

보 문

## *Pichia pastoris*에서 사람 락토페린 N-lobe의 발현과 항균활성

원수진 · 조재형 · 김승환 · 권혁진 · 이현환\*

한국의국어대학교 생명공학과

## Expression of human lactoferrin N-lobe in *Pichia pastoris* and its antibacterial activity

Su-Jin Won, Jae-Hyung Jo, Seung-Hwan Kim, Hyuk-Jin Kwon, and Hyune-Hwan Lee\*

Department of Bioscience and Biotechnology and Protein Research Center of GRRC, Hankuk University of Foreign Studies, Yongin 17035, Republic of Korea

(Received September 2, 2015; Accepted September 11, 2015)

**ABSTRACT:** Lactoferrin (LF) is a multifunctional, iron-binding glycoprotein found in physiological secretions of mammals. LF shows antibacterial, antiviral and antifungal activities. In the present study, a gene encoding the N-terminal lobe of human lactoferrin (hLF) was isolated, cloned and expressed in methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. The recombinant hLF-N (rhLF-N) protein was secreted into the culture medium at the level of 458 µg/ml in 3 L fermentor. The size of purified hLF-N was estimated as 35 kDa when analyzed by SDS-PAGE and western blotting. The rhLF-N was further confirmed by immunodiffusion using the anti-hLF polyclonal antibody. The expression profile analysis by qRT-PCR showed that the relative mRNA expression of rhLF-N was maximal after 2-3 days of methanol induction and reduced gradually at 4 days. The purified rhLF-N showed broad antibacterial activities against the pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, and *Salmonella typhimurium*. However, rhLF-N showed relatively lower activity when compared to peptides derived from LF. In spite of this weak activity, the rhLF-N expressed in *P. pastoris* might be more advantageous for the industrial application, because rhLF-N is secreted into the culture medium and the production can also be increased by optimization of culture conditions.

**Key words:** *Pichia pastoris*, antibacterial activity, expression, human lactoferrin, N-lobe

사람 락토페린(human lactoferrin, hLF)은 주로 초유에서 대량(약 7-8 g/L)으로 분비되는 단백질로서 양이온성(cationic)이며, 철과 결합하는 다기능성 당단백질이다. 또한 호중구, 혈장, 침, 눈물, 질액(vaginal fluid), 정액, 콧물, 위장관액과 같은 다양한 생체 내 용액에서도 검출된다(Masson *et al.*, 1966). hLF는 많은 생리적 기능을 가진 것으로 알려져 있다. 특히 두 분자의 철 이온과 결합함으로써 철 이온의 대사 과정에 관여한다. 또한 내재적 면역(innate immunity)의 일부로서 아주 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려졌으며, 이에 따라 박테리아, 곰팡이, 바이러스와 심지어 기생충에 의한 감염을 효과적으로 막는 숙주방어체계로서의 역할을 수행한다(Valenti and

Antonini, 2005). hLF의 철 이온에 대한 높은 결합 친화력으로 말미암아 미생물이 자라는 환경으로부터 철 이온을 고갈시킴으로써 미생물의 성장을 억제(bacteriostatic)한다. 이와 같은 기작은 iron-free 상태의 apo-hLF가 철 이온과 결합하여 holo-hLF를 형성함으로써 가능한 것으로 알려져 있다(Day *et al.*, 1992). 한편 철 이온이 결합된 holo-hLF로부터 박테리아를 사멸시키는 기능(bactericidal) 또한 알려져 있으며 이는 hLF가 병원균의 lipopolysaccharide (LPS)에 직접 작용함으로써 일어난다. 즉 hLF의 N-말단부위에 Lys나 Arg 같은 염기성 아미노산이 상대적으로 많이 분포하여 LPS에 쉽게 결합하게 되고, 결과적으로 LPS와 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 등과 같은 양이온들과의 결합을 차단하여 세포벽으로부터 LPS를 유리시키고 세포막의 투과성을 증가시켜 박테리아의 사멸을 초래하게 되는 것이다(Coughlin *et al.*, 1983; Ellison *et al.*, 1988; Miyazawa *et al.*,

\*For correspondence. E-mail: hyunelee@hufs.ac.kr;  
Tel.: +82-31-330-4280; Fax: +82-31-330-4566

1991; Bellamy et al., 1992).

hLF는 분자량 78 kDa의 single polypeptide로서 N-lobe와 C-lobe라고 하는 구조적으로 유사한 두 개의 lobe로 구성되어 있다. 이 두 lobe간의 아미노산 유사도는 약 40%이며(Day et al., 1992), X-선 회절상에 의하면 두 lobe는 입체구조가 아주 비슷한 bilobal 형태를 이루고 있어 두 lobe가 대칭적으로 접혀 있다는 것을 나타낸다(Anderson et al., 1987, 1989, 1990). 이 두 lobe는 아주 짧은 “hinge”로 연결되어 있으며(Anderson et al., 1989), 각각의 lobe는 한 분자의  $Fe^{3+}$ 과  $CO_3^{2-}$  이온과 동시에 결합한다(Anderson et al., 1990; Day et al., 1992). 보고에 의하면 N-lobe에는 염기성 아미노산이 많이 분포하기 때문에 박테리아를 죽이는 bactericidal 활성이 hLF로부터 N-lobe만을 분리하였을 경우에도 여전히 존재하는 것으로 알려져 있다(Bellamy et al., 1992). 이는 N-lobe가 hLF가 위(stomach)에서 pepsin에 의해 분해될 때 생성되는 강력한 염기성 항균 펩타이드인 락토페리신(lactoferricin, Lfcin)(Kuwata et al., 1998)을 포함하고 있기 때문인 것으로 추측된다. 따라서 N-lobe만을 분리하였을 때 항균활성의 변화를 연구하고 이를 hLF나 Lfcin과 비교하는 것은 그 의미가 매우 있다 할 것이다.

메탄올자화 효모인 *Pichia pastoris*는 alcohol oxidase 1 (AOX1) promoter를 사용하여 외래 유전자를 대량 발현시키거나(Sreekrishna et al., 1997), 발현된 단백질을 세포 외로 분비시키기(Sue et al., 2005)에 아주 좋은 숙주로 알려져 있다. *P. pastoris*를 이용하여 단백질을 대량 발현시키기 위한 다양한 방법들이 알려져 있다. 즉 유전자의 codon 최적화(Teng et al., 2007), 분비서열 변형(Xiong et al., 2006), 외부 유전자의 copy

number 증대(Clare et al., 1991), 최적 발효조건 연구(Plantz et al., 2006) 등이다. 또한 *P. pastoris*를 이용하여 많은 외부 단백질들이 발현되었고 산업화를 위한 효과적인 숙주로서 증명되었다.

락토페린(LF)의 항균 기능을 비롯한 다양한 생리적 기능에도 불구하고 산업적 측면에서 볼 때 LF 유래 펩타이드들은 크기가 너무 작아 배양이나 정제과정 등에서 손실이 크고, 반면에 완전한 형태의 LF나 hLF는 분자량이 너무 커서 배양 시 세포 외부로 분비가 쉽지 않다. 따라서 본 연구에서는 hLF 유래 N-lobe를 분리하여 클로닝하고, 메탄올자화 효모인 *P. pastoris*의 염색체 속으로 삽입한 후, 발현시켜 배양액으로 분비시킨 후 정제하여 항균활성을 측정하고 그 특성을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 균주, 플라스미드, 재료 및 배양 조건

Table 1은 본 연구에 사용된 균주와 플라스미드를 나타낸다. Rabbit anti-hLF polyclonal antibody는 Sigma에서 구입하여 사용하였다. Mouse anti-His6 antibody는 IG Therapy Co.에서 구입하였으며, goat anti-mouse IgG AP-conjugated antibody는 Stressgen Co.에서 구입하였다. Western Blue<sup>R</sup> kit는 Promega에서 구입하였고 플라스미드 분리과 DNA 정제 kit는 QIAgen으로부터 구입하였다. Total RNA 추출 kit와 DiaStar<sup>TM</sup> RTase cDNA purification kit는 Real Biotech Co.와 Solgent Co.로부터 각각 구입하였다. 사용한 모든 primer들은 Table 2에 나타

**Table 1.** Strains and plasmids used in this study

Strains / Plasmids	Genotype / Characteristics	Reference
<b>Strains</b>		
<i>Escherichia coli</i> TOP10F'	F'[tet]mcrA△(mrr-shd RMS mcrBC) Ψ80△lacX74 deoR recA1 galU galKλ. nupG endA1 araD139 (ara ,leu)-7697 rpsL	Invitrogen, Inc.
<i>Pichia pastoris</i> SMD1168	His4 mut <sup>+</sup> pep4	Invitrogen, Inc.
SJ-HLNL	<i>Pichia pastoris</i> SMD1168 integrated by pPIC9K-hLfN	This study
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacterial pathogen	ATCC 6538P
<i>Escherichia coli</i>	Bacterial pathogen	ATCC 8739
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacterial pathogen	KCCM 11802
<i>Burkholderia cepacia</i>	Bacterial pathogen	ATCC 25416
<i>Salmonella typhimurium</i>	Bacterial pathogen	ATCC 14028
<b>Plasmids</b>		
pPIC9K	Expression vector, kan <sup>r</sup> amp <sup>r</sup> his <sup>+</sup>	Invitrogen, Inc.
pPIC9K-630M	pPIC9K containing hLf-ScTIP630	Jo et al. (2011)
pPIC9K-hLfN	pPIC9K containing hLF N-lobe	This study

**Table 2.** Primer sequences used in this study

Primer	Sequence (5'→3')*
hLfN(F)	AAAAAGCGGCCGCGGGCCGTAGGAGAAGGAGT
hLfN(R)	AAAAAGCGGCCGCTTAATGATGATGATGATGATGCCTCAAGTTCGGATGGC
AOX1(F)	GACTGGTTCCAATTGACAAG
AOXTT(R)	GCAAATGGCATTCTGACATC
actin cDNA(R)	GGAGTACTTTCTTTCTGGTGGA
actin(F)	ATCTTCATCCATTGAGAAGTCTTAC
actin(R)	GATGTTACTGTAGAGTTCCTTACGAA
qRT-N(F)	GCTGGAGACGTGGCTTTT
qRT-N(R)	AGATTCCAGATGGCATCCTC

\*Underlined sequences show the *NotI* restriction endonuclease recognition site.

나 있으며 Bioneer Co.에서 합성하여 구입하였다. Peptide bovine LFcin17-31 (Madureira *et al.*, 2007), bovine LFampin 268-284 (Van der Kraan *et al.*, 2006), Hlopt2 (Håversen *et al.*, 2010), HLSA (personal communication)는 Peptron Co.에서 합성하였다. *E. coli* TOP10F'은 플라스미드 형질전환 숙주로서 LB 배지에 배양하였으며, 필요 시 50 µg/ml의 ampicillin을 첨가하였다. 균주 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *E. coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* KCCM 11802, *Burkholderia cepacia* ATCC 25416, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028은 항균활성 측정 대상 균주로 사용하였다. *P. pastoris* SMD 1168은 hLF-N의 발현 숙주로 사용하였고 통상적으로 YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose)에서 배양하였다. BMGY 배지와 BMMY 배지는 *P. pastoris*에서 hLF-N의 발현에 사용하였다(Jo *et al.*, 2011).

### *P. pastoris*에서 hLF N-lobe의 클로닝과 발현

hLF-N을 coding하는 유전자는 플라스미드 pPIC9K-630M (Jo *et al.*, 2011)으로부터 PCR을 통해 얻었다. 이 때 forward primer와 reverse primer는 hLfN(F)와 hLfN(R)을 각각 사용하였다. 이 두 primer는 모두 제한효소 *NotI* 서열을 포함하고 있으며, 특히 reverse primer는 6x His-tag가 삽입되어 있다. PCR에 의해 얻은 1.0 kb의 hLF-N DNA를 pPIC9K vector (Invitrogen)의 *NotI* 부위에 삽입하여 재조합 플라스미드 pPIC9K-hLfN을 제조하였다. 이 재조합 플라스미드를 제한효소 *SaI*I으로 절단하여 선형으로 만든 후 *P. pastoris* SMD 1168의 염색체 속으로 electroporation에 의해 삽입하였다(Jo *et al.*, 2011). *P. pastoris*의 염색체 DNA에 삽입된 플라스미드 DNA는 AOX1 프로모터와 hLF-N 유전자 사이를 PCR로 증폭함으로써 확인하였으며, 이때 forward primer는 AOX1(F)를, reverse

primer는 AOXTT(R)을 사용하였다. 이렇게 만들어진 hLF-N을 발현하는 재조합 *P. pastoris* 균주를 SJ-HLNL이라고 명명하였다.

재조합 균주 SJ-HLNL로부터 hLF-N의 발현은 Jo 등(2011)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 간략하게 보면 BMGY 배지에서 30°C에서 하룻밤 배양한 SJ-HLNL 종균을 원심분리하여 수확한 후, BMMY 배지를 OD<sub>600</sub>에서 1.0이 되도록 첨가한 다음 본 배양을 시행하였다. hLF-N의 발현을 유도하기 위해서 본 배양 시작 48시간 후부터 120시간까지 매 24시간마다 methanol을 최종농도 0.5% (v/v)가 되게 첨가하였다.

### SDS-PAGE와 western blotting에 의한 hLF N-lobe의 발현 분석

BMMY 배지에서 재조합 균주 SJ-HLNL을 배양한 후 4°C, 3,500 × g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 회수한 후 12% SDS-PAGE로 분석하였다. Western blotting은 Western Blue<sup>R</sup> kit (Promega)를 사용하였으며 Sambrook 등(1989)의 방법에 따라 수행하였다. N-lobe를 탐지하기 위해서 mouse anti-6x His monoclonal antibody와 goat anti-mouse IgG (Fc)-alkaline phosphatase conjugate를 사용하였다. Alkaline phosphatase의 기질로는 4-nitrobluetetrazolium chloride (NBT)와 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) (Thermo scientific Inc.)를 사용하였다.

### RNA 분리, cDNA 합성, quantitative real time PCR (qRT-PCR)

재조합 균주 SJ-HLNL로부터 total RNA를 kit (Real Biotech Co.)를 사용하여 추출하였다. 이 때 추출방법은 제조사의 방법에 따랐다. 추출과정에서 오염된 genomic DNA는 RQI RNase-

Free DNase (Promega)을 처리하여 제거하였다. cDNA 합성 반응은 DiaStar™ RT Kit (Solgent Co.)를 사용하였으며 제조사의 방법에 따라 반응시켰다. 간단히 보면 cDNA 합성은 1.0 µg total RNA, 1 µM primer, 4 µl reaction buffer (5x), 0.4 mM DTT, MuLV 역전사효소를 포함하는 1 µl DiaStar™ RTase를 20 µl의 반응액 속에 혼합한 후 50°C에서 60분 반응하였다. hLF-N과 house-keeping 유전자인 actin cDNA의 합성을 위해서는 hLfN(R) primer와 actin cDNA(R) primer를 각각 사용하였다. cDNA 합성은 PCR에 의해 확인하였으며 이를 위해 hLFN(F)와 hLfN(R) primer를 사용하였다. Actin cDNA의 합성을 확인하기 위해서는 actin(F)와 actin(R) primer를 사용하였다.

qRT-PCR은 25 µl의 USB® HotStart-IT® SYBR® Green qRT-PCR Master Mix (2x), 5 µl의 cDNA (1:5 희석), 1 µl의 각 primer (10 µM)를 포함하는 50 µl의 반응액을 MyiQ™ Single-Color real-time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, Inc.)를 사용하여 수행하였다. 이 때, hLF-N의 증폭을 위해서는 qRT-N(F)와 qRT-N(R) primer를 사용하였으며 95°C, 1 min의 pre-denaturation 후, amplification은 95°C, 15 sec, 60°C, 15 sec, 72°C, 30 sec에서 총 40 cycle을 시행하였고 그 후, 72°C에서 1 min 동안 1 cycle의 extension을 하였다. House-keeping 유전자로는 actin 유전자를 사용하였고, 결과는 2<sup>-△△Ct</sup> 방법(Livak and Schmittgen, 2001)에 의해 분석하였다. 반복성 검증을 위해서 3번의 독립적인 실험을 수행하였다.

### 재조합 hLF N-lobe의 정제

재조합 N-lobe는 재조합 균주 SJ-HLNL을 배양하여 N-lobe의 발현을 유도한 다음, 상등액을 수확하여 QIAexpress® Kits (QIAGEN Co.)를 사용하여 Ni-NTA affinity chromatography로 정제하였다. 먼저 1 L의 SJ-HLNL 배양액을 Ultracel® 30 kDa Ultrafiltration Discs (Millipore)를 장착한 Stirred Ultrafiltration Cells Model 8200 (Millipore)를 사용하여 1/20으로 농축하였다. 이 농축용액을 Ni-NTA affinity chromatography를 이용하여 정제하였으며 이 때 방법은 제조사의 방법에 따랐다. 간단히 요약하면 30 ml의 elution buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0)에 collection 된 N-lobe를 4°C, 1 L의 PBS 용액에서 6시간 동안 Spectra/Por® dialysis membrane (MW cutoff: 1.2-1.4 kDa, Spectrum laboratories, Inc.)을 사용하여 dialysis 하였다. 그 후, 용액을 회수하여 동일한 조건으로 1 L의 증류수에서 각각 6시간, 12시간씩 두 번 더 dialysis하였다. 그 후 Dialyzed된 용액을 Pierce® Concentrator (MW cutoff: 20 kDa)을 사용하여 농축하였다. 단백질 농도는 Lowry법(1951)을 사용하여 정량하였다.

### 면역확산 분석법

재조합 hLF-N을 Ouchterlony double diffusion 분석법(1953)을 이용하여 면역학적으로 확인하였다. 간단히 기술하면, 4 ml의 0.8% agarose gel 용액을 90 mm petri dish에 부어서 굳힌 후, 지름 8 mm 크기의 구멍 4개를 가운데 구멍을 중심으로 2.5 cm 간격으로 만들었다. 주변의 구멍 3개에 각각 다른 농도(63.2 µg, 39.5 µg, 23.7 µg)의 재조합 hLF-N 단백질을 떨어 뜨리고, 나머지 한 개의 구멍에는 초유로부터 정제된 hLF를 떨어뜨렸다. 가운데 구멍에는 rabbit anti-hLF antibody를 떨어뜨린 후 상온에서 하룻밤 방치하여 확산이 진행되게 하였다. 이 후 이를 coomassie blue로 염색하여 관찰하였다.

### 항균활성 측정

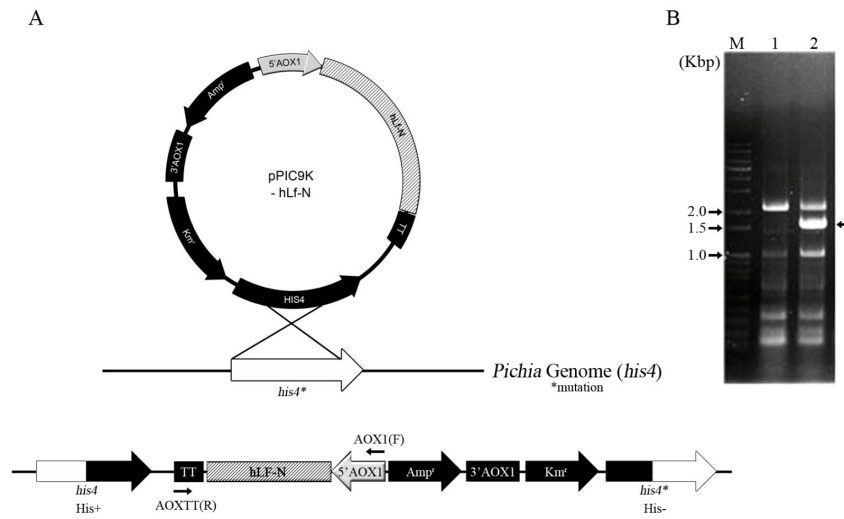
항균활성은 Jo 등(2011)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. Halo assay를 위해서는 약 40 µg의 정제 hLF-N을 peptone-agar (1% peptone, 1.5% agar)에 각각 도말 된 병원성 균주 *S. aureus* ATCC 6538P, *E. coli* ATCC 8739, *P. aeruginosa* KCCM 11802, *B. cepacia* ATCC 25416, *S. typhimurium* ATCC 14028 위에 점적하였다. 이를 37°C 항온기에서 하룻밤 배양한 다음, 나타나는 투명한 환(clear halo)을 관찰하였다. Colony counting assay를 위해서는 약 3 × 10<sup>4</sup>개의 균체를 PBS (0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4)에 현탁 한 후, 주어진 농도의 재조합 hLF-N과 섞어 22°C에서 1시간 30분 방치한 다음, peptone-agar에 도말하여 37°C에서 하룻밤 배양하였다. Negative control은 *P. pastoris* SMD 1168의 배양 상등액을 첨가한 뒤 나타난 colony수를 사용하였다. 항균 효과는 상대생존율로 나타내었으며, hLF-N이나 항균 펩타이드 첨가 후 나타난 colony수를 negative control에서 나타난 총 colony수로 나눈 백분율로 표시 하였다. 한편 positive control로는 kanamycin 150 µg을 첨가한 후 나타나는 colony수를 counting하여 사용하였다. 또한 hLF-N과 항균성을 비교하기 위해 항균 펩타이드인 bovine LFcin17-31, bovine LFampin 268-284, Hlopt2, HLSA 등을 사용하였다.

## 결 과

### *P. pastoris*에서 hLF N-lobe의 클로닝, 발현 및 정제

3'말단에 6x His-tag가 부착된 hLF-N 유전자를 pPIC9K 벡터의 제한효소 *NotI* 부위로 삽입하여 재조합 플라스미드 pPIC9K-hLfN을 제조하였다(Fig. 1A). 발현된 재조합 단백질

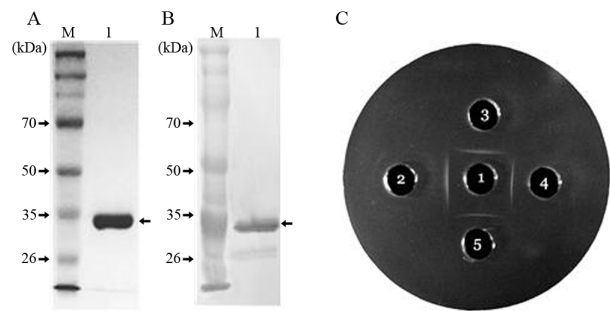




**Fig. 1. Recombinant plasmid pPIC9K-hLF-N and integration into the chromosome of *P. pastoris*.** (A) The plasmid was cut by *Sall* and integrated into the *his4* site of chromosome by single crossover. (B) Agarose gel analysis of the amplified DNA by PCR from the chromosomal DNA of strain SJ-HLNL. Used primers are indicated by arrows. M, size marker; lane 1, chromosomal DNA of *P. pastoris* SMD 1168; lane 2, *P. pastoris* SJ-HLNL. 1.5 kb amplified DNA containing hLF-N is shown by arrow.

의 세포 외분비를 위해서 hLF-N 유전자를  $\alpha$ -factor signal sequence와 연결하여 AOX1 프로모터 하에 위치하게 하였다. 재조합 플라스미드 pPIC9K-hLF-N을 제한효소 *Sall*으로 절단하여 선형으로 만든 후, 이를 *P. pastoris* SMD 1168의 염색체의 *his4* 위치로 single crossover에 의해 삽입 시켰다(Fig. 1A). hLF-N 유전자의 삽입을 확인하기 위해서 primer AOX1(F)와 AOXTT(R)을 사용하여 PCR에 의해 증폭하였다. 그 결과 AOX1 프로모터에서 pPIC9K 벡터의 전사종결부위(TT) 사이에 존재하는 1.5 kb의 DNA가 나타났다(Fig. 1B). 이는 pPIC9K-hLF-N의 동일위치의 크기와 일치하였으며, 또한 이 DNA를 sequencing한 결과 염기서열이 hLF-N 유전자와 정확히 일치하였다(자료 미제시). 이런 결과로 볼 때 hLF-N 유전자는 *P. pastoris*의 *his4* 위치에 정확하게 삽입되었으며, 이 재조합 균주를 SJ-HLNL이라 명명하였다.

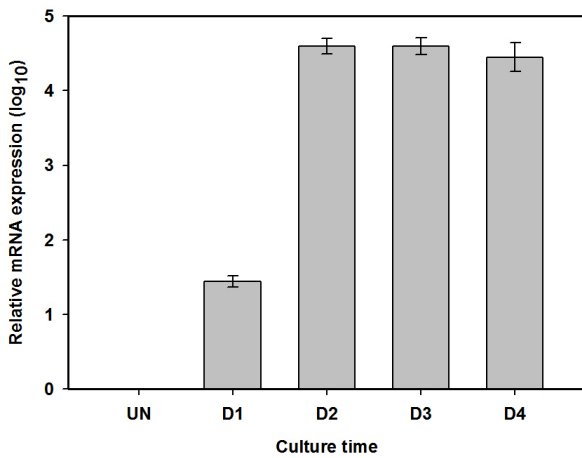
재조합 균주 SJ-HLNL로부터 hLF-N을 발현하기 위하여 ‘재료 및 방법’에 언급한 대로, 1 L의 BMMY 배지에서 5일 동안 배양한 후 methanol을 첨가하여 발현 시켰다. 배양액을 수확하여 분석한 결과 hLF-N은 약 458  $\mu\text{g/ml}$  이었다. 발현된 재조합 hLF-N을 Ni-NTA chromatography에 의해 정제하였다. Elution된 hLF-N 용액 속에 포함된 imidazole을 dialysis에 의해 제거하고, 이를 농축하여 총 68.7 mg의 hLF-N을 얻었다. Fig. 2A와 B는 각각 정제된 hLF-N의 SDS-PAGE와 western blotting을 나타낸다. 정제된 재조합 hLF-N을 면역확산법에 의해 분석하였다. 재조합 hLF-N은 모유에서 정제된 hLF와 같이 anti-hLF polyclonal antibody에 반응하여 분명한 precipi-



**Fig. 2. Purification of hLF-N from culture supernatant using Ni-NTA chromatography.** Purified hLF-N was analyzed by SDS-PAGE (A) and western blotting (B). Arrows indicate the purified recombinant hLF-N. M, protein size marker; lane 1, purified hLF-N. The purified hLF-N was further characterized by immunodiffusion (C). 1, rabbit anti-hLF antibody; 2-4, hLF-N 63.2  $\mu\text{g}$ , 39.5  $\mu\text{g}$ , and 23.7  $\mu\text{g}$  of hLF-N; 5, colostrum hLF.

tation line을 형성하였다(Fig. 2C). 이 결과는 재조합 균주 SJ-HLNL에 의해 발현된 hLF-N은 세포 밖으로 분비되어 배양액 속에 안정적으로 존재한다는 것을 나타낸다.

SJ-HLNL로부터 hLF-N의 발현 양상을 분석하기 위해 qRT-PCR을 실시하였다. Fig. 3은 hLF-N을 발현하기 위해 methanol을 첨가하여 발현을 유도하기 전과 후의 시간경과에 따른 hLF-N mRNA 발현 양상을 보여준다. Methanol을 첨가하여 발현유도 후 시간이 경과함에 따라 점차적으로 mRNA의 양이 증가하여 발현유도 2-3일 후에 최고의 발현 양을 보였다. 또한 유도 후 4일째에는 발현 양이 감소하였다. 이는 아마도 배양시간이 오래 경과함에 따라 배지 내 영양소의 결핍에 따른



**Fig. 3.** qRT-PCR of hLF-N mRNA from the *P. pastoris* SJ-HLNL. Relative hLF-N mRNA was analyzed by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. Actin mRNA was used as house-keeping gene. UN, uninduction; D1~D4, culture duration from 24 h to 96 h post-induction. The values are means  $\pm$  SD of three independent experiments.

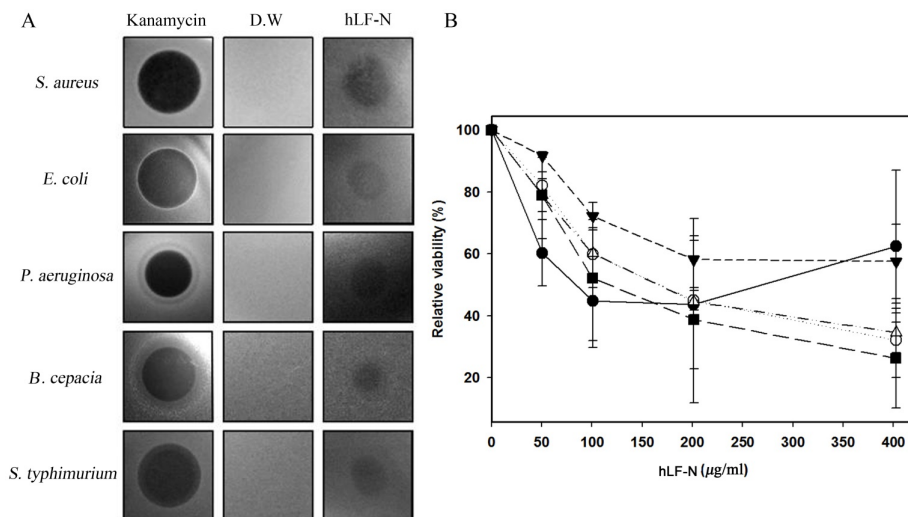
세포사멸, 이로 인한 mRNA의 분해에 기인하는 것으로 사료된다.

### 재조합 hLF N-lobe의 항균활성

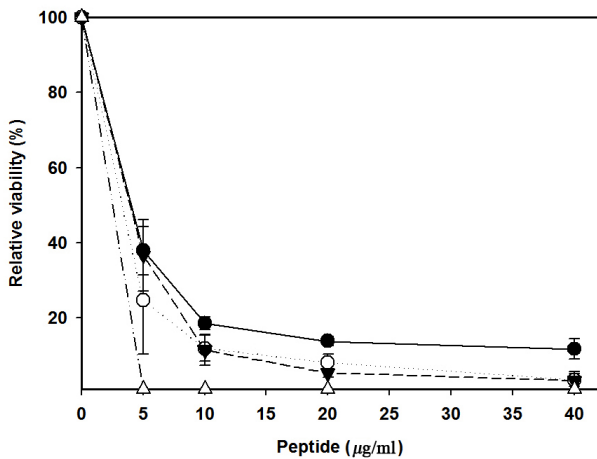
재조합 hLF-N의 항균활성을 분석하였다. 먼저 halo assay를 위해서는 약 40  $\mu$ g의 정제된 hLF-N을 사용하였으며, 대상

균으로는 *S. aureus* ATCC 6538P, *E. coli* ATCC 8739, *P. aeruginosa* KCCM 11802, *B. cepacia* ATCC 25416, *S. typhimurium* ATCC 14028가 사용되었다. Fig. 4A에 나타난 바와 같이 hLF-N은 대상 균에 대해 투명환을 보임으로서 항균 작용이 광범위하게 나타남을 알 수 있으나, 그 작용에 대한 민감도는 균에 따라 다르다는 것을 알 수 있다. hLF-N의 항균작용을 colony counting법에 의해 다시 한 번 확인하였다(Fig. 4B). 결과에서 나타나는 것처럼 약  $3 \times 10^4$ 개의 *S. aureus*를 50% 사멸시키는데 필요한 hLF-N의 농도 LD<sub>50</sub>은 약 100.6  $\mu$ g/ml (약 2.85 mM) 이었다. 그러나 대상 균에 대한 민감도에 따라 그 농도가 달랐으며, 이와 같은 민감도는 halo assay에서 나타난 투명환의 크기에서 나타난 결과와 일치하였다.

재조합 hLF-N의 항균활성을 LF 유래 펩타이드들과 비교하였다. 펩타이드는 bovine LFcin 17-31, bovine LFampin 268-284, Hlopt2, HLSA를 사용하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 LF 유래 펩타이드들은 hLF-N에 비해 월등히 높은 항균력을 나타내었다. Bovine LFcin의 경우 5  $\mu$ g/ml에서 99% 이상의 대상 균을 사멸시켰으며, LFampin, HLSA, Hlopt2 등은 40  $\mu$ g/ml에서 99% 이상 사멸시켰다. 이에 비해 hLF-N의 LD<sub>50</sub>은 100.6  $\mu$ g/ml로서 이들 펩타이드에 비해 매우 낮은 활성을 보이고 있다. 심지어 높은 농도의 hLF-N을 대상균과 함께 섞어 반응하였을 때 오히려 약간의 생장이 일어나는 현상을 볼 수 있는데, 이는 bacteriostatic 한 상태의 균들이 hLF-N을 질소원으로 이



**Fig. 4.** Antibacterial activity of hLF-N expressed from the *P. pastoris* SJ-HLNL. (A) Purified hLF-N (40  $\mu$ g) was dropped on the lawn of each target microorganism. 150  $\mu$ g kanamycin and DW (distilled water) were used as positive and negative control, respectively. (B) Colony counting assay of the purified hLF-N.  $3 \times 10^4$  /ml of each target cell was incubated with the indicated concentration of hLF-N at 22°C for 90 min followed by spreading on the peptone agar plates as described in 'Materials and Methods'. Relative viability (%) is defined as follows: 100 - (number of colonies survived/number of colonies of negative control)  $\times$  100. (-●-) *S. aureus* ATCC 6538P, (-○-) *E. coli* ATCC 8739, (-▼-) *P. aeruginosa* KCCM 11802, (-△-) *B. cepacia* ATCC 25416, (-■-) *S. typhimurium* ATCC 14028. Values were the means  $\pm$  SD of the three independent experiments.



**Fig. 5.** Comparison of antibacterial activity of hLF-N with antibacterial peptides derived from lactoferrin. *S. aureus* ATCC 6538P was used as target microorganism. Each peptide was described in the text and the relative viability was described in the Fig. 4 legend. Values were the means  $\pm$  SD of the three independent experiments. (●) bovine LFampin, (○) Hlopt2, (△) HLSA, (▽) bovine LFcin.

용하였을 가능성을 시사하는 것이다. hLF-N이 hLF나 이들 유래 펩타이드에 비해 bactericidal 혹은 bacteriostatic effect가 약하다는 것은 bilobal 구조인 hLF가 hLF-N으로 되면서 iron-binding capacity나 membrane-binding capacity가 감소되었기 때문인 것으로 사료된다.

### 고찰

hLF는 그람 양성균, 그람 음성균, 곰팡이 등의 병원성 균에 대해 광범위한 항균활성을 보이기 때문에 산업적으로 이용하려는 시도가 많이 되고 있다. 그러나 hLF가 분자량 78 kDa로서 매우 커서 이를 이용하는데 단점이 있다. 예를 들어 분자량의 크기 때문에 세포 외로 분비하기가 어려워 대량으로 생산하기가 쉽지 않다. 따라서 항균활성을 유지하면서 N-lobe를 분리하여 발현할 수 있다면 이런 단점을 해소할 수 있어 그 활용범위가 보다 다양해질 수 있을 것이다. 이미 N-lobe를 분리하여 클로닝하고 발현시킨 몇 개의 보고가 있다. Luo 등(2007)은 소 락토페린 N-lobe를 분리하여 *E. coli*에서 발현시키고 항균활성을 보였으나 이는 N-lobe의 항균활성이 존재함을 밝혔을 뿐 생산성 측면에서 볼 때 산업적 응용에는 다소 어려운 것으로 생각된다. 이외의 대부분의 연구는 LF의 구조와 기능을 알아보기 위함이거나(Nakamura *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2003) 또는 특정 동물유래의 N-lobe를 발현시킨 것(Wang *et al.*, 2010; Redwan *et al.*, 2014)으로서 이 또한 산업적 이용가

능성과는 다소 거리가 있다. 이런 이유로 사람 유래의 hLF로부터 N-lobe를 분리하여 항균활성을 확인하고 이를 메탄올산화 효모인 *P. pastoris*에서 대량 발현시켜 그 특성을 동정하고 LF 유래 펩타이드들과 항균활성을 비교한 본 연구는 N-lobe의 산업적 이용을 위한 토대가 될 수 있을 것이다.

hLF-N 유전자를  $\alpha$ -factor 분비서열과 연결하고 AOX1 프로모터 하에 위치시켜 재조합 플라스미드 pPIC9K-hLFn을 만들고 이를 *P. pastoris* 염색체 DNA 속으로 삽입시켰다. 만들어진 재조합 균주 SJ-HLNL로부터 hLF-N을 발현양상을 qRT-PCR을 이용하여 mRNA의 상대적인 발현양으로 분석한 결과, methanol 첨가에 의한 발현 유도 후 2일과 3일째에 가장 높은 발현 빈도를 보였으며, 발현 유도 전에 비해서 약  $1.4 \times 10^3$ 배의 급격한 발현증가를 보였다. 그러나 발현 유도 4일째에는 발현 유도 전과 비교 하였을 때  $1.0 \times 10^3$ 배의 발현을 보여 약 30% 감소를 보였다(Fig. 3). 이와 같은 발현량의 감소는 그 원인에 대해 보다 세밀한 연구가 필요하겠으나, 아마도 배지내의 영양소 감소에 따른 세포사멸이 일어나고 이에 따라 합성된 mRNA가 분해되었기 때문으로 사료된다. 이러한 hLF-N의 mRNA 발현양상은 본 연구실에서 보고한 hLF 표면발현 균주 *P. pastoris* SMD-9K-630M (Jo *et al.*, 2011)을 이용한 qRT-PCR에서도 동일하였다(자료 미제시). 이와 같은 발현 특성은 메탄올을 탄소원과 발현 유도제로 동시에 사용하는 *P. pastoris*의 고유한 특성에 기인하는 것으로 보인다.

본 연구에서 제조된 재조합 균주 SJ-HLNL로부터 발현된 hLF-N은 세포 외로 분비되고 3 L jar fermenter에서 458 µg/ml 수준의 발현양을 보였다. *P. pastoris*를 이용하여 돼지 LF를 발현하였을 때 약 12 µg/ml, *S. cerevisiae*를 이용하였을 때 약 1-1.5 µg/ml의 발현양이 보고 되었으나(Wang *et al.*, 2002), 본 연구에서는 월등히 높은 hLF 발현양(약 38 배)을 보임으로써 산업적으로 이용하기가 보다 용이 할 것으로 사료된다. 그러나 보다 높은 발현 양을 위해서는 배지 최적화, 배양조건, 메탄올에 의한 발현 유도조건 등에 관한 자세한 연구가 필요하다. 무엇보다 재조합 *P. pastoris*를 이용하여 외부 단백질을 발현하고자 할 때 산소 요구량이 매우 높다고 알려져 있으므로 용존 산소량(DO)에 대한 보다 심도 있는 연구가 필요한 것으로 사료된다.

본 연구에서 발현한 재조합 hLF-N은 그람 양성균인 *S. aureus* 6538P, 그람 음성균인 *E. coli* ATCC 8739, *P. aeruginosa* KCCM 11802, *B. cepacia* ATCC 25416, *S. typhimurium* ATCC 14028 등을 대상으로 한 항균 실험에서 광범위한 항균활성을 보였다. *S. aureus*를 대상으로 한 항균 실험에서 LD<sub>50</sub> 농도가 약 100.6 µg/ml (2.85 mM)로 나타났다. 이는 LF 유래

펩타이드들의 LD<sub>50</sub> (약 2.5-5 µg/ml)과 비교하였을 때 매우 높은 농도이다. hLF-N이 이와 같은 높은 농도가 필요한 이유로서 첫째, bacteriostatic activity 관점에서 보면 bilobal 구조인 hLF가 hLF-N으로 되면서 single lobe로 바뀌어 철 이온과의 결합력이 감소하였기 때문인 것으로 사료되며, 둘째, bactericidal activity 관점에서 보면 single lobe로 되면서 단백질의 3차 구조가 변형되어 세포막과의 결합에 영향을 끼쳤기 때문으로 사료된다. 이는 세포막에 있는 LPS와 hLF의 결합으로 인해 bactericidal activity가 유도된다는 점에서, hLF-N의 pI 값 (9.05)이 hLF의 pI 값(8.07) 보다 높기 때문에, 염기성 외에 다른 원인이 bactericidal activity에 영향을 끼치는 것으로 볼 수 있기 때문이다. 그러나 이에 관해서는 향후 보다 심도 있는 연구가 필요한 것으로 생각된다.

비록 본 연구에서 발현한 hLF-N이 hLF 나 hLF로부터 유래된 여러 펩타이드들에 비해서 상대적으로 낮은 항균활성을 보이지만 대량생산이라는 산업적 측면에서 보면 오히려 유용한 점이 많은 것으로 생각된다. 첫째, 본 연구에서 발현된 hLF-N은 배양 시에 세포 외로 분비되기 때문에 정제과정 등 생산 과정에 따른 수율 향상, 제조 경비를 줄일 수 있고, 공정을 단순화시킬 수 있으며, 둘째, hLF-N의 단백질 크기가 작기 때문에 방부제와 같은 특별한 목적으로 제제를 할 경우 안정성이나 활성 유지 측면에서 보다 유리하기 때문이다. 이에 반해, 펩타이드들은 활성은 매우 높으나 크기가 작아 배양이나 정제과정에서 많은 손실이 생기게 되어 오히려 활용성이 떨어지는 단점이 있고, hLF는 분자량이 너무 커서 세포 외 분비나 활성 유지, 안정성 측면에서 오히려 불리한 점이 있을 수 있다. 따라서, 항균활성이 유지되는 hLF-N의 발현 양을 증대시키면 향후 산업적 측면에서 보다 유용할 것으로 사료된다.

## 적 요

락토페린(LF)는 철이온과 결합하는 당 단백질로서 항균, 항바이러스, 항진균 등의 기능을 가지고 있으며, 생체의 각종 체액으로부터 분비되는 다기능성 단백질이다. 본 연구에서는 사람의 락토페린(hLF)으로부터 유래된 N-lobe의 유전자를 분리하고 산업용 균주로서 많이 사용되는 메탄올자화 효모인 *Pichia pastoris*에서 발현시켰다. 재조합 사람 락토페린 N-lobe (rhLF-N)는 배양액으로 분비 발현되었으며, 3L 발효조에서 약 458 µg/ml이 수준으로 생성되었다. rhLF-N을 정제한 다음 SDS-PAGE와 western blot으로 분석하여 분자량 35 kDa 단백질을 확인하였으며, hLF에 대한 항체를 이용하여 면역확산법

으로 면역성을 확인하였다. rhLF-N의 mRNA 발현양상을 qRT-PCR로 분석한 결과 메탄올 첨가에 의한 발현 유도 후 2-3 일째에 발현율이 가장 높았으며, 4일째에는 점차적으로 감소하였다. 정제한 rhLF-N을 이용하여 항균활성을 조사한 결과 *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Salmonella typhimurium*과 같은 병원성 균에 대해 광범위한 항균활성을 보였으나, LF유래 항균 peptide들과 항균활성을 비교하였을 때, 항균력이 상대적으로 매우 떨어지는 것으로 나타났다. 비록 본 연구에서 발현한 rhLF-N은 항균력은 떨어지나, hLF에 비해 그 크기가 작고 배양조건 연구로 *P. pastoris*에서 대량 생산이 가능하며, 배양액으로 분비시킬 수 있기 때문에 정제 비용 등을 고려할 때 산업적 응용에는 보다 유리할 것으로 사료된다.

## 감사의 말

본 연구의 일부는 2014년도 한국외국어 대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행 되었으며, 일부는 2014년도 경기도 GRRC 연구비(GRRC-HUFS, B01) 지원에 의해 수행 되었습니다. 이에 감사 드립니다.

## References

- Anderson, B.F., Baker, H.M., Dodson, E.J., Norris, G.E., Rumball, S.V., Waters, J.M., and Baker, E.N. 1987. Structure of human lactoferrin at 3.2-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1769-1773.
- Anderson, B.F., Baker, H.M., Norris, G.E., Rice, D.W., and Baker, E.N. 1989. Structure of human lactoferrin: Crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **4**, 711-734.
- Anderson, B.F., Baker, H.M., Norris, G.E., Rumball, S.V., and Baker, E.N. 1990. Apolactoferrin structure demonstrates ligand-induced conformational change in transferrins. *Nature* **344**, 784-787.
- Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., and Tomita, M. 1992. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1121**, 130-136.
- Clare, J.J., Romanos, M.A., Raynent, F.B., Rowedder, J.E., Smith, M.A., Payne, M.M., Sreekrishna, K., and Henwood, C.A. 1991. Production of mouse epidermal factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* **105**, 205-212.
- Coughlin, R.T., Tonsanger, S., and McGroarty, E.J. 1983. Quantitation of metal cations bound to membranes and extracted lipopoly-



- saccharide of *Escherichia coli*. *Biochem.* **12**, 2002–2007.
- Day, C.L., Stowell, K.M., Baker, E.N., and Tweedie, J.W.** 1992. Studies of the N-terminal half of human lactoferrin produced from the cloned cDNA demonstrate that interlobe interactions modulate iron release. *J. Biol. Chem.* **267**, 13857–13862.
- Ellison, R.D., Giehl, T.J., and LaForce, F.M.** 1988. Damage of the outer membrane of enteric Gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect. Immun.* **56**, 2774–2781.
- Håversen, L., Kondori, N., Baltzer, L., Hanson, L.Å., Dolphin, G.T., Dunér, K., and Mattsby-Baltzer, I.** 2010. Structure-microbicidal activity relationship of synthetic fragments derived from the antibacterial  $\alpha$ -Helix of human lactoferrin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 418–425.
- Jo, J.H., Im, E.M., Kim, S.H., and Lee, H.H.** 2011. Surface display of human lactoferrin using a glycosylphosphatidylinositol anchored protein of *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* **33**, 1113–1120.
- Kuwata, H., Yip, T.T., Yip, C.L., Tomita, M., and Hutchens, T.W.** 1998. Bactericidal domain of lactoferrin: detection, quantitation, and characterization of lactoferricin in serum by SELDI affinity mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**, 764–773.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods* **25**, 402–408.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- Luo, H., Chen, S., Ren, F., Guo, H., Lin, S., and Xu, W.** 2007. *In vitro* reconstitution of antimicrobial pathogen activity by expressed recombinant bovine lactoferrin N-terminal peptide in *Escherichia coli*. *J. Dairy Res.* **74**, 233–238.
- Madureira, A.R., Pereira, C.I., Gomes, A.M., Pintado, M.E., and Malcata, F.X.** 2007. Bovine whey proteins—overview on their main biological properties. *Food Res. Int.* **40**, 1197–1211.
- Masson, P.L., Hermans, J.F., and Dive, C.** 1966. An iron-binding protein common to many external secretions. *Clin. Chim. Acta.* **14**, 735–739.
- Miyazawa, K., Mantel, C., Lu, L., Morrison, D.C., and Broxmeyer, H.E.** 1991. Lactoferrin-lipopolysaccharide interactions. Effect on lactoferrin binding to monocyte/macrophage-differentiated HL-60 cells. *J. Immunol.* **146**, 723–729.
- Nakamura, I., Watanabe, A., Tsunemitsu, H., Lee, N.Y., Kumura, H., Shimazaki, K., and Yagi, Y.** 2001. Production of recombinant bovine lactoferrin N-lobe in insect cells and its antimicrobial activity. *Protein Exp. Purif.* **21**, 424–431.
- Ouchterlony, Ö.** 1953. Antigen-antibody reactions in gels. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* **32**, 230–240.
- Plantz, B.A., Sinha, J., Villarete, L., Nickerson, K.W., and Schlegel, V.L.** 2006. *Pichia pastoris* fermentation optimization: energy state and testing a growth-associated model. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 297–305.
- Redwan, E.M., EL-Faklarany, E.M., Uversky, V.N., and Linjawi, M.H.** 2014. Screening the anti-infectivity potentials of native N- and C-lobes derived from the camel lactoferrin against hepatitis C virus. *BMC Complement. Altern. Med.* **14**, 219–234.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> (ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, N.Y., USA.
- Sreekrishna, K., Brankamp, R.G., Kropp, K.E., Blankenship, D.T., Tsay, J.T., Smith, P.L., and Birkenberger, L.A.** 1997. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **190**, 55–62.
- Sue, M.P., Mariana, L.F., Brian, M., and Linda, M.H.** 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* **22**, 249–270.
- Tanaka, T., Nakamura, I., Lee, N.Y., Kumura, H., and Shimazaki, K.** 2003. Expression of bovine lactoferrin and lactoferrin N-lobe by recombinant baculovirus and its antimicrobial activity against *Prototheca zopfii*. *Biochem. Cell Biol.* **81**, 349–354.
- Teng, D., Fan, Y., Yang, Y., Tian, Z., Luo, J., and Wang, J.** 2007. Codon optimization of *Bacillus licheniformis*  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase gene and its expression in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 1074–1083.
- Valenti, P. and Antonini, G.** 2005. Lactoferrin: an important host defense against microbial and viral attack. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2576–2587.
- Van der Kraan, M.I., Nazmi, K., van't Hof, W., Amerongen, A.V.N., Veerman, E.C., and Bolscher, J.G.** 2006. Distinct bactericidal activities of bovine lactoferrin peptides LFampin 268–284 and LFampin 265–284: Asp-Leu-Ile makes a difference. *Biochem. Cell Biol.* **84**, 358–362.
- Wang, J., Tian, Z., Teng, D., Yang, Y., Hu, J., and Wang, J.** 2010. Cloning, expression and characterization of Kunming mice lactoferrin and its N-lobe. *Biomaterials* **23**, 523–530.
- Wang, S.H., Yang, T.S., Lin, S.M., Tsai, M.S., Wu, S.C., and Mao, S.J.** 2002. Expression, characterization, and purification of recombinant porcine lactoferrin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **25**, 41–49.
- Xiong, A., Yao, Q., Peng, R., Zhang, Z., Xu, F., Liu, J., Han, P., and Chen, J.** 2006. High level expression of a synthetic gene encoding *Peniophora lycti* phytase in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 1039–1047.