

Proteomics를 이용한 약제 내성 *S. typhimurium* 분리주의 단백질 분석

이우원^{1*} · 곽현정¹ · 이강록¹ · 김금향¹ · 이동수¹ · 김용환²

축산물 위생검사소

Exploring of Protein Associated with Antimicrobial Resistant *S. typhimurium* isolates by Proteomics

Woo-Won Lee¹ †, Hyun-Jeong Kwak¹, Gang-Rok Lee¹, Geum-Hyang Kim¹, Dong-Soo Lee¹ and Yong-Hwan Kim²

¹Veterinary Service Laboratory

²College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

Abstract

In the proteome analysis of *S. typhimurium*, the reference maps for innate cell protein (ICP) and outer membrane protein (OMP) of *S. typhimurium* SN282 isolate, DT104, were constructed by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) combined with matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). 41 of 440 spots and 11 of 220 spots were able to identify from 2-DE profiles for ICP and OMP, respectively. In the 2-DE map of ICP, DNA-binding H-NS and stress inducing protein including stringent starvation protein A, DnaK, GroEL and universe stress protein were reported to be involved in antibiotics resistance mechanism in Gram-negative bacteria. In the 2-DE map of OMP, TolC and OmpD were known as constitute of multidrug resistance efflux system in Gram-negative bacteria. The 2-DE map was compared with those of SN75 (not phage typed; resistance to DST), SN296 (DT22, resistance to penicillin), SN164 (DT193, resistance to ACCbDNaPSSuT) and 3 isolates including SN282, SN309 and SN310 identified as DT104 (resistance to ACCbDNaPSSuT). It was shown that proteins involved in antibiotic resistance between isolates studied were not parallel with either phage types or resistance patterns to antibiotic drug, and both. In the present study, these proteins supposed to be present already might be either varied or improve functionally to resist effectively in antibiotic rich surrounding environment to survive.

In the present study, these proteins existed possibly before exposing in antibiotics or they might be improved effectively in antibiotic rich surrounding environment for survival.

Key Words: ICP, OMP, 2-DE, MALDI-TOF MS, multi drug resistance efflux system

서 론

*Salmonella*속 균은 *Enterobacteriaceae*과에 속하는 그람 음성 간균이며 *S. bongori*와 *S. enterica*의 두 종이 있다. *S. enterica*는 *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizoanae*, *houtenae* 및 *indica*의 6 subspecies로 구분되며, *S. enterica* subsp. *enterica*는 다시 serotype, biotype 및 phage type에 의해 구분된다^{1, 2}. *S. typhimurium* phage type DT104는 1984년 영국에서 처음으로 소와 사람에서 분리되었지만 그 후 많은 역학적 조사에서 가금, 돼지 및 양 등의 가축에서 더 흔히 검출되고 있다³. 사람에서 살모넬라감염 증은 주로 *Salmonella*속 균에 감염된 가축이나 이 균에 오염

된 육가공식품을 섭취함으로써 발생하며, 원인균 중 *S. typhimurium* DT104가 공중보건학적으로 문제시 되고 있는 것은 그 분리율이 높기 때문이 아니라 다양한 약제에 대하여 내성을 나타내기 때문이다⁴⁻⁶.

일반적으로, 다제내성균주는 ampicillin (A), chloramphenicol (C)/florfenicol (F), streptomycin (S)/spectinomycin (Sp), sulfonamides (Su) 및 tetracycline (T)에 대하여 내성을 가진 균주로 규정하고 있다 (Koneman 등, 1997). 영국과 미국의 경우 가축에서 ACSSuT 내성형의 *S. typhimurium* DT104가 많이 분리되고 있지만^{3, 7}, 국내에서는 가축에서 약제내성균주에 관한 역학 조사는 거의 이루어져 있지 않을 뿐만 아니라 phage type의

† Corresponding author. E-Mail: wwlee@busan.go.kr
Phone: 051-331-0095, Fax: 051-338-8266

분포 정도도 파악하기 어려운 실정이다. 본 연구에서 도출된 돼지로부터 분리한 *S. typhimurium*을 phage typing한 결과에 의하면 DT104에 비하여 DT193이 높은 분포를 나타내었으며, DT193은 ACSSuT에 대하여 높은 내성율을 나타내었다.

그람 음성 세균의 외벽은 cytoplasmic membrane, peptidoglycan layer 및 outer membrane (OM)의 세 층으로 구분된다. OM에 풍부하게 존재하는 transmembrane protein은 세균의 외부환경과 내부환경을 연결하기 위하여 지질 이중막을 가로질러 있다. 주된 기능은 세포외부로부터 세포 내부로의 영양분을 수송하고 세포외부의 환경변화에 대한 세포의 적응을 위한 시발점으로 작용한다. 이 transmembrane protein은 친수성 부분과 소수성 부분으로 구분된다¹⁾. 단백질의 친수성 부분은 통로를 형성하기 위해 folding 되어 있어 친수성 분자를 쉽게 통과시키며, 단백질의 소수성 부분은 지질 이중막에 연결되어 있다. 한편, outer membrane protein (OMP)은 항생제의 흡수를 위한 첫 관문이다. 항생제는 세균의 사멸 및 증식 억제를 위해 외부환경으로부터 세균에 침입 또는 약리적 효용성을 나타내기 위해서는 유효한 수용체에 결합되어야 한다. 그러나 세균은 외막에서 수용체로 작용하는 단백질의 구조적 변경, pump 및 channel의 형성에 의해 항생제에 대한 내성을 획득한다²⁻⁹⁾.

세균의 drug efflux pump는 ATP binding cassette (ABC) superfamily, major facilitator superfamily (MFS), small multidrug resistance (SMR) family, multidrug and toxic compound extrusion (MATE) 및 resistance nodulation cell division (RND) family로 분류한다. ABC superfamily는 pump의 작용을 위한 에너지원으로서 ATP를 이용하며, 나머지 네 가지의 경우에는 proton motive force를 사용한다. ABC superfamily에 속하는 lmrA가 *Lactococcus lactis*에서 확인되었으며, MFS의 members는 *Escherichia coli*의 emrB가, *Staphylococcus aureus*의 norA와 qacA 등의 gene이 확인되었다. SMR family에는 *E. coli*와 *S. aureus*에서 emrE와 smr이 각각 동정되었으며, 그 외 모든 그람 음성 세균에서도 확인되었다. MATE family에는 norM, ydhE 및 yojI가 있으며, 이것은 각각 *Vibrio parahaemolyticus*, *E. coli* 및 *Bacillus subtilis*에서 확인되었다. RND family에는 *E. coli*의 acrB,

*Pseudomonas aeruginosa*의 mexB 등이 있다. 이 중 *S. typhimurium*에서는 *E. coli*의 RND family에 속하는 acrB에 높은 homolog가 확인되었고, *S. aureus*의 MFS family에 속하는 qacA에 높은 유사성이 있는 smvA gene이 확인되었다¹⁰⁻¹⁵⁾. 그러므로 이러한 연구를 통해 *S. typhimurium*에서 약제내성 획득을 위한 transporter system에는 적어도 RND와 MFS에 관련된 2개의 pump system이 작용할 것으로 생각된다.

항생제에 대한 내성균의 출현은 전 세계적으로 심각한 문제를 야기하고 있다. *S. typhimurium* DT104에 대한 약제내성 기전은 유전자 연구에 의해 많이 이루어진 반면 proteomics를 통한 약제내성에 관여하는 단백질의 규명은 미약한 수준이다¹⁶⁻²²⁾. *S. typhimurium* DT104 균주를 제외한 균주들에서도 다제내성을 나타내는 균주들이 있는 것으로 규명되었으나, 보고된 문헌에서는 이에 대한 약제내성기전에 대한 연구는 거의 이루어져 있지 않았다. 본 연구에서는 다제내성을 보이는 *S. typhimurium* DT104 3균주, DT193 1균주, DST 내성형 1균주 및 penicillin 내성 DT22 1균주를 포함한 총 6균주의 OMP와 innate cell protein (ICP)을 각각 추출하여 proteome을 비교 분석하여 항생제 내성발현에 관련된 단백질을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

공시균주

실험에 공시한 균주는 Table 1에서와 같이 요약하였다. 사용된 균주들은 tryptic soy broth (Difco, USA)에서 14~16 시간 동안 배양한 다음, PBS (phosphate buffered saline, pH 7.2)로 세 번 세척 후 실험에 즉시 사용하였다.

OMP의 추출

Triton X-114를 사용한 OMP의 추출은 Lee 등²³⁾의 방법을 준용하였다. 균체를 1% Triton X-114가 함유되어 있는 PBS에 부유한 후 4°C에서 가볍게 vortexing한 다음 13,000 rpm에서 30분간 원심 분리하였다. 상층액인 OMP층과 pellet인 innate cell (IC) 층으로 구분하였다. OMP층은 다시 동량의 1% Triton X-114 solution을 첨가하여 37°C에서 30분간 반

Table 1. *S. typhimurium* isolates used for proteome analysis

Strain	Phage type	Resistance pattern	Plasmid profile (kb)
SN296 (Single)	DT22	P	NT ¹⁾
SN75 (Triple)	RDNC ²⁾	DST	40, 6.3
SN164 (Multiple 1)	DT193	ACCbDNaPSSuT	90, 40, 10.5, 6.3, 3
SN282 (Multiple 2)	DT104	ACCbDNaPSSuT	90, 40, 10.5, 6.3, 3
SN309 (Multiple 3)	DT104	ACCbDNaPSSuT	40, 10.5, 6.3, 3
SN310 (Multiple 4)	DT104	ACCbDNaPSSuT	90, 40, 10.5, 6.3, 3

¹⁾ NT; Not detectable

²⁾ RDNC; Reacts with phages but does not confirm.

응시킨 후 1,000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 상층의 Triton X-114층과 하층의 PBS층으로 나눈 후 상층을 새 시험관에 옮기는 과정을 세번 반복하였다. 마지막으로 구분된 상층에 cold ethanol을 10배량 첨가하여 -20°C 에서 12시간 이상 침전한 후 13,000 rpm에서 40분간 원심 분리한 다음 상층액을 제거하였다. 남아 있는 ethanol을 완전히 제거하기 위하여 vacuum dryer에서 10분간 원심 분리한 후 two-dimensional gel electrophoresis (2-DE)를 위한 시료로 사용하기 위해 -20°C 에서 보관하였다.

Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE)

2-DE의 수행은 Görg 등²⁹의 방법을 수정 보완하여 수행하였다. Triton X-114로 추출한 OMP를 rehydration buffer (9 M urea, 4% CHAPS, 20 mM DTT, 0.5% IPG buffer pH 4-7 및 소량의 bromophenol blue)에 부유시킨 후 isoelectric focusing (IEF)을 수행하였다. *S. typhimurium* 6균주의 각 IC는 lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 20 mM DTT, 0.5% IPG buffer 3-10)로 ICP를 추출한 후 다시 rehydration buffer로 희석하였다. IEF를 위해 준비된 OMP 및 ICP는 30분간 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 13cm pH 4-7 immobilized pH gradient (IPG) strip (Amersham biosciences, Sweden)에 loading하였다. IEF의 수행은 IPGphor system (Amersham biosciences, Sweden)을 사용하였다. 준비된 단백질 시료는 'in gel rehydration' 방법으로 loading하였고 IEF를 위한 방법은 low volt (30 V에서 6시간, 60 V에서 6시간)에서 수행한 후 80,000 volt까지 단계적으로 volt를 높였다. IEF 종결 후 IPG strip은 SDS-PAGE에 적용하기 전까지 -70°C 에서 보관하였다. IEF된 gel은 SDS-PAGE에 적용하기 위해서 우선 equilibration buffer A (6 M urea, 30% glycerol, 50 mM Tris · HCl (pH 8.8), 2% SDS 및 100 mg/mL DTT)와 equilibration buffer B (6 M urea, 30% glycerol, 50 mM Tris · HCl (pH 8.8), 2% SDS 및 250 mg/mL iodoacetamide)로 각각 실온에서 15분간 반응시켰다. 그 후 SDS-PAGE의 수행은 12.5% polyacrylamide gel에서 실시하였으며 gel의 염색은 도염색으로 실시하였다.

Matrix assisted laser adsorption/desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

In gel digestion

MALDI-TOF MS에 적용하기 위한 시료의 준비는 Lee 등²⁹의 방법을 준용하였다. SDS-PAGE gel 및 2-DE gel 상에서 단백질 band 및 spot은 1 mm²의 크기로 잘라서 1.5 mL tube에 옮긴 후 증류수로 세 번 세척한 다음 50% acetonitrile로 dehydration시킨 후 모든 liquid를 제거하기 위하여 vacuum centrifuge를 이용하여 gel을 건조시켰다. 건조된

gel은 100 mM NH_4HCO_3 로 10분 동안 rehydration시켰고, 단백질을 환원 및 알킬화시키기 위하여 reduction solution (100 mM NH_4HCO_3 및 10 mM DTT)과 alkylation solution (100 mM NH_4HCO_3 및 55 mM iodoacetamide)으로 각각 실온에서 30분간 반응시켰다. 용액을 제거시킨 후 100 mM NH_4HCO_3 와 acetonitrile을 이용하여 번갈아 가면서 gel을 세척한 다음 vacuum centrifuge로 건조시켰다. 건조된 gel은 digestion buffer (50 mM NH_4HCO_3 containing 12.5 ng/ μL trypsin)를 넣은 후 ice에서 45분 동안 반응시켰으며 digestion buffer를 버리고 다시 digestion buffer (without trypsin)를 넣은 다음 37°C 에서 하룻밤 보관하였다. Peptide를 추출하기 위하여 extraction buffer (water (93) : acetonitrile (5) : trifluoroacetic acid (2))를 동량으로 첨가 한 후 15분 동안 vortexing하였으며 상층액을 새 tube에 옮긴 후 gel이 들어있는 tube에 extraction buffer를 첨가하고 10분 동안 vortexing하였다. 여기에 acetonitrile을 동량으로 첨가한 후 다시 10분 동안 vortexing하여 peptide가 수집되어 있는 시험관에 상층액을 옮긴 후 vacuum centrifuge를 이용하여 농축시켰다.

MALDI target을 위한 시료 준비

Tryptic peptide는 Landry 등²⁹의 방법으로 MALDI plate에 targeting하였다. 즉, vacuum centrifuge로 농축된 peptide를 extraction solution에 부유시켜 matrix solution (-cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA; 40 mg/mL) in acetone) 과 nitrocellulose solution (nitrocellulose (20 mg/mL) in acetone : isopropanol)을 4:1로 혼합된 것을 동량으로 첨가하여 plate 상에 loading하였다.

MALDI-TOF MS 및 database 검색

실험에 사용된 MALDI-TOF MS는 Voyager DE-STR MALDI-TOF mass spectrometer (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA)를 사용하였으며, 기기의 조건은 positive ion mode, reflectron/delayed extraction mode, 20 kV의 accelerating voltage, 76.000%의 grid voltage, 0.010%의 guide wire voltage, 150 nano second의 delay time 및 laser shot은 128 pulse로 하여 mass spectra를 획득하였다. MALDI-TOF MS로 나온 실험적 mass value는 MS-FIT (http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/ms_fit.htm)를 이용하여 mass tolerance는 ± 50 ppm이하의 조건에서 단백질을 동정하였다.

결 과

약제내성 *S. typhimurium* 분리주의 ICP와 OMP에 대한 proteome 분석

*S. typhimurium*의 항생제 내성발현 기전에 관여하는 단백질을 규명하고자 항생제 내성유형에 차이를 보이는 6균주에 대하여 ICP와 OMP를 구분하여 2-DE profile을 비교하였다. 먼저 ACCbDNApSSuT에 내성이 있으면서 phage type에 의해 DT104로 확인된 SN282 균주에 대한 표준 map (reference map)을 작성하였다. IPG dry strip pH 4-7 (13cm)을 이용하여 2-DE를 수행한 후 도염색을 한 결과 ICP의 경우 440여개의 spot이 검출되었다. 또한 Triton X-114에 의해 추출된 OMP분획은 동일 범위 내에서 220여개의 spot이 검출되었다.

MALDI-TOF MS를 사용한 peptide mass fingerprinting (PMF)의 결과 ICP의 2-DE map에서는 46개의 spot에서 41개의 단백질을 동정하였으며, OMP에 대한 2-DE map에서는 14 spot에서 elongation factor-Tu를 포함한 12개의 단백질을 동정하였다.

ICP의 2-DE map에서 50번 spot의 PMF를 수행한 결과 Swiss-prot에서 *S. typhimurium*의 chaperone protein HtpG로 동정되었으나 NCBI에서 *S. typhi*의 prolyl-tRNA synthetase로 동정되었다. 421번 spot의 PMF 결과 Swiss-prot에서 *E. coli*의 protein YfiD와 autonomous glyceryl radical cofactor로 동정되었으며, NCBI에서는 *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi A str. ATCC 9150의 hypothetical protein SPA0272와 conserved hypothetical protein, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi Ty2의 hypothetical protein t0264, *S. typhimurium* LT2의 putative formate acetyltransferase 및 *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi str. CT18의 hypothetical protein STY2839의 5종류 단백질로 동정되었다 (Fig. 1B).

OMP의 2-DE map에서 얻어진 1번 spot은 *S. typhimurium*의 outer membrane protein precursor로 동정되었으며 mass value는 unknown protein from 2D-page (spots m62/m63/o3/t35), *Shigella flexneri*의 hypothetical protein SF0167, *E. coli*의 putative outer membrane protein Vpr, *Yersinia pseudotuberculosis*의 putative surface antigen 및 *Erwinia carotovora*의 putative surface antigen의 mass value와 일치하였다.

109번 spot은 NCBI database에서 *S. paratyphi*의 putative lipoprotein과 *S. typhimurium*의 putative serine/threonine protein kinase의 2종류 단백질로 동정되었으며, 이 두 단백질의 mass value는 일치하여 동일한 것이었다. 125번 spot은 *S. typhi*의 outer membrane protein A (OmpA)와 *S. typhimurium*의 putative hydrogenase membrane component precursor로 동정되었으며, 이 두 단백질의 mass value는 일치하였다. 163 및 165번 spot의 mass value는 *S. typhimurium*의 putative outer membrane lipoprotein과 *E. coli*의 D-methionine-

binding lipoprotein MetQ precursor와 일치하였다 (Fig. 1A).

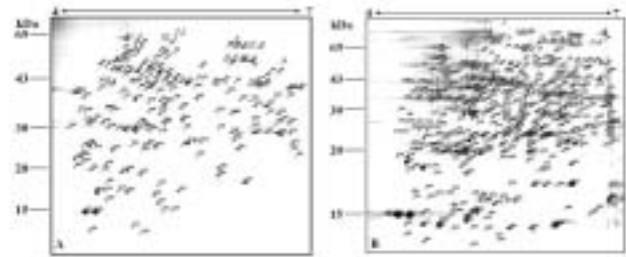


Fig. 1. A partial 2-DE maps for OMP (A) and ICP (B) of *S. typhimurium* SN282. After lysing innate cell, IEF was carried out using IPG dry strip pH 4-7 (13cm) followed by 2-DE and visualized by silver staining. The spots were randomly selected and carried out PMF analysis to identify proteins.

약제내성 *S. typhimurium* 분리주간의 ICP의 2-DE profile 비교

S. typhimurium 6균주의 ICP에 대한 2-DE profile을 서로 비교하였던 바 4부분에서 주요한 차이를 보였다. 그 결과 각 균주들의 pH 4-7 범위의 2-DE profile에서 검출된 spot은 상당히 많은 수가 공통적으로 관찰되었으나 a부분 (pH 4.5-5.0 및 51-69 kDa)에서 6개의 spot에서, b부분 (pH 4.6-5.3 및 20-24 kDa)에서 3개의 spot에서, c부분 (pH 4.2-4.5 및 18-20 kDa)에서 4개의 spot에서, d부분 (pH 4.7-5.5 및 8-15 kDa)에서 3개의 spot에서 주요한 차이를 보였다 (Fig. 2).

a부분 (pH 4.5-5.0 및 51-69 kDa)에서 검출된 spot에서 DnaK, GroEL, TF, ATP synthase 및 flagellin의 4종류의 spot이 시험에 사용된 전 균주의 2-DE profile에서 동정되었

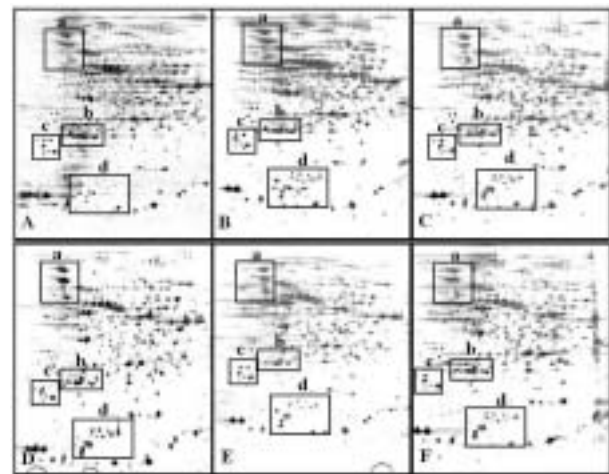


Fig. 2. Comparisons of 2-DE profiles for ICP of *S. typhimurium* SN72 (A), SN164(B), SN282(C), SN296(D), SN309(E) and SN310(F) isolates. All bacteria for 2-DE sample preparation were cultured at 37 °C in 50 mL of TSB and adjusted to until OD 610nm 1.0 (10⁹ CFU/mL) in Proteins in 2-DE gels were visualized by silver staining. 2-DE profiles of isolates were compared by phoretix 2-DE image analysis software and the different areas were marked by boxes labeled as a, b, c and d.

다 (Fig. 3). 그러나 1번, 2번 및 flagellin의 3종류의 spot은 균주간의 차이를 보였다. 1번 spot은 *S. typhimurium* SN309 (DT104)에서만 검출되었으나 나머지 다섯 균주에서는 관찰되지 않았다. 2번 spot은 *S. typhimurium* SN72와 SN164 (DT193) 균주들에서 검출 할 수 없었으나 SN296 (DT22) 균주에서는 미약하게, DT104의 3균주에서는 도은염색에서 강하게 염색되었다. 3번 영역의 flagellin으로 동정된 세 spot에서도 균주간의 많은 차이를 보였다. *S. typhimurium* SN309 (DT104)의 2-DE profile에서는 flagellin의 세 spot들은 관찰되지 않았으며, 또한 penicillin에만 내성을 보인 SN296 (DT22)의 경우 약한 염색성을 보였던 반면 SN164 (DT193), SN282 (DT282) 및 SN310 (DT310)의 3균주에서는 짙은 염색성을 보였다.

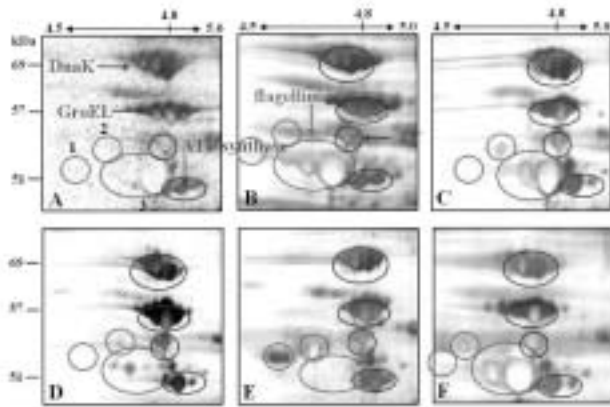


Fig. 3. Comparisons of ICP of *S. typhimurium* SN72 (A), SN164 (B), SN282 (C), SN296 (D), SN309 (E) and SN310 (F) in (a) area of 2-DE profiles.

b부분 (pH 4.6-5.3 및 20-24 kDa)에서는 4개의 spot에 대하여 3종류의 단백질을 동정하였으며, 동정된 단백질은 PPase, C22 및 peroxidase이었다 (Fig. 4). Peroxidase로 동정된 spot의 peptide mass value는 *E. coli*의 EmrR protein의 peptide mass value와 일치성을 보였으나 이 spot은 모든 균주의 2-DE profile에서 관찰되었다. 균주들의 2-DE profile간 차이가 나는 spot 중 1번 spot은 DT104인 SN309를 제외한 모든 균주에서 관찰되었다. 2번과 3번 spot

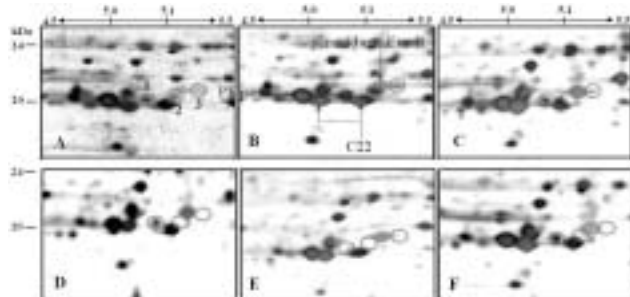


Fig. 4. Comparisons of ICP of *S. typhimurium* SN72 (A), SN164 (B), SN282 (C), SN296 (D), SN309 (E) and SN310 (F) in (b) area of 2-DE profiles.

의 경우에는 SN72와 SN164 (DT193)의 2-DE profile에서 관찰되었으나 나머지 균주에서는 관찰되지 않았다.

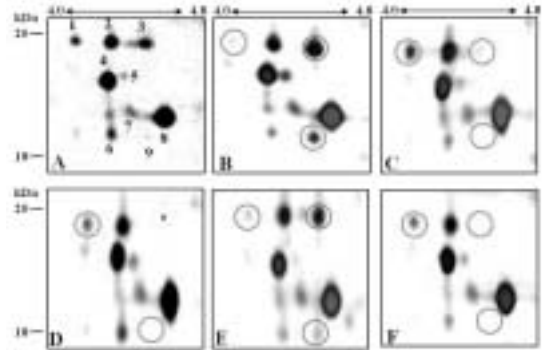


Fig. 5. Comparisons of ICP of *S. typhimurium* SN72 (A), SN164 (B), SN282 (C), SN296 (D), SN309 (E) and SN310 (F) in (c) area of 2-DE profiles.

pH 4.2-4.5 및 18-20 kDa 영역의 c부분에서는 PMF에 의하여 어떠한 spot도 동정되지 않았다 (Fig. 5). 그러나 이 부분에서 1번, 3번 및 9번 spot에서 균주간 차이를 나타내었다.

1번 spot의 경우 SN72와 SN282 (DT104)의 2균주에서 도은염색에 의해 강하게 염색된 반면에 SN296 (DT22), SN164 (DT193), SN309 (DT104) 및 SN310 (DT104)에서는 약하게 염색되었다. 3번 spot은 SN72, DT193인 SN164 및 SN309 (DT104)에서는 강한 염색성으로서 검출된 반면에 나머지 균주에서는 관찰되지 않았다. 9번 spot은 phage type DT193으로 동정된 SN164 균주에서 강한 염색성이 관찰되었다.

d부분 (pH 4.7-5.5 및 8-15 kDa)에서는 4개의 spot을 동정하였으며, 동정된 단백질은 DMRI, formate acetyltransferase, DNA-binding protein H-NS 및 stress protein A로 확인되었고 이 단백질들은 본 연구에서 사용된 전 균주의 2-DE profile에서 도은염색에 의해 강하게 염색되었다 (Fig. 6). 한편 이 영역에서 균주간 차이를 보이는 spot도 관찰되었다. 1번의 경우 SN72의 2-DE profile에서 두 spot으로 구성되어 있었으나, 나머지 균주들의 2-DE profile에서는 한 개의 spot만 관찰되었다. 1번 spot이 검출된 균주들의 2-DE profile에서는 염색성의 차이를 보였으며, 강한 염색성이 관찰된 균주로는 SN164와 SN309로서 phage typing에 의해 각각 DT193과 DT104로 확인되었고 다제내성 균주로 분류되었다. 그러나 DT104이며 다제내성 균주인 SN282와 SN310 및 penicillin에 대한 내성을 보이는 DT22인 SN282의 경우에는 약한 염색성을 보였다. 2번 spot은 SN72와 SN164 (DT193)에서 강한 염색성이 관찰되었으며, SN282, SN296 및 SN310에서는 약한 염색성을 보인 반면에 SN309의 경우에는 염색성이 전혀 관찰 되지 않았다. 한편, 3번과 4번 spot은 DT193인 SN164에서는 도은염색에 의해 강하게 염색되었으나 나머지 균주에서는 아주 낮은 염색성을 보였다.

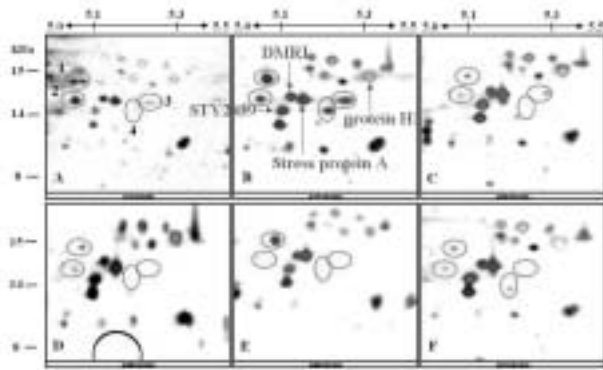


Fig. 6. Comparisons of ICP of *S. typhimurium* SN72 (A), SN164 (B), SN282 (C), SN296 (D), SN309 (E) and SN310 (F) in (d) area of 2-DE profiles.

약제내성 *S. typhimurium* 분리주간의 OMP의 2-DE profile 비교

본 실험에 사용한 약제내성 *S. typhimurium* 6균주의 whole cell을 Triton X-114 phase solution을 이용하여 OMP를 추출하고, 2-DE를 수행하여 각 균주간 spot의 차이를 비교하였다. OMP를 이용한 각 균주의 2-DE profile은 ICP의 2-DE처럼 균주간에 유사한 2-DE profile을 보인 반면에 5부위에서 차이가 나는 spot이 검출되었다 (Fig. 7).

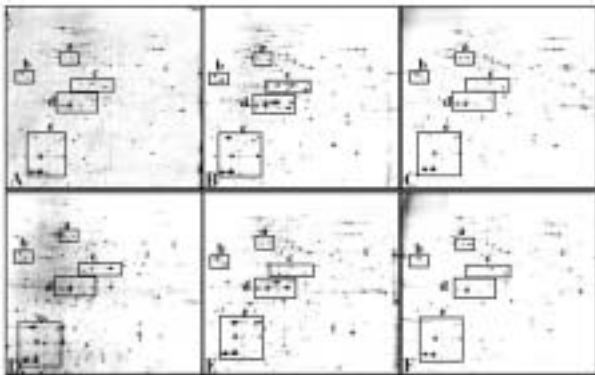


Fig. 7. Comparisons of 2-DE profiles for outer membrane proteins of *S. typhimurium* SN72 (A), SN164 (B), SN282 (C), SN296 (D), SN309 (E) and SN310 (F). 2-DE gels were visualized by silver staining. 2-DE profiles were compared by phoretix 2-DE image analysis software and the different areas were marked by boxes labeled a, b, c, d and e.

a부분에서는 RND pump system에 관여하는 AcrAB/TolC complex의 구성 단백질인 TolC의 2개 spot이 실험에 사용된 모든 균주의 2-DE profile에서 관찰되었다 (Fig. 8). 이 부분의 2-DE profile에서는 균주간 4개의 spot에서 차이를 보였다. 1번 spot의 경우 도은염색에 강한 염색성을 보이는 것은 DT193인 SN164이었으며, 이것보다 비교적 낮은 염색성이 관찰되는 것은 SN75와 DT22인 SN296이었으며, DT104의 경우에는 전혀 검출되지 않았다. 2번 spot은

DT104의 SN282와 SN310에서만 관찰되었고 이 두 균주는 plasmid profile이 동일한 것으로 판명되었다. 3번 spot은 DT193인 SN164와 DT104인 SN282에서 강한 염색성을 보였으며, 나머지 균주에서는 인식할 수 없을 정도의 염색성을 보였다. 4번 spot은 대부분의 균주에서 강하게 발현되었으나 DT22인 SN296과 DT104인 SN309에서는 전혀 검출되지 않았다.

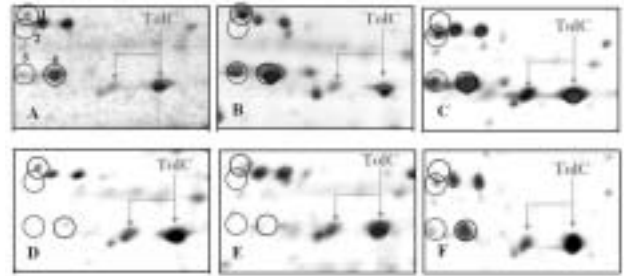


Fig. 8. Comparisons of OMP of *S. typhimurium* SN72 (A), SN164 (B), SN282 (C), SN296 (D), SN309 (E), and SN310 (F) in (a) area of 2-DE profiles.

b부분에서는 PMF에 의해 2개의 단백질이 동정되었다 (Fig. 9). 하나는 lipoprotein으로 이 spot은 모든 균주의 OMP를 이용한 2-DE profile에서 관찰되었다. 이 부분의 2-DE profile에서 동정된 OmpD는 균주간 차이를 보였다. DT193인 SN163과 DT104인 SN309에서는 이 OmpD가 도은염색에 의해 강하게 염색되었으나 나머지 균주의 2-DE profile에서는 약한 염색성을 보였다. 동정되지 않은 3개의 spot 중 1번과 2번의 spot은 DT104인 SN309에서 짙은 염색성이 관찰되었으며, DT193인 SN164, DT194인 SN282 및 DT22인 SN296의 2-DE profile에서는 SN309에 비해 더 옅은 염색성이 관찰되었으나 나머지 균주에서는 관찰되지 않았다. 3번 spot은 DT193인 SN164와 DT104인 SN309에서 강한 염색성으로 검출되었다.

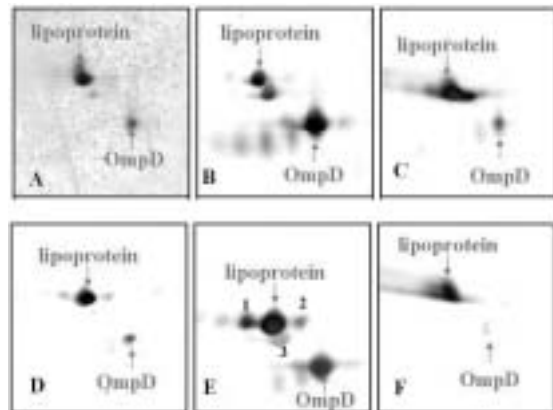


Fig. 9. Comparisons of OMP of *S. typhimurium* SN72 (A), SN164 (B), SN282 (C), SN296 (D), SN309 (E), and SN310 (F) in (b) area of 2-DE profiles.

MALDI-TOF MS를 사용한 PMF에 의해 OmpA로 동정된 c부분에서는 2개의 spot에서 차이를 보였다 (Fig. 10). 1번 spot의 경우 DT22인 SN296, DT104인 SN282와 SN309에서 2개의 spot이 겹쳐져 있었으나 SN72, DT193인 SN164 및 DT104인 SN310에서는 1개의 spot만 관찰되었다. 2번 spot은 DT193인 SN164에서 강하게 염색되었고, DT22인 SN296, DT104인 SN282와 SN309에서는 약하게 염색되었으나 나머지 균주의 2-DE profile에서는 검출되지 않았다.

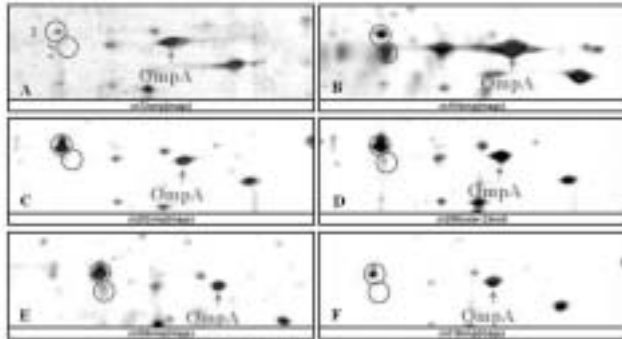


Fig. 10. Comparisons of OMP of *S. typhimurium* SN72 (A), SN164 (B), SN282 (C), SN296 (D), SN309 (E), and SN310 (F) in (c) area of 2-DE profiles.

d부위에서 검출된 주요 5개의 spot에 대하여 PMF로 단백질을 동정한 결과 2개의 spot에서 outer membrane lipoprotein을 동정하였으나 3개의 spot에서는 동정할 수 없었다 (Fig. 11). 동정된 2개의 spot은 모든 균주에서 관찰되었고, 동정되지 않은 1번, 2번 및 3번 spot은 균주 간 차이를 보였다. 다제내성균주이며 DT193으로 분류된 SN164의 2-DE profile에서는 3개의 spot 모두 강하게 발현되었으나 SN75, SN282 및 SN310에서는 거의 발현되지 않았다. 한편, penicillin에 내성을 보이는 DT22인 SN296에서 2번 spot은 강하게 발현되었으나 나머지 2개의 spot은 발현되지 않았고, 다제내성이면서 DT104인 SN309에서는 2번 spot은 약하게 발현되었으나 1번과 3번 spot은 강하게 발현되었다

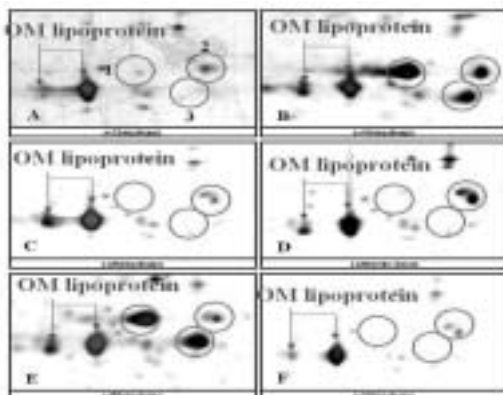


Fig. 11. Comparisons of OMP of *S. typhimurium* SN72 (A), SN164 (B), SN282 (C), SN296 (D), SN309 (E), and SN310 (F) in (d) area of 2-DE profiles.

e부분에서는 PMF에 의해 OmpX로 동정된 2개의 spot 및 lipoprotein으로 동정된 1개의 spot이 관찰되었다 (Fig. 12). 균주 간 비교에서 pH 4.5 및 분자량 18kDa인 OmpX에서 차이를 보였다. 이 OmpX는 DST에 내성을 보이는 SN72와 다제내성을 보이는 DT104로 분류된 SN282에서 도염색에 의해 약하게 염색된 반면 DT104로 분류된 SN310에서는 전혀 관찰되지 않았고, 나머지 균주에서는 강하게 염색되었다.

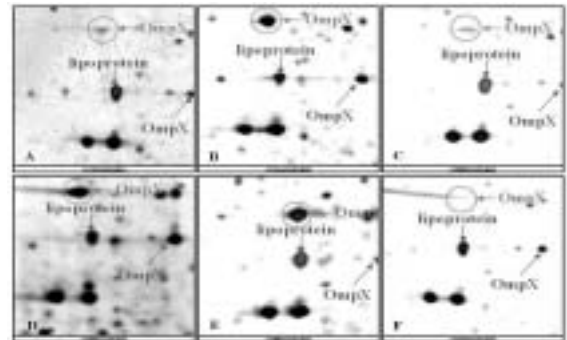


Fig. 12. Comparisons of OMP of *S. typhimurium* SN72 (A), SN164 (B), SN282 (C), SN296 (D), SN309 (E), and SN310 (F) in (e) area of 2-DE profiles.

고찰

다제내성유형을 보이는 *S. typhimurium*의 phage type은 1984년 영국에서 DT104가, 1980년부터 1990년 초기에 이탈리아와 영국의 돼지고기 가공품에서 DT193과 DT204가 분리되었다. 국내의 경우 앞 part에서 소와 돼지로부터 분리된 약제내성유형을 보이는 *S. typhimurium*의 phage typing 결과 DT104에 비하여 DT193의 분리율이 더 높은 것을 알 수 있었다. 이러한 약제내성유형을 보이는 *S. typhimurium* 분리주의 역학조사는 disc 확산법과 관련하여 약제내성에 관련된 gene의 PCR 증폭을 통한 확인 및 restriction fragment length polymorphism (RFLP)의 방법 등을 사용하여 역학관계를 조사하고 있다. 이들 세균의 항생제 내성기전에 관한 연구는 항생제 내성에 관여하는 gene의 제거 (deletion) 및 삽입 (insertion) 등을 통한 mutation에 의하여 많이 이루어졌다. 그러나 최근 유핵세포 (eukaryotic cell)와 무핵세포 (prokaryotic cell)의 생리학적 기능 및 조절에 대한 연구에서 gene의 기능 보다는 그것으로부터 발현된 단백질의 기능에 더 초점을 맞추고 있다¹⁶⁻²². 그러므로 본 연구에서는 proteomics를 통해 *S. typhimurium*의 기존에 규명된 항생제 내성 gene으로부터 발현된 단백질을 검출하고, phage type별 약제내성에 관련된 단백질의 차이 및 약제내성유형별 균주 간 비교를 통하여 약제내성특성을 규명하고자 하였다.

본 연구에서 ICP에 대한 2-DE profile 작성 시 MALDI-TOF MS에 의한 PMF 수행 결과 41개의 단백질을 동정하였다. 동정된 단백질의 기능별 분류는 Table 2에서 요약하였다.

이러한 단백질 중 DNA-binding protein H-NS는 처음에 transcription factor로서 보고되었으나 후에 chromosomal DNA의 구조와 기능에서 중요한 역할을 하는 것으로 규명되었다^{26, 27}. *E. coli*의 항생제 내성기전에서 H-NS는 RND transport family에 속하는 AcrEF와 MdtEF의 발현을 억제하는 것으로 보고되었다²⁸. 한편, stringent starvation protein A는 *E. coli*에서 stationary phase에서의 영양 결핍 및 acid stress의 환경에서 세균의 적응과 관련되어 있으며 H-NS의 negative regulon의 기능을 수행하는 것으로 보고되었다²⁹. 그러므로 본 연구의 ICP의 2-DE profile에서 동정된 H-NS와 stringent starvation protein A는 항생제 내성기전에 관련된 단백질들의 표현에 중요한 기능을 수행하는 것으로 사료된다.

본 연구에서 동정된 TF, GroEL, DnaK 및 HtpG등 posttranslational modification, protein turnover 및 chaperones에 관련된 단백질, EF-Ts와 EF-Tu 등 translation, ribosomal structure와 biogenesis 및 universal stress protein A 단백질은 stationary phase, carbon, nitrogen, phosphate, sulphate 및 amino acids의 starvation과 heat, oxidants, metals 및 antibiotics의 자극에 대한 stress 반응에서 강하게 발현되는 것으로 보고되었다²⁹⁻³¹. 이러한 stress 반응은 약제내성에 관련된 influx와 efflux의 regulon과 밀접한 연관성이 있는 것으로 연구자들은 추정하고 있다^{32, 33}. 본 연구를 통하여 동정된 이러한 단백질들은 다양한 약제내성유형을 보이는 *S. typhimurium* 6균주의 ICP의 2-DE profile에서 모두 관찰되어 약제내성기전의 관련성은 정확하게 확인할 수 없지만 단계 또는 다제에 대한 한 균주의 내성유형 연구 시 유용한 자료를 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서도 ICP의 2-DE 결과 도은염색에 의하여 염색된 spot 중 2개 (50번과 421번)의 spot은 database에 따라서 상이한 단백질로 동정되었다. 이러한 이유는 pi와 MW가 유사한 단백질들이 2-DE profile 상에서 동일한 위치에서 겹쳐서 나타날 수 있거나, 단백질 또는 gene database에 등록된 단백질의 차이에 기인될 수 있다. 50번 spot의 경우 HtpG와 prolyl-tRNA synthetase의 두 단백질이 겹쳐져 있고, 두 단백질들은 두 database에 각각 존재하고 있을 것으로 사료된다. 421번 spot의 경우 PMF에 의한 mass value는 Swiss-prot와 NCBInr에서 동정된 단백질들 사이에서 879.47의 peptide mass value에만 차이를 보여 각 database에서 동정된 단백질들은 아미노산서열에서 높은 유사성이 있는 것으로 생각되어 동일한 단백질인 것으로 추정된다. 339번 spot의 peptide mass value는 *S. typhi*의 peroxidase와 *E. coli*의 EmrR로서 동정되었다. *emrR*은 *E. coli*의 다제내성에 관여하는 *mpr* locus에 위치하며, MFS에 속하는 EmrAB pump의 negative regulator이다³⁴. *S. typhi*의 peroxidase의 기능이 *E. coli*의 EmrR과 어떠한 연관성이 있는지 명확히 규명

된 것은 없지만 두 사이의 peptide mass value는 높은 유사성이 있는 것으로 추정된다.

그람음성 세균의 세포벽은 peptidoglycan layer와 외막을 구성하는 polymer 즉, lipoprotein, outer membrane 및 lipopolysaccharide로 구성되어 있으며, OM의 전형적인 지질 이중막 및 major protein인 porin은 온도, 염분 및 영양소 등의 외부환경의 변화에 대한 세균의 적응 및 항생제와 소독제에 대한 세균의 내성을 증가하기 위한 efflux pump 또는 통로의 기능을 한다³⁵. 그러므로 OM의 구성 단백질들은 항생제 내성기전을 규명하기 위한 연구에서 중요한 위치에 있으므로 본 연구에서는 다양한 약제내성유형을 보이는 *S. typhimurium* 6균주의 OM을 분리하고 이에 대한 2-DE map을 작성하여 균주간 비교함으로써 항생제 내성기전 및 그에 관련된 단백질을 규명하고자 하였다.

본 연구에서는 Triton X-114를 이용하여 OMP를 분리하였으며, OMP의 순수 정제 및 농축을 위해서 ethanol 침전법을 사용하였다. Triton X-114는 비이온성계면활성제로서 소수성 물질 및 단백질과 상호작용하여 micelle을 형성함으로써 소수성 단백질 및 물질들의 용해도를 증가시킬 수 있다. 친수성 단백질은 이러한 계면활성제와 거의 상호작용하지 않는 것으로 보고되어 있다^{8, 23}. *S. typhimurium*, *Haemophilus somnus* 및 *Mycoplasma* spp. 등의 세균으로부터 OM의 분리하는 비이온성계면활성제를 사용하여 성공적으로 분리할 수 있었다고 보고하였다^{8, 23}. 2-DE map 작성 시 지질과 lipopolysaccharide는 전기영동시간의 연장 및 염색된 gel에서 horizontal streaking의 원인이 될 수 있다. 이러한 지질과 lipopolysaccharide를 제거하기 위하여 TCA 및 ammonium sulfate 등 다양한 화학물질을 사용하고 있으나 이러한 화학물질은 방법의 복잡성 및 고비용 등의 문제점이 있다. 본 연구에서 사용된 ethanol 침전법은 다른 침전법에 비하여 단순하여 단백질 침전법으로 많이 이용되고 있다^{8, 23}. Triton X-114의 OMP 추출법과 ethanol 침전법을 이용하여 *S. typhimurium*의 6균주로부터 OMP와 ICP에 대한 2-DE map의 비교 및 OMP에 대한 2-DE map 작성을 위한 MALDI-TOF MS를 사용한 PMF의 동정 결과 14개의 spot이 기준에 보고된 *S. typhimurium*의 OM에 위치하는 것과 일치되어 그 효용성이 증명되었다.

본 연구에서 MALDI-TOF MS를 사용한 PMF로 *S. typhimurium* 6균주의 OM에 대한 2-DE map을 작성한 결과 outer membrane protein precursor (unknown protein from 2D-page spots M62/M63/O3/O9/T35 precursor), fumarate reductase flavoprotein subunit, outer membrane protein TolC precursor, pectinesterase precursor, putative lipoprotein (putative serine/threonine protein kinase), putative outer membrane lipoprotein (D-methionine-binding lipoprotein MetQ precursor), phospholipase A1

precursor (detergent-resistant phospholipase A; outer membrane phospholipase A), putative lipoprotein, outer membrane protein X (OmpX) precursor, organic solvent tolerance protein precursor 및 OmpA (putative hydrogenase membrane component precursor)의 11개의 단백질을 동정하였다. Qi 등⁸⁾은 *S. typhimurium* SL1344의 envelope 단백질에 대하여 2-DE map을 작성하여 OmpA, TolC, flavoprotein 및 unknown protein from 2D-page spots M62/M63/O3/O9/T35 precursor 등을 포함한 39개의 단백질을 동정하였으며, Molloy 등⁹⁾은 *S. typhimurium* LT2의 OMP에 대한 2-DE map을 작성하여 outer membrane antigen 90, organic solvent tolerance protein, TolC 및 OmpA 등 37개의 단백질을 동정하였다고 하였다. 본 연구에서는 비록 11개의 단백질을 동정하였지만 이전 연구^{8,9)}에서 동정하지 못한 pectinesterase precursor, putative lipoprotein (putative serine/threonine protein kinase) 및 putative outer membrane lipoprotein (D-methionine-binding lipoprotein MetQ precursor)의 3종류의 단백질을 더 동정하였다.

S. typhimurium 6균주의 OMP에 대한 2-DE map을 작성한 결과 단백질의 기능별로 분류할 수 있었다. 먼저 outer membrane protein precursor (unknown protein from 2D-page spots M62/M63/O3/O9/T35 precursor), outer membrane protein TolC precursor, OmpX precursor, organic solvent tolerance protein precursor, phospholipase A precursor 및 OmpA의 6개의 단백질들은 cell wall/membrane/envelope의 생합성에 관여하며, putative outer membrane lipoprotein (D-methionine-binding lipoprotein MetQ precursor)과 pectinesterase는 각각 inorganic ion과 carbohydrate의 수송과 대사에 관여하는 단백질이다. 한편, 본 연구에서 동정된 단백질은 *S. typhimurium*에서 TolC 및 OmpD의 약제내성에 관련된 단백질뿐만 아니라 TolC, OmpX, lipoprotein 및 outer membrane protein 등을 포함한 virulence factor로 알려져 있어 이 세균의 약제내성기전 및 virulence 연구에 중요한 자료로 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

OmpD는 OM과 periplasm을 연결시키는 pore를 형성하여 outer membrane channel의 기능을 수행함으로써 독성물질의 efflux 또는 influx에 밀접한 역할을 하는 단백질로 보고되어 있다. 그러나 이 단백질은 다양한 약제내성을 부여하는 4가지의 MDR pump system으로 분류하지 못하고 있다¹⁰⁾. Santiviago 등²⁰⁾은 세균의 독성물질인 methyl viologen에 대한 *S. typhimurium*의 내성기전을 규명한 실험에서 기존의 MDR pump system으로 규명된 다양한 단백질 family에 분류되지 않은 YddG-OmpD complex pump system을 규명하였다. 그러나 *S. typhimurium*의 YddG-OmpD complex pump system이 methyl viologen의 독성물질에 대해서만

특이적으로 작용하는지 아니면 다양한 약제의 내성에 관여하는지는 규명되어 있지 않다. 본 연구에서 OmpD는 시험에 공시한 *S. typhimurium*의 전 균주의 2-DE profile에서 동일한 위치에서 관찰되었으나 발현의 정도는 균주간의 많은 차이를 보였다. 특히, 다제내성유형을 보이는 *S. typhimurium* SN164와 *S. typhimurium* SN309의 2균주에서 강한 발현을 보였다. 이 2균주는 phage typing에 의해 각각 DT193과 DT104로 규명되었지만 다제내성유형을 보이면서 DT104로 규명된 다른 2균주인 SN282과 SN310에서, DST 내성유형인 SN75와 penicillin에서만 내성을 보이는 DT22로 규명된 SN296에서는 약하게 발현되었다. 이러한 결과를 볼 때 OmpD는 phage type에 따른 특이 단백질이 아닌 것으로 사료되며 Santiviago 등²⁰⁾이 제시한 특이적 독성물질 및 항생물질에 대한 efflux pump system인지는 알 수 없었다.

OmpX의 발현은 superoxide와 sodium salicylate의 스트레스 반응과 연관하여 그람음성 세균에서 유도되는 것으로 보고되어 있다. 그러나 최근 *Enterobacter aerogenes*에서 β -lactams, fluoroquinolones, chloramphenicol, tetracycline 및 kanamycin에 내성인 2분리주에 대하여 SDS-PAGE를 이용하여 OMP profile을 조사한 바 이러한 약제에 감수성이 있는 균주에 비하여 OmpX는 강하게 발현되어 이 단백질은 약제내성에 관련된 단백질인 것으로 보고하였다³⁵⁻³⁷⁾. 본 연구에서 OmpX는 pI 4.5와 MW 18 kDa 및 pI 4.7과 MW 16 kDa의 두 곳에서 OmpX를 검출하였으며, 이중 차이를 보이는 것은 pI 4.7과 MW 16 kDa인 spot에서 관찰되었다. 즉, DST에 내성을 보이는 SN72, 다제내성을 보이는 SN282와 SN310에서는 거의 인식할 수 없을 정도로 약한 발현을 보인 반면에 다제내성을 보이는 SN164와 SN309, penicillin에 대해 내성을 보이는 SN296에서는 강한 발현을 보였다. *E. aerogenes*에서처럼 OmpX의 발현이 *S. typhimurium*에서도 밀접한 관련이 있는지를 확인하기 위하여 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

RND multidrug efflux system은 *E. coli*³⁸⁾, *S. typhimurium*¹⁶⁾, *Haemophilus influenza*, *Neisseria spp.*³⁹⁾, *Burkholderia spp.*⁴⁰⁾, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida* 및 *Stenotrophomonas maltophilia*¹¹⁾와 같은 그람음성 균에서 주로 확인되었다. RND family는 periplasmic membrane fusion protein과 outer membrane protein (또는 factor)의 상호작용에 의해 세포질 내에 축적된 항생제의 농도를 감소시키는 기능을 한다. *E. coli*와 *S. typhimurium*에서는 AcrA와 AcrB 및 TolC의 3종류의 단백질이 확인되었으며, 이들은 각각 periplasmic membrane과 OM에 위치하여 AcrAB-TolC efflux pump를 구성한다¹⁰⁻¹¹⁾. 본 연구에서 그람음성 균의 약제내성에 중요한 기능을 하는 AcrAB-TolC efflux pump를 구성하는 세 단백질 중 비록 AcrA와 AcrB의 두 단백질을 다양한 약제내성을 보이는 *S. typhimurium* 6균주의 2-DE profile에서 동정할 수 없었지

만, TolC는 실험에 공시한 모든 균주의 OMP에 대한 2-DE profile에서 동정하였다. 이러한 결과는 적어도 TolC는 실험에 공시한 모든 균주의 OM의 구성단백질이거나 단제 또는 다제내성에 밀접한 관련이 있는 것으로 사료된다.

본 연구에서 공시된 *S. typhimurium* 6균주에서 내성유형 및 phage type과 무관하게 OM에서 TolC의 두 분자가 MALDI-TOF MS에 의해 동정되었다. *S. typhimurium* DT104와 DT204의 다제내성에 관여하는 gene의 mutation에 의한 연구에서 TolC는 다른 efflux system보다 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다⁷⁾. 한편, 이 단백질을 암호화하는 gene은 quinolones, chloramphenicol, tetracycline 및 penicillin 등의 약제에 대한 내성을 부여하는 것으로 보고되어 있다^{14, 15)}. 본 연구의 결과와 이전 연구의 결과를 토대로 TolC는 항생제 내성기전에서 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었으며 특히 항생제에만 관련된 것이 아님을 알 수 있었다.

본 연구에서 다양한 약제내성유형을 보이는 6균주의 2-DE profile을 비교함으로써 항생제 내성기전에 관여하는 단백질을 동정하고자 하였다. 기존의 연구에서 약제내성에 관여하는 것으로 보고된 OmpD^{7, 10, 35)}를 동정하였으나 이러한 단백질은 약제내성유형에 따라 분류할 수 없었다. 이는 아마도 세균이 약제에 대한 내성 획득 시 처한 환경과 약제내성에 관련된 gene의 획득 또는 발현의 양상 등 다양한 원인에 의하여 균주 간 내성기전에 관련된 단백질의 발현 정도에는 차이가 있을 수 있으나 유사한 내성기전을 가지는 것으로 생각된다.

결 론

본 연구는 *S. typhimurium*의 약제내성에 관련된 단백질 및 기전을 규명하기 위하여 proteomics 접근을 시도하였다. Reference map은 *S. typhimurium* SN282 (DT104)의 innate cell protein (ICP)과 outer membrane protein (OMP)을 추출하여 이차원전기영동 (Two-dimensional gel electrophoresis)과 matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)를 이용하여 작성하였고, SN75 (not phage typed; DST에 내성), SN296 (DT22; penicillin에 내성), SN164 (DT193; ACCbDNaPSSuT에 내성) 및 SN309와 SN310 (DT104; ACCbDNaPSSuT에 내성)과 서로 비교하였다. 작성된 ICP의 2-DE map에서 440여개의 spot에서 41개의 단백질을 동정하였고, OMP의 2-DE map에서는 220여개의 spot에서 11개의 단백질을 동정하였다. ICP의 2-DE map에서 그람 음성 세균에서 항생제 내성기전에 밀접한 관련이 있는 DNA-binding H-NS와 stringent starvation protein A, DnaK, GroEL 및 universe stress protein을 동정하였다. 또한, OMP의 2-DE profile에서는 그람 음성 세균의 다제내성 efflux system을 구성하는 단백질인 TolC와 OmpD를 동정하였으나 균주 간 비교에서 이러한 단백질은 phage type 또

는 약제내성유형에 따라서 분류할 수 없었다. 따라서 이들 단백질은 아마도 항생제 노출 전에 이미 존재하며, 항생제에 노출될 경우에 세균의 생존을 위해서 그의 기능이 변화하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC and Winn Jr WC. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 5th edition, p570-650(1997).
2. Popoff MY, Bockemuhl J and Gheesling LL. Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann White scheme. *Res Microbiol*, 154(3):173-174(2003).
3. Wall PG, Morgan D, Lamden K, Ryan M, Griffin M, Threlfall EJ, Ward LR and Rowe B. A case control study of infection with an epidemic strain of multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104 in England and Wales. *Commun. Dis Rep CDR Rev*, 4:4(11):130-135(1994).
4. Helms M, Ethelberg S, and Molbak K. DT104 Study Group. International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992-2001. *Emerg Infect Dis*, 11(6):859-867(2005).
5. Glynn MK, Bopp C, Dewitt W, Dabney P, Mokhtar M and Angulo FJ. Emergence of multidrug resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 infections in the United States. *N Engl J Med*, 7:338(19):1333-1338(1998).
6. Besser TE, Goldoft M, Pritchett LC, Khakhria R, Hancock DD, Rice DH, Gay JM, Johnson W and Gay CC. Multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 infections of humans and domestic animals in the Pacific Northwest of the United States. *Epidemiol Infect*, 124(2):193-200(2000).
7. Sukupolvi S, Vaara M, Helander IM, Viljanen P and Makela PH. New *Salmonella typhimurium* mutants with altered outer membrane permeability. *J Bacteriol*, 159(2):704-712(1984).
8. Qi SY, Moir A and O'Connor CD. Proteome of *Salmonella typhimurium* SL1344: identification of novel abundant cell envelope proteins and assignment to a two-dimensional reference map. *J Bacteriol*, 178(16):5032-5038(1996).
9. Molloy MP, Phadke ND, Maddock JR and Andrews PC. Two-dimensional electrophoresis and peptide

- mass fingerprinting of bacterial outer membrane proteins. *Electrophoresis*, 22(9):1686–1696(2001).
10. Paulsen IT, Brown MH and Skurray RA. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev*, 60(4):575–608(1996).
 11. Bolhuis H, van Veen HW, Poolman B, Driessen AJ and Konings WN. Mechanisms of multidrug transporters. *FEMS Microbiol Rev*, 21(1):55–84(1997).
 12. Barker KF. Antibiotic resistance: a current perspective. *Br J Clin Pharmacol*, 48(2):109–124(1999).
 13. Poole K. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 4(5):500–508(2001).
 14. Randall LP and Woodward MJ. The multiple antibiotic resistance (*mar*) locus and its significance. *Res Vet Sci*, 72(2):87–93(2002).
 15. Moreira MAS, Souza ECS and de Moraes CA. Multidrug efflux systems in Gram-negative bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35: 19–28(2004).
 16. Nikaido H, Basina M, Nguyen V and Rosenberg EY. Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those beta-lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *J Bacteriol*, 180(17):4686–4692(1998).
 17. Baucheron S, Chaslus-Dancla E and Cloeckaert A. Role of *TolC* and *parC* mutation in high-level fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT204. *J Antimicrob Chemother*, 53(4):657–659(2004).
 18. Baucheron S, Tyler S, Boyd D, Mulvey MR, Chaslus Dancla E and Cloeckaert A. AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(10):3729–3735(2004).
 19. Baucheron S, Mouline C, Praud K, Chaslus Dancla E and Cloeckaert A. TolC but not AcrB is essential for multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium colonization of chicks. *J Antimicrob Chemother*, 55(5):707–712(2005).
 20. Santiviago CA, Fuentes JA, Bueno SM, Trombert AN, Hildago AA, Socias LT, Youderian P and Mora GC. The *Salmonella enterica* sv. Typhimurium *smvA*, *yddG* and *ompD* (porin) genes are required for the efficient efflux of methyl viologen. *Mol Microbiol*, 46(3):687–698(2002).
 21. Giraud E, Cloeckaert A, Kerboeuf D and Chaslus Dancla E. Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(5):1223–1228(2000).
 22. Macvanin M and Hughes D. Hyper-susceptibility of a fusidic acid resistant mutant of *Salmonella* to different classes of antibiotics. *FEMS Microbiol Lett*, 15:247(2):215–220(2005).
 23. Lee RP, Doughty SW, Ashman K and Walker J. Purification of hydrophobic integral membrane proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae* by reversed phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 21:737(2):273–279(1996).
 24. Gorg A, Weiss W and Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4(12):3665–3685(2004).
 25. Landry, F, Lombardo, C.R. and Smith J.W. A method for application of samples to matrix-assisted laser desorption ionization time of flight targets that enhances peptide detection. *Anal Biochem*, 279(1):1–8(2000).
 26. Atlung T and Ingmer H. H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol Microbiol*, 24(1):7–17(1997).
 27. Williams RM and Rimsky S. Molecular aspects of the *E. coli* nucleoid protein, H-NS: a central controller of gene regulatory networks. *FEMS Microbiol Lett*, 15:156(2):175–185(1977).
 28. Nishino K and Yamaguchi A. Role of histone like protein H-NS in multidrug resistance of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 186(5):1423–1429(2004).
 29. Hansen AM, Qiu Y, Yeh N, Blattner FR, Durfee T and Jin DJ. SspA is required for acid resistance in stationary phase by downregulation of H NS in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 56(3):719–734(2005).
 30. Hommais F, Krin E, Laurent Winter C, Soutourina O, Malpertuy A, Le Caer JP, Danchin A and Bertin P. Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H NS. *Mol Microbiol*, 40(1):20–36(2001).

31. Spory A, Bosserhoff A, von Rhein C, Goebel W and Ludwig A. Differential regulation of multiple proteins of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by the transcriptional regulator SlyA. *J Bacteriol.* 184(13):3549–3559(2002).
32. Van Bogelen RA, Hutton ME and Neidhardt FC. Gene–protein database of *Escherichia coli* K–12: edition 3. *Electrophoresis.* 11:1131–1166.
33. Bader MW, Navarre WW, Shiau W, Nikaido H, Frye JG, McClelland M, Fang FC and Miller SI. Regulation of *Salmonella typhimurium* virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides. *Mol Microbiol.* 50(1):219–230(2003).
34. Lomovskaya O, Lewis K and Matin A. EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump EmrAB. *J Bacteriol.* 1995 May;177(9):2328–34.
35. Dupont M, De E, Chollet R, Chevalier J and Pages JM. *Enterobacter aerogenes* OmpX, a cation selective channel mar and osmo regulated. *FEBS Lett.* 2:569(1–3):27–30(2004).
36. Ghisalberti D, Masi M, Pages JM and Chevalier J. Chloramphenicol and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*. *Biochem Biophys Res Commun.* 25:328(4):1113–1118(2005).
37. Gayet S, Chollet R, Molle G, Pages JM and Chevalier J. Modification of outer membrane protein profile and evidence suggesting an active drug pump in *Enterobacter aerogenes* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(5):1555–1559(2003).
38. Ma D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, Nikaido H and Hearst JE. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 175(19):6299–6313(1993).
39. Hagman KE, Lucas CE, Balthazar JT, Snyder L, Nilles M, Judd RC and Shafer WM. The MtrD protein of *Neisseria gonorrhoeae* is a member of the resistance/nodulation/division protein family constituting part of an efflux system. *Microbiology.* 143(Pt7):2117–2125(1997).
40. Moore RA, DeShazer D, Reckseidler S, Weissman A and Woods DE. Efflux–mediated aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(3):465–470(1999).