

RESEARCH ARTICLE

큰느타리버섯에서 석충 페리틴 단백질 유전자의 발현 최적화 및 생물학적 활성

우연정, 오시윤, 최장원*

대구대학교 대학원 자연자원학과

Optimization of the Expression of the Ferritin Protein Gene in *Pleurotus eryngii* and Its Biological Activity

Yean Jeong Woo, Si Yoon Oh, Jang Won Choi*

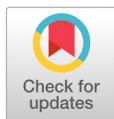
Department of Natural Resources, Graduate School, Daegu University, Gyeongsan 38453, Korea

*Corresponding author: chjawa@daegu.ac.kr

ABSTRACT

To optimize the expression and secretion of ferritin protein associated with iron storage in the mushroom, *Pleurotus eryngii*, a recombinant secretion vector, harboring the ferritin gene, was constructed using a pPEVPR1b vector under the control of the CaMV 35S promoter and signal sequence of pathogen related protein (PR1b). The ferritin gene was isolated from the T-Fer vector following digestion with *EcoRI* and *HindIII*. The gene was then introduced into the pPEVPR1b secretion vector, and it was then named pPEVPR1b-Fer. The recombinant vector was transferred into *P. eryngii* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. The transformants were selected on MCM medium supplemented with kanamycin and its expression was confirmed by SDS-PAGE and western blotting. Expression of ferritin protein was optimized by modifying the culture conditions such as incubation time and temperature in batch and 20 L airlift type fermenter. The optimal conditions for ferritin production were achieved at 25°C and after incubating for 8 days on MCM medium. The amount of ferritin protein was 2.4 mg/g mycelia, as measured by a quantitative protein assay. However, the signal sequence of PR1b (32 amino acids) seems to be correctly processed by peptidase and ferritin protein may be targeted in the apoplast region of mycelia, and it might not be secreted in the culture medium. The iron binding activity was confirmed by Perls' staining in a 7.5% non-denaturing gel, indicating that the multimeric ferritin (composed of 24 subunits) was formed in *P. eryngii* mycelia. Mycelium powder containing ferritin was tested as a feed additive in broilers. The addition of ferritin powder stimulated the growth of young broilers and improved their feed efficiency and production index.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, Ferritin, *Perinereis nuntia*, *Pleurotus eryngii*

**OPEN ACCESS**pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249Kor. J. Mycol. 2019 December, 47(4): 359-71
<https://doi.org/10.4489/KJM.20190041>**Received:** November 19, 2019**Revised:** December 15, 2019**Accepted:** December 17, 2019

© 2019 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

큰느타리버섯(*Pleurotus eryngii*)의 원산지는 남유럽 일대이며, 북아프리카, 중앙 아시아, 남러시아 등지에도 분포한다. 1975년 송이과로 분류되었으나 1986년 느타리버섯과로 재분류되어 최종적으로 큰느타리버섯으로 명명되었다[1]. 큰느타리버섯은 비타민이 느타리버섯에 비해 7배, 팽이버섯에 비해 10배나 많이 함유되어 있으며, 일반 버섯에 주로 함유된 비타민 B1과 B2, 나이아신 등은 검출되지 않지만 비타민 B6가 많이 함유되어 있고 악성빈혈 치유인자로 알려진 비타민 B12도 미량 함유되어 있다[2]. 전당 함량이 높은 편이고 필수아미노산 10종 가운데 9종을 함유하고 있으며 칼슘과 철 등 신진대사를 원활하게 도와주는 무기질의 함량도 다른 버섯에 비하여 매우 높다.

식물체에서 형질전환을 위하여 널리 사용하는 *Agrobacterium tumefaciens*는 식물의 뿌리와 줄기 부분에서 혹(crown gall)을 발생시키며, 도입된 유전자를 숙주세포의 염색체 부위로 이동시키면서 새로운 형질의 식물체를 형성한다. 이와 같은 ATMT 방법(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation)은 다른 형질전환법에 비해서 효율성이 높고 경제적이며 쉽게 이용할 수 있는 방법이고, 외래 유전자 도입에 있어 삽입하는 형태가 간단하고 유전학적인 조절이 가능한 것 등의 장점이 많기 때문에 보편적으로 많이 사용한다. 따라서 본 연구에서는 기존 식물 벡터의 promoter (CaMV 35S)와 pathogen-related protein[3]의 분비신호서열을 (또는 laccase 및 Pleurotolysin A) 포함하는 분비 벡터를 이용하여 큰느타리버섯을 숙주로 하여 외래단백질을 배양액이나 원기(exudates)로 분비하는 시스템을 개발하려 한다. 또한, 외래단백질로는 페리틴 단백질 유전자를 포함한 제 1세대 바이오 의약품(epidermal growth factor, colony stimulation factor, human growth hormone) 등의 유전자를 도입하여 식품으로 안정성이 확보된 버섯의 원기 및 균사체에서 새로운 개념의 단백질 대량생산의 공장 시스템을 개발하고 또한 바이오시밀러 시대를 대비하여 의학 소재 원료를 제공하는 산업화에 의해 고부가가치 창출 기반을 조성하는 것을 목표로 한다.

Perinereis nuntia(석충)은 한국, 일본 및 기타 국가의 얇은 해저에 서식하는 생물로, 전 세계 1속 1종으로 알려져 있고, 갯벌 환경 생태 및 순환에 필수적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 페리틴은 체내 철분 보유량에 따라 철분 흡수율이 달라지는데, 특히 페리틴 단백질에 결합된 철분 형태는 훌륭한 철분 공급원이다. 페리틴 단백질은 신호서열 17개 아미노산을 포함하여 174개의 아미노산으로 구성된 18.2 kDa의 H-type subunit 24개가 결합하여 multimer를 형성하는 것으로 보고되었다[3]. 본 연구에서는 우리나라 갯벌에 서식하는 토착 갯지렁이인 *P. nuntia*로부터 페리틴 유전자를 분리하였고(GenBank accession No. DQ207752), 페리틴의 발현 최적화를 위해 식물용 발현분리 벡터인 pPEVPR1b 벡터로 페리틴 유전자를 도입하여 재조합 발현벡터를 구축하였다. 그리고 ATMT 방법을 통해 큰느타리버섯에 형질전환하여 얻어진 재조합 형질전환체에서 페리틴의 발현 및 발현 최적화를 위하여 배지, 온도, 시간에 따라 발현도 차이를 조사하였다. 또한, 정량 분석을 통하여 페리틴의 발현량을 측정하고, 균사체를 사용하여 파우더를 제조하여 육계에서 페리틴의 생물학적 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에서 사용한 큰느타리버섯(*Pleurotus eryngii*) 균사체는 경상남도 농업기술원(KNR 2312)에서 분양받아 실험에 사용하였다. 분양 받은 균사체는 완전 고체배지인 PDA (0.4% potato starch, 2% dextrose, 1.5% agar powder)를 사용하여 배양하였으며, 액체배지로는 PDB (0.4% potato starch, 2% dextrose) 배지를 사용하여 계대 배양한 후, 버섯 최적배양 배지인 mushroom complete medium (2% glucose, 0.2% yeast extract, 0.2% peptone, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% K_2HPO_4 , 0.046% KH_2PO_4)을 사용하였으며, 배양조건은 모두 동일하게 25°C 암조건에서 정지배양 및 50 rpm 이하로 교반하였다. 큰느타리버섯 형질전환을 위하여 induction medium (10 mM glucose, 0.205% K_2HPO_4 , 0.145% KH_2PO_4 , 0.015% NaCl, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01% $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.00025% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% $(NH_4)_2SO_4$, 0.5% glycerol, 200 μM acetosyringone, 40 mM MES)[4] 과 minimal medium (0.2% glucose, 0.205% K_2HPO_4 , 0.145% KH_2PO_4 , 0.015% NaCl, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01% $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.00025% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% $(NH_4)_2SO_4$) [5]을 사용하였다. Plasmid 증폭 및 재조합을 위한 균주로는 *E. coli* XL1-blue MRF' (F' , *proAB*, *lacI^qZ Δ M15*, *thi*, *recA*, *gyrA*, *relA*, *supE*, Tn10)[6] (Stratagene, La Jolla, USA)를 LB (Luria-Bertani) medium (1% bacto tryptone, 0.5% bacto yeast extract, 1% NaCl)에서 배양하여 사용하였고 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (*Ach5*, *pTiAch5*, *Sm^R*, *Sp^R*)[7] 균주는 YEP medium (1% bacto tryptone, 1% bacto yeast extract, 0.5% NaCl)에 접종하여 사용하였다. 페리틴 유전자는 T-Fer (Ap^r , *f1* & *ColE1 ori*, MCS, ferritin) [8]을 이용하였고, 발현 및 분비벡터로는 pPEVPR1b (CaMV 35S promoter, NOS-terminator, 5' UTR, 3' UTR, Km^r *ColE1 ori*, PR1b) [9]을 사용하였다.

페리틴 유전자의 PCR 증폭 및 분비벡터의 구축

페리틴 유전자는 기구축된 vector, T-Fer[8]를 사용하여 mature form을 확보하기 위하여 *EcoRI*과 *HindIII*로 자른 다음 Klenow 효소 처리에 의해 cohesive end를 filling하여 0.5 kb단편의 페리틴 유전자를 확보하였다. 재조합 발현벡터 제조에 사용한 pPEVPR1b 분비벡터에 페리틴 유전자를 도입하기 위해 pPEVPR1b 분비벡터를 *BamHI*로 절단 후 얻어진 선형 DNA (11.3 kb)에 Klenow 효소로 filling한 후 agarose겔에서 분획화 후 정제하여 얻은 다음, 페리틴 유전자와 ligation하여 *E. coli* XL-1 Blue MRF'로 형질전환하였다. 항생제 내성 (kanamycin, 50 mg/mL)에 의해 선별된 형질전환체들로부터 plasmid 들을 추출하여 DNA 크기, 제한효소 처리 및 염기서열 분석에 의해 도입된 페리틴 유전자를 확인하였다. 그 후 대장균에서 유전자 증폭 후[10], *A. tumefaciens*에 재조합벡터를 도입시켰다.

Agrobacterium tumefaciens 형질전환

구성된 재조합 vector를 대장균에서 유전자 증폭 후 얻어진 plasmid vector를 *A. tumefaciens* LBA4404에 형질전환 하였다[11]. YEP 배지에 *A. tumefaciens* LBA4404를 $OD_{600}=0.5$ 가 될 때까지 30°C에서 150 rpm으로 교반하면서 배양하고, 배양액을 얼음에서 10분간 방치하여 냉각시킨 후 3,500 rpm으로 10분간 원심분리 하여 균을 회수하고 차가운 20 mM $CaCl_2$ 용액 1 mL에 잘 현탁하

고, 상기 *A. tumefaciens* LBA4404 현탁액 200 μ L에 재조합 벡터를 넣은 혼합액을 액체 질소에 방치하여 급속 냉동시킨 다음, 얼려진 혼합액을 37°C에서 5분 정치하였다. 이어서 혼합액의 10배 부피의 YEP 배지를 첨가하여 28°C에서 2시간 동안 교반하면서 배양하였다[12]. 배양 후 균을 회수하기 위해 4,500 rpm으로 10분간 원심분리하고, 균을 YEP배지 0.3 mL에 잘 현탁시키고, 이중 0.1 mL을 취하여 kanamycin (50 mg/mL)을 포함하는 YEP 고체배지에 도말하고 30°C에서 하루 동안 배양하여 콜로니가 생성되도록 하였다. 그 형질전환체로부터 DNA를 추출하고 PCR에 의하여 *A. tumefaciens* LBA4404에 도입된 재조합 벡터를 선별하였다.

*Agrobacterium tumefaciens*에 의한 큰느타리버섯 형질전환

재조합 벡터(pPEVPR1b-Fer)가 도입된 *A. tumefaciens* LBA4404를 kanamycin (50 mg/mL)이 첨가된 5 mL minimal medium [0.2% glucose, 0.205% K_2HPO_4 , 0.145% KH_2PO_4 , 0.015% NaCl, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01% $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.00025% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% $(NH_4)_2SO_4$]에 접종하고 30°C에서 2일 동안 진탕 배양 후, 유도배지(10 mM glucose, 0.205% K_2HPO_4 , 0.145% KH_2PO_4 , 0.015% NaCl, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01% $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.00025% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% $(NH_4)_2SO_4$, 0.5% glycerol, 200 μ M acetosyringone, 40 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid)에 세포밀도가 0.5가 되도록 희석하고 같은 조건에서 3시간 동안 더 배양한 후, 동일한 부피의 큰느타리버섯 자실체와 혼합하여 vacuum infiltration 하였다[13]. 그 후 acetosyringone (200 μ M) 및 kanamycin (50 mg/mL)를 함유하고 3 MM filter paper (Whatman, USA)가 깔려진 PDA 유도배지에 vacuum infiltration이 끝난 자실체를 옮겨준 뒤, 28°C에서 2일동안 공동배양(co-cultivation)하였다. 공동배양 후 3 MM filter paper에서 자란 자실체를 cefotaxime (200 μ M) 및 kanamycin (50 mg/mL)을 포함하는 PDA 배지로 옮겨 *A. tumefaciens*를 제거하였고 상기의 PDA 배지에서 자란 큰느타리버섯의 균사체를 PCR 분석을 통해 형질전환체 clone을 선별하였다.

형질전환체 균사체 배양

재조합벡터 pPEVPR1b-Fer을 함유하는 형질전환체는 PDA 고체배지에서 균사를 완전히 성장시킨 다음, 0.5 cm^2 크기로 절단 후 PDB 액체배지에 접종하여 배양한 후, batch culture를 통한 페리틴 발현 최적화 조건을 확립하기 위하여 500 mL 플라스크에 100 mL MCM 배지를 넣고 균사체 배양액 1%(v/v)를 접종한 후 온도 및 시간에 따른 발현양을 조사하였다. 액상침지 배양은 20 L airlift type fermenter에 antifom A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)가 포함된 MCM 배지 15 L에 균사체를 1% (v/v)로 접종하고 공기유량은 0.5 vvm으로 유지하면서 28°C에서 14일 동안 배양하였다. 시간별로 시료를 수거하여 페리틴 단백질 양을 SDS-PAGE 및 western blot에 의해 분석하였다.

SDS-PAGE 및 western blot 분석

형질전환체 *P. eryngii*를 MCM 배지에 접종 후 25°C에서 시간별로 배양된 균사체를 초음파 처리 완충액 (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM, beta-mercapto ethanol)을 균사체 g당 1 mL로 현탁시키고, 초음파 처리에 의해 분해시킨 후 원심분리(4°C, 15,000 rpm, 5 min)를 이용하여 상층액을 획득하고 같은 부피의 에탄올로 농축 후 얻어진 단백질 pellet을 증류수 20 μ L에 용해

하여 Lammlie[14]의 loading buffer (0.05 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.1 M DTT, 2% SDS, 10% glycerol, and 0.1% bromphenol blue)를 넣고 90°C에서 10 분간 끓여 주었다. 가열된 시료 20 μ L를 SDS-PAGE (sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)로 분획하였다. 또한 western blot 분석을 위하여 Trans-Blot SD apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 SDS-PAGE에서 단백질들을 PVDF membrane으로 이동시킨 다음, TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20)에 skim milk를 5% 농도로 첨가하여 4°C에서 1시간 교반하였다. PVDF membrane을 TBST(3 회, 15 분)로 세척한 후, 1차 항체인 rabbit polyclonal anti-ferritin antibody (1:2000 dilution, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas)와 1시간 반응하고, 결합되지 않은 1차 항체를 TBST(3회, 15분)로 세척한 후, 2차 항체인 horseradish peroxidase – conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology, USA)로 1시간 동안 반응한 다음, ECL™ western blot 검출 시스템 (RPN2109, Amersham Pharmacia Biotech, USA)을 이용하여 이용하여 X-ray 필름에 감광하였다. 그 blot을 스캔하여 Chemilmager™ (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA)로 단백질의 농도를 간접적으로 비교 측정하였다.

Native-PAGE 및 Perls' staining

발현된 페리틴의 생물학적 활성을 조사하기 위하여, 페리틴 분자의 철 결합능은 Perls' staining 방법[15]에 의해 확인되었다. 형질전환체를 초음파 처리 후 원심분리(4°C, 12,000 rpm, 5 min) 하여 상층액을 회수하고 일정량을 western blot용 시료와 Perls' staining용 시료, duplicate를 알콜로 농축하고 원심분리(4°C, 15,000 rpm, 10 min)후 단백질 pellet을 얻어 건조한 다음, 얻어진 단백질 pellet에 SDS와 DTT를 포함하지 않는 loading buffer를 현탁하여 7.5% non-denaturing polyacrylamide gel (native gel)에서 전기영동을 수행하였다. 그 후 native gel은 solution A (1 mL HCl in 24 mL DW)와 solution B (1 g potassium ferricyanide in 25 mL DW)의 혼합액에서 15분간 염색하고 물로 여러 번 세척한 다음, DAB (Diaminobenzide) 기질 용액 (25 mg DAB, 2.5 mL 1 M Tris-HCl, pH 7.5, and 40 μ L of H₂O₂ in total volume 50 mL)과 30분간 반응하여 철분을 함유하는 페리틴 중합체의 불용성 진한 갈색 band를 확인하였다.

육계를 이용한 field test

20 L fermenter를 이용하여 페리틴 유전자가 도입된 형질전환체를 MCM 배지에서 8일동안 대량 배양한 다음, 균사체를 원심분리에 의해 회수한 후 초음파 처리에 의해 균질화하고, SDS-PAGE 및 western blot 분석에 의해 단백질을 확인하고 정량하였다. 그 후 얻어진 균질화 추출액 내에 페리틴 단백질을 PBS buffer (139 mM NaCl, 10 mM phosphate, 2.7 mM KCl, pH 7.4)로 희석하고 최종적으로 투여농도(10 mg/kg of wheat sorts)에 맞도록 말분(wheat sorts, 대한제분, Korea)과 섞어 혼합한 후 열풍건조기에 의해 파우더 형태의 사료첨가제를 제조하였다. 자동급수 시설을 갖춘 육계농장(경북 김천시)의 협조를 받아 본 사료에 파우더를 첨가하는 방식으로 투여하여 페리틴 첨가에 의한 사육기간 동안의 폐사율, 증체량, 사료요구율(FE, feed efficiency) 및 생산지수(PI, production index)를 산출하여 대조군과 비교하였다[16].

결과 및 고찰

재조합 발현벡터 구성

식물용 발현벡터인 pPEV vector (Takara, Japan)는 CaMV 35S promoter, 35S 5'-UTR 및 3'-UTR, BamHI cloning site, NOS-terminator를 가지고 있으며, 이 벡터에 pathogen related protein (PR1b)의 분비신호서열(32아미노산)이 도입된 pPEVPR1b 벡터[9]를 모벡터로 사용하여 페리틴 유전자를 도입하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, 페리틴 mature form 유전자가 도입되어진 T-Fer[8]를 EcoRI 과 HindIII로 자른 다음 Klenow 효소를 처리하여 cohesive end를 filling하고 아가로스 젤에서 분획한 다음, 0.5 kb 단편의 페리틴 유전자를 elution하여 확보하였다. 발현 및 분비벡터는(pPEVPR1b) BamHI로 절단한 다음 Klenow 효소를 처리하여 filling한 후, agarose 겔에서 분획하여 페리틴 유전자와 ligation시켜 E. coli XL-1 Blue MRF로 형질전환하였다. 항생제에 의해 선별된 형질전환체들로부터 plasmid들을 추출하여 DNA size 선별 및 염기서열 분석에 의해 확인 후 pPEVPR1b-Fer (11.8 kb)로 명명하였다. 대장균에서 Sambrook 등[10]의 방법에 의해 유전자를 증폭한 후, A. tumefaciens로 freeze-thaw 방법[11]에 의해 재조합벡터를 도입하여 PCR에 의해 도입된 0.5 kb 페리틴 유전자를 확인하였다(data not shown).

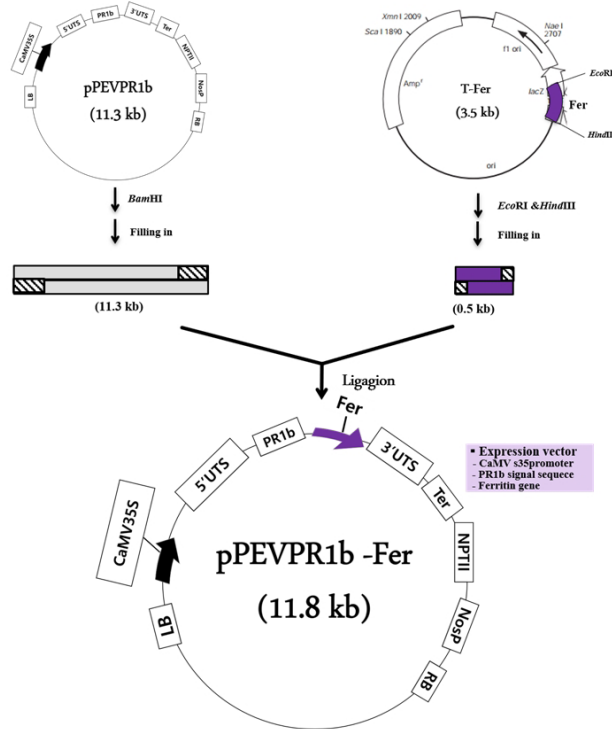


Fig. 1. Construction strategy of the recombinant vector, pPEVPR1b-Fer harboring ferritin gene.

ATMT 형질전환 및 형질전환체 검색

큰타리버섯으로 형질전환은 pPEVPR1b-Fer을 함유하는 *A. tumefaciens*를 사용하여 자실체와 공동배양에 의해 시도되었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 공동배양 후 PDA 유도배지(Kanamycin 및 Acetosyringone)에서 *Agrobacterium*의 virulence 관련 유전자를 유도하고, Kanamycin과 cefotaxime (200 uM)을 함유하는 1차 선별배지에서 도입되지 않은 *Agrobacterium*을 제거한 다음, Kanamycin 항생제 배지에서 2차 선별하였다. 그 결과 선별된 형질전환체(27 clones)로부터 genomic DNA를 추출하여 페리틴-특이적 primer를 사용하여 PCR한 결과 27개 형질전환체 중에서 22개 형질전환체에서만 페리틴 유전자가 증폭되어 확인되었다 (Fig. 2). 또한 22개 형질전환체들의 단백질을 분석한 결과 17개 형질전환체에서만 페리틴 단백질이 확인되었으며 이는 유전자 도입과정 동안 염색체 DNA와 재조합 과정에서 이상현상이나 또는 gene silencing 현상에 의한 것으로 추정된다[17]. 페리틴 발현 형질전환체 중 transformant 7번을 이용하여 10 mL MCM 배지에서 발현을 시간별로 유도하고 SDS-PAGE 및 western blot 분석 결과, 형질전환된 *P. eryngii* 균사체에서 18.2 kDa의 분자량을 갖는 특정 밴드가 관찰되었으며, non-transformant에서는 페리틴 band가 보이지 않았다. 발현된 페리틴의 단백질 크기는 32개의 아미노산으로 구성된 PR1b 분비신호서열이 제거되지 않았다면 21.7 kDa이지만 SDS-PAGE 및 western blot 결과 positive ferritin 단백질의 크기 18.2 kDa과 같은 위치에 있는 것으로 보아 peptidase에 의해 발현된 단백질의 signal sequence가 정확하게 제거된 것으로 예상되며 세포막과 세포벽 사이의 apoplast에 페리틴 단백질이 분비된 것으로 추정된다. 또한 pPEVPR1b-Fer 함유 *P. eryngii* 형질전환체에서 발현된 페리틴 단백질은 전체 단백질 중 3일째 약 14%, 7일째 약 15%, 10일째 16.3%가 발현된 것을 확인할 수 있다(Fig. 3). 다음으로 페리틴 단백질을 발현하는 형질전환체 7번을 이용하여 100 mL batch culture에서 발현 최적화 조건들을 조사하였다.

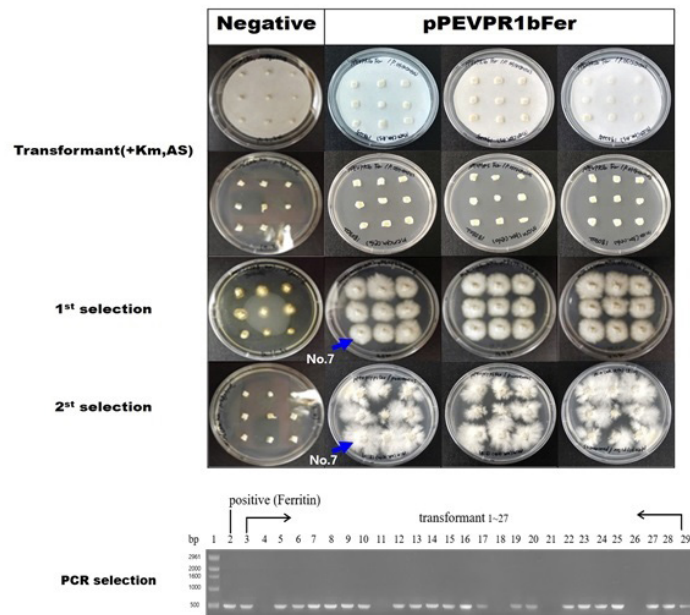


Fig. 2. Selection of right transformants on PDA medium with kanamycin and cefotaxim after co-cultivation. The genomic DNAs were extracted from the transformants and amplified by PCR using ferritin-specific primer. The arrow indicates No.7 transformant.

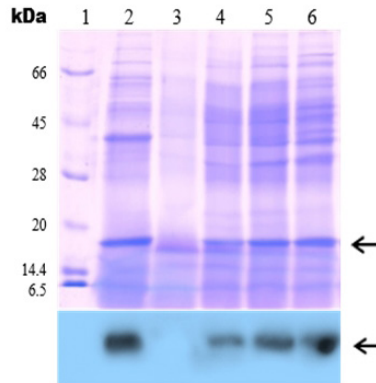


Fig. 3. Expression patterns of the ferritin from *Pleurotus eryngii* harboring pPEVPR1b-Fer vector. The transformant 7 was grown during 10 days in 10 mL of MCM medium. Lane 1, MW maker; lane 2, Ferritin (positive control); lane 3, Control (*P. eryngii* only); lane 4, pPEVPR1b-Fer (3 days); lane 5, pPEVPR1b-Fer (7 days); lane 6, pPEVPR1b-Fer (10 days). The arrows indicate the position of the ferritin.

Batch culture에 의한 페리틴 단백질 발현 최적화

Cauliflower mosaic virus의 35S promoter는 일반적으로 식물체에서 사용되는 promoter들보다 전사활성이 약 10배 정도 강하고, 유도발현이 아닌 일정한 수준으로 외래 유전자의 전사 및 단백질을 발현 시키는 promoter이다. 따라서 본 연구에서도 35S promoter와 분비신호서열을 갖는 pPEVPR1b-Fer 벡터를 함유하는 *P. eryngii*를 batch (100 mL medium in 500 mL flask) culture 및 submerged fermenter (20 L)를 이용하여 발현 최적화 조건을 조사하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 형질전환된 *P. eryngii* 균사체를 10일 동안 회분식 배양(batch culture) 결과, 페리틴 단백질은 배양시간에 따라 증가하였으며 배양 7일째 가장 높게 발현 되었으며, 30°C에서 보다는 25°C에서 평균적으로 약 2-3.5배 이상 발현이 증가한 것으로 나타났다. 이는 배양 시간 및 배양온도 증가에 따른 단백질 분해효소의 활성화에 의해 기인하는 것으로 추정된다[17].

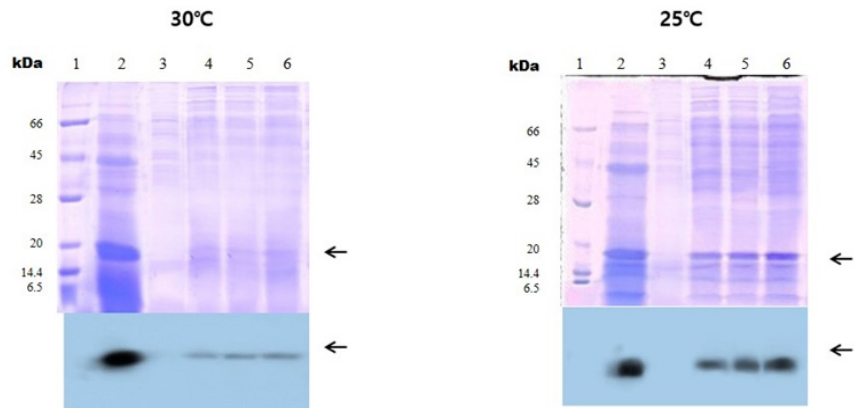


Fig. 4. Expression changes of ferritin protein from *Pleurotus eryngii* harboring pPEVPR1b-Fer vector by culture condition. The transformant 7 was grown during 10 days in 100 mL of MCM medium at 30°C (Left) and 25°C (Right), respectively. Lane 1, MW maker; lane 2, Ferritin (positive control); lane 3, Control (mycelia of *P. eryngii*); lane 4, pPEVPR1b-Fer (3 days); lane 5, pPEVPR1b-Fer (7 days); lane 6, pPEVPR1b-Fer (10 days). The arrows indicate the position of the ferritin.

Fermenter를 이용한 형질전환체의 배양 및 발현

회분식배양(100 mL MCM 배지)에서 페리틴 생산 최적화에 의해 확립된 조건에 따라 20 L airlift type fermenter를 이용하여 페리틴 단백질의 대량 생산을 통한 산업화 가능성을 타진하기 위하여 20 L fermenter에서 액상침지 배양을 시도하였다. Seed 배양으로 형질전환체 *P. eryngii* 균사체를 25°C, 100 rpm으로 MCM 배지(100 mL)에서 7일 동안 배양한 다음, 균사체 배양액(1%, v/v)을 15 L의 MCM 배지가 들어있는 20 L airlift type fermenter로 접종하여 14일 동안 배양하면서 세포밀도(세포중량) 및 pH 변화, 페리틴 발현률 등을 조사하였다. Fig. 5와 Table 1에서 보는 바와 같이 균사체의 무게는 4일부터 급격하게 증가하여 배양시간에 비례하면서 14일째에 wet weight (28.5 g/L) 및 dry weight (14 g/L)를 보였다. 발현된 페리틴 단백질의 발현 수준은 14일 배양 기간 중 8일째에 전체단백질의 21.4%로 페리틴 발현량이 가장 높았으며(2.4 mg/g 균사체), 8일 배양이 지나면서 점차 감소하는 경향을 보였다 (Table 1, Fig. 5). 또한 pH는 초기에 6.8에서 14일 배양 후에는 5.86으로 감소는 하였지만 pH 변화가 전체 단백질 양 및 균사체 양에는 크게 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 페리틴 발현량은 배양액의 pH 변화에 의해 의존하는 것으로 보이며, pH 변화는 균사체의 단백질 분해효소 시스템에 영향을 줄 수도 있고 또한 균사체 pellet 크기에 영향을 줌으로써 산소 공급에 영향을 주어 단백질 발현에 변화가 일어날 수 있다고 보고되었다[18].

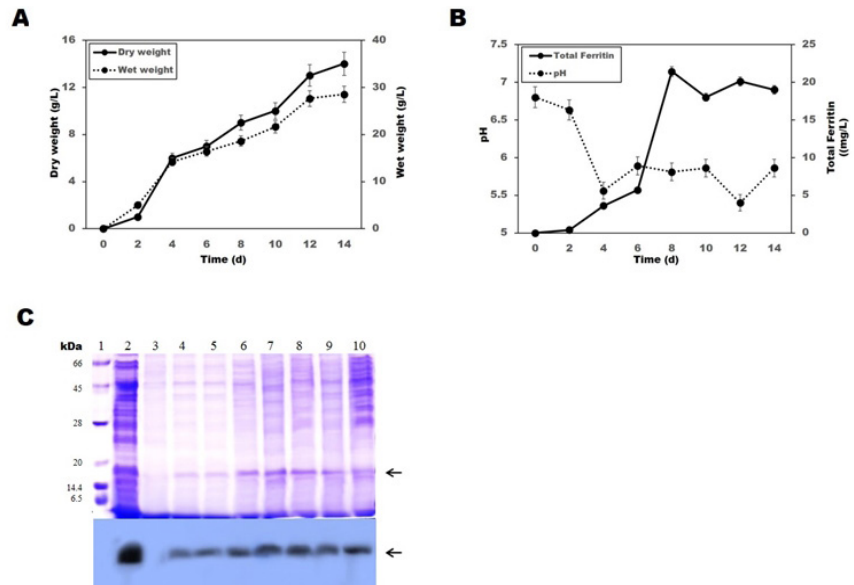


Fig. 5. Time profile of mycelial production and expression patterns of ferritin from transgenic *Pleurotus eryngii* mycelia at 25°C in 20 L fermenter. A, Dry weight and wet weight; B, pH variation and amount of total ferritin; C, 12% SDS-PAGE and western blot analysis. Lane 1, MW maker; lane 2, Ferritin (positive control); lane 3, pPEVPR1bFer (0 day); lane 4, pPEVPR1b-Fer (2 days); lane 5, pPEVPR1b-Fer (4 days); lane 6, pPEVPR1b-Fer (6 days); lane 7, pPEVPR1b-Fer (8 days); lane 8, pPEVPR1b-Fer (10 days); lane 9, pPEVPR1b-Fer (12 days); lane 10, pPEVPR1b-Fer (14 days). The arrows indicate the position of the ferritin.

Table 1. Time profile of pH, biomass, total protein, and amount of total ferritin during mycelial production of *Pleurotus eryngii* harboring pPEVPR1b-Fer in 20 L airlift type fermenter

Time (day)	pH	Wet weight (g/L)	Dry weight (g/L)	Total protein (g/L)	Expression ferritin (%)	Total ferritin (mg/L)	Total ferritin (mg/g mycelia)
0	6.80	-	-	-	-	-	-
2	6.63	5.0	1	3	15.6	1.8	0.4
4	5.56	14.2	6	21	16.8	3.6	0.6
6	5.89	16.4	7	36	15.9	5.7	0.8
8	5.81	18.6	9	130	16.5	21.4	2.4
10	5.86	21.6	10	120	15.0	18.0	1.8
12	5.40	27.6	13	138	14.6	20.1	1.5
14	5.86	28.5	14	137	13.9	19	1.4

페리틴의 생물학적 활성

대부분의 페리틴은 고분자량의 multimer 단백질(24 subunits)을 형성하여 분자 중심에 형성된 내공(core)에는 옥시하이드로사이드 폴리머(oxyhydroxide polymer)가 있어 내부 표면의 여러 지점에서 3가 철(Fe^{3+})과 결합하여 철-단백질 상호작용하는 경계면을 형성하며, 4,500 개의 철 원자를 함유할 수 있으며 또한 분자 당 헤모글로빈 1,200 분자를 생합성 할 수 있다[19-21]. 큰타리버섯에서 발현된 monomer 형태의 페리틴이 24개 subunit으로 구성된 multimer를 형성하고, 또한 철 결합능을 가지고 있는지 조사하기 위하여, SDS 와 DTT를 포함하지 않는 non-denaturing gel (7.5%)에서 분획한 결과, Fig. 6에서 보는 바와 같이 고분자량 위치인 436 kDa 크기에서 페리틴이 확인되었으며, 철분을 함유하는 페리틴 중합체 형태는 DAB (diaminobenzide) 기질에 의한 염색 후 진한 갈색을 보이는 band로 나타나 철을 결합하는 활성도 유지하고 있는 것으로 분석되었다(Fig. 6). 결과적으로 발현된 페리틴은 24개의 subunit으로 구성된 큰 구형의 거대분자를 형성하고 이때 생긴 내부 공간에 철 원자를 축적할 수 있고, 또한 헥사시아노철산염 이온($K_4Fe(CN)_6$)이 페리틴 중합체의 내부공간에 존재하는 3가 철 (Fe^{3+})과 결합하여, 군청색의 불용성 색소인 prussian blue로 알려진 potassium ferric ferrocyanide를 형성한다. 이는 생명체에 유해한 2가 철 이온(Fe^{2+})은 3가 철이온처럼 prussian blue 반응을 하지 않으므로 페리틴 중합체는 3가 철이온을 포집하는 것을 의미하며 큰타리버섯에서 발현된 페리틴이 생물학적 활성을 갖는 것으로 사료된다.

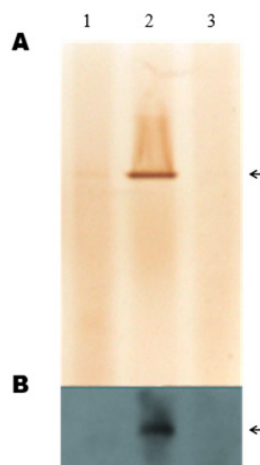


Fig. 6. Perls' staining of the ferritin protein in 7.5% Native-PAGE and western blot analysis. (A) Perls' staining. Lane 1, *Pleurotus eryngii* (control); lane 2, pPEVPR1b-Fer (mycelia); lane 3, pPEVPR1b-Fer (supernatant) (B) western blot. The arrows indicate the position of the ferritins.

육계 필드시험

페리틴 유전자가 도입된 *P. eryngii*를 대량 배양하여 원심분리에 의해 균사체를 회수하여 발현된 페리틴 양을 측정함 다음, 파우더 형태의 사료첨가제를 제조하여 자동급수 시설을 갖춘 육계농장의 협조를 받아 페리틴 함유 사료첨가제의 생물학적 활성을 측정하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 파우더 형태의 페리틴을 투여한 육계시험의 경우, 대조구 및 시험구의 경우 각각 510 및 494 마리의 병아리를 사용하였고, 병아리가 입고된 직후부터 출고 전까지 본 사료에 0.1% 정도 혼합하여 투여하였다. 출고시 전체중량(TBW)은 시험구의 경우 778 kg(대조구 737 kg)이고, 한 마리당 평균체중은 시험구는 1.60 kg으로 대조구 1.52 kg 보다 6.5% 정도 증체 효과를 나타냈다. 일당 체중 증가율은 시험구에서 53 g이었고, 대조구의 경우 50 g으로 시험구에서 조금 높게 나타났으며, 시험구에서는 전체 사료량이 1,252 kg(2.58 kg/수) 소모되었고, 대조구에서는 1,312 kg(2.7 kg/수) 소진되었다. 전체적인 사료요구율은(FE)은 시험구에서 1.52, 대조구의 경우 1.60로서 시험구에서 약 5.3% 정도 개선된 효과를 보이는 것으로 나타났다. 또한 생산지수(PI)의 경우 시험구에서는 321이며, 대조구에서는 268으로 생산성이 약 19.7% 정도 증가한 것으로 나타났다. 사육기간 동안 페리틴 투여군에 있어서 무게변화는 4주째 들어가면서 크게 증가하였고 또한 사료섭취량도 비례하여 증가하였다(Table 2). 초기에 입하된 병아리 평균 체중이 사육기간 30일동안 42 g에서 시작하여 출하 시 평균체중이 1.60 kg으로 1,558 g 증가하였으며, 한 마리가 평균적으로 먹는 사료 양은 2,474 g으로 측정되었다. 따라서 시험구 485 마리의 육계 사육에 필요한 사료 총 양은 1,252 kg이 필요하였으며, 페리틴 파우더(10 mg/kg 말분)는 약 1.25 kg이 필요한 것으로 나타났다. 전체적으로 볼 때 육계 사육농장의 환경 조건 및 입수되는 병아리의 초기 건강상태에 따라, 또는 페리틴의 파우더 형태의 성상에 따라 약간의 성장효과에 있어서 차이는 있지만 전반적으로 육계 사육에 좋은 성장 효과를 보이는 것으로 나타났으며, 이는 철분 단백질에 의한 원활한 산소 공급에 의해 신진대사 촉진 효과라고 추정된다[22]. 따라서 대량생산을 통하여 충분한 양을 확보한 다음 파우더 형태의 사료첨가제를 제조하여 육계에 투여하였을 때 체중증가, 사료요구율 및 생산지수 등이 크게 증가하였고, 이는 사료첨가제로서 충분한 경쟁력을 가질 수 있고 또한 철 결핍 예방 치료를 위한 의약소재산업 및 식품산업 등의 다양한 분야에서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 전망된다.

Table 2. Field test for biological activity of ferritin (powder type) in farm animal (chicken broiler)

Sample	No. Input animal	Culturing Period (Days)	No. Output animal	Rate of Survival (%)	TBW (kg)	ABW (kg)	ADG (g)	TFI (kg)	FE	PI
Control group	510	30	484	94.0	737	1.52	50	1,312	1.78	268
Treated group	495	30	485	97.0	778	1.60	53	1,252	1.61	321

Powder containing ferritin (10 mg ferritin/kg wheat sorts) was supplied to final concentration of 0.1% in main feed after input. ADG(average daily gain): ABW(average body weight) / Culturing Period; FE(feed efficiency): TFI(total feed intake) / TBW(total body weight); PI(production index): (ABW x Rate of Survival) / (FE x Culturing Period) x 100.

적요

큰느타리버섯에서 철 저장과 관련된 페리틴 단백질의 발현 및 분비를 최적화하기 위해, T-Fer 벡터에 EcoRI 및 HindIII처리를 해 페리틴 유전자를 얻은 후, BamHI으로 처리된 선형의 pPEVPR1b 분비 벡터에 클로닝하여 pPEVPR1b-Fer 재조합 벡터를 구축한 다음 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 로 도입하였다. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation 방법에 의해 *Pleurotus eryngii*로 형질전환하고 kanamycin함유된 MCM 배지에서 올바른 형질전환체를 선별하였고, 단백질 발현은 SDS-PAGE 및 항원항체 반응에 의한 western blot으로 확인하였다. 페리틴 단백질의 분비 발현은 batch culture 및 20 L airlift type fermenter에서 배양 시간 및 온도와 같은 배양 조건에 의해 최적화되었다. 페리틴 생산을 위한 배양 조건은 MCM 배지에서 25°C 및 8 일 배양에 의해 최적화되었다. 페리틴 단백질의 양은 정량적 단백질 분석에 의해 2.4 mg/g mycelium으로 측정되었다. 그러나, PR1b (32 amino acid)의 분비서열은 큰느타리버섯 내부의 peptidase에 의해 정확하게 processing되지 않았지만, 페리틴 단백질은 균사체에서 최대로 전체단백질의 24.7% 발현되었고, 배양액에서는 검출되지 않았다. 철 결합 활성은 7.5% non-denaturing gel에서 Perl's staining에 의해 확인되었으며, 다량체 페리틴(24 subunits)이 *P. eryngii* 균사체에서 형성되었음을 보여준다. 생물학적 활성 측정을 위하여 페리틴을 함유한 분말을 제조하여 육계의 사료 첨가제로서의 사용 가능성에 대해 시험하였으며, 결과적으로 페리틴은 육계의 성장을 촉진하고 사료 효율 및 생산 지수를 향상시키는것으로 확인되었다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Daegu University Research Scholarship Grants.

REFERENCES

- Rodriguez Estrada AE, Royse DJ. Yield, size and bacterial blotch resistance of *Pleurotus eryngii* grown on cottonseed hull/oak sawdust supplemented with manganese, copper and whole ground soybean. *Bioresour Technol* 2007;98:1898-906.
- Zadrazil F. Mushroom Science IX (Part I). In proceedings of the 9th international scientific congress on the cultivation of edible fungi; 1974. p. 621-52.
- Alexander D, Goodman RM, Gut-Rella M, Glascock C. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:7327-31.
- Jeong BR, Chung SM, Baek NJ, Koo KB, Baik HS, Joo HS, Chang CS, Choi JW. Characterization, cloning, and expression of the ferritin gene from the Korean polychaete, *Periserrula leucophryna*. *J Microbiol* 2006;44:54-63.
- Bundock P, Dulk-Ras AD, Beijersbergen A, Hooykass PJJ. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 1995;14:3206-14.
- Hooykaas PJJ, Snijdwindt FGM, Schilperoort RA. Identification of the sym plasmid of *Rhizobium leguminosarum* strain1001 and its transfer to and expression in other rhizobia and *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* 1982;8:73-82.
- Wei X, Zhu C, Zhu B. An efficient and stable method for the transformation of heterogeneous

- genes into *Cephalosporium aceremonium* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotechnol* 2005;15:683-88
8. Choi JW. Secretion of ferritin protein of *Periserrula leucophyryna* in *Bacillus subtilis* and its feed efficiency. *KSBB J* 2016;31:105-12.
 9. Park HS, Choi JW. Functional expression of bovine growth hormone gene in *Pleurotus eryngii*. *Biotechnol Bioproc Eng* 2014;19:33-42.
 10. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning, a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. p. 541-8.
 11. Holster M, Waele DD, Depicker A, Messens E, van Montagu M, Schell J. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet* 1978;163:181-7.
 12. Michielse CB, Salim K, Ragas P, Ram AF, Kudla B, Jarry B, Punt PJ, van den Hondel CA. Development of a system for integrative and stable transformation of the zygomycete *Rhizopus oryzae* by *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Mol Genet Genomic* 2004;271:499-510.
 13. Chung SJ, Kim S, Sapkota K, Choi BK, Shin C, Kim SJ. Expression of recombinant human interleukin-32 in *Pleurotus eryngii*. *Ann Microbiol* 2011;61:331-8.
 14. Lammlie UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
 15. Perls M. Nachweis von eisenoxyd in gweissen pigmenten. *Archiv F Pathol Anat* 1867;39:42-8.
 16. Owens FN, Secrist DS, Hill WJ, Gill DR. The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle. *J Anim Sci* 1997;75:868-79.
 17. Farran I, Sanchez-Serrano JJ, Medina JF, Prieto J, Mingo-Castel AM. Targeted expression of human serum albumin to potato tubers. *Transgenic Res* 2002;11:337-46.
 18. Punt PJ, van Biezen N, Conesa A, Albers A, Mangnus J, van den Hondel C. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol* 2002;20:200-6.
 19. Massover WH, Cowley JM. The ultrastructure of ferritin macromolecules, the lattice structure of the core crystallites. *Proc Natl Acad Sci* 1973;70:3847-51.
 20. Banyard SH, Stammers DK, Harrison PM. Electron density map of apoferritin at 2.8-Å resolution. *Nature* 1978;271:282-4.
 21. Yang CY, Meagher A, Huynh BH, Sayers DE, Theil EC. Iron(III) clusters bound to horse spleen apoferritin: an X-ray absorption and mossbauer spectroscopy study that shows that iron nuclei can form on the protein. *Biochemistry* 1987;26:497-503.
 22. Theil EC. Ferritin: structure, gene, regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annu Rev Biochem* 1987;56:289-315.