

〈국문초록〉

세균에서 전자조절자에 의한 유전자 발현 조절에 대한 연구

연구자 : 강지유(2학년, jeeyoolucy@naver.com)

김용태(2학년, yt7481@naver.com)

노유진(2학년, lime1001@naver.com)

책임지도자 : 고인정(KAIST 부설 한국과학영재학교, koin2@kaist.ac.kr)

공동지도자 : 오정일(부산대학교, joh@pusan.ac.kr)

조교 : 이하나(부산대학교, sscjf@naver.com)

요약문

전자조절자인 Crp와 FurA는 *M. smegmatis*에서 *ahpC* 오페론의 발현을 조절한다. 본 연구에서는 두 reporter gene (*lacZ*와 *gfp*) 및 reverse-transcription PCR을 사용하여, *ahpC*의 발현이 FurA 및 Crp에 의해 조절되는지 조사하였다. 우리는 wild-type (WT)과 세 *furA* 유전자나 *crp* 유전자를 비활성화 시킨 mutant strains ($\Delta f1f2f3$ 와 Δcrp)의 *ahpC* 유전자 발현을 각각 비교하였다. *M. smegmatis*의 WT, $\Delta f1f2f3$ 와 ΔCrp strains를 10 mM cumene hydroperoxide (CHP)에 1시간 처리하여 유전자 발현을 강하게 만들었다. 결과적으로 FurA와 Crp가 *ahpC* 발현에 각각 activator과 repressor의 역할을 한다는 것을 알아내었다. 본 연구를 통하여 원핵생물에서 전자조절자의 기능을 밝히기 위해 접근하는 방법을 배울 수 있었다.

주제어 : *Mycobacterium smegmatis*, *ahpC* gene, cAMP receptor protein, ferric uptake regulator, transcriptional regulator

I. 서론

유전자란 유전 정보가 암호화된 상태의 DNA 부분이다. 인간과 같은 진핵생물과는 다르게 핵막이 없는 원핵생물은 몇 개의 비슷한 기능을 하는 유전자가 모여서 오페론이라는 단위를 이룬다. 오페론의 특징으로는 비슷한 유전자들이 같이 발현되고 억제되기 때문에 효율적으로 RNA나 단백질을 생산할 수 있다는 점이 있다.

오페론이 한꺼번에 발현될 수 있는 기작의 원인은 유전자 발현의 과정인 전사(transcription)와 번역(translation) 중 전사에 있다. 전사란 DNA 위의 유전자를 읽어서 그 정보를 mRNA(messenger RNA)로 옮기는 과정이고, 번역이란 mRNA의 정보를 단백질로 옮겨서 최종적인 결과물을 얻어내는 과정이다. 이 중 전사 과정은 또 세부 과정인 개시(initiation)와 신장(elongation), 그리고 종결(termination)으로 나뉜다. 여기서 개시와 종결은 각각 RNA 중합효소(RNA polymerase)가 DNA에 붙고 떨어지는 과정인데, RNA polymerase는 오페론의 윗부분(upstream)에 있는 RNA polymerase binding site에 붙고 아랫부분(downstream)에 있는 terminator에서 떨어진다. 이렇게 전체 전사 과정에서 한 오페론의 유전자들을 다 같이 발현하게 하는 것이다.

오페론의 전사를 조절하는 기작은 주로 개시 과정에서 일어난다. RNA polymerase binding site 주변에는 전사조절자(transcriptional regulator)가 있어서 전사를 촉진하거나 억제하는 역할을 하는데, *Mycobacterium smegmatis*(이하 *M. smegmatis*)에서 활성 산소에 의한 스트레스를 억제하는 alkyl hydroperoxide reductase를 만드는 유전자인 *ahpC*의 전사 조절자로 추정되는 자리인 IR1과 IR2가 발견되었다. 각각은 cAMP receptor protein(이하 Crp)와 Ferric uptake regulator(이하 FurA)로 불리는 전사조절자가 붙는 자리라고 알려져 있다.

본 연구에서는 Crp와 FurA의 binding site로 예상되는 IR1과 IR2에 이들이 activator이나 repressor 같이 유전자 *ahpC*에 어떤 전사조절자 작용을 하는지 조사하고자 하였다. 이를 위해 IR1과 IR2가 포함된 유전자 *ahpC*의 윗부분과 lactose 오페론(이하 *lacZ*), Kanamycin(이하 Km) 또는 Hygromycin(이하 Hyg) 저항유전자를 동시에 가지고 있는 plasmid를 만들었다.

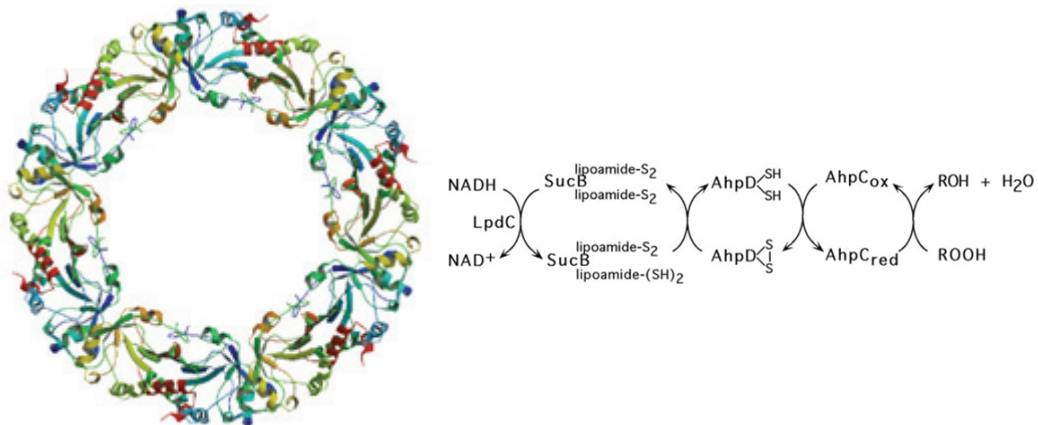
그리고 Crp와 FurA에 대한 binding site를 변형시킨 plasmid를 *M. smegmatis*에 ligation 시켜 wild type과 비교하여 β -galactosidase의 발현을 보았다. 이러한 실험으로 *crp*와 *furA*가 *ahpC*의 발현을 어떻게 조절하는지 알아보았다.

II. 이론적 배경

1. Alkyl hydroperoxide reductase

인체의 대식 세포는 몸 속으로 들어온 결핵균을 제거하기 위해 peroxide 분자를 생성하는 등 산화적 스트레스 조건을 형성한다. 결핵균은 이에 대응하여 산화적 스트레스를 제거할 수 있는 효소의 발현을 증가시킨다. 이 효소들 중 하나가 alkyl hydroperoxide reductase로, 이는 organic peroxide를 이에 상응하는 alcohol로 환원시키고, 과산화수소(hydrogen peroxide)를 물 분자로 환원시키며, NO로부터 유래된 peroxinitrite(ONOO-)를 환원시키는 반응을 촉매해 결핵균의 생존을 돕는다(Fig. 1).

또한 alkyl hydroperoxide reductase는 결핵균 *Mycobacterium tuberculosis*뿐만 아니라 *M. smegmatis*를 비롯한 Mycobacterium 속의 생명체들이 공통적으로 분비할 수 있는 효소로, 유전자 *ahpC*에 의해 암호화되어 있다.



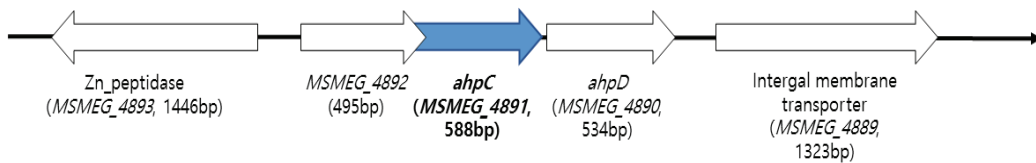
[Fig. 1] Alkyl hydroperoxide reductase의 구조와 촉매 반응에 관여하는 단백질과 electron carrier. (LpdC: dihydrolipoamide dehydrogenase, SucB: dihydrolipoamide succinyltransferase)

2. *AhpC*(MSMEG_4891) regulator

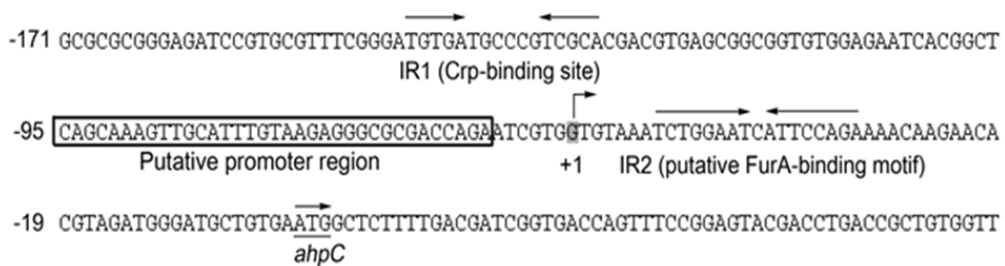
Alkyl hydroperoxide reductase(이하 AhpC)는 기능하기 위해 AhpD를 필요로 하며, 이는 유전자 *ahpD*에 의해 암호화되어 있다. 유전자 *ahpC*와 유전자 *ahpD*가 이루는 *ahpCD*

operon은 산화적 스트레스 아래 발현이 유도된다 알려져 있으며, 다른 오페론과 같이 발현을 조절하는 전사조절자가 있을 것으로 여겨진다. 일반적으로 전사조절자가 DNA에 결합해 유전자 발현을 조절하는 경우 RNA 중합 효소가 결합하는 자리인 promotor 전후에 결합위치가 존재한다. 전사조절자가 DNA에 결합하면 전사조절자의 종류에 따라 발현 조절이 두 가지로 나뉜다. 만약 결합한 전사조절자가 activator로서 작용한다면 유전자 *ahpC*의 발현을 촉진시켜 전사조절자의 생성을 억제한 mutant type의 발현이 그러지 않은 wild type의 발현보다 적을 것이다. 한편, 결합한 전사조절자가 repressor로서 작용한다면 반대로 발현을 억제해 전사조절자의 생성을 억제한 mutant type의 발현이 wild type의 발현보다 더 많이 일어날 것이다. 이처럼 mutant type과 wild type의 유전자 발현 정도를 비교해 전사조절자가 유전자 *ahpC*에 어떤 영향을 미치는지를 알아낼 수 있다.

유전자 *ahpC*의 promotor 전후에서는 Crp 결합위치(IR1)과 FurA 결합위치(IR2)가 발견되었다(Fig. 3). 그러나 *M. smegmatis*의 유전자 *ahpC*의 발현 조절 과정에 두 전사조절자가 어떠한 영향을 미칠지에 대해서는 알려진 바가 없다.



[Fig. 2] 유전자 *ahpC* locus 주위의 genetic organization



[Fig. 3] 유전자 *ahpC* 앞의 조절부위 서열

III. 실험 방법

1. 사용 균주

본 연구에서 사용한 균주인 *M. smegmatis*는 Actinobacteria 문과 Mycobacterium 속의 박테리아다. 결핵을 일으키는 병원균인 *M. tuberculosis* 나 나병을 일으키는 병원균인 *M. leprae* 와 같은 속이나, 질병을 일으키지 않는다. 안전하다는 특성과 더불어 키우기 쉽고, 같은 속의 다른 박테리아와 비교했을 때 상대적으로 빠르게 성장한다는 특징으로 인해 실험용으로 많이 쓰인다. 또한 중요한 특징 중 하나로, 산화적 스트레스를 방어하기 위한 기작이 존재한다. 이는 박테리아가 인체에 침투한 뒤에 macrophage와 같은 면역 세포에게 잡아먹히면 작동되는데, 대식 세포가 박테리아를 소화하기 위해 내부로 과산화수소와 같은 산화력이 강한 물질을 분비하면 이에 대응하기 위해 superoxide radical을 소화하는 효소를 분비한다.

사용한 또 다른 균주인 *Escherichia coli*(이하 *E. coli*)는 대장균으로 이 실험에서는 DH5 α strain을 competent cell로 사용하여 plasmid를 넣었다 cloning하고 다시 빼는데 사용하였다. 실험에 사용한 strain과 plasmid의 사용 목적과 genotype은 [Table. 1]과 같다.

2. 세균 배양

본 연구에서는 *E. coli* strain인 DH5 α 와 *M. smegmatis* 세균 두 종류를 사용하였다. *M. smegmatis*는 37°C, 200 rpm에서 0.2% (w/v) glucose와 0.02% (v/v) Tween-80이 첨가된 7H9 (Difco, Sparks, MD) 액체배지에 호기적으로 배양하였고, *E. coli* DH5 α 는 Luria-Bertoni(LB) 배지에 호기적으로 배양하였다. 본 연구에서 사용되었던 vectors인 pMV306은 Km에 대해, pNCII는 Hyg에 대해 각각 항생제 내성 유전자를 포함하고 있다. 실험에 사용한 세균의 strain과 plasmid의 종류는 [Table. 1]에 정리되어 있다. pMV306과 pNCII plasmid가 증식 과정에서 사라지지 않게 하기 위해 배지에는 selective pressure를 줄 용도로 Km과 Hyg 항생제가 각각 들어갔다(Table. 2). 실험 중에 PCR에서 사용했던 primer의 종류와 서열, 사용한 목적은 [Table. 3]과 같다.

산화적 스트레스를 주는 조건으로 Cumene Hydroperoxide (CHP)를 사용하였다. 배양한 *M. smegmatis*는 OD₆₀₀이 0.4인 조건에서 +CHP 조건 배양액에만 CHP 0.1 mM을 1시간동안 처리하였다. Activity staining을 위한 세균 배양에서는 *M. smegmatis*가 OD₆₀₀이 0.4인 조건에서 H₂O₂ 0.1 mM을 1시간동안 처리하였다.

Table 1. Table of strains and plasmids

Strain	Relevant phenotype/genotype or purpose
<i>M. smegmatis</i>	Wild type
<i>M. smegmatis</i> $\Delta f1f2f3$	Deletion mutant of <i>furA1</i> , <i>furA2</i> , <i>furA3</i>
<i>M. smegmatis</i> Δcrp	Insertion mutant of <i>crp</i>
<i>E. coli</i> DH5 α	Plasmid cloning and conjugation
Plasmid	
pMV306:: <i>M3::gfp</i>	[Not I] - <i>M3</i> - [Xba I] - <i>gfp</i> - [EcoR I] - Km resistant(○)하 Km r
pMV306:: <i>ahpC::gfp</i>	[Not I] - <i>ahpC</i> - [Xba I] - <i>gfp</i> - [EcoR I] - Km r
pGFPuv	[Pst I] - <i>green florence protein gene</i> (○)하 <i>gfp</i> - [Hind III]
pNC	[Xba I] - [Cla I] - <i>lacZ</i> - Hyg resistant
pNCgfp	[Xba I] - [Pst I] - <i>gfp</i> - [Hind III] - [Cla I] - <i>lacZ</i> - Hyg resistant

Table 2. Table of antibiotics

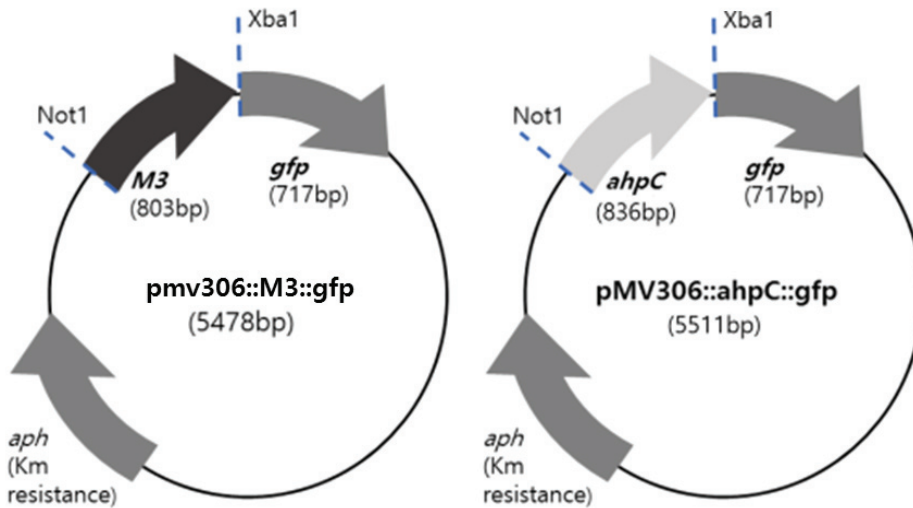
	<i>E. coli</i>	<i>M. smegmatis</i>
Kanamycin	50 $\mu\text{g/ml}$	30 $\mu\text{g/ml}$
Hygromycin	200 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$

Table 3. Table of primers

Primer name	Sequence(5'→3')	Purpose
AhpC_SalI+	ATATGTCGACCATCGACGTCGCCCGCCC	<i>ahpC</i> cloning
AhpC_XbaI-	ATATTCTAGAGTCATCGGGCTGCTTGGC	
GFP_PstI+	ATATCTGCAGCATGCATGAGTAAAGGAGAAGAAC	<i>gfp</i> cloning
GFP_HindIII-	ATATAAGCTTGCCCTGACGGGCTTGTCTG	
AhpC_F	CGTGTGTCGGTGGACAACGAG	RT-PCR for <i>ahpC</i>
AhpC_R	GGTCACCGACACGAACTGGA	

3. pMV306::*ahpC::gfp* Plasmid와 pMV306::*ahpC::lacZ* 제작

유전자 *ahpC* template DNA를 이용한 PCR(Qiazen™ 2X EF Taq PCR Pre-Mix, Taq DNA polymerase, primer (ahpCNotI+, ahpCXbaI-)로 유전자 *ahpC*의 promoter 부분이 포함된 0.8kb *ahpC* gene DNA를 증폭시켰다. 증폭된 *ahpC* DNA와 pMV306::*M3::gfp* plasmid를 Not I 과 Xba I restriction enzyme로 double digestion을 수행한 뒤 pMV306::*M3::gfp*는 agarose gel electrophoresis로 double digestion이 올바르게 수행되었는지 확인, 각각 DNA만을 추출 해낸 뒤 (Gel & PCR Purification System, Solgent™) ligation해 pMV306::*ahpC::gfp* plasmid를 제작했다(Fig. 4).



[Fig. 4] pMV306::ahpC::gfp와 pMV306::ahpC::gfp plasmid의 construct. Plasmid 상의 *M3*, *gfp*, *ahpC* gene의 길이 및 위치와 kanamycin resistant gene이 나타나 있다. Not I 과 Xba I restriction enzyme이 plasmid에 작용하는 site 또한 plasmid 위에 나타나 있다.

위와 같은 방법으로 primer (ahpCSalI+, ahpCXbaI-)를 이용해 유전자 *ahpC*의 promoter 부분이 포함된 0.8kb *ahpC* gene DNA를 증폭시켰다. Sal I 과 Xba I restriction enzyme으로 pMV306lacZ plasmid의 double digestion을 수행한 후 증폭시킨 *ahpC* gene과 ligation해 pMV306lacZ::*ahpC* plasmid를 제작했다.

4. β -galactosidase assay

pMV306lacZ::*ahpC*를 가지는 *M. smegmatis* WT, Δ f1f2f3 mutant, Δ crp mutant를 각각 CHP를 이용한 oxidative stress 처리 조건과 비처리 조건에서 배양하였다. 각 strain을 O.D.600 값이 0.45~0.50이 될 때까지 키워 harvest하고 1.5 ml β -galactosidase buffer에 resuspend 하였다. Sonification(10초 on, 50초 off)을 8번 반복해 균체를 파쇄한 뒤 13000 rpm에서 10분 간 원심분리하였다. 얻어진 crude extract는 4배 희석하여 사용하였다.

Assay mixture (1 ml)는 전체 농도가 20 mM이 되도록 β -mercaptoethanol을 첨가한 β -galactosidase buffer 750 μ l, assay buffer에 녹인 0.2% (w/v) o-NPG 200 μ l, cell crude extract 50 μ l로 구성되었다. Assay mixture를 3회 invert시킨 후 spectrophotometer로 O.D.420에서 1분간의 흡광도 변화를 측정하였다. 이후 흡광도 변화량과 단백질 정량값을 이용하여 specific activity를 구하였다.

5. GFP assay

pMV306::ahpC:gfp를 가지는 *M. smegmatis* WT, Δ f1f2f3 mutant, Δ crp mutant를 각각 CHP를 이용한 oxidative stress 처리 조건과 비처리 조건에서 배양하였으며, β -galactosidase assay와 같은 방식으로 총 6개 sample의 crude extract를 얻어냈다. Buffer로는 β -galactosidase buffer가 아닌 Tris-HCL buffer (10 mM, pH 8.0)를 사용했다.

각 sample의 crude extract를 단백질 정량해 모든 sample의 단백질 농도가 동일하도록 희석시켰다. 준비된 sample은 fluorescence spectrophotometer를 이용해 395 nm의 excitation wavelength와 509 nm의 emission wavelength 조건에서 GFP fluorescence intensity를 측정하였다.

6. 단백질 농도 측정

Bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하고, Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher)를 이용하여 단백질의 농도를 측정하였다.

7. Polyacrylamide gel electrophoresis

Native PAGE는 protein denaturation을 일으키지 않아 protein 3차 구조, 분자량, charge 등에 속도가 영향을 받으며 효소 자체의 특징과 활성 정도를 알 수 있다. Amino acid 사이의 bond가 유지되어 protein의 분자량을 알아낼 수는 없으나 다른 sample과 비교하여 단백질 자체의 양을 비교할 수 있으며 존재 여부를 알 수 있다. Native PAGE를 이루는 gel의 구성성분은 [Table. 4]와 같다.

Table 4. composition of stacking gel and resolving gel

	composition	stacking gel	resolving gel (7.5%)
acrylamide solution (30%)	30% (w/v) acrylamide + 0.8% (w/v) bisacrylamide	0.5 ml	2.5 ml
Stacking buffer	0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1 ml	
Resolving buffer	3 M Tris-HCl, pH 8.8		1.25 ml
Ammonium persulfate	10% (w/v) Ammonium persulfate	0.03 ml	0.075 ml
DW		2.29 ml	5.65 ml
TEMED		0.005 ml	0.005 ml

8. Activity Staining

Activity staining에 사용된 균주는 *M. smegmatis*로 6개의 sample를 사용했다(Table 5). *M. smegmatis*의 crude extracts 20 μ g을 7.5% (wt/vol) polyacrylamide gel에서 native gel electrophoresis에 적용 하였다. Electrophoresis 후, gel을 DW로 15 분 동안 3 회 세척하였다. Gel을 30% (wt/vol) H_2O_2 10 μ l가 들어있는 DW 100 ml에 담그고 10 분 간 젖는다. H_2O_2 용액을 배출시키고, gel을 DW로 행구었다. 그 다음, 2% (wt/vol)의 potassium ferricyanide와 2% (wt/vol)의 ferric chloride를 함유하는 제조된 용액 30 ml를 gel 위에 부었다. 이어서, gel이 진한 녹색으로 변하기 시작할 때까지 gel container를 일정하게 흔들었다. Gel을 DW로 세척하였다. Catalase activity를 지닌 단백질 밴드는 진한 녹색 배경에서 무채색 밴드로 검출되었다.

Table 5. DNA of activity staining

sample	treat	strains
1	w/o H_2O_2	WT
2		Δ f1f2f3
3		Δ crp
4	w H_2O_2	WT
5		Δ f1f2f3
6		Δ crp

9. Reverse transcription of mRNA

Mid log phage까지 배양시킨 4개 *M. smegmatis* sample에서 유기용매 TRIzol을 이용해 total RNA만을 얻어냈다(Table 6). 이 total RNA를 template로 해 anchored primer와 reverse transcriptase를 반응시켜 cDNA를 합성하였다. RNA는 20배 희석해 각 sample마다 total RNA의 양을 1 μ g로 일치시켰고, anchored primer는 2 μ l 사용하였다. 이후 얻어낸 cDNA를 template DNA로 해 template DNA 5 μ l, 각 primer 1 μ l, DW 13 μ l로 RT-PCR를 진행한 뒤 electrophoresis로 그 결과를 확인했다.

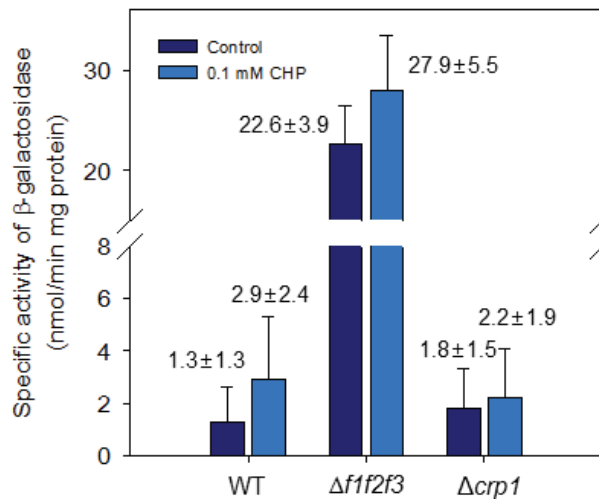
Table 6. mRNA of RT-PCR

sample	Treat	Strains
1	w/o H_2O_2	WT
2		Δ crp
3	w H_2O_2	WT
4		Δ crp

IV. 연구 결과 및 고찰

1. β -galactosidase의 specific activity를 통한 유전자 *ahpC*의 발현 확인

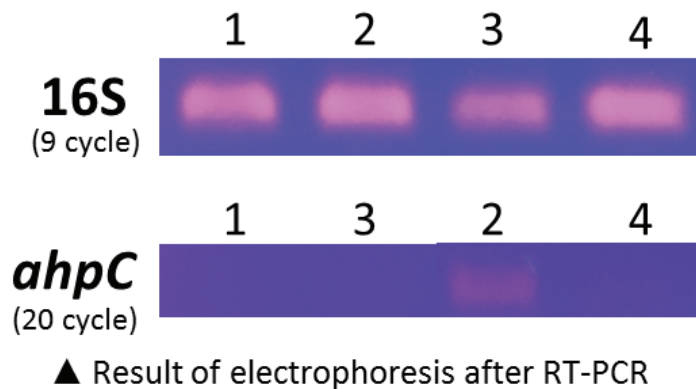
ahpC::lacZ transcriptional fusion (pMV306lacZ::*ahpC*)를 제작해 유전자 *lacZ*의 발현이 유전자 *ahpC* promoter의 영향을 받도록 하였다. 이를 이용해 *M. smegmatis*의 유전자 *ahpC*의 발현을 β -galactosidase의 specific activity 측정을 통해 관찰할 수 있었다. 대조군인 *M. smegmatis* WT와 각각 유전자 *furA*, *crp*를 mutant시킨 $\Delta f1f2f3$ mutant, Δcrp mutant sample을 각각 CHP 처리 조건과 비처리 조건에서 배양해 6개 sample를 얻어냈다. CHP 처리 조건의 경우 O.D.₆₀₀이 0.4일 때 0.1 mM의 CHP를 1시간 동안 처리한 뒤 0.5일 때 harvest하였다. 4배로 희석한 crude extract의 단백질 정량을 진행한 뒤 β -galactosidase specific activity를 측정 한 결과는 [Table. 기와 같다. 선행 연구에서의 결과와 같이 oxidative stress로 작용한 CHP는 3개 sample 모두의 유전자 *ahpC*의 발현을 증가시켰다. CHP 비처리 조건의 $\Delta f1f2f3$ 는 대조군에 비하여 약 6배 증가했으며 Δcrp 는 1/4배 감소하였음을 확인하였다(Fig. 5).



[Fig. 5] Sample 별 o-NPG 효소 발현 정도 측정 결과. CHP 처리 조건과 비처리 조건에서 배양한 6개 sample. 왼쪽에서부터 대조군 WT와 $\Delta f1f2f3$, Δcrp 이다.

2. RT-PCR를 통한 transcription 단계에서의 유전자 *ahpC* 발현 확인

유전자 *ahpC*의 cDNA의 양은 template로 사용되는 total mRNA중 존재하는 *ahpC* mRNA의 양에 비례한다. 그를 이용하여 *ahpC* mRNA를 template로 해 *ahpC* cDNA를 합성한 뒤, cDNA를 PCR해 electrophoresis로 밴드의 intensity를 비교해 보는 것으로 *ahpC* mRNA의 양, transcription 단계에서의 *ahpC*의 발현을 비교해 볼 수 있다. H₂O₂를 접종하여 각각 oxidative stress 조건과 non-oxidative stress 조건에서 키운 2개 mutant 유전자를 RT-PCR을 진행하여 16S rRNA를 PCR하고 electrophoresis로 확인한 결과, 모든 sample에서 동일히 200 bp 위치에서 밴드가 발견되었다. 밴드의 intensity가 동일한 것을 보아 RT-PCR 시 template로 이용된 sample들의 total RNA양은 동일하게 맞추어졌음을 확인할 수 있었다. 그 뒤 *ahpC* cDNA를 PCR하고 electrophoresis로 확인한 결과 wild type은 oxidative stress 조건보다 non-oxidative stress 조건에서 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 또한 oxidative stress와 관계없이 Δcrp 의 밴드는 wild type의 밴드보다 열음을 확인하였다.

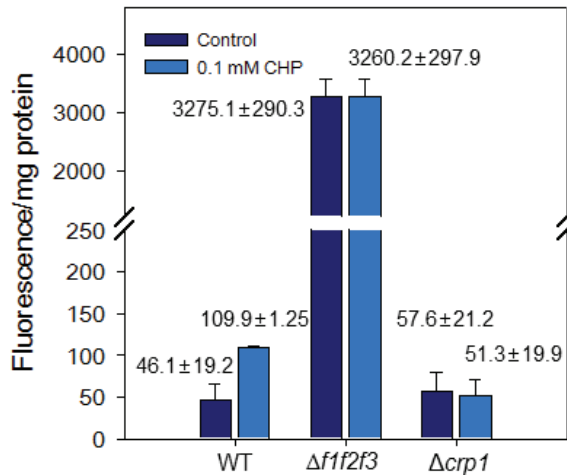


[Fig. 6] *M. Smegmatis* 균주에서의 16S rRNA와 *ahpC* mRNA 양을 비교한 RT-PCR의 결과이다. 각 sample마다 동일한 양의 mRNA가 사용되었는지 알기 위해 sample의 종류에 영향을 받지 않는 16S rRNA의 양이 동일한지 확인하였고(RT-PCR 9 cycle 수행), 그 후 *ahpC* mRNA 양을 비교하였다(RT-PCR 20 cycle 수행).

3. pMV306::*ahpC*::gfp cloning

ahpC::gfp transcriptional fusion (pMV306::*gfp*::*ahpC*)를 제작해 유전자 *gfp*의 발현이 유전자 *ahpC* promoter의 영향을 받도록 하였다. 이를 이용해 *M. smegmatis*의 유전자 *ahpC*의

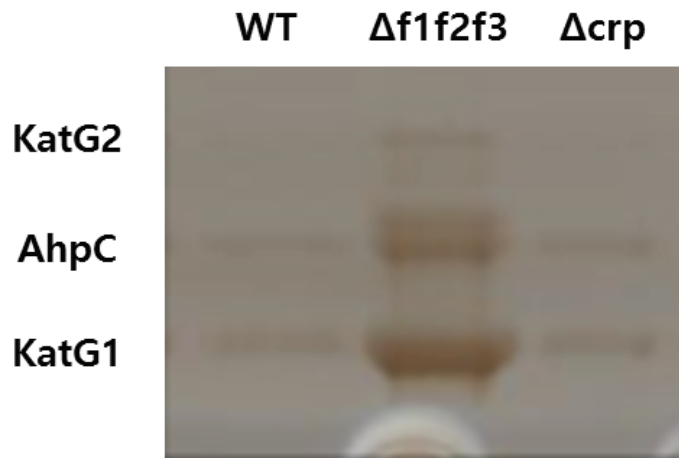
발현을 GFP의 fluorescence intensity 측정을 통해 관찰할 수 있었다. β -galactosidase assay와 마찬가지로 대조군인 *M. smegmatis* WT와 $\Delta f1f2f3$, Δcrp 를 각각 CHP 처리 조건과 비처리 조건에서 배양해 6개 sample을 얻어냈다. 모든 sample의 단백질 농도가 동일해지도록 crude extract를 희석한 후 fluorescence spectrophotometer를 이용해 GFP fluorescence를 관찰한 결과 oxidative stress 조건을 기준으로 wild type과 비교했을 때 $\Delta f1f2f3$ 의 유전자 *ahpC* 발현은 약 65배 증가하였으며 Δcrp 의 유전자 *ahpC* 발현은 약 0.5배 감소하였다(Fig. 7).



[Fig. 7] Sample 별 green fluorescence protein 형광 측정 결과. 각각 CHP 처리 조건과 비처리 조건에서 에서 자란 sample 6개(wild type, $\Delta f1f2f3$, Δcrp).

5. Activity staining을 통한 유전자 *ahpC* 발현 확인

Crp가 유전자 *ahpC*의 발현에 어떤 영향을 주는지 알아보기 위하여 crude extract를 native gel electrophoresis에 적용하여 살펴보았다. H_2O_2 처리 조건에서 wild type과 mutant의 유전자 *ahpC* 발현 정도를 protein level에서 측정했다. DAB 용액에 의해 염색된 세 개의 catalase 밴드 중 $\Delta f1f2f3$ 의 AhpC 밴드가 대조군에 비해 선명해졌다. 이는 FurA가 repressor임을 뜻한다.



[Fig. 8] Oxidation 조건에서 Activity staining을 완료한 3개의 sample이다. 나타난 3개의 band는 위쪽부터 순서대로 catalase/oxidase protein KatG2, AhpC, catalase/oxidase protein KatG1이다. AhpC protein band를 비교해보면 3번 레인의 21kDa의 AhpC protein이 가장 뚜렷하게 나타났다.

V. 결론

결핵균과 비슷한 성질을 지녔으나 위험성이 비교적 낮아 인체에 해를 끼치지 않는 *M. smegmatis*는 인체에 들어와 macrophage에 의해 포식된 뒤 산화적 스트레스 조건 등에서 *ahpCD* operon의 발현 생성물로 인해 증식, 또는 잠복이 가능하다. 본 연구에서는 대식세포 내의 스트레스 조건 중 oxidative stress 조건을 걸었을 때 FurA와 Crp를 mutation 시킴으로서 나타나는 *M. smegmatis*의 유전자 *ahpC* 발현 양상의 변화를 조사하였다. 또한 wild type과 Δcrp 는 oxidative stress 조건에서 키운 *M. smegmatis*의 *ahpC* activation이 non-oxidative stress 조건보다 높았다. β -galactosidase assay에서 10 mM CHP를 처리한 wild type은 *ahpC* 발현이 약 2배 증가하였으며, CHP 처리 조건에서의 $\Delta f1f2f3$ 는 *ahpC* 발현이 약 1.3배 증가하였다. 이는 oxidative stress 처리 조건에서 유전자 *ahpC*의 발현이 증가함을 의미한다. 실험 결과를 보면 $\Delta f1f2f3$ 의 *ahpC* 발현은 wild type에 비해 극히 높았으며 Δcrp 의 *ahpC* 발현은 wild type에 비해 낮았다. 마찬가지로 Activity staining의 결과, $\Delta f1f2f3$ 의 AhpC가 가장 많이 발현되었으며 *gfp* 형광 측정 결과에서도 wild type보다 약 60배 밝게 나왔다. 이는 FurA가 repressor임을 나타낸다. Δcrp 는 oxidative stress 조건에서 모두 wild type보다 미세하게 *ahpC* 발현 정도가 낮게 나왔으며, 여러 실험에서 동일한 경향을 보였기에 FurA는 repressor이며 Crp는 activator라는 결론을 내렸다. 또한 oxidative stress 조건을 처리하였을 때 다른 두

strain에 비해서 *crp* mutant는 대조군과 비교하였을 때 변화량이 극히 미미했다. 이는 oxidative stress 작용 기작이 Crp dependent함을 의미한다.

VI. 참고문헌

- [1] Han-Seung Jeon, Ki-Hoon Yang, In-Jeong Ko, and Jeong-Il Oh, (2014). Expression of Adenylyl Cyclase Genes in *Mycobacterium smegmatis* under Hypoxic and Nitric Oxide Conditions, *J. Life Sci*: 1330-1338
- [2] Ha-Na Lee, Na-On Lee, Seung J. Han, In-Jeong Ko, Jeong-Il Oh, (2014). Regulation of the *ahpC* Gene Encoding Alkyl Hydroperoxide Reductase in *Mycobacterium smegmatis*, *PLoS ONE* 9(11): e111680. doi: 10.1371/journal.pone.0111680
- [3] Master SS, Springer B, Sander P, Boettger EC, Deretic V, et al. (2002) Oxidative stress response genes in *Mycobacterium tuberculosis*: role of *ahpC* in resistance to peroxynitrite and stage-specific survival in macrophages. *Microbiology* 148: 3139-3144.
- [4] Chen L, Xie QW, Nathan C (1998) Alkyl hydroperoxide reductase subunit C (*AhpC*) protects bacterial and human cells against reactive nitrogen intermediates. *Mol Cell* 1: 795-805.
- [5] Berg OG, von Hippel PH (1988) Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. II. The binding specificity of cyclic AMP receptor protein to recognition sites. *J Mol Biol* 200: 709-723.
- [6] Koshkin A, Knudsen GM, Ortiz De Montellano PR (2004) Intermolecular interactions in the *AhpC/AhpD* antioxidant defense system of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Biochem Biophys* 427: 41-47.
- [7] Milano A, Forti F, Sala C, Riccardi G, Ghisotti D (2001) Transcriptional regulation of *furA* and *katG* upon oxidative stress in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 183: 6801-6806.

ABSTRACT

Regulation of gene expression by transcriptional factors in bacteria

Researcher : Jeeyoo Kang(sophomore, jeeyoolucy@naver.com)

Yongtae Kim(sophomore, yt7481@naver.com)

Yujin Roh(sophomore, lime1001@naver.com)

Supervisor : Injeong Ko(Korea Science Academy of KAIST, koin2@kaist.ac.kr)

Co-Supervisor : Jeongil Oh(Pusan National University, joh@pusan.ac.kr)

Assistant : Hana Lee(Pusan National University, sscjf@naver.com)

Abstract

Ferric uptake regulator (FurA) and cAMP receptor protein (Crp) are the well-known transcriptional regulators in mycobacteria. The binding sites for FurA and Crp were identified in the upstream of the *alkyl hydroperoxide reductase (ahpC)* operon in *Mycobacterium smegmatis*. In this study, we investigated whether the expression of *ahpC* was regulated by FurA and Crp using two reporter genes (*lacZ* and *gfp*) and reverse transcription PCR. We compared the expression levels of the *ahpC* gene between the wild-type (WT) and mutant strains ($\Delta f1f2f3$ and Δcrp) in which three *furA* genes or *crp* gene are inactivated, respectively. When the WT, $\Delta f1f2f3$ and Δcrp were grown without treatment of cumene hydroperoxide (CHP), expression of *ahpC* was strongly derepressed in the $\Delta f1f2f3$ relative to the WT strain. The treatment of the strain with 10 mM CHP for 1 h led to the induction of *ahpC* expression in the WT strain, while this induction effect was abolished in the Δcrp . This expression pattern of *ahpC* was confirmed at the protein level by activity staining for peroxidase. Our results indicate that FurAs and Crp serve as

repressors and activator for *ahpC* expression, respectively. Through this research and education program, we learned how to approach to reveal the function of transcriptional regulators in prokaryotes.