한국생물공학회지 제17권 제2호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 17, No. 2, 153-157(2002)

Poly-lysine이 연결된 hEGF와 angiogenin의 융합단백질의 고체상 재접힘

박 상 중 · 류 강 · 서 창 우 · [1]채 영 규 · [2]권 오 병 · [2]박 승 국 · †이 은 규
한양대학교 공과대학 화학공학과, [1]한양대학교 과학기술대학 생화학과, [2]대웅제약 중앙기술개발 연구소
(접수 : 2002. 2. 18., 게재승인 : 2002. 4. 10.)

Solid-Phase Refolding of Poly-Lysine Tagged Fusion Protein of hEGF and Angiogenin

Sang Joong Park, Kang Ryu, Chang Woo Suh, Young Gyu Chai[1], Oh Byung Kwon[2], Seung Kook Park[2], and Eun Kyu Lee†
Department of Chemical Engineering
[1]Department of Biochemistry & Molecular Biology, Hanyang University, Ansan 425-791 Korea
[2]Central R&D Center, Daewoong Pharmaceutical Co., Ltd., Sungnam, Korea
(Received : 2002. 2. 18., Accepted : 2002. 4. 10.)

A fusion protein, consisting of a human epidermal growth factor as the recognition domain and human angiogenin as the toxin domain, can be used as a targeted therapeutic against breast cancer cells among others. The fusion protein was expressed as an inclusion body in recombinant *E. coli*, yet when the conventional solution-phase refolding process was used the refolding yield was very low due to severe aggregation, probably because of the opposite surface charge resulting from the vastly different pI values of each domain. Accordingly the solid-phase refolding process, which exploits the ionic interactions between a solid matrix and the protein, was tried, however the ionic binding yield was also very low regardless of the resins and pH conditions used. Therefore, to provide a higher affinity toward the solid matrix, six lysine residues were tagged to the N-terminus of the hEGF domain. When cation exchange resins, such as heparin- or CM-Sepharose, were used as the matrix, the adsorption capacity increased 2.5~3-fold and the subsequent refolding yield increased nearly 15-fold compared to the conventional process. A similar result was also obtained when an Ni-NTA metal affinity resin was used.

Key Words : refolding, solid-phase refolding, inclusion body, fusion protein, heparin, cationic tagging

서 론

융합단백질을 사용하여 특정 세포의 receptors에 cytotoxins을 전달하는 기술은 높은 선택도와 효과로 인해 최근 암치료에 사용되어지고 있다(1,2). Human EGF(epidermal growth factor; pI 4.5, 6 kDa)는 암세포 인식부위(3)로써 사용되고 human angiogenin(pI 9.0, 14 kDa)는 암세포 괴사부위(4,5)로 사용된다. 여기서 EGF의 C 말단은 다섯 개의 아미노산(GGGGS)(2)으로 구성된 linker에 의해 angiogenin의 N 말단에 연결되어진다. EGF는 특정 암세포의 표면에 발현된 EGF receptors에 대한 targeting marker로써 작용한다. 그런 다음 융합단백질이 internalization된 후에 angiogenin은 암세포를 죽이는 ribonucleolytic toxin으로써 작용한다(4,5).

이번 연구에서 융합단백질(E5A)은 *E. coli*에서 내포체 형태로 발현시켰고 여러 전통적인 재생공정을 적용해 보았다. 기존의 희석과 투석에 의한 재접힘공정은 단백질간 상호작용에 의한 응집현상으로 재접힘 수율이 4.8%로 매우 낮았다. 이것은 아마도 다른 domain의 pI 값이 많이 차이가 나기 때문에 재접힘 pH 9.0에서 두 domain의 반대되는 전기적인 charge에서 기인하는 것 같다.

그러므로 응집현상을 해결하기 위해 고체상 재접힘 공정(solid-phase refolding)을 개발하였다. 기본적으로 고체상 재접힘 공정은 3단계로 구성된다. 첫 번째 단계는 용해된 단백질을 고체 담체 표면에 흡착, 두 번째 단계는 변성제를 제거함으로 고체 담체 표면에서 재접힘, 세 번째 단계는 고체 표면으로부터 용출이다. 이러한 고체상 재접힘 공정은 몇 가지 이점을 갖고 있다. 첫째 단백질간에 상호작용을 구조적으로 피할 수 있기 때문에 응집현상을 최소화 할 수 있다. 둘째

†Corresponding Author : Bioprocessing Research Laboratory, Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Ansan, 425-791 Korea
Tel : +82-31-400-5275, Fax : +82-31-408-3779
E-mail : eklee@hanyang.ac.kr

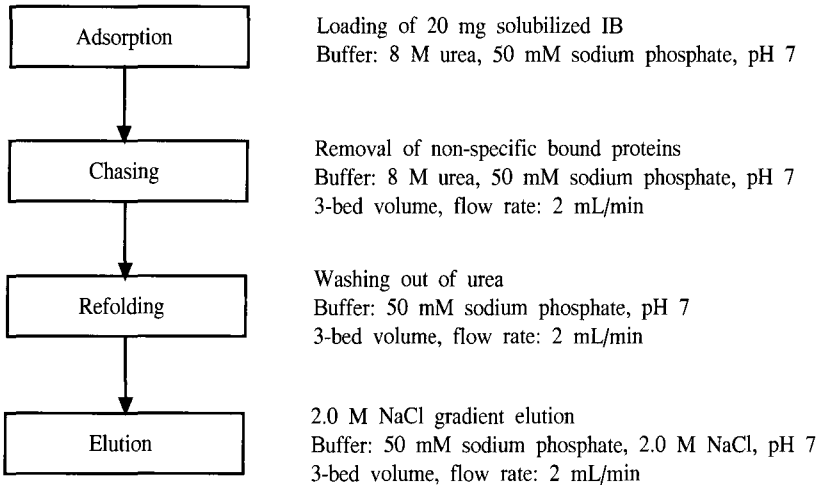

Figure 1. Flow chart of solid-phase refolding.

재접힘공정 중 상대적으로 높은 농도를 유지할 수 있다. 이것은 주어진 담체에 대해 단백질의 흡착능에 의존한다. 이와 더불어 고체상 재생공정은 전체 재접힘 공정시간과 응집체로부터 단량체를 분리하는 재접힘 공정후의 단계를 감소시킬 수 있다(6-8).

정제를 위한 아미노산이 tagging 되어있는 부분을 다시 절단하기 위한 전단부위가 포함된다. 본 연구에서는 고체상 재접힘의 수율 향상을 위하여 6개의 lysine과 절단부위인 factor Xa protease의 인식부위를 tagging하였다(6L10E5A). 이것은 poly-lysine의 강한 양이온성을 이용하여 양이온 교환수지에 대한 친화력을 향상시키기 위함이다. 본 논문에서는 6L10E5A의 고체상 재접힘 공정의 적용과 기존의 액상 재접힘 공정과 비교하여 서술하고자 한다.

재료 및 방법

융합단백질 발현

본 연구에서는 EGF를 coding하는 유전자로서 hEGF발현벡터 pTE105를 사용하였고, human angiogenin의 유전자로서 human liver cDNA library로부터 얻은 angiogenin을 plasmid pRSET A에 cloning한 균주를 이용하였다. Plasmids pTEA의 구조는 *E. coli.*에서 융합단백질 EGF-$(gly)_4$ser-angiogenin(E5A)를 발현하도록 디자인되었다. 자세한 plasmid의 구조는 논문에 제시되었다(2,9). 같은 vector system이 6L10E5A 발현에도 사용되었다. 재조합 *E. coli.*의 발효에서 GNPF 배지가 사용되었고 그런 다음 mid-exponential phase에서 1 mM IPTG를 사용하여 융합단백질을 발현하였다. E5A와 6L10E5A의 분자량은 21 kDa과 22 kDa이다. 자세한 발효와 발현 과정은 논문에 제시된 방법을 따랐다(10).

내포체 회수와 용해

발효 후 발효액을 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 세포를 회수했다. SDS-PAGE(16%)과 Western blotting을 사용하여 목적단백질의 발현을 체크하였고 발현된 양은 scanning densitometer를 사용하여 정량하였다. 회수한 세포는 파쇄 버퍼(100 mM sodium phosphate, 1% Tween 20, pH 7.0)를 가한 후 초음파로 파쇄하였다. 파쇄 후 세포 파쇄액을 8000 rpm에서 30분간 원심분리 후 내포체를 회수하였다. 회수된 내포체는 세척용액(50 mM sodium phosphate, 0.1% Tween 20, pH 7.0)을 사용하여 3회 세척하였다. 그 후 세척된 내포체를 용해 버퍼(8 M urea, 50 mM sodium phosphate, pH 7.0)를 사용하여 용해시켰다.

고체상 재접힘

고체상 재접힘을 위해 우선 두 용해된 단백질 E5A와 6L10E5A에 대한 적당한 고체 담체의 선정을 위해 흡착조건과 평형 흡착능을 다양한 pH, ionic strengths에서 테스트하였다. CM-Sepharose, Q-Sepharose, DEAE-Sepharose와 phenyl-Sepharose는 Amersham pharmacia Biotech(Uppsala Sweden)에서 구입하였다. 이때 resin의 부피는 0.5 mL이었으며, 0.5 mg의 내포체를 1 mg/mL 농도로 용해된 내포체 용액을 loading하였다. 내포체 용해액이 loading된 resin을 5분간 저속 교반하고 자연침강 시킨 후 상등액을 취하여 Bradford assay법에 의해 단백질의 농도를 측정하여 흡착량을 계산하였다.

최적의 resin과 실험조건을 찾은 후에 충진된 칼럼(5 mL bed volume)에서 고체상 재접힘 공정을 수행하였다. Resin에 6L10E5A를 흡착한 후에 세척용액(50 mM sodium phosphate, pH 7.0)으로 urea를 제거하였다. 이 과정에서 흡착된 융합단백질은 resin표면에 부착된 상태에서 고체상 재접힘 되었다. 재접힘후 0~2 M NaCl 농도에서 25분 동안 선형적인 기울기를 가지는 용출 버퍼(50 mM sodium phosphate containning 2 M NaCl, pH 7.0)를 사용하여 단백질을 용출 하였다. Figure 1은 고체상 재접힘 절차와 조건들의 흐름도를 보여준다. 용출물에서 재접힘 된 6L10E5A의 RNase 생활성은 tRNA 분석법을 사용하여 측정하였다(4). 재접힘 수율은 칼럼 용출물내의 6L10E5A의 질량을 용액화된 내포체의 질량으로 나누어 계산하였다.

결과 및 고찰

E5A와 6L10E5A발현

E5A발현에 대한 발효에서 최종 OD는 600 nm에서 20이었

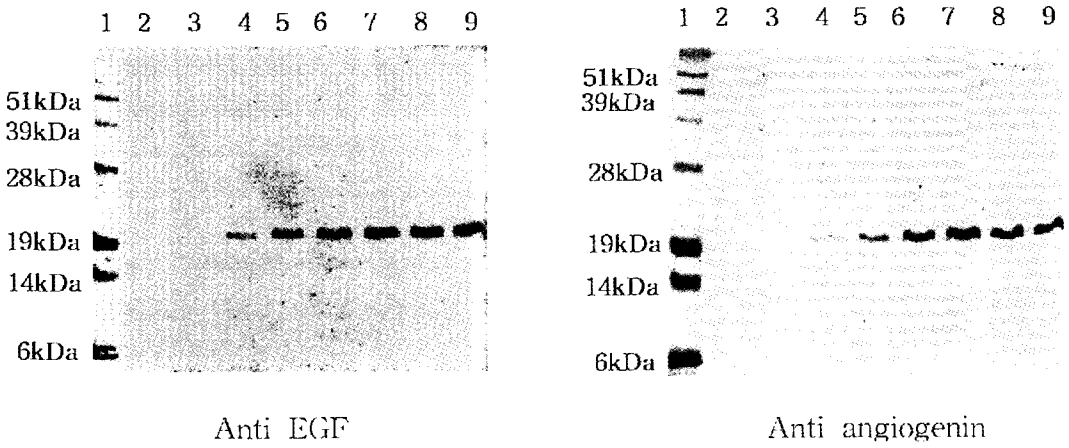

Figure 2. Western blotting result of 6L10E5A fermentation.(Lane 1: Size maker, Lane 2: 5 h before induction, Lane 3: 3.7 h before induction, Lane 4: 2.5 h before induction, Lane 5: 1 h before induction, Lane 6: induction point, Lane 7: 1 h after induction, Lane 8: 2 h after induction, Lane 9: 4 h after induction)

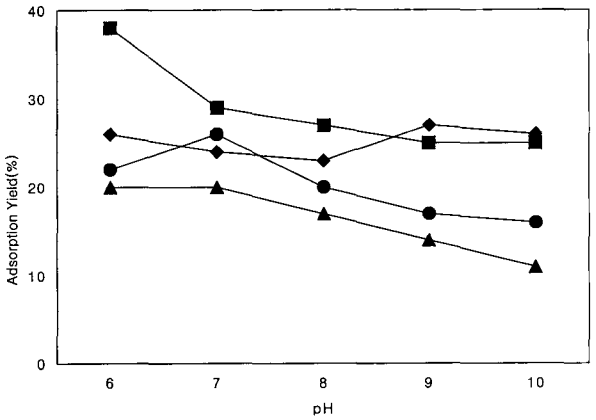

Figure 3. Adsorption yield of E5A with different resins and various pHs. Q-Sepharose (◆), CM-Sepharose (●), DEAE-Sepharose (▲), Heparin-sepharose (■)

고 세포건조질량은 6.7 g/L였다. 발현율은 전체 단백질의 약 25%였다. 6L10E5A의 발효결과는 최종 OD는 25이고 세포건조질량 4.7 g/L였다. 발현율은 전체 단백질의 약 21%였다(결과생략).

발효 중의 6L10E5A의 발현단면은 anti-hEGF antibody와 anti-angiogenin antibody의 Western blots으로 확인하였고 그 결과는 Figure 2에 나타냈다. 6L10E5A의 일부분은 IPTG induction전에 소량 발현되는 것이 관찰되었지만 대부분의 단백질은 induction 후에 발현되었다.

E5A의 흡착능력

내포체를 전통적인 방법(rapid dilution followed by dialysis)을 사용하여 재접힘 하였을 때 응집현상이 보여졌고 수율이 4.8%로 매우 낮았다. 또한 24시간 이상의 장시간 재접힘 시간이 필요했다. 고체상 재접힘에 적용하였을 때 중요한 열쇠는 적절한 흡착 담체와 공정조건들을 찾는 것이었다.

네 가지 종류의 이온 교환수지(CM-Sepharose, heparin-Sepharose, Q-Sepharose and DEAE-Sephrose)들을 다양한 pH (6-10)에서 시험하였다. 각각의 경우마다 흡착 수율은 다양하지만, 흡착 능력은 모든 경우에 있어 30%(0.3 mg-E5A/mL-resin) 이하였다(Figure 3). 또한 흡착능력은 이온강도에 영향을 받지 않았다(50, 100, 200, 300 and 400 mM이 시험되었다). 융합단백질이 양전하와 음전하를 둘다 가지고 있는 것을 감안하면서, pH 7.0에서 같은 부피의 CM-Sepharose와 DEAE- Sepharose를 혼합한 resin을 시험해봤다. 그러나 흡착 수율은 여전히 40% 이하였다. 소수성 결합 resin(Phenyl-Sephrose) 또한 시험했지만 흡착 수율은 매우 낮게 나타났다.

Heparin은 angiogenin에 친화력을 가지고 있는 것으로 잘 알려져 있다. heparin-Sepharose를 담체로 사용하였을 때 흡착 수율은 다른 것들보다 높았지만, 최대 흡착 수율은 pH 6.0에서 38%였다(Figure 3). Heparin-Sephrose를 고체상 재접힘에 적용하기에는 여전히 수율이 낮기 때문에 고체상 재접힘 기술은 어떤 resin도 E5A에 대해 현저히 낮은 친화도 때문에 실시하기 어렵다고 생각되어진다. 이것은 주로 EGF와 angiogenin이 반대의 전자 표면 부하를 가지고 있기 때문에 척력과 인력이 모두 존재하게 되어 ionic interaciton이 방해받게 되는 것으로 생각된다.

6L10E5A의 흡착능력

E5A가 여러 가지 담체에 대해서 흡착 능력이 떨어지기 때문에 우리는 흡착 능력을 높이기 위해서 여섯 개의 lysine 잔기들을 E5A(6L10EA5)의 N-말단에 붙어서 양이온 교환수지에 결합력을 높게 만들어 주었다. Angiogenin(14 kDa, pI>9.5)이 EGF(6 kDa, pI 4.5)보다 훨씬 큰 domain을 가지고 있고 융합단백질의 중요한 전기적 힘을 나타내므로 음이온 교환수지보다 양이온 교환수지가 선택되었다. 이는 angiogenin이 분자량이 크고 또한 pI 값이 매우 높기 때문에 이온교환수지의 흡착능을 높이기 위해서 양이온 교환수지를 선택하였다. 6L10E5A 내포체를 다양한 pH (6,7,8,9,10)에서 여러가지 resin(CM-Sepharose, Q-Sepharose, DEAE-Sepharose, and heparin-Sepharose)에 적용하였다. Figure 4는 흡착수율이 양이온 교환수지에 더 강한 친화도를 가지는 poly-lysine이 붙음으로써 크게 개선됨을 보여준다. 예를 들면, pH 6에서 CM-Sepharose를 사용했을 때 흡착 수율은 65%에 가까웠고 E5A경우(21%)

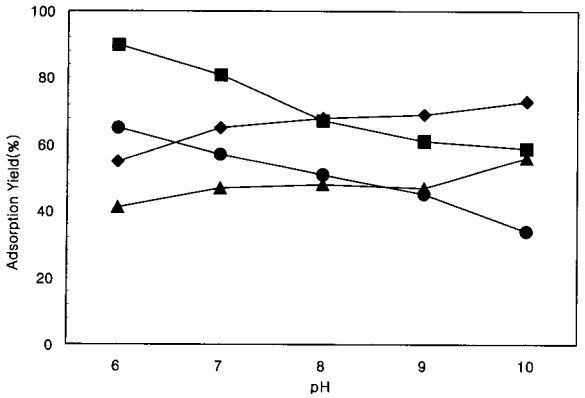

Figure 4. Adsorption yield of 6L10E5A with different resins and various pHs. Q-Sepharose (◆), CM-Sepharose (●), DEAE-Sepharose (▲), Heparin-Sepharose (■)

보다 2.5배에서 3배까지 높게 나타났다.

Heparin-Sephrose는 pH 6에서의 흡착 수율은 거의 88% 이르고 이는 가장 큰 흡착 능력을 보였다. Poly-lysine이 붙어있지 않은 때의 흡착 수율은 약 38% 정도라는 사실에 주목하면, lysine이 붙어있을 때는 이온 상호작용을 증가시키기 때문에 heparin의 흡착능력을 증대시킨다고 결론지을 수 있다. 다시 말하면 양이온 poly-lysine이 붙어있으면 pH 6에서 heparin에 대한 양이온 angiogenin의 고유의 친화도를 더 강하게 만든다. 이 실험에 근거하여 고체상 재접힘에 matrix로써 heparin-Sepharose를 선택하였다.

Histidine, arginine, lysine과 같은 양이온 잔기의 고분자들은 Ni-NTA(nikel-nitrilotriacetate) agarose와 같은 특정 metal-chelating resin에 강한 친화도를 나타내는 것으로 잘 알려져 있다. 이는 친화작용으로부터 재조합 hEGF를 정재하는데 사용된다. 같은 실험 조건에서 흡착능력의 비교를 위해서 Ni-NTA resin에 6L10E5A의 비교실험 하였다. pH 7과 pH 9 사이에서 흡착 수율은 70(±5%)에서 일정하였다. 비용적인 면(heparin-Sepharose 보다 20% 이상 비용이 더 듦)과 imidazole과 관련된 문제의 가능성으로 인해 더 이상의 실험은 수행되지 않았다.

고체상 재접힘

세척된 6L10E5A의 내포체는 8 M urea를 포함하는 버퍼에 용해되었고, 전체 단백질의 10 mg을 포함하는 수용액이 8 M urea와 평형하게 heparin-Sepharose 칼럼(5 mL bed volume)에 2 mL/min으로 주입되었다. 15 mL의 버퍼용액으로 칼럼을 세척하는 것으로 비결합된 단백질을 분리한 후에 15 mL의 urea-wash 버퍼로 urea를 씻어낸다. 이 단계동안 tagging된 융

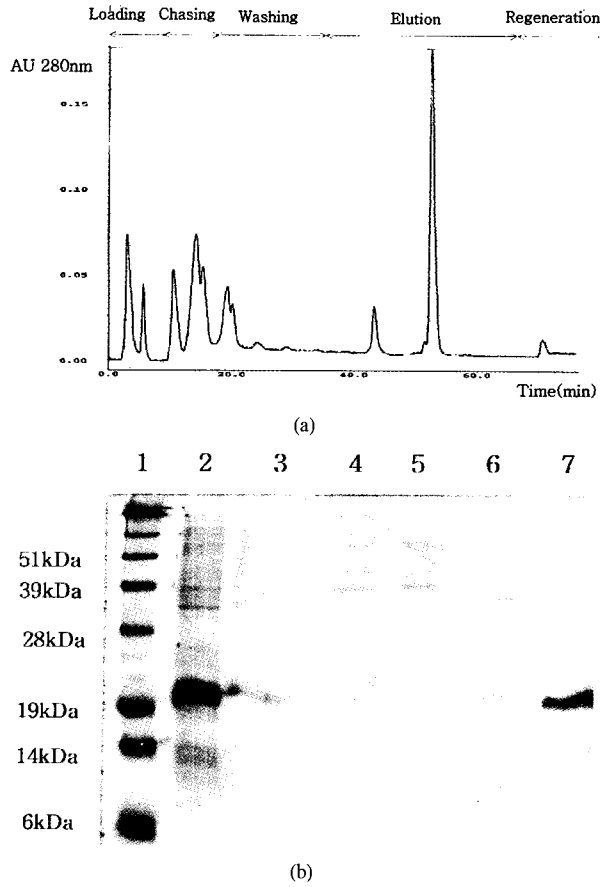

Figure 5. Solid-phase refolding results in Heparin-Sepharose column. (a) Heparin-Sepharose chromatogram. (b) SDS-PAGE result of Heparin-Sepharose chromatogram (Lane 1: Size marker, Lane 2: solubilized IB, Lane 3: 3 min, Lane 4: 10 min, Lane 5: 13 min, Lane 6: 14.5 min, Lane 7: 52 min).

합단백질은 컬럼안에서 다른 융합단백질과 함께 재접힘된다. 고체상 재접힘 후에, 융합단백질은 1.0 M NaCl, 52 min (Figure 5(a))에 용출된다. Figure 5(b)의 lane 7은 이 peak가 6L10E5A를 함유하고 있음을 보여준다.

최소의 peak는 0.2 M NaCl, 44분에 용출 되었다. *E. coli*와 관련된 비정제 단백질이 이 정도 염농도에서 용출 된다고 알려져 있기 때문이다. 각각 16번의 분리된 실험에서의 평균 재접힘 수율은 63.6%(3.2%의 표준오차)였다. 이는 E5A의 액상 방법보다 약 13배 이상 수율이 증가됨을 보였다(Table 1). 이러한 재접힘 수율의 증가는 재접힘 과정에서 주로 응집현상이 줄어들기 때문이다. 고체상 재접힘은 분자들 사이의 상호작용을 체계적으로 피할 수 있기 때문에 좋은 결과를 가져

Table 1. Refolding yield profile of fusion protein

Method	Conventional method	Solid-phase refolding		
	Dilution / dialysis / CM-Sepharose chromatography	CM-Sepharose chromatography		Heparin-Sepharose
Fusion protein	E5A	E5A	6L10E5A	6L10E5A
Solubilized IB mass	1 g	1 g	1 g	1 g
Recovered fusion protein mass	0.048 g	0.136 g	0.337 g	0.636 g
Refolding yield	4.8%	13.6%	33.7%	63.6%

왔다.

Table 1의 첫 번째와 두 번째 칼럼의 결과에서 E5A의 전통적인 액상 방법과 고체상 방법(CM-Sepharose 사용)은 고체상 재접힘 방식의 우수함을 보여준다. 단백질 농도는 mL resin당 전체 단백질의 2 mg이었다. 이는 액상 재접힘 방법을 사용했을 때의 농도보다 훨씬 높은 것이다. 고수율과 적은 부피의 재접힘 공정은 고체상 재접힘의 주요 이점이다. 게다가 고체상 재접힘 방법은 약 4~5시간이 소요되는 반면에 기존의 액상 방법에서의 공정시간은 약 30시간 정도였다. 이는 각 단계마다 한정된 부피를 공급하는 기본적인 칼럼공정이기 때문이다.

Heparin-Sepharose로부터 분류된 peak의 용출물은 투석을 거치고 RNase의 생활성을 확인하였다. 생활성은 다른 미생물로부터 정제된 angiogenin 대비 65%를 나타내었다. 생활성 값은 고체상 재접힘된 6L10E5A가 생물학적 활성을 유지하고 있음을 보여준다. 또한 hEGF와 angiogenin을 각각 Western blots으로 발현정도를 확인되었다.

여섯 개의 lysine 잔기들은 재접힘 공정 후에 factor Xa로 절단반응을 시킨 후 이온교환 칼럼으로 미반응 융합단백질, 절단된 융합단백질 그리고 lysine 잔기로 각각 용출시 분리하고자 한다.

요 약

Poly-lysine이 tagging된 hEGF와 angiogenin(6L10E5A)의 융합단백질의 고체상 재접힘이 heparin-Sepharose column에서 수행되었을 때, untagging 단백질(E5A)의 기존의 액상 재접힘 방법과 비교하여 재접힘 수율은 약 13배 정도 증가하였다. 게다가 poly-lysine tagging된angiogenin은 heparin에 친화도를 높여주므로 2.5배에서 3배 정도의 흡착 수율이 증가한다.

재접힘 수율은 고체상 반응으로 인해 높은 재현성을 보였다. 재접힘 공정시간은 대략 8배 단축되었다. 고체상 재접힘된 단백질은 자신의 생물학적 역가를 유지하였다. 따라서 이 연구는 고체상 재접힘 방법이 분자간의 상호작용을 억제하여 응집현상을 현저히 줄였기 때문에 기인한 결과로 생각된다. 따라서 응집으로 인한 재접힘 수율이 낮은 단백질의 재접힘 공정에 고체상 재접힘 공정을 사용하면 높은 재접힘 수율을 얻을 수 있다.

감 사

이 연구는 산자부 중기거점기술개발사업에서 지원해 주셨습니다. 또한 초정밀생물분리기술연구센터(ERC)의 일부 연구비 지원에도 감사드립니다.

REFERENCES

1. Psarras, K., M. Ueda, T. Yamamura, S. Ozawa, M. Kitajima, S. Aiso, S. Komatsu, and M. Seno (1998), Human pancreatic RNase1-human epidermal growth factor fusion; an entirely human 'immunotoxin analog' with cytotoxic properties against squamous cell carcinomas, *Protein Eng.*, **11**, 1285-1292.
2. Yoon, J. M., S. H. Han, O. B. Kown, S. H. Kim, M.H. Park, and B. K. Kim (1999), Cloning and cytotoxicity of fusion proteins of EGF and angiogenin. *Life Science,* **16**, 1435-1445.
3. Hirata, Y. and A. N. Orth (1979), Epidermal growth factor (urogastrone) in human fluids: size heterogeneity. *J. Clin. Endocrinol. Metab,* **48**, 673-679.
4. Shapiro, R., J. F. Riordan, and B. L. Vallee (1986) Characteristic ribonucleolytic activity of human angiogenin. *Biochemistry,* **25**, 3527-3532.
5. Wu, Y. N., S. K. Saxena, W. Ardelt, M. Gadina, S. Mikulski, C. D. Lorenzo, G. DAlessio, and J. Youle (1995), A study of the intracellular routing of cytotoxic ribonucleases. *J. Biol. Chem,* **1270**, 17476-17481.
6. Creighton, T. E. (1989), Process for the production of a protein. US Patent 4,977,248.
7. Sinha, N. K. and A. Light (1975), Refolding of reduced, denatured trypsinogen and trypsin immobilized on agarose beads. *J. Biol. Chem,* **250**, 8624-8629.
8. Stempfer, G., B. H. Neugebauer, and R. Rudolph (1996), Improved refolding of immobilized fusion protein, *Nature Biotech,* **14**, 329-334.
9. Lee, K. M., Y. W. Koh, J. Y. Chung, S. K. Park, and M. W. Park (1997), A novel gene coding human epidermal growth factor and preparing the same. US Patent 8,360,841.
10. Lee, Y. S. (1999), Fermentation and purification processes for fusion protein of human epidermal growth factor and angiogenin from recombinant *E. coli*. M.S. Thesis. Hanyang University, Dept. of Chemical Engineering, Korea.
11. Kim, C. S. and E. K. Lee (2000), Effects of operating parameters in in vitro renaturation of a fusion protein of human growth hormone and glutathione S transferase from inclusion body. *Proc. Biochem.*, **36**, 111-117.
12. Soncin, F., D. J. Strydom, and R. Shapiro (1997), Interaction of heparin with human angiogenin. *J. Biol. Chem,* **272**, 9818-9824.