

## Note

## *Vibrio anguillarum* O1이 생산하는 Outer Membrane Vesicle (OMV)의 분리 및 OMV 내의 단백질 특성

홍경은 · 김동균 · 민문경 · 공인수\*

부경대학교 수산과학대학 생물공학과

**Isolation and characterization of the outer membrane vesicle (OMV) protein from *Vibrio anguillarum* O1.** Gyeong-Eun Hong, Dong-Gyun Kim, Mun-Kyeong Min and In-Soo Kong\*. *Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea*

**Abstract** *Vibrio anguillarum* is a gram-negative bacterium that causes vibriosis in approximately 80 different fish species. *V. anguillarum* produces several exotoxins are correlated with the pathogenesis of vibriosis. This study is focused on the composition of the outer membrane vesicle. Most of gram-negative bacteria produce outer membrane vesicle (OMV) during cell growth. OMV was formed from the outer membrane surface of cell and than released to extracellular environment. OMV consists of outer membrane lipids, outer membrane protein (OMP), LPS, and soluble periplasmic components. Also, they contain toxins, adhesions, and immunomodulatory. Many gram-negative bacteria were studied out forming OMV. In *Vibrio* sp., formation of OMV by electron microscopy has been reported from *V. cholerae* and *V. parahaemolyticus*. In present study, we isolated OMV from *V. anguillarum* and OMV protein was separated by SDS-PAGE. Major band was sliced and analyzed by MALDI-TOF. The major protein band of 38kDa was identified as OmpU by MALDI-TOF MS analysis.

**Key words :** *Vibrio anguillarum*, outer membrane vesicle, OmpU

### 서 론

*Vibrio anguillarum*은 다양한 수해양 어패류에 질병을 일으키는 그람음성세균으로 해양 양식업을 포함한 산업에 막대한 경제적 손실을 일으키는 병원성 세균이다 [2,5]. *V. anguillarum*이 생산하는 대표적인 virulence factor로는 hemolysin, protease, metalloprotease, hemmagglutinin, cytotoxin등이 대표적이며 이러한 독성 물질들이 어류에 노출 되면 어류는 출혈성 패혈증 등의 대표적 증상들이 나타나 기능장애 및 치사에 이르게 된다 [3,9]. *V. anguillarum*의 독성 물질들은 세포외로 분비되거나 세포내에 존재하기도 하는데 세포내 독성인자들의 숙주세포내로의 전달 과정은 세포외 독성인자들과 비교해서 아직도 연구가 미비한 실정이다.

그람음성세균에서 세포내 독성인자가 숙주세포로 전달되는 중요한 수단인 하나로써 알려진 것이 outer membrane vesicle (OMV)에 의한 것이다. OMV는 세균의 생육과정 중 outer cell membrane의 일부가 세포로부터 돌출되어져 방출되면서 구형 상태로 형성되는데 크기는 직경이 50 nm~250 nm 정도이다 [1,4,10]. OMV는 세포와는 달리 단순한 구성성분을 지니고 있는데 주로 outer cell membrane의 구성성분인 phospholipid, lipid가 대부분이며 그 외 lipopolysaccharide, periplasm에 존재하는 protein들로 이루어져 있다. 따라서 OMV내에는 세포외로 분비되는 exotoxin과 periplasm에 존재하는 toxin 등의 다양한 virulence factor 들이 존재하고 있으며 이같은 물질들은 감염초기에 숙주세포에게 중요한 영향을 미치고 있는 것으로 보고되고 있다 [6,8]. 현재까지 OMV

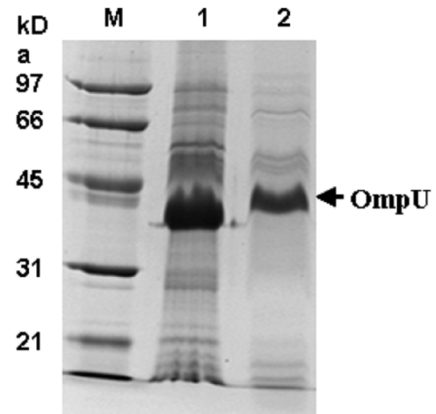
\* Corresponding author

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

E-mail: iskong@pknu.ac.kr

를 생산하는 세균으로는 *Escherichia coli*, *Shigella* sp., *Neisseria* sp., *Bacteroid* so., 등의 그람음성세균들이 알려져 있으며 이들 OMV의 생화학적 특성에 관한 다수의 연구보고가 있다 [8]. *Vibrio*속 세균에는 *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*가 OMV를 생산하고 있다고 보고하고 있으나 [7] 이는 단지 현미경 관찰에 의한 존재 유무만을 보고하고 있을 뿐 OMV의 생화학적 특징에 대해서는 보고된바가 없다. 본 연구실에서는 또다른 *Vibrio*속 세균인 *V. anguillarum*이 OMV를 생성하고 있으며 이들의 생화학적 특성을 처음으로 보고 중이다. 본 연구실에서는 *V. anguillarum*의 OMV내 주요 단백질을 분리하여 MALDI-TOF 분석을 통하여 얻은 결과를 보고하고자 한다.

*V. anguillarum*의 OMV는 다음과 같은 방법으로 분리 하였다. 균을 BHI broth에 접종하여 25°C에서 배양한 후 배양액을 6,000 X g, 4°C에서 20분간 원심 분리 한다. Cell을 분리한 배양액을 0.2 µm membrane filter를 이용하여 여과한 후 여과액에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 40 %의 농도가 되게 첨가하여 2시간 이상 처리한다. 이 후 20,000 X g, 4°C에서 원심분리하여 pellet을 얻어 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)에 용해시켜 같은 buffer로 16시간 투석한다. 투석시킨 용액을 4°C, 27,000 X g 로 40분간 원심 분리하여 얻은 pellet을 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)에 녹여 -20°C에 보관하여 사용하였다. 분리한 OMV 용액을 12% polyacrylamide 전기영동을 행한 후 염색하여 단백질 band pattern을 관찰한 결과 Fig. 1에서 보는 것처럼



**Fig. 1.** SDS-PAGE profiles of outer membrane proteins (OMPs) and outer membrane vesicles (OMVs) from cells of *Vibrio anguillarum* serotype O1 grown in BHI broth at 25°C. lane M, molecular mass standard (molecular masses are indicated on the left); lane 1, OMP; lane 2, OMV.

약 38 kDa의 주요 band가 나타났으며 그 외 몇 개의 약한 단백질 band가 존재함을 알 수 있었다. OMV의 주요 구성 단백질로 보이는 38 kDa의 단백질이 어떠한 기능을 담당하는 단백질인지를 확인하기 위하여 gel에서 단백질 band를 잘라내어 trypsin 처리 후 MALDI-TOF 분석을 행하였다. Table 1에 나타낸 것과 같이 16개의 peptide sequence를 얻었으며 database에서 homology를 조사한 결과 OmpU 단백질로 확인되었다. OmpU 단백질은 *V. anguillarum*에 bile salt를 처리하였을 때 생성이 증가되는 것으로 알려져 있으며 outer membrane에 존재하는 단백질의 하나로 보고되고 있어 [11] OMV의 생성은 outer membrane이

**Table 1.** Peptides from OmpU

Measured mass	aa residue <sup>a</sup>	sequence
1101.613	318-327	SEDELALGLR
1300.775	316-327	AKSEDELALGLR
1591.874	139-152	IVVADRVDNMVAYK
1607.868	139-152	IVVADRVDNMVAYK
1677.792	229-312	SYISYFNLLDSDK
1795.881	97-113	YTYAGIGGNFGEVTYVK
1962.023	299-315	SYISYFNLLDSDKVGK
1994.988	282-298	ADSFVAVDATYFFKPNFR
2118.136	256-273	YTMGQAVFTSTYNYLESK
2238.171	279-298	DKADSFVAVDATYFFKPNFR
2267.252	114-134	NDGALGVITDFTDIMSYHGK
2283.254	114-134	NDGALGVITDFTDIMSYHGK
2466.422	91-113	GDLNRYTYAGIGGNFGEVTYVK
2960.096	170-198	QESTSAITDNNADGYSLSAIYAIGDTGVK
3449.678	166-198	FADRQESTSAITDNNADGYSLSAIYAIGDTGVK
3652.953	63-96	VAINDSL YGVGF YEGEFTTADEGTADNKGDLNDR

<sup>a</sup>) amino acid residue

세포로부터 방출되어 형성되고 있음을 뒷받침하는 결과를 보여주고 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 해양수산부 마린바이오 21사업의 해양바이오 프로세스연구단 연구비 지원 (과제관리번호 M2007-06)에 의해 수행 되었습니다.

## 참 고 문 헌

1. Beveridge, T. J. 1999. Structures of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **181**, 4725-4733.
2. Buchholtz, C., Nielsen, K. F., Milton, D. L., Larsen, J. L. and Gram, L. 2006. Profiling of acylated homoserine lactones of *Vibrio anguillarum* in vitro and in vivo: Influence of growth conditions and serotype. *Syst. App. Microbiol.* **29**, 433-445.
3. Denkin, S. M. and Nelson, D. R. 1999. Induction of protease activity in *Vibrio anguillarum* by gastrointestinal mucus. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3555 - 3560.
4. Henry, T., Pommier, S., Journet, L., Bernadac, A., Gorvel, J. P. and Llobès, R. 2004. Improved methods for producing outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Res. Microbiol.* **155**, 437-446.
5. Holmström, K. and Gram, L. 2003. Elucidation of the *Vibrio anguillarum* genetic response to the potential fish probiont *Pseudomonas fluorescens* AH2, using RNA-Arbitrarily Primed PCR. *J. Bacteriol.* **185**, 831-842.
6. Kadurugamuwa, J. L., Mayer, A., Messner, P., Sára, M., Sleytr, U. B. and Beveridge, T. J. 1998. S-Layered *Aneurinibacillus* and *Bacillus* spp. are susceptible to the lytic action of *Pseudomonas aeruginosa* membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **180**, 2306-2311.
7. Kondo, K., Takade, A. and Amako, K. 1993. Release of outer membrane vesicles from *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol. Immunol.* **37**, 149 - 152.
8. Kuehn, M. J. and Kesty, N. C. 2005. Bacterial outer membrane vesicles and the host - pathogen interaction. *Genes Dev.* **19**, 2645-2655.
9. Toranzo, A. E., Santos, Y. and Barja, J. L. 1997. Immunization with bacterial antigens: *Vibrio* infections. *Dev. Biol. Stand.* **90**, 93-105.
10. Wai, S. N., Lindmark, B., Söderblom, T., Takade, A., Westermark, M., Oscarsson, J., Jass, J., Richter-Dahlfors, A., Mizunoe, Y. and Uhlin, B. E. 2003. Vesicle-mediated export and assembly of Pore-forming oligomers of the Enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell* **115**, 25 - 35.
11. Wang, S. Y., Lauritz, J., Jass, J. and Milton, D. L. 2003. Role for the major outer-membrane protein from *Vibrio anguillarum* in bile resistance and biofilm formation. *Microbiology* **149**, 1061-1071.