

우유로부터 Angiogenin의 정제

남명수* · 배형철* · 박창식**

충남대학교 농업생명과학대학 동물자원학부 유식품생물화학실*,

충남대학교 농업생명과학대학 형질전환돼지연구센터**

Purification of Angiogenin from Bovine Milk

M. S. Nam*, H. C. Bae* and C. S. Park**

Lab. of Milk Food Biochemistry, Division of Animal Science & Resources, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, KOREA.*

Research Center for Transgenic Cloned Pigs, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, KOREA**

ABSTRACT

This study was carried out to establish the purification protocol of angiogenin(ANG) from bovine milk. The purification of ANG from bovine milk was performed by using cation chromatography, high-performance liquid chromatography and gel-filtration. We obtained the ANG protein have the molecular weight of about 14 kD by SDS-PAGE analysis. This protein was confirmed as ANG by NH₂-terminal sequence analysis of the first 15 amino acids. Identified amino acids revealed the protein to be identical to that previously reported for bovine ANG.

(Key words : Angiogenin, Amino acid sequence, N-terminal amino acid sequence)

I. 서 론

Angiogenin(ANG)은 14.1 kDa의 단량체로 인체 종양유도 angiogenesis factor로 종양세포에서 처음 분리되었고(Fett 등, 1985) 그 후에 항암치료를 위해서 잠재적으로 중요한 물질로 알려져 왔다. ANG는 간(Weiner 등, 1987), 말초혈액세포, 상피세포, 섬유아세포(Rybak 등, 1987)에서 분리되고 정상적인 경우 250 ~ 360 ng/ml의 농도로 순환한다(Blaser 등, 1993; Shimoyama 등, 1996). 또한 adenocarcinoma 세포조직 배지와 정상혈장에서 존재하는 것으로 밝혀진 엽기성 단백질로 angiogenesis 즉, 새로

운 혈관 형성을 유도하는 능력이 있고(Shapiro 등, 1992; Moroianu과 Riordan, 1994; Moroianu과 Riordan, 1994) 여러 가지 형태의 암에 의해 영향을 받는 환자의 경우 혈청에서 ANG의 농도는 상승한다고 보고하였다(Olson 등, 1995). ANG은 인체 pancreatic ribonuclease(RNase) A와 상동성이 35%이다(Strydom 등, 1985). 이러한 상동성은 인체 ANG과 같이 특별한 RNA 분해활성 및 28S와 18S rRNA의 분해를 촉매하는 생리활성 기능을 보여준다고 보고하였다(Shapiro 등, 1986). 그리고 우유에 함유된 ANG의 양은 2.09 ~ 4.85 ng/ml(Rustamian 등, 1999)정도 존재함을 보고하였다. 한편 Maes 등

Corresponding author : M. S. Nam, Lab. of Milk Food Biochemistry, Division of Animal Science & Resources, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, KOREA. Tel : 042-821-5782, Fax : 042-823-2766, E-mail : namsoo@cnu.ac.kr

(1988)은 우유 ANG의 아미노산 서열을 밝혔다. 본 연구는 Bond와 Vallee(1988)가 젖소 혈액으로부터 분리한 ANG의 방법을 변형하여 우유로부터 ANG을 정제하는 방법을 확립하고 생리활성을 탐색하기 위한 기초 자료를 얻고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 우유로부터 유청 분리

충남대학교 동물사육장에서 사양 관리하는 홀스타인 젖소로부터 착유한 유즙을 -70℃ 냉동고에 보관하면서 ANG 정제에 사용하였다. 젖소로부터 착유한 우유에서 지방을 제거하기 위해서 5,000g으로 원심분리하여 탈지유를 제조하였다. 탈지유에 1N HCl를 첨가하고 pH 4.6으로 조정 후 원심분리 하여 casein과 유청을 분리하였다. 분리된 유청은 분자량 10,000 dalton 투석막을 이용하여 투석한 다음 침전된 단백질을 원심분리 하여 제거하고 상등액을 정제에 이용하였다.

2. 단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 단백질 정량 kit(Bio-rad, USA)를 사용하여 측정하였다.

3. ANG의 분리 정제

(1) Ion-exchange chromatography

양이온교환 수지인 CM-Sepharose(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 컬럼(5.0 × 20 cm)을 제작하여 실험에 사용하였다. 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화시킨 컬럼에 유청단백질을 흡착시키고 충분히 세척 후 같은 buffer에 0.3 M, 0.6 M NaCl이 포함된 용출 buffer로 step gradient 방법으로 시간당 60 ml의 유속으로 용출시켜서 15 ml씩 분획하였다. 분획한 시료는 280 nm에서 흡광

도를 측정하여 그래프를 그렸다.

(2) FPLC

Ion-exchange chromatography를 수행하여 얻은 ANG을 포함하는 분획을 모아서 AKTA FPLC system(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 사용하여 ANG을 정제하였다. 사용한 컬럼은 Mono-S TM-75(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)이고 정제 조건은 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화시킨 다음 같은 buffer에 0.3 M, 0.7 M, 1.0 M NaCl이 포함된 용출 buffer로 step gradient 방법으로 시간당 80 ml의 유속으로 용출시켰다.

(3) Gel-filtration chromatography

Sephadex G-75(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 컬럼(1.5 × 100 cm)을 제작한 다음 FPLC를 수행하여 얻은 ANG을 포함하고 있는 분획을 모아서 gel-filtration 컬럼에 주입하였다. 50mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 사용하여 10 ml/hr의 유속으로 2 ml/tube의 시료를 분획하였다. 분획한 시료는 280 nm에서 흡광도를 측정하여 그래프를 그렸다.

4. 아미노산 sequence 분석

정제된 ANG의 N-말단 15개의 아미노산 sequence의 분석은 Applied Biosystem Model 491 protein sequencer(한국기초과학지원연구원 프로테옴 분석팀)를 이용하여 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Ion-Exchange Chromatography

우유로부터 ANG을 정제하기 위해서 투석한 유청단백질 용액을 평형화 된 CM-Sepharose ion-exchange 컬럼에 흡착시킨 후 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 세척하여 흡

착되지 않은 유청단백질을 제거하였다. 유청단백질이 흡착된 컬럼에 0.3 M, 0.6 M NaCl 용액으로 step gradient로 용출한 그래프 및 전기영동 결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 0.3 M에서 OD 값이 높고 폭이 큰 peak I(분획번호 2-18), 0.6 M에서 OD 값이 0.5 정도의 폭이 좁은 peak II(분획번호 34-48)가 각각 나타났다. 각 peak의 4, 10, 16, 36, 40, 44번 분획을 취해서 전기영동을 수행한 결과 분획 4, 10, 16번은 immunoglobulin, lactoperoxidase, serum albumin, α -lactalbumin, β -lactoglobulin 등의 단백질이 함유되어 있고 분획 36, 40, 44번은 serum albumin, lactoferrin, 미량의 α -lactalbumin, β -lactoglobulin 및 ANG

등의 단백질이 함유되어 있음을 확인 할 수 있었다. ANG이 함유되어 있는 36번 분획 전후를 모아서 투석 후 동결 건조하여 FPLC용 Mono-S 컬럼에 흡착시켰다.

2. FPLC

CM-Sepharose chromatography에서 분획한 36번 분획 전후를 Mono-S 컬럼에 흡착하여 ANG을 분리하였다. 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 0.3 M, 0.7 M, 1.0 M NaCl 이 포함된 용출 buffer를 이용하여 step gradient로 용출한 그래프 및 전기영동 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. Fig. 2에 나타난

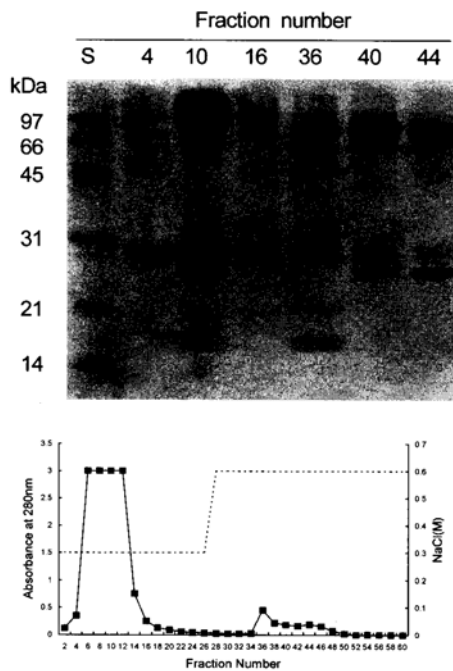


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of selected column fraction from CM-Sepharose ion exchange chromatography. The column was eluted with a step gradient of 0.3 M, 0.6 M NaCl in 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) at a flow rate of 40 ml/hr.

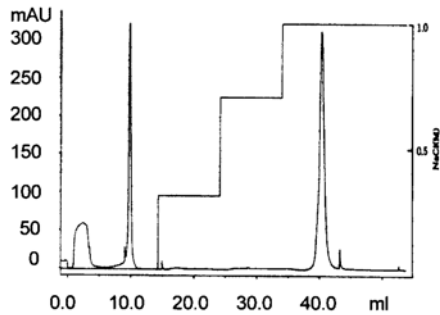
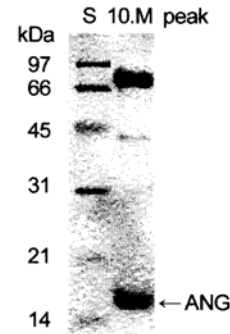


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of selected peak from HPLC. HPLC column was eluted with a step gradient of 0.3 M, 0.7 M, 1.0 M NaCl in 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) at a flow rate of 80 ml/hr.

바와 같이 0.3 M과 0.7 M에서는 용출된 단백질이 없었고 1.0 M에서 하나의 peak가 나타났다. 이 peak를 전기영동을 수행한 결과 약 14kD의 ANG이 함유되어 있음을 확인 할 수 있었다. 이 분석을 모아 gel-filtration을 수행하였다.

3. Gel-filtration chromatography

Sephadex G-75 gel-filtration 컬럼으로 정제한 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 흡광도가 높은 첫 번째 peak와 흡광도가 낮은 두 번째 peak로 나타났는데 전기영동한 결과를 보면 첫 번째 peak는 LF이고 두 번째 peak는 ANG으로 각각 단일밴드로 확인되었다. ANG을 정제한 보고를 보면 Bond와 Vallee(1988)가 젖소의 혈액으로부터 ANG을 분리하였는데 방법은 CM-52 cation-exchange,

Mono S 그리고 C18 HPLC의 3단계 과정을 거쳐서 정제를 하였고 Fett 등(1985)은 인체 종양 세포인 HT-29 세포로부터 ANG을 분리하였는데 CM-cellulose, Gel filtration, Cation-exchange의 3단계 과정을 거쳐서 정제를 하였다. 본 연구는 우유로부터 ANG를 분리하기 위해 동결 건조한 유청단백질을 CM-Sepharose ion exchange, FPLC-Mono-S, Gel filtration의 3단계 정제방법을 수행하였다. 비교적 흡착력이 뛰어난 CM-Sepharose ion exchange 컬럼과 FPLC-Mono-S 컬럼을 사용하여 정제하였으므로 ANG을 효율적으로 분리할 수 있었다고 사료된다.

4. N-terminal sequence 확인

정제단계별 단백질 정량은 Table 1에 나타난 바와 같다. 우유 10 l로 약 8 ng/ml의 ANG를 얻었는데 이는 Rustamian 등(1999)이 보고한 2.09 ~ 4.85 ng/ml 보다는 조금 많은 양이지만 우유 10 liter에 함유된 ANG 양으로 비교하기에는 너무 적은 시료로 개체에 따른 ANG의 정량분석이 필요하리라 사료된다. 단일밴드로 분리 정제된 ANG의 N-말단 15개 아미노산 sequence 분석 결과는 Table 2에 나타나 있다. Table 2는 Maes 등(1988)이 보고한 내용과 비교한 것으로 1번 아미노산인 alanine으로부터 15번 아미노산인 tyrosine까지 동일한 것으로 밝혀졌다. 이와 같이 아미노산 sequence가 동일하게 나타나므로 ANG으로 확인되었고 높은 순도로 정제되었음을 확인 할 수 있었다. 한편, bovine ANG은 125개의 아미노산 잔기로, human ANG은 123개의 아미노산 잔기로 각각 구성되

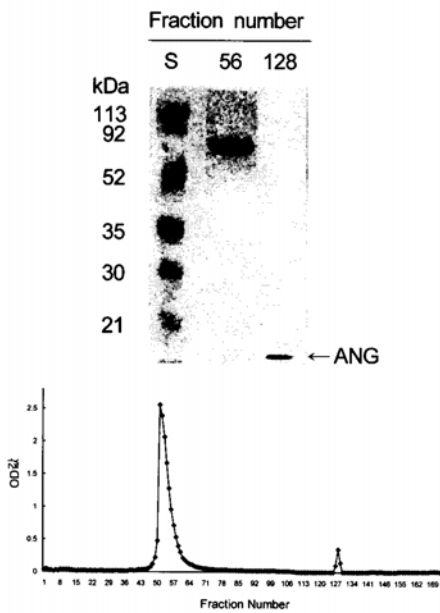


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of selected column fraction from Sephadex G-75 gel filtration chromatography. The column was eluted with 50 mM sodium phosphate buffer at a flow rate of 16 ml/hr.

Table 1. Purification of angiogenin from bovine milk

Purification step	Protein(mg)	ANG(ug)
Bovine milk whey	5,500	-
CM-Sepharose	750	-
FPLC Mono-S	14	-
Gel filtration	0.08	80

Table 2. Comparison of amino acid sequence of angiogenin

	N-terminal Amino acid sequence of angiogenin														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
*Maes, et al.(1988)	A	Q	D	D	Y	R	Y	I	H	F	L	T	Q	H	Y
Nam	A	Q	D	D	Y	R	Y	I	H	F	L	T	Q	H	Y

어 있고 두 단백질은 64%의 높은 상동성을 나타내고 있다(Strydom et al, 1985; Maes et al, 1988).

IV. 요약

본 연구는 우유의 angiogenin(ANG) 생리활성기능을 조사하기 위한 전단계로 ANG 정제 방법을 확립하기 위하여 실시하였다. 우유로부터 ANG을 CM-Sepharose ion exchange chromatography, HPLC, Gel-filtration의 3단계 방법을 이용하여 정제하였다. 1단계인 CM-Sepharose ion exchange chromatography를 수행한 결과 0.6 M NaCl 농도의 36번 분획에서 ANG의 밴드를 볼 수 있었고 2단계인 Mono-S 컬럼을 이용하여 HPLC를 수행한 결과에서는 1.0 M에서 하나의 peak가 분리되었고 전기영동 결과는 LF와 ANG 두 가지 성분이 함유되어 있음을 확인하였다. 마지막 단계인 Gel-filtration을 수행한 결과 ANG이 단일 밴드로 분리되었다. 우유 10 l로부터 약 80 ug의 ANG를 얻었고 정제된 ANG을 N-말단 아미노산 배열을 분석한 결과 AQDDYRYIHFLTQHY로 밝혀졌다.

V. 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(R11-2002-100-00000-0) 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

VI. 인용 문헌

1. Blaser, J., Triebel, S., Kopp, C. and Tschesche, H. 1993. A highly sensitive immunoenzymometric assay for the determination of angiogenin. Eur. J

Clin. Chem. 31:513-516.

2. Bond, M. S. and Valle, B. L. 1988. Isolation of bovine angiogenin using a placental ribonuclease inhibitor binding assay. Biochemistry. 27:6282-6287.

3. Fett, J. W., Strydom, D. J., Lobb, R. R., Alderman, E. M., Bethune, J. L., Riordan, J. F. and Vallee, B. L. 1985. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenin protein from human carcinoma cells. Biochemistry. 24:5480-5486.

4. Maes, P., Damart, D., Rommens, J., Montreuil, J., Spick, G. and Tartar, A. 1988. The complete amino acid sequence of bovine milk angionin. FEBS. 241:41-45.

5. Moroianu, J. and Riordan, J. F. 1994. Identification of the nucleolar targeting signal of human angiogenin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 203:1765-1772.

6. Moroianu, J. and Riordan, J. F. 1994. Nuclear translocation of angiogenin in proliferating endothelial cells is essential to its angiogenic activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:1677-1681.

7. Olson, K. A., Fett, J. W., French, T. C., Key, M. E. and Vallee, B. L. 1995. Angiogenin antagonists prevent tumor growth *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:442-446.

8. Rustamian L., Shalygina A. M., Tikhomirova N. A., Rabinovich M. L., pleshanov A. N. and Komolova G. S. 1999. Immunoenzyme analysis of angiogenin in cow's milk. Prikl Biokhim Mikrobiol. 35:105-108.

9. Rybak, S. M., Fett, J. W., Yao, Q. Z. and Vallee, B. L. 1987. Angiogenin mRNA in human tumor and normal cells. Biochem Biophys Res Commun. 46:1240-1248.

10. Shapiro, R., Riordan, J. F. and Vallee, B. L. 1986. Characteristic ribonucleolytic activity of human angiogenin. Biochemistry. 25:3527-3532.

11. Shapiro, R. and Vallee, B. L. 1992. Identification of functional arginines in human angiogenin by site-directed mutagenesis. Biochemistry. 31:12477-12485.

12. Shimoyama, S., Gansauge, F., Gansauge, S., Negri,

- G., Oohara, T. and Beger, H. G. 1996. Increased angiogenin expression in pancreatic cancer is related to cancer aggressiveness. *Cancer Research*. 56:2703-2706.
13. Strydom, D. J., Fett, J. W., Lobb, R. R., Alderman, E. M., Bethune, J. L., Riordan, J. F. and Vallee, B. L. 1985. Amino acid sequence of human tumor derived angiogenin. *Biochemistry*. 24: 5486-5494.
14. Weiner, H. L., Weiner, L. H. and Swain, J. L. 1987. Tissue distribution and developmental expression of the messenger RNA encoding angiogenin. *Science*. 237:280-282.
- (접수일자 : 2003. 10. 9. / 채택일자 : 2004. 1. 8.)