

## 인노로부터 유용단백질의 통합 분리정제 공정

김 기 용 · 정 광 회 · 문 홍 모  
(재) 목암생명공학연구소

### An Integrated Process for the Separation and Purification of Biologically Active Proteins from Human Urine

Ki-Yong Kim, Kwang-Hoe Chung and Hong-Mo Moon

MOGAM Biotechnology Research Institute

#### ABSTRACT

For the purpose of combining the purification processes for several biologically active proteins from human urine, an efficient integrated fractionation procedure has been investigated. The procedure was started by concentration with ultrafiltration and pH precipitation followed by a selectable combination of chromatography on gel filtration, adsorption, ion exchanger, affinity, and reverse phase column. By this process, the purified urokinase, epidermal growth factor and albumin migrated as a single band on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and were fully active. The recoveries of these purified proteins were 48%, 17%, and 46%, respectively.

#### 서 론

인체로부터 배설되는 뇨 속에는 염산염, 황산염, 인산염, 칼륨, 나트륨, 칼슘 등의 이온과 다량의 요소(urea), 그리고 미량의 단백질이 포함되어 있다. 이러한 사람의 뇨에는 여러 가지 유용한 단백질이 포함되어 있음이 보고되었으며, 그 중 urokinase (1), epidermal growth factor(EGF) (2), colony stimulating factor(CSF) (3) 등은 순수분리되어 생물학적 특성이 연구된 바 있다. 특히 urokinase는 대량 정제 공정이 이미 오래전에 확립되어 지난 20~30년간 의학적으로 널리 활용되어 왔다. 그러나 인노로부터 이들 유용단백질의 정제 및 생산공정은 대부분 목적하는 한 가지 대상 단백질을 분리하기 위한 공정이기 때문에 경제적 측면에서 재고할 필요가 있다. 따라서 본 실험에서는 혈장단백질(plasma protein)의 분획화(4)처럼 인노로부터 유용단백질인

urokinase, albumin, EGF를 동시에 분리하는 체계적인 단백질 분획화 공정을 개발하고자 시도하였다.

Urokinase는 411개의 아미노산으로 이루어진 serine protease로서 분자량이 54,000 Da인 plasminogen activator이며, 54,000 Da의 high molecular weight(M. W.) urokinase뿐만 아니라 N-말단 쪽의 135개 아미노산이 없어진 34,000 Da의 low M. W. urokinase도 혈전용해 활성을 가지고 있다고 보고되었다(5). 이러한 urokinase는 뇨뿐만 아니라 신장세포(6) 및 특정한 암세포 배양액(6) 등에서도 분리되고 있다. Albumin은 혈액의 삼투압을 유지시키고 지방산, 아미노산 등을 세포 내로 이동하는데 관여하는 단백질로서 분자량이 약 67,000 Da 정도이며, 혈장으로부터 분리된 albumin은 혈액대용제로 오랫동안 사용되어 왔다(8). EGF는 상피세포 및 내피세포를 포함하는 여러 세포의 증식에 관여하는 유사분열인자(mitogenic factor)로서 53개의 아미

노산으로 이루어진 peptide이다. 인노(9)와 쥐의 턱 밑샘(10)에서 분리된 EGF는 각막이식수술 후 상처의 빠른 재생과 위궤양 치료에 효과가 있다고 보고되었다.

본 연구에서는 산업적으로 유용성이 높고 활성분석이 확립된 albumin, urokinase, EGF를 대상물질로 하여, 농축과 pH침전법 그리고 일련의 chromatography방법을 이용하여 이들 세 가지 단백질을 동시에 분리정제할 수 있는 효과적인 정제공정을 확립하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

정제공정에 사용한 membrane은 Amicon사의 제품을, column resin은 Pharmacia사 제품을 사용하였고, HPLC column은 Toyosoda사에서, 유기용매는 Merck사에서 구입하여 사용하였다. Fibrinogen과 thrombin은 (주) 녹십자 제품을, EGF의 RIA kit는 Amersham 제품을 사용하였다. 표준 bovine serum albumin과 urokinase는 Sigma사에서, mouse EGF는 Toyobo사에서 구입하였다. 단백질 정량과 전기영동에 사용한 시약들은 Bio-Rad사에서 구입하여 사용하였고, 그밖의 시약들은 Sigma사에서 구입하였다.

### 활성측정

Urokinase의 활성은 plasminogen이 포함된 fibrin plate 상에서 형성된 lysis zone을 측정하는 방법(11)과 pyro-Glu-Gly-Arg-paranitroanilide(S-2444)를 이용한 발색방법(12)으로 측정하였다. Albumin의 양은 HPLC G3000SW column을 사용하여 표준 albumin의 elution time과 일치하는 peak의 적분치를 비교 측정함으로써 수행하였다. EGF의 활성은 radioimmunoassay 방법(2)으로 측정하였다.

### 단백질 정량 및 전기이동

노중의 단백질은 Bradford방법(13)으로 정량하였으며, 전기이동은 Laemmli방법(14)으로 수행하였다.

### 인노의 수집 및 전처리

건강한 성인 남자의 뇨를 15°C 이하의 조건에서 수거한 뒤 6시간 이내 사용하였다. 수집한 뇨 20ℓ를 0.45 μm의 hollow fiber cartridge가 장치된

Amicom ultrafiltration system(Model DC 10ℓ)을 이용하여 여과한 후 부유물질을 모두 제거한 다음, 분자량 3,000 Da 이하의 물질만을 통과시키는 또다른 hollow fiber cartridge(H10P3-20)를 사용하여 ultrafiltration 및 diafiltration을 실시하였다. 그 결과 얻은 500ml의 농축뇨에 5N HCl을 가하여 pH를 4.0으로 조정한 후 1시간 가량 교반한 다음, 12,000×g에서 10분간 원심분리하여 침전물과 상층액을 각각 모아 다음의 정제실험에 사용하였다.

### 유용 단백질의 정제

모든 정제공정은 4~8°C에서 수행하였다. 이상의 전처리 공정으로 얻은 상층액은 EGF의 정제에 사용하였고, 침전물은 urokinase와 albumin의 정제에 사용하였다. EGF의 정제를 위하여 첫번째 단계로 상층액 485ml을 40mM sodium acetate buffer, pH 4.0으로 미리 평형시킨 silica gel column(50×200mm)에 통과시킨 후, gel에 결합된 단백질을 20% ethanol이 포함된 40mM Tris-HCl buffer, pH 7.6으로 용출시켰다. 이 용출분획 중 EGF의 활성을 갖는 분획만 모아 YM3 membrane(M. W. cut-off: 3000 Da)을 이용하여 부피가 20ml가 되도록 농축한 다음, 이어서 50mM NaCl을 포함하는 20mM Tris-HCl buffer, pH 7.6으로 미리 평형시킨 Sephadex G50 column(26×1500mm)에 통과시켰다. 또한 이 단계에서 용출된 분획 중 EGF의 활성분획을 다시 모아 0.1%(v/v) trifluoroacetic acid로 미리 평형시킨 PepRPC column(10×100mm, FPLC system)에 마지막으로 적용하였다. 이 단계에서의 단백질 용출은 50%(v/v) acetonitrile로 수행하였고, 마찬가지로 용출분획 중 EGF의 활성분획만을 모은 다음 용액에 포함된 용매는 evaporator와 freeze dryer를 사용하여 완전히 제거하였다.

한편 농축뇨를 pH 4.0으로 처리한 후 원심분리하여 얻은 침전물은 urokinase와 albumin의 정제를 위해 다음과 같이 사용하였다. 먼저 20mM Tris-HCl buffer, pH 7.6으로 침전물을 완전히 용해한 후 같은 buffer로 미리 평형시킨 DEAE-Sephacel column(26×200mm)에 적용시켰다. 용출은 40mM sodium acetate buffer, pH 4.6으로 실시하였고, 이때 용출분획을 분석하여 urokinase와 albumin 분획으로 각각 분리하여 모았다. Urokinase 분획은 다음 단계로 더 정제하기 위하여 20mM Tris-HCl buffer, pH 7.6으로 투석한 후 같은 buffer로 평형시킨 benzamidine-Sephacel 6B column(26×150mm)에

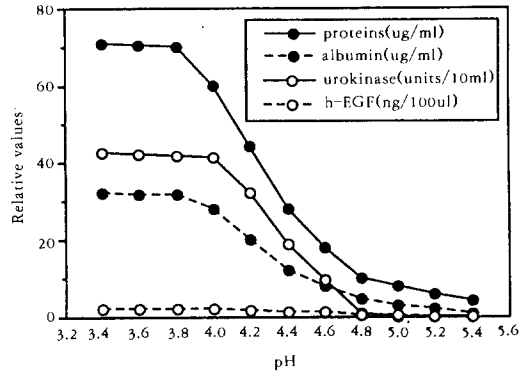
적용시킨 다음, 50mM glycine HCl buffer, pH 3.6으로 용출시켰다. 이때 용출되는 시험관마다 1M Tris-HCl buffer, pH 9.0을 첨가하여 pH가 7.6이 되도록 보정하였다.

또한 DEAE-Sephacrose column을 통해 얻은 albumin 분획은 이어서 20mM Tris-HCl buffer, pH 7.6으로 평형시킨 Blue-Sephacrose CL-6B column(20×100min)에 적용시킨 다음, 2M NaCl 용액으로 용출시켰다. 이 단계에서 얻은 albumin 분획을 다시 모아 YM10 membrane(M. W. cut-off: 10,000 Da)을 이용하여 3ml이 되도록 농축하고, 이 농축액을 마지막으로 50mM NaCl을 포함하는 20mM Tris-HCl buffer, pH 7.6으로 미리 평형화시킨 Sephacryl S-300 column(16×900mm)에 통과시켜 순수한 albumin을 제조하였다.

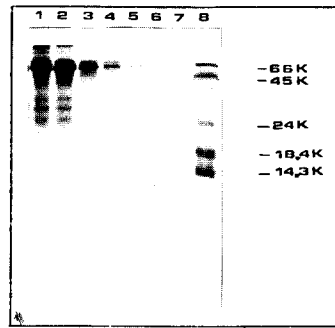
결 과

Ultrafiltration system을 이용하여 얻은 농축뇨를 pH를 달리하면서 urokinase, albumin, EGF의 활성과 단백질의 침전을 조사한 결과, pH 4.0에서 urokinase와 albumin은 95% 이상 침전되었으나 EGF는 거의 침전되지 않았다(Fig. 1). 따라서 pH 4.0에서의 침전법을 시도함은 정제하기가 어려운 EGF를 쉽게 분리할 수 있다는 이점과 많은 색소가 제거된 urokinase와 albumin 분획을 얻을 수 있다는 장점이 있다. EGF를 정제하기 위한 silica gel column의 적용은 수율과 재현성 그리고 속도 측면에서 볼 때 ion-exchange resin의 단점을 극복할 수 있었다. 즉 pH 6.0 이하의 조건에서 EGF는 silica gel에 흡착을 잘하며 용출액으로 사용된 20% ethanol 용액은 높은 수율을 나타냈으며, 이어서 Sephadex G-50 column에 통과시키고 여기서 얻은 EGF의 활성 분획을 FPLC system을 이용하여 C18 reverse phase column에 적용한 결과, 24% acetonitrile에서 EGF가 순수하게 분리되었으며 이때의 정제수율은 17%이었다(Fig. 2, Table 1).

한편 urokinase와 albumin의 분리는 pH 4.0에서의 침전물로부터 얻을 수 있었다. 이 침전물은 pH 7.0 이상인 buffer에서 쉽게 용해되었으며, DEAE-Sephacrose column에 적용시키고, pH 7.6으로 용출했을 경우 하나의 urokinase의 활성분획만이 나타났으며, 이어서 pH 5.0 이하의 buffer로 용출했을 때 2개의 urokinase의 활성분획과 1개의 albumin분획을 얻을 수 있었다(Fig. 3). 이것은 pH변화에 따른



(a)



(b)

Fig.1. Precipitation of targeted urinary proteins at various pH. (a) pH dependent profile of urinary proteins in the precipitates. (b) SDS-Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of proteins in the precipitates at various pH(lane 1, precipitate at pH 3.8; lane 2, precipitate at pH 4.0; lane 3, precipitate at pH 4.2; lane 4, precipitate at pH 4.4; lane 5, precipitate at pH 4.6; lane 6, precipitate at pH 4.8; lane 7, precipitate at pH 5.0; lane 8, M. W. protein markers: BSA (66,000 Da), egg albumin(45,000 Da), trypsinogen(24,000 Da), β-lactoglobulin(18,400 Da), lysozyme(14,300 Da).

른 용출방법이 salt농도에 따른 용출방법보다 효과적이라는 것을 보여주고 있다. 3개의 urokinase활성분획을 zymography방법으로 분석하면 54Kd과 34Kd의 urokinase 외에 46Kd정도의 분자량을 갖는 proteinase가 존재함을 확인할 수 있었으며, 54Kd의

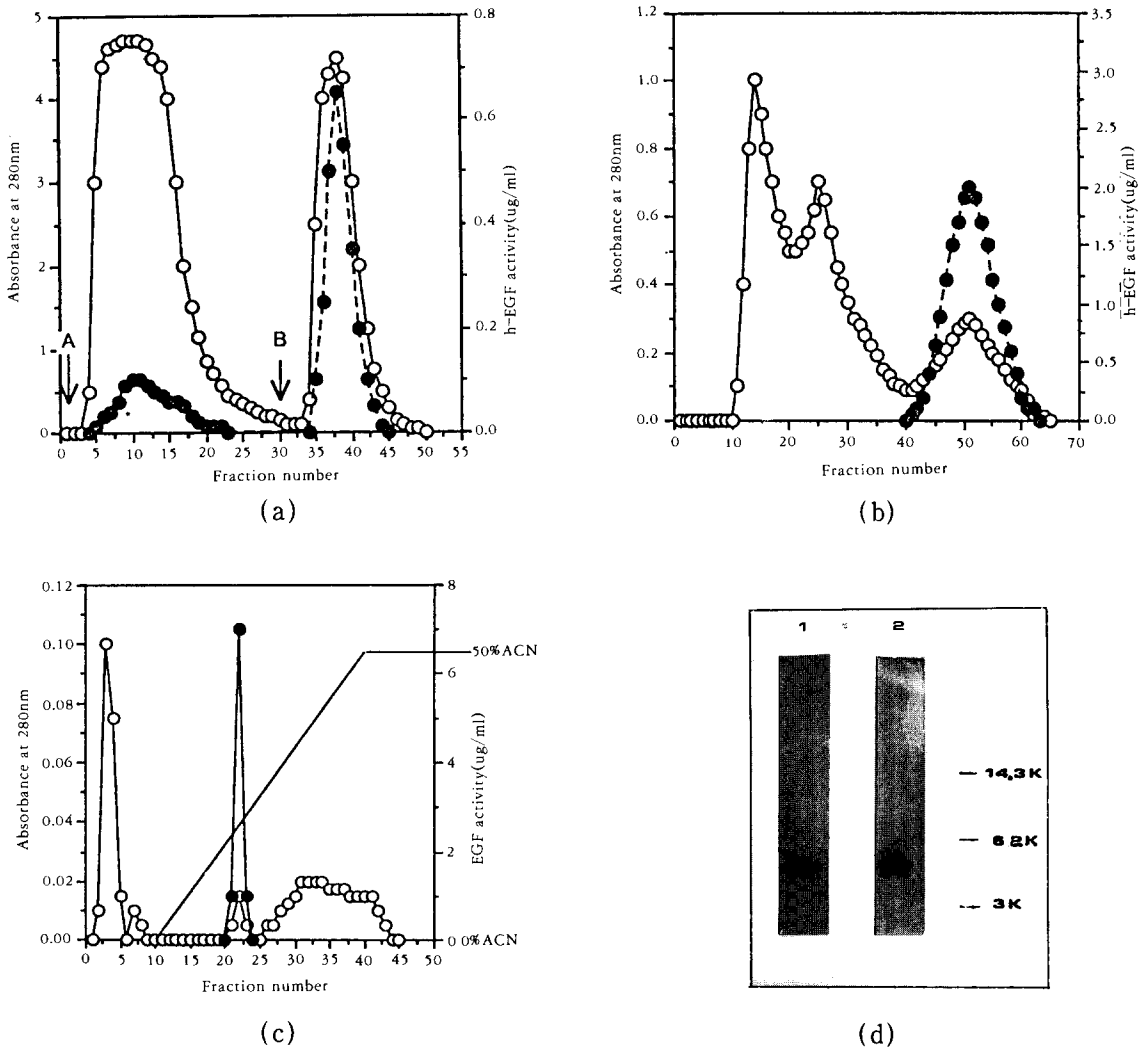
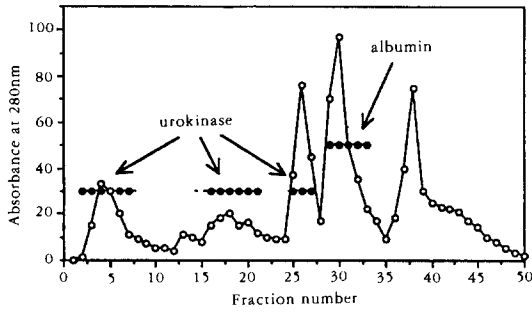


Fig. 2. Fractionation of epidermal growth factor from human urine. The chromatographic condition was described under "Materials and Method". Absorbance at 280nm and h-EGF activity are shown by open circle and closed circle, respectively. (a) Separation on silica gel column (Silica gel 60, 50×200mm). (b) Gel filtration on Sephadex G-50 column(26×1500mm) (c) Separation on reverse phase column(Pep RPC, C18, 10×100mm). (d) SDS-PAGE(20%) analysis of purified h-EGF.

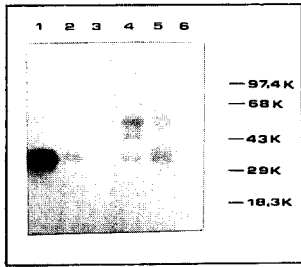
urokinase는 비교적 낮은 pH에서 용출됨을 알 수 있었다. 한편, 대부분의 urokinase활성은 첫번째와 두번째 분획에서 나타났으며 이 분획에 포함된 활성 urokinase의 분자량은 34Kd으로 확인되었다. 아마도 정제과정 중에 뇨 속에 들어 있는 다른 단백질 분해효소에 의해 고분자량의 urokinase가 전환된 것으로 추정된다. 따라서 활성이 강한 이 두 분획을 모

아 benzamidine Sepharose 6B column을 이용하여 순수한 urokinase를 정제하였다(Fig. 4, Table 2). 이상의 과정을 통하여 20 l의 뇨로부터 87,647units/mg의 비활성도를 갖는 urokinase를 얻을 수 있었으며, 정제수율은 48%이었다.

Albumin의 경우 blue-Sepharose 친화성 크로마토그래피와 Sephacryl S-300 gel filtration을 통하

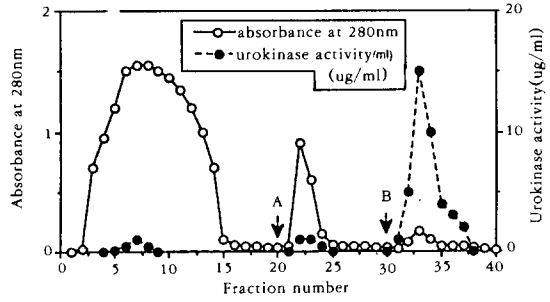


(a)

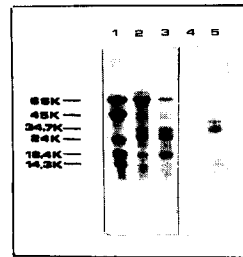


(b)

Fig. 3. DEAE-Sephadex chromatography of urokinase and albumin from human urine. (a) Fractionation of urokinase and albumin from urine on DEAE-Sephadex Fast Flow column(26×200mm). (b) Zymographic patterns of urokinase fractionated by DEAE-Sephadex Fast Flow chromatography (lane 1, fraction No. 5; lane 2, fraction No. 17; lane 3, fraction No. 23; lane 4, fraction No. 27; lane 5, fraction No. 33; lane 6; fraction No. 36).



(a)



(b)

Fig. 4. Benzamidine-Sepharose chromatography of urokinase from human urine. (a) Fractionation of urokinase on benzamidine-Sepharose 6B column (26×150mm). (b) SDS-PAGE(12.5%) analysis of purified urokinase(lane 1, M. W. markers: BSA(66,000 Da), egg albumin(45,000 Da), pepsin(34,700 Da), trypsinogen(24,000 Da), β-lactoglobulin(18,400 Da), lysozyme(14,300 Da); lane 2, concentrated urine; lane 3, precipitates of concentrated urine at pH 4.0; lane 4, purified urokinase; lane 5, Reference urokinase obtained from Sigma).

Table 1. Purification of EGF from the concentrated human urine.

Purification steps	Total protein (mg)	Total EGF (μg)	Specific activity (μg/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Concentrated urine	950	272	0.29	1	100
pH Supernatant	148	244	1.65	6	90
Silica gel chromatography	26	126	4.85	17	46
Sephadex G-50 gel filtration	3.3	98	29.7	102	36
Reverse phase FPLC	0.05	46	920	3172	17

여 20 l 의 뇨에서 약 188mg의 순수한 albumin을 얻을 수 있었다(Fig. 5, Table 3).

이상의 과정으로 동시에 분리한 세 가지 단백질의 순도를 분석하고자 HPLC TSK G3000SW column (7.5×600mm)을 이용한 gel filtration을 수행한 결과, Fig. 6에서 보여주듯이 각각의 단백질들은 99% 이상의 순도를 나타내었다.

### 고 찰

뇨중에는 albumin을 비롯하여 많은 단백질들이

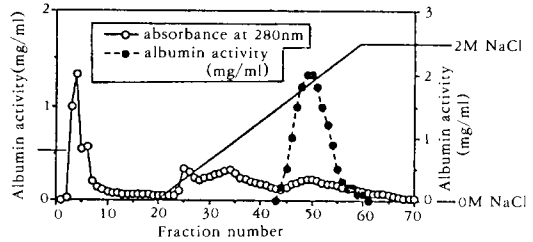
**Table 2. Purification of urokinase from the concentrated human urine.**

Purification steps	Total (mg)	Total UK (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Concentrated urine	950	62000	65.2	1	100
pH precipitate	807	59100	73.2	1.1	95
DEAE-Sephrose chromatography	48.5	33100	682	10.5	53
Benzamidine Sepharose 6B chromatography	0.34	29800	87647	1344	48

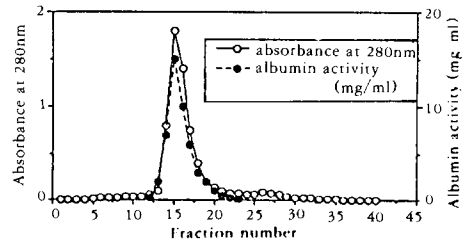
존재하고 있고 의학적으로 중요한 성분들이 포함되어 있으나 그 농도가 너무 낮아 산업적으로 이용되지 못하고 있는 실정이다. 본 연구에서는 뇨 속에 존재하는 몇 가지 유용단백질, 즉 urokinase, EGF, albumin을 목적물질로 하여 동시에 효과적으로 회수할 수 있는 일련의 정제공정을 고안하였고, 수율과 재현성에 중점을 두어 연구를 수행하였다.

뇨 단백질을 회수하는 기존의 방법으로는 bentonite를 이용한 흡착법(15)과 metal ion을 이용한 침전법(16) 등이 있으나 이 방법들은 모두 대상물질 이외의 다른 유용물질을 고려하지 않았기 때문에 결국 회수할 수 없다는 단점이 있다. 이러한 기존의 방법이 가지는 문제점을 해결하기 위하여 미량으로 존재하는 전체 뇨 단백질을 ultrafiltration 방법으로 농축하는 것이 전처리 공정에서 필수적일 것으로 생각된다. 또한 pH 침전법은 오래전부터 단백질 분획에 사용되었던 방법이었으나 본 실험에 적용한 결과 목적물질을 뚜렷하게 분획할 수 있는 좋은 단계로 판단되었다. 이상의 과정으로 얻은 상층액과 침전물을 목적에 따라 선택한 뒤 일련의 chromatography 방법을 이용하여 목적단백질들을 동시에 경제적으로 정제할 수 있었다. 이 공정으로 분리한 EGF의 경우 단독으로 정제했을 때(2)의 전체수율인 8% 보다 2배 이상의 높은 수율을 얻을 수 있었으며, urokinase의 경우에도 기존의 방법으로 정제한 경우(16)와 거의 동일한 수준의 수율을 나타내었다. 그러나 인노료부터 albumin의 분리는 아직까지 산업적 목적으로 시도된 바 없기 때문에 타공정과의 비교는 곤란하였다.

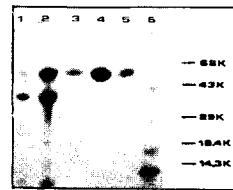
농축뇨를 직접 column chromatography에 적용



(a)



(b)



(c)

**Fig. 5. Fractionation of albumin from human urine.** (a) Separation of Blue-Sephrose column(26×150mm). (b) Separation on Sephacryl S-300 gel filtration column(16×900mm). (c) SDS-PAGE (12.5%) analysis of purified albumin (lane 1, precipitates of concentrated urine at pH 4.0; lane 2, albumin fractionated from DEAE-Sephrose column; lane 3, albumin fractionated from Blue-Sephrose column; lane 4, albumin fractionated from Sephacryl S-300 column; lane 5, reference bovine serum albumin; lane 6, M. W. markers: BSA(68,000 Da), ovalbumin (43,000 Da), carbonic anhydrase(29,000 Da), β-lactoglobulin(18,400 Da), lysozyme(14,300 Da).

**Table 3. Purification of albumin from the concentrated human urine.**

Purification steps	Total protein (mg)	Total Albumin (mg)	Specific activity (mg/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Concentrated urine	950	410	0.43	1	100
pH precipitate	807	372	0.46	1.1	91
DEAE-Sepharose chromatography	404	275	0.68	1.6	67
Blue-Sepharose CL-6B	210	198	0.94	2.2	48
Sephacryl S-300 chromatography	190	188	0.99	2.3	46

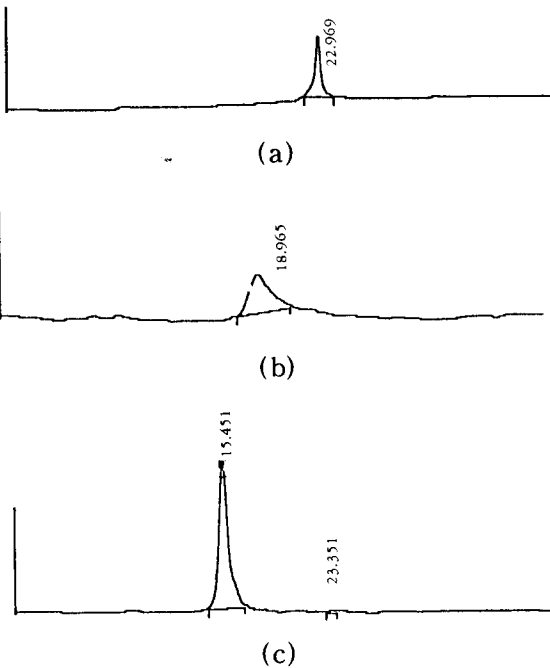
의하여 상층액과 침전물로 분획하여 chromatography에 적용하는 것이 효과적인 정제방법이었다. pH 침전법을 수행할 때 농축뇨의 농축배수는 50배 정도 일 때 단백질의 농도나 부피면에서 가장 적당하였고, 본 공정에서는 pH를 4.0으로 조정하였는데 이는 EGF의 분리에 초점을 맞춘 것이므로 또 다른 단백질의 분별침전을 목적할 경우에는 pH의 조정이 있어야 할 것으로 생각된다. 또한 assay system만 확립된다면 일련의 chromatography 방법을 이용하여 뇨 속에 존재하는 다른 유용단백질의 체계적인 분획화도 가능할 것으로 생각된다.

**요 약**

사람의 뇨로부터 유용한 단백질을 동시에 분리하기 위한 목적으로 효과적인 통합 분리정제 공정이 고안되었다. Ultrafiltration 방법을 이용한 농축과정과 pH침전법을 전처리 단계로 사용하였고, 이어서 gel filtration과 흡착, 이온교환, 친화, 그리고 역상 column을 선택적으로 혼합한 chromatography를 수행하였다. 이 공정으로 정제한 urokinase, epidermal growth factor, albumin은 각각 SDS-polyacrylamide gel 전기이동상에서 단일의 단백질 띠로 이동하였고, 자신의 단백질 활성을 유지하고 있었다. 이들 세 가지 목적 단백질의 전체 수율은 각각 48%, 17%, 46%로 나타났다.

**참고 문헌**

1. J. R. B. Williams(1951), *Br. J. Exp. Pathol.*, **32**, 530.
2. J. M. Jasper and P. Franchimont(1987), *Eur. J. Biochem.*, **166**, 295.
3. X. Tao, G. Gao, H. Z. Zhang, D. X. Zhu, A. Boersma, G. Lamblin and K. K. Han(1987), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **368**, 187.
4. J. M. Curling(1983), in *Separation of Plasma Proteins*, (Pharmacia Fine Chemical AB. eds), Vol. 1, Sweden.
5. W. F. White, G. H. Barlow and M. M. Mozen(1966), *Biochemistry.*, **5**, 2160.
6. G. H. Barlow and L. Lazer(1973), *Thromb. Res.*, **1**, 201.
7. D. C. Rijken and D. Collen(1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 7035.



**Fig.6. HPLC gel filtration profiles of purified proteins on TSK G3000SW column.**  
 (a) Epidermal growth factor. (b) Urokinase. (c) Albumin.

하는 것은 수율이나 정제도 면에서 볼때 효과적인 분획방법이 아니며, ultrafiltration과 pH 침전법에

8. P. J. Theodore(1975), in *The Plasma Proteins*, Vol. 1, **133**, Academic Press, Inc., New York.
9. C. R. J. Savage and R. Harper(1981), *Anal. Biochem.*, **111**, 195.
10. C. R. J. Savage and S. Cohen(1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 7601.
11. P. Brakman(1967), in *Fibrinolysis*, Vol. 1, Amsterdam.
12. D. C. Stemp, M. Thienpoit and D. Collen (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 1267.
13. M. Bradford(1976), *Anal. Biochem.*, **72**, 248.
14. U. K. Laemmli(1970), *Nature* **227**, 680.
15. A. Lesuk(1967), *U. S. Patent* **3**, 355, 361.
16. K. H. Chung, M. W. Sunwoo, H. S. Woo and S. B. Baik(1990), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **5**, 183.