

내포체 단백질의 재생을 위한 용해 및 재접힘공정의 비교분석

김 창 성 · 김 윤 하 · 이 은 규

한양대학교 화학공학과 생물공정연구실, ¹쌍용정유 기술개발팀
(접수 : 1997. 8. 5., 게재승인 : 1998. 3. 5.)

Comparative Analysis of Dissolution and Refolding Processes for Inclusion Body Protein Renaturation

Chang Sung Kim, Yun Ha Kim¹, and Eun Kyu Lee[†]

Department of Chemical Engineering, Bioprocessing Research Laboratory
Hanyang University, Ansan 425-791 KOREA

¹Ssang Yong Refinery Co., Ltd., Technology Development Team, Ulsan, Korea

(Received : 1997. 8. 5., Accepted : 1998. 3. 5.)

Using rIFN- α and rhGH as the model proteins, the refolding performances of the published processes were evaluated and compared. Key engineering parameters such as the type of denaturant and its concentration, protein concentration in the refolding buffer, and pH and ionic strength of the buffer were experimentally investigated. Furthermore, the role of a co-solvent of surfactant type in aggregation reduction was also studied. Of the denaturants tested (8M urea, 6M guanidine HCl, 0.5% SDS), SDS at alkaline pH (9.5) and ambient temperature gave the highest recovery yield. The SDS process was effective in the refolding of rhGH at the concentration range of 0.5-1.0 mg/ml. The effect of ionic strength was not as pronounced. However, a trend was observed where dissolution proceeded better under lower strength (10 mM) but aggregation was suppressed under higher strength (>50 mM.) When PEG-4000 and/or Tween were added as co-solvent or refolding-enhancing additive, 1.6-2 times higher yield was realized. The 'masking' of the hydrophobic patches located on the surface of the protein with the surfactant molecules was believed to be responsible for the considerable reduction in aggregation during refolding.

Key Words : refolding, renaturation, inclusion body, rhGH, rIFN- α

서 론

재조합 단백질의 원핵세포내 과발현은 종종 내포체의 형태로 나타나며 이를 정확한 3차원적 구조로 재접힘시키는 것이 재조합 단백질 생산에 있어 가장 중요한 단계의 하나이다. 내포체는 대개 불용성의 응집된 형태를 이루고 있으며 많은 양의 재조합 단백질을 포함하고 있고, 광학 현미경상에서 dense한 cytoplasmic granule로 보인다. 그 형성과정은 확실치는 않으나 단백질의 낮은 용해도로 인해 생성된다는 견해가 지배적이다(1).

세포질 내에 발현된 내포체를 생물학적 활성을 가진 native한 단백질로 재생시키는 공정은 각각의 단백질의 성질에 따라 다르므로 실험적으로 그 공정조건들이 결정되어야 한다. 하지만 일반적으로 널리 쓰이는 재생공정을 도시하면 Figure 1과 같다

(2). 세포파쇄후 원심분리를 통해 내포체를 pellet 형태로 얻는다. 이 pellet에서 세척을 통해 불순물을 제거한 후, 변성제를 첨가함으로써 응집된 형태의 단백질을 random한 코일 형태로 용해시킨다. 일반적으로 변성제는 8M urea나 6M guanidine HCl 같은 chaotropes, 또는 SDS(sodium dodecyl sulfate)같은 계면활성제가 사용된다. 때때로 강한 염기 환경(pH>12)에서 수행되기도 한다. 용해공정을 효과적으로 수행하여 높은 최종 정제수율을 얻기 위해서는 몇몇의 공정변수들을 고려해야 한다. 주요 공정변수들을 살펴보면 변성제의 종류 및 농도, pH, 온도, 단백질 농도, 완충제의 종류 및 이온강도, 용해시간 등이다. 단백질이 모두 용해되었을 때 재접힘공정은 시작되어야 하며, 재접힘공정은 첨가된 변성제의 부분적 제거를 통해 수행된다. 이를 위해 회석, 투석여과 (diafiltration), 투석, 탈염 column 등을 이용한다. 정확히 재접힘된 단분자 단백질의 최대 수율을 얻기 위해 몇 가지의 변수들, 예를 들어 단백질의 농도 및 순도, 완충제의 종류와 이온강도, pH, 온도, 재접힘용액의 redox potential, 재접힘촉진 첨가제의 영향 등이 고려되어야 한다.

재접힘 단계에서 misfolding과 응집 (aggregation)은 심각한

[†] Corresponding author: Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Ansan 425-791 KOREA
Tel: 0345-400-5275, Fax: 0345-408-3779
e-mail: eklee@mail.hanyang.ac.kr

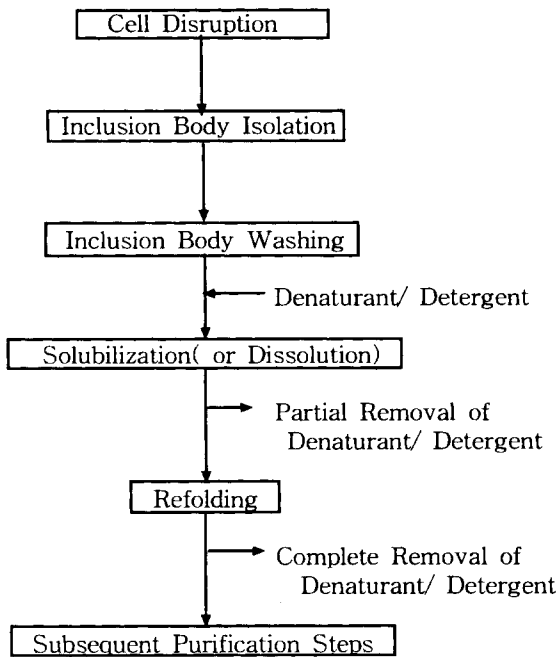


Figure 1. Standard Process to Renature Inclusion Body Protein.

문제를 유발한다. 응집체의 형성은 2차 또는 그 이상의 차수 반응이고 정확한 재접힘 반응은 1차 반응으로 알려져 있다(3). 따라서 재접힘 조건을 적절히 설정하여 응집체의 형성을 극소화하는 방법이 여러 가지 방향으로 시도되고 있다. 전통적으로 sucrose나 glycerol을 재접힘 용액에 첨가하면 단백질간의 상호작용을 최소화할 수 있다(4). 최근에는 'molecular chaperones'의 이용에 대해 연구되어지고 있다. 이들은 단백질의 일종으로 접힘 중간체 (refolding intermediates)와 결합하여 비정상적인 응집현상을 억제하는 것으로 알려져 있다(5-6). 그러나 이러한 접근은 두 가지의 결점이 있는데 첫째로 chaperone을 동시 발현시키기 위해서 복잡한 발현 system을 이용해야 한다는 것이고 다른 하나는 단백질 변성공정중 chaperone도 변성이 되어 그 기능을 손실할 수 있다는 것이다(7). 또한 최근에는 비이온성 계면활성제가 응집을 억제하고 접힘 중간체의 안정을 통해 침전을 줄이는 목적으로 사용되기도 한다(8-12). 이러한 여러 가지 변수들의 영향에 대한 공학적 분석과 실험을 통하여 보다 효과적이고 경제적인 재생공정의 수립이 가능하리라 사료된다.

본 연구의 목적은 기존에 제안된 재접힘공정들을 단백질의 순도와 재생수율에 초점을 맞추어 정량적 분석을 행하고 이들 데이터를 토대로 최적의 조건을 찾는 것이다. 재조합 interferon- α (rIFN- α)와 인성장호르몬(rhGH)을 목적 단백질로 하여 실험을 수행하였으며, 전체 재접힘공정을 크게 두 부분, 즉 내포체 용해공정과 재접힘공정으로 나누어 목적 단백질의 수율에 중요한 열쇠가 되는 변수들의 영향을 비교 분석하였다.

실험재료 및 방법

rIFN- α 와 rhGH이 내포체의 형태로 발현된 재조합 대장균 MC1061은 (주)녹십자로부터 제공받았다. rIFN- α 는 단분자 단

백질로 발현되며 rhGH는 GST(glutamic S transferase)-fusion(GST중 69개의 아미노산이 결합됨)된 형태로 발현된다. IFN- α 는 166개의 아미노산으로 구성된 단일사슬 단백질로 Cys 1-98, Cys 29-138에 두 개의 이황화 결합을 가지고 있으며 pI는 5.9이다. 인성장호르몬도 191개의 아미노산 잔기를 가지는 단일사슬 단백질로 Cys 53-165, Cys 182-189에 두 개의 이황화 결합을 가지고 있으며 pI는 5.2이다.

RP-HPLC (reversed phase high pressure liquid chromatography) (Gilson, model 302)를 이용하여 단백질의 분리 및 정량분석을 수행하였다. 역상칼럼으로는 MacroSphere 300 C18 column (Alltech Inc., 5 μ m, 150mm x 4.6mm)을 사용하였고, 220nm에서 흡광도를 측정하였다. 완충액 A와 B로는 각각 0.1%(v/v) TFA (trifluoroacetic acid)를 증류수에 용해시킨 것과 0.1%(v/v) TFA를 acetonitrile에 용해시킨 것을 사용하였으며 완충액의 유속은 1 ml/min으로 조정하였다. 두 단백질에 모두 선형 농도구배를 이용하였으며 rIFN- α 는 B buffer의 농도를 50%에서 75%까지 30분간 구배하였고 rhGH는 B buffer의 농도를 24%에서 75%까지 30분간 구배하였다.

변성제로는 urea (8M), guanidine-HCl (6M)와 SDS (0.5%)를 사용하였으며 모두 Sigma사에서 구입하였다. 용해공정후 재접힘공정시 urea와 Gu-HCl은 MWCO 10,000의 ultrafiltration membrane을 이용 투석여과하여 제거하였으며 SDS는 저온침전후 상청액을 음이온 교환수지(Amberlite IRA420)를 이용하여 제거하였다. SDS의 분석은 1% acridine orange 용액으로 단백질 용액 내 SDS를 발색시킨 후 toluene으로 추출하여 추출액을 499nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 결정하였다.

PEG (polyethylene glycol) 4000 및 6000과 Tween 20을 재접힘 촉진제로 사용하였으며 모두 Sigma사에서 구입하였다. 재접힘공정 중 생성되는 aggregates의 정량화는 FPLC system (Pharmacia Biotech, P-500, Superose 12HR 10/30)과 단량체와 aggregate사이의 흡광도 차이를 보이는 350nm에서의 흡광도를 측정하여 수행하였다.

전체적인 재접힘공정은 다음과 같이 수행하였다. 내포체가 포함된 재조합 대장균세포를 초음파분쇄기 (Sonic disintegrator, model 550, Fisher Co.)를 이용하여 파쇄시킨 후, 5,600xg로 20분간 원심하여 내포체 pellet을 얻는다. 이 pellet을 4배 부피의 세척액 (10mM EDTA in 0.2M sodium carbonate, pH 7.5)을 가하여 2번 세척한다. 내포체 paste는 8M urea, 6M Gu-HCl, 또는 0.5% SDS가 포함된 sodium bicarbonate buffer (46mM, pH 9.0)를 이용하여 4-6시간 동안 실온에서 용해시킨다. Urea와 Gu-HCl을 포함한 변성제 용액은 4배 희석하여 재접힘 초기 농도를 각각 2M과 1.5M로 조정한 후, 실온에서 재접힘을 시작하였으며, SDS를 포함한 변성제 용액은 먼저 0-4°C에서 저온침전을 수행하여 침전물을 제거한 후 실온에서 재접힘공정을 시작하였다. 변성제의 완전제거를 위하여는 urea와 Gu-HCl은 투석여과를 이용하여 제거하였고 SDS는 음이온 교환수지인 IRA420을 이용 흡착, 제거하였다.

결과 및 고찰

산화 및 환원된 형태의 분리

환원된 단백질은 이황화 결합이 없고 산화된 단백질은 이황화

결함을 가지고 있으므로 이에 따른 단백질 표면의 소수성 차이에 의해 RP-HPLC를 이용하여 분리할 수 있다. 실험에서 강력한 환원제인 DTT (dithiothreitol) 5mM로 처리하여 환원시킨 rIFN- α 와 산화된 형태의 rIFN- α 를 섞어 HPLC에 주입하였다. Figure 2(a)에서 보듯이 두 형태의 IFN- α 간의 분리를 볼 수 있었다. 산화된 형태는 약 7.5분에서, 환원된 형태는 내부의 소수성 잔기의 외부 노출의 영향으로 약 12분에 용출되었다. 280nm에서 두 형태간의 흡광계수 (extinction coefficient)에는 차이는 없었다. rhGH의 경우 rIFN- α 와는 달리 환원된 형태는 15.2분에서, 산화된 형태는 17분에서 용출되었다(Figure 2(b)). 이 차이점은 rhGH에 fusion되어 있는 GST fragment의 영향에 의한 것으로 사료된다. 단백질의 정량은 농도 대 peak area의 검량선을 이용하였으며 rIFN- α 은 200 μ g/ml 까지 rhGH는 12 mg/ml까지 선형이 유지되었다.

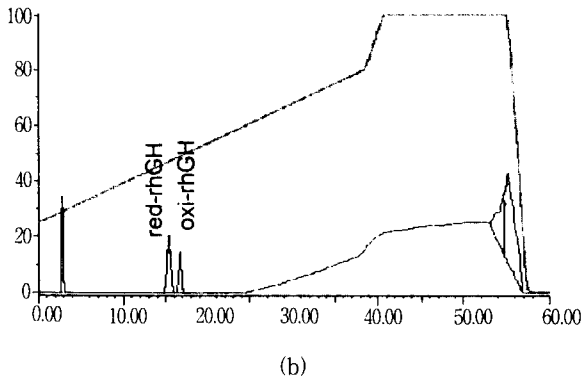
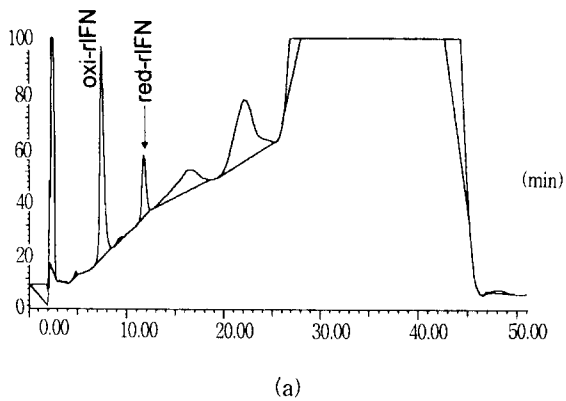


Figure 2. Resolution of Oxidized and Reduced Form of (a) rIFN- α and (b) rhGH. Buffer A = 0.1% (v/v) TFA in DI Water and buffer B = 0.1%(v/v) TFA in acetonitrile; elution rate =1 ml/min; gradient system for rIFN- α was 50%-75% buffer B in 30 min and 24%-75% in 30 min for rhGH.

변성제의 내포체 용해성능 평가

동일한 양의 내포체 paste (건조질량으로 1.75g; 70% 함유율 감안)를 각각 8M urea, 6M Gu-HCl, 또는 0.5% SDS가 함유된 100ml buffer (46mM sodium carbonate, pH 9.0)에 첨가

한 후 실온에서 24시간 용해시켰다. 완전히 용해된 후 0.2 μ m microfiltration시킨 후 단백질의 양을 분석하여 총발현단백질(즉 내포체형태와 용해되어 있는 형태의 합)과 비교하였다. 총발현단백질은 별도의 절차에 따라 분석하였다(13). Figure 3에서 보듯이 SDS가 가장 높은 효과를 보이는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 rIFN- α 와 rhGH의 내포체 용해에서 동일하게 관찰되었다. 본 발현시스템에 의한 목적단백질의 내포체 발현성능이 약 95% 이상인 점을 감안하면(13) 거의 모든 내포체단백질이 SDS에 의해 용해되는 것으로 유추된다. 변성제의 비용 면에서 (Gu-HCl이 가장 비쌌), 폐수처리면에서 (urea나 Gu-HCl 경우 질소함량이 높음), 또한 다른 결점 (urea의 경우 carbamylation 가능성, Gu-HCl의 경우 추후공정 (SDS-PAGE나 이온교환 크로마토그래피)과의 상충성 등)을 고려해서 SDS를 가장 효과적인 변성제로 채택하였다. SDS는 단백질의 소수성 부위와의 결합을 통해 단백질의 응집체를 효과적으로 용해시킬 수 있는 것으로 알려져 있다(14).

최적의 SDS 농도와 pH 조건을 결정하기 위하여 SDS 농도를 0.1, 0.2, 0.5, 1.0%로, pH는 5.0, 7.0, 9.5, 12.0으로 조정하였고 다른 실험적 환경은 동일하게 유지하였다. 이 결과를 Figure 4에 나타내었다. 용해효과는 pH가 높아질수록 향상되는 것을 알 수 있었다. 하지만 너무 높은 pH, 즉 강염기 환경에서는 좋지 않은 것으로 보여진다. 이것은 모든 단백질에 부정적인 영향을 미치는 것은 아니며, 이전에 보고된 논문에 의하면 몇몇의 단백질 (예: rbGH, prochymosin)의 경우 pH 11.8-12.15에서 변성제를

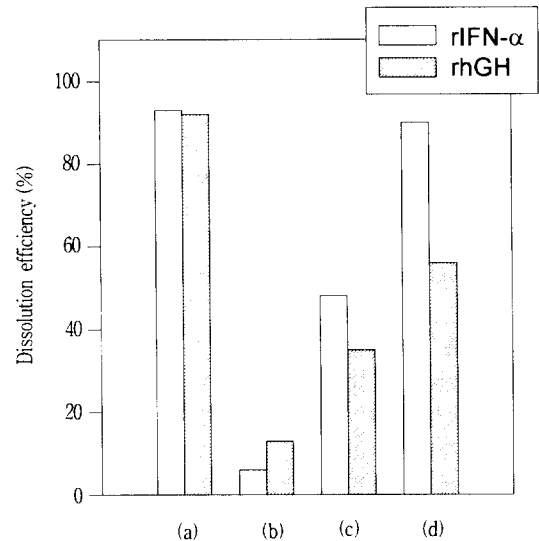


Figure 3. Effect of Denaturants on Dissolution Efficiency of rIFN- α and rhGH Inclusion Body. Washed inclusion body (1.75g dry weight) was placed in a 100ml sodium bicarbonate buffer solution containing (a) 0.5% SDS, (b) 8M urea, or (c) 6M Gu-HCl. The buffer pH was 9.0 (for all) and the dissolution was carried out at room temperature except one buffer with Gu-HCl that was at 4°C (d). Dissolution efficiency was determined as the mass of the monomeric proteins detected by RP-HPLC divided by that of the total expressed proteins.

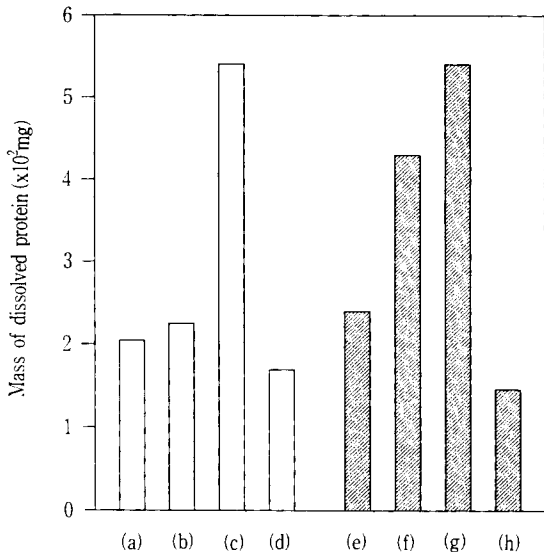


Figure 4. Effect of SDS Concentration and pH on rhGH Inclusion Body Dissolution. Washed rhGH inclusion body (1.75g dry weight) was placed in a 100ml sodium bicarbonate buffer solution (pH 9.5) containing (a) 0.1, (b) 0.2, (c) 0.5, or (d) 1.0% SDS (empty bars) and 0.5% SDS at pH (e) 5, (f) 7, (g) 9.5, or (h) 12 (shaded bars). All the dissolution was at room temperature.

사용하지 않고도 효과적으로 용해된다고 보고되었다(15-16). 그러나 우리 실험의 경우 0.5% SDS, pH 12의 조건에서는 단백질 침전이 형성됨을 볼 수 있었다. 이는 강염기환경에 SDS가 추가됨으로서 단백질이 변성되었음에 기인한 것으로 사료된다. 내포체내 rhGH의 질량농도가 약 30%임을 감안할 때 (data not shown), 0.5%의 SDS는 단백질과 약 100 : 1 몰비율을 갖는 것임으로 이 몰비율이 내포체 용해에 가장 효과적임을 알 수 있었다. 이 때 SDS 용해액내의 단백질 농도는 약 5.4 mg/ml으로서 비교적 고농도에서도 성공적으로 용해시킴을 볼 수 있었다.

재접힘공정중 변성제 및 단백질 농도의 영향

일반적으로 재접힘 공정은 용해시 첨가된 변성제를 급속히 제거시켜 강한 변성조건을 약화시키면서 시작된다. 이러한 중간농도에서의 단백질은 active-like한 2차구조를 형성하기 시작하며, 변성제의 영향에 의한 분자간 상호작용이 억제됨으로써 응집현상이 최소화될 수 있다. 이러한 중간농도는 변성제마다 다르며 urea나 Gu-HCl의 경우는 각각 2M, 15M이 가장 많이 사용되어지고 있다. 이것은 용해공정에서 사용된 농도가 4배 희석된 농도이다. 재접힘 초기에 변성제 농도를 감소시키기 위해 urea와 Gu-HCl이 포함된 용해액은 탄산완충액을 이용하여 4배 희석시켰고, SDS가 포함된 용해액은 4℃에서 저온침전후 SDS가 포함된 침전물을 원심하여 제거하였다. SDS의 경우 저온침전에 의해 약 30%의 SDS가 침전제거됨을 확인하였다 (data not shown). 처리후 각각의 용액을 buffer로 희석시킨 후, 실온에서 24시간 공기산화 (air oxidation)시켰다. 이 반응은 shuffling을 통한 이황화 결합을 유도하기 위한 것으로 환원된 형태의 thiol기를 산화된 형태의 이황화 결합으로 변화시키기 위한 것이다.

간단하고 경제적인 방법을 사용하기 위해 우리는 공기산화법을 택하였으며, 많은 다른 방법들도 사용할 수 있다 (예: 산화 또는 환원된 glutathione을 일정한 비율로 첨가하거나, cysteine, dithiothreitol, 2-mercaptoethanol과 같은 환원제의 첨가를 통한 redox potential의 조절, 구리이온의 첨가 등).

변성제 농도와 더불어 단백질 농도는 재접힘 공정에 가장 중요한 요소로 작용한다. 단백질간의 상호작용은 억제하고 단백질내의 소수성 결합, 이온결합, 이황화결합 등을 촉진하기 위하여 단백질의 농도는 낮게 유지하는 것이 효과적이다. rhGH나 rpGH의 경우 1-4 mg/ml 까지도 정확하게 재접힘된다고 보고되고 있지만(14), 일반적으로 1-20 μg/ml 또는 0.1 mg/ml을 넘지 않게 사용하는 것이 관례로 되어 있다(17). 그러나 이러한 농도는 산업적 공정으로 이용하기에는 너무 낮기 때문에 증가시킬 필요가 있다. 본 실험에서는 저온침전후의 용해액 중 rhGH의 농도를 0.1에서 5 mg/ml가 되도록 조정하고 SDS의 농도는 0.35%로 일정하게 유지시켜 (저온침전에 의해 제거되는 SDS의 양을 감안) 재접힘공정중 단백질 농도의 영향을 살펴보았다.

Figure 5에서 보듯이 재접힘 효율은 0.5-1.0 mg/ml (17-34 μM)의 단백질 농도에서 높은 효과를 보였다. 2 mg/ml 이상의 농도에서는 수율이 크게 감소하였는데, 이것은 단백질간의 상호작용에 기인하여 응집체가 과다하게 형성되어진 것으로 생각된다. 또한 0.1 mg/ml의 낮은 농도에서도 효율이 낮은 것으로 관

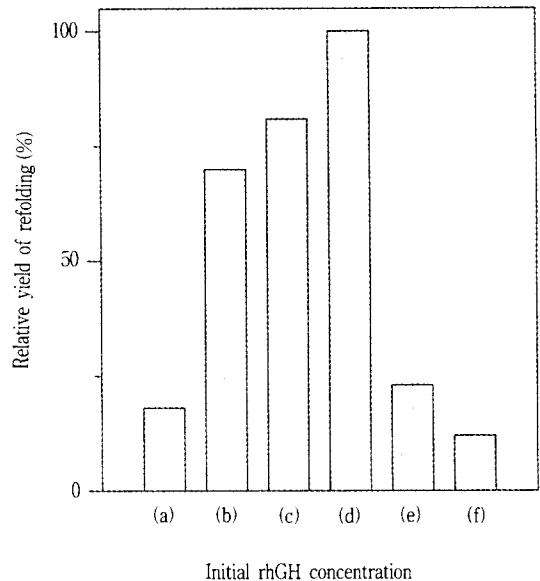


Figure 5. Effect of rhGH Concentration on Refolding Yield. Washed rhGH inclusion body (1.75g dry weight) was dissolved as described in Figure 4. After the dissolution, the buffer was subjected to cryoprecipitation at 4℃ for partial removal of SDS. The buffer was diluted with the sodium bicarbonate buffer containing 0.35% SDS accordingly to (a) 0.1, (b) 0.2, (c) 0.5, (d) 1, (e) 2, or (f) 5 mg/ml rhGH concentration. Each solution was air-oxidized at room temperature for 24 hrs, and then fed to IRA420 column for complete removal of SDS. The eluates were analyzed for oxidized form of the monomeric rhGH by RP-HPLC.

측되었는데 이는 SDS 농도가 단백질 농도에 비해 상대적으로 높아 3차구조 형성을 억제시키기 때문인 것으로 생각된다. Kiefhaber 등에 의하면(18) 재접힘 공정은 단백질농도만의 영향이라고 가정할 때 10 μ M 이상에서는 재접힘 수율이 거의 0%에 접근한다고 보고하였다. 그러나 이 보고는 변성제의 영향을 감안하지 않은 것으로서 적당농도의 변성제 존재 하에서는 재접힘 수율을 향상시킬 수 있으며 이는 변성제가 단백질간의 aggregation을 억제하는 효과 때문인 것으로 유추된다. 이러한 결과로부터 단백질의 농도에 비하여 SDS의 농도가 상대적으로 낮으면 과도한 aggregation이 유발되고, 높으면 3차구조 형성을 억제하게 됨을 유추하였다. 따라서 정확한 재접힘 공정을 위하여는 SDS와 단백질이 일정 범위의 적정비율로 존재하여야 함을 알 수 있었다.

재접힘에 대한 이온 강도의 효과

재접힘 용액내 이온강도는 일반적으로 단백질 농도가 높을 때 더욱 큰 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다. 재접힘 공정의 pH(9.5)에서 rhGH의 표면은 음이온성을 띄기 때문에 탄산이온은 zeta layer에 밀집하여 electrostatic shield를 형성하여 단백질간의 소수성결합을 억제하는 역할을 할 것으로 유추된다. 본 실험에서는 이온강도에 의한 aggregation 방지 및 재접힘 수율에 대한 영향을 확인하기 위하여, aggregates 생성이 용이한 비교적 고농도인 2 mg/ml의 단백질농도에서 탄산완충액(Na₂CO₃:NaHCO₃=1:1, 0.5% SDS, pH 9.5)의 이온강도를 10, 21, 50,

100mM로 각각 조정하여 각각 1시간과 2일간 공기산화시킨 후 재접힘된 단분자 단백질의 수율을 비교평가하였다.

Figure 6의 결과에서 보면 재접힘 수율의 영향에는 낮은 이온강도를 주는 것이 효과적이었다. 하지만 응집현상의 억제를 위해서는 높은 이온강도를 유지해 주는 것이 보다 효과적인 것으로 생각되어진다. 따라서 재접힘 효율의 적정화를 위해 적절한 이온강도가 존재하는 것으로 생각되며, 본 실험에서는 50mM이 가장 효과적인 것으로 관찰되었다. 또한 실험결과에서 관찰되었듯이 시간에 따라 재접힘된 단분자의 농도가 다소 감소하는 현상은 비록 단백질내의 이황화결합이 올바르게 형성되어 있더라도 결합되어 있는 SDS의 영향으로 단백질의 분자구조가 native한 것처럼 compact하지 않은 상태이므로 비교적 고농도인 단백질 용액내에서는 소수성결합 등에 의한 spontaneous (또는 self) aggregation이 형성되어 발생하는 것으로 유추된다. 이온강도가 증가됨에 따라 이같은 aggregation이 상대적으로 줄어들어주는 것으로 미루어 볼 때 spontaneous aggregation은 주로 소수성결합에 의한 것으로 사료된다.

재접힘 첨가제의 영향

응집체의 형성은 재접힘 공정의 수율에 심각한 손실을 가져오므로 최소화시켜야 한다. 응집체의 형성에는 두 가지의 경로가 있는 것으로 생각되고 있는데, 첫 번째는 단백질 분자간 또는 분자내의 이황화결합의 mismatching과 두 번째는 단백질 분자간의 소수성 상호작용(즉 비공유성 결합)에 의한 것이다. 응집반응은 정확한 재접힘 반응과 경쟁적으로 진행되나 재접힘 반응에 비해 높은 반응차수를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 두 반응 모두 'molten globule state'라 불리는 재접힘 중간체로부터 시작된다(7). 이 중간체는 구형의 형태로 native state에 비해 소수성의 잔기들이 외부에 많이 노출되어 있으며(19), self-association에 의해 열역학적으로 보다 안정한 응집체를 형성하려 한다(8). 비이온성 계면활성제인 PEG나 Tween의 첨가는 이러한 응집현상을 효과적으로 방지할 수 있는 것으로 보고되었다(9-12).

본 실험에서는 PEG-4000을 3 g/L의 농도로 용해액 또는 재접힘 용액에 첨가하였다. 각각의 용액중의 단백질 농도는 5 mg/ml이었으므로 PEG와 rhGH의 몰비율은 4.4:1이었다. 또 다른 용해액에는 PEG-6000을 10 g/L의 농도로 첨가하였다. PEG를 첨가하지 않은 용해액을 기준으로 수율을 비교하였다. Figure 7에서 보듯이 PEG는 용해과정에서 첨가하는 것이 재접힘과정에서 첨가하는 것보다 더 효과적인 것으로 관찰되었다. 비교적 높은 단백질 농도에서도 PEG나 Tween의 첨가를 통하여 수율을 증가시킬 수 있음을 확인하였다. 또 다른 실험에서는 PEG와 Tween의 양을 각각 3 g/L, 5 g/L로 재접힘 용액에 첨가하여 40분간 재접힘과정을 수행하였다. 여기서 첨가한 양은 첨가제: 단백질 몰비율로 각각 4.4:1, 2.5:1 이었다. Figure 7의 결과에서 보듯이 첨가제는 재접힘수율을 1.6-2배 증가시킬 수 있었으며, 이것은 첨가제가 단백질 표면의 소수성 부위와의 결합을 통해 소수성 상호작용을 억제하여 응집을 방지하기 때문인 것으로 생각되어진다(12). 아울러 Tween이 응집체 형성을 억제하는 작용에는 더욱 효과적인 것으로 관찰되었다.

재접힘공정중 응집현상

응집체형성반응의 속도와 경향을 얻기 위해서는 빠른 분석이

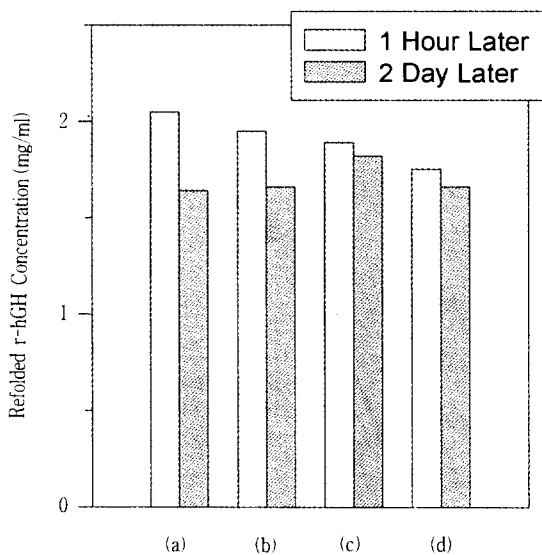


Figure 6. Effect of Ionic Strength on rhGH Refolding Yield. Washed rhGH inclusion body was dissolved and cryoprecipitated as described in Figure 5. The supernatant was divided into four aliquots, and the ionic strength of each was adjusted to (a) 10, (b) 21, (c) 50, and (d) 100 mM sodium bicarbonate. The rhGH concentration of each aliquot was 2.5 mg/ml. Each solution was air-oxidized. Samples were taken after 1 hour and 2 days into the air-oxidation, and fed to IRA420 column for complete removal of SDS. Each eluate was measured for the monomeric rhGH by RP-HPLC.

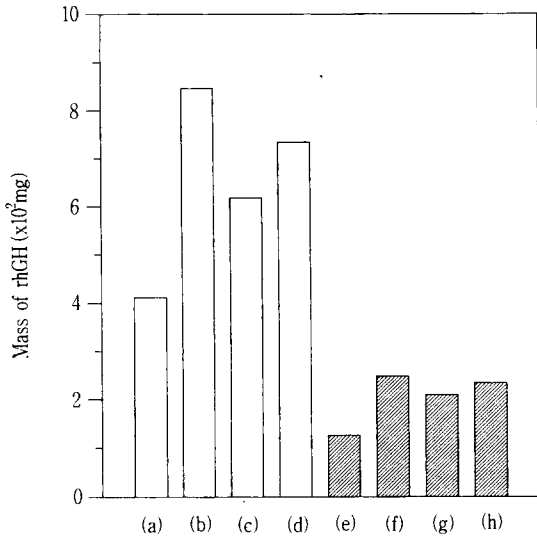


Figure 7. Effect of PEG or Tween Addition on rhGH Refolding Yield. Washed rhGH inclusion body (1.75g dry weight) was placed in a 100ml sodium bicarbonate buffer solution (pH 9.5) containing 0.5% SDS. Control was (a), (b) was PEG-4000 and (c) was PEG-6000 added in dissolution step, (d) was PEG-4000 added in refolding step(empty bars). Washed rhGH inclusion body (0.45g dry weight) was dissolved and cryoprecipitated as described in Figure 5. After this, control was (e), (f) was PEG-4000, (g) was Tween and (h) was PEG and Tween added in refolding step. Each solution was air-oxidized at room temperature for 24 hrs, and then fed to IRA420 column for complete removal of SDS. The eluates were analyzed for oxidized form of the monomeric rhGH by RP-HPLC.

필요하다. 지온침전에 의한 SDS의 제거후 상청액을 공기산화를 통해 재집합시키면서 350nm에서 흡광도를 측정하여 불용성의 응집체를 분석하였다(9). 본 실험에 사용된 rhGH의 경우 단분자와 응집체 형태는 350nm에서 현저한 흡광도 차이를 보였으며 (Figure 8 참조), 따라서 350nm에서의 흡광도분석에 의해 응집체를 정량분석할 수 있었다. Figure 9의 결과에서 보면 응집현상은 30분 이내에 빠른 속도로 평형상태에 도달하는 것을 알 수 있었다. PEG의 첨가는 응집현상을 방지하는 것을 확인할 수 있었고, 이러한 방지효과는 첨가제를 첨가하지 않았을 때와 비교시 PEG-4000은 약 28%, PEG-6000은 약 22%의 억제효과를 나타냈다. 이러한 결과는 Tween 첨가시보다는 다소 낮았으며 PEG-4000과 PEG-6000의 경우 PEG 분자량이나 몰비율 (4.4:1, 9.8:1)의 차이에 의한 변화는 거의 없었다. 이 결과는 기존에 발표된 Tween의 영향 평가결과, 즉 Tween을 rhGH와 10:1의 몰비율로 첨가하였을 때 응집억제효과는 Tween의 분자량에 의해 그 효과가 변하는 것과는 다른 결과이다 (Bam 등(7)은 Tween 20, 40, 또는 80의 경우 응집억제효과는 각각 36%, 65%, 55%로 나타났다고 보고하였다). 응집체의 증가곡선을 최소자승법에 의해 응집반응차수를 계산해 본 결과 PEG를 첨가하지 않은 경우의 반응차수는 약 2.5로 계산되었다. 이는 일반적으로 응집현

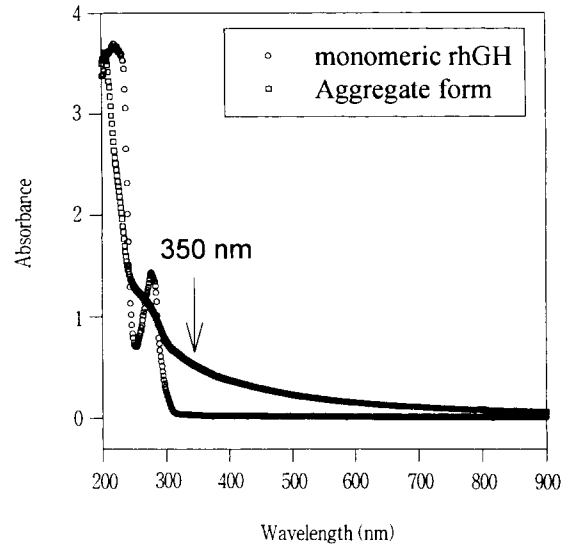


Figure 8. Scanning Profiles of Monomeric rhGH and Aggregate Form. Both the monomeric and the aggregated rhGH were scanned. The aggregate was fraction collected from FPLC. Light absorbance at 350nm was correlated with the FPLC peak area to quantify the aggregate mass assuming that the extinction coefficients of the aggregate and the monomer were identical.

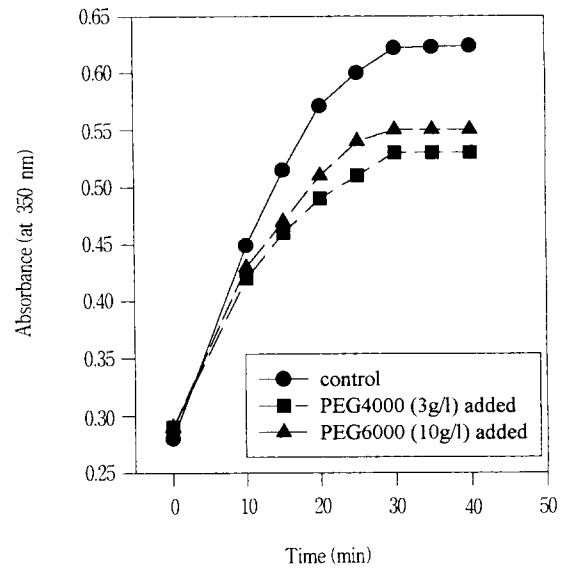


Figure 9. Aggregation Profiles During rhGH Air-Oxidation. Washed rhGH inclusion body was dissolved and cryoprecipitated as described in Figure 5. The buffer was diluted with the sodium bicarbonate buffer containing ca. 0.35% SDS to the rhGH concentration of 2.0 mg/ml, and air-oxidized (control). To the same solution PEG-4000 and PEG-6000 were added to 3 and 10 g/L concentration, respectively, just prior to the air-oxidation. The aggregate formation profiles were determined by measuring the absorbance at 350nm.

상의 반응차수는 2차 이상이라는 결과와 부합되었으며(3), PEG의 첨가시 반응차수가 약 2.2로 낮아짐을 관찰하였다. 또한 단백질의 농도가 응집현상에 미치는 영향을 살펴본 결과는 Figure 10에 나타내었다. 단백질의 초기농도가 높을수록 응집현상이 과도하게 일어났으며 겉보기(apparent) 응집반응상수는 약 $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 로 계산되었다. 이 값은 Zettlmeissl 등(20)이 lactic dehydrogenase의 응집반응실험에서 유추한 반응상수와 같은 크기였다.

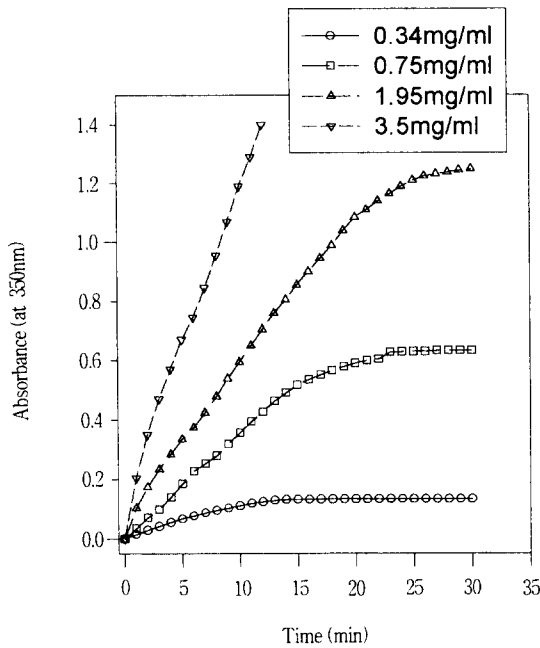


Figure 10. Aggregation Profiles at Various rhGH Concentrations. Washed rhGH inclusion body was dissolved and cryoprecipitated as described in Figure 5. The buffer was diluted with the sodium bicarbonate buffer containing ca. 0.35% SDS to 0.34, 0.75, 1.95, or 3.5 mg/ml rhGH concentration. Each solution was air-oxidized and the aggregate formation profiles were determined by measuring the absorbance at 350nm at room temperature.

음이온 교환수지를 이용한 SDS의 제거

재접힘 공정의 수행후 추후 정제공정을 위해서는 잔류하고 있는 변성제를 완전 제거해야 한다. Urea와 Gu-HCl의 제거는 일반적인 투석여과방법을 사용하였고 SDS는 음이온 교환수지 칼럼을 이용하여 제거하였다. 사용한 음이온 교환수지는 경제적이고 범용성인 Amberlite IRA420으로 효율적으로 제거할 수 있었다. Figure 11는 Amberlite IRA420을 이용한 SDS 과과곡선(breakthrough curve)으로 0.35% SDS를 함유한 단백질 용액을 1 bed volume/hr의 유량으로 feeding하며 용출액의 SDS 농도를 분석하여 작성한 것이다. Bed volume의 3.5배 부피까지 용출된 단백질용액내 SDS가 검출되지 않았으며(SDS 분석허용오차는 0.6ppm 이내임), SDS 흡착성능은 1ml의 칼럼부피당 12mg으로 계산되었다. 비특이성(non-specific) 흡착에 의한 단백질의 손실은 없었으며 수지는 아주 쉽게 재생이 가능하였다.

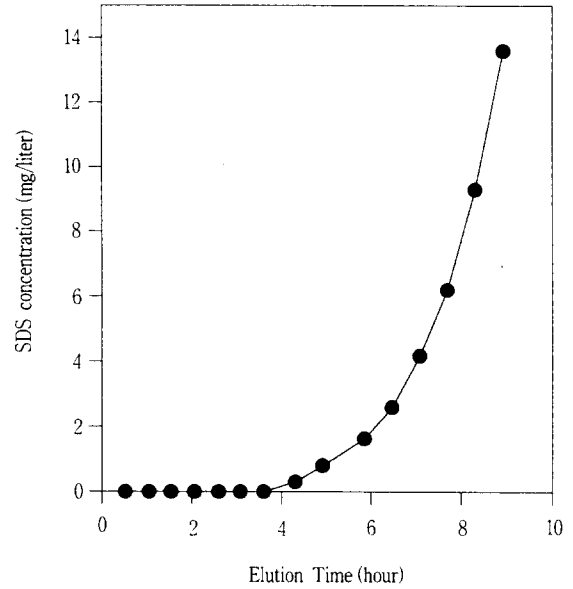


Figure 11. Breakthrough Curve of SDS Adsorption on to IRA420 Column. Air-oxidized solution containing 1.0 mg/ml rhGH and ca. 0.35% (or 3500 ppm) SDS was fed to the IRA420 column (packed volume was 50ml) at room temperature, and the eluate was analyzed for SDS concentration. Feeding rate was 50 ml/hr, or 1 bed volume per hour.

용해 및 재접힘공정의 회수율

SDS를 이용한 rhGH 내포체 재생공정 중 각 단계별 수율을 나타내었다 (Table 1). 수율은 내포체 100g (건조질량 기준)을 기준으로 하여 나타내었고 각 단계별 단백질의 정량은 RP-HPLC의 oxidized monomer의 peak area로서 결정하였다.

Table 1. Recovery yield profile of rhGH inclusion body renaturation process.

Step	Condition	rhGH mass	Yield
Washed inclusion body paste	-	5.95g (wet) 1.75g (dry)	100%
SDS dissolution	0.5% SDS; 46mM NaHCO ₃ ; pH 9.5; room temp.; 6 hrs of mild agitation	0.586g	33.5%
Cryoprecipitation	at 4°C; ca. 1 hours; 5600xg centrifugation for 10 min	0.586g	33.5%
Buffer dilution	6x dilution with 46mM NaHCO ₃ containing 0.35% SDS	not measured	
Air-oxidation	1.0 mg/ml rhGH; room temp.; 0.35% SDS; 24 hours	0.560g	32.0%
IRA eluate	1 bed volume per hour; room temp.	0.495g	28.3%

결 론

내포체 단백질의 재생에 영향을 미치는 주요공정변수들을 rIFN- α 와 rhGH를 대상으로 용해 및 재접힘 공정의 수율에 초점을 맞추어 비교 분석하였다. 내포체 용해용 변성제로는 urea (8M), Gu-HCl (6M), SDS (0.5%) 중 SDS가 두 단백질 모두 가장 높은 수율을 나타내었고 SDS를 이용한 용해시 실온, pH 9.0-9.5에서 가장 높은 용해성능을 보여 주었다. 또한 rhGH의 경우 단백질 농도가 0.5-1.0 mg/ml 일 때의 재접힘효과가 가장 높은 것으로 관찰되었다. 용해시는 비교적 낮은 이온강도 (<10mM)의 탄산완충액이 좋았으나 재접힘시에는 50mM 이상의 이온강도가 유리한 경향을 볼 수 있었다. 재접힘시 응집현상을 억제하여 단분자 단백질의 수율을 향상시킬 목적으로 비교적 고농도의 rhGH (5 mg/ml) 용액에 PEG 또는 Tween 20을 첨가한 결과 1.6-2배의 수율 향상효과를 얻을 수 있었다. PEG 분자량이나 농도에 의한 수율 변화는 거의 없었으며 이 첨가제의 투입에 의해 응집반응차수가 2.5에서 2.2로 감소되는 것으로 계산되었다. SDS는 저온침전에 의해 약 30%가 침전 제거되고 경제적인 이온교환수지인 Amberlite IRA420에 의해 완전 제거될 수 있으므로 SDS를 이용한 용해 및 재접힘 공정을 수립할 수 있으며 PEG 등 재접힘 촉진제를 동시에 이용시 산업적 공정으로의 이용도 가능하리라 사료된다.

감 사

본 연구는 '95년도 교육부 학술연구조성비 (생물화학공학분야: 과제번호 G-09)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다. 본 연구에 참여한 연구원 김창성은 교육부지정 국책대학원인 한양대학교 신소재공정공학원의 장학지원에 대하여 감사의 뜻을 전합니다. 아울러 재조합대장균 세포 및 정제된 단백질을 제공하여 주신 (주)녹십자 생물공정팀 박경남, 안상점님 및 (재)목암생명공학연구소 발효연구실의 정경환님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Schonor, E. G., L. F. Ellis, and B. E. Shonor (1985), Isolation and purification of protein granules from *E. coli* cells overproducing bovine growth hormone, *Bio/Technology*, **3**, 151-154.
- Lowe, E. G., S. K. Rhind, R. Sugrue, and Marston, F. A. O. (1987), Solubilisation, refolding and purification of eukaryotic proteins expressed in *E. coli*, *Protein Purification: Micro to Macro*, pp. 429-442, Alan R. Liss, Inc.
- Bowden, G. A., A. M. Paredes, and G. Georgiou (1991), Structure and morphology of protein inclusion body in *Escherichia coli*, *Bio/Technology*, **9**, 725-734.
- Gekko, K. and S. N. Timasheff (1981), Mechanism of protein stabilization by glycerol: Preferential hydration in glycerol-water mixtures, *Biochemistry*, **20**, 4667-4676.
- Badcoe, I., C. Smith, S. Wood, D. Halsall, J. Holbrook, P. Lund, and A. Clarke (1991), Binding of a chaperonin to the folding intermediates of lactate dehydrogenase, *Biochemistry*, **30**, 9195.
- Martin, J., Y. Langer, R. Boteva, A. Schramal, A. Horwich, and F. Hartl (1991), Chaperonin-mediated protein folding at the surface of groEL through a 'molten globule'-like intermediate, *Nature*, **352**, 36.
- Bam. N. B., J. L. Cleland, and T. W. Randolph (1996), Molten globule intermediate of recombinant human growth hormone: Stabilization with surfactants, *Biotechnol. Prog.*, **12**, 801-809.
- Brems, D. N. (1988), Solubility of different folding conformers of bovine growth hormone, *Biochemistry*, **25**, 4541.
- Defellippis, M. R., L. A. Alter, A. H. Pekar, H. A. Havel, and D. N. Brems (1993), Evidence for a self-associating equilibrium intermediate during folding of human growth hormone, *Biochemistry*, **32**, 1555-1562.
- Cleland, J. L. and D. I. C. Wang (1990), Refolding and aggregation of bovine anhydrase B: Quasi-elastic light scattering analysis, *Biochemistry*, **29**, 11072-11078.
- Cleland, J. L., C. Hedgepeth, and D. I. C. Wang (1992), Polyethylene glycol enhanced refolding of bovine carbonic anhydrase B, *J. Biol. Chem.*, **267** (19), 13327-13334.
- Cleland, J. L. and T. W. Randolph (1992), Mechanism of polyethylene glycol interaction with the molten globule intermediate of bovine carbonic anhydrase B, *J. Biol. Chem.*, **267**(5), 3147-3153.
- Kim, Y. H. (1995), "Direct quantification of interferon- α inclusion body in recombinant *E. coli* fermentor beer using reversed-phase HPLC," M.S. Thesis, Dept. of Chem. Eng., Hanyang Univ., Seoul, Korea.
- Hermann, R. (1993) Protein Folding, in EPO Applied Technology Series, Vol. 12, pp. 7, European Patent Office, Netherlands.
- Jaenicke, R. (1987) Folding and association of proteins, *Prog. in Biophys. and Mol. Biol.* **49**, 117-237.
- Radek, J. T. and F. J. Castellino (1989), Purification and properties of yolk protein factor I, a sequence-specific DNA-binding protein from *Drosophila melanogaster*, *J. Biol. Chem.*, **264**, 5195-5210.
- Fischer, B., I. Summer, and P. Goodenough (1993), Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies, *Biotech. Bioeng.*, **41**, 3-13.
- Kiefhaber, T., R. Rudolph, H-H. Kohler, and J. Buchner (1991), Protein aggregation *in vitro* and *in vivo*: A quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation, *Biotechnology*, **9**, 825-829.
- Ptitsyn, O. B., R. H. Pain, G. V. Semisotnov, E. Zerovnik, and D. I. Razgulyaev (1990), Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding, *FEBS Lett.*, **262**, 20.
- Zettlmeissl, G., R. Rudolph, and R. Jaenicke (1979), Reconstitution of lactic dehydrogenase. Noncovalent aggregation vs. reactivation, *Biochemistry*, **18**, 5567-5571.