

# *Salmonella* Type III Secretion System을 이용한 단백질 분비시스템 개발

Vo Dinh Le Tam · 홍순호\*

울산대학교 생명화학공학과

## Development of Protein Secretion System using Type III Secretion System of *Salmonella*

Le Tam Vo Dinh and Soon Ho Hong\*

School of Chemical Engineering & Bioengineering, University of Ulsan, 29 Mugeo-dong, Nam-gu, Ulsan 680-749, Korea.

**Abstract** New protein secretion system was developed using Type III secretion system of *Salmonella*. N-terminal region of SlrP and SptP effector proteins were fused with TliA and EstA-P lipases by overlapping PCR. Lipase activity of *Salmonella* with SptP-TliA fusion system increased by 2.6 fold compare with wild type *Salmonella* strain. This result showed that lipase secretion via the T3SS would be a useful protein secretion machinery.

**Keywords:** Type III Secretion System, *Salmonella*, secretion, lipase

### 서 론

질병을 야기하는 병원성균주들의 특성 및 이의 선택적 치료는 생명공학의 가장 핵심적인 연구분야 중의 하나이다. 페니실린의 발견 이후 지속적인 연구를 통하여 병원성균주를 선택적으로 제거할 수 있는 항생제들이 성공적으로 개발되어져 왔으나, 최근에는 항생제 내성균주들의 출현으로 한계에 부딪히고 있는 실정이다. 따라서 병원성균주 혹은 질병세포를 선택적으로 인식·공격·제거 할 수 있는 새로운 질병치료 패러다임이 필요한 실정이다. 식중독을 일으키는 대표적인 미생물인 살모넬라균의 Type III Secretion System (T3SS)는 동물세포에 직접 단백질을 주입 (injection)할 수 있으며(1), 이를 활용한 라이브백신의 모델 시스템으로서 많은 각광을 받고 있다(Fig. 1).

T3SS는 많은 그람음성균주들과 동물 혹은 식물 숙주 (host)들과의 interaction에 핵심적인 기관이며, 박테리아의 운동성을 담당하는 편모로부터 진화되어졌다고 알려져 있

다(1, 2). T3SS의 기본구조는 편모와 매우 유사하며, T3SS의 바늘 구조물의 지름은 8 nm이며 길이는 80 nm이다(3, 4). 살모넬라균이 산소농도, 삼투압 등의 외부조건을 인식하여 소장에 도달하였음을 인식하면, *Salmonella* Pathogenicity Island-1 (SPI-1) network을 활성화하여 T3SS 구조물 단백질 들을 합성하여 균주외부에 발현시킨다(Fig. 1). 이와 동시에 effector라는 일련의 단백질들을 발현한 후, T3SS를 통하여 숙주인 소장세포 내부로 주입 (injection)한다. 주입된 effector들은 숙주세포의 신호전달네트워크 (signal transduction network)를 조작하여 숙주세포의 변형을 유발하고, 변형된 인체 소장세포 내부로 살모넬라균이 침입한 이후 혈관을 통하여 인체의 다른 기관으로 이동하여 식중독 등의 질병을 일으킨다.

살모넬라균이 인체침투 및 질병유발을 위해 사용하는 T3SS를 이용하면, 암 및 질병세포 내부에 선택적으로 치료용 단백질을 직접적으로 주입하는 것이 가능하므로, 암 세포 치료 및 질병치료의 새로운 패러다임으로 많은 기대를 모으고 있다. 이를 위하여 특정 세포나 주변조건을 인식하여 목적 유전자를 발현시키는 artificial gene circuit을 만드는 연구도 활발히 이루어지고 있다(5, 6). 본 연구진은 T3SS를 이용한 외래단백질 분비 (secretion) 가능성을

### \*Corresponding author

Tel: +82-52-259-1293, Fax: +82-52-259-1689  
e-mail: shhong@mail.ulsan.ac.kr

살펴보기 위하여, 살모넬라균의 effector 단백질과 모델 단백질인 lipase와의 fusion protein을 제작하고 이를 균주의 부로 분비하는 연구를 수행하였다.

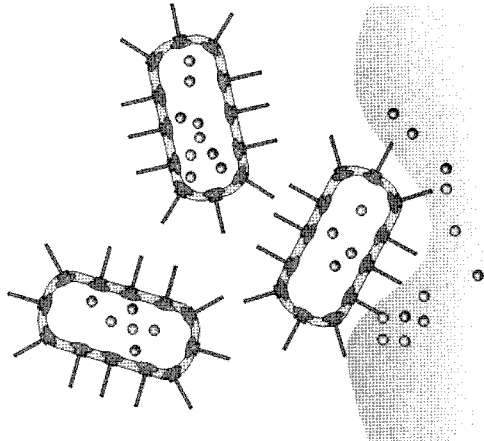


Fig. 1. Schematic diagram of the *Salmonella* invasion. If *Salmonella* recognize host cell, *Salmonella* assembles needle like Type III Secretion System apparatus and inject effector proteins (circle) into host.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지

클로닝 등의 일반적인 유전자 조작을 위한 균주로 *Escherichia coli* TOP10 균주가 사용되었으며, 유전자 발현 균주로는 *Salmonella typhimurium* SL1344 균주가 사용되었다. 배양을 위하여 Luria-Bertani 배지 (Bacto Tryptone 10 g/L, Bacto yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L)가 사용되었으며, ampicillin 100 mg/L를 추가하였다.

### 플라스미드 제작

PCR은 Expand high-fidelity PCR system (Roche Molecular

Biochemicals, Mannheim, Germany)을 이용하여 수행하였으며, 본 연구에서 사용한 PCR primer들은 Table 1에 정리되어 있다. SPI-1의 effector *sptP*, *slrP* 유전자의 PCR primer는 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2의 염기서열을 바탕으로 제작하였다. *sptP* 유전자의 프로모터와 5-말단 474 bp를 PCR 증폭하였고, *tliA*, *estA-P* 유전자도 PCR로 증폭하였다. *sptP* 유전자와 *tliA*, *estA-P* 유전자를 overlapping PCR을 수행하여 *sptP-tliA*, *sptP-estA-P* fusion 유전자들을 제작하였다(Fig. 2). *slrP* 유전자의 프로모터와 N-말단 573 bp를 PCR 증폭하여 *tliA* 유전자와 overlapping PCR을 수행하여 *slrP-tliA* fusion 유전자를 제작하였다(7). Fusion 유전자들은 pGEM-T 벡터에 클로닝 하여, *S. typhimurium* SL1344 균주에 도입하였다.

### Lipase 활성분석

*S. typhimurium* SL1344 균주를 37°C, 250 rpm에서 stationary phase에 이를 때 까지 배양한 후, 배양액을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 한다. Lipase 활성도 분석을 위한 기질로 *p*-nitrophenyl decanoate를 사용하였다. Acetonitrile-용액에 10 mM의 농도로 *p*-nitrophenyl decanoate를 용해시킨 후에, ethanol, 50 mM Tris-HCl 용액과 1 : 4 : 95 (10 mM *p*-nitrophenyl decanoate : ethanol : 50 mM Tris-HCl)의 비율로 혼합하여 기질용액을 제작하였다(8-11). 배양 상등액 0.5 mL와 기질용액 3 mL를 혼합한 후 37°C에서 10분간 반응 후, 0.5 M EDTA 용액 2 µL를 주입하여 반응을 종료하였다. 활성도는 생산물인 *p*-nitrophenol를 405 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

### 결과 및 고찰

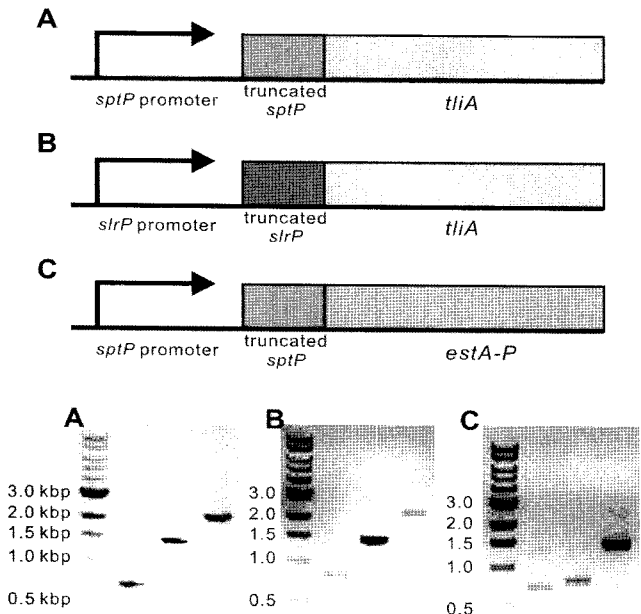
T3SS 분비시스템의 경우 일반적인 단백질 분비시스템과 달리 고유의 신호염기서열 (signal sequence)가 밝혀져 있지 않으며, T3SS의 정확한 분비기작에 대하여는 아직 보고되어 있지 않았다. 다만 몇몇 effector 단백질의 N-말단

Table 1. List and sequences of PCR primers

Primer	Primer sequence	Target gene
Primer 1	5'-GCTCTAGAAGTTCGTTGAAAGCGTGT-3'	<i>slrP</i> for <i>slrP-tliA</i>
Primer 2	5'-GTTCTTGTAGTCAAATACACCCATGGTAAGTCCTAATATTTTCAGAC-3'	<i>slrP</i> for <i>slrP-tliA</i>
Primer 3	5'-GCTCTAGACGATTCTATCTGGCGGCAG-3'	<i>sptP</i> for <i>sptP-estA-P</i>
Primer 4	5'-GTCTGCCACCAGATGTTATTCATTCTGCCACTTTTGTATCGCCGCCTTT-3'	<i>sptP</i> for <i>sptP-estA-P</i>
Primer 5	5'-GCTCTAGACGATTCTATCTGGCGGCAG-3'	<i>sptP</i> for <i>sptP-tliA</i>
Primer 6	5'-GTTCTTGTAGTCAAATACACCCATTTCTGCCACTTTTGTATCGCCGCCTTT-3'	<i>sptP</i> for <i>sptP-tliA</i>
Primer 7	5'-ATGGGTGTATTTGACTACAAGAAC-3'	<i>tliA</i>
Primer 8	5'-CGGGATCCTTATCAACTGATCAGCACACCC-3'	<i>tliA</i>
Primer 9	5'-ATGAATAACATCTGGTGGCAGAC-3'	<i>estA-P</i>
Primer 10	5'-CGGGATCCTTACACCCTCTGCTTCAACGCCACC-3'	<i>estA-P</i>

부분을 외래단백질의 N-말단부분에 fusion할 경우 해당 단백질이 분비됨이 보고되어져 있다(12). 본 연구진은 effector 단백질 중 SptP와 SlrP의 N-말단 각 158 아미노산 서열과 191 아미노산서열을 *Pseudomonas fluorescens* 유래 TliA lipase와 fusion하였다.

*sptP* 유전자의 5-말단 474 bp를 프로모터와 함께 *tliA* 유전자와 overlapping PCR을 수행하여 *sptP-tliA* fusion 유전자를 제작하였으며, *slrP* 유전자의 5-말단 573 bp를 프로모터와 함께 *tliA* 유전자와 overlapping PCR을 수행하여 *slrP-tliA* fusion 유전자를 제작하였다(Fig. 2). 제작한 *sptP-tliA* fusion 시스템은 *sptP* 유전자의 프로모터에 의하여 발현이 조절되며, 활성화되면 *SptP* 단백질의 N-말단 158 아미노산과 TliA 단백질이 fusion된 SptP-TliA fusion 단백질을 발현한다. 즉, *S. typhimurium* SL1344 균주의 SPI-1 네트워크가 외부의 조건을 인식 후 활성화하면 *sptP*, *slrP* 유전자의 프로모터가 작동하여 fusion 단백질이 생산된 후, T3SS를 통하여 외부로 분비되는 시스템이다.

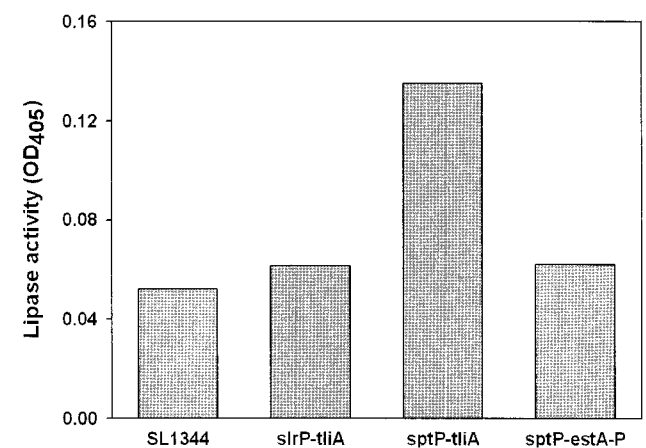


**Fig. 2.** Effector-lipase fusion gene system. Promoter and N-terminal region of effector proteins were fused with lipase genes by overlapping PCR. (A) Promoter and N-terminal region of *sptP* (705 bp) was fused with *tliA* (1,442 bp); (B) Promoter and N-terminal region of *slrP* (805 bp) was fused with *tliA* (1,442 bp); (C) Promoter and N-terminal region of *sptP* (705 bp) was fused with *estA-P* (1,458 bp).

살모넬라 균주의 SPI-1 네트워크는 다양한 외부의 조건을 인식하여 활성화되지만, 살모넬라 균주를 stationary phase에 이르도록 배양할 경우 SPI-1 네트워크가 발현됨이 보고되어졌다(13). 본 연구진은 재조합 *S. typhimurium* SL1344 균주를 stationary phase까지 배양하여 SPI-1 네트

워크를 활성화하는 전략을 취하였다. 재조합 fusion 단백질 시스템을 테스트하기 위하여, *S. typhimurium* SL1344, *S. typhimurium* SL1344 (*sptP-tliA*), *S. typhimurium* SL1344 (*slrP-tliA*) 균주를 stationary phase에 이르도록 배양한 후 lipase 활성도를 측정하였다.

SlrP-TliA fusion 단백질을 포함한 *S. typhimurium* SL1344 (*slrP-tliA*) 재조합균주는 일반 *S. typhimurium* SL1344 균주와 비슷한 수준의 lipase 활성도를 보여주었지만, *S. typhimurium* SL1344 (*sptP-tliA*) 균주는 약 2.6배 증가된 lipase 활성도를 보여주었다(Fig. 3). 본 결과로부터 SlrP, SptP 단백질 중 SptP 단백질과 TliA 단백질을 fusion 하였을 경우 더욱 효율적으로 분비됨을 확인 할 수 있었다.



**Fig. 3.** Lipase activity assay Lipase activities of *Salmonella typhimurium* SL1344, *S. typhimurium* SL1344 (*slrP-tliA*), *S. typhimurium* SL1344 (*sptP-tliA*) and *S. typhimurium* SL1344 (*sptP-estA-P*) strains were analyzed.

TliA 단백질의 분비에 효과적이었던 SptP 단백질의 N-말단부분이 다른 lipase의 분비에도 효율적인지 확인하기 위하여 SptP 단백질과 EstA-P lipase와의 fusion 단백질을 제작하였다. *S. typhimurium* SL1344 (*sptP-estA-P*)를 배양하여 lipase 분비 실험을 수행한 결과, *S. typhimurium* SL1344 균주와 비슷한 수준의 lipase 활성도를 얻을 수 있었다. 본 실험결과로부터 SptP 단백질의 N-말단 부분이 모든 단백질 혹은 lipase의 분비에 효율적이지 않고, TliA라는 특정 lipase에 높은 효율을 보임을 확인할 수 있었다.

본 연구를 통하여 기존의 protein secretion system과는 다른 분비 기작을 가지고 있는 T3SS를 통하여 효과적으로 단백질을 세포 외부로 분비시킬 수 있음을 확인하였다. T3SS를 활용하면 동물세포 내부로 직접 단백질을 직접 분비할 수 있으므로, 이를 활용한 신개념 약물전달시스템 및 치료제의 개발에 활용될 수 있으리라 예상된다. T3SS를 약물전달시스템으로 활용하기 위하여 후속적인 연구들이 수행되어야 한다. 우선 현재 분비된 SptP-TliA fusion protein이 실제로 균주외부로 분비된 것인지 확인하여보아야 할 것이며, lipase 활성을 나타내지 않은 SlrP-TliA, SptP-EstA-P

fusion protein들의 활성도 확인하여 보아야 한다. 또한 일반적인 신호염기서열과 달리 T3SS effector 단백질의 N-말단 부분은 분비과정에서 제거되는 기작이 없으므로, fusion한 N-말단 부분과 목적 단백질과의 구조적 융합성이 중요할 것이다. 즉, effector의 N-말단과 목적 단백질이 서로의 3차원 단백질 구조를 간섭하지 않으며, 목적 단백질의 활성도를 저하시키지 않아야 한다. 이를 위하여 본 연구에서 실험한 SlrP, SptP 이외에 다양한 effector 단백질을 테스트하여 보아야 할 것이다.

## 요 약

단백질을 동물세포내부로 직접 주입할 수 있는 살모넬라 균주의 T3SS를 활용하여 모델 단백질인 lipase를 세포외부로 분비하는 시스템을 제작하였다. T3SS의 effector 단백질인 SlrP, SptP의 N-말단부분과 lipase를 fusion하였다. Lipase 분비실험의 결과 *S. typhimurium* SL1344 (*sptP-tliA*) 균주의 경우 lipase 활성도가 약 2.6배 증가하는 결과를 얻을 수 있었다. 본 실험결과를 바탕으로 T3SS에 관한 연구가 더욱 활발히 이루어진다면, T3SS를 신개념 약물전달시스템으로 활용이 가능해 지리라 예상된다.

## 감 사

이 논문은 2008년도 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (KRF-2008-313-D00304).

접수 : 2009년 7월 7일, 게재승인 : 2009년 8월 7일

## REFERENCES

- Blocker, A. J., J. E. Deane, A. K. J. Veenendaal, P. Roversi, J. L. Hodgkinson, S. Johnson, and S. M. Lea (2008), What's the point of the type III secretion system needle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 6507-6513.
- Hueck, C. J. (1998), Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *MMBR* **62**, 79-433.
- Cornelis, G. R. (2000), Type III secretion: a bacterial device for close contact with cells of their eukaryotic host. *Phil. Trans. R. Soc. Lon.* **355**, 681-693.
- Steele-Mortimer, O., J. H. Brumell, L. A. Knodler, S. Mresse, A. Lopez, and B. B. Finlay (2002), The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* is necessary for intracellular proliferation and vacuole biogenesis in epithelial cells. *Cellular Microbiology* **4**, 43-54.
- Anderson, J. C., C. A. Voigt, and A. P. Arkin (2007) A genetic AND gate based on translation control. *Molecular Systems Biology* **3**, 133.
- Anderson, J. C., E. J. Clarke, A. P. Arkin, and C. A. Voigt (2006) Environmentally controlled invasion of cancer cells by engineered bacteria. *J. Mol. Biol.* **355**, 619-627.
- Joseph, S. and D. W. Russell (2001), Molecular cloning : a laboratory manual, 3rd ed., Cold spring harbor laboratory press, Cold spring harbor, N.Y.
- Lee, S. H., S. Y. Lee, and B. C. Park (2005), Cell surface display of lipase in *Pseudomonas putida* KT2442 using OprF as an anchoring motif and its biocatalytic applications. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(12), 8581-8586.
- Lee, S. H., J. I. Choi, H. M. Jung, J. H. Choi, and S. Y. Lee (2005), Display of lipase on the cell surface of *Escherichia coli* using OprF as an anchor and its application to enantioselective resolution in organic solvent. *Biotechnol. Bioeng.* **90**, 223-230.
- Lee, S. H., J. H. Choi, S. H. Park, J. I. Choi, and S. Y. Lee (2004), Enantioselective resolution of racemic compounds by cell surface displayed lipase. *Enzyme. Microb. Technol.* **35**, 429-436.
- Lee, S. H., J. I. Choi, S. J. Park, S. Y. Lee, and B. C. Park (2004), Display of bacterial lipase on the *Escherichia coli* cell surface by using FadL as an anchoring motif and use of the enzyme in enantioselective biocatalysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(9), 5074-5080.
- Brown1, N. F., J. Szeto, X. Jiang, B. K. Coombes, B. B. Finlay, and J. H. Brumell (2006), Mutational analysis of *Salmonella* translocated effector members SifA and SopD2 reveals domains implicated in translocation, subcellular localization and function. *Microbiology* **152**, 2323-2343.
- Temme, K., H. Salis, D. Tullman-Ercek, A. Levskaya, S. H. Hong, and C. A. Voigt (2008), Induction and relaxation dynamics of the regulatory network controlling the Type III secretion system encoded within *Salmonella Pathogenicity Island 1*. *J. Mol. Biol.* **377**, 47-61.