



미생물을 이용한 우유 유래 항균펩타이드(락토페리신)의 생산

강 대 경
단국대학교 동물자원학과

Production of Milk-Originated Antimicrobial Peptide, Lactoferricin, in *E. coli*

Dae-Kyung Kang

Department of Animal Resources Science, School of Bio-Resources Science, Dankook University

ABSTRACT

Bovine lactoferricin(LFcin B) is a peptide of 25 amino acids that originated from the N terminus of bovine lactoferrin, and is characterized as having potent antimicrobial activity against bacteria, fungi, protozoa and viruses. But, direct expression of Lfcin B is lethal to *Escherichia coli*. For the efficient production of Lfcin B in microorganism, we developed an expression system in which the gene for cationic Lfcin B was fused to an anionic peptide gene, and successfully expressed the concatemeric fusion gene in *E. coli*. The purified recombinant Lfcin B was found to have antimicrobial activity, as chemically synthesized Lfcin B peptide does.

(Key words : bovine lactoferricin, expression, concatemeric fusion)

서 론

우유 단백질은 영양소 공급원으로서의 역할뿐만 아니라, 여러 가지 기능성 물질을 함유하고 있어 생체 내에서 다양한 생리활성 작용을 나타낸다. 우유 유래의 대표적인 생리활성물질의 하나인 락토페린(lactoferrin)은 분자량 80,000달톤 크기의 당단백질로서 숙주 방어체계에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Oram 등, 1968). 우유 유래의 락토페린(bovine lactoferrin)을 펩신으로 분해하면 N-말단 부위에 해당하는 Phe₁₇-Phe₄₁ 부위에서 유래한 분자량 3,124달톤의 펩타이드가 생성되는데, 이를 락토페리신(bovine lactoferricin, 이하 Lfcin B으로 약칭함)이라고 한다(Bellamy 등, 1992a). 락토페리신의 항균 활성은 락토페린보다 수십배 이상 강하다고 보고되고 있다(Bellamy 등, 1992b). 락토페리신은 세균뿐만 아니라 곰팡이나 바이러스에 대해서도 억제 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Andersen 등, 2003; Bellamy 등, 1993). 특히, 임상적으로 중요한 *E. coli* O157, *Helicobacter pylori*, *Candida albicans* 등이 락토페리신에 의해 성장 저해를 받는 것으로 보고되었다(Diarra 등, 2002; Isamida 등, 1998;

McCann 등, 2003; Shin 등, 1998; Wakabayashi 등, 1998). 항균력 이외에도 락토페리신은 암의 전이 과정, 단핵구에서 LPS에 의해 유도되는 IL-6 반응, 철과 아스코르빈산염에 의해 유도되는 지질 과산화 과정 등을 억제하는 것으로 알려져 있다(Haversen 등, 2002; Wakabayashi 등, 1999; Yoo 등, 1998).

상기와 같이 다양한 생리활성을 나타내는 락토페리신을 대량으로 생산할 수 있다면, 식품 산업뿐만 아니라 제약 산업에서의 활용가치가 매우 높을 것으로 예상된다. 일반적으로 락토페리신을 얻기 위해 락토페린을 펩신으로 분해하여 분리하고자 할 경우, 생산량이 낮을 뿐만 아니라 장시간이 소요되며 기술이 복잡하고 비용이 많이 든다. 또한, 인공적으로 락토페리신 및 그 이성체를 합성하려면 비용도 많이 들 뿐만 아니라 대규모 생산이 불가능하다. 따라서 락토페리신을 경제적으로 생산하기 위해서는 미생물을 이용한 유전공학적 생산 방법을 검토할 필요가 있다.

하지만, lysine, arginine 등의 양전하를 띠는 아미노산의 비율이 높은 락토페리신(bovine lactoferricin) 자체가 항균 작용을 갖는 특성 때문에 미생물 내에서 직접 발현시키기가 어려운 실정이다. LaVallie 등(1995)과 Lee 등(1998)의 보고에 의하면, 염기성의 항균 펩타이드와 산성 펩타이드의 융합 유전자의 중합체를 제조함으로써, 발현된 산성 펩타이드

*Corresponding author : Dae-Kyung Kang, Dept. of Animal Resources Science, Dankook University, Anseo-dong 29, Cheonan 330-714, Korea, Tel : +82-41-550-3655, Fax : +82-41-564-3655, E-mail : dkkang@dankook.ac.kr

가 항균 펩타이드의 염기성을 중화시켜 숙주에 대한 항균력을 일시적으로 소거할 수 있었다고 하였다. 상기의 보고들을 응용하여, 락토페리신을 대장균에서 성공적으로 발현시켰기에 이를 소개하고자 한다.

본 론

우유 유래의 락토페리신(Lfcin B)을 중화시킬 수 있는 산성 펩타이드를 탐색한 결과, 마가이닌 유전자(Lee 등, 1998)가 선별되어 마가이닌 유전자를 포함하는 플라스미드를 제작하였다. 기 합성된 락토페리신 유전자와 마가이닌 유전자를 주형으로 하여 recombinational PCR 방법을 실시하여 마가이닌 유전자와 락토페리신 유전자를 융합하였다(Fig. 1).

마가이닌과 락토페리신의 융합유전자(ML gene)를 *Bbs*I 제한효소로 처리한 후에 동일한 제한효소로 처리한 pUBS1 플라스미드에 연결하여 pUBS-ML1 플라스미드를 제작하였다(Fig. 1). ML 유전자를 갖고 있는 pUBS-ML1 플라스미드를 *Bbs*I 제한 효소로 처리하여 5'말단에 CCCC, 3'말단에 GGGG 염기서열을 갖는 152 bp의 ML 유전자를 잘라내었다. 이를 회수한 후에, self-ligation 방법을 사용하여 동일한 유전자가 여러 회 반복되는 즉, tandem repeat을 이루는 (ML)_n 유전자가 만들어지도록 하였다(data not shown). pUBS1-ML1 플라스미드에 들어있는 다양한 copy 수로 결합되어 있는 ML 유전자 중에서 copy number가 1~5 사이의 유전자를 콜로니 PCR 방법으로 선발하였다(Fig. 2).

상기의 발현 플라스미드(pET-(ML)_n)들을 *E. coli* BL21 (DE3)에 도입하였다. 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3)[pET-(ML)_n]을 LB 액체 배지에서 진탕 배양하였으며, OD₆₀₀=0.5~0.6에

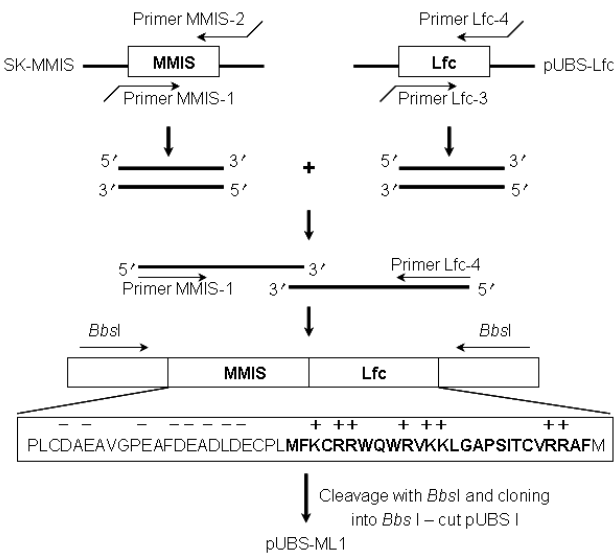


Fig. 1. Construction of MMIS-Lfcin B fusion gene.

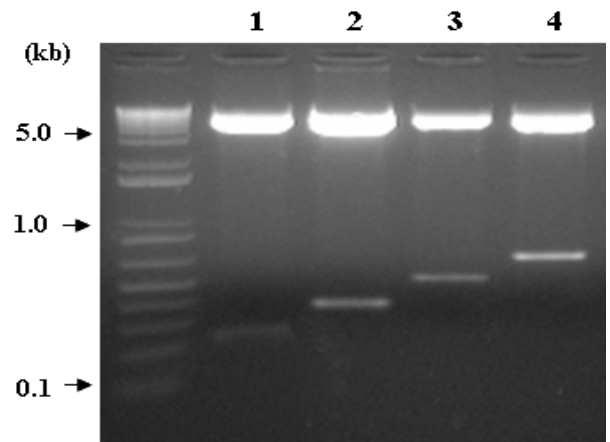


Fig. 2. Restriction analysis of multimeric MMIS-Lfcin B fusion genes cloned in expression vector pET21d (Modified from Kim et al., 2006). Lane 1: (ML)₁, Lane 2: (ML)₂, Lane 3: (ML)₃, Lane 4: (ML)₄.

도달할 때 1 mM IPTG를 처리함으로써 마가이닌과 락토페리신 융합단백질의 발현을 유도시켰다. 그 결과, 락토페리신 유전자가 1회부터 4회까지 반복되어 들어있는 플라스미드들은 단백질 발현이 효율적으로 이루어졌으나, 락토페리신 유전자가 5회 이상 반복하여 들어있는 발현 벡터는 단백질 합성이 효율적으로 이루어지지 않았다(data not shown). 락토페리신의 대량 발현을 위해 락토페리신 유전자가 4회 반복되어 들어있는 플라스미드인 pET-(ML)₄를 갖는 *E. coli* BL21(DE3)[pET-(ML)₄]을 LB 액체배지에서 진탕배양하고 대장균이 OD₆₀₀=0.5~0.6에 도달할 때 1 mM IPTG를 처리함으로써, 분자량 20,000 Da 정도의 융합 단백질의 발현을 유도시켰다. 유도시간에 따른 융합 단백질의 발현 정도를 확인한 결과, IPTG 처리 1시간 이후에 융합단백질이 대량으로 발현됨을 확인하였다(Fig. 3).

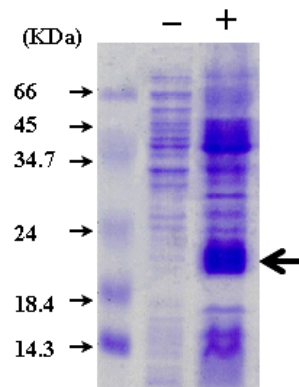


Fig. 3. Expression of tetrameric MMIS-Lfcin B fusion peptide by IPTG induction (Modified from Kim et al., 2006). -: before IPTG induction, +: 1 hr after IPTG induction.

상기의 플라스크 실험결과를 토대로, 5 L의 LB 배지에 대장균을 배양한 후에 상기 조건과 동일하게 1 mM의 IPTG를 처리하여 융합단백질의 발현을 유도하였다. IPTG 처리 1시간 후에 세포를 회수하고 파쇄하였으며, 이를 원심분리하여 침전물로부터 봉입체(inclusion body)를 회수하였다. 회수한 봉입체를 8 M urea(pH 8.0)에 녹인 후에 Ni²⁺-NTA column을 이용하여 락토페리신 융합 단백질을 용출시켰다(data not shown). 용출시킨 융합단백질을 cyanogen bromide(CNBr)로 처리함으로써 음전하를 갖는 마가이닌 펩타이드와 양전하를 갖는 락토페리신을 절단시켰다. CNBr 처리에 의해 융합단백질로부터 떨어져 나온 락토페리신은 QAE-sephadex 크로마토그라피를 이용하여 정제하였다(Fig. 4).

대장균에서 발현시킨 락토페리신의 N-말단 아미노산 서열을 분석한 결과, 락토페리신의 아미노산 서열과 동일한 것으로 확인되었으며(data not shown), 상기의 결과로부터 락토페리신을 대장균에서 성공적으로 발현시켰음을 확인하였다. 발현된 재조합 락토페리신을 정제한 다음, 항균력을 조사하였다. 화학적으로 합성한 락토페리신을 대조군으로 하여 재조합 락토페리신을 1 µg/mL에서 100 µg/mL 농도까지 희석한 후에, 대장균(10⁶/mL)과 함께 배양하였다. 37°C에서 24시간 동안 배양한 후에 대장균 성장 정도를 조사한 결과, 재조합 락토페리신은 화학적으로 합성한 락토페리신과 거의 동일한 항균력을 가지고 있음을 확인할 수 있었다(data not shown).

결론

락토페리신과 같은 항균 펩타이드는 광범위한 항균 스펙트럼을 가지고 있는 경우가 많기 때문에 식품 산업뿐만 아

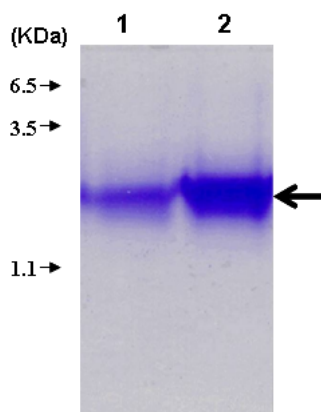


Fig. 4. Purification of the Lfcin B peptide using an ion exchange resin after treatment with cyanogen bromide (Modified from Kim et al., 2006). Lane 1: chemically synthesized Lfcin, Lane 2: purified recombinant Lfcin.

니라 제약 산업 등에서도 매우 유용한 물질의 하나이다. 새로운 개념의 항생물질인 항균 펩타이드는 기존에 사용되고 있는 항생물질과는 다른 작용 기작을 통하여 항균 활성을 나타내므로, 항생제의 약점인 항생제 내성 균주에 대한 문제를 해결할 수 있을 것으로 기대되고 있다. 본 연구를 통해 확보된 락토페리신 대량 발현 기술을 더욱 개량하여 산업적으로 적용이 가능한 수준까지의 생산이 가능해진다면, 식품 소재로서 뿐만 아니라 의약품, 화장품 소재 등으로 응용범위를 넓힐 수 있을 것으로 예상된다.

참고문헌

- Andersen, J. H., Jenssen, H. and Gutteberg, T. J. 2003. Lactoferrin and lactoferricin inhibit Herpes simplex 1 and 2 infection and exhibit synergy when combined with acyclovir. *Antiviral Res.* 58(3):209-215.
- Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K. and Tomita, M. 1992a. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 1121(1-2):130-136.
- Bellamy, W., Takase, M., Wakabayashi, H., Kawase, K. and Tomita, M. 1992. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 472-479.
- Bellamy, W., Wakabayashi, H., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S. and Tomita, M. 1993. Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* 182(2):97-105.
- Diarra, M. S., Petitclerc, D. and Lacasse, P. 2002. Effect of lactoferrin in combination with penicillin on the morphology and the physiology of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 85(5):1141-1149.
- Havenssen, L., Ohlsson, B. G., Hahn-Zoric, M., Hanson, L. A. and Mattsby-Baltzer, I. 2002. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF- κ B. *Cell. Immunol.* 220(2):83-95.
- Isamida, T., Tanaka, T., Omata, Y., Yamaguchi, K., Shimazaki, K. and Saito, A. 1998. Protective effect of lactoferricin against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J. Vet. Med. Sci.* 60(2):241-244.
- Kim, H.-K., Chun, D.-S., Kim, J.-S., Yun, C.-H., Lee, J.-H., Hong, S.-K. and Kang, D.-K. 2006. Expression of the cationic antimicrobial peptide lactoferricin fused with the anionic

- peptide in *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72:330-338.
9. LaVallie, E. R. and McCoy, J. M. 1995. Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*. Curr. Opin. Biotechnol. 6(5):501-506.
 10. Lee, J. H., Minn, I. I., Park, C. B. and Kim, S. C. 1998. Acidic peptide-mediated expression of the antimicrobial peptide buforin II as tandem repeats in *Escherichia coli*. Prot. Exp. Purif. 12:53-60.
 11. McCann, K. B., Lee, A., Wan, J., Roginski, H. and Coventry, M. J. 2003. The effect of bovine lactoferrin and lactoferricin B on the ability of feline calicivirus (a norovirus surrogate) and poliovirus to infect cell cultures. J. Appl. Microbiol. 95(5):1026-1033.
 12. Oram, J. D. and Reiter, B. 1968. Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents. Biochim. Biophys. Acta. 170:351-365.
 13. Shin, K., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Hayasawa, H., Tomita, M., Otsuka, Y. and Yamazaki, S. 1998. Antibacterial activity of bovine lactoferrin and its peptides against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Lett. Appl. Microbiol. 26(6):407-411.
 14. Wakabayashi, H., Abe, S., Teraguchi, S., Hayasawa, H. and Yamaguchi, H. 1998. Inhibition of hyphal growth of azole-resistant strains of *Candida albicans* by triazole antifungal agents in the presence of lactoferrin-related compounds. Antimicrob. Agents Chemother. 42(7):1587-1591.
 15. Wakabayashi, H., Matsumoto, H., Hashimoto, K., Teraguchi, S., Takase, M. and Hayasawa, H. 1999. Inhibition of iron/ascorbate-induced lipid peroxidation by an N-terminal peptide of bovine lactoferrin and its acylated derivatives. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63(5):955-957.
 16. Yoo, Y. C., Watanabe, S., Watanabe, R., Hata, K., Shimazaki, K. and Azuma, I. 1998. Bovine lactoferrin and Lactoferricin inhibit tumor metastasis in mice. Adv. Exp. Med. Biol. 443:285-291.