



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

공 학 석 사 학 위 논 문

Proteomic 분석을 통한 *Vibrio anguillarum*의
스트레스 대응 단백질에 관한 연구



2010년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

생 물 공 학 과

김 은 영

공 학 석 사 학 위 논 문

Proteomic 분석을 통한 *Vibrio anguillarum*의
스트레스 대응 단백질에 관한 연구

지도교수 공 인 수

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함.

2010년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

생 물 공 학 과

김 은 영

김은영의 공학석사 학위논문을 인준함.

2010년 2월 25일



주심 이학박사 이 형 호 인

위 원 공학박사 김 중 균 인

위 원 공학박사 공 인 수 인

목 차

Abstract	iii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. Preparation of proteins	4
1-1. Bacterial strains and cultural conditions	4
1-2. Stress conditions	4
1-3. Sample preparation	5
2. Analysis and identification of proteins	5
2-1. 2D-PAGE	5
2-2. In-gel digestion, MALDI-TOF/MS analysis and protein identification	6
3. Gene sequencing	6
3-1. Design of primers for sequencing	7
3-2. PCR analysis	7
3-3. Sequencing	8
4. Gene expression analysis	8

4-1. Total RNA isolation and cDNA synthesis	8
4-2. RT-PCR	9
III. 결과 및 고찰	10
1. Differential expression protein of diverse stress conditions	10
2. Sequencing and analysis of <i>V. anguillarum</i> OSDR	22
3. Transcriptional analysis of the OSDR gene	26
IV. 요약	29
V. 감사의 글	31
VI. 참고문헌	32



Eun-Young Kim

Department of Biotechnology, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Vibrio anguillarum is a halophilic and gram-negative bacterium that universal marine pathogen causing vibriosis in marine fish and other aquatic animals. In general, bacteria have developed strategies to survive in harsh environments. *V. anguillarum* also encounter various stresses with seawater and hosts. In this study, we investigated differential protein expression of the *V. anguillarum* in response to pH and temperature stresses. *V. anguillarum* was cultured under stress condition A (15 °C, pH 7), stress condition B (25 °C, pH 10), and normal condition (25 °C, pH 7), respectively. Proteins were separated by 2D-PAGE, and these proteins were observed different expression in each conditions, and identified by MALDI-TOF/MS. About 550 proteins in normal condition, about 530 proteins in stress condition A, and 580 proteins in stress condition B were expressed on the gel. Among them, 40 proteins were identified, and 2 proteins were commonly down-regulated under some stress conditions. These proteins were identified as putative C4-dicarboxylate transport sensor protein and oxidoreductase short-chain dehydrogenase/reductases family protein (OSDR). Especially, OSDR was down-regulated at pH (5), NaCl concentration (2M), and bile salt (0.1%). OSDR was included in short-chain dehydrogenase/reductases (SDR), and it has distinct sequence motifs as TGXXGXG. Analysis of transcriptional level with RT-PCR showed that OSDR gene was reduced by time course. As a result, expression of OSDR protein was regulated in transcriptional level. To the best of our knowledge, this is the first report describing stress-responsive proteins of *V. anguillarum* using proteomic approaches. Our results provide a useful strategy for detection of changed environment with *V. anguillarum*.

I. 서론

*Vibrio anguillarum*은 Gram-negative, facultative bacterium으로 대표적인 수 해양성 미생물이다[12]. 또한 marine fish, freshwater fish 및 shellfish에 vibriosis를 유발하는 대표적인 어류 병원성 병원균이다[10, 12]. *V. anguillarum*은 O-antigen 반응 결과에 의하여 23여 종의 sero-type이 알려져 있으며, 그 중 O1, O2, 그리고 O3 type이 fish에 vibriosis를 유발한다[10]. *V. anguillarum*에 의한 hemorrhagic septicemia 증상은 높은 폐사율을 일으키기 때문에 다양한 양식 산업에 막대한 경제적 피해를 일으킨다[12]. 따라서 이러한 경제적 손실을 막기 위하여 *V. anguillarum*에 대한 연구가 필요하나, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* 및 *V. vulnificus* 등의 human pathogenic *Vibrio* species에 대한 연구만이 활발히 수행되고 있으며 *V. anguillarum*에 대한 보고는 미비한 실정이다.

Fish 및 shellfish pathogenic *V. anguillarum*은 해수 및 먹이 등에 존재하다가 host 체내로 침투하며, 장내에서 colonization을 통하여 septicemia를 유발한다[16]. 따라서 host 체내로 침투한 *V. anguillarum*은 temperature, pH shift, salt, osmotic stress 및 bile salt 등의 다양한 host 체내 환경의 stress 하에서 생존하

여야만 하며, 이러한 조건에서 생존하기 위한 mechanism을 이용한다[11, 16].

Bacteria는 다양한 환경변화를 접하게 되며 이러한 환경변화에 적절하게 적응 또는 반응함으로써 생존한다. 따라서 이러한 환경변화에 대한 bacteria의 적응 및 반응에 대한 규명은 생육특징, infection mechanism 및 virulence factor등 병원성 bacteria의 연구에 다양한 유용정보를 제공한다. 이러한 mechanism을 규명하기 위한 연구는 다양하게 시도되었으며 genetic level 또는 protein level로 나누어 연구 되었다[2, 7, 11, 18, 19]. 하지만, genomic 조작 및 유전자의 screening 과정을 통한 연구는 다양한 조건에 대한 특정 유전자의 기능을 밝히기에 매우 어렵다는 문제점이 있다[7]. 따라서 특정 환경조건에 순응하는 기작을 밝히는 연구는 다양한 stress 하에서 protein의 발현을 비교, 분석하는 proteomic analysis에 의하여 효율적으로 밝혀져 왔다[18].

다양한 proteomics analysis 방법 중에서 two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE)를 이용한 방법이 매우 광범위하게 사용되어 왔다 [7, 11]. 2D-PAGE는 bacteria가 다양한 stress에 대하여 발현하는 total cellular protein map을 작성할 수 있으며 이러한 protein spot map의 비교를 통하여 특정 조건하에서 발현이 차이가 나는 functional protein spot을 찾을 수 있다 [7, 11]. 따라서 특정 환경 stress에 대한 이러한 protein의 기능을 규명하기에

적합하다. 또한 2D-PAGE를 통한 matrix assisted laser desorption ionization - time of flight /mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) 및 amino acid N-terminal sequence 분석을 통하여 특정 단백질이 어떠한 단백질인가 규명할 수 있다[7].

본 연구에서는 *V. anguillarum*을 temperature, pH, NaCl, 그리고 bile salt concentration을 변화시킨 다양한 environmental stress 조건을 처리한 다음 이러한 stress에 의하여 발현이 차이 나는 protein spot들을 찾아내었으며, MALDI-TOF/MS를 통한 분석결과로부터 spot의 protein이 어떠한 protein인지 밝혀내었다. 그리고 밝혀낸 단백질을 encoding하고 있는 유전자의 정보를 밝혀내었다. 밝혀낸 유전자의 서열을 이용하여 reverse transcriptase-PCR을 수행하여 genetic level에서의 regulation에 관하여 연구를 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. Preparation of proteins

1-1. Bacterial strains and cultural conditions

실험에 사용된 *V. anguillarum* strain O1은 Holmstrom and Gram (2003)의 것을 사용하였으며 Brain Heart Infusion (BHI; Difco, USA) broth와 1.2% agar를 함유한 BHI plate에서 25°C, 180RPM으로 표준 배양하였다. 또한 20% glucose와 7% dimethyl sulfoxide (DMSO)를 사용해 -70°C에서 보관하였다.

1-2. Stress conditions

V. anguillarum O1의 stress는 온도 (15°C), pH (5, 10), NaCl 농도 (2M), bile salt 농도 (0.1%) 하에서 각각 실험하였다. 먼저 *V. anguillarum* O1을 표준 배양하여 optical density가 600nm에서 0.4가 되었을 때 원심분리 (4000RPM, 10 min, 4°C) 하여 cell을 모은 후 각각의 stress 조건에 맞춘 배지에 resuspension 하였다. Stress 조건에 부합한 배양 시간은 2M NaCl에서 1시간, 15°C에서 2시간, pH 5와 pH 10, bile salt에서 각각 3시간으로 하였으며[12], 1ml 씩 원심분

리 (12000RPM, 2.5min) 하여 cell은 -20℃에서 보관하였다.

1-3. Sample preparation

1ml 씩 원심분리한 cell은 lysis buffer (7M urea, 2M thio-urea, 4% CHAPS)에 0.0154g/ml Dithiothreitol (DTT)와 20 μ l/ml pharmalyte를 첨가한 lysis solution 150 μ l에서 4-16시간 동안 multi-vortex 해 충분히 lysis 시킨 후 원심 분리 (12000RPM, 5min, 4℃) 하여 cell debris를 제거하였다. 얻어낸 supernatant는 2-D Clean-Up Kit (Amersham Biosciences, USA)를 이용하여 preparation 하였으며, dry된 상태의 sample은 lysis solution 50-100 μ l에 4-16 시간 동안 충분히 lysis 시켰다.

Protein은 Bradford assay법에 따라 정량 하였으며 standard curve는 bovine serum albumin을 이용해 그렸다.

2. Analysis and identification of proteins

2-1. 2D-PAGE

First-dimensional IEF와 second-dimensional SDS-PAGE는 Amersham

Biosciences manual에 따라 수행하였다. 각각의 lysis solution에 충분히 lysis 된 sample을 정량 하여 150-200 μ g의 protein을 취한 후 0.5% IPG buffer (pH 4-7)와 5% bromophenol blue 포화용액을 첨가하여 미리 rehydration 시켜 놓은 IPG strip (immobilized pH4-7, 13cm, Amersham Biosciences, USA)에 loading하였다. Isoelectric focusing은 1 step에서 1시간 동안 100V를 유지하였으며, 2 step에서 500V를 1시간 30분 유지하였고, 마지막 3 step에서 8000V까지 gradient하게 진행하여 80000Vhr까지 전력을 올렸다. First-dimensional IEF가 끝난 gel strip은 equilibration buffer (50mM Tris-HCl , pH 8.8 , 6M urea, 30% glycerol, 2% SDS)에 각각 1% DTT와 0.5% idoacetamide를 첨가한 solution으로 equilibration 시킨 후 12% polyacrylamide gel에 loading하였다. Second-dimensional SDS-PAG는 130V로 전개하였다. Gel의 염색은 Heukeshoven and Dernick의 silver staining법에 따랐다. 2D-PAGE는 각각 stress에 따라 여섯 번 이상 수행하여 결과를 도출하였다.

2-2. In-gel digestion, MALDI-TOF/MS analysis and protein identification

Silver staining한 gel의 spot을 분리하여 25% ethanol과 7% acetic acid가 함유된 solution에 넣어 spot 고유의 색이 사라질 때까지 destaining 하였다. 그

후 in-gel digestion은 trypsin을 이용해 수행하였다. 그리고 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) 가 0.1% 함유된 50% acetonitrile solution을 이용해 gel에서 peptide를 분리하였다. 이를 vacuum centrifuge로 건조시키고, trypsin을 처리하여 MALDI-TOF/MS 및 MALDI-TOF/MS/MS 분석을 실행하였다 [9]. Peptide mass fingerprint data는 Mascot search engine (<http://www.matrixscience.com/home.html>)과 SWISSPLOT을 이용하여 protein database와 비교 분석하였다.

3. Gene sequencing

3-1. Design of primers for sequencing

MALDI-TOF/MS/MS를 통해 얻어낸 부분적인 sequence와 이미 알려진 *Vibrio* sp.의 각각의 DNA sequence를 바탕으로 알고자 하는 protein을 coding 하는 gene의 sequencing을 위한 primer를 작성하였다. Sequence similarity analysis는 NCBI server에서 BLAST와 FASTA network를 이용하였다.

3-2. PCR analysis

*V. anguillarum*의 chromosomal DNA를 template로 하여 50 μ l의 reaction mixture (250uM dNTP, 5 μ l 10X PCR buffer, 10pmol primer, 0.5U Taq DNA polymerase, distilled water up to 50 μ l)를 95℃에서 5분 동안 denaturation 시킨 후 95℃에서 30초, 56℃에서 30초, 72℃에서 30초를 30 cycle 거쳤으며, 72℃에서 7분 동안 남은 반응을 종료 시켰다.

3-3 . Sequencing

PCR product의 sequencing은 ABI 3730xl 96-capillary DNA analyzer (Applied Biosystems, USA)를 이용하였으며 gene의 open reading frame (ORF)를 구하고자 5'과 3'쪽의 염기서열은 DNA Walking SpeedUP Premix Kit (Seegene, Korea)를 사용하였다.

4. Gene expression analysis

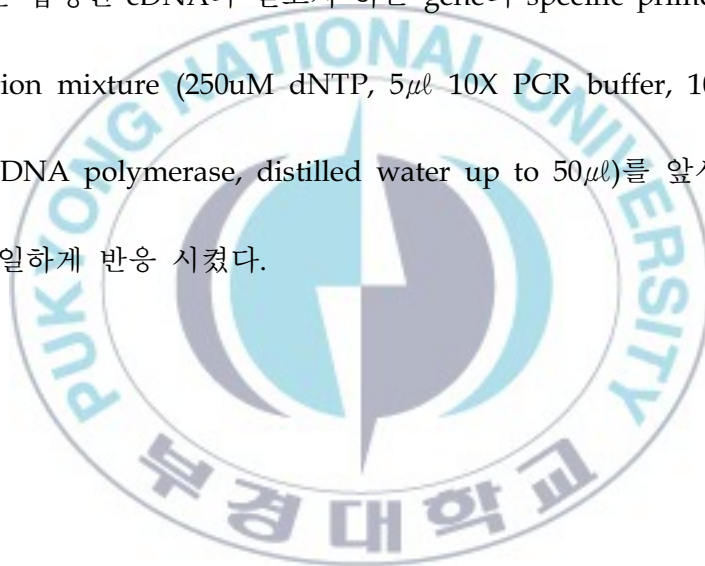
4-1. Total RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA는 TRIzol Reagent (Invitrogen, USA)를 이용하여 Invitrogen사의 protocol에 따라 분리하였으며, 분리 후 DNase I (TaKaRa, Japan)을 처리하

여 DNA를 제거하고 pure한 RNA를 얻었다. Total RNA를 First strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (Roche, USA)을 이용하여 mRNA에서 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA는 -20℃에서 보관하였다.

4.2. RT-PCR

RT-PCR은 합성된 cDNA와 얻고자 하는 gene의 specific primer를 포함한 50 μ l의 reaction mixture (250uM dNTP, 5 μ l 10X PCR buffer, 10pmol primer, 0.5U Taq DNA polymerase, distilled water up to 50 μ l)를 앞서 언급한 PCR 과정과 동일하게 반응 시켰다.



Ⅲ. 결과 및 고찰

1. Differential expression protein of diverse stress conditions

각종 stress 하에서 up 또는 down regulation 되는 *V. anguillarum* O1의 protein을 분석하고자, spot의 변화가 가장 많았던 15℃와 pH 10을 중심으로 균의 생육 환경 조건을 변화 시킨 후 2D-PAGE를 통해 달라진 protein을 관찰하였다. 여섯 번의 동일한 실험을 반복하여 재현성을 높였다. 그 결과 *V. anguillarum*이 25℃, pH 7에서 성장하는 경우 총 spot의 수는 평균 550여 개에서 15℃의 stress를 받은 균의 경우 spot의 양이 530여 개로 감소한 반면, pH stress를 받은 균의 경우 총 580여 개로 증가하였다 (Fig. 1, 2, 3). *V. anguillarum*의 주요 protein spot과 변화된 protein spot 등을 대상으로 MALDI-TOF/MS와 MALDI-TOF/MS/MS를 실시한 결과, 총 40개의 spot을 identification 할 수 있었다. 총 64개의 spot에서 분석 결과가 clear 한 pick를 얻었음에도 불구하고 24개 spot의 경우 data base 부족으로 identification하지 못했다. Identification된 모든 protein들은 Fig. 1과 Table 1에 명시하였다.

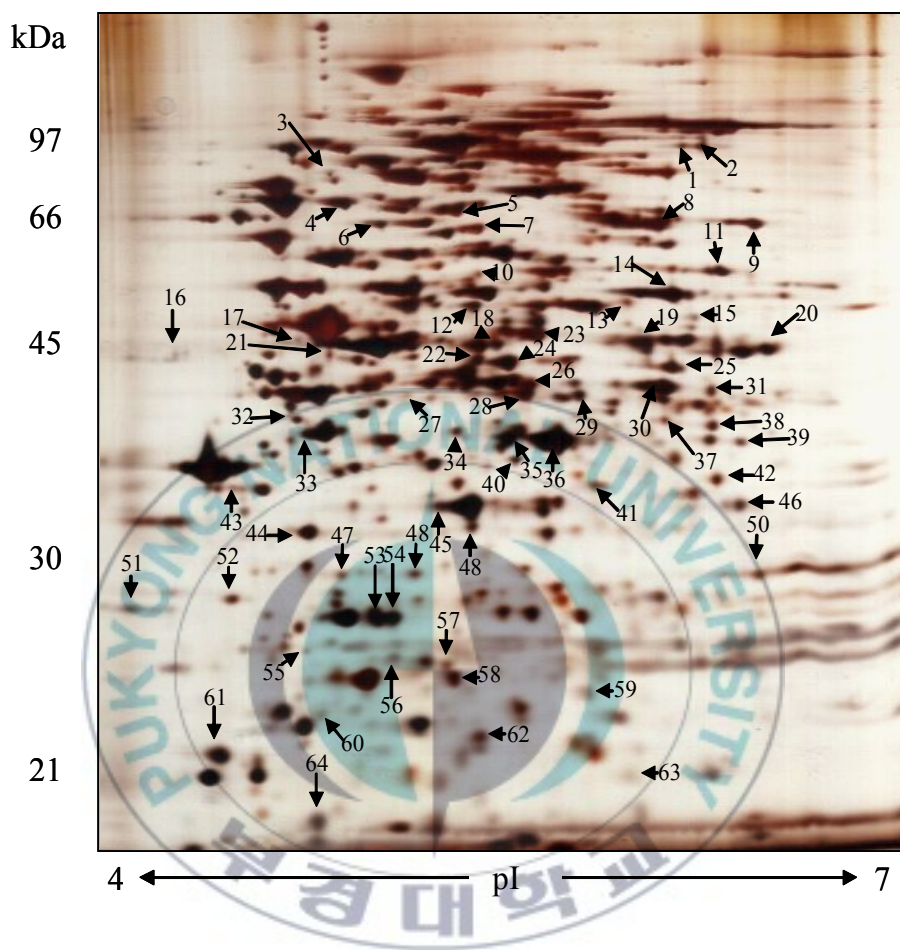


Fig. 1. A proteome reference map of *Vibrio anguillarum*. Proteins were separated by 2D and then visualized by silver staining.

Table 1. *Vibrio anguillarum* proteins identified from the reference map.

Spot no.	Definition	Origin	Accession ID	Molecular mass (kDa)	15°C	pH 10
1	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar eltor str. N16961	gi 15641269	86	-	-
2	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ZP_05909994	86	-	-
3	General secretion pathway protein D precursor	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633	gi 28896907	73	-	+
4	Heat shock protein 90	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	NP_797200	72	-	-
5	Aspartyl-tRNA synthetase	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	NP_797426	65	+	-
6	Carboxylase subunit B	<i>Vibrio vulnificus</i>	NP_760495	64	-	+
7	ABC transporter, ATP-binding protein	<i>Vibrio splendidus</i>	CAV18694	61	+	-
8	Hypothetical protein VCA0199	<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar eltor str. N16961	gi 15600969	74	-	-
9	CTP synthetase	<i>Vibrio splendidus</i> 12B01	gi 84390113	60	-	-
10	6-Phospho-beta-glucosidase	<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar eltor str. N16961	gi 15641566	21	-	+
11	Unidentified					
12	Phosphomannomutase	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	NP_760581	47	+	-
13	Unidentified					-
14	Unidentified					-
15	Unidentified					+
16	Hypothetical protein	<i>Listria monocytogenes</i>	ABB99935	43	-	-
17	Unidentified					+
18	Histidyl-tRNA synthetase	<i>Vibrio vulnificus</i>	NP_759422	45	+	-
19	Unidentified					-
20	Putative C4- dicarboxylate transport sensor protein	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ZP_05908166	77	-	-
21	Elongation factor Tu	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	gi 27364738	43	-	-
22	Hypothetical protein VP1087	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	NP_797466	78	+	-
23	Adenylosuccinate synthetase	<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar eltor str. N16961	NP_232230	46	+	-
24	Asparagine synthetase B	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	NP_797205	62	+	-
25	Glucose-1-phosphate adenylyl transferase	<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar eltor str. N16961	gi 15641731	45	-	+
26	Protein recA (RecombinaseA)	<i>Listonella anguillarum</i>	CAH57105	38	+	-
27	Hypothetical protein MED222_19679	<i>Vibrio</i> sp. MED222	gi 86146956	44	-	+
28	Unidentified					+
29	Unidentified					+
30	Probable peroxamine synthetase	<i>Listonella anguillarum</i>	AAB81626	40	+	-
31	Unidentified					-
32	Unidentified					+
33	ADP-L-glycero-D-mannoheptose-6-epimerase	<i>Vibrio splendidus</i> 12B01	gi 84386892	35	-	-
34	Adenylosuccinate lyase	<i>Bartonella henselae</i> str. Houston 1	gi 49475719	49	-	-
35	Unidentified				+	-
36	Unidentified					-
37	Probable peroxamine synthetase	<i>Listonella anguillarum</i>	gi 2558977	40	-	-

Table 1. Continued.

Spot no.	Definition	Origin	Accession ID	Molecular mass (kDa)	15°C	pH 10
38	L-threonine 3-dehydrogenase	<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar eltor str. N16961	gi 15601640	38	-	-
39	Unidentified				-	-
40	Fructose 1,6-bisphosphate kinase	<i>Vibrio splendidus</i> 12B01	gi 84385734	35	+	+
41	Cysteine synthase A	<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar eltor str. N16961	gi 15640984	34	+	+
42	Leucine transcriptional activator	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	NP_796729	36	+	+
43	Unidentified				-	+
44	Acyl carrier protein S-malonyltransferase	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	gi 27366282	32.43	-	-
45	Unidentified				-	-
46	Unidentified				-	-
47	Deoxyribose-phosphate aldolase	<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar eltor str. N16961	gi 15642347	27.94	+	+
48	Threonine dehydratase	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato str. DC3000	NP_795019	30	+	+
49	Unidentified				-	-
50	Ribosomal protein S2	<i>Listonella anguillarum</i>	gi 20451753	39.01	-	-
51	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ZP_05909259	72	+	+
52	Unidentified				-	+
53	Hypothetical protein mlr6547	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	gi 13475468	42.63	-	-
54	Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family protein	<i>Vibrio alginolyticus</i>	gi 91224782		-	-
55	Unidentified				+	+
56	Transcriptional regulator	<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar eltor str. N16961	gi 15601325	28.04	+	+
57	Unidentified				+	+
58	Uracil phosphoribosyltransferase	<i>Vibrio splendidus</i> 12B01	gi 84389758	22.6	-	+
59	Unidentified				+	+
60	Unidentified				+	+
61	Putative outer membrane lipoprotein	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> R1MD2210633	gi 28900251	12.38	-	-
62	S-Ribosylhomocysteine	<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar eltor str. N16961	gi 15640579	19.13	-	-
63	Unidentified				+	+
64	Unidentified				-	-

pH 10의 stress를 주었을 경우, 64개의 spot들 중 spot 3, 6, 10, 25, 40, 47, 48, 51, 56 등을 비롯하여 23개의 protein spot들이 up-regulation 되었으며, spot 1, 2, 20, 21, 33, 34, 38, 50, 54, 58 등을 포함한 18개의 protein spot들이 down-regulation 되었다. Up-regulation protein으로는 gluconeogenesis 과정에 이용되는 carboxylase subunit B와 6-phospho-beta-glucosidase를 비롯하여 starch와 sucrose의 metabolism에 사용되는 glucose-1-phosphate adenylyl transferase, fructose, mannose metabolism에 속하는 fructose-1-phosphate kinase, 그리고 pentose phosphate pathway의 deoxyribose-phosphate aldolase 등 glycolysis와 관련한 enzyme들이 주를 이루었다[35]. Amino acid의 합성에 관여하는 enzyme 중 cysteine synthase A와 threonine dehydratase의 protein spot들도 증가한 모습을 보여, pH 10의 염기성 환경이 각각 cysteine metabolism과 isoleucine biosynthesis에 영향을 주는 것으로 예측된다. 그 외에도 transport에 관여하는 general secretion pathway protein D precursor, protein folding에 작용하는 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP-type, 그리고 transcription을 조절하는 transcriptional regulator가 up-regulation 되었다[14]. (Fig. 2, Table 1)

반면, ribonucleotide-diphosphate reductase subunit과 adenylosuccinate

lyase, uracil phosphoribosyl transferase 등의 transcription에 관련된 protein spot들과 elongation factor Tu, ribosomal protein S2 등의 translation과 연관된 protein spot들이 down-regulation 되었다[4, 5]. 또한 lipopolysaccharide biosynthesis에 관여하는 ADP-L-glycero-D-mannoheptose-6-epimerase의 spot 이 감소하는 모습을 보였으며, glycine, serine, threonine 등의 metabolism에 이용되는 L-threonine 3-dehydrogenase와 oxidoreductase short-chain dehydrogenase/reductases family protein (OSDR) 등의 oxidoreductase enzyme가 down-regulation 되는 모습을 보였다[9].



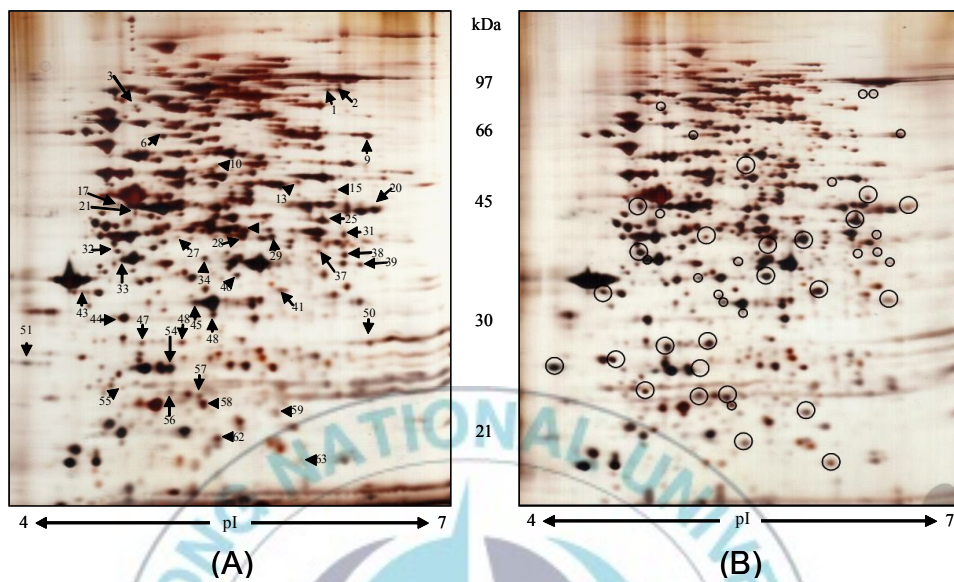


Fig. 2. 2-DE patterns of *V. anguillarum* O1 strain incubated under pH 7 (A) and pH 10 (B).

*V. anguillarum*을 15℃에서 배양한 경우, 25℃에서 배양한 균에 비해 spot 5, 7, 12, 18, 23, 24, 26, 30, 42 등을 비롯하여 11개의 protein들이 up-regulation 되었으며, spot 4, 6, 20, 51, 54 등 6개의 spot들이 down-regulation 되는 모습을 볼 수 있었다 (Table 1, Fig. 3).

pH stress와는 반대로 15℃의 stress 하에서는 transcription에 관여하는 adenylosuccinate synthetase, leucine transcriptional activator와 translation에 관여하는 aspartyl-tRNA synthetase, histidyl-tRNA synthetase 등의 protein spot들이 up-regulation 되었다[6]. 또한 asparagine biosynthetic process에 관여하는 asparagine synthetase B와 mannose biosynthetic process에 이용되는 phosphomannomutase 등을 비롯한 몇몇 spot들은 pH stress하에서 up-regulation 되는 부분과 유사하게 나타났다. 그 외에 ion transport에서 작용하는 ABC transporter ATP-binding protein이 증가하는 모습을 보였다. 반면, down-regulation된 spot들에는 heat shock protein 9, gluconeogenesis에 관여하는 carboxylase subunit B, 그리고 protein folding에 작용하는 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 등이 있다. Carboxylase subunit B와 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase는 pH stress에서 발현된 성상과는 달리 감소되는 모습을 보였다.

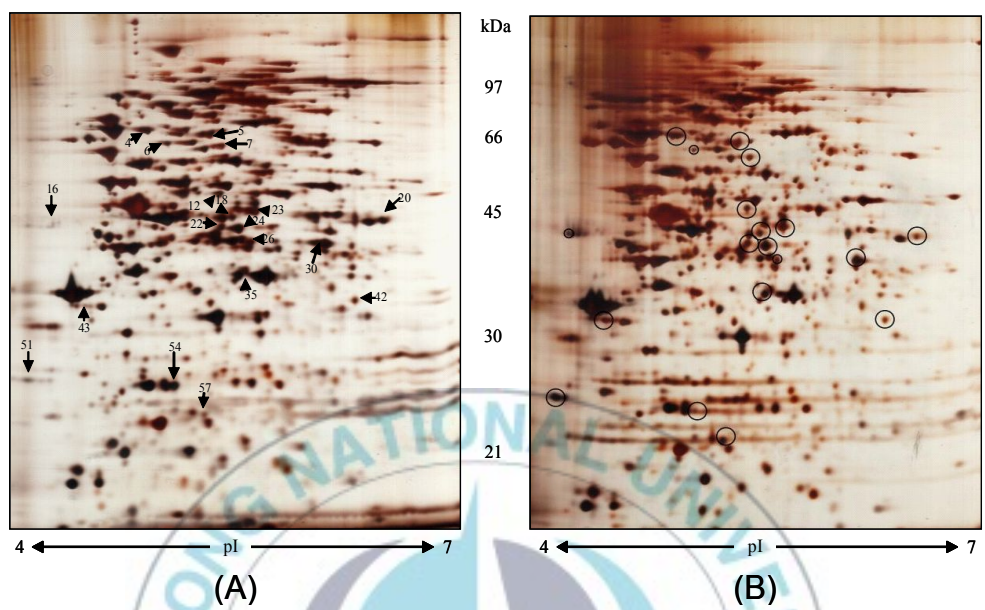


Fig. 3. 2-DE patterns of *V.anguillarum*O1 strain incubated under 25°C (A) and 15°C (B).

Probable perosamine synthetase의 경우 pH 10에서는 감소하였으나 15℃에서는 오히려 증가하는 모습을 보였다. 이 enzyme는 *V. cholerae*의 O-antigen에서 찾을 수 있는 4-aminodeoxysugar인 perosamine를 합성하는 물질과 같은 물질로 예상되어지고 있다[1]. 이 물질이 stress 하에서 down-regulation 된다는 사실은 bacteria의 pethogen인 O-antigen의 감소를 내포할 수 있으며, 반대로 15℃에서 up-regulation 된다는 사실은 O-antigen의 증가를 의미할 수 있다. 때문에 pH, 온도 외에도 각종 stress condition 하에서 *V. anguillarum*과 fish pethogen 사이의 probable perosamine synthetase에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다. (Fig. 2, Table 1)

54번 spot OSDR과 20번 spot putative C4-dicarboxylate transport sensor protein의 경우 pH 10과 15℃의 두 가지 stress 조건에서 모두 down-regulation되었다. putative C4-dicarboxylate transport sensor protein은 signal transduction에 주로 이용되며, C4-dicarboxylate transport system의 작동에 관여한다고 보고되었다. 특히 system 내에서 succinate, fumarate, 그리고 malate와 같은 C4-dicarboxylate를 up-take하는데 사용된다고 알려져 있다[17]. OSDR은 short-chain dehydrogenase/reductases (SDR) family에 속하는 protein으로 SDR family는 정의되어 있지 않은 아주 큰 protein family이다.

하지만 family 내에서 분명한 sequence motif가 존재하고 있다고 보고되었다 [13]. 또한, OSDR의 경우 위 두 가지 stress 외에 pH 5, NaCl 농도 (2M), bile salt 농도 (0.1%)에 변화를 주는 실험을 실시한 결과에서도 역시 down-regulation되는 모습을 보여, 다양한 환경적 조건의 변화에 대해서도 민감하게 변화하는 모습을 보였다.



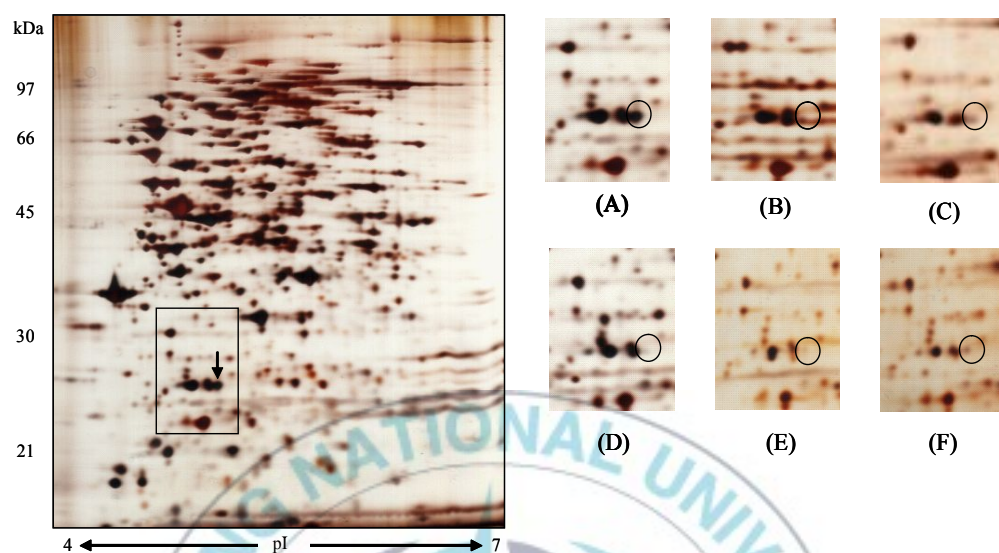


Fig. 4. Comparative proteome analysis of OSDR under the various growth condition ; (A) 25°C, pH 7, (B) 15°C, (C) Bile salt, (D) pH 10, (E) pH 5, (F) 2M NaCl

2. Sequencing and analysis of *V. anguillarum* OSDR

V. anguillarum O1의 OSDR gene을 sequencing 하기위하여 MALDI-TOF MS/MS를 통해 밝혀진 amino acid와 *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* 등에서 이미 보고된 DNA sequence를 alignment하여 유사도가 높은 부분을 대상으로 primer를 제작하였으며 이를 바탕으로 DNA Walking SpeedUp Premix Kit를 이용하여 759bp의 ORF를 밝혔으며, 252 amino acid 서열을 찾았다 (Fig. 5, 6). 이 amino acid 서열은 *Vibrio* sp. EX25의 dehydrogenase 및 *V. alginolyticus*의 OSDR과 84%의 가장 높은 상동성을 보였다 (Fig. 6).

또한 SDR family에서 존재한다고 알려진 sequence도 발견되었다. OSDR protein의 amino acid 서열의 12-19번째에 존재하는 TGXXXGXG는 coenzyme 이 binding 되는 region이며, 61번째의 D는 약하게 binding 되는 coenzyme과 adenine ring pocket의 stabilization을 위한 잔기로 보고되었다[8, 13]. 87-90번째의 NNAG의 경우 중심의 β -sheet 구조를 stabilization 시키는데 이용된다고 알려져 있으며, 112번째의 N이 active site이다[13]. Active site는 이외에도 139-152-156번째 amino acid인 S-Y-K에도 존재한다[8]. 180번째의 N은 substrate의 binding loop와 activite site를 connection 시키기 위함이며,

184-185번째에는 일반적으로 PG가 보존되어 reaction direction을 담당한다고 알려진 amino acid 인데[8, 13], *V. anguillarum*과 몇몇 *Vibrio* species의 경우 이 부분에 PS가 존재하였다. 마지막으로 189번째의 T는 nicotinamide ring의 carboxamide에 H-binding을 위한 역할을 한다고 보고되었다[13].



* 20 * 40 * 60 * 80 * 100
 ATGAATGGTTTAAACCATAAAGTCGCTTTAGTCACGGGTGCCGCCAACGGCATCGGCTTTGCGATAGCACAGCGTTTATATGATGAAGGGGCCAATGTAG
 * 120 * 140 * 160 * 180 * 200
 TACTGGCCGACTGGAATGAAGAGCAACTCGCCACCGCCATCGAAGCTTTTGACTCAACACGCGTCGCGGGCGCAAGTGATTGACGTCTCCGATCCTAAAAA
 * 220 * 240 * 260 * 280 * 300
 AGTAAAAGCCATGATCGATAACGCCGTATCAGCTTCGGTAAGCTCGACATTTTAGTCAACAATGCGGGCATCCACATCCCCGGCTCCGTCTTAGAAAGC
 * 320 * 340 * 360 * 380 * 400
 AGCGTTGAAGATTGGAAGAAAAATATCAGCGGTGAATATTGATGGCGTCGTGATTGCTCTAAATTTGCCTTACCTGAACTGCATAAAAAACGAGGGGACCA
 * 420 * 440 * 460 * 480 * 500
 TAGTCAACACCGCTTCAGTCTCTGGCTTAGGTGGCGACTGGGGTGCCGCATTTTACTGCGCCAGTAAAGGCGCGGTAGTCAACCTCAGCGCGCCATGGC
 * 520 * 540 * 560 * 580 * 600
 GCTAGACCAACGGTGCCGCTGGCGTACGAATTAACGCCGTGTGCCCAAGCTTAGTTAAACCAATATGACCAATGGTTGGTCGCAAGAGATTAGAGATAAA
 * 620 * 640 * 660 * 680 * 700
 TTAAACGAGCGCATCGCACTAGGACGCGCCGAGAACCGAGCGAAATTGCCGCGCAGTGCCCTTTTAGCCAGTGACGATGCATCATTTATCAATGGTG
 * 720 * 740 *
 TCAATTTACCCGTCGATGGTGGCGCTACCGCTTCGACGGCCAACTAAAAATCGTTTAA : 759

Fig. 5. A sequence of OSDR gene from *Vibrio anguillarum*.

V. anguillarum : MNLTHKVALVCAANGICPAIAQRLYDEGANVVLADWNEEQALATAIEAFDSTRVAAQVIVSDPKKVKAA
V. angustum : MNRFEKVVVFCAANGICPAIAHRFASEGAIIVVLADLYQDALDKVHSELIAEKTLCVKTIVSNEAEVKN
V. alginolyticus : MRGLKNKVALVCAANGICPAIAKRLYEEGANVALADWNEEQALANAVEGFDKQRVSAHSTIVSDPKVAA
V. cholerae : MRGLTHKVALVCAANGICPAIAERLYEEGATLALADWNEEQALAIIVIEQFDSARVYAQKVIVSDPEQVQA

V. anguillarum : MIDNAVSREFGLDILVCAAGIHIPGSSVLESSVEDWKKISAVNIDGVVYCSKFALPELLKTQGTIVNTAIV
V. angustum : LIEQTIKNFNKIDILVCAAGIHIPGTILDGSIQDWKISSVINGAIYCSKYALPYLIESKGCIVNNAIV
V. alginolyticus : LISDVVTRFGKLDILVCAAGIHPGSSVIEGSSVEDWKKISGVNIDGVVYCAKFALPELLKTGCMVNTAIV
V. cholerae : LVRKTYVERFGRDILVCAAGIHPGTVLECSVQDWRRIASVNIIDGVVYCAMHALPELIKTRGCMVNTAIV

V. anguillarum : SGLGGDWGAAPCATAGAVVNLTRAMALDHGAAGVRIAVQPSLVKINMTNGWQSQEIRDKFNERIALGRA
V. angustum : SGLGADWGAAYCVSAGAVVNLTRVLALDFGLQGVRIASVQPSLVKINMTNGWPEDIRNKFNERIPLGRA
V. alginolyticus : SGLGGDWGAAPCATAGAVVNLTRAMALDHGADGVRIAVQPSLVKINMTNGWPQDIRDKFNERIALGRA
V. cholerae : SGLGGDWGAAPCATAGAVVNLTRALALDHGAQGVRIAVQPSLVKINMTNGWPQAIRDQFNERIALGRA

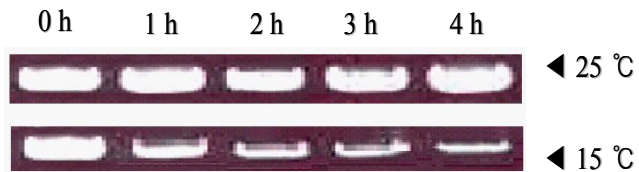
V. anguillarum : AEPSEIAAAVAFLASDDASFINGVNLVPDGGATASDGQPKIV- : 252
V. angustum : AEPPEEVAAMSEFLASDDASFVNGVNLVPDGGVTASDGQPKIVA : 253
V. alginolyticus : AEPPEIASVVTFLASDDASFINGVNLVPDGGATASDGQPKIV- : 252
V. cholerae : AEPKEIAAAVAFLASDDASFVHGVNLVPDGGATASDGQPKIV- : 252

Fig. 6. A sequence of OSDR amino acids from *Vibrio anguillarum* and other *Vibrio* species.

3. Transcriptional analysis of the OSDR gene

OSDR protein의 발현이 어느 지점에서 발생하는지 알아보하고자 RT-PCR을 실시하여 mRNA level에서 gene의 발현을 관찰하였다. 15℃에서 stress를 받은 *V. anguillarum*과 stress를 받지 않은 *V. anguillarum*으로부터 total RNA를 분리하였으며, 먼저 이를 바탕으로 stress 시간에 따른 mRNA의 cDNA를 합성하여 OSDR gene을 PCR을 통해 생성시켰다. 그 결과 25℃에서는 stress 시간이 흐르는 동안에도 동일한 양의 band가 나타나는 것에 반해 15℃에서는 stress 시간이 지남에 따라 band의 생성량이 줄어드는 모습을 보였다. 이러한 transcription 과정에서의 변화는 OSDR protein의 발현이 gene level에서 조절됨을 보여주었다 (Fig. 7).

OSDR



Control gene



Fig. 7. *Vibrio anguillarum* gene expression profiles: stress-related gene; OSDR gene, internal control gene ; 16S rRNA.

Bacteria는 다양한 environmental stress에 항상 노출 되어 있으며, 이러한 stress 하에서도 bacteria의 homeostasis를 유지하여야 한다. 이러한 조건에서 bacteria가 순응하기 위해서는 metabolism의 변화 또는 cellular structure compounds의 구조를 바꿈으로써 가능하다. 또한 이러한 반응은 gene regulation 등의 transcriptional level에서 조절 되는 mechanism이 있을 수도 있고, protein의 synthesis 또는 post-translational modification등의 translational level에서 조절되는 mechanism 일 수 도 있다. 이러한 조절 기작에 의하여 up-또는 down-regulation 되는 유전자 또는 단백질에 의하여 다양한 environmental stress에 견딜 수 있게 된다.

본 연구에서는 다양한 stress를 처리 하였을 때의 *V. anguillarum*의 total protein의 발현을 각각 비교하여 특정 stress 하에서 어떠한 protein의 발현이 shift 됨으로써 stress에 어떠한 protein이 관련이 있는지를 밝혔다. 또한 본 연구를 통해 *V. anguillarum*의 OSDR이 다양한 환경적 stress에 대해 매우 sensitive하게 작동함을 밝혔으며, 이러한 결과를 바탕으로 *V. anguillarum*의 stress 여부를 측정하는 satellite maker로써 OSDR이 적합하다는 결론을 도출하였다.

IV. 요약

*Vibrio anguillarum*은 호염성, gram-negative의 대표적인 어류병원성 수해양 미생물로 인체 및 어류에 큰 피해를 주고 있다. 이러한 *V. anguillarum*을 다양한 환경적 stress 하에 둬으로써 이에 따른 단백질의 발현을 2-dimensional electrophoresis 와 matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight/mass spectrometry (MALDI-TOF/MS)를 통해 분석하였다. 그 결과 wild type의 경우 550여 개의 spot이 나타났으며, 15℃의 온도 stress를 받은 균의 경우 spot의 양이 530여 개로 감소한 반면 pH stress를 받은 균의 경우 총 580여 개로 증가하였다. 이들 spot 중 40개의 spot이 identification 되었다. 온도 stress의 경우 aspartyl-tRNA synthetase, ABC transporter ATP-binding protein을 비롯하여 11개의 spot이 up-regulation되었으며 heat shock protein 9, putative C4-dicarboxylate transport sensor protein 등 6개의 spot이 down-regulation 되었다. pH stress의 경우에는 general secretion pathway protein D precursor, adenylyltransferase 등 23개의 protein이 up-regulation 되었으며 Ribosomal protein S2, ADP-L-glycero-D-mannoheptose-6-epimerase 등 18개의 protein

이 down-regulation 되었다. oxidoreductase short-chain dehydrogenase/reductases family protein (OSDR) 의 경우 온도와 pH stress를 비롯해 NaCl 농도 (2M), Bile salt 농도 (0.1%)의 변화에도 protein이 down regulation 되었다. Stress에 민감하게 반응하는 OSDR의 DNA sequencing을 통해 759 bp의 ORF를 밝혔으며, 이를 바탕으로 252 amino acid 서열을 찾았다. 또한 OSDR protein의 발현의 조절 mechanism을 찾고자 RT-PCR을 실시한 결과 stress 조건 하에서 OSDR은 시간이 지남에 따라 급격히 감소하였고, 이를 통해 OSDR protein의 발현의 조절이 transcriptional level에서 일어남을 알 수 있었다. 본 연구를 통해 *V. anguillarum*의 OSDR이 다양한 환경적 stress에 대해 매우 sensitive하게 작동함을 밝혔으며 또한 이러한 결과를 바탕으로 *V. anguillarum*의 stress 여부를 측정하는 satellite maker로 OSDR이 적합하다는 결론을 도출하였다.

V. 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 부족한 저를 아낌없는 지도와 격려로 이끌어 주신 공인수 교수님께 고개 숙여 감사드립니다. 또한 저를 생물공학과 석사과정 대학원생으로서 열심히 연구할 수 있도록 도와주신 김중균 교수님, 이형호 교수님, 홍용기 교수님, 박남규 교수님, 김성구 교수님께 감사드립니다.

제가 여기까지 올 수 있도록 도와주신 윤수철, 하정철, 김구택, 김영옥, 박기재, 박효진, 김대경, 이종희, 이은우, 김현국, 최선영, 이상봉, 강정화, 진철호, 김형섭, 신승렬, 김남현, 한정현, 최윤혁, 박제현, 김미숙, 임준혁, 김선희, 이은미, 안선희, 박은미, 정승하, 홍경은 선배님들께 진심으로 감사드립니다.

실험실의 시작부터 지금까지 제 힘의 가장 큰 원천이 되어준 악똥 김동균 선배님께 특히 감사드립니다. 항상 자신의 일처럼 걱정해주고 챙겨주는 문경이 언니, 많은 노력과 고난의 시간을 함께 해준 울보 김유리 양, 알게 모르게 항상 옆에 있었던 애교쟁이 배유리 양, 논문을 쓰는 동안 많이 응원해줬던 밍키 허원석 군, 아침 라면 담당 감자 전형린 군, 일하랴 공부하랴 고생 많았을 민정이 언니 그리고 연구실 힘들다고 뛰쳐나간 많은 후배님들. 이 모든 분들의 도움이 있었기에 유전공학 연구실은 무척 힘이 들지만 많이 힘이 나는 곳이었던 것 같습니다. 고맙습니다. 그리고 이하 생물공학과 선·후배님들 감사합니다.

존재만으로도 많은 힘이 되어준 윤지, 주미, 류희, 아람이, 금주, 희주, 종진이, 진영이, 동진선배, 효심선배, 은정선배, 학보사 선·후배님들. 저의 supporter를 자칭하던 당신들에게 미안하고 고맙습니다. 앞으로 더욱 열심히, 더욱 증진하겠습니다. 저를 응원해주시는 모든 분들에게 다시 한번 감사드립니다.

마지막으로 2년을 나만 바라보도록 도와주신 사랑하는 할머니, 아버지, 어머니, 미랑이, 재훈이, 그리고 할아버지. 너무나 사랑하는 나의 가족에게 이 논문을 바칩니다.

VI. 참고문헌

1. Albermann C. and W. Piepersberg. 2001. Expression and identification of the RfBE protein from *Vibrio cholerae* O1 and its use for the enzymatic synthesis of GDP-D-perosamine. *Glycobiology*. 11: 655-661.
2. Araki T. 1991. The effect of temperature shifts on protein synthesis by the psychrophilic bacterium *Vibrio* sp. strain ANT-300. *J. Gen. Microbiol.* 137: 817-826
3. Choi H., K. Gabriel, J. Schneider, S. Otten and W. H. McClain. 2003. Recognition of acceptor-stem structure of tRNA^{Asp} *Escherichia coli* aspartyl-tRNA synthetase. *RNA*. 9: 386~393
4. Cox, Michael; Nelson, David R.; Lehninger, Albert L. 2005. *Lehninger principles of biochemistry* (4th ed.). San Francisco: W. H. Freeman.
5. Elledge S. J., Z. Zhou and J. B. Allen. 1992. Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation. *Trends Biochem. Sci.* 17: 119-123.
6. Eriani G., M. Delarue, O. Poch, J. Gangloff and D. Moras. 1990. Partition

- of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature*. 347: 203-206
7. Feng D. Q., B. Zhang, W. D. Lu and S. S. Yang. 2006. Protein expression analysis of *Halobacillus dabanensis* D-8^T subjected to salt shock. *J. Microbiol.* 44: 369-374
 8. Filling C., E. Nordling, J. Benach, K. D. Berndt, R. Ladenstein, H. Jörnvall and U. Oppermann. 2001. Structural role of conserved Asn179 in the short-chain dehydrogenase/reductase scaffold. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289: 712-717.
 9. Jörnvall H., B. Persson, M. Krook, S. Atrian, R. Gonzalez-Duarte, J. Jeffery and D. Ghosh. 1995. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry*. 34: 6003-6013
 10. Kao D-Y, Y-C Cheng, T-Y Kuo, S-B Lin, C-C Lin, L-P Chow and W-J Chen. 2009. Salt-responsive outer membrane proteins of *Vibrio anguillarum* serotype O1 as revealed by comparative proteome analysis. *J. Appl. Microbiol.* 106: 2079-2085.
 11. Lee A. Y., S. G. Park, M. Jang, S. Cho, P. K. Myung, Y. R. Kim, J. H.

- Rhee, D. H. Lee and B. C. Park. 2006. Proteomic analysis of pathogenic bacterium *Vibrio vulnificus*. *Proteomics*. 6: 1283-1289
12. Ma L., J. Chen, R. Liu, X-H Zhang and Y-A Jiang. 2009. Mutation of *rpoS* gene decreased resistance to environmental stresses, synthesis of extracellular products and virulence of *Vibrio anguillarum*. *FEMS microbial. Ecol.* 70: 130-136
13. Oppermann U., C. Filling, M. Hult, N. Shafqat, X. Wu, M. Lindh, J. Shafqat, E. Nordling, Y. Kallberg, B. persson and H. Jörnvall. 2003. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem. Biol. Interact.* 143-144: 247-253
14. Osada S., T. Matsubara, S. Daimon, Y. Terazu, M. Xu, T. Nishihara and M. Imagawa. 1999. Expression, DNA-binding specificity and transcriptional regulation of nuclear factor 1 family proteins from rat. *Biochem. J.* 342: 189-198
15. Shen L. and J. Preiss. 1965. Biosynthesis of bacterial glycogen. *J. Biol. Chem.* 240: 2334-2340.
16. Uttakleiv Ræder I. L., S. M. Paulsen, A. O. Smalås and N. P. Willassen.

2007. Effect of fish skin mucus on the soluble proteome of *Vibrio salmonicida* analysed by 2-D gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *Microb. Pathog.* 42: 36-45.
17. Willecke K. and R. Lange. 1974. C₄-Dicarboxylate transport in *Bacillus subtilis* studied with 3-fluoro-L-erythro-malate as a substrate. *J. Bacteriol.* 117: 373-378
18. Xu C., H. Ren, S. Wang and X. Peng. 2004. Proteomic analysis of salt-sensitive outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus*. *Res. Microbiol.* 155: 835-842
19. Yang L., D. Zhou, X. Liu, H. Han, L. Zhan, Z. Guo, L. Zhang, C. Qin, H-C Wong and R. Yang. 2009. Cold-induced gene expression profiles of *Vibrio parahaemolyticus*: a time-course analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 291: 50-58