

## 녹농균 임상균주의 퀴럼 센싱 관련 표현형 분석

정경주<sup>1,2</sup> · 최유상<sup>1</sup> · 하창완<sup>1</sup> · 신정환<sup>3,4</sup> · 이준희<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>부산대학교 약학대학 미생물학 연구실, <sup>2</sup>인제대학교 부속 부산백병원 진단검사의학과,  
<sup>3</sup>인제대학교 의과대학 진단검사의학교실, <sup>4</sup>백인제 기념 임상의학연구소

## Analysis of Quorum Sensing-Related Phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates

Kyung-Ju Jung<sup>1,2</sup>, Yusang Choi<sup>1</sup>, Changwan Ha<sup>1</sup>, Jeong Hwan Shin<sup>3,4</sup>, and Joon-Hee Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Pusan National University, Busan 609-735, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine, Inje University Busan Paik Hospital, Busan 614-735, Republic of Korea

<sup>3</sup>Department of Laboratory Medicine, Inje University College of Medicine, Busan 614-735, Republic of Korea

<sup>4</sup>Paik Institute for Clinical Research, Inje University College of Medicine, Busan 614-735, Republic of Korea

(Received May 28, 2010/Accepted August 30, 2010)

*Pseudomonas aeruginosa* is a Gram (-) opportunistic human pathogen causing a wide variety of infections on lung, urinary tract, eyes, and burn wound sites and quorum sensing (QS), a cell density-sensing mechanism plays an essential role in *Pseudomonas* pathogenesis. In order to investigate the importance of QS in the *Pseudomonas* infections of Korean patients, we isolated 189 clinical strains of *P. aeruginosa* from the patients in Pusan Paik Hospital, Busan, South Korea. The QS signal production of these clinical isolates was measured by signal diffusion assay on solid media using reporter strains. While most clinical strains (79.4%) produced the QS signals as similar level as a wild type strain, PAO1 did, where LasR, the initial QS signal sensor-regulator was fully activated, a minority of them (4.2%) produced much less QS signals at the level to which LasR failed to respond. Similarly, while 72.5% of the clinical isolates produced QS signals enough to activate QscR, an another QS signal sensor-regulator, some few of them (9%) produced the QS signals at much lower level where QscR was not activated. For further analysis, we selected 74 clinical strains that were obtained from the patients under suspicion of *Pseudomonas* infection and investigated the total protease activity that is considered important for virulence. Interestingly, significant portion of them showed very low protease activity (44.6%) or no detectable protease activity (12.2%). When the biofilm-forming ability that is considered very important in chronic infection was examined, most isolates showed lower biofilm-forming activity than PAO1. Similarly, significant portion of clinical isolates showed reduced motility (reduced swarming activity in 51.4% and reduced twitching activity in 41.9%), or non-detectable motility (swarming-negative in 28.4% and twitching-negative in 28.4%). Our result showed that the clinical isolates that produced QS signals at the similar level to wild type could have significantly reduced activities in the protease production, biofilm formation, and motility, and some clinical isolates had unique patterns of motility, biofilm formation, and protease production that are not correlated to their QS activity.

**Keywords:** bacterial cell to cell signaling, biofilm, clinical isolate, *P. aeruginosa*, quorum sensing, virulence

그람음성 간균인 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)은 대표적인 인체 기회감염균으로 면역이 약화된 사람들에게는 치명적인 미생물이다(26). 특히 자기 스스로 호흡을 하지 못하고

ventilator와 같은 장비를 삽입한 환자들이나, 낭포성 섬유증(cystic fibrosis) 등의 호흡기 질병을 가진 환자에게 치명적인 감염균이다(26). 녹농균의 감염 및 발병에 관여하는 병독인자(virulence factors)에는 편모, 섬모, lipopolysaccharide 등 기본 세포 구성 성분들이나, 특정 환경에서 생성되는 인자들, 즉 독소(exotoxin A, exoenzyme S), 각종 프로테아제(elastase (LasB),

\* For correspondence. E-mail: joonhee@pusan.ac.kr; Tel: +82-51-510-2821; Fax: +82-51-513-6754

LasA protease (staphylolytic 활성), alkaline protease, protease IV], 용혈소(hemolysin), 계면활성 성분(rhamnolipid) 등이 알려져 있다(1, 2, 7, 8, 19, 24, 38). 이러한 병독인자들 중에는 주변 환경과 관계없이 항상 발현되는 것들도 있지만, 숙주내에서 감염을 일으킬 때 주변 환경의 변화에 따라 특이적으로 발현이 유도되는 것들도 많다. 따라서 이러한 병독인자들의 발현에 관여하는 중요한 인자, 조절 단백질들의 활성을 제어함에 의해 병원균들의 감염력을 제어하려는 연구가 진행되어 왔다(17, 21).

퀴럼 센싱(Quorum sensing; QS)은 *Vibrio fischeri*에서 처음 발견된 세포 밀도 인식기전으로, 여러 세균에서 병독인자들의 발현, 생물막 형성, 운동성, 항생제 내성 등과 같은 발병력과 관련되는 현상들의 조절에 관여하는 중요한 인식 조절기전이다(29, 39, 41). 따라서 병원균의 감염력 제어를 위한 좋은 타겟으로 여겨져 왔으며, 다양한 퀴럼 센싱 억제물질들이 광범위하게 탐색되었다(6, 14, 20, 21, 26). 더욱이 퀴럼 센싱은 기본적으로 군집내 세균 개체들간의 신호전달 기전이기 때문에, 세균들의 통일되고 조직화된 집단행동(group behavior)을 가능하게 하여, 병원균에게 보다 강력한 생존력, 감염력, 항생제 내성 등을 부여한다. 특히 전체 만성감염의 65% 이상을 매개할 것으로 추정되는 생물막 형성에 의한 감염에서도 퀴럼 센싱이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(10, 42).

퀴럼 센싱은 일반적으로 확산이 가능한 작은 신호 물질과 이를 합성하는 효소, 그리고 이를 수용하는 수용체 단백질을 통해 일어난다. 퀴럼 신호물질은 세균에 따라 그 구조와 종류가 매우 다양한데, 그람 양성균은 올리고 펩타이드 계열의 물질을, 그람 음성균은 acyl homoserine lactone (AHL) 계열의 물질을 주로 사용하며, 비브리오 균과 장내세균에서는 AI-2로 불리는 furanone 계열의 물질이 사용되기도 한다(16). 퀴럼 센싱에 대해 많은 연구가 이루어진 녹농균의 경우, N-3-oxodecanoyl-homoserine lactone (3OC12-HSL)과 N-butryl-homoserine lactone (C4-HSL)을 주 신호물질로 생산한다(33). 또한 PQS (*Pseudomonas* quinolone signal; 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone)라는 신호물질도 병원성 및 생물막 형성과 관련하여 중요한 역할을 한다(13). 그런데 C4-HSL과 PQS의 생성은 3OC12-HSL 신호에 의존적이기 때문에(12), 대부분의 퀴럼 센싱 관련 표현형들은 3OC12-HSL에 의해 초기 발현이 이루어진다. 이러한 신호물질들은 각각에 대해 특이적인 수용체 단백질에 의해 인식되는데, 3OC12-HSL에 대한 수용체 단백질은 LasR과 QscR, C4-HSL에 대한 수용체 단백질은 RhlR으로 알려져 있다(33). 이러한 수용체 단백질은 신호물질을 수용할 수 있는 부분과 함께 유전자의 프로모터에 존재하는 특이적인 염기서열에 결합할 수 있는 DNA 결합부위를 가지고 있어, 신호물질과 결합한 후 특정 유전자군의 발현을 조절하는 조절 단백질의 역할도 수행한다. LasR, RhlR, QscR에 의해 조절되는 조절군에는 다양한 녹농균의 병독 인자들이 포함되어 있다(23, 33, 34).

퀴럼 센싱이 병원균의 병원성에 매우 중요한 지표가 될 수 있기 때문에 외국의 경우 임상환자들에서 분리된 병원균에서

퀴럼 센싱 신호물질이나, 퀴럼 센싱 활성을 분석하는 연구가 수행되어 왔으며, 특히 녹농균의 경우 임상 균주에서의 퀴럼 유전자 활성과 생물막 형성능력 등에 대한 다양한 실험들이 있어왔다(30-32). 하지만, 국내 임상환자들에서 분리된 녹농균에서 퀴럼 신호물질 및 생물막 형성에 대한 분석은 아직 폭넓게 수행된 바가 없었다. 본 실험에서는 국내 환자들에서 분리된 다량의 녹농균 임상균주들에서 퀴럼 신호물질 생성과 생물막 형성 정도를 분석하고, 이들이 임상균들의 병원성에 대한 지표로 사용될 수 있는 가능성을 조사해 보았다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

2009년에 부산백병원 임상 미생물검사실로 의뢰된 환자들의 검체로부터 동정된 녹농균 189개를 이번 실험에 사용하였으며, 질병에 따른 녹농균 임상균주의 수는 Table 1과 같다. 표준 야생형 녹농균 균주로는 일반적으로 많은 연구진에 의해 연구되어온 PAO1을 사용하였으며, 퀴럼 센싱을 하지 못하는 대조군 균주로는 MW1 (*lasI-rhlI*-, 이중 돌연변이주)을 사용하였다. 녹농균 동정에는 VITEK2-System (bioMérieux, Korea)을 사용하였으며, 표준 녹농균 균주인 PAO1과 생리적 특성이 차이가 나는 임상균들에 대해서는 16S 리보솜 RNA 염기서열 분석을 통해 보다 정확히 녹농균임을 확인하였다.

### 리포터 균주의 제조

퀴럼 신호물질인 3OC12-HSL의 검출을 위해서 두 종류의 공존가능한 플라스미드(compatible plasmids)들을 조합하여 도

**Table 1.** The diseases from which the clinical strains used in this study were isolated

Diseases	Number of isolates
Pneumoniae	19
Otitis media	10
Brain disease or damage	42
Chronic renal failure	8
Fracture	10
Respiratory diseases	22
Urinary diseases	16
Liver diseases	19
Burn	2
Diabetes	4
Acute appendicitis	3
Carcinoma of the colon	3
Heart diseases	4
Rectal cancer	4
Stomach cancer	3
Other diseases	17
Cervical cancer	3
Total	189

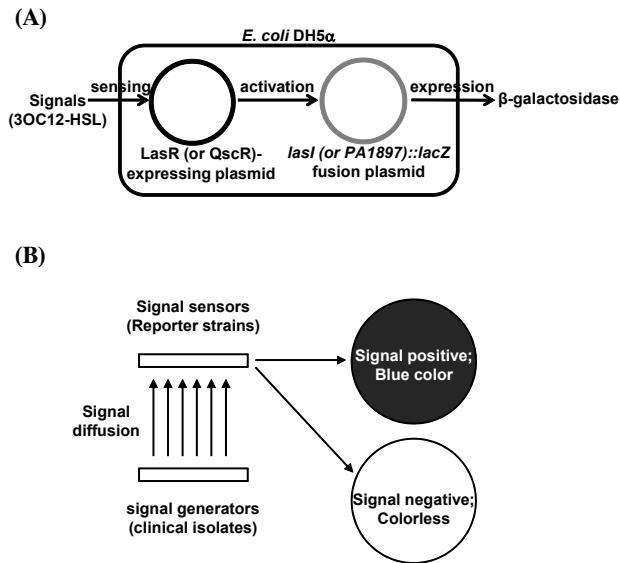


Fig. 1. The reporter strains used in this study (A) and the principle of the signal diffusion assay (B).

입한 재조합 대장균(*Escherichia coli*) 균주를 사용하였다(Fig. 1A). 한 종류는 arabinose에 의해 발현이 유도되는 프로모터에 3OC12-HSL에 대한 퀴럼 수용체 단백질들인 LasR과 QscR을 각각 클로닝한 pJN105L과 pJN105Q이고, 다른 종류는 LasR과 QscR이 각각 특이적으로 발현을 유도하는 lasI와 PA1897 유전자의 프로모터를 lacZ 리포터 유전자에 결합시킨 pSC11과 pJL101 플라스미드들이다(9, 22). 이들을 각각 pJN105L-pSC11과 pJN105Q-pJL101의 조합으로 함께 대장균 DH5α에 형질전환을 통해 도입한 후, 3OC12-HSL에 반응하여 β-galactosidase를 발현하는 리포터 균주로 사용하였다.

### 고체 배지상에서 퀴럼 신호물질의 검출

QS 신호전달을 처음 개시하는 3OC12-HSL의 검출을 위해 고체 배지상에서 리포터 균주를 이용한 신호 확산 검출법(signal diffusion assay)을 수행하였다(Fig. 1B). Luria-Bertani (LB) 고체배지에 발색반응을 위하여 40 µg/ml X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside)를, 두 플라스미드를 갖는 리포터 균주를 선택하기 위하여 10 µg/ml gentamicin과 100 µg/ml ampicillin을, 리포터 균주내에서 3OC12-HSL 인지 단백질인 LasR과 QscR을 발현 시키기 위하여 0.4% L-arabinose를 각각 첨가한 후, 그 위에 Fig. 1B에서처럼 리포터 균주를 선형으로 그어 접종하였다. 여기에 녹농균 임상균주들을 나란히 그어 접종하여 24시간 동안 배양하며 리포터 균주의 색깔 변화를 관찰하였다. Fig. 1B에 묘사된 것처럼, 임상균주들로부터 생성된 3OC12-HSL이 확산을 통해 리포터에 도달하면, 그 속의 LasR 혹은 QscR이 활성화 되어 β-galactosidase를 발현하게 되고, 이 효소에 의해 X-gal이 분해되어 파란 색깔을 나타내게 된다. 이 파란색의 짙은 정도가 임상균주에서 생성된 3OC12-HSL의 양을 반영하므로, 이를 네 등급으로 나누어 각각 -, +, ++, +++로 표시하였다.

### 프로테아제 활성 측정

프로테아제 활성은 skim milk agar (0.5% skim milk, 0.5% peptone, 0.1% glucose, 1.5% agar)를 이용하여 측정되었다. Skim milk agar plate 위에 지름 0.5 cm의 여과지를 놓고 그 위에 OD<sub>600</sub>=1.0로 배양한 임상 균주들을 2 µl씩 접종하였다. 이를 18-24시간 배양하면서 주위에 skim milk 속의 단백질이 분해되어 생기는 투명환을 관찰한 후, 그 직경의 크기를 통해 프로테아제 활성을 측정하였다. 그 활성의 정도를 네 등급으로 나누어 각각 -, +, ++, +++로 표시하였다. 각 등급별 투명환의 크기는 균들이 자란 부분의 가장자리로부터 -는 0 mm, +는 1-5 mm, ++는 5-9 mm, +++는 10 mm 이상이였다.

### 생물막 형성 측정

생물막 형성은 M63 최소 배지[M63 salt (12 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 28 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8 g/L (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5% CAA, 0.2% citrate)에서 수행되었다. 두 개의 96 well plate에 M63 액체배지를 150 µl씩 분주한 후, 24시간 배양한 임상 균주들의 seed 배양액을 동일하게 2%로 접종하고 37°C에서 48시간 배양하였다. 두 plate 중 하나는 OD를 측정하고, 다른 하나는 다음과 같이 생물막 형성 정도를 측정하였다. 우선 plate를 뒤집어 배양액을 모두 버린 후, 물로 2-3회 씻고 0.1% crystal violet 용액을 180 µl씩 첨가하였다. 약 7분간 잘 흔들어 염색한 후, plate를 뒤집어 여분의 crystal violet 용액을 버리고 다시 2-3회 물로 세척하였다. 여기에 absolute ethanol 200 µl를 넣고 30분간 잘 흔들어 crystal violet을 녹여낸 후, 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 양에 의한 오차를 보정하기 위하여 이 흡광도를 앞에서 측정한 OD값으로 나누어 준 값을 생물막 형성 정도로 제시하였다. 흡광도 측정에는 Tristar LB941 (Berthold, Germany)이 사용되었다.

### 운동성 측정

임상균주들의 운동성은 평판배지법을 통해 측정되었다. twitching 활성 측정용 평판배지는 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1% agar로 만들었으며, swarming 활성 측정용 평판배지는 0.4% tryptone, 0.2% yeast extract, 0.2% NaCl, 0.5% agar, 0.5% glucose로 만들었다. 각각의 평판배지 위에 임상균주들을 접종하여 이들이 각각의 운동성을 통해 주변으로 퍼져나가는 정도를 측정한 후, 그 정도를 네 등급으로 나누어 각각 -, +, ++, +++로 표시하였다. 세포가 균일하게 퍼져 나가는 것은 아니지만 대략 -는 10-15 mm, +는 11-20 mm, ++는 15-24 mm, +++는 25-35 mm 이상으로 측정되었다.

## 결과 및 고찰

### 녹농균 임상 균주들에서의 퀴럼 센싱 신호물질 생성

녹농균 임상 균주들을 동정하기 위해 인제대학교 부속 부산 백병원에 내원한 외래환자와 입원환자의 모든 가검물에서 녹농균으로 의심되는 균들을 VITEK2-System (bioMérieux)을 이용하여 동정했다. 중복을 피하기 위하여 같은 환자로부터 동정된

*P. aeruginosa*는 배제하고 한 환자당 하나의 녹농균만을 취하여, 총 189개의 임상 균주를 얻었다. 이렇게 얻어진 189개의 임상 균주에서 퀴럼 신호물질 생성 여부를 Fig. 2A, 2B에 예시된 것처럼 고체배지상에서 신호 확산법으로 조사하였다. 그 결과 전체 189종의 임상 균주중 79.4% (150종)가 녹농균 야생형 균주와 비슷하게 퀴럼 센싱 조절의 가장 상위 신호인식-조절 단백질인 LasR을 충분히 활성화 시키는 수준으로 퀴럼 신호물질을 생성하였다(Fig. 2C). LasR은 3OC12-HSL을 인식하는 퀴럼 신호 수용체 단백질로 많은 병독인자들(virulence factors)의 발현을 직접 조절할 뿐만 아니라, C4-HSL에 의한 RhlR-I 조절군과 PQS 신호 조절군 등 다른 퀴럼 센싱 조절군을 연속적으로 활성화시키는 역할을 한다. 따라서 LasR이 충분히 활성화될 만큼 퀴럼 신호물질을 생성한다는 것은 이 임상 균주들이 정상적으로 퀴럼 센싱을 할 수 있음을 보여주는 지표라 할 수 있다. 한편 전체의 12.2% (23종)는 다소 낮은 정도의 퀴럼 신호물질 생성능력을 보였다. 반면, 전체의 8.4% (16종)는 상당히 낮은 수준으로 퀴럼 신호물질을 생성하였으며, 이중 절반 정도, 즉 전체의 4.2% (8종)는 신호물질을 전혀 합성하지 못하는 녹농균 돌연변이주(MW1)와 비슷하게 LasR을 전혀 활성화 시키지 못하는 수준이었다(Fig. 2C). LasR은 3OC12-HSL에 대한 특이성과 민감성이 모두 높기 때문에(35), 이 4.2%는 퀴럼 음성으로 판단된다. 이 실험결과는 79.4%의 임상 균주들이 3OC12-HSL을 야생형 수준으로 생성하지만, 나머지는 야생형 보다 낮은 수준으로 생성하거나 생성하지 못함을 보여주는 것이다.

또 다른 퀴럼 신호물질 인식 단백질인 QscR은 LasR처럼 3OC12-HSL을 인식하는 수용체 이지만 생리적으로 LasR에 비해 나중에 발현되는 것으로 생각되며, LasR과 RhlR의 작용을 일부 억제하는 것으로 알려져 있다(9, 22). QscR은 3OC12-HSL에 대한 민감성이 LasR보다 낮기 때문에 3OC12-HSL 자체를 검출해 내는 데는 좋지 않지만, 3OC12-HSL에 대한 특이성이 낮아 구조적으로 보다 넓은 범위의 신호물질을 인식할 수 있다(22). 따라서 임상 균주들에서 생성되는 신호물질들 중에 3OC12-HSL과 비슷하지만 약간 구조적으로 다른 acyl-HSL이 있다면 QscR의 활성을 통해 검출할 수 있다. QscR이 반응하는 acyl-HSL에는 3OC12-HSL을 포함하여, 3OC10-HSL (*N*-3-oxodecanoyl-homoserine lactone), C12-HSL (*N*-dodecanoyl-homoserine lactone), C10-HSL (*N*-decanoyl-homoserine lactone), 3OHC10-HSL (*N*-3-hydroxydecanoyl-homoserine lactone), C8-HSL (*N*-octanoyl-homoserine lactone), C14-HSL (*N*-tetradecanoyl-homoserine lactone) 등이 있다(22). LasR 대신 QscR의 활성을 검사할 수 있는 리포터 균주를 이용하여 189개의 임상 균주들을 조사해본 결과, 전체의 72.5% (137종)가 야생형과 비슷한 수준으로 QscR을 충분히 활성화 시켰으며, 11.1% (21종)가 다소 낮은 정도로 QscR을 활성화 시켰다(Fig. 2C). 반면, 전체의 16.4% (31종)가 아주 낮은 수준으로 QscR을 활성화 시켰으며, 이중 54.8%, 즉 전체의 9% (17종)는 QscR을 전혀 활성화 시키지 못하였다(Fig. 2C). 이러한 결과는 LasR 리포터를 사용하였을 때에 비해 퀴럼 음성 균주의 비율이 다소

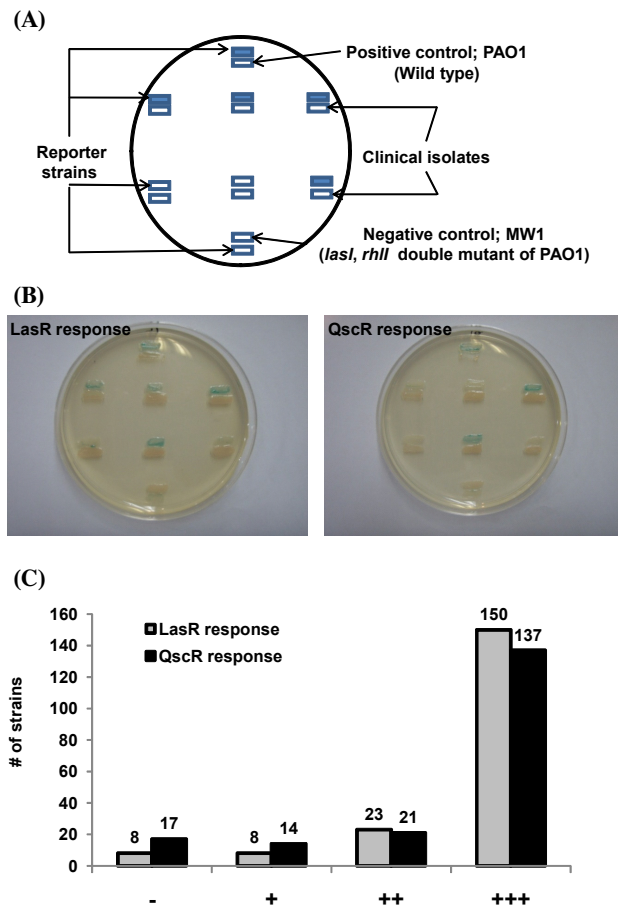


Fig. 2. Examples of the signal diffusion assay (A, B) and the final result about QS signal production (C).

높게 나온 것인데, 이는 LasR 리포터에서는 신호물질이 검출되었지만 QscR 리포터에서는 신호물질이 확인되지 않은 임상 균주가 9종 있었기 때문으로, 이는 3OC12-HSL에 대한 QscR의 민감도가 LasR보다 낮기 때문에 나온 결과로 사료된다. 한편 LasR을 활성화 시키지 못하면서 QscR만 활성화 시키는 임상 균주는 하나도 없었다. 이는 퀴럼 신호물질을 생성하는 임상 균주들은 모두 야생형처럼 3OC12-HSL을 주로 생성하며, 탄소사슬의 길이나 기능이 다른 acyl group을 갖는 acyl-HSL을 의미있는 수준으로 생성하는 임상 균주는 없었음을 의미한다. LasR 리포터를 사용한 분석과 QscR 리포터를 사용한 분석 중 LasR 리포터를 사용한 분석이 보다 민감하게 퀴럼 센싱 신호물질의 활성을 반영하기 때문에, 실제 퀴럼 센싱 음성인 임상균은 LasR 리포터를 이용한 분석결과인 전체의 4.2% (8종)로 보는 것이 타당하다고 사료된다.

한편, 임상 균주들 중 특히 녹농균 감염이 의심되는 폐렴, 화상부위 감염, 요도 감염, 호흡기 감염 등에서 동정된 74종만을 선택하여 따로 분석하였을 때에도 전체의 8.1% (6종)가 낮은 퀴럼활성을, 전체의 5.4% (4종)가 퀴럼 음성으로 분석되어, 전체 189종을 가지고 분석했을 때와 유사한 것으로 나타났다(Fig. 3). 마찬가지로 74종에 대해 QscR 리포터 균주를 이용한

결과를 가지고 분석하였을 때 16.2% (12종)가 낮은 활성을, 10.8% (8종)가 음성으로 분석되어 전체 189종을 가지고 분석했을 때와 대동소이하었다(Fig. 3). 본 연구에서는 QS 신호물질을 생성하지 않은 임상 균주들 중에 녹농균이 아닌 것이 잘못 동정된 경우가 포함되었을 가능성을 배제하기 위하여 16S rRNA 염기서열 분석을 통하여 보다 엄밀하게 녹농균임을 확인하였고, 녹농균이 아닌 것은 제외하였다(자료 미제시).

### 임상 균주들에서의 프로테아제 생성

임상 균주의 QS 신호물질 생성이 실제로 감염력과 관련이 있는지 확인하기 위해 녹농균 감염이 의심되는 환자에서 동정된 74종에 대해 대표적 병독인자인 프로테아제 활성을 분석하였다. 녹농균의 프로테아제들은 퀴럼 센싱의 조절을 받아 발현되는 것이 많은데, 8종 이상의 세포외로 분비되는 프로테아제가 퀴럼 센싱의 조절을 받는다는 것이 전사체 분석을 통해 알려졌다(34), LasB, protease IV 등의 프로테아제들은 그 발현이 LasR 등 퀴럼 센싱 조절 단백질에 의해 직접 조절된다는 것이 밝혀진 바 있다(4, 5, 34, 35, 40). 본 연구에서도 퀴럼 센싱 활성이 정상적인 임상 균주 대부분이 야생형 PAO1과 비슷한 수준의 프로테아제 활성을 보였으며, 통계적으로도 퀴럼 센싱과 프로테아제 생성간에 유의한 상관관계가 있는 것으로 관찰되었으나(p-value=0.499, Fig. 3), 전체적으로는 44.6%인 33종의 임상 균주들이 낮은 프로테아제 활성을 보였고, 전체의 12.2% (9종)에서는 프로테아제 활성이 관찰되지 않았다(Fig. 3). 또한 일부 임상 균주들은 정상적인 퀴럼 활성을 보이면서도 프로테아제 활성은 나타나지 않거나(Fig. 3, J6, J40, J52, J59, J90, J117, J123, J130), 매우 약하게 나타났(Fig. 3, J3, J27, J34, J43, J63, J74, J76, J86, J94, J115, J132, J160, J194, J199, J202). 이와 반대로 퀴럼 활성은 없으면서 프로테아제 활성이 야생형과 비슷한 수준으로 나오는 경우는 없었으며, J187만이 퀴럼 활성이 없으면서도 PAO1에 비해 낮은 수준으로 프로테아제 활성을 보였다(Fig. 3). 이 결과는 임상 균주들에서도 야생형 균주인 PAO1으로부터 알려진 퀴럼 센싱과 프로테아제 활성사이의 상관관계가 여전히 나타남을 보여주는 한편, 그것이 절대적이지는 않아서 퀴럼 센싱이 정상이면서 프로테아제 활성이 감소한 종들도 일부 존재한다는 사실을 함께 보여주고 있다.

프로테아제는 감염에서 매우 중요한 역할을 하는 병독인자로 알려져 있기 때문에 임상균에서 프로테아제 활성이 낮은 경우가 상당한 비율로 발견된다는 것은 다소 의외의 결과이다. 이 경우는 다른 병독인들이 더 중요하게 작용하였거나, 혹은 생물막 형성을 통한 만성감염 기전으로 감염한 경우가 아닌가 생각할 수 있다. 생물막 형성을 통한 만성감염에서는 생물막 자체의 강한 생존력과 부착능력이 중요하며, 상대적으로 병독인자의 분비는 덜 중요하기 때문이다.

### 임상 균주들의 생물막 형성능

임상 균주들의 생물막 형성능력을 알아보기 위해 앞에서 사용한 74종의 임상 균주들을 대상으로 생물막 형성 정도를 조

사하였다. 임상 균주들을 48시간 동안 배양하여 생물막 형성을 측정하였을 때, 흥미롭게도 대부분이 야생형 PAO1 보다 생물막 형성능력이 떨어져 있었다(Fig. 3). 생물막 형성능력이 PAO1 보다 더 높아진 임상균주는 J16, J40, J63, J76, J123, J161, J202 등 7종으로 전체의 9.5%였으며, 이들은 야생형에 비해 15% 이상 증가된 생물막을 형성하였다(Fig. 3). 야생형에 비해 50% 이상 생물막을 많이 형성한 것은 J16, J76, J161 등 3종 뿐이었다. 따라서 생물막 형성의 증가가 감염에 중요한 역할을 했다고 보기는 어려운 것으로 판단된다.

퀴럼 활성이 정상적이면서 PAO1보다 훨씬 높은 생물막 형성능력을 보인 J76, J161과, 이와는 반대로 퀴럼 음성이면서 매우 높은 생물막 형성능을 보인 J16은 매우 흥미로운 임상 균주들이다. 특히 나머지 퀴럼 음성 임상균들(J25, J150, J187)은 PAO1보다 현저하게 적은 생물막 형성능을 보였다. 이 점에서 J16에 대한 추가 연구가 필요하다고 사료된다. 녹농균에서는 오랫동안 퀴럼 센싱과 생물막 형성이 밀접한 관계가 있다는 것이 많이 보고되어 왔는데(11, 28), 최근에는 생물막 형성에 퀴럼 센싱이외의 다른 조절인자가 작용한다는 보고도 많으며, 실험 조건이나 주변 환경 인자에 의해 퀴럼 센싱과는 독립적으로 다양하게 조절 받을 수 있는 것으로 생각하고 있다(18, 27). 본 연구 결과 또한 임상균주에서는 퀴럼 센싱과 생물막 형성사이의 상관관계가 낮으며, J16과 같이 전혀 상관관계가 없는 경우도 있음을 보여준다.

### 임상 균주들의 운동성

녹농균의 운동성이 생물막 형성과 관련이 있다는 것이 보고된 바 있다(3, 25, 36). 임상 균주들에서 관찰된 생물막 형성능력과 운동성간의 상관 관계를 알아보기 위해 74종의 임상균을 가지고 평판배지에서 약 48시간 배양하면서 swarming과 twitching 활성을 측정해 보았을 때, 많은 임상균들에서 swarming과 twitching 능력이 저해되어 있었다. 전체의 51.4%인 38종이 감소된 swarming 활성을 보였으며, 전체의 41.9%인 31종이 감소된 twitching 활성을 보였다(Fig. 3). 이들 중 절반이상에서 swarming과 twitching 능력이 관찰되지 않았다 [Fig. 3, 전체의 28.4% (21종)가 swarming 음성, 전체의 28.4% (21종)가 twitching 음성]. 이는 생물막 형성능력 저하와 함께 운동능력 또한 저하된 임상 균주들이 상당 부분 존재함을 보여주는 결과이다.

녹농균 임상 균주에서 퀴럼 센싱이 어떻게 나타나는지 연구한 외국의 연구 사례들은 꾸준히 있어왔는데(15, 31, 32, 37), 본 연구에서처럼 외국의 녹농균 임상 균주에서도 퀴럼 센싱 음성인 임상 균주들이 2.5% 빈도로 동정된 바 있었으며(31), 이는 본 연구에서 퀴럼 음성 임상 균주들이 나온 빈도인 4.2%보다 낮은 수치이다. 또한 퀴럼 센싱을 정상적으로 하는 임상 균주들에서도 프로테아제 생성, 생물막 형성, 운동성 등의 특징들이 저해되어 있는 경우가 많았다는 점도 본 연구 결과에서 언급할 만한 부분이다. J16과 같은 일부 임상 균주들은 퀴럼 활성과는 상관관계가 없는 독특한 패턴의 프로테아제 생성능과 생물막 형성능 및 운동성을 보여주고 있음도 본 연구를 통

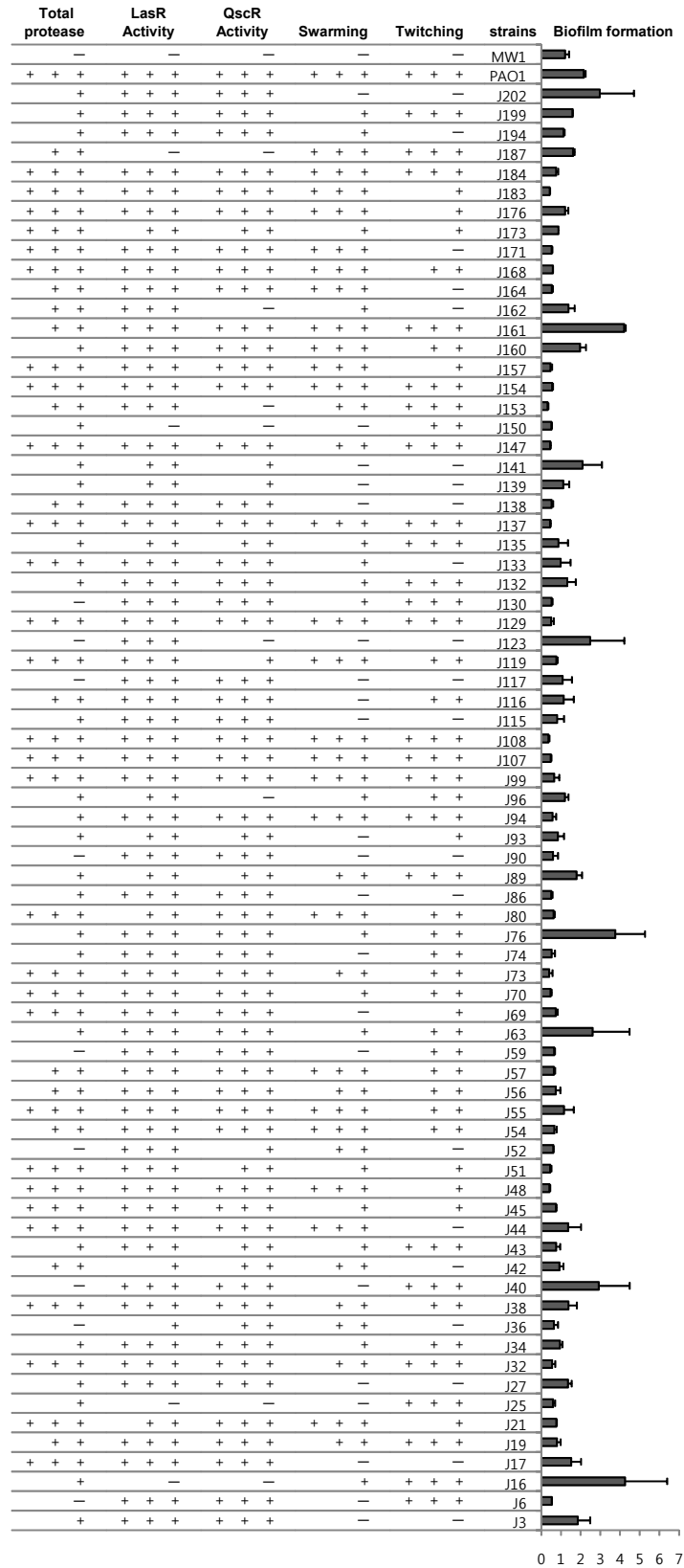


Fig. 3. Summary of the results of the assays for the total protease activity, biofilm formation, swarming motility, twitching motility, and QS signal production for comparison. The results for the QS signal production assays by two different reporters were presented together as LasR activity and QscR activity, respectively.

해 확인하였다.

퀴럼 센싱은 녹농균의 감염과 병원성에 핵심적인 역할은 한 다고 알려져 왔기 때문에 녹농균 감염의 중요한 지표로 사용하 려는 시도가 진행되어 왔으나, 국내 환자들에게서 동정된 녹농 균 임상 균주에서 퀴럼 센싱 및 이와 관련된 여러 생리적 특성 들에 대한 연구는 아직까지 제한적이었다는 점에서 본 연구의 결과는 중요한 정보로 쓰일 수 있다고 생각된다.

## 적요

그람음성 간균인 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)은 비노 기, 결막(conjunctiva), 호흡기(respiratory system), 화상부위 등 에 광범위하게 감염하며, 병원성의 발현에 세균의 세포피도 인 식기전인 퀴럼 센싱이 매우 중요하다고 알려진 기회감염성 병 원균이다. 국내의 환자들에게 감염하는 녹농균에서 퀴럼 센싱 의 중요성을 알아보기 위해 부산 백병원의 환자들로부터 189 종의 녹농균을 분리 동정하였다. 이 임상 균주들에서 퀴럼 센 싱 신호 물질의 발현을 리포터 균주를 이용한 고체 배지 확산 법으로 조사하였다. 전체 임상 균주의 79.4%가 녹농균 야생형 균주와 비슷하게 퀴럼 센싱 조절의 가장 상위 신호인식-조절 단백질인 LasR을 충분히 활성화 시키는 수준으로 퀴럼 신호물 질을 생성하였다. 반면 4.2% 정도는 신호물질을 합성하지 못 하는 녹농균 돌연변이주와 비슷하게 LasR을 활성화 시키지 못 하는 수준으로 퀴럼 신호물질을 생성하였다. 한편, 전체의 72.5%가 또 다른 퀴럼 신호인식-조절 단백질인 QscR을 충분 히 활성화 시킬 수 있는 야생형 수준으로 신호물질을 생성한 반면, 9%가 QscR을 활성화 시키지 못하는 수준으로 신호물질 을 생성하였다. 임상 균주들 중 특히 녹농균 감염이 의심되는 환자들에게서 유래한 74종을 선정하여 병독인자로 중요한 프 로테아제 활성을 조사한 결과, 44.6%에서 프로테아제 활성이 낮아져 있었으며, 12.2%에서는 프로테아제 활성이 관찰되지 않았다. 같은 균들을 대상으로 만성감염에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 생물막 형성 능력을 확인하였을 때, 대부분이 야생형보다 생물막 형성능력이 떨어져 있었다. 또한 이 균주들 의 운동성을 살펴본 결과 많은 균주들이 swarming과 twitching 능력이 저해되어 있었으며(전체의 51.4%가 reduced swarming activity, 전체의 41.9%가 reduced twitching activity), 관찰되 지 않는 수준의 균주도 상당부분 있었다(전체의 28.4%가 swarming negative, 전체의 28.4%가 twitching negative). 본 연구결과는 퀴럼 센싱을 정상적으로 하는 임상 균주들 중에서도 상당 부분은 프로테아제 생성, 생물막 형성, 운동성 등의 특 징들이 저해될 수 있음을 의미하며, 일부 임상 균주들은 그들 의 퀴럼 활성과는 상관관계가 없는 독특한 패턴의 프로테아제 생성능과 생물막 형성능 및 운동성을 보여주고 있음을 확인하 였다.

## 감사의 말

이 논문의 연구는 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)의

지원에 의하여 수행되었음

## 참고문헌

1. Abdel-Mawgoud, A.M., F. Lepine, and E. Deziel. 2010. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1323-1336.
2. Alionte, L.G., B.M. Cannon, C.D. White, A.R. Caballero, R.J. O'Callaghan, and J.A. Hobden. 2001. *Pseudomonas aeruginosa* LasA protease and corneal infections. *Curr. Eye Res.* 22, 266-271.
3. An, D., T. Danhorn, C. Fuqua, and M.R. Parsek. 2006. Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 3828-3833.
4. Anderson, R.M., C.A. Zimprich, and L. Rust. 1999. A second operator is involved in *Pseudomonas aeruginosa* elastase (lasB) activation. *J. Bacteriol.* 181, 6264-6270.
5. Arevalo-Ferro, C., M. Hentzer, G. Reil, A. Gorg, S. Kjelleberg, M. Givskov, K. Riedel, and L. Eberl. 2003. Identification of quorum-sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics. *Environ. Microbiol.* 5, 1350-1369.
6. Balaban, N., A. Giacometti, O. Cirioni, Y. Gov, R. Ghiselli, F. Mocchegiani, C. Viticchi, M.S. Del Prete, V. Saba, G. Scalise, and G. Dell'Acqua. 2003. Use of the quorum-sensing inhibitor RNAlII-inhibiting peptide to prevent biofilm formation *in vivo* by drug-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* 187, 625-630.
7. Blackwood, L.L., R.M. Stone, B.H. Iglewski, and J.E. Pennington. 1983. Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and elastase as virulence factors in acute lung infection. *Infect. Immun.* 39, 198-201.
8. Bruno, T.F., D.E. Woods, and C.H. Mody. 2000. Exoenzyme S from *Pseudomonas aeruginosa* induces apoptosis in T lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 67, 808-816.
9. Chugani, S.A., M. Whiteley, K.M. Lee, D. D'Argenio, C. Manoil, and E.P. Greenberg. 2001. QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 2752-2757.
10. Cos, P., K. Tote, T. Horemans, and L. Maes. 2010. Biofilms: An extra hurdle for effective antimicrobial therapy. *Curr. Pharm. Des.* 16, 2279-2295.
11. Davies, D.G., M.R. Parsek, J.P. Pearson, B.H. Iglewski, J.W. Costerton, and E.P. Greenberg. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295-298.
12. Dietrich, L.E., A. Price-Whelan, A. Petersen, M. Whiteley, and D.K. Newman. 2006. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 61, 1308-1321.
13. Diggle, S.P., P. Cornelis, P. Williams, and M. Camara. 2006. 4-Quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: old molecules, new perspectives. *Int. J. Med. Microbiol.* 296, 83-91.
14. Dong, Y.H. and L.H. Zhang. 2005. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J. Microbiol.* 43, 101-109.
15. Erickson, D.L., R. Endersby, A. Kirkham, K. Stuber, D.D. Vollman, H.R. Rabin, I. Mitchell, and D.G. Storey. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems may control virulence factor expression in the lungs of patients with cystic fibrosis. *Infect. Immun.* 70, 1783-1790.
16. Henke, J.M. and B.L. Bassler. 2004. Bacterial social

- engagements. *Trends Cell. Biol.* 14, 648-656.
17. Hentzer, M., H. Wu, J.B. Andersen, K. Riedel, T.B. Rasmussen, N. Bagge, N. Kumar, M.A. Schembri, Z. Song, P. Kristoffersen, M. Manefield, J.W. Costerton, S. Molin, L. Eberl, P. Steinberg, S. Kjelleberg, N. Hoiby, and M. Givskov. 2003. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J.* 22, 3803-3815.
  18. Heydorn, A., B. Ersboll, J. Kato, M. Hentzer, M.R. Parsek, T. Tolker-Nielsen, M. Givskov, and S. Molin. 2002. Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2008-2017.
  19. Johnson, M.K. and D. Boese-Marrazzo. 1980. Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 29, 1028-1033.
  20. Kim, C., J. Kim, H.Y. Park, J.H. Lee, H.J. Park, C.K. Kim, and J. Yoon. 2009. Structural understanding of quorum-sensing inhibitors by molecular modeling study in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 1095-1103.
  21. Kim, C., J. Kim, H.Y. Park, H.J. Park, C.K. Kim, J. Yoon, and J.H. Lee. 2009. Development of inhibitors against TraR quorum-sensing system in *Agrobacterium tumefaciens* by molecular modeling of the ligand-receptor interaction. *Mol. Cells* 28, 447-453.
  22. Lee, J.H., Y. Lequette, and E.P. Greenberg. 2006. Activity of purified QscR, a *Pseudomonas aeruginosa* orphan quorum-sensing transcription factor. *Mol. Microbiol.* 59, 602-609.
  23. Lequette, Y., J.H. Lee, F. Ledgham, A. Lazdunski, and E.P. Greenberg. 2006. A distinct QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit. *J. Bacteriol.* 188, 3365-3370.
  24. Matsumoto, K. 2004. Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratal keratitis. *Biol. Chem.* 385, 1007-1016.
  25. O'Toole, G.A. and R. Kolter. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30, 295-304.
  26. Page, M.G. and J. Heim. 2009. Prospects for the next anti-*Pseudomonas* drug. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 558-565.
  27. Parsek, M.R. and E.P. Greenberg. 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol.* 13, 27-33.
  28. Purevdorj, B., J.W. Costerton, and P. Stoodley. 2002. Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4457-4464.
  29. Reading, N.C. and V. Sperandio. 2006. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 254, 1-11.
  30. Rumbaugh, K.P., A.N. Hamood, and J.A. Griswold. 2004. Cytokine induction by the *P. aeruginosa* quorum sensing system during thermal injury. *J. Surg. Res.* 116, 137-144.
  31. Schaber, J.A., N.L. Carty, N.A. McDonald, E.D. Graham, R. Cheluvappa, J.A. Griswold, and A.N. Hamood. 2004. Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 53, 841-853.
  32. Schaber, J.A., A. Hammond, N.L. Carty, S.C. Williams, J.A. Colmer-Hamood, B.H. Burrowes, V. Dhevan, J.A. Griswold, and A.N. Hamood. 2007. Diversity of biofilms produced by quorum-sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 56, 738-748.
  33. Schuster, M. and E.P. Greenberg. 2006. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Med. Microbiol.* 296, 73-81.
  34. Schuster, M., C.P. Lostroh, T. Ogi, and E.P. Greenberg. 2003. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* 185, 2066-2079.
  35. Schuster, M., M.L. Urbanowski, and E.P. Greenberg. 2004. Promoter specificity in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 15833-15839.
  36. Shrout, J.D., D.L. Chopp, C.L. Just, M. Hentzer, M. Givskov, and M.R. Parsek. 2006. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol. Microbiol.* 62, 1264-1277.
  37. Storey, D.G., E.E. Ujack, H.R. Rabin, and I. Mitchell. 1998. *Pseudomonas aeruginosa* lasR transcription correlates with the transcription of lasA, lasB, and toxA in chronic lung infections associated with cystic fibrosis. *Infect. Immun.* 66, 2521-2528.
  38. Tang, A., M.E. Marquart, J.D. Fratkin, C.C. McCormick, A.R. Caballero, H.P. Gatlin, and R.J. O'Callaghan. 2009. Properties of PASP: a *Pseudomonas* protease capable of mediating corneal erosions. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 3794-3801.
  39. Welch, M., H. Mikkelsen, J.E. Swatton, D. Smith, G.L. Thomas, F.G. Glansdorp, and D.R. Spring. 2005. Cell-cell communication in Gram-negative bacteria. *Mol. Biosyst.* 1, 196-202.
  40. Whiteley, M., K.M. Lee, and E.P. Greenberg. 1999. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13904-13909.
  41. Williams, P. 2007. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* 153, 3923-3938.
  42. Ymele-Leki, P. and J.M. Ross. 2007. Erosion from *Staphylococcus aureus* biofilms grown under physiologically relevant fluid shear forces yields bacterial cells with reduced avidity to collagen. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1834-1841.