

유아 분변에서 분리한 *Lactobacillus acidophilus*의 특성 및 표면 단백질 유전자 클로닝과 대장균 내에서의 발현

박명수 · 지근억¹ · 유관희² · 이시경³ · 정원석⁴ · 김진형⁴ · 조명환⁴ · 김수영⁴

안양과학대학 호텔조리영양학부, ¹서울대학교 생활과학대학 식품영양학과, ²상지대학교 이공과대학 생명과학과, ³건국대학교 생명환경과학대학, ⁴건국대학교 이과대학 생명과학과

Characterization of a *Lactobacillus acidophilus* Strain Isolated from Korean Infant Feces and Cloning of Surface Layer Protein Gene *slp* and Its Expression in *Escherichia coli*. Park, Myeong-Soo, Geun-Eog Ji¹, Kwan-Hee You², Si-Kyung Lee³, Won-Seok Jeong⁴, Jin-Hyung Kim⁴, Myoung-Hwan Jo⁴, and Soo-Young Kim^{4*}. Department of Nutrition and Hotel Culinary Art, Anyang Technical College, Anyang 430-749, Korea, ¹Department of Food and Nutrition, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea, ²Department of Biological Science, Sangji University, Wonju, Korea, ³Department of Applied Biology and Chemistry, Konkuk University, ⁴Department of Biological Sciences, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea – A *Lactobacillus* sp. has been isolated from infant feces and characterized according to its physiological properties and identified as *Lactobacillus acidophilus* KLA1012. A gene coding surface layer protein (SLP) has been cloned and the sequence has been determined. The nucleotide sequence of *slpA* was 1,338 bp in size and was identical to that of *L. acidophilus* ATCC 4356 (100%). Amino acid sequence of SLP-A was deduced from the nucleotide sequence and it had signal sequence at N-terminal, consisting of positively charged amino acid mainly lysine. *slpA* was cloned and heterologously expressed in *E. coli* M15 and the 45.2 kDa surface-layer protein band was examined by SDS-PAGE and confirmed by Western blotting using polyclonal antibody against *L. acidophilus* KLA 1012 SLP-A protein.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*, surface layer protein gene, nucleotide sequence

서 론

장내 환경에 적극적으로 적응하여 성장하고 장내 상피세포의 표면에 부착할 수 있는[9, 10] 유산균은, 다른 유해균들의 장내 부착을 경쟁적으로 억제 하며[2] 인간의 장내, 비뇨생식기관(urogenital tract)에서 증식한다. 유산균은 면역글로블린 생산 자극[15], 대식세포의 인터페론 유도[16], 신체의 부분적 산성화[28], 저콜레스테롤 효과[11], 돌연변이 유발성 물질과의 반응[21], 항균물질인 박테리옌 생성 및 소화관 병원성 세균의 흡착 저해[17] 기능이 알려졌다. 또한 이러한 능력은 장내에서 소화 흡수를 돕고, 부패 억제, 설사 및 변비 치료 효과, 비타민 생성 등을 나타내며, 건강한 사람의 장내에는 유산균이 다른 장내세균 보다 상대적으로 많이 분포되어 성인병의 예방 및 치료와 관련 있다고 보고되었다[1, 22, 27].

유산균의 세포벽은 일반적인 그람 양성균의 세포벽 구성원인 펩티도글리칸(peptidoglycan), 테이코산(teichoic acids),

다당류 그리고 표면 단백질(Surface-layer protein; SLP)로 구성되어 있다. SLP는 세균의 외부환경에 대한 보호[20], 세포 형태 결정[23], 전하와 파아지 수용체 같은 기본적 세포벽의 보호 역할[14, 24], 그리고 상피세포에 부착[8, 26] 등과 관련이 있는 것으로 알려졌다. SLP는 Eubacteria와 Archaeobacteria 400여 종에서 발견되었고, 2차원적인 당단백질의 불완전 결정체 구조(paracrystalline arrays)로서 보고되었다[3, 9, 25]. SLP는 분자량이 40-200 kDa이며 비공유적으로 이온과 수소결합을 하고, 소수성 상호작용에 의해 세포벽(eubacteria)이나 원형질막(대부분 archaeobacteria)에 형성되어 있다.

SLP-A는 acidic protein이며 *L. brevis* ATCC 8287에서 양전하의 45 kDa인 SLP로 보고 되었다[28]. 단백질의 형성과 안정성은 2가 양이온(Ca^{2+} , Mg^{2+})에 의존적이며 세포벽과 결합은 이온강도에 의존적이므로 urea, Triton X-100, SDS, guanidine hydrochloride, LiCl, metal chelating agents 등으로 분리 가능하다[4, 5, 7, 18, 19]. 그 중에서 *L. acidophilus*에서는 분자량 43,636 Da인 SLP-A와, 분자량 44,884 Da인 SLP-B가 보고되었는데, SLP-A의 N-말단 부분에서는 양전하 부위(6 아미노산 M-K-K-N-L-R)와 연이은 소수성 부위(13 아미노산, α -helix)로 이루어진 특징적인 signal

*Corresponding author

Tel: 82-2-450-3429, Fax: 82-2-447-6112

E-mail: kimsybt@konkuk.ac.kr

sequence가 발견되었다[5, 6].

프로바이오틱 유산균의 SLP를 이용한 외래 단백질의 표면 발현시스템 개발이 시도 되고 있는데 [12, 13], 이는 세균의 표면단백질을 표면발현모체(surface anchoring motif)로 하여 외래 단백질을 발현시켜 이형단백질을 항원으로 작용시키는 방법이다. 다양한 motif를 이용한 표면발현시스템이 개발되어 그 장단점이 보고되었다[13].

본 연구에서는 SLP를 이용한 표면발현시스템의 개발을 위해, 유아의 분변에서 분리 및 동정된 *L. acidophilus*에서 표면단백질 유전자를 클로닝하여 염기서열을 분석하고 이를 *E. coli* 내에서 발현하였다.

Lactobacillus sp. 의 분리와 동정

모유를 섭취하는 생후 3개월 된 유아의 분변에서 m-LBS (BBL, USA)배지를 이용하여 *Lactobacillus* 균주를 분리하였다. 분리 균주를 37°C의 혐기조건에서 OD_{600nm} = 0.8까지 배양한 후 현미경으로 관찰한 결과 형태상으로 간균이었고, 호기조건에서 산을 생성하나 가스를 발생하지 않으며 3차 계대 배양에서도 활성이 소실되지 않는 균주를 선발하였다. 분리한 균주는 그람 양성 간균이었으며 포자를 형성하지 않았고 운동성이 없었다(data not shown). 또한 혐기 조건에서 잘 자랐으며, 호기 조건에서도 생육이 가능했고 30°C-45°C에서도 성장할 수 있었으며, pH는 4.2에서 7.5까지 생육이 가능했다. 염의 농도는 4% 에서도 성장할 수 있었고 가스 생성은 없었으며 Catalase와 Oxidase test는 모두 음성이었다. 당 발효능 조사를 위해 API 50 CHL test를 한 결과

galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, N acetyl glucosamine, amygdaline, esculine, salicine, cellobiose, maltose, lactose, saccharose, trehalose, D-raffinose와 β-gentiobiose 등을 발효하였고, melibiose의 경우 약한 발효 반응을 보였으며 D-furanose는 발효 반응을 보이지 않았다. 이러한 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성분석결과와 Bergey's manual of systematic bacteriology, Bergey's manual of determinative bacteriology 그리고 APILAB program version 3.3.3(BioMrieux)을 이용하여 분석한 결과, 분리 균주는 *L. acidophilus*로 동정되었으며, *L. acidophilus* KLA 1012라 명명하였다.

slpA 유전자 클로닝

*slpA*를 증폭하기위해 Lac EA와 Lac EB primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. Lac EA는 개시코돈 ATG 상류의 -54에서 -31 base 사이의 기본 틀로 *Sph* I 제한 효소 자리를 포함하도록 하였고, Lac EB primer는 종결코돈 TAATAA를 포함하며, 1326 base부터 1347 base를 기본 틀로 *Hind* III를 포함하도록 하였다(Table 1; Fig. 1). *L. acidophilus* KLA 1012의 염색체 DNA를 분리하고 PCR을 수행하여 약 1.4 kb의 DNA를 얻고(Fig. 2A), 이를 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 pTSLP-A를 얻었다. 또한 *L. acidophilus* KLA 1012의 염색체에서 PCR로 증폭한 *slpA* 유전자를 probe로 사용하여 Southern hybridization을 수행하여 pTSLP-A에 도입된 DNA 단편이 *slpA*임을 확인하였다(Fig. 2B). 그리고 Lac EA와 Lac LR1 primer를 이용하여 pTSLP-AI, Lac

Table 1. Bacterial strains and PCR primers used in this study.

Bacterial Strains	Characteristics	References
<i>E. coli</i> JM 109	<i>endA1, recA1, gryA96, thi, hsdR17(r_k⁻, m_k⁺), relA1, supE44, Δ(lac-proAB) [F', traD36, proAB, lacI_qΔM15] λ-</i>	PROMEGA
<i>E. coli</i> M15	Nal ^S , Str ^S , Rif ^S , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺ , <i>lac, ara, gal, mtl, f.</i>	QIAGEN
<i>L. acidophilus</i> KLA 1012	isolated from infant feces	this study
<i>E. coli</i> pQESLP-A	<i>slpA</i>	this study

Primers	Nucleotide sequences (5' → 3')	Site at <i>slpA</i>	underlined sequence
Lac EA	<u>TGCATGCCCTATGGCCTATTACAT</u>	-54 ~ -31	<i>Sph</i> I
Lac EB	CTACGA <u>AAGCTT</u> TATTATCTAAAG	1326 ~ 1347	<i>Hind</i> III
Lac LF2	AGCATGCAATTGCCGGTAACCTT	205 ~ 228	<i>Sph</i> I
Lac LF3	TCGAGCTCGCCGTTTCAGTT	636 ~ 654	<i>Sac</i> I
Lac LF4	TAGTCGACAGCGTAAGCAAGA	938 ~ 958	<i>Sal</i> I
Lac LR1	GTTACCGGCAATA <u>AAGCTT</u> TAG	205 ~ 225	<i>Hind</i> III
Lac LR2	<u>AAGCTT</u> GGCACCGTTAGTTAC	631 ~ 651	<i>Hind</i> III
Lac LR3	GATGTTTGCA <u>AAGCTT</u> GATGT	1108 ~ 1137	<i>Hind</i> III
T7	TAATACGACTCACTATAGGG		
SP6	TATTTAGGTGACACTATAG		
pQE Type III/IV	CGGATAACAATTTACACAG		
pQE Reverse	GTTCTGAGGTCATTACTGG		

* Underlines indicate Restriction enzyme site.

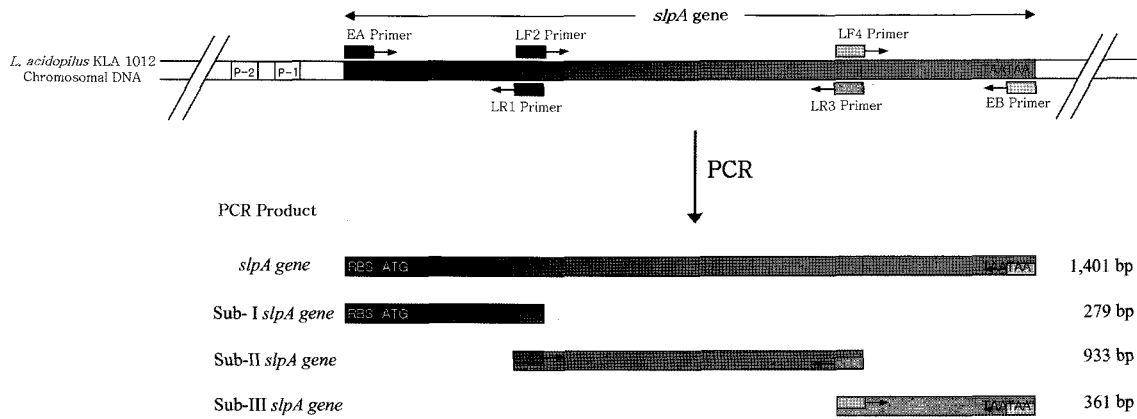


Fig. 1. Schematic diagram for the cloning of *slpA* from *L. acidophilus* KLA 1012 genomic DNA. PCR product of *slpA* was obtained using EA primer and EB primer. Three partial amplicons of sub-I *slpA*(279 bp), sub-II *slpA*(933 bp) and sub-III *slpA*(361 bp) were ligated into pGEM-T assay vector to construct pTSLPA-I, pTSLPA-II and pTSLPA-III, respectively.

LF2와 Lac LR3 primer를 이용하여 pTSLP-AII, Lac LF4와 Lac EB primer를 이용하여 pTSLP-AIII를 각각 제조하여 *slpA*의 염기서열 분석에 이용하였다(Fig. 1).

***slpA* 유전자의 염기서열 분석 및 비교**

L. acidophilus KLA 1012의 genomic DNA에서 Lac EA와 Lac EB primer를 이용하여 증폭하여 클로닝 한 DNA는 1,401 bp 크기였고, 1,338 bp의 open reading frame (ORF)을 포함 하였다. 이 부분은 GenBank 분석결과 *L. acidophilus* ATCC 4356의 *slpA*와 염기서열이 100% 일치 하였다. *L. acidophilus* ATCC 4356은 개시점인 ATG로부터 상위 9번째 염기에 ribosome binding site(RBS)인 AGGAGG가 존재하였으며[5] 대부분 *Lactobacillus* 속의 *slp* 유전자가 하나의 종결 코돈이 존재하는 데 반하여 *L. acidophilus* ATCC 4356와 *L. brevis* ATCC 8287은 종결 코돈 2개가 연이어 존재한다고 보고되었다[6]. *L. acidophilus* KLA 1012의 *slpA*도 개시점인 ATG로부터 상위로 9번째 염기에 RBS(AGGAGG)가 존재하였으며, 연속된 두개의 종결 코돈(TAATAA)을 가지고 있어 강한 종결 신호로 효율적으로 유전자를 종결 한다고 판단된다. SLP-A의 아미노산 구성은 표면 단백질의 일반적인 특징인 소수성 아미노산과 양전하 아미노산이 많이 발견되었다. 특히 소수성 아미노산인 alanine이 가장 많은 양으로 존재하였으며, valine도 많이 존재하는 것으로 확인되었다. 또한 S 원소가 함유된 cysteine과 methionine은 거의 없고, 전하를 띠는 아미노산 중에서는 양전하 아미노산이 음전하 아미노산보다 약 2배 정도 더 많이 존재하는 것으로 확인되었다(data not shown). N-말단에서는 특징적 signal sequence인 양전하 부위(6 아미노산, M-K-K-N-L-R)와 연이은 소수성 부위(13 아미노산, α -helix)가 발견되었고 기존의 보고[5, 6]와 일치하였다.

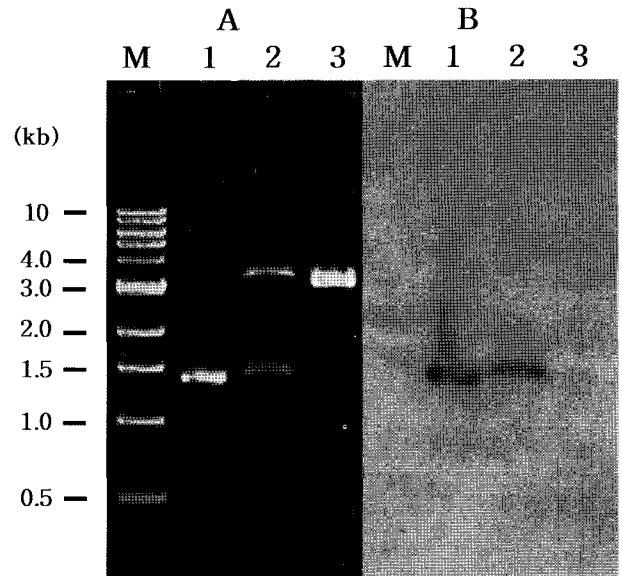


Fig. 2. Agarose gel analysis of the recombinant plasmid pTSLP-A containing *slpA* (A) and Southern blotting analysis (B). M, 1 Kb size marker (Promega, USA); Lane 1, *slpA* fragment produced by PCR from genomic DNA of *L. acidophilus* KLA1012; lane 2, pTSLP-A containing *slpA* digested with *Sph* I and *Hind* III; lane 3, pGEM-Teasy vector digested with *Sph* I and *Hind* III. Panel B shows the results of Southern blotting analysis of panel A. The probe used in Panel B was the PCR product of *slpA* fragment from *L. acidophilus* KLA 1012.

***E. coli* 내에서 *slpA*의 발현**

E. coli 내에서 *slpA*를 발현하기 위하여, pTSLP-A를 *Hind* III와 *Sph* I으로 절단하여 *slpA* 유전자를 얻어 같은 효소로 절단한 pQE-32 vector에 ligation 하여 pQESLP-A를 제조하고 *E. coli* M15에 형질전환 하여 형질전환체를 얻었고 SLP-A 단백질의 발현을 확인하였다. 재조합체에서 SLP-A 발현 여부를 확인하기 위하여 *L. acidophilus* KLA 1012

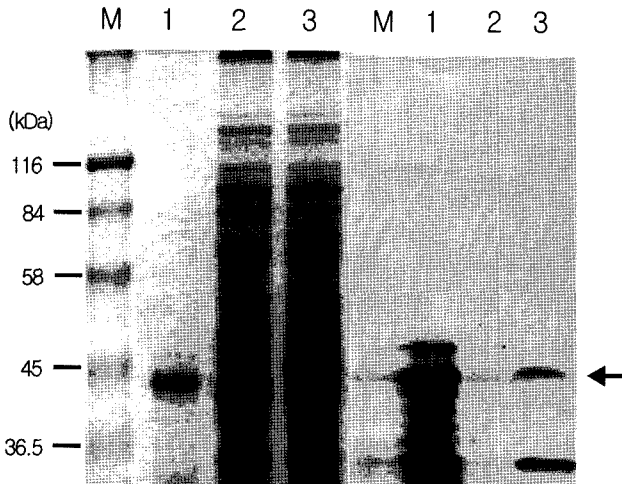


Fig. 3. SDS-PAGE and Western blotting analysis of SLP-A from *L. acidophilus* KLA 1012 and *E. coli* M15 harboring pQESLP-A. (A) SDS-PAGE analysis and Coomassie brilliant blue R-250 stained. M, Standard molecular weight marker (Sigma, USA); Lanes 1, SLP-A of *L. acidophilus* KLA 1012 extracted by guanidinehydrochloride; 2, Lysate of *E. coli* M15 harboring pQE-32 vector; 3, Lysate of *E. coli* M15 harboring pQESLP-A. (B) Western blotting result of Panel (A) gel. Arrow indicates the SLP-A protein produced by recombinant *E. coli* M15.

에서 정제한 SLP-A를 항원으로 사용하여 생후 6주된 Balb/c mouse에 주사하여 다클론항체(polyclonal antibodies)를 제조하여 Western blotting에 사용하였다. *L. acidophilus* KLA 1012와 *E. coli* M15(pQESLP-A)에서 분리한 SLP-A 단백질을 SDS-PAGE 후 anti-SLP-A serum으로 Western blotting을 실시한 결과 43.7 kDa에서 양성반응 단백질을 확인할 수 있었다(Fig. 3). *L. acidophilus* KLA 1012에서 분리한 SLP의 경우 부분적으로 분해된 단백질의 밴드들이 관측하였다. Vidgren 등[28]은 *L. brevis* ATCC 8287에서 양전하의 45 kDa SLP를 관찰하였다. *E. coli* M15 내에서 발현하는 SLP-A와 *L. acidophilus* KLA 1012의 SLP-A의 크기는 두 가지 요인에 의해 약간 차이를 보이는 것으로 생각된다. 첫 번째 요인은 EA, EB primer를 사용하여 pQE-32 vector에 클로닝 하는 과정에서 총 30개의 아미노산이 추가되었고, 두 번째 요인은 *L. acidophilus* KLA 1012 *slpA* 유전자에서 발현된 SLP-A는 N-말단 부분에 signal sequence가 절단 되지만 *E. coli* 내에서 발현하는 SLP-A에서는 cleavage가 일어나지 않아 단백질 분자량의 차이를 보이는 것으로 추측된다. SLP-A는 크게 3부분의 영역으로 나누어진다고 판단되며 N-말단 부위의 염기성 아미노산부위와 연이은 소수성 부위, signal sequence의 cleavage가 일어나는 부위, 그리고 나머지 부분이다[5, 6]. 또한 *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. crispatus*와 *L. helveticus*의 SLP 아미노산 서열을 비교한 결과 세 번째 영역에 세포벽과 결합하는 부분이 있다고 보고되었다[7]. 본 연구를 기반으로 *Lactobacillus*에서 표면발현 시스템을 구축하기 위해서 *slpA* 유전자의 부분적

인 서열을 포함하는 클론을 이용하여 유산균 표면에서의 SLP-A 구조에 대한 연구(epitope mapping)와 외래유전자의 표면발현(surface display)에 대한 연구가 필요하다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2004-015-C00506).

REFERENCES

1. Arai, S., T. Osawa, H. Ohigashi, M. Yoshikawa, S. Kaminogawa, M. Watanabe, T. Ogawa, K. Okubo, S. Watanabe, H. Nishino, K. Shinohara, T. Esashi, and T. Hirahara. 2001. A mainstay of functional food science in Japan-History, present status, and future outlook. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 1-13.
2. Beachey, E. H. 1981. Bacterial adherence: adhesin receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.* **143**: 325-345.
3. Beveridge, T. J. and L. L. Graham. 1991. Surface layers of bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**: 684-705.
4. Bhowmik, T., M. C. Johnson, and B. Ray. 1985. Isolation and partial characterization of the surface protein of *Lactobacillus acidophilus* strains. *Int. J. Food Microbiol.* **2**: 311-321.
5. Boot, H. J., C. P. Kolen, J. M. van Noort, and P. H. Pouwels. 1993. S-Layer Protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 : Purification, expression in *Escherichia coli*, and nucleotide sequence of the corresponding gene. *J. Bacteriol.* **175**: 6089-6096.
6. Boot, H. J., C. P. Kolen, and P. H. Pouwels. 1995. Identification, cloning, and nucleotide sequence of a silent S-Layer protein gene of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 which has extensive similarity with the S-Layer Protein gene of this species. *J. Bacteriol.* **177**: 7222-7230.
7. Callegari, M. L., B. Riboli, J. W. Sanders, P. S. Cocconcelli, J. Kok, G. Venema, and L. Morelli. 1998. The S-layer gene of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 892 : cloning, sequence and heterologous expression. *Microbiol.* **144**: 719-726.
8. Cowan, S. T. 1974. *Manual for the Identification of Medical Bacteria*, pp. 147-161. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
9. Doig, P., L. Emdy, and I. J. Trust. 1992. Binding of laminin and fibronectin by the trypsin-resistant major structural domain of the crystalline virulence surface array protein of *Aeromonas salmonicida*. *J. Biol. Chem.* **267**: 43-49.
10. Egbert, S., and H. P. Peter. 2002. One repeat of the cell wall binding domain is sufficient for anchoring the *Lactobacillus acidophilus* surface layer protein. *J. Bacteriol.* **184**: 4617-4616.
11. Fernandes, C. F., K. M. Shahani, and M. A. Amer. 1987. Therapeutic role of dietary *Lactobacilli* and *lactobacillic*

- fermented dairy products. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**: 343-356.
12. Fischetti, V. A., D. Medaglini, M. Oggioni, and G. Pozzi. 1993. Expression of foreign proteins on Gram-positive commensal bacteria for mucosal vaccine delivery. *Curr. Opin. Biotechnol.* **4**: 603-610.
 13. Georgious, G., H. L. Poetschke, C. Stathopoulos, and J. A. Francisco. 1993. Practical application for engineering Gram-negative bacteria cell surface. *Tibitech.* **11**: 6-10.
 14. Ishiguro, E. E., W. W. Kay, T. Ainsworth, J. B. Chamberlain, R. A. Austen, J. T. Buckley, and T. J. Trust. 1981. Loss of virulence during culture of *Aeromonas salmonicida* at high temperature. *J. Bacteriol.* **148**: 333-340.
 15. Isolauri, E., J. Joensuu, H. Suomalainen, M. Luomala, and T. Vesikari. 1995. Improved immunogenicity of oral Dx RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine* **13**: 310-312.
 16. Kitazawa, H., K. Matsumura, T. Itoh, and T. Yamaguchi. 1992. Interferon induction in murine peritoneal macrophage by stimulation with *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiol. Immunol.* **36**: 311-315.
 17. Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 39-85.
 18. Masuda, K. and T. Kawata. 1979. Ultrastructure and partial characterization of a regular array in the cell wall of *Lactobacillus brevis*. *Microbiol. Immunol.* **23**: 941-953.
 19. Masuda, K. and T. Kawata. 1980. Reassembly of the regularly arranged subunits in the cell wall of *Lactobacillus brevis* and their reattachment to cell wall. *Microbiol. Immunol.* **24**: 299-308.
 20. Munn, C. B., E. E. Ishiguro, W. W. Kay, and T. J. Trust. 1982. Role of surface components in serum resistance of virulent *Aeromonas salmonicida*. *Infect. Immun.* **36**: 1069-1075.
 21. Orrhage, K., E. Sillerström, J. A. Gustafsson, C. E. Nord, and J. Raftér. 1994. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mutat. Res.* **311**: 239-248.
 22. O'Sullivan, M. G., G. Thornton, G. C. O'Sullivan, and J. K. Collins. 1992. Probiotic bacteria: Myth or reality. *Trends Food Sci. Technol.* **3**: 309-314.
 23. Pum, D., P. Messner, and U. B. Sleytr. 1991. Role of the S layer in morphogenesis and cell division of the archaeobacterium *Methanococcus sinense*. *J. Bacteriol.* **173**: 6865-6873.
 24. Sra, M. and U. B. Sleytr. 1987. Molecular sieving through S layers of *Bacillus stearothermophilus* strains. *J. Bacteriol.* **169**: 4092-4098.
 25. Sra, M., and U. B. Sleytr. 2000. S-layer protein. *J. Bacteriol.* **182**: 859-868.
 26. Simon, G. L. and S. L. Gorbach. 1986. The human intestinal microflora. *Dig. Dis. Sci.* **31**: 1475-1625.
 27. Steer, T., H. Carpenter, K. Tuohy, and G. R. Gibson. 2000. Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* **13**: 229-254.
 28. Vidgren, G., I. Palva, R. Pakkanen, K. Lounatmaa, and A. Palva. 1992. S-layer protein gene of *Lactobacillus brevis*: Cloning by polymerase chain reaction and determination of the nucleotide sequence. *J. Bacteriol.* **174**: 7419-7427.

(Received Oct. 9, 2007/Accepted Nov. 12, 2007)