

재조합 *Saccharomyces cerevisiae*로부터 인체 리포코틴-I의 분비 생산 및 정제

김 병 문 · †정 봉 현 · 이 상 기 · 박 영 훈 · *남 수 완

한국과학기술연구원 생명공학연구소, *동의대학교 미생물학과

Production and Purification of Human Lipocortin-I Secreted by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*

Byung-Moon Kim, Bong-Hyun Chung,† Sang-Ki Rhee, Young-Hoon Park and Soo-Wan Nam*

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
KIST, P. O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea.

*Department of Microbiology, College of Natural Science, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea

ABSTRACT

Human lipocortin-I (LCI) is a calcium ion-dependent and phospholipid-binding protein which exhibits an anti-inflammatory activity by inhibiting phospholipase A₂ activity. In this study, the LCI gene containing its own terminator region was joined to *GAL10* promoter-ppL (prepro-leader sequence of mating factor a). An ATG start codon of LCI gene was placed at downstream with KR endoprotease recognition site (Lys-Arg) of ppL. Recombinant *S. cerevisiae* harboring the LCI expression/secretion vector, pYGLPT5, was aerobically grown on a liquid YPDG medium at 30°C for 72hrs. The whole cell and culture supernatant were separated after centrifugation, and the expressed LCI was analyzed by SDS-PAGE and western blotting methods. A majority fraction of the expressed LCI was found to be accumulated in the intracellular fraction, resulting in very low secretion efficiency of about 7.4%. About 500mg/ℓ of LCI was extracellularly produced by the fed-batch culture employing the controlled-feeding of glucose and galactose. The secreted LCI was purified by ultrafiltration and hydroxylapatite column chromatography, and a purity of more than 99% was obtained.

서 론

리포코틴 I (LCI)은 스테로이드를 동물에 투여하였을 때 분비가 촉진되어 phospholipase A₂(PLA₂)의 활성을 억제함으로써 항염증성 효과를 나타내는 calcium 의존성 인지질 결합 단백질이다 (1). 또한, 스테로이드 제제와는 달리 인체에 대한 부작용이 거

의 없어 잠재력이 높은 새로운 항염증 제제 중의 하나이다. 일반적으로, 분비 단백질은 N-말단에 소수성의 시그널 서열을 포함하고 있으나 인체 LCI은 이러한 시그널 서열을 갖고 있지 않으면서도 분비가 되는 단백질로 밝혀진 바 있다 (2). 인체 LCI의 N-말단에는 매우 높은 Ca⁺⁺ 친화성이 있으며 PLA₂ 저해 활성과 dimer 형성 부분이 있다 (3). 인체 LCI의 대량생산을 위하여 cDNA는 이미 cloning되었으

† Corresponding Author

며 대장균과 효모에서도 발현이 되었다(4-6).

효모 *S. cerevisiae*는 단세포 진핵 생물로서 대장균과 동물 세포의 장점을 모두 가지고 있으므로 동물 세포 유래의 이종 단백질의 생산에 많이 이용되고 있다. 최근 Giga-Hama 등(7)은 인체 LCI을 분열 효모인 *Schizosaccharomyces pombe*의 균체 내에 발현 촉진시켰으며, 균체를 glass-bead로 파쇄하고 이온교환 및 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.

본 연구에서는 보다 경제적인 LCI의 대량생산을 위하여 *GAL10* promoter, mating factor α 의 ppL (pre-pro leader sequence)과 LCI terminator를 포함하는 LCI 발현 분비 벡터 시스템을 구축한 후, 재조합 효모의 유가 배양법을 통하여 고농도의 LCI을 직접 발효액으로부터 회수할 수 있는 방법을 개발하였다. 또한, 분비 생산된 LCI을 고순도로 정제할 수 있는 효율적인 정제 공정도 개발하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 Plasmid

LCI 발현용 효모 균주로는 *S. cerevisiae* SEY2102 (*MAT ura3-52 leu2-3, -112 his4-519 suc2-Δ9*) (8)를 사용하였다. pYGLPT5 (Fig. 1)는 *GAL10* promoter-ppL-LCI 유전자-LCI terminator로 구성된 플라스미드이며 backbone은 YEG α -HIR525에서 유래하였다 (9-11).

배지 및 배양방법

숙주세포, 재조합 효모의 배양 및 LCI 유전자 발현 억제용 배지로 YPD (1% yeast extract, 2% bacto-peptone, 2% glucose)를, 효모의 형질 전환체를 얻기 위한 선택 배지로는 YNBDLH (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% casamino acid, 2% glucose, 0.003% Leu, 0.002% His)를 사용하였다. LCI 유전자 발현 유도 배지로는 YPDG (1% yeast extract, 2% bacto-peptone, 0.4% glucose, 2% galactose)를 사용하였으며 재조합 효모 균주를 진탕배양기에서 30°C, 72시간 배양한 후 LCI 유전자의 발현 수준을 조사하였다.

시약 및 재료

ProtoBlot western blot anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate는 Promega사에서, pure nitrocellulose membrane, prestained SDS-PAGE

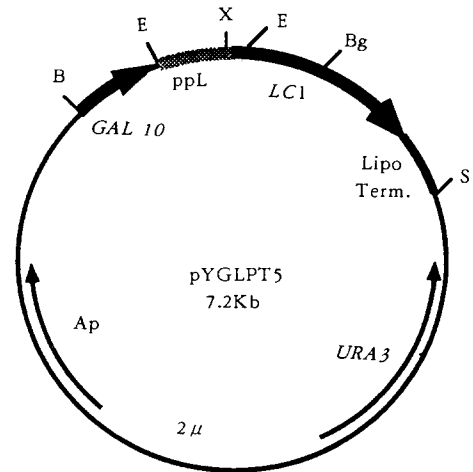


Fig. 1. Schematic diagram of human lipocortin-I expression vector pYGLPT5. *GAL10*, *GAL10* promoter; ppL, prepro leader sequence of mating factor; LCI, LCI gene; Lipo Term., lipocortin-I transcription terminator; B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; X, *Xba*I; Bg, *Bgl*II; S, *Sal*I.

marker, hydroxylapatite, protein assay kit는 BIO-RAD사에서, silver staining kit, trichloroacetic acid (TCA), protein molecular weight marker, sodium deoxycholate (DOC)는 Sigma사에서 구입하였다.

SDS-PAGE, Silver Staining 및 Western Blotting

Ito 등 (12)의 방법을 사용하여 형질전환된 *S. cerevisiae* SEY2102를 YPDG 유도 배지에서 72시간 배양한 후 배양액 1ml를 원심분리 (5,000rpm, 5분)하여 배양 상등액과 균체를 얻었다. 배양 상등액 100 μ l에 0.2% (w/v) DOC를 가하여 5분간 실온에서 방치한 다음 100 μ l의 100% TCA를 첨가하였다. 그 후 0°C에서 30분간 방치한 후 원심분리 (15,000rpm, 10분)하여 단백질을 농축한 다음 acetone으로 washing하고 pellet을 50 μ l의 1X lysis buffer (50mM Tris-Cl pH 6.8, 100mM dithiothreitol, 2% SDS, 5% mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol)에 녹였다. 또한 균체는 1ml의 파쇄 완충액 (2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.0,

1mM EDTA)에 녹인 다음 glass bead (직경 0.4-0.5mm)를 이용하여 효모세포를 파쇄한 후 330 μ l의 4X lysis buffer를 첨가하였다. 이상에서 얻은 단백질 시료 각 10 μ l을 Laemmli (13) 방법에 따라 SDS-PAGE (10%) 후, 밴드는 coomassie brilliant blue로 염색하여 LCI 단백질을 확인하였다. silver staining은 SDS-PAGE 후, manufacturer's instructions에 따라 염색하여 LCI 단백질을 확인하였다.

SDS-PAGE 후 gel 속의 단백질을 tank transfer unit (Hofer사 모델 TR-22)로 nitrocellulose 막에 전사 시킨 후 전사된 단백질 중 LCI 단백질은 rabbit anti-LCI polyclonal antibody (11)와 Promega protoblot western blot AP system {goat anti-rabbit IgG [(H+L) or Fc]-alkaline phosphatase conjugate (GAR-AP)}를 사용하여 확인하였다.

Zymolyase 처리에 의한 세포의 분획

YPDG배지에서 30°C, 30시간 배양한 형질 전환 효모 배양액 1ml을 5,000rpm, 5분간 원심분리하여 균체를 회수한 다음 1ml의 zymolyase 용액 (0.8 KCl, 10mM EDTA, 0.1M mercaptoethanol, 0.1M Na-phosphate, pH 7.5, 1mg/ml zymolyase 100T)에 녹였다. 30°C에서 1시간 반응 시킨 것을 whole cell분획, 다시 이것을 4°C 5,000rpm, 10분간 원심분리하여 precipitate를 protoplast 분획, supernatant를 TCA 침전으로 5배 농축하여 periplasm 분획으로 하였다. 각 분획을 SDS-PAGE 후 western blotting 분석을 하였다.

LCI의 생산 및 정제

pYGLPT5 plasmid(14)를 포함하고 있는 재조합 균주를 최소배지 YNBDLH plate에서 단일 colony로 분리한 다음 10ml YNBDLH배지의 시험관에 접종하여 150rpm, 30°C에서 15시간 동안 전배양을 한 후 다시 100ml YNBDLH 배지를 포함하는 500ml 진탕플라스크에 접종하여 동일 조건하에서 배양하였다. YEP (1% yeast extract, 2% peptone)를 기본배지로 하고 탄소원으로 glucose와 galactose를 controlled-feeding하여 2.5-liter 발효조 (KFC Co., Korea)에서 유가 배양하였다.

배양 상등액 2l를 원심분리 및 막여과 (pore size, 2 μ m)하여 균체를 완전히 제거하고 ultrafiltration (molecular weight cut-off=10,000)하여 농축

액 0.2l를 얻었다. 10mM phosphate buffer (pH 7.0)로 buffer exchange한 후, 이 농축액을 미리 동일 buffer로 평형화시킨 hydroxylapatite column (3.2 \times 25cm)에 loading한 다음 동일 buffer로 결합되지 않은 단백질을 washing 하였다. Hydroxylapatite에 약하게 결합된 단백질들을 먼저 1mM CaCl₂로 washing한 다음 LCI을 50mM CaCl₂로 elution하였다. LCI에 binding된 CaCl₂는 50mM EDTA로 dialysis하여 제거하였다. 단백질 시료 중 LCI 단백질의 순도는 SDS-PAGE를 한 후 silver staining을 통해 확인하였다.

분석 방법

균체 농도는 O.D.₆₀₀에서 측정하였으며 (UVICON 930, Switzerland), galactose의 농도는 효소적인 방법 (Boehringer Mannheim, FRG)으로 측정하였다. Plasmid stability는 배양액을 희석하여 YPD배지에 30°C 2일간 배양한 뒤 colony를 YNBDLH (ura⁺) 및 YNBDLH (ura⁻) 배지 plate 도말하여 colony 형성 비율 (CFUs; colony forming units)을 구하였다. 전체 단백질의 농도는 protein assay kit로 측정하였다. LCI 단백질의 양은 densitometer (Biomed Instrument SCR 2D/1D, U.S.A.)로 band의 강도를 측정한 뒤 대조군과 비교하여 정량하였다.

결과 및 고찰

LCI의 발현 및 분비

숙주세포 및 YEG α -HIR525 (negative control), pYGLPT5 (LCI 발현 분비 vector)로 형질전환된 재조합 효모균주를 YPD 및 YPDG에 배양하였다. 숙주세포 및 YEG α -HIR525로 형질전환된 재조합 효모균주에서는 LCI 밴드가 균체의 분획 (extracellular fraction)의 어느 곳에서도 보이지 않았다 (Fig. 2A, lane 8, 9, 10, 11). 또한, pYGLPT5로 형질전환된 재조합 효모균주를 YPD에서 배양하면 GAL10 promoter가 포도당에 의해 억제되어 균체의 분획에 LCI 밴드가 보이지 않았다 (Fig. 2A, lane 12). 그러나, YPDG에서는 GAL10 promoter가 galactose에 의해 유도되어 균체의 분획에 34kDa의 LCI 밴드가 관찰되었다 (Fig. 2A, lane 13).

균체내 분획 (intracellular fraction)에는 밴드가 많아 coomassie staining으로서는 34kDa의 LCI의 발현 여부를 확인할 수 없었다 (Fig. 2A, lanes 2-7). 균체 내 및 균체의 분획들을 western blotting

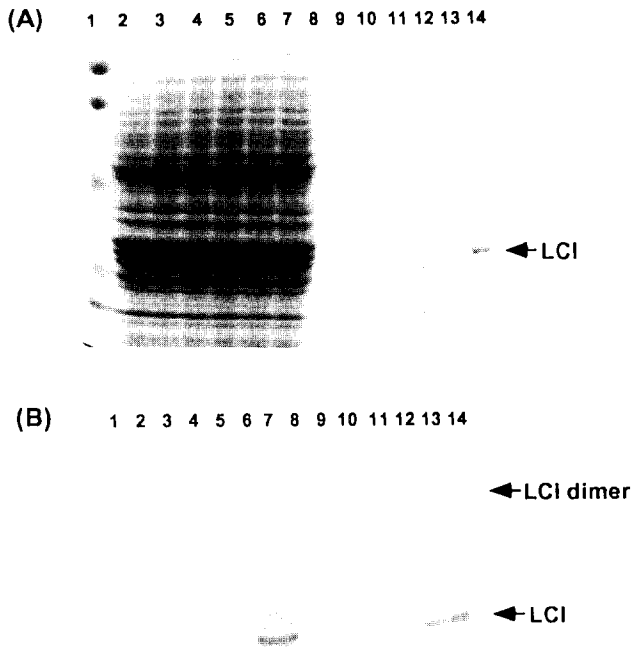


Fig. 2. SDS-PAGE (A) and western blotting (B) analyses for intracellular (lanes 2-7) and extracellular (lanes 8-13) proteins of yeast transformants grown on YPD (lanes of even number) and YPDG (lanes of odd number) media.
 lane 1; prestained protein molecular weight marker (106, 80, 50, 33, 27 kDa)
 lane 2, 3, 8, 9; host cell
 lane 4, 5, 10, 11; YEG α -HIR525-containing cell
 lane 6, 7, 12, 13; pYGLPT5-containing cell
 lane 14; purified LCI (5 μ g).

분석한 결과, anti-LCI polyclonal antibody와 immunoreaction한 밴드가 pYGLPT5를 갖는 재조합 효모 균주의 균체내 (Fig. 2B, lane 7) 및 균체외 (Fig. 2B, lane 13) 분획 모두에서 관찰되었다. 균체내 및 균체외 분획에서의 LCI 양을 densitometer로 비교한 결과 배지로의 분비율은 7.4%로 매우 낮았다. 균체내 분획에서 35-60kDa 영역에 많은 밴드가 관찰되는데 이는 processing 되지 않은 LCI으로 추정

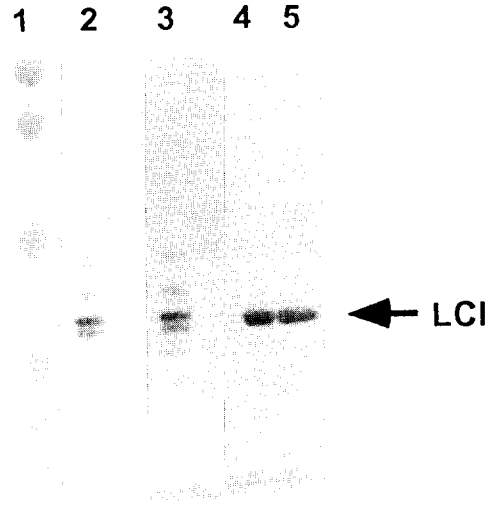


Fig. 3. Localization of lipocortin-I expressed in pYGLPT5-containing *S. cerevisiae*.
 lane 1; prestained protein molecular weight marker (106, 80, 50, 33, 27 kDa)
 lane 2; whole cell fraction
 lane 3; protoplast fraction
 lane 4; periplasmic fraction
 lane 5; purified LCI (5 μ g).

되며, 80kDa 부근의 밴드는 LCI의 dimer라 생각된다. 34kDa보다 낮은 영역에서도 밴드가 관찰되는데 이는 분비되지 못한 LCI이 ER(endoplasmic reticulum)이나 액포에서 protease에 의해 분해된 것이라 생각된다. *Rhizopus*의 aspartic proteinase-I을 *S. cerevisiae*에서 발현시켰을 경우 분비되지 않은 단백질이 ER에서도 분해되는 것이 보고된 바 있다 (15).

발현된 LCI의 국재성 (localization)

효모의 cytoplasm에서 ribosome의해 합성된 분비 단백질은 N-말단에 분비 시그날을 가지며, 통상 ER-golgi체-분비소포-periplasm-배지의 순으로 분비 경로를 거치게 된다. ER막을 통과할 때 분비 시그날의 pre-부분은 signal peptidase에 의해 절단되며, pro-부분은 golgi체에서 KR endoprotease 등에 의해 processing된다. 효모 균체 내에 잔존하는 LCI의 국재성을 알아보기 위하여 효모 균체를 protoplast와 periplasm fraction으로 나누어 western blotting으로 LCI 밴드를 확인하였다. 그 결과를 보면 anti-LCI polyclonal antibody와 immunoreac-

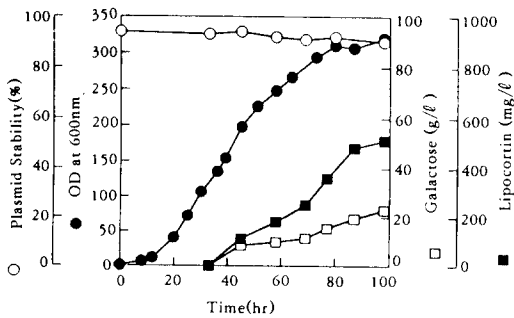


Fig. 4. Fed-batch production of recombinant LCI.

tion한 40kDa 이상의 밴드는 모두 protoplast 분획 (Fig. 3, lane 3)에 존재하였다. 또한 36kDa의 LCI이 whole cell과 protoplast에서 거의 같은 양이 있는 것으로 보아 mature form의 LCI도 분비되지 않고 세포내에 상당히 축적되어 있음을 알 수 있다. 그리고 periplasm 분획 (zymolyase-released supernatant; Fig. 3 lane 4)에는 분비과정 중의 LCI이 소량 존재할 뿐이었다. 각 분획의 LCI양을 densitometer로 비교한 결과 protoplast 68.6%, periplasmic 24%, culture supernatant 7.4%로 분포하였다.

발효조에서 LCI의 생산 및 정제

pYGLPT5로 형질전환된 *S. cerevisiae* 2102를 균체 증식기와 LCI의 발현 유도기로 나누어 유가 배양하였다. 우선 포도당만으로 35시간 동안 균체의 증식을 유도한 뒤 포도당과 galactose 혼합물을 공급하여 균체 증식과 LCI의 발현 유도를 동시에 하였으며 균체의 증식에 따라 feeding rate도 증가시켜 주었다. 적당한 시간 간격으로 sampling하여 균체농도, plasmid stability 및 LCI의 분비량을 조사하였으며, 분비 생산된 최종 LCI의 농도는 약 500mg/l였다 (Fig. 4). 균체를 제거한 배지에는 LCI이 분비된 전체 단백질 중 약 15%를 차지하였다 (Fig. 5, lane 3). LCI은 Ca⁺⁺ 결합성 단백질이므로 기능기로서 Ca⁺⁺을 갖고 있는 hydroxylapatite gel을 이용한 chromatography 정제 방법을 개발하였다. 처음부터 마지막 단계까지의 정제과정결과들이 Fig. 5에 나타나 있다. 배지로 분비된 36kDa의 LCI을 ultrafiltration 과 hydroxylapatite column chromatography의 두 단계만으로 순도 99% 이상으로 정제할 수 있었다 (Fig. 5, lane 7).

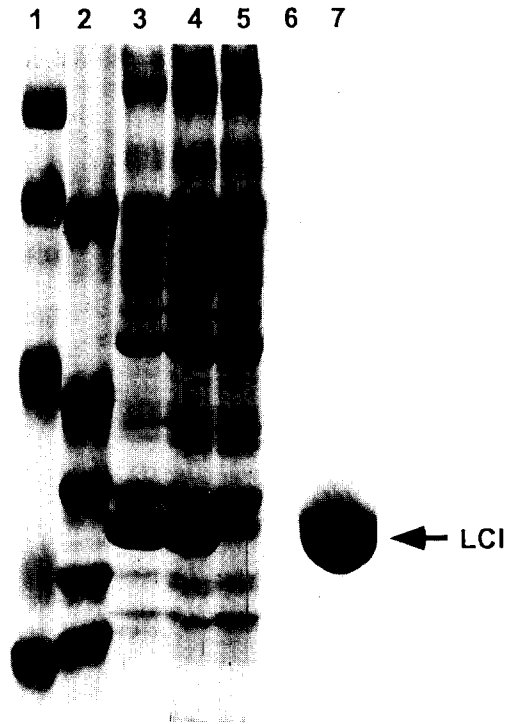


Fig. 5. Purification of recombinant LCI from culture supernatant.

- lane 1; prestained protein molecular weight marker (106, 80, 50, 33, 27kDa)
- lane 2; protein molecular weight marker (66, 45, 36, 29, 24kDa)
- lane 3; fermentation culture media of pYGLPT5-containing cell
- lane 4; retentate after ultrafiltration (molecular weight cut-off=10,000)
- lane 5; eluent after washing with a 10mM phosphate buffer (pH 7.0)
- lane 6; eluent after washing with a 1mM CaCl₂
- lane 7; LCI (100µg) eluted with 50mM CaCl₂.

요 약

LCI은 스테로이드를 동물에 투여하였을 때 분비가 촉진되어 항염증성 효과를 나타내는 calcium의 존성 phospholipid 결합 단백질이다. *S. cerevisiae*는

대장균과 동물세포의 장점을 모두 가지고 있으므로 동물세포 유래의 이종 단백질의 분비 생산에 많이 이용되고 있다. 본 연구에서는 *GAL10* promoter-ppL-LCI유전자-LCI terminator로 구성된 pYGLPT5로 LCI을 *S. cerevisiae* SEY2102에서 발현 분비시키고 각 분획으로 나누어 LCI양을 비교한 결과 protoplast 68.6%, periplasmic 24%, culture supernatant 7.4%로 분포하였다. pYGLPT5로 형질전환된 *S. cerevisiae* 2102를 유가 배양한 결과, 최종적인 LCI의 생산량은 약 500mg/ℓ 였다. LCI은 N-말단 부근에 Ca⁺⁺ 결합부위가 있으므로 이를 이용하여 hydroxylapatite column chromatography로 정제하였다. 배지로 분비된 34kDa LCI을 ultrafiltration과 hydroxylapatite column chromatography의 두 단계로 순도 99% 이상으로 정제할 수 있었다.

참고 문헌

1. W. T. Wong, S. C. Frost and H. S. Nick (1991), *Biochem. J.*, **275**, 313.
2. P. Christmas, J. Callaway, J. Fallon, J. Jones and H. T. Haigler(1994), *J. Biol. Chem.*, **266**, 2499.
3. H. Hayashi, M. K. Owada, S. Sonobe and T. Kakunaga(1989), *J. Biol. Chem.*, **264**, 17222.
4. K. R. Huh, S. H. Park, S. M. Kang, I. S. Song, H. Y. Lee and D. S. Na(1990), *Korean Biochem. J.*, **23**, 459.
5. B. P. Wallner, R. J. Mattaliano, C. Hession, R. L. Cate, R. Tizard, L. K. Sinclair, C. Foeller, E. P. Chow, J. L. Browning, K. L. Ramachandra and R. B. Pepinsky(1986), *Nature*, **320**, 77.
6. S. W. Nam, D. J. Seo, S. -K. Rhee, Y. H. Park and B. H. Chung(1993), *J. Microbiol. Biotechnol.*, **3**, 168.
7. Y. Giga-hama, H. Toda, H. Okada, M. K. Owada, H. Okayama and H. Kumagai(1994), *Bio/Technol.*, **12**, 400.
8. D. Julius, L. Blair, A. Brake, G. Sprague and J. Thorner(1983), *Cell*, **32**, 933.
9. D. T. Moir and D. R. Dumais(1987), *Gene*, **56**, 209.
10. S. D. Emr, R. Schekman, M. C. Flessel and J. Thorner(1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **80**, 7080.
11. E. -S. Choi, J. -H. Sohn and S. -K. Rhee (1994), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 587.
12. H. Ito, Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura (1983), *J. Bacteriol.*, **153**, 163.
13. U. K. Laemmli(1970), *Nature*, **227**, 680.
14. B. M. Kim, S. W. Nam, B. H. Chung, Y. H. Park and S. K. Rhee (1994), *J. Microbiol. Biotechnol.*, **4**, 237.
15. R. Fukuda, H. Horiuchi, A. Ohta and M. Takagi(1994), *J. Biol. Chem.*, **269**, 9556.