

Solid-phase refolding of immobilized enterokinase for fusion protein cleavage

Min Young Kim, Sea Jin Na, Chang Woo Suh, Chang Ho Kim,
Na Hyun Lee, and Eun Kyu Lee[†]

Bioprocessing Research Laboratory, Department of Chemical Engineering,
Hanyang University, Ansan, Korea 425-791
TEL: +82-31-400-4072, FAX: +82-31-408-3779

서 론

Enterokinase (EK)는 endopeptidase로써 (Asp)₄-Lys-의 특이적인 인식서열을 가진 재조합 융합단백질을 절단하는데 사용되어진다. 액상 EK의 경우 한번 사용하면 회수가 불가능하기 때문에 효소를 고정화시켜 고가의 효소를 반복사용한다면 경제적인 효과를 얻을 수 있다. 본 실험에 사용된 효소 고정화 방법에는 6x histidine tag된 EK의 경우 Ni-affinity를 유도하였고, native EK의 경우 활성화된 담체의 알데하이드기와 EK의 아민기와 공유 결합을 시도하였다.¹⁾ 본 실험은 효소의 반복사용에 따른 활성 감소를 고체상 폴림과 재접힘 공정을 통해 초기의 활성을 회복하는데 초점을 두었다. 또한 고정화된 담체 안으로 기질의 확산이 용이한지를 확인하기 위해 크기가 다른 기질을 대상으로 실험했으며, 이 다른 기질을 이용하여 EK와 기질에 대한 친화도 차이를 확인하는 실험을 수행하였다. 본 연구에서 사용된 작은 기질과 큰 기질로는 각각 Gly-(Asp)₄-Lys-β-naphthylamide와 6x His와 hGH가 (Asp)₄-Lys-로 연결되어 있는 융합단백질(His-hGH)을 사용하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용된 EK와 His-hGH는 (주)대웅으로부터 제공받았다. (주)대웅에서 제공받은 EK는 6개의 histidine tag이 C-말단기에 붙어 있으며 His-hGH(23.5 kDa) 역시 C-말단기에 6개의 histidine tag이 붙어있다. 또한 native form의 EK(26 kDa, pI 5.2)와 작은 기질로 이용한 Gly-(Asp)₄-Lys-β-naphthylamide(800 Da)는 각각 Roche사(USA)와 Sigma사(USA)에서 구입하였다.

EK 고정화 방법

효소 고정화 방법으로는 Ni-NTA(nickel-nitrilotriacetic acid) resin(Qiagen, CA,

USA)과 6x histidine tagged EK의 histidine 잔기들 사이의 친화결합을 이용한 방법과 native EK를 glyoxyl-Sepharose 겔에 공유결합하는 두 가지 방법을 시도하였다. Native EK를 glyoxyl-Sepharose 겔에 공유 결합하는 방법은 반응 pH를 4~11까지 변화를 주어 50 mM sodium phosphate와 환원제인 25 mM NaCNBH₃을 넣은 버퍼 조건에서 3시간 동안 공유결합 반응을 시켰다. EK가 고정화된 glyoxyl-Sepharose는 50 mM Tris-HCl(pH 8.0) 버퍼로 세척 후 동일 버퍼 상에서 EK의 활성을 측정하였다.²⁾

작은 기질과 큰 기질에 대한 EK의 활성

본 실험에서는 23 unit으로 동일한 활성을 가지는 액상 EK와 고정화된 EK(공유결합의 고정화 방법)를 대상으로 50 mM Tris-HCl(pH 8.0) 버퍼 상에서 작은 기질을 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05, 0.01 mM의 농도별로 37℃에서 1 시간 동안 반응시켰다. 그 후 절단된 β-naphthylamide의 발색 반응을 통해 각 농도에 대한 EK의 활성을 측정하였다. 큰 기질에 대한 액상 EK와 고정화된 EK는 위와 동일한 방법으로 절단 반응을 시켰으며 SDS-PAGE 18% 겔과 SigmaScan Pro(SPSS Inc., Chicago, IL)를 이용해 His-hGH의 절단된 양을 분석하였다.

고정화 효소의 폴립과 재접힘

고정화 효소의 폴립과 재접힘을 위해서 다양한 변성제 농도(2, 4, 6 M Guanidine HCl)에서 30분간 노출시켜 폴립 상태를 유도한 후 변성제를 제거하여 재접힘을 하였다. 대조실험을 위한 액상 효소는 (주)대웅에서 제공받은 6x histidine tagged EK와 Roche에서 구입한 native EK를 각각 사용하였다. 액상 효소의 재접힘은 투석을 통해 수행하였다. 고정화 효소는 Ni 친화결합을 한 6x histidine tagged EK와 공유결합을 한 native EK를 사용하였다. 재접힘 버퍼는 50 mM Tris-HCl(pH 8.0)이고 재접힘 후의 효소 활성을 비교하여 재접힘 공정의 수율을 계산하였다.

결과 및 고찰

EK 고정화

니켈 친화결합형 방법과 공유결합형 고정화 방법을 수행한 결과 니켈 레진과 6x histidine tagged EK의 histidine과의 고정화 정도는 1 ml 니켈 레진당 300 μg의 EK가 고정화 되었으며 고정화 수율은 100%를 나타내었다. 그러나 고정화 전의

EK 활성과 비교해서 50%의 활성을 나타내었다. Figure 1과 2는 공유결합형 고정화 방법을 여러 pH 조건에서 수행한 결과이다. pH 4의 반응 조건에서는 1 ml glyoxyl-Sepharose 레진당 150 μg 으로 100%의 고정화 수율을 나타낸 반면 pH 6에서는 고정화 전의 EK 활성과 비교해서 27.5%로 가장 높은 활성을 유지하였다. 그러나 공유결합형 고정화 방법은 전체적으로 30% 미만의 활성을 나타내어 니켈 친화결합 방법보다 낮은 활성을 나타내었다. 고정화로 인한 효소 활성의 감소는 고정화 과정에서 효소의 구조적 변성이나 고정화로 인하여 효소의 active site가 가리어지는 steric hindrance에 의한 영향 등으로 보고되고 있다.³⁾ 공유결합형 고정화 방법의 random amine coupling이 니켈 친화 결합 방법의 C-말단기 단일 결합보다 효소의 구조적 변성이나 steric hindrance의 영향이 더 큰 것으로 판단된다.

기질 크기에 따른 고정화 EK의 기질 친화도 비교

Figure 3에서 보듯이 작은 기질과 큰 기질을 대상으로 액상 EK와 고정화된 EK의 활성을 비교했을 때 레진에 고정화됨으로써 생기는 레진 안으로의 기질 확산에 대한 영향은 기질의 크기가 0.8 kDa과 23.5 kDa의 경우 모두 큰 영향이 없는 것으로 나타났다. 그러나 기질의 종류에 따른 효소의 활성은 큰 기질에 대한 EK의 활성이 작은 기질과 비교해서 전체적으로 약 30% 낮은 것으로 나타났다.

고정화 EK의 폴림과 재접힘

고정화 효소는 반복 사용 시 구조적 변성과 겔 내부의 이물질의 축적으로 인하여 활성이 감소하게 된다. 고정화 되지 않은 EK와 친화결합 및 공유결합으로 고정화된 EK에 있어서 2, 4, 6 M의 guanidine HCl로 폴림 상태를 만든 후 활성을 측정한 결과 모두 활성은 나타나지 않았다. 그 후 변성제를 제거하여 재접힘을 하였을 경우 액상의 EK는 35~38%의 낮은 재접힘 활성을 나타내었으나 고정화 효소의 경우 이보다 높은 재접힘 수율을 나타내었다(Table 1). 2 M guanidine HCl로 처리한 경우는 두 경우 모두 낮은 활성을 보이는데 이는 Guisan 등의 연구 결과에서처럼 완전히 풀린 후에 재접힘하는 것이 더 높은 수율을 보인다는 결과와 일치하였다.⁴⁾ 이러한 고체상 재접힘이 액상 재접힘보다 높은 수율을 보이는 것은 폴림 과정에서도 일정한 'reference structure'를 유지하고 있기 때문인 것으로 보인다.⁵⁾

요 약

EK를 고정화하기 위해 니켈 친화결합 방법과 공유 결합형 고정화 방법을 수행하였으며 니켈 친화결합이 공유 결합형 고정화보다 높은 고정화 수율과 activity를 나타냈다. 폴림과 재접힘을 이용한 효소의 활성 회복은 공유결합형 고정화가 니켈 친화결합보다 높은 결과를 나타내었다. 또한 기질의 분자량 크기에 따른 절단율의 차이가 없었으므로 레진 공극 내부로의 확산도 차이에 의한 절단반응의 차이는 없는 것으로 나타났고, 기질 종류에 따른 EK의 활성은 작은 기질이 큰 기질보다 높은 활성을 보였다.

References

1. Zemanova, I., J. Turkova, M. Capka, L. A. Nakhapetyan, F. Svec, and J. Kalal (1981), Effect of nature of proteins on their coupling to different epoxide-containing supports, *Enzyme Microb. Technol.* **3**, 229-232.
2. Grant, D. A. W. and 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.
3. Blanco, R. M., J. J. Calvete, and J. M. Guisan (1989), Immobilization-stabilization of enzymes: variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment, *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 353-359.
4. Soler, G., A. Bastida, R. M. Blanco, R. Fernandez-Lafuente, and J. M. Guisan (1997), Reactivation strategies by unfolding/refolding of chymotrypsin derivatives after inactivation by organic solvents, *Biochimica et Biophysica Acta* **1339**, 167-175.
5. Park, S. J., K. Ryu, C. W. Suh, Y. G. Chai, O. B. Kwon, S. K. Park, and E. K. Lee (2002), Solid-phase refolding of poly-lysine tagged fusion protein of hEGF and angiogenin, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **7**, 1-5.

Table 1. Comparison of enterokinase refolding yield

GuHCl concentration (M)	Refolding yield of enterokinase (%)			
	Soluble EK (6x His tag)	Soluble EK (native form)	Ni-affinity	Covalent bonding
2	-	-	50	84
4	-	-	69	100
6	35	38	70	100

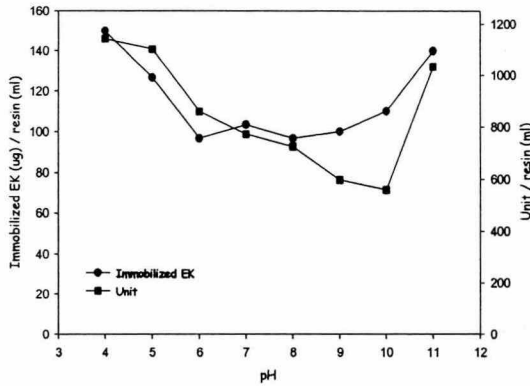


Figure 1. Comparison of EK immobilization and unit at each pH.

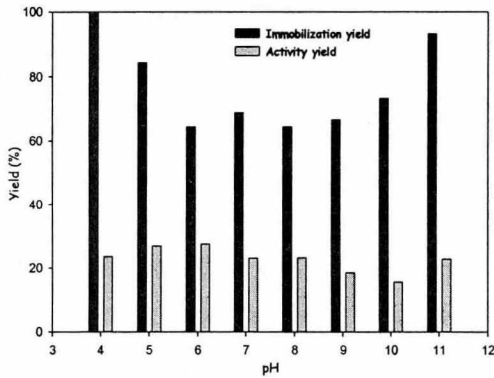


Figure 2. Comparison of EK immobilization yield and activity yield at each pH.

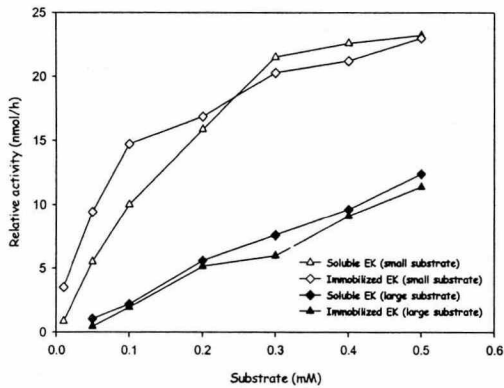


Figure 3. Activity comparison of soluble EK and immobilized EK at small and large substrate concentration.