

박테리아의 히스톤 유사 단백질에 의한 유전자 발현 조절

박신애^{1,2} · 이정신^{1,2*}

¹강원대학교 분자생명과학과, ²강원대학교 크리티컬존선도연구소

Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria

Shinae Park^{1,2} and Jung-Shin Lee^{1,2*}

¹Department of Molecular Bioscience, College of Biomedical Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

²Critical Zone Frontier Research Laboratory, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

(Received February 6, 2018; Revised March 5, 2018; Accepted March 8, 2018)

A prokaryotic cell has various histone-like proteins also known as nucleoid-associated proteins (NAPs). These proteins bind AT-rich sequence at DNA, which induce DNA wrapping, bending, and bridging, and subsequently regulate the gene expression in bacteria. Because NAPs function in transcriptional silencing of virulence genes, it is important to study their roles in gene silencing and specific mechanisms of these proteins. In this review, we discussed two well-known NAPs, H-NS, and HU, and summarized their roles for gene expression in *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium. Through the oligomerization and filamentation of H-NS, it represses the expression of virulence genes in human pathogenic bacteria, such as *Salmonella* Typhimurium, and it works with other NAPs positively or negatively. Recently, H-NS also regulates typhoid toxin expression, which causes typhoid fever and systemic disease in human. Additionally, HU regulates the expression of genes related to both virulence and physiology of *Salmonella*. Therefore, we suggest that NAPs like H-NS and HU are crucial factors to reveal the molecular mechanisms of virulence gene expression in bacteria.

Keywords: gene expression, histone-like protein, H-NS, HU, NAP

원핵 세포와 진핵 세포 모두 DNA와 결합하여 DNA의 구조를 변화시키는 단백질들이 존재한다. 진핵 세포에는 DNA 결합

단백질로 히스톤(histone)이 있는데, 히스톤 단백질의 기능에 대한 연구는 매우 많이 이루어져 있다. 히스톤은 단백질 자체가 양성 전하를 띠고 있어 음성 전하를 띤 DNA와 결합하여 크로마틴(chromatin)의 구조 변화에 영향을 미칠 뿐 아니라, 다양한 효소들에 의하여 번역 후의 변형(post-translational modification)이 일어난다. 이러한 히스톤의 변형은 크로마틴 구조와 유전자의 발현에 많은 영향을 줄 수 있다(Bannister and Kouzarides, 2011). 원핵 세포에도 히스톤 단백질과 같이 DNA에 결합하는 단백질이 존재하는데, 이것을 히스톤 유사 단백질(histone-like protein)이라고 한다. 하지만, 히스톤 유사 단백질이란 이름이 이 단백질들이 가지고 있는 고유 기능과는 다르다는 주장이 있어서, 보편적으로 핵양체 연합 단백질(nucleoid-associated protein, NAP)라고 불리고 있다(Drlica and Rouvière-Yainv, 1987; Dorman and Deighan, 2003; Dillon and Dorman, 2010). 원핵 세포는 많은 종류의 다양한 NAP를 가지고 있지만, 아직 이들이 구체적으로 어떻게 유전자 발현을 조절하는가에 대한 연구는 충분하지 않다. 대부분의 NAP는 DNA에 결합할 수 있어, DNA를 구부리거나(bending), 감싸고(wrapping), 또는 인접하고 있는 DNA와 DNA 사이의 다리 역할(bridging)을 하여 DNA의 방향과 구조에 영향을 줄 수 있다(Dillon and Dorman, 2010). 따라서 본 논문에서는 NAP가 유전자 발현을 어떻게 조절하는지 알기 위하여, 현재까지 보고된 NAP의 유전자 발현 조절에 관한 연구들을 정리하였다. 특별히, 그 종류가 다양한 NAP 중에서 가장 잘 알려져 있는 H-NS와 HU 단백질의 구조

*For correspondence. E-mail: jungshinlee@kangwon.ac.kr;
Tel.: +82-33-250-8540; Fax: +82-33-259-5641

와 특징을 서술하고, 이들이 어떤 유전자들의 발현에 영향을 미치는지에 대하여 정리하였다.

본 론

그람 음성균의 대표적인 NAP인 H-NS의 구조와 특징

가장 잘 알려진 NAP로는 Histone-like Nucleoid Structuring protein (H-NS)이 있다. H-NS 단량체(monomer)는 15.5 kDa의 작은 단백질로, 처음에는 단순히 DNA의 구부러진 부분에 잘 결합할 수 있다고 알려졌으나, 현재는 DNA 이중나선의 minor groove와 AT-rich 서열에 잘 결합한다는 것이 알려졌다 (Navarre *et al.*, 2006; Grainger, 2016; Singh *et al.*, 2016). H-NS는 처음에 *Escherichia coli*에서 발견되었으며, *Salmonella* 뿐만 아니라 이와 가까운 그람 음성균들에 많이 존재하고 있다. *E. coli*의 H-NS 구조를 보았을 때, N-말단에 4개의 α -helix ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$) 구조를 가지고 있고, 이 부분을 이용하여 다른 H-NS와 결합하여 올리고머화(oligomerization)를 할 수 있다. $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ 도메인을 이용하여 head-to-head 결합, $\alpha 3$ 와 $\alpha 4$ 도메인을 이용하여 tail-to-tail 결합을 할 수 있다 (Esposito *et al.*, 2002; Bloch *et al.*, 2003; Cerdan *et al.*, 2003; Arold *et al.*, 2010). C-말단 부위는 DNA에 결합할 수 있는 도메인으로 두 개의 β -Sheet ($\beta 1$, $\beta 2$)와 5번째 α -helix ($\alpha 5$) 그리고 3_{10} helix를 가지고 있다. H-NS는 $\beta 2$ 와 α -helix를 포함하고 있는 side chain 사이에 존재하고 있는 고리(loop) 구조를 이용하여 DNA의 minor groove의 AT-rich 서열에 결합한다 (Gordon *et al.*, 2011). 그리고, H-NS의 올리고머화로 인해 형성된 DNA의 필라멘트 구조는 그 결합 자체로 유전자 발현을 억제할 수 있음이 밝혀졌는데, 특히 *Pseudomonas aeruginosa*의 H-NS family 중 하나인 MvaT를 결핍시켰을 때, higher-order 구조의 필라멘트가 형성되지 않을 뿐만 아니라, 이와 동시에 DNA가 필라멘트 구조를 형성하고 있을 때, 억제되어 있던 유전자들이 발현되는 것을 확인하였다 (Winardhi *et al.*, 2012). 그리고 H-NS는 DNA와 DNA를 연결하는 DNA-bridging을 일으켜, DNA-H-NS-DNA로 이루어진 다리(bridge) 구조를 형성하여 전사과정을 억제할 수 있다 (Amit *et al.*, 2003; Dame *et al.*, 2005). *E. coli*와 *Salmonella*를 이용한 Chromatin immunoprecipitation (ChIP) 실험을 통해, DNA와 결합하고 있는 H-NS 필라멘트 구조를 알 수 있는데, 이 필라멘트 구조는 온도와, Mg^{2+} 농도, pH 등과 같은 환경적인 요소의 변화에 따라 조금씩 다른 결과를 보였다 (Liu *et al.*, 2010). 대표적인 예를 들어, Liu 등(2010)은 *in vitro* 실험을 통하여, H-NS가 5 mM 이하의 Mg^{2+} 농도에서는

하나의 이중나선의 DNA에만 결합하고 있는 linear 필라멘트를 형성하고 있는 것을 관찰하였으나, 5 mM 이상의 Mg^{2+} 농도에서는 두 이중나선 DNA와 bridged 필라멘트를 형성할 수 있음을 확인하였다 (Fig. 1). 그리고, H-NS는 AT-rich 서열이 많은 프로모터 근처에서 DNA-bridging을 일으켜, RNA 중합효소를 가두어버린다 (Lim *et al.*, 2012). 이와 같이 H-NS의 구조 자체와 H-NS의 올리고머화, 그리고 유전자 발현 억제와의 관계를 밝히려는 연구들이 활발하게 진행되었다. 이러한 연구의 일부로 H-NS의 올리고머화와 DNA 결합에 중요한 도메인에 있는 몇 가지 아미노산 잔기를 다른 아미노산으로 치환하여 만든 point mutant를 이용한 실험들이 많이 진행되었다. 그 중에서도 H-NS의 아미노산 서열 21번~63번째 사이의 지역은 H-NS dimerization에 중요한 위치로 알려져 있는데, 그 중에서도 30번째 아미노산인 Leucine을 다른 아미노산으로 치환시킨 돌연변이(L30D, L30P)는 유전자 발현을 억제하는 기능을 더 이상 수행할 수 없었다. 하지만 L30K 돌연변이 같은 경우에는 wild type과 비슷하게 silencing이 다시 회복되는 것을 알 수 있었다 (Ueguchi *et al.*, 1996, 1997; Lim *et al.*, 2012). 이런 결과를 통해서, H-NS의 올리고머화에 중요한 아미노산 잔기 하나의 변화로 인해, H-NS의 전체적인 입체구조에 변화가 발

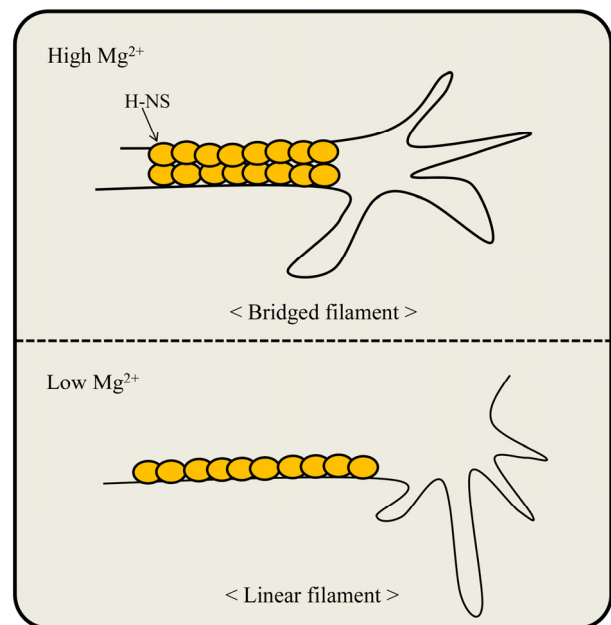


Fig. 1. The formation of filament structure by H-NS. Oligomerization of H-NS makes two different filamentous structures with DNA, linear and bridged filament, according to environmental conditions. For example, Liu *et al.* (2010) observed that H-NS formed a bridged filament in high Mg^{2+} concentrated buffer and formed a linear filament in low Mg^{2+} concentrated buffer (Black line indicates double-stranded DNA).

생하여, 유전자 발현이 억제 혹은 다시 정상화될 수 있다는 사실을 알 수 있었다. 또, 이는 H-NS의 dimerization 자체가 H-NS의 기능에 중요하다는 것을 보여 주며, 필라멘트 구조에 따른 유전자 발현 억제가 H-NS의 직접적인 결합에 의한 것임을 더 확실히 알 수 있었다. H-NS의 C-말단 도메인은 다른 H-NS와 dimerization하기보다는 DNA 결합 활성이 있는 지역으로 알려졌는데, 115번째 아미노산인 proline을 alanine으로 치환하면, DNA 결합 활성 자체에는 이상이 없으나, H-NS의 올리고머화에 문제가 발생하였다(Spurio *et al.*, 1997). 이러한 결과를 토대로, H-NS의 입체구조 변화로 인해 C-말단 도메인도 N-말단의 단백질-단백질간 결합에 영향을 미칠 수 있음을 알 수 있었다.

H-NS의 DNA 결합과 유전자 발현 조절

*E. coli*와 *Salmonella*를 이용한 ChIP-seq 분석을 통하여 H-NS가 결합하는 DNA 지역과 특정 모티프가 밝혀졌다(Grainger *et al.*, 2006; Kahamanoglou *et al.*, 2011). 앞에서 언급하였듯이, H-NS는 AT-rich 염기서열에 잘 결합할 수 있는데, 특히 수평적 유전자 이동(horizontal gene transfer, HGT)으로 얻어진 유전자 부위는 AT-rich라는 특징을 가지고 있기 때문에, 이로 얻어진 독성(virulence) 유전자들은 H-NS에 의해 발현이 억제된다. H-NS는 5~6 nucleotide로 이루어진 oligonucleotide에 결합한다고 알려져 있다(Lucchini *et al.*, 2006; Kahramanoglou *et al.*, 2011). H-NS가 일단 결합하면 다른 H-NS를 불러 들여와, H-NS의 spreading이 이루어져서, 짧게는 0.5 kb에서 길게는 50 kb의 DNA와 결합하여 필라멘트 구조를 형성한다(Kotlajich *et al.*, 2015). Kahamanoglou 등(2011)은 이때 1 kb 이하의 비교적 짧은 H-NS 결합 부위를 “short H-NS”와 1 kb 이상의 긴 부위를 “long H-NS”로 분류하였는데, HGT로 얻어진 유전자들은 대부분 long H-NS에 속한다는 사실을 알 수 있었고, 이는 HGT로 얻어진 유전자들이 전체 유전체에서 다른 유전자들보다 평균이상의 AT 염기서열을 가지고 있음을 뒷받침한다. 실제로 *hms* 유전자가 결실된 Δhms 돌연변이를 가지고 전체적인 전사체의 레벨을 보았을 때, H-NS가 결합하고 있는 유전자들의 상당수가 전사 레벨에서 증가되어 있다는 것을 알 수 있었다. 이는 H-NS가 직접적으로 결합하고 있는 유전자들의 발현을 살펴본 것인데, 이와 반대로 H-NS의 결합이 없지만 Δhms 돌연변이에서 이동성(motility)과 관련된 표현형(phenotype)을 잃어버리는 경우를 발견할 수 있었다. 실제로 이동성에 관여하는 유전자들은 H-NS의 결합이 없어 직접적으로 영향을 받는 유전자가 아니라는 것을 알 수 있었다. 이처럼, H-NS는 독성과 관련된 유전자뿐만 아니라, 미생물의 생리적 기능에

중요한 유전자의 발현에도 중요한 DNA 결합 단백질을 알 수 있었다.

H-NS의 *Salmonella* 독성 유전자 발현 조절

*Salmonella*는 HGT로 얻어진 *Salmonella* pathogenicity island (SPI)를 총 5개 가지고 있고, 현재까지 SPI-1, SPI-2 유전자와 H-NS와의 관계에 대한 연구들이 활발하게 진행되고 있다. 먼저 SPI-1 유전자들은 *Salmonella*가 장내 상피세포에 침투할 때에 필요한 유전자들이고, SPI-2 유전자들은 대식세포(macrophage) 내 생존과 증식에 필요하여 결국에는 최종적으로 systemic disease를 유발한다고 알려져 있는 유전자들이다(Ellermeier and Slauch, 2007; Fass and Groisman, 2009). SPI-1 유전자들의 전사 조절자(transcriptional regulator)로 알려진 HilD는 SPI-1 내에 존재하는 한 유전자의 생성물이다. 이전 연구를 통해, HilD가 SPI-2 전사조절자인 *ssrAB*의 발현을 유도할 수 있다는 것이 밝혀지면서 SPI-1과 SPI-2 사이에는 transcriptional crosstalk이 있다고 여겨진다(Fig. 2)(Bustamante *et al.*, 2008). Martinez 등(2014)에 의해 밝혀진 바에 따르면, *Salmonella*가 독성 유전자를 발현해야 하는 상황에서 HilD가 *ssrAB* 유전자에 결합하여, *ssrAB*의 발현을 억제하고 있는 H-NS에 길항적으로 작용하기 때문에 *ssrAB*의 전사를 촉진시킬 수 있다(Fig. 2). 또한,

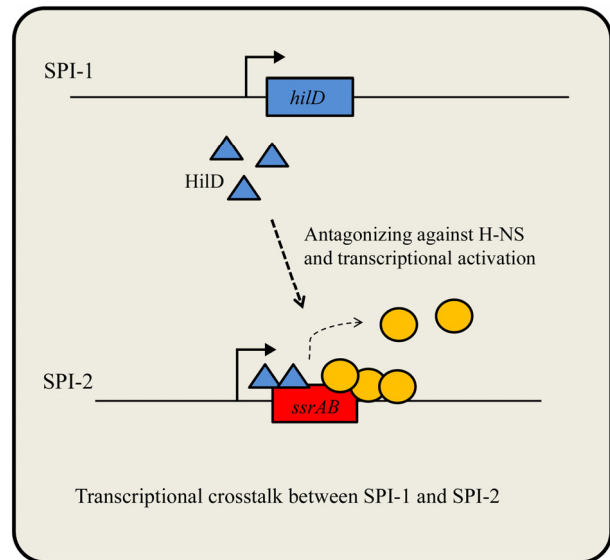


Fig. 2. Transcriptional crosstalk between SPIs (*Salmonella* pathogenicity islands). HilD plays a role in regulating transcription of SPI-1 genes and it also located in SPI-1. According to Bustamante *et al.* (2008) HilD can induce expression of *ssrAB*, which is a transcriptional regulator of SPI-2 genes and they suggested there is a transcriptional crosstalk between SPI-1 and SPI-2. Especially, when virulence genes are required for *Salmonella*'s survival, HilD binds to *ssrAB* and acts antagonistically against to H-NS.

SsrB 자체가 H-NS의 결합을 대체하여 H-NS에 의하여 유도되는 유전자 발현 억제를 완화시켜, 전사를 활성화시킬 수 있다 (Walthers *et al.*, 2007). 이렇게 *Salmonella* 뿐만 아니라, 병원성을 가지고 있는 다양한 세균들은 침입한 숙주의 면역반응에 대응해서 살아남기 위하여, 독성 유전자를 발현시켜야 하기 때문에, H-NS에 의한 유전자 발현 억제를 극복해야 한다. 하지만, 숙주인 사람의 입장에서서는 이런 병원성 세균들의 독성 유전자 발현 억제가 유지되어야 한다. 그러므로, H-NS에 의한 병원성 유전자의 억제와 이 유전자의 발현이 다시 유도되는 일반적인 메커니즘을 규명하는 일은 매우 중요하다(Fig. 3).

최근에 발표된 논문에 의하면, *Salmonella*가 사람에게 감염되었을 때에만 분비하는 typhoid toxin의 유전자도 H-NS에 의해서 조절된다. Typhoid toxin은 여러 소단위체들로 이루어진 단백질로, *Salmonella*에 감염된 사람의 세포 내에 존재하는 *Salmonella*를 함유하고 있는 액포(*Salmonella*-containing vacuole, SCV)의 lumen의 안쪽으로 분비된다. *Salmonella*의 typhoid toxin은 SCV 환경에서만 발현되고, 그 외 환경에서는 발현이 억제되어 있는데, 이 때 이 발현을 H-NS가 억제하고 있다(Fowler and Galan, 2018). 이를 통해, H-NS가 *Salmonella*와 같은 병원성 세균의 독성유전자 발현에 중요한 단백질로, H-NS를 이용

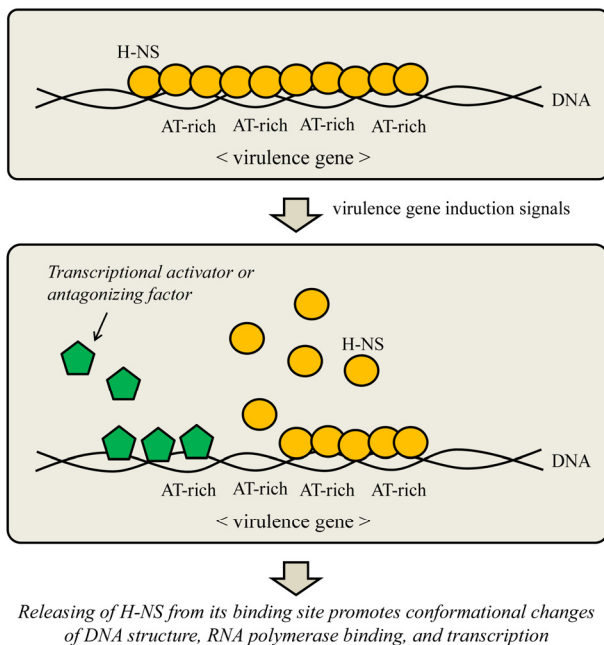


Fig. 3. The regulation of virulence gene expression by H-NS. Under normal condition, expression of virulence genes is repressed in pathogenic bacteria. However, when bacteria meet some signals (e.g. immune response of host) that trigger the expression of virulence genes, H-NS proteins are released from their binding site by some factors such as transcriptional activator or antagonizing factor.

하여 병원성 유전자를 억제시키는 새로운 물질을 개발하는 연구가 필요함을 제시할 수 있다.

H-NS와 다른 Nucleoid-associated Proteins들에 의한 유전자 발현 조절

H-NS는 자신들끼리 homodimer를 이루어 올리고머화할 수 있지만, 다른 NAP들과 heterodimer를 이루어 전사를 조절할 수 있다. *E. coli*는 3가지 H-NS 유사 단백질(StpA, Hha, YdgT)을 가지고 있고, 이 세 가지 NAP는 H-NS와 결합할 수 있다고 잘 알려져 있다(Johansson and Uhlin, 1999; Nieto *et al.*, 2002; Paytubi *et al.*, 2004). 특히, Hha는 8 kDa의 작은 단백질로 DNA 자체에는 결합할 수 없지만, 이 단백질의 N-말단 지역에 H-NS의 올리고머화에 필요한 도메인과 비슷한 도메인을 가지고 있어, H-NS와 결합할 수 있다. Hha는 *E. coli* 5K에서 haemolysin 오페론(*hlyCABD*)의 억제자로도 알려져 있을 뿐만 아니라, *Salmonella*에서는 Hha도 H-NS의 조절을 받고 알려진 독성 유전자들의 발현 또한 크게 증가하였다(Nieto *et al.*, 2000). 그리고 Hha와 YdgT을 불활성화시키면, H-NS의 target으로 잘 알려져 있는 HGT로 얻어진 유전자들의 발현 또한 많이 유도되었다(Ueda *et al.*, 2013). 이는 Hha와 YdgT가 단순히 H-NS와 결합할 수 있는 능력만 가지고 있는 것이 아니라, 유전자 발현 억제에도 관여할 수 있음을 보여준다. 이와 같이 H-NS와 함께 작용하여 유전자 발현을 조절하는 NAP가 있다면, 반대로 H-NS에 의한 유전자 발현 억제를 방해하는 NAP도 있다. H-NS에 의한 전사 억제에 있어서 대표적인 모델은 H-NS의 올리고머화에 의하여 DNA가 헤어핀구조를 형성하게 되면, 그 안에 RNA 중합효소가 갇혀 전사를 진행시키지 못하는 것이다. 예를 들어, *rnmB* ribosomal RNA 유전자의 프로모터 부근에 H-NS가 올리고머화를 하고 있으면, RNA 중합효소는 전사 개시 부위에 결합하여 앞으로 전진하지 못하게 된다(Schroder and Wagner, 2000). 하지만 이때, Fis라는 NAP가 전사 개시 부위 근처에 결합함으로써, DNA와 DNA 사이의 벌어짐을 유도하여 H-NS 필라멘트 구조에 의한 유전자 발현 억제에 대하여 길항적인 효과를 일으킨다. Fis는 그람음성균에 존재하는 11 kDa의 NAP로 DNA를 구부리는 등의 활성을 가지고 있는 단백질이다(Schneider *et al.*, 2003).

HU 단백질의 구조와 다양한 유전자 발현의 조절

HU 또한 가장 많이 존재하고 있는 NAP중 하나로, 처음에 histone-like protein from *E. coli* U93으로 발견되었고, *E. coli*에 많이 존재하는 NAP일 뿐만 아니라, 여러 다양한 세균에 존재하고 있다(Rouvière-Yaniv and Gros, 1975). HU는 9~10 kDa의

로 H-NS보다 작은 단백질로 α -subunit과 β -subunit으로 이루어져 있고, 각각 *hupA*와 *hupB* 유전자에 암호화되어 있다 (Kano *et al.*, 1985, 1987). 이 두 소단위체는 N-말단 지역의 α -helix 구조를 통해 homodimer ($HU_{\alpha 2}$, $HU_{\beta 2}$)나 heterodimer ($HU_{\alpha\beta}$)를 형성하여 기능한다(Claret and Rouvière-Yaniv, 1997). 이 세 형태의 HU dimer는 성장 단계에 따라 각 HU dimer의 양이 달라지지만, $HU_{\alpha\beta}$ 가 모든 성장 단계에서 대부분을 차지한다. 그리고, HU는 DNA에 비교적 비특이적으로 결합하지만, 일단 DNA에 결합하면 HU와 DNA 사이의 협동적인 복합체가 형성되어 DNA 구조가 안정화되면서, DNA의 구부러짐을 유도한다(Swinger *et al.*, 2003). 또, HU는 DNA에 결합할 수 있을 뿐만 아니라, RNA에 결합하여 전사 후에 단백질 합성을 방해할 수도 있다고 알려져 있다(Balandina *et al.*, 2001). Oberto 등(2009)은 *E. coli*의 HU 유전자 결핍 돌연변이가 성장에 결함을 보이며, 다양한 표현형을 보여 준다는 것을 알았기 때문에, 이 돌연변이의 전사체를 분석하여 다양한 종류의 유전자 발현에 있어서 HU의 역할을 밝히려고 하였다. 먼저, HU는 삼투압 조절과 supercoiling, 그리고 acid-stress에 관여하고 있는 유전자의 발현을 조절하고 있다. Mangan 등(2011)은 또한 HU에 영향을 받는 유전자를 알아보기 위하여, *Salmonella*에서 *hupA*와 *hupB*를 각각 혹은 모두 결핍시킨 돌연변이를 만들어 전사체를 분석을 수행하였다. 그 결과, $\Delta hupA \Delta hupB$ 모두 결핍된 돌연변이에서 많은 유전자들의 발현이 증가되거나 감소된 것을 확인하였다. 특히, 발현이 감소된 유전자들 중에서, H-NS의 결합으로 인해 그 발현이 감소된다고 알려진, SPI-1과 SPI-2 유전자들이 HU의 모든 유전자가 결핍됨에 따라 많은 감소가 일어난다는 것을 알 수 있었다. 따라서, 비록 HU의 이런 기능은 H-NS와 반대되는 역할이지만, HU 또한 *Salmonella*의 독성 유전자 발현 기작을 규명하는 데 있어서 중요한 단백질임을 알 수 있었고, 독성과 직접적으로 관련된 유전자는 아니지만, 이동성 그리고 호흡 및 대사 기능에 관련된 유전자의 발현에도 많은 영향을 주는 것을 확인하였다. 이 돌연변이들의 표현형질을 살펴 본 결과, 상피세포에 침투하는 능력 또한 감소된 것을 알 수 있었다(Mangan *et al.*, 2011). 따라서, HU 단백질은 독성 유전자들뿐만 아니라, *Salmonella*의 physiology 자체에 관련된 유전자들을 조절할 수도 있기 때문에, 병원성 세균의 연구에 있어서 반드시 필요한 target 단백질로 생각할 수 있다.

환경 변화와 HU 발현의 관계

미생물은 끊임없이 다양한 환경에 적응해 나가기 위해 여러 방법을 동원한다. 예를 들어 병원성의 미생물은 사람의 면

역반응에 대응하여 살아남기 위하여 독성유전자를 발현시키고, 온도나 삼투압과 같이 자신이 살아가는 환경이 변하면, 이에 반응하여 필요한 유전자는 발현시키고 불필요한 유전자는 그 발현을 억제한다. 지난 연구를 통해서 실험실 환경에서 *E. coli*를 최적온도인 37°C에서 배양하다가 15°C 이하의 낮은 온도로 배양 온도를 바꾸는 cold shock을 주었을 때 다양한 대사 상태의 변화를 보였다(Giangrossi *et al.*, 2002). 예를 들어, *E. coli*는 cold shock을 받자마자 즉시 CspA라는 cold shock 단백질을 발현하거나, NAP인 H-NS와 GyrA의 유전자의 발현 또한 유도하였다. 핵양체(Nucleoid)의 구조는 cold shock 이후에 DNA supercoil뿐만 아니라 다양한 DNA 재배열(rearrangement)과 응축(condensation)을 겪는다(La Teana *et al.*, 1991; Jones *et al.*, 1987; Bae *et al.*, 1997; Mitta *et al.*, 1997). 따라서 Giangrossi 등(2002)은 *E. coli*뿐만 아니라, 다른 미생물에도 많이 존재하고 있는 NAP인 HU가 cold shock 이후에 어떻게 달라지는지 확인하였다. 이들은 cold shock을 겪은 *E. coli*의 HU_{α} 와 HU_{β} 의 유전자인 *hupA*와 *hupB*의 발현양을 살펴보았다. 이때, *hupA*의 프로모터는 그 기능을 제대로 하지 못하거나 발현된 전사체가 매우 불안정한 형태를 가지고 있는 반면 *hupB* 유전자의 발현은 매우 안정적으로 일어나고, 활발하게 번역이 이루어지

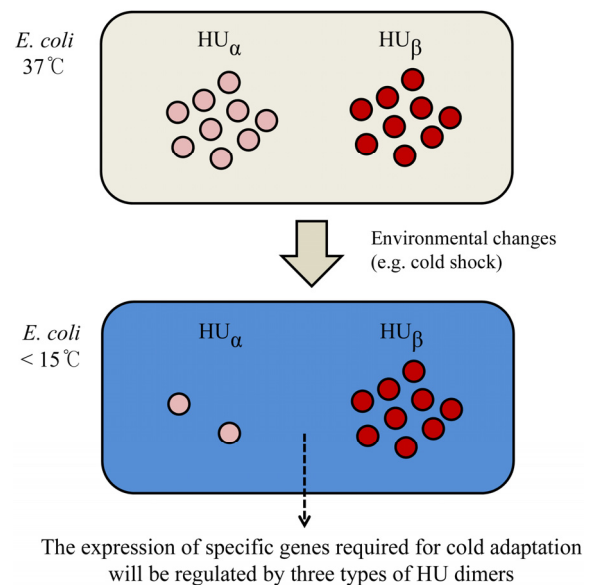


Fig. 4. The expression of HU subunits affected by temperature. In *E. coli*, the expression of HU subunits is altered while the temperature is shifted from optimal temperature (37°C) to low temperature (< 15°C). A downshift in temperature, which is also called as cold shock, induces different expression of two HU subunits, HU_{α} and HU_{β} , respectively. Subsequently, three types of HU dimer ($HU_{\alpha 2}$, $HU_{\beta 2}$, and $HU_{\alpha\beta}$) are assembled in different quantities compared with those at optimal temperature. Therefore, three different HU dimers promote or repress expression of genes for cold adaptation.

고 있음을 알 수 있었다. 그리고, *hupB* 결핍 돌연변이에서 *hupA*의 mRNA 레벨이 WT보다 다소 증가된 것을 알 수 있었는데, 이는 HU $_{\beta}$ 의 억제를 받던 *hupA*의 전사 억제가 약화되었기 때문으로 생각될 수 있었다. 실제로, *hupA*와 *hupB*의 발현은 성장 단계에 따라서 달라질 수 있고, 이들이 형성하는 HU dimer의 종류도 달라질 수 있다. 그렇기 때문에 형성된 세 가지의 HU dimer의 기능도 서로 다르다. HU $_{\alpha\beta}$ heterodimer의 경우 stationary phase 동안 cell viability 유지에 매우 중요한 반면 HU $_{\beta}$ homodimer는 DNA 구조에 있어서 매우 중요하다고 알려져 있다(Miano *et al.*, 1982; Claret and Rouvière-Yaniv, 1997). 따라서 cold shock 동안에, HU $_{\alpha}$ dimer의 발현은 억제되고, HU $_{\beta}$ dimer의 발현이 촉진되는 것은 낮은 온도 환경에서 미생물이 적응해 나가기 위하여 필요한 유전자들의 발현이나 대사과정에 있어서 중요한 일임을 생각해 볼 수 있다(Fig. 4). 따라서 본 논문은 이렇게 NAP가 독성 유전자의 발현뿐만 아니라, 미생물이 살아가는 환경 적응에 있어서 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 통하여, 특정 미생물의 NAP 발현 양상을 이용하여 환경 적응에 따른 후성 유전학적 모델을 개발할 수 있음을 제시한다.

결론

현재까지 진핵 세포의 히스톤 단백질이 유전자 발현에 미치는 영향에 대해서는 활발하게 연구가 되어 이들의 역할이 잘 규명되고 있지만, 원핵 생물인 세균이 가지고 있는 히스톤 유사 단백질이 구체적으로 어떻게 유전자 발현에 영향을 미칠 수 있는지는 정확하게 규명되고 있지 않다. 따라서, 본 논문은 잘 알려진 핵양체 결합 단백질(NAP)인 H-NS와 HU의 구조와 특징, 그리고 이들이 유전자 발현에 미치는 영향을 정리하여 두 단백질의 연구가 중요함을 제시하였다. 특히, 병원성 세균으로 알려진 *Salmonella*를 이용한 실험의 결과와, 이들의 독성 유전자들의 발현에 H-NS와 HU가 미치는 영향을 정리하였다. 먼저 H-NS는 homodimer를 형성하여 AT-rich 염기서열을 가지고 있는 DNA에 결합하여 필라멘트 구조를 형성하는데, 이때의 길이는 아주 짧은 것부터 긴 것까지 다양하다. 특히, *Salmonella*에서 수평적 유전자 이동(HGT)을 통하여 획득된 SPI-1과 SPI-2 유전자의 발현억제에 관여하고 있으며, SPI-1의 HilD는 SPI-2 유전자의 전사 조절자인 *ssrAB* 유전자에 결합하여 H-NS를 대체함으로써 *ssrAB*의 전사를 촉진시킨다. 그리고 HU는 주로 heterodimer를 형성하고 비특이적으로 구부러진 DNA 구조에 잘 결합하여 DNA 구조를 안정화시키는 단백질로 잘 알려

져 있다. HU가 *Salmonella*의 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, HU의 유전자를 제거하였을 때, *Salmonella*의 독성 유전자를 비롯하여 *Salmonella*의 physiology에 관여하고 있는 많은 유전자의 발현에 영향을 미쳤다. 하지만, 현재까지 H-NS와 HU 단백질 모두 구체적으로 어떤 신호에 의하여 DNA로부터 떨어져 나가, 이들이 억제하고 있는 유전자들의 발현이 이루어지는가에 대해서는 밝혀지지 않았다. 따라서 본 논문에서는 아직 구체적으로 정리되지 않은 두 단백질의 유전자 발현 조절 기작을 밝히기 위한 분자생화학적 실험이 많이 이루어져야 함을 제시할 수 있었다. 실제로, H-NS와 HU 두 단백질은 온도와 같은 외부 환경에 반응하여 그 발현양이 달라질 수 있고, 이들의 영향을 받는 유전자들의 발현 또한 조절할 수 있다고 잘 알려져 있다. 따라서, 실험실 환경에서 다양한 환경 조건에 변화를 주어 두 단백질이 다양한 환경에 변화에 적응하기 위하여 어떤 역할을 할 수 있는지 규명하는 연구가 필요하고, 병원성 세균의 유전자 발현 억제를 제어하기 위해서, 두 단백질의 구체적인 유전자 발현 조절 기작을 알아내는 일은 매우 흥미로운 연구일 것임을 제안한다.

적요

원핵 세포는 핵양체 결합 단백질(NAP)로 알려진 다양한 히스톤 유사 단백질을 가지고 있다. 이들은 DNA의 AT-rich 서열에 결합하여, DNA 자체를 감싸거나, 구부러지거나, 떨어져 있는 DNA 가닥을 연결시키는 다리 역할을 하여, 결국에는 원핵 생물의 유전자 발현을 조절한다. NAP는 특히 전사의 억제 기능을 가지고 있기 때문에, 유전자 발현 억제에 있어서 이들의 역할과, 구체적인 메커니즘을 밝히는 것을 매우 중요한 일이다. 본 논문에서는 잘 알려져 있는 NAP인 H-NS와 HU에 대하여 정리하였고, 특히 *E. coli*와 *Salmonella Typhimurium*에서 이들의 유전자 발현에 대한 기능을 요약하였다. H-NS는 이들의 올리고머화와 필라멘트 구조 형성을 통하여 *Salmonella*와 같은 사람에게 감염하는 병원성 세균의 독성유전자 발현을 억제할 수 있고, 이런 기능을 수행하였을 때 다른 NAP와 함께 작용할 수 있다. 최근에 H-NS는 사람에게 typhoid fever와 systemic disease를 발생시키는 독성물질인, typhoid toxin의 발현 또한 조절할 수 있음이 밝혀졌다. *Salmonella*에서 HU 또한 독성 유전자뿐만 아니라, 이들의 생리적 기능에 중요한 유전자들의 발현을 조절할 수 있다. 따라서, H-NS와 HU와 같은 NAP들이 원핵 생물의 독성 유전자 발현의 분자적인 메커니즘을 밝히는 데 중요한 요소임을 제시한다.

감사의 말

이 논문은 2016년도 강원대학교 학술연구구성비(D1000978-01-01)와 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원(NRF-2013R1A1A3008065, NRF-2015R1D1A1A02061743, NRF2015R1A4A1041105)을 받아 수행되었다.

References

- Amit, R., Oppenheim A.B., and Stavans, J. 2003. Increased bending rigidity of single DNA molecules by H-NS, a temperature and osmolarity sensor. *Biophys. J.* **84**, 2467-2473.
- Arold, S.T., Leonard, P.G., Parkinson, G.N., and Ladbury, J.E. 2010. H-NS forms a superhelical protein scaffold for DNA condensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 15728-15732.
- Bae, W., Jones, P.G., and Inouye, M. 1997. CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*, negatively regulates its own gene expression. *J. Bacteriol.* **179**, 7081-7088.
- Balandina, A., Claret, L., Hengge-Aronis, R., and Rouviere-Yaniv, J. 2001. The *Escherichia coli* histone-like protein HU regulates rpoS translation. *Mol. Microbiol.* **39**, 1069-1079.
- Bannister, A.J. and Kouzarides, T. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **21**, 381-395.
- Bloch, V., Yang, Y., Margeat, E., Chavanieu, A., Auge, M.T., Robert, B., Arold, S., Rimsky, S., and Kochoyan, M. 2003. The H-NS dimerization domain defines a new fold contributing to DNA recognition. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 212-218.
- Bustamante, V.H., Martinez, L.C., Santana, F.J., Knodler, L.A., Steele-Mortimer, O., and Puente, J.L. 2008. HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 14591-14596.
- Cerdan, R., Bloch, V., Yang, Y., Bertin, P., Dumas, C., Rimsky, S., Kochoyan, M., and Arold, S.T. 2003. Crystal structure of the N-terminal dimerisation domain of VicH, the H-NS-like protein of *Vibrio cholerae*. *J. Mol. Biol.* **334**, 179-185.
- Claret, L. and Rouviere-Yaniv, J. 1997. Variation in HU composition during growth of *Escherichia coli*, the heterodimer is required for long term survival. *J. Mol. Biol.* **273**, 93-104.
- Dame, R.T., Luijsterburg, M.S., Krin, E., Bertin, P.N., Wagner, R., and Wuite, G.J. 2005. DNA bridging, a property shared among H-NS-like proteins. *J. Bacteriol.* **187**, 1845-1848.
- Dillon, S.C. and Dorman, C.J. 2010. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 185-195.
- Dorman, C.J. and Deighan, P. 2003. Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 179-184.
- Drlica, K. and Rouviere-Yaniv, J. 1987. Histone-like proteins of bacteria. *Microbiol. Rev.* **51**, 301-319.
- Ellermeier, J.R. and Slauch, J.M. 2007. Adaptation to the host environment, regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 24-29.
- Esposito, D., Petrovic, A., Harris, R., Ono, S., Eccleston, J.F., Mbabaali, A., Haq, I., Higgins, C.F., Hinton, J.C., Driscoll, P.C., et al. 2002. H-NS oligomerization domain structure reveals the mechanism for high order self-association of the intact protein. *J. Mol. Biol.* **324**, 841-850.
- Fass, E. and Groisman, E.A. 2009. Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 199-204.
- Fowler, C.C. and Galan, J.E. 2018. Decoding a *Salmonella* typhi regulatory network that controls typhoid toxin expression within human cells. *Cell. Host Microbe* **23**, 65-76.
- Giangrossi, M., Giuliadori, A.M., Gualerzi, C.O., and Pon, C.L. 2002. Selective expression of the beta-subunit of nucleoid-associated protein HU during cold shock in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **44**, 205-216.
- Gordon, B.R., Li, Y., Cote, A., Weirauch, M.T., Ding, P., Hughes, T.R., Navarre, W.W., Xia, B., and Liu, J. 2011. Structural basis for recognition of AT-rich DNA by unrelated xenogeneic silencing proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 10690-10695.
- Grainger, D.C. 2016. Structure and function of bacterial H-NS protein. *Biochem. Soc. Trans.* **44**, 1561-1569.
- Johansson, J. and Uhlin, B.E. 1999. Differential protease-mediated turnover of H-NS and StpA revealed by a mutation altering protein stability and stationary-phase survival of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10776-10781.
- Jones, P.G., VanBogelen, R.A., and Neidhardt, F.C. 1987. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 2092-2095.
- Kahramanoglou, C., Seshasayee, A.S., Prieto, A.I., Ibberson, D., Schmidt, S., Zimmermann, J., Benes, V., Fraser, G.M., and Luscombe, N.M. 2011. Direct and indirect effects of H-NS and Fis on global gene expression control in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **39**, 2073-2091.
- Kano, Y., Osato, K., Wada, M., and Imamoto, F. 1987. Cloning and sequencing of the *HU-2* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **209**, 408-410.
- Kano, Y., Yoshino, S., Wada, M., Yokoyama, K., Nobuhara, M., and Imamoto, F. 1985. Molecular cloning and nucleotide sequence of the *HU-1* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **201**, 360-362.
- Kotlajich, M.V., Hron, D.R., Boudreau, B.A., Sun, Z., Lyubchenko, Y.L., and Landick, R. 2015. Bridged filaments of histone-like nucleoid structuring protein pause RNA polymerase and aid termination in bacteria. *Elife* **4**, e04970.
- La Teana, A., Brandi, A., Falconi M., Spurio, R., Pon, C.L., and Gualerzi, C.O. 1991. Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10907-10911.
- Lim, C.J., Lee, S.Y., Kenney, L.J., and Yan, J. 2012. Nucleoprotein

- filament formation is the structural basis for bacterial protein H-NS gene silencing. *Sci. Rep.* **2**, 509.
- Liu, Y., Chen, H., Kenney, L.J., and Yan, J.** 2010. A divalent switch drives H-NS/DNA-binding conformations between stiffening and bridging modes. *Genes Dev.* **24**, 339–344.
- Lucchini, S., Rowley, G., Goldberg, M.D., Hurd, D., Harrison, M., and Hinton, J.C.** 2006. H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS Pathog.* **2**, e81.
- Mangan, M.W., Lucchini, S., Croinin, T.O., Fitzgerald, S., Hinton, J.C., and Dorman, C.J.** 2011. Nucleoid-associated protein HU controls three regulons that coordinate virulence, response to stress and general physiology in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* **157**, 1075–1087.
- Martinez, L.C., Banda, M.M., Fernandez-Mora, M., Santana, F.J., and Bustamante, V.H.** 2014. HilD induces expression of *Salmonella* pathogenicity island 2 genes by displacing the global negative regulator H-NS from *ssrAB*. *J. Bacteriol.* **196**, 3746–3755.
- Miano, A., Losso, M.A., Gianfranceschi, G.L., and Gualerzi, C.O.** 1982. Proteins from the prokaryotic nucleoid I. Effect of NS1 and NS2 (HU) proteins on the thermal stability of DNA. *Biochem. Int.* **5**, 415–422.
- Mitta, M., Fang, L., and Inouye, M.** 1997. Deletion analysis of *cspA* of *Escherichia coli*: requirement of the AT-rich UP element for *cspA* transcription and the downstream box in the coding region for its cold shock induction. *Mol. Microbiol.* **26**, 321–335.
- Navarre, W.W., Porwollik, S., Wang, Y., McClelland, M., Rosen, H., Libby, S.J., and Fang, F.C.** 2006. Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* **313**, 236–238.
- Nieto, J.M., Madrid, C., Miquelay, E., Parra, J.L., Rodriguez, S., and Juarez, A.** 2002. Evidence for direct protein-protein interaction between members of the enterobacterial Hha/YmoA and H-NS families of proteins. *J. Bacteriol.* **184**, 629–635.
- Nieto, J.M., Madrid, C., Prenafeta, A., Miquelay, E., Balsalobre, C., Carrascal, M., and Juarez, A.** 2000. Expression of the hemolysin operon in *Escherichia coli* is modulated by a nucleoid-protein complex that includes the proteins Hha and H-NS. *Mol. Gen. Genet.* **263**, 349–358.
- Oberto, J., Nabti, S., Jooste, V., Mignot, H., and Rouviere-Yaniv, J.** 2009. The HU regulon is composed of genes responding to anaerobiosis, acid stress, high osmolarity and SOS induction. *PLoS One* **4**, e4367.
- Paytubi, S., Madrid, C., Forns, N., Nieto, J.M., Balsalobre, C., Uhlin, B.E., and Juarez, A.** 2004. YdgT, the Hha paralogue in *Escherichia coli*, forms heteromeric complexes with H-NS and StpA. *Mol. Microbiol.* **54**, 251–263.
- Rouviere-Yaniv, J. and Gros, F.** 1975. Characterization of a novel, low-molecular-weight DNA-binding protein from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3428–3432.
- Schneider, D.A., Ross, W., and Gourse, R.L.** 2003. Control of rRNA expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 151–156.
- Schroder, O. and Wagner, R.** 2000. The bacterial DNA-binding protein H-NS represses ribosomal RNA transcription by trapping RNA polymerase in the initiation complex. *J. Mol. Biol.* **298**, 737–748.
- Singh, K., Milstein, J.N., and Navarre, W.W.** 2016. Xenogeneic silencing and its impact on bacterial genomes. *Annu. Rev. Microbiol.* **70**, 199–213.
- Spurio, R., Falconi, M., Brandi, A., Pon, C.L., and Gualerzi, C.O.** 1997. The oligomeric structure of nucleoid protein H-NS is necessary for recognition of intrinsically curved DNA and for DNA bending. *EMBO J.* **16**, 1795–1805.
- Swinger, K.K., Lemberg, K.M., Zhang, Y., and Rice, P.A.** 2003. Flexible DNA bending in HU-DNA cocrystal structures. *EMBO J.* **22**, 3749–3760.
- Ueda, T., Takahashi, H., Uyar, E., Ishikawa, S., Ogasawara, N., and Oshima, T.** 2013. Functions of the Hha and YdgT proteins in transcriptional silencing by the nucleoid proteins, H-NS and StpA, in *Escherichia coli*. *DNA Res.* **20**, 263–271.
- Ueguchi, C., Seto, C., Suzuki, T., and Mizuno, T.** 1997. Clarification of the dimerization domain and its functional significance for the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *J. Mol. Biol.* **274**, 145–151.
- Ueguchi, C., Suzuki, T., Yoshida, T., Tanaka, K., and Mizuno, T.** 1996. Systematic mutational analysis revealing the functional domain organization of *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *J. Mol. Biol.* **263**, 149–162.
- Walthers, D., Carroll, R.K., Navarre, W.W., Libby, S.J., Fang, F.C., and Kenney, L.J.** 2007. The response regulator SsrB activates expression of diverse *Salmonella* pathogenicity island 2 promoters and counters silencing by the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol. Microbiol.* **65**, 477–493.
- Winardhi, R.S., Fu, W., Castang, S., Li, Y., Dove, S.L., and Yan, J.** 2012. Higher order oligomerization is required for H-NS family member MvaT to form gene-silencing nucleoprotein filament. *Nucleic Acids Res.* **40**, 8942–8952.