

- 연구단보(Research Note) -

## Phospholipid Liposomes과 Bovine Lactoferrin의 상호작용

김미영<sup>1</sup> · 강신원<sup>1</sup> · 박장수<sup>1</sup> · 남명수<sup>2\*</sup>

### Interactions of Phospholipid Liposomes and Bovine Lactoferrin

Mi-young Kim<sup>1</sup> · Shin-won Kang<sup>1</sup> · Jang-su Park<sup>1</sup> · Myoung Soo Nam<sup>2\*</sup>

#### ABSTRACT

Apo, holo, native-type of lactoferrin showed a similar pattern of circular dichroism(CD) spectra. Lactoferrin appeared to interact more easily with negatively charged liposome than neutral liposome. Holo-type of lactoferrin showed the highest degree of leakage, whereas apo-type of lactoferrin showed the lowest level of leakage. Holo-type lactoferrin could more easily interact with phospholipid liposomes than apo-type lactoferrin, when used as an artificial membrane.

**Key words:** Apo-lactoferrin, CD spectra, Holo-lactoferrin, Phospholipid liposome

## I. 서론

Lactoferrin은 단일 polypeptide 사슬의 690개의 아미노산으로 구성되어있는 분자량 약 77,000 dalton의 철 결합 당단백질(Schanbacher 등, 1993; Lonnerdal와 Iyer, 1995)로 두 개의 lobe를 가지고 각각의 lobe에 하나의 철 분자가 결합되어있다(Baker 등, 1994).이 lobe를 N-와 C-lobe라 하고, 각각의 lobe는 아미노산 상동성이 약 40%로 유전자 복제에 의해 진화되어진 transferrin family의 한 종류인 lactoferrin으로 생각되어진다(Lonnerdal와 Iyer, 1995). 이 단백질은 transferrin family로, 처음에는 우유로부터 분리되었고 눈물, 침, 정액, 그리고 neutrophils의 secondary granules 분비물과 같이 대부분의 내분비물에서 발견되었다. Lactoferrin에 관한 많은 연구자들은 in vitro에서 항균활성과 항염증 기능이 있는 것으로 보고하였는데, 이것은 감염과 과도한 염증을 억제하는 개체방어으로써 중요한 역할을 하는 것으로 보고하였다(Broxmeyer 등, 1980; Frasson와 Lonnerdal, 1980; Hoshizume 등, 1983).

Lactoferrin의 항균활성 기전은 미생물 외막의 lipopolysaccharide를 lactoferrin이 공격하므로 미생물이 손상을 입어서 사멸하는 모델을 제시하고 있다(Ellison III 등, 1988).

인지질은 미생물계, 식물계, 동물계에 널리 분포하며, 단백질과 함께 각종 생체막을 구성하는 중요 구성 성분의 하나이다. 인지질은 복합지질의 일종으로 인산에스테르 및 인산에스테르를 갖는 지질의 총칭이다. 생체막이 관여하는 각종 생리 기능에 대한 연구를 위해서 생체막 지질의 모델로서 각종 인지질을 조합하여 조제한 인공막(지질인공막, liposome)을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구는 lactoferrin의 항균활성 기전을 밝히는 기초 연구로 미생물의 생체막 구성성분인 인지질 liposome과 상호작용을 알아보기 위해서 수행하였고 그 결과를 보고한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. Lactoferrin의 준비

동결 건조한 젖소 유청 단백질(0.5 g/10 ml)은 50 mM sodium phosphate buffer에 녹이고 CM-Sephadex C-50-120 (Sigma, U.S.A)에 흡착시키고 Nam 등(1998)의 방법으로 정제하여 동결건조 후 냉동 보관하면서 사용하였다

### 2. apo-와 holo-lactoferrin의 준비

apo-lactoferrin을 준비하기 위하여 정제한 lactoferrin은 0.1 M citric acid에 24시간 투석시킨 후, 증류수에 48시간 투석하여 동결건조하였다(Aisen와 Leibman, 1972; Schanbacher 등, 1993). 철 포화 락토페린(holo-lactoferrin)은 lactoferrin (30 mg)을 0.1 M sodium bicarbonate(pH 8.2) buffer로 0.7 ml 녹인 후 FeCl<sub>3</sub> solution(12.5 mM: pH 2.3)을 첨가하여 완전히 포화시켜 0.1 M sodium bicarbonate로 희석시켰다.

<sup>1</sup> 부산대학교 화학과(Department of Chemistry, Pusan National University, Busan 609-735, Korea)

<sup>2</sup> 충남대학교 동물바이오키스시스템과학과(Lab. of Milk Food Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea)

\* Corresponding author: 남명수(Myoung Soo Nam)

Tel.: +82-42-821-5782 Fax: +82-42-823-2766

E-mail: namssoo@cnu.ac.kr

2010년 9월 16일 투고

2010년 10월 10일 심사완료

2010년 12월 13일 게재확정

그리고 증류수에 3시간 동안 투석시킨 후 동결 건조하여 사용하였다(Feng 등, 1995).

### 3. Circular dichroism

CD spectra는 25 °C, 200 nm - 260 nm에서 20 nm/min (Jasco, J.600A CD spectropolarimeter, Tokyo, Japan)간 측정하였다. Lactoferrin의 농도는 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0)에서 20 μM로 조정하였다(Aisen와 Leibman, 1972).

### 4. phospholipid liposomes과 상호 작용

Small unilamella vesicle은 Phosphatidyl Choline(PC, Sigma, USA)과 PC-PG (Phosphatidyl Glycerol, Sigma, USA)을 이용하여 만들었다. 인지질 혼합물을 소량의 diethyl ether에 용해시킨 후 evaporated at 35 °C, 60 rpm에서 유기물을 증발 시켰다. 유기물이 증발된 지질 혼합물을 5 ml의 Tris-buffer(5 mM, pH 7.4)로 수화시킨 후 vortex mixer를 사용하여 혼합하였다. 혼합된 용액을 4 °C, 15,000 rpm에서 40분 동안 원심 분리하여 multilamella vesicles을 제거한 후 25 ml의 동일한 buffer를 넣어 사용하였다. CF(carboxy fluorescein, Sigma, USA)을 가지는 unilamellar vesicles은 상기와 유사한 방법으로 Tris-HCl buffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8.0)와 100 mM carboxy fluorescein 넣어 준비 하였다(Posse 등, 1994). 형광 liposome은 520 nm과 450 nm의 형광 영역에서 측정하였다. 50 μl의 lactoferrin을 liposome에 넣은 후 3분 동안 15초 형광을 측정하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. apo, holo, native-type lactoferrin의 CD spectroscopy

CD spectra는 200nm에서 260nm의 범위에서 얻었다. Fig. 1은 각각의 종류에 따른 lactoferrin(apo, holo, native-type lactoferrin)의 circular dichroism(CD) spectra를 측정한 결과이다. 각각의 lactoferrin은 비슷한 경향의 spectra 결과를 나타내었다. 이런 결과는 철 결합이 spectra의 경향에 거의 영향이 없음을 암시한다. Holo-lactoferrin(iron-saturated lactoferrin)에 대한 타원편광은 lactoferrin (apo-, and native-lactoferrin) 보다 더 높게 나타났는데 이런 관찰은 lactoferrin의 2차 구조는 Fe<sup>+++</sup> 포화 정도에 의해 영향을 받지 않는다는 것을 의미한다.

### 2. Lactoferrin과 인지질 liposome 과의 상호 작용

Fig. 2-A는 중성 liposome(PC)에서의 lactoferrin에 의한 형광누출 결과를 보여주고 있다. Holo-type의 lactoferrin에

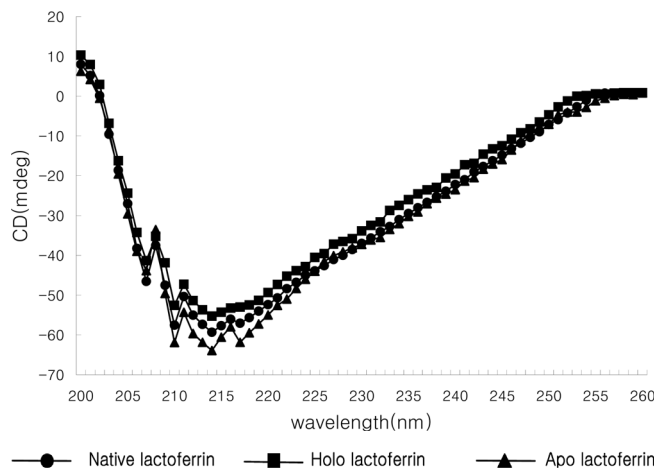


Fig. 1. CD spectra of lactoferrin was measured in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0) at 25 °C. The protein concentration was 20 μM.

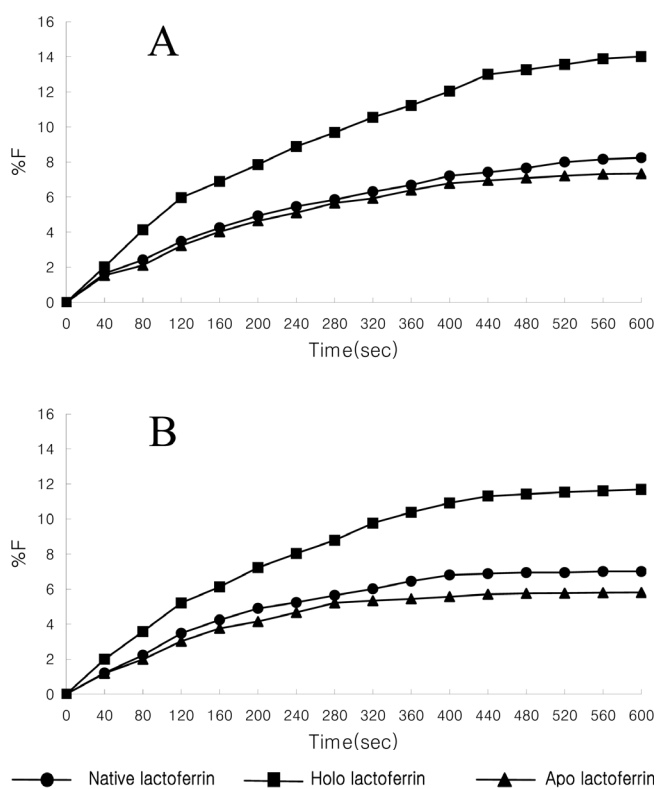


Fig. 2. Percentage fluorescence in liposomes-leakage pattern of lactoferrin in PC. The percentage of fluorescence (%F) was calculated according to the following;  $\%F = (F - F_0) / (F_t - F_0) \times 100$  where  $F_0$  and  $F$  are the donor fluorescence in the absence and in the presence of lactoferrin, and  $F_t$  is the fluorescence of Triton X-100 (A). Percentage fluorescence in liposomes-leakage pattern of lactoferrin in PC:PG (4:1). The percentage of fluorescence (%F) was calculated according to the following;  $\%F = (F - F_0) / (F_t - F_0) \times 100$  where  $F_0$  and  $F$  are the donor fluorescence in the absence and presence of lactoferrin, and  $F_t$  is the fluorescence of Triton X-100 (B).

서는 높은 형광 누출을 보이는 반면에 apo-type의 lactoferrin에서는 낮은 누출을 보였다. 이 결과는 holo-type의 lactoferrin이 apo-type의 lactoferrin 보다 쉽게 인지질 liposome과 상호작용한다는 것을 보여주는 것이다. 또한 Fig. 2-B에서는 산성 liposome(negatively charged liposome, PC:PG, 4:1)에서 lactoferrin에 의한 형광누출 결과를 보여주고 있다. Fig. 2-A와 Fig. 2-B을 비교해 보면, 음전하를 가지는 liposome(PC:PG, 4:1)이 중성 liposome(PC only) 보다 상호작용이 높은 것을 알 수 있다. 이 결과들의 명확한 이유를 밝히기 위해서는 보다 많은 실험들이 필요하다고 생각한다.

Fig. 1에 나타난 바와 같이, lactoferrin의 iron 결합은 CD spectra의 형태에 큰 영향을 미치지 못하고 있다. 이 결과는 철의 포화 정도에 따른 lactoferrin의 2차 구조의 변화가 없다는 것을 보여주는 결과이다. Lactoferrin은 음전하를 가지는 liposome과의 상호작용이 중성 liposome보다 높은 것으로 나타났지만 이것에 대한 확인은 좀더 많은 실험이 필요할 것 같다(Fig. 2-A, Fig. 2-B). 같은 type의 liposome인 경우에도, holo-lactoferrin이 다른 type보다 더 활성이 높다. 이것은 양전하를 많이 가진 holo-lactoferrin과 liposome 사이의 정전기적 상호작용 때문인 것 같다.

Aguilera 등(1999)은 lactoferrin에서 유래된 항균성 펩타이드를 *Escherichia coli*와 인공막에 결합하여 투과성을 연구하였다. 이 펩타이드는 liposome에 결합하여 비특이적인 이온의 투과성을 증대하여 미생물의 세포질 막을 비극성으로 바꾸고, pH 기울기를 상실하도록 하여 ATP의 생산과 세포의 치사와 같은 치명적인 세포막 기능에 불균형을 미칠 수 있다고 보고하였다.

#### IV. 결론

Lactoferrin의 항균활성 기전을 밝히는 기초 연구로 미생물의 생체막 구성성분인 인지질 liposome과 상호작용을 알아보았다. Apo-, holo-, native-type의 lactoferrin의 spectra 결과는 각각 비슷한 경향을 나타내었는데 이런 결과는 철 결합이 spectra의 경향에 거의 영향이 없음을 암시한다. Lactoferrin은 중성 liposome 보다 음성전하를 띤 liposome에 더 쉽게 상호작용하였다. Holo-type의 lactoferrin에서는 높은 형광 누출을 보였는데 이는 holo-type의 lactoferrin이 apo-type의 lactoferrin 보다 쉽게 인지질 liposome과 상호작용하는 것이다.

#### 참고문헌

- Aguilera, O., H. Ostolaza, L.M. Quiro's, J.F. Fierro. 1999. Permeabilizing action of an antimicrobial lactoferrin-derived peptide on bacterial and artificial membranes. FEBS. 462: 273-277.
- Aisen, P., A. Leibman. 1972. Lactoferrin and transferrin: a comparative study. Biochem. Biophys. Acta. 257: 314-323.
- Baker, E.N., B.F. Anderson, H.M. Baker, C.L. Day, M. Haridas, G.E. Norris, S.V. Rumball, C.A. Smith, D.H. Thomas. 1994. Three-dimensional structure of lactoferrin in various functional states. Anv. Exp. Med. Biol. 357: 1-12.
- Broxmeyer, H.E., M. Desousa, A. Smithyman, P. Ralph, J. Hamilton, J.I. Kurland, J. Bagnacki. 1980. Specificity and modulation of the action of lactoferrin, a negative feedback regulator of myelopoiesis. Blood 55: 324-333.
- Ellison III, R.T., T.J. Giehl, F.M. LaForce. 1988. Damage of outer membrane of the enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. Infect. Immun. 56: 2774-2781.
- Feng, M., L. Van Der Does, A. Bantjes. 1995. Preparation of apo-lactoferrin with a very low iron saturation. J. Dairy Sci. 78: 2352-2357.
- Frasson, G.B., B. Lonnerdal. 1980. Iron in human milk. J. Pediatrics 96: 380-384.
- Hoshizume, S., K. Kuroda, H. Murakami. 1983. Identification of lactoferrin as an essential growth factor for human lymphocytic cell lines in serum free medium. Biochim. Biophys. Acta. 763: 377-382.
- Lonnerdal, B., S. Iyer. 1995. Lactoferrin molecular structure and biological function. Ann. Rev. Nutr. 15: 93-110.
- Nam, M.S., D.Y. Yu. 1998. Purification of Korean native goat milk lactoferrin by using ion-exchange chromatography and affinity chromatography. Korean J. Dairy Sci. 20: 217-222.
- Posse, E.B., F. De Arcuri, R.D. Morero. 1994. Lysozyme interactions with phospholipid vesicles : relationships with fusion and release of aqueous content. Biochim. Biophys. Acta. 1193: 101-106.
- Schanbacher, F.L., R.E. Goodman, R.S. Talhouk. 1993. Bovine mammary lactoferrin : implication from messenger ribonucleic acid (mRNA). J. Dairy. Sci. 76: 3812-3831.