

이중특이성 인산화 효소의 결손이 *Candida albicans* 병원성에 미치는 효과

박윤희 · 박희문*

충남대학교 생명시스템과학대학 미생물·분자생명과학과

Disruption of the Dual Specificity Kinase Gene Causes the Reduction of Virulence in *Candida albicans*

Yun-Hee Park and Hee-Moon Park*

Department of Microbiology & Molecular Biology, College of Bioscience and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Received 14, March 2011., Accepted 21, March 2011)

ABSTRACT : The opportunistic human pathogen *Candida albicans* has the ability to convert from yeast-form to pseudohyphal or true hyphal form. The morphological transition is considered as an important virulence factor, because the decrease or lack in dimorphism causes the reduction of virulence. Our previous study revealed that the disruption of dual specificity kinase gene caused the reduction of dimorphism in *C. albicans*. Therefore we tested the effect of dual specificity kinase in virulence using mouse model. The mean survival time for kinase-defective strains was about 15 days in comparison with those of wild-type, 3.9 days. Moreover the fungal burden on kidneys for kinase-defective strains was decreased by ten-fold than that for wild-type. These results suggest possible involvement of dual specificity kinase in a novel signal transduction pathway for morphological transition and virulence of *C. albicans*.

KEYWORDS : *Candida albicans*, Dual specificity kinase, Mouse, Virulence

*Candida albicans*는 사람에게 발병하는 기회감염성 진균으로 건강한 사람에게는 가벼운 피부점막 감염을, 면역능이 저하된 사람에게는 생명을 위협하는 피부점막 및 전신 감염을 유발하는 등 다양한 유형의 칸디다증을 일으킨다 (Dhillon, *et al.*, 2003; Odds, *et al.*, 1988). *C. albicans*는 효모형, 위균사형 및 균사형으로 형태 변환이 가능하며 이러한 능력은 병원균의 전파와 숙주 조직으로의 침투과정에 필수적인 것으로 알려져 있다 (Biswas, *et al.*, 2007; Sudbery, *et al.*, 2004).

*C. albicans*의 발병인자는 다양한 세포형으로 전환이 가능한 이형성을 비롯하여 숙주세포에의 부착능, 분해효소의 분비와 빠른 표현형의 전환 등을 들 수 있다 (Calderone and Fonzi, 2001). 그러나 형태변환 과정에 문제가 있는 경우, 병원성이 약해지거나 결여되기 때문에 이형성이 *C. albicans*의 병원성에 가장 결정적인 요인으로 여겨지고 있다 (Biswas, *et al.*, 2007). 지금까지 *C. albicans*의 형태변환과 연관된 스트레스 반응기작과 다양한 신호전달기작이 밝혀졌고 보고된 결과를 종합해 보면, *C. albicans*가 보여주는 이형전환은 한 가지 경로의 작용에 의한 결과라기 보다는 다양한 경로가 복합적으로 작용하여 나타나는 결과라고 여겨진다.

이러한 관점에서 볼 때, *C. albicans*의 이형전환 과정에는 아직 밝혀지지 않은 미지의 신호전달경로가 관여할 가능성이 있다. 특히 세포 내 신호전달경로는 여러 종류의 단백질이 인산화 또는 탈인산화 되면서 주요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있기 때문에 인산화 효소 및 탈인산화 효소가 미지의 신호전달경로를 구성할 가능성이 많다고 하겠다.

선행 연구 결과, *C. albicans*에서 이중특이성 인산화 효소 유전자(orf19.4979)의 결손은 균사형 성장을 유도하는 조건에서 균사형 생장이 감소함을 보였다 (Park, 2008). 그리하여 본 연구에서는 이중특이성 인산화 효소의 결손이 *C. albicans*의 병원성에 미치는 효과를 규명하고자 마우스 모델을 사용하였다. 이중특이성 인산화 효소의 결손 돌연변이를 감염시킨 마우스의 생존을 통하여 병원성을 조사하고, 감염된 마우스로부터 신장을 분리하여 *Candida* 콜로니 형성능을 확인함으로써 병원성을 재확인하였다.

이중특이성 인산화효소 결손 돌연변이주의 마우스 치사효과 조사

마우스 실험은 Lorenz와 Fink (2001)의 방법에 따라 수행하였다. (주)대한바이오링크로부터 18-20 g 크기의 4주령 BALB/c mice (male)를 구매하고 10% urethane 200 µl를 복강 주사하여 마취시켰다. 2일 동안 YPD 완전배지에서 자

*Corresponding author <E-mail: hmpark@cnu.ac.kr>

란 *C. albicans* 야생형과 orf19.4979 결손 균주들의 단일 콜로니를 PBS 완충용액에 현탁하여 세포 수를 측정하였다. 세포 현탁액 100 μ l를 꼬리 혈관에 주사한 뒤, 일정기간 동안 마우스의 치사여부를 관찰하였다. 그 결과, *C. albicans* 총 세포수를 1×10^6 의 높은 농도로 주사하였을 때에는 균주별로 치사효과의 차이를 보이지 않았으나(결과 미제시), 낮은 농도인 2×10^5 개의 *C. albicans* 세포를 감염시켰을 때에는 한 쌍의 이중특이성 인산화효소 유전자(orf19.4979)가 결손된 동형접합변이체(D2)나 동형접합변이체에 야생형의 유전자를 한 copy 도입하여 제조한 이형접합변이체(R; revertant)를 주사한 군집이 야생형에 비해 더 오래 생존하였다(Fig. 1). 즉, 야생형이 감염된 마우스의 평균 생존기간은 3.9일인데 비하여 돌연변이주들이 감염된 경우에는 평균 15.8일과 14.1일의 생존기간을 보였다(Table 1). 이러한 결과는 결손 돌연변이주의 병원성 감소에 기인한 것으로 보여지며, 균사형 성장과 병원성의 상관관계를 유추해 볼 수 있는 근거를 제공할 뿐만 아니라, 이중 특이성 인산화 효소가 항진균제 연구에 있어 표적 물질로 이용될 수 있음을 시사한다.

감염 후 마우스 조직 내 콜로니 형성능 및 형태변화 조사

*C. albicans*의 정맥 주사로 감염되어 죽은 마우스로부터 두 개의 콩팥을 적출한 후, 파쇄하여 현탁액을 만들고, 이를 *C. albicans* 검출용 선택배지(*Candida* elective agar, MERCK사)에 접종하여 colony-forming units (CFUs)을 조사하였다. 모든 실험에서 *C. albicans* 가 확인되었으나, 야생형과 돌연변이주

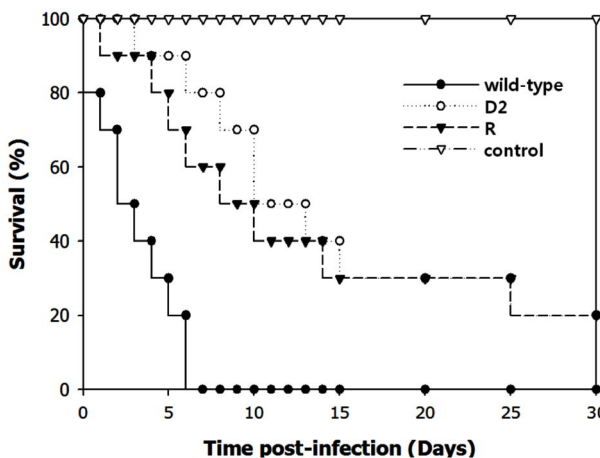


Fig. 1. *In vivo* virulence assay of *C. albicans* strains. Survival curves for wild-type (SC5314), D2 (homozygous mutant; orf19.4979 Δ /orf19.4979 Δ), R (heterozygous mutant; orf19.4979 Δ /orf19.4979) strains in a mouse model of systemic infection are shown. Mice were infected with 2×10^5 cells of *C. albicans*. For each strain, ten BALB/c male mice weighing 18 to 20 g were injected through the tail vein. Survival of mice was observed and recorded continuously for at least 30 days after injection. Control mice were only injected with PBS buffer.

의 경우 CFUs가 다름을 확인하였다. 야생형을 주사한 마우스에서 적출한 조직의 경우 평균적으로 5×10^6 CFUs/g를 보이나, 결손 돌연변이주들의 경우 평균적으로 그보다 낮은 4.6×10^5 CFUs/g를 보였다(Table 1 & Fig. 2). 이러한 결과도 마우스의 치사 효과와 함께 이중 특이성 인산화 효소의 결손이 마우스의 병원성에 관련되어 있음을 뒷받침한다.

Alonso-Monge 등(1999)은 위의 종류에 따라, 병원성 분석에 사용하는 *Candida* 세포의 농도가 다르며, 사용한 세포농도

Table 1. Mean survival times and kidney fungal burden in infected mice

Strain	Mean $\pm$ SD	
	Survival time (days)	Kidney burden ($\log_{10}$ CFUs/g) ^c
Wild-type	3.9 $\pm$ 0.30	6.70 $\pm$ 0.13
D2 ^a	15.8 $\pm$ 1.25	5.64 $\pm$ 0.14
R ^b	14.1 $\pm$ 1.20	5.67 $\pm$ 0.11

^a)D2 indicates orf19.4979 Δ /orf19.4979 Δ as homozygous mutant.

^b)R is the revertant, which is generated by reintroducing back into homozygous mutant.

^c)Kidney burden was presented as log of CFUs calculated by viable counting.

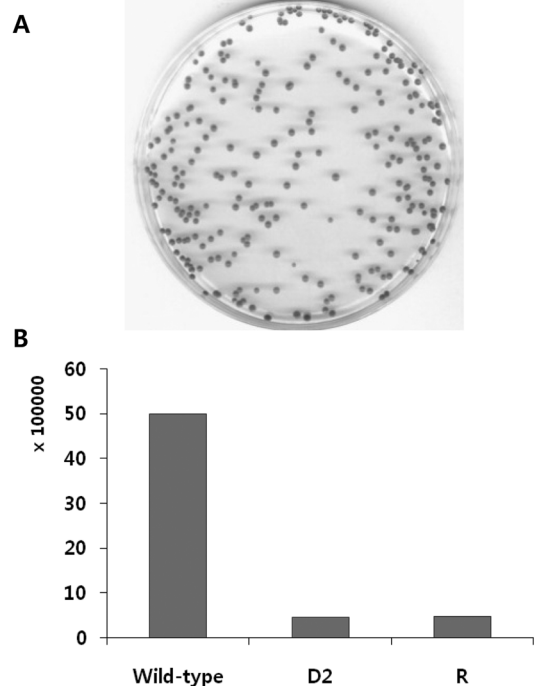


Fig. 2. Kidney fungal burden. Mice were infected with an inoculum of 2×10^5 cells of *C. albicans*. To quantify the colony forming *C. albicans* units in the kidneys, kidneys of dead mice were excised, homogenized in PBS buffer. The suspension were diluted and plated onto *Candida* elective agar (MERCK, Germany). (A) Image shows brown colony, which were derived from infected mice, onto *Candida* elective agar. (B) Kidney burdens were presented as colony-forming units (CFUs) calculated by viable counting.

에 따라 조직별로 검출되는 CFUs도 다름을 밝힌 바 있다. 이러한 자료에 근거하여, 콩팥이 아닌 다른 조직에서의 CFUs도 확인해 볼 필요가 있다. 더불어 실험에 사용한 야생형 *C. albicans*는 SC5314 균주로 *ura3* 유전자를 한 쌍 가지고 있으나 실험균으로 사용한 인산화 효소 결손 돌연변이 균주들은 *ura3* 유전자가 한 카피만 있도록 제조되었다. 이러한 돌연변이주는 SC5314와 완전히 일치하는 유전형이 아니기에 돌연변이와 동일한 유전형을 갖는 야생형인 CAF2-1으로 재확인할 필요가 있다. 또한 이중특이성 인산화 효소의 기능 연구를 통하여 이형전환 및 병원성과 관계되어 있음을 규명한다면 *C. albicans*의 이형전환을 조절하는 새로운 신호전달경로를 밝힐 수 있는 계기가 될 것이다.

적요

*C. albicans*는 사람에게 병증을 유발하는 기회감염성 진균으로 효모형에서 균사형 및 위균사형으로 전환할 수 있다. 이러한 이형성의 감소나 상실은 병원성의 결여와 연관되어 있기에 *C. albicans*의 병원성에 가장 결정적인 요인으로 여겨진다. 선행 실험을 통하여 이중특이성 인산화 효소의 결손 균주에서 이형성의 감소를 관찰하였기에, 마우스 모델에서 병원성에 미치는 효과를 확인하고자 하였다. 이중특이성 인산화 효소의 결손 균주를 감염시킨 경우, 마우스의 생존기간이 약 15일로 야생형의 3.9일보다 증가하였다. 또한 신장조직에 침투한 *C. albicans*의 세포수는 야생형에 비해 10배 가량 감소하였다. 본 연구는 *C. albicans*에서 이형성과 병원성에 연관된 이중특이성 인산화효소에 의한 새로운 신호전달기작의 가능성을 제시한다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 정부재원 (교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2006-521-C00162).

참고문헌

- Alonso-Monge, R., Navarro-Garcia, F., Molero, G., Diez-Orejas, R., Gustin, M., Pla, J., Sanchez, M., and Nombela, C. 1999. Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 181:3058-3068.
- Biswas, S., Van Dijck, P., and Datta, A. 2007. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71:348-376.
- Calderone, R. A. and Fonzi, W. A. 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 9:327-335.
- Dhillon, N. K., Sharma, S., and Khuller, G. K. 2003. Signaling through protein kinases and transcriptional regulators in *Candida albicans*. *Crit. Rev. Microbiol.* 29:259-275.
- Lorenz, M. C. and Fink, G. R. 2001. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature.* 412:83-86.
- Odds, F. C., Webster, C. E., Mayuranathan, P., and Simmons, P. D. 1988. *Candida* concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 26:277-283.
- Park, Y. H. 2008. Functional analyses of LAMMER kinase in budding yeast. Ph. D. Thesis. Chungnam National University, Daejeon, Korea.
- Sudbery, P., Gow, N., and Berman, J. 2004. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 12:317-324.