재조합 *Escherichia coli* 시스템을 이용한 폐흡충 cystein proteinase의 생산 연구.

홍성희*, 이길환*, 전희진, 황현아, 박성렬, 황영보*, 박현
*군산대학교 공과대학 화학공학과, 원광대학교 의과대학 기생충학 교실
전화 (063) 850-6768, FAX (063) 857-0342

A fermentation study of the recombinant *Escherichia coli* system has been tired to overproduce a recombinant *Paragonimus westermani* cysteine proteinase, rPwCP1. Using the modified LB media, main cultures and chemical induction with IPTG were carried out to examine the possibility of secretory protein overproduction at high cell density culture. As a result, the target protein of rPwCP1, purified by metal affinity chromatography and gel filtration, has been shown at 50.8 kDa on SDS-PAGE, and its final concentration turns out to be 350mg/L.

서론

폐흡충(*Paragonimus westermani*)은 유충에 감염된 민물 가재나 민물 새우등을 섭취할 때 인체, 고양이 또는 호랑이 등의 폐에 감염된다. 감염된 기생충은 뇌나 횡경막으로 전이되어 하반신 마비, 발작 또는 심한 가슴통증을 유발하는 원인이 될 수 있다. 이러한 폐흡충 감염은 아프리카, 남미 그리고 우리나라와 일본을 포함하는 아시아 전 지역에서 보고되고 있지만 회충, 십이지장충 등과 같은 토양 매개성 기생충의 경우와는 다르게 보건환경 및 위생에 대한 지속적인 노력에도 불구하고 환자 발생률이 좀처럼 감소하지 않는 기생흡충이다.

1993년의 세계보건기구(WHO) 자료에 따르면 전 세계적으로 폐흡충 환자의 수를 4천만명 정도로 추산하고 있으며, 국내에서도 백만 여명의 흡충 환자가 현재 치료를 받고 있다고 1995년 통계청 자료는 밝히고 있다.

폐흡충 감염 진단은 대변 검사법, 혈액 검사법 또는 skin test와 같은 직접 진단법과 그리고 ELISA 응용 방법 등으로 이루어지고 있으나, 검사 민감도와 반응 특이도 그리고 신뢰도가 비교적 낮기 때문에, 현재 병원에서는 적어도 세 가지 방법을 동시에 실시하여 그 결과를 복합적으로 분석하여 판단하는 등, 그 진단법이 매우 복잡하고 불편하다고 알려져 있다.

최근에는 이러한 단점을 극복할 수 있는 보다 효율적인 진단법으로서 기생충증의 특이 항원 반응을 이용하는 새로운 감염 진단 방법 개발에 많은 관심이 집중되고 있으며, 특히 특정 시스틴 분해효소(cysteine proteinase)가 여러 가지 기생흡충에 의해 발병되는 다양한 질환을 진단하는데 활용될 가능성이 높음이 보고되고 있다. 폐흡충의 경우에도 그 자신이 분비하는 단백질 분해 효소들 중의 하나인 cysteine proteinase가 특이 항원 반응성이 있음이 보고되었다.

본 연구에서는 이러한 시스틴 단백질 분해효소 유전자를 발현시킬 수 있는 재조합 *Escherichia coli* 시스템을 유전공학적 기술을 이용하여 개발하였으며, 미생물 배양 및 목적 재조합 단백질(recombinant *Paragonimus westermani* cysteine proteinase, rPwCP1)의 발현에 관한 최적 조건들을 탐색하였다.

재료 및 방법

1 균주

본 연구에서 사용된 recombinent cystein proteinase의 생산균주의 숙주는 *Escherichia coli* BL21의 일종이고, 재조합 rPwCP1 생산 vector로는 T7 promoter에 의해 발현되는 pRSETa를 사용하였으며, 이것은 분리정제 과정에서 metal affinity purification 이 효율적으로 이루어질 수 있도록 C-terminal에 6-histidin이 tagging 된 것이다.

2 배지조성

삼각 플라스크에서의 종자 배양과 기초 실험용 진탕 배양에서는 Luria Broth(LB) 배지인 10g/L tryptone; 5g/L yeast extract; 5g/L NaCl; 100mg/L ampicillin이 포함된 배지를 사용하였고, 7L 규모의 회분배양 시스템에서는 modified LB 배지를 사용하였다

3 배양방법

종균 배양은, Deep Freezer에 glycerol stock으로 냉동 보관된 종균을 우선 50mL tube (working volume 10mL)에서 활성화시킨 다음, 멸균처리된 1L 삼각 플라스크(working volume 200mL)에 옮겨 접종하고, 37℃, 250rpm 조건의 진탕 배양기에서 3.5 시간 정도 실시한다. 주 배양인 7L 발효 시스템(korea fermentor Co. KFC-7L)에 멸균 준비된 4L modified medium에 5% 접종한 후, 37℃, pH7.0, 500-700rpm, DO 1.5vvm 인 조업조건으로 약 7.5시간에 걸쳐 실시한다. 발효조에서의 배양액 중 pH의 지속적인 조절을 위하여 4N NH_4OH 용액을 사용하였고, 목적 유전자 발현을 위해서 inducer인 Isopropyl thio-β-D-galactoside(IPTG)를 지수 생장 기간중 최적 시점에서 투여한 다음, 약 4시간 정도 배양 및 induction 하였다.

4. 분석방법 및 정제

배양과정에서의 균체의 증식도 조사는 배양액의 광 밀도(OD_{600})를 측정함으로써 실시하였다. 또한 chemical induction 전과 induction 후의 배양액을 각각 sampling함과 동시에 초음파 파쇠시켜 얻게 되는 상등액을 10% polyacrylamid gel에서 SDS-PAGE 함으로써, induction 전후 과정에서의 rPwCP1의 발현 양상을 비교하였다. 단백질 정제를 위해서 metal affinity column chromatography 법을 이용하였고, column에 쓰여진 resin은 Ni-NTA를 사용하였다.

결과 및 고찰

시간에 따른 균체농도, 포도당 농도, acetic acid 농도의 변화

그림 1은 working volume 4L의 회분 발효 시스템에서 배양 시간에 따른 균체농도, 포도당 농도, acetic acid 농도 변화를 나타낸 것으로, 5시간 배양후인 지수 생장기에서 IPTG-induction 되었음에도 불구하고 일반적인 *E. coli* 배양의 경우에서 볼 수 있는 전형적인 회분식 생장곡선을 보여주고 있다.

그림에서 쉽게 알 수 있는 바와 같이, IPTG-induction 이후에도 1시간 정도의 균체 성장이 지속되어 IPTG-induction 전과 비교하여 균체농도가 2배 정도 증가함과 동시에 acetic acid 농도도 3g/L 정도까지 증가하였으나, 5.5시간의 배양후에는 균체 증식도와 acetic acid 농도 모두가 확연히 감소하였음을 확인할 수 있었는데, 이러한 사실은 균체증식의 멈춤이 IPTG-induction에 기인한다기 보다는 오히려 1차 탄소원인 포도당의 결핍에 기인된다고 판단되며,

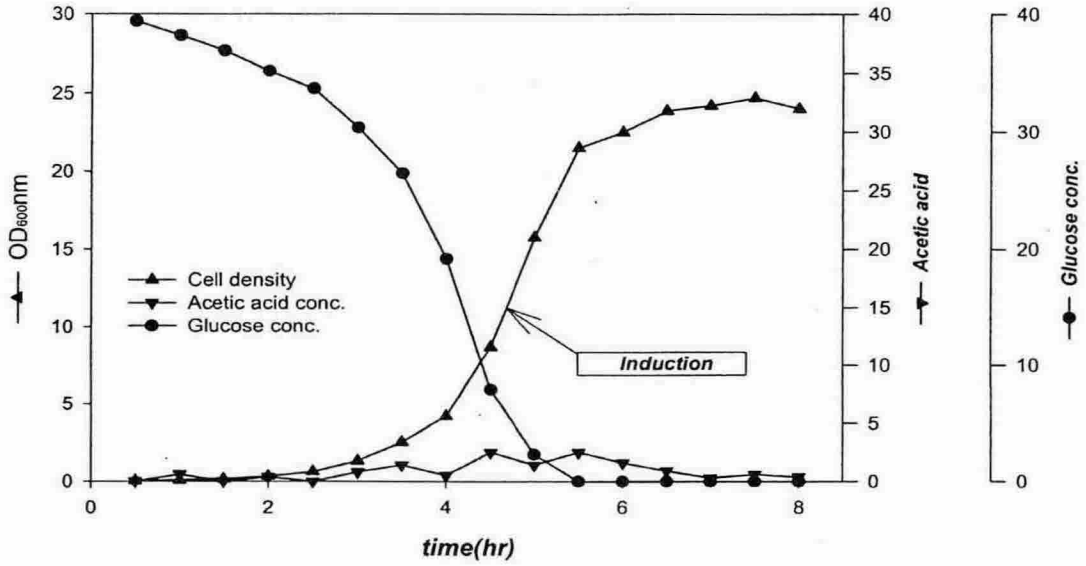

Figure 1. Bacterial density and acetic acid concentration during the growth of *E.coli BL21*.

추후 실시될 유가 배양에 의한 고농도 균체증식후 IPTG-induction에 관한 연구에 중요하게 이용될 것이다.

재조합 단백질의 발현 양상 및 정제

그림 2는 IPTG-induction 된 균체를 SDS-PAGE로 전기영동한 결과를 나타내는 것으로 sample 1은 IPTG-induction하기 전의 결과를, sample 2는 그 이후의 결과를 각각 나타낸 것이다. 그림에 나타난 바와 같이, IPTG-induction 이전에는 미미하던 50.8kDa의 목적 재조합 단백질의 band는 IPTG-induction 이후에 확연하게 나타남을 확인할 수 있었으며, 그 이후의 데이터들은 별 차이가 없는 것으로 나타났다. 그림 1에서도 나타난 바와 같이 *E. coli*의 autolysis에 의한 균체농도 감소와 더불어 총 발현량의 감소를 초래할 수도 있기 때문에 induction 최적화 필요성도 나타내고 있다.

그림 3은 원심 분리법으로 harvest한 발현된 재조합 *E. coli*를 초음파 파쇄시킨 뒤, 상등액을 metal affinity chromatography 방법으로 분리 및 정제시킨 다음, 전기영동을 수행한 결과로서, 50.8kDa의 분자량 위치에서 우리가 원하는 재조합 단백질 bend만이 유일하게 나타남을 확인할 수 있었다. 이 결과로서 metal affinity chromatography 방식에 의한 정제를 통하여 목적 재조합 단백질인 시스틴 분해효소(cysteine proteinase)만을 따로 분리 및 농축할 수 있음을 확인하였다.

또한 protein assay 결과도 rPwCP1이 350mg/L의 농도로 생산되었음을 확인하였다(data not shown). 이것은 진탕 배양 시스템 결과에 비교하여 약 50배 이상 높은 결과임을 확인할 수 있었다.

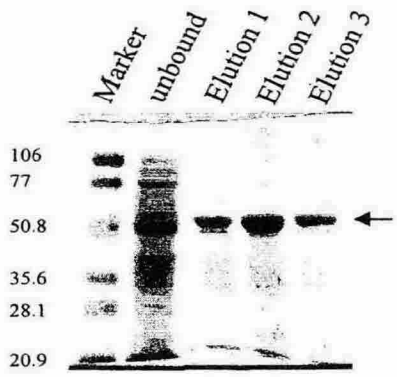

Fig.3. SDS-PAGE analysis of recombinant cysteine proteinase of rPwCP1 at various stages of purification. Duplicate samples were separated of 10% polyacrylamide gel under reducing conditions and starned with Coomassie Billiant Blue staining. M: molecular size marker, Lane1: cell sonication. Lane2.Lane3, Lane4 : concentrated pooled fractions after the Ni-NTA-agarose affinity column.

요약

본 연구에서는 재조합 *E. coli* 시스템에 의한 재조합 cystein proteinase의 대량 생산을 위하여 4L 회분 배양 및 최적 지수 생장기에서의 IPTG- induction을 연속적으로 실시하였다. 발현된 rPwCP1 양은 진탕 배양 시스템에서의 결과와 비교해 볼때 현저하게 향상되었음을 알 수 있었으며, 더불어 metal affinity chromatography 방법으로 처리하여 전기영동을 수행한 결과, 목적 재조합 단백질만을 정제 및 농축시킬 수 있음이 확인되었다.

참고문헌

1. El-Mansi. E.M.T., Holms. W.H. 1989. Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *E. coli* in batch and continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2875-2883.
2. Kleman. G. L. Strohl. W. R. 1994. Acetate metabolism by *E.coli* in high-cell-density fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3952-3958
3. J. Shiloach, J. Kaufman, A. S. Guillard, 1995. Effect of glucose supply strategy on acetate accumulation, growth, and recombinant protein production by *E. coli* BL21(λ DE3) and *E. coli* JM109. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 421-428
4. Hyun Park, Kyeong Man Hong, Jae Sook Ryu, 1996. Cloning of a cysteine proteinase cDNA of adult *Paragonimus westermani* by polymerase chain reaction. *Mol. Cell.* 7: 335-339
5. Byoung-Kuk Na, Po-Hyun Park, Kyoung-Ju Song, 2000. Cloning and expression of a cysteine proteinase gene from *Paragonimus westermani* adult worms. *J Parasitol.* 86(2): 333-339