

재조합 GG1234-DsRed 융합 단백질의 생산 및 *In vitro* 탄산칼슘 결정화에 미치는 영향에 대한 연구

손채연, 김진호, 김지하, 최유성*

Production of Recombinant GG1234-DsRed Fusion Protein and Its Effect on *in vitro* CaCO₃ Crystallization

Chaeyeon Son, Jin Ho Kim, Ji Ha Kim, and Yoo Seong Choi*

Received: 23 October 2015 / Revised: 11 November 2015 / Accepted: 25 November 2015

© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Eggshell-based biocomposites have become attractive due to their exquisite nanostructure and biological properties, which are mainly composed of highly organized calcium carbonate crystals controlled by organic macromolecules such as proteins and polysaccharides. Here, we designed the recombinant fusion protein of a putative eggshell matrix protein named as GG1234 and a fluorescent reporter protein of DsRed. The protein was successfully over-expressed in *E. coli* and purified by Ni-NTA affinity chromatography. *In vitro* calcium carbonate crystallization was conducted in the presence of the fusion protein, and morphological change was investigated. The protein inhibited the calcite growth *in vitro*, and spherical calcium carbonate micro-particles with the diameter of about 20-30 μm were obtained. We expect that this study would be helpful for better understanding of eggshell-based biomineralization.

Keywords: Biomineralization, Calcium carbonate, Recombinant protein, Fusion protein

1. INTRODUCTION

조류의 알 (avian egg) 및 해양 연체류의 껍질 (Molluskan shell) 등은 탄산칼슘 (CaCO₃)을 주성분으로 하는 대표적인 바이오미네랄로서 생명체의 구조적 지지체 및 외부로부터 생체조직을 보호하는 역할을 한다. 그리고 상기 바이오미네랄을 구성하는 것으로 알려진 5% 미만의 껍질 매트릭스 단백질 (shell matrix protein)은, 아직까지 메커니즘에 대한 이해가 충분히 이루어지지 않는 반면, 유기복합화를 통해 바이오미네랄 형성을 위한 탄산칼슘 결정의 성장 및 형태를 조절하는 데 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [1,2]. 지금까지 다양한 종류의 껍질 매트릭스 단백질에 대한 1차 구조 및 추정되는 기능이 유전체 및 단백질체 분석을 통해 제시되고 있으며 [3-5], 이들 단백질은 특징적으로 1차 구조적인 유사성은 잘 관찰되지 않으나, 음이온성 아미노산인 아스파르트산과 글루탐산이 상대적으로 많이 분포하여 산성을 띠는 경우가 많고, 안정적인 2-3차 구조를 형성하기 어려운 아미노산 (intrinsically disordered proteins) 및 아미노산의 반복 서열이 빈번히 나타난다 [6,7]. 또한 단백질의 3차 구조가 풀린 상태에서 추출된 천연 단백질 또한 결정 핵형성 및 성장의 조절에 관여하는 것으로 알려져, 자연상태에서의 정확한 3차 구조가 단백질의 기능을 나타내는 데 결정적이지 않은 것으로 추정되고 있다 [8-10]. 하지만 단순히 상기 단백질을 구성하는 아미노산으로 결정화를 수행하였을 때, 껍질 형성 단백질의 효과가 나타나지 않은 것으로 보아, 단백질 3차 구조상에서의 입체 화학적인 특성은 요구되는 것으로 판단되

충남대학교 응용화학공학과
Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
Tel: +82-42-821-5682, Fax: +82-42-822-8995
e-mail: biochoi@cnu.ac.kr

고 있다 [6,11].

최근 조류껍질 (eggshell)로부터 유래한 바이오복합재료는 독특한 나노구조를 바탕으로 기계적·생물학적 물성으로 인해 관심이 증대되고 있다 [12-14]. 조류껍질은 주로 탄산칼슘의 한 형태인 방해석 (calcite)으로 구성되어 있고, 500가지 이상의 단백질이 조류껍질과 연관되어 있을 것으로 추정되고 있다 [4]. 하지만 조류껍질 단백질에 의한 생광물화 (biomineralization) 연구는 대체로 추출에 의해 얻을 수 있는 ovalbumin, lysozyme, osteopontin, ovovleidin 등의 단백질에 대하여 제한적으로 수행되어 왔다 [2,15-17]. 이러한 측면에서 생광물화 형성에 관여하는 단백질의 생화학적 특성 및 기반한 메커니즘을 더욱 효율적으로 이해하기 위하여 생광물화 형성에 관여하는 단백질을 효율적으로 확보하는 것은 매우 중요하다.

본 연구에서는 재조합 단백질 생산 전략을 통해, 단순히 추출에 의해 확보하기 어려운 껍질 매트릭스 단백질을 효율적으로 얻을 것으로 기대하였다. 또한 대상 매트릭스 단백질에 형광 단백질을 융합하고 이를 대량 발현하여 확보한 매트릭스 단백질의 생화학적 특성을 더욱 효과적으로 분석하고자 하였다. 이러한 측면에서 본 연구에서는, 이전의 연구에서 확보한 조류껍질 형성에 관여할 것으로 판단되는 GG1234 단백질 (NCBI reference sequence, XP_001234449)과 [18], 다양한 생물학적 연구에서 널리 사용되는 대표적인 표지자 중 하나인 DsRed 형광 단백질을 융합하여 GG1234-DsRed 융합 단백질 발현 벡터를 구축하고, 이를 대장균 (*E. coli*)에서 대량 발현하였다. 또한 상기 단백질을 C-말단에 도입되어 있는 6개의 히스티딘을 활용한 Ni-NTA 친화도 크로마토그래피에 의해 용이하게 정제하였고, 이를 이용하여 *In vitro* 상에서 탄산칼슘 결정화를 수행하였을 때 탄산칼슘 결정 성장에 상기 단백질이 어떠한 영향을 주는 지를 분석하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 균주 및 발현벡터 구축

대장균 DH5 α (Life technologies, Carlsbad, CA, USA)가 재조합 벡터 제작에 이용되었고, 대장균 BL21(DE3) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)가 재조합 GG1234-DsRed 단백질 발현에 활용되었다. 대장균은 50 μ g/mL 엠펜실린이 포함된 Luria-Bertani (LB) 배지에서 배양되었다. GG1234-DsRed 융합 단백질을 발현하기 위한 pGG-DsRed 벡터를 제작하기 위하여, pET-23b 벡터의 *Nde*I과 *Hind*III 사이에 이전 연구에서 확보한 GG1234 유전자를 도입하였고 [18], *Hind*III와 *Xho*I 사이에 상업적으로 판매되고 있는 pDsRed-Monomer N1 벡터 (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA)의 DsRed monomer 유전자를 도입하였다. 구축된 pGG-DsRed 발현 벡터는 시퀀싱을 통해 모든 서열이 정확히 도입되었는지 검증하였다.

2.2. GG1234-DsRed 융합 단백질의 발현 및 정제

pGG-DsRed 벡터를 대장균 BL21(DE3)에 도입하였다. GG1234-DsRed 융합 단백질의 발현을 위하여, 우선 50 μ g/mL의 엠펜실린이 포함된 LB 배지에 상기 벡터가 포함된 대장균 세포를 접종하여, 37°C에서 진탕배양하였다. 그리고 단백질 발현을 유도하기 위하여 흡광도 (OD₆₀₀)값이 0.8-1.0이 되었을 때, 단백질 발현 유도물질인 Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 최종농도가 0.1 mM 되도록 첨가하였고, 25°C에서 20시간 동안 추가로 배양한 후, 배양된 세포를 원심분리하여 상등액을 제거하고 세포를 회수하였다. 회수된 세포를 세포 파쇄를 위한 용액 (50 mM 인산나트륨 완충액 (sodium phosphate buffer), pH 8, 10 mM 이미다졸 (imidazole))에 부유시킨 다음 초음파 분쇄기를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄된 세포를 수용성 분액과 불용성 분액으로 나누어 각각을 통상의 SDS-PAGE를 이용하여 분석하였다. 또한, 상기 단백질의 수용성 분액을 니켈 레진이 충전된 컬럼에 적용하여 단백질과 컬럼이 결합하도록 하고, 세척 버퍼 (50 mM 인산 나트륨 완충액, 20 mM 이미다졸, pH 8.0)로 컬럼에 결합하지 않은 단백질을 우선적으로 씻어 냈고, 마지막으로 컬럼 안의 레진이 차지하는 부피만큼의 단백질 용출을 위한 버퍼 (50 mM 인산나트륨 완충액, 300 mM 이미다졸, pH 8.0)를 이용하여 세척하였다. 그리고 최종적으로 단백질 용출 버퍼를 이용하여 GG1234-DsRed 융합 단백질을 회수하였다. 이후 12-14 kDa MWCO의 투석용 막 (Spectra/Por®; Spectrum Lab. Inc., USA)에 정제된 단백질 (100 mL)을 담고, 3 L 증류수를 이용한 투석을 4회 진행하여, 단백질 수용액에 남아 있는 물과 단백질 성분 이외의 성분을 제거하였다. 투석을 진행하였을 응집체의 재형성이 거의 이루어지지 않아 최종적으로 물에 용해된 정제된 단백질 용액을 생산하였다.

2.3. GG1234-DsRed 융합 단백질을 이용한 *In vitro* 탄산칼슘 결정화

GG1234-DsRed 단백질을 이용한 *In vitro* 상에서의 탄산칼슘 결정화는 24-well 플레이트의 유리표면 위에서, CaCl₂와 Na₂CO₃ 용액을 혼합하는 이전의 보고된 방법을 다음과 같이 수정하여 진행하였다 [19]. 다양한 농도 (0-600 μ g/mL)의 GG1234-DsRed 단백질이 포함된 20 mM CaCl₂ 용액과, 같은 부피의 20 mM Na₂CO₃ 용액을 준비하여 빠르게 혼합하고, 4°C에서 20시간 동안 놓아 두었다. 결정화에 의해 유리 표면에 침전된 탄산칼슘 결정을 증류수로 세척하고 상온에서 건조하였다. 얻어진 탄산칼슘 결정의 형태와 형광 단백질의 형광을 관찰하기 위하여 CCD 카메라 (Coolsnap; Photometrics, Tucson, AZ, USA)가 부착되어 있는 형광 현미경 (TE 2000; Nikon Co., Tokyo, Japan)을 이용하였고, 형태를 더욱 정확히 파악하기 위하여 얻어진 샘플을 금으로 코팅하여 주사전자현미경 (scanning electron microscope (SEM) SNE-4500M; SEC Co., Suwon, Korea)으로 관찰하였다. 또한 얻어진 결정의 X-선 회절패턴을 X-선 회절계 (X-ray diffractometer (XRD) D/MAX-2200; Rigaku Co., Tokyo, Japan)로 분석하였다.

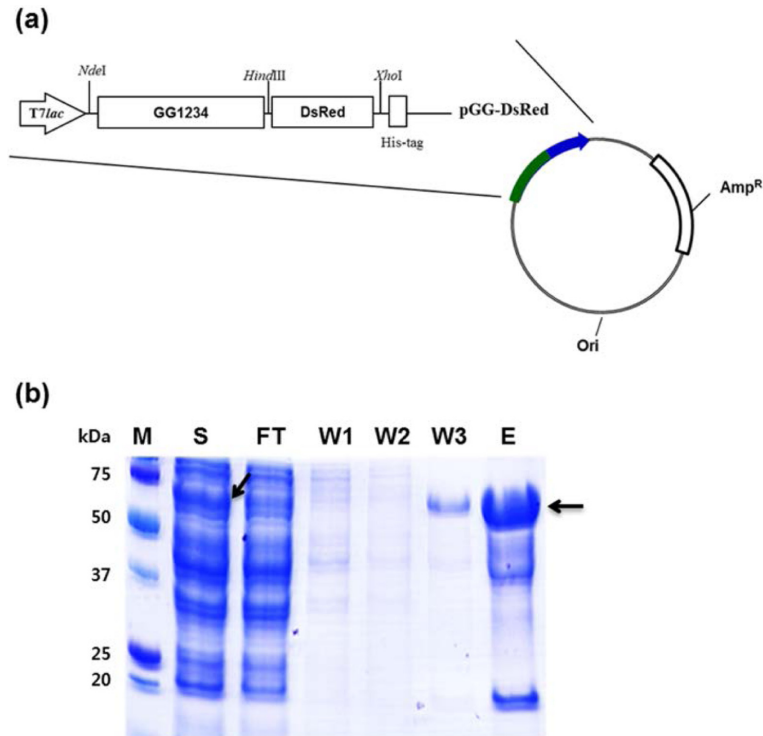


Fig. 1. (a) Schematic diagram of the vector system to over-express GG1234-DsRed fusion protein. (b) SDS-PAGE analysis of the GG1234-DsRed purification on Ni-NTA affinity chromatography. Lanes: M, protein marker; S, soluble lysate; FT, flow through ; W1, wash fraction 1; W2, wash fraction 2; W3, wash fraction 3; E, eluate.

3. RESULTS AND DISCUSSION

우선, GG1234-DsRed 융합 단백질을 제조하기 위하여, 이전 연구에서 얻어진 GG1234 단백질의 C-말단 유전자서열에, 리포터 단백질로 통상적으로 많이 사용되는 DsRed의 유전자서열을 연결하여, 강력한 T7 프로모터에 의해 발현이 조절되는 pET 벡터 시스템에 도입하였다 (Fig. 1a). GG1234-DsRed 융합 단백질의 대량발현은 37°C 배양 후 다양한 농도의 IPTG 농도와 IPTG 발현 유도 이후 다양한 온도 (37°C, 30°C, 25°C, 20°C)에서 단백질의 발현 정도를 확인하여, 결과적으로 0.1 mM IPTG 발현 유도 이후 25°C, 20 hr 배양하는 조건으로 결정하였다. GG1234-DsRed 융합 단백질은 상기 조건에서 수용성 단백질로 발현이 되어 세포의 색깔이 DsRed 단백질의 색깔인 붉은색으로 변하였고, 발현된 융합 단백질은 C-말단에 추가로 도입되어 있는 6개의 히스티딘을 활용한 친화도 크로마토그래피 법에 의하여 성공적으로 정제하여 (Fig. 1b), 최종적으로 정제된 단백질은 DsRed 단백질에서 나타나는 형광 특성을 마찬가지로 보여주었다. 하지만 SDS-PAGE 상에서 융합단백질을 구성하는 GG1234와 DsRed 단백질의 단편으로 판단되는 밴드가 일부 확인되었고, 이는 융합 단백질의 발현에서 종종 나타나는, 융합 단백질의 융합 부위에서 일부 단백질이 분해된 것으로 판단되었다.

다음으로 다양한 농도의 GG1234-DsRed 융합 단백질을 할

용하여 *In vitro* 상에서 탄산칼슘의 결정화를 CaCl_2 와 Na_2CO_3 용액을 혼합하는 방법에 의하여 진행하였다. 그 결과 만들어진 탄산칼슘 결정은 광학/형광 현미경 및 주사 전자 현미경을 통하여 관찰하였다. GG1234-DsRed 융합단백질이 존재하지 않을 때는, 통상적으로 나타나는 마름모 (rhombohedra) 형태의 결정이 응집된 직경이 약 20-30 μm 정도의 탄산칼슘 결정이 얻어졌다 (Fig. 2a). 하지만 융합 단백질이 첨가됨에 따라 결정의 형태는, 결정의 모서리 부분에서 결정 성장이 점차 저해를 받아 점차 구형의 형태로 바뀌었고, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 융합 단백질 농도에서는 구형의 마이크로 입자가 안정적으로 형성되었다 (Fig. 2b-f). 탄산칼슘 결정을 형광현미경으로 관찰하였을 때, 첨가되는 단백질의 농도가 증가함에 따라 결정에서 DsRed 단백질에 의한 형광의 검출 정도가 함께 증가하였고, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상 영역에서는 첨가되는 융합 단백질 농도를 더욱 증가하여도 결정에서의 형광의 세기는 일정하게 유지되어, GG1234-DsRed 단백질이 구형의 탄산칼슘 결정 형성에 일정 비율로 관여하여 구형의 입자 형성에 관여할 것으로 판단되었다. 이러한 구 형태의 마이크로 입자는 lysozyme 및 ovalbumin을 이용한 탄산칼슘 결정 형성 연구결과에서 보고된 바 있으나 무정형의 결정이 아닌 베타라이트 (vaterite) 결정을 형성하고 안정화에 관여하는 것으로 알려졌다 [16,17]. 한편 해양 유래의 여러 껍질 매트릭스 단백질들에 대하여, 단백질의 특성에 따라 여러 형태의 무정형

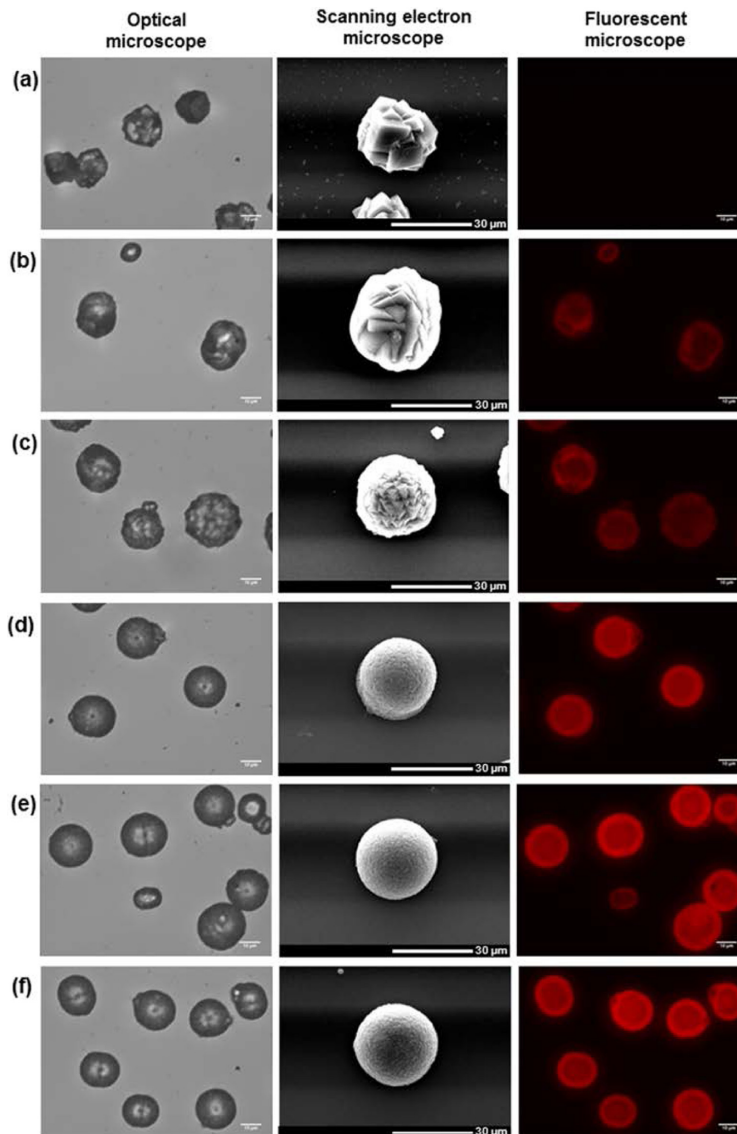


Fig. 2. Calcium carbonate precipitates from *in vitro* crystallization by rapid mixing of aqueous CaCl_2 and Na_2CO_3 solutions with no GG1234-DsRed (a), 10 $\mu\text{g/mL}$ (b), 100 $\mu\text{g/mL}$ (c), 200 $\mu\text{g/mL}$ (d), 400 $\mu\text{g/mL}$ (e) and 600 $\mu\text{g/mL}$ GG1234-DsRed (f).

의 탄산칼슘을 안정화하거나 아라고나이트 (aragonite) 및 방해석 (calcite) 형성에 관여하는 결과들이 보고되고 있다 [19-21]. 단백질과 칼슘이온의 상호작용 및 탄산칼슘 결정 면과의 상호작용의 형태와 정도에 따라, 결정의 형태가 다양하게 컨트롤되므로, 본 연구결과에 대한 추가적인 비교 분석 연구가 필요하지만 조류껍질 부분에 존재하는 단백질로서 탄산칼슘 결정 형성에 저해 및 제어에 관여할 것으로 추정하였다. X-선 회절 실험을 통해 얻어진 탄산 칼슘 결정의 형태를 분석하였을 때, 융합 단백질이 첨가되지 않은 탄산칼슘 결정은 전형적인 방해석 (calcite)의 X-선 회절 패턴을 얻을 수 있었고 (Fig. 3a), 융합 단백질이 첨가됨에 따라 탄산칼슘의 결정성 특징은 점차 약해짐을 알 수 있어, GG1234-DsRed 융합단백질이 결정성 탄산칼슘의 성장을 저해하는 것으로 여겨졌

다 (Fig. 3b-f). 이러한 저해 양상은 대조군으로 활용될 수 있는 BSA 단백질을 이용한 탄산칼슘 결정화 및 아스파탁산과 글루탐산의 첨가에서는 관찰되지 않았고, 단백질이 첨가되지 않았을 때의 방해석 결정이 형성되거나 방해석의 경계 부분이 약간 부드럽게 변화되는 정도만이 관찰되었으며 (data not shown), 이는 이전의 다른 보고와도 맥을 같이하였다 [11,19].

4. CONCLUSION

본 연구에서는 대장균에서 조류껍질 형성에 관여하는 것으로 판단되는 GG1234 단백질과 형광단백질인 DsRed 단백질

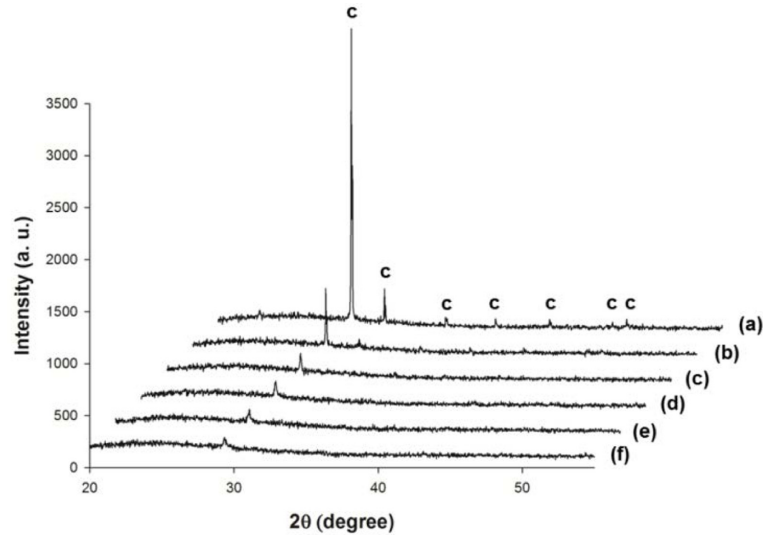


Fig. 3. X-ray diffraction (XRD) of the calcium carbonate precipitates from *in vitro* crystallization by rapid mixing of aqueous CaCl_2 and Na_2CO_3 solutions with no GG1234-DsRed (a), 10 $\mu\text{g/mL}$ (b), 100 $\mu\text{g/mL}$ (c), 200 $\mu\text{g/mL}$ (d), 400 $\mu\text{g/mL}$ (e) and 600 $\mu\text{g/mL}$ GG1234-DsRed (f).

의 유전자를 연결한, GG1234-DsRed 융합 단백질을 대장균에서 성공적으로 발현하고 정제하였다. 얻어진 융합단백질을 이용하여 *In vitro* 상에서 탄산칼슘 결정화를 수행하였고, 첨가되는 융합 단백질의 농도가 증가함에 따라 방해석 탄산칼슘의 성장이 저해되어 200 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 융합 단백질 농도에서는 구형의 마이크로 입자가 형성됨을 확인하였고, 이때 융합 단백질이 결정과 결합하고 있음을 결정에서 나타나는 형광으로 파악하였다. 본 연구결과는 단백질에 의해 조절되는 생광물화 현상에 대한 이해를 높이는 데 기여할 것이고, 향후 단백질 기반의 유무기복합화에 의한 바이오미네랄 생체재료 개발에 적용될 것으로 기대된다.

Acknowledgements

본 연구는 2015년도 충남대학교 CNU 학술연구비 연구과제와 한국연구재단 (NRF-2012R1A1A1003516)의 연구비 지원을 받아 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Marin, F., G Luquet, B. Marie, and D. Medakovic (2008) Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution. *Curr. Top. Dev. Biol.* 80: 209-276.
- Rose, M. L. H. and M. T. Hincke (2009) Protein constituents of the eggshell: Eggshell-specific matrix proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 2707-2719.
- Miyamoto, H., H. Endo, N. Hashimoto, K. Iimura, Y. Isowa, S. Kinoshita, T. Kotaki, T. Masaoka, T. Miki, S. Nakayama, C. Noga-
- awa, A. Notazawa, F. Ohmori, I. Sarashina, M. Suzuki, R. Takagi, J. Takahashi, T. Takeuchi, N. Yokoo, N. Satoh, H. Toyohara, T. Miyashita, H. Wada, T. Samata, K. Endo, H. Nagasawa, S. Asakawa, and S. Watabe (2013) The diversity of shell matrix proteins: Genome-wide investigation of the pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Zool. Sci.* 30: 801-816.
- Mann, K., B. Macek, and J. V. Olsen (2006) Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer. *Proteomics* 6: 3801-3810.
- Evans, J. S. (2012) Aragonite-associated biomineralization proteins are disordered and contain interactive motifs. *Bioinformatics* 28: 3182-3185.
- Picker, A., M. Kellermeier, J. Seto, D. Gebauer, and H. Colfen (2012) The multiple effects of amino acids on the early stages of calcium carbonate crystallization. *Z. Kristallogr.* 227: 744-757.
- Magdalena, W., P. Dobryszycski, and A. Ozyhar (2012) Intrinsically disordered proteins in biomineralization. pp 3-32. In: J. Seto (ed.), *Advanced Topics in Biomineralization*. InTech.
- Sun, J. and B. Bhushan (2012) Hierarchical structure and mechanical properties of nacre: A review. *RSC adv.* 2: 7617-7632.
- Suzuki, M., K. Saruwatari, T. Kogure, Y. Yamamoto, T. Nishimura, T. Kato, and H. Nagasawa (2009) An acidic matrix protein, Pif, is a key macromolecule for nacre formation. *Science* 325: 1388-1390.
- Addadi, L., D. Joester, F. Nudelman, and S. Weiner (2006) Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chem.* 12: 980-987.
- Briegel, C. and J. Seto (2012) Single amino acids as additives modulating CaCO_3 mineralization. pp 33-48. In: J. Seto (ed.), *Advanced Topics in Biomineralization*. InTech.
- Nys, Y., J. Gautron, J. M. Garcia-Ruiz, and M. T. Hincke (2004) Avian eggshell mineralization: biochemical and functional charac-

- terization of matrix proteins. *Cr. Palevol.* 3: 549-562.
13. Addadi, L. and S. Weiner (1992) Control and design principles in biological mineralization. *Angew. Chem. Int. Ed.* 31: 153-169.
 14. Cordeiro, C. M. and M. T. Hincke (2011) Recent patents on eggshell: shell and membrane applications. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* 3: 1-8.
 15. Chien, Y. C., M. T. Hincke, and M. D. McKee (2009) Avian eggshell structure and osteopontin. *Cells Tissues Organs* 189: 38-43.
 16. Wang, X., R. Kong, X. Pan, H. Xu, D. Xia, H. Shan, and J. R. Lu (2009) Role of ovalbumin in the stabilization of metastable vaterite in calcium carbonate biomineralization. *J. Phys. Chem. B* 113: 8975-8982.
 17. Wang, X., H. Sun, Y. Xia, C. Chen, H. Xu, H. Shan, and J. R. Lu (2009) Lysozyme mediated calcium carbonate mineralization. *J. Colloid Interface Sci.* 332: 96-103.
 18. Son, C. S. Y. Bahn, H. J. Cha, and Y. S. Choi (2015) Calcium binding proteins and coacervate formed from calcium binding proteins. *Korea patent* 10-2015-0064348.
 19. Bahn, S. Y., B. H. Jo, B. H. Hwang, Y. S. Choi, and H. J. Cha (2015) Role of Pif97 in nacre biomineralization: *In vitro* characterization of recombinant Pif97 as a framework protein for the association of organic-inorganic layers in nacre. *Cryst. Growth Des.* 15: 3666-3673.
 20. Marin, F., G. Luquet, B. Marie, and D. Medakovic (2008) Molluscan shell proteins: Primary structure, origin, and evolution. *Curr. Top. Dev. Biol.* 80: 209-276.
 21. Addadi, L., S. Raz, and S. Weiner (2003) Taking advantage of disorder: amorphous calcium carbonate and its roles in biomineralization. *Adv. Mater.* 15: 959-970.