

Expression of Antimicrobial Peptide (AMP), Moricin Using SUMO Fusion Tag in *Escherichia coli*

Dong-gyu Ahn^{1,2}, Sun Ill Park¹ and Soon Young Kim^{1*}

¹Department of Biological Sciences, Andong National University, Andong 36729, Korea

²Foreign Animal Disease Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Korea

Received October 5, 2022 /Revised November 21, 2022 /Accepted November 22, 2022

Plant Chloroplast have several advantages as an expression platform of biopharmaceuticals over conventional expression platforms such as mammalian cells, yeast and bacteria. First, plants do not serve as a host for mammalian infectious virus and have endotoxin like bacteria which can cause anaphylactic shock. In addition, high copy number of chloroplast genome allows for chloroplast transformants to reach the high level of expression of heterologous genes. Moreover, the integration of transgenes into specific region of chloroplast genomes makes chloroplast transformants unaffected by positional effect which can be frequently observed from nuclear transformants, resulting in loss of transgene expressions. Antimicrobial peptides (AMPs) are a kind of innate immunity which is found from bacteria to humans. Unlike conventional antibiotics, very less dosage of AMPs can have catastrophic effect on bacterial survival. Further, the repeated use of AMPs does not trigger the development of bacterial resistance. Moricin, one of the AMPs, was isolated from *Bombyx mori*, a silkworm moth. The C-terminal of moricin consists largely of basic amino acids, and the N-terminal has an α -helix structure. Moricin was chosen and expressed in a SUMO/SUMOase without leaving any unwanted amino acids which could potentially affect the anti-bacterial activity of the moricin. The transformation vector used in this study has already been created in this lab for the expression in both prokaryotic systems such as *E. coli* and chloroplast. The expressed moricin was purified using Ni columns and SUMOase, and the antibacterial activity of the purified moricin was confirmed using an agar diffusion assay.

Key words : Antimicrobial peptide, chloroplast, *Escherichia coli*, moricin, small ubiquitin-related modifier (SUMO)

서 론

재조합 단백질은 박테리아, 효모, 동물 세포, 식물 등 다양한 생물을 이용하여 생산할 수 있으며, 단백질의 활성, 순도, 생산 속도 및 비용 등을 고려하여 생산 방법을 선택한다[14]. 일반적으로 *E. coli*, 효모, 동물 세포주 등을 이용하여 단백질을 생산하지만 이들은 몇 가지 단점이 있다. *E. coli*에서 생산되는 단백질은 진핵생물과 달리 제한적인 glycosylation만 일어나고, 세균 내부의 독소로 오염될 위험이 있다. 효모는 chaperone을 필요로 하여 단백질의 생산에 어려움이 있다. 동물 세포주는 배양 시설의 유지 관리 및 생산된 단백질의 추출과 정제 등에 많은

비용이 들며, 인체에 유해한 세균이나 바이러스에 의한 생산시설의 오염이 일어날 수 있다[6, 17].

식물에서 단백질을 생산할 경우 다른 생산 방법들보다 빠르고 많은 양의 재조합 단백질을 생산할 수 있다[13, 29]. 또한 식물은 물과 햇빛, 무기영양소만으로 키울 수 있기 때문에 생산 비용이 절감되며, 식물은 내독소(endotoxin)를 생산하지 않고, 인체에 유해한 바이러스는 식물을 숙주로 이용하지 않기 때문에 식물에서 생산된 단백질은 오염될 위험이 낮다[6, 21].

식물에서 단백질을 생산하는 방법은 핵 형질전환 방식과 엽록체 형질전환 방식이 있다. 엽록체는 많은 양의 유전자가 복제되기 때문에 핵 형질전환 방법에 비해 엽록체 형질전환 방법은 많은 재조합 단백질을 생산할 수 있다[12]. 엽록체 유전체는 핵 유전체와 달리 모계유전 되기 때문에 삽입된 외래 유전자가 꽃가루로 전파되지 않아, 자연 환경으로 유전자가 유출될 위험이 낮다[13, 18]. 핵 형질전환은 유전자가 무작위 위치에 들어가고, 들어가는 위치에 따라 발현에 영향을 미치지만, 엽록체 형질전환은 상동재조합을 이용하여 유전자가 특정 위치에 삽입되기

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5647, Fax : +82-54-820-7705

E-mail : kimsy@anu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

때문에 일정한 발현량을 얻을 수 있다. 또한 엽록체는 원핵세포와 유사하기 때문에 오픈된 기작을 이용하여 동시에 여러 유전자를 발현시킬 수 있다[29].

일반적으로 재조합 단백질을 발현시킬 때 세포 내부에서 단백질이 분해되거나, 혹은 용해도나 활성이 떨어져서 추출에 어려움이 있다. 또한 서로 뭉치게 되는 봉입체 형성이 일어날 수 있다. 이를 완화시키기 위하여 융합 단백질 기술을 이용하면 발현량과 용해도 등이 향상되어 정제가 용이하며, 자연적으로 분해되는 단백질 양을 줄일 수 있다[16, 27, 28]. Small ubiquitin-like modifier (SUMO) 단백질은 세포의 다른 단백질에 공유결합으로 결합 및 분리되는 단백질군으로, 수모화(SUMOylation)를 통해 단백질 안정성에 도움을 준다[10].

단백질 분해효소는 아미노산 서열을 인식하여 단백질을 자르는 반면 SUMO 단백질 분해효소(SUMOase)는 3차 구조를 인식하여 자르기 때문에 정확하고 효율적으로 제거할 수 있다[1, 3, 23]. 또한 SUMO는 진핵생물에 있는 단백질로, 식물에서 단백질을 발현시킬 경우 재조합 단백질의 SUMO가 식물 내부에 있는 SUMOase에 의해 바로 제거될 수 있다[15]. 일반적으로 유전자를 엽록체에서 발현시키기 전 *E. coli*에서 단백질 발현 유무를 확인하는데, 이는 식물 엽록체와 *E. coli*의 전사 및 번역 기작이 유사하기 때문이며[5], 또한 융합 단백질로 사용한 SUMO가 *E. coli*에 대한 항균펩타이드의 독성을 완화시키기 때문이다[19, 20, 30].

곤충에 있는 항균펩타이드는 선천 면역으로 작용하며, 적은 양으로도 항균활성을 나타낸다[12, 25]. 기존의 페니실린과 같은 항생제는 내성균이 생기기 쉬운 반면, 항균펩타이드는 내성에 대해 큰 저항성을 갖기 때문에 새로운 치료제로 주목받고 있다[12, 21, 26]. Moricin은 66개의 아미노산 잔기로 구성된 항균펩타이드로, 누에나방의 한 종류인 *Bombyx mori*에서 분리되었다[8]. Moricin은 다른 항균펩타이드와 마찬가지로 높은 염기성을 나타내며 이는 세포막을 변형시켜 항균펩타이드가 박테리아에 더 잘 붙을 수 있게 해준다[8, 12]. 또한 moricin은 특이하게 C 말단에 염기성 아미노산이 모여 있고, N 말단에는 α -helix 구조를 가지고 있어서 박테리아의 세포막에 붙어 막을 용해한다[8, 11].

*E. coli*는 오랜 기간 동안 재조합 단백질 발현에 이용되어 왔다. *E. coli*에서의 발현은 다른 숙주에 비해 저렴하고 조작이 간편하다[7]. 엽록체의 유전 물질의 구조가 박테리아와 공통점이 많은데, 특히 엽록체 유전자의 promoter와 polymerase가 *E. coli*와 매우 유사하다고 제시되었다[2, 5]. 본 연구실에서는 이미 *E. coli*와 엽록체에서 단백질을 생산할 수 있는 벡터를 제작하였다[16]. 본 연구에서는 이 벡터를 이용하여 조작이 간편한 *E. coli*에 moricin 유전자를 삽입한 후 moricin의 발현을 확인하고, 발현된 moricin

의 항균활성을 확인하였다. 이 연구 결과를 바탕으로 담배 잎의 엽록체를 형질전환시켜 moricin을 대량 생산할 수 있을 것으로 예상된다.

재료 및 방법

발현 벡터

본 실험에서 사용된 발현 벡터는 엽록체에 삽입되어 작동할 수 있는 promoter와 terminator를 가지고 있는 pKSEC1으로 XbaI과 NdeI를 처리하여 moricin 유전자를 6xHisSUMO와 함께 융합시켰다[16].

*E. coli*에서 6xHisSUMO-moricin의 발현 확인

6xHisSUMO-moricin-pKSEC1로 형질전환된 *E. coli* BL21을 ampicillin과 spectinomycin이 함유된 Terrific Broth (Sigma-Aldrich, USA)에서 37°C에서 18시간 동안 배양하였다. 원심분리(8,000 rpm, 4°C, 3분)하여 세포를 수집하고 lysis buffer (pH 7.6, PBS, 1 mg/ml Lysozyme, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF)로 현탁하였다. 부유된 *E. coli*를 초음파 분쇄기로 세포막을 깨고, 4°C, 13,000 rpm으로 10분 동안 원심분리 하여 상층액 부분에 있는 수용성 단백질을 얻은 후 Bradford Reagent (Sigma Aldrich, USA)를 사용하여 단백질 농도를 정량하였다. 15% polyacrylamide gel에 준비된 단백질을 넣고 SDS-PAGE를 진행한 뒤, PVDF membrane에 단백질을 이동시켰다. 상온에서 membrane에 5% skim milk 용액을 1시간 동안 섞고, 1차 항체(His-probe, mouse monoclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1:1,000의 비율로 5% skim milk에 희석한 뒤 membrane에 부어 4°C에서 16시간 동안 섞었다. 그 후 TBS-T buffer로 15분씩 3회 세척한 뒤, 2차 항체(mouse anti-rabbit IgG-HPR, Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1:2,000 비율로 5% skim milk에 희석하여 membrane에 부어 1시간 동안 섞었다. 그 뒤 TBS-T로 15분씩 3회 세척하였다. Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences, USA)를 membrane에 3분 동안 처리한 후, C-Digit Blot Scanner (Li-Cor, USA)로 6xHisSUMO-moricin의 발현을 확인하였다.

발현된 moricin의 정제

완성된 재조합 벡터를 BL21 (*E. coli*, competent cell)에 삽입하여 moricin을 생산하는 colony를 선별하였다. LB배지(50 µg/ml spectinomycin, 100 µg/ml ampicillin)에 접종하여 배양한 뒤, lysis buffer (Tris 20 mM, NaCl 300 mM, Imidazole 5 mM)로 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 0.45 µm syringe filter와 0.2 µm syringe filter에 여과시켜 불순물을 최대한 제거한 뒤, His60 Ni Superflow Resin & Gravity Columns (Takara, Japan)를 사용하여 단백질을 분

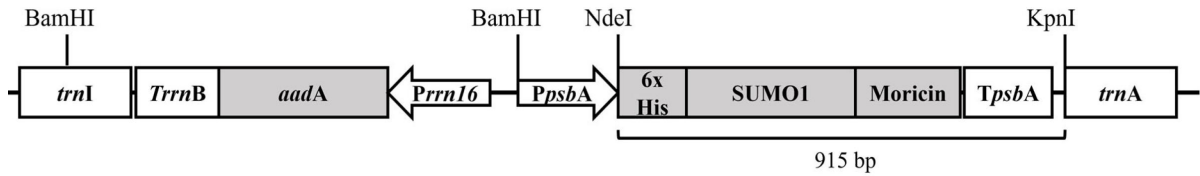


Fig. 1. Schematic diagram of the expression 6xHisSUMO-moricin-pKSEC1. *Prrn16*, 16S rRNA promoter; *aadA*, aminoglycoside 3' adenylyltransferase gene; *TrrnB*, 3' UTR of *E. coli* *rrmB* operon; *PpsbA*, *psbA* promoter and 5'UTR; *TpsbA*, 3' UTR of the *psbA* gene; *trnI*, isoleucyl-tRNA; *trnA*, alanyl-tRNA.

리하였다. 분리된 재조합 단백질의 농도를 측정하고, 단백질에 SUMO Protease (Enzygnomics, Korea)를 30°C에서 1시간 간격으로 최대 6시간 동안 처리하여, 융합 단백질(6xHisSUMO)과 moricin을 분리하였다. 분리된 단백질과 2x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, USA)를 섞어 95°C에서 5분 동안 끓였다. 15% polyacrylamide gel에 준비된 단백질을 넣고 SDS-PAGE를 진행한 뒤, PVDF membrane에 단백질을 옮겼다. Membrane에 5% skim milk 용액을 상온에서 1시간 동안 섞고, 1차 항체(His-probe, mouse monoclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1:1,000의 비율로 5% skim milk에 희석한 뒤 membrane에 부어 4°C에서 16시간 동안 섞었다. 그 후 TBS-T buffer로 15분씩 3회 세척한 뒤, 2차 항체(mouse anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1:2,000 비율로 5% skim milk에 희석한 후 membrane에 부어 1시간 동안 섞었다. 그 뒤 TBS-T로 15분씩 3회 세척하였다. Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences, USA)를 membrane에 3분 동안 처리한 후, C-Digit Blot Scanner (Li-Cor, USA)로 단백질의 발현을 확인하였다.

Moricin의 항균활성 확인

Moricin의 항균활성을 확인하기 위해 agar diffusion assay를 수행하였다[31]. LB배지(1.5 % [w/v] agar)에 *Bacillus subtilis*를 McFarland 1이 되도록 희석하여 면봉으로 도말한 뒤, white tip을 사용하여 배지에 일정한 구멍을 만들었다. 이 구멍에 SUMOase를 처리한 재조합 단백질 20 µl를 첨가하여 37°C에서 18시간 동안 배양하여 투명대(clear zone)를 확인하여 항균활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

발현 벡터에 삽입된 moricin 유전자의 확인

본 연구에서는 moricin을 생산하기 위해 융합 단백질인 6xHisSUMO-moricin을 사용하고[3, 23], 이 융합 단백질을 *PpsbA*와 *TpsbA* 유전자 사이에 넣기 위해서 양 끝에 *XbaI*와 *NdeI*의 제한 효소 자리를 첨가하였다(Macrogen, Korea). Fig. 1에서 제시된 것과 같이 pUC19 벡터에 여러 유전자들을 삽입하여 Kim *et al.* [16]의 방법에 따라 pKSEC1 벡

터를 제작한 후, SDS-PAGE를 수행하여 moricin 유전자가 정확하게 삽입된 것을 확인하였다(Fig. 2).

6xHisSUMO-moricin의 발현 확인

6xHisSUMO-moricin의 6xHis 부분에 항체를 부착하여 Western blot으로 6xHisSUMO-moricin의 발현을 확인하였다(Fig. 3). 6xHisSUMO-moricin의 크기는 19.1 kDa 예측되었고, 대부분 수용액에 존재하였다. 대조군으로 형질전환이 되지 않은 *E. coli*에서는 항체가 부착된 단백질이 발현되지 않았다.

Moricin의 분리 및 항균 활성

형질전환된 *E. coli*에서 6xHisSUMO-moricin을 발현시킨 뒤, His60 Ni Columns (Takara, Japan)을 사용하여 6xHisSUMO-moricin을 분리하였다. 분리한 6xHisSUMO-moricin에 SUMOase를 처리하고 His-probe를 이용하여 western blot을 진행하였다(Fig. 4). SUMOase를 1시간에서 6시간까지 처리한 결과, 1시간에서 모두 잘린 것을 확인하였

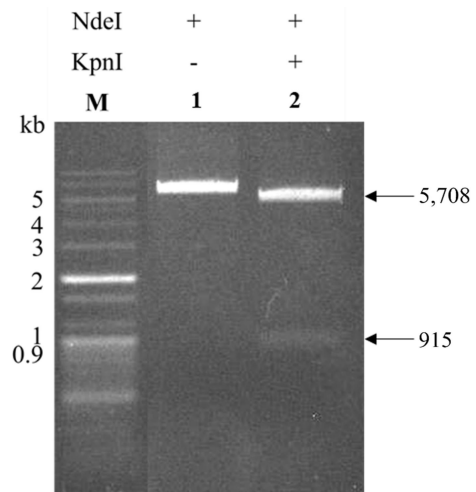


Fig. 2. The expression of 6xHisSUMO-moricin-pKSEC1. M, DNA size marker; Lane 1, cloning of 6xHisSUMO-moricin into pKSEC1 and confirmation of the insertion by a single digestion with *KpnI* (6,623 bp) and by double digestion with *KpnI* and *NdeI* (5,708 bp and 915 bp) in lane 2.

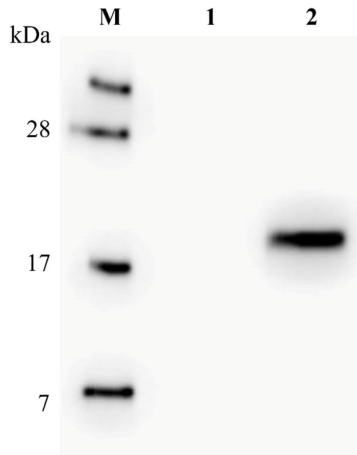


Fig. 3. Analysis of expressed 6xHisSUMO-moricin fusion protein in *E. coli*. The size of the expressed 6xHisSUMO-moricin is about 19 kDa. There is no 6xHis tag proteins in original *E. coli*, and the expressed 6xHisSUMO-moricin is almost presented in soluble part. M, Protein size marker (kDa); Lane 1, Control (*E. coli* protein); Lane 2, 6xHisSUMO-moricin protein.

다. 6xHisSUMO-moricin의 크기는 19.1 kDa이고, SUMOase에 의해 분리된 6xHisSUMO의 크기는 11.9 kDa이며, moricin은 7.1 kDa으로 예측되었다. SUMOase에 의해 분리된 6xHisSUMO의 크기가 17 kDa 보다 작은 크기로 확인되었다. 이 결과는 6xHisSUMO-moricin 이 SUMOase의 작용으로 moricin이 분리되었다는 것을 제시한다[24].

Moricin은 항균펩타이드로 N 말단 부분에 양친매성을

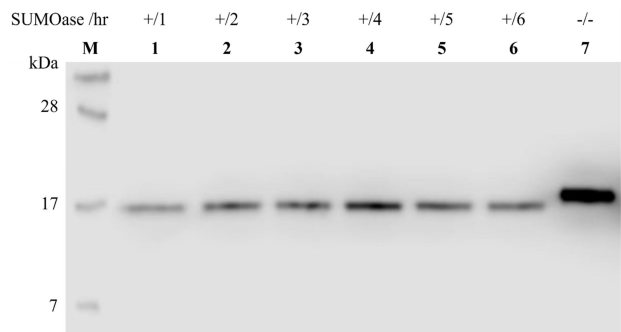


Fig. 4. Analysis of moricin fusion protein treated by SUMOase. SUMOase was treated at 1 hr intervals. The part of protein with his tag was detected by western blot. M, Protein size marker (kDa); Lane 1, Moricin treated with SUMOase for 1 hr; Lane 2, Moricin treated with SUMOase for 2 hr; Lane 3, Moricin treated with SUMOase for 3 hr; Lane 4, Moricin treated with SUMOase for 4 hr; Lane 5, Moricin treated with SUMOase for 5 hr; Lane 6, Moricin treated with SUMOase for 6 hr; Lane 7, Control (moricin not treated with SUMOase).

나타내는 α -helix 구조가 있어 막 투과성을 증가시키며[11, 12], C 말단에는 염기성 아미노산이 모여 있다[8]. 또한 다른 항균펩타이드와 마찬가지로 높은 염기성을 나타내며, 높은 염기성은 항균 능력과 연관이 있다[8, 12]. 항균펩타이드의 염기성은 정전기적 상호작용을 통해 항균펩타이드를 박테리아 표면에 부착시키는 요인이라고 제시되었다[4].

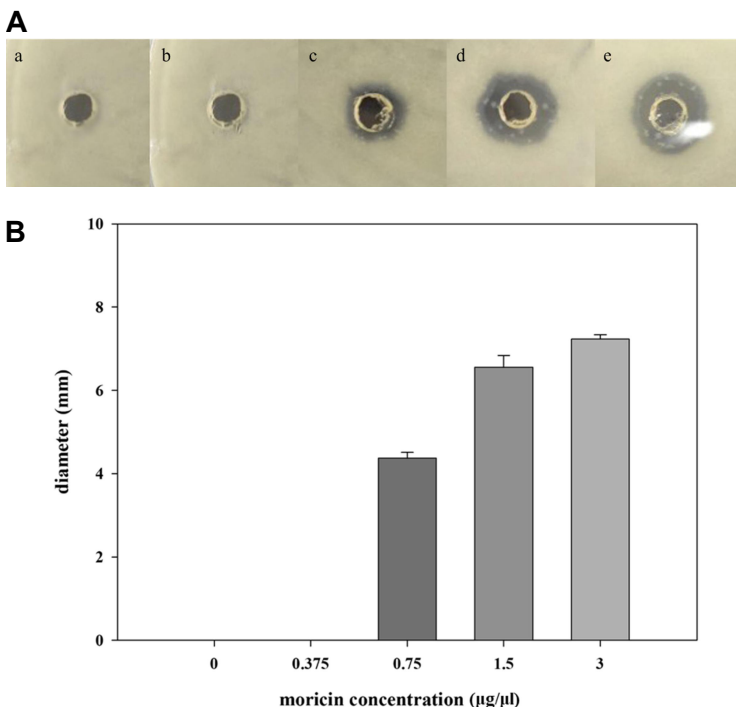


Fig. 5. Antimicrobial activity of moricin against to *Bacillus subtilis*. To test the antimicrobial activity of moricin, the fusion protein 6xHisSUMO1-moricin was produced and was treated by SUMOase. A minimum inhibitory concentration (MIC) of moricin was shown between 0.375 and 0.75 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$). (A) Antibacterial activity test according to the concentration of moricin against *B. subtilis*. (a), control (buffer); (b), 0.375 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ moricin; (c), 0.75 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ moricin; (d), 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ moricin; (e), 3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ moricin. (B) Evaluation of the inhibitory effect of moricin on *B. subtilis* by measuring the clear zone diameter.

재조합 벡터에서 만들어진 moricin이 항균활성이 있는지 확인하기 위해 *Bacillus subtilis*를 McFarland 1 농도로 희석하여 항균활성 실험을 진행하였다. Fig. 5에서 0.75 µg/µl의 농도에서 항균활성을 보이며 농도가 높아질수록 항균활성이 증가하는 것을 확인하였다. Hara and Yamakawa[8]는 *Bombyx mori*에서 추출한 moricin은 0.19 µM (= 약 $8.53 \cdot 10^{-4}$ µg/µl)에서 *Bacillus subtilis*에 대한 항균활성이 나타난다고 보고하였다. 또한 그람 음성균인 *E. coli*와 *Salmonella typhimurium*, 그리고 그람 양성균인 *Bacillus subtilis*와 *Staphylococcus aureus*에서 moricin의 항균활성이 확인되었다[8, 9, 22, 32]. 본 연구에서 얻은 moricin에 비해 낮은 농도에서 항균활성을 보여주었는데, 이는 정제 방법의 차이로 추측된다. 본 연구에서는 대장균을 이용하여 생산된 moricin도 정상적으로 항균활성을 가지고 있는 것을 확인하였다. 또한 본 연구에서는 식물에서 moricin을 생산하기 위한 벡터가 *E. coli*에서 정상적으로 발현되는 것을 확인하였다.

항균펩타이드는 일반적인 항생제와 달리 내성에 대해 큰 저항성을 갖기 때문에 새로운 치료제로 주목받고 있다 [12, 21, 26, 33]. 또한 moricin은 아미노산 구조에 추가적인 변형이 없어서 재조합 단백질로 이용하기에 좋다[8]. 본 연구 결과를 토대로 *E. coli*를 이용하여 항균펩타이드인 moricin을 대량으로 생산하여 치료제로 개발할 수 있다. 더 나아가 본 연구는 형질전환된 벡터를 유전자총을 이용하여 열록체에 삽입하면 보다 안전하고 생산 비용이 절감된 방법으로 moricin을 대량 생산할 가능성을 제시한다.

감사의 글

이 논문은 안동대학교 기본연구지원사업에 의하여 연구되었음.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Balbás, P. 2001. Understanding the art of producing protein and nonprotein molecules in *Escherichia coli*. *Mol. Biotechnol.* **19**, 251-267.
- Briat, J. F., Lescure, A. M. and Mache, R. M. 1986. Transcription of the chloroplast DNA: a review. *Biochimie* **68**, 981-990.
- Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P. and Mattern, M. R. 2005. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr. Purif.* **43**, 1-9.
- Christensen, B., Fink, J., Merrifield, R. B. and Mauzerall, D. 1988. Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 5072-5076.
- Daniell, H. 1993. Foreign gene expression in chloroplasts of higher plants mediated by tungsten particle bombardment. *Meth. Enzymol.* **217**, 536-556.
- Demain, A. L. and Vaishnav, P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.* **27**, 297-306.
- Gopal, G. J. and Kumar, A. 2013. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein J.* **32**, 419-425.
- Hara, S. and Yamakawa, M. 1995. Moricin, a novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* **270**, 29923-29927.
- Hara, S., Asaoka, A. and Yamakawa, M. 1996. Effect of moricin, a novel antimicrobial peptide of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), on the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Appl. Entomol. Zool.* **31**, 465-466.
- Hay, R. T. 2005. SUMO: a history of modification. *Mol. Cell* **18**, 1-12.
- Hemmi, H., Ishibashi, J., Hara, S. and Yamakawa, M. 2002. Solution structure of moricin, an antibacterial peptide, isolated from the silkworm *Bombyx mori*. *FEBS Lett.* **518**, 33-38.
- Hu, H., Wang, C., Guo, X., Li, W., Wang, Y. and He, Q. 2013. Broad activity against porcine bacterial pathogens displayed by two insect antimicrobial peptides moricin and cecropin B. *Mol. Cells* **35**, 106-114.
- Jin, S. and Daniell, H. 2015. The engineered chloroplast genome just got smarter. *Trends in Plant Sci.* **20**, 622-640.
- Kafri, M., Metzl-Raz, E., Jona, G. and Barkai, N. 2016. The cost of protein production. *Cell Rep.* **14**, 22-31.
- Kerscher, O., Felberbaum, R. and Hochstrasser, M. 2006. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 159-180.
- Kim, D. S., Kim, S. W., Song, J. M., Kim, S. Y. and Kwon, K. C. 2019. A new prokaryotic expression vector for the expression of antimicrobial peptide abaecin using SUMO fusion tag. *BMC Biotechnol.* **19**, 13.
- Koya, V., Moayeri, M., Leppla, S. H. and Daniell, H. 2005. Plant-based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. *Infect. Immun.* **73**, 8266-8274.
- Kwon, K. C. and Daniell, H. 2015. Low-cost oral delivery of protein drugs bioencapsulated in plant cells. *Plant Biotechnol. J.* **13**, 1017-1022.
- Li, J. F., Zhang, J., Song, R., Zhang, J. X., Shen, Y. and Zhang, S. Q. 2009. Production of a cytotoxic cationic antibacterial peptide in *Escherichia coli* using SUMO fusion partner. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**, 383-388.
- Li, J. F., Zhang, J., Zhang, Z., Kang, C. T. and Zhang, S. Q. 2011. SUMO mediating fusion expression of antimicrobial peptide CM4 from to joined genes in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* **62**, 296-300.

21. Liu, Y., Kamesh, A. C., Xiao, Y., Sun, V., Hayes, M., Daniell, H. and Koo, H. 2016. Topical delivery of low-cost protein drug candidates made in chloroplasts for biofilm disruption and uptake by oral epithelial cells. *Biomaterials* **105**, 156-166.
22. Nesa, J., Sadat, A., Buccini, D. F., Kati, A., Mandal, A. K. and Franco, O. L. 2020. Antimicrobial peptides from *Bombyx mori*: a splendid immune defense response in silkworms. *RSC Adv.* **10**, 512-523.
23. Nguyen, T., Duong, T., Dang, T., Le, N., Le, Q., Do, T., Nguyen, V., Le, T. and Truong, N. 2018. Enhanced soluble expression and effective purification of recombinant human interleukin-11 by SUMO fusion in *Escherichia coli*. *Indian J. Biotechnol.* **17**, 579-585.
24. Park, A. R., Kim, S. W., Kim, S. Y. and Kwon, K. C. 2021. Expression of antimicrobial peptide (AMP), cecropin B, in a fused form to SUMO tag with or without three-glycine linker in *Escherichia coli* and evaluation of bacteriolytic activity of the purified AMP. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **13**, 1780-1789.
25. Rahnamaeian, M., Cytryńska, M., Zdybicka-Barabas, A., Dobszlaff, K., Wiesner, J., Twyman, R. M., Zuchner, T., Sadd, B. M., Regoes, R. R., Schmid-Hempel, P. and Vicsinskas, A. 2015. Insect antimicrobial peptides show potentiating functional interactions against Gram-negative bacteria. *Proc. Royal Soc. B* **282**, 20150293.
26. Torres, M. D., Sothiselvam, S., Lu, T., K. and de la Fuente-Nunez, C. 2019. Peptide design principles for antimicrobial applications. *J. Mol. Biol.* **431**, 3547-3567.
27. Uhlén, M., Forsberg, G., Moks, T., Hartmanis, M. and Nilsson, B. 1992. Fusion proteins in biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **3**, 363-369.
28. Vargas-Cortez, T., Morones-Ramirez, J. R., Balderas-Renteria, I. and Zarate, X. 2017. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli* tagged with the fusion protein CusF3H+. *Protein Expr. Purif.* **132**, 44-49.
29. Verma, D. and Daniell, H. 2007. Chloroplast vector systems for biotechnology applications. *Plant Physiol.* **145**, 1129-1143.
30. Wei, X., Wu, R., Zhang, L., Ahmad, B., Si, D. and Zhang, R. 2018. Expression, purification, and characterization of a novel hybrid peptide with potent antibacterial activity. *Molecules* **23**, 1491.
31. Wiegand, I., Hilpert, K. and Hancock, R. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* **3**, 163-175.
32. Xu, X., Zhong, A., Wang, Y., Lin, B., Li, P., Ju, W., Li, P., Ju, W., Zhu, X., Yu, J., Mandal, S. E. and Jin, F. 2019. Molecular identification of a moricin family antimicrobial peptide (Px-Mor) from *Plutella xylostella* with activities against the opportunistic human pathogen *Aureobasidium pullulans*. *Front. Microbiol.* **10**, 2211.
33. Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-395.

초록 : 대장균에서 SUMO fusion tag을 이용하여 항균펩타이드인 moricin의 발현

안동규^{1,2} · 박선일¹ · 김순영^{1*}

(¹안동대학교 생명과학과, ²농림축산검역본부 신종외래질병연구실)

식물에서 재조합 단백질을 생산하는 것은 여러 가지 장점이 있다. 식물은 인간 병원체에 감염되지 않으며, 박테리아와 달리 내독소를 생산하지 않는다. 엽록체 형질전환은 핵 형질전환에 비해 안정적으로 많은 유전자를 발현시킬 수 있는 등 다양한 이점이 있다. 항균펩타이드(AMP)는 많은 동물들이 가지고 있는 선천면역의 일종으로, 소량이라도 항균력을 가지며, 기존 항생제와 다르게 쉽게 내성균이 생기지 않는다. 항균펩타이드인 moricin은 누에나방의 한 종류인 *Bombyx mori*에서 분리되었으며, C-말단은 염기성 아미노산이 모여 있고, N-말단은 α -helix 구조를 가지고 있다. Moricin을 생산할 때 SUMO와 6xHis tag를 융합하여 사용하였다. 발현된 moricin의 용해성과 안정성을 높이기 위해 SUMO를, 발현된 moricin을 정제하기 위하여 6xHis tag를 이용하였다. 본 연구에서 담배 엽록체와 대장균에서 항균펩타이드를 발현하기 위한 형질전환 벡터를 제작하였다. 또한, 엽록체와 박테리아의 전사 및 번역의 유사성을 이용하여 대장균에서 단백질의 발현을 확인하였다. 발현된 moricin을 Ni 컬럼 및 SUMOase를 처리하여 정제하고 agar diffusion assay를 이용하여 항균 활성을 확인하였다.