

저산소 분압과 낮은 산도 조건에서 발현이 증가되는 결핵균 단백질의 동정

충남대학교 의과대학 미생물학교실

이길수 · 박정규 · 임재현 · 김수영 · 신아름 · 양철수 · 오재희
권유미 · 송창화 · 조은경 · 김화중*

Identification of Proteins Induced at Hypoxic and Low pH Conditions in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Kil-Soo Lee, Jeong-Kyu Park, Jae-Hyun Lim, Su-Young Kim, A-Rum Shin, Chul-Su Yang,
Jae-Hee Oh, Yu-Mi Kwon, Chang-Hwa Song, Eun-Kyeong Jo and Hwa-Jung Kim*

Department of Microbiology, College of Medicine, Chungnam National University,
6 Munhwa-dong, Jung-ku, Daejeon 301-747, Korea

Received : April 18, 2006

Accepted : May 8, 2006

Mycobacterium tuberculosis likely reside within a granuloma as a dormant state. An area of necrosis forms at the center of lung granulomas. Within this area, the bacteria are deprived of nutrients and exposed to harsh conditions, including low pH and anoxia. The response of *M. tuberculosis* to low pH and low oxygen conditions was investigated in both cellular and extracellular proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis analysis and MALDI-TOF. Several proteins intensively expressed under low pH and/or hypoxic conditions were found. In the culture filtrate, PhoS1 (Rv0934) and ScoB (Rv2503c) were found in significant amounts under both the low oxygen and acidic stress conditions. These results indeed extend our understanding of acidic response as well as hypoxic in *M. tuberculosis* and provide an important insight into physiology of the latent bacilli.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, Dormant state, Hypoxic response, PhoS1, ScoB

서 론

결핵 (tuberculosis, TB)은 전 세계적으로 매년 8백여만 명의 신환자와 2백여만 명의 사망자를 발생시키는 심각한 만성 감염 질환으로, 원인체는 큰포식세포 (macrophage) 내에서 생존할 수 있는 결핵균 (*Mycobacterium tuberculosis*)이다 (12). 전 세계 인구의 1/3은 뚜렷한 임상 증상 없이 결핵균에 잠복 감염되어 있다 (12). 이들 중 평생 동안 5~10%는 활동성 결핵으로 재활성화가 되며, 잠복 결핵 감염자가 AIDS 환

자인 경우 매년 10%에서 활동성 결핵이 발병한다 (29). 감염자의 대다수에서 결핵 균체는 면역 반응에 의해 형성된 육아종 (granuloma) 내에 존재하며 결국 잠복 상태로 오랫동안 생존하게 된다 (17). 그러나 육아종의 안쪽은 산도가 낮고 산소 공급이 원활하지 못한 부위이다 (15,22,28). 따라서 큰포식세포와 육아종과 같은 적대적인 환경에서 결핵균이 생존하기 위한 일련의 반응들이 일어날 것으로 생각되나 잠복 감염 유도과 관련된 기전은 잘 알려져 있지 않다.

결핵균의 잠복 상태 (dormant or latent state)란 감염이 성립된 후 병원균을 처리하려는 면역 반응이 일어났을 때 결핵균이 스스로 무활동 상태로 들어간 상태이다. 또한 이 상태는 병을 전염시키지 않으며, 건강에 위협을 주지 않는 특징을 갖는다. 잠복기 상태의 결핵균은 PPD (purified protein derivative) 접종을 이용한 투베르쿨린 피부 반응 검사 (tuberculin

*교신저자: 김화중. 301-747, 대전광역시 중구 문화 1동 6번지,
충남대학교 의과대학 미생물학교실
Phone: 042-580-8242, Fax: 042-585-3686,
e-mail: hjukim@cnu.ac.kr

skin test)와 old TB의 상처라고 지적되는 흉부 방사선 사진 등을 통해 양성 반응을 나타내지만 임상적인 질병이 나타나지는 않는다 (20,24).

폐에 결핵균이 감염되는 경우 균을 탐식한 큰포식세포와 T 림프구의 지속적인 면역 반응에 의해 육아종 (granuloma)을 형성하게 된다. 육아종 내의 산소와 영양분의 결핍은 결핵균으로 하여금 정지기 (stationary phase)에 들어가게 하고 non-replicating persistent (NRP) 상태로 변형시킨다 (36).

결핵균의 잠복기 상태 유지는 생존에 유해한 환경에서 살아남기 위한 방법으로 알려져 있다 (5,13). 낮은 산소 분압은 결핵균의 잠복기를 유도하게 되고 저산소 상태에 적응하면 오랜 기간 동안 생존하게 된다 (11,19,24,27). 이러한 잠복기 형태는 결핵균이 항결핵제에 내성을 갖게 하는 요인이 되며 (3,5,10,16), 오랜 기간 동안 화학요법과 항결핵제 치료에도 불구하고 결핵균의 잠복 감염을 가능하게 한다 (36,37). 만약 숙주의 면역 반응 체계가 불균형을 이루게 되면, 잠복 감염되어 있던 결핵균이 재활성화 된다. 따라서 큰포식세포 내에서 결핵균이 생존하기 위해 필요한 내성 능력을 갖는데 관련하는 생리 현상을 연구하는 것이 잠복 결핵 치료 연구에 필수적이다.

잠복 감염 *in vitro* 모델은 주로 산소 (36) 또는 영양 공급 (3)이 제한된 상태에서 결핵균을 배양하는 방법을 사용하였고 이와 관련된 여러 유전자와 단백질이 보고되었다. 이들 중 가장 대표적인 단백질은 16 kDa 단백질인 α -crystallin이다. 결핵균을 짧은 기간 동안 pH 5.5에 노출하여 유도되는 유전자를 microarray로 분석한 보고 (14)는 있으나 산성의 조건과 잠복 상태 유도와의 관련된 연구는 보고된 바가 없다.

활성화된 큰포식세포는 균을 포함하는 포식소체 (phagosome)의 산도를 5.0 이하로 산성화시켜, 용해소체와의 융합 후에 결핵균 용균 작용에 필요한 효소의 활성을 최적화시킨다 (15,23). 포식세포 내에서 결핵균이 살아있을 경우 pH 6.1~pH 6.5 정도를 유지시키지만, 결핵균이 죽었을 경우 탐식세포의 산성화를 막지 못해 pH 5.5 이하로 떨어지게 된다 (23,32). 결핵균이 탐식되어 있는 상태에서 큰포식세포는 계속적인 산성화를 유도하게 되고 결핵균은 이에 저항하여 살아남게 된다 (32). 낮은 산도 조건이 혐기성 조건이나 영양분 고갈과 같이 매우 심각한 스트레스 요인임에도 불구하고, 산성 조건에서 결핵균의 성장에 관여하는 특정한 단백질에 대하여 알려진 바가 거의 없다.

본 연구는 결핵균의 잠복 감염이 유도되는 환경이 육아종 내의 저산소와 낮은 산도이고 또한 큰포식세포의 포식소체 내의 산도도 약산성인 것을 착안하여, 산도를 pH 6.0으로 낮춘 Sauton 배지와 저산소 분압에서 결핵균을 20일간 배양하여 발현이 증가되는 단백질을 동정하였다. 동정된 단백질 중

Table 1. Culture condition and composition of Sauton media

No.	pH	Sauton media	Culture condition
1	6.0	Sauton ^{a)}	20% O ₂
2	7.2	Sauton ^{a)}	20% O ₂
3	6.0	Modified ^{b)}	20% O ₂
4	7.2	Modified ^{b)}	20% O ₂
5	6.0	Sauton ^{a)}	0% O ₂
6	7.2	Sauton ^{a)}	0% O ₂
7	6.0	Modified ^{b)}	0% or 13%* O ₂
8	7.2	Modified ^{b)}	0% O ₂

^{a)} Sauton media: 4.0 g L-asparagine, 2.0 g citric acid, 0.5 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄, 0.05 g ferric ammonium citrate, 60 ml glycerol to 1L DDW. Adjust pH to 7.3 with ammonia.

^{b)} Modified Sauton media: Sauton media has replaced 0.5 g MgSO₄ by 4.9 g K₂SO₄. Adjust pH to 6.0 with HCl.

* Modified Sauton media used for 13% O₂ culture condition

38 kDa 항원인 PhoS1 단백질이 두 가지 스트레스가 동시에 주어지는 경우 배양액 내에서 발현이 유의하게 증가되었다.

재료 및 방법

1. 결핵균의 배양과 배양액 준비

M. tuberculosis H37Rv (ATCC 27294)를 Sauton 배지 (pH 7.2)에서 37°C, 6~8주 정지 배양한 후 배양액을 여과지로 걸러 균체를 수집한 후 새로운 변형된 Sauton 배지에 옮겨서 재배양하였다 (Table 1). 변형된 Sauton 배지는 pH 6.0, pH 7.2 배지와 배지 성분 중 2.1 mM MgSO₄를 첨가한 배지와 MgSO₄를 대신하여 28 mM K₂SO₄를 넣은 배지를 포함하여 4가지 조건의 배지를 사용하였다. 각각을 대기압 (O₂ 20%)과 낮은 산소 분압 (O₂ 13%, 5% CO₂) 및 혐기성 조건 (O₂ 0%)에서 20~40일까지 정지 배양하였다. 대기압 조건은 500 ml 삼각 플라스크에 200 ml Sauton 배지를 넣은 후 균을 접종하여 항온실에서 배양하였고, 낮은 산소 분압 조건은 대기압 조건과 같은 형태로 항온기 (Forma Scientific, Inc.) 내에서 질소 가스로 산소 분압을 조절하여 배양하였다. 혐기성 조건은 anaerobic jar (Oxoid) 내에 0.2 μ m filter cap이 있는 T-25, T-75 flask (Falcon) 안에 배양액을 각각 30 ml, 100 ml 넣은 후, anaerogen pack (Oxoid)과 anaerobic indicator (Oxoid)를 각각 1개씩 넣고 뚜껑을 밀폐시킨 후 37°C 항온기 내에서 배양하였다. 혐기성 조건 확인은 anaerobic indicator의 색이 흰색으로 변화하는 것을 이용해 판단하였다. 배양 기간이 완료되면 배양액을 1.2 μ m membrane filter (Millipore Type RA)로 1차 여과한 후 0.2 μ m membrane filter (Millipore Type GS)로 2

차 여과 멸균하였다. YM10 membrane filter (Millipore, Amicon)를 이용해 ultrafiltration으로 20 ml 이하로 농축하였고 Viva-spin 4 (10 kDa, vivascience)를 이용하여 최종 농축액이 5 ml 이하가 되도록 농축하였다. 최종적으로 100,000 rpm 10°C 3 시간 동안 초원심 분리한 후 상층액을 얻어서 소량씩 분주하여 -70°C 냉동고에 보관하였다.

2. 균체 항원 준비

상기 배양 조건에서 수집된 균체를 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2)으로 2회 세척한 후 PBS로 재부유하여 sonication (20%, 4°C, 20 min 동안 5초/5초 pause, Sonics, vibra cell)하였다. Sonication 후 urea (9 M), DTT (70 mM)와 Triton X-100 (2%)를 첨가하였다. 시료를 30분 동안 상온에 방치하면서 때때로 섞어준 후 50,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 상층액을 얻어 최종적으로는 100,000 rpm으로 3시간 초원심 분리하여 추출액을 -70°C에 보관하였다.

3. 단백질의 농도 측정

단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준으로 하여 Micro BCA protein assay reagent kit (Pierce, Rockford, IL, USA) 및 protein assay dye reagent (Bio-Rad)를 이용하여 Bradford method (OD=580 nm)로 측정하였다.

4. 2-차원 전기영동 (2-Dimensional Electrophoresis; 2-DE)

Rehydration buffer [8.8 M urea, 3% CHAPS, 80 mM DTT (1.4 M stock), 0.001% bromophenol blue (0.1% stock)]에 각 조건의 시료를 260~300 µg이 되도록 첨가하였다. IPG strip의 종류에 따라서 각각 pH 3-10, pH 3.9-5.1, pH 4.7-5.9의 ampholyte (Biolyte, Bio-Rad)를 최종 농도 0.2%가 되도록 첨가하여 최종 시료 접종 양을 140~250 µl가 되게 하였다. pH 4-7, pH 3.9-5.1, pH 4.7-5.9 IPG strip 7 cm (Bio-Rad, USA)을 사용하여 PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad)상에서 isoelectric focusing (IEF)을 실시하였다. IEF는 12~16시간 동안 rehydration한 후 시료의 염 (salt) 및 불순물을 제거하기 위해서 3차 증류수로 미리 적신 electrode wick을 전극선 (electrode) 위에 올려놓고 strip을 얹은 후 미네랄 오일로 덮어주고 250 V, 30분 동안 과잉의 염을 제거하였다. 시료의 염 제거 후 2시간 동안 250 V로부터 4000 V까지 올려주고 4000 V로 5시간 (20,000 Vh) 동안 focusing하였다. Focusing이 끝난 후 단백질의 표류 방지 및 over-focusing을 방지하기 위하여 500 V로 hold step을 진행하였다. IEF가 종료된 후 IPG strip은 2차 SDS-PAGE전까지 -70°C에 보관하였다.

IPG strip을 실온에서 녹이고, 2차 SDS-PAGE를 위해 SDS

와 결합할 수 있도록 equilibration buffer I [6 M urea, 0.375 M Tris (pH 8.8), 2% SDS, 20% glycerol, 2% DTT (w/v)]에 넣고 30분 동안 반응시켰다. 1차 반응이 끝난 후 equilibration buffer II [6 M urea, 0.375 M Tris (pH 8.8), 2% SDS, 20% glycerol, 2.5% iodoacetamide (w/v)]에 넣고 30분 동안 2차 반응시켰다. IPG strip을 SDS-PAGE 겔에 삽입할 때 양극 (anode) 쪽을 gel의 왼쪽으로 넣고 그 위에 상층의 겔을 300 µl 부어 IPG strip을 고정시켰다. SDS-PAGE의 acrylamide 농도는 하층은 12~15%, 상층은 4.5%의 겔을 사용하였고, 전기영동 후 겔은

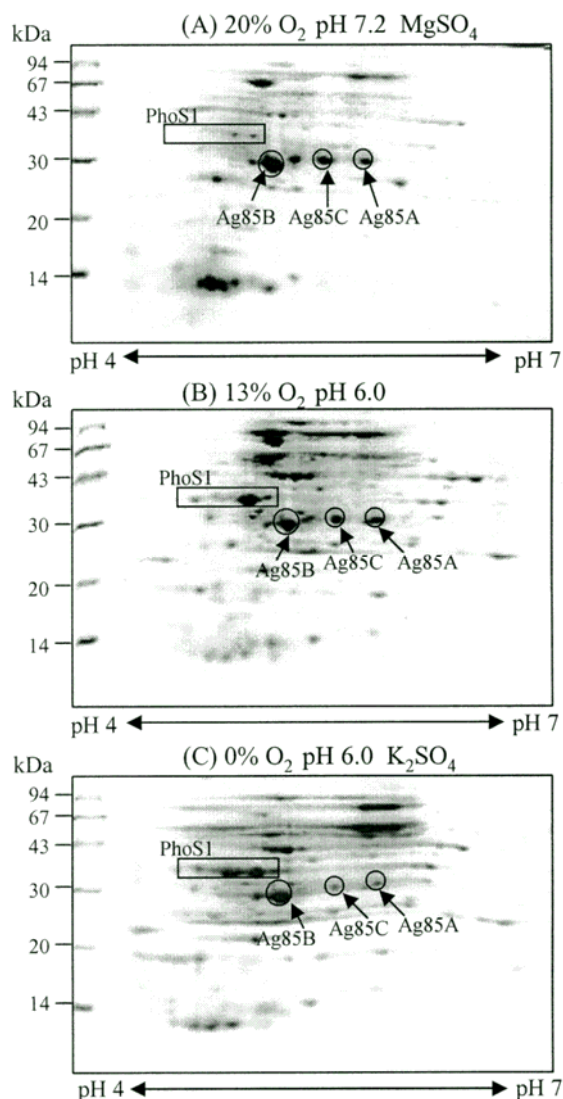


Figure 1. Two-dimensional electrophoretic analysis of the culture filtrate (CF) of *M. tuberculosis* H37Rv grown under 20% (A), 13% (B), and 0% (C) oxygen conditions. The CF proteins were separated by isoelectric focusing (pH 4-7) in the first dimension and by SDS-PAGE (15% polyacrylamide gel) in the second dimension. The gels were stained with 0.25% Coomassie brilliant blue R250.

Coomassie brilliant blue R250 (Bio-Rad, USA)로 염색하였다.

5. 단백질 동정

2-차원 전기영동 후 Coomassie blue로 염색한 겔에서 유의성 있는 단백질 spot의 동정은 연세대학교 Proteome Tech Inc. 분석팀에 의뢰하여 MALDI-TOF으로 동정하였다.

6. 결핵균 38 kDa 당지질 단백질 (glycolipoprotein)의 분리 정제

결핵균 배양 농축액의 55~80% ammonium sulfate (ASF) 침

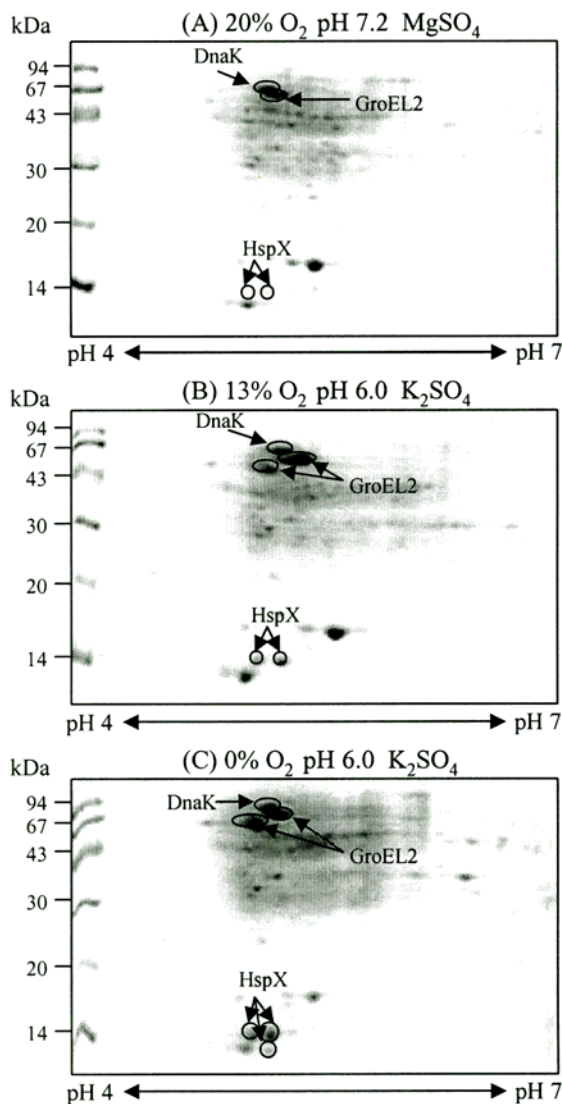


Figure 2. 2-DE analysis of the lysate of *M. tuberculosis* H37Rv grown under 20% (A), 13% (B), and 0% (C) oxygen conditions. The lysate proteins were separated by isoelectric focusing (pH 4-7) in the first dimension and by 15% SDS-PAGE in the second dimension. The gels were stained with Coomassie brilliant blue R250.

전 분획 (precipitation fraction)을 hydroxylapatite column에 가한 후 1 mM PB buffer (pH 7.2)로 세척하였다. Column에 흡착되지 않고 통과하는 분획을 모아 농축한 후 DEAE-Sephacel column에 가하였다. 1 mM PB (pH 6.8)로 충분히 세척한 후 5 mM PB (pH 6.8)로 용출하여 정제하였다 (1).

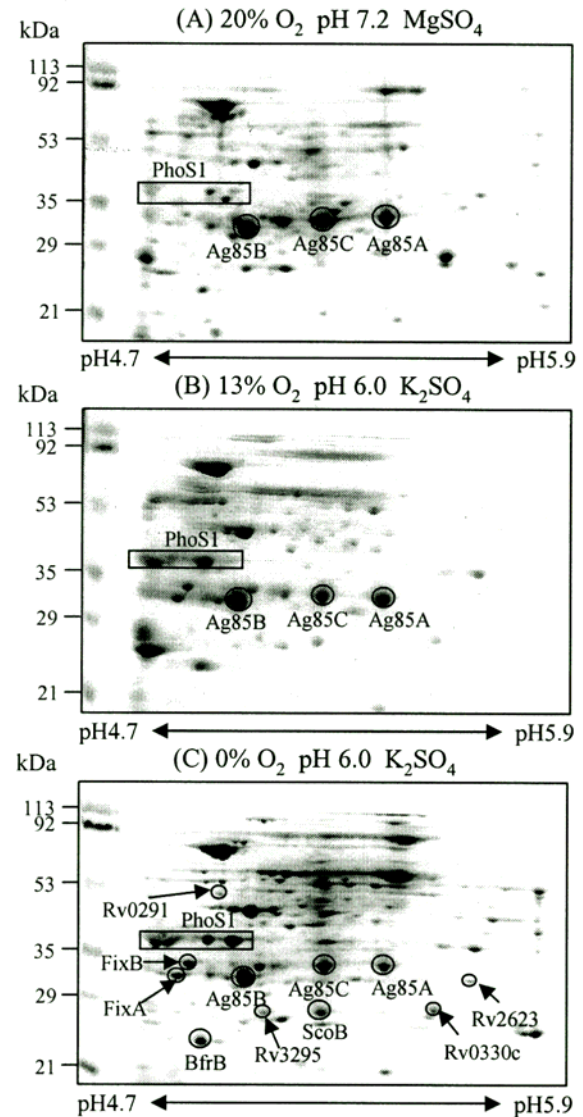


Figure 3. 2-DE analysis of the CF of *M. tuberculosis* H37Rv grown at different oxygen and pH conditions. The CF proteins were separated by isoelectric focusing (pH 4.7-5.9) in the first dimension and by SDS-PAGE (12% polyacryl-amide gel) in the second dimension. The second dimensional gels were stained with Coomassie brilliant blue R250. The bacteria were cultured with an oxygen supply of 20% (A), 13% (B), and 0% (C), respectively. PhoSI and ScoB are highly induced under low oxygen and low pH conditions than other dormancy induced protein spots. The numbers on the left indicate molecular mass markers and pI values at the bottom of the panel.

7. Western blot

SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질을 Semi-dry transfer cell (Bio-Rad Trans-blot SD)을 이용하여 nitrocellulose membrane (0.45 μ m, Bio-Rad)에 1시간 동안 20 V로 blotting한 후 5% skim milk가 들어있는 PBS로 2시간 동안 상온에서 blocking 하였다. 1차 항체로 rabbit anti-38 kDa polyclonal antibody (연세대학교 미생물학교실 조상래 교수님으로부터 분양 받음)를 1,000배 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 5~10 분씩 6회 세척하였다. 2차 항체로는 peroxidase가 표지된 anti-rabbit IgG 항체를 5% skim milk in PBS로 2,000배 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 5~10분씩 6회 세척하였다. 3% 4-chloro-1-naphthol in absolute ethanol 200 μ l를 20 mM Tris, 500 mM NaCl (pH 7.4) 20 ml에 첨가하고, 30% H₂O₂ 20 μ l를 첨가한 용액으로 발색 반응 후에 3차 증류수로 세척하였다.

결 과

1. 산소 분압과 배지의 산도에 따른 단백질 발현의 차이

잠복 감염 유도과 관련된 결핵균 단백질을 동정하기 위해 낮은 산소 분압과 pH 6.0에서 균을 20일간 배양한 후 배양액과 균체 추출액을 2-DE로 분석하였다 (Fig. 1과 2). 낮은 산도 조건에서 Mg²⁺은 결핵균의 성장에 많은 양이 요구되기 때문에 잠복 상태를 유지하기 위해 낮은 산도 조건에서 MgSO₄를 대신하여 K₂SO₄를 넣어준 배지를 사용하였다 (7,25). 배양 조건은 pH 7.2 Sauton medium에서 20% 산소 분압 조건에서 배양한 것 (Fig. 1A)과 Mg²⁺이 결여된 pH 6.0 Sauton medium에서 13%의 산소 분압 조건 (Fig. 1B)과 0% 산소 분압 조건 (Fig. 1C)으로 20일간 배양한 것으로 구분하였다. 배양일은 조건 변화된 시점으로부터 40일까지 배양하였으나 단백질 발현 양상이 20일 배양한 것과 큰 차이가 없었다 (40일 배양한 배양액의 분석결과는 그림으로 제시하지 않음).

본 연구에서는 낮은 산소 분압에서 강하게 발현되는 단백

질에 주로 관심을 갖고 관찰하였다. 대기압 (20% O₂)에서 배양된 배양액 보다 13% 또는 0% 산소 분압 조건에서 분자량이 38 kDa인 PhoS1 단백질 spot이 강하게 발현되었다. 반면 Ag85A와 Ag85C는 낮은 산소 분압 조건에서 발현이 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 1C). 균체 추출액과 배양액 간의 2-DE에 의한 단백질 분리 양상은 뚜렷한 차이를 나타내었다 (Fig. 2). 균체 추출액의 spot들을 상호 비교하였을 때 큰 차이는 없었지만 분자량 56 kDa 위치에서 강하게 발현하는 새로운 spot을 확인할 수 있었다 (Fig. 2B, 2C). 분자량 67 kDa 부위에 heat-shock 단백질인 DnaK와 GroEL2 (Rv0440, 60 kDa chaperonin 2)이 모든 조건에서 주요 spot으로 관찰되었다. 특히하게도 낮은 산도와 저산소 분압 조건으로 배양된 균체에서는 GroEL2가 두 개의 주요 spot으로 관찰되었다. 잠복기 상태에서 발현이 증가되는 대표적인 단백질인 Hsp X (Rv2031c, 16 kDa α -crystallin small heat-shock 단백질) (26,40)가 예상했던 것과 같이 산소 분압을 제한하고 산도를 낮춘 조건에서 발현 정도가 증가되어 있음이 확인되었다 (Fig. 2B와 2C). 따라서 본 연구의 배양 조건은 기존의 잠복 상태와 유사한 환경을 유도하였음을 확인하였다.

결핵균 배양액에서 발현이 강하게 증가되었던 38 kDa 위치에 해당되는 spot들은 균체 추출액에서 관찰되지 않았다. 이와 같은 결과는 배양액에서 증가된 분자량 38 kDa의 spot들이 결핵균 용균에 기인하지 않음을 의미한다.

좁은 영역의 pH 범위를 자세히 분석하기 위해서 pH 4.7-5.9 strip으로 IEF를 실시하여 분석하였다 (Fig. 3). 혐기성과 낮은 산도 및 Mg²⁺를 제한한 조건에서 배양된 배양액을 2-DE로 분리하여 대기압 조건과 비교하여 뚜렷한 차이를 보이는 spot들을 선택하여 MALDI-TOF로 동정하였다 (Fig. 3과 Table 2). 그 결과 38 kDa 부위의 4개의 spot들은 PhoS1 (PstS1)이었고 25 kDa 부위의 증가된 spot은 ScoB였다. 산도 6.0과 산소 분압이 감소할수록 PhoS1 (Rv0934) spot들과 ScoB (Rv2503c)의 발현이 증가하였고, 그 외에도 BfrB (Rv3841c)와 FixA (Rv3029c), FixB (Rv3028c) 등이 증가되었다 (Table 2).

Table 2. *M. tuberculosis* H37Rv proteins significantly induced by low-oxygen condition and/or low pH on 2-DE

Identified protein	Gene	Theoretical mass (kDa)	pI value	Putative protein function
Rv0934	<i>phoS1</i>	38.4	5.1	protein antigen B, phosphate-binding protein
Rv2503c	<i>scoB</i>	23.1	5.1	succinyl CoA:3-oxoacid CoA-transferase
Rv3029	<i>fixA</i>	28.1	4.7	electron transfer flavoprotein β subunit
Rv3028c	<i>fixB</i>	31.7	4.7	electron transfer flavoprotein α subunit
Rv3295		24.9	5.3	hypothetical protein Rv3295
Rv3841	<i>bfrB</i>	18.3	4.2	bacterioferritin

2. Immunoblotting에 의한 38 kDa 단백질 발현 분석

낮은 산소 분압과 pH 6.0에서 가장 강하게 발현되는 단백질인 PhoS1 spot들에 대한 분석을 실시하였다. 일반적인 조건의 Sauton medium에서 6주간 배양된 결핵균 배양액으로부터 hydroxylapatite 및 DEAE-Sephacel chromatography를 이용하여 native 38 kDa 당단백 항원을 정제하였다. 정제된 38

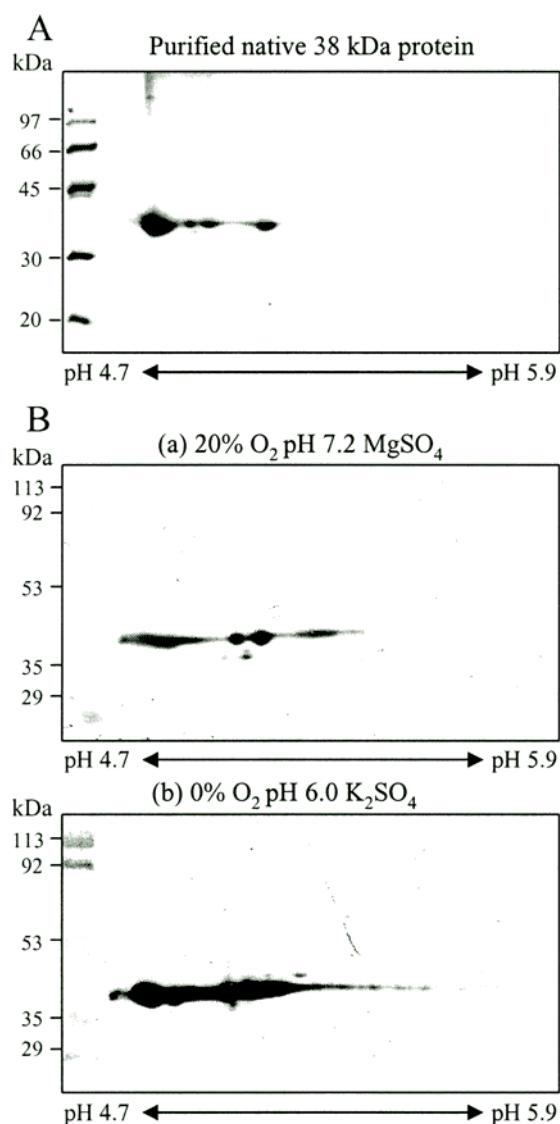


Figure 4. Analysis of 38 kDa antigen with Coomassie blue staining and Western blot. **A.** Purified 38 kDa antigen separated by IEF on pH 4.7-5.9 IPG strip in the first dimension and 12% SDS-PAGE in the second dimension. The gel was stained by Coomassie blue. **B.** The CF obtained from *M. tuberculosis* grown in pH 6.0, 0% oxygen tension (b) and pH 7.2, 20% oxygen tension 20 (a) were separated by isoelectric focusing (pH 4.7 to 5.9) and SDS-PAGE (12% polyacrylamide gel), and then analyzed by immunoblotting with rabbit anti-38 kDa polyclonal antibody.

kDa 당단백 50 μ g을 2-DE로 분리하여 양상을 확인해 보았다. pH 4.7에 가까운 위치에서 강한 spot이 관찰되고 pI 값이 증가하는 형태로 나열된 작은 spot들이 세 개로 분리되어 나타났다 (Fig 4A). 이 같은 분리 양상은 저산소 분압에서 배양된 배양액의 PhoS1 spot과 분리 양상이 동일하였다.

정상적인 조건과 pH 6.0의 혐기성 조건에서 배양된 배양액 (260 μ g/strip)을 2-DE로 분리한 후 rabbit anti-38 kDa 다항체를 이용하여 immunoblotting을 실시하였다. 혐기성 조건에서 배양 38 kDa 항원이 현저히 증가되었음을 다시 확인할 수 있었다 (Fig. 4B). 총괄적으로 정제된 38 kDa 항원의 2-DE 분리 양상과 immunoblotting 결과는 본 연구에서 MALDI-TOF으로 동정된 PhoS1 spot들이 이미 잘 알려진 38 kDa 당단백 항원임을 확인시켜 주었다.

3. PhoS1 단백질 발현이 증가되는 조건 분석

최초에 잠복 결핵을 *in vitro*에서 유도하기 위하여 균을 낮은 산소 분압, pH 6.0 및 Mg^{2+} 이온이 결여된 배지 조건에서 배양한 결과 PhoS1 단백질이 유의하게 증가되었다. 따라서 어떠한 조건이 이들 단백질 발현에 영향을 미치는 알아보기 위해 다음과 같은 조건으로 배양된 배양액을 2-DE로 분석하였다.

M. tuberculosis H37Rv를 Table 1과 같이 ① 산소 분압, ②

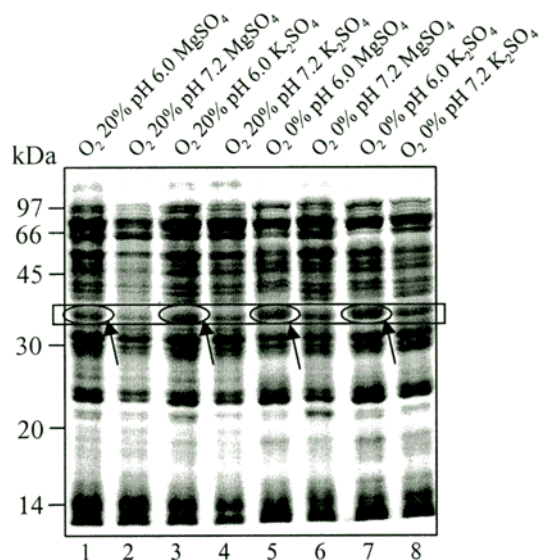


Figure 5. SDS-PAGE analysis of CF of *M. tuberculosis* H37Rv grown at 8 different conditions. The CF proteins were separated first dimension by 12% SDS-PAGE. Empty box indicate 38 kDa regions. Lane 1, 3, 5, and 7 (pH 6.0) are showed more dense band than Lane 2, 4, 6, and 8 (pH 7.2). Open circles represent protein bands highly increased under hypoxia and low pH condition with different media composition respectively (The arrow indicates the position of the region of 38 kDa antigen.) Proteins were visualized by Coomassie blue staining.

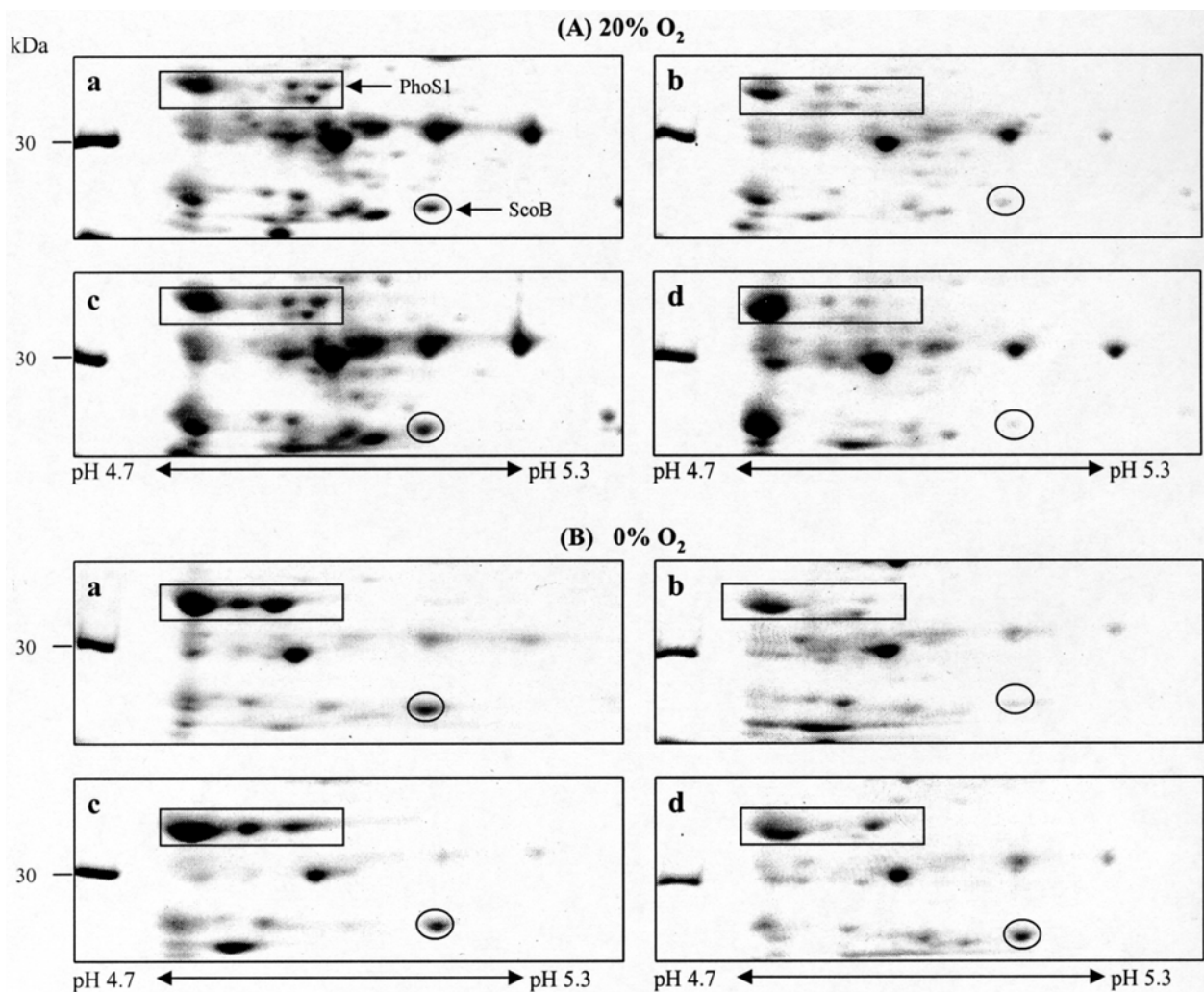


Figure 6. 2-DE analysis of the CF of *M. tuberculosis* H37Rv grown at 8 different conditions. *M. tuberculosis* were cultured in Sauton medium at 20% O₂ (A) and at 0% O₂ tension (B) with following the conditions. a, pH 6.0 Sauton medium with MgSO₄; b, pH 7.2 Sauton medium with MgSO₄; c, pH 6.0 Sauton medium with K₂SO₄; d, pH 7.2 Sauton medium with K₂SO₄. All condition samples were separated by isoelectric focusing (pH 4.7-5.9) and by 12% SDS-PAGE. The gels were stained with Coomassie blue.

산도 그리고 ③ Sauton 배지의 양이온 공급 유무를 통해 8가지 조건으로 배양하여 분석하였다. 즉 20% 산소 분압에서 pH 6.0과 7.2, Mg²⁺의 존재 유무로 4가지 조건과 혐기성 조건에서도 동일하게 4가지 조건에서 분석하였다. 정상적인 배양 조건인 pH 7.2와 Mg²⁺이 존재하는 경우는 Fig. 5의 lane 2와 Fig. 6A의 b이다. Fig. 5에서와 같이 분자량 38 kDa의 위치의 단백질 band가 산도가 낮고 혐기성 조건에서 증가하는 경향을 관찰하였다. 또한 23~25 kDa 부분에서 증가된 단백질 band를 관찰할 수 있었다. 1차 SDS-PAGE 결과에서도 저산소 분압과 낮은 산도 조건에서 특정 부위의 단백질의 농도가 더욱 증가함을 육안으로 관찰할 수 있었다.

8가지 조건에서 배양된 배양액을 각각 2-DE로 분석하여 확인하였다 (Fig. 6). 결핵균을 대기압에서 배양하는 경우 배

양액의 pH 6.0인 경우 PhoS1과 ScoB가 약간 증가하였다. 또한 Ag85 항원 역시 모두 증가하였다. 혐기성 조건에서도 산도가 pH 6.0일 경우 PhoS1과 ScoB가 뚜렷하게 증가하였다. 그러나 혐기성 조건에서도 pH 7.2인 경우는 PhoS1의 발현이 대기압의 pH 7.2와 뚜렷한 차이가 없었다. Ag85 항원은 혐기성 조건 모두에서 발현이 현저히 억제되었다. 총괄적으로 PhoS1은 pH 6.0에서 발현이 약간 증가는 하지만 혐기성 조건이 주어지는 경우 더욱 뚜렷하게 증가하였고 혐기성 조건만으로는 발현이 증가되지 않았다. 또한 Mg²⁺의 존재 유무는 PhoS1 발현에 영향을 미치지 않았다. ScoB는 낮은 산도 조건에서 모두 발현이 증가되었고 혐기성 조건에서 pH 7.2 조건에서 Mg²⁺이 없는 경우에도 증가하였다.

고 찰

성장하기 위해 산소의 공급이 필수적인 결핵균이 산소 공급의 제한, 영양분의 고갈과 낮은 산도 조건에 처하는 경우 잠복 상태로 전환된다 (3,14,36). 최근까지 결핵균 잠복 감염 모델로서 주로 Wayne 등 (36)이 보고한 산소 분압을 서서히 감소시키는 방법을 이용하였다. 실제로 낮은 산소 분압에서 발현되는 단백질로 Rv0569, Rv2031c, Rv 2626c, Rv3841 등이 보고되었다 (27). 그러나 본 연구는 결핵균이 낮은 산도 조건과 저산소 분압을 동시에 조우하는 경우 PhoS1의 발현이 현저히 증가되었음을 최초로 동정하였다.

실제로 육아종 내부가 저산소 조건일 뿐만 아니라 결핵균이 체내에 감염된 후 큰포식세포에 의해 탐식되었을 경우 포식소체 내에서도 동일한 환경에 접하게 된다. 따라서 포식소체 내에 존재하는 결핵균은 생존을 위한 방법으로 endosome과 acidic lysosomal compartment와의 융합을 억제시키고 산소와 질소의 중간 생성물에 의한 숙주의 방어 작용을 회피한다 (23). 또한 vesicular proton ATPase를 들어오지 못하게 하여 정상적인 lysosomal pH (pH 4.5)에 비하여 산도를 증가시켜 결핵균이 생존하기에 적당하도록 포식소체의 산성화를 억제하여 산도 수준을 pH 6.1-6.5 정도의 약산성을 유지시킨다 (2,32,39). 따라서 본 연구에 적용한 변형된 배지의 산도는 pH 6.0은 결핵균의 성장을 억제할 수 있는 요건이 된다.

본 실험에서 적용한 잠복 상태 유도 조건은 잠복기 표지로서 널리 알려진 Rv2031c가 발현이 증가되는 것으로 보아 기존의 *in vitro* 잠복 감염 모델과 유사한 환경을 유도하였음을 알 수 있었다. 또한 균체 추출액에서 GroEL2 (Rv0440 또는 Hsp60)의 발현이 본 실험 조건에서 유의하게 증가되었고 두 개의 spot으로 발현되었다 (Fig. 2B, C). GroEL2는 60 kDa chaperonin 2로 알려진 heat-shock 단백질로 단백질의 접힘(folding)에 관여하는 단백질 안정화 구성 성분이다. GroEL2는 *M. bovis* BCG에서 대식세포에 의한 탐식 후 발현되는 단백질로 알려져 있다 (22). 아마도 스트레스 상황에서 결핵 단백질의 안정화를 위한 chaperon 단백질이 많이 요구되기 때문에 증가할 것으로 사료된다.

저산소 분압과 pH 6.0의 조건에서 발현이 증가되는 38 kDa (Rv0934, PhoS1, *phoS*, *pstS*, *pab*) 항원은 *Escherichia coli* Pst system과 유사한 putative phosphate transport receptor를 암호화하고 있으며, 결핵균의 대사에 관련되어 있다 (6,34). 또한 *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. intracellulare* 등을 포함하는 병원성 결핵균에서 관찰되며, 강력한 체액성 반응을 유도하여 진단적인 유의성이 있는 항원으로 보고된 항원이다 (8, 33,38). PhoS1은 당지질 단백질로 생리학적인 기능은 인 결

합 단백질로 무기 인 (inorganic phosphate)을 세포막을 통해 세포 내부로 능동 수송하는데 관여한다. 또한 세포의 표면에 존재하거나 세포 외부로 분비되고, 인 고갈시 증가한다 (18, 34). 큰포식세포에 결핵균을 감염시킨 후에 RT-PCR로 분석한 결과 PhoS1 단백질의 유전자의 발현이 증가되었다는 보고가 있다 (21). 본 연구에서 혐기성 조건만으로는 PhoS1의 발현이 증가되지 않았고 낮은 산도 조건만 주는 경우 발현이 약간 증가되며 두 가지 스트레스가 동시에 주어지는 경우에 유의하게 증가되었다. 이와 같은 결과는 PhoS1의 생리학적 기능은 낮은 산도 조건에서 적응하기 위한 어떤 중요한 기능을 수행하는 것으로 생각되며 산소 분압이 낮아지는 경우 산도 적응을 위한 기능이 배가되거나 수송 단백질인 관계로 영양 공급과 같은 생존에 중요한 기능을 수행할 것으로 생각된다. 현재 PhoS1 유전자를 knockout시킨 돌연변이주를 개발하여 이를 증명하기 위한 연구를 진행하고 있다.

ScoB는 housekeeping 단백질로 *H. pylori*에서 succinyl-CoA: acetoacetate CoA transferase (SCOT)의 β subunit로 밝혀져 새로운 CoA-transferase family로 알려졌다 (9,30). SCOT은 succinyl-CoA로부터 succinate를 생성하며 3-oxoacid로부터 3-oxoacyl-CoA를 생성하는 가역적인 반응을 촉매하는 효소이다. 따라서 SCOT은 *H. pylori*에서 α -ketoglutarate dehydrogenase와 succinyl CoA synthetase의 활성이 결여되었을 때 tricarboxylic acid (TCA) cycle을 진행시키기 위한 alternative pathway에 관여할 것으로 사료된다 (9). 또한 ScoB는 결핵균에서는 저산소 상태에서 증가하는 단백질로 보고되었으나 (31) 휴지기 상태와의 관련성은 아직 보고된 바 없다.

본 연구는 배양액 내에서 단백질을 동정하였기 때문에 이들 증가한 단백질이 과연 스트레스 조건에서 발현이 증가되었고, 세포 밖으로 분비가 증가되어 배양액에 많이 존재하는 것인지, 아니면 결핵 균체 내에서 존재하던 단백질이 스트레스 조건에서 용균 작용을 통해서 배양액 내로 분비가 된 것인지를 확인할 필요가 있었다. 결핵 균체를 초음파로 용균시켜 균체에 존재하는 세포내 단백질을 확인한 결과 PhoS1과 ScoB 단백질이 균체 추출액에서는 증가되지 않았다. 따라서 균체의 용균에 의한 단백질 농도 증가로 판단되지는 않았다.

현재까지는 PhoS1과 ScoB 단백질이 결핵 잠복 감염 유도에 있어서 정확한 기능을 추측할 수 없다. 이들 유전자를 knockout시킨 돌연변이주를 개발하고 잠복 결핵 동물 모델 등을 이용한 분석이 요구된다. 앞으로 포식소체 및 육아종 내에서의 결핵균 생존과 관련이 있을 것으로 추정되는 PhoS1과 ScoB의 발현에 관계되는 기작을 밝히고 조절할 수 있다면, 잠복기 유도 결핵균을 사멸하는데 중요한 기초 자료가 될 것이다.

감사의 글

이 논문은 정부의 재원(교육인적자원부)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (R05-2003-000-11405-0).

참 고 문 헌

- 1) 박정규, 장희철, 임재현, 송창화, 김운옥, 조은경, 김화중: 결핵균 배양액에서 38 kDa 당지질 단백질항원의 정제와 분석. *J Bacteriol Virol* **31**: 249-257, 2001.
- 2) Barker LP, George KM, Falkow S, Small PLC: Differential trafficking of live and dead *Mycobacterium marinum* organisms in macrophages. *Infect Immun* **65**: 1497-1504, 1997.
- 3) Betts JC, Lukey PT, Robb LC, McAdam RA, Duncan K: Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol* **43**: 717-731, 2002.
- 4) Benstrup KH, Russell DG: Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment. *Trends Microbiol* **9**: 597-605, 2001.
- 5) Boon C, Dick T: *Mycobacterium bovis* BCG response regulator essential for hypoxic dormancy. *J Bacteriol* **184**: 6760-6767, 2002.
- 6) Braibant M, Lefevre P, Wit L, Peirs P, Ooms J, Huygen K, Andersen AB, Content J: A *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding proteins of a phosphate transporter homologous to the *Escherichia coli* Pst system. *Gene* **176**: 171-176, 1996.
- 7) Buchmeier N, Blanc-Potard A, Ehrst S, Piddington D, Riley L, Groisman EA: A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *Mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **35**: 1375-1382, 2000.
- 8) Chiang IH, Suo J, Bai KJ, Lin TP, Luh KT, Yu CJ, Yang PC: Serodiagnosis of Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **156**: 906-911, 1997.
- 9) Cortesy-Theulaz IE, Bergonzelli GE, Henry H, Bachmann D, Schorderet DF, Blum AL, Ornston LN: Cloning and Characterization of *Helicobacter pylori* succinyl CoA: acetoacetate CoA-transferase, a Novel prokaryotic member of the CoA-transferase Family. *J Biol Chem* **272**: 25659-25667, 1997.
- 10) Dick T: Dormant tubercle bacilli: the key to more effective TB chemotherapy? *J Antimicrob Chemother* **47**: 113-124, 2001.
- 11) Dick T, Lee BH, Murugasu-Oei B: Oxygen deletion induced dormancy in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett* **163**: 159-164, 1998.
- 12) Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC: Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *J Am Med Assoc* **282**: 677-686, 1999.
- 13) Fenton MJ, Vermeulen MW: Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun* **64**: 683-690, 1996.
- 14) Fisher MA, Plikaytis BB, Shinnick TM: Microarray analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes. *J Bacteriol* **184**: 4025-4032, 2002.
- 15) Gomes MS, Paul S, Moreira AL, Appelberg R, Rabino-vitch M, Kaplan G: Survival of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* in acidified vacuoles of murine macrophages. *Infect Immun* **67**: 3199-3206, 1999.
- 16) Hu YM, Butcher PD, Sole K, Mitchison DA, Coates ARM: Protein synthesis is shutdown in dormant *Mycobacterium tuberculosis* and is reversed by oxygen or heat shock. *FEMS Microbiol Lett* **158**: 139-145, 1998.
- 17) Jeffrey K. Actor. Margaret Olsen, Chinnaswamy Jagannath, Robert L. Hunter: Relationship of survival, organism containment, and granuloma formation in acute murine tuberculosis. *J Interferon Cytokine Res* **19**: 1183-1193, 1998.
- 18) Lefevre P, Braibant M, Wit LD, Kalai M, Roeper D, Grotzinger J, Delville JP, Peirs P, Ooms J, Huygen K, Content J: Three different putative phosphate transport receptors are encoded by the *Mycobacterium tuberculosis* genome and are present at the surface of *Mycobacterium bovis* BCG. *J Bacteriol* **179**: 2900-2906, 1997.
- 19) Lim A, Eleuterio M, Hutter B, Murugasu-Oei B, Dick T: Oxygen depletion-induced dormancy in *Mycobacterium bovis* BCG. *J Bacteriol* **181**: 2252-2256, 1999.
- 20) Manabe YC, Bishai WR: Latent *Mycobacterium tuberculosis*-persistent, patience, and winning by waiting. *Nat Med* **6**: 1327-1329, 2000.
- 21) Mariani F, Cappelli G, Riccardi G, Colizzi V: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv comparative gene-expression analysis in synthetic medium and human macrophage. *Gene* **253**: 281-291, 2000.
- 22) Monahan IE, Betts J, Banerjee DK, Butcher PD: Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages. *Microbiology* **147**: 459-471, 2001.

- 23) Oh YK, Straubinger RM: Intracellular fate of *Mycobacterium avium*: Use of dual-label spectrofluorometry to investigate the influence of bacterial viability and opsonization on phagosomal pH and phagosome-lysosome interaction. *Infect Immun* **64**: 319-325, 1996.
- 24) Parrish NM, Dick J, Bishai WR: Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* **6**: 107-112, 1998.
- 25) Piddington DL, Kashkouli A, Buchmeier NA: Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a defined medium is very restricted by acid pH and Mg^{2+} levels. *Infect Immun* **68**: 4518-4522, 2000.
- 26) Quinn FD, Birkness KA, King PJ: Alpha-crystallin as a potential marker of *Mycobacterium tuberculosis* latency. *ASM News* **68**: 612-617, 2002.
- 27) Rosenkrands I, Slayden RA, Crawford J, Aagaard C, Barry CE 3rd, Andersen P: Hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* studied by metabolic labeling and proteome analysis of cellular and extracellular proteins. *J Bacteriol* **184**: 3485-3491, 2002.
- 28) Schnappinger D, Ehrt S, Voskuil MI, Liu Y, Mangan JA, Monahan IM, Dolganov G, Efron B, Butcher PD, Nathan C, Schoolnik GK: Transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages: insights into the phagosomal environment. *J Exp Med* **198**: 693-704, 2003.
- 29) Selwyn PA, Hartel D, Lewis VA, et al: A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* **320**: 545-550, 1989.
- 30) Solca NM, Bernasconi MV, Valsangiacomo C, Van Doorn LJ, Piffaretti JC: Population genetics of *Helicobacter pylori* in the southern part of Switzerland analysed by sequencing of four housekeeping genes (*atpD*, *glnA*, *scoB* and *recA*), and by *vacA*, *cagA*, *iceA* and IS605 genotyping. *Microbiology* **147**: 1693-1707, 2001.
- 31) Starck J, Kallenius G, Marklund BI, Andersson DI, Akerlund T: Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* grown under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiology* **150**: 3821-3829, 2004.
- 32) Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG: Lack of acidification in *Mycobacterium phagosomes* produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* **263**: 678-681, 1994.
- 33) Thangaraj HS, Bull TJ, Smet KAL, Hill MK, Rouse DA, Moreno C, Ivanyi J: Duplication of genes encoding the immunodominant 38 kDa antigen in *Mycobacterium intracellulare*. *FEMS Microbiol Lett* **144**: 235-240, 1996.
- 34) Torres A, Juarez MD, Cervantes R, Espitia C: Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* phosphate specific transport Characterization of recombinant 38 kDa. *Microb Pathog* **30**: 289-297, 2001.
- 35) Tufariello JM, Chan J, Flynn JL: Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect Dis* **3**: 578-590, 2003.
- 36) Wayne LG, Hayes LG: An *in vitro* model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect Immun* **64**: 2062-2069, 1996.
- 37) Werngren J, Hoffner SE: Drug-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype does not develop mutation-conferred resistance to rifampin at an elevated rate. *J Clin Microbiol* **41**: 1520-1524, 2003.
- 38) Wilkson RJ, Haslov K, Rappuoli R, Giovannoni F, Narayanan PR, Desai CR, Vordermeier HM, Paulsen J, Pasvol G, Ivanyi J, Singh M: Evaluation of the recombinant 38-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis* as a potential immunodiagnostic reagent. *J Clin Microbiol* **35**: 553-557, 1997.
- 39) Xu S, Cooper A, Sturgill-Koszycki S, Heyningen T, Chatterjee D, Orme I, Allen P, Russell DG: Intracellular trafficking in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-infected macrophages. *J Immunol* **153**: 2568-2578, 1994.
- 40) Yuan Y, Crane DD, Barry CE 3rd: Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial α -crystallin homolog. *J Bacteriol* **178**: 4484-4492, 1996.