

## *Pichia pastoris*에서 Human Lactoferrin의 발현

임소용 · 주인선 · 윤동훈\* · 성창근†

충남대학교 식품공학과

\*(주) 일신유화

### Expression of Human Lactoferrin in *Pichia pastoris*

So-Yong Yim, In-Sun Joo, Dong-Hun Yoon\* and Chang-Keun Sung†

Dept. of Food Science and Technology, Chungnam University, Taejeon 305-764, Korea

\*Il Shin Emulsifier Co. LTD., Seoul 121-050, Korea

#### Abstract

This study was attempted to express human lactoferrin gene that has importance as a functional additive in food industry. Lactoferrin has distinctive antibacterial properties. Also, a number of physiological roles have been postulated for the lactoferrin in the modulation of immune and inflammatory responses and as a growth factor. Since it did not show feasible growth inhibition by antimicrobial test against HLF, *Pichia pastoris* was selected the best lactoferrin expression host. HLF expression plasmid pHIL-SI was integrated into the genomic DNA of *P. pastoris* GS115. The integration was confirmed not only with 2.4Kb fragment of HLF gene by PCR(polymerase chain reaction) product, but also with same size of specific signal by southern blotting. Among the various *pichia* transformants, the JY-1 cell showed a positive response for the expression of HLF by the immunoblotting analysis. The recombinant HLF protein was started to be secreted at 48hr of culture and reached at the highest secretion level at 96hr.

Key words: lactoferrin, *Pichia* sp., gene expression

#### 서론

Lactoferrin(LF)은 당단백질로써 항균력, 성장 촉진제, 철 운반체, 면역반응, 세포막의 receptor에 대한 특이적인 반응 등 생리·생물학적인 특징이 많이 밝혀지고 있다.

이중 human lactoferrin(HLF)의 구조는 681개의 amino acid 잔기로 되어 있으며 두개의 lobe 중 한개 lobe의 domain 사이에는 철과 결합하는 iron site가 존재하고 항균력을 나타내는 부분만 lactoferricin을 갖는다. 철과 결합한 HLF는 산 안정성이 높아짐으로써 위나 췌장의 단백분해효소에도 거의 안정하다고 보고된 바 있다(1-3).

HLF는 우유를 분비하는 mammary gland 뿐만 아니라 눈물, 기관지, 침샘 등에서도 분비되며, 신장과 자궁 분비물, 정액, heterophilic 백혈구에서도 발견되었다(4). LF는 대부분의 포유류에서 분비되지만 사람에게서는

모유 중 2mg/ml 이상으로 분비되는 반면 guinea-pig나 mouse, mare에서는 0.2~2mg/ml, bovine, goat에서는 0.02~0.2mg/ml의 낮은 농도로 분비된다(5). LF의 1차 구조를 비교할 때 bovine LF의 amino acid 서열과 human LF는 약 69%의 유사성을 나타내지만(6) 분유에 공급하였을 때의 LF효과는 판이하다. B. A. Wharaton은 아이에게 bovine LF가 첨가된 분유와 모유를 각각 먹인 후 분변 미생물을 분석하였다. 분유를 먹인 아이에게는 *Enterococci*, *Coliform*, *Bacteroides*가 주요 분변 미생물로 나타난 반면, 모유를 먹인 아이에게는 *Bifidobacteria*, *Lactobacilli*, *Staphylococci*와 같은 유용 미생물이 분석되었다(7). 이것은 bovine LF가 장내에서 불활성화되거나 외부 단백질에 대한 면역학적 반응을 보이기 때문일 것이라고 추측된다. 따라서 HLF는 유아용 조제분유 등의 첨가제로의 이용 뿐만 아니라 정균효과나 세포성장촉진 및 염증예방 등의 특성에 의한 낙농 및 의약산업분야에서 동물사료나 의약제로써의 응용

† To whom all correspondence should be addressed

가능성이 무궁하다고 생각된다.

최근, HLF를 유전공학적인 방법으로 대량 생산하려는 시도가 이루어지고 있다. 1992년 Ward 등은 *Aspergillus nidulans*에서 alcohol dehydrogenase(alcA) promoter의 조절로 HLF를 5mg/L의 수준까지 발현시켰다(8). 또한 *A. oryzae*에서도  $\alpha$ -amylase promoter로 약 25mg/L의 HLF가 발현되었다(9). 1995년 Ward와 Piddington은 *A. awamori*에서 2g/L의 HLF를 발현시켰으며 이때는 glucoamylase promotor를 이용하였다(10). 1993년 Liang과 Richardson은 *Saccharomyces cerevisiae*에 chelatin promoter와 invertase 분비서열을 이용하여 1.5~2.0mg/L의 재조합 HLF를 얻었다고 보고하였다(11). *S. cerevisiae*에서 합성된 재조합 LF는 당쇄가 부가되었고 HLF의 합성수준은 일정하지 않았으며 HLF는 재조합 효모세포의 생육에 저해가 될 수도 있을 것이라고 고찰하였다.

*Pichia pastoris*는 탄소원으로 메탄올을 이용하는 효모이며 발효기술을 이용하였을 때 1L당 100g 이상의 건조균체 농도를 보일만큼 발효공정이 잘 발달되어 있고 생육배지의 단가가 저렴하다는 장점이 있다(12). 또한 AOX(alcohol oxidase)-promoter 하에서 외래 단백질을 발현시켰을 때 tumor necrosis factor는 8g/L, tetanus toxin fragment C는 12g/L 수준으로 발현되는 등 높은 발현율을 보였다.

본 연구에서는 산업적 이용성이 많은(13,14) HLF를 유전공학적인 기술을 이용해 발현, 생산하고자 *P. pastoris* system의 AOX1-promoter 조절하에서 *PHO1*의 분비신호를 이용하여 HLF 발현재를 구축한 뒤 염색체 삽입을 통해 HLF가 세포막으로 분비되는 형질전환체를 선별하고 HLF의 발현 및 생산양상을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 사용균주

모든 제한효소와 효소는 Boehringer Mannheim Biochemical사에서 구입하였다. Oligonucleotide primer는 In vitrogen사에서, amino acids, yeast nitrogen base (YNB), yeast extract, peptone과 glucose 등 배지 구성 성분은 Difco사에서 구입하였다. HLF와 기타 단백질 전기영동 및 immunoblotting 등에 사용되었던 시약은 Sigma사 제품을 이용하였다. 항균력 test에서 검정균으로 사용되었던 균주는 Table 1와 같고 *E. coli* Top10F' (F<sup>+</sup>proAB, lacI<sup>q</sup>, lacZ $\Delta$ M15, Tn10(Tet<sup>R</sup>)) *mcrA*,  $\Delta$ (*mrr-hsd RMS-mcrBC*),  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ lacX74, *deoR*, *recA1*, *ara* D139,  $\Delta$ (*ara-leu*) 7697, *galU*, *galK*,

**Table 1. Test organisms used for measurement of antibacterial activity**

Type	Strain	Medium cultured
Gram negative bacteria	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	Luria-bertani medium(LB)
Gram positive bacteria	<i>Escherichia coli</i> ATCC1129	Luria-bertani medium(LB)
Yeast	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC1199	Yeast extract peptone dextrose medium(YEPD)
	<i>Pichia pastoris</i> (in vitrogen)	Yeast extract peptone dextrose medium(YEPD)
Fungi	<i>Aspergillus oryzae</i> ATCC1699	Potato dextrose medium(PDA)

*rpsL*(Str<sup>R</sup>), *end* A1, *nupG*  $\lambda$ )과 *Pichia pastoris* GS115 (Mut<sup>+</sup>*his4*)가 형질전환에 사용되었고 pHLS1(5'AOX1 promoter, *HIS4* ORF ColE origin, Ap<sup>r</sup>)vector는 In vitrogen사에서 구입하였다(Table 1).

### HLF발현에 적합한 host 선별

LF의 항균력 검증은 Wakabayashi와 Bellamy의 방법에 따라 실시하였다(15). 본 실험에 사용한 검정균은 Table 1에 제시한 바와 같고 증충 배지위에 LF를 적신 paper disc를 상치하여 배양한 후 투명환의 형성을 관찰하였다. 그리고 LF에 대하여 저항력을 보이는 균주를 숙주세포로 사용하였다.

### *Pichia pastoris*에 형질전환

HLF cDNA가 존재하는 *E. coli* DH 5a(pRL100)와 vector로 사용될 *E. coli* Top10(pHLS1)을 배양한 후 Birnboim과 Doly, Ish-Horowicz와 Burke의 변형된 방법에 따라 DNA를 정제하였다(16). pRL100은 제한효소 *XhoI*을 처리하여 *XhoI*으로 미리 처리된 pHLS1과 ligation하여 HLF 발현 plasmid를 제조하였다(Fig. 1).

*P. pastoris*를 YPD배지에서 30°C의 조건으로 2일 동안 배양한 후 세포를 준비하였고 재조합된 plasmid DNA를 *SaI*I으로 절단하여 숙주세포 100ng과 DNA 10  $\mu$ g을 혼합하여 Chang 등의 방법에 따라 1500 volt에서 electrophoration하였다. 선택배지로는 RDB(Regeneration Dextrose medium, 1M sorbitol, 1% dextrose, 1.34% YNB, 4X10<sup>-3</sup>% biotin, 0.005% amino acid(without histidine))를 이용하였고 control로써는 RDBH(RDB, 0.004% hisidine)를 이용하였다. 형성된 colony를 MD (Minimal Dextrose medium, 1.34% YNB, 4 $\times$ 10<sup>-3</sup>% bi

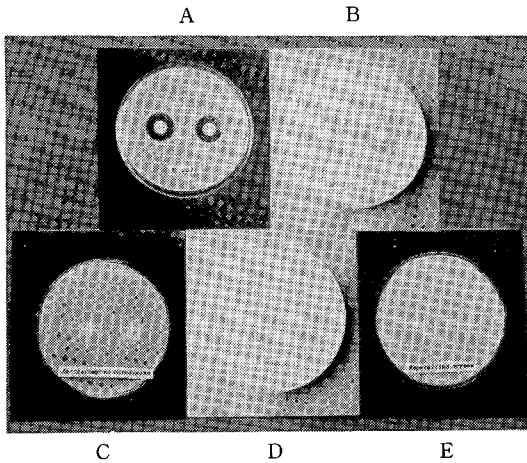


Fig. 1. Schematic diagram of expression vector, pHIL-SI.

A fragment containing HLF gene from HLF cDNA library was inserted into plasmid pRL194 expression vector, pHILS1 was used for the expression including PHO1 secretion signal.

otin, 1% dextrose)와 MM(Minimal Methanol medium, 1.34% YNB,  $4 \times 10^{-3}$ % biotin, 0.5% methanol)배지에 각각 replica plating하여 MM 배지에서 18시간 내에 증식하는 colony를 His<sup>+</sup>Mut<sup>+</sup>(Histidine prototroph, methanol utilizing)로 선별하였다.

PCR

형질전환된 *Pichia*의 genomic DNA를 Ausubel 등 (17)의 방법에 따라 정제하고 inset DNA를 확인하기 위해 pHIL SI과 wild type에 존재하는 AOX1(alcohol oxidase) gene 부분을 다음의 primer를 이용하여 PCR을 실시하였다.

3'AOX 1 5'GACTGGTTCCAATTGACAAGC3'  
5'AOX 1 5'GCAAATGGCATTCTGACATCC3'

Southern blot

Probe는 pRL100에서 2.3Kb의 HLF절편을 이용하였다. Southern(18)의 방법에 따라 5개의 형질전환체에 대해 southern blot하였다. 반응이 끝난 Nylon membrane은 NBT와 X-phosphate로 발색시킴으로써 확인하였다.

Immunoblotting

HLF에 대한 immunoblotting을 위한 polyclonal antibody와 2차 antibody인 peroxidase를 Sigma사에서 구입하였고 Bio-Rad사의 PVDF membrane(0.2μm)을

사용하여 형질전환체 배양액을 10배 농축한 액을 100μl씩 취해 dot blotting을 실시하였다.

HLF의 발현

HLF의 발현을 위해 BMGY(1% yeast extract, 2% peptone, 1.34% YNB,  $4 \times 10^{-5}$ %, biotin, 100mM potassium phosphate(pH 6.0), 1% glycerol) 25ml에 2일 동안 28~30°C, 250rpm의 조건에서 배양하고 pellet만 BM-MY(1% yeast extract, 2% peptone, 1.34% YNB,  $4 \times 10^{-5}$ % biotin, 100mM potassium phosphate(pH 6.0), 0.5% methanol)에서 다시 배양하면서 24시간 마다 최종 농도가 0.5%가 되도록 100% methanol을 첨가하여 주었다. 24시간 마다 배양액을 회수하여 단백질의 양을 비교하였고 가장 많은 단백질을 분비하는 시간의 배양액을 Centriprep과 Centricon을 이용하여 농축하였다. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis는 Laemmli의 방법(19)에 따라 실시하였고 gel은 Coomassie blue로 염색하였다.

결과 및 고찰

Host의 선별을 위하여 5 가지의 원핵 및 진핵생물을 LF에 대한 항균 test를 한 결과 Fig. 2에서와 같이 *A. oryzae*, *P. pastoris* 그리고 *S. cerevisiae*에 대해서만 저항력을 보였다. 이 결과로서 LF를 발현시키기 위한 숙주로 진핵생물인 세가지의 균을 이용할 수 있다는 것을 확인하였다. 본 실험에서는 alcohol oxidase(AOX)

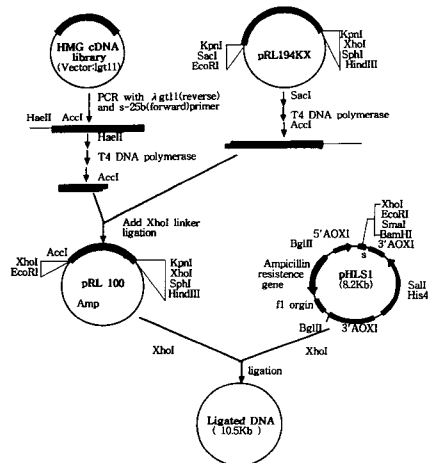


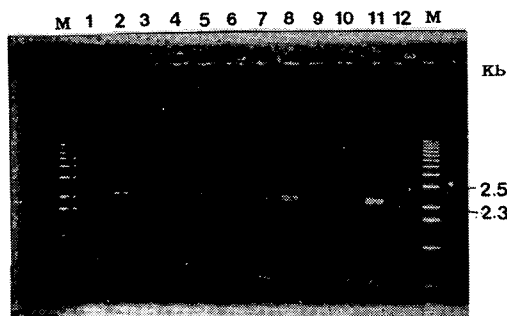
Fig. 2. Antibacterial effect of lactoferrin against various microorganisms lactoferrin was digested with 3% pepsin(10unit/ml) at 37°C for 4hrs. A: *Escherichia coli*, B: *Bacillus subtilis*, C: *Pichia pastoris*, D: *Saccaromyces cerevisiae*, E: *Aspergillus oryzae*

promoter를 이용할 수 있고 methanol 자화성을 갖는 *P. pastoris*를 최적 숙주세포로써 선별하였다(Fig. 2).

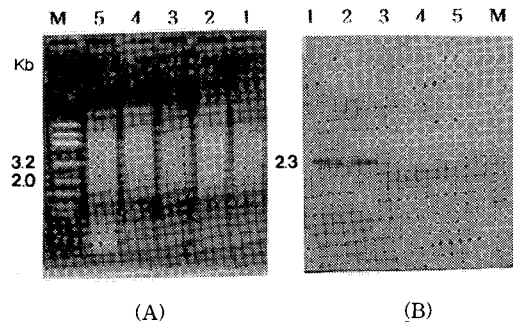
HLF의 subcloning에 이용한 pRL100과 pHLS1의 구조는 각각 Fig. 1에 나타낸 바와 같다. pRL100은 HLF 절편이 있는 pRL194 vector로부터 제조되었으며 vector로 이용한 pHLS1은 AOX promoter 조절하에 5'AOXI primer site, 3'AOXI primer site가 존재하며 *PHO1* 분비신호(S), *HIS4* ORF gene 등으로 구성되어 있다. *P-HO1*의 분비신호는 22개의 아미노산으로 구성되어 있으며 아미노산 생성 후 분비신호 마지막 아미노산인 Ala와 HLF의 첫번째 아미노산인 Arg 사이에서 절단되어 분비되는 것으로 추정된다(Fig. 2).

Expression vector를 제한효소 *SaI*로 처리하여 *Pichia* 염색체 DNA의 *his4* 위치에 integration시킨 후에 chromosome의 *his4*와 vector의 *his4* 사이에서 재조합이 일어나도록 하였다. *P. pastoris* GS115 세포에 형질전환하여 생성된 colony를 MD와 MM 배지 모두에 접종하여 MM 배지에 접종한 colony가 모두 18시간 내에 증식하였다. 이 결과로서 His<sup>+</sup>Mut<sup>+</sup>로 형질이 전환되었음을 확인하였다. His<sup>+</sup>Mut<sup>+</sup>로 형질 전환된 colony 중에서 HLF이 *Pichia*의 염색체 DNA에 integration되었는지 그리고 Mut<sup>+</sup> 형인지를 확인하기 위해 3'AOXI primer와 5'AOXI primer를 이용하여 PCR을 실시한 결과 5개의 형질전환체가 선별되었다. Fig. 3에서는 2.3 Kb와 2.5Kb에서 PCR product가 합성되었는데 2.3Kb는 HLF DNA size이고 2.5Kb는 wild type의 AOX1 gene size(2.2Kb)와 pHLS1의 PCR product size(250bp)를 합한 값이다. 2, 3, 5, 8, 11번에서는 각각 두개의 band를 확인하여 모두가 His<sup>+</sup>Mut<sup>+</sup> type이며, transformants는 각각 JY-1, 2, 3, 4, 5라고 명명하였다.

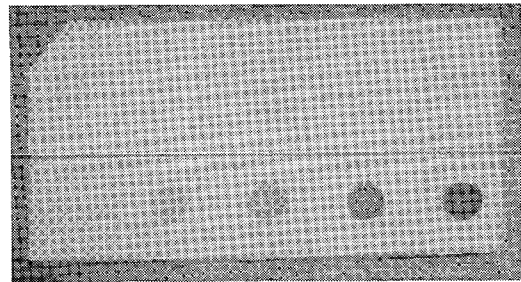
HLF 유전자가 *Pichia*의 염색체 DNA에 multiple co



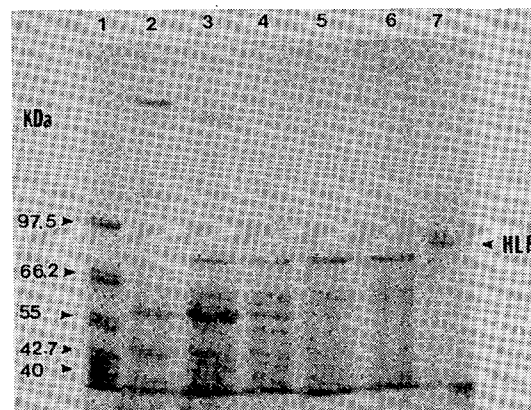
**Fig. 3. Screening of transformants including HLF gene through polymerase chain reaction(PCR).** Lane M is 1Kb ladder, 1 to 12 are primarily selected re-combinants. Lane 2, 3, 5, 8 and 11 show HLF gene out of *Pichia* chromosomal DNA by digestion.



**Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of various transformants of *Pichia pastoris* cleaved by *XhoI*(A). Southern blot analysis of *Pichia* transformants(B). Lane 1 is the size marker of 1Kb; 2, JY-1; 3, JY-2; 4, JY-3; 5, JY-4; 6, JY-5.**



**Fig. 5. Immunoblotting(dot blot) of various transformants.** Upper lane indicate transformants of JY-1, JY-2, JY-3, JY-4, and JY-5. And lower lane reveal HLF protein standard, respectively, 0µg/µl, 10µg/µl, 25µg/µl, 75µg/µl, 200µg/µl.



**Fig. 6. SDS-PAGE of human lactoferrin expressed by the culture of *Pichia* JY-1.** Lane 1, middle range molecular weight marker; Lane 2 is culture filtrates of each following cultures; lane 2, 24hrs; lane 3, 48hrs; lane 4, 72hrs; lane 5, 96hrs; lane 6, 120hrs; lane 7, Commercial HLF protein.

py로 integration된 colony를 선별하기 위하여 PCR에

서 얻은 5개의 colony에 대해 southern blot을 실시한 것은 Fig. 4와 같다. 이 결과 JY-1, 2에서는 대조구에 비하여 다소 강한 band를 나타냄으로써 재조합 HLF DNA가 *P. pastoris*의 genomic DNA에 integration되었음을 유추할 수 있었다.

이들 형질전환체(JY-1, JY-2, JY-3, JY-4, JY-5)에 대한 HLF의 발현성을 조사하기 위해 각각의 배양액을 10배 정도 농축하여 immunoblotting인 dot blot을 실시하였다. Dot blot결과 Fig. 5와 같이 JY-1에서 가장 높은 발색을 보였으며 이 결과로 JY-1에서 많은 양의 HLF가 발현될 것으로 생각되어 JY-1을 120시간 배양하여 24시간 마다 배양액의 상등액을 농축한 다음 SDS-PAGE를 한 결과는 Fig. 6과 같았다. Control로 지정한 HLF와 유사한 약 75KDa의 위치에서 band가 생성되는 것이 확인되었으며 96시간에서 가장 많은 HLF의 단백질이 분비되었다. 사람에서 분비되는 HLF 단백질 크기는 78KDa으로 알려져 있으나 *Pichia*를 숙주세포로 발현시켰을 때는 75KDa이 생산된 것은 사람과 효모 사이의 발현기구 차이에서 기인되는 것으로 사려된다. 이를 규명하기 위해서 앞으로 *Pichia*에서 발현된 HLF단백질의 serine, threonine, arginine 등에서 일어나는 glycosylation의 정도와 종류 및 단백질을 구성한 아미노산들의 수식(post-translational modification)등을 살펴 봐야 할 것이다.

## 요 약

면역활성, 항균성 등의 기능을 보여 식품첨가물로 전량 수입에 의존하여 사용되는 human lactoferrin을 진핵세포에서의 생산을 시도하였다. 우선, 항균성을 보이는 lactoferrin에 대하여 생육저해가 없는 host cell에 lactoferrin 유전자를 발현시키고자 lactoferrin에 대한 항균력을 실험한 결과 *Pichia pastoris*는 생육저해를 일으키지 않아 이를 lactoferrin 생산균주로 선정하였다. *Pichia*를 숙주로 하는 pHLL-SI expression vector에 lactoferrin 유전자를 삽입하였을 때 genomic DNA에 유전자가 integration되었다. 즉, transformant JY-1, JY-2는 PCR(polymerase chain reaction)과 southern blotting에 의하여 2.4Kb의 크기의 HLF(human lactoferrin) 유전자가 삽입되었음을 확인하였다. 유전자 발현을 검토한 결과 transformant JY-1은 immunoblotting에 의하여 lactoferrin 단백질 생산을 확인하였다. 배양시간에 따른 HLF의 생산성을 알아본 결과 48시간 이후에 75 KDa의 HLF단백질이 분비됨을 확인하였다.

## 감사의 글

본 연구는 교육부 학술연구 조성비(유전공학)에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Broc, J. H. : Lactoferrin in human milk: its role in iron absorption and protection against enteric infection in the newborn infant. *Archives of Disease in Childhood*, **55**, 417(1980)
2. Anderson, B. F., Baker, H. M. and Norris, G. E. : Structure of Human lactoferrin : crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. Academic Press limited, p.711(1989)
3. Saito, H., Miyakaya, H. and Tamura, Y. : Potent bacteriocidal activity of bovine lactoferrin hydrolysate produced by heat treatment at acidic pH. *J. Dairy Sci.*, **74**, 3724(1991)
4. Masson, P. L. and Heremans, J. F. : LF in milk from different species. *Comp. Biochem. Physiol.*, **38B**, 119 (1970)
5. Annick, P., Didier, C. and Monique, B. : Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.*, **196**, 177(1991)
6. William-Hutchens, T. : Lactoferrin-structure and function. *Advances in experimental medicine and biology*. Vol. 357, Plenum press, New York and London, p.91 (1994)
7. Jin, H. S., Keum, J. S. and Kim, J. W. : Biological characteristics of lactoferrin. *Korean Dairy Technol.*, **11**, 31(1994)
8. Ward, P. P., May, G., Haedon, D. R. and Oria, M. : An inducible expression system for the production of human lactoferrin in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, **122**, 219(1992)
9. Ward, P. P., Lo, J. Y. and Duke, M. : Production of biologically active recombinant human lactoferrin in *Aspergillus oryzae*. *Bio/Technology*, **10**, 784(1992)
10. Ward, P. P. and Piddington, C. S. : A spectrum for production of commercial quantities of human lactoferrin: a broad spectrum natural antibiotic. *Bio/Technology*, **13**, 498(1995)
11. Liang, Q. and Richardson, T. : Expression and characterization of human lactoferrin in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1800(1993)
12. Scorer, C. A., Clare, J. J. and McCobie, W. R. : Rapid selection using G418 of high copy no. transformant of *Pichia pastoris* from high-level foreign gene expression. *Bio/Technology*, **12**, 181(1994)
13. Teraguchi, S., Ozawa, K. and Yasuda, S. : Effects of orally administered bovine lactoferrin on the Faecal *Enterobacteriaceae* of OPF mice fed milk. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 360(1993)
14. Bellamy, W., Wakabayashi, H. and Takase, M. : Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial derived from the N-terminal region of

- bovine lactoferrin. *Med. Microbial. Immunol.*, **182**, 97 (1993)
15. Wakabayashi, H. and Bellamy, W. : Inactivation of *Listeria monocytogenes* by lactoferrin a potent anti-microbial peptide derived from cow's milk. *J. Food Protection*, **55**, 238(1992)
  16. Ish-Horowicz, D. and Burke, J. F. : Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.*, **9**, 2980(1981)
  17. Ausubel, F. M., Brenet, R. and Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, T. A. and Struhl, K. : Current protocols in molecular biology. Greene publishing associates and Wiley-Interscience, New York(1990)
  18. Southern, E. M. : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503(1975)
  19. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680(1970)

(1997년 5월 13일 접수)