

## 고정화된 enterokinase의 풀림과 재접힘 공정을 통한 효소 활성회복기법

나세진, 서창우, 박신혜<sup>1</sup>, 이은규<sup>\*</sup>

한양대학교 화학공학과 생물공정연구실, (주)대웅제약<sup>1</sup>

전화 (031) 400-4072, FAX (031) 408-3779

### 서론

유전자 재조합 기술의 발전에 따라 미생물 발현체계를 이용하여 여러 가지 의약품 단백질을 대량 발현시키는 공정이 개발되고 있다. 특히 외래 단백질의 발현 효율을 증대시키고 발현되는 단백질의 기능성을 향상시키기 위하여 대상 단백질 유전자에 필요한 기능을 갖는 특정 부위를 융합시켜 융합단백질 형태로 발현시키는 방법이 많이 이용되고 있다.<sup>1)</sup> 정제 후 목적단백질 외의 융합 partner 부분은 제거되어야 한다. 이 때 특이적인 인식서열을 가지고 있는 융합단백질에 특이적인 절단효소를 이용하여 원하고자 하는 목적 단백질만을 분리할 수 있다. 단백질 분해 효소인 enterokinase(EK)는 -(Asp)<sub>4</sub>-Lys의 아미노산 서열을 인식하고 lysine의 뒷부분을 절단 할 수 있는 특이성을 가지고 있기 때문에 위와 같이 재조합된 융합단백질의 분리에 사용되어진다.<sup>2, 3)</sup> 이런 고가의 효소를 단 1회의 사용을 위하여 회분식 반응에 투여하는 것은 매우 비경제적이므로 효소를 고정화시켜 반복사용 하는 것이 필수적이다. 이를 위해 enterokinase의 고체상 재접힘(solid-phase refolding) 공정을 통한 효소의 활성을 회복하는 방법을 시도하였다.<sup>4)</sup>

### 재료 및 방법

본 실험에 사용된 EK(6x His-tagged) 및 재조합 인성장호르몬(6x His-tag)은 (주)대웅제약에서 용액 상태로 제공받았다. 고정화에 이용된 Ni-NTA agarose는 Qiagen(USA)에서 구입하였다. 변성제로는 guanidine hydrochloride(GuHCl)를 사용하였고 running buffer로 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)를 사용하였다.

### Enterokinase의 활성 측정

기질인 Gly-(Asp)<sub>4</sub>-Lys-β-naphthylamide를 EK와 37°C에서 1시간 반응시킨 뒤 0.1 N HCl을 첨가하여 반응을 멈춘다. 0.2% sodium nitrite(NaNO<sub>2</sub>)를 첨가한 후 약 3분간 방치한

뒤 0.5% ammonium sulfamate를 넣어주고 다시 3분간 방치한 다음 0.05% N-1-(naphthyl)-ethylenediamine을 넣고 약 45분간 방치시킨 후 580 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### **Enterokinase의 폴립(unfolding)/재접힘(refolding)**

Ni-resin 1 ml에 EK 10 unit을 고정화 시킨다. 2 M, 4 M, 6 M, 7 M, 8 M의 GuHCl 농도에 따른 기질을 만들어 주었다. EK가 고정화된 Ni-resin 30  $\mu$ l 씩 두 개를 준비하여 GuHCl에 넣어 약 30분간 방치하여 unfolding 시켰다. 이 중 한 개는 GuHCl이 들어 있는 기질에 넣어주고 다른 한 개는 50 mM Tris-HCl (pH 8)로 세척하고 30분간 방치시켜 재접힘을 유도하였다. 각각의 효소 활성을 측정하여 폴립과 재접힘 후의 활성 변화를 측정하였다.

### **결과 및 고찰**

EK를 이용하여 융합단백질을 액상에서 절단시킨 SDS-PAGE 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 1 mg의 융합단백질을 1 unit의 enterokinase로 16°C에서 18 시간 반응한 결과 약 80% 이상의 절단수율을 얻을 수 있었다. 액상 반응에서는 효소를 재사용 할 수 없으므로 효소를 고정화하여 반복사용을 함으로써 경제적인 공정을 수행할 수 있다. 1 ml의 Ni-resin에 EK 10 unit을 고정화 시켰다. 이 때의 고정화 수율은 약 50% 였다. Ni-resin에 고정된 EK의 폴립과 재접힘 공정(Fig. 2)을 통해서 효소의 활성 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 폴립 상태에서의 변성제 농도에 따른 EK의 활성은 0% 였다. 이는 고정된 EK가 GuHCl에 의해 완전히 unfolding 되었기 때문이다. 4 M 이상의 GuHCl에서 unfolding 된 후 재접힘시켰을 때는 초기 활성대비 약 70 %로 2 M GuHCl에 비해서 상대적으로 높은 활성을 나타내었다. 이는 낮은 변성제의 농도에서는 효소의 3차원적 구조가 완전히 풀리지 못하고 부분적으로만 풀렸기 때문에 변성제를 제거했을 때 완전한 활성을 회복하지 못하기 때문이다. 액상 재접힘 공정에서는 약 35%의 재접힘 수율을 나타내었다. 고체상 재접힘 수율보다 액상 재접힘 수율이 낮은 것은 액상 재접힘 공정에서는 효소분자의 상호 작용에 의한 응집현상이 일어나기 때문이다. EK와 glyoxyl -sepharose간의 아민 공유결합 반응을 유도하여 EK의 재접힘 공정을 수행하려 했으나 고정화 반응을 수행하지 못하였다. 때문에 EK의 affinity 결합과 공유 결합에 의한 재접힘 공정의 직접적인 비교는 하지 못하였다. 아민 공유결합에 의해서 고정화된 urokinase의 경우 6 M GuHCl 에서 폴립과 재접힘 공정 후에는 초기 활성의 100%가 회복되었다고 보고되었다 (4). 아민 공유결합은 효소의 아미노

산 서열중에서 lysine의 아민기와 glyoxyl-sepharose의 알데하이드기가 다중 공유결합을 이루기 때문에 구조적인 안정성을 가지고 있는 반면, Ni-resin과 EK 간의 고정화는 Ni과 EK에 tagging된 histidine의 아민기 간의 친화도에 의한 것이기 때문에 공유결합보다는 안정성이 떨어진다고 판단된다. 이에 추후 실험으로 공유결합을 통한 EK의 폴림과 재접힘 공정을 수행함으로써 위의 결과와 비교하려 한다.

### 요 약

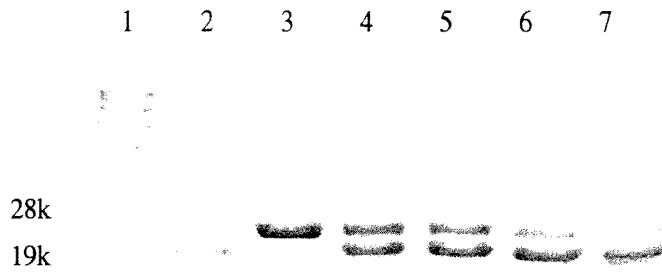
고체상 폴림과 재접힘 공정을 통해서 EK의 활성이 회복되어지는 것을 확인할 수 있었다. 이는 고정화 효소를 사용함으로써 기존의 액상반응에서 불가능한 효소의 재사용 문제를 해결할 수 있다. 친화도보다는 다중 공유결합을 통한 효소의 고정화가 효소의 활성 회복에 높은 안정성을 가질 수 있다고 예상한다.

### 감 사

본 연구는 산학협동재단의 연구비 지원으로 수행되었습니다. 또한 (주)대웅제약의 연구지원에 감사합니다.

### 참고문헌

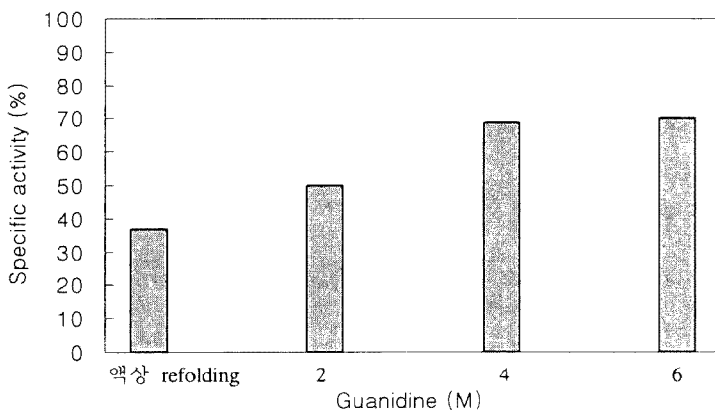
1. La Vallie, E. R., Rehemtulla, A., Racie, L. A., DiBlasio, E. A., Ferenz, C., Grank, K, L., Light, A., and McCoy, J. M.(1993), *J. Biol. Chem.*, **268**, 23311-23317.
2. Song, H. W., S. I. Choi, and B. L. Seong (2002), Engineered recombinant enteropeptidase catalytic subunit: Effect of N-Terminal Modification, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **400**(1), 1-6.
3. Grant, D.A.W., J. H. Taylor (1979), Hydrolysis of artificial substrates by enterokinase and trypsin and the development of a sensitive specific assay for enterokinase in serum, *Biochim. et Biophys. Acta*, **567**, 207-215.
4. Suh, C. W., G. S. Choi and E. K. Lee (2003), Enzymic cleavage of fusion protein using immobilized urokinase covalently conjugated to glyoxyl-agarose, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **37**, 149-155.



**Fig. 1.** SDS-PAGE of cleavage of fusion protein in solution phase. 1: marker, 2: hGH, 3: fusion protein, 4: cleavage after 4 hr, 5: cleavage after 6 hr, 6: cleavage after 10 hr, 7: cleavage after 18 hr



**Fig. 2.** Solid-phase refolding of affinity-immobilized enterokinase



**Fig. 3.** Refolding yield of affinity-immobilized enterokinase unfolded at various concentrations of guanidine hydrochloride