

항암제인 α -galactosylceramide 제조용 α -galactosidase의 과량 발현

조용재*, 김수지*, 박재영*, 김선호*, 최낙식**, 이우일*

**건양대학교 의료신소재학과

**(주) 케이프로텍

e-mail:rktnjns5@naver.com

Excess expression of α -galactosidase for the preparation of α -galactosylceramide, an anticancer drug

Yong-Jae Cho*, Su-Ji Kim*, Jae-Young Park*, Sun-Ho Kim*,
Nak-Sik Choi**, Woo-Yiel Lee*

*Dept. of Biomedical Materials, Konyang University

**Kprotec Inc.

요약

본 논문에서는 효소 반응 공정을 통하여 α -galactosylceramide를 합성할 수 있는 α -galactosidase의 과량 발현 및 발현 조건 최적화에 초점을 두어 연구를 진행하였다. 항암제로서 많이 사용되는 α -galactosylceramide의 기존 생산방식은 생산과정부터 사용까지 여러 부작용을 갖고 있어 이러한 문제점을 보완한 α -galactosylceramide의 생산을 위해 transgalactosylation 기능을 가진 α -galactosidase의 다량 발현을 진행하였다. α -galactosidase의 다량 생산을 위하여 대장균을 통한 발현 시스템에 적합한 코돈 최적화를 진행하였고, BL21(DE3) 대장균을 통해 다량 발현을 진행하였다. 또한 발현 후 단백질의 고순도 정제를 위해 6x-Histidine이 있는 pRSET_A를 사용하였으며, 다량 발현 이후 Ni-NTA Chromatography를 통해 고순도로 정제된 단백질을 획득할 수 있도록 하였다.

1. 서론

α -galactosidase는 약 100 kDa의 크기를 가지며 당지질과 당단백질에서 말단 α -galactose를 절단하는 효소로 Raffinose와 같은 다당류로부터 Galactose기를 절단해 Galactose 단량체로 만든다[1]. α -galactosylceramide는 Ceramide의 Galactose기 유도체이자 해양 스펀지 *Agelas mauritianus*로부터 유래하는 당 합성 지질로, 생체 내 모델에서 NKT 세포(Natural Killer T Cell)를 강하게 활성화시킨다[2]. α -galactosylceramide와 같은 ligand에 의해 강하게 활성화된 NKT 세포는 여러 가지 면역세포에 관여하는 사이토신을 분비하여 여러 가지 면역 반응을 개시시키는 강력한 항암물질 중 하나로 알려져 있다[3].

그러나 현재 α -galactosylceramide의 생산은 해조류로부터 직접 추출하는 방법과 화학 합성 반응을 통해 Ceramide로부터 다단계를 거쳐 합성하는 방식으로 수득률이 매우 떨어지기 때문에 산업적 측면에서 비효율적이며 인체에 대한 부작용이 있다[4-5]. 이러한 문제를 해결하기 위해 transgalactosylation 기능을 가진 α -galactosidase를 이용한 친환경적이며 효율이 높은 α -galactosylceramide 합성 공정 방법 개발이 필요한 시점이다.

본 연구에서는 *Escherichia coli* (strain K12) 유래의 α -galactosidase 유전자를 사용하였으며 대장균 발현 시스템에 적합한 코돈 최적화를 통해 재조합 벡터를 구축하고 다량 발현 및 고순도 정제를 통해 transgalactosylation 기능을 하는 α -galactosylceramide의 합성 촉매인 순수한 α -galactosidase를 획득하는 것이 궁극적인 목표이다[6].

2. 실험 방법

2.1 재료

유전자 증폭을 위한 PCR 시약은 주형 DNA와 primer를 제외하고 TAKARA사에서 구입하였으며 단백질 발현 vector는 ThermoFisher사의 pRSET_A를 사용하였으며 단백질 발현 균주는 enzymomics사 제품의 BL21(DE3)를 사용하였다. 단백질 정제용 column은 Ni-NTA agarose를 이용했으며 각 분석용 시약은 각 실험방법에 기입하였고 이외의 시약은 모두 일급을 사용하였다.

2.2 PCR을 통한 Galactosidase 유전자의 획득

α -galactosylceramide 유전자는 *Escherichia coli* (strain K12) 유래를 사용하였으며 template DNA는 상기

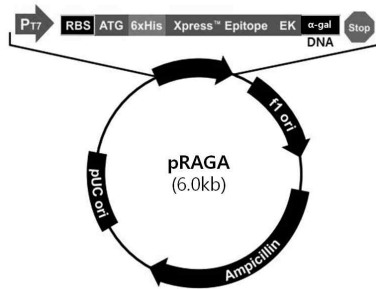
의 미생물을 SOB broth에 배양시킨 후 cell harvest를 수행하고 100℃에서 10분간 가열하여 gDNA를 추출하여 이를 template DNA로 사용하였다. PCR 과정은 Taq DNA polymerase, dNTP, primer, template DNA, PCR buffer를 PCR tube에 혼합시킨 후 thermal cycler device를 통하여 반응을 진행하였다.

[표 1]. *Escherichia coli* (strain K12) 유래의 AGA 유전자의 증폭을 위한 primer의 세부 정보

Extra site	Restriction enzyme site	Annealing site
CGC	<u>GGA TCC</u> (BamH I)	ACC ATG ATT ACG GAT TCA CTG GC
GGG	<u>GGA TCC</u> (BamH I)	TTA TTT TTG ACA CCA GAC CAA CTG G

2.3 재조합 α -galactosidase 발현 벡터 구축

Cloning에 사용한 α -galactosidase의 DNA는 대장균에서 발현하기에 적절하지 않기 때문에 코돈 최적화를 진행한 후 α -galactosidase의 대량발현 및 정제의 용이성을 위하여 T7 promoter 시스템과 6x Histidine이 붙어있는 발현 벡터인 pRSET_A를 사용하여 동일한 조건하에 제한효소 BamH I 과 HindIII로 절단하였다. 각각의 vector와 insert DNA는 spin column을 통하여 정제를 실시하고, 이후 각각의 단편을 1:5 몰 비율로 T4 DNA ligase를 이용해 재조합 벡터인 pRAGA를 구축하였다.



[그림1] pRAGA vector의 모식도

2.4 대장균 BL21(DE3)로부터 재조합 pRAGA의 발현

최적화된 조건을 바탕으로 대장균 BL21(DE3)으로부터 α -galactosidase의 과발현을 진행하였다. 형질전환체를 Ampicillin이 포함된 SOB broth에 배양한 후 이를 다시 발현용 배지에 접종하여 main culture 및 over-expression을 유도하였다. 이후 cell lysis buffer (10% sucrose, 0.1 M Tris-HCl, 0.05 M EDTA, 0.2 M NaCl, pH 7.9)로 균주를 현탁한 후 sonic dismembrator로 균주를 파쇄하여 발현 단

백질을 추출하였다. Cell lysate는 cell wash buffer (2% Triton X-100, 1.0 M Urea)로 세척하고, solubilization buffer (8 M Urea, 0.01 M Tris-HCl, 0.2 M Na₂HPO₄, pH 8.0)로 봉입체를 완전히 용해시켜 SDS-PAGE를 통해 단백질 발현 양상을 분석하였다.

2.5 친화성 크로마토그래피를 통한 pRAGA 단백질의 정제

Ni-NTA을 이용한 affinity chromatography를 통하여 대량 발현한 α -galactosidase를 단일 물질로 정제하였다. 정제는 Bio-rad 사의 protein purification system을 이용하여, 각각의 단계에서 용출된 단백질 fraction을 수집하였으며 SDS-PAGE 분석을 통하여 순도를 확인하였다.

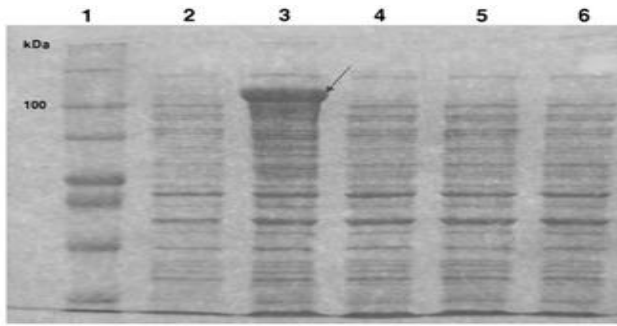
3. 실험 결과

3.1 중합효소연쇄반응을 통한 α -Galactosidase 유전자 증폭 확인

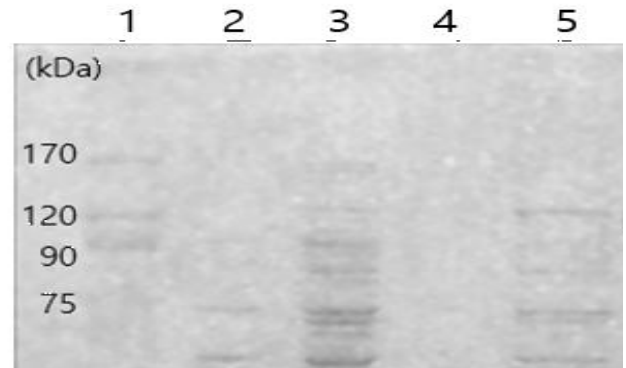
반응 완료 후 Agarose gel 전기영동을 통하여 증폭된 DNA의 크기 및 농도를 분석하고 단일 band 여부를 확인하였다. 분석 결과, T_m 값이 52 ℃에서 약 3,000 bp에서 단일 band가 관찰되었으며, 이를 통해 α -galactosidase 유전자가 올바르게 증폭된 것을 확인하였다.

3.2 pRAGA 발현 확인

BL21 (DE3) 균주를 이용한 형질전환 후 Ampicillin을 첨가한 SOB agar 배지에 균주를 선별하여 colony PCR로 1차 형질전환을 확인하였으며, 발현 후 SDS-PAGE로 결과를 확인하였다. SDS-PAGE 분석 결과, [그림 2]의 lane 3에서 100 kDa 부근에서 높은 농도의 발현 band가 관찰되었으며, 이는 이론상 α -galactosidase의 분자량과 매우 유사해 이를 통하여 α -galactosidase가 대장균에서 상당한 양의 발현이 이루어졌음을 확인하였다.



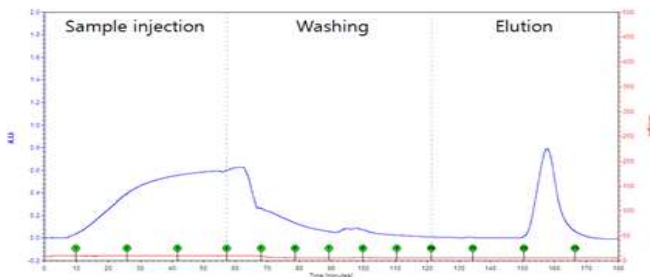
[그림 236] 재조합 Galactosidase의 발현에 대한 SDS-PAGE 분석 결과. (Lane 1 : protein marker, Lane 2 : pRAGA/BL21 (DE3) colony no. 1, Lane 3 : pRAGA/BL21 (DE3) colony no. 2, Lane 4 : pRAGA/BL21 (DE3) colony no. 3, Lane 5 : pRAGA/BL21 (DE3) colony no. 4, Lane 6 : pRAGA/BL21 (DE3) colony no. 5)



[그림 238] Ni-NTA Affinity chromatography를 통한 재조합 Galactosidase 정제 과정의 SDS-PAGE 분석 결과. (Lane 1 : protein marker, Lane 2 : BL21 (DE3), Lane 3 : Sample loading Fraction (pH 8.0), Lane 4 : Wash Fraction - ① (pH 6.2), Lane 5 : Wash Fraction - ② (pH 5.9), Lane 6 : Elution Fraction (pH 4.8))

3.3 Ni-NTA affinity chromatography를 이용한 단백질 정제 확인

pRAGA의 정제는 pRSET_A의 6x his tag를 이용하여 단일물질로 분리했다. 단백질의 용출은 고농도의 Urea가 포함된 buffer의 pH를 점진적으로 낮추면서 실시하였으며, 최대 4.8까지 용출 작업을 진행하였다. 정제가 완료된 후 loading과 wash, elution 1단계와 elution 2단계의 fraction을 수집하여 SDS-PAGE를 실시함으로써 분리 정도 및 단백질의 순도를 분석 결과 [그림5]와 같이 고순도로 정제된 단백질을 확인할 수 있다.



[그림 237] Ni-NTA Affinity chromatography를 통한 재조합 Galactosidase의 정제 과정의 크로마토그램.

4. 결론

본 연구는 항암제로 사용되는 α -galactosylceramide의 부작용을 최소화하고 친환경적인 효소 반응 공정을 통해 α -galactosylceramide를 생산하는 α -galactosidase의 다량 발현에 관한 연구하였다. 대장균으로부터 다량 발현을 위하여 α -galactosidase 유전자를 대장균 코돈에 최적화시켜 재조합 pRAGA 발현 벡터를 구축하였으며 Ni-NTA affinity chromatography를 이용한 정제를 통해 다량 발현된 α -galactosidase를 단일물질로 분리하였다. 본 연구에서는 합성 촉매인 α -galactosidase의 발현에 관한 실험을 진행하였으며 향후 발현시킨 α -galactosidase를 이용해 Raffinose의 Galactose를 분해하여 Ceramide에 합성하는 효소 반응 공정을 통해 α -galactosylceramide를 생산할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- [1] Yoon, K. H. (2010). Mannanolytic enzyme activity of *Paenibacillus woosongensis*. *Korean Journal of Microbiology*, 46(4), 397-400.
- [2] Trappeniers, M., Goormans, S., Van Beneden, K., Decruy, T., Linclau, B., Al-Shamkhani, A., ... & Van Calenbergh, S. (2008). Synthesis and in vitro Evaluation of α -GalCer Epimers. *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery*, 3(7), 1061-1070.
- [3] Smyth, M. J., Crowe, N. Y., Pellicci, D. G., Kyparissoudis, K., Kelly, J. M., Takeda, K., ... & Godfrey, D. I. (2002). Sequential production of interferon- γ by NK1.1+ T cells and natural killer

cells is essential for the antimetastatic effect of α -galactosylceramide. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 99(4), 1259–1266.

[4] Brown, L. C. W., Penaranda, C., Kashyap, P. C., Williams, B. B., Clardy, J., Kronenberg, M., ... & Fischbach, M. A. (2013). Production of α -galactosylceramide by a prominent member of the human gut microbiota. PLoS Biol, 11(7), e1001610.

[5] von Gerichten, J., Lamprecht, D., Opłłka, L., Soulard, D., Marsching, C., Pilz, R., ... & Sandhoff, R. (2019). Bacterial immunogenic α -galactosylceramide identified in the murine large intestine: dependency on diet and inflammation. Journal of lipid research, 60(11), 1892–1904.

[6] Burstein, C., & Kepes, A. (1971). The α -galactosidase from Escherichia coli K12. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–General Subjects, 230(1), 52–63.