

Cell Migration and Wound Healing Activities of Recombinant Thymosin β -4 Expressed in *Escherichia coli*

Kyo-Chang Hong¹, Yung Hyun Choi^{1,2}, Gun-Do Kim³, Hee-Jae Cha⁴, Sung-Jong Jeon^{1,5} and Soo-Wan Nam^{1,5*}

¹Department of Smart Bio-Health, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea

²Department of Biochemistry, Dong-Eui University College of Korean Medicine, Busan 47227, Korea

³Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

⁴Department of Parasitology and Genetics, Kosin University College of Medicine, Busan 49267, Korea

⁵Biomedical Engineering and Biotechnology Major, Division of Applied Bioengineering, College of Engineering, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea

Received January 14, 2022 / Revised January 27, 2022 / Accepted January 27, 2022

Thymosin β -4 (TB4) is a small peptide composed of 43 amino acids. To obtain sufficient biologically active mouse TB4 economically, we cloned and overexpressed this gene in an *Escherichia coli* system. With the isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside induction of the *E. coli* transformant, TB4 fusion protein with intein- and chitin-binding domain was successfully expressed in the soluble fraction within the *E. coli* cell. The TB4-intein - chitin-binding domain fusion protein was purified from the soluble fraction of *E. coli* cell lysate. The affinity chromatography with chitin beads and dithiothreitol-mediated intein self-cleavage reaction releases the TB4 peptide into the stripping solution. Sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot analyses were used to confirm that the recombinant TB4 peptide was produced with the expected size of 5 kDa. We found that the recombinant TB4 stimulated cell migration in the transwell plate chamber assay. After 18 hr of the treatment of the recombinant TB4 with 1 ng/ml concentration, the migration of the HT1080 cell was increased by 20% compared with that of the chemically synthesized TB4. The recombinant TB4 was also observed to promote the healing of a wound area in C57BL/6 mice by as high as 35% compared with that of the chemically synthesized TB4. These results suggest that the recombinant TB4 has better biological activity for cell migration and wound healing than that of the chemically synthesized TB4 peptide.

Key words : Cell migration, *E. coli*, Thymosin beta-4, wound healing

서 론

Thymosin β -4 (TB4)는 43개의 amino acid로 구성이 되어있고, 분자량은 5 kDa이다[8]. 포유류 세포에서만 발견이 되고, 기능은 G actin과 binding 하여[1], 항염증[23], 심장세포나 정맥내피세포의 migration을 일으키며[2, 9, 17], 혈관신생과 궤양과 상처 및 화상 등의 치유 및 모낭발달에도 관여하며[5, 11, 15, 16, 18, 21, 28, 31], 암 전이[4, 12], 퓨린성 신호전달[7], 안구건조 방지[30] 등 여러 가지 기능이 최근에 많이 알려지고 있다. 현재 TB4 유전자가 많이 발견된 생물종은 human, mouse, rat이며[8]. 위의 여러 기능을 하는 TB4는 의약품으로 사용되기도 하고[20, 25], 분자 marker라 하여 질병의 유무를

판별하는데 사용이 되기도 한다[3, 26]. TB4를 포유류 세포에서 직접 생산, 정제해서 쓰기도 하지만, 그 양이 많지 않을뿐더러, 시간도 많이 들고, 경제적으로도 아주 고비용 공정이다.

그래서 미생물 세포에서 재조합 단백질 형태로 생산하는데, 대표적으로 쓰이는 숙주세포가 *Escherichia coli* 이다. 조작도 쉽고, 성장속도 및 단백질 생산 속도가 빨라서 적은 시간으로도 많은 양의 단백질을 고효율로 생산해 낼 수 있다[10]. 그러나, *E. coli* 내에서 분자량이 작은 펩타이드를 발현시키면 *E. coli* 내에 있는 protease에 의해서 proteolysis가 자주 일어난다[24]. 이러한 proteolysis 정도를 낮추기 위해서 protease-deficient 균주를 사용하거나[13, 19], tumor necrosis factor 또는 green fluorescent protein을 융합 파트너로 사용하여 분자량을 높은 chimeric 단백질 형태로 발현시키거나[10, 27], 6X His 또는 intein tags를 사용해서 TB4를 발현시키려는 시도가 있어 왔다[6, 13, 14, 30]. 특히, intein-tag은 chitin binding domain (CBD)과 융합되어 있어 목적 단백질의 분자량을 높혀 *E. coli* 세포질 내 proteases의 공격으로부터 목적 단백질을 보호할 수 있고, chitin과의 친화력을 이용하면, 정제 시 목적 단백질만 높은 수율로 단시간에 획득할 수 있다[6, 30].

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-2276, Fax : +82-505-182-6897

E-mail : swnam@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

본 논문에서는 mouse TB4 유전자를 subcloning하여 intein-tag과 CBD와 융합된 대장균 발현계를 구축하고, protease-deficient 균주인 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질전환시켜 최적 발현조건을 조사하고, 과발현된 recombinant TB4의 분리, 정제 공정을 확립하고자 하였다. 또한, 정제된 recombinant TB4의 주요한 생물학적 활성(cell migration, wound healing)을 밝히고자 하였다. 특히, 이때까지 연구되지 않았던, 그리고, 중앙 생검 조직에 사용되는 인간 섬유육종 세포주 HT1080를 사용하여 cell migration 활성을 조사하였고, 상처치유 효능도 직접 동물 mouse를 사용하여 인위적 상처를 유발시킨 뒤 recombinant TB4의 상처치유 효능을 정량적으로 살펴보았다.

재료 및 방법

사용균주 및 Plasmid

본 연구에 사용된 mouse TB4 유전자는 pET-22b vector에 재조합시켜 얻은 plasmid pET-22b-TB4에 subcloning 되어 있다(고신대 의대 제공). 이 plasmid를 *E. coli* DH5a 에 형질전환시켜 보관하였고, GeneAIIIR GENEx Genomic kit (GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)를 사용하여 추출한 plasmid는 pTYB2 vector (New England Biolabs Ltd, UK)에 subcloning을 위해 PCR 증폭(forward primer (GGAATTCATATGTCTGACAAACC; under line: *Nde* I cutting site)와 reverse primer (CCGCTCGAGCGATTCG; under line: *Xho* I cutting site)하였다. 구축한 plasmid pTYB2-TB4 (7,575 bp)를 *E. coli* BL21 (DE3) codon plus 에 형질전환시켰다. Plasmid pTYB2-TB4는 *T7* promoter를 가지고 있어 isopropyl thiogalactoside (IPTG)를 첨가함으로써 TB4 발현을 유도할 수 있다.

배양 및 유전자 발현 최적화

E. coli BL21 (DE3) codon plus/pTYB2-TB4은 LB 배지에서 37°C, 16시간 본 배양을 하고, OD₆₀₀ 값이 0.5가 되었을 때, IPTG를 첨가하였다. TB4 발현 최적 조건을 규명하기 위해 IPTG 농도 별(0, 0.1, 0.3, 0.5 mM), 유도 시간별(0, 3, 6, 12시간), 배양 온도 별(37°C, 30°C, 25°C)로 TB4-intein (60 kDa)의 발현량을 10% glycine SDS-PAGE로 측정하였다.

TB4의 정제

E. coli BL21 (DE3) codon plus/pTYB2-TB4를 LB 배지에서 1 L 배양하였고, 배양 후 10,000× g, 10분, 4°C에서 원심분리하여 cell pellet만 모으고, column buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.5) 에 녹이고 난 후, sonication 실행하였다.

Cell lysate를 15,000× g, 10분, 4°C에서 원심분리한 후, 상등액(soluble fraction)을 chitin beads가 들어있는 Econo-Pac chromatography column (Bio-Rad, USA) 에 넣고, column

buffer로 washing한 후, cleavage buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM DTT, pH 8.5)를 넣고 25°C에서 48시간 동안 반응시켜 TB4와 intein-CBD를 절단시켰다[30]. TB4 용출 후, column 내의 intein-CBD와 chitin beads를 분리하기 위해 stripping buffer (1% SDS)와 DW로 washing 한 뒤, column buffer를 채워 넣었다. 용출된 TB4는 DTT를 제거하기 위해 PBS로 투석하였다.

Protein 농도와 SDS-PAGE를 이용한 TB4 분석

단백질 정량은 Lowry 법을 사용하였고, 표준 단백질로 0.1% BSA를 사용하였다. 단백질 농도를 각 lane 별로 2.5 µg/ml의 농도로 맞추고 10% glycine SDS-PAGE와 16% Tricine SDS-PAGE를 실행하였다. 염색은 Coomassie Brilliant Blue (R250)를 사용하였다.

정제 TB4의 western blotting

정제된 TB4를 16% Tricine SDS-PAGE를 실행하고 난 뒤, western blotting을 실행하였다. 0.2 µm pore size의 PVDF membrane을 methanol에 적셔준 뒤 transfer buffer에 5분간 반응시켰다. Semi dry transfer로 15 V에 1시간 동안 transfer시킨 뒤, membrane을 blocking buffer에 넣고 4°C에서 overnight 하였다. PBST (PBS, 0.5% tween 20)로 3번 washing, DW로 1번 washing 해주고 난 뒤, TB4 antibody (LS Bio, Seattle, USA)를 25°C에서 1시간 동안 반응시키고 washing 후, secondary antibody (AP-conjugated goat anti-mouse antibody, LSBio, Seattle, USA)를 25°C, 1시간 반응시킨 뒤 washing하였다. Detection 용액(Miracle-Star™ Western Blot Detection System, iNtRON Biotechnology, Korea)을 분주하고 37°C에서 20분 동안 반응을 시키고, 반응을 종결시키기 위해 DW로 washing하였다. 화학합성 TB4 (chemical TB4, Bachem AG, Bubendorf, Switzerland)와 recombinant TB4의 분자량을 비교하기 위해 16% Tricine SDS-PAGE를 실행하였다.

재조합 TB4의 cell migration assay

TB4의 주 기능인 cell migration 활성을 측정하기 위해 인간 섬유육종 세포주 HT1080를 사용하였고, 배지조성은 DMEM과 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin, 1% L-glutamine이며, 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양하였다.

Hemocytometer로 세포수를 세고, 각 well 당 5×10⁴ cells/ml를 12 plate well에 seeding한 다음 TB4를 처리하였다. 대조군으로 PBS를 사용하였고, 화학합성 TB4, recombinant TB4를 각 농도별(1, 10, 100, 1000 ng/ml)로 각 well에 분주하고 난 뒤, 24시간 동안 incubation 시켰다[17]. 24시간 동안 TB4를 처리해준 HT1080 cell은 0.25% Trypsin-EDTA로 처리하여 FBS가 포함된 DMEM를 분주하고 1,000 rpm, 4°C, 5분 동안 원심분리 하고 난 뒤 cell pellet을 DMEM (FBS free)에 재현탁

시켰다.

Trans-well lower chamber를 0.5 mg/ml 농도의 collagen 10 μ l 분주 후 도포하고 뒤집어 말린 뒤 4°C에 보관하였다. Lower chamber에 DMEM, 0.1% FBS를 600 μ l 분주하고, upper chamber에는 위의 재현탁한 HT1080 cell 농도가 1×10^4 cells/ml 되도록 seeding하고(total volume 100 μ l가 되도록 FBS-free DMEM 을 채워줌), 18시간 동안 배양하였다. 이후 trans-well의 배지를 제거하고 trans-well 바닥을 methanol로 1분간 cell fixing시켰다. Hematoxylin으로 3분간 cell을 염색 시킨 뒤, DW로 washing하고 upper chamber filter 부분을 면봉으로 닦아주었다. 뒤집어서 수분을 말린 뒤, filter를 칼로 올려내고 lower chamber filter가 윗부분으로 하여 slide glass 위에 놓은 뒤, Balsam 시약을 처리하고 세포수를 세었다. 이렇게 센 세포수를 seeding한 세포수와 비교하여 상대적 수치(%)로 나타내었다[2, 22].

재조합 TB4의 wound healing assay

TB4의 주 기능인 wound healing 활성을 측정하기 위해 mouse C57BL/6를 사용하였고 age는 6-week, sex는 female이었다(Kosin 15-10). 15마리를 사용하여 control (DW: glycerol 비율을 7: 3으로 만든 용액) 5마리, chemical TB4 처리용 5마리, recombinant TB4 처리용 5마리로 나누어 사용하였다. 전신마취를 시키고 난 뒤, 쥐 등에 있는 털을 제거한 후, 2 mm biopsy punch로 상처를 내고, TB4를 처리하였다. DW: glycerol 비율을 7: 3으로 만든 용액 50 μ l에 25 μ g TB4를 녹인 용액으로 5일 동안 매일 치료한 뒤(최종 처리 농도 0.5 mg/ml), 상처부위의 tissue를 현미경으로 찍어 상처 면적을 상대적 수치(%)로 나타내었다.

결과 및 고찰

TB4 - Intein 융합 단백질의 최적 발현

형질전환체 *E. coli* BL21 (DE3) codon plus/pTYB2-TB4를 LB 배지에서 37°C에서 16시간 배양하여 OD₆₀₀ 값이 0.5가 될 때, 최종 농도 0.5 mM의 IPTG 를 첨가하고 3시간 유도배양하였다. 유도배양 후, 배양액을 4°C에서 10,000 \times g로 원심분리하여 cell pellet을 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 녹인 다음, 10% glycine SDS-PAGE로 확인한 결과, 60 kDa의 부위에서 TB4-intein-CBD 융합단백질이 발현된 것을 확인하였다(Fig. 1).

TB4 - intein-CBD 융합 단백질의 최적 유도발현 조건을 정하기 위해 IPTG 농도별(0, 0.1, 0.3, 0.5 mM), 유도 시간별(0, 3, 6, 12시간), 배양 온도별(37°C, 30°C, 25°C)로 형질전환체를 배양한 후 TB4 - intein-CBD 융합 단백질의 발현 국제성과 발현량을 조사하였다. Cell lysate를 insoluble과 soluble 분획으로 나누어 SDS-PAGE로 분석한 결과, TB4 - intein-CBD 융합

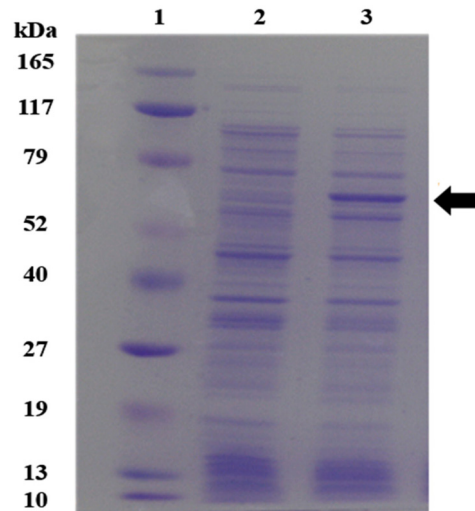


Fig. 1. 10% Glycine SDS-PAGE analysis of the recombinant TB4-intein fusion protein. Lane 1, protein molecular weight markers; lane 2, cell lysate of *E. coli* BL21 (DE3) Codon plus; lane 3, cell lysate of *E. coli* BL21 (DE3) Codon plus/pTYB2-TB4 (37°C, 0.5 mM IPTG, 3 hr).

단백질은 soluble 분획에서 발현되었고, 최적 IPTG 농도는 0.1 mM, 최적 배양온도와 유도 시간은 25°C에서 3시간으로 확인되었다(data not shown). *E. coli*에서 TB4가 soluble 분획에서 발현된 것은 ploy-His tag과의 발현과 dimeric TB4 발현에서도 보고된 바 있다[13, 29]. TB4 발현량을 증대시키기 위해 dimer 또는 tetramer 형태로 발현시키는 경우가 있는데[28, 29], 본 연구에서는 monomer 형태(single copy)로 발현시키도 과발현에 문제가 없음을 보여주었다.

재조합 TB4의 정제 및 western blotting

TB4-intein-CBD 융합 단백질은 chitin beads가 채워진 Econo-Pac chromatography column으로 정제를 하였다. Cell lysate 상등액을 column에 넣어 TB4-intein-CBD를 chitin beads에 붙였다. 그 다음으로 cleavage buffer를 넣고 48시간 동안 25°C에서 TB4와 intein-CBD를 cleavage 시켰다. 정제 단계별로 재조합 TB4를 10% glycine SDS-PAGE로 확인한 결과, intein-CBD는 55 kDa에서 확인이 되었고(Fig. 2A), TB4는 16% Tricine SDS-PAGE에서 5 kDa 단일 밴드로 확인되었다(Fig. 2B). 정제된 TB4를 western blotting으로 다시 확인한 결과(Fig. 2C), 5 kDa에서 순수한 단일 밴드로 나타나, 약 95% 이상의 순도를 보이는 것으로 판단된다. 또한, 화학합성한 TB4 (chemical TB4)와 정제한 recombinant TB4를 동일한 농도에서 16% Tricine SDS-PAGE로 비교한 결과, 둘 다 5 kDa에서 band 확인이 되었으나, 화학합성한 TB4의 band는 넓게 퍼져 있고 연한 반면에, recombinant TB4는 퍼져 있지 않고 굵고 진한 band로 나타났(data not shown). 이는 recombinant TB4의 단백질(펩타이드) 접힘(folding)이 천연형에 가깝게 더

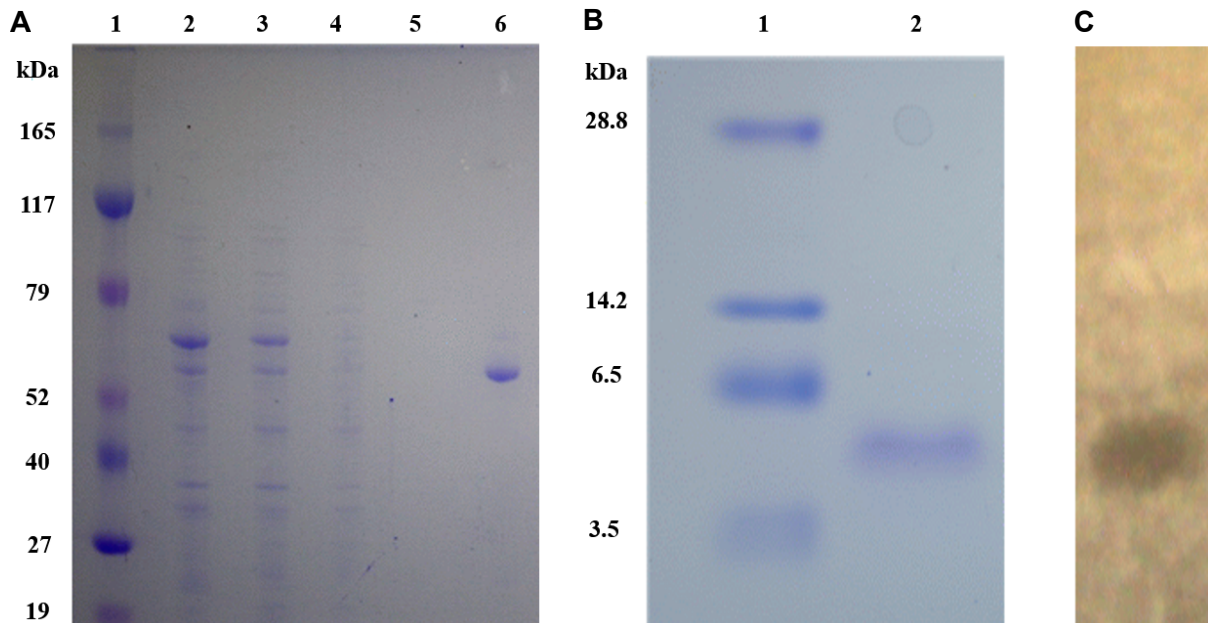


Fig. 2. Purification of recombinant TB4 expressed in *E. coli*. (A) 10% glycine SDS-PAGE of *E. coli* BL21 (DE3) Codon plus/pTYB2-TB4. Lane 1, protein molecular weight markers; lane 2, crude extract of transformant *E. coli* cells; lane 3, supernatant of crude extract of transformant *E. coli* cells; lane 4, non-binding proteins to chitin beads; lane 5, elution fraction after cleavage with DTT; lane 6, intein-CBD fraction. (B) 16% Tricine SDS-PAGE of purified TB4. Lane 1, protein molecular weight markers; lane 2, purified TB4. (C) Western blotting of recombinant TB4.

잘 일어났음을 의미하며, 동일한 펩타이드 농도로 처리시, chemical TB4 보다 recombinant TB4가 더 높은 생물학적 활성을 보일 것으로 예측된다.

Intein-CBD 융합 파트너를 이용한 TB4 발현에서 대부분 2 단계 이상의 chromatography (hydrophobic interaction chromatography 포함)를 해야 95% 이상의 순도를 보이는 것으로 보고된 바[6, 30], 본 연구에서는 1단계의 chromatography로도 95% 이상의 순도를 나타내어 정제 효율성(수율과 순도)이 우수함을 의미하여, 이때까지 TB4의 생산을 대부분 화학합성에 의존하던 공정을 *E. coli*에서 recombinant 형태로 생산함에 높은 경제성을 부여할 것으로 판단된다.

재조합 TB4의 cell migration 활성

Transwell 사용하여 HT1080 cell을 migration 시킨 결과, TB4 최적농도가 1 ng/ml이고, 농도를 높이면 높일수록 migration은 저하되는 것을 알 수 있었다(Fig. 3). 대조구(PBS)의 상대적 cell migration 값이 98.87 ± 2.3 이었고, 1 ng/ml 농도에서 화학합성 TB4는 142.64 ± 6.8 , recombinant TB4는 172.85 ± 5.3 을 보여($p < 0.01$), 대조구에 비해 화학합성 TB4는 44%, recombinant TB4는 75% 증가된 cell migration 효율을 보였다. 또한, 1 ng/ml 이상의 모든 농도에서 화학합성 TB4 보다 recombinant TB4가 HT1080 세포의 migration을 약 20% 이상 더 잘 시킴을 알 수 있었다(Fig. 3D).

Cell migration과 TB4의 농도와의 관계는 반비례하는 보고

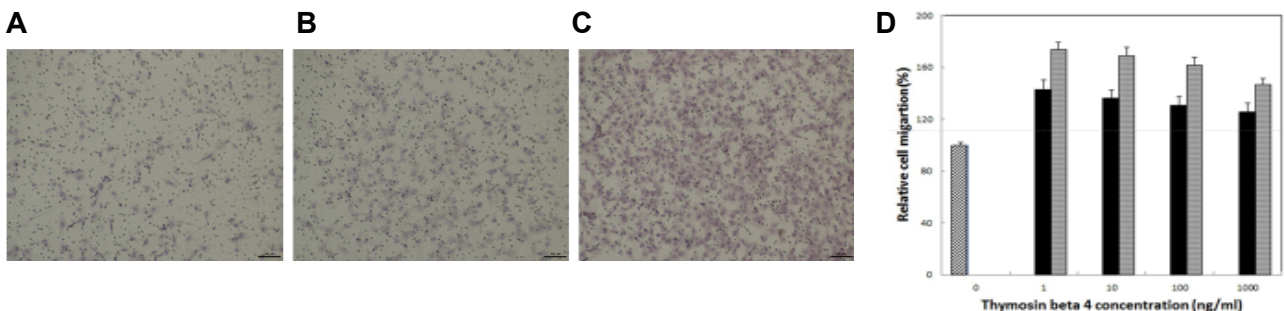


Fig. 3. Staining of migrated HT1080 cell with hematoxylin. (A), control (PBS); (B), 1 ng/ml chemical TB4; (C), 1 ng/ml recombinant TB4. Scale bar 10 μ m. (D), Effects of TB4 concentration on HT1080 cell migration. (black bar, chemical TB4; grey bar, recombinant TB4). Student's t-test, $p < 0.01$.

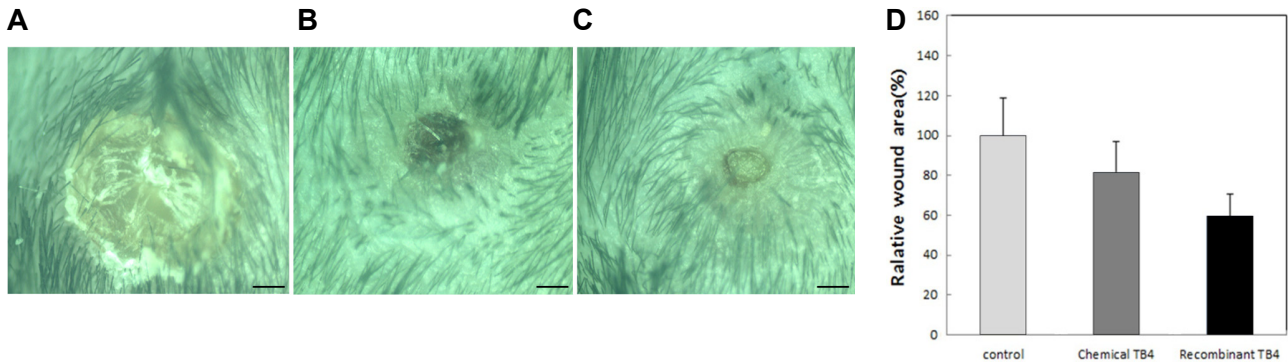


Fig. 4. Microphotographs of wound tissues after treatment of TB4 for 5 days. (A), control (30% glycerol); (B), chemical TB4; (C), recombinant TB4; (D), Wound healing activity of recombinant TB4 (final concentration=0.5 mg/ml). Student's t-test, $p < 0.01$. (scale bar = 100 μm).

는 인간 태줄정맥 내피세포[18, 29]와 모낭 줄기세포에서 보고 [5]가 있어, 본 연구 결과와 잘 일치함을 알 수 있었다. 화학합성 TB4 보다 recombinant TB4가 cell migration를 더 잘 일으키는 이유는 recombinant TB4 peptide의 좀 더 정확한 접힘으로 추정된다. Mouse TB4와 인간 TB4의 아미노산 유사성은 100%이기 때문에 인간 섬유육종 세포주 HT 1080에서도 recombinant mouse TB4가 이러한 결과를 보이는 것으로 판단된다. 높은 TB4 농도에서 cell migration 활성이 약해지는 현상은 다양한 수용체 관련 생물학적 반응에서 공통적으로 나타나며[7, 29], 그 기작은 아직 정확히 알려지지 않아 향후 연구가 더 필요한 부분이다.

재조합 TB4의 wound healing 활성

25 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ (0.5 mg/ml)의 화학합성 TB4와 recombinant TB4를 5일 동안 쥐 상처부위에 처리한 결과, 대조구(30% glycerol)에 비해 TB4를 처리해 준 쥐 실험군에서 상처 면적이 현저히 작아짐을 확인하였다(Fig. 4B, Fig. 4C). 대조구(30% glycerol)의 상대적 상처 면적 값이 100.00 ± 18.8 이었고, 화학합성 TB4는 81.21 ± 15.7 , recombinant TB4는 60.00 ± 10.9 값을 보여 ($p < 0.01$), 화학합성 TB4는 19%, recombinant TB4는 40% 정도로 상처 면적을 많이 줄였다(Fig. 4D).

화학합성 TB4와 recombinant TB4의 두가지 만을 비교를 하였을 때, recombinant TB4의 상처치료 효과(상처 면적 감소 효과)가 약 35% 더 높음을 알 수 있었다.

Recombinant TB4의 상처 치유 효능이 높은 이유는, cell migration 활성이 높은 이유와 마찬가지로, 재조합 TB4의 정확한 folding 때문인 것으로 유추된다[28]. 화학합성 TB4 보다 recombinant TB4의 상처 치유 활성이 높다는 보고는 몇 편 있으나[15, 28, 29, 31], 본 연구에서처럼 동물(쥐) 모델에 직접 상처를 내고 아무는 과정을 연구한 보고는 거의 없는 실정이며, 그나마 최근 *E. coli*에서 발현된 recombinant dimer TB4의 상처치유 효과도 0.25 mg/ml 농도에서 7일 정도 지나야 rat의 상처가 아문다고 보고되었다[29]. 따라서, 본 연구에서 생산한

monomer 형태의 recombinant TB4의 상처치유 효능이 더 우수하다고 판단되며, 앞으로 다양한 동물 모델에서의 상처치유 연구가 기대된다.

결론

Mouse thymosin β -4 (TB4) 유전자를 *Escherichia coli*에서 intein-tag 융합 단백질로 발현시키고 정제하였다. Recombinant TB4-intein 융합 단백질의 분자량을 10% glycine SDS-PAGE로 확인한 결과, 세포 내 soluble 분획에서 60 kDa의 단백질을 얻을 수 있었고, 유도발현 최적 조건은 0.1 mM IPTG, 25°C에서 3시간 동안 유도 발현할 때가 최적임을 확인하였다. Recombinant TB4 만을 얻기 위해서 chitin bead를 이용한 친화성 크로마토그래피 후 DTT를 이용해 self-cleavage를 일으킨 다음, 분자량을 확인한 결과, 5 kDa으로 확인되었으며, 순도는 95% 이상이였다. 정제한 recombinant TB4가 생물학적 기능을 보유하고 있는지 확인을 하기 위하여, TB4를 농도 별(1~1,000 ng/ml)로 하여 HT1080 cell을 이용한 cell migration를 측정한 결과, 모든 농도에서 recombinant TB4가 화학합성 TB4 보다 약 20% 이상 높은 활성을 보였으며, recombinant TB4 1 ng/ml의 농도에서 cell migration 활성이 가장 높게 나타났다. Recombinant TB4를 마우스 상처 부위에 5일 동안 매일 처리한 결과(최종 처리 농도 0.5 mg/ml), 화학합성 TB4 보다 recombinant TB4의 상처치유 활성이 약 35% 더 높음을 알 수 있었다. 따라서, 본 연구에서 생산한 monomer 형태의 recombinant TB4의 상처치유 효능이 기존 recombinant TB4 보다 더 우수하다고 판단되며, 앞으로 다양한 동물 모델에서의 항암 효능과 상처치유 효능 연구가 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2021학년도 동의대학교 교내연구비(20210188001)의 지원으로 수행되었습니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Belsky, J. B., Rivers, E. P., Filbin, M. R., Lee, P. J. and Morris, D. C. 2018. Thymosin beta 4 regulation of actin in sepsis. *Expert Opin. Biol. Ther.* **18**, 193-197.
- Bock-Marquette, I., Saxena, A., White, M. D., DiMaio, J. M. and Srivastava, D. 2004. Thymosin β 4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature* **432**, 466-472.
- Carpintero, P., Anadon, R., Diaz-Regueira, S. and Gomez-Marquez, J. 1999. Expression of thymosin β 4 messenger RNA in normal and kainate-treated rat forebrain. *Neuroscience* **90**, 1433-1444.
- Cha, H. J., Jeong, M. J. and Kleinman, H. K. 2003. Role of thymosin β 4 in tumor metastasis and angiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**, 1674-1680.
- Dai, B., Sha, R. N., Yuan, J. L. and Liu, D. J. 2021. Multiple potential roles of thymosin β 4 in the growth and development of hair follicles. *J. Cell Mol. Med.* **25**, 1350-1358.
- Esipov, R. S., Makarov, D. A., Stepanenko, V. N. and Mir-osnikov, A. I. 2016. Development of the intein-mediated method for production of recombinant thymosin β 4 from the acetylated *in vivo* fusion protein. *J. Biotechnol.* **228**, 73-81.
- Freeman, K. W., Bowman, B. R. and Zetter, B. R. 2011. Regenerative protein thymosin β -4 is a novel regulator of purinergic signaling. *FASEB J.* **25**: 907-915.
- Gómez-Márquez J., Dosil, M., Segade, F., Bustelo, X. R., Pichel, J. G., Dominguez, F. and Freire, M. 1989. Thymosin-beta 4 gene, preliminary characterization and expression in tissues, thymic cells, and lymphocytes. *J. Immunol.* **143**, 2740-2744.
- Kaur, H. and Mutus, B. 2012. Platelet function and thymosin β 4. *Biol. Chem.* **393**, 595-598.
- Kaveh-Baghbaderani, Y., Blank-Shim, S. A., Koch, T. and Berensmeier, S. 2018. Selective release of overexpressed recombinant proteins from *E. coli* cells facilitates one-step chromatographic purification of peptide-tagged green fluorescent protein variants. *Protein Expr. Purif.* **152**, 155-160.
- Kim, S. H. and Kwon, J. K. 2014. Thymosin beta 4 improves dermal burn wound healing via downregulation of receptor of advanced glycation end products in db/db mice. *Biochim. Biophys. Acta.* **1840**, 3452-3459.
- Kobayashi, T., Okada, F., Fujii, N., Tomita, N., Ito, S., Tazawa, H. and Hosokawa, M. 2002. Thymosin- β 4 regulates motility and metastasis of malignant mouse fibrosarcoma cells. *Am. J. Pathol.* **160**, 869-882.
- Kozaczuk, A., Selmi, A. and Bednarek, R. 2013. Bacterial expression, purification and angiogenesis-promoting activity of human thymosin β 4. *Protein Expr. Purif.* **90**, 142-152.
- Li, T., Ma, S. Y., Tang, X. C., Nie, L. Y. and Huang, H. 2013. Production and characterization of highly purified recombinant thymosin beta 4 in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **90**, 90-95.
- Li, X., Zheng, L., Peng, F., Qi, C., Zhang, X., Zhou, A. and Wu, S. 2007. Recombinant thymosin beta 4 can promote full-thickness cutaneous wound healing. *Protein Expr. Purif.* **56**, 229-236.
- Lv, S., Cai, H., Xu, Y., Dai, J., Rong, X. and Zheng, L. 2020. Thymosin- β 4 induces angiogenesis in critical limb ischemia mice via regulating Notch/NF- κ B pathway. *Int. J. Mol. Med.* **46**, 1347-1358.
- Malinda, K. M., Goldstein, A. L. and Kleinman, H. K. 1997. Thymosin beta 4 stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J.* **11**, 474-481.
- Malinda, K. M., Sidhu, G. S., Mani, H., Banaudha, K., Maheshwari, R. K., Goldstein, A. L. and Kleinman, H. K. 1999. Thymosin β 4 accelerates wound healing. *J. Invest. Dermatol.* **113**, 364-368.
- Martinez, A., Knappskog, P. M., Olafsdottir, S., Doskeland, A. P., Eiken, H. G., Svebak, R. M., Bozzini, M., Apold, J. and Flatmark, T. 1995. Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in *Escherichia coli* circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. Isolation and characterization of the wild-type enzyme. *Biochem. J.* **306**, 589-597.
- Otto, A., Müller, C., Huff, T. and Hannappel, E. 2002. Chemotherapeutic drugs change actin skeleton organization and the expression of β -thymosins in human breast cancer cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **128**, 247-256.
- Philp, D., Goldstein, A. L. and Kleinman, H. K. 2004. Thymosin β 4 promotes angiogenesis, wound healing, and hair follicle development. *J. Coloproctol.* **125**, 113-115.
- Qiu, P., Kurpakus-Wheater, M. and Sosne, G. 2007. Matrix metalloproteinase activity is necessary for thymosin beta 4 promotion of epithelial cell migration. *J. Cell. Physiol.* **212**, 165-173.
- Renga, G., Oikonomou, V., Stincardini, C., Pariano, M., Borghi, M., Costantini, C., Bartoli, A., Garaci, E., Goldstein, A. L. and Romani, L. 2018. Thymosin β 4 limits inflammation through autophagy. *Expert Opin. Biol. Ther.* **18**, 171-175.
- Skosyrev, V. S., Kuleskiy, E. A., Yakhnin, A. V., Temirov, Y. V. and Vinokurov, L. M. 2003. Expression of the recombinant antibacterial peptide sarcotoxin IA in *Escherichia coli* cells. *Protein Expr. Purif.* **28**, 350-356.
- Sosne, G. 2018. Thymosin beta 4 and the eye: the journey from bench to bedside. *Expert Opin. Biol. Ther.* **18**, 99-104.
- Stoeckli, M., Chaurand, P., Hallahan, D. E. and Caprioli, R. M. 2001. Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat. Med.* **7**, 493-496.
- Tsuji, Y., Kitahara-Tanabe, N., Noguchi, K., Gatanaga, T., Mizuno, D. and Soma, G. 1989. Production in *Escherichia coli* of human thymosin beta 4 as chimeric protein with human tumor necrosis factor. *Biochem. Int.* **18**, 501-508.
- Wang, X., Yang, G., Li, S., Gao, M., Zhao, P. and Zhao, L. 2013. The *Escherichia coli*-derived thymosin β 4 concatemer

- promotes cell proliferation and healing wound in mice. *Biomed. Res. Int.* **2013**, Article ID 241721.
29. Xu, T. J., Wang, Q., Ma, X. W., Zhang, Z., Zhang, W., Xue, X. C., Zhang, C., Hao, Q., Li, W. N., Zhang, Y. Q. and Li, M. 2013. A novel dimeric thymosin beta 4 with enhanced activities accelerates the rate of wound healing. *Drug Des. Devel. Ther.* **7**, 1075-1088.
30. Yu, R., Cao, S., Liu, Y., Si, X., Fang, T., Sun, X., Dai, H., Xu, J., Fang, H. and Chen, W. 2018. Highly effective biosynthesis of N-acetylated human thymosin β 4 (T β 4) in *Escherichia coli*. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **46**, S95-S104.
31. Zhou, Q., Jiang, S., Ma, K. and Li, C. 2014. Expression of a novel recombinant fusion protein BVN-T β 4 and its effects on diabetic wound healing. *J. Biosci. Bioeng.* **118**, 341-343.

초록 : 재조합 Thymosin β -4의 세포이동능과 상처치유능

홍교창¹ · 최영현^{1,2} · 김군도³ · 차희재⁴ · 전송중^{1,5} · 남수원^{1,5*}

(¹동의대학교 스마트바이오헬스학과, ²동의대학교 한의과대학 생화학교실, ³부경대학교 자연과학대학 미생물학과, ⁴고신대학교 의과대학 기생충학 유전학 교실, ⁵동의대학교 공과대학 바이오응용공학부 의생명공학전공)

Mouse thymosin β -4 (TB4) 유전자를 *Escherichia coli*에서 intein-tag 융합 단백질로 발현시키고 정제하였다. 재조합 TB4-intein 융합 단백질의 분자량을 10% glycine SDS-PAGE로 확인한 결과, 세포내 soluble 분획에서 60 kDa의 단백질을 얻을 수 있었고, 유도발현 최적 조건은 0.1 mM IPTG, 25°C에서 3시간 동안 유도 발현할 때가 최적임을 확인하였다. TB4 만을 얻기 위해서 유도발현된 TB4-intein을 DTT를 이용해 self-cleavage를 일으킨 다음, chitin bead를 이용한 친화성 크로마토그래피로 정제 후 분자량을 확인 한 결과, 5 kDa으로 확인되었으며, 순도는 95% 이상 이었다. 정제한 recombinant TB4가 생물학적 기능을 보유하고 있는지 확인을 하기 위하여, TB4를 농도 별 (1~1,000 ng/ml)로 하여 HT1080 cell을 이용한 cell migration을 측정 한 결과, 모든 농도에서 recombinant TB4가 화학합성한 TB4 보다 약 20% 이상 높은 활성을 보였으며, recombinant TB4 1 ng/ml의 농도에서 cell migration 활성이 가장 높게 나타났다. Recombinant TB4를 마우스 상처 부위에 5일 동안 매일 처리한 결과(최종 처리 농도 0.5 mg/ml), 화학합성 TB4 보다 recombinant TB4의 상처치유 활성이 약 35% 더 높음을 알 수 있었다. 이상의 결과는 recombinant TB4가 화학합성 TB4보다 cell migration과 상처치유에 훨씬 높은 활성을 나타냄을 보여주고 있다.