(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0074387
(43) 공개일자 2019년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *C12N 9/52* (2006.01)
C12Q 1/02 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
C12N 9/52 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0175688
(22) 출원일자 2017년12월20일
심사청구일자 2017년12월20일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이규호
서울특별시 송파구 올림픽로4길 42
이경조
경기 성남시 수정구 수정로306번길 15
정유철
경남 김해시 경원로55번길 9
(74) 대리인
박원미

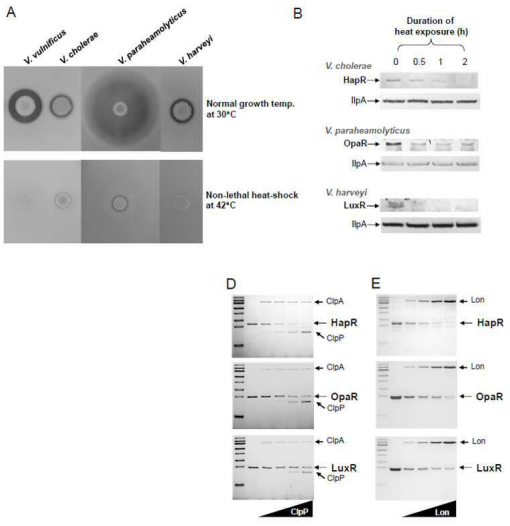
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **비치사적 열 충격을 이용한 비브리오 균의 쿼럼센싱 억제 방법**

(57) 요 약

본원에서는 열충격 온도에서 비브리오 균을 처리하여, 비브리오의 쿼럼센싱을 조절하여, 비브리오 균의 독성을 억제하는 방법 및 상기 방법을 이용한 쿼럼센싱 억제제 스크리닝 방법을 개시된다. 본원에 따른 방법은 열충격을 통해 쿼럼센싱을 억제하여, 쿼럼센싱 조절자에 의해 발현이 활성화되는 독성인자들 감소시켜 비브리오 균의 독성 제어에 효과적으로 사용될 수 있다. 또한 본원에서 규명된 기전을 이용하면 쿼럼센싱 저해제의 스크리닝이 가능하다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
C12Q 1/02 (2013.01)
C12Y 304/21053 (2013.01)
C12Y 304/21092 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017068471
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 유전체미래원천기술개발사업(장내 병원성 세균/공생미생물)
연구과제명 포스트게놈다부처유전체사업
기 여 율 1/2
주관기관 서강대학교
연구기간 2017.09.01 ~ 2018.06.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013M3C1A3064325
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 첨단융합기술개발사업
연구과제명 광합성 생체 소재 활용 플랫폼 구축
기 여 율 1/2
주관기관 서강대학교
연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

비브리오 균을 비치사 열충격 온도에서 처리하는 단계를 포함하며,

상기 비치사 열충격에 의해 상기 비브리오 균에서 *ClpPA* (ClpP:ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit; ClpA: ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit) 및 *Lon* (Lon: ATP-dependent protease La) 단백질의 발현이 증가하고, 상기 단백질의 발현 증가에 의해, 상기 비브리오 균의 쿼럼센싱 (Quorum Sensing, QS) 마스터 조절자의 농도가 저하되어 상기 마스터 조절자에 의해 발현이 조절되는 독성인자 인자의 발현이 억제되는 것인, 비브리오균의 독성(virulence)를 억제하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 비치사 열충격온도는 37℃ 내지 42℃인, 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 비브리오 균은 *V. 블니피쿠스*(*V. vulnificus*), *V. 콜레라*(*V. cholerae*), *V. 파라헤모리티쿠스*(*V. parahaemolyticus*), 또는 *V. 하베이*(*V. harveyi*)이며, 상기 QS 조절자는 상기 각 균에 대하여 각각 SmcR (regulator for starvation-induced maintenance of culturability); HapR (regulator of HA/protease gene); OpaR (transcriptional regulatory protein controlling opacity); 및 LuxR (lux-specific DNA- binding Protein)인, 인비트로에서 비브리오 균의 쿼럼센싱 억제 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 비브리오 균은 *V. 블니피쿠스*(*V. vulnificus*), *V. 콜레라*(*V. cholerae*), *V. 파라헤모리티쿠스*(*V. parahaemolyticus*), 또는 *V. 하베이*(*V. harveyi*)이며, 상기 독성인자는 상기 각 균에 대하여 각각 CPS(capsular polysaccharide) 또는 VvpE (Elastase); HAP (Hemagglutinin protease), CPS, T3SS (type 3 secretion system), 또는 T6SS (type 6 secretion system); 및 T3SS인, 인비트로에서 비브리오 균의 쿼럼센싱 억제 방법.

청구항 5

다음 단계를 포함하는 비브리오 균(vibrio spp)의 쿼럼센싱(Quorum sensing, QS) 억제제 스크리닝 방법:

ClpPA (ClpP: ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit; ClpA: ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit) 및 *Lon* (Lon: ATP-dependent protease La) 단백질을 발현하는 세포를 제공하는 단계;

상기 세포를 비치사 열충격 온도가 아닌 온도에서 배양하는 단계;

상기 세포를 시험물질과 접촉시키는 단계;

상기 시험물질과 접촉한 세포 및 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군 세포에서 상기 QS 조절자의 농도를 측

정하는 단계; 및

상기 시험물질과 접촉한 세포 및 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군 세포에서 상기 QS 조절자의 농도를 비교하여, 상기 접촉한 세포에서 상기 QS 조절자의 농도가 감소된 경우, 상기 시험물질을 쿼럼센싱억제제 후보물질로 선별하는 단계.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 비치사 열충격 온도가 아닌 성장 온도는 비브리오 균의 성장온도로 10℃ 내지 36℃인, 스크리닝 방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서,

상기 시험물질은 상기 *ClpPA* 및 *Lon* 단백질의 발현 또는 활성을 증가시킬 것으로 기대되는 물질인, 스크리닝 방법.

청구항 8

제 5 항에 있어서,

상기 비브리오 균은 *V. 블니피쿠스*(*V. vulnificus*), *V. 콜레라*(*V. cholerae*), *V. 파라헤모리티쿠스*(*V. parahaemolyticus*), 또는 *V. 하베이*(*V. harveyi*) 이며, 이 경우, 상기 QS 조절자는 상기 각 균에 대하여 각각 SmcR, HapR, OpaR, 및 LuxR 인, 스크리닝 방법.

청구항 9

SmcR, LuxR, HapR, OpaR을 포함하는 QS 마스터 조절자 단백질을 제공하는 단계;

상기 마스터 조절자 단백질을 시험물질과 접촉시키는 단계;

상기 시험물질과 접촉한 상기 마스터 조절자 단백질 및 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군에서 상기 마스터 조절자 단백질의 이량체화 또는 농도변화를 측정하는 단계; 및

상기 측정결과, 상기 시험물질과 접촉한 경우, 상기 마스터 조절자 단백질의 이량체화 억제되거나, 또는 상기 마스터 조절자 단백질의 농도가 감소된 경우, 상기 시험물질을 쿼럼센싱 억제제 후보물질로 선별하는 단계를 포함하는, 비브리오 균의 쿼럼센싱 억제제 후보물질 스크리닝 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 비브리오 균은 *V. 블니피쿠스*(*V. vulnificus*), *V. 콜레라*(*V. cholerae*), *V. 파라헤모리티쿠스*(*V. parahaemolyticus*), 또는 *V. 하베이*(*V. harveyi*) 인, 비브리오 균의 쿼럼센싱 억제제 후보물질 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 비브리오 균(*Vibrio* species) 쿼럼센싱 억제에 관한 기술분야이다.

배 경 기 술

[0002] 비브리오(*Vibrio* species) 감염증은 전 세계적으로 임상증례가 계속 보고되고 있어 주목받고 있는 질환 중의 하나로, 전세계적으로 절대적인 발병례는 콜레라나 살모넬라 식중독보다 적지만 높은 치명율과 비극적인 임상증상 때문에 심각한 사회적 문제를 야기하고 있다.

[0003] 특히, 비브리오 블니피쿠스(*V. vulnificus*)는 강 하구에 서식하고 있는 어패류에 오염이 된 상태로 섭취되어 장관에 이르고, 장관 내에서는 점액질을 통과하여 장관 상피세포에 부착한 후, 이를 파괴하고 장관 점막층으로 침입하여 혈관으로 들어가는 것으로 알려져 있다. 간장 질환 등의 기저질환을 가지고 있는 감수성이 높은 환자들의 혈류로 들어간 *V. 블니피쿠스*는 활발하게 증식하는데 이 상태를 패혈증이라 한다. *V. 블니피쿠스* 패혈증은 잠복기가 짧고, 일단 발병하면 전격적으로 진행하여 효과적 항균제 치료 타이밍을 놓치기 쉽다.

[0004] 세균은 세포간 신호전달 시스템의 일종인 적정밀도 인식(Quorum Sensing, 쿼럼센싱) 이라는 신호 전달체계를 통해 적정 개체수를 유지한다. 한정된 공간에서 균이 임계밀도에 도달할 경우 이를 인지하여 더 이상의 증식을 막는 신호전달방법으로 비브리오 균에서는 오토인듀서(autoinducer, AI)라는 물질이 관여한다. AI는 특정 농도에 도달하면 세포막 단백질에 의해 인식되어 마스터 QS 조절자라 불리는 전사 인자 즉, *V. harveyi*의 LuxR, *V. parahaemolyticus*의 OpaR, *V. cholerae*의 HapR 및 *V. vulnificus*의 SmcR로 신호를 전달한다. 이어 이들은 각각, 예를 들면 생체발광 조절, 콜로니 불투명도, 세포외 HA/프로테아제 및 영양결핍으로 인한 배양성 유지 등과 같은 현상을 조절하는 유전자를 조절한다. 특히 *V. 블니피쿠스*의 경우 바이오필름의 크기가 QS 마스터 조절자인 SmcR에 의해 조절되는 것으로 알려져 있고, SmcR 단백질 억제를 통해 비브리오균의 쿼럼센싱을 조절할 수 있다.

[0005] 대한민국 등록특허 제1243696호는 '병원성 미생물의 의사소통 저해제 및 이를 이용한 항균 조성물' 에 관한 것으로, SmcR의 결합을 저해하는 피라졸 화합물이 개시되어 있다. 대한민국 등록특허 제1141787호는 '쿼럼센싱 저해제를 스크리닝하는 방법' 에 관한 것으로, 특정 발현 카세트로 이루어진 벡터가 도입된 균주를 이용하여 쿼럼센싱 저해제 스크리닝 방법이 개시되어 있다.

[0006] 그러나 비브리오 균에 의한 독소의 일종인 CPS(Capsular polysaccharide) 생산은 쿼럼센싱(quorum sensing, QS)에 의해 조절되고, 상기 QS 조절은 QS-조절자인 SmcR 등 LuxR 호모로그에 의한 CPS 생합성 유전자군의 전사를 유도를 통해 이루어진다는 경로는 알려져 있으나, 상기 경로 중 QS- 조절자인 SmcR 등 LuxR 호모로그를 분해시켜 그의 활성 조절하는 프로테아제에 대하여는 알려진 바가 없다. 또한 비치사열충격 온도와 쿼럼센싱과의 연관성에 대해서는 알려진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 비치사적(non lethal) 열 충격조건에서 쿼럼센싱 조절을 통한 비브리오균의 독성 억제 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본원은 비치사 열충격 온도에서 비브리오 균의 쿼럼센싱(QS)이 조절된다는 새로운 기전의 규명에 근거한 것이다. 구체적으로 비치사 열충격 온도에서 발현이 증가하는 ClpPA (ClpP:ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit; ClpA: ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit) 및 Lon (Lon: ATP-dependent protease La) 단백질이 QS의 조절자를 분해하여, 결국 QS을 억제함으로써 QS에 의해 조절되는, 독성을 일으키는 CPS(Capsular polysaccharide) 생산과 같은 균의 병원성 활성을 억제할 수 있다는 발견에 근거한 것이다.

[0011] 한 양태에서 본원은 열충격온도에서 비브리오 균을 처리하여, 이의 쿼럼센싱을 억제하여, 독성을 제어하는 방법을 제공한다.

[0012] 또한 본원에서는 열충격 조건에서 발현되는 다른 양태에서 본원은 ClpPA (ClpP:ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit; ClpA: ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit) 및 Lon (Lon: ATP-dependent protease La) 단백질이 쿼럼센싱에 관여하는 마스터 조절자를 제어한다는 것을 규명하였는바, ClpPA 및 Lon 단백질을 포함하는, 쿼럼센싱 억제를 통한 비브리오 균 억제용 조성물을 제공한다.

[0013] 본원에서는 ClpPA 및 Lon이 *V. 블니피쿠스*(*V. vulnificus*)는 물론, *V. 콜레라*(*V. cholerae*), *V. 파라헤모리티쿠스*(*V. parahaemolyticus*), 또는 *V. 하베이*(*V. harveyi*)의 QS 조절자도 분해하는 것을 규명하였으며, 따라서 이러한 다양한 균주에 적용될 수 있다.

[0014] 다른 양태에서 본원은 또한 본원에서 규명된 기전을 이용한 비브리오 균(*Vibrio* spp)의 쿼럼센싱(Quorum sensing, QS) 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0015] 일 구현예에서 상기 방법은 ClpPA (ClpP:ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit; ClpA: ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit) 및 Lon (Lon: ATP-dependent protease La) 단백질을 발현하는 세포를 제공하는 단계; 상기 세포를 비치사 열충격 온도가 아닌 온도에서 배양하는 단계; 상기 세포를 시험물질과 접촉시키는 단계; 상기 시험물질과 접촉한 세포 및 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군 세포에서 상기 QS 조절자의 농도를 측정하는 단계; 및 상기 시험물질과 접촉한 세포 및 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군 세포에서 상기 QS 조절자의 농도를 비교하여, 상기 접촉한 세포에서 상기 QS 조절자의 농도가 감소된 경우, 상기 시험물질을 쿼럼센싱억제제 후보물질로 선별하는 단계를 포함한다.

[0016] 일 구현예에서 비치사 열충격 온도가 아닌 온도는 비브리오 균의 정상 성장온도인 약 10~36℃를 포함한다.

[0017] 본원에 따른 일 구현예에서, 상기 비브리오 균은 *V. 블니피쿠스*(*V. vulnificus*), *V. 콜레라*(*V. cholerae*), *V. 파라헤모리티쿠스*(*V. parahaemolyticus*), 또는 *V. 하베이*(*V. harveyi*)이며, 이 경우, 상기 QS 조절자는 각각 SmcR, HapR, OpaR, 또는 LuxR 이다.

[0018] 본원에 따른 일 구현예에서, 상기 비브리오 균은 *V. 블니피쿠스*(*V. vulnificus*), *V. 콜레라*(*V. cholerae*), *V. 파라헤모리티쿠스*(*V. parahaemolyticus*), 또는 *V. 하베이*(*V. harveyi*)이며, 이 경우, 상기 독성인자는 상기 각 균에 대하여 각각 CPS(capsular polysaccharide) 또는 VvpE (Elastase); HAP (Hemagglutinin protease), CPS, T3SS (type 3 secretion system), 또는 T6SS (type 6 secretion system); 또는 T3SS 이다.

[0019] 본원에 따른 일 구현예에서 상기 시험물질은 상기 ClpPA 및 Lon 단백질의 발현을 활성화 시킬 것으로 기대되는 물질을 포함하나, 본원에 따른 효과를 달성하는 한 이로 제한하는 것은 아니다.

[0020] 다른 양태에서 본원은 또한 ClpPA (ClpP:ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit; ClpA: ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA), 및 Lon (Lon: ATP-dependent protease La) 단백질을 비치사 열충격 온도가 아닌 성장 온도 예를 들면 약 10~36℃에서 비브리오균에 처리하는 단계를 포함하며, 상기 ClpPA 및 Lon 단백질로의 처리에 의해, 상기 비브리오 균의 세포에서 쿼럼센싱 조절자가 분해되는 것인, 인비트로에서 비브리오 균의 쿼럼센싱 억제 방법을 제공한다.

[0021] 일 구현예에서 상기 쿼럼센싱 억제에 의해, 비브리오 균에서 생산되는 독소인 CPS(Capsular polysaccharide) 및 바이오필름 형성/생산과 같은 균의 병원성 활성을 억제할 수 있다.

[0022] 일 구현예에서 상기 비브리오 균은 *V. 블니피쿠스*(*V. vulnificus*), V. 콜레라(*V. cholerae*), *V. 파라헤모리티쿠스*(*V. parahaemolyticus*), 또는 *V. 하베이*(*V. harveyi*)이며, 이 경우, 상기 QS 조절자는 각각 SmcR, HapR, OpaR, 또는 LuxR이다.

[0023] 본원은 마스터 조절자 단백질의 이량체화가 쿼럼센싱 조절에 중요한 것을 규명하였다. 이에, 다른 양태에서 본원은 SmcR, LuxR, HapR, OpaR을 포함하는 QS 마스터 조절자 단백질을 제공하는 단계; 상기 마스터 조절자 단백질을 시험물질과 접촉시키는 단계; 상기 시험물질과 접촉한 상기 마스터 조절자 단백질 및 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군에서 상기 마스터 조절자 단백질의 이량체화 또는 농도변화를 측정하는 단계; 및 상기 측정 결과, 상기 시험물질과 접촉한 경우, 상기 마스터 조절자 단백질의 이량체화 억제되거나, 또는 상기 마스터 조절자 단백질의 농도가 감소된 경우, 상기 시험물질을 쿼럼센싱 억제제 후보물질로 선별하는 단계를 포함하는, 쿼럼센싱 억제제 후보물질 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0025] 본원에서 비치사 열충격에서 발현이 증가하는 ClpP와 Lon이 공격하는 기질이 쿼럼센싱 마스터 조절자임을 규명하였다. 또한 본원에서는 비치사 열충역을 받은 Vibrio 내 쿼럼센싱 마스터 조절자의 농도가 급격히 저하되고 그에 따라 쿼럼센싱의 조절을 받아 활성화되는 독성인자(virulence factor) 예를 들면 엑소프로테아제 및 CPS 등의 농도가 저하되는 것을 발견하였다.

[0026] 미국 FDA에 의하면 비브리오 균을 포함하는 대부분의 식중독 균은 섭씨 50도까지 성장을 보이고 있어서, 비활성화를 위해 그 이상의 고온에 노출시켜야 함을 제안하고 있다 (Bacterial Pathogen Growth and Inactivation, Appendix 4, FDA, 2017). 반면, 본원에서는 비브리오 균에 열충격 반응을 보일 정도로만 열충격을 가하면 비브리오의 독성을 상당히 저하시킬 수 있다. 또한 상기 기전을 이용하면, 쿼럼센싱을 억제할 수 있는 물질을 개발하여 비브리오의 제어에 사용할 수 있다.

[0027] 즉, 본원에서는 열충격 반응으로 인해, 쿼럼센싱이 조절된다는 새로운 사실을 규명 하였고, 그에 따라 쿼럼센싱에 의해 조절 받는 CPS를 포함하는 여러 독성인자가 열충격 영향을 받는 것을 발견하였다. 따라서, 본원에 따른 방법은 비치사 열충격을 통해 쿼럼센싱을 억제하여, 쿼럼센싱 조절자에 의해 발현이 활성화되는 여러 독성인자들 예를 들면 CPS(Capsular polysaccharide) 및 엑소프로테아제를 감소시켜 비브리오 균의 독성 제어에 효과적으로 사용될 수 있다. 또한 본원에서 규명된 기전을 이용하면 쿼럼센싱 저해제의 스크리닝이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 열충격 조건시 *V. 불니피쿠스*가 생산하는 CPS(Capsular polysaccharide) 양을 관찰하여 나타낸 것이다.

도 1A는 콜로니 형태를 나타낸 것이다. *V. 불니피쿠스* 야생형과 *wbpP* 돌연변이 균주를 LBS 아가 플레이트에 12 h 동안 30℃와 42℃ 온도조건에서 배양한 후 콜로니의 불투명도를 관찰하였다. O와 T는 각각 콜로니가 불투명(opaque)함와 투명(transparent)함을 나타낸 것이다.

도 1B는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 이용한 CPS 추출물을 관찰하여 나타낸 것이다. *V. 불니피쿠스* 야생형을 30℃와 42℃, *wbpP* 돌연변이를 30℃에서 배양한 후 CPS를 추출하여 5% 스태킹(stacking) 폴리아크릴아미드 겔상에 전기영동한 후 Stains-All로 염색하여 관찰하였다.

도 1C는 CPS 정량하여 나타낸 것이다. 추출한 CPS의 양을 CPS를 이루는 물질 중 한 종류인 *D*-갈락투론산 표준을 이용하여 정량하였다. 측정된 CPS의 농도는 1㎕의 CPS 추출액에 존재하는 갈락투론산의 질량(ng)으로 표시하였다.

콜로니 불투명도는 박테리아 세포가 생성하는 CPS의 양에 비례하였다. 상기 도 1A의 결과로 보아, 42℃ 조건하에 배양된 야생형 *V. 불니피쿠스*의 콜로니 형태는 30℃에서 배양된 세포보다 투명한 것으로 보이며 투명한 정도가 CPS를 생성하지 못하는 돌연변이(*wbpP*)와 비슷한 것으로 보아 CPS가 생성되고 있지 않은 것으로 판단된다. 실제 CPS를 추출하여 분석한 결과 또한 42℃ 조건하에 배양된 야생형 *V. 불니피쿠스*는 CPS 생성이 저하되었다(도 1B 및 C). 도 1의 결과는 *V. 불니피쿠스*를 42℃라는 온도조건하에 놓기만 하더라도 독성인자인 CPS의 합성을 효과적으로 저해할 수 있다는 것을 보여준다.

도 2는 열 충격 조건 하에서 세포 내 CPS 생합성 유전자군의 전사량과 SmcR 양의 관찰하여 나타낸 것이다.

도 2A는 CPS 생합성 유전자군의 세포내 전사량을 나타낸 것이다. 야생형 *V. 불니피쿠스*를 AB-fumarate medium에 late exponential phase (OD_{595} of 1.0)까지 배양한 후 각기 다른 test tube에 분주하여 30℃와 42℃에서 2 h 동안 배양하였다. 배양된 세포를 얻어 total RNA를 추출했고, 시료 내 CPS 생합성 유전자군의 전차체의 양을 정량적 RT-PCR을 이용하여 정량하여, *gap* 유전자의 전사체량으로 노말라이즈하여 비교분석 하였다.

도 2B는 세포 내 SmcR 양을 관찰하여 나타낸 것이다. 30℃와 42℃에서 배양된 *V. 불니피쿠스* 세포를 파쇄하여 얻은 시료를 SDS-PAGE하여 단백질을 분리한 후anti-SmcR 다클론 항체를 이용한 웨스턴 블랏팅을 하여 시료 내 SmcR의 양을 관찰하였다. 음성 대조군으로, *SmcR* mutant의 세포파쇄액을 이용하였다. 42℃에서 열충격을 받은 야생형 *V. 불니피쿠스* 내 CPS 생합성 유전자군의 전사량을 관찰한 결과 30℃에서 배양된 cell에 비해 전사량이 감소됨을 관찰하였다. CPS 생합성 유전자군의 전사는 쿼럼센싱(quorum sensing) 마스터 조절자인 SmcR에 의해 활성화된다는 것이 밝혀져 있으므로 열충격 조건 하의 세포내 SmcR의 양을 관찰하였다. 그 결과 본원에서는 42℃에서 열충격을 받은 야생형 *V. 불니피쿠스* 내 SmcR의 양이 급격하게 감소되는 것을 발견하였다. 도 2의 결과는 42℃에서 비브리오균의 다양한 독성인자의 발현을 활성화시키는 조절자인 SmcR이 급격히 감소하고, 그 결과 여러 독성인자의 생성, 특히 CPS가 생성되지 않음을 보여주는 것으로, 42℃에서 비브리오균을 처리하면, 독성을 현저히 감소시킬 수 있음을 나타낸다.

도 3은 *V. 불니피쿠스* 돌연변이 균주 내 SmcR 양을 관찰하여 나타낸 것이다.

도 3A는 세포내 SmcR의 양을 조절하는 프로테아제를 스크리닝하기 위해 *clpP*, *clpX*, *clpA*와 *lon* 유전자가 결실

된 *V. 불니피쿠스* 돌연변이를 제작하여 배양하였고 웨스턴 블랏방법으로 세포 내 SmcR양을 관찰하였다. *V. 불니피쿠스* 세포를 30℃와 42℃ 조건하에 3 h 동안 배양한 후 시료를 채취하여 세포파쇄액을 얻었고 SDS-PAGE 후 anti-SmcR 다클론 항체를 이용한 웨스턴 블랏팅을 하여 시료 내 SmcR의 양을 관찰하였다.

도 3B 내지 도 3D는 *clpP*, *clpA*와 *lon* 돌연변이 내 SmcR 양을 관찰하여 나타낸 것이다. 그림에 표시된 *V. 불니피쿠스* 균주를 42℃ 조건하에 2 h 동안 배양한 후 시간별로 시료를 채취하여 각 세포 내 SmcR의 양을 관찰하였다. 세포 내 SmcR의 양을 조절하는 프로테아제를 찾기 위해 다양한 프로테아제 돌연변이 세포를 배양하여 세포 내 SmcR의 양을 관찰하였다. 그 결과 30℃에서 배양된 *clpP, clpA, lon* 돌연변이에서 야생형 *V. 불니피쿠스*에 비해 SmcR 양이 크게 증가함을 관찰하였다. 또한 야생형 *V. 블니피쿠스*의 경우 42℃ 조건하에서는 SmcR의 양이 감소되는 반면, *clpP, clpA, lon* 돌연변이에서는 그러한 패턴이 보이지 않았다. 이를 통해 열충격 조건하에 SmcR의 분해에 ClpPA와 Lon 프로테아제가 관여함을 알 수 있었다. 도 3의 결과는 비브리오균의 다양한 독성인자의 활성화를 관장하는 SmcR의 세포 내 양이 열 충격 하에서 두 가지 프로테아제인 ClpPA와 Lon에 의해 조절됨을 보여준다.

도 4는 *clpP, clpA, lon* 돌연변이 내 CPS생합성 유전자군의 발현량 및 CPS 생성량을 관찰한 것이다.

도 4A는 CPS생합성 유전자군 발현에 대한 *clpP, clpA, lon* 돌연변이의 효과를 나타낸 것이다. *clpP, clpA, lon* 돌연변이 내 pCB014(CPS 클러스터 프로모터와 *luxAB*-transcription reporter를 fusion 시킨 plasmid)를 넣어 AB-fumarate medium에 3㎍/ml tetracycline을 첨가하여 배양하였다. 시간별 세포 배양액을 채취하여 세포 성장(OD_{595})와 RLU(relative light units)를 측정하였다. Specific luciferase activity는 RLU를 OD_{595}로 나누어 계산하였다.

도 4B 및 도 4C는 CPS 생성에 대한 *clpP, clpA, lon* 돌연변이의 효과를 나타낸 것이다. 상기 도 2B 및 C와 동일한 방법으로 CPS 양을 관찰하였다. 이는 본원에 따른 ClpA 및 Lon이, 비브리오 균에서 비브리오의 독성물질인 CPS를 효과적으로 억제할 수 있음을 나타내는 것이다.

세포 내 CPS 유전자 군의 발현은 SmcR 양에 의존적이므로 *clpP, clpA, lon* mutant 내 SmcR 양의 변화에 따라 CPS 유전자군의 전사 및 생성량이 변화하는지 관찰하였다. 그 결과 세 가지 돌연변이 모두에서 CPS 유전자군의 전사량이 증가함을 관찰하였고(도 4A), 전사량의 변화에 따라 CPS 생성량도 변화함을 관찰할 수 있었다.

도 5는 ClpPA 및 Lon에 의한 SmcR의 *인비트로* 단백질분해를 나타낸 것이다.

도 5A는 정제된 rSmcR(2.0㎛M)을 rClpP(2.2㎛M)와 rClpA(0.6㎛M)와 섞어 25분 동안 반응시키며 시간별로 시료를 채취하였다. 음성 단백질분해 대조군으로 각각 rClpA(lane 2)나 rClpP(lane 11)만 첨가하여 단백질분해가 진행되지 않음을 관찰하였다.

도 5B는 rSmcR(2.0㎛M)을 rClpA(0.6㎛M)와 섞어주고 rClpP의 농도가 0~2.2 ㎛M이 되도록 높여주면서 첨가하여 30분간 반응시킨 후 시료를 채취하였다. rRpoS는 ClpPA 단백질분해의 특이성을 보여주기 위해 첨가되었다(Lane 11, 12).

도 5C는 정제된 rSmcR(2.0㎛M)을 rLon(0.6㎛M)과 섞어 60 min 동안 반응시키며 시간별로 시료를 채취하였다.

도 5D는 rSmcR(2.0㎛M)을 rLon의 농도가 0~0.6㎛M이 되도록 높여주면서 첨가하여 60분간 반응시킨 후 시료를 채취하였다. 네 가지 조건의 반응액 내 SmcR 양을 관찰하기 위해 시료를 SDS-PAGE로 분리시킨 후 쿠마씨 블루 염색을 하여 관찰하였다. 정제된 SmcR과 각 프로테아제를 이용해 인 비트로 단백질분해를 진행한 결과 ClpPA와 Lon 모두 SmcR을 직접적으로 분해시키는 것으로 관찰되었다. ClpP와 ClpA각각 프로테아제와 chaperone의 기능을 담당하는 단백질로써 따로 첨가될 시 단백질분해 기능을 갖지 못하는 것으로 알려져 있고 따라서 본 연구에서도 같은 실험을 진행하여 따로 첨가될 시 기능이 없음을 보여주었다. 기존 연구에서 ClpP의 또 다른 partner chaperone인 ClpX가 ClpP와 함께 RpoS를 분해시키는 것으로 알려져 있으므로 본 연구의 ClpP의 단백질분해 활성이 ClpA와 작동될 때 SmcR을 특이하게 분해시킴을 보여주기 위해 RpoS를 기질로 첨가해 주었고, 그 결과 RpoS는 분해시키지 않는 것으로 관찰되었다.

도 5의 결과는 ClpPA와 Lon 프로테아제가 기질 특이적으로 SmcR을 분해함을 보여준다. 이는 여러 독성물질의 발현에 관여하는 SmcR이 ClpPA와 Lon에 의해 직접적으로 분해됨으로서 ClpPA와 Lon이 비브리오균의 독성제어에 중요하다는 것을 의미한다.

도 6은 ClpPA 및 Lon에 의한 모노머 및 다이머 형태의 SmcR의 단백질분해를 나타낸 것이다.

도 6A는 모노머 및 다이머 형태의 재조합 SmcR를 나타낸 것이다. 야생형 SmcR (SmcRWT)과 돌연변이 SmcR ($SmcR_{Y171A/C198A}$)을 DTT 첨가 유무에 따라 분자량 변화를 SDS-PAGE로 분리하여 관찰하였다.

도 6B는 정제된 $SmcR_{WT}$(2.0μM)과 $SmcR_{Y171A/C198A}$(2.0μM)을 rClpP(2.2μM)와 rClpA(0.6mM)와 섞어 DTT가 첨가되거나 첨가되지 않은 반응액으로 나누어 45 min 동안 반응시키며 시간별로 시료를 채취하였다.

도 6C는 정제된 $SmcR_{WT}$(2.0μM)과 $SmcR_{Y171A/C198A}$(2.0μM)을 rLon(0.6μM)과 섞어 DTT가 첨가되거나 첨가되지 않은 반응액으로 나누어 45 min 동안 반응시키며 시간별로 시료를 채취하였다. 채취된 시료는 SDS-PAGE로 분리시킨 후 쿠마씨 블루 염색하여 관찰하였고, 각각의 시료 내 SmcR의 잔존량을 densitometric analysis로 측정하여 그래프를 작성하였다.

SmcR이 DNA에 결합하기 위해서 다이머화가 중요한 것으로 알려져 있다. 다이머형태에 의해 SmcR의 안정성이 영향 받는지 알아보기 위해 dimerization이 되지 않는 돌연변이 SmcR ($SmcR_{Y171A/C198A}$)을 제작하여 다이머/모노머 형태의 여부를 관찰하였다(도 6A). 또한 SmcR dimerization에 중요한 residue인 C198의 이황화결합을 환원시키기 위하여 DTT의 첨가하였고 dimerization에 영향을 주는지 분석하였다. 그 결과 SmcRWT은 DTT가 첨가되지 않았을 때 대부분 dimerization 되어 있으며 DTT첨가 시 모두 모노머 형태로 변화되는 것을 관찰하였다. $SmcR_{Y171A/C198A}$의 경우 DTT 첨가 유무와 상관없이 모두 모노머 형태로 관찰되었다. 따라서 DTT첨가 유무, 돌연변이 여부에 따라 다이머와 모노머 형태를 만들 수 있으며, 다이머와 모노머 형태로 나누어진 상태에서 ClpPA 및 Lon으로 단백질 분해 시켰을 때 그 효율에 변화가 생기는지 관찰하였다. ClpPA 와 Lon에 의해 SmcR이 분해될 시 다이머 형태가 모노머 형태에 비해 안정성이 높아짐을 관찰하였다(도 6B 및 C). 도 6의 결과는 SmcR의 상태변화에 따라 ClpPA와 Lon에 의해 직접적으로 분해되는 정도가 달라짐을 보여준다. 따라서 SmcR을 모노머상태로 만들어 주는 조건 및 다이머 저해제를 개발할 수 있다면 ClpPA와 Lon에 의한 독성물질의 제어가 더욱 용이해질 수 있는 가능성이 있다.

도 7은 여러 *비브리오* 균에서의 QS 조절에 대한 열충격 처리의 효과를 나타낸 것이다.

도 7A는 *V. 불니피쿠스*, *V. 콜레라*, *V. 파라헤몰리티쿠스(parahaemolyticus)*, *V. 하베이(harveyi)*의 외부단백질분해(exoproteolytic) 활성을 나타낸 것이다. *비브리오* 균을 30℃와 비치사성(non-lethal) 고온인 42℃에서 배양하며 총 프로테아제 활성을 관찰하였다. 30℃에서 배양된 세포를 2.5% 탈지유 아가 플레이트에 spotting한 후 30℃와 42℃로 나누어 배양하였고 24시간 뒤 형성된 cleared zone크기를 비하였다.

도 7B는 여러 *비브리오 균의* 세포내 LuxR homologues양을 나타낸 것이다. *비브리오* 세포를 30℃에서 배양한 후 42℃로 옮겨 2 h 동안 배양하며 시간별로 시료를 채취하였다. 채취된 세포를 파쇄하여 total 세포 융해물을 얻었고 SDS-PAGE로 분리 후 anti-HapR (*V. cholerae*), anti-OpaR (*V. parahaemolyticus*), anti-LuxR (*V. harveyi)* 다클론 항체를 이용한 웨스턴 블랏을 진행하였다. IlpA는 열충격에 의한 영향을 받지 않는 단백질로 loading control로 이용되었다.

도 7C는 ClpPA에 의한 LuxR homologues의 인비트로 단백질분해를 나타낸 것이다. 다양한 농도의 *V. 불니피쿠스* rClpP(0~2.2μM)을 0.6μM의 rClpA와 섞은 rHapR, rOpaR, rLuxR (각각 2.0μM)에 첨가하여 60분 동안 반응시키고 시료를 얻었다. 얻어진 시료는 SDS-PAGE로 분리 후 쿠마씨 블루 염색하여 관찰하였다.

도 7D는 Lon에 의한 LuxR homologues의 인비트로 단백질분해를 나타낸 것이다. 다양한 농도의 *V. 블니피쿠스* rLon(0~0.6μM)을 rHapR, rOpaR, rLuxR (각각 2.0μM)에 첨가하여 60분 동안 반응시키고 시료를 얻었다. 얻어진 시료는 SDS-PAGE로 분리 후 쿠마씨 블루 염색하여 관찰하였다.

기존 연구에 의하면 여러 *비브리오* 균의 외부프로테아제(exoprotease)의 발현이 쿼럼센싱 마스터 조절자(LuxR homologues)에 의해 조절되는 것으로 알려져 있으며, LuxR homologues 또한 *V. 블니피쿠스*처럼 열충격에 의해 조절받는지의 여부를 알기 위해 탈지유 플레이트를 이용한 total 프로테아제 활성을 관찰하였다 (도 7A). *V. 블니피쿠스*와 마찬가지로 다른 *비브리오* 균도 42℃에서 배양할 경우 탈지유 플레이트상에 clear zone이 형성되지 않는 것을 관찰하였다. 또한 비브리오 균 내 LuxR homologue의 양이 열 충격을 받은 이후부터 서서히 감소하는 것을 볼 수 있고, ClpPA와 Lon에 의해 직접적으로 분해되는 것을 관찰할 수 있었다. 도 7의 결과로 ClpPA와 Lon에 의한 쿼럼센싱 마스터 조절자의 분해는 적어도 네가지 비브리오 균주(*V. 불니피쿠스, V. 콜레라, V. 파라헤모리티쿠스, V. 하베이*)에서 공통적으로 존재하는 현상임을 알 수 있으며, 이를 통한 독성인자의 제어를 통해 비브리오속의 병원성균주를 제어할 수 있음을 시사한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본원에서 비치사 열충격에서 발현이 증가하는 ClpP와 Lon이 공격하는 기질로 쿼럼센싱 마스터 조절자임을 규명하였다. 또한 본원에서는 열충역을 받은 Vibrio 내 QS 마스터 조절자의 농도가 급격히 저하되며, 그에 따라 쿼럼센싱의 조절을 받아 활성화되는 독성인자(virulence factor) 예를 들면 exoproteases, CPS의 농도가 저하되는 것을 발견하였다. 따라서 세균에게 비치사 열충격 반응을 보일 정도로만 열충격을 가하면 비브리오의 독성을 상당히 저하시킬 수 있다. 또한 상기 기전을 이용하면, 쿼럼센싱을 억제할 수 있는 물질을 개발하여 비비리오의 제어에 사용할 수 있다.

[0031] 이에 한 양태에서 본원은 비브리오 균을 비치사 열충격 온도에서 처리하는 단계를 포함하는 비브리오균의 독성(virulence)를 억제/제어하는 방법을 제공한다.

[0032] 본원에 따른 방법에서 상기 비치사 열충격에 의해 상기 비브리오 균의 상기 비치사 열충격 온도에서 발현이 증가하는 *ClpPA* (ClpP:ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit; ClpA: ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit) 및 *Lon* (Lon: ATP-dependent protease La) 단백질에 의해, 상기 비브리오 균에서 발현되는 쿼럼센싱 마스터 조절자 단백질의 농도가 억제되고, 이에 의해 상기 마스터 조절자에 의해 발현이 조절되는 독성인자 인자의 발현이 억제될 수 있다.

[0033] 본원에서 "독성인자(virulence factor)"는 숙주에 감염시, 숙주 내에서 균주의 복제, 전파를 용이하게 하게 하는 인자로서 숙주에서 복제하고, 주로 숙주의 방어 시스템을 피하거나, 교란시키는 인자이며, 이러한 인자는 병원성 균에서 잘 알려진 것이다 (Cross, Crit Care. 2008; 12(6): 196).

[0034] 따라서 비브리오 균에서 발견되는 다양한 인자가 본원의 방법에 포함될 수 있으며, 예를 들면 상기 비브리오 균은 *V. 블니피쿠스*(*V. vulnificus*), *V. 콜레라*(*V. cholerae*), *V. 파라헤모리티쿠스*(*V. parahaemolyticus*), 또는 *V. 하베이*(*V. harveyi*)이며, 이 경우, 상기 독성인자는 상기 각 균에 대하여 각각 CPS(capsular polysaccharide) 또는 VvpE (Elastase); HAP (Hemagglutinin protease), CPS, T3SS (type 3 secretion system), 또는 T6SS (type 6 secretion system); 또는 T3SS를 포함하나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0035] 비브리오 균의 독소의 일종인 CPS(Capsular polysaccharide) 생산은 쿼럼센싱(quorum sensing, QS)에 의해 상향 발현 또는 증가되기 때문에, 상기와 같이 열충격 온도에서 쿼럼센싱에 관여하는 마스터 조절자의 농도를 억제하면, 비브리오의 독성을 억제할 수 있다.

[0036] 구체적으로 ClpPA 및 Lon 단백질은 쿼럼센싱의 마스터 조절자를 분해하여, 이러한 조절자의 표적이 되는, 비브리오 균에서 독소를 생산하는 유전자를 조절하기 때문에, 비브리오 균의 병원성 제어에 유용하게 사용될 수 있다.

[0037] 본원의 비브리오 균은 그람 음성균으로써 야생종은 바닷물에 널리 분포하며, 담수와 토양에서도 많이 발견된다. 사람이나 어류에서 병원성을 나타내는 것이 있으며, 사람에게 패혈증, 식중독등을 일으키는 것으로, 이러한 비브리오 균으로는 *V. 블니피쿠스*(V. vulnificus), V. 콜레라(*V. cholerae*), V. 파라헤모리티쿠스(*V. parahaemolyticus*), 또는 *V. 하베이*(*V. harveyi*) 등이 있으나, 이에 제한되지 않으며 본원에 적용될 수 있는 비브리오 균은 모두 포함될 수 있다.

[0038] 본원에 사용된 용어 '쿼럼센싱(Quorum sensing)'은 세균은 세포간 신호전달 시스템의 일종으로 개체의 적정밀도를 유지한다. 한정된 공간에서 균이 임계밀도에 도달할 경우 이를 인지하여 더 이상의 증식을 막는 신호전달 방법으로 비브리오 균에서는 오토인듀서(autoinducer, AI)라는 물질이 관여한다. AI는 특정 농도에 도달하면 세포막 단백질에 의해 인식되어 마스터 QS 조절자라 불리는 전사 인자 즉, *V. harveyi*의 LuxR, *V. parahaemolyticus*의 OpaR, *V. cholerae*의 HapR 및 V. vulnificus의 SmcR로 신호를 전달한다. 이어 이들은 예를 들면 생체발광 조절, 콜로니 불투명도, 세포외 HA/프로테아제 및 영양결핍으로 인한 배양성 유지, 바이오필름, 및 독소 생산 등과 같은 현상을 조절하는 표적 유전자를 조절한다.

[0039] 본원의 상기 'ClpPA'는 ClpP와 이의 동족(cognate) 샤페론(chaperone) 단백질인 ClpA를 말한다. ClpP 프로테아제는 기질 특이성을 가지기 위하여 ATPase 도메인을 함유하는 ClpA와 같은 동족 샤페론 단백질이 필요하다. 본원의 상기 'ClpP' (ClpP: ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, YP_004189348.1)는 ATP-의존성 세린 프로테아제이며, 다양한 스트레스 조건에서 단백질 정량 조절에 중요한 단백질로, 목적에 따라 다양한 숙주 유래의 것이 본 방법에 사용될 수 있다. 또한 동일한 숙주, 예를 들면 *E. coli*에서 유래된 것이라도 특정 지역, 환경 등에 따라 서열변이가 있을 수 있으며, 이러한 것은 물론 일부 서열이 변형(결실, 치환, 부가)되었으

나, 기능적으로 동등한 변이체가 모두 본 발명에 사용될 수 있다.

[0040] 본원의 상기 'ClpA' (ClpA: ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA, YP_004188216.1)는 ClpAP 및 ClpAXP 프로테아제 복합체에서 ClpP 세린 프로테아제에 적합한 기질-특이적 부위로 작용하는 ATP-의존성 분자 샤페론으로서 안정한 단백질 구조를 펼쳐서 ClpP가 기질을 절단할 수 있도록 하는 단백질로, 목적에 따라 다양한 숙주 유래의 것이 본 방법에 사용될 수 있다. 또한 동일한 숙주에서 유래된 것이라도 특정, 지역, 환경 등에 따라 서열변이가 있을 수 있으며, 이러한 것은 물론 일부 서열이 변형(결실, 치환, 부가)되었으나, 기능적으로 동등한 변이체가 모두 본 발명에 사용될 수 있다.

[0041] 본원의 상기 'Lon' (ATP-dependent protease La, YP_004189346.1)은 DNA-결합 ATP-의존성 프로테아제로, 목적에 따라 다양한 숙주 유래의 것이 본 방법에 사용될 수 있다. 또한 동일한 숙주, 예를 들면 *비브리오 블니피쿠스*에서 유래된 것이라도 특정 개인, 지역, 환경 등에 따라 서열변이가 있을 수 있으며, 이러한 것은 물론 일부 서열이 변형(결실, 치환, 부가)되었으나, 기능적으로 동등한 변이체가 모두 본 발명에 사용될 수 있다.

[0042] 본원에서 비치사 열충격 온도는 박테리아가 성장할 수 있지만 heat shock response를 보이는 온도로 약 37℃ 내지 42℃이다.

[0043] 다른 양태에서 본원은 또한 *비브리오 균(vibrio spp)*의 쿼럼센싱(Quorum sensing, QS) 억제제 스크리닝 방법에 관한 것으로, 본 방법에 의해 선별된 물질은 비브리오 균 쿼럼센싱 억제제로 효과적으로 사용될 수 있다.

[0044] 본원에 따른 방법은 일 구현예에서 프로테아제인 *ClpPA* (ClpP:ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit; ClpA: ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit) 및 *Lon* (Lon: ATP-dependent protease La) 단백질을 발현하는 세포를 제공하는 단계; 상기 세포를 비치사 열충격 온도가 아닌 온도에서 배양하는 단계; 상기 세포를 시험물질과 접촉시키는 단계; 상기 시험물질과 접촉한 세포 및 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군 세포에서 상기 QS 조절자의 농도를 측정하는 단계; 및 상기 측정 결과, 시험물질과 접촉한 세포 및 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군 세포에서 상기 QS 조절자의 농도를 비교하여, 상기 접촉한 세포에서 상기 QS 조절자의 농도가 감소된 경우, 상기 시험물질을 쿼럼센싱억제제 후보물질로 선별하는 단계를 포함한다.

[0045] 본원에서 비치사 열충격 온도가 아닌 온도는 비치사 열충격 온도가 아닌 온도로서 ClpPA 및 Lon 의 발현을 증가시키지 않는 온도이다. 본원에서는 비치사 열충격 온도에서 ClpPA 및 Lon 의 발현이 증가하고, 이것이 QS 마스터 조절자의 농도를 저하시켜 결국 QS를 억제할 수 있다. 따라서 정상 성장 온도에서 ClpPA 및 Lon 의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질은 QS 억제제로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0046] 일 구현예에서, 비치사 열충격 온도가 아닌 온도는 박테리아의 성장 온도로 10℃ 내지 41℃, 특히 10℃ 내지 36℃이나 이로 제한하는 것은 아니다.

[0047] 상기 본원에 사용되는 ClpPA 및 Lon은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 특히 제조방법은 유전자 재조합 기술을 이용하는 것이다. 예를 들면 상기 단백질을 코딩하는 상응하는 유전자를 포함하는 플라스미드를 원핵 또는 진핵세포 세포 예를 들면 곤충세포, 포유류 세포에 전달하여 과발현 시킨 후 정제하여 사용할 수 있다.

[0048] 또는 단백질을 암호화하는 DNA 또는 RNA 서열을 적당한 숙주 세포에서 발현시켜 그 세포 파쇄물을 만들거나 상기 스크리닝 단백질의 mRNA를 시험관내에서 번역한 후 당업계에 공지된 단백질 분리 방법에 의해 스크리닝 단백질을 정제할 수 있다. 통상, 세포잔여물(cell debris) 등을 제거하기 위해 상기 세포 파쇄물 또는 시험관내 번역한 결과물을 원심분리한 후, 침전, 투석, 각종 컬럼 크로마토그라피 등을 적용한다. 이온교환 크로마토그라피, 겔-퍼미에이션 크로마토그라피, HPLC, 역상-HPLC, 프렙용 SDS-PAGE, 친화성 컬럼 등은 컬럼크로마토그라피의 예이다.

[0049] 본원의 상기 'QS 조절자'는 본원에서 규명된 *ClpPA* 및 *Lon* 프로테아제에 의해 분해되는, LuxR 호모로그인 SmcR, HapR, OpaR, 및 LuxR 등을 말한다. 상기 유전자는 공지된 것으로 다음을 참조할 수 있다: SmcR: YP_004187760.1, HapR: EAZ76092.1, OpaR: NP_798895.1, LuxR: AIV06635.1. 상기 조절자는 모두 ClpPA 및 Lon에 의해 단백질 분해되므로, 이들 조절자의 농도가 대조군에 비해 감소되었는지 여부에 따라 QS 억제유무를 알 수 있다. 상기 QS 조절자의 농도 감소여부는 일반적인 단백질 농도 측정하는 방법을 사용할 수 있다.

[0050] 단백질의 농도를 측정하기 위한 방법도 공지되어 있으며, 예를 들면 실시예 바로 앞 부분에 기재된 문헌 리스트에서 적절한 것을 참고할 수 있다. 또한 예를 들면 웨스턴블랏, ELISA(Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay), 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 조직면역염색, 면역침전 분석법, 보체 고정분석법, FACS (Fluorescent

Activated Cell Sorter), 단백질 칩 등을 들 수 있으나 이로 제한하는 것은 아니다. 상기 방법들을 통하여, 대조군에서의 QS 조절자의 농도를 비교하여 그 양을 감소시킨 물질을 비브리오 균 QS 억제제 후보물질로 선별한다. 이러한 물질은 비브리오 균 QS 억제제로서 유용할 수 있다.

[0051] 한 구현예에서, ClpPA 및 Lon 단백질은 이를 발현하는 세포의 형태로 제공될 수 있다. 예를 들면 ClpPA 및 Lon를 발현(Transient 또는 Stable)하는 *V. 블니피쿠스(V. vulnificus), V. 콜레라(V. cholerae), V. 파라헤모리티쿠스(V. parahaemolyticus),* 또는 *V. 하베이(V. harveyi)*를 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 예를 들면 상기 세포를 세포배양 플레이트에 배양한 후, 여기에 시험물질을 첨가한 후, 일정 시간 후에 세포로부터 총 단백질을 추출하여, 예를 들면 웨스턴 블랏 등을 통하여 QS 조절자 농도 감소 여부를 확인할 수 있다. 대조군(시험물질을 처리하지 않은 경우)와 비교하여, QS 조절자의 농도를 감소시킨 것을 비브리오 균 QS 억제제 후보물질로 선별할 수 있다.

[0052] 본 방법에서 사용되는 단백질의 양, 세포의 종류 및 농도와 시험물질의 양 및 종류 등은 사용하는 구체적인 실험방법 및 시험물질의 종류에 따라 달라지며, 당업자라면 적절한 양을 선택할 수 있을 것이다. 실험결과 시험물질과 접촉되지 않은 대조군과 비교하여 시험물질의 존재하에서 QS 조절자의 농도 감소를 가져오는 물질을 비브리오 균 QS를 억제하는 물질로 선별한다. 대조군과 비교 약 99% 이하 감소, 약 95% 이하 감소, 약 90% 감소, 약 85% 감소, 약 80% 감소, 약 75% 감소, 약 70% 감소, 약 65% 이하 감소, 약 60% 이하 감소, 약 55% 감소, 약 50% 이하 감소, 약 45% 이하 감소를 의미하나, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다.

[0053] 본 발명에서 "시험물질"은 비브리오 균 QS를 억제할 것으로 기대되는 물질을 의미하여, 저분자량 화합물, 고분자량 화합물, 핵산분자(예컨대, DNA, RNA, PNA 및 앱타머), 단백질, 당 및 지질 등을 포함하나 이로 한정하는 것은 아니다. 상기 시험물질은 2개 이상의 아미노산 잔기, 예컨대 6개, 10개, 12개, 20개 이하 또는 20개 초과 예컨대 50개 아미산 잔기를 갖는 폴리펩타이드일 수 있다.

[0054] 비브리오 균 QS를 억제하는 물질의 스크리닝 목적을 위해서는 화합물은 저분자량의 치료효과를 갖는 것이 사용될 수 있다. 예를 들면 중량이 400 Da, 600 Da 또는 800 Da과 같은 약 1000 Da 내외의 화합물이 사용될 수 있다. 목적에 따라 이러한 화합물은 화합물 라이브러리의 일부를 구성할 수 있으며, 라이브러리를 구성하는 화합물의 숫자도 수십개부터 수백만개까지 다양하다. 이러한 화합물 라이브러리는 펩타이드, 펩토이드 및 기타 환형 또는 선형의 올리고머성 화합물, 및 주형을 기본으로 하는 저분자 화합물, 예컨대 벤조디아제핀, 하이단토인, 바이아릴, 카보사이클 및 폴리사이클 화합물(예컨대 나프탈렌, 페노티아진, 아크리딘, 스테로이드 등), 카보하이드레이트 및 아미노산 유도체, 디하이드로피리딘, 벤즈하이드릴 및 헤테로사이클(예컨대 트리아진, 인돌, 티아졸리딘 등)을 포함하는 것일 수 있으나, 이는 단지 예시적인 것으로 이로 한정되는 것은 아니다.

[0055] 본원에 따른 방법에서 비브리오 균은 비치사 열충격온도가 아닌 온도에서 배양된다. 비치사 열충격온도는 37 내지 42℃로, 이러한 온도를 제외한 성장 온도 예를 들면 약 10-36℃, 특히 10-32℃이다.

[0056] 본원에서는 또한 QS 마스터 조절자의 이량체화가 QS의 조절에 중요한 것을 발견하였다.

[0057] 이에, 또 다른 양태에서 본원은 또한 SmcR, LuxR, HapR, OpaR을 포함하는 QS 마스터 조절자 단백질을 제공하는 단계; 상기 마스터 조절자 단백질을 시험물질과 접촉시키는 단계; 상기 시험물질과 접촉한 상기 마스터 조절자 단백질 및 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군에서 상기 마스터 조절자 단백질의 이량체화 또는 농도변화를 측정하는 단계; 및 상기 측정결과, 상기 시험물질과 접촉한 경우, 상기 마스터 조절자 단백질의 이량체화 억제되거나, 또는 상기 마스터 조절자 단백질의 농도가 감소된 경우, 상기 시험물질을 쿼럼센싱 억제제 후보물질로 선별하는 단계를 포함하는, 쿼럼센싱 억제제 후보물질 스크리닝 방법을 제공한다.

[0058] 본원에 따른 쿼럼센싱 억제제 후보물질 스크리닝 방법에 사용되는 단계의 구성은 앞서 언급한 바 및 이하 실시예의 기재를 참조할 수 있다.

[0059] 본 발명은 달리 언급이 없는 한 세포생물학, 세포배양, 분자생물학, 유전자 형질전환 기술, 미생물학, DNA 재조합기술, 및 면역학 분야의 당업자의 기술수준 내인 통상의 기술을 사용하여 실시될 수 있다. 또한 일반적인 기술에 관한 보다 자세한 설명은 다음의 책 및 문헌을 참조할 수 있다. 분자생물학 및 생화학에 관한 일반적인 방법에 관해서는 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. (Ausubel et al. eds.,John Wiley & Sons 1999); DNA Cloning, Volumes I and II (Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (Gait ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (Hames and Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (Hames

and Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (Freshney and Alan, Liss, Inc., 1987); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller and Calos, eds.); Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Edition (Ausubel et al., eds.); 및 Recombinant DNA Methodology (Wu, ed., Academic Press)등을 참조할 수 있다. 또한 Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Miller and Calos, eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al., eds.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (Weir and Blackwell, eds., 1986); Protein Methods (Bollag et al., John Wiley &Sons 1996); Non-viral Vectors for Gene Therapy (Wagner et al. eds., Academic Press 1999); Viral Vectors (Kaplitt &Loewy eds., Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (Lefkovits ed., Academic Press 1997); 및 Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley &Sons 1998)을 참조할 수 있다. 세포배양 및 배지에 관한 일반적 기술에 관하여는 Large Scale Mammalian Cell Culture (Hu et al., Curr. Opin. Biotechnol. 8 (1997), 148); Serum-free Media (Kitano, Biotechnology 17 (1991), 73); Large Scale Mammalian Cell Culture (Curr. Opin. Biotechnol. 2 (1991), 375); 및 Suspension Culture of Mammalian Cells (Birch et al., Bioprocess Technol. 19 (1990), 251)을 참조할 수 있다.

[0061] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해서 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0063] **실시예**

[0064] **물질 및 재료**

[0065] **박테리아 균주, 배양 배지 및 올리고뉴클레오타이드 프라이머**

[0066] 본원에 사용된 박테리아 균주 및 플라스미드는 하기 표 1에 정리하였다.

[0067] *V. 블니피쿠스* MO6-24/O (wild-type)과 돌연변이 균주는 2.5% 소디움클로라이드의 LB(Luria-Bertani) 또는 AB 푸마레이트 배지(300 mM NaCl, 50 mM MgSO4, 0.2% vitamin-free casamino acids, 10 mM potassium phosphate, 1 mM L-arginine, 1.0% fumarate, pH 7.5; 38)을 배지로 사용하여 30℃에서 배양하였다. 클로닝에 사용된 E. coli 균주는 기본적으로 LB 배지를 사용하여 37℃에서 배양하였다. Broad-host-range 벡터 pRK415 및 derivative 플라스미드를 가진 *V. 블니피쿠스* 균주는 3 μg/ml tetracycline을 첨가한 배지에 배양하였다. *E. coli* 균주의 경우 배지에 항생제를 첨가할 때 100μg/ml 앰피실린, 20μg/ml 클로람페니콜, 15μg/ml 테트라사이클린을 첨가하여 배양하였다. 본원에 사용된 프라이머들은 하기 표 1에 정리하였다.

[0068] [표 1] 본원에 사용된 박테리아 균주 및 플라스미드

Strain/plasmid	Genotype	Source/reference
E. coli		
DH5α	(Φ80 *lacZΔM15*) *recA1 endA1 gyrA96 relA1 thi-1 hsdR17*($r_K^-m_K^-$) *supE44 deoRΔ* (*lacZYA-argF*)*U169*	Laboratory collection
SM10*λpir*	*thi-1 thr leu tonA lacY supE recA*:: Rp4-2-Tc::Mu*λpir*, OriT of RP4, Km^R	1
JM109	*endA1 recA1 gyrA96 thi-1 hsdR17*($r_K^-m_K^-$) *relA1supE44* Δ(*lac-proAB*)[F' *traD36proABlacI*^{q}ZΔ*M*15]	Qiagen
BL21 (DE)	*E. coli* strain B F$^-$ *dcm ompT hsdS* ($r_B^-m_B^-$) *galλ* (DE3)	Invitrogen
V. vulnificus		
MO6-24/O	Clinical isolate	2
CB504	MO6-24/O, *wbpP*::mini-*Tn*5 lacZ1-Km^R	3
HS031	MO6-24/O, *smcR*, Km^R	4
KL321	MO6-24/O, Δ*clpP*	This study
KL322	MO6-24/O, Δ*clpA*, Km^R	This study
KL421	MO6-24/O, Δ*lon*, Km^R	This study
SM801	MO6-24/O, Δ*clpX*, Km^R	This study
V. cholerae		
ATCC14033	Serovar O1, biotype ElTor, serotype Inaba	ATCC
V. harveyi		
B392	unknown	5
V. parahaemolyticus		
RIMD2210633	Serotype O3:K6	ATCC/BAA-238
Plasmids		
pRK415	IncP *ori*, broad-host-range vector; *oriT* of RP4; Tc^R	6
pRK415-*clpP*	pRK415 containing *V. vulnificus clpP* gene, Tc^R	This study
pRK415-*clpA*	pRK415 containing *V. vulnificus clpA* gene, Tc^R	This study
pRK415-*lon*	pRK415 containing *V. vulnificus lon* gene, Tc^R	This study
pRK415-*lon*6XHis	pRK415 containing *V. vulnificus lon* gene with 6XHis codons, Tc^R	This study
pBluescript II SK(+)	Cloning vector, Ap^r	Stratagene
pDM4	Suicide vector, *ori*R6K, Cm^r	7
pUC4K	*nptI*, Ap^r, Km^r	Pharmacia Biotech
pSK*clpX*up	pBluescript II SK(+) with 670-bp *V. vulnificus clpX* upstream region	This study
pSK*clpX*up/down	pSK*clpX*up with 1618-bp *V. vulnificus clpX* downstream region	This study

[0069]

[0070]

pSK*clpX*up/*nptI*/down	pSK*clpX*up/down with 1.2-Kb *nptI* gene	This study
pSM801	pDM4 with 3.6-Kb DNA of internally deleted and *nptI* inserted *clpX*	This study
pSK*clpP*up	pBluescript II SK(+) with 566-bp *V. vulnificus clpP* upstream region	This study
pSK*clpP*up/down	pSK*clpP*up with 719-bp *V. vulnificus clpP* downstream region	This study
pDM4-Δ*clpP*	pDM4 with 1.3-Kb DNA of internally deleted *clpP*	This study
pSK*clpA*up	pBluescript II SK(+) with 819-bp *V. vulnificus clpA* upstream region	This study
pSK*clpA*up/down	pSK*clpA*up with 819-bp *V. vulnificus clpA* downstream region	This study
pSK*clpA*up/nptI/down	pSK*clpA*up/down with 1.2-Kb *nptI* gene	This study
pDM4-Δ*clpA*Km^r	pDM4 with 2.7-Kb DNA of internally deleted and *nptI* inserted *clpA*	This study
pSK*lonA*up	pBluescript II SK(+) with 647-bp *V. vulnificus lon* upstream region	This study
pSK*lonA*up/down	pSK*lonA*up with 514-bp *V. vulnificus lon* downstream region	This study
pDM4-Δ*lon*	pDM4 with 1.2-Kb DNA of internally deleted *lon*	This study
pCB014	pHK0011containing the upstream region of the CPS-cluster (*wza-luxAB*);Tc^R	3
pQE30	Expression vector, N-terminal 6-His tag, Ap^R	Qiagen
pQE-SmcR	pQE30 containing the *V. vulnificus smcR* ORF, Ap^R	This study
pQE-SmcR$_{Y171A/C198A}$	pQE30 containing *smcR* Y171A and C198A mutated region, Ap^R	This study
pQE-ClpP	pQE30 containing the *V. vulnificus clpP* ORF, Ap^R	This study
pQE-ClpA	pQE30 containing the *V. vulnificus clpA* ORF, Ap^R	This study
pQE-RpoS	pQE30 containing the *V. vulnificus rpoS* ORF, Ap^R	This study
pQE-VhLuxR	pQE30 containing the *V. harveyi luxR* ORF, Ap^R	This study
pQE-VpOpaR	pQE30 containing the *V. parahaemolyticus opaR* ORF, Ap^R	This study
	Expression vector; T7 *lac* promoter, *oriF1*; Km^R	
pET28a	pET28a containing the *V. cholerae hapR* ORF, Km^R	Novagen
pET28a-VcHapR		This study

[0072] [표 2] 본원에 사용된 프라이머

Primer name	Sequences (5'→3')
lonA-upF	GATCGTCGACGGAACGTTCCGAGCGTATCGAGATCCC
lonA-upR	GATCCTCGAGGTTTCTTGACGCGGTTACGGATGCGC
lonA-downF	GATCCTCGAGGGCTGCACATCGTGGTGGTATTACAAC
lonA- downR	GATCGGGCCCCCAACTAGAGCTACTTGATCACCAGAC
lonA-comF	CCCAAGCTTATGAACTTGGAACGTTCCGAG
lonA-comR	CGGGATCCCTATTTTTTAGCGTCAAACTCCACCCC
clpP-upF	GATCGGGCCCGTTGAAGCACGTCAACTACCAGAACTAAACG
clpP-upR	CGGGATCCGGCGACATTGCATTTTTTTCTTGGTAGCTCAT
clpP-downF	CGGGATCCGACTCATCGCAGTGCATAATTTGCCTGCGC
clpP-downR	GATCGAGCTCATCTTCGCCCACATAACCCGCTTCTGTTAG
clpP-comF	GATCAAGCTTATGAGCTACCAAGAAAAAAATGCAATG
clpP-comR	GATCGGATCCTTATGCACTGCGATGAGTCAATACTG
clpA-upF	GATCGGGCCCGCAGCCTGCTGTGGCGTGAATTAG
clpA-upR	GATCGGATCCCCAACAATGCGAGTAGGAGGTGTTC
clpA-downF	GATCGGATCCCGCGTGAAGAAGCGGTTCATTAAAAG
clpA-downR	GATCGAGCTCCATCGTAACGGAACCATGTATCCCCC
clpA-comF	GATCCTGCAGATGCTTAATAAAGAATTAGAGTCGAG
clpA-comR	GATCGGATCCCTTAATGAACCGCTTCTTCACGCG
clpX-upF	CGAGCTCACCTAACTCACGTGTGATGATTCACCAGCC
clpX-upR	CGGGATCCAGCAAGATGTTACTCTTACCTAGCTCCACG
clpX-do wnF	CGGGATCCCGTGTTGCTAGAAACCATGTATGAACTGCC
clpx-dow nR	GCGGGCCCTCATTGAACGAGTTGTTCTGTTCTGGGTCC
SmcRexp-F	CGGGATCCATGGACTCAATCGCAAAGAGA
SmcRexp-R	GATCAAGCTTCTGGTGTTATTCGTGCTCGCG
ClpPexp-F	GATCGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACTATGAGCTACCAAGAAAAAAAT GCAATG
ClpPexp-R	GATCGGATCCCTAGTGATGGTGATGGTGATGTGCACTGCGATGAGTCAATACT GCG
ClpAexp-F	GATCGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACTATGCTTAATAAAGAATTAGAG TCGAGC
ClpAexp-R	GATCGGATCCCTAGTGATGGTGATGGTGATGATGAACCGCTTCTTCACGCGTT GTC
RpoSexp-F	GATCGGATCCTGAAAAGAGGAGAAATTAACTATGCATCACCATCACCATCAC ATGAGTATCAGCAACACAGTCACC
RpoSexp-R	GATCAAGCTTTCAATCCATATCGATATCAAACAAATTTTCC
lonA-comF	CCCAAGCTTATGAACTTGGAACGTTCCGAG
lon6XHR	CGGGATCCCTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGTTTTTTAGCGTCAAACTCCAC

[0073]

HapRexp-F	GATCGGATCCATGCTCAATCAACAACTCAATTG
HapRexp-R	GATCAAGCTTCTAGTTCTTATAGATACACAGC
LuxRexp-F	GATCGGATCCATGGACTCAATTGCAAAGAGACC
LuxRexp-R	GATCAAGCTTAGTGATGTTCACGGTTGTAGATG
OpaRexp-F	GATCGGATCCATGGACTCAATTGCAAAGAGACC
OpaRexp-R	GATCAAGCTTAGTGTTCGCGATTGTAGATGC
SmcRY171AR	CAAACAGCGAGGCACAAATGCCGTGG
SmcRY171AF	CCACGGCATTTGTGCCTCGCTGTTT
SmcRC198ARH	GATCAAGCTTC*TTA*TTCGTGCTCGCGTTTATAGATGGCTAGCATGTC

[0074]

[0076] **재조합 단백질 클로닝 및 정제**

[0077] 하기 프라이머 세트를 이용하여 (SmcRexp-F / SmcRexp-R; ClpPexp-F / ClpPexp-R; ClpAexp-F / ClpAexp-R; RpoSexp-F / RpoSexp-R; lonA-comF / lon6XHR) 얻어진 PCR 생성물을 pQE30 (*smcR, clpP, clpA,* and *rpoS)* 또는 pRK415 (*lon*)에 클로닝하였다. 재조합 SmcR, ClpP, ClpA, RpoS는 *E. coli* JM109 cell을 이용하여 1 mM IPTG를 첨가한 LB 배지에 배양하여 과발현 시켰고, 재조합 Lon은 *V. 불니피쿠스* MO6-24/O host cell를 이용하여 1 mM IPTG가 첨가된 LBS 배지 배양하여 과발현 시켰다. 과발현된 재조합 단백질은 Ni^{+}-니트릴로트리아세트산 친화 컬럼을 이용하여 정제하였고, rLon의 경우 활성을 유지시키기 위해, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM $MgCl_2$, 10% 글리세롤 버퍼로 투석(dialysis)하였다.

[0079] **통계 분석**

[0080] 결과는 최소 3번의 독립된 실험의 평균 ± 표준편차로 나타내었다. Student's t-test (SYSTAT program, SigmaPlot version 9, Systat Software Inc.)를 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 각 도면 또는 도면의 설명에 나타나 있는 P-value는 0.05<p<0.001 또는 p<0.001는 각각 * 또는 **로 나타내었다.

[0082] **실시예 1. 열충격 조건에서 생장한 *V. 블니피쿠스* 세포에 의한 CPS 생산 감소 확인**

[0083] 본 발명자는 종래 논문에서 CPS 생산에 결합이 있는 *V. 블니피쿠스* 돌연변이(예를 들어, *wbpP* 돌연변이)는 야생형에 비하여 생물막 형성이 증가된다는 것을 보고하였다. *V. 블니피쿠스*의 CPS 합성이 배양 온도에 좌우되는 것인지 확인하기 위하여, AB-푸마레이트 플레이트 상에서 30℃ 또는 42℃에서 생장시킨 *V. 블니피쿠스*의 콜로니 불투명성을 관찰하였다.

[0084] 콜로니 불투명도는 박테리아 세포가 생성하는 CPS의 양에 비례하였다. 도 1A의 결과로 보아, 42℃ 조건하에 배양된 야생형 *V. 불니피쿠스*의 콜로니 형태는 30℃에서 배양된 세포보다 투명한 것으로 보이며 투명한 정도가 CPS를 생성하지 못하는 돌연변이(*wbpP*)와 비슷한 것으로 보아 CPS가 생성되고 있지 않은 것으로 판단된다. 실제 CPS를 추출하여 분석한 결과 또한 42℃ 조건하에 배양된 야생형 *V. 불니피쿠스*는 CPS 생성이 저하되었다(도 1B 및 C).

[0085] 즉, CPS-음성 *wbpP* 돌연변이에서는 반투명의 콜로니 타입이 나타난 반면, 30℃에서 생장시킨 야생형에서는 불투명한 콜로니 형태가 나타났다. 그러나, 42℃에서 생장시킨 야생형 *V. 블니피쿠스*에서는 투명한 콜로니 형태가 나타났다(도 1A). 42℃에서 형성된 *V. 블니피쿠스* 콜로니의 반투명한 외관이 CPS 합성의 결핍에 기인한 것인지 확인하기 위하여, 48시간동안 30℃ 또는 42℃에서 AB107 푸마레이트 아가 플레이트에서 생장시킨 *V. 블니피쿠스*에서 CPS 분획을 추출하여 5% 스태킹 폴리아크릴아미드 겔에서 분리시켰다. 42℃에서 생장시킨 *V. 블니피쿠스* 유래 CPS 분획 염색에서 기저 레벨로 나타났는데, 이는 *wbpP* 돌연변이와 유사하였다(도 1B). 30℃에서 생장시킨 야생형 및 *wbpP* 돌연변이 유래 CPS의 농도는 각각 CPS 프레퍼레이션 ㎕당 125 ± 6.3 및 41 ± 5.2 ng의 갈락투론산 동등량이었다. 42℃에서 생장시킨 야생형에서 추출한 분획에서의 CPS 농도는 CPS 프레퍼레이션 ㎕당 56 ± 4.2 ng의 갈락투론산 동등량이었다(도 1C). CPS-결실 돌연변이에 의해 형성된 생물막의 사이즈 증가는, 종래 주장된 바와 같이 세포의 부착 및 응집 증가에 의하여 성숙 생물막으로부터의 세포 확산이 감소되기 때문인 것으로 여겨진다. 분산 정도의 감소에 대한 배양 온도의 효과를 연구하기 위하여, 30℃에서 형성된 생물막을 2X 부피의 후레쉬 PBS(Phosphate buffered saline)에 재서스펜젼시켜 추가로 24시간동안 30℃ 또는 42℃에서 배양시켰다(도 1D 및 E). 48시간동안 30℃에서 형성된 첫 번째 생물막(도 1D 및 E에서 1로 라벨됨)은 30℃(3으로 라벨됨)보다는 42℃(5로 라벨됨)에서 계속 더 유지되었다. 반대로, 첫 번째 생물막 유래 분산 세포에 의해 형성된 두 번째 생물막은 30℃(2로 라벨됨)에서 분명하였지만, 42℃(4로 라벨됨)에서는 최소였다.

[0087] **실시예 2. 전사 활성인자 SmcR의 레벨의 상당 수준의 감소에 기인한, 열충격 조건 하에서의 CPS 생합성 유전자군의 하향-조절.**

[0088] **정량적 RT-PCR** : 30℃ 온도 조건에서 배양된 야생형 *V. 블니피쿠스*를 각각 다른 tube에 나눠 담고, 30℃나 42℃ water bath에 배양하여 시간별로 샘플을 채취하였다. 얻어진 cell로부터 total RNA를 추출하였고, M-MLV reverse transcriptase와 random 6-mer primer를 이용하여 cDNA를 제작하였다. CPS 생합성 유전자군과 *gap* 유전자 특이적 primer를 이용하여 정량적 RT-PCR을 수행하였다. 정량적 RT-PCR로부터 얻어진 각각의 C_T 값을 $2^{-\Delta\Delta}$

^{CT} 방법을 이용하여 노말라이즈하였다.

[0089] *V. 블니피쿠스* 균주 MO6-24/O에서, CPS 생산은 주로 wza부터 wbfV 까지의 최소 18 유전자(CPS gene cluster; 6)를 포함하는 CPS 생합성 유전자군의 전사 조절에 의해 좌우된다. 열충격 *V. 블니피쿠스*에서의 CPS 생산 감소가 상기 전사 결함에 의해 야기되는 것인지 조사하기 위하여, 상기와 같이 CPS-유전자 클러스터에서의 wza 유전자를 사용하여 상기한 바의 정량적 RT-PCR을 수행하였다. 30℃ 또는 42℃에서 배양시킨 *V. 블니피쿠스*에서의 CPS 유전자 클러스터의 전사인자의 상대적 풍부 여부를 각 샘플에서 gap(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene) 전사로 노말라이즈하여 측정하였다.

[0090] 42℃에서 열충격을 받은 야생형 *V. 불니피쿠스* 내 CPS 생합성 유전자군의 전사량을 관찰한 결과 30℃에서 배양된 cell에 비해 전사량이 감소됨을 관찰하였다. 기 보고된 논문(Lee *et al*. 2013)에서 CPS 생합성 유전자군의 전사는 쿼럼센싱(quorum sensing) 마스터 조절자인 SmcR에 의해 활성화된다는 것이 밝혀져 있으므로 열충격 조건 하의 세포내 SmcR의 양을 관찰하였다. 그 결과 42℃에서 열충격을 받은 야생형 *V. 불니피쿠스* 내 SmcR의 양이 급격하게 감소되는 것을 관찰하였다.

[0091] 즉, 30℃에서 생장한 세포에서의 wza 전사 레벨과 비교하여, wza 전사의 세포 레벨은 42℃에 노출된 세포에서보다 상당히 감소하였다(도 2A). CPS 유전자 클러스터의 전사가 QS 마스터 조절자 SmcR에 의해 활성화되기 때문에, 42℃로 노출된 세포에서의 이의 함량을 조사하였다. SmcR-특이적 항체를 사용한 웨스턴 블랏 분석에서, 42℃로 노출된 세포에서 SmcR 레벨이 재빨리 감소하였고, 1시간 동안 42℃에서 배양한 샘플에서는 SmcR 밴드가 분명하게 관찰되지가 않았다(도 2B). 반대로, 30℃로 노출된 세포에서는 최소 3시간 이상 잘 유지되었다. 이러한 결과로 SmcR의 특이적 단백질분해에서 열충격 프로테아제가 관여하는 것으로 생각할 수 있다.

[0093] **실시예 3. *clpP, clpA,* 및 *lon* 돌연변이에서 SmcR의 세포내 레벨 증가 확인**

[0094] 고온에서의 SmcR 레벨 저하를 유발하는 인자를 확인하기 위하여, *V. 블니피쿠스*의 열충격 프로테아제 돌연변이에서의 SmcR의 세포내 함량을 조사하였다.

[0095] **3-1. 결실 돌연변이 구축**

[0096] ***lon* 결실 돌연변이 구축** : *lon* 유전자를 돌연변이시키기 위하여 MO6-24/O의 염색체를 템플레이트로lon-upF와 lon-upR, lon-downF와 lon-downR 프라이머를 이용해 업스트림과 다운스트림 지역을 PCR 하였다. 각 PCR 생성물을 제한 효소로 다이제스트하여 모두 pBluescript KS(+)에 라이게이션(ligation)하였고, SK*lonA*up/down 플라스미드를 건조하였다. pSK*lonA*up/down로부터 *lonA*up/down insert를 얻어 pDM4에 ligation 하여 pDM4-Δ*lon*을 건조하였고, *E. coli* strain인 SM10λ*pir*에 transformation하여 MO6-24/O에 conjugation하였다. 2μg/mℓ의 클로람페니콜이 첨가된 TCBS 배지에서 자란 콜로니를 LBS broth에 계대배양하며 homologous 재조합시켜 5% 수크로오즈가 첨가된 LBS 플레이트에 스프레딩하였고, 자라난 콜로니들 중 불투명(opaque)한 콜로니를 분리하여 PCR을 이용하여 최종적으로 돌연변이 여부를 확인하였다.

[0097] ***clpP* 결실 돌연변이 구축** : *clpP* gene을 mutation 하기 위하여 MO6-24/O의 chromosome을 template로 clpP-upF와 clpP-upR, clpP-downF와 clpP-downR primer를 이용해 upstream과 downstream 지역을 PCR 하였다. 각 PCR product를 restriction enzyme으로 digestion 하여 모두 pBluescript KS(+)에 ligation 하였고, pSK*clpPA*up/down plasmid를 건조하였다. pSK*clpPA*up/down로부터 *clpPA*up/down insert를 얻어 pDM4에 ligation 하여 pDM4-Δ*clpP*을 건조하였고, *lon* deletion mutant 제작 과정과 동일한 방법으로 mutant를 제작하였다.

[0098] ***clpA* 및 *clpX* 결실 돌연변이 구축** : *clpA* 유전자를 돌연변이시키기 위하여 MO6-24/O의 염색체를 템플레이트로 clpA-upF와 clpA-upR, clpA-downF와 clpA-downR 프라이머를 이용해 업스트림과 다운스트림 지역을 PCR 하였다. 각 PCR 생성물을 제한 효소로 digestion 하여 모두 pBluescript KS(+)에 ligation 하였고, pSK*clpA*up/down 플라스미드를 건조하였다. pSK*clpA*up/down 플라스미드를 BamHI으로 digestion한 후 pUC4K 유래의 가나마이신 내성 유전자(nptI)를 삽입하여 pSK*clpA*up/*nptI*/down을 건조하였다. *clpA*up/*nptI*/down insert를 얻어 pDM4에 ligation 하여 pDM4-Δ*clpA*Km^{r}을 건조하였고, *lon* 결실 돌연변이 제작 과정과 동일한 방법으로 돌연변이를 선별하였다.

[0099] 마찬가지로, *clpX* gene을 돌연변이시키기 위하여 MO6-24/O의 염색체를 템플레이트로 clpX-upF와 clpX-upR, clpX-downF와 clpX-downR 프라이머를 이용해 업스트림과 다운스트림 지역을 PCR 하였다. 각 PCR 생성물을 제한

효소로 digestion 하여 모두 pBluescript KS(+)에 ligation 하였고, pSK*clpX*up/down 플라스미드를 건조하였다. pSK*clpX*up/down plasmid를 BamHI으로 digestion한 후 pUC4K 유래의 가나마이신 내성 유전자(nptI)를 삽입하여 pSK*clpX*up/*nptI*/down을 건조하였다. *clpX*up/*nptI*/down insert를 얻어 pDM4에 ligation 하여 pDM4-Δ*clpX*Km^{r}을 건조하였고, *lon* 결실 돌연변이 제작 과정과 동일한 방법으로 돌연변이를 선별하였다.

[0101] **3-2. 웨스턴 블랏 및 결과**

[0102] 야생형 및 상기에서 구축한 Δ*clpP*, Δ*clpA*, Δ*clpX*, 및 Δ*lon* 균주를 30℃ 또는 42℃에서 생장시켜, 이들의 세포 용해물을 SmcR-특이적 항체로 웨스턴 블랏팅을 수행하였다. 그 결과, 30℃에서 생장한 야생형 균주보다 Δ*clpP*, Δ*clpA*, Δ*clpX*, 및 Δ*lon* 균주의 용해물에서 SmcR 밴드의 강도가 더 높게 나타났다. 또한, 고 배양온도에서도 이러한 돌연변이에서의 SmcR 레벨 증가가 지속되었으며, 반면 도 2A(도 3A)에서 나타난 바와 같이 42℃에 노출된 야생형 세포에서는 SmcR 밴드는 관찰되지 않았다. *V. 블니피쿠스* ClpP, ClpA, 및 Lon가 열충격 단백질이라는 것을 확인하기 위하여, ClpP, ClpA, 및 Lon의 세포내 레벨에 대한 열충격의 효과를 anti-ClpP, anti-ClpA, 및 anti-Lon 다클론 항체를 사용하여 관찰하였다. 예상한 바와 같이, 이들 단백질은 정상 배양 온도, 즉 30℃에서 생장한 세포 내에 분명히 존재하며, 이들의 세포내 레벨은 열충격 조건, 즉 42℃에서 높게 유도되었다.

[0103] 즉, 세포 내 SmcR의 양을 조절하는 프로테아제를 찾기 위해 다양한 프로테아제 돌연변이 세포를 배양하여 세포 내 SmcR의 양을 관찰한 결과, 30표에서 배양된 *clpP, clpA, lon* 돌연변이에서 야생형 *V. 불니피쿠스*에 비해 SmcR 양이 크게 증가함을 관찰하였다. 또한 야생형 *V. 블니피쿠스*의 경우 42℃ 조건하에서는 SmcR의 양이 감소되는 반면, *clpP, clpA, lon* 돌연변이에서는 그러한 패턴이 보이지 않았다. 이를 통해 열충격 조건하에 SmcR의 분해에 ClpPA와 Lon 프로테아제가 관여함을 알 수 있었다.

[0105] **실시예 4. SmcR 함량 및 CPS 생산량에 대한 *clpP, clpA,* 및 *lon* 돌연변이의 효과**

[0106] **4-1. SmcR 함량**

[0107] SmcR의 세포내 레벨에 대한 *clpP, clpA*, 및 *lon* 돌연변이의 효과를 조사하기 위하여, the wild-type strain harboring the broad-host-range vector pRK415, the mutant (Δ*clp*P, Δ*clpA*, and Δ*lon*) strains harboring pRK415, 및 the mutant strains complemented with the corresponding intact genes in pRK415 (e.g., pRK-clpP, pRK-clpA, or pRK-lon)를 2시간 이상동안 42℃에 노출시켰다(도 3B~D). 항-SmcR 항체를 사용하여 열-노출 세포에 대해 웨스턴 블랏 분석을 수행하여, 그 결과 얻은 SmcR 밴드 강도를 야생형의 밴드와 비교하였다. 최소 2시간 이상 증가된 42℃에의 노출이 지속됨에 따라 야생형 세포에서의 SmcR의 세포내 함량은 점차적으로 감소하였다. 반대로, 42℃에서 동일한 배양시간 동안 노출된 야생형 균주에서보다 상기 3가지 돌연변이 균주에서 세포내 SmcR이 더 높은 것이 분명하였다. 상기 3가지 돌연변이 균주는 또한 야생형 균주보다 42℃에서 지속 시간에 대해 상대적으로 덜 민감하였다. 그러나, 플라스미드 pRK-clpP 및 pRK-clpA로 각각 보충되었을 때, Δ*clpP* 및 Δ*clpA* 돌연변이는 SmcR 세포내 레벨은 야생형과 유사하게 나타났다(도 3B 및 C). Δ*lon* mutant harboring pRK-lon 경우에 있어서, SmcR은 42℃에 노출되지 않은 세포내에서조차 거의 탐지되지 않았다(도 3D).

[0109] **4-2. CPS**

[0110] **CPS 추출물 분석 :** *V. 블니피쿠스*를 48 h 동안 AB-푸마레이트 아가 플레이트 배양하여 자라난 세포를 얻어 10 ml의 PBS에 풀어주고 1시간 동안 30℃ 진탕 배양기에서 배양하였다. PBS에 녹아 나온 EPS를 제거한 후 세포를 2% EDTA, 0.9% NaCl 용액에 풀어주고 4℃에서 1시간 동안 배양했다. 용액에 흘러나온 CPS를 에탄올 침전시킨 후 D. W.에 녹여 5% 스태킹 겔에 SDS-PAGE하였다. 겔 상에 분리된 CPS를 Stains-All (Sigma) 염색하여 확인하였다. 추출된 CPS의 정량을 위해 갈락투론산 특이적 비색분석 방법을 이용하였다. 200㎕의 샘플 용액을 3 ml의 농축 황산(96%)에 첨가한 후 100 ㎕의 카바솔 시약(0.1% w/v solution in 100% ethanol)를 첨가하여 60℃에 1 h 동안 반응시켰다. 발색된 용액을 530 nm에서 OD를 측정하고, D-(+)-갈락투론산 모노하이드레이트(Sigma) 농도별로 측정된 OD 값으로부터 샘플 내 갈락투론산 양을 계산하였다.

[0111] **CPS 유전자 클러스트의 프로모터 활성을 특정하기 위한 발광분석(Luminescence assay) :** CPS 생합성 유전자군

의 발현량 관찰을 위해 pCB014 (CPS cluster promoter-*luxAB* reporter gene fusion plasmid)를 가진 균주를 30℃ 조건 하에서 AB-푸마레이트(3 μg/ml tetracycline 첨가된) 브로스(broth) 배양하며 cell mass (OD_{595nm})와 Light production (relative light unit, RLU)를 측정하였다. RLU 측정을 위해 배양액과 0.06% (v/v) *n*-데실알데하이드를 9:1로 섞어 luminometer (TD-20/20 Luminometer, Turners Designs)를 이용하여 빛 측정을 하였고 얻어진 결과 값을 cell mass (OD_{595}) 값으로 나누어 specific luciferase activity를 계산하였다.

[0112] **결과 :** 3종류의 열충격 프로테아제 돌연변이에서 SmcR의 세포내 레벨 증가에 기인한, *clpP*, *clpA*, 또는 *lon* 돌연변이에 의해 CPS 유전자 클러스터의 전사가 영향을 받는지 조사하기 위하여, 상기 클러스터 및 이의 업스트림 부위(pCB014; 3)의 프로모터를 포함하는 *luxAB*-전사 리포터 융합을 지닌 플라스미드의 프로모터 활성을 야생형 및 돌연변이 균주에서 모니터하였다(도 4A). 전체 배양기간 동안 3개 돌연변이 모두에서의 pCB014 발현은 야생형에서의 동일한 융합과 비교하여 약 3~4배 증가하였다. 종래에 *V. 블니피쿠스*에 의한 CPS 생산이 주로 전사 레벨에서 조절되고 SmcR가 CPS 유전자 클러스터의 전사에 대한 활성인자라는 것이 보고되었으므로, 플라스미드를 포함하는 돌연변이 균주 및 야생형에 의해 생산된 CPS의 양을 비교하였다(도 4B). 30℃에서보다 42℃에서 야생형 세포는 CPS를 더 적게 생산하였다. 측정된 CPS양은, 30℃ 및 42℃에서 각각 생장한 야생형 세포에서 분획한 추출물 1㎕내에 138 ± 23 및 30 ± 16 ng의 갈락투론산 동등량이었다(도 4C). 돌연변이 세포에서 추출한 CPS를 SDS-PAGE 분석한 결과, 30℃ 및 42℃ 둘 다에서 생장한 세 돌연변이 모두 30℃에서 생장한 야생형보다 CPS를 더 많이 생산하였다. 측정된 CPS양은, 각각 30℃에서 생장한 Δ*clpP*, Δ*clpA*, 및 Δ*lon* 균주에서 분획한 추출물 1㎕내에 263 ± 13.2, 387 ± 5.0, 및 228 ± 7.9 ng의 갈락투론산 동등량이었다(도 4C). Δ*clpP* 및 Δ*clpA* 돌연변이를 순수(intact) 유전자로 보충하면 30℃ 또는 42℃에서 CPS를 생산하게 되는데, 이는 각각 30℃ 또는 42℃에서 생장한 야생형 세포의 레벨과 유사하였다. 그러나, *lon*으로 보충한 Δ*lon* 돌연변이는 항상 배양 온도와 상관없이 CPS 양이 상당히 낮았다.

[0113] 즉, 세포 내 CPS 유전자 군의 발현은 SmcR 양에 의존적이어서 *clpP*, *clpA*, *lon* mutant 내 SmcR 양의 변화에 따라 CPS 유전자군의 전사 및 생성량이 변화하는 지 관찰한 결과, 세 가지 돌연변이 모두에서 CPS 유전자군의 전사량이 증가함을 관찰하였고(도 4A), 전사량의 변화에 따라 CPS 생성량도 변화함을 관찰할 수 있었다.

[0115] **실시예 5. ClpPA 및 Lon에 의한 재조합 SmcR의 특이적 단백질분해**

[0116] **5-1. *인 비트로* 단백질분해 활성 분석**

[0117] <u>ClpPA 단백질분해</u>: 20 μl의 reaction buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM NaCl, 20 mM MgCl2, 1 mM DTT, 2 mM ATP, 10% glycerol)에 1μg의 rSmcR과 rClpA 이 포함되도록 섞어 주고, rClpP (0 to 0.5 μg)를 첨가하여 37℃에서 반응을 시작하였다.

[0118] <u>Lon 단백질분해</u>: 20 ㎕의 Lon 반응 버퍼(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM $MgCl_2$, 1mM DTT, 2mM ATP 10% glycerol)에 1μg의 rSmcR이 포함되도록 섞어 주고 rLon (0 to 1μg)을 첨가하여 37℃에서 반응을 시작하였다.

[0119] 반응 후 얻어진 샘플은 SDS-loading buffer (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol, 200 mM DTT)를 첨가하여 반응을 멈추고 boiling한 후 SDS-PAGE로 분리하였고 쿠마씨 블루 염색하여 단백질 band를 관찰하였다.

[0121] **5-2. 결과**

[0122] SmcR이 ClpPA- 및 Lon-유도 단백질분해의 기질인지 여부를 설명하기 위하여, 상기와 같이 SmcR, ClpP, ClpA, 및 Lon 재조합 단백질을 사용한 인비트로 단백질분해 분석을 수행하였다. 동량의 SmcR 및 ClpA를 반응버퍼에 혼합하고, ClpP를 추가하여 단백질분해 반응을 개시시키고, 지정 시점에 상기 혼합물을 끓여서 반응을 중지시켰다. 그 후 첨가된 재조합 단백질의 양을 SDS-PAGE로 가시화하였다. ClpP는 ClpA 부재시에 SmcR을 절단하지 못하였고(레인 11, 도 5A), ClpP 및 A는 배양 시간 의존적 방식으로 SmcR을 점차적으로 절단하였는데(레인 3 내지 10, 도 5A), SmcR은 20분 내에 거의 완전하게 절단되었다. 또한, SmcR의 ClpA 단백질분해는 추가된 ClpP의 농도에 좌우되었다(레인 2 내지 8, 도 5B). SmcR 대신, ClpPX 복합체로 분해되는 것으로 알려진 RpoS를 ClpPA 단백질분해 추가 실험에서 첨가하였다. RpoS는 ClpPA에 의해 전혀 절단되지 않았는데(레인 12, 도 5B), 이는 SmcR에 대한 ClpPA의 특이성을 의미한다. 유사하게, SmcR에 대한 Lon의 단백질분해 활성을 시험하였다. ClpPA-단백질분해

반응에서 나타난 바와 같이, 단백질분해의 프로테아제 농도 의존적(도 5D) 패턴과 마찬가지고 Lon 활성은 배양 시간 의존적인 것으로 나타났다(도 5C).

[0123] 즉, 정제된 SmcR과 각 프로테아제를 이용해 인 비트로 단백질분해를 진행한 결과 ClpPA와 Lon 모두 SmcR을 직접적으로 분해시키는 것으로 관찰되었다. ClpP와 ClpA 각각 프로테아제와 chaperone의 기능을 담당하는 단백질로써 따로 첨가될 시 단백질분해 기능을 갖지 못하는 것으로 알려져 있고 따라서 본 연구에서도 같은 실험을 진행하여 따로 첨가될 시 기능이 없음을 보여주었다. 기존 연구에서 ClpP의 또 다른 partner chaperone인 ClpX가 ClpP와 함께 RpoS를 분해시키는 것으로 알려져 있으므로 본 연구의 ClpP의 단백질분해 활성이 ClpA와 작동될 때 SmcR을 특이하게 분해시킴을 보여주기 위해 RpoS를 기질로 첨가해 주었고, 그 결과 RpoS는 분해시키지 않는 것으로 관찰되었다.

[0125] **실시예 6. 재조합 SmcR 단백질의 단백질분해에 대한 차별적 민감성**

[0126] **SmcR의 부위-특이적 돌연변이 제작**

[0127] SmcR Y171를 A로 치환하기 위해 SmcRexp-FB / SmcRY171AR 과 SmcRY171AF / SmcRexp-RH 프라이머 세트를 이용하여 PCR 하였다. 각 PCR 생성물을 섞어 템플레이트 DNA로 이용하여 PCR 하였고 돌연변이화된 *smcR* DNA를 얻어 pQE30에 클로닝하여 pQE-SmcRY171A를 만들었다. pQE-SmcRY171A 플라스미드를 template로 SmcRexp -FB / SmcRC198ARH 프라이머 세트를 이용해 다시 PCR 하였고 최종적으로 Y171A/C198A 돌연변이 smcR DNA 절편을 얻어 pQE30에 클로닝하여 pQE-SmcRY171A/C198A 플라스미드를 건조하였다. 건조한 플라스미드는 JM109에 트랜스포메이션하였고 상기 방법과 동일하게 단백질 정제를 진행하였다.

[0128] **결과 :** 많은 다른 전사인자와 유사하게 SmcR은 타겟 유전자의 조절부위에 결합할 때 다이머형태인 것으로 보고되어있다. 열충격 조건에서 ClpPA 및 Lon에 의한 특이적 단백질 분해를 결정하는 SmcR의 상태를 특징을 규명하기 위하여, 상기와 같이 돌연변이화된 SmcR 단백질을 구축하였다. 다이머형태의 SmcR을 형성하는데 중요한 것으로 보고되어 있는, SmcR의 C-말단 도메인에 있는 아미노산 잔기인 Tyr171 및 Cys198를 알라닌으로 대체시켜 SmcR171A/C198A를 만들었다. 오리지날 SmcR(SmcRWT) 및 SmcRY171A/C198A의 모노머 또는 다이머 형태를 조사하기 위하여, 환원제 DTT 존재 또는 부존재하에 재조합 단백질을 SDS-PAGE로 분획하였다. 비-환원조건하에서, 대부분의 SmcRWT는 다이머 상태였으며, 반면 SmcRWT는 DTT 존재하에 모노머 상태로 입체구조를 변경하였다(도 6A). 반대로, SmcRY171A/C198A 상태에 대해 DTT 첨가에 의한 효과가 없었는데, 이는 비환원조건 및 환원 조건하에서 항상 모노머 상태를 나타내었다. DTT 존재 또는 부존재시에 SmcRWT를 사용한 단백질분해 반응은 다이머 SmcR보다 ClpPA(도 6B) 및 Lon(도 6C)에 의해 더욱 재빨리 절단되었다. 이러한 관찰과 일치하게도, $SmcR_{Y171A/C198A}$는 모노머 SmcRWT만큼 재빨리 ClpPA(도 6B) 및 Lon(도 6C)에 의해 절단되었다. ClpPA에 의한 SmcR의 단백질 분해 측정 속도는 모노머 및 다이머 형태일 때 각각 88.0 및 59.1 nM/min이며, Lon에 의해서는 모노머 및 다이머 형태일 때 각각 17.9 nM/min 및 9.9 μM/min이었다(도 6B 및 C).

[0129] 즉, SmcR이 DNA에 결합하기 위해서 다이머화가 중요한 것으로 알려져 있는데, 다이머형태에 의해 SmcR의 안정성이 영향 받는지 알아보기 위해 상기와 같이 다이머화가 되지 않는 돌연변이 SmcR($SmcR_{Y171A/C198A}$)을 제작하여 다이머/모노머 형태의 여부를 관찰하였다(도 6A). 또한 SmcR dimerization에 중요한 residue인 C198의 이황화결합을 환원시키기 위하여 DTT의 첨가하였고 dimerization에 영향을 주는지 분석하였다. 그 결과 SmcRWT은 DTT가 첨가되지 않았을 때 대부분 dimerization 되어 있으며 DTT첨가 시 모두 모노머 형태로 변화되는 것을 관찰하였다. $SmcR_{Y171A/C198A}$의 경우 DTT 첨가 유무와 상관없이 모두 모노머 형태로 관찰되었다. 따라서 DTT첨가 유무, 돌연변이 여부에 따라 다이머와 모노머 형태를 만들 수 있으며, 다이머와 모노머 형태로 나누어진 상태에서 ClpPA 및 Lon으로 단백질분해 시켰을 때 그 효율에 변화가 생기는지 관찰하였다. ClpPA 와 Lon에 의해 SmcR이 분해될 때 다이머 형태가 모노머 형태에 비해 안정성이 높아짐을 관찰하였다(도 6B 및 C).

[0131] **실시예 7. 다른 종류의 비브리오 균에서의 열충격 프로테아제에 의한 QS 조절**

[0132] 상기한 바와 같이, *V. 블니피쿠스* QS 조절은 열충격 처리에 의해 턴오프될 수 있다. 열충격이 다른 비브리오 균에서도 역시 QS를 조절하는지를 연구하기 위하여, 탈지유 플레이트에 이들 세포를 접종하여 30℃ 또는 42℃에서 배양하여 세포외 프로테아제를 비교하였다. *V. 블니피쿠스*, *V. 콜레라*, 및 *V. 하베이*에서는 엑소프로테아제의 발현은 QS에 의존적인데, *V. 파라헤모리티쿠스*에서와 유사하게 조절되는 것으로 생각된다. 비브리오 균의 단백

질분해 활성은 박테리아 콜로니 주변의 클리어존으로 입증되었다. 상당한 크기의 클리어런스가 본원에서 시험된 모든 비브리오 균주에서 분명히 관찰되었다(도 7A, 위쪽). 비록 42℃가 본원에서 실험한 비브리오 균주에 대해 치명적이거나 생장을 늦추는 온도는 아니지만, 42℃에서 배양된 모든 종들은 거의 엑소-단백질분해활성을 잃는 것으로 나타났다(도 7A, 아래쪽). 주로 엘라스타아제 VvpE로 구성되어 있는 *V. 블니피쿠스* 엑소프로테아제는 30℃ 또는 42℃에서 유사한 효소 활성을 나타내므로, 엑소-단백질분해 활성 감소가 고온에서의 효소 활성 감소에 기인하는 것이 아니다. 따라서, 엑소프로테아제 발현은 42℃에서 감소되는 것으로 추측된다. 고온에서 엑소프로테아제 발현이 감소하거나 부족하게 되는 이유를 설명하기 위하여, *V. 콜레라* HapR, *V. 파라헤모리티쿠스* OpaR, 또는 *V. 하베이* LuxR에 특이적인 다클론 항체를 사용하여 각 QS 마스터 조절자의 세포외 함량을 각 비브리오 균에서 조사하였다. 42℃-처리된 *V. 블니피쿠스*에서 SmcR에 나타난 바와 같이(도 2B), 세포를 42℃에서 2시간 이상 배양하였을때 각 LuxR 호모로그에 대한 단백질 밴드가 점차적으로 사라졌다(도 7B).

[0133] 즉, 기존 연구에 의하면 여러 *비브리오* 균의 외부프로테아제(exoprotease)의 발현이 쿼럼센싱 마스터 조절자(LuxR homologues)에 의해 조절되는 것으로 알려져 있으며, LuxR homologues 또한 *V. 블니피쿠스*처럼 열충격에 의해 조절받는지 여부를 알기 위해 탈지유 플레이트를 이용한 total 프로테아제 활성을 관찰하였다 (도 7A). *V. 블니피쿠스*와 마찬가지로 다른 *비브리오* 균도 42℃에서 배양할 경우 탈지유 플레이트상에 clear zone이 형성되지 않는 것을 관찰하였다. 또한 비브리오 균 내 LuxR homologue의 양이 열 충격을 받은 이후부터 서서히 감소하는 것을 볼 수 있고, ClpPA와 Lon에 의해 직접적으로 분해되는 것을 관찰할 수 있었다.

[0135] **실시예 8. ClpPA 및 Lon에 의한 LuxR 호모로그의 단백질 분해**

[0136] **8-1. HapR, OpaR, 및 LuxR에 대한 다클론 항체의 제조**

[0137] LuxR homologues를 과발현시키기 위해 *V. 콜레라 hapR*, *V. 하베이 luxR*, *V. 파라헤모리티쿠스 opaR* DNA 절편을 각각 하기 프라이머 세트(HapRexp-F / HapRexp-R; LuxRexp-F / LuxRexp-R and OpaRexp-F / OpaRexp-R)로 PCR 하였다. *luxR*과 *opaR* DNA 절편은 pQE30에, *hapR* DNA fragment pET28a에 클로닝하였고 각각 JM109 및 BL21(DE3) 세포에 트랜스포메이션하였다. 단백질 정제 방법은 상기 방법과 동일하게 진행하였다. HapR-, LuxR-, OpaR-specific 다클론 항체를 얻기 위해 6주령 Sprague-Dawley rat에 각각 50 μg의 protein을 2주 간격으로 3번 복강주사하여 마지막 복강 주사 후 3일 후 혈청을 얻었다.

[0139] **8-2. SmcR 및 다른 LuxR homologues의 웨스턴 블랏 분석**

[0140] 야생형과 돌연변이 *V. 불니피쿠스*를 30℃ 조건 하의 AB-푸마레이트에서 OD 1.0이 되도록 배양하였다. 다른 *비브리오* 균주들은 LBS 배지를 이용하여 같은 조건에서 배양하였다. 배양된 세포를 두 개의 테스트 튜브에 나눠 담아 각각 30℃와 42℃ 수조에 배양하며 시간별로 샘플 채취를 하였다. 각 샘플 내 세포를 TBST buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, and 0.05% (v/v) Tween 20)에 풀어 세포 파쇄를 하였고 얻어진 세포 파쇄액을 내 단백질 양을 정량하여 동일 농도의 total 단백질을 SDS-PAGE하여 분리한 후 PVDF 멤브레인에 옮겼다. PVDF 멤브레인 상의 단백질 band 중 SmcR, LuxR, HapR, OpaR에 특이적으로 반응하는 항체를 처리한 후, 각 항체와 반응하는 2차 항체를 처리하였고, 2차 항체에 접합되어 있는 AP 효소를 이용한 NBT/BCIP 발색 반응으로 각 band를 확인하였다.

[0142] **8-3 결과 :** *V. 콜레라*, *V. 파라헤모리티쿠스*, 및 *V. 하베이*는 열충격반응동안 ClpPA 및 Lon 둘 다를 취하는 것으로 추정된다. 각 ClpP[VC_1922 (V. cholera); VP0917 (*V. parahaemolyticus*); 및 LA59_05535 (*V. harveyi*)], ClpA [VC_1144 (V. cholera); VP1014 (*V. parahaemolyticus*); 및 LA59_06115 (*V. harveyi*)], 및 Lon [VC_1920 (V. cholera); VP0919 (*V. parahaemolyticus*); 및 LA59_05545 (*V. harveyi*)]의 인 실리코 분석에서, 이들은 각각 *V. 블니피쿠스* ClpP, ClpA, 및 Lon의 아미노산 잔기와 96~98, 91~93, 및 90~94% 동일하였다. *V. 블니피쿠스*에서 나타난 바와 같이(도 5), 3개의 Lux-호몰로그가 ClpPA 및/도는 Lon에 의해 직접 절단되는지를 설명하기 위하여, *V. 블니피쿠스* ClpPA 및 Lon을 지닌 재조합 HapR, paR, 및 LuxR 단백질을 사용하여 인비트로 단백질분해 반응을 수행하였다. 정제된 LuxR 호모로그 및 ClpA의 동등량을 반응버퍼에 혼합시키고 다양한 농도의 ClpP를 첨가하여 반응을 개시시켰다. 60분 후, 반응혼합물에 남아있는 기질 단백질은 SDS-PAGE로 분획하였는데, 3개 Lux 호모로그 모두 ClpPA에 의해 서로 다른 정도로 단백질분해되어 절단된 것으로 나타났다(도 7C). HapR이 ClpPA 단백질분해에 가장 민감하였다. 유사하게, 다양한 농도의 Lon 존재시에 각 LuxR

호모로그를 60분간 배양하여, LuxR 호모로그 모두 Lon에 의해 절단되고 HapR이 Lon 단백질분해에 가장 민감하다는 것을 입증하였다(도 7D).

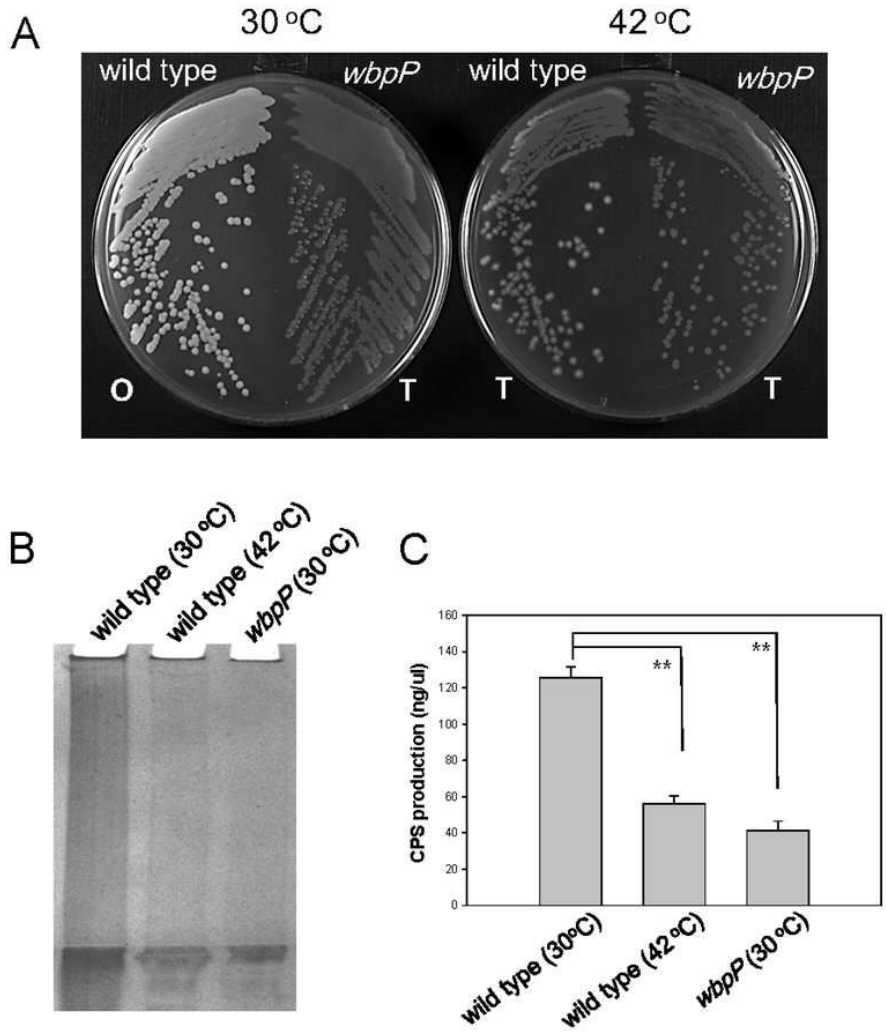
[0143] 상기한 바와 같이, 본 발명에서는 최소 4개의 비브리오 균에서의 Lon 및 ClpP의 단백질분해 활성을 통해 전사 후 레벨에서의 QS 마스터 조절자의 발현에 대한 또다른 조절 매카니즘을 규명하였다(도 3B-D, 5, 및 7C-D). 최소 4종의 비브리오 균은, 이들의 QS 마스터 조절자의 강한 단백질분해에 의해 열충격조건 하에서 QS 조절을 개시하는 능력이 상당히 감소하였다. 열충격 반응을 통한 이러한 타입의 QS 소거는 AI 분자 농도가 고세포 밀도임을 나타내는 레벨에 달할 때에도 가능할 수 있다. 고온에서의 QS 불활성화의 한 예로 생물막 형성을 들 수 있다. 또한 다른 독성인자가 QS에 의해 유도되는 것으로 알려졌다. 병인성 비브리오 균은 오염된 음식 소비를 통해 인간 호스트에 침투하여 장 환경에서 다양한 미생물을 접하게 된다. 만일 독성인자의 발현이 단지 숙주 환경에 들어가는데 요구되는 것이 아니라면, 열충격 매개 QS를 소거하면 장 미생물에 의해 생성되는 고농도의 AI-2 분자존재시에도 병원균이 독성을 유발하는 것을 막을 수 있다.

[0145] 이상에서 본원의 예시적인 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본원의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본원의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본원의 권리범위에 속하는 것이다.

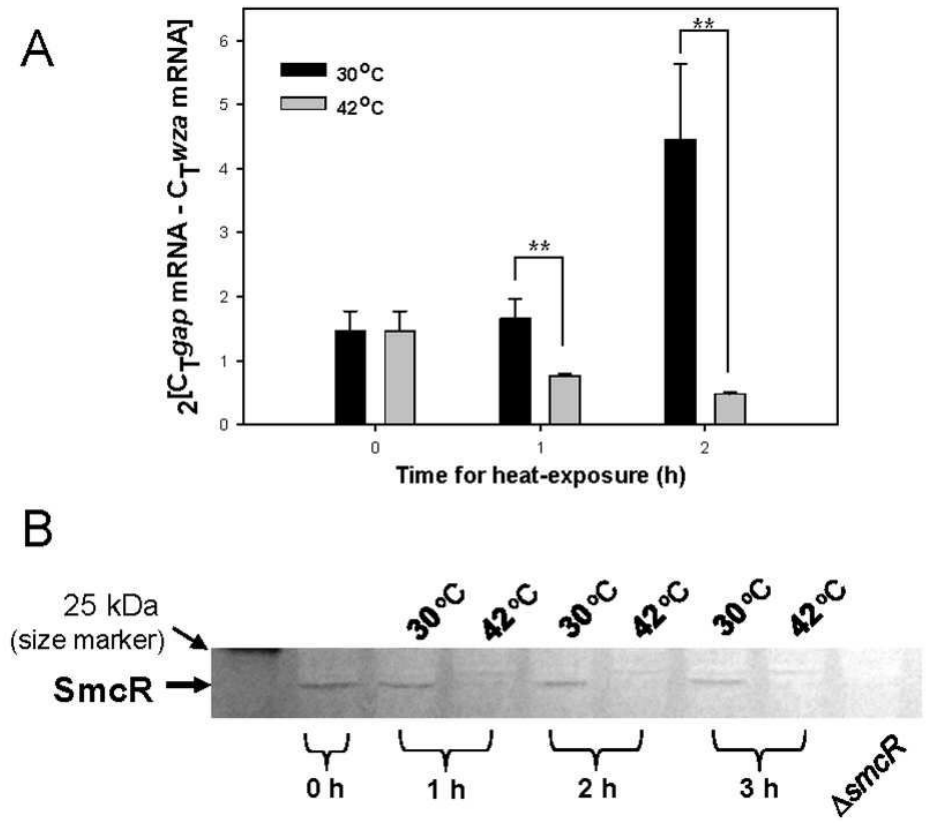
[0146] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

도면

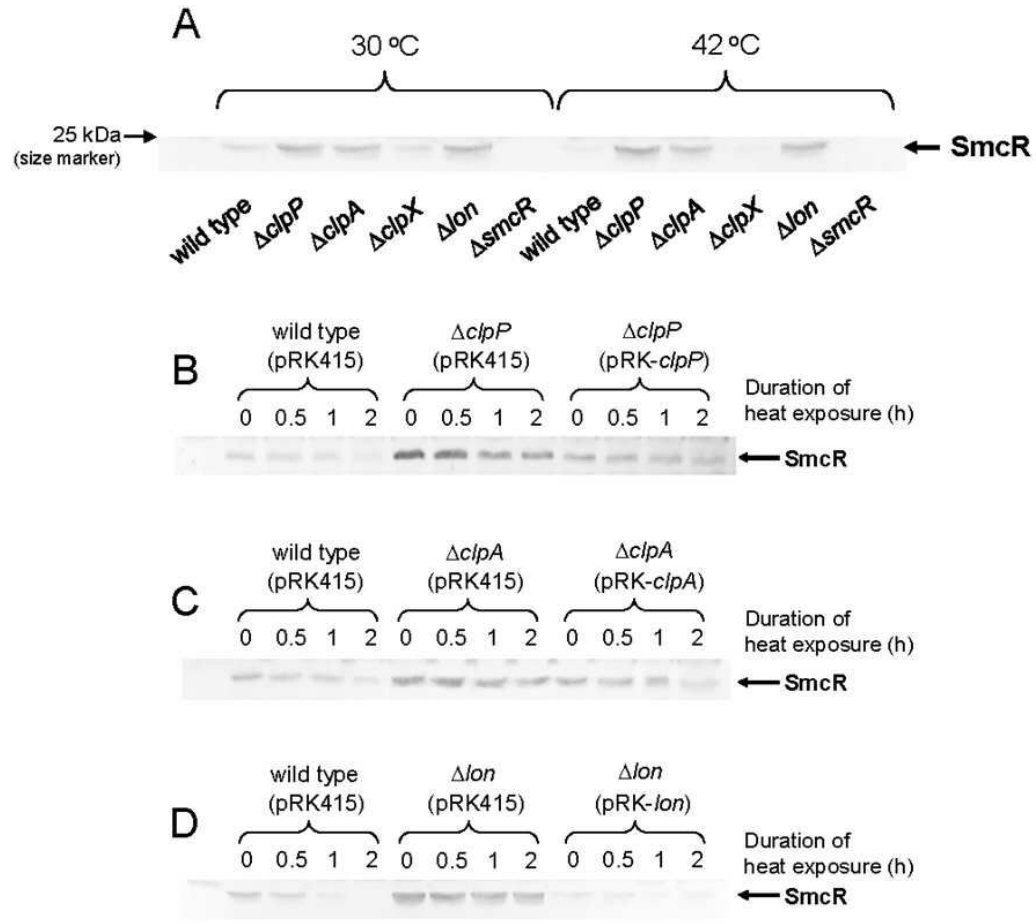
도면1


A
30 °C
42 °C
wild type
wbpP
wild type
wbpP
O
T
T
T
B
wild type (30 °C)
wild type (42 °C)
wbpP (30 °C)
C
CPS production (ng/ul)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
**
**
wild type (30°C)
wild type (42 °C)
wbpP (30 °C)

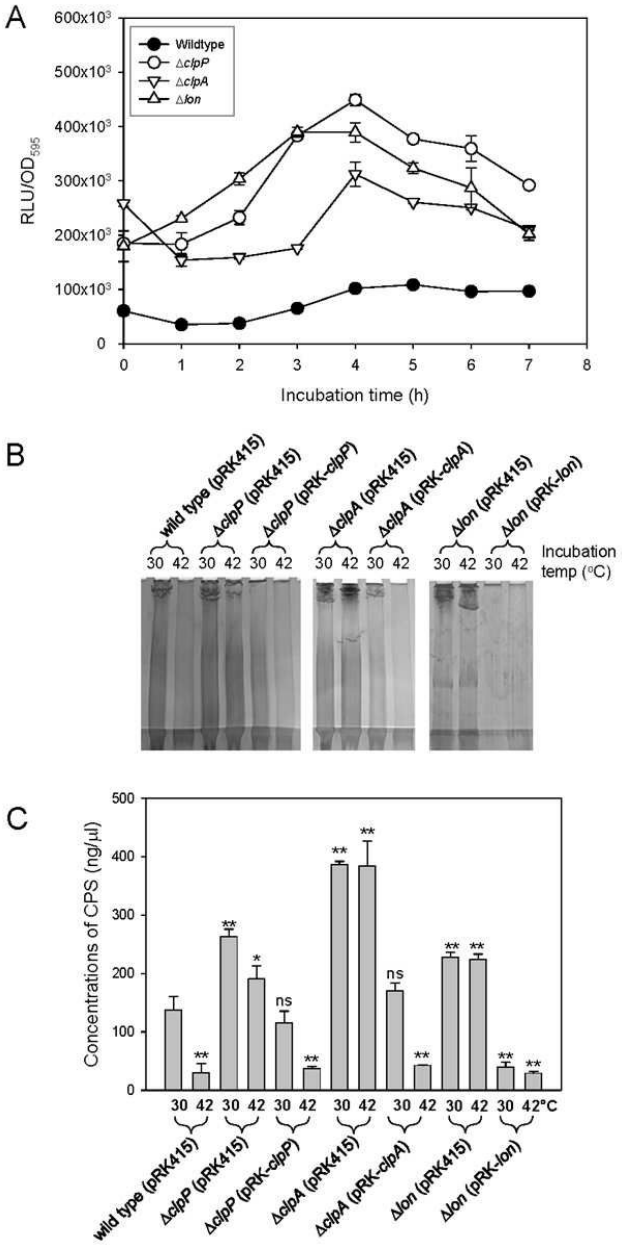
도면2


A
$2^{[C_T gap\ mRNA - C_T wza\ mRNA]}$
30°C
42°C
**
**
0
1
2
3
4
5
6
Time for heat-exposure (h)
B
25 kDa
(size marker)
SmcR
30°C
42°C
30°C
42°C
30°C
42°C
0 h
1 h
2 h
3 h
ΔsmcR

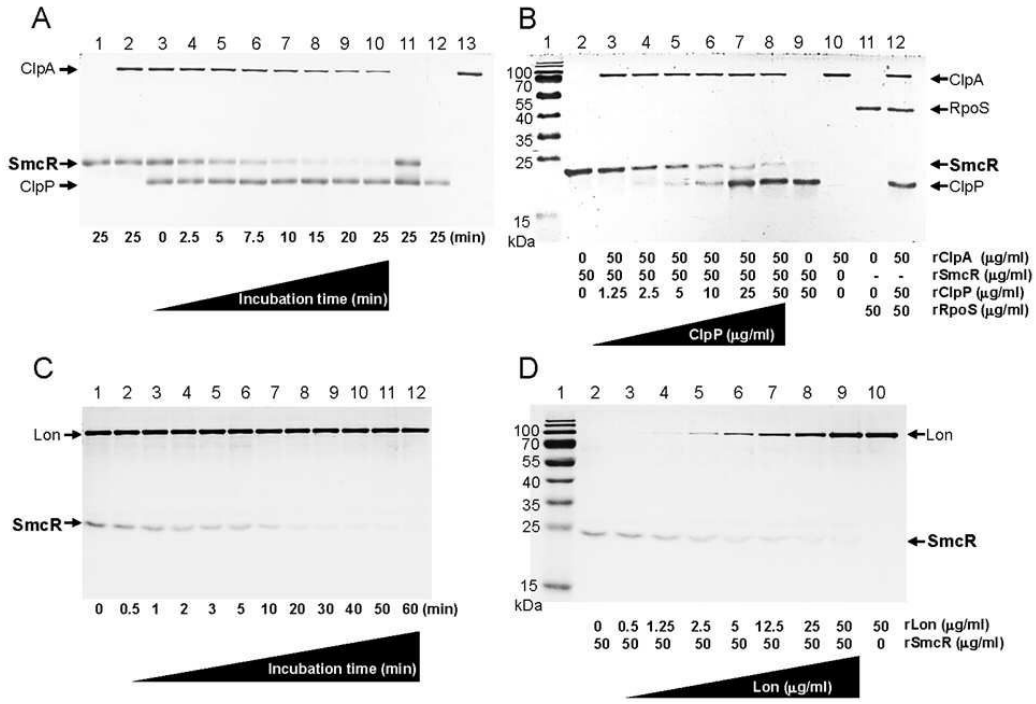
도면3


A
30 ºC
42 ºC
25 kDa
(size marker)
SmcR
wild type
ΔclpP
ΔclpA
ΔclpX
Δlon
ΔsmcR
wild type
ΔclpP
ΔclpA
ΔclpX
Δlon
ΔsmcR
B
wild type (pRK415)
ΔclpP (pRK415)
ΔclpP (pRK-clpP)
0 0.5 1 2 0 0.5 1 2 0 0.5 1 2
Duration of heat exposure (h)
SmcR
C
wild type (pRK415)
ΔclpA (pRK415)
ΔclpA (pRK-clpA)
0 0.5 1 2 0 0.5 1 2 0 0.5 1 2
Duration of heat exposure (h)
SmcR
D
wild type (pRK415)
Δlon (pRK415)
Δlon (pRK-lon)
0 0.5 1 2 0 0.5 1 2 0 0.5 1 2
Duration of heat exposure (h)
SmcR

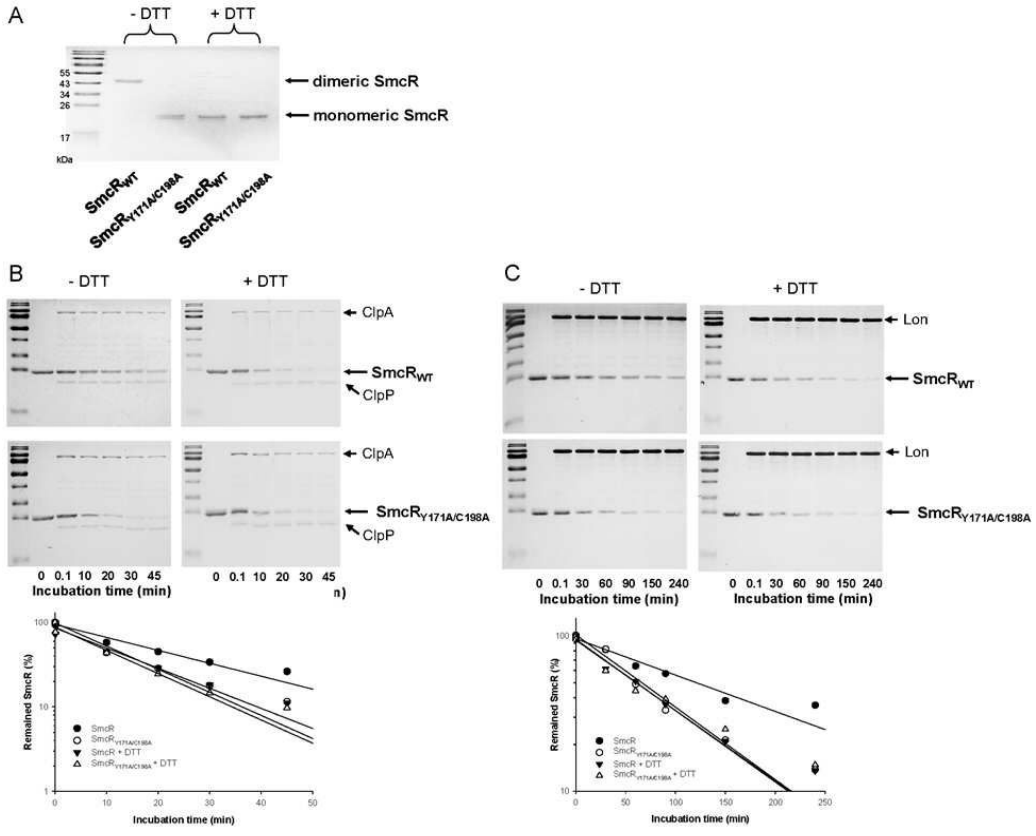
도면4


A
600x10³
500x10³
400x10³
300x10³
200x10³
100x10³
0
RLU/OD595
Wildtype
ΔclpP
ΔclpA
Δlon
0 1 2 3 4 5 6 7 8
Incubation time (h)
B
wild type (pRK415)
ΔclpP (pRK415)
ΔclpP (pRK-clpP)
ΔclpA (pRK415)
ΔclpA (pRK-clpA)
Δlon (pRK415)
Δlon (pRK-lon)
30 42 30 42 30 42 30 42 30 42 30 42 30 42
Incubation temp (°C)
C
Concentrations of CPS (ng/μl)
500
400
300
200
100
0
ns
30 42 30 42 30 42 30 42 30 42 30 42 30 42°C
wild type (pRK415)
ΔclpP (pRK415)
ΔclpP (pRK-clpP)
ΔclpA (pRK415)
ΔclpA (pRK-clpA)
Δlon (pRK415)
Δlon (pRK-lon)

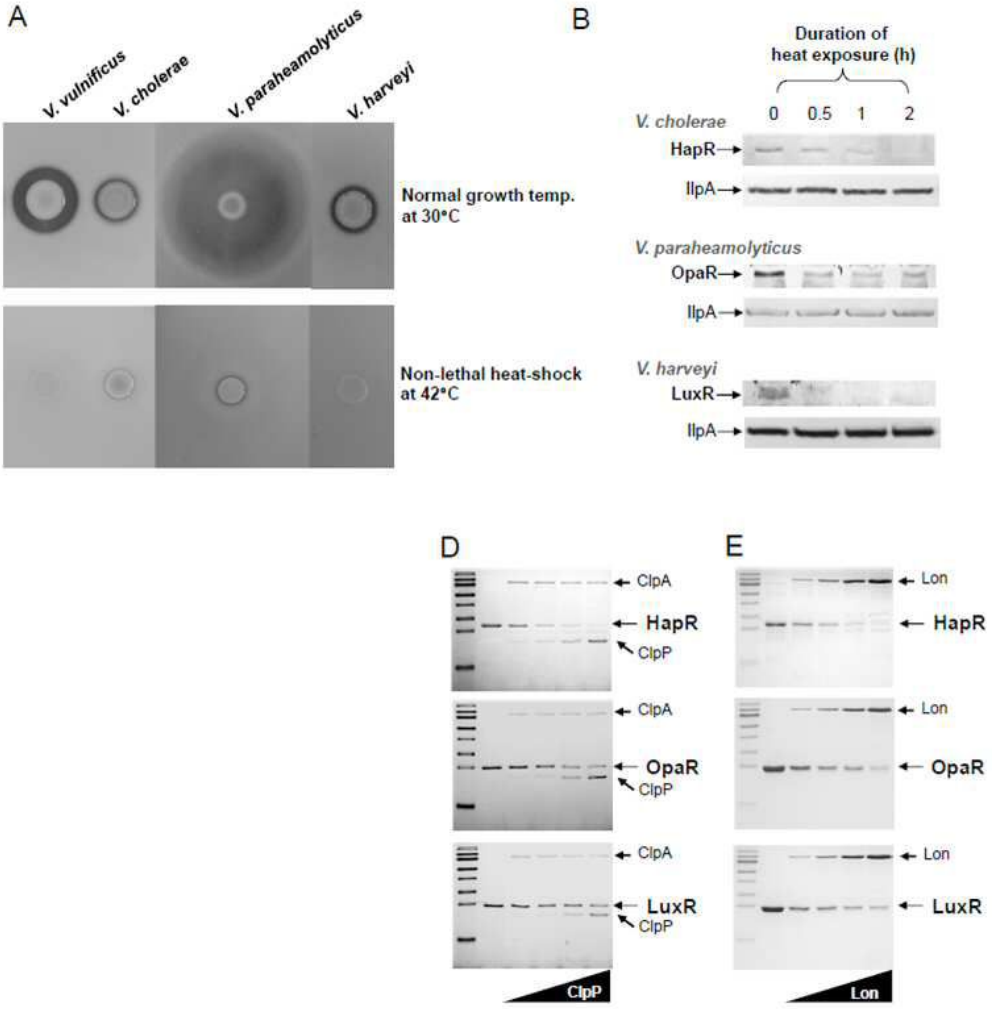
도면5


A
ClpA
SmcR
ClpP
25 25 0 2.5 5 7.5 10 15 20 25 25 25 (min)
Incubation time (min)
B
ClpA
RpoS
SmcR
ClpP
kDa
rClpA (μg/ml)
rSmcR (μg/ml)
rClpP (μg/ml)
rRpoS (μg/ml)
ClpP (μg/ml)
C
Lon
SmcR
0 0.5 1 2 3 5 10 20 30 40 50 60 (min)
Incubation time (min)
D
Lon
SmcR
kDa
rLon (μg/ml)
rSmcR (μg/ml)
Lon (μg/ml)

도면6


A
- DTT
+ DTT
dimeric SmcR
monomeric SmcR
kDa
SmcRWT
SmcRY171A/C198A
B
- DTT
+ DTT
ClpA
SmcRWT
ClpP
SmcRY171A/C198A
Incubation time (min)
Remained SmcR (%)
Incubation time (min)
C
- DTT
+ DTT
Lon
SmcRWT
SmcRY171A/C198A
Incubation time (min)
Remained SmcR (%)
Incubation time (min)

도면7


A
V. vulnificus
V. cholerae
V. paraheamolyticus
V. harveyi
Normal growth temp. at 30°C
Non-lethal heat-shock at 42°C
B
Duration of heat exposure (h)
0 0.5 1 2
V. cholerae
HapR
IlpA
V. paraheamolyticus
OpaR
IlpA
V. harveyi
LuxR
IlpA
D
ClpA
HapR
ClpP
ClpA
OpaR
ClpP
ClpA
LuxR
ClpP
ClpP
E
Lon
HapR
Lon
OpaR
Lon
LuxR
Lon