

하이드록실아민 절단 가능한 재조합 인간 상피세포 성장인자의 유전자 재조합 및 발현

노현정*, 유호민*, 장홍륜*, 한수빈*, 최낙식**, 이우일*

*건양대학교 의료신소재학과

** (주)케이프로텍

e-mail: lee0519@konyang.ac.kr

Genetic Recombination and Expression of Hydroxylamine Cleavable Recombinant Human Epidermal Growth Factor

Hyeon-Jeong Noh*, Ho-min Yu*, Hong-ryun Jang*, Su-Bin Han*,

Nak-Sik Choi**, Woo-Yiel Lee*

*Dept. of Biomedical Materials, Konyang University

**Kprotec Inc.

요약

본 논문에서는 기능성 원료인 EGF의 대량 생산을 위해 hydroxylamine을 이용하여 융합태그 절단이 가능한 rhEGF와 단백질 3차 구조의 보조 단백질인 샤페론과의 공발현을 통하여 native 상태의 rhEGF 단백질 생산에 대해 연구하였다. *E.coli*에서 기존 봉입체 형태로 발현된 rhEGF는 샤페론 벡터인 pG-TF2와 공발현을 함으로써 수용성 단백질 형태로 발현되는 것을 western blot을 통해 확인하였으며, rhEGF의 융합 태그는 기존 Enterokinase를 사용하는 방법 대신 Hydroxylamine으로 절단이 가능한 인식 부위 Asn-Gly를 추가하여 N-말단에 발현되도록 유전자를 재조합 하였다. ELISA assay를 통해 재조합한 pHAEGF 단백질의 활성도를 시판되는 standard hEGF와 비교 분석을 진행하였으며 분석 결과 샤페론과의 공발현을 통한 rhEGF의 활성도가 약 8% 높은 것을 확인하였다.

1. 서론

상피세포 성장인자(Epidermal growth factor, EGF)는 다양한 상피조직 세포에 대해 강력한 세포 성장 촉진에 영향을 주는 단백질의 일종이다. EGF는 피부 표면에 존재하는 EGF 수용체(EGFR)와 결합하여 수용체의 protein tyrosin kinase의 활성을 자극하고 세포 내에 해당 과정 및 단백질 합성을 증가 시킴으로써 DNA 합성과 세포증식 및 재생에 영향을 주게 된다. 인체 내의 대부분 조직과 체액에서 합성되는 human EGF(hEGF)는 53개의 아미노산으로 구성되어 있으며 분자량이 6,045 Dalton인 단일 사슬 폴리펩타이드로, 초기 hEGF의 생산은 소변 등에서 직접 추출하여 정제하는 방식을 이용하였지만 한정적인 수득률로 인해 현재는 분자생물학적 기술을 바탕으로 유전자 재조합을 통해 미생물에 형질전환 하여 recombinant human EGF(rhEGF)로 생산되고 있다[1, 2].

재조합 단백질 발현 시에는 대부분 비교적 간단한 조건과 짧은 소요 시간의 장점이 있는 대량발현 시스템인 대장균을 숙주로 이용하지만 *E.coli* 발현 시스템은 봉입체 형태로 형성 되어 단백질 활성이 완전하지 못하다는 단점이 있다. 또한

*E.coli*에서 발현된 재조합 단백질의 정제는 필수적으로 수행 되어야 하며 이를 위해 EGF 유전자에 maltose binding protein이나 기타 signal peptide와 같은 단백질을 융합시키는 전략이 사용되고 있다. 하지만 융합단백질을 제거하기 위한 효소 공정이 필요하며, 효소 절단 과정 이후 추가 단백질 정제 공정이 필요하다는 단점이 존재한다[3].

위와 같은 문제점을 해결하기 위해 본 연구에서는 단백질의 3차 구조를 보조해주는 샤페론(Chaperon) 단백질과의 공동 발현을 이용해 protein refolding 공정을 생략하며, 고가의 효소를 사용하는 대신 hydroxylamine을 이용하여 화학적 방법으로 융합 단백질을 절단할 수 있는 rhEGF 공정을 조사하였다.

2. 재료 및 실험 방법

2.1 재료

유전자 재조합 과정에 사용된 *E.coli* BL21(DE3)은 iNtRON (Korea)에서 구매하였으며, SOB 배지를 이용하여 배양하였다. 재조합 단백질의 발현벡터는 pRSET_A (Thermo Fisher, USA)를 사용하였으며, 샤페론 공동 발현을 위한 pG-TF2 (TaKaRa, Japan)를 사용하였다. DNA cloning

은 제한효소 BamHI, EcoR I (NEB, USA)와 T4 ligase (NEB, USA)를 사용하여 수행하였다. 정제 과정에서는 Ni-NTA Agarose(QIAGEN, Germany)를 사용하였으며, 분석 과정에서는 Human ELISA kit (Aviva Systems Biology, USA)를 사용하여 분석하였다. 그 밖에 사용한 시약은 모두 일급 또는 그에 준하는 등급으로 구매하여 사용하였다.

2.2 rhEGF 발현 벡터 pHAEGF 구축

DNA template는 이전에 연구한 대장균에서 발현이 용이하게 코돈 최적화된 hEGF를 사용하였다. hEGF의 증폭을 위해 PCR을 진행하였으며 hydroxylamine 인식 부위인 Asparagin-Glycine (Asn-Gly) 서열을 추가하여 아래 [표 1]과 같이 설계하였다. PCR 반응 후 정제된 hEGF의 증폭은 agarose gel 전기영동을 통해 확인하였으며, 증폭된 hEGF와 pRSET_A을 제한효소 처리하여 T4 ligase를 이용하여 25 °C에서 2시간 동안 반응시켜 발현벡터 pHAEGF를 구축하였다. BL21(DE3) 균주에 pHAEGF를 형질전환 하여 ampicilin (100 µg/µl)를 포함한 SOB acar 배지에 배양하였다. 재조합 pHAEGF는 colony PCR을 통해 1차 선별하여 1.0 mM의 IPTG를 첨가하여 3시간동안 단백질 발현 후 SDS-PAGE를 진행하였다.

[표 1] hEGF의 증폭을 위한 PCR primer의 design

Primer name	Nucleotide sequence (5' → 3')
Forward primer (pF)	CGCGGATCCAACGGCAACAGCGATAG CGAATG
Reverse primer (pR)	GGCCCGAATTCCTAGCGCAGTCCAC

2.3 재조합 pHAEGF와 샤페론의 공동 발현과 재조합 hEGF 단백질의 정제

대장균 BL21(DE3)에서 활성 형태의 단백질을 가장 높은 수율로 발현시키기 위해 pG-TF2 벡터를 이용하여 공동 발현을 시도하였다. Chloramphenicol을 함유한 배지에 pG-TF2를 형질전환 한 BL21(DE3)를 배양한 후 pG-TF2/BL21(DE3)는 pHAEGF로 다시 형질전환 하였다. 항생제가 포함된 SOB 배지에서 pG-TF2, pHAEGF/BL21(DE3) colony를 선별하여 tetracyclin 10 ng/µl과 IPTG 1.0 mM을 첨가하여 6시간동안 배양하였다. 균주는 발현이 완료된 후 원심분리하여 상등액과 pellet을 각각 Ni-NTA를 이용하여 정제하였다. 정제된 rhEGF 수용액은 Buffer A (hydroxylamine 2 M, Tris-HCl 0.2 M, pH 9.0)를 첨가하여 2시간동안 반응시켰다. HCl을 이용하여 pH 6.0으로 낮추어 반응을 종결시킨 후 TFF system (Milipore, USA)을 이용하여 목적 단백질을 분리하여 SDS-PAGE과 Western blot을 통해 분석하였다.

2.4 rhEGF의 활성도와 세포 증식 시험 분석

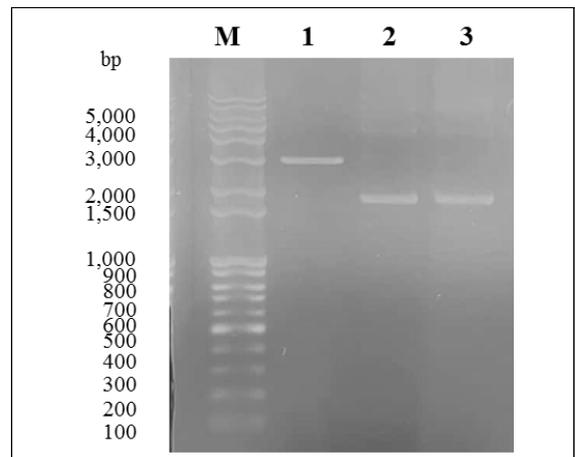
재조합된 단백질의 활성도 측정은 Human EGF ELISA kit의 protocol을 따라 진행하였다. rhEGF는 standard hEGF를 대조군으로 하여 anti-human EGF antibody로 코팅된 96 well plate에서 반응시켰으며, 2차 항체인 1x Avidin-biotin-peroxidase complex를 첨가 후 TMB 발색제를 이용하여 O.D₄₅₀에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 측정은 Microplate reader를 이용하여 실험군과 대조군을 각각 2 well 씩 3회 반복하여 측정하였다.

세포의 증식 시험은 96 well plate에 CCD-986sk cell을 초기 농도 2 x 10³ cells/well로 설정하여 10 % fetal bovine serum(FBS)과 IMDM 용액 (1 % Penicillin/Streptomycin)에서 실험군과 대조군을 각 농도별로 첨가 후 48시간 배양하였다. EZ-CYTOX를 이용하여 반응이 종결된 시료는 O.D₄₅₀에서 microplate reader를 이용하여 3회 반복 측정하였다.

3. 실험 결과

3.1 발현 벡터 pHAEGF의 구축 확인

PCR을 통해 E.coli에 코돈 최적화된 hEGF의 DNA의 성공적인 증폭을 확인하였으며, pRSET_A 벡터에 삽입 후 pHAEGF를 구축하였다. 재조합한 pHAEGF는 다시 제한효소를 처리하여 비교 분석하였다(그림 1). 약 3.0 kb의 pHAEGF는 lane 1에서 확인할 수 있었으며, 제한효소를 처리한 pHAEGF와 pRSET_A 벡터는 약 2.8 kb의 크기로 나타난 것을 확인할 수 있었다.

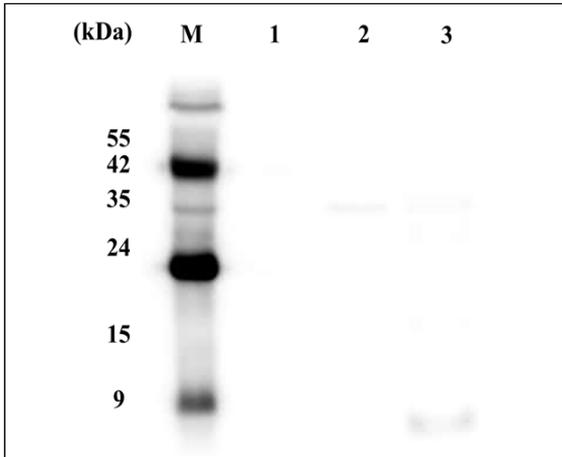


[그림 1] agarose gel 전기영동을 통한 pAHEGF 벡터 분석. (lane M: 1Kbp plus 100bp DNA Ladder Marker, lane 1: pHAEGF vector, lane 2: pHAEGF treated with restriction enzyme, lane 3: pRSET_A treated with restriction enzyme)

3.2 재조합 pHAEGF&pG-TF2의 발현

발현벡터 pHAEGF로 형질전환 된 BL21(DE3)를 샤페론

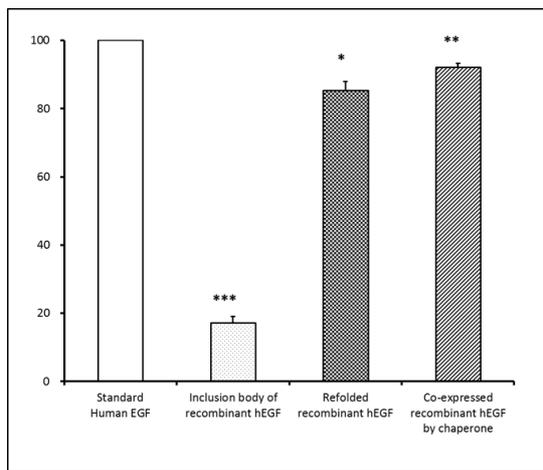
백터인 pG-TF2로 추가 형질전환을 하여 SDS-PAGE로 분석을 하였으며, 9.5 kDa에서 나타나는 밴드로 보아 6.5 kDa의 rhEGF가 3 kDa의 크기를 가지는 발현백터인 pRSET_A에 삽입되어 발현된 단백질을 확인할 수 있었다. 목적한 rhEGF의 재확인을 위해 6x-His tag monoclonal antibody를 사용하여 western blot분석을 실시하였으며(그림 2), lane 3에서 약 9 kDa에서 밴드를 확인할 수 있었다.



[그림 2] 대장균 BL21(DE3)에서 pHAEGF에 의한 발현의 western blot 분석. (lane M: Smart Color Protein Marker, lane 1: BL21 (DE3), lane 2: recombinant hEGF inclusion body, lane 3: recombinant hEGF soluble protein)

3.3 rhEGF의 활성도와 세포 증식 시험 분석 결과

발현된 rhEGF 단백질은 Hydroxylamine을 첨가하여 45 °C에서 2시간동안 반응시켜 융합태그를 절단하였으며, 그 결과를 SDS-PAGE로 분석하였다. 융합태그가 붙은 rhEGF와 비교하여 약 3 kDa 정도 작은 단백질 밴드가 나타난 것으로 보



[그림 3] anti-human EGF antibody를 이용한 ELISA 분석. (p < 0.05 = *, p < 0.01 = **, p < 0.001 = ***)

아 성공적인 융합태그의 절단을 확인할 수 있었으며, ELISA assay를 통해 활성도를 측정하였다(그림 3). 상업용 standard

hEGF와 비교하였을 때, 봉입체 형태의 단백질은 기능이 거의 없는 것으로 나타났으며, 샤페론 공발현 후 hydroxylamine 처리를 한 rhEGF가 약 92%의 활성도를 나타냄을 확인할 수 있었다.

융합태그를 절단한 rhEGF가 세포증식에 미치는 영향을 인간 유래의 섬유아세포 CCD-986sk의 세포증식 시험으로 평가하였다. 그 결과 0.1 ~ 10 ppm 농도 범위에서 유의한 수준(p < 0.05)으로 세포증식을 촉진하는 것으로 나타났다.

4. 결과 및 고찰

본 연구는 기능성 원료인 EGF의 대량 생산을 위해 hydroxylamine을 이용하여 융합태그 절단이 가능한 rhEGF와 단백질 3차 구조의 보조 단백질인 샤페론과의 공발현을 통하여 native 상태의 rhEGF 단백질 생산에 대해 연구하였다. *E.coli*에서 기존 봉입체 형태로 발현된 rhEGF는 샤페론 백터인 pG-TF2와 공발현을 함으로써 수용성 단백질 형태로 발현되는 것을 western blot을 통해 확인할 수 있었다. rhEGF의 융합 태그는 기존 Enterokinase를 사용하는 방법 대신 Hydroxylamine으로 절단이 가능한 인식 부위 Asn-Gly를 추가함으로써 절단 공정의 단가 절감을 기대할 수 있으며, 효소를 사용한 절단 방법과 비교하여 근사한 절단률을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

참고문헌

- [1] Soler, L. Ferrer, et al. "Cloning, expression and purification of human epidermal growth factor using different expression systems." *Journal of chromatography B* 788.1 (2003): 113-123.
- [2] Chopra, Kanwaljit, Ankita Baveja, and Anurag Kuhad. "MMPs: a novel drug target for schizophrenia." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 19.1 (2015): 77-85.
- [3] Jang, Eun-Bin, Jun Su Kim, and Woo-Yiel Lee. "Expression of Recombinant Human Epidermal Growth Factor as a Active Form through Codon Optimization with *E. coli* and Co-expression of Chaperone." *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society* 21.9 (2020): 559-568.