

Methylotrophic Yeast, *Pichia pastoris*에서 사람 락토페린의 발현 및 항균성 연구

이상오 · 임은미 · 남은주 · 이현환*

한국의국어대학교 자연과학대학 생명공학과

사람의 모유에 많이 함유된 human lactoferrin(hLf)은 항균 및 항 바이러스 작용이 있는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 hLf를 메탄올자화 효모인 *Pichia pastoris*에 cloning 하고 그 발현을 RT-PCR, Northern blotting, SDS-PAGE 및 Western blotting으로 확인하였다. 그 결과 2.1 kb의 hLf 유전자가 *P. pastoris*의 염색체 DNA로 끼어들어가 안정적으로 hLf를 발현하였다. 이 재조합 *P. pastoris*로부터 hLf를 포함하는 세포 추출액을 얻어 항균 작용을 연구하였다. 발현된 재조합 hLf는 *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus flavus* 등의 그람 양성균에 대해 강력한 항균작용을 보일 뿐만 아니라 그람 음성 동물성 병원균인 *Pseudomonas fluorescens* ID 9631, *E. coli* ATCC8739, 25922, 35 등과 *Salmonella typhimurium* 114, 115 등 다양한 균에 대해서도 강력한 항균 작용을 보였다. 이는 재조합 hLf가 생물학적 활성이 있다는 것을 보여준다.

Key words □ antibacterial activity, expression, *Pichia pastoris*, recombinant human lactoferrin

Human lactoferrin(hLf)은 철과 결합하는 당단백질의 일종으로 lactotransferrin이라고도 하며, 주로 모유, 침, 눈물, 점액비물이나 polymorphonuclear leucocytes의 secondary granules 등에 존재하며(1, 2, 3) red protein으로 명명되었다. hLf은 분자량이 78 kDa로 691개의 아미노산으로 구성된 단일 폴리펩타이드 사슬로 되어있다. 이 단백질은 2개의 globular lobes, 즉 N-말단 부분을 구성하고 있는 N-lobe 와 C-말단 부분을 구성하고 있는 C-lobe로 되어있다. 두 lobes는 매우 유사한 구조를 가지고 있으며, 약 40% 이상 아미노산서열의 상동성을 갖고 있다(4). 최근 X-ray crystallography에 의해 Lf의 3차 구조가 밝혀짐에 따라 Lf에는 N-lobe와 C-lobe에 각각 하나의 철과 결합할 수 있는 부위가 있어 한 분자 당 두개의 Fe³⁺이온이 가역적으로 결합할 수 있음이 확인되었다. Lf는 외부비선에서 분비되는 비면역글로불린 저항성 단백질(non-immunoglobulin protective protein) 중의 하나로써 직접 또는 간접적으로 *in vitro*와 *in vivo*의 모든 상태에서 다양한 미생물에 대해 광범위한 항균작용을 일으키며, 최근에는 항 바이러스작용이 있는 것으로 알려졌다(8, 9). 특히 iron-free상태(apo-type)에서 *E. coli*나 *Klebsiella pneumonia*, *Aerobacter aerogenes* 등의 그람 양성균에 대해 높은 항균활성을 갖는다(8, 9). 한편 Lf는 철을 빼앗아 미생물의 성장을 억제시키는 작용기 작용은 구별되는 또 다른 항균 작용기작용을 갖고 있는 것으로 알려졌다. 이 작용은 Lf가 그람음성균의 외막(outer membrane)에 작용하여 이 막의 구성성분인 당지질(lipopolysaccharide)을 다량 방출시키는 작용인데, 이로 인해 그람 음성균은 permeability

barrier가 파괴되어 lysozyme이나 rifampicin같은 소수성 항생제에 대한 민감성이 증대되어 저항성을 잃고 사멸되게 된다(9, 10). Lf의 이와 같은 작용과 더불어 사람 유래의 hLf연구는 최근에 모유의 중요성이 더욱 강조되어 활성화되고 있지만, 그럼에도 산업적 대량생산에 의한 실용화 단계까지는 아직 미치지 못하고 있다.

메탄올자화효모(Methylotrophic yeast)인 *Pichia pastoris*는 재조합 유전물질을 생산하는데 아주 효율적인 것으로 알려져 있다. *P. pastoris*는 외래 단백질을 다량 (10~100배 이상)으로 형질발현시킬 수 있는데(5, 6, 8, 9), 이러한 작용은 메탄올을 이용할 때 필요한 *AOX1* gene의 promoter 부분 바로 뒤에 외래 단백질을 coding하는 유전자를 끼워 넣음으로써 가능하다(14, 18, 19). *P. pastoris*는 산업적으로나 유전공학 분야에서 많이 사용하고 있는 *S. cerevisiae*와 매우 유사한 특성을 갖고 있기 때문에, 많은 부분에서 *S. cerevisiae*에 이용되는 분자생물학적, 유전학적, 생화학 기술의 이용이 가능하다. 그리고 *P. pastoris*를 숙주로 이용할 경우 원하는 외래 단백질을 세포내나 혹은 세포외로 분비되는 형태로 형질 발현시킬 수 있다. 또한 *P. pastoris*는 아주 소량의 자체단백질만을 배지내로 배출시키기 때문에 실제 배지내로 배출되는 대부분의 단백질은 cloning되어 발현된 외래 단백질이 된다. 그 외에도 *S. cerevisiae*의 당단백질과는 달리, *P. pastoris*는 특이적인 posttranslational modification pathway를 갖고 있어서, 배지내로 배출되는 당단백질은 고등진핵생물들의 당단백질과 유사하다. 따라서 *S. cerevisiae*의 당단백질에서 보여지는 문제점들을 상당부분 감소시킬 수 있다(7, 17). 본 실험에서는 이러한 다수의 강점을 갖고 있는 *P. pastoris*를 hLf protein의 발현숙주로 사용하였다. 먼저 2.1kb의 성숙형 hLf cDNA를 얻어

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 031-330-4280, Fax: 031-330-4566
E-mail: hyunelee@san.hufs.ac.kr

cloning을 시도하였으며, *P. pastoris*에 발현시키기위해 expression vector를 제작하였다. 이를 형질전환 시킨 후 Southern blotting, PCR, RT-PCR, Northern blotting, SDS-PAGE 및 Western blotting 등의 방법을 통하여 genomic DNA상에 hLf 유전자의 삽입(integration) 여부 및 발현을 확인하였다. 또한 발현된 재조합 hLf(rhLf)가 강력한 항균작용을 가지고 있음을 생물학적 활성 검증방법을 통해 확인하였다.

재료 및 방법

균주, plasmids 및 배양조건

본 실험에서 사용된 균주인 *P. pastoris*와 발현벡터인 pPIC3.5K는 Invitrogen에서 구입하였으며 그 외 사용된 균주와 플라스미드는 Table 1에 나타내었다. 본 실험에서 사용한 미생물균주는 특별한 언급이 없는 한 LB배지 (1% Bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)를 사용하였고, 필요시 50 µg/ml의 ampicillin을 첨가하여 사용하였으며, 37°C에서 배양하였다. *P. pastoris*는 YPD배지 [1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose(D)]에서 배양하였으며, 형질전환체의 선별을 위해서는 MD agar배지 [1.34% yeast nitrogen base (YNB), 4 × 10⁻⁵% biotin (B), 2% dextrose, 1.5% agar]와 MM agar배지 [1.34% YNB, 4 × 10⁻⁵% B, 0.5% methanol (M), 1.5% agar]를 사용하였다. 그리고 hLf 유전자의 발현은 BMGY배지 [1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate buffer (pH6.0), 1.34% YNB, 4 × 10⁻⁵% B, 1% glycerol]와 BMMY배지 (10 g yeast extract, 20 g peptone, 100 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0), 1.34% YNB, 4 × 10⁻⁵% B, 0.5% methanol/L)를 이용하여 30 °C에서 진탕배양하였다.

PCR을 이용한 2.1kb hLf의 증폭

2.1 kb hLf 유전자를 pPIC3.5K에 삽입하기위해 hLf full-gene이 들어있는 pHLf-8을 주형으로 하여 primer Lf-SF (GCGGATCCA CCATGAAACTTGCTTTCCTCG)와 Lf-ERB (GAATCCTTACTT

CCTGAGAAATTCACAG)를 사용하여 PCR로 증폭하였다 (Thermal cycler: Perkin Elmer Co). 증폭된 2.1 kb hLf 유전자는 전기영동을 수행하여 확인한 후 electroelution 방법과 Wizard™ Clean-Up system (Promega, Co. USA.)을 사용하여 회수하였으며, pGEM-T vector (Promega Co.)에 subcloning 하였다.

***P. pastoris*의 형질전환 및 선별**

hLf cDNA를 포함한 pPIC3.5K-S는 제한효소 *Sall*으로 digestion하여 직선형으로 만들어 준 후, lithium chloride 방법을 사용하여 *P. pastoris* SMD1168에 형질전환 시켜 *Pichia*의 염색체내로 Fig. 2와 같이 삽입시켰다. 삽입이 일어나게 되면 His auxotroph이던 *P. pastoris*가 pPIC3.5K-S에 포함되어 있던 *HIS4* gene의 발현으로 histidine이 첨가되지 않은 배지에서 자랄 수 있게 된다. 이들 형질전환체 중에서 MD와 MM agar 배지에서 모두 잘 자라게 되는 형질전환체 (His⁺ Mut⁺)를 선별하였다.

형질전환체의 genomic DNA의 분리

형질전환체의 genomic DNA는 lysis buffer (2.5 M LiCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 4% Triton X-100, 62.5 mM Na₂EDTA)와 glass bead를 이용하여 분리하였다. 즉, *P. pastoris* cell을 수확한 후, cell lysis buffer와 glass bead를 동량 넣은 다음 2분정도 vortex하여 cell을 lysis시켰다. 여기에 동일 volume의 phenol/chloroform을 넣어 extraction 한 다음, 상층액만 회수하여 2V의 ethanol로 DNA를 침전시킨 후 TE buffer에 녹여서 사용하였다

Yeast 형질전환체의 확인

형질전환체의 genomic DNA에 2.1 kb hLf gene이 제대로 삽입되어 있는지 확인하고자, Lf-SF와 Lf-ERB를 이용하여 PCR을 수행하였다. 이들 각 primer sequence는 위에 기술하였다. 또한 Southern blotting에 의하여 삽입을 확인하였다. 이때 probe는 hLf의 full sequence를 사용하였다.

RT-PCR

Table 1. Bacterial and Yeast strains and Plasmids

Strains/Plasmids	Genotype/Characteristics	Reference
Strains		
<i>E. coli</i>		
Top10F'	F[tet ^r mcrAΔ(mrr-shd RMS-mcrBC) φ80ΔlacX74 deoR recA1 araD139(ara,leu)-7697 galU galκλ rpsL endA1 nupG	
Yeast		
<i>P. pastoris</i> SMD1168	his4 mut ⁺ pep4	
<i>P. pastoris</i> SM5-3KS	his ⁺ mut ⁺ pep4	This study
Plasmids		
<i>E. coli</i>		
pGEM-S	Amp ^r containing hLf cDNA (secretion form)	This study
Yeast		
pPIC3.5K	Amp ^r his ⁺ expression vector	
pPIC3.5K-S	Amp ^r his ⁺ containing 2.1kb hLf cDNA (secretion form)	This study

RT-PCR을 위해 RNA를 재조합 균주로부터 분리하였다(16). hLf gene의 integration이 확인된 형질전환체를 BMMY에서 3일간 배양한 다음, 원심분리하여 균체를 회수하였다. 수확된 균체를 AE buffer (50 mM sodium acetate, pH 5.3, 1 mM EDTA)에 녹이고 10% SDS와 saturated phenol을 첨가하여 추출하였다. 상등액을 ice/ethanol bath에서 incubation한 뒤 phenol/chloroform을 넣어 다시 한번추출하고 상등액만 회수하여 2V의 ethanol로 total RNA를 침전시켰다. 얻어진 total RNA는 DEPC-treated water에 녹인 후 RT-PCR을 수행하였다. 이때 primer로는 Lf-SF와 Lf-ERB를 사용하였다.

Northern blotting

Northern blotting을 위해 수확된 RNA를 1% formaldehyde agarose gel에서 전기영동 한 후, nylon membrane에 transfer하여 probe와 hybridization하였다. Northern blotting을 위해서 사용한 probe는 hLf의 2.1kb full sequence이며 BrightStar Psoralen Nonisotopic Labeling Kit (Roche Co.)를 사용하여 표지하였다.

Western blotting

*P. pastoris*의 genomic DNA상에 hLf 유전자가 integration된 형질전환체를 BMGY에서 2일간 배양하고 원심분리하여 균체를 회수한 후, 다시 BMMY배지를 넣고 30°C에서 형질발현 시켰다. 배양시간에 따라 균체를 취하여 원심 분리한 후 cell을 수확하고, glass bead를 사용하여 용해 시켰다. 이를 원심분리한 후 상등액을 취하여 5X sample buffer (50 mM Tris · HCl, pH6.8, 100 mM dithiothreitol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol)를 넣은 후 끓는 물에서 5분간 중탕한 뒤 10% SDS-PAGE를 수행하였다. 한편 발현된 hLf를 분석하기 위하여 electrophoresis 후 SDS-PAGE상의 단백질을 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane에 electrophoretic transfer 한 후 Western blotting을 수

행하였다(15). Primary antibody는 rabbit anti-hLf (Sigma Co.)를 사용하였으며, secondary antibody는 alkaline phosphatase가 conjugate되어 있는 anti-rabbit IgG (Promega Co.)를 사용하였다.

항균활성측정

재조합 *P. pastoris* 세포를 용해하여 얻은 추출액(crude extract)을 여과(pore size 0.45 μm, ADVANTEC MFS, Inc)하여 용해되지 않은 whole cell debris들을 제거하였다. TGY(1% typtone, 1% yeast extract, 1% Glucose, 0.5% NaCl) agar plate 위에 *M. flavus* ATCC 10240와 *S. aureus* ATCC 6538P를 각각 2%(V/V) 포함한 TGY soft agar를 부어 표면을 건조시킨 후 위에 준비한 세포 추출액 10 μl를 점적 한 다음, 하룻밤 배양하여 colony 주위에 생기는 투명한(clear halo)을 확인하였다.

결과 및 고찰

hLf의 cloning 및 형질전환

hLf 유전자를 *P. pastoris*의 발현벡터에 subcloning 하기 위하여, 본 실험실에서 제작한 hLf full-length 유전자가 cloning 되어 있는 pLf-8을 주형으로 하여 primer Lf-SF와 Lf-ERB를 사용해서 PCR로 증폭하였다. primer Lf-SF와 Lf-ERB는 hLf gene에 불필요한 부분이 삽입되는 것을 최소로 하고, hLf 유전자의 분비서열과 단백질 coding region을 포함할 수 있는 primer이다. 이렇게 얻은 hLf 유전자를 *P. pastoris*에서 형질발현 시키기 위하여 pPIC3.5K에 subcloning시켰다. 이 재조합 plasmid를 pPIC 3.5K-S이라 명명하였다. pPIC3.5K-S에 대한 유전자 지도는 Fig. 1A와 같다. pPIC3.5K-S를 제한효소 *Sall*으로 절단하여 직선형으로 만든 후 *P. pastoris* SMD1168에 형질전환하였다. Plasmid DNA는 재료 및 방법에 서술한 대로 *P. pastoris*의 염색체 DNA 내로 integration시켰으며 나타난 형질 전환체중 His⁺ Mut⁺ 표현형을

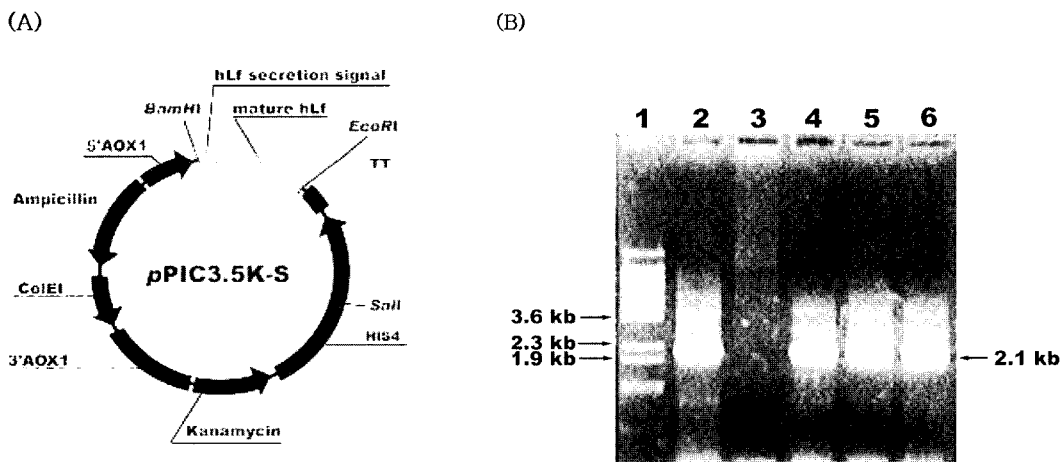


Fig. 1. Structure of pPIC3.5K-S (A) and colony PCR for the identification of integration of hLf gene (B). Discrete 2.1kb hLf genes are shown. Lane 1: size marker, Lane 2: positive control (pLf-8), Lane 3: negative control (*P. pastoris* SMD1168), Lane 4-6: isolated recombinant *P. pastoris* transformants.

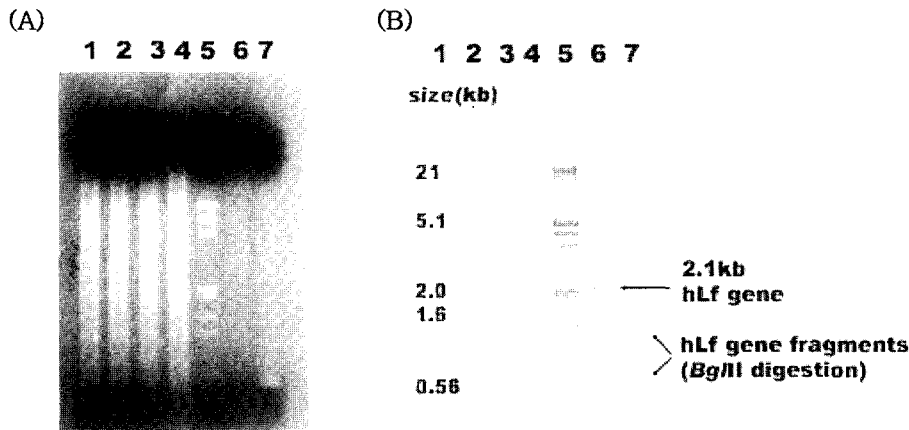


Fig. 2. Southern blot analysis of the integration of hLf gene. Agarose gel electrophoresis (A) and Southern blot analysis (B). Lane 1: negative control (*P. pastoris* SMD1168 chromosome, digested with *Bam*HI/*Eco*RI), Lane 2: negative control (*P. pastoris* SMD1168 integrated with pPIC 3.5K), Lane 3: SM5-3KS chromosomal DNA digested with *Bam*HI/*Eco*RI, Lane 4: SM5-3KS chromosomal DNA digested with *Bam*HI/*Eco*RI/*Bgl*II, Lane 5: size marker(DIG-labeled), Lane 6: plasmid pPIC3.5K-S digested with *Bam*HI/*Eco*RI, Lane 7: plasmid pPIC3.5K-S digested with *Bam*HI/*Eco*RI/*Bgl*II.

보이는 균주들을 선별하고 이들을 여러 방법을 사용하여 확인하고 동정하였다. *P. pastoris* genome에 hLf gene이 integration되어 있는지를 확인하기 위해 형질전환체의 genomic DNA를 분리한 후 primer Lf-SF와 Lf-ERB를 사용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 선별된 형질전환체로부터 2.1kb hLf cDNA의 band가 증폭되어 나타났으며, 이는 2.1kb hLf cDNA가 *P. pastoris*의 염색체 내에 integration되어 있음을 나타낸다(Fig. 1B). 이 재조합 *P. pastoris*를 SM5-3KS라 명명하였다. 한편 Southern blot을 통해서도 SM5-3KS의 genomic DNA내에 hLf 유전자가 integration되어 있음을 다시 확인하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 SM5-3K의 염색체 DNA를 *Bam*HI과 *Eco*RI으로 절단하여 hLf 유전자를 분리시키고, 다시 이를 *Bgl*II로 절단한 다음 probe로 탐색한 결과 hLf의 *Bgl*II에 해당하는 절편들을 찾을 수 있었다. 이는 hLf 유전자가 *P. pastoris*의 염색체 DNA내로 삽입되었음을 보여주는 것이다.

hLf 유전자의 transcription 확인

hLf 유전자의 integration이 확인된 형질전환체 SM5-3KS로부터 total RNA를 분리하여 Northern blotting을 수행하였다. Fig. 3A와 B에서 보는 바와 같이 hLf 특이적 mRNA가 SM5-3KS에서만 나타나는 것을 알 수 있으며 이는 integrated hLf 유전자가 transcription 되어 발현된다는 것을 나타낸다. 한편 분리된 total RNA를 주형으로 하여 RT-PCR을 수행하였다. 이때 primer는 LF-SF와 LF-ERB를 사용하였다. 그 결과 재조합 *P. pastoris*인 SM5-3KS에서 2.1kb hLf 유전자의 band가 증폭되어 나타났으며, 이를 통해 hLf 유전자가 *P. pastoris* 내에서 안정적으로 발현되는 것을 알 수 있다(Fig. 3C).

hLf 유전자의 형질발현 및 동정

PCR과 Southern blotting, Northern blotting 및 RT-PCR에 의해 hLf 유전자의 integration 및 전사가 확인된 SM5-3KS로부터 hLf를 발현시키기 위하여, BMGY에서 2일간 배양하여 후,

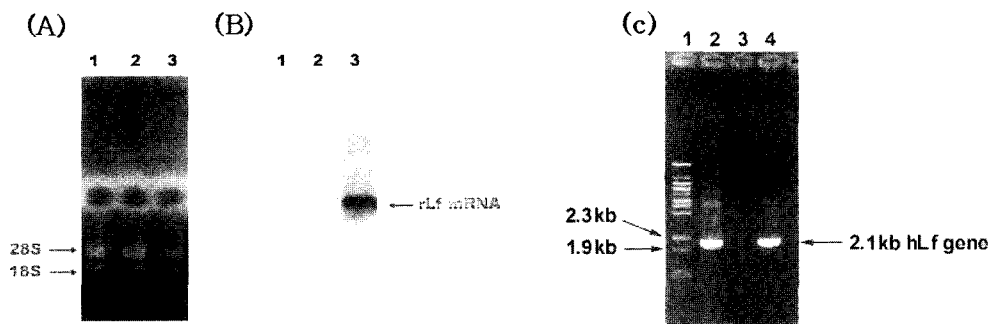


Fig. 3. Northern blot analysis and RT-PCR of hLf mRNA isolated from SM5-3KS. Denaturation agarose gel electrophoresis (A), Northern blotting (B) and RT-PCR (C). Discrete mRNA band is shown, indicating the transcription of hLf gene. For (A) and (B), Lane 1: *P. pastoris* SMD 1168, Lane 2: *P. pastoris* SMD1168 integrated with vector pPIC3.5K, Lane 3: SM5-3KS. For (C), Lane 1: size marker, Lane 2: positive control (phLf-8), Lane 3: *P. pastoris* SMD1168 integrated with vector pPIC3.5K, Lane 4: Recombinant *P. pastoris* SM5-3KS.

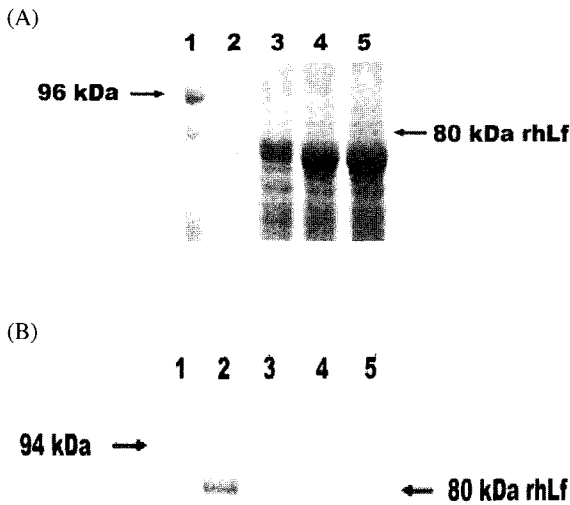


Fig. 4. Expression of recombinant hLf(rhLf) in recombinant *P. pastoris* SM5-3KS. Expressed rhLF was analysed by SDS-PAG (A) and Western blotting (B). Lane 1: protein size marker, Lane 2: hLf protein as control (purified from human colostrol milk), Lane 3: *P. pastoris* SMD1168, Lane 4: *P. pastoris* SMD1168 transformed by pPIC3.5K, Lane 5: SM5-3KS.

BMMY에 옮겨서 inducer인 methanol을 첨가하였다. 배양시간에 따라 배양액을 원심분리하여 배양액을 취하고, 또한 세포를 용해시킨 후 상등액을 취하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 음성 대조군

으로는 host인 *P. pastoris*와 pPIC3.5K가 integration 되어있는 형질전환체를 사용하였으며, 양성 대조군으로는 본 실험실에서 모 유로부터 정제한 hLf를 사용하였다. Fig. 4A에서 보는 바와 같이, 음성 대조군에서는 아무런 band도 나타나지 않은 반면, 각각의 *Pichia* 형질전환체에서는 양성 대조군인 hLf protein과 같은 위치(약 80 kDa)에서 hLf band를 확인할 수 있었다. SDS-PAGE에서 확인된 band가 hLf인지를 알아보기 위하여 Western blotting을 수행하였다. Primary antibody는 polyclonal anti-hLf antibody를 사용하였으며, anti-rabbit AP-conjugate에 의한 NBT/BCIP non-isotopic coloring (Roche Co.)으로 detection하였다. 그 결과 80 kDa의 rhLf band를 확인할 수 있었다(Fig. 4B). 그러나 Northern blotting이나 RT-PCR에서 나타난 것과 다르게 발현된 hLf는 그 양이 적은 것으로 생각된다. 이는 추후 확인해야 할 사항이기는 하지만 아마도 발현된 hLf의 세포내 안정성이 떨어지거나, 또는 intracellular 혹은 extracellular protease에 의해 분해되는 것으로 생각된다. 이와 같은 유추의 간접적인 증거로서 배양시간이 길어질수록 hLf의 degradation fragment로 보이는 band들이 SDS-PAGE 상에 많이 나타나며, 또한 Western blotting시에 이들 small fragment들이 anti-hLf antibody에 의해 검출된다는 점이다(자료미제시). 한편 pPIC3.5K는 외부단백질을 세포내에 축적시키는 발현 벡터로서 분비 signal을 가지고 있지 않기 때문에, 본 실험에서는 hLf를 세포외로 분비시키고자 hLf cDNA의 분비 signal을 포함하여 cloning 하였으나 세포 안에 존재하는 rhLf만

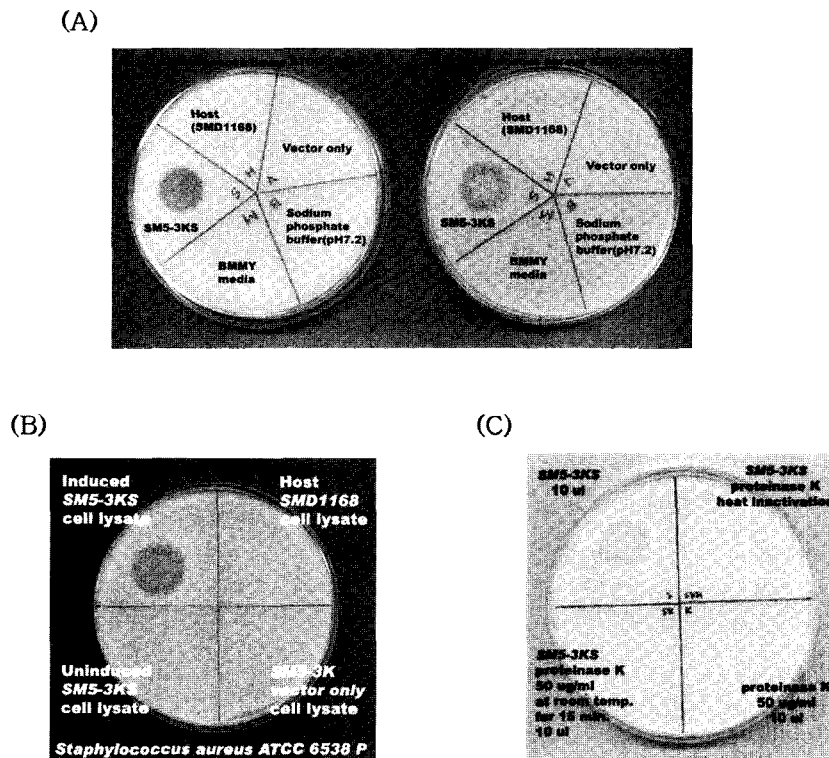


Fig. 5. Antibacterial activity of recombinant hLf. (A) Antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P and *Micrococcus flavus* ATCC 10240. (B) Antibacterial activity was shown only from the methanol-induced SM5-3KS cells. (C) Loss of antibacterial activity by inactivation of the rhLf with protease K. SM5-3KS treated with heat inactivated proteinase K and proteinase K only (as control) did not show any clear halos. For experiment (B) and (C), *S. aureus* was used as test organism.

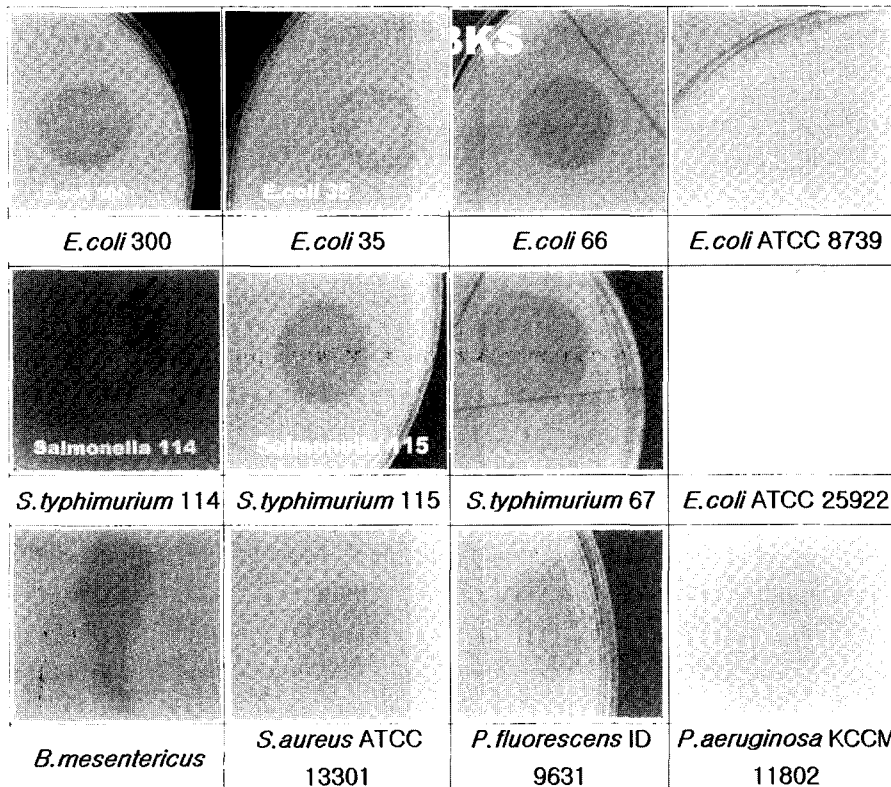


Fig. 6. Antibacterial activity of recombinant hLf against various microbial pathogens. 12 microorganisms were used for antibacterial activity test with rhLf. Antibacterial activities by rhLf were different from strain to strain.

이 확인되었으며 세포배양액으로 분비된 rhLf는 확인할 수 없었다. 그러나 발현된 hLf를 세포배양액에서 확인 할 수 없다는 사실만으로는 hLf의 분비 signal이 *P. pastoris*에서 작동하지 않는다는 것인지, 혹은 분비되는 양이 적은 것인지를 판단하기에는 적절치 않은 것으로 사료된다. 만약 분비되지 않는 경우라면 *P. pastoris*에서 유래되거나 알려진 *S. cerevisiae* 유래의 분비 signal을 사용하여야 할 것으로 사료된다. 그러나 분비되는 양이 적어서 검출되지 않았다면 이는 적절한 발현 및 배양조건 미비 때문인 것으로 사료된다. 본 연구실의 연구에 의하면 배양조건을 달리하면 발현율이나 분비가 증가할 수 있는 것으로 나타났기 때문이다. 따라서 향후 이들에 대한 보다 진전된 연구가 필요할 것으로 보인다.

항균활성 측정

발현이 확인된 rhLf의 생물학적 활성을 알아보기 위해 여러 균주에 대한 항균활성을 알아보았다. 대표적인 균주로는 패혈증을 일으키는 *S. aureus* ATCC 6538P와 식중독균인 *M. flavus* ATCC 10240을 사용하였다. 그 결과 대조균에 대해 SM5-3KS의 세포추출액 만이 두 균주에 대한 항균활성을 나타내었다. Fig. 5A에서 보는 바와 같이 균체주위에 투명한 환을 보임으로서, rhLf가 항균 작용이 있음을 알 수 있다. 반면 음성대조균인 *P. pastoris* 숙주와 벡터 pPIC3.5K만 integration된 *P. pastoris*, 그리고 세포 파쇄시 사용했던 완충 용액 등에서는 어떠한 항균활성

도 관찰되지 않았다. 또한 재조합 *P. pastoris* SM5-3KS를 배양하면서 inducer인 methanol을 첨가한 것과 첨가하지 않은 경우를 보면, inducer가 첨가되지 않았을 경우 rhLf가 항균성이 나타나지 않음을 볼 수 있는데(Fig. 5B) 이는 rhLf의 발현이 methanol에 의해 강력하게 조절되고 있음을 시사한다. 그리고 proteinase K를 SM5-3KS의 세포추출액에 처리하였을 경우 투명환을 보이지 않음으로서(Fig. 5C) SM5-3KS의 세포추출액에 있는 rhLf가 항균작용을 일으켰음을 알 수 있다. 또한 위의 두 가지 미생물 외에도 다른 다양한 병원성균을 이용하여 rhLf의 항균력을 알아보았다. 그 결과 Fig. 6에서 보는 것과 같이 항균작용을 확인할 수 있었다. Fig. 6에 나타나는 병원성균 외에도 *Listeria monocytogenes* KCTC 3444, *Chrysenomonas luteola* SBA 9634, *Xanthomonas maltophila* SBC 9611 등에 대해서도 항균활성을 나타내었다(자료미제시). 이와 같은 rhLf의 다양한 병원성균에 대한 항균력은 hLf의 항균 활성이 매우 광범위한 spectrum을 가졌기 때문으로 생각되며 이는 항생제 대체용으로 이용될 수 있는 가능성을 가진 것으로 생각된다.

따라서 이러한 항균활성을 가진 rhLf의 발현은 therapeutic glycoprotein으로서의 hLf의 산업적 이용시에 매우 유용한 고부가가치를 가질 것으로 예상된다. 물론 앞으로 정제를 통한 정확한 rhLf의 발현량 측정과 사람 및 동물의 병원성균을 포함한 더욱 다양한 미생물들에 대한 항균활성 연구 수행이 필요할 것으로 사료된다. 한편 Lf은 HIV나 HCV, HSV-1, human cyto-

megalovirus등 사람에게 치명적인 virus에 대하여 억제 작용이 있는 것으로 알려져 있다(11, 13). 따라서 본 연구에서 발현된 rhLf를 이용하여 항바이러스성을 연구하고, 더 나아가 이를 이용하여 치명적 바이러스에 대한 항바이러스제제로 개발에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Ainscough, E.W., A.M. Brodie, and J.E. Plowman. 1979. The chromium, manganese, cobalt and copper complexes of human lactoferrin. *Inorg. Chim. Acta.* 33, 149-153.
2. Aisen, P. and I. Listowsky. 1980. Iron transport and storage proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 49, 357-393.
3. Akin, D.T., M.Q. Lu, S. Kendall, J. Rundegren, and R.R. Arnold. 1994. Bactericidal activity of different forms of lactoferrin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 357, 61-70.
4. Anderson, B.F., H. Baker, M. Norris, G.E. Rice, and D.W. Baker. 1989. Structure of human lactoferrin; Crystallographic structure analysis and refinement at 2.8Å resolution. *J. Mol. Biol.* 209, 711-734.
5. Arnold, R.R., M. Brewer, and J.J. Gauthier. 1980. Bactericidal activity of human lactoferrin : sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect. Immun.* 28, 893-898.
6. Arnold, R.R., J.E. Russell, W.J. Champion, M. Brewer, and J.J. Gauthier. 1982. Bactericidal activity of human lactoferrin: Differentiation from the stasis of iron deprivation. *Infect. Immun.* 35, 792-799.
7. Cregg, J.M., J.L. Cereghino, J. Shi, and D.R. Higgings. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* 16, 23-52.
8. Doring, G., T. Pfestorf, K. Botzenhart, and M.A. Abdallah. 1988. Iron-chelating substances and inflammation. *Scand. J. Gastroenterol.* 23, 68-69.
9. Ellison III, R.T. and T.J. Giehl. 1991. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J. Clin. Invest.* 88, 1080 - 1091.
10. Ellison III, R.T., T.J. Giehl, and F.M. LaForce. 1988. Damage of the outer membrane of the enteric Gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect. Immun.* 56, 2774-2781.
11. Ikeda, M., A. Nozaki, K. Sugiyama, T. Tanaka, A. Naganuma, K. Tanaka, H. Sekihara, K. Shimotohno, M. Saito, and N. Kato. 2000. Characterization of antiviral activity of lactoferrin against hepatitis C virus infection in human cultures cells. *Vir. Res.* 66, 51-63.
12. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
13. Moriuchi, M. and H. Moriuchi. 2001. A milk protein lactoferrin enhances Human T Cell Leukemia Virus Type 1 and suppresses HIV-1 infection. *J. Immunol.* 166, 4231-4236.
14. Romanos, M.A., C.A. Scorer, and J.J. Clare. 1992. Foreign gene expression in yeast: review. *Yeast* 8, 423-488.
15. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual 1st ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
16. Schmitt, M.E., A.B. Timothy, and B.L. Trumpower. 1990. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic. Acids Res.* 18, 3091-3092.
17. Schorer, C.A., J.J. Clare, W.R. McCombie, M.A. Romanos, and K. Sreekrishna. 1994. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Biotechnology* 12, 181-184.
18. Sreekrishna, K., J.F. Tschopp, and M. Fuke. 1987. Invertase gene (SUC2) of *Saccharomyces cerevisiae* as a dominant marker for transformation *Pichia pastoris*. *Gene* 59, 115-125.
19. Tschopp, J.F., G. Dverlow, R. Kosson, W. Craig, and L. Grinna. 1987. High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 5, 1305-1308.

(Received June 23, 2004/Accepted November 22, 2004)

ABSTRACT : Expression and Antibacterial Activity of Recombinant Human Lactoferrin in Methylotrophic Yeast, *Pichia pastoris*.

Sang O Lee, Eun Mi Im, Eun Joo Nam, and Hyune Hwan Lee* (Department of Bioscience and Biotechnology, College of Natural Sciences, Hankook University of Foreign Studies, Yon-gin 449-791, Korea)

The expression and antibacterial activity of recombinant human lactoferrin (hLf) was studied from methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. The gene encoding hLf, isolated from human breast cDNA library, was subcloned into the expression vector, pPIC3.5K under the control of *AOX1* promoter. The gene was integrated into the host chromosome and was identified by Southern blotting. The expression of the integrated gene was investigated by RT-PCR, Northern blotting, SDS-PAGE and Western blotting. Discrete band corresponding to hLf was detected from the SDS-PAGE, which was confirmed by Western blotting. The expression was also confirmed by RT-PCR and Northern blotting. The antibacterial activity of the recombinant hLf (rhLf) was investigated using *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P and *Micrococcus flavus* ATCC 10240 as test organisms. The rhLf showed strong antibacterial activities against the bacteria. Furthermore, many Gram-negative animal pathogens such as *E.coli* ATCC8739, 25922, and *Salmonella typhimurium* 114 and 115, *Pseudomonas fluorescens* ID 9631, *P. aeruginosa* KCCM 11802, and Gram-positive bacteria *Bacillus mesentericus* were also inhibited in their growth by the rhLf.