Journal of Bacteriology and Virology 2015. Vol. 45, No. 1 p.36 – 43
http://dx.doi.org/10.4167/jbv.2015.45.1.36

Original Article

Prediction of Nuclear Targeting Proteins with Nuclear Localization Signals in *Staphylococcus aureus* and Nuclear Targeting of β-lactamase in Host Cells

Sung Hoon Ahn, Jung Hwa Lee and Je Chul Lee*

Department of Microbiology, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu, Korea

Nuclear targeting of bacterial proteins in host cells and subsequent interaction with nuclear molecules are an emerging pathogenic mechanism of bacteria. In this study, we predicted the nuclear targeting proteins with nuclear localization signals (NLSs) in *Staphylococcus aureus* using bioinformatic analysis. A total of 51 proteins of *S. aureus*, comprising of 24 functional and 27 hypothetical proteins, were predicted to carry putative NLSs. Among them, β-lactamase and MsrR proteins with the putative NLSs were selected to determine the nuclear targeting in host cells. Fusion proteins of BlaZ-green fluorescent protein (GFP) were evenly distributed in the nuclei of host cells and subsequently induced host cell death. However, fusion proteins of MsrR-GFP were not localized in the nuclei of host cells In conclusion, screening of nuclear targeting proteins with NLSs and determination of their pathology in host cells may open up the new field of *S. aureus* pathogenesis.

Key Words: Nuclear targeting proteins, Bioinformatics, Pathogenesis, Cell death

INTRODUCTION

세균에서 유래된 일부 단백은 숙주세포의 미토콘드리아에 전달되어 세포상해를 유도하는 것으로 알려져 있으며, enteropathogenic *Escherichia coli*의 EspF와 Map 단백 및 *Neisseria* 균종의 외막단백인 PorB 단백이 대표적인 미토콘드리아 타깃팅 단백이다 (1~5). 이와 더불어 숙주세포의 핵으로 전달되어 핵에 있는 다양한 분자들과 결합하여 숙주세포의 항상성을 저해하거나 세포상해를 유도하는 세균단백이 최근 보고되고 있다 (6). 그람음성균에서 유래한 cytolethal distending toxin (CDT) (7), *Shigella* 균종의 IpaH9.8 (8), *Salmonella* 균종의 SspH1 (9), *Yersinia* 균종의 YopM (10), *Acinetobacter baumannii*의 outer membrane protein A (AbOmpA) (11), *Klebsiella pneumoniae*의 HsdM (12) 등이 현재까지 알려져 있는 숙주세포 핵 타깃팅 단백들이다. 그람음성균의 CDT는 숙주세포의 핵으로 타깃팅되어 세포주기의 G2/M기를 정지시켜 숙주세포사를 유도하며 (7, 13~15), IpaH9.8, SspH1 및 YopM 단백은 type III secretion system을 통해 세균으로부터 숙주세포의 세포질로 전달된 뒤 핵으로 이동하여 세포상해와 세포사를 유도한다 (8~10). *A. baumannii*의 AbOmpA는 숙주세포의 세포질에서는 미토콘드리아의 voltage-dependent anion channel과 결합하여 apoptosis를 유도하고, 일부는 핵으로

Received: January 27, 2015/ Revised: February 2, 2015/ Accepted: February 4, 2015
*Corresponding author: Je Chul Lee. Department of Microbiology, Kyungpook National University School of Medicine, 102 Dongin-dong 2 Ga, Jung-gu, Daegu 700-422, Korea.
Phone: +82-53-420-4844, Fax: +82-53-427-5664, e-mail: leejc@knu.ac.kr
**This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT and future Planning (NRF-2014R1A2A2A01006400).
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/license/by-nc/3.0/).

타깃팅 되어 DNase I 활성으로 숙주세포의 세포사를 유도하기도 한다 (11, 16, 17).

진핵세포의 세포질에서 생산된 핵 단백은 핵공복합체 (nuclear pore complex)를 통해 핵으로 전달된다. 분자량이 40 kDa 이하의 단백은 농도구배(concentration gradient)에 의한 확산으로 핵으로 이동하지만, 40~60 kDa 이상의 단백은 세포질과 핵의 shuttle vector인 karyopherin β family인 importin에 결합한 후 핵공복합체를 통해 핵으로 전달된다 (18~21). 이때 세포질에서 생산된 핵 단백은 아미노산 서열에 nuclear localization signal (NLS)를 가지고 있으며, 이들 NLS 부위에 importin이 결합함으로써 핵 이동이 가능하게 된다. 단백의 아미노산 서열에서 염기성 아미노산인 arginine (Arg) 또는 lysine (Lys)이 특정 부위에 집중되어 있으면서 importin과 결합할 수 있는 부위가 NLS로 작용한다. 따라서 염기서열 또는 아미노산 서열이 알려진 세균의 유전자나 단백을 대상으로 NLS를 검색하면 숙주세포의 핵으로 타깃팅 될 수 있는 세균단백을 예측할 수 있다. Cokol 등 (6)은 대장균의 4,286개의 open reading frame (ORF)을 대상으로 NLS를 검색하여 54개의 NLS를 가진 단백을 검색하였으며, 최근에는 그람음성균인 *A. baumannii*와 *Helicobacter pylori*에서도 NLS를 가진 단백이 각각 34개 및 49개 검색되었다 (22, 23).

사람이나 동물에서 흔하게 감염증을 유발하는 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)은 다양한 독력인자를 가지고 있으며, 각각의 독력인자에 의한 병원성 기전은 비교적 잘 알려져 있으나, 숙주세포의 세포소기관에 타깃팅되어 세포상해를 유도하는 단백에 의한 병원성 기전은 전혀 규명되어 있지 않다. 본 연구에서는 대표적인 그람양성 병원성 세균인 황색포도알균을 대상으로 현재까지 보고된 유전자와 유전체의 염기서열을 대상으로 NLS를 가진 단백을 생물정보학 분석을 통해 고속대량 스크리닝하였으며, 이들 검색된 단백들 중에서 β-lactamase (BlaZ)와 MsrR 단백의 숙주세포 핵 타깃팅과 이에 의한 세포상해를 조사하였다.

MATERIALS AND METHODS

NLS sequence 예측에 의한 핵 타깃팅 단백의 검색

NCBI taxonomy browser database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy)에 등록되어 있는 *S. aureus*의 염기서열을 모두 추출한 후 이들 ORF를 아미노산 서열로 바꾸었다. NLS sequence를 검색하기 위해 Redhat Linux-based workstation computer에 PredictNLS (http://cubic.bioc.columbia.edu) software와 module을 설치하였고, 많은 양의 데이터를 처리하기 위해 Perl scripts (O'Reilly Media Inc)와 Emboss package software (http://emboss.sourceforge.net)를 사용하였다. NLS를 검색하기 위해 "K or R" KRKK, 5 times K, between 3 and 5 times K or R, 3 or more K's의 알고리즘을 사용하였다.

세균 배양

임상분리주인 *S. aureus*를 실험에 사용하였으며, 균주는 혈액우무배지와 Luria-Bertani (LB) 액체배지에 배양하였다. *E. coli* DH5α는 LB 우무배지 또는 LB 액체배지에서 배양하였으며, 필요에 따라서 배지에 ampicillin (100 μg/ml)과 kanamycin (25 μg/ml)을 첨가하였다.

세포 배양

Human laryngeal epithelial cell에서 유래된 HEp-2 세포주와 African green monkey kidney cell에서 유래된 fibroblast 세포주인 COS-7 세포주를 한국세포주은행에서 분양 받아 사용하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (HyClone), 2 mM L-glutamine, 1,000 U/ml의 penicillin G와 50 μg/ml의 streptomycin을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco BRL)에서 5%의 CO_2 하에서 37℃ 배양기에서 배양하였다.

유전자 클로닝 및 형질전환

액체 배양된 *S. aureus*로부터 DNA를 genomic DNA preparation kit (Quiagen)를 사용하여 추출하였다. Polymerase chain reaction (PCR)으로 *blaZ* 유전자와 *msrR* 유전자를 증폭하였다. *blaZ* 유전자 증폭용 primer는 5'-CGG AAT TCA TGA AAA AGT TAA TAC TTT TAA-3', 5'-CGG GAT CCC CTT ACC GAA AGC AGC AGG-3'이며, *msrR* 유전자는 5'-CGG AAT TCA TGG ATA AAG AAA CTA ATG-3'과 5'-CGG GAT CCC ATC TTC ATC TAA AAA GTC-3'의 primer를 사용하였다. 증폭산물의 염기서열은 ABI Prism 3100 analyzer (Applied Biosystems)를 사용하여 확인하였다. 증폭된 PCR 산물은 PCR 클로닝 벡터인 pGEM-T easy vector (Promega)에 클로닝하고 *E. coli* DH5α에 형질전환시켰다. 대장균으로부터 추출한 대량의 plasmid DNA는 pAcGFP1-N2 vector와 pAcGFP1-C2 vector (Clontech)에 클

로닝 하기 위해 동일한 제한효소로 vector와 plasmid DNA를 절단한 후 ligation 시켜 *E. coli* DH5α에 형질전환 시켰다. COS-7 세포와 HEp-2 세포에 transfection 시키기 전에 plasmid를 다시 제한효소로 절단하고 전기영동하여 ligation 시킨 유전자 절편이 나타나는지 확인하고 염기서열을 결정하여 돌연변이가 없는 것을 확인하였다. 기타 기본적인 DNA 조작은 Sambrook 등 (24)의 방법에 따라 시행하였다.

Plasmid DNA의 transfection과 세포 내 green fluorescence 발현의 관찰

blaZ 유전자가 클로닝된 plasmid construct와 vector plasmid를 Exprep™ plasmid SV kit (GeneAll, Korea)를 사용하여 추출하였다. Plasmid DNA를 Opti-MEM MEM I medium (Invitrogen)에 희석한 후 1~2 μg의 DNA를 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 사용하여 세포에 transfection 시키고 20~48시간 배양 후 세포를 4% paraformaldehyde로 고정하고 488 nm 파장의 형광을 이용하여 세포의 green fluorescence 발현을 fluorescence microscope (Nikon)으로 관찰하였다.

세포상해

COS-7 세포와 HEp-2 세포를 24-well plate에 8×10^4개가 되도록 접종하고 24시간 배양한 후 *blaZ* 유전자를 GFP 발현 vector에 클로닝한 plasmid DNA 0.8 μg을 lipofectamin 2000 (Invitrogen)을 사용하여 세포에 transfection 시켰다. 세포를 배양하여 충분한 단백발현을 유도한 후 MTT 용액을 0.4 mg/ml 되도록 첨가하였다. 37℃에서 4시간 반응시킨 다음 배양액을 제거하고, 400 μl의 dimethyl sulfoxide를 첨가한 후 ELISA reader로 580 nm에서 흡광도를 측정하였다.

RESULTS

NLS 보유 세균단백의 검색

NCBI taxonomy browser database에 등록되어 있는 모든 *S. aureus* 균종의 유전자를 추출하였다. 추출된 유전자의 DNA 염기서열을 아미노산 서열로 바꾼 후 NLS를 가진 단백을 검색하였다. 모두 112개의 NLS 보유 단백이 검색되었으나, 동일한 단백 또는 전체 유전자가 아닌 일부 유전자만 알려진 단백을 제외하면 51개의 NLS를 가진 단백이 검색되었다. 51개의 단백은 24개의 기능이 알려진 단백(Table 1)과 27개의 hypothetical 단백(Table 2)으로 구성되었다. 검색된 단백의 크기는 91개의 아미노산으로 구성된 50S ribosomal protein L23으로부터 6,713개의 아미노산으로 구성된 hypothetical protein ebhA 단백까지 다양하였다. NLS를 가진 단백의 90% 이상이 세균의 세포질에 존재하는 단백이었으며, 10% 미만의 단백만이 막단백 또는 분비단백인 것으로 나타났다.

NLS 보유 단백의 숙주세포 핵 타깃팅

NLS를 가지고 있는 것으로 예측된 51개의 단백들 중 β-lactamase (AY369345)와 regulatory protein MsrR (Q7BHL7) 2개의 단백을 선택하여 숙주세포 핵 타깃팅 여부를 실험적으로 확인하였다. 179개의 아미노산으로 구성된 β-lactamase 단백의 NLS는 $_{136}$KKIKKRLKK$_{144}$으로 예측되었으며, MsrR 단백은 327개의 아미노산으로 구성된 세포질 단백으로, NLS는 $_{21}$KRKKKKK$_{27}$로 예측되었다. 이들 단백의 숙주세포 핵 타깃팅을 위해 *blaZ* 유전자와 *msrR* 유전자를 pAcGFP1-N2 vector에 클로닝하고, 유전자가 클로닝된 plasmid construct를 배양세포에 transfection한 후 녹색의 형광을 발현하는 융합단백의 숙주 내 위치를 형광현미경으로 관찰하였다. *blaZ* 유전자를 클로닝하여 얻은 BlaZ-GFP 융합단백은 COS-7 세포와 HEp-2 세포의 핵에서 관찰되었으나, *msrR* 유전자를 클로닝하여 얻은 MsrR-GFP 융합단백은 COS-7 세포와 HEp-2 세포의 핵에서 발현되지 않았다(Fig. 1). *blaZ* 유전자를 pAcGFP1-C2 vector에 클로닝하여 얻은 GFP-BlaZ 융합단백은 COS-7 세포의 세포질에만 분포하였다(Fig. 2).

BlaZ-GFP 융합단백에 의한 세포상해

숙주세포의 핵으로 타깃팅 되는 것으로 확인된 β-lactamase 단백에 의한 세포상해를 조사하기 위해 *blaZ* 유전자를 pAcGFP1-N2 vector와 pAcGFP1-C2 vector에 각각 클로닝한 plasmid construct를 COS-7 세포와 HEp-2 세포에 transfection 시킨 후 세포상해를 MTT assay로 측정하였다. 대조군으로 pAcGFP1-N2 vector와 pAcGFP1-C2 vector를 세포에 transfection 시켰다. 숙주세포의 핵으로 타깃팅 되는 BlaZ-GFP 융합단백은 COS-7 세포와 HEp-2 세포에서 세포상해를 유도하였지만, 숙주세포의 핵으로 타깃팅 되지 않고 세포질에만 존재하는 GFP-BlaZ 융합단백은 세포상해를 유도하지 않았다(Fig. 3).

Table 1. Prediction of NLS sequences in functional proteins of *S. aureus*

GenBank Accession No.	Protein (No. of amino acid)	Putative NLS sequences
C90022	50S ribosomal protein L23 (91)	$_{72}$NKRRK$_{76}$
A89954	Acetyl-CoA carboxylase transferase (285)	$_{9}$KKKKYL$_{13}$
AAA26683.1	Acetyltransferase (219)	$_{208}$LKRKRKL$_{214}$
C90070	Alkaline phosphatase III precursor (474)	$_{393}$KKLQKLLKK$_{401}$
AAN71837.1	BacG-like protein (331)	$_{2}$RKKKL$_{6}$
AY369345	Beta-lactamase (179)	$_{136}$KKIKKRLKK$_{144}$
AAL00934.1	Cell surface elastin binding protein (486)	$_{53}$QRRKRRR$_{59}$
D89918	Dihydrolipoamide succinyltransferase (422)	$_{231}$RKRKKE$_{236}$
BAA01369.1	DNA gyrase B (644)	$_{108}$GGKFGGGG$_{115}$
A89927	Elastin binding protein (486)	$_{53}$QRRKRRR$_{59}$
BAD72834.1	Enoyl-ACP reductase (243)	$_{31}$RKERSRKE$_{38}$
NP_932197.1	Far1 (213)	$_{98}$KKVKKIKIP$_{106}$
B90054	Gluconate permease (452)	$_{293}$MRKRKM$_{298}$
BAA24009.1	Integrase (354)	$_{120}$KIPKRRK$_{126}$
AAQ55244.1	MobA (330)	$_{252}$RREKIKRD$_{259}$
Q7BHL7	Regulatory protein MsrR (327)	$_{21}$KRKKKKK$_{27}$
AAF24086.1	Resolvase (205)	$_{121}$RKKIKER$_{127}$
CAD91929.1	Ribonuclease R (790)	$_{747}$GRKKKGKQ$_{754}$
F89870	Serine proteinase HtrA (769)	$_{15}$RKRRE$_{19}$
AAL58470.1	Serine-threonine rich antigen (2283)	$_{2268}$RKKKKD$_{2273}$
AAQ17171.1	Tn552 transposase (480)	$_{14}$KRKKAIQKY$_{22}$
AAQ17141.1	TraK (546)	$_{452}$KRKKNQ$_{457}$
AAF05840.1	Trans-2-enoyl-ACP reductase (256)	$_{39}$RKERSRKE$_{46}$
P26839	Virginiamycin A acetyltransferase (219)	$_{208}$LKRKRKL$_{214}$

DISCUSSION

Cokol 등 (6)은 숙주세포의 핵으로 타깃팅 되는 세균단백을 고속대량 스크리닝으로 검색할 수 있는 방법을 처음으로 고안하였으며, 대장균의 유전체를 대상으로 54개의 NLS 보유 단백을 검색하였다. 그러나 이들은 검색된 단백의 숙주세포 핵 타깃팅을 실험적으로 증명하지는 않았다. 본 연구에서는 처음으로 그람양성균인 황색포도알균의 유전자와 유전체를 대상으로 NLS를 가진 단백을 분석하였으며, 모두 51개의 NLS를 가진 단백을 검색하였다. 또한 이들 중에서 β-lactamase의 숙주세포 핵 타깃팅과 이에 의한 숙주세포 상해를 실험적으로 증명하였다.

본 연구에서는 NLS 검색엔진인 PredictNLS software (http://cubic.bioc.columbia.edu)를 사용하여 NCBI taxonomy browser database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy)에 등록되어 있는 *S. aureus* 균종의 유전자 염기서열을 대상으로 NLS를 가진 단백을 검색하였다. 보고된 *S. aureus*의 전체 유전자와 유전체 전체를 대상으로 한 결과에서는 모두 112개가 검색되었다. 그러나 균주에 따라 다르게 등록된 동일 유전자와 전체 유전자 염기서열이 아닌 일부의 유전자 서열만 등록된 것을 제외하면 최종적으로 51개의

Table 2. Prediction of NLS sequences in hypothetical proteins of *S. aureus*

GenBank Accession No.	Protein (No. of amino acid)	Putative NLS sequences
AAF24090.1	AF117259_2 unknown (190)	$_{175}$LKRKRMKL$_{182}$
AAF81096.1	Putative undecaprenol kinase (291)	$_{90}$QRRSKPRR$_{97}$
B89867	Hypothetical protein appF (326)	$_{83}$KKLRKSRQ$_{90}$
QQSA4E	Hypothetical protein C-403 (403)	$_{292}$KKRRESLKE$_{300}$
B89921	Hypothetical protein ebhA (6713)	$_{6612}$PKRRRKE$_{6618}$
YP_025317.1	Hypothetical protein pE194p1 (403)	$_{292}$KKRRESLKE$_{300}$
YP_025317.1	Hypothetical protein SA0297 (225)	$_{181}$LRDQAKKRK$_{189}$
H89799	Hypothetical protein SA0331 (284)	$_{220}$KKDKKL$_{225}$
F89801	Hypothetical protein SA0345 (613)	$_{456}$KKRTH$_{460}$
C89817	Hypothetical protein SA0464 (87)	$_{10}$RLIKRR$_{15}$
D89817	Hypothetical protein SA0465 (130)	$_{18}$KKQRQKM$_{24}$
C89828	Hypothetical protein SA0550 (113)	$_{90}$RKRRKE$_{95}$
D89828	Hypothetical protein SA0551 (482)	$_{32}$LKTFKRR$_{38}$
E89856	Hypothetical protein SA0769 (341)	$_{112}$PRRRAKQ$_{118}$
D89880	Hypothetical protein SA0954 (339)	$_{281}$KKKEKRK$_{287}$
C89893	Hypothetical protein SA1051 (565)	$_{436}$KKKKA$_{440}$
B89902	Hypothetical protein SA1122 (428)	$_{332}$DKLKKL$_{337}$
D89922	Hypothetical protein SA1277 (381)	$_{352}$KRRKL$_{356}$
E89946	Hypothetical protein SA1464 (86)	$_{22}$PQQKRAKQ$_{29}$
A89959	Hypothetical protein SA1562 (1274)	$_{21}$KKKRR25
F89960	Hypothetical protein SA1575 (553)	$_{543}$KLRRRVR$_{549}$
D89968	Hypothetical protein SA1639 (262)	$_{80}$KKRKK$_{84}$
A89988	Hypothetical protein SA1788 (123)	$_{79}$RKRKREAELRRKKP$_{92}$
B90038	Hypothetical protein SA2165 (207)	$_{4}$RRIRKTK$_{10}$
E90065	Hypothetical protein SA2382 (188)	$_{137}$KKGDNKLIKK$_{146}$
F90073	Hypothetical protein SA2447 (2271)	$_{2256}$RKKKKD$_{2261}$
BAB96506.1	Truncated probable transposase (222)	$_{14}$KRKKATQK$_{21}$

유전자가 NLS sequence를 가진 단백이 검색되었다.

NLS를 가진 세균단백이 숙주세포의 핵으로 타깃팅 되어 숙주세포 상해를 유도하기 위해서는 다음과 같은 과정들이 필요하다. 첫째, 세균단백은 감염을 일으킨 세균으로부터 다양한 분비시스템을 통해 분비되거나 유리되어야 한다. 둘째, 균체로부터 분비되거나 유리된 세균단백은 숙주세포의 세포질막을 통과하여 세포질로 전달되어야 한다. 셋째, 세포질로 전달된 세균단백은 단백분해효소 등 숙주세포의 외부물질 분해시스템에 의해 파괴되지 않고 importin과 결합하여 핵으로 타깃팅 되어야 한다. 넷째, 핵으로 타깃팅 된 세균단백은 핵에 존재하는 분자들과 결합하여 핵의 정상적인 기능을 저해하거나 세포상해를 유도하여야 한다.

본 연구에서는 검색된 51개의 NLS 보유 단백 중 β-lactamase와 MsrR 단백을 선택하여 숙주세포 핵 타깃팅을 확인하였다. *S. aureus*가 가진 β-lactamase는 최근 막

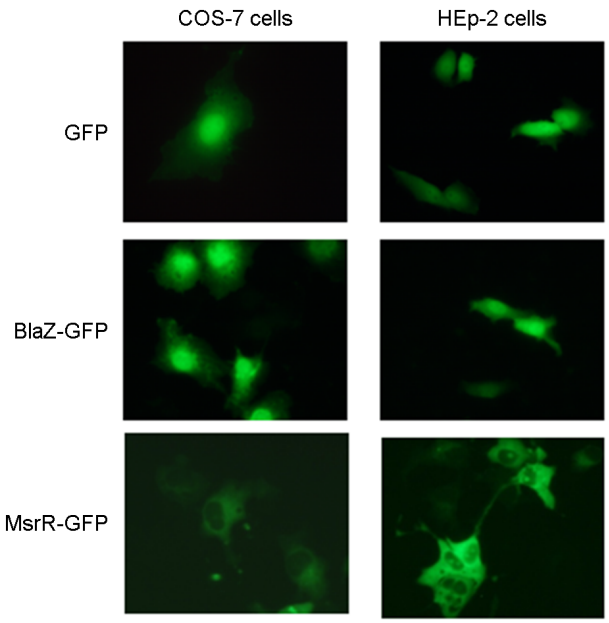

Figure 1. Nuclear targeting of fusion proteins of BlaZ-GFP in host cells. COS-7 and HEp-2 cells were transfected with *blaZ* and *msrR* cloned with pAcGFP1-N2 vector, respectively. Cells were transfected with the empty pAcGFP1-N2 vector as a control. Expression of BlaZ-GFP fusion proteins in host cells was observed using fluorescence microscope. Magnification: ×40.

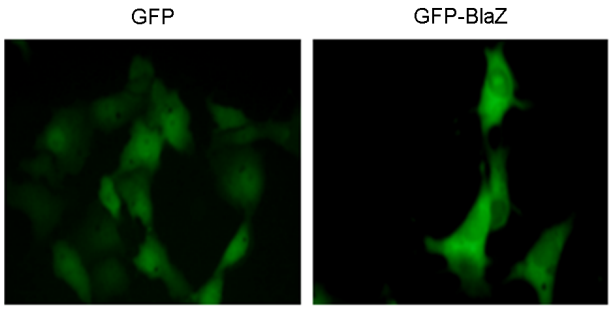

Figure 2. Cytosolic localization of fusion proteins of GFP-BlaZ in host cells. COS-7 cells were transfected with pAcGFP1-C2 vector or *blaZ* cloned with pAcGFP1-C2 vector. Expression of GFP-BlaZ fusion proteins in host cells was observed using fluorescence microscope. Magnification: ×40.

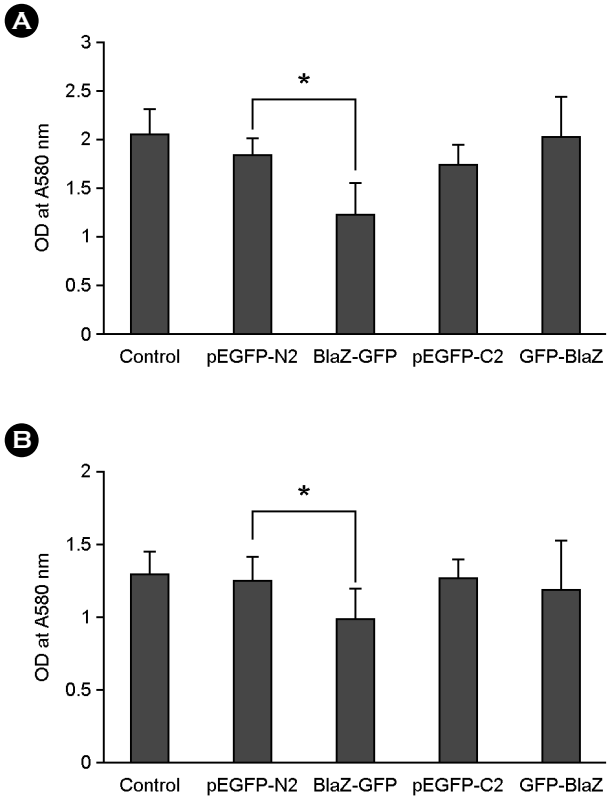

Figure 3. Cytotoxicity of β-lactamase fused with GFP in host cells. Cells were transfected with plasmid constructs of *blaZ* cloned with pAcGFP1-C2 and pAcGFP1-N2 vector, respectively. Cells were transfected with pAcGFP1-N2 or pAcGFP1-C2 vectors as a control. Cells transfected cells with plasmid constructs were incubated at 37℃ for 44 h, and MTT assay was performed. (A), COS-7 cells. (B), HEp-2 cells. Data are presented as the mean ± SD of duplicate experiments. *$p < 0.05$.

소포체(membrane vesicle)를 통해 효소활성을 가진 많은 양의 β-lactamase가 분비된다고 알려져 있으며 (25~28), MsrR 단백도 막소포체를 통해 분비되는 것을 최근 확인하였다(Unpublished data). 그람양성균이 분비하는 막소포체의 숙주세포의 세포질막 결합 및 세포질 이동에 관해서는 아직 규명되어 있지 않지만, *S. aureus*가 분비한 막소포체를 배양세포에 처치하면 30분 이내에 MV의 구성성분인 protein A가 숙주세포의 세포질에서 관찰되는 것으로 보아 막소포체를 통해 분비된 단백은 빠르게 숙주세포로 전달될 수 있다 (25). 이러한 결과는 막소포체를 통해 균체로부터 분비된 효소활성을 가진 β-lactamase나 MsrR 단백이 신속하게 숙주세포로 전달될 수 있음을 시사하므로, 본 연구에서는 이들 단백의 숙주세포 세포질로부터 핵으로의 이동만을 실험적으로 증명하였다.

β-lactamase 유전자인 *blaZ*를 단백 발현벡터인 pAcGFP1 N2 vector에 클로닝하여 생산되는 BlaZ-GFP 융합단백은 숙주세포 핵으로의 이동이 관찰되지만(Fig. 1), *blaZ* 유전자를 pAcGFP1-C2 vector에 클로닝하여 생산되는 GFP-

BlaZ 융합단백은 핵으로의 이동이 관찰되지 않았다(Fig. 2). 이러한 결과는 *blaZ* 유전자가 단백으로 생산될 때 GFP를 발현하는 클로닝 벡터에 따라서 3차 구조가 바뀌게 되어 NLS sequence가 외부로 노출되어 importin과 결합하게 되면 핵으로의 타깃팅이 가능하지만, NLS sequence가 융합단백의 내부에 위치하여 importin과의 결합이 불가능하게 되면 숙주세포 핵으로 전달되지 않을 가능성을 시사한다. 또한 MsrR-GFP와 GFP-MsrR 융합단백은 모두 숙주세포의 핵으로 타깃팅 되지 않았다. 이러한 결과는 단백의 아미노산 서열에서 Arg 또는 Lys이 집중적으로 존재하는 부위가 importin과 결합할 수 있는 NLS로 작용할 가능성이 높지만, NLS 부위에서의 Arg과 Lys의 숫자나 배열 등에 일정한 규칙이 없으므로 예측된 NLS 부위가 모두 기능을 하는 NLS가 아님을 시사하는 결과이다. β-lactamase 단백의 핵 타깃팅에 의한 세포상해를 조사한 결과에서도 핵으로 타깃팅 되는 BlaZ-GFP 융합단백은 숙주세포의 상해를 유도하지만, GFP-BlaZ 융합단백은 세포상해를 유도하지 않았다. 이러한 결과는 β-lactamase 단백은 숙주세포의 세포질에서는 세포의 항상성에 큰 영향을 주지 않지만, NLS를 통해 핵으로 타깃팅 되면 세포상해가 유도됨을 의미한다. 그러나 본 연구에서는 β-lactamase 단백의 핵에서의 분자 결합과 세포상해 기전에 대해서는 연구하지 않았으므로 이에 대한 추후 연구가 필요하다.

본 연구에서는 알려진 *S. aureus* 균의 유전정보를 대상으로 생물정보학 분석을 통해 고속대량 스크리닝하여 NLS를 가진 51개의 단백을 검색하였다. 또한 *S. aureus* 감염 시 NLS를 가진 세균단백이 감염균으로부터 숙주세포로 전달된 후 NLS에 의해 핵으로 타깃팅 되면 숙주세포 상해를 유도할 가능성을 확인하였다. 이러한 연구결과는 세균단백의 숙주세포 핵 타깃팅이 새로운 개념의 세균 병원성 기전임을 시사하는 결과이므로 검색된 NLS 보유 단백의 숙주세포 핵 타깃팅과 이에 의한 병원성 기전 규명 연구가 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

1) Matarrese P, Falzano L, Fabbri A, Gambardella L, Frank C, Geny B, *et al*. *Clostridium difficile* toxin B causes apoptosis in epithelial cells by thrilling mitochondria. Involvement of ATP-sensitive mitochondrial potassium channels. J Biol Chem 2007;282:9029-41.

2) Müller A, Günther D, Brinkmann V, Hurwitz R, Meyer TF, Rudel T. Targeting of the pro-apoptotic VDAC-like porin (PorB) of *Neisseria gonorrhoeae* to mitochondria of infected cells. EMBO J 2000;19:5332-43.

3) Nagai T, Abe A, Sasakawa C. Targeting of enteropathogenic *Escherichia coli* EspF to host mitochondria is essential for bacterial pathogenesis: critical role of the 16th leucine residue in EspF. J Biol Chem 2005;280:2998-3011.

4) Nougayrède JP, Donnenberg MS. Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway. Cell Microbiol 2004;6:1097-111.

5) Papatheodorou P, Domańska G, Oxle M, Mathieu J, Selchow O, Kenny B, *et al*. The enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Map effector is imported into the mitochondrial matrix by the TOM/Hsp70 system and alters organelle morphology. Cell Microbiol 2006;8:677-89.

6) Cokol M, Nair R, Rost B. Finding nuclear localization signals. EMBO Rep 2000;1:411-5.

7) Elwell C, Chao K, Patel K, Dreyfus L. *Escherichia coli* CdtB mediates cytolethal distending toxin cell cycle arrest. Infect Immun 2001;69:3418-22.

8) Toyotome T, Suzuki T, Kuwae A, Nonaka T, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, *et al*. *Shigella* protein IpaH (9.8) is secreted from bacteria within mammalian cells and transported to the nucleus. J Biol Chem 2001;276:32071-9.

9) Haraga A, Miller SI. A *Salmonella enterica* serovar Typhimurium translocated leucine-rich repeat effector protein inhibits NF-κB-dependent gene expression. Infect Immun 2003;71:4052-8.

10) Benabdillah R, Mota LJ, Lützelschwab S, Demoinet E, Cornelis GR. Identification of a nuclear targeting signal in YopM from *Yersinia* spp. Microb Pathog 2004;36:247-61.

11) Choi CH, Hyun SH, Lee JY, Lee JS, Lee YS, Kim SA, *et al*. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. Cell Microbiol 2008;10:309-19.

12) Lee JC, Kim DS, Moon DC, Lee JH, Kim MJ, Lee SM, *et al*. Prediction of bacterial proteins carrying a nuclear localization signal and nuclear targeting of HsdM from *Klebsiella pneumoniae*. J Microbiol 2009;47:641-5.

13) Lara-Tejero M, Galán JE. A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. Science

2000;290:354-7.

14) McSweeney LA, Dreyfus LA. Nuclear localization of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin CdtB subunit. Cell Microbiol 2004;6:447-58.

15) Nishikubo S, Ohara M, Ueno Y, Ikura M, Kurihara H, Komatsuzawa H, *et al*. An N-terminal segment of the active component of the bacterial genotoxin cytolethal distending toxin B (CDTB) directs CDTB into the nucleus. J Biol Chem 2003;278:50671-81.

16) Choi CH, Hyun SH, Kim J, Lee YC, Seol SY, Cho DT, *et al*. Nuclear translocation and DNAse I-like enzymatic activity of *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A. FEMS Microbiol Lett 2008;288:62-7.

17) Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, *et al*. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. Cell Microbiol 2005;7:1127-38.

18) Izaurralde E, Adam S. Transport of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. RNA 1998;4:351-64.

19) Moroianu J. Distinct nuclear import and export pathways mediated by members of the karyopherin β family. J Cell Biochem 1998;70:231-9.

20) Mosammaparast N, Pemberton LF. Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. Trends Cell Biol 2004;14:547-56.

21) Pemberton LF, Blobel G, Rosenblum JS. Transport routes through the nuclear pore complex. Curr Opin Cell Biol 1998; 10:392-9.

22) Moon DC, Gurung M, Lee JH, Lee YS, Choi CW, Kim SI, *et al*. Screening of nuclear targeting proteins in *Acinetobacter baumannii* based on nuclear localization signals. Res Microbiol 2012;163:279-85.

23) Lee JH, Jun SH, Baik SC, Kim DR, Park JY, Lee YS, *et al*. Prediction and screening of nuclear targeting proteins with nuclear localization signals in *Helicobacter pylori*. J Microbiol Methods 2012;91:490-6.

24) Sambrook J, Fritsch E & Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Press, 1989.

25) Gurung M, Moon DC, Choi CW, Lee JH, Bae YC, Kim J, *et al*. *Staphylococcus aureus* produces membrane-derived vesicles that induce host cell death. PLoS One 2011;6:e27958.

26) Lee EY, Choi DY, Kim DK, Kim JW, Park JO, Kim S, *et al*. Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. Proteomics 2009;9:5425-36.

27) Lee J, Lee EY, Kim SH, Kim DK, Park KS, Kim KP, *et al*. *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles carry biologically active β-lactamase. Antimicrob Agents Chemother 2013;57: 2589-95.

28) Lee JC. *Staphylococcus aureus* membrane vesicles and its potential role in bacterial pathogenesis. J Bacteriol Virol 2012; 42:181-8.