

락토페린 구조·기능 및 생산에 관한 연구

유 대 열
KIST 생명공학연구소

I. 서 론

젖은 창조주가 만든 “완전식품”으로 신생아의 성장과 발달에 필요한 모든 영양성분이 균형있게 함유되어 있을 뿐만 아니라 신생아를 외래 병원체로부터 보호하는데 필요한 각종 생리활성물질이 젖중에 포함되어 있음이 최근 밝혀지고 있어 이 분야의 연구가 활발히 전개되고 있다. 젖생리활성물질중 가장 활발히 연구되고 있는 것은 락토페린이다. 1939년 Carlsberg Brewery 생화학연구소 교수였던 Soren Peter Lauritz Sorensen과 그의 부인 Margarethe Sorensen은 인유중에 함유되어 있는 “붉은 단백질”을 락토페린이라고 처음 발표하였다¹⁾. 락토페린은 락토포스페린이라고도 불리며, 젖, 침, 눈물, 정액과 같은 외분비물과 호중구의 secondary granules에서 분리되어 유해한 미생물 및 바이러스의 감염으로부터 숙주를 보호하는 생체방어물질로 알려지고 있다. 오늘날까지 사람, 소, 생쥐, 산양 등의 락토페린이 분리 정제되어 그 구조와 각종 생리활성 기능이 밝혀지고 있어, 락토페린을 대량 생산하려는 연구가 세계적으로 진행되고 있다. 필자가 소속된 연구실에서는 1991년부터 락토페린에 관심을 갖고 사람 및 흑염소 락토페린을 분리 정제하여 그 기능을 연구하고 있으며 유전조작으로부터 유전자를 클로닝하여 그 구조를 밝혔고, 동물·식물 형질전환기술을 활용하여 대량생산을 위한 연구를 계속해 오고 있다. 그동안 본 연구실에서 얻은 결과를 중심으로 락토페린의 구조·기능 및 생산에 관한 세계적 연구동향을 살펴보고자 한다.

II. 본 론

1. 락토페린의 구조

락토페린 분자량은 약 80,000으로 각 동물간 거의 유사하다. 락토페린은 2개의 lobe(N-lobe, C-lobe)로 구성되어 있고 각 lobe 안에 각각 한 개의 철결합 부위가 존재하고 있다. N-lobe와 C-lobe는 유사한 구조를 가지고 있으며 각각의 아미노산의 상동성이 약 40%나 된다^{2,3)}. 락토페린은 당단백질로 사람 락토페린 1차 구조에 3개의 glycosylation site가 존재하며, 소 락토페린 1차 구조에는 5개의 glycosylation site가 존재한다⁴⁾. 락토페린이 펩신에 의해 분해되면 사람 락토페린에서 47개의 아미노산(1~47 잔기)으로 구성된 peptide(lactoferricin-H)가 생성되고, 소 락토페린에서는 25개의 아미노산(17~41 잔기)으로 구성된 peptide(lactoferricin-B)가 생성되는데, 이들 lactoferricin은 락토페린보다 항균성이 강한 것으로 알려지고 있다⁵⁾. 오늘날까지 각종 동물의 락토페린 1차 구조가 peptide 분석, cDNA

표 1. 각종간의 락토펜린 상동성

Amino acid	Human	Porcine	Mouse	Goat	Bovine
Human	100				
Porcine	70	100			
Mouse	70	63	100		
Goat	70	73	63	100	
Bovine	69	72	63	91	100

DNA	Human	Porcine	Mouse	Goat	Bovine
Human	100				
Porcine	76	100			
Mouse	74	70	100		
Goat	76	78	70	100	
Bovine	75	78	70	93	100

클로닝에 의해 밝혀졌다^{6,7,8,9,10}. 본 연구실에서도 사람 및 흑염소 유선으로부터 락토펜린 cDNA를 각각 클로닝 하였다. 클로닝한 사람 락토펜린 cDNA는 97bp의 5' flanking sequence, open reading frame, 그리고 3' UTR로 구성된 2424bp(GeneBank accession number 52941)로 1990년 Powell과 Ogden이 보고한 염기와 비교하여 cytosine 1개와 7개의 염기가 결실되어 있음이 발견되어 사람간에 polymorphism이 있음을 확인하였다. 흑염소락토펜린 cDNA는 8bp의 5' UTR, open reading frame 그리고 3' UTR로 구성된 2265bp(GeneBank accession number U53857)로 1994년 LeProvost 등이 발표한 산양(Saanen종) 락토펜린 Sequence⁷)와 비교하여 15개의 염기가 서로 다르고 이에 따라 6개의 아미노산이 서로 다른데 이 중 5개의 아미노산 차이가 N-lobe에 집중되어 있음이 발견되어 흥미로운 현상을 보이고 있다. 락토펜린 cDNA sequence를 이용하여 각종 락토펜린의 염기와 아미노산 상동성을 비교해 보면 표 1과 같다. 본 연구실에서는 사람 락토펜린 genomic DNA를 cosmid library로부터 클로닝하는데 성공하였다. 크기는 약 40kb에 달한다.

2. 락토펜린의 기능

락토펜린은 생체방어 작용에 관여하고 있다. 락토펜린이 젖, 침, 눈물, 콧물, 정액 등의 외분비물뿐만 아니라 호중구에도 존재하고 있어 유해한 미생물과 바이러스의 공격으로부터 생체를 보호하고 있다^{11,12,13}. 이에 관련있는 각각의 생리활성 기능은 다음과 같다.

1) 항균작용

인유 중의 락토펜린은 6~8%의 철을 포함하고 있다¹². 불포화(apo)락토펜린은 gram-positive와 gram-negative 박테리아의 성장을 저해시키는데, 이는 불포화락토펜린이 철을 결합하므로써 박테리아가 철을 이용하는 것을 제한하는 것으로 해석되고 있다^{11,12,13}. 사실 이러한 형태의 성장저해는 락

표 2. 각종 락토페린과 락토페린 유도체의 *E. coli* 0111에 대한 항균력

(단위 : $\mu\text{g/ml}$)

	Human	Horse	Bovine	Sheep	Goat	KN-goat
Lactoferrin	3,000	—	2,000	—	—	5,000
Pepsin hydrolysed	500	1,000	100	1,000	1,000	·
Lactoferricin	100	·	6	·	·	·

— : no antimicrobial activity even at 7,200

· : not determined

토페린의 철결합력 이상으로 과다한 철을 첨가하였을 때 효과가 없었다. 소 유선 중에 분비되는 락토페린의 항균성(bacteriostasis)은 상유 중의 높은 농도의 citrate에 의해 소멸되거나 비유기중 유방염이 발생되면 항균성은 증가한다¹¹⁾. 불포화 락토페린은 Gram-negative 박테리아의 외막에 결합하므로써 lipopolysaccharide를 방출시켜, 궁극적으로는 이러한 박테리아를 파멸시키게 된다^{14,15)}. 락토페린의 pepsin 가수분해물은 cationic peptide를 생성한다¹⁶⁾. 사람 락토페린 N 말단(1~47) 잔기와 소 락토페린 N 말단(17~41) 잔기로 구성된 각각의 peptide(lactoferricin-H와 lactoferricin-B)는 박테리아의 LPS와 상호작용하여 막을 파괴시킴으로써 강한 항균작용을 나타낸다¹⁷⁾. Lactoferricin-B의 항균작용은 lysozyme을 필요로 하지 않으며 또한 철의 존재 유무와 관계없으나, 고농도의 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 에서 감소하는 것으로 알려져 있다⁵⁾. Lactoferrin과 lactoferricin의 항균력을 비교해 보면 표 2와 같다. 항균력은 소의 락토페린과 그 유도체가 가장 강하였다. 염소(Sannen)락토페린을 재래흑염소와 비교했을 때 재래흑염소가 항균력이 더 강한 것으로 나타났다. 재래흑염소락토페린이 염소(Sannen)락토페린보다 항균력이 더 강한 것은 아미노산 sequence의 차이에 기인하는 것으로 생각되고 있다.

2) 항바이러스 작용

락토페린은 friend virus¹⁸⁾, human immunodeficiency virus(HIV) 및 human cytomegalovirus¹⁹⁾에 항바이러스 효과가 있는 것으로 보고되었다. 본 연구팀에서는 사람 락토페린을 CaMV35 promoter 벡터에 재조합한 후 agrobacterium tumefaciens를 사용하여 형질전환담배를 생산하였다. 그 결과 사람 락토페린 signal peptide의 영향으로 담배조직의 세포벽에 사람 락토페린이 생산 분비됨을 확인하였으며, 식물에 광범위하게 감염하는 cucumber mosaic virus(CMV)-Y에 강한 저항성을 보여주었다. 최근 사람락토페린이 HCV envelop에 결합한다는 결과도 알려지고 있어(투고중) 락토페린은 생체방어를 위해 각종 virus에 결합하여 virus의 기능을 저해하는 것으로 판단된다.

3) Hydroxyl-radical 형성 저해

불포화 락토페린은 free-iron을 결합하므로써 superoxide와 H_2O_2 로부터 iron-catalyze된 hydroxyl radical 형성을 저해한다^{4,12)}. 그러므로 염증 부위에 불포화 락토페린이 존재하게 되면 활성산소에 의한 세포 및 extracellular matrices의 손상이 저해된다.

4) Natural killer(NK) cell 활성화 및 항암 효과

락토페린은 NK세포를 자극·활성화시킴으로써 생쥐에 있어서 solid tumor의 성장을 저해하였으며,

metastatic lung lesion의 수를 감소시키는 효과도 보여주었다^{20,21)}. 최근 일본에서는 락토페린이 colon cancer에 큰 효과가 있음이 보고되었다.

5) 면역조절작용

Lactoferrin은 성숙한 leukocyte의 기능과 hemopoietic progenitor cell의 분화와 증식을 조절하는 것으로 조절복합체 network의 성분으로서 역할을 한다^{22,23)}. 그러나 아직까지 면역조절 역할은 완전히 밝혀지지 않았다. 락토페린에 대한 특이적인 수용체는 macrophage, monocyte^{24,25)}, lymphocyte를 비롯한 혈액 세포의 여러 가지 형태의 표면에서 발견되었다. 사람 락토페린의 N-terminal 근처에 위치한 tetrapeptide sequence Lys-Arg-Asp-Ser는 혈소판에 의해 인식되는데 혈소판의 응고를 저해하고 있다. 락토페린은 T-lymphocyte의 Fc μ 와 Fc 수용체의 표면을 자극하고 lymphocyte에 의한 leukocyte migration inhibitory factor의 분비를 유도한다. 또한 락토페린은 T-lymphocyte와 monocyte에 의한 colony stimulating factor의 분비를 저해하고^{26,27)} migration에 의해 유도된 T-lymphocyte의 증식을 억제하며 IgA를 분비하는 B-lymphocyte의 분화를 유도하고 T cell 활성을 유도하는 CD4⁺ CD8⁻ T cell 전구물질의 성숙을 촉진하는데²⁸⁾, 이것은 IL-1과 비슷한 방법으로 한다. 또한 락토페린은 rat mast cell에서 calcium ionopore-induced histamine의 방출을 억제한다. 이것은 C3-convertase의 합성을 억제하므로 complement의 활성화에 대한 classical pathway을 차단하는 역할을 한다.

6) 전사(transcriptional) 조절 작용

Garre 등은 락토페린이 사람 myelogenous leukemia 세포에 결합되어 핵내로 운반된다고 보고하였다²⁹⁾. Furmanski 팀은 락토페린이 결합하는 DNA consensus sequence가 3가지 형태임을 발표하였다

³⁰⁾. 이러한 관찰에 따라 염증 부위에 있는 호중구로부터 방출된 락토페린이 다른 면역세포에 매개되어 유전자 발현을 조절하는 핵내 DNA에 결합하는 것으로 판단되는데, 락토페린이 어떤 경로에 의해 세포 밖으로부터 핵내로 이동되는지를 밝힐 연구가 더 필요하다.

7) 기타 기능

- 소장 상피세포의 성장 촉진³¹⁾
- LPS 매개되는 호중구 활성 저해³²⁾
- 항응고 효과³³⁾

3. 락토페린의 생산 및 활용

1) 우유로부터 락토페린의 생산

오늘날 치즈부산물로부터 소 락토페린을 정제하여 주로 조제분유의 첨가제로써 활용하고 있다. 최근 일본 모리나가 연구소는 소 락토페린이 참돔의 생체방어능력을 향상시킨 것으로 보고하여^{34,35)}, 양식장에서 면역증강제 또는 항생보조제로써 활용될 수 있을 것으로 보인다. 또한 모리나가 연구소는 개와 고양이의 피부병 치료보조제(SK-1)를 개발하여 시판하고 있다. 소 락토페린의 사용은 면역성 때문에 경구투여에 한정되어 있다. 또한 사람의 활용에는 특이적 수용체/단백질 간의 상호작용이 요구되어

소 락토페린보다 사람 락토페린이 더 활용범위가 넓을 것으로 생각된다. 따라서 유전공학기법에 의한 사람 락토페린의 대량생산은 인체 의료분야에의 적용에 큰 도움을 줄 것으로 판단된다.

2) 재조합 락토페린의 생산

재조합 사람 락토페린은 *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, BHK 세포 그리고 사람 293세포에서 낮은 수준(2~25mg/L)으로 발현된다고 보고되었었다⁴⁾. 최근 Ward 등은 *Aspergillus awamori*로부터 재조합 사람 락토페린이 2g/L나 생산되는 시스템을 개발하였다³⁶⁾. 네델란드의 Pharming BV에서는 소 α_1 -casein 유전자 발현조절에 의해 재조합 사람 락토페린이 유즙중에 50g/L나 생산되는 형질전환생쥐를 개발하였으며^{37,38)}, 형질전환젓소도 개발중에 있다³⁹⁾. 재조합 사람 락토페린과 천연 사람 락토페린의 구조와 기능을 비교해 보았을 때 N-glycosylation 및 metal 포화 정도 외에는 서로 차이가 없음이 밝혀졌다^{4,36,38,40)}. 이러한 차이가 생리활성에 어떠한 영향을 끼칠지는 좀 더 연구가 필요하다. 본 연구실에서도 1991년부터 사람 락토페린을 유즙중에 생산할 수 있는 형질전환동물을 개발하고 있다. 소 β -casein 유전자 발현조절에 의해 사람 락토페린이 유즙중에 생산되는 형질전환생쥐가 개발되었으며(표 3)⁴¹⁾, 사람 락토페린을 유즙중에 생산할 수 있는 능력을 지닌 형질전환젓소 1마리가 지난해 말에 탄생하였다. 앞으로 4년 후에는 사람 락토페린을 유즙 중에 생산하는 형질전환젓소가 다수 출현할 것으로 기대된다.

III. 결 론

이상으로 살펴본 바와 같이 락토페린은 다기능성 생리활성물질이므로 락토페린을 대량생산하여 활

표 3. Analysis of transgenic founder mice

Founder	Sex	No. of G1 transgenic / progeny	Germ line transmission rate (%) ^a	Copy No.	hLF in milk (μ g/ml)
1	M	1/10	10.0	25	ND
2	F	1/9	11.0	1	150-200
3	F	3/9	33.3	18	ND
6	M	6/14	42.9	38	250-300
7	M	2/10	20.0	13	ND
8	M	1/10	10.0	4	ND
9	M	3/8	37.5	8	ND
11	M	4/10	40.0	23	ND
12	F	2/6	33.3	9	ND
15	F	0/3	0	ND	ND
20	F	3/6	50.0	15	150-200

The sex of animals is indicated by "F" for female and "M" for male.

^aPercentage is the number of transgenic animals per live births.

용하려는 연구가 국내외에서 활발히 진행되고 있다. 지난 1992년부터 “락토페린 구조와 기능”이란 제목으로 국제 심포지움이 열렸으며, 1997년 5월 5일부터 9일까지 국제심포지움이 프랑스에서 성황리에 개최되었다. 이처럼 락토페린은 세계적으로 관심을 끌고 있는 물질이다. 앞으로는 락토페린의 생체내 기능에 대한 연구와 락토페린 활용기술 개발이 더욱 요청되고 있다.

IV. 참고문헌

1. Sorensen, M. and S. P. L. Sorensen, C. R. Lab. (Carlsberg) 1939. [Ser Chim], 23 : 55-59.
2. Metz-Boutigue, M. H., J. Jolles, J. Mazurier, F. Schoentgen, D. Legrand, G. Spike, J. Montreuil, and P. Jolles. 1984. Human lactoferrin : amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. Eur. J. Biochem., 145 : 659-676.
3. Pierce, A., D. Colavizza, M. Benaissa, P. Maes, A. Tartar, J. Montreuil, and G. Spik. 1991. Eur. J. Biochem., 196 : 177.
4. Van Berkel, P. H. C., M. E. J. Geerts, H. A. Van Veen, P. M. Kooiman, F. Pieper, H. A. de Boer and J. H. Nuijens. 1995. Biochem. J., 312 : 107-114.
5. Tomita, M., M. Takase, H. Wakabayashi, and W. Bellamy. 1994. Adv. Exp. Med. Biol., 357 : 209-218.
6. Seyfert, H.-M., A. Tuckoricz, H. Luterthal, D. Koczan, and G. Hobom. 1994. Gene, 143 : 265-269.
7. Le Provost, F., M. Nocart, G. Guerin, and P. Martin. 1994. Biochem. Biophys. Res. Commun., 203(2) : 1324-1332.
8. Alexander, L. J., W. B. Levine, C. T. Teng, and C. W. Beattie. 1992. Anim. Genetics, 23 : 251-256.
9. Rey, M. W., S. L. Woloshuk, H. A. de Boer, and F. R. Pieper. 1990. Nucleic Acids Res., 18 : 5288.
10. Pentecost, B. T. and C. T. Teng. 1987. J. Biol. Chem., 262 : 10134-10139.
11. Schanbacher, F. L., R. E. Goodman, and K. S. Talhouk. 1993. J. Dairy Sci., 76 : 3812-3831.
12. Sanchez, L., M. Calvo, and J. H. Brock. 1992. Arch. Dis. Child., 67 : 657-661.
13. Chierici, R. and V. Vigi. 1994. Acta Pediatr. Suppl., 402 : 83-88.
14. Ellison, R. T., T. J. Giehl, and F. M. LaForce. 1988. Infect. Immu., 56 : 2774-2781.
15. Ellison, R. T., F. M. LaForce, T. J. Giehl, D. S. Boose, and B. E. Dunn. 1990. J. Gen. Microbiol., 136 : 1437-1446.
16. Francis, G. L., F. M. Upton, F. J. Ballard, K. A. Mcneil, and J. C. Wallace. 1988. Biochem. J., 251 : 95-103.
17. Ellison, R. T. (1994) Adv. Exp. Med. Biol., 357 : 71-90.
18. Lu, L., G. Hangoc, A. Oliff, L. T. Chen, R. N. Shen, and H. E. Broxmeyer. 1987. Cancer Res., 47 : 4184-4188.

19. Harmsen, M. C., P. J. Swart, M. P. de-Bethune, R. Pauwels, E. de-clercq, T. H. The, and D. K. Meijer. 1995 *J. Infect. Dis.*, 172 : 380-388.
20. Shau, H., A. Kim, and S. H. Golub. 1992. *J. Leuk. Biol.*, 51 : 343-349.
21. Bezault, J., R. Bhimani, J. Wiprovnick, and P. Furmanski. 1994. *Cancer Res.*, 54 : 2310-2312.
22. Malmquist, J., N. E. Hansen, and H. Karle. 1978. *Scand. J. Haematol.*, 21 : 5-8.
23. Broxmeyer, H. E. 1989. Wiley, and Sons Ltd., New York, 199-221.
24. VanSnick, W. L. and P. L. Masson. 1976. *J. Exp. Med.*, 144 : 1568-1580.
25. Birgens, H. S., N. E. Hansen, H. Karle, and L. O. Kristensen. 1983. *Br. J. Haematol.*, 54 : 383-391.
26. Broxmeyer, H. E., A. Smithyman, R. P. Eger, P. A. Meyers, and M. De. Soursa. 1978. *J. Exp. Med.*, 148 : 1052.
27. Bagby, G. C., V. D. Riga, R. M. Bennett, A. A. Vandenbark, and H. S. Garewal. 1981. *J. Clin. Invest.*, 68 : 56.
28. 남명수, 최인성, 이수원. 1994. *Korean J. Dairy Sci.*, 16(30) : 219-227.
29. Penco, S., S. Pastorino, S. G. Bianchi, and C. Garre. 1995. *J. Biol. Chem.* 270 : 12263-12268.
30. He, J. and P. Furmanski. 1995. *Nature*, 373 : 721-724.
31. Oguchi, S., W. A. Walker, and I. R. Sanderson. 1995. *Biol. Neonate*, 67 : 330-339.
32. Wang, D., K. M. Pabst, Y. Aida, and M. J. Pabst. 1995. *J. Leuk. Biol.*, 57 : 865-874.
33. Mann, D. M., E. Romm, and M. Migliorini. 1994. *J. Biol. Chem.*, 269 : 23661-23667.
34. Kakuta, I. and H. Kurokura. 1995. *Fish Pathology*, 30(4) : 289-290.
35. Kakuta, I., H. Kurokura, H. Nakamura, and K. Yamauchi. 1996. *Suisanzoshoku*, 44(2) : 197-202.
36. Ward, P. P, C. S. Piddington, G. A. Cunningham, X. Zhou, R. D. Wyatt, and O. M. Cooneely. 1995. *Bio /Technology*, 13 : 498-503.
37. Platenburg, G. J., E. P. Kootwijk, P. M. Kooiman, S. L. Woloshuk, J. H. Nuijens, P. J. Krimpenfort, F. R. Pieper, H. A. de Boer, and R. Strijker. 1994. *Transgenic Res.*, 3 : 99-108.
38. Nuijens, J. H., M. E. J. Geerts, P. H. C. van Berkel, P. P. Hartevelt, H. A. de Boer, H. A. Van Veen, and F. R. Pieper. 1995. *Proc. 2nd Int'l. Conf. on Structure and Function of LF*.
39. Lönnerdal, B. and S. Iyer. 1995. *Ann. Rev. Nutr.*, 15 : 93-110.
40. Legrand, D., V. Salmon, B. Coddeville, M. Benaissa, Y. Plancke, and G. Spik. 1995. *FEBS Lett.*, 365 : 57-60.
41. Kim, S. J., Y. Y. Cho, K. W. Lee, D. Y. Yu, C. S. Lee, Y. M. Han, and K. K. Lee. 1994. *Mol. Cells.*, 4 : 355-360.