

융합단백질 절단반응을 위한 고정화된 enterokinase의 고체상 재접힘

서창우 · 나세진 · ¹박신혜 · ¹박승국 · †이은규
한양대학교 화학공학과 생물공정연구실, ¹(주)대웅생명공학연구소
(접수 : 2003. 6. 1. 게재승인 : 2003. 8. 22.)

Solid-phase Refolding of Immobilized Enterokinase for Fusion Protein Cleavage

Chang-Woo Suh, Sea-Jin Na, Sin-Hye Park¹, Seung-Guk Park¹, and Eun-Kyu Lee[†]

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

¹Biotechnology Research Center, Dae Woong Corp., Yongin, Korea

(Received : 2003. 6. 1. Accepted : 2003. 8. 22.)

Solid-phase refolding of immobilized proteins can be an effective way to reuse an immobilized enzyme column. Oriented immobilization methods are known to provide higher activity of the immobilized enzymes. In this study, using recombinant EK (enterokinase) as a model enzyme and a fusion protein, that consisted of recombinant human growth hormone and six His tag that was linked by the peptide of EK-specific recognition sequence, as a model substrate, we evaluated two oriented immobilization methods, i. e., reductive alkylation of N-terminus α -amine and affinity interaction between poly-histidine tag and Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid). The immobilization yield, activity and cleavage of the immobilized enzymes, and the yield of solid-phase refolding were compared. The Ni affinity immobilization and the covalent immobilization yields were about 100% and 65%, respectively. But the specific activities were the same, about 50% of that of the soluble enzyme. The cleavage rate by the covalently immobilized EK was higher than the soluble enzyme and the side reaction of cryptic cleavage was significantly decreased. Covalently immobilized EK showed almost 100% refolding yield but the affinity immobilized EK showed only 70% yield, which suggested the covalent conjugation provided more rigid 'reference structure' for the solid-phase refolding. The monomeric hGH could be easily obtained by capturing the cleaved poly Histidine tag by the Ni affinity column.

Key Words : Enterokinase, solid-phase refolding, immobilization, fusion protein cleavage, Sepharose gel

서론

유전자 재조합 기술의 발전에 따라 미생물 발현체계를 이용하여 여러 가지 의약품 단백질을 대량 발현시키는 공정이 개발되고 있다. 특히 외래 단백질의 발현 효율을 증대시키고 발현되는 단백질의 기능성을 향상시키기 위하여 대상 단백질 유전자에 필요한 기능을 갖는 특정 부위를 융합시켜 융합단백질 형태로 발현시키는 방법이 많이 이용되고 있다(1). 이러한 경우 융합단백질에서 목적단백질을 절단하여 얻어내는

공정이 필요하다. 기존의 공정은 절단효소를 사용하여 대부분 회분식 공정으로 처리하고 있다. 이 경우 효소의 회수 및 재사용이 어려워 산업적 규모에서는 효소의 비용이 생산공정에서 큰 부분을 차지하게 된다. 또한 교반에 의한 전단응력에 의해 효소의 불활화가 일어나게 되고, 연속 공정이 힘들고, 효소반응 후 반응물, 생성물 그리고 효소가 혼합되어 있기 때문에 생성물 분리에 추가적인 공정이 필요하다. 따라서 고정화 효소반응을 도입함으로써 효소의 재사용과 반응 후 회수 및 정제공정이 용이하여 경제적인 공정구축이 가능해진다.

효소의 고정화 방법으로는 흡착법, 가동법, 공유결합법 등이 있다. 흡착법은 담체 표면에 부착시키는 방법으로 정전기력, 이온결합력, 소수성 결합과 같은 물리적 힘을 이용한다. 공유결합법은 activated esters, bialdehydes, epoxides, amines와 thiol 등의 시약을 사용하여 담체에 효소를 화학적으로 공유

† Corresponding Author : Bioprocessing Research Laboratory, Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Ansan 425-791, Korea.

Tel : +82-31-400-5275, Fax : +82-31-408-3779

E-mail : eklee@hanyang.ac.kr

결합시키는 방법이다(2). 공유결합 방법 중 glyoxyl agarose에 고정화하는 방법은 많은 장점이 있다. 6%의 agarose 겔의 경우 최대 40 mg/ml까지 효소의 고정화가 가능하며 glyoxyl기가 화학적으로 안정하여 4°C에서 1년간 활성이 유지된다고 보고 되었다(3). 또한 pH에 의해 고정화 반응속도를 제어할 수 있으며 공유결합의 개수를 조절할 수 있다. Borohydride reduction 방법을 통한 단일 공유결합을 유도할 수 있다(4).

본 연구에 사용된 공유결합 방법인 reductive alkylation은 단백질의 아민기를 화학적으로 변형하는 잘 알려진 방법이다. 1958년 Fischer에 의해서 glycogen phosphorylase의 pyridoxal phosphate moiety를 환원시키는데 sodium borohydride를 사용하는 방법이 처음 제시되었다(5). Carbonyl 잔기에 α -와 ϵ -amino 잔기가 친핵성 공격을 하고 물이 빠지는 두 번째 반응을 거쳐 최종적으로 imine을 형성하게 된다. 이 반응 속도는 pH에 의해서 조절이 가능하며 일반적으로 pH 4~5에서 수행된다. 이 반응에서 환원제는 hydride 이온을 protonated imine으로 바꾸어주는 역할을 수행한다. 이러한 reductive alkylation에 사용되는 환원제로는 sodium borohydride, sodium cyanoborohydride, dimethylamine borane과 pyridine borane이 있다. 이중 sodium borohydride는 빠른 반응을 일으키는 반면 다른 환원제는 느린 반응을 일으킨다.

Reductive alkylation반응은 lysine 잔기의 ϵ -amine과 N-terminal의 α -amine 사이의 통상 4 정도의 pI 차이를 통하여 이루어진다. 단백질은 pI 값보다 낮은 pH에서 amine 그룹이 NH_3^+ 로 바뀐다. 이러한 특성을 이용하여 pH를 조절하여 lysine 잔기의 ϵ -amine을 NH_3^+ 로 만들고 N-terminal α -amine은 NH_2 로 만들어 N-terminal만이 반응에 참여할 수 있도록 조건을 만들어 준다(6). 이러한 선택적인 반응은 pH에 의해 제어되고, aldehyde기와 단백질의 N-terminal α -amine이 lysine 잔기의 아민 그룹보다 우선적으로 일어나게 된다.

절단반응 공정에서 장기간 사용하면 효소의 활성이 떨어지는 문제가 발생한다. 이 경우 고정화 효소의 반복사용을 위하여 효소의 재생방법이 필요하다. 고정화 효소의 재생방법에는 세척에 의한 담체내의 이물질을 제거하는 방법이 있으나 구조적인 변형에 의해 활성이 감소한 경우에는 이러한 방법으로 활성이 회복되지 않는다. 그러나 고체상 재접힘 방법을 도입하여 변성된 단백질을 변성제를 이용하여 완전히 풀림상태로 만든 후에 변성제를 제거하여 재접힘을 할 경우 초기 활성으로 회복된다는 여러 보고들이 있다. 이러한 고체상 재접힘은 이온교환수지에 고정화된 단백질의 재접힘(7), 친화결합에 의한 고정화된 단백질의 재접힘(8, 9), 그리고 공유결합된 단백질의 재접힘(10) 등이 있다. 고체상 재접힘은 액상 재접힘에 비하여 재접힘 시간이 짧고 재접힘 수율이 높다는 장점이 있다.

본 연구에서는 EK의 고정화 방법으로 친화결합과 공유결합을 시켜 고정화 수율과 효소의 활성과의 관계를 찾아 절단반응에 적합한 고정화 방법을 찾고자한다. 둘째, 친화결합과 공유결합된 EK를 변성제를 이용하여 풀림과 재접힘을 통해 활성회복 정도를 변성제의 농도를 변화시켜 최적의 재접힘 조건을 찾는다. 마지막으로 고정화된 효소와 액상 효소의 절단반응을 비교하고 절단반응 후 목적단백질을 얻는 정제방법을 수행하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 EK와 융합단백질은 (주)대웅으로부터 제공받았다. 대웅에서 제공받은 EK는 6개의 Histidine tag이 C-말단기에 붙어 있으며 융합단백질인 hGH 역시 C-terminus에 6개의 Histidine tag이 붙어있다. 또한 대조실험을 위해 native form의 EK (분자량은 26 kDa, pI는 5.2)는 Roche사 (USA)에서 구입하였다. 고정화 담체로 사용되는 Sepharose CL-6B는 Amersham Pharmacia Biotech (Sweden)에서 구입하였고 활성화에 필요한 시약과 효소활성 측정용 시약들은 모두 Sigma (USA)에서 구입하였다. 효소의 풀림과 재접힘을 위한 변성제인 guanidine hydrochloride (GuHCl)와 기타 시약들 역시 Sigma사 (USA)에서 구입하였다.

효소 고정화 방법

효소의 고정화 방법으로는 Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid) resin (Qiagen, CA, USA)에 poly-histidine tagged EK의 histidine을 이용한 친화결합을 하는 방법과 native EK를 활성화 겔에 공유결합하는 두 가지 방법을 시도하였다. 먼저 Ni-resin과 histidine의 친화결합은 Ni-resin 100 μl 와 poly-histidine tagged EK 10 unit을 40분간 상온에서 천천히 교반시켜 친화결합을 유도하였다. 반응 후에 원심분리를 통하여 상등액을 분리하여 미반응 poly-histidine tagged EK를 제거하였다. 그 후 Ni-NTA resin을 10 mM imidazole로 3회 세척하였다.

공유결합에 의한 고정화 방법은 reductive alkylation을 통해 활성화된 glyoxyl Sepharose의 aldehyde기와 native EK의 α -amine기와 반응시켰다. Sepharose의 활성화는 먼저 Sepharose CL-6B와 glycidol (2, 3-epoxy-1-propanol)을 12시간 반응하여 etherification을 시켜 glyceryl Sepharose gels ($\text{Ag-O-CH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{OH}$)을 만들고 결합된 glycidol의 알킬기를 강한 산화제인 sodium periodate (NaIO_4)를 사용하여 glyoxyl-Sepharose ($\text{Ag-O-CH}_2\text{-CHO}$)로 산화시켰다(10). Reductive alkylation에 의한 효소의 고정화는 0.1 M Sodium phosphate (pH 4.0)와 환원제인 25 mM NaBH_3CN 을 넣은 버퍼조건에서 native EK를 사용하여 3시간 동안 공유결합반응을 시켰다(5). 반응 후에 1 M ethanolamine으로 미반응 활성화 잔기를 blocking 시킨다. 고정화 전후의 단백질량을 통해 고정화 수율을 측정하고 고정화 후 효소의 활성을 측정하여 고정화 단백질 대비 활성을 측정하였다.

Enterokinase의 활성측정

EK의 활성측정은 EK가 특이적으로 인식하는 (Asp) $_4$ -Lys 부위를 가진 기질 Gly-(Asp) $_4$ -Lys- β -naphthylamide를 37°C에서 1시간 반응 시켜 생성된 β -naphthylamide의 양을 정량하여 측정하였다(12, 15). 1 nmole의 β -naphthylamide가 1시간 동안 반응 후 생성되는 것을 1 unit으로 정의하였다. 절단된 β -naphthylamide를 0.05% N-1-(naphthyl)-ethylenediamine (0.2% sodium nitrite, 0.5% ammonium sulfamate buffer)으로 염색하여 발색반응을 유도하였다. 발색반응 후 580 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 효소의 활성을 계산하였다.

융합단백질 절단반응

동일한 활성의 EK를 이용하여 여러 가지 농도의 융합단백질(0.1, 0.5, 1, 2, 4, 5 mg/ml)에 대해 절단반응을 시켰다. 반응 조건은 1 ml의 부피의 융합단백질에 1 unit의 EK를 넣고 pH 8.0 (50 mM Tris-HCl)과 상온에서 16시간 동안 반응 하였다. 절단된 융합단백질은 linker가 결합된 6개의 histidine과 hGH로 분리되었다. 고정화 EK를 이용한 절단반응은 액상 절단반응과 동일한 조건에서 수행하였다. 융합단백질의 절단 정도는 반응에 투입된 융합단백질의 질량 대비 절단된 융합단백질의 양을 SDS-PAGE를 통해 비교함으로써 평가하였다. 분석조건은 SDS-PAGE 15% gel을 사용하여 분석 후 densitometer를 통해 정량평가 하였다.

목적단백질의 분리정제

효소에 의한 절단반응 후 histidine tag이 있는 linker와 목적단백질인 hGH 그리고 미반응 융합단백질이 함께 존재하게 된다. 이때 목적단백질만을 얻기 위한 정제과정으로 histidine tag과 친화결합을 하는 니켈친화칼럼을 이용하였다. 칼럼을 통과한 것은 histidine tag이 없는 순수한 hGH이기 때문이다. 공정조건은 1 ml 부피의 칼럼에 1 ml/min의 유속으로 절단 용액을 주입하였다.

고정화 효소의 풀림과 재접힘

고정화 효소의 풀림과 재접힘을 위해서 다양한 변성제 농도 (2, 4, 6 M Guanidine HCl)에서 30분간 노출시켜 풀림상태를 유도하고 변성제를 제거하여 재접힘을 하였다. 대조실험을 위한 액상 효소는 (주)대웅에서 제공받은 poly-histidine tagged EK와 Roche에서 구입한 native EK를 각각 사용하였다. 액상 효소의 재접힘은 투석을 통해 수행하였다. 고정화 효소는 Ni 친화결합을 한 poly-histidine tagged EK와 공유결합을 한 native EK를 사용하였다. 재접힘 버퍼는 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)이고 재접힘 후의 효소 활성을 비교하여 재접힘 공정의 수율을 계산하였다.

결과 및 고찰

EK 고정화

Native EK의 고정화를 위한 담체인 glyoxyl Sepharose는 넣어주는 glycidol의 농도에 따라서 ml gel 당 glyoxyl의 농도는 4 μ M에서 46 μ M까지 선형적으로 나타나고 있다. 즉 활성화된 glyoxyl 기의 양은 gel 1000 \AA^2 당 1개에서 11개에 해당한다. 이러한 결과는 앞서 발표된 연구 결과와 유사하다 (13). 활성화 정도에 따라서 단백질의 고정화되는 정도의 차이를 관찰하기 위하여 과량의 BSA를 첨가하여 반응 시간에 따른 고정화 정도를 관찰하였다. Fig. 1에서 단백질의 고정화에 필요한 시간은 한 시간이 소요되며 활성화 정도에 따라서 단백질의 고정화 정도가 ml 겔 당 1.5 mg에서부터 4 mg까지 증가함을 알 수 있다. 여러 가지 활성화 겔 중에서 많은 양의 단백질을 고정화할 수 있는 2.0 M의 glycidol로 활성화시킨 겔 (46 μ M-glyoxyl/ml-gel)을 사용하기로 하였다.

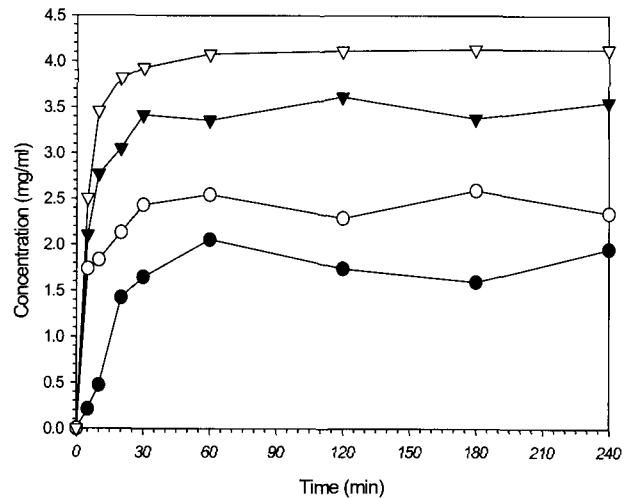


Figure 1. Comparison of protein immobilization at each glycidol concentration on glyoxyl agarose. Immobilization condition was as follow: 80 mg BSA was reacted with 1 ml activated gel at 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 10.5) and room temperature. (●): 0.2 M, (○): 0.6 M, (▽): 2.0 M glycidol.

공유결합형 고정화 방법과 니켈친화결합 방법을 비교한 결과 친화결합은 니켈 resin과 poly-histidine tagged EK의 histidine과 100%의 고정화 수율을 나타내었으나 고정화 후 효소의 활성은 5 unit의 활성만을 나타내었다. 효소의 고정화 수율은 높으나 고정화 후 효소의 활성에 대한 수율은 50%이다. 그런 반면 공유결합형 고정화 방법은 30 μ g EK 중 17.6 μ g의 EK만 고정화 되어 65%의 고정화 수율을 나타내었고 고정화된 효소 활성은 4.9 unit을 나타내어 약 50%의 효소활성 수율을 보여주었다. 즉 두 가지 고정화 방법 모두 고정화 과정에서 절반정도의 활성을 잃어버리는 것으로 나타났다. Reductive alkylation 방법에 의한 고정화는 단백질의 N-terminus의 α -amine에서만 반응이 일어난다고 알려져 있다. 하지만 아직 N-terminus에만 고정화가 이루어졌는지는 확인하지 못하였다. 고정화로 인한 효소활성의 감소는 고정화 과정에서 효소의 구조적 변성이나 고정화로 인하여 효소의 active site가 가리어지는 steric hindrance에 의한 영향 등으로 보고 되고 있다(14). 고정화 효소의 이용에서 가장 큰 문제로 나타나는 고정화 과정에서의 효소활성의 감소에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

융합단백질의 절단반응

융합단백질의 절단반응은 액상 효소절단 반응과 고정화 효소의 절단반응을 비교하였다. 먼저 액상 효소의 절단반응은 기질대비 효소의 양에 대한 최적조건을 찾는 것이 중요하다. 적은 효소를 사용하면 절단수율이 낮고 반응 시간이 길어지는 단점이 있고 많은 양의 효소를 사용하면 부반응이 일어나며 고가의 효소에 대한 비용문제가 있다. 최적의 절단반응 조건을 찾기 위하여 효소 대 기질의 비율을 1 unit의 효소에 융합단백질을 0.1-5 mg까지 증가시키면서 16시간 후의 절단 수율을 비교하였다. Fig. 2는 1 unit의 효소에 1 mg의 융합단백질일 때 80%의 절단수율을 보이는 최적임을 보여주고 있

다. 융합단백질의 농도가 1 mg/ml 이하로 낮아지는 경우 농도가 낮아져 효소와 기질간의 접촉횟수가 감소하여 절단수율이 감소하는 것으로 생각이 된다. 또한 융합단백질의 농도가 높아지는 경우 역시 절단수율이 감소하는데 이는 EK의 절단반응이 비교적 느린 반응이기 때문에 같은 절단 수율을 얻기 위해서 더 많은 시간이 요구되는 것으로 생각된다.

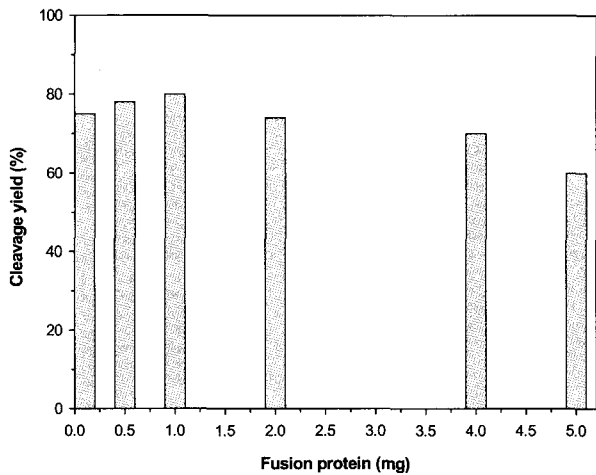


Figure 2. Effect of S:E ratio on cleavage yield of fusion protein. One unit of EK reacted 1 ml of fusion protein solution at various concentrations (0.1-5 mg/ml) for 16 hr.

고정화 효소를 이용한 절단반응을 수행하여 융합단백질의 절단율을 액상반응과 비교하였다. Fig. 3는 액상절단 반응과 고정화 효소를 이용한 batch상의 절단반응 결과를 나타내고 있다. 고정화 효소는 공유결합형 고정화 효소를 사용하였다. 두 경우 모두 80%의 절단수율을 보이고 있어 고정화 효소를 이용하여도 동일한 절단율을 얻을 수 있음을 알 수 있다. 효소의 절단반응을 1차 반응으로 가정하여 반응속도 상수(Kcat)를 구하였다. 액상 native EK의 경우 0.8853 hr^{-1} , 고정화 native EK의 경우 1.1289 hr^{-1} 로 고정화 native EK의 절단반응 속도가 더 빠른 것을 알 수 있다. 또한 고정화 효소를 사용한 경우는 융합단백질내의 EK 절단부위 이외에 부분이 절단되는 부반응이 현저히 감소하였다. 이러한 부반응 감소는 Suh의 결과와 같이 고정화로 인하여 효소의 기질 특이성이 높아진 것으로 보인다(11).

니켈친화결합을 한 poly-histidine tagged EK를 이용한 절단반응은 융합단백질 역시 6개의 histidine tag이 있어서 융합단백질이 절단되기 보다는 Ni resin에 친화결합을 하는 문제점을 나타내었다. EK의 니켈친화결합 후 10 mM imidazole로 세척하여 미 결합 잔기를 blocking 하였지만 경쟁적 친화반응에 따라서 과량의 histidine tag된 융합단백질이 resin에 결합하는 현상을 보였다. 이러한 결과는 절단공정이 진행되는 과정에 액상의 단백질을 분석한 결과 반응시간에 따라 점차 줄어드는 것을 확인하였고 절단반응 후 resin에 붙은 단백질을 모두 용출시켰을 때 절단되지 않은 융합단백질이 나타나는 것으로 확인하였다. 따라서 니켈친화결합을 한 poly-histidine tagged EK는 histidine tag되지 않은 융합단백질의 절단반응에 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

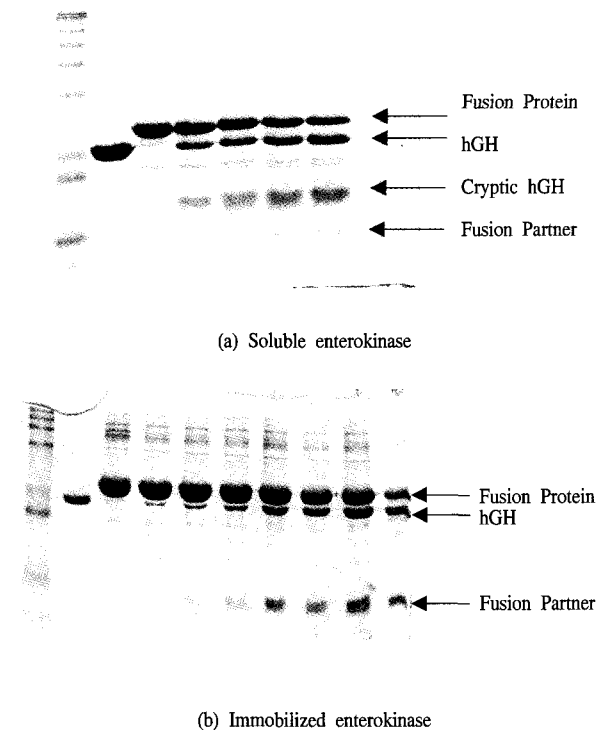


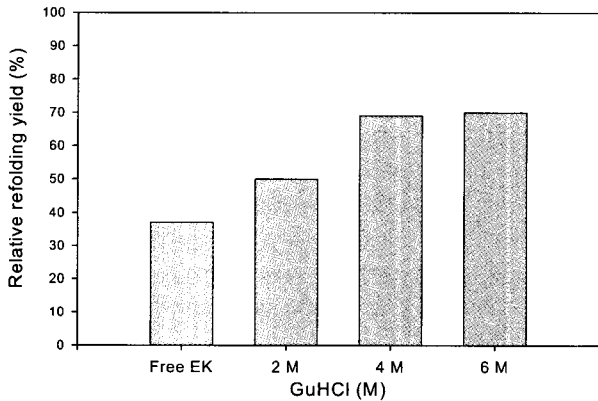
Figure 3. Fusion protein cleavage profiles. Fusion protein concentration is 1 mg/ml and 1 unit enterokinase was added. (a) fusion protein: 1 mg, soluble EK: 1 unit, lane 1: Standard marker, lane 2: hGH, lane 3: fusion protein, lane 4-7: 4, 6, 10, 16 h. (b) fusion protein: 1 mg, immobilized EK: 10 μg , lane 1: Standard marker, lane 2: hGH, lane 3-10: 10, 30 min, 1, 2, 4, 6, 9, 18 h. Cryptic hGH is non specific cleaved hGH. Fusion partner is consisted with six histidines and EK recognition poly-peptide ((Asp)₆-Lys).

고정화 EK의 폴림과 재접힘

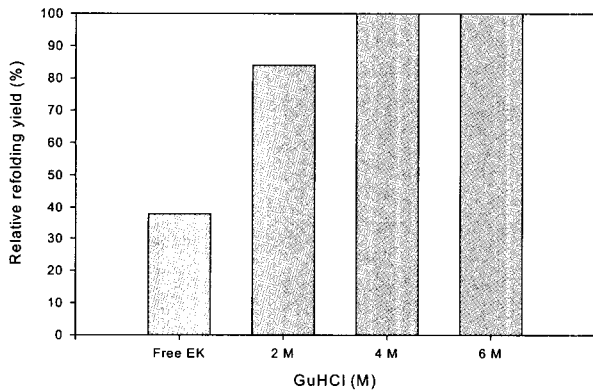
고정화 효소의 가장 큰 장점인 반복사용을 위하여 단백질의 폴림과 재접힘을 도입하였다. 고정화 효소는 장기간 사용시 구조적 변성과 겔 내부의 이물질의 축적으로 인하여 활성이 감소하게 된다(10). 이러한 문제를 동시에 해결하기 위하여 강력한 변성제인 6 M GuHCl을 사용하여 고정화 효소를 폴림상태로 만들고 변성제를 제거하여 재접힘을 유도하였다. 이때 효소가 초기 활성으로 돌아오는 정도를 평가하였다.

고정화 되지 않은 EK와 친화결합과 공유결합을 한 EK에 있어서 2, 4, 6 M의 GuHCl로 폴림상태를 만든 후 효소의 활성을 측정된 결과 모두 활성은 나타나지 않았다. 그 후 변성제를 제거하여 재접힘을 하였을 경우 액상의 EK는 35-38%의 낮은 재접힘 활성을 나타내었으나 고정화 효소의 경우 이보다 높은 재접힘 수율을 나타내었다. Fig. 4에 친화결합을 한 poly-histidine tagged EK의 재접힘에서 4 M 이상의 변성제로 풀고 재접힘 할 경우 70% 정도의 재접힘 수율을 얻을 수 있었고 공유결합을 한 native EK의 경우 4 M 이상의 변성제 처리 후 재접힘에서 100%의 초기 활성을 회복하였다. 이는 공유결합이 더 높은 효소 안정성을 가져온 것으로 생각되어진다. 이러한 결과는 Suh 등이 Sepharose 겔에 단백질 절단효소인 urokinase를 고정화 시킨 후 동일한 방법으로 재

접힘을 수행한 경우 98% 이상의 초기 활성이 회복된 결과와 잘 일치한다(16). 2 M의 GuHCl로 처리한 경우는 두 경우 모두 낮은 활성을 보이는데 이는 Guisan 등의 연구결과에서처럼 완전히 풀린 후에 재접힘 하는 것이 더 높은 수율을 보인다는 결과와 일치하였다(10). 이러한 고체상 재접힘이 액상 재접힘보다 높은 수율을 보이는 것은 풀림 과정에서도 일정한 'reference structure'를 유지하고 있기 때문인 것으로 보인다(17).



(a) Ni-affinity immobilized enterokinase



(b) Covalent immobilized enterokinase

Figure 4. Comparison of solid-phase refolding yield with soluble enterokinase and immobilized enterokinase denatured by each denaturant concentration.

친화결합의 경우보다는 공유결합을 한 고정화 EK가 더 높은 재접힘 수율을 보임을 알 수 있다. 공유결합을 한 EK의 경우 재접힘 후 초기 활성을 모두 회복한다는 결과는 추후 고정화 효소의 반복사용이 가능하다는 것을 나타낸다. 재접힘 방법을 통한 효소의 재사용은 변성된 효소의 활성을 다시 회복할 수 있다는 것으로 기존에 알려진 세척과 같은 효소의 재생방법보다 더 강력한 방법이라 할 수 있다.

목적단백질의 정제

고정화 효소에 의한 절단반응 후 목적단백질인 인성장호르몬만을 얻기 위해서 정제공정이 필요하다. 절단반응 후에는 미반응 융합단백질과 목적단백질인 hGH 그리고 절단된

histidine tag이 함께 존재하게 된다. 미반응 융합단백질 역시 histidine tag을 가지고 있기 때문에 목적단백질만을 얻기 위해서 니켈친화칼럼을 사용하였다. 반응용액을 칼럼에 주입하면 미반응 융합단백질과 절단된 histidine tag은 칼럼에 친화결합을 하고 histidine tag이 없는 목적단백질인 인성장호르몬만 용출이 된다. 따라서 칼럼 용출액을 회수하여 목적단백질을 얻었다. Fig. 5에서 용출된 용액에서는 순수한 인성장호르몬만이 나타나는 것을 확인 할 수 있다. 이러한 histidine tag된 융합단백질은 정제공정이 용이하여 많은 재조합 단백질의 생산에 이용되고 있다.

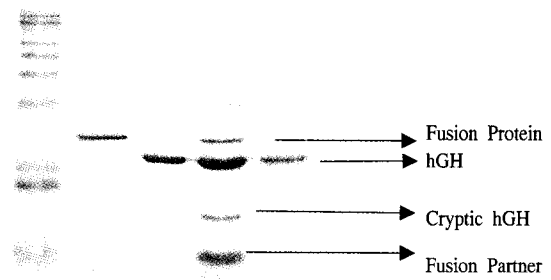


Figure 5. Purification of hGH using Ni-NTA column. Lane 1 is molecular marker, lane 2 is standard fusion protein, lane 3 is standard hGH, lane 4 is cleaved fusion protein, lane 5 is purified hGH with the Ni-NTA column.

요 약

융합단백질의 절단을 위해 EK를 고정화하여 액상 절단반응과 같은 80%의 절단수율을 얻을 수 있었다. 그리고 니켈친화칼럼을 이용하여 간단한 정제공정을 구축하였다. 공유결합한 EK의 경우 니켈친화 결합한 EK보다 높은 재접힘 수율을 나타내었고 풀림과 재접힘을 이용하여 효소의 초기 활성을 회복함에 따라서 반복사용을 통한 경제적인 절단공정을 구축할 수 있게 되었다. 그러나 고정화 과정에서 효소의 활성이 감소하는 문제점과 고정화 수율을 높이기 위한 연구가 필요하다.

감 사

본 연구는 산학협동재단의 2001년도 학술 연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다. 또한 인하대학교 초정밀분리기술연구센터 (ERC)의 부분적인 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Pryor, K. D. and B. Leighting (1997), High level expression of soluble protein in *Escherichia coli* using a His-tag and maltose-binding double affinity fusion system, *Protein Expr.*

- Purif.* **10**, 309-319.
- Zemanova, I., J. Turkova, M. Capka, L. A. Nakhapetyan, F. Svec, and J. Kalal (1981), Effect of nature of proteins on their coupling to different epoxide-containing supports, *Enzyme Microb. Technol.* **3**, 229-232.
 - Bickerstaff, G. F. (1997), Immobilization of enzymes and cells, p277, Humana Press, Totowa, New Jersey.
 - Blanco, R. M. and J. M. Guisan (1989), Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin agarose derivatives, *Enzyme Microb. Technol.* **11**(6), 360-366.
 - Means, G. E. and R. E. Feeney (1995), Reductive alkylation of proteins, *Anal. Biochem.* **224**, 1-16.
 - Kinstler, O. B., N. E. Gabriel, C. E. Farrar, and R. B. DePrince, US patent, 5824784 (1994).
 - Stempfer, G., B. H. Neugebauer, and R. Rudolph (1996), Improved refolding of immobilized fusion protein, *Nature Biotech.* **14**, 329-334.
 - Geng, X. and X. Chang (1992), High-performance hydrophobic interaction chromatography as a tool for protein refolding, *J. Chromatography* **599**, 185-194.
 - Shiba, N. K. and A. Light (1975), Refolding of reduced, denatured trypsinogen and trypsin immobilized on agarose beads, *J. Biol. Chem.* **250**, 8624-8629.
 - Soler, G., A. Bastida, R. M. Blanco, R. Fernandez-Lafuente, and J. M. Guisan (1997), Reactivation strategies by unfolding / refolding of chymotrypsin derivatives after inactivation by organic solvents, *Biochim. et Biophys. Acta* **1339**, 167-175.
 - Suh, C. W., G. S. Choi, and E. K. Lee (2003), Enzymic cleavage of fusion protein using immobilized urokinase covalently conjugated to glyoxyl-agarose, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **37**, 149-155.
 - Grant, D. A. W. and J. H. Taylor (1979), Hydrolysis of artificial substrates by enterokinase and trypsin and the development of a sensitive specific assay for enterokinase in serum, *Biochim. et Biophys. Acta* **567**, 207-215.
 - Suh, C. W., K. Y. Kang, H. S. Lee, S. J. Ahn, and E. K. Lee (2000), Fusion Protein Cleavage by Urokinase Covalently Immobilized to Activated Sepharose Gels, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**(1), 42-48.
 - Blanco, R. M., J. J. Calvete, and J. M. Guisna (1989), Immobilization-stabilization of enzymes: variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment, *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 353-359.
 - Wang, Z. M., H. Rubin, and N. M. Schechter (1995), Production of active recombinant human chymase from a construct containing the enterokinase cleavage site of trypsinogen in phase of the native propeptide sequence, *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* **376**, 681-682.
 - Suh, C. W., S. J. Ahn, G. S. Choi, and E. K. Lee (2001), Scale-up of covalently immobilized urokinase column and repeated use of it by solid-phase refolding, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**(5), 500-504.
 - Park, S. J., K. Ryu, C. W. Suh, Y. G. Chai, O. B. Kwon, S. K. Park, and E. K. Lee (2002), Solid-phase refolding of poly-lysine tagged fusion protein of hEGF and angiogenin, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **7**, 1-5.