

Maltose Binding Protein 융합단백질에 의한 인간유래의  
엔지오스타틴과 엔도스타틴의 대장균에서 수용성 단백질 발현

## Soluble Expression of Human Angiostatin and Endostatin by Maltose Binding Protein (MBP) Fusion in *E. coli*

백 선 열' 최 선 건''  
Paek, Seon-Yeol Choi, Shin-Geon

### Abstract

Rapid production of therapeutic proteins such as angiostatin and endostatin angiogenic inhibitors has been highly demanded for cancer treatment. In this regard, recombinant human angiostatin and endostatin were successfully expressed as soluble forms by maltose binding protein (MBP)-mediated fusion expression in *Escherichia coli*. PCR amplified angiostatin and endostatin genes from human placenta cDNA library were inserted into an expression vector pMAL-c2e to construct prokaryotic expression vectors, pMAL-c2e/AS and pMAL-c2e/ES, respectively. Recombinant angiostatin and endostatin were efficiently expressed in *E. coli* origami (DE3) after IPTG induction and protein expression were confirmed by SDS-PAGE analyses. The expressed recombinant proteins were purified near homogeneity using an amylose affinity column chromatography. In contrast that previous *E. coli* expressions were all insoluble, our results first time demonstrated that MBP fused human angiostatin and endostatin were soluble in *E. coli*.

**키워드 :** 앤지오스타틴, 엔도스타틴, MBP 융합단백질, 수용성 단백질발현  
**Keywords :** angiostatin, endostatin, MBP fusion protein, solubilization

1. 서론

인류는 암을 극복하기 위해 수없이 많은 연구를 거듭하여, 종양의 성장과 전이는 신생혈관형성에 의존적이라는 것을 밝혀냈으며 이에 따라 신생혈관억제 치료방법은 고형암의 새로운 치료제가 될 수 있을 것이라는 가설이 제안되었다 [2]. 이 후, 신생혈관억제를 통한 암 치료제를 개발하기 위해 서 다각적인 연구가 진행되었고, 그 결과 동물의 세포는 생존을 위해서 산소와 영양분이 필요하며,

이것을 공급받기 위해서는 산소 확산범위에 해당하는  $100\mu\text{m}$  이내에 세포가 존재해야 한다는 사실이 밝혀졌다. 따라서 이를 초과한 세포에서는 산소와 영양분의 공급을 원활히 하기 위하여 혈관생성 유도물질을 분비해 혈관생성을 유도한다는 것을 밝혀냈으며, 평상시 신생혈관형성은 신체내의 길항작용에 의해서 엄격하게 통제되어, 성인의 경우에는 대부분의 혈관은 거의 분열하지 않고 있고, 제한적인 신생혈관생성이 일어난다. 이로 미루어 보아 신생혈관생성이 억제된 상태로 유지되고 있으며 이러한 역할을 하는 인자들이 있을 것으로 예상할 수 있었다.

이와 관련하여 많은 연구가 진행되었고 그 결과 많은 종류의 억제 인자들이 발견되었다. 이러한 혈

\* 강원대학교 대학원 생물공학과 석사과정

\*\* 강원대학교 공과대학 생물공학과 교수, Ph.D.,  
교신저자

관생성억제인자들중 대표적으로 앤지오스타틴(angiostatin)과 엔도스타틴(endostatin)이 1994년과 1997년에 J. Folkman 그룹에 의해서 발견되었으며 쥐 실험을 통해서 그 활성이 입증되었다[3,4].

이를 바탕으로 각각의 억제물질에 대해 알아보면, 앤지오스타틴은 38kDa의 플라스미노겐의 일부분이며, 플라스미노겐의 클링클 도메인 4개를 포함하고 있다. 플라스미노겐 자체는 신생혈관 억제 효과가 없지만 앤지오스타틴은 신생혈관 억제 효과가 있으며 종양의 성장 및 전이를 막는다[3]. 이 물질의 기전은 아직 명확하게 정의되어 있진 않지만 혈관내피세포의 ATP 합성효소와 앤지오모토린 등과 결합하여 결과적으로 세포의 증식과 이동을 방해하는 것으로 제시되고 있다[5].

이와 더불어 같은 신생혈관 억제역할을 하는 엔도스타틴은 20kDa의 콜라겐18 일부분으로서 앤지오스타틴과 같이 콜라겐18 자체일 경우에는 신생혈관 억제 효과가 없지만, 절단된 엔도스타틴은 신생혈관 억제효과가 있다. 이 물질의 기전 역시 완벽하게 정의되어 있지 않지만 혈관내피세포의 세포사멸을 유도하여, 동물모델에서 종양의 성장 및 전이를 강력하게 억제하는 것으로 제시되고 있다[3].

따라서 두 단백질의 정확한 작용기전 및 치료제로서의 가능성을 연구하기 위해서는 많은 양의 단백질을 필요로 한다. 하지만 두 단백질 모두 인간유래의 단백질이므로 원해생물체에서는 수용성 단백질로 생산하기가 매우 어려운 점이 있어, 지금까지는 흐르 및 동물세포에서 얻어왔다. 따라서 본 연구에서는 이를 해결하기 위해서 수용성이 높은 MBP(maltose binding protein)과의 융합을 통하여 수용성 단백질을 생산하고자 한다[1].

## 2. 재료 및 연구방법

### 2.1 시약 및 재료

엔지오스타틴과 엔도스타틴 유전자는 한양대학교 의과대학 김용석 교수로부터 얻었다. 발현을 위한 운반체인 pMAL-c2e는 New England Biolab에서 구매를 하였다. 발현 및 유전자 증폭을 위한 균주는 origami(DE3)와 XL10-gold를 이용하였다. PCR을 위한 primer는 bioneer(Korea)에 제작을 의뢰하였다. 발현을 유도하기 위한 유도제인 Isopropyl thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG)는 TaKaRa로부터 구매하였다. 발현된 단백질의 정체를 위해 MBP Excellose spin kit을 바이오프로젠으로부터 구매하였다. 또한 본 실험에서 사용된 완충용액은 다음과 같다. 완충용액 1:20mM

(pH7.4), 0.2M NaCl, 완충용액 2: 20mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.2M NaCl, 10mM maltose.

Table 1. PCR primer list

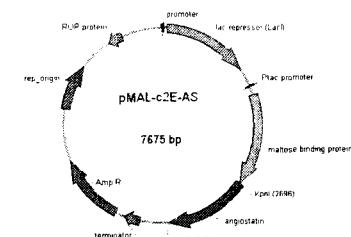
Primer 1	5'-GGGGTACCGCACAGCCACCGGGACTTC-3'
Primer 2	5'-CCAAGCTTCTACTTGGAGGCAGTCAT-3'
Primer 3	5'-GGGTACCCCTGCAAGACTGGAAATGGA-3'
Primer 4	5'-CCAAGCTCTAGCATTTCAGGTTGCA-3'

### 2.2 연구방법

#### 2.2.1 단백질 발현을 위한 운반체 제작

단백질 발현을 위한 운반체에 앤지오스타틴과 엔도스타틴 유전자를 삽입하여 만들었다. 각각의 유전자는 그것을 포함하고 있는 cDNA와 primer 1, 2와 primer 3, 4를 이용하여 PCR을 통해서 증폭하였으며, 각각의 primer는 앞에는 *Kpn*I과 뒤에는 *Hind*III를 가지고 있다. 증폭과정은 PCR (Applied Bio)를 이용하여서 94°C에서 15초, 59°C에서 30초, 72°C에서 각각 30초, 60초를 주었으며 이 과정을 28회 반복하였다. 증폭된 DNA 절편은 Ethidium Bromide가 포함된 0.8% 아гар조igel을 이용하여서 관찰하였다. 증폭된 DNA 절편은 발현 운반체로 삽입을 하였다(Fig. 1).

A)



B)

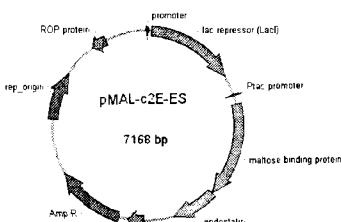


Fig. 1. Schematic maps of (A) pMAL-c2e/AS, (B) pMAL-c2e/ES

### 2.2.2 Origami(DE3)에서 재조합 단백질의 발현

각각의 유전자가 삽입된 발현운반체를 *E. coli* XL10-gold에 먼저 삽입한 후 다시 origami(DE3)에 넣었다. *E. coli* origami(DE3)는 LB배지에서 3시간 동안 배양을 하여 A600에서 O.D.가 0.7정도 되었을 때 최종농도가 0.3mM이 되도록 IPTG를 넣어주어 발현을 유도하였으며, 후에 *E. coli*를 30°C에서 13시간동안 더 키웠다. 배양이 끝난 후 4,000g에서 20분동안 원심분리하여 *E. coli*를 분리하였다.

### 2.2.3 MBP융합단백질의 정제

원심분리를 통해서 얻어진 *E. coli* 세포에 완충용액 1을 넣고 재현탁한 후, 초음파 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포추출액을 9,000g에서 30분동안 원심분리를 통하여 고액분리를 하였다. 얻어진 상층액을 MBP spin column에 넣은 후 완충용액 1을 두 번 더 넣어주어 비특이적인 단백질들을 제거하였다. 후에 완충용액 2를 넣어 목적단백질을 용출하였다.

### 2.2.4 정제된 단백질의 확인

정제된 단백질을 확인하기 위해서 정제된 단백질을 SDS sample 완충용액과 섞은 후에 15% polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 하여 확인하였다.

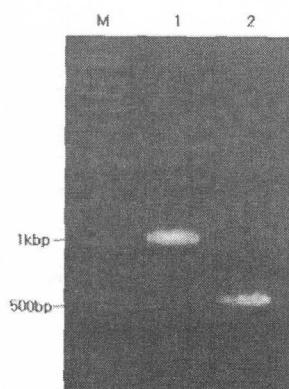


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis analysis of angiostatin and endostatin PCR products. lane 1: angiostatin PCR product, lane 2: endostatin PCR product

## 3. 결론

### 3.1 앤지오스타틴과 엔도스타틴 유전자의 확인

앤지오스타틴과 엔도스타틴의 유전자를 확인하기 위해서 pGEM T-easy vector 삽입하고 *E. coli* XL10-gold에 형질전환 하여 유전자를 발현운반체로 삽입하기 위한 유전자를 증폭하였다. 또한 증폭된 유전자를 염기서열분석을 통해서 유전자의 서

열을 확인하였다. 확인된 유전자의 서열을 NCBBLAST를 통하여 확인한 결과 앤지오스타틴은 NM000301.1으로 확인되었으며 567, 636, 918 부분에서 침묵적 돌연변이가 있는 것으로 확인되었다. 엔도스타틴은 NM 030582.3으로 확인되었으며, 정확히 일치하는 것으로 확인되었다.

### 3.2 앤지오스타틴, 엔도스타틴 발현 운반체 제작

pGEM T-easy vector에 포함되어 있는 앤지오스타틴과 엔도스타틴 유전자를 주형으로 하여서 PCR을 하였다. 0.8% agarose 젤을 이용하여 확인한 결과 앤지오스타틴은 1.1kbp, 엔도스타틴은 0.6kbp 크기의 DNA 절편이 관찰되었다.(Fig. 2) 이것을 이용해서 pGEM T-easy vector에 삽입하여 증폭된 유전자를 *E. coli* 발현운반체인 pMAL-c2e에 다시 삽입하였다. 최종적으로 발현운반체에 삽입된 유전자는 재한효소 *Kpn*I, *Hind*III를 처리하여 나온 DNA 절편의 크기를 이용하여 확인하였다(Fig. 3).

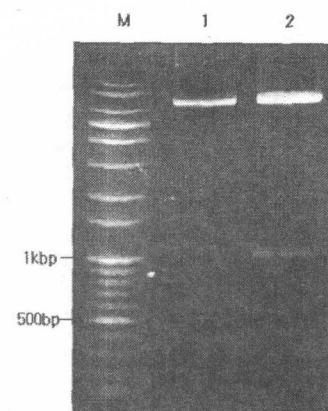


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis analysis for insert gene confirmation of enzyme(*Kpn*I, *Hind*III) digestion of fusion gene. lane 1 : endostatin fusion gene digested enzyme(*Kpn*I, *Hind*III). lane 2 : angiostatin fusion gene digested enzyme(*Kpn*I, *Hind*III.)

### 3.3 *E. coli* origami(DE3)에서의 재조합 앤지오스타틴과 엔도스타틴의 발현

재조합된 앤지오스타틴과 엔도스타틴은 *E. coli* origami(DE3)의 O.D.가 0.7에서 IPTG의 최종농도가 0.3mM이 되도록 하여서 발현을 유도하였다. 이 후 30°C에서 13시간동안 배양을 하였고 이 때 다량의 수용성 목적 단백질을 얻을 수 있었다. 이것은 SDS-PAGE에서 MBP와 융합된 앤지오스타틴은 약 100kDa정도에서 관찰이 되었고, MBP와 융합된 엔도스타틴은 약 60kDa에서 관찰이 되었다. 또한 수용성과 불용성의 확인을 위해 전체 세포파쇄액과 원심분리를 통해 얻어진 상층액들을 비교하여 확인

한 결과, 목적 단백질이 대부분 수용성이라는 것을 알 수 있었다(Fig. 4).

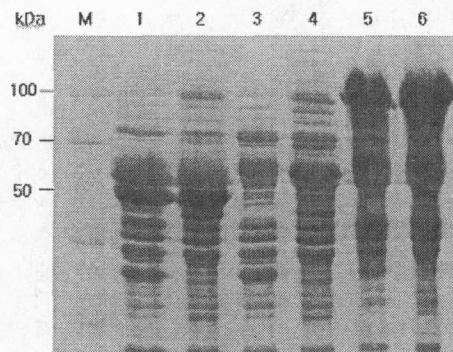


Fig. 4. SDS-PAGE analyses of MBP - angiostatin and endostatin fusions expressed in *E. coli* origami(DE3). Lane 1: total cell lysate of vector control (pMAL-c2e), lane 2: supernatant of vector control (pMAL-c2e), lane 3: total cell lysate of MBP-endostatin fusion (pMAL-c2e/ES), lane 4: supernatant of MBP- endostatin fusion (pMAL-c2e/ES), lane 5: total cell lysate of MBP-angiostatin fusion (pMAL-c2e/AS), lane 6: supernatant of MBP- angiostatin fusion (pMAL-c2e/AS).

#### 3.4 *E. coli* origami(DE3)에서 발현된 재조합 엔지오스타틴과 엔도스타틴의 정제

수용성으로 확인된 재조합 엔지오스타틴과 엔도스타틴을 MBP excellose MBP spin kit을 이용해서 정제를 하였다. 정제한 결과 예상하던 밴드의 영역의 단백질을 얻을 수 있었다(Fig. 5).

#### 4. 고찰

신생혈관형성은 암의 성장과 침윤에 꼭 필요한 요소이다. 따라서 이것을 억제한다면 새로운 암 치료방법 중 하나로 접근할 수 있을 것이며, 엔지오스타틴과 엔도스타틴과 같은 신생혈관억제 물질들은 혈관내피세포의 정상적으로 성숙된 혈관내피세포에는 영향을 주지 않으면서 암에 의해 분화가 유도된 혈관내피세포를 억제함으로써 암의 성장 및 침윤을 억제한다. 또한 이것은 신생혈관형성 억제물질이 목적부위에 접근하기 쉬우며, 낮은 내성을 가지고 있다는 장점도 있다. 즉 인간의 플라스미노겐의 절편인 엔지오스타틴과 콜라겐의 절편인 엔도스타틴은 혈관내피세포의 이동성, 증식성, 암의 성장을 억제하는데 효과가 있다. 하지만 기능적으로 활성이 있는 엔지오스타틴과 엔도스타틴은

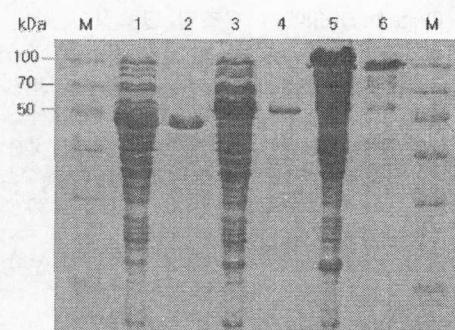


Fig. 5. SDS-PAGE analyses of crude extracts and purification of fusion protein using MBP excellose spin kit. Lane 1: supernatant of control crud extracts, lane 2: purified MBP control, lane 3: supernatant of MBP-Endostatin fusion crude extracts, lane 4: purified MBP-Endostatin fusion protein, lane 5: supernatant of MBP-Angiostatin fusion crude extracts, lane 6: purified MBP- angiostatin fusion.

효모에서 주로 생산이 되어져 왔다[19,20]. 그러나 효모에서 발현을 유도하는 것은 대량화에 대한 문제점과 낮은 수율, 높은 비용이라는 문제점을 안고 있다. 따라서 본 연구에서는 이러한 것을 극복하기 위해서 대장균을 이용하여서 발현을 유도하였고, 그 결과 수용성인 MBP와 융합된 엔지오스타틴과 엔도스타틴을 얻을 수 있었다.

추후에 MBP와 목적단백질 사이에 단백질 가수분해 효소의 절단 인식서열을 이용하여 목적단백질을 분리하는 실험이 필요하다. 지금까지 대장균에서 이루어진 대부분의 발현이 불용성의 형태로되어 있어 가용화과정을 필요로 하였다. 그러나 본 실험에서 얻어진 MBP융합단백질은 수용성으로 존재하여 곧 바로 효소절단을 통한 목적단백질인 엔지오스타틴과 엔도스타틴의 생산이 가능하므로 정제방법면에 있어서 기존 방법보다 많은 장점을 지닌 것으로 사료된다.

#### 참고문헌

- [1] Guan, C., Li, P., Riggs, P.D. and Inouye, H. Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene*, 67:21-30, 1988.
- [2] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implication. *N. Engl. J. Med.*, 285:1182-1186, 1971.

- [3] Michael S. O'Reilly, Lars Holmgren, Yuen Shing, Catherine Chen, Rosalind A. Rosenthal, Marsha Moses, William S. Lane, Yihai Cao, E. Helene Sage, Judah Folkman., Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma. *Cell*, 79:315-328, 1994.
- [4] Michael S. O'Reilly, Thomas Boehm, Yuen Shing, Naomi Fukai, George Vasilios, William S. Lane, Evelyn Flynn, James R. Birkhead, Bjorn R. Olsen, Judah Folkman., Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. *Cell*, 88:277-285, 1997.
- [5] Moser TL, Stack MS, Asplin I, Enghild JJ, Hojrup P, Everitt L, Hubchak S, Schnaper HW, Pizzo SV. Angiostatin bind ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:2811-2816, 1999.
- [6] Semi Kim. angiogenesis: From Branch to Bedside. *Biochemistry and Molecular Biology News*, October, 2005.
- [7] Kim Lee Sim B, Angiostatin and endostatin: endothelial cell-specific endogeneous inhibitors of angiogenesis and tumor growth. *Angiogenesis*, 2:37-48, 1998.
- [8] Kim Lee Sim B, MacDonald NJ, Gubish ER. Angiostatin and endostatin: endogeneous inhibitors of tumor growth. *Cancer Metastasis Rev.*, 19:181-190, 2000.
- [9] Tabruyn SP, Griffioen AW. Molecular pathways of angiogenesis inhibition. *Biochem Biophys Res Comm*, 355:1-5, 2007.
- [10] Kim HK, Lee SY, Oh HK, Kang BH, Ku HJ, Lee Y, Shin JY, Hong YK, Joe YA. Inhibition of endothelial cell proliferation by the recombinant kringle domain of tissue-type plasminogen activator. *Biochem Biophys Res Comm*, 304:740-746, 2003.
- [11] Lu H, Zhang H, Wang Q, Yuan H, He W, Zhao Z, Li Y. Purification, refolding of hybrid hIFNg-Kringle 5 expressed in *E. coli*. *Curr Microbiol*, 42:211-216, 2001.
- [12] Kim Lee Sim B, O'Reilly MS, Liang H, Fortier AH, He W, Madsen JW, Lapcevich R, Nacy CA. A recombinant human angiostatin protein inhibits experimental primary and metastatic cancer. *Cancer Res*, 57:1329-1334, 1997.
- [13] Hou WH, Fang T, Chai YR, Wang TY, Wang JM, Xue LX. Expression of recombinant kringle 1-5 domains of human plasminogen by a prokaryote expression system. *Protein Expr Purif*, 47:93-98, 2006.
- [14] Huang X, Wong MKK, Zhao Q, Zhu Z, Wang KZQ, Huang N, Ye C, Corelik E, Li M. Soluble recombinant endostatin purified from *E. coli* : anti angiogenic activity and a anti tumor effect. *Cancer Res*, 61:478-481, 2001.
- [15] Yang F, He YL, Jiang XY, Liu Y, Peng DX, Zong LL. Cloning, expression, purification and characterization of human endostatin gene. *J First Mil Med Univ*, 25:416-418, 2005.
- [16] You WK, So SH, Sohn YD, Lee HS, Park DH, Chung SI, Chung KH. Characerization and biological activities of recombinant human plasminogen kringle 1-3 produced in *E. coli*. *Protein Expr Purif*, 36:1-10, 2004.
- [17] Mao X, Liu W, Fu S, Li R, Liang G. Fusion expression and identification of angiostatin and endostatin in *E. coli*BL21(DE3). *Journal of biomedical engineering*, 23:1086-91, 2006.
- [18] Kim KS, Kim HS, Park JS, Kwon YG, Park YS. Inhibition of B16BL6 tumor progression by coadministration of recombinant angiostatin K1-3 and endostatin genes with cationic liposomes. *Cancer Gene Ther.*, 11:441-449, 2004.
- [19] Wu J, Fu W, Luo J, Zhang T. Expression and purification of human endostatin from *Hansenular polymorpha* A16. *Protein Expr Purif*, 42:12-19, 2005.
- [20] Zhang AL, Zhang TY, Luo JX, Chen SC, Guan WJ, Fu CY, Peng SQ, Li HL. Constitutive expression of human angiostatin in *Pichia pastoris* by high-density cell culture. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 34:117-122, 2007.