

인간 Glucagon-like Peptide-1 변이체의 재조합 생산

김성건¹ · 박종태^{2*}

¹영동대학교 의생명과학과, ²충남대학교 식품공학과

Recombinant production of human glucagon-like peptide-1 mutant

Sung-Gun Kim¹, Jong-Tae Park^{2*}

¹Department of Biomedical Science, Youngdong University, Chungbuk 370-701, Korea

²Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Received on 30 May 2014, revised on 8 August 2014, accepted on 14 August 2014

Abstract : Human Glucagon like peptide-1 (GLP-1) is an incretin hormone that promotes secretion of insulin. In order to eliminate the formation of the soluble aggregate, Ala19 in GLP-1 was substituted with Thr, resulting in a GLP-1 mutant GLP-1A19T. The gene synthesis of GLP-1A19T and the fusion of 6-lysine tagged ubiquitin gene were accomplished by using the overlap extension polymerase chain reaction. The ubiquitin fused GLP-1A19T (K6UbGLP-1A19T) is expressed as form of inclusion body with little formation of the soluble aggregation in recombinant *E. coli*. In order to produce K6UbGLP-1A19T in large amounts, fed-batch fermentation was carried out in a pH-stat feeding strategy. Maximum dry cell weight of 87.7 g/L and 20.4% of specific K6UbGLP-1A19T content were obtained. Solid-phase refolding using a cation exchanger was carried out to renature K6UbGLP-1A19T. The refolded K6UbGLP-1A19T aggregated little and was released GLP-1A19T by on-column cleavage with ubiquitin-specific protease-1. The molecular mass of GLP-1A19T showed an accurate agreement with its theoretical molecular mass.

Key words : Glucagon-like peptide-1, diabetes, fed-batch fermentation, *Escherichia coli*

I. 서론

Human glucagon like peptide 1 (GLP-1)은 glucagon을 생산하는 소장의 L-세포에서 분비되고 인슐린 분비 및 glucose 섭취를 증가시키는 역할을 하는 31개의 아미노산으로 구성된 incretin hormone으로 인슐린 비의존성 당뇨병 치료제로 쓰인다(Olrskov et al., 1986). 소장에서 pro-glucagon으로부터 형성되는 4가지 형태의 GLP-1의 isopeptides 중 각각 37개와 36개의 아미노산으로 이루어진 GLP-1 (7-37)과 GLP (7-36) amide만 인슐린 분비 촉진 효과가 있으며, 그 효능은 동일한 것으로 알려져 있다(Nauck and Meier, 2005). GLP-1은 췌장에서의 인슐린 분비를 촉진하므로 외부에서 투여하는 인슐린에 비하여 훨씬 더 효과적이며, 인슐린의 생합성과 분비 모두를 증가시키므로 분비만 촉진시키는 sulfonurea 제제에서 나타나는 β-세포의

인슐린 고갈 현상이 나타나지 않으므로 현재 사용되고 있는 제2형 당뇨병 치료제에 비하여 뛰어난 점이 있다.

Ubiquitin은 모든 76개의 아미노산으로 이루어진 비교적 작은 단백질로서 모든 진핵세포에 존재하며, 세포 내 단백질분해 및 세포주기 조절 같은 세포기능 조절에 관여하는 단백질이다(Weissman, 2001). Ubiquitin은 대장균 및 효모에서 재조합 단백질과 peptide를 생산하는데 있어서 융합단백질로 이용되고 있다(Pilon et al., 1997; Einhauer et al., 2002). 융합단백질로서 ubiquitin은 사멸론 활성을 갖고 있어 융합된 목적단백질의 접힘 수율 및 발현 수준을 증가시키기도 한다(Butt et al., 1989; Han et al., 1994). Ubiquitin specific protease (UBP)나 ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH)는 ubiquitin의 카르복시 말단 glycine 잔기 다음을 정확하게 절단하므로 정확한 아미노 말단을 갖는 단백질 및 peptide를 얻을 수 있다(Pilon et al., 1997; Na et al., 2005).

재접힘 중 단백질간 상호응집을 막기 위해 고체상 재접

*Corresponding author: Tel: +82-42-821-6728

E-mail address: jtpark@cnu.ac.kr

힘에 관한 많은 연구가 시도되었다(Berdichevsky et al., 1999; Jungbauer et al., 2004). 고체상 재접힘은 변성제에 의해 풀린 단백질을 고체 담체에 고정화 시킨 후 변성제를 제거함으로써 단백질을 재접힘시키는 방법이다. 재접힘 공정에 있어서 중요한 공정변수 중 하나인 단백질 농도에 따라 조업부피도 변한다(Clark, 2001). 여러 고정화 방법 중 목적단백질에 poly-lysine을 융합시키는 방법은 낮은 단가로 고농도 고정화가 가능하여 조업부피를 감소시킬 수 있고 고수율로 고체상 재접힘이 가능하다(Park et al., 2002; Kweon et al., 2004).

대부분의 peptide는 화학합성을 통해 생산된다. 그러나 화학합성을 통한 peptide 생산은 생산단가가 높아 30개 이상의 아미노산으로 구성된 peptide인 경우 재조합 미생물을 이용한 생물공학적 생산방법이 더 유리하다(Yan et al., 2003; Zhang et al., 2004). 또한 화학합성을 통해 peptide를 생산하는 경우 합성공정 중 응집체 형성 및 부적절한 접합 같은 문제가 있다(Lee et al., 2005). 재조합 미생물에서 크기가 작은 peptide만 발현시키는 경우 세포 내 peptidase에 바로 분해되어 다른 단백질에 융합시켜 발현하는 방법으로 생산된다(Fairlie et al., 2002; Wang et al., 2003; Zhang et al., 2004). 발현된 융합 peptide는 화학적 혹은 효소적 절단을 통해 융합단백질을 제거하고 peptide만을 분리할 수 있다(Pilon et al., 1997; Fairlie et al., 2002; Zhang et al., 2004).

재조합 대장균에서 발현된 K6UbGLP-1의 70%는 내포체를 형성하지만 30%는 가용성 응집체를 형성하는 것을

선행연구를 통해 밝혀졌다(Kim et al., 2011). 본 연구에서는 가용성 응집체 형성비율이 낮은 GLP-1A19T을 생산하기 위해 아미노 말단에 ubiquitin과 6-lysine tag을 융합시킨 K6UbGLP-1A19T의 발현벡터를 제작하였고 재조합 대장균에서 내포체 형태로 발현시켰다. K6UbGLP-1A19T의 고체상 재접힘 및 *Saccharomyces cerevisiae*의 ubiquitin-specific protease 1 (UBP1)을 이용한 컬럼상 절단을 통해 재조합 GLP-1A19T의 생산공정에 관한 연구를 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 균주 및 플라스미드

본 연구에서 사용된 균주와 plasmid들은 Table 1에 표시하였다. DNA 조작을 위한 균주는 *Escherichia coli* DH5α를 사용하였고 K6UbGLP-1A19T의 발현을 위해서 발현용 균주인 *E. coli* BL21 (DE3)를 사용하였다(Table 1). GLP-1A19T 유전자 합성 및 아미노 말단에 6-lysine tag이 부가된 ubiquitin 융합은 Table 1에 보여진 oligonucleotides와 ubiquitin 유전자를 함유한 pUC18K6Ub를 사용하여 overlap extension polymerase chain reaction을 통해 K6UbGLP-1A19T 유전자를 증폭하였다. PCR은 Accupower HL PCR PreMix[®] (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)로 수행하였다.

Table 1. Bacterial strains, plasmids, and oligonucleotides used in this study.

Strain, plasmid or oligonucleotide	Relevant characteristics, construction, or nucleotide sequence	Reference
Strains		
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ (80 <i>lacZ</i> M15) <i>relA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (r _K ⁻ ,m _K ⁺) <i>supE44(lacZYA-argF)</i> U169	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Novagen
Plasmids		
pUC18K6Ub	2.9 kb, Amp ^r , ubiquitin fragment	AP Tech.
pAP	5.4 kb, Kan ^r , <i>tac</i> promoter	AP Tech.
pAP-K6UbGLP1	5.8 kb, Kan ^r , K6UbGLP1, <i>tac</i> promoter	This study
Oligonucleotides		
K6UbGLP1-F	5'-GGAATTCCATATGAAGAAAAAAGAAAAAGCAGATTTTCGTCAAGACT-3'	This study
GLP1-F	5'-CTTGTGCTAAGGCTAAGAGGTGGCCATGCGGAAGGCACCTTTACCAGCGATGTGAGCAGCTATCTGGAAGGCCAGGCG-3'	
GLP1-R	5'-CGCGGATCCTCATTAGCCGCGGCCCTTTCACCAGCCACGCAATAAATTCTTTCGCCGCCTGGCCTCCAGATAGCTGCT-3'	
K6UbGLP1-R	5'-CGCGGATCCTCATTAGCCGCGGCC-3'	

2. 회분식 및 유가식 배양

회분식 배양은 2.5 L 발효조(Kobiotech, Incheon, Korea)에 1 L의 Luria-Bertani (LB) 배지(10 g tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl per liter)를 사용하여 37°C, 500 rpm에서 수행되었다. K6UbGLP-1의 발현은 배양액의 흡광도(O.D. at 600 nm)가 0.51.0에 도달했을 때 isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 1 mM 이 되게 첨가하여 유도하였다.

유가식 배양에서는 제한 배지인 변형된 Riesenbergl 배지를 사용하였다. 배지 조성은 다음과 같다(Kim et al., 2005). 20 g glucose, 4 g(NH₄)₂HPO₄, 13.5 g KH₂PO₄, 1.7 g citric acid, 1.4 g MgSO₄·7H₂O, 그리고 10 ml trace metal solution을 1차 증류수 1 L에 녹였으며 pH는 6.8로 조절하였다. 사용된 trace metal solution의 조성은 5 M HCl 1 L에 10 g FeSO₄·7H₂O, 2.25 g ZnSO₄·7H₂O, 1 g CuSO₄·5H₂O, 0.5 g MnSO₄·4H₂O, 0.23 g Na₂B₄O₇·10H₂O, 2 g CaCl₂, 그리고 0.1 g(NH₄)₆Mo₇O₂₄로 이루어졌다. 배양 중 28% (vol/vol) NH₄(OH)를 자동으로 첨가하여 pH 6.8로 유지시켰다. 유가식 배양 중 기질공급은 pH-stat 방법을 이용하여 배양액의 포도당이 모두 소모되어 pH가 6.8 이상 올라가면 기질공급용액(800 g/L glucose, 20 g/L MgSO₄·7H₂O)을 일정시간 공급해서 포도당이 1.36 g/L가 되도록 하였다. 배양액 내의 용존산소는 교반속도를 1,500 rpm까지 증가시키거나 순수 산소를 주입시켜 40% 이상이 되도록 유지시켰다. 유가식 배양에서도 IPTG를 1 mM이 되게 첨가하여 K6UbGLP-1A19T를 발현 유도하였다.

3. 고체상 재접힘

K6UbGLP-1A19T이 발현된 세포를 회수하여 완충용액 A (50 mM sodium phosphate, pH 7.0)에 현탁시킨 후 ultrasonic processor (Cole-Parmer, IL, USA)로 파쇄하였다. 세포파쇄 후 얻어진 불용성 분획을 내포체 세척 완충용액 B (50 mM sodium phosphate, pH 7.0, 2% Trion X-100, 20 mM EDTA, 0.5 M NaCl)로 세척하여 불순물을 제거하였다. 최종적으로 얻어진 K6UbGLP-1A19T의 내포체를 용해 완충용액 C (8 M urea, 50 mM sodium phosphate, pH 7.0)로 용해시킨 후 양이온 교환수지인 SP Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)에 고정화시켰다. K6UbGLP-1A19T가 고정화된 양이온

교환수지 침전 후 용해 완충용액 C를 완충용액 A로 치환하면서 urea를 제거하여 K6UbGLP-1A19T의 고체상 재접힘을 수행하였다. 재접힘 된 K6UbGLP-1A19T가 고정화된 양이온 교환수지에 용출 완충용액 D (2 M NaCl, 50 mM sodium phosphate, pH 7.0)를 동량 첨가하여 재접힘 된 K6UbGLP-1A19T를 용출하였다. (주)에이피테크놀로지 (Suwon, Korea)에서 제공받은 UBP1은 재접힘 된 K6UbGLP-1A19T의 절단반응에 사용되었다. 여기서 사용된 UBP1은 아미노 말단에 6-histidine tag이 융합되어 있어 nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) 컬럼을 통해 정제된 것이다(Na et al., 2005).

K6UbGLP-1A19T의 고체상 재접힘을 SP Sepharose Fast Flow이 충전된 HiTrap SP FF 컬럼(1 mL)에서 수행하였다. ÄCTA FPLC (GE Healthcare)를 이용하여 시료의 주입 및 완충용액의 치환을 자동화하며 UV monitor로 컬럼상 절단반응을 확인하였다.

4. 분석 방법

균체농도는 배양액을 적당한 배율로 희석하여 spectrophotometer (UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Japan)로 600 nm에서 흡광도를 측정하고 균체 농도와와의 관계식을 이용하여 계산하였다. 단백질 농도는 protein assay kit (Bio-rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 측정하였다.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 16% gel을 사용하여 Mini-PROTEIN 3 Electrophoresis Cell (Bio-rad)에서 수행하였다. SDS-PAGE 후 Coomassie Brilliant Blue R-250 및 G-250으로 염색된 gel은 densitometry software (TotalLab 1.01, Nonlinear Dynamics Ltd, Newcastle, UK)로 분석하였다.

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)을 이용한 GLP-1의 분자량 측정은 Voyager DE-STR (Applied Biosystems) 측정하였다.

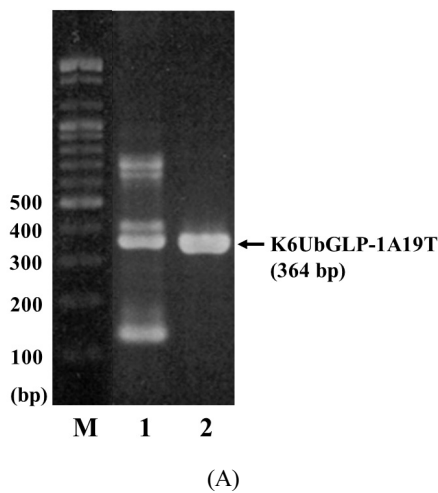
III. 결과 및 고찰

1. GLP-1A19T 유전자 합성 및 ubiquitin 융합

GLP-1A19T 유전자 합성을 위해 고안된 oligonucleotide

(GLP1-1A19T-F, GLP1-1A19T-R)는 대장균에서 가장 많은 사용빈도를 갖는 codon을 기준으로 제작되었다 (Table 1). Ubiquitin 융합을 위해 ubiquitin 유전자가 함유된 pUC18K6Ub와 Table 1에 명시된 oligonucleotides를 사용하여 overlap extension PCR을 수행하였다(Fig. 1A). 1차 PCR 후 K6UbGLP-1A19T 밴드 외 다른 비특이적인 밴드도 검출되었다. K6UbGLP-1를 선택적으로 증폭시키기 위해 2차 PCR에서 주형으로 1차 PCR 산물과 프라이머 K6UbGLP1-F와 K6UbGLP1-R을 사용하였다. 이 때 사용한 프라이머 K6UbGLP1-F와 K6UbGLP1-R의 말단에

는 pAP에 삽입하기 위한 제한효소 *NdeI* (CATATG)과 *BamHI* (GGATCC)의 인식 부위를 각각 포함시켰다. 2차 PCR을 통해 증폭된 DNA를 전기영동으로 확인해본 결과 364 bp의 증폭된 K6UbGLP-1A19T의 유전자를 확인할 수 있었다. 2차 PCR 산물과 *tac* 프로모터를 함유한 발현벡터인 pAP를 *NdeI*과 *BamHI*로 이중절단한 후 ligation시켜 pAP-K6UbGLP-1A19T을 제작하였다(Fig. 1B). 여기서 제작된 pAP-K6UbGLP-1A19T은 *NdeI*-*BamHI*의 처리와 DNA 염기서열 분석을 통해 K6UbGLP-1A19T 유전자의 정확한 삽입 및 GLP-1A19T의 ubiquitin 융합을 확인하였다(결과 생략).



2. K6UbGLP-1A19T의 발현 및 유가식 배양

발현용 균주인 *E. coli* BL21 (DE3)에 pAP-K6UbGLP-1A19T을 형질전환 시킨 후 LB 배지에서 배양하였다. 희분식 배양을 통해 IPTG로 K6UbGLP-1A19T의 발현을 유도한 후 SDS-PAGE 분석을 통해 발현양상을 분석하였다. K6UbGLP-1A19T는 재조합 대장균 내에서 과발현되었다. GLP-1A19T에 융합되어있는 ubiquitin은 샤페론 기능을 갖고 있어 융합된 단백질의 가용성 발현을 증가시키지만 (Pilon et al., 1996) K6UbGLP-1A19T는 100% 가까이

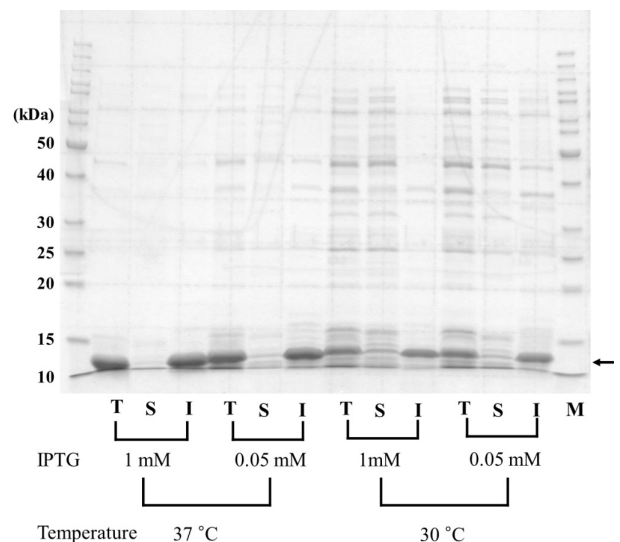
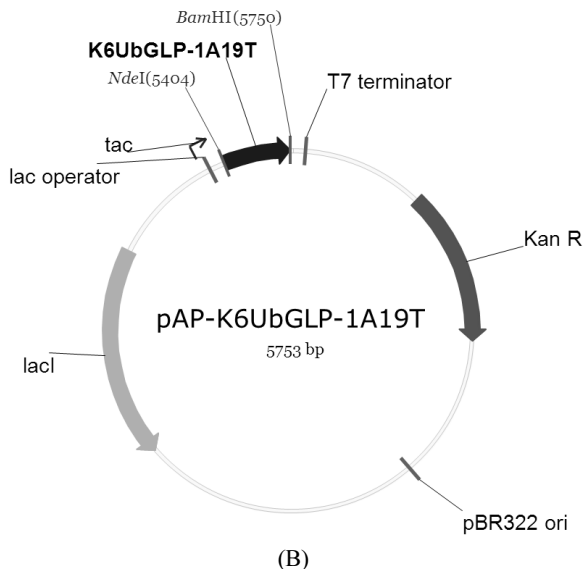


Fig. 1. Construction of expression plasmid pAP-K6UbGLP-1A19T (A) Analysis of the overlap extension PCR for GLP-1A19T gene synthesis and ubiquitin fusion on 2% agarose gel electrophoresis. Lane 1 and lane 2 are first and second PCR products, respectively. M denotes 100 bp DNA ladder marker. (B) Schematic representation of expression plasmid pAP-K6UbGLP-1A19T.

Fig. 2. SDS-PAGE analysis of expressed K6UbGLP-1A19T. Recombinant *E. coli* BL21 (DE3) strains were grown at 37°C and induced with 1.0 mM IPTG for K6UbGLP-1A19T expression. After 6 h induction, cells were harvested, disrupted and fractionated into total cell lysate (T), soluble fraction (S), and insoluble fraction (I). Lane M denotes a protein size marker.

내포체 형태로 발현되었다(Fig. 2). 발현 온도와 IPTG 농도가 높을 수록 K6UbGLP-1A19T의 발현률은 향상되었다. 교반에 의해 발생하는 전단응력(shear stress)은 α -helix 구조인 GLP-1을 β -sheet로 전환시킨다. β -sheet로 전환된 GLP-1은 용해도가 무려 1000배 감소되어 응집체를 형성한다(Kim et al., 1994). 발효조를 이용한 재조합 대장균의 배양 중 교반에 의해 발생하는 전단응력에 의해 발현되는 K6UbGLP-1A19T의 용해도가 감소하여 내포체 형태로 발현되었던 것으로 생각된다. 세포막 유사 환경인 dodecyl-phosphocholine micelle 내에 GLP-1이 존재할 경우에는 대부분 용해도가 높은 α -helix 구조로 존재한다(Thornton and Gorenstein, 1994). 가용성 분획에 존재하는 K6UbGLP-1A19T는 초음파에 의해 세포가 파쇄되면서 세포막과의 상호작용에 의해 α -helix 구조로 전환된 것이라고 생각된다. 세포막을 가용화시키는 계면활성제가 포함된 단백질 추출 시약으로 세포를 파쇄한 경우 가용성 분획에는 K6UbGLP-1A19T가 거의 존재하지 않았다(결과 생략). 따라서 K6UbGLP-1A19T의 내포체와 세포막과의 상호작용은 K6UbGLP-1A19T의 수용성에 관련성이 있다고 여겨지고 이것은 내포체 수율 및 순도에 영향을 미칠 수 있다. 재접힘 공정의 수율에 큰 영향을 미치는 K6UbGLP-1A19T 내포체의 순도는 90% 이상이었다. 재조합 peptide를 대장균에서 발현시킬 경우 세포 내 peptidase에 의해 분해되기도 하여 내포체 형태의 발현이 요구되기도 한다(Viesturs et al., 1997). 따라서 peptidase에 의해 분해되지 않는 내포체로 발현된 K6UbGLP-1A19T는 재접힘 공정을 통해 생물학적 활성을 회복할 수 있다.

K6UbGLP-1A19T의 과잉생산 및 발현 최적화를 위해 pH-stat 유기식 배양을 시도하였다. K6UbGLP-1A19T의 발현이 세포성장을 저해하므로 지수기인 세포농도 56.3 g/L(16시간)에서 IPTG를 배지 내에 1 mM의 농도가 되도록 첨가함으로써 K6UbGLP-1A19T를 발현 유도시켰다. 유도 8시간 경과 후 최종 세포농도는 87.7 g/L 였고 발현 수준은 총 단백질의 20.4%까지 점진적으로 올라갔다(Fig. 3).

양이온 교환 수지를 이용한 단백질 재접힘은 고농도의 단백질 농도에서도 고수율로 재접힘이 가능하다(Kweon et al., 2004). 대장균 세포질내에서 높은 발현 수준과 순도로 발현된 K6UbGLP-1A19T의 내포체를 8 M urea로 가용화시킨 후 회분식 고체상 재접힘을 수행하였다. K6UbGLP-1A19T는 아미노 말단에 부가된 6-lysine tag에 의해 양이온 교환

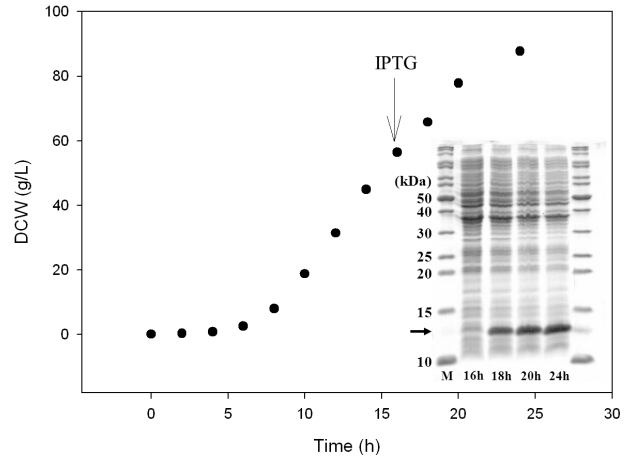


Fig. 3. Fed-batch culture of recombinant E. coli for production of K6UbGLP-1A19T. The inset is the result of SDS-PAGE analysis of expressed K6UbGLP-1A19T. The band position of K6UbGLP-1A19T was indicated by the arrow.

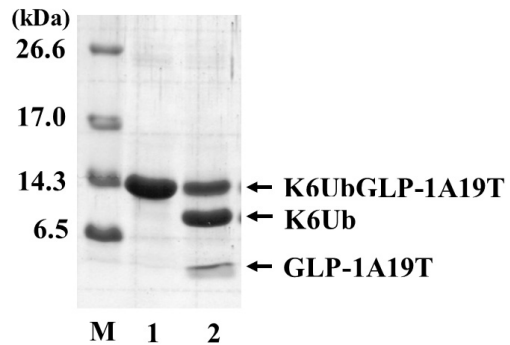


Fig. 4. SDS-PAGE analysis for before (lane 1) and after (lane 2) cleavage of the refolded K6UbGLP-1A19T by UBP1. Lane M denotes peptide size marker.

수지인 SP Sepharose FF에 고정화되었다. SP Sepharose FF에 고정화되어 있는 K6UbGLP-1A19T의 urea를 제거함으로써 2.0 g/L 이상의 농도에서도 90% 이상의 수율로 재접힘되었다(결과 생략). 10-lysine tag 융합을 이용하여 *Bacillus macerans* 유래의 cyclodextrin glycosyltransferase가 8 g/L 이상의 단백질 농도에서 100%에 가까운 재접힘 수율로 고체상 재접힘된 보고가 있다(Kim et al., 2005). 이것은 고농도 일지라도 K6UbGLP-1A19T가 양이온 교환 수지에 고정화되어 있어 재접힘 중 상호 응집되지 않았기 때문이라고 생각된다. 2 M NaCl이 포함된 완충액으로 재접힘된 K6UbGLP-1A19T를 양이온 교환수지로부터 용출시킨 후 UBP1으로 절단해보았다. 약 80%의 수율로 K6UbGLP-1A19T는 UBP1에 의해 ubiquitin (K6Ub)와 GLP-1A19T로 절단되었다(Fig. 4). 또한 재접힘 후 양이온 교환수지에 고

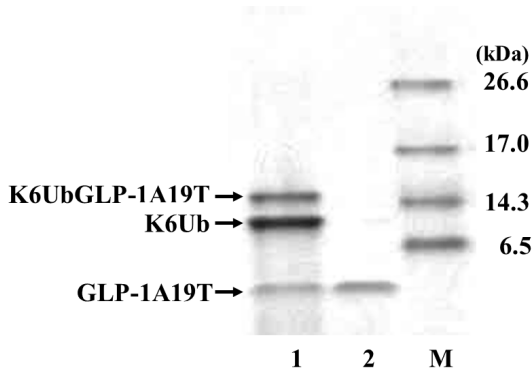


Fig. 5. SDS-PAGE analysis for GLP-1A19T obtained from refolded K6UbGLP-1A19T via on-column cleavage (Lane 2).

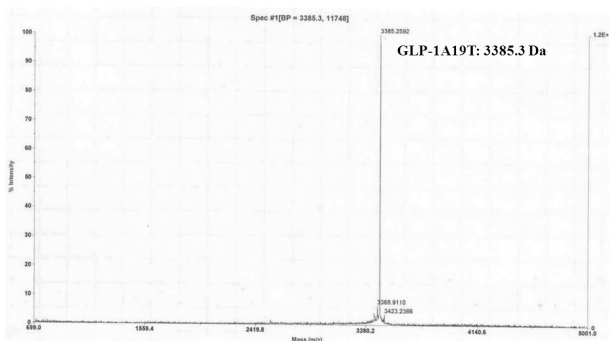


Fig. 6. The refolded K6UbGLP-1A19T treated by UBP1 in a buffer was shown in lane 1. Lane M denotes peptide size marker. Molecular weight analysis for GLP-1A19T by MALDI-TOF MS.

정확한 K6UbGLP-1A19T에 UBP1을 처리하는 컬럼상 절단을 수행하여 GLP-1A19T 만 얻어낼 수 있었다(Fig. 5). GLP-1은 전단응력 및 phenol에 의해 응집체가 형성되거나 내부 수소결합을 증가시키고 소수성 상호작용을 약화시키는 역할을 하는 2,2,2- trifluoroethanol에 의해 helical dimer aggregate를 형성한다(Kim et al., 1994; Chang et al., 2002). 재접힘되면서 GLP-1은 수용성이 높은 monomeric α -helix외에도 응집체 및 helical dimer aggregate같은 misfolded isoform으로 존재할 수 있다. K6UbGLP-1A19T의 misfolding에 의해 UBP1에 의해 절단되지 않은 20%의 K6UbGLP-1A19T이 존재한다고 생각된다.

3. GLP-1A19T의 분석

컬럼상 재접힘 및 절단 후 얻어진 GLP-1에 포함된 UBP1을 제거하기 위해 Ni-NTA 수지가 충전된 컬럼을 통과시킨 후 역상 HPLC 분석을 통해 순도를 측정하였다. 정제된

GLP-1의 순도는 95%이상으로 측정되었다(결과 생략). 재조합 대장균에서의 생산과 고체상 재접힘 및 UBP1에 의한 절단을 통해 얻어진 재조합 GLP-1A19T를 MALDI-TOF MS로 분석해본 결과 재조합 GLP-1A19T의 분자량은 3,385.3 Da으로 표준 GLP-1A19T의 이론적 분자량과 거의 일치됨을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

IV. 결론

본 연구에서 가용성 응집체를 형성하지 않는 GLP-1 변이체인 GLP-1A19T를 재조합 대장균을 이용하여 성공적으로 생산하였다. 6-lysine tagged ubiquitin의 유전자와의 융합을 통해 고안된 K6UbGLP-1A19T는 재조합 대장균에서 가용성 응집체 형성 없이 대부분 내포체 형태로 발현되었고 고체상 재접힘 및 컬럼상 절단을 통해 고순도의 GLP-1A19T를 얻어낼 수 있었다. 이와 같이 생산된 GLP-1A19T는 분자량이 정확히 이론 값과 일치하였다. 본 연구결과를 바탕으로 활성이 우수한 재조합 인간 GLP1을 대장균을 이용하여 저렴한 가격에 생산할 수 있을 것으로 기대된다. 관련산업 활용을 위하여 앞으로 GLP-1A19T와 천연 GLP-1과의 생화학적 특성 비교연구가 필요할 것이다.

참고 문헌

- Berdichevsky Y, Lamed R, Frenkel D, Gophna U, Bayer EA, Yaron S, Shoham Y, Benhar I. 1999. Matrix-assisted refolding of single-chain Fv cellulose binding domain fusion proteins. *Protein Expression and Purification* 17:249-259.
- Butt TR, Jonnalagadda S, Monia BP, Sternberg EJ, Marsh JA, Stadel JM, Ecker DJ, Crooke ST. 1989. Ubiquitin fusion augments the yield of cloned gene products in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:2540-2544.
- Chang X, Keller D, O'Donoghue SI, Led JJ. 2002. NMR studies of the aggregation of glucagon-like peptide-1: formation of a symmetric helical dimer. *FEBS Letters* 515:165-170.
- Clark EDB. 2001. Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology*, 12:202-207.
- Einhauer A, Schuster M, Wasserbauer E, Jungbauer A. 2002. Expression and purification of homogenous proteins in *Saccharomyces cerevisiae* based on Ubiquitin-FLAG fusion. *Protein Expression and Purification* 24:497-504.
- Fairlie WD, Uboldi AD, De Souza DP, J HG, Nicola NA, Baca M. 2002. A fusion protein system for the recombinant production of short disulfide-containing peptides. *Protein*

- Expression and Purification 26:171-178.
- Han K, Hong J, Lim HC, Kim CH, Park Y, Cho JM. 1994. Tyrosinase production in recombinant *E. coli* containing trp promoter and ubiquitin sequence. *Annals of the New York Academy of Sciences* 721:30-42.
- Jungbauer A, Kaar W, Schlegl R. 2004. Folding and refolding of proteins in chromatographic beds. *Current Opinion in Biotechnology* 15:487-494.
- Kim SG, Kweon DH, Lee DH, Park YC, Seo JH. 2005. Coexpression of folding accessory proteins for production of active cyclodextrin glycosyltransferase of *Bacillus macerans* in recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 41:426-432.
- Kim SG, Shin SY, Park YC, Shin CS, Seo JH. 2011. Production and solid-phase refolding of human glucagon-like peptide-1 using recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 78:197-203.
- Kim Y, Rose CA, Liu Y, Ozaki Y, Datta G, Tu AT. 1994. FT-IR and near-infrared FT-Raman studies of the secondary structure of insulinotropin in the solid state: a-helix to b-sheet conversion induced by phenol and/or high shear force. *Journal of Pharmaceutical Science* 83:1175-1180.
- Kweon DH, Lee DH, Han NS, Seo JH. 2004. Solid-phase refolding of cyclodextrin glycosyltransferase adsorbed on cation-exchange resin. *Biotechnology Progress* 20:277-283.
- Lee EK, H HJ, Shin DY, Kim DI, Yoo YJ. 2005. Production of recombinant amyloid-b peptide as an ubiquitin extension. *Protein Expression and Purification* 40:183-189.
- Na KI, Kim MD, Min WK, Kim JA, Lee WJ, Kim DO, Park KM, Seo JH. 2005. Expression and purification of ubiquitin-specific protease (UBP1) of *Saccharomyces cerevisiae* in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 10:599-602.
- Nauck MA, Meier JJ. 2005. Glucagon-like peptide-1 and its derivatives in the treatment of diabetes. *Regulatory Peptides* 128:135-148.
- Ørskov C, Holst JJ, Seier-Poulsen S, Kirkegaard P. 1986. Pancreatic and intestinal processing of proglucagon in man. *Diabetologia* 30:874-881.
- Park SJ, Ryu K, Suh CW, Chai YG, Kwon OB, Park SK, Lee EK. 2002. Solid-phase refolding of poly-lysine tagged fusion protein of hEGF and angiogenin. *Biotechnology and Bio-process Engineering* 7:1-5.
- Pilon A, Yost P, Chase T, Lohnas G, Bentley W. 1996. High-level expression and efficient recovery of ubiquitin fusion proteins from *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* 12:331-337.
- Pilon A, Yost P, Chase TE, Lohnas G, Burkett T, Roberts S, Bentley WE. 1997. Ubiquitin fusion technology: Bioprocessing of peptides. *Biotechnology Progress* 13:374-379.
- Thornton K, Gorenstein DG. 1994. Structure of glucagon-like peptide(7-36) amide in a dodecylphosphocoline micelle as determined by 2D NMR. *Biochemistry* 33:3532-3539.
- Viesturs B, Inta J, Ainars S, Ilona B, Valdis B. 1997. Synthesis of recombinant atrial natriuretic peptide (rANP) using hybrid fusion protein-phage fr coat/ANP (CP/ANP). *Peptides* 18:1229-1235.
- Wang J, Chen W, Lu J, Lu S. 2003. Overexpression and purification of recombinant atrial natriuretic peptide using hybrid fusion protein REF-ANP in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 28:49-56.
- Weissman AM. 2001. Ubiquitin and proteosomes: themes and variations on ubiquitylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2:169-178.
- Yan Y, Chen J, Li J. 2003. Overexpression of a small medicinal peptide from ginseng in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 29:161-166.
- Zhang ZZ, Yang SS, Dou H, Mao JF, Li KS. 2004. Expression, purification, and C-terminal amidation of recombinant human glucagon-like peptide-1. *Protein Expression and Purification* 36:292-299.