

코돈 최적화 및 샤페론 공발현을 통한 활성 형태의 재조합 인간 상피세포성장인자의 발현

장은빈, 김준수, 이우일*
건양대학교 의료신소재학과

Expression of Recombinant Human Epidermal Growth Factor as a Active Form through Codon Optimization with *E. coli* and Co-expression of Chaperone

Eun-Bin Jang, Jun Su Kim, Woo-Yiel Lee*
Department of Biomedical Materials, Konyang University

요약 세포 분열 및 성장 촉진에 영향을 주는 상피세포 성장인자(Epidermal Growth Factor, EGF)는 다양한 의학적 용도를 갖고 있는 호르몬 단백질이다. 본 연구에서는 human EGF 유전자를 대장균 코돈에 최적화 하고 pRSET 벡터에 클로닝하여 발현벡터를 구축하였다. Human EGF를 봉입체가 아닌 활성이 있는 형태의 과량 발현을 위해 코돈의 최적화와 더불어 최초로 샤페론 공발현이 시도되었다. 발현된 Native protein 형태의 재조합 human EGF는 고순도로 정제하기 위해 Ion Exchange Chromatography를 2번 연속적으로 수행하여 순수 분리 정제되었고, ELISA 분석결과 99% 이상으로 재조합 EGF의 활성도가 상업용 EGF와 유사하게 나타났으며, 세포증식시험 결과 인간 재조합 EGF는 인체 피부 섬유아세포의 세포증식을 촉진하는 것으로 확인 되었다. 본 연구의 인간 EGF 발현 시스템은 양적인 측면 뿐 아니라 성공적인 활성형태의 발현으로 추가적인 재접힘 과정 및 N 말단의 융합부분을 제거하기 위한 크로마토그래피 작업이 필요가 없다는 점에서 기존의 방법들에 대체 될 수 있는 효과적인 인간 EGF 발현 시스템을 제공하고 있다.

Abstract Epidermal growth factor (EGF) is a hormone protein that affects cell growth and proliferation, and has various medical applications. In the present study, the gene of human EGF was codon-optimized with *E. coli* and the expression vector was constructed by cloning into pRSET. In order to obtain the recombinant human EGF in an active form rather than an inclusion body, chaperone co-expression was attempted along with codon optimization, for the first time. The expressed human EGF was isolated in the pure form by performing Ion Exchange Chromatography in two consecutive runs. ELISA analysis showed that the activity of purified EGF was greater than 99%, which is similar to commercially available EGF. Cell proliferation test confirmed that the recombinant human EGF has the ability to promote cell proliferation of human skin fibroblasts. The human EGF expression system of this study gives a significant amount of protein, and does not require the renaturation step and the additional chromatographic system to remove a fusion contaminant, thereby providing a very useful alternative to conventional expression systems for the preparation of recombinant human EGF.

Keywords : Epidermal Growth Factor, Recombination, Co-Expression, Codon Optimization, Chaperone

본 연구는 중소기업청에서 주관한 중소기업 기술혁신개발사업과 건양대학교의 지원으로 수행되었음.

*Corresponding Author : Woo-Yiel Lee(Konyang Univ.)

email: lee0519@konyang.ac.kr

Received July 9, 2020

Accepted September 4, 2020

Revised August 19, 2020

Published September 30, 2020

1. 서론

Human Oligopeptide-1이라고도 불리는 표피세포 성장인자(Epidermal growth factor, EGF)는 다양한 표피조직세포 성장 촉진에 영향을 주는 단백질 종류이다 [1, 2]. EGF는 피부 표면에 존재하는 EGF receptor와 결합하여 protein-tyrosine kinase의 활성을 자극하고 활성화된 tyrosine kinase으로부터 연쇄적인 Signaling cascade가 일어남으로써, 세포의 성장과 증식 또는 DNA 합성 등에 영향을 주게 된다[3, 4]. EGF는 대부분 포유동물에 존재하며, 사람의 경우 대부분 조직과 체액에서 합성되는데 Human EGF (hEGF)의 단백질은 53개의 아미노산으로 구성 되었으며, 분자량 6,222 Dalton의 단일 사슬 폴리펩타이드로 3개의 Disulfide 결합이 존재한다[5-8].

피부 세포의 성장과 재생을 촉진시키는 hEGF는 생리 활성 소재로서 상처나 흉터를 치유하는 의약품에 처음으로 사용되었으며[9], 최근에는 코스메슈티컬의 대표적인 기능성 원료로 화장품과 피부 미용 제품에 적용되고 있다[10]. 또한 hEGF는 각막을 회복시키는 효능을 가지고 있어 안과용 액제로 쓰이고 있으며, 피부 이식 및 외과 수술시 절개 부위를 치료하는데 사용되는 국소 외용제와 위산 분비를 억제하고 위 점막을 보호하는 위궤양 치료제로도 사용되는 등 여러 의약품이나 산업체 분야에서 폭넓게 활용되고 있다[11, 12].

E. coli 발현 시스템은 재조합 단백질을 생산하는데 가장 많이 사용되고 있는 방식으로, 비교적 짧은 배양 시간, 취급의 용이성, T7 Promoter System 등을 통한 Over-expression이 가능하다는 장점이 존재한다. 하지만, 일부 단백질은 Inclusion body로 형성되어 완전한 단백질 활성을 나타내지 못한다는 단점이 존재한다 [13-17]. *E. coli*로부터 Native protein 형태의 재조합 단백질을 발현하기 위한 연구가 지속적으로 이루어지고 있으며, 최근에는 Maltose binding protein과 같은 특정 단백질을 융합시키거나 PelB, OmpA 등 Signal sequence을 결합시켜 목표 단백질의 Periplasmic expression을 유도하는 방법이 제시되고 있다[18, 19]. 하지만 이러한 방법의 문제점은 두 단백질간의 크기 및 거리의 최적화가 수반되어야 하는 점 즉, 엔지니어링 관점의 기술이 필요하며, 또 융합단백질의 경우 링커가 제대로 작용하지 않을 시 두 단백질이 엉킬 수 있다는 문제점이 존재한다[20].

샤페론(Chaperon)은 폴리펩타이드의 올바른 3차 구

조를 형성하는데 도움을 주는 보조 단백질이다. 샤페론 단백질은 기능과 크기에 따라 Hsp70, Hsp90, Calnexin 등으로 분류할 수 있으며, 대부분 다양한 스트레스 조건에서 발현되는 열 충격 단백질이다[21-26]. 열충격 단백질은 세포가 열 충격 등의 스트레스 등을 받았을 때 증가하는 단백질로서 열충격 단백질이 증가하면 변형이 된 단백질을 다시 정상 단백질로 회복시키고 세포도 강화된다[27]. *E. coli*로부터 Inclusion body를 형성하는 외부 단백질의 경우에서 샤페론 단백질과 공발현을 시도할 경우 외부 단백질의 번역과정에서 폴리펩타이드 사슬이 안정화 되고 번역 후 단백질 접힘이 완성되는 Native protein 형태의 발현이 최근 보고 되었다[28].

본 연구에서는 대장균 내에서 Inclusion body 형태가 아닌 활성형태의 hEGF를 발현하기 위하여 샤페론과의 공동 발현이 시도 되었다. *E. coli*에 코돈 최적화된 hEGF 유전자를 pRSET_A에 cloning하여 *E. coli*용 hEGF 발현 벡터를 구축하였다. 발현벡터에는 발현 후 정제 과정에서 추가적인 불필요한 과정을 단축하기 위하여 단백질의 N 말단 부분에 융합된 부분(6 x His tag과 epitope)을 제거하여 순수한 hEGF 부분만이 삽입되었다. 4종류의 샤페론 벡터 pG-Tf2 (8.3 kb, groES-groEL-tig), pGro7 (5.4 kb, groES-groEL), pKJE7 (7.2 kb, DnaK-DnaJ-GrpE), pTf16 (5 kb, Tig)와 각각 공발현을 시도하여 조건을 최적화하고 기존 Inclusion body로 발현되는 재조합 hEGF 단백질을 Native protein 형태의 발현이 시도 되었다. 4종류의 샤페론 벡터에 포함되어 있는 샤페론 단백질들이 EGF의 형태를 복원하는데 영향을 미치게 된다. 활성구조를 갖춘 재조합 hEGF는 이온 교환 크로마토그래피를 통하여 정제를 실시하고, ELISA 및 인간 섬유아세포의 세포증식 효과들이 분석 되었다.

2. 재료 및 실험방법

2.1 재료

클로닝 및 발현용 균주로는 각각 DH5 α (iNtRON, Korea)와 BL21(DE3) (iNtRON, Korea)를 사용하였고, Taq DNA Polymerase (iNtRON, Korea), Nde I (Enzymics, Korea) BamH I (Enzymics, Korea), T4 DNA ligase (NEB, UK), pRSET_A (Invitrogen, USA), SOB broth (Biosesang, Korea)을 cloning 과정에서 사용하였다. 샤페론 발현 벡터는 pG-Tf2, pGro7, pKJE7,

pTf16 (Takara, Japan)을 사용하였다. 단백질 발현 및 정제 단계에서 BCA Protein Assay kit (iNtRON, Korea) 와 DEAE Sepharose CL-6B (GE Healthcare, USA)를 사용하였고 ELISA 분석은 Human EGF ELISA kit (Aviva Systems Biology, USA)를 사용하였다. 세포 증식시험에서는 CCD-986sk Cell (Human Fibroblast Cell Line), IMDM/High Glucose (LM004-01, Welgene), Penicillin/Streptomycin (SV30010, Thermo), Fetal Bovine Serum (16000-044, Gibco), TrypLE (12604-013, Gibco), 96well Cell Culture Plate (3595, Corning), EZ-CYTOX (EZ-1000, Daeillab)을 사용하였다. 그밖에 사용한 시약과 Buffer는 모두 일급 내지 이에 준하는 등급을 구매하여 사용하였다.

2.2 Human EGF의 발현벡터 구축

인간 EGF의 유전자 염기 서열을 *E. coli* codon usage를 바탕으로 코돈 최적화를 진행한 후 해당 염기서열을 유전자 합성 업체인 '바이오니아'에 의뢰하여 코돈 최적화가 완료된 hEGF 유전자를 획득하였다 (Fig. 1).

```

1 AACAGCGATA GCGAATGCC GCTGAGCCAT GATGGCTATT GCCTGCATGA
  N S D S E C P L S H D G Y C L H D
51 TGGCGTGTGC ATGTATATTG AAGCGCTGGA TAAATATCGG TGCAACTGCG
  G V C M Y I E A L D K Y A C N C
101 TGGTGGGCTA TATTGGCGAA CGCTGCCAGT ATCGCGCTCT GAAATGGTGG
  V V G Y I G E R C Q Y R A L K W W
151 GAAGCTGCC
  E L R
    
```

Fig. 1. Codon-optimized hEGF gene for expression in *E. coli*.

인간 EGF 발현 벡터로 사용한 pRSET은 T7 Promoter System을 가지고 있는 *E. coli* 용 발현 벡터로 N-terminal에 6x Histidine을 비롯하여 Xprss- Epitope와 같은 기능성 peptide 들이 존재한다. Ni-NTA Affinity Chromatography를 통하여 단백질을 정제 한 후 Enterokinase를 처리하여 Fusion protein과 Target protein을 절단하게 된다.

본 연구에서는 발현 후 추가적인 정제 과정을 단축하기 위하여 pRSET 특성인 6x Histidines을 포함한 융합 단백질의 부분 중 6x Histidines에서 Enterokinase 인 식부위까지 절단하기 위하여 RBS Down stream에 있는 서열의 CATATG를 Nde I으로 절단하고 MCS 부분인 GGATCC를 BamH I으로 처리하여 N 말단 융합 부분 전부를 제거하였다. 합성된 hEGF 유전자를 Template DNA로 사용하여 pRSET 벡터에 Nde I/ BamH I 삽입을 위하여 PCR을 진행하였다. 사용된 프라

이머는 각각 pF : GGGAATTCCATATGAACAGCGATAGCGAATGC, pR : CGCGGATCCTTAGCGCAGTTCCAC이며 (도입된 제한효소 부위는 밑줄로 표시됨), Agarose gel 전기영동을 통하여 hEGF 유전자의 증폭여부를 확인한 후 spin column을 통해 DNA 단편을 정제하였다. pRSET_A에 본래의 hEGF에 Methionine만이 추가되는 대장균 코돈으로 최적화된 hEGF 유전자를 함유하는 발현 벡터 pEGF를 구축하였다 (Fig. 2).

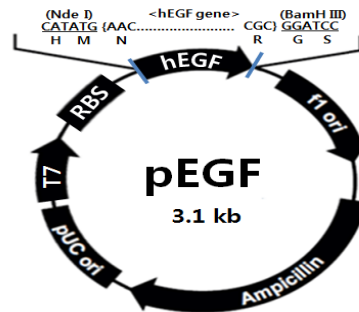


Fig. 2. Structural features of pEGF vector.

2.3 BL21(DE3)로부터 재조합 pEGF의 발현

구축된 pEGF는 발현용 *E. coli*인 BL21(DE3)에 형질 전환하여 재조합 hEGF의 발현을 시도하였다. SOB broth에 pEGF/BL21(DE3)를 main culture하고 OD 600 nm에서 흡광도가 0.8이 되었을 때 IPTG는 최종농도가 1 mM이 되도록 첨가하여 37 °C, 4시간 동안 발현을 진행하였다. 발현이 완료된 균주는 6,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하고 Cell plate을 Buffer I (200mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% Sucrose, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0)로 현탁하였다. 이 후 Sonic dismembrator를 이용하여 균주를 완전히 파쇄 하였으며, Cell Lysate는 16,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 수용성 단백질 부분을 분리하였다. 생성된 Pellet은 Buffer II (1.5% Triton X-100, 1.0 M Urea, 1 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 7.0)로 세척하고, 다시 Buffer III (500 mM NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, pH 9.0)으로 현탁 하여, 불용성 단백질들을 완전히 용해시켰다. 분리된 수용성 단백질과 용입체들은 18% Polyacrylamide Gel에서 SDS-PAGE를 실시하여, BL21(DE3)으로 부터 재조합 pEGF의 발현 양상을 분석하였다.

2.4 사페론과 pEGF의 공발현

재조합 hEGF와 사페론 단백질의 공발현은 pEGF로 형질전환된 pEGF/BL21(DE3)를 Ampicillin이 첨가한 SOB broth에 배양시키고 CaCl₂를 처리하여 반응능 세포를 제조하였다. 이 후 분주된 반응능 세포에 pGro7, pKJE7, pTf16 그리고 pG-Tf2로 각각 형질전환하여 Ampicillin과 Chloramphenicol이 함께 첨가된 SOB broth에 도말하였다.

재조합 pEGF와 사페론 벡터의 공발현은 각 사페론 단백질에 맞는 Inducer를 첨가하여 먼저 Induction시킨 후 적정 OD값에 IPTG를 첨가하여 hEGF를 발현하였다. 4개의 BL21(DE3) 형질전환체 중 pGro7 & pEGF, pKJE7 & pEGF 그리고 pTf16 & pEGF가 도입된 균주는 두 개의 항생제가 포함된 SOB broth에 Seed culture한 후 동일한 SOB broth에 0.5 µg/ml L-Arabinose를 추가로 첨가하고 Main culture를 실시하였다. 나머지 1개의 BL21(DE3) 형질전환체인 pG-Tf2 & pEGF가 도입된 균주는 동일한 SOB broth에 5 ng/ml Tetracycline를 추가로 첨가하여 Main culture를 실시하였다. 이 후 각각의 균주는 OD 600 nm에서 흡광도가 0.8이 될 때까지 배양을 실시한 후, IPTG의 최종농도가 1 mM이 되도록 첨가하였고 37 °C에서 4시간 동안 hEGF의 발현을 진행하였다.

공발현이 완료된 균주는 원심분리를 실시한 후 상기의 방법과 동일한 방법으로 Cell lysis 및 Washing을 진행하고 18 % Polyacrylamide Gel에서 재조합 hEGF에 대한 수용성 단백질로의 발현 여부를 분석하였다.

2.5. 재조합 hEGF 단백질의 정제

재조합 pEGF로부터 발현된 hEGF는 정제를 위한 6x His Tag이 없기 때문에 Ion-Exchange Chromatography을 통하여 단백질 정제를 실시하였다. Column에 DEAE Sepharose CL-6B Resin을 충전시킨 후 20 mM의 Tris-HCl Buffer (pH 7.5)로 평형화하고 hEGF를 Loading하였다. 이 후 NaCl을 500 mM까지 염 경사도 용리 방법으로 pI 값의 차이에 따라 단백질을 분리하였다. 다시 고순도의 정제를 위하여 Column DEAE Sepharose CL-6B Chromatography를 한번 더 수행하였다. 20 mM Tris-HCl Buffer의 pH를 6.8으로 낮추고 Flow rate를 1.0 ml/min으로 고정시킨 후 NaCl의 농도를 150~200 mM에서 매우 점진적으로 용출을 시도하였다. 전체적인 정제 공정은 Protein Auto

Purification System (280 nm, Bio-Rad)을 사용하였으며, 실시간으로 단백질의 용출을 확인하고 각각의 분획된 단백질들은 SDS-PAGE를 실시하여 재조합 hEGF의 정제 여부를 확인하였다. 재조합 hEGF는 BCA Protein Assay Kit를 사용하여 정량 분석을 실시하였다.

2.6 재조합 Human EGF의 ELISA analysis

각 샘플의 농도는 16 µg/mL로 설정하였다. 코팅 완충액 중의 100 µl를 Micro Plate의 각 Well에 첨가하고 Plate를 37 °C에서 2시간동안 반응하였다. PBS에 100 µl 차단 완충액, 3 % 탈지유를 첨가하여 Well에 남아있는 단백질의 결합 부위를 차단하여 반응하였다. 항체 50 µl를 각 Well에 첨가하고, 37 °C에서 1시간 동안 배양하였다. 100 µl PBST로 6번 세척하였다. 사용 직전에 완충 용액을 차단하여 희석된 공액 이차 항체 50 µl를 첨가 후 37 °C에서 1 시간 동안 배양하였다. 100 µl PBST로 6번 세척하였다. 아세트산, TMB 및 H₂O₂를 4:1:5의 비로 혼합된 기질 용액을 Well당 50 µl로 분배하였다. Plate를 37 °C인 어두운 곳에서 30분 동안 배양하고, 충분한 발색 후, Well에 100 µl의 정지 용액을 첨가하였다. Plate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. ELISA assay는 3회 반복하여 측정되었다.

2.7 재조합 EGF의 세포증식시험

96 Well Cell Culture Plate에 10 % Fetal Bovine Serum (FBS)과 1 % Penicillin/Streptomycin이 첨가된 IMDM (Isocove's Modified Dulbecco's Medium) 배양액으로 2 × 10³ cells/well 농도의 섬유아세포인 CCD-986sk 세포를 24시간 배양한 뒤 Serum free, 1 % Penicillin/Streptomycin이 첨가된 IMDM으로 배지를 교체하고 24시간 배양하였다. 시료는 농도 별로 준비하고 이를 Serum free, 1 % Penicillin/Streptomycin이 첨가된 IMDM으로 희석해 교체하고 48시간 배양하였다. 세포가 배양이 완료되었을 때 EZ-CYTOX (EZ-1000, Daeil Lab Service, Korea)를 10 % 함유한 IMDM(Serum Free, 1% P/S)배지로 교체하고, 흡광도를 450 nm에서 Plate reader로 측정하여 세포 증식율을 계산하였다. 실험 결과에 대한 통계적 유의성은 Microsoft사의 프로그램인 Office Excel 2007 기능 중 t-test (Paired t-test, 양측검증)를 이용하여 확인하였으며, 통계적으로 p 값을 0.05 미만일 때 유의하다고 판단되었다.

3. 결과 및 고찰

3.1 BL21(DE3)로부터 재조합 pEGF의 발현

재조합된 pEGF를 BL21(DE3)에 형질전환 후 발현을 확인하기 위해 SDS-PAGE로 분석한 결과 lane 5번 하단의 약 7 kDa 근처에서 나타나는 뚜렷한 밴드는 봉입체 형태의 재조합 hEGF로 보인다(Fig. 3). 즉 pEGF로 형질전환 된 대장균 내에서 재조합 hEGF 단백질은 대부분 봉입체 형태로 발현되었다. 세포파쇄 과정에서 인간 EGF의 과발현으로 인해 이황화 결합이 잘못 이루어지는 것과 더불어 소수성 결합이 이루어져서 봉입체 형태로 나타날 수 있는데 봉입체 형태는 파쇄 후 원심 분리하여 침전물 형태로 얻을 수 있지만 활성형 형태가 아니므로 Refolding의 추가과정이 필요하다.

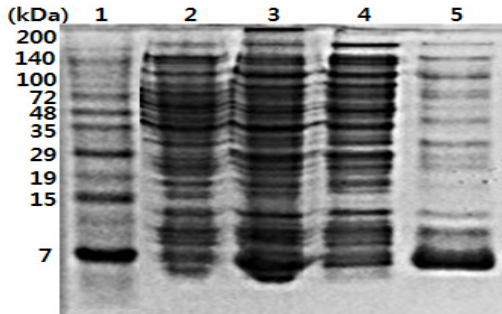


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of pEGF expression in *E. coli* BL21(DE3). Lane 1: marker, Lane 2: pEGF/BL21(DE3) negative control (not induction), Lane 3: Total protein from pEGF/BL21(DE3) after induction, Lane 4: Soluble proteins from pEGF/BL21(DE3), Lane 5: Inclusion bodies from pEGF/BL21(DE3).

3.2 재조합 pEGF와 사페론 벡터의 공발현

발현벡터 pEGF로 형질전환 된 발현 균주인 BL21(DE3)에 사페론 벡터인 pGro7, pKJE7, pTf16 그리고 pG-Tf2로 각각 추가적으로 형질전환 하였다. pTf16&pEGF로 형질전환 된 BL21(DE3)의 경우 hEGF의 band가 봉입체 부분에 집중되었으며(Fig 4, lane 3), pGro7&pEGF 공발현의 경우는 화살표로 표시된 관측 가능 정도의 수용성 및 불용성 형태의 재조합 hEGF가 보인다(Fig. 4, lane 4, 5).

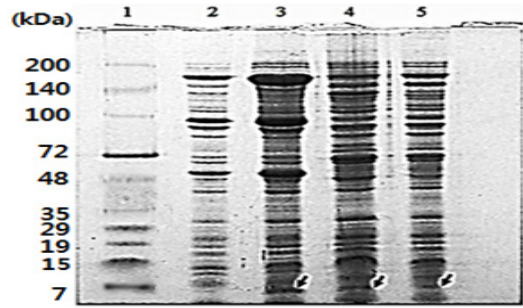


Fig. 4. SDS-PAGE analysis for co-expressions of pTf16&pEGF/BL21(DE3) and pGro7&pEGF/BL21(DE3). Lane 1: protein marker, Lane 2: Soluble proteins of pTf16&pEGF, Lane 3: Inclusion bodies of pTf16 &pEGF, Lane 4: Soluble proteins of pGro7&pEGF, Lane 5: Inclusion bodies of pGro7&pEGF. (Bands considered to be expressed rhEGF are indicated by arrows)

pKJE7&pEGF가 도입된 BL21(DE3)의 경우 약 7 kDa크기의 hEGF의 Band가 수용성 단백질에서 뚜렷하게 관찰되지만 상대적인 양적인 측면에서 봉입체 형태의 재조합 단백질보다 적어(Fig. 5, lane 2, 3) 대부분 봉입체 형태로 hEGF가 형성되는 것으로 나타났기 때문에 사페론 공발현을 통한 hEGF의 단백질 접힘 효과가 매우 적은 것으로 보인다.

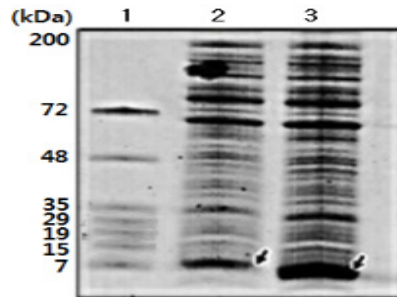


Fig. 5. SDS-PAGE analysis for co-expression of pKJE7 & pEGF / BL21(DE3). Lane 1: Protein marker, Lane 2: Soluble proteins of pKJE7 & pEGF, Lane 3: Inclusion bodies of pKJE7 & pEGF.

Tetracycline을 사페론 벡터의 Induction 물질로 사용하는 pG-Tf2&pEGF로 형질전환 된 BL21(DE3)의 경우 수용성 단백질과 봉입체 단백질에서 모두 뚜렷한 재조합 hEGF의 Band가 관찰되었으며, 수용성 단백질로 전환되는 단백질 양이 상당히 높은 것으로 나타났다(Fig. 6, lane 3, 4). 이 결과는 pG-Tf2의 사페론 단백질들이

재조합 hEGF의 접힘 과정을 효과적으로 완성시켜 올바른 구조 형성을 할 수 있도록 작용하는 것으로 분석된다.

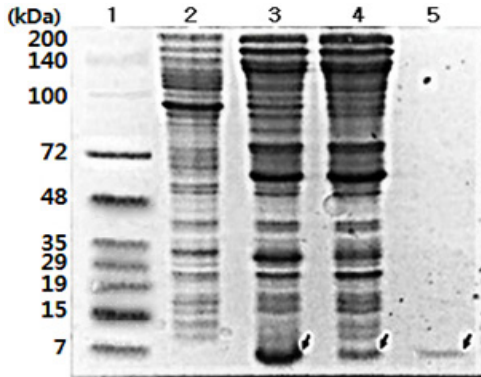


Fig. 6. SDS-PAGE analysis for co-expression of pG-Tf2 & pEGF/BL21(DE3). Lane 1: Protein marker, Lane 2: BL21 (DE3) negative control, Lane 3: Soluble proteins of pG-Tf2 & pEGF, Lane 4: Inclusion bodies of pG-Tf2 & pEGF, Lane 5: Commercial standard EGF.

3.3 Ion Exchange chromatography를 통한 재조합 hEGF 단백질의 정제

pG-Tf2와 pEGF의 공발현을 통해 얻은 수용성의 재조합 EGF 단백질을 분리 및 정제하기 위해서 Ion Exchange Chromatography (DEAE Sepharose CL-6B)를 실시하였다. 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)을 Base Buffer로 NaCl의 농도를 0에서 최대 500 mM까지 점진적으로 늘리면서 pI 값의 차이에 따라 단백질을 분리하였다. 수용성 단백질은 약 200mM NaCl에서 용출이 되었다.

고 순도로 rhEGF를 정제하기 위하여 다시 DEAE Sepharose CL-6B Chromatography를 실행하였다. 20 mM Tris-HCl(pH 6.8, 150 mM NaCl) 완충용액으로 Column을 평형화하고 NaCl의 농도를 150 ~ 200 mM에서 매우 점진적으로 용출을 시도하였다(Fig. 7). Fig. 7의 Chromatogram에서 보여진 14번부터 17번까지의 분획 즉 DEAE-Sepharose CL-6B의 Chromatography에서 약 160~170mM NaCl에서 용출된 분획들에 대하여 SDS-PAGE를 실시하였고 약 7 kDa 크기의 정제된 재조합 hEGF를 확인 하였다(Fig. 8).

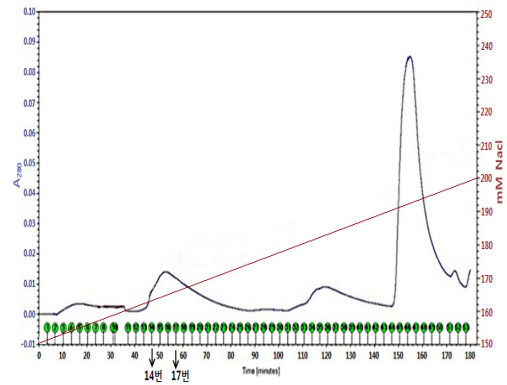


Fig. 7. DEAE Sepharose CL-6B chromatogram of fractions including soluble rhEGF resulted from first IEX (Ion Exchange chromatography).

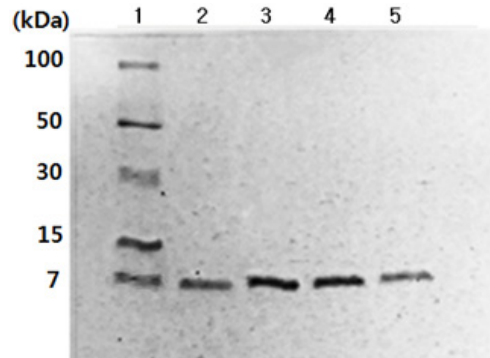


Fig. 8. SDS-PAGE analysis after Ion Exchange Chromatography for purification of hEGF. Lane 1: marker, Lane 2~5: purified hEGF.

정제가 완료된 재조합 hEGF는 BCA protein assay를 통해 정량 분석을 실시하였으며, 발현 배지의 양에 따른 단백질의 생산량을 계산하였다. 다른 샤페론 벡터인 pGro7, pKJE7, pTf16과의 공발현 경우와 정량적인 비교분석을 위하여 봉입체 형태의 발현에 대하여 Refolding 과정을 거친 후 상기의 Chromatography 과정을 수행한 다음 BCA protein assay를 실시하여 각 경우들에 대한 재조합 hEGF의 발현형태들에 대해서 정량적 비교분석을 실시하였다. 샤페론 벡터 중 pG-Tf2가 가장 우수한 공발현 파트너로 확인 되었으며 pG-Tf2와 pEGF의 공발현을 통해 얻은 재조합 hEGF는 발현 배지 1 Liter당 약 20.5 mg의 수득 량 중 약 70%가 수용성 단백질로 발현되는 것으로 분석되었다(Table 1).

Table 1. Comparison of various chaperone types for soluble hEGF expression in *E. coli*.

Strain	Vector	rhEGF concentration (mg / l)	
		Total	Soluble
BL21 (DE3)	pTf16/pEGF	15.4	3.7
	pGro7/pEGF	17.1	8.9
	pKJE7/pEGF	18.7	7.0
	pG-Tf2/pEGF	20.5	14.3

pG-Tf2(8.3 kb), pGro7(5.4 kb), pKJE7(7.2 kb), pTf16 (5 kb)은 각각 groES-groEL-tig, groES-groEL, DnaK -DnaJ-GrpE, tig와 같은 단백질을 포함하고 있으며 groEL은 14개의 서브유닛으로 이루어져 있고, 부분적으로 folding되어 있거나 잘못 folding된 폴리펩타이드를 GroES와 작용하여 정상적으로 folding이 이루어지게 하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(29). TF (Trigger Factor)는 폴딩을 보조하고 잘못된 폴딩을 방지하는 샤페론 단백질이다(30). 현재의 결과는 pG-Tf2와 pEGF의 공발현 시스템에서 groES-groEL -tig의 성공적인 작동을 의미하는 것으로 보여진다.

3.4 재조합 hEGF의 ELISA Assay

재조합 hEGF의 활성도를 분석하기 위해 ELISA assay가 수행되었다. 각 Control, Standard EGF, pE GF Inclusion body, pEGF refolding, Native protein(샤페론 공발현) 샘플 흡광도의 평균값을 나타내었고, 각 샘플의 농도는 16 pg/mL에서 측정하였다. Control은

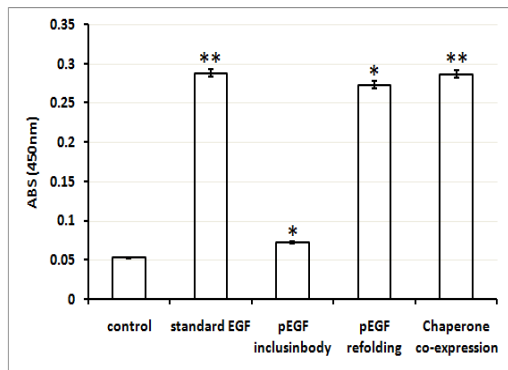


Fig. 9. ELISA analysis of hEGF quantification. (* = p-value<.05, ** = p-value<.01, and *** = p-value<.001)

BL21(DE3)를 사용하였으며, Standard EGF로 상업용 EGF를 사용하였다. 분석 결과 샤페론 발현벡터 중 가장 좋은 공발현 파트너로 확인된 pG-Tf2와 pEGF의 공발현을 통한 Native protein 형태의 EGF는 상업용 Standard EGF의 약 99 % 이상의 활성도를 나타내었다(Fig. 9).

3.5 재조합 EGF의 세포증식시험

세포증식시험에서는 시험 물질인 재조합 hEGF가 인간유래 피부세포(사람의 섬유아세포)의 세포 증식에 미치는 영향을 조사 하였다. 본 시험은 재조합된 EGF를 인체 피부 유래 섬유아세포인 CCD-986sk 세포주를 이용하여 시료가 가지는 세포 증식능을 체외 배양되는 세포의 증식율을 이용하여 확인하였으며, 세포증식의 확인은 생존 세포 내의 Mitochondrial NADH-Dehydrogenase activity에 의해 Tetrazolium salt의 4개의 질소로 이루어진 Tetrazolium moiety가 환원되어 유색의 Formazan으로 전환되는 원리를 이용하여 확인하였다. 세포증식시험 결과 재조합 EGF 시료는 섬유아세포에 1.25내지 20 ppm처리 농도범위에서 농도 의존적이며, 통계적으로 유의한(p<0.05) 수준의 세포 증식 촉진 양상을 확인할 수 있었다. 특히, 20 ppm 농도로 처리 시 32.95 % 세포 증식을 촉진하는 것으로 나타났다(Fig. 10). 본 시험의 결과 재조합 hEGF시료는 피부 섬유아세포의 세포 증식을 촉진하는 것으로 확인되었다.

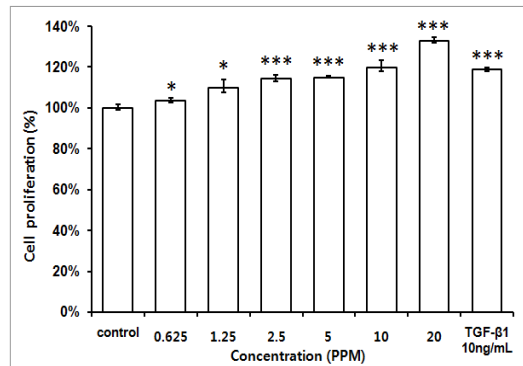


Fig. 10. Fibroblast cell proliferation analysis of recombinant human EGF. (* = p-value<.05, ** = p-value<.01, and *** = p-value<.001)

4. 결론

본 연구에서는 human EGF를 봉입체가 아닌 활성형

태로의 과량 발현을 위하여 hEGF 유전자를 대장균 코돈에 최적화하고 재조합 하여 pEGF 발현벡터를 구축하였다. pEGF를 4종류의 사페론 발현 벡터와 (pG-Tf2, pGro7, pKJE7, pTf16) 각각 공발현을 시도 하였고 4종류의 사페론 발현 벡터 중 pG-Tf2와의 공발현에서 가장 많은 양의(14.3 mg/L) 수용성 hEGF가 발현 되어 pG-Tf2 & pEGF 공발현 시스템이 본 연구 중 최적의 조건으로 분석 되었다. 이 수용성 형태의 재조합 hEGF는 ELISA assay에서 시판 중인 hEGF와 유사한 활성도를 보이며 세포증식시험에서 농도 의존적으로 섬유아세포의 세포증식을 촉진하는 것으로 나타났다. 본 연구의 pG-Tf2 & pEGF 공발현 시스템은 과량의 재조합 hEGF가 수용성 형태로 발현되어 Refolding없이 직접적으로 2번의 연속적인 DEAE-Sepharose CL-6B Chromatography를 통하여 순수한 형태의 활성구조를 갖는 hEGF를 제공하고 있다.

References

- [1] Sung, K., & Kim, I. H. "Expression and purification of recombinant human epidermal growth factor using fusion partners in *Escherichia coli*", *Korean Chemical Engineering Research*, 56(5), 711-717. (2018). DOI: <https://doi.org/10.9713/kcer.2018.56.5.711>
- [2] Kim, B.-L., Baek, J. E., Lee, E. G., Lee, H.-W., Kim, C. S., Ahn, J.-O., Lee, H.-W., Kim, I.-H., & Jung, J.-K. "Study on Soluble Expression of Recombinant Human Epidermal Growth Factor Using Various Fusion Partners in *Escherichia coli*", TT -. *Korean Society for Biotechnology*, 35. (2007). <https://www.earticle.net/Article/A100302>
- [3] Parthasarathy Seshacharyulu, Moorthy P Ponnusamy, Dhanya Haridas, Maneesh Jain, Apar K Ganti & Surinder K Batra, "Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy, Expert Opinion on Therapeutic Targets", 16:1, 15-31, (2012). DOI: <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.648617>
- [4] Carpenter G, Cohen S. "Epidermal growth factor", *Tanpakushitsu Kakusan Koso. Protein, Nucleic Acid, Enzyme*, 45(13 Suppl), 2116-2122. (2000). DOI: <https://doi.org/10.5578/kvi.24183>
- [5] Hyun Sook Kim, Ki Mun Kang, Sang-wook Lee, Jae Boem Na, and Gyu Young Chai, "Effect of Recombinant Epidermal Growth Factors on Irradiated Fibroblast Proliferation", *Korean Journal of Radiation Oncology*, 24(3), 58. (2006).
- [6] Ma, Y., Yu, J., Lin, J., Wu, S., Li, S., & Wang, J. "High Efficient Expression, Purification, and Functional Characterization of Native Human Epidermal Growth Factor in *Escherichia coli*", *BioMed Research International*, (2016). DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/3758941>
- [7] Ferrer Soler, L., Cedano, J., Querol, E., & de Llorens, R. "Cloning, expression and purification of human epidermal growth factor using different expression systems *Journal of Chromatography*", *B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 788(1), 113-123. (2003). DOI: [https://doi.org/10.1016/s1570-0232\(02\)01035-8](https://doi.org/10.1016/s1570-0232(02)01035-8)
- [8] Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., Robbins, S. L. and Cotran, R. S., "Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease (7th ed.)", *Elsevier Saunders*, St. Louis, Mo (2005).
- [9] Kang, J. S., La, H. N., Bak, S. U., Eom, H. J., Lee, B. K., & Shin, H. J. "Development of Dermal Transduction Epidermal Growth Factor (EGF) Using A Skin Penetrating Functional Peptide", *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, 45(2), 175-184. (2019).
- [10] Kim, K. H., Lee, S., & Park, H.-S. "Inhibitory Effects of Three Dimensional Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium on Immune Response and Efficacy Evaluation of its Cream", *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 17(1), 25-36. (2019). DOI: <https://doi.org/10.20402/ajbc.2018.0255>
- [11] Woo, G. W. "Recombinant Human Epidermal Growth Factor", *Journal of Korean Burn Society*, 11(2), 79-84. (2008).
- [12] Jung Woo Yi, Hee Jun Kim, Seong Wan Cho, J. S. P. and Y. W. C. "Topical Gel Formulations of Epidermal Growth Factor and Their Wound Healing Effects", *Yakhak Hoeji*, 40(4), 411-417. (1996).
- [13] Kim, J.-S., Jang, S.-W., Park, J.-B., Kwon, D.-H., Chang, Y.-J., Jung, H.-M., Han, S.-I., Hong, E.-K., & Ha, S.-J. "Production of Human Interferon β by Recombinant *E. coli* Using the Codon Optimized Gene", *KSBB Journal*, 32, 16-21. (2017). DOI: <https://doi.org/10.7841/ksbbj.2017.32.1.16>
- [14] Tokuoka, M., Tanaka, M., Ono, K., Takagi, S., Shintani, T., & Gomi, K. "Codon optimization increases steady-state mRNA levels in *Aspergillus oryzae* heterologous gene expression", *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6538-6546. (2008). DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01354-08>
- [15] Chen, G. F. T., & Inouye, M. "Role of the AGA/AGG codons, the rarest codons in global gene expression in *Escherichia coli*", *Genes and Development*, 8(21), 2641-2652. (1994). DOI: <https://doi.org/10.1101/gad.8.21.2641>
- [16] Ikemura, T. "Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: A proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system", *Journal of Molecular Biology*, 151(3), 389-409. (1981).

- DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90003-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90003-6)
- [17] Kane, J. F., Violand, B. N., Curran, D. F., Staten, N. R., Duffin, K. L., & Bogosian, G. "Novel in-frame two codon translational hop during synthesis of bovine placental lactogen in a recombinant strain of *Escherichia coli*", *Nucleic Acids Research*, 20(24), 6707-6712. (1992).
DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/20.24.6707>
- [18] Singh, S. M., & Panda, A. K. "Solubihzation and refolding of bacterial inclusion body proteins", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(4), 303-310. (2005). DOI: <https://doi.org/10.1263/jbb.99.303>
- [19] Su, Z., Huang, Y., Zhou, Q., Wu, Z., Wu, X., Zheng, Q., Ding, C., & Li, X. "High-Level Expression and Purification of Human Epidermal Growth Factor with SUMO Fusion in *Escherichia coli*", *Protein & Peptide Letters*, 13(8), 785-792. (2006).
DOI: <https://doi.org/10.2174/092986606777841280>
- [20] Heejin Jeong, "Fusion protein synthesis technology development and research trend", *BRIC View* 2017-T38(2017).
<http://www.ibric.org/myboard/read.php?Board=report&id=2849> (Oct.26, 2017)
- [21] Yujin E. Kim, Mark S. Hipp, Andreas Bracher, Manajit Hayer-Hartl, and F. Ulrich Hartl "Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis", *This article's DOI: https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-092442* (2013)
- [22] Hartl, F. U. "Molecular chaperones in cellular protein folding", *Nature*, 381(6583), 571-580. (1996).
DOI: <https://doi.org/10.1038/381571a0>
- [23] Bukau, B., & Horwich, A. L. "The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines", *Cell*, 92(3), 351-366. (1998).
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80928-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80928-9)
- [24] Frydman, J. "Folding of Newly Translated Proteins In Vivo: The Role of Molecular Chaperones", *Annual Review of Biochemistry*, 70(1), 603-647. (2001).
DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.603>
- [25] Hartl, F. U., & Hayer-Hartl, M. "Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein", *Science*, 295(5561), 1852-1858. (2002).
DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1068408>
- [26] Kwon, M., Park, S., Kim, B., Kim, S., Nam, S., Society, K., Life, O., & Information, C. "Improvement of production of active cyclodextrin glucanotransferase by coexpression GroEL/ES chaperone in *E. coli*", *Korean Society Of Life Science*(2002).
- [27] Suk Young Kim, "The Role of Heat Shock Protein in Perinatal Fields", *Korean J Perinatol* Vol.16, No.1(2005).
- [28] Shuo-Shuo, C., Xue-Zheng, L., & Ji-Hong, S. "Effects of co-expression of molecular chaperones on heterologous soluble expression of the cold-active lipase", *Lip-948. Protein Expression and Purification*, 77(2), 166-172. (2011).
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.01.009>
- [29] Soung-Hun Roh, Corey F. Hryc, Hyun-Hwan Jeong, Xue Fei, Joanita Jakana, George H. Lorimer, and Wah Chiu, "Subunit conformational variation within individual GroEL oligomers resolved by Cryo-EM", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(31): 8259-8264, 2017 Aug 1. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1704725114>
- [30] Kushagra Singhal, Jocelyne Vreede, Alireza Mashaghi, Sander J. Tans, Peter G. Bolhuis, "The Trigger Factor Chaperone Encapsulates and Stabilizes Partial Folds of Substrate Proteins", *PLoS Comput Biol* 11(10): e1004444. (2015).
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004444>

장 은 빈(Eun-Bin Jang)

[준회원]



- 2018년 2월 : 건양대학교 나노바이오화학과 (이학학사)
- 2020년 8월 : 건양대학교 대학원 의료신소재학과 (공학석사)

<관심분야>
생화학, 생명과학

김 준 수(Jun-Su Kim)

[준회원]



- 2014년 2월 : 건양대학교 일반대학 화학과 (이학석사)
- 2015년 10월 ~ 2020년 3월 : (주)BCRM 연구원
- 2019년 3월 ~ 현재 : 건양대학교 의료신소재학과 강사
- 2020년 8월 ~ 현재 : (주)케이프 로텍 선임연구원

<관심분야>
생화학, 분자생물학

이 우 일(Woo-Yiel Lee)

[정회원]



- 1988년 8월 : 경희대학교 문리과 대학 화학과 (이학석사)
- 1996년 8월 : (미국)에리조나주립 대학교 생화학과 (이학박사)
- 1997년 1월 ~ 1998년 8월 : 한국 생명공학연구원 postdoctorate
- 2006년 3월 ~ 2019년 2월 : 건양 대학교 제약생명공학과 교수
- 2019년 3월 ~ 현재 : 건양대학교 의료신소재학과 교수

〈관심분야〉

생명과학, 단백질화학