

대장균이 생산한 재조합 인체 감마인터페론의 발현과 정제

^{1,2}박정렬 · ¹김성우 · ¹김재범 · ¹정우혁 · ²한명완 · ¹조영배 · ^{3*}정준기

¹(주)에이스바이오텍, ²충남대학교 화학공학과, ³한국생명공학연구원

(접수 : 2005. 3. 7., 게재승인 : 2005. 10. 23.)

Expression and Purification of Recombinant Human Interferon-gamma Produced by *Escherichia coli*

Jung-Ryeol Park^{1,2}, Sung-Woo Kim¹, Jae-Bum Kim¹, Woo-Hyuk Jung¹, Myung-Wan Han²
Young-Bae Jo¹, and Joon-Ki Jung^{3*}

¹AceBiotech Co., Ltd., Buyong-myeun, Cheongwon-gun, Chungbuk 363-942, Korea

²Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea,

³Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-333, Korea

(Received : 2005. 3. 7., Accepted : 2005. 10. 23.)

For the production of the recombinant human interferon-gamma (rhIFN- γ) in *Escherichia coli*, human glucagon and ferritin heavy chain were used as fusion partners. Even though rhIFN- γ is expressed as an inclusion body form in *E. coli* because of strong hydrophobicity of itself, over 50% of fused rhIFN- γ was expressed as soluble form in *E. coli* OrigamiTM (DE3) harboring pT7FH(HE)-IFN- γ which encodes ferritin heavy chain-fused rhIFN- γ . In the case of using glucagon-ferritin heavy chain hybrid mutant as a fusion partner, 6X His-tag was additionally introduced to N-terminus of GGFHM(HE)-IFN- γ for enhancing purification yields of rhIFN- γ . Fusion protein HGGFHM(HE)-IFN- γ with two 6X His-tag was more effectively bound to Ni-NTA agarose bead than GGFHM(HE)-IFN- γ with a 6X His-tag. rhIFN- γ was completely purified from enterokinase-treated HGGFHM(HE)-IFN- γ by Ni-NTA affinity column. For high-level production of rhIFN- γ , glucose was used as the sole carbon source with simple exponential feeding rate (2.4~7.2 g/h) in fed-batch process. The effective lactose concentration for the expression of the rhIFN- γ was 10~20 mM. Under the fed-batch culture conditions, rhIFN- γ production yield reached 11 g DCW/L for 6 hours after lactose induction.

Key Words : Recombinant human interferon-gamma, expression, purification, glucagon, ferritin heavy chain

서론

Interferon (이하 IFN)은 바이러스, 이중가닥 RNA, 렉틴 등에 의해 동물세포에서 유발된 항바이러스 작용을 갖는 단백질 또는 당단백질의 총칭이다. 1957년 Issacs과 Lindemann은 인플루엔자 바이러스가 송아지 세포로부터 비 바이러스성 단백질을 분비하도록 유도하는데, 이들 단백질이 연속적인 바이러스의 감염으로부터 세포들을 보호하는 역할을 한다는 사실을 밝혀냈다(1). IFN이 발견된 이래로 IFN의 항백혈병성 기작(2) 및 면역조절자로서의 작용(3-5) 등이 밝혀져 왔다.

IFN은 지금까지 IFN- α , IFN- β , IFN- ω 및 IFN- τ 를 포함하는 Type I과 IFN- γ 가 유일한 Type II의, 두 가지 type의 IFN이 알려져 있다(6). 인체 유래의 IFN- γ 는 143개의 아미노산 잔기로 이루어진 분자량 16.7 kDa의 단백질이며, T cell-specific antigens, staphylococcal enterotoxin A, 그리고 phytohemagglutinin과 phorbol ester의 조합에 의한 면역학적 자극제들에 의해 T cell과 natural killer (NK) cell에서 만들어진다(7, 8). 1983년 Naylor 등은 IFN- γ 의 유전자가 인간의 12번 염색체상에 존재한다는 사실을 밝혔으며(9), Nagata 등은 *E. coli*에서 재조합 IFN- γ 의 발현에 최초로 성공하였다(10, 11). Type I의 IFN- α 와 IFN- β 는 같은 수용체에 결합하여 생리활성이 유사하며 항바이러스나 항암활성이 Type II에 비해 높은 반면, Type II의 IFN- γ 는 배양세포의 DNA 합성을 억제하고 세포증식을 직접 억제하는 작용(antiproliferative activity)이 강하고(12-14) 면역 조절 활성(immunomodulatory activity)(15, 16)이 IFN- α 나 IFN- β 보다 월

* Corresponding Author : Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-333, Korea

Tel : +82-42-860-4510, Fax : +82-42-860-4516

E-mail : jkjung@kribb.re.kr

등히 높아 기존 항암제로 유효한 치료법이 없는 암 치료제로 기대를 모으고 있다.

Glucagon은 29개의 아미노산으로 이루어진 peptide로 대장균 내에서 안정적인 융합단백질의 형태로 합성되어진다(17). Glucagon은 작은 peptide임에도 불구하고 알파 helix 구조를 이루고 있으며, 자가 결합능이 뛰어나 분자간의 강한 소수성 결합에 의해서 올리고머를 형성하는 것으로 알려져 있다(18). 이러한 자가 결합성이 강한 특성을 이용해 목적단백질에 융합시켜 발현시킴으로써 고 순도의 불용성 응집체 (inclusion body)로 회수하여 간단한 조작만으로 불용성의 응집체를 수용성의 active한 융합단백질로 얻을 수 있다(19). Ferritin은 체내에 철분을 저장하는 단백질로 heavy chain과 light chain이 약 24개의 조합으로 이루어져 있다. 그중 heavy chain이 수용성 융합파트너로 사용될 수 있음을 보여주는 연구가 최근에 발표되었다(20).

특히 당쇄부분이 단백질의 활성에 필수적이거나 분자량이 매우 큰 경우를 제외하고는 재조합 단백질 생산을 위한 균주로 주로 *E. coli*와 *Saccharomyces cerevisiae*가 많이 이용되고 있는 추세이다. 세계적으로 Granulocyte Colony Stimulating Factor (Amgen), Human Growth Hormone (Eli Lilly), Interferon- α (Schering-Plough), Human Insulin (Eli Lilly) 등의 치료용 의약 단백질이 대장균을 이용하여 생산되어 시판되고 있다. 그러나 대장균의 경우 발현율은 높으나 대부분 활성이 없는 불용성 결합체로 얻어져 초기 분리는 수월하지만 단백질의 재활성화 과정을 거치는 등 정제과정이 매우 복잡한 단점이 있다. 공정의 경제성을 결정하는 생산비용은 미생물 발현시스템의 선택에 따라 크게 좌우됨으로 생산성을 높이고 경제성을 극대화시키기 위해서는 생산 (발효·정제)공정을 최소화 및 최적화하여야 한다.

따라서 본 연구에서는 융합파트너를 이용하여 재조합 IFN- γ 을 대량으로 생산하기 위한 미생물 발현시스템의 최적화와 정제공정의 간소화를 달성하기 위해 대장균 내에서의 발현조건과 정제조건을 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 사용배지

재조합 IFN- γ 의 발현을 위해 사용한 균주는 *E. coli* BL21(DE3)[F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3)]와 Origami(DE3)[Δ ara-leu7697 Δ lacX74 Δ phoAPvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'[lac+(lacI)pro] gor522::Tn10(TcR) trxB::kan(DE3)]를 사용하였다(Novagen, Inc. USA). IFN- γ 유전자의 cloning 및 균주개발에 필요한 배지는 Luria-Bertani (LB) 배지 (bacto tryptone 1.0%, yeast extract 0.5%, NaCl 1.0%, pH 7.0)를 사용하였으며, 필요에 따라 100 μ g/ml 농도의 ampicillin을 첨가하여 사용하였다. IFN- γ 의 생산성을 검토하기 위해 실시된 유가식 배양에서 사용한 배지조성은 Table 1과 같았으며, Trace elements는 15 ml/L의 농도로 배지에 첨가하였다.

배양조건

*E. coli*의 플라스크배양은 100 ml의 LB 배지가 들어 있는 500 ml baffled 플라스크에서 10 ml의 종균배양액을 접종하여 이루어졌으며, 37 $^{\circ}$ C의 rotary shaker (SI-600R, JeioTech, Korea)에서 180 rpm의 속도로 교반하면서 배양하였다. 5 L 발효조 (KF-5L, KoBioTech, Korea)에서의 배양은 Table 1과 같은 배지 1.8 L에 종균배양액 200 ml를 접종하여 300~800 rpm으로 교반하면서 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 배양액의 pH는 30% 암모니아수로 조절하였으며 소포제로는 LS-303 (Dow Corning, USA)를 사용하였다. 또한 용존산소량은 공기포화도의 30% 이상으로 유지하였으며 30% 이하로 떨어질 때는 순산소를 사용하여 30% 이상으로 유지하였다.

Table 1. Medium compositions for the production of recombinant human interferon-gamma in fed-batch culture.

	Batch media (g/L)	Feeding media (g/L)
Yeast extract	5	25
Casamino acid	5	20
(NH ₄) ₂ SO ₄	5	20
K ₂ HPO ₄	3	15
CaCl ₂ *	1	1.8
MgSO ₄ *	0.5	5.7
Glucose**	20	200
Galactose**		200
Trace elements (g/L)***		
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	13.2
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	8.4
	MnSO ₄ · 7H ₂ O	2.4
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2.4
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.48
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.48
	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.24
Adjust pH to 7.0 with 10 N HCl.		

*To avoid precipitation, CaCl₂ and MgSO₄ were separately sterilized.

**Glucose and Galactose were sterilized at 110 $^{\circ}$ C for 20 minutes.

***Trace elements were dissolved in 1.0 N HCl solution and filtered with 0.22 μ m filter.

Enterokinase 반응조건

융합파트너가 제거된 목적단백질을 얻기 위하여 enterokinase (E180-01, Invitrogen, USA)를 사용하여 제조사에서 제공한 사용방법에 따라 pH shift에 의해 가용화된 융합단백질을 절단하였다. 그러나 효소반응은 예비실험을 통해 가장 효율적인 조건으로 확인된 융합단백질 20 μ g에 대해 효소 0.5 unit를 사용하여 30 $^{\circ}$ C에서 10시간 동안 반응을 행하였다.

발현 벡터의 제조

본 연구에 사용된 인간 유래의 IFN- γ 유전자는 전북대학교 cytokine bank로부터 분양받았으며 본 연구실에서 보유하고 있는 플라즈미드 pT7G3(HE)-IL2(Fig. 1)를 모체로 하여 Sambrook 등이 기술한 방법(21)에 따라 Table 2에서와 같은 IFN- γ 발현vector들을 제조하였다. NCBI (National Center for Biotechnology Information)에 발표된 인간 유래의

IFN- γ 유전자의 염기배열순서를 기반으로 양끝말단이 XhoI/ClaI 제한효소 부위를 가지도록 PCR을 수행하였으며, 얻어진 PCR산물은 pGEM-T vector (Promega, USA)에 cloning하였다. TA cloning을 통해 선별된 균주로부터 분리한 플라스미드를 제한효소 XhoI과 ClaI을 동시에 처리하여 목적단편을 얻었다. 얻어진 단편을 pT7G3(HE)-IL2에서 XhoI 과 ClaI을 처리하여 IL-2부분을 제거한 벡터부분에 삽입함으로써 pT7G3(HE)-IFN- γ 를 제조하였다. 한편, 인간의 간 (liver) 조직으로부터 얻어진 cDNA 라이브러리로부터 양 말단이 NdeI/XhoI이 되도록 PCR을 수행하여 ferritin heavy chain 단편을 얻었다. 얻어진 단편은 TA cloning을 수행하여 균주를 선별하고 이들로부터 얻은 플라스미드를 제한효소 NdeI/XhoI을 동시에 처리하여 목적단편만을 얻었다. pT7G3(HE)-IFN- γ 에서 NdeI과 XhoI을 처리하여 글루카곤 삼중체를 제거한 각각의 벡터부분에 목적단편을 삽입함으로써 pT7FH(HE)-IFN- γ 를 제조하였다. Ferritin heavy chain hybrid mutant를 얻기 위하여 ferritin heavy chain의 N-말단 부분에서 하나의 α -helix를 제거하고 양 말단이 EcoRI 과 XhoI이 되도록 PCR을 수행하였다. TA cloning에 의해 얻어진 PCR산물을 EcoRI/XhoI 처리하여 목적단편을 얻었으며, pT7G3(HE)-IFN- γ 를 제한효소 EcoRI과 XhoI을 동시에 처리하여 한 개의 glucagon 유전자만이 존재하는 벡터부분에 목적단편을 삽입하여 pT7GFHM(HE)-IFN- γ 를 제조하였다. Glucagon의 N-말단부분에 6X His-tag을 추가로 삽입할 목적으로 6X His-tag이 있는 primer를 합성하여 glucagon을 주형으로 PCR(NdeI/EcoRI)을 수행하였다. TA클로닝을 통해 얻어진 PCR product는 NdeI/EcoRI으로 잘라 목적단편을 얻었으며, pT7GFHM(HE)-IFN- γ 를 NdeI/EcoRI으로 처리하여 얻은 벡터 부분에 삽입함으로써 pT7HGFHM(HE)-IFN- γ 를 얻었다.

Table 2. Plasmids cited in this experiment

Vector Name	Relevant Characteristics	Source or Reference
pGEM-T vector	Cloning vector for PCR products; Amp ^r	Promega
pT7G3(HE)-IL2	Backbone plasmid with T7 promoter (T7), three glucagon gene (G3), 6X his-tag (H), enterokinase gene (E) and human interleukin-2 gene (IL-2); Amp ^r	Our Lab.
pT7G3(HE)-IFN- γ	Substituted interferon-gamma gene (IFN- γ) for IL-2 in pT7G3(HE)-IL2; Amp ^r	This study
pT7FH(HE)-IFN- γ	Substituted Ferritin heavy chain gene (FH) for G3 in pT7G3(HE)-IFN- γ ; Amp ^r	This study
pT7GFHM(HE)-IFN- γ	Substituted a glucagon (G) and ferritin heavy chain mutant (FHM) which removed an N-terminus α -helix for G3 in pT7G3(HE)-IFN- γ ; Amp ^r	This study
pT7HGFHM(HE)-IFN- γ	H inserted between T7 and G in pT7GFHM(HE)-IFN- γ ; Amp ^r	This study

SDS-PAGE를 이용한 융합단백질의 분석

제조된 plasmid들을 이용하여 E. coli에서 발현시킨 융합 단백질과 enterokinase를 처리하거나 affinity column chromatography를 통해 정제된 IFN- γ 를 Ausubel F. M. 등이 기술한 방법(23)에 따라 Tris-glycine 완충액상에서 12% polyacrylamide gel로 분석하였다. 단백질 분자량 marker로는 SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (LC5925, Invitrogen, USA)를 사용하였다.

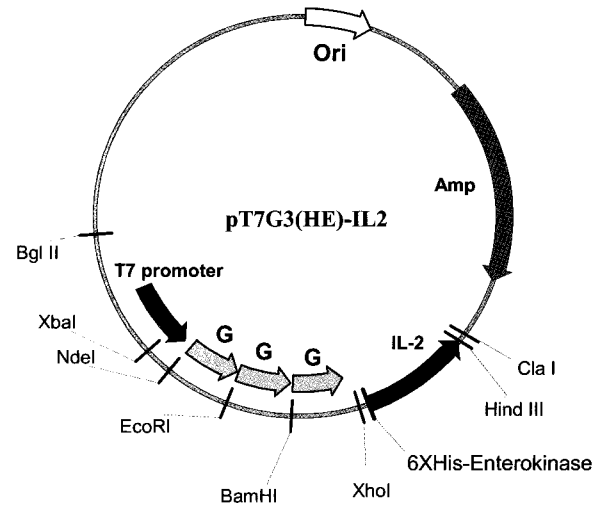


Figure 1. Map of the mother plasmid used to construct expression vectors of human interferon-gamma.

Western blot analysis

발현된 단백질이 인체유래 IFN- γ 임을 확인하기 위하여 Ausubel F. M. 등이 기술한 방법(23)에 따라 western blot을 수행하였다. Anti- γ -interferon (#407309, Calbiochem, CA, USA)를 1차 항체로, goat-anti-mouse IgG-AP (sc-2008, Santacruz Biotechnology, CA, USA)를 2차 항체로 사용하였으며, 각각의 항체는 phosphate buffered saline (pH 7.4)에 1 : 1000으로 희석하여 사용하였다. 감마인터페론의 표준물질로는 대장균이 생산하는 재조합 인체유래 γ -interferon (#407306, Calbiochem, CA, USA)을 사용하였으며, Immobilon-NC membrane (0.45 μ m, HAHY 00010, Millipore, MA, USA) 상으로 이동시킨 단백질들은 AP-conjugate substrate kit (#170-6432, Bio-Rad, CA, USA)를 사용하여 발현된 인체유래 IFN- γ 를 확인하였다.

형질전환체의 선별, 배양 및 융합단백질의 생산

Sambrook 등이 기술한 방법(21)에 따라 BL21(DE3)와 Origami™ (DE3)에 각각의 plasmid들을 형질전환시킨 다음, 100 μ g/ml ampicillin이 들어 있는 LB 평판배지에서 형질전환균주들을 선별하였다. 선별된 균주들은 종균배양을 거쳐 10 ml을 100 μ g/ml ampicillin이 첨가된 100 ml LB 배지에 접종한 다음 37°C에서 180 rpm으로 배양하였다. 배양액의 OD600가 0.4일 때 IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside)를 첨가 (최종농도 0.4 mM)하여 재조합 유전자의 발현을 유도하였다. IPTG 첨가 후 동일한 조건에서 4시간을 교반

배양하여 배양액으로부터 균체를 회수하였다.

단백질의 정량

단백질 정량은 Bradford법(23)으로 행하였으며, 단백질 표준물질로 bovine serum albumin을 사용하였다.

수용성 융합단백질의 분리 및 pH shift

Ferritin heavy chain을 융합파트너로 사용한 균체를 세포 배양액으로부터 분리한 후, 10 mM Tris-Cl (pH 8.0) 완충용액에 현탁하여 초음파 파쇄기 (Misonix, XL-2020, USA)로 파쇄하였다. 파쇄액을 다시 15000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상등액과 침전물을 각각 분리한 후 SDS-PAGE (12% Tris-Glycine gel)를 통해 수용성발현의 양상을 확인하였다. 또한 glucagon 삼중체 (G3)와 glucagon-ferritin 혼성체 (GFHM)를 융합파트너로 사용한 균주로부터 회수한 세포 배양액을 상기에서와 동일한 방법으로 상등액과 침전물을 각각 분리하였다. 분리된 침전물은 1% Triton X-100으로 2회 세척하여 잔존하는 불순물을 제거하였으며, 불용성 단백질 응집체로 확인된 침전물을 적당량의 NaOH (pH 12.0) 용액에 현탁하고 단백질을 완전히 변성시키기 위해 실온에서 약 1시간 정도 방치하였다. 변성된 단백질들을 refolding시키기 위해 현탁액의 pH가 8.0 부근이 될 때까지 1M Tris-Cl (pH 8.0) 완충용액을 첨가한 후 15000 rpm에서 15분간 원심분리 하였으며, 원심 상등액으로부터 수용화된 상태의 재조합 융합단백질을 얻었다. 수용화된 재조합단백질은 SDS-PAGE (12% Tris-Glycine gel) 상에서 분석하였다.

수용성 재조합 융합단백질 및 IFN- γ 의 정제

재조합 융합단백질만의 선택적 분리 및 정제는 Ni-NTA agarose bead (Qiagen, Germany)와 Chelating Excellose Spin Kit (Bioprogen, Korea)를 이용하였으며, 제조사에서 제공한 사용방법에 따라 목적단백질의 분리와 정제를 행하였다. IFN- γ 의 완전정제를 위하여 EK-Away Resin (R180-01, Invitrogen, USA)으로 융합파트너를 제거하기 위해 사용된 enterokinase를 제거하였다.

결과 및 고찰

수용성 IFN- γ 발현벡터의 선별

인체 유래의 IFN- γ 를 발현시키기 위해 ferritin heavy chain을 융합파트너로 사용하여 융합단백질을 수용성 상태로 발현시켰고, 다른 하나는 glucagon 삼중체 및 glucagon-ferritin 혼성체를 사용하여 불용성 응집체 (inclusion body)로 발현을 유도하였다.

Glucagon만을 융합파트너로 사용하여 재조합 단백질간의 자가 결합력을 증대시켜 고 순도의 재조합 단백질을 얻고자 하였던 균주 (pT7G3(HE)-IFN- γ)는 안정적으로 재조합 단백질을 생산하여 높은 순도의 불용성 응집체를 형성하였으나, Fig.2 (a)에서와 같이 pH shift를 통한 수용화에 있어서 매우 낮은 수용성을 보이면서 대부분의 재조합 단백질이 aggregates로 침전됨을 확인할 수 있었다. 반면에

ferritin heavy chain을 융합파트너로 사용하여 수용성 발현을 유도한 균주 (pT7FH(HE)-IFN- γ)에서는 Fig. 3에서와 같이 전체 발현된 재조합 IFN- γ 의 50% 이상이 수용성 상태로 발현됨을 확인할 수 있었다.

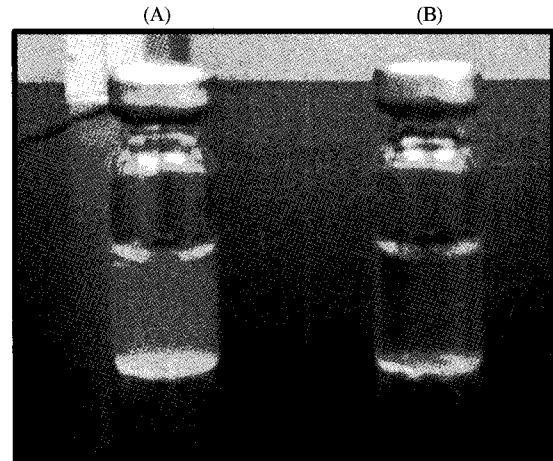


Figure 2. Effect of glucagon and ferritin heavy chain on the solubilization of fusion proteins (Fusion protein G3(HE)-IFN- γ (A) and GFHM(HE)-IFN- γ (B) were solubilized after pH shift treatment, respectively).

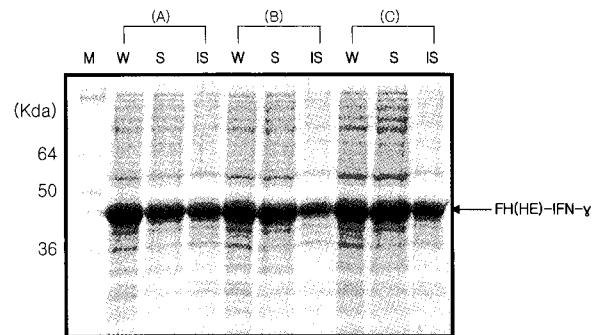


Figure 3. Confirmation of the content of soluble protein from pT7FH(HE)-IFN- γ transformants (pT7FH(HE)-IFN- γ was transformed into *E. coli* BL21(DE3). Fusion proteins were expressed under control of the T7 promoter in *E. coli* BL21(DE3) at 37°C and induced with 0.4 mM IPTG at cell growth O.D₆₀₀=0.4 for 4 h post-induction. Transformants (A), (B) and (C) were randomly selected and disrupted by ultra-sonicator. W, whole cell lysate; S, soluble fraction; IS, insoluble fraction).

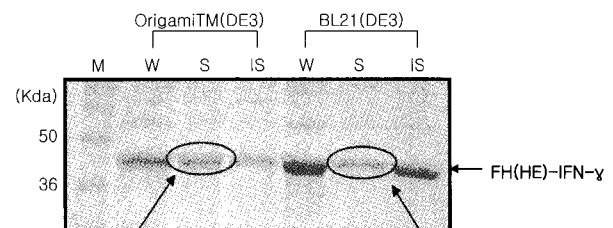


Figure 4. Expression patterns of the fusion protein FH(HE)-IFN- γ in BL21(DE3) and OrigamiTM(DE3) (FH(HE)-IFN- γ expression was carried out in 50 ml LB broth with *E. coli* BL21(DE3) and OrigamiTM(DE3), respectively. Cells were induced with 0.4 mM IPTG at cell growth O.D₆₀₀=0.4 for 4 h post-induction. W, whole cell lysate; S, soluble fraction; IS, insoluble fraction).

또한 glucagon-ferritin 혼성체를 통한 재조합 단백질의 발현을 유도한 균주 (pT7GFHM(HE)-IFN- γ)에서는 Fig. 2(b)에서와 같이 *in vitro* refolding 이후에 그 수용성이 매우 증가된 양상을 나타내었다. 따라서 *in vitro* refolding 이후 수용성이 현저히 떨어져 aggregates로 형성되는 pT7G3(HE)-IFN- γ 를 제외하고 수용성이 향상된 pT7GFHM(HE)-IFN- γ 및 pT7HGFHM(HE)-IFN- γ 와 수용성 발현을 목적으로 만들어진 pT7FH(HE)-IFN- γ 에 대해서 IFN- γ 의 발현을 검토하였다.

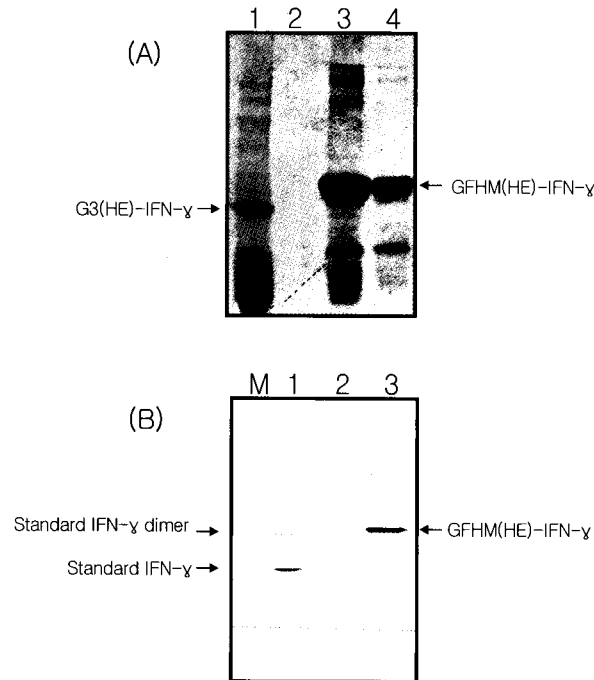


Figure 5. Effect of fusion partners on the fusion protein expression and solubilization. G3(HE)-IFN- γ and GFHM(HE)-IFN- γ were expressed under control of the T7 promoter in *E. coli* BL21(DE3) at 37°C and induced with 0.4 mM IPTG at cell growth O.D₆₀₀=0.4 for 4 h post-induction.

Panel (A): Both proteins were analyzed on SDS-PAGE. lane 1, total G3(HE)-IFN- γ protein before pH shift; lane 2, soluble fraction of G3(HE)-IFN- γ protein after pH shift; lane 3, total GFHM(HE)-IFN- γ protein before pH shift; lane 4, soluble fraction of GFHM(HE)-IFN- γ protein after pH shift.

Panel (B): Soluble GFHM(HE)-IFN- γ protein was confirmed with western blot analysis. M, molecular weight marker; lane 1, Standard IFN- γ ; lane 2, supernatant before pH shift; lane 3, supernatant after pH shift.

Host 적합성 검토

재조합 단백질 발현을 위한 host 적합성을 검토하기 위해 일반적으로 사용되는 BL21 (DE3) 이외에 *E. coli* K-12 계열의 균주로서 thioredoxin reductase (trxB)와 glutathione reductase (gor)에 돌연변이를 가지고 있어 원형질 내의 이황화결합 형성이 활성화 되어있는 균주인 OrigamiTM (DE3)을 이용하여 수용성의 재조합 융합 IFN- γ 의 발현양상을 검토하였다.

Fig. 4에서와 같이 IFN- γ 의 발현 수준은 그리 높지 않았으나, OrigamiTM (DE3)균주에서 발현된 재조합 융합 IFN- γ 의 50%이상이 수용성 형태로 존재함을 확인할 수 있었고, 반면에 BL21 (DE3) 균주에서는 20% 정도만이 수용성

형태로 존재함을 확인할 수 있었다. 상기의 결과를 바탕으로 OrigamiTM (DE3)균주에서 재조합 IFN- γ 의 발현정도를 증대시키기 위하여 재조합 단백질의 N-말단 부위에 6X His-tag을 추가하였다. 그러나 BL21 (DE3) 균주에서는 30% 이상이 재조합 IFN- γ 로 발현되었으나 OrigamiTM (DE3) 균주에서는 발현이 매우 저조하였으며 균의 생육도 BL21 (DE3)에 비하여 느려 cell mass도 떨어졌다(data not shown). 이러한 현상은 OrigamiTM (DE3) 균주가 재조합 IFN- γ 의 발현을 metabolic burden(24)으로 받아들이는 것으로서 본 균주는 재조합 IFN- γ 대량생산을 위한 숙주세포로서는 적합하지 않은 것으로 사료되었다.

재조합 IFN- γ 의 분리

재조합 IFN- γ 는 세포과쇄액으로부터 친화성 컬럼을 통해서 선택적으로 분리하였다. Glucagon을 융합파트너로 가지고 있는 GFHM(HE)-IFN- γ 와 HGFHM(HE)-IFN- γ 는 inclusion body의 형태로 불용성의 융합단백질을 생성하기 때문에 pH shift (12→8)를 통해서 *in vitro* refolding 후, 원심분리하여 상등액을 취하였으며, FH(HE)-IFN- γ 와 FH(HF)-IFN- γ 는 수용성 발현을 나타내기 때문에 초음파 파쇄 후 원심분리를 통하여 cell debris를 제거한 상등액을 취하여 Ni-NTA agarose bead column과 Chelating Excellose Spin Kit를 통해서 각각의 재조합단백질을 정제하였다. Glucagon 삼중체를 융합파트너로 사용한 경우와 glucagon-ferritin 혼성체를 융합파트너로 사용한 경우의 융합단백질 발현량과 pH shift를 통해 얻어진 수용화된 융합단백질의 양을 비교하였다. Fig. 5(A)에서와 같이 glucagon 삼중체를 융합파트너로 사용한 G3(HE)-IFN- γ 의 경우 glucagon-ferritin 혼성체를 융합파트너로 사용한 GFHM(HE)-IFN- γ 보다 융합단백질의 발현량이 현저히 적었으며(lane 1) pH shift를 통해 수용화된 단백질은 전혀 확인할 수 없었다(lane 2). GFHM(HE)-IFN- γ 의 경우 약 30% 가량이 수용화 되었으며(lane 4) 이들을 western blotting을 통해 확인할 수 있었다(Fig. 5(B)). 이는 glucagon과 혼성된 ferritin이 융합 IFN- γ 의 수용성을 증가시키는 것으로 사료된다.

Ferritin을 융합파트너로 사용한 경우는 목적 단백질을 수용성으로 발현시켰으나 두 개의 컬럼 중 어느 것에서도 효과적으로 분리가 이루어지지 않았고 다만 융합파트너의 N-말단에 6X His-tag이 하나 더 추가된 HGFHM(HE)-IFN- γ 만이 효과적으로 분리가 이루어졌다(data not shown). 이는 pT7HGFHM (HE)-IFN- γ 를 제외한 다른 plasmid에서는 융합 단백질 발현시 6X His-tag이 융합파트너와 목적단백질인 IFN- γ 사이에 존재함으로써 융합단백질 분자에 의해 외부로의 노출이 방해를 받아 Ni²⁺와 상호작용을 제대로 이루지 못한 것으로 생각되어진다. 반면에 pT7HGFHM(HE)-IFN- γ 의 발현시는 융합파트너의 C-말단 뿐만 아니라 N-말단에도 6X His-tag이 존재하므로 상대적으로 표면에 노출될 확률이 높아 효과적으로 분리될 수 있었을 것으로 사료된다.

융합파트너의 제거 및 IFN- γ 의 정제

발현된 융합단백질로부터 융합파트너를 선택적으로 제

거하기 위해 단백질 분해효소인 enterokinase 인식부위를 융합파트너와 IFN- γ 사이에 도입하였다. Enterokinase는 Asp-Asp-Asp-Asp-Lys를 인식부위로 하는 serine protease로서 인식부위의 C-말단을 자르는 분해효소이다. Enterokinase의 IFN- γ 에 대한 non-specific cleavage 여부를 확인하기 위해 표준물질로 *E. coli* 유래의 재조합 IFN- γ (Calbiochem, Germany)를 이용하여 예비실험을 수행한 결과, non-specific cleavage로 인한 IFN- γ 의 손상은 없는 것으로 확인되어 다음 실험에 사용하였다(data not shown).

융합단백질 HGFHM(HE)-IFN- γ 를 enterokinase로 처리하여 목적단백질인 IFN- γ 를 분리, 정제하였다. Fig. 6에서와 같이 pH shift를 통해서 수용화시킨 HGFHM(HE)-IFN- γ 를 Ni-NTA affinity column chromatography를 통해서 정제한다 다음(lane 1), enterokinase로 절단하고(lane 4) EK-Away Resin으로 enterokinase를 제거한 후 Chelating Excellose spin kit를 이용하여 인간유래의 재조합 IFN- γ 를 완전 정제하였다(lane 2). Enterokinase로 HGFHM(HE)-IFN- γ 를 절단하면 His-tag잔기가 융합파트너의 N-말단과 C-말단에 존재하게 되어 Ni-NTA agarose bead에 통과시키지만 해도 flow-through를 통해서 IFN- γ 를 간단히 얻을 수 있었다. 즉 His-tag잔기가 남아 있는 모든 단백질은 Ni-NTA agarose bead에 모두 결합되고(lane 3) His-tag잔기가 없는 목적 단백질만 그대로 빠져나오게 함으로서 순수하게 정제할 수 있었다.

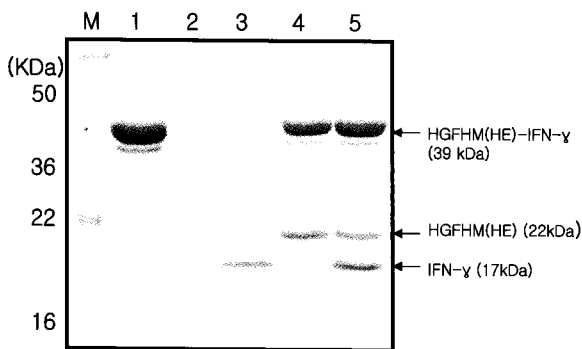


Figure 6. Purification of IFN- γ from fusion protein HGFHM(HE)-IFN- γ using affinity column chromatography (HGFHM(HE)-IFN- γ digested with enterokinase at 30°C for 10 h and enterokinase was removed by EK-Away Resin. M, molecular weight marker; lane 1, HGFHM(HE)-IFN- γ after pH shift; lane 2, flow-through (purified IFN- γ); lane 3, eluent; lane 4, enterokinase digested HGFHM(HE)-IFN- γ .

발현유도제가 융합단백질의 발현에 미치는 영향

본 연구에 사용된 재조합 단백질 발현시스템은 T7 promoter에 의해서 재조합 단백질의 발현이 조절되기 때문에 이들의 발현을 유도하기 위한 유도체로서 IPTG와 lactose를 각각 사용하였다. Fig. 7(a)에서 보는 바와 같이 재조합 단백질 발현유도를 위한 최적의 IPTG농도를 결정하기 위해 0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM의 IPTG로 단백질 발현을 유도하였다. 0.5 mM과 1 mM에서의 발현효율이 비슷하였으며 IPTG의 최적 농도를 0.5 mM로 결정하였다. 한편 lactose 자체가 cell에 의해 glucose와

galactose로 분해되어 발현 메카니즘을 방해하기 때문에 발현효율이 떨어지는 단점이 있음에도 불구하고 공정상의 경제성 측면을 고려하여 IPTG에 비해 상대적으로 저가인 lactose를 이용하여 단백질 발현을 유도하였다.

Fig. 7(b)에서와 같이 lactose의 농도를 10 mM에서부터 100 mM까지 세분화하여 발현을 유도한 결과, 10 mM부터 70 mM까지는 비슷하였지만 10 mM에서 발현효율이 더 양호하였다. 대체로 30% 이상의 발현율을 보였으나 100 mM에서는 발현율이 감소하였다. 이러한 현상은 세포막을 통해 lactose가 cell내로 이동할 때 proton과 transport시스템을 공유하는 H⁺-symport 시스템에 의존(25, 26)하므로 갑작스런 lactose의 유입은 세포내의 proton motive force를 교란시켜 세포성장을 방해하는 것으로 사료된다. 따라서 lactose를 이용한 적정 발현농도는 세포성장에 방해를 주지 않으면서 발현효율이 양호할 것으로 기대되는 10 mM과 20 mM의 중간값인 15 mM로 결정하였다.

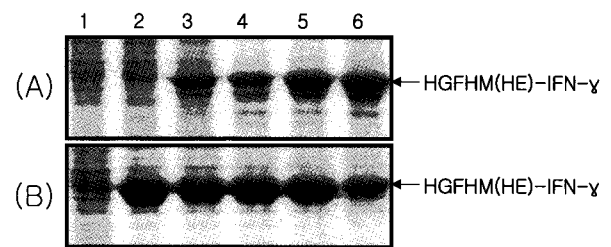


Figure 7. Effect of various concentrations of IPTG (panel A) and lactose (panel B) on the expression of HGFHM(HE)-IFN- γ (Fusion protein HGFHM(HE)-IFN- γ was expressed in *E. coli* BL21(DE3) harboring pT7HGFHM(HE)-IFN- γ and induced with various concentrations of IPTG and lactose at cell growth O.D₆₀₀=0.4 for 4 h post-induction, respectively).

Panel (A): lane 1, uninduced whole cell; lane 2, 0.001 mM IPTG; lane 3, 0.01 mM IPTG; lane 4, 0.1 mM IPTG; lane 5, 0.5 mM IPTG; lane 6, 1 mM IPTG

Panel (B): lane 1, uninduced whole cell; lane 2, 10 mM lactose; lane 3, 20 mM lactose; lane 4, 50 mM lactose; lane 5, 70 mM lactose; lane 6, 100 mM lactose

유가식 배양에 의한 IFN- γ 의 생산

재조합 INF- γ 의 산업적인 대량생산을 위해 먼저 5 L 발효조에서 발효조건을 검토하였다. Fig. 8(a)에서 보듯이 5 L 유가식 발효 배양을 함에 있어 발효조에 종균을 배양한 이후 glucose가 완전히 고갈된 배양 6시간째부터 glucose를 일정한 속도 (2.4 g/h)로 첨가하기 시작하여 잔존 glucose 양이 0.5 g/L의 수준 미만으로 유지하였으며, 이후 세포 비성장속도가 0.2 h⁻¹를 유지하도록 glucose 분석기 (YSI2700 Biochemistry Analyzer, OH, USA)를 통하여 glucose량을 모니터링 하면서 주입속도를 2.4~7.2 g/h로 조절하였다. 또한 예비실험에서 재조합 INF- γ 발현유도는 세포 성장 말기에 하는 것이 효과적이었기 때문에 glucose로 세포의 성장을 유도하다가 O.D₆₀₀ = 94 시점에서 15 mM lactose로 재조합 융합단백질 발현을 유도하였다. Fig. 8(b) 결과에서와 같이 유도 발현된 재조합 단백질은 lactose에 의해 발현이 유도된 이후 6시간 정도 지난 T6에서 25%이상의 발현율을 나타내었으며, 재조합 균체의 단위 건조질량 (dry cell weight,

g)으로 약 11 g DCW/L 수준의 재조합 융합단백질이 생산되었다.

감 사

이 논문은 2002년도 한국산업기술진흥협회 연구성과지원사업 및 중소기업진흥공단 이전기술개발사업의 연구비 지원에 의하여 수행되어졌으며 이에 감사드립니다.

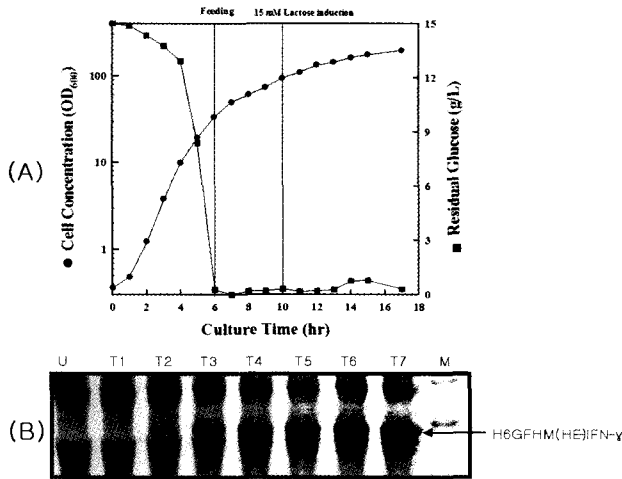


Figure 8. Cell growth (A) and expression patterns of the fusion protein HGFHM(HE)-IFN- γ (B) during the fed-batch culture. To measure the cell growth and analyse the fusion protein expression pattern, 10 ml of culture broth was taken every one hour. U, uninduced sample; T1~T7, every one hour sample after lactose induction; M, molecular weight marker.

요 약

IFN- γ 의 대량생산을 위한 기초연구로서 IFN- γ 의 아미노 말단에 glucagon과 ferritin을 융합파트너로 각각 결합시켜 재조합 IFN- γ 의 발현을 유도하였다. 대장균 내에서 발현되는 IFN- γ 는 그 자체로 매우 강한 소수성 결합의 양상을 나타내어 inclusion body 형태로 발현된다고 알려져 있으나 OrigamiTM(DE3) 균주로부터 50% 이상의 수용성 형태로 발현시켰다.

IFN- γ 로부터 융합파트너를 제거할 수 있는 system을 개발하기 위해 융합파트너와 IFN- γ 사이에 enterokinase cleavage site를 도입하였으며, enterokinase에 의해 IFN- γ 에는 영향을 미치지 않고 효과적으로 융합파트너를 제거할 수 있었다. 재조합 IFN- γ 의 분리 및 정제를 위해 발현벡터 상의 융합파트너와 IFN- γ 사이에 6X His-tag을 도입하였고 융합파트너의 N-말단에도 6X His-tag을 추가적으로 도입함으로써 융합파트너와 더불어 enterokinase에 의해 분해되지 않은 융합단백질을 Ni-NTA agarose column으로 제거함으로써 IFN- γ 를 완전 정제할 수 있었다. IFN- γ 의 발현을 유도하는 발현유도체로서 15 mM lactose를 이용하여 5 L 발효조에서 IFN- γ 의 발현을 검토한 결과, 재조합 균체의 단위 건조질량 (dry cell weight, g)으로 약 11 g DCW/L 수준의 재조합 융합단백질을 얻을 수 있었다.

REFERENCES

1. Isaacs, A., J. Lindemann, and R. C. Valentine (1957), Virus interference. II. Some properties of interferon, *Proc. Roy. Soc. London (Biol)*. **147(B)**, 268-273.
2. Loosdrecht, van de A., G. J. Ossenkoppele, R. H. Beelen, M. G. Broekhoven, M. M. Langenhuijsen (1992), Role of interferon gamma and tumour necrosis factor alpha in monocyte-mediated cytostasis and cytotoxicity against a human histiocytic lymphoma cell line, *Cancer Immunol. Immunother.* **34(6)**, 393-398.
3. Fidler, I. J., W. E. Fogler, E. S. Kleinerman, and I. Saiki (1985), Abrogation of species specificity for activation of tumoricidal properties in macrophages by recombinant mouse or human interferon- γ encapsulated in liposomes, *J. Immunol.* **135**, 4289-4296.
4. Mehta, K., R. L. Juliano, and G. Lopez-Berestein (1984), Stimulation of macrophage protease secretion via liposomal delivery of muramyl dipeptide derivatives to intracellular sites, *Immunology* **51**, 517-527.
5. Smith, M. R., K. Muegge, J. R. Keller, H.-F. Kung, H. A. Young, and S. K. Durum (1990), Direct evidence for an intracellular role for IFN- γ : microinjection of human IFN- γ induces Ia expression on murine macrophages, *J. Immunol.* **144**, 1777-1782.
6. Pfeffer, L. M., C. A. Dinarello, R. B. Herberman, B. R. Williams, E. C. Borden, R. Bordens, M. R. Walter, T. L. Nagabhusan, P. P. Trotta, and S. Pestka (1998), Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons, *Cancer Res.* **58(12)**, 2489-2499.
7. Pestka, S. (1997), The human interferon-alpha species and hybrid proteins, *Semin. Oncol.* **24(suppl. 9)**, S9-4-S9-17.
8. Sreevalsan, T. (1995), Biological therapy with Interferon-alfa and beta: preclinical studies. In: DeVita V. T. J., S. M. D. Hellman, S. A. Rosenberg, eds. *Biologic Therapy of Cancer*, 2nd ed., Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 347-364.
9. Naylor, S. L., A. Y. Sakaguchi, T. B. Shows, M. L. Law, D. V. Goeddel, and P. W. Gray (1983), Human immune interferon gene is located on chromosome 12, *J. Exp. Med.* **57**, 1020-1027.
10. Nagata, S., N. Mantei, and C. Weissmann (1980), The structure of one of the eight or more distinct chromosomal genes for human interferon-alpha, *Nature* **287**, 401-408.
11. Nagata, S., H. Taira, A. Hall, L. Johnstrud, M. Streuli, J. Escodi, W. Boll, K. Cantell, and C. Weissmann (1980), Synthesis in *E. coli* of a polypeptide with human leukocyte interferon activity, *Nature* **284**, 316-320.
12. Goldberg, M. M., L. S. Belkowsky, and B. R. Bloom (1989), Regulation of macrophage growth and antiviral activity by interferon-gamma, *J. Cell Biol.* **109**, 1331-1340.
13. Gattacceca, F., Y. Pilatte, C. Billard, I. Monnet, S. Moritz, J. Le Carrou, M. Eloit, and M.-C. Jaurand (2002), Ad-IFN- γ induces antiproliferative and antitumoral responses in malignant mesothelioma, *Clin. Cancer Res.* **8(10)**, 3298-3304.
14. Shuai, K., J. Liao, and M. M. Song (1996), Enhancement of antiproliferative activity of gamma interferon by the specific inhibition of tyrosine dephosphorylation of Stat1, *Mol. Cell Biol.* **16(9)**, 4932 - 4941.
15. Dalton, D. K., S. Pitts-Meek, S. Keshav, I. S. Figari, A. Bradley, T. A. Stewart (1993), Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes, *Science* **259(5102)**, 1739-1742.

16. Billiau, A. A., H. Heremans, K. Vermeire, and P. Matthys (1998), Immunomodulatory Properties of Interferon- γ : An Update, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **856**(1), 22-32.
17. Shin, C. S., M. S. Hong, C. S. Bae, D. Y. Kim, H. C. Shin, and J. Lee (1988), 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.
18. Sasaki, K., S. Dockerill, D. A. Adamiak, I. J. Tickle, and T. Blundell (1975), X-ray analysis of glucagon and its relationship to receptor binding, *Nature* **257**, 751-757.
19. Saraswat, V., J. Lee, D. Y. Kim, and Y. H. Park (2000), Synthesis of recombinant human interleukin-2 via controlled feed of lactose - complex media in fed-batch cultures of *Escherichia coli* BL21(DE3) [pT7G3-IL2] *Biotechnol. Letters* **22**, 261-265.
20. Lee, J., S. W. Kim, Y. H. Kim, and J. Y. Ahn (2002), Active human ferritin H/L-hybrid and sequence effect on folding efficiency in *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **298**, 225-229.
21. Sambrook, J. and D. W. Russell (2001), *Molecular Cloning - a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press
22. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (2002), *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, 5th ed. John Wiley & Sons, Inc.
23. 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.
24. Alonso, A., G. Morales, R. Escalante, E. Campanario, L. Sastre, and J. L. Martinez (2004), Overexpression of the multidrug efflux pump SmeDEF impairs *Stenotrophomonas maltophilia* physiology, *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 432-434.
25. Büchel, D. E., B. Gronenborn, and B. Müller-Hill (1980), Sequence of the lactose permease gene, *Nature* **283**, 541-545.
26. Kaback, H. R., S. Frillingos, H. Jung, K. Jung, G. G. Prive, M. L. Ujwal, C. Weitzman, J. Wu, and K. Zen (1994), The lactose permease meets Frankenstein, *J. Exp. Biol.* **196**, 183-195.