

Platform Technology for Food-Grade Expression System Using the genus *Bifidobacterium*

**Park, Myeong Soo², Kang, Yoon Hee², Cho, Sang Hee², Seo,
Jeong Min² and Geun Eog Ji^{1,2}**

¹Dept Food & Nutrition, Seoul National University

²Research Center, BIFIDO Co LTD.

Bifidobacterium spp. is nonpathogenic, gram-positive and anaerobic bacteria, which inhabit the intestinal tract of humans and animals. In breast-fed infants, bifidobacteria comprise more than 90 % of the gut bacterial population. *Bifidobacterium* spp. are used in commercial fermented dairy products and have been suggested to exert health promoting effects on the host by maintaining intestinal microflora balances, improving lactose tolerance, reducing serum cholesterol levels, increasing synthesis of vitamins, and aiding the immune enhancement and anticarcinogenic activity for the host. These beneficial effects of *Bifidobacterium* are strain-related. Therefore continued efforts to improve strain characteristics are warranted.

In these respect, development of vector system for *Bifidobacterium* is very important not only for the strain improvement but also because *Bifidobacterium* is most promising in serving as a delivery system for the useful gene products, such as vaccine or anticarcinogenic polypeptides, into human intestinal tract.

For developing vector system, we have characterized several bifidobacterial plasmids at genetic level and developed several shuttle vectors between *E. coli* and *Bifidobacterium* using them. Also, we have cloned and sequenced several metabolic genes and strong promoters from *Bifidobacterium*, which is the good candidate for gene expression controller and food grade selection marker. Also we have obtained bifidobacterial surface protein, which will be used as the mediator for surface display of foreign genes. Recently we have succeeded in expressing amylase and GFP in *Bifidobacterium* using our own expression vector system. Now we are in a very exciting stage for the molecular breeding and safe delivery system using probiotic *Bifidobacterium* strains.

서 론

비피더스균은 안전성이 입증된 GRAS 미생물로 최근에는 항암, 콜레스테롤 저하, 혈압강하, 혈전저해, 설사 방지 등의 probiotics 효과에 대한 연구 결과가 계속 발표되고 있는 건강기능성 유용 미생물이다. *Bifidobacterium*의 벡터 및 유전체 연구는 현재 국내 연구진이 선도할 수 있는 틈새 개발 분야이며 최근 Self-cloning에 의한 novel food 개념이 도입되어 *Bifidobacterium*을 이용한 재조합 균주는 법적으로 안전한 식품용 균주로 사용 가능성이 높아지고 있다. 비피더스 발현 시스템은 식품산업용 발효에서 매우 중요한 위치를 차지하는 비피더스 유산균의 효율을 극대화 할 수 있는 기술로서 식품산업 뿐 아니라 동물 사료 및 의약품 등 발효산업 전반에 걸쳐서 응용될 수 있는 기반 기술이다.

비피더스용 vector 개발 및 외래 유전자의 발현

[비피더스용 vector의 개발]

*Bifidobacterium*에서 이용할 수 있는 vector는 대략 세 가지 타입이 가능하다. 첫째, *Bifidobacterium*에서 유래한 replicon을 이용한 경우, 두 번째, 이 균과 매우 가까운 유연관계를 가지는 미생물의 replicon을

이용하는 경우, 그리고 broad host range plasmid를 이용하는 경우가 그것이다. 첫 번째의 경우처럼 *Bifidobacterium* 유래의 replicon을 확보하기 위해서는 이 균의 cryptic plasmid에 대한 연구가 필수적이다. 비피더스균의 플라스미드에 관한 연구는 1982년에 이탈리아의 Sgorbati 등에 의해서 시작된 이래 [13] 유전자 지도의 작성과 전체 염기서열 분석 등을 통해 shuttle vector로 개발하고자 하는 연구가 진행되고 있다. 이러한 비피더스의 vector 연구는 주로 이탈리아 볼로냐 대학의 연구 그룹과 일본의 야쿠르트사와 교토 대학 그리고 본 연구진 등에 의해서 주도되고 있다. 이들에 의하여 pCIBbI [7], pMB1 [10], pKJ50 [8], pKJ36 [9] 등이 완전히 sequencing이 되었고, pCIBbI, pKJ50 그리고 pKJ36은 single-stranded DNA를 중간체로 하는 rolling circle replication에 의해서 복제하는 것이 확인되었다. 이와 같은 비피더스 플라스미드에 대한 유전자 수준에서의 연구결과가 축적이 되고 1980년대 중반부터 상용화된 electroporation에 의해 *Bifidobacterium*에서도 shuttle vector의 개발이 진행되었다 [1]. 이러한 셔틀벡터는 food-grade 클로닝 벡터나 발현벡터 구축을 위한 좋은 후보들이다.

지금까지 *Bifidobacterium*에서 cloning 및 sequencing되어 보고된 유전자는 몇 종에 불과하다. 이들은 *B. longum*의 β -galactosidase [11], *B. breve*의 β -D-glucosidase [6], *B. adolescentis*의 α -galactosidase, *B. breve*의 *recA*, *B. asteroides*의 *recA*, *B. longum*의 *ldh* [12], *B. longum*의 bile salt hydrolase [14] 등이다. 본 연구진은 비피더스에서 α -amylase [5], β -galactosidase (not published), β -xylosidase (not published), α -glucosidase [18]를 클로닝하여 염기서열 분석을 마쳤으며, 그 특성을 분자생물학적 방법을 사용하여 규명하였다. 이러한 효소 유전자들은 비피더스에서 외래 유전자의 발현 및 food grade marker로서 이용될 수 있을 것이다.

이와 같이 몇 가지의 shuttle vector가 개발되고 효소유전자에 대한 연구가 축적되면서 *Bifidobacterium*을 host로 한 외래 유전자 발현시도가 가속화되고 있다. 이탈리아에서는 *Bifidobacterium longum* MB 219 lacZ gene이 cloning되어 염기서열, 발현 및 전사조절부위가 분석되었다 [11]. 본 연구실에서는 비피더스의 플라스미드를 이용하여 자체 개발한 셔틀벡터 pBES2를 사용하여 박테리아나 동물세포에서 marker로 사용되는 GFP gene의 발현을 시도하여, mRNA 수준에서 GFP가 발현되는 것을 확인하였다 [17]. 또한 *B. adolescentis* Int57 유래의 α -amylase를 pBES2를 이용하여 여러 *Bifidobacterium* host에서 발현시킨 결과 모균주보다 활성이 강한 transformant를 얻었다(국제특허출원). 이 유전자는 발현된 효소의 대부분이 세포밖으로 분비되어 외래 유전자의 발현 및 분비 시스템으로 개발할 때 매우 유용한 도구가 될 것으로 예상된다. 현재 본 연구진은 이 분비시스템에 대장암을 제어할 수 있는 항암유전자 및 다양한 기능성 유전자를 fusion에 의하여 발현시키고자 하는 연구를 진행하고 있다.

[*Bifidobacterium* host 연구]

비피더스의 발현 시스템이 개발되어 외래 유전자가 발현이 되었을 경우 이를 인간이나 동물의 장내로 전달하고자 할 때 도입된 유전자가 충분히 발현되어 효과를 나타내기 위해서는 주입된 비피더스가 인체의 장에서 잘 부착하여야 한다. 이러한 분야에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있으며 그 특성은 균주마다 상이한 것으로 나타나고 있으며 그 부착 메커니즘에 관한 연구결과가 보고되고 있다 [2, 3, 4, 15]. 이에 대한 가능성을 점검하는 연구로 최근 일본에서 *B. longum*이 mouse의 solid tumor에 정착하고 증식하는 것을 확인하였다 [16]. 정상 세포에 비해, solid tumor에는 산소분압이 매우 낮은 hypoxic region이 존재하는데 이러한 특성을 이용한다면 비피더스 발현시스템을 이용하여 대장암세포에 선택적으로 항암 물질을 전달할 수 있을 것이다.

응용분야

비피더스 발현 시스템은 곧바로 식품 소재 및 기능성 발효유의 제조, 정장제품의 개발 뿐 아니라 질병 치료를 위한 신개념의 유전자 치료 기법에 이용될 수 있을 것이다. 인간의 대장은 전체 면역체계의 약 60%를 차지하고 있어 이를 이용하기 위하여 *Salmonella*와 *Shigella* 등을 포함하는 장내 미생물이 관심의

대상이 되고 있는데 이러한 장 감염성 세균들이 점막 면역 반응을 잘 유도하는 특징들 때문이다. 하지만 안전성 면에서 상당한 논란을 불러일으킬 소지가 있다. 이에 비하여 비피더스는 이미 GRAS (generally recognized as safe)로 인정을 받고 있으며 인간의 장에서 최우세 균총을 형성하여 *Lactobacillus*보다도 약 1,000배정도의 수준으로 존재하며 또한 장에 대한 정착성 및 probiotics로서 기능이 널리 알려져 이것을 vaccine carrier로 이용할 수 있다면 live vaccine의 개발에 획기적인 진전을 이룰 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Argnani, A., Leer, R.J., van Lwijk, N. and Pouwels, P.H. (1996) A convenient and reproducible method to genetically transform bacteria of the genus *Bifidobacterium*. *Microbiology*. 142, 109-114.
2. Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL.(1993) Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Appl Environ Microbiol*. 59, 4121-8.
3. Del Re B, Busetto A, Vignola G, Sgorbati B, Palenzona DL.(1998) Autoaggregation and adhesion ability in a *Bifidobacterium suis* strain. *Lett Appl Microbiol*. 27, 307-10.
4. Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M, Palenzona D. (2000) Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett Appl Microbiol*. 31, 438-42.
5. Lee SK, Kim YB, Ji GE. (1997) Purification of amylase secreted from *Bifidobacterium adolescentis*. *J Appl Microbiol*. 83, 267-72.
6. Nunoura N, Ohdan K, Tanaka K, Tamaki H, Yano T, Inui M, Yukawa H, Yamamoto K, Kumagai H. (1996) Cloning and nucleotide sequence of the -D-glucosidase gene from *Bifidobacterium breve* clb, and expression of -D-glucosidase activity in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 60, 2011-2018.
7. O'Riordain, K., Fitzgerald, G.F. (1999) Molecular characterization of a 5.75-kb cryptic plasmid from *Bifidobacterium breve* NCFB2258 and determination of mode of replication. *FEMS microbiol. lett*. 174, 285-292.
8. Park, M.S., Shin, D.W., Lee, K.H. and Ji, G.E. (1999) Sequencing analysis of the plasmid pKJ50 from *Bifidobacterium longum*, *Microbiology*, 154, 585-592.
9. Park, M.S., Shin, D.W., Lee, K.H. and Ji, G.E. (2000) Characterization of plasmid pKJ36 from *Bifidobacterium longum* and construction of *E. coli* - *Bifidobacterium* shuttle vector. *J. Microbiol. Biotechnol*. 10 :312-320.
10. Rossi, M., Brigidi, P., Rodriguez, A.G.V. and Matteuzzi, D. (1996) Characterization of the plasmid pMB1 from *Bifidobacterium longum* and its use for shuttle vector construction. *Res. Microbiol*. 147, 133-143.
11. Rossi, M., Altomare L, Gonzalez Vara y Rodriguez A, Brigidi, P. and Matteuzzi, D. (2000) Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Bifidobacterium longum* MB 219 lacZ gene. *Arch Microbiol*. 174(1-2):74-80.
12. Roy D, Sirois S. (2000) Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the ldh gene. *FEMS Microbiol Lett*. 191,17-24.
13. Sgorbati. B., Scardovi, V. and Leblanc, D.J. (1982) plasmids in the genus *Bifidoabacterium*. *Journal of General Microbiology* 128, 2121-2131.
14. Tanaka H, Hashiba H, Kok J, Mierau I. (2000) Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum*-biochemical and genetic characterization. *Appl Environ Microbiol*. 66, 2502-12.
15. Wadstrom T, Andersson K, Sydow M, Axelsson L, Lindgren S, Gullmar B. (1987) Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *J Appl Bacteriol*. 62, 513-20.
16. Yazawa K, Fujimori M, Amano J, Kano Y, Taniguchi S.(2000) *Bifidobacterium longum* as a delivery system for cancer gene therapy: selective localization and growth in hypoxic tumors. *Cancer Gene Ther*. 7, 269-74.
17. Kang, Yoon Hee (2001) Development of foreign-gene expression system for *Bifidobacterium longum* GE1, Thesis for the degree of Master of Science, Seoul National University
18. Lee, Sun Young (2001) Molecular cloning and expression of a -glucosidase gene from *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 in *Escherichia coli*, Thesis for the degree of Master of Science, Seoul National University.