

젖소 초유로부터 TGF-β 1의 정제

남명수[†] · 배형철 · 김평현* · 김완섭** · 고준수**

충남대학교 동물자원학부, *강원대학교 미생물학과, **강원대학교 축산가공학과

Purification of TGF-β 1 from Bovine Colostrum

Myoung-Soo Nam[†], Hyoung-Choul Bae, Pyeung-Hyeun Kim*, Wan-Sub Kim** and Juhn-Su Goh**

Division of Animal Science & Resources, Chungnam National University, *Department of Microbiology,

**Department of Animal Food Science and Technology, Kangwon National University

Abstract

Bovine colostrum contains various bio-functional proteins. Especially, transforming growth factor-β 1 (TGF-β 1) has a function in concerns with immune response. The purpose of this study was to establish the purification processing of transforming growth factor-β 1(TGF-β 1). The highest concentration of TGF-β 1 was measured within 48 h after parturition in bovine colostrum using ELISA kit. Purification of TGF-β 1 from whey protein was carried out by the gel filtration, AF-heparin chromatography and AF-heparin rechromatography. After final purification step, TGF-β 1 with a molecular weight of 25 kD was obtained, and confirmed by silver staining and western blotting. Finally, TGF-β 1 was identified native form of 25 kD and reducing form of 12.5 kD by reducing agent.

Key words : transforming growth factor-β 1, bio-functional proteins, bovine colostrum.

서 론

우유는 영양적으로 우수한 식품일 뿐만 아니라 다양한 생리활성물질을 함유하고 있다. 우유단백질은 casein과 유청단백질인 β-lactoglobulin, β-lactalbumin, serum albumin 등이 주된 성분으로 구성되어 있다. 미량성분으로서 생리활성 기능을 가지고 있는 lactoferrin을 비롯한 우유성장인자(MGF)로 불리는 상피세포성장인자(Read et al. 1984), 인슐린유사성장인자(Francis et al., 1988), 변환성장인자(Cox and Burk, 1991)등이 초유에 함유되어 있다. 우유로부터 유래된 성장인자는 유선발달 및 분화(Collier et al. 1993), 태아의 면역체계 발달(Ishizaka et al., 1994; Donnet-Hughes et al., 1995), 소화관 성장 및 성숙(Read et al., 1984), 태아영양(Nagashima et al., 1990) 등에 관여한다. 이 중에서 transforming-growth

factor-β (TGF-β)는 세포의 성장, 분화 및 조직복구 등의 기능을 하는 구조적으로 관련된 다양한 기능을 하는 슈퍼패밀리로 알려져 있다(Roberts and Sporn, 1993). TGF-β는 불활성 전구물질로 합성되고 잠재관련단백질(LAP)로 존재하다가 25 kD의 활성형 dimeric protein이 되도록 전구물질의 carboxyl-terminal로부터 절단되어진다. 포유동물 세포에서는 TGF-β(TGF-β 1, TGF-β 2, TGF-β 3)의 3개 동형은 9개의 cystein 위치를 포함하여 높은 상동성을 갖는 특성이 있는 것으로 밝혀졌다(Roberts and Sporn, 1989). 본 연구에서는 이미 보고된 Tokuyama와 Tokuyama(1993)의 방법을 변형하여 TGF-β 1을 젖소의 초유로부터 정제하여 식품소재 및 의약품소재로 이용하기 위한 기초자료를 얻고자 수행하였다.

재료 및 방법

유즙에 함유된 TGF-β 1 측정 및 유청단백질 분리
충남대학교 동물사육장에서 사육중인 Holstein종 젖소에서 분만후 72시간 이내의 신선한 초유를 수집하여 냉동보관

[†]Corresponding author : Myoung Soo Nam, Division of Animal Science & Resources, Chungnam National University, 220, Kung-dong, Yusung-ku, Taejeon, Tel : 042-821-5782, Fax : 042-823- 2766, e-mail : nams00@cnu.ac.kr

하면서 실험에 사용하였다. 초유를 4°C에서 8,000 rpm으로 원심분리하여 지방을 제거하여 탈지유를 제조하였다. 탈지유에 1 N HCl을 첨가하여 pH 4.6으로 조정하여 원심분리후 casein과 유청을 분리하였다. 분리한 유청에 1 N HCl로 pH 2.0으로 조정후 4시간 방치하여 분자량 10 kD의 투석막(Sigma, St. Louis, MO)을 이용하여 투석시키고 동결건조하여 정제에 사용하였다.

Gel Filtration Chromatography

Gel filtration 용 Sephadex-G 50 (Sigma)을 증류수로 충분히 부풀리고 공기를 제거한 다음 column(1.5×100 cm)에 충전하여 1 M 초산으로 평형화 시켰다. 유청단백질 50 mg을 1 M acetic acid 용액으로 녹여 컬럼에 주입하고 20 mL/hr의 용출속도로 분획수집기에 2.5 mL/tube씩 분획하였다. 분획한 샘플은 spectrophotometer(Bio-Rad, CA, USA)로 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

TGF-β1 정량

각 단계별 TGF-β1 정량은 R&D Systems(Minneapolis, MN, USA)회사의 효소결합면역분석(ELISA) kit (TGF-β1 정량용)을 이용하여 측정하였다.

AF-Heparin Chromatography

Gel filtration chromatography에서 TGF-β1이 많이 함유된 분획(64~78번)을 회수하여 동결건조시킨 다음 AF-Heparin (Pharmacia-Biotech, alameda, CA)으로 컬럼을 제작하여 흡착시키고 흡광도가 0이 될 때까지 충분히 column을 세척한 후 1 M 초산에 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 M의 CH₃COONa를 함유하는 용액으로 단계별 농도구배 방법으로 30 mL/hr의 유속으로 용출하여 얻은 분획을 280nm에서 흡광도를 측정하였다. AF-Heparin rechromatography도 AF-Heparin chromatography에서 TGF-β1이 많이 함유된 분획(14~18번)을 회수하여 동결건조시킨 다음 같은 방법으로 수행하였다.

은염색

전기영동할 각 분획을 취하여 speed vac으로 농축시켜 SDS-PAGE(12.5% acrylamide 농도)를 비환원 조건하에서 수행하였다. 전기영동을 수행한 gel를 Bio-Rad 은염색 kit를 이용하여 은염색을 수행하였다.

TGF-β 1의 Western Blotting

정제한 TGF-β1의 항원성 및 환원형을 확인하기 위하여 2-mercaptoethanol을 처리하여 환원시킨 후 전기영동을 수행한 다음 gel에서 분리된 단백질을 Nitrocellulose membrane으

로 옮겼다. Nitrocellulose 막에 Rabbit anti-human TGF-β1 단일클론항체(R&D)를 이용하여 Western blot을 실시하였다. Rabbit anti-human TGF-β1 monoclonal antibody(1:1,000)를 반응시켰다. 다음 PBS-T로 Nitrocellulose membrane 세척 후 2차 항체인 anti-IgG HRP(Sigma)를 1:1,000으로 반응시키고 발색제인 4-chro-1-naptal(Sigma)로 발색시켰다.

결과 및 고찰

송아지 분만 후 1일째 아침과 저녁, 2일째 아침과 저녁, 3일째 아침과 저녁, 4일째 아침과 저녁에 각각 초유를 수집하여 TGF-β1의 함량을 sandwich ELISA 방법으로 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. 분만 후 1일째 아침은 약 150 ng/mL, 저녁은 약 90 ng/mL 함유하고 있었고 2일째 아침은 약 115 ng/mL, 저녁은 95 ng/mL 함유하고 있었다. 분만 후 3일째, 4일째는 TGF-β1의 함량이 급격히 떨어져서 약 40~50 ng/mL 정도 함유하고 있음을 알 수 있었다. 따라서 본 실험에서 사용하는 초유는 TGF-β1의 함량을 많이 함유하고 있는 1일째와 2일째 초유를 이용하였다. 젖소 초유로부터 분리하여 동결건조한 유청단백질 50 mg을 Gel filtration column에 주입하여 1 M 초산으로 용출한 결과는 Fig. 2와 같이 두 개의 peak로 분리되었다. 분리된 peak에서 분획을 취해 TGF-β1 함량을 측정된 결과는 Fig. 1의 막대그래프에 나타난 바와 같다. 76 번 분획이 가장 높은 34,000 pg/mL이었고 전체적으로 첫 번째 peak에서 높게 나타났다. Fig. 2는 각 분획을 전기영동하여 은염색한 결과로 첫 번째 peak 즉 68, 72, 76 분획은 immunoglobulin, lactoferrin, serum albumin, β-lactoglobulin의 밴드가 보이고 분자량 약 25 kD의 TGF-β1 밴드도 확인할 수 있었다. 84, 90, 94, 98, 104번 분획은 β-lactoglobulin과 α-lactalbumin의 band가 나타났다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 TGF-β1 밴드는 β-lactoglobulin이나 α

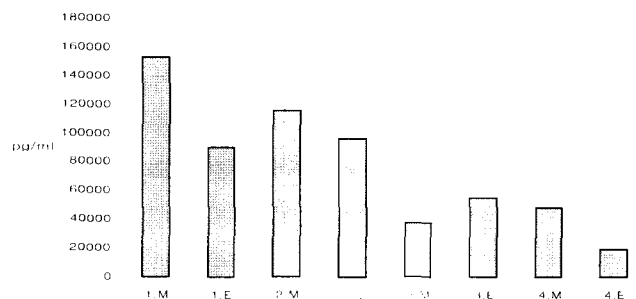


Fig. 1. TGF-β 1 concentration of bovine colostrum whey within 1st, 2nd, 3rd and 4th day after parturition. TGF-β 1 assay was carried out by sandwich ELISA method. M : morning, E : evening.

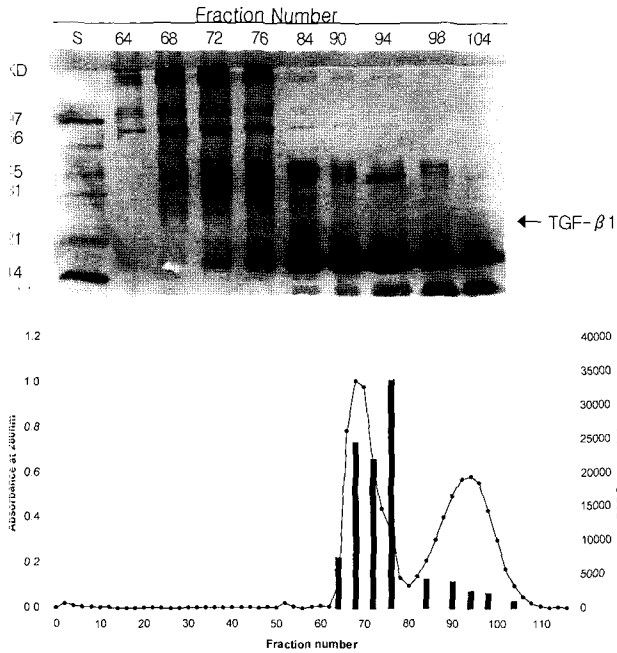


Fig. 2. Silver-stained SDS-PAGE(12.5%) analysis of selected column fraction from gel filtration chromatography. Gel filtration chromatography of the bovine whey protein on Sephadex G-50 in 1 M-acetic acid. The bovine whey protein (50 mg) was applied to a column(2.5×1,000 mm) previously equilibrated with 1 M-acetic acid. The column was eluted with 1 M acetic acid at a flow rate of 16 mL/hr. Each fraction was 2.3 mL, of which 0.5 mL was assayed for TGF- β 1 concentration by ELISA.

β -lactalbumin 밴드에 비해 약하게 나타남을 알 수 있다. Gel filtration chromatography 수행에서 TGF- β 1이 많이 함유된 분획(64~78번 분획)을 회수하여 동결건조시켜 AF-Heparin 컬럼에 완전히 흡착시켰다. 흡착된 AF-Heparin 컬럼을 1M 초산에 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 M의 CH₃COONa를 함유하는 용액으로 stepwise gradient로 용출한 결과는 Fig. 3과 같다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 3개의 작은 peak와 하나의 큰 peak로 나타나고 있는데 이 peak들의 TGF- β 1 함량을 측정된 결과는 12번 분획이 TGF- β 1을 6,900 pg/mL 정도로 가장 많이 함유하고 있는 것으로 확인되었고 0.3 M CH₃COONa에서 용출되었다. 각각의 분획들을 전기영동하여 silver stain 한 결과 12번 분획은 TGF- β 1의 band가 보이고 18, 20, 22, 23번 분획은 serum albumin과 β -lactoglobulin, 25, 26, 27번 분획은 β -lactoglobulin과 serum albumin의 band가 나타났다.

AF-Heparin chromatography로 분리 정제한 12번 분획을 AF-Heparin rechromatography한 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같이 0.3 M CH₃COONa에서 용출되고 15번 분획의 TGF- β 1량이 3,700 pg/mL 정도로 함유하고 있는 것으로 확인되었고 이 분획을 전기영동한 결과는 Fig. 5에 나타난 바와 같

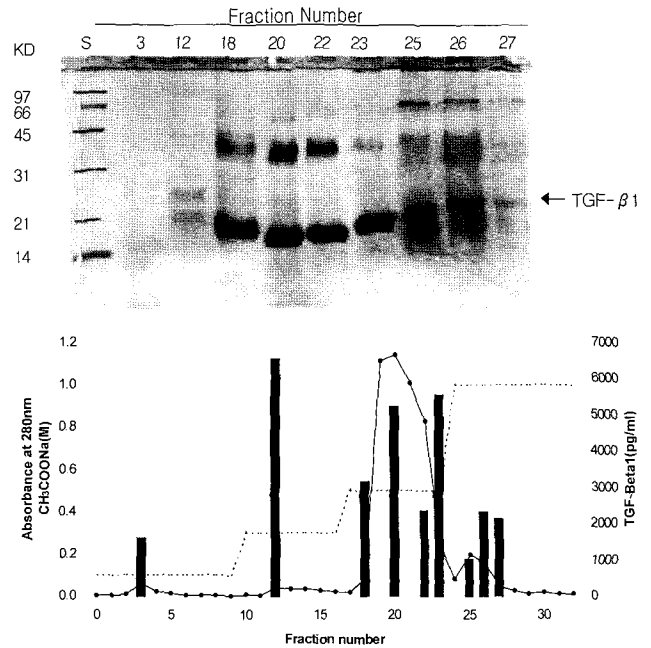


Fig. 3. Silver-stained SDS-PAGE(12.5%) analysis of selected column fraction from AF-Heparin column chromatography. AF-heparin chromatography of eluant from gel filtration chromatography. Samples from Sephadex G-50 column were loaded into a AF-heparin column equilibrated with 1M-acetic acid. The column was eluted with a step gradient of 0.1, 0.3, 0.5 and 1.0 M CH₃COONa(.....) in 1 M acetic acid at a flow rate of 40 mL/hr. Each fraction was 2.3 mL, of which 0.5 mL was assayed for TGF- β 1 concentration by ELISA.

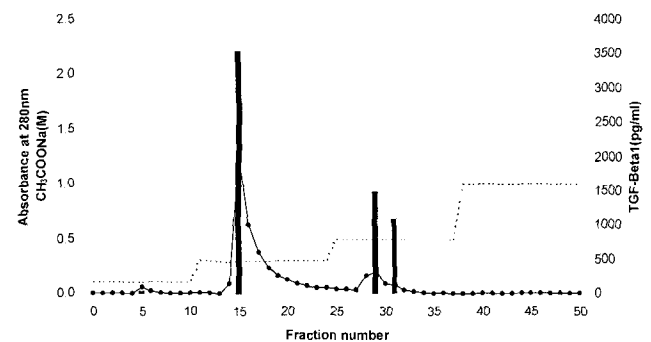


Fig. 4. AF-Heparin rechromatography of eluant from AF-Heparin chromatography. Sample from AF-Heparin column was loaded into a AF-Heparin column equilibrated with 1M-acetic acid. The column was eluted with a step gradient of 0.1, 0.3, 0.5 and 1.0 M CH₃COONa(.....) in 1 M acetic acid at a flow rate of 40 mL/hr. Each fraction was 2.3 mL, of which 0.5 mL was assayed for TGF- β 1 concentration by ELISA.

다. Lane 2 번은 표준 TGF- β 1이고 lane 3 번은 정제한 TGF- β 1으로 약 25 kD의 TGF- β 1 밴드가 표준품과 같은 위치에

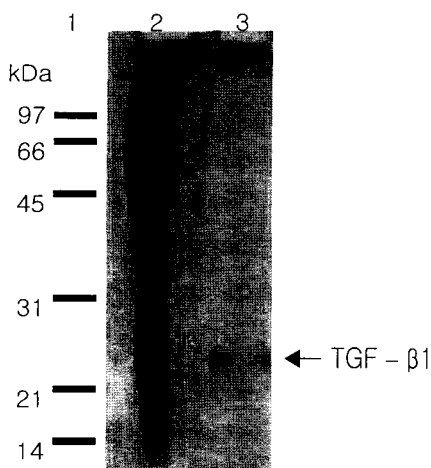


Fig. 5. Silver-stained SDS-PAGE under non-reducing condition of the standard TGF-β1 and purified TGF-β1.

lane 1 : standard molecular weight marker.
 lane 2 : standard TGF-β1.
 lane 3 : purified TGF-β1.

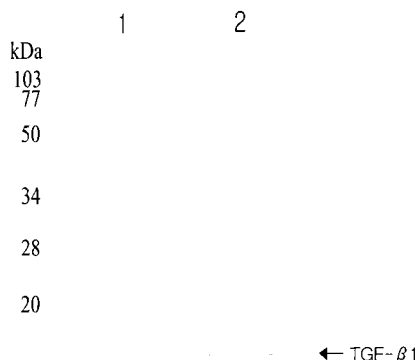


Fig. 6. Western blot analysis under reducing condition of purified TGF-β1 from bovine milk.

1 : prestained standard molecular weight marker.
 2 : purified TGF-β1 from bovine milk.

Table 1. Purification of TGF-β1 from bovine colostrum milk

Purification Step	Recovery(ng) (TGF-β)	Yield(%)	
		Step	Overall
Whey Protein Powder	286	100	100
G-50 Sephadex	142	49.6	49.6
AF-Heparine	62	43.6	21.6

나타남이 확인되었다. Fig. 6은 정제한 TGF-β1을 Western blotting한 것으로 정제한 TGF-β1을 환원제로 환원시킨 후 전기영동하여 Western blotting을 수행하였다. 비환원형태의

TGF-β1은 dimer 상태로 존재하고 환원형은 monomer 상태로 변하기 때문에 이를 확인한 결과이다. Dimer 형태로 존재하는 TGF-β1은 환원제에 의해 monomer 형태로 되어 약 13 kD의 밴드가 확인되었다.

젖소 초유로부터 TGF-β를 정제한 보고를 보면 Tokuyama 와 Tokuyama(1993)은 anion-exchange column과 Gel filtration 방법을 이용하여 약 25 kD의 TGF-β2-related growth factor를 정제하였다. 또한 Cox 와 Burk(1991)도 25 kD의 TGF-β2-related polypeptide를 Cation-Exchange column과 Phenyl-Sepharose column을 이용하여 분리하였다. Zwiebel 등(1986)도 모유로부터 TGF-β를 분리하였다. 본 연구는 젖소 초유로부터 TGF-β1을 분리하기 위해 동결건조한 유청단백질을 Gel filtration, AF-Heparin chromatography 그리고 AF-Heparin rechromatography를 수행하였다. ELISA kit로 각 단계별로 TGF-β1의 양을 측정하여 TGF-β1이 많이 함유된 분획을 취하고 불순단백질은 제거하였다. 비교적 흡착력이 뛰어난 AF-Heparin column을 사용한 것은 이미 보고된 정제방법(Cox and Burk, 1991; Jin et al., 1991; Tokuyama and Tokuyama, 1993; Kanda et al., 1994)을 변형하여 정제를 시도한 것으로 TGF-β1을 효율적으로 분리할 수 있었다. 일반적으로 알려진 정제방법은 Gel filtration chromatography 단계에서는 phosphate-buffered saline(PBS)와 ion-exchange chromatography 단계에서 NaCl 농도구배를 각각 사용하여 용출시켰지만 이를 이용하는 경우에는 분리된 TGF-β1을 분석하기 위해 모든 분획들을 산성용액에 투석하여 활성화시키는 과정이 필요하게 되어 정제과정이 복잡하고 분리과정에서 유효성분이 많이 유실된다. 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하기 위해서 용출액으로 초산을 이용하여 TGF-β1이 분리과정에서 항상 활성을 나타내도록 하였다. Table 1은 정제단계별 TGF-β1 회수율을 나타낸 것이다. 286 ng의 TGF-β1이 함유된 50 mg의 whey protein을 Gel filtration column에 흡착시켜 TGF-β1이 다량 함유되어 있는 분획들을 모아서 TGF-β1의 함량을 측정한 결과 회수율 49.6%인 142 ng이었다. Gel filtration chromatography에서 TGF-β1이 다량 함유된 분획들을 모아서 AF-Heparin 컬럼에 흡착하여 TGF-β1을 정제하였다. AF-Heparin column chromatography를 수행하여 얻은 TGF-β1 분획들을 모아서 TGF-β1의 함량을 측정한 결과 회수율 21.6%인 62 ng이었다.

우유는 TGF-β family가 ng/mL 단위로 미량 함유되어 있고 3 단계의 정제과정을 거치므로 정제에 많은 어려움이 있었다. 따라서 본 연구에서의 분리정제 방법을 더욱 개선하여 보다 효율적인 정제방법을 연구하는데 도움이 되리라 사료된다.

요 약

TGF- β 1은 여러 가지 생리활성 기능을 가지고 있기에 기능성식품 및 의약품 소재로 이용될 수 있다. 본 연구에서는 bovine colostrum milk로부터 TGF- β 1을 분리 정제하기 위해 Gel-filtration chromatography, AF-heparin column chromatography 및 AF-heparin column rechromatography를 수행하여 TGF- β 1을 정제하였다. 정제된 TGF- β 1은 비환원조건하에서 전기영동을 수행하여 표준 TGF- β 1과 같은 위치에 단일 band가 나타남으로 TGF- β 1임을 확인하였다. 또한 환원 조건하에서 Western blot을 수행한 결과 TGF- β 1 단일클론 항체와 결합하는 monomer 형태의 밴드를 확인하였다. 정제된 TGF- β 1의 회수율은 21% 였다.

감사의 글

본 연구는 99년도 농림기술연구개발사업의 지원 (과제번호 : 299084-3) 에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Collier, R. J., McGrath, M. F., Byatt, J. C. and Zurfluh, L. L. (1993) Regulation of bovine mammary growth by peptide hormones: involvement of receptors, growth factors and binding proteins. *Livestock Production Sci.*, **35**, 21-33.
2. Cox, D. A. and Burk, R. R. (1991) Isolation and characterization of milk growth factor, a transforming-growth-factor- β 2-related polypeptides from bovine milk. *Eur. J. Biochem.*, **197**, 353-358.
3. Donnet-Hughes, A., Schiffrin, E. J. and Huggett, A. C. (1995) Expression of MHC antigens by intestinal epithelial cells. Effect of transforming growth factor-beta 2(TGF-beta 2). *Clinical and Experimental Immunology*, **99**, 240-244.
4. Francis, G. L., Upton, F. M., Ballard, F. J., McNeil, K. A. and Wallace, J. C. (1988) Insulin-like growth factors-I and in bovine colostrum: Sequences and biological activities compared with those of a potent truncated form. *Biochemical Journal*, **251**, 95-103.
5. Ishizaka, S., Kimoto, M., Tsujii, T. and Saito, S. (1994) Antibody production system modulated by oral administration of human milk and TGF-beta. *Cellular Immunology*, **159**, 77-84.
6. Jin, Y., Cox, D. A., Knecht, R., Raschdorf, F. and Cerletti, N. (1991) Separation, purification, and sequence identification of TGF- β 1 and TGF- β 2 from milk. *J. Protein Chemistry*, **10**, 565-575.
7. Kanda, Y., Yamamoto, N. and Abe, Y. (1994) Growth factor from human milk: Purification and characterization. *Life Sc.*, **55**, 1509-1520.
8. Nagashima, K., Itoh, K. and Kuroume, T. (1990) Levels of insulin-like growth factor 1 in full and preterm human milk in comparison to levels in cow's milk and in milk formulas. *Biology of the Neonate*, **58**, 343-346.
9. Read, L. C., Upton, F. M., Francis, G. L., Wallace, J. C., Dahlenberg, G. W. and Ballard F. J. (1984) Changes in the growth-promoting activity of human milk during lactation. *Pediatric Research*, **62**, 501-507.
10. Roberts, A. B. and Sporn, M. B. (1993) Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor- β (TGF- β). *Growth Factors*, **8**, 1-9.
11. Roberts, A. B. and Sporn, M. B. (1989) In Peptide Growth Factors and Their Receptors(Roberts, A. B., and Sporn, M. B. eds)Vol. 95, Springer-Verlag, Heidelberg.
12. Tokuyama, Y. and Tokuyama, H. (1993) Purification and identification of TGF- β 2-related growth factor from bovine colostrum. *J. Dairy Sci.*, **60**, 99-109.
13. Zwiebel, J. A., Bano, M., Nexo, E., Salomon, D. S. and Kidwell, W. R. (1986) Partial Purification of Transforming Growth Factors from Human Milk. *Cancer Research*, **46**, 933-939.

(Accepted November 28, 2002)