

프로테오믹스를 이용한 탄저균 아포 감염에 대한 바이오마커 탐색

Discovery of Protein Biomarkers for Infected *Bacillus anthracis* Spores in Using Proteomic Analysis

서귀문* 남덕화* 오광근** 김성주*
Gwi-Moon Seo Deok-Wha Nam Kwang-Keun Oh Seong-Joo Kim

김지천* 채영규*
Ji-Chon Kim Young-Gyu Chai

ABSTRACT

The etiological agent is *Bacillus anthracis*, a gram-positive rod-shaped bacterium able to form spores. In order to elucidate the mechanism of infection on human macrophage cells, we performed two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF analysis using the infected human macrophage cells with the spores of *B. anthracis* Sterne or inactivated *B. anthracis* Sterne. We identified 9 proteins which related to the infection of *Bacillus anthracis* spores on human macrophage cells at the early stage events. Maybe nine proteins will be bio-markers and vaccine candidates to the *Bacillus anthracis* spore infection.

1. 서론

탄저(anthrax)는 탄저균(*Bacillus anthracis*)의 감염에 의해 가축뿐만 아니라 사람에게도 발병되는 인수공통 전염병이다. 탄저균의 독력유전자는 pXO 1과 pXO 2의 2개의 플라스미드에 위치하고 있다^[10]. pXO 1은 탄저독소의 구조 유전자인 *lef*(치사요소), *cya*(부종요소), 및 *pagA*(방어항원)를 포함하고 있다^[13]. 이

독소단백질들은 두 개의 binary exotoxin을 형성한다. 방어항원은 숙주세포에 결합하여 세포 내로 들어갈 수 있게 하는 수용체이며, 치사요소는 숙주세포 내에서 Zinc metalloprotease로 작용한다. 방어항원과 치사요소로 구성된 치사독소는 대식세포에 들어간 후, 숙주세포의 사멸에 직접적인 영향을 준다^[2,6].

방어항원과 부종요소로 구성된 부종독소는 숙주세포 내에서 calmodulin-dependent adenylate cyclase로 작용한다^[8]. 독소와 협막 발현에 관여하는 trans-acting protein인 조절유전자 *atxA*는 플라스미드 pXO 1에 위치하며^[9], 협막에 관련된 유전자는 pXO 2

* 한양대학교 생화학 및 분자생물학과

** (주)셀엔젠

에 위치하고 있다^[13].

대개의 경우, 대식세포의 식균 작용에 의하여 세포 내로 들어간 세균은 대식세포 내에서 사멸하게 된다. 그러나 몇몇 대식세포에 들어간 세균의 경우는 생존하게 되어 병원성을 나타내게 되는데 대표적인 경우는 다음과 같다. *Legionella pneumophila*은 lysosome-phagosome 융합을 방해하면서 저항성을 나타내며, *Listeria monocytogenes* 와 *Shigella* spp. 등은 phagosome-lysosome이 융합하기 전에 세포질 내로 들어가며, *Salmonella typhimurium*은 항 미생물 반응에 저항하는 것으로 알려져 있으나, 아직 정확한 병원성에 관련된 기작은 밝혀져 있지 않다^[3].

탄저균 아포가 대식세포에 감염하게 되는 초기 단계에서는 탄저균이 숙주세포내로 들어가기 위하여 대식세포와 탄저균 아포의 상호작용이 일어난다^[4]. 그런 후, 대식세포가 아포를 식균 작용에 의하여 세포내부로 취하게 되고, 세포 내로 들어간 탄저균 아포는 림프구로 이동된 대식세포 내에서 발아가 된다. 발아된 아포는 탄저균 영양세포로서 탄저 관련 독력 유전자를 발현하게 되어 들어간 대식세포를 사멸케 하고, 결국, 초기감염 단계 후반부에 탄저균 영양세포는 혈액 1 ml 당 10⁸개로 증식이 된다, 그런 후 온몸으로 퍼져서, 결국 패혈증에 의하여 숙주를 사망에 이르게 한다^[4,5].

탄저균 아포의 발아는 플라스미드 pXO 1에 위치하고 있는 *gerS*에 의하여 조절된다고 알려져 있다^[13]. *Bacillus* 종들을 비롯한 플라스미드 pXO 1을 갖고 있는 스테인과 플라스미드 pXO 1이 제거된 델타스틴을 생쥐 대식세포에 감염시키면 발아가 되는 반면에 비 병원성 *Bacillus* 종들에서는 거의 발아가 진행되지 않는 것을 보고하였다^[6]. 주목할 만한 것은 다른 *Bacillus* 종들과는 다르게 플라스미드가 완전히 제거된 델타스틴 균주에서도 대식세포 안에서 발아를 한다는

점이다^[6]. 탄저균의 아포가 대식세포 내에서 어떻게 발아 및 생존하는지? 또한, 탄저균 아포가 대식세포에 감염된 초기 단계에 어떤 유전자나 인자들이 관여하는지, 주된 관심분야이나 아직 그 기전이 정확히 밝혀져 있지 않은 상태이다.

현재까지 세포나 조직에서 전체 단백질의 발현 패턴을 연구하기 위한 노력이 경주되었으며, 그 중 2차원 전기영동이 가장 많이 사용되고 있는 방법 중 하나이다^[11]. 병원성 미생물의 병원성 기전을 이해하기 위하여 *Chlamydia pneumoniae*를 HEP-2 세포에 감염을 시켜 변화하는 단백질의 패턴을 프로테오믹스 기술을 이용하여 분석하였으며^[11], 2차원 전기영동 기술을 이용하여 *Mycoplama pneumoniae*의 단백질 맵을 작성하기도 하였다^[14]. 또한, 전체 단백질체에 대한 연구 이외에도 병원성 세균에 대한 유전자 발현 패턴의 연구로 *L. pneumophila*를 생쥐 폐포 대식세포에 감염시켜 DNA chip을 이용하여 유전자 발현을 관찰하였으며^[12], Nau 그룹은 사람 대식세포에 그람양성균, 그람음성균, 및 *Mycobacterium* 종 등을 감염시키고 DNA chip을 이용하여 변화가 생기는 유전자 발현양상을 분석 보고한 바 있다^[12].

본 연구에서는 탄저균 스테인과 불활성화 시킨 스테인 아포를 사람 대식세포에 감염시켰을 때 일어나는 기전을 이해하기 위하여 초기 발현하는 단백질 패턴을 2차원 전기영동을 수행하였으며, MALDI-TOF MS/MS를 이용하여 관련된 단백질을 확인하고자 하였다.

2. 탄저균 아포와 사람 대식세포의 상호작용에 관한 실험 및 결과분석

Dixon 등^[11]의 방법에 의하여 탄저균 스테인 및 불활

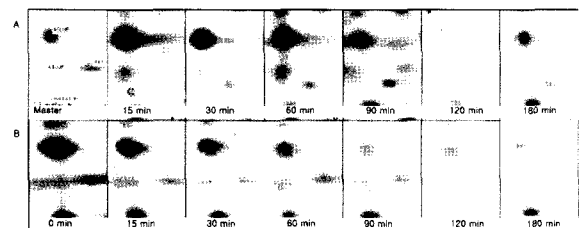
성화 시킨 스티인 아포를 각각 사람 대식세포에 처리하면 감염된 아포의 관찰은 15분 정도 배양하였을 때 가능하였다. 약 10분 정도 경과하면 대식세포와 상호작용을 하는 아포를 관찰할 수 있다^[6]. 본 실험의 결과 감염이 안 된 아포도 관찰할 수 있었으며, 감염이 안 된 아포는 모두 제거를 한 다음, 후속 실험을 수행하였다. 감염된 아포는 본 실험의 결과에 따르면, 사람 대식 세포에 감염이 된 직후 바로 발아가 진행되었으며, 90분 정도 되면 세포 내에 발아, 증식된 영양 세포를 대다수 관찰할 수 있었다, 이는 Hanna 등^[6]의 발표한 감염 아포의 발아 양상과 비슷하였다. 또한 감염 후 약 2시간이 경과 되면서 대식세포의 형태가 약간씩 변화하기 시작하는 것을 확인하였다.

탄저균 아포의 감염초기에 있어서 대식세포와의 어떤 상호작용이 발생하는지 확인하기 위하여 2차원 전기영동기술을 이용하여 확인하였다. 사람 대식세포에 탄저균 스티인과 불활성화 시킨 스티인아포를 감염시킨 후 감염된 대식 세포를 시간별로 회수한 후에 2-DE를 이용하여 탄저균 스티인과 불활성화 시킨 스티인 아포의 병인성에 따라서 감염초기에 대식세포에서 증감되는 단백질을 관찰하였다. 대표적으로 발현이 증감되는 동정된 단백질들을 표 1에 나타내었다. 그 중에서도 thimet peptidase와 pyruvate kinase는 불활성화 시킨 스티인에서는 15분에서 180분까지 거의 같은 양으로 발현되는 반면에 스티인에서는 전체적으로 많은 양이 감소됨을 확인할 수 있었다. Ubiquitin conjugating E2N은 스티인에서 지속적으로 증가되는 경향을 보이고 있는데, 불활성화 시킨 스티인에서는 발현이 거의 안되는 것을 확인하였다.반대로, protein phosphatase는 불활성화 시킨 스티인균주에서는 증가되는데 반해 스티인균주에서는 거의 발현이 되지 않는 것을 확인할 수 있었다. 기능이 밝혀져 있지 않은 RIKEN cDNA

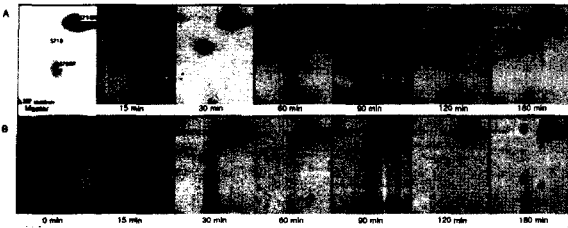
는 불활성화 시킨 스티인에서는 증가되는데 스티인균주에서는 발현이 확인되지 않았다. Unnamed protein (X14487)과 HSCARG 단백질은 불활성화 시킨 스티인

[표 1] Biomarkers for Bacillus anthracis spore infection in human macrophage cells identified in this study

Spot NO.	Protein	Accession NO.	Source
H4718	Thimet peptidase	AAH13878	Human
H4509	Pyruvate kinase M 1	S64635	Human
H5002	Ubiquitin conjugating E2N	NM_003448	Human
H5302	Protein phosphatase 1	NM_002709	Human
H5304	Transaldolase 1	NM_006755	Human
H5718	RIKEN cDNA	XP_133217	Human
H7107	Unnamed protein	X14487	Human
H7202	HSCARG protein	NM_020677	Human



[그림 1] Two-dimensional gels of human macrophage cells after infection by inactivated Bacillus anthracis Sterne (A) and by Bacillus anthracis Sterne spores (B). This spot was identified the thimet peptidase.



[그림 2] Two-dimensional gel image of human macrophage cells after infection by inactivated *Bacillus anthracis* Sterne (A) and by *Bacillus anthracis* Sterne spores (B). This spot was identified the RIKEN cDNA product.

에서도 발현되었는데, 스텐에서 더 많은 양이 발현되었다.

그리고, 대표적으로 증감되는 단백질의 이미지를 그림 1과 2에 나타내었다.

그림 1과 2에서도 확인할 수 있는 바와 같이 불활성화 시킨 탄저균 스텐아포와 살아있는 탄저균 아포가 감염되었을 시에 단백질 발현 패턴에 많은 차이를 보여준다. 이와 같은 결과로서 동정된 9개의 단백질을 탄저균 감염 시에 바이오 마커와 백신에 대한 후보물질로서 그 가능성을 가지고 있다고 사료된다.

3. 결 론

탄저균의 불활성화 시킨 스텐과 스텐 아포를 사람의 대식세포에 감염을 시켜 단백질 발현 패턴을 연구하였다. 탄저균의 불활성화 시킨 스텐과 살아있는 스텐균주의 아포를 사람 대식세포에 감염을 시켜서 많은 차이를 보이는 9개의 단백질을 동정하였다. 이들은 탄저균 감염에 대한 바이오 마커 및 백신에 대한 후보물질로서 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- [1] Dixon, T. C., A. A. Fadl, T. M. Koehler, J. A. Swanson, and P. C. Hanna. 1999. Early *Bacillus anthracis*-macrophage interactions: intracellular survival and escape. *Cell Microbiol.* 6, 453-463.
- [2] Duesbery, N. S., C. P. Webb, S. H. Leppla, V. M. Gordon, K. R. Klimpel, T. D. Copeland, N. G. Ahn, M. K. Oskarsson, K. Fukasawa, K. D. Paul, and G. F. Vande Woude. Copeland. 1998. Proteolytic inactivation of MAP-Kinase-Kinase by anthrax lethal factor. *Science* 280, 734-737.
- [3] Finlay, B. B., and P. Cossart. 1997. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 276, 718-725.
- [4] Guidi-Rontani, C. 2002. The alveolar macrophage: the Trojan horse of *Bacillus anthracis*. *Trends Microbiol* 10, 405-409.
- [5] Guidi-Rontani, C. M. Weber-Levy, E. Labruyere, and M. Mock. 1999. Germination of *Bacillus anthracis* spores within alveolar macrophage. *Mol. Microbiol.* 31, 9-17.
- [6] Hanna, P. C., S. Kochi, and R. J. Collier. 1992. Biochemical and physiological changes induced by anthrax lethal toxin in J774 macrophage-like cells. *Mol. Biol. Cell* 3, 1269-1277.
- [7] Ireland, J. A. and P. C. Hanna. 2002. Macrophage-enhanced germination of *Bacillus anthracis* endospores requires *gerS*. *Infect.*

- Immun.* 10, 5870-5872.
- [8] Leppla, S. H. 1982. Anthrax toxin edema factor : a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3162-3166.
- [9] Makino, S. C., Sasakawa, I. Uchida, N. Terakado, and M. Yoshikawa. 1998. Cloning and CO₂-dependent expression of the genetic region for encapsulation from *Bacillus anthracis*. *Mol. Microbiol.* 2, 371-376.
- [10] Mock, M. and A. Fouet. 2001. Anthrax. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 647-671.
- [11] Molestina, R. E., J. B. Klein, R. D. Miller, W. H. Pierce, J. A. Ramirez, and J. T. Summersgill. 2002. Proteomic analysis of differentially expressed *Chlamydia pneumoniae* genes during persistent infection of HEp-2 cells. *Infect. Immun.* 6, 2976-2981.
- [12] Nau, G. J., J. F. Richmond, A. Schlesinger, E. G. Jennings, E. S. Lander, and R. A. Young. 2002. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 1503-1508.
- [13] Okinaka, R. T., K. Cloud, O. Hampton, A. R. Hoffmaster, K. K. Hill, P. Keim, T. M. Koehler, G. Lamke, S. Kumano, J. Mahillon, D. Manter, Y. Martinez, D. Ricke, R. Svensson, and P. J. Jackson. 1999. Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes. *J. Bacteriol.* 181, 6509-6515.
- [14] Regula, J. T., B. Ueberle, G. Boguth, A. Görg, M. Schnölzer, R. Herrmann, and R. Frank. 2000. Towards a two-dimensional proteome map of *Mycoplasma pneumoniae*. *Electrophoresis* 21, 3765-3780.