

## Salmonella enterica serovar Typhimurium에서 Type III 분비장치의 표적단백질들의 분비신호 확인 및 Type III 분비장치를 이용한 Secretion Vector의 개발

최혁진 · 엄준호 · 조정아 · 이 선<sup>1</sup> · 이경미<sup>1</sup> · 이인수<sup>1</sup> · 박용근\*

고려대학교 생명공학원, 한남대학교 미생물학과<sup>1</sup>

소장의 상피세포내로 세균 세포가 들어가는 과정(invasion)은 *Salmonella*의 감염에서 중요한 단계이다. invasion은 *Salmonella* type III 분비장치에 의해 분비되는 단백질들에 의해 유도된다. type III 분비단백질들은 특이하게, 일반적인 분비단백질들이 가지는 N-말단 분비 신호 펩타이드를 가지고 있지 않는 것으로 알려져 있다. *Yersinia*에서의 최근 연구에서 type III 분비장치에 의해 인지되는 분비신호는 분비 단백질을 암호화하는 mRNA의 5'말단부위가 형성하는 2차 구조에 있을 것이라는 보고가 있다. 본 연구에서는 *Salmonella* type III 분비장치의 분비신호를 조사하기 위해 type III 분비단백질중 하나인 *sopE*를 택하여 *ompR*과의 translational fusion을 만들었다. translational fusion을 위해 사용된 *sopE* DNA절편은 프로모터와 시작 코돈으로부터 10, 15 코돈을 포함하는 절편이다. Immunoblot으로 확인한 결과, *OmpR*을 포함하는 fusion 단백질이 형질전환 *Salmonella* 세포로부터 분비되었다. 이러한 결과는 *Salmonella*의 type III 분비신호가 분비단백질을 암호화하는 mRNA의 5'말단에 위치할 가능성을 제시하고 있다. 또한, 이러한 분비신호를 활용하여 유용한 외래 단백질을 세균 세포 내에서 효과적으로 생산, 분비할 수 있는 secretion vector의 원형을 개발하였다.

**Key words** □ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, secretion signal, secretion vector, *sopE*

장티푸스 등의 원인이 되는 병독성 *Salmonella* 세포가 숙주 세포 내로 침입해 들어가는 과정(invasion)에 대해서 여러 연구자들이 연구해 왔음에도 불구하고 아직도 알려져 있지 않은 부분이 많다. 소장의 상피 세포 내로 *Salmonella*가 invasion하는 이 단계에는 *Salmonella*로부터 분비되는 단백질들이 필요하며, 이러한 단백질들은 type III 분비장치에 의해 분비된다(8).

일반적으로 세균단백질을 분비하는 경로는 그람음성세균의 경우 type I-IV까지의 네 가지가 알려져 있다(7). 첫째, type I 분비장치는 sec-independent로, 전형적인 신호펩타이드가 목적단백질의 N-말단부위에 있지 않고, C-말단부위에 있다. 이 장치는 3-4개의 단백질이 trans-membrane channel을 형성하여 목적단백질을 통과시키는 것이다(13). 둘째, type II 분비장치는 sec-dependent로, 그람음성세균에서 단백질을 분비하는 가장 일반적인 기구이다. 목적단백질의 N-말단에 있는 짧은 아미노산 서열은 이러한 단백질들 사이에서 보존되어 있다. 목적단백질은 이 분비기구를 통해 periplasm으로 운반되며, 짧은 아미노산서열은 분비장치의 일부로 되어있는 peptidase에 의해 제거된다. 셋째, type IV 분비장치 역시 sec-dependent이나, outer membrane을 통과하는데 또 다른 단백질을 필요로 하지 않는다. 여기서는 분비단백질들이 공극을 형성하여 자신들의 분비를 유도하게 된다(5,11,12). 마지막

으로, type III 분비장치는 sec-independent이며, 목적단백질 N-말단의 15-20개 아미노산이 분비신호로 작용할 것이라 제시되어져 왔다. 그러나, 연구자들은 분비신호로 작용할 구조적 특징을 관찰하지 못하였고, N-말단의 아미노산을 변형시키는 돌연변이에 의해서도 목적단백질의 분비가 영향 받지 않는다는 것을 관찰하였다. 다른 한편, *Yersinia enterocolitica*의 YopE, YopN에 대한 최근의 연구에서, type III 분비장치에 의해 인지되는 분비신호는 목적단백질의 N-말단부위에 있는 것이 아니라 목적단백질을 암호화하는 mRNA의 5'부위의 특정 2차 구조에 있을 가능성이 제시되었다(1). 그리고 type III 분비장치를 구성하는 단백질중 하나인 LcrD를 가지지 않는 돌연변이에서 YopQ의 translation과 분비가 일어나지 않음이 보고되었다(2). 그러나, 아직 *S. enterica* serovar Typhimurium에서는 비슷한 mRNA 분비신호가 보고되지 않았으며, *Yersinia*에서조차도 위의 가설을 검증할 실험적 결과들이 충분하지 않은 상태이다.

한편, 유용한 외래단백질의 대량생산을 위해 *E. coli*, *Bacillus* 등이 숙주세포로 사용되어 왔다. 그러나 *E. coli*의 내부에서 단백질을 과발현시키는 것은 불용성 단백질침전을 형성시키게 되며, 발현된 단백질을 정제하기 위해 세포를 깨뜨리면 endotoxin인 LPS가 나오게 되어 정제에 어려움을 겪는 등의 난점이 있다. *Bacillus*를 숙주 세포로 사용할 경우에도, 세포 밖으로 분비되는 다양한 exoprotease들로 인해 목적 단백질을 다량으로 확보하는데에는 어려움이 적지 않다(6, 9). 따라서 좀더 효과적으로 외래 단백질을 발현, 분비시킬 수 있는 vector 및 숙주 system의 개발

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 02-3290-3422, Fax: 02-927-9028  
E-mail: ykpark@korea.ac.kr

이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 *Salmonella*의 type III 분비단백질 중 SopE를 선정하고, 앞서 언급한 *Yersinia* 연구 결과를 토대로 *sopE*의 프로모터와 SopE의 N-말단 일부를 이용하여 SopE-OmpR translational fusion을 만들었으며, *Salmonella* type III 분비장치에 의한 이 fusion protein의 분비를 조사하였다. 또한 본 연구 결과를 바탕으로, 유용한 외래 단백질을 효과적으로 생산, 분비할 수 있는 secretion vector의 원형을 개발하였다.

## 재료 및 방법

### *sopE* mRNA의 2차 구조분석

NCBI를 통해 *S. enterica* serovar Typhimurium의 *sopE* 유전자 염기서열을 얻고, D. Zuker 박사가 인터넷으로 제공하는 MFOLD를 이용하여 *sopE* mRNA의 2차 구조를 분석하였다.

### 균주, 플라스미드, 배양조건

SopE의 N-말단부위에 해당하는 DNA 절편을 PCR을 통해 얻기 위해 주형으로 사용할 genomic DNA를 *S. enterica* serovar Typhimurium SL1344로부터 얻었으며, 형질전환용 숙주세포로는 DH5 $\alpha$ 등을 사용하였다. 중간 숙주로는 *Salmonella* 균주인 SF586을 사용하였으며, reporter 플라스미드를 넣어 OmpR의 분비를 확인하기 위해 *ompR* 돌연변이주로 *Salmonella* 균주인 CDJ359를 사용하였다.

Secretion vector의 원형을 만들기 위해 pGEM-3Z vector를 사용하였으며 TA 클로닝을 위해 pGEM T-easy system(Promega, Madison, USA)을 사용하였다.

Immunoblot을 위한 단백질 합성을 유도하기 위해 본 배양시 LB(0.5% NaCl)에서 5시간 배양 후 세포를 다시 LB(1% NaCl)에 현탁하여 5시간을 더 배양하였다.

### DNA 조작, 형질전환

Reporter 단백질로 사용하기 위한 *ompR*의 DNA절편을 얻기 위해 primer를 제조하여 PCR을 수행하였다. 이를 XbaI, PstI로 처리한 뒤 같은 처리를 거친 pGEM3Z vector와 ligation하여 reporter plasmid를 제조하였다.

*sopE*의 분비신호를 얻기 위해 우리는 다음과 같은 PCR primer를 제조하였다. EU(5'cggaattctaattaccctgacgatt3'), E10(5'cgggatccgctaataaatatatacaaaacactc3'), E15(5'cgggatcc atactgaaaa-cattgctaataaa3'). PCR산물은 QIAEX kit로 추출하였으며, BamHI 과 EcoRI을 처리한 뒤 같은 처리를 거친 reporter plasmid와 ligation하였다.

대장균 균주는 CaCl<sub>2</sub> 방법으로 형질전환 하였다. 세포를 37°C에서 하룻밤 전 배양 한 뒤, 역시 37°C에서 OD600 $\approx$ 0.3이 되도록 본 배양 후 3,300 $\times$ g에서 15분간 원심분리한 다음 10 ml의 50 mM CaCl<sub>2</sub>에 resuspend하였다. 이를 원심분리하고 5분간 얼음에 둔 후 여기에 1 ml의 50 mM CaCl<sub>2</sub>를 넣고 1시간 30분 가량 얼음에 방치하고 그리고 42°C에서 1분 30초 동안 정확하게 열 충격을 준 뒤 미리 준비한 LB를 1 ml정도 넣고 60분 정도

배양하여 선택배지 위에 도말하였다. *S. enterica* serovar Typhimurium균주는 electroporation 방법으로 형질 전환하였다. 37°C에서 하룻밤동안 전 배양 한 뒤 OD $\approx$ 0.7이 되도록 본 배양 후 3,300 $\times$ g에서 15분간 원심분리한 다음 세포를 같은 부피의 차가운 D.W로 잘 닦고 다시 원심분리하고 세포를 0.5부피의 차가운 D.W로 잘 닦고 다시 원심분리 후 0.02부피의 차가운 20% glycerol-water로 잘 섞고 원심분리 하였다. 마지막으로 0.002-0.003부피의 차가운 20% glycerol-water로 섞은 뒤 25-30  $\mu$ l씩 분주하여 -70°C에 보관하였다. 형질전환시에는 CP cell 20  $\mu$ l에 DNA를 3  $\mu$ l 섞고 300 V에서 수행하였다.

### 상등액에서의 단백질 침전

1% NaCl LB에서 배양한 세포배양액을 3,300 $\times$ g에서 20분간 원심분리 후 상등액을 취하여 low-protein binding filter인 Gelman사의 HT Tuffryn membrane Syringe Filter로 filtering하였다. 여기에 같은 부피의 ice-cold acetone를 천천히 교반시키면서 가한 후 15분간 더 ice상에서 교반시켜 침전시켰다.

### Immunoblotting

Protein methods(3)의 방법에 따랐다.

## 결과 및 고찰

### *yopE*, *yopQ*, *yopN*과 *sopE*의 mRNA의 2차 구조분석

현재까지 *Yersinia*의 type III 분비장치에서 밝혀진 바로는 목적 단백질의 분비가 chaperone의 도움을 받아 이루어지는 경우와 mRNA의 특징적인 2차 구조에 의존하는 두 가지 경우가 보고되었다(1,4). 특히, YopQ의 경우에서처럼 분비와 translation이 연계된 경우(2)에는 mRNA 특징적인 2차 구조의 형성과 분비, 그리고 translation이 연관관계를 가지고 단백질의 분비가 이루어진다.

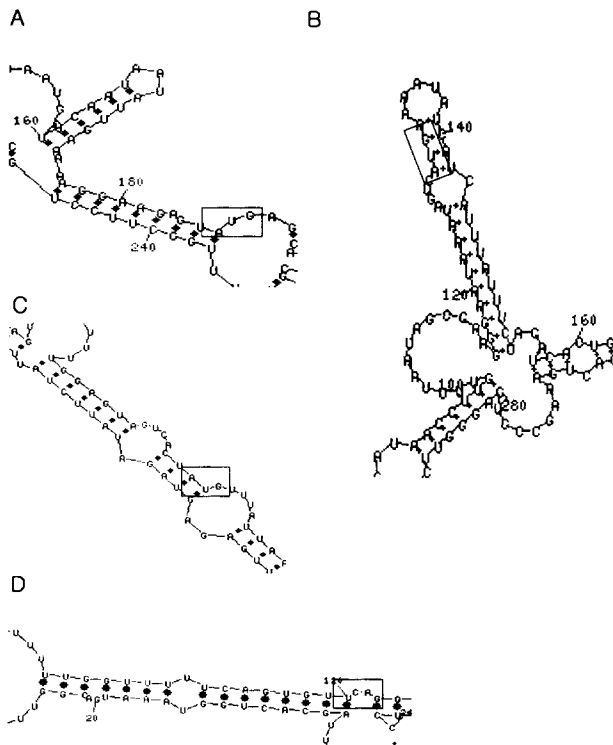
따라서 우리는 *Yersinia*의 type III 분비단백질의 mRNA 2차 구조와 *S. enterica* serovar Typhimurium의 그것을 서로 비교해 보았다(Fig. 1). 그 결과, 이들간에는 특징적인 유사점이 발견되었는데, 주로 Shine-Dalgarno sequence와 start codon등이 stem내에 위치하고, loop에는 위치하지 않는 것을 관찰할 수 있었다. 이로 미루어 볼 때, 위의 구조가 translation에 영향을 미칠 가능성을 제시하고 있다. 즉, Shine-Dalgarno sequence 등이 mRNA 2차 구조에서 stem구조에 갇힘으로 인해 translation에 필요한 리보솜의 결합이 차단될 수 있는 것이다.

### *sopE*의 분비신호, *ompR* DNA절편의 합성 및 translational fusion의 제조

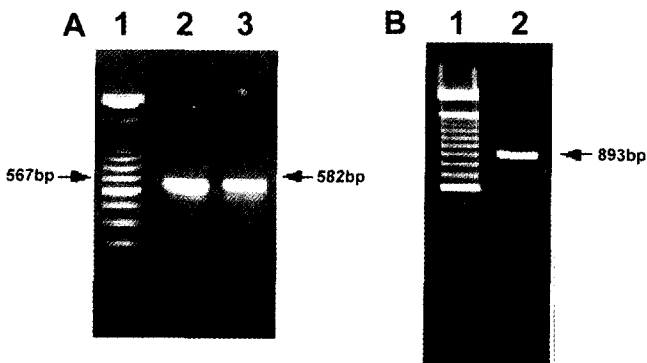
*yopQ*, *yopE*의 경우에서와 같이, type III 분비와 관련된 mRNA 신호는 시작 코돈에서부터 약 15개 코돈까지로 알려져 있다. Type III 분비장치들은 각 세균사이에서 보존되어 있으므로, 일단 *sopE*의 프로모터 부위와 시작 코돈으로부터 15개 정도의 코돈들을 선정하여 reporter 단백질(OmpR)과 융합시킨 후, 융합단백질의 분비 여부를 조사하였다. 이를 위해 우선 *Salmonella* 균주인 SL1344의 genomic DNA를 주형으로 한 PCR을 통해

*sopE*의 프로모터와 시작 코돈으로부터 10, 15개 코돈들을 포함하는 DNA 절편들을 제조하였다(Fig. 2A). 그리고 *ompR* DNA 절편은 역시 coding 부위만을 가지도록 primer를 제조하여 SL1344의 genomic DNA를 주형으로 PCR을 통해 얻었다(Fig. 2B).

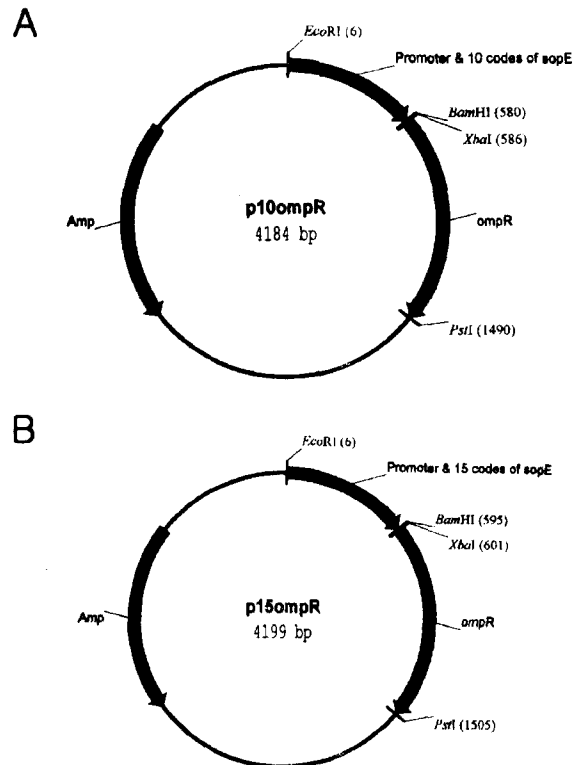
이상의 두 가지 DNA 절편들을 TA vector에 클로닝한 뒤 sequencing을 통해 point mutation이 일어나지 않았음을 확인하였다(data not shown).



**Fig. 1.** Secondary structure of mRNAs that encode type III secretion proteins and beta-lactamase. Boxes implicate start codon; A, beta-lactamase; B, *yopE*; C, *yopQ*; D, *sopE*.



**Fig. 2.** PCR products of secretion signal of *sopE* and *ompR*. Chromosomal DNA of *S. enterica* serovar Typhimurium was used as template: A. lane 1, 100 bp ladder; lane 2, promoter and sequence of 1-10 codons(567 bp); lane 3; promoter and sequence of 1-15 codons(582 bp). B. lane 1, 100 bp ladder; lane 2, *ompR*(893 bp).



**Fig. 3.** Translational fusion of putative secretion signal of *sopE* and *ompR* ; A. promoter and 10 codes of *sopE* was fused with *ompR*. B. promoter and 15 codes of *sopE* was fused with *ompR*.

*sopE*와 *ompR*의 translational fusion을 만들기 위해 *ompR* DNA 절편을 PCR로 합성한 다음 pGEM-3Z에 cloning하여 reporter plasmid를 제조하였다. cloning해 넣은 *ompR*의 상위부분에 *sopE*의 분비신호에 해당하는 DNA 절편을 frame에 맞춰 삽입함으로써 translational fusion을 제조하였다(Fig. 3). 이렇게 제조한 재조합 플라스미드를 대장균 균주인S DH5α에 형질전환하고 여기서 얻은 플라스미드를 다시 SF586을 거쳐 최종 숙주인 야생형 *Salmonella* 균주인 SL1344로 형질전환 하였다.

**Reporter 단백질(OmpR)의 분비확인 및 Secretion vector로의 활용**

분비된 OmpR 단백질을 확인하기 위해, 세균을 배양한 상등액으로부터 단백질을 얻은 다음, SDS-PAGE후 immunoblot을 통해 융합된 OmpR reporter 단백질이 상등액으로 분비됨을 확인하였다(Fig. 4).

SopE10-OmpR과 SopE15-OmpR의 밴드가 야생형의 OmpR 밴드보다 더 높게 나타난 것은 OmpR 단백질의 앞부분에 분비신호인 *sopE*의 일부가 포함되어있기 때문으로 보인다. 이 결과로 볼 때, 목적 단백질을 분비시키는데 필요한 분비신호로 작용하는 부위는 *sopE*의 시작 코돈으로부터 10개 코돈까지인 것으로 추정된다. SopE의 분비신호는 단백질 N-말단의 아미노산 서열에 있는 것으로 보여지나, 이전의 연구들에서 type III 분비단백질들의 N-말단에서는 특징적으로 반복되는 서열이 관찰된 바 없으므로

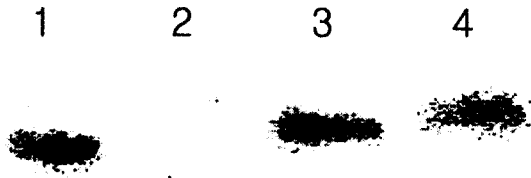


Fig. 4. Secretion of reporter OmpR proteins in culture supernatant at high osmolarity conditions: lane 1, native OmpR; lane 2, negative control; lane 3, SopE-10 amino acids and OmpR; lane 4, SopE-15 amino acids and OmpR.

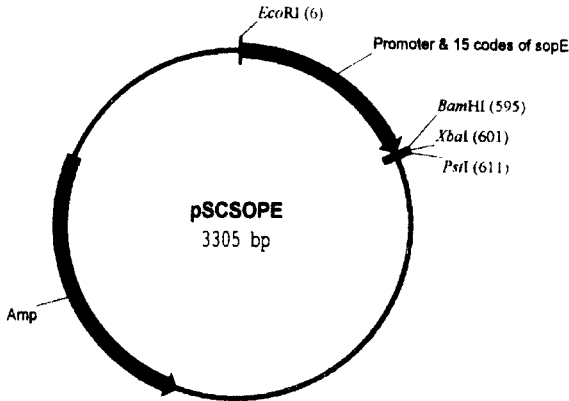


Fig. 5. Secretion vector using putative secretion signal of *sopE*.

이 또한 *Yersinia enterocolitica*에서 YopQ, YopE(1, 2) 등의 경우와 마찬가지로 mRNA의 2차 구조가 단백질의 분비에 영향을 미친 것으로 사료된다.

그러나 이와 같이, mRNA가 분비신호를 가진다는 것을 확증 하려면 몇 가지 실험 결과가 더 필요할 것이다. 먼저 분비신호부위에 frame-shift 돌연변이를 일으킨 다음 reporter 단백질의 분비 양상이 어떻게 변화하는가를 관찰해야 하며 둘째로, type III 분비장치와 분비단백질의 mRNA가 상호작용을 한다는 것을 밝혀야 한다. 전형적인 type III protein인 YopQ의 경우에서, translation과 분비가 연계되어 있는데 type III 분비장치를 구성하는 특정 단백질에 의해 mRNA의 2차 구조가 변형되면서 translation이 시작된다는 모델이 제시되고 있다. 그리고 *Yersinia*에서 type III 분비장치를 이루는 단백질 중 LcrD의 돌연변이주에서 이러한 YopQ의 translation이 저해(2)되었으므로, *Salmonella*에서는 이와 비슷한 염기서열을 가지는 *invA*가 동일한 역할을 할 것으로 사료된다. 따라서, *InvA*와 *sopE*의 mRNA간의 상호작용을 관찰할 필요가 있는 것으로 생각된다.

위의 연구결과를 토대로 볼 때, *sopE*의 분비신호 뒤에 목적단백질의 DNA 염기를 클로닝하면 그 단백질이 세포배양액으로 분비되어 나올 것이다. 우리는 이와 같은 방법으로 secretion vector의 원형을 제조하였다(Fig. 5). pGEM-3Z vector의 multi-cloning site에 *sopE*의 분비신호부위를 클로닝하여 만든 이 플라스미드는 효율적인 목적단백질의 발현을 위해 앞으로도 몇 가지의 개선이

이루어져야 할 것이다. *Yersinia*의 type III 분비장치에서도 보고된 바(2)와 같이 우선 전사수준에서의 조절로서 과발현시키기에 적당한 다른 프로모터를 *sopE*의 프로모터 대신으로 이용하여 그 발현정도를 높여야 할 것이다. 또, secretion vector에 과발현시킨 *hila* DNA절편을 클로닝하여 type III 분비장치의 과발현을 유도할 필요가 있다. *hila*는 SPI1의 type III 분비장치를 positive하게 조절(8)하므로 이 작업으로 복제단백질이 분비될 수 있는 기구가 늘어나 결과적으로 단백질의 분비가 촉진될 것으로 사료된다.

### 감사의 글

이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되었음.

### 참고문헌

- Anderson, D. M. and O. Schneewind. 1997. A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science* 278, 1140-1143.
- Anderson, D. M. and O. Schneewind. 1999. *Yersinia enterocolitica* type III secretion: an mRNA signal that couples translation and secretion of YopQ. *Molecular Microbiology* 31, 1139-1148.
- Bollag, D. M. and S. J. Edelstein. 1991. WILLY-LISS. Protein Methods 181-211.
- Cheng L, W. and O. Schneewind. 1999. *Yersinia enterocolitica* type III secretion. On the role of SycE in targeting YopE into HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 274(31), 22102-8.
- Cover, T. L., M. K. Tummuru, P. Cao, S. A. Thompson, and M. J. Blaser. 1994. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J. Biol. Chem.* 269, 10566-105731.
- Detlev Behnke et al. 1992. *Biotechnology* 22, 143-188.
- Fath, M. J. and R. Kolter. 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* 57, 995-1017.
- Galan, J. E. and C. M. Collazo. 1997. The invasion-associated type-III protein secretion system in *Salmonella*--a review. *Gene* 192, 51-59.
- Hueck, C. J. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *MMBR.* 62, 379-433.
- Maloy, S. R. 1989. Experimental techniques in bacterial genetics. Jones and Bartlett publishers. 53-55.
- Miyazaki H., N. Yanagida, S. Horinouchi, and T. Beppu. 1989. Characterization of the precursor of *Serratia marcescens* serine protease and COOH-terminal processing of the precursor during its excretion through the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171, 6566-6572.
- Poulsen K., J. Brandt, J. P. Hjorth, H. C. Thogersen, and M. Kilian. 1989. Cloning and sequencing of the immunoglobulin A1 protease gene(*iga*) of *Haemophilus influenzae* serotype b. *Infect. Immun.* 57, 3097-3105.
- Welch, R. A. 1991. Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 5, 521-528.

(Received August 14, 2000/Accepted November 30, 2000)

---

**ABSTRACT : Identification of Secretion Signals of Target Proteins in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Construction of Secretion Vector using this Signal**

**Choi Hyuk Jin, Eom Joon Ho, Cho Jung Ah, Lee Sun<sup>1</sup>, Lee Kyoung Mi<sup>1</sup>, Lee In Soo<sup>1</sup>, and Park Yong Keun\*** (Graduate School of Biotechnology, Korea University; Seoul 136-701, <sup>1</sup>Dept. of Microbiology, Hannam University, Taejeon 306-791, Korea)

Invasion process of bacterial cell into intestinal epithelium is important in *Salmonella* infection. The invasion is induced by the proteins secreted by type III secretion apparatus of *Salmonella*. It has been known that the proteins do not have N-terminal signal peptide existing in general secreted proteins. Recent studies on *Yersinia* reported that secretion signal of type III apparatus may lie on 5'end secondary structure of mRNA of secreted protein. In this study, we constructed translational fusion of *ompR* and *sopE*, encoding type III secretion protein of *Salmonella*, and observed secretion of the fusion protein for investigating the secretion signal of *Salmonella* type III apparatus. The *sopE* DNA fragments of the translational fusion contain the region of promoter and from start code to tenth or to fifth code. These translational fusions indicate that type III secretion signal of *Salmonella* is located on 5'end of mRNA encoding secreted protein. We constructed prototype of secretion vector using this signal to produce useful foreign protein.