

어류 병원성 세균 *Edwardsiella tarda*의 형질전환 및 재조합 ghost 세균에서의 E-lysis 유전자의 전사 발현 특징

권 세 련 · 남 윤 권^{1,*}

부경대학교 수산생명의학과, ¹부경대학교 양식학과

Transformation of *Edwardsiella tarda* and Transcriptional Characteristics of E-lysis Gene in Recombinant Bacterial Ghosts

Se Ryun Kwon and Yoon Kwon Nam^{1,*}

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

¹Department of Aquaculture, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Edwardsiella tarda, a gram (-) pathogen causing edwardsiellosis in farmed fish, was transformed via electroporation with a plasmid expression vector driving the PhiX174 E-lysis gene under the transcriptional control by lambda PR regulatory sequence. The persistent maintenance of the plasmid vector in recombinant *E. tarda* was found in numerous subculture procedures over up to 6 months without any adverse effect on the original copy number of plasmids. Comparative examination based on semi-quantitative RT-PCR analysis on transcriptional efficiency of E-lysis gene between recombinant *E. coli* and *E. tarda* indicated that promoter strength and induction capacity of bacterial ghosts would be retarded in *E. tarda* as compared to the *E. coli*. However, the completeness of induction for bacterial ghosts in *E. tarda* was the same with *E. coli*, in which at least 99.99% of induction rate was possible and further the viability of recombinant bacteria was completely eliminated by a post-induction procedure including washing and freeze drying lyophilization.

Key words : *Edwardsiella tarda*, transformation, bacterial ghosts, gene expression

서 론

어류의 질병을 제어하기 위해 사용되고 있는 항생제는 심각한 내성 균의 유발은 물론 항생제 과용으로 인한 생태계 파괴, 그리고 잔류 항생제에 의한 인체 위해성 논란이 끊이지 않고 있다. 이에 백신기술을 이용한

질병 예방이 중요시되고 있으나 종래 사용되고 있는 단순 사균 방식의 불활화 백신 (formalin-killed 세균 등)들은 일부 유효한 효과의 입증에도 불구하고, 이의 제작 시 필연적으로 야기되는 표면 항원성의 손실 그리고 다량의 세포질 단백질들로 인한 비특이적 면역 유도 억제 (immune suppression) 등의 부작용으로 인해 더 이상의 큰 기술적 진보를 보이지 못하고 있으며 새로운 개념의 어류 백신 전략이 요구되고 있다.

Ghost bacteria 제조 기술은 세균의 벽에 nano scale의

*Corresponding author: yoonknam@pknu.ac.kr

작은 구멍을 인위적으로 유도함으로써 세균의 세포질 성분을 밖으로 유실토록 하는 기술이다. 따라서 ghost화된 세균 자체는 생존능력이 없으나 세포 표면의 물리적 및 화학적 구성은 완벽히 보존시킬 수 있는 장점을 갖고 있다(Witte *et al.*, 1992; Hensel *et al.*, 1996; Szostak *et al.*, 1996). Ghost bacteria 유도를 위해서는 phiX174 phage의 E-protein의 발현의 인위적 유도를 프로그램화할 수 있는 발현 벡터와 이를 이용한 재조합 목적 세균의 안정적인 형질전환 기술이 확보되어야만 한다.

*Edwardsiella tarda*는 다양한 해산 및 담수 어종에서 에드워드스감염증(edwardsiellosis)을 유발하는 중요한 어류 병원성 세균이며, 특히 넙치 등 우리나라 주요 양식 품종에 심각한 질병의 원인 균이기도 하다(Thune *et al.*, 1993; Plumb, 1999). 이에 최근 *Edwardsiella tarda*를 대상으로 실험적인 ghost 유도가 가능함이 최근 보고되어 적절한 백신 전략이 개발될 경우 에드워드스감염증에 대한 우수한 예방 효과를 얻을 수 있으리라 기대되고 있다(Kwon *et al.*, 2005, 2006). 그러나 아직 본 기술을 재조합 ghost 백신으로 개발하기 위해서는 경제성을 갖춘 최적 유도 조건이 확립되어야 하며, 이를 위해서는 형질전환 균체의 형질전환 안정성 그리고 재조합 ghost 유도 시 최적 발현프로그램 개발을 위한 재조합 균주의 E-lysis 발현 양상에 관한 정보가 수집되어야만 한다.

이에 본 연구는 어류 병원성 세균 *E. tarda*를 대상으로 구축된 플라스미드 벡터를 이용, electroporation에 의한 형질전환을 실시하고, 형질전환 균체의 형질전환 안정성을 평가하며, 아울러 E-lysis 유전자를 포함하는 재조합 *E. tarda*의 ghost 유도 효율 및 특징을 *E. coli*와 mRNA 수준에서 비교 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 발현 벡터 및 *E. tarda* 형질전환

Ghost 유도가 가능한 벡터의 제조를 위해서 유전자 소재들을 확보하였다. 세포벽에 nano hole을 유도하기 위한 E-gene은 박테리오파지 phiX174로부터 PCR 분리를 수행하였으며, E-lysis 유전자의 발현 조절은 temperature switching을 수행할 수 있는 lambda PR promoter와 CI regulatory repressor 유전자를 이용하였다. 각각 요구되는 유전자 소재들은 PCR과 제한효소 위치 클로닝 등을 병행하여 pGEM 벡터의 backbone에 탑재하였으며 항생제 내성 표지 유전자는 ampicillin 내성 유전자인 *bla*를 이용하였다. 그리고 최종 확보된 유전자 소재들 간의 재설계를 통해 융합 발현 벡터를 대상으로

융합 구조의 확인을 위해 염기서열을 재확인 분석하였다(see also Kwon *et al.*, 2005). 순수 분리된 플라스미드 벡터의 다양한 농도별(0~200 ng)로 Gene Pulser(Bio-Rad, USA)를 이용, electroporation을 실시하였으며 electroporation 조건은 제조사의 권고 조건을 따라 실시하였다. Electroporation 후 항생제(ampicillin) 내성 표지를 이용한 재조합 균주의 선별을 위해 electroporation 처리된 균들을 ampicillin 50 µg/mL을 포함하는 TSA-agar 배지(Dibco)에 도말하여 colony forming unit를 측정하였다.

2. 재조합 *E. tarda*의 형질전환 안정성 분석

재조합 *E. tarda*내 세포 당 플라스미드 copy수 및 재조합 상태의 지속 안정성 분석을 위해서 재조합 *E. tarda*내에서 세포 당 플라스미드 copy의 정도를 분석하였다. 형질전환 직후 형질전환 *E. tarda*내 replication되는 세포 당 플라스미드 copy를 대조군 *E. coli*와 비교 평가하기 위해 OD 600 nm를 기준으로 세포 수를 계산하고 아울러 일정 세포수로부터 추출된 플라스미드의 양과 플라스미드 분자량을 바탕으로 세포당 플라스미드 copy수를 평가하였다. *E. tarda*내에 도입된 재조합 플라스미드가 지속적이고 안정적으로 유지되는지를 확인하기 위해서 형질전환 *E. tarda*를 이용, 형질전환 직후부터 6개월까지 3~5일 간격으로 연속적인 subculture를 수행하고 이때 1개월 단위로 플라스미드 copy수의 안정성을 분석하였다.

3. 재조합 ghost 발현 유도 및 E-lysis 유전자의 전사 발현 특징 분석

구축된 벡터의 작동을 대조군인 *E. coli*와 *E. tarda*에서 평가하였다. 동일한 플라스미드 벡터로 형질전환된 재조합 *E. coli*를 대상으로 최초 세포농도 OD₆₀₀ nm 0.2~0.4 범위까지 28°C에서 사전 배양을 수행하고 42°C로 온도를 올려 CI repressor의 작동을 억제하였으며 E-lysis 유전자의 전사발현을 유도하였다. 분광흡광도계를 이용하여 OD의 변화를 추적하였으며 최초 OD 값 이하로 감소하는 시점을 반응의 완료 시점으로 설정하였다. 반응이 완료되면 증류수 washing을 수행하고 일부 분획은 RNA 분리를 위해 초저온 냉동고에 보관하였으며 나머지는 생균 측정을 위해 동결건조를 수행하였다. 기타 배양조건은 Kwon *et al.* (2005)에 의거하여 실시하였다.

Ghost 발현 유도 구간에서 확보된 *E. tarda* 및 *E. coli* 시료를 대상으로 total RNA를 분리하고 semi-quantita-

tive RT-PCR을 수행하여 E gene transcripts의 증감 양상을 추적하였다. -80°C에 보관되어 있는 균체로부터 RNeasy mini Kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 total RNA를 분리 하였고 이때 DNA의 오염을 제거하기 위해 DNase I (30 U) 처리 및 clean-up과정을 추가로 실시하였다. RNA 시료 1 µg을 MOPS-agarose gel (1%)에 loading하여 RNA 시료의 효과적인 추출을 확인하였고 16S rRNA band의 image densitometry와 흡광도 측정을 이용하여 RNA 시료들 간 정량 normalization을 수행하였다. 정량된 시료들로부터 500 ng의 total RNA를 취하여 RT-PCR 분석을 실시하였으며 이때 RT-PCR 분석은 42°C에서 1시간 역전사 반응 후 4분간의 RTase inactivation을 수행하고 22 cycles의 온도순환 반응 (94 °C 25 sec, 58°C 20 sec 및 72°C 30 sec)을 통해 E-gene transcript를 증폭하였다. PCR 반응은 iCycler (Bio-Rad, USA)를 이용하였고 증폭을 위한 oligonucleotide primer는 E-gene 단편을 특이 증폭시킬 수 있는 primer (E-lysis FW: 5'-ATGGTACGCTGGACTTTGTG-3' 및 E-lysis RV: 5'-CTTCTGCGTCAGTAAG AACG-3')를 합성하여 사용하였다. 예상 증폭 산물의 크기는 240 bp였다. RT-PCR용 premix (Bioneer, Korea)를 이용 3반복 분석을 수행하였으며 증폭 산물의 전기 영동상을 Quantity-one Image Analysis Software (Bio-Rad, USA)를 이용하여 각 시료의 16S rRNA band에 대하여 상대 정량 분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

구축된 벡터를 이용하여 *E. tarda*를 대상으로 플라스미드 DNA 양을 0~200 ng까지 6개 구간으로 나누어 형질전환을 실시한 결과 DNA 농도 의존적인 cfu 경향을 나타내어 사용한 DNA 양이 증가할수록 형질전환 효율은 증가하였고 100 ng과 200 ng 사이에는 통계적 차이가 관찰되지 않았다 (Fig. 1) ($P > 0.05$). 재조합 *E. tarda*내 형질 전환된 플라스미드 copy 수 평가와 이의 지속 안정성을 분석한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에서 보듯이 *E. tarda*내 플라스미드의 copy수는 조사한 6개월간 50회 이상의 계대를 거치면서도 약 120~150 플라스미드 copies/cell 수준을 일양하게 유지하는 것으로 나타났으며 이에 안정적인 형질전환 *E. tarda* 균주의 확립이 가능함을 잘 보여주고 있다.

상기 벡터가 도입된 재조합 대장균 및 재조합 *E. tarda*의 ghost (E-lysis gene 발현) 유도에 따른 lysis와 이로 인한 OD value (600 nm)의 변화를 비교하였다.

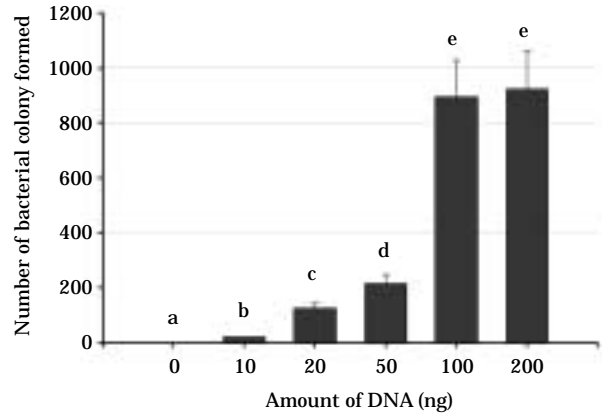


Fig. 1. Number of recombinant *E. tarda* colonies formed via electroporation of an expression vector driving the E-lysis gene as function of the amount plasmid DNA used. Histograms show the mean based on triplicate examinations. T bars indicate standard deviations. Means with the same letter were not significantly different based on ANOVA at $P = 0.05$.

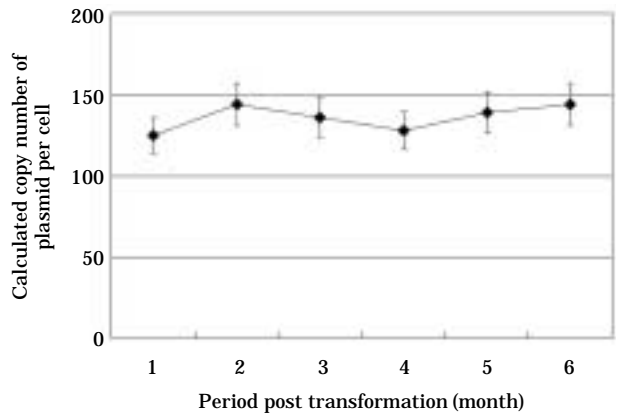


Fig. 2. Copy number of plasmids containing E-lysis gene driven by lambda PR regulation during subculture over 6 months. No statistical difference was detected at every detection point.

Fig. 3에서 보듯이 대장균의 경우 온도 shifting 후 30~45분부터 급격한 lysis 반응이 관찰되어 최초 OD 값까지의 감소에 요구되는 반응시간은 1시간 내외로 나타남으로써 종래의 *E. coli* bacterial ghost 유도 양상과 유사하게 나타났다 (Haidinger *et al.*, 2003). 그러나 *E. tarda*의 경우 90~120분 후에 OD 값의 감소가 개시되어 *E. coli*보다는 lysis 개시점이 다소 지연되는 것으로 나타났으며 ghost 반응의 완료까지도 대장균보다 장시간이 필요한 것으로 나타나 역시 Kwon *et al.* (2005)의 보고와 유사하였다.

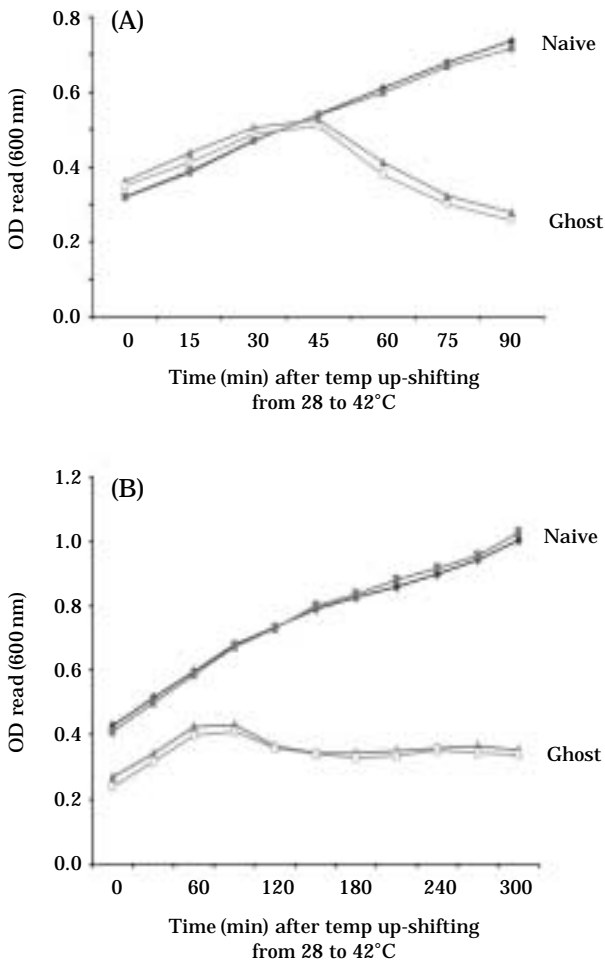


Fig. 3. Induction of recombinant bacterial ghosts in *E. coli* (A) and *E. tarda* (B). Curves represent the spectrophotometric reading at OD 600 nm of two replicate induction experiments.

앞의 결과와 같이 *E. tarda*를 대상으로 한 ghost 유도는 대장균에 비해 상대적으로 장시간의 반응 시간이 요구되며 이는 lambda phage PR promoter의 transcription efficiency가 대장균에서보다 *E. tarda*에서 상대적으로 낮고, 또한 발현된 E protein이 *E. tarda* 세포벽에 hole을 형성하는 효율이 대장균의 경우보다 약하기 때문인 것으로 나타났다. 이는 비교적 가까운 근연 관계에 있는 두 gram (-) 세균 계통에 있어서도 중간 heterologous 유전자의 인식 차이에 기인하는 것으로 판단되며 목적 세균별로 promoter 부위 조작 및 구조 유전자의 재설계에 관한 최적화의 필요성을 잘 제시하고 있다 (Tijhaar *et al.*, 1994; John *et al.*, 2000). 또한 박테리아 유전자 발현의 경우 전사의 개시 (transcription initiation) 뿐만 아니라 전사체의 신장 (elongation) 역시 유전자 발현에 많은 영향을 미칠 수 있음이 보고됨에 따라

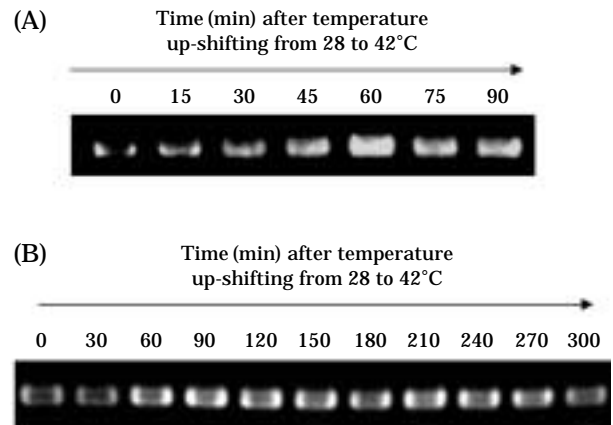


Fig. 4. Semi-quantitative RT-PCR analysis of E-lysis gene transcripts in *E. coli* (A) and *E. tarda* (B) ghosts as a function of time after temperature upshifting from 28 to 42°C.

*E. tarda*내 발현하는 E-lysis transcript들의 안전성 역시 차이가 있을 수 있음을 시사하고 있다 (Borukhov *et al.*, 2005).

E-lysis 유전자의 RT-PCR 분석 결과 Fig. 4에서 보듯이 *E. coli* 및 *E. tarda* 모두에서 온도 자극 초기부터 E-gene transcript가 효과적으로 검출되나 온도 자극 기간의 경과에 따라 대장균의 경우 급격한 transcript의 증가와 함께 신속한 lysis가 유도되지만, *E. tarda*의 경우 E-gene transcript 증가 폭이 상대적으로 적으며 또한 E-gene transcript가 계속 발현함에도 불구하고 lysis의 개시가 지연되는 것으로 나타났다. 이는 상기 형질전환 안정성을 고려할 때 세포 당 plasmid copy 수가 낮기 때문보다는 전사 발현 강도의 감소와 함께 발현된 E protein의 용해 능력이 *E. tarda*에서 다소 약화되었기 때문으로 판단된다 (see also Browning and Busby, 2004). 그러나 대장균에 비해 ghost 유도 속도가 다소 낮음에도 불구하고 반응이 완성되었을 시점에서의 *E. tarda*의 ghost 효율은 대장균과 전혀 차이가 없는 것으로 나타났다. 즉 지연된 lysis 반응에도 불구하고 OD 값의 감소가 최소 수준까지 도달하였을 때는 대장균 및 *E. tarda* 모두 99.99% 이상의 생존력 제거효율을 나타내었다. 더욱이 저장액 처리 및 동결건조 과정을 통해 백신 시료를 제작하였을 경우 대장균 및 *E. tarda* 실험구 모두에서 균의 생존력이 완벽하게 100% 제거되었음이 확인되었다 (not shown). 이에 본 연구에서 얻어진 발현 정보를 바탕으로 bacterial ghost 유도를 위한 미세 발현 유도 프로그램의 최적화 및 신규 조절 부위 조작 연구가 뒤따라야 할 것이다.

적 요

어류 에드워드스감염증에 대한 예방 재조합 ghost 백신을 개발하기 위한 연구의 일환으로 어류 병원성 세균인 *Edwardsiella trada*를 대상으로 플라스미드 형질전환을 실시하고 형질전환 안정성을 평가하였으며, 형질 도입된 재조합 ghost 세균의 E-lysis 유전자 발현을 분석하였다. *E. tarda*를 대상으로 한 ghost 유도는 대장균에 비해 상대적으로 장시간의 반응 시간이 요구되며 lysis의 개시가 지연된 점을 고려 시 발현된 E protein의 용해 능력 또는 E-gene의 전사발현 양이 *E. tarda*에서 다소 약화되는 것으로 나타났다. 그러나 대장균에 비해 ghost 유도 속도가 다소 낮음에도 불구하고 반응이 완성되었을 시점에서의 *E. tarda*의 ghost 효율은 대장균과 전혀 차이가 없이 99.99% 이상의 유도효율을 나타내었다.

사 사

본 연구는 해양수산부 수산특정연구개발과제에 의해 수행되었음.

인 용 문 헌

- Borukhov, S., J. Lee and O. Laptenko. 2005. Bacterial transcription elongation factors: new insights into molecular mechanism of action. *Mol. Microbiol.*, 55 : 1315~1324.
- Browning, D.F. and S.J. Busby. 2004. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2 : 57~65.
- Haidinger, W., U.B. Mayr, M.P. Szostak, S. Resch and W. Lubitz. 2003. *Escherichia coli* ghost production by expression of lysis gene *E* and staphylococcal nuclease. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 : 6106~6113.
- Hensel, A., L.A.G. van Leengoed, M.P. Szostak, H. Windt, H. Weissenböck, N. Stockhofe-Zurwieden, A. Katinger, M. Stadler, M. Ganter, S. Bunka, R. Papst and W. Lubitz. 1996. Induction of protective immunity by aerosol or oral application of candidate vaccines in a dose-controlled pig aerosol infection model. *J. Biotechnol.*, 44 : 171~181.
- John, M., T.I. Crean, S.B. Calderwood and E.T. Ryan. 2000. In vitro and in vivo analyses of constitutive and in vivo-induced promoters in attenuated vaccine and vector strains of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.*, 68 : 1171~1175.
- Kwon, S.R., Y.K. Nam, S.K. Kim, D.S. Kim and K.H. Kim. 2005. Generation of *Edwardsiella tarda* ghosts by bacteriophage PhiX174 lysis gene *E*. *Aquaculture*, 250 : 16~21.
- Kwon, S.R., Y.K. Nam, S.K. Kim and K.H. Kim. 2006. Protection of tilapia (*Oreochromis mosambicus*) from edwardsiellosis by vaccination with *Edwardsiella tarda* ghosts. *Fish Shellfish Immunol.*, 20 : 621~626.
- Plumb, J.A. 1999. *Edwardsiella* septicaemias. In: Woo, P.T.K., Bruno, D.W. (Eds.), *Fish Diseases and Disorders Vol. 3. Viral, Bacterial and Fungal Infections*. CAB International, pp. 479~521.
- Szostak, M.P., A. Hensel, F.O. Eko, R. Klein, T. Auer, H. Mader, A. Haslberger, S. Bunka, G. Wanner and W. Lubitz. 1996. Bacterial ghosts: non living candidate vaccines. *J. Biotechnol.*, 44 : 161~170.
- Thune, R.L., L.A. Stanley and R.K. Cooper. 1993. Pathogenesis of gram negative bacterial infections in warm water fish. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 3 : 37~68.
- Tijhaar, E.J., Y. Zheng-Xin, J.A. Karlas, T.F. Meyer, M.J. Stukart, A.D. Osterhau and F.R. Mooi. 1994. Construction and evaluation of an expression vector allowing the stable expression of foreign antigens in a *Salmonella typhimurium* vaccine strain. *Vaccine*, 12 : 1004~1011.
- Witte, A., G. Wanner and W. Lubitz. 1992. Dynamics of PhiX174 protein E-mediated lysis of *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.*, 157 : 381~388.

Received : March 30, 2007

Accepted : May 5, 2007