

Yeast 내에서 탄저병 원인균인 *Bacillus anthracis*의 치사독소인 Lethal Factor 단백질 발현

황해현 · 김정목 · 최경재 · 정희일 · 한성환 · 구본성¹ · 윤문영*

한양대학교 화학과, ¹농업생명공학연구원 미생물기능팀

*Bacillus anthracis*는 탄저병의 병원체이다. 탄저병의 독소는 *Bacillus anthracis* 가 가진 세 가지 독소로 이루어져 있다. protective antigen (PA), lethal factor (LF) 그리고 edema factor (EF)로 구성되어 있다. PA는 세포 수용체와 결합하여 활성화 과정을 거친 후 LF 혹은 EF를 세포질 안으로 이동시켜 주는 역할을 한다. LF는 금속이온 (Zn^{2+}) 의존적 단백질 가수분해 효소로써 탄저병에 감염된 동물들의 치사독소로 작용하게 된다. 따라서 LF에 대한 특성 분석 및 억제제 개발에 관한 연구는 탄저치료제 개발에 매우 중요한 과정이라 할 수 있다. 본 연구에서는 탄저독소의 치료제 개발을 위해 선행되어야 하는 LF 고처리량 활성검증방법 및 저해제 선별에 더 높은 효율을 가지기 위해 이러한 시스템 방법 등을 이용하여 세포내 검정방법의 기초 자료를 마련하고자 하였다. 이를 위하여 yeast를 숙주로 한 LF 발현 vector의 구축과, 구축한 발현 시스템을 yeast에 형질전환 하여 plasmid의 안정성 및 LF 유전자의 발현을 확인하였다. 본 연구는 LF 유전자의 발현을 진핵세포 내에서 처음으로 시도했으며, 세포내 검증 시스템 도입의 기초적 자료를 제공하였다. Yeast내에서의 LF의 발현은 탄저병의 저해제 선별이나 활성측정검증을 생체 내에서 용이하게 할 수 있다는 가능성을 나타냈다.

Key words □ *Bacillus anthracis*, lethal factor, proteolytic activity, yeast expression system

탄저병은 사람 및 가축에게 발병하는 급성질환으로써 *Bacillus anthracis* 에 의해 감염되는 병이다. *Bacillus anthracis*는 그람 양성균으로 막대형태로 포자를 형성할 수 있는 박테리아이다(13, 16, 18). 대부분은 감염된 동물의 사체를 먹거나 부산물에 노출되었거나, 혹은 탄저균의 포자를 흡입했을 때 발병하게 된다. 탄저균의 포자는 환경적으로 매우 강한 저항력을 가지고 있어 2001년 미국에서 발생한 테러에 생물학적 무기로서 사용되었다(8). 탄저포자에 감염되면 우선 대식세포에게 잠식되어 탄저균 포자의 피막이 용해되면서 발아하게 되는데 이와 동시에 림프교점에 도달하게 되고, 그럼으로써 탄저균의 독소가 전신으로 퍼지게 된다(4).

탄저균은 두 종류의 큰 plasmid를 가지는데 pXO1과 pXO2이다. pXO2는 phagocytosis에 저항할 수 있는 “poly-D-glutamic acid capsule”를 합성할 수 있는 유전자를 보유하고 있으며(7, 14), pXO1은 외독소인 protective antigen (PA; 83kDa), lethal factor (LF; 87kDa), edema factor (EF; 90kDa)를 생산한다(3, 9, 15, 19). 이들 개개의 독소는 독립적으로는 병원성을 나타낼 수 없다. 그러나 PA와 LF가 결합하면 “lethal toxin (LTx)”으로 작용하고 PA와 EF가 결합하면 “edema toxin (ETx)”으로 작용한다. PA가 세포표면의 수용체 즉, “anthrax toxin receptor (ATR)”와 결합하면 furin 계열의 protease 에 의해 N-terminal의 20kDa

(PA20)이 잘리게 되고 PA의 63kDa (PA63)은 heptamer를 이루게 되어 LF 혹은 EF가 경쟁적으로 붙게 된다(1, 10, 11, 17). 이렇게 조합된 중합체들은 세포내로 들어가게 되고 그 즉시 endosome 형태가 된다. 독소 중합체들은 endosome 안에서 PA heptamer 안의 낮은 pH 변화에 따라 LF 또는 EF가 endosome의 막을 통해 세포질 안으로 이동하게 된다. 세포질 안으로 들어간 EF는 calcium-calmodulin 의존적 adenylate cyclase로써 세포질 내에서의 cAMP 농도를 증가시켜 부종을 일으키게 된다(5, 12). LF는 금속 (Zn^{2+}) 의존적 단백질 가수분해 효소로써 현재까지 세포내 성장, 분화, 사멸 등의 다양한 신호전달을 조절하는 MAP kinase kinase (MAPKK)를 절단하는 것으로 보고 되어 졌다. 이 집단 단백질들의 N-terminal 부위를 절단하여 하위 단백질 MAP kinase (MAPK)의 활성화를 억제함으로써 대상세포의 죽음을 유도하는 것으로 추정된다. 이들의 아미노 말단 부위의 절단은 하위 조절 인자의 활성화를 억제함으로써 신호 전달체의 교란이 세포사멸과 관련되는 것으로 알려져 있다(6, 21). PA, LF, EF의 세 가지 독소 및 이들의 조합, 협막, 기타 탄저균 세포구성 성분을 대상으로 면역원성 및 방어력 유발 항원물질 분석연구를 통해 백신제조에 효과적인 항원을 탐색하기 위한 연구가 여러 연구자에 의해 보고 되었다. 이들을 중합해보면 협막 및 세포구성물질의 방어력은 확인되지 못한 반면에 세 가지 독소는 각각 면역원성 및 방어력이 확인되고 있으며 그중 PA가 탄저감염에 관련된 가장 강력한 방어효과를 유발할 수 있는 항원성분인 것으로 확인 되었다(8, 2, 20). 즉 탄저의 예방을 위한 성분백신 개발 시

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-2220-0959, Fax: 02-2299-0762
E-mail: myyoon@hanyang.ac.kr

에는 PA 성분이 필수적으로 포함되어야 하는 것으로 알려져 있으며, 여기에 LF나 EF를 미량 첨가할 경우 면역효과가 증강될 가능성도 있으나(8), 이들 독소의 결합에 따라 부작용 유발이 예상됨에 따라 이들 결합을 저해하기 위한 PA 돌연변이 방어항원의 제조기법, LF 혹은 EF가 붙는 부위에 짧은 아미노산 염기 서열을 이용하여 LF 혹은 EF가 붙는 것을 경쟁적으로 저해하거나 PA가 붙는 ATR 수용체 부분만을 이용하여 PA가 세포막에 붙는 것을 방해하는 예방 방법등이 연구되고 있다(21), 그러나 PA와 관련된 백신 개발이나 치료제 개발에 관련된 연구는 결론적으로 LF의 세포내 주입만을 방해하는 예방 방법일 뿐이다. 탄저균에 감염되면 잠복기가 길고, 균이 활동하면서부터 LF가 세포내에서 활성을 갖기 까지 매우 짧은 시간이 소요된다. 그렇다면 초기에 발병사실을 발견하지 못했다면 이러한 예방방법의 효과가 매우 작아진다. 결론적으로 사망에 이르게 하는 치명적인 LF의 저해제 개발에 모든 초점이 맞추어져야 할 것이다. 그러나 탄저병의 치명적인 결과에도 불구하고 국내 및 국외에서조차도 뚜렷한 성과를 나타내는 치료제 개발이나 진단방법이 아직 개발되지 못하고 있는 실정이다. 그만큼 독소 활성 검증개발이나, 저해제 검증방법등이 효과적으로 개발되지 않아 임상에서의 실효 검증이 아직까지 어려운 실정이다.

본 실험은 LF의 세포내 활성점정 시스템 개발을 위하여 먼저 진핵세포내에서 LF의 발현 시스템을 구축하고자 하였다. 이를 위하여 yeast를 숙주로한 발현 vector를 이용하여 LF를 삽입한 발현 vector를 구축하였으며 형질전환 된 yeast내에서 LF의 발현 및 유전자 안정성을 확인하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

발현숙주로 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)는 AH109 (MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2, GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-His3, MEL1 GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3 MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ)를 사용하였고, 효모의 완전배지로는 YPDA (Difco peptone, Yeast extract, dextrose 0.2% adenine hemisulfate. Clontech Co., USA)배지, 선택배지로는 SD (Yeast nitrogen base without amino acids)를 이용하였다. 효모는 30°C에서 200 rpm. 으로 OD₆₀₀= 0.7~0.8까지 배양했으며, plasmid DNA의 증폭에는 대장균 균주인 DH5 α 를 이용하였다. DH5 α 의 완전배지 Luria-Bertani (Bacto-tryptone, Bacto-yeast extract, NaCl)배지를 이용하였고, 진탕 배양기에서 37°C에서 180rpm으로 OD₆₀₀= 0.7 ~ 0.8까지 배양하였다.

효모 발현 vector의 구축 (pGBKT7 Δ BD)

효모 내에서 단백질 발현을 위하여 Yeast Two-hybrid에 사용되는 MATCHMAKER vector (CLONTECH Co., USA)인 pGBKT7 (7.3 kb)의 vector를 선택하였고 vector내 존재하는 genetic element [GAL4 DNA-binding domain (762-1202, 440

bp)]를 제거하였다. 이를 위하여 PCR을 이용한 Quik-change mutagenic PCR kit (Stratagene Co., USA)의 방법을 사용하였으며, 기존의 BD 지역에 Bgl II 제한효소 인식 자리를 임의로 넣어 주어 제거되었는지 1차적으로 확인하였다. 이를 위하여 primer (UP-BD): 5'- AA AGA TCT CTT TCA GGA GGC TTG-3', (DN-BD) 5'- AA AGA TCT CCG GAA TTT GTA ATG CGA-3'를 합성하였다. 5% DMSO가 함유된 반응용액에서 pre-denaturation 95°C 2분, denaturation 95°C 45초, annealing 55°C 1분, extension 68°C 3분을 한 회전으로 하여 25회전 PCR 반응 후 Dpn I 효소처리를 통하여 template DNA (pGBKT7)를 제거한 뒤 DH5 α E. coli에 형질전환 하였다. LB배지 800 μ l를 첨가하여 37°C에서 200rpm 45분 진탕하고 50 μ g의 kanamycin이 첨가된 배지에 도말하여 형질전환 시켰다. 형질전환 시킨 DH5 α 를 증식시켜 plasmid를 추출하여, Bgl II 제한효소 처리 후 잘리는지 확인한 뒤 유전자 염기서열을 통해 확인하였다.

Lethal factor 클로닝 및 형질전환 (pGBKT7 Δ BD/LF)

LF의 유전자만을 얻기 위하여 LF의 precursor 부분을 제외한 LF의 염기서열을 *Bacillus anthracis* Sterne 균주의 genomic DNA를 주형으로 하여 primer (UP-LF): 5'-AA GAG CTC GGG ATC CGT GCG GGC GGT CAT GGT -3', (DN-LF): 5'- AAG GTC GAC TTA TGA GTT AAT AAT GAA CTT AAT CTG-3'를 이용하여 증폭하였다. 클로닝을 용이하게 하고자 primer말단 각각에 제한효소 인식자리를 5'-(*Bam*HI): reverse 3'-(*Sal*I)의 염기서열을 부착하였다. DNA 증폭기를 이용하여 pre-denaturation 95°C 2분, denaturation 95°C 45초, annealing 55°C 1분, extension 68°C 3분을 한 주기로 하여 25회 증폭시킨 후 *Bam*HI과 *Sal*I 제한효소로 절단한 뒤 이미 *Bam*HI과 *Sal*I 제한효소로 절단해 놓은 pGBKT7 Δ BD vector에 클로닝 하였다 (pGBKT7 Δ BD/LF).

Yeast 내에서의 형질전환

형질전환 방법은 CLONTECH에서 제공하는 YEASTMAKER yeast transformation protocol을 이용하였다. 먼저 yeast를 YPDA 배지 50 ml에서 200 rpm, 30°C에서 OD₆₀₀=0.4 ~ 0.6까지 배양 후 1,000 \times g로 5분 동안 원심 분리하여 cell을 모은 뒤 상층액은 버리고 증류수로 한번 씻어준 다음 다시 cell을 모았다. 여기에 1X TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5)/1X LiAc (100 mM lithium acetate) 1.5 ml 첨가하여 competent cell을 준비했다. DNA 100ng과 herring testes carrier DNA 100 μ g을 섞은 후 준비한 100 μ l의 yeast competent cell과 섞었다. PEG/LiAc (40% PEG4000, 1X TE buffer, 1X LiAc)용액을 0.6 ml 넣고 30°C에서 30분간 200rpm 진탕 배양한 뒤 70 μ l의 DMSO를 넣고 섞었다. 42°C에서 15분간 열 충격과 주고, 얼음에 1-2분 넣어두었다. 원심분리로 cell을 모은 뒤 상층액은 버리고 1X TE 0.5 ml을 첨가하여 섞은 다음 SD/-Trp plate에 도포하였다. 자란 형질 전환체 균집을 획득하여 SD/-Trp 액체배지에서 30°C에서 OD₆₀₀ = 0.7 ~ 0.8까지 200rpm으로 진탕 배양하였다.

Lethal factor 단백질의 추출 및 Western-blot analysis

CLONTECH Co.,에서 제공하는 YEASTMAKER Yeast protein extract protocol 방법을 이용하였다. SD/-Trp 배지에서 키운 형질 전환된 yeast의 pellet을 하루정도 -70°C에서 하루정도 놔두었다. 37°C에서 녹인 후 Cracking buffer (8M Urea, 5% SDS, 40 mM Tris-HCl, pH6.8, 5mM BME, 1mM EDTA, 0.1 mM PMSF)에 넣어 yeast를 용해시켰다. Glass bead 80 µl 넣고 vortex를 2분간 두 번 실시하였다. 70°C에서 10분간 놔둔 후 1,000 X g에서 원심분리를 15분간 실시한 후 상층액을 1.5 ml tube에 옮겼다. 5X SDS sample buffer넣고 100°C에서 5분 놔둔 후 형질전환된 yeast의 단백질 추출물 일정량을 분획하여 10% SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, Mini-Protein II electrophoresis, gel thickness 1.5 mm, Bio-Rad, USA) 140V로 전기영동 하였고, 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 NC membrane (nitrocellulose)에서 Blotting (Mini Trans-Blot Transfer Cell, Bio-Rad, USA)을 30V로 12시간 이동하였고, 2% BSA로 1 시간동안 blocking 했으며, 첫 번째 c-myc antibody를 2시간동안 상온에서 붙였고, 두번째 항체인 anti-Rabbit IgG (HRP conjugate)를 1시간 동안 반응시켰다. NC membrane에 부착된 단백질들의 발현양상을 보기 위해 ECL-plus reagent (Amersham Co., USA)로 반응, X-ray Film에 노출하여 관찰하였다.

Lethal factor 단백질 가수분해 활성검정

형질전환된 yeast를 SD/-Trp 배지에서 진탕배양 후 세포를 수확한 뒤 lysis buffer (20 mM Tris, pH7.4, 150 mM NaCl, 0.2% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM DTT)에 현탁시키고 초음파 분쇄기에서 10분간 반응시켰다. 반응용액에 glass bead를 넣어 5분간 vortex한뒤 14,000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 얻었다. 단백질 추출물 0.5 mg에 2 µg c-myc antibody, 20 µl proteinA-Sepharose (50% slurry)를 넣어준뒤 4°C에서 2시간동안 반응한 뒤 lysis buffer 를 이용하여 5회 세척하여 LF를 정제하였다. 반응 기질로 알려진 MEK1 (Mitogen-activated protein kinase kinase)는 아미노 말단에 GST가 융합된 형태로 준비하였다. 단백질 가수분해 활성 검정을 위하여 Immunoprecipitation을 통하여 정제한 LF를 1 mM 1, 10-phenanthroline (혹은 같은 양의 DMSO)를 넣어주어 37°C에서 15분간 선반응 후 기질을 포함하고 있는 반응용액 (25 mM phosphate buffer, pH 7.4, 20 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM ZnCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 10% glycerol, 1 µg GST-MEK)하에서 37°C에서 30분간 반응시켰다. 5X SDS/PAGE sample buffer를 넣어 반응을 종결하고 95°C에서 5분간 끓인 뒤 12% SDS/PAGE를 통해 전기영동 후 NC membrane으로 옮겨 anti-MEK1 antibody를 이용하여 western blot을 실시하였다.

결 과

Yeast 내 LF 발현 vector의 구축 (pGBKT7ΔBD-LF)

본 실험에서는 pGBKT7 vector를 이용하였다. pGBKT7 vector

는 *in vivo* protein interaction 실험에서 주로 사용되는 yeast two-hybrid system에서 사용되는 효모발현 vector로써 목적단백질의 아미노 말단부위에 GAL4 DNA binding domain (GAL4 BD)이 융합된 형태로 생산한다. 따라서 LF 발현을 위하여 먼저 vector 가 갖는 GAL4 BD 를 제거하기 위해 mutagenesis PCR 방법 (Quik change, Stratagen)을 이용하였으며 기존의 GAL4 BD부분에 BglIII 제한효소 자리를 임의로 삽입하였다 (pGBKT7ΔBD, Fig. 1A). LF유전자 (2.4 kb)는 *Bacillus anthracis* Sterne 균주의 genomic DNA를 추출하여 PCR을 통하여 확보한 뒤 BamH I 및 Sal I 자리에 삽입하였다 (pGBKT7ΔBD/LF). 유전자 염기서열은 DNA 염기서열 분석을 통하여 확인하였으며 예상되는 유전자 절편의 크기를 다양한 제한효소처리를 통하여 확인하였다 (Fig. 1B).

Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*, AH109)내 LF의 발현

Clontech사의 standard protocol에 따른 형질전환 방법을 통하여 pGBKT7ΔBD/LF를 yeast (AH109)에 형질 전환시킨 후, 형질 전환된 yeast를 확인하기 위해 선택배지인 SD/-Trp 배지에서 yeast균체 들을 획득하였다. 획득된 균체에서 LF의 발현을 확인하기 위해 형질전환 yeast를 배양하여 PCR 및 Western blot을 통하여 확인하였다. yeast에서 유전자를 추출하여 클로닝에 사용된 LF의 primer를 이용하여 PCR한 결과 LF의 유전자를 확인하였다 (Fig. 2A). 또한 LF 단백질이 효모 내에서 단백질로 발현되는지를 확인하기 위하여 형질전환된 yeast의 전체 단백질을 분리한 뒤, 분리된 단백질을 5 µl, 10 µl, 15 µl씩 농도별로 전기 영동하여 분리된 단백질에 항원 항체 반응을 이용한 Western blot 방법을 이용하여 확인할 결과 LF의 단백질 (90 kDa)을 확인하였다 (Fig. 2B).

발현된 LF의 활성검정

yeast에서 발현된 LF의 활성검정을 위하여 immunoprecipitation을 이용하여 LF를 정제 하였다. 여기에 기질인 GST-MEK1를 이용하여 단백질 가수분해 활성을 측정하였다. LF에 의한 단백질 가수분해 반응 후 반응용액을 12% SDS/PAGE에서 전기영동 후 NC membrane에 옮겨 MEK1 특이 항체를 이용하여 MEK의 절단 여부를 확인하였다. GST-MEK1 기질은 LF의 기질인 MEK1의 절단부위가 아미노 말단에 치우쳐 있는점 (Pro8-Ile9)을 감안하여 아미노말단에 26 kDa의 GST (glutathione-S-transferase)를 융합하여 절단반응이 일어났을 때 크기변화를 쉽게 관찰하고자 준비하였다. Fig. 3에서 보는바와 같이 LF를 이용한 30분 반응에서 GST-MEK의 절단을 확인하였으며 LF에 의한 반응임을 확인하고자 Zn²⁺이온에 높은 결합력을 갖는 1, 10-phenanthroline 반응용액에 첨가하였을 때 절단반응이 억제됨을 관찰하였다.

고 찰

생물학적 테러에 탄저균이 이용되면서 그 위험에 대한 대응책 마련은 전 세계인 문제로 관심이 부각되고 있다(4, 16). 지난 몇

년 동안 탄저균에 대한 관심이 높아졌으며, 탄저병에 대응하기 위한 많은 연구들이 현재 진행 중에 있다. 탄저에 대한 대응방법에는 신속한 조기진단에 따른 치료제, 감염 역학조사에 의한 사전예방요법 등이 사용될 수 있으나 테러에 의한 탄저 포자흡입의 경우 잠복기가 2~60일로 길어 조기진단이 매우 어렵고, 증세

가 나타났을 때는 이미 치료효력이 없어 높은 치사율을 가진다 (8). 전 세계적으로 탄저 백신을 개발하여 사용하고 있는 나라는 미국과 영국에 불과하며 이들 나라에서도 기존에 개발되어 사용되고 있는 탄저백신의 개량과 관련된 연구가 수행되고 있으며,

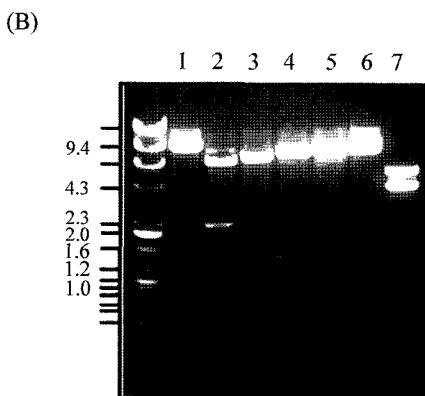
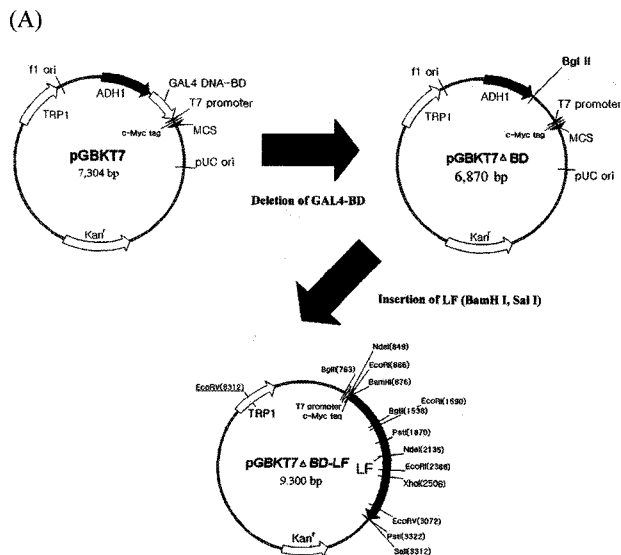


Fig. 1. Schematic diagram for LF expression vector (pGBKT7ΔBD/LF). (A) To remove the gene coding to GAL4 DNA-binding domain (GAL4-BD, 762-1202 region of original pGBKT vector), Quik change PCR (Stratagen) was performed using mutagenic primers containing Bgl II site instead of the GAL4-BD sequence. A mature form of LF, of which gene corresponding to signal peptide was removed, was inserted into pGBKT7ΔBD at BamHI and SalI site. This plasmid has two replication origins, and selection markers for *E. coli* (PUC ori., Kan^r) and yeast (2μ ori., Trp1), respectively. The constructed plasmid produces LF as a N-terminal c-myc tag fusion protein, of which expected molecular weight is about 90 kDa. (B) Physical mapping of the LF expressing plasmid (pGBKT7ΔBD/LF). The constructed plasmid was treated with several restriction enzymes and the products were resolved onto 1% agarose gel electrophoresis. Expected DNA fragments are as follows. Lines 1. XhoI, 9.2kb; 2. BamHI & SalI, 6.8/2.3kb; 3. BglIII, 0.6/8.5kb; 4. PstI, 1.4/7.6kb; 5. EcoRI, 0.6/0.8/7.7; 6. NdeI, 1.2/8.0kb and 7. EcoRV, 3.8/5.3kb.

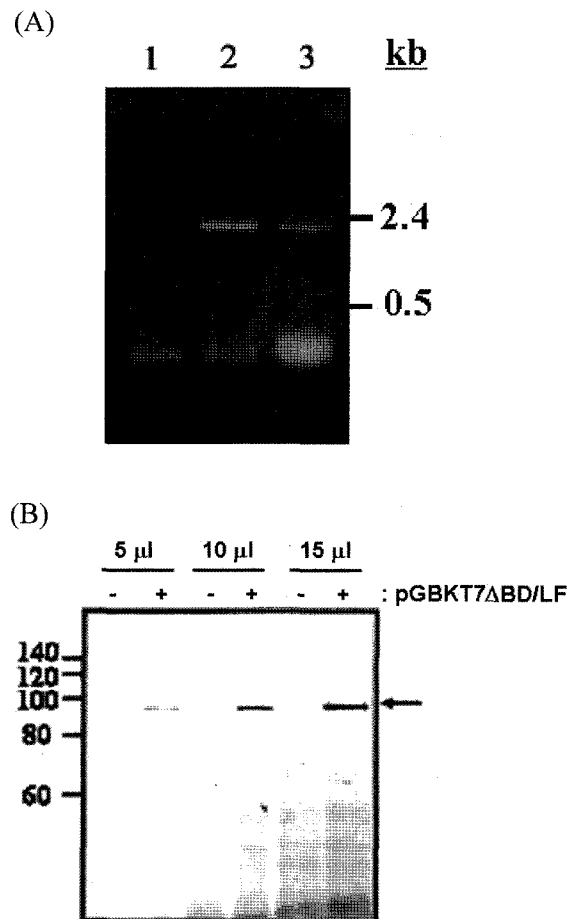


Fig. 2. Confirmation of stable yeast cell line expressing anthrax LF. The plasmid coding to anthrax LF (pGBKT7ΔBD-LF) was transformed into yeast cell, AH109, as described in Materials and Methods. Cells were grown in the selection media, SD/-trp (Synthetic Dropout medium supplemented with essential amino acids except tryptophan) at 30°C for 2 days. (A) Cells were lysed in the buffer containing 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5, and 50U lyticase at room temperature for 60 min, followed by adding 20% SDS. Cell lysates were treated by phenol:chloroform extraction and the DNA was precipitated with a same volume of isopropanol. To confirm that the plasmid expressing LF was correctly inserted and properly propagated within yeast, PCR was carried out using the cloning primer set. Template DNAs were pGBKT7ΔBD (lane 1), pGBKT7ΔBD/LF (lane 2), and pGBKT7ΔBD, which was purified from the yeast (lane 3). Expected size of PCR product is around 2.4 kb. (B) Cells were lysed in the cracking buffer containing 8M urea and 5% SDS. Cell extracts were resolved on 8% SDS/PAGE and transferred into NC membrane. Expression of LF was determined by immunoblotting using anti-c-myc antibody.

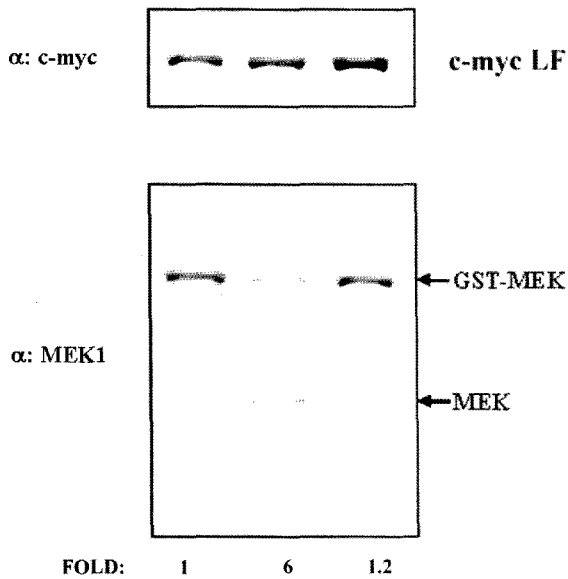


Fig. 3. In vitro proteolytic assay of purified LF. Prior to proteolytic reaction, immuno precipitated LF complex was pre-incubated with (lanes 3) or without (lanes 1, 2) 1 mM 1, 10-phenanthroline for 15 min at 37°C. Reaction was initiated by adding of the preincubated enzyme to the reaction mixture containing 25 mM phosphate buffer, pH 7.4, 20 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM ZnCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 10% glycerol, and 1 µg of GST-MEK1. Reaction was carried out at 37°C for 30 min. Reaction was terminated by addition of 5X SDS/PAGE sample buffer, followed by boiling. Peptidase activity of LF on GST-MEK1 was determined by the decrease of substrate band intensity, and fold activity was calculated from the intensity ratio between reference (lane 1, zero time point) and samples (lanes 2, 3), using a densitometer (Bio-Rad). (upper) immunoblot for precipitated LF, (bottom) immunoblot for MEK1 cleavage.

여러 연구결과들이 발표되고 있으나 임상 시험이 완료되어 완제품을 생산하고 있는 나라는 아직 없다. 이러한 이유로 빠르고 정확하며 간편한 진단체 개발 및, LF를 저해할 수 있는 치료제 개발이 우선시 되어야 하며, 그러기 위해서는 LF의 활성검증방법 등이 개발되어 새로운 치료제검증 및 안정성 확보가 필요하기에 이번 연구에서 lethal factor의 활성검증방법이 효모 내에서 개발될 수 있다는 가능성을 제시하였다. 탄저균의 치사독소인 LF를 클로닝 하는데 이번 연구가 처음 시도되는 바이며, 또한 본 연구에서는 기존의 효모 vector가 가진 기본 특성중 하나인 GAL4 DNA binding domain을 완전히 제거시킴으로 yeast내에서 LF만을 발현시켰다. 본 연구에서는 출아효모에서의 LF의 발현에 중점을 두고 연구했다. LF가 출아효모 내에서 발현된다는 사실은 LF 외의 여러 독소가 in vitro에서의 고처리량 활성검증 뿐만 아니라, 저해제 검증 개발에 있어서 우선시 되는 효모의 in vivo에서의 검증이 쉽고 빠르게 이루어질 수 있다는 가능성을 보여 주었다. 이로써 진핵세포인 효모 내에서 저해제 검증방법을 개발할 수 있는 다양성을 제시하였다고 판단되어 진다.

감사의 말

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 2005041034632)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

1. Beauregard, K.E., R.J. Collier, and J.A. Swanson. 2000. Proteolytic activation of receptor-bound anthrax protective antigen on macrophages promotes its internalization. *Cell. Microbiol.* 2, 251-258.
2. Cieslak, T.J. and E.M. Eitzen. 1999. Clinical and epidemiological principles of Anthrax. *EID.* 5, 552-555.
3. Collier, R.J. and J.A. Young. 2003. Anthrax toxin. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 19, 45-70.
4. Dixon, T.C., M. Meselson, J. Guillemin, and P.C. Hanna. 1999. Anthrax. *Engl. J. Med.* 341, 815-826.
5. Drum, C.L., S.Z. Yan, J. Bard, Y.Q. Shen, D. Lu, S. Soelaiman, Z. Grabarek, A. Bohm, and W.J. Tang. 2002. Structural basis for the activation of anthrax adenyl cyclase exotoxin by calmodulin. *Nature.* 415, 396-402.
6. Duesery, N.S., C.P. Webb, S.H. Leppla, V.M. Gordon, K.R. Klimpel, T.D. Copeland, N.G. Ahn, M.K. Oskarsson, K. Fukasawa, K.D. Paull, and C.F. Bande Woude. 1998. Proteolytic inactivation of MAP-Kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science.* 280, 734-737.
7. Ezzell, J.W. and S.L. Welkos. 1999. The capsule of bacillus anthracis, a review. *J. Appl. Microbiol.* 87, 250.
8. Ezzell, J.W. and T.G. Abshire. 1988. Immunological analysis of cell Associated antigens of *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* 56, 349-356.
9. Green, B.D., L. Battisti, T.M. Koehler, C.B. Thorne, and B.E. Ivins. 1985. Demonstration of a capsule plasmid in *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* 49, 291-297.
10. Grossier, F. and M. Mock. 2001. Toxins of *Bacillus anthracis*. *Toxicol.* 39, 1747-1755
11. Klimpel, K.R., S.S. Molloy, G. Thomas, and S.H. Leppla. 1992. Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 10277-10281.
12. Leppla, S.H. 1982. Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 3162-3166.
13. Leppla, S.H. 1988. Production and purification of anthrax toxin, in: *Methods in Enzymology.* Academic press. 165, 103-116.
14. Makino, S., M. Watarai, H. I. Cheun, T. Shirahata, and I. Uchida. 2002. Effect of the lower molecular capsule released from the cell surface of *Bacillus anthracis* on the pathogenesis of anthrax. *J. Infect. Dis.* 186, 227-233.
15. Mikesell, O.P., B.E. Ivins, J.D. Ristroph, and T.M. Dreier. 1983. Evidence for plasmid mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* 39, 371-376.
16. Mock, M. and A. Fouet. 2001. Anthrax. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 647-671.
17. Mogridge, J., K. Cunningham, and R.J. Collier. 2002. Stoichiometry of anthrax toxin complexes. *Biochemistry* 41, 1079-1082.
18. Morton, N. and M.D. Swartz. 2001. *N. Engl. J. Med.* 345, 1621-1626.

19. Smith, H. and J. Keppie. 1954. Observations on experimental anthrax: demonstration of a specific lethal factor produced in vivo by *Bacillus anthracis*. *Nature* 173, 869-870
20. Turnbull, P.C.B., M.G. Broster, J.A. Carman, R.J. Manchee, and J. Melling. 1986. Development of antibodies to protective antigen and lethal factor components of anthrax toxin in humans and guinea pigs and their relevance to protective immunity. *Infect Immun.* 52, 356-363.
21. Vitale, G, R. Pellizzari, C. Recchi, G. Napolitani, M. Mock, and C. Montecucco. 1998. Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKKs and induces tyrosine/threonine phosphorylation of MAPKs in cultured macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 706-711.

(Received October 18, 2005/Accepted November 22, 2005)

ABSTRACT : Expression of Anthrax Lethal Factor, a Major Virulence Factor of Anthrax, in *Saccharomyces cerevisiae*

Hye Hyun Hwang, Joungmok Kim, Kyoung-Jae Choi, Hoeil Chung, Sung-Hwan Han, Bon-Sung Koo¹, and Moon-Young Yoon* (Department of Chemistry, College of Natural Science, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea, ¹Microbial Function Team, National Institute of Agricultural Biotechnology, RDA, Suwon 441-707, Korea)

Anthrax is an infectious disease caused by the gram-positive bacterium, *Bacillus anthracis*. Anthrax toxin is a tripartite toxin comprising of protective antigen (PA), lethal factor (LF) and edema factor (EF). PA is the receptor-binding component, which facilitates the entry of LF or EF onto the cytosol. LF is a zinc-dependent metalloprotease, which is a critical virulence factor in cytotoxicity of infected animals. Therefore, it is of interest to develop its potent inhibitors for the neutralization of anthrax toxin. The first step to identify the inhibitors is the development of a rapid, sensitive, and simple assay method with a high-throughput ability. Much efforts have been concentrated on the preparation of powerful assays and on the screening of inhibitors using these system. In the present study, we have tried to construct anthrax lethal factor in yeast expression system to prepare cell-based high-throughput assay system. Here, we have shown the results covering the construction of a new vector system, subcloning of LF gene, and the expression of target gene. Our results are first trial to express LF gene in eukaryote and provide the basic steps in design of cell-based assay system.