

곤충세포주에서 누에신 단백질의 발현 및 특성구명

윤은영 · 구태원 · 황재삼 · 김상현 · 강석우 · 김근영 · 진병래¹
농촌진흥청 농업과학기술원 잠사곤충부, ¹동아대학교 생명자원과학부

Characterization and Expression of Antibacterial Protein Gene, Nuecin

Eun Young Yun, Tae Won Goo, Jae Sam Hwang, Sang Hyun Kim,
Seok Woo Kang, Keun Young Kim and Byung Rae Jin¹

Department of Sericulture and Entomology, NIAST, RDA, Suwon 441-100, Korea
¹College of Natural Resources and Life Science, Dong-A, Busan 607-714, Korea

ABSTRACT

The antibacterial protein gene, nuecin was expressed in Sf9 cells using baculovirus expression vector system (BEVS). The antibacterial activity of mature nuecin against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Ralstonia solanacearum* and *Pseudomonas tolaasii* was significantly high, demonstrating that nuecin had a wider antibacterial spectrum on gram negative and positive bacteria. The result appears to be superior to other antibacterial peptide, attacin. The nuecin was purified by SP-sepharose and Mono Q HR ion-exchange chromatography, and then by Superdex 200 HR 10/30 column. The purified nuecin is quite stable at 80°C and 100°C for several hours of incubation and in a wide pH range (pH 2-12).

Key words : BEVS (baculovirus expression vector system), antibacterial protein gene, nuecin

서 론

곤충은 미생물이나 외부 물질 등의 침입에 대한 생체방어 수단으로 식작용(phagocytosis), 결절형성(nodule formation), 캡슐 형성(capsule formation) 등으로 침입 물질을 제거하는 세포성 면역와 지방체와 혈구에서 단백질을 합성한 후 혈림프로 분비하여 미생물을 제거하는 체액성 면역을 가지고 있다(Boman and Hultmark, 1987; Dunn, 1986). Boman과 Hultmark(1981)는 표피의 상처 또는 세균이나 lipopolysaccharide (LPS) 등의 체강주입으로 면역유도한 산누에나방과의 세크로피아잠(*Hyalophora cecropia*)으로부터 cecropin, lysozyme, hemolin 및 attacin 등의 항세균 활성을 나타내는 단백질을 분리하였다. 그밖의 생체방어에 관련된 단백질로 apidaecin, defensin, dipterin, hypancin 등이 보고되고 있다(Casteels *et al.*, 1989; Lambert *et al.*, 1989; Dimarcq *et al.*, 1988; Park *et al.*, 1994).

이 중 attacin은 약 20~23 kDa의 분자량을 가지는 펩타이드로, 지금까지 보고된 6가지의 형태 중 4가지는 염기성이고 2가지는 산성의 등전점을 나타낸다(Dunn, 1986). 산성 attacin은 19개 아미노산의 preprosequence와 28개 아미노산의 prosequence로 이루어졌고, 염기성 attacin은 17개

아미노산의 preprosequence와 29개 아미노산의 prosequence로 구성되어 있다. 전구체 형태의 preproattacin은 소포체(endoplasmic reticulum)로 수송된 후(Simon and Blobel, 1991) 2개의 염기성 잔기(arginine-arginine)를 인식하는 효소(signal peptidase)에 의해 signal peptide가 제거되어 mature attacin으로 전환되고(Pfeffer and Rothman, 1987), N-말단의 glutamine이 pyroglutamyl로 전환되면서 혈림프로 분비되어 생물학적 활성을 나타낸다(Gunne *et al.*, 1990).

또한 항세균 활성 기작에 있어서 cecropin은 세균의 막을 파괴하는 작용을 하고, *Sarcophaga peregrina*에서 분리된 attacin과 유사한 단백질인 sarcotoxinIIA는 세균의 세포벽 합성을 저해하는 작용을 한다(Ando and Natori, 1988; Kanai and Natori, 1990). 그리고 attacin은 세균 피막 단백질의 생합성을 저해하고(Carlsson *et al.*, 1991) *E. coli*의 외막을 침해하여 cecropin이나 lysozyme의 항세균 활성을 증진시키나, 그 항세균 활성이 단지 수종의 그람 음성 세균에 국한되어져 있다(Engstöm *et al.*, 1984). 한편 누에로부터 분리된 attacin 유사 펩타이드는 cDNA의 크기가 846 bp로 보고되었으나, 항세균 활성의 스펙트럼은 아직 보고되지 않았다(Sugiyama *et al.*, 1995).

본 연구에서는 집누에(*Bombyx mori*)로부터 분리한 항세

균성 단백질인 누에신 유전자를 baculovirus 발현 벡터 시스템을 이용하여 곤충세포주에서 발현하고 식물 세균병 유래의 다양한 세균에 대한 항세균 활성을 검정하였으며, 단백질을 순수 분리하여 그 성상을 구명하였다.

재료 및 방법

1. Inhibition zone assay

항세균 활성은 재조합 바이러스(vAc-nucenin)를 Sf9 세포에 감염시킨 후 4일 경과된 세포 배양액 40 ml(0.5×10^6 cells/ml, 접종농도 1 MOI)을 농축한 후 inhibition zone assay 방법(Lambert *et al.*, 1989)으로 검정하였다. 멸균 petri dish(87×15 mm)에 대수기의 세균(2×10^5 cells/ml)이 포함된 아가배지(1% nutrient agar, pH 7.2)를 5 ml씩 분주하여 응고시켰다. 여기에 직경 6.1 mm paper disc(Whatman 3MM)를 놓고 각 disc 당 농축된 세포 배양액(0.4, 0.8 및 1.2 μm nucenin)을 적하하고 28°C에서 배양한 후, 형성된 성장 억제환(clear zone)의 크기를 측정하였다. 항세균성 검정을 위한 대상 균주로는 주요 농작물의 세균병을 일으키는 4종의 그람 음성 세균(*Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* KACC 10401, *Ralstonia solanacearum* KACC 10475, *Pseudomonas tolaasii* KACC 10038, *Xanthomonas campestris pv. campestris* KACC 10377)을 농업과학기술원 분자유전과의 한국 농용미생물 보존센터(KACC)에서 분양받아 사용하였다.

2. 재조합 누에신 단백질 순수분리

누에신 단백질을 순수분리하기 위해 Sf9 곤충세포주에서 무혈청 배지를 이용하여 약 1 l의 재조합 누에신 단백질을 생산한 후 시료로 사용하였다. 우선적으로 ion exchange chromatography를 통한 누에신 단백질 분리를 위해 양이온 교환 수지인 SP-sepharose column을 이용하였고, 그 다음 음이온 교환 수지에 의한 누에신 단백질 분리하기 위해 DE-52 및 Mono Q HR column을 이용하여 분리한 각각의 fraction에 대해 SDS-PAGE 및 inhibition zone assay를 수행하여 활성이 있는 누에신 단백질의 존재를 확인하였다. 그리고 활성이 있는 fraction만을 취해 Superdex 200 HR 10/30 column을 이용하여 gel filtration chromatography를 수행하였으며 누에신 순수분리를 위한 전 과정은 ÄKTA purifier(Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 수행하였다.

3. 누에신 단백질의 pH 및 온도 안정성

농도 3 μg/ml의 누에신 단백질 5 μl씩을 pH 2~12까지 조정된 완충액 15 μl와 혼합한 뒤 25°C에서 30분간 유지

하였다가 *E. coli*에 대한 항세균 활성을 측정하였다. 각 pH 완충액은 0.1 M HCl-KCl(pH 2.0), 50 mM citric acid-sodium citrate buffer(pH 4.0, 6.0), 0.1 M 인산 완충액(pH 8.0), NaHCO₃-NaOH buffer(pH 10.0), Na₂HPO₄-NaOH buffer(pH 12.0) 등을 이용하였다.

온도 안정성 조사는 증류수에 녹인 누에신 단백질을 80°C와 100°C에서 수분에서 수시간 동안 처리한 후 inhibition zone assay에 의해 항세균 활성 변화를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 누에신 단백질의 항세균 활성 검정

비병원성 세균인 대장균을 누에에 체강주사하여 유도된 유전자로부터 항세균성 단백질 누에신 유전자를 선별한 후, 이 유전자를 곤충 핵다각체 바이러스 게놈에 도입하여 재조합 바이러스를 만들었다. 그리고 이 재조합 바이러스를 곤충세포주인 Sf9 세포에 감염시켜 재조합 누에신 단백질을 생산하였다. 곤충세포주에서 누에신 유전자의 전사체를 분석한 결과, 누에신 유전자의 주 전사체는 약 950 bp 정도의 크기임을 확인할 수 있었으며, 세포내에서 발현된 누에신 단백질의 분자량은 약 23 kDa이었고 signal peptide가 절단된 후 세포외로 분비된 활성을 가지는 성숙 누에신 단백질은 세포내에서 발현된 누에신 단백질의 분자량에 비해 약 3 kDa이 감소된 약 20 kDa의 밴드를 나타내었다(Yun *et al.*, 1997). 이러한 결과로부터 누에신 단백질은 세포내에서 번역 후 변형과정(post-translational modification)을 통해 arginine-arginine을 인식하는 효소에 의해 signal peptide가 제거된 후 N-말단의 glutamine이 pyroglutamyl로 전환되면서 활성을 띠는(Pfeffer & Rothman, 1987; Gunne 등, 1990) 성숙 누에신 단백질이 세포외로 분비되는 것으로 추정할 수 있었다. 그리고, 세포외로 분비된 성숙 누에신 단백질의 발현량을 측정한 결과, 세포 배양액 1 ml당 약 2 μg의 누에신 단백질이 세포외로 분비됨을 알 수 있었다.

한편 세포외로 분비되는 분비형 항세균성 단백질인 누에신의 분자량의 크기를 고려하여 의학용보다는 농업용 항세균 재재로서의 응용 가능성을 모색해 보았다. 우선 곤충 세포내에서 발현 되어 세포외로 분비된 성숙 누에신 단백질의 여러 가지 유용작물에서 문제시되는 세균에 대한 항세균 활성 및 스펙트럼을 조사하기 위하여, 농업과학기술원 분자유전과의 한국 농용미생물 보존센터(KACC)로부터 감자 고추의 무름병을 일으키는 *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* KACC 10401, 가지 및 고추의 풋마름병을 일으키는 *Ralstonia solanacearum* KACC 10475, 양송이 버섯의 세균성 갈색 무늬병을 일으키는 *Pseudomonas tolaasii* KACC 10038, 무 및 배추의 검은색무늬병을 일으키는

Xanthomonas campestris pv. *campestris* KACC 10377을 분양받아 공시균주로 사용하였다. 분양받은 주요 농작물의 세균병을 일으키는 4종의 그람음성 세균(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas tolaasii*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)에 대한 inhibition zone assay는 각종의 검정용 세균이 함유된 nutrient agar, *Pseudomonas* agar F 및 yeast extract glucose carbonate 배지상의 3 MM paper에 약 0.4, 0.8 및 1.2 µg의 누에신 단백질을 적하한 후, 28°C에서 16시간 배양하여 형성된 억제환의 크기를 조사하였다. 그 결과 가지, 감자 고추의 무름병을 일으키는 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, 가지 및 고추의 풋마름병을 일으키는 *Ralstonia solanacearum*, 양송이 버섯의 세균성 갈색 무늬병을 일으키는 *Pseudomonas tolaasii*에 대해서 항세균활성을 나타냄을 관찰하였고 무 및 배추의 검은 썩음병을 일으키는 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*에 대해서는 항세균 활성을 나타내지 않았다(Table 1).

따라서 이상에서 언급한 누에신 단백질이 감자 고추의 무름병, 가지 및 고추의 풋마름병, 양송이 버섯의 세균성 갈색 무늬병에 대해서 항세균성을 나타내므로 생물농약으로서의 이용 가능성이 높을 것이라 사료되며, 이 중 특히 버섯 재배에서 가장 문제시되는 세균의 갈색 무늬병의 경우 일반작물과는 다르게 농약사용에 의한 높은 방제 효과가 없

고 예방에 의해 튼튼하게 키우는 것밖에 별다른 방제 방법이 없으므로 누에신 단백질의 항세균성 제제로 사용시 보다 적합한 작물로 판단되었다. 그리고 추후 이러한 농업용 항세균성 제제로서의 누에신 단백질의 실용화를 위해 경제적인 측면을 고려하여 대량생산 및 형질전환 작물창출 등에 관한 연구가 요구된다.

2. 누에신 단백질의 순수분리 및 성상구명

누에신 단백질을 순수분리하기 위해 Sf9 곤충세포주에서 무혈청 배지를 이용하여 약 1 l의 재조합 누에신 단백질을 생산한 후 원심분리하여 세포의 잔존물을 제거하고 항세균 활성을 갖는 세포외로 분비된 성숙 누에신 단백질이 포함된 상등액을 취한 후 0.45 µm 필터를 통과시킨 뒤 정제과정에 이용하였다. 이 시료를 ÄKTA purifier(Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 양이온 교환 칼럼을 분당 1 ml의 유속으로 용출시키고 280 nm에서 자외선 흡광도 측정하여 피크를 나타내는 분획만을 취하여 항세균 활성을 조사한 결과 양이온 칼럼을 통과한 분획에서는 항세균 활성을 확인할 수 없었으므로 누에신 단백질이 음이온 단백질을 추정할 수 있었다. 그리고 음이온 교환 칼럼을 이용하여 피크를 나타내는 분획을 취하여 *E. coli*에 대한 inhibition zone assay 방법으로 항세균 활성을 확인한 결과 그림 1에서의 19번 분획에서 분리한 단백질이 항세균 활성을 나타내었고, 또한

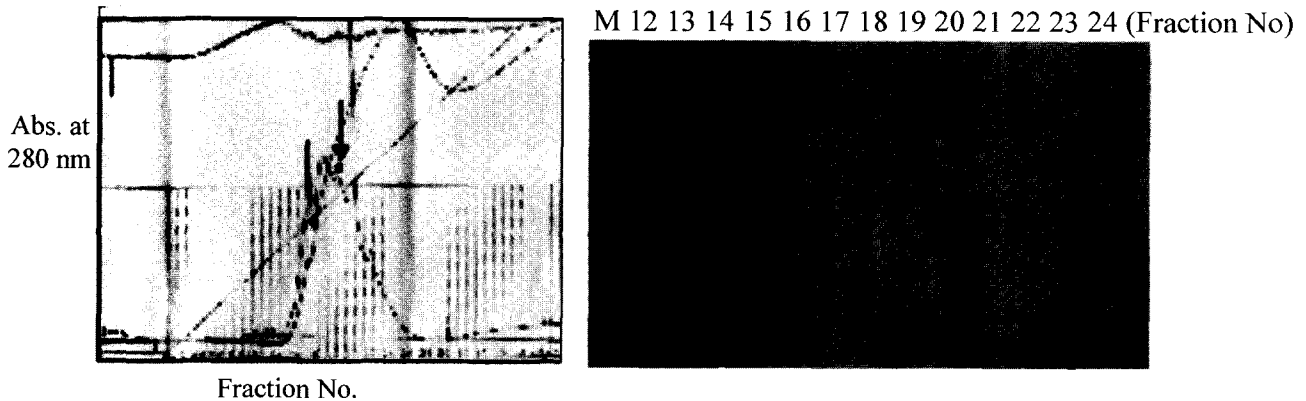


Fig. 1. Chromatogram of nuecin by Mono Q HR column. Each peak fraction (left panel) was collected and analyzed by SDS-PAGE (right panel) and inhibition zone assay. An arrow indicates the purified nuecin.

Table 1. Antibacterial activity of the mature nuecin. The antibacterial activity was determined by the clear zone size of 1.2 µg inoculum in the inhibition zone assay as follows: +, 10 to 15 mm; ++, 15 to 20 mm; -, no inhibition

Microorganism	Scientific name	Antibacterial activity
Bacteria (Gram-Negative)	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	++
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	+
	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	-
	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	++

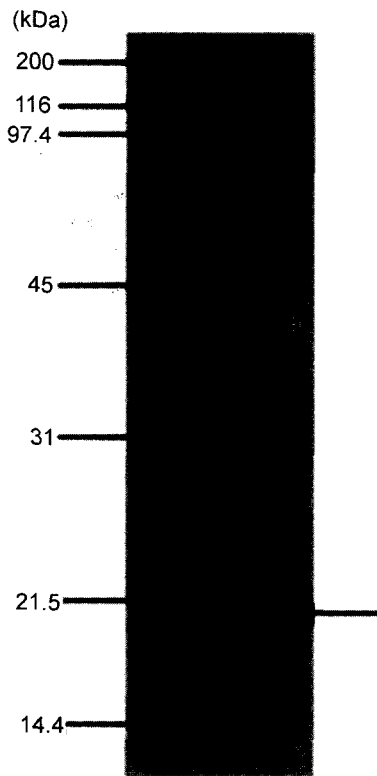


Fig. 2. SDS-PAGE of nuecin protein purified through Mono Q HR and Superdex 200 HR column. An arrow indicates the purified nuecin.

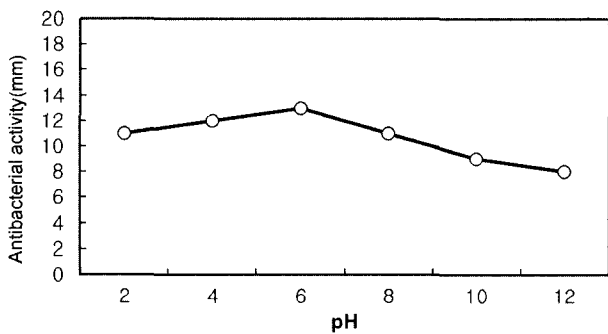


Fig. 3. pH stability of nuecin protein.

SDS-PAGE 결과 누에신 단백질 밴드를 확인할 수 있었으므로 누에신 단백질이 19번 fraction 내에 존재함을 확인할 수 있었다.

그 후 항세균 활성을 나타내는 19번 분획만을 취하여 Superdex 200 HR 10/30 칼럼을 이용하여 gel filtration chromatography를 수행하여 세포외로 분비된 약 20 kDa의 누에신 단백질을 순수 분리하였다(Fig. 2).

정제된 누에신 단백질의 pH 및 온도에 대한 안정성을 조사한 결과, pH 2~12 완충액에서 30분간 처리하였을 때

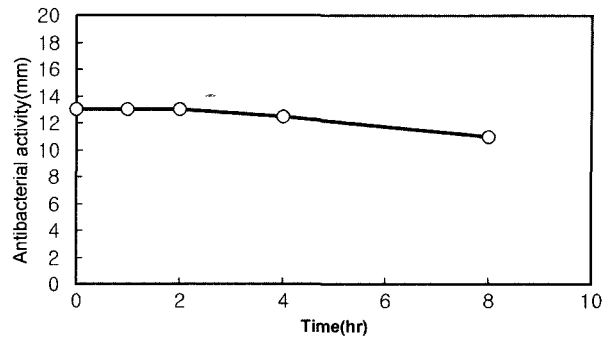


Fig. 4. Thermal stability of nuecin protein at 100°C.

에도 항세균활성이 그대로 유지되었고(Fig. 3), 100°C에서 2시간 및 4시간 처리시 2시간 처리구에서는 활성이 안정적이었으며 4시간 처리구도 80% 정도의 안정성을 유지하고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

따라서 누에신 단백질의 경우 여러 가지 농작물의 세균병의 균주에 대해 항세균 활성을 나타낼 뿐만 아니라 pH 및 온도에 대해서도 안정성을 나타내므로 추후에 생물 농약 등 농업용 소재로서 응용이 가능하리라 사료되었다.

적 요

본 연구는 곤충 유전자를 이용한 항세균성 펩타이드 생산 및 농업용 소재로서의 응용에 관한 연구로서 항세균성 단백질 누에신 유전자를 벡클로 바이러스 발현계(BEVS)를 이용하여 곤충세포주에서 발현한 후 누에신 단백질의 농업용 소재로서의 가능성을 모색하기 위해 농작물을 가해하는 감자 고추의 무름병을 일으키는 *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*, 가지 및 고추의 풋마름병을 일으키는 *Ralstonia solanacearum*, 양송이 버섯의 세균성 갈색 무늬병을 일으키는 *Pseudomonas tolaasii* 및 무와 배추의 검은썩음병을 일으키는 *Xanthomonas campestris pv. campestris*에 대해서 항세균 활성을 관찰하였다. 그 결과 *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*, *Ralstonia solanacearum* 및 *Pseudomonas tolaasii*에 대해 높은 활성을 나타내었으며 *Xanthomonas campestris pv. campestris*에는 활성을 나타내지 않았다. Ion exchange 및 gel filtration chromatography를 수행하여 약 20 kDa의 성숙 누에신 단백질을 순수 분리하여 pH 및 온도에 대한 안정성을 조사한 결과, pH 2~12 완충액에서 30분간 처리하였을 때에도 항세균 활성이 그대로 유지되었고 100°C에서 2시간 처리시에는 활성이 안정되었으며 4시간 처리시에도 80% 정도로 유지됨을 확인함으로써 누에신 단백질은 pH 및 온도에 대한 안정성이 있음을 확인할 수 있었다.

인용문헌

- Ando, K. and Natori, S. (1988) Molecular cloning, sequencing, and characterization of cDNA for SarcotoxinIIA, an inducible antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *Biochemistry*. **27**: 1715-1721.
- Boman, H. G. and Hultmark, H. G. (1981) Cell free immunity in insects. *Trends Biochem. Sci.* **6**: 306.
- Boman, H. G. and Hultmark, D. (1987) Cell-free immunity in insects. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 103-216.
- Carlsson, A., Engstrom, P., Palva, E. T. and Bennich, H. (1991) Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with omp gene transcription. *Infect. Immuno.* **59**: 3040-3045.
- Carsteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M. and Tempst, P. (1989) Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.* **8**: 2387-2391.
- Dimarcq, J. L., Keppi, E., Dunbar, B., Lambert, J., Reichhart, J. M., Hoffmann, D., Rankine, S. M., Fothergill, J. E. and Hoffmann, J. A. (1988) Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranova* and complete amino-acid sequence of the predominant member, dipteracin A. *Eur. J. Biochem.* **171**: 17-22.
- Dunn, P. E. (1986) Biochemical aspects of insect immunology. *Annu. Rev. Entomol.* **31**: 321-329.
- Engström, P., Carlsson, A., Engström, A., Tao, Z. T. and Bennich, H. (1984) The antibacterial effect of attacins from the silkworm *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *E. coli*. *EMBO J.* **3**: 3347-3351.
- Gunne, H., Hellers, M. and Steiner, H. (1990) Structure of preproattacin and its processing in insect cells infected with a recombinant baculovirus. *Eur. J. Biochem.* **187**: 699-703.
- Kanai, A. and Natori, S. (1990) Analysis of a gene cluster for SarcotoxinII, a group of antibacterial proteins of *Sarcophaga peregrina*. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 6114-6122.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Lambert, J., Keppi, E., Dimarcq, J., Wicker, c., Reichhart, J., Dunbar, B., Lepage, P., Dorsselaer, A., Hoffmann, J., Fothergill, J. and Hoffmann, D. (1989) Insect immunity. Isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 262-266.
- Park, H. Y., Park, S. S., Park, D. S., Shin, S. W. and Joo, C. K. (1994) Bacteria-induced antibacterial peptide, Hyphancin from the fall webworm, *Hyphantria cunea*. *Korean J. Entomol.* **24**: 191-198.
- Pfeffer, S. R. and Rothman, J. E. (1987) Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and golgi. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 829-852.
- Simon, S. M. and Blobel, G. (1991) A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell*. **65**: 371-380.
- Sugiyama, M., Kuniyoshi, H., Kotani, E., Taniai, K., Kadono, O. K., Kato, Y., Yamamoto, M., Shimabukuro, M., Chowdhury, S. K., Xu, J., Kataoka, H., Suzuki, A. and Yamakawa, M. (1995) Characterization of a *Bombyx mori* cDNA encoding a novel member of the attacin family of insect antibacterial proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**: 385-392.
- Yun, E. Y., Kim, S. H., Kang, S. W., Jin, B. R., Kim, K. Y., Kim, H. R., Han, M. S. and Kang, S. K. (1997) Molecular cloning and expression of the novel attacin-like antibacterial protein gene isolated from the *Bombyx mori*. *Korean J. Appl. Entomol.* **36**(4): 331-340.