P602

Purification of Single Chain Human Insulin Precursors Using Various Fusion Proteins

박선호*,**, 조정우*, 남두현***
계명대학교 화학·재료공학부*, (주)바이코시스**, 영남대학교 약학대학***
전화 (053)580-5457, FAX (053)633-4929

Abstract

For the production of B^{30}-homoserine human insulin precursor, four types of fusion peptides LacZ, MBP, GST, and His-tagged sequence were studied in this work. Recombinant *E. coli* JM 103 and *E. coli* JM 109 containing fusion peptides were cultivated at 37℃ for 1hr, and gene expression was occurred when 0.5mM of isopropyl-D-thiogalactoside(IPTG) was added to the culture broth, and followed by longer than 4hr fermentation respectively. DEAE-Sphacel and gel filtration chromatography, amylose and glutathione-Sepharose 4B affinity chromatography, and nickel-affinity chromatography system were employed as purification of B^{30}-homoserine human insulin precursor. Recovery yields of His-tagged, LacZ, GST, and MBP fused B^{30}-homoserine human insulin precursor resulted in 47%, 20%, 20%, and 18%, respectively.

서론

1970년대 중반부터 본격적으로 활용되기 시작한 유전공학 기법은 진핵생물의 polypeptide를 미생물에서 대량 생산할 수 있는 길을 열어 놓았다[1]. 이러한 유전공학적 기법을 통해 미생물 발효조로 상업화된 polypeptide가 human insulin이다. Human insulin은 분자량이 5734, 등전점이 5.4이며, 21개의 아미노산으로 구성된 A 사슬과 30개의 아미노산으로 구성된 B 사슬이 2개의 사슬간 이황화 결합과 1개의 사슬내 이황화 결합을 지닌 polypeptide계 호르몬이다[2]. Human insulin의 생산을 위하여 널리 이용되는 대표적인 미생물은 재조합 *E. coli*이다. 재조합 *E. coli*는 생물학적인 연구가 많이 되어 왔으며, 이에 따라 재조합 기술을 이용하여 이종성 단백질의 합성 및 생산을 위해 널리 사용된 박테리아이다. 최근에는 insulin A 사슬과 B 사슬의 유전자를 재조합 *E. coli*에 각각 도입하여 이 두 사슬을 따로 생산하고 이를 화학적 방법으로 조립하여 분리 정제하는 기존 공정을 개선하여 하나의 사슬에서 human insulin precursor가 발현 생산되어지는 경제적인 공정이 보고되었다 (Table 1)[3]. 이 공정에서 생산된 single chain human insulin precursor는 특정한 gel matrix상에 친화력을 가지는 특정한 peptide sequence를 지닌 융합단백질의 형태로 발현되도록 구성되어 분리·정제가 간단할 뿐만 아니라 분리 정제 수율도 우수한 것으로 보고되었다[4]. 본 논문에서는 재조합 *E. coli*로부터 여러 종류의 융합단백질이 결합된 single chain human insulin precursor의 분리 정제에 관한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 균주 및 운반체

본 실험에 사용된 균주는 pKBA 및 pMAL-BA, pGEX-BA 발현을 위해서는 *E. coli* JM103[*supE thi-1 endA1 hsdR4 sbcB15 strA* △*(lac-proAB)* F′*(traD36 proAB*$^+$ *lacI*^{q} *lacZ* △*M15)*]와 *E. coli* JM109[*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyr96 relA1 thi* △*(lac-proAB)* F′*(traD36 proAB*$^+$ *lacI*^{q} *lacZ* △*M 15)*]가 plasmid와 IPTG를 이용한 융합단백질 유전자의 발현시 숙주세포로 각각 사용되었다. pET-BA 발현을 위해서는 *E. coli* JM109[*recA1 SupE44 endA1 hadR17 gyr96 relA1*

thi(lac⁻proAB) F'*(traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ M15)*]가 plasmid와 IPTG를 이용한 융합단백질 유전자의 발현시 숙주세포로 사용되었으며, *E. coli* BL21(DE3)pLysS[F⁻*ompT hsdS_B* (*r_B⁻m_B⁻*) *gal dcm (DE3) pLysS*]이 유전자 발현용 숙주세포로 사용되었다. 유전자 운반체로는 LacZ-fused B^{30}-homoserine insulin precursor의 유전자가 클론된 pKBA plasmid와 이 유전자의 subcloning시 pUC19 plasmid가 이용되었고, pTBA, pMAL-c, pGEX-KG, pET-28a plasmid가 각각 이용되었다.

2. 배지 및 배양

숙주세포인 *E. coli* JM103 및 pUC19, pIBA, pTBG, pTBA가 도입된 *E. coli* JM103, 그리고 *E. coli* JM109는 ampicillin이 50㎍/㎖으로 첨가된 LB배지(pH7.0)에서 37℃, 150rpm으로 진탕 배양되었다. pKBA 및 pMAL-BA가 도입된 *E. coli* JM109는 ampicillin이 100㎍/㎖ 첨가된 LB배지(pH7.0)에서 37℃, 150rpm으로 진탕 배양되었다. pGEX-BA가 도입된 *E. coli* JM109는 증류수 1ℓ에 bacto-tryptone 16g, bacto-yeast extract 10g, NaCl 5g, glucose 20g의 조성을 지닌 2xYT-G배지(pH7.0)에 ampicillin이 100㎍/㎖ 첨가되어 37℃, 150rpm에서 진탕 배양되었다. pET-BA가 도입된 *E. coli* BL21(DE3)pLysS는 증류수 1ℓ에 bacto-tryptone 16g, bacto-yeast extract 10g, NaCl 5g의 조성을 지닌 2xYT배지(pH7.0)에 15㎍/㎖의 kanamycin이 첨가되어 37℃, 150rpm에서 진탕 배양되었다. pKBA, pMAL-BA, pGEX-BA 및 pET-BA가 도입된 융합단백질 유전자의 발현을 유도시키기 위한 회분식 배양은 전술한 각각의 배지에 종 배양액을 overnight 배양한 다음 2%(V/V)되게 접종한 다음 1시간 배양한 다음 0.5mM IPTG를 주입하고 다시 4시간 더 배양하였다. 회분식 배양 운전조건은 5ℓ발효조에 배양배지 3ℓ, 배양온도 37℃, pH7.0, 초기 교반속도 400이었다. 회분식 배양 중 발효조내 용존산소농도는 포화농도치의 20% 이상으로 유지되었다.

3. 융합단백질 확인

LacZ, MBP, GST 및 HTS-fused B^{30}-homoserine insulin precursor 융합단백질의 정성분석은 14%, 12%, 13% 및 16% SDS-PAGE를 실시하여 수행되었는데, gel 통과시 조건은 100volt로 voltage constant로 수행되었다. 전기영동된 gel은 0.1% coomassie brilliant blue R-50으로 염색한 후 30% methanol, 10% acetic acid 용액으로 탈색하여 발현된 단백질을 확인하였다.

4. 단백질 농도 측정

단백질의 농도는 표준물질로 bovine serum albumin(BSA)를 사용하여 Lowry 및 Bradford 법으로 optical density를 측정하여 구하였다[5].

5. 융합단백질의 분리 정제

LacZ-fused B^{30}-homoserine insulin precursor

E. coli JM 103 배양 파쇄액을 원심분리하여 분리된 침전물을 8M의 urea로 용출시키고 다시 원심분리하여 얻은 상등액을 8M Urea를 함유하고 있는 buffer(20mM Tris-Cl, pH8.0, 1mM EDTA, 50mM NaCl)로 미리 평형시켜 둔 DEAE-Sephacel column에 부하하였다. 부하 후 동일한 buffer로 충분히 세척한 다음 0.5M NaCl까지 linear gradient 방법으로 0.6㎖/min로 6㎖씩 분획별로 분취하였다. 피이크 양상이 관찰된 분획을 취하여 ultrafiltration으로 농축하고, 농축액을 8M Urea를 함유하는 20mM Tris-Cl(pH8.0) buffer로 미리 평형시켜 둔 Sephadex G-200 column에 부하하여 동일한 buffer로 분당 0.1㎖의 유속으로 2㎖씩 분획하였다.

MBP-fused B^{30}-homoserine insulin precursor

원심분리된 *E. coli* JM109 배양액의 균체를 lysis buffer로 현탁시켜 초음파 파쇄기

로 파쇄한 다음 20분간 10,000rpm에서 원심분리하여 상등액을 분리 회수하고 여기에 5배 용량의 column buffer로 희석하였다. 이렇게 희석된 상등액을 column buffer로 평형시켜 둔 amylose resin column에 부하하고 8배 용량의 column buffer를 분당 1㎖의 유속으로 유출시키면서 세척하였다. 그 다음 이 amylose resin column으로부터 MBP-fused B^{30}-homoserine insulin precursor를 유출시키기 위하여 10mM의 maltose가 첨가된 column buffer를 0.5㎖/min으로 유출시키면서 1.5㎖씩 분획하였다.

GST-fused B^{30}-homoserine insulin precursor

배양액의 균체를 lysis buffer로 현탁시킨 다음 초음파 파쇄기를 이용하여 균체를 파쇄하였다. 이 균체 파쇄액을 10,000rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 회수하고 미리 1x PBS로 평형시켜 놓은 glutathione-Sepharose 4B column에 상등액을 부하하여 GST-fused B^{30}-homoserine insulin precursor를 결합시키고, 10 gel volume의 1x PBS로 세척한 뒤 glutathione elution buffer를 0.5㎖/min으로 유출시켜 융합단백질을 분획하였다.

His-tagged B^{30}-homoserine insulin precursor

배양액의 균체를 1x binding buffer로 현탁시킨 다음 초음파 파쇄기를 이용하여 균체를 파쇄하였다. 이 균체 파쇄액을 8,000rpm에서 10분간 원심분리하여 분리된 균체를 8M urea로 단백질을 용출한 다음 15,000rpm에서 20분간 용출액을 원심분리하여 상등액을 분리하여 pore size 0.2㎛인 여과지로 여과하였다. 여과된 상등액은 50mM Ni^{2+} ion으로 충전된 His · Bind affinity chromatography column에 부하하였으며, 이어서 10 및 6 gel volume의 1x binding buffer(6M Urea, pH7.9)와 1x wash buffer(6M Urea, pH7.9)가 0.64cm/min의 유속으로 column에 각각 부하하여 gel matrix에 결합되지 않은 단백질들을 제거시켰다. His-tagged B^{30}-homoserine insulin precursor는 1x elute buffer(6M Urea, pH7.9)를 부하하여 분리하였으며, 280nm에서 융합 단백질의 peak 양상이 확인된 부분을 분획하였다.

결과 및 고찰

네 종류의 서로 다른 polypeptide sequence가 결합된 B^{30}-homoserine insulin precursor의 분리 정제 연구를 수행하였다. IPTG 유도에 의해 발현된 융합 단백질들은 모두 inclusion body의 형태로 발현되어 전처리 과정을 거쳐 최종적으로 8M urea로 용출되어 총단백질 정량 분석에 이용되었다. 배양액 1ℓ 당 분석된 총단백질량은 pGEX-BA plasmid를 가지고 있는 *E. coli* JM 109가 500㎎으로 가장 높게 측정되었으며, pET-BA plasmid를 가지고 있는 *E. coli* BL21(DE3)pLysS가 321㎎, pKBA plasmid를 가지고 있는 *E. coli* JM103이 180㎎, 그리고 pMAL-BA plasmid를 가지고 있는 *E. coli* JM 109가 160㎎으로 가장 낮게 측정되었다. 8M urea로 용출된 용출액은 각각의 융합 단백질 분리를 위해서 coupling gel에 부하되고 displacer로 제거되었다. 본 연구에서는 NaCl, maltose, gluththione 및 imidazole이 각각의 융합단백질에 대해 displacer로써 이용되었다(Table 2). 1ℓ 배양액에 대한 융합단백질의 회수량과 수율 분석에서 immobilized metal ion chromatography(IMAC)의 일종인 Ni^{2+} affinity chromatography를 이용하여 분리된 His-tagged fused B^{30}-homoserine human insulin precursor 융합단백질의 회수량과 수율은 150㎎/ℓ, 47%로 가장 높게 측정되었으며, DEAE-Sephacel chromatography와 gel filtration chromatography를 이용한 LacZ-fused B^{30}-homoserine human insulin precursor 융합단백질의 회수량과 수율은 32㎎, 32%이었으며, gluthathione-Sepharose 4B affinity chromatography를 이용한 GST-fused B^{30}-homoserine human insulin precursor의 회수량과 수율은 32㎎, 20%이었으며, amylose affinity chromatography를 이용한 MBP-fused B^{30}-homoserine human insulin precursor의 회수량과 수율은 32㎎, 18%으로 가장 낮게 측정되었다(Table 2).

참고문헌

1. Marston, F. A. O, "The purification of eucaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*"(1986), Biochem. J., **240**, 1-12.
2. Demetri, P., Elpida, S. and John, C, "Computer-aided process analysis and economic evaluation for biosynthetic human insulin production-A case study"(1995), Biotechnol. Bioeng., **48**, 529-541.
3. Lee, S. Y., Ko, J. H. Choi, M. H. and Nam, D. H, "Fermentation and purification of LacZ-fused single chain insulin precursor for(B^{30}-Homoserine) human insulin"(1996), Biotechnol. Bioprocess Eng., **1**, 9-12.
4. Chang, S. G., Kim, D. Y., Choi, K. D., Shin, J. M. and Shin, H. C, "Human insulin production from a novel mini-proinsulin which has high receptor-binding activity"(1998), Biochem. J., **329**, 631-635.
5. Daniel, M. B. and Edelstein, S. J, "Protein methods"(1991), Wiley-Liss, 50-59.

Table 1. Comparison of processes for human insulin production

Commercial Name	HUMULIN	NOVOLIN	ISOLIN
Manufacturer	Eli Lilly Co.	Novo Industri	This Work
Strain	*E. coli*	*S. cerevisiae*	*E. coli*
Production	Separate Production of A & B Chain	Single Chain Insulin Precursor	Single Chain Insulin Precursor
Production Form	Inclusion Body (Insoluble)	Separation to Media (Soluble)	Inclusion Body (Insoluble)
Productivity	High	Low	High
Liberation of Insulin Chain	CNBr Cleavage (Low yield)	Enzymatic Cleavage (High yield)	CNBr Cleavage (Low yield)
Reconstitution Method	Chemical Reconstitution (Low yield)	Already Reconstitution	Chemical Reconstitution (High yield)

Table 2. Purification processes using various fusion BA peptides

Vector	pKBA	pMAL-BA	pGEX-BA	pET-BA
Fusion Partner	LacZ	MBP	GST	HTS
Fusion Protein Molecular Weight	25kDa	46kDa	29kDa	9kDa
Protein Form	Inclusion Body	Inclusion Body	Inclusion Body	Inclusion Body
Coupling Gel	DEAE-Sephacel	Amylose	Glutathione-Sepharose 4B	His · Bind Sepharose
Displacer	NaCl	Maltose	Glutathione	Imidazole
Medium	LB	LB	2xYT-G	2xYT
Recovery of Fusion Protein (㎎/ℓ_cell broth)	32	32	100	150

Abbreviations : GST, glutathione-S-transferase ; MBP, maltose-binding protein ; HTS, His-tagged sequence.