Comparative Proteome Analysis of Zerumbone-treated *Helicobacter pylori*

Sa-Hyun Kim

Department of Clinical Laboratory Science, Semyung University, Jecheon, Korea

Zerumbone 처리에 따른 *Helicobacter pylori*의 단백질 비교분석

김사현

세명대학교 임상병리학과

Helicobacter pylori is a causative organism of various gastrointestinal diseases, including chronic gastritis, gastric ulcer, or gastric adenocarcinoma. Pathogenic factors, such as cytotoxin-associated protein A (CagA) and vacuolating cytotoxic protein A (VacA), play a role. This study analyzed qualitatively and quantitatively the effects of zerumbone on the changes in the protein expression levels of various *H. pylori* proteins, including CagA and VacA. Approximately 200 significant proteins were screened for the *H. pylori* 60190 (VacA positive / CagA positive; Eastern type) strain, and proteomic analysis was performed on 13 protein molecules that were clinically significant. After two-dimensional electrophoresis (2-DE), ImageMaster™ 2-DE Platinum software was used for quantitative measurements of protein spots. Matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS) were used for protein identification. After intensive analysis of the proteins that showed significant changes, a reverse transcription-polymerase chain reaction was performed as required to verify the results. In this study, the significance of zerumbone as a therapeutic agent for *H. pylori* infection was examined by screening a new pharmacological activity mechanism of zerumbone.

Key words: AmiE, CagA, *Helicobacter pylori*, OorA, VacA

Corresponding author: Sa-Hyun Kim
Department of Clinical Laboratory Science,
Semyung University, 65 Semyeong-ro,
Jecheon 27136, Korea
Tel: 82-43-649-1624
Fax: 82-50-4411-9604
E-mail: science4us@semyung.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2018 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: August 11, 2018
Revised 1st: August 15, 2018
Revised 2nd: August 20, 2018
Revised 3rd: August 24, 2018
Revised 4th: August 29, 2018
Accepted: August 30, 2018

서 론

현재까지 질환과 병원성 인자 사이의 연관성을 규명하기 위하여 다양한 *Helicobacter pylori* 임상균주를 대상으로 프로테오믹스 분석 결과가 보고되어 왔다. 무엇보다도 Cytotoxin-associated protein A (CagA)와 Vacuolating cytotoxic protein A (VacA)가 위염 및 위암 발병과 관련이 큰 *H. pylori*의

가장 대표적인 병원성 인자로 알려져있다[1]. 특히 CagA의 경우, *cag* pathogenicity island (*cag* PAI) 내에 위치한 유전자의 배열에 따라 *H. pylori*의 병원성이 결정되는 것으로 판단되며, 위암 발병에 있어 가장 중요한 병원성 결정인자이다[2-4]. Urease, flagella, adhesin 및 ferritin 또한 *H. pylori*의 병원성 결정 인자로서 보고되고 있다[5-7]. 현재 *H. pylori*의 병원성 인자 파악에 있어서 26695와 J99 균주의 경우에는 완전한 게놈 서

열이 분석되어 위장관계 질환과 관련된 특이적 진단 마커는 지속적으로 축적되고 있기 때문에 향후 관련 연구 및 치료법 개발에 있어 큰 도움이 될 것으로 판단된다[8, 9]. 본 연구에서는 zerumbone을 이용하여 *H. pylori*의 병원성 인자를 포함하는 총단백 발현 변화를 분석하였다. 본 연구에서 분석한 *H. pylori* 주요 단백질의 변화 패턴을 바탕으로 하여 향후 zerumbone을 이용한 *H. pylori* 항균 연구의 토대를 마련하고자 한다.

Zerumbone은 동남아시아와 폴리네시아 반도 등 열대지역에 자생하는 생강과 식물인 *Zingiber zerumbet* Smith의 뿌리에 다량 함유되어 있는 성분으로, 기존에는 약리학적으로 항염증, 항종양, 항산화, 면역활성 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다[10-13]. 천연물 유래 추출물 성분 중에서 약리적 활성을 띄는 것으로 잘 알려져 있는 taxol, aspirin, resveratrol 등은 분자를 구성하는 원자 사이에 발생하는 전기음성도 차이에 기인하여 전하를 띄게 되는 구조적 특징을 나타내는데, 이를 structure-activity relationships (SAR)이라 정의한다[14]. Zerumbone의 분자구조를 살펴보면 이 역시 SAR의 특징을 확인할 수 있다(Figure 1). 산소 원자와 결합한 1번 탄소 원자 사이에는 전기음성도 차이가 존재하여, 그 결과로 산소는 상대적으로 음성 전하를(δ^-), 탄소는 양성 전하를 띤다(δ^+). 이러한 전기음성도 차이는 인접한 α 와 탄소의 전하에 영향을 미치면서 이들이 음성 전하(δ^-)를 띄게 하고, 다음 β 와의 탄소들은 양성 전하

(δ^+)를 띄게 한다. 이러한 전기적 구배 원리를 이용하여 악성 종양세포 내외에 존재하는 극성 분자와 zerumbone과의 결합 가능성을 중심으로 연구가 시도된 바 있다[15].

본 연구팀의 기존 연구에 따르면, zerumbone은 *H. pylori*에서 urease 활성을 억제하는 효과를 보이기도 하는데, 이로써 *H. pylori*가 위장 내 강산(공복시 pH 2.2 내외) 환경에 저항할 수 없도록 하여 zerumbone이 *H. pylori*의 위장 내 정착 및 감염 성립을 저지하는 효과를 기대해 볼 수도 있다고 알려져 있다[16].

본 연구에서는 사전 실험을 통해 확인한 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 미만의 농도로 확인된 20 μ M 조건으로 zerumbone을 처리하여 *H. pylori* 60190 표준균주에서의 총단백 발현 변화를 2-dimensional electrophoresis (2-DE), matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS) 기법을 통하여 분석하였다.

재료 및 방법

1. Zerumbone

Zerumbone은 농촌진흥청 기능성작물부에서 *Zingiber zerumbet* Smith로부터 분리한 것을 제공받아 실험에 사용하였다. Zerumbone은 100% 에탄올에 100 mM 농도로 용해하여 -70°C 에서 보관한 뒤 실험에 사용하였다.

2. 균주 및 배양

Helicobacter pylori 60190 (CagA 양성/VacA 양성: Eastern type) 표준균주는 American Type Cell Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. *H. pylori*는 10% 소 태아 혈청(FBS, Gibco, Long Island, NY, USA)이 첨가된 Brucella 한천 배지(Becton-Dickinson, Baintree, MA, USA)에 접종하여 3일간 100% 습도가 유지되는 미세산소 환경에서 37°C 배양하였다. Zerumbone의 영향을 규명하기 위한 실험에서는 상기와 동일 조건 하에서 20 μ M의 zerumbone을 처리하여 3일간 액체 배양한 뒤 원심분리하여 배양된 세포를 채취한 뒤 프로테옴 분석을 준비하였다.

3. 단백질 샘플 준비 및 2차원 전기영동

채취한 *H. pylori* 시료는 7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate (CHAPS) 및 16 μ L 단백질분해효소 억제제 혼

Zerumbone

Figure 1. Structure-activity relationships (SAR) are defined as the structural features that result in electric charges due to electronegativity differences between atoms constituting a molecule. Zerumbone is a SAR substance that possesses electrical properties such that the α -carbon is negatively charged (δ^-) and the β -carbon is positively charged (δ^+) due to electronegativity difference between oxygen atom and number 1 carbon.

합액(Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IA, USA)을 함유하는 50 mM Tris 완충액 0.5 mL에 현탁하여 전체 단백질을 분리하였다. 2-DE 분석을 위해, pH 4~7 immobilized pH gradient strip (Amersham, Pittsburgh, PA, USA)을 사용하였다. 2-D 분리는 8~16 % (v/v) 선형 구배 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에서 수행하였다. 단백질 스팟 검출 및 2D 패턴 정합은 ImageMaster™ 2D Platinum 소프트웨어(version 7.0, Amersham, Pittsburgh, PA, USA)를 사용하여 수행되었다. 대조군 샘플과 처리 샘플 간의 단백질 스팟 밀도를 비교하기 위해 모든 겔에 걸쳐 20 개 이상의 스팟을 선별하여 표준화 분석을 수행하였다. 후보 단백질의 정량 된 스팟을 히스토그램으로 비교하였다. 2-DE 실험의 재현성을 확보하기 위해, 각 샘플을 대상으로 독립된 5회의 분석을 실시하였다.

4. 펩타이드 추출

선별된 단백질 스팟들의 in-gel 용해 및 추출 이후의 과정은 ProteomeTech (서울, 대한민국)에 의뢰하여 수행하였다. 펩타이드 추출 과정을 간략하게 요약하자면, 2-DE 분석을 수행한 겔을 coomassie blue 염색하여 단백질 스팟을 겔로부터 절제

한 뒤에는 염색하여 겔로부터 절제된 단백질 스팟들을 트립신(trypsin)을 이용하여 용해, 추출하였다.

5. MALDI-TOF MS를 이용한 단백질 분석 및 동정

추출한 펩타이드의 질량 측정은 Voyager-DE STR 질량 분석기(PerSeptive Biosystems, Bedford, MA, USA)를 이용하여 수행하였다. 오차 보정은 모든 시료를 대상으로 정밀하게 수행하였다. 단백질 동정은 peptide mass fingerprinting (PMF) 검색, Swiss-Prot과 NCBI 데이터베이스 검색, ProFound 소프트웨어(http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe, Rockefeller University, Version 4.10.5), MASCOT (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF), MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>, University of California San Francisco, Version 4.0.5)를 활용하여 수행되었다.

6. LC-MS/MS를 이용한 단백질 동정

생성된 트립신 펩타이드를 분리하고 Finnigan LCQ 이온 트랩 질량 분석기(LC-MS/MS)에 직접 결합된 역상 모세관 HPLC

Figure 2. *H. pylori* protein profile showing qualitative and quantitative changes with zerumbone treatment. After 2-DE analysis, the gel was stained with silver ion, and about 200 protein spots were selected using the PDQuest™ program. First, the proteins with the qualitative and quantitative changes were selected and identified using peptide mass fingerprints and MALDI-TOF-MS or LC-MS/MS. Among them, 13 proteins with high clinical relevance to *H. pylori* pathogenic factors, chronic gastritis, gastric ulcer or gastric adenocarcinoma were selected and analyzed. (A) Nine protein showed qualitative and quantitative reduction. (B) Four proteins showed an increase in the same conditions.

를 사용하여 분석하였다. 탠덤 질량 분석을 위해 전체 질량 스펙트럼 범위 모드는 $m/z=450\sim 2000$ Da으로 하였다. MS/MS의 개별 스펙트럼은 PDQuest^{TM} 소프트웨어(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 및 TurboSEQuest^{TM} 소프트웨어(Thermo Quest, San Jose, CA, USA)를 사용하여 처리하였다. 생성된 피크 리스트 파일은 MASCOT 프로그램(<http://www.matrixscience.com>)을 사용하여 MSDB 데이터베이스 또는 NCBI와 대조하는데 사용되었다. MASCOT 확률 분석에 의해 선별된 유의미한 단백질을 모두 동정하였다.

7. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

배양한 *H. pylori*를 채취하여 PBS로 2회 세척한 후, Trizol (Thermo, San Jose, CA, USA)을 사용하여 전체 RNA를 추출하였다. 역전사를 통해 합성한 cDNA는 기존 연구에서 기술한 바와 같이 PCR을 통해 증폭하였다[17].

결 과

1. 단백질 선정 및 동정

2-DE 분석을 마친 겔은 염색한 뒤에 PDQuest^{TM} 소프트웨어를 사용하여 약 200 개의 단백질 반점을 선별하였는데, 정성적, 정량적 변화가 뚜렷하고 MALDITOF-MS를 사용한 펩타이드 질

량 지문(peptide mass dingerprint) 규명이나 LC-MS/MS를 사용하여 펩티드 분석이 가능한 것들을 대상으로 하였다(Figure 2). Table 1, Table 2에 제시한 분석 결과는 *H. pylori* 병원성이나 물질대사에 관여하는 단백질들을 중심으로 하였다.

2. Zerumbone 처리에 따라 정량적으로 감소한 *H. pylori* 단백질 분석

Zerumbone 처리에 따라 정량적으로 감소를 나타낸 *H. pylori* 단백질 중 기존 연구에서 질환 특이적 진단 마커로 보고되었거나, *H. pylori* 생존과 관련된 생리 활성에 관여하는 것으로 알려져 있는 9개 단백질의 변화에 대하여 집중적으로 분석하였다(Table 1). Zerumbone이 20 μ M 조건으로 처리되었을 때, Elongation factor thermos unstable (Ef-Tu)는 -97.98%, Flagellar basal body protein FliL (FliL)는 -95.54%, Heat shock protein 90 (Hsp90)는 -97.10% 씩 각각 감소를 보였다. Aconitate hydratase AcnB (AcnB), Acylamide amidohydrolase (AmiE), 2-oxoglutarate-acceptor oxidoreductase subunit (OorA), Iron-dependent superoxide dismutase (SodB), Non-heme iron-containing ferritin (FtnA)는 각각 -97.53%, -78.12%, -99.24%, -98.85%, -54.71% 씩 유의한 감소를 보였다. 또한, Preprotein translocase subunit SecA (SecA)도 -146.80% 발현이 감소하였다(Figure 3).

Table 1. Down-regulated *H. pylori* 60190 proteins by Zerumbone treatment

Spot No.	TIGR locus name	Protein ^{a)}		2-DE data ^{b)}	
		Protein name	pI/Mr ^{c)}	Protein-change ratio (%) after zerumbone treatment ^{d)}	Standard deviation ^{e)}
1	HP1205	Elongation factor thermos unstable (Ef-Tu)	5.36/43,594	-97.98	9.60
2	HP0809	Flagellar basal body protein FliL (FliL)	5.41/55,134	-95.54	9.15
3	HP0210	Heat shock protein 90 (Hsp90)	5.73/71,230	-97.10	9.44
4	HP0779	Aconitate hydratase AcnB (AcnB)	6.44/118,230	-97.53	9.52
5	HP0294	Acylamide amidohydrolase (AmiE)	7.28/37,689	-78.12	16.04
6	HP0589	2-oxoglutarate-acceptor oxidoreductase subunit (OorA)	6.43/67,448	-99.24	9.85
7	HP0389	Iron-dependent superoxide dismutase (SodB)	6.17/24,617	-98.85	9.77
8	HP0653	Non-heme iron-containing ferritin (FtnA)	4.86/19,302	-54.71	3.77
9	HP0786	Preprotein translocase subunit SecA (SecA)	6.12/99,207	-146.80	4.23

^{a)}Protein designation according to *H. pylori* strain, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), KEGG database (<http://www.genome.jp/kegg/>).

^{b)}According to peptide mass fingerprinting (PMF) data were obtained from Figure 2.

^{c)}pI: isoelectric point, Mr: molecular weight.

^{d)}The ratio of protein-change amount was calculated as follows:

$$\text{change ratio (\%)} = \frac{\Delta \text{ value (protein amount w/zerumbone - protein amount w/o zerumbone)}}{\text{value (protein amount w/o zerumbone)}} \times 100$$

^{e)}Standard deviation of protein-change ratio in each spot was obtained from repeated five independent 2-DE analysis.

Table 2. Up-regulated *H. pylori* 60190 proteins by Zerumbone treatment

Protein ^{a)}			2-DE data ^{b)}		
Spot No.	TIGR locus name	Protein name	pI/Mr ^{c)}	Protein-change ratio (%) after zerumbone treatment ^{d)}	Standard deviation ^{e)}
1	HP0547	Cytotoxin-associated gene protein A (CagA)	6.38/131,348	+229.92	5.35
		Cytotoxin-associated gene protein A (CagA) fragment	5.57/81,500	+206.28	5.08
2	HP0887	Vacuolating cytotoxic protein A (VacA)	6.20/140,000	+521.00	7.23
		Vacuolating cytotoxic protein A (VacA) fragment	6.65/87,970	+1923.61	9.06
3	HP0294	Acylamide amidohydrolase (AmiE)	7.28/41,448	+363.79	6.45
4	HP0589	2-oxoglutarate-acceptor oxidoreductase subunit (OorA)	6.94/92,701	+349.91	6.36

^{a)}Protein designation according to *H. pylori* strain, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), KEGG database (<http://www.genome.jp/kegg/>).

^{b)}According to peptide mass fingerprinting (PMF) data were obtained from Figure 2.

^{c)}pI: isoelectric point, Mr: molecular weight.

^{d)}The ratio of protein-change amount was calculated as follows:

$$\text{change ratio (\%)} = \frac{\Delta \text{ value (protein amount w/zerumbone} - \text{protein amount w/o zerumbone)}}{\text{value (protein amount w/o zerumbone)}} \times 100$$

^{e)}Standard deviation of protein-change ratio in each spot was obtained from repeated five independent 2-DE analysis.

Figure 3. Quantitatively reduced protein. When zerumbone was treated to *H. pylori* 60190 standard strain at 20 μ M, nine *H. pylori* proteins showed a significant decrease. Ef-Tu decreased by -97.98%, FliL decreased by -95.54%, and Hsp90 decreased by -97.10%. AcnB, AmiE, OorA, SodB and FtnA decreased by -97.53%, -78.12%, -99.24%, -98.85% and -54.71%, respectively. SecA also showed a -146.80% reduction in expression.

3. Zerumbone 처리에 따라 정량적으로 증가한 *H. pylori* 단백질 분석

앞선 분석과 동일한 기준으로 zerumbone 처리에 따라 정량적으로 증가한 *H. pylori* 단백을 살펴본 결과, 4개의 단백질 발현 변화를 관찰할 수 있었다(Table 2). 위 실험과 동일한 조건으로 zerumbone이 처리된 조건에서 *H. pylori*의 대표적인 독소 단백질인 CagA는 229.92% 또는 206.28% 씩 증가한 것으로 확인되었다. 또한, VacA가 521.00%, VacA fragment가 1923.61% 증가하였다. 이 외에도 zerumbone 처리 조건에서 AmiE와 OorA가 각각 363.79%, 349.91% 증가한 결과를 나타냈다(Figure 4).

고 찰

본 연구는 농촌진흥청 기능성작물부에서 *Zingiber zerumbet* Smith로부터 추출한 zerumbone을 *H. pylori*에 처리하여 *H. pylori* 총단백 발현 상의 정성적, 정량적 변화를 프로테옴 분석하고 유의미한 병원성 인자의 증가, 감소를 알아보고자 진행하였다. 본 실험에 사용한 *H. pylori* 60190 표준균주는 CagA와 VacA를 모두 보유하여 고병원성 균주(Eastern type)에 해당하며, 감염 환자에서 전형적인 임상적 증상 유발 가능성이 크기 때문에 실험에 널리 사용되고 있다[18]. MIC 미만의 농도인 20 μ M 조건으로 zerumbone을 처리하였을 때 2-DE 분석에서 유의미한 증가를 보인 *H. pylori* 단백질은 9개, 감소를 보인 것은 4개였다.

H. pylori 60190 균주의 전체 단백질 변화 스팟 프로파일은

기준에 보고된 2-DE 스팟 프로파일들과 대조하여 확정하였다[19, 20]. 이 연구에서 나타난 단백질 스팟들은 *H. pylori* 병원성 인자, 만성 위염, 위궤양 또는 위 선암과 같은 임상 질환과의 관계에 초점을 두었으며[20, 21], Table 1, Table 2에서와 같은 병원성 인자 또는 물질대사 등 생리 활성에 관여하는 단백질이다.

먼저, zerumbone 처리에 따라 정량적 감소를 보인 단백질은 *H. pylori*의 전사인자인 Etf-Tu, 편모 구조 단백질 FliL, 현재까지 *H. pylori*에서의 기능이 명확하게 규명되지 않은 Hsp90과 *H. pylori*에서 다양한 물질 대사에 관여하여 생리 활성을 조절한다고 알려져 있는 AcnB, AmiE, OorA, SodB, FtnA, 그리고 VacA 독소 단백질의 세포 외 분비를 조절하는 것으로 알려져 있는 SecA로 확인되었다[20, 21]. 이처럼 *H. pylori* 생존에 필수적인 단백질 분자들이 zerumbone에 의해 감소한 현상으로 미루어보아, zerumbone은 항균제 후보 물질로서 의미가 있다고 판단되며 향후 세포감염, 동물감염 실험 등의 후속 연구를 진행하여 zerumbone의 *H. pylori* 항균 메커니즘을 명확하게 규명할 필요가 있어 보인다.

다음으로, zerumbone 처리에 따라 정량적 증가를 보인 단백질은, *H. pylori*의 대표적 병원성 인자로써 위염 및 위암의 직접적인 발병 원인으로 지목되는 CagA와 VacA를 비롯하여 물질 대사 관련 생리 활성 조절자인 AmiE, OorA였다[22-24]. 여기에서 주목할 부분은 zerumbone에 의한 *H. pylori* CagA와 VacA 단백질의 세포내 증가 현상이다. 본 연구팀은 이것이 CagA, VacA 단백질의 세포내 생합성이 증가한 결과인지, 아니면 zerumbone의 영향으로 세포내에서 단백질 분자의 축적이 일어난 결과인지

Figure 4. Quantitatively increased protein. There were four *H. pylori* proteins that showed significant increase when zerumbone was treated with *H. pylori* 60190 standard at 20 μ M. It was confirmed that CagA increased by 229.92% and CagA fragment increased by 206.28%. Also, VacA and VacA fragments increased by 521.00% and 1923.61%, respectively. In addition, AmiE and OorA increased by 363.79% and 349.91%, respectively.

확인하기 위하여 각 단백질의 전구체인 mRNA 발현 수준을 RT-PCR을 통해 분석해보았다. 실험 결과, zerumbone을 5, 10, 20 μM 등 다양한 농도로 처리하였을 때에도 *cagA* 및 *vacA* mRNA의 발현은 양적 변화를 보이지 않았다(Figure 5). 즉, zerumbone은 CagA 및 VacA 단백질 생합성에 영향을 미치지 않는다는 것이다. 그렇다면, zerumbone이 각각 CagA와 VacA의 세포 외 분비를 조절한다고 알려져 있는 제4형 분비체계(type IV secretion system, T4SS) 및 제5형 분비체계(type V secretion system, T5SS)의 기능을 저하시켰을 가능성에 대해 고민해볼 필요가 있겠다.

본 연구팀의 기존 연구에 따르면, T4SS의 구조 단백질의 발현이 억제되거나, T5SS 조절 단백질의 발현이 억제되면 *H. pylori*에

Figure 5. Measurement of mRNA expression levels of *cagA* and *vacA* in zerumbone treatment conditions. The amount of *cagA* and *vacA* mRNA expression was measured by RT-PCR in order to investigate whether the increase of CagA and VacA in *H. pylori* during zerumbone treatment might be caused by increased protein expression or simply intracellular protein accumulation. The expression of *cagA* and *vacA* mRNA did not show any quantitative change when zerumbone was treated with various concentrations of 5, 10, and 20 μM in *H. pylori* 60190 standard strain.

서는 CagA, VacA의 세포 외 분비가 억제되어 세포 내 단백질 축적 현상이 나타날 수 있다[18]. 안타깝게도 본 연구에서는 T4SS 구조 단백질이나 조절 단백질들의 증감 여부가 통계적으로 불분명하여 명확한 결과를 얻을 수는 없었다. 단, T5SS 조절 단백질인 SecA의 감소가 확인되어 zerumbone 처리에 따른 VacA의 세포 외 분비가 억제되어 세포 내 축적이 증가했다는 결론을 얻을 수 있었다.

한편, *H. pylori* 생리 대사에 관여하는 AmiE, OorA는 아이러니하게도 본 연구에서 감소와 증가 현상을 동시에 나타내는 것으로 분석되었다(Tables 1, 2). 본 실험에서 zerumbone 처리 농도를 MIC 미만인 20 μM 로 설정하였음에도 불구하고 *H. pylori*가 이러한 외부 자극에 저항하기 위하여 생리 활성 메커니즘을 강화하면서 AmiE, OorA와 같은 생리 대사 관련 단백질의 발현이 증가하는 ‘과분비 보상기전(compensatory hyper-increase)’ 현상이 나타난 것으로 판단된다[22]. 이러한 현상은 본 연구팀의 과거 다른 연구에서도 확인할 수 있었던 내용이다[25]. AmiE는 aliphatic amidases (지방족 분해효소)의 일종으로, *H. pylori*에서 암모니아 및 유기산을 생성하기 위하여 가수분해를 촉매하는 효소이다[26]. 잘 알려져 있는 것처럼 *H. pylori*는 위장 내 강산 환경에서 생존, 정착하기 위하여 Urease를 분비하고 pH 2.2 전후의 산성 환경을 중화할 수 있도록 한다. 이러한 Urease의 생성을 조절하는 AmiE 또한 *H. pylori* 병원성 인자의 일종이라 할 수 있겠다. OorA는 에너지 대사에 관여하여 α -ketoglutarate를 succinyl coenzyme A 및 CO_2 로의 전환을 촉매하는 효소이다. *H. pylori*는 영양 공급이 원활하지 않을 경우에 대비하여 상황에 따라 대사 효소의 발현량을 조절하는데, OorA 또한 그 대상이다[27]. Zerumbone 처리와 같은 외부 자극이 주어졌을 때 Urease 생성에 관여하는 AmiE, 에너지 대사에 관여하는 OorA, 등 악화된 주변환경에 저항 또는 회피하

Figure 6. Zerumbone SAR features and possibility of dimer formation. There is an electronegativity difference between the number 1 carbon atom bonded to the oxygen atom in the chemical structure of Zerumbone, so oxygen has a negative charge (δ^-) and carbon has a positive charge (δ^+). This electronegativity difference affects the charge of the adjacent α -carbon and makes the negative charge (δ^-), and the β -carbon of the next β -positively charges the positive charge (δ^+). This electrical gradient causes the possibility that other molecules with negative charge bind to the β -carbon to form a dimer.

기 위하여 이러한 인자들이 증가하는 현상을 나타낸 것으로 사료된다.

Zerumbone은 Urease 억제제로도 작용할 가능성이 있다는 기존 보고가 있는데, imidazoles, phosphorodiamidates and hydroxamic acid 유도체 등 이미 임상적으로 활용되고 있는 다양한 Urease 억제제는 독성이 높아 제한적으로 임상 적용이 이루어질 수 밖에 없는 반면, zerumbone은 천연물 유래 성분으로, 기존 치료제 대비 인체 독성이 낮다는 면에서 장점을 띤다 [16]. 또한, zerumbone은 구조적으로 SAR의 특징을 보유한 물질이다(Figure 1). 앞서 언급한 바와 같이 산소 원자와 결합한 1번 탄소 원자 사이에 전기음성도 차이가 존재하여, 산소는 상대적으로 음성 전하를(δ^-), 탄소는 양성 전하를 띤다(δ^+). 이러한 전기음성도 차이는 인접한 α 와 탄소의 전하에 영향을 미치면서 음성 전하(δ^-)를 띄게 하고, 다음 β 와의 탄소들은 양성 전하(δ^+)를 띄게 한다. 이러한 전기적 구배 현상으로 인하여 β 와 탄소에는 음성 전하를 띄는 다른 분자가 결합할 가능성이 생기게 된다(Figure 6). Zerumbone은 위와 같은 원리로 전기적 특성을 띄며, *H. pylori* Urease 상에 존재하는 -SH radical과 결합하면서 두 개의 Urease와 이배체(dimer)를 형성함으로써 [15] Urease의 활성을 억제한 것으로 추정된다(Figure 6). 본 연구팀은 향후 추가 연구를 진행하여 zerumbone에 의한 Urease 활성 억제 메커니즘을 규명해야 할 것으로 사료된다.

요 약

*Helicobacter pylori*는 만성 위염, 위궤양 또는 위 선암을 비롯한 다양한 위장병의 원인균으로 알려져 있으며, 이 세균이 분비하는 cytotoxin-associated protein A (CagA), vacuolating cytotoxic protein A (VacA)와 같은 병원성 인자가 그 원인으로 알려져 있다. 본 연구에서는 zerumbone이 CagA, VacA를 비롯한 다양한 *H. pylori*의 병원성 인자들의 단백질 발현량 변화에 정성적, 정량적으로 어떠한 영향을 미치는지 분석하였다. *H. pylori* 60190 (VacA 양성 / CagA 양성; Eastern type) 표준균주를 대상으로 하여 약 200개의 유의미한 단백을 선별한 후, 그 중에서 임상적으로 의의가 큰 13개 단백질 분자에 대한 프로테옴 분석을 수행하였다. 이차원 전기영동법(2 dimensional electrophoresis, 2-DE) 수행 후, 단백질 스팟의 정량적 측정에는 ImageMasterTM 2-DE Platinum 소프트웨어를 사용하였고, 단백질 동정에는 matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)와 liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry

(LC-MS/MS)를 사용하였다. 동정이 완료된 전체 단백질 중에서 유의미한 변화를 보인 단백을 집중적으로 분석한 뒤에 필요에 따라 reverse transcription-polymerase chain reaction을 수행하여 결과를 추가 검증하였다. 본 연구에서는 zerumbone이 보유한 새로운 약리학적 활성 기전을 스크리닝함으로써 향후 zerumbone이 *H. pylori* 감염증 치료제로서 어떠한 의미를 지니는지 규명하고자 하였다.

Acknowledgements: This paper was supported by the Semyung University Research Grant of 2016.

Conflict of interest: None

REFERENCES

- Cover TL, Cao P, Lind CD, Tham KT, Blaser MJ. Correlation between vacuolating cytotoxin production by *Helicobacter pylori* isolates in vitro and in vivo. *Infect Immun*. 1993;61:5008-5012.
- Israel DA, Salama N, Arnold CN, Moss SF, Ando T, Wirth HP. *Helicobacter pylori* strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses. *J Clin Invest*. 2001;107:611-620.
- Meyer-ter-Vehn T, Covacci A, Kist M, Pahl HL. *Helicobacter pylori* activates mitogen-activated protein kinase cascades and induces expression of the proto-oncogenes c-fos and c-jun. *J Biol Chem*. 2000;275:16064-16072.
- Selbach M, Moese S, Meyer TF, Beckert S. Functional analysis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island reveals both VirD4-CagA-dependent and VirD4-CagA-independent mechanisms. *Infect Immun*. 2002;70:665-671.
- Mégraud F, Neman-Simha V, Brüggmann D. Further evidence of the toxic effect of ammonia produced by *Helicobacter pylori* Urease on human epithelial cells. *Infect Immun*. 1992;60:1858-1863.
- Doig P, Austin JW, Kostrzynska M, Trust TJ. Production of a conserved adhesin by the human gastroduodenal pathogen *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*. 1992;174:2539-2547.
- Waidner B, Greiner S, Odenbreit S, Kavermann H, Velayudhan J, Stähler F, et al. Essential role of ferritin Pfr in *Helicobacter pylori* iron metabolism and gastric colonization. *Infect Immun*. 2002;70:3923-3929.
- Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 1999;397:176-180.
- Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 1997;388:539-547.
- Perimal EK, Akhtar MN, Mohamad AS, Khalid MH, Ming OH, Khalid S, et al. Zerumbone-induced antinociception: involvement of the L-arginine-nitric oxide-cGMP-PKC-K⁺ ATP channel pathways. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011;108:155-162.

- <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2010.00635.x>.
11. Keong YS, Alitheen NB, Mustafa S, Abdul Aziz S, Abdul Rahman M, Ali AM. Immunomodulatory effects of zerumbone isolated from roots of *Zingiber zerumbet*. Pak J Pharm Sci. 2010;23:75-82.
  12. Taha MM, Abdul AB, Abdullah R, Ibrahim TA, Abdelwahab SI, Mohan S. Potential chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated and 2-acetylaminofluorene-promoted hepatocarcinogenesis by zerumbone from the rhizomes of the subtropical ginger (*Zingiber zerumbet*). Chem Biol Interact. 2010;186:295-305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2010.04.029>.
  13. Lee MH, Kim SH, Ryu SR, Lee P, Moon C. Enhancing the effects of Zerumbone on THP-1 cell activation. Korean J Clin Lab Sci. 2017;49:1-7. <https://doi.org/10.15324/kjcls.2017.49.1.1>.
  14. Yuan F, Bai G, Chen Y, Miao Y, Chen J, Li X. Structure-activity relationships of diverse ACGs against multidrug resistant human lung cancer cell line A549/Taxol. Bioorg Med Chem Lett. 2015;25:787-790. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.12.088>.
  15. Choi SH, Lee YJ, Seo WD, Lee HJ, Nam JW, Lee YJ, et al. Altered cross-linking of HSP27 by zerumbone as a novel strategy for overcoming HSP27-mediated radioresistance. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2011;79:1196-1205. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.10.025>.
  16. Woo HJ, Lee MH, Yang JY, Kwon HJ, Yeon MJ, Kim DH, et al. Evaluation of urease inhibition activity of zerumbone in vitro. Microbiol. Biotechnol. Lett. 2017;45:265-270. <http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1708.08002>.
  17. Yoo TH, Lee MH, Park M, Lee J, Woo HJ, Kim HW, et al. Detection of EBV-encoded small RNA from diffuse large B-cell lymphoma patients by RT-PCR method. Biomedical Science Letters. 2015;21:227-232. <https://doi.org/10.15616/BSL.2015.21.4.227>.
  18. Kim SH, Lee MH, Park M, Woo HJ, Kim YS, Tharmalingam N, et al. Regulatory effects of black rice extract on *Helicobacter pylori* infection-induced apoptosis. Mol Nutr Food Res. 2018;62. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700586>.
  19. Jungblut PR, Bumann D, Haas G, Zimmy-Arndt U, Holland P, Lamer S, et al. Comparative proteome analysis of *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol. 2000;36:710-725.
  20. Park JW, Song JY, Lee SG, Jun JS, Park JU, Chung MJ, et al. Quantitative analysis of representative proteome components and clustering of *Helicobacter pylori* clinical strains. Helicobacter. 2006;11:533-543.
  21. Backert S, Kwok T, Schmid M, Selbach M, Moese S, Peek RM Jr, et al. Subproteomes of soluble and structure-bound *Helicobacter pylori* proteins analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. Proteomics. 2005;5:1331-1345.
  22. Kim SH. Comparative proteome analysis of celastrol-treated *Helicobacter pylori*. Biomedical Science Letters. 2017;23:395-401. <https://doi.org/10.15616/BSL.2017.23.4.395>.
  23. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, et al. cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93:14648-14653.
  24. Rassow J. *Helicobacter pylori* vacuolating toxin A and apoptosis. Cell Commun Signal. 2011;9:26. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-26>.
  25. Kim SH, Kim JB. Comparative proteome analysis of cyanidin 3-O-glucoside treated *Helicobacter pylori*. Biomedical Science Letters. 2015;21:233-240. <https://doi.org/10.15616/BSL.2015.21.4.233>.
  26. Skouloubris S, Labigne A, De Reuse H. The AmiE aliphatic amidase and AmiF formamidase of *Helicobacter pylori* natural evolution of two enzyme paralogues. Mol Microbiol. 2001;40:596-609.
  27. Gilbreath JJ, West AL, Pich OQ, Carpenter BM, Michel S, Merrell DS. Fur activates expression of the 2-oxoglutarate oxidoreductase genes (oorDABC) in *Helicobacter pylori*. J Bacteriol. 2012;194:6490-6497. <https://doi.org/10.1128/JB.01226-12>.