

유산균을 이용한 백신 단백질 생산 연구동향

김슬아, 이일교, 한남수
충북대학교 식품생명공학과

1. 개요

유산균(젖산균, lactic acid bacteria)은 식품산업에서 이용되는 중요한 미생물로 다양한 탄소원을 이용해 젖산을 주로 생성하는 그람양성세균이다. 식품에 있어서 acetoin이나 diacetyl과 같은 향기성분을 만들고 dextran과 같은 다당을 생성하여 물성개선 등의 효과를 제공하기도 한다[1]. 인체 내에서는 장내 유해 세균 증식을 막아 면역력을 정상으로 조절하고 아토피와 건선 같은 피부질환을 개선하며, 비만 및 대사증후군을 억제하는 효과 등 숙주의 건강에 도움을 주는 균으로 알려져 있다. 식품산업에서는 *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, 그리고 *Pediococcus* 등이 많이 이용되고 있다[2].

1978년, 재조합 대장균을 사용하여 인슐린을 대량 생산한 연구를 시작으로 미생물을 이용해 의약품을 생산하는 연구가 진행되었고, 이후로 연구자들은 독성이 없고 유전공학에 적용이 쉬운 더욱 안전한 균주를 찾고자 하였다[3]. 그 중 *Lactococcus lactis*는 치즈와 같은 유제품에 많이 사용되는 안전한 균주이며 유전공학적 도구가 많이 개발된 좋은 후보였다[3, 4]. 따라서, 유산균에서는 처음으로 이 균주를 이용해 치료용 단백질인 interleukin-10을 발현하는 연구가 수행되었으며, 그 이후 *Lactobacillus*를 포함하여 여러 유산균 숙주를 이용한 치료제 생산 연구가 수행되었다[5].

유산균의 대사경로는 생물공학 용도로 사용되는 다른 미생물에 비해 단순하여 유용 물질의 합성능력과 생산되는 대사물질의 다양성이 제한되는 반면, 오히려 단순한 대사경로는 본 미생물을 대사공학적 용도로 개발하는 데 있어서 장점으로 평가된다[6]. 더욱이 에너지 대사경로와 생합성 경로가 거의 완벽하게 분리되어있어 서로 간에 영향을 미치지 않는 점은 큰 장점으로 간주된다[3, 5]. 이러한 장점들 때문에 최근 유산균을 매개로 하여 치료제를 개발하려는 연구가 진행되고 있다. 아래는 유산균을 이용한 치료제 개발 전략을 나타낸 그림이다.

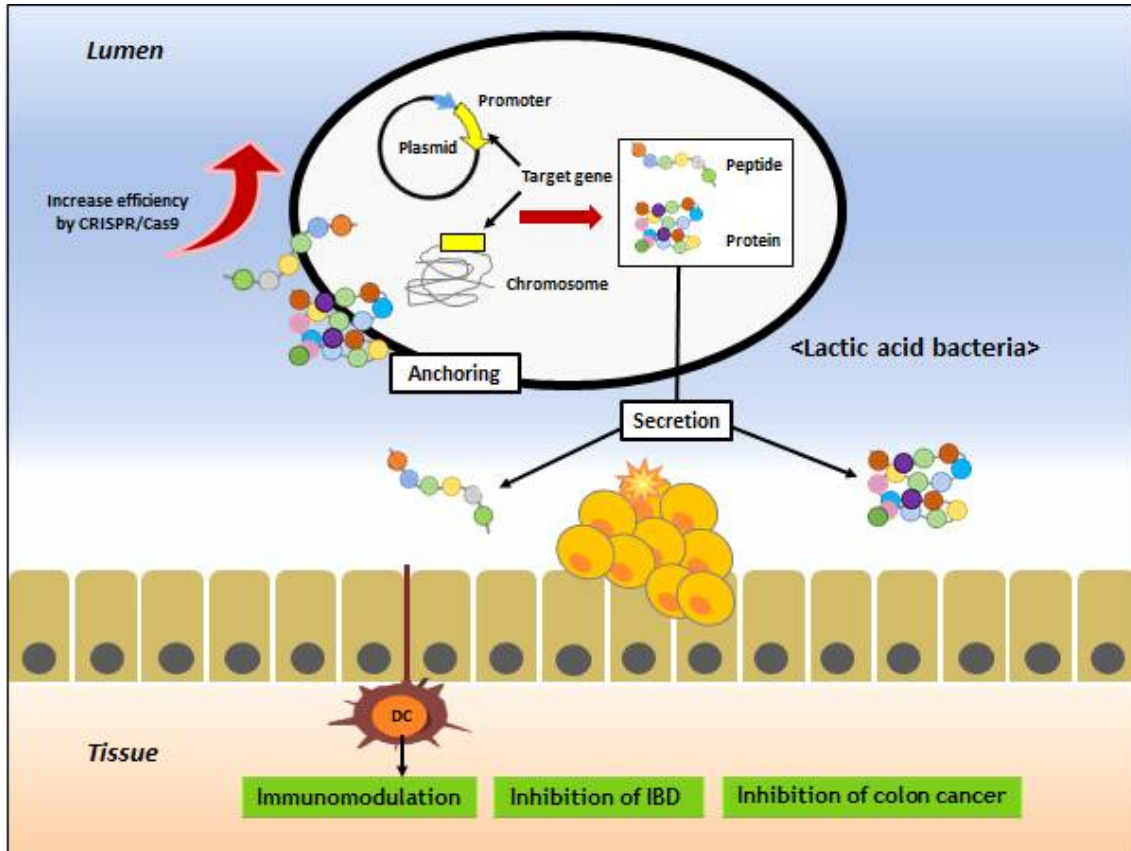


그림 1 유산균 치료제 개발 전략

2. 유산균 치료제 연구동향 및 개발 현황

1) 연구 필요성

유산균 Drug Delivery System(DDS)이란 유산균을 위장관(Gut Intestinal Track, GIT)까지 전달한 후 치료약물을 발현 및 분비시키는 시스템을 말한다. 이를 위해서는 유산균 기반 유전자 치료제의 핵심 기술로 꼽히는 DNA 재조합 기술과 DNA 운반체라고 불리는 발현벡터 제작 기술이 요구된다[7]. 이 기술은 운반하고 싶은 특정 DNA서열을 바꾸어 유산균을 이용해 발현시키기 때문에 생물공학, 치료용 단백질 의약품 등 다양한 분야에서 폭넓게 응용이 가능하다[8]. 유산균은 위장관에서 살아남는 능력이 뛰어나 원하는 곳까지 단백질 치료제가 도달하도록 도와주며, GRAS로 분류되어 부작용이 적고 주사제가 아닌 경구투여가 가능하다는 장점이 있다. 유산균 DDS는 기존의 비(非)생물치료(non-living therapeutics)가 갖는 한계들

을 보완한다는 점에서 의의를 갖는다. 아래는 유산균을 이용한 약물전달시스템구축 과정과 이를 대장암치료에 활용한 사례이다[7].

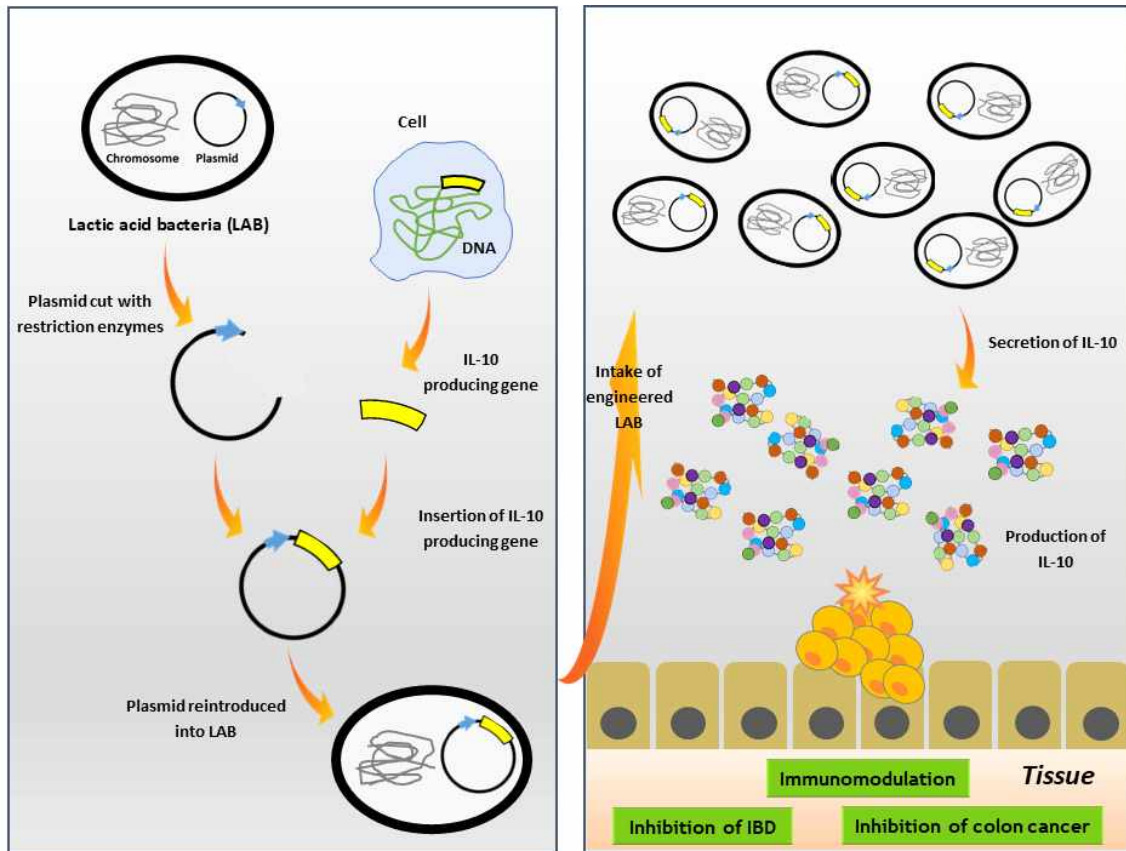


그림 2 재조합 유산균을 이용한 IL-10 생산

2) 연구동향

치료용 단백질을 유산균에서 생산하는 방법으로는 목적 단백질 유전자를 플라스미드나 염색체에 삽입하여 발현시키는 방법이 있으며, 주로 *Lactococcus*와 *Lactobacillus*를 활용한 연구가 많이 진행되었다[3]. 또한 치료용 단백질이 세포 밖으로 배출되도록 signal peptide를 이용한 분비시스템과 anchor peptide를 활용하여 표면발현 시키는 시스템이 연구되고 있다[9, 10].

● 유산균 발현시스템

지금까지 유산균의 다양한 벡터는 *Lactococcus*, *Lactobacillus*, 그리고 *Leuconostoc*의 자체 벡터의 복제원점을 사용함으로써 구축되었다.

발현시스템으로는 단백질과 효소 같은 다양한 물질들을 효율적으로 생산할 수 있게 유전자가 항상 고농도로 발현될 수 있는 항시프로모터와 발현수준을 적절히 조절할 수 있는 유도프로모터를 이용한 시스템이 사용되었다. 대표적으로 *Lc. lactis*에서 항균 펩타이드인 nisin을 이용해 유전자발현을 조절하는 NICE 시스템이 있다. 최근에는 *Lactobacillus*와 *Leuconostoc* 에서도 항시발현 뿐만 아니라, sakacinP나 sucrose를 이용한 유도발현 시스템이 개발되기도 하였다[12, 13].

표1 유산균 발현벡터 시스템 개발 현황 [3, 12]

Host strain	Promoter type	Name of promoters	References
<i>Lactococcus</i>	Constitutive	P45	Zhu <i>et al.</i> , 2015
		P32	Zhu <i>et al.</i> , 2015
		P8, P5, P3, and P2	Zhu <i>et al.</i> , 2015
	Inducible	P170	Madsen <i>et al.</i> , 1999
		PxyIT	Miyoshi <i>et al.</i> , 2004
		SICE	Benbouziane <i>et al.</i> , 2013
		ACE system	Linares <i>et al.</i> , 2015
		NICE system	Mierau and Kleerebezem 2005; Song <i>et al.</i> , 2017a
		NICE system	Berlec <i>et al.</i> , 2018
<i>Lactobacillus</i>	Inducible	Sakacin P	Karimi <i>et al.</i> , 2016; Karlskas <i>et al.</i> , 2014; Sorvig <i>et al.</i> , 2005
<i>Leuconostoc</i>	Constitutive	P710	Cho <i>et al.</i> , 2014
		04C	Park <i>et al.</i> , 2017
	Inducible	P1409	Cho <i>et al.</i> , 2014

● 시그널 펩타이드(Signal peptide)

시그널 펩타이드는 단백질의 N말단 쪽에 위치해 분비될 수 있도록 하는 특수한 소수성의 아미노산 배열 15~30개이며, 이를 바탕으로 세포 내에서 다양한 장소로 보내진다. 일반적으로 외래 유전자로부터 발현시킨 단백질은 세포 외로 배출되지 못하고 세포 내에서 축적되어 유산균 재조합체를 치료제로 사용하는 경우 약리적 활성이 매우 떨어진다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 치료용 단백질에 signal peptide를 결합하여 세포 외 분비 효율을 증가시키는 연구가 진행되었다[9]. 유산균과 같은 그람 양성균에서는 signal peptide를 이용해 단백질을 세포 외로 배출시킨 후 말단을 인식하는 signal peptidase가 작용하여 절단하는 기작의 type I 이

가장 많이 이용된다. 가장 대표적인 예로 각각 *Lc. lactis*와 *Streptococcus* M6 유래 signal peptide를 치료용 단백질 N-말단에 부착하여 secretion 카세트를 구성한 사례가 있다. 아래는 그람양성균에서 type I의 signal peptide를 이용해 단백질을 세포 외로 배출시키는 기작이다[9, 10].

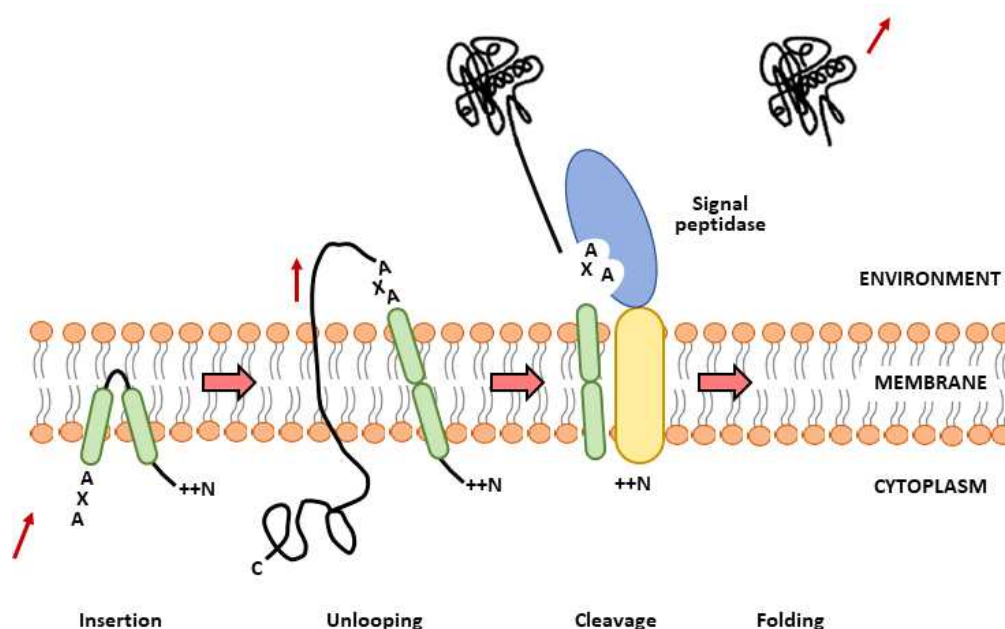


그림3. 그람양성균에서 type I signal peptide의 단백질 배출 기작

● 앵커 펩타이드 (anchor peptide)

유산균과 같은 그람 양성세균은 두꺼운 세포벽에 치료용 단백질을 고정시킬 수 있어 동물 또는 인간 숙주에게 경구 투여 될 때 세포 외로 충분히 노출될 수 있게 한다. 이를 가능하게 하는 앵커 펩타이드는 세포 표면 발현에 있어서 필요한 아미노산 서열로 단백질이 세포벽이나 막에 고정될 수 있도록 해주며 그 종류로는 다섯 가지가 있다: (i) transmembrane anchors, (ii) lipoprotein anchors, (iii) LPXTG anchors, (iv) LysM-repeat anchors (v) S-layer protein anchors. 특히 LPXTP 도메인은 다른 앵커 펩타이드에 비해 단백질이 세포벽에 고루 분포되어 발현되는 특징이 있어 표면 발현 시스템에 많이 이용된다. 아래 그림은 앵커 펩타이드가 세포 표면에 고정되는 기작을 보여준다[14, 15].

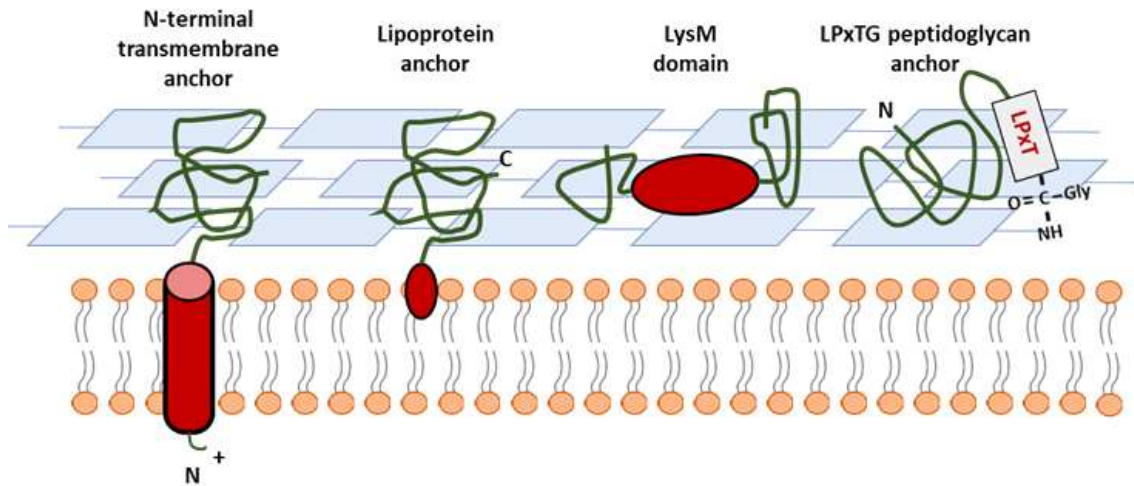


그림 5 앵커 펩타이드 세포 표면 고정 기작

2) 유산균 치료제 개발 현황

최근 Intrexon, AnGes, Mucosis 등 기업에서 유산균으로 치료용 단백질을 분비 또는 세포 표면 발현시키는 시스템을 개발하고 있다. 이들 기업들은 치료가 어려운 IBD, HIV, 1형 당뇨병, 암과 같은 질병을 치료 또는 완화 시킬 수 있는 유산균을 개발하여 산업적으로 이용하고자 한다. 아래는 재조합 유산균을 이용하여 임상 시험 사례이다.

표 2. 재조합 유산균을 포함한 약물의 임상시험 사례 [3]

Drug	Phase	Company	Host	Recombinant protein	Indication
FluGem-A	Phase I	Mucosis	BLP/ <i>L. lactis</i>	Influenza vaccine antigen	Influenza vaccine
SynGem RSV	Phase I	Mucosis	BLP/ <i>L. lactis</i>	RSV-F antigen	RSV vaccine
AG011	Phase I/II	Intrexon	<i>L. lactis</i>	IL-10	Ulcerative colitis
AG013	Phase I/II	Intrexon	<i>L. lactis</i>	TFF-1	Oral mucositis
AG014	Phase I	Intrexon	<i>L. lactis</i>	Anti-TNF α antibody fragment	Inflammatory bowel disease
AG019	Phase I	Intrexon	<i>L. lactis</i>	IL-10 and proinsulin	Type I diabetes
BLS-ILB-E710c	Phase I/II	AnGes	<i>Lb. casei</i>	HPV 16 E7	HPV vaccine
MucoCept	Phase I planned	Osel	<i>Lb. jensenii</i>	Anti-HIV antibody fragment	HIV prevention

● 염증성 장 질환의 예방 및 치료

염증성 장 질환 (IBD)은 전 세계 수백만의 사람들에게 영향을 미치며 장의 염증을 유발하는 두 가지 만성 질환, 즉 크론병 (CD)과 궤양성 대장염 (UC)을 말한다. IBD치료를 위해 재조합 *Lc. lactis*를 이용하여 IL-10을 발현시키는 연구가 처음으로 진행되었고, 이 후 더 효과적인 단백질 발현을 위해 stress-inducible controlled expression (SICE) system과 secretion system을 도입하기도 하였다[16, 17]. 재조합 유산균을 이용해 치료용 단백질 IL-10을 발현시켰을 때 동물실험에서 효과적인 IBD억제 효과를 보였다. 또한 anti-TNF α 를 분비하는 재조합 *Lc. lactis*를 경구투여하는 방법으로 IBD를 억제하는 연구도 진행되었다 [18].

국내동향으로는 김치에서 분리한 유산균인 *Pediococcus*를 이용하여 대장암치료에 효과를 보이는 P8과 시스타인A 유전자를 삽입해 항암 단백질을 대량 생산하는데 성공하였다. 마우스 모델에서 재조합 *Pediococcus*를 경구 투여한 결과, 항암효과가 나타났고 장내에서도 해당 단백질이 검출돼 장내 정착 후 지속적으로 발현 및 분비됨이 확인되었다 [7,8].

● 자가면역 질환의 치료

재조합 유산균은 알레르기, 당뇨병 및 비만과 같은 자가 면역 장애의 치료에 대한 가능성으로 주목을 끌었다[3]. 제 1 형 당뇨병 (T1D)은 병원성 자가 반응성 T 세포에 의한 인슐린-생성 췌장 β -세포의 선택적 파괴를 특징으로 하는 만성자가 면역 질환의 두드러진 예이다. 이 질환을 제어하기 위해 항체 기반 면역 요법 및 광범위한 면역 억제 약물이 개발되었지만, 이러한 치료에는 단기간 치료가 어렵고 장기 투여 시 독성 효과가 나타날 수 있으며, 약물을 사용했을 때 약물면역과 비자가면역을 구분하지 못한다는 단점이 있다. 따라서, 항원-기반 면역 요법은 면역계의 기능을 유지하면서 질병 관련 T 세포를 선택적으로 표적화하는 것이 연구의 초점이 되고 있다. 해외 연구동향으로는 재조합 *Lc. lactis*를 이용해 IL-10과 함께 프로인슐린을 발현시킨 연구가 진행되었으며, 당뇨병을 유발한 마우스 모델에서 재조합 유산균을 경구 투여하였을 때 혈당을 정상으로 회복시킨 연구가 보고 되었다[19].

일본에서는 재조합 *Lactobacillus plantarum* NCL21을 이용하여 삼나무 꽃가루 알레르기 항원인 Cry j1을 발현하는 연구가 진행되었고, 이를 활용한 항알레르기 효과가 평가되었다. 또 다른 꽃가루 알레르기의 항원인 Fes p1를 surface expression시스템을 이용하여 *Lb. plantarum* WCFS1에 표면 발현 시킨 연구사례가 있었으며, 꽃가루 알레르기를 효과적으로 억제하였다. 이는 재조합 유산균의 경구투여가 알레르겐-특이적 IgE 반응을 개선하는데 이용될 수 있음을 시사하고, 보다 안전하고 효과적인 항알레르기제 개발의 새로운 플랫폼을 제공한다[20].

● 항균 및 항바이러스제의 개발

항생제나 항바이러스제는 유전자 돌연변이나 내성유전자의 발생 등의 문제를 일으킨다. 유산균 재조합체는 이의 좋은 대안이 될 수 있으며 이를 이용해 항균 및 항바이러스제를 개발하려는 연구 또한 활발하게 진행되고 있다. 해외 연구로는 재조합 유산균 *Lc. lactis*를 이용하여 항균 펩타이드 alyteserin-1a과 A3APO를 분비하는 하는 연구가 진행되었고 *E. coli*와 *Salmonella*가 효과적으로 억제되었다. 이러한 재조합 균주는 기존 항생제나 항바이러스제의 부작용 없이 효과적으로 장내에서 유해미생물을 억제할 가능성이 있다[21].

Oscel사에서는 *Lb. jensenii*를 이용해 항바이러스 단백질인 cyanovirin을 분비하는 유산균 치료제를 만들었다. 동물 실험 결과, 재조합 유산균을 투여한 원숭이에서 HIV 감염률이 63%에서 35%으로 낮아진 사례가 있다. 재조합 유산균을 이용하여 항균 및 항바이러스 펩타이드를 발현하는 연구는 효과적으로 감염을 억제하였고 좋은 대체제가 될 수 있다[22].

3. 전망

최근 몇 가지 새로운 기술이 유산균에 적용되어 보다 빠르고 간단한 게놈 엔지니어링에 기여하고 있다. 대표적인 방법으로 CRISPR/Cas9과 single stranded DNA를 이용하여 *Lb. reuteri*의 정밀한 편집이 가능하여 졌고, *Lb. casei*에서는 편집 플라스미드와 Cas9을 이용해 homologous recombination 효율을 증대시킨 방법이 있었다 [23, 24].

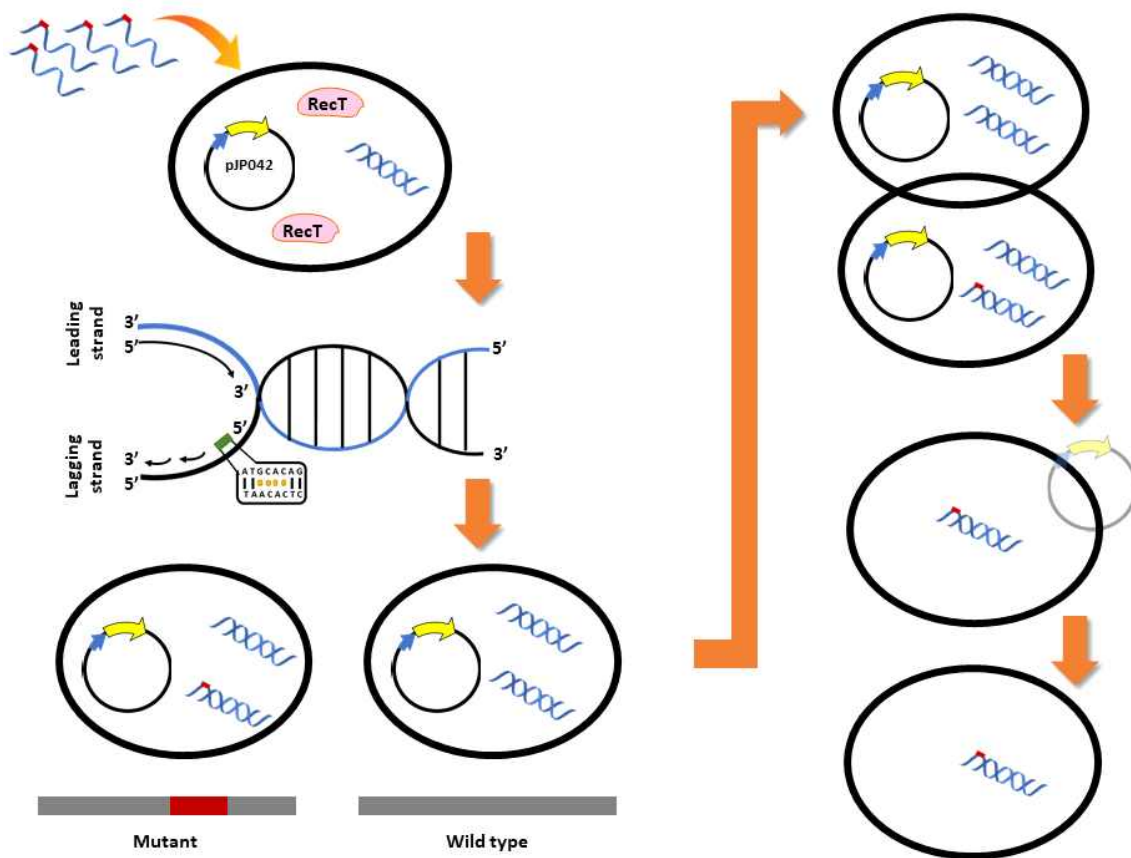


그림 6 CRISPR/Cas9과 single stranded DNA를 활용한 유전자 정밀편집 전략

Cas9 기술이 발전함에 따라서 과거 시간이 오래 걸렸던 homologous recombination 기술의 소요 시간을 단축시킬 수 있었고 염색체의 몇 개 유전자 서열만 바꾸는 정밀한 유전자편집이 가능해졌다. 이러한 기술의 발달은 치료 단백질의 발현에만 국한되지 않고 새로운 생체 의학 기능을 부여하는 합성 생체 치료제 개발까지 이용이 가능할 것이다.

참고문헌

- [1] Thakur, K., Tomar, S. K., De, S. (2016). Lactic acid bacteria as a cell factory for riboflavin production. *Microb Biotechnol*, 9(4), 441-451.
- [2] Jeong, J. H., Lee, C. Y., Chung, D. K. (2016). Probiotic lactic acid bacteria and skin health. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 56(14), 2331-2337.
- [3] Plavec, T. V., Berlec, A. (2019). Engineering of lactic acid bacteria for delivery of therapeutic proteins and peptides. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103(5), 2053-2066.
- [4] Yvon, M., Thirouin, S., Rijnen, L., Fromentier, D., Gripon, J. C. (1997). An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavor compounds. *Appl Environ Microbiol*, 63(2), 414-419.
- [5] Steidler, L. W., Hans, L., Schotte, S., Neirynck, F., Obermeier, W., Falk, W., Remaut, E. (2000). Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*, 289: 1352-1355.
- [6] Jang, Y. J., Seo, S. O., Kim, S. A., Li, L., Kim, T. J., Kim, S. C., Jin, Y. S, Han, N. S. (2017). Elimination of the cryptic plasmid in *Leuconostoc citreum* by CRISPR/Cas9 system. *J Biotechnol*, 251, 151-155.
- [7] 정명준. (2018). P8 단백질을 발현 및 분비하는 위장관 질환 치료 약물 전달용 미생물 및 그를 포함하는 위장관 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 등록특허 10-1915951
- [8] 정명준, 서재구. (2010). 페디오코커스 펜토사세우스에서 분리된 신규한 플라스미드 및 그의 용도, 등록특허 10-0985702
- [9] Maarten, L., Nick. G., Jan D.H., Harold, T., Jean-Yves, F., Sierd, B., Jan, M., Jozef, A. (2004). Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. *Biochem Biophysic Acta*, 279-297
- [10] Eom, H. J., Moon, J. S., Seo, E. Y., Han, N. S. (2009). Heterologous expression and secretion of *Lactobacillus amylovorus* α -amylase in *Leuconostoc citreum*. *Biotechnol Lett*, 31(11), 1783.
- [11] Kuczkowska, K., Kleiveland, C. R., Minic, R., Moen, L. F., Øverland, L., Tjåland, R., Carlsen, H., Lea, T., Mathiesen, G., Eijsink, V. G. H. (2017). Immunogenic properties of *Lactobacillus plantarum* producing surface-displayed *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Appl Environ Microbiol*, 83: e02782-16.
- [12] Eom, H. J., Moon, J. S., Cho, S. K., Kim, J. H., Han, N. S. (2012). Construction of theta-type shuttle vector for *Leuconostoc* and other lactic acid bacteria using pCB42 isolated from kimchi. *Plasmid*, 67:35-43

- [13] Cho, S. K., Lee, S. J., Shin, S. Y., Moon, J. S., Li, L., Joo, W., Han, N. S. (2015). Development of bile salt-resistant *Leuconostoc citreum* by expression of bile salt hydrolase gene. J Microbiol Biotechnol, 25: 2100-2105.
- [14] Fredriksen, L., Kleiveland, C. R., Olsen, L. T., Hult, T., Lea, C. S., Nygaard, V. G., Eijsink, H., Mathiesen, G. (2012). Surface display of N-terminally anchored invasins by *Lactobacillus plantarum* activates NF- κ B in monocytes. Appl Environ Microbiol, 78: 5864-5871.
- [15] Michon, C., Langella P., Eijsink, V. G., Mathiesen, G., Chatel, J. M., (2016). Display of recombinant proteins at the surface of lactic acid bacteria: strategies and applications. Microb Cell Fact, 15: 70-016-0468-9
- [16] Frossard, C. P., Steidler, L., Eigenmann, P. A. (2007). Oral administration of an IL-10-secreting *Lactococcus lactis* strain prevents food-induced IgE sensitization. J Clin Immunol, 119(4), 952-959.
- [17] Takiishi, T., Cook, D. P., Korf, H., Sebastiani, G., Mancarella, F., Cunha, J. P. M. C. M., Rottiers, P. (2017). Reversal of diabetes in NOD mice by clinical-grade proinsulin and IL-10-secreting *Lactococcus lactis* in combination with low-dose anti-CD3 depends on the induction of foxp3-positive T cells. Diabetes, 66(2), 448-459.
- [18] Chiabai, M. J., Almeida, J. F., de Azevedo, M. G. D., Fernandes, S. S., Pereira, V. B., de Castro, R. J. A., Bocca, A. L. (2019). Mucosal delivery of *Lactococcus lactis* carrying an anti-TNF scFv expression vector ameliorates experimental colitis in mice. BMC biotechnol, 19(1), 38.
- [19] Liu, K. F., Liu, X. R., Li, G. L., Lu, S. P., Jin, L., Wu, J. (2016). Oral administration of *Lactococcus lactis*-expressing heat shock protein 65 and tandemly repeated IA2P2 prevents type 1 diabetes in NOD mice. Immunol Lett, 174, 28-36.
- [20] Ortiz-Velez, L., Britton, R. (2017). Genetic Tools for the Enhancement of Probiotic Properties. Microbiol Spectr, 5(5).
- [21] Mandal, S. M., Silva, O. N., Franco, O. L. (2014). Recombinant probiotics with antimicrobial peptides: a dual strategy to improve immune response in immunocompromised patients. Drug Discov Today, 19(8), 1045-1050.
- [22] Vangelista, L., Secchi, M., Liu, X., Bachi, A., Jia, L., Xu, Q., Lusso, P. (2010). Engineering of *Lactobacillus jensenii* to secrete RANTES and a CCR5 antagonist analogue as live HIV-1 blockers. Antimicrob Agents Chemother, 54(7), 2994-3001.
- [23] Oh, J. H., van Pijkeren, J. P. (2014). CRISPR-Cas9-assisted recombineering in

Lactobacillus reuteri. Nucleic Acids Res, 42(17), e131-e131.

[24] Song, X., Huang, H., Xiong, Z., Ai, L., Yang, S. (2017). CRISPR-Cas9D10A nickase-assisted genome editing in *Lactobacillus casei*. Appl Environ Microbiol, 83(22), e01259-17.