

효모에서 활성형의 곤충유래 항균펩티드 defensin의 발현

강대욱 · 안순철 · 김민수 · 안종석*

한국생명공학연구원

Expression of Biologically Active Insect-Derived Antibacterial Peptide, Defensin, in Yeast

Dae Ook Kang, Soon Cheol Ahn, Min Soo Kim and Jong Seog Ahn*

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology P.O. Box 115, Yuseong Daejeon 305-600, Korea

Abstract

As a biological model system for the production of an active antibacterial peptide, we have attempted the expression and secretion of insect defensin in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleotide sequences encoding mature defensin composed of 40 amino acids were fused in frame with promoter and signal sequence of *Saccharomyces diastaticus* glucoamylase, and mating factor $\alpha 1$ [MF $\alpha 1$] prosequence. The host strain, *S. cerevisiae* 2805 was transformed with the resulting plasmid, pSMF11. The secretion of functional defensin was confirmed by growth inhibition zone assay using *Micrococcus luteus* as a test organism. Insect defensin was secreted to the culture supernatant in biologically active form by glucoamylase signal sequence and mating factor $\alpha 1$ prosequence. Most of antibacterial activity was detected in the culture supernatant. Defensin was also active against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*.

Key words – Defensin, glucoamylase signal sequence, mating factor $\alpha 1$ prosequence, secretion, *Saccharomyces cerevisiae*

서 론

최근에 새로운 항생물질로서 주목을 받고 있는 항균펩티드[antibacterial peptide]는 곤충, 갑각류, 양서류, 포유동물, 식물 및 세균 등과 같은 자연계의 다양한 생물체로부터 합성되어 병원성 세균의 감염으로부터 자신을 방어하는데 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다[2,7]. 대부분의 항균펩티드는 항균활성이 없는 prepropeptide의 큰 전구체로 합성된 후 proteolytic processing을 통해 pre-

sequence인 분비신호서열과 prosequence가 제거되어 최종적으로 활성이 있는 C-말단의 완성된 항균펩티드가 생성된다. 이러한 사실은 활성형의 재조합 항균펩티드 생산을 위한 숙주세포로서 대장균의 사용을 제약하는 요인이 된다.

미생물의 감염이나 상처 등에 반응하여 fat body 및 hemocyte에서 합성이 유도되는 곤충 항균펩티드는 지금까지 약 150종 이상 발견되었으며 이중 곤충 defensin에 관한 연구가 비교적 많이 진행되었다. 곤충 defensin은 포유동물의 defensin과 아미노산서열은 비슷하지만 2, 3차 구조는 완전히 다르다. 분자내에 6개의 cysteine이 존재하여 3개의 disulfide bond를 이루고 있다. 특히 *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Corynebacterium*, *Stre-*

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 042-860-4312, Fax : 042-860-4595
E-mail : jsahn@kribb.re.kr

ptomyes 속의 미생물 종에 더 강력한 항균활성을 보인다 [3,4,7,10].

한편 효모 *Saccharomyces* 속은 인체에 전혀 무해하며 (Generally Regarded As Safe) 진핵 단세포 미생물로서 고등세포의 연구를 위한 model system으로서 장기간 연구가 진행되어 유전학, 생리학 및 배양공학에 관한 풍부한 기술과 지식이 축적되어 있다. 또한 *S. cerevisiae*는 고등세포와 거의 동일한 단백질의 분비계가 존재하여 대장균, 고초균 등의 세균과는 달리 진핵세포의 분비단백질에서 특이적으로 일어나는 proteolytic processing, glycosylation 및 disulfide bond formation 등의 post-translational modification을 수행할 수 있어 분비계를 지나면서 proteolytic processing에 의해 항균활성을 갖는 형태로 전환되는 항균 펩티드나 기타 고등세포 유래의 단백질을 발현하기 위한 숙주로 적합하다[6,8,17]. *S. cerevisiae*를 숙주세포로 사용한 재조합 항균펩티드의 발현에 관한 보고로서 Reichhart 등 [16]과 Kang 등은[9] MF α 1의 promoter와 분비신호서열을 이용하여 *Phormia terranoviae*의 defensin을 분비하였으며 Pang 등[15]은 전갈의 곤충독소를 효모에서 발현, 분비에 성공하였으나 생물학적으로 활성이 없는 형태로 소량 분비되었다. 또한 Martin-Eauclaire 등[13]도 PGK promoter와 MF α 1 preprosequence를 이용하여 전갈의 신경독소를 활성적인 형태로 분비한 것을 보고하였다. MF α 1의 promoter와 분비신호서열을 이용하여 무에서 유래한 51개의 아미노산으로 구성되고 사상형의 곰팡이에 대해 항균활성을 보유한 항진균펩티드의 성공적인 발현 및 분비가 Alves 등[1]에 의해 보고되었다. 효모에서 재조합 항균펩티드의 발현은 대부분 효모 MF α 1의 promoter와 preprosequence를 이용하여 이루어졌으며 glucoamylase 유전자를 이용한 항균 펩티드의 발현과 분비에 관한 연구는 보고되지 않았다.

본 논문에서는 *S. cerevisiae*에서 효모 glucoamylase의 promoter와 분비신호서열을 이용하여 곤충 항균펩티드의 일종인 defensin을 항균활성이 있는 형태로 분비하는 것에 대하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

미생물 및 plasmids

본 연구에 사용한 대장균은 *Escherichia coli* DH5 α [*supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96*

thi-1 *relA1*]로서 plasmid DNA의 분리를 위한 숙주로 사용하였다. *Micrococcus luteus* IAM 1056은 재조합 효모가 분비하는 defensin의 항균활성을 측정하기 위한 시험균으로 한국생명공학연구원 유전자은행[Korean Collection for Type Cultures, KCTC]에서 분양받아 사용하였다. *S. cerevisiae* 2805[α ,*ura3-52* *pep4::HIS3* Δ *prb1* Δ *his3* *can1*]를 한국생명공학연구원 이상기박사 연구팀에서 제공받아서 defensin 발현, 분비용 숙주로 사용하였다. 또한 효모 MF α 1의 prosequence를 분리하기 위해 *S. cerevisiae*의 MF α 1 유전자를 함유하고 있는 플라스미드(plasmid) YEp70 α T를 동일 연구팀에서 제공받아 사용하였다. Defensin 분비를 위한 재조합 플라스미드 제작을 위해 *S. diastaticus* glucoamylase 유전자[*STA1*]의 promoter와 분비신호서열을 함유하고 있는 플라스미드 pYEG27을 사용하였다[14].

배지 및 배양조건

대장균은 LB 배지[1% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 1% NaCl]에서 배양하였으며 플라스미드를 함유한 대장균은 항생제 ampicillin를 75 μ g/ml의 농도로 첨가하였다. 효모형질전환체의 1차 선별을 위한 최소배지로 YNBD 한천배지 [0.67% Bacto-yeast nitrogen base without amino acids, 2.0% dextrose, 0.002% L-His, 2.0% agar]를 사용하였다. *M. luteus*는 NB 배지[1.25% Bacto-heart infusion, 0.5% Bacto-nutrient broth, 0.25% yeast extract]에서 37°C에서 15시간 배양한 후 항균활성의 측정에 사용하였다.

Defensin 유전자의 합성 및 재구성

Mature defensin 유전자를 세 부위로 나누어 합성하였다. 이때 합성 항균펩티드 유전자의 5'과 3' 말단에는 제한 효소인식부위 *Xba*I과 *Sal*I이 각각 함유되게 합성하였다. Defensin의 아미노말단 앞에는 분비단백질이 골지체를 통과할 때 Kex2 endopeptidase에 의해 잘라지는 부위이고 MF α 1 prosequence의 C-말단인 아미노산 Lys-Arg을 첨가함으로써 defensin 본래의 아미노 말단이 생기도록 하였다. 합성한 defensin 유전자 oligomer 6개중 중간 부위에 해당되는 oligomer (+)/(-) 가닥[F2, R2]을 동시에 인산화시키고 모든 oligomer를 같은 농도[200 nM]로 섞은 후 annealing 하고 이중 1 μ l를 취하여 20 μ l에서 5시간 ligation한 후 다시 5' 말단을 인산화시켰다.

효모 형질전환

Defensin 유전자를 함유한 재조합 플라스미드를 숙주인 효모에 도입하기 위해 Dohmen 등[5]의 방법으로 효모의 형질전환을 수행하였다.

Defensin을 분비하는 효모의 선별

일차 선별한 효모 형질전환체를 0.1 M phosphate 완충 용액(pH 7.0)을 함유하고 uracil이 없는 YNBD 한천배지에 tooth-picking하고 하룻밤 배양한 후 시험균인 *Micrococcus luteus* IAM1056 배양액[1%]을 함유한 top agar[1.25% Bacto-heart infusion, 0.5% Bacto-nutrient broth, 0.25% Bacto-yeast extract, 0.8% agar] 10 ml을 붓고 30°C에서 24시간 배양한 후 시험균의 생육이 저해되어 균체주위에 생기는 투명환의 생성여부를 조사하여 활성형의 defensin이 분비되는 형질전환체를 선별하였다[11].

Defensin의 항균범위조사

황산암모늄으로 농축한 배양 상등액을 사용하여 *M. luteus* IAM1056 이외 임의의 10종 세균에 대한 항균활성을 조사하였다. 각각의 시험균 배양액 1%를 함유한 0.8% top agar로 overlay된 NB plate에 구멍을 만든 후 배양농축액 50µl를 loading하고 37°C에서 15시간 배양하였다. 구멍 주위에 생긴 투명환의 지름을 측정하여 항균활성을 조사하였다.

결과 및 고찰

Defensin 분비벡터의 제작

Mature defensin의 분자량이 너무 작아서 이것을 효모에서 직접 발현시키기는 것이 불가능할 것으로 생각되어 22개의 아미노산으로 구성된 glucoamylase signal sequence 및 MFα1의 prosequence와 융합단백질로 발현을 시도하고자 하였다. MFα1의 prosequence를 분리하기 위해 BamHI 인식부위를 함유한 5' end primer와 Xba I 인식부위를 함유한 3' end primer를 사용하여 PCR로써 플라스미드 YEp70αT를 template로 사용하여 MFα1의 prosequence 180 bp DNA 단편[18]을 증폭하여 pUC19의 BamHI과 Xba I 인식부위에 삽입하였다. 플라스미드 DNA 분리 후 제한효소 mapping과 염기서열분석을 통해 정확한 클론을 선별한 후

시험관에서 재구성한 합성 defensin 유전자를 MFα1 prosequence의 3' 말단에 삽입하고 염기서열분석을 하여 정확히 합성되고 제작된 클론을 선별하였다. 정확히 재구성된 defensin 합성유전자의 염기서열과 유추된 아미노산서열을 Fig. 1에 나타내었다. 이 플라스미드를 BamHI과 SalI을 처리하여 MFα1 prosequence와 defensin 유전자를 함유한 320 bp DNA 단편을 분리하여 pYEG27의 BamHI/Sal I 부위에 삽입하여 최종적으로 pSMF11을 제작하였다[Fig. 2].

Defensin의 발현 및 분비

재조합 플라스미드 pSMF11로 형질전환된 효모를 대상으로 활성형의 defensin을 세포외로 분비하는지를 재료 및 방법에 기술한 대로 조사한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 재조합 플라스미드로 형질전환된 효모균체에는 투명환이 관찰되었으나 pYEG27로 형질전환된 숙주 효모에서는 나타나지 않았다. 따라서 곤충에서 유래한 항균펩티드 defensin이 glucoamylase signal sequence와 MFα1의 prosequence에 의해 효모세포에서 processing이 되어 항균활성이 있는 형태로 분비됨을 확인할 수 있었다.

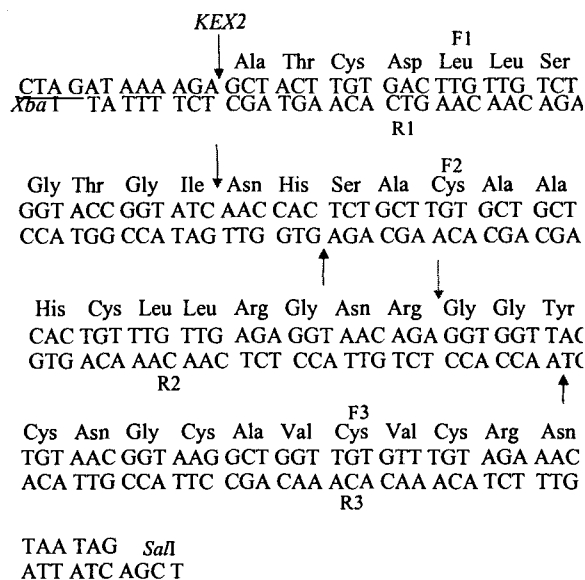


Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of synthesized defensin gene.

Defensin gene was synthesized by 6 oligonucleotides and assembled *in vitro* through kination of F2 and R2 oligonucleotides, annealing of 6 oligonucleotides, ligation and kination.

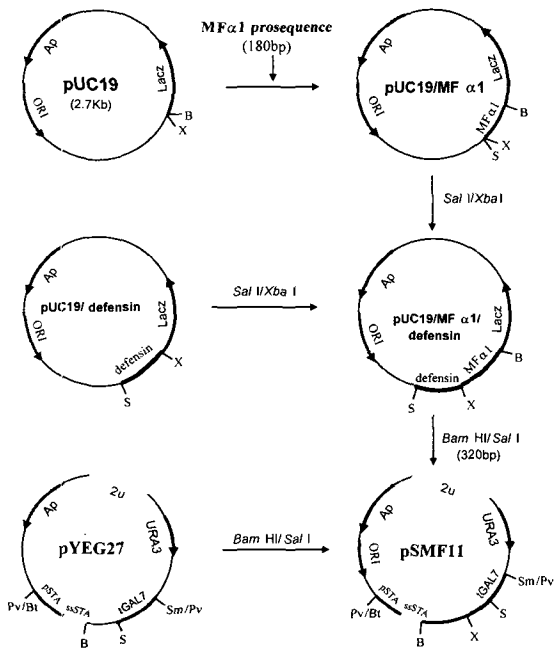


Fig. 2. Construction of the recombinant plasmid, pSMF11 for defensin secretion.

Abbreviation: pSTA, promoter region of glucoamylase gene; ssSTA, glucoamylase signal sequence; tGAL7, transcription terminator of GAL7 gene; B, BamH I; Bt, BstE II; S, Sal I; Sm, Sma I; X, Xba I.

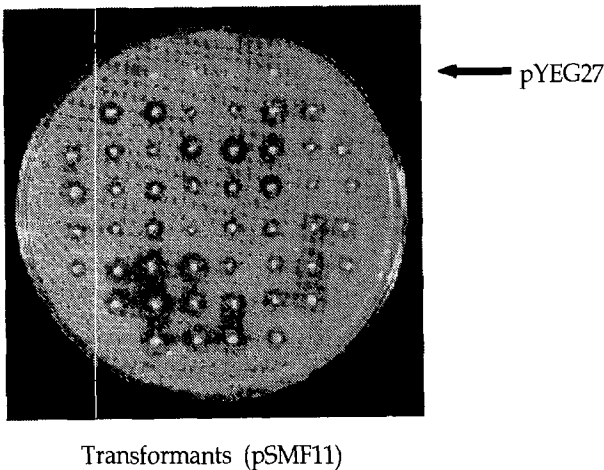


Fig. 3. Secretion of biologically active defensin from yeast transformants.

Yeast *S. cerevisiae* 2805 transformed with pSMF11 was grown on YNBD agar media containing phosphate buffer, pH 7.0 at 30°C for 24 hr. The plates were overlaid with 10ml of 0.8% top agar containing 1% log-phase cells of *Micrococcus luteus* IAM1056 and followed by overnight incubation at 37°C.

또한 액체배양 시에도 활성형의 defensin이 분비되는지 조사하기 위해 형질전환체를 5ml의 YPD broth에서 3일간 배양하고 배양 상등액 50 μ l를, NB 한천배지에 시험균 1%를 함유한 5ml의 0.8% top agar가 깔린 plate에 만든 well [5 mm 지름]에 loading하고 37°C에서 24시간 배양한 결과 well 주위에 투명한이 생기는 것을 관찰하였다.

Defensin이 pSMF11의 형질전환체 *S. cerevisiae* 2805에서 분비되는 정도를 조사하기 위해 배양액을 상등액, periplasmic space 및 cytosolic region의 세 부위로 분획한 후 항균활성을 조사하였다. 효모 배양액을 원심분리하여 상등액과 균체를 분리하고 균체에 효모세포벽 분해효소인 zymolyase를 처리하여 periplasmic fraction을 얻고 glass bead로써 sphaeroplast를 파괴하여 cytosolic fraction을 얻었다[12]. 배양 상등액 원액, periplasmic과 cytosolic fraction의 10배 농축액 50 μ l을 각각, 0.5% *M. luteus*를 함유한 0.8% top agar로 overlay된 NB plate[1.25% brain heart infusion, 0.54% nutrient broth, 0.25% yeast extract, 1.5% agar]에 만든 well에 loading하고 배양한 후 inhibition zone을 관찰한 결과 발현된 defensin이 대부분 세포 외로 분비되어 거의 모든 항균활성이 배양 상등액에 존재하였다 [Fig. 4].

Defensin의 항균범위조사

황산암모늄으로 농축한 배양 상등액을 사용하여 *M. luteus* 이외의 임의의 10종의 세균에 대한 항균활성을 조사하였다. 각각의 시험균 배양액 0.5%를 함유한 0.8% top agar로 overlay된 NB plate에 well을 만든 후 배양농축액 50 μ l를 loading하고 37°C에서 배양하였다. 그람 음성균인 대장균과 *Salmonella typhimurium* 에는 항균활성이 없었으나 병원성균인 *Staphylococcus aureus*와 *Listeria monocytogenes* 등에 비교적 강한 항균활성을 나타내었다 [Table 1]. 지금까지 알려진 바에 의하면 곤충 defensin은 그람 음성세균에는 항균활성이 없으나 그람 양성세균에는 강한 항균활성을 나타낸다. Table 1에서 그람 양성균인 고초균과 젖산균에 대해서는 항균활성을 나타내지 않았는데 이것은 defensin의 specific activity가 낮기 때문으로 풀이된다.

이상의 연구 결과에 따라 항균활성을 보유한 곤충 defensin을 효모세포에서 분비가 가능하였고 이러한 결과는 곤충 defensin이 glucoamylase signal sequence와 MF α

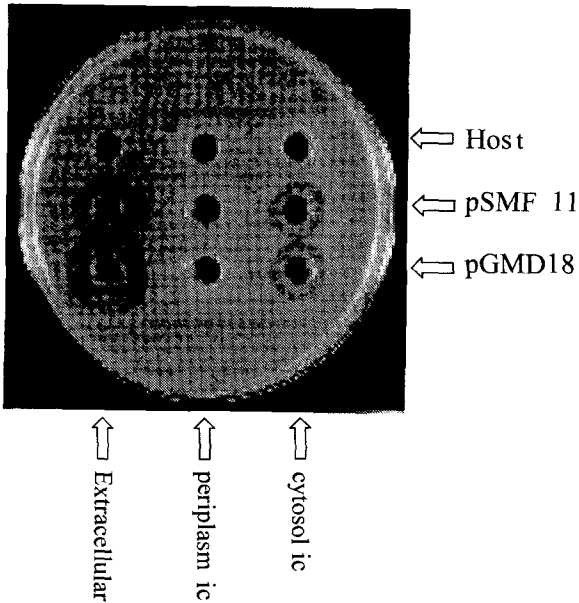


Fig. 4. Antibacterial activity of transformant with respect to subcellular fractions.

Nutrient broth agar plate was overlaid with 10ml of 0.8% top agar containing 1% log-phase cells of *M. luteus* and 9 wells were made on it. Yeast cultures were fractionated into extracellular, periplasmic and cytosolic fraction. 50 μ l of culture supernatant and 50 μ l of periplasmic and cytosolic fractions of 5-fold concentrate were loaded in each well and the plate was incubated at 37 $^{\circ}$ C. pGMD18 is a yeast expression vector for defensin constructed by using the promoter, signal sequence and presequence of Mf α 1[9].

Table 1. Antibacterial spectrum of defensin

Bacterial strain	Antibacterial activity
<i>B. cereus</i>	-
<i>B. coagulans</i>	-
<i>B. subtilis</i>	-
<i>St. aureus</i>	++
<i>S. typhimurium</i>	-
<i>L. monocytogenes</i>	+
<i>E. coli</i>	-
<i>L. mesenteroides</i>	-
<i>L. plantarum</i>	-
<i>L. acidophilus</i>	-

- : No inhibition zone

+ : Radius of inhibition zone, 0~5 mm

++ : Radius of inhibition zone, 5~10 mm

1 prosequence와의 융합 펩티드로 합성된 후 효모의 분비

경로를 지나면서 이들 서열들이 signal peptidase와 Kex2 endoprotease 등의 순차적인 작용에 의해 잘려져 최종적으로 항균활성이 있는 mature defensin 서열만 성공적으로 분비되기 때문이다.

요 약

효모 glucoamylase의 promoter와 분비신호서열 그리고 MF α 1의 prosequence를 이용하여 곤충 defensin을 *S. cerevisiae* 2805에서 항균활성을 보유한 형태로 발현 및 분비하는데 성공하였다. 발현된 defensin의 대부분이 세포 외로 분비되어 거의 모든 항균활성이 배양 상등액에 존재하였다. 이것은 *S. cerevisiae*에서 발현된 defensin이 glucoamylase의 분비신호서열과 MF α 1의 prosequence에 의해 효율적으로 processing되어 분비됨을 시사한다. Defensin의 다른 미생물에 대한 항균활성을 조사한 결과 병원균인 *St. aureus*와 *L. monocytogenes*에 대해서도 항균활성이 존재하였다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 연구비로 수행되었음을 밝히며 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Alves, A. L., G. W. De Samblanx, F. R. Terras, B. P. Cammue and W. F. Broekaert. 1994. Expression of functional *Raphanus sativus* antifungal protein in yeast. *FEBS Lett.* **348**, 228-232.
- Boman, H. G. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 61-92.
- Chalk, R., H. Townson, S. Natori, H. Desmond and P. J. Ham. 1994. Purification of an insect defensin from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **24**, 403-410.
- Cociancich, S., A. Ghazi., C. Hetru., J. A. Hoffmann, and L. Letrillier. 1993. Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.* **268**, 19239-19245.
- Dohmen, R. J., A. W. Strasser, C. B. Honer and C. P.

- Hollenberg. 1991. An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* **7**, 691-692.
6. Hammond, J. R. M. 1995. Genetically-modified brewing yeasts for the 21st century, progress to date. *Yeast* **11**, 1613-1627.
 7. Hermmi, H., J. Ishibashi, S. Hara and M. Yamakawa. 2002. Solution structure of moricin, an antibacterial peptide, isolated from the silkworm *Bombyx mori*. *FEBS Letters* **518**, 33-38.
 8. Hodgson, J. 1993. Expression systems : A user's guide. *Bio/Technology* **11**, 887-893.
 9. Kang, D. O., J. W. Lee, M. S. Kim, B. Y. Kim, T. I. Mheen and J. S. Ahn. 2000. Cultural characteristics of a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for the improved production of a antibacterial peptide defensin of fleshfly. *Kor. J. Microbiol.* **36**, 236-241.
 10. Hoffmann, J. A. and C. Hetru. 1992. Insect defensins : inducible antibacterial peptides. *Immunology Today* **13**, 411-415.
 11. Lehrer, R. I., M. Rosenman, S. S. Harwig, R. Jackson and P. Eisenhauer. 1991. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immunol. Methods* **137**, 167-173.
 12. Lundlad, V. 1989. *Saccharomyces cerevisiae* in *Current Protocols in Molecular Biology*. Unit 13.13. John Wiley & Sons, Inc., New York.
 13. Martin-Eauclaire, M.-F., M. Sogaard, C. Ramos, S. Cestele, P. E. Bougis and B. Svensson. 1994. Production of active, insect-specific scorpion neurotoxin in yeast. *Eur. J. Biochem.* **223**, 637-645.
 14. Nam, S. W., B. M Kim, B. H. Chung, D. O. Kang, and J. S. Ahn. 1994. Expression and secretion of human lipocortin-1 by promoter and signal sequence of *STA1* from *Saccharomyces diastaticus*. *Biotechnol. Lett.* **16**, 897-902.
 15. Pang, S. J., S. M. Oberhaust, J. L. Rasmussen, D. C. Knipple, J. R. Bloomquist, D. H. Dean, K. D. Bowman and J. C. Sanford. 1992. Expression of a gene encoding a scorpion insectotoxin peptide in yeast, bacteria and plant. *Gene* **116**, 165-172.
 16. Reichhart, J. M., I. Petit, M. Legrain, J. L. Dimarcq, E. Keppi, J. P. Lecocq, J. S. Hoffmann and T. Achsteter. 1992. Expression and secretion in yeast of active insect defensin, an inducible antibacterial peptide from the fleshfly *Phormia terranova*. *Invertebrate Reproduction and Development* **21**, 15-24.
 17. Romanos, M. A., C. A. Scorer and J. J. Clare. 1992. Foreign gene expression in yeast : a review. *Yeast* **8**, 423-488.
 18. Singh, A., E. Y. Chen, J. M. Lugovoy, C. N. Chang, R. A. Hitzeman and P. H. Seeburg. 1983. *Saccharomyces cerevisiae* contains two discrete genes coding for the α -factor pheromone. *Nucleic Acid Res.* **11**, 4049-4063.

(Received July 4, 2002; Accepted August 21, 2002)