

헬리코박터 파이로리 배양에서 CO₂ 농도 차이에 따른 단백질 조성 비교

경상대학교 의과대학 미생물학교실¹, 소아과학교실², 경상 건강과학원³, 생명과학연구소⁴, 공동실험관⁵

이승규¹ · 김경미¹ · 박정원¹ · 권영철¹ · 송재영¹ · 배동원⁵ · 윤희상²
서지현² · 백승철^{1,3} · 이우곤^{1,4} · 조명제^{1,4} · 이광호^{1,4} · 강형련^{1,4*}

Comparison of Proteome Component of *Helicobacter pylori* in Different Atmospheric CO₂ Concentration

Seung-Gyu Lee¹, Kyung-Mi Kim¹, Jeong-Won Park¹, Young-Chul Kwon¹, Jae-Young Song¹,
Dong-Won Bae⁵, Hee-Shang Youn², Ji-Hyun Seo², Seung-Chul Baik^{1,3}, Woo-Kon Lee^{1,4},
Myung-Je Cho^{1,4}, Kwang-Ho Rhee^{1,4} and Hyung-Lyun Kang^{1,4*}

¹Department of Microbiology, ²Pediatrics, and ³Gyeongsang Institute of Health Science, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeong-nam 660-751, Republic of Korea, ⁴Research Institute of Life Science and

⁵Central Laboratory, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeong-nam 660-701, Republic of Korea

Received : November 5, 2007

Accepted : December 4, 2007

Helicobacter pylori is a spiral, slow growing gram-negative microaerophilic bacterium. It has been shown to be the etiological agent of gastroduodenal diseases, such as chronic gastritis, gastric and duodenal ulcers, and gastric cancer. General culture condition of *H. pylori* is 5% O₂, 10% CO₂ and 100% humid atmosphere. We have compared proliferation protein expression profile of *H. pylori* incubated under normal microaerophilic (10% CO₂) and environment stress (4% CO₂, 18% CO₂) conditions. *H. pylori* cultured under environment stress displayed coccoid morphology and time-dependent decrease in proliferation. We have further compared the protein expression profiles of *H. pylori* under normal growing and environment stress conditions by a global proteomic analysis, which includes high-resolution 2-DE followed by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight and nanoelectrospray/tandem mass spectrometry. In total, 42 protein spots were found to be up- or down-regulated by more than 2-fold under environment stress conditions. Of the 42 protein spots processed, 27 spots were identified; they represented 19 genes, including 2 kinds of hypothetical proteins.

Key Words: *Helicobacter pylori*, Proteome, Environment stress

서 론

*Helicobacter pylori*는 호주의 Royal Perth Hospital의

Warren과 Marshall이 1983년 위염환자의 위 점막에서 처음으로 분리 동정하여 보고하였다 (33). 이 세균은 사람의 위 점막에서 서식하는 B형 날문방 위염 (type B antral gastritis)의 원인 균이며 위십이지장 궤양이 발병할 근본 조건을 제공하는 세균이다 (2,12,28). 전세계 인구의 절반 이상이 이 세균에 감염되어 있다 (42). 이 세균은 숙주에서 일어나는 환경 변화에 대처하기 위해 유전자 발현을 조절한다. 숙주의 환경 변화는 *H. pylori*를 포함한 많은 종류의 병원성 미생물에서 독성 유전자의 발현을 조절하

*교신저자: 강형련. 660-751, 경남 진주시 칠암동 92
경상대학교 의과대학 미생물학교실
Phone: +82-055-751-8785, Fax: +82-055-759-1588,
e-mail: kangssi@gnu.kr

**이 논문은 2003년도 정부(과학기술부)의 재원으로 지원을 받아 수행된 연구임 (R01-2003-000-10533-0).

는 것으로 잘 알려져 있으나, 조절 방법은 많이 알려져 있지 않다 (4,7,32). *H. pylori*는 온도 (8,25), 철 이용도 (9, 53), 산도 (26,27,35)와 같은 환경 요소들에 대한 유전자 발현 조절이 알려져 있다. 전형적인 조절 요소인 ferric uptake regulator (Fur) (9,10,11), chemotaxis proteins (CheA, CheY) (21)와 flagellar sensory kinase (FlgR) (47) 그리고 heat shock protein (HspR) (48)는 *H. pylori*에서 동정되었다. 또한 삼투압 스트레스 반응과 산에 저항하는 스트레스 반응의 조절 유전자인 RpoS와 (22,46), 온도 스트레스에 대해서 chaperone의 발현을 조절하는 RpoH가 발견되었다 (14). 최근 *H. pylori* 감염에 대한 숙주세포 방어기전에 관련된 heat shock protein 등과 같은 스트레스 관련 단백질 연구가 보고되었다 (19,34,54). *H. pylori*는 미호기성 세균이다. 이는 산소가 꼭 필요하지만 산소이용에 따른 활성산소에 대한 보호기전이 불완전한 세균이라는 것을 의미한다. 일부 무산소성 세균을 제외하고 대부분의 산소성 및 미세산소성 세균은 산소가 존재할 경우 superoxide dismutase (Sod), catalase (Kat), 그리고 peroxidases 생산이 성장에 필수 요소이다 (44,49). *H. pylori* 배양에서 산소 농도의 조절을 통한 유전자 발현의 차이를 프로테옴 기법으로 분석한 보고들이 있다 (5,16). 하지만 이 세균의 성장에 필수적 조건인 이산화탄소의 변화에 따른 유전자의 발현 차이에 관한 연구는 미흡하다. 광합성균이나 무기 영양균은 이산화탄소가 유일한 탄소원이다. 다른 세균들은 탄소원으로 유기물질을 사용하며 소량의 이산화탄소를 필요로 한다. 이산화탄소는 phosphoenolpyruvate가 oxaloacetate를 형성할 때, carbamoyl phosphate 형성, purine 계 핵산 생합성에도 이용된다. 대부분 세균의 경우 이런 요구를 충족시키기 위해 충분한 이산화탄소가 여러 대사 과정에서 생산된다. 그러나 환경에 이산화탄소가 없으면 발육이 안되는 경우도 있다. *H. pylori*는 acetyl-CoA carboxylase의 이산화탄소 (carbonate)에 대한 친화도가 매우 낮아서 일정 농도 이상의 이산화탄소가 성장에 필수적이다 (15). *H. pylori* 배양에서 이산화탄소 농도를 1%, 5%, 10%에서 배양하였을 때 5% 이상에는 양호하게 자랐으나 1%에서는 거의 자라지 못했다 (1). *H. pylori*의 성장에 필요한 최소 농도의 이산화탄소만을 공급한 스트레스 조건과 최고 농도의 이산화탄소를 공급한 스트레스 조건에서 부족한 이산화탄소를 보충하거나 스트레스를 극복하기 위한 유전자 발현 변화 등 생리적인 변화가 예상된다. 본 연구에서는 프로테옴 기법을 사용하여 이

세균의 생물학적 특징의 폭 넓은 이해를 목적으로 이산화탄소 변화로 인한 환경 스트레스 과정에서 나타나는 단백질의 발현양상의 차이를 분석하였다.

재료 및 방법

1. 균주와 배양조건

H. pylori 26695 균주를 헬리코박터 파이로리 분리균주 은행 (*H. pylori* Korean Type Culture Collection, 경상대학교)에서 제공받아 사용하였다. 액체질소에 냉동 보관한 균주를 37°C 항온수조에서 녹인 뒤 소 혈청이 10% 첨가된 Brucella 한천배지에 접종하고 10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂, 100% 습도가 유지되는 37°C 배양기 (Sanyo, Osaka, Japan)에서 24시간 전배양 후 5% O₂에 CO₂를 각각 4, 10, 그리고 18% 조건 하에서 각각 3일간 계대 배양하였다. 모든 세균 배양에서 O₂ 농도는 5%로 고정하여 실시하였다.

2. 세균의 형태적 변화 관찰

24시간 전배양 후 계대 배양 전의 세균의 형태를 먼저 관찰하고, 이 세균의 일반적인 배양조건인 CO₂ 농도 10%와 높은 농도인 18% 그리고 낮은 농도인 4%에서 배양한 세균의 형태를 3일간 배양 후 관찰하였다. 이 세균의 형태적 관찰을 위해 배양된 균체를 슬라이드 글라스에 옮긴 후 그람 염색법을 사용하여 염색하였다. 염색된 균체를 광학현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)으로 1000배 배율로 관찰하고 디지털 카메라 (Olympus)로 이미지를 얻었다 (Fig. 1).

3. 세균의 단백질 용출

배양한 균을 세척액 (40 mM Tris-HCl [pH 7.2], 1 mM EDTA)에 섞어 2회 원침 세척하였다. 균에 세척액 2 ml를 첨가하여 다시 진탕하고, 진탕한 균을 각각 1 ml씩 튜브에 분주하여 이를 다시 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 남은 균체를 튜브 벽면에 고루 퍼서 바르고, O'Farrell (40) 방법을 약간 변형시킨 방법으로 용해하였다. 튜브에 용해용액 (9.5 M urea, 4% CHAPS, 35 mM Tris [pH 7.2]) 600 µl를 첨가한 후 20분간 진탕하였고, 얼음에 20분간 정지하였다. 이를 10°C에서 12,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 그리고 Bradford (13) 방법으로 단백질을 정량한 후 -70°C 초저온 냉동고에 보관하여 실험에 사용하였다.

4. 이차원 전기영동 (2-DE)

1) Isoelectric focusing (IEF)

320 μ l의 재수화 용액 (8 M urea, 4% CHAPS, 10 mM DTT, 0.2% ampholite, pH 5~8)에 단백질 200 μ g을 첨가하고 진탕한 후에 피펫으로 조심스럽게 기포가 생기지 않도록 IEF tray에 옮겼다. -20°C에 보관하였던 immobilized pH gradient (IPG) strip (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)의 젤 표면의 보호막을 제거한 후 젤을 시료에 앉혔다. 젤 위에 mineral oil을 약 1 ml 정도 없어서 젤이 마르지 않도록 한 후 protein isoelectric focusing (IEF) Cell (Bio-Rad)안에서, 20°C로 14~16시간 동안 재수화시켰다. 수화된 젤을 증류수로 조심스럽게 씻은 후 포화 여과지를 이용하여 과다한 물을 제거하였다. 두 개의 wick을 증류수로 적신 후 IEF Cell tray의 양극 (+와 -)의 전선에 올린 후 mineral oil을 약 1 ml 정도 덮었다. Strip을 wick 위에 올리고, strip 위에 전류가 흐를 수 있도록 mineral oil을 덮었다. Protein IEF Cell의 프로그램은 다음과 같이 작동시켰다. 염을 제거하고 charged contaminants를 3시간 동안 10,000 volt에 두어 conditioning 단계가 끝나면 전류가 strip에 50 μ A를 넘지 않도록 linear voltage 단계를 12시간 동안 실시하였다. 마지막 focusing 단계로 90,000 volt/hours가 될 때까지 최대의 voltage를 걸어주었다. IEF가 완료된 젤을 -70°C에서 보관하였다.

2) 평형화

이차원 전기영동을 시행하기 전 IPG strip을 SDS가 들어있는 완충액으로 평형화시켰다. Strip을 첫 번째 평형 완충액 (6 M urea, 0.375 M Tris-HCl [pH 8.8], 2% SDS, 20% glycerol, 2% (w/v) DTT) 15 ml이 들어있는 conical tube에 넣은 후 교반기 위에서 교반하였다. 20분 후 strip을 두 번째 평형 완충액 (6 M urea, 0.375 M Tris-HCl [pH 8.8], 2% SDS, 20% glycerol, 2.5% (w/v) iodoacetamide)을 넣어서 교반기에서 20분간 교반하였다.

3) SDS-PAGE

평형화된 strip을 증류수로 씻고 건조시킨 후 12.5% polyacrylamide 젤 위에 올렸다. 나머지 공간은 running buffer에 녹인 0.7% low melting agarose로 채웠다. Running buffer로 채운 후 20 mA에서 15분간, 다음 30 mA에서 bromophenol blue marker가 젤의 제일 아래에 닿을 때까지 전기영동하였다. 전기영동을 끝마친 젤은 은 염색을 위한 고정액에 두었다.

5. 은 염색

은 염색은 Heukeshoven 등의 방법을 변형시켜 시행하였다 (23). 젤은 fixing solution (50% methanol, 12% acetic acid, 0.03% formaldehyde)에서 1시간 30분 동안 고정시켰다. 모든 반응은 교반기를 이용하여 부드럽게 교반하였다. 고정시킨 후 젤을 20분 동안 50% 에탄올로 두 번 세척하고, 다시 20분간 증류수로 세척했다. 젤을 Na₂S₂O₃ · 5H₂O (0.2 mg/ml)용액에 1분간 처리하고 증류수로 20초간 3회 세척했다. 젤을 AgNO₃ (2 mg/ml)용액에서 30분 동안 교반하여 AgNO₃를 단백질 스팟에 부착시킨 후 증류수로 20초간 3회 세척하였다. Developing solution (Na₂CO₃ [60 mg/ml], Na₂S₂O₃ · 5H₂O [0.2 mg/ml], 0.06% HCOH)용액에 젤을 넣고 교반하여, 젤에서 스팟이 명확히 보이면 증류수로 20초 세척 후 반응을 중지시키기 위하여 stop solution (50% methanol, 12% acetic acid)을 넣어 1시간 30분 이상 두었다.

6. 이미지 분석

젤 이미지는 Fluor-S Multi Images (Bio-Rad)로 스캔하여 이미지를 얻었다. CO₂ 4%, 10% 그리고 18% 농도에서 얻은 이미지 각각 3장씩을 PDQUEST (Version 8, Bio-Rad) 프로그램을 사용하여 각 스팟을 일치시켜 normalization 된 마스터 젤을 만들었다. 만들어진 3종류의 마스터 젤을 이용하여 단백질 스팟들의 발현의 차이를 비교하기 위하여 동일한 방법을 사용하여 전체 단백질 스팟에 대한 정보를 가진 마스터 젤을 만들었다. 이렇게 만들어진 마스터 젤에서 각각의 단백질 스팟들은 고유번호 (SSP numbers: Standard spot numbers)를 가지는데 이 고유번호를 이용하여 단백질들 간의 발현 차이를 확인하였다.

7. 단백질 스팟 전처리 및 동정

1) 탈색

은 염색된 젤로부터 단백질 스팟을 잘라낸 후 은을 제거하기 위해 환원제 (15 mM potassium ferricyanide, 50 mM sodium thiosulfate) 0.1 ml로 탈색시켰다. 젤 조각에서 색 깔이 없어지면 200 mM ammonium bicarbonate를 젤이 잠기게 넣고 30분 동안 교반하였다. 이후에 젤 조각을 증류수로 씻고, acetonitrile을 첨가하여 젤 조각이 불투명한 흰색이 될 때까지 진탕하여 탈수시켰다. 젤 조각은 30분

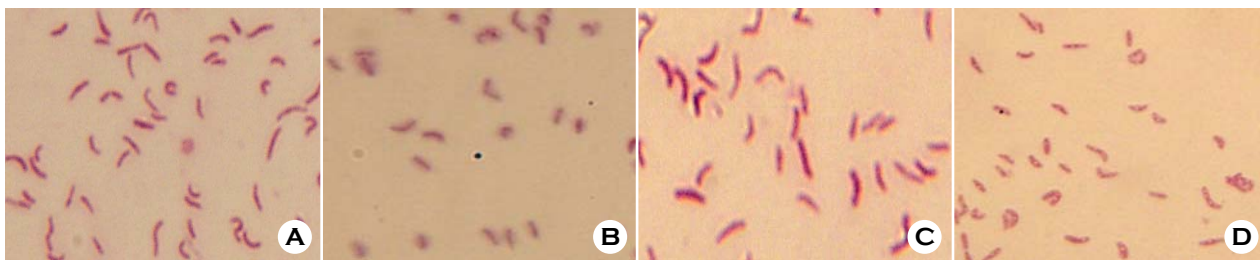


Figure 1. Morphology change of *H. pylori*. Original culture grown under 5% O₂ and 10% CO₂ (A) were transferred to the new medium and cultured 3 more days under 4% CO₂ (B), 10% CO₂ (C) and 18% CO₂ (D).

동안 진공 건조시켰다.

2) 단백질 스팟 in-gel digestion

In-gel digestion은 O'Connell & Stults에 의한 방법으로 수행하였다 (39). 젤이 담긴 튜브를 얼음에 두고 trypsin이 포함된 효소 반응액 (trypsin [0.6 ng/μl]) 30 μl 첨가하여 재수화를 위해 얼음에 45분간 정치하였다. 효소 반응액을 제거하고 digestion buffer (50 mM NH₄HCO₃, 5 mM CaCl₂) 20 μl를 넣어 젤이 잠긴 상태로 37°C 배양기에서 하룻밤 동안 정치하였다. 이후 acetonitrile 20 μl를 튜브에 넣고 30분간 교반하여 원심 후 상층액을 취하였다. 이 상층액을 1시간 동안 진공 건조하였다.

3) Nanoelectrospray MS/MS

Digestion 후 건조된 시료의 정제를 위하여 GELoader tip (Eppendorf, Hamburg, Germany)에 poros R2 resin (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA)을 충전하고, 먼저 resin을 세척용액 (5% methanol, 3% acetic acid) 20 μl로 세척한 후, 5% acetic acid를 사용하여 건조된 시료를 용해시켜 resin을 통과시켰다. 다시 세척용액 20 μl를 두 번 resin을 통과시켜 세척하였고, 마지막으로 추출용액 (70% methanol, 3% acetic acid) 2.5 μl로 정제된 펩타이드 용액을 추출하여 이를 단백질 동정에 사용하였다. MS/MS 분석은 QSTAR pulsar-i mass spectrometry 시스템 (AB/MDS Sciex, Toronto, Canada)을 이용하였으며, source는 nanoelectrospray ion source (MDS Protana, Odense, Denmark)를 이용하였고, 2.5 μl의 시료를 long spray capillary (MDS Protana, Odense, Denmark)에 주입 후 capillary 끝을 분무가 가능하도록 절단하여 사용하였다.

Ion spray voltage는 900~950 volt로 사용하였고, 이온 형태는 positive mode로 TOF-MS 범위는 400~1,600 Da (m/z)로 설정하여 사용하였다. MS/MS 측정을 위한 MS 범위는 80~2,000 Da (m/z)으로 사용하였으며, 각 펩타이드에 대한 collision energy (CE)값은 수동으로 최적화시켜 사

용하였다. 이렇게 얻어진 MS/MS의 수정되지 않은 자료는 MASCOT 프로그램 (<http://www.matrixscience.com>)으로 NCBI database를 이용하여 단백질을 동정하였다.

4) MALDI-TOF-MS를 이용한 지문분석

Matrix 용액 (α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid [40 mg/ml], 50% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid)와 시료용액을 섞어서 target plate well에 올린 후 재빨리 말리고 30초간 피펫을 이용하여 증류수로 2회 세척하였다. Voyager Biospectrometry Workstation (PE Biosystem, Foster city, CA, USA)를 이용하여 20 kV accelerating voltage, 65% grid voltage, 0.02% guide wire voltage, 150 ns delay하고 800에서 3,500 사이의 mass gate로 in-gel digestion된 펩타이드 단편의 질량을 측정하였다. 측정된 펩타이드의 질량은 Protein prospector Package program MS-FIT (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml/msfit.htm>)을 이용하여, NCBI databas의 자료를 바탕으로 단백질을 동정하였다.

결 과

1. 세균의 형태 변화

24시간 전배양한 세균의 모양에서는 전형적인 나선균의 모습을 보였다 (Fig. 1A). *H. pylori*의 일반적 배양조건인 10% CO₂에서 3일간 배양한 균의 모양은 전배양한 세균과 동일한 나선균의 모습을 보였지만 (Fig. 1C), 4% CO₂에서 3일간 배양한 균의 모양에서는 나선균의 모양을 하고 있으나 전체적으로 그 길이가 짧아졌고, 말굽모양이나 구모양으로 변한 사멸기에 접어든 균도 관찰되었다 (Fig. 1B). 18% CO₂에서 3일간 배양한 균의 모양에서도 4% CO₂ 배양조건에서 배양한 균의 모양과 비슷한 경향을 보였다 (Fig. 1D).

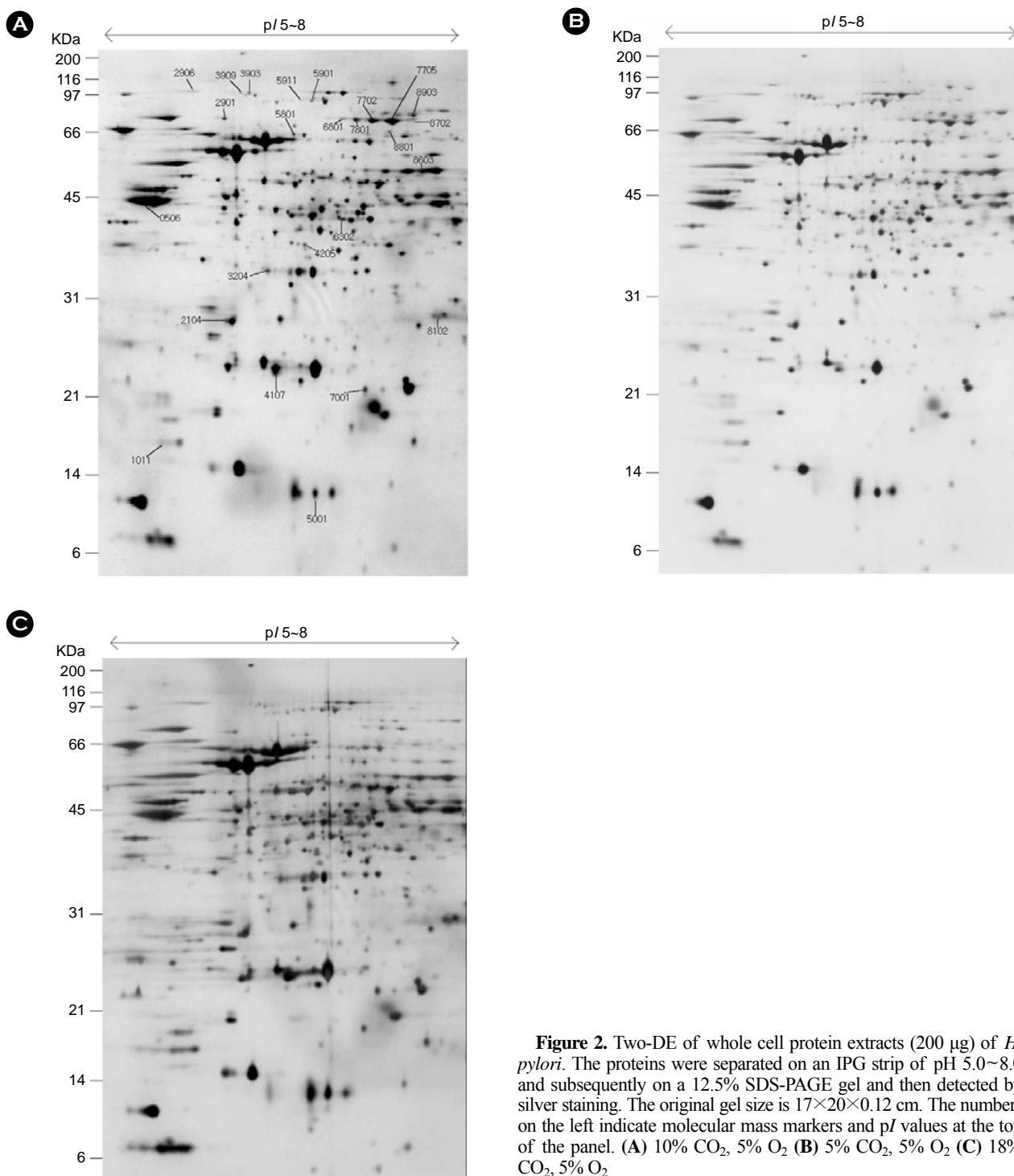


Figure 2. Two-DE of whole cell protein extracts (200 µg) of *H. pylori*. The proteins were separated on an IPG strip of pH 5.0~8.0 and subsequently on a 12.5% SDS-PAGE gel and then detected by silver staining. The original gel size is 17×20×0.12 cm. The numbers on the left indicate molecular mass markers and pI values at the top of the panel. (A) 10% CO₂, 5% O₂ (B) 5% CO₂, 5% O₂ (C) 18% CO₂, 5% O₂

2. CO₂ 농도에 따른 단백질 발현의 차이

CO₂ 4%, 10%, 18%에서 각각 3일간 배양한 *H. pylori* 균체 단백질을 추출액을 2-DE로 분석하였다 (Fig. 2-A, B, C). 대조군 (Fig. 2-A)보다 처리군 (Fig. 2-B, C)에서 두 배

이상 농도 차이를 보이는 스팟의 단백질을 질량 분석기 (MALDI-TOF, Tandem MS spectrometer)로 분석·동정하였다 (Table 1, 2). 대조군에 비해 4% CO₂에서 polynucleotide phosphorylase (Pnp), ATP-dependent protease binding subunit (ClpB), hydantoin utilization protein A (HyaA), glucose inhi-

Table 1. Identified up or down-regulated proteins under various CO₂ concentration of *H. pylori* strain 26695 by using tandem ms/ms

SSP No	Proteins name	Accession no	MW	pI	Amino acid seq	Score	HP No
0506 ^e	Translation elongation factor EF-Tu (TufB)	gi:2314366	43647.7	4.93	R.ELLSAYEFPGDDTPIVAGSALR.A	66	1205
					K.TFLMPVEDVFSIAGR.G	19	
1011 ^c	3-dehydroquinase type II (AroQ)	gi:2314182	18483.25	4.93	K.ILVIQGPNLNMLGHR.D	65	1038
					K.QGNLDVELEFFQTNFEGEIIDK.I	72	
2104 ^b	Conserved hypothetical protein	gi:2314773	28417.54	5.24	R.GLSLAGNQVLTR.T	63	1588
					R.QALSAATLTLFK.M	46	
2901 ^a	Polynucleotide phosphorylase (Pnp)	gi:2314375	76894.54	5.34	K.TETTLIEQNMLSK.I	73	1213
					R.AQDFEILTSR.L	32	
3204 ^b	Thioredoxin reductase (TrxB)	gi:2313959	33538.22	6.25	K.NQYFDEIHK.G	45	0825
					K.ESLNMIEMR.S	41	
4205 ^b	Chemotaxis protein (CheV)	gi:2313092	36587.05	6.19	R.ELVVPGFIFVGYDVNNAVLK.Q	53	0019
					R.LVQVVDIEK.M	48	
5801 ^b	Threonyl-tRNA synthetase (ThrS)	gi:2313207	70239.64	6.36	K.DLYAVNVFK.I	19	0123
					R.ELTIPLIDMK.K	23	
5901 ^a	ATP-dependent protease binding subunit (ClpB)	gi:2313207	70239.64	6.36	R.IYGIAFATK.E	30	0123
					K.LAGAYLGGDENNEMLR	74	
5911 ^c	ATP-dependent protease binding subunit (ClpB)	gi:2314182	96683.36	6.27	K.ALAQFLFDSDKNLIR.I	27	0264
6302 ^b	ATP-binding protein (Mpr)	gi:2314182	96683.36	6.27	K.ALAQFLFDSDKNLIR.I	25	0264
6801 ^e	Hydantoin utilization protein A (HyuA)	gi:2313292	45197.63	8.58	K.VGLLDADVYGPNIPIR.M	74	0207
7001 ^d	Modulator of drug activity (Mda66)	gi:2313818	78532.79	6.94	K.LLPGNEVIGPAIVESDATTFFVIPK.G	33	0695
					K.NPQVEQYLNSLTTHLR.Q	24	
7702 ^e	Hydantoin utilization protein A (HyuA)	gi:2313748	21604.61	7.16	R.TIVSGPIGGVIGSK.L	39	0695
					R.LVLSLPLVAMDSVGAGAGSFVR.I	22	
7705 ^e	Hydantoin utilization protein A (HyuA)	gi:2313818	78532.79	6.94	K.IIQDAWDELTLK.V	50	0695
					R.GVVATQKPVIPVEK.E	24	
7801 ^e	Hydantoin utilization protein A (HyuA)	gi:2313818	78532.79	6.94	R.TIVSGPIGGVIGSK.L	59	0695
					K.YDDPLIPLKR.I	44	
8102 ^b	Ucase alpha subunit (UreA)	gi:2313818	78532.79	6.94	R.TIVSGPIGGVIGSK.L	31	0073
					R.LVLSLPLVAMDSVGAGAGSFVR.I	26	
8603 ^f	Conserved hypothetical iron-sulfur protein	gi:2313154	26539.49	8.96	K.IIQDAWDELTLK.V	24	0138
					R.IFGFNALVDR.Q	71	
					K.LNYVEAVALISAHIMEEAR.A	18	
					K.LLAPILPLVK.E	26	
					K.DGDEANEIYNLAK.E	53	
					R.LDEYLELFEK.N	48	

Table 1. Continued

SSP No	Proteins name	Accession no	MW	pI	Amino acid seq	Score	HP No
8702 ^{a,e}	Hydantoin utilization protein A (HyuA)	gi:2313818	78532.79	6.94	R.GVVATQKPVIPVEK.E	25,	0695
					R.TIVSGPIGGVIGSK.L	68,	
8801 ^a	Glucose inhibited division protein (GidA)	gi:2313303	69683.72	7.13	R.LGLMEEDFYK.E	38,	0213
					K.GIPGLSLEAVEK.L	42,	
8903 ^{a,e}	N-methylhydantoinase	gi:2313819	86511.66	6.95	R.TVLLVDEK.	31,	0696
					K.GGPGFGDPIER.D	45,	

^{a)} Increased protein spots in 4%-CO₂. ^{b)} Increased protein spots in 18%-CO₂. ^{c)} Increased protein spots in both 4% and 18%-CO₂.
^{d)} Decreased protein spots in 4%-CO₂. ^{e)} Decreased protein spots in 18%-CO₂. ^{f)} Decreased protein spots in both 4% and 18%-CO₂.

Table 2. Identified up or down-regulated proteins under various CO₂ concentration of *H. pylori* strain 26695 by using MALDI-TOF MS

SSP No	Proteins name	Accession no	MW	pI	HP no
5001 ^b	Co-chaperone (GroES)	gi:2313085	12990.87	6.59	0011
2906 ^a	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO3 subunit (NQO3)	gi:2314431	94229.31	5.12	1266
3903 ^a	Protein translocase subunit (SecA)	gi:2313910	99083.31	5.65	0786
3909 ^a	Protein translocase subunit (SecA)	gi:2313910	99083.31	5.65	0786
4107 ^c	Alkyl hydroperoxide reductase (AhpC)	gi:2314747	22235.57	6.25	1563

^{a)} Increased protein spots in 4%-CO₂. ^{b)} Increased protein spots in 18%-CO₂. ^{c)} Decreased protein spots in 4%-CO₂

bited division protein (GidA), N-methyl-hydantoinase, NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO3 subunit (NQO3), protein translocase subunit (SecA)의 발현이 두 배 이상 증가하였다. 반면 modulator of drug activity (Mda66), alkyl hydroperoxide reductase (AhpC)의 발현이 두 배 이상 감소하였다.

대조군에 비해 18% CO₂에서 conserved hypothetical protein, thioredoxin reductase (TrxB), chemotaxis protein (CheV), threonyl-tRNA synthetase (ThrS), ATP-binding protein (Mpr), urease alpha subunit (UreA), co-chaperone (GroES)의 발현이 두 배 이상 증가하였고, translation elongation factor EF-Tu (TufB), N-methyl-hydantoinase (HyuB), HyuA 단백질은 발현이 두 배 이상 감소하였다.

대조군에 비해 처리군 (4%, 18% CO₂)에서 공통으로 두 배 이상 발현이 증가한 단백질 스팟은 3-dehydroquinase type II (AroQ), ClpB이었다.

대조군에 비해 처리군 (4%, 18% CO₂)에서 공통으로 두 배 이상 발현이 감소한 단백질 스팟은 conserved hypothetical iron-sulfur protein이었다.

동정된 단백질의 발현강도를 그래프로 나타내어 대조군과 처리군 간의 전체적인 발현양상을 비교하였다 (Fig.

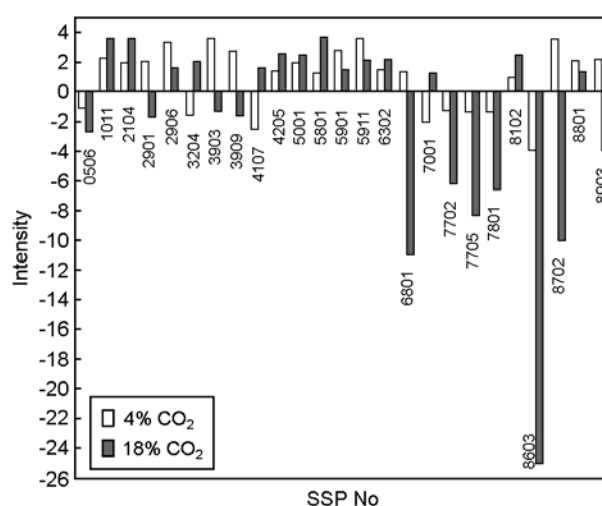


Figure 3. Comparison of expression intensity in over two fold increased or decreased protein spots in CO₂ 4% and/or 18%. X axis and Y axis represent spot number and spot intensity, respectively. SSP No is standard spot number in PDQUEST program.

3). 그 양상은 특징되게 두 가지로 구별되었다. 첫째 대조군에 비하여 처리군에서 공통으로 발현이 증가하는 단백질은 HP1038을 포함한 총 11개이며, 둘째 대조군에 비

Table 3. Identified proteins classification by functional annotation of using COGs

Proteins name	GOG No	Functional annotation Code
3-dehydroquinase type II (AroQ)	0757	E
Modulator of drug activity (Mda66)	2249	R
Polynucleotide phosphorylase (Pnp)	1185	J
NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO3 subunit (NQO3)	1034	C
Ucase alpha subunit (UureA)	0831	E
protein translocase subunit (SecA)	0653	N
ATP-dependent protease binding subunit (ClpB)	0542	O
Thioredoxin reductase (TrxB)	0492	O
ATP-binding protein (Mpr)	0489	D
Alkyl hydroperoxide reductase (AhpC)	0450	O
Glucose inhibited division protein (GidA)	0445	D
Threonyl-tRNA synthetase (ThrS)	0441	J
Co-chaperone (GroES)	0234	O
N-methylhydantoinase	0146	E
Hydantoin utilization protein A (HyuA)	0145	E
Translation elongation factor EF-Tu (TufB)	0050	J, E
C: Energy production and conversion		D: Cell division and chromosome partitioning
E: Amino acid transport and metabolism		J: Translation, ribosomal structure and biogenesis
N: Cell motility and secretion		O: Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
R: General function prediction only		

해 처리군에서 공통으로 발현이 감소한 단백질은 HP1205를 포함한 5개였다.

3. 동정된 단백질의 기능별 분류

대조군에 비해 처리군에서 발현이 두 배 이상 증감을 보인 42개의 스팟들 중 27개가 분석되었고, 19개의 유전자를 확인하였다. 이 19개의 유전자들 중 GOG database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>)에서 기능분류가 되지 않은 hypothetical protein (HP1588)과 chemotaxis protein (HP0019)을 제외한 17개의 유전자를 기능별로 7가지로 분류하였다 (Table 3). 특히 18% CO₂에서 발현이 감소한 단백질 7개 중 6개가 아미노산 운반과 대사 기능을 하는 단백질이었다.

고 찰

*H. pylori*는 일반적 배양조건인 10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂에서 전형적으로 나선균의 모습을 보인다 (Fig. 1A). 하지만 3일 이상 배양하거나 배양조건이 나쁠 때 세균의

길이가 짧아지고 나선균의 모양에서 말굽모양으로 형태가 변하기 시작하며 빠르게 사멸한다.

4%와 18% CO₂에서 배양한 경우, 대조군에 비해서 균이 사멸기에 접어든 전형적인 모양이 많이 관찰되었다 (Fig. 1-C, D). 이것은 배양 최적조건에서 벗어나 스트레스로 인한 세균의 성장과 증식억제로 세균의 사멸이 촉진되어 나타나는 것으로 사료된다.

생물체의 유전자 발현은 pH, 산소조건, 온도 등 여러 환경적 요인들에 의해서 다양하게 변한다. 배양환경의 pH 변화는 Hsp70 등 여러 단백질의 발현을 유도하거나 (29) ure 유전자의 mRNA 분해에 영향을 주는 (3) 등 여러 유전자 발현에 영향을 미친다. 본 연구에서 확인된 세균의 모양 변화나 유전자 발현의 변화가 CO₂가 배지의 pH를 변화시킨 결과가 아닌지 확인하였으나 대조군과 처리군에서 배지의 pH에서 유의한 차이를 보이지 않았다 (pH값 결과를 표나 그래프로 나타내지 않았다). 산소조건도 유전자의 발현에 변화를 줄 수 있는 중요한 요인으로서 본 연구에서는 산소의 영향을 배제하기 위하여 5% 산소조건에서 수행하였다.

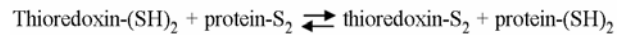
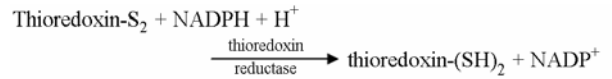
2-DE로 동일한 시료 또는 동일한 조건에서 배양한 세균의 시료를 전개하면 젤 상에서 염색되어 보이는 발현 단백질의 양이 미세한 차이를 보인다. 각 젤의 단백질 스팟의 농도 편차를 최소화 하기 위하여 동일한 시료를 세 장의 젤에 전개하고 염색하여 얻어진 이미지를 PDQUEST 이미지 분석프로그램으로 마스터 젤을 만들고 normalization한 다음 단백질 스팟의 농도를 분석하였다 (Fig. 2).

대조군에 비해 4% CO₂에서는 Pnp, ClpB, HyuA, GidA, NQO3, N-methylhydantoinase 그리고 SecA 등 7개 단백질의 발현이 두 배 이상 증가하였다. Pnp는 mRNA의 단백질 전사 후 변형 (post-transcriptional modification)의 첫 번째 기전으로 작용하며, 3' → 5' 핵산말단 가수분해 효소로 mRNA 붕괴 (decay)를 막는 중요한 역할을 한다 (20). 또 생합성적으로 보면 RNA 전사에서 heteropolymeric tail을 mRNA 3' 말단에 붙이는 기능을 한다 (37). ClpB는 ATP 활성화에 필요한 chaperone의 기능을 하는 단백질이다 (30). 고도의 열 스트레스에 의해 응집된 단백질의 분해나 재활성화 기능을 하는 세포 생존에 필수적인 단백질이며 Heat shock protein 104와 같이 N-domain과 두 개의 AAA+ domain [nucleotide-binding domain 1과 2 (NBD-1과 -2)]을 포함하는 protomer를 가지며, 동일한 protomer들로 구성된 hexameric 단백질이다 (31).

HyuA와 N-methylhydantoinase는 순수 D-, L- 아미노산 생산에 필요한 효소이며 pyrimidine 분해의 환원 경로에서 대사 기능뿐만 아니라 생물공학적인 순수 아미노산 생산에 중요하다 (50). 이 두 단백질의 발현이 4% CO₂ 조건에서 함께 증가하며 이들의 유전자가 게놈상의 거리가 12 염기쌍에 떨어져 있지 않아서 한 오페론으로 발현이 조절되고 있는 것으로 판단된다.

4% CO₂에서 발현이 증가한 7종류 단백질의 기능을 분류하였을 때 다양한 범주에 속하는 단백질들이었다 (Table 3). 이 결과가 의미하는 것은 이 세균이 잘 자랄 수 있는 환경을 벗어나 CO₂의 결핍에 의한 극한 환경으로 인한 스트레스로부터 적응하고 생존을 위해 필요한 여러 가지 단백질을 고르게 증대시킴으로 나타난 결과라 추측된다.

대조군에 비해 18% CO₂에서 conserved hypothetical protein, TrxB, CheV, ThrS, Mpr, UreA, GroES의 발현이 두 배 이상 증가하였다. TrxB는 단백질의 이황화 결합을 가수분해한다 (24). 그 기전은 다음과 같다.



Trx는 세포들의 단백질 thiol 이황화결합 상태의 조절에 중요한 역할을 하며 산화적 스트레스가 가해졌을 때 *H. pylori*에서 발현이 증가되는 대표적인 항산화효소로 보고되었다 (24,51). *H. pylori*는 요소분해효소가 균체 단백질의 약 6%를 차지할 정도로 요소분해효소의 생성능이 매우 강하다. 생성량 뿐만 아니라 기질인 요소에 대한 친화도가 다른 세균이나 식물의 요소분해효소에 비하여 20 배 이상 높다 (36,38). 요소분해효소 유전자는 8.6 kb에 걸쳐 9개의 유전자로 구성된 유전자군에서 발현된다. 요소분해효소 유전자군의 유전자 순서는 *ureC*, *ureD*, *ureA*, *ureB*, *ureI*, *ureE*, *ureF*, *ureG*, *ureH*이고 각각의 크기는 1,335, 395, 714, 1,707, 585, 510, 768, 597, 795 bp이다 (17,18). 전체적인 유전자군의 구조는 세균에서 일반적으로 관찰되는 오페론과 유사하나 조절 유전자는 확인되지 않았다. *ureD*와 *ureA*의 약 310 bp 위쪽에 σ 54 전사촉진 유전자와 유사한 서열이 있으며 σ 54 전사촉진 유전자는 질소 농도에 따라 조절되는 전사촉진 유전자로 보고되었다 (29). 본 연구에서 UreA의 발현량의 차이는 CO₂ 농도 변화에 따른 질소 분압 차이에 의한 것으로 사료된다.

대조군에 비해 4% CO₂에서 발현이 두 배 이상 감소한 단백질은 Mda66와 AhpC였다. AhpC는 thiol-dependent 2-Cys peroxiredoxin 그룹에 속하며 (52), *H. pylori*에서 가장 양이 많은 항산화 단백질이다 (41). 그리고 AhpC는 전자주개 (electron donor)에 의해 환원되는 이황화결합을 통해 동형이합체 형태를 이룬다 (43). 이 결과에서 AhpC의 감소는 아마도 이산화탄소의 감소에 의한 세균의 호흡대사의 저하 또는 장애에서 기인된 결과라고 사료된다.

18% CO₂에서도 대조군에 비해 TufB, HyuA 그리고 HyuB 등 3개의 단백질의 발현이 두 배 이상 감소하였다. 특히 HyuA는 연속된 다섯 개의 스팟으로 나타났으며 이는 번역 후 수식 (posttranslational modification)에 의한 아미노산 잔기의 측쇄사슬 (side chain) 전하의 변화에 의한 결과로 생각된다 (6).

대조군에 비하여 처리군에서 공통으로 두 배 이상 발현이 감소한 단백질은 conserved hypothetical iron-sulfur protein으로 확인되었다. Iron-sulfur protein의 생물학적 기능은 ferredoxin에서 NADPH⁺로의 전자 수송 역할을 하는

ferredoxin-NADPH⁺ reductase와의 상호작용을 막음으로써 cytochrome C의 환원을 방해한다 (45). 이와 같이 iron-sulfur protein의 발현 감소는 결국 세균의 형질막에서 호흡기능을 하는 단백질 중 하나인 cytochrome C의 감소로 이어졌다는 것이고, CO₂의 과잉 또는 부족으로 인한 이 세균의 호흡대사가 제대로 이루어지지 않음으로 iron-sulfur protein의 발현 차이가 나타난 것으로 추정된다.

대조군에 비하여 처리군에서 공통으로 발현이 증가하는 단백질은 HP1038을 포함한 11개였고 대조군에 비해 처리군에서 공통으로 발현이 감소한 단백질은 HP1205를 포함한 5개였다 (Fig. 3). 처리군에서 발현이 증가하는 단백질의 경우 CO₂의 과부족 스트레스 환경에서 과 발현하여 이 균이 적응과 생존해 나가기 위해 나타나는 반응이라 사료된다. 처리군에서 발현이 감소하는 단백질의 경우는 스트레스 환경에서 적응하기 위해 필요한 단백질 합성에 필요한 에너지를 충당하기 위해 이 균 스스로가 생존에는 영향을 미치지 않는 단백질합성을 줄여서 나타나는 결과라 추측된다.

산소 스트레스에 의한 *H. pylori* 단백질의 proteome 분석 (16)과 *H. pylori*의 항산화효소에 대한 보고 (51)에 의하면 AhpC, Sod, Kat 그리고 Trx 등 29개의 단백질이 산화적 스트레스에 대항하는 중요한 기능을 담당한다. 본 연구에서는 AhpC, TrxB 그리고 MdaB 등 세 개의 효소만이 공통적으로 발현 변화를 보였다. 이들 세 단백질은 여러 가지 스트레스에 대항하는 광범위 항산화효소로 산소 스트레스뿐만 아니라 CO₂의 과부족 스트레스에서도 작용하는 것으로 생각된다.

대조군에 비해 처리군에서 발현이 두 배 이상 증감을 보인 42개의 단백질 스팟에서 19개 유전자 (27개 스팟)를 확인하였다. 이들 19개의 유전자들 중 기능을 알 수 없는 hypothetical protein (HP1588)과 GOG database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>)에서 분류되지 않은 chemotaxis protein (HP0019)을 제외한 17개의 유전자를 기능별로 분류하였다 (Table 3). 17개의 유전자는 7가지의 기능으로 분류되었다. 이 결과에서 특히 18% CO₂에서 발현이 감소한 단백질 7개 중 6개가 아미노산 운반과 대사의 기능을 하는 단백질로 확인되었다. 이것은 아마도 이산화탄소의 양이 많은 배양조건에서 이 세균이 성장 저하에 의해 아미노산 운반과 대사 기능을 원활히 할 수 없기에 단백질 발현이 감소한 것으로 사료된다. 산소 스트레스에 의해 조절되는 단백질 보고 (16,51)에서 29개의 단백질 중

COG 분류에 의한 상위 3개의 기능으로는 O (posttranslational modification, protein turnover, chaperones) 8개 단백질, P (inorganic ion transport and metabolism) 5개 단백질, L (DNA replication, recombination and repair) 5개 단백질이 29개 단백질 중 62%를 차지하였고, 본 연구에서 이산화탄소 스트레스에 의해 조절되는 단백질 27개의 단백질 중 상위 3개의 기능으로는 E (amino acid transport and metabolism) 9개 단백질, O (posttranslational modification, protein turnover, chaperones) 5개 단백질, J (translation, ribosomal structure and biogenesis) 3개 단백질이 27개 단백질 중 63%를 차지하는 것을 확인되었다. 이 결과 산소 스트레스에 의해 조절되는 단백질 기능과 이산화탄소 스트레스에 의해 발현이 조절되는 단백질 기능에서 차이를 확인하였다. *H. pylori* 배양에서 일정 농도의 산소와 이산화탄소의 공급이 필요하지만 산소와 이산화탄소 대사는 구별된다고 사료된다. 이상의 결과를 바탕으로 이 세균의 배양조건에서 이산화탄소의 과잉 또는 결핍에 의한 환경 스트레스로부터 적응하기 위한 생물학적 특성을 이해하는데 중요한 기초자료가 될 것이다.

참 고 문 헌

- 1) 이광호, 조명제, 김종배, 최상경, 김영채: 위내시경 생검체에서 분리한 *Campylobacter pylori*의 미생물학적 특성. 대한미생물학회지 **23**: 17-26, 1988.
- 2) 이광호, 조명제, 김종배, 최상경, 박철근, 김영채, 최진학, 최국진: 위십이지장 염증성 질환과 *Campylobacter pylori*에 관한 전향적 연구. 대한미생물학회지 **23**: 9-16, 1988.
- 3) Akada JK, Shirai M, Takeuchi H, Tsuda M, Nakazawa T: Identification of the urease operon in *Helicobacter pylori* and its control by mRNA decay in response to pH. *Mol Microbiol* **36**: 1071-1084, 2000.
- 4) Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, Smith DR, Noonan B, Guild BC, Dejonge BL, Carmel G, Tummino PJ, Caruso A, Uria-Nickelsen M, Mills DM, Ives C, Gibson R, Merberg D, Mills SD, Jiang Q, Taylor DE, Vovis GF, Trust TJ: Genomic sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **397**: 176-180, 1999.
- 5) Back HY, Lim JW, Kim HY, Kim JM, Kim JS, Jung HC, Kim KH: Oxidative-stress-related proteome changes in *Helico-*

- bacter pylori*-infected human gastric mucosa. *J Biochem* **397**: 291-299, 2004.
- 6) **Bail SC, Kim KM, Song SM, Kim DS, Jun JS, Lee SG, Song JY, Park JU, Kang HL, Lee WK, Cho MJ, Youn HS, Ko GH, Rhee KH**: Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Helicobacter pylori* strain 26695. *J Bacteriol* **186**: 949-955, 2004.
- 7) **Bearson S, Bearson B, Foster JW**: Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett* **147**: 173-180, 1997.
- 8) **Beier D, Spohn G, Rappuoli R, Scarlato V**: Identification and characterization of an operon of *Helicobacter pylori* that is involved in motility and stress adaptation. *J Bacteriol* **179**: 4676-4683, 1997.
- 9) **Bereswill S, Greiner S, van Vliet AH, Waidner B, Fassbinder F, Schiltz E, Kusters JG, Kist M**: Regulation of Ferritin-Mediated Cytoplasmic Iron Storage by the Ferric Uptake Regulator Homolog (Fur) of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **182**: 5948-5953, 2000.
- 10) **Bereswill S, Lichte F, Greiner S, Waidner B, Fassbinder F, Kist M**: The ferric uptake regulator (Fur) homologue of *Helicobacter pylori*: functional analysis of the coding gene and controlled production of the recombinant protein in *Escherichia coli*. *Med Microbiol Immunol* **188**: 31-40, 1999.
- 11) **Bereswill S, Lichte F, Vey T, Fassbinder F, Kist M**: Cloning and characterization of the *fur* gene from *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett* **159**: 193-200, 1998.
- 12) **Blaser MJ**: *Helicobacter pylori*; its role in disease. *Clin Infect Dis* **15**: 386-392, 1992.
- 13) **Bradford MM**: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254, 1976.
- 14) **Bukau B**: Regulation of the *Escherichia coli* heatshock response. *Mol Microbiol* **9**: 671-680, 1993.
- 15) **Burns BP, Hazell SL, Mendz GL**: Acetyl-CoA carboxylase activity in *Helicobacter pylori* and the requirement of increased CO₂ for growth. *Microbiology* **141**: 3113-3118, 1995.
- 16) **Chuang MH, Wu MS, Lin JT, Chiou SH**: Proteomic analysis of proteins expressed by *Helicobacter pylori* under oxidative stress. *Proteomics* **5**: 3895-3901, 2005.
- 17) **Collins CM, Falkow S**: Genetic analysis of *Escherichia coli* urease genes: evidence for two distinct loci. *J Bacteriol* **172**: 7138-7144, 1990.
- 18) **Cussac V, Richard L, Ferrero, Labigne A**: Expression of *Helicobacter pylori* urease genes in *Escherichia coli* grown under nitrogen-limiting conditions. *J Bacteriol* **174**: 2466-2473, 1992.
- 19) **de Vries N, van Ark EM, Stoof J, Kuipers EJ, van Vliet AH, Kusters JG**: The stress-induced hsp12 gene shows genetic variation among *Helicobacter pylori* strains. *FEMS Immunol Med Microbiol* **38**: 45-51, 2003.
- 20) **Donovan WP, Kushner SR**: Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 120-124, 1986.
- 21) **Foyne S, Dorrell N, Ward SJ, Stabler RA, McColm AA, Rycroft AN, Wren BW**: *Helicobacter pylori* possesses two CheY response regulators and a histidine kinase sensor, CheA, which are essential for chemotaxis and colonization of the gastric mucosa. *Infect Immun* **68**: 2016-2023, 2000.
- 22) **Hengge-Aronis R**: Back to log phase. sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **21**: 887-893, 1996.
- 23) **Heukeshoven J, Dernick R**: Improved silver staining of sodiumdodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**: 28-32, 1988.
- 24) **Holmgren A**: Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action. *J Biol Chem* **254**: 9113-9119, 1979.
- 25) **Homuth G, Domm S, Kleiner D, Schumann W**: Transcriptional analysis of major heat shock genes of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **182**: 4257-4263, 2000.
- 26) **Huesca M, Goodwin A, Bhagwansingh A, Hoffman P, Lingwood CA**: Characterization of an acidic-pH-inducible stress protein (*hsp70*), a putative sulfatide binding adhesin, from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* **66**: 4061-4067, 1998.
- 27) **Karita M, Tummuru MK, Wirth HP, Blaser MJ**: Effect of growth phase and acid shock on *Helicobacter pylori* *cagA* expression. *Infect Immun* **64**: 4501-4507, 1996.
- 28) **Langenberg ML, Tytgat GN, Schipper ME, Rietra PJ, Zanen HC**: *Campylobacter*-like organisms in the stomach of patients and healthy individuals. *Lancet* **i**: 1348-1349, 1984.
- 29) **Lee MH, Mulrooney SB, Renner MJ, Markowicz Y, Hausinger RP**: *Klebsiella aerogenes* urease gene cluster: sequence of *ureD* and demonstration that four accessory genes (*ureD*, *ureE*, *ureF*, *ureG*) are involved in nickel metallo-center biosynthesis. *J Bacteriol* **174**: 4324-4330, 1992.
- 30) **Lee S, Sowa ME, Tsai TF**: Structure of the ClpB molecular chaperone. *Life Sciences* **2**: pp: 68, 2004.

- 31) Lee S, Sowa ME, Watanabe YH, Sigler PB, Chiu W, Yoshida M, Tsai FT: The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. *Cell* **115**: 229-240, 2003.
- 32) Litwin CM, Calderwood SB: Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* **6**: 137-49, 1993.
- 33) Marshall BJ, Warren JR: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **i**: 1311-1314, 1984.
- 34) Matsukawa Y, Asai Y, Kitamura N, Sawada S: Exacerbation of rheumatoid arthritis following *Helicobacter pylori* eradication: disruption of established oral tolerance against heat shock protein? *Med Hypotheses* **64**: 41-43, 2005.
- 35) McGowan CC, Necheva A, Thompson SA, Cover TL, Blaser MJ: Acid-induced expression of an LPS-associated gene in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **30**: 19-31, 1998.
- 36) Mendes MJ, Karmali A, Brown P: One-step affinity purification of urease from jack beans. *Biochimie* **70**: 1369-1371, 1988.
- 37) Mohanty BK, Kushner SR: Polynucleotide phosphorylase functions both as a 30~50 exonuclease and a poly(A) polymerase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11966-11971, 2000.
- 38) Musher DM, Griffith DP, Yawn D, Rossen RD: Role of urease in pyelonephritis resulting from urinary tract infection with *Proteus*. *J Infect Dis* **131**: 177-181, 1975.
- 39) O'connell KL, Stults JT: Identification of mouse liver proteins of two-dimensional electrophoresis gel by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of *in situ* enzymatic digests. *Electrophoresis* **18**: 349-359, 1997.
- 40) O'Farrell PH: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**: 4007-4021, 1975.
- 41) Olczak AA, Seyler RW, Olson JW, Maier RJ: Association of *Helicobacter pylori* antioxidant activities with host colonization proficiency. *Infect Immun* **71**: 580-583, 2003.
- 42) Petersen AM, Krogfelt KA: *Helicobacter pylori*: an invading microorganism? A review. *FEMS Immunol Med Microbiol* **36**: 117-126, 2003.
- 43) Reynolds CM, Poole LB: Activity of one of two engineered heterodimers of AhpF, the NADPH:peroxiredoxin oxidoreductase from *Salmonella typhimurium*, reveals intrasubunit electron transfer between domains. *Biochemistry* **40**: 3912-3919, 2001.
- 44) Richard W, Seyler JR, Jonathan WO, Robert JM: Superoxide dismutase-deficient mutants of *Helicobacter pylori* are hypersensitive to oxidative stress and defective in host colonization. *Infect Immun* **69**: 4034-4040, 2001.
- 45) Shin M, Arnon DI: Enzymic mechanisms of pyridine nucleotide reduction chloroplasts. *J Biol Chem* **240**: 1405-1411, 1965.
- 46) Small P, Blankenhorn D, Welty D, Zinser E, Slonczewski JL: Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH. *J Bacteriol* **176**: 1729-1737, 1994.
- 47) Spohn G, Scarlato V: Motility of *Helicobacter pylori* is coordinately regulated by the transcriptional activator FlgR, an NtrC homolog. *J Bacteriol* **181**: 593-599, 1999.
- 48) Spohn G, Scarlato V: The autoregulatory HspR repressor protein governs chaperone gene transcription in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **34**: 663-674, 1999.
- 49) Stead D, Park SF: Roles of Fe superoxide dismutase and catalase in resistance of *Campylobacter coli* to freeze-thaw stress. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3110-3112, 2000.
- 50) Syldatk C, May O, Altenbuchner J, Mattes R, Siemann M: Microbial hydantoinases-industrial enzymes from the origin of life? *Appl Microbiol Biotechnol* **51**: 293-309, 1999.
- 51) Wang G, Alamuri P, Maier RJ: The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **61**: 847-860, 2006.
- 52) Wood ZA, Schroder E, Robin Harris J, Poole LB: Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* **28**: 32-40, 2003.
- 53) Worst DJ, Otto BR, de Graaff J: Iron-repressible outer membrane proteins of *Helicobacter pylori* involved in heme uptake. *Infect Immun* **63**: 4161-4165, 1995.
- 54) Yeo M, Park HK, Kim DK, Cho SW: Restoration of heat shock protein70 suppresses gastric mucosal inducible nitric oxide synthase expression induced by *Helicobacter pylori*. *Proteomics* **4**: 3335-3342, 2004.