

대장균 세포에서 Leptin 유전자의 발현 유도

김은정 · 정인철 · 오상환* · 조무연†

고신대학교 의학부 생화학교실

*연세대학교 의과대학 생화학분자생물학교실

Induction of Leptin cDNA Expression in *Escherichia coli* Cells

Eun-Jung Kim, In-Cheol Jeong, Sang-Hwan Oh* and Moo-Youn Cho†

Department of Biochemistry, Kosin University College of Medicine, Pusan 602-702, Korea

*Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Yonsei University, Seoul 120-752, Korea

Abstract

Leptin gene, an obesity gene, has been known to involve in the regulation of food intake and body weight. It is also thought to be related to the glucose metabolism, insulin secretion and type II diabetes mellitus. Recently, the production of recombinant leptin protein has been attempted for the application in the treatment of obesity and the correction of hereditary obesity and type II diabetes. In the present study, leptin cDNA was cloned from mouse fat cells by RT-PCR and prokaryotic expression of leptin was attempted in order to prepare a leptin-specific antigen. Immunization of a rabbit with the leptin-specific antigen into a rabbit resulted in the generation of leptin-specific antiserum that could be useful in the detection of leptin expressed in various tissues. The sequence of leptin cDNA prepared in the present study was identical to the previously reported one. Transformation of *E. coli*(DH5α) cells with the leptin cDNA-inserted translation vector, pGEX-4T-3-leptin followed by treatment with IPTG (0.1mM) resulted in the expression of a large amount of GST-leptin fusion protein with a molecular weight of 44 KDa as an inclusion body. Denaturation of the insoluble fusion protein by 8M urea, 6M guanidium-HCl or 0.1% 2-mercaptoethanol followed by a slow oxidation could not solubilize the inclusion body. The cell extract was subjected to SDS-PAGE and GST-leptin protein electroeluted from the gel was then injected into a rabbit subcutaneously for the immunization. Anti-GST-leptin rabbit antiserum which had a cross reactivity to the GST-leptin protein was generated. Leptin protein expressed in mouse brain and fat tissues was detected by Western blot immunodetection system using the antiserum generated in the present study.

Key words – Leptin, cDNA, Expression, Anti-leptin antibody.

†Corresponding author

서 론

Leptin은 지방세포에서 유래한 체중조절 cytokine으로서 마우스 비만 유전자의 위치 선정으로 처음 밝혀졌으며 이 단백질은 식이 섭취와 체온 조절에 영향을 미치고 있음이 밝혀졌다[18]. Choroid plexus에는 leptin이 결합하는 leptin 수용체가 있으며[23] leptin의 활성은 hypothalamic OB-R(leptin receptor)를 통해서 나타난다는 사실도 알게되었다. 그리고 leptin 수용체는 지방세포 외에 신장, 폐, 간 등 다른 조직에서도 발현된다고 알려져 있다 [6,14]. 이러한 관점에서 볼 때 leptin은 식이 섭취 및 체온 조절뿐 아니라 또 다른 생리적 기능을 가지고 있을 것으로 생각되며 이에 대한 더 많은 연구가 요구되고 있다. 최근 보고에 의하면 과 지방 축적은 혈청내에 고농도의 leptin과 관련이 있다고 하였다[8,15]. 그리고 비만과 인슐린 저항성은 매우 높은 상관 관계를 가지고 있으므로 leptin이 인슐린에 의한 당 대사조절에 관여할 가능성도 높다. 따라서 leptin 유전자의 발현 조절과 합성은 비만의 예방 및 치료에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다. Leptin은 분자량(167 아미노산)이 비교적 작은 펩타이드로서 시험관이나 세포 배양 시스템에서 합성이 용이할 것으로 생각되고 있다. 여러 가지 벡터를 이용한 leptin cDNA 발현이 시도되고 있으며[17] 재조합 adenovirus 벡터를 이용한 leptin cDNA의 발현은 성숙한 ob/ob 마우스의 비만 표현형질을 교정할 수 있었다고 보고하였다. 그러나 비만의 생물학적 기전은 아직 확실치 않으며 치료 또한 단순하지 않기 때문에 병인과 치료를 위한 분자생물학적 접근이 요구되고 있다. 비만 억제유전자로 알려진 leptin 유전자의 변이는 비만을 일으키는 원인이 될 수 있다는 사실이 증명되었다[25]. 그리고 선천적인 비만 치료에 leptin 유전자를 이용한 유전자 치료의 가능성이 있음을 보고 되었다[17]. 유전적으로 비만증을 가진 ob/ob 마우스는 인슐린 비 의존성 당뇨병 환자에게서 흔히 나타나는 것과 매우 유사한 당 대사 결함을 보이고 있으며 이런 마우스에서는 leptin 단백질이 결핍되어 있음이 발견되었고 [7] 이들이 보이는 증상은 비만은 물론이고 고혈당, 내당력 저하 및 고인슐린증 등이다. 그리고 ob/ob 마우스에 leptin 주사를 반복 시행하여 체중감소 효과를 얻은 결과도 보고되었다[5,10,18].

본 연구에서는 마우스 지방조직으로부터 분리한 mRNA를 template로 이용하여 RT-PCR 방법으로 leptin cDNA를 합성한 다음 원핵 세포 단백질 합성 벡터에 삽입하고 대장균에서 leptin 단백질을 유도 합성하여 이에 대한 항체를 만들어 각 조직에서 발현되고 있는 leptin 단백질을 검색 하고자 하였다.

재료 및 방법

Leptin cDNA 합성

체중 30 g의 ICR 자성 마우스 하복부로부터 제거한 지방조직(8.4g)에 TRI reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, USA) 3 ml를 가하고 부유시킨 후 0.6 ml의 chloroform을 첨가하고 15초간 진탕한 후 실온에서 10분간 보관하였다. 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하고 상층 수용액을 취하여 새로운 원심분리관으로 옮기고 1.5 ml의 isopropyl alcohol을 가한 뒤 잘 섞고 실온에서 10분간 보관한 후 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 RNA 침전물을 얻고 75% ethanol 3 ml로 씻은 다음 4°C에서 12,000 rpm으로 2분간 원심분리하고 ethanol을 제거한 후 DEPC(0.1% diethyl pyrocarbonate)가 포함된 중류수 150 µl에 녹이고 260 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA 농도를 결정하고 이를 template로 이용하여 RT-PCR을 실시하였다. PCR primer는 Zhang 등[25]이 보고한 Leptin cDNA 염기서열중 단백질을 코딩하는 부위(nucleotide No. 116- 615)를 포함하고 단백질 합성 시작 코돈과 pGEX-4T-3 plasmid의 glutathione-S-transferase 코돈 프레임이 맞게 설계하고 단백질 합성 종지코돈과 양쪽 끝에 BamHI과 XhoI 제한효소 인식부위를 삽입하여 다음과 같이 primer를 주문(바이오니아, 청원, 한국) 합성하였고 이를 primer의 sequence는 다음과 같다.

Sense primer: 5'-AGGATCCATGTGCTGGAGACCCCTGT-

Antisense primer: 5'-ACTCGAGTCAGCATTCAAGGG-
CTAAC

역전사 반응을 위하여 분리한 RNA 1 µg을 취하고 DEPC로 처리한 재증류수로 부피를 8 µl로 맞춘 다음 5X 역전사 완충용액(250 mM Tris-Cl, pH 8.3, 250 mM KCl, 50 mM DTT, 50 mM MgCl₂) 2 µl를 첨가한 후 65°C에서 10분간 방치하고 antisense primer 100 pmole, 10 mM

dNTP 1 μ l, RNase inhibitor 20 units, AMV 역전사효소 10 units를 첨가하고 최종부피를 DEPC 처리한 재증류수를 가하여 20 μ l로 맞춘 후 37°C에서 1 시간 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 종합효소 연쇄반응은 Saiki 등[19]의 방법에 따라 cDNA 1 μ l, sense primer 와 antisense primer 각각 50 pmoles, 10 mM dNTP 1 μ l, 10X 반응 완충용액(500 mM KCl, 100 mM Tris-Cl, pH 8.0, 40 mM MgCl₂) 5 μ l, Taq DNA polymerase 1.0 unit를 넣고 재증류수로 부피를 50 μ l로 맞춘 후 다음과 같이 반응 시켰다. 제 1 단계에서는 94°C에서 2분간 변성, 58°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 중합시키고 제 2 단계에서는 94°C에서 30초간 변성, 58°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1 분간 중합시키는 반응을 30회 반복하고, 제 3 단계에서는 94°C에서 30초 동안 변성, 58°C에서 30초 동안 annealing, 72°C에서 5분간 중합 시켰다.

합성된 RT-PCR 산물을 Sambrook 등[20]의 방법에 따라 1.0% agarose gel 전기영동을 실시하여 UV transilluminator에서 cDNA를 확인하였다.

Leptin cDNA의 subcloning 과 DNA sequencing

PCR 산물을 agarose gel 전기영동으로 분리하고 leptin cDNA 크기에 해당하는 DNA 띠를 절단해낸 다음 Gene Clean II kit(BIO 101 Inc., La Jolla CA, USA)를 이용하여 DNA를 회수하고 pT7 vector 의 BamHI 과 XhoI 제한효소 절단 부위에 삽입한 다음 Sambrook 등[20] 방법에 따라 competent *E. coli*(DH5a)에 전입시켜 형질전환 시키고 leptin cDNA가 삽입된 plasmid를 얻었다. Leptin cDNA 삽입의 확인을 위하여 각 클론에서 얻은 plasmid를 BamHI 과 XhoI 제한효소로 처리하고 leptin cDNA에 해당하는 DNA 절편이 절단되어 나오는지 여부를 agarose gel 전기영동을 실시하여 확인하였다. plasmid의 순수분리는 Sambrook 등[20] 방법으로 시행하고 plasmid에 삽입된 leptin cDNA의 염기서열 결정은 Sanger 및 Coulson의 방법[21]에 따라 시행하였다.

Leptin 단백질의 발현

GST-leptin 융합단백질을 *E. coli*에서 발현시키기 위해 RT-PCR로 합성 증폭한 leptin cDNA를 pGEX4T-3 (Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, New Jersey, USA)에

삽입하여 pGEX-4T-3-Lep을 제조하였다(Fig. 1). pGEX-4T-3 vector 1 μ g 과 BamHI 그리고 XhoI 제한효소 각각 5 units, 10x 제한효소 반응 완충용액 2 μ l를 넣고 4 차 증류수로 용액의 최종 부피를 20 μ l로 만든 후 37°C에서 1 시간 동안 반응시키고 65°C에서 10 분간 처리하여 효소기능을 비활성화 시킨 후 냉각시키고 calf intestinal alkaline phosphatase (GIBCO BRL, Grand Island, New York, USA) 1 unit 와 효소완충용액 (10 mM ZnCl₂, 10 mM MgCl₂, 100 mM Tris-Cl, pH 8.3) 2 μ l를 첨가한 후 37°C에서 45분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 6 x agarose gel loading 완충용액을 첨가하여 섞고 1% agarose gel 전기영동을 실시하였다. pT7 Blue plasmid에 subcloning 된 leptin cDNA를 BamHI 과 XhoI 제한효소로 처리 절단하고 agarose gel 전기영동한 후 gel에서 GENECLEAN kit를 이용하여 회수하고 분리된 각각의 DNA 용액 8 μ l와 10x ligase 반응액(200 mM Tris-Cl, pH 7.6, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 500 mg%, 10 mM ATP) 2 μ l, T4 DNA ligase 2.5 units을 첨가하고 증류수로 최종부피가

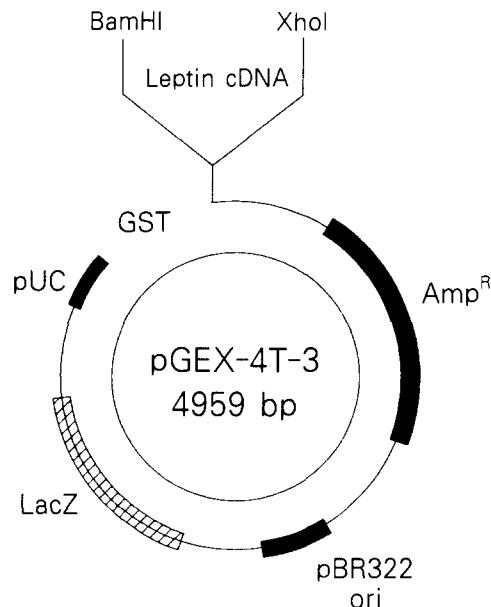


Fig. 1. Construction of leptin expression vector(pGEX-4T-3-Lep). Leptin cDNA(0.5 kb) was inserted into multicloning sites(BamHI and XhoI) of pGEX-4T-3 vector.

20 μ l 가 되도록 한 후 4°C에서 하룻밤 동안 반응시키고 *E. coli* 형질전환에 사용하였다. 형질전환된 *E. coli*로부터 plasmid를 실험 3.에서 시행한 방법으로 분리하고 leptin cDNA가 pGEX4T-3 vector에 삽입되어 있음을 같은 방법으로 확인하였다. 형질전환된 *E. coli* cell(DH5 α)를 2% 포도당이 함유된 2x YT 배양액(1.6% bacto-trypotone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl) 10 ml에 접종하고 37°C 배양기에서 하룻밤 동안 배양하고 이것을 다시 2% 포도당이 함유된 2x YT 배양액에 1:100으로 희석한 후 600 nm에서 OD값이 0.6이 될 때까지 배양한 후 0.1 M isopropyl-thiogalactoside(IPTG)를 최종농도가 0.1 mM이 되도록 첨가하고 다시 2시간 동안 배양하여 GST-leptin 융합 단백질의 합성을 유도하였다. 합성된 GST-leptin 융합 단백질의 분석을 위해 배양된 *E. coli* 세포를 원심분리하여 회수하고 세포를 초음파 진동으로 분쇄한 다음 SDS polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)을 실시하였다. SDS-PAGE는 Laemmli[12]의 방법으로 수직형 전기영동조에서 실시하였고 전기영동이 끝난 후 gel을 염색하고난 다음 탈색하여 분자량 약 44,000 dalton에 해당하는 GST-leptin 융합 단백질을 확인하였다.

Leptin 단백질에 대한 항체 제조

항-Leptin 항체 제조를 위해 *E. coli*에서 유도 합성한 GST-leptin 융합 단백질을 SDS-PAGE를 시행하여 분리하고 융합단백질 띠를 절개해낸 gel 조각을 다시 잘게 자른 후 SDS-PAGE 완충용액 3 ml와 함께 투석막에 넣고 수평 전기영동 시스템(Hoefer Scientific Instrument, San Francisco, USA)에서 1 시간동안 전기영동(100V)을 시행하였다. 다시 음극과 양극을 바꾸어 30초 동안 전기영동을 한 다음 투석막안의 용액을 회수하고 이를 냉동 건조시켰다. 이 단백질 100 μ g을 500 μ l의 PBS에 녹이고 동량의 Freund's complete adjuvant를 부가하여 유탕액을 만들어 체중 1.5 kg의 토끼에 피하주사한 다음 2 주 후에 다시 GST-leptin 융합단백질(10 μ g/500 μ l PBS)과 동량의 incomplete adjuvant와 섞어만든 유탕액을 booster로 피하 주사하였다. 그로부터 2 주 후에 토끼로부터 채혈하여 혈청을 분리 보관하였다. GST-leptin 융합단백질에 대한 항체 형성 여부 및 역가는 Harlow 및 Lane의 방법[11]에 따라 결정하였다.

마우스 조직에서 leptin 단백질의 검출

마우스 조직에서 발현된 leptin 단백질을 검출하기 위하여 마우스를 회생시키고 간, 신장, 뇌 그리고 하복부 지방조직을 절제한 후 단백질을 분리하였다. 조직(0.5 g)을 미세원침판에 넣고 얼음위에서 500 μ l의 용해용액(RIPA: 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% SDS, 50nM Tris-Cl, pH 7.5, 1mM phenylmethylsulfonylfluoride)을 가하고 조직분쇄기(OMNI 1000)를 이용하여 1분간 분쇄하고 30분간 가끔씩 진탕(vortex)하면서 얼음위에 둔 다음 4°C에서 15,000 rpm으로 10분간 원심분리하고 상층액을 새 미세원침판으로 옮긴 다음 Bradford 방법[2]으로 단백질 정량을 시행하였다. 10 μ g의 조직 단백질을 취하여 10% SDS PAGE를 실시하고 분리된 단백질은 Burnette 의 방법[3]을 이용하여 ECL-associated western blot immunodetection 기구(Amersham Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, England)를 이용하여 leptin 단백질의 발현을 확인하였다.

GST-leptin 융합단백질에 대한 1차 항체는 탈지분유(5%)가 포함된 TBST 완충용액에 1:1,000으로 희석한 토끼 항혈청을 사용하였고 horse radish peroxide가 결합된 토끼 IgG에 대한 면양 항혈청(Calbiochem, La Jolla, CA, USA)을 5% 탈지분유가 포함된 TBST 완충용액에 1:2,000으로 희석하여 2차 항체로 사용하였다.

결 과

Leptin cDNA의 subcloning

Zhang 등[3]이 cloning 한 마우스 cDNA의 단백질 코딩 부분(167 아미노산)의 염기서열중 단백질 발현 시작코돈(ATG)를 포함하고 BamHI 제한효소 인식 염기서열(GGATTC)을 끼워 넣은 sense primer와 단백질 발현 종지 코돈(TGA)을 포함한 antisense primer를 이용하고 마우스 지방조직(white fat)으로부터 분리한 mRNA를 template로 하여 RT-PCR을 시행한 결과 크기가 약 500 bp에 해당하는 DNA가 증폭 되었음을 확인하였다(Fig. 2A). 증폭된 leptin cDNA를 pT7Blue vector에 삽입하여 subcloning 하였다. pT7Blue vector에 subcloning된 leptin cDNA를 BamHI과 XbaI 제한 효소로 절단하고 agarose gel 전기영동을 시행한 후 leptin cDNA에 해당하는

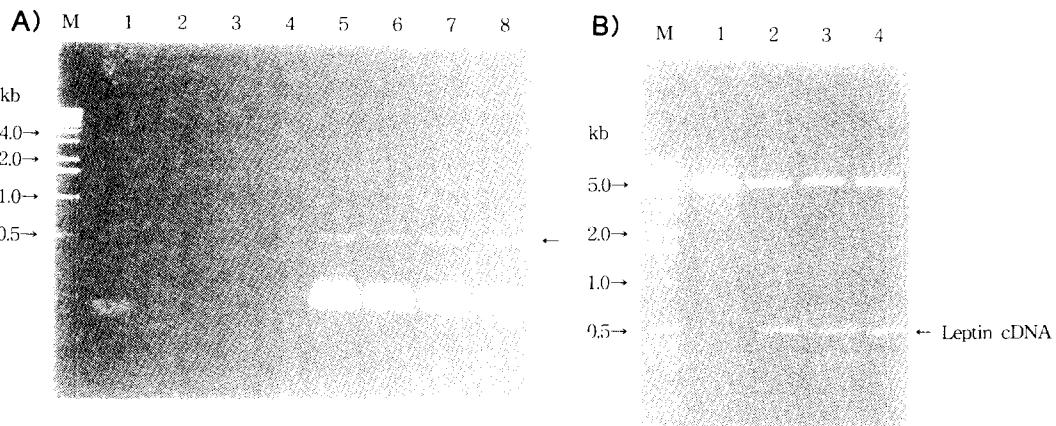


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of leptin cDNA. A, leptin cDNA(\leftarrow)amplified by RT-PCR.

cDNA was reverse transcribed from mRNA isolated from white adipose tissue of a mouse and used as the template. M; Molecular size marker(1kb ladder). 1-4; random hexamer was used in the cDNA synthesis. 5-8; antisense primer specific to leptin cDNA was used as the primer. B, Confirmation of the insertion of leptin cDNA into pGEX-4T-3 vector. M; Molecular size marker. 1-5; Plasmids obtained from *E.coli* transformed with leptin inserted vector (pGEX-4T-3-Lep)that were digested with *Bam*H and *Xba*I.

DNA 퍼(500 bp)를 gel에서 분리하고 원핵세포 단백질 발현 vector 인 pGEX-4T-3 의 multicloning site(*Bam*H & *Xba*I)에 삽입하여 subcloning 하고 *Bam*H과 *Xba*I 제한 효소로 다시 절단하고 agarose gel 전기영동한 결과 leptin cDNA(0.5 kb)가 삽입 되었음을 확인하였다(Fig. 2B). 또한 삽입된 leptin cDNA의 코돈이 pGEX-4T-3 vector 의 GST 단백질의 C-terminal 아미노산 코돈과 in frame fusion 형태로 연결되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

GST-leptin 융합 단백질의 발현 유도

pGEX-4T-3-Lep에 의해 형질전환된 *E. coli*(DH5a)의 배양액을 1:100으로 희석하고 600 nm에서 흡광도가 약 1.0이 될 때까지 배양한 후 IPTG의 최종농도가 0.1 mM이 되도록 1.0 M IPTG 용액을 투여하고 충분한 공기를 공급하면서 2시간 동안 단백질의 발현을 유도한 결과 44 kDa의 GST-leptin 융합 단백질이 다량 유도 합성되었으며 leptin cDNA가 삽입되지 않은 pGEX-4T-3 vector로 형질전환 시킨 *E. coli*(DH5a)에 같은량의 IPTG 용액을 투여하고 2시간 동안 단백질의 발현을 유도한 경우에는 26 kDa의 GST 단백질이 다량 유도 합성되었다. 그리고 비교군으로 사용한 형질전환 되지 않은 *E. coli*(DH5a)에서는 IPTG

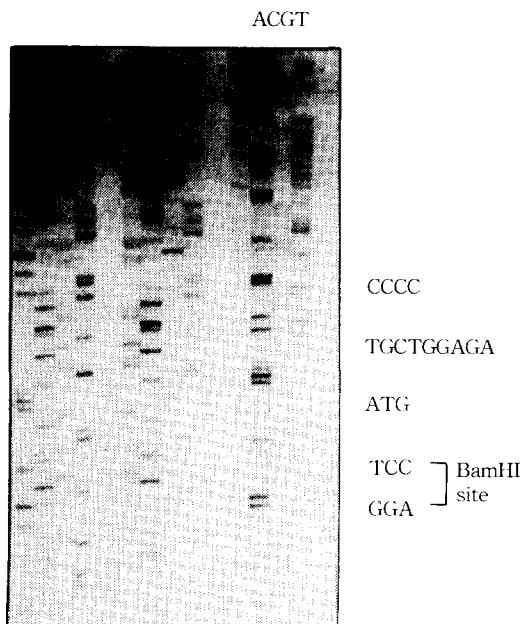


Fig. 3. DNA sequencing of leptin cDNA inserted into pGEX-4T-3.

Start codon(ATG) of leptin cDNA (GGATCCATGT-GCTGGAGACCC) infraredmed into the amino acid codon of translation vector (CTGGTTCCGCCTGGATCCCC) was confirmed.

에 의해 유도합성되는 단백질이 없었고 pGEX-4T-3-Lep 재조합 plasmid로 형질전환시킨 *E. coli*(DH5a)에 IPTG(0.1 mM)를 처리한 경우는 처리하지 않은 경우보다 plasmid vector에서 발현되는 단백질량이 많았다(Fig. 4).

GST-leptin 융합단백질에 대한 항체 제조 및 마우스 조직에서 발현된 leptin 단백질의 동정

E. coli(DH5a)에서 유도 합성된 GST-leptin 융합단백질은 대부분 봉입체(inclusion body)형태로 나타났고 수용액에서의 용해도가 극도로 낮았다. 따라서 *E. coli*(DH5a) 세포에 1% SDS 용액을 넣어 녹이고 초음파 분쇄기(Fisher sonic dismembraneator, USA)로 30초동안 최고 속도로 작동시켜 세포밖으로 용출된 고분자 염색체 DNA를 세절한 다음 SDS-PAGE 시료용액에 녹여 SDS-PAGE를 시행하고 GST-leptin 융합단백질을 분리하였다. 분리된 융합단백질을 gel에서 추출하여 토끼에 주사하여 얻은 혈청에는

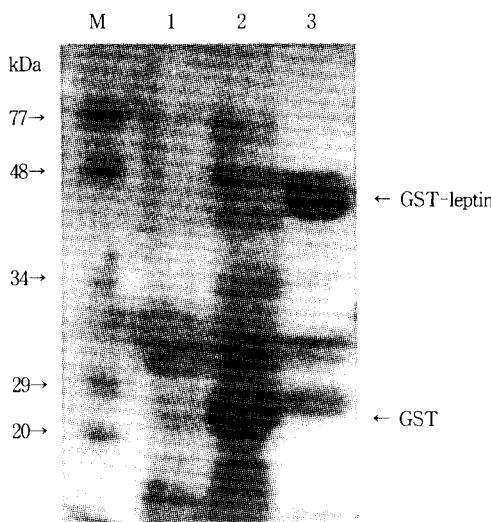


Fig. 4. SDS polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) of GST-leptin fusion protein expressed in *E. coli* (DH5a).

E. coli cells transformed with pGEX-4T-3 were cultured for 3 hours(0.6 in OD₆₀₀) and IPTG (0.1mM) was added following by further culture for another 2 hours. Cells were harvested and lysed in SDS-PAGE buffer and subjected to SDS- PAGE. M:Molecular weight marker. 1; Control (untransformed cells). 2: Cells transformed with pGEX-4T-3. 3; Cells transformed with pGEX-4T- 3-Lep.

GST-leptin 융합단백질에 대한 특이 항체가 있음을 Western blot immunodetection을 시행하여 확인 하였다(Fig. 5).

마우스 조직에서 발현되는 leptin 단백질을 검출하기 위하여 마우스 간, 신장, 뇌, 그리고 지방 조직에서 추출한 단백질을 SDS-PAGE를 실시하고 nitrocellulose membrane에 electrotransfer 하여 GST-leptin 융합단백질에 대한 항혈청을 1차 항체로 이용한 Western blot immunodetection 한 결과 뇌와 지방 조직에서는 leptin 단백질이 감지되었고 다른 조직에서는 감지되지 않았다(Fig. 6).

고 칠

Leptin cDNA는 5'쪽에 97bp leading sequence 와 167 아미노산 코딩 염기서열과 약 3.7kb 의 3' untranslation 코딩 염기서열로 구성되어있다[3]. Leptin 단백질은 167개

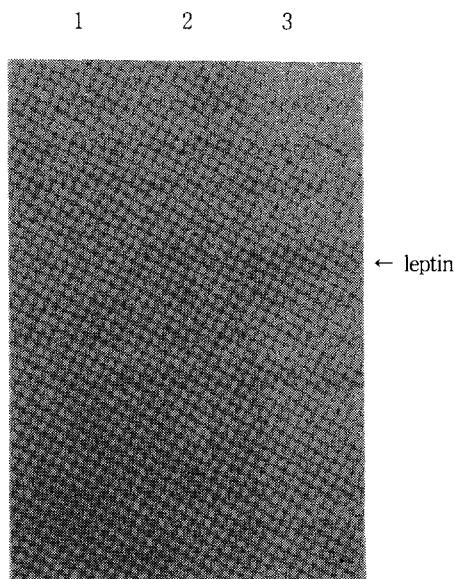


Fig. 5. Western blot immunodetection of GST-leptin protein.

E. coli cells transformed with pGEX-4T- 3-Lep and treated with IPTG(0.1 mM) were lysed and subjected to SDS-PAGE Proteins were electrotransferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted, and leptin was detected by ECL-associated immunodetection method described in the text. 1; Control(Cells untransformed). 2; Cells transformed with pGEX-4T-3-Lep without treatment with IPTG. 3. Cells transformed with pGEX-4T-3-Lep with IPTG(0.1 mM) induction.

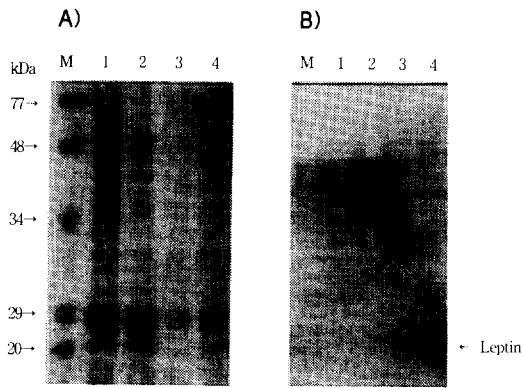


Fig. 6. Western blot immunodetection of leptin in various mouse tissues.

Proteins extracted from liver, kidney, brain and adipose tissue were separated by SDS-PAGE, blotted on nitrocellulose membrane and subjected to ECL-associated immunodetection of leptin. A) SDS-PAGE and protein staining. B) Western blot immunodetection of leptin. M: Molecular weight marker; 1, liver; 2, kidney; 3, brain; 4, adipose tissue.

의 아미노산으로 구성되어 있으며 단백질 발현 시작 코돈인 ATG의 5'쪽 3번째 염기가 adenosine으로 되어 있어 Kozak의 translation 시작 신호 염기로 되어 있으나 이 염기의 필요성은 유핵세포에서의 단백질 발현에 관련된 것 이므로 원핵세포 발현시스템인 본 연구에서는 이를 고려하지 않았다. 본 연구에서는 leptin cDNA를 *E. coli*(DH5α)에서 발현시키기 위해서 RT-PCR을 통한 leptin cDNA를 증폭하고자 하였으며 이 증폭된 cDNA는 pGEX-4T-3 vector내 GST cDNA의 translation 코돈에 leptin cDNA 코돈이 연결되어 GST-leptin 융합단백질을 합성할 수 있도록 설계하였으며 subcloning을 쉽게 하기 위하여 pGEX-4T-3의 multicloning 부위의 *Bam*H I 인식 염기서열을 ATG코돈의 5'쪽 옆에 부착하고 antisense primer에는 leptin 단백질의 C-terminal 아미노산인 cysteine 다음에 있는 translation stop 코돈(TGA) 옆에 *Xba*I 제한효소 인식 염기서열을 부착하여 주문 합성하였다. 본 연구에서는 마우스 지방조직에서 분리한 총 RNA 중 leptin mRNA로부터 역전사된 cDNA를 합성하였고 이 cDNA중 leptin 단백질을 코딩하는 염기서열 부분만을 증폭하였다. 증폭된 cDNA는 비교적 크기가 작아서(501bp) 원핵세포 translation

vector인 pGEX-4T-3에 쉽게 subcloning할 수 있었고 GST-leptin 융합단백질을 유도 합성할 수 있었다. pGEX-4T-3 plasmid는 tac promoter에 의한 발현 체계를 가지고 있는데 이것은 trp promoter 와 lac promoter 가 조합된 것으로 lac promoter와 같이 IPTG에 의해 유도가 되지만 종말 산물에 의한 feedback inhibition 이 되지 않는 promoter 이다(Amann 등, 1983; deBoer 등, 1983). 이 promoter에 의해 표현되는 단백질은 GST 와 leptin의 융합단백질 형태로 나타난다. 만일 이 융합 단백질이 가용성으로 발현된다면 glutathione을 결합시킨 affinity gel chromatography 방법으로 원하는 GST-leptin 융합단백질을 비교적 간단히 순수 분리 할 수 있다. 그러나 본 연구에서 유도 합성한 GST-leptin 융합단백질은 대부분 봉입체 형태로 나타났기 때문에 이를 affinity gel chromatography로 분리할 수 없었고 SDS-PAGE를 시행하여 분리하고 gel에서 electroelution 방법으로 용출하였으며 단백질에 SDS가 결합된 가용성 상태였다. 봉입체 형태를 예방하는 방법으로는 *E. coli*(DH5α) 배양온도를 28°-30°C로 낮추거나 IPTG 농도를 변화시키고 또는 *E. coli*(host) 균주를 바꾸는 경우[13,22] 가용성 단백질로 발현되는 경우가 있다고 하였으나 본 실험에서는 위에 설명한 조건에서도 봉입체 형성 예방 효과를 얻지 못하였다. 이 같은 사실에 관한 원인은 정확히 알 수 없으나 합성된 재조합 단백질이 정상적으로 접힘(folding)이 일어날 수 없음 반영한 것이다[16]. 봉입체에 존재하는 단백질은 대부분 변성된 형태인데 이것은 *E. coli*(DH5α) 세포질의 환원적 환경에서 일부 그 이유를 찾을 수 있다고 하였으며[24], 또는 단백질들이 이합체 혹은 종합체를 형성하거나 합성된 융합 단백질의 소수성 구조가 봉입체 구성에 중요한 역할을 할 것으로 생각하고 있다[16]. 봉입체 형태의 단백질을 가용성으로 변화시키기 위해 6-8 M urea[4], 6 M guanidium-HCl[9] 혹은 유기용매[1]등을 이용하여 변성시킨 후 서서히 산화시켜 자연상태의 구조로 변화시키는 방법이 권장되기도 했으나 아직은 만족할만한 결과를 얻기에는 기술적인 어려움이 남아있다. 본 연구에서는 8 M urea, 6 M guanidium-HCl, 1% 2-mercaptoethanol을 이용하여 봉입체를 용해시키고 다시 서서히 산화시켜 가용성 단백질로 변화시키고자 하였으나 거의 대부분의 단백질이 다시 불용성 상태로 침전되었다. 따라서 preparative SDS-PAGE

를 시행하여 44 kDa 의 융합단백질을 분리하였고 이 단백질은 SDS가 결합된 가용성 단백질이었기 때문에 분리하는 데에 큰 어려움이 없었다. 분리된 GST-leptin 용액을 Freund's adjuvant 와 혼합하여(1:1) 유탕액을 만들고 토끼의 피하에 주사하여 원하는 항 GST-leptin 항혈청을 얻었으며 이 항 혈청은 GST-leptin 융합단백질과 교차반응을 하였다. 따라서 SDS가 결합된 상태의 GST-leptin 웨타이드가 토끼에 주입되어 항원으로 작용할 수 있음을 말해주고 있다. 본 연구에서 제조한 항 GST-leptin 항혈청을 1:1000 비율로 희석하여 1차 항체로 사용한 Western blot immunodetection을 실시하였고 마우스 각 조직에서 발현된 leptin 단백질을 검출하는데 효과적으로 이용할 수 있었다. 앞으로 본 실험에서 제조한 항 GST-leptin 항체는 leptin 의 발현과 대사 그리고 기능에 관한 연구에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

동물의 식이 섭취와 체중조절에 관여하는 것으로 알려진 leptin 의 cDNA로부터 leptin 단백질을 발현시키고 이를 대한 항체를 제조하기 위하여 마우스 지방조직에서 RNA를 분리하고 이를 template로 이용하여 RT-PCR 방법으로 leptin cDNA 중 단백질을 코딩하는 부위를 증폭 합성하였다. 합성된 cDNA는 전에 보고된 염기서열과 일치하였으며 이 cDNA를 원핵세포 단백질 발현 vector인 pGEX-4T-3 에 subcloning 한다음 *E. coli*(DH5α)에 접종, 형질전환 시키고 IPTG(0.1 mM)를 처리하여 GST-leptin 융합단백질 합성을 유도한 결과 분자량 44 kDa 에 해당하는 GST-leptin 단백질이 봉입체 형태로 다량 합성되었고 이를 8 M urea, 6 M guanidium-HCl 또는 2-mercaptoethanol로 변성시킨 후 서서히 산화시켰으나 가용성 단백질로 변화되지 않고 침전된 상태로 나타났다. 불용성 상태의 GST-leptin 봉입체를 SDS-PAGE를 실시하여 분리하고 SDS-PAGE gel로부터 가용성 상태의 GST-leptin 분획을 추출한 결과 비교적 순수한 형태의 단일 웨타이드이었다. 분리된 GST-leptin 융합단백질(100 ug)을 Freund's adjuvant와 혼합(1:1)하여 유탕액을 만들고 토끼에 피하 주사하여 항 GST-leptin 항 혈청을 얻었다. 제조된 항혈청은 GST-leptin 단백질과 특이하게 교차반응을 하였고 마우스

뇌 및 지방 조직에서 발현되는 leptin 단백질의 검출을 위한 Western blot immunodetection에 사용될 수 있었다.

이상과 같은 실험 결과로 마우스의 뇌와 지방조직에서 leptin 단백질이 발현되어 있음을 알 수 있었으며 본 연구에서 제조한 항 leptin 항혈청은 leptin 의 발현, 체내 대사 및 기능에 관한 연구에 활용될 수 있을 것으로 본다.

참 고 문 헌

- Adari, H. Y., Rose, K., Williams, K. R., Konigsberg, W. H., Lin, T. C., Spicer, E. K. 1985. Cloning, nucleoside sequence, and expression of the bacteriophage T4 reg A gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)* **83**, 1901-1905.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* **72**, 248-254.
- Burnette, M. M. 1981. "Western blotting" electrophoretic transfer of protein from SDS PAGE to unmodified nitrocellulose and radioactive detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem* **112**, 195-203.
- Cabilly, S., Riggs, A. D., Pande, H., Shively, J. E., Holmes, W. E., Rey, M., Perry, L. J., Wetzel, R. and Heyneker, H. L. 1984. Generation of antibody activity from immunoglobulin polypeptide chains produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)* **81**, 3273-3277.
- Campfield, L. A., Smith, F. J., Guisez, Y., Devos, R. and Burn, P. 1995. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* **269**, 546-549.
- Cioffi, J. A., Shafer, A. W., Zupancic, T. J., Smith-Gbur, J., Mikhail, A., Platik, D. and Snodgrass, H. R. 1996. Novel B219/OB receptor isoforms: Possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nature Med.* **2**, 585-589.
- Cohen, B., Novick, D. and Rubinstein, M. 1996. Modulation of insulin activities by leptin. *Science* **274**, 1185-1188.
- Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kravciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Marco, C. C., McKee, L. J., Bauer, T. L. and Caro, J. F. 1996. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans.

- New Engl. J. Med. **334**, 292-301.
9. Goeddel, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K. and Riggs, A. D. 1979. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes in human insulin. Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) **76**, 106-110.
 10. Halaas, J. L., Gaziwala, K. S., Maffei, M., Cohen, S. L., Chait, B. T., Rabinowitz, D., Lalonne, R. L., Burley, S. K. and Friedman, J. M. 1995. Weight reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. Science **269**, 543-546.
 11. Harlow, E. and Lane, D. 1988. *Detergent lysis of monolayer cultures. Antibodies, a Laboratory Manual.* pp. 449, Cold Spring Harbor laboratory Press, N. Y.
 12. Laemmli, E. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**, 680-685.
 13. Lautzen, C., Tuchsen, E., Hansin, P. E., Skovgaard, O. 1991. BTPI and N-terminal extended analogs generated by factor Xa cleavage and cathepsin C trimming of a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. Protein Expression and Purification **2**, 372-378.
 14. Lee, G. H., Proenca, R., Montez, J. M., Carroll, K. M., Darvishzadeh, J. G., Lee, J. I. and Friedman, J. M. 1996. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. Nature **379**, 632-635.
 15. Lonnqvist, F., Thone, A., Nilsson, K., Hoffstedt, J. and Arner, P. 1995. A pathologic role of visceral fat betadrenerceptors in obesity. J. Clin. Invest. **95**, 1109-1116.
 16. Marston, F. A. O., Hartley, D. L. 1990. *Solubilization of protein aggregated Methods in Enzymology.* pp. 264-276, Academic Press Inc., San Diego, C. A.
 17. Muzzin, P., Eisensmith, R. C., Copeland, K. C. and Woo, S.L.C. 1996. Correction of obesity and diabetes in genetically obese mice by leptin gene therapy. Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) **93**, 14804-14808.
 18. Pelleymounter, M. A., Cullen, M. J., Baker, M. B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T. and Collins, F. 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. Science **269**, 540-543.
 19. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. V., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. and Erlich, H. A. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239**, 487-491.
 20. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning Laboratory Manual.* pp.9.31-9.58, 2nd ed. Cold Spring Harbor, N. Y.
 21. Sanger, F. and Coulson, A. R. 1978. The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. FEBS Letter **87**, 107-110.
 22. Takagi, H., Morinaga, Y., Tsuchiya, M., Ikemura, G. and Inouye, M. 1988. Control of folding of proteins secreted by a high expression secretion vector, pIN-III-ompA: 16 fold increase in production of active subtilisin E in *Escherichia coli*. Biotechnology **6**, 948-950.
 23. Tartaglia, L. A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G. J., Campfield, L. A., Clark, F. T., Deeds, J., Muir, C., Smutko, J. S., Mays, G. G., Woolf, E. A., Monroe, C. A. and Tepper, R. I. 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. Cell **83**, 1263-1271.
 24. Tuggle, C. K., Fuch, J. A. 1990. Glutathione reductase is not required for maintenance of reduced glutathione in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol **162**, 34-41.
 25. Zhang, Y., Proneca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature **372**, 425-432.