

병원성 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium의 저온 유도성 산 내성 반응

송상선 · 이 선 · 이경미 · 임성영 · 조민호 · 박용근¹ · 박경량 · 이인수*

한남대학교 미생물학과, ¹고려대학교 생명공학원

Salmonella enterica serovar Typhimurium의 대수 생장기 산 적응기전(acid tolerance response; ATR)은 pH 4.5 이하 조건에서 산 적응결과 형성된 것이며, 이것은 세균세포가 강한 산성환경에 노출되었을 때 생존율을 높일 수 있는 기전이다. ATR은 세균의 생장단계에 따라 대수 생장기 ATR과 생장 정지기 ATR로 구분되어질 수 있으며, 각 생장 단계는 산 적응 과정에서 합성되는 고유의 ASP (acid shock protein)가 존재한다. ATR 기전은 낮은 온도 등과 같은 환경조건에 영향을 받는다는 것이 본 실험 결과를 통하여 발견되었다. 낮은 온도 및 약산성 조건에 노출되었을 경우 강한 산성 조건에서 세균의 생존율은 증가하는 양상을 보였으며, 이때의 생존율은 37°C에서 보여졌던 것보다 높게 나타났다. 25°C에서 산 적응을 하지 않은 경우의 세균은 37°C와 비교하였을 경우 약 10,000배 정도의 생존율 증가를 보여주었다. 산 내성 반응에 주요한 기능을 담당하는 *rpoS* 돌연변이주의 산 내성도는 37°C의 결과와 비교해볼 때 저온의 조건에서 산 내성능이 높게 나타났다. 비록 *rpoS* 돌연변이주가 저온에서 산 적응 여부에 관계없이 pH 3.1에서 유사한 ATR 양상을 보여주고 있지만, 25°C의 산성 조건에서 *rpoS* 돌연변이주는 지속적 산 내성도를 나타내지 않으므로써 저온에서도 *rpoS* 의존성 ATR 기전이 존재하고 있다는 것을 알 수 있었다. 결과적으로 저온 조건에서는 *rpoS* 의존적 및 비의존적 ATR 기전 모두가 존재하는 것으로 여겨진다. 저온 조건과 ATR의 기초연구를 위해서 병원성 *S. enterica* serovar Typhimurium UK에서 low temperature acid tolerance (*lat*) 유전자를 P22-*MudJ*(Km, *lacZ*)를 이용한 *lacZ* 오픈론 융합법을 사용하여 LF452 *latA::MudJ*를 분리하였다. LF452 *latA::MudJ* 돌연변이주는 저온에서 산 적응기전을 보유하지 않았으며, 결과적으로 *latA*는 25°C에서 산 적응 내성 기전에 관여하는 주요 유전자로 판단되며, *latA*의 유전자는 *Salmonella* Genetic Map상의 21.5 min에 위치하고 있다.

Key words □ acid, low temperature, *rpoS*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, tolerance

Salmonella enterica serovar Typhimurium은 조건적 혐기성 세균으로서 다른 장내 병원성 세균들과 마찬가지로 생활사 동안 다양한 환경 스트레스들을 경험하며, 더 나아가 변화된 환경을 감지하고 적절하게 반응함으로써 자연계 및 숙주생명체에서 생명을 유지한다. 이러한 외부 환경 스트레스 요인들은 자외선 조사, 영양분의 결핍, 산소배양조건에서 무산소 상태로의 전이, 열 충격 및 pH의 변동 등이며, 이와 관련된 연구는 *Escherichia coli*와 *Salmonella typhimurium*을 중심으로 주로 연구되어 왔다(2,13,14,22). 특히 Gottesman (10)은 이러한 환경 stress 반응에 관련한 현상들을 하나의 유전자군(regulon)으로 묶어서 유전 및 생리적 변화와 그 조절기전을 밝히고 있다. 특히 *Salmonella*의 환경 스트레스에 대한 많은 연구들 중에서 산성화로부터 세균세포를 보호하는 기전에 관련된 부분은 사람을 비롯하여 가축 및 오염된 환경 등에서 세균의 생존을 이해하는데 도움을 줄 수 있으며, *E. coli*, *Shigella* 및 *Vibrio* 등의 장내세균뿐만 아니라 *Streptococcus mutans*와 같은 그람 양성 세균을 대상으로 최근에

산 내성도 관련 연구들이 점진적으로 진행되고 있다(11,24). *Salmonella*는 자연환경과의 상호작용뿐 아니라 동물 숙주 내에서도 다양한 pH 변화를 겪게 되는데(5,23), 일단 *Salmonella*가 동물의 위에 들어가게 되면 pH 1-2의 아주 강한 산성 변화를 겪게 되고, 소장에서는 체장 분비물로 인해 다시 혐기성 환경을 경험하게 된다. 이어서 세균들은 장에서 집락(colonization)을 형성하고, 탄소 화합물의 발효과정을 통해 다시 약산성 pH 환경을 접하게 된다. 이와 같은 다양한 환경 변화를 겪은 후 *Salmonella*는 장내 표피세포로 침투하여 macrophage와 대항하게 된다. Macrophage의 phagosome에 존재하는 *Salmonella*는 lysosome의 공격으로 다시 한번 산성 pH를 경험한다. 그러나 *Salmonella*는 이러한 모든 pH 스트레스를 극복하고, 증식하여 결국 병독성을 발휘한다. *Salmonella*는 macrophage 내에서 증식할 수 있는 세균으로 알려져 있는데(20), 즉 *S. typhimurium*은 낮은 pH 조건에서 생장할 수 있는 생존전략을 갖고 있으며, 이것은 acid tolerance response (ATR)의 결과로 형성된다(15,17). pH 5.8 또는 pH 4.3의 약산성 조건에서 적응한 *Salmonella*는 pH3.3의 매우 낮은 산성 조건에서 적응하지 않은 대조구와 비교하여 우수한 생존율을 나타내었다(16,17). 이는 세균의 산성화 방어기전에 의한 결과로 해석할 수 있다. 즉 중성 pH조건에서 생장한 대수

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-629-7933, Fax: 042-629-7625
E-mail: inslee@eve.hannam.ac.kr

생장기의 세균세포들을 대상으로 산적용(pH 4.3) 조건에서 단백질을 분석한 결과, 약 20개의 acid shock protein (ASP)들이 형성되었으며, 이와 같은 단백질들은 *Salmonella*를 산성 스트레스 조건에서 생존케 하는 필수단백질들로 여겨진다. 또한 stationary phase 세포들을 대상으로 pH 4.3에서 산적용을 주었을 경우에는 15개의 ASP들이 발견되었다(3,16). 아울러 최근에 Kim 등(14)은 혐기조건에서 산내성에 관련된 유전자를 보고하여 *Salmonella*의 산 내성 반응은 매우 다양한 조절계를 갖는 것으로 추측되고 있다.

이상에서 볼 수 있듯이 *Salmonella*의 산성 pH 스트레스에 대한 적응력은 숙주에 대한 일종의 대항작용으로 해석되며, 결국 세균의 병독성 발현에 중요한 요소임을 알 수 있다. 이에 관련한 직접적인 예로는 *S. typhimurium*의 병독성 감쇄를 유도하는 putative sigma factor *rpoS* (3,16)와 *phoP/phoQ* regulon (19)이 있다. 즉 pH 4.3의 산 적용을 경험한 *rpoS* 돌연변이주를 pH 3.3의 산 환경에서 노출시켰을 경우 *rpoS* 균주와 비교하여 산 내성도가 급격히 감소함을 보여주어, 산 적용 내성 반응은 *rpoS* 의존성 반응이며, 따라서 대수생장기 ASP들은 *rpoS*와 조절 연계성이 있는 단백질이라고 할 수 있다(15). 산 적용된 *S. typhimurium*은 열, oxidative 스트레스 및 삼투 스트레스에 대하여 교차보호(cross protection)를 나타내는데, 여기에도 물론 RpoS가 관여한다. 이 같은 산 방어전략은 산성의 가수분해 효소 생산능을 소유한 macrophage내에서 *Salmonella*의 필수적인 생존 전략이 되며(6,9,15), 따라서 산성 pH 유도 및 내성 유전자들은 세균의 병독성 발현과 상호연계성이 있는 것으로 보여진다. 한편 장으로부터 배설물과 함께 환경으로 배출된 *Salmonella*는 숙주 생명체에서와는 다른 종류의 다양한 스트레스 압력을 받게된다. 즉 숙주의 장내에서 비교적 최적 성장을 경험한 세균은 다시 환경조건에 적응하기 위하여 스트레스 대항산물들을 합성해야 한다. 최근에 온도 변화에 따른 세균의 반응과 병독성에 관련하여 *Vibrio cholerae*의 *toxR*은 온도와 약산성 pH 조절 하에 있음이

보고되어, 온도와 pH는 상호 조절연계성이 있는 것으로 해석되었다(18). *Salmonella*의 경우 최적 생장온도보다 낮은 온도 조건에서 산 내성 또는 산 적용 반응은 아직 알려지지 않았으며, 또한 지금까지의 ATR에 관련한 연구들은 최적생장 온도 조건인 37°C에서만 진행되었기 때문에, 본 연구에서는 저온에서의 산 적용 및 산 내성을 조사하여 온도와 산 내성도의 상호 관계를 알아보고자 하였으며, 아울러 기존에 알려진 *rpoS* 의존적 산 내성도를 저온에서 재평가하고, 분리된 돌연변이 유전자를 대상으로 온도 의존성 산 내성도를 분석하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양 배지

본 실험에 사용된 세균은 병원성 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium UK1이며, 이 세균을 대상으로 *MudJ* (Km, *lacZ*) 형질도입을 수행하기 위한 균주 및 제작된 돌연변이주들은 Table 1에 표기하였다. 세균의 증균을 위한 배지는 Luria Bertani (bacto tryptone; 10.0 g, bacto yeast extract; 5.0 g, NaCl; 5.0 g, bacto agar; 15.0 g, dDW, 1 l)를 사용하였으며, 최소배지 (salt glucose, SG)는 Vogel과 Bonner (25)의 E 배지(50×E stock solution per liter: MgSO₄ · 7H₂O, 10.0 g; citric acid · H₂O, 100.0 g; K₂HPO₄ · 3H₂O, 655.0 g; Na(NH₄)₂PO₄ · 4H₂O, 175 g)에 최종 농도가 0.4%가 되도록 포도당을 첨가하여 준비하였다. *MudJ*나 Tn10tet 삽입 돌연변이 균주 그리고 항생제에 저항능을 소유한 균주들은 ampicillin (50 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml) 및 tetracycline (20 µg/ml) 등이 각각 함유된 배지에서 증균시켰다. 세균의 배양은 37°C와 25°C로 각각 조정되어있는 진탕배양기에서 250 rpm으로 실시하였다.

돌연변이주 준비

돌연변이주 제작은 P22 HT 105/1-int를 이용한 Holly와

Table 1. Bacterial strains and plasmid used in this study

Strain	Source	Relevant genotype	Reference/Source
SF530	UK1	virulent wild type	J. Foster ^a
JF2690	UK1	<i>rpoS</i> Δ <i>Ap</i>	J. Foster
LF447	UK1	<i>latA::MudJ</i>	P22(SF261) × UK1
LF452	UK1	<i>latA::MudJ</i>	P22(LF447) × UK1
LF495	UK1	<i>rpoS</i> Δ <i>Ap latA::MudJ</i>	P22(LF452) × JF2690
LF557	UK1	<i>zxx::Tn10 near latA::MudJ</i> (98% linked)	Tn10 pool(LF452) × UK1
LF564	UK1	<i>zxx::Tn10 near latA +</i>	P22(LF452) × UK1
SLF261	LT2	<i>hisD9953::MudJ his-9941::Mud1</i>	J. Foster
SLF463	LT2	mini Tn10tet(Tet ^r)	J. Foster
SLF464	LT2	pNK972 transposase(Ap ^r)	J. Foster
<i>E. coli</i>	DH5α	Φ80 <i>dlacZ</i> Δ M15 (<i>lacZYA-argF</i>) <i>recA</i> <i>lndA</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>relA1</i> <i>deoR</i> U169	Life technology
pCR [®] TOPO		Cloning vector for PCR	Invitrogen

^aDepartment of Microbiology, University of South Alabama

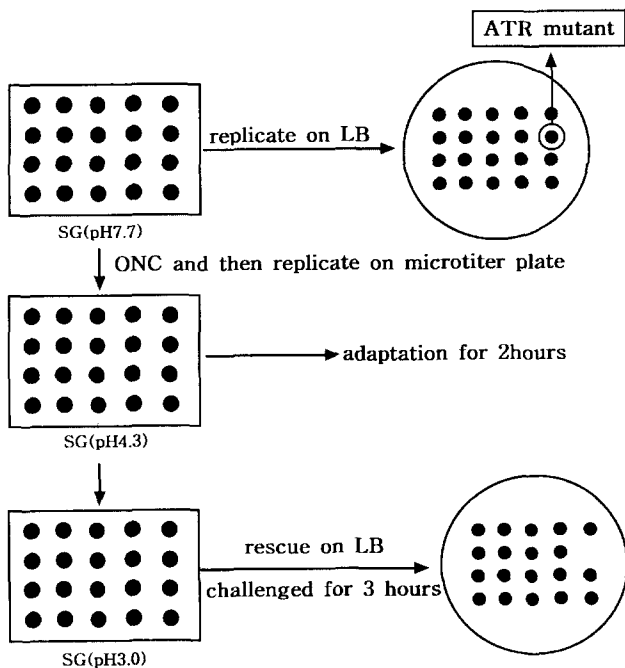


Fig. 1. The screening strategy for isolation of *latA::MudJ*. P22-mediated *MudJ* (Km, *lacZ*) insertion transductants were cultured in microtiter plates at 25°C for overnight. The grown cells were transferred in microtiter plates containing fresh minimal glucose medium (pH 4.3) that was adjusted pH with inorganic acid (HCl). After acid adaptation for two hours, cells were transferred in microtiter plates containing minimal glucose medium (pH 3.0). After three hours, acid-challenged transductants at pH 3.0 were rescued on LB plates. Solid circle means no growth on LB plate. *ONC: overnight culture.

Foster (12), 그리고 Aliabadi 등(1)의 방법을 변형하여 사용하였다. 준비된 약 35,000개의 *MudJ* 형질도입체들을 대상으로 Fig. 1의 돌연변이 분리 전략을 사용하여 생성된 형질도입체 중에서 산 감수성을 나타내거나 완전히 사멸되는 돌연변이주들을 1차로 선별하고, 다시 동일한 방법으로 재확인한 다음, 25°C에서 산 내성도를 조사하여 산 민감성을 나타내는 돌연변이주들을 분리하였다. 또한 *MudJ* 인접한 위치에 Tn10을 삽입하거나 *MudJ*를 Tn10*dtet*으로 치환하기 위하여 사용되는 돌연변이주의 mini Tn10*dtet* pool은 Aliabadi 등(1)의 방법을 변형하여 제작하였다. 즉, transposase 유전자를 갖는 플라스미드 pNK972를 소유한 SF464의 high transducing phage lysate (HT phage lysate)를 사용하여 산 감수성을 나타내는 *MudJ* 돌연변이체에 플라스미드를 형질도입시키고, 형질도입된 균주에 mini Tn10*dtet*을 소유한 SF463의 phage를 형질도입시켜서 생성된 모든 콜로니들을 5 ml의 LB 액체배지에 현탁(약 1010 cells/ml)시켰다. 현탁액 전량을 500 ml의 LB 액체배지에 접종하여 1시간 진탕 배양(37°C, 250 rpm)하고, 여기에 1 ml의 HT UK1 phage 용액을 첨가하여 18시간 진탕 배양하였다. 배양 후, 1/100의 농도로 chloroform을 넣고 세균들을 파쇄한 다음, 원심분리(5,000 rpm, 30 min)하여 각 돌연변이주들의

Tn10*dtet* pool을 제조하였다.

분리된 유전자의 위치 조사

*MudJ*가 삽입된 유전자좌 확인은 Tn10*dtet*이 *MudJ*에 인접된 또는 *MudJ* 내부에 삽입된 균주를 대상으로 Youderian 등(26) 그리고 Benson과 Goldman (4)의 방법을 변형하여 수행하였다. *MudJ* 인접 위치에 Tn10이 삽입된 균주의 확보는 각각의 *MudJ* 돌연변이주의 Tn10*dtet* pool과 UK1의 형질도입을 통하여 kanamycin과 tetracycline 모두에 저항성을 소유한 콜로니들을 선별하고, 선별된 균주의 HT phage를 제조한 다음, 이 phage lysate와 UK1의 형질도입을 수행하여 *MudJ*와 Tn10이 약 90% 이상 연관된 균주를 선택함으로써 이루어졌다. 선별된 *MudJ* 인접 Tn10*dtet* 또는 *MudJ*내 Tn10*dtet* 삽입 균주를 OD₆₀₀=0.2까지 배양하고 배양액 1 ml을 원심분리(12,000 rpm, 2 min)하여 세균세포들을 회수한 다음, E 완충용액으로 3회 세척하고 1 ml의 동일한 완충용액에 현탁시켰다. 준비된 현탁액 0.1 ml을 Nunn 평판배지(trypton, 10 g; yeast extract, 5 g; NaCl, 10 g; glucose, 2 g; chlorotetra-cycline hydrochloride, 0.05 g; NaH₂PO₄ · H₂O, 10 g; fusaric acid (2 mg/ml), 6 ml; zinc chloride (20 μM), 5 ml; agar, 15 g; dDW, 1 l)에 도말하고, *Salmonella* 염색채상에서 약 3 min 간격으로 이미 유전자의 위치가 알려진 *MudP*와 *MudQ* phage lysate들을 약 5-10 μl씩 떨어뜨려 Tn10이 *MudP/Q*와 교차된 colony들의 성장을 육안으로 확인하여 유전자좌를 결정하였다.

Acid Tolerance Response 조사

S. enterica serovar Typhimurium UK1과 돌연변이주들을 대상으로 산에 대한 내성도를 조사하기 위한 acid tolerance response (ATR) 조사는 Kim 등(14)의 방법을 변형하여 사용하였다. 산 적응(adapted) ATR 조사는 SG 최소배지(pH 7.7)상에서 37°C와 25°C 조건으로 각각 진탕배양시킨 돌연변이주의 배양액을 1/300의 농도로 동일한 배지에 접종하여 OD_{600 nm}=0.4가 되도록 37°C와 25°C에서 각각 진탕 배양한 다음, inorganic acid를 사용하여 pH 4.4로 배양액의 pH를 조정하고 1시간 30분 동안 동일한 온도 조건에서 산 적응을 경험하게 한 후, 배양액의 pH를 pH 3.1로 재조정하여 시간별로 세균의 생존율을 조사함으로써 측정되었다. 산 적응을 경험하지 않은 (unadapted) 세균의 ATR 조사는 pH 4.4의 적응단계 없이 OD₆₀₀=0.4까지 배양시킨 세균의 배양액을 pH 3.1로 조정하여 시간별로 생존율을 조사함으로써 수행되었다.

latA 유전자 분석

latA 유전자 주위를 클로닝하기 위해서 mini Tn10*dtet*이 *MudJ* 부위로부터 98% 연관된 위치에 삽입된 LF557을 제작하였으며, 이 균주의 하룻밤 배양된 배양액을 400 μl취하여 10분간 끓는 물에서 처리하고, 즉시 원심분리(5 min, 2,000 rpm)한 다음 상등액을 PCR을 위한 주형으로 사용하였다. *MudJ*-

left (5'-CCAATG-CCTCCCGGTTTT-3')와 Tn-right (5'-GAC-AAGATGTGGAT-CCACCTTAAC-3') primer를 사용하여 *MudJ*와 Tn10*dtet* 연결부위를 Thermocycler (Hybaid, UK)를 이용하여 증폭시킬 수 있었으며, 0.8% agarose 전기영동을 통하여 증폭된 DNA를 확인하였다. PCR 산물은 TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen, Netherland)을 사용하여 pCR[®] 벡터에 클로닝되었다. 재조합 플라스미드는 *E. coli* DH5 α 에 형질전환시켜 유전자 분석을 위한 재료로 사용하였다. 염기서열은 Sanger 등 (21)의 방법을 사용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

돌연변이주의 분리

25°C에서 산 적응 내성에 관여하는 유전자를 분리하기 위하여 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium UK1를 대상으로 Fig. 1의 방법을 사용하여 돌연변이주의 분리작업을 수행한 결과, *MudJ*가 삽입되어 대수성장기에서 산 감수성을 나타내는 LF447 *latA::MudJ*를 분리하였고, 이 돌연변이주의 HT phage를 제작하여 다시 UK1에 형질도입시켜 LF452를 얻었다. 또한 분리된 LF452의 Tn10*dtet* pool을 제작하고, 제작된 pool을 야생형 균주 UK1과의 형질도입을 통하여 Tn10*dtet*이 *MudJ* 근처에 삽입된 LF557을 얻었으며, LF557의 HT phage를 사용한 cotransduction 실험을 통하여 Tn10*dtet*은 *MudJ*와 약 98% 연관되어 있는 것으로 조사되었다. 분리된 LF557는 *latA* 유전자 분석을 위한 균주로 사용되었다.

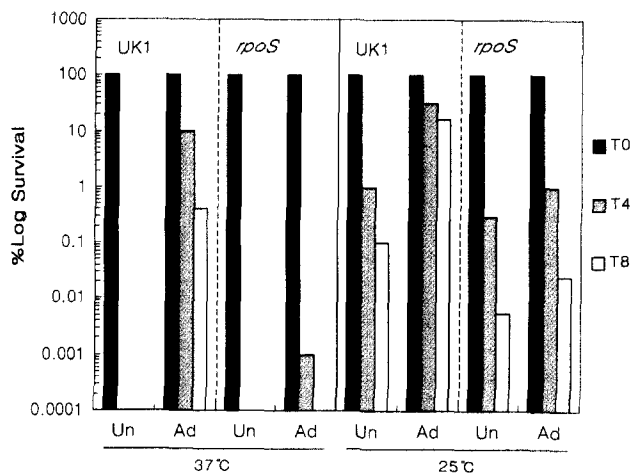


Fig. 2. Log-phase acid tolerance responses of *rpoS* and UK1. Cells grown to mid log phase in minimal glucose medium were subjected to adaptation protocol prior to acid challenge at pH 3.1 for 37°C and for 25°C, respectively. Unadapted cell cultures were adjusted directly to challenge pH 3.1. Acid shock adaptations at pH 4.4 for 25°C and for 37°C were conducted for 90 min before acid challenge, respectively. Viable counts were taken at 0 h, 4 h and 8 h after acid challenge. The bars represent average percent survival. Full 100% viability was approximately 2×10^8 cells/ml. Un; unadapted, Ad; adapted

S. enterica serovar Typhimurium의 저온 유도 산내성 반응

야생형 *S. enterica* serovar Typhimurium UK1의 산적응 내성도에 중요한 기능을 담당한다고 알려진(15) putative RNA polymerase의 유전자인 *rpoS*를 대상으로 25°C 및 37°C 온도 조건에서 각각 산 내성도를 평가한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. UK1의 최적 생장온도 37°C 및 호기 조건에서 pH 4.4의 산 적응을 경험하지 못한 세균세포는 산 적응을 경험한 세균들과 비교하여 pH 3.1의 산성환경에서 4시간 노출된 후 약 10⁵배 이상의 생존율 감소를 보여주었다. 반면에 최적 생장 온도보다 12°C 낮은 온도인 25°C에서 성장된 세균들의 경우에는 37°C와는 달리 약 30배 정도의 생존율 감소만을 나타내어, 온도변화에 따른 산 내성도 변동을 보여주었다. 즉, 저온에서 *Salmonella*는 산에 대한 내성도가 매우 높은 세균으로 판명되었다. 아울러 산 적응된 UK1은 pH 3.1에 노출되어 8시간이 지나서도 계속 산 내성을 나타내어 25°C에서도 Foster 등(7,8) 및 Kim 등(14)이 보고한 산 적응 내성 기전(acid tolerance response)이 존재하는 것으로 관찰되었으며, 특히 25°C에서의 산 적응 효과는 37°C와 비교하여 월등히 우수한 것으로 조사되었다. 온도에 따른 산 내성도를 비교하면, 25°C에서 산 적응을 경험하지 않은 세균세포의 경우 pH 3.1 환경에서 4시간 노출된 후 생존된 세균세포의 비율은 37°C에서 관찰된 것보다 10,000배 이상 생존율 증가를 나타내었다. 이와 같은 결과는 25°C 환경에서의 ATR은 산 적응 내성 반응 이외에 저온에서 유도되는 산 저항의 개념도 포함하고 있을 것이라는 직접적 증거이다. *rpoS* 돌연변이주를 대상으로 25°C에서 ATR 조사를 수행한 결과, 산 내성도는 37°C와 비교하여 약 1,000배의 생존율 증가를 보여주었다. 또한 25°C 온도조건에서 산 적응의 경험 여부와는 관계없이 모두 UK1의 unadapted 결과와 유사하게 나타났다. 이와 같은 결과는 이미 알려진(7,8,15) 37°C 조건의 ATR 개념과는 다른 양상을 보여주는 것이다. 즉, 저온 ATR은 *rpoS*-의존적 및 비의존적 특성을 모두 포함한다는 것을 의미한다. 그러므로 저온 ATR은 기존에 알려진 대수 성장기, 혐기성 및 세포 정지기 ATR과는 다른 고유의 특성을 소유하는 것으로 이해된다.

저온 유도성 Acid Tolerance Response 조사

돌연변이 분리작업 결과 분리된 *latA*와 UK1, *rpoS* 그리고 *latA rpoS* 이중 돌연변이주들을 대상으로 25°C에서 산 적응 및 산 내성 반응을 조사하였고, 그 결과는 Fig. 3에 나타나 있다. Fig. 3은 대수성장기까지 성장된 세균세포들을 대상으로 25°C 산 적응을 경험한 경우와 그렇지 못한 경우 pH 3.1에서의 생존율을 보여주고 있다. *latA* 돌연변이주는 pH 4.4의 산 적응 조건에 90분 동안 노출시킨 경우와 pH 4.4의 산 적응을 경험하지 못한 경우 모두에서 낮은 산 내성도 나타내어, *Salmonella*의 산 적응 내성 기전에 필수적 기능을 담당하는 유전자로 밝혀졌다. 일반적으로 *Salmonella*의 ATR에서 *rpoS*가 중재하는 acid shock 단백질들은 지속적 산 내성도를 (sustained acid induction) 유도하는 것으로 알려져 있으며(15), 따라서 *rpoS* 돌연변이주는 Fig. 2과 3에서 보는 바와 같이 낮은 산 내성도를 나타내었다. 분리된 *latA*

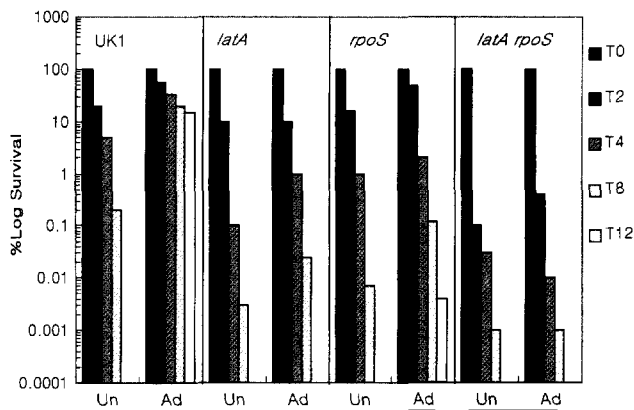


Fig. 3. Log-phase acid tolerance responses of *rpoS*, *latA*, *latA*, *rpoS* and UK1 at low temperature. Cells grown to mid log phase at 25°C were subjected to unadapted ATR and adapted ATR. Unadapted cell cultures were adjusted directly to challenge pH 3.1. Acid shock adaptation at pH 4.4 was conducted for 90 min before acid challenge at pH 3.1. Viable counts were taken at 0 h, 2 h, 4 h, 8 h and 12 h after acid challenge. The bars represent average percent survival. Full 100% viability was approximately 2×10^8 cells/ml. Un; unadapted, Ad; adapted.

돌연변이주 역시 지속적 산 내성도를 소실하였으며, 그 효과는 *rpoS* 보다 훨씬 높게 나타나, *latA*는 산 적응반응에 관여하는 다수의 유전자들을 조절하고 있을 것이라는 가정을 가능케 한다. 또한 *rpoS* *latA* 이중 돌연변이주에 대한 산 적응능은 *rpoS*나 *latA* 단독의 경우보다도 pH 3.1 환경에서 생존율이 훨씬 감소하였는데, 이것은 두 유전자의 교차반응에 의한 결과로 여겨진다.

latA 유전자좌 결정 및 DNA 염기서열 분석

P22의 중재에 의한 *MudJ* 형질도입 방법을 사용하여 분리된 산 내성 유전자 *latA::MudJ*의 유전자좌를 알아보기 위하여 LF452의 Tn10*dtet* pool을 이용하여 분리된 LF557의 HT P22 lysate를 이용하여 *latA*⁺근처의 Tn10*dtet*만 존재하는 LF564 균주를 얻었다. LF564를 대상으로 Tn10*dtet*이 *MudP*와 *MudQ*로 치환되어 Num 배지 상에서 tetracycline 감수성 세균들의 생장 위치를 확인함으로써 유전자좌를 알 수 있는 *MudP/Q* rapid mapping을 시도한 결과, *latA*의 유전자좌는 *Salmonella*의 Physical map의 21.5 min에 위치하는 것으로 조사되었다. *latA* 유전자의 클로닝은 mini Tn10*dtet*이 *MudJ*로부터 98% 연관된 위치에 삽입된 LF557를 대상으로 PCR을 통하여 수행되었으며, 염기서열을 분석한 결과(data not shown), 아직 그 기능이 알려지지 않은 유전자로 판명되어, 향후 산 적응 내성 관련 연구필요성이 부각되었다.

감사의 글

이 논문은 1999년도 한국학술진흥재단의 연구비에 의하여 지원되었음

참고문헌

- Aliabadi, Z., F. Warren, S. Mya, and J.W. Foster, 1986. Oxygen regulated stimulons of *Salmonella Typhimurium* identified by *MudJ* (*Ap*, *lacZ*) operon fusions. *J. Bacteriol.* 165, 780-786.
- Aliabadi, Z., Y.K. Park, J.L. Slonczewski, and J.W. Foster, 1988. Novel regulatory loci controlling oxygen and pH regulated gene expression in *S. Typhimurium*. *J. Bacteriol.* 170, 841-851.
- Bang I. S., I.S. Lee, Y.N. Lee, and Y.K. Park, 1995. Identification of the genes involved in stationary-phase specific acid resistance of *Salmonella Typhimurium*. *J. Microbiol.* 33, 21-27.
- Benson, M.R. and B.S. Goldman, 1992. Rapid mapping in *Salmonella typhi* with *MudJ*-P22 prophages. *J. Bacteriol.* 174, 1673-1681.
- Choi, H. J., J.H. Eom, I.S. Lee, K.R. Park, and Y.K. Park, 1998. Expression control of *ssaJ* and *ssaK* of SPI2 in *Salmonella Typhimurium*. *Korean J. Microbiol.* 34, 108-114.
- Fields P. I., E.A. Groisman, and F. Heffron, 1989. A *Salmonella* locus that controls resistance to microbial proteins from phagocytic cells. *Science* 243, 1059-1065.
- Foster, J.W. and H.K. Hall, 1990. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella Typhimurium*. *J. Bacteriol.* 172, 771-778.
- Foster, 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., Y.K. Park, I.S. Bang, K. Karem, H. Bettes, H.K. Hall, and E. Shaw, 1994. Regulatory circuits involved with pH-regulated gene expression in *Salmonella Typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* 140, 341-352.
- Gottesman, S. 1984. Bacterial regulation ; Global regulatory networks. *Ann. Rev. Genet.* 18, 415-441.
- Hamilton, I.R. and G. Syensater, 1998. Acid-regulated proteins induced by *Streptococcus mutans* and other bacteria during acid shock. *Oral Microbiol. Immunol.* 13, 292-300.
- Holly, E.A. and J.W. Foster, 1982. Bacteriophage P22 as a vector for Mu mutagenesis in *Salmonella Typhimurium*; isolation of *nad-lac* and *pnc-lac* gene fusions. *J. Bacteriol.* 152, 959-962.
- Jung, J.R., K.R. Park, S.K. Koh, Y.K. Park, and I.S. Lee, 1998. Genetic Responses to Metal Ion in *Salmonella Typhimurium*. *Korean J. Life Science* 8, 216-225.
- Kim, Y.C., S. Lee, K.M. Lee, S.Y. Lim, Y.K. Park, H.S. Baik, K.R. Park, and I.S. Lee, 1999. Anaerobic acid tolerance response in *Salmonella Typhimurium*. *Korean J. Life Science* 9, 169-175.
- Lee I.S., J. Lin, H.K. Hall, B. Bearson and J.W. Foster, 1995. The stationary-phase sigma factor σ^r (*RpoS*) is required for sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella Typhimurium*. *Molecular Microbiol.* 17, 155-167.
- Lee I.S., J. Lin. Slonczewski, and J.W. Foster, 1994. A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response 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.
- Merrell, D.S., C. Bailey, J.B. Kaper, and A. Camilli, 2001. The Toxr-mediated organic acid tolerance response of *Vibrio cholerae* requires *OmpU*. *J. Bacteriol.* 183, 2746-2754.
- Miller, S.I., A.M. Kukral, and J.J. Mekalanos, 1989. A two-component regulatory system (*phoP*, *phoQ*) controls *Salmonella Typh-*

- imurium* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 86, 5054-5058.
20. Popiel, I. and P.C.B. Turnbull, 1985. Passage of *Salmonella uteritidis* and *Salmonella thompson* through chick ileocecal mucosa. *Infect. Immun.*, 47, 786-792.
21. Sange, F., S. Nicken, and A.R. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 74, 5463-5467.
22. Spector, J., Z. Aliabadi, T. Gonzalez, and J.W. Foster, 1986. Global control in *Salmonella Typhimurium*: Two dimensional electrophoretic analysis of starvation, anaerobiosis, and heat shock inductive proteins. *J. Bacteriol.* 168, 420-424.
23. Stocker, B.A.D. and P.H. Makela, 1986. Genetic determinants of bacterial virulence with special reference to *Salmonella*. *Current Top. Microbiol. Immunol.* 124, 149-172.
24. Svensater, G., B. Sjogreen, and I.R. Hamilton, 2000. Multiple stress responses in *Streptococcus mutans* and in the induction of general and stress-specific proteins. *Microbiol.* 146, 107-117.
25. Vogel, H.J. and D.M. Bonner, 1956. Aetylomithase of *Escherichia coli*; partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 93, 237-244.
26. Youderian, P., P. Braier, K.L. Sugino, N.P. Higgins, and T. Elliot, 1998. Packaging specific segments of the *Salmonella* chromosome with lacked in Mud-P22 prophages. *Genetic.* 118, 581-592.

(Received May 25, 2001/Accepted August 31, 2001)

ABSTRACT: Low Temperature Inducible Acid Tolerance Response in virulent *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Sang-Sun Song, Sun Lee, Kyoung-Mi Lee, Sung-Young Lim, Min-Ho Cho, Young-Keun Park¹, Kyeong-Ryang Park, and In-Soo Lee* (Department of Microbiology, Han Nam University, Daejon 300-791, and ¹Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea)

The acid tolerance response (ATR) of log-phase *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is induced by acid adaptation below pH4.5 and will protect cells against more severe acid. Two distinctive ATR systems in this organism are a log-phase and stationary-phase ATR in which acid adaptations trigger the synthesis of acid shock proteins (ASPs). We found that log-phase ATR system was strongly affected by environmental factor, low temperature, 25°C. Exposure to low temperature and mild acid has been shown to increase acid survival dramatically, and this survival rate was showed higher than 37 °C. Especially unadapted cells at 25 °C presented ten thousand folds survival increasing when compared with cells at 37 °C. The degree of acid tolerance of *rpoS* which is known to be required for acid tolerance more increase than 37 °C. Even though ATR pattern of *rpoS* between unadapted and adapted was showed similar at pH 3.1, *rpoS*-dependent ATR system also has been detected in low temperature because *rpoS* Ω 4p prevents sustained acid survival at 25 °C. Therefore the results suggest low temperature ATR system requires *rpoS*-dependent and -independent both. To investigate the basis for low temperature related ATR system, gene that was participated for low temperature acid tolerance (*lat*) was screened in virulent *S. enterica* serovar Typhimurium UK1. Using the technique of P22-*MudJ* (Km, *lacZ*)-directed *lacZ* operon fusion, LF452 *latA::MudJ* was isolated. The *latA::MudJ* of *S. enterica* Typhimurium prevented low temperature acid tolerance response. Therefore *latA* is considered one of the important genes for acid adaptation.