

## 대장균에서 흉막폐렴균 독소 Apx I과 Apx II의 대량발현

김태중 · 이봉주 · 이재일\*

전남대학교 수의과대학  
(게재승인: 2005년 5월 20일)

### Mass expression of Apx I and Apx II of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in *Escherichia coli*

Tae-Jung Kim, Bong-Joo Lee, Jae-II Lee\*

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Accepted: May 20, 2005)

**Abstract :** *Actinobacillus pleuropneumoniae* is the causative agent of a porcine contagious pleuropneumonia. Among several virulence factors including exotoxin (Apx toxins), LPS, transferrin-binding proteins, OMPs, and some proteases, Apx toxins have been major targets for the protection study. In this study, cloning and expression of *A. pleuropneumoniae* Apx I and Apx II toxin, which are produced by all highly virulent strains, were performed by *Escherichia coli* expression system. Genes coding Apx I and II toxin were amplified from the *A. pleuropneumoniae* serotype 5 genomic DNA using polymerase chain reaction and cloned to a prokaryotic expression vector, pRSET. Expression of the Apx I and Apx II coding sequences in *E. coli* resulted in the formation of insoluble inclusion bodies purified according to a denaturing purification protocol, which employs the use of guanidium. Recombinant proteins were purified using Ni<sup>2+</sup>-charged resin affinity purification. This expression and purification system made it possible to produce Apx I and Apx II in large amounts for further immunologic studies.

**Key words :** *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Apx toxin, recombinant protein expression

## 서 론

*Actinobacillus pleuropneumoniae*는 돼지에서 급만성으로 전염성, 섬유소성, 출혈성 폐렴을 일으키는 원인균이다. 특히 이로 인해 발생하는 섬유소성 흉막폐렴은 돼지의 증체율 감소, 사료효율 저하 및 출하 지연 등으로 인해 양돈산업에 막대한 경제적 피해를 유발한다 [3, 8]. *A. pleuropneumoniae*는 다양한 병원성 인자들(exotoxins, LPSs, transferrin-binding proteins, OMPs, 그리고 몇몇 proteases)을 내포하고 있지만 그 중에서 repeats in the structural toxins(RTX) 독소군에 해당하는 Apx I과 Apx II가 가장 중요한 병원성 인자에 해당한다 [7, 14]. Apx toxin은 현재까지 네 가지가 밝혀졌지만 모든 고병원성 균주들은 Apx I과 Apx II를 발현하며 Apx III과 Apx IV

에 비해 훨씬 독성이 강하다고 알려져 있다 [10]. Apx I과 Apx II 모두는 적혈구 용혈능이 있고 macrophage나 호중구에 독성을 보이는데 그 중에서 Apx I이 더 강력한 독성을 나타낸다 [10]. 국외의 경우 이미 많은 연구자들이 Apx toxin에 대한 연구를 실시하였고 백신으로써의 응용 가능성에 대한 실험도 실시되었다 [4, 12, 14, 16]. 국내에서도 신 등 [1]이 Apx I, Apx II 그리고 Apx III에 대한 재조합 단백질 발현 실험을 실시하였으나 그 발현량이 너무 소량이었어서 Western blot을 이용한 실험에서 검출될 정도여서 재조합 단백질 백신으로써의 응용에 어려움이 있었다. 이에 본 실험은 재조합 단백질을 이용한 백신 연구의 일환으로 먼저 대장균 발현 시스템을 이용하여 Apx I과 Apx II를 발현시키고 높은 회수율을 위해 guanidium을 이용, denaturing

\*Corresponding author: Jae-II Lee

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea  
[Tel: +82-62-530-2854, Fax: +82-62-530-2857, E-mail: jaeil@chonnam.ac.kr]

condition 하에서 다량의 재조합 Apx toxin을 확보하는 방법을 확립하였다.

## 재료 및 방법

### 공시균주

연구에 사용된 균주는 국립수의과학검역원에서 *A. pleuropneumoniae* serotype 5 표준균주를 분양받아 실험에 이용하였다. Cloning 및 expression에 사용된 competent *E. coli* JM109 및 BL21(DE3)pLysS 균주는 Invitrogen(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. 균주에서 genomic DNA의 분리 및 단백질 분리 등의 작업은 Sambrook 등 [13]과 Ausubel 등 [2]에 준하여 실시하였다.

### Apx I 및 Apx II 유전자 cloning

유전자의 cloning을 위한 DNA 염기 서열 정보는 GenBank accession number AF363361과 AF363362를 기초로 하여 Apx I은 5'에 *Bam*HI, 그리고 3'에 *Hind*III site를, Apx II의 경우는 5'에 *Bam*HI, 그리고 3'에 *Eco*RI site를 만들어서 PCR로 증폭하였다. PCR에 사용된 각각의 primer의 정보는 Table 1에 명시하였다.

Cloning을 위한 PCR 조건은 다음과 같다. 먼저 94°C/3분간 pre-denature 후, 94°C/40초, 55°C/40초, 72°C/4 min을 30회 반복하고 최종 72°C/7분간 final extension을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel에서 그 size (각각 3.0 kb와 2.8 kb)를 확인하였고 PCR purification kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 gel elution을 실시하였다. Elution한 증폭 산물을 제한효소 *Bam*HI와 *Hind*III 또는 *Eco*RI(Promega, USA)를 사용하여 PCR 산물 양단에 restriction site를 sticky-end로 만든 다음, 위의 각각의 두 제한효소로 처리한 prokaryotic expression vector인 pRSET와 ligation을 실시하여 2개의 construct(pRSET-Apx I과 pRSET-Apx II)를 생산하였다. pRSET vector는

**Table 1.** Nucleotide sequences of primers used in this study

Primers	Nucleotide sequence	GenBank accession no.
Apx I forward	5'-ATAT-GGATCC -ATGGCTAACTCTCAG-3'	AF363361
Apx I reverse	5'-TGTG-AAGCTT -TTAAGCAGATTGTGT-3'	
Apx II forward	5'-ATAT-GGATCC -ATGTCAAAAATCACT-3'	AF363362
Apx II reverse	3'-TGTG-GAATTC -TTAAGCGGCTCTAGC-3'	

affinity binding을 위해 N-terminal fusion peptide로 6개의 Histidine을 발현하도록 되어 있다. 그 후 준비된 construct를 competent *E. coli* JM109에 transformation 시키고 100 ug/ml ampicillin이 첨가된 LB agar plate에서 배양하였다. 배양된 colony에서 QIAprep Spin Mini Kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 plasmid를 추출한 다음 각각 2개의 제한효소(Apx I은 *Bam*HI+*Hind*III, Apx II는 *Bam*HI+*Eco*RI)로 처리하여 insert 유무를 확인하고 insert의 size가 확인된 것은 ABI Prism 3100 Genetic Analyzer(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 sequencing을 실시하여 vector내의 open reading frame(ORF)의 shift 여부를 확인하였다.

### Apx I 및 Apx II 단백질 발현

Sequencing을 통해 insert의 존재 및 ORF의 확인을 마친 transformant로부터 분리된 construct는 재조합 단백질 발현을 위해 대장균 발현용 competent cell인 BL21(DE3)pLysS에 transformation 시켰다. Transformant는 100 ug/ml ampicillin과 35 ug/ml chloramphenicol이 함유된 LB agar plate에서 배양 후 단독 colony를 선택하였다. 선택된 colony는 LB broth에서 배양 후 단백질 발현을 위해 IPTG 첨가하고 0, 1, 2, 3시간 간격으로 1 ml씩 시료를 채취하였다. 채취된 시간별 시료는 native condition 및 denaturing condition의 조건으로 구분하여 단백질 발현 여부를 검사하였다.

Native condition은 다음과 같이 실시하였다. 준비된 배양액 시료를 원심분리(10,000×g/10 min) 후 상층액을 버리고 pellet을 100 u/l의 PBS에 재부유 후 2X sample buffer(125 mM Tris-Cl, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.2% bromophenol blue, pH 6.8) 100 u/l를 첨가하고 5분간 boiling한 뒤 SDS-PAGE를 통해 단백질을 전개하였다.

Denaturing condition은 다음과 같이 실시하였다. 준비된 배양액 시료를 원심분리(10,000×g/10 min) 후 상층액을 버리고 pellet을 150 u/l의 denaturing buffer(6M guanidine HCl, 20 mM NaPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, pH 7.8)에 재부유 후 실온에서 10분간 흔들어 준다. 그 후 sonication(2초 펄스/1초 휴식을 10회 반복) 후 4,000×g/10분 원심 분리 후 상층액을 SDS-PAGE에 사용하였다.

### Apx I 및 Apx II 순수분리

Native condition에서는 단백질 발현이 인정되지 않았기 때문에 순수분리는 시도되지 않았다. Denaturing condition으로 준비된 상층액 시료는 8M urea가 포함된 binding buffer, washing buffer 그리고 elution buffer를 이용하는 Ni<sup>2+</sup>-charged resin affinity purification kit

(Probond; Invitrogen, USA)를 이용하여 순수분리 하였고 eluted fraction을 SDS-PAGE를 통해 분리정도를 알아보았다. 순수분리된 단백질의 농도는 Bradford법에 기초한 Bio-Rad Protein assay kit(BioRad, USA)를 이용하여 측정하였다.

**결 과**

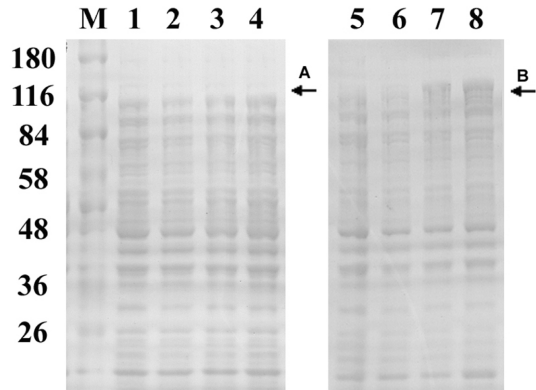
**Apx I 및 II 유전자 cloning**

두 쌍의 primer를 이용하여 PCR을 실시한 결과, Fig. 1A 과 같이 3069 bp(Apx I) 및 2871 bp(Apx II) 크기의 PCR 산물을 얻을 수 있었다. 이들을 pRSET vector와 ligation하여 생산된 두 개의 construct, pRSET-Apx I과 pRSET-Apx II를 제한효소로 처리하여 insert의 size를 확인하였고(Fig. 1B), sequencing을 통하여 ORF의 frame shift 여부를 확인하였다.

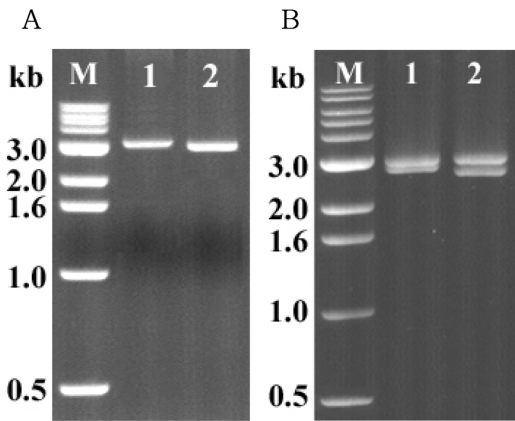
**Apx I 및 Apx II 단백질 발현**

Native condition에서는 인정될 만한 양의 단백질이 발현되지 않았지만(Fig. 2) denaturing condition하에서 Apx I 및 Apx II 단백질은 각각 110 kDa, 102.5 kDa(fusion peptide인 6X histidine 등으로 인해 약 4 kDa이 증가되어 각각 114 kDa, 106.5 kDa의 크기로 발현됨)의 크기로 발현됨을 알 수 있었다(Fig. 3). 즉 Apx I 및 Apx II는

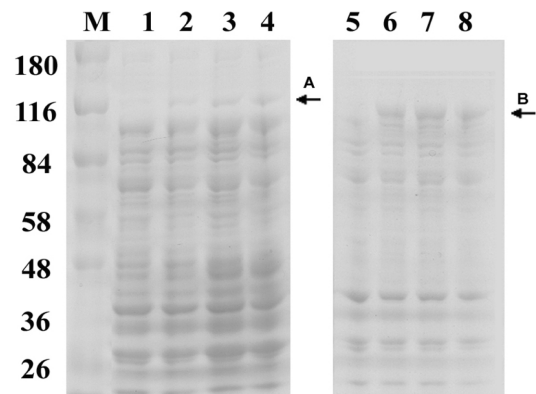
세포질내에서 용해된 상태로 존재하지 않고 봉입체를 형성하여 세포외로 분비되기 위한 형태로 존재함을 알 수 있었다.



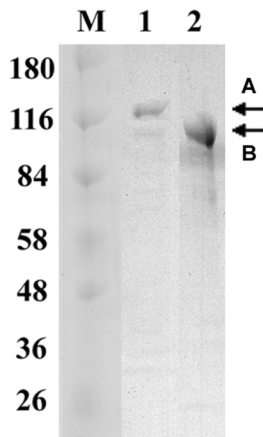
**Fig. 2.** SDS-PAGE analysis of recombinant Apx I (left) and Apx II (right) expressed in *E. coli*. No remarkable expression of recombinant protein was shown when samples were prepared by native condition described in Materials and methods. M: molecular size marker; lane 1, 5: before induction by the addition of IPTG; lane 2, 6: 1 h after induction; lane 3, 7: 2 h after induction; lane 4, 8: 3 h after induction. Arrows indicate the expected size of expressed recombinant Apx I(A) and Apx II(B).



**Fig. 1.** (A) *Actinobacillus pleuropneumoniae* Apx I and II genes were amplified by PCR. M: 1 kb size marker; lane 1, Apx I; lane 2, Apx-II. (B) PCR products were cloned into pRSET (3 kb) prokaryotic expression vector. Each construct (pRSET-Apx-I and pRSET-Apx II) was digested with two restriction enzymes, *Bam*HI and *Hind*III for pRSET-Apx I and *Bam*HI and *Eco*RI for pRSET-Apx II generating restriction fragments, 3 kb+3.1 kb for Apx I and 3 kb+2.8 kb for Apx II. M: 1 kb size marker; lane 1, pRSET-Apx I; lane 2, pRSET-Apx-II.



**Fig. 3.** SDS-PAGE analysis of recombinant Apx I(left) and Apx II(right) expressed in *E. coli*. Sample preparation was performed by denaturing condition described in Materials and Methods to contain inclusion bodies in cell lysates. M: molecular size marker; lane 1, 5: before induction by the addition of IPTG; lane 2, 6: 1 h after induction; lane 3, 7: 2 h after induction; lane 4, 8: 3 h after induction. Arrows indicate the expected size of expressed recombinant Apx I(A) and Apx II(B).



**Fig. 4.** SDS-PAGE analysis of purified recombinant Apx I(lane 1) and Apx II(lane 2). Large amounts of purified recombinant protein without contamination by other proteins was recovered using  $\text{Ni}^{2+}$ -charged resin affinity column following preparation of samples by denaturing condition. M: molecular size marker. Arrows indicate the expected size of expressed recombinant Apx I(A) and Apx II(B).

#### Apx I 및 Apx II 순수분리 및 농도측정

$\text{Ni}^{2+}$ -charged resin affinity column을 이용한 단백질의 순수분리 결과, 기대되는 크기의 단백질(fusion peptide)을 포함하여 각각 114 kDa 및 106.5 kDa)만이 순수분리됨을 알 수 있었다(Fig. 4). 순수분리된 단백질의 농도를 측정할 결과, 500 ml culture를 통해 affinity binding으로 얻을 수 있는 재조합 단백질의 양은 각각 약 1.2 mg과 2.2 mg 정도였다.

## 고 찰

*A. pleuropneumoniae*에 의해 발생하는 돼지의 흉막폐렴은 주로 발육중인 건강한 돼지에서 발생하지만 전 연령에 걸쳐 발생할 수 있으며 그로 인해 심각한 경제적 피해가 발생하고 있다 [3, 5]. *A. pleuropneumoniae*는 현재까지 약 15종의 혈청형으로 분류되고 있고, 4가지의 RTX toxin(Apx I, II, III, 그리고 IV)을 분비하는 것으로 알려져 있으며 이 중 병원성이 강력한 strain은 모두 Apx I과 Apx II를 분비한다 [9, 14]. 이들 독소의 분비는 폐포상피, 내피상피, 적혈구, 호중구 및 macrophage의 사멸을 초래하며 흉막폐렴의 병원성에 가장 중요한 역할을 담당한다 [9]. Apx toxin은 탐식세포나 표적장기의 세포에 pore를 형성하여 세포의 종창을 유발하여 표적세포를 사멸시키며 [8], Apx toxin만으로도 폐병변을 일으키는 것으로 보고되었다 [11]. 또 다른 연구를 통하여 보

면 Apx toxin을 생산하지 못하는 변이주는 병변을 유발하지 못하는 것으로 보아 Apx toxin들이 폐병변 유발에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 보인다 [9]. 백신 실험에서 보면 whole-cell bacterin의 사용으로 같은 혈청형에 의한 감염으로 인한 치사율은 일부 감소하지만 다른 혈청형의 감염은 막지 못하는데 이는 bacterin에서는 Apx toxin의 생산이 없기 때문으로 해석되고 있다 [15]. 이와는 반대로 재조합 Apx toxin을 이용한 subunit vaccine은 교차방어의 효과가 상대적으로 높고 임상증상의 정도가 경감하는 효과가 있으나 [8] Apx toxin만을 이용하는 vaccine에서는 성공적인 방어를 유도할 수 없었다 [6]. 그러나 균체 단백질이면서 iron up-take에 중요한 역할을 하는 transferrin-binding protein을 함께 포함하는 백신은 훨씬 효과가 있었던 것으로 보아 [16] 백신에 의한 효과적인 방어에 Apx toxin이 필요한 요소임을 알 수 있다. 특히 이러한 방어기작에는 체액성 면역이 그 기능을 담당하며 세포성 면역은 방어에 크게 중요하지 않음도 밝혀졌다 [8]. 즉 Apx toxin에 대한 항체가 없으면 macrophage는 탐식과정중에 사멸하게 되지만, 항체의 존재는 호중구의 사멸을 막고 *A. pleuropneumoniae*의 효과적인 제거를 돕는다고 알려져 있다 [8]. 따라서 Apx I 및 Apx II에 대한 항체의 생성은 *A. pleuropneumoniae*에 대한 방어 기작에 중요한 역할을 하며, 이를 위하여 다량의 재조합 단백질이 절실히 요구된다.

Apx I 및 Apx II는 발현과정중에 대장균 체내에서 세포질내 용해되어 있지 않고 봉입체의 형태로 존재한다. Burdychova 등 [4]은 대장균에서 Apx I의 발현 실험을 실시하였는데 그 실험결과 발현된 Apx I은 세포질내 용해되어 있지 않고 봉입체를 형성하여 존재하였는데 본 실험에서도 세포질의 단백질 검사방법인 native condition에서는 단백질의 발현이 인정되지 않았으나 봉입체를 포함하는 denaturing condition 방법에서는 단백질의 발현이 인정되었다. 국내에서 실시된 Apx toxin에 대한 실험 [1]에서 재조합 단백질의 발현이 적은 이유는 guanidium 등을 이용한 denaturing 방법을 적용하지 않고 native condition에서 sample preparation을 하여 그 발현 정도가 낮은 것으로 생각된다. 하지만 본 실험에서 보여준 바와 같이 대장균에서 Apx toxin을 발현한 다음 denaturing condition에서 시료를 준비한다면 면역효과 검증 및 vaccine 실험에 사용할 수 있을 다량의 재조합 단백질을 준비할 수 있을 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. 신성재, 조영옥, 유한상. 국내분리 흉막폐렴균의 *apxIA*, *IIA*, *IIA* 유전자 cloning, 염기서열 분석 및 단

- 백질 발현. 대한수의학회지 2003, **43**, 247-253.
2. **Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K.** Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, New York, 1996.
  3. **Bosse JT, Janson H, Sheehan BJ, Beddek AJ, Rycroft AN, Kroll JS, Landford PR.** *A. pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. Microbes Infect 2002, **4**, 225-235.
  4. **Burdychova R, Rychtera M, Horvath R, Dendis M, Bartos M.** Expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* gene coding for Apx I protein in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 2004, **230**, 9-12.
  5. **Chiers K, Donne E, van Overbeke I, Ducatelle R, Haesebrouck F.** *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in closed swine herds: infection patterns and serological profiles. Vet Microbiol 2002, **85**, 343-352.
  6. **Chiers K, van Overbeke I, de Laender P, Ducatelle R, Carel S, Haesebrouck F.** Effects of endothelial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with inactivated vaccines containing the Apx toxins. Vet Q 1998, **20**, 65-69.
  7. **Frey J.** Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. Trends Microbiol 1995, **3**, 257-261.
  8. **Haesebrouck F, Chiers K, van Overbeke I, Ducatelle R.** *A. pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. Vet Microbiol 1997, **58**, 239-249.
  9. **Haesebrouck F, Pasmans F, Chiers K, Maes D, Ducatelle R, Decostere A.** Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? Vet Microbiol 2004, **100**, 255-268.
  10. **Jarma E, Corradino G, Regassa LB.** Anaerobiosis, growth phase and *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX toxin production. Microb Pathog 2004, **37**, 29-33.
  11. **Kamp EM, Stockhofe-Zurwieden N, van Leengoed LAMG, Smits MA.** Endobronchial inoculation with Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* leads to pleuropneumonia in pigs. Infect Immun 1997, **65**, 4350-4354.
  12. **Prideaux CT, Lenghaus C, Krywult J, Hodgson ALM.** Vaccination and protection of pigs against pleuropneumonia with a vaccine strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* produced by site-specific mutagenesis of the Apx II operon. Infect Immun 1999, **67**, 1962-1966.
  13. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
  14. **Seah JN, Frey J, Kwang J.** The N-terminal domain of RTX toxin Apx I of *Actinobacillus pleuropneumoniae* elicits protective immunity in mice. Infect Immun 2002, **70**, 6464-6467.
  15. **Van den Bosch H, Frey J.** Interference of outer membrane protein PalA with protective immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in vaccinated pigs. Vaccine 2003, **21**, 3601-3607.
  16. **Van Overbeke I, Chiers K, Donne E, Ducatelle R, Haesebrouck F.** Effects of endothelial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with a vaccine containing Apx toxins and transferrin-binding proteins. J Vet Med B 2001, **48**, 15-20.