

Salmonella typhimurium cadBA 오페론의 발현에 관여하는 돌연변이체의 선별 및 그 특성

방성호* · 박용근¹

한서대학교 생물학과, ¹고려대학교 생명공학원

*S. typhimurium cadBA operon*의 발현에는 산성 pH와 고농도의 lysine 등 적어도 두 가지의 세포외부 신호가 요구된다. pH와 lysine신호에 따른 *cadBA* 발현 조절 기작을 이해하기 위하여, *Tn10*삽입, 자발적 돌연변이, EMS 돌연변이 등을 수행하여 JF2238과 *cadA-lacZ*의 발현특성에 차이를 보이는 돌연변이체를 선별하였다. *cadBA*의 양성적 조절자의 유전자인 *cadC*내의 돌연변이 중 *cadC4* 돌연변이는 pH-비의존성, lysine-의존성 발현을, *cadC6* 돌연변이는 pH-비의존성, lysine-비의존성 *cadA-lacZ* 발현을 나타내었다. 산성 pH, lysine이 없는 조건에서 *cadA-lacZ* 발현을 유도하는 *cadR::Tn10*과 *cadR3* 돌연변이체를 분리하여 *cadR*이 lysine이 없는 조건에서 *cadBA* 발현을 음성적으로 조절하는 음성적 조절자의 유전자를 알 수 있었다. *cadR* 돌연변이체는 lysine의 독성 유사체인 thiosine에 대해 내성 (*Ts^r*)을 나타냈으며, *E. coli*의 *lysP* 클론을 갖고 있는 pLYSP에 의해 돌연변이 형질이 보상되었다. 또한 lysine decarboxylase (CadA)의 반응산물인 cadaverine은 *cadC⁺* 균주에서 *cadA-lacZ* 발현에 억제효과를 나타냈으나, *cadC* 돌연변이에는 억제효과가 나타나지 않았다.

Key words □ cadaverine, *cadBA* operon, *cadC*, *cadR*, lysine decarboxylase

*Salmonella typhimurium*은 생활사를 수행하는 동안 생태학적인 지위에 따라 매우 다양한 강도의 산성 스트레스에 노출되어 있다. 숙주에 침입 시 미생물은 위에서 강산을, 장에선 휘발성 지방산을 그리고 phagosome과 phagolysosome에서도 산성 스트레스를 겪는다(4). 산성 스트레스는 결국 미생물 세포 내 pH (pH_i)를 산성화하여 세포의 다양한 거대분자에게 손상을 주게되며 미생물을 사멸에 이르게 한다(2). 이러한 산성 스트레스는 미생물로 하여금 산성 스트레스를 중화 또는 약화시킬 수 있는 여러 가지 생존 전략을 진화시키도록 하였는데 이러한 전략은 산 내성 반응(Acid Tolerance Reponse, ATR)과 여러 가지 아미노산 탈탄산효소(amino acid decarboxylase)에 의해 수행된다(5,6,8, 10,11). 미생물이 어떻게 외부 pH(pH_o) 변화를 감지하고 반응하는가에 관한 연구는 미생물의 pH 변화에 따른 신호 전환(signal transduction) 기작을 설명하도록 해줄 것이며, 더욱이 미생물이 pH 이외의 다양한 환경 스트레스에 대해 어떻게 반응하는가를 설명할 수 있는 모델을 제시해줄 것이다.

이를 위해 본 연구진은 *S. typhimurium*에서 산성 조건에서 발현이 유발되는 *cadBA* 오페론을 분리하여 이의 구성과 발현 특성 등에 관한 연구를 수행하였다. *S. typhimurium cadBA* operon은 산성 pH_o, 라이신(lysine) 존재시, 무산소 조건에서 최고의 발현이 유도되며 염색체 상에서 56.2 min에 위치하였고(7), *cadBA* operon은 lysine decarboxylase를 암호화하고 있는 *cadA*와 lysine/cadaverine antiporter를 암호화하고 있는 *cadB*로 구성되어 있었

고, *E. coli*의 *cadBA* 오페론과는 79%의 상동성을 나타내었다. 또한 pH 3.0의 낮은 pH에서 pH 항상성 유지에 lysine decarboxylase는 중요한 기능을 하였다(12,16).

산성 pH_o와 분해 기질인 라이신이 존재할 때 발현이 유발되는 *E. coli*와 *S. typhimurium*의 *cad* 오페론은 발현이 유도된 CadA와 CadB의 작용으로 라이신을 세포 외에서 유입된 H⁺를 소비하면서 탈탄산하여 염기성 산물인 카테르틴(cadaverine)으로 전환시킨 후 세포 외로 분비시켜 외부 산성 pH를 중화시키는 기작으로 세포를 산성 pH 조건에서 보호하는 모델이 제시되었다(12,15,16). 그러나 pH 신호에 따른 유전자 발현 조절에 관한 연구는 *E. coli*의 *cad* 오페론에서만 비교적 연구가 진행되었을 뿐 *E. coli*의 다른 유전자 및 *Salmonella*를 비롯한 병원성을 유발하는 미생물에서는 알려진 바가 거의 없는 실정이다. *E. coli*의 *cad* 오페론은 *trans-acting* 조절자인 *CadC*가 양성적 조절자(22)로서 그리고 *LysP/CadR*가 음성적 조절자로 작용하여 pH-신호, 라이신-신호에 따른 유전자 발현 조절이 이루어진다(14). 그리고 본 연구진은 최근에 *S. typhimurium*에서 양성적 조절유전자인 *cadC*를 분리하였고 그 유전자를 cloning하여 염기서열을 밝혀 그 기능과 구조가 *E. coli*의 *cadC*와 유사함을 보고하였다(9).

이에 본 연구에서는 *S. typhimurium*을 재료로 하여 pH 신호에 대한 신호전환 기작을 규명하기 위해 *S. typhimurium cad* 오페론의 발현에 관여하는 *trans-acting* 조절유전자를 *Tn10* 삽입, 자발적 돌연변이유발, EMS 돌연변이유발 등을 수행 분리하였다. 그리고, 각 조절인자에 의한 *cadBA* 오페론의 발현 조절 양상과 lysine decarboxylase의 작용산물인 카테르틴에 의한 영향 등을 조사하였다. *S. typhimurium cadBA* 오페론 발현은 양성적 조절

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 041-660-1342, Fax: 041-660-1119
E-mail: bang342@hanseo.ac.kr

유전자인 *cadC*와 음성적 조절인자인 *cadR*에 의해 조절이 이루어졌고, pH-신호는 *cadC*에 의해, 라이신-신호는 *cadC*와 *cadR*에 의해 매개되었다. 또한 이러한 조절인자에 의한 발현조절 이외에도 *cadBA* 오페론의 발현은 산성 pH에서 카테콜린에 의해 음성적으로 조절되었다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에 사용한 균주, 파아지 및 플라스미드는 Table 1에 명시하였다.

배양배지로는 최소배지로서 E 최소배지(50배 농축 - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 g; Citric acid $1H_2O$ 100 g; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 655 g; $NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$; D.W 1000 ml-을 희석 사용)에 glucose (0.4%)를 첨가하여 사용하였고(SG), 영양배지로서 LB 배지를 사용하였고, *lacZ* 유전자의 발현 여부는 MacConkey 배지와 LB 및 E 최소 배지에 0.3 ml/100 ml X-gal(20 µg/ml)과 40 µg/ml IPTG를 첨가한 배지를 사용하였으며, 파아지 감수성 실험에는 녹색 지시평판 배지(Green Indicator plate)를 사용하였다. LB 배지의 pH 적정을 위한 완충제로는 Slonczewski 등(19)의 방법에 따라 MES[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid] (pH 5.5)와 MOPS[3-(N-morpholino)proanesulfonic acid] (pH 8.0)를 각각 100 mM 농도로 사용하였다. 항생제는 *MudJ* 확인을 위해 Km은 50 µg/ml, *Tn10* 삽입 확인을 위해 Tet는 20 µg/ml을 사용하였고, plasmid 형질 전환을 확인할 때는 Ap는 60 µg/ml을 사용하였으며 라이신의 독성 유사체인 S-(β-Aminoethyl)-L-cystein(thiosine)은 100 µg/ml 농도로 사용하였다.

Tn10 pool을 이용한 조절 유전자의 검색

cad 오페론의 발현에 관여하는 조절유전자를 찾기 위해

Tn10(*dT₁₀*) pool을 이용하였다. *Tn10* pool 50 µl를 수용세포인 JF2238에 형질 도입시켜 각 pH 조건의 X-gal이 첨가된 LB 배지에서 표현형의 전이가 나타나는 균주를 선별한 후 β-galactosidase 활성을 측정하여 pH 조건에 따른 유도비를 확인하였다. *Tn10* 삽입 돌연변이가 프로모터 부위에 발생한 것(cis-acting)인지 혹은 독립적인 위치에서 발생한 것(trans-acting)인지를 확인하기 위하여, 조절 유전자 부위를 포함하는 transducing particle을 P22로 제조한 후 모균주(JF2238)에 형질도입시켜 프로모터 연관 여부를 확인하였다.

돌연변이 유발

자발적 돌연변이는 *cadA-lacZ* 균주들을 3 ml의 E 배지(pH 7.0)에서 12시간 진탕 배양한 후, 동일 양의 PBS로 3번 세척하여 현탁시킨 후 유일 탄소원으로 0.2% 락토오스를 포함한 NCE 배지(50배 농축- KH_2PO_4 197 g; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 323 g; $NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$ 175 g; D.W 1000 ml-희석 사용)에 도말하여 2-3일간 37°C에서 배양한 후 Lac발현을 나타내는 균주를 1차로 선별하였으며, 2차로 X-gal이 포함된 각 pH 조건별, 라이신 존재 유무에 따른 선별 배지에서 모균주와 표현형이 다른 돌연변이체를 선별하고 β-galactosidase 활성을 측정하였다. 또한 *cadA-lacZ* 균주의 발현에 영향을 미치는 조절 유전자를 분리하기 위해 Methanesulfonic acid ethyl ester(EMS)를 돌연변이원으로 이용하여 Neely 등(14)의 방법에 따라 돌연변이를 유발시켰으며, 각 조건의 배지에서 표현형의 전이를 나타내는 돌연변이 균주를 선별하였다.

β-galactosidase 활성 측정

β-galactosidase 활성은 Miller(13)의 방법으로 수행하였다. 각 균주를 pH 7.0의 SG배양액에서 후기 대수기까지 전배양한 후 각 pH 조건별(pH 5.8, pH 7.8)과 라이신 유무별[Lys(+);10 mM,

Table 1. Characteristics of bacteria and plasmid in this study

Strains & plasmid	Genotype and/or relevant characteristic	Source/reference
<i>Salmonella typhimurium</i>		
LT-2	wild type	J. W. Foster
JF2238	<i>cadA10::MudJ</i>	This study
JF2643	<i>cadA10::MudJ cadC1::Tn10</i>	This study
JF2644	<i>cadC1::Tn10</i>	This study
JF2744	<i>cadA10::MudJ cadR1::Tn10</i>	This study
JF2818	JF2743/pLYSP	This study
YK3127	<i>cadA10::MudJ cadC4</i>	This study
YK3129	<i>cadA10::MudJ cadC4 cadC1::Tn10</i>	This study
YK3135	<i>cadA10::MudJ cadC6</i>	This study
YK3136	<i>cadA10::MudJ cadR3</i>	This study
YK3138	<i>cadA10::MudJ cadC6 cadC1::Tn10</i>	This study
YK3139	<i>cadA10::MudJ cadR3 cadC1::Tn10</i>	This study
Plasmid		
pLYSP	pUC19-based plasmid expressing lysP, Apr	Steffes <i>et al.</i> (20)

Lys(-)]로 조성된 SG배양액에 전배양 균주를 접종하여 OD₆₀₀=0.4까지 성장시킨 후 β-galactosidase 활성을 측정하였다. 그리고 카데브린 영향을 확인하는 연구에선 라이신이 첨가된 pH 5.8 SG배양액에 카데브린을 농도별로 첨가 또는 첨가하지 않은 배양액에서 본배양한 후 활성을 측정하였다.

결 과

조절 유전자, *cadR*

*S. typhimurium*에서 라이신-신호에 따라 *cadBA* 오페론의 발현에 영향을 주는 요소를 분리하기 위하여 JF2238에 *Tn10* pool을 형질도입하거나 또는 EMS를 사용하여 돌연변이를 유발시킨 뒤 라이신이 결여된 SG-5.8-X-gal 평판 배지에서 청색 집락을 형성하는 라이신-비의존성 돌연변이체를 선별하였다. *Tn10* 삽입 돌연변이체(JF2743)와 EMS에 의한 돌연변이체(YK3136)들에 대한 β-galactosidase 활성을 조사한 결과, 산성 pH이고 라이신이 없는 조건에서 JF2238보다 높은 유도비를 나타내고 있었다(Table 2). *Tn10* 삽입부위(*cadR::Tn10*)를 *S. typhimurium* LT-2에 형질도입시킨 결과 *Km^r*와 *Tc^r*의 상호 형질도입 빈도가 0%로 측정되어 라이신-비의존성 돌연변이는 *cadBA*와는 전혀 연관되어 있지 않는 *trans-acting* 조절 유전자 내에 일어났으며, 라이신 결여 시 *cadBA* 발현을 억제하기 때문에 음성적 조절 유전자에 *Tn10* 삽입 또는 돌연변이가 생겼음을 확인하였고 이 유전자를 *cadR*라

명명하였다. 한편, 분리한 돌연변이체의 thiosine내성을 조사해보니 JF2643은 thiosine 감수성(*Ts^r*), 모든 *cadR* 돌연변이는 thiosine 내성(*Ts^s*)을 나타내었다. *cadR* 돌연변이에 따른 *S. typhimurium*의 라이신 투과효소 활성은 현재 조사 중이지만 *E. coli*의 *lysP* 클론을 지니고 있는 pLYSP(20)를 *cadR* 돌연변이(JF2743)에 형질 전환시킨 형질 전환체(JF2818)에서 *cadBA* 발현과 *Ts^r*에 대한 보상이 이루어지는 것으로 확인되어 *cadR*은 라이신 투과효소를 코딩하고 있을 것으로 예상하고 있다(Table 2). Mud PQ system(1)을 이용하여 *cadR::Tn10*의 염색체상의 위치를 확인하였더니 *cadR*은 55 min.와 57 min. 사이에 존재하고 있어, *E. coli*의 *cadR* 위치가 46.5 min. 존재하는 것과는 차이를 나타내고 있었다.

pH-비의존성, 라이신-의존성 돌연변이와 pH-비의존성, 라이신-비의존성 돌연변이

유일 탄소원으로 lactose를 첨가한 NCE 배지에서 자발적 돌연변이와 EMS에 의한 돌연변이를 수행하여 라이신과 X-gal이 첨가된 SG평판배지(pH 7.8)에서 청색 집락을 형성하는 돌연변이체를 선별하였고, 각 돌연변이체의 β-galactosidase 활성을 측정하여 *cadA-lacZ* 발현 특성을 확인한 결과 라이신 존재 시에 산성 pH와 염기성 pH 모두에서 *cadA-lacZ* 발현이 유도되는 YK3127과 pH-비의존성이고 라이신-비의존성인 발현 특성을 나타내는 YK3135가 선별되었다(Table 3). 이러한 돌연변이체(YK3127, YK3135)들의 transducing particle을 LT-2에 형질 도입한 결과 돌

Table 2. Effect of pH and lysine on *cadA-lacZ* expression in *cadR* mutants

Strain	genotype	β-Galactosidase activity*			
		pH 5.8		pH 7.8	
		Lys(-)	Lys(+)	Lys(-)	Lys(+)
JF2238	<i>cadA10::MudJ</i>	3.6	850.0	7.5	9.1
JF2743	<i>cadA10::MudJ cadR1::Tn10</i>	760.2	770.2	11.2	10.0
YK3136	<i>cadA10::MudJ cadR3</i>	1060.8	1143.5	6.7	4.4
JF2818	JF2743/pLYSP	20.0	682.0	6.2	3.1

*Expressed as μmol min⁻¹(OD₆₀₀ unit)⁻¹, according to Miller (1992).

Table 3. Effect of pH and lysine on *cadA-lacZ* expression in *cadC* and *cadR* variants

Strain	genotype	β-Galactosidase activity*			
		pH 5.8		pH 7.8	
		Lys(-)	Lys(+)	Lys(-)	Lys(+)
JF2238	<i>cadA10::MudJ</i>	3.4	926.4	10.9	7.0
JF2643	<i>cadA10::MudJ cadC1::Tn10</i>	17.6	15.6	17.0	18.1
YK3127	<i>cadA10::MudJ cadC4</i>	21.2	1260.8	10.0	375.7
YK3129	<i>cadA10::MudJ cadC4 cadC1::Tn10</i>	10.2	9.3	7.2	6.9
YK3135	<i>cadA10::MudJ cadC6</i>	565.0	560.9	535.3	529.2
YK3138	<i>cadA10::MudJ cadC6 cadC1::Tn10</i>	20.2	29.2	30.1	32.0
YK3136	<i>cadA10::MudJ cadR3</i>	1035.5	1141.6	7.3	4.4
YK3139	<i>cadA10::MudJ cadR3 cadC1::Tn10</i>	13.9	17.0	7.6	10.1

*Expressed as μmol min⁻¹ (OD₆₀₀ unit)⁻¹, according to Miller (1992).

연변이 표현형의 형질도입이 각각 46%와 56%의 빈도로 일어났기 때문에 돌연변이 부위는 *cadA*와 연관되어 존재하는 것으로 확인하였으며, *cadC* 내부에 *Tn10*이 삽입되어 균주인 JF2644의 *Tn10*삽입 부위를 YK3127(*cadC4*)과 YK3135(*cadC6*)에 형질도입하였을 때 돌연변이의 상좌가 이루어졌기 때문에 이 돌연변이는 *cadC*내부에서 돌연변이가 유발된 것으로 확인하였다(Table 3). *cadC*내의 돌연변이가 pH-비의존성이고 라이신-의존성 또는 pH-비의존성이고 라이신-비의존성인 *cadA-lacZ* 발현 양상을 보여주고 있는 결과에 따라 *cadC*내부에 pH신호와 라이신 신호를 인지할 수 있는 부위가 있는 것으로 확인되었다.

한편, *S. typhimurium*에서 CadC와 CadR과의 연계성을 조사하기 위해 *cadR3* 돌연변이 균주(YK3136)에 *cadC::Tn10*부위를 형질도입하여 얻은 균주(YK3139)의 *cadA-lacZ* 발현 정도를 β -galactosidase 활성으로 측정하였다(Table 3). YK3139의 *cadA-lacZ* 발현이 JF2643 마찬가지로 어떤 조건에서도 유도되지 않았기 때문에 라이신 신호에 대해 작용하는 CadR의 작용은 CadC에 의해 전달되는 것으로 확인되었다.

카데브린에 의한 영향

카데브린 자체의 *cadBA* 발현 조절 기작을 결정키 위해 생장 배지의 pH를 pH5.8로 완충시키고 다양한 농도의 라이신과 카데브린을 배지에 부가한 후 JF2238을 접종하여 *cadA-lacZ* 발현 정도를 β -galactosidase 활성을 측정하여 조사하였다. Fig. 1에 나타난 것처럼 카데브린은 라이신 농도에 비해 10^{-1} - 10^{-2} 정도의 낮은 농도에서도 *cadA-lacZ* 발현을 억제하였다. 그리고 pH, 라이신 신호에 대해 다른 조절 양상을 보이는 *cadC*와 *cadR*의 돌연변이 균주에 대해서도 cadaverine에 의한 억제 효과도 조사하였다. Table 4의 결과에서 보는 바와 같이 JF2238 (*cadC*⁺), JF2743 (*cadC*⁺ *cadR1::Tn10*), YK3136 (*cadC*⁺ *cadR3*) 등과 같은 *cadC*⁺인 균주에서는 카데브린이 *cadA-lacZ* 발현을 억제하였지만 YK3127(*cadC4*), YK3135(*cadC5*) 등의 균주에서는 카데브린 존재 시에도 높은 β -galactosidase 활성을 보여 pH-비의존성이고 카데브린에 영향을 받지 않는 *cadA-lacZ* 발현을 나타내었다. 이상의

Table 4. Effect of cadaverine on *cadA-lacZ* expression in *cadC* and *cadR* mutants

Strains	genotypes	β -Galactosidase activity*	
		cadaverine(-)	cadaverine(+)**
JF2238	<i>cadA10::MudJ</i>	830.5	18.1
JF2743	<i>cadA10::MudJ</i> <i>cadR1::Tn10</i>	698.8	30.2
YK3136	<i>cadA10::MudJ cadR3</i>	858.2	15.2
YK3127	<i>cadA10::MudJ cadC4</i>	804.1	816.7
YK3135	<i>cadA10::MudJ cadC6</i>	460.6	421.6

*Expressed as $\mu\text{mol min}^{-1} (\text{OD}_{600} \text{ unit})^{-1}$, according to Miller(1972),
**Cadaverine; 1500 uM.

결과로 라이신 신호에 대한 조절작용은 CadC와 CadR에 의해 이루어지지만 pH, 카데브린에 대한 반응은 CadC를 통해 작용한다고 결론 지을 수 있다.

고찰

JF2238로부터 *Tn10* 삽입, 자발적 돌연변이, EMS에 의한 돌연변이를 수행하여 다양한 표현형을 나타내는 돌연변이체들을 선별하였다. *cadC::Tn10* 돌연변이체는 어떤 조건에서도 발현이 유발되지 않았고, *cadC* 내부의 돌연변이체로 확인된 *cadC4* 돌연변이체는 pH-비의존성이고 라이신-의존성인 *cadA-lacZ* 발현을 나타냈으며, *cadC6* 돌연변이체는 pH-비의존성이고 lysine-비의존성인 *cadA-lacZ* 발현양상을 나타내었는데, 이와 같은 결과로 CadC는 *cadA-lacZ*의 발현을 유발시키는 작용을 하는 양성적 조절유전자이며, CadC 내에는 pH 신호와 lysine 신호를 인식하는 부위가 존재한다고 생각한다. *E. coli*에서의 연구 결과에 따르면 CadC는 아미노 말단이 세포질 쪽에 존재하고 중간에 막횡단 부위가 그리고, 카르복시 말단에 주변세포질(periplasmic) 부위가 존재하는 내막성 단백질이며, CadC 아미노 말단의 아미노산 서열이 ROII 종류에 속하는 전사활성요소(17)들의 DNA-결합 부위에서 나타나는 아미노산 서열과 높은 상동성을 지니기 때문에 CadC의 아미노 말단 부위가 Pcad에 작용하여 *cad* 오페론의 발현을 유발시키며(12,21), CadC의 카르복시말단 부위의 돌연변이가 pH-의존성이고 라이신-비의존성 또는 pH-비의존성이고 라이신-비의존성의 *cadA-lacZ* 표현형을 나타내는 것을 알게 되어, 세포외부 산성 pH 신호와 라이신 신호를 CadC의 주변 세포질 부위에서 인식한다고 제안되었다(3,14). 그러나, CadC 자체의 발현은 pH에 영향을 받지 않고 항구적으로 소량 발현되기 때문에 CadC는 산성 pH에서 구조적 변화를 일으키고, 이러한 구조적 변화가 CadC의 아미노말단이 Pcad 또는 전사를 유발시키는 어떤 요소에 작용하여 *cad* 오페론을 산성 pH에서 발현이 유발되도록 한다는 모델을 제시하였다(15,22). 이러한 *cad* 오페론의 발현이 CadC의 구조적 변화에 의해 이루어진다는 모델은 CadC의 돌연변이체들이 pH와 라이신 신호가 없는 조건에서 발현되기 때문에 CadC의 돌연변이에 의해 생성되는 단백질의 구조가 산성

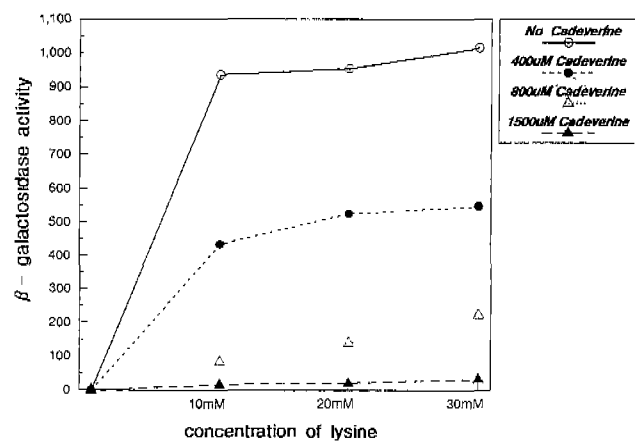


Fig. 1. Effects of the concentration of lysine and cadaverine on *cadA-lacZ* expression in JF2238.

pH에서 구조적 변화가 일어난 CadC의 구조(active form)와 매우 유사할 것이라는 가능성을 보여주고 있다(3). 본 연구의 S. typhimurium의 돌연변이 결과와 최근에 cloning하여 염기서열을 확인한 S. typhimurium의 cadC의 염기서열 및 추정된 아미노산 서열이 E. coli cadC와 55%의 상동성을 나타내고, E. coli cadC에서 중요한 역할을 하고 있는 염기 위치가 거의 일치하고 두 CadC의 소수성 양상이 유사한 것으로 보고한 결과에 따라 S. typhimurium의 CadC에 의한 조절은 E. coli와 유사할 것으로 생각된다(9).

라이신 신호에 의한 cad 오페론의 발현 조절을 규명하기 위해 Tn10 삽입과 EMS 돌연변이를 수행하여 cadR::Tn10, cadR4 돌연변이체들을 선별하였다. 이들은 모두 pH-의존성이고 라이신-비의존성인 cadA-lacZ 표현형을 나타냈기 때문에 CadR은 라이신이 없을 때 음성적 조절자로 작용하여 cadA-lacZ 발현을 위한 라이신 신호를 인식함을 알 수 있었다. 그리고 YK3139(cadR3 cadC3::Tn10)의 표현형이 cadC::Tn10 돌연변이체와 동일한 것으로 보아 CadR에 의한 cadA-lacZ 발현조절은 CadC에 의해 매개되는 것으로 추측하고 있다. E. coli에서는 cadR/lysP 자체는 cad 오페론의 발현조건과 동일한 상태에서 발현이 유발되고, 돌연변이 연구에 의해 CadR/LysP가 라이신 신호를 인식하는 것으로 알려졌다. 이러한 결과로 인해 LysP와 CadC에 연관된 cadA-lacZ 발현 유도에 대한 두 가지 모델이 제시되어 있다. 첫째는, 세포 내외의 라이신 농도는 LysP에 의해 조절되고 이러한 세포 내외의 라이신 농도에 의해 CadC의 활성이 결정된다는 것이고, 둘째는, 라이신은 LysP의 활성을 조절하고 LysP 자체가 CadC의 활성을 조절한다는 것이다(14,18). S. typhimurium과 E. coli에서 분리된 cadR::Tn10 돌연변이체가 라이신-비의존성인 cadA-lacZ 표현형을 나타내는 사실은 이 두 모델에 모두 적용이 된다. 그러나 S. typhimurium, E. coli에서 이 두 모델을 정확히 설명하기 위해서는 cadR 자체의 발현 조절 기작의 규명과 CadC의 라이신 유무에 따라 나타나는 생화학적 증거(활성, 비활성 전이등)가 뒷받침되어야 한다.

Lysine decarboxylase의 작용산물인 카테브린에 의한 발현조절을 확인한 결과 보통의 효소들과 마찬가지로 산물에 의한 억제 작용이 나타났으며, 카테브린에 의한 억제효과가 어떻게 전달되는지 확인하기 위해 각 조절 유전자 부위에 돌연변이가 유발된 돌연변이체에 대한 카테브린의 억제효과를 조사한 결과 cadC의 돌연변이는 카테브린에 의한 억제 효과가 나타나지 않았기 때문에 카테브린 신호는 CadC를 통해 전달되는 것을 알 수 있었다.

현재까지 본 연구에서 조사한 연구결과와 E. coli의 cad 오페론에 관한 연구 결과에 따르면 두 균주 모두에서 cad 오페론의 발현 조절은 CadC를 중심으로 이루어지고 있는 것으로 확인되었고 CadR은 라이신 신호에 대해 조절기능을 발휘하고 CadC, CadR 이외에도 반응산물인 카테브린이 cad 오페론의 발현에 관여함을 알 수 있었다. E. coli와 S. typhimurium에서 cad 오페론이 발현이 유도되기 위해서는 산성 pH와 라이신의 존재가 필수적이다. 세포의 산성 pH와 lysine 신호가 어떻게 인지되고 cad 오페론의 발현을 조절하는 반응을 나타나게 하는가에 대한 연구

는 세균이 어떻게 다양한 환경신호를 감지하고 반응하는 신호 전환 기작을 분자유전학적으로 설명할 수 있는 좋은 모델을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

- Benson, M.R. and B.S. Goldman. 1992. Rapid mapping in *Salmonella typhimurium*. with Mud-P22. *J. Bacteriol.* 174, 1673-1681.
- Booth, I. R. 1985. Regulation of cytoplasmic pH in Bacteria. *Microbiol. Rev.* 49, 359-378.
- Dell, C.L., M.N. Neely, and E.R. Olsen. 1994. Altered pH and lysine signalling mutants of cadC, gene encoding a membrane-bound transcriptional activator of the *Escherichia coli* cad operon. *Mol. Microbiol.* 14, 7-16.
- Finlay, B.B. and S. Falkow. 1989. *Salmonella* as an intracellular parasite. *Mol. Microbiol.* 3, 1833-1841.
- Forster, J.W. 1991. *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. *J. Bacteriol.* 173, 6896-6902.
- Forster, J.W. and H.K. Hall. 1991. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 173, 5129-5135.
- Foster, J.W., Park, Y.K., Bang, I.S., Karem, K., Betts, H., Hall, H. K., and Shaw, E. 1994. Regulatory circuits involved with pH-regulated gene expression in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology.* 140, 341-352.
- Gale, E.F. and Epps, H.M.R. 1942. The effect of the pH of the medium during growth on the enzymic activities of bacteria and the biological significance of the changes produced. *Biochemistry.* 36, 600-619.
- Kim, B.H., H.J. Lee, I.S. Lee, S.H. Bang, J. Kim, and Y.K. Park. 2001. Cloning and sequencing analysis of cadC encoding transcriptional activator CadC from *Salmonella typhimurium*. *J. Microbiol.* 39, 109-115.
- Lee, I.S., J.L. Slonczewski, and J.W. Foster. 1994. A low-pH inducible stationary phase acid tolerance in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 176, 1422-1426.
- Lin, J., I.S. Lee, J. Frey, J.L. Slonczewski, and J.W. Foster. 1995. Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177, 4097-4104.
- Meng, S.-Y. and G.N. Bennett. 1992. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* cad operon: Location of a site required acid induction. *J. Bacteriol.* 174, 2670-2678.
- Miller, J.H. 1992. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Neely, M.N., C.L. Dell, and E.R. Olsen. 1994. Roles of LysP and CadC in Mediating the lysine requirement for acid induction of the *Escherichia coli* cad operon. *J. Bacteriol.* 176, 3278-3285.
- Neely, M.N. and E.R. Olsen. 1996. Kinetic expression of the *Escherichia coli* cad operon as a function of pH and lysine. *J. Bacteriol.* 178, 5522-5528.
- Park, Y.K., B. Bearson, S.H. Bang, I.S. Bang, and J.W. Foster. 1996. Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 20, 605-611.
- Parkinson, J.S., and E.C. Kofoid. 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* 26, 71-112.

18. Popkin, P.S. and W.K. Maas. 1980. *Escherichia coli* regulatory mutation affecting lysine transport and lysine decarboxylase. *J. Bacteriol.* 141, 485-492.
19. Slonczewski, J.L., T.N. Gonzalez, F.M. Bartholomew, and N.J. Holt. 1987. Mud-directed *lacZ* fusion regulated by low pH in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169, 3001-3006.
20. Steffes, C., J. Wu., and B.P. Rosen. 1992. The *lysP* gene encodes the lysine-specific permease. *J. Bacteriol.* 124, 149-172.
21. Taber, H., E.W. Hafner, and C.W. Tabor. 1980. Construction of an *Escherichia coli* strain unable to synthesize putrescine, spermidine, or cadaverine: characterization of two genes controlling lysine decarboxylase. *J. Bacteriol.* 144, 952-956.
22. Watson, N., D.S. DunYak, E.L. Rosey, J.L. Slonczewski, and E.R. Olsen. 1992. Identification of elements involved in the transcriptional regulation of the *Escherichia coli cad* operon by external pH. *J. Bacteriol.* 174, 530-540.

(Received November 5, 2001/Accepted December 7, 2001)

ABSTRACT: Characterization of *cadC* and *cadR* Mutants in Mediating the Expression of the *Salmonella typhimurium cadBA* Operon

Seong Ho Bang and Yong Keun Park¹ (Department of Biology, Hanseo University, Seosan 356-706, ¹Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea)

It has been well known that the expression of *S. typhimurium cadBA* operon requires at least two extracellular signals: low pH and high concentration of lysine. To better understand the nature of pH-dependent and lysine-dependent signal transduction, mutants were isolated in JF2238(*cadA-lacZ*) by *Tn10* insertion, spontaneous mutagenesis, and EMS treatment. Two mutants were isolated from JF2238, expressed as a *cadA-lacZ* operon fusion in various growth conditions, and analyzed to have mutations in *cadC*, a gene encoding a function necessary for transcriptional activation of *cadBA*. One isolate (*cadC6*) conferred pH-independent and lysine-independent *cadBA* expression and the other (*cadC4*) showed pH-independent and lysine-dependent *cadBA* expression. *cadR::Tn10* and *cadR4* mutants were expressed in the absence of exogenously added lysine. They were also resistant to thiosine and complemented by *lysP* clone from *E. coli*. Thus, in the absence of exogenous lysine, *cadR* is a negative regulator of *cadBA* expression. Cadaverine, the product of lysine decarboxylation, was shown to inhibit expression of *cadA-lacZ* fusion in *cadC*⁺ cell.