

감마선 조사가 *Vibrio vulnificus*의 Metalloprotease 유전자 발현에 미치는 영향

정진우 · 임상용 · 조민호 · 윤혜정 · 허정무 · 김동호*
한국원자력연구원 방사선생명공학연구센터

Effect of Gamma Irradiation on the Expression of Gene Encoding Metalloprotease in *Vibrio vulnificus*. Jung, Jinwoo, Sangyong Lim, Minho Joe, Hyejeong Yun, Jungmu Hur, and Dongho Kim*. Radiation Research Center for Biotechnology, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup, 580-185, Korea – To check the microbiological safety with respect to increased virulence of surviving pathogens after irradiation, in this study, the transcriptional change of *vvp* gene encoding metalloprotease, which is one of the typical virulence factors of *Vibrio vulnificus*, was monitored by real-time PCR during the course of growth cycle after re-inoculation of irradiated *Vibrio*. When *V. vulnificus* was exposed to a dose of 0.5 and 1 kGy, the lag period before growth resumption of sub-cultures became longer than non-irradiated counterpart as increase of irradiation dose. In the case of non-irradiated culture, the transcription of *vvp* was significantly activated at 15 h after inoculation, when bacterial growth reached the stationary phase, and the highest level of protease activity (686 U/mL) was measured at the same time. Interestingly, *vvp* expression of irradiated *Vibrio* was turned up earlier than non-irradiated *Vibrio* during the mid log phase of growth, whereas these rapid induction of *vvp* expression from irradiated cells didn't result in an increase of metalloprotease production. When *Vibrio* was irradiated at 0.5 and 1 kGy, the protease activities peaked at 18 h after inoculation and the levels of activities were lower 1.2- and 1.4-fold, respectively, compared to the non-irradiated counterpart. Results from this study indicate that gamma radiation is not likely to activate the virulence ability of surviving *Vibrio*.

Key words: Gamma irradiation, *Vibrio vulnificus*, metalloprotease(*vvp*), real-time PCR

서 론

감마선이나 전자선 등의 전리 방사선을 이용한 방사선 조사는 식품 고유의 풍미와 품질을 유지하면서도, 안정적이고 효율적으로 식품 위해 미생물을 제거할 수 있는 유효한 기술로 평가되고 있다[5, 20]. 세계보건기구(WHO), 식량농업기구(FAO), 미국 식품의약국(US FDA) 등의 국제기관들은 1980년대에 이미 방사선 조사 식품의 영양학적 손실 여부 및 독성학적, 미생물학적 안전성 등에 대한 반복적인 검증을 통하여 안전성을 인종하였다[17, 18]. 그럼에도 불구하고 방사선 조사 식품의 안전성에 대한 소비자의 검증 요구는 여전히 계속되고 있으며 특히 방사선의 생물체에 대한 돌연변이 유발과 관련하여, 방사선 조사 후 생존한 미생물이 변이를 일으켜 보다 더 유해한 병원성 미생물로 변화 시킬 수도 있다는 주장은 지금까지도 많은 논쟁의 대상이 되고 있다. 이와 관련하여 미국 식품의약국은 방사선 조사에 의한 변이가 미생물의 병원성을 증가시킨다는 어떠한 증거도 얻을 수 없다고 발표한 바 있으나[17, 20] 방사선 조사 후 생존 미생

물에 대한 미생물학적 안전성 검증은 영양학적, 식품화학적, 독성학적 안전성 검증에 비하여 자료가 부족한 것이 현실이다.

미생물의 방사선 감수성은 미생물의 각 종, 성장상태, 또는 환경 등에 따라 각기 다르다. *Clostridium*이나 *Bacillus*속의 그람 양성 세균과 내생포자, 그리고 일부 방사선저항성 미생물들은 D_{10} 값 1 kGy 이상의 높은 방사선 저항성을 나타낸다[3, 6]. 이에 비하여, 포자를 형성하지 않는 식중독 세균(*Salmonella*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Escherichia* 등)들은 방사선 저항성이 낮아 0.5 kGy 내외의 D_{10} 값을 나타내며, 일반적인 식품의 방사선살균 선량인 3 kGy의 방사선 조사에 의하여 약 10^{-6} 수준의 살균효과가 나타난다[3, 6]. 한편, 과일이나 육류 등과 같이 1 kGy 내외의 저 선량 살균이 적용되는 경우, 병원성 미생물이 생존하거나 병원성과 관련된 돌연변이가 생성될 가능성을 배제하기 어렵다. 그러나 장내 병원성 세균들을 포함한 그람 음성균의 경우 방사선 살균을 목적으로 하는 병원성 세균의 치사율에 대한 연구 이외에 방사선 조사 후 생존한 세균의 병원성 변화에 관련된 연구는 거의 보고된 바 없다.

하절기에 집중적으로 발생하는 비브리오 패혈증은 *Vibrio vulnificus* 균에 오염된 어패류를 생식하거나 오염된 해수 및 어패류와의 접촉 시 피부 상처를 통해서 감염되어 발생하며

*Corresponding author

Tel: 82-63-570-3140, Fax: 82-63-570-3149

E-mail: fungikim@kaeri.re.kr

특히, 간질환이나 면역결핍이 있는 사람이 *V. vulnificus*에 감염되면 높은 치사율을 보이는 패혈증을 일으키게 된다 [1]. *V. vulnificus* 감염 질환에는 적혈구를 분해하는 hemolysin (cytolysin), 세포독성을 나타내는 RtxA 독소, protease, lipase, esterase 등의 다양한 세포 외 분비효소, 생체 내에서 세균의 철분 이용도를 높여주는 siderophores, 식균작용과 정상 혈청의 살균 작용에 대한 저항성, 다당체 협막 등의 병원성 인자가 관여하는 것으로 알려져 있다[7]. 이러한 병원성 인자 중 *V. vulnificus* vvp (vvpE, empV) 유전자가 생산하는 protease는 효소 활성에 아연이온(Zn^{2+})이 필요한 metalloprotease로 collagenase, elastase, caseinase 등의 부가적인 활성을 가지고 있다[2, 7, 14]. Metalloprotease는 실험동물 모델에서 혈관투과성 증가, 피하출혈, 부종 등을 발생시키고 heme 결합 단백질, transferrin 등을 분해하여 *V. vulnificus*의 철분 이용을 용이하게 해주기 때문에 균의 성장이나 발병 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있으나[7, 15, 16], 아직까지 *V. vulnificus*의 발병 과정에 protease가 정확히 어떤 역할을 하는지는 아직 명확하게 규명되지 않고 있다[4, 22].

본 연구는 치사율 이하의 저 선량 방사선 조사가 *Vibrio vulnificus*의 병원성에 영향을 주는지를 살펴보기 위한 연구의 일환으로, *V. vulnificus*의 병원성 인자로 알려져 있는 metalloprotease를 생산하는 vvp 유전자의 발현과 vvp 유전자가 생산하는 protease 활성의 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

방사선 조사

방사선 조사는 한국 원자력연구원의 선원 300 kCi, Co-60 감마선 조사 시설 (AECL, IR-79, Nordion)을 이용하여 실시하였다. 감마선 조사 조건은 4°C에서 분당 70 Gy 선량율로 각각 0.5, 1, 1.5, 2 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였으며 총 흡수 선량의 오차는 $\pm 5\%$ 이내가 되도록 하였다. 이 때 흡수선량의 측정에는 5-mm-diameter alanine dosimeter (Bruker Instruments)로 측정하였다.

배지 및 균주 배양

실험에 사용된 균주는 *Vibrio vulnificus* ATCC 29307을 사용하였고, 기본 배지로 LBS (1% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 3% NaCl)를 사용하였으며 균의 생육은 분광광도계(Amersham)로 600 nm에서 흡광도를 측정하여 조사하였다. 균주를 LBS에 접종한 다음 30°C에서 24시간 배양한 전 배양액을 1:100의 비율로 새로운 배지에 접종한 후 흡광도가 2.0 정도가 되었을 때 배양액을 회수하여 이를 감마선 조사 시료로 사용하였다. 비 조사 시료도 4°C에서 동일 시간 방치한 후 감마선 조사 시료와 함께 멸균 생리식염수에 1/10 단위로 순차 희석하여 LBS agar 배지에 도말 후 30°C의 배양기에서 48시간 배양한 후 생성된 colony를 계수

하여 생균수를 측정하였다. 한편, 시료의 일부를 취하여 동일한 양의 *Vibrio*를 (~10 CFU) 새로운 LBS 배지에 접종하여 3시간 단위로 real time PCR 방법으로 vvp 유전자의 발현 정도를 비교하고 아울러 metalloprotease의 활성을 측정하였다.

Oligonucleotides

vvp 유전자의 mRNA로부터 cDNA를 만들기 위한 역전사 반응에는 vvp1 primer (5'-gct aag gtc aac aga gcc tag agt-3')를 사용하였고 vvp 발현 정도를 측정하기 위한 real time PCR 반응에는 vvp2 (5'-act gag caa caa cga tct ct-3')와 vvp3 (5'-ggt tac ggt caa aca acg at-3') primer를 사용하였다. Reference 유전자로 사용된 16s rRNA의 경우, cDNA 합성에는 16S1 (5'-acg ctt tcg cat ctg agt gtc agt atc-3'), real-time PCR 반응에는 16S2 (5'-cag cca cac tgg aac tga ga-3')와 16S3 (5'-tta gcc ggt gct tct tct gt-3') primer를 각각 사용하였다.

Total RNA 정제 및 cDNA 합성

감마선 조사 또는 비 조사 균을 새로운 배지에 접종한 후 3시간 마다 배양액 1 mL을 채취하여 Trizol(Invitrogen)로 total RNA를 추출한 후 DNA-free™ DNase(Ambion)로 genomic DNA를 제거하고 RNeasy mini kit(Qiagen)를 이용하여 추출된 RNA를 정제하였다. 모든 방법은 제조회사의 매뉴얼에 따라서 수행하였다. 정제된 total RNA는 agarose gel을 이용한 전기 영동법을 통하여 순도를 확인한 뒤 230, 260 및 280 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 계산하였다. 정제된 total RNA 2 µg의 부피를 10 µL로 조절한 후 75°C에서 5분간 가열하고 4°C에서 50 ng의 primer (vvp1 또는 16S1), 30unit AMV reverse transcriptase (Promega), 5X reaction buffer, 10mM dNTP, 40unit RNasin을 혼합하여 역전사 반응용액(50 µL)을 만들었다. DNA thermal cycler(Primus 96^{plus}, MWG Biotech)를 사용하여 25°C에서 10분간 annealing, 42°C에서 90분간 역전사 반응을 수행한 후 95°C에서 5분간 역전사 효소의 활성을 중지시키고 4°C로 냉각하여 반응을 종료시켰다.

Real-time PCR을 이용한 vvp 유전자 발현도 분석

합성된 cDNA의 정량 분석을 위해 12.5 µL의 2X SYBR Premix Ex Taq™ (Takara), 각 0.5 µL의 10 µM primer, 2 µL의 cDNA (20 ng/µL)를 9.5 µL의 증류수와 혼합하여 real time PCR 반응 용액을 만들었다. Smart Cycler II System(Cepheid)을 이용하여 95°C에서 10초간 denaturation, 50°C에서 20초간 annealing, 72°C에서 20초간 extension 과정을 40회 반복하였다. SYBR Green의 형광 신호는 PCR cycle 중 신장반응이 끝난 후에 매번 측정하였다. PCR 산물의 정량 지표인 형광도가 직선적으로 증가하는 성질을 보이

는 증폭 초기에 기본 형광도(horizontal line)를 넘어서는 PCR cycle의 횟수를 “Threshold cycle (Ct)”이라고 한다 [28]. 본 실험에서도 Ct 값을 이용하여 *vvp* 유전자의 발현 변화를 측정하였고 샘플양의 변이를 보정해 주는 reference 유전자로는 16s rRNA를 사용하였다. PCR 반응 종료 후 증폭된 PCR 산물이 목적인 DNA 단편인지 알아보기 위하여 60°C에서 99°C까지 초당 0.2°C씩 온도를 상승시키며 증폭된 PCR 산물의 용해 곡선을 측정하였다. PCR 반응, 데이터의 수집 및 분석은 Smart CyclerII System과 함께 제공되는 프로그램을 사용하여 수행하였다.

Metalloprotease 활성 측정

LBS 액체배지 100 mL에 감마선 조사 또는 비 조사된 *V. vulnificus* 배양액 1%를 접종한 후 3시간 마다 배양액 1 mL을 취하여 원심 분리한 후 그 상등액을 조효소 액으로 사용하였다. 효성활성 측정은 1%의 azocasein 기질용액 (0.1 M 인산완충용액, pH 7.5) 400 µL에 조효소액 100 µL을 섞어 준 후 30°C에서 30분간 반응시켰다. 25%(w/v) trichloroacetic acid 용액 250 µL을 가해 반응을 종료시킨 후 15분 동안 반응액을 정지시키고 10,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여, 그 상등액을 취하여 동일 양의 1 N NaOH 용액과 섞어 주었다. 효소의 역가 1 unit은 상기 조건에서 1분당 440 nm에서 흡광도 0.01을 증가시키는데 필요한 효소 양으로 하였다[14].

결과 및 고찰

*V. vulnificus*의 방사선 감수성 측정

초기 균 수 $1.7 \pm 1.5 \times 10^9$ CFU/mL의 *V. vulnificus* 배양액에 감마선을 조사하여 방사선 감수성을 확인한 결과, 0.5 kGy에서 $1.3 \pm 0.6 \times 10^6$ CFU/mL의 균체가, 1 kGy에서는 $7.0 \pm 2.4 \times 10^3$ CFU/mL의 균체가 생존하였으며 1.5 kGy 이상의 조사선량에서는 생존 균체가 관찰되지 않았다. 사멸율을 나타내는 이차방정식 기울기의 역수 값으로부터 계산된 D_{10} 값, 즉, *V. vulnificus*를 90% 살균하는데 필요한 감마선 조사선량은 0.17 kGy로 계산되었다(Fig. 1). 한편, 본 실험에서 계산된 *V. vulnificus*의 D_{10} 값은 *Campylobacter jejuni*와 유사한 수준이었으며 *Salmonella* sp. ($D_{10}=0.7$ kGy)나 *E. coli* O157:H7 ($D_{10}=0.3$ kGy) 보다는 낮아 다른 병원성 미생물들에 비하여 상대적으로 높은 방사선 감수성을 나타내었다[5, 25].

방사선 조사에 따른 metalloprotease (*vvp*) 유전자의 발현 변화

감마선 조사 후 생존한 *V. vulnificus*를 진탕 배양하여 3시간 간격으로 배양시간에 따른 균체 성장과 metalloprotease를 생산하는 *vvp* 유전자의 발현양을 real-time PCR로 확인

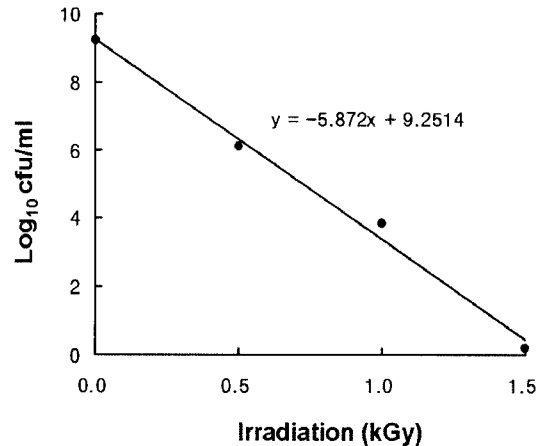


Fig. 1. Irradiation survival curves of *V. vulnificus*. Cells were grown overnight in LBS broth to early log phase and irradiated with ^{60}Co at 0.5, 1 and 1.5 kGy on wet ice. Following irradiation appropriate dilutions were made and plated on LBS agar. Plates were incubated at 30°C for 48 hours prior to the counting of colonies.

하였다. 감마선 비 조사 (0 kGy) 또는 조사된 (0.5와 1 kGy) 균주의 배양액 2% (v/v)를 새로운 LBS 배지에 접종한 후 3 시간마다 균체를 취해 미생물의 성장을 관찰하였고 동시에 total RNA를 추출하여 *vvp* 유전자의 발현도를 측정하였다. 3시간 마다 채취된 균체에서의 *vvp* 발현 정도는 comparative method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 방법을 이용하여 접종 후 3시간이 지난 후의 방사선 비조사구 *vvp* 유전자의 발현양을 기준으로 삼아 상대적으로 계산하였다[13]. 감마선을 조사하지 않은 *V. vulnificus*는 접종 직후부터 생장이 관찰되었으며 *vvp*의 발현은 접종 후 9시간이 지나자 증가하였다(Fig. 2). *vvp*의 발현은 접종 후 15시간이 지나면서 최대치를 나타내었으며 metalloprotease의 활성 또한 이 시간에서 최대치를 보였다(Fig. 3). 이 결과들은 metalloprotease의 활성이 *V. vulnificus*의 성장 곡선 중 정지기에서 최대로 유도된다는 기존의 결과와 일치하였다[11, 27]. 0.5 kGy의 감마선이 조사된 *V. vulnificus*는 접종 후 3시간, 1 kGy를 조사한 경우에는 9시간이 지나자 균체량이 증가하였다(Fig. 2). 이러한 결과는 감마선이 조사된 미생물의 경우 생육이 시작되기 전에 일정 시간의 유도기가 필요하다는 것을 의미한다. 일반적으로 방사선은 세포 내 DNA와 세포 구조를 이루는 세포질 막에 직접적인 영향을 주어 미생물의 사멸을 유도한다[21, 26]. 특히, 감마선과 같은 이온화 방사선은 직접 DNA에 손상을 입히거나 물로부터 활성산소나 자유 라디칼을 생산시켜 DNA에 손상을 유발하므로[24] 손상된 DNA가 DNA 복구 시스템에 의해 회복되는 기간 (유도기) 동안 생장이 저해되었다는 것을 알 수 있다.

감마선 조사를 하지 않은 *V. vulnificus*는 감마선 조사에 따른 유도기가 없으므로 접종 직후부터 자라기 시작하여 생육이 시작된 후 9시간이 지나야 비로소 *vvp* 발현이 증가

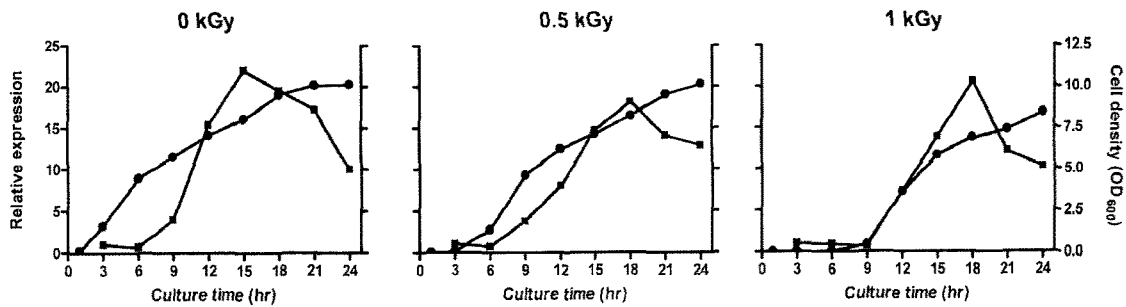


Fig. 2. Growth kinetics and growth-phase dependent expression of *vvp* after irradiation. *V. vulnificus* strain grown to early log phase in LBS medium was exposed to doses of 0.5 and 1 kGy irradiation. After re-inoculation of irradiated or non-irradiated cells at 1:50 into fresh LBS medium, samples removed at the indicated times from cultures of cells were analyzed for *vvp* mRNA by real-time PCR. The level of the *vvp* mRNA was normalized to that of 16s rRNA gene. The induction of *vvp* transcript in each sample is expressed relative to the amount of the *vvp* transcript from non-irradiated *V. vulnificus* after 3 h of inoculation. This result is a representative of three independent experiments. ●, cell density; ■, *vvp* expression

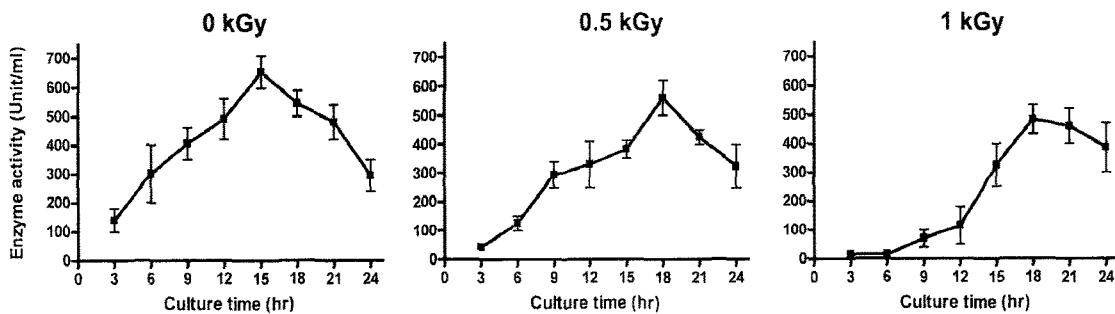


Fig. 3. The effect of irradiation on protease (*vvp*) production. After irradiation (0.5 and 1 kGy), the supernatants of the sub-cultures were obtained at the time points as indicated and the protease activities were assayed with azocasein. Data represent the mean±SD of three experiments.

되었다. 하지만 이에 비하여 0.5 kGy의 감마선에 노출된 *V. vulnificus*는 3시간의 유도기를 거친 후 생육이 시작되었고 생육이 시작된 후 6시간 정도가 지나자 *vvp* 발현이 증가되었다. 더욱 흥미로운 것은, 1 kGy의 감마선을 조사한 시료의 경우에는 9시간의 유도기를 거친 후에야 비로소 균체량이 확연하게 증가되었음에도 불구하고 *vvp* 발현은 생육이 시작된 후 3시간 만에 빠르게 증가되는 양상을 보였다(Fig. 2). 즉, 균체의 생육 시작점을 기준으로 *vvp*의 발현 증가 시점을 비교해 보면 방사선 조사구가 비조사구에 비하여 3시간(0.5 kGy) 또는 6시간(1 kGy) 정도 빠르게 *vvp* 발현이 유도되는 것을 알 수 있었다.

*vvp*는 10 bp정도 떨어진 두 개의 promoter, promoter L (PL)과 promoter S(PS)에 의하여 발현이 조절된다[9]. PL은 *Vibrio*의 성장 단계(growth phase)와 상관없이 항상 기본적으로 발현이 유지되는 promoter로, PS는 RpoS, cAMP·CRP, SmcR 등의 조절인자에 의하여 *vvp* 발현을 조절하는 promoter로 알려져 있다[9, 10]. 온도, 삼투압, 철 이온의 농도, 산소 농도 등을 변화시킨 다양한 배양조건에서 *vvp* 유전자의 발현을 조사한 결과 *Vibrio*의 성장 단계(growth phase)가 정지기에 이르렀을 때 *vvp* 발현은 최대로 증가하였고[23, 27] 이런 성장 단계 의존적인 *vvp* 발현에는 PL 보

다는 PS promoter가 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다 [9, 10]. 방사선 조사는 생체 내에서 hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$)이나 superoxide radical ($\cdot\text{O}_2$)과 같은 반응성이 높은 산소종(reactive oxygen species)을 생성시켜 산화 스트레스를 유발한다[20, 22]. PS promoter의 조절 인자 중의 하나인 RpoS는 일반적으로 정지기에서 생산되어 다양한 유전자들의 발현을 유도하지만 대수기에서도 *V. vulnificus*가 산화 스트레스를 겪을 경우에는 *V. vulnificus*의 생존에 관여한다[19]. 그러므로 방사선이 조사된 실험구에서 비조사구에 비하여 *vvp* 발현이 빠르게 유도되는 현상은 방사선 조사에 의하여 유발된 산화 스트레스에 의하여 생성이 유도된 RpoS가 PS promoter의 활성을 높여 발생한 결과일 수도 있을 것이다. 하지만, 다른 한편으로는 아직까지 밝혀지지 않은 PL promoter의 조절인자의 생산량(또는 활성)이 방사선 조사에 의하여 증가되어 PL promoter의 활성이 높아졌을 가능성 또한 배제할 수 없을 것이다. 이 부분과 관련하여서는 다양한 실험이 필요할 것으로 생각된다.

방사선 조사에 따른 metalloprotease의 활성 변화
 감마선 조사 후 생존한 *V. vulnificus*가 생산하는 metalloprotease의 활성을 접종 후 3시간 마다 측정하여 *vvp* mRNA

의 발현양과 비교하여 보았다. 방사선이 조사된 *V. vulnificus*에서 *vvp*의 발현이 증가하기 시작한 9시간(0.5 kGy)과 12시간(1 kGy)에서의 metalloprotease 활성을 비조사구에서 *vvp*의 발현이 증가하기 시작한 시점(9시간)에서의 활성과 비교한 결과 감마선이 조사된 실험구의 protease 활성은 비조사구에 비해서 각각 70%, 25% 수준 밖에 되지 않았다(Fig. 3). 1 kGy의 감마선이 조사된 *V. vulnificus*의 12시간에서의 *vvp* 유전자의 상대적 발현도는 약 7.3으로 비조사구의 상대적 발현도인 4와 비교하면 약 2배 정도 높음에도 불구하고 metalloprotease의 활성은 오히려 4배 정도 낮았다. 하지만 mRNA의 양이 일정하더라도 그에 따라 단백질의 양이 일정하게 생산되지 않는다는 것을 고려하면[8] 이러한 차이는 방사선 조사에 의한 영향이라기 보다는 mRNA양과 단백질 양사이의 불일치에서 오는 결과로 생각된다. 한편, metalloprotease 활성은 감마선 비조사구에서는 15시간에서 686 ± 55 U/mL로 최대값을 보였고 0.5 kGy와 1 kGy로 감마선이 조사된 경우에는 18시간에서 556 ± 60 U/mL와 480 ± 50 U/mL로 각각 최대 활성을 보였다(Fig. 3). Metalloprotease 활성이 최대로 증가한 시간은 *vvp*의 발현이 최대로 증가된 시간과 같은 시간이었지만(Fig. 2) 역시 비조사구에 비해서는 감소하는 것을 알 수 있었다.

결론적으로 감마선 조사를 하였을 때 *vvp*의 발현이 빠르게 유도되었지만 metalloprotease의 활성은 감마선 비조사구에 비하여 감소하였으므로 감마선 조사 후에 생존한 *V. vulnificus*의 병원성은 비조사구에 비하여 증가하지 않는다는 것을 알 수 있었다. 이와 더불어, 아직까지 밝혀지지 않은 방사선 효과에 의하여 유전자 발현이 조절될 수 있으므로 병원성 유전자의 발현 감소 또는 증가만을 지표로 하여 방사선 조사 후에 생존한 병원성 세균의 안정성을 판단하기에는 무리가 있을 것으로 생각된다. 따라서 미생물의 방사선 안정성과 관련된 연구의 경우 병원성 유전자의 발현 변화와 더불어 단백질 수준에서 병원성 인자의 활성 변화를 판별하는 연구가 동시에 수행되어야 할 필요가 있다.

요 약

방사선 조사 후에 생존한 병원성 미생물의 안정성을 연구하기 위하여 패혈증을 일으키는 *Vibrio vulnificus* ATCC 29307의 병원성 인자인 metalloprotease (*vvp*) 유전자의 발현과 효소 활성의 변화를 감마선 조사 후에 시간대별로 확인 하였다. *V. vulnificus*는 다른 병원성 미생물들에 비하여 비교적 높은 방사선 감수성을 보였으며 방사선 조사 직후 유도를 거친 후에 성장이 다시 시작되었다. 감마선을 조사하였을 경우 *vvp* 유전자의 발현은 비조사구에 비하여 3~6시간 정도 빨리 유도되었으나 총 metalloprotease의 활성은 감소하였다. 또한, *vvp* 유전자의 발현이 최대로 증가한 시점에서 metalloprotease의 활성을 비교한 결과 감마선이 조사된

균의 경우 감마선이 조사되지 않은 균에 비하여 약 70~80% 수준으로 생산량이 감소하는 것을 알 수 있었다. 결론적으로, 감마선 조사 후 생존한 *Vibrio vulnificus*에서 병원성 인자 (*vvp*)의 발현 및 활성은 증가하지 않았으며 본 연구결과를 감마선 조사 식품의 미생물학적 안정성을 보여주는 기초 자료중의 하나로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Borenstein, M. and F. Kerdel. 2003. Infections with *Vibrio vulnificus*. *Dermatol. Clin.* **21**: 245-248.
- Cheng, J. C., C. P. Shao, and L. I. Hor. 1996. Cloning and nucleotide sequencing of the protease gene of *Vibrio vulnificus*. *Gene*. **183**: 255-257.
- Diehl, J. F. 1995. Microbiological safety of irradiated foods, p. 225-239. *In Safety of Irradiated Foods*. Marcel Dekker Inc. New York.
- Fan, J. J., C. P. Shao, Y. C. Ho, C. K. Yu, and L. I. Hor. 2001. Isolation and characterization of a *Vibrio vulnificus* mutant deficient in both extracellular metalloprotease and cytolysin. *Infect. Immun.* **69**: 5943-5948.
- Farkas, J. 1998. Irradiation as a method for decontaminating food. *Int. J. Food Microbiol.* **44**: 189-204.
- Farkas, J. 1989. Microbiological safety of irradiated foods. *Int. J. Food Microbiol.* **9**: 1-15.
- Gulig, P. A., K. L. Bourdage, and A. M. Starks. 2005. Molecular pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *J. Microbiol.* **43**: 118-131.
- Gygi, S. P., Y. Rochen, B. R. Franza, and R. Aebersold. 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 1720-1730.
- Jeong, H. S., K. C. Jeong, H. K. Choi, K. J. Park, K. H. Lee, J. H. Rhee, and S. H. Choi. 2001. Differential expression of *Vibrio vulnificus* elastase gene in a growth phase-dependent manner by two different types of promoters. *J. Biol. Chem.* **276**: 13875-13880.
- Jeong, H. S., M. H. Lee, K. H. Lee, S. J. Park, and S. H. Choi. 2003. SmcR and cyclic AMP receptor protein coactivate *Vibrio vulnificus vvpE* encoding elastase through the RpoS-dependent promoter in a synergistic manner. *J. Biol. Chem.* **278**: 45072-45082.
- Kawase, T., S. Miyoshi, Z. Sultan, and S. Shinoda. 2004. Regulation system for protease production in *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **240**: 5-59.
- Kim, S. Y., S. E. Lee, Y. R. Kim, C. M. Kim, P. Y. Ryu, H. E. Choy, S. S. Chung, and J. H. Rhee. 2003. Regulation of *Vibrio vulnificus* virulence by the LuxS quorum-sensing

- system. *Mol. Microbiol.* **48**: 1647-1664.
13. Livak, K. and T. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods.* **25**: 402-408.
 14. Miyoshi, N., C. Shimizu, S. Miyoshi, and S. Shinoda. 1987. Purification and characterization of *Vibrio vulnificus* protease. *Microbiol. Immunol.* **31**: 13-25.
 15. Miyoshi, S., H. Nakazawa, K. Kawata, K. Tomochika, K. Tobe, and S. Shinoda. 1998. Characterization of the hemorrhagic reaction caused by *Vibrio vulnificus* metalloprotease, a member of the thermolysin family. *Infect. Immun.* **66**: 4851-4855.
 16. Okujo, N., T. Akiyama, S. Miyoshi, S. Shinoda, and S. Yamamoto. 1996. Involvement of vulnibactin and extracellular protease in utilization of transferrin- and lactoferrin-bound iron by *Vibrio vulnificus*. *Microbiol. Immunol.* **40**: 595-598.
 17. Olson, D. G. 1998. Irradiation of food: scientific status summary. *J. Food Tech.* **52**: 56-62.
 18. Osterholm, M. T. and A. P. Norgan. 2004. The role of irradiation in food safety. *N. Engl. J. Med.* **350**: 1898-1901.
 19. Park, K. J., M. J. Kang, S. H. Kim, H. J. Lee, J. K. Lim, S. H. Choi, S. J. Park, and K. H. Lee. 2004. Isolation and characterization of *rpoS* from a pathogenic bacterium, *Vibrio vulnificus*: role of sigma S in survival of exponential-phase cells under oxidative stress. *J. Bacteriol.* **186**: 3304-3312.
 20. Parnes, R. B. and A. H. Lichtenstein. 2004. Food irradiation: a safe and useful technology. *Nutr. Clin. Care.* **7**: 149-155.
 21. Scholes, G., J. F. Ward, and J. Weiss. 1960. Mechanism of the radiation-induced degradation of nucleic acid. *J. Mol. Biol.* **2**: 379-391.
 22. Shao, C. P. and L. I. Hor. 2000. Metalloprotease is not essential for *Vibrio vulnificus* in mice. *Infect. Immun.* **68**: 3569-3573.
 23. Shao, C. P. and L. I. Hor. 2001. Regulation of metalloprotease gene expression in *Vibrio vulnificus* by a *Vibrio harveyi* LuxR homologue. *J. Bacteriol.* **183**: 1369-1375.
 24. Symons, M. C. R. 1994. Direct and indirect damage to DNA by ionizing radiation. *Radiat. Phys. Chem.* **43**: 403-405.
 25. Thayer, D. W. 2004. Irradiation of food – Helping to ensure food safety. *N. Engl. J. Med.* **350**: 1811-1812.
 26. Von Sonntag, C. 1987. Targets in radiation biology, p. 94-109. *In The chemical basis of radiation biology*. Taylor and Francis Inc. New York.
 27. Watanabe, H., S. Miyoshi, T. Kawase, K. Tomochika, and S. Shinoda. 2004. High growing ability of *Vibrio vulnificus* biotype 1 is essential for production of a toxic metalloprotease causing systemic diseases in humans. *Microbiol. Pathog.* **36**: 117-123.
 28. Wilhelm, J. and A. Pingoud. 2003. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem.* **4**: 1120-1128.

(Received Dec. 17, 2007/Accepted Feb. 3, 2008)