

*Vibrio fluvialis*의 Oligopeptide Permease Gene 결손에 의한 생육과 Biofilm 생산의 비교

이은미 · 안선희 · 공인수*

부경대학교 수산과학대학 생물공학과

Comparisons of growth and biofilm production with *Vibrio fluvialis* and mutants deficient in oligopeptide permease gene. Eun Mi Lee, Sun Hee Ahn and In Soo Kong*. *Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea*

Abstract Various Δopp mutants of *Vibrio fluvialis* were constructed by allelic exchange method. The mutants occurred in target genes were confirmed by PCR and Southern hybridization analyses. After the exact mutants were identified, cell growth and biofilm production were examined using the respective mutants. The growth of wild strain was more rapid than mutants within 4hr incubation. Thereafter, the growth of wild strain and mutants reached to same level. When the productivities of wild strain and mutants were examined, $\Delta oppA$ mutant showed the highest productivity. Though $\Delta oppC,D$ and F mutants produced the lower production than that of $\Delta oppA$ mutant, the productivities of those mutants were much higher than that of wild strain.

Key words : *Vibrio fluvialis*, oligopeptide permease gene, biofilm, Δopp mutants

서 론

Peptide는 일반세균에 있어서 주요 질소원의 공급 원으로서 생육에 필수적인 중요한 영양성분이다. Peptide의 세포내 전달은 peptide의 길이에 따라 각각 다른 전달체를 이용하여 세포내로 전달되는데 현재 까지 di-, tri-, oligopeptide permease system을 통하는 것으로 보고되고 있다[5]. 이들 peptide permease system은 ATP 분해로 얻어지는 energy를 사용하는 ABC(ATP-binding cassette) transporter에 의한 방법이다[4]. 이와같은 ABC transporter system은 binding protein dependent system으로서 특정한 binding protein 이외에도 transmembrane protein과 ATP binding protein들로 구성되어 있는 multi-component system으로 보고되고 있다[7]. System을 구성하는 한 요소인 binding protein은 cytoplasmic membrane의 outer sur-

face에 노출되어 peptide인 substrate와 결합하는데 이때 높은 특이성과 affinity를 보여주고 있다. Peptide와 결합 후 세포질내로의 translocation은 membrane bound permease의 활성화에 의해 이루어지는데 이때 cytoplasmic membrane에 존재하는 ATP binding protein에 의한 ATP 분해로 얻어지는 energy를 필요로 한다.

ABC transporter는 di-, tri-, oligopeptide를 전달하는 dipeptide transporter(Dpp), tripeptide transporter(Tpp)와 oligopeptide transporter(Opp) 등이 밝혀졌으며 이들 system은 peptide binding protein, peptide를 전달하는 permease, ATP 결합과 분해에 관여하는 protein으로 구성되어 있다. Binding protein의 경우 Dpp 및 Tpp의 binding protein이 Opp system의 binding protein보다 높은 특이성을 보여주고 있다. Opp system에서의 binding protein은 자연적으로 또는 인위적으로 변

* Corresponding author

Phone: +82-51-620-6185, Fax: +82-51-620-6180

E-mail: iskong@pknu.ac.kr

형된 다양한 peptide가 binding되고있는 것으로 보고되고 있다[10]. 그러므로 미생물에서는 덜 특이적인 Opp system이 peptide의 전달과정에 더 중요하다고 볼 수 있다. 세균에서 밝혀진 Opp system은 염색체상에서 operon 형태의 gene cluster인 *oppABCDF*로 구성되어 있다[3,12,16,17]. *OppA* gene은 peptide binding protein을 coding하고 있으며, *oppB*, *C* gene은 trans-membrane protein, *oppD*, *F*는 ATP binding protein을 coding하고 있는 것으로 보고되고 있다[4,7]. Opp system은 oligopeptide의 uptake가 주된 역할이지만 peptidoglycan의 생합성, cell wall recycling에도 관여하고 있으며 gram positive 세균에서는 cell-cell signaling에 Opp system이 중요하게 작용하고 있음이 보고되었다[6,18,19].

현재까지 gram negative bacteria에서의 Opp system에 관한 연구는 주로 *Escherichia coli*와 *Salmonella typhimurium*에서 이루어졌으며 최근에 본연구실에서 수해양 서식 세균의 대표인 *Vibrio* sp.의 한종이며 인체 및 어패류에 pathogenic한 *V. fluvialis*로부터 *opp* operon 유전자를 분리하여 염기서열을 밝혔으며 *opp* operon 유전자 가운데 *oppA* 유전자가 deletion된 mu-

tant를 제조하여 생육 및 생화학적 특성을 검토하여 보고하였다[9,11]. 본논문에서는 *V. fluvialis oppABCDF* 유전자에서 *oppA*를 제외한 각각의 유전자가 deletion된 mutant들을 homologous recombination에 의한 allelic exchange 방법에 의해 제조한 후, mutant들이 보여주는 생화학적 특성을 조사한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 연구에 사용된 *V. fluvialis*는 생명공학원 유전자은행으로부터 분양받아 사용하였다. 실험에 사용된 strain들과 plasmid는 Table 1에 나타내었다. *Vibrio* 균의 생육을 위한 배지로는 brain heart infusion(BHI) 배지와 M9 최소배지를 사용하였으며 37°C에서 진탕배양하였다.

Biofilm productivity 측정

V. fluvialis wild strain과 *opp* 각각의 유전자들이 knock-out된 mutant들이 생산하는 biofilm의 측정은

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Bacterial Strains/ plasmids	Genotype or relevant characteristics	Reference or source
Bacterial strains		
<i>V. fluvialis</i>		
KCTC2473	Wild type strain isolated from human feces in Bangladesh	KCTC
A04	KCTC2473 <i>opp A</i> deficient	This work
B02	KCTC2473 <i>opp B</i> deficient	This work
C53	KCTC2473 <i>opp C</i> deficient	This work
D60	KCTC2473 <i>opp D</i> deficient	This work
F32	KCTC2473 <i>opp F</i> deficient	This work
<i>E. coli</i>		
XLI-Blue SM10 λ pir	<i>RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacqz</i> ΔM15 Tn10(Tetr)] <i>thi thr leu tonA lacY supE recA</i> :: RP4-2-Tc :: Mu λ pir Km ^r host for π - requiring plasmids; conjugal donor	Stratagene [11]
Plasmids		
pUC19	Cloning vector; Amp ^r	Promega
pGEM-4Z	Cloning vector; Amp ^r	Promega
pNQ705	Cloning vector; R6 K γ <i>ori</i> (requires π); <i>oriT</i> of RP4; Cm ^r	[11]
pVFH195	<i>HindIII</i> partial digestion fragment including partial <i>oppA</i> , complete <i>oppB</i> ~ <i>oppF</i> ORF in pUC19	This work
pVOPA3	4.3Kb <i>Sall</i> fragment including complete <i>oppA</i> and partial <i>oppB</i> sequence in pGEM-4Z	This work

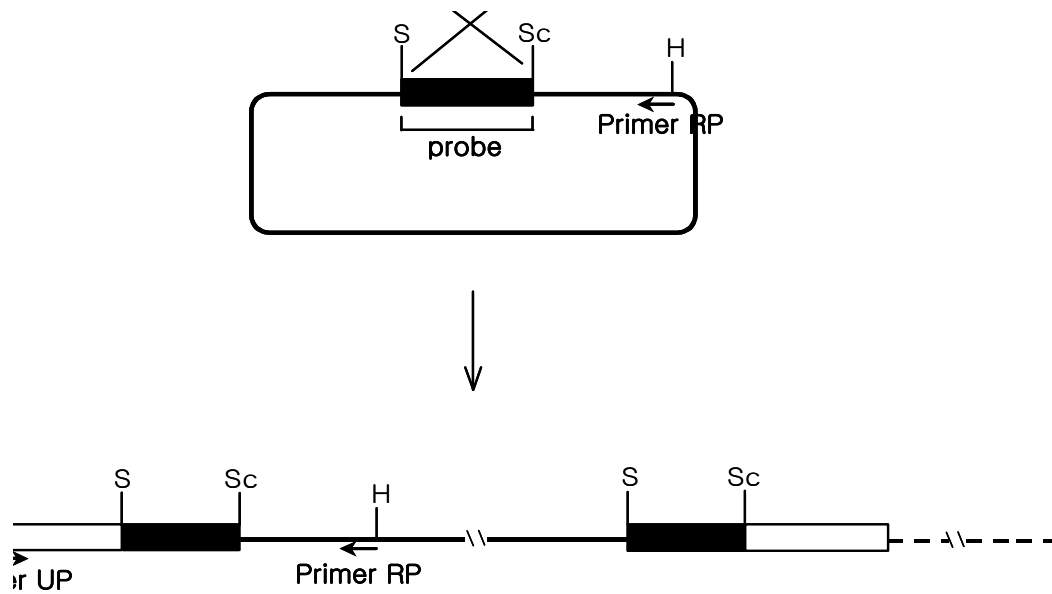


Fig. 1. General scheme for construction of knock out mutant by insertional mutagenesis. Dashed lines, the *V. fluvialis* chromosome; solid line, the plasmid sequence; open rectangles, the target *opp* gene; solid rectangles, the truncated *opp* gene; large X, genetic crossover.

Lee 등의 방법을 사용하였다[11]. Cell을 BHI 배지에서 OD600=0.4까지 배양한 후 3μl의 배양액을 75mm borosilicate glass tube(Chase Scientific Glass Co.)에 옮긴 후 300μl BHI broth를 첨가하여 37°C에서 1-2시간 정치배양하였다. 배양 후 glass 표면에 붙지 않은 planktonic cell을 제거한 후 증류수로 tube를 세척하고 세척된 glass에 350μl의 1% crystal violet을 넣어

25분간 염색시킨다. 염색 후에 cell-associated dye를 제거하기 위하여 400μl의 DMSO로 용출 시킨 후 OD570 값을 측정한다.

Knock-out mutants 제조

*V. fluvialis*의 chromosome 상에서 deletion된 knock-out mutant의 제조는 Fig. 1에 나타난 것처럼

Table 2. Oligonucleotides used in this study

Primer	Character	Oligonucleotide Sequencea (5'→3')	Location (bp)	PCR Product (bp)
Primer 1	Forward primer of Probe 2	CAACAGCTCAAACGACCAG	3631 ~ 3649	578
Primer 2	Reverse primer of Probe 2	GTCACCCTGCAGGATGTTGG	4189 ~ 4208	
Primer 3	<i>oppA</i> knock out forward primer	GGCCGTCGACTTACCTGCCGATTG	2998 ~ 3014	523
Primer 4	<i>oppA</i> knock out reverse primer	GGCCGAGCTCTTGGTTTTCTAGCGCTAC	3500 ~ 3520	
Primer 5	<i>oppB</i> knock out forward primer	GATCATGTCGACGGCCATGC	4376 ~ 4395	513
Primer 6	<i>oppB</i> knock out reverse primer	GGCCGAGCTCTCGATATACGCGAGCAG	4872 ~ 4888	
Primer 7	<i>oppC</i> knock out forward primer	GGCCGTCGACCTGTTGGTGCGA ACTCTG	5190 ~ 5210	568
Primer 8	<i>oppC</i> knock out reverse primer	GGCCGAGCTCACCATGAATGCGGCTG	5740 ~ 5757	
Primer 9	<i>oppD</i> knock out forward primer	GGCCGTCGACACTGGGTATTGTCGG	5957 ~ 5974	598
Primer 10	<i>oppD</i> knock out reverse primer	GGCCGAGCTCCATGGTACGACCCGC	6537 ~ 6554	
Primer 11	<i>oppF</i> knock out forward primer	GGCCGTCGACGCGGTTAACGTGCGTC	6935 ~ 6953	614
Primer 12	<i>oppF</i> knock out reverse primer	GGCCGAGCTCCACCGCATTGCCCAAG	7531 ~ 7548	

* Restriction sites are underlined.

homologous recombination을 기초로 하는 allelic exchange 방법에 의해 제조하였다[9]. *OppB-F* 유전자들의 ORF 일부분을 chromosome 상에서 deletion 시키기 위해 먼저 각 유전자의 중간부분에 위치한 약 0.6-0.7kb fragment를 PCR로 증폭시켰다. 사용한 primer들의 sequence는 Table 2에 나타내었다. 증폭된 DNA를 *SalI*, *SacI*으로 처리된 suicide vector pNQ705에 연결 시킨후 host cell인 *E. coli* λpir에 transformation 시켰다. 선별된 *E. coli* transformant와 *V. fluvialis* wild strain을 mating 시킨후 chloramphenicol이 첨가된 TCBS selective medium agar plate에 옮겨 원하는 mutant를 선택하였다. 선택된 mutant는 Southern hybridization과 PCR로 *oppB-F*의 각 유전자가 deletion 되었음을 확인하였다.

사용시약

연구에 사용한 일반시약은 Sigma 제품을 구입하였으며 BHI medium은 Difco 제품을 사용하였다. 제한효소 및 Taq polymerase는 Promega 제품을 사용하였다.

결과 및 고찰

Mutants 선별

선택배지가 포함된 agar plate상에서 1차 선별된 각각의 *opp* mutant들이 목적으로하는 유전자가 *V. fluvialis* chromosome 상에서 정확하게 homologous recombination이 일어난 결과의 산물인지를 확인하기 위하여 pNQ705 vector의 multi cloning site에 특이적으로 binding되는 primer와 *opp* target DNA에 위치한 primer를 사용하여 PCR을 행하였다. Fig. 2에 나타난 것처럼 각각의 mutant에서는 chromosome상에 pNQ705 vector DNA가 삽입되어 있으므로 *opp* target 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 PCR을 행할 경우에 예상되는 size에 해당되는 증폭 DNA가 나타나고 있으나 wild strain의 경우에는 pNQ705 vector가 chromosome 상에 들어가 있지 않기 때문에 PCR을 행할 경우에 아무런 증폭 band를 보여주고 있지않고 있다. PCR에 의해서 mutant로 확인된 균들은 Southern hybridization에서도 wild strain과는 다른 pattern을 보여 목적하는 각각의 *opp* 유전자들이 확

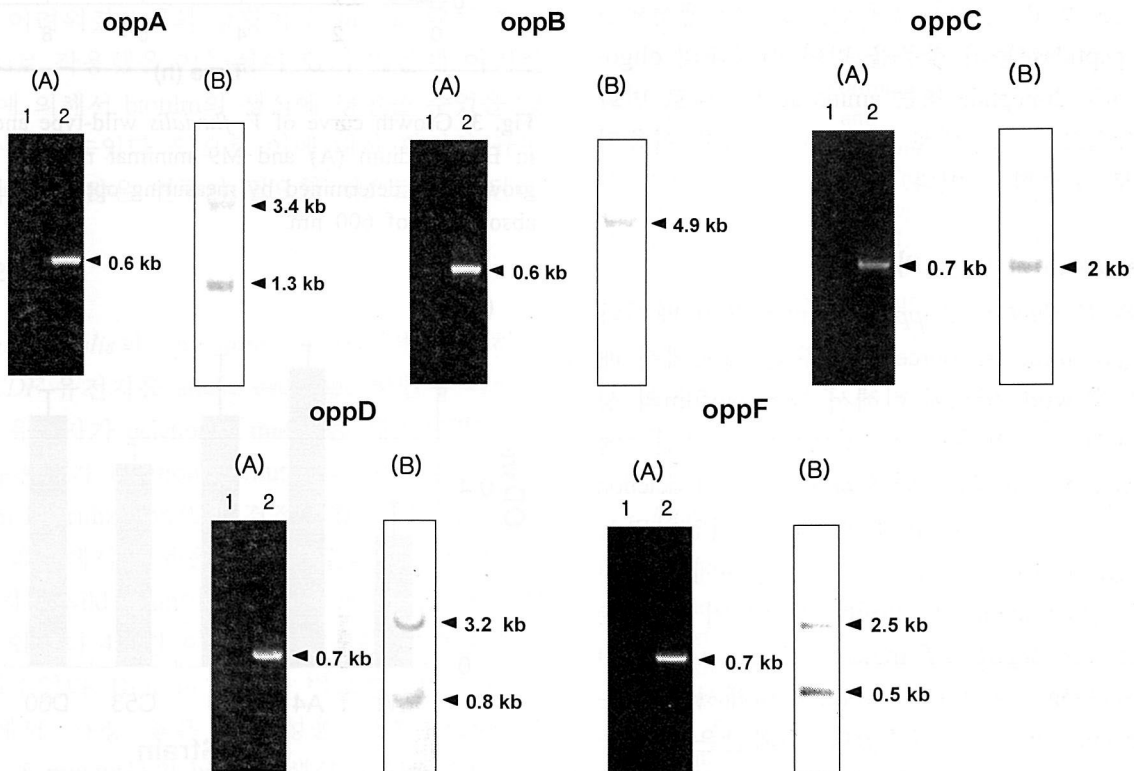


Fig. 2. Identification of the *opp* knock-out mutants. (A) 0.7% Agarose gel electrophoresis patterns of PCR products. (B) Southern blot analyses. Each chromosomal DNA was digested with either *PstI*(*oppA*), *SalI*(*oppB*), *PvuII*(*oppC*), *BamHI*(*oppD*) or *BamHI*(*oppF*).

실하게 deletion되었음을 확인할 수있었다.

BHI 및 최소배지에서의 생육

V. fluvialis wild strain과 각각의 *opp* 유전자가 deletion된 mutant들을 BHI 및 M9 최소배지에서 배양시키면서 생육변화를 측정하였다. Fig. 3A에 나타냈듯이 BHI 배지에서 배양하였을 때 배양초기에는 wild strain의 생육이 mutant들에 비해서 빠른 곳을 확인할 수있었다. 이는 mutant들이 배지내에 존재하는 oligopeptide의 이용이 가능하지 않기때문인 것으로 추정된다. 이러한 추정은 최소배지인 M9 배지를 사용하였을 때 wild strain과 mutant들의 생육에서 다른 차이점을 보여주지 않고 있는 결과(Fig. 3B)로도 가능한데 이는 M9 배지에는 oligopeptide가 거의 포함되지 않은 최소배지이므로 BHI 배지에서의 생육변화가 oligopeptide의 이용성과 매우 밀접한 관계가 있음을 뒷받침해 주고 있다. 그러나 BHI 배지에서 생육시 생육초기 단계에서는 차이를 보여주었으나 4시간 이후의 생육에서는 별다른 차이없이 mutant들도 wild strain의 생육수준에 도달하였다(Fig. 3B). 따라서 생육초기 단계에서는 oligopeptide의 빠른 이용성에 제한을 받고 있으나 그후 균으로부터 생성되는 protease, peptidase등의 작용을 받아 배지내의 oligopeptide가 tri-, di-peptide 또는 amino acid 형태로 변화되어 정상적으로 세포내로 전달되어 생육에 이용되는 것으로 추정할 수있다.

Biofilm productivity 비교

Lee등은 *V. fluvialis* $\Delta oppA$ mutant를 BHI 배지나 또는 특정의 nitrogen source 가 함유된 배지에서 배양하였을 때 wild strain에 비해서 높은 biofilm의 생산성을 보여주고 있다고 보고하였다[11]. 본 연구에서는 $\Delta oppA$ mutant이외의 다른 *opp* 유전자가 deletion된 mutant들을 사용하여 BHI 배지에서 배양하면서 biofilm의 productivity를 비교하였다. Fig. 4에 나타낸 것처럼 $\Delta oppA$ mutant에서 biofilm의 생산이 가장 높게 나타났으며 $\Delta oppC, D, F$ mutant들도 $\Delta oppA$ mutant에 비해서는 낮았으나 wild strain에 비해서는 높은 biofilm productivity를 보여주었다. 이와같은 결과는 *V. fluvialis*의 oligopeptide 이용성이 biofilm의 생산과 밀접한 관계가 있음을 보여주는 결과라 할수있다. Jefferson등은 병원미생물에 있어서 biofilm을 생산이

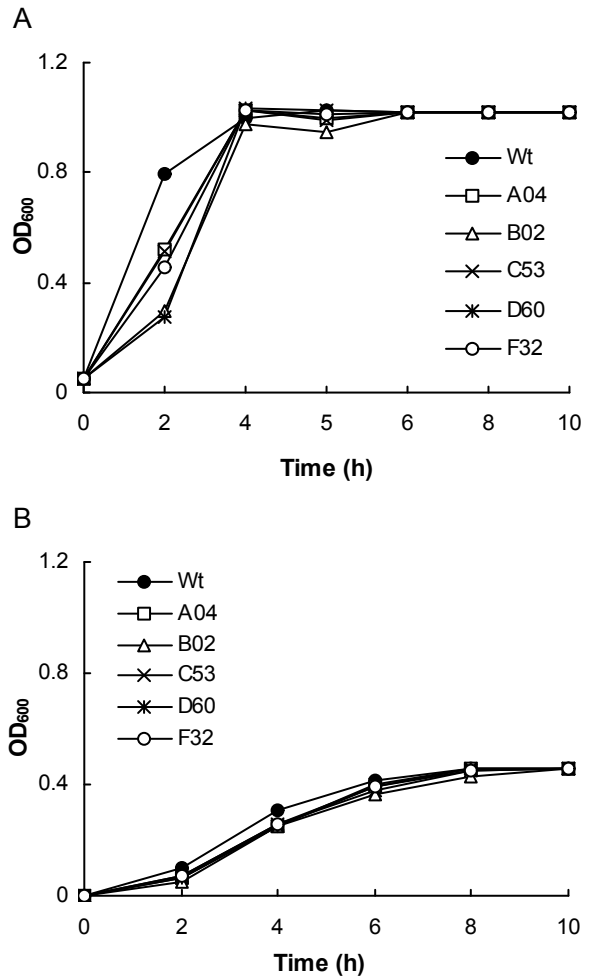


Fig. 3. Growth curve of *V. fluvialis* wild-type and mutants in BHI medium (A) and M9 minimal medium (B). Cell growth was determined by measuring optical density at an absorbance of 600 nm.

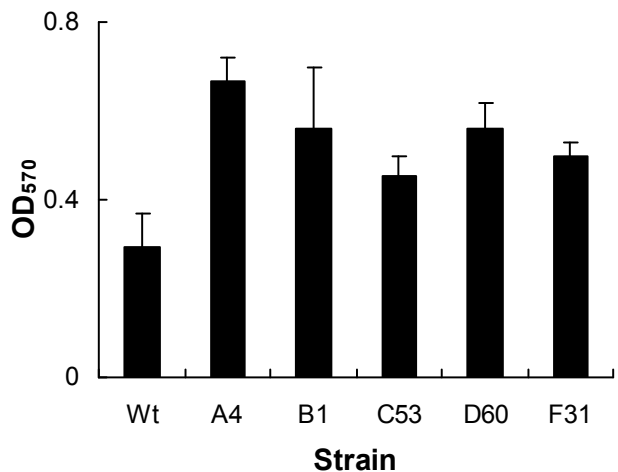


Fig. 4. Biofilm productivities of *V. fluvialis* wild-type and mutants. Three independent experiments were performed in triplicate. The data are means \pm the standard deviation.

미생물에게 미치는 주요 이점이 첫째, 숙주세포의 공격으로부터 자신을 보호할 목적으로 biofilm을 생산하거나 둘째, 목적하는 영양분을 많이 섭취하기 위하여 셋째, 동종의 미생물들이 biofilm에 의해서 쉽게 colonization이 되어 주어진 환경에서 살아남기 위한 수단으로 사용되거나 넷째, 자연이 아닌 실험실상에서 나타나는 생육의 한가지 표현방법으로 실제 자연 환경에서 보여주는 생육의 artifact로서 biofilm이 생산되는 것으로 보고하고 있다[8]. 지금까지 여러 미생물들의 biofilm 생산에는 많은 유전자들이 관여하고 있는 것으로 보고되고 있는데 예를 들면 adhesion에 관여하는 유전자들, quorum sensing에 관여하는 *comX*[14], *luxS*[15] 유전자들, cell wall biosynthesis에 관여하는 유전자들[13], stress response 유전자들인 *dgk*, *purR* 유전자들이 보고되고 있다[1,2,20]. Oligopeptide의 경우도 미생물에 있어서는 주요한 nitrogen source로서의 기능을 가지고 있을뿐만 아니라 signal sensing의 주요 인자로서 작용되고 있음이 보고되고 있다[10]. 따라서 *V. fluvialis*의 경우에도 oligopeptide를 이용하지 못했을 때 signal sensing에 어떤 영향을 미쳤거나 혹은 nitrogen source의 즉각적인 이용이 어려워졌을때의 상황이 *V. fluvialis*에게 환경적 stress로 작용했을 가능성이 있기 때문에 이러한 요인들에 의해서 biofilm의 생성에 영향을 주었을 것으로 추측할 수있다. 앞으로 이에 대한 확실한 규명을 위해서 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

*Vibrio fluvialis*의 *opp* gene cluster내에 존재하는 *oppABCDF* 유전자들 allelic exchange 방법에 의해서 각각의 유전자가 deletion된 mutant를 제조하였다. 각각의 유전자가 deletion된 mutant의 확인은 PCR과 Southern hybridization으로 결정하였다. 각 mutant들을 BHI 배지에서 생육을 비교한 결과 배양후 4시간 이전까지는 wild strain이 모든 mutant들에 비해서 생육이 좋았으나 4시간 이후부터는 같은 수준의 생육을 보여주었다. Biofilm 생산을 비교한 결과 $\Delta oppA$ mutant에서 가장 높은 생산성을 보여주었다. $\Delta oppC,D$, F mutant들의 biofilm 생산은 $\Delta oppA$ mutant 보다는 낮았으나 wild strain보다는 높은 biofilm 생산성을 보여주었다.

참 고 문 헌

1. Adams, J. L. and McLean, R. J. 1999. Impact of *rpoS* deletion on *Escherichia coli* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4285-4287.
2. Corona-Izquierdo, F. P. and Membrillo-Hernandez, J. 2002. A mutation in *rpoS* enhances biofilm formation in *Escherichia coli* during exponential phase of growth. *FEMS Microbiol. Lett.* **211**, 105-110.
3. Cundell, D. R., Pearce, B. J., Samderls, J., Naughton, A. M. and Masure, H. R. 1995. Peptide permease from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eukaryotic cells. *Infect. Immun.* **63**, 2493-2498.
4. Detmers, F. J. M., Laufermeijer, F. C. and Poolman, B. 2001. Peptides and ATP binding cassette peptide transporters. *Res. Microbiol.* **152**, 245-258.
5. Foucaud, C., Kunji, E. R. S., Hagting, A., Richard, J., Konings, W. N., Desmazeaud, M. and Poolman, B. 1995. Specificity of peptide transport systems in *Lactococcus lactis*: Evidence for a third system which transports hydrophobic Di- and Tripeptides. *J. Bacteriol.* **177**, 4652-4657.
6. Goodwell, E. W. and Higgins, C. F. 1987. Uptake of cell wall peptides by *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 3961-3865.
7. Higgins, C. F. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Ann. Rev. Cell Biol.* **8**, 67-113.
8. Jefferson, K. K. 2004. What drives bacteria to produce a biofilm?. *FEMS Microbiol. Lett.* **236**, 163-173.
9. Kim, S. H., Ahn, S. H., Lee, J. H., Lee, E. M., Kim, N. H., Park, K. J. and Kong, I. S. 2003. Genetic analysis of phosphomannomutase/phosphoglucosmutase from *Vibrio furnissii* and characterization of its role in virulence. *Arch. Microbiol.* **180**, 240-250.
10. Lazazzera, B. 2002. The intracellular function of extracellular signalling peptides. *Cellules* **22**, 1519-1527.
11. Lee, E. M., Ahn, S. H., Park, J. H., Lee, J. H., Ahn, S. C. and Kong, I. S. 2004. Identification of oligopeptide permease (*opp*) gene cluster in *Vibrio fluvialis* and characterization of biofilm production by *oppA* knockout mutation. *FEMS Microbiol. Lett.* **240**, 21-30.
12. Lin, B., Short, S. A., Eskildsen, M., Klempner, M. S. and Hu, L. T. 2001. Functional testing of putative oligopeptide permease (Opp) proteins of *Borrelia burgdorferi*: a complementation model in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1499**, 222-231.
13. Loo, C. Y. 2003. Oral Streptococcal genes that encode biofilm formation. In: Wilson, M. and Devine, D. (eds), *Medical implications of biofilms*, vol 1, pp 212-227.
14. Lunsford, R. D. and London, J. 1996. Natural genetic transformation in *Streptococcus gordonii*: *comX* imparts spontaneous competence on strain wicky. *J. Bacteriol.* **178**, 5831-5835.
15. Meritt, J. Qi, F., Goodman, S. D., Anderson, M. H. and Shi, W. 2003. Mutation of *luxS* affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* **71**, 1972-1979.
16. Perego, M., Higgins, C. F., Pearce, S. R., Gallagher, M.

- P. and Hoch, J. A. 1991. The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. *Mol. Microbiol.* 5, 173-185.
17. Podbielski, A., Pohl, B., Woischnik, M., Korner, C., Schmidt, K. H., Rozdinski, E. and Leonard, B. A. 1996. Molecular characterization of group A streptococcal (GAS) oligopeptide permease (Opp) and its effect on cysteine protease function. *Mol. Microbiol.* 21, 1087-1099.
 18. Rudner, D. Z., LeDeaux, J. R., Ireton, K. and Grossman, A. D. 1991. The Spo0K locus of *Bacillus subtilis* is homologous to oligopeptide permease locus and is required for sporulation and competence. *J. Bacteriol.* 173, 1388-1398.
 19. Solomon, J. M., Magnuson, R., Srivastava, A. and Grossman, A. D. 1995. Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 9, 547-558.
 20. Yoshida, A. and Kuramitsu, H. K. 2002. Multiple *Streptococcus mutans* genes are involved in biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4285-4287.