

Cytokine Profiles of Macrophages by *Mycobacterium abscessus* Conditional Morphotype Variants and Comparison of Their Extracellular-Protein Expressions

Kil-Soo Lee, Hosung Sohn, Seung-Sub Lee, Byung Soo Lee, Hwa-Jung Kim and Sung Jae Shin*

Department of Microbiology and Research Institute for Medical Sciences, College of Medicine,
Chungnam National University, 6 Munhwa-dong, Jung-gu, Daejeon 301-747, Republic of Korea

Received : June 20, 2008

Revised : July 11, 2008

Accepted : July 17, 2008

Mycobacterium abscessus has been identified as an emerging pulmonary pathogen in humans. Previously, it was documented that a spontaneously formed rough variant of *M. abscessus* causes persistent and invasive infection in mice, while a smooth isogenic variant does not. However, little is known for immune responses elicited by *M. abscessus* variants artificially induced by culture conditions and their culture filtrate antigens. Thus, morphological variants of *M. abscessus* type strain (ATCC19977T) were generated by an acidic and low oxygen culture conditions. Overall comparison between the variant and its original smooth strain showed that the rough variant was less virulent than original smooth strain in murine bone-marrow derived macrophage. To understand the basis for the difference, the protein expression pattern in the culture filtrates of each strain was analyzed by 1-dimensional electrophoresis. Generally, the protein expressions were more influenced by pH conditions than oxygen pressures. Interestingly, several proteins, mainly lower than 30 kDa molecular weight, were uniquely expressed in normal culture conditions. In contrast, several high molecular weight proteins (>55 kDa) were induced by acidic and low oxygen culture conditions. These findings not only provide new insights of association between morphological change and the virulence, but may also be useful in the design of immunological diagnosis and vaccines for *M. abscessus* infection.

Key Words: *Mycobacterium abscessus*, Morphological variants, Culture filtrate, Protein expression

서 론

*Mycobacterium abscessus*는 비결핵 항산균 (nontuberculous mycobacteria, NTM)에 속하며 고체 배지에서 배양 후 7일 이내에 육안으로 집락을 관찰할 수 있는 신속성장균 (rapidly growing mycobacteria)이다 (29). *M. abscessus*

는 과거에 *M. chelonae* subsp. *abscessus*로 분류되었다가 1992년 Kusunoki에 의해 새로운 종으로 명명되었다 (17). *M. abscessus*는 *M. chelonae*와 집락 형태가 동일하며 조면 집락 (rough colony)과 활면집락 (smooth colony)을 동시에 형성한다 (6). 또한 신속성장균 중 인체 감염을 일으키는 비결핵 항산균으로 환경에 주로 존재하며 주로 음용수에서 검출된다 (22). 우리나라와 근접한 일본이나 비교적 결핵의 보고가 적은 미국에서는 NTM 폐질환의 원인균으로 *M. avium* complex (MAC)이 가장 흔하게 보고되고, *M. kansasii*가 두 번째로 많이 보고되며, *M. abscessus*는 상대적으로 적게 검출된다 (20). 반면 국내에서는 특이적으로 MAC 다음으로 *M. abscessus*가 많이 보고되고 있으며, 인체 감염의 약 20% 정도를 차지한다 (14,15). 면역

*Corresponding author: Sung-Jae Shin. Department of Microbiology and Research Institute for Medical Sciences, College of Medicine, Chungnam National University, 6 Munhwa-dong, Jung-gu, Daejeon, 301-747, Republic of Korea.

Phone: +82-42-580-8246, Fax: +82-42-585-3686

e-mail: sjshin@cnu.ac.kr

**This work was funded by the Korea Science and Engineering Foundation (KOSEF) through MOST grant #R01-2007-000-10702-0.

기능이 저하된 환자에서 파종성 감염을 주로 일으키며, 면역 능력이 정상인 환자에서는 수술 후 피부 또는 조직의 국소 감염을 주로 유발한다 (1,22). 결핵균 (*M. tuberculosis* H37Rv)과 더불어 주로 폐질환의 원인균이며 피부질환과 낭포성 섬유증을 일으키고, 낭포성 섬유증 환자에서 *M. avium*과 함께 호흡기 감염의 중요한 원인 균이다 (10,16,18,22). 전 세계적으로 면역저하 환자에서 증가하고 있고 수술 기구 오염에 따른 pseudoinfection을 유발한다 (1,4).

*M. abscessus*는 표면 형태에 따라 조면집락과 활면집락으로 나뉘며 조면집락을 형성하는 균이 활면집락을 형성하는 것보다 더 높은 병원성을 나타내는 경향이 있다 (7,11). 각 집락 사이에 상호 전환이 가능하며 반복적인 계대 배양을 통하여 돌연변이주를 얻을 수 있고, 마우스에 감염시킨 후 감염된 부위로부터 돌연변이주의 분리가 가능하다 (6,7,11). 그러나 최근 연구에서 각 집락을 형성하는 균 사이의 사이토카인 유도능에 차이가 없는 것으로 나타났다 (24). 따라서 각 집락의 표면 형태의 변이 유발에 대한 기작과 병원성에 관련된 구체적인 연구가 더욱 필요하다.

각 형태를 결정하는 것은 세포벽에 존재하는 glycopeptidolipid (GPL) 성분으로 활면집락의 표면에 다량 존재하여 집락화 (colonization), 활주 이동 (sliding motility) 및 생물막 형성 (biofilm formation)에 관여하며 병원성에도 영향을 미친다 (2,6,11). 또한 GPL은 *M. abscessus*의 균 표면에 노출된 지질 중 85% 이상을 구성하며 *M. avium*, *M. chelonae* 그리고 *M. smegmatis*에도 존재한다 (9,23). 현재까지 *M. abscessus*에서 병원성에 관여하는 항원은 GPL에 초점이 맞춰져 있다. 하지만 GPL 외에도 cord factor와 같은 여러 가지 표면 단백질이 세포 형태에 따른 병원성에 연관되어 있을 것이다.

본 연구에서는 산소 분압과 산도에 따른 변형된 배양 조건을 이용하여 집락의 표면 형태가 변화되는지를 확인하였다. 활면집락균과 조면집락균의 특징을 구분시키기 위하여 각 균과 배양농축액을 이용하여 마우스 유래 큰 포식세포에 감염시킨 후 사이토카인 발현 정도와 세포 내 생존율을 각각 비교 분석하였다. 또한 각 조건에 따른 변이주의 배양농축액에 존재하는 단백질 패턴을 전기영동법을 이용하여 비교 분석하였다.

재료 및 방법

1. *Mycobacterium abscessus*의 배양

*M. abscessus*의 표준균주 (ATCC 19977T)를 10% OADC enrichment (Difco, Detroit, MI, USA)를 포함하는 Middlebrook 7H9 배지 (pH 6.8) (Difco)를 사용하여 3~4일 동안 37°C에서 정치 배양하였다. 배양액을 13,000 rpm에서 30 분 동안 원심분리하여 수집한 후 10 mM PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)로 3회 세척하였다. 각각 pH 5.0, 6.0 및 7.5로 산도를 맞춘 변형된 Watson-Reid (mWR) 액체 배지 (per liter: L-asparagine, 5 g; D-glucose, 10 g; glycerol, 63 ml; ammonium hydrogen citrate, 2 g; ferric ammonium citrate, 75 mg; KH₂PO₄, 2 g; NaCl, 2 g; MgSO₄ · 7H₂O, 1 g; ZnSO₄ · 7H₂O, 10 mg; CaCl₂ · 2H₂O, 20 mg; CoCl₂ · 6H₂O, 2 mg)에 *M. abscessus*를 접종한 후 대기압 (O₂ 21%)과 낮은 산소 분압 (O₂ 13%, 5% CO₂)에서 14일까지 정치 배양하였다. 산도는 염산과 암모니아수를 이용하여 적정하였다. 대기압 배양 조건은 T-75 flask (Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)에 mWR 배지를 넣은 후 균을 접종하여 37°C 항온기 (Forma Scientific, Marietta, OH, USA)에서 배양하였고, 낮은 산소 분압 조건은 산소 분압 조절 항온기 (Forma) 내에서 질소 가스로 산소 분압을 조절하여 13% O₂ 조건으로 배양하였다.

2. *M. abscessus*의 배양 농축항원 준비

*M. abscessus*를 pH 5.0, 6.0 및 7.5로 산도를 적정한 mWR 액체 배지에 접종하여 37°C, 21% O₂ 및 13% O₂ 조건에서 14일 동안 배양하였다. 배양 기간이 완료되면 13,000 rpm 초원심분리를 통해 침전된 균을 제거하고 배양상층액을 얻은 후 0.22 µm membrane filter (Millipore, Bedford, MA, USA)로 여과 멸균하였다. YM3 membrane filter (Millipore)를 이용해 초미세여과법 (ultrafiltration)으로 10 ml 이하로 농축하였고 최종적으로 60,000 rpm, 10°C, 3시간 동안 초원심분리한 후 상층액을 얻어서 수용성 단백질만 수집 후 소량씩 분주하여 사용 전까지 -70°C에 보관하였다.

3. *M. abscessus*의 형태 변화 관찰

3일 동안 전배양한 후 계대 배양 전의 *M. abscessus*의 형태를 먼저 관찰하고, *M. abscessus*를 정상 산소 분압

(21% O₂), pH 5.0 및 7.5와 낮은 산소 분압 (13% O₂), pH 5.0에서 배양한 균을 7H10 고체 배지 (Difco)에 접종하여 3~7일 배양 후 형태를 비교 관찰하였다. *M. abscessus*의 형태 분석을 위해 7H10 고체 배지에서 배양된 균체를 광학현미경 (IX50, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하고, 비교하고자 하는 집락의 형태는 동일한 배율을 적용하여 디지털 카메라로 이미지를 얻었다.

4. 마우스 골수 유래 큰포식세포 (bone-marrow derived macrophage, BMDM) 준비

6~8주령 C57BL/6 마우스 (KOATECH, Pyung-Tek, Korea)의 골수로부터 plain Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Bio Whittaker, Taufkirchen, Germany)를 이용하여 골수세포를 얻은 후 Shin, *et al.*의 방법을 변형하여 마우스 골수 유래 큰포식세포 (BMDM)를 분리하였다 (26). 약술하면, 마우스의 대퇴부를 절단하여 피부와 근육부분을 제거하고, 18 게이지 바늘이 연결된 주사기와 plain DMEM을 이용하여 경골로부터 골수를 채취하였다. 피펫을 이용하여 골수세포를 균일하게 부유한 후 Cell strainer (Falcon)를 이용하여 찌꺼기 부분을 거른 후 필터를 통과한 세포 부유액을 1,200 rpm, 20°C, 5 min 동안 원심분리하였다. 상층액 제거 후 세포를 plain DMEM을 이용하여 1회 세척하였다. 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, Logan, UT, USA), 1% antibiotics (100 U of penicillin/ml and 100 µg of streptomycin/ml; Hyclone), 5×10⁻⁵ β-mercaptoethanol (Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 mM sodium pyruvate (Sigma) 그리고 M-CSF의 source로 10% L929 cell-conditioned supernatant가 포함된 DMEM 배지를 이용하여 골수세포를 5×10⁵ cells/ml 농도로 부유시켜 48 well plate에 500 µl씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 4일 동안 배양하였다. 4일 배양 후 PBS를 이용하여 mechanical disruption에 의해 상층액에 부유된 세포는 제거하고 plate 바닥 표면에 부착된 세포를 얻었다. 37°C로 가온한 plain DMEM 배지를 부착된 세포에 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 1일 동안 resting 하였고, 5% FBS가 첨가된 DMEM 배지로 갈아준 후 부착된 세포를 mature BMDM으로 사용하였다.

5. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 이용한 사이토카인의 측정

산소 분압과 산도가 변형된 배양 조건에서 배양한 *M.*

*abscessus*의 세포의 분비항원을 최종 농도 1 µg/ml이 되도록 BMDM에 자극하였다. 4, 24 그리고 72시간 동안 배양된 세포 배양상층액을 eppendorf tube로 옮겨 담고 vortexing하였다. 15,000 rpm에서 3분간 원심분리 후 상층액을 얻어 ELISA 실험 전까지 -20°C에서 보관하였다. Mouse IL-12p40 set와 TNF-α set (eBioscience, San Diego, CA, USA)를 이용하여 상층액 속의 사이토카인을 측정하였다. 모든 실험은 2회 이상 반복하여 그 평균치를 구하였고, 평균치에서 background control에서 얻은 수치를 제거하였다. 각 plate에서 mouse IL-12p40는 4~300 pg/ml standard를 사용하였고, mouse TNF-α는 16~1000 pg/ml standard를 사용하여 환산하였다.

6. 세포 내 생존을 비교 (intracellular survival assay)

마우스 BMDM을 5×10⁵ cells/ml 농도로 부유시켜 37°C, 5% CO₂ 조건에서 4일 동안 48-well cell culture plate (Falcon 3047; Falcon)에 500 µl씩 부착시켰다. 부착되지 않은 상층액은 PBS를 이용하여 세척 후 제거하였고 부착된 BMDM 세포만 취하여 실험에 사용하였다. *M. abscessus* 균을 각 배양 조건별로 준비하여 MOI (multiplicity of infection) 1:1이 되도록 감염시켰다. 4시간 감염 후 감염되지 못한 상층액 내의 균을 PBS로 세척하여 제거하였다. 멸균된 증류수를 이용하여 세포를 파괴시킨 후 세포 내 생존 균 수를 7H10 고체 배지에서 plate counting 방법을 이용하여 측정하였고 3일까지 비교 관찰하였다.

7. 단백질의 농도 측정

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

8. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 분석

SDS-PAGE의 acrylamide 농도는 하층 12%, 상층 4.5%의 겔을 사용하였다. 전기영동 완충액을 채운 후 80 V에서 15분 동안 전기영동 후 100 V에서 마커가 겔을 통과할 때까지 전기영동하였다. 겔은 Coomassie brilliant blue R250 (Bio-Rad)로 염색하였다. 각 겔의 이미지는 gel

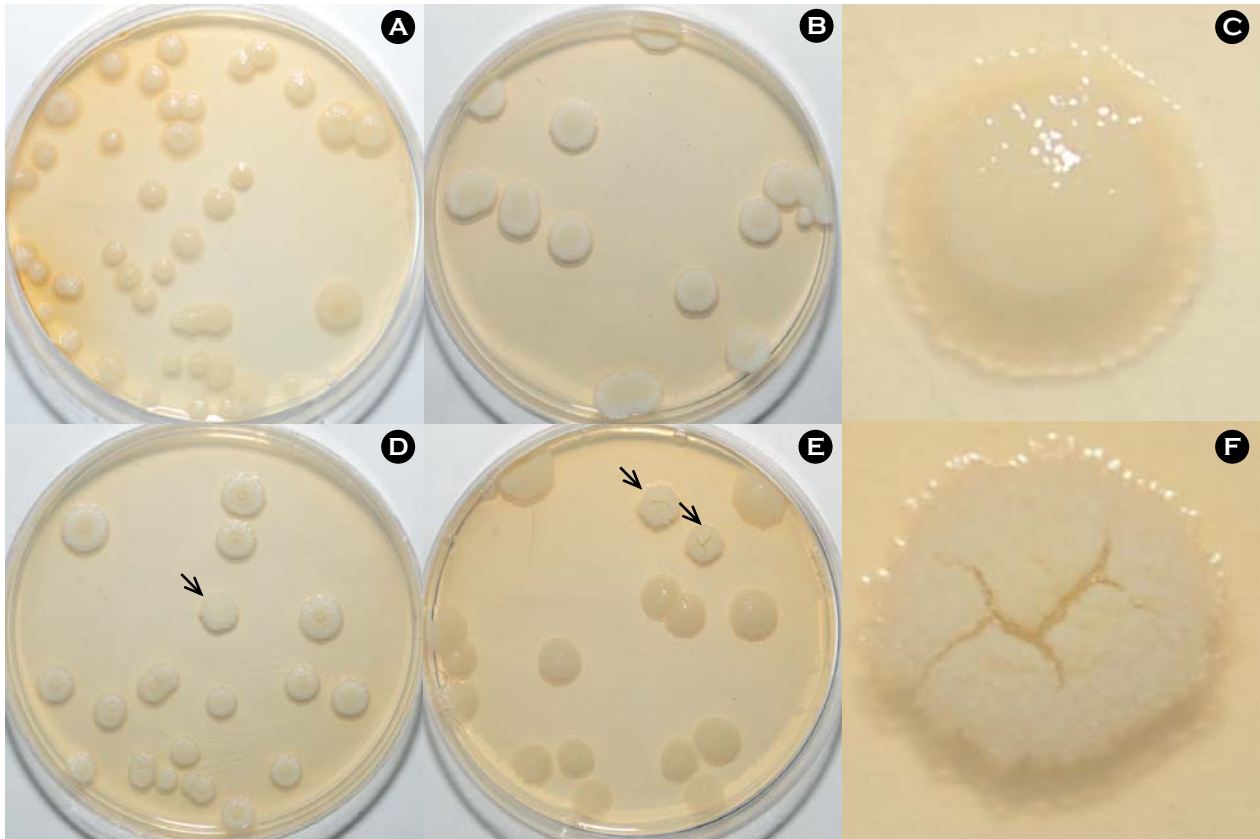


Figure 1. Colony morphology of *M. abscessus* type strain under variable culture conditions. (A) Normal oxygen tension (21%) and pH 6.0, (B) pH 7.5, (D) pH 5.0 and (E) low oxygen tension (13%), pH 5.0 culture conditions affected the morphology of *M. abscessus*. The smooth (C) and rough (F) variants were obtained from modified culture conditions after 7 days of incubation on 7H10 agar plate at 37°C. The arrows indicate rough variants of *M. abscessus*.

documentation system (Gel Doc 2000; Bio-Rad)을 이용하여 단백질의 패턴 분석을 실시하였다.

9. 통계적 분석

데이터는 독립적인 실험들로부터 얻었으며 평균 \pm 표준편차 값으로 제시하였다. 모든 데이터는 Student's *t*-test를 이용하여 분석하였고 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. 배양 조건에 따른 *M. abscessus*의 세포 모양 변화

*M. abscessus*의 세포 표면 모양 변화를 유도 및 관찰하고자 산소 분압을 13%로 낮추고, 산도를 pH 7.5 또는 pH 5.0으로 변형시킨 mWR 배지에서 7일간 배양하였다. 계대 배양 후 7H10 고체 배지에 재배양시켰을 때 pH 7.5 조건에서 자란 균주는 원래의 활면집락 형태를 유지하였

다 (Fig. 1A, B). 반면, pH 5.0에서 배양된 경우 균주의 일부분이 조면집락을 형성하는 것을 관찰하였다 (Fig. 1D, E). 또한 산소 분압이 낮을수록 조면집락의 형성 빈도가 증가하였다 (Fig. 2). 산도 조건만 pH 5.0으로 낮췄을 경우, 조면집락의 형성 빈도는 약 7.5% 정도였으나, 산소 분압을 13%로 낮추고 pH 5.0 배지에서 배양한 경우에는 조면집락이 약 14% 정도의 빈도를 나타내었다. 조면집락 형성균주를 7H9 (pH 6.8) 액체 배지에 5일 배양 후 7H10 고체 배지에 반복적으로 계대 배양하였을 때 활면집락으로 변하지 않고 비가역적인 조면집락 형태를 지속적으로 유지하였다 (결과를 그림으로 나타내지 않았다). 현미경 상으로 관찰한 결과 활면집락은 변연부로 갈수록 투명해지며 전체적으로 표면에 윤기가 있고 매끈한 반면, 조면집락은 표면이 거칠고 코드 (cord)를 형성하며 전체적으로 불투명한 특징을 나타내었다 (Fig. 1C, F).

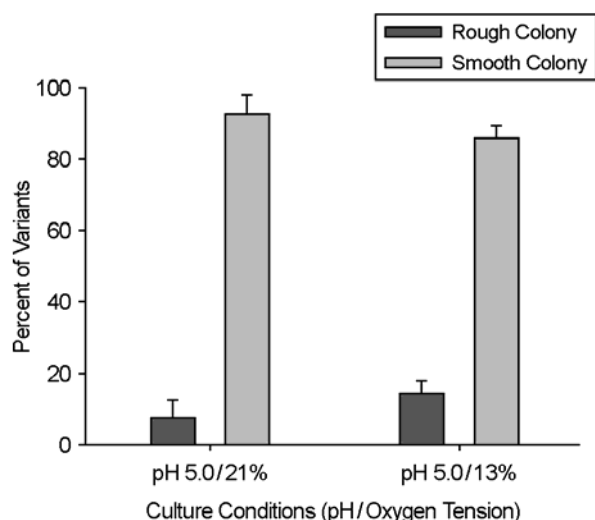


Figure 2. The frequency of morphotype changes under acidic and low oxygen tension culture conditions. *In vitro* conditional culture system affects the colony morphology of *M. abscessus*. Rough colonies of *M. abscessus* have mutated from smooth type strain.

2. *M. abscessus* 집락간 BMDM 내 생존 능력 비교

M. abscessus 활면집락과 낮은 산소 및 산도 배양 조건에 의해 표면 형태가 변화된 *M. abscessus* 조면집락과 세포 내 생존능력에 관한 차이를 확인하기 위하여, C57BL/6 마우스의 BMDM을 이용하여 각 균주를 감염시킨 후 BMDM 내 생존률을 비교 관찰하였다 (Fig. 3). MOI 1:1이 되도록 감염시킨 후 3일까지 비교하였을 때, 감염 후 1일까지는 4가지 조건의 균주의 BMDM 내 생존율에서 모두 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 3일이 지난 후 생존율을 비교했을 때 활면집락을 형성한 균주 (# 1, # 4)들이 조면집락을 형성한 균주 (# 2, # 3)에 비해 BMDM 내에서 더 많이 생존하였다 (Fig. 3). MOI 0.1 농도로 소량의 균을 감염시켰을 경우에도 동일한 결과를 나타내었다 (결과를 그래프로 나타내지 않았다). BMDM 감염 후 7H10 고체 배지에서 균의 표면 형태 변화를 관찰한 결과 # 1 및 # 4 균주들은 활면집락 형태를 유지하였고, # 2과 # 3 균주들은 조면집락이 주를 이루고 활면집락균이 혼합되어 형성되었으며, # 2보다는 # 3 균주가 더 높은 비율로 조면집락이 형성되었다. 또한 *in vitro* 상에서 배양했을 때보다 조면집락의 발생 빈도가 높게 나타났다 (결과를 그래프로 나타내지 않았다).

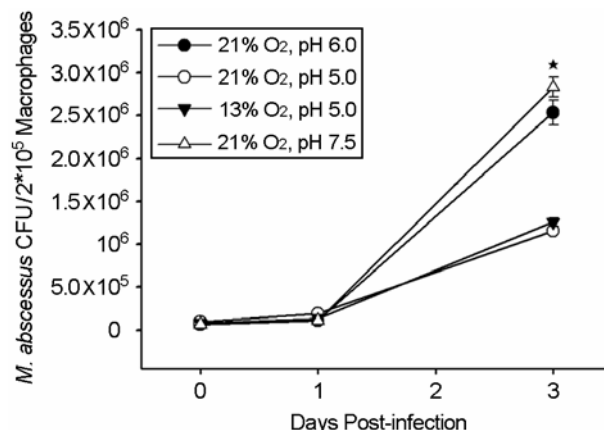


Figure 3. Growth of *M. abscessus* conditional variants strains in BMDM. *M. abscessus* # 1 (●) and # 4 (△) survive and more actively multiply in BMDMs than *M. abscessus* # 2 (○) and # 3 (▼). BMDMs were infected with 2.5×10^5 *M. abscessus* strains for 4 h. Bacterial cfu in cell lysates was determined at the indicated intervals. Data are the mean of duplicated determinations of two separate experiments. Data are presented as the mean \pm SD of two experiments. Significant differences (* $p < 0.05$) compared with conditional morphotype variants are indicated. *M. abscessus* strains were grown under each indicated condition as # 1 (●); 21% O₂, pH 6.0, # 2 (○); 21% O₂, pH 5.0, # 3 (▼); 13% O₂, pH 5.0, and # 4 (△); 21% O₂, pH 7.5.

3. *M. abscessus*의 조면집락과 활면집락 감염 및 배양 농축액에 의한 사이토카인 유도능 비교

활면집락균 (# 1)과 조면집락균 (# 3)을 BMDM에 감염시킨 후 4, 24 및 72시간에 BMDM에서의 사이토카인 유도능을 비교 분석하였다. 조면집락균에 의해 유도되는 TNF- α 의 양은 활면집락균에 의해 유도되는 것보다 유의하게 낮았다. TNF- α 는 24시간 이전에는 큰 차이가 없었지만, 72시간 이후에 활면집락균에 의한 사이토카인의 분비가 10배 이상 증가되었다 (Fig. 4A). IL-12p40의 경우 72시간에서 조면집락균에 의한 분비 유도에 비해 활면집락균에 의한 IL-12p40의 분비가 증가되었지만 유의한 차이는 없었다 (Fig. 4B).

반면 각 집락의 배양농축액 (# 1 CF, # 3 CF)으로 자극한 세포로부터 유도된 사이토카인 분비는 균에 의한 유도와 다른 양상이 관찰되었다. TNF- α 의 경우 배양농축액 처리 초기에 급격히 분비가 유도되었다. 그러나 배양농축액 또한 균을 감염시킨 경우와 유사하게 활면집락균의 배양농축액에서 더 많은 TNF- α 가 분비되었다. 반면 균에 의한 TNF- α 분비와 다르게 시간이 경과됨에 따라 TNF- α 의 분비량은 감소하였다. 배양농축액에 의한 IL-12p40 분비 유도는 균에 의한 유도능과 유사한 양상

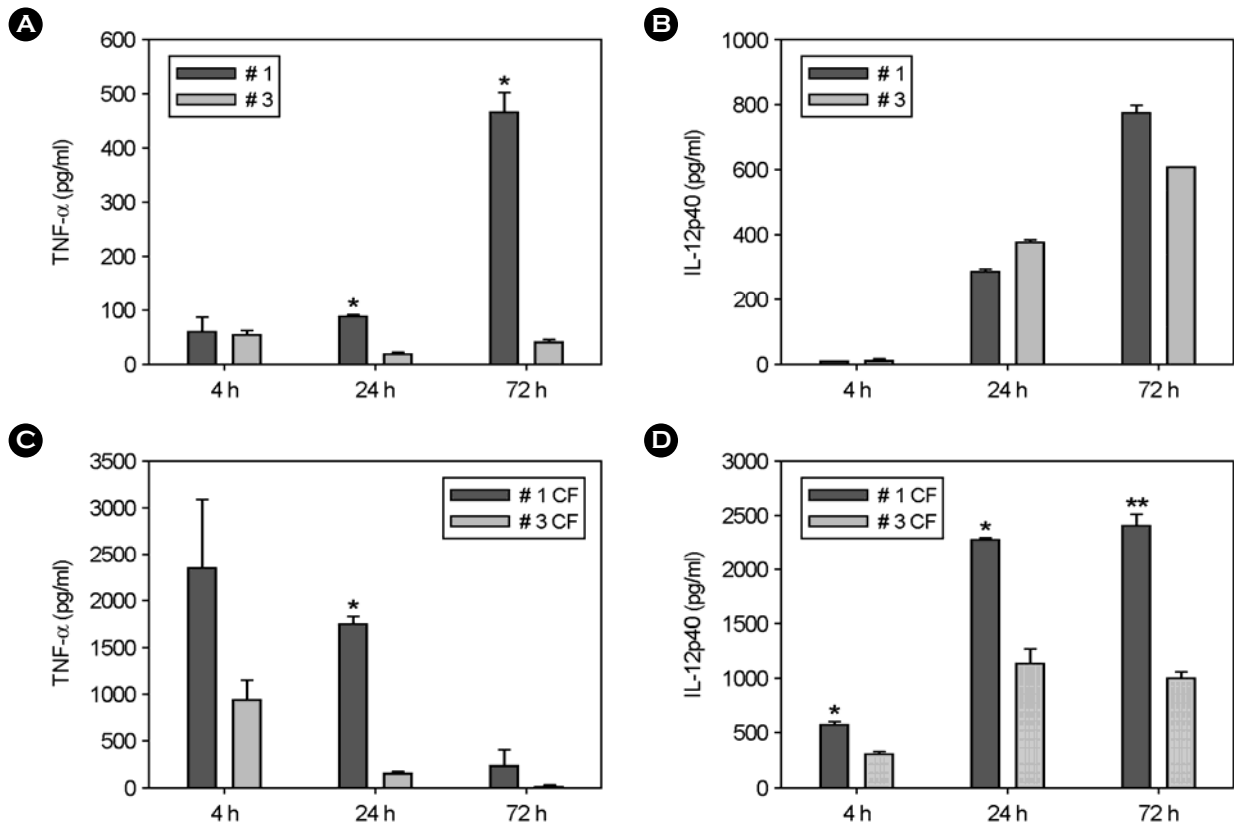


Figure 4. TNF- α and IL-12p40 production in BMDMs stimulated with *M. abscessus* conditional variants and treated with culture filtrate (CF). BMDMs were infected for 4 hr with *M. abscessus* # 1 and # 3 variants at a MOI of 1:1, washed three times, and further incubated for 72 hr (A, B). The CF was used at a concentration of 1 μ g/ml (C, D). TNF- α and IL-12p40 were measured in culture supernatants at 4, 24 and 72 hr post-infection. Data are presented as the mean \pm SD of three experiments. Significant differences (* p <0.05; ** p <0.01) compared with strain or CF of smooth variant are indicated.

을 나타내었다. 24시간 이후 IL-12p40의 양은 큰 차이가 없이 72시간까지 유지되었다. 균에 의한 TNF- α 및 IL-12p40 유도와 달리, 동일 농도의 CF를 자극했을 경우 4 시간과 24시간에서 TNF- α 의 경우 약 2.5~10배 분비 차이를 보이고, IL-12p40 분비 수준은 4, 24 및 72시간에서 약 2배 차이를 보였다 (Fig. 4C, D).

4. 산소 분압 및 산도 변화에 의한 단백질 발현 양상 비교

배양 조건에 따른 균 배양액을 농축하여 일차원 전기영동법으로 분리한 후 각각의 단백질 패턴을 비교 분석하였다. 정상 산도 (pH 6.0) 또는 pH 7.5 배지에서 배양한 균 배양농축액의 경우 낮은 산도 (pH 5.0)에서 배양한 배양농축액과 비교 시 30 kDa 이하의 단백질의 발현이 산도가 높을수록 많이 증가되었다. 반면 낮은 산도 조건에서는 55 kDa 이상의 단백질 발현이 유의하게 증가되는 경향을 보였으나, 55 kDa 이하의 단백질은 대체로 감소되

었다 (Table 1, Fig. 5). 정상 조건보다 산도가 높은 경우에 대부분의 단백질 발현 패턴이 정상 조건과 유사했으나, 21 kDa와 25 kDa 위치의 단백질이 유의하게 증가되었다. 그러나 낮은 산도 조건 (pH 5.0)에서 산소 분압을 21%와 13%로 다르게 배양하였을 때 발현되는 단백질 패턴에서는 산소 분압에 따른 특이적인 차이점을 관찰할 수 없었다 (Table 1, Fig. 5).

고 찰

본 연구에서는 배양 조건에 따른 *M. abscessus*의 세포 표면 변화를 관찰하였다. 배양 배지의 산도를 낮추고 산소 분압을 정상보다 낮추었을 경우, 활면집락의 *M. abscessus* 균주로부터 조면집락으로 세포 표면 형태가 변화된 균주를 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 *M. abscessus* 균주를 이용하여 배양 조건에 따른 세포 형태의 변화

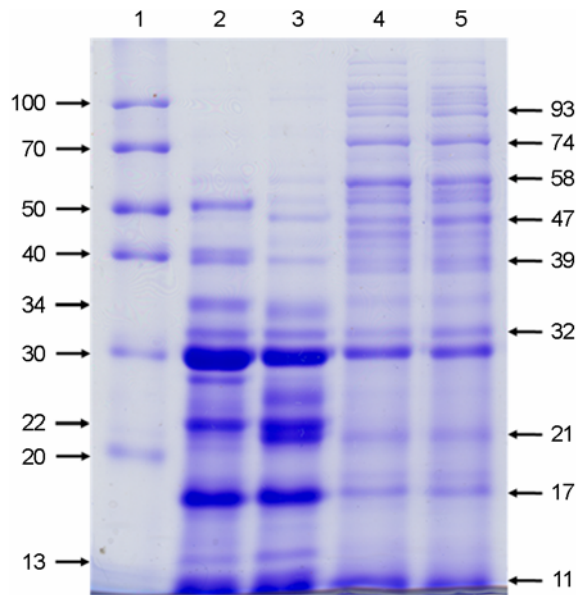


Figure 5. Comparison of the culture filtrate (CF) protein profiles from *M. abscessus* variants grown under 21% O₂, pH 6.0 (2), 21% O₂, pH 7.5 (3), 21% O₂, pH 5.0 (4), 13% O₂, pH 5.0 (5) conditions. The first lane (1) was loaded with protein molecular weight marker. The CF proteins (30 µg of total proteins for each lane) were separated by 12% SDS-PAGE. The gel was stained with 0.25% Coomassie brilliant blue R250.

유도에 대한 첫 번째 보고이다. 활면집락에서 조면집락으로 변이가 일어나는 것은 *M. abscessus* 및 MAC 등에서 기존에 보고된 바 있으며, GPL에 변이가 생겨 발현되지 않을 경우 조면집락을 형성한다 (8,9,11). 기존 보고에 의하면 조면집락 형성균이 활면집락균에 비해 병원성이 높은 것으로 나타났으며 뿐만 아니라 *ex vivo* 및 *in vivo*에서 생존율도 높았다 (7,11). TNF- α 유도능 또한 조면집락이 유의하게 높은 것으로 보고되었다 (7). 그리고 *M. abscessus*는 BMDM에서 IL-12p40를 유도하나 (26) 조면집락과 활면집락 사이에서 IL-12p40 유도능을 비교한 보고는 없었다. 그러나 *in vitro*에서 배양 조건을 변형시켜 활면집락균으로부터 조면집락 형태로 변형시켰을 때, BMDM 내 생존율을 비교한 결과 활면집락형성 균보다 산소분압과 산도를 낮춘 배양 조건에 의해 변형된 조면집락균의 BMDM 내 성장률이 낮게 관찰되었다 (Fig. 3). 또한 초기 염증 반응에 관련된 TNF- α 발현 수준이 *M. abscessus* 감염 후 72시간에서 활면집락균보다 조면집락균에서 유의하게 낮게 유도되었다 (Fig. 4A). 보고에 의하면 조면집락균은 활면집락균에 비해 cord factor가 발달되어 있는데, cord factor는 결핵균에서 TNF- α 를 유도할

Table 1. Comparison of differentially expressed proteins under variable culture conditions

| Protein bands (kDa) | *Compared with mWR-pH 6.0 (21%), change of protein expression in; | | |
|---------------------|---|--------------|--------------|
| | pH 7.5 (21%) | pH 5.0 (13%) | pH 5.0 (21%) |
| 127 | - | ↑ | ↑ |
| 114 | - | ↑ | ↑ |
| 101 | - | ↑ | ↑ |
| 93 | - | ↑ | ↑ |
| 74 | - | ↑ | ↑ |
| 58 | - | ↑ | ↑ |
| 55 | - | ↑ | ↑ |
| 52 | ↓ | ↓ | ↓ |
| 48 | ↑ | - | - |
| 47 | - | ↑ | ↑ |
| 44 | - | ↑ | ↑ |
| 41 | ↓ | ↓ | ↓ |
| 39 | ↓ | ↓ | ↓ |
| 38 | - | ↑ | ↑ |
| 34 | ↓ | ↓ | ↓ |
| 33 | ↑ | - | - |
| 31 | - | ↓ | ↓ |
| 30 | - | ↓ | ↓ |
| 28 | ↓ | ↓ | ↓ |
| 25 | ↑ | - | - |
| 22 | - | ↓ | ↓ |
| 21 | ↑ | ↑ | ↑ |
| 20 | ↓ | ↓ | ↓ |
| 18 | - | - | - |
| 17 | - | ↓ | ↓ |
| 13 | ↑ | ↓ | ↓ |
| 11 | - | ↓ | ↓ |

* Arrows indicate the expression levels of *M. abscessus* extracellular-proteins cultivated in each culture condition compared with those produced from normal condition (21% O₂, pH 6.0). The up-arrow (↑), down-arrow (↓), and hyphen (-) represent the increased (or present), decreased (or absent), and same (not significantly different) level of protein expressions to normal culture condition, respectively.

수 있는 병원성 인자이며 cell-to-cell spread를 용이하게 한다 (5,12). 그러나 낮은 산도 및 낮은 산소분압 배양 조건에 의해 형성된 조면집락 변이주에서는 기존의 보고

와 달리 TNF- α 유도가 일어나지 않았으며 정반대의 경향을 나타냈다 (Fig. 4A). 또한 IL-12p40 역시 조면집락 변이주보다 활면집락균에 의해 더 높은 유도능을 나타내었다 (Fig. 4B). 이것은 BMDM에 감염된 후 BMDM 내에서 활면집락균의 증식 속도가 활면집락균과 조면집락균이 혼합되어 있는 경우보다 더 빠른 것과 관련이 있을 것이다. 또한 기존의 보고가 자연 발생적인 변이주를 선별한 것에 반해, 본 연구에서는 인위적인 변이 유도로 인해 *M. abscessus*가 생리적으로 약해질 가능성이 있다. 특이하게도 *in vitro* 상에서 pH 5.0으로 13% 산소 분압 조건하에서 배양했을 경우, 조면집락 형성 빈도가 20%에 미치지 못했으나, BMDM 감염 후 세포 내에서 생존한 집락을 배양한 결과에서는 조면집락의 형성 빈도가 매우 증가하였다. 조면집락균이 BMDM 감염 시 세포 내에서 활면집락균보다 증식 능력이 우수한 것인지, 낮은 산도와 저산소 분압에서 배양한 균주가 BMDM 내에서 조면집락균으로 변이되는 빈도가 높아지는 것인지에 대한 명확한 기작은 아직 밝혀지지 않았다. 세포 내 생존을 비교 결과 활면집락균을 감염시킨 조건에서 조면집락균이 형성되지 않았다. 반면, 활면집락으로부터 조면집락으로 변이된 균주를 포함하는 집락균을 BMDM에 감염시켰을 때, 조면집락균의 수가 감염 전보다 BMDM 내에서 증식한 후에 더욱 증가하였다. 이 결과를 통해 비록 BMDM 내에서 증식하는 속도는 조면집락균과 활면집락균의 혼합균이 활면집락균만 존재하는 경우보다 느릴지라도, 활면집락균과 혼합되어 감염시킬 경우 조면집락균의 증식 능력이 활면집락균보다 더 높다는 것을 추정할 수 있다.

GPL은 활면집락균의 형태 유지에 관여하는 또 하나의 병원성 인자이다 (11,27). GPL은 활면집락균 표면에 존재하며 결핍 시 조면집락균으로 변화된다 (8). 또한 숙주 면역 체계를 억제하여 병원성을 나타내며 사람의 큰포식 세포의 탐식작용을 억제하고, BMDM에서 TNF- α 의 분비 유도를 억제한다 (13,28). 또한 고병원성의 결핵균인 *M. tuberculosis* W-Beijing family의 경우 TNF- α 의 분비를 억제하고, 전염증 반응에 관여하는 IL-12p40의 발현을 조절하는 특이적인 당지질이 존재한다 (19). 이러한 결과들은 세포 표면에 존재하는 GPL이 활면집락균의 염증 반응 억제와 연관되어 있음을 나타낸다. 그러나 정제된 deacetylated GPL이 TNF- α 의 분비를 억제하지 못하고 병원성을 증가시키지 못한다는 보고가 있으므로 GPL 외의

항원에 대한 추가적인 연구가 필요하다 (7).

사이토카인 분비 분석 결과, 균을 감염시켰을 때와 비교했을 때 CF를 직접 처리한 후의 TNF- α 및 IL12p40의 발현 양상에 차이를 보였다 (Fig. 4). CF의 최종 처리 농도가 1 μ g/ml임을 감안할 때, 분비항원이 BMDM의 사이토카인 분비에 미치는 영향은 살아있는 균에 의해서 분비되는 단백질이 숙주의 면역반응 유도에 매우 중요하다는 것을 반영한다.

따라서 본 연구에서는 GPL보다는 세포의 분비항원에 중점을 두었으며, 두 균주의 단백질 발현 양상을 비교 분석한 결과 조면집락을 형성하는 균과 활면집락을 형성하는 균의 단백질 양상이 현저하게 차이를 확인하였다 (Fig. 5). *M. abscessus* 균주를 pH 6.0에서 2주 정도 배양한 후 배지의 pH는 7.3~7.6 정도로 높아진다. 또한 *M. abscessus*에서 산소 분압이 단백질 발현에 미치는 영향보다 배지의 pH가 단백질 발현에 더욱 큰 영향을 주기 때문에 pH를 중심으로 비교 분석하였다. 분비항원은 살아있는 균에 의해서 발현되는 것으로, 결핵이나 다른 미코박테리아에 의한 감염에서도 병원성 인자뿐만 아니라 진단이나 백신의 후보 물질이 배양농축액 내에 많이 존재한다 (21,25). 그러므로 *M. abscessus*의 분비항원에 대한 연구는 질병의 과정을 이해하고 병원성 인자를 찾는 데 매우 중요하며, 환경에 대한 적응 기작 연구의 중요한 기초가 될 것이다.

산소 분압 차이로 인한 단백질 발현 양상 변화는 뚜렷하게 나타나지 않았지만, 산도 조건을 산소 분압과 동시에 적용시켰을 경우 단백질의 패턴이 유의하게 변화되는 것을 관찰하였다 (Fig. 5). 특히 산도가 pH 5.0이고 산소 분압이 13%인 경우에 분자량이 35 kDa 이상 되는 위치에서 유의하게 증가되는 band를 다수 관찰할 수 있었다. 또한 이와 대조적으로 35 kDa 이하에서 유의하게 감소되는 band도 확인하였다 (Fig. 5, Table 1). 단백질 패턴 분석 결과 산소 분압에 의한 영향보다 산도 조건 변화에 따른 단백질 발현 유무가 더욱 영향을 받는 것으로 추정된다. 이러한 단백질 패턴의 차이는 세포 표면 형태 변화와 밀접하게 관련되어 있으며, 특히 세포 내 생존율을 증가시키는데 관여하거나 사이토카인 분비를 유도하는데 연관되어 있을 것이다. MAC의 경우 큰포식세포에 의해 탐식되었을 때 31 kDa에서 90 kDa의 분자량을 갖는 여러 단백질의 발현이 증가되었다 (3). 탐식 후 세포 내의 환경 조건이 산도가 낮고 산소 분압이 낮아졌다는

것을 가정하면, *in vitro*에서 배양 조건의 변화가 BMDM 내의 환경에서와 유사한 단백질 발현 양상의 변화를 유도한 것으로 판단된다.

따라서 세포 형태에 따른 병원성에 관련된 단백질을 동정 및 분석하는 과정이 필요하며, GPL 및 cord factor를 비롯한 병원성 인자와 결핵균의 표면 항원에 관한 연구는 *M. abscessus*에 의한 병인 기작을 규명하는데 도움을 줄 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Bartralot R, Pujol RM, Garcia-Patos V, Sitjas D, Martin-Casabona N, Coll P, Alomar A, Castells A: Cutaneous infections due to nontuberculous mycobacteria: histopathological review of 28 cases. Comparative study between lesions observed in immunosuppressed patients and normal hosts. *J Cutan Pathol* **27**: 124-129, 2000.
- 2) Belisle JT, Brennan PJ: Chemical basis of rough and smooth variation in mycobacteria. *J Bacteriol* **171**: 3465-3470, 1989.
- 3) Bermudez LE, Petrofsky M: Regulation of the expression of *Mycobacterium avium* complex proteins differs according to the environment within host cells. *Immunol Cell Biol* **75**: 35-40, 1997.
- 4) Blossom DB, Alelis KA, Chang DC, Flores AH, Gill J, Beall D, Peterson AM, Jensen B, Noble-Wang J, Williams M, Yakus MA, Arduino MJ, Srinivasan A: Pseudo-outbreak of *Mycobacterium abscessus* Infection Caused by laboratory contamination. *Infect Control Hosp Epidemiol* **29**: 57-62, 2008.
- 5) Byrd TF: Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) promotes growth of virulent *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes iron-mediated growth suppression is correlated with decreased release of TNFalpha from iron-treated infected monocytes. *J Clin Invest* **99**: 2518-2529, 1997.
- 6) Byrd TF, Lyons CR: Preliminary characterization of a *Mycobacterium abscessus* mutant in human and murine models of infection. *Infect Immun* **67**: 4700-4707, 1999.
- 7) Catherinot E, Clarissou J, Etienne G, Ripoll F, Emile JF, Daffé M, Perronne C, Soudais C, Gaillard JL, Rottman M: Hypervirulence of a rough variant of the *Mycobacterium abscessus* type strain. *Infect Immun* **75**: 1055-1058, 2007.
- 8) Eckstein TM, Inamine JM, Lambert ML, Belisle JT: A genetic mechanism for deletion of the *ser2* gene cluster and formation of rough morphological variants of *Mycobacterium avium*. *J Bacteriol* **182**: 6177-6182, 2000.
- 9) Etienne G, Villeneuve C, Billman-Jacobe H, Astarie-Dequeker C, Dupont MA, Daffé M: The impact of the absence of glycopeptidolipids on the ultrastructure, cell surface and cell wall properties, and phagocytosis of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **148**: 3089-3100, 2002.
- 10) Hayes D Jr: *Mycobacterium abscessus* and other non-tuberculous mycobacteria: evolving respiratory pathogens in cystic fibrosis: a case report and review. *South Med J* **98**: 657-661, 2005.
- 11) Howard ST, Rhoades E, Recht J, Pang X, Alsup A, Kolter R, Lyons CR, Byrd TF: Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiology* **152**: 1581-1590, 2006.
- 12) Hunter RL, Venkataprasad N, Olsen MR: The role of trehalose dimycolate (cord factor) on morphology of virulent *M. tuberculosis* in vitro. *Tuberculosis (Edinb)* **86**: 349-356, 2006.
- 13) Irani VR, Maslow JN: Induction of murine macrophage TNF-alpha synthesis by *Mycobacterium avium* is modulated through complement-dependent interaction via complement receptors 3 and 4 in relation to *M. avium* glycopeptidolipid. *FEMS Microbiol Lett* **246**: 221-228, 2005.
- 14) Jeon K, Koh WJ, Kwon OJ, Suh GY, Chung MP, Kim H, Lee NY, Park YK, Bai GH: Recovery rate of NTM from AFB smear-positive sputum specimens at a medical centre in South Korea. *Int J Tuberc Lung Dis* **9**: 1046-1051, 2005.
- 15) Koh WJ, Kwon OJ, Jeon K, Kim TS, Lee KS, Park YK, Bai GH: Clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolated from respiratory specimens in Korea. *Chest* **129**: 341-348, 2006.
- 16) Koh WJ, Kwon OJ, Lee KS: Nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases in immunocompetent patients. *Korean J Radiol* **3**: 145-157, 2002.
- 17) Kusunoki S, Ezaki T: Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov., nom. rev., and elevation of *Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus* (Kubica et al.) to species status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 240-245, 1992.
- 18) Le Bourgeois M, Sermet-Gaudelus I, Catherinot E, Gaillard JL: Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis. *Arch*

- Pediatr* **12**: S117-S121, 2005.
- 19) **Manca C, Tsenova L, Freeman S, Barczak AK, Tovey M, Murray PJ, Barry C, Kaplan G**: Hypervirulent *M. tuberculosis* W/Beijing strains upregulate type I IFNs and increase expression of negative regulators of the Jak-Stat pathway. *J Interferon Cytokine Res* **25**: 694-701, 2005.
 - 20) **Marras TK, Daley CL**: Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med* **23**: 553-567, 2002.
 - 21) **Mustafa AS**: Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis. *Mol Immunol* **39**: 113-119, 2002.
 - 22) **Petrini B**: *Mycobacterium abscessus*: an emerging rapid-growing potential pathogen. *APMIS* **114**: 319-328, 2006.
 - 23) **Ripoll F, Deshayes C, Pasek S, Laval F, Beretti JL, Biet F, Risler JL, Daffé M, Etienne G, Gaillard JL, Reytrat JM**: Genomics of glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae*. *BMC Genomics* **8**: 114, 2007.
 - 24) **Sampaio EP, Elloumi HZ, Zelazny A, Ding L, Paulson ML, Sher A, Bafica AL, Shea YR, Holland SM**: *M. abscessus* and *M. avium* Trigger Toll like Receptor 2 and Distinct Cytokine Response in Human Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* [Epub ahead of print], 2008.
 - 25) **Sharma K, Chopra P, Singh Y**: Recent advances towards identification of new drug targets for *Mycobacterium tuberculosis*. *Expert Opin Ther Targets* **8**: 79-93, 2004.
 - 26) **Shin DM, Yang CS, Yuk JM, Lee JY, Kim KH, Shin SJ, Takahara K, Lee SJ, Jo EK**: *Mycobacterium abscessus* activates the macrophage innate immune response via a physical and functional interaction between TLR2 and dectin-1. *Cell Microbiol* [Epub ahead of print], 2008.
 - 27) **Torrelles JB, Ellis D, Osborne T, Hoefler A, Orme IM, Chatterjee D, Brennan PJ, Cooper AM**: Characterization of virulence, colony morphotype and the glycopeptidolipid of *Mycobacterium avium* strain 104. *Tuberculosis (Edinb)* **82**: 293-300, 2002.
 - 28) **Villeneuve C, Etienne G, Abadie V, Montrozier H, Bordier C, Laval F, Daffe M, Maridonneau-Parini I, Astarie-Dequeker C**: Surface-exposed glycopeptidolipids of *Mycobacterium smegmatis* specifically inhibit the phagocytosis of mycobacteria by human macrophages. Identification of a novel family of glycopeptidolipids. *J Biol Chem* **278**: 51291-51300, 2003.
 - 29) **Wallace RJ Jr.**: Recent changes in taxonomy and disease manifestations of the rapidly growing mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **13**: 953-960, 1994.
-