

유산균을 이용한 경구용 항원 단백질 수송능 연구

조희정 · 최한곤* · 김정애* · 오유경†

포천중문 의과대학교, *영남대학교 약학대학
(2005년 1월 31일 접수 · 2005년 3월 25일 승인)

Lactic Acid Bacteria as Oral Antigen Protein Carriers

Hee-Jeong Cho, Han-Gon Choi*, Jung-Ae Kim* and Yu-Kyoung Oh†

College of Medicine, Pochon CHA University, Seungnam, Kyonggi-do 463-712, Korea

*College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

(Received January 31, 2005 · Accepted March 25, 2005)

ABSTRACT – A promising application of *Lactococcus lactis* is its use as live vehicles for production and delivery of heterologous proteins of vaccines and therapeutic substances. Because *L. lactis* has GRAS (“generally regarded as safe”) status, we tested whether *L. lactis* could function as the carrier of the L1 protein of human papillomavirus (HPV) type 16. The RNA level expression of L1 gene was detected in *L. Lactis*. The L1 protein was expressed in *L. lactis* with L1 gene. The growth of strains *L. lactis* with an empty plasmid (pAMJ328) and *L. lactis* with L1-encoding plasmid (pAMJ328-L1) was slightly decreased in comparison with the growth of strains *L. lactis* (wild type). However, all the three strains of *L. lactis* maintained the ability to ferment sugars primarily into lactic acid, indicating that L1 protein did not affect the biochemical property of *L. lactis*. These results suggest that *L. lactis*, capable of carrying L1 protein, might be further developed as a biocompatible oral protein delivery system.

Key words – *Lactococcus lactis*, oral carrier, protein delivery system

유산균은 gram-positive lactic acid bacterium의 일종으로서 인간을 포함한 대부분의 동물들의 장에 존재한다. 유산균은 발효에 중요한 역할을 하여 전통적, 산업적으로 발효 음식, 음료 그리고 동물 사료를 만드는데 사용되어져 왔다. 이런 점으로 지난 10년간 유산균에 대한 연구가 활발히 진행되어 유산균에 대한 유전적 기술, 형질전환 방법 그리고 정교한 벡터 시스템 등이 발달하게 되었다.¹⁻³⁾

최근 유산균은 백신이나 치료 단백질의 생산과 전달을 위한 살아있는 수송체로서 주목 받고 있는데 그 이유는 단백질을 약물로서 사용하는 것에 여러 가지 제약이 있기 때문이다. 단백질은 낮은 안정성을 가지고 있어 약물 제조 시에 단백질을 안정화시키기 위한 보조제의 첨가와 무균 제조 공정이 요구된다. 이렇게 단백질 약물은 제조, 보관, 관리에 어려운 점이 있다. 단백질 약물을 생체 내에 투여한 후에도 여러 가지 단백질 분해 효소에 의해 바로 분해가 되고 혈액순환에 의해 빠르게 배출된다. 또한 단백질 약물의 주요 제형인 주사제는 환자에게 투여 시 고통이 따르는 단점도 있다.

이렇게 백신이나 치료를 위한 단백질은 주사제와 같은 비경구성 경로를 통해 전달하는 것이 대부분이었으나 최근에는 다양한 경로로 단백질을 적용하려는 시도들이 진행되게 되었다. 이런 시점에서 경구로 간편하게 투여가 가능한 유산균은 비병원성이고 비침입적이며, 비전이적이므로 인체에 무해하여 GRAS(“generally regarded as safe”)로 분류되기 때문에 백신, 치료 단백질을 전달하기 위한 안전한 수송체라 할 수 있다.

인간 유두종 바이러스의 주요 캡시드 단백질인 L1 단백질은 진행 세포 내에서 스스로 모여서 바이러스 유사 입자를 형성한다. L1 단백질로 조립된 바이러스 유사입자는 바이러스가 감염되었을 때와 비슷한 면역반응을 유도해 내었다.⁴⁾ 인간 유두종 바이러스의 L1 단백질은 악성 질병을 유발하는 요인이 아니고, 다른 보조제를 첨가하지 않고 그 자체로 면역반응을 유도해내기 때문에 안전성 면에서 큰 장점을 가지고 있다. 이런 점에서 인간 유두종 바이러스의 감염과 이로 인해 유발되는 자궁 경부암의 발병을 방지하기 위해 L1 단백질을 이용한 백신 개발이 활발히 진행되고 있다.⁵⁻⁸⁾

따라서 본 연구에서는 식품 등급의 유산균이 면역 반응을 유도할 수 있는 항원 단백질인 L1 단백질을 안정적으로 생

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 031)703-8613, E-mail : ohyk@cha.ac.kr

성할 수 있다는 것을 확인하여 생체 적합한 경구용 단백질 수송체로서 제작하기 위하여 유산균 내에서 인간 유두종 바이러스 (HPV) 유형 16의 L1 단백질을 안정적으로 발현시킬 수 있는지 확인하였다.

실험 방법

시약 및 기기

실험에 사용된 완충용액 및 시약은 모두 증류수를 사용하여 제조하였으며, 증류수는 Milli-Q (Millipore Co., 미국)를 통과시켜 사용하였다. 유산균 배양에 사용된 배지인 M17은 Gibco BRL (미국)에서 구입하였다. 배지에 첨가된 항생제인 에리스로마이신은 Amresco (미국)에서 구입하였다. pGEM-T easy 벡터는 Promega (미국)에서 구입하였고 pAMJ328 벡터는 Biotechnological Institute (덴마크)에서 제공해 주었다. 플라스미드를 정제하기 위해 사용한 Plasmid Extraction kit는 Bioneer (한국)에서 구입하였다. cDNA 합성에 사용한 SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit는 Invitrogen (미국)에서 구입하였다. RT-PCR에 사용한 HiPi DNA Polymerase와 dNTP 혼합물은 Elpis (한국)에서 구입하였다. 마우스 항-HPV 16 L1 CamVir-1은 RDI (미국)에서 구입하였고, 알칼리성의 인산염이 복합된 항-마우스 IgG 항체는 Santa Cruze (미국)에서 구입하였다.

균주 및 균 배양 조건

사용된 대장균은 DH10B이고, 배양액은 Luria-Bertani 배지를 사용하였다. 선발 표지로서 사용된 항생제 에리스로마이신은 1 ml 당 250 µg이 되게 처리해 주었다. 대장균은 37°C에서 180 rpm으로 교반하면서 16~18시간 동안 배양하였다. 사용된 유산균은 MG1363이고, 배양액은 삽입된 플라스미드의 발현 시스템이 작동되지 않는 0.5% 아르기닌과 0.1% 글루코오스가 첨가된 1.5배의 M17 액체배지이며, 유산균을 충분히 키우는데 사용하였다. 이 후 1% 글루코오스가 첨가된 1.5배의 M17 액체배지에 흡광도 600 nm에서 0.1의 값이 되게 재접종하여 배양하였다. 이 배지에서는 삽입된 플라스미드의 발현 시스템이 작동하게 된다. 본 연구에서 수행한 모든 실험에서 유산균 샘플은 재접종한 시점을 기준으로 하여 채취하였다. 선발 표지로 사용된 항생제인 에리스로마이신은 1 ml 당 1 µg이 되게 처리해 주었다. 유산균은 30°C에 교반하지 않은 상태에서 키웠다.

플라스미드 유전자

pAMJ328-L1 플라스미드는 pAMJ328 벡터에 있는 *BgIII*

와 *SalI* 자리에 L1 유전자를 삽입하였다. L1 유전자의 준비는 다음과 같이 하였다. HPV 16 L1 유전자의 개시 코돈 앞은 *BgIII* 제한 효소로 잘릴 수 있는 염기 서열을 넣고 종결 코돈 뒤는 *PstI* 제한 효소로 잘릴 수 있는 염기 서열을 넣어 중합효소 연쇄 반응으로 증폭시켰다. 증폭된 L1 유전자는 pGEM-T easy 벡터에 삽입 한 후 *BgIII*, *SalI* 제한 효소로 잘라서 준비하였다. pAMJ328 플라스미드도 *BgIII*, *SalI* 제한 효소로 자른 후 준비된 L1 유전자를 삽입하였다. pAMJ328 플라스미드에 L1 유전자가 삽입되었는지를 확인하기 위해 대장균에 전기적 충격 방법을 사용하여 pAMJ328-L1 플라스미드를 넣어 주었다. 대장균에서 알칼리성 분해법을 통해 플라스미드를 분리한 후 제한 효소인 *BgIII*와 *SalI*으로 잘라서 L1 유전자가 삽입된 것 확인하였다. 이렇게 확인된 pAMJ328-L1 플라스미드를 Plasmid Extraction kit를 사용하여 정제하고 전기적 충격 방법을 사용하여 유산균에 넣어주었다. 재조합된 유산균은 STE-A [0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)] 완충용액으로 한차례 씻어준 후 대장균에서와 같은 방법을 사용하여 pAMJ328-L1 플라스미드가 들어간 유산균인지 확인하였다.

유산균의 단백질 수송성 확인

유산균의 단백질 수송성은 RNA와 단백질 단계에서 모두 확인 하였다. RNA 단계에서 L1 유전자의 발현을 평가하기 위해 유산균은 배양을 하는 동안 한 시간 단위로 1 ml씩 채취한 후 원심 분리하여 배지와 유산균을 분리하였다. 분리된 배지는 pH meter를 사용하여 배지의 pH 값을 측정하였고, 유산균은 TE [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)] 완충용액으로 씻어 주고 500 µl의 TE 완충용액에 다시 분산시킨 후 바로 액체질소에 얼렸다. 얼려진 유산균은 RNA를 뽑을 때까지 -80°C에 보관하였다. RNA를 뽑기 위해서 500 µl의 TE 완충용액에 분산된 유산균에 0.6 g의 유리 비드, 50 µl의 sodium dodecyl sulfate (SDS, 10%), 500 µl의 phenol (pH 4.7) 및 170 µl의 macaloid (2% in TE, RNase inhibitor)를 첨가해 주었다. 균을 깨기 위해 1분간 vortex를 한 후 2분간 얼음에 방치하였다. 이 과정을 세차례 반복한 후 4°C, 1300 rpm에서 30분간 원심 분리하였다. 상층액을 새 튜브에 옮기고 phenol-chloroform으로 정제하고 에탄올로 RNA를 침전시킨 후 TE 완충용액에 녹였다.⁹⁾ 유산균에서 분리해 낸 RNA는 revers transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석을 위해 SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit를 사용하여 cDNA를 합성하였다. RT-PCR은 sense 및 antisense primer (10 pmol)를 각각 0.5 µl씩, HiPi DNA Polymerase (5 U/µl)를

0.2 μ l, 2.5 mM dNTP mix를 0.5 μ l, 10X reaction buffer를 2.5 μ l 사용하여 총 용량 25 μ l로 수행하였다. L1 유전자의 sense primer는 5'-GGA GAG TCT ATG TCT CTT TGG CTG CCT AGT-3', antisense primer는 5'-GCT GCA GIT ACA GCT TAC GIT TTT TGC G-3'이었으며, PCR 조건은 95°C 1분: 65°C 1분: 72°C 1분으로 20회 반복하여 증폭하였다. 증폭산물의 크기는 약 1.6 kb였다. 대조군으로는 유산균의 16S rRNA을 사용하였는데 sense primer는 5'-ATA CCG CAT AAA AAC TTT AAA CAC AAG T-3', antisense primer는 5'-GTT CTT CTC TAC CAA CAG AGT TTT ACG AT-3'이었으며, PCR 조건은 95°C 1분: 60°C 1분: 72°C 1분으로 20회 반복하여 증폭하였다. 증폭산물의 크기는 약 0.3 kb였다.

단백질 단계에서 L1 유전자의 발현을 평가하기 위해 pAMJ328-L1 플라스미드가 삽입된 유산균을 1시간마다 1 ml 씩 채취하였다. 채취한 유산균은 원심 분리한 후 배지를 완전히 제거하고 1 ml의 TES [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), 25% Sucrose] 완충용액에 다시 분산시켰다. 100 μ l의 100% trichloroacetic acid를 첨가하여 잘 섞어 준 후 4°C, 1300 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거한 후 유산균은 차가운 아세톤에 한차례 씻어 주었다. 4°C, 1300 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 아세톤을 제거하고 유산균은 상온에서 5~10분 정도 건조시켰다. 상온에서 건조된 유산균은 70 μ l의 TES-Lys [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), 25% sucrose, lysozyme (5 mg/ml), 1 mM phenylmethylsulfonyl, 10 mM dithiothreitol] 완충용액에 다시 분산시킨 후 37°C에서 30분간 방치하였다. 이후, 30 μ l의 SDS (20%) 용액을 첨가하여 잘 섞어 주면 유산균이 파괴되고 유산균 내에 있던 단백질들이 완충용액에 섞이게 된다.³⁾ 유산균에서 분리해낸 단백질은 크기 별로 분리하기 위해 8% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 하였다. 크기 별로 분리된 단백질을 이동 완충용액 [12 mM Tris-base, 96 mM glycine, 20% methanol]에서 전기적 이동 (1시간, 75 mA)을 이용하여 nitrocellulose 막으로 옮긴 다음 단일클론 항체 (1:1000, 마우스 항-HPV 16 L1 CamVir-1)에 넣어 상온에서 1시간 동안 진탕하였다. 다음 단계로 0.05% Tween 20이 첨가된 인산완충용액으로 3~4차례 씻어 주었다. 씻어준 막을 알칼리성의 인산염이 복합된 항-마우스 IgG 항체 (1:2000)와 함께 상온에서 1시간 동안 진탕하였다. 다음 단계로 0.05% Tween 20이 첨가된 인산완충용액으로 3~4차례 씻어 주었다. 유산균의 전체 단백질이 옮겨진 막에서 항체와 복합체를 이룬 단백질을 확인하기 위해 nitroblue tetrazolium와 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate를 처리

하여 발색시켰다. 밴드가 보이면 발색액을 버리고 증류수로 씻어 주었다.

유산균의 성장능 평가

플라스미드가 삽입되지 않은 유산균, pAMJ328 플라스미드가 삽입된 유산균 그리고 pAMJ328-L1 플라스미드가 삽입된 유산균을 0.5% 아르기닌과 0.1% 글루코오스가 첨가된 1.5배의 M17 액체배지에 접종하여 30°C에서 16~18시간 동안 배양하였다. 배양된 유산균은 1% 글루코오스가 첨가된 1.5배의 M17 액체배지에 흡광도 600 nm에서 0.1의 값이 되도록 재접종하여 배양하였다. 재접종한 시간을 기준으로 12 시간 동안, 1시간 간격으로 흡광도 600 nm에서 그 값을 측정하였다.

유산균의 유산 생성능 평가

플라스미드가 삽입되지 않은 유산균, pAMJ328 플라스미드가 삽입된 유산균 그리고 pAMJ328-L1 플라스미드가 삽입된 유산균을 0.5% 아르기닌과 0.1% 글루코오스가 첨가된 1.5배의 M17 액체배지에 접종하여 30°C에서 16~18시간 동안 배양하였다. 배양된 유산균을 백 분의 일로 희석하여 준비하였다. 플라스미드가 삽입되지 않은 유산균과 플라스미드가 삽입되어 발현 시스템이 작동하고 있는 유산균은 유산 생성능을 비교하기 위해 1% 글루코오스, 10% CaCO₃, 1.5% bacto-arga를 첨가된 1.5배의 M17 고체배지에 준비한 유산균을 각각 1 μ l씩 접종하였다. 유산균이 접종된 고체 배지는 30°C에서 24시간 동안 배양한 후 4°C에서 보관하면서 CaCO₃의 분해 정도를 관찰하였다. 육안으로 확인을 용이하게 하기 위해 자란 유산균은 깨끗하게 제거하고 고체배지를 검은 종이 위에 올려서 CaCO₃가 분해된 것을 확인하였다.

결과 및 고찰

유산균의 플라스미드 삽입 확인

pAMJ328 플라스미드는 셔틀 벡터로서 대장균과 유산균 양 쪽 모두에서 복제된다. pAMJ328 플라스미드는 유산균 내에서 많은 수로 존재하고 삽입된 유전자가 발현하여 생성된 단백질은 세포질에 존재하게 된다. L1 유전자가 삽입된 pAMJ328 플라스미드의 크기는 약 8.5 kb이고 L1 유전자가 플라스미드에 삽입 되었는지 여부를 확인하기 위해서 대장균을 사용하였다. 대장균에서 확인된 pAMJ328-L1 플라스미드는 깨끗하게 정제한 후 유산균에 삽입시켰다. 유산균에서 pAMJ328-L1 플라스미드를 다시 분리해 내어 L1 유전자의 삽입 자리인 *Bgl*III와 *Sal*I 제한 효소로 다시 처리한 결과,

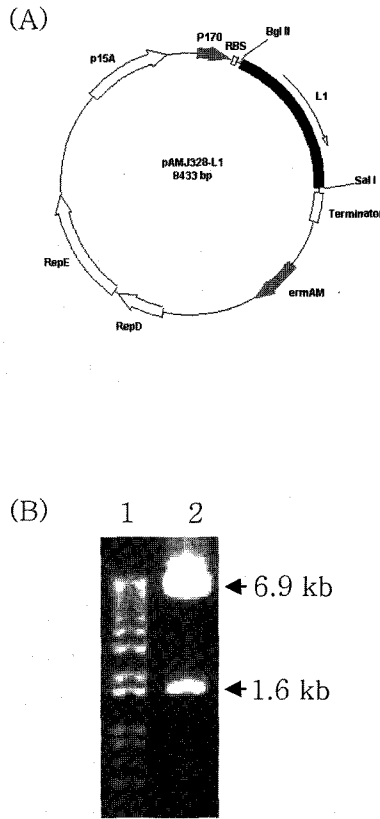


Figure 1—(A) Physical map of plasmid pAMJ328-L1. (B) A restriction digestion pattern of plasmid pAMJ328-L1 from *L. lactis* MG1363 strain. Lane 1, 1 kb plus ladder; Lane 2, pAMJ328-L1 digested with *Bgl*II and *Sal*I.

약 6.9 kb의 pAMJ328 vector와 약 1.6 kb의 L1 유전자가 확인되었다(Figure 1). 즉, L1 유전자가 존재하는 pAMJ328-L1 플라스미드가 유산균에 제대로 들어간 것을 확인하였다.

유산균의 L1 단백질 수송성

유산균에서의 L1 단백질 발현을 일차적으로 RNA 단계에서 확인하기 위하여 pAMJ328-L1 플라스미드가 삽입된 유산균을 배양하면서 각 성장 단계 별로 RT-PCR을 수행하였다. Figure 2에서 성장이 서서히 정지되는 단계로 갈수록 배지의 pH가 5.5~6.0으로 낮아지는 것을 확인하였다. 유산균이 자라면서 배양액에 첨가해 준 1%의 글루코오스로 유산을 생성하게 되어 pH를 낮추는 것이다. 이렇게 낮아진 배양액의 pH는 L1 유전자를 발현시키기 위한 pAMJ328 플라스미드의 P170 발현 시스템을 작동시키는 요인으로 작용한다.¹⁰⁾ Figure 3의 RT-PCR 결과를 보면 pH가 약 6.0이고 성장이 서서히 멈추는 단계에서 L1 유전자의 전사량이 가장 많은 것으로 확인되었다. 이 두가지 결과를 보면 유산균으로 삽입된 pAMJ328 플라스미드의 P170 발현 시스템이 정상 작동

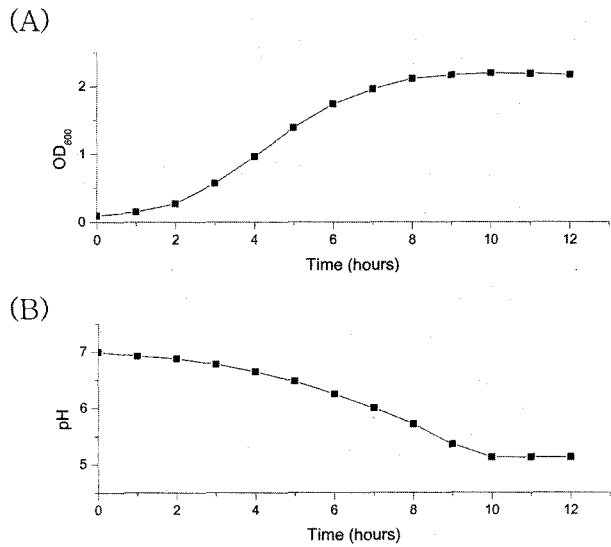


Figure 2—Growth and pH curves of *L. lactis* (pAMJ328-L1). (A) Growth was measured by absorbance at 600 nm. (B) pH was measured during the growth for 1 to 12 hours.

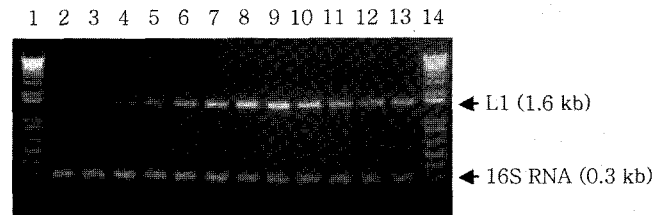


Figure 3—L1 transcription pattern in *L. lactis*. Culture samples were taken during the growth phase for 1 to 12 hours (lane 2~13). The positions and sizes of the L1 and the 16S rRNA were indicated by horizontal arrows. Lane 1 and 14 is 1 kb plus ladder.

하여 L1 유전자가 유산균 내에서 RNA로 발현되는 것을 알 수 있었다.

유산균 내에서 발현된 L1 유전자의 RNA에서 L1 단백질이 생성되는지 확인하기 위하여 pAMJ328-L1 플라스미드가 삽입된 유산균을 성장 단계별로 단백질을 뽑아서 immunoblot 분석을 수행하였다. Figure 4에서 항-HPV 16 L1 CamVir-1 단일클론 항체를 사용하여 57 kDa 크기의 L1 단백질이 생성된 것을 확인하였다. 유산균 내에서 pAMJ328 플라스미드의 P170 발현 시스템이 작동하는 조건이 아닐 경우 (pH > 6.0, OD₆₀₀ < 2.0), L1 단백질은 생성되지 않거나 적은 양이라서 immunoblot 분석을 통해 확인하기 힘들었다. 반면 유산균 내에서 pAMJ328 플라스미드의 P170 발현 시스템이 작동하는 조건일 경우 (pH < 6.0, OD₆₀₀ > 2.0), L1 단백질은 많은 양으로 발현하고 있는 것을 확인할 수 있었다. L1 단백질의 발현도 RNA 단계와 같이 낮아진 pH와 늦은 성장 단계의 조건에서 많은 양으로 생성된 것을 확인

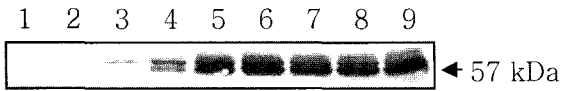


Figure 4—L1 protein expression in *L. lactis*. Culture samples were taken during the growth at 1 hour intervals for 4 to 12 hours (lane 1~9). The position and size of the L1 protein are indicated by a horizontal arrow.

할 수 있었다(Figure 3, Figure 4). 다른 특수 처리 없이 L1 단백질을 유산균 내에서 발현시킬 수 있는 것을 확인함에 따라 유산균이 이 단백질의 수송체로서 적합함을 알 수 있다. L1 단백질 위에 발색된 단백질은 플라스미드가 삽입되지 않은 유산균, pAMJ328 플라스미드가 삽입된 유산균에서도 공통적으로 확인이 되어 비특이적으로 항체와 결합한 단백질을 알 수 있었다.

유산균의 성장능

유산균 내에서 L1 단백질을 생성하는 것이 유산균 자체의 성장 능력에 미치는 영향을 알아보기 위해 플라스미드가 삽입되지 않은 유산균, pAMJ328 플라스미드가 삽입된 유산균 그리고 pAMJ328-L1 플라스미드가 삽입된 유산균의 성장 상에 차이가 있는지 알아보았다. 그 결과 pAMJ328, pAMJ328-L1 플라스미드가 삽입된 유산균이 플라스미드가 삽입되지 않은 유산균보다 성장이 정지되는 단계까지 걸리는 배양 시간이 약 2시간 정도 느린 것으로 나타났다(Figure 5). 외부의 플라스미드가 삽입된 것이 유산균의 성장에 불리하다는 것을 시사하고 있지만 pAMJ328, pAMJ328-L1 플라스미드가 삽입된 유산균의 성장 곡선이 거의 일치하는 것을 보아 L1 단백질의 생성이 유산균에 미치는 영향이 거의

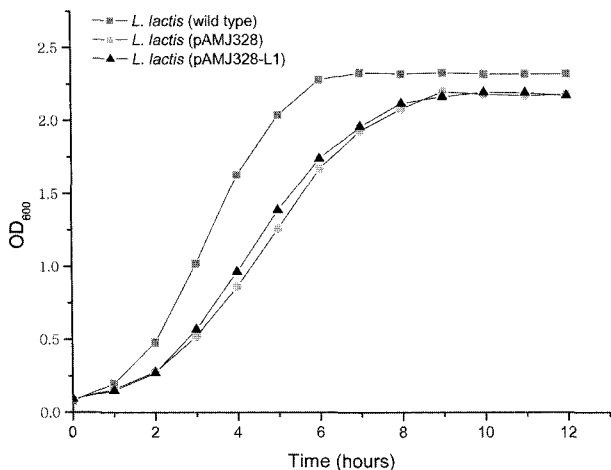


Figure 5—Growth curves of different strains. Growth was measured by absorbance at 600 nm.

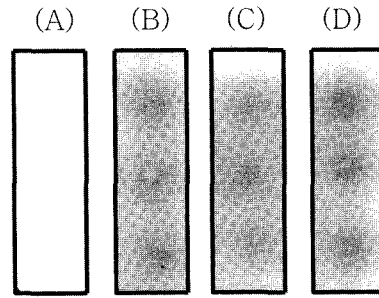


Figure 6—Lactic acid-producing capability test. The three strains of *L. lactis* were incubated on agar plates with 10% CaCO₃. (A) Liquid media, (B) *L. lactis* (wild type), (C) *L. lactis* (pAMJ328), (D) *L. lactis* (pAMJ328-L1).

없음을 간접적으로 알 수 있었다.

단백질 수송성 유산균의 유산 분비능

유산균의 가장 큰 특징인 유산 생성 능력의 이상 유무를 확인해보기 위해서 10% CaCO₃가 첨가된 고체배지에서 위의 세 종류 유산균을 배양하였다. 유산균이 생성한 유산에 의해 CaCO₃가 분해되어 깨끗한 영역이 생기게 되어 육안으로 유산 생성의 유무를 확인할 수 있다. 플라스미드가 삽입되지 않은 유산균, pAMJ328 플라스미드가 삽입된 유산균 그리고 pAMJ328-L1 플라스미드가 삽입된 유산균이 자란 고체배지에서 모두 CaCO₃가 분해되어 깨끗한 영역이 생성된 것을 확인하였다(Figure 6). 따라서 외부 플라스미드가 삽입되고 L1 단백질이 생성되어도 유산균이 유산을 분비하는 능력에는 문제가 없음을 확인하였다.

외부 플라스미드가 삽입된 유산균은 그렇지 않은 유산균에 비교해 성장이 조금 저해되는 것으로 확인되었지만 이것은 L1 단백질의 생성에 의한 것이 아니라 외부 플라스미드의 삽입에 의한 차이로 할 수 있다. 또한 유산균의 대표적인 특징인 유산 생성 능력에는 모두 이상이 없음을 확인할 수 있었다. 이 결과로 유산균 내에서 L1 단백질을 생성하여도 유산균의 안정성에는 문제가 없음을 간접적으로 알 수 있었고 단백질 수송체로서 사용이 가능함을 확인하였다.

결 론

유산균 내에서 인간 유두종 바이러스 유형 16의 주요 캡시드 단백질인 L1 유전자의 발현을 확인해 본 결과, 다른 특수 처리 없이 RNA와 단백질 단계에서 L1 유전자가 발현되는 것을 확인하였다. 또한 L1 단백질을 생성하고 있는 유산균은 고유의 특성인 유산 분비능에 이상이 없는 것으로 확인되었다. 이 결과로 L1 단백질을 생산하고 수송하는 것이

유산균의 안정성에 큰 영향을 주지 않는 것을 간접적으로 알 수 있었다. 따라서 본 연구는 생체 적합한 경구용 단백질 수송체인 유산균 내에서 인간 유두종 바이러스 유형 16의 L1 단백질을 생성하였고 앞으로 경구 투여 시 점막에 면역 반응을 유도할 수 있는 항원 수송 시스템의 기반 기술로 활용 될 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부 나노 바이오 기술개발사업 (과제번호 M10414010003-04N1401-00310) 및 산업자원부 지역혁신 인력양성사업 (KITF 000-B-106-108)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Willem M de Vos, Gene expression systems for lactic acid bacteria, *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**, 289-295 (1999).
- 2) S. Nouaille, L. A. Ribeiro, A. Miyoshi, D. Pontes, Y. Le Loir, S. C. Oliveira, P. Langella and V. Azevedo, Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*, *Genet. Mol. Res.*, **2**, 102-111 (2003).
- 3) Y. Le Loir, A. Gruss, S. D. Ehrlich and P. Langella, A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*, *J. Bacteriol.*, **180**, 1895-1903 (1998).
- 4) R. Kimbauer, F. Booy, N. Cheng, D. R. Lowy and J. T.

- Schiller, Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 12180-12184 (1992).
- 5) J. A. Suzich, S. J. Ghim, F. J. Palmer-Hill, W. I. White, J. K. Tamura, J. A. Bell, J. A. Newsome, A. B. Jenson and R. Schlegel, Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11553-11557 (1995).
- 6) D. Nardelli-Haeffliger, R. B. Roden, J. Benyacoub, R. Sahli, J. P. Kraehenbuhl, J. T. Schiller, P. Lachat, A. Potts and P. De Grandi, Human papillomavirus type 16 virus-like particles expressed in attenuated *Salmonella typhimurium* elicit mucosal and systemic neutralizing antibodies in mice, *Infect. Immun.*, **8**, 3328-3336 (1997).
- 7) S. Biemelt, U. Sonnewald, P. Galmbacher, L. Willmitzer and M. Muller, Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants, *J. Virol.*, **77**, 9211-9220 (2003).
- 8) Y. K. Oh, T. Sohn, J. S. Park, M. J. Kang, H. G. Choi, J. A. Kim, W. K. Kim, J. J. Ko and C. K. Kim, Enhanced mucosal and systemic immunogenicity of human papillomavirus-like particles encapsidating interleukin-2 gene adjuvant, *Virology*, **328**, 266-273 (2004).
- 9) S. Even, N. D. Lindley and M. Coccagn-Bousquet, Molecular physiology of sugar catabolism in *Lactococcus lactis* IL1403, *J. Bacteriol.*, **183**, 3817-3824 (2001).
- 10) S. M. Madsen, J. Arnau, A. Vrang, M. Givskov and H. Israelsen, Molecular characterization of the pH-inducible and growth phase-dependent promoter P170 of *Lactococcus lactis*, *Mol. Microbiol.*, **32**, 75-87 (1999).