

Proteome Analysis of Alkylhydroxide Peroxidase–Deficient Isogenic Mutant of *Helicobacter pylori* 26695

Woo-Kon Lee^{1,2}, Seung-Chul Baik^{1,2}, Min-Kyung Shin^{1,2}, Myunghwan Jung^{1,2}, Jin-Sik Park¹, Jong-Hoon Ha¹, Dong-Hae Lee¹, Min-Jeong Kim¹, Jeong-ih Shin¹, Hyung-Lyun Kang^{1,2*}

¹Department of Microbiology, Gyeongsang National University School of Medicine, 816-15 Jinjudaero, Jinju, Gyeongnam, 52727 KOREA

²Research Institute of Life Science, Gyeongsang National University 501 Jinjudaero, Jinju, Gyeongnam, 660-751 KOREA

Corresponding

Hyung-Lyun Kang
 Department of Microbiology, Gyeongsang
 National University School of Medicine,
 816-15 Jinju-daero, Jinju, Gyeongnam,
 52727 Korea

Phone : +82-55-772-8085

Fax : +82-55-772-8089

E-mail : kangssi@gnu.kr

Received : December 5, 2019

Revised : December 13, 2019

Accepted : December 14, 2019

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

In order to investigate the antioxidant effect of alkylhydroxide peroxidase (*ahpC*) of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 26695, an *ahpC*-deficient mutant (*H. pylori* 26695 *ahpC::cat*) was generated. *ahpC*-deficient mutant was grown slowly at lower pressure of oxygen (5% oxygen) compared to the *H. pylori* 26695. Whole cell proteins isolated from *H. pylori* 26695 and *H. pylori* 26695 *ahpC::cat* were analyzed by MALDI-TOF and tandem-MS. The expression of 15 proteins, including Ppa, HypB, GrpE, Elp, RecA, GroES, Mda66, RibE, NapA, GlnA, BioB, TrxB, Tsf, FumC and Icd, was more than doubled in *H. pylori* 26695 *ahpC::cat*. Production of 10 proteins such as UreG, FabE, Adk, Pnp, OorC, AtpA, AtpD, Nqq3, Pfr, and TagD decreased below 50% in *H. pylori* 26695 *ahpC::cat* compared to the *H. pylori* 26695. In microarray analysis, 9 genes including *sul1*, *amiE*, *frxA*, *fecA*, *hyuA*, and *katA* increased in transcription level in *H. pylori* 26695 *ahpC::cat* compared to *H. pylori* 26695. A total of 24 genes, including *flaB*, protein kinase C inhibitor, *cag16*, *pabC*, and *sabA*, reduced in transcription. 27 genes, including HP0889, showed common expression changes in *ahpC*, *katA*, and *sodB*-deficient mutations. As a result of this study, there were not many genes whose expression was commonly changed by the deletion of each of the three major antioxidant enzymes of *H. pylori*. These results showed the functions and regulation of the three antioxidant enzymes were different in *H. pylori*.

Key Words: *Helicobacter pylori*; antioxidant, *ahpC*

서론

호주의 Warren과 Marshall에 의해 1983년 위염환자의 위점막에서 처음으로 분리 동정하여 보고된 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)는 사람의 위점막에서 서식하며 B형 발암물질 위염(type B antral gastritis)과 위십이지장 궤양의 원인균이다 (1). 세계보건기구에서는 1994년 *H. pylori*를 제1종 발암원(group I carcinogen)으로 정의하였다 (2). *H. pylori*는 전세계 인구의 절반 이상에 감염되어 있다(3). *H. pylori*가 산이나 면역세포가 침투할 수 없는 사람의 위점막 점액층 내에 서식하기 때문에 현재까지 효과적인 예방법이 없다 (4, 5).

분자생물학의 발달은 *H. pylori*에 의한 발병기전을 찾고 유전자 기능 탐색을 가능케 하여 요소분해효소(Urease)나 세포독성-연관 유전자A(CagA) 등 발병관련 단백질을 밝

Copyright © 2019 Journal of Bacteriology and Virology

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

혀내기도 하였다 (6, 7).

유전체학(Genomics)의 발달로 한 생명체의 유전체 염기서열을 완전히 분석할 수 있게 되었고 *H. pylori*의 약 1,600개 유전자 염기서열이 확인되어 발병관련 유전자의 빠른 탐색이 가능해졌다. The Institute of Genome Research (TIGR)에서는 1997년 십이지장궤양 환자에서 분리한 균주인 *H. pylori* 26695의 전체 유전체 염기서열(1,667,867 bp)을 발표하였다 (8, 9). 지금까지 1,496 균주의 *H. pylori*의 유전체 분석이 완료되거나 진행 중에 있다 (10). 유전체 염기서열이 알려지기 시작한 이래로 염기서열이 갖는 의미나 유전자의 기능을 찾는 접근법으로 DNA chip을 이용한 microarray 및 프로테옴 분석법 등이 널리 사용되고 있다.

숙주세포의 방어기작에 대응하는 *H. pylori*의 항산화 단백질 등 스트레스에 대한 대응기작에 대한 연구가 진행되고 있다 (11, 12). *H. pylori*가 위벽 점막에 감염되면, 숙주는 면역반응과 염증반응을 유발하여 감염균을 공격하는 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)을 만든다 (13). 이 ROS는 숙주의 위 점막세포를 손상시킬 뿐만 아니라 감염된 *H. pylori*를 공격한다. 이런 ROS에 저항하기 위해서 *H. pylori*는 방어 작용으로 여러 항산화 효소를 생산한다. *H. pylori*의 대표적인 스트레스 관련 단백질은 수퍼옥사이드 디스무타제(Superoxide dismutase, SodB), 카탈라제(catalase, KatA), 알킬히드록시드 환원효소(alkyl hydroxide reductase, AhpC) 그리고 여러 퍼옥시다제(oxidases) 등이 잘 알려져 있다 (14). *H. pylori*의 이런 항산화 단백질을 결손시키면 ROS에 대항하여 살아남기 위한 세균 내의 유전자 발현변화 등 생리적인 변화가 예상되며 이때의 변화를 프로테옴 기법과 마이크로어레이, RT-PCR 등의 방법을 사용하여 분석하고 *H. pylori*의 항산화 기전을 이해하기 위한 자료를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

세균의 배양

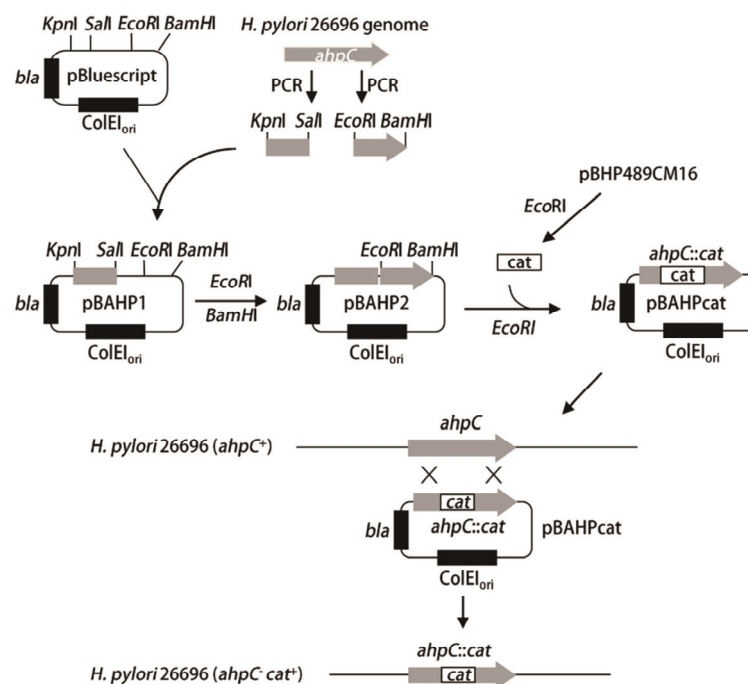
실험에 사용된 *H. pylori* 26695, 대장균 그리고 플라스미드는 헬리코박터 파이로리 분리균주은행(*H. pylori*, Korean Type Culture Collection, 경상대학교)에서 제공받아 사용하였다. *H. pylori* 26695와 *ahpC* 결손 돌연변이주를 37°C 항온수조에서 녹인 뒤 소혈청이 10% 첨가된 브루셀라 액체배지 3 ml에 접종하고 5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂, 100% 상대습도가 유지되는 37°C 배양기(Sanyo, Osaka, Japan)에서 3 일 간 박층액체배양법으로 계대배양 하였다 (15). 단백질과 RNA는 대수기 성장기에 해당하는 24 시간 배양한 균체에서 추출하였다 (16).

AhpC 유전자 결손 *H. pylori* 26695 돌연변이주의 제조

클로닝을 위한 플라스미드 pBluescript를 *KpnI*과 *SalI* 두 가지 효소로 절단하여 준비하였다. *ahpC* 유전자의 상위부분과 하위부분을 클로닝하기 위하여 두 쌍의 PCR 프라이머를 디자인하였다(Table 1). 프라이머 *ahpCUF*와 *ahpCUR*을 이용하여 *ahpC* 상위부위를 PCR 증폭하였다. PCR 산물은 *KpnI*과 *SalI* 두 가지 효소로 절단하여 같은 효소로 잘라서 준비한 플라스미드에 클로닝하고 pBAHP1이라 명명하였다. 프라이머 *ahpCDF*와 *ahpCDR*을 이용하여 *ahpC* 하위부위를 PCR 증폭한 뒤 *EcoRI* 과 *BamHI* 두 가지 효소로 절단하고, 같은 세트의 효소로 절단한 pBAHP1에 클로닝하여 pBAHP2라고 명명하였다. 유전자 결손을 위하여 사용한 항생제 마커는 *Campylobacter coli*의 플라스미드인 C-589의 클로람페니콜 아세틸전이효소 유전자(chloramphenicol acetyltransferase, cat)가 삽입된 플라스미드 pBluescript-CM25에서 추출하였다 (17). 플라스미드 pBAHP2의 *ahpC* 유전자의 가운데에 있는 *EcoRI* 자리를 절단하고 절단된 부위에 pBluescript-CM25에서 *EcoRI*로 절단하여 추출한 *cat* 유전자를 삽입하여 pBAHPcat을 제작 하였다. 만들어진 플라스미드 pBAHcat을 *H. pylori* 26695에 형질전환하여 *ahpC* 결손 돌연변이주를 만들었다(*H. pylori* 26695 *ahpC::cat*) (Fig. 1).

Table 1. Strains and plasmids used in this study

DNAs and strains	Genotype, phenotype and sequence	Reference
Strains		
<i>H. pylori</i> 26695		8
<i>H. pylori</i> 26695 <i>ahpC::cat</i>	<i>ahpC</i> -deficient mutant	this study
Plasmids		
pBluescript II	ColEori; <i>bla</i>	26
pBAHP1	pBluescript II containing 5'-fragment of <i>ahpC</i>	this study
pBAHP2	pBluescript II, containing both 5' fragment and 3' fragment of <i>ahpC</i>	this study
pBAHPcat	pBluescript II, chloramphenicol acetyltransferase(<i>cat</i>) was inserted in the middle of <i>ahpC</i>	this study
pBluescript-CM25	ColEori; <i>bla</i> ; <i>cat</i>	17,26
oligomers (product size)		
<i>ahpC</i> 5' fragment (479 bp)	ahpCUF; aaggtaccacaagaagcgcgctaaag ahpCUR; ttgtcgacgcaatgatttctgtaggc	8
<i>ahpC</i> 3' fragment (557 bp)	ahpCDF; gcgaattctgaagaagcgatcgctttga ahpCDR; ttgatccaagatttgcgcatgcggaac	8
<i>icd</i> (323 bp)	F; taagggtggtatgggagtcct R; ccccttcgg tgtattcatg	8
<i>trxB</i> (305 bp)	F; gattatcgctaccggtggta R; tcgcccttgatttctccac	8
<i>mda66</i> (323 bp)	F; gaaacctgactgaccatgc R; aatgggagcgttccaagtca	8
<i>pfr</i> (357 bp)	F; agttgctaaacgaacaagtg R; gttcagacacataccattgc	8

**Fig. 1.** Strategy for construction of knock-out mutants (*H. pylori* 26695 *ahpC::cat*)

단백질과 RNA의 분석

*H. pylori*의 단백질 추출과 이차원 전기영동은 O'Farrell의 방법을 이용하였다 (16). 배양한 균을 12,000 rpm으로 1분 간 원심분리하여 배양액을 제거하였다. 침전된 세균을 2 ml의 세척액(40 mM Tris-HCl [pH 7.2], 1 mM EDTA)에 섞어 원심분리하고 상등액을 제거하였다. 침전된 세균을 원심부리 튜브 벽면에 골고루 펴서 바르고 600 μ l의 용해용액(9.5 M urea, 4% CHAPS, 35 mM Tris [pH 7.2])를 첨가하였다. 튜브를 20분 간 상온에서 진탕하였고, 얼음에 20분 간 정치 한 후 10°C에서 12,000 rpm으로 30분 간 원심분리하여 상층액을 취하였다. Bradford 방법으로 단백질을 정량하였다. 단백질 200 μ g을 이차원 전기영동에 사용하였다. 젤의 염색은 Heukeshoven 등의 방법을 사용하였고 Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectroscopy (MALDI-TOF) 분석은 Park 등의 방법을 사용하였다 (16, 18, 19).

RNA 정제, RT-PCR은 hot phenol법과 Cho 등의 방법을 사용하였다 (20, 11). *H. pylori* 배양액(3 ml)에 1.5 ml의 용해용액(2% SDS, 16 mM EDTA)을 넣고 100°C에서 5분 간 중탕하였다. 여기에 4.5 ml의 65°C로 데워진 phenol/chloroform (5:1) 넣은 후 65°C에서 10분 간 정치하였다. 반응 후 2,500g로 15분 간 원심분리하고 상층액을 새 튜브에 옮겼다. 시료가 들어있는 튜브에 같은 부피의 phenol/chloroform으로 진탕한 다음 4°C에서 2,500g로 10분 간 원심분리하여 상층액을 새 튜브에 옮겼다. 여기에 같은 부피의 isopropanol을 넣은 후 -20°C에서 2시간 이상 정치하였다. 튜브를 4°C에서 2,500g로 15분 간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 2ml의 70% 에탄올로 세척한 후 건조하였다. 침전된 시료는 DEPC로 처리한 증류수에 용해시켰다.

마이크로어레이는 *H. pylori* Microarray AR-HPGS-1(Eurogentek, Belgium)를 사용하였다 (21).

결 과

AhpC 유전자 결손 *H. pylori* 26695 돌연변이주의 확인

H. pylori 26695와 *ahpC* 결손 돌연변이주에서 단백질을 추출하여 이차원 전기영동으로 AhpC 단백질의 발현을 확인하였다. *H. pylori* 26695에서는 AhpC 단백질이 약 26 kDa 크기로 확인되었으나 *ahpC* 결손 돌연변이주에서는 확인되지 않았다(Fig. 2).

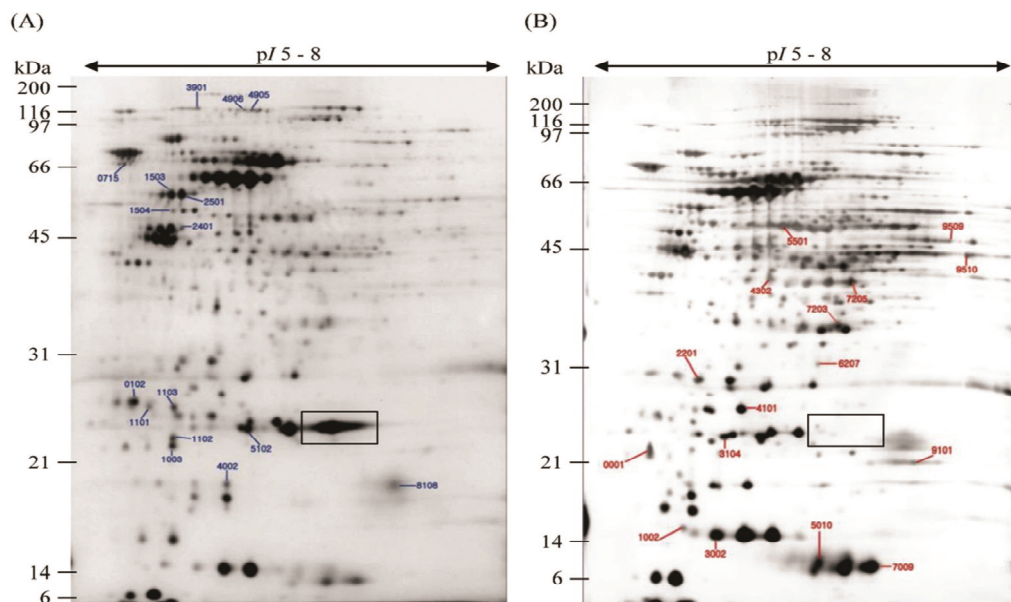


Fig. 2. 2D Separation of whole cell proteins of the wild-type (*H. pylori* 26695) (A), *H. pylori* 26695 *ahpC::cat* (B). The proteins were separated on an IPG strip of pH 5.0-8.0 and subsequently on a 12.5% SDS-PAGE and then detected by silver staining. The original gel size was 18×20×0.15. A) Wild type. B) *H. pylori* 26695 *ahpC::cat*. The protein spots corresponding to AhpC are marked with rectangle. kDa shows the molecular mass (indicated on left).

H. pylori 26695 와 *ahpC* 결손 돌연변이주의 성장곡선

H. pylori 26695와 *ahpC* 결손 돌연변이주를 5% O₂와 10% CO₂ 조건에서 40시간 동안 박층액배양법으로 배양하며 600nm의 흡광도를 측정하였다. *H. pylori* 26695는 5% O₂와 10% O₂ 조건 모두에서 유사하게 성장하였으나 *ahpC* 결손 돌연변이주는 10% O₂ 조건에서 성장하지 못했다. *H. pylori* 26695와 *ahpC* 결손 돌연변이주의 성장곡선은 5% O₂ 조건에서 배양하여 조사하였다. *H. pylori* 26695는 32시간 동안 OD₆₀₀이 2.5까지 성장하였고 그 이후는 변화가 거의 없었다. *ahpC* 결손 돌연변이주는 32시간까지 OD₆₀₀이 2.0까지 성장하였으나 이후에는 1.2까지 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3). 프로테옴 분석을 위한 단백질과 RT-PCR과 마이크로어레이 분석을 위한 RNA는 대수 성장기에 해당되는 24시간 배양한 세균체에서 분리하였다.

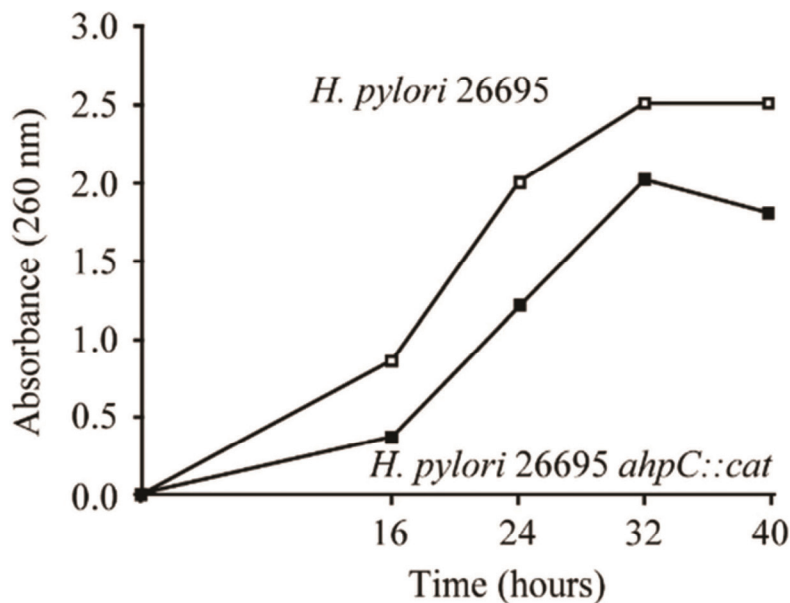


Fig. 3. Growth curve of *H. pylori* 26695 and *H. pylori* 26695 *ahpC::cat* at thin layer culture condition.

H. pylori 26695와 *ahpC* 결손 돌연변이주간 발현 차이를 보이는 단백질

24시간 배양한 *H. pylori*에서 분리한 단백질 200 μ g을 단백질을 분리하여 각각 3회의 이차원 전기영동으로 분석하였다(Fig. 2). 그 결과 *H. pylori* 26695에 비해 *ahpC* 결손 돌연변이주에서 발현이 두 배 이상 증가 하거나 감소한 단백질 spot을 표시하였다. 표시한 단백질 spot을 MALDI-TOF MS와 tandem ms spectrometer를 이용하여 동정한 결과 *ahpC* 결손 돌연변이주에서 Inorganic pyrophosphatase (Ppa), Hydrogenase expression/formation protein (HypB), Co-chaperone and heat shock protein (GrpE), Elongation factor P (Efp), Recombinase A (RecA), Co-chaperonin (GroES), Modulator of drug activity (Mda66), Riboflavin synthase beta chain (RibE), Neutrophil activating protein (NapA), Glutamine synthetase (GlnA), Biotin synthetase (BioB), Thioredoxin reductase (TrxB), Translation elongation factor EF-Ts (Tsf), Fumarase (FumC) 그리고 Isocitrate dehydrogenase (Icd) 등 15개의 단백질 발현이 두 배 이상 증가하였다. Urease accessory protein (UreG), Biotin carboxyl carrier protein (FabE), Adenylate kinase (Adk), Polynucleotide phosphorylase (Pnp), Ferredoxin oxidoreductase, gamma subunit (OorC), ATP synthase F1, subunit alpha (AtpA), ATP synthase F1, subunit beta (AtpD), NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO3 subunit (Nqq3), Nonheme iron-containing ferritin (Pfr), Adhesin-thiol peroxidase (TagD) 등 10개의 단백질이 *H. pylori* 26695에 비해서 50% 이하로 감소하였다. 총 35개의 단백질 spot들이 발현 차이를 보였으며, 이는 25개의 단백질에 해당하였다(Table 2, 3).

Table 2. List of up- or down-regulated proteins in *ahpC*-deficient isogenic mutant compared to *H. pylori* 26695 by using tandem ms.

SSP no	protein name	Accession no	mw	p/	amino acid seq	Score	HP no
Increased							
0001	Inorganic pyrophosphatase (Ppa)	gi:15645244	19,260	4.8	K.YELDKESGALMVDR.V	70	0620
					R.LVGVLNMEDESGMDEK.L	74	
2201	Hydrogenase expression/formation protein (HypB)	gi:15645518	27,179	5.2	K.ADMVEVFNFR.V	37	0900
					K.TTMLENLADFK.D	17	
3104	Co-chaperone and heat shock protein (GrpE)	gi:15644740	22,026	5.1	K.EGLYVLNFMSSPGSGK.T	68	0110
					K.IVQVLQQGYK.Y	45	
4101	Elongation factor P (Elp)	gi:15644806	20,657	5.3	K.IALDLLPVIDALLGAHK.S	43	0177
					K.IELGGVPYR.I	33	
4302	Recombinase A (RecA)	gi:15644782	37,555	5.5	K.AISVDVPQVVALK.I	53	0153
					K.ALADEITLK.I	30	
5010	Co-chaperonin (GroES)	gi:15644644	12,860	6.5	R.SGGIDLVVVDSVAALTPK.A	59	0011
					K.AEIDGDMGDQHVGLQAR.L	75	
9101	Modulator of drug activity (Mda66)	gi:15645254	21,474	7.1	K.TSSGIIIPDNAK.E	46	0630
Decreased							
0102	Urease accessory protein (UreG)	gi:15644698	21,824	4.7	K.NPQVEQYLSLTTHLR.Q	24	0068
					R.AKEGLDDVIAWIK.R	33	
1003	Biotin carboxyl carrier protein (FabE)	gi:15644999	17,122	5.2	K.IDLAPYVGADLK.V	55	0371
					K.VVSVEVGDAQPVEYGTK.L	75	
1101	Adenylate kinase (Adk)	gi:15645243	21,230	5.0	K.EDFVLSPMVGTIFYHAPSPGAEPYVK.V	19	0618
					K.GIILIDGYPR.S	39	
1102	Biotin carboxyl carrier protein (FabE)	gi:15644999	17,122	5.2	R.VFLDPLGEIQNFYK.N	53	0371
					K.VVSVEVGDAQPVEYGTK.L	64	
1103	Adenylate kinase (Adk)	gi:15645243	21,230	5.0	K.EDFVLSPMVGTIFYHAPSPGAEPYVK.V	44	0618
					K.GIILIDGYPR.S	49	
4905	Polynucleotide phosphorylase (Pnp)	gi:2314375	76,846	5.3	R.VFLDFLGEIQNFYK.N	66	1213
					R.AQDFEILTSR.L	32	
4906	Polynucleotide phosphorylase (Pnp)	gi:2314375	76,846	5.3	K.NQYFDEIHK.G	45	1213
					K.ESLNMIMMR.S	41	
5102	Ferredoxin oxidoreductase, gamma subunit (OorC)	gi:2313709	20,244	5.3	R.AQDFEILTSR.L	29	0591
					K.NQYFDEIHK.G	31	
					K.ESLNMIMMR.S	45	
					K.VDILLDRDEIIFPYAK.E	32	
					K.QGGIVVIDPNLVTPTK.E	45	
					R.FTGVGQGQGVLLAGEILAEAK.I	77	
					R.SSSQLLYSEIVAGR.V	67	

Table 3. List of up- or down-regulated proteins in *ahpC*-deficient isogenic mutant compared to *H. pylori* 26695 by using MALDI-TOF.

SSP no	protein name	Accession no	mw	pI	HP no
Increased					
1002	Riboflavin synthase beta chain (RibE)	gi:15644636	16,912	4.98	0002
3002	Neutrophil activating protein (NapA)	gi:15644871	16,802	5.83	0243
5501	Glutamine synthetase (GlnA)	gi:15645139	54,383	6.04	0512
6207	Biotin synthetase (BioB)	gi:15646016	31,344	5.88	1406
7009	Co-chaperone (GroES)	gi:15644644	12,860	6.59	0011
7203	Thioredoxin reductase (TrxB)	gi:15645444	33,407	6.25	0825
7205	Translation elongation factor EF-Ts (Tsf)	gi:15646162	39,564	6.53	1555
9509	Fumarase (FumC)	gi:15645938	50,844	7.29	1325
9510	Isocitrate dehydrogenase (Icd)	gi:15644660	47,400	7.95	0027
Decreased					
1503	ATP synthase F1, subunit alpha (AtpA)	gi:15645748	55,012	5.05	1134
1504	ATP synthase F1, subunit beta (AtpD)	gi:15645746	51,347	5.08	1132
2401	ATP synthase F1, subunit beta (AtpD)	gi:15645746	51,347	5.08	1132
2501	ATP synthase F1, subunit alpha (AtpA)	gi:15645748	55,012	5.05	1134
3901	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO3 subunit (Nqq3)	gi:15645880	94,099	5.12	1266
4002	Nonheme iron-containing ferritin (Pfr)	gi:15645277	19,155	5.49	0653
8108	Adhesin-thiol peroxidase (TagD)	gi:15645018	18,161	8.18	0390

ahpC 결손 돌연변이주에서 RNA 수준의 발현변화를 보이는 유전자

마이크로어레이 분석결과 *H. pylori* 26695에 비해 *ahpC* 결손 돌연변이주에서 전사수준에서 발현이 두 배 이상 증가한 유전자는 sulfate permease (*sul1*), aliphatic amidase (*amiE*), NAD(P)H-flavin oxidoreductase (*frx4*), iron(III) dicitrate transport protein (*fecA*), acetone carboxylase subunit beta (*hyuA*), catalase (*katA*)를 포함한 총 9개의 유전자였다(Table 4).

Flagellin B (*flaB*), protein kinase C inhibitor, cag pathogenicity island protein (*cag16*), aminodeoxychorismate lyase (*pabC*), multidrug ABC transporter ATP-binding protein, outer membrane protein (*sabA*)를 포함한 총 24개의 유전자는 *H. pylori* 26695에 비해 *ahpC* 결손 돌연변이주에서 전사수준의 발현이 50% 이하로 감소하였다. 마이크로어레이 결과 발현의 증감이 확인된 유전자들 중 이차원 전기영동에서 발현양상이 같은 유전자 4개(*icd*, *trxB*, *mda66*, *pfr*)를 선별하여 RT-PCR로 RNA 수준에서 발현차이를 확인하였다(Fig. 4). 위 4개 유전자의 전사와 해독의 증감은 같은 결과를 보였으나 단백질 발현의 증가율과 RNA 양의 증가율은 다소 차이를 보였다. 이는 RT-PCR과 마이크로어레이의 민감도 부족이 원인으로 판단된다.

AhpC 결손 돌연변이주, KatA 결손 돌연변이주, SodB 결손 돌연변이주에서 공통으로 발현이 달라진 기능이 알려진 유전자

H. pylori 26695에서 항산화 효소 유전자인 *katA*나 *sodB*를 결손시킨 *katA* 결손 돌연변이주와 *sodB* 결손 돌연변이주를 대상으로 *ahpC* 결손 돌연변이주와 공통으로 세 변이주 모두에서 공통으로 전사수준 또는 해독수준에서 발현이 증가하는 유전자들 중 기능이 알려진 유전자는 iron(III) dicitrate transport protein (HP0686), hydantoin utilization protein A (HP0695), NAD(P)H-flavin oxidoreductase (HP0642) 그리고 aliphatic amidase (HP0294)를 포함하는 총 8개였다. 반면 multidrug

resistance protein (HP0600), protein kinase C inhibitor (HP0404), iron(III)dicitrate ABC transporter permease protein (HP0889)를 포함한 총 19개의 유전자는 세 결손 돌연변이주들에서 공통적으로 발현이 감소하였다(Table 5).

Table 4. List of genes of which expression are increased over two-fold in *ahpC* isogenic mutant when compared with wild type *H. pylori* 26695

HP No.	Fold	Gene name
Increased		
HP0009	2.440	membrane protein
HP0228	2.029	sulfate permease (<i>sul1</i>)
HP0294	3.399	aliphatic amidase (<i>amiE</i>)
HP0642	2.192	NAD(P)H-flavin oxidoreductase (<i>frxA</i>)
HP0686	2.000	iron(III) dicitrate transport protein (<i>fecA</i>)
HP0695	2.054	acetone carboxylase subunit beta (<i>hyuA</i>)
HP0873	2.129	membrane protein
HP0874	3.975	hypothetical protein
HP0875	3.639	catalase (<i>katA</i>)
Decreased		
HP0018	0.478	hypothetical protein
HP0115	0.435	flagellin B (<i>flaB</i>)
HP0373	0.496	conserved hypothetical protein
HP0404	0.47	protein kinase C inhibitor
HP0408	0.315	hypothetical protein
HP0430	0.449	hypothetical protein
HP0503	0.146	hypothetical protein
HP0536	0.473	cag pathogenicity island protein (<i>cag16</i>)
HP0564	0.464	transcriptional regulator
HP0587	0.221	aminodeoxychorismate lyase (<i>pabC</i>)
HP0600	0.324	multidrug ABC transporter ATP-binding protein
HP0603	0.422	hypothetical protein
HP0611	0.488	hypothetical protein
HP0613	0.496	ABC transporter ATP-binding protein
HP0698	0.392	hypothetical protein
HP0702	0.253	hypothetical protein
HP0704	0.450	hypothetical protein
HP0712	0.153	hypothetical protein
HP0725	0.498	outer membrane protein (<i>sabA</i>) 1110
HP1167	0.444	membrane protein
HP1390	0.265	hypothetical protein
HP1426	0.300	conserved hypothetical protein
HP1453	0.486	conserved hypothetical protein
HP1564	0.157	outer membrane protein

Table 5. List of genes with increased or decreased expression common to *ahpC*, *sodB*, *katA* isogenic mutants when compared with *H. pylori* 26695

HP No.	Gene name
Increased	
HP0686	iron(III) dicitrate transport protein
HP0695	hydantoin utilization protein A
HP0642	NAD(P)H-flavin oxidoreductase
HP0294	aliphatic amidase
HP0696	N-methylhydantoinase
HP1174	glucose/galactose transporter
HP0865	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase
HP0871	CDP-diglyceride hydrolase
Decreased	
HP0600	multidrug resistance protein
HP0404	protein kinase C inhibitor
HP0889	iron(III) dicitrate ABC transporter permease protein
HP0004	carbonic anhydrase
HP0297	ribosomal protein L27
HP1530	purine nucleoside phosphorylase
HP1227	cytochrome c553
HP0531	cag pathogenicity island protein
HP0532	cag pathogenicity island protein
HP0536	cag pathogenicity island protein
HP0537	cag pathogenicity island protein
HP0989	<i>IS605</i> transposase
HP1534	<i>IS605</i> transposase
HP1557	flagellar basal-body protein
HP0587	aminodeoxychorismate lyase
HP1458	thioredoxin
HP0981	exonuclease VII-like protein
HP1534	<i>IS605</i> transposase
HP1238	aliphatic amidase

고 찰

*H. pylori*는 미호기성 세균으로 대기 산소압 이하에서 자라며 이는 산소의 독성을 중화시키는 능력이 낮지만 낮은 산소농도에서 자라기 위한 최소한의 항산화 기능을 가진 효소를 가지고 있다는 것을 의미한다. *H. pylori*의 주요 항산화 효소로는 SodB, KatA, AhpC 등이 있으며 이들 유전자들의 기능을 연구하기 위해서는 각각의 유전자 결손 또는 과발현 연구가 필요하다고 사료된다. SodB 결손 돌연변이주와 *katA* 결손 돌연변이주의 단백질 변화에 대한 분석과 산소농도에 대한 성장 특성 등은 이미 보고하였으며 이 연구에서는 또 다른 주요 항산화 효소인 AhpC의 기능을 연구하기 위하여 *ahpC* 결손 돌연변이를 만들고 *H. pylori* 26695와 산소독성에 반응하는 유전자들을 비교하였다.

ahpC 결손 돌연변이주는 상동성 재조합법으로 만들었다. *H. pylori* 26695는 주어진 배지와 습도에서 10% O₂ 농도에서 성장하지만 산소독성의 해독과 관련된 항산화 효소 유전자가 손상을 입을 경우 *sodB* 결손 돌연변이주의 경우에서와 같이 10% O₂ 농도에서 자랄 수 없을 것으로 예측하였다 (11). 그래서 *ahpC* 결손 돌연변이주는 5% O₂ 농도에서 확인하였다. 예측과 같이 *ahpC* 결

손 돌연변이주는 5% O₂ 농도에서만 자랐으며 10% 에서는 자라지 못했다. 이것은 AhpC 결손에 의한 산화 스트레스 저항성이 *sodB* 결손에 의한 결과와 유사하지만 10% O₂에서도 *H. pylori* 26695의 60% 이상의 수준으로 자라는 *katA* 결손 효과와는 다를 것이라는 예측이 가능하게 했다 (12). 또한 *ahpC* 결손 돌연변이주는 5% O₂ 에서도 *H. pylori* 26695 보다 성장속도가 느렸다. 이 결과를 *sodB* 결손 돌연변이주와 *katA* 결손 돌연변이주들의 성장을 비교해보면, *H. pylori* 26695에 비하여 세가지 돌연변이 모두 5% O₂에서 성장이 둔화되었다. 그러나 *sodB*나 *katA*가 결손된 돌연변이 *H. pylori*는 10% O₂에서도 약 60% 정도의 성장을 보였으나 *ahpC*가 결손될 경우 전혀 자라지 못했다는 점이 다르다. 이는 KatA나 SodB에 비하여 AhpC가 결손되었을 때 산소독성에 대해 더 민감하며 세균의 성장에 더 치명적이라는 것으로 사료된다. 먼저 *H. pylori* 26695 보다 *ahpC* 결손 균주에서 Ppa, HypB, GrpE, Efp, RecA, GroES, Mda66, RibE, NapA, GlnA, BioB, TrxB, Tsf, FumC, Icd의 발현이 증가하였다. *H. pylori*의 NapA는 호중구를 활성화하는 매개 인자들로서는 첫 번째로 확인된 단백질이며, 감염부위를 호중구나 단핵구로 회복시키는 중요한 기능을 한다 (22). Trx는 세포들의 단백질 thiol 이황화결합 상태의 조절에 중요한 역할을 하며 산화적 스트레스가 가해졌을 때 *H. pylori*에서 발현이 증가되는 대표적인 항산화 효소로 보고되었다 (23). *ahpC* 결손 균주에서 발현이 증가한 단백질들 중 NapA, TrxB, Mda66과 같은 항산화 효소와 GroES, GrpE 등 스트레스 저항성 효소의 발현증가는 항산화 효소 *ahpC* 결손에 의해 *H. pylori*가 산소에 저항하는 새로운 대사 체계를 갖추는 과정에서 나타난 결과로 추정된다 (14). 이 결과는 *ahpC* 유전자의 결손이 NapA의 발현을 5 배 증가시킨다는 이전의 보고와 같은 결과이다 (24). 이 세가지 단백질 중 TrxB와 Mda66은 microarray와 RT-PCR에서도 발현이 모두 증가하였다. 이 세가지 단백질과 Icd 발현 증가를 RT-PCR로 확인하였다.

지금까지의 결과로 추정해 볼 때 *H. pylori*의 항산화 단백질로 잘 알려진 TrxB, NapA는 *ahpC*, *sodB* 결손 돌연변이균주에서도 발현이 증가하였고, 산소 스트레스 조건인 산소농도 18%에서 배양한 이차원 전기영동에서도 발현이 증가하였다(data not shown). TrxB와 NapA는 *H. pylori*가 산화 스트레스 환경에서 생존해 나가기 위해 다른 항산화 단백질에 발현을 증가시켜 산소스트레스에 적응하는 것으로 사료된다. *ahpC*와 *sodB*의 결손에 따른 산소대사에서 이 두 가지 항산화 단백질이 주요 항산화작용을 수행하여 *H. pylori*가 생존해 갈 수 있는 것으로 추정된다.

ahpC 결손 돌연변이균주에서는 산화 스트레스에 대응하기 위해서 KatA 단백질의 발현이 크게 증가할 것으로 기대되었으나 단백질 수준의 KatA의 발현 증가는 관찰되지 않았다. 그러나 microarray 분석에서는 *katA* 유전자의 전사가 3.6배 이상 증가하였다. 이는 *H. pylori*의 *ahpC* 결손이나 *P. aeruginosa*의 *bfrA* 유전자 등 항산화 효소의 결손으로 organic peroxide가 세포내에 축적되면 catalase 활성을 저해한다는 이전의 보고와 연결되는 것으로 보인다 (25). *H. pylori*의 *ahpC* 결손에서 *katA* 유전자의 전사는 증가해도 단백질 양이 증가하지 않는 것은 *P. aeruginosa*의 경우처럼 catalase 활성저해와는 다른 기전이지만 전체적인 catalase 활성을 감소시키는 효과에서는 유사한 결과로 판단된다. 그러나 *sodB*나 *mdaB* (NADPH quinone reductase gene) 같은 항산화 유전자의 결손은 catalase 활성저해를 보이지 않는 것으로 보고되어 AhpC의 항산화 효과는 SodB의 그것과는 다소 다른 것으로 생각된다. *H. pylori* 26695의 세가지 주요 항산화 효소 유전자들 중 *sodB*와 *katA*를 각각 결손시킨 결손 돌연변이주의 유전자 발현에 대한 결과는 이미 보고되었다 (11, 12). *sodB*와 *ahpC* 각각의 돌연변이주에서 각각 18개 유전자와 11개 유전자가 전사 또는 해독수준의 발현증가가 확인되었고, 각각 41개 유전자와 37개 유전자의 발현감소가 확인되었다. 산소독성에 대한 주요 항산화 효소의 결손에 대한 유전자들의 발현변화 양상이 매우 다르고, 한가지 항산화 효소가 결손되도 다른 항산화 효소의 발현변화가 확인되지 않는 것은 이 세가지 항산화 효소의 작용기작이나 발현조절이 서로 다르다는 것을 시사한다고 사료된다.

이상의 결과를 바탕으로 *H. pylori*가 배양조건에서 산소의 과잉 또는 결핍에 의한 스트레스로부터 적응하기 위한 생물학적 특성이 해와 산소 대사 관련 유전자의 결손에 의한 다른 항산화효소의 작용 연구에 중요한 기초 자료가 될 것이다.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (2016R1A2B1015791).

REFERENCES

- 1) Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984;1:1311–54.
- 2) No authors listed. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 1994;61:1-241.
- 3) No authors listed. *Campylobacter*-like organisms in the stomach of patients and healthy individuals. *Lancet* 1984; 1:1348-9.
- 4) Rhee KH, Cho MJ, Kim JB, Choi SK, Park CK, Kim YC, *et al.* A prospective study on *Campylobacter pylori* isolated from patients of gastroduodenal inflammatory conditions. *J Kor Soc Microbiol* 1988;23:9-16.
- 5) Petersen AM, Krogfelt KA. *Helicobacter pylori*: an invading microorganism? A review. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;36:117-26.
- 6) 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* 2000;36:1071-84.
- 7) Higashi H, Tsutsumi, Muto S. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 2002;295:683-6.
- 8) Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, *et al.* The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997;388:539-47.
- 9) Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, *et al.* Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1999;397:176-80.
- 10) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/overview/helicobacter%20pylori>
- 11) Cho MJ, Lee SG, Lee KH, Song JY, Lee WK, Baik SC, *et al.* Comparison of gene expression patterns between *Helicobacter pylori* 26695 and its superoxide dismutase isogenic mutant. *J Bacteriol Virol* 2013;43:279-89.
- 12) Kang HL, Lee SG, Park JS, Song JY, Cho MJ, Baik SC, *et al.* Proteome Analysis of a Catalase-deficient Isogenic Mutant of *Helicobacter pylori* 26695. *J Bacteriol Virol* 2014;44:177-87.
- 13) Seyler RW Jr, Olson JW, Maier RJ. Superoxide dismutase-deficient mutants of *Helicobacter pylori* are hypersensitive to oxidative stress and defective in host colonization. *Infect Immun* 2001;69:4034–40.
- 14) Wang G, Alamuri P, Maier RJ. The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 2006;61:847-60.
- 15) Joo JS, Park KC, Song JY, Kim DH, Lee KJ, Kwon YC, *et al.* A thin-layer liquid culture technique for the growth of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2010;15:295-302.
- 16) O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250:4007-21
- 17) Wang Y, Taylor DE. Chloramphenicol resistance in *Campylobacter coli*: nucleotide sequence, expression, and cloning

vector construction. *Gene* 1990;94:23-8.

- 18) Heukeshoven J, Dernick R. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 1988;9:28-32.
- 19) Park JW, Song JY, Hwang HR, Park HJ, Youn HS, Seo JH, *et al.* Proteomic analysis of thiol-active proteins of *Helicobacter pylori* 26695. *J Bacteriol Virol* 2012;42:211-23.
- 20) Chuang SE, Daniels DL, Blattner FR. Global regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1993;175:2026-36.
- 21) Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* 1999;21:33-7.
- 22) Olczak AA, Wang G, Maier RJ. Up-expression of NapA and other oxidative stress proteins is a compensatory response to loss of major *Helicobacter pylori* stress resistance factors. *Free Radic Res* 2005;39:1173-82.
- 23) Comtois SL, Gidley MD, Kelly DJ. Role of the thioredoxin system and the thiol-peroxidases Tpx and Bcp in mediating resistance to oxidative and nitrosative stress in *Helicobacter pylori*. *Microbiology* 2003;149:121-9.
- 24) Wang G, Conover RC, Benoit S, Olczak AA, Olson JW, Johnson MK, *et al.* Role of a bacterial organic hydroperoxide detoxification system in preventing catalase inactivation. *J Biol Chem* 2004;279:51908-14
- 25) Olczak AA, Olson JW, Maier RJ. Oxidative-stress resistance mutants of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 2002;184:3186-93.