

Staphylococcus aureus FtsZ의 클로닝, 발현 및 폴리머 형성 활성 분석

손상현¹ · 이동윤² · 김예준² · 고수호² · 조성준² · 정효철² · 이형호^{1,3*}

¹국민대학교 생명나노화학과, ²서울과학기술대학교, ³국민대학교 의생명융합학과

Received : May 14, 2012 / Revised : July 16, 2012 / Accepted : July 26, 2012

Cloning, Expression, and Polymerization Assay of FtsZ Protein from *Staphylococcus aureus*. Son, Sang Hyeon¹, Dong Yun Lee², Ye Jun Kim², Sooho Ko², Seong Jun Cho², Hyo Cheol Jung², and Hyung Ho Lee^{1,3*}. ¹Department of Bio & Nano Chemistry, Kookmin University, Seoul 136-702, Korea, ²Seoul Science High School for Gifted Students, Seoul 110-530, Korea, ³Department of Integrative Biomedical Science and Engineering, Kookmin University, Seoul 136-702, Korea – Cytokinesis is the final stage of cell division, dividing one mother cell into two daughter cells. For the cutting of a plasma membrane during bacterial cytokinesis, a tubulin homolog FtsZ protein is recruited from the cytoplasm to the division site. FtsZ protein polymerizes in a GTP-dependent manner and its N-terminal domain has a GTPase activity. In this study, we have begun to characterize FtsZ from *Staphylococcus aureus* (SA). Full-length SA FtsZ was cloned into pRSFDuet-1 vector and the clone was transformed into a BL21 (DE3) star cell. The recombinant SA FtsZ protein was purified using Ni-NTA affinity chromatography and dialysis. Using a spectrofluorometer, we showed that SA FtsZ undergoes a GTP-dependant polymerization *in vitro*. The polymer of the SA FtsZ protein disappeared after a few minutes, suggesting that the polymer is degraded as the GTP is consumed. This assay system may well be applied for inhibitor screening targeting *S. aureus* FtsZ.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, FtsZ, polymerization assay, GTPase

서 론

박테리아의 세포 분열은 마지막 단계에서 세포막의 절단에 의해 하나의 세포가 두 개의 세포로 나뉘어지는 세포질 분열(cytokinesis)로 마무리가 된다. 진핵세포와 달리 원핵세포에서의 세포질 분열에서는 tubulin과 상동(homolog)인 FtsZ 단백질의 폴리머 형성이 중요한 역할을 하며, FtsZ 단백질은 eubacteria, archaea, chloroplast 등에 골고루 존재하지만 진핵 세포에는 존재하지 않는다[8]. FtsZ 단백질의 폴리머 형성은 박테리아의 세포질 분열에 필요한 단백질들이 조합을 이루는 과정에서 scaffold 역할을 하며, 또한 세포막 함입이 일어나게 하는 에너지를 제공하는 역할도 하게 된다[1]. 따라서 FtsZ의 폴리머 형성은 세포 주기에 따라서 여러 다양한 조절 단백질들에 의해 정교하게 조절된다[1]. FtsZ 단백질의 폴리머 형성 과정을 억제함으로써 박테리아의 세포 분열을 억제할 수 있으므로 FtsZ 단백질은 신규 항생제 개발의 표적 단백질로 인식되고 있다[5].

FtsZ는 두 개의 도메인으로 구성되어 있고, 아미노 말단은 GTPase 도메인이며[4], GTP가 결합하였을 때에 FtsZ 단백질의 폴리머 형성에 관여한다[8]. (Protein Data Bank code:

1FSZ). FtsZ 단백질의 카르복시 말단 도메인은 4개의 β -sheet로 구성되어 있으며, 아미노 말단 도메인과 카르복시 말단 도메인의 가운데에는 긴 helix가 위치하는 구조를 가지고 있다[8]. FtsZ 단백질의 폴리머 형성은 마그네슘 이온의 존재 하에 일어나게 되는데, GTP가 FtsZ 단백질의 아미노 말단 도메인에 결합하여 폴리머 형성이 일어나며, 그와 동시에 FtsZ 단백질의 아미노 말단 도메인은 GTPase 활성을 가지고 있으므로 폴리머가 형성된 후에 GTP가 분해되어 FtsZ 폴리머가 다시 단량체로 바뀌게 된다[4, 9]. 리포솜을 활용한 연구에서는 리포솜 표면에서 FtsZ의 폴리머 형성을 통해서 막을 수축시키는 현상이 보고된 바가 있다[11].

기존의 다른 균주에서의 FtsZ 단백질의 구조 및 기능 연구를 통해서 FtsZ 단백질이 어떻게 폴리머를 형성하는지에 대한 연구는 많이 되어 왔으나, EzrA 단백질과 같은 FtsZ 폴리머 형성 조절 단백질들이 어떻게 폴리머 형성을 조절하는지에 대한 연구는 아직 미흡한 편이다. 특히 본 연구에서는 인체 병원균 중의 하나이며, 다제내성(multi-drug resistance)을 보이는 균주인 *Staphylococcus aureus* (SA)의 FtsZ 단백질을 발현하고 폴리머 형성 활성을 관찰하였다. Methicillin에 약제 내성을 보이는 *S. aureus*의 경우, methicillin 이후에 여러 종류의 항생제가 개발되어 왔으나 이들에 내성을 보이면서 병원 내 감염(Nosocomial infection)의 주요 균으로서 문제가 되고 있으며 *S. aureus*를 표적으로 하는 항생제 연구

*Corresponding author

Tel: +82-2-910-5767, Fax: +82-2-910-4415

E-mail: hhlee@kookmin.ac.kr

가 필요하다[6, 7]. 본 연구를 통하여 *S. aureus*를 표적으로 하는 항생제 개발을 위한 SA FtsZ 단백질의 폴리머 형성 모델 시스템을 구축하기 위해 SA FtsZ의 재조합 단백질을 대장균을 이용해 발현하여 정제하였고, 폴리머 형성 활성을 형광계를 이용하여 분석하였다. 본 연구의 결과는 *S. aureus*를 표적으로 하는 항생제 개발 연구에 응용될 수 있을 것이다.

재료 및 방법

PCR 및 유전자 클로닝

SA FtsZ 유전자를 증폭하기 위해서 *S. aureus* (strain COL)의 genomic DNA를 주형으로 이용하였으며, PCR을 위해 사용한 primer의 DNA 서열은 다음과 같다. Forward primer: 5'-GCTATATGGATCCCGAAAACCTGTATT-TTC-AGGGCATGTTAGAAATTTGAACAAGGATTTAATCATT-3' (밑줄은 BamHI 제한효소 절단부위, 굵은 글씨는 TEV 인식 부위), reverse primer: 5'-GCTAATTCTCGAGTCAAC-GTCTTGTCTTCTTGAACGTCTTTC-3' (밑줄은 XhoI 제한효소 절단부위). Forward primer의 경우, 단백질 발현 후의 정제 과정에서 TEV (Tobacco Etch Virus) protease를 이용한 polyhistidine tag 제거를 목적으로 5'말단에 TEV protease 인식 서열 (ENLYFQG, CGAAAACCTGTATTTTCAGGGC)을 삽입하였다. PCR 반응을 위해서 Maxime™ PCR PreMix (Intron Biotechnology社) kit를 사용하였다. SA FtsZ 유전자의 PCR 후에는 GeneAll^R Expin™ Combo GP (GeneAll Biotechnology社) kit를 이용하여 DNA를 정제하였다. 정제해서 나온 DNA에 BamHI(Fermentas社)과 XhoI (Fermentas社) 제한효소를 37°C 항온 수조에서 한 시간 동안 반응을 시켰다. 제한효소 처리가 끝난 후, GeneAll^R Expin™ Combo GP (GeneAll Biotechnology社) kit를 이용하여 DNA를 정제하였다. 발현 벡터의 경우, pRSFDuet-1 (Novagen社)에 BamHI (Fermentas社)과 XhoI (Fermentas社) 제한효소를 37°C 항온 수조에서 한 시간 동안 처리하여 제조하였고, GeneAll^R Expin™ Combo GP (GeneAll Biotechnology社) kit를 이용하여 gel extraction 방법으로 정제하였다. 정제 후에 alkaline phosphatase (New England Biolab社)를 37°C 항온 수조에서 1시간 동안 반응을 시키고, GeneAll^R Expin™ Combo GP (GeneAll Biotechnology社) kit를 이용하여 정제 하였다.

Ligation 반응은 2 μL SA FtsZ DNA (~30 ng/μL), 1.5 μL 발현 벡터 (~100 ng/μL), 1 μL 10X T4 DNA ligase 완충용액 (New England Biolab社), 0.5 μL T4 DNA ligase (New England Biolab社), 5 μL 증류수를 혼합한 후 22°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 ligation 혼합물 10 μL를 이용하여 대장균 XL1 Blue 세포에 형질전환 하였다. 클로닝 성공 여부는 colony PCR을 통해 확인하였다. Agarose gel 상에서 클로닝이 확인된 colony를 kanamycin

(50 μg/mL) 4 μL가 포함되어 있는 Luria-Bertani (LB) 배지 4 mL에 접종한 후 37°C에서 12시간 배양하였고 GeneAll^R Expin™ Plasmid SV (GeneAll biotechnology社) kit를 이용하여 플라스미드를 분리 및 정제를 하였다. 클로닝이 확인된 플라스미드는 DNA sequencing을 통하여 유전자 서열을 확인하였다.

재조합 단백질의 발현과 정제

정제된 플라스미드 DNA 1 μL를 대장균 BL21(DE3)star competent cell에 형질전환하여 kanamycin (50 μg/mL)이 첨가된 1 L LB 배지에 접종 후, 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 시 세포 밀도는 Scinco社의 S-3100 UV 분광광도계를 이용하여 측정하였고, 탁도가 0.7~0.8에 이르렀을 때 0.5 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside(IPTG)를 처리한 후, 20°C 에서 12시간 동안 배양하였다. 배양물은 5,000 rpm으로 30분간 원심분리를 하고 세포 pellet만 취하였다. 세포 pellet에 20 mM Tris-HCl (pH 7.9), 500 mM NaCl, 5 mM Imidazole 50 mL (A-완충용액)와 1 mM phenylmethylsulphonylfluoride(PMSF)를 넣어서 섞어준 후에, 초음파 파쇄기로 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포를 12,000 rpm 1시간 동안 원심분리를 하여 pellet을 버리고 상층액을 따로 모았다. 상층액을 A-완충용액으로 안정화시킨 Ni-sepharose 컬럼에 흘렸다. Ni-sepharose 흘린 후, 20 mM Tris-HCl (pH 7.9), 500 mM NaCl, 20 mM imidazole 용액으로 씻어서, imidazole 농도가 100 mM에서 500 mM이 되도록 농도 구배로 하여 용출을 하였다. 정제된 단백질은 12% sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 확인하였다. 정제된 단백질에 TEV protease를 5 mM β-mercaptoethanol과 함께 처리하여 (~0.3 mg/mL) 4°C에서 12시간 동안 처리하여 아미노 말단의 polyhistidine tag를 제거하였다.

Dialysis와 Bradford 방법을 이용한 FtsZ 단백질 농도 측정

TEV protease 처리 후 원심분리를 하여 상층액을 모은 후, 투석막 (SnakeSkin^R Pleated Dialysis Tubing, 10000 MWCO, Pierce社)을 사용하여 B-완충용액 (50 mM MES-NaOH pH 6.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂) 2 L에 4°C에서 12시간 동안 투석 처리를 하였다. 투석 처리가 끝난 용액에 남아있는 TEV protease와 절단이 안된 SA FtsZ 단백질을 분리하기 위하여 B-완충용액으로 안정화시킨 Ni-sepharose 컬럼에 다시 통과하여 제거한 후 컬럼에 붙지 않고 나온 SA FtsZ 단백질을 모았다. 단백질의 농도 측정은 Bradford 방법을 이용하였으며, Bio-Rad社의 protein assay kit (500-0002)의 bovine serum albumin을 표준시료로 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

FtsZ 단백질의 효소 활성

SA FtsZ의 *in vitro* 상에서의 폴리머 형성 활성을 측정하

기 위하여 Scinco社의 FS-II 형광계를 이용하여 폴리머의 형성에 따라 excitation 방향과 90° 방향으로 빛이 산란되는 현상을 이용하였다. Excitation 파장은 350 nm, emission 파장은 330-370 nm로 설정하였다. Excitation과 emission의 슬릿 간격은 둘 다 2.5 nm로 고정하였고 PMT voltage는 500 volt로 설정하였다. 형광 측정용 cuvette (path length: 1 cm)에 B-완충용액에 1 mM GTP를 넣고 330-370 nm에서의 emission을 관찰하고, 9.5 μM SA FtsZ 단백질에 B-완충용액과 1 mM GTP를 첨가한 후에 30°C에서 배양을 하면서 매 30 초마다 emission을 관찰하였다.

결과 및 고찰

FtsZ 단백질의 발현 및 정제

SA FtsZ 단백질 full length의 발현 및 정제는 대장균 발현 시스템을 이용하였으며, 단백질의 순도는 12% SDS-PAGE로 확인하였다(Fig. 1). Ni-sepharose 컬럼을 이용한 친화크로마토그래피에서 SA FtsZ 단백질은 100-300 mM imidazole에서 용출되었다. 그리고 아미노 말단에 결합되어 있는 polyhistidine tag를 제거하기 위해 TEV protease를 처리한 후 투석을 하고 Ni-sepharose 컬럼에 다시 통과하여 polyhistidine tag가 잘리지 않은 SA FtsZ 단백질을 제거하였으며, Ni-sepharose 컬럼에 통과되어 나온 SA FtsZ 단백질은 SDS-PAGE를 통해 95% 이상 순수하게 정제되었음을 관찰하였다(Fig. 1). SA FtsZ 단백질의 polyhistidine tag가 제거되었을 경우 크기가 41.1 kDa이기 때문에 SDS-PAGE에서 단백질 마커 위치인 37 kDa와 50 kDa 사이에서 나올 것으로 예측하였으나 Fig. 1에서 보듯이 ~50 kDa에 SA FtsZ 단백질이 위치하고 있는 것을 확인하였다. SA FtsZ 유전자가 클로닝된 벡터의 DNA 서열을 DNA sequencing을 통하여 확인하였으므로, SDS-PAGE 상에서 SA FtsZ 단백질의

크기가 이론값보다 크게 나온 이유는 SA FtsZ 단백질이 SDS-PAGE 상에서 실제 크기와 다르게 이동하기 때문인 것으로 예측되며, SA FtsZ 재조합 단백질이 본 연구에서와 같이 SDS-PAGE 상에서 ~50 kDa의 위치에서 관찰된 예는 다른 논문에서도 보고된 바가 있다[2].

Bradford 방법을 이용한 FtsZ 단백질의 농도 측정

SA FtsZ 단백질은 자외선 파장을 흡수하는 아미노산을 포함하지 않기 때문에 자외선 흡광도를 이용하여 단백질 농도를 측정할 수 없었고, Bradford 방법을 이용하여 단백질의 농도를 측정하였다[3]. BSA 단백질을 0 μg/mL, 50 μg/mL, 200 μg/mL, 400 μg/mL, 600 μg/mL, 1000 μg/mL의 농도로 각각 만든 후, Bradford 시약을 섞은 후에 분광계 (Triad LT, DYNEX technologies)에서 620 nm로 측정하였다. 이렇게 얻은 표준 점진선을 이용하여 SA FtsZ 단백질의 농도를 측정 한 결과 395 μg/mL (9.5 μM) 임을 확인하였다.

FtsZ 단백질의 효소 활성 측정

다른 박테리아의 FtsZ 단백질의 경우에도 형광계를 이용하여 excitation 빛의 방향과 90°를 이루는 방향에서 폴리머 형성 활성을 관찰한 예가 있다[10]. 대조군에서는 FtsZ 단백질이 단량체로 존재하므로 빛의 산란이 없다가, 실험군에서 GTP를 첨가했을 때 FtsZ 단백질의 폴리머 형성이 유도되어 excitation 빛의 90° 방향의 검출기에서 FtsZ 폴리머로부터 산란된 빛이 감응되는 방식이다[10]. 본 연구에서도 SA FtsZ 단백질의 폴리머 형성을 형광계를 이용하여 관찰하였는데, 먼저 SA FtsZ 단백질을 넣지 않고 폴리머 형성 완충용액 (B-완충용액, 50 mM MES pH 6.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂)만 가지고 emission을 측정하였을 때 폴리머 형성이 거의 되지 않았음을 알 수 있었다(Fig. 2). 이것은 GTP와 B-완충용액의 성분이 폴리머 형성을 하지 않았다는 것을 의미

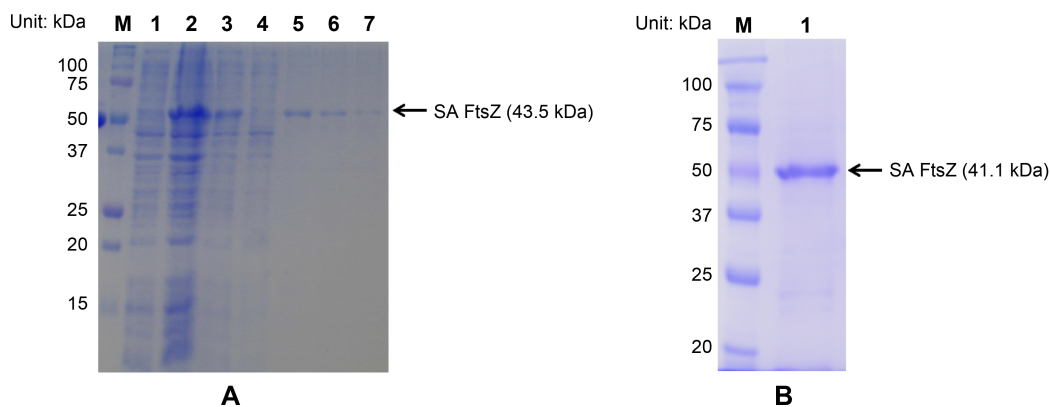


Fig 1. Expression and purification of recombinant SA FtsZ protein. (A) Lane M, protein size marker; lane 1, cell lysates of *E. coli* BL21(DE3)star before IPTG induction; lane 2, cell lysates after IPTG induction; lane 3, supernatant of the lysates after IPTG induction; lane 4, flow through of cell lysates after nickel affinity chromatography; lane 5, wash (20 mM imidazole); lane 6, 1st elution (100 mM imidazole); lane 7, 2nd elution (200 mM imidazole). The position of SA FtsZ protein is indicated as arrow. (B) Lane M, protein size marker; lane 1, SA FtsZ after treating with TEV protease.

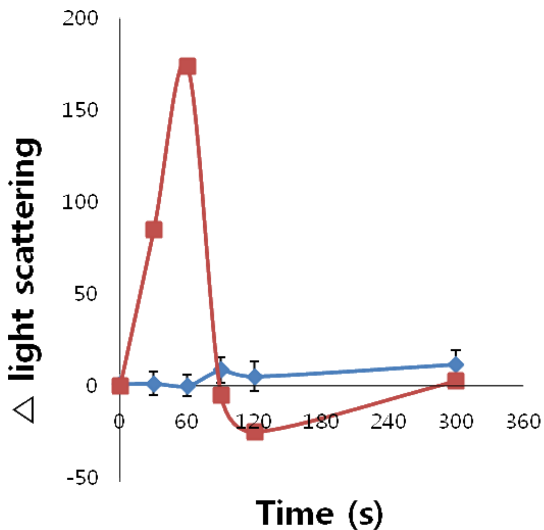


Fig 2. Polymerization assay of SA FtsZ. ◆: polymerization buffer (50 mM MES buffer pH 6.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, and 1 mM GTP), ■: 9.5 μM SA FtsZ in the polymerization buffer.

한다. 하지만 SA FtsZ 단백질에 GTP와 MgCl₂을 처리하였을 때, 반응 후 약 30초 전후로 하여 emission peak가 현저하게 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이것은 SA FtsZ 단백질에 GTP와 MgCl₂이 결합하여 폴리머를 형성했다는 것을 나타내며, 1분 전후로는 빛의 산란량이 급격하게 줄어든 것을 볼 수 있는데, 이것은 SA FtsZ 단백질의 GTPase 활성에 의해서 GTP가 분해되고, 이에 따라서 SA FtsZ 단백질의 폴리머가 분해되었기 때문이라고 예측된다(Fig. 2).

요 약

본 연구에서는 다제내성을 보이는 인체 병원균의 하나인 *S. aureus*에서 유래된 FtsZ 단백질의 유전자를 클로닝하고 대장균에 형질전환하여 재조합 단백질을 만들고, in vitro 상에서 폴리머 형성 활성을 측정하였다. Bradford 방법을 이용하여 SA FtsZ 단백질의 농도를 측정 후, SA FtsZ 단백질의 폴리머 형성 활성을 확인하기 위해 형광계를 이용하여 excitation 방향과 90°의 방향에서 산란되는 빛의 양을 측정하는 방법을 사용하였을 때 대조군에서는 빛이 산란되지 않았고, SA FtsZ 단백질에 GTP와 Mg²⁺를 처리한 실험군에서만 빛이 산란되는 현상을 관찰하였다. 1분여의 시간이 지난 이후에는 다시 산란되는 빛이 줄어드는 것을 볼 수 있는데, 이것은 SA FtsZ 단백질의 아미노말단 도메인의 GTPase 활성에 의해서 GTP가 분해되어서 SA FtsZ 단백질의 폴리머가 단량체로 분해되었기 때문이라고 예측된다. 본 연구를 통하여 확립된 SA FtsZ 활성 측정 방법은 향후 SA FtsZ 단백질의 폴리머 형성을 저해하는 방식으로 *S. aureus*를 표적으로 하는 항생제 후보물질 도출을 위한 스크리닝 방법으로 사용될 수 있을 것이다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korean government (MEST; grant No. 2012-0004085) and by the Research Program 2012 of Kookmin University. This work was also supported by the Seoul R&BD program (ST100072) and R&E program by the Seoul Science High School for Gifted Students.

REFERENCES

- Adams, D. W. and J. Errington. 2009. Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 642-653.
- Andreu J. M., C. Schaffner-Barbero, S. Huecas, D. Alonso, M. L. Lopez-Rodriguez, L. B. Ruiz-Avila, R. Núñez-Ramírez, O. Llorca, and A. J. Martín-Galiano. 2010. The antibacterial cell division inhibitor PC190723 is an FtsZ polymer-stabilizing agent that induces filament assembly and condensation. *J. Biol. Chem.* **285**: 14239-14246.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- de Boer, P., R. Crossley, and L. Rothfield. 1992. The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature* **359**: 254-256.
- Haydon, D. J., N. R. Stokes, R. Ure, G. Galbraith, J. M. Bennett, D. R. Brown, P. J. Baker, V. V. Barynin, D. W. Rice, S. E. Sedelnikova, J. R. Heal, J. M. Sheridan, S. T. Aiwale, P. K. Chauhan, A. Srivastava, A. Taneja, I. Collins, J. Errington, and L. G. Czaplowski. 2008. An inhibitor of FtsZ with potent and selective anti-staphylococcal activity. *Science* **321**: 1673-1675.
- Jevons, M. P., A. W. Coe, and M. T. Parker. 1963. Methicillin resistance in *Staphylococci*. *Lancet* **1**: 904-907.
- Kwon, Y. I., T. W. Kim, H. Y. Kim, Y. H. Chang, H. S. Kwak, G. J. Woo, and Y. H. Chung. 2007. Monitoring of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from medical environment in Korea. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 158-162.
- Löwe, J. and L. A. Amos. 1998. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* **391**: 203-206.
- Mukherjee, A. and J. Lutkenhaus. 1998. Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis. *EMBO J* **17**: 462-469.
- Mukherjee, A. and J. Lutkenhaus. 1999. Analysis of FtsZ assembly by light scattering and determination of the role of divalent metal cations. *J. Bacteriol.* **181**: 823-832.
- Osawa, M., D. E. Anderson, and H. P. Erickson. 2009. Curved FtsZ protolaments generate bending forces on liposome membranes. *EMBO J* **28**: 3476-3484.