

재조합 α -galactosidase의 클로닝과 발현

김승현*, 이승훈*, 이율하*, 김준수**, 이우일*

*건양대학교 의료신소재학과

** (주)케이프로텍

*lee0519@konyang.ac.kr

Cloning and Expression of Recombinant α -Galactosidase

Seung-hyun Km*, Seung Hoon Km*, Yulha Lee*, Jun Soo Kim**, Woo-Yiel Lee*

*Department. of Biomedical Materials, Konyang University

**K-ProTech Co., Ltd

*lee0519@konyang.ac.kr

본 논문에서는 유전자 재조합 기술을 통하여 당 전이 효소인 α -galactosidase가 삽입된 발현 벡터를 구축하고 이를 대장균인 DH5 α 에 형질전환하여, 재조합 α -galactosidase를 대량으로 발현하였으며, 친화성 크로마토그래피를 통하여 재조합 α -galactosidase를 정제하였다. 생산된 재조합 α -galactosidase를 촉매로 raffinose와 ceramide을 당 전이 반응의 기질로 사용하여 α -galactosylceramide (KRN7000)의 합성 가능성을 조사 분석 하였다.

1. 서론

전 세계적으로 유행하고 있는 코로나-19의 영향으로 인하여 항바이러스, 항암 등 생리활성 효과가 뛰어난 기능성 소재의 관심이 높아지고 있으며, 새로운 기능성 소재 발굴을 위한 연구개발이 지속적으로 이루어지고 있다.

Ceramide의 당 유도체인 α -galactosylceramide (KRN7000)은 해양 스펀지 일종인 *Agelas mauritanus*에서 유래하는 당 지질로, 생체 내 Natural killer T (NKT) 세포를 강하게 활성화시켜 여러 가지 면역 반응을 개시시키는 강력한 항암 효과를 가지고 있다. 특히 KRN7000은 사이토카인 IL-4를 강력히 유도함으로써 이에 의해 조절되는 제1형 당뇨병, 다발성 경화증과 같은 자가면역질환 치료에 효과적으로 적용될 수 있는 물질이며, 암이나 만성적인 알레르기 질환, 각종 감염증의 치료제로도 사용될 수 있는 기능성 원료이다.

KRN7000에서는 CD1d가 인식하는 galactose 분자의 구조적 특성이 KRN7000의 기능을 형성하는데 중요한 역할을 하며, 특히 KRN7000의 α -anomer 연결구조가 NKT 세포에 대한 강력하고 효과적인 리간드로 작용하게 된다.

초기 KRN7000의 생산은 해조류로부터 직접 추출하는 방식으로 이루어졌지만, 현재는 Ceramide를 시작물질로 다단계의 화학 합성 반응을 통해 제조되고 있다. 추출을 통한 KRN7000의 생산은 낮은 KRN7000의 함량으로 인하여 매우

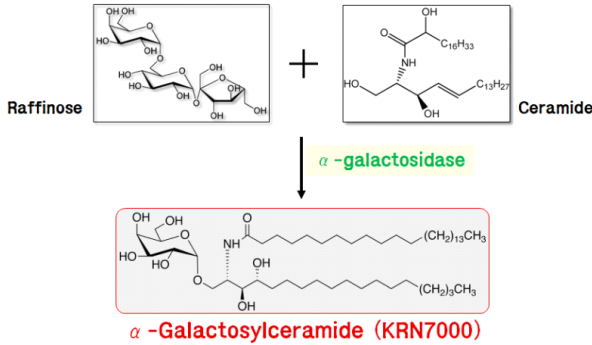
비효율적이며, 유기 반응을 통한 KRN7000의 합성은 메커니즘이 매우 복잡할 뿐만 아니라 수득률이 매우 낮다는 단점이 존재한다.

효소의 고유한 반응 메커니즘을 응용하여 상대적으로 복잡한 구조를 가진 특정 물질을 효율적으로 합성할 수 있다.

Cyclodextrin glucanotransferase (2.4.1.25)는 Cyclodextrin을 합성하는 당 전이 효소이지만, L-ascorbic acid의 유도체인 L-Ascorbic Acid 2-Glucoside를 합성하는 촉매로 사용되고 있으며, Amylosucrase (2.4.1.4)는 sucrose을 glucose와 fructose로 가수분해하는 촉매지만, hydroquinone를 acceptor로 사용하면 hydroquinone의 glucose 유도체인 α -arbutin을 합성할 수 있다. 그밖에 α -glucosidase (3.2.1.10), dextran dextrinase (2.4.1.2), levanase (3.2.1.65), inulinase (3.2.1.7) 등은 특정 분자에 glucose나 fructose 분자를 결합시키는 당 전이 반응 메커니즘을 가지고 있다. α -galactosidase (3.2.1.22)는 melibiose또는 raffinose와 같은 다당류를 galactose로 가수분해하는 효소이며, 상기의 당 전이 효소들과 마찬가지로 반응 조건에 따라 다양한 종류의 galactoside 유도체를 합성할 수 있는 기능을 가지고 있다.

본 연구에서는 분자 클로닝 기술을 통하여 α -galactosidase의 유전자가 삽입된 재조합 발현 벡터를 구축하고, 이를 대장균인 DH5 α 에 대량 발현을 유도하여, 재조합 α -galactosidase을 대량으로 생산하였다. 또한 크로마토그래피 시스템을 통

해 재조합 효소를 분리하고, 이를 Ceramide의 galactose 진이 반응의 촉매로 사용하여, KRN7000을 효율적으로 합성하는 것을 목적으로 한다.



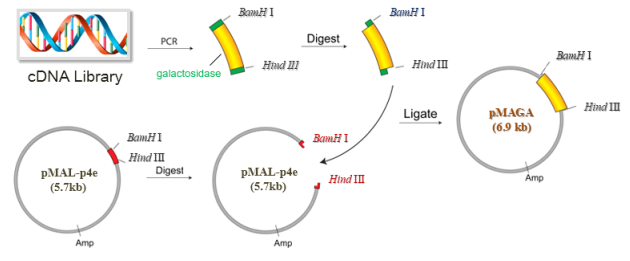
[그림 1] α -galactosidase의 transgalactosylation을 통한 KRN7000 합성의 반응 메커니즘

2. 본론

2.1 α -galactosidase (AGA)의 발현 벡터 구축

효소연쇄반응(PCR)을 통해 AGA 유전자를 증폭하여 유전자 클로닝에 사용하였다. 유전자 증폭에 사용할 AGA 유전자는 *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 유래의 효소를 사용하며, Bioneer社에서 유전자 합성을 의뢰하여 코돈을 최적화하고, 이를 PCR의 주형 DNA로 사용하였다. 프라이머는 pF: CGCGGATCCATGAAAAAGATCACTGCAGC와 pR: GGG AAGCTTTTATTACCGTTGCGTTTAA를 사용하였으며 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 3분 조건으로 총 28회 반복 실행하였다.

이 후 증폭된 AGA 유전자와 pMAL-p4e 벡터를 제한효소인 BamHI과 HindIII로 처리한 후 T4 DNA ligase와 반응시켜 α -galactosidase 유전자가 삽입된 새로운 발현 벡터 pMAGA를 제조하였다. 구축된 발현 벡터는 단백질 발현을 위하여 대장균 DH5a에 열 충격 방식으로 형질전환 하였으며, 앰피실린에 포함된 SOB 고체 배지에 도말하여 형질전환체를 선별하였다.



[그림 2] α -galactosidase 유전자가 삽입된 발현 벡터 pMAGA의 유전자 재조합 과정 모식도

2.2 대장균으로부터 재조합 α -galactosidase의 발현

DH5a에 형질전환된 재조합 균주의 대량 발현을 진행하기에 앞서 발현 조건을 최적화하기 위하여 small scale로 다양한 조건에서 발현을 진행하였다. 발현 배지에는 0.2% glucose를 포함시켰으며, IPTG를 이용하여 단백질 과발현을 유도하고 SDS-PAGE를 실시하여 각각의 sample의 발현량을 비교 분석하였다.

최적화된 조건을 바탕으로 1 Liter의 발현 배지로부터 재조합 α -galactosidase의 과발현을 실시하였다. 형질전환체를 항생제가 포함된 SOB 배지에 접종한 후 이를 다시 발현용 배지 1 Liter에 접종하여 main culture 및 과발현을 유도하였다.

발현이 끝난 균주는 Cell lysis buffer (10 % sucrose, 0.1 M Tris-HCl, 0.05 M EDTA, 0.2 M NaCl, pH 7.9)으로 균주를 현탁한 후 Sonic dismembrator로 균주를 파쇄하여, 발현 단백질을 추출하였으며, Cell lysate는 Cell wash buffer (2 % Triton X-100, 1.0 M Urea)으로 세척하고, Solubilization buffer (8 M Urea, 0.01 M Tris-HCl, 0.2 M Na_2HPO_4 , pH 8.0)으로 용입체를 완전히 용해시켰다.

2.3 재조합 α -galactosidase의 정제 및 분리

대량 발현된 Soluble protein 형태의 재조합 α -galactosidase를 크로마토그래피를 통하여 정제를 실시하였다. 발현 벡터인 pMAL-p4e에 tagging된 Maltose binding protein에 특이적으로 결합하는 Amylose resin으로 고정상으로 사용하였다.

기기는 biorad社의 protein purification system을 사용하였으며, Loading 및 Wash buffer (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4)와 Elution buffer (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Maltose, pH 7.4)를 사용하였다. 정제가 완료된 α -galactosidase는 BCA protein assay를 통해 정량 분석하여 발현 배지당 생산되는 발현 단백질의

량을 계산하였다.

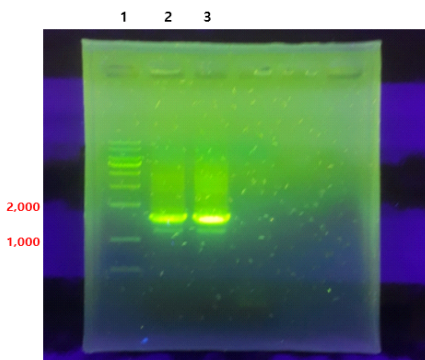
2.4 재조합 α-galactosidase의 효소 반응을 통한 KRN7000의 합성

KRN7000의 합성 반응을 진행하기에 앞서 α-galactosidase의 최적화된 반응 온도와 pH를 탐색하였다. 반응에 사용한 기질은 1% raffinose로 sodium phosphate buffer 및 tris buffer를 완충 용액으로 사용하였다. 효소는 최종 부피의 0.5%를 첨가하였고, 1시간 동안 반응시켜 가장 높은 활성도를 나타내는 조건을 탐색하였다. 효소 활성도는 DNS method을 통하여 측정하였다.

3. 실험 결과

3.1 재조합 pMAGA의 발현 벡터 구축

Bacteroides fragilis NCTC 9343 유래의 α-galactosidase 유전자(1,209 bp)를 PCR을 통해 증폭하고 spin column으로 정제한 후 Agarose gel 전기영동을 실시하여, 목표 DNA가 올바르게 증폭되었음을 확인하였다. 이 후 증폭된 AGA 유전자와 pMAL-p4e를 동일한 제한효소로 처리하고, T4 DNA ligase로 봉합하여, α-galactosidase 유전자가 삽입된 재조합 pMAGA를 구축하였으며, 이를 대장균 DH5α에 형질전환하였다.

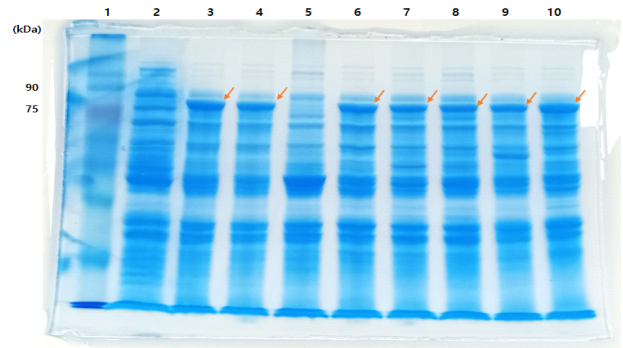


[그림 3] 증폭된 α-galactosidase 유전자의 Agarose gel 전기영동 결과. Lane 1: DNA marker, Lane 2,3: α-galactosidase 유전자.

3.2 재조합 α-galactosidase의 발현 조건 최적화

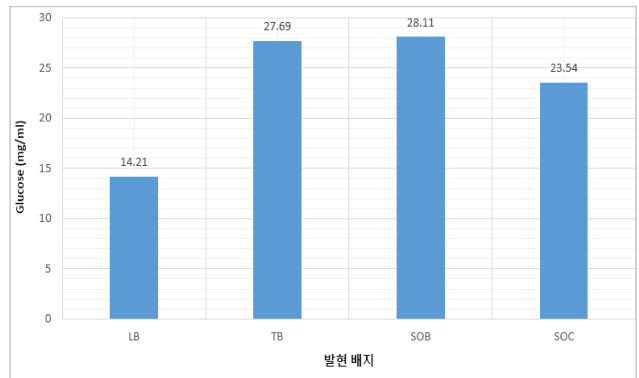
α-galactosidase의 발현을 나타내는 균주를 선별하기 위하여 다수의 형질전환체를 배양시킨 후 small scale로 발현 테스트를 진행하였다. 발현은 OD_{600nm} = 0.5, 0.3 mM IPTG, 37°C에서 2시간동안 진행하였으며, 균주를 증류수로 희석하고

이를 바로 SDS-PAGE에 사용하였다. 총 8개의 sample 중 7개의 균주에서 α-galactosidase의 발현 band가 나타났으며, 이 중 첫 번째 sample을 사용하여 발현 조건을 최적화하였다.

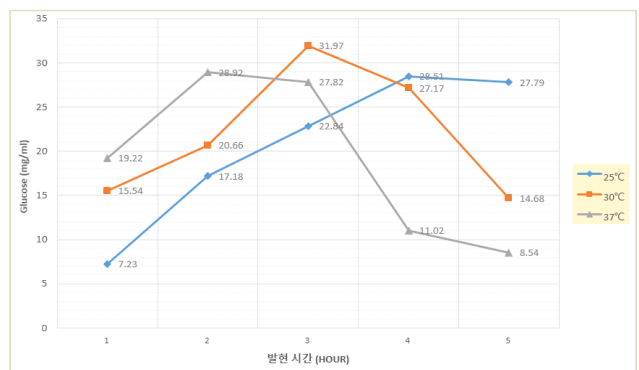


[그림 4] 대장균 DH5α로부터 재조합 α-galactosidase 발현 테스트에 대한 SDS-PAGE 분석 결과. Lane 1: protein marker, Lane 2: BL21(DE3) 음성대조군, Lane 3~10: 발현이 유도된 pMAGA의 형질전환체.

배지 조성, 배양 시간 및 발현 온도를 최적화 변수를 선정하고 각각의 조건 별로 단백질 발현을 진행한 후 DNS method을 통하여 효소 활성도를 비교 분석하였다.



[그림 5] 발현 배지에 따른 재조합 α-galactosidase의 효소 활성도의 비교 분석 결과

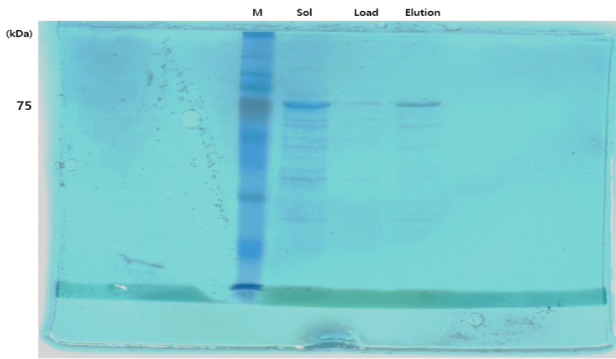


[그림 6] 발현 온도 및 시간에 따른 재조합 α-galactosidase의 효소 활성도의 비교 분석 결과.

배지 중에서는 SOB broth가 가장 높은 활성도를 나타냈으며, 발현 온도 및 시간 조건으로는 30℃에서 3시간 발현 했을 경우 가장 높은 활성도를 나타내었다.

3.3 재조합 α-galactosidase 단백질의 정제 결과

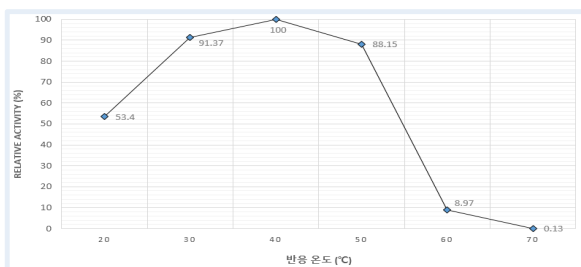
최적화된 조건을 바탕으로 α-galactosidase 단백질을 대량으로 발현한 후 Amylose resin을 이용한 친화성 크로마토그래피를 통해 Native protein 분획을 정제하였다. 컬럼을 Tris buffer로 평형화하고 sample을 loading한 후 10 mM maltose가 포함된 Elution buffer로 목표 단백질의 분리하였다. 정제된 단백질은 BCA protein assay를 통해 정량 분석을 하였으며 그 결과, 발현 배지 1 Liter에서 생산된 α-galactosidase의 양은 2.458 mg으로 나타났다.



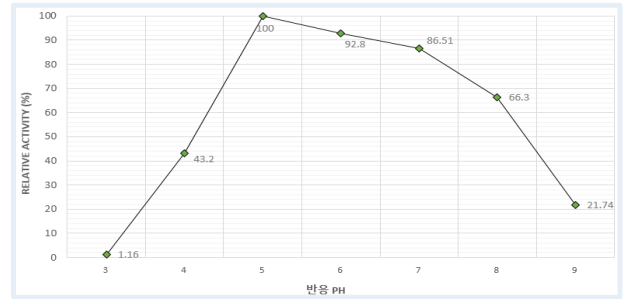
[그림 7] 친화성 크로마토그래피에서 정제된 α-galactosidase의 SDS-PAGE 분석 결과

3.4 재조합 α-galactosidase를 통한 KRN7000의 합성 기능성 분석

KRN7000 합성에 가장 적합한 재조합 α-galactosidase의 반응 조건을 탐색하였다. 온도는 20℃에서 80℃까지 비교하였고, pH는 phosphate buffer와 tris buffer를 사용하여, 3.0부터 9.0까지 분석하였다. 효소 활성도는 상기의 방법과 동일한 DNS method으로 계산하였다. 재조합 α-galactosidase는 40℃, pH 5.0에서 가장 높은 활성도를 나타내는 것으로 분석되었다.



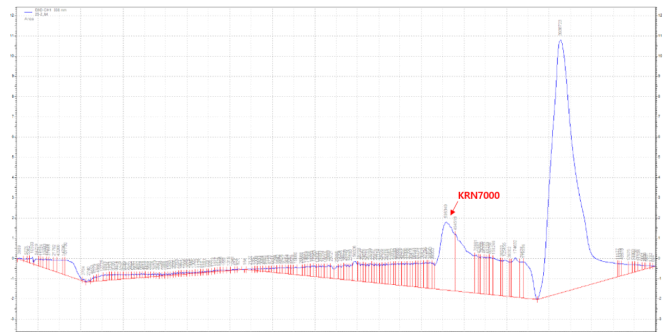
[그림 8] α-galactosidase의 온도별 효소 활성도 비교 분석 결과



[그림 9] α-galactosidase의 pH 별 효소 활성도 비교 분석 결과

KRN7000의 합성 반응은 1% raffinose와 0.5% ceramide를 기질로 사용하였고, 0.5% α-galactosidase를 첨가하여, 40℃에서 20시간 동안 반응을 진행하였다.

반응 결과물은 HPLC 분석을 실시하여 KRN7000의 합성 여부를 확인하였다. 각각의 반응물은 100 mM borate buffer에 녹여진 O-phtalaldehyde 시약을 통하여 유도체를 형성시킨 후 UV detector 및 형광 분석기를 통하여 흡광도를 검출하였다. 컬럼은 Intersil SIL 150A-5, 4.6 × 250 mm을 사용하였고, 용매는 n-hexane : isopropylalcohol : H₂O (73 : 26.5 : 0.5), 검출기는 340 nm와 455 nm에서 분석하였다. 분석 결과, 효소 반응물에서 α-galactosylceramide와 동일한 retention time의 peak가 나타났으며, 이를 통하여 KRN7000이 올바르게 합성되었음을 확인할 수 있었다.



[그림 10] 재조합 α-galactosidase의 KRN7000 합성 반응에 대한 HPLC 분석 결과

참고문헌

- [1] Morecki S, et al., "Effect of KRN7000 on induced graft-vs-host disease", *Exp Hematol*, Vol. 32, No. 7, pp. 630-637, July, 2004.
- [2] Duthie MS, Kahn SJ, "During acute *Trypanosoma cruzi* infection highly susceptible mice deficient in natural killer cells are protected by a single α-galactosylceramide treatment", *Immunology*, Vol. 119, No. 3, pp. 355-361, November, 2006.