

항암제인 α -galactosylceramide 제조를 위한 *aCGT*와 *LLCRE*의 세포 외 발현 및 샤페론과의 공발현

박찬빈*, 김준수**, 노현정*, 이승현*, 최낙식**, 이우일*

*건양대학교 의료신소재학과

** (주)케이프로텍

e-mail: lee0519@konyang.ac.kr

Extracellular expression and co-expression with chaperone of *aCGT* and *LLCRE* for production of α -galactosylceramide, an anticancer drug

Chan-Bin Park*, Jun-Soo Kim**, Hyeon-Jeong Noh*, Seung-hyeon Lee*,

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

*Dept. of Biomedical Materials, Konyang University

**Kprotec Inc.

요약

항암물질 중 하나인 α -galactosylceramide의 기존 생산 방법인 화학 합성에서의 문제점에 초점을 두고 친환경적인 합성을 위하여 합성 효소인 α -galactosidase와 raffinose-raffinose α -galactosyltransferase의 발현에 대하여 연구하였다. 두 효소의 유전자인 *aCGT*와 *LLCRE*를 이용하여 재조합 벡터인 prrET와 pGCET를 구축하였으며, signal peptide인 N20과 샤페론 벡터와의 공발현을 통해 *E.coli*에서 재조합 단백질의 세포 외 발현을 유도하였다. 향후 발현시킨 *aCGT*와 *LLCRE*를 이용하여 ceramide에 raffinose에서 분해된 galactose의 결합을 유도하는 효소 반응 공정으로 α -galactosylceramide의 친환경적 생산이 가능할 것으로 기대된다.

1. 서론

해양 스펀지의 일종인 *Agielas mauritanus*에서 유래하는 당지질인 α -galactosylceramide(α -GalCer)는 생체 내 natural killer T 세포(NKT)를 활성화시키는 강력한 항암물질 중 하나이다[1, 2]. α -GalCer는 사이토카인 IL-4등을 유도하여 이에 의해 조절되는 자가면역질환 치료에 효과적으로 적용될 수 있는 물질이며, 각종 감염증의 치료제로 사용될 수 있는 기능성 원료이다. α -GalCer는 ceramide의 galactose 유도체로, 초기 생산은 해조류로부터 직접 추출하는 방식으로 이루어졌지만, 현재는 ceramide로부터 다단계의 화학합성 반응을 통해 제조되고 있다. 추출공정을 통한 생산은 α -GalCer의 함량이 매우 적어 원료당 수득률이 매우 떨어지며, 화학 합성을 통한 생산은 매우 복잡한 메커니즘일 뿐만 아니라 다수의 유해한 유기 용매를 사용하기 때문에 인체에 대한 부작용이 존재한다는 단점이 있다. 이를 해결하기 위해 친환경적인 α -GalCer의 합성 방법의 개발이 필요하다[3].

α -GalCer의 친환경적 합성 방법으로 galactose 전이 기능

을 가진 α -galactosidase의 효소를 이용한 공정은 인체에 유해한 유기 용매를 사용하지 않은 친환경적 제조 방법일 뿐만 아니라 단일 단계로 단백질을 합성하기 때문에 높은 수율의 α -GalCer를 얻을 수 있다는 장점이 있다.

본 연구에서는 α -GalCer의 합성을 위하여 Raffinose-raffinose α -galactosyltransferase 및 α -galactosidase를 각각 발현시킬 수 있는 *LLCRE*와 *aCGT*의 유전자들을 재조합하여 대장균(*Escherichia coli*, *E.coli*)에서 대량 발현을 실시하였다. 각 효소는 *E.coli*에서의 발현에 맞춰 코돈 최적화되었으며, 세포 외 발현 및 단백질 refolding 과정의 생략을 위해 샤페론(chaperon)과의 공발현을 실시하였다.

2. 실험 방법

2.1 재료

*E.coli*에 코돈 최적화를 한 template DNA와 primer를 제외한 PCR 시약은 TaKaRa사에서 구입하여 진행하였으며, 단백질 발현용 vector인 pET-25(b)는 ThermoFisher사에서 구입하였다. 제한효소로 사용한 Nde I 과 Xho I 과 함께 재조합 단백질 발현 균주 BL21(DE3)는 enzymonics사에서 구매하

여 사용하였다. Chaperon 발현 벡터는 TaKaRa 사의 pG-TF 2를 사용하였으며, 그 외 사용한 시약과 buffer는 일급 또는 그에 준하는 등급의 시약을 구매하여 사용하였다.

2.2 PCR을 통한 *aCGT*와 *LLCRE* 유전자 획득

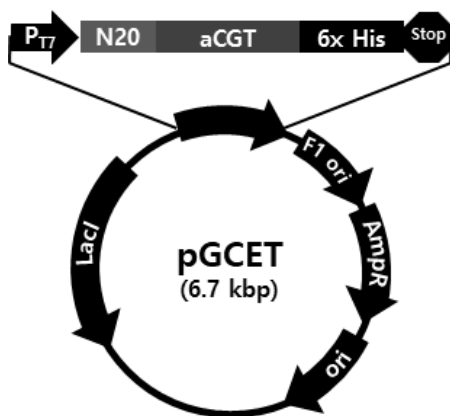
Template로 사용될 두 DNA는 각각 *E.coli*에 최적화된 코돈으로 합성을 진행하였으며, 세포 외 발현을 위해 N-terminal에 signal peptide N20을 추가로 삽입하여 바이오니아 사에 의뢰하였다. 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)은 60 bp의 N20을 포함하여 진행하였으며, 사용된 primer는 아래 [표 1]과 같다. PCR 과정은 annealing 온도는 52 °C, 56 °C, 60 °C로 변수로 하고 extension을 1분간 진행하였으며, 28 cycle을 진행하였다.

[표 1] *aCGT*와 *LLCRE* 유전자의 PCR을 위한 primer의 세부 정보

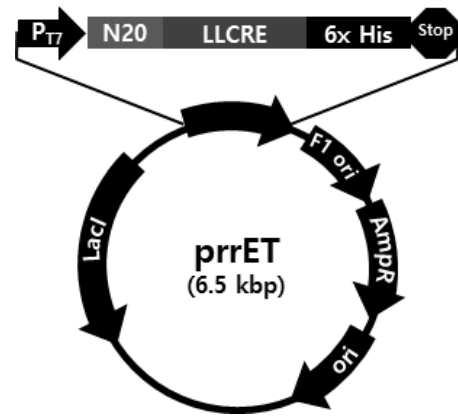
Enzyme	Primer	Sequence
<i>aCGT</i>	pF_ <i>aCGT</i>	GGGAATTC CAT ATG AAAAAGATCACTGCAGCAG
	pR_ <i>aCGT</i>	CCG CTC GAG TTTATTACCGTTGCGTTTAATCAGAC
<i>LLCRE</i>	pF_ <i>LLCRE</i>	GGGAATTC CAT ATG ATGAAGAAAATTACTGCTGCAGC
	pR_ <i>LLCRE</i>	CCG CTC GAG GTGCAGTTTTTTAGATTTTTTCAATGT

2.3 재조합 *aCGT*와 *LLCRE*의 발현 벡터 구축

단백질 발현 균주인 *E.coli*에 코돈 최적화를 진행한 DNA는 정제의 용이를 위해 6x histidine이 있는 pET-25(b)를 사용하였다. Insert DNA와 vector는 동일한 조건에서 제한효소 Nde I 과 Xho I 을 이용하여 절단한 후 spin column을 이용하여 정제하였고, 이후 각 단편을 T4 ligase를 이용하여 ligation을 진행하였다. 구축된 재조합 vector pGCET와 prrET의 모식도는 각각 아래 [그림 1]과 [그림 2]에 나타내었다.



[그림 1] 재조합 pGCET vector의 모식도



[그림 2] 재조합 prrET vector의 모식도

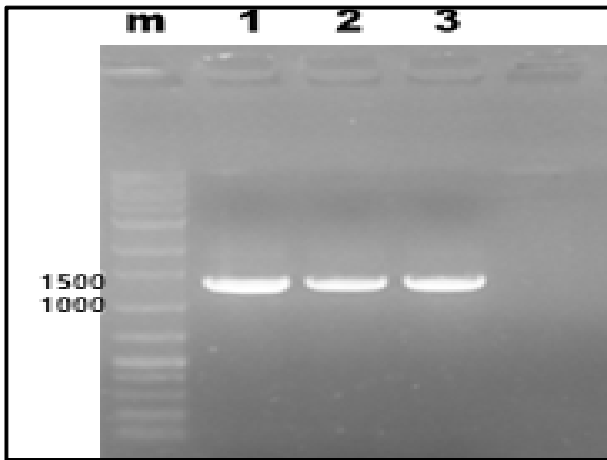
2.4 *E.coli* BL21(DE3)를 이용한 재조합 prrET와 pGCET의 발현

단백질 발현을 위해 균주 BL21(DE3)에 샤페론 벡터인 pG-Tf2를 형질 전환한 후 재조합 발현벡터 prrET와 pGCET를 공형질전환하였다. prrET&pG-Tf2/BL21(DE3) 및 pGCET&pG-Tf2/BL21(DE3)는 항생제 ampicilin과 chloramphenicol을 포함한 TB broth에 배양함으로써 1차 선별을 진행하였다. 이를 다시 tetracycline을 추가로 첨가한 발현용 배지에 접종하여 단백질 유도제인 IPTG의 최종농도가 0.5 mM이 되도록 첨가한 뒤 37 °C에서 6시간 동안 main culture와 over expression을 유도하였다. 발현이 완료된 후 원심분리기를 이용해 상층액과 cell pellet을 분리하고 cell pellet은 lysis buffer(10% sucrose, 0.005 M EDTA, 0.1 M Tris-HCl, 0.2 M NaCl, pH 8)로 현탁한 후 sonication으로 세포를 파쇄하였다. Inclusion body는 8 M의 urea에 용해시키고, media는 acetone을 이용하여 단백질을 침전시켰다. 각각의 soluble protein과 inclusion body, 농축된 media를 이용하여 SDS-PAGE 분석을 통해 단백질의 발현 양상을 확인하였다.

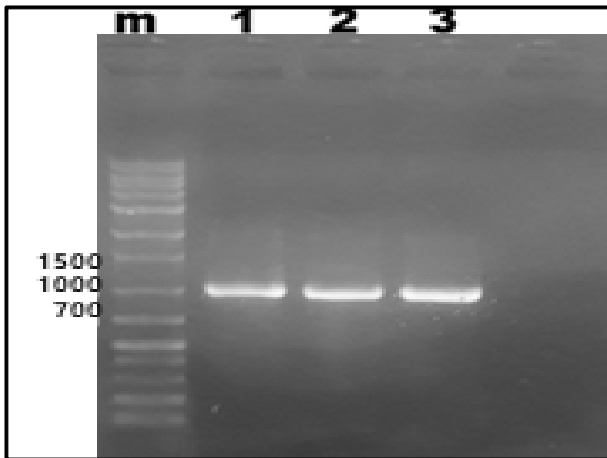
3. 결과

3.1 PCR을 통한 *aCGT*와 *LLCRE* 유전자의 증폭

PCR 반응 완료 후 agarose gel electrophoresis를 통해 DNA의 크기와 농도를 분석하였다. N20은 signal peptide로 60bp의 크기를 가지며, *aCGT*sms 1,149 bp의 크기를 가지므로, 1,209 bp에서 단일 band를 확인할 수 있었다[그림 3]. N20이 합쳐진 *LLCRE*의 크기는 1,044 bp로 성공적인 증폭을 확인할 수 있었다[그림 4].



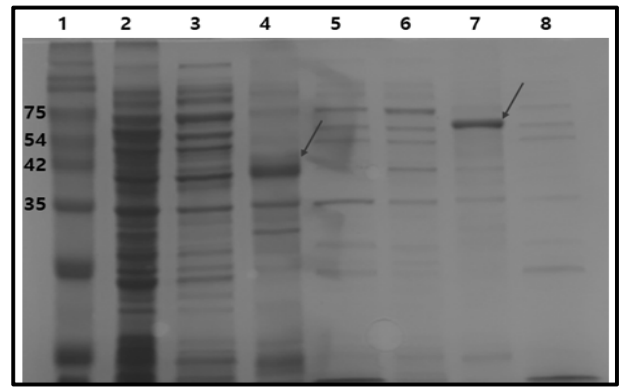
[그림 3] PCR을 통한 N20_α-galcer galactosyltransferase 유전자 증폭의 Agarose gel 전기영동 결과(Lane 1 : DNA marker, Lane 2 : 증폭된 α-galcer galactosyltransferase 유전자 (52℃), Lane 3 : 증폭된 α-galcer galactosyltransferase 유전자 (56℃), Lane 4 : 증폭된 α-galcer galactosyltransferase 유전자 (60℃))



[그림 4] PCR을 통한 N20_Raffinose-raffinose alpha-galactosyltransferase 유전자 증폭의 Agarose gel 전기영동 결과 (Lane 1 : DNA marker, Lane 2 : 증폭된 Raffinose-raffinose alpha-galactosyltransferase 유전자 (52℃), Lane 3 : 증폭된 Raffinose-raffinose alpha-galactosyltransferase 유전자 (56℃), Lane 4 : 증폭된 Raffinose-raffinose alpha-galactosyltransferase 유전자 (60℃))

3.2 재조합 prrET와 pGCET의 발현 결과

BL21(DE3) 균주를 이용한 형질전환 후 ampicillin을 첨가한 배지에서 균주를 선별하여 1차 확인을 하였으며, SDS-PAGE 분석을 실시하였다[그림 5]. SDS-PAGE 분석 결과, prrET(38 kDa)의 경우 Lane 4의 inclusion body에서 확실한 발현밴드가 관찰되었으며, pGCET(45 kDa)의 경우 inclusion body에서 예상보다 높은 크기(54~75 kDa)의 발현밴드가 관찰되었으므로 pGCET의 seq를 다시 체크하고 다른 조건에서 발현을 진행할 예정이다.



[그림 5] prrET 및 pGCET의 발현에 대한 SDS-PAGE 결과(Lane 1 : marker, Lane 2 : not induction (-), Lane 3 : prrET의 soluble protein, Lane 4 : prrET의 Inclusion body, Lane 5 : prrET의 Media, Lane 6 : pGCET의 soluble protein, Lane 7 : pGCET의 Inclusion body, Lane 8 : pGCET의 media)

4. 결론

본 연구는 항암물질 중 하나인 α-galactosylceramide의 친환경적인 합성을 위하여 합성 효소인 α-galactosidase(*aCGT*)와 raffinose-raffinose α-galactosyltransferase(*LLCRE*)의 발현에 대하여 연구하였다. *E. coli*에서의 대량 발현을 위해 코돈 최적화를 진행한 *aCGT*와 *LLCRE* 유전자를 이용하여 재조합 벡터인 prrET와 pGCET를 구축하였으며, signal peptide인 N20과 사폐론 벡터와의 공발현을 통해 단백질의 발현을 유도하였다. 향후 발현시킨 *aCGT*와 *LLCRE*의 정제 및 분리를 통해 ceramide에 raffinose에서 분해된 galactose를 합성하는 효소 반응 공정으로 α-galactosylceramide의 친환경적 생산이 가능할 것으로 기대된다.

참고문헌

- [1] Morita, Masahiro, et al. "Structure-activity relationship of α-Galactosylceramides against B16-bearing mice." *Journal of medicinal chemistry* 38.12 (1995): 2176-2187.
- [2] Chen, Q., and A. C. Ross. "α-Galactosylceramide stimulates splenic lymphocyte proliferation in vitro and increases antibody production in vivo in late neonatal age mice." *Clinical & Experimental Immunology* 179.2 (2015): 188-196.
- [3] Morita, Masahiro, et al. "Syntheses of α-, β-monoglycosylceramides and four diastereomers of an α-galactosylceramide." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 5.7 (1995): 699-704.