

생물막 (biofilm)에 대한 최신 연구 동향



이 준 희
부산대학교 약학대학 약학과
joonhee@pusan.ac.kr

서론

생물막은 미생물이 스스로 분비한 다량체 기질 (polymeric matrix) 속에 형성된 미생물들의 3차원적 구조물로써, 고체 표면위에 막 형태로 형성된다. 미생물에 의한 생물막은 거의 모든 종류의 고체 표면과 살아있는 생물의 조직에서 형성될 수 있다. 특히 감염 과정에서 병원균은 숙주의 상피세포, 뼈, 치아, 혈관내벽 등을 비롯해 카테터 (catheter), 각종 삽입 보형물 (implant), 인공장기 같은 의, 치과 의료기구에 도 생물막을 형성한다 (Fux et al, 2005). 또한 수도관, 하수관, 정수기, 공기 정화시설 등 미생물이 접근할 수 있는 모든 종류의 인공 시설물에도 생물막을 형성할 수 있기 때문에, 이것이 미생물에 의한 생물학적 현상임에도 불구하고 의학, 치의학, 약학 등을 비롯해 토목, 건축, 도시, 환경 공학 등 광범위한 분야에서 오랫동안 다루어져 온 관심사 중의 하나였다. 또한 생물막 형성을 막을 수 있는 표면처리법이나 소재개발이라는 측면에서 재료공학이나 화학공학에서도 관심을 가져온 주제이다.

생물막은 표면에 강하게 부착되어 있어 제거가 어렵고, 생체내에서는 접촉에 의한 만성 염증의 원인이 된다. 또한 표면으로부터 지속적으로 미생물을 방출하기 때문에, 유해 미생물의 저장소 (reservoir)와 같은 역할을 한다는 점에서 공중 보건상 매우 큰 문제를 야기한다. 생물막 속의 미생물은 부유생활 (planktonic life)을 할 때에 비해 가혹한 환경, 항생제, 면역세포의 공격 등에 대해 훨씬 강한 저항력을 가지기 때문에 멸균, 소독, 치료가 극히 어렵다. 최근의 보고에 따르면 전체 감염성 질환의 65%정도가 생물막에 의한 것으로 추산되고 있으며 충치와 잇몸 염증의 가장 큰 원인이기도 하다 (Ymele-Leki and Ross, 2007). 따라서 생체내, 구강내, 수도관, 하수관, 통기관 등 다양한 환경조건에서 생물막 형성을 막거나 이미 형성된 생물막을 제거하는 방법이 오래도록 연구되어 왔으나 아직 어느 분야에서도 충분히 효율적인 생물막 방지 혹은 제거 기법을 개발하지는 못하였다. 한편, 오, 폐수의 정화, 수돗물 정수에서는 유기물 제거에 생물막이 유용하게 이용된다는 점에서 (Singh et al., 2006), 최근에는 일반적으로 생물막을 제거하기 보다는 생물막 형성에 중요한 미생물의 생리적 특성을 이용하여 생물막의 형성과 이탈을 원하는 방향으로 제어할 수 있는 방법을 개발하려는 움직임이 대두되고 있다.

본론

이러한 새로운 접근은 최근의 미생물학 연구 결과로부터 생물막의 형성이 미생물간의 신호전달에 의해 능동적으로 이루어진다는 사실이 보고되면서부터 시작되었다. 과거에는 미생물들에 의해 분비되는 끈적끈적한 다량체 (sticky polymer)에 미생물들이 수동적으로 부착되어 생물막이 형성된다고 생각되었으나, 최근의 연구 결과는 생물막의 초기 부착 (attachment), 성숙 (maturation), 심지어는 마지막 이탈 (detachment) 단계에 이르기까지 각 단계에서 필요로 하는 인자들의 생성이 미생물들의 신호전달에 의해 정교하게 조절된다는 것을 보여 주었다 (Parsek and Greenberg, 2005). 즉 생물막 형성은 전형적인 미생물들의 집단행동중 하나라는 것이다 (Kolter and Greenberg, 2006). 이는 미생물학 적으로도 큰 진전이었지만, 생물막 형성을 제어하려는 많은 응용 분야에도 큰 영향을 미쳤다. 미생물의 신호전달 현상이 생물막의 형성을 제어하는 새로운 타겟으로 부각되었기 때문이다.

처음 이러한 생각을 촉발시킨 것은 세균의 세포밀도 인지 및 세 공간 신호전달 기전인 퀴럼 센싱 (quorum sensing; QS)이 생물막 형성을 조절한다는 발견이었다. 많은 세균에서 QS 신호전달기전과 생물막 형성의 연관성이 보고되었으며, 이를 통해 처음에는 세균이 군집내에서 일정 세포 밀도에 도달하면 신호전달에 의해 능동적으로 생물막 형성을 위한 생리적 변화 (ex, pili, fimbriae and exopolymer production)를 일으키고, 그 결과로 생물막이 형성된다고 생각하게 되었다. 아울러 QS 신호물질을 인위적으로 조절하거나, QS 신호물질의 antagonist (quorum quencher)를 사용함으로써 생물막 형성을 막아보려는 시도도 수행되었다. 그러나 이러한 생각은 조금씩 변화되기 시작하였는데, *Pseudomonas aeruginosa*에서는 QS와 생물막 형성간의 관계가 실험 조건에 매우 의존적이어서 경우에 따라서는 서로 연관성이 없는 경우도 관찰된다는 점과, 실제 *Pseudomonas* 생물막에서 발견되는 exopolymer를 합성하는 유전자 (psl, pel)가 QS에 의해 조절받지 않는다는 점, 그리고 특정 세균에서는 QS보다 다른 요인에 의해 생물막 형성이 조절된다는 보고 등이 있었기 때문이다 (Parsek and Greenberg, 2005; Branda et al., 2005). 따라서 아직 무엇이 결정적으로 생물막 형성을 촉발시키는 신호인지는 분명하지 않아 보인다.

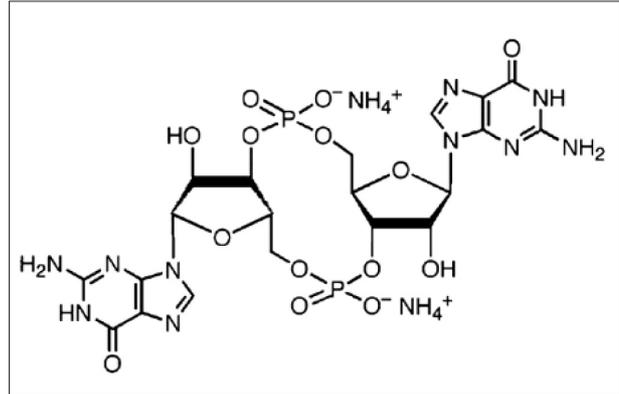


그림 1. cyclic diGMP의 구조

그럼 어떤 신호가 생물막을 형성하는 가장 중요한 신호가 될 수 있을까? 이는 현재 생물막 연구의 초점이 되고 있는 관심사이며, 현재 다음과 같은 것들이 가장 중요하게 다루어 지고 있는 것으로 보인다.

1. cyclic diGMP

cyclic diGMP (그림 1)는 *Gluconacetobacter zylinus*의 cellulose synthesis에서 allosteric activator로 처음 알려졌다 (Römling and Amikam, 2006). 최근 이 물질의 세포내 농도와 생물막 관련 현상 사이에 높은 상호관계가 있다는 것이 밝혀졌는데, cyclic diGMP의 세포내 농도가 높으면 sessility, biofilm

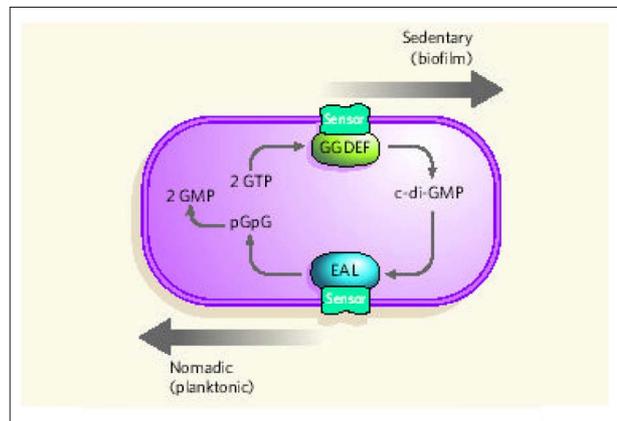


그림 2. cyclic diGMP의 농도와 nomadic or sedentary life style (그림출처 : Kolter and Greenberg, 2005)

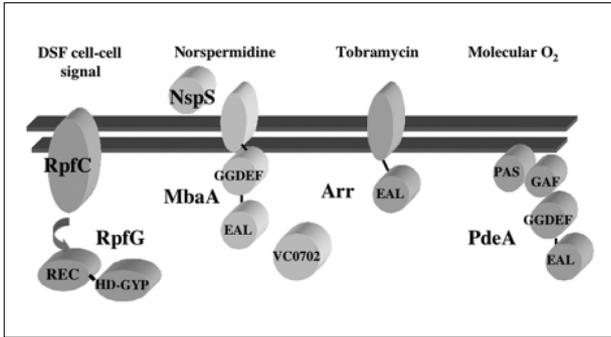
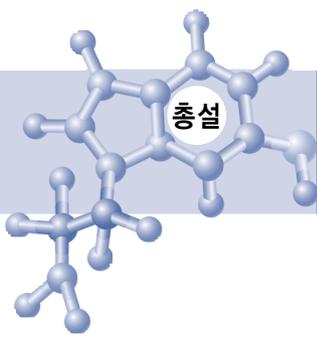


그림 3. 다양한 자극을 수용하는 도메인들과 GGDEF 혹은 EAL/HD-GYP 도메인들의 융합체들 (그림출처 : Ryan et al., 2006)

formation, aggregative behavior 등이 나타나고, 낮으면 motility의 증가, virulence factor의 합성 등이 일어나기 때문에 생물막의 형성과 깊은 관계가 있을 것으로 예상되고 있다 (그림 2). cyclic diGMP는 GGDEF 도메인을 가지는 단백질에 의해 합성되고, EAL 혹은 HD-GYP 도메인을 가지는 단백질에 의해 분해된다. 이 도메인들은 광범위한 미생물 중에서 발견되는데, 대부분 막 단백질이며, 세포 표면에서 receptor로 작용할 수 있는 다른 도메인과 (그림 3) 에서 처럼 fusion이 되어 있다. 이 receptor 도메인의 구조와 역할은 매우 다양하여 산소, 신호전달 물질, 항생제 등의 수용체 역할을 하며, GGDEF나 EAL/HD-GYP 도메인이 이들 수용체 도메인과 fusion 되어 있기 때문에 여러가지 외부 신호를 인지하여 세포내에서 cyclic diGMP양을 조절할 것으로 생각되고 있다. 또한 이들 receptor들의 발현 양 또한 transcription 혹은 post-transcription 단계에서 조절 된다는 것이 알려졌기 때문에, cyclic diGMP에 의한 조절은 매우 복잡한 양상을 보일 것으로 예상된다. 어쨌든 이 많은 종류의 외부 신호들이 cyclic diGMP라는 세포내 small signal molecule로 수렴될 수 있다는 점에서 매력적이다.

2. 세포의 밀도 - Quorum sensing (QS)

세포밀도를 인지하는 기전인 QS는 생물막 형성을 조절하는 신호체계로 일찍부터 주목 받았다. 생물막 형성에서 QS의 역할은 한동안 절대적인 것처럼 여겨져 왔고, 마치 유행처럼 많은 연구 그룹에 의해 연구 되었다. 이는 최초에 QS mutant가 생물막을 형성하지 못한다는 1998년의 Science 논문에서 비롯되었다 (Davies et

al., 1998). 그러나 이 결과는 이후 다른 랩에 의해 실험 조건에 의존적이라는 주장이 제기 되면서 많은 도전을 받기도 했다 (Parsek and Greenberg, 2005). 그러나 QS와 생물막 형성의 관련성은 많은 미생물에서 많은 논문을 통해 보고되어 왔기 때문에 그 자체는 분명한 것으로 생각된다. 다만 QS이 생물막 형성을 유도하는 것인지, 아니면 생물막의 초기 부착 이후에 QS이 시작되는 것인지 여부가 아직 분명하지 않으며, 이는 생물막 제어를 위해 QS이 적절한 target인가의 문제와 연결되어 여전히 논란이 되고 있는 것으로 보인다. 이런 측면에서 앞에서 언급한 cyclic diGMP 와 QS 사이의 연관성이 최근 관심을 끌고 있다 (그림 4). 사실 cyclic diGMP는 세포외부의 다양한 상황을 인지할 가능성이 많은 반면, QS은 신호물질 농도를 통해 군집의 크기를 인식하는 기전이므로 최초의 신호 인식과정은 독립적일 수 있다. 그러나 각자의 신호를 인지한 후 생물막을 형성하기 위해 필요한 공통의 유전자군을 조절할 수도 있고, 서로 순차적으로 생물막 형성에 관여할 수도 있으므로, 한쪽이 활성화 되었을 때 다른 쪽이 어떤 영향을 받는지가 큰 관심사라고 할 수 있다. 아직 두 기전 사이의 상호 관련성은 명확히 밝혀져 있지 않다.

3. Composition of biofilm matrix

생물막을 이루고 있는 matrix는 구조와 조성이 극도로 다양하여, 중간에, 혹은 같은 종이라도 strain에 따라 다른 형태를 보인다. 대체로 exopolymer가 matrix를 이루는 주 성분이라고 추정해

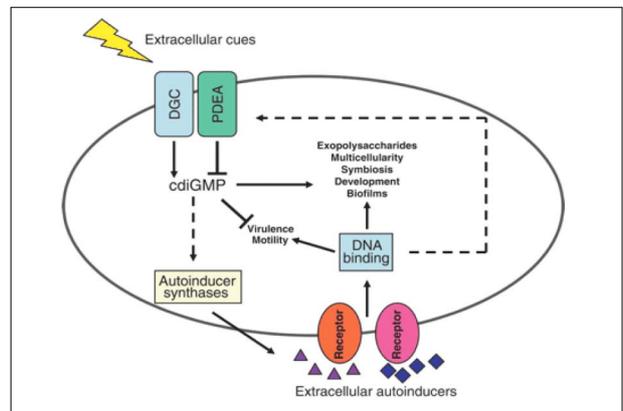


그림 4. QS와 cyclic diGMP 시스템 (그림출처 : Camilli and Bassler, 2006)

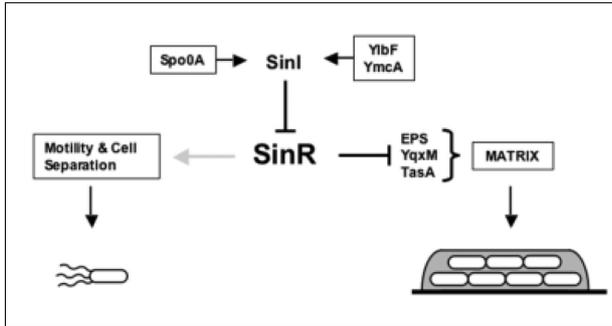
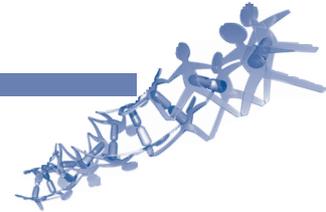


그림 5. B.subtilis에서 생물막 형성 모델 (그림출처 : Branda et al., 2006)

왔으나, 실제로 그들이 어떤 분자인지 정확히 규명되어 있지 않았다. 최근 생물막의 matrix 조성을 Bacillus subtilis에서 분석해 보았을 때, 주로 TasA라는 단백질과 exopolysaccharide로 구성된다는 것이 알려졌다. 각각을 합성하는 유전자 돌연변이를 가지고 조사해 보았을 때, 이 두 component중 하나가 없으면, 나머지로 생물막이 형성되지만, 둘 다 없으면 완전히 생물막이 형성되지 않는다는 것이 밝혀졌다. 그런데 이들 돌연변이주에 각 성분을 외부에서 넣어주면 functional biofilm이 형성되는 것으로 보아, 생물막을 이루는 matrix는 세포외부에서 assemble 될 수 있다는 것을 알 수 있다. 이는 어떤 형태로든 필요한 exopolysaccharide와 단백질이 존재하면 생물막이 형성될 수 있다는 것을 의미하므로, 이들이 어떻게 생성되느냐가 가장 중요한 관건이라는 것을 의미한다. Bacillus subtilis에서는 최근 SinR-I system이 생물막과 planktonic state를 결정하는 master regulator로 제안되었는데, 이 시스템이 TasA와 exopolysaccharide를 생합성하는 eps 오페론을 발현조절하기 때문이다 (그림 5). 이 시스템은 QS 시스템이 아니라 regulator와 anti-regulator system이다. 앞서의 cyclic diGMP나 QS 기전이 생물막 형성과 관련된다는 것은 많이 관찰되었으나, 이들이 직접적으로 matrix 구성 성분을 발현 시킨다는 것은 아직 명확히 알려지지 않았다. 따라서 matrix의 구성 성분을 먼저 분석하고, 이들의 발현에 영향을 주는 조절 단백질을 찾아가는 방법은 보다 직접적인 접근이라는 강점이 있다.

이와 유사하게 최근 B. subtilis 생물막 matrix의 중요한 성분으로 PGA (poly glutamic acid)가 사용된다는 것이 최근 유전학적 방법으로 밝혀졌다 (Stanley and Lazizzera, 2005). 이 물질을 생성하는 유전자 (ywsC, ywtA, ywtB)는 two component system인 ComPA 시스템과 DegSU 시스템에 의해 발현이 조절

된다. 그러나 이들의 조절을 처음 triggering 하는 자극은 아직 알려져 있지 않다.

4. DNA release in biofilm

최근 여러종류의 세균의 생물막 matrix에서 DNA가 발견되었다. 이는 DNA가 matrix를 이루는 한 성분이거나, 생물막이 형성되는 과정에서 세포의 lysis가 일어난다는 뜻이다. 이 DNA들은 생물막 구조를 형성하는데 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌는데, 이는 죽은 세포가 생물막 속에 존재한다는 점에서 죽은 세포의 유출물 (detritus)이 matrix를 이루는 한 성분이 될 수 있음을 보여준 것이다 (Spoering and Gilmore, 2006). 실제 생물막 matrix를 이루는 DNA는 whole genome에 가깝다는 점에서, 이는 DNA가 살아있는 세포로부터 분비되었다기 보다는 죽은 세포로부터 토출되어 나왔음을 의미한다. Pseudomonas의 생물막에서 이러한 DNA의 release가 acyl-HSL과 PQS signaling에 의존적이라는 실험 결과가 최근에 보고되었다. 흥미로운 것은 DNA가 주로 버섯 줄기의 바깥부분, 즉 줄기와 머리의 경계부분에 높은 농도로 존재한다는 점과, quorum mutant의 생물막은 DNA 함량이 낮으며 그 강도가 약하다는 점이다. 이는 DNA가 matrix를 이루는 중요 성분이며, 생물막에 기계적인 강도를 부여한다는 것을 의미하는 것이다. 또한 이러한 DNA의 분비가 신호전달에 의한 조직적인 세포의 사멸에 의한 것임을 간접적으로 보여주는 것이다. 앞서도 언급한 것처럼, 실제 생물막의 matrix를 이루는 exopolysaccharide를 생합성하는 유전자들이 QS의 조절을 받지 않는다는 것이 의문이었는데, DNA release가 한가지 실마리를 제공해 주고 있다.

5. extracytoplasmic or envelop stress

고체배지위의 콜로니는 넓은 의미에서 생물막의 한 형태라고 할 수 있다. 그림 6에서 처럼 같은 종을 같은 조건에서 배양하더라도 agar의 농도를 바꿔주면 다른 형태의 생물막이 형성된다. 이는 배지의 경도 한가지지만 바뀌더라도 생물막 형성이 영향을 받는다는 뜻이다. 고체표면에 의해 조성된 경직성은 페리플라즘과 세포막에서 세포외부 스트레스 (extracytoplasmic stress) 형태로 인식될 수 있다. 세포외부 스트레스 인지 기전은 envelop stress 인지 기전이라고도 하는데, 세포막과 세포벽, 페리플라즘을 포함한 세포

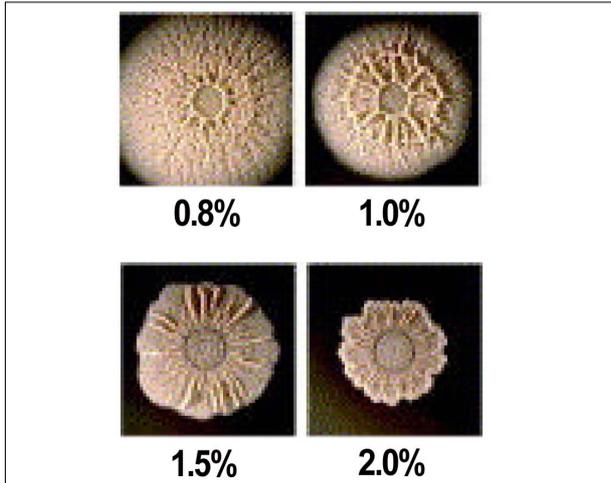
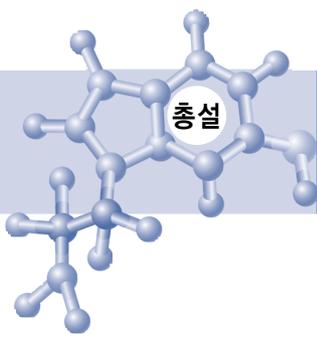
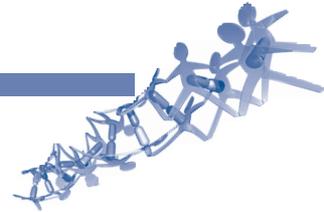


그림 6. 고체 배지의 농도에 따른 콜로니 형태 변화 (그림출처 : Branda et al., 2005)

외부의 완전성 (integrity)을 저해하는 스트레스를 인식하는 기전이다. 최근 세포 envelope의 성분이 생물막 형성에 관여하며, 세포 외부 스트레스 인지기전에 의해 병독소 (virulence factor)의 생성이나 생물막 형성이 조절된다는 보고가 있었다 (van de Mortel and Halverson, 2004; Raivio, 2005). 대장균에서는 세포외부 스트레스 인식 단백질인 Cpx가 소수성 고체표면과의 접촉에 의해 활성화되며, cpx pathway가 망가진 돌연변이는 고체표면과 상호작용을 잘 하지 못한다는 것이 알려졌다 (Dorel et al., 2006). 이는 주변 환경과의 접촉이 신호가 될 수 있음을 의미한다. 세포막의 유동성 (fluidity) 변화도 외부 스트레스 인지 시스템을 활성화 시킬 수 있는데, 경직된 주변 환경은 세포막 유동성에 영향을 줄 수 있다. 사실 이것은 축각의 가장 원시적인 형태와 유사하다고 할 수 있다. 그런데 세포막 성질의 변화는 또한 QS에 영향을 준다는 보고가 있다. 일반적으로 lipid desaturase는 세포막의 유동성을 변화시키는데, 그 활성을 위해서 철을 cofactor로 가진다. 철분은 생물막 형성의 중요한 cue이며, 철 결핍이 생물막 형성을 막는다는 것이 알려져 있다. 따라서 세포막 유동성과, 세포외부 스트레스, QS, 생물막 형성이 어떤 연결고리를 가지고 있을 가능성은 매우 높아 보인다.

결론

폭넓은 응용 영역을 가지는 생물막 연구의 핵심주제는 부착, 성숙, 이탈 과정에 관여하는 신호 전달 기전을 밝힘으로써 생물막을 효과적으로 제어하는 것이다. 초기 QS 신호전달이 생물막 형성에 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀진 이래, QS이외에도 많은 기전들이 생물막 형성에 관여한다는 것이 보고되었다. 이는 생물막 형성에 매우 다양한 요인이 관여함을 보여주는 것으로, 환경 조건에 따라 생물막의 형성과 기질 조성이 많이 달라질 수 있음을 의미한다. 이러한 다양성을 설명하기 위한 많은 가설들이 있으나, 기본적으로 생물막이라는 것이 액체로부터 고체 표면에 미생물이 부착하여 생기는 것이므로, 생물막 형성을 결정하는 요인이 고체표면과 접촉하기 전에 발생하는 경우와, 고체표면과의 접촉으로부터 그 요인이 발생하는 경우로 나누어 생각해 볼 수 있다. 전자는 액체 배지 상태에서 이미 어떤 변화가 생물막을 형성할 수 있도록 미리 진행되었음을 의미하는 것이다. 앞에서 고찰해본 많은 가설들이 여기에 기초하고 있다. 이는 생물막의 형성이라는 것을 어떤 다른 현상의 결과물로 생각한다는 것을 의미한다. 그러나 만약 고체 표면과 접촉하였기 때문에 미생물이 생물막을 형성할 수 있도록 생리가 변한다고 생각하면, 생물막 형성을 위한 모든 생리적 변화는 고체표면에 접촉했다는 상황의 결과가 된다. 이때는 고체 표면과의 접촉이 가장 기본적인 생물막 형성의 cue가 될 것이다. 이는 마치 QS기전을 통해 자신이 일정 세포 밀도 이상의 군집에 있다는 것을 인지하듯이, 자신이 고체표면과 같이 경직된 환경에 있음을 인지하는 것을 의미한다. Pseudomonas가 생물막을 형성할 때, 초기에는 부착이 느리고 편편한 반면, 어느 순간 이후에는 빠른 속도로 성장하면서 버섯모양 (mushroom-shape biofilm)을 형성한다는 것을 알 수 있다. 이는 부착 이후에 어떤 생리적 변화가 생긴다는 것을 의미한다. 이런 면에서 세포외 스트레스 인지 기전에 의한 생물막 형성에 대해 보다 심도 깊은 연구가 이루어 질 것으로 기대된다. 또한 cyclic diGMP의 농도를 결정하는 GGDEF와 EAL/HD-GYP domain이 많은 경우 세포막 수용체 단백질과 융합되어 있다는 점에서 세포외 스트레스가 cyclic diGMP의 농도변화로 수렴될 가능성이 높다. QS 기전의 경우도 세포밀도가 높아져서 고체 표면에 부착한다는 면도 있으나, 부착 이후에 세포밀도나 신호물질의 농도가 부분적으로 높아지는 면도 있으므로, 앞에서 열거된 모든 주제들이 모두 고체표면이라는 물리적 환경과 밀접히 연결되어 있



을 가능성이 높다. 이 부분에 더 많은 연구가 기대된다

참고문헌

- Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R.** Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 2005 Jan;13(1):20-6.
- Branda SS, Chu F, Kearns DB, Losick R, Kolter R.** A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol Microbiol.* 2006 Feb;59(4):1229-38.
- Camilli A, Bassler BL.** Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science.* 2006 Feb 24;311(5764):1113-6.
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP.** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* 1998 Apr 10;280(5361):295-8.
- Dorel C, Lejeune P, Rodrigue A.** The Cpx system of *Escherichia coli*, a strategic signaling pathway for confronting adverse conditions and for settling biofilm communities? *Res Microbiol.* 2006 May;157(4):306-14.
- Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P.** Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 2005 Jan;13(1):34-40.
- Kolter R, Greenberg EP.** Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature.* 2006 May 18;441(7091):300-2.
- van de Mortel M, Halverson LJ.** Cell envelope components contributing to biofilm growth and survival of *Pseudomonas putida* in low-water-content habitats. *Mol Microbiol.* 2004 May;52(3):735-50.
- Parsek MR, Greenberg EP.** Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol.* 2005 Jan;13(1):27-33.
- Raivio TL.** Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. *Mol Microbiol.* 2005 Jun;56(5):1119-28.
- Römling U, Amikam D.** Cyclic di-GMP as a second messenger. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Apr;9(2):218-28.
- Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, Jiang BL, He YQ, Feng JX, Tang JL, Dow JM.** Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol.* 2007 Jan;63(2):429-42.
- Singh R, Paul D, Jain RK.** Biofilms: implications in bioremediation. *Trends Microbiol.* 2006 Sep;14(9):389-97.
- Spoering AL, Gilmore MS.** Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Apr;9(2):133-7.
- Stanley NR, Lazazzera BA.** Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly-gamma-dl-glutamic acid production and biofilm formation. *Mol Microbiol.* 2005 Aug;57(4):1143-58.
- Ymele-Leki P, Ross JM.** Erosion from *Staphylococcus aureus* biofilms grown under physiologically relevant fluid shear forces yields bacterial cells with reduced avidity to collagen. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Mar;73(6):1834-41.