

글루카곤을 융합파트너로 이용한 재조합 단백질 생산 및 글루카곤 수용체 단편을 이용한 친화성 정제기술 개발

이지원 · 김대영 · V. Saraswat · 박영훈

생명공학연구소 미생물공정연구실

1. 서론

일반적으로 inclusion body가 형성되는 것은 폴리펩타이드 사슬이 연속적으로 형성되는 세포 내 환경 하에서 과발현된 상태의 재조합 단백질이 folding 중간체 단계에서 응집되는 현상을 의미한다. In-vivo 단백질 응집은 경우에 따라서는 비특이적이어서 다양한 숙주 단백질들과의 응집에 의해 목적 재조합 단백질의 응집체 내 순도를 저하시키며, 공유결합성의 단단한 응집체를 형성한다. 일반적으로 외래 단백질의 소수성 self-assembly를 유도하는 특정 융합 펩타이드의 사용은 inclusion body 상태에서 상대적으로 순수한 단백질을 쉽게 회수하는데 긍정 상 큰 장점이 있다. 펩타이드면서도 α -helix 구조를 지닌 글루카곤은 같은 α -helix 구조를 지닌 단백질류와의 직접적인 상호작용을 유도하고, 강한 자가 응집력과 수용체와의 안정한 복합체를 형성하는 특이적 결합능력을 가지고 있기 때문에 대장균으로부터 재조합 단백질 생산에 이용되는 융합 발현파트너로서 유용한 가치가 있다. 특히 특이적인 글루카곤-수용체 간의 결합은 고순도 단백질을 생산하기 위하여 특정 단백질-리간드 상호작용이 요구되는 친화성 컬럼 크로마토그래피 등의 편리한 정제수단을 제공할 수 있다.

글루카곤은 과도한 인슐린 활성화에 대하여 혈중 포도당 농도 상승을 유도하는 29개 아미노산으로 구성된 펩타이드 호르몬이다(Unger & Dobbs, 1978). X-ray 분석 결과에 의하면, 글루카곤은 α -helix 구조를 띠며, 회석용액 내에서는 분자들 사이의 자가결합(self-association)에 의해 올리고머를 형성하거나, 수용체와의 소수성 결합에 의해 α -helix 구조를 안정화시키려는 경향이 강한 것으로 보고된 바 있다(Sasaki 등, 1975). 이러한 특징은 대장균으로부터 재조합 단백질을 생산하기 위한 융합파트너로서 글루카곤을 이용하고, 분리정제에 있어서는 친화성 컬럼 크로마토그래피용 리간드로서 글루카곤 수용체를 사용할 수 있다는 타당성을 제공한다. 단백질 간의 특이적인 상호작용은 분리공정에서 상당히 효과적으로 이용될 수 있다. 특히 융합 단백질에 기초한 친화성 분리정제에 있어서 이러한 특이적 상호작용을 이용하면 공정을 상당히 단순화

시킬 수 있어 downstream 공정의 효율성을 크게 향상시킬 수 있다(Przybycien, 1998). 글루카곤 수용체는 GTP 결합 단백질(G-단백질)을 통해 adenyl cyclase에 결합하는 GPCR(G-protein coupled receptor)의 일종이다(Lok 등, 1994). 인간 글루카곤 수용체의 cDNA는 최근 cloning되어 염기서열과 구조가 밝혀졌으며(Lok 등, 1994), 글루카곤과의 결합 위치는 항체 인지 부위에 포함되는 아미노 말단 부분으로 추측되고 있다(Buggy 등, 1995)

본 논문에서는 (1) 글루카곤 또는 이의 유사체를 아미노 말단의 융합 파트너로서 이용하여 대장균으로부터 재조합 인간 인터루킨-2(rhIL-2)를 생산하고, (2) 글루카곤 결합 리간드로서 글루카곤 수용체 단편(GR120H)을 사용하는 친화성 정제 공정 개발에 관한 내용이 논의되고 있다. 결과에 의하면, 글루카곤 융합에 의해 in-vivo 상태에서 분자상호간의 S-S 결합에 의한 공유결합성 다량체 형성을 피하면서 동질성 응집체 형성을 효과적으로 유도하였다. GR120H를 리간드로 이용한 친화성 컬럼 크로마토그래피 공정에 의해 재조합 융합 rhIL-2 및 융합 magainin-2를 정제함으로써 그 효율성을 검증하였다.

2. 글루카곤의 아미노 말단 융합에 의해 유도된 단백질 분자 간의 결합특성 변화 및 소수성 자가 결합(Self-Association) 현상

rhIL-2의 융합 발현을 위하여, 다음과 같이 글루카곤과 그 유사체를 포함하는 다양한 융합파트너를 디자인하였다: T_LG(10.8kDa), T_SG(6.2kDa), G(4.7kDa), G2(8.3kDa), G3(12.0kDa), G3Δ(H)₆(11.2kDa), Gα(4.4kDa), Gβ(4.4kDa), Gγ(4.7kDa) (Fig 1). 인간 TNF(tumor necrosis factor)-α의 아미노말단에서 유래한 T_S와 T_L 펩타이드들은 다른 의약품 단백질의 고효율 생산에 있어서 매우 효과적인 융합파트너로 보고된 바 있으며(Chang 등, 1998; Shin 등, 1997; 1998), 글루카곤의 융합파트너로서의 역할을 명확히 밝히기 위해 이용되었다. 유전자 발현 후, 모든 재조합 융합 단백질들은 대장균 cytoplasm 내에서 불용성 응집체의 형태로 축적되었으며, 분

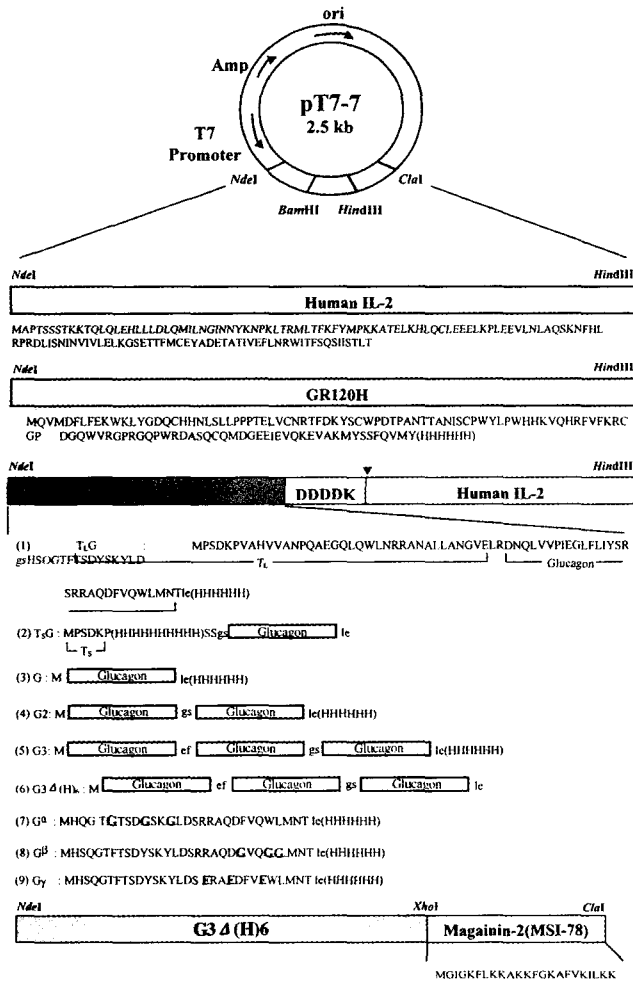


Fig. 1. Schematic presentation of recombinant expression systems: small letters in amino acid sequences represent restriction enzyme sites; polyhistidine tags were indicated in parentheses; new residues inserted by point mutation in the glucagon mutants($G\alpha$, $G\beta$, and $G\gamma$) were represented by bold and underlined letters; and symbol “▼” indicates cleavage site for enterokinase.(Amp and ori: ampicillin resistance gene and origin of replication, respectively; *NdeI*, *Bam*HI, *Hind*III, and *Cla*I: restriction enzyme sites.)

리된 응집체들은 특별한 단백질 변성제를 전혀 사용하지 않고도 pH 변화(->12->8) 만으로 용해시킬 수 있었다.

2-1. 재조합 rhIL-2의 직접발현 및 융합발현 결과 비교

용해된 응집체를 native PAGE에 걸어 Western blot 분석을 수행한 결과에 의하면, 응집체 내 rhIL-2 단백질은 고분자량의 거대 다량체(multimer)를 형성하였다(Fig. 2A). 직접 발현된 rhIL-2를 포함하는 응집체의 immunoblotting 분석 결과는 비 환원성 SDS-PAGE 조건 하에서 다양한 분자량 위치에서 면역반응성이 높게 나타남을 보여주고 있다(Fig. 2B). 반면에 환원조건 하에서는 단지 단량체(monomer)와 homo-dimer 위치

생물산업

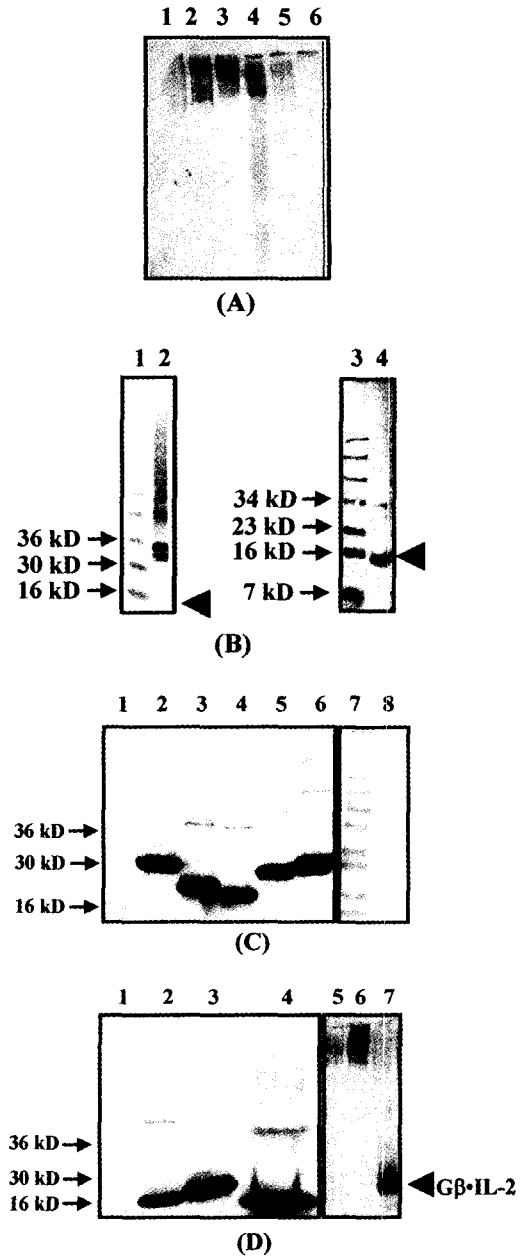


Fig. 2.(A) Result of Western blot analysis after native PAGE of inclusion bodies involving directly-expressed rhIL-2(lane 1), $T_LG \cdot IL-2$ (lane 2), $T_SG \cdot IL-2$ (lane 3), $G \cdot IL-2$ (lane 4), $G2 \cdot IL-2$ (lane 5), and $G3 \cdot IL-2$ (lane 6). (B) Result of Western blot analysis after non-reducing(lane 2) and reducing(lane 4) SDS-PAGE of inclusion bodies involving directly-expressed rhIL-2.(lanes 1,3, markers; “◀” indicates monomeric rhIL-2.) (C) Result of Western blot analysis after non-reducing SDS-PAGE of inclusion bodies involving $T_LG \cdot IL-2$ (lane 2), $T_SG \cdot IL-2$ (lane 3), $G \cdot IL-2$ (lane 4), $G2 \cdot IL-2$ (lane 5), and $G3 \cdot IL-2$ (lane 6).(lanes 1,7, markers; lane 8, total cell lysate sample from wild-type BL21(DE3)) (D) Result of Western blot analysis after non-reducing SDS-PAGE(lanes 1-4) and native PAGE(lanes 5-7) of inclusion bodies involving $G\alpha \cdot IL-2$ (lanes 2, 5), $G\beta \cdot IL-2$ (lanes 3,6), and $G\gamma \cdot IL-2$ (lanes 4,7).(lane 1, markers).

에서만 면역반응성이 나타남을 알 수 있다(Fig. 2B). 직접발현 조건 하에서는 분자 간의 비특이적인 disulfide 결합에 의해 다양한 공유결합성 다량체가 상당량 형성됨을 말해 준다. 그러나 글루카곤을 이용 융합발현된 재조합 단백질을 포함하는 응집체의 경우는 비환원성 SDS-PAGE 후 immunoblotting 분석 결과(Fig. 2C), 대부분의 면역반응 단백질이 단량체 위치에서 나타났다. 따라서, 글루카곤 융합에 의해 분자상호간의 S-S 결합은 효과적으로 억제되며, 소수성 상호작용에 의해 다량체가 형성됨을 알 수 있다.

글루카곤 유사체 $G\alpha$ 를 사용하는 융합발현에 있어서, 분리된 응집체의 native PAGE-Western blot 분석결과는 천연형 글루카곤을 사용하는 융합발현 결과와 유사하게 다량체를 형성하고 있음을 보여준다(Fig. 2D). 그러나 $G\beta$ 융합의 경우, 겔 여과 크로마토그래피를 이용한 분석 결과에 의하면, 면역반응성 다량체의 크기가 110kDa 정도로 상당히 감소되었으며(Fig 2D, lane 7), 또한 110kDa의 올리고머도 비공유결합성(소수성) 상호작용에 의해 형성된 것임을 알 수 있다(Fig 2D, lane 3).

다양한 재조합 대장균 배양을 통해 생산된 단백질 응집체를 분리 후, 응집체 내 재조합 인터루킨-2의 순도를 환원성 SDS-PAGE에 의해 측정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 재조합 단백질의 응집체 내 순도는 별현율과 특별한 연관성을 보이지 않고 있으며, 직접 발현된 rhIL-2의 응집체 내 순도는 rhIL-2와 다른 숙주단백질 사이의 비특이적 결합의 결과로 매우 낮은 반면(~40%), $G3$ (IL-2의 순도는 상대적으로 매우 향상되었음을 볼 수 있다(~80%). 재조합 단백질 T_LG 및 T_SG (IL-2의 순도는 $G \cdot IL-2$ 보다 낮아졌는데, 이는 β -sheet 구조를 지닌 인

간 $TNF-\alpha$ 의 융합이 동종 응집체 형성을 유도하는 글루카곤의 효과를 감소시키고 있음을 의미한다. 변이된 글루카곤 유사체 ($G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$)가 융합된 재조합 단백질 중 특히 $G\alpha$ 융합체의 순도는 40% 이하로 가장 낮게 나타났다(Fig.3).

2-2. In-vitro Coaggregation 연구: 융합파트너로서 글루카곤(G)과 글루카곤 유사체($G\alpha$)의 비교

재조합 융합단백질의 분자간 상호작용에 있어서 글루카곤 펩타이드의 역할을 검증하기 위해 in-vitro coaggregation 실험을 수행하였다. $G \cdot IL-2$ 와 $G\alpha \cdot IL-2$ 를 생산하는 BL21(DE3) [pT7-GIL2]와 BL21(DE3)[pT7- $G\alpha$ IL2]를 각각 배양하여 세포 파쇄 후 강한 조건(0.1M HCl) 하에서 침전된 전체 단백질 응집체(재조합 및 숙주 단백질)를 DTT(50mM)와 요소(2M)을 포함하는 강한 변성제로 용해시켰다. In-vitro coaggregation 과정은 위의 용해된 단백질 혼합물을 담고 있는 투석용 반투막 튜브 내부에서 진행되는데, 투석에 의해 DTT와 요소가 제거되면서 coaggregation이 점진적으로 일어나게 된다. 각각의 coaggregation 실험 도중 불용성 단백질 응집체는 용액 내에 전혀 형성되지 않았으며 coaggregation 산물은 환원성/비환원성 SDS-PAGE와 Western blot에 의해 분석되었다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 실험 전에는 단량체 형태의 $G \cdot$ 및 $G\alpha \cdot IL-2$ 가 비환원성 SDS-PAGE 조건 하에서도 나타나지만, coaggregation 종료 후에는 $G\alpha \cdot IL-2$ 단량체가 비환원성 SDS-PAGE에서 사라진다(Fig. 4, lane 8). 결국 대부분의 $G \cdot IL-2$ 는 소수성 상호작용에 의해 응집되는 반면, $G\alpha \cdot IL-2$ 는 분자 상호간의 공유결합(S-S 결합)에 의해 응집되는 현상을 확인할 수 있다.

2-3. 글루카곤에 의한 자가응집 및 Coaggregation의 원리

인간 인터루킨-2는 4개의 α -helix 구조가 모여 다발 형태를

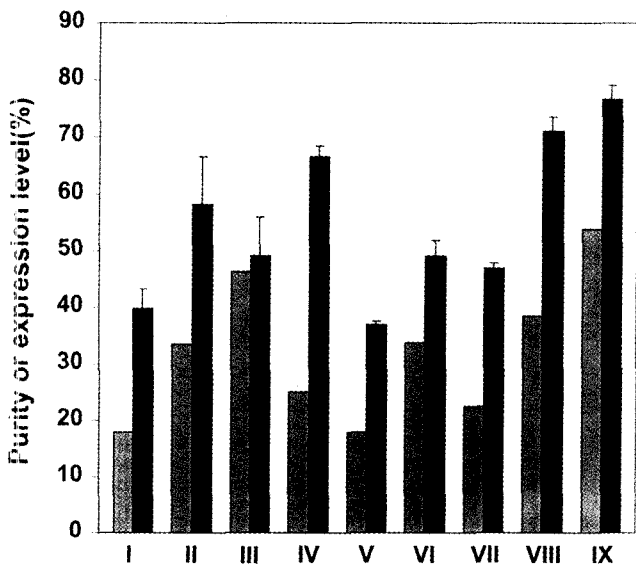


Fig. 3. Aggregate purity, % (black bars) and expression level, % (grey bars) of various recombinant proteins: directly-expressed rhIL-2(I), $T_LG \cdot IL-2$ (II), $T_SG \cdot IL-2$ (III), $G \cdot IL-2$ (IV), $G\alpha \cdot IL-2$ (V), $G\beta \cdot IL-2$ (VI), $G\gamma \cdot IL-2$ (VII), $G2 \cdot IL-2$ (VIII), $G3 \cdot IL-2$ (IX).

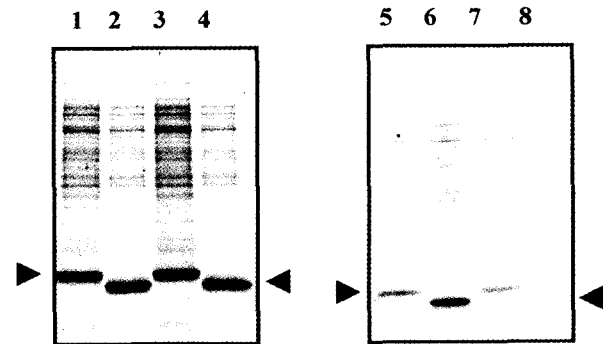


Fig. 4. Results of reducing (lanes 1,2,5,6) and non-reducing (lanes 3,4,7,8) SDS-PAGE analysis of total cellular proteins involving $G \cdot IL-2$ (lanes 1,3,5,7) and $G\alpha \cdot IL-2$ (lanes 2,4,6,8) before (lanes 1-4) and after (lanes 5-8) in-vitro coaggregation experiment. (“▶” and “◀” indicate recombinant $G \cdot$ and $G\alpha \cdot IL-2$, respectively.)

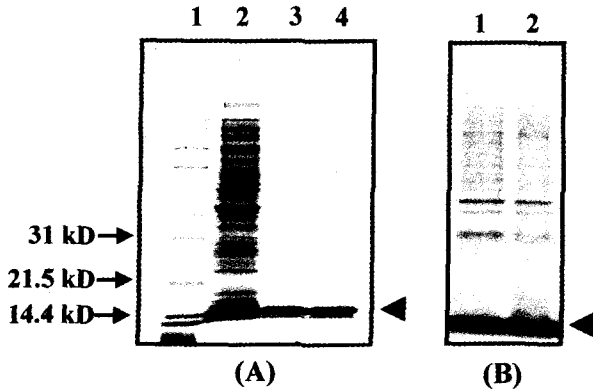


Fig. 5.(A) Result of reducing SDS-PAGE analysis of total cell lysates(lane 2) and inclusion bodies involving GR120H, before(lane 3) and after(lane 4) dissolved by simple pH shift(\rightarrow 12 \rightarrow 8).(lane 1, markers) (B) Results of reducing(lane 1) and non-reducing(lane 2) SDS-PAGE analysis of inclusion bodies involving GR120H, after dissolved by simple pH shift(\rightarrow 12 \rightarrow 8).("◀" indicates recombinant GR120H.)

이루는 "4-helix bundle protein" 부류에 속한다. 전기영동과 immunoblotting 분석에 의하면, 직접 발현된 rhIL-2는 다양한 숙주 단백질과의 disulfide 결합에 거대 다량체를 형성함을 알 수 있다. 이는 off-pathway 응집과정에서 rhIL-2 folding 중간체의 cysteine residue(Cys58과 Cys105)가 rhIL-2 분자 내부의 S-S 결합 형성에 우선하여 다른 단백질 분자들과의 disulfide 결합에 참여하고 있음을 의미한다. 그러나 글루카곤 분자가 아미노 말단에 융합된 경우는 모든 재조합 융합단백질이 분자 상호간의 disulfide 결합 없이 소수성 응집체를 형성하며, 재조합 융합단백질의 응집체 내 순도가 상당히 증가 있음을 보았다. 우선 분자상호간 결합 방식에 있어서의 커다란 변화는 N-말단 α -helical 펩타이드에 의해 같은 α -helix 구조를 지닌 rhIL-2의 뚜렷한 구조 변화(conformational change)가 유도되어 rhIL-2와 다양한 숙주 단백질과의 disulfide 결합형성이 효과적으로 억제되었다는 것이다. Sasaki 등(1975)의 보고에 의하면 글루카곤 분자의 α -helix 구조는 helix 끼리 좀더 안정적으로 결합될 수 있는 trimer 또는 그 이상의 다량체 형성을 선호한다. 합성되는 융합 단백질의 N-말단 글루카곤은 α -helix 구조로 빠르게 전환되어 folding 중간체 단계에서 전체 융합 단백질의 고유 구조형성에 기여하며 자가 응집 현상을 유도되는 것으로 여겨진다. 일반적으로 다량체에 비해 올리고머 단백질들이 더 높은 자가친화력을 가지고 있기 때문에 (Janicke & Rudolph, 1986), 3개의 α -helix 구조가 반복된 G3 펩타이드가 상대적으로 높은 자가결합력을 보유하게 되고 따라서 G3 · IL-2의 응집체 내 순도가 크게 향상되었을 것으로 보인다.

G 펩타이드 대신, G α 를 융합파트너로 사용하면 응집체 내 순도가 현저히 감소하며, 분자간의 S-S결합을 형성하는 경향 생물산업

은 훨씬 강해진다. 방향성 sidechain을 가진 세개의 소수성 아미노산의 point mutation(Phe6Gly, Tyr10Gly, Tyr13Gly) 결과는 분자상호간의 응집 특이성에 영향을 주는 중요한 구조적 변화를 수반하고 있다. 즉, Phe6, Tyr10, Tyr13을 구성하는 글루카곤의 N-말단 영역은 같은 분자 내 인터투킨-2와의 상호작용은 물론 분자상호간의 특이적 결합을 유도, 소수성 자가응집을 증진시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 즉, Phe6-Tyr10-Tyr-13의 영역은 분자상호간의 소수성 결합을 직접 유발하는 특이적 위치로 여겨진다. 다른 융합단백질과 달리 G β · IL-2는 분자량이 훨씬 작은 올리고머(~110kDa)를 형성하였다. 하나의 단백질이 다른 단백질에 비해 상대적으로 빨리 folding되거나 응집되면 다른 단백질과의 coaggregate complex 형성이 극히 억제된다는 것은 주지의 사실이다(Mitraki 등, 1993; Speed 등, 1996). C-말단의 소수성 아미노산들(Phe22, Trp25, Leu26)이 glycine으로 치환됨으로써 융합 단백질 folding 중간체의 응집 속도가 증가하여 off-pathway 응집과정에서 작은 크기의 올리고머 단계에서 응집체가 빨리 안정화되었기 때문인 것으로 여겨진다. 즉, C-말단의 glycine residue들은 폴리펩타이드를 구조적으로 유연하게 만들어 줌으로써 응집 초기 단계에서 올리고머가 열역학적으로 안정적인 구조로 빨리 전환되어 다량체 형성이 계속 진행되지 않은 것으로 추측된다. 결과적으로, N-말단 영역(Phe6-Tyr10-Tyr13)은 helix-helix docking을 통하여 융합단백질의 특이적인 구조 형성 및 자가 결합에 관련이 있는 반면, C-말단 영역(Phe22-Try25-Leu26)은 folding 중간체의 응집 과정에서 영향을 미치는 것으로 보인다.

Off-pathway 응집 반응은 일반적으로 비특이적이라는 가정이 지배적이었지만, 이러한 응집현상이 비특이적인 coaggregation 보다는 folding 중간체의 특이적인 상호작용에 의해 일어날 수 있다고 최근 보고된 바 있다(Speed 등, 1996). 본 연구에 의해 밝혀진 바와 같이 융합단백질의 응집 특이성은 N-말단 융합 펩타이드인 글루카곤의 아미노산 서열에 매우 민감하였다. 따라서 특이적 분자 상호작용에 의해 합성된 단백질의 구조 변화, folding 및 단백질 간의 결합방식을 효과적으로 조절할 수 있는 융합 펩타이드가 개발된다면 재조합 단백질 생산공정 개발에 매우 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

3. 글루카곤 수용체를 이용한 친화성 정제

3-1. 대장균을 이용한 재조합 수용체 단편의 제조

인간 글루카곤 수용체는 7개로 추정되는 transmembrane (TM) 영역을 포함하는 477개 아미노산으로 구성된 단백질이다(Lok 등, 1994). Signal 펩타이드와 첫번째 TM 서열 사이의 119개 아미노산(Gln27 - Tyr 145) 부분이 세포 외부 영역으로 추정되며 글루카곤과 특이적으로 결합하는 부위이다(Bugg 등,

1995; Lok 등, 1994). Polyhistidine tag(H6)을 C-말단에 융합시켜 글루카곤 수용체의 세포 외 단편을 T7 promoter를 이용, 재조합 대장균에서 생산하였다.(Fig. 1) 생산된 재조합 단백질(GR120H, 14.8 kDa)은 불용성 응집체의 형태로 세포 내에 축적되었으며 분리된 응집체는 역시 pH 조절(->12-> 8) 만으로 간단히 용해되었다.(Fig. 5A) Fig. 5B에서 보는 바와 같이 용해된 GR120H의 대부분이 비환원성 SDS-PAGE에서도 단량체 위치에 나타남으로써 분자 간의 S-S 결합은 극히 미미함을 알 수 있다. Tris-HCl 완충용액(20mM, pH 8)에 용해된 GR120H는 Ni²⁺-Sephacel 컬럼에 충전된 후, His-tag의 Ni²⁺ 킬레이팅 작용에 의해 고정되었다.(Fig. 6A)

3-2. 친화성 컬럼 크로마토그래피 및 GR120H 리간드의 안정성

세포 내 단백질 혼합물로부터 G3Δ(H)₆·IL-2를 정제하기 위해 앞의 친화성 크로마토그래피 컬럼(GR120H-Ni²⁺-Sephacel)을 이용하였다. 우선, 글루카곤 분자의 α-helix 구조

를 유지하면서도 G3Δ(H)₆·IL-2 다량체를 효율적으로 해체, 작은 분자량의 올리고머로 만들기 위해 특정 용액(urea(요소), 0.5M NaCl, 50mM imidazole, 20mM Tris-HCl 완충용액(pH 8), 단백질 농도 0.16 g/L)에 포함되는 요소 농도를 변화시켜 그 영향을 조사하였다. Fig. 6B에서 보듯, 요소 농도가 1M 이하인 영역에서 G3Δ(H)₆·IL-2의 순도가 현저히(90% 이상) 증가하였다. 또한 Fig. 6C에 의하면 G3Δ(H)₆·IL-2는 GR120H가 결합되지 않은 Ni²⁺-Sephacel 컬럼에 의해서는 정제되지 않았으며, 이러한 결과로부터 재조합 G3Δ(H)₆·IL-2는 GR120H 리간드와의 특이적 결합에 의해 정제됨을 알 수 있다. G3Δ(H)₆·IL-2의 정제결과는 역상 HPLC분석의 결과에서도 확인할 수 있다.(Fig. 6E)

친화성 리간드로서 GR120H의 효율성 검증을 목적으로, 세포 파쇄 후 단백질 혼합물에서 G3Δ(H)₆·M(재조합 융합 magainin-2)을 정제하기 위해 같은 친화성 컬럼(GR120H-Ni²⁺-Sephacel)을 사용하였다. 재조합 G3Δ(H)₆·M의 발현

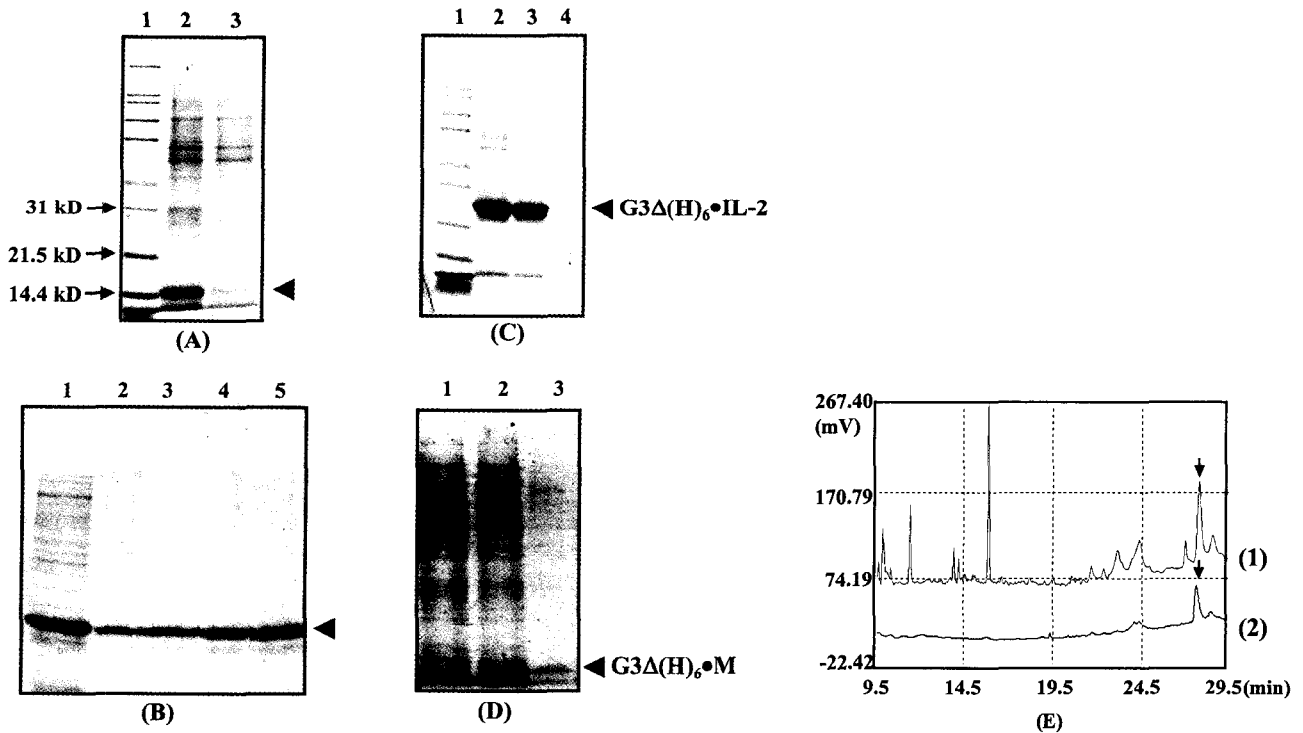


Fig. 6.(A) GR120H binding to Ni²⁺-Sephacel column, analyzed by reducing SDS-PAGE: lane 1, markers; lane 2, inclusion bodies involving GR120H, dissolved by simple pH shift(->12->8)("load-in" solution); lane 3, effluent of unbound proteins from the column("load-out" solution). (B) Purification of G3Δ(H)₆·IL-2 using GR120H-Ni²⁺-Sephacel column, analyzed by reducing SDS-PAGE: lane 1, total intracellular proteins containing G3Δ(H)₆·IL-2("load-in" solution); lanes 2-5, eluted solutions from the column loaded with 2 M(lane 2), 1 M(lane 3), 0.5 M(lane 4), and 0.2 M(lane 5) urea. (C) Purification of G3Δ(H)₆·IL-2 using Ni²⁺-Sephacel column(GR120H-unbound), analyzed by reducing SDS-PAGE: lane 2, total intracellular proteins containing G3Δ(H)₆·IL-2("load-in" solution); lane 3, effluent of unbound proteins from the column("load-out" solution); lane 4, eluted solution from the column.(lane 1, markers) (D) Purification of G3Δ(H)₆·M using GR120H-Ni²⁺-Sephacel column, analyzed by reducing SDS-PAGE: lane 1, total intracellular proteins from non-induced recombinant culture; lane 2, total intracellular proteins from induced recombinant culture("load-in" solution); lane 3, eluted solution from the column. (E) Purification of G3Δ(H)₆·IL-2 using GR120H-Ni²⁺-Sephacel column, analyzed by C8 reverse-phase HPLC: chromatograms 1 and 2 were obtained by analyzing the same "load-in" and eluted solutions, shown in lanes 1 and 4, respectively, in Fig. 6B.

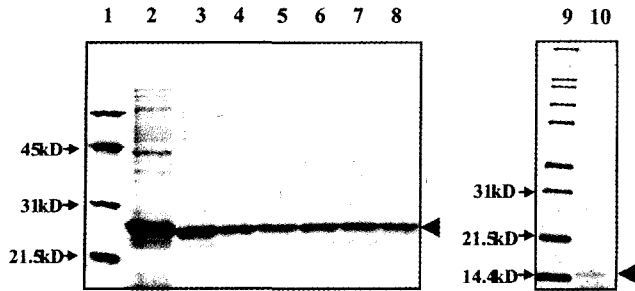


Fig. 7. Purification of $G3\Delta(H)_6 \cdot IL-2$ through multiple cyclic operation of affinity chromatography using GR120H- Ni^{2+} -Sepharose column, analyzed by reducing SDS-PAGE: lane 2, "load-in" solution of total intracellular proteins containing $G3\Delta(H)_6 \cdot IL-2$; lanes 3-8, eluted solutions at 1st, 10th, 20th, 30th, 40th, and 50th column chromatography, respectively; "◀" indicates $G3\Delta(H)_6 \cdot IL-2$. (lane 1, 9, markers; lane 10, GR120H eluted by passing 0.5 M imidazole after 50th operation is finished, indicated by "◀".)

율이 5%이하의 낮은 수준임에도 불구하고, $G3\Delta(H)_6 \cdot M$ 는 친화성 리간드인 GR120H의 작용으로 효율적으로 정제 되었다(Fig. 6D). 결론적으로, 박테리아 발현 시스템을 사용하여 재조합으로 합성된 GR120H 리간드는 Ni^{2+} -Sepharose 컬럼에 고정화된 후, 융합파트너인 아미노 말단의 글루카곤 펩타이드가 선택적으로 결합할 수 있는 구조를 유지함으로써 친화성 리간드로서의 역할을 성공적으로 수행하였다.

단백질 리간드인 GR120H의 안정성을 조사하기 위하여 재조합 $G3\Delta(H)_6 \cdot IL-2$ 정제를 위한 친화성 크로마토그래피 공정을 GR120H- Ni^{2+} -Sepharose 컬럼을 이용, 50회 반복하였다. Fig. 7(lane 3-8)의 결과에서 보듯이, $G3\Delta(H)_6 \cdot IL-2$ 에 대한 GR120H 리간드의 특이적 친화력은 50회의 반복 공정에서도 안정하게 유지되어 모든 정제공정이 성공적으로 수행되었다. 50회의 정제공정 이후, 0.5M imidazole에 의해 컬럼 내의 GR120H 리간드가 elution됨을 확인하였다.

3-3. 재조합 수용체 단편의 친화성 정제공정에서의 응용

Ni^{2+} -Sepharose 컬럼에 고정화된 GR120H는 재조합 융합 단백질인 $G3\Delta(H)_6 \cdot IL-2$, $G3\Delta(H)_6 \cdot M$ 모두에 대해 분자 간의 상호작용에 있어 상당한 특이성이 있었다. 비록 최근 동물세포배양을 통해 생산된 글루카곤 수용체(Buggy 등, 1995; MacNeil 등, 1994)와의 구조적인 동일성이 확인되지는 않았지만, 고정화된 재조합 GR120H가 효과적으로 renaturation 되었고, 천연형 수용체와 같이 글루카곤 분자에 대한 특이적 결합 친화력을 유지하고 있음을 의미한다. 재조합 단백질의 컬럼 내 고정화는 최근 단백질 refolding 측면에서 많은 장점이 있다고 보고된 바 있다. 두가지 chloroplast 막 단백질(Toc 75와 LHC2)(Rogl 등, 1998)과 박테리아의 prosubtilisin(Volkov & Jordan, 1996)의 refolding에서 확인된 바와 같이 컬럼 고정

생물산업

화는 단백질끼리의 재응집을 막는데 효과적일 수 있다. 반응 집 효과의 이유는 컬럼 내의 미세 담체 물질이 folding 중간체 간의 소수성 결합을 막아주는 chaperone과 같은 기능을 가지기 때문인 것으로 추측되고 있다(Rogl 등, 1998).

글루카곤 융합 단백질 용액에 특정 양의 요소(0.5-1.0 M)를 가했을 때는, $G3\Delta(H)_6 \cdot IL-2$ 의 다량체 일부가 해체, 올리고머화되어 GR120H에 대한 결합 효율성을 증진시켜 회수 정제율이 높아진 것으로 생각된다. 고농도의 요소(2M)에서 $G3\Delta(H)_6 \cdot IL-2$ 의 정제순도가 낮아진 것은 단백질 변성(helix uncoiling)에 의해 GR120H에 대한 결합 특이성이 감소된 것이 원인으로 여겨진다. 고농도 요소에 의한 글루카곤의 helix uncoiling은 요소가 GR120H와 글루카곤 융합단백질 사이의 특이적 결합력을 없애줌으로써 효과적인 eluent로서 사용될 수 있음을 의미한다.

특이적 분자 상호작용으로 특정 단백질에 대한 선택적 친화력을 갖는 새로운 친화성 리간드의 개발문제는 단백질 융합을 이용한 친화성 크로마토그래피에서 매우 중요한 영역 중의 하나이다. 새로운 단백질 리간드를 개발하기 위해서는 저비용 발현시스템에 의한 대량 생산이 가능해야 하고 장기간 이용이 가능한 안정성이 검증되어야 한다(Boder & Wittrup, 1997; Georgiou 등, 1997; Lima 등, 1997; Nord 등, 1997; Triplet 등, 1996). 이러한 관점에서 볼 때 글루카곤 수용체 유래의 GR120H는 친화성 컬럼 크로마토그래피를 위한 효과적인 단백질 리간드로서 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Struhl, K., Chanda, V.B. 1988. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York.
2. Boder, E.T., Wittrup, K.D. 1997. Yeast surface display for screening combinatorial libraries. *Nat. Biotechnol.* **15**: 553-557.
3. Buggy, J., Rossomando, A., MacDougall, M., Mierz, D., Wunderlich, D., Yoo-Warren, H. 1995. Human glucagon receptor monoclonal antibodies: antagonism of glucagon action and use in receptor characterization. *Horm. Metab. Res.* **28**: 215-219.
4. Cha, S.-S., Kim, J.-S., Cho, H.-S., Shin, N.-K., Jeong, W., Shin, H.-C. 1998. High resolution crystal structure of a human tumor necrosis factor- α mutant with low systemic toxicity. *J. Biol. Chem.* **273**: 2153-2160.
5. Chang, S.G., Kim, D.Y., Choi, K.D., Shin, J.M., Shin, H.C. 1998. Human insulin production from a novel mini-proinsulin which has high receptor-binding activity. *Biochem. J.* **329**: 631-635.
6. Chrnyk, B.A., Evans, J., Lillquist, J., Young, P., Wetzel,

- R. 1993. Inclusion body formation and protein stability in sequence variants of interleukin-1 beta. *J. Biol. Chem.* **268**: 18053-18061.
7. Cleland, J.L. 1993. Impact of protein folding on biotechnology. In: Cleland, J.L. editor. Protein folding: In vivo and in vitro. American Chemical Society Symposium Series No. 526, Washington DC. p. 1-21.
8. Georgiou, G., Stathopoulos, C., Daugherty, P.S., Nayak, A.R., Iverson, B.L., Curtiss, R. 1997. Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nat. Biotechnol.* **15**: 29-34.
9. Hendrick, J.P., Hartl, F-U. 1993. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **62**: 349-384.
10. Hasse-Pettingell, C.A., King, J. 1988. Formation of aggregates from a thermolabile in vitro folding intermediate in P22 tailspike maturation. *J. Biol. Chem.* **263**: 4977-4983.
11. Ikemura, H., Tagaki, H., Inouye, M. 1987. Requirement of pro-sequence for the production of active subtilisin E in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**: 7859-7864.
12. Jacob, L., Zasloff, L.M. 1994. Potential therapeutic applications of maganins and other antimicrobial agents of animal origin. In: Antimicrobial Peptides, Ciba Foundation Symposium 186, John Wiley & Sons, Chichester. p. 197-223.
13. Jaenicke, R., Rudolph, R. 1986. Refolding and association of oligomeric proteins. *Methods Enzymol.* **131**: 218-250.
14. Lima, V.L.M., Correia, M.T.S., Cechinel, Y.M.N., Sampaio, C.A.M., Owen, J.S., Coelho, L.C.B.B. 1997. Immobilized Cratylia mollis lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyl transferase. *Carbohydr. Polym.* **33**: 27-32.
15. Lok, S., Kuijper, J.L., Jelinek, L.J., Kramer, J.M., Whitmore, T.E., Sprecher, C.A. 1994. The human glucagon receptor encoding gene: structure, cDNA sequence and chromosomal localization. *Gene* **140**: 203-209.
16. MacNeil, D.J., Occi, J.L., Hey, P.J., Strader, C.D., Graziano, M.P. 1994. Cloning and expression of a human glucagon receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**: 328-334.
17. Mitraki, A., King, J. 1989. Protein folding intermediates and inclusion body formation. *BioTechnology.* **7**: 690-697.
18. Mitraki, A., Danner, M., King, J., Seckler, R. 1993. Temperature-sensitive mutations and second-site suppressor substitutions affect folding of the P22 tailspike protein in vitro. *J. Biol. Chem.* **268**: 20071-20075.
19. Nord, K., Gunneriusson, G., Ringdahl, J., Stahl, S., Uhlen, M., Nygren, P-A. 1997. Binding proteins selected from combinatorial libraries of an(-helical bacterial receptor domain. *Nat. Biotechnol.* **15**: 772-777.
20. Przybycien, T.M. 1998. Protein-protein interactions as a means of purification. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**: 164-170.
21. Rogl, H., Kosemund, K., Kuhlbrandt, W., Collinson, I. 1998. Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilized by nickel chelating chromatography. *FEBS Lett.* **432**: 21-26.
22. Saen, J.L., Agard, D.A. 1989. The alpha-lytic protease pro-region does not require a physical linkage to activate the protease domain in vivo. *Nature* **341**: 462-464.
23. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS USA* **74**: 5463-5467.
24. Sasaki, K., Dockerill, S., Adamiak, D.A., Tickle, I.J., Blundell, T. 1975. X-ray analysis of glucagon and its relationship to receptor binding. *Nature* **257**: 751-757.
25. Shin, C.S., Hong, M.S., Bae, C.S., Lee, J. 1997. Enhanced production of human mini-proinsulin in fed-batch cultures at high cell density of *Escherichia coli* BL21(DE3)[pET-3aT2M2]. *Biotechnol. Prog.* **13**: 249-257.
26. Shin, C.S., Hong, M.S., Bae, C.S., Kim, D.Y., Shin, H.C., Lee, J. 1998. Growth-associated synthesis of recombinant human glucagon and human growth hormone in high-cell-density cultures of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 364-370.
27. Silen, J.L., Frank, D., Fujishige, A., Bone, R., Agard, D.A. 1989. Analysis of prepro-alpha-lytic protease expression in *Escherichia coli* reveals that the pro region is required for activity. *J. Bacteriol.* **171**: 1320-1325.
28. Speed, M.A., Wang, D.I.C., King, J. 1996. Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: The molecular basis of inclusion body composition. *Nat. Biotechnol.* **14**: 1283-1287.
29. Tabor, S., Richardson, C.C. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/ promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *PNAS USA* **82**: 1074-1078.
30. Tripet, B., Yu, L., Bautista, D.L., Wong, W.Y., Irvin, R.T., Hodges, R.S. 1996. Engineering a *de novo*-designed coiled coil heterodimerization domain for the rapid detection, purification and characterization of recombinantly expressed peptides and proteins. *Protein Eng.* **9**: 1029-1042.
31. Unger, R.H., Dobbs, R.E. 1978. Insulin, glucagon, and somatostatin in the regulation of metabolism. *Ann. Rev. Physiol.* **40**: 307-343.
32. Unger, R.H., Orci, L. 1981. Glucagon and the A cell: physiology and pathophysiology. *N. Engl. J. Med.* **304**: 1518-1524.
33. Volkov, A., Jordan, F. 1996. Evidence for intramolecular

- processing of prosubtilisin sequestered on a solid support. *J. Mol. Biol.* **262**: 595-599.
34. Wetzel, R. 1992. Stability of protein pharmaceuticals. In: Ahern, T.J., and Manning M.C. editors. *In vivo* pathways of degradation and strategies for protein stabilization, Plenum Press. p. 43-88.
35. Wetzel, R. 1994. Mutations and off-pathway aggregation of proteins. *TIBTECH* **12**: 193-198.
36. Winther, J.R., Sorensen, P. 1991. Propeptide of carboxypeptidase Y provides a charperone-like function as well as inhibition of the enzymatic activity. *PNAS USA* **88**: 9330-9334.
37. Zhu, X., Ohta, Y., Jordan, F., Inouye, M. 1989. Pro-sequence of subtilisin can guide the refolding of denatured subtilisin in an intermolecular process. *Nature* **339**: 483-484.