P719

*Saccharomyces cerevisiae*에서의 비만 억제용 재조합 단백질 leptin 생산 연구

강환구, 이충열, 윤지선, 김원철, 박형수
한남대학교 화학공학과
전화 (042) 629-8009, FAX (042) 623-9489

Abstract

Human leptin is a 16kDa protein and is known to influence body weight control. It is composed of 146 amino acids. In this study, human leptin gene was obtained from homosapiens leptin mRNA using RT-PCR. And leptin gene was inserted into secretion vectors and *Saccharomyces cerevisiae* was transformed. In flask culture, *Saccharomyces cerevisiae* transformant showing high leptin expression titre was selected and with the best transformant, fed-batch fermentation and purification was optimized. As a result, about 2 g/L of leptin was expressed and the yield of purification was about 80%.

서론

Leptin은 ob라고 불리는 비만 유전자에 의해 encode되어지는 146개의 아미노산으로 구성된 단백질이며 이 leptin은 몸무게를 유지하기 위해 충분히 음식물을 섭취하였다는 신호(signal)를 뇌에 보내는 역할을 수행하는 것으로 알려진다. 이러한 ob 유전자가 mutation 되어진 실험쥐의 경우에 먹는 것을 멈추라는 leptin의 신호가 없으므로 이러한 실험쥐가 비만이 되는 것이 관측되어졌다. 이러한 leptin은 ob 유전자가 원래 coding한 167 long peptide가 process 되어져 146개의 아미노산으로 구성된 leptin으로 발현되어지는데 leptin은 helical cytokine family의 한 member이며 leptin의 folding pattern은 Interleukin-2와 비슷하다고 알려지며 4개의 antiparallel helice로 구성되어 있다. 이 leptin 에는 disulfide bond가 한 개 있는 것으로 알려지며 96 과 146 position의 두 개의 cystein 사이의 disulfide bond는 leptin구조에 매우 중요하다고 알려지며 이 leptin은 대부분 aggregation형태로 존재한다고 알려진다. 현재 유전자 재조합 방법을 이용한 leptin의 생산에는 *E. coli*와 baculovirus-infected insect cell을 이용한 방법들만이 보고되어진다. *E. coli*를 이용한 실험결과는 Schering-Plough 사에의해 발표되었는데 *E. coli*에서 inclusion body로 발현된 leptin의 경우 leptin의 정제수율은 높은 편이지만 생산된 leptin의 실제 potency가 eucaryotic cell등에 의해 secretion에 의해 생산된 leptin의 10%이하인 문제점들이 대두되어진다. 따라서 leptin의 대량 생산이 필요한 경우 *E. coli*는 바람직하지 않다고 생각되어진다. 또한 Indianopolis의 Lilly Research Lab에서의 결과에 의하면 insect cell의 일종인 Spodoptera frugiperda (Sf-9) cell을 recombinant baculovirus로 infection시켜 leptin을 생산한 결과 folding이 잘되고 unmodified 형태로 발현되어짐이 확인되었으나 발현량이 매우 낮은 수준임을 알 수 있었다. 따라서 이 연구과제에서는 효모를 이용한 leptin 발현 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

유전자 클로닝

Homo sapiens leptin (LEP) 3426bp mRNA로부터 약 438bp의 인간 leptin 유전자를 RT-PCR등의 방법으로 증폭하여 얻었다..

균주 및 벡터

발현을 위해 *S.cerevisiae* Y2805(his-, ura-)를 사용하였다.

배양

최소배지 배양을 통하여 얻어진 균주들의 발현량 확인을 위한 기초적인 회분식 실험을 위하여 플라스크 배양을 진행하였는데, 플라스크로는 500ml의 baffled flask를 이용하고 100 ml의 배지에 균주를 접종한후 250rpm의 진탕배양기에서 실험하였다. 플라스크 배양을 통하여 고발현 균주를 선택하고 이 균주를 이용한 최적화의 발효방법 개발을 위하여 5L scale의 발효기 (코바이오텍(주))를 이용하여 발효실험을 진행하였다. 최적의 발효를 위하여 fed-batch 방식에 의한 발효로 진행하였는데 균주의 비성장속도, 기질수율에 따라 feeding 속도가 조절되는 프로그램을 이용하여 최적량의 C-source와 N-source를 peristaltic pump를 이용하여 feeding함으로써 최적의 균주 성장을 유지하였다.

정제

발효하여 얻은 배지중의 leptin을 정제하기 위해 chromatography를 수행하였다. Chromatography로는 anion exchanger (DEAE sepharose CL-6B) 및 gel filtration (Sephadex G-75)를 사용하였다.

결과 및 고찰

*S. cerevisiae*에서의 발현

최소배지 배양을 통하여 선택된 leptin 유전자를 포함하고 있는 다양한 콜로니가 선택하였고 플라스크 배양을 통해 이 중에 발현율이 높은 콜로니를 선택하여 그림 1과 같이 fed-batch 결과 $O.D._{660}$에서 80, 이 때 발현된 leptin 양은 약 800 mg/L이었다. 또한 $O.D._{660}$에서 200까지 균주를 성장시킨 결과 발현된 leptin 발현량은 약 2 g/L 수준이었다.

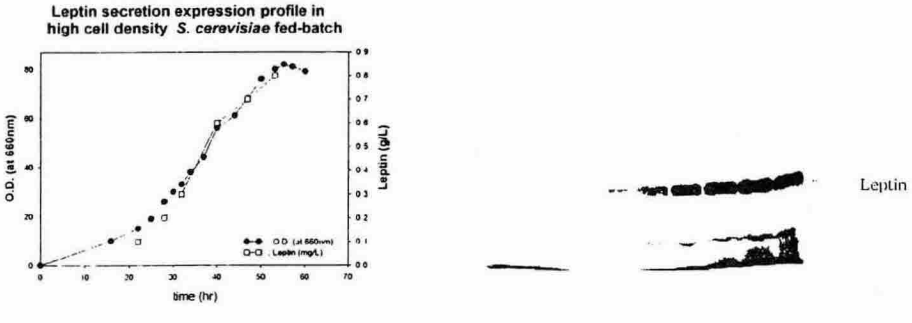

그림 1. *S. cerevisiae*에서의 leptin 발현 결과

정제

Secretion 형태로 발현된 발효기의 발효 배지를 chromatography로 정제한 결과 leptin 회수율은 약 80%이었다.

참고문헌

1. Keiichi Imagawa, Yoshito Numata et al., "Structure-fuction studies of human leptin" (1998), J. Bio. Chem., 52, 35245~35249

2. Mark M. Mason, Yufang He et al., "Regulation of Leptin Promoter Function by Sp1, C/EBP, and 1 Novel Factor" (1998), Endocrinology, 139, 1013~1012

3. Ki Jun Jeong, Sang Yup Lee, "Secretory Production of Human Leptin in Escherichia coli" (2000), Biotech. and Bioeng., 67, 398~407

4. Mark P. Richards, Tomas J. Caperna et al., " Design and application of a polyclonal peptide antiserum for the universal detection of leptin protein" (2000), J. Biochem. Biophy. Methods, 147-156