

## Expression, purification and characterization of ubiquitin-specific protease 1 for hydrolysis of ubiquitin-fused human growth hormone expressed in recombinant *Escherichia coli*

나강인, 서진호

서울대학교 농생명공학부

전화 (031) 290-2591, FAX (031) 293-4789

### Abstract

This research was focused on expression, purification and characterization of ubiquitin-specific protease 1 (UBP1) expressed in recombinant *Escherichia coli*. Various systems were constructed by fusing polycationic fusion tails or fusion partners to the C- or N-terminus of the product protein. In particular, UBP1 containing 6 histidine residues at the N-terminal end showed best results in terms of expression level and purification efficiency. The N-terminal 6×His-tagged UBP1 was overproduced in recombinant *E. coli* using high cell density cultivation technology and purified using immobilized metal affinity chromatography. The molecular weight of UBP1 was found to be 83,500 daltons. The optimum temperature and pH for the enzyme reaction when ubiquitin-human growth hormone (hGH) was used as a substrate were 40°C and pH 8.0, respectively.

### 서 론

단백질제품은 생물산업의 60% 정도를 차지하고 있는 핵심제품이며, 이중 상당한 부분이 재조합 미생물의 발효공정을 통하여 생산되고 있다<sup>1)</sup>. Genomics, proteomics의 연구결과물로 많은 신규 또는 개량 단백질제품이 개발될 것이며<sup>2)</sup>, 재조합 미생물을 이용한 의약단백질의 생산에 대한 연구가 더욱 활성화되고 있다. 이에 대하여, 생산하고자 하는 제품단백질 구조유전자의 N-말단 또는 C-말단에 융합단백질이 결합된 생산시스템을 구축함으로써<sup>3)</sup>, 제품단백질의 분리·정제 공정의 효율성을 제고할 수 있다. 본 연구에서는 재조합 대장균에서 ubiquitin 융합<sup>4)</sup>을 통해 인성장 호르몬 단백질을 생산하고 융합된 ubiquitin을 효율적으로 절단할 수 있는 ubiquitin-specific protease를 생

산, 분리·정제하고 그 특성에 대한 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### Protein overexpression

pNAUBPN6His 플라스미드를 *E. coli* BL21(DE3) RIL 균주에 형질전환하고, Km이 첨가된 LB배지에 전배양하고 2g/L glucose가 첨가된 LB배지에 접종한 후 glucose가 소모된 시점에서 1mM IPTG를 첨가하여 단백질 발현을 유도하였다.

### Purification of enzyme

배양액은 원심분리하여 50mM sodium phosphate buffer에 현탁한 후, 균체를 파쇄하여 immobilized metal affinity chromatography를 거쳐 순수분리, 정제하였다.

### 최적 온도 및 최적 pH

효소반응의 최적온도를 알아보기 위해 15~50℃범위에서 정제효소액을 240mM ubiquitin-hGH와 약 3분간 반응하여 최적온도를 측정하였고, 최적 pH를 알아보기 위해 pH 4~10범위에서 ubiquitin-hGH와 40℃, 3분간 반응하여 densitometric analysis를 통하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### Purification of enzyme

정제된 효소는 SDS-PAGE 상에서 단일 밴드를 나타내었으며 분자량은 MALDI-TOF MS를 통하여 약 83.5kDa으로 염기서열로부터 예상되는 분자량과 정확하게 일치하였다.

### General properties

효소반응의 최적 온도는 40℃, pH는 8.0에서 최적 활성을 나타내었다.

### 효소활성 측정

Ubiquitin-human growth hormone(hGH)에 대한 효소반응정도를 측정하기 위하여, 240mM ubq-hGH 기질을 40℃에서 약 5분간 반응시킨 결과, ubiquitin과 human growth hormone으로 완전히 분해시킴을 알 수 있었다.

## 요 약

본 연구에서는 고부가가치 의약단백질인 human growth hormone을 고순도로 얻기

위하여 재조합 대장균을 이용하여 ubiquitin이 융합된 형태로 단백질을 발현시키고, 이를 분해하는 ubiquitin-specific protease를 발현시켜 이를 분리·정제하고 효소특성을 살펴 보았다. UBPI enzyme을 재조합 대장균을 이용하여 발현하고 분리·정제한 결과, 분자량은 약 83.5kDa이었으며, 40℃, pH 8.0에서 최대 효소활성을 보였다.

#### 참고문헌

1. Stephen P. Chambers (2002) "High-throughput protein expression for the post-genomic era" *Drug Discovery Today*, 7(14): 759~765
2. Shigeyuki Yokoyama (2003) "Protein expression systems for structural genomics and proteomics" *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(1): 39~43
3. LaVallie, E. R., J. M. McCoy (1995) "Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*" *Curr. Opin. Biotech.* 6:501~506
4. A. Pilon, P. Yost, T. E. Chase, G. Lohnas, T. Burkett, S. Roberts, W. E. Bentley (1997) "Ubiquitin Fusion Technology: Bioprocessing of Peptides" *Biotechnol. Prog.* 13: 374~379