

# 대장균과 효모를 이용한 lunasin peptide의 생산 및 histone acetylation 억제활성

박재호<sup>1</sup>, 박광훈<sup>2</sup>, 송훈민<sup>2</sup>, 정진부<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>중원대학교 생약자원개발학과, <sup>2</sup>안동대학교 생약자원학과, <sup>3</sup>안동대학교 농업과학기술연구소

## The Production of Lunasin Peptide Using *E. coli* and *P. pastoris*, and Inhibitory Effect of Histone Acetylation

Jae Ho Park<sup>1</sup>, Gwang Hun Park<sup>2</sup>, Hun Min Song<sup>2</sup> and Jin Boo Jeong<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Medicinal Plant Science, Jungwon University, Goesan 28024, Korea

<sup>2</sup>Department of Medicinal Plant Resources, Andong National University, Andong 36729, Korea

<sup>3</sup>Agricultural Science and Technology Research Institute, Andong National University, Andong 36729, Korea

**Abstract** - In this study, we produced the recombinant lunasin peptide using *E. coli* and *P. pastoris*, and evaluated biological activity of the recombinant lunasin peptide. Lunasin peptide was produced from *E. coli* transfected with pGEX-lunasin expression vector and *P. pastoris* GS115 transfected with pPIC-lunasin expression vector. These recombinant lunasin peptides were similar to the synthetic lunasin peptide in the identification by LC-ESI-MS. In addition, the recombinant lunasin peptide from *E. coli* and *P. pastoris* was bound in the chromatin, and inhibited histone acetylation and the activity of histone acetyltransferase. These findings suggest that the production of the lunasin peptide using *E. coli* and *P. pastoris* will be useful for industrial utilization of lunasin peptide.

**Key words** - Functional peptide, Lunasin peptide, Large-Scale Production, Recombinant lunasin peptide

### 서 언

대두(*Glycine max*)에서 유래된 peptide 인 lunasin은 대두의 코틸레돈-특이성(cotyledon-specific) cDNA인 Gm2S-1이 코드화하는 2S 알부민의 small subunit peptide로써, 43개의 아미노산으로 구성되며, 구조적으로 C말단에 8개의 poly aspartic acid를 가지고 있다고 알려져 있다(Galvez and de Lumen, 1999). Lunasin은 대두 외에 보리, 밀, 기장, 까마중 등의 종자에 함유되어 있다(Jeong *et al.*, 2002; Jeong *et al.*, 2007a; Park *et al.*, 2009; Jeong *et al.*, 2007b).

Lunasin은 종양세포에 쉽게 부착할 수 있는 adhesion motif Arg-Gly-Asp(RGD)와 나선구조(helix)에 의해 세포 내의 chromatin에 결합하는 특징이 있어 암세포의 유사분열을 저해함으로써 세포사멸을 유도하는 항암 활성이 보고되어져 왔다

(Galvez and de Lumen, 1999). Lunasin은 MCF-7과 C3H세포에서 histone acetylation을 억제시키고 암이 유발된 C3H 세포에서 foci 형성을 억제하였고, SENCAR mouse skin tumor model을 이용한 연구에서 피부암 생성을 억제시키는 것으로 나타났다(Galvez *et al.*, 2001). Lunasin은 폐암세포인 NSCLC H661에서 종양억제단백질인 retinoblastoma protein의 phosphorylation을 억제시킴으로써 폐암세포의 세포생육을 억제시켰고(McConnell *et al.*, 2015), FAK/Akt/ERK와 NF- $\kappa$ B signaling 조절을 통한 matrix metalloproteinase-2/-9의 발현을 억제하여 유방암세포의 침윤과 전이를 억제하였다(Jiang *et al.*, 2016). 그 외 효능연구에서 lunasin은 histone H3-lysine 14의 PCAF acetylation을 억제하여 HMG Co-A reductase의 발현억제를 통한 LDL cholesterol을 낮춘다고 보고되어져 왔다(Lule *et al.*, 2015; Galvez *et al.*, 2014). 또한 본 연구진은 lunasin의 항산화 활성을 Fe<sup>2+</sup> chelating을 통한 hydroxyl radical 생성 억제를 보고하였다(Jeong *et al.*, 2010).

\*교신저자: jjb0403@anu.ac.kr

Tel. +82-54-820-7757

그러나 lunasin의 산업적 활용을 위해서는 이의 대량생산이 필수적이다. 본 연구진은 기존 연구에서 대두 조직배양을 통한 lunasin 생산방법을 보고하였다(Park *et al.*, 2007). 조직배양을 통한 lunasin 생산방법은 lunasin의 발현 정도가 낮아 산업적 활용측면에서 경제성이 낮아 본 연구를 통한 새로운 lunasin 생산방법을 확립하고자 하였다. 본 연구에서 대장균(*Escherichia coli*) 또는 효모 (*Pichia pastoris*)를 이용한 재조합 lunasin peptide의 생산 및 생산된 lunasin의 생물학적 활성을 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### Lunasin peptide 발현벡터의 클로닝을 위한 대장균용 lunasin DNA 제조 및 expression vector 제조

cDNA를 제조하기 위해 RNAqueous kit (Ambion, USA)를 이용하여 개화 후 6주차 태광콩(*Glycine max*) 종자로부터 전체 RNA를 분리하였다. 분리된 전체 RNA로부터 High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 RT-PCR (Reverse transcriptase polymerase chain reaction)을 수행하여 cDNA를 제조하였다. DNA로부터 lunasin DNA 단편을 얻기 위하여 양쪽 끝이 BamHI과 XhoI 으로 절단되도록 고안된 프라이머(Table 1)를 이용한 PCR (Polymerase chain reaction)(GeneAmp PCR system, Applied Biosystems, Singapore)을 실시하였다. PCR 증폭산물은 아가로스 젤 전기영동을 수행한 후 180 bp 부위의 밴드를 확인하고 젤 추출 키트 (Axygen, USA)를 이용하여 추출하고, DNA 시퀀싱을 의뢰 (GnC Bio, Korea) 하여 lunasin DNA 서열을 확인하였다.

Lunasin 생산 도메인을 포함하는 대장균용 expression vector의 제조는 lunasin peptide의 발현과 정제를 용이하게 하기 위해서 glutathione S-transferase (GST) gene fusion 벡터인 pGEX-4T-3 vector를 이용하였다. PCR 증폭산물과 pGEX-4T-3 vector를 BamHI과 XhoI 제한효소로 절단하고 아가로스 젤 전기영동을 수행한 후 젤 추출 키트를 이용하여 각 절단된 단편을 추출하였다. 각 단편을 DNA Ligation kit(Takara, Japan)를 이용하여 연결시키고 대장균 (*E. coli* strains BL21, DE3)에

화학적 형질전환 방법(chemical transformation; heat and cold shock)으로 형질전환 하였다. 형질전환체를 SOC 배지(20 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 20 mM glucose, pH 7.0)를 이용하여 37°C에서 1.5 시간 배양하였다. 배양체 100 µl를 LB-엠펜실린 고체배지(10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl, 10 g/L agar, 100 mg/L ampicillin, pH 7.5)에 접종하고 37°C에서 18 시간 배양하여 형성된 콜로니 중 무작위로 10 개를 선택하였다. 선택된 콜로니(colony)를 LB-엠펜실린 액체 배지(10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl, 100 mg/L, pH 7.5)에 16 시간 배양한 후 플라스미드 추출 kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 플라스미드 DNA를 추출하였다. 추출된 플라스미드 DNA는 BamHI과 XhoI 제한효소를 처리한 뒤 아가로스 젤 전기영동을 통하여 약 140 bp 크기의 DNA 절편을 확인하였다. 확인된 DNA 절편은 젤 추출 키트를 이용하여 추출하고 DNA 시퀀싱을 의뢰하여 lunasin DNA 서열을 확인하였다.

### 대장균용 재조합 lunasin peptide의 발현 및 정제

pGEX-Lunasin이 올바르게 삽입된 클론체를 LB-엠펜실린 액체배지에 접종하여 600 nm에서 흡광도가 0.8-1.0 정도가 되도록 배양한 뒤, IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)의 최종 농도가 1 mM이 되도록 첨가하고 30°C에서 8 시간 배양하였다. 대조구는 IPTG를 처리하지 않았다. 각 처리구의 배양액을 회수하여 5,000 rpm에서 5 분간 원심분리 하고 상등액을 제거하고 세포 침전물을 수득하였다. 세포 침전물을 1 × PBS (Phosphate buffered saline, 8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.44 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)를 첨가한 뒤 초음파 세포 파쇄기를 이용하여 세포내 단백질을 추출한 뒤 15,000 rpm에서 5 분간 원심분리 하고 상등액을 취하였다. 각 상등액을 Glutathion Sepharose 4B가 충전된 컬럼에 넣어준 후 실온에서 4 시간 방치한 뒤 1 × PBS 로 세척하였다. GST-lunasin 결합을 절단하기 위해 트롬빈(Thrombin)을 처리하고 4°C에서 16 시간 방치한 후, GST로부터 절단된 lunasin peptide를 용출시키고, HiTrap Benzamidine FF (GE Healthcare Life Sciences, USA)를 이용하여 thrombin을 제거하여 정제된 lunasin peptide를 얻었다.

Table 1. Lunasin primer sequences for *E. Coli* lunasin expression vector

Forward-lunasin	5'-gcctcacgttcaggatccaatggcagcaccagcaagatagc-3'
Reverse-lunasin	5'-gctaggcatgtcctcgagttagtcgtctcatcatc-3'

**lunasin 발현벡터의 클로닝을 위한 효모용 lunasin DNA 제조 및 expression vector 제조**

효모 발현 벡터를 위한 삽입 lunasin DNA는 lunasin 발현벡터의 클로닝을 위한 대장균용 lunasin DNA 제조방법과 동일한 조건으로 실시하였다. 이때 클로닝을 용이하게 하기 위해 lunasin 프라이머 양쪽 끝이 SnaBI 과 NotI으로 절단되도록 고안하였다(Table 2). 효모용 lunasin expression vector 제조는 pPIC9K (Invitrogen, USA)를 이용하여 클로닝 하였다. PCR 증폭산물과 pPIC9K vector를 SnaBI 과 NotI 제한효소로 절단하고 아가로스 젤 전기영동을 수행한 후 젤 추출 키트를 이용하여 각 절단된 단편을 추출하였다. 각 단편을 DNA Ligation kit (Takara, Japan)를 이용하여 연결시키고 화학적 형질전환 방법(chemical transformation; heat and cold shock)에 의한 방법으로 형질전환 하였다. 형질전환체를 SOC 배지를 이용하여 37°C에서 1.5 시간 배양하였다. 배양체 100 µl 를 LB-엠포실린 고체배지(10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl, 10 g/L agar, 100 mg/L ampicillin, pH 7.5)에 접종하고 37°C에서 18 시간 배양하여 형성된 콜로니 중 무작위로 10 개를 선택하였다. 선택된 콜로니(colony)를 LB-엠포실린 액체 배지(10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl, 100 mg/L ampicillin, pH 7.5)에 16 시간 배양한 후 플라스미드 추출 kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 플라스미드 DNA를 추출하였다. 추출된 플라스미드 SnaBI 과 NotI 제한효소를 처리한 뒤 아가로스 젤 전기영동을 통하여 약 140 bp 크기의 DNA절편을 확인하였다. 확인된 DNA 절편은 젤 추출 키트를 이용하여 추출하고 DNA 시퀀싱을 의뢰하여 lunasin DNA 서열을 확인하였다. 확인된 형질전환체의 플라스미드를 효모(*Pichia pastoris*, GS115)에 형질 전환하기 위하여 Pichia Spheroplast kit (Invitrogen, USA)를 이용하였다. 형질전환체를 SOC 배지를 이용하여 37°C에서 1 시간 배양하였다. 배양체 200 µl 를 MD 고체배지(13.4 g/L yeast nitrogen base with ammonium sulfate without amino acid, 0.4 mg/L biotin, 20 g/L dextrose, 1.5 g/L Agar, pH 7.5)에 접종하고 30°C에서 3 일간 배양하여 형성된 콜로니 중 무작위로 10 개를 선택하였다. 선택된 콜로니(colony)를 100 µl 의 멸균된 H<sub>2</sub>O에 희석한 뒤, Geneticin418이 포함된(0, 2, 4 mg/ml) YPD 고체배지(10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone,

20 g/L dextrose(glucose), 20 g/L agar)에 접종한 뒤 30°C에서 5 일간 배양하여 Geneticin418 저항성 콜로니를 선별하였다. 선별된 콜로니는 YPD 액체 배지(10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 20 g/L dextrose(glucose))에 16 시간 배양한 후 플라스미드 추출 kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 플라스미드 DNA를 추출하였다. 추출된 플라스미드 DNA는 SnaBI 과 NotI 제한효소를 처리한 뒤 아가로스 젤 전기영동을 통하여 약 140 bp 크기의 DNA절편을 확인하였다. 확인된 DNA 절편은 젤 추출 키트를 이용하여 추출하고 DNA 시퀀싱을 의뢰하여 lunasin DNA 서열을 확인하였다.

**효모용 재조합 lunasin peptide의 발현 및 정제**

pPIC9K-Lunasin이 올바르게 삽입된 클론체를 YPD 25 ml 액체배지에 접종하여 30°C에서 16 시간 배양 후 원심분리(1500 rpm, 5 분) 후 상등액을 제거하였다. 침전된 배양체에 멸균된 NaCl (8 g/L) 용액을 첨가한 뒤 다시 원심분리(1500 rpm, 5 분)하여 상등액을 제거하였다. 침전된 배양체를 MGY 배지(13.4 g/L yeast nitrogen base with ammonium sulfate without amino acid, 10 ml glycerol, 0.4 mg biotin)로 옮겨 30°C에서 600 nm에서 흡광도가 1.5-2.0 정도가 되도록 배양한 뒤 원심분리(1,500 rpm, 5분) 하여 상등액을 제거하고 배양체를 MM 배지 (13.4 g/L yeast nitrogen base with ammonium sulfate without amino acid, 5 ml methanol, 0.4 mg biotin)에 옮겼다. MM 배지에 옮겨진 배양체를 30°C에서 200 rpm으로 배양을 하며, 24 시간마다 메탄올 1%를 첨가하면서 5 일 후 배양액을 원심분리(15,000 rpm, 15 분) 하여 상등액을 취하였다. 상등액을 투석(dialysis) 튜브(Molecular weight cut off; MWCO 3,500)로 옮겨 증류수를 투석버퍼로 하여 3 일간 투석하여 상등액 내 MM 배지 조성물을 제거하였다. 투석한 배양액을 동결건조 하여 lunasin peptide 동정을 위한 시료로 사용하였다.

**재조합 lunasin peptide의 동정**

동결 건조한 재조합 lunasin peptide는 15 % SDS-PAGE와 지메드(Zymed) R1을 1차 항체로 하여 웨스턴 블롯(Western Blot)(LI-COR 3600, LI-COR Inc., USA)의해 동정 되었다. 그리고 15 % SDS-PAGE를 수행한 뒤 쿠마시(Coomassie Blue,)

Table 2. Lunasin primer sequences for *P. pastoris* lunasin expression vector

Forward-lunasin	5'-ggggtatcttactgatccaaatggcagcaccag-3'
Reverse-lunasin	5'-tccttttgcggccgcttagctgctcatcatc-3'

염색을 수행하여 기존의 합성 lunasin과 일치하는 부위의 밴드를 잘라서 LC-ESI MS를 이용하여 lunasin peptide의 시퀀스를 확인하였다. LC-MS 분석은 LCQ-Duo Mass Spectrometer (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA)이 장착된 Jasco PU-1585 liquid chromatograph (Jasco Corporation, Tokyo, Japan)를 활용하였다. LC는 Waters Sunfire C18(3.5  $\mu$ m, 100  $\times$  2.1 mm I.D.) 컬럼을 사용하였고, 이동상은 A (0.1% formic acid in water)/B (0.1% formic acid in acetonitrile) 90:10에서 20:80으로, 유속은 300  $\mu$ l/min으로 분석하였다. Mass spectrometer는 electrospray ionisation (ESI) source가 장착되었다. ESI의 전압과 온도는 각각 4.5 kV 그리고 200°C였으며, sheath gas와 auxiliary gas (nitrogen)의 flow rate는 각각 0.75와 1.2 L/min이었다. 분리된 재조합 lunasin peptide의 질량은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에 등록된 lunasin peptide의 단편 질량에 대한 데이터베이스(AAP62458)와 비교하여 분석하였다.

#### 재조합 lunasin peptide의 히스톤 아세틸화 억제활성

재조합 lunasin peptide의 히스톤 아세틸화 억제 활성을 평가하기 위해 NIH3T3세포(ATCC, DMEM + 10 % FBS, 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>)에 재조합 lunasin peptide(100  $\mu$ M)와 히스톤 디아세틸라아제(histone deacetylase) 억제제인 5 nM sodium butyrate를 처리하여 24 시간 배양하였다. 배양된 세포를 산 추출하여 (추출버퍼; 10 mM Hepes (pH 7.9), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT(Dithio threitol), 1.5 mM PMSF (Phenylmethyl sulfonyl fluoride), 0.1 M acetic acid), SDS-PAGE와 acetyl-H3 antibody를 이용한 western blot에 의하여 재조합 lunasin peptide에 의한 세포내 히스톤 아세틸화 억제 활성을 조사하였다. 그리고 재조합 lunasin peptide의 히스톤 아세틸화 효소 억제활성은 Non-Radioactive HAT indirect ELISA Assay kit (Upstate Biotechnology, USA)를 이용하였다. 스트렙타비딘(Streptavidin) 단백질이 코팅된 strip plate에 1  $\mu$ g/ml reconstituted histone H3와 H4 100  $\mu$ l 를 주입한 후 30 분 동안 상온에서 반응시켰다. HAT Reaction Cocktail(10  $\mu$ l 5X HAT assay buffer, 10  $\mu$ l 500  $\mu$ M Acetyl-CoA, 25-75 ng HAT, H<sub>2</sub>O (총 50  $\mu$ l) 50  $\mu$ l 을 주입하고 30°C 하에서 반응시켰다. 1차 항체로 anti-아세틸-라이신(Anti-acetyl-Lysin)을 1 : 250 비율로 각 웰(well)에 처리한 후 1 시간 30 분 동안 상온에서 반응시킨 후 2차 항체인 Goat Anti-Rabbit IgG, HRP conjugate (Horseradish peroxidase conjugate)를 1 : 10,000 비율로 각 웰

(well)에 처리한 후 30 분간 상온에서 반응시켰다. 각 웰(well)에 발색시약인 TMB (Tetramethyl benzidine) Substrate Mixture를 100  $\mu$ l 주입한 후 암기상태서 10 분간 반응시킨 후 plate reader를 이용하여 450 nm와 570 nm 파장에서 OD (Optical density)값을 측정하였다.

#### 재조합 lunasin peptide의 세포내 핵으로 부착활성

대장균과 효모에 의해 생산된 재조합 lunasin peptide(각 100  $\mu$ M)를 NIH3T3세포(ATCC, DMEM + 10 % FBS, 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>)에 처리한 후 20 시간 배양하였다. 배양 세포를 2 % 포르말데히드로 고정된 후 10 % PBS/FBS 버퍼(1  $\times$  PBS, 10 % FBS)가 포함된 1  $\times$  PBS로 헹구고, 사포닌버퍼(0.1 % saponin, 10 % FBS, 1  $\times$  PBS)에 lunasin 1차 항체와 Alexa-Fluor 488 (Invitrogen Co, USA) 2차 항체를 처리하고, 핵을 염색하기 위한 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)(Sigma, USA)를 처리하여 형광 현미경으로 세포내 재조합 lunasin peptide와 핵의 위치를 비교하여 재조합 lunasin peptide의 세포내 내재력을 조사하였다.

### 결과 및 고찰

#### 재조합 lunasin peptide의 생산과 동정

대장균을 이용하여 재조합 lunasin peptide를 생산하기 위해, GEX4T-3 vector에 삽입된 pGEX-lunasin을 대장균 (*E. Coli* BL21 DE3)에 형질전환하여 IPTG(Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside)에 의해 lunasin peptide 생산을 유도한 결과 IPTG 무처리구에서는 lunasin peptide의 발현이 나타나지 않았으나(Fig. 1-lane 1), IPTG처리 시 lunasin peptide는 GST-lunasin 복합체 형태로 발현되었다(Fig. 1-lane 2). 발현된 GST-lunasin 복합체로부터 lunasin을 분리하기 위해, Sepharose 4B 충진제에 GST-lunasin 복합체를 결합시킨 뒤 thrombin에 의해 GST와 lunasin peptide를 절단시키고, HiTrap Benzamide FF를 이용하여 thrombin을 제거하여 정제된 lunasin peptide를 확인하였다(Fig. 1-lane 3).

효모를 이용하여 재조합 lunasin peptide를 생산하기 위해, pPIC9K 벡터에 삽입된 pPIC-lunasin을 효모(*P. pastoris* GS115)에 형질전환하여 lunasin peptide의 생산을 유도하였다. 24 시간마다 1%의 메탄올을 첨가하여 5 분후 배양액으로부터 각 일자별 lunasin peptide의 발현을 확인한 결과, 배양시간이 길어질수록 lunasin peptide의 생산이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1B).

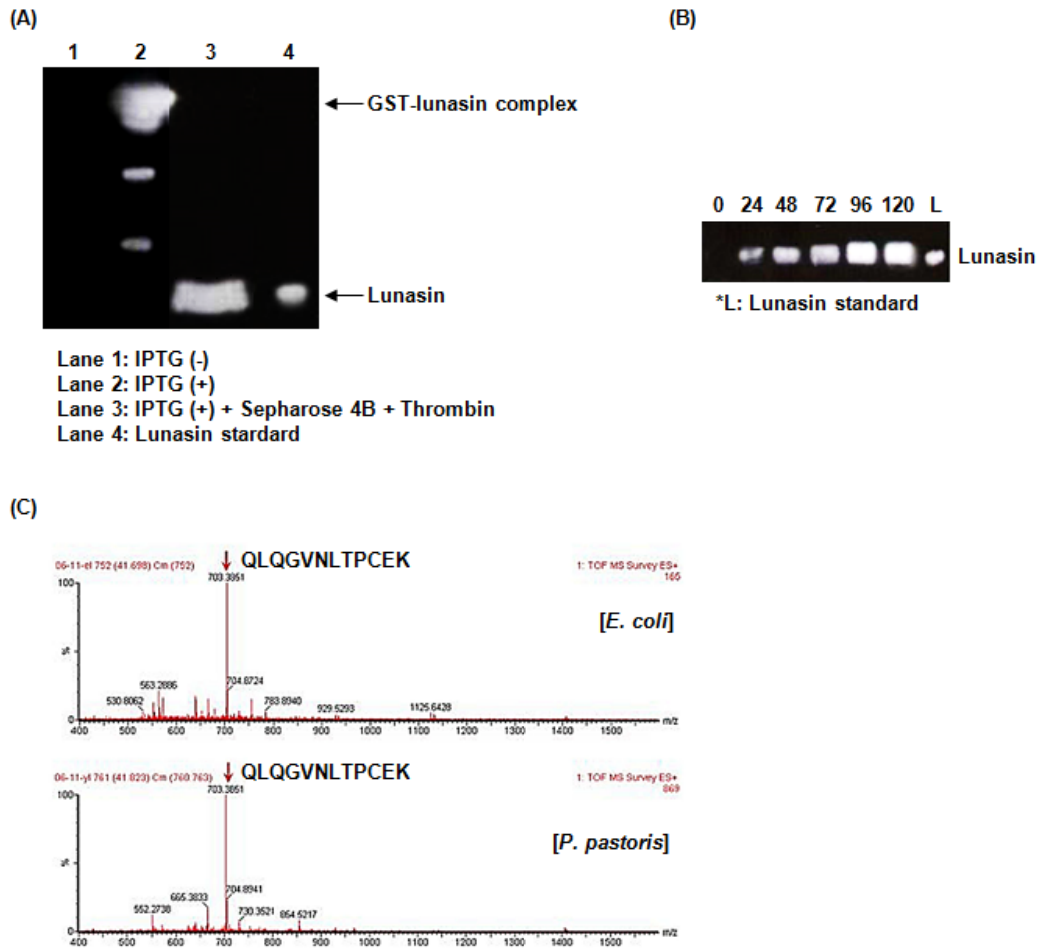


Fig. 1. Production of recombinant lunasin peptide and its identification. (A) Production of lunasin peptide using *E. Coli* transfected with pPGEX-lunasin expression vector induced by IPTG. (B) Production of lunasin peptide using *P. pastoris* GS115 transfected with pPIC-lunasin expression vector induced by 1% methanol. (C) Identification of lunasin peptide produced by *E. Coli* or *P. pastoris* GS115 using LC-ESI-MS.

대장균과 효모에 의해 생산된 재조합 lunasin peptide를 LC-ESI MS를 이용하여 동정한 결과, lunasin peptide의 아미노산 시퀀스 중 QLQGVNLTPECK 동정되어 기존의 lunasin peptide와 동일한 것으로 확인되었고(Fig. 1C), 본 결과는 정 등 (Jeong *et al.*, 2007a)에 의한 결과와 일치하였다. *E. coli*와 *P. pastoris*에 의해 재조합된 lunasin peptide의 질량은 703,3851 Da였으며, peptide 서열은 대두종자 Gm2S-1의 small subunit의 34-46에 해당하는 QLQGVNLTPECK로 확인되었다(Galvez *et al.*, 2001).

#### 재조합 lunasin 펩타이드의 histone acetylation 억제효능

Histone acetylation과 deacetylation은 전사조절과 관련되

어 있으며, lunasin 펩타이드의 histone acetylation의 억제는 발암과정에서 종양억제인자로 역할을 하며 세포주기 조절에 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다(Shogren-Knaak *et al.*, 2006; de Lumen, 2005). Lunasin 펩타이드의 주요 생리활성 중 하나는 chromatin에 결합하여 histone의 acetylation을 억제하는 것이기 때문에 생산된 재조합 lunasin이 식물 유래 lunasin과 유사한 생리활성을 보이는지 평가하기 위해 재조합 lunasin을 처리하고 immunostaining을 통해 lunasin의 chromatin 결합을 확인한 결과, *E. coli*와 *P. pastoris*로부터 생산된 lunasin peptide 모두 chromatin과 결합하는 것으로 나타났다 (Fig. 2A). 그리고 재조합 lunasin peptide의 histone acetylation 억제효능 평가한 결과, 재조합 lunasin은 synthetic lunasin

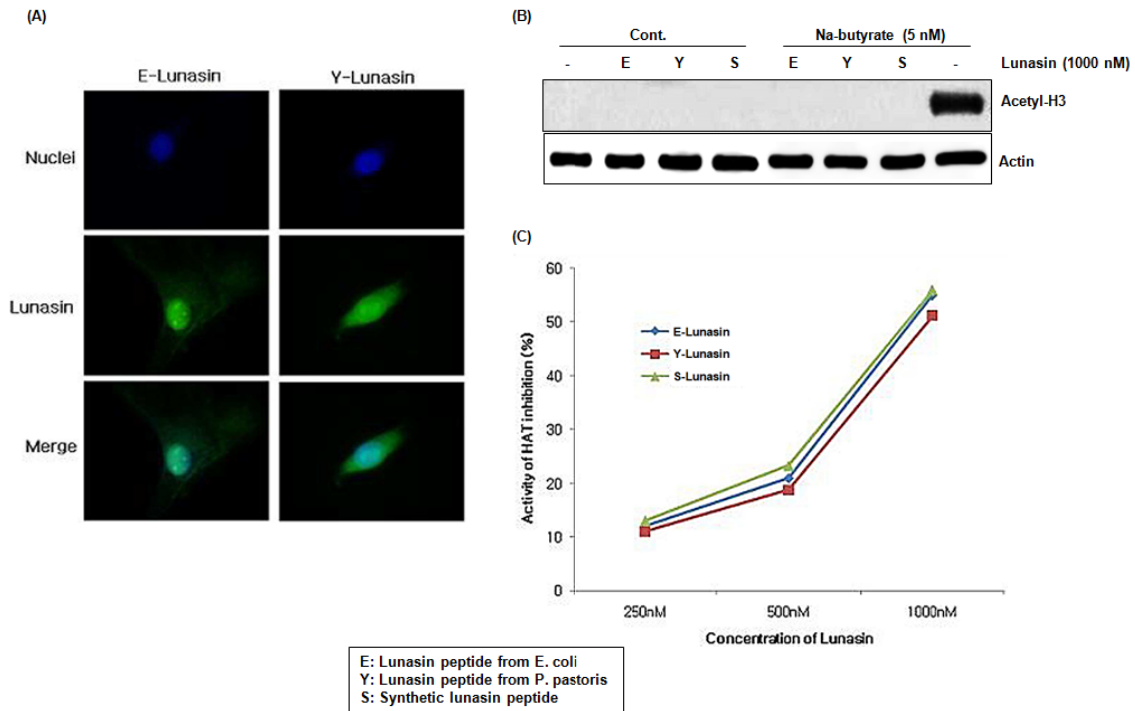


Fig. 2. Effect of the recombinant lunasin peptide from *E. coli* and *P. pastoris* on chromatin binding (A), histone acetylation (B) and the activity of histone acetyltransferase (C).

peptide와 유사하게 Na-butyrate에 의해 유도되는 histone의 acetylation을 억제하였다(Fig. 2B). 기존 연구에서 lunasin peptide의 histone acetylation 억제는 histone acetyltransferase (HAT)에 기인한다는 연구결과에 따라 재조합 lunasin peptide의 HAT 억제활성을 평가한 결과, 재조합 lunasin은 synthetic lunasin peptide와 유사하게 HAT의 활성을 억제하였다(Fig. 2C). 본 결과를 미루어 볼 때, *E. coli*와 *P. pastoris*로부터 생산된 lunasin peptide는 식물 유래 lunasin peptide와 유사한 활성을 가지는 것으로 판단된다.

### 적 요

본 연구는 항암 단백질로 알려진 lunasin peptide의 산업적 활용성을 높이고자 lunasin peptide를 생산할 수 있는 시스템을 개발하고, 생산된 lunasin peptide가 식물유래 lunasin peptide의 생리활성을 가지는지 chromatin binding 활성과 histone acetylation 억제활성을 통해 평가하였다. 그 결과 *E. coli*와 *P. pastoris*를 활용하여 재조합 lunasin peptide를 생산했으며, 생산된 재조합 lunasin 펩타이드가 식물유래 lunasin peptide의 chromatin binding 활성과 histone acetylation 억제활성을 나

타냄을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 실험 연구의 결과를 토대로 lunasin 펩타이드의 대량생산이 진행된다면 천연물 유래 생리활성 물질로서 효과적이면서도 안전한 기능성 식품소재로의 산업적 활용이 가능할 것으로 기대된다.

### 사 사

본 연구는 농림축산식품부 고부가가치식품기술개발사업(과제번호 : 115042-3)에 의해 이루어진 것의 일부이며, 이에 감사드립니다.

### References

De Lumen, B.O. 2005. Lunasin: A cancer preventive soy peptide. *Nutr. Rev.* 63:16-21.  
 Galvez, A.F. and B.O. de Lumen. 1999. A soybean cDNA encoding a chromatin-binding peptide inhibits mitosis of mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 17:495-500.  
 Galvez, A.F., N. Chen, J. Macasieb and B.O. de Lumen. 2001. Chemopreventive property of a soybean peptide (lunasin) that bind to deacetylated histones and inhibits acetylation.

- Cancer Res. 61:7473-7478.
- Jeong, H.J., J.B. Jeong, D.S. Kim, J.H. Park, J.B. Lee, D.H. Kweon, G.Y. Chung, E.W. Seo and B.O. de Lumen. 2007a. The cancer preventive peptide lunasin from wheat inhibits core histone acetylation. *Cancer Lett.* 255:42-48.
- Jeong, H.J., Y. Lam and B.O. de Lumen. 2002. Barley lunasin suppresses ras-induced colony formation and inhibits core histone acetylation in mammalian cells. *J. Agric. Food Chem.* 50(21):5903-5908.
- Jeong, J.B., B.O. de Lumen and H.J. Jeong. 2010. Lunasin peptide purified from *Solanum nigrum* L. protects DNA from oxidative damage by suppressing the generation of hydroxyl radical via blocking fenton reaction. *Cancer Lett.* 293:58-64.
- Jeong J.B., H.J. Jeong, J.H. Park, S.H. Lee, J.R. Lee, H.K. Lee, G.Y. Chung, J.D. Choi and B.O. de Lumen. 2007b. Cancer-preventive peptide lunasin from *Solanum nigrum* L. inhibits acetylation of core histones H3 and H4 and phosphorylation of retinoblastoma protein (Rb). *J. Agric. Food Chem.* 55:10707-10713.
- Jiang Q., Y. Pan, Y. Cheng, H. Li, D. Liu and H. Li. 2016. Lunasin suppresses the migration and invasion of breast cancer cells by inhibiting matrix metalloproteinase-2/-9 via the FAK/Akt/ERK and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Oncol. Rep.* 36(1):253-262.
- Lule, V.K., S. Garg, S.D. Pophaly, Hitesh and K.T. Sudhir. 2015. Potential health benefits of lunasin: A multifaceted soy-derived bioactive peptide. *J. Food Sci.* 80(3):485-9-494.
- McConnell, E.J., B. Devapatla, K. Yaddanapudi and K.R. Davis. 2015. The soybean-derived peptide lunasin inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation by suppressing phosphorylation of the retinoblastoma protein. *Oncotarget* 6(7):4649-4662.
- Park, J.H., J.B. Jeong, B.O. de Lumen and H.Y. Jeong. 2007. The anticancer properties of lunasin peptide from aged callus induced by the soybean tissue culture. *Korea J. Plant Res.* 20(6):518-523.
- Park, J.H., J.B. Jeong, J.R. Lee, B.O. de Lumen and H.J. Jeong. 2009. Effect of lunasin extracted from millet (*Panicum miliaceum*) on the activity of histone acetyltransferases,  $\gamma$ GCN5 and p/CAF. *Korean J. Plant Res.* 22(3):203-208.
- Shogren-Knaak, M., H. Ishii, J.M. Sun, M.J. Pazin, J.R. Davie and C.L. Peterson. 2006. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311:844.847.

(Received 17 August 2016 ; Revised 25 October 2016 ; Accepted 1 November 2016)