

바이오패닝에 의한 Bisphenol A 친화성 펩타이드 서열의 탐색

유익근^{1*} · 최우석²

¹울산대학교 공과대학 화학공학부, ²성균관대학교 공과대학 화학공학부

Screening of Peptide Sequences with Affinity to Bisphenol A by Biopanning

Ik-Keun Yoo^{1*} and Woo-Seok Choe²

¹School of Chemical Engineering and Bioengineering, University of Ulsan, Ulsan 680-749, Republic of Korea

²School of Chemical Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 400-746, Republic of Korea

(Received June 7, 2013 / Accepted June 24, 2013)

Bisphenol A (BPA) is a highly hazardous component to human since it is regarded as one of endocrine disruptors. For the analysis and/or removal of BPA, the searching for the specific ligand with a selective affinity to target BPA is required. In order to find the peptide moiety that specifically binds to BPA, the ultrasound-assisted biopanning was carried out with a phage-displayed peptide library expressing constrained heptamer. After six rounds of positive screening against BPA particles followed by the negative screening against the surface of eppendorf tube, the peptide sequence (CysLysSerLeuGluAsnSerTyrCys) with affinity to BPA was screened based on the order of frequency from the screened phage clones. To further verify the specificity of screened peptide sequence, the cross-binding affinity of the phage peptide toward BPA analogues such as Bisphenol S (BPS) and Bisphenol F (BPF) was also assessed, where the selected phage peptide showed a higher affinity to BPA over BPS and BPF.

Keywords: biopanning, bisphenol A, endocrine disruptor, peptide, ultrasound

비스페놀 A (2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane, BPA)는 폴리카보네이트, 폴리스타이렌, 에폭시 수지 등의 생산에 필요한 주요 화학 원료로서, 대표적인 내분비계 장애물질 중의 하나로 알려지면서 관심을 끌고 있다(Staples *et al.*, 1998). 내분비계 장애물질은 매우 낮은 농도에서도 인체의 내분비계 대사 기능을 저해하기 때문에 심각한 위협이 되고 있는데, BPA 이외에도 프탈레이트, 알킬페놀 등 100여 종 이상의 다양한 물질이 내분비계 장애물질로 알려져 있다(Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2004). BPA는 특히 실생활과 밀접한 각종 플라스틱류, 캔 용기의 코팅에서 침출되는 등 실생활에서 직접적인 위협이 되고 있어, 이의 모니터링 및 제거를 위한 다양한 연구가 진행되고 있다(Goodson *et al.*, 2004). 현재까지 BPA는 주로 가스/액체 크로마토그래피를 이용하여 분석하고 있는데(Stuart *et al.*, 2005), 일반적으로 시료의 전처리가 필요하며 측정 시간이 비교적 길고 검출 농도의 한계가 존재하는 단점이 있다. 이러한 단점은 다른 화학물질의 미량 농도 측정 과정에서도 흔히 발생하는 문제점으로, 해결책의 하나로 특정한 표적 물질에 선택성이 높은 다양한 생물학적 리간드 기반의 바이오센서가 연구되고 있다. 현재까지 발표된 리간드들에는 항체, 효소, 미생물, DNA, 펩타이드 등이 있으며(Parellada *et al.*, 1998; Marrazza *et al.*, 1999; Rose *et al.*,

2002; Védrine *et al.*, 2003), 예를 들어 alkylphenol, polychlorinated biphenyl, isoproturon 등의 표적물질에 선택성을 보이는 리간드들이 탐색되었다.

아미노산 올리고머인 펩타이드의 경우도 여러가지 표적 물질에 대해서 선택성이 높은 서열이 탐색되어 왔는데, 특히 금속 또는 금속 산화물 친화성 서열이 많이 보고되고 있다. 예를 들어 Cd²⁺에 친화성을 보이는 HisSerGlnLysValPhe(HSQKVF), Hg²⁺에 대한 GlyHisHisProHisGly(GHHPHG), Pb²⁺에 대한 ThrAsnThrLeuSerAsn Asn(TNLSNN) 서열이 밝혀졌다(Mejare *et al.*, 1998; Kotrba *et al.*, 1999; Nian *et al.*, 2010). 특히 펩타이드 기반의 리간드는 대장균과 같은 박테리아 표면에 발현시켜 특정 중금속의 선택적 제거가 가능한 생흡착제로 이용하려는 연구들도 수행되었으며 그 외에도 다양한 용도로 응용될 수 있는 장점이 있다(Vijayaraghavan and Yun, 2008; Ravikumar *et al.*, 2011, 2012; Nguyen *et al.*, 2013). 현재까지 펩타이드 서열은 대장균 혹은 파지의 세포표면 디스플레이를 적용한 바이오패닝에 의해 주로 탐색되고 있다. 바이오패닝은 표적 물질의 선정에 제약을 거의 받지 않고 천문학적 숫자의 다양한 펩타이드 서열의 표적 물질에 대한 친화성을 단시간 내에 탐색할 수 있는 장점이 있으나, 기존에 탐색된 서열들은 주로 중금속 유래의 표적 물질에 대한 것으로 BPA와 같은 유기물에 대한 서열 탐색은 매우 드물게 시도되었다.

본 연구에서는 대표적인 내분비계 장애물질인 BPA의 분석

*For correspondence. E-mail: ikyoo@ulsan.ac.kr; Tel.: +82-52-259-2251; Fax: +82-52-259-1689

Table 1. The number of phage in each round of biopanning against bisphenol A

Round	Binding buffer ^a	Initial phage (pfu)	Eluted phage (pfu) ^b			
			EG1	EG2	EG3	ES
1	0.1% Tween 20 + TBS	1×10 ¹¹	2×10 ⁶	3×10 ⁵	3×10 ⁵	Not detected
2	0.2% Tween 20 + TBS	2×10 ¹¹	3×10 ⁷	1×10 ⁷	5×10 ⁶	2×10 ⁶
3	0.3% Tween 20 + TBS	2×10 ¹¹	7×10 ⁷	6×10 ⁷	7×10 ⁶	6×10 ⁶
4	0.4% Tween 20 + TBS	2×10 ¹¹	1×10 ⁷	4×10 ⁶	2×10 ⁶	1×10 ⁷
5	0.5% Tween 20 + TBS	2×10 ¹¹	5×10 ⁷	9×10 ⁶	3×10 ⁶	2×10 ⁷
6	0.6% Tween 20 + TBS	2×10 ¹¹	4×10 ⁷	8×10 ⁶	1×10 ⁶	3×10 ⁷

^aTBS: 50 mM Tris-HCl +150 mM NaCl at pH 7.5

^bElution condition (EG1, the first 10 min elution of BPA-phage by 0.2 M Glycine-HCl at pH 2.2; EG2, the second 10 min elution under same condition; EG3, the third 10 min elution under same condition; ES, the fourth 10 min elution by sonication at 28 kHz)

또는 생흡착제의 기능기로서 작용할 수 있는 펩타이드 서열을 전통적인 바이오패닝 기법에 의해 탐색해 보았다. 또한 탐색된 서열의 선택적 친화성을 검증하기 위해 BPA 유사 물질과의 교차 인지성을 확인하였다. 이와 같이 탐색된 서열은 바이오패닝에 의해 탐색되었던 기존의 펩타이드 서열들이 센서 또는 흡착제의 리간드로서 적용되고 있음을 볼 때 후속 연구를 통해 다양하게 활용될 수 있을 것이다.

스크리닝에 이용한 라이브러리는 양 말단에 시스테인이 있고 사이에 7개의 무작위 아미노산으로 이루어진 고리형 펩타이드를 M13 파지 pIII의 일부로 발현하도록 구성한 파지 표면 디스플레이 시스템(Ph.D.-C7CTM, E8120S)으로 NEB (New England Biolabs, USA)에서 구입하였다. 10 µl의 파지 라이브러리를 990 µl의 binding buffer (TBS buffer with 0.1% Tween 20)에 희석하고 1 ml의 BPA 입자 용액(60 mg/ml)과 섞어 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. Binding buffer는 TBS buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5)에 Tween 20을 첨가한 것으로 Tween 20은 BPA 입자와 파지 사이의 결합을 방해하는 역할을 하게 된다. 후속 패닝 라운드에서는 binding buffer의 Tween 20 농도를 0.1% (v/v)씩 높여가면서 파지의 BPA에 대한 흡착 경쟁을 증가시켜 패닝의 선택성이 향상되도록 하였다. 그 다음 16,000×g에서 원심분리하여 BPA에 흡착되지 않은 파지 입자를 함유한 상등액을 제거하였다. BPA에 약하게 흡착된 파지는 binding buffer로 반복 세척하여 원심분리에 의해 제거한 후, BPA에 강하게 흡착된 파지 입자들을 elution buffer (0.2 M Glycine-HCl at pH 2.2)와 10분간 반응시키고 원심분리하여 파지 pfu (plaque forming unit)를 측정하였다. Elution은 동일한 조건에서 10분씩 3회에 걸쳐 반복 실시하여 BPA로부터 탈착되는 파지를 원심분리, 회수하였다(EG1, EG2, EG3). EG3 단계까지 회수되지 않고 BPA 입자에 강하게 결합한 파지는 28 kHz의 초음파 세척기(Ultrasonic cleaner, Jeio Tech, Korea)에서 파지-BPA 입자를 포함한 에펜도르프 튜브를 10분간 처리하여 탈착되는 파지를 회수하였다(ES). 이와 같이 1라운드 패닝을 완료한 후 ES 단계에서 회수된 파지를 증폭하고, Tween 20 농도를 0.2%로 증가시킨 binding buffer에서의 초기 개수가 2×10¹¹ pfu/ml로 되도록 파지의 농도를 조정하여 2라운드의 패닝을 실시하고 ES 단계에서 회수된 파지를 증폭하였다. 3라운드의 이후

의 패닝도 같은 방법으로 실시하여 총 6라운드의 positive 패닝을 실시하였다.

Table 1에 이와 같이 실시한 6라운드의 패닝 과정에서 이용한 binding buffer의 조성, 각각의 라운드에서 BPA에 흡착된 파지들이 EG, ES elution을 거쳐 회수된 양을 나타내었다. 1라운드 패닝을 제외하고는 각 라운드마다 3회에 걸친 EG elution에서 회수되지 않았던 파지들이 초음파를 이용하는 ES elution을 통해서 추가적으로 회수되는 것을 볼 수 있다. 따라서 초음파를 이용한 파지 elution 방법은 BPA에 상대적으로 더 강하게 흡착되는 파지를 회수할 수 있는 전략으로 적절했다고 판단된다. ES elution 단계에서 회수되는 파지의 양은 2-3라운드에 비해 4-6라운드에서 증가하였지만 1×10⁷, 2×10⁷, 3×10⁷ pfu에 대체로 포화되는 경향을 보이고 있다. 또한 EG elution에서도 4-6라운드에서 회수되는 파지의 양이 대체로 일정한 값으로 포화되고 있어 6라운드에서 패닝을 종료하였다.

앞에서 회수된 파지 중에는 용액이 담겨 있던 에펜도르프 튜브 재질에 친화성이 있는 파지도 같이 섞여 있을 수 있다. 따라서 이를 배제하기 위하여 튜브에 붙지 않는 파지를 선별하는 negative 패닝을 실시하였다. 6라운드에서의 ES elution을 거쳐 얻어진 파지를 증폭시켜 BPA가 첨가되지 않은 TBS 버퍼와 섞고 1.5 ml 에펜도르프 튜브에서 1시간 동안 배양하였다. 파지 용액을 다시 새로운 에펜도르프 튜브에 옮겨 1시간 동안 추가로 배양하여 에펜도르프 튜브에 친화성이 있는 파지가 배제된 파지 용액을 확보하였다. BPA에 대한 positive 스크리닝과 에펜도르프 튜브에 대한 negative 스크리닝을 모두 거친 파지의 표면 펩타이드 서열을 분석하기 위해, 35개의 파지 클론을 무작위로 선택하여 각각 증폭하였다. 증폭된 각각의 파지는 QIA M13 kit (Qiagen)를 이용하여 ssDNA를 추출한후 NEB에서 제공된 -96 gIII sequencing primer를 이용하여 DNA 서열 분석을 의뢰하였다. Table 2에 정리한 바와 같이 서열 분석이 성공한 32개의 샘플 중에서 18개에서 공통 서열로 CysLysSerLeuGluAsnSerTyrCys (CKSLENSYC) 서열이 스크리닝되었다. 양 말단의 시스테인은 실험에서 이용한 펩타이드 라이브러리가 고리형(constrained type)으로 제작된 결과이다. Table 2에서 다른 서열의 경우 빈도가 1-2개로 거의 의미가 없어 1번 서열에서 높은 BPA 친화성을 기대할 수 있을 것으로 판단되지만, 검증을 위해 추가적인 실험

Table 2. Amino acid sequences of BPA binding peptides obtained from phage-displayed peptide library expressing constrained heptamer

No.	Amino acid sequences of peptides	Frequency of each sequence
1	CysLysSerLeuGluAsnSerTyrCys (C KSLENSY C)	18
2	CysLysSerValGlyAsnTyrGlnCys (C KSVGNYQ C)	2
3	CysLysAsnProThrThrGlyThrCys (C KNPTTGTC C)	2
4	CysLysSerLeuGluAsnSerGlnCys (C KSLENSQ C)	1
5	CysAsnProSerAsnArgAsnAspCys (C NPSNRND C)	1
6	CysLysSerProGlyAsnTyrGlnCys (C KSPGNYQ C)	1
7	CysLysSerLeuGluGlnSerTyrCys (C KSLEQSY C)	1
8	CysAsnProSerAsnArgGlnAspCys (C NPSNRQD C)	1
9	CysThrGlyThrThrAsnGlnTyrCys (C TGTTNQY C)	1
10	CysAsnSerProArgProSerThrCys (C NSRPST C)	1
11	CysAsnValGluHisAsnLysThrCys (C NVQHNTK C)	1
12	CysSerThrArgHisThrTyrAspCys (C STRHTYD C)	1
13	CysIleLysSerThrHisAsnHisCys (C IKSTHNNH C)	1
Sum		32

을 진행하였다.

1번 서열(KSLENSYC) 이외에도 비교군으로서 각각 2개의 빈도를 보였던 2, 3번 서열(KSVGNYQC, CKNPTTGTC)에 해당하는 파지와 wild type M13 파지 10^{10} pfu를 각각 앞에서 실시한 패닝 조건에서와 같이 60 mg/ml의 BPA가 첨가된 binding buffer (TBS buffer with 0.1% Tween 20)에 희석하고 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. BPA에 약하게 흡착된 파지는 binding buffer로 반복 세척하여 원심분리에 의해 제거한 후 남은 파지-BPA 복합체는 1 ml의 elution buffer에 넣고 10분간 초음파 세척기에서 처리하여 elution하였다. 이 과정을 3회 반복하여 평균 값으로서 회수된 파지의 양을 Fig. 1에서 비교하였다. 예상한 바와 같이 wild type 파지에서 회수된 파지의 양이 가장 작았고 1번 서열에서 23.4×10^5 pfu의 파지가 회수되어 2, 3번 서열의 3.6,

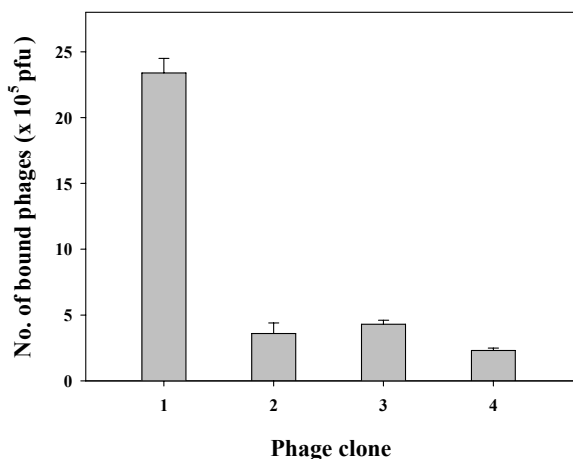


Fig. 1. Comparison of bisphenol A affinity between individual phage peptide screened from 6-round of biopanning: 1, phage displayed with the peptide, KSLENSYC; 2, phage displayed with the peptide, KSVGNYQC; 3, phage displayed with the peptide, CKNPTTGTC; 4, wild type phage. The data are aggregate results from replicate experiments (n=3).

4.3×10^5 pfu와 큰 차이를 보이고 있어 1번 서열의 BPA에 대한 친화성이 상대적으로 높음을 알 수 있다.

또한 1번 펩타이드 서열이 BPA 이외의 다른 유사 물질에도 교차 친화성을 보이는지 검증하기 위해 대조군으로 BPA와 구조가 거의 유사한 BPS (bisphenol S), BPF (bisphenol F)를 선정하였다(Fig. 2). Fig. 1에서와 마찬가지로 방법으로 10^{10} pfu의 파지를 각각 60 mg/ml의 BPA, BPS, BPF가 첨가된 binding buffer (TBS buffer with 0.1% Tween 20)에 희석하고 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 elution하여 회수된 파지의 양을 비교하였다. 이때 BPA, BPS, BPF 입자의 표면적이 각각 달라서 파지의 흡착 표면적이 달라지는 점을 보정할 필요가 있다. 입도분석기 (Particle size analyzer, Microtrac S3500, USA)를 이용하여 BPA, BPS, BPF 입자의 평균 직경을 측정된 결과 각각 1136, 53.5, 23.8 μm 로 측정되었고, 이를 구형으로 가정한 표면적은 각각 4.05×10^6 , 8.99×10^3 , $1.78 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ 로 계산되었다. 따라서 이를 바탕으로 입자 1 mm^2 표면적당 흡착된 파지의 개수로 계산한 결과를 Fig. 3에 비교하였다. 그림에서 보듯이 BPA의 경우 8824 pfu로 BPS 13 pfu, BPF 1198 pfu에 비해 매우 높은 값을 보이고 있어 유사 물질에 대한 교차 친화성이 적음을 알 수 있었다. 이와 같이 Fig. 1과 3에서 실시한 기본적인 검증 실험을 통해 바이오

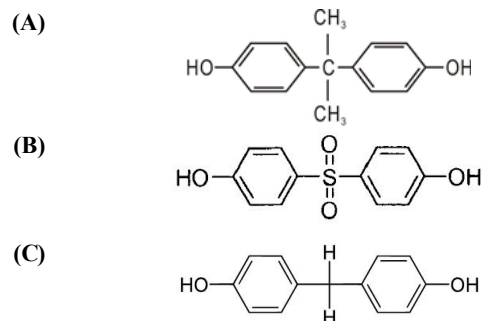


Fig. 2. Structures of bisphenol A (A), bisphenol S (B), bisphenol F (C).

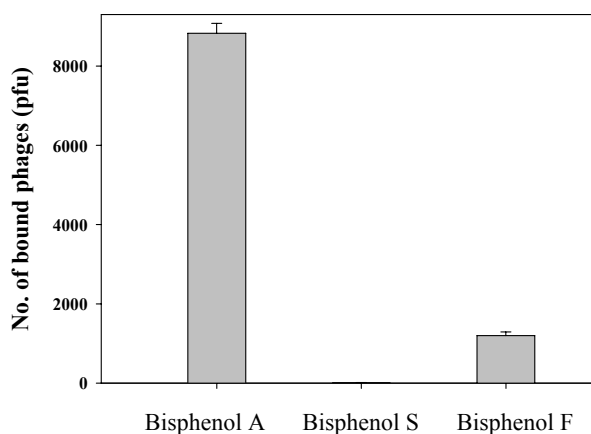


Fig. 3. Comparison of affinity towards bisphenol A and its analogues (bisphenol S, bisphenol F) by the phage displayed with the peptide, CKSLENSYC. The numbers of eluted phage are compensated values, the number of eluted phage per square millimeter of bisphenol A and its analogues particles, respectively. The data are aggregate results from replicate experiments (n=3).

패닝 프로토콜에 의해 스크리닝한 파지 디스플레이 펩타이드 서열이 BPA에 대하여 선택적인 친화성이 있음을 보였다. 본 연구에서는 더 이상의 검증은 진행하지 않았지만, 후속 연구를 통해 보다 다양하게 유사 구조, 혹은 간접 효과를 일으킬 수 있는 물질에 대한 친화성 검증이 필요할 것이다.

적요

비스페놀 A (BPA)는 내분비계 장애물질의 하나로서 인간에게 큰 위협이 되고 있는 물질이다. 따라서 BPA의 분석 및 제거를 위해 BPA에 대해 선택적 친화성을 보이는 특정 리간드 탐색이 요구되고 있다. 본 연구에서는 초음파 처리를 동반한 바이오 패닝 기법을 이용하여 파지 표면 디스플레이 라이브러리로부터 BPA에 친화성이 높은 펩타이드 서열을 탐색하였다. BPA 입자에 대한 6라운드의 positive 스크리닝과 에펜도르프 튜브 표면 재질에 대한 negative 스크리닝 과정을 실시하였고, 이를 통해 BPA에 선택적 친화성이 높은 CysLysSerLeuGluAsnSerTyrCys (CKSLENSYC) 서열을 스크리닝하였다. 또한 확보된 서열의 선택적 친화성을 검증하기 위해 BPA와 구조가 유사한 비스페놀 F (BPF), 비스페놀 S (BPS)에 대해서 교차 친화성이 있는지 평가하였고, 앞에서 선택된 서열이 BPS, BPF에 비하여 상대적으로 BPA에 대한 친화성이 높다는 것을 확인하였다.

감사의 말

이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업 연구임(KRF-2008-521-D00230).

참고문헌

- Goodson, A., Robin, H., Summerfield, W., and Cooper, I. 2004. Migration of bisphenol A from can coating-effects of damage, storage conditions and heating. *Food Addit. Contam.* **21**, 1015-1026.
- Kotrba, P., Doleckova, L., de Lorenzo, V., and Ruml, T. 1999. Enhanced bioaccumulation of heavy metal ions by bacterial cells due to surface display of short metal binding peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1092-1098.
- Marrazza, G., Chianella, I., and Mascini, M. 1999. Disposable DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. *Anal. Chim. Acta* **387**, 297-307.
- Mejare, M., Ljung, S., and Bulow, L. 1998. Selection of cadmium specific hexapeptides and their expression as OmpA fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Eng.* **11**, 489-494.
- Nguyen, T.L.T., Lee, H.R., Hong, S.H., Jang, J.R., Choe, W.S., and Yoo, I.K. 2013. Selective lead adsorption by recombinant *Escherichia coli* displaying a lead-binding peptide. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **169**, 1188-1196.
- Nian, R., Kim, D.S., Nguyen, T., Tan, L., Kim, C.W., Yoo, I.K., and Choe, W.S. 2010. Chromatographic biopanning for the selection of peptides with high specificity to Pb²⁺ from phage displayed peptide library. *J. Chromatogr. A* **1217**, 5940-5949.
- Parellada, J., Narváez, A., López, M.A., Domínguez, E., Fernández, J.J., Pavlov, V., and Katakis, I. 1998. Amperometric immunosensors and enzyme electrodes for environmental applications. *Anal. Chim. Acta* **362**, 47-57.
- Ravikumar, S., Ganesh, R., Yoo, I.K., and Hong, S.H. 2012. Construction of a bacterial biosensor for zinc and copper and its application to the development of multifunctional heavy metal adsorption bacteria. *Process Biochem.* **47**, 758-765.
- Ravikumar, S., Yoo, I.K., Lee, S.Y., and Hong, S.H. 2011. Construction of copper removing bacteria through the integration of two-component system and cell surface display. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **165**, 1674-1681.
- Rodriguez-Mozaz, S., Marco, M.P., Lopez de Alda, M.J., and Barcelo, D. 2004. Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: a review article. *Anal. Bioanal. Chem.* **378**, 588-598.
- Rose, A., Nistor, C., Emnéus, J., Pfeiffer, D., and Wollenberger, U. 2002. GDH biosensor based off-line capillary immunoassay for alkylphenols and their ethoxylates. *Biosens. Bioelectron.* **17**, 1033-1043.
- Staples, C.A., Dom, P.B., Klecka, G.M., O'Block, S.T., and Harris, L.R. 1998. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* **36**, 2149-2173.
- Stuart, J.D., Capulong, C.P., Launer, K.D., and Pan, X. 2005. Analyses of phenolic endocrine disrupting chemicals in marine samples by both gas and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1079**, 136-145.
- Védrine, C., Leclerc, J.-C., Durrieu, C., and Tran-Minh, C. 2003. Optical whole-cell biosensor using *Chlorella vulgaris* designed for monitoring herbicides. *Biosens. Bioelectron.* **18**, 457-463.
- Vijayaraghavan, K. and Yun, Y.S. 2008. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnol. Adv.* **26**, 266-291.