was transformed back into the mutant, the complemented mutant recovered ability of siderophore production. These results indicated that AlcA is one of essential components for the alcaligin siderophore biosynthesis. The mutant strains obtained in this study will be used in the further studies for the biochemical function of AlcA.

Key words – *Bordetella bronchiseptica*, alcaligin, siderphore, *alcA*

서 론

Bordetella 속의 세균은 사람을 포함한 다양한 동물의 호흡기관에 병을 일으키는 병원성 세균으로서, 그 중에서 *Bordetella pertussis*는 인간에게 백일해를 유발시키는 원인균이고, *Bordetella bronchiseptica*는 포유동물의 호흡기관에 집락을 형성하여 질병을 유발한다[1].

*B. pertussis*와 *B. bronchiseptica*는 호흡기의 점액성 표면에 감염을 일으키지만 혈류를 통해서 다른 조직으로 전이되지 않는 특징을 가진다. 이들 병원균이 감염을 이루게 되는 데는 여러 요소들이 관여하는데 그 중에서 철(iron)이 중요한 요인으로 작용한다. 철은 모든 세포에서 필수 영양소로 작용하는데 진핵 숙주세포 내에서는 단백질에 결합한 형태로 존재하므로 병원성 세균이 획득할 수 있는 자유로운 철(free iron)은 제한적이다. 따라서 병원성 세균들이 감염을 이루는데 있어서 제한된 조건에서 철을 이용할 수 있는 메커니즘을 가동시키는 것이 필수적이다[13]. 또한 철은 세균들에 독성 인자로서의 역할도 한다[4,5,8,9,16].

세균은 일반적으로 철을 획득하기 위한 두 가지의 시스템을 이용한다. 그 중 하나는 iron-chelating soluble siderophore로 철에 대한 높은 친화성을 이용하는 방법이고[12], 다른 하나는 숙주 단백질로부터 세포표면에 있는 transferrin이나 lactoferrin과 같은 특정 수용체를 통해 직접적으로 철을 획득하는 것이다[2,10,11,17]. *B. pertussis*와 *B. bronchiseptica*는 putrescine을 전구체로 하여[8] alcaligin이라는 hydroxamate 형태의 siderophore를 생산하는데 macrocyclic dihydroxamate siderophore alcaligin의 분자구조인 1,8(s),11,8(s)-tetrahydroxy-1,6,11,16-tetraazacycloeicosane-2,5,12,15-tetrone (molecular formula, $C_{16}H_{28}N_4O_8$; molecular weight, 404)으로 확인되었다[13,14](Fig. 1).

Alcaligin의 생합성에는 *alcA*, *alcB*, *alcC*, *alcD*, *alcE* 유전자들이 관여하며, 이들 유전자에 대한 Alc-LacZ fusion proteins 연구에서 이 *alc* 유전자들은 *alcA* 유전자의 상류 105 bp 부분에 위치하고 있는 *alc* promoter의 조절을 받는 operon으로 이루어져 있는 것으로 밝혀졌다[6]. *Bordetella*에서 추정되는 alcaligin 생합성 경로는 ornithine decarboxylase의 활성에 의해서 putrescine이 생성되고[8], 만들어진 putrescine이 succinate와 반응하여 succinyl-hydroxy-putrescine이 생성되는 것으로 추정을 하고 있으며, 이 반응은 *alcA*가 coding하는 AlcA의 아미노산 서열을 바탕으로 유추되는 oxygenase의 활성에 의해 촉매되는 것으로 생각되어지고 있다. 이러한 alcaligine siderophore의 생합성 과정은 여러 측면에서 추정은 되고 있지만 직접적으로 증명된 바는 없다[7].

*Corresponding author
Tel : +82-51-510-2267, Fax : +82-51-514-1778
E-mail : leeth@pusan.ac.kr

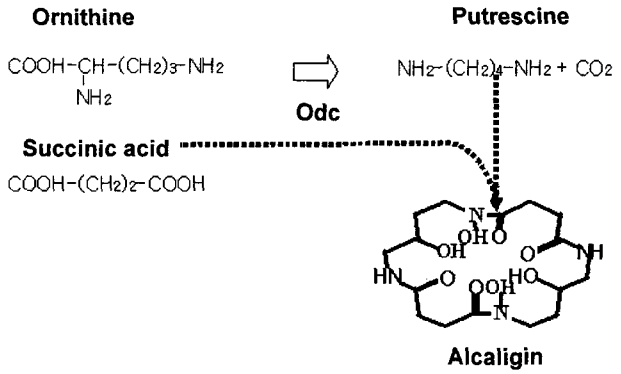

Fig. 1. A brief scheme of initial biosynthetic pathway for *Bordetella* alcaligin. Putrescine is made up of ornithine decarboxylase from precursor ornithine. Alcaligin is synthesized by unknown mechanism from putrescine and succinic acid.

본 연구에서는 *alcA* 유전자가 *B. bronchiseptica*의 alcaligin의 생합성에 어떠한 역할을 하는지 알아보기 위해 *alcA* 유전자를 결손시킨 *B. bronchiseptica*의 돌연변이주를 구축한 후 complementation 실험으로 alcaligin siderophore 생합성에 *alcA* 유전자의 직접적인 관여를 증명하였고 앞으로 행해질 생화학적인 연구를 위한 실험재료를 구축하였다.

재료 및 방법

사용균주, 플라스미드와 배양조건

실험에 사용한 균주와 플라스미드는 Table 1에 나타내었다. *Escherichia coli*균은 플라스미드의 형질전환을 위한 donor로 사용되었다. *B. bronchiseptica*의 액체배양을 위해 Luria-Bertani (LB)배지를 사용하였고 37℃에서 24시간 배양하였다. 고체배양은 LB 배지에 1.5% (w/v) agar를 함유하는 평판배지에서 수행하였다. *B. bronchiseptica*의 야생형의 alcaligin siderphore 생합성 정도를 확인하기 위해서는 Chrome Azurol S (CAS) 배지를 사용하였다. 사용된 CAS배지는 Stainer-Scholte (SS) basal medium (sodium glutamate 10.72 g, L-proline 0.24 g, NaCl 2.50 g, KH_2PO_4 0.50 g, KCl 0.20 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.10 g, $CaCl_2$ 0.02 g, Tris 1.52 g /1000 ml H_2O)와 SS vitamins(100배 농축 stock: L-cystine 0.4 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g, ascorbic acid 0.2 g, nicotinamide 0.04 g, glutathione 1.00 g / 100 ml H_2O)을 첨가한 배지로서 자세한 제조법은 선행 연구에서 이용된 방법을 사용하였다[6]. CAS 배지에 사용되는 모든 초자기구들은 4 M H_2SO_4로 세척을 한 후 3차 증류수로 세척을 행하여 철 성분을 제거하였다.

Allelic exchange 방법에 의한 돌연변이주를 구축하기 위해서 5% sucrose가 첨가된 LB agar 배지를 사용하였고, 실험의 단계에 따라 선택적으로 ampicillin (Ap), tetracycline (Tet), diaminopimelic acid (DAP)을 각각 100 μg/ml, 15 μg /ml, 100 μg/ml씩 배지에 첨가하여 사용하였다.

유전자 조작

유전자 조작은 Sambrook *et al.*의 방법[15]으로 실시하였다. *E. coli*로의 형질 전환은 calcium chloride 방법 또는 electroporation법으로 실시하였다. Nucleotide sequencing은 ABI 373 automatic sequencer (PE Applied Biosystems)에 의해 실시되었다.

*B. bronchiseptica*의 염색체 DNA를 template로 하여 Accu-Power HL PCR premix (Bioneer) 20 μl에 첨가하여 PCR을

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Bacteria or plasmid	Characteristics	Referencs of sources
Bacteria		
Bordetella bronchiseptica	wild-type	Lab stock
Bordetella bronchiseptica H1	alcaligin siderphore biosynthetic mutant	This study
E.coli DH5α	transformation host for cloning vector	Lab stock
E.coli χ7213	*E.coli* DH5α delivative(Δ*asd*),DAP required	Lab stock
Plasmid		
pGEM-T Easy	vector for cloning of PCR products	Promega
pRK415	cloning vector, blue/white screening, RK*ori* {broad-host range},Tet^R	Lab stock
pCP1.11	Tet^R , *alc* operon in pCP13 cosmid vector	Lab stock
pDMS197	suicide vector, requird DAP, Tet^R	Lab stock
pHS1	pGEM-T Easy with A1; Ap^R	This study
pHS2	pGEM-T Easy with A1::A3 ; (ΔA2) Ap^R	This study
pDM1	pDMS197 with A1::A3 ; (ΔA2) DAP, Tet^R	This study
pCalcA	pRK415 with *alcA'* ; Tet^R	This study

*Ap^R, ampicillin resistance; Tet^R, tetracycline resistance

수행하였다. PCR은 Applied Biosystems (Gene Amp PCR System 2700)를 사용하였고, PCR 조건은 95℃에서 5분간 pre-denaturation시킨 후 denaturation은 95℃에서 1분, annealing은 55℃에서 1분, extension은 72℃에서 1분으로 30 cycle을 수행하고 마지막 chain extension을 위해 72℃에서 7분간 반응하였다. 얻어진 PCR 산물은 TAE (40 mM Tris acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) buffer를 사용한 0.8% agarose gel 상에서 전기영동을 통해 확인하였다. PCR에 사용된 oligonucleotide primers는 Bioneer Co. (Cheongwon, Korea)에서 주문 제작하였고, 사용된 oligonucleotide들의 염기서열은 Table 2에 나타내었다.

pHS1과 pHS2의 구축

Alcaligin 생합성에 관여하는 *alc* operon을 함유하고 있는 pCP1.11 플라스미드 DNA를 template로 하여 *alcA* 부위의 각종 DNA를 증폭시키기 위하여 각 부위에 특이적인 primer(Table 2)들을 제작하였다.

alcA 결손 돌연변이주를 구축하기 위하여 pCP1.11 플라스미드 DNA를 template로 하여 primer sF와 aR를 이용해서 *alcA*의 5'-flanking DNA fragment를 PCR법으로 증폭하였고 얻어진 산물을 pGEM-T easy vector (Promega, USA)에 subcloning하고 이를 pHS1이라 명명하였다. 동일한 방법으로 pCP1.11 플라스미드 DNA를 template로 하여 primer s1F와 a1R를 이용해서 *alcA*의 3'-flanking DNA fragment를 PCR법으로 증폭하여 얻어진 산물을 pGEM-T easy vector (Promega, USA)에 subcloning한 후 제한효소 *Bam*HI과 *Sac*I를 처리하여 얻어진 3'-flanking DNA를 동일한 제한효소로 처리된 pHS1 플라스미드에 cloning하여 플라스미드 pHS2을 구축하였다.

재조합 플라스미드 pDM1의 구축

Allelic exchange 방법에 의한 *alcA* 유전자 결손 돌연변이 균주를 얻기 위하여 suicide vector인 pDMS197 plasmid를 사용하여 recombinant suicide vector plasmid pDM1을 구축하였다. 제한효소 *Kpn*I과 *Sac*I으로 처리된 pDMS197 DNA vector에 pHS2를 *Kpn*I/*Sac*I으로 처리하여 얻어진 5'- 및 3'-flanking을 포함하는 DNA fragment를 ligation한 후 *E. coli* χ 7213으로 형질전환하여 recombinant suicide vector pDM1을 구축하였다.

Allelic exchange에 의한 alcaligin siderophore을 생합성하는 유전자의 불활성화 돌연변이체 선발

pDM1을 포함하는 *E. coli* χ7213으로부터 수용체인 *B. bronchiseptica*로 접합에 의해 suicide plasmid를 도입하기 위해 다음과 같이 실시하였다. 분광 광도기를 이용하여 660 nm에서 흡광도 0.8~1.0 정도까지 배양한 후 donor:recipient를 4:1의 비율로 하여 12,000 rpm, 4℃, 5분간 원심분리한 후 pellet을 얻었다. 얻어진 pellet을 LB broth 1 ml에 완전히 resuspension 시킨 후, 12,000 rpm, 4℃, 5분간 원심분리하여 pellet을 얻는 과정을 3회 반복한 후 각각의 pellet을 LB broth 30 μl에 녹여 donor와 recipient를 잘 혼합하여 DAP을 함유하는 LB 고체 배지에 접종한 후 37℃ 배양기에서 18시간 배양하여 mating하였다. Single crossover가 이루어진 돌연변이 균주를 tetracycline을 함유하는 LB 액체배지에서 선택배양하여 5% sucrose가 첨가된 LB 고체평판배지에 100 μl 정도 도말한 후 37℃ 배양기에서 18시간 배양하여 선별하였다. Counter-selection을 위해 5% sucrose를 함유하는 LB 고체평판배지와 tetracycline을 함유하는 LB 고체평판배지에서 replica method로 균을 toothpicking하여 5% sucrose를 함유하는 평판배지에서는 집락을 이루고 tetracycline 배지에서는 생육하지 않는 colony를 선별하였다. 선별된 균의 염색체 DNA를 추출해서 *alcA* mutant identification primer(Table 2)들을 사용하여 PCR 증폭을 실시하였다. 대조군으로 *B. bronchiseptica* 야생형을 동일한 primer들을 사용하여 DNA의 크기를 비교함으로서 *alcA* 유전자의 결손여부를 확인하였다.

Table 2. Nucleotide sequences of the primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Characteristics
alcA mutant primer		
primer sF	GGGGGTACCAGATTGCCCAGGGCCATGACC	Amplification of A1 gene, contains *Kpn* I site
primer aR	GGGGGATCCGATACCGATAGCCACGAAGTC	Amplification of A1 gene, contains *Bam* HI site
primer s1F	GGGGGATCCAGTTCTCTCCACCAGCAGACG	Amplification of A3 gene, contains *Bam* HI site
primer a1R	GGGGAGCTCGAAGGCAAGGCTTGCCGTCTT	Amplification of A3 gene, contains *Sac* I site
alcA mutant identification primer		
primer s2F	TATTGCAAACTCACCACCCGC	Amplification of *alcA* internal region
primer a2R	TGGAAATATTCGGTGTAGTCC	Amplification of *alcA* internal region
Complementation primer		
primer-F	GGGGGATCCCGCGCGAAATGCCGGCGG	Amplification of *alcA* gene, contains *Bam* HI site
primer-R	GGGAAGCTTCGTCATCATCGCGCTTCC	Amplification of, *alcA* gene, contains *Hind* III site

CAS 활성에 의한 alcaligin siderophore의 검출

alcA 유전자가 결손된 *B. bronchiseptica* H1로부터 alcaligin siderophore의 생합성을 검출하기 위해서 CAS agar 배지에 도말을 통한 실험을 실시하였다. CAS agar 배지에는 iron이 결핍된 최소배지 M9을 사용하였고, alcaligin siderophore의 활성도는 clear zone의 생성 여부를 육안으로 관찰하였다.

alcA 유전자의 complementation assay

pCP1.11 플라스미드 DNA가 가지고 있는 *alcA* 유전자로부터 complementation primer들인 primer-F와 primer-R를 이용해서 PCR을 실시하여 *alcA* promoter 부위가 포함된 부위부터 *alcA*를 완전히 포함하는 DNA fragment를 증폭하였고, 이 PCR 산물을 broad-host 영역 플라스미드인 pRK415 vector에 제한효소 *Bam*HI와 *Hin*dIII를 처리하여 ligation을 실시하였다. 제작된 재조합 플라스미드의 complementation 능력을 확인하기 위하여 플라스미드를 *alcA* 결손 돌연변이주에 도입하였다. 플라스미드의 형질전환을 확인하기 위해 tetracycline이 첨가된 LB 고체평판배지에서 선별하였고, alcaligin siderphore의 형성 능력은 CAS 고체평판배지상에서 확인하였다.

결과 및 고찰

alcA 유전자가 결손된 재조합 suicide plasmid 구축을 위한 subcloning

*B. bronchiseptica*의 alcaligin siderphore 생합성에 관여하는 효소인 ornithine decarboxylase 유전자의 결손 돌연변이주를 활용한 연구에서 alcaligin 생합성의 필수 전구체로 putrescine이 관여한다는 사실은 이미 밝혀져 있다[3](Fig. 1). 이에 *alcA* 유전자를 결손시키기 위해 먼저 alcaligin 생합성에 관여하는 5개의 유전자를 함유하는 *alc* operon을 가지는 pCP1.11 플라스미드 DNA를 주형가닥으로 해서 primer sF와 aR을 이용해서 pHS1의 구축을 위한 실험을 실시하였다. PCR 법으로 얻어진 0.6 kb *alcA* 5'-flanking DNA와 pGEM-T easy vector을 ligation시킨 후 *E. coli* 숙주에 형질전환시켰다. 분리한 플라스미드 DNA를 제한효소 *Kpn*I, *Kpn*I/*Bam*HI을 처리하였을 때 3.6 kb 및 3.0 kb/0.6 kb의 DNA 크기를 확인함으로서 cloning 산물을 확인할 수 있었다(data not shown). pCP1.11 플라스미드 DNA를 주형가닥으로 해서 primer s1F와 a1R을 이용해서 0.7 kb의 *alcA* 3'-flanking DNA를 증폭하였다. 5'-flanking DNA를 함유하고 있는 pHS1 DNA vector(Fig. 2)에 primer s1F와 a1R을 사용하여 PCR을 통해 획득한 0.7 kb 3'-flanking DNA를 각각 제한효소 *Bam*HI/*Sac*I으로 처리하여 ligation시켜 재조합 플라스미드 pHS2를 구축하였다. 플라스미드 pHS2 DNA를 제한효소 *Sac*I, *Sac*I/*Bam*HI을 처리하였을 때 4.3 kb와 3.0 kb/1.3 kb의 DNA 크기를 확인함으로서 원하는 형태의 재조합 DNA가 구축되었음을 확인할 수 있었다(data not shown).

alcA 유전자의 결손돌연변이주 구축

*alcA*의 5'-과 3'-flanking DNA가 연결되어 *alcA* 유전자가

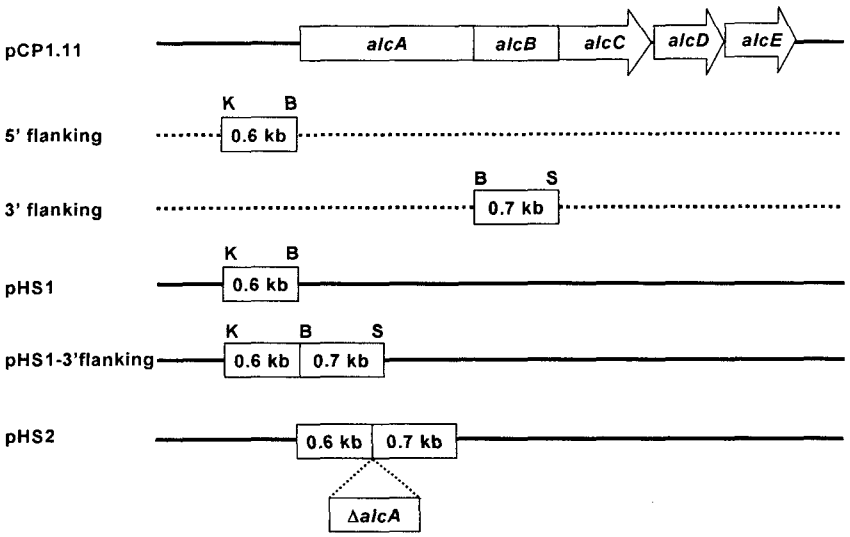

Fig. 2. Schematic overview of the genetic organization of *B. pertussis alcA* genes. The 5'-flanking DNA fragment of *alcA* gene was PCR amplified and cloned it into the pGEM T-easy vector, resulting in pHS1. A 0.7 kb *alcA* 3'-flanking fragment DNA amplified by PCR was digested with the enzyme *Bam*HI and *Sac*I, and then it was subcloned into pHS1 at *Bam*HI and *Sac*I sites, resulting in the pHS2 carrying *alcA* deletion. Abbreviations: K, *Kpn*I; B, *Bam*HI; S,*Sac*I

결손된 재조합 DNA를 함유하고 있는 pHS2로부터 이 DNA fragment를 suicide vector pDMS197로 옮기는 실험을 하였다. pHS2에 제한효소 *Kpn*I/*Sac*I을 처리하여 원하는 재조합 DNA fragment를 잘라내고 동일 제한효소로 처리된 pDMS197과 ligation한 후 $CaCl_2$ 방법으로 DAP 요구주인 *E. coli* χ7213에 형질전환하여 *alcA* 유전자 결손을 위한 재조합 suicide 플라스미드를 제작하였다. 목적 재조합 suicide 플라스미드를 제한효소 *Kpn*I, *Kpn*I/*Sac*I의 처리와 PCR로서 해당 유전자의 크기를 6.9 kb, 5.6 kb/1.3 kb 그리고 1.3 kb로 확인하였다(data not shown). 생성된 재조합 suicide 플라스미드를 pDM1으로 명명하였다(Fig. 3).

*B. bronchiseptica*와 *E. coli* χ7213/pDM1을 4:1의 비율로서 혼합하여 DAP을 함유한 LB 평판배지상에서 pDM1 plasmid DNA를 접합에 의해 *B. bronchiseptica*로 전달하였다. 데트라사이클린이 첨가된 LB 고체평판배지상에서 single cross-over가 이루어진 균을 일차적으로 선택한 후 double cross-over가 일어나서 *alcA* 유전자가 결손된 mutant을 구축하기 위해 다음 과정을 진행하였다. 일차적으로 선택된 colony를 LB 액체배지에서 2일간 배양하고, 5% sucrose와 Tet이 첨가된 LB 고체한천배지상에서 tooth picking하여 counter-selection을 실시하였다. 5% sucrose 배지에서만 성장하는 colony를 염색체 DNA를 분리하여 PCR 방법으로 확인한 후 *alcA* 유전자가 결손된 돌연변이주를 *B. bronchiseptica* H1이라고 명명하였다. *alcA* 유전자가 결손된 돌연변이주와 야생형

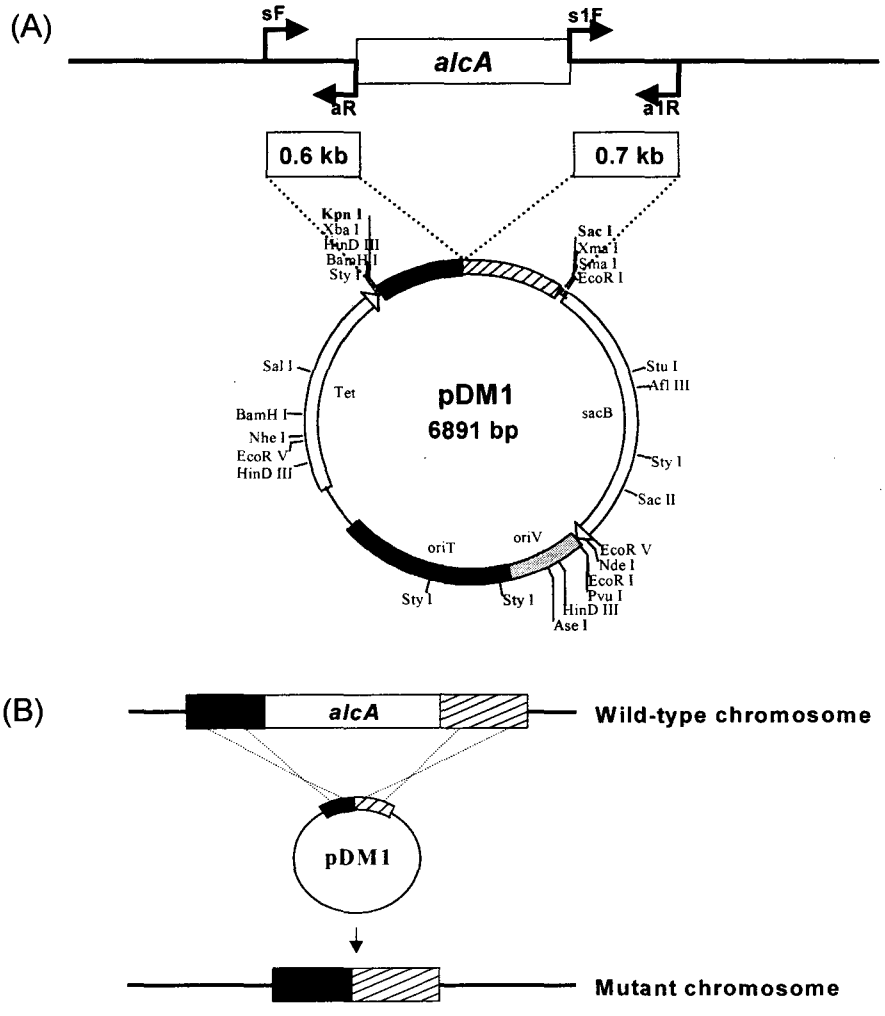

Fig. 3. Construction of *alcA* deleted mutant by allelic exchange from *B. bronchiseptica*. (A) Diagram of pDM1. Relative location and orientation of primers used in the amplification of *alc*A flanking DNA were designated on the map. Ligation of PCR amplified DNA fragments were indicated with dotted lines. A recombinant suicide plasmid pDM1 was presented in a circular map. *ori*, replication origin R6K; *sacBR*, positive selection marker on sucrose media; *tet*, tetracycline resistance gene, (B) A process of allelic exchange. The 5'-flanking DNA(black box), *alc*A(white box), and 3'-flanking DNA(sliced box) were designated. Cross-dotted lines indicated recombination of allele between chromosomal and plasmid.

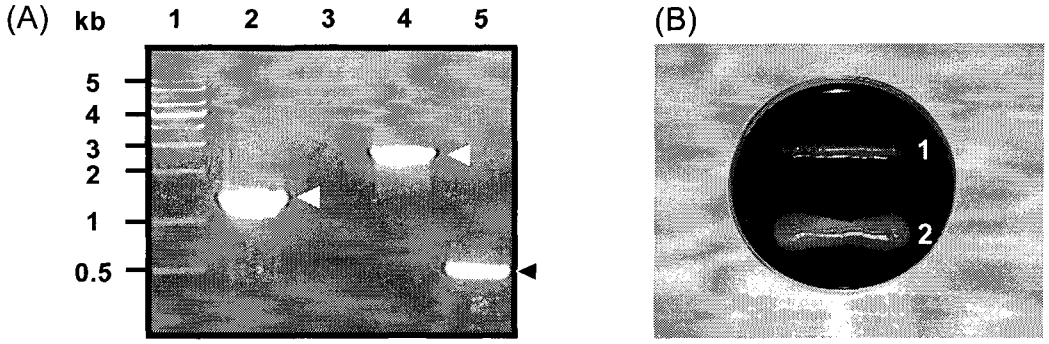

Fig. 4. Confirmation of *alc*A deletion mutant. (A) Genetic confirmation of *alcA* deletion mutation. Lane 1, size marker; lane 2, PCR product from *B. bronchiseptica* H1 with primers sF/a1R; lane 3, PCR product from *B. bronchiseptica* H1 with mutant identification primers s2F/a2R; lane 4, PCR product from wild type *B. bronchiseptica* with mutant primers sF/a1R; lane 5, PCR product from wild type *B. bronchiseptica* with mutant identification primers s2F/a2R. (B) Definition of siderophore production of the mutant. *B. bronchiseptica* H1(number 1) and wild type strain(number 2) were patched on CAS agar media and incubated for 24 hrs. Siderophore production was identified by the observation of orange zone around cells.

에 대해서 CAS 배지상의 alcaligin siderophore의 활성을 비교하였다(Fig. 4). *B. bronchiseptica* H1은 *B. bronchiseptica*의 야생형과 비교하였을 때 현저히 낮은 alcaligin siderophore의 활성을 나타내었다. 이상의 유전적, 생화학적 실험결과를 통하여 *alcA* 유전자가 결손된 돌연변이주를 확인하였으며 *B. bronchiseptica* H1이라 명명하였다.

alcA 유전자의 complementation assay

*alcA*가 결손된 돌연변이주인 *Bordetella bronchiseptica* H1의 *alcA* 유전자의 complementation assay을 위해 pCP1.11의 DNA에서 *alcA* 유전자의 promoter 부위를 포함한 *alcA* 유전자를 증폭하기 위한 primer로 primer-F와 primer-R을 합성하였다(Table 2). pCP1.11 플라스미드 DNA를 template로 하여 promoter를 포함한 *alcA* 유전자를 증폭시킨 후 pRK 415 벡터에 DNA 단편을 ligation시킨 후 *E.coli*에 형질전환시켰다(Fig. 5-(A)). *alcA*가 재조합된 플라스미드는 *alcA* 유전자가 결손된 돌연변이주인 *B. bronchiseptica* H1에 electroporation법으로 형질전환되었다. *alcA* 유전자의 활성이 complementation 되었는지 CAS 배지에서 확인하였다. Fig. 5에서 나타나는 바와 같이 *alcA* 유전자가 결손된 *B. bronchiseptica* H1은 낮은 alcaligin siderophore의 활성을 보인 반면, 야생형과 *alcA* 유전자의 complementation이 이루어진 *B. bronchiseptica* H1/pCalcA은 높은 활성을 보였다. 그러나 *B. bronchiseptica* H1/pCalcA이 야생형에 비교하여 약간 불완전하게 활성의 회복을 보였는데 그 이유는 명확하게 알 수가 없었다.

이상의 결과를 종합하면 *alcA* 유전자는 *B. bronchiseptica*의

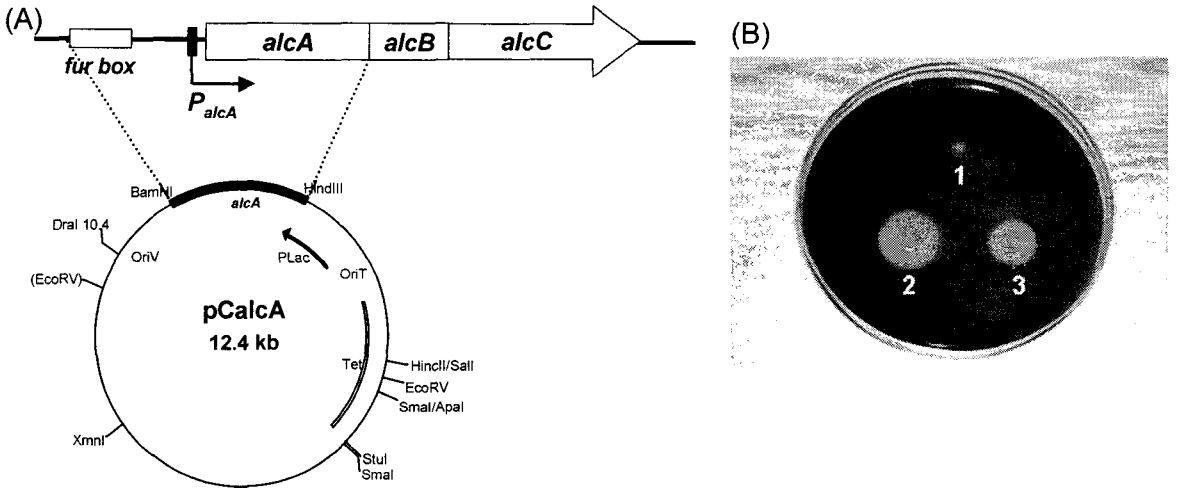

Fig. 5. Complementation of *alc*A deletion. (A) The genetic map of the plasmid pCalcA. A part of *alc* operon containing *alc* promoter region was diagramed. The physical limit of DNA fragment used in complementation of *alc*A deletion was designated with expanded line in pCalcA. (B) Certification of the siderophore active recovery of plasmid pCalcA on CAS agar plate. 1: *B. bronchiseptica* H1, 2: *B. bronchiseptica* wild type, 3: *B. bronchiseptica*/pCalcA

alcaligin siderophore 생합성에 직접적으로 관여한다는 것을 알 수 있었으며, 본 연구에서 구축된 *B. bronchiseptica* 돌연변이주나 pCalcA 플라스미드는 앞으로 진행될 AlcA 단백질의 생화학적인 기능 분석에 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

요 약

돼지 위축성 비염과 개의 kennel cough의 원인균인 *B. bronchiseptica*는 각 숙주의 상부 호흡기관의 점막에 집락을 형성하는 병원균으로서 철이 부족한 환경에서 hydroxamate type의 alcaligin이라는 siderophore를 생산한다. Alcaligin의 생합성에 관련하는 구조유전자 중 *alcA* 유전자의 기능을 밝히고자 *alcA* 결손돌연변이주 구축을 통하여 확인하였다. *alcA* 유전자 결손 돌연변이를 위해 0.6 kb *alcA* 5′ flanking DNA와 0.7 kb *alcA* 3′ flanking DNA fragment들을 pCP1.11을 주형으로 하여 PCR법으로 증폭한 후, 5′ flanking과 3′ flanking DNA가 연결된 재조합 suicide vector pDM1을 구축하여 세포 접합을 통해 *B. bronchiseptica*로 도입시켰다. 도입된 pDM1으로부터 allelic exchange법에 의해 *alcA* 유전자가 결손된 돌연변이주 *B. bronchiseptica* H1을 얻을 수 있었다. *B. bronchiseptica* H1은 야생형인 *B. bronchiseptica*에 비하여 alcaligin siderophore를 거의 생성하지 못하였다. *alc* 오페론 중 promoter와 *alcA* 유전자만을 가지는 재조합 플라스미드를 *B. bronchiseptica* H1에 도입하였을 때 alcaligin siderophore의 생산이 회복됨을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로부터 *alcA* 유전자가 alcaligin 생합성에서 매우 중요한 역할을 수행하는 것을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)의 지원으로 이루어짐.

참 고 문 헌

1. Armstrong, S. K., and M. O. Clements. 1993. Isolation and characterization of Bordetella bronchiseptica mutants deficient in siderophore activity. *J. Bacteriol.* **175,** 1144-1152.
2. Blanton, K. J., G. D. Biswas, J. Tsai, J. Adams, D. W. Dyer, S. M. Davis, G. G. Koch, P. K. Sen, and P. F. Sparling. 1990. Genetic evidence that *Neisseria gonorrhoeae* produces specific receptors for transferrin and lactoferrin. *J. Bacteriol.* **172,** 5225-5235.
3. Brickman, T. J., and S. K. Armstrong. 1996. The ornithine decarboxylase gene odc is required for alcaligin siderophore biosynthesis in Bordetella spp.: putrescine is a precursor of alcaligin. *J. Bacteriol.* **178,** 54-60.
4. Calderwood, S. B., and J. J. Mekalanos. 1987. Iron regulation of Shiga-like toxin expression in Escherichia coli is mediated by the fur locus. *J. Bacteriol.* **169,** 4759-4764.
5. Grant, C. C., and M. L. Vasil. 1986. Analysis of transcription of the exotoxin A gene of Pseudomonas aeruginosa. *J. Bacteriol.* **168,** 1112-1119.
6. Kang, H. Y., and S. K. Armstrong. 1998. Transcriptional analysis of the *Bordetella alcaligin* siderophore biosynthesis operon. *J. Bacteriol.* **180,** 855-861.
7. Kang, H. Y., T. J. Brickman, F. C. Beaumont, and S. K. Armstrong. 1996. Identification and characterization of iron-regulated *Bordetella pertussis* alcaligin siderophore biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* **178,** 4877-4884.
8. Litwin, C. M., and S. B. Calderwood. 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.* **6,** 137-149.
9. Lory, S. 1986. Effect of iron on accumulation of exotoxin A-specific mRNA in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **168,** 1451-1456.
10. Mietzner, T. A., and S. A. Morse. 1994. The role of iron-binding proteins in the survival of pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Nutr.* **14,** 471-493.
11. Morton, D. J., and P. Williams. 1990. Siderophore-independent acquisition of transferrin-bound iron by *Haemophilus influenzae* type b. *J. Gen. Microbiol.* **136,** 927-933.
12. Neilands, J. B., and K. Nakamura. 1991. Detection, determination, isolation, characterization and regulation of microbial iron chelates, D. 1-15. In G. Winkelmann(ed.), Handbook of microbial iron chelates. CRC Press, Boca Raton, Fla.
13. Nishio, T., and Y. Ishida. 1990. Production of dihydroxamate siderophore alcaligin by Alcaligines denitrificans subsp. xylosoxydans. *Agric. Biol. Chem.* **54,** 1837-1839.
14. Pradel, E., N. Guiso, and C. Locht. 1998. Identification of AlcR, an AraC-type regulator of alcaligin siderophore synthesis in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* **180,** 871-880.
15. Sambrook, J., E. F., Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning : a lacoratory manual, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
16. Schmitt, M. P., and R. K. Holmes. 1991. Iron-dependent regulation of diphtheria toxin and siderophore expression by the cloned *Corynebacterium diphtheriae* repressor gene *dtxR* in *C. diphtheriae* C7 strains. *Infect. Immun.* **59,** 1899-1904.
17. Tsai, J., D. W. Dyer, and P. F. Sparling. 1988. Loss of transferrin receptor activity in *Neisseria meningitidis* correlates with inability to use transferrin as an iron source. *Infect. Immun.* **56,** 3132-3138.