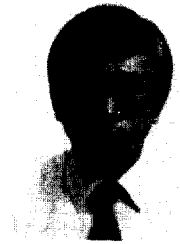


특수단백질 분리 기술

- 재조합 인체 인터루킨-2의 대량생산 -

한국과학기술원 유전공학센터 **함 경 수**



지난 10여년간 급속히 발전한 유전공학기술의 개발로 이제는 유전공학의 산물인 단백질에 인위적으로 변형을 일으키거나, 자연계에 존재하지 않는 새로운 단백질을 창제하고자 하는 단백질공학 기술이 개발되고 있다. 또한 단백질공학기술의 성공적인 발전을 위해서는 유전자재조합기술에 의해서 대장균이나 효모로부터 생산되는 단백질을 대량으로 손쉽게 순수분리할 수 있는 기술이 개발되어야 한다.

그동안 한국과학기술원 부설 유전공학센터에서는 인체 인터루킨-2(rh IL-2)의 클로닝과 대장균으로 하여금 이 인체 인터루킨-2를 합성, 과생산하게 하는데 성공하였으며, 이 대장균균주의 대량생산에 성공하여 이 균주로부터 rh IL-2를 높은 수율로 정제하는 과정을 소개하고자 한다.

인터루킨-2(IL-2)는 1976년 T세포 성장인자로서 최초로 발견된 (1) 분자량 15,400의 단백질로서 휴지기의 T세포가 항원등에 의해 활성화됨으로써 생성되며 *in vitro*와 *in vivo*에서 여러가지의 면역조절현상을 매개할 수 있는 물질이다(2). IL-2는 세포표면의 특이한 수용체와 결합함으로써 여러가지 면역작용을 한다. 즉 자연살해세포를 활성화시키고, 그 기능을 증진시키며, alloantigen 반응을 증진시키며, 림포카인에 의한 활성화 살해세포(LAK 세포)의 활성화 및 증식에 관여하고 면역결핍상태의 환자의 경우 면역기능을 회복시키는 등 중요한 역할을 한다(3-7).

인체 IL-2유전자는 1983년 Taniguchi 등(8)에 의해 대장균에 클로닝된 이래 재조합 IL-2의 분리 정제와 특성연구 및 구조-활성관계의 연구가 활발히 진행되어 왔다(9, 10). 유전공학센터에서는 사람 백혈병세포주로부터 IL-2유전자의 cDNA를 대장균으로 클로닝하여 균주의 대량배양을 거쳐

rh IL-2의 대량생산 및 그 특성에 관한 연구를 수행하고 있다.

재료 및 방법

재조합 인터루킨-2의 정제

재조합 인터루킨-2를 불용성인 축합체의 형태로 과생산하는 대장균세포로부터의 분리정제는 다음과 같이 시행하였다. 재조합 IL-2를 생산하는 대장균세포는 먼저 초음파를 이용하여 파쇄한 후 불용성인 IL-2를 우레아로 추출하고 sodium dodecyl sulfate(SDS)를 이용하여 용해시킨다. 여기에 DL-dithiothreitol(DL-DTT)을 첨가시켜 환원시킨 상태에서 초산나트륨용액으로 평형된 Sephacryl S-200(Pharmacia Fine Chemicals, Sweden)젤을 이용하여 rh IL-2를 분리하였다. 상기의 젤여과 chromatography는 rh IL-2를 함유하는 분획들을 모아 다시한번 시행함으로써 rh IL-2를 순수분리하였으며, 내독소의 제거를 위해 polymyxin-B-sepharose 4B를 통과시키고 renaturation시킨후 동결 건조하여 보관하였다.

단백질의 농도는 Lowry 등의 방법(11)을 일부 수정한 micro 방법을 이용하여 결정하였으며, 최종산물내의 내독소함량은 표준 limulus amoebocyte lysate(LAL)방법에 의하여 측정하였다.

rh IL-2의 환원(renaturation)은 투석과정을 통하여 SDS의 농도 및 DL-DTT를 서서히 제거 시킴으로써 수행하였으며, 정제된 rh IL-2의 순도는 SDS-PAGE(12), 역상 HPLC(13) 등에 의해서 확인하였다.

재조합 인터루킨-2의 생화학적 분석

재조합 1L-2의 N-말단 아미노산의 분석은 단백질을 Edman 방법으로 처리한 후 유리되는 PTH-유도체를 HPLC를 사용하여 결정하였으며 (14), 재조합 1L-2와 천연 1L-2의 아미노산서열을 비교하기 위하여 재조합 1L-2를 trypsin-TPCK로 처리한 후 (15), 유리되는 펩티드를 HPLC를 이용하여 분리하였으며, 이들 펩티드의 N-말단 아미노산배열순서는 Edman 방법을 이용하는 manual sequencing 방법 (13)에 의하여 결정하였다.

또한 재조합 1L-2의 생물학적 활성도는 1L-2의 존세포주인 CTLL 세포를 이용하는 표준방법 (16)을 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

재조합 1L-2의 분리정제 과정은 Table 1에 요약해서 나타내었다. 재조합 1L-2의 축합체를 함유하는 세포 약 30g을 함유하고 있는 대장균 배양액 1/로 부터 약 100mg의 1L-2를 순수분리 할 수 있으며, 이는 대장균 전체단백질의 2%에 해당하며 수율은 약 10%이다. Fig. 1은 분리과정중 채용해 시킨 1L-2를 첫번째 Sephacryl S-200 크로마토그래피를 통과시킨 양상으로서 전기영동결과에서 보여주는 바와 같이 1L-2가 90% 이상 정제되며, 두번째 크로마토그래피에 의해서 (Fig. 2 A) 단일 피크로 분리가 되며, 전기영동한 후 densitometer를 이용하여 순수도를 측정한 결과 (Fig. 2 B) 95% 이상 순수분리되었음을 알 수 있

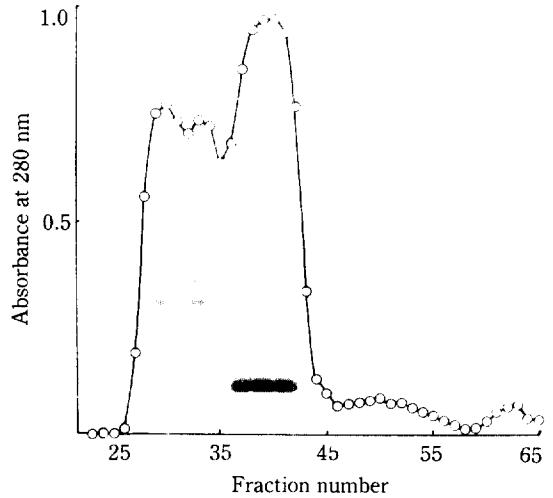


Fig. 1. Representative elution profile of the first Sephacryl S-200 chromatography of solubilized KAIST rIL-2. The inset shows the result of 12% SDS-PAGE for the corresponding column fractions.

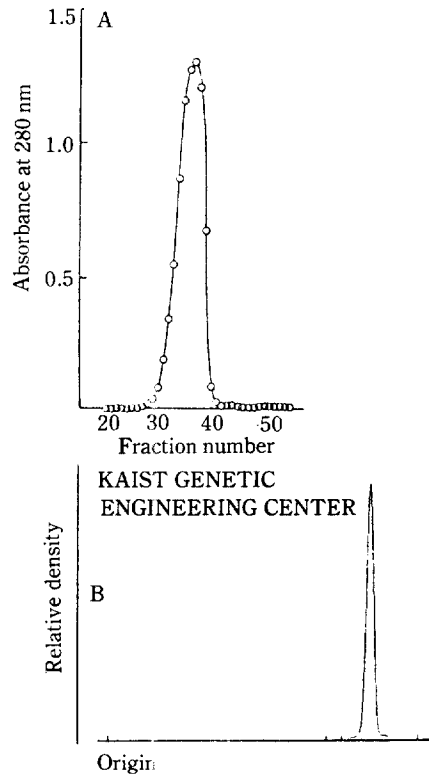


Fig. 2. Representative elution profile (A) of the second chromatography using Sephacryl S-200 of KAIST rIL-2 and the densitogram (B) obtained from the scanning of the gel electrophoresed the column fractions.

Table 1. Purification of KAIST rIL-2

Step	Volume (ml)	Protein (g)	IL-2* (g)	Yield (%)
E. coli culture broth	1000			
Sonication	60	5.0	1.0	100
Urea extraction	30	0.7	0.5	50
Slubilization	10	0.35	0.3	30
Chromatography				
Sephacryl S-200(I)				
Sephacryl S-200(II)	10	0.1	0.1	10

* The amount of IL-2 was estimated from the gel scanning data.

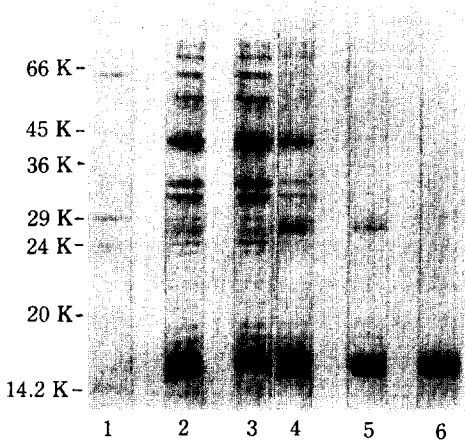


Fig. 3. Purification of KAIST rH IL-2 analyzed by 12% SDS-PAGE. Lane 2; total extract, lane 3; supernatant of the extract, lane 4; precipitate of the extract, lane 5; after the first Sephacryl S-200 chromatography, lane 6; purified rH IL-2 after the second gel filtration chromatography, and lane 1; MW standard.

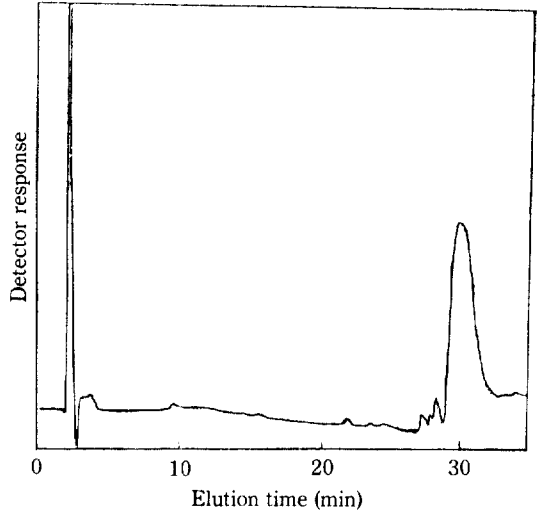


Fig. 4. HPLC profile of the purified KAIST rH IL-2. The purified product was analyzed as described in Materials and Methods and assayed at 214 nm.

다. 정제된 1L-2의 순도는 전기영동한 후 coomassie blue로 염색시킨 경우(Fig. 3, lane 6)나 silver stain으로 염색시킨 경우(Fig. 5) 모두 단일 단백질대로 나타나는 것으로 보아 확인할 수 있었으며, 또한 HPLC에 의해서도 그 순수를 재확인하였다(Fig. 4). 또한 Fig. 5의 결과는 정제과정의 변화나, 정제된 rH 1L-2의 보관과정

에서 단백질의 어떤 부산물이 생기지 않으며 rH 1L-2가 상당히 안정한 단백질임을 보여주며, 환원제의 첨가여부 또한 rH 1L-2에 아무 차이를 나타내지 않음을 알 수 있다. 이와 같이하여 정제된 rH 1L-2의 내독소함량은 단백질 mg당 0.25 미만이었으며, rH 1L-2의 생물학적 활성도는 1.0~2.5×10⁶ units/mg 단백질로써 국외의 타회사제품과 유사하였다.

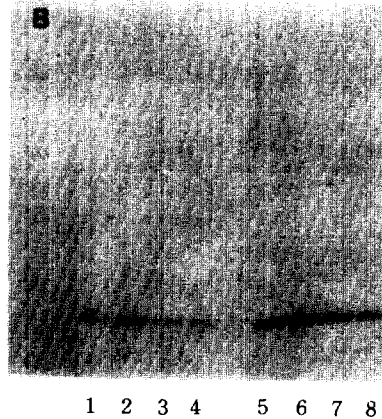
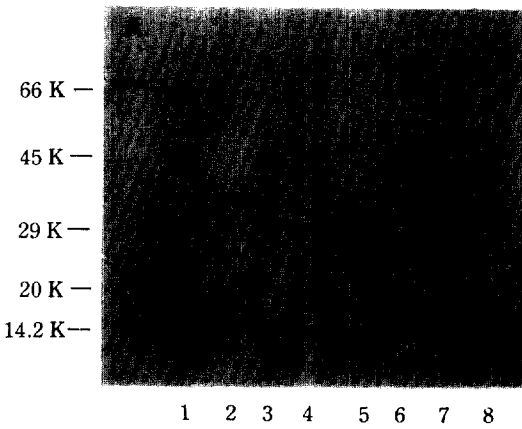


Fig. 5. SDS-PAGE (7.5%-18%) of KAIST rH IL-2 and KAIST Ser¹²⁵ rH IL-2. Panel A shows the result obtained from the samples treated with 2-mercaptoethanol and panel B shows the result obtained from unreduced samples. Lane 1-4 shows KAIST rH IL-2 purified under reducing (lanes 1 and 2) and nonreducing (lanes 3 and 4) conditions and lane 5-8 shows KAIST Ser¹²⁵ rH IL-2 purified under reducing (lanes 5 and 6) and nonreducing (lanes 7 and 8) conditions.

10. Liang S.M., Thatcher D.R., Liang C.H. & Allet B., *J. Biol. Chem.* **261**: 334-337, 1986.
11. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J., *J. Biol. Chem.* **193**: 265-271, 1951.
12. Hahm K.-S., Tikkanen M.J., Dargar R., Cole T.G. & Schonfeld G., *J. Lipid. Res.* **24**: 877-885, 1983.
13. Kim S.-H., Hara S., Hase S., Ikenaka T., Toda H., Kitamura K. & Kaizuma N., *J. Biochem.* **98**: 435-448, 1985.
14. Iwanaga S., Wallen P., Groendahl N.J., Hensen A. & Blombaek B., *Eur. J. Biochem.* **98**: 435-448, 1985.
15. Samy T.S.A., Hahm K.-S., Modest E.J., Lampman G.W., Keutman K.T., Umezawa H., Herlichy W.C. Gibson B.W., Carr S.A. & Biemann K., *J. Biol. Chem.* **258**: 183-191, 1983.
16. Gillis S., Farn M.M., Ou W. & Smith K.A., *J. Immunol.* **120**: 2027-2032, 1978.
17. Degraeve W., Tavernier J., Duerinck F., Plaetinck G., Devos R., & Fiers W., *EMBO J.*, **2**: 2349-2353, 1983.

(44 page에서 계속)

료를 쉽게 만들수 있으며, 오염물질 특히, polychlorinated biphenyls 같은 것을 분해하는 효소도 개발중이다.

·Du Pont社는 농약, 화학약품, 플라스틱, 섬유질을 만드는 수단으로 단백질공학을 연구중이다. 센디애고의 syntro社도 섬유질에 관한 연구중인데 세균에서 생산할 수 있는 生絲와 비슷한 성질을 가진 섬유질에 대한 유전자를 합성한 바 있다.

·Bio-Polymer社는 외과적인 봉합술에 대체될

것으로 믿어지는 의료용 아교를 생산하는 세포를 수정하고 있다.

3) 네덜란드

Gist-Brocades社는 산소포백제와 함께 사용할 수 있는 세제용 효소를 개발했다. 효소를 이루는 275개의 아미노산 중에서 2개의 아미노산을 치환함으로써 포백제를 사용하는 세탁 진행중에도 계속 효소의 활성을 강화시킬 수 있다는 것을 발견하였다.