

대장균에서 생산된 항 에이파토시스 재조합 30K 단백질의 정제

박혜정, 김은정, 박대현
서울대학교 응용화학부

Purification of anti-apoptotic recombinant 30K protein produced
in *Escherichia coli*

Hye Jung Park, Eun Jeong Kim, Tai Hyun Park
School of Chemical Engineering, Seoul National University

서론

에이파토시스 억제 효과가 있는 5령 누에의 체액 성분인 30K 단백질을 유전자를 대장균에서 과발현 시키기 위해 발현 벡터인 pET22b(+)에 cloning하였으며 IPTG유도에 의해 발현시킨 결과 내포체 형태로 생산되었다. 벡터의 특성상 재조합 단백질을 말단에 Histidine이 함께 발현됨으로 affinity chromatography를 이용하여 불활성 상태의 30K를 95%이상의 순도로 정제한 후 회석하여 재접합을 수행하였다. 곤충세포인 Sf9세포와 포유동물 세포인 HeLa 세포를 대상으로 하여 재조합 30K 단백질의 에이파토시스 저해 활성을 측정하였다. 이를 위해 actinomycin D와 staurosporine을 첨가하여 Sf9 세포와 HeLa 세포의 에이파토시스를 유도하고, 적정 농도의 재조합 30K 단백질을 배지에 첨가하여 에이파토시스 저해를 관찰하였다. 에이파토시스는 Hechst 염색을 이용해 분석하였다.

에이파토시스는 necrosis와는 다른 특성을 가진 세포 사멸 기작이다. necrosis는 독성 물질, 물리적 충격 또는 국소 빈혈에 의한 상처에 대한 반응으로 일어나며, 세포들의 팽창과 세포막의 파괴가 일어나고 핵의 염색질이 농축되지 않고 용해된다. 반면에 에이파토시스의 경우에는 세포막 손상은 늦게 일어나고 죽은 세포들은 이웃 세포나 식균세포들이 빨아들여 염증이 거의 없다.

정상적인 상황에서는 세포 증식과 세포 죽음은 평형상태를 이루게 된다. 만약 세포 죽음이나 세포 증식의 속도에 비정상적인 변화가 생기면 병의 발병에 이른다. 어떤 세포 집단에서 요구되어지는 정상적인 에이파토시스가 안 일어난다든지 비정상적으로 에이파토시스가 과잉으로 일어나면 병이 발병하게 된다. 곤충세포-배큘로바이러스 시스템에서 누에체액을 배지에 첨가함으로써 배큘로바이러스에 의해 유도된 에이파토시스를 억제할 수 있었고,¹ 에이파토시스 유도 물질인 actinomycin D, camptothecin, 그리고 staurosporine에 의한 에이파토시스 역시 억제하는 효과를 보였다. 뿐만 아니라 인간 세포인 HeLa의 백시니아 바이러스에 의한 에이파토시스도 억제하였다.⁴ 5령 누에체액의 성분을 분석한 결과, 기능이 알려져 있지 않은 '30K proteins'임을 알게 되었다.² 30K proteins는 storage protein이라 불리워지는 혈장 단백질이며 누에유충의 fat body에서 합성되어 체액으로 유출된다.^{5,6} 30K proteins의 5가지 cDNA clones 즉, pBmHPC-6, pBmHPC-12, pBmHPC-19, pBmHPC-21, 그리고 pBmHPC-23 중 pBmHPC-6 (30Kc6)를 포유동물세포와 곤충세포에서 발현시켜 에이파토시스의 억제효과를 보았다.⁷

본 논문에서는 산업적인 이용을 위해 대장균으로부터 재조합 30K 단백질을 생산하고, 에이파토시스 억제 작용을 살펴보았다.

실험방법

30K 발현을 위한 플라스미드 운반체의 제조 및 사용균주

pBm30Kc6RTP에서 원하는 영역을 증폭하기 위하여 프라이머 p1(5'-CTGGCTTCTGG ATCCACACTTGCACCAAGA-3')과 프라이머 p2(5'-TTACAACAACCTCGAGGTAGGG

GACGATGTA-3')를 사용하였다. 양말단을 BamH I 과 Xho I 으로 절단한 후, pET22b(+) 운반체로 삽입하였다. 완성된 pET22b(+)/30Kc6는 CaCl₂ 방법에 의해 BL21(DE3)에 형질 전환하였다.

Cell extract 제조

E.coli BL21(DE3) cell을 1 mM IPTG로 유도 한 후 4시간 동안 37 °C 250 rpm으로 배양하고, 20분간 원심분리하였다. 상등액을 버리고 남은 침전물을 9 mL/g cell 의 완충액 (20mM Tris-HCl, pH 8.0)에 현탁시킨 다음 세포를 초음파 분쇄기를 이용하여 파쇄하였다. 20분간 원심분리하여 상등액은 버리고 남은 침전물을 9 mL/g cell 의 농도가 되게 완충액(2 M Urea, 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 2% Triton X-100, pH 8.0)에 현탁한 후 재차 초음파 분쇄하였다.

이와 같은 세척과정을 3회 반복한다. 최종적으로 얻게 되는 침전물은 9 mL/g cell의 완충액 (6 M guanidine hydrochloride, 20 mM imidazole, pH 8.0)으로 현탁한 후 4 °C에 12 시간 이상 배양하였다. 남아있는 불용성 물질들을 제거하기 위해 0.45 µm인 membrane으로 여과하였다.

Ni-loaded column을 이용한 affinity chromatography

6 M guanidine hydrochloride가 포함된 단백질 용액을 FPLC (Bio-Rad, Biologic HR)을 이용해 HiTrap chelating HP 1 mL (Amersham pharmacia) column에서 정제하였다. 0.1 M NiSO₄ 용액을 0.5 mL 흘려주고, 증류수 5 mL로 세척하였다. 이어서 10 mL의 완충액을 흘려주고 sample 1 mL을 흘려주었다. 그리고 10 mL의 세척 완충액 (6 M urea, 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 50 mM imidazole, pH 8.0)를 흘려주었다. 마지막으로 용출 완충액 (6 M urea, 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 350 mM imidazole, pH 8.0) 10 mL을 흘려주었다.

재접힘과 탈염

정제된 단백질 용액을 재접힘 완충액 (10% glycerol, 1 mM DTT pH 8.0)로 1:1 희석하여 4 °C에서 30 min 동안 배양한 후, HiTrap 탈염 컬럼 (5 mL) (Amersham pharmacia)을 이용해 증류수로 buffer change하여 남아있는 detergent와 염를 제거했다.

에이파토시스 유도 및 분석

정제된 단백질 0.2 mg/mL을 5% FBS가 포함된 배지에 첨가하여 48시간 배양 후 Sf9 세포의 경우 200 ng/mL actinomycin D를, HeLa 세포의 경우 0.6 µM staurosporine을 배지에 넣어 10시간 이후의 에이파토시스 억제 효과를 Hoechst 33342 염색을 통해 분석하였다.

결과 및 토론

변성된 단백질 용액을 Affinity chromatography를 이용하여 Fig. 1.에 보인 과정에 따라 정제한 결과, 컬럼에 주입한 전체 단백질 (0.236 g/1 L of cell culture) 중 85% 이상 (0.201 g/1 L of cell culture)이 용출되었다. Fig. 2. 에서나타난 바와 같이 90%이상의 순도를 보였다.

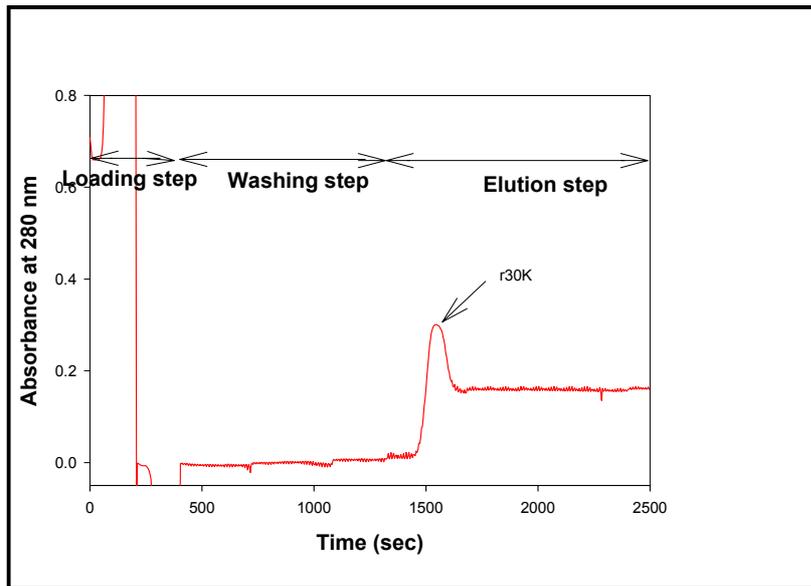


Fig. 1. Purification of denatured 30K protein by affinity chromatography. The arrow indicates the 30K-containing fraction.

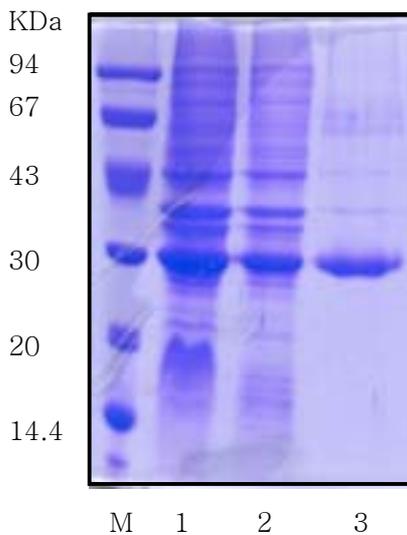


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of 30K protein

- 1: Total cell lysate
- 2: Solubilized proteins
- 3: Purified 30K protein by affinity chromatography

변성된 단백질 용액을 10% glycerol, 1 mM DTT가 들어간 재접힘 완충액으로 희석하여 재접힘을 유도하였다. 재접힘된 r30K 단백질은 HiTrap 탈염 컬럼 (5 mL)을 사용하여 염을 제거하였다. 이를 위해 재접힘된 단백질 용액 1 mL을 흘려준 뒤 1 mL/min의 유속으로 증류수를 흘려주었다. 그 결과 affinity chromatography에서 용출된 단백질 농도의 26.47%가 회수되었으며, 결국 배양 배지 1 L 당 53.28 mg의 단백질을 회수할 수 있었다.

염이 제거된 단백질 용액을 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 동결건조하여 분말상태로 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 곤충세포 (Sf9), 포유동물세포 (HeLa) 각각의 배지에 5% FBS, 0.2 mg/mL r30K를 녹여 0.2 μm membrane으로 여과하였다. 각각의 세포는 96wells plate에 10% FBS(control), 5% FBS와 0.2 mg/ml r30K가 들어간 배지에서 48시간 배양하였다. Sf9 세포의 경우 200 ng/mL actinomycin D를, HeLa 세포의 경우 0.6 μM staurosporine을 배지에 첨가하여 에이파토시스를 유도하고 10시간 이후 Hoechst 33342 염색을 한 결과, 곤충세포 (Fig. 4)와 포유동물세포(Fig. 5) 모두 재조합 30K 단백질을 배지에 첨가하였을 때 apoptosis 특적인 핵의 fragmentation 현상이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

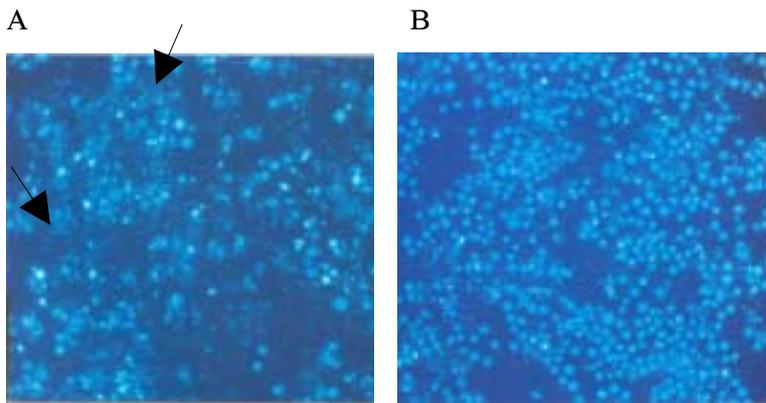


Fig. 4. Inhibitory effect of r30K protein on Sf9 cell apoptosis. (A) medium containing 10% FBS (B) medium containing 5% FBS and recombinant 30K protein Actinomycin D (200 ng/ml) was used for the induction of apoptosis. Nuclear chromatin was stained with Hoechst 33342 fluorescent dye. Arrows indicate apoptotic nuclear fragmentation.

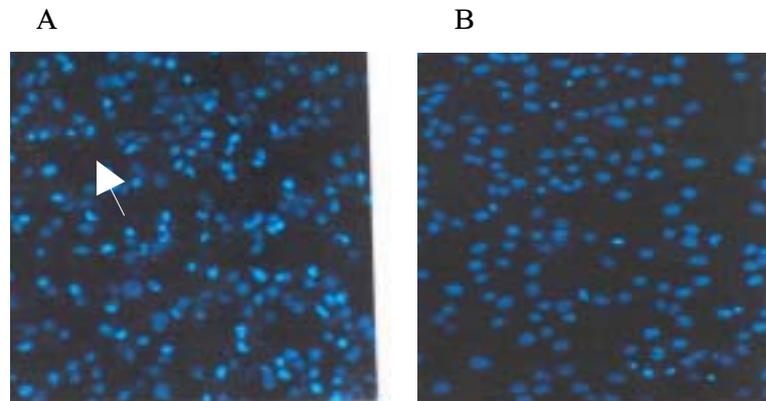


Fig. 5. Inhibitory effect of r30K protein on HeLa cell apoptosis. (A) medium containing 10% FBS (B) medium containing 5% FBS and recombinant 30K protein Staurosporine (0.6 μM) was used for the induction of apoptosis. Nuclear chromatin was stained with Hoechst 33342 fluorescent dye.

참고문헌

1. Rhee, W. J., and Park, T. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 271, 186-190.
2. Kim, E. J, Rhee, W. J.,and Park, T. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 285, 224-228.
3. Rhee, W. J., and Park, T. H. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, 1, 853-857.
4. Choi, S. S, Rhee, W. J., and Park, T. H. *Biotechnol. Pog.* **2002**, accepted.