

*Pichia pastoris*로부터 Toll-like Receptor 9의 세포 내 도메인 단백질의 발현과 순수분리 정제

이균영, 이곤호*

경상대학교 대학원 응용생명과학부, 식물분자생물학 및 유전자조작연구소, 환경생명과학 국가핵심연구센터

Expression and Purification of Toll-like Receptor 9 Cytoplasmic Domain in *Pichia pastoris*

Kyun Young Lee, Kon Ho Lee*

Division of Applied Life Science, PMBBRC & EB-NCRC, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

ABSTRACT Toll-like receptors (TLR) are important components of innate immunity in the defense against pathogens. TLRs recognize pathogen-associated common molecular patterns. TLRs are similar to the receptors involved in defense responses in plants. TLR protein is a type 1 membrane protein, consisting of an extracellular domain containing leucine-rich repeats and a cytoplasmic domain. The cytoplasmic domain delivers ligand recognition signals that result in production of anti-microbial agents. The cytoplasmic domain (amino acid 858-1032) of toll-like receptor 9 has been expressed using methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. The protein expression was confirmed by Western-blot, N-terminal sequencing and MALDI-TOF mass spectrometry. The proteins have been purified by nickel affinity, cation exchange and gel-filtration chromatography.

Key words: *Pichia pastoris*, Protein expression, protein purification, toll-like receptor 9 cytoplasmic domain

서 론

식물과 동물은 병원성 미생물에 대항하여 인지하고, 반응하는 잘 보존된 선천적 면역기작을 가지고 있다 (Medzhitov and Janeway 1997). 선천적 면역에는 미생물의 분자 패턴을 인지하는 수용체들이 관련되어 있다 (Akira et al. 2001). 식물에는 lipopolysaccharide와 flagellin, 키틴, ergosterol과 같은 미생물 관련 분자패턴들을 인지하는 수용체들이 세포막과 세포내에 존재하고 있는 것이 알려져 있다 (Nurnberger et al. 2004). 그리고 포유류와 곤충에는 툴과 같은 수용체 (Toll-like receptor; TLR)가 미생물의 인지에 관련하는 수용체 단백질로서 세포막에 존재하며 (Rock et al. 1998; Aderem and Ulevitch 2000), peptidoglycan, lipopolysaccharide, 박테리아 DNA, RNA와 flagellin과 같은 미생물의 공통적인 분자패턴을 인지한다

(Aliprantis et al. 1999; Yoshimura et al. 1999; Hemmi et al. 2000; Alexopoulou et al. 2001; Hayashi et al. 2001; Takeda et al. 2003). 지금까지 확인된 10가지 인간의 TLR은 제1형 막단백질로서 leucine-rich repeats (LRR)로 구성된 세포의 도메인과 Toll-interleukin 1 (IL-1) 수용체 (TIR) 도메인으로 구성되어 있다 (Takeda et al. 2003). LRR 도메인은 식물과 동물의 다양한 수용체에서 발견되며 미생물의 공통 분자패턴을 인지하는데 관련되어 있다. 리간드의 인지는 진화적으로 포유동물과 초파리에서 잘 보존된 신호전달경로에 의해서 세포 안으로 전달되어 진다. 신호전달경로는 IL-1 수용체군 (IL-1 receptor family: IL-1R)의 신호전달경로와 아주 유사한데, 약 200여개의 아미노산으로 구성된 TIR 도메인은 신호전달 연결단백질 (adaptor protein)과 결합하여 리간드 인지 신호를 전달한다. 그 결과로 NF- κ B와 같은 전사인자가 활성화되고 항미생물 제제의 생산이 유도된다 (Barton and Medzhitov 2003). TLRs의 신호전달은 TIR 도메인과 연결단백질의 결합에 의한 상호작용에 의존해서 시작되어진다. 신호전달

*Corresponding author Tel 055-751-6257 Fax 055-759-9363

E-mail: lkh@gsnu.ac.kr

경로는 연결단백질 MyD88에 의존하는 경로와 TIRAP (TIR domain containing adaptor molecule)와 Mal (MyD88-adaptor-like)이 관여하는 MyD88에 의존하지 않는 경로가 있다 (Fitzgerald et al. 2001; Horng et al. 2001). 모든 TLR이 두 경로를 다 가지고 있지는 않으며 이러한 신호전달의 차이는 MyD88과 TIRAP (혹은 Mal)과 결합하여 작용하는 각각의 TIR 도메인의 구조적인 차이 때문이라고 생각되어 진다. 지금까지 TLR1과 TLR2의 TIR 도메인의 삼차원구조가 결정되었는데, 50%의 아미노산서열의 일치성에도 불구하고 많은 구조적인 차이를 보이고 있다 (Xu et al., 2000). TIR 도메인 단백질의 대량발현을 위하여 대장균에서의 발현이 시도되었으나 발현이 소량이기 때문에 효모균 *Pichia pastoris*에서의 발현을 시도하였다. *P. pastoris*는 methylophilic 효모균으로 여러 가지 이종 단백질을 대량 발현하는데 성공적으로 사용되어져 왔다 (Higgins and Cregg 1998; Cereghino et al. 2000). *P. pastoris* 발현시스템은 다른 발현시스템에 비교하여 여러 가지 잇점을 가지고 있다. 첫째, alcohol oxidase I 유전자의 promoter를 사용하여 대량의 단백질을 발현할 수 있으며, 발현된 단백질이 배지내로 분비되기 때문에 단백질의 분리정제가 용이하다는 장점을 지니고 있다. 또한, 이 발현시스템을 사용하면 포유세포와 곤충세포 발현시스템에서 얻을 수 있는 전사후 변형된 단백질을 얻을 수 있다. 본 연구에서는 인간 TLR9 단백질의 세포내 TIR 도메인을 효모 *P. pastoris*에서의 발현을 조사하고 발현된 단백질의 순수분리정제를 수행하였다.

재료 및 방법

박테리아와 효모 균주

Pichia pastoris 야생 균주 X-33가 TIR 단백질의 발현을 위해 사용되었다. 그리고 대장균 TOP10F'가 모든 plasmid 제작에 사용되었다 (Invitrogen, USA).

발현벡터 pPICZαA-TIR9의 제작

TLR9의 TIR 도메인 부분을 (아미노산 859에서 1032) TLR9 cDNA로부터 primer 5'-gcggaattcggcgccgcaagtgggcgagatg-3' (forward), 5'-gcgggtacctcaatgatgatgatgatgatgtccttcggcctgggtcctctg (backward)를 사용하여 PCR로 증폭하였다. 증폭된 DNA 조각을 *EcoRI*과 *KpnI*으로 자른 후, *Pichia pastoris* 발현벡터 pPICZαA (Invitrogen)의 *EcoRI* (5' end)와 *KpnI* (3' end)에 클로닝하고 pPICZαA-TIR9 벡터를 만들었다 (Sambrook and Russell 2000). TIR9 도메인 DNA 서열은 DNA 염기서열분석 (Church and Gilbert 1984)에 의하여 확인하였다

*P. pastoris*에 형질전환과 과발현균주의 선별과 TIR9 단백질의 발현

*P. pastoris*에 형질전환하기 위하여 5-10 μg의 pPICZαA-TIR9 plasmid를 제한효소 *PmlI*으로 잘라 선형화하였다. 선형화된 DNA는 25 μF, 200 Ω, 1500 V에서 electroporation하여 *P. pastoris* 야생형 X-33에 형질전환하였다. 형질전환체는 30°C에서 100 μg/mL Zeocin (Invitrogen, USA)을 함유한 YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextros)배지에 키워 선별하였다. TIR9 DNA조각이 올바르게 삽입되어 있는가를 확인하기 위하여 형질전환된 *Pichia* clone에서 genomic DNA를 분리하고 발현벡터 제작에 사용되었던 primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. 선별된 균주는 단백질의 발현을 위해서 BMGY (1% yeast extract, 2% peptone, 1.34% YNB, 4×10⁻⁵% biotin, and 1% glycerol)배지에 접종하고 24시간 동안 키운 다음, 4°C에서 1500-3000 x g에서 5분간 원심 분리하여 세포를 모으고 흡광도가 1.0이 되도록 BMMY (1% yeast extract, 2% peptone, 1.34% YNB, 4×10⁻⁵% biotin, and 1% 메탄올)배지에 잘 섞고 단백질 발현을 위하여 30°C에서 180 rpm의 속도로 분당기에서 배양하였다. 단백질 발현을 유도하기 위하여 매 24시간마다 1%의 메탄올을 배지에 첨가하였다. 72시간 동안 배양한 후, 4°C 2000 x g에서 10분간 원심분리하여 세포를 제거하고 상등액을 모았다 (Figure 1).

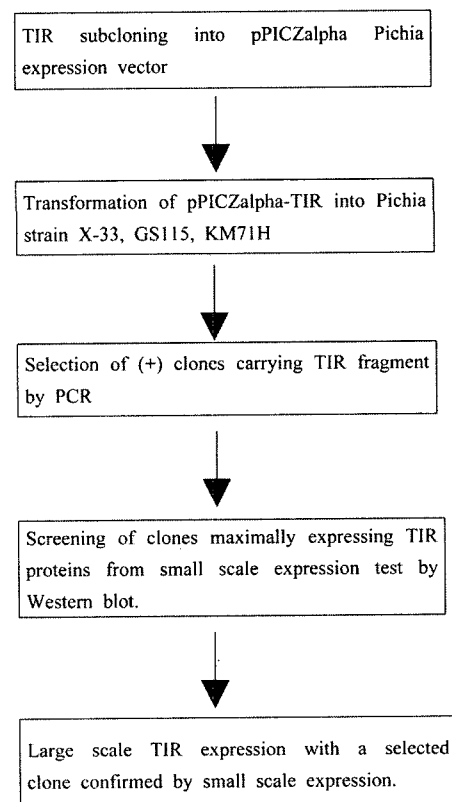


Figure 1. Steps for TIR protein expression in *P. pastoris*.

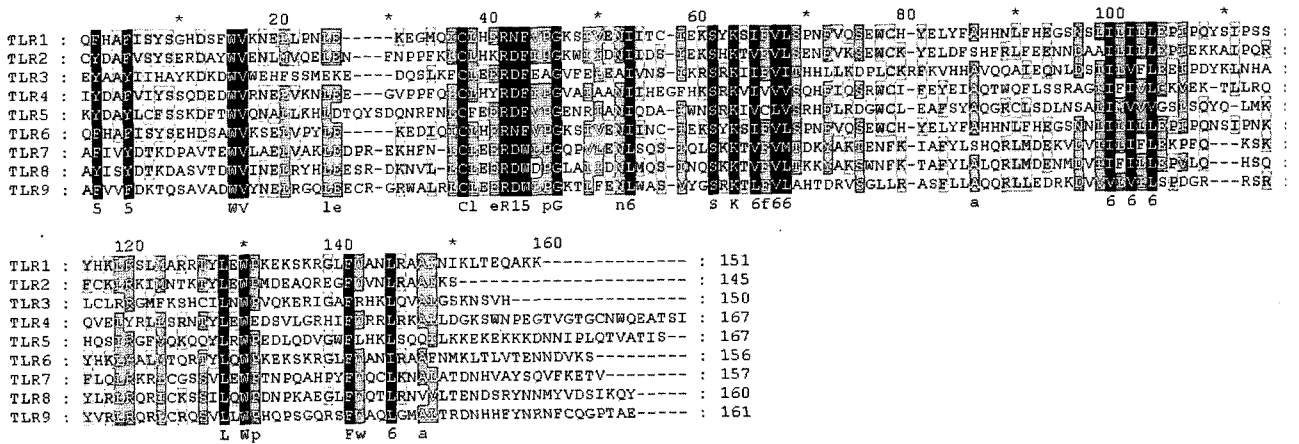


Figure 2. Amino acid sequence alignment of the cytoplasmic domain of human TLR family members. Amino acid residues conserved in least four molecules are highlighted by solid shades. The amino acid residues are indicated by single letter code.

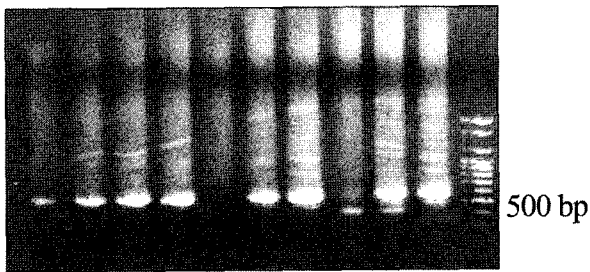


Figure 3. PCR to confirm the incorporation of the TIR9 DNA fragment into *P. pastoris* genomic DNA. Lanes 1 - 10 are *P. pastoris* transformants selected and lane 11 is 100 bp DNA marker.

SDS-PAGE와 Western-blot 분석

Ausubel 등 (1989)의 방법으로 15%의 SDS polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동하여 단백질의 순도를 확인하였다. 그리고 western-blot의 방법 (Towbin et al. 1979)으로 단백질을 nitrocellulose막에 옮기고 anti-his 단일항체와 alkaline phosphatase와 연결된 anti-mouse 항체를 사용하여 TIR9 단백질을 확인하였다.

TIR9 단백질의 순수 분리 정제

발현된 단백질은 배양액 속으로 분비되기 때문에 단백질을 분리하기 위하여 배양 상등액을 모아 배양 상등액의 완충액을 결합완충액 (50 mM Na-phosphate, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazole)로 바꾸고 니켈 친화 크로마토그래피를 수행하였다. 먼저, 니켈칼럼에 배양 상등액을 적용하고 20 ml의 세척완충액 (50 mM Na-phosphate, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole)로 세척하였다. 단백질 분리는 15 ml의 분리완충액 (50 mM Na-phosphate, pH 8.0, 0.1 M NaCl, 300 mM imidazole)로 니켈칼럼에서 분리하였다. 다음

단계로 HS20 양이온교환수지 칼럼을 (Peprseptive Biosystems, USA) 사용하여 양이온교환수지방법으로 salt-gradient를 적용하여 단백질을 분리하였다. TIR9 단백질은 약 200 mM의 NaCl 농도에서 분리되었다. 그리고 superdex 75 (GE, USA)을 사용하여 겔 투과 크로마토그래피를 수행하였다. 순수 분리 정제된 단백질은 mass spectrometry를 통하여 동정하였고, 분리된 단백질의 순도는 SDS-PAGE에 의하여 분석하였다.

결과 및 고찰

TLR9의 세포내 TIR 도메인은 미생물 병원균의 분자패턴 인지 신호가 전달되는 주요한 시발점이 되는 신호전달 단백질이다. 인간 TLR의 TIR 도메인은 약 200여개의 아미노산으로 구성되어 있으며 높은 아미노산서열의 유사성을 가지고 있지만 그 신호전달경로는 종류에 따라 조금 차이가 있다 (Figure 2). 이러한 신호전달 경로의 차이는 삼차원 구조의 차이에 의한 것으로 생각되며, 이를 구조적으로 이해하기 위하여 TIR 도메인 단백질을 methylotrophic 효모균인 *P. pastoris*에서 과발현을 시도하였다. TLR9의 TIR DNA 조각을 효모 발현벡터 pPICZaA에 클로닝하고 TIR9 발현벡터 pPICZaA-TIR9를 제작하였다. 제작된 pPICZaA-TIR9를 사용하여 *P. pastoris* 야생형 균주 X-33에 형질 전환하였다. 형질전환체를 항생제를 사용하여 선별하고 형질전환된 *P. pastoris* 균주가 TIR9의 DNA 조각을 가지고 있는가를 PCR을 수행하여 확인하였다 (Figure 3). TIR9의 DNA 조각을 가진 형질전환균주는 약 530 bp의 PCR 산물을 만들게 되는데, PCR의 결과에서 거의 모든 선별된 *P. pastoris* 균주에서 같은 크기의 PCR 산물을 얻을 수 있었다. 이는 선별된 형질전환 *P. pastoris* 균주 거의 모두가 TIR9의 DNA 조각을 genomic DNA에 가지고 있음을 나타내고

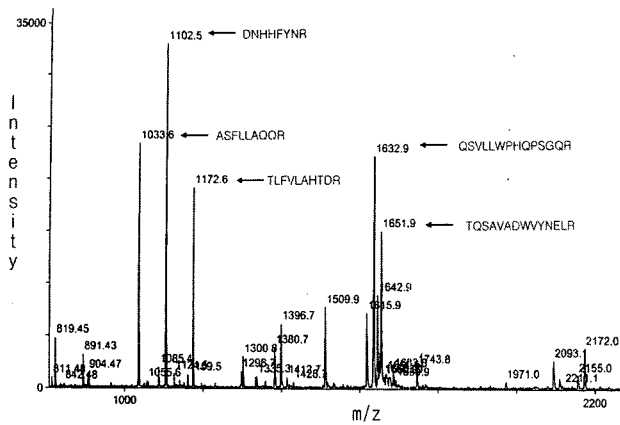


Figure 4. MALDI-TOF mass spectrum of TIR9. The peaks are corresponding to the mass of the peptide fragments of TIR9. This indicates the protein expressed in *P. pastoris* is TIR9.

있다. 선별된 *P. pastoris* 균주를 사용하여 TIR9 단백질의 발현을 시도하였다. *P. pastoris*는 메탄올에 의하여 alcohol oxidase I promoter가 활성화되어 promoter 아래에 삽입된 유전자의 대량발현이 유도된다. 따라서 메탄올이 있는 상태에서 pPICZαA-TIR9에 삽입된 TIR9의 발현이 유도되게 된다. 그런데 pPICZαA-TIR9에 삽입된 TIR9은 효모의 알파 요소 단백질의 아래에 삽입되게 되어 알파요소단백질의 분비신호에 의하여 배지 속으로 분비되도록 되어 있다. 따라서 *P. pastoris*에서 발현되는 단백질이 배양액 속에 분비되어 축적되게 된다. 그러므로 세포파쇄가 어려운 효모균의 내부에 단백질이 축적되지 않고 발현된 단백질이 배양액에 분비되어 분리정제가 용이하다는 장점을 가지고 있다. 72시간 동안 배양한 후 상등액 속에 발현된 단백질을 분리하기 위하여 상등액을 수거하고, 단백질이 가지고 있는 histidine tag를 이용하여 니켈 친화 크로마토그래피를 수행하였다. 니켈 친화 크로마토그래피에 의하여 분리된 단백질을 SDS-PAGE와 western-blot으로 확인하였다 (Figure 5a, b). 그리고 MALDI-TOF 질량분석기를 사용하여 단백질을 동정하였다 (Figure 4). Anti-his 항체를 사용한 western-blot에서 histidine tag를 가진 단백질이 발현되었음을 확인할 수 있었다. 또한, MALDI-TOF 질량분석에서 각 펩타이드 조각들이 이론적인 질량값과 잘 일치하고 있음을 보아

발현된 단백질이 TIR9 단백질임을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 *P. pastoris*에서 TIR9 단백질이 성공적으로 발현되고 배지 속으로 잘 분비되고 있음을 나타낸다. 니켈 친화 크로마토그래피에 의하여 분리된 단백질을 더욱 순수 분리 정제하기 위하여 양이온수지교환법을 사용하여 분리하였다. pH 8.0에서 salt-gradient를 사용하여 분리하였는데 약 200 mM의 NaCl 농도에서 분리됨을 확인할 수 있었다. 분리된 단백질을 초순수분리하기 위해 겔 투과 크로마토그래피를 수행하였다 (Figure 5c). TIR9 단백질은 약 20 kDa의 분자량을 가진 크기에서 분리되었는데 이론적인 분자량과 비슷하였다. 이 결과는 TIR9 단백질이 용액에서 단량체로 존재하고 있음을 나타낸다. 분리된 TIR9은 SDS-PAGE에서 단일밴드로 순도가 아주 높음을 확인할 수 있었다. 이와 같이 *P. pastoris*에서 발현 분리정제된 단백질의 양은 1리터 배양에 약 200 µg 정도로 그 양은 많지 않았다. 대장균에서 발현되는 TIR 단백질의 경우 그 안정도가 낮아 가용하게 분리되는 단백질의 양은 아주 제한적인 것에 비하여 *P. pastoris*에서 발현되는 양은 비교적 많으나 발현량이 구조 분석을 하기에는 충분하지 않았다. 따라서 구조해석을 위해서는 *P. pastoris*에서의 단백질 발현조건을 최적화해야 할 것이다. 식물과 동물에는 TIR 도메인을 가지는 단백질들이 많이 존재하는 것으로 알려져 있다. 이와같은 동물과 식물에 존재하는 TIR 단백질의 발현을 위하여 효모 *P. pastoris*를 사용하여 단백질을 발현하는 방법을 응용할 수 있을 것이다.

적 요

Methylotrophic 효모 *Pichia pastoris* 발현시스템을 사용하여 인간 TLR9 단백질의 세포내 TIR 도메인을 발현하였다. TIR 단백질이 *P. pastoris*에서 발현되어 배지 속으로 분비되는 것을 SDS-PAGE로 확인하였고, 발현된 단백질을 western-blot, MALDI-TOF 질량분석으로 동정하였다. 이를 통하여 TIR 단백질이 *P. pastoris*에서 안정적으로 발현됨을 알 수 있었다. 그리고 발현된 단백질을 니켈 친화, 양이온교환수지, 겔 투과 크로마토그래피를 사용하여 순수 분리 정



Figure 5. Purification of TIR9 expressed in *P. pastoris*. A) Western blot of the protein purified from nickel affinity chromatography probed by anti-his antibody. B) SDS-PAGE of the protein purified from nickel affinity chromatography. C) SDS-PAGE of TIR9 purified from gel filtration chromatography.

제하였다. *P. pastoris*를 이용한 단백질의 발현과 정제방법은 대장균에서 잘 발현되지 않는 단백질의 발현에 응용될 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 2002년도 학술진흥재단의 지원에 의해 연구되었습니다 (KRF-2002-003-C00111).

인용문헌

- Aderem A, Ulevitch RJ (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406: 782-787
- Akira S, Takeda K, Kaisho, T (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2: 675-680
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3 *Nature* 413: 732-738
- Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A (1999) Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285: 736-739
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410
- Ausubel FM, Brent R, Kingstone RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1989) *Current protocols in molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York
- Cereghino JL, Cregg JM (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 24: 45-66
- Church GM, Gilbert W (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1991-5
- Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT (2001) Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413: 78-83
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410: 1099-103
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, and Akira S (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740-745
- Higgins DT, Cregg JM in: N.J. Totowa (Ed.), *Pichia Protocols*, Humana Press, 1998, pp 103
- Horng T, Barton GM, Medzhitov R (2001) TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2: 835-41
- Medzhitov R, Janeway CA, Jr. (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91: 295-298
- Nurnberger T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 198: 249-266
- Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF (1998) A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 588-593
- Sambrook J, Russell DW (2000) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Ed 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp 1.90-1.92
- Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003) Toll-like receptors. *Ann Rev Immunol* 21: 335
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *PNAS* 76: 4350-4354
- Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D (1999) Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 163: 1-5
- Xu Y, Tao X, Shen B, Horng T, Medzhitov R, Manley JL, Tong L (2000) Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Science* 408: 111-115

(접수일자 2005년 11월 14일, 수리일자 2005년 11월 28일)