



α 1 – Antitrypsin의 생산 연구

Studies of α 1 – Antitrypsin Production

연구기관
한국 과학기술원
부설 유전공학센터

과 학 기 술 처

요 약 문

I. 제 목

α 1-Antitrypsin의 생산 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

본 연구에서는 therapeutic enzyme의 일종인 α 1-antitrypsin (α 1-AT)을 대상으로 하여 유전공학기법을 통한 생산을 시도하고자 한다. α 1-AT는 기존 생산방법이 사람 피에서 분리정제하는 것으로서 원재료인 사람의 제한, 그로 인한 고가의 생산 단가, 그리고 다른 전염성 세균이나 바이러스의 감염 등과 같은 문제점때문에 대부분의 다른 blood product들 처럼 유전공학 기법을 이용하여 미생물이나 고등동물 세포배양으로부터 생산해 내는 것이 안전하다. 또한 α 1-AT는 세린프로티아제의 저해제로서 프로티아제-저해제 복합체의 상호작용 및 구조 연구에도 좋은 모델이 된다. 본 연구의 제 1차년도 연구목적은 인체 α 1-AT의 유전자를 확보하고 이를 대장균에서 발현시키는 것을 시도하며 더불어 α 1-AT를 정량할 수 있는 시스템을 확립하는 데 있다.

III. 연구개발의 내용과 범위

1) 인체 간 cDNA library에서 α 1-AT 유전자 선별

- 2) 인체 $\alpha 1$ -AT의 유전자 구조
- 3) $\alpha 1$ -AT 활성측정 방법
- 4) $\alpha 1$ -AT 발현벡터 제조
- 5) 대장균에서 재조합 $\alpha 1$ -AT의 발현

IV. 연구개발 결과 및 건의

본 연구에서는 인체 간 cDNA library로부터 $\alpha 1$ -AT 유전자를 스크린하였으며, 선별된 $\alpha 1$ -AT 유전자의 제한효소 지도 및 일부 DNA 서열의 분석 결과 이미 보고된 인체 $\alpha 1$ -AT 유전자의 서열과 일치함을 알 수 있었다. $\alpha 1$ -AT 유전자를 tac (tac) 프로모터의 조절하에 대장균에서 발현시키기 위해 발현벡터 pT-AT를 제조하였다. 플라스미드 pT-AT에 의해 형질전환된 E. coli JM109 균주에서는 재조합 단백질의 발현을 유도한 결과 $\alpha 1$ -AT의 활성이 발현유도 전 보다 10배 정도 증가하는 것을 보였으며, 이 재조합 $\alpha 1$ -AT는 사람 피에서 정제한 authentic $\alpha 1$ -AT와 그 면역학적 특성이 같음을 알 수 있었다. 또한 재조합 균주의 세포 추출액을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동법으로 분석한 결과 Coomassie Blue로 단백질 밴드를 염색했을 때는 발현된 $\alpha 1$ -AT를 검증할 수 없었으나, $\alpha 1$ -AT에 대한 rabbit IgG 항체와 필옥시다제가 연결된 anti-rabbit IgG goat 항체를 사용하여 웨스턴 블랏을 한 결과 $\alpha 1$ -AT 밴드가 기대했던 분자량 위치에서 확인되었다. 이와같이 생산된 재조합 $\alpha 1$ -AT는 authentic $\alpha 1$ -AT보다 분자량이 작은

것으로 나타났는데 이는 E. coli 세포내에서 발현된 $\alpha 1$ -AT는 glycosylation이 안 된, 하지만 활성은 지닌 형태의 것임을 말해 준다. 앞으로의 연구방향은 대장균에서의 발현을 최적화하여 수율을 높이는 것과 효모와 같은 진핵세포에서의 발현을 시도하는 것이다. 이러한 연구는 $\alpha 1$ -AT에 대한 단백질공학을 하기 위한 기초작업이 될 것이다.

SUMMARY

I. Title

Studies of α 1-antitrypsin Production

II. Aims of Research

Goal of the present research is to produce recombinant α 1-antitrypsin (α 1-AT) in microorganisms. α 1-AT is one of the therapeutic enzymes and has been purified from human blood. However due to limited source of human blood, high production cost, and the problem of virus contamination, emphasis has been laid on producing α 1-AT via recombinant DNA techniques. α 1-AT is an inhibitor of well-characterized serine proteases and therefore provides a good model system for studying structure and interaction of protease-inhibitor complexes. In the first year we screened human α 1-AT gene and attempted to express it in *E. coli*. We also set up the assay system for α 1-AT activity.

III. Scope and Contents

- 1) Screening of human α 1-AT gene in liver cDNA library
- 2) Gene structure of human α 1-AT
- 3) Assay system for α 1-AT activity

4) Construction of α 1-AT expression vector

5) Expression of recombinant α 1-AT in E. coli

IV. Results and Recommendation

Human α 1-AT gene was screened from human liver cDNA library. Restriction enzyme digestion and partial DNA sequencing confirmed that the obtained gene is identical to human α 1-AT gene reported previously. α 1-AT gene was cloned with tac promoter and expression vector pT-AT was constructed. E. coli JM109 cells transformed with pT-AT showed ten-fold increase of α 1-AT activity upon induction. The expressed recombinant α 1-AT was immunologically identical to authentic α 1-AT purified from human blood. Cell lysates of E. coli JM109/pT-AT was analyzed on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Although the expressed α 1-AT was not detected in a gel stained with Coomassie Blue, Western blot analysis with rabbit IgG against α 1-AT and peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody showed the existence of α 1-AT at the expected molecular weight region. Molecular weight of recombinant α 1-AT was slightly lower than that of authentic α 1-AT, which presumably due to lack of glycosylation inside E. coli cells. In conclusion, we succeeded in expressing human

α 1-AT gene in E. coli as an active non-glycosylated form but the yield of the recombinant protein was low. In order to establish protein engineering system for this protein, it is necessary to improve expression yield in E. coli. We also plan to express the gene in yeast cells to obtain glycosylated form.

CONTENTS

Chapter I. Introduction	15
Chapter II. Materials and Methods	25
1. Materials	25
2. Methods	26
Chapter III. Results and Discussion	29
1. Cloning of human α 1-antitrypsin gene	29
1.1. Screening of human liver cDNA library	29
1.2. Structure of human α 1-antitrypsin gene	34
2. Expression of human α 1-antitrypsin gene in <u>E. coli</u> ...	37
2.1. Construction of expression vector	37
2.2. Characterization of recombinant α 1-antitrypsin ..	39
Chapter IV. Conclusions and Recommendation	44
References	46

목 차

제 1 장 서 론	15
제 2 장 실험재료 및 방법	25
제 1 절 실험재료	25
제 2 절 실험방법	26
제 3 장 결과 및 고찰	29
제 1 절 인체 $\alpha 1$ -antitrypsin 유전자의 클로닝	29
1. 1 인체 간 cDNA library의 스크리닝	29
1. 2 인체 $\alpha 1$ -antitrypsin 유전자의 구조	34
제 2 절 대장균에서 인체 $\alpha 1$ -antitrypsin 유전자의 발현...37	
2. 1 발현백타의 제조	37
2. 2 재조합 $\alpha 1$ -antitrypsin의 특성	39
제 4 장 결론 및 건의	44
참 고 문 헌	46

제 1 장 서 론

α 1-antitrypsin (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 세린프로티아제에 대해 저해작용을 가지지만 특히 neutrophil leucocyte로 부터 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 (호흡기증)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-AT는 다른 혈장단백질로부터 다음과 같은 몇 단계를 거쳐 순수한 형태로 분리정제할 수 있다 (4). 첫째 혈장을

ammonium sulfate 분획 방법으로 처리하여 50%와 80% 포화사이의 침전물을 얻는다. 다음단계인 Cibacron Blue Sepharose 컬럼을 거쳐 void volume 에서 나오는 $\alpha 1$ -AT를 회수하여 DEAE-Cellulose와 Sephadex-75 컬럼을 거쳐서 순수한 $\alpha 1$ -AT를 얻을수 있다. 이외에도 thiol-disulfide 교환컬럼을 이용하거나 (5) anhydro chymotrypsin을 리간드로 사용하는 친화성컬럼을 이용하여 정제하는 법도 개발되었다. 또 Aerosil380 (fumed silica)과 50% 황산암모니움 및 25mM DTT를 처리하여 다른 단백질을 변성시키고 마지막으로 DEAE-52 컬럼을 이용하여 정제하는 방법도 개발되었다 (7). 이와같이 정제된 $\alpha 1$ -AT는 분자량이 5만 정도이며 SDS-polyacrylamide gel 전기영동에서 하나의 밴드로 나타난다. $\alpha 1$ -AT의 일차구조는 아미노산 서열분석과 cDNA 서열분석에 의해 결정되었는데, 394개 아미노산으로 구성되어 있으며 아미노말단에는 24개의 소수성이 큰 아미노산잔기로 구성된 signal peptide가 존재한다 (1). $\alpha 1$ -AT 폴리펩타이드는 세개의 탄수화물 사슬이 달려있으며 native상태의 $\alpha 1$ -AT는 단합체 (monomer)로서 수용성이 큰 globular 형태의 단백질이다. $\alpha 1$ -AT 분자의 활성부위는 358번의 메치오닌잔기 주위이며 기질인 프로티아제와 1:1 복합체를 형성한다. $\alpha 1$ -AT는 최근 X선 결정구조가 밝혀졌는데 β -sheet이 40%, α -helix가 30%정도로 그 구조가 상당히 ordered된 상태이다 (8). $\alpha 1$ -AT 자체는 결정화가 안 되었고,

기질인 프로티아제와 반응한후 활성부위 펩타이드 본드 (Met358-Ser359)가 잘려진 상태로 결정화 되었다. 이상태에서 Met358과 Ser359는 Fig.1에서와 같이 69 Å 떨어져 있는데 원래 상태에서는 서로 인접해 있어야 되기 때문에 그림1b에서와 같이 긴장된 상태로 존재할 것으로 보고있다. 따라서 잘려진 상태의 α 1-AT는 불활성화되어 있지만 단백질 자체는 안정하고, 활성이 있는 상태의 α 1-AT는 활성부위가 노출되어 있으며 metastable 한 상태로 있게된다.

α 1-AT의 아미노산 서열을 살펴보면, antithrombinIII와 ovalbumin의 아미노산 서열과 상당히 유사하여 새로운 superfamily를 형성하는것을 알수 있다 (1). 이들 외에도 angiotensinogen (9), α 1-antichymotrypsin (10) 및 혈장응고, complement system 그리고 inflammation에 관련된 프로티아제들에 대한 저해제들의 대부분도 이 superfamily에 속하는 것으로 간주된다 (11,12). 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 (13). α 1-AT의 활성부위 서열을 다른 저해제들의 것과 비교해 보면 Table1에서 보는 바와같이 서로 유사한데 각 저해제의 기질특이성은 P1 위치의 잔기에 의해

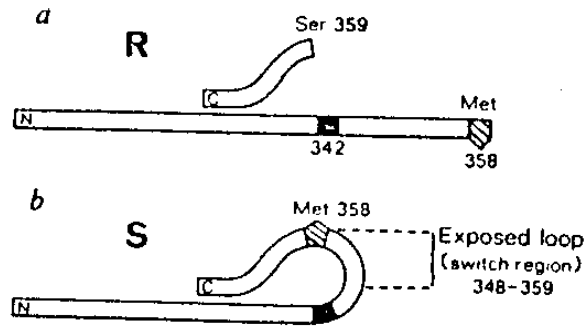


Fig. 1. α 1-AT 폴리펩티드의 모식도. a) 프로티아제에 의해 358Met-359Ser 펩티드 본드가 특이적으로 절단된 R (relaxed) 형태위 α 1-AT, b) native 상태의 저해제는 S (strained) 형태로서 아미노산 348-359 부위가 외부로 노출된 상태로 있게 된다.

Table 1. 세린 프로티아제 저해제 (serpin)들의 활성부위 아미노산 잔기들.

Inhibitor	Target	Reactive centre residues					
		P ₂	P ₁	P ₁ '	P ₂ '	P ₁ '	P ₄ '
<i>Serpin superfamily</i>							
α_1 -Antitrypsin	elastase	Pro	Met	Ser	Ile	Pro	Pro
Valine mutant	elastase	Pro	Val	Ser	Ile	Pro	Pro
Pittsburgh mutant	thrombin	Pro	Arg	Ser	Ile	Pro	Pro
Antithrombin	thrombin	Gly	Arg	Ser	Leu	Asn	Pro
α_1 -Antichymotrypsin	chymase	Leu	Leu	Ser	Ala	Leu	Val
Mouse contrapsin	'trypsin'	Arg	Lys	Ala	Ile	Leu	Pro
C1-Inhibitor	kallikrein	Ala	Arg	Thr	Leu	Leu	Val
Ovalbumin	? elastase	Ala	Ala	Ser	Val	Ser	Glu
Angiotensinogen	? function	Pro	Gly	Ser	-	Pro	Glu
<i>Plant inhibitors</i>							
Soybean	trypsin	Thr	Lys	Ser	Asn	Pro	Pro
Garden bean	elastase	Thr	Ala	Ser	Ile	Pro	Pro
Lima bean	trypsin	Thr	Lys	Ser	Ile	Pro	Pro

결정되는 것을 알 수있다 (13). 그리고 이들이 작용하는 프로티아제가 모두 활성부위세린을 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→Val)은 혈장속의 α 1-AT양이 M 타입에 비해 60%, Z 타입 (Glu342→Lys)은 15%정도 밖에 존재하지 않는다 (1). 이렇게 생산량이 감소된 원인은 S 타입의 경우 아미노산 잔기 치환결과 단백질 안정도가 떨어졌으며 (14) 또 최근에 밝혀진 바에 의하면 염기치환에 의해 없었던 intron splicing자리가 생성된 것이 원인이 된다고 알려졌다 (15). Z 타입의 폴리펩타이드 경우는 간세포 안에 granule 형태로 존재하는데 (16), in vitro 에서의 실험결과 Z 폴리펩타이드는 자연형과 마찬가지로 정상적으로 탄수화물이 첨가되었지만 (17) in vivo 실험에서는 정상적인 분비가 되지 않으며 그에 따라서 탄수화물 첨가도 되지않는 것을 알 수 있었다 (18). Glu342는 Fig.1에서와 같이 활성부위구조에

영향을 주는 hinge에 위치하고 있는데 이 글루타메이트 잔기는 저해제 family 전체에 모두 보존되어 있다. Z 타입 폴리펩타이드 중 일부 (15%)는 활성이 있는 형태로 만들어지는데 일단 만들어진 것은 안정도가 자연형 α 1-A와 같다. 따라서 Carrell등은 (19) Z 폴리펩타이드가 folding 또는 secretion defect가 있다고 제의했다. 이와같은 Z 타입이 존재하는 경우는 혈장에 α 1-AT의 부족으로 인해 emphysema와 같은 질병을 초래한다. 이외에도 α 1-AT는 간의 질환에 따라 혈장내에서 그 양이 달라진다. α 1-AT는 α -fetoprotein과 같은 carcinoembryonic (fetooncogene) 항원과 관련이 있다고 밝혀졌다 (20). α 1-AT는 간세포가 acute phase에 있거나 또는 임신중에는 그 혈장량이 현저하게 증가된다 (21). 뿐만아니라 간암 (hepatocarcinoma)환자로서 표면항원을 갖지 않는 경우 α 1-AT의 혈장량이 665mg/100ml로써 정상인의 434mg/100ml보다 훨씬 높기때문에 간암진단에 marker enzyme으로 사용할 수 있다 (22). 간암환자중 표면항원이 있는 경우도 571mg/100ml로서 정상인보다 높은 것으로 나타난다. 이외에도 조직염색방법에 의해 간암세포를 구분하는데 immunochemical marker로 이용될 수 있다 (23).

α 1-AT를 코우드하는 유전자는 1981년 E. W. Davie박사 (24) 연구팀에 의해 간의 mRNA로 만든 cDNA 클론으로부터

얻어졌다. 그후 몇몇 다른 연구팀들도 $\alpha 1$ -AT의 cDNA 클론을 얻는데 성공하였다 (25-27). 이리하여 얻어진 유전자 전체의 DNA 염기서열을 결정함으로써 아미노산 잔기서열을 알 수 있었는데 그것은 이미 발표된 아미노 말단 또는 카르복시 말단 부분의 서열과 일치했다 (28). 총 394개의 아미노산 잔기로 구성되어 있으며 아미노 말단에는 24개의 signal sequence가 존재하는 것을 알 수 있었다. $\alpha 1$ -AT의 크로모솜 유전자를 genomic library로부터 스크린하여 그 구조를 밝혔는데 총 길이는 5K bp 정도이고 Fig.2에서와 같이 구조유전자 안에 세개의 intron이 존재하는 것을 알 수 있었다 (33). 한편 같은 superfamily에 속하는 angiotensinogen의 크로모솜 유전자의 구조도 밝혀졌는데 (34), 두 유전자구조가 매우 흡사한 것을 알 수 있다 (Fig.2). 유전자 전체에 걸쳐 네개의 intron이 존재하며 (그중 세개는 구조유전자 내부에 존재함) 그 위치가 서로 비슷하다. 또 두개 단백질 모두 아미노 말단에 잘려지는 펩타이드 길이가 비슷하며 그 위치도 signal 펩타이드 바로 뒤에 위치한다. 따라서 이 두 유전자는 같은 조상으로부터 유전자 복제에 의해 진화된 것이라고 간주되고 있다. 한편 ovalbumin의 크로모솜유전자의 경우는 intron이 일곱개 존재하며 $\alpha 1$ -AT 유전자와 비교해 볼때 그 위치도 각각 다르다 (35). 따라서 이들 두 단백질은 아미노산서열은 유사하나 유전자구조는 전혀 다른것을 알 수 있다. 인체 $\alpha 1$ -AT 유전자의 크로모솜위치가

밝혀졌는데 immunoglobulin heavy chain (GM)과 link되어 있으며 GM은 크로모솜14의 32.3 밴드에, α 1-AT는 24.3과 32.1 사이에 존재함을 알 수 있다(36).

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 (29, 30) 또는 효모 (31, 32)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, λ , Δ (lac, proAB), F'(traD36, proAB, lacI^g, lacZ Δ M15)]이다. 플라스미드 pUC9은 Pharmacia P-L Biochemicals로 부터 구매하였고, 프라스미드 pT-6IN은 이미 보고된 것이다 (37). 인체 간 cDNA library (λ gt10)는 Clontech에서 구매하였다.

제한효소들, E. coli DNA polymerase I (Klenow), T4 DNA ligase, 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 KOSKO에서 구입하였다. DNA sequencing kit, ATP 및 ³²P로 표지된 nucleotide들은 Amersham으로 부터 구입하였으며 sequencing primer와 reverse primer는 New England Biolab으로부터 구입하였다. 인체 α 1-AT, porcine elastase, succinyl-(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 company로 부터 구입하였다.

제 2 절 실험방법

1. 클로닝 방법

유전자 클로닝에 필요한 모든 효소 반응은 Maniatis 등 (38)의 방법에 의해 행하여졌다. 재조합 DNA에 의한 대장균의 형질전환은 CaCl_2 방법 (39)으로 행하였다.

2. Oligonucleotide

합성 oligonucleotide들은 Bechman System Plus DNA 합성기로 합성하였으며, Lo 등 (40)의 방법으로 정제하였다.

3. DNA 서열분석

DNA 서열분석은 Sanger 등 (41)의 chain termination 방법에 의해 행하였다.

1. α 1-AT의 Assay.

α 1-AT의 활성측정은 Fig. 3에서와 같은 방법으로 행하였다. 완충용액 (0.1M Tris-HCl, 0.5M NaCl)에 들어 있는 Elastase (0.18mg/ml) 50ul와 같은 완충용액에 들어있는 α 1-AT 용액과 1분동안 반응 시킨다. Elastase의 기질인 succinyl-(alanyl)₃-p-nitroanilide (40mM)을 20ul 가하고 잘 섞은후 spectrophotometer를 사용하여 410 nm에서 흡광도의

* Assay

Buffer: 0.2M Tris-HCl, pH 8.0, 0.5M NaCl

Substrate: Succinyl-(L-alanyl)₃-p-nitroanilide (Sigma)
40mM stock solution (dissolve in DMSO)

Enzyme: Porcine pancreatic elastase (Sigma)
0.9mg/5ml Tris-HCl 0.1M, pH 8.0 NaCl 0.5M

Inhibitor: Antitrypsin (Sigma)
0.9mg/5ml Tris-HCl 0.1M, pH 8.0 NaCl 0.5M

Procedure: Control; Enzyme (50ul) }
Buffer (930ul) } 1min incubation } add Substrate (20ul)
measure ΔA_{410}

Test ; Enzyme (50ul) }
Inhibitor (150ul) } 1min incubation } add Substrate (20ul)
Buffer (780ul) } measure ΔA_{410}

* One unit of elastase-inhibitory activity is defined as the reduction in the ΔA_{410} of elastase control by 1.0 absorbance unit per minute. The molar extinction coefficient of p-nitroaniline is 8800 at 410 nm.

Fig. 3. $\alpha 1$ -AT의 활성 측정 방법.

변화를 측정하여 elastase의 잔여 활성을 결정한다. 이때 전체 반응액의 부피는 1ml로 하며, α 1-AT 용액의 양을 변화시키면서 elastase 효소활성의 감소를 측정함으로써 α 1-AT에 의한 억제 곡선을 결정할 수 있다.

5. Double immunodiffusion.

세포 추출액에서 α 1-AT의 존재를 검증하기 위해서는 Ouchterlony의 double immunodiffusion 방법 (42)을 사용하였다. PBS용액 (NaCl 0.14M, KCl 2.7mM, KH_2PO_4 1.5mM, Na_2HPO_4 8.1mM)에 agarose를 2% (w/v)로 하여 사용하였다. Fig. 12와같이 중앙 well에는 α 1-AT에 대한 항체 (0.2mg/ml)를 가하고 주변 well에는 비교하고자 하는 E. coli 세포 추출물과 positive control인 정제된 α 1-AT를 각각 가하고 습기찬 상자속에 12~20시간 동안 방치시켰다. Well과 well사이에 흰색의 띠가 나타난 것을 확인한 후 agarose를 PBS용액으로 세척하고 Coomassie Brilliant blue로 염색하여 띠를 관찰하였다.

6. 전기영동 및 웨스턴 블랏

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis는 Laemmli의 방법에 의해 행하였으며 (43), 웨스턴 블랏은 펄옥시다제가 연결된 항체를 사용하여 Towbin의 방법에 의해 행하였다 (44).

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 인체 $\alpha 1$ -Antitrypsin 유전자의 클로닝

1. 1 인체 간 cDNA library의 스크리닝

λ gt10 library 의 클론 중에서 $\alpha 1$ -AT 유전자를 지닌 것을 선별 하기 위하여 ^{32}P 방사능으로 표지된 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용한 플라크 하이브리다이제이션 방법을 행하였다. 이 때 두 가지 프로브를 사용하였는데 그 서열은 Fig. 4에 표시된 바와 같이 Long등이 보고한 유전자의 DNA 서열 (28)중에서 50~72 (N-probe)와 1150~1172 (C-probe)의 서열에 대한 상보적인 서열이었다. N-probe와 C-probe 모두를 섞어서 사용한 첫번째 선별에서 18만개의 플라크들로부터 32개의 positive signal을 얻었고 (Fig. 5), 이중에서 열네개를 선정하여 N-probe와 C-probe를 각각 사용하여 하이브리다이제이션을 행하였다. 이 두번째 선별에서는 C-probe를 사용하였을 때에 열두개의 positive signal을 얻었으며, 이중 네개는 N-probe를 사용하였을 때도 하이브리다이제이션되었다 (Fig. 6). 이들 N-probe를 사용하여 선별된 네개의 플라크들 (3, 6, 8, 11번) 중에서 완전한 서열의 $\alpha 1$ -AT 유전자가 포함되어있는 것을 선별하기 위해 각각 플라크로부터 DNA를 분리정제하고 EcoRI으로

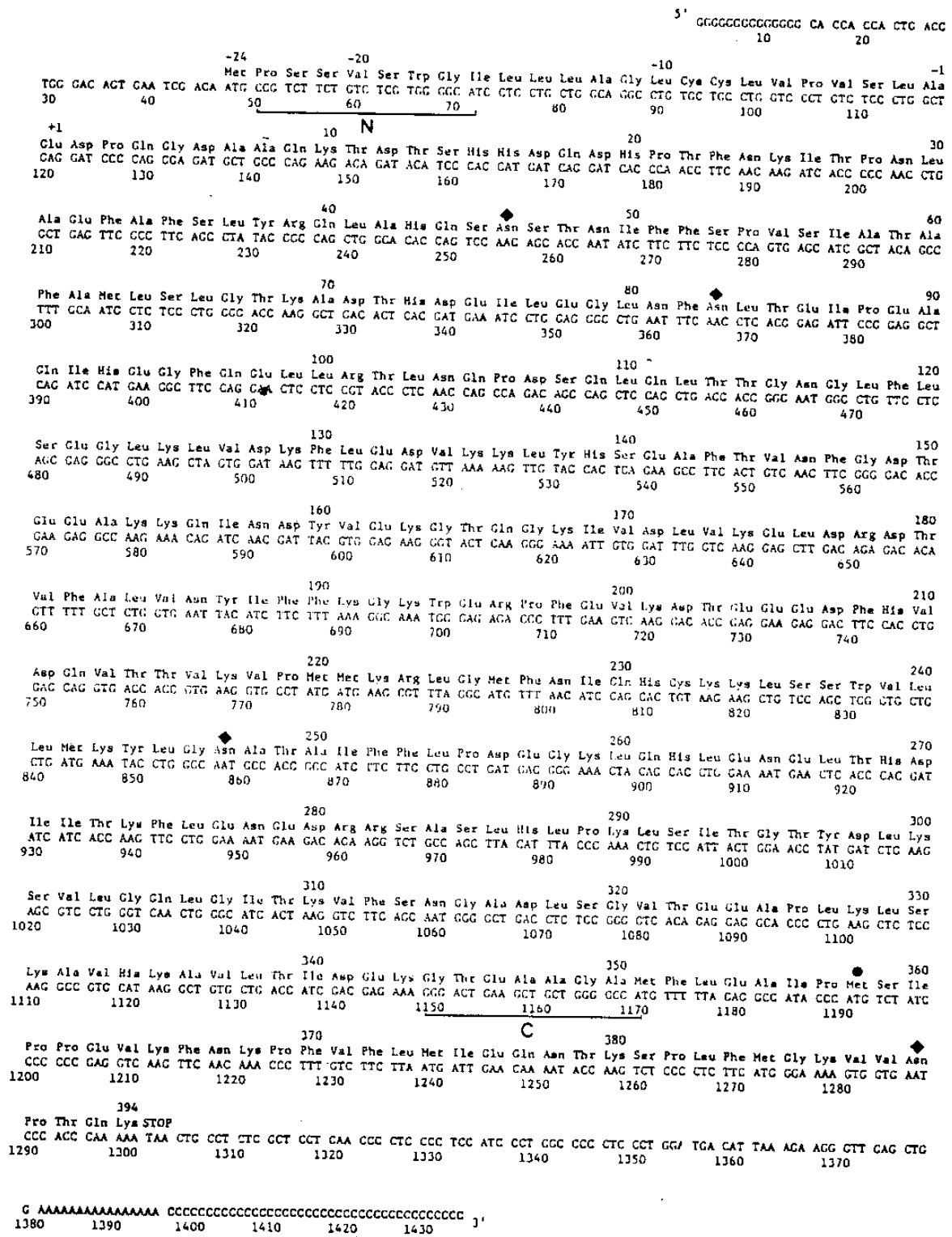


Fig. 4. α 1-AT의 cDNA 서열. N- 및 C-probe로 사용된 서열이 표시되어 있음.

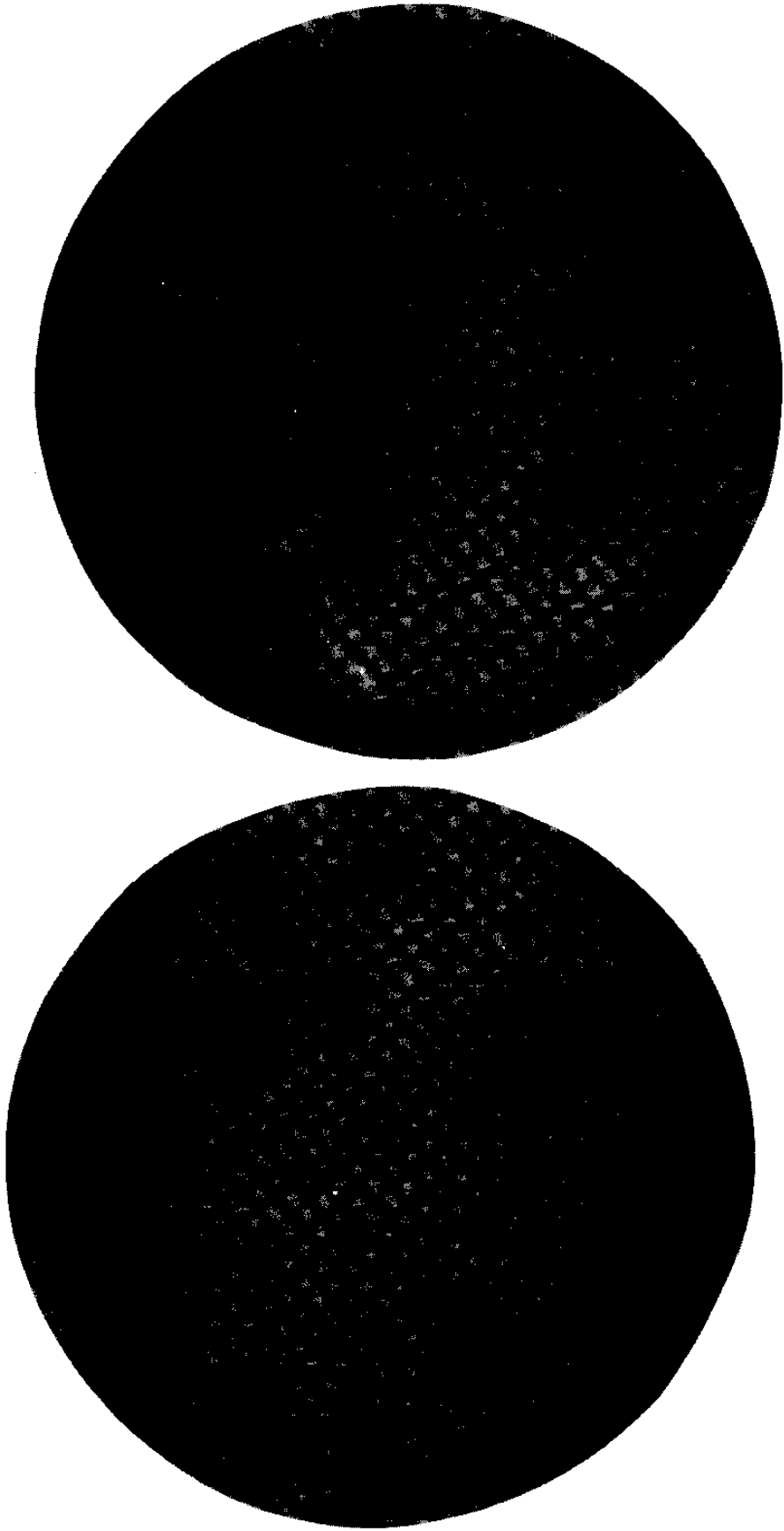


Fig. 5. First screening의 결과.

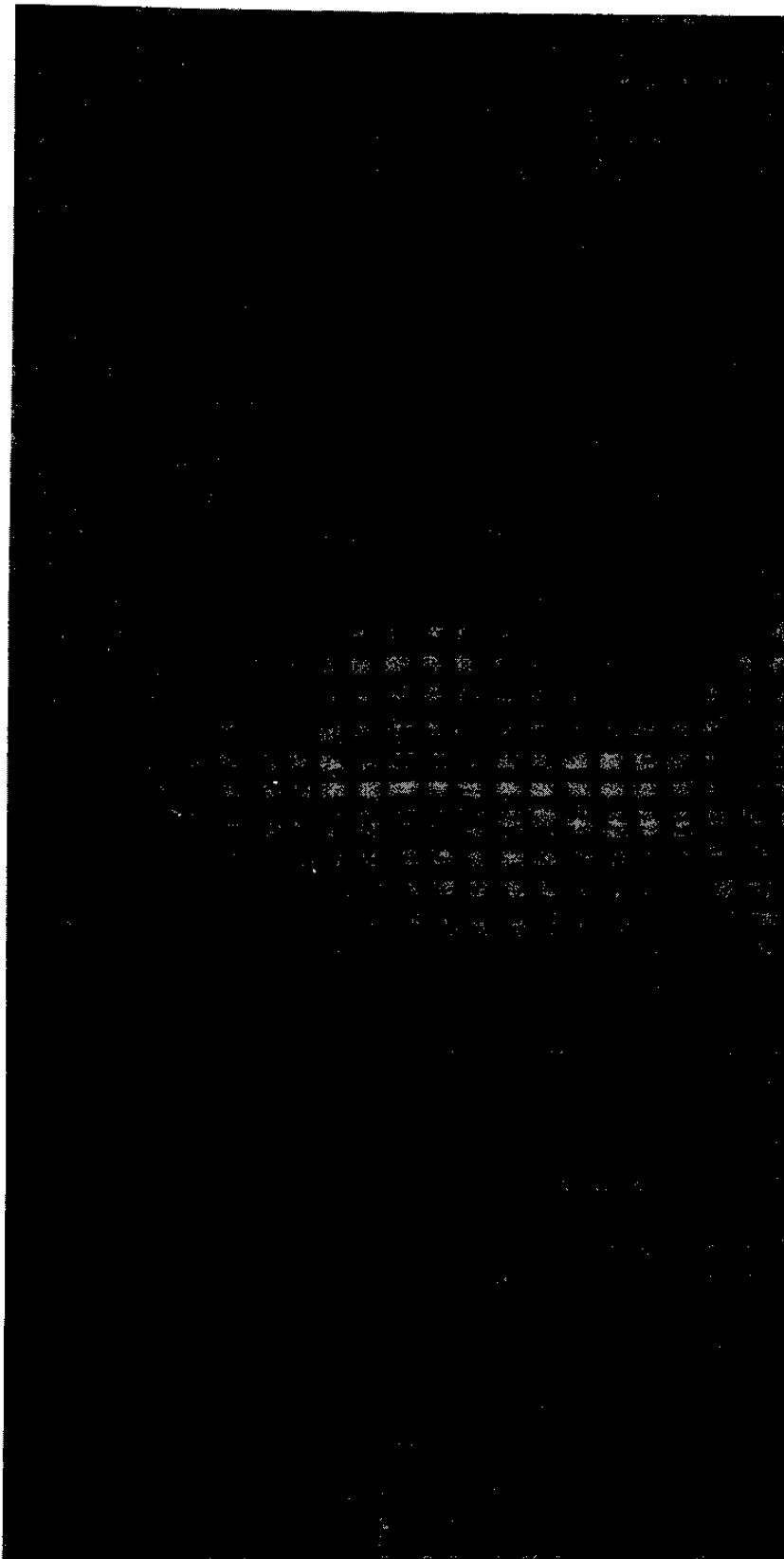


Fig. 6. Second screening의 결과.

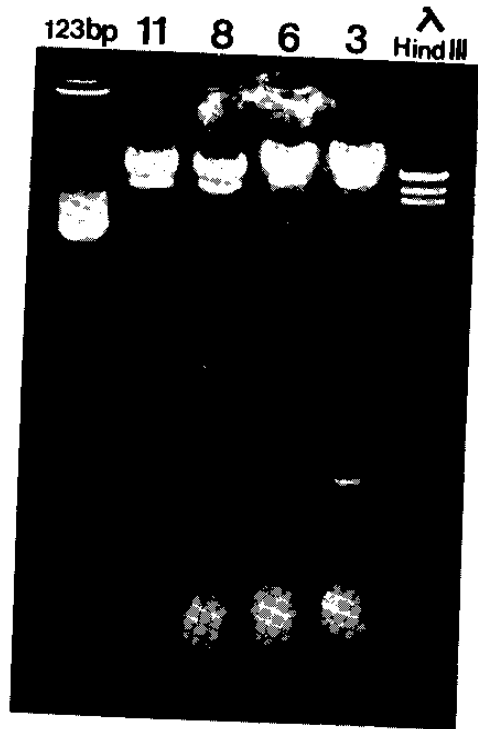


Fig. 7. Agarose gel 전기영동에 의한 insert DNA의 확인.

절단하여 agarose gel에서 전기영동하였다. 그 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 8번 클론에 약 1.3k bp의 insert가 들어있는 것을 알 수 있었다.

1. 2 인체 α 1-antitrypsin 유전자의 구조

하이브리다이제이션 방법으로 선별된 상기의 8번 클론에 삽입된 insert DNA가 α 1-AT 유전자임을 확인하기 위해 이를 pUC9에 삽입하여 pUC-AT 플라스미드를 제조하였다 (Fig. 8a). 8번 클론으로부터 plate lysate 방법(38)에 의해 DNA를 얻고, EcoRI 제한효소로 절단한 후 gel elution 하여 정제하고 pUC9 벡터의 EcoRI 부위에 연결하여 E. coli에 형질전환하였다. 각각 형질전환된 콜로니로부터 플라스미드 DNA를 분리하고 insert DNA의 방향을 확인한 후, α 1-AT 유전자가 제대로 들어가 있는 벡터를 pUC-AT라 명명하였고 꺼꾸로 삽입된 것을 pUC-AT(R)라 하였다. 이들 재조합 pUC9 벡터에 들어있는 α 1-AT 유전자는 제한효소 Aval, BamHI, EcoRI, HincII, HinfI, PvuII, TaqI등으로 절단하고 1% agarose gel에서 전기영동하여 그 단편들의 크기로 부터 제한효소 지도를 확인하였다 (Fig. 8b). 확보된 α 1-AT 유전자의 제한효소 지도는 Long등 (28)이 보고한 DNA서열의 제한효소 지도와 일치하였으며, 거의 전체의 α 1-antitrypsin 유전자 서열이 존재함을 확인하였다.

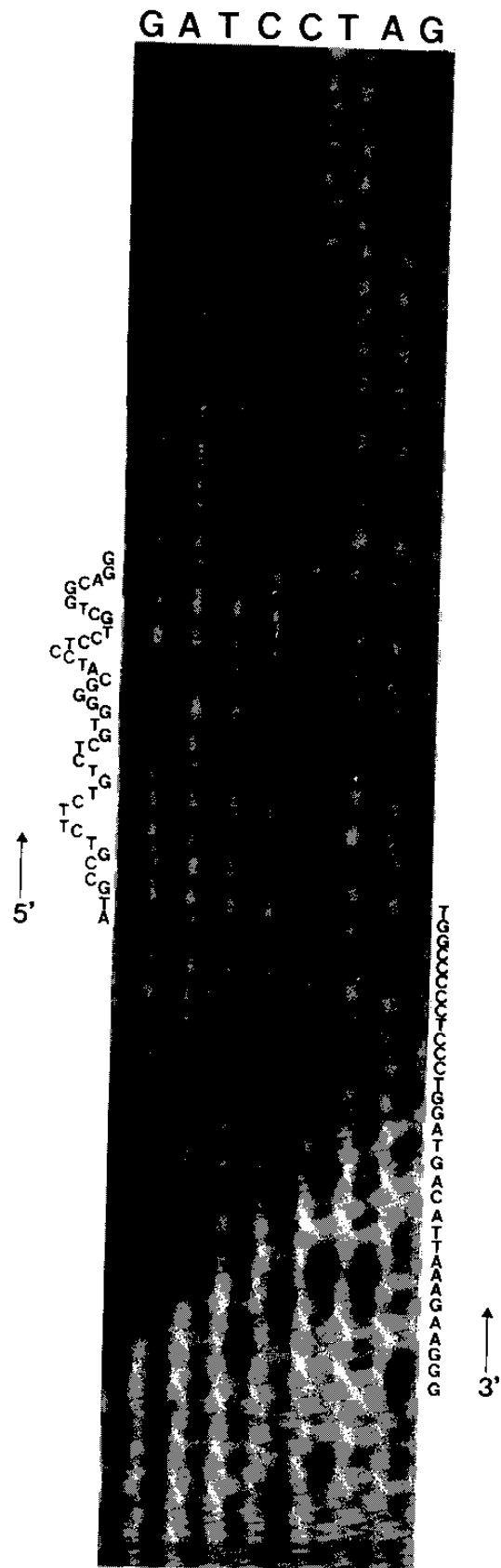


Fig. 9. 클론된 α 1-AT 유전자의 일부 DNA 서열.

플라스미드 pUC-AT에 삽입된 α 1-AT 유전자의 서열확인 및 전체서열이 존재하는가를 확인하기 위해 삽입된 DNA의 일부분을 서열분석하였다. Fig. 9에 보여진 바와 같이 universal sequencing primer를 사용하였을 경우에는 α 1-AT 구조 유전자의 5' 말단 으로부터 40 bp까지의 서열을 확인할 수 있었으며, reverse primer를 사용하였을 경우에는 Fig. 4의 서열에서 3' 말단 부위 30 bp의 상보서열을 확인할 수 있었다. DNA 서열분석의 결과에 의하면, pUC-AT 플라스미드에는 signal sequence를 포함하는 α 1-AT 유전자의 전체 coding sequence가 포함되어 있음을 알 수 있었다.

제 2 절 대장균에서 인체 α 1-antitrypsin 유전자의 발현

2. 1 발현벡터의 제조

앞에서 확인한 플라스미드들 중에 α 1-AT 유전자가 반대방향으로 들어있는 pUC-AT(R) 벡터의 DNA를 제한효소 BamHI으로 절단하여 signal sequence가 떨어져 나간 (Fig. 4) α 1-AT 유전자를 얻은후, 택 (tac) 프로모터가 들어 있는 발현벡터 pT-6IN (37)의 BamHI 부위에 삽입하여 pT-AT를

제조하였다 (Fig. 10). 이와같이 조작하여 얻어진 발현벡터 pT-AT는 택 프로모터의 조절하에 α 1-AT이 생성되게 되며, 이때 해독시작서열은 pT-6IN의 ATG 코돈을 사용하고 해독정지서열은 α 1-AT의 정지 코돈을 사용하게된다. 따라서 생성되는 α 1-AT는 signal sequence가 없는 상태로서 아미노 말단의 Glutamine이 제거되고 pT-6IN으로부터 도입된 7개의 아미노산 잔기가 아미노 말단에 연결된 형태의 융합 단백질이 된다.

2. 2 재조합 α 1-antitrypsin의 특성

E. coli 세포 내에서 재조합 α 1-AT의 발현은 inhibitor assay 및 double immunodiffusion에 의해 확인하였다. 발현벡터 pT-AT를 지니고 있는 E. coli JM109를 ampicillin (50 ug/ml)이 포함된 LB배지에서 IPTG로 induction한 후 28 °C와 37 °C에서 각각 3시간동안 배양하였다. 수거된 세포를 sonication 하여 분쇄하고 원심분리한 후 상등액을 취해서 α 1-AT의 활성을 측정하였을 때, induction 하지않은 재조합 균주 또는 pT-AT가 들어있지않은 E. coli JM109 control에비해 세포 추출물의 단백질이 약 1mg일때 10배의 활성을 보였다 (Fig. 11).

같은 세포추출물을 α 1-AT에 대한 항체와 double

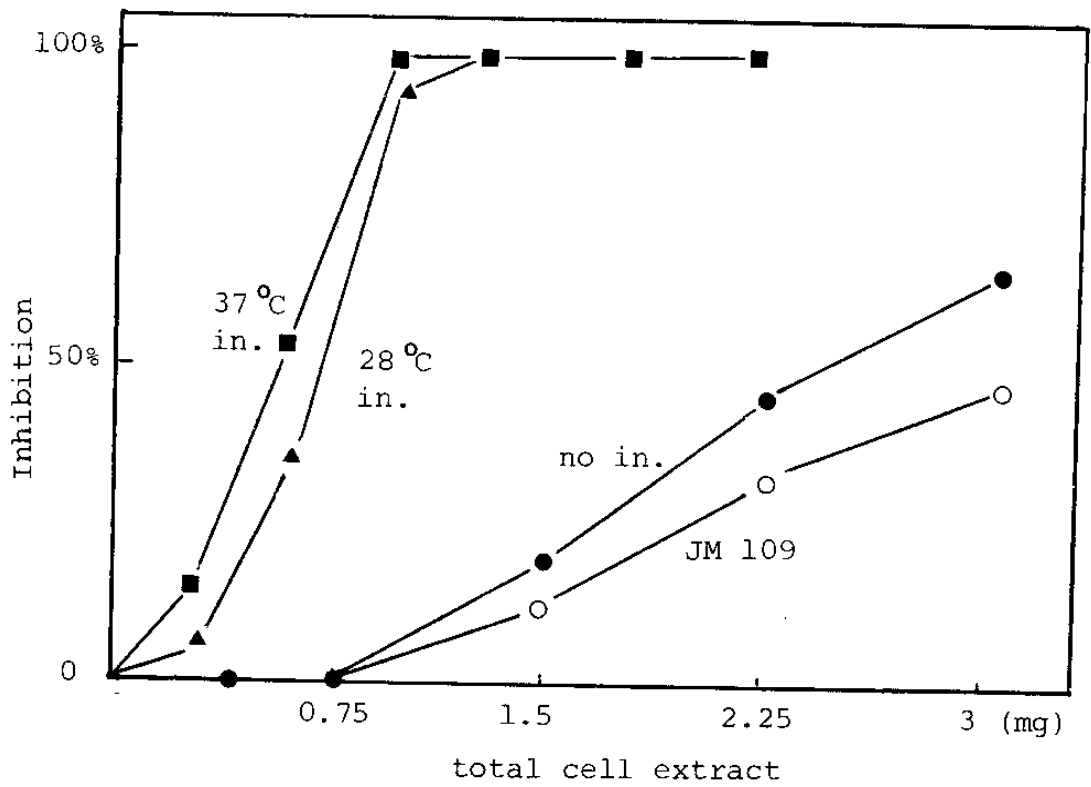
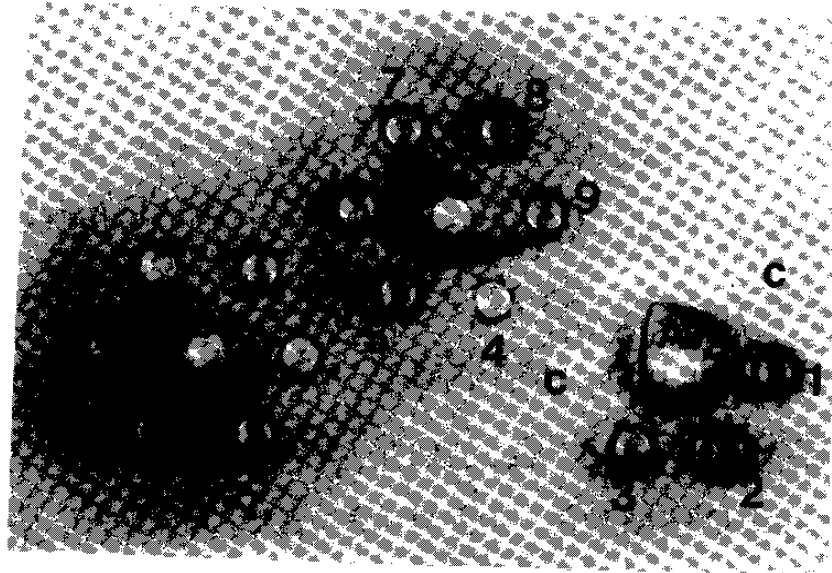


Fig. 11. 재조합 $\alpha 1$ -AT의 활성 측정.

immunodiffusion 했을때, induction한 재조합 균주 JM109/pT-AT의 세포 추출물과 순수 정제된 control α 1-AT는 항체와 반응하여 날카로운 띠를 나타내는 반면, induction하지않은 JM109/pT-AT, JM109/pT-6IN, insert가 반대방향으로 연결된 pT-AT(R)를 지닌 JM109균주 및 플라스미드가 없는 control JM109균주의 세포추출물은 항체와 반응하지 않았다 (Fig. 12). 또한 induction한 JM109/pT-AT 세포의 추출물과 순수한 α 1-AT에 의해 형성된 띠가 만나는 부위에 교차 (spur) 가 나타나지않고 매끄럽게 연결되었다. 이와같은 사실로 미루어 E. coli 내에서 pT-AT에 의해 코우드되는 α 1-AT는 활성을 지닌 형태로 발현 되었으며, 그 면역학적 성질이 자연상태에서 분리정제한 인체 α 1-AT와 동일함을 확인하였다.

플라스미드 pT-AT에 의해 생산되는 재조합 α 1-AT가 E. coli 세포 내에서 발현되는 수율을 조사하기 위해 상기의 세포 추출액을 SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하였다. Fig. 13a에 나타난 바와 같이 Coomassie Blue로 단백질 밴드를 염색하였을 때에는 발현된 α 1-AT를 검증하기가 어려웠다. 이러한 결과는 재조합 α 1-AT의 발현 수율이 상당히 낮거나 또는 다른 숙주세포 단백질 밴드와 전장에서 같은 위치에 이동하였기 때문일 것이다. 하지만 α 1-AT에 대한 항체를 사용하여 웨스턴 블랏 방법으로 α 1-AT를 검증하였을 때 Fig. 13b에서와 같이



- | | |
|--------------------------|------------------------|
| 1; pT-AT pre in. (28 °C) | 7; JM 109 |
| 2; " induction(28 °C) | 8; pT-6INIII |
| 3; " induction(37 °C) | 9; pT-AT(back insert) |
| 4; pT-AT pre in. (37 °C) | C; Antitrypsin(sigama) |
| 5; " induction(28 °C) | 0.2mg/ml |
| 6; " induction(37 °C) | Ab(sigama); 10mg/ml |

Fig. 12. 재조합 α 1-AT의 면역학적 특성.

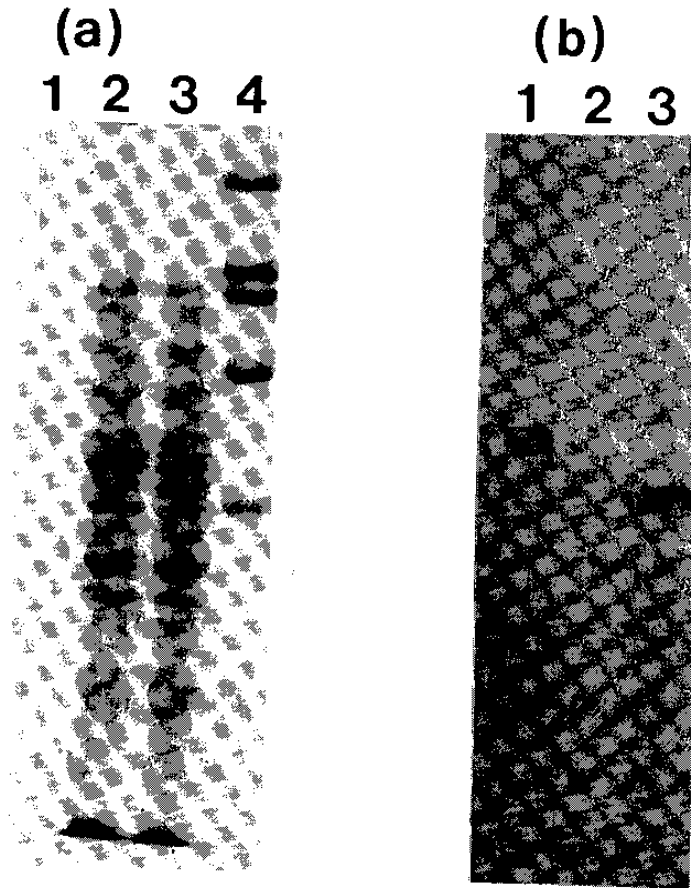


Fig. 13. E. coli JM109/pT-AT 세포추출액의 SDS-polyacrylamide gel 전기영동 (a) 및 Western blot의 결과 (b). 1, authentic α 1-AT ; 2, E. coli JM109/pT-AT 발현유도 전 ; 3, E. coli JM109/pT-AT 발현유도 후 ; 4, 분자량 마크, 위에서부터 200 kd, 116 kd, 94 kd, 66 kd, 42.5 kd.

기대했던 분자량 위치에 $\alpha 1$ -AT가 존재함을 알 수 있었다. E. coli에서 발현된 재조합 $\alpha 1$ -AT는 정제된 인체 $\alpha 1$ -AT보다 분자량이 작는데 이는 E. coli에서 생산되는 것은 glycosylation이 안된 상태이기 때문일 것이다.

제 4 장 결론 및 건의

본 연구에서는 인체 간 cDNA library로 부터 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용하여 $\alpha 1$ -AT 유전자를 스크린하였다. 선별된 파지 클론에는 1.3k bp의 DNA가 삽입되어 있었으며 이를 pUC 벡터에 다시 클론하여 분석한 결과 이미 보고된 $\alpha 1$ -AT 유전자의 서열과 일치함을 알 수 있었다. $\alpha 1$ -AT 유전자를 대장균에서 발현시키기 위해 택 (tac) 프로모터에 의해 전사가 활성화되도록 발현벡터 pT-AT를 제조하였다. 플라스미드 pT-AT에 의해 형질전환 된 E. coli JM109 균주에서는 IPTG를 넣고 재조합 단백질의 발현을 유도한 결과 $\alpha 1$ -AT의 활성이 발현유도 전 보다 10배 정도 증가하는 것을 보였으며, 발현된 $\alpha 1$ -AT는 사람 피에서 정제한 $\alpha 1$ -AT와 그 면역학적 특성이 같음을 알 수 있었다. 또한 같은 세포 추출액을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동법으로 분석한 결과 Coomassie

Blue로 단백질 밴드를 염색했을 때는 발현된 $\alpha 1$ -AT를 검증할 수 없었으나, $\alpha 1$ -AT에 대한 rabbit IgG 항체와 펄옥시다제가 연결된 anti-rabbit IgG goat 항체를 사용하여 웨스턴 블랏을 한 결과 $\alpha 1$ -AT 밴드가 기대했던 분자량 위치에서 확인되었다. 이와같이 생산된 재조합 $\alpha 1$ -AT는 authentic $\alpha 1$ -AT보다 분자량이 작은 것으로 나타났는데 이는 E. coli 세포 내에서 발현된 $\alpha 1$ -AT는 glycosylation이 안 된 형태의 것임을 나타내 준다. 2차년도에서는 대장균에서의 발현을 최적화하여 수율을 높이는 것과 효모와 같은 진핵세포에서 발현하는 것을 시도할 예정이다. 이러한 연구는 $\alpha 1$ -AT에 대한 단백질공학을 하기 위한 기초작업이 될 것이다.

참 고 문 헌

1. Carrell,R.W. et al. (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. Travis,J., and Johnson,D. (1981) Methods in Enzymology, Vol. 80, 754-765
5. Laurell,C.B., Dahlqvist,I., and Persson,U. (1983) J. Chromatography, 278, 53-61
6. Drechsel,D., Karic,L., and Glaser,C.B. (1984) Anal. Biochem. 143, 141-145
7. Glaser,C.B. et al (1982) Anal. Biochem. 124, 364-371
8. Lobermann et al. (1984) J. Mol. Biol. 177, 531-556

9. Doolittle,R.F. (1983) Science, 222, 417-419
10. Chandra,T. et al. (1983) Biochemistry, 22, 5055-5061
11. Hill,R.E. et al. (1984) Nature, 311, 175-177
12. Carrell,R. (1984) Nature, 312, 14
13. Carrell,R., and Travis,J. (1985) TIBS 20-24
14. Lieberman,J. (1973) Chest. 64, 579-584
15. Schindler,D. (1984) 16th Miami Winter Symposium.
Advances in Gene Technology, Human Genetic Disorders
(Ahmad,S et al. eds.) P.32
16. Sharp,H.L. (1971) Hospital Pract. 6, 83-96
17. Bathurst,I.C., Stenflo,J., Errington,D.M., and
Carrell,R.W. (1983) FEBS Lett. 153, 270-274
18. Foreman,R.C., Judah,J.D., and Colman,A. (1984) FEBS

Lett. 168, 84-88

19. Carrell,R.W., Bathurst,I.C., and Brennan,S.D. (1984)
Biochem. Soc. Symp. 49, 55-66
20. Frazer,J.M. et al. (1985) Arch. Biochem. Biophys.
239, 112-119
21. Walker,J.E. et al. (1982) Brit. J. Obsteries
and Gynaecology 89, 208-210
22. Sparos,L. et al. (1984) Br. J. Cancer, 49, 567-570
23. Tanaka,Y. et al. (1982) J. Juzen Med. Soc. 91, 727-743
24. Kurachi,K. et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA, 78, 6826-6830
25. Bollen,A. et al. (1983) DNA, 4
26. Costanzo,F. et al. (1983) EMBO J., 2, 57-61

27. Rogers, J. et al. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 116, 375-382
28. Long, G.L. et al. (1984) *Biochemistry*, 23, 4828-4837
29. Bollen, A. et al. (1984) *FEBS lett.* 166, 67-70
30. Courtney, M. et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 669-673
31. Rosenberg, S. et al. (1984) *Nature*, 312, 77-80
32. Travis, J. et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 4384-4389
33. Leicht, M. et al. (1982) *Nature*, 297, 655-659
34. Tanaka, T., Ohkubo, H., and Nakanishi, S. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 8063-8065
35. McReynolds, L. et al. (1978) 273, 723-728
36. Cox, D.W., Markovic, V.D., and Teshima, I.E. (1982)

- Nature, 297, 428-430
37. Choi, Y.C. et al. (1988) Korean Biochem. J. 21, 102-109
38. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratories, New York.
39. Mandel, M. and Higa, A. (1970) J. Mol. Biol. 53, 154.
40. Lo, K.M., Jones, S.S., Hackett, N.R., and Khorana, H.G. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 2285-2289
41. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467
42. Ouchterlony, O. and Nilsson, L.A. (1978) Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In Handbook of Experimental Immunology, ed. D.M. Weir, 3e Chapter 19. Blackwell Scientific Publications Oxford.
43. Laemmli, U.K. (1970) Nature, 227, 680-685

44. 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.