

결핵균 H37Rv에 감염된 마우스의 폐에서 면역 반응에 대항하는 Mtb 유전자의 발현 변화

이효지 · 조정현 · 강수진 · 정유진*

강원대학교 생명과학과 및 의료·바이오 신소재 융복합 연구사업단

Change of Gene Expression Pattern of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Against Host Immune Response in Infected Mouse Lung

Hyo-Ji Lee, Jung-Hyun Cho, Su-Jin Kang, and Yu-Jin Jung*

Department of Biological Science and Medical & Bio-Materials Research Center, Kangwon National University,
Chuncheon 200-701, Republic of Korea

(Received January 29, 2010/Accepted April 22, 2010)

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) is one of the most successful pathogens to infect one third of world population. Th1-mediated immunity against Mtb infection is known as critical to express mycobacteriostatic function but it is not sufficient to resolve the infection. In this study, to verify the possibility Mtb itself change the gene expression to survive against host immune response, expression pattern of selected H37Rv genes, 16S rRNA, *acr*, *fbpA*, *aceA*, and *ahpC*, during the course of infection was measured with absolute quantitation method using real-time RT-PCR. The total number of transcripts of 16S rRNA increased during the course of infection, which was coincide with the increasing CFU. The total number of *fbpA* transcripts per CFU, which encode typical secreted Mtb antigen, Ag85A, increased for 10 days of infection before decreasing. The number of transcripts of *acr* per CFU, which encode heat shock protein, α -crystallin, increased during the infection, and *ahpC* and *aceA*, they both are enzymes produced in oxidative stressful condition, increased for 20 days and then slightly decreased on day 30. These findings are one of survival strategy of pathogen evading host immune response lead to persistent infection inside host cells.

Keywords: absolute quantification, H37Rv, gene expression, *M. tuberculosis*, real-time PCR

결핵(tuberculosis)은 선사시대부터 인류를 위협하는 질병이
었으며 전 세계 인구의 1/3 이상이 결핵균에 감염된 것으로 보
고되어 있다(21). 현재까지 매년 200만명 이상의 사람들을 사
망하게 하는 무서운 질병이다. 결핵의 예방백신으로 BCG가
사용되고 있으나 성인 결핵 환자의 85% 이상을 차지하는 폐결
핵을 예방하는 효과는 높지 않다는 것이 최근의 연구 결과이다
(2, 6). 결핵균에 감염된 일부의 사람에게서 결핵이 발병하지만
대다수의 사람들은 감염 후 자연 치유 되거나 전 생애 동안 결
핵 발병없이 잠복 감염의 상태로 지낸다. 그러나 HIV (Human
Immunodeficiency virus)에 감염되거나 면역억제제를 장기 투
여하는 경우 잠복 상태에 있는 결핵균이 활발하게 증식하여 활
동성 결핵으로 진행되는 것을 볼 수 있다(5).

결핵균은 항산성균으로 주로 포유류의 큰포식세포를 감염시

켜 그 안에서 증식하며 매우 천천히 분열하는 세균으로 대략의
doubling time은 24시간 또는 그 이상이다(20). 폐결핵의 경우
주로 호흡기를 통해 활동성 결핵 환자로부터 배출된 비말을 통
해 감염되어, 호흡기의 큰포식세포가 최초로 결핵균을 포식하
여 선천성 면역 반응을 유발하게 된다. 큰포식세포에 의해 포
식된 결핵균은 항원 처리를 통해 분해되고, 큰포식세포는
MHC class II 분자에 결핵균의 펩티드를 결합시켜 CD4 T 세
포에 제시하게 되어 본격적인 세포 면역 반응이 나타나게 된
다. 숙주의 면역 반응에도 죽지 않는 결핵균은 폐의 큰포식세
포에서 증식하게 되고 지속적으로 결핵균 특이 항원이 생산되
므로 결핵에 감염된 큰포식세포 주위로 CD4 T 세포 뿐 아니
라, CD8 T 세포, 자연살 세포(natural killer cell) 등이 모여들
어 육아종(granuloma)을 형성하게 된다(13).

활성화된 CD4 T 세포는 IFN- γ 와 같은 사이토카인을 생산
하여 감염된 큰포식세포를 활성화 시키고, 활성화된 큰포식세
포는 결핵균을 처치하기 위하여 Nitric Oxide (NO)나 Reactive

* For correspondence. E-mail: yujung@kangwon.ac.kr; Tel: +82-33-250-8533; Fax: +82-33-251-3990

Oxygen Species (ROS) 같은 radical을 생성한다. 따라서 면역 반응이 개시되면 큰포식세포의 산성 소포(acidic vesicle)에 들어가 있는 결핵균의 성장에 매우 불리한 조건이 형성된다(10). 그러나 이러한 숙주의 면역반응에도 불구하고 감염된 결핵균은 사멸하지 않고 살아남게 된다. 결핵에 대한 면역학적 연구는 주로 마우스, 랫, 기니피그, 토끼 등과 같은 소동물을 감염시켜 연구되어 왔는데, 이상의 연구를 통해 결핵에 대한 Th1 면역 반응은 감염 후 3주 후, 대략 20여 일 후에 활성화 된다는 것이 정설이다(13).

따라서 본 연구에서는 숙주의 세포 면역 반응이 개시되기 전인 감염 후 1일과 10일, 숙주에서 Th1 매개 면역 반응이 활성화 되는 20일과 Th1 면역 반응이 최고조에 달하는 30일에 감염된 마우스의 폐에서 큰포식세포 내에 생존하고 있는 결핵균의 유전자 발현 양상을 연구하고자 하였다(10). 대표적인 Mtb 항원인 Ag85A 유전자인 *fbpA*, heat shock protein인 *acr*, 산화적 스트레스에 대항하는 *ahpC*, 그리고 주로 지속적인 감염 상태에서 작동하며 항생제 내성에도 관여한다고 알려진 *aceA*를 대상으로 그 발현 변화를 absolute quantification 방법으로 측정 후 발현 유전자의 copy number를 colong forming unit (CFU)로 나눈 값으로 해석하였다. 본 연구를 통하여 감염 초기와 감염이 진행됨에 따라 변화되는 Mtb 유전자 발현 패턴이 숙주의 면역 반응에 대항하여 살아남은 결핵균의 생존 전략 중 하나라고 생각되며 이를 통해 병원체가 적대적인 숙주의 면역 반응을 회피하는 기작을 유도한다는 사실을 확인할 수 있었다.

재료 및 방법

결핵균주 및 실험동물

병원성 결핵균주인 H37Rv (TMC.# 102)에 감염된 mouse lung은 Trudeau institute (Saranac Lake, NY, USA)의 Dr. Robert North에게 제공받았다. 박테리아 균주 및 감염 방법은 기존의 발표된 논문에 따랐다(9). 간략히 설명하면 0.01% Tween 80을 함유하고 있는 Proskauer & Beck 액체 배지에서 활발히 증식하고 있는 Mtb를 분주하여 급속 냉동하여, 감염 시에 5초간 초음파로 뭉친 균주를 분쇄한 후 0.01% Tween 80

을 포함한 PBS에 10⁶ CFU/ml 농도로 희석하여 10 ml을 호흡기 감염 기기(Tri Instruments, USA)에서 실험 동물에 30분간 분사하여 감염시켰다. 감염 후 1일, 10일, 20일, 30일에 폐를 적출하여 오른쪽은 CFU 측정을 위해 사용되었고 왼쪽 폐는 액체질소에 급냉동하여 실험 전까지 -70°C에 보관하였다. 감염 후 날짜 별로 4마리의 마우스 폐를 이용하였고, 각 폐의 오른쪽 1/2은 CFU 측정을 위해 사용되었다. CFU 측정 방법은 발표된 논문의 실험 방법을 따랐다(9). 통계 처리는 GraphPad Prism version 3 for Windows (GraphPad Software, USA) 프로그램을 이용하여 Student's t test를 구했다.

Mtb RNA 추출

감염된 mouse lung을 homogenizer로 분쇄하여 Trizol로 숙주와 감염된 Mtb RNA를 모두 추출하였다. 한 차례 RNA를 추출한 후 남아 있는 pellet에서 freezing-thawing 방법을 이용하여 Mtb RNA를 RNA Mini Column kit (QIAGEN, USA)로 추출하였다(14, 15). 감염된 박테리아가 들어있다고 생각되는 Trizol pellet을 sonicator를 이용하여 400 W에서 30-40초간 파쇄한 후 액체 질소에 급속도로 냉동한 후 37°C에서 녹이고 다시 급속 냉동한 후 녹이는 과정을 4번 되풀이하여 Mtb 세포 벽을 파쇄한 후 column을 통해 RNA를 추출한 후 실험에 사용하였다. 16S rRNA 증폭을 통한 실험 결과 90% 이상의 Mtb RNA는 Trizol 추출 후 남아있는 pellet에 존재함을 확인하였다.

cDNA 합성 및 real-time RT-PCR

추출한 RNA에 RNase-free DNase (Ambion, USA)를 37°C에서 1시간 처리하여 genomic DNA를 제거한 후 gene-specific primer와 *C. therm.* Polymerase (Roche, Germany)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 연구에 사용된 primer와 probe는 Primer Express Software (PE Biosystems, USA)를 이용하여 디자인하였고, Integrated DNA Technologies (USA)에서 합성하였다 (Table 1). Probe는 말단에 6-carboxy-fluoresceine과 quencher로 Black Hole Quencher 1을 포함하도록 제작하였다. 합성된 cDNA는 ABI-prism 7700으로 증폭하였다.

합성된 cDNA 10 µl에 2.5 µl와 10× Taqman Buffer A,

Table 1. PCR primers and probe sequence for detection of Mtb gene expression

	Forward primer	Reverse primer	Probe	Amplicon size (bp)
16S rRNA	TTTCCTTCCTTGGGATCCGT	GGTAAGGTTCTTCGCGTTGC	AGTACGGCCGCAAGGCTAA AACTCAAAG	129
<i>fbpA</i>	GATGAGGGAAGCAAGAATG	CACGAGTCGACGCGACATAC CA	CTTGTTGACAGGGTTCGTG GCGC	141
<i>acr</i>	ATTATGGTCCGCGATGGTCA	GTGCGAACGAAGGAACCGTA	CGAGCGCACCGAGCAGAAG GAC	175
<i>ahpC</i>	TGCTAACCATTGGCGATCAA	TGCCTGGGTGTTGTCCTACT	TCCAAGGTCGACGCCAAGC AGC	103
<i>aceA</i>	ACTGCTCGCCATCGTTCAAC	CGAGTAGTTCAGCGCATGGA	AAGGAGCTGGCAGCCATGG GCT	117

3 mM MgCl₂, 각 200 μM의 dATP, dCTP, dGTP와 400 μM dUTP, 0.625 U AmpliTaq Gold, 0.25 U AmpErase Uracil N-glycosylase (Perkin Elmer/Applied Biosystems, USA)를 첨가하여 최종 25 μl로 반응을 수행하였다. 각 반응에는 0.3 μM primer와 0.2 μM의 probe가 사용되었다. 모든 반응액이 들은 tube를 50°C에서 2분, 94°C에서 10분씩 처리한 후 40 cycle을 수행하였다(94°C 15초, 60°C 1분). 모든 샘플은 triplicate 하였고, 세 번의 반복 실험을 통해 결과를 얻었다. 최종적인 copy number 계산은 아래 식에 의하여 계산되었다. $N=(Ct-b)/m$, N 은 copy number, Ct 는 threshold cycle, b 는 standard curve에 의해 작성된 y-intercept이다(9, 14, 15).

결과

Mtb 유전자 발현을 분석하기 위한 표준 곡선 작성

Absolute quantification 방법으로 Mtb 유전자의 발현을 정확하게 측정하기 위해 각 유전자의 T7 transcript를 제조하였다(3). *In vitro* transcription을 수행하기 전에 PCR product의 sequence를 확인하였고 이를 정제하여 반응에 사용하였다. 결핵균 발현 유전자 중 16S rRNA, *fbpA*, *acr*, *ahpC*, *aceA*의 T7 transcript를 농도별로 10배씩 희석하여 Taqman real-time PCR로 증폭한 후 template로 넣어준 T7 transcript copy number와 real-time PCR을 통해 얻어진 threshold cycle (ct) 값을 이용하여 standard curve를 작성하였다(Fig. 1). PCR template가 10배씩 희석됨에 따라 대부분의 모든 standard curve의 기울기는 대략 3-3.2 사이였고, y 절편 값은 40 근처로 계산되었다.

16S rRNA와 CFU의 상관관계

결핵균의 성장은 보통 7H11 agar 고체 배지 위에 감염된 샘플을 접종 한 후 37°C에서 3주간 배양하여 생성된 colony 개수를 측정하여 나타낸다(22). H37Rv를 마우스에 호흡기를 통

해 감염 후 폐에서의 성장을 CFU를 통해 측정하였다. 호흡기를 통해 감염 후 H37Rv는 20일간 급속하게 성장하나 숙주에서 Th1 매개 면역 반응이 유도되면 성장 속도가 둔화되고 그 후로는 6.5 정도에서 100일 이상 지속적인 감염을 유지한다(10, 13, 14). 본 연구에서도 앞선 연구와 비슷한 Mtb CFU를 확인 할 수 있었다(Fig. 2A). 또한 16S rRNA의 발현이 Mtb가 성장함에 따라 급격하게 20일까지 10⁵에서 10¹⁰ 이상 증가하고 30일에는 박테리아 성장이 멈춤에 따라 발현 정도가 20일과 비슷하게 유지되는 것이 확인되었다(Fig. 2B). 16S rRNA 발현 정도와 CFU와의 상관관계가 유의성 있게 나타남에 따라 16S rRNA 발현 정도가 CFU를 대신하여 Mtb growth를 측정할 수 있는 지표로 사용 될 수 있음을 시사하고 있다(Fig. 2C).

감염 후 숙주의 면역 반응에 대항하는 Mtb 유전자 발현 양상의 변화

Figure 3에서 1마리의 마우스 폐에 있는 Mtb 유전자들의 전체 mRNA copy number를 계산하여 전체 결핵균수를 의미하는 CFU로 나누어 그래프로 나타내었다. 이는 결핵균 유전자의 발현이 1 CFU 단위에서 숙주의 면역 반응에 따라 어떻게 변화되는 지를 알 수 있게 해준다. 앞선 연구를 통해 Mtb 유전자 중 대표적인 항원인 ESAT6와 Ag85B를 코딩하는 유전자의 발현을 조사했다(14). 이들 대표적인 Mtb 항원 유전자들은 세포 면역 반응이 개시되면 그 발현이 급속도로 떨어지는 것이 확인되었다. 이번 연구에서도 대표적인 항원인 Ag85A를 코딩하는 *fbpA*의 경우 감염 후 1일부터 10일 사이 최대치로 올라 갔다가 숙주의 Th1 세포 면역 반응이 개시되는 시기인 감염 후 20일 경부터 감소하기 시작하여 숙주의 면역 반응이 최고조에 이르는 감염 후 30일에는 감염 초기의 수준으로 떨어진다는 것이 밝혀졌다(Fig. 3A). 이는 결핵균이 왕성하게 성장할 때는 분비 항원인 Ag85A와 B와 같은 유전자의 발현 수준이 높아지지만 성장이 저해되면 이들이 발현을 급격하게 낮춰

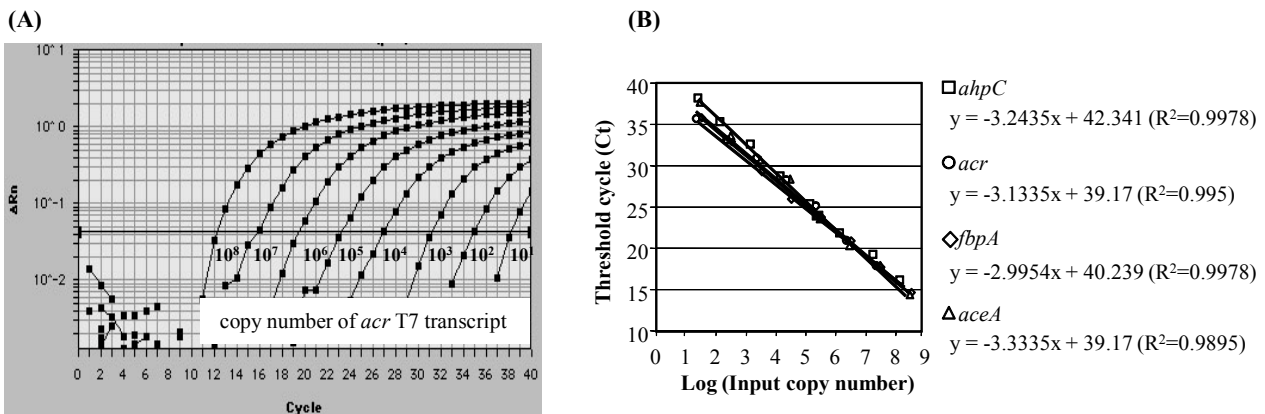


Fig. 1. Amplification plots of real-time detection of the genes by Taqman reaction with a serially diluted T7 RNA transcripts. (A) Starting RNA copy numbers from 1×10^8 to 1×10^1 . Cycle number reported on x-axis and plotted vs the logarithm of Change in normalized reporter signal (ΔRn). ΔRn is the intensity of reporter dye emission of each sample minus the fluorescence intensity of control tubes without templates. For each sample, the algorithm calculated the PCR cycle (Ct value) at which an increase in reporter fluorescence above the baseline signal can first be detected. (B) Calibration curves for *ahpC*, *acr*, *fbpA*, and *aceA* were generated by plotting the value of Ct (on the y-axis) vs the log copy number of standard T7 transcripts (from 10⁸ copies to 10 copies; x-axis).

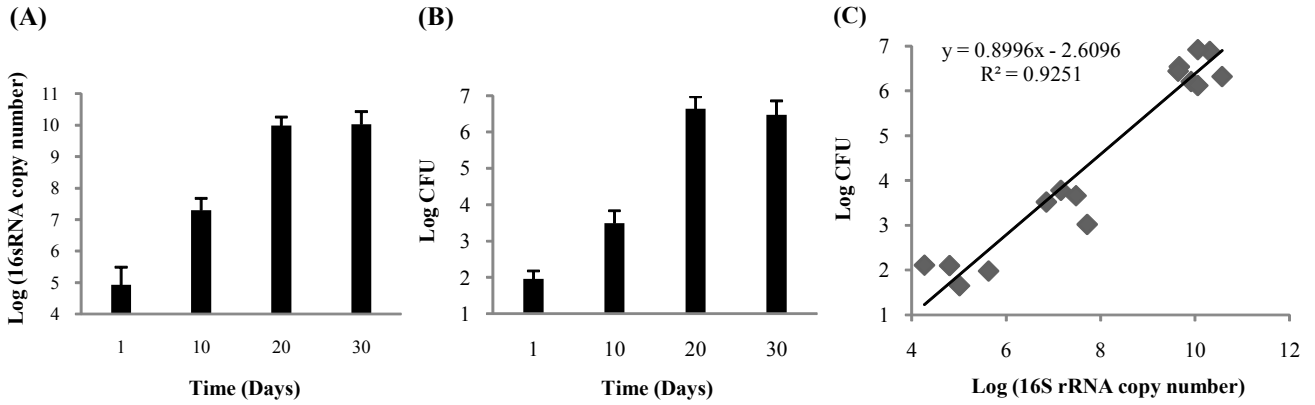


Fig. 2. Correlation of CFU with the copy number of 16S rRNA from Mtb growing in the lungs of C57BL/6 mice. Lungs were harvested from Mtb-infected mice at selected times during infection. (A) Half the lung (attached to the right bronchus) was used to quantitate the number of copies of 16S rRNA by Taqman real-time RT-PCR, and the other half (attached to the left bronchus) was used to determine the number of CFU. The data points shown in the figure represent Mean(±SD) of data (expressed in log units) per lung obtained from four animals per time point per mouse strain. (B) Correlation curve for CFU and 16S rRNA copies (in log units) obtained with four lungs from mice pooled together. Correlation coefficient was calculated. ($R^2=0.9251$)

주의 면역 기작을 회피하는 한 방법으로 생각된다. 반면에 Mtb에 저산소상태에서 발현한다고 알려진 heat shock protein인 α -Crystallin을 coding하는 유전자인 *acr*의 발현이 급격하게 증

가하는 것이 확인 되었다(1, 17)(Fig. 3B). 또한 산화적 스트레스에 대하여 alkyl hydroperoxide reductase C를 생성하는 *ahpC*의 발현도 감염이 진행됨에 따라 증가하였으나 감염 후

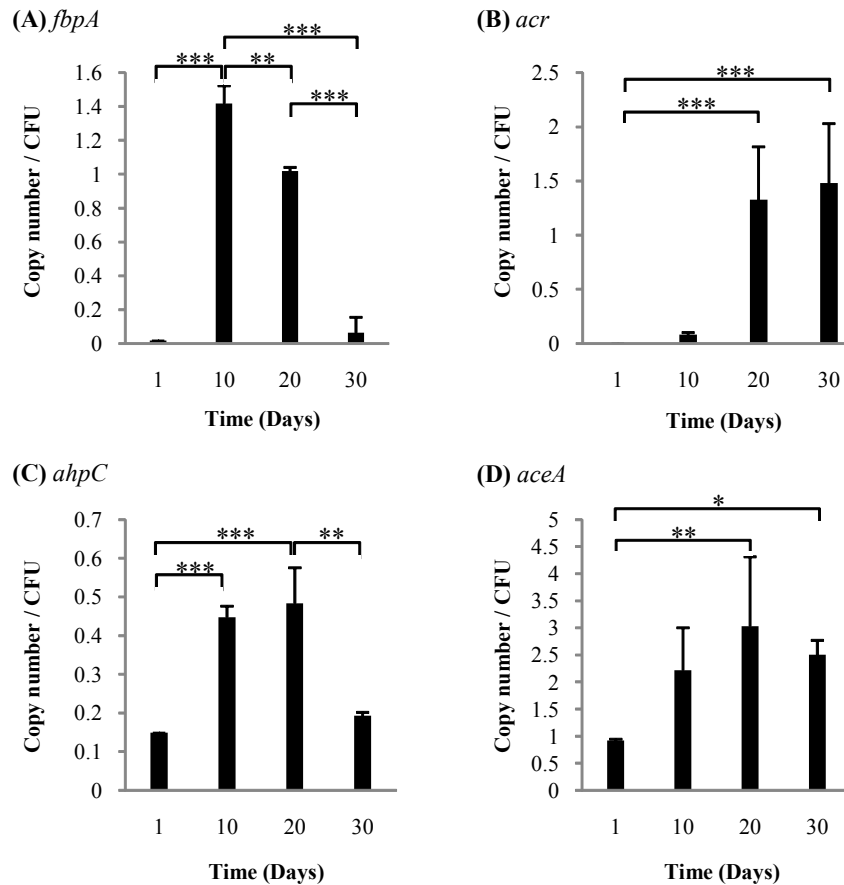


Fig. 3. Changes against time of infection in the mRNA copy number per CFU for (A) *fbpA*, (B) *acr*, (C) *ahpC*, and (D) *aceA*, as quantified by real-time RT-PCR. Means±SD for Mtb RNA from lungs of four mice per time-point. Triplicate experiments yielded similar results. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

30일에는 초기 수준으로 감소하였다(7, 11, 16)(Fig. 3C). 탄수화물을 분해하는 해당과정으로 에너지를 생성하기 어려울 때 glyoxylate shunt에 관여하는 isocitrate lyase를 생산하는 *aceA*의 발현도 역시 증가되어 일정 수준이상 지속됨이 확인되었다(12, 18)(Fig. 3D).

이상의 결과는 결핵균이 감염 후 10일 에서 20일 사이 급격하게 성장할 때는 분비 항원을 생산하는 *fbpA*의 발현이 높아지다가, 감염 후 20일에서 30일 사이 세포 매개 면역 반응이 활성화 되면 항원으로 작동하는 유전자는 급격히 감소하고 숙주의 면역 반응으로부터 생성되는 NO나 ROS와 같은 강력한 산화제의 작용으로부터 자신을 보호하기 위하여 heat shock protein, 산화적 스트레스에 대항하는 효소들을 만들어내어 숙주의 면역 반응에도 불구하고 생존하여 장기 감염 상태를 지속시킨다는 기존의 연구(1, 17, 19, 20)와 일치하는 결과이다.

고찰

결핵은 생명과학의 비약적인 발전에도 불구하고 퇴치하기 어려운 전염병으로 인식되고 있다. 특히 최근 AIDS 환자에게서 결핵의 발병율이 매우 높아지면서 전체 결핵 환자 중 20% 이상은 결핵과 HIV에 중복 감염된 사람들이다(21). 강력한 항생제가 많이 개발되었음에도 불구하고 결핵 약제에 대한 내성을 나타내는 multi-drug resistant 균주들에 의한 감염으로 결핵 환자의 수와 결핵으로 인한 사망자수가 쉽게 줄어들지 않고 있다(2). 결핵에 대한 예방백신으로는 소의 결핵균을 약독화시킨 BCG가 있으나 이는 영유아에게서 나타나는 중추신경계의 결핵균 감염에는 효과적이나 성인에게 주로 나타나는 폐결핵을 예방하는 효과는 크지 않다는 것이 최근의 조사 결과이다(6). 효과적인 결핵 백신을 개발하기 위한 연구가 지속적으로 이루어졌으나 아직 BCG 보다 우수한 항결핵 백신은 개발되지 못했다. 따라서 결핵에 대한 면역학적 연구는 이러한 결핵 예방백신 개발에 중요한 기초 자료가 될 수 있다.

결핵에 대한 면역반응은 대표적인 세포 매개성 면역 반응으로 특히 Th1 반응으로 일컬어지는 CD4 T 세포와 감염된 큰포식세포 사이의 중요한 상호작용이다. 호흡기로 침입한 Mtb는 큰포식세포에 포식되어 항원 처리 과정을 거쳐 CD4 T 세포에 항원을 제시하게 된다(13). 이때부터 획득 면역 단계에 접어든다고 간주하며, 마우스뿐 아니라 랫, 토끼 등의 설치류를 사용한 연구를 통하여 이 과정이 대략 감염 후 2-3주 걸리는 것으로 확인되었다(13). Mtb에 대한 Th1 면역 반응은 감염 후 4주, 즉 30일 경에 최고조에 도달하며 이때 가장 많은 Mtb에 특이적인 CD4 T 세포가 IFN- γ 등과 같은 사이토카인을 분비한다(10). CD4 T 세포 중 주로 IFN- γ 를 분비하는 세포를 Th1 세포라 하며, 이 세포는 감염된 큰포식세포를 활성화 시킨다고 알려져 있다. 큰포식세포는 Mtb 감염에 의해서도 활성화되지만 Th1 세포에 의해 IFN- γ 가 분비되면 세포 내 기생 박테리아를 살상하는 NO나 ROS의 분비를 더욱 촉진시켜 세포매개 면역 반응을 활성화시켜 세포 내 기생 박테리아를 사멸시킨다(19). 그러나 결핵균 감염에 감수성이 있는 숙주의 경우 Mtb에

대한 지속적인 면역 반응에도 불구하고 결핵균이 사멸되지 않고, 오히려 지속적인 면역 반응으로 인한 육아종(granuloma)을 폐에 형성함으로써 호흡계에 기능적인 상실을 초래하게 된다(12). 이러한 사실로부터 우리는 결핵균이 숙주의 면역 공격을 피할 수 있는 능력이 있을 것이라는 사실을 유추하게 되었고 이를 결핵균 감염에 대한 숙주의 면역 반응 기작이 잘 정립되어 있는 마우스 모델에서 H37Rv를 감염시켜 결핵균의 유전자 발현을 통해 살펴보고자 하였다.

앞 선 연구에서 몇 가지 유전자의 발현 양상을 *in vivo* 마우스 모델에서 확인하였으나 세포 면역 반응이 활발하게 나타나는 시점에서 Mtb가 산화적 스트레스에 어떻게 대항하는지, 지속적인 Mtb 항원을 인지하여 감염된 큰포식세포 근처로 면역 세포들이 모여 형성되는 육아종(granuloma) 하의 저산소 상태에 대항하여 유전자의 발현이 변화하는지에 관한 연구는 여러 편 있으나(14, 15), 정량적 실험을 통해 이러한 사실을 규명한 연구는 드물다. 따라서 본 연구에서는 대표적인 분비 항원인 Ag85A 유전자와 heat shock protein인 *acr*, 산화적 스트레스에 대항하는 *ahpC*, 그리고 주로 지속적인 감염 상태에서 작동하며 항생제 내성에도 관여한다고 알려진 *aceA*를 대상으로 그 발현 변화를 absolute quantification 방법으로 측정하였다. 면역 세포의 공격을 회피하기 위한 한 기작으로 자신의 항원으로 제시되는 단백질의 발현을 매우 낮추는 현상은 기존의 연구에서도 확인되었으나(14, 15, 18), 활성화된 큰포식세포의 결핵균 제어 메커니즘을 통한 산화적 스트레스 상황에서 결핵균이 발현하는 다양한 유전자들이 발현이 증가된다는 것을 정량적인 측정을 통해 CFU 당 mRNA copy number로 해석한 결과는 본 연구 결과가 최초이다. 또한 유전자들이 mRNA copy number가 CFU값에 비해 매우 작은 것은 기존에 알려진 non-replicating persistence의 결과로 해석될 수 있다(19, 20). 이는 오랜 기간 인간과 함께 살아오며 아직도 도태되지 않고 강력한 감염력으로 인류를 위협하고 있는 Mtb의 생존 전략으로 여겨진다.

그러므로 숙주의 면역 반응을 활성화하여 결핵균을 퇴치하고자 하는 항결핵 예방 백신이나 치료제의 개발을 위하여서는 숙주의 면역 반응 측면만을 강조할 것이 아니라 면역 반응에 대항하여 생존 전략을 구사하는 Mtb에 대하여도 충분한 고려를 해야 할 것으로 생각된다.

적요

전 세계 인구의 1/3을 감염시키고 있는 결핵균은 21세기에도 인류를 위협하는 병원균이다. 결핵균에 대항하는 Th1 면역 반응은 결핵균의 세포 내 성장을 제어하는 것으로 알려져 있으나, 이는 결핵균 감염을 자연 치유하는 수준에는 미치지 못한다. 본 연구에서는 C57BL/6 마우스에 병원성 결핵균인 H37Rv를 감염시켰을 때 숙주의 면역 반응에 대항하여 결핵균이 자신의 유전자 발현을 변화시킨다는 사실을 규명하기 위하여, 결핵균 유전자 중 16S rRNA, *acr*, *fbpA*, *aceA*, *ahpC* 등의 발현을 real-time RT-PCR을 이용하여 연구하였다. 16S rRNA의 copy number는 감염 후 30일까지 급격하게 증가하였는데 이는 CFU

측정 결과와 일치하고 있다. 결핵균 유전자 중 주된 항원으로 작용하는 유전자인 *fbpA*의 copy number를 CFU로 나눈 값으로 표현한 발현 양상은 감염 후 10일까지 증가하다가 감소되었다. Heat shock protein인 α -crystallin을 coding하는 *acr*은 감염 후 지속적으로 높아졌으나, 산화적 스트레스 환경에서 발현되는 효소들인 *ahpC*와 *aceA*의 발현은 감염 후 20일 동안 높아졌다가 30일에는 약간 감소하였으나 비교적 높은 수준을 유지하였다. 이상의 결과는 결핵균이 숙주의 면역 반응이 개시되면 결핵균의 주된 항원 중 하나인 Ag85A를 코딩하는 유전자인 *fbpA*의 발현 수준을 낮춰 숙주의 Th1 면역 반응이 낮아지도록 유도한다는 증거로 볼 수 있으며, 면역 반응이 활발해짐에 따라 큰포식세포 내에서 산화적 스트레스로부터 균을 보호하기 위하여 *ahpC*와 *aceA*의 발현이 높아진 것으로 해석된다. 따라서 본 연구는 결핵균이 유전자 발현을 숙주의 면역 반응에 대항하여 스스로 변화시켜 적대적인 숙주 세포 내에서 살아 남을 수 있는 생존 전략을 구사한다는 가능성을 제시한다.

감사의 말

이 논문은 2009년 교육과학기술부의 기초연구사업(2009-0071963)과 지역거점연구단육성사업(의료·바이오신소재융복합 연구사업단)으로부터 지원받아 수행된 연구임.

참고문헌

- Beisiegel, M., H.J. Mollenkopf, K. Hahnke, M. Koch, I. Dietrich, S.T. Reece, and S.H. Kaufmann. 2009. Combination of host susceptibility and *Mycobacterium tuberculosis* virulence define gene expression profile in the host. *Eur. J. Immunol.* 39, 3369-3384.
- Britton, W.J. and U. Palendira. 2003. Improving vaccines against tuberculosis. *Immunol. Cell. Biol.* 8, 34-45.
- Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169-193.
- Copenhaver, R.H., E. Sepulveda, L.Y. Armitige, J.K. Actor, A. Wanger, S.J. Norris, R.L. Hunter, and C. Jagannath. 2004. A mutant of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv that lacks expression of antigen 85A is attenuated in mice but retains vaccinogenic potential. *Infect. Immun.* 72, 7084-7095.
- Corbett, E.L., C.J. Watt, N. Walker, D. Maher, B.G. Williams, M.C. Raviglione, and C. Dye. 2003. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch. Intern. Med.* 163, 1009-1021.
- Delogu, G. and G. Fadda. 2009. The quest for a new vaccine against tuberculosis. *J. Infect. Dev. Ctries* 3, 5-15.
- Fontán, P., V. Aris, S. Ghanny, P. Soteropoulos, and I. Smith. 2008. Global transcriptional profile of *Mycobacterium tuberculosis* during THP-1 human macrophage infection. *Infect. Immun.* 76, 717-725.
- Huygen, K. 2003. On the use of DNA vaccines for the prophylaxis of mycobacterial diseases. *Infect. Immun.* 71, 1613-1621.
- Jung, Y.J., R. LaCourse, L. Ryan, and R.J. North. 2002. Evidence inconsistent with a negative influence of T helper 2 cells on protection afforded by a dominant T helper 1 response against *Mycobacterium tuberculosis* lung infection in mice. *Infect. Immun.* 70, 6436-6443.
- Jung, Y.J., L. Ryan, R. LaCourse, and R.J. North. 2005. Properties and protective value of the secondary versus primary T helper type 1 response to airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J. Exp. Med.* 201, 1915-1924.
- Kim, S.Y., B.S. Lee, S.J. Shin, H.J. Kim, and J.K. Park. 2008. Differentially expressed genes in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv under mild acidic and hypoxic conditions. *J. Med. Microbiol.* 57, 1473-1480.
- Munoz-Elias, E.J., J. Timm, T. Botha, W.T. Chan, J.E. Gomez, and J.D. McKinney. 2005. Replication dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in chronically infected mice. *Infect. Immun.* 73, 546-551.
- North, R.J. and Y.J. Jung. 2004. Immunity to tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 599-623.
- Rogerson, B.J., Y.J. Jung, R. LaCourse, L. Ryan, N. Enright, and R.J. North. 2006. Expression levels of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) antigen-encoding genes versus production levels of antigen-specific T cells during stationary level lung infection in mice. *Immunology* 118, 194-201.
- Shi, L., Y.J. Jung, S. Tyagi, M.L. Gennaro, and R.J. North. 2003. Expression of Th1-mediated immunity in mouse lungs induces a *Mycobacterium tuberculosis* transcription pattern characteristic of nonreplicating persistence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 241-246.
- Singh, K.K., Y. Dong, S.A. Patibandla, D.N. McMurray, V.K. Arora, and S. Laal. 2005. Immunogenicity of the *Mycobacterium tuberculosis* PPE55 (Rv3347c) protein during incipient and clinical tuberculosis. *Infect. Immun.* 73, 5004-5014.
- Stewart, J.N., H.N. Rivera, R. Karls, F.D. Quinn, J. Roman, and C.A. Rivera-Marrero. 2006. Increased pathology in lungs of mice after infection with an alpha-crystallin mutant of *Mycobacterium tuberculosis*: Changes in cathepsin proteases and certain cytokines. *Microbiology* 152, 233-244.
- Talaat, A.M., R. Lyons, S.T. Howard, and A. Johnston. 2003. The temporal expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 4602-4607.
- Voskuil, M.I., D. Schnappinger, K.C. Visconti, M.I. Harrell, G.M. Dolganov, D.R. Sherman, and G.K. Schoolnik. 2003. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *J. Exp. Med.* 198, 705-713.
- Wayne, L.G. and C.D. Sohaskey. 2001. Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 139-163.
- WHO global tuberculosis control, WHO Report 2008, http://www.who.int/tb/publications/global_report
- Winslow, G.M., A.D. Roberts, M.A. Blackman, and D.L. Woodland. 2003. Persistence and turnover of antigen-specific CD4 T cells during chronic tuberculosis infection in the mouse. *J. Immunol.* 170, 2046-2052.