

Expression of Polyhistidine-Containing Fusion Human HepG2 Type Glucose Transport Protein in *Spodoptera* Cells and Its Purification Using a Metal Affinity Chromatography

Chong-Kee Lee[†]

Department of Immunology, School of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu 705-718, Korea

In order to develop procedures for the rapid isolation of recombinant sugar transporter in functional form from away from the endogenous insect cell transporter, gene fusion techniques were exploited. Briefly, BamHI-digested human HepG2 type glucose transport protein cDNA was first cloned into a transfer vector pBlueBacHis, containing a tract of six histidine residues. Recombinant baculoviruses including the human cDNA were then generated by allelic exchange following transfection of insect cells with wild-type BaculoGold virus DNA and the recombinant transfer vector. Plaque assay was then performed to obtain and purify recombinant viruses expressing the human transport protein. All the cell samples that had been infected with viruses from the several blue plaques exhibited a positive reaction in the immuassay, demonstrating expression of the glucose transport protein. In contrast, no color development in the immunoassay was observed for cells infected with the wild-type virus or no virus. Immunoblot analysis showed that a major immunoreactive band of apparent Mr 43,000~44,000 was evident in the lysate from cells infected with the recombinant baculovirus. Following expression of the recombinant fusion protein with the metal-binding domain and enterokinase cleavage site, the fusion protein was recovered by competition with imidazole using immobilized metal charged resin. The leader peptide was then removed from the fusion protein by cleavage with porcine enterokinase. Final separation of the recombinant protein of the interest was achieved by passage over Ni²⁺-charged resin under binding conditions. The expressed transport protein bound cytochalasin B and demonstrated a functional similarity to its human counterpart.

Key Words: Baculovirus expression system, Fusion protein, Imidazole purification

서 론

포도당 (glucose)은 모든 포유동물 세포의 주요 대사 에너지원이며 이들의 세포내 이동은 수동적 포도당 수송체 (passive glucose transporters)들에 의해 이루어진다 (Wood and Trayhurn, 2003). 유전공학을 이용한 염기서열의 비교분석 결과는 박테리아를 포함한 미생물과 포유동물들에 존재하는 당 수송 단백질 (sugar transport proteins)들의 염기서열에는 상동성이 있으며, 이들은 커다란 당 수송체 집단을 형성하고 있음을 보여주었다 (Mueckler et al., 1985; James et al., 1989; Seatter and Gould, 1999; Joost

and Thorens, 2001; Wood and Trayhurn, 2003). 이러한 사실은 이들 수송체들이 공동의 조상으로부터 진화되었음을 암시하고 있으며, 따라서 이들 중 어느 한 구성 멤버 단백질의 당 수송 기전이나, 삼차원적 구조를 정확히 밝혀 낼 수 있다면 당수송체 집단 모두에 관한 귀중한 연구 자료가 될 뿐 아니라 당뇨병 연구에도 유용한 정보가 될 수 있을 것이다.

특히 사람의 뇌, 적혈구 등에서의 포도당 수송을 담당하는 적혈구형 또는 HepG2형 포도당 수송체 (Bell et al., 1993; Vannucci et al., 1997)의 삼차원적 구조 분석에는 결정화 (crystallization)와 같은 생물리학적 연구와 구조와 기능의 상관관계를 위한 유전공학적 연구 등이 필요하나 실제 이들 연구 수행에는 많은 어려움이 있는 실정이다. 주된 이유로 세포막내에는 이들 수송체가 위와 같은 연구에 충분치 않은 양으로 존재하고 있으며 nucleoside 수송체와 같은 물질들로 오염 (Jarvis and Young, 1981)되기 쉬워 순수한 적혈구형 수송체만을 분리, 정제하기가 쉽

*접수일: 2010년 7월 23일 / 수정일: 2010년 9월 15일
채택일: 2010년 9월 16일

†교신저자: 이종기, (우) 705-718 대구광역시 남구 대명4동 3056-6, 대구가톨릭대학교 의과대학 면역학교실
Tel: 053-650-4477, Fax: 053-650-4477
e-mail: leeck@cu.ac.kr

지 않기 때문이다. 이러한 연유로 당수송체들을 유전공학적인 방법을 이용하여 많은 양 생산하고자 하는 노력들이 꾸준히 진행되어 왔으며, 그 예로서 *E. coli* (Sarkar et al., 1988; Thorens et al., 1988), *Xenopus oocytes* (Gould and Lienhard, 1989; Keller et al., 1989), mammalian cells (Asano et al., 1989; Gould et al., 1989; Harrison et al., 1990), transgenic mice (Liu et al., 1992) 등을 이용한 이성질적 발현 노력들이 있었다. 그러나 아쉽게도 막 단백질(membrane proteins)들이 갖는 특성으로 인해 단지, 소량의 기능성 있는 단백질 발현만을 보여주었을 뿐이다.

최근 이러한 어려움을 극복하기 위한 노력의 일환으로 baculovirus와 곤충세포를 이용한 사람 적혈구형 포도당 수송체 단백질 발현 노력은 고무적이었으나 baculovirus의 복제와 단백질 합성을 허용하는 숙주세포에 내재하는 당수송체의 높은 활동으로 인해 발현단백질 활성의 직접적 증거 제시에는 실패하였다 (Yi et al., 1992; Cope et al., 1994). 그 이유로는 baculovirus의 증식을 허용하는 숙주세포인 *Spodoptera* 세포가 주 탄소 원으로 0.1% D-glucose가 함유된 TC-100와 같은 배양액에서 잘 자랄 수 있게 하는 (Summers and Smith, 1987) 곤충세포에 내재한 당 수송체계의 존재 때문이다. 그럼에도 불구하고 포유동물의 당수송체와는 달리 곤충세포 당수송체의 특성에 관해서는 아직까지 거의 알려진 바가 없다. 따라서 당수송체들과 같은 막 단백질의 이성질적 발현에 baculovirus 발현체계가 효율적으로 활용될 수 있게 하기 위해서는 곤충세포의 내재적 당수송체로부터 유전자 재조합된 당수송체를 (recombinant transporters) 기능성 있는 형태로 빠르게 분리해낼 수 있는 방법이 반드시 필요한 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 유전자 융합 (gene fusion) 기술이 접목된 plasmid vector를 이용하여 사람의 HepG2형 포도당 수송체 막 단백질을 곤충세포에 발현시켰고, 또 발현단백질을 다른 단백질들로부터 오염 없이 손쉽게 분리하는 법을 구축하였다.

재료 및 방법

곤충세포의 배양과 recombinant transfer vector cloning

숙주세포로 Sf21 세포를 Summers와 Smith (1987)의 방법을 변형하여 28°C에서 CO₂ 없이 배양하였다. Transfer plasmid로 pBlueBacHis C DNA (Invitrogen, USA)를 BamHI (3 units/μg)으로 잘라 phosphatase 효소 처리하였고, HepG2형 cDNA를 포함하는 plasmid pSGT도 같은 절단효소로

자른 후, gel-purification하여 2.5 kb의 cDNA를 얻었다. 그 후 처리된 insert는 pBlueBacHis vector에 ligation, transformation시켰고, 얻어진 transformants들을 여러 절단 효소들을 사용하여 HepG2형 DNA가 올바른 방향으로 포함하는 되었는지를 확인하였다 (pBacHis-GT).

Recombinant baculovirus 생산 및 recombinant transporter 확인

사람 transporter 유전자를 포함하는 recombinant Baculovirus 생산은 Summers와 Smith의 (1987) 방법을 기반으로 한 transfection manual에 따라 recombinant vector pBacHis-GT DNA와 wild-type baculovirus viral DNA (BaculoGold, PharMingen)를 함께 Sf 세포에 co-transfection시켜 in vivo recombination을 유도함으로써 recombinant virus를 생산하였다. 그 후 Sf21 세포를 96-well plate에 1.5×10^4 cells/well로 seeding한 후 plaque assay를 통해 얻은 바이러스를 $10^2 \sim 10^4$ 으로 serial dilution시킨 다음, 웰 당 50 μl의 바이러스로 감염시켜 28°C에서 5일간 배양하였다. Sodium hydroxide로 용해시킨 세포액을 그 후 dot-blot 장치를 사용하여 nitrocellulose에 전위시킨 후 HepG2형 C-terminus 대한 일차항체와 phosphatase-conjugate된 이차 항체로 immunostaining하였다.

Polyhistidine containing-fusion protein의 Imidazole elution 과 분리

곤충세포에 발현된 recombinant 수송 단백질의 N-terminus에는 poly-histidine residue들이 포함되어 있으며 이들은 니켈과 같은 금속이온에 높은 친화성을 가진다. 따라서 fusion 단백질 정제에 nickel-charged resin (Probond resin, Invitrogen)을 사용한 chromatography를 제조사의 protocol에 따라 진행하였다. 먼저 nickel-charged column을 7 ml imidazole elution buffer (20 mM sodium phosphate, 300 mM imidazole을 함유하는 500 mM NaCl, pH 6.3)로 한 번 씻은 후에 Native binding buffer (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, pH 7.8)로 두 번 세척한다. 그 후 AcNPVHIS-GT로 감염시킨 Sf 세포 9 ml을 수확 후 protease inhibitors (2 mM-iodoacetamide, 0.2 mM-phenylmethanesulphonyl fluoride, pepstatin A (10 g/ml)를 함유하는 20% (W/V) octaethylene glycerol dodecyl ether (C₁₂E₈, Calbiochem) 1 ml로 20분간 4°C에서 부드러운 shaking으로 용해시켜, 초고속 원심분리를 사용하여 1시간 100,000 X g로 원심분리 하였다. 막 단백질을 포함하는

용해된 세포의 상층액을 미리 8 ml 1% C₁₂E₈로 균등화시킨 니켈 column에 통과시킨 다음 1% C₁₂E₈와 protease inhibitors를 함유하는 8 ml Native washing buffer (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, pH 6.3)로 씻어 느슨하게 결합된 단백질을 제거했다. 견고하게 결합된 단백질은 300 mM imidazole과 1% C₁₂E₈에 protease inhibitors를 함유하는 8 ml Native washing buffer로 elution시켰다. 세척분리 과정 중에 수합된 샘플의 absorbance는 280 nm에서 측정하였고, peak absorbance가 관찰된 샘플은 수합 후 투석 및 porcine enterokinase 처리를 하여 leader peptide를 제거한 후 최종 elution 정제과정을 거친 후 immunostaining 하여 확인하였다.

Sf21 세포에 내재하는 당 수송체를 위한 functional assay로서 cytochalasin B binding (Gorga and Lienhard, 1981)을 측정하였다. 결합된 (Bound) cytochalasin B에 대한 결합되지 않은 (Free) cytochalasin B의 비율 즉, B/F은 생물학적 활성이 있는 당수송체(농도) 측정에 좋은 척도가 될 수 있다.

결과 및 고찰

Baculovirus expression system을 이용해 성공적으로 사람의 당수송체를 발현시킨다 할지라도 발현시킨 당수송체를 곤충세포의 당수송체로부터 빠르고, 기능성 있는 형태로 분리해낼 수 있는 방법이 없이는 왕성한 곤충세포 당수송체계의 활동으로부터 recombinant 당수송체의 직접적 활동 검색은 어려운 상황이다. 이러한 어려움을 극복하기 위해서 몇 가지 잠재적 방법들을 고려해 볼 수 있는데 그 중 한 가지 방법이 cytochalasin B와 같은 수송체에 견고한 결합이 가능한 억제제 (inhibitors)에 바탕을 둔 affinity chromatography이다. 그러나 이러한 접근은 당수송체의 용해화 (solubilization)에 필요한 비이온성 세제 (non-ionic detergents)가 cytochalasin B 결합의 억제제가 될 수 있다는 사실 (Zoccoli et al., 1978) 때문에 시도할 수가 없었다. 또 다른 접근 방법은 비이온성 세제의 영향을 받지 않는, 매우 특이적 단클론성 당수송체 항체를 사용하는 immuno-chromatography이다. 불행히도 이 방법은 성공률이 높지 않다. 그 이유는 고정시킨 항체 column으로부터 당수송체를 분리 용출시키기 위해서는 매우 낮은 pH를 적용해야 하는데 이런 혹독한 환경은 단백질을 쉽게 변성시킬 수 있기 때문이다. 그러므로 gene fusion 기술을 이용한 plasmid 활용 분리 방법을 본 실험에 사용

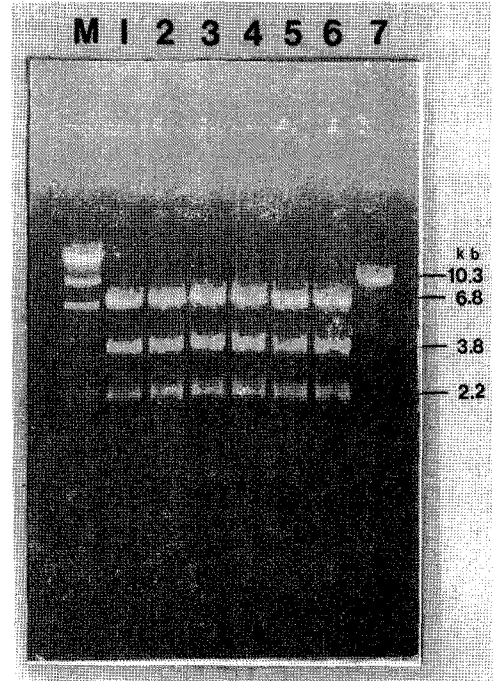


Fig. 1. EcoRI Restriction digests of putative recombinant plasmids obtained by cloning HepG2 type transporter cDNA into the plasmid pBlueBacHis C. The putative six recombinants were digested with EcoRI (lanes 1~6) and electrophoresed on a 0.8% agarose gel containing ethidium bromide. Lane M; λ -DNA/Hind III size markers (from top: 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0, 0.56 Kb). Lane 7; linearized plasmid pBlueBacHis C.

하게 되었다.

먼저 사람 HepG2형 수송체 2.5 kb 유전자를 포함하는 recombinant vector cloning이 올바른 방향으로 되어 있음을 EcoRI 절단효소로 잘랐을 때 나타난 세 개 (6.8 kb, 3.8 kb, 2.2 kb)의 밴드를 통하여 확인하였으며 (Fig. 1), 그 중 하나의 plasmid DNA를 pBacHis-GT로 명명하여 사용하였다. 그 후 여섯 개의 histidine residues를 포함한 사람 당수송체를 발현하는 recombinant baculovirus는 Sf21 세포에 co-transfection시킨 pBacHis-GT DNA와 wild-type baculovirus viral DNA (BaculoGold)가 적절한 in vivo recombination을 일으켜 HepG2형 포도당 수송체 유전자를 포함하는 recombinant baculovirus (AcNPVHis-GT)가 생산될 수 있었다. Lethal BaculoGold baculovirus는 lacZ 유전자를 함유하고 있어 만약 사람 HepG2형 수송체 유전자를 포함하는 complementing plasmid에 의해 구조가 일어난 경우에만 푸른색의 plaque을 형성하게 되며 (Fig. 2). 그로부터 얻어진 바이러스를 이용하여 감염시킨 숙주세포들은 immuassay 결과 모두 양성 반응을 나타내었다. 반면에 wild-type 바이러스나 바이러스 없이 감염시

킨 control에서는 양성 반응을 볼 수 없었다 (Fig. 3). 이 사실은 사람 당수송체가 곤충세포에 잘 발현되었음을 말해주고 있다.

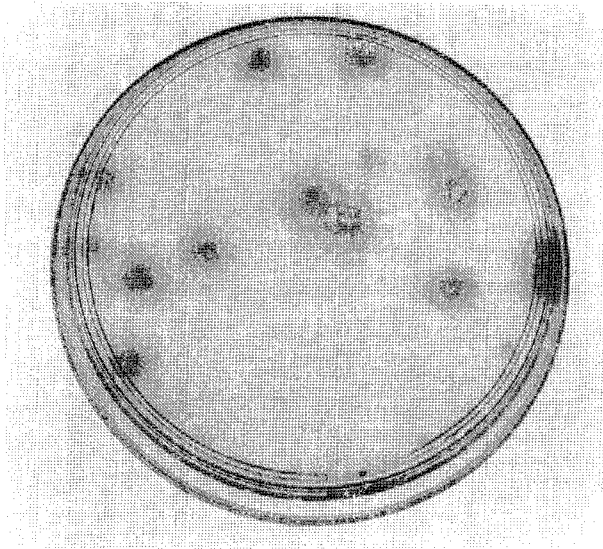


Fig. 2. Plaques containing infected cells that have expressed β -galactosidase. The lethal 'BaculoGold' baculovirus contains a lacZ gene that is replaced after plasmid rescue by the foreign gene of a complementing plasmid. However, the transfer vector pBlueBacHis C involved also contains the cloned lac Z gene to aid visual screening for recombinant viruses. Therefore, plaques containing recombinant viruses turn blue.

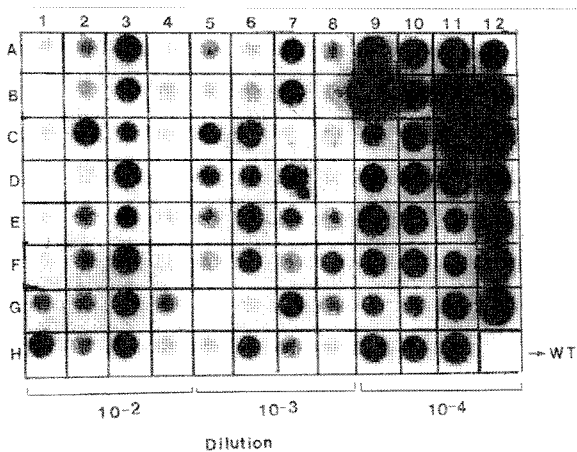


Fig. 3. Detection of recombinant viruses by limiting dilution and immunostaining. Sf21 cells were infected with 50 μ l of 10-fold dilutions of virus prepared from the eight individual plaques, ranging from 10^{-2} to 10^{-4} . The assay was performed as described in Summers and Smith (1887). Viruses expressing HepG2 type transporter were detected by Western blotting using antibodies against the C-terminus of HepG2 type transporter and alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG. Well 12H was infected with wild-type virus as control.

Recombinant fusion transporter에 포함된 여섯 개의 histidine residues는 니켈과 같은 금속이온에 매우 높은 친화성이 있으며, poly-histidine 잔기가 포함된 짧은 leader

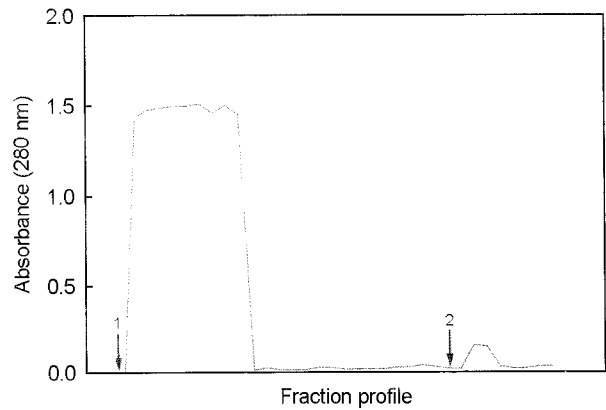


Fig. 4. Imidazole elution of polyhistidine-containing HepG2 type transporter-fusion protein. AcNPVHIS-GT-infected Sf21 cells (1.1×10^8) were solubilised in C12E8 and the supernatant (9 ml) containing the membrane proteins was passed over a Ni^{2+} -charged resin column as described in the text. After washing, the column was eluted with 8 ml of the native imidazole elution buffer at pH 6.0. Fractions (1 ml) were collected and their absorbance was measured at A_{260} nm. Arrow 1 indicates the application of sample. Arrow 2 indicates the addition of imidazole elution buffer.

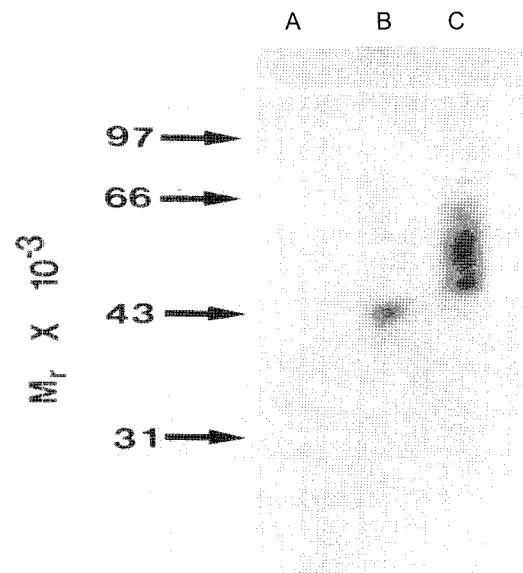


Fig. 5. Western blot analysis of the purified peak fractions. Samples were electrophoresed on an SDS/10% polyacrylamide gel, transferred electrophoretically to nitrocellulose and then detected with antibodies against the C-terminal peptide of HepG2 type transporter and alkaline phosphatase-conjugated second antibody. Lane A shows the material that was not bound to column. Lane B displays 10 μ g of protein from the peak fractions dialysed. Lane C: 10 μ g of protein-depleted human erythrocyte membrane as control.

Table 1. Cytochalasin B binding to Sf21 cell membranes

Sample (1 mg/ml)	Cytochalasin B (B/F)		
	(-) D-Glucose	(+) D-Glucose	*Specific B/F
Sf21 cell membranes	0.049	0.048	0.001
Sf21 cell membranes with recombinant virus Δ	1.533	0.158	1.375

Membranes of Sf21 cells were prepared as described in the texts. The assay for cytochalasin B binding activity of membrane samples was performed by equilibrium dialysis using 40 nM-[³H]cytochalasin B, in the absence (-) or presence (+) of 400 mM D-glucose, as described in Zoccoli et al (1978). Cytochalasin B binding activity (*) was calculated as described previously (Gorga and Lienhard, 1981). B/F = [bound cytochalasin B] / [free cytochalasin B]. Δ represents preparation from the Sf21 cells infected with the recombinant baculovirus containing Human transporter gene (AcNPVHIS-GT).

sequence는 porcine enterokinase로 쉽게 분리될 수 있다. 그러므로 Ni²⁺ affinity chromatography를 이용한 recombinant transporter의 정제가 가능하다 (Fig. 4). 이는 대부분의 곤충세포 단백질은 금속 resin에 결합하지 않을 것이며 설령 약간의 친화성을 가진 단백질이 결합된다 할지라도 낮은 pH 버퍼를 활용한 세척단계에서 선택적 제거가 가능하기 때문이다. 특히 레진에 있는 Ni²⁺ 이온에 대해 유전자 재조합된 단백질과 경쟁관계에 있는 imidazole 버퍼 (pH 6.0)의 사용은 단백질 정제에 부드러운 환경을 제공하여 단백질 변성을 최소화 하는 환경을 제공할 수 있게 된다. Immunoblot 분석결과 곤충세포에 발현된 polyhistidine을 함유하는 recombinant transporter의 크기는 apparent Mr 43,000~44,000으로 사람의 적혈구에 있는 당수송체의 크기 보다는 상대적으로 적었다 (Fig. 5). 이것은 사람 적혈구형 당수송체에는 있는 complex oligosaccharides가 곤충세포에서는 첨가되지 않는 glycosylation 차이 때문으로 생각된다. 그러나 곤충세포에 발현시킨 recombinant 사람 당수송체는 강력한 억제제인 cytochalasin B에 대해 Sf 당수송체와는 다른 매우 높은 특이적 친화성을 보여주어 발현된 transporter가 생물학적 활성이 있음과 cytochalasin B는 유용한 표지자가 될 수 있음을 보여 주었다 (Table 1). 그러므로 본 연구에서 활용된 poly-histidine을 이용한 gene fusion vector와 lacZ 유전자를 활용한 recombinant virus 선별과정은 이성질적 발현이 쉽지 않은 사람의 당수송체와 같은 막 단백질을 기능성 있는 형태로 곤충세포에, 보다 신속하고 용이하게 발현시킬 수 있게 하였으며 또한 재조합된 수송체를 곤충세포의 내재적 당수송체나 혹은 다른 단백질의 오염 없이 빠르게 분리해 낼 수 있는 매우 유용한 접근 방법을 보여 주고 있다.

REFERENCES

- Asano T, Shibasaki Y, Ohno S, Taira H, Lin JL, Kasuga M, Kanazawa Y, Akanuma Y, Takaku F, Oka Y. Rabbit brain glucose transporter responds to insulin when expressed in insulin-sensitive Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1989. 264: 3416-3420.
- Bell GI, Burant CF, Takeda J, Gould GW. Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J Biol Chem.* 1993. 268: 19161-19164.
- Cope DL, Holman GD, Baldwin SA, Wolstenholme AJ. Domain assembly of the GLUT1 glucose transporter. *Biochem J.* 1994. 300: 291-294.
- Gorga FR, Lienhard GE. Equilibria and kinetics of ligand binding to the human erythrocyte glucose transporter. Evidence for an alternating conformation model for transport. *Biochemistry* 1981. 20: 5108-5113.
- Gould GW, Derechin V, James DE, Tordjiman K, Ahern S, Gibbs EM, Lienhard GE, Mueckler M. Insulin-stimulated translocation of the HepG2/erythrocyte-type glucose transporter expressed in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 1989. 264: 2180-2184.
- Gould GW, Lienhard GE. Expression of a functional glucose transporter in *Xenopus* oocytes. *Biochemistry* 1989. 28: 9447-9452.
- Harrison SA, Buxton JM, Clancy BM, Czech MP. Insulin regulation of hexose transport in mouse 3T3-L1 cells expressing the human HepG2 glucose transporter. *J Biol Chem.* 1990. 265: 20106-20116.
- James DE, Strobe M, Mueckler M. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature (London)* 1989. 338: 83-87.
- Jarvis SM, Young JD. Extraction and partial purification of the nucleoside-transport system from human erythrocytes based

- on the assay of nitrobenzylthioinosine-binding activity. *Biochem J.* 1981. 194: 331-339.
- Joost HG, Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol.* 2001. 18: 247-256.
- Keller K, Strube M, Mueckler M. Functional expression of the human HepG2 and rat adipocyte glucose transporters in xenopus oocytes. *J Biol Chem.* 1989. 32: 18884-18889.
- Liu ML, Olson AL, Moye-Rowley WS, Buse JB, Bell GI, Pessin JE. Expression and regulation of the human GLUT4/muscle-fat facilitative glucose transporter gene in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1992. 267: 11673-11676.
- Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 1985. 229: 941-945.
- Sarker HK, Thorens B, Lodish HF, Kaback HR. Expression of the human erythrocyte glucose transporter in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988. 85: 5463-5467.
- Seatter MJ, Gould GW. The mammalian facilitative glucose transporter (GLUT) family. *Pharm Biotechnol.* 1999. 12: 201-208.
- Summers MD, Smith GE. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. *Tex Agric Exp Stn Bull.* 1987. No. 1555.
- Thorens B, Sarker HK, Kaback HR, Lodish HF. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and β -pancreatic islet cells. *Cell* 1988. 55: 281-290.
- Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia.* 1997. 21: 2-21.
- Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): Expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr.* 2003. 89: 3-9.
- Yi CK, Charalambous BM, Emery VC, Baldwin SA. Characterization of functional human erythrocyte-type glucose transporter expressed in insect cells using a recombinant baculovirus. *Biochem J.* 1992. 283: 643-646.
- Zoccoli MA, Baldwin SA, Lienhard GE. The monosaccharide transport system of the human erythrocyte. Solubilization and characterization on the basis of cytochalasin B binding. *J Biol Chem.* 1978. 253: 6923-6930.
-