항 리스테리아 박테리오신인 페디오신 PA-1의 이종발현

Heterologous expression of anti-listerial bacteriocin, pediocin PA-1

문 기 성
Gi-Seong Moon*

충주대학교 생명공학과
Department of Biotechnology, Chungju National University

I. 서론

박테리오신(bacteriocin)은 그람양성 혹은 그람음성 세균이 생산하는 단백질성 물질로 분류학적으로 유연관계에 있는 종을 주로 억제한다. 최초로 발견된 박테리오신은 colicin으로 대장균(*Escherichia coli*)이 생산한다. 이후 유산균에서도 colicin과 같은 다양한 박테리오신들이 발견되었는데 현재 세계적으로 상용화되어 있는 박테리오신은 nisin이 유일하다. 그럼에도 불구하고 지금도 박테리오신에 대한 연구는 활발하게 진행되고 있으며 특히 안전성 등의 문제로 유산균이 생산하는 박테리오신에 대한 연구가 집중되는 추세이다. 학자마다 분류하는 기준에 다소의 차이가 있지만 유산균이 생산하는 박테리오신은 크게 세 개의 그룹으로 분류할 수 있으며 그룹 I은 lantibiotics로 *Lactococcus* 속 등이 주로 생산하며 다른 박테리오신과는 달리 번역 후 수식(post-translational modification) 과정을 거치는 것이 특징이며 대표적으로 nisin이 그룹 I에 속한다. 그룹 II는 비교적 분자량(대략 10kDa 이하)이 작은 박테리오신으로 열에 대한 안정성이 우수하며 그룹 I과는 달리 번역 후 수식이 일어나지 않아 이종발현(heterologous expression)에 용이하다. 그룹 II의 경우 다시 세 그룹으로 분류하는데 그룹 IIa에 속하는 박테리오신의 경우 병원성 세균인 리스테리아(*Listeria monocytogenes*)에 대한 강한 항균활성을 보이는 것이 공통적인 특징이며 이 그룹에 속하는 대표적인 박테리오신이 pediocin이다. 그룹 III는 비교적 분자량이 큰 박테리오신들이 포함되며 helveticin J가 대표적이다(표 1, 1). 지금까지 유산균으로부터 발견된 대다수의 박테리오신이 그룹 II에 속하는 것이며 그들의 아미노산 서열 및 유전자 구조가 규명되었거나 연구되고 있다. Pediocin PA-1은 대표적 그룹 IIa 박테리오신으로 그룹 I에 속하는 nisin과 더불어 많은 연구가 진행되었고 아미노산 서열 및 구조, 면역, 수송관련 유전자 오페론 구조가 규명되었다. Pediocin 오페론은 4개의 유전자(*pedA, pedB, pedC* 및 *pedD*)로 구성되어 있으며 각각 구조(*pedA*), 면역(*pedB*) 및 수송(*pedCD*)을 담당하는 단백질을 발현하는 것으로 알려져

*Corresponding author: Gi-Seong Moon
Department of Biotechnology, Chungju National University
61 Daehak-ro, Jeungpyeong-gun, Chungbuk 368-701, Korea
Tel: +82-43-820-5251
Fax: +82-43-820-5272
E-mail: gsmoon@cjnu.ac.kr

표 1 유산균 생산 박테리오신 분류(1)

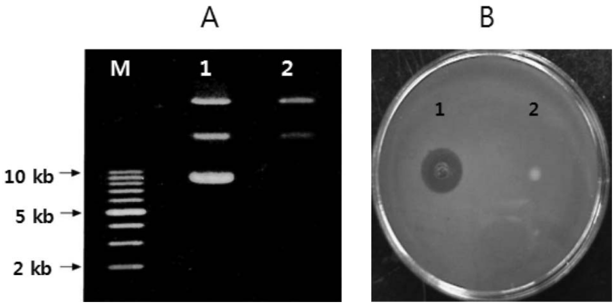
Main category	Characteristics	Subcategory	Examples
Class Ⅰ	Lantibiotics(containing lanthionine and β-lanthionine)	Type A (elongated molecules; molecular mass, <4 kDa)	Nisin A Nisin Z Subtilin Epidermin
		Type B (globular molecules; molecular mass, 1.8 to 2.1 kDa)	Mersacidin Actagardin Mutacin Ⅱ
Class Ⅱ	Nonmodified heat-stable bacteriocins containing peptides with molecular masses of <10 kDa	Subclass Ⅱa (antilisterial pediocin-like bacteriocins)	Pediocin PA-1 Sakacin A, P
		Subclass Ⅱb (two-peptide bacteriocins)	Plantaricin EF Plantaricin JK
		Subclass Ⅱc (other peptide bacteriocins)	Lactococcin 972
Class Ⅲ	Protein bacteriocins with molecular masses of >30 kDa		Helveticin J Millericin B

있다(2). 특히, pediocin PA-1을 포함한 그룹 IIa 박테리오신은 아미노말단에 -YGNGV-의 β-turn 구조를 가지고 있어 목적 세균의 수용체를 인지하고 또한 양전하를 띤 아미노산에 의해 세포막 표면에 결합한 후 카복실 말단의 α-helix 구조에 의해 세포막에 구멍이 생기고 세포 내부의 화합물이 유출되면서 세균이 사멸에 이르는 것으로 추측되고 있다(3). 앞서 설명한 바와 같이 현재 nisin만 상용화되어 천연보존제로서 식품 등에 첨가되고 있으나 박테리오신에 대한 활발한 연구와 항생제 대체제 및 천연보존제로서의 잠재성이 부각된다면 다른 박테리오신들의 상업화도 가속화 될 것이며 pediocin PA-1이 최우선 순위가 될 것으로 예측된다. 그러한 추세와 더불어 pediocin PA-1의 상업적 가치로 이종발현에 관한 연구 또한 활발하게 진행될 것으로 판단된다. 그런 측면에서 본 저자가 수행했던 pediocin PA-1 이종발현 관련 연구결과들을 본 지면을 통해 소개하고자 한다.

Ⅱ. 본론

1. *Pediococcus acidilactici* K10의 pediocin 오페론 구조 규명

P. acidilactici K10은 김치에서 분리한 균주이며 광범위 항균력을 가지고 있다. 플라스미드 제거(plasmid curing) 실험을 통해서 약 9.5kb의 크기를 가진 플라스미드에 pediocin PA-1 생산관련 유전자가 있음을 확인하고 (그림 1) 데이터베이스(GenBank) 상에 공개된 다른 균주의 pediocin 오페론 염기서열을 기초로 PCR(polymerase chain reaction, 중합효소연쇄반응)용 프라이머 쌍을 설계하여 K10의 pediocin 오페론을 증폭한 후 DNA 염기서열을 분석하였다. 분석 결과 기존의 pediocin 오페론 염기서열과 100% 일치함을 확인하였다(2). 따라서 9.5kb의 플라스미드를 이용하여 pediocin PA-1 유전자의 PCR 클로닝을 위한 주형으로 사용하였다.



1: *Pediococcus acidilactici* K10, 2: K10 mutant

그림 1. *Pediococcus acidilactici* K10 플라스미드 제거실험(A)과 항균활성(B).

2. Pediocin PA-1의 대장균 발현

천연보존제로서의 pediocin PA-1의 잠재성이 커 대장균에서 대량발현을 위한 시스템 개발을 시도하였다. 정제의 용이성을 위해 아미노말단 히스티딘 부착용 플라스미드 벡터(pQE-30 Xa, Qiagen 사)를 우선적으로 사용하여 재조합 플라스미드를 제작하였다(그림 2). 이 벡터는 IPTG(Isopropyl-β-D-thio-galactoside)에 의해 발현이 유도되는 *lac* 작동자가 엄격히 조절되어 숙주세포에 독성이 있는 단백질 발현에 용이하다. 재조합 플라스미드(pQEPED: pQE-30 Xa::mature *pedA*)로 대장균을 형질전환 시킨 다음 LB(Luria-Bertani) 액체배지에서 대수기 중기(OD_{600}: ~0.5)까지 배양한 다음 IPTG로 재조합 pediocin PA-1의 발현을 유도한 결과 세포의 증식속도가 급속히 감소하는 경향을 보였다. 이 결과는 대장균 세포 내에서 발현된 재조합 pediocin PA-1이 세포에 대한 독성이 있음을 의미하고 아미노말단에 부착된 히스티딘 잔기들은 박테리오신 활성에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. 그럼에도 불구하고 재조합 대장균 세포 추출물을 얻어 Ni-NTA(Nichel-Nitrilotriacetic acid) 친화성 크로마토그래피를 수행하여 정제된 재조합 pediocin PA-1을 얻을 수 있었으며 SDS-PAGE(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)와 활성염색으로 예상된 분자량(6.5kDa)과 항균활성을 확인하였다(그림 3, 2). 그러나 세포 독성 문제로 항균활성이 있는 상태로 재조합 pediocin PA-1을 대장균에서 대량으로 생산하는 것은 어려울 것으로 판단되었다. 그래서 대장균에서 안정하게 발현되는 단백질과 융합하여 pediocin PA-1을 발현시키는 방법을 생각했고 그러한 목적으로 Qiagen 사의 pQE40 플라스미드 벡터를 이용하여 pediocin PA-1 유전자를 재조합하여 pQE40PED(pQE40::mature *pedA*)라 명명하였다(그림 2). 재조합 플라스미드를 위와 같은 대장균 숙주에 형질전환 한 다음 대수기 중기에 IPTG를 첨가해 융합단백질의 발현을 유도한 결과 세포의 증식속도에 영향을 미치지 않았다. 이는 융합단백질 형태로 발현된 pediocin PA-1의 박테리오신 활성이 없음을 의미하고 Ni-NTA 친화성 크로마토그래피를 수행하여 정제한 후의 결과도 일치하였다. 따라서 활성을 가진 박테리오신으로 회복시키기 위해서는 아미노말단의 이종 단백질(DHFR; Dihydrofolate reductase)을 제거해 주어야 한다. 그러한 목적으로 이종 단백질과 pediocin PA-1사이에 Factor Xa 단백질분해효소가 인지할 수 있는 아미노산 서열(-IEGR-)을 인위적으로 첨가해 주었다. 정제된 융합단백질에 Factor Xa 단백질분해효소를 처리한 결과 이종단백질과 페디오신 PA-1이 분리되었고 SDS-PAGE 및 활성 염색 결과 pediocin PA-1의 실제 크기 위치에서 박테리오신 활성이 나타나는 것을 확인하였다(그림 4). 이 결과는 Factor Xa 단백질분해효소로 인해 아미노말단의 이종단백질이 정확하게 절단되었음을 의미하고 pediocin PA-1은 고유의 3차 구조를 회복해 다시 박테리오신 활성을 나타내는 것으로 판단되었다. 효소 처리된 샘플로부터 pediocin PA-1만을 다시 정제하기 위해 분자량을 이용한 한외여과(ultrafiltration)를 실시하였고 그 결과 pediocin PA-1만을 순수하게 정제할 수 있었다(4). 그럼에도 불구하고 상업적으로 접근하기에는 수율(yield)이 너무 낮게 나왔으며 또한 고가의 단백질분해효소를 사용해야 하므로 추가적인 연구를 통해 생산비를 낮추는 공정을 개발한다

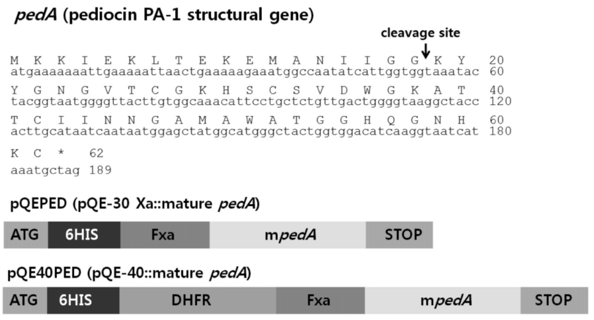
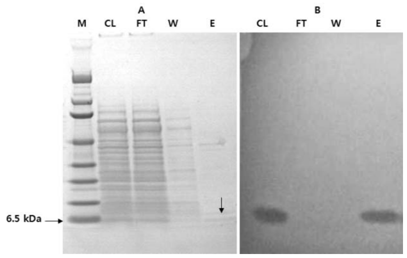
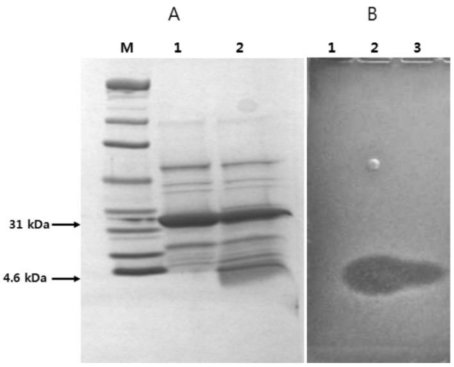


그림 2. Pediocin PA-1 구조유전자 및 재조합 DNA.



CL: cleared lysate, FT: flow through,
W: wash, E: eluate.

그림 3.정제 His-tagged pediocin PA-1의 SDS-PAGE 겔(A)과 활성 염색(B).



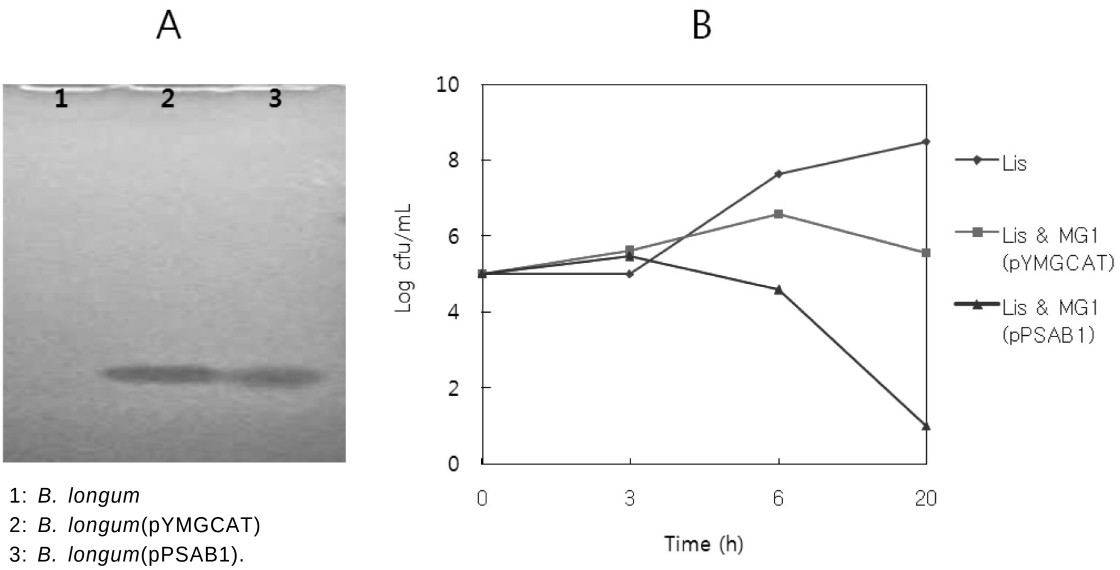
1: 무처리
2: Factor Xa 단백질 분해효소 처리
3: 자연 pediocin PA-1

그림 4. Factor Xa 단백질 분해효소 처리 후 SDS-PAGE 겔(A) 및 활성 염색(B).

면 pediocin PA-1이 상업적으로 판매 가능할 경우 대량 생산에 응용할 수 있을 것으로 판단된다.

3. 페디오신 PA-1의 비피도박테리아 발현

비피도박테리아는 인체 장내에 정착해서 장내 건강을 촉진하는 유익균이다. 비피도박테리아는 많은 연구를 통해서 다양한 건강기능들이 알려져 있는데 대표적으로 병원성 세균의 억제, 설사 및 변비 예방, 면역 증진, 항종양 효과 등이 있다. 균주 마다 다소의 차이는 있겠지만 장내 정착력이 상대적으로 우수하므로 외래 유용단백질의 장내 전달체로서 그 활용도가 높을 것으로 기대된다. 같은 맥락에서 그람 양성 병원성 세균에 대한 항균활성이 우수한 pediocin PA-1을 비피도박테리아를 이용하여 장내에 전달한다면 병원성 세균의 효과적인 억제가 가능할 것으로 판단되어 비피도박테리아에서 pediocin PA-1을 발현시켜 보고자 하였다. 박테리오신이 항균활성을 발휘하기 위해서는 필수적으로 세포외 분비가 일어나야 하는데 이를 위해서는 pediocin 오페론 전체를 클로닝 해야 하는 문제가 발생한다. 따라서 본 저자는 pediocin PA-1 구조 및 면역유전자와 비피도박테리아(*Bifidobacterium adolescentis*)로부터 분비되는 α-amylase의 프로모터 및 분비신호를 융합하여 재조합 DNA를 제작하였고 이를 비피도박테리아에서 복제 가능한 플라스미드(pMG1)와 재조합해 최종 재조합 플라스미드(pPSAB1)를 제작하였다. 재조합 플라스미드로 형질전환 된 대장균으로부터 박테리오신 활성을 확인할 수 있었으며 이를 비피도박테리아(*Bifidobacterium longum*)에 형질전환 했을 때도 박테리오신 활성이 유지되었다. 비피도박테리아로부터 재조합 pediocin



1: *B. longum*
2: *B. longum*(pYMGCAT)
3: *B. longum*(pPSAB1).
Lis: *Listeria monocytogenes*, MG1: *B. longum* MG1 strain.

그림 5. 형질전환 비피도박테리아 상등액의 SDS-PAGE 후 활성 염색(A)과 리스테리아 동시배양(B).

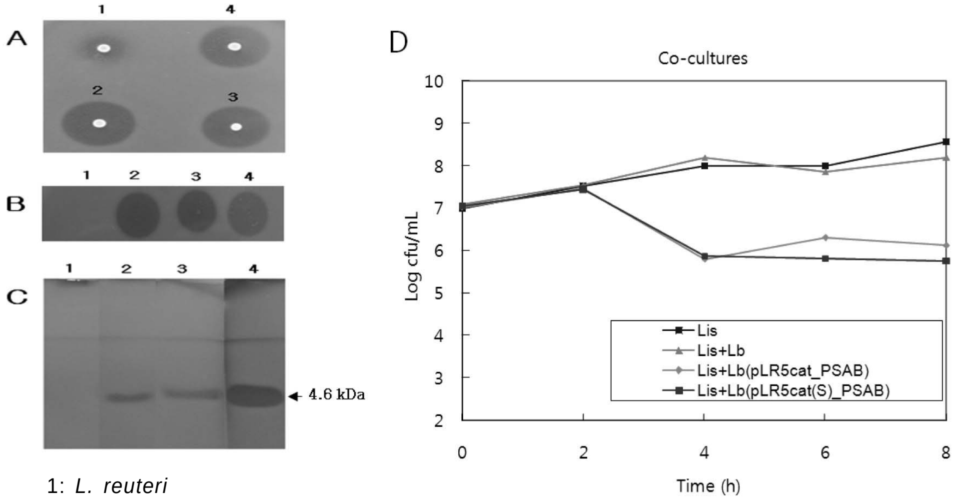
PA-1이 분비되는 지를 검증하기 위해 배양 상등액을 얻어 SDS-PAGE 후 활성 염색을 통해 분비됨을 확인하였고 분비된 재조합 pediocin PA-1의 분자량이 *P. acidilactici* K10이 생산하는 자연 pediocin PA-1의 분자량과 일치함도 확인하였다. 이는 재조합에 사용된 비피도박테리아의 α-amylase 분비신호가 정상적으로 작동했음을 의미한다. 이렇게 획득한 항균활성 pediocin PA-1 생산 재조합 비피도박테리아의 병원성 세균에 대한 억제효과를 검증하기 위해 리스테리아(*Listeria monocytogenes*)와 동시 배양을 수행한 결과 대조구에 비해 리스테리아를 억제하는 효과가 훨씬 우수하였다(그림 5, 5). 추가적으로 동물실험을 통해 in vivo에서도 리스테리아를 억제하는 효과가 입증된다면 박테리오신 및 박테리오신 생산 재조합 균주의 활용도가 훨씬 증가될 것으로 판단된다.

4. Pediocin PA-1의 락토바실러스 발현

비피도박테리아와 더불어 인체 유익균으로 인정되는 속(genus)이 락토바실러스 이다. 따라서 락토바실러스에서도 pediocin PA-1을 이종발현 시키고자 실험을 수행하였다. 앞서 비피도박테리아에서 pediocin PA-1 발현 및 분비를 위해 제작한 재조합 DNA(PSAB: 비피도박테리아 α-amylase의 프로모터 및 분비신호와 pediocin PA-1 구조 및 면역유전자의 결합)를 락토바실러스에서 복제가능한 플라스미드 셔틀벡터(pLR5cat)에 삽입하여 최종 재조합 플라스미드를 제작하였고 대장균 형질전환체에서 박테리오신 활성을 확인하였다. 이를 락토바실러스(*Lactobacillus reuteri*)에 형질전환하여 박테리오신 활성을 분석한 결과 대조구와 확연한 차이를 보였다(그림 6). 비피도박테리아에서와 마찬가지로 형질전환 균주 세포 외로 pediocin PA-1이 분비되는 지 확인하기 위해 배양상등액을 얻어 SDS-PAGE와 활성 염색을 수행한 결과 재조합 pediocin PA-1이 분비되었으며 K10 균주가 생산하는 자연 pediocin PA-1의 분자량과 일치하였다. 이 결과로 앞서 제작한 비피도박테리아의 α-amylase의 프로모터와 분비신호가 다른 속인 락토바실러스에서도 작동한다는 사실을 확인하였다. 또한 리스테리아(*L. monocytogenes*)와의 동시배양에서도 그 억제효과가 대조구와는 확연한 차이를 보여 주었다(그림 6, 6).

III. 결론

유산균이 생산하는 박테리오신은 차세대 항생제 및 천연보존제로서의 잠재성이 커 관심이 증대되고 있다. 특히



1: *L. reuteri*
2: *L. reuteri*(pLR5cat_PSAB)
3: *L. reuteri*(pLR5cat(S)_PSAB)
4: *P. acidilactici* K10. Lis:
Listeria monocytogenes, Lb: *Lactobacillus reuteri* KCTC 3679.

그림 6. 형질전환 락토바실러스 세포(A) 및 배양 상등액(B)의 항균활성과 SDS-PAGE 후 활성 염색(C) 및 리스테리아 동시배양(B).

pediocin PA-1의 경우 nisin에 이어 상업화 가능성 높은 박테리오신 중에 하나이며 nisin과는 달리 번역 후 수식 과정을 거치지 않기 때문에 다양한 목적으로 pediocin PA-1의 이종발현이 연구되어져 왔다. 본 저자 역시 pediocin PA-1의 대량생산과 그람 양성 병원성 세균의 효율적인 억제를 위해서 대장균과 비피도박테리아 및 락토바실러스에서 pediocin PA-1을 이종발현 시키는 연구를 지난 몇 년간 수행하였다. 대량생산을 위한 추가적인 연구가 더 수행되어야 하지만 일차적으로 대장균에서 활성형 혹은 비활성형 재조합 pediocin PA-1을 생산하는데 성공하였고 비피도박테리아와 락토바실러스에서 자연 pediocin PA-1의 분자량과 같은 재조합 pediocin PA-1을 성공적으로 발현 및 분비시켰다. 현재는 GMM(genetically modified microorganisms; 유전자재조합 미생물)에 대한 사용허가가 쉽지는 않지만 앞으로 보편화되는 시대가 오고 pediocin PA-1이 항생제 대체제 및 천연보존제로 상업화되면 여기에 기술된 결과물들에 대한 가치가 상승할 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Drider, D, G Fimland, Y Héchard, LM McMullen, and H Prévost. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70: 564-582.
2. Moon, GS, YR Pyun, and WJ Kim. 2005. Characterization of pediocin operon of *Pediococcus acidilactici* K10 and expression of His－tagged recombinant pediocin PA－1 in *Escherichia coli*. J. Microbiol. Biotechnol. 15:403-411.
3. Ennahar, S, T Sashihara, K Sonomoto, and A Ishizaki. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiol. Rev. 24: 85-106.
4. Moon, GS, YR Pyun, and WJ Kim. 2006. Expression and purification of a fusion typed pediocin PA－1 in *Escherichia coli* and recovery of biologically active pediocin PA－1. Int. J. Food Microbiol. 15:136-140.
5. Moon, GS, YR Pyun, MS Park, GE Ji, and WJ Kim. 2005. Secretion of recombinant pediocin PA－1 by *Bifidobacterium longum*, using the signal sequence for bifidobacterial α－amylase. Appl. Environ. Microbiol. 71:5630－5632.
6. Eom, JE, SK Moon, and GS Moon. 2010. Heterologous production of pediocin PA-1 in *Lactobacillus reuteri*. J. Microbiol. Biotechnol. 20:1215-1218.