

바이오접합과 자가결합을 이용한 박테리아 세포막의 위치 특이적 형광 표시

양이지 · 임성인[†]

부경대학교 화학공학과
48513 부산광역시 남구 용소로 45
(2021년 12월 14일 접수, 2022년 1월 25일 수정본 접수, 2022년 2월 3일 채택)

Site-specific Dye-labeling of the Bacterial Cell Surface by Bioconjugation and Self-assembly

I Ji Yang and Sung In Lim[†]

Department of Chemical Engineering, Pukyong National University, 45 Yongso-ro, Nam-gu, Busan, 48513, Korea
(Received 14 December 2021; Received in revised form 25 January 2022; Accepted 3 February 2022)

요 약

그람음성균의 외막은 수많은 생물물리학적 및 생화학적 과정이 작용하여 생존력을 유지하도록 설계되어 있는 세포 환경의 가장 바깥 층이다. 세포공학의 발전으로 인해 박테리아의 막 환경을 변경하는 등 유전정보를 원하는 대로 조작할 수 있게 되었고 이는 박테리아를 특정 목적에 적용시킬 수 있게 하였다. 그중 기능성 분자를 박테리아 외막에 표시하는 세포 표면공학은 숙주세포가 특정 외부물질이나 자극에 반응하도록 유도하는 전략 중 하나이다. 기능성 펩타이드 또는 단백질을 세포 표면에 표시하기 위한 방법으로 막 고정 모티프를 융합한 후 세포 내에서 발현하는 방법이 일반적으로 사용되고 있지만 이는 박테리아 시스템에서 발현할 수 없는 외인성 단백질이나 크기가 큰 단백질에는 적용할 수 없다는 한계점이 있다. 박테리아 외막의 구성요소에 자연적으로 존재하는 반응성 그룹과 기능성 물질을 화학접합하는 방법도 있으나 필수 구성 요소의 비특이적 변형으로 인해 세포의 생장이 저해되는 경우가 많다. 본 연구에서는 비천연아미노산 또는 자가결합 도메인을 사용해 대장균의 세포 표면을 부위 특이적으로 형광 표시하는 두 가지의 접근법을 수행하였다. 첫 번째 접근법은 화학선택적 반응성을 지닌 비천연아미노산이 삽입된 펩타이드를 대장균 표면에 발현하여 위치 특이적으로 형광염료를 접합시키는 방법이다. 두 번째 접근법은 자가결합능력을 지닌 이중 이량체 코일-코일에서 유래된 α -나선 도메인을 대장균 외막에 발현하고 녹색 형광 단백질이 융합된 상보적인 α -나선 도메인을 막 표면에 특이적으로 고정하는 방법이다. 제시된 방법들은 위치와 시간이 제어된 방식으로 박테리아 외막에 새로운 기능을 부여하는 방법론으로서 유용하다.

Abstract – The outer membrane of Gram-negative bacteria is the outermost layer of cellular environment in which numerous biophysical and biochemical processes are in action sustaining viability. Advances in cell engineering enable modification of bacterial genetic information that subsequently alters membrane physiology to adapt bacteria to specific purposes. Surface display of a functional molecule on the outer membranes is one of strategies that directs host cells to respond to a specific extracellular matter or stimulus. While intracellular expression of a functional peptide or protein fused to a membrane-anchoring motif is commonly practiced for surface display, the method is not readily applicable to exogenous or large proteins inexpressible in bacteria. Chemical conjugation at reactive groups naturally occurring on the membrane might be an alternative, but often compromises fitness due to non-specific modification of essential components. Herein, we demonstrated two distinct approaches that enable site-specific decoration of the outer membrane with a fluorescent agent in *Escherichia coli*. An unnatural amino acid genetically incorporated in a surface-exposed peptide could act as a chemoselective handle for bioorthogonal dye labeling. A surface-displayed α -helical domain originating from a part of a selected heterodimeric coiled-coil complex could recruit and anchor a green fluorescent protein tagged with a complementary α -helical domain to the membrane surface in a site- and hetero-specific manner. These methods hold a promise as on-demand tools to confer new functionalities on the bacterial membranes.

Key words: Outer membrane, Bacterial surface display, Bioconjugation, Unnatural amino acid, Coiled-coil, Self-assembly

[†] To whom correspondence should be addressed.

E-mail: silim@pknu.ac.kr

§ 이 논문은 포항공과대학교 강인석 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

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.

1. 서 론

세포는 자가 복제가 가능한 생명의 기본 단위로서 수많은 분자들 간의 상호작용 및 생화학 반응의 유기적인 조절을 통해 생명력을 유지한다. 원핵생물인 박테리아는 빠른 증식 속도와 단순한 세포 구조, 상대적으로 적은 유전체 함량 등의 장점으로 인해 일찍이 세포생물학의 표준 연구 대상으로 자리잡았으며 관련 응용 산업의 역사도 길다. 종별 다양한 유전형 및 표현형을 지닌 박테리아를 특성 분석하고 이를 바탕으로 분류, 보관, 배양, 제형 기술을 통해 유용 산물을 획득하는 고전적인 생물 공정은 여전히 산업적으로 유효한 가운데 고도화된 분자생물학 도구들을 갖춘 합성생물학, 대사공학 분야의 연구자들은 유전체(genomics), 전사체(transcriptomics), 단백질체(proteomics) 분야에서 빠르게 축적되어 온 연구결과에 기반하여 세포를 유전자 수준에서 능동적으로 개량하는 연구를 활발히 진행 중이다[1]. 세포막은 세포질과 세포외환경을 구분 짓는 물리적 경계이기도 하지만 세포 외부의 물질을 선택적으로 흡수 또는 차단하는 관문의 역할, 외부의 자극을 특정 생물학적 신호로 전환 및 증폭하는 변환기 역할을 하기도 한다[2-4]. 이러한 생물학적 기능은 세포막 이중층(bilayer)의 주요성분인 인지질(phospholipid)뿐만 아니라 막에 고정되어 존재하는 막단백질, 지질다당류 등의 독립적 또는 협동적 활성에 의해 매개된다[5,6]. 특히, 정밀한 3차 구조를 지닌 막단백질은 특정 물질에 선택적인 화학반응, 물질전달, 신호증폭 등의 역할을 높은 정확도(fidelity)로 수행할 수 있다[7].

세포막 공학에 있어 가장 기본적인 접근은 관심 기능을 지닌 막단백질을 과발현하거나 관심 기능을 지닌 단백질을 막단백질에 융합하여 세포외막에 고정함으로써 특정 기능성이 증대된 세포주를 구축하는 것이다. *Bacillus licheniformis* 유래의 지질분해효소인 lipase를 대장균표면에 발현시켜 세포전체를 생체 촉매로 사용할 수 있게 하거나 Cd^{2+} 를 흡착하는 hexa-histidine(His)이 세포막 표면에 고정된 대장균을 금속 친화성 흡착제로 사용하는 등의 연구가 진행되었다[8,9]. 앞서 서술하였듯이 박테리아의 세포외막에 관심 단백질을 표현하는 가장 일반적인 방법은 관심 단백질을 박테리아 본연의 막단백질에 유전자 융합하는 것이다. 이때 막단백질은 고정대(anchor) 역할을 한다. 숙주가 대장균일 경우 주로 효과적으로 사용되는 고정대 막단백질은 lpp-OmpA를 포함하여 다수가 알려져 있다[10-12]. lpp-OmpA에 Sortases의 인식부위(아미노산 잔기)를 포함하는 재조합 단백질을 융합해 외막 표면에 고정한 후 Sortases가 단백질을 부위 특이적으로 절단할 수 있다는 특징을 사용하여 재조합 단백질의 발현 및 정제를 위한 새로운 방법을 제시하는 연구가 진행되었다[13]. 또한 미생물 내의 수은 이온 농도의 증가에 반응하여 수은 저항성 유전자의 전사를 활성화하는 금속조절단백질 MerR를 외막단백질인 ice nucleation protein(INP)를 고정대로 사용해 표면 발현한 연구는 세포막 공학에 의해 변형된 박테리아가 중금속 생물 흡착체로서 유용하게 사용될 수 있음을 시사하였다[14]. 고정대 막단백질 융합법은 기술적 장벽이 낮은 반면, 다합체(multimer) 구조의 단백질이나 박테리아에서 발현이 불가능한 동물세포 유래 단백질에는 적용하기 어렵다. 더욱이 관심 기능분자가 단백질이 아닌 핵산 또는 합성저분자 물질일 경우 이 방법은 적용이 불가능하다. 대안으로서, 관심 기능분자를 세포외막에 자연적으로 존재하는 활성기(reactive group)에 화학적으로 접합시킬 수 있다[15]. 막 단백질에 존재하는 아미노기를 표적으로 해 DNA 접합체를 제조하고 살아있는 세포 표

면에 화학적으로 접합시켜 DNA를 표면에 패턴화할 수 있는 방법이 보고되었다[16]. 그러나 사용되는 화학접합반응의 위치 특이성 및 반응 그룹 선택성이 낮을 경우 기타 생분자들의 구조 변형 및 기능 손실, 세포성장 저해를 초래할 수 있다[17].

표적 분자 간의 특이적 결합을 유도하기 위한 방법으로 특이 반응을 지닌 비천연아미노산을 활용할 수 있다. 비천연아미노산은 아미노기와 카복실기를 모두 포함하는 중심 구조를 지녔으나 잔기는 천연아미노산에서 발견되지 않는 그룹으로 치환되어 있는 분자이다. 자연적인 조건에서 비천연아미노산은 생분자로 인식되지 않지만, 분자생물학적 도구를 통해 진화된 단백질 생합성 관여 분자들이 존재할 경우 비천연아미노산은 단백질의 새로운 구성요소로 포섭될 수 있다[18]. 단백질은 여러 아미노산이 생합성된 중합체로서 각각의 아미노산을 하나씩 추가하는 과정인 번역(translation)을 통해 생합성되며, 특정 아미노산을 지정하는 코돈(codon)이 연속적으로 배열된 mRNA, 이에 상보적으로 결합하는 anti-코돈을 가지는 tRNA, tRNA에 특정 아미노산을 연결해주는 aminoacyl-tRNA synthetase, 아미노산 간 아마이드 결합을 촉매하는 리보솜이 번역 과정 시 필요한 분자체들이라는 점은 익히 잘 알려져 있다. 세 가지 뉴클레오타이드의 연속배열로 암호화된 코돈의 개수는 64가지이고 그 중 61개의 코돈은 20개의 천연아미노산중 하나를 지정할 수 있는 반면 나머지 세 개의 코돈인 amber (UAG), ochre (UAA), opal (UAG)은 번역 종결신호로서, 특정 아미노산을 지정하지 않기 때문에 비천연아미노산 삽입을 위한 확장된 유전 코드(expanded genetic code)로 활용될 수 있다. 또한 비천연아미노산을 인지하는 tRNA와 aminoacyl-tRNA synthetase pair는 단백질을 합성하는 박테리아 세포의 내인성 tRNA와 aminoacyl-tRNA synthetase pair와 교차활성이 없어야 하므로 고세균(archaea)처럼 박테리아와 진화적 계통이 먼 세포의 tRNA와 aminoacyl-tRNA synthetase pair로부터 방향성 진화를 거쳐 선별된다[19,20]. 이 때 tRNA는 anti-코돈의 변형을 거쳐 비천연아미노산을 지정하는 주요 종결코돈인 amber 코돈에 상보적으로 결합하는 amber suppressor tRNA로 전환된다. Aminoacyl-tRNA synthetase 또한 돌연변이와 라이브러리 스크리닝을 거쳐 비천연아미노산을 특이적으로 인식해 amber suppressor tRNA와 연결하는 기능을 갖는다. 이러한 과정으로 생성된 amber suppressor tRNA와 aminoacyl-tRNA synthetase pair를 사용해 단백질의 원하는 부위에 특이적으로 비천연아미노산을 삽입할 수 있다[21]. 확장된 유전 코드로 단백질에 삽입 가능한 비천연아미노산은 현재까지 보고된 바로 100가지가 넘는다. 특히 p-azido-L-phenylalanine은 phenylalanine의 변이체로서 잔기에 아자이드 그룹(azide)을 포함하고 있다. 아자이드 그룹은 생분자에 존재하는 모든 반응기에 불활성이지만 알카인(alkyne) 그룹에 대해 특이적인 cycloaddition 반응을 통해 triazole 공유결합을 형성하는 특징을 보인다. 아자이드와 알카인 모두 자연계에는 존재하지 않는 그룹이므로 비천연아미노산 삽입을 통해 아자이드를 지닌 단백질 또는 세포는 알카인 특이적인 접합 활성을 갖게 된다. 이를 생물직교활성(bioorthogonality)이라고 한다.

표적 분자 간의 특이적 결합을 유도하기 위한 또다른 방법으로 단백질의 자가결합 현상을 이용할 수 있다. 코일-코일 도메인은 진핵생물 단백질의 10%에서 발견되는 일반적인 모티프이다. 코일은 소수성 또는 하전된 7개의 아미노산 잔기가 반복된다는 특징을 가지며 두개 이상의 코일이 서로를 감싸는 형태로 코일-코일 도메인을 형성

한다[22]. 코일-코일 모티프는 기능성 분자를 연결하고 자가조립하는 것으로 잘 알려진 모티프 중 하나이다. Methyl-cytosine binding domain 2(MBD2)와 p66 α 는 세포내에서 DNA의 메틸화에 중요한 단백질 복합체의 일부이며 해리상수가 12.4 nM로 높은 친화성을 가지는 역평행 이중이량체를 형성한다[23,24]. 코일-코일 모티프는 생체분자나 나노구조 및 재료의 자가조립을 위한 유망한 도구로 사용된다. 바이오센서의 금 표면을 류신지퍼캡타이드로 코팅한 후 상보적인 짝 코일을 관심단백질의 항원단백질과 융합한 후 간단한 인큐베이션으로 짝코일에 고정하여 바이오센서 표면에 단백질의 부위별 고정화 방법을 개발하였다[25]. 또한 코일-코일 모티프 중 하나인 ZE 및 ZR 코일은 약한 자가조립능력을 가진 streptavidin의 C 또는 N말단에 융합되어 streptavidin의 자가결합능력을 향상시켰다[26].

본 연구에서는 고정대 막단백질 융합법의 적용이 불가한 관심 기능분자를 대장균 세포외막에 위치 특이적으로 표현하기 위한 두 가지 방법을 제시한다. 첫째, 생물직교 반응활성이 있는 비천연아미노산을 세포외막에 표현하는 방법이다(Fig. 1(a)). 별도로 생산된 관심 기능분자는 화학링커를 통해 비천연 아미노산과 위치 특이적 공유결합을 통해 고정될 수 있을 것이다. 둘째, 코일-코일 이중이량체(coiled-coil heterodimer)를 구성하는 코일 중 하나를 세포외막에 표현하는 방법이다(Fig. 1(b)). 짝코일과 융합된 형태로 별도 생산된 관심 기능분자는 세포외막의 코일과 비공유 자가결합(non-covalent self-assembly)을 통해 고정될 수 있을 것이다.

2. 실험

2-1. 균주 및 벡터구축

pET-coil B-GFP 발현벡터는 coil B-GFP 단백질의 유전자와 Ampicillin 저항성 유전자(AmpR)를 포함하는 pET21a(+) 계열의 재조합 벡터이며 유전자 합성 및 클로닝을 통해 제조되었다. pET-lpp-OmpA-coil A는 lpp-OmpA-coil A 단백질의 유전자와 Ampicillin 저항성 유전자(AmpR)를 포함하는 pET21a(+) 계열의 재조합 벡터이며 유전자 합성 및 클로닝을 통해 제조되었다. 재조합 벡터는 *E. coli* DH5 α 를 숙주로 이용하여 증폭 및 선별되었다. 제작된 재조합 벡터의 유전자 서열은 BIONICS에 시퀀싱을 의뢰해 확인하였다. BL21, E.cN[27]을 열충격법을 통해 각각 pET-coil B-GFP 및 pET-lpp-OmpA-coil A로 형질전환하였다. 형질전환 발현 균주를 37 °C의 조건에서 Luria-Betani(LB)-Ampicillin 고체배지에 12시간 이상 배양 후 Ampicillin 저항성을 가지는 단일 콜로니를 얻었다. 얻어진 단일 콜로니는 단백질 발현에 사용되었다.

2-2. 단백질 발현 및 정제

단백질 생산을 위한 모든 종배양(seed culture)은 LB-Ampicillin 액체배지에서 37 °C, 200 rpm 조건으로 Ampicillin (100 μ g/mL)을 첨가해 수행하였다. 종배양된 LB-Ampicillin 액체배지에서 4 mL를 채취해 400 mL 본 배양 LB-Ampicillin 액체배지에 첨가하였다. 분광광도계(BioDrop)로 600 nm에서 측정된 흡광도(OD₆₀₀)가 0.6이

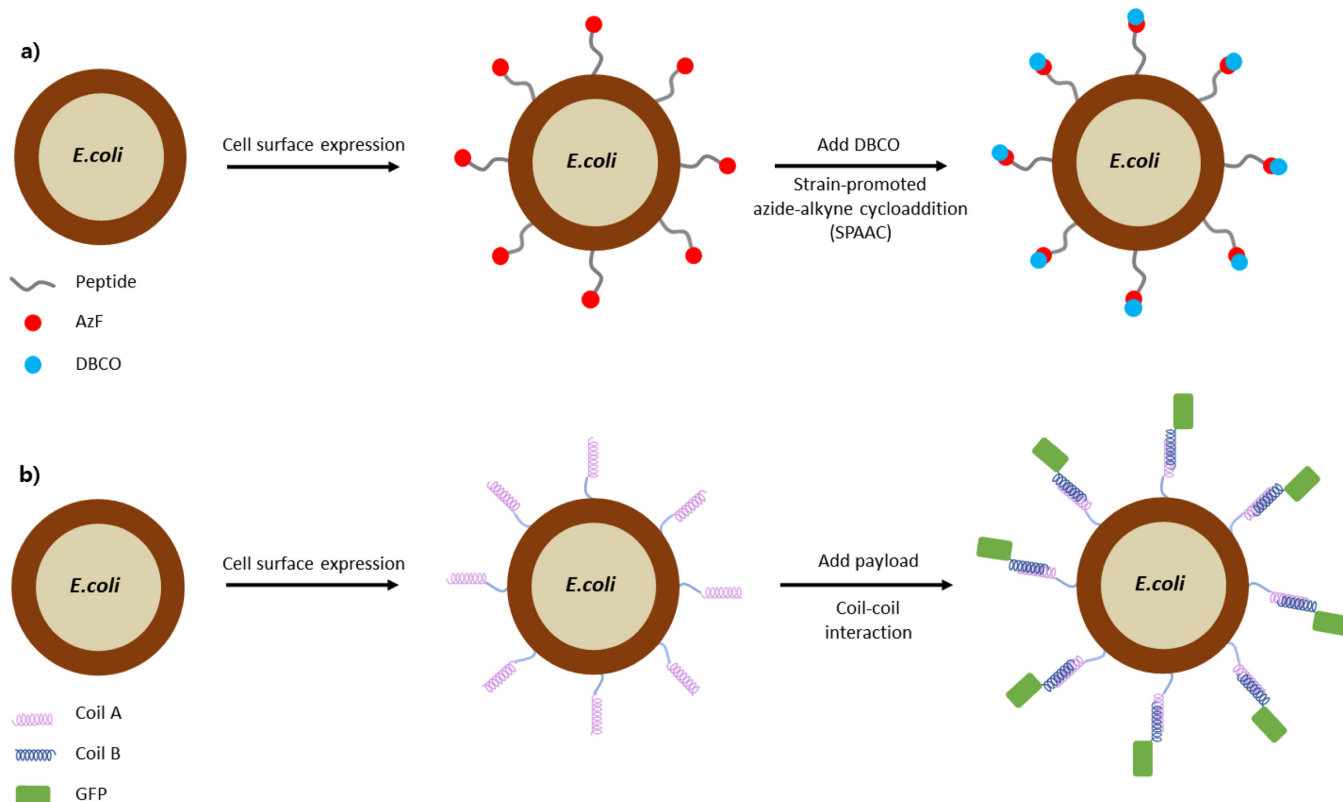


Fig. 1. Schematics of site-specific cell surface labeling. a) Surface presentation of a peptidyl motif containing an unnatural amino acid, p-azido-L-phenylalanine (AzF), and its bioorthogonal conjugation with dibenzocyclooctyne (DBCO) or its derivatives. b) Surface presentation of an α -helical motif (Coil A) and its assembly with green fluorescent protein (GFP) tagged with a complementary α -helical motif (Coil B).

될 때까지 37 °C, 200 rpm에서 배양한 후 1 mM Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)로 단백질 발현을 유도하였다. 이후 30 °C로 온도를 낮추어 밤새 배양하였다. 모든 본 배양은 전술한 조건으로 수행되었다. 배양된 세포는 최종 OD₆₀₀를 측정하고 4,000 g, 4 °C의 조건에서 10분간 원심분리해 수확하였다. Lpp-OmpA-coil A 발현세포의 본 배양은 표면 발현 분석전행직전에 수행되었다. Coil B-GFP발현세포는 단백질 정제를 위해 원심분리 후 용해완충액을 첨가해 재현탁시켜 Lysozyme (최종농도 1 mg/mL)을 400 μ L 첨가한 후 4 °C 조건에서 30분간 교반하였다. 준비된 시료는 초음파법으로 세포파쇄 후 10,000 g, 4 °C의 조건에서 20분간 원심분리해 불용성, 가용성분획으로 분리되었다. 가용성분획의 단백질은 Ni-NTA Agarose resin을 1.5 mL 첨가한 후 4 °C의 조건에서 10분간 교반하였다. Ni-NTA Agarose resin과 결합한 단백질을 폴리프로필렌 컬럼을 통해 불순물과 분리하였다. 세척완충액 15 mL를 첨가해 불순물을 세척한 후 용출완충액 500 μ L를 5번 나누어 첨가해 컬럼을 통과하는 단백질용액을 수집한 후 SDS-PAGE로 분석하였다.

2-3. 비천연아미노산의 삽입

pET-lpp-OmpA-WT를 주형으로 사용해 PCR에 의한 부위 지정 돌연변이를 수행하여 지정부위에 앰버코돈(UAG)을 도입하였다. 앰버코돈이 추가된 pET-lpp-OmpA-AzF 또한 전술한 절차를 통해 유전자 서열을 확인하였다. pET-lpp-OmpA-AzF로 형질전환된 *E. coli* DH5 α 에 CaCl₂를 처리하여 적격세포를 제작해 15% glycerol을 포함하는 0.1 M CaCl₂ 용액에 재현탁한 후 영하 80 °C에 보관하였다. 제작된 적격세포에 chloramphenicol 저항성을 가지는 pEVOL-pAzF를 열충격법으로 추가적으로 형질전환한 후 chloramphenicol과 Ampicillin을 포함하는 LB 고체배지에 37 °C의 조건에서 12시간 이상 계대배양하여 단일 콜로니를 얻었다. 전술한 조건에서 전 배양을 수행하고 chloramphenicol과 Ampicillin을 포함하는 100 mL LB 액체배지에 전배양 액체배지 1 mL와 p-Azido-L-phenylalanine (AzF, 최종농도 1 mM)을 첨가해 37 °C, 200 rpm의 조건에서 흡광도(OD₆₀₀)가 0.6이 될 때까지 배양하였다. lpp-OmpA-AzF, AzF 특이적 tRNA/tRNA synthetase 발현을 유도하기 위해 1 mM IPTG 및 0.1%(w/v) L-(+)-Arabinose를 배양물에 첨가하였다. 유도 후 37 °C, 200 rpm의 조건에서 12시간 이상 배양 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리해 세포펠렛을 수확하였다. 세포펠렛을 인산완충생리식염수(PBS)로 세척한 후 50% glycerol을 포함하는 PBS에 재현탁해 사용전까지 영하 80 °C에 보관하였다.

2-4. 시험관 내 자외선조사 형광분석 실험

비천연아미노산 AzF와 AF 405 Dibenzocyclooctyne (DBCO)의 화학접합 및 형광분석은 다음과 같이 진행되었다. 영하 80 °C에 보관되어 있던 lpp-OmpA-AzF, lpp-OmpA-WT, DH5 α 세포펠렛을 13,000 rpm에서 2분간 원심분리하고 PBS로 재현탁해 세척하였다. AF 405 DBCO(최종농도 100 μ M)를 첨가하고 볼텍스 믹서에 고정 한 후 실온에서 2시간동안 교반하고 13,000 rpm에서 2분간 원심분리해 상층액을 제거한 후 PBS로 2회 세척하였다. 13,000 rpm에서 2분간 원심분리한 후 UV로 AF 405 DBCO 라벨링 결과를 확인하였다. 코일 자가결합에 의한 세포표면라벨링은 다음과 같이 진행되었다. 본 배양 후 lpp-OmpA-coil A 세포를 PBS로 재현탁해 세척하고 13,000 rpm에서 2분간 원심분리한 후 0.5 mg/mL coil B-GFP를 1

mL 첨가해 실온에서 1시간동안 교반하였다. 13,000 rpm에서 2분간 원심분리한 후 PBS로 세척하고 13,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 UV로 형광 분석하였다.

2-5. 유세포분석실험

E. coli WT와 lpp-OmpA-coil A 발현 균주(OD₆₀₀: 1; $\sim 10^9$ cells/mL)를 13,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 수확하고 PBS로 세척한 후 3×10^7 cells/mL가 되도록 희석하였다. 그 후 10 μ M coil B-GFP를 포함하는 1 mL PBS로 재현탁하고 볼텍스 믹서에 고정하여 30분간 교반하였다. 13,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 PBS로 2회 세척한 후 최종 부피가 1 mL이 되도록 PBS에 재현탁하였다. 각 실험에 대해 30,000개의 세포가 분석되었다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 비천연아미노산의 부위 특이적 화학반응을 이용한 세포 표면 형광 염색

pET-lpp-OmpA-WT는 막관통단백질인 lpp-OmpA의 C말단에 수용성이 높은 펩타이드가 연결된 융합 단백질의 유전자 발현을 제어하는 벡터이다. 비천연아미노산인 AzF를 세포막표면에 제시하기 위해 융합단백질의 유전자 코돈 235번째 위치에 종결코돈(amber, TAG)을 삽입한 pET-lpp-OmpA-AzF를 구축하였다(Fig. 2(a)). 비천연아미노산 p-azido-L-phenylalanine (AzF)을 인식하는 amber suppressor tRNA/tRNA synthetase pair의 발현벡터 pEVOL-pAzF[28]과 pET-lpp-OmpA-AzF로 *E. coli*를 공동형질전환하여 AzF 삽입 가능한 균주인 lpp-OmpA-AzF를 구축한 후, 해당 융합단백질의 세포표면 발현 및 AzF의 위치 특이적 삽입을 유도하였다. DBCO 그룹을 지닌 물질은 AzF와 strain-promoted azide-alkyne cycloaddition(SPAAC) 반응을 통해 트리아졸(triazole) 고리를 형성한다고 알려져 있다(Fig. 2(b))[29].

E. coli lpp-OmpA-AzF 막표면에 제시된 AzF와 DBCO-Dye의 특이적 화학접합을 확인하기 위해 *E. coli* lpp-OmpA-AzF와 DBCO-Dye를 혼합한 후 일정 시간 뒤 세척하였다. 균주 펠렛에 대한 UV 조사 결과 Dye에 의한 형광이 관찰되었으며 DBCO-Dye를 첨가하지 않은 *E. coli* lpp-OmpA-AzF에서는 형광이 관찰되지 않았다(Fig. 3(a)). 형광제의 강한 비특이적 세포막 흡착 또는 불특정 세포막 성분과의 공유결합에 의한 발광 가능성을 탐색하기 위해 대조균인 *E. coli* lpp-OmpA-WT, *E. coli* WT를 DBCO-Dye로 동일하게 처리한 후 UV를 조사한 결과 두 대조균 모두 형광이 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 DBCO-Dye가 세포막 표면에 발현된 펩타이드에 위치 특이적으로 삽입된 AzF와 선택적 SPAAC 반응으로 고정되어 발광하였음을 의미한다(Fig. 3(b)). 이러한 형광 접합법은 이중 세포 군집 상황에서 박테리아의 표적 이미징 목적으로 유용하게 사용될 수 있다. 위치 특이적 비천연아미노산 삽입 및 SPAAC는 단백질의 특정 위치에 새로운 기능 물질을 부착하는 용도로 유용하게 사용되어 왔다. 항체-약물 접합체 제조, 단백질 약물의 반감기 개선을 위한 PEG, 지질 또는 알부민 접합 등이 주된 사례이다[30-32]. 세포막에 AzF를 표출한 세포 또한 SPAAC를 통해 다양한 기능 물질로 변형될 수 있다. 천연아미노산의 잔기인 아민(amine), 싸이올(thiol)의 반응성을 이용한 기존의 세포막 기능화 방법은 손쉬운 접근성 대비 접합 위치 비특이성으로 인한 세포 생장력 손상의 위험이 크다. 반면, SPAAC

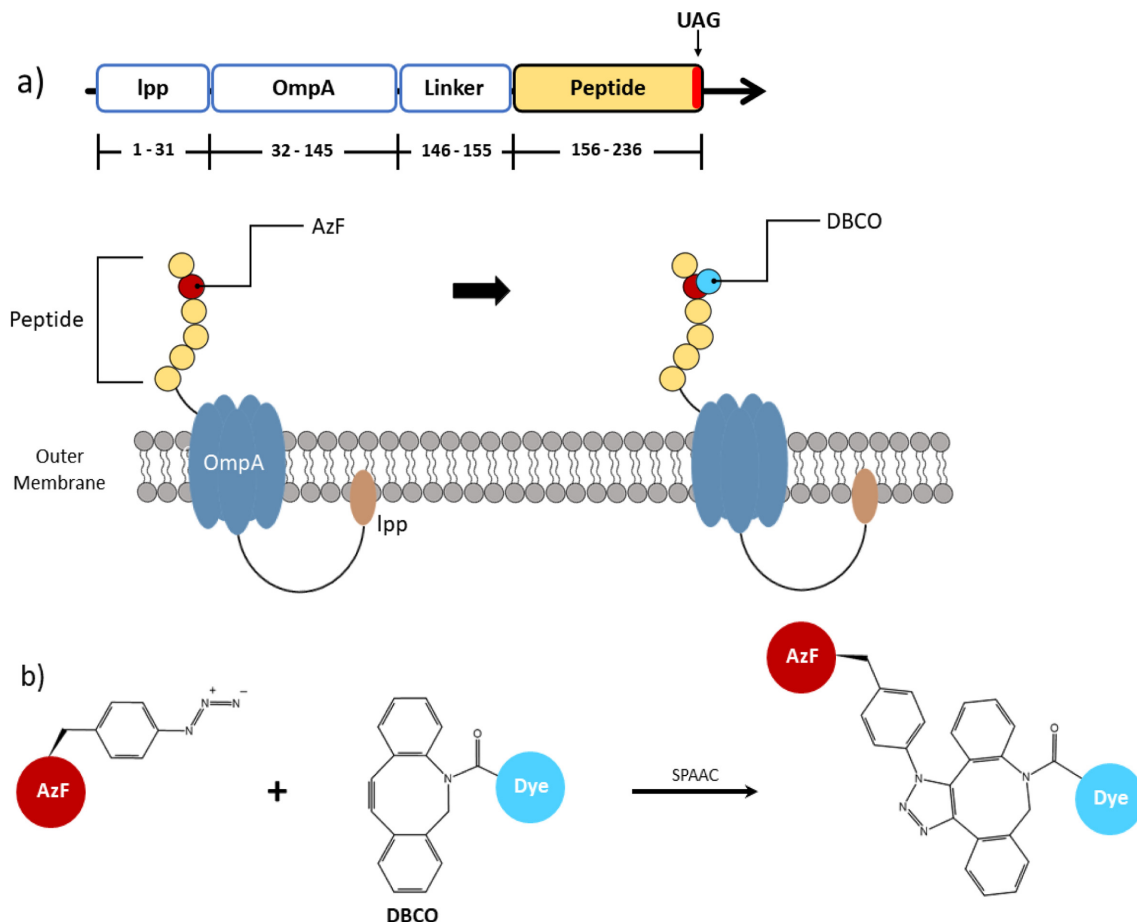


Fig. 2. Site-specific decoration of the cell surface by unnatural amino acid incorporation and bioorthogonal chemistry. a) Schematics of the gene construct of lpp-OmpA-peptide fusion protein (upper) and the reaction of surface-expressed AzF with DBCO-Dye (lower). Numbers indicate the size of each domain in amino acids. The site of AzF incorporation is denoted UAG. b) Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition of AzF and DBCO-Dye.

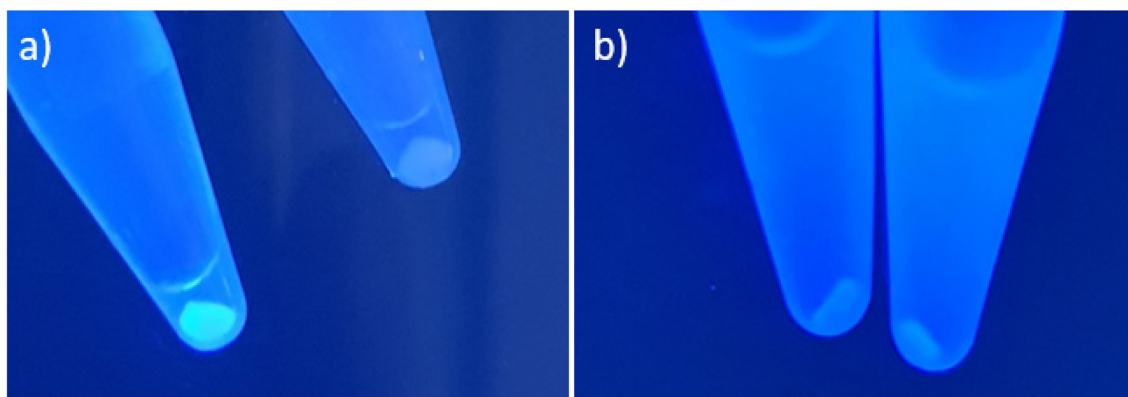


Fig. 3. Images of UV-irradiated fluorescence analyses to confirm the site-specific reaction between AzF and DBCO-Dye. a) lpp-OmpA-AzF mixed with DBCO-Dye (left) and lpp-OmpA-AzF without DBCO-Dye (right). b) lpp-OmpA-WT mixed with DBCO-Dye (left) and *E. coli* WT mixed with DBCO-Dye (right).

는 생물직교성 덕분에 세포막 접합의 위치 및 밀도를 제어할 수 있으므로, 세포 성장성을 유지하면서 세포막의 리모델링이 가능하다.

3-2. 코일-코일 자기결합력을 이용한 세포 표면 형광 염색

자가결합을 하는 coil A와 coil B를 세포 표면 형광표지 도구로 사용하기 위해서 coil A를 세포 표면에 고정하도록 설계된 pET-lpp-

OmpA-coil A 벡터(Fig. 4)로 형질전환된 lpp-OmpA-coil A 균주와 coil B를 green fluorescent protein (GFP)에 연결시킨 pET-coil B-GFP 벡터로 형질전환된 Coil B-GFP 균주를 구축하였다. 세포 표면 표지물질이 되는 coil B-GFP는 C-말단에 있는 His tag의 금속이온과의 친화성을 이용한 친화성 크로마토그래피로 정제되었다. 정제 후 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동법(SDS-PAGE)으로 coil

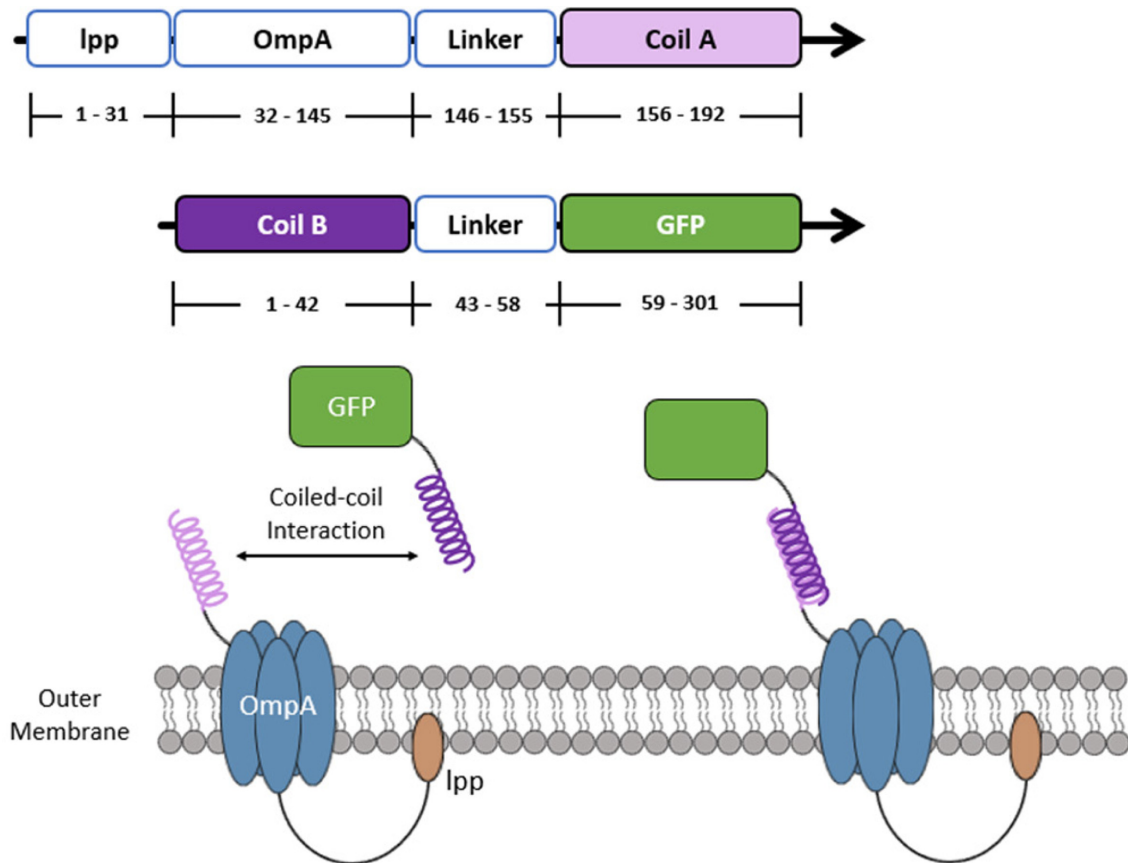


Fig. 4. Schematics of the gene constructs of lpp-OmpA-coil A fusion protein and coil B-GFP (upper) and self-assembly of coil B-GFP and surface-expressed coil A (lower). Numbers indicate the size of each domain in amino acids.

B-GFP의 발현과 순도를 확인하였다(Fig. 5(a)). 전기영동결과 35 kDa의 사이즈 마커 아래에 위치하는 밴드를 관찰할 수 있었으며 이로 인해 33.39 kDa의 분자량을 가지는 coil B-GFP가 성공적으로 발현되었음을 확인하였다. 정제된 coil B-GFP와 세포 표면에 발현된 coil A의 자가결합으로 인한 특이적 형광표지를 정성적으로 확인하기 위해, 표지물질 coil B-GFP를 lpp-OmpA-coil A 균주 및 *E. coli* WT 세포와 각각 혼합하였다. PBS 세척 후 세포펠렛에 자외선을 조사하여 형광분석을 진행하였다. lpp-OmpA-coil A 균주는 coil A와 coil B-GFP의 자가결합으로 GFP에 의한 형광을 띠었지만 *E. coli* WT의 경우 형광이 검출되지 않았다(Fig. 5(b)). 이러한 결과는 coil A와 coil B의 특이적 자가결합력에 의해 lpp-OmpA-coil A 균주의 세포막 표면에 coil B-GFP가 고정되었음을 의미한다.

세포 표면 형광표지를 정량적으로 분석하기 위해 유세포분석기를 이용하였다. 유세포분석기는 세포 표면 발현분야에서 가장 일반적으로 사용되는 분석법으로서 형광 염색된 세포를 유동시켜 레이저를 이용해 산란된 빛과 형광을 검출한 후 해당 신호를 분석한다. Coil B-GFP로 처리된 lpp-OmpA-coil A 균주의 경우 세포당 평균 형광도가 강하게 나타난 반면 coil B-GFP로 동일하게 처리된 *E. coli* WT의 경우 형광이 검출되지 않았다(Fig. 5(c)). GFP에 의한 평균 형광 수치는 *E. coli* WT와 lpp-OmpA-coil A 균주가 각각 48, 39,942로서 832배의 차이를 보여 이중이량체 코일쌍을 이용한 성공적인 세포막 형광표지를 확인하였다(Table 1). 이러한 결과는 coil B-GFP가 *E. coli* WT의 세포막 표면 물질과는 비특이적 흡착 또는

결합을 거의 하지 않지만, coil A가 세포막 표출된 lpp-OmpA-coil A 균주와는 특이적 코일-코일 상호작용으로 인해 세포막 표면에 고정될 수 있음을 의미한다.

4. 결 론

세포막 공학은 특정 물질을 외막 표면에 고정시킴으로써 세포 본연의 생리학적 활성에 특이 기능성을 더하여 주는 유용한 분자생물학적 도구이다. 예를 들어, 인간의 종양세포에 대한 감응성 및 종양 미세환경 군집화 경향을 보이는 악독화 살모넬라의 외막에 항암 펩타이드를 고정시킴으로써 훨씬 향상된 항암 유효성을 보이는 항암 살모넬라를 획득하였다[33]. 최근 FDA 판매 허가를 받은 항암세포 치료제 Kymriah는 인간의 T 면역세포의 표면에 특정 암세포를 인지하는 단백질을 부착하여 우수한 항암효과를 달성하였다[34]. 기능성 단백질을 외막에 고정하는 방법으로서 내인성 막단백질에 기능성 단백질을 유전자 융합하는 방식이 일반적이지만, 더 다양한 종류의 단백질과 핵산, 합성저분자 등 비펩타이드성 물질을 외막에 고정하기 위해서는 제어가능하고 효율성 높은 새로운 방법이 필요하다. 첫 번째 방법론으로서, 본 연구는 대장균의 막단백질 세포 외 노출 부위에 생체적교반응성을 지닌 비천연아미노산을 삽입하고, 알카인 그룹을 지닌 비펩타이드성 물질이 해당 비천연아미노산과 위치 특이적 공유결합으로 고정될 수 있음을 보였다. 두 번째로, 본 연구는 이중 특이적 자가결합력을 지닌 코일-코일 도메인 중 하나의 코일

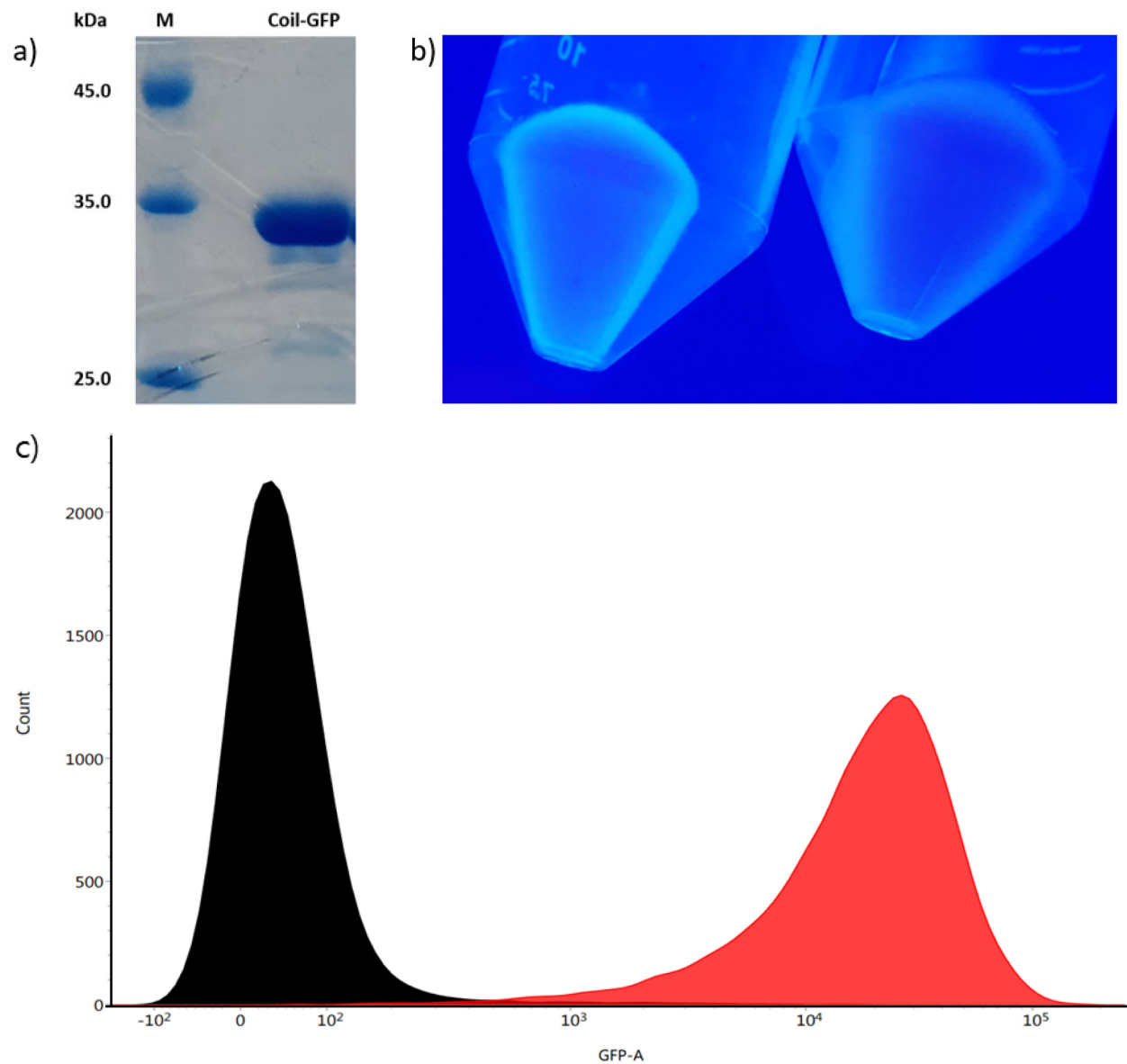


Fig. 5. a) SDS-PAGE result of purified coil B-GFP. b) Results of UV-irradiated fluorescence analysis to confirm cell surface labeling by coil-coil interaction for *lpp*-OmpA-coil A (left) and *E. coli* WT (right). c) Flow cytometric analyses of surface labeling for *lpp*-OmpA-coil A (red) and *E. coli* WT (black).

Table 1. Parameters obtained from flow cytometric analyses

Name	Events	FSC-Mean	SSC-Mean	GFP-Mean
<i>E. coli</i> WT	29,391	22,073	21,740	48
<i>lpp</i> -OmpA-coil A	29,271	22,056	21,715	39,942

모티프가 위와 동일한 내인성 막단백질의 카복실 말단에 유전자 융합되어 외막 고정되어 있는 대장균을 제조하였다. 다른 결합 짝 코일 모티프로 말단 표지된 형광단백질은 코일-코일 자가결합력에 의해 해당 대장균 외막의 코일 모티프와 위치 특이적 비공유결합으로 고정될 수 있었다. 이러한 방법론은 기존 시스템으로 세포막 고정이 불가능 했던 다양한 기능성 물질에 적용될 수 있기 때문에 세포치료제, 환경정화균주 개발에 있어 진보된 플랫폼의 역할을 할 것으로 기대된다.

감 사

이 논문은 부경대학교 자율창의학술연구비(2021년)에 의하여 연구되었음.

References

1. Read, T. D. and Massey, R. C., “Characterizing the Genetic

- Basis of Bacterial Phenotypes Using Genome-Wide Association Studies: A New Direction for Bacteriology," *Genome Med.*, **6**(11), 109(2014).
2. Qing, G., Gong, N., Chen, X., Chen, J., Zhang, H., Wang, Y., Wang, R., Zhang, S., Zhang, Z., Zhao, X., Luo, Y. and Liang, X.-J., "Natural and Engineered Bacterial Outer Membrane Vesicles," *Biophys. Rep.*, **5**(4), 184-198(2019).
3. van Bloois, E., Winter, R. T., Kolmar, H. and Fraaije, M. W., "Decorating Microbes: Surface Display of Proteins on Escherichia Coli," *Trends Biotechnol.*, **29**(2), 79-86(2011).
4. Kechagia, J. Z., Ivaska, J. and Roca-Cusachs, P., "Integrins as Biomechanical Sensors of the Microenvironment," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**(8), 457-473(2019).
5. Patel, D. S., Qi, Y. and Im, W., "Modeling and Simulation of Bacterial Outer Membranes and Interactions with Membrane Proteins," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **43**, 131-140(2017).
6. Varki, A., "Biological Roles of Glycans," *Glycobiology*, **27**(1), 3-49(2017).
7. Bond, P. J. and Sansom, M. S. P., "The Simulation Approach to Bacterial Outer Membrane Proteins (Review)," *Mol. Membr. Biol.*, **21**(3), 151-161(2004).
8. Sousa, C., Cebolla, A. and de Lorenzo, V., "Enhanced Metal-adsorption of Bacterial Cells Displaying Poly-His Peptides," *Nat. Biotechnol.*, **14**(8), 1017-1020(1996).
9. Jo, J.-H., Han, C.-W., Kim, S.-H., Kwon, H.-J. and Lee, H.-H., "Surface Display Expression of Bacillus Licheniformis Lipase in Escherichia Coli Using Lpp'OmpA Chimera," *J. Microbiol.*, **52**(10), 856-862(2014).
10. Jose, J., "Autodisplay: Efficient Bacterial Surface Display of Recombinant Proteins," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **69**(6), 607-614(2006).
11. Nicchi, S., Giuliani, M., Giusti, F., Pancotto, L., Maione, D., Delany, I., Galeotti, C. L. and Brettoni, C., "Decorating the Surface of Escherichia Coli with Bacterial Lipoproteins: A Comparative Analysis of Different Display Systems," *Microb. Cell Fact.*, **20**(1), 33(2021).
12. Kang, S.-M., Rhee, J.-K., Kim, E.-J., Han, K.-H. and Oh, J.-W., "Bacterial Cell Surface Display for Epitope Mapping of Hepatitis C Virus Core Antigen," *FEMS Microbiol. Lett.*, **226**(2), 347-353(2003).
13. Fasehee, H., Rostami, A., Ramezani, F. and Ahmadian, G., "Engineering E. Coli Cell Surface in Order to Develop a One-Step Purification Method for Recombinant Proteins," *AMB Express*, **8**(1), 107(2018).
14. Weon, B., H, W. C., Jan, K., Ashok, M. and Wilfred, C., "Enhanced Mercury Biosorption by Bacterial Cells with Surface-Displayed MerR," *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**(6), 3176-3180(2003).
15. Bi, X., Yin, J., Chen Guanbang, A. and Liu, C.-F., "Chemical and Enzymatic Strategies for Bacterial and Mammalian Cell Surface Engineering," *Chem. - Eur. J.*, **24**(32), 8042-8050(2018).
16. Hsiao, S. C., Shum, B. J., Onoe, H., Douglas, E. S., Gartner, Z. J., Mathies, R. A., Bertozzi, C. R. and Francis, M. B., "Direct Cell Surface Modification with DNA for the Capture of Primary Cells and the Investigation of Myotube Formation on Defined Patterns," *Langmuir*, **25**(12), 6985-6991(2009).
17. Bi, X., Yin, J., Chen Guanbang, A. and Liu, C.-F., "Chemical and Enzymatic Strategies for Bacterial and Mammalian Cell Surface Engineering," *Chem. - Eur. J.*, **24**(32), 8042-8050(2018).
18. Noren, C. J., Anthony-Cahill, S. J., Griffith, M. C. and Schultz, P. G., "A General Method for Site-Specific Incorporation of Unnatural Amino Acids into Proteins," *Science*, **244**(4901), 182-188(1989).
19. Kobayashi, T., Nureki, O., Ishitani, R., Yaremchuk, A., Tukalo, M., Cusack, S., Sakamoto, K. and Yokoyama, S., "Structural Basis for Orthogonal tRNA Specificities of Tyrosyl-tRNA Synthetases for Genetic Code Expansion," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **10**(6), 425-432(2003).
20. Wang, L., Xie, J., Deniz, A. A. and Schultz, P. G., "Unnatural Amino Acid Mutagenesis of Green Fluorescent Protein," *J. Org. Chem.*, **68**(1), 174-176(2003).
21. Mehl, R. A., Anderson, J. C., Santoro, S. W., Wang, L., Martin, A. B., King, D. S., Horn, D. M. and Schultz, P. G., "Generation of a Bacterium with a 21 Amino Acid Genetic Code," *J. Am. Chem. Soc.*, **125**(4), 935-939(2003).
22. Utterström, J., Naeimipour, S., Selegård, R. and Aili, D., "Coiled Coil-Based Therapeutics and Drug Delivery Systems," *Adv. Drug Delivery Rev.*, **170**, 26-43(2021).
23. Walavalkar, N. M., Gordon, N. and Williams, D. C., "Unique Features of the Anti-Parallel, Heterodimeric Coiled-Coil Interaction between Methyl-Cytosine Binding Domain 2 (MBD2) Homologues and GATA Zinc Finger Domain Containing 2A (GATAD2A/P66a)*," *J. Biol. Chem.*, **288**(5), 3419-3427(2013).
24. Gnanapragasam, M. N., Scarsdale, J. N., Amaya, M. L., Webb, H. D., Desai, M. A., Walavalkar, N. M., Wang, S. Z., Zu Zhu, S., Ginder, G. D. and Williams, D. C., "P66a-MBD2 Coiled-Coil Interaction and Recruitment of Mi-2 Are Critical for Globin Gene Silencing by the MBD2-NuRD Complex," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**(18), 7487(2011).
25. Kruis, I. C., Löwik, D. W. P. M., Boelens, W. C., van Hest, J. C. M. and Puij, G. J. M., "An Integrated, Peptide-Based Approach to Site-Specific Protein Immobilization for Detection of Biomolecular Interactions," *Analyst*, **141**(18), 5321-5328(2016).
26. Paloni, J. M. and Olsen, B. D., "Coiled-Coil Domains for Self-Assembly and Sensitivity Enhancement of Protein-Polymer Conjugate Biosensors," *ACS Appl. Polym. Mater.*, **2**(3), 1114-1123(2020).
27. Ou, B., Yang, Y., Tham, W. L., Chen, L., Guo, J. and Zhu, G., "Genetic Engineering of Probiotic Escherichia Coli Nissle 1917 for Clinical Application," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**(20), 8693-8699(2016).
28. Chin, J. W., Santoro, S. W., Martin, A. B., King, D. S., Wang, L. and Schultz, P. G., "Addition of P-Azido-L-Phenylalanine to the Genetic Code of Escherichia Coli," *J. Am. Chem. Soc.*, **124**(31), 9026-9027(2002).
29. Lutz, J.-F., "1,3-Dipolar Cycloadditions of Azides and Alkynes: A Universal Ligation Tool in Polymer and Materials Science," *Angew. Chem., Int. Ed.*, **46**(7), 1018-1025(2007).
30. Lim, S. I., Hahn, Y. S. and Kwon, I., "Site-Specific Albumination of a Therapeutic Protein with Multi-Subunit to Prolong Activity in Vivo," *J. Controlled Release*, **207**, 93-100(2015).
31. Lim, S. I., Mizuta, Y., Takasu, A., Hahn, Y. S., Kim, Y. H. and Kwon, I., "Site-Specific Fatty Acid-Conjugation to Prolong Protein Half-Life in Vivo," *J. Controlled Release*, **170**(2), 219-225(2013).
32. Maruani, A., Smith, M. E. B., Miranda, E., Chester, K. A., Chudasama, V. and Caddick, S., "A Plug-and-Play Approach to

- Antibody-Based Therapeutics via a Chemoselective Dual Click Strategy," *Nat. Commun.*, **6**(1), 6645(2015).
33. Park, S.-H., Zheng, J. H., Nguyen, V. H., Jiang, S.-N., Kim, D.-Y., Szardenings, M., Min, J. H., Hong, Y., Choy, H. E. and Min, J.-J., "RGD Peptide Cell-Surface Display Enhances the Targeting and Therapeutic Efficacy of Attenuated *Salmonella*-Mediated Cancer Therapy," *Theranostics*, **6**(10), 1672-1682(2016).
34. Ali, S., Kjekken, R., Niederlaender, C., Markey, G. and Saunders, T. S., "The European Medicines Agency Review of Kymriah (Tisagenlecleucel) for the Treatment of Acute Lymphoblastic

Leukemia and Diffuse Large B-Cell Lymphoma," *Oncologist*, **25**(2), e321-e327(2020).

Authors

I Ji Yang: Master's Course, Department of Chemical Engineering, Pukyong National University, Busan 48513, Korea; diddlwl78@naver.com

Sung In Lim: Assistant Professor, Department of Chemical Engineering, Pukyong National University, Busan 48513, Korea; silim@pknu.ac.kr