

LasA 프로펩타이드를 이용한 녹농균 감염 완화

김태현^{ID} · 리시후이 · 이준희*^{ID}

부산대학교 약학대학 약학과 미생물학 연구실

Alleviation of *Pseudomonas aeruginosa* infection by LasA propeptide

Tae-Hyeon Kim^{ID}, Xi-Hui Li, and Joon-Hee Lee*^{ID}

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Pusan National University, Busan 46241, Republic of Korea

(Received August 12, 2022; Revised September 13, 2022; Accepted September 13, 2022)

Pseudomonas aeruginosa, an opportunistic human pathogen, expresses LasA (elastase A) for infection as an important virulence factor. Since the LasA activity can be inhibited by its propeptide, we tried to alleviate the severity of *P. aeruginosa* infection using the purified LasA propeptide (LasA_{pp}). The purified LasA_{pp} efficiently inhibited LasA *in vitro*. The effectiveness of LasA_{pp} in alleviating the *P. aeruginosa* infection was investigated using mouse skin infection and acute lung infection models. The LasA_{pp} treatment of *P. aeruginosa* alleviated severity of *P. aeruginosa* infection to some extent in both models of the skin and acute lung infections, and the PIV_{pp} itself caused no harmful effect on host tissues. However, since the degree to which LasA_{pp} alleviated the infection was very small compared to that expected from the degree to which LasA_{pp} inhibited the activity of purified LasA *in vitro*, we investigated how much LasA activity was inhibited when live *P. aeruginosa* cells were treated with LasA_{pp}. As a result, LasA activity was inhibited only to a very small extent compared to the *in vitro* result with the purified LasA. This demonstrates that when LasA_{pp} is directly applied to live *P. aeruginosa* cells, LasA_{pp} does not sufficiently inhibit the activity of LasA, and thus the effect of alleviating severity of infection is limited.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, infection control, LasA, LasA propeptide, mouse acute lung infection, mouse skin infection, propeptide

녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)은 화상 부위 감염 및 각막염과 같은 급·만성 감염을 일으키는 기회 감염균이다(Van Delden and Iglewski, 1998). 낭포성 섬유증 환자에서 발생하는 세균 감염의 가장 흔한 원인균이며, 인공호흡기 관련 폐렴 및 카테터 매개 감염과 같은 병원 내 감염의 주요한 원인균이기도 하다(Hancock and Speert, 2000; De Bentzmann and Plésiat, 2011; Moradali *et al.*, 2017). 녹농균은 다양한 감염 과정에서 세포 외 프로테아제(extracellular protease), 파이오시아닌(pyocyanin), 람노지질(rhamnolipid) 등과 같은 많은 독성 인자를 분비한다(Lau *et al.*, 2004; Hoge *et al.*, 2010; Moradali *et al.*, 2017).

이러한 독성 인자들 중 세포 외 프로테아제는 숙주의 조직을 구성하는 단백질이나 숙주의 면역 인자들을 분해하기 때문에 매우 강력한 독성 인자로 작용하는데, 특히 elastase B (pseudolysin, LasB), protease IV (PIV), elastase A (staphylolysin, LasA)는 녹농균의 감염 및 발병에 매우 중요한 역할을 한다(Hoge *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2014). 이들은 면역 글로블린, 보체, 피브리노젠, 플라스미노젠 등 많은 숙주 면역 단백질을 분해할 수 있고(Engel *et al.*, 1998; Malloy *et al.*, 2005; Hoge *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2014), 모두 퀴럼 센싱(quorum sensing, QS)에 의해 세포 밀도 의존적으로 일시에 발현되기 때문에, 강력한 독성을 발휘한다(Park *et al.*, 2014; Oh *et al.*, 2017; Li and Lee, 2019). 따라서 이들의 활성 억제는 녹농균 감염을 감소시킬 수 있는 주요한 방법으로 생각되어 왔다. 그러나 우리 인체 또한 혈액 응고나 보체 시스템 등에서 필수적인 프로테아제들을 많이 생성하기 때문에, 일반적인 프로테아제 억제제를 사용할 경우 인체의 기능에 심각한 독성이 나타날 수도 있

*For correspondence. E-mail: joonhee@pusan.ac.kr;
Tel.: +82-51-510-2821; Fax: +82-51-513-6754

다. 따라서 세균이 생성하는 프로테아제들만 특이적으로 억제할 수 있는 억제제의 개발이 필요한 실정이다.

PIV, LasA, LasB는 서로 아미노산 서열이 유사하지 않지만, 유사한 도메인 구조를 갖는 전구 단백질 형태(prepro-form)로 발현되는데, 이 전구 단백질은 N-말단에 신호 펩타이드(signal peptide, SP)를, 중간에 프로펩타이드(propeptide, PP)를, C-말단에 최종 상태의 프로테아제를 가진다(Hoge et al., 2010; Li and Lee, 2019). 세포질에서는 이 전구 단백질 형태로 존재하지만 페리플라즈막으로 이동하면서 SP가, 그리고 페리플라즈막에서 세포 외로 분비될 때 PP가 순차적으로 잘려 나가 활성화된 프로테아제가 된다(Kessler et al., 1998; Hoge et al., 2010; Li and Lee, 2019). 하지만 자신의 PP가 절단되어 제거될 때까지는 비활성화된 상태로 존재하는데, 이는 PP가 절단되지 않고 붙어 있거나, 혹은 절단되더라도 여전히 자신의 프로테아제에 결합하고 있기 때문이다(Kessler and Safrin, 1994; Oh et al., 2017; Li and Lee, 2019). 이렇게 완전히 분비되기 전까지 자신의 PP에 의해 특이적으로 프로테아제 활성이 억제되는 현상은 LasB, PIV, LasA 모두에서 발견되었고, 이는 각 프로테아제들이 완전히 외부로 분비될 때까지 활성을 억제하여 자신에게 독성이 나타나지 않도록 하는 “안전판” 역할을 PP가 하고 있다는 의미이다(Kessler and Safrin, 1994; Braun et al., 2001; Oh et al., 2017; Li and Lee, 2019).

이렇듯 PP가 자신의 프로테아제만 특이적으로 억제하기 때문에, 이들 PP만을 따로 발현, 정제하여 녹농균을 처리함으로써 주요 프로테아제들의 활성을 억제하고 녹농균의 병독성도 감소시키려는 시도가 있어왔다. LasB, PIV, LasA는 LasB가 pro-PIV와 pro-LasA를 PIV와 LasA로 활성화시키고, 활성화된 PIV가 pro-LasA를 LasA로 활성화시키는 순차적 활성화 기전을 가지기 때문에(Li and Lee, 2019), LasB를 억제하는 것이 녹농균 감염 억제를 위한 가장 좋은 방법으로 생각되었다. 하지만, LasB의 PP만을 발현, 정제한 것(LasB_{pp})으로 LasB를 처리하였을 때, LasB_{pp}가 LasB에 의해 분해되어 버려 LasB 활성은 조금만 억제되었다(Li and Lee, 2019). 이와 달리 PIV와 LasA는 그들의 PP만을 발현하여 정제한 것(각각 PIV_{pp}와 LasA_{pp})으로 처리하였을 때 충분히 활성이 억제되었다(Oh et al., 2017; Li and Lee, 2019). 이는 PP들의 자신의 프로테아제에 대한 특이적 저해제로 사용될 수 있음을 보여주는 것이다. 실제로 PIV_{pp}로 녹농균을 처리했을 때, 녹농균의 병독성이 의미 있게 완화되었다(Kim et al., 2021). 본 연구에서는 LasA_{pp}를 분리, 정제하여 녹농균에 처리함으로써 PIV_{pp}처럼 녹농균 감염을 완화시킬 수 있는지 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주와 배지, 배양 조건

본 연구에서는 사용된 세균 균주, 실험 동물, 플라스미드 등은 Table 1에 정리되어 있다. 대부분의 녹농균(*P. aeruginosa*) 실험에는 야생형 균주인 PAO1이 사용되었지만, LasA의 과량 발현에는 PAO-T7 균주가 사용되었다. 대장균(*E. coli*)은 LasA 활성화 실험에는 DH5α 균주를, LasA_{pp} 과량 발현에는 BL21 균주를 사용하였다. 대장균과 녹농균은 Luria-Bertani 배지(LB; 5 g/L yeast extract, 10 g/L bacto-tryptone, 5 g/L NaCl)에서 37°C로 호기 배양되었다. 고체 배지는 한천(agar)을 1.5%로 첨가하여 제조하였다. 세균의 생장은 600 nm에서의 광학적 밀도(optical density, OD₆₀₀)로 측정되었다. 항생제는 다음과 같은 농도로 사용되었다: ampicillin, 100 µg/ml; carbenicillin 150 µg/ml; tetracycline, 50 µg/ml. 단백질 발현 유도에는 isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG)가 0.1 혹은 0.5 mM로 첨가되었다.

갈색 거저리(*Tenebrio molitor*) 유충을 사용한 병독성(virulence) 분석

녹농균의 병독성은 이전 연구방법을 따라 측정하였다(Park et al., 2014; Oh et al., 2017). 먼저 녹농균의 배양 상등액(culture supernatant)을 얻기 위해 각 균주를 LB 배지에서 37°C 진탕 배양한 후, 다음 날 다시 새 LB 배지에 1% 접종하여 37°C에서 16시간 동안 진탕 배양하였다. 4°C, 13,250 × g로 원심 분리하여 세포를 제거하고 상등액을 취해 다시 세균용 필터(0.22 µm, Satorious)로 거른 후, 이를 10 kDa cut-off centricron (Vivaspin®, Satorious)에서 10배 농축하였다. 농축한 배양 상등액 5 µl를 주사기를 이용하여 조심스럽게 곤충의 일종인 갈색 거저리(*Tenebrio molitor*, mealworm beetle)의 유충(mealworm)에 주입한 후, 30°C에서 4일간 관찰하면서 죽은 유충의 수를 확인하였다. 건드려도 반응이 없으면 유충이 죽은 것으로 판단하였다.

LasA의 정제

LasA는 이전 연구에서처럼 C-말단에 histidine 태그가 붙은 형태로 녹농균 PAO-T7에서 과량 발현한 후 nickel-agarose resin (Ni-NTA)을 이용한 크로마토그래피 방법으로 정제하였다(Li and Lee, 2019). 먼저 C-말단에 histidine-tag이 붙은 LasA를 과량 발현하는 플라스미드인 pQF21c-LasA (Table 1)를 PAO-T7 균주에 형질 전환을 통해 도입하였다. 이 세포를

LB 배지에서 OD=0.5까지 진탕 배양한 후, 16°C로 온도를 낮추고 IPTG를 0.1 mM로 첨가하여 단백질 발현을 유도한 후, 16°C에서 16시간을 더 배양하였다. 세포를 13,250 × g로 원심 분리하여 제거하고 상등액을 취해 다시 세균용 필터(0.22 μm)로 거른 후, 이를 nickel-agarose resin (Ni-NTA)에 넣고 resin에 결합한 LasA 단백질을 imidazole 농도 구배를 이용해 용출하였다. LasA를 포함하는 분획들을 모아 저장용액(storage buffer; 20 mM Tris-HCl; pH 8.0 and 5% glycerol)에서 충분히 투석한 후 적은 양으로 나누어 사용시까지 -80°C에 보관하였다.

LasA propeptide (LasA_{pp}) 과량 발현용 플라스미드의 제조 및 LasA_{pp}의 정제

LasA_{pp}를 과량 발현하는 플라스미드(pET21b-Apro, Table 1)는 전체 *lasA* 유전자 중 SP와 PP를 코딩하고 있는 부분(첫 번째 아미노산부터 236번째 아미노산까지)만을 NdeI과 BamHI 절단 부위를 갖는 프라이머로 PCR 증폭하여 pET21b plasmid의 NdeI-BamHI 위치에 삽입하여 제조하였다. pET21b는 C-말단 부위에 histidine-tag을 붙여주는 플라스미드이므로(Table

1), pET21b-Apro는 histidine-tagged LasA_{pp}를 과량 발현한다. pET21b-Apro를 BL21 균주에 형질 전환으로 도입하고, LB 배지에서 OD=0.5까지 진탕 배양한 후, 16°C로 온도를 낮추고 IPTG를 0.5 mM로 첨가하여 단백질 발현을 유도하고 나서 16시간을 더 배양하였다. 원심 분리(13,250 × g)로 세포를 모은 후, 이를 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)에 현탁하여 초음파로 파쇄하였다. 이를 원심 분리하여 수용성 분획만을 포함하는 상등액을 취해 Ni-NTA 크로마토그래피에 적용하였다. imidazole 농도 구배를 이용해 Ni-NTA 레진에 결합한 LasA_{pp}를 용출한 후, 충분히 순도가 높은 분획들만 모아 저장용액(20 mM Tris-HCl; pH 8.0, 5% glycerol)에서 충분히 투석하였다. 이를 소량으로 나누어 -80°C에 보관하였다.

LasA 활성 측정

LasA 활성은 LasA의 포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 용균 활성(staphylolytic activity)을 통해 측정하였다(Li and Lee, 2019; Kim *et al.*, 2021). 포도상구균 RN4220 세포를 LB 배지에서 16시간 배양한 후 13,000 rpm (13,250 × g)에서 원심

Table 1. Bacteria used in this work

| Name | Description | References |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <i>P. aeruginosa</i> | | |
| PAO1 | Wild type <i>P. aeruginosa</i> | Pearson <i>et al.</i> (1997) |
| MW1 | <i>lasI</i> , <i>rhlI</i> double mutant of PAO1 | Whiteley <i>et al.</i> (1999) |
| DH001 | <i>piv</i> ⁻ mutant of PAO1, Tc ^R | Park <i>et al.</i> (2014) |
| <i>AlasB</i> | <i>lasB</i> ⁻ mutant of PAO1, Tc ^R | Li and Lee (2019) |
| <i>AlasA</i> | <i>lasA</i> ⁻ mutant of PAO1, Tc ^R | Li and Lee (2019) |
| PAO-T7 | T7 RNAP [*] -expressing PAO1 | Hoang <i>et al.</i> (2000) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | | |
| RN4220 | A laboratory strain of <i>S. aureus</i> | Kim <i>et al.</i> (2021) |
| <i>Bacillus subtilis</i> | | |
| ATCC6051 | A wild type strain of <i>B. subtilis</i> | Lab. collection |
| <i>E. coli</i> | | |
| DH5α | <i>supE44ΔlacU169(80lacZΔM15)hsdR17recA1 gyrA96thi-1 relA1</i> | Lab. collection |
| BL21(DE3) | F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻)</i> <i>dem gal λ</i> (DE3) | Lab. collection |
| Insect | | |
| <i>Tenebrio molitor</i> | Yellow mealworm | Kim <i>et al.</i> (2021) |
| Mouse | | |
| Jcl:ICR mice | A strain of albino mice | Samtako Bio |
| Plasmids | | |
| pQF21c-LasA | <i>lasA</i> in pQF21c, Cb ^R | Li and Lee (2019) |
| pET21b | A plasmid for the overexpression of C-terminal histidine-tagged protein, Ap ^R | Novagen |
| pET21b-Apro | Propeptide-coding region of LasA in pET21b, Ap ^R | This study |

Tc, tetracycline; Ap, ampicillin; Cb, carbenicillin.

분리하여 수확하였다. 이를 20 mM Tris-HCl (pH 8)에 현탁하고 100°C에서 10분간 사멸하였다. 시료와 사멸된 포도상구균 세포를 OD₆₀₀ = 1이 되게 섞은 후 37°C에 2시간 동안 두어 포도상구균의 용균이 일어나도록 하였다. 살아있는 녹농균이 들어 있는 시료에서 LasA 활성을 측정할 때에는 먼저 녹농균 세포와 정제된 LasA_{pp}를 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)에 섞고 25°C에서 10분간 배양한 뒤, 여기에 포도상구균 세포를 넣어(녹농균:포도상구균 = 9:91) OD₆₀₀ = 1이 되게 맞추고 37°C에서 2시간 용균이 일어나도록 하였다. 2시간 후 OD₆₀₀의 감소 정도가 포도상구균의 용균 정도를 의미하므로, 2시간 후의 OD₆₀₀ 값이 낮을수록 LasA의 활성이 높음을 의미한다. 이를 보다 직관적으로 이해하기 좋도록 다음과 같이 상대 활성으로 환산하여 제시하였다. The relative LasA activity (%) = [(1-OD₆₀₀ of sample with LasA_{pp})/(1-OD₆₀₀ of sample without LasA_{pp})] × 100. 이러한 전환에 의해 LasA_{pp}를 처리하지 않았을 때의 LasA 활성이 100%로 표시된다.

쥐의 관리와 동물 실험 윤리 준수

쥐 실험을 위해 6주령 수컷 쥐(Jcl:ICR mice, Samtako Bio, Table 1)를 분양받아 나무 절편을 깔아준 polycarbonate 케이지에서 케이지당 4-5 마리, 온도 24°C, 습도 55%, 조명 주기 12시간을 유지하면서 관리, 사육하였다. 쥐는 부산대학교 동물 실험 시설(Laboratory Animal facility at Pusan National University)에서 관리되었으며, 모든 동물 실험들은 미국 국립보건원(National Institutes of Health, USA)의 실험 지침에 따라 수행되었다. 또한 본 연구에 사용된 모든 실험 방법들은 부산대학교 동물 실험 윤리위원회(Pusan National University-Institutional Animal Care and Use Committee; PNU-IACUC)의 사전 승인을 받았다(Approval number: PNU-2018-2019).

쥐를 이용한 피부 감염

피부 감염 실험은 이전 연구 방법을 따라 진행하였다(Kim et al., 2021). 7~9주령 쥐를 1.2% avertin (2, 2, 2-tribromoethanol) 용액을 주입하여(0.2 ml/10 g body weight) 20분 동안 마취한 후, 등쪽 피부의 털을 면도기로 제거하고 70% ethanol로 소독하였다. 여기에 생체 검사용 펀치(biopsy punch, Kai Medical)를 사용하여 지름 약 6 mm의 원형 상처를 낸 뒤, 20 µl의 시료를 상처부위에 떨어뜨려 접종하였다. 시료는 20 µl의 PBS에 2 × 10⁶ CFU 녹농균, 0.4 µg LasA_{pp}, 혹은 2 × 10⁶ CFU 녹농균 + 0.4 µg LasA_{pp} (0.2 pg/CFU)를 넣고 상온에서 15분간 두어 준비하였다. 접종 후 10일 동안 상처부위의 변화를 계속 관찰하면서 사진 촬영하였다.

쥐를 이용한 급성 폐 감염

폐 감염 실험도 이전 연구 방법을 따라 진행하였다(Kim et al., 2021). 7~9주령 쥐를 위와 같은 방식으로 마취한 뒤, 반듯이 누운 자세(supine position)로 고정하고 목 부위를 70% 에탄올로 소독하였다. 목을 세로로 절개하여 호흡관(trachea)이 드러나게 한 후, 시료 50 µl를 1 ml 주사기를 사용해 호흡관 안으로 접종하였다. 시료는 50 µl PBS 용액에 5 × 10⁶ CFU 녹농균, 1 µg LasA_{pp}, 혹은 5 × 10⁶ CFU 녹농균 + 1 µg LasA_{pp} (0.2 pg/CFU)를 넣고 상온에서 15분간 두어 준비하였다. 접종 후 절개했던 호흡관을 피부 스탭러(Skin Stapler, Visistat[®])로 봉합하고 쥐가 마취에서 깨어날 때까지 37°C 온열 패드(heating pad)에 놓아두었다. 접종 24시간 후, 감염시킨 쥐를 CO₂로 안락사 시키고 관찰을 위해 폐를 적출하였다.

조직의 H&E 염색(haematoxylin and eosin stain) 및 관찰

조직의 염색은 이전 연구 방법을 따라 진행하였다(Kim et al., 2021). 쥐에서 적출한 폐는 4% formalin에 넣어 고정하고 4°C에서 하룻밤 보관하였다. 폐엽(lobes)을 절취하여 sucrose가 들어있는 PBS 용액에 넣고 4°C에 두었는데, sucrose 농도를 점차 높여가며 충분히 배어들게 하였다(10%에서 1시간, 20%에서 두시간, 30%에서 하룻밤). 폐엽을 O.C.T. compound (Tissue-Tek[®])로 옮겨 얼린 후 cryostat microtome (CM1860, Leica)을 사용하여 7 µm 두께의 절편으로 잘라내었다. 조직 절편을 물로 세척한 뒤, H&E 염색을 위해 먼저 Mayer's hematoxylin 용액 [50 g aluminum potassium sulfate (KAl(SO₄)₂ · 12H₂O), 1 g hematoxylin, 0.2 g sodium iodate (NaIO₃), 1 g citric acid (monohydrate) in 1 L]으로 8분간 상온에서 염색하였다. 따뜻한 물과 95% 에탄올로 충분히 세척한 뒤, eosin Y 용액(eosin Y stock [1% eosin Y in 76% EtOH]:80% EtOH:glacial acetic acid = 50:150:1)으로 대비 염색하였다. 에탄올로 탈수한 뒤, 절편에 xylene (DAEJUNG)을 가하여 염색이 더 선명해지도록 하였다. 다시 피마자유(castor oil)를 떨어뜨리고 커버글라스로 덮은 후 현미경(CX40, Olympus)으로 관찰하였다.

유의성 분석

통계적 유의성을 위해서 데이터는 마이크로소프트 사의 MS office Excel을 사용하여 student's t-test (two-sample assuming equal variances) 방법으로 분석되었다. p-value가 0.05보다 낮으면 유의한 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

LasA가 녹농균의 병독성(virulence)에 미치는 영향

LasB, PIV, LasA의 활성화 단계에서 LasA는 가장 하위에 있으므로(Li and Lee, 2019), LasA가 녹농균 감염 완화를 위한 좋은 타겟이 될 수 있는지 먼저 알아볼 필요가 있었다. 이를 위해 LasA 활성이 낮아질 경우 어느 정도나 병독성(virulence)이 감소하는지를 PIV, LasB와 비교해 보았다. LasA, PIV, LasB를 코딩하고 있는 *lasA*, *piv*, *lasB* 유전자가 각각 결핍된 돌연변이 균주들(*ΔlasA*, *Δpiv*, *ΔlasB*)과, QS 기전이 제거되어 LasB, PIV, LasA을 포함한 대부분의 세포외 프로테아제 발현이 모두 낮아져 있는 돌연변이인 MW1 (*lasI rhII*)의 병독성을 갈색 거저리 유충을 이용하여 조사하였을 때, 예상대로 MW1은 병독성이 거의 나타나지 않았으며, *ΔlasB*, *Δpiv*, *ΔlasA* 균주들 또한 모두 야생형에 비해 병독성이 유의미하게 낮아져 있었다(Fig. 1). 정량적으로 비교하면 MW1은 세균이 없는 대조군(control)과 비슷한 수준으로 거의 병독성이 나타나지 않았으며, *ΔlasB*, *Δpiv*, *ΔlasA* 중에서는 *ΔlasB*가 가장 낮은 수준의 병독성을 보였다(Fig. 1). 주목할 만한 것은 *ΔlasA*가 *Δpiv*보다 비슷하거나 더 낮은 수준의 병독성을 보였다는 점이다(Fig. 1). PIV는 PIV_{pp}를 이용해 녹농균에서 그 활성을 억제했을 경우 녹농균 감염이 완화되었음이 확인된 타겟인데(Oh *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2021), *ΔlasA*가 *Δpiv*보다 더 낮은 병독성을 보였다는 것은 LasA 또한 녹농균 감염 완화를 위한 좋은 타겟이 될 수 있음을 의미하는 것이다.

한 가지 언급할 것은, Fig. 1의 결과는 LasB가 더 좋은 타겟임을 시사하며, 이들 세 프로테아제들이 LasB, PIV, LasA 순서로 단백질 분해 연쇄(proteolytic cascade)를 통해 활성화된다는 점에서 충분히 이해되는 결과이다(Li and Lee, 2019). 하지만 이전 연구에서 LasB_{pp}가 LasB에 의해 분해되어 LasB를

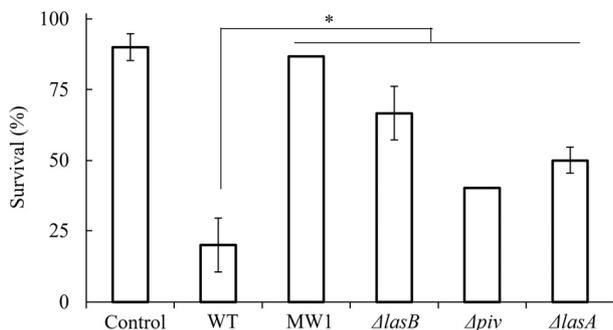


Fig. 1. Virulence of *lasA* mutant. The virulence of the *lasA* mutant (*ΔlasA*) was measured using *T. molitor* larvae and compared with other protease mutants (*ΔlasB* and *Δpiv*) or a quorum sensing mutant (MW1). LB medium was injected as a control. * $p < 0.05$.

억제할 수 없다는 것이 밝혀졌으므로(Li and Lee, 2019), 본 연구에서는 LasA에 초점을 맞추어 이후 연구를 진행하였다.

정제된 LasA propeptide (LasA_{pp})의 LasA 활성 억제

이전 연구에서 PIV를 PIV_{pp}로 억제하여 녹농균 감염을 완화시켰던 것처럼(Kim *et al.*, 2021), LasA를 LasA_{pp}로 억제하여 녹농균 감염을 완화해 보기 위해 먼저 LasA_{pp}를 분리 정제하였다(Fig. 2A). 처음 발견되는 prepro-LasA의 전체 크기는

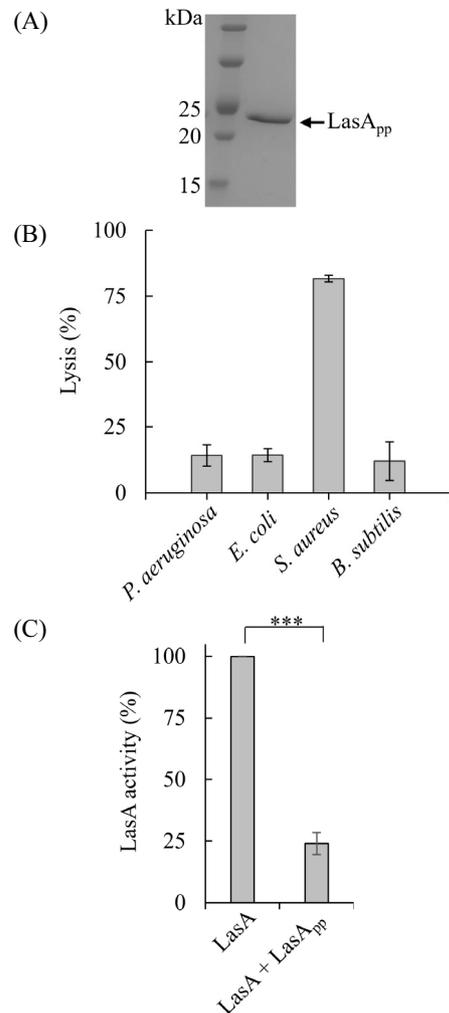


Fig. 2. Purification of LasA propeptide (LasA_{pp}) and inhibition of LasA activity by the purified LasA_{pp}. (A) The histidine-tagged propeptides of LasA (LasA_{pp}) were overexpressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified using nickel-NTA affinity column chromatography. SDS-PAGE result shows the final purity of LasA_{pp} (> 95% by densitometric analysis). (B) Cells of several different bacterial species (OD₆₀₀ = 1) were mixed with the purified LasA, incubated for 2 h at 37°C, and then measured for OD₆₀₀. The decrease of OD₆₀₀ reflects the cell lysis and the extent of lysis was relatively presented as percentage. (C) 1 μg of purified LasA was mixed with 3 μg of purified LasA_{pp}, incubated for 15 min, and measured for LasA activity. *** $p < 0.005$.

45.5 kDa이고, 최종단계의 성숙한 LasA는 20 kDa이며, LasA_{pp}만의 크기는 약 19 kDa이다(Li and Lee, 2019). *lasA* 유전자 중 SP와 PP를 코딩하고 있는 부분만을 과량 발현용 플라스미드(pET21b)에 삽입한 후, 대장균에서 과량 발현시켜 이 19 kDa의 LasA_{pp}를 95% 이상의 순도로 분리 정제하였다(Fig. 2A). 이 LasA_{pp}가 LasA 활성을 억제하는지 확인하기 위해 이전 연구처럼 LasA도 분리 정제하였다(Li and Lee, 2019). LasA가 가지는 포도상구균 용균 활성(Staphylolytic activity)은 다른 세균에는 나타나지 않고 포도상구균에만 특이적으로 나타나므로(Hoge *et al.*, 2010), 정제된 LasA의 활성을 확인해 본 결과, 황색 포도상구균만을 특이적으로 용균시켰다(Fig. 2B). 이를 이용해 LasA의 활성을 특이적으로 측정할 수 있는데, 정제된 LasA_{pp}를 LasA에 처리하였을 때 이전에 보고된 것과 유사한 수준으로 LasA의 활성이 억제되었다(Fig. 2C) (Li and Lee, 2019). 이는 정제된 LasA와 LasA_{pp}가 모두 자신의 활성을 충분히 가지고 있음을 확인해 주는 결과이다.

LasA_{pp}에 의한 녹농균 감염 완화 효과

LasA의 활성을 억제함으로써 녹농균의 감염을 완화할 수 있는지 확인하기 위해 쥐를 이용한 피부 감염 및 급성 폐 감염 실험을 수행하였다. 먼저 피부 감염 실험에서 녹농균을 감염시킨 쥐의 피부 부위는 2일째부터 화농이 일어나기 시작하여 8일째에는 화농이 매우 심해졌으나, LasA_{pp}를 처리한 녹농균을 감염시켰을 때는 화농의 정도가 다소 약화되는 결과를 보였다(Fig. 3). LasA_{pp}만을 피부에 올렸을 때에는 상처가 회복되는 것으로 보아 LasA_{pp} 자체는 독성을 가지지 않는 것으로 판단되었다(Fig. 3). 그러나 PIV_{pp}를 사용한 이전 연구(Kim *et al.*, 2021)에서는 PIV_{pp}만 피부에 올렸을 때의 회복 속도가 아무것도 올리지 않은 대조군과 거의 같았던데 반해, 본 연구에서 LasA_{pp}만을 올렸을 때의 피부 상처 회복 속도는 대조군에 비해 다소 늦었다(Fig. 3).

급성 폐감염 실험은 이전 연구처럼 녹농균을 호흡관(trachea) 안으로 주입하여 감염시킨 후, 24시간 이후에 폐를 적출하여

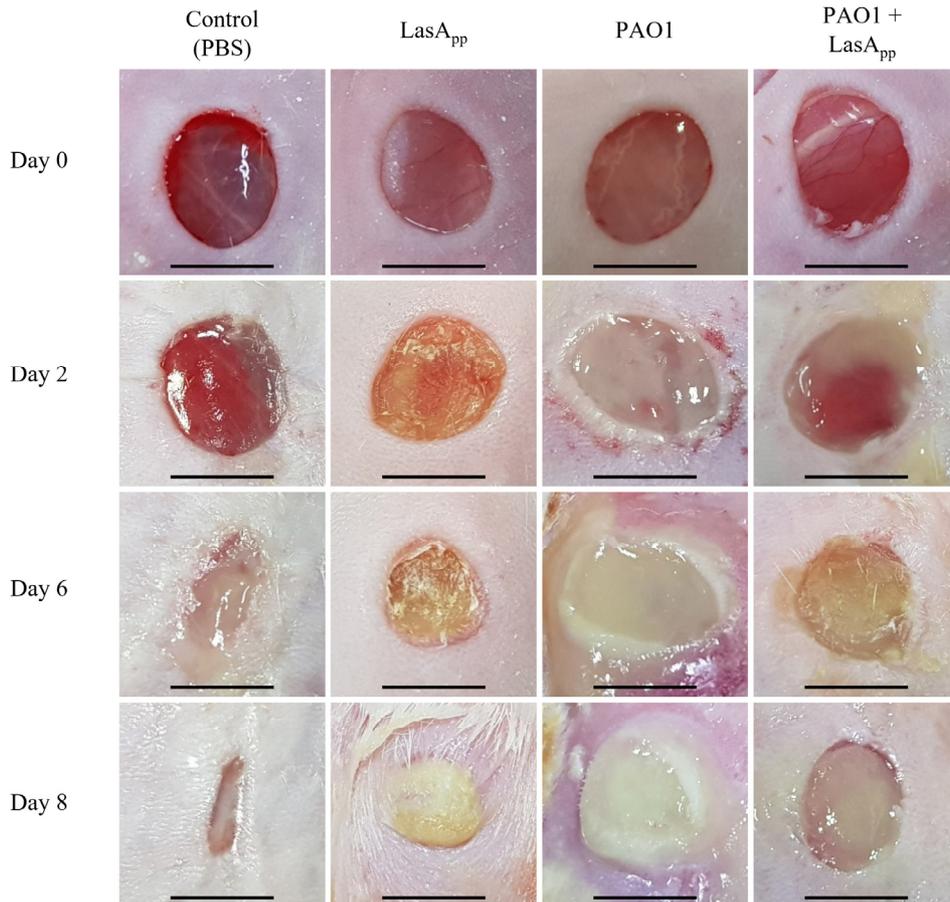


Fig. 3. Skin infection by *P. aeruginosa* with LasA_{pp}-treatment. Diameter-6-mm circular wounds were made by biopsy punch and then 2×10^6 CFU of *P. aeruginosa* (PAO1) was dropped on to wound sites. For the LasA_{pp} treatment, 2×10^6 CFU of *P. aeruginosa* cells were treated with 0.4 μ g LasA_{pp} (0.2 pg/CFU) for 15 min before dropping. As controls, same volume of PBS (control) or 0.4 μ g LasA_{pp} alone were dropped. Scale bar = 5 mm.

폐 조직을 H&E 염색하여 관찰하는 방식으로 수행되었다 (Kim *et al.*, 2021). 녹농균을 호흡관으로 주입한 조직에서는 염증 반응과 백혈구 침윤(leukocyte infiltration)이 심하게 일어났다(Fig. 4). LasA_{pp}만을 호흡기로 주입한 경우에는 염증과 백혈구 침윤이 거의 일어나지 않았다. 녹농균을 LasA_{pp}로 처리하여 호흡관 안에 감염시킨 경우에는 처리하지 않은 것에 비해 염증과 백혈구 침윤이 다소 약하게 일어나긴 하였으나, 차이가 크지는 않았다(Fig. 4).

이러한 결과들을 종합해 보면, LasA_{pp}가 녹농균 감염 완화 효과는 가지기는 하나 *in vitro*에서 정제된 LasA를 효과적으로 억제한 것에 비해서는 그 효과가 매우 약한 것으로 보이며, 자체의 독성은 없거나(급성 폐 감염의 경우) 아주 약하다고(피부 감염의 경우) 판단된다.

살아있는 녹농균에서 LasA_{pp}에 의한 LasA 활성 억제 효과

*In vitro*에서는 LasA_{pp}가 LasA 활성을 잘 억제했음에도 불구하고, 실제 감염 실험에서는 LasA_{pp}의 감염 완화 효과가 매우 작았기 때문에, 실제 살아있는 녹농균에 LasA_{pp}를 처리할 경우 얼마나 LasA 활성이 억제되는지 조사해 보았다. 5×10^5 CFU의 녹농균 세포에 LasA_{pp} 양을 증가시켜 가며 처리한 후, LasA 활성을 측정해 보았을 때, 16 µg까지 처리하더라도(32 pg/CFU), LasA 활성은 약 30% 정도만 감소하였다(Fig. 5). 이는 LasA_{pp}를 정제된 LasA에 처리하였을 때에 75% 이상 활성이 억제된 것에 비해(Fig. 2C) 매우 작은 억제 효과이며, 이는 LasA_{pp}를 살아있는 녹농균에 직접 처리할 경우 LasA 활성 억제 효과가 매우 제한적임을 보여주는 결과이다. 즉, LasA_{pp}는 정제된 시스템과 실제 살아있는 세포에서 LasA 활성 억제 효

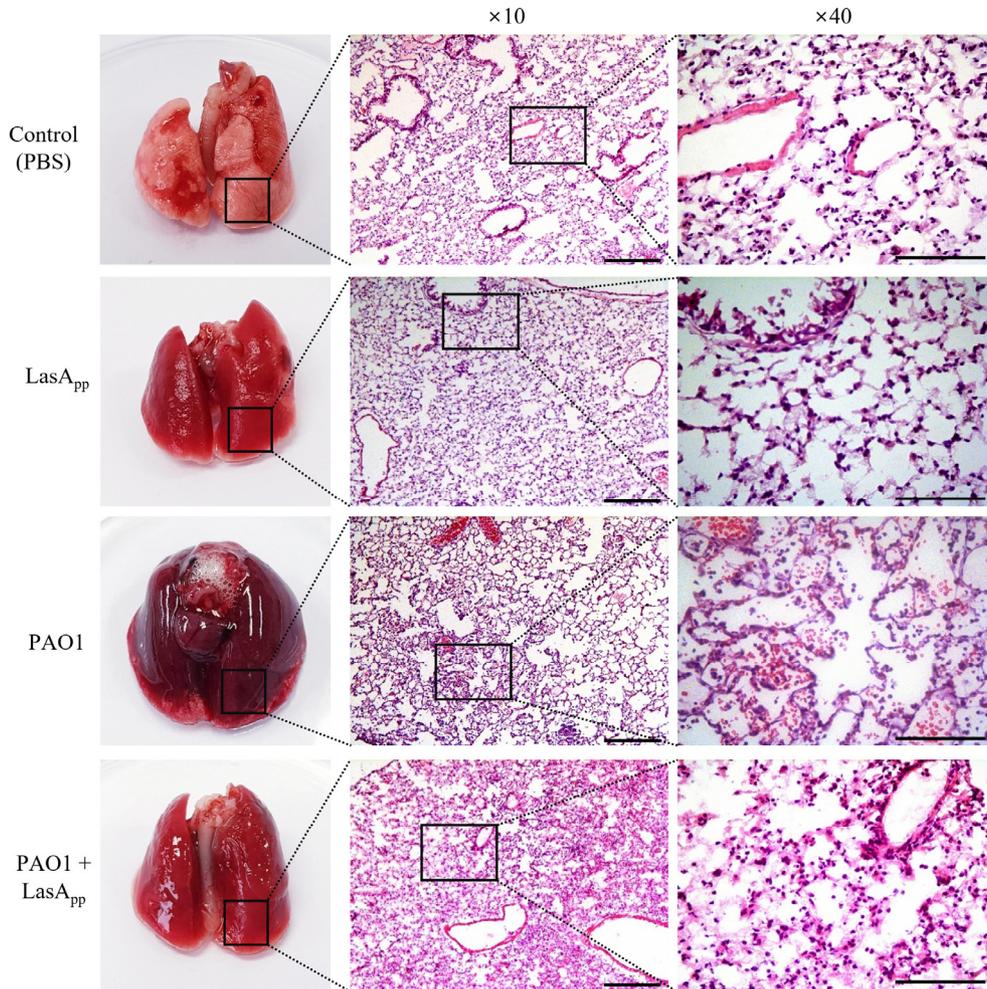


Fig. 4. Acute lung infection by *P. aeruginosa* with LasA_{pp}-treatment. Mouse acute lung infection experiments were carried out as described in the section “Materials and Methods”. 5×10^6 CFU of *P. aeruginosa* (PAO1) was inoculated into trachea. For the LasA_{pp} treatment, 5×10^6 CFU of *P. aeruginosa* cells were treated with 1 µg LasA_{pp} (0.2 pg/CFU) for 15 min before intratracheal inoculation. As controls, same volume of PBS (control) or 1 µg LasA_{pp} alone were inoculated. Tissues in lungs of the mice were prepared 24-h after inoculation and stained by H&E staining. Scale bar = 250 µm (×10), 100 µm (×40).

과가 매우 다르게 나타난다는 의미이다.

이는 PIV_{pp}와 매우 다른 결과이다. PIV_{pp}의 경우엔 5×10^5 CFU의 살아있는 녹농균을 1 µg의 PIV_{pp}로 처리하여도(2 pg/CFU), 70% 정도까지 PIV 활성을 억제하였다(Kim et al., 2021). 정제된 PIV에 PIV_{pp}를 처리하였을 때도 75% 정도의 PIV 활성 억제효과를 보였기 때문에(Oh et al., 2017), 이는 PIV_{pp}는 정제된 시스템과 실제 살아있는 세포에서 유사한 억제 효과를 보인다는 뜻이다. 이러한 두 PP의 차이는 아마도 살아있는 녹농균 세포가 분비하는 다양한 인자들에 의한 영향 때문일 것으로 생각된다. 녹농균이 분비하는 인자 중 LasA_{pp}를 분해하는 프로테아제가 있거나 혹은 LasA_{pp}의 활성을 억제하는 물질이 있을 경우 LasA_{pp}의 작용이 제한적일 수 있다. 만약 이러한 인자들에 의해 LasA_{pp}의 작용이 방해받게 되면, 녹농균 감염 완화 효과도 제한적일 수밖에 없을 것이다.

LasB, PIV, LasA는 모두 녹농균의 강력한 독성 인자이므로 그 자체로 녹농균 감염 억제를 위한 중요한 타겟이 될 수 있지만, 이에 더하여 각각 나름대로 타겟으로써의 추가적인 장점이 있다. LasB는 단백질 분해 연쇄(proteolytic cascade)를 통한 순차적 활성화의 최상위 인자이므로 이를 타겟으로 할 경우 LasB 뿐만 아니라 다른 두 프로테아제의 활성도 함께 억제할 수 있다는 장점이 있고, PIV는 폐렴구균성 폐렴과 전신질환을 악화시키므로(Bradshaw et al., 2018), PIV를 억제할 경우 이러한 복합 감염에 효과적으로 대처할 수 있다는 장점이 있다. LasA는 LasB의 활성을 증가시켜주는 활성이 있기 때문에(Peters and Galloway, 1990; Li and Lee, 2019), LasA의 억제

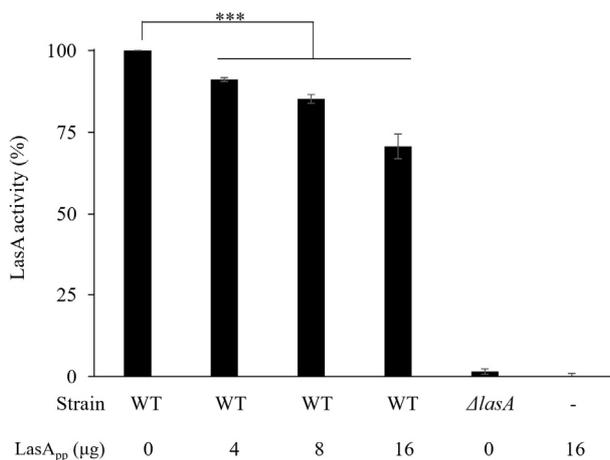


Fig. 5. Inhibition of LasA activity in the LasA_{pp}-treated *P. aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa* wild type cells (PAO1, 5×10^5 CFU) were treated with increasing amount of the purified LasA_{pp} and the LasA activity was measured. The activity was normalized to the sample without LasA_{pp} treatment (which corresponds to 100%). The LasA activity of *lasA* mutant (*ΔlasA*) was measured for comparison. *** $p < 0.005$.

도 녹농균 감염 완화를 위한 좋은 방법일 수 있다. 본 연구에서는 LasA_{pp}를 이용한 LasA의 특이적 억제제가 정제된 시스템에서는 효과적이지만 실제 감염에 사용하기에는 한계가 있음을 보여주었다. 그러나 PP가 자신의 프로테아제 활성을 특이적으로 억제할 수 있다는 점과, LasA가 녹농균 감염 완화를 위한 좋은 타겟이라는 점은 분명하므로, LasA_{pp}를 개량하여 녹농균 감염 억제제로 개발하는 연구는 계속될 필요가 있다고 생각된다.

적 요

기회 감염성 인간 병원균인 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)은 감염 과정에서 중요한 병독 인자(virulence factor)로 LasA (elastase A)를 발현한다. LasA 활성이 자신의 프로펩타이드(propeptide, PP)에 의해 억제될 수 있었으므로, 본 연구에서는 정제된 LasA의 PP (LasA_{pp})를 이용하여 녹농균 감염을 완화시키고자 하였다. 본 연구에서 분리 정제한 LasA_{pp}는 *in vitro*에서 효과적으로 LasA 활성을 억제하였다. LasA_{pp}가 녹농균 감염을 완화하는 효과는 쥐 피부 감염 및 급성 폐 감염 모델을 사용하여 조사되었다. 녹농균을 LasA_{pp}로 처리하였을 때 녹농균 감염의 심각도는 피부와 급성 폐 감염 모델에서 다소 완화되었으며, LasA_{pp} 자체는 숙주 조직에 해로운 영향을 미치지 않았다. 하지만 *in vitro*에서 LasA_{pp}가 정제된 LasA의 활성을 억제하는 정도에서 기대되는 것에 비해서는 감염이 완화되는 정도가 매우 작았기 때문에, 우리는 실제 살아있는 녹농균 세포를 LasA_{pp}로 처리하여 LasA 활성이 얼마나 억제되는지 조사해 보았다. 결과는 정제된 단백질을 이용한 *in vitro* 결과에 비해 아주 작은 정도로만 LasA 활성이 억제되었다. 이는 살아있는 녹농균에 직접 LasA_{pp}를 처리할 경우 LasA_{pp}가 LasA의 활성을 충분히 억제하지 못하며, 이로 인해 감염 완화 효과가 제한적일 수 있음을 보여주는 것이다.

감사의 말

이 과정은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

Conflict of Interest

Joon-Hee Lee is Editor in Chief of KJM. He was not involved in the review process of this article. Also, Authors have no conflicts of interest to report.

Ethical Statement

쥐는 부산대학교 동물 실험 시설(Laboratory Animal facility at Pusan National University)에서 관리되었으며, 모든 동물 실험들은 미국 국립보건원(National Institutes of Health, USA)의 실험 지침에 따라 수행되었다. 또한 본 연구에 사용된 모든 실험 방법들은 부산대학교 동물실험윤리위원회(Pusan National University-Institutional Animal Care and Use Committee; PNU-IACUC)의 사전 승인을 받았다(Approval number: PNU-2018-2019).

References

- Bradshaw JL, Caballero AR, Bierdeman MA, Adams KV, Pipkins HR, Tang A, O'Callaghan RJ, and McDaniel LS.** 2018. *Pseudomonas aeruginosa* Protease IV exacerbates pneumococcal pneumonia and systemic disease. *mSphere* **3**, e00212-18.
- Braun P, Ockhuijsen C, Eppens E, Koster M, Bitter W, and Tommassen J.** 2001. Maturation of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. Formation of the disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* **276**, 26030-26035.
- De Bentzmann S and Plésiat P.** 2011. The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. *Environ. Microbiol.* **13**, 1655-1665.
- Engel LS, Hill JM, Caballero AR, Green LC, and O'Callaghan RJ.** 1998. Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **273**, 16792-16797.
- Hancock REW and Speert DP.** 2000. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist. Updat.* **3**, 247-255.
- Hoang TT, Kutchma AJ, Becher A, and Schweizer HP.** 2000. Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* **43**, 59-72.
- Hoge R, Pelzer A, Rosenau F, and Wilhelm S.** 2010. Weapons of a pathogen: proteases and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*, pp. 383-395. In Méndez-Vilas A. (ed.), Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology vol. 2. FORMATEX, Badajoz, Spain.
- Kessler E and Safrin M.** 1994. The propeptide of *Pseudomonas aeruginosa* elastase acts an elastase inhibitor. *J. Biol. Chem.* **269**, 22726-22731.
- Kessler E, Safrin M, Gustin JK, and Ohman DE.** 1998. Elastase and the LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* are secreted with their propeptides. *J. Biol. Chem.* **273**, 30225-30231.
- Kim TH, Li XH, and Lee JH.** 2021. Alleviation of *Pseudomonas aeruginosa* infection by propeptide-mediated inhibition of protease IV. *Microbiol. Spectr.* **9**, e0078221.
- Lau GW, Hassett DJ, Ran H, and Kong F.** 2004. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol. Med.* **10**, 599-606.
- Li XH and Lee JH.** 2019. Quorum sensing-dependent post-secretional activation of extracellular proteases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **294**, 19635-19644.
- Malloy JL, Veldhuizen RAW, Thibodeaux BA, O'Callaghan RJ, and Wright JR.** 2005. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **288**, L409-L418.
- Moradali MF, Ghods S, and Rehm BHA.** 2017. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 39.
- Oh J, Li XH, Kim SK, and Lee JH.** 2017. Post-secretional activation of Protease IV by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* **7**, 4416.
- Park SJ, Kim SK, So YI, Park HY, Li XH, Yeom DH, Lee MN, Lee BL, and Lee JH.** 2014. Protease IV, a quorum sensing-dependent protease of *Pseudomonas aeruginosa* modulates insect innate immunity. *Mol. Microbiol.* **94**, 1298-1314.
- Pearson JP, Pesci EC, and Iglewski BH.** 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* **179**, 5756-5767.
- Peters JE and Galloway DR.** 1990. Purification and characterization of an active fragment of the LasA protein from *Pseudomonas aeruginosa*: enhancement of elastase activity. *J. Bacteriol.* **172**, 2236-2240.
- Van Delden C and Iglewski BH.** 1998. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* **4**, 551-560.
- Whiteley M, Lee KM, and Greenberg EP.** 1999. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13904-13909.