

박테리오파아지 표면 발현 시스템을 이용한 *Maackia amurensis* Hemagglutinin (MAH)의 기능적 발현

임 미 정[#]

숙명여자대학교 약학대학

(Received April 3, 2003; Revised May 16, 2003)

Functional Display of *Maackia amurensis* Hemagglutinin (MAH) on Bacteriophage

Mijung Yim[#]

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Abstract — A library of unlimited number of novel lectins with diverse specificities has been previously generated by randomly mutating the carbohydrate-recognition domain of *Maackia amurensis* hemagglutinin (MAH). To establish the experimental environment capable of selecting high affinity mutant lectins in *E. coli*, phage display system was adapted. Carbohydrate binding capacity of two phagemid vectors, pComb3 and pComb8 displaying wild-type MAH lectin was assessed. Specific bindings of pComb3 and pComb8 phages expressing wt. MAH to affinity-purified polyclonal anti-MAH antibody and to glycophorin was demonstrated. Both phages also showed strong hemagglutinating activity to intact but not sialidase-treated human erythrocytes, which is consistent to the specificity of native MAH. Taken together, two different phage display vectors successfully allowed the expression of active MAH as a fusion protein on the surface of bacteriophage, which will lead to preparation of unique plant lectins with high affinity toward a variety of carbohydrate chains.

Keywords □ Lectin, *Maackia amurensis* hemagglutinin (MAH), phage display system

박테리오파아지는 그 사용의 편리함과 유효성으로 인해 cDNA 라이브러리와 유전체 라이브러리의 제작에 널리 이용되어져 왔다. 또한 최근에는 박테리오파아지의 섬모에 재조합 항체 라이브러리를 융합단백질의 형태로 발현시켜 목적의 항체를 얻는 파아지 표면 발현 시스템(phage display system)이 개발되었다.¹⁾ 이로 인해 기존의 방법으로는 얻을 수 없는, 많은 중요한 단백질에 대한 항체를 인공적으로 얻을 수 있는 길이 열려 생물학적 연구에 크게 이바지하게 되었다. 그러나 파아지 표면 발현 시스템을 이용하여 재조합 항체 라이브러리를 제작하였을 경우, anti-protein 항체는 항원-항체간 결합력이 커 용이하게 얻어질 수 있는 반면, anti-carbohydrate 항체는 결합력이 작아 쉽게 얻어질 수 없다는 단점이 있다.²⁾

Carbohydrate는 세포표면에 있어서 생체 정보의 전달, 세포의 형성, 단백질 분자의 고차구조의 유지 등 단백질과 핵산에 이은 제3의 생체성분으로서 생체 기능의 발현과 조절에 중요한 기능

을 담당하고 있는 것으로 알려져 있다.^{3,4)} 만약 carbohydrate를 인식하는 항체이외의 분자를 파아지 표면 발현 시스템으로 인공적으로 얻을 수 있는 방법이 개발된다면 carbohydrate의 생물학적 의미를 해명하고 그 존재가치를 밝히는 연구에 크게 이바지할 것이다.

이에 본 연구자는 선행연구에서 항체 이외의 carbohydrate 인식분자, 즉 식물렉틴의 하나인 *Maackia amurensis* hemagglutinin (MAH)를 유전 공학적 방법으로 변형시켜 서로 다른 구조의 carbohydrate를 인식 가능한 재조합 렉틴 라이브러리를 제작한 바 있다.⁵⁾ 본 연구에서는 재조합 렉틴 라이브러리로부터 자연에는 존재하지 않는, 새로운 carbohydrate 인식 능력을 가지는 렉틴을 선별할 수 있는 실험계를 확립하기 위해, phage display system을 도입해 MAH를 파아지 표면에 최적으로 발현할 수 있는 박테리오파아지 운반체를 검토하였기에 이에 보고한다.

실험방법

재조합 파아지의 제작

wt. MAH의 cDNA는 *Spe* I과 *Xho* I으로 잘라 파아지미드 운

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-710-9572 (팩스) 02-715-9498
(E-mail) myim@sookmyung.ac.kr

반체인 pComb3와 pComb8에 각각 삽입하였다. 재조합 파이지 미드 운반체는 대장균 SURE 세포(Stratagene, La Jolla, CA)에 형질전환한 후, HEM 고체배지(24 g/l tryptone, 48 g/l yeast extract, 10 g/l MOPS, pH 7.0, agar 15 g/l)에서 37°C, 8시간 배양하였다. 100 ml의 HEM 액체배지(24 g/l tryptone, 48 g/l yeast extract, 10 g/l MOPS, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂, pH 6.9)로 세포를 희석한 후 37°C에서 1~2시간 배양하였다. 새로운 100 ml의 배지에 A₆₀₀=0.3이 되도록 세포를 희석한 후 VCSM13 helper 파이지 (~10¹² pfu; Stratagene, La Jolla, CA)로 감염시켰다. 30°C에서 12시간 진탕 배양한 배양액을 polyethylene glycol 8000과 NaCl로 농축시켜 Tris 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% bovine serum albumin)으로 현탁시킨 후 실험에 사용하였다.

ELISA

Microtiter plate(Costar 3690)를 2 µg의 정제된 anti-MAH 폴리클로날 항체 또는 Glycophorin(Sigma, St. Louis, MO)으로 4°C에서 하룻밤 부착시켰다. 각 well을 3%(w/v) BSA로 실온에서 2시간 차단시킨 후 ~10⁹ cfu 재조합 파이지를 가하여 실온에서 3시간 반응시켰다. 0.2% tween-20을 함유하는 TBS로 3번 세척한 후 결합한 파이지는 HRP-conjugated anti-M13 항체(Amersham pharmacia biotech UK Ltd., England)로 검출하였다.

적혈구 응집 반응

사람 적혈구의 sialidase 처리는 다음과 같이 하였다. PBS (pH 6.0) 용의 2% 적혈구 현탁액에 30 mU/ml의 sialidase(Nacalai Tesque, Japan)를 가한 후 37°C에서 8시간 약하게 흔들여 주었다. 반응이 끝난 적혈구는 TBS로 5번 세척하였다. 5배 희석 계열의 재조합 파이지 100 µl를 sialidase 처리 또는 무처리의 3% 적혈구 현탁액 50 µl에 가하여 실온에서 2시간 반응시킨 후 1 ml의 찬 TBS로 3번 세척하였다.

반응이 끝난 적혈구는 10 µg/ml의 sheep anti-M13 항체(5 prime-3 prime, Boulder, CO) 100 µl에 재현탁시킨 후 둥근 밑면의 96 well plate에 옮겨 2시간 방치한 후 응집여부를 판단하였다.

실험결과

박테리오파지 표면상의 wt. MAH의 발현

wt. MAH가 박테리오파지 표면에 발현될 수 있는지 검토하기 위해, 먼저 2종류의 서로 다른 박테리오파지 운반체, λ fo_o^{6,7}와 T7(Novagen Inc., Madison, USA)을 사용하였다. λ fo_o는 파이지 tail의 주 단백질인 V 단백질에, 그리고 T7은 파이지 Capsid

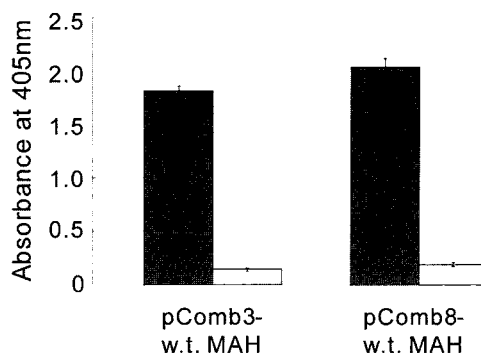


Fig. 1 – Binding of pComb3 and pComb8 phages expressing wt. MAH to anti-MAH polyclonal antibody versus BSA. *gray bars*, anti-MAH polyclonal antibody; *white bars*, bovine serum albumin (BSA).

의 주단백질인 10B 단백질에 외래 단백질을 융합된 형태로 발현시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 실험 결과, wt. MAH의 발현이 파이지 증식을 늦추기 때문에 두 파이지 운반체 모두 MAH의 파이지 표면 발현 시스템에는 적합하지 않은 것으로 밝혀졌다 (미공개 실험 결과). 이로 인해 다음은 파이지미드 운반체를 검토하게 되었다.

본 연구에서 사용한 파이지미드 운반체는 pComb3와 pComb8으로, 두 파이지미드 운반체는 삽입된 DNA를 minor coat 단백질 III(pComb3) 또는 major coat 단백질 VIII(pComb8)의 C-말단에 외래 단백질로 발현 가능하도록 설계되었다.^{8,9,10} pComb3는 표면에 오직 단일의 외래 단백질을 발현하는 것에 비해 pComb8은 다수의 단백질을 발현하는 것으로 알려져 있다.^{8,9,10} 파이지 표면 발현 시스템을 통한 재조합 파이지의 선별은 파이지 표면의 단백질 발현 효율에 크게 좌우되므로,¹¹ 두 파이지미드의 wt. MAH 발현 정도를 비교 검토하였다.

먼저 파이지상의 wt. MAH의 발현을 anti-MAH 폴리클로날 항체를 이용한 ELISA로 확인하였다. 대조군으로는 Bovine serum albumin(BSA)를 사용하였다. wt. MAH를 발현한 pComb3, pComb8 모두 BSA와는 달리 anti-MAH 폴리클로날 항체에 특이적인 반응을 보여, wt. MAH가 파이지 표면에 성공적으로 발현되었음을 알 수 있었다(Fig. 1).

재조합 파이지의 생물학적 활성

MAH는 *Maackia amurensis* 종자에서 정제된 콩과 식물 렉틴의 하나로 강한 적혈구 응집능력을 가지는 것으로부터 *Maackia amurensis* hemagglutinin이라 명명된 바 있다.¹² 또한 MAH가 인식하는 carbohydrate의 구조는 Neu5Aco2-3Galβ1-3(Neu5Aco2-6)GalNac의 4탄당으로,¹³ sialic acid를 포함한 carbohydrate를 인식하는데 중요한 MAH의 아미노산이 최근 밝혀지기도 하였다.^{14,15,16} 따라서 재조합 파이지의 carbohydrate 결합 능력을 적혈구 응집실험으로 측정하였다. 특히 sialic acid에 특이적인 반

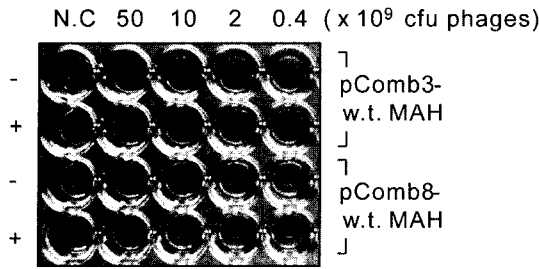


Fig. 2 – Hemagglutination activity of pComb3 and pComb8 phages expressing w.t. MAH. Negative reactions show sharp ~2 mm diameter erythrocyte spots whereas the erythrocytes in agglutinated wells form a thin carpet coating the entire floor of the wells. - : sialidase-untreated, + : sialidase-treated, N.C. : Control pComb3 or pComb8 phages.

응을 확인하기 위해 sialidase 처리한 적혈구도 함께 사용하였다. w.t. MAH를 발현하는 pComb3, pComb8은 사람 적혈구에 특이적으로 반응하였으며, 그 반응은 sialic acid가 존재하지 않을 경우 나타나지 않았다(Fig. 2). 이것은 위에서도 언급했듯이 w.t. MAH가 sialic acid에 특이적인 반응을 보이는 사실과 일치하는 결과이다. 적혈구 응집에 필요한 최저 titer는 각각 1×10¹⁰ cfu로, 대조군으로 사용한 pComb3, pComb8 자체는 반응을 보이지 않았다(Fig. 2).

파이지 표면에 발현된 w.t. MAH의 생물학적 활성을 보다 정확히 조사하기 위해, 사람 적혈구 표면 분자이자 MAH가 인식 가능한 4탄당을 함유하는 glycoporphin에 대한 결합을 ELISA로 측정하였다. Fig. 3에서 보듯이 두 파이지 모두 농도 의존적인 결합을 보였으나, 예상과 달리 파이지 1개당 단일의 MAH를 발현하는 pComb3가 복수의 MAH를 발현하는 pComb8 보다 강한 생물학적 활성을 지니는 것으로 나타났다. ELISA로 측정 가능한 pComb3의 최저 titer는 약 8 × 10⁶ cfu였다. 본 연구로 w.t.

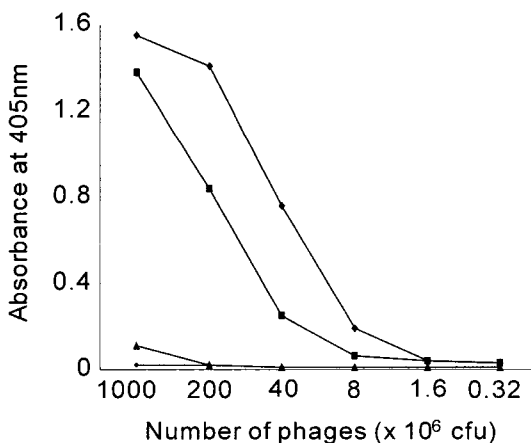


Fig. 3 – Comparison of binding of recombinant phages to glycoporphin. triangle, pComb3; circle, pComb8; diamond, pComb3-w.t. MAH; square, pComb8-w.t. MAH.

MAH의 발현에는 phage 운반체보다 phagemid 운반체가 적합하며 박테리오파지 표면에 발현된 w.t. MAH는 그 carbohydrate 인식 특이성을 유지하고 있음이 명백해졌다.

고찰 및 결론

최근 DNA array를 사용하여 유전자의 발현 패턴을 분석함으로써 생체 활성 분자의 기능을 밝히려는 시도가 각 방면에서 이루어지고 있다. 그러나 생체 활성 분자의 기능은 오직 유전자 발현에 의해서만 결정되는 것이 아니며 glycosylation과 같은 번역 후 수식(post-translational modification) 또한 중요한 역할을 한다. 이는 포유동물 세포가 다양한 구조의 carbohydrate를 지니며, 이들이 생체 기능의 조절에 크게 관여하고 있다는 사실^{17,18}과도 일맥상통하는 것이라 할 수 있다. 그러나 극히 제한적인 carbohydrate 구조 분석 기술로 인해 생체 활성분자의 기능 해석이 어려움을 겪고 있는 실정이다. 본 연구에서는 그러한 구조적 차이를 밝히는 식물 렉틴을 MAH의 유전공학적 조작으로부터 얻고자 파이지 표면 발현 시스템을 이용한 실험계를 확립하였다. 이 실험계를 사용하여 다양한 구조의 carbohydrate을 인식 가능한 각종 렉틴을 인공적으로 얻을 수 있는 길이 열렸으며 이는 향후 carbohydrate의 존재 의의 해명에 크게 이바지할 것으로 생각된다. 또한 지금까지 보고된 파이지 표면 발현 시스템은 펩타이드 또는 재조합 항체 등에 한정되어 있었으나, 본 연구로 식물 렉틴인 MAH를 박테리오파지 표면에 처음으로 발현 가능케 되었고 이는 파이지 표면 발현 시스템의 적용 범위 확대에 유용한 정보가 될 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 숙명여자대학교 2002년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

- 1) Watkins, N. A. and Ouweland, W. H. : Introduction to antibody engineering and phage display. *Vox Sang* **78**, 72 (2000).
- 2) Wang, L., Anaraki, F., Henion, T. R. and Galili, U. : Variations in activity of the human natural anti-Gal antibody in young and elderly populations. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **50**, M227 (1995).
- 3) Kobata, A. : A journey to the world of glycobiology. *Glycoconj. J.* **17**, 443 (2000).
- 4) Hakomori, S. : Glycosylation defining cancer malignancy : new wine in an old bottle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 10231 (2002).

- 5) Yim, M., Ono, T. and Irimura, T. : Mutated plant lectin library useful to identify different cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 2222 (2001).
- 6) Maruyama, I. N., Maruyama, H. I. and Brenner, S. : Lambda phage: a lambda phage vector for the expression of foreign proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 8273 (1994).
- 7) Kuwabara, I., Maruyama, H., Mikawa, Y. G., Zuberi, R. I., Liu, F. T. and Maruyama, I. N. : Efficient epitope mapping by bacteriophage lambda surface display. *Nat. Biotechnol.* **15**, 74 (1997).
- 8) Farbas, C. F. 3rd, Kang, A. S., Lerner, R. A. and Benkovic, S. J. : Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 7978 (1991).
- 9) Fang, A. S., Jones, T. M. and Burton, D. R. : Antibody redesign by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 11120 (1991).
- 10) Huse, W. D., Stinchcombe, T. J., Glaser, S. M., Starr, L., MacLean, M., Hellstrom, K. E., Hellstrom, I. and Yelton, D. E. : Application of a filamentous phage pVIII fusion protein system suitable for efficient production, screening, and mutagenesis of F(ab) antibody fragments. *J. Immunol.* **149**, 3914 (1992).
- 11) Wang, L., Radic, M. Z., Siegel, D., Chang, T., Bracy, J. and Galili, U. : Cloning of anti-Gal Fabs from combinatorial phage display libraries: structural analysis and comparison of Fab expression in pComb3H and pComb8 phage. *Mol. Immunol.* **34**, 609 (1997).
- 12) Kawaguchi, T. and Osawa, T. : Elucidation of lectin receptors by quantitative inhibition of lectin binding to human erythrocytes and lymphocytes. *Biochemistry.* **15**, 4581 (1976).
- 13) Konami, Y., Yamamoto, K., Osawa, T. and Irimura, T. : Strong affinity of *Maackia amurensis* hemagglutinin (MAH) for sialic acid-containing Ser/Thr-linked carbohydrate chains of N-terminal octapeptides from human glycoprotein A. *FEBS. Lett.* **342**, 334 (1994).
- 14) Konami, Y., Ishida, C., Yamamoto, K., Osawa, T. and Irimura, T. : A unique amino acid sequence involved in the putative carbohydrate-binding domain of a legume lectin specific for sialylated carbohydrate chains: primary sequence determination of *Maackia amurensis* hemagglutinin (MAH). *J. Biochem. (Tokyo).* **115**, 767 (1994).
- 15) Yamamoto, K., Konami, Y. and Irimura, T. : Sialic acid-binding motif of *Maackia amurensis* lectins. *J. Biochem. (Tokyo).* **121**, 756 (1997).
- 16) Imberty, A., Gautier, C., Lescar, J., Perez, S., Wyns, L. and Loris, R. : An unusual carbohydrate binding site revealed by the structures of two *Maackia amurensis* lectins complexed with sialic acid-containing oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **275**, 17541 (2000).
- 17) Varki, A. : Diversity in the sialic acids. *Glycobiology.* **2**, 25 (1992).
- 18) Troy, F. A. 2nd. : Polysialylation: from bacteria to brains. *Glycobiology.* **2**, 5 (1992).