

$\alpha 1$ -antitrypsin의 생산 및 구조변형 연구

Production and Structural Studies of $\alpha 1$ -antitrypsin

연구기관
한국과학기술연구원
부설 유전공학센터

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 " α 1-antitrypsin의 생산 및 구조변형 연구"
사업의 최종보고서로 제출합니다.

1990. 2.

주관연구기관명 : 한국과학기술연구원 유전공학센터

총괄연구책임자 : 유명희 (유전공학센터 선임연구원)

연 구 원 : 이기녕 (유전공학센터 연구원)

신화수 (유전공학센터 연구원)

김진미 (유전공학센터 연구원)

요약문

I. 제목

α 1-antitrypsin의 생산 및 구조변형 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

본 연구에서는 호흡기종치료제인 α 1-antitrypsin을 유전공학적 기법을 통하여 생산하고자 한다. α 1-antitrypsin은 기존 생산방법이 사람피에서 분리정제하는 것으로서 원료의 제한, 그로 인한 고가의 생산단가, 그리고 다른 전염성 세균이나 바이러스의 감염 등과 같은 문제점 때문에 대부분의 다른 blood product들처럼 유전공학적 기법을 이용하여 미생물이나 고등동물 세포배양으로부터 생산하는 것이 안전하다. 본 연구의 제 2차년도 연구목표는 이미 확보된 인체 α 1-antitrypsin의 cDNA를 대장균 및 효모에서 보다 높은 수율로 발현시키는 데 있다.

III. 연구개발의 내용과 범위

1) 대장균에서 인체 α 1-antitrypsin 유전자의 발현 최적화

1. 파지 T7 프로모터 시스템을 이용한 α 1-antitrypsin cDNA의 클로닝
2. 대장균에서 재조합 인체 α 1-antitrypsin의 발현

2) 효모에서 인체 $\alpha 1$ -antitrypsin 유전자의 발현연구

1. 효모 발현벡터를 이용한 $\alpha 1$ -antitrypsin cDNA의 클로닝
2. 발현벡터에 적합한 효모 균주의 개발
3. 효모에서 재조합 인체 $\alpha 1$ -antitrypsin의 발현

IV. 연구개발 결과 및 건의

본 연구에서는 인체 $\alpha 1$ -antitrypsin 유전자를 대장균 및 효모에서 발현하는 것을 시도하였다. 대장균에서 T7 RNA polymerase 시스템을 이용하여 발현하였을 때 유전자서열 앞부분에 T7 파지의 major capsid 단백질로부터 유래한 10여개의 아미노산잔기가 융합되었을 경우에 최대의 발현수율 (총 세포단백질의 약 40%정도)을 나타내었지만 활성이 없는 inclusion body 상태로 생산되었다. 하지만 $\alpha 1$ -antitrypsin 구조유전자서열만을 다른 유전자와 융합되지 않은 상태로 발현시켰을 때에는 발현수율이 다소 감소하기는 하였어도 (약 20%) 활성이 있는 native 형태로 생산되었다. 대장균에서 생산된 재조합 $\alpha 1$ -antitrypsin은 SDS-polyacrylamide gel 전기영동 방법으로 분석한 결과 사람피에서 정제된 authentic $\alpha 1$ -antitrypsin 보다 분자량이 작은 것으로 나타났는데, 이는 대장균 세포내에서 발현된 $\alpha 1$ -antitrypsin이 glycosylation이 안 된, 하지만 활성을 지닌 형태의 것임을 알 수 있었다.

효모에서 $\alpha 1$ -antitrypsin을 발현시키기 위해서는 GAL10/CYC1 프로모터 시스템을 이용하였는데 이때 발현된 $\alpha 1$ -antitrypsin을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동방법으로 분석한 결과 Coomassie Brilliant blue로 염색하였을 때는 검색이 불가능하였지만 Western blot

결과 발현을 확인할 수 있었다. 발현된 $\alpha 1$ -antitrypsin은 glycosylation이 안 된 상태이며 대장균에서 발현된 것보다 SDS-polyacrylamide gel 상에서 분자량이 더 작은것으로 나타났는데, 이는 효모에서 사용된 ATG코돈이 대장균에서 사용된 것과 다르기 때문이거나 아니면 숙주 효모의 프로테아제에 의한 공격때문으로 간주된다.

종합하여 볼 때 대장균에서 재조합 $\alpha 1$ -Antitrypsin을 총 세포단백질의 20% 정도의 수율로 활성이 있는 형태로 생산하는데 성공하였는데 생산되는 $\alpha 1$ -antitrypsin은 glycosylation이 안되어서 단백질 stability가 authentic $\alpha 1$ -AT보다 낮을 것으로 예상되며, 효모 시스템에서는 발현수율이 훨씬 떨어졌지만 glycosylation 시킬 수 있다는 가능성이 있다. 앞으로의 연구는 대장균에서 발현되는 $\alpha 1$ -antitrypsin을 DNA변이를 통해 stability를 증가시키는 연구와 효모에서 발현 및 분비 효율을 증가시키는 방향으로 진행시키는 것이 바람직하다고 생각된다.

SUMMARY

I. Title

Production and Structural Studies of α 1-antitrypsin

II. Aims of Research

Goal of the present research is to produce recombinant human α 1-antitrypsin in microorganisms. The α 1-antitrypsin is a therapeutic protein for emphysema and has been obtained from human blood. However, the problems associated with use of human blood products made researchers seek for an alternative way of α 1-antitrypsin production via recombinant DNA technology. In the second year of the research, we expressed α 1-antitrypsin cDNA in E. coli and yeast, which had been isolated previously from human liver cDNA library.

III. Scope and Contents

- 1) Optimizing the expression of human α 1-antitrypsin gene in E. coli
 1. Cloning of human α 1-antitrypsin cDNA under phage T7 promoter system

2. Synthesis of recombinant human α 1-antitrypsin in E. coli
-
- 2) Expression of human α 1-antitrypsin cDNA in yeast
 1. Cloning of human α 1-antitrypsin cDNA onto an yeast expression plasmid
 2. Construction of a suitable host strain for the expression plasmid
 3. Synthesis of human α 1-antitrypsin in yeast

IV. Results and Recommendations

We attempted to produce human α 1-antitrypsin in E. coli and yeast. The maximum yield of expression (40% of total cellular proteins) was achieved by cloning the gene under phage T7 promoter system. The construction yielded a α 1-antitrypsin polypeptide in which 14 amino acid residues of amino terminal portion of T7 major capsid protein was fused in front of the structural protein. The recombinant fusion polypeptides aggregated inside the host E. coli cells and form inclusion bodies. However when the α 1-antitrypsin structural gene was expressed without any fusion, the recombinant protein was produced as a soluble and active form, though the expression yield decreased down to 20% of total cellular proteins. According to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, the size of recombinant α 1-antitrypsin synthesized in E. coli was smaller than

that of authentic protein, which presumably due to lack of glycosylation inside *E. coli*.

In order to express α 1-antitrypsin in yeast cells the gene was cloned under GAL10/CYC1 promoter. The expression could be detected not by SDS-polyacrylamide gel stained with Coomassie Brilliant Blue, but by Western blot analysis. The recombinant α 1-antitrypsin synthesized in yeast was not glycosylated. It was slightly smaller than that of *E. coli*, which was presumably due to the usage of an alternative ATG start codon or partial proteolytic degradation in yeast cells.

In summary, we succeeded in producing recombinant human α 1-antitrypsin in *E. coli* as a soluble native form with a yield of 20% of total cellular proteins. Recombinant α 1-antitrypsin synthesized in *E. coli* probably has lower stability than authentic protein due to lack of glycosylation. In yeast cells, though the expression yield was much lower, it has potential to produce α 1-antitrypsin as a glycosylated form, if a proper signal sequence is attached in front of structural gene. In the future, we plan to increase the stability of α 1-antitrypsin produced in *E. coli* by DNA mutagenesis. It will be also essential to produce the recombinant protein as a glycosylated form with a high expression yield in yeast.

CONTENTS

Chapter I. Introduction	15
Chapter II. Materials and Methods	19
1. Materials	19
2. Methods	20
Chapter III. Results and Discussion	23
1. Optimizing the expression of human α 1-AT gene in E. coli	23
1.1. Cloning of α 1-AT cDNA under phage T7 promoter system	23
1.2. Synthesis of recombinant human α 1-AT in E. coli	26
2. Expression of human α 1-AT gene in yeast	33
2.1. Cloning of α 1-AT cDNA onto an yeast expression vector	33
2.2. Construction of a suitable host strain for the expression plasmid	35
2.3. Synthesis of recombinant human α 1-AT in yeast	35
Chapter IV. Conclusions and Recommendation	40
References	41

목 차

제 1 장 서 론	15
제 2 장 실험재료 및 방법	19
제 1 절 실험재료	19
제 2 절 실험방법	20
제 3 장 결과 및 고찰	23
제 1 절 대장균에서 인체 $\alpha 1$ -AT 유전자의 발현 최적화	23
1. 1 파지 T7 프로모터 시스템을 이용한 $\alpha 1$ -AT cDNA의 클론닝	23
1. 2 대장균에서 재조합 인체 $\alpha 1$ -AT의 발현	26
제 2 절 효모에서 인체 $\alpha 1$ -AT 유전자의 발현연구	33
2. 1 효모 발현벡터를 이용한 $\alpha 1$ -AT cDNA의 클론닝	33
2. 2 발현벡터에 적합한 효모 균주의 개발	35
2. 3 효모에서 재조합 인체 $\alpha 1$ -AT의 발현	35
제 4 장 결론 및 건의	40
.....	41

제1장 서론

α 1-antitrypsin (α 1-AT)은 혈장내에 존재하는 여러종류의 프로티아제 저해제들 중 하나로 생체내에서의 역할은 elastic tissue를 프로티아제의 공격으로부터 보호하는 반면에, 염증이 생긴 부위에서는 불활성화되어 세포가 프로티아제에 의해 액체화되어 주위 세포로부터 분리되는 것을 도와준다 (1). α 1-AT는 트립신, 카이모트립신, 일레스타제, 콜라게네이즈, 트롬빈, 플라스민과 같은 대부분의 세틴프로티아제에 대해 저해작용을 가지지만 특히 neutrophil leucocyte로부터 분비되는 일레스타제에 대한 저해제로서 기능이 중요하다. α 1-AT는 유전자의 선천적 결핍증이나 많은양의 흡연 또는 심한 환경공해로 인해 혈장내에서 활성이 있는 형태의 양이 상대적으로 감소하게 된다. 결과적으로 이에 따른 프로티아제-저해제 균형이 깨져 허파는 신축성을 잃게되고 난치병인 emphysema (호흡기종)로 발전하게 된다. 따라서 이와같은 질병을 치료하고 예방하기 위해 α 1-AT를 피에서 분리정제하여 치료제로 사용하거나 (2) 또는 분자량이 작은 효과적인 저해제 유사체를 개발하는 것이 연구되어 왔다 (3).

α 1-AT의 일차구조는 아미노산 서열분석과 cDNA 서열분석에 의해 결정되었는데, 394개 아미노산으로 구성되어 있으며 아미노말단에는 24개의 소수성이 큰 아미노산잔기로 구성된 signal peptide가 존재한다 (1). α 1-AT 폴리펩타이드는 세개의 탄수화물 사슬이 달려있으며 native상태의 α 1-AT는 단합체 (monomer)로서 수용성이 큰 globular 형태의 단백질이다. α 1-AT 분자의 활성부위는 358번의 메치오닌잔기 주위이며 기질인

프로티아제와 1:1 복합체를 형성한다. α 1-AT는 최근 X선 결정구조가 밝혀졌는데 β -sheet이 40%, α -helix가 30%정도로 그 구조가 상당히 ordered된 상태이다 (4).

α 1-AT의 아미노산 서열을 살펴보면, antithrombinIII와 ovalbuman의 아미노산 서열과 상당히 유사하여 새로운 superfamily를 형성하는것을 알수 있다 (1). 이들 외에도 angiotensinogen (5), α 1-antichymotrypsin (6) 및 혈장응고, complement system 그리고 inflammation에 관련된 프로티아제들에 대한 저해제들의 대부분도 이 superfamily에 속하는 것으로 간주된다 (7, 8). 이들 각각 단백질 사이의 아미노산 서열의 homology는 30% 내외인데 소수성이 큰 아미노산 잔기들만 고려해 볼때 그 homology가 70% 정도이므로 단백질 내부에 존재하는 잔기들이 보존되어 그 3차 구조가 비슷할 것으로 예상된다 (9). 그리고 이들이 작용하는 프로티아제가 모두 활성부위세틴을 가지고 있다는 점에서 이들이 속하는 superfamily를 serpin (serine protease inhibitor)이라고 명명하였으며 그 P1 잔기에 따라 α 1-AT는 Met serpin이고 antithrombin은 Arg serpin이라 하였다. 이와같은 것을 고려해 볼 때 한 저해제의 활성부위 잔기를 치환함으로써 기질특이성을 쉽게 전환시킬수 있는 가능성이 있다는 것을 알수있다.

α 1-AT 유전자에는 자연형인 M 타입 외에 두 종류의 유전적 변이형이 존재하는데 S 타입 (Glu324 \rightarrow Val)은 혈장속의 α 1-AT양이 M 타입에 비해 60%, Z 타입 (Glu342 \rightarrow Lys)은 15%정도 밖에 존재하지 않는다 (1). 이렇게 생산량이 감소된 원인은 S 타입의 경우 아미노산 잔기 치환결과 단백질 안정도가 떨어졌으며 (10) 또 최근에 밝혀진 바에 의하면 염기치환에 의해

없었던 intron splicing자리가 생성된 것이 원인이 된다고 알려졌다 (11). Z 타입의 폴리펩타이드 경우는 간세포 안에 granule 형태로 존재하는데 (12), in vitro 에서의 실험결과 Z 폴리펩타이드는 자연형과 마찬가지로 정상적으로 탄수화물이 첨가되었지만 (13) in vivo 실험에서는 정상적인 분비가 되지 않으며 그에 따라서 탄수화물 첨가도 되지않는 것을 알 수 있었다 (14). Glu342는 활성부위구조에 영향을 주는 hinge에 위치하고 있는데 이 글루탐레이트 잔기는 저해제 family 전체에 모두 보존되어 있다. Z 타입 폴리펩타이드 중 일부 (15%)는 활성이 있는 형태로 만들어지는데 일단 만들어진 것은 안정도가 자연형 $\alpha 1$ -A와 같다. 따라서 Carrell등은 (15) Z 폴리펩타이드가 folding 또는 secretion defect가 있다고 제의했다. 이와같은 Z 타입이 존재하는 경우는 혈장에 $\alpha 1$ -AT의 부족으로 인해 emphysema와 같은 질병을 초래한다. 최근 Z 타입 폴리펩티드의 결함을 억제할 수 있는 또 다른 변이를 Z 타입 유전자 내에 삽입해서 파괴된 Glu342-Lys290 salt bridge를 Lys342-Glu290 치환으로 회복시킴으로써 그 salt bridge가 폴딩 및 분비에 중요함을 증명하였다 (16).

$\alpha 1$ -AT는 세린프로티아제의 저해제로서 단백질의 구조-기능 관계 및 단백질-단백질 상호작용의 연구에도 좋은 모델이 된다. 최근 $\alpha 1$ -AT에 대한 단백질공학 연구가 활발히 진행되고 있는데, 예를 들어 산화가 잘 되는 활성잔기 Met358을 Arg358로 치환하여 산화에 저항성이 강한 변이단백질을 생산할 수 있었다 (17). 또한 인체 $\alpha 1$ -AT 유전자를 transgenic mouse에서 발현시키는데 성공하였는데 (18), 특히 Z 타입 인자는 transgenic mouse 내에서 신생아 간염을 유발시키기 때문에 이 질병의 동물모델로 이용될 수 있음을 시사하였다.

α 1-AT 단백질은 그 원료가 사람혈액인 blood product의 일종으로서 원료의 제한 및 다른 전염세균 또는 바이러스의 감염과 같은 문제와 halflife가 6일뿐인 점 때문에 현재로서는 유전공학기법을 통한 생산이 안전하고 경제적인 것으로 간주되고 있다. 보고된 바에 의하면 α 1-AT 유전자를 대장균 (19 - 23) 또는 효모 (17, 24 - 26)에서 발현시켰을 때 탄수화물이 부착되지 않은 상태로 생산되는데, 이러한 형태의 α 1-AT는 활성은 지니고 있지만 안정도가 떨어짐을 알 수 있었다. 본 연구에서는 인체 α 1-AT의 유전자를 확보하고 이를 재조합하여 미생물에서 발현시키는 것을 시도하였다. 이와같은 연구는 DNA 변이를 통해 기능이나 안정도가 개선된 단백질을 생산하는데에 기본이 될 것이다.

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절 실험재료

균주 및 플라스미드 - 사용한 대장균 균주는 E. coli JM109 [recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, strA, sbcB, Δ (lac, proAB), F'(traD36, proAB, lacI^q, lacZΔM15)], E. coli K12 strain HMS174 (F-, recA, r-K12,m+k12, Rif^R), 및 E. coli B strain BL21 (F-, ompT, r-Bm-B) 등이다. HMS174는 pET 벡터의 클로닝 및 유지에 사용되었으며 BL21은 lon 프로티아제가 생성안되고 outer membrane의 프로티아제인 ompT가 결여되어서 재조합단백질의 발현 및 정제에 유리하게 사용될 수 있다. BL21(DE3)는 BL21 균주에 파지 탐다의 유도체인 DE3가 lysogenic상태로 포함되어 있는데 DE3는 lacI의 유전자, lacUV5 프로모터, 및 T7 RNA polymerase 유전자가 탐다의 int 유전자 내에 삽입된 것이다 (27). 균주 BL21(DE3)pLysE는 T7 lysozyme 유전자가 클론된 pLysE를 지닌 균주이며, BL21(DE3)pLysS는 T7 lysozyme이 플라스미드에 거꾸로 삽입되어 소량 발현되는 상태의 균주이다 (27). 플라스미드 pUC-AT(R)는 이미 보고된 바와 같이 인체 간 cDNA library로부터 스크린 된 α 1-AT cDNA를 pUC9에 클론한 것이며 (28), 플라스미드 pET (27) 및 pLGSD5 (29)에 대해서는 다른 문헌에 상세히 보고되어 있다.

제한효소들, E. coli DNA polymerase I large fragment (Klenow), T4 DNA ligase, S1 nuclease, T4 polynucleotide kinase, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (XGal),

isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) 등은 New England Biolabs, Bethesda Research Laboratories, Promega Biotech, Amersham 또는 KOSCO에서 구입하였다. DNA sequencing kit, ATP 및 32 P로 표지된 nucleotide들은 Amersham으로부터 구입하였으며 sequencing primer와 reverse primer는 New England Biolab으로부터 구입하였다. 인체 α 1-AT, porcine elastase, succinyl-(L-alanyl) $_3$ -p-nitroanilide, anti- α 1-AT rabbit antibody, peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG goat antibody, bovine serum albumin 및 ampicillin 등은 Sigma Chemical company로부터 구입하였다.

제 2 절 실험방법

1. 클로닝 방법

유전자 클로닝에 필요한 모든 효소반응은 Maniatis 등 (30)의 방법에 의해 행하여졌다. 재조합 DNA에 의한 대장균의 형질전환은 CaCl_2 방법 (31)으로 행하였다. 효모의 형질전환은 Ito 등의 방법 (32)으로 행하였으며 재조합 균주들은 적당한 단순배지에서 선별하였다.

2. Gal⁺ 효모 균주의 개발

효모 균주의 cross 및 사포자분석법은 Sherman 등의 방법 (33)을 따랐으며 특히 sporulation은 균주를 presporulation 고체배지(0.8% bacto-yeast extract, 0.3% bacto-peptone, 10% dextrose, 2% bacto-agar)에서 2 일간 배양 후 고체배지 (1% potassium acetate, 0.1% bacto-yeast

extract, 0.05% dextrose, 2% bacto-agar)에서 3일간 배양하여 시행하였다. 효모 균주의 Gal⁺ 형질에 대한 판별은 갈락토즈 고체배지 (1% bacto-yeast extract, 2% bacto-peptone, 0.4% brom cresol purple, 2% bacto-agar)에 streaking 한 후 하루 간격으로 colony를 관찰함으로써 갈락토즈 분해에 따라 indicator인 brom cresol purple이 노란색으로 변하면 Gal⁺로 판정하였다.

3. DNA 서열분석

DNA 서열분석은 Sanger 등의 chain termination 방법 (34)에 의해 행하였다.

4. α 1-AT의 활성측정

α 1-AT의 활성측정은 Travis와 Johnson의 방법 (35)을 약간 변형시켜 행하였다. 완충용액 (0.1M Tris-HCl, 0.5M NaCl)에 들어있는 elastase (0.18mg/ml) 50ul와 같은 완충용액에 들어있는 α 1-AT 용액과 1분동안 반응시키고, elastase의 기질인 succinyl-(L-alanyl)₃-p-nitroanilide (40mM)을 20ul 가하고 잘 섞은 후 spectrophotometer를 사용하여 410nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 elastase의 잔여활성을 결정했다. 이때 전체 반응액의 부피는 1ml로 하며, α 1-AT 용액의 양을 변화시키면서 elastase 효소활성의 감소를 측정함으로써 α 1-AT에 의한 억제 곡선을 결정할 수 있었다. 효모 추출액의 경우에는 1.8 ug의 elastase와 임의의 양의 세포추출액을 완충용액에 녹여 부피가 500ul 되도록하여 1분간 반응시키고 기질(40mM) 20 ul 및 완충용액 480ul를 넣어 잘 섞은 후 410nm에서 흡광도의 변화를 1 분간 측정하여 계산하였다.

5. 전기영동 및 웨스턴 블랏

SDS-polyacrylamide gel 전기영동은 Laemmli의 방법에 의해 행하였으며 (36), 웨스턴 블랏은 펄옥시다제가 연결된 항체를 사용하여 Towbin의 방법에 의해 행하였다 (37).

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 대장균에서 인체 $\alpha 1$ -Antitrypsin 유전자의 발현최적화

1.1. 파지 T7 프로모터 시스템을 이용한 인체 $\alpha 1$ -Antitrypsin cDNA의 클로닝

$\alpha 1$ -AT cDNA 유전자를 인체 간 cDNA library에서 스크린하여 대장균내에서 tac 프로모터의 조절하에 발현을 시도하였으나 그 수율이 낮아 웨스턴 블랏을 이용하여 검색될 정도 였다 (28). 따라서 $\alpha 1$ -AT를 대장균내에서 높은 수율로 생산하기 위해서 파지 T7의 프로모터 시스템을 이용하고자 하였다. 플라스미드 pET-3b는 pBR322의 tet 유전자 부위에 파지 T7의 프로모터가 그림1에서와 같이 삽입되어 있는데, pUC-AT(R) 플라스미드로부터 얻은 $\alpha 1$ -AT를 코드하는 1.3 kb BamHI 절편을 pET-3b의 BamHI 부위에 삽입하여 연결시킨 후, 대장균 균주 HMS174에 형질전환하였다. 얻어진 재조합 균주로부터 플라스미드를 분리하여 제한효소 분석법에 의해 $\alpha 1$ -AT 유전자가 올바른 방향으로 삽입된 것을 선별하여 (그림2) pEAT3라 명명하였다. 이와같이 제조된 pEAT3플라스미드에 의해 코드되는 $\alpha 1$ -AT는 그림1의 상단에서 보는바와 같이 $\alpha 1$ -AT 구조단백질 앞에 12개의 아미노산이 융합된 상태의 폴리펩티드가 된다.

$\alpha 1$ -AT 구조유전자를 다른 아미노산이 융합되지 않은 상태로 발현시키기 위해 플라스미드 pET-8c를 이용하였다. 그림3에서와 같이 플라스미드 pET-8를 NcoI으로 절단한 후 클리나우 효소로 처리하여 끝

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
	Met	Ala	Ser	Met	Thr	Gly	Gly	Gln	Gln	Met	Gly	Arg	Asp
<u>AAGGAGATATACATATG</u>	<u>GCT</u>	<u>AGC</u>	<u>ATG</u>	<u>ACT</u>	<u>GGT</u>	<u>GGA</u>	<u>CAG</u>	<u>CAA</u>	<u>ATG</u>	<u>GGT</u>	<u>CGG</u>	<u>GAT</u>	<u>CC</u>
SD	NdeI	NheI										BamHI	

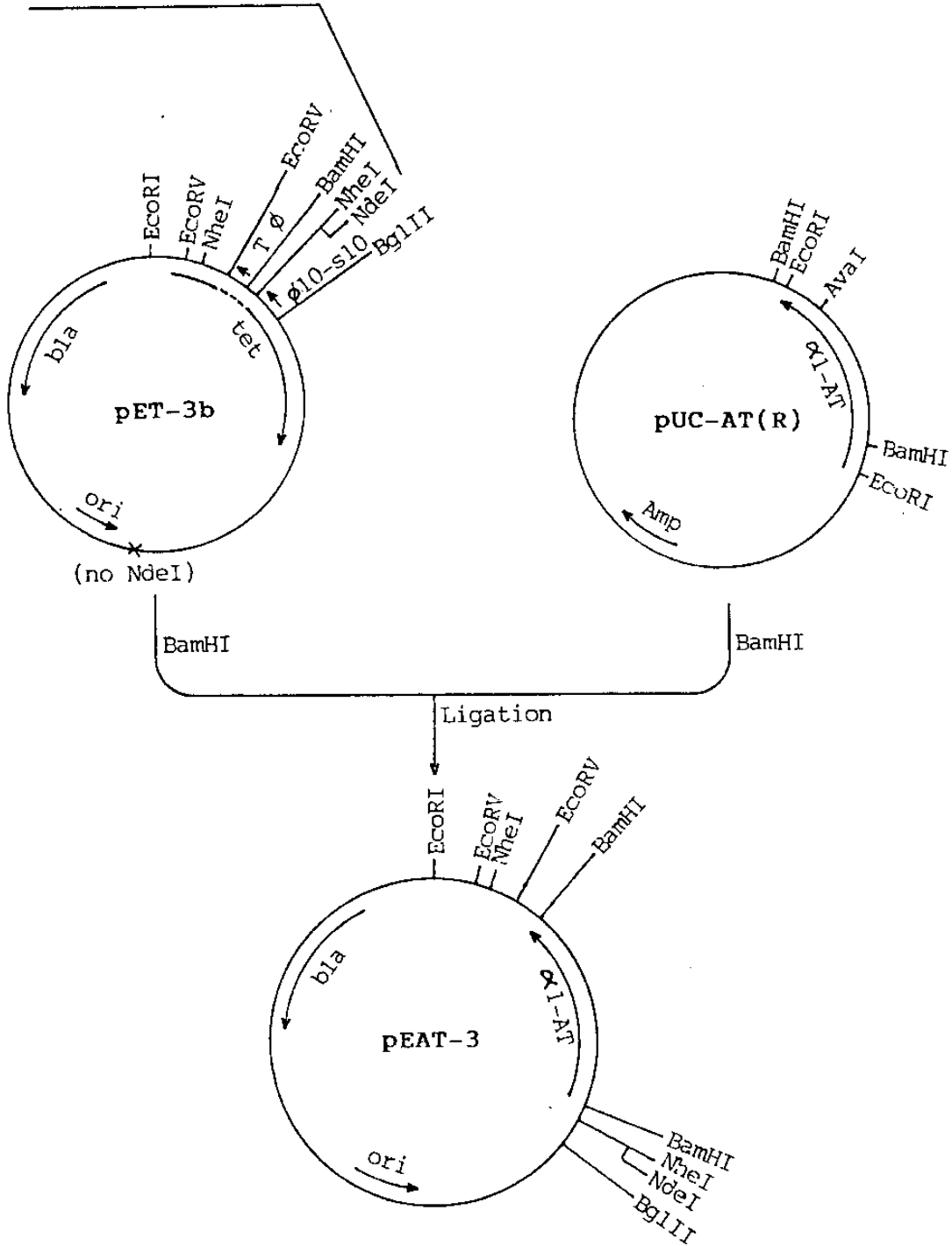
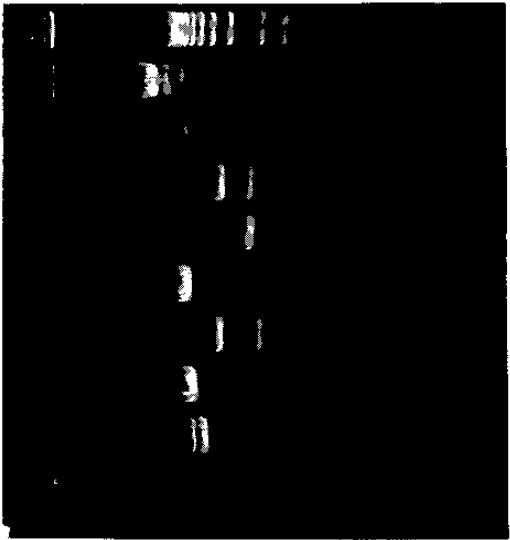


그림 1. 플라스미드 pEAT3의 제조방법.

1 2 3 4 5 6 7 8 9



1X agarose gel pEAT3
1: BamHI
2: EcoRI
3: PvuII
4: PstI
5: PstI-AvaI
6: AvaI
7: PstI
8: HindIII
9: 1kb

그림 2. 제한효소 분석법에 의한 pEAT3 플라스미드의 확인.

부분을 blunt end로 전환 시켰다. 1.3 kb의 α 1-AT 유전자 역시 클리나우 효소로 처리하여 blunt end로 전환시킨 후 상기의 pET-8c DNA와 연결시켜 대장균 HB101에 형질전환시켰다. 얻어진 재조합 균주로 부터 플라스미드 DNA를 분리하여 제한효소 분석법에 의해 α 1-AT 유전자가 바른 방향으로 삽입된 것을 선별하여 (그림4) pEAT8이라 명명하였다. 이와 같이 제조된 pEAT8플라스미드에 의해 코드되는 α 1-AT는 그림3의 상단에서 보는 바와 같이 ATG 개시코돈에 의해 코드되는 매치오닌잔기 뒤에 α 1-AT 구조단백질의 두번째 잔기가 바로 연결되는 상태의 폴리펩티드가 된다.

1.2. 대장균에서 재조합 인체 α 1-Antitrypsin의 발현

앞에서 제조된 플라스미드 pEAT3 및 pEAT8에 의해 코드되는 α 1-AT를 대장균내에서 발현시키기 위해 각각의 플라스미드를 분리한 후 대장균 균주 BL21, BL21(DE3), BL21(DE3)/pLysS, 및 BL21(DE3)/pLysE에 형질전환 시켰다. 각각의 재조합 균주들이 α 1-AT를 생산할 수 있는가를 조사하기 위하여 이들 균주들을 37 °C에서 배양한 후 600nm에서 흡광도가 0.6정도 되었을 때, IPTG(2mM)을 넣어 재조합단백질의 생성을 유도 하였다. 배양을 4-6시간정도 더한뒤 세포추출액을 만들어 α 1-AT의 활성을 측정하였고 또한 SDS-polyacrylamide gel 전기영동법에 의해 재조합 α 1-AT의 생성을 확인하였다.

표 1에 각각 재조합 균주에서 생성된 α 1-AT의 활성이 정리되어 있는데, 발현벡터 pEAT3 및 pEAT8 모두에 의해 α 1-AT가 발현됨을 알 수 있었고, pEAT3보다는 pEAT8이 더 많은 양의 α 1-AT 활성을 생산함을 알 수 있었다. 상기 두 플라스미드가 T7 lysozyme을 발현하는 pLysS와 동시에

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
	Met	Ala	Ser	Met	Thr	Gly	Gly	Gln	Gln	Met	Gly	Arg	Ile
<u>AAGGAGATATACC</u>	<u>ATG</u>	<u>GCT</u>	<u>AGC</u>	<u>ATG</u>	<u>ACT</u>	<u>GGT</u>	<u>GGA</u>	<u>CAG</u>	<u>CAA</u>	<u>ATG</u>	<u>GGT</u>	<u>CGG</u>	<u>ATC</u>
SD	NcoI	NheI										BamHI	C

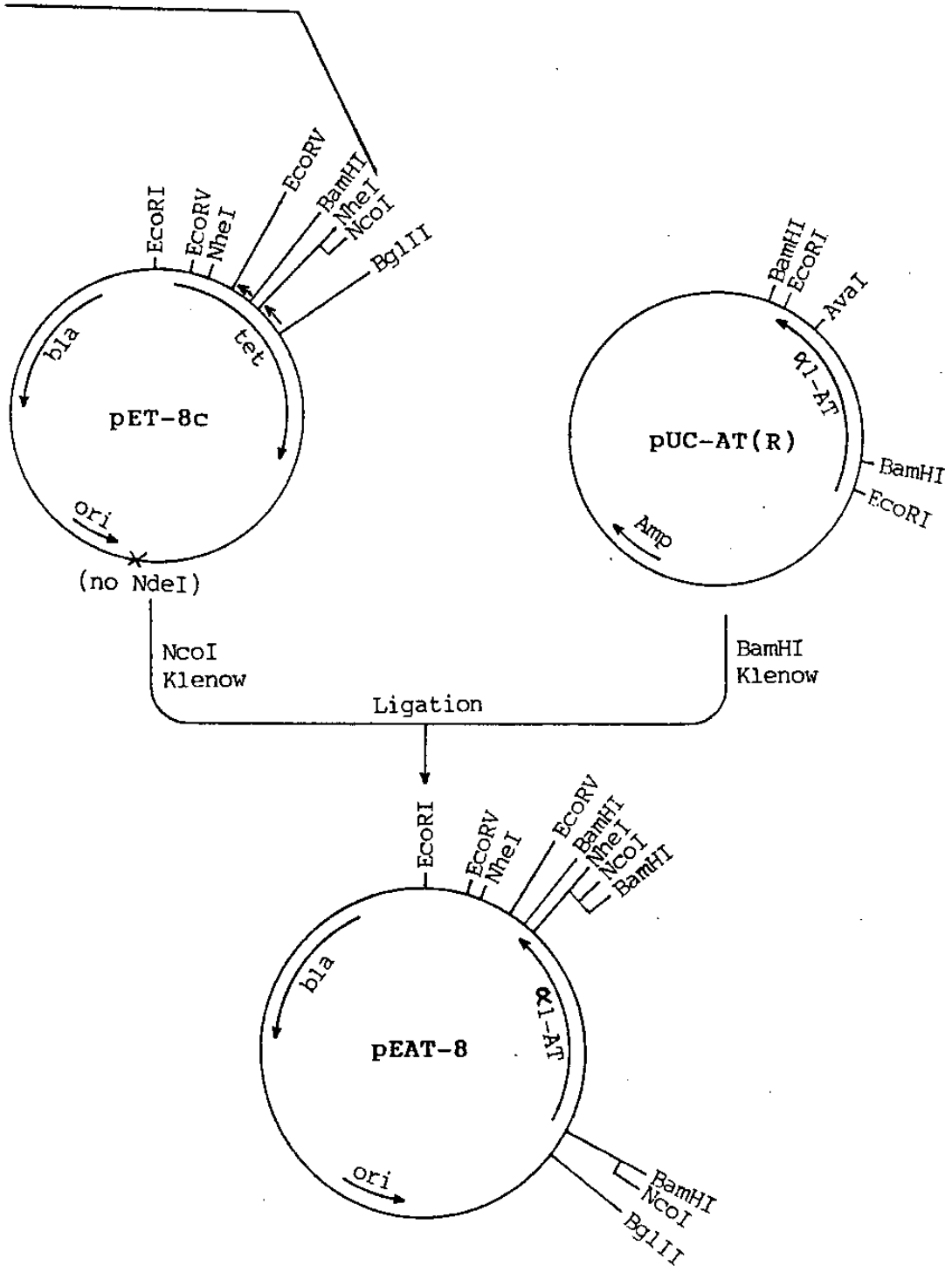
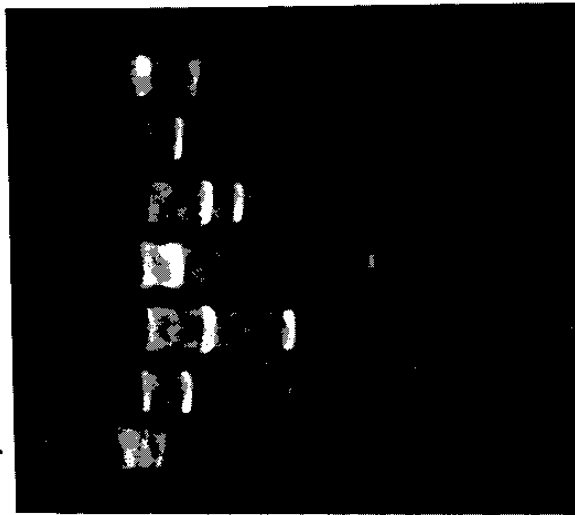


그림 3. 플라스미드 pEAT8의 제조방법.

1 2 3 4 5 6 7



1: Agarose Gel pEAT8
1: ϕ HindIII
2: BamHI
3: BamHI-PstI
4: EcoRI
5: Aval
6: PstI
7: pEAT8

그림 4. 제한효소 분석법에 의한 pEAT8 플라스미드의 확인.

존재할 때에도 lysozyme이 발현 안 될 때보다는 적지만 $\alpha 1$ -AT가 약간 발현되었고, 반면에 lysozyme이 많이 발현되는 pLysE가 동시에 존재할 때에는 $\alpha 1$ -AT가 전혀 생산되지 않았다.

이들 재조합 균주에서 단백질이 생성되는 것을 확인하였는데, 그림5에서 볼 수 있듯이 pEAT3에 의해 분자량 약 46 kDa 정도의 폴리펩티드가 유도되는 것을 알 수 있었으며 (lane 5), control 벡터인 pET3b가 존재하는 균주에서는 그 생성이 유도되지 않았다 (lane 3). 한편 pEAT8의 경우에도 IPTG에 의해 46 kDa 폴리펩티드의 생성이 유도되었으며 (lane 10), pEAT8와 pLysS가 동시에 존재할 때에도 그 폴리펩티드의 생성이 약간 유도되었다 (lane 12). 그러나 pEAT8이 pLysE와 동시에 존재할 때에는 46 kDa 폴리펩티드가 생성되지 않았다. 이러한 결과는 표 1의 $\alpha 1$ -AT 활성측정 결과와 잘 일치하고 있다. 재조합 단백질의 발현수율을 측정하기 위해 상기의 젤을 densitometry로 분석한 결과 표 1에 정리된 것과 같이 pEAT3을 지닌 균주에서는 총 세포단백질의 40% 정도가, pEAT8를 지닌 균주에서는 총 세포단백질의 25% 정도가 각각의 플라스미드에 의해 발현되었다. 발현된 46 kDa 폴리펩티드는 $\alpha 1$ -AT 유전자에 의해 코드되는 단백질의 기대했던 분자량과 동일하였으며 authentic $\alpha 1$ -AT보다는 그 크기가 작았는데, 이는 대장균 내에서 발현된 단백질이 glycosylation이 안되었기 때문으로 간주된다.

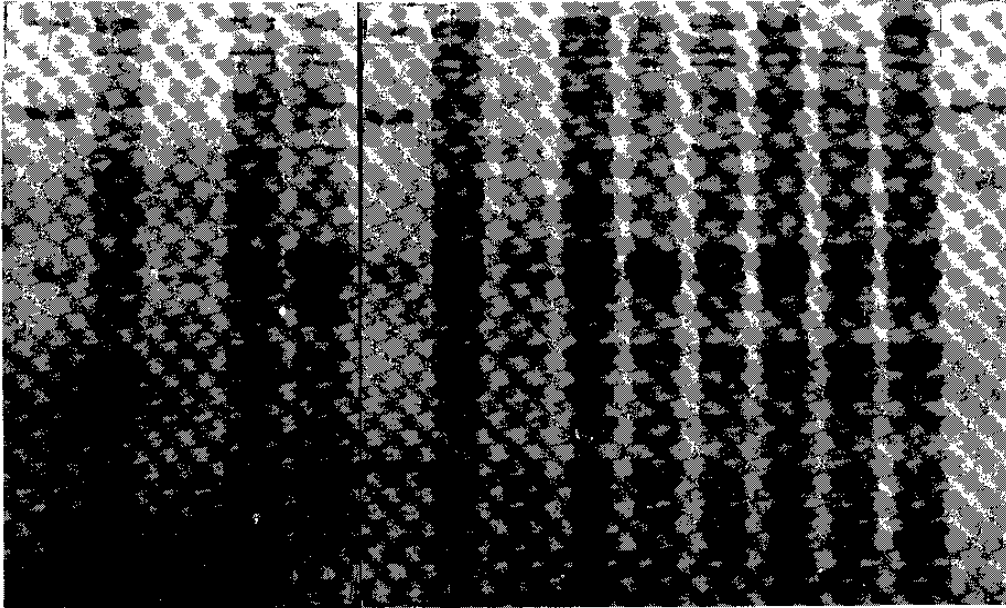
플라스미드 pEAT3에 의해 생성되는 폴리펩티드의 양은 pEAT8에 의해 발현되는 것보다 많지만 $\alpha 1$ -AT 활성은 더 적은 것으로 나타났다 (표1). 이와 같은 결과는 pEAT3에 의해 발현되는 $\alpha 1$ -AT의 일부가 세포 내에서 응집되어 inclusion body를 형성하는 것을 암시한다. 따라서 플라스미드 pEAT3 및 pEAT8에 의해 코드되는 재조합 $\alpha 1$ -AT가 세포내에서 inclusion

표1. 플라스미드 pEAT3 및 pEAT8에 의해 발현된 α 1-AT의 활성

Plasmid	% of Elastase Activity Remained		Relative Amount of α 1-AT (ug) per 0.3 ml Culture	% of Total Cellular Proteins*
	uninduced	induced		
pEAT-3	90%	25%	9	40%
pEAT-3, pLysS	100%	41%	7	8%
pEAT-3, pLysE	100%	100%	-	-
pEAT-8	100%	10%	12	25%
pEAT-8, pLysS	90%	61%	4.6	11%
pEAT-8, pLysE	95%	97%	-	-

* The amount of α 1-AT expressed was quantitated by densitometric scanning of SDS-polyacrylamide gel stained with Coomassie Brilliant blue.

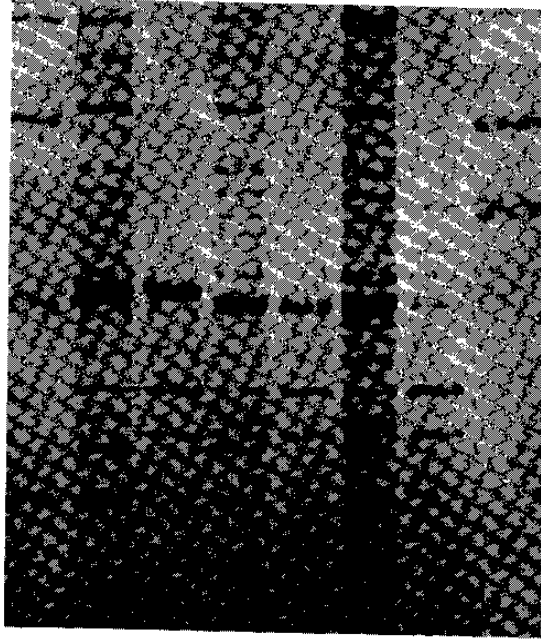
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



	-	+	-	+		-	+	-	+	-	+	-	+	
MW	pET-3b	pEAT-3			pET-8c	pEAT-8	pEAT-8	pEAT-8	pEAT-8	pLysS	pLysE			α 1-AT

그림 5. 전기영동법에 의한 α 1-AT 생산의 확인.

1 2 3 4 5 6 7 8



S P S P S P

MW pEAT-3 pEAT-8 pEAT-8 α 1-AT
pLysS

그림 6. 재조합 균주에 의해 생성되는 단백질의 분획.

body를 형성하는지 아니면 soluble한 형태로 생산되는지를 조사하기 위해 세포추출액을 원심분리하여 (12,000 x g, 5분) 상등액과 침전물로 분획한 후 SDS-polyacrylamide gel 전기영동법으로 분석하였다. 그림6에서 볼 수 있듯이 pEAT3에 의해 발현되는 폴리펩티드는 침전물로 떨어지고 (lane 3) 반면에 pEAT8에 의해 발현되는 폴리펩티드는 대부분이 상등액에 남아있는 것을 알 수 있다 (lane 4, lane 6). 이와 같은 차이점은 각각의 플라스미드에 의해 코드되는 아미노산서열의 차이에서 기인하는 것으로 간주되는데, pEAT3에 의해 코드되는 α 1-AT서열은 구조유전자 앞에 파지 T7 major capsid 단백질의 아미노말단서열 12개 잔기로 코드하는 서열이 융합되어 있다.

제 2 절 효모에서 인체 α 1-AT 유전자의 발현 연구

2.1. 효모 발현벡터를 이용한 α 1-Antitrypsin cDNA의 클로닝

효모에서 인체 α 1-AT cDNA를 발현시키기 위해 α 1-AT cDNA를 효모 발현벡터 pLGSD5에 클론하였다. 플라스미드 pLGSD5는 갈락토즈에 의해 유도되는 GAL10/CYC1 하이브리드 프로모터를 지니고 있으며 CYC1 유전자의 전사 및 번역개시 부위도 지니고 있었다 (29). 그림7에서와 같이 pUC-AT(R)에서 1.3 kb BamHI-SmaI 절편을 분리한 후 pLGSD5의 BamHI 과 PvuII부위 사이에 삽입하여 연결시킨 pGAT6를 제조하였다. 플라스미드 pGAT6의 α 1-AT는 ATG 개시코돈이후 연결된 α 1-AT의 구조유전자가 프레임이 맞지 않는 상태인데, 이를 프레임이 맞도록 BamHI으로 절단하고

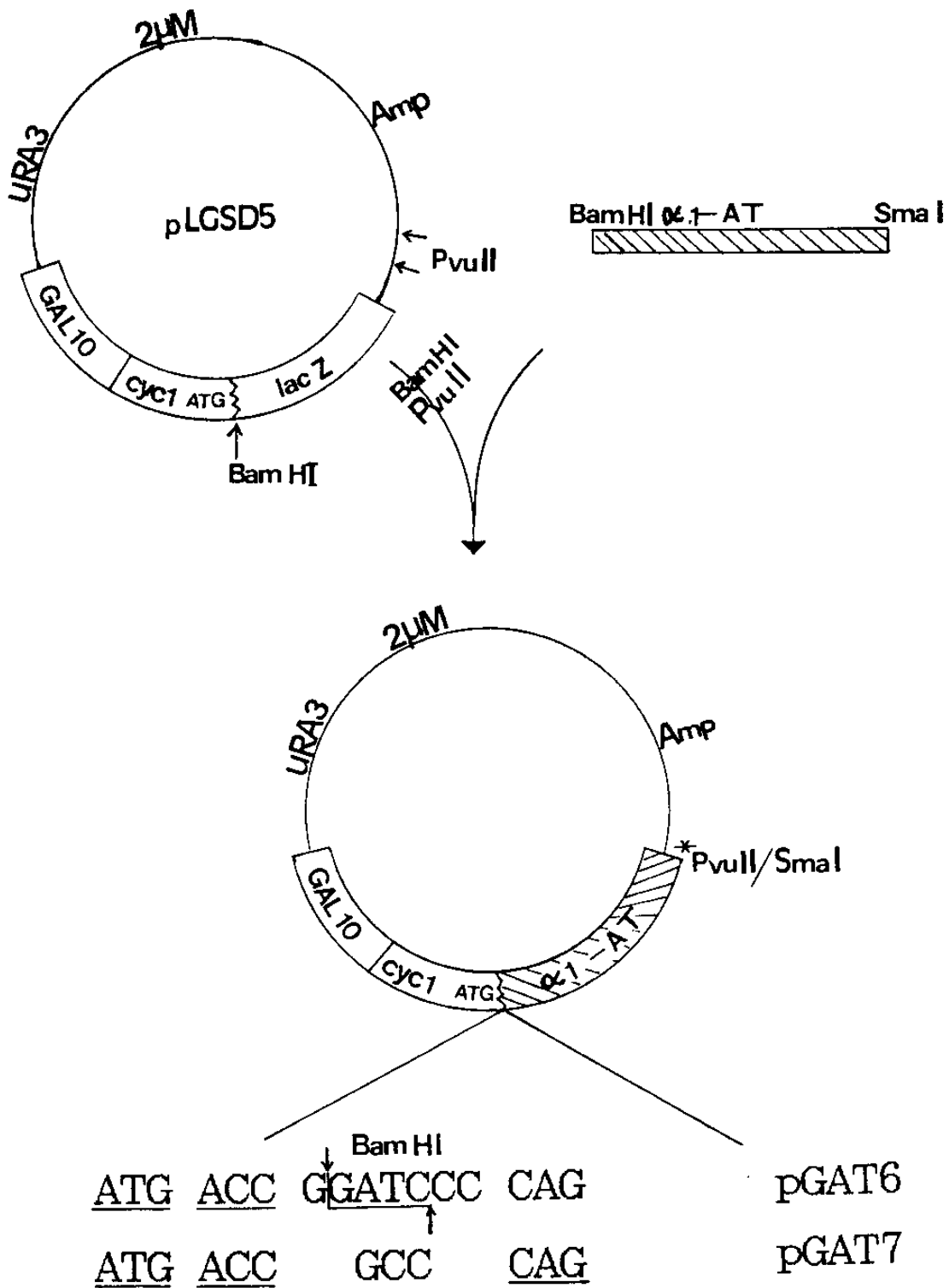


그림 7. 플라스미드 pGAT7의 제조방법.

S1뉴클리아제를 처리하여 다시 연결 시켰다. 이와같이 건설된 플라스미드 pGAT7은 GAL10/CYC1 하이브리드 프로모터의 조절하에 α 1-AT를 생산할 수 있다. 플라스미드 pGAT7에 의해 코드되는 재조합 α 1-AT의 아미노말단은 Met-Thr-Ala-Gln-으로서 native α 1-AT의 Asp-Pro-Gln-과 약간 다른데, 이러한 차이점은 α 1-AT의 활성에 크게 영향을 미치지 않을 것으로 예상되었다.

2.2. 발현벡터에 적합한 효모 균주의 개발

발현벡터 pLGSD5의 GAL10/CYC1 하이브리드 프로모터는 배지내의 갈락토즈 유무에 따라 조절된다. 그러나 야생형을 포함하는 대부분의 효모 균주들은 갈락토즈 대사에 필요한 GAL1 유전자 혹은 GAL2 유전자에 돌연변이를 가지고 있어서 표현형이 갈락토즈를 이용하지 못하는 Gal⁻이므로 GAL10/CYC1 프로모터에 적합하지 못하다.

Gal⁺인 효모 균주를 얻기 위해 이미 확보된 BWG9A-1 (MAT α , gal4) 균주와 YNN281(MAT α , Gal⁻) 균주를 교배시킨 후 사포자분석법에 의해 Gal⁺ 균주를 선별하였다. BWG9A-1은 gal4 돌연변이에 의해 Gal⁻이지만 GAL1과 GAL2 유전자는 야생형이므로 교배에 의해 얻어진 이배체를 sporulation시켜 GAL1, GAL2, GAL4 유전자 모두가 야생형인, 즉 표현형이 Gal⁺인 단배체를 얻을 수 있었다. 이 균주를 KY8이라 명명하였으며 발현벡터의 숙주로 사용되었다.

2.3. 효모에서 재조합 인체 α 1-AT의 발현

플라스미드 pGAT7 및 control 플라스미드 pGAT6를 상기에서 개발된 효모균주 KY8에 형질전환시킨 후 α 1-AT의 생성을 유도하기 위해 포도당 배지에서 자라는 재조합 균주들을 갈락토스가 2% 포함된 배지에 옮겨 18시간 배양하였다. 흡광도 (600nm)가 0.5일 때 100 ml 효모배양액으로부터 균체를 수거하여 200ul의 완충용액 (0.1M Tris-Cl, pH 8.0, 0.5M NaCl)에 녹인 후 0.45g의 glass bead로 세포를 분쇄한 상등액을 수거하여 α 1-AT의 활성을 측정하였다. 표2에 정리된 결과를 보면 갈락토스 배지에서 배양된 pGAT7을 지닌 균주에 의해서만 저해제활성이 나타났으며 (30-40% 잔여활성), 포도당에서 배양된 같은 균주, 또는 포도당이나 갈락토스 배지에서 자란 pGAT6을 지닌 균주들은 저해제활성을 나타내지 못하였다 (85-100% 잔여활성). 효소 elastase의 활성을 약간 저해하는 85%활성은 세포추출물에 의한 비특이적 활성으로 간주된다.

플라스미드 pGAT7에 의해 실제로 α 1-AT가 생성되는 것을 확인하기 위해 세포추출액을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동법으로 단백질을 분리한 후 α 1-AT에 대한 항체를 이용하여 웨스턴 블랏을 행하였다. 그림8의 A에서와 같이 단백질 밴드를 Coomassie Brilliant blue로 염색하였을 때는 α 1-AT의 검색이 어려웠으나 웨스턴 블랏 결과 pGAT7을 지닌 균주가 갈락토스 배지에서 자랐을 때만 44 kDa의 폴리펩티드 밴드가 검색되었다 (그림8B, lane 8). 포도당 배지에서 자란 같은 균주 (lane 7) 또는 pGAT6를 지닌 균주 (lane 5, lane 6)는 α 1-AT에 특이적인 폴리펩티드를 생산하지 못하였다. 이와같은 결과는 상기의 α 1-AT 활성 측정결과에 잘 일치되고 있다. 효모에서 생성된 α 1-AT는 인체 혈액에서 분리된 authentic α 1-AT보다 분자량이 작는데, 이는 재조합 α 1-AT가 glycosylation되지 않았기 때문으로 간주된다. 플라스미드 pGAT7은

표2. 플라스미드 pGAT7에 의해 효모에서 발현된 α 1-AT의 활성

Inhibitor (α 1-AT) or Cell extract	O.D.	% of Elastase Activity Remained
Control (α 1-AT)		
0 ug	0.1241	100.0%
4.5 ug	0.0939	75.7%
9 ug	0.0666	53.7%
18 ug	0.0276	22.7%
27 ug	0.0109	8.8%
pGAT6 (glu)	0.1062	85.6%
pGAT6 (gal)	0.1289	100.0%
pGAT7-1 (glu)	0.1070	86.2%
pGAT7-1 (gal)	0.0359	28.9%
pGAT7-2 (glu)	0.1060	85.4%
pGAT7-2 (gal)	0.0464	37.4%

* Cell extracts (equivalent to 340 ug of protein) were added to reaction mixture.

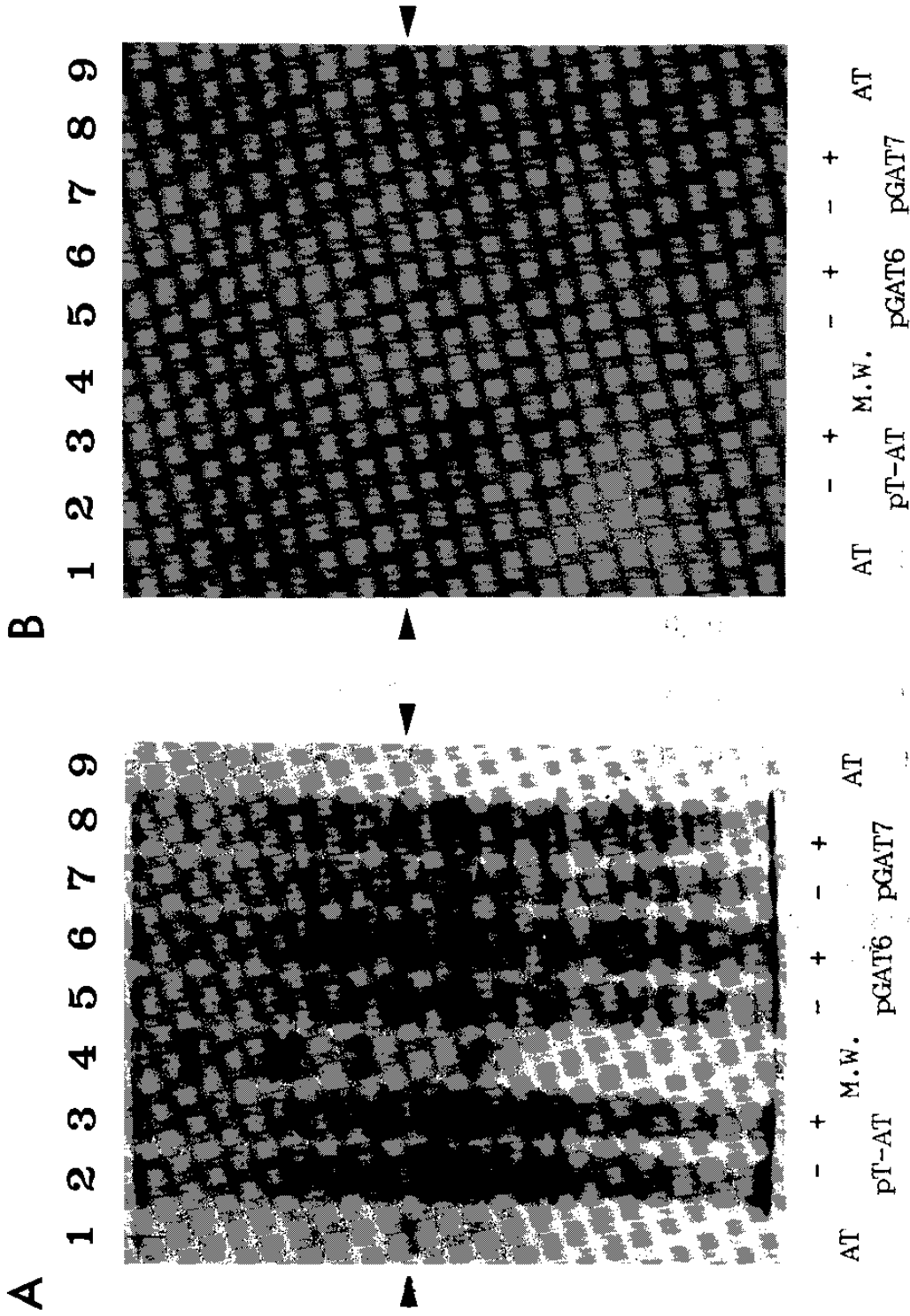


그림 8. 전기영동법 및 웨스턴블랏에 의한 α 1-AT 생산의 확인.

secretion signal을 지니고 있지 않기 때문에 효모의 분비 경로를 거치지 않았을 것이다. 또한 발현된 α 1-AT은 대장균에서 발현된 것보다 SDS-polyacrylamide gel 상에서 분자량이 더 작은것으로 나타났는데 (lane 3 vs. lane 8), 이는 효모에서 사용된 ATG코돈이 대장균에서 사용된 것과 다르기 때문이거나 아니면 숙주 효모의 프로테아제에 의한 공격때문으로 간주된다.

제 4 장 결론 및 건의

본 연구의 목적은 호흡기종치료제인 $\alpha 1$ -antitrypsin을 유전공학적인 기법을 통하여 생산하고자 하는 것으로 2차년도 연구목표는 이미 확보된 인체 $\alpha 1$ -antitrypsin의 cDNA를 대장균 및 효모에서 보다 높은 수율로 발현시키는 데 있다. 대장균에서 T7 RNA polymerase 시스템을 이용하여 발현하였을 때 유전자서열 앞부분에 T7 파지의 major capsid 단백질로부터 유래한 10여개의 아미노산잔기가 융합되었을 경우에 최대의 발현수율 (총 세포단백질의 약 40%정도)을 나타내었지만 활성이 없는 inclusion body 상태로 생산되었다. 하지만 $\alpha 1$ -antitrypsin 구조유전자서열만을 다른 유전자와 융합되지 않은 상태로 발현시켰을 때에는 발현수율이 다소 감소하기는 하였어도 (약 20%) 활성이 있는 native 형태로 생산되었다. 효모에서 $\alpha 1$ -antitrypsin을 발현시키기 위해서는 GAL10/CYC1 프로모터 시스템을 이용하였는데 이때 발현된 $\alpha 1$ -antitrypsin은 Western blot 결과 발현을 확인할 수 있었다.

종합하여 볼 때 대장균에서 재조합 $\alpha 1$ -Antitrypsin을 총 세포단백질의 20% 정도의 수율로 활성이 있는 형태로 생산하는데 성공하였는데 생산되는 $\alpha 1$ -antitrypsin은 glycosylation이 안되어서 단백질 stability가 authentic $\alpha 1$ -AT보다 낮을 것으로 예상되며, 효모 시스템에서는 발현수율이 훨씬 떨어졌지만 glycosylation 시킬 수 있다는 가능성이 있다. 앞으로의 연구는 대장균에서 발현되는 $\alpha 1$ -antitrypsin을 DNA변이를 통해 stability를 증가시키는 연구와 효모에서 발현 및 분비 효율을 증가시키는 방향으로 진행시키는 것이 바람직하다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Carrell, R. W., Jeppsson, J.-O., Laurell, C.-B., Brennan, S. O., Owen, M. C., Vaughan, L. and Boswell, D. R. (1982) *Nature*, 298, 329-334
2. Gadek, J.E., and Crystal, R.G. (1983) *Am. Rev. Resp. Dis.* 127, suppl, 2, 45-46
3. McRae, B., Nakajima, K., Travis, J., and Powers, J.C. (1980) *Biochem.* 19, 3973-3978
4. Lobermann et al. (1984) *J. Mol. Biol.* 177, 531-556
5. Doolittle, R.F. (1983) *Science*, 222, 417-419
6. Chandra, T. et al. (1983) *Biochemistry*, 22, 5055-5061
7. Hill, R.E. et al. (1984) *Nature*, 311, 175-177
8. Carrell, R. (1984) *Nature*, 312, 14
9. Carrell, R., and Travis, J. (1985) *TIBS* 20-24

10. Lieberman, J. (1973) Chest. 64, 579-584
11. Schindler, D. (1984) 16th Miami Winter Symposium. Advances in Gene Technology, Human Genetic Disorders (Ahmad, S et al. eds.) P.32
12. Sharp, H.L. (1971) Hospital Pract. 6, 83-96
13. Bathurst, I.C., Stenflo, J., Errington, D.M., and Carrell, R.W. (1983) FEBS Lett. 153, 270-274
14. Foreman, R.C., Judah, J.D., and Colman, A. (1984) FEBS Lett. 168, 84-88
15. Carrell, R.W., Bathurst, I.C., and Brennan, S.D. (1984) Biochem. Soc. Symp. 49, 55-66
16. Brantly, M., Courtney, M. and Crystal, R. G. (1988) Science 242, 1700.
17. Rosenberg, S., Barr, P. J., Najarian, C. R. and Hallewell, A. (1984) Nature 312, 77.
18. Dycaico, M. J., Grant, S. G. N., Felts, K., Nichols, W. S.,

- Geller, S. A., Hager, J. H., Pollard, A. J., Kohler, S. W., Short, H. P., Jirik, F. R., Hanahan, D., and Sorge, J. A. (1988) *Science* 242, 1409.
19. Bollen, A., Loriau, R., Herzog, A. and Herion, P. (1984) *FEBS Lett.* 166, 67-70
20. Courtney, M., Buchwalder, A., Tessier, L. H., Jaye, M., Benavente, A., Balland, A., Kohli, V., Lathe, R., Tolstoshev, P. and Lecocq, J. P. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 669-673
21. Tessier, L.-H., Jallat, S., Sauvageot, M., Crystal, R. G., and Courtney, M. (1986) *FEBS Lett.* 208, 183-188
22. Johansen, H., Sutiphong, J., Sathe, G., Jacobs, P. Cravador, A., Bollen, A., Rosenberg, M., and Shatzman, A. (1987) *Mol. Biol. Med.* 4, 291-305
23. Sutiphong, J., Johansen, H., Sathe, G., Rosenberg, M., and Shatzman, A. (1987) *Mol. Biol. Med.* 4, 307-322
24. Travis, J., Owen, M., George, P., Carrel, R., Rosenberg, S., Hallewell, R. and Barr, P. (1985) *J. Biol. Chem.* 260,

4384-4389

25. Cabezon, T., De Wilde, M., Herion, P., Lorian, R., and Bollen, A. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6594-6598
26. Moir, D. T. and Dumais, D. R. (1987) Gene 56, 209-217
27. Studier, F. W. and Moffatt, B. A. (1986) J. Mol. Biol. 189, 113-130
28. Lee, S. C. and Yu, M.-H. (1989) Kor. J. Biochem. 22, 148-153
29. Guarente, L. Yocum, R. R., and Gifford, P. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7410-7414
30. Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratories, New York.
31. Mandel, M. and Higa, A. (1970) J. Mol. Biol. 53, 154.
32. Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983) J. Bacteriol. 153, 163-158
33. Sherman, F., Fink, G. R., and Hicks, J. B. (1986) Laboratory

Course Manual for Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor
Laboratories, Cold Spring Harbor, New York

34. Sanger,F., Nicklen,S., and Coulson,A.R. (1977) Proc. Natl.
Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467

35. Travis,J., and Johnson,D. (1981) Methods in Enzymology, Vol. 80,
754-765

36. Laemmli,U.K. (1970) Nature, 227, 680-685

37. Towbin,H., Staehelin,T., and Gordon,J. (1979) Proc. Natl. Acad.
Sci. USA, 76, 4350-4354

주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 한다.