

고초균을 이용한 재조합 인간 골 형성 단백질-7의 발현과 정제

김춘광^{1,4,5} · 오성덕⁴ · 이종일^{2,3,4,5*}

¹전남대학교 물질·생물화학공학과, ²응용화학공학부, ³촉매연구소, ⁴바이오광사업단, ⁵기능성 나노정밀화학사업단

Expression and Purification of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-7 (rhBMP-7) in *Bacillus subtilis*

Chun-Kwang Kim^{1,4,5}, Sung-Duk Oh⁴, and Jong Il Rhee^{2,3,4,5*}

¹Department of Material and Biochemical Engineering

²School of Applied Chemical Engineering

³The Research Institute for Catalysis

⁴Research Center for Biophotonics

⁵Center for Functional Nano Fine Chemicals, Chonnam National University, YongBong-Dong 300, Gwangju 500-757, Korea

Abstract Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) is one of important growth factors for skeletal development and bone growth. In this work, BMP-7 was efficiently expressed in recombinant *Bacillus subtilis*. The mature BMP-7 protein indicated molecular weight of 15.4 kDa by Western blot assay and was secreted into culture medium with 0.35 ng/mL. The extracellular and intracellular rhBMP-7 proteins were purified by using a FPLC system with an ion exchange column and a gel filtration column. The extracellular and intracellular rhBMP-7 proteins had finally a 57.1% purity and a 36.2% purity, respectively. The purified rhBMP-7 proteins showed an intact biological activity which stimulated alkaline phosphatase (ALP) activity in MC3T3-E1 cells.

Keywords: *Bacillus subtilis*, expression, bone morphogenetic protein-7, purification

서 론

골 형태 형성 단백질 (bone morphogenetic protein, BMPs) 은 β 형 전환 성장인자 (transforming growth factor β , TGF- β) 슈퍼패밀리 (superfamily)에 속하는 펩타이드 성장 인자이다. BMPs는 포유동물에서 조직 줄기세포 (stem cell)에 작용하여 골 세포 및 연골 세포로 분화를 촉진시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [1]. 그리고 BMPs가 속해있는 β 형 전환 성장인자 슈퍼패밀리의 특징은 성숙한 부분 (mature

region)에 7개의 시스테인이 매듭을 형성하여 이중합체를 이루는 것이 특징이다 [2]. 1965년 Urist가 여러 종류의 산성 용액으로 탈회한 골 기질을 근육과 피하에 이식하였을 때 이소성 연골이나 골의 분화가 일어난다는 사실을 처음 밝혔으며 [3], 태생기 또는 그 이후에 미분화 골 형성 전구세포를 분화시키는 물질을 발견하여 BMP라 명명하였다 [4]. 이후 기능적 생물 검정을 통하여 BMP를 정제하였으며, 분자 클로닝과 재조합된 인간 BMP (rhBMP)의 발현으로 각종 BMP를 발견하여 분류하였다 [5-7]. 지금까지 15종류의 BMP가 밝혀져 있으며 이 중에서 골 형성을 유도하는 것으로 확인된 것은 5종으로 BMP-2 (BMP-2a), BMP-3 (Osteogenin), BMP-4 (BMP-2b), BMP-6 (human homologue of the murine, Vgr-1), BMP-7 (Osteogenic protein-1)이

*Corresponding author

Tel: +82-62-530-1847, Fax: +82-62-530-0846

e-mail: jirhee@chonnam.ac.kr

다 [8-10]. 이들 중 재조합 DNA 기술에 의해 포유류 세포 (CHO cell)로부터 얻어지는 rhBMP-2와 rhBMP-7의 골 유도능이 가장 우수하다고 보고되어 이를 이용한 연구가 많이 이루어졌으며, 현재까지도 주로 생산되어 연구재료로 사용되고 있다. 즉, 유전자 재조합에 의해 생산된 rhBMP-2와 rhBMP-7 단백질을 근 골격계 재생에 이용한 임상 연구들이 보고되었다 [11,12]. BMPs의 재조합 생산은 원핵세포와 진핵세포의 배양 시스템에서 모두 가능하다. 원핵세포 배양 시스템에서는 포유류 발현 벡터를 통해 완전구조 유전자 (full-length cDNA)를 중국 햄스터 난소 세포 (Chinese hamster ovary cell, CHO cell)에 감염시켜 최초로 rhBMPs를 생산했다 [13]. 그러나, 포유류 세포로부터 생산되어지는 rhBMPs는 생산 수율이 낮으며, 중국 햄스터 난소 세포와 아프리카 푸른 원숭이 신장 세포 (COS cell) 시스템을 사용하여 높은 수준의 BMPs 발현이 어렵다고 보고하였다 [1,14]. 한편, 진핵세포를 이용한 경우 배양 시스템의 구조가 단순할 뿐만 아니라 배양이 용이하며 다수의 개체를 취급하기 쉬운 대장균 (*E. coli*)을 단백질 발현에 많이 사용하였다 [17]. 그러나 대장균을 이용하여 BMPs를 생산하는 경우 봉입체

(inclusion body)의 형성으로 생체 밖 (in vitro)에서 재접힘 (refolding)을 통해 활성형 BMPs로 만들어야 하는데, 재접힘 과정이 복잡하고 재접힘 완충용액이 비싼 시약을 포함할 뿐만 아니라 총 수율이 낮은 단점을 가지고 있다 [15-17].

최근, 외래 단백질의 대량생산을 위한 숙주세포로서 그람 양성균인 고초균 (*B. subtilis*)이 사용되고 있는데, 고초균은 미국 식품 의약국 (FDA)으로부터 안정성과 내독성이 없는 균주로 승인 (generally recognized as safe, GRAS)되었다. 또한, 고초균은 발현된 단백질을 배양액으로 직접적으로 방출하기 때문에 세포 파쇄의 과정이 생략되어 단백질 정제가 간소화되고 세포질에서 봉입체의 형성이 감소됨에 따라 활성형 단백질의 생산이 용이하다 [18]. 이러한 다양한 장점으로 고초균은 산업규모의 발효에서 유용균주로 사용되고 있다 [19].

본 연구에서는 고초균을 rhBMP-7 유전자의 발현 시스템으로 사용하여 rhBMP-7의 발현과 생산에 대한 연구를 하고자 한다. 그리고, 생산된 rhBMP-7을 정제하고 MC3T3-E1 세포에서 알칼리인 포스파타제 활성도 (alkaline phosphatase activity, ALP activity)를 측정함으로써 rhBMP-7의 생물학적 활성을 조사하고자 한다.

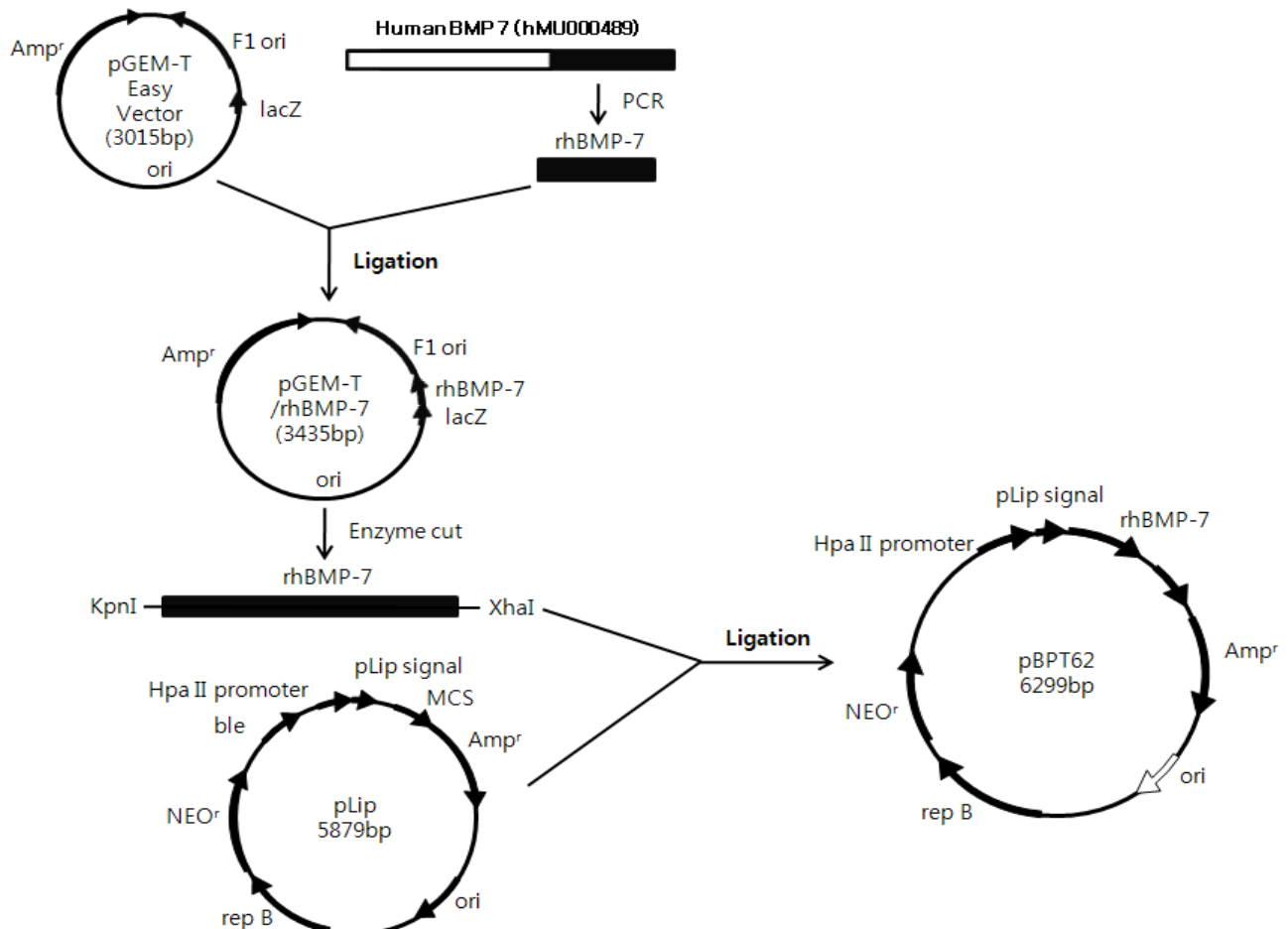


Fig. 1. Construction of an expression vector for rhBMP-7 gene.

재료 및 방법

균주 및 재조합 플라스미드

BMP-7의 생산을 위한 숙주 세포로 고초균 (KCCM 11496)을 사용하였다. *E. coli* DH5 α 는 서브클로닝 (subcloning)을 위한 숙주 세포로 사용하였으며, 단백질 발현 벡터로는 pLip (Bioleaders, Korea)을 사용하였다. 인간 BMP-7 cDNA는 hMU000489 (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon, Korea; Genbank BC008584)로부터 준비하였고, 재조합 플라스미드는 Birboim와 Doly가 제시한 방법 [19-22]을 사용하였으며, 재조합 플라스미드 pBPT62로 고초균을 형질전환 시켰다 [23-25].

재조합 BMP-7 유전자의 제조

BMP-7의 성숙한 (mature) 부분과 N-말단 메티오닌 연장 (extension) 부분에 해당하는 293-431개의 아미노산을 암호화하는 cDNA를 중합효소 연쇄 반응 (Polymerase Chain Reaction, PCR)에 의해 증폭하였다. 동시에 고초균 발현 벡터 pLip의 프로모터 부위 뒤에 암호화 서열을 완성하는 Kpn I (프라이머 서열: 5'-ATgggtaccATGTCCACGGGGAGCAAA-3')과 Xba I (프라이머 서열: 5'-ATtctagaCTAGTGGCAGC CACAGGC-3')에 대한 제한 부분을 도입하였다. rhBMP-7 cDNA는 2 μ L rhBMP-7 cDNA 용액, 20 pM 프라이머, 0.2 mM dNTP 혼합물, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 5 unit의 Taq 중합효소를 중합효소 연쇄 반응 기기 (PCR, APOLLO ATC201 PCR, USA)를 사용하여 증폭시켰다. 이때 반응은 1 cycle (94°C 5분), 30 cycle (94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 40초), 1 cycle (72°C 5분, 4°C)의 순서로 진행하였다. 증폭된 rhBMP-7 유전자를 1% 아가로스 겔 (agrose gel)을 이용하여 분리하고 420 염기쌍 (bp)에 해당하는 밴드를 겔 추출 키트 (QIAGEN GmbH, Germany)를 이용하여 정제한 후, pGEM-T easy vector system (Promega, Madison, WI)으로 서브클로닝 하였다. 그리고 얻어진 재조합 플라스미드는 반응능 (competent) *E. coli* DH5 α 로 형질전환 하였다. 삽입된 플라스미드는 DNA 정제 키트 (miniprep kit, QIAGEN GmbH, Germany)를 이용하여 분리하고 염기 서열을 확인하였다. 발현 벡터를 제작하기 위하여 pGEM-T easy vector를 제한 효소로 처리한 후, pLip 벡터와 성숙한 rhBMP-7을 융합하여 발현 벡터인 플라스미드 pBPT62를 제조하였고 (Fig. 1), 염기 서열 분석 (Solgent Co., Korea)을 하였다.

고초균의 형질전환

전기 반응능 (electrocompetent) 고초균 세포는 Ito와 Nagane [26]의 방법을 약간 변형하여 준비하였다. 즉, 활성화된 고초균을 성장배지 (5 g/L glucose, 5 g/L peptone,

5 g/L yeast extract, 3 g/L NaHCO₃, pH 7)에 1% 접종하고 진탕 배양기 (Jeiotech Co., Korea)에서 30°C, 200 rpm으로 배양하고, 세포 광학밀도 (optical density, OD₆₀₀)가 0.5가 되었을 때 배양액에 1%의 glycine을 첨가한 후 1시간 동안 배양하였다. 원심분리기를 이용하여 침전된 세포를 획득하고 전기천공 (electroporation) 배지 (0.5 M sorbitol, 0.5 M mannitol, 10% (w/v) glycerol)에 10¹⁰ CFU/mL가 되도록 재현탁 시켰다. 전기천공을 하기 위해 2 μ g DNA (pLip/BMP-7)와 60 μ L 세포 현탁액을 미리 냉각시킨 일회용 시험용기 (cuvette)에서 혼합하고, 혼합액을 Gene-pulser (Bio-Rad)를 사용하여 전기펄스에 노출시켰다. 형질전환체 (transformants)를 선별하기 위해 50 μ g/mL의 항생제 카나마이신 (kanamycin)을 첨가한 LB 고체배지 (5 g/L yeast extract, 10 g/L tryptone, 10 g/L NaCl, 10 g/L agar)에서 콜로니를 형성시켜 형질전환 된 고초균을 얻었다.

재조합 고초균의 rhBMP-7 생산 조건과 배지 조성

한 개의 재조합 고초균 콜로니를 LB 배지 3 mL에 접종하여 진탕 배양기에서 30°C, 200 rpm으로 종균 배양한 후 50 mL LBL 배지 (5 g/L lactose, 5 g/L yeast extract, 10 g/L tryptone, 10 g/L NaCl, 50 μ g/mL kanamycin)에 1% 접종하여 종균배양 조건과 동일하게 36시간 동안 배양하였다. 또한, rhBMP-7을 생산하기 위해 3 L 생물반응기를 사용하였으며, 온도 30°C, 교반속도 400 rpm, 공기주입량 1 vvm (aeration volume/medium volume/minute)으로 재조합 고초균을 48시간 동안 배양하였다.

생산된 세포의 (extracellular) rhBMP-7의 농도를 측정하기 위하여 배양액을 원심 분리 (10,000 g, 30분, 4°C)하고 회수된 상등액을 ELISA를 이용하여 분석하였다. 세포내 (intracellular) rhBMP-7의 농도를 측정하기 위해 침전된 세포에 1 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 1 mM PMSF (phenylmethyl sulfonyl fluoride), 1 mM DTT (dithiothreitol), 1 mM leupeptin, 1 mM benzamidine, 0.5% (v/v) Triton-X100을 함유하는 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.2)으로 재현탁 시킨 후 초음파 (HD2070, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Germany) 파쇄 하였다. 세포 파쇄 후 원심 분리하여 침전물을 제거하고 ELISA를 이용하여 세포내 rhBMP-7의 농도를 측정하였다.

rhBMP-7의 정제

생산된 rhBMP-7의 정제를 위해 ÄKTA FPLC 시스템 (Amersham Pharmacia Co., UK)을 이용하였다. 재조합 고초균 배양액을 원심 분리 (10,000 g, 30분, 4°C)하여 침전물을 제거하고 얻어진 상등액을 -50°C에서 3일 동안 동결 건조 한 분말을 5 mM CaCl₂를 함유한 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.5) 30 mL에 재현탁 시킨 후 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.5) 2 L로 24시간 동안 투석하였

다. 투석시킨 rhBMP-7을 이온교환 크로마토그래피 컬럼 (Q-Sepharose column, Amersham Pharmacia Co., USA)을 장착한 FPLC를 이용하여 정제하였다. 컬럼은 5 mM CaCl₂를 함유하는 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.5)을 0.2 mL/min 유속으로 흘려 안정화시키고, 0.2~0.8 M NaCl을 함유하는 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.5)을 0.2 mL/min 유속 (선형 구배)으로 흘려서 단백질을 용출시켰다. rhBMP-7을 포함하는 시료는 겔 여과 크로마토그래피 컬럼 (Sephacryl S-200, Amersham Pharmacia, UK)으로 분리하였고, 정제된 rhBMP-7은 웨스턴블로팅 (western blotting)으로 확인하였다.

겔 전기영동 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)는 Laemmli 방법으로 수행하였고, 12% (w/v) 폴리아크릴아미드 겔을 사용하였으며 크기 표시는 미리 염색된 단백질 표지 (prestained protein ladder, SM0671; Fermentas Co., Germany)를 사용하였고, 겔은 코마시브릴런트블루 (Coomassie Brilliant Blue)로 염색하였다.

웨스턴블로팅 (Western Blotting)

웨스턴블로팅 분석을 위해 단백질을 12% SDS-PAGE로 분리하고 이동 (transfer) 완충용액 (12 mM Tris (pH 8.3), 96 mM glycine, 20% methanol)을 이용하여 니트로셀룰로오스 막 (nitrocellulose membrane, Sigma Co., USA)으로 이동시켰다. 니트로셀룰로오스 막을 10 mL의 블로킹 (blocking) 완충용액 (10% w/v skim milk와 0.5% Tween 20을 함유한 PBS)에 넣어 상온에서 1시간 정도 교반한 후, TBS-T 완충용액 (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 3.8 mM HCl, 0.1% Tween 20)으로 15분 동안 4회 반복하여 세척하였다. 블로킹 완충용액에 1/1000로 희석되도록 anti-BMP7 항체 (R&D system, MN, USA)를 넣고 상온에서 1시간 30분 동안 교반한 후 TBS-T 완충용액으로 3회 세척하였다. 블로킹 완충용액에 1/1000로 희석되도록 효소 horse radish peroxidase (HRP)가 결합된 anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, USA)를 넣은 용액에 니트로셀룰로오스 막을 담근 후 1시간 동안 교반하였다. 그리고, 화학발광키트 (Enhanced chemiluminescence; ECL, Amersham Biosciences, UK) 용액에 니트로셀룰로오스 막을 담근 후 1분 동안 교반하고 X선 필름 (Hyperfilm, GE Healthcare Bio-Sciences, Sweden)에 현상하였다.

ELISA

rhBMP-7은 ELISA를 이용하여 측정하였으며 Fig. 2에 측정 순서를 나타내었다. ELISA 키트 (Duoset, R&D system, MN, USA)에 제시된 방법을 사용하였으며, 96-웰 마이크로플레이트 (96-well microtiter plate)는 NUNC 회사 (NUNC Co., Denmark)로부터 구입하여 사용하였다.

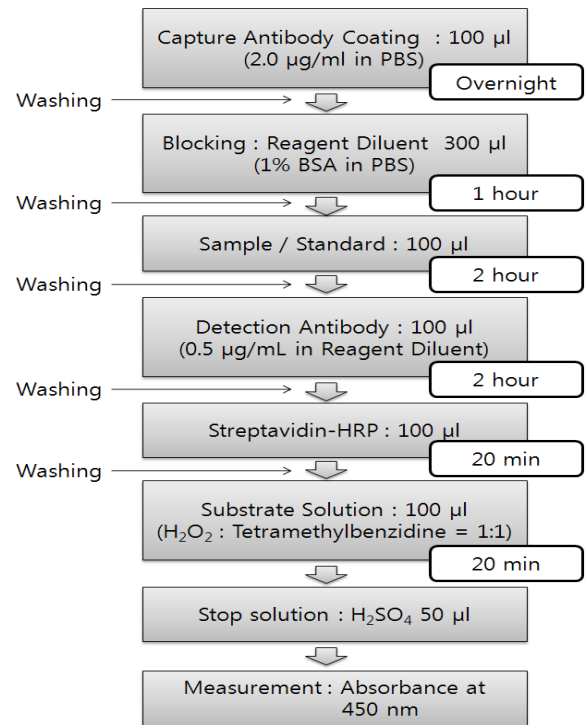


Fig. 2. General ELISA protocol for rhBMP-7 detection.

세포주 (cell-line) 배양

쥐의 조골세포 세포주 MC3T3-E1은 10% 우태 혈청 (fetal bovine serum; FBS, Gibco BRL, USA)과 100 unit/mL penicillin-G, 100 µg/mL streptomycin (Gibco BRL, USA)을 첨가한 α -변형 최소배지 (minimum essential medium alpha modification; α -MEM, Gibco BRL, USA)에 보관되었다. 세포주 배양은 온도 37°C, 습도 95%, 5%의 이산화탄소가 혼합된 세포배양기 (CO₂ incubator)에서 배양하였다.

rhBMP-7 활성의 생물학적 분석

생산된 rhBMP-7의 생물학적 활성은 쥐의 조골세포 (mouse osteoblast) 세포주 MC3T3-E1을 이용하여 골 형성의 분화 표지인 알칼라인 포스파타제 활성도를 측정하였다. rhBMP-7의 세포 성장에 대한 영향성을 측정하기 위해 MC3T3-E1 세포를 5% 우태혈청을 첨가한 α -변형 최소배지 플레이트에 각 웰 당 5×10^4 개씩 세포를 분주한 후 rhBMP-7을 처리하고 1~5일 동안 관찰하였다. 알칼라인 포스파타제 활성도 측정을 위해 먼저 37°C에서 24시간 동안 배양한 세포를 원심 분리하여 상등액을 제거한 후 PBS로 세척하였다. 그리고, 새로운 배지 0.5 mL에 생산된 rhBMP-7을 0~300 ng/mL 농도로 첨가하여 세포에 처리하고 37°C에서 3일 동안 배양한 후 PBS로 세척하고 배양액을 각 웰로부터 제거하였다. 세포를 파쇄하고 세포내 알칼라인 포스파타제를 방출시키기 위해 각 웰에 200 µL Triton X-100 (2% v/v)을 넣어준

후 세포를 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 투명해진 상등액 100 μL를 p-nitrophenylphosphate (pNPP) 분석 원리를 이용한 LabAssay™ 알칼라인 포스파타제 키트 (Wako Co., Japan)를 이용하여 알칼라인 포스파타제 활성도를 측정하였다. 분광광도계 (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Co., Filand)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하고 정규 분포곡선을 이용하여 알칼라인 포스파타제 활성도를 측정하였다. 알칼라인 포스파타제 비활성도는 nmol p-nitrophenol/min/mg protein으로 표현하였다. 용해된 세포의 단백질 함유량은 Lowry 방법 [27]으로 측정하였다.

결과 및 고찰

rhBMP-7의 염기서열 분석

```
(a) 1 atacagctgacctcacttggaaatcggcccccacagcttctggagcctctgggacc 60
   M H V R S L R A A A P H S F V A L W A P
61 ctatttctctgctcctcggccctggccagcttcaacctggaacaagagtgcaactcggac 120
   L F L L R S A L A D F S L D N E V H S S
121 ttcactccaccgacccctccagccagccagccagccagccagccagccagccagccagcc 180
   F I H R R L R S Q E R R E H Q R E I L S
181 attttggagcttcccaccgcccggccgacacctccagggcaagcacaactcggacc 240
   I L G L P H R P R P H L Q G K H N S A P
241 atattcatcctggacctatcaagccatggcagctggaggggggggggggggggggggggg 300
   M F N L D L V N A H A V E E G G G P G G
301 caggacctctctaccctcagagggcctctgagatcccagggcccccctctggccagc 360
   Q G F S V P V K A V F S T Q G P P L A S
361 ctacagatagcatttctcaccagcggcagcctggatcatgacctcgtcaactctgt 420
   L Q D S H F L T D A D M V N S F V N L V
421 aacatgacaaagatcttccaccgacgctaccaccatcagagattcgggttggatctt 480
   E H D K E F F H P R V H H R E F R F D L
481 tccaagatcccagagggagagctgtcacggcagccagatctcagatctacaaggactac 540
   S K I P E G E A V T A A E F R I V K D Y
541 atccggaaaccttcaaatgagagcttccggatcagcgttctcaggtctccaggg 600
   I R E R F D N E T F R I S V Y Q V L Q E
601 cacttggggagagatcagatctcttctcctcgcaccagccatccctctgggctcggag 660
   H L G R E S D L F L L D S R T L W A S E
661 gaggctggctgggtttgacatcacaccaccagcaccactggatggtcaatccggg 720
   E G W L V F D I T A T S N H W V V N P R
721 cacaacctgggctcgaactctcggatggagagcctggatggggagagcatcaaccag 780
   H N L G L Q L S V E T L D G Q S I N P K
781 tggcggcctgattggcggcagcggcccccagagcagccctctcagggctctc 840
   L A G L I G R H G P Q N K O P F M V A F
841 tccaagccagggagctcacttccgagcagctcggctccaggggggagcagcagcggc 900
   F K A T E V H F R S I R S T G S K Q R S
901 cagaacctcagaagaccagagagcagagagccctcggatggcagcagctgagcag 960
   Q N H S K I T P K N G E A L R M A N V A E
961 aacacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc 1020
   N S S S D Q R Q A C K K H E L V S F R
1021 gacctggactgacagcagctgagctatcggcctgagggctacccagcctactactgaa 1080
   D L G W Q D W I I A P E G V A A V Y C E
1081 gggagatgaccttcccttgaactctctacatgagccaccaccaccagccatctgca 1140
   G E G A E P I N S Y M N A T N H A I Y Q
1141 acctggtcactctatcaaccggagagcggctcccaaccttactatggcccagcag 1200
   T L V H F I N P E T V P K P C C A P T Q
1201 ctcaatgccatcctgctctactctgagcagctccagcctcctctgaaagaaat 1260
   L N A I S V L Y F D D S S N V I L K K Y
1261 aaaaacatggatcggcctctgagctcactag 1296
   B N H V Y B A C G C H +
```

```
(b) BMP-7 : M H V R S L R A A A P H S F V A L W A P L F L L R S A L A D F S L D N E V H S S F I H R R L R S Q E R R E H Q R E I L S : 60
BMP-7 : I L G L P H R P R P H L Q G K H N S A P M F N L D L V N A H A V E E G G G P G G : 120
BMP-7 : L Q D S H F L T D A D M V N S F V N L V E H D K E F F H P R V H H R E F R F D L : 180
BMP-7 : I R E R F D N E T F R I S V Y Q V L Q E H L G R E S D L F L L D S R T L W A S E : 240
BMP-7 : H N L G L Q L S V E T L D G Q S I N P K L A G L I G R H G P Q N K O P F M V A F : 300
rhBMP-7 : S T G S K Q R S : 300
BMP-7 : Q N H S K I T P K N G E A L R M A N V A E N S S S D Q R Q A C K K H E L V S F R : 360
rhBMP-7 : Q N R S K T F P N C E A L R M A N V A E N S S S D Q R Q A C K K H E L V S F R L G W Q D W I I A P E G V A A Y Y C E : 360
BMP-7 : R C A F F L N S Y M N A T N H A I V Q T L V H F I N P E T V P K P C C A P T Q L N A I S V L Y F D D S S N V I L K K Y : 420
rhBMP-7 : R C A F F L N S Y M N A T N H A I V Q T L V H F I N P E T V P K P C C A P T Q L N A I S V L Y F D D S S N V I L K K Y : 420
BMP-7 : B N V Y R A C C G H : 431
rhBMP-7 : B N V Y R A C C G H : 431
```

Fig. 3. Human BMP-7 cDNA nucleotide and deduced amino acid sequences. (a) The cDNA coding for amino acids 293-431 (underline) of the mature part of BMP-7 plus an N-terminal Met extension was amplified by PCR. (b) The homology between the rhBMP-7 and BMP-7 sequence identities.

클로닝된 rhBMP-7의 뉴클레오티드를 확인하였으며 (Gene Bank accession number NM_001719.1), 염기서열의 분석 결과 인간 BMP-7은 420개의 염기쌍으로 이루어져있는 것으로 나타났다. Fig. 3(a)에 PCR에 의해 증폭된 성숙한 BMP-7과 N-말단 메티오닌 연장부분의 293~431개의 아미노산을 암호화하는 cDNA에 대한 염기서열을 나타내었다. 염기서열 분석결과와 Bethany [28] 등이 연구한 인간 BMP-7의 염기서열 분석결과와 일치하였다. 그리고, 재조합 BMP-7과 BMP-7 (NP_001710.1)의 아미노산 서열을 Fig. 3(b)에 비교하였는데, 재조합 BMP-7과 BMP-7의 유전자 염기서열의 상동성은 100% 일치하였다.

rhBMP-7 유전자의 확인

rhBMP-7 유전자는 pLip vector로 클로닝하였으며, 재조합 플라스미드 pBPT62를 제조하였다. 플라스미드 pBPT62는 Hpa II promoter [18]를 조절하여 rhBMP-7 유전자를 발현하기 위해 고초균에 형질전환하였다. 증폭된 rhBMP-7 유전자를 아가로스 겔에서 전기영동하여 확인한 결과 0.42 kb의 DNA 띠가 관찰되었고 (Fig. 4), rhBMP-7 유전자가 증폭된 것을 확인하였다.

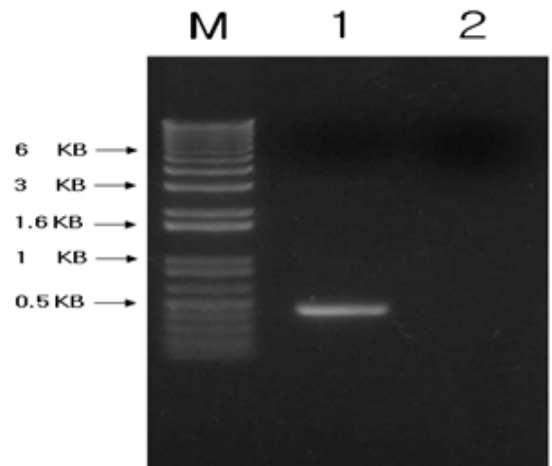


Fig. 4. Agarose gel (0.8%) electrophoresis of PCR product. M: 1 kb marker DNA; lane 1: PCR product (420 bp) of the rhBMP-7 gene; lane 2: negative control form transformed *B. subtilis*.

재조합 고초균에서 rhBMP-7의 생산

플라스미드 pBPT62를 함유한 재조합 고초균을 LBL 배지에서 진탕 배양한 후, rhBMP-7의 발현과 배양 배지로 분비된 rhBMP-7의 농도를 측정하였다. rhBMP-7의 웨스턴블로팅 분석결과 배양액의 상등액에 존재하는 성숙한 rhBMP-7 (세포외 rhBMP-7)의 대부분은 성숙한 rhBMP-7의 사이즈인 약 15.4 kDa의 면역반응성 밴드로 나타났다 (데이터 표시하지 않음). 이러한 결과는 고초균에서 발현된 성숙한 rhBMP-7이 배양 배지로 잘 분비됨을 나타낸다.

그리고, 세포의 rhBMP-7의 대량 생산의 가능성을 알아보기 위해 재조합 고초균을 LBL 배양매지를 이용하여 3 리터 생물반응기에서 배양하였고, 배양 21시간부터 시료를 채취 하였다. Fig. 5에서 보는바와 같이 세포의 rhBMP-7의 생산량은 배양 21시간 이후부터 증가하였고 배양 33시간에 0.35 ng/mL로 최대 생산량을 나타내었다. 반면에, 세포내 rhBMP-7은 배양 21시간부터 생산량이 감소하는 것으로 나타났다. 또한, SDS-PAGE 겔 사진에서도 세포의 rhBMP-7이 배양시간에 따라 증가하는 것으로 나타났으며, 세포의 rhBMP-7의 ELISA 분석결과와 일치하였다. 한편, LB 배지에서 재조합 고초균을 배양한 경우에는 세포의 rhBMP-7의 생산량이 약 20~30% 정도 감소하였다 (데이터 표시하지 않음). 이러한 결과는 배양 조건과 배지 성분이 rhBMP-7의 생산과 분비에 영향을 미치기 때문이다.

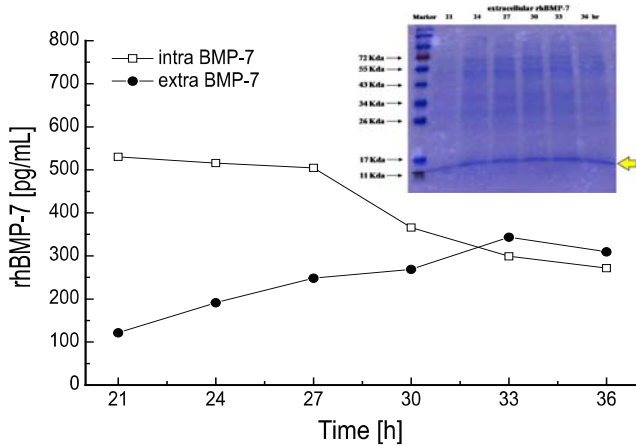


Fig. 5. Production of the rhBMP-7 during cultivation in 3-l jar fermenter with LBL medium and SDS-PAGE gel image for the extracellular rhBMP-7 protein.

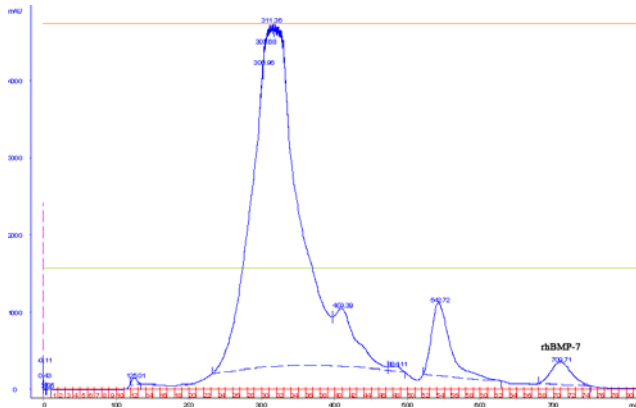


Fig. 6. Fraction of sample for purification of extracellular rhBMP-7 by FPLC system.

rhBMP-7의 정제와 생물학적 활성

생물반응기를 이용한 배양에서 생산된 세포의 rhBMP-7과

세포내 rhBMP-7은 ÄKTA FPLC 시스템을 이용하여 정제 하였다. Fig. 6은 세포의 rhBMP-7을 정제하기 위하여 FPLC 시스템을 이용하여 시료를 사이즈별로 분획한 데이터를 나타내었다.

각 단계에서 세포내 rhBMP-7과 세포외 rhBMP-7의 수율을 Table 1에 정리하였다. 동결건조단계에서 배양액 중에 단백질은 47.5배 농축되었고 매우 작은 양의 단백질이 손실 되었다. 두 단계의 정제를 거친 후 수율 58.8%와 순도 57.1%의 세포외 rhBMP-7을 얻었다 (Table 1(a)). 각각의 정제 단계에 대한 세포외 rhBMP-7의 순도는 SDS-PAGE와 웨스턴 블로팅 분석을 이용하여 확인하였다.

Table 1(a). Recovery of extracellular rhBMP-7 in the purification process

	Volume (mL)	Protein (mg)	rhBMP-7 (µg)	Yield (%)	Purity (%)
Culture supernatant	2850	74	1.36	100	0.0018
Concentration with freeze dryer	60	70	1.20	88.2	0.0017
Ion exchange column	40	0.013	1.0	73.5	7.7
Gel filtration column	9	0.0014	0.8	58.8	57.1

Table 1(b). Recovery of intracellular rhBMP-7 in the purification process

	Volume (mL)	Protein (mg)	rhBMP-7 (µg)	Yield (%)	Purity (%)
Cell supernatant	300	213	12.68	100	0.0059
Concentration by ultrafiltration	50	158	10.12	79.8	0.0064
Ion exchange column	40	0.092	8.84	69.7	9.6
Gel filtration column	9	0.018	6.52	51.4	36.2

정제된 세포외 rhBMP-7의 분자량은 SDS-PAGE와 웨스턴 블로팅 분석에 의해 약 15.4 kDa으로 확인되었다 (Fig. 7). 한편, 세포내 단백질의 약 25%가 초여과 (ultrafiltration) 단계에서 손실되었고, 최종단계에서 51.4%의 수율과 36.2% 순도의 세포내 rhBMP-7을 얻었다 (Table 1(b)).

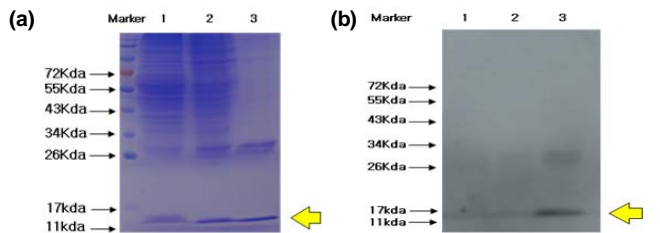


Fig. 7. (a) SDS-PAGE and (b) western blot assay for the extracellular rhBMP-7 during purification steps. Lane marker: protein marker; lane 1: sample concentrated with freeze dryer; lane 2: sample eluted from the ion exchange column; lane 3: sample eluted from the gel filtration column.

세포외 rhBMP-7과 세포내 rhBMP-7의 생물학적 활성은 쥐의 조골세포 (MC3T3-E1)에서 발현된 알칼라인 포스파타제의 활성도를 정량하여 측정하였다. 다양한 농도 (0~

300 ng/mL)의 rhBMP-7을 처리한 MC3T3-E1 세포를 5일 동안 배양하고 5일째 수확하여 분석한 결과 rhBMP-7을 처리한 세포의 알칼라인 포스파타제 활성은 처리하지 않은 세포에 비교하여 약 6배 높았다 (Fig. 8).

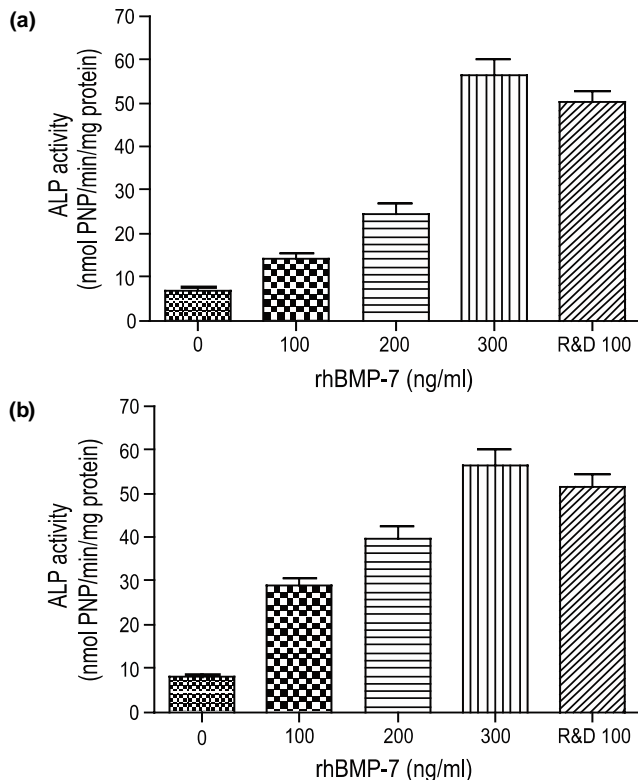


Fig. 8. The effects of the rhBMP-7 protein produced in this work on the ALP activity of MC3T3-E1 cells: (a) extracellular rhBMP-7 and (b) intracellular rhBMP-7.

또한, 알칼라인 포스파타제 활성은 rhBMP-7의 농도가 증가함에 따라 높아지고 rhBMP-7의 농도가 100 ng/mL와 300 ng/mL인 경우 rhBMP-7을 처리하지 않은 경우에 비교하여 알칼라인 포스파타제 활성은 각각 2.5배와 8.9배 높아졌다. 한편, 양성 대조군 (positive control)으로 사용된 상업 화용 rhBMP-7 (R&D system, MN, USA)은 재조합 고초균에서 생산된 300 ng/mL rhBMP-7을 처리한 실험군과 비슷한 알칼라인 포스파타제 활성을 나타내었다. 따라서, 본 연구에서 생산된 rhBMP-7은 생물학적 활성을 가지고 있는 것으로 확인되었다.

결론

BMP-7은 신장 외상과 당뇨병성 신장질환 치료제로써 임상학적으로 매우 높은 가치의 잠재력을 가지고 있음이 보고되었다. 따라서, 상업화를 위한 BMP-7의 대량 생산과 정제가 필요하다. 동물세포와 대장균에서 rhBMP-7의 발현

은 대규모의 생산을 가능하게 하지만, 세포 독성, 봉입체의 형성 그리고 복잡한 정제 단계와 같은 많은 문제점을 가지고 있다 [15-17].

반면에, 고초균은 배양배지로 많은 양의 단백질을 분비하기 때문에 대량생산 시스템에 효과적인 숙주세포이다. 효율적인 분비 시스템은 단순한 다운스트림 (downstream) 공정만으로 세포 성분으로부터 단백질의 분리를 가능하게 할뿐만 아니라, 고초균은 세포질 내를 둘러싸는 현상을 감소시켜 좋은 접힘 조건을 제공함에 따라 봉입체의 형성을 막는다 [18,19].

본 연구에서는 rhBMP-7 유전자와 구성 프로모터를 포함하는 pBPT62 플라스미드 제작하고 고초균에서 rhBMP-7을 발현시켰다. rhBMP-7은 고초균에서 효율적으로 발현되었고 재조합 고초균은 세포내에서 rhBMP-7을 생산하여, 약 0.35 ng/mL를 배양 배지로 분비하였다. 한편, 재조합 고초균을 이용한 rhBMP-7의 생산과 분비는 배양 조건과 배지와 같은 요인에 영향을 받았다. 그리고, 세포의 rhBMP-7과 세포내 rhBMP-7은 이온 교환 컬럼과 겔 여과 컬럼을 장착한 FPLC 시스템을 이용하여 정제하였다. 2 단계의 정제과정을 거친 후, 각각 57.1% (58.8% 수율)와 36.2% (51.4% 수율)의 순도를 가진 세포의 rhBMP-7과 세포내 rhBMP-7을 얻을 수 있었으며, 정제된 rhBMP-7 단백질은 생물학적 활성 즉, MC3T3-E1 세포에서 알칼라인 포스파타제 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

감사

본 연구는 지식경제부 지방기술혁신사업 (RTI04-03-03)과 교육과학기술부 Post-BK21 사업 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

접수 : 2009년 9월 4일, 게재승인 : 2010년 5월 15일

REFERENCES

1. Wozney, J. M., V. Rosen, A. J. Celeste, J. M. Mitscock, M. J. Whitters, R. W. Kriz, R. M. Hewick, and E. A. Wang (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242: 1528-1534.
2. Kingsley, D. M. (1994) The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.* 8: 133-146.
3. Urist, M. R. (1965) Bone formation by autoinduction. *Science* 150: 893-899.
4. Urist, M. R. and B. S. Strates (1971) Bone morphogenetic protein. *J. Dent. Res.* 50: 1392-1406.
5. Wang, E. A., V. Rosen, and P. Cordes (1988) Purification

- and characterization of other distinct bone inducing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 9484-9488.
6. Luyten, F. P., N. S. Cunningham, and S. Ma (1989) Purification and partial amino acid sequence of osteogenin a protein in initiating bone differentiation. *J. Biol. Chem.* 264: 13377-13380.
 7. Wozney, J. M., V. Rosen, and A. J. Celeste (1988) Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 242: 1528-1534.
 8. Daluiski, A., T. Engstrand, and M. E. Bahamonde (2001) Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat. Genet.* 27: 84-88.
 9. Gazit, D., G. Turgeman, and P. Kelley (1999) Engineered pluripotent mesenchymal cells integrate and differentiate in regenerating bone: a novel cell-mediated gene therapy. *J. Gene. Med.* 1: 121-133.
 10. Groeneveld, E. H. and E. H. Burger (2000) Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur. J. Endocrinol.* 142: 9-21.
 11. Geesink, R. G. T., N. H. M. Hoefnagels, and S. K. Bulstra (1999) Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a human fibular defect. *J. Bone Joint. Surg.* 81-B: 710-718.
 12. Yamagiwa, H., N. Endo, K. Tokunaga, T. Hayami, H. Hatano, and H. E. Takahashi (2001) *In vivo* bone-forming capacity of human bone marrow-derived stromal cells is stimulated by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J. Bone Miner Metab.* 19: 20-28.
 13. Gentry, L. E., N. R. Webb, G. J. Lim, A. M. Brunner, J. E. Ranchalis, D. R. Twardzik, M. N. Lioubin, H. Marquardt, and A. F. Purchio (1987) Type I transforming growth factor beta: amplified expression and secretion of mature and precursor polypeptides in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell Biol.* 7: 3418-3427.
 14. Wang, E. A., V. Rosen, J. S. D'Alessandro, M. Bauduy, P. Cordes, T. Harada, D. I. Israel, R. M. Hewick, K. M. Kerns, P. LaPan, D. P. Luxenberg, D. Mcquaid, J. K. Moutsatsos, J. Nove, and J. M. Wozney (1990) Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2220-2224.
 15. Ruppert, R., E. Hoffmann, and W. Sebald (1996) Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *Eur. J. Biochem.* 237: 295-302.
 16. Vallejo, L. F., M. Brokelmann, S. Marten, S. Trappe, J. Cabrera-Crespo, A. Hoffmann, G. Gross, H. A. Weich, and U. Rinas (2002) Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *J. Biotech.* 94: 185-194.
 17. Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 411-421.
 18. Wely, K. H. M., J. Swaving, R. Freudl, and A. J. M. Driessen (2001) Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 437-454.
 19. Schallmeyer, M., A. Singh, and O. P. Ward (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50: 1-17.
 20. Hakamada, Y., K. Koike, T. Yoshimatsu, H. Mori, T. Kobayashi, and S. Ito (1997) Thermostable alkaline cellulase from an alkaliphilic isolate, *Bacillus* sp. KSM-S237. *Extremophiles* 1: 151-156.
 21. Sumitomo, N., K. Ozaki, S. Kawai, and S. Ito (1992) Nucleotide sequence of the gene for an alkaline endoglucanase from an alkaliphilic *Bacillus* and its expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56: 872-877.
 22. Sumitomo, N., K. Ozaki, J. Hitomi, S. Kawaminami, T. Kobayashi, S. Kawai, and S. Ito (1995) Application of the upstream region of a *Bacillus* endoglucanase gene to high-level expression of foreign genes in *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 2172-2175.
 23. Hakamada, Y., Y. Hatada, K. Koike, T. Yoshimatsu, S. Kawai, T. Kobayashi, and S. Ito (2000) Deduced amino acid sequence and possible catalytic residues of a thermostable, alkaline cellulase from an alkaliphilic *Bacillus* strain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 2281-2289.
 24. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
 25. Chang, S. and S. N. Cohen (1979) High frequency transformation of *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 168: 111-115.
 26. Ito, M. and M. Nagane (2001) Improvement of the electro-transformation efficiency of facultatively alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 by high osmolarity and glycine treatment. *Biosci Biotechnol Biochem.* 65: 2773-2775.
 27. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the foline phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
 28. Bethany, S.-U., J. K. Mills, J. Vennarini, K. Boakye, J. Luo, S. Pomerantz, M. R. Cunningham, F. X. Farrell, M. F. Naso, B. Amegadzie (2008) Expression and characterization of a human BMP-7 variant with improved biochemical properties. *Protein Expr. Purif.* 57: 312-319.