

## 락토페린의 면역반응에서의 기능: 락토페린에 의한 인터루킨-1 $\beta$ 의 유전자 발현조절

김 지 영

경희대학교 생명과학부

### 초 록

### 서 론

락토페린은 주로 유즙에 많이 포함되어 있으며 인간 분비물 등에서도 발견되는 당단백질로써, 미생물 감염에 대한 방어작용이 있는 것으로 알려져 있다. 락토페린의 미생물에 대한 방어작용은 미생물 성장에 필요한 철이온이 락토페린에 결합하여 성장을 저해하기 때문인 것으로 알려져 있다. 락토페린은 이외에도 염증반응의 조절, 임파세포의 성장촉진 등 면역반응에도 관여하는데 이러한 활성은 철에 결합하는 성질과는 무관하게 일어나며 락토페린이 DNA에 결합하는 성질과 관련이 있는 것으로 추측되어진다. 락토페린은 DNA에 결합하여 유전자의 전사에 관여할 것으로 여겨지는데 그 동안 어떤 유전자의 발현에 관여하는지에 대해서 알려진 바가 없었다. 최근 본 연구팀은 락토페린이 포유세포의 세포유전자의 전사에 관여하는지를 분석한 결과 락토페린 결합부위를 가지고 있는 유전자중의 하나인 인간 인터루킨-1 $\beta$  유전자의 전사를 활성화시킨다는 연구 결과를 보여 주었다. 인간 myelogenous leukaemia 세포주인 K562 세포를 락토페린과 phorbol myristate acetate(PMA)로 함께 처리하면 K562 세포의 인터루킨-1 $\beta$  mRNA의 양은 PMA 단독으로 처리하였을 때 보다 상승적으로 더 많이 유도됨을 보여주었다. 또한 IL-1 $\beta$ /Luciferase 융합 유전자를 K562 배양세포에 넣어 전사 활성을 비교함으로써 락토페린에 의한 인터루킨-1 $\beta$ 의 전사활성을 확인하였다. 락토페린을 전체, N-말단, 혹은 C-말단 부위를 COS-1 세포에 발현시켜 전사 활성을 측정한 결과 C-말단 쪽은 전사활성이 없었으나 N-말단 90개 아미노산 부위(N1a라 명명)가 전사활성을 가지고 있음을 규명하였다. 본 연구결과는 락토페린이 인터루킨-1 $\beta$ 의 유전자의 전사에 역할을 하고 있음을 보여 주고 있으며 또한 인터루킨-1 $\beta$ 의 유전자 외에도 락토페린 결합 부위를 유전자의 조절부위에 포함하고 있는 세포 유전자의 전사도 관여할 수 있음을 제시하고 있다.

유즙은 영양학적으로 균형있는 성분들이 풍부하게 함유되어 있을 뿐 아니라 외래 병원체의 방어를 필요한 여러 가지 생리활성 물질들이 많이 포함되어 있다. 락토페린은 초유에 많이 포함되어 있고 타액선, 담관, 유선과 같은 외분비선 체액성 분비물에도 포함되어 있다. 락토페린은 철 결합 당단백질로서 생체내의 철이온을 운반하는 transferrin family에 속해있다. 락토페린은 생체내 철이온을 운반하고 저장하는 기능을 가지고 있으며 생체내의 철의 항상성 유지에 관여하고 있다. 철이온과 결합함으로써 박테리아의 생장에 필수적인 철의 공급을 차단하여 감염된 박테리아의 생장을 억제시키는 기능을 가지고 있다(1, 2). 692 아미노산으로 구성되어 있으며 분자량은 약 82 KDa 정도이다. 락토페린의 3차원적 구조를 살펴보면, 구조상 80% 이상의 homology를 가지고 있는 N, C-lobe로 나누어져 있으며 각각 하나의 철 결합부위를 가지고 있다(3, 4).

락토페린은 호중구의 secondary granules의 주성분이며 염증 반응 시 호중구 세포 밖으로 분비된다(5, 6). 락토페린은 다기능 단백질로써 myelopoiesis의 조절(7)과 NK 세포의 활성화(8), granulopoiesis의 억제(9), lymphokine에 의해 활성화된 killer 세포의 활성화 자극(10)과 같이 많은 면역학적 반응에 관여한다. 또한 많은 연구가들에 의해 락토페린은 TNF- $\alpha$ , 인터루킨-1 $\beta$ , 인터루킨-8, NO, GM-CSF와 같은 사이토카인의 분비와 생성에 영향을 주는 것으로 보고되었다(11-16). 이러한 면역체계에 관한 락토페린의 조절 기능들은 명확히 규명되진 않았지만 이 같은 역할의 일부는 철 이온과의 결합 능력과는 무관한 것으로 생각되어지고 있다.

최근에는 락토페린이 세포 표면의 수용체와 결합 후에 세포 안으로 들어가 핵 안에서 DNA와 결합함이 알려졌다(17). 또한 락토페린이 DNA에 특이적으로 결합하는 결합

부위(LBS)가 random human sequence에서 발견되었으며 특이적 결합 LBS중의 하나인 5'-GGCACTTGC-3'를 reporter 유전자와 융합하여 전사활성을 측정된 결과 락토페린에 의해서 융합 reporter 유전자의 전사가 증가되었음이 보고되었다(18, 19). 락토페린은 수용체를 통하여 세포로 들어가 핵내에서 DNA에 작용하여 특정 단백질의 발현에 관여 할 것으로 추측되나 아직까지 실제로 락토페린이 세포유전자의 전사에 역할을 하며 어떻게 작용하는지는 거의 알려져 있지 않은 상태이다. 본 연구팀은 락토페린 결합 부위, 5'-GGCATTGC-3'를 가지고 사람 유전자를 탐색한 결과 인터루킨-1β (IL-1β)의 5'-flanking sequence에 5개의 putative LBS가 포함되어 있어 락토페린이 인터루킨-1β의 전사에 관여하는지를 분석하여 면역세포에서 락토페린의 인터루킨-1β의 유전자의 전사를 활성화시키는 것을 관찰하여 그 결과를 보고한 바 있다 (20).

**락토페린에 의한 인터루킨-1β 유전자 발현 조절**

락토페린이 인터루킨-1β 유전자의 발현에 관여하는지를 확인하기 위해 K562 세포에 락토페린 (10 μg/ml)을 처리하고 24시간 후에 PMA(10 ng/ml)를 처리하였다. 그 후 24시간 배양하여 인터루킨-1β의 mRNA를 RT-PCR로 알아보았다. 그림 1에서 보는 바와 같이 락토페린만을 처리하였을 때는 45 cycles 시 극히 미세한 인터루킨-1β mRNA 증가를 볼 수 있었다. 그러나 락토페린과 PMA를 같이 처리하면 PMA만으로 증가된 인터루킨-1β mRNA 양이 상승적으로 유도됨을 확인 할 수 있었다.

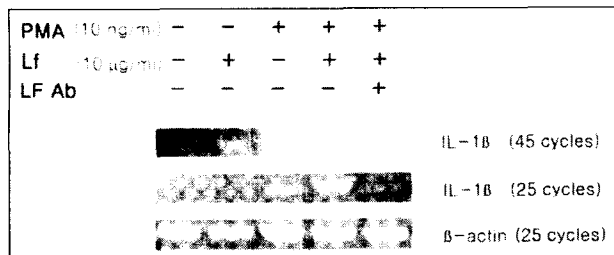


그림 1. 락토페린에 의한 IL-1β 유전자 발현의 조절: RT-PCR 분석 PMA, phorbol myristate acetate; Lf, Lactoferrin; Ab, Lf에 대한 항체

인터루킨-1β 발현에 대한 락토페린과 PMA의 효과는 그림 2에서 보는 것처럼 융합 reporter 유전자의 전사측정 결과에 의해 재차 확인되었다. 이러한 결과가 락토페린에 의해서 유도되었는지를 확인하기 위하여 락토페린 항체를 이용한 immunodepletion 후에 K562 세포의 RT-PCR과 Luciferase assay를 수행하였다. 그림 1, 2에서 인터루킨-1β의 mRNA와 luciferase activity가 PMA만 처리한 수

준으로 감소한 것으로 보아 락토페린의 효과임을 다시 한번 확인하였다.

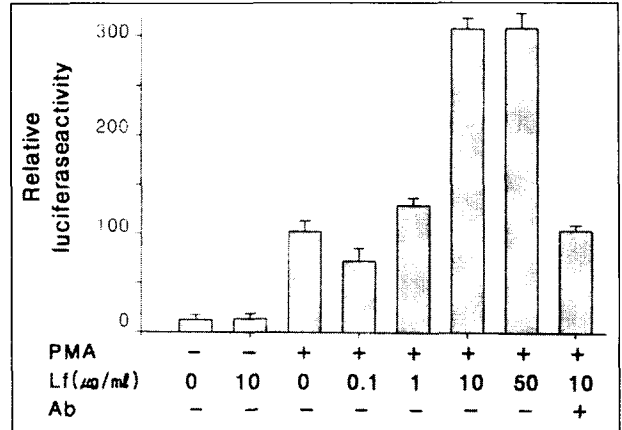


그림 2. 락토페린에 의한 IL-1β/Luc 융합 유전자의 전사 저조 PMA myristate acetate; Lf, Lactoferrin; Ab, Lf에 대한 항체

**인터루킨-1β 발현에 대한 락토페린의 전사활성화 부위 분석**

PMA와 락토페린에 의해 인터루킨-1β 유전자의 전사활성화에 대해 락토페린의 어느 부위가 작용하는지 알아보기 위해 위해서 락토페린 전체, 락토페린의 N-말단 부위 혹은 C-말단부위를 발현하는 플라스미드를 K562 세포에 넣어 PMA (10 ng/ml)를 처리한 다음 RT-PCR을 수행하였다. 그림 3에서 보는 바와 같이 락토페린, N-terminal lobe 그리고 Nla가 PMA와 상승작용으로 인터루킨-1β mRNA를 증가시키고 있음을 확인하였다.

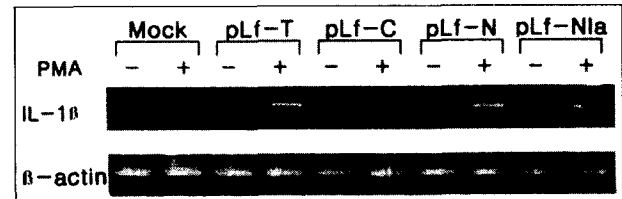


그림 3. 락토페린 및 락토페린 절편에 의한 IL-1β 유전자 발현 조절: RT-PCR 분석 아미노산 잔기 위치: T, 1-692; C, 342-692; N, 1-345; Nla, 1-90

이 같은 결과는 IL-1β/luciferase reporter 플라스미드와 락토페린, N-말단 부위 및 C- 말단부위를 발현하는 플라스미드를 K562 넣어 융합 유전자의 전사활성을 측정한 실험에서도 확인되었다 (그림 4).

락토페린의 전사활성화부위를 알아보기 위하여 GAL4 system을 또한 이용하였다. GAL4 binding domain과 락토페린 유전자 전체, 락토페린의 N-말단 부위 혹은 C-말단 부위에 해당하는 유전자 부위를 융합하여 클로닝한 플라스미드와 GAL4 /CAT 융합 유전자를 포함한 pG5E1b/CAT

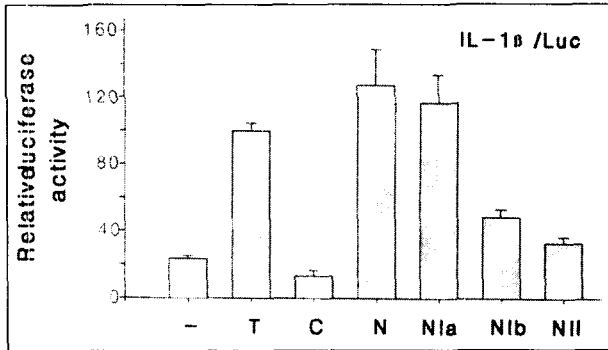


그림 4. 락토 페린 및 락토페린 절편에 의한 IL-1 $\beta$ /Luc 유합 유전자의 전사조절 아미노산 잔기 위치: T, 1-692; C, 342-692; N, 1-345; N1a, 1-90; N1b, 252-350; N11, 91-251

플라스미드를 COS-1세포에 함께 넣은 후 reporter 유전자에 대한 각각의 전사활성을 측정하였다. 그림 5에서 보는 바와 같이 락토페린과 N-terminal half lobe는 융합유전자의 전사를 활성화시켰으나, C-terminal half lobe는 융합유전자의 전사를 활성화시키지 못하는 것이 확인되었다.

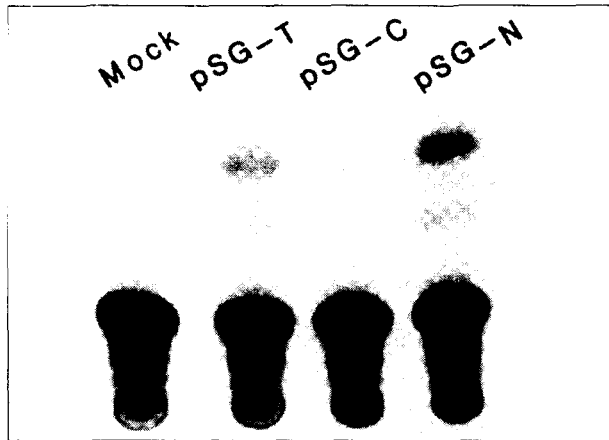


그림 5. 락토페린의 전사 활성화 부위 분석 아미노산 잔기 위치: T, 1-692; C, 342-692; N, 1-345

락토페린의 전사활성화부위는 N-terminal 90 아미노산으로 이루어진 부위에 존재함을 확인하였다. 락토페린의 N1a 부위에는 Arg<sup>2</sup>-Arg<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Arg<sup>5</sup>와 Arg<sup>28</sup>-Lys<sup>29</sup>-VAL<sup>30</sup>-Arg<sup>31</sup>로 이루어진 2개의 basic cluster가 존재한다. Basic cluster들로 인하여 락토페린이 heparin, lipid A, human lysozyme, DNA에 interaction하는 것으로 보고되었으며 (21) 이 부위가 DNA 결합에 중요한 역할을 할 것으로 보이며 이를 뒷받침하는 실험이 앞으로 진행되어야 할 것이다.

결론적으로 본 결과는 락토페린이 인터루킨-1 $\beta$  유전자의 전사에 관여하고 있으며 락토페린의 N-terminal 90 아미노산으로 이루어진 N1a가 중요한 부위라 할 수 있다.

## 인터루킨-1 $\beta$ 유전자의 LBS 부위에 대한 향후 연구

인터루킨-1 $\beta$  유전자에는 5곳의 putative LBS가 존재하며, 각각의 위치와 sequence는 다음과 같다. LBS 1은 -3202~-3193 (GGCACTTGC), LBS 2는 -3137~-3129 (GGA-CTTGC), LBS 3은 -2384~-2376 (GTCACGTGC), LBS 4는 -1357~-1348 (GGCACTGTGC), LBS 5는 -1052~-1043 (GGA-CTTGC)이다. 인터루킨-1 $\beta$  유전자 발현에 락토페린과 PMA의 상승작용의 중용한 site는 아직까지 밝혀지지 않았다. 또한 인터루킨-1 $\beta$  발현 및 분비는 세포 내 철 농도에 의해 조절된다는 것이 보고된 바 있다 (22,23). 따라서 인터루킨-1 $\beta$  유전자의 LBS중 어느 부위가 락토페린에 의한 인터루킨-1 $\beta$  유전자 발현에 중요한 site인지 알아보는 실험이 필요하다고 하겠으며 세포 내 철 농도와 락토페린과의 관계를 알아보는 것 또한 수행되어야 하겠다. 이러한 연구는 앞으로 락토페린이 면역반응에서 어떠한 역할을 하는지를 이해하는데 기여할 것으로 기대된다.

## 참고문헌

- 1) Arnold, R.R., Brewer, M., and Gauthier, J.J. (1980) Bacteriocidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of macroorganisms. *Infect. Immun.* 28, 893-899.
- 2) Brines, R.D., and Brock, J.H. (1983) The effect of trypsin and chymotrypsin on the in vitro antimicrobial and iron-binding properties of lactoferrin in human milk and bovine colostrums. Unusual resistance of human lactoferrin to proteolytic digestion. *Biochim. Biophys. Acta.* 759, 655-672.
- 3) 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 $\text{\AA}$  resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci., U SA* 84, 1769-1773.
- 4) 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 $\text{\AA}$  resolution *J. Mol. Biol.* 209, 711-734.
- 5) Masson, P.L., Heremans, J.F., and Schonke, E. (1969) Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J. Exp. Med.* 130, 643-658.
- 6) Slater, K., and Fletcher, J. (1987) Lactoferrin derived from neutrophils inhibits the mixed lymphocyte reaction. *Blood* 69, 1328-1333.
- 7) Rado, T.A., Wei, X., and Benz, E.J. (1987) Isolation of lactoferrin cDNA from a human myeloid library and expression of mRNA during normal and leukemic myelopoiesis. *Blood* 70, 989-993.
- 8) Nishiya, K., and Horwitz, P.A. (1982) Contrasting effects of lactoferrin on human lymphocyte and monocyte natural killer cell activity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 129, 2519-2523.
- 9) Bagby, G.C., McCall, E., and Layman, D.L. (1983) Regulation of colony-stimulating activity production: Interaction of fibroblasts, mononuclear phagocytes, and lactoferrin. *J. Clin. Invest.* 71, 340-344.
- 10) Shau, H., Kim, A., and Golub, S.H. (1992) Modulation of natural killer and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity by lactoferrin. *J. Leukoc. Biol.* 51, 343-349
- 11) Zucali, J. R., Broxmeyer, H. E., Levy, D., and Morse, C. (1989) Lac-

- toferin decreases monocyte-induced fibroblast production of myeloid colony-stimulating activity by suppressing monocyte release of interleukin-1. *Blood* 74, 1531-1536
- 12) Crouch, S.P.M., Slater, K.J., and Fletcher, J. (1992) Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin. *Blood* 80, 235-240
  - 13) Penco, S., Pastorino, S., Bianchi-Scarra, G., and Garre, C. (1995) Lactoferrin down-modulates the activity of the granulocyte macrophage colony-stimulating factor promoter in Interleukin-1 $\beta$ -stimulated cells. *J. Biol. Chem.* 270, 12263-12268.
  - 14) Shinoda, I., Takase, M., Fukuwatari, Y., Shimamura, S., Koller, M., and Konig W. (1996) Effects of lactoferrin and lactoferricin on the release of interleukin 8 from human polymorphonuclear leukocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 521-523.
  - 15) Sorimachi, K., Akimoto, K., Hattori, Y., Ieiri, T., and Niwa, A. (1997) Activation of macrophages by lactoferrin: secretion of TNF-alpha, IL-8 and NO. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 43, 79-87
  - 16) Choe, Y., and Lee, S. (1999) Effect of lactoferrin on the production of tumor necrosis factor- and nitric oxide. *J. Cell. Biochem.* 76, 30-36
  - 17) Garre, C., Bianchi-Scarra, G., Sirtio, M., Musso, M., and Ravazzolo, R. (1992) Lactoferrin binding sites and nuclear localization in K562(S) cells. *J. Cell. Physiol.* 153, 477-482.
  - 18) He, J., and Furmanski, P. (1995) Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature* 373, 721-724.
  - 19) Kanyshkova, T.G., Semenov, D.V., Buneva, V.N., and Nevinsky, G. A. (1999) Human milk lactoferrin binds two DNA molecules with different affinities. *FEBS Lett.* 451, 235-237
  - 20) Kyung-No Son, Junbae Park, Chan-keun Chung, Dae K. Chung, Dae-Yeul Yu, Kyung-Kwang Lee, Jiyoung Kim (2002) Human Lactoferrin Activates Transcription of IL-1 $\beta$  Gene in Mammalian Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290, 1, 236-241
  - 21) Van Berkel, P.H.C., Geerts, M.E.J., van Veen, H.A., Mericskay, M., de Boer, H.A., and Nujens, J.H. (1997) N-terminal stretch Arg2, Arg3, Arg4 and Arg5 of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA. *Biochem. J.* 328, 145-151
  - 22) Shirakawa, F., Saito, K., Bonagura, C. A., Galson, E. L., Fenton, M. J., Webb, A. C., and Auron, P. E. (1993) The human prointerleukin 1 beta gene requires DNA sequences both proximal and distal to the transcription start site for tissue-specific induction. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1332-1344
  - 23) OBrien-Ladner, A.R., Nelson, S.R., Murphy, W.J., Blumer, B.M., and Wesselius, L.J. (2000) Iron is a regulatory component of human IL-1beta production. Support for regional variability in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 23, 112-9