

고정화 Aminopeptidase M에 의해 메치오닐 인간성장호르몬으로부터 전환된 천연형 인간성장호르몬의 정제 및 특성 확인

†이 성 희 · 조 영 우 · 손 문 호 · 서 상 범 · 고 선 진 · 장 기 호
*최 차 용 · 김 원 배 · 양 중 익

동아제약(주) 연구소, *서울대학교 공과대학 공업화학과

Purification and Characterization of Authentic Human Growth Hormone Converted from Methionyl Human Growth Hormone by Immobilized Aminopeptidase M

Sung-Hee Lee[†], Yeong-Woo Jo, Moon-Ho Son, Sang-Beom Seo, Sun-Jin Ko, Ki-Ho Chang
Cha-Yong Choi*, Won-Bae Kim and Jung-Ick Yang

Research Laboratories, Dong-A Pharm. Co., Ltd.,
Kyunggi-do 449-900, Korea

*Department of Chemical Technology, College of Engineering,
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

ABSTRACT

The authentic hGH converted from met-hGH by immobilized ApM was purified by successive chromatographic processes based on the differences in isoelectric points, hydrophobicities and charges. The final recovery yield was about 14.1% and the specific activity of the purified hGH was 2.75 IU per mg when assayed by enzyme immunoassay. The purified hGH was verified to be authentic hGH through the analysis of amino acid composition, amino-terminal amino acid sequence, carboxy-terminal amino acid and tryptic peptide map. The purity of purified hGH was higher than that of commercial hGH when assessed by SDS-PAGE, PAGE, IEF and HSGF. In weight-gain assay and tibia test with hypophysectomized rats, the hGH produced in this study showed the same growth effect as the commercial hGH.

서 론

인간 성장 호르몬은 뇌하수체 전엽에서 분비되는 191개의 아미노산으로 구성된 단일사슬을 이룬 분자량 22,000 Da의 펩타이드 호르몬으로 세포크기의

증가, 세포분열의 증가 및 분화 촉진에 의한 체세포 성장과 골단의 성장 및 조골세포를 자극시키므로 나타나는 연골, 골 성장 촉진작용뿐만 아니라 혈당 조절 작용, 지방조직의 지방 분해작용, 단백질 합성 촉진 작용 및 세포내 전해질 대사작용 등 세포대사에 직접 관여하는 기능을 가지는 것으로 알려져 있다(1-3).

† Corresponding Author

사람의 뇌하수체에서 추출한 성장 호르몬(pituitary human growth hormone, pit-hGH)이 뇌하수체성 왜소증(hypopituitary dwarfism) 치료에 쓰일 수 있다는 가능성이 1958년 Raben(4)에 의하여 처음으로 제시된 이후 성장 호르몬의 수요는 급격히 증가하게 되었다. 그러나 뇌하수체 유래 성장 호르몬을 사용한 환자들에서 치명적 신경계 질환인 Creutzfeldt-Jacob 병이 종종 발생한다는 보고(5)가 나옴에 따라 뇌하수체 유래 인간 성장 호르몬의 사용은 거의 중단되기에 이르렀다. 최근에 유전공학 기술이 발전함에 따라 대장균(6-7)과 효모(8)에서 인간 성장 호르몬의 생산에 성공하였으며, 이들 재조합 인간 성장 호르몬은 뇌하수체에서 유래된 천연형 인간 성장 호르몬보다 아미노말단 메치오닌(amino-terminal methionine)이 더 첨가된 192개의 아미노산으로 구성되어 있다. 아미노말단 메치오닌은 대장균이나 효모의 단백질 합성 개시코돈 AUG에서 유래된 것이다. 메치오닐 인간 성장 호르몬(methionyl human growth hormone, met-hGH, somatrem)은 왜소증 치료 효과에서 뇌하수체 유래 성장 호르몬과 생물학적 활성이 동등하였으며 심각한 부작용을 나타내지 않았으나(9-11) 성장 호르몬에 대한 항체의 생성 정도가 비교적 높게 나타났다(11-13). 따라서 아미노말단 메치오닌이 없는 천연형 재조합 인간 성장 호르몬(human growth hormone, hGH, somatotropin)은 상대적으로 항원성이 작거나 없을 것으로 기대되어 왔는데 최근의 연구결과 천연형 아미노산 서열의 재조합 인간 성장 호르몬이 성장 호르몬 결핍증 소아의 치료에서 뇌하수체 유래 성장 호르몬, 재조합 메치오닐 인간 성장 호르몬과 마찬가지로 성장 촉진 효과가 있었으며, 성장 호르몬 항체 생성률이 상대적으로 낮아 면역원성이 작은 것으로 보고되었다(14-17).

천연형 재조합 인간 성장 호르몬을 만드는 방법은 대장균 또는 효모에서 met-hGH 또는 hGH의 아미노말단에 아미노산이 추가된 형태로 생합성된 pre-hGH에 효소를 반응시켜 아미노말단의 메치오닌 또는 추가 아미노산을 제거시켜 만드는 방법(18-20)과 signal peptide 유전자에 첨가된 hGH유전자를 갖는 plasmid를 이용하여 생합성한 후 periplasm 또는 배양액 중으로 분비되는 동안 천연형 hGH가 되도록 하여 만드는 방법(21-25) 등이 보고되어 있다.

한편 체내의 hGH와 마찬가지로 재조합 hGH에도 여러 가지 변이체가 존재한다. 149, 152번 아스파라긴이 디아미드화된 디아미드화형(deamidated form)

(26-29), Thr142-Tyr143 부위가 단백분해효소에 의해 절단된 절단형(clipped form)(30), 이량체, 중합체 등의 응집체(aggregated form)(31) 등이 존재한다. 디아미드화형과 절단형 변이체는 intact hGH와 동일한 생리적 활성을 가지나(28, 32) 응집체는 단량체 hGH 활성의 21.6% 정도만을 나타내는 것으로 알려져 있다(33).

저자 등은 고정화 aminopeptidase M(ApM) 즉 Cellufine-ApM을 이용하여 재조합 대장균으로부터 정제하여 얻은 met-hGH의 아미노말단 메치오닌을 특이적으로 제거하여 hGH로 전환시킬 수 있음을 이미 확인하였으며, 본 연구에서는 이와 같이 met-hGH로부터 아미노말단 메치오닌을 제거하여 얻은 hGH를 정제하고 정제한 hGH의 특성을 확인하였다.

재료 및 방법

실험재료

hGH 정제 시료는 고정화 ApM에 의해 met-hGH의 아미노말단 메치오닌이 제거된 것으로 동아 제약(주) 연구소에서 공급받았다. 재조합 대장균에서 발현시켜 정제한 met-hGH는 SDS-PAGE 분석에서 순도가 약 92%로 숙주유래 peptide들이 혼재되어 있었으며 고정화 ApM에 의해 아미노말단 메치오닌의 제거과정을 거치면서 생성된 hGH의 디아미드화 변이체, 절단형 변이체, 이량체 등이 혼재되어 있었다(Fig. 1의 B열, Fig. 2의 C열). 상용표준품 hGH로는 현재 뇌하수체성 왜소증 치료에 사용하고 있는 천연형 재조합 인간 성장 호르몬으로 Bio-Technology General사에서 생산한 SciTropin[®]을 구입하여 사용하였다. hGH의 정제시 사용한 Trizma base, NaCl, MES(2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid), MOPS(3-[N-Morpholino]-propane-sulfonic acid), TEA(Triethanolamine), glycine, Gly-Gly, urea는 Sigma사로부터 구입하였다. HPLC의 용매로 사용한 acetonitrile은 Baxter사, TFA(trifluoroacetic acid)는 Sigma사의 것을 사용하였고 그 이외의 시약들은 모두 특급시약을 사용하였다.

hGH의 정제

고정화 ApM을 이용하여 met-hGH를 hGH로 전환시켜 얻은 hGH 용액을 50mM Tris·HCl 완충용액(pH 8.2)으로 미리 평형화시킨 DEAE-Sepharose Fast Flow column (2.2×19cm, Pharmacia)

에 주입한 후 같은 완충용액으로 충분히 세척하여 column에 결합하지 않은 단백질을 제거하였고 poly buffer(MES, 11 mM; MOPS, 10 mM; TEA, 10 mM; glycine, 10 mM; Gly-Gly, 10 mM; Trizma base, 13 mM; urea, 2 M; pH 5.5)를 16.4ml/cm² hr의 속도로 흘려주어 hGH를 용출하였다. 음이온 교환 크로마토그래피에서 얻은 hGH 용액을 용매 A (30% 30 mM ammonium bicarbonate/38% acetonitrile/32% DW)로 미리 평형화시켜 놓은 Silica SC column (2.2×21cm, Amicon Matrex)에 주입하여 동일한 용매 A로 충분히 세척한 후 용매 A에서 용매 B(30% 30 mM ammonium bicarbonate/45% acetonitrile/25% DW)로 즉 38%에서 45%로의 acetonitrile 직선농도구배를 걸어주면서 결합된 단백질을 용출시켰다. 이 때 용출속도는 12.6ml/cm² hr이었다. hGH fraction을 모아 30 mM NaCl이 포함된 50 mM Tris·HCl 완충용액(pH 8.2)으로 평형화시켜 놓은 DEAE-Sepharose Fast Flow column (2.2×19cm, Pharmacia)에 주입한 후 같은 완충용액으로 세척하여 결합되지 않은 단백질을 제거하였다. hGH는 12.6ml/cm² hr의 속도로 30 mM에서 120 mM까지의 NaCl 직선농도구배를 걸어주면서 용출시켰고 직선농도구배에서도 용출되지 않은 단백질은 120 mM NaCl을 포함하는 50 mM Tris·HCl 완충용액(pH 8.2)으로 계속 흘려주어 용출시켰다. Non-denaturing PAGE분석을 통하여 hGH band를 확인한 후 순도가 좋은 fraction을 모아 YM10 membrane(MWCO : 10,000, Amicon)을 이용하여 농축시킨 후 정제된 hGH로 사용하였다.

전기영동

Pharmacia사(Uppsala, Sweden)의 Phast System과 Novex사(San Diego, USA)의 Xcell II Mini-cell kit를 이용하여 Laemmli(34)방법에 따라 polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 실시하였다. Nondenaturing PAGE시에는 Pharmacia사의 Phast 8-25 gradient gel과 Phast Native buffer strip을 사용하였으며, 등전집속시험(Isoelectric focusing, IEF)시에는 Phast Gel IEF 4~6.5를 사용하여 Phast System manual에 따라 전기영동하였다. SDS-PAGE시에는 Novex사의 Novex 4-20% Tris-glycine gel을 사용하였고 0.1% SDS를 포함하는 running buffer를 사용하였으며 단백질 시료는 2% SDS가 포함된 sample buffer와 섞은 다음 100℃에서 5분간 가열한 후 loading하고 전압을

130V로 일정하게 유지시키면서 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel은 0.25% Coomassie brilliant blue R-250(CBB, Sigma)이 포함된 염색용액에서 잘 흔들어서 염색시켰다. 염색된 gel은 30%(v/v) 메탄올과 10%(v/v) 빙초산이 포함된 탈색용액에 담겨 잘 흔들어서 탈색시켰다. IEF시의 표준 단백질과 등전위점은 Human carbonic anhydrase B, pI 6.55; Bovine carbonic anhydrase B, pI 5.85; β -lactoglobulin A, pI 5.20; Soybean trypsin inhibitor, pI 4.55; Glucose oxidase, pI 4.15; Amyloglucosidase, pI 4.0 이었으며, SDS-PAGE에서 사용한 표준 단백질(See Blue™ Pre-Stained Standards, Novex)과 분자량은 다음과 같다. Myosin, 250 KD; BSA, 98 KD; Glutamic dehydrogenase, 64 KD; Alcohol dehydrogenase, 50 KD; Carbonic anhydrase, 36 KD; Myoglobin, 30 KD; Lysozyme, 16 KD; Aprotinin, 6 KD.

효소 면역 측정법(Enzyme Immunoassay)

hGH의 역가는 Medix Biotech사(Foster City, USA)의 Enzyme immunoassay test kit, KIF 4015를 사용하여 측정하였다. Assay system은 polyclonal sheep anti-hGH가 고정된 microtiter plate well과 enzyme-conjugated mouse monoclonal anti-hGH를 사용하였다. Microtiter plate의 각 well에 hGH 표준품과 시료, 대조액을 각각 50 μ l 분주하고 enzyme-conjugated antibody 용액을 100 μ l 가하여 잘 섞은 후 실온에서 45분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 microtiter plate well을 증류수로 5회 세척하고, 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine(TMB)이 포함된 기질 용액을 200 μ l 가한 후 실온, 암소에서 15분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 microtiter plate의 각 well에 반응정지액(2N HCl)을 50 μ l 씩 가하여 반응을 정지시키고, 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 농도와 역가를 알고 있는 hGH 표준품의 농도와 흡광도 값으로부터 표준곡선을 작성하고 표준곡선으로부터 각 시료의 역가를 계산하였다.

고압 액체 크로마토그래피

역상 고압 액체 크로마토그래피 (Reverse-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)(32)는 Bio-Rad사(Herculis, U.S.A.)의 Hi-Pore® RP-304 column(4.6×250mm)을 사용하였으며 HPLC system은 HPLC controller(LKB,

2152), HPLC pump(LKB, 2150), UV monitor (LKB, 2158)와 Integrator(Hitachi, D-2500 Chromato-Integrator)로 구성되어 있다. 정제한 hGH 시료를 용매 A(0.2% TFA/20% acetonitrile/80% DW)와 부피비로 1:1로 섞은 후 100 $\mu\ell$ 를 취해 용매 B(0.1% TFA/10% acetonitrile/90% DW) 65%와 용매 C(0.1% TFA/70% acetonitrile/30% DW) 35%로 미리 평형화된 HPLC column에 주입하고 50분에 걸쳐 용매 B, 10%와 용매 C, 90%까지 선형농도구배로 유속 0.5ml/min으로 용출시켰다. 이때 용출액은 280nm에서 UV monitor로 검출하였으며 크로마토그램을 integrator에 기록하였다.

고속 겔 여과 크로마토그래피(High speed gel filtration, HSGF)는 TSK G 2000 SW(7.5 \times 600mm)을 사용하였고, 비변성 조건(non-denaturing condition)에서 분석하기 위하여 50mM sodium phosphate buffer, pH 7.4와 1% 2-propanol을 함유하는 용매를 사용하였다(29). 농도 2mg/ml의 정제한 hGH 시료 20 $\mu\ell$ 를 주입하여 0.5ml/min의 유속으로 용출하였으며 용출액은 280nm에서 UV monitor로 검출하였다.

아미노산 조성과 아미노말단의 아미노산 서열 분석 정제한 hGH의 아미노산 조성과 아미노말단의 아미노산 서열은 기초과학연구원 센터에 의뢰하여 분석하였다. 10 μg 의 시료를 0.5% phenol이 포함된 HCl로 110 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 동안 가수분해하고, phenylisothiocyanate(PITC)와 반응시켜 phenylthiohydantoin(PTH) 아미노산 유도체를 합성하였다. 아미노산 유도체는 Pico-Tag column(8.5 \times 150mm)이 부착된 HPLC로 분석하였다. 각 아미노산은 254nm에서 얻어진 PTH-아미노산 표준품의 피크면적과 비교하여 각 아미노산의 피크면적으로부터 계산되었다. 아미노말단의 15개 아미노산 서열은 시료를 Edman degradation으로 가수분해한 후 PTH-아미노산 유도체를 합성하였으며 단백질 서열 자동 분석기(Milligen 6600B, Waters)로 분석하였다.

카르복시 말단의 아미노산 분석

카르복시 말단의 아미노산 분석은 Bennett 등(35)의 방법에 따랐다. 정제한 hGH 2.2mg(100 nmole)을 0.1% sodium dodecyl sulfate이 첨가된 0.2 M N-ethylmorpholine acetate 완충용액(pH 8.5)에 투석시킨 후 carboxypeptidase A(Boehringer Mannheim) 22 $\mu\ell$ 을 2ml hGH 용액(2.2mg

hGH)에 첨가하여 실온에서 반응시켰으며 분석을 위해 반응 5분, 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 60분, 90분, 120분 후에 각각 200 $\mu\ell$ 의 시료를 취하여 반응정지 용매인 acetic acid를 최종농도가 10%가 되도록 첨가하고 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 가열하였다. 이때 유리된 아미노산의 분석은 Bidlingmeyer 등(36)의 방법에 따라 이 아미노산들에 phenylisothiocyanate(PITC)를 결합시켜 PTH-아미노산을 만든 후 HPLC로 분석하였다. Pico-Tag column(3.9 \times 150mm, Waters)을 사용하였으며 시료 50 $\mu\ell$ 를 주입한 후 Pico-Tag eluent A buffer와 60% acetonitrile의 buffer B에 의한 gradient로 용출하였고 용출액은 254nm의 UV detector로 검출하였다. 아미노산 standard는 Pierce사의 amino acid standard H(cat no. 20088)를 사용하였다.

트립신 펩타이드 절편 분석

트립신 펩타이드 절편 분석(trypsinic peptide mapping)은 Kohr 등(37)의 방법에 따랐다. 정제한 hGH 1.0mg/ml을 pH 9.0의 1% ammonium bicarbonate 용액으로 투석하여 salt를 제거시킨 후 1% ammonium bicarbonate 용액으로 용해시킨 trypsin 10 $\mu\ell$ 을 첨가하여 실온에서 반응시켰고, 8시간 후 10 μg 의 trypsin을 재 첨가하여 하룻 밤 동안 반응시켰다. 시료는 Waters사의 Nova-Pak C₁₈ column을 이용한 HPLC를 통하여 분석하였다. 이때 온도는 30 $^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였고 0.1% TFA를 첨가한 H₂O와 0.1% TFA를 첨가한 acetonitrile을 사용하여 20분까지는 acetonitrile 20%, 60분까지는 35%, 80분까지는 55%, 81분에서 91분까지는 90%, 91분에서 92분까지 0%를 유지하는 농도구배로 1.0ml/min의 유속으로 용출하였다. 용출액은 254nm의 UV detector로 검출하였다.

hGH의 생리활성도 측정

뇌하수체가 제거된 쥐의 체중 증가법과 경골 시험법을 이용하여 정제한 hGH의 생리활성을 측정하였다. 쥐들은 Sprague-Dawley종으로 수컷들이며 체중이 90~130g으로 찰스리버 연구소(Charles River Breeding Lab., Japan)에서 구입하여 청정실에서 사육하였다. 쥐들의 뇌하수체 제거(Hypophysectomy)는 Falconi 등(38)의 방법을 약간 변형하여 동아제약(주) 연구소에서 수술되었으며 그 후 표준식으로 사육하였다. 뇌하수체 제거된 쥐 40마리를 각 8마리씩 5개의 군으로 나눈 후, hGH 주입 10

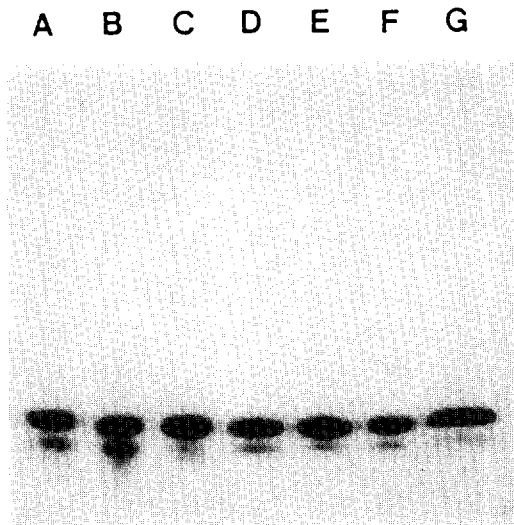


Fig. 1. Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis of hGH during purification. PHAST 8-25 gradient gel was run according to method. Lane (A), met-hGH solution before conversion reaction; (B), hGH solution after conversion reaction; (C), hGH fractions after DEAE-Sepharose chromatography eluted by pH gradient; (D), hGH fractions after Silica SC chromatography; (E), hGH fractions after DEAE-Sepharose chromatography eluted by NaCl gradient; (F), (G), hGH standard.

일 전부터 주입 후 6일간 매일 무게를 관찰하여 기록하였다. 대조군(control group)은 hGH 대신 우혈청 알부민(54 $\mu\text{g}/\text{day}$)만을 주사하였으며, 제 1군과 제 2군은 상용표준품 hGH (18 $\mu\text{g}/\text{day}$, 54 $\mu\text{g}/\text{day}$)을 제 3군과 제 4군은 정제한 hGH(18 $\mu\text{g}/\text{day}$, 54 $\mu\text{g}/\text{day}$)을 매일 하루에 2회 7시간 간격으로 6일 동안 피하로 주사하였다(39). 각 쥐의 뇌하수체가 완전히 제거된 것은 실험이 끝난 후 해부하여 뇌하수체의 존재유무를 관찰하여 다시 확인하였다.

경골시험(tibia test)은 마지막 주사 후 18시간에 체중을 측정후 해부하여 경골을 얻고 mid-sagittal plane을 따라 자른 뒤 2% 질산으로 염색하고 24시간 이내에 광학현미경(Olympus, No 512133)으로 사진을 촬영하여 최종적으로 40배 확대하여 epiphyseal cartilage 폭을 일정 간격의 10군데 다른 부위에서 측정하여 평균치를 구하였다(40).

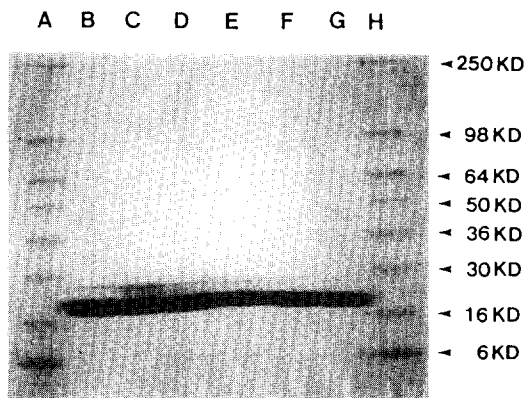


Fig. 2. Nonreducing SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of hGH solutions during purification. 4-20% Tris-Glycine Gel was run according to method. Lane (A), marker proteins; (B), met-hGH solution before conversion reaction; (C), hGH solution after conversion reaction; (D), hGH fractions after DEAE-Sepharose chromatography eluted by pH gradient; (E), hGH fractions after Silica SC chromatography; (F), hGH fractions after DEAE-Sepharose chromatography eluted by NaCl gradient; (G), hGH standard; (H), marker proteins.

결과 및 고찰

hGH의 정제

고정화 ApM을 이용하여 met-hGH의 아미노말단 메치오닌을 제거한 hGH 용액을 등전위점, 소수성, 전하량의 차이에 따라 3회의 일련의 크로마토그래피를 수행하여 hGH를 정제하였다. 1차 음이온 교환 크로마토그래피에서 등전위점의 차이에 따라 정제하였을 때 대부분의 변이체들이 제거되었으나(Fig. 1의 C열과 Fig. 2의 D열), hGH 주 밴드 아래 디아미드화 변이체 밴드 주변에 희미한 밴드가 남아 있었다(Fig. 1의 C열). 역상 크로마토그래피를 통하여 이 희미한 밴드를 제거할 수 있었고(Fig. 1의 D열), 마지막으로 음이온 교환 크로마토그래피를 실시하여 절단형 변이체, 디아미드화 변이체, 이량체, 다량체 등 정제과정을 거치면서 생성된 변이체를 제거할 수 있었다. 최종 정제된 hGH는 디아미드화 변이체가 약간 남아 있었으나 상용품보다 적은 양이었고(Fig. 1의 E, F, G 열), SDS-PAGE 분석에서는 단일 밴

Table 1. Purification of hGH.

STEP	Protein ^a (mg/ml)	Total protein(mg)	Specific act. ^b (IU/mg)	Total act. (IU)	Yield (%)
Conversion Rxn	2.0	449.8	2.24	1007.6	100.0
DEAE-Sepharose (pH gradient)	1.6	235.5	2.72	640.6	63.6
Silica SC	0.6	161.3	2.52	406.5	40.3
DEAE-Sepharose (NaCl gradient)	0.8	51.7	2.75	142.2	14.1

^aProtein concentration was determined by Lowry method.

^bhGH activity was assayed by ELISA method.

드로 나타났다(Fig. 2의 F열). 3단계의 크로마토그래피를 수행하여 정제한 hGH의 비활성은 효소 면역측정법으로 측정하였을 때 2.75IU/mg 이었으며, 정제수율은 14.1% 이었다(Table 1).

HPLC 분석

정제한 hGH의 순도를 확인하기 위하여 역상 고압액체 크로마토그래피를 실시한 결과 실험조건에서 정제한 hGH는 좌우대칭인 단일피크로 용출되었으며, retention time은 29.9분이었다(Fig. 3). 재조합 hGH에 존재하는 대부분의 이량체는 noncovalent form으로 존재하는데, 이는 PAGE나 30% 아세토니트릴 수용액에서 단량체 형태로 분리되기 때문에 이들 이량체 함량을 분석하려면 비변성 조건에서 분석하는 것이 바람직하다. 또한 이러한 이량체는 단량체 형태의 hGH에 비해 역가가 매우 낮은 것으로 보고되었다(33). 정제한 hGH에 존재하는 이량체 또는 중합체의 양을 비변성 조건에서 고속겔 여과 크로마토그래피법으로 분석한 결과(Fig. 4) 단량체가 97.7%(retention time, 32.79분), 이량체가 0.48%(retention time, 29.29분), 중합체가 1.8%(retention time, 22.12분)로 나타났다. 상분화된 hGH에 존재하는 단량체의 비율은 대부분 95% 이상으로(29) 정제한 hGH의 단량체 비율이 비교적 높은 것으로 나타났다.

정제한 hGH의 특성

정제한 hGH의 아미노산 조성은 보고된 hGH의 아미노산 조성과 비교적 잘 일치하였고(Table 2), 아미노말단 15개 아미노산의 서열은 알려진 hGH의 아미노산 서열과 일치하였으며, met-hGH의 아미노산 서열은 첫번째 아미노산이 메치오닌인 것을 제외하고는 hGH의 아미노말단 서열과 일치하였다

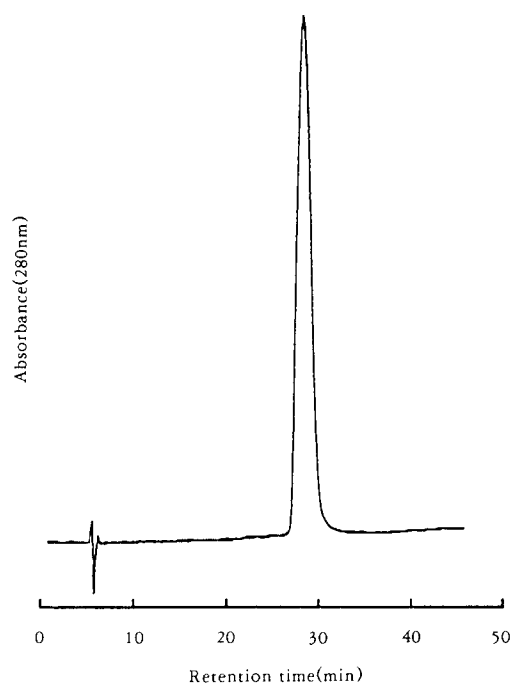


Fig. 3. Reverse-phase HPLC chromatogram of the purified hGH. Aliquot of the protein solution was injected onto a Hi-pore RP-304(4.6×250mm) HPLC column. The elution solvents were 0.1% TFA/10% acetonitrile/water(solvent A) and 0.1% TFA/70% acetonitrile/water(solvent B). The elution conditions consisted of a linear gradient from 35% solvent A plus 65% solvent B to 10% solvent A plus 90% solvent B for 50min and a flow rate of 0.5ml/min. The protein peak was monitored at 280nm.

Table 2. Amino acid composition of purified hGH.

Amino acid	Experimental values	Theoretical values
CYA*	6.4	4
ASX**	20.8	20
GLX**	26.7	27
SER	15.0	18
GLY	9.5	8
HIS	3.5	3
ARG	10.0	11
THR	9.4	10
ALA	7.8	7
PRO	8.1	8
TYR	7.8	8
VAL	7.7	7
MET	3.1	3
ILE	7.9	8
LEU	24.3	26
PHE	11.6	13
TRP	1.6	1
LYS	9.8	9
TOTAL	191	191

*CYA means the sum of cysteic acid and oxidized cystein.

**ASX and GLX mean the sum of asparagine and aspartic acid and glutamine and glutamic acid, respectively.

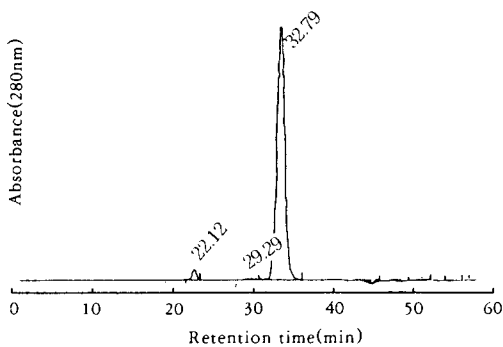


Fig. 4. High speed gel filtration chromatogram of purified hGH. An aliquot of the protein solution was injected onto a TSK G2000SW(7.4×600mm) HPLC column. The mobile phase used was 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 1% 2-propanol. The flow rate was 0.5ml/min. The eluant was monitored by UV detection at 280 nm.

Table 3. NH₂-terminal amino acid sequence of hGH.

Cycle	hGH	met-hGH
1	Phe	Met
2	Pro	Phe
3	Thr	Pro
4	Ile	Thr
5	Pro	Ile
6	Leu	Pro
7	Ser	Leu
8	Arg	Ser
9	Leu	Arg
10	Phe	Leu
11	Asp	Phe
12	Asn	Asp
13	Ala	Asn
14	Met	Ala
15	Leu	Met

The sequence analysis of hGH was performed with a automated protein sequencer(Waters, model : Milligen 6600B).

(Table 3). 이는 met-hGH를 hGH로 전환시킬 때 met-hGH의 아미노말단 메치오닌이 특이적으로 제거되었다는 것을 나타낸다.

정제한 hGH의 카르복시말단 아미노산이 Cys-Gly-Phe임을 예측하고 효소의 기질특이성을 고려하여 carboxypeptidase A(41)를 사용하여 정제한 hGH의 카르복시 말단 아미노산을 분석하였다. Carboxypeptidase A 반응 시간별로 시료를 분석한 결과 반응 5분 후에 첨가된 hGH 양의 약 83%의 phenylalanine이 유리되었고 약 6.5%의 glycine이 유리되었음을 확인하였으며 반응 120분 후에는 phenylalanine이 94.0%, glycine이 11.2% 유리되었음을 확인하였다(Fig. 5). 이러한 결과는 정제된 hGH의 카르복시 말단(191위치)의 아미노산이 phenylalanine이며, 190위치에 glycine이 존재한다는 것을 의미한다. 189위치의 cysteine은 만일 절단되었어도 다이설파이드 결합으로 인해 유리되지 않았을 것이며, 실험결과 다른 아미노산은 검출되지 않았다. 또한 이 결과는 Bennett 등(35)의 결과와 잘 일치하였다.

hGH는 트립신에 의해 20 부위가 절단되는데, 트립신에 의해 절단된 hGH의 펩타이드 절편들의 분석은 hGH의 구조를 밝히는 방법 중의 하나이다. Fig. 6은 정제한 hGH, met-hGH 표준품, hGH 표준품의

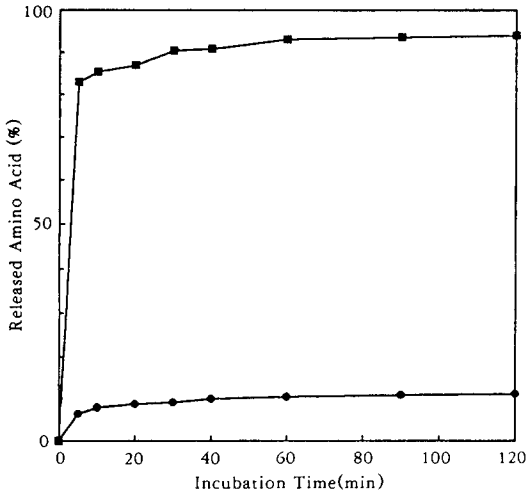


Fig. 5. Carboxypptidase A digestion of purified hGH. Digestion of 100 nmole hGH and analysis of the products were carried out as described in methods. ■-■, phenylalanine; ●-●, glycine.

tryptic peptide map을 비교한 것으로 Kohr 등(37)이 얻은 tryptic peptide map과 매우 유사한 형태로 나타났다. 정제된 hGH와 hGH 표준품의 각 펩타이드 절편의 모든 피크가 잘 일치하며, met-hGH와는 화살표로 표시된 피크 이외의 모든 피크가 일치한다. met-hGH에서 화살표로 표시된 피크가 hGH에서 표시된 피크보다 retention time이 더 큰 위치에 나타나는데, 이는 met-hGH에서 아미노 말단 절편에 메치오닌이 하나 더 있기 때문이다. 이상의 결과에서 정제된 hGH는 고정화 ApM에 의해 met-hGH의 아미노말단 메치오닌이 특이적으로 제거되었으며 아미노말단 메치오닌의 제거과정이나 정제과정중에서 아미노말단 또는 카르복시 말단이 절단되지 않았음을 알 수 있었다.

SDS-PAGE는 단백질의 분자량과 순도를 평가하는 분석법이며, hGH의 경우에는 conformation의 분석으로도 이용된다. SDS 존재하에서 전기영동적 이동은 분자량뿐만 아니라 다이설파이드 본드 (disulfide bonds)의 산화-환원 상태에 따라 다르게 나타난다. Fig. 7은 정제된 hGH, 표준품 hGH, 표준품 met-hGH의 환원제 존재시와 비존재시의 전기영동 결과를 보여주고 있다. 환원제 존재시에 표준품 hGH 또는 met-hGH와 같이 예상되는 분자량 22,000 Da 위치에 단백질 밴드가 나타났다. hGH는

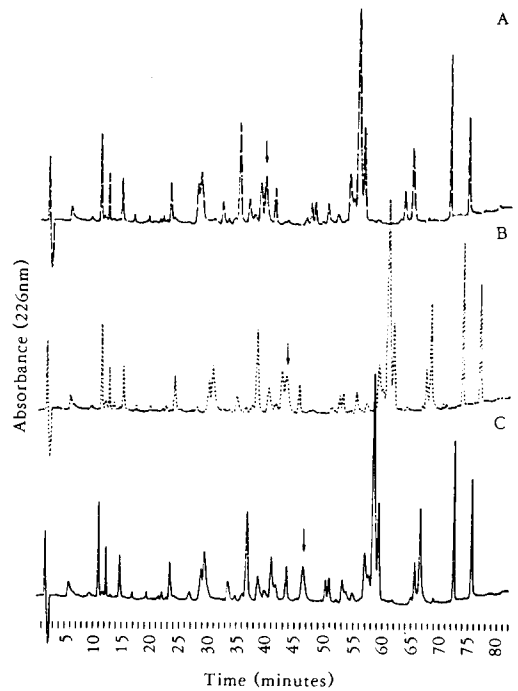


Fig. 6. Tryptic peptide mapping of hGH and met-hGH. Approximately 1mg of hGH standard(A) or purified hGH(B) or met-hGH (C) was digested with trypsin and aliquots of 35 μg injected onto the HPLC. The elution solvents were 0.1% TFA in water (solvent 1) and 0.1% TFA in acetonitrile (solvent 2). The elution conditions consist of a gradient from solvent 1 to solvent 2 as described in method at 30°C and a flow rate of 1ml/min. Detection of the eluant was at 226nm. The arrows denote noncoincident peaks between hGH and met-hGH.

제대로 folding되었을 경우 2개의 다이설파이드 본드가 존재한다. Fig. 7에서 환원제 비존재시와 환원제 존재시의 겔에서의 이동거리에서 뚜렷한 차이를 보였으며, 환원제 비존재시 환원된 hGH 위치에는 단백질 밴드가 나타나지 않으므로써 정제된 단백질이 모두 S-S 결합을 이룬 상태로 존재함을 나타낸다. 또한 절단형 hGH가 존재하면 환원제 비존재시 2,000 Da 큰 위치에 밴드가 나타나는 것으로 보고되어 있는데(35) 정제된 hGH에서는 그 위치에 밴드가 나타나지 않았다.

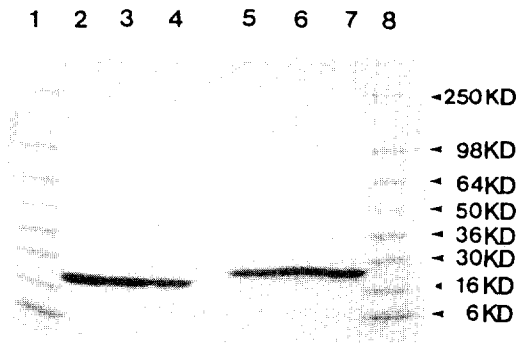


Fig. 7. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified hGH in nonreducing and reducing condition. Samples were incubated in 2 % SDS solution with or without 1 mM DTT at 100°C for 10 min before being loaded onto the Novex gel and run according to method. Lanes 2, 3 and 4, nonreducing condition; lanes 5, 6 and 7, reducing condition. Lanes 1 and 8, marker proteins; lanes 2 and 5, met-hGH; lanes 3 and 6, purified hGH; lanes 4 and 7, hGH standard.

정제한 hGH의 등전위점(Isoelectric point, pI)을 분석하기 위하여 등전집속시험을 실시하였다. Fig. 8에서 정제한 hGH의 등전위점이 약 5.0으로 hGH 표준품과 같은 값을 나타냈으며 met-hGH의 등전위점과도 같은 것으로 나타났다. 이는 단백질의 전반적 conformation이 매우 유사하다는 것을 의미한다. 절단형 hGH의 등전위점은 약 5.2로 보고되었으며, met-hGH의 등전위점이 hGH의 등전위점과 같은 것은 hGH의 아미노말단 메치오닌이 hGH전체의 전하특성 또는 단백질구조에 큰 영향을 주지 않는다는 것을 암시하며(35) 인터루킨-2의 경우에도 아미노말단 메치오닌이 등전위점에 영향을 주지 않는 것으로 보고되어 있다(42).

hGH의 생리활성

정제한 hGH의 생리활성을 측정하기 위하여 뇌하수체가 제거된 쥐의 체중 증가법과 경골(tibia) 시험법을 이용하였다. Fig. 9는 hGH 투여에 의한 체중 변화 결과를 보여주고 있다. 대조군에서는 체중이 단지 $-1.9 \pm 0.6g$ 증가하였다. 이에 비하여 상용표준품을 $18 \mu g/day$, $54 \mu g/day$ 주사한 군에서는 각각 $13.3 \pm 1.1g$, $19.8 \pm 0.3g$ 의 체중이 증가하였으며, 정

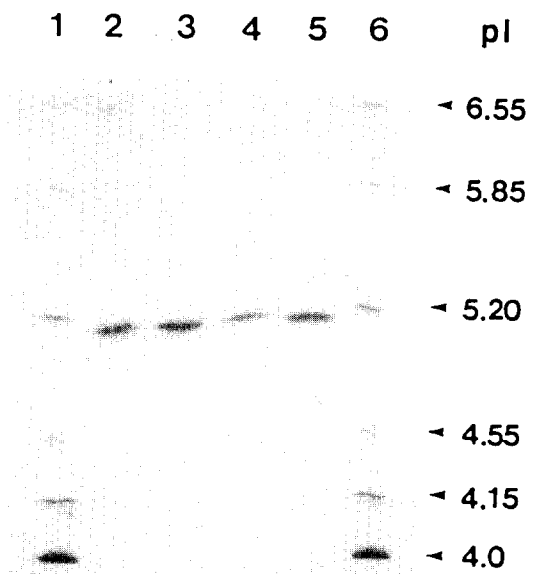


Fig. 8. IEF analysis of purified hGH. Phast IEF 4-6.5 gel was run according to method. Lanes 1 and 6, marker proteins; lane 2, met-hGH; lane 3, purified hGH; lanes 4 and 5, hGH standard.

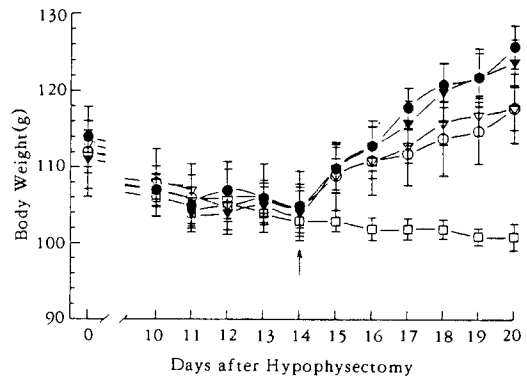


Fig. 9. Effect of hGH at two different doses on body weights of hypophysectomized rats. Initial weights of rats after hypophysectomy were measured 10 days prior to drug administration. Values represent mean \pm SEM(hGH standard: ∇ = $18 \mu g/day$, n=8; \blacktriangledown = $54 \mu g/day$, n=8; purified hGH: \circ = $18 \mu g/day$, n=8; \bullet = $54 \mu g/day$, n=8; control: \square = $54 \mu g$ BSA/day, n=8).

Table 4. Effects of hGH on body weight and uncalcified epiphyseal width of tibia in hypophysectomized rats.

	Control	purified hGH 18 μ g	purified hGH 54 μ g	hGH standard 18 μ g	hGH standard 54 μ g
Body Weight Gain(g)	-1.9 \pm 0.6	13.1 \pm 0.3	20.9 \pm 0.8	13.3 \pm 1.1	19.8 \pm 0.3
Epiphyseal Width(μ m)	54 \pm 3	106 \pm 16	126 \pm 20	112 \pm 14	117 \pm 20

제한 hGH 18 μ g/day, 54 μ g/day 주사한 군에서는 각각 13.1 \pm 0.3g, 20.9 \pm 0.8g의 체중 증가를 보였다. 정제한 hGH는 상용 표준품의 효력과 비교하여 거의 차이를 나타내지 않았으며, 주입한 hGH의 양에 따라 체중증가의 차이가 나타나는 dose-response 현상을 보여주었다.

뇌하수체 절제 쥐의 경골(tibia)의 epiphyseal cartilage 폭의 증가를 측정하여 본 결과(Table 4) 우혈청 알부민을 주사한 대조군의 uncalcified growth plate의 폭이 54 \pm 3 μ m인데 이에 비하여 상용 표준품 18 μ g, 54 μ g, 정제한 hGH 18 μ g, 54 μ g를 주사한 군에서는 uncalcified epiphyseal growth plate가 각각 112 \pm 14 μ m, 117 \pm 20 μ m, 106 \pm 16 μ m, 126 \pm 20 μ m까지 증가하여 우혈청 알부민을 주사한 대조군에 비해 경골의 성장에 있어서 뚜렷한 차이를 볼 수 있었다.

요 약

met-hGH로부터 고정화 ApM에 의해 전환된 천연형 hGH를 등전위점, 소수성, 전하량의 차이에 따라 3회의 일련의 크로마토그래피를 수행하여 정제하고, 정제된 hGH의 특성을 조사하였다. 정제한 hGH의 비활성은 효소면역측정법으로 분석하였을 때 2.75IU/mg이었고, hGH 회수율은 14.1%이었다. 정제한 재조합 hGH는 아미노산 조성, 아미노 말단의 15개의 아미노산 서열 분석, 카르복시 말단의 아미노산 분석, 트립신 가수분해 펩타이드들의 HPLC 분석등을 통해 아미노말단 메치오닌이 제거된 천연형 hGH임을 알 수 있었고, SDS-PAGE, native-PAGE, IEF, RP-HPLC, HSGF 등의 분석 결과 정제한 hGH는 상용품보다 순도가 높다는 것을 알 수 있었으며, 뇌하수체 제거 쥐의 체중 증가와 경골 성장폭의 증가를 통한 활성 측정 결과 정제한 hGH는 상용 hGH와 같은 정도의 활성을 나타내었으며 우혈청 알부민을 주사한 대조군에 비해 뚜렷한 성장 효과를 나타냈다. 따라서 본 연구에서 정제한 hGH는

천연형이며, 높은 순도와 우수한 생리활성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. G. Baumann, J. G. MacCART and K. Amburn(1983), *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, **56**, 946.
2. W. F. Ganong(1989), *Review of Medical Physiology*, p. 338, Prentice-Hall International Inc.
3. A. C. Guyton(1991), *Textbook of Medical Physiology*, p. 819, W. B. Saunders Company.
4. M. Raben(1958), *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, **18**, 901.
5. M. A. Preece(1986), *Applied Neurobiol.*, **12**, 509.
6. D. V. Goeddel, H. L. Heyneker, T. Hozumi, R. Arentzen, K. Itakura, D. G. Yansura, M. J. Ross, G. Miozzari, R. Crea and P. H. Seeburg (1979), *Nature*, **281**, 544.
7. M. Ikehara, E. Ohtsuka, T. Tokunaga, Y. Taniyama, S. Iwai, K. Kitano, S. Miyamoto, T. Ohgi, Y. Sakuragawa, K. Fujiyama, T. Ikari, M. Kobayashi, T. Miyake, S. Shibahara, A. Ono, T. Ueda, T. Tanaka, H. Baba, T. Miki, A. Sakurai, A. Oishi, O. Chisaka and K. Matsubara(1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 5956.
8. T. Tokunaga, S. Iwai, H. Gomi, K. Kodama, E. Ohtsuka, M. Ikehara, O. Chisaka and K. Matsubara(1985), *Gene*, **39**, 117.
9. S. L. Kaplan, L. E. Underwood, G. P. August, J. J. Bell, S. L. Blethen, R. M. Blizzard, D. R. Brown, T. P. Foley, R. L. Hintz, N. J. Hopewood, A. Johansen, R. T. Kirkland, L. P. Plotnick, R. G. Rosenfeld and J. J. Van Wyk (1896), *Lancet*, 697.

10. H. Flodh(1987), *Acta Paediatr. Scand.*, **337** (suppl), 130.
11. R. D. G. Milner, N. D. Barnes, J. H. Buckler, D. J. Carson, D. R. Hadden, I. A. Hughes, D. I. Johnston, M. J. Parkin, D. A. Price, P. H. W. Rayner, M. O. Savage, C. S. Smith and P. G. Swift(1987), *Archiv. of Disease in Childhood*, **62**, 776.
12. M. A. Preece(1986), *Immunological Aspects of Human Growth Hormone* (eds Milner, R. D. G. and Flodh, H.), p. 9, Medical Education Services, Oxford.
13. J. Tyllström, B. Karlen and O. Guilbaud (1986), *Immunological Aspects of Human Growth Hormone*(eds Milner, R. D. G. and Flodh, H.), p. 19, Medical Education Services, Oxford.
14. L. H. Rasmussen, M. Zachmann and P. Nilsson(1988), *Helv. Paediatr. Acta.*, **43**, 443.
15. F. Buzi, C. R. Buchanan, D. J. Morrell and M. A. Preece(1989), *Clin. Endocrinol.*, **30**, 531.
16. K. Lundin, L. Berger, F. Blomberg and P. Wilton(1991), *Acta Paediatr. Scand.*, **372** (suppl), 167.
17. H. F. Kuo, P. C. Liu, K. C. Shih, T. S. Lee and L. T. Ho(1992), *Acta Paed. Sin.*, **33**, 12.
18. S. Nakagawa, T. Yomada, K. Kato and O. Nichimura(1987), *Biotechnology*, **5**, 824.
19. H. Dalbøge, H-H. M. Dahl. J. Pedersen, J. W. Hansen and T. Christensen(1987), *Biotechnology*, **5**, 161.
20. E. Franchi, F. Maisano, S. A. Testori, G. Galli, S. Toma, L. Parente, F. D. Ferra and G. Grandi(1991), *J. Biotechnol.*, **18**, 41.
21. G. L. Gray, K. A. Mckeown, A. J. S. Jones, P. H. Seeburg and H. L. Heyneker(1984), *Biotechnology*, **4**, 161.
22. H. M. Hsiung, N. G. Mayne and G. W. Becker(1986), *Biotechnology*, **4**, 991.
23. C. N. Chang, M. Rey, B. Bochner, H. Heyneker and G. Gray(1987), *Gene*, **55**, 189.
24. C. Kato, T. Kobayashi, T. Kudo, T. Furusato, Y. Murakami, T. Tanaka, H. Baba, T. Oishi, E. Ohtsuka, M. Ikehara, T. Yanagida, H. Kato, S. Moriyama and K. Horikoshi(1987), *Gene*, **54**, 197.
25. H. M. Hsiung A. Cantrell, I. Luirink, B. Oudega, A. J. Veros and G. W. Becker (1989), *Biotechnology*, **7**, 267.
26. U. J. Lewis, R. N. P. Singh, L. F. Bonewald and B. K. Seavey(1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 11645.
27. W. S. Hancock, E. Canova-Davis, R. C. Chloupek, S. L. Wu, I. P. Baldonado, J. E. Battersby, M. W. Spellman, L. J. Basa and J. A. Chakel(1987), *Banbury Rep.*, **29**, 95.
28. G. W. Becker, P. M. Tackitt, W. W. Brommer, D. S. Lefebvre and R. M. Riggin (1988), *Biotech. Appl. Biochem.*, **10**, 326.
29. P. Gellerfors, B. Pavlu, K. Axelsson, C. Nyhlen and S. Johansson(1990), *Acta Paediatr. Scand.*, **370** (suppl), 93.
30. P. Gellerfors, G. Eketorp, K. Fh lenhag, B. Pavlu, S. Johansson and L. Fryklund(1989), *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **7**, 173.
31. R. C. Baxter and J. E. Turtle(1985), *The Biochemistry of the Poly Peptide Hormone*, p. 410, Wallis, M. Howell, S. L., Taylor, K. W., eds.
32. E. Canova-Davis, I. P. Baldonado, J. A. Moore, C. G. Rudman, W. F. Bennett and W. S. Hancock(1990), *Int. J. Peptide Protein Res.*, **35**, 17.
33. G. W. Becker, R. R. Bowsher, W. C. Mackellar, M. L. Pcor, P. M. Tackitt and R. M. Riggin(1987), *Biotech. Appl. Biochem.*, **9**, 478.
34. U. K. Laemmli(1970), *Nature*, **227**, 680.
35. W. F. Bennett, R. Chloupek, R. Harris, E. Canova-Davis, R. Keck, J. Chakel, W. S. Hancock, P. Gellefors and B. Pavlu(1989), *Advances in Growth Hormone and Growth Factor Research*, p. 29, E. E. Miller, D. Cocchi and V. Locatelli eds, Pytagora Press, Roma-Milano and Springer Verlag, Berlin-Heidelberg.
36. B. A. Bidlingmeyer, S. A. Cohen and T. L. Tarvin(1984), *J. Chromatogr.*, **336**, 93.
37. W. J. Kohr, R. Keck and R. N. Harkins (1982), *Anal. Biochem.*, **122**, 348-359.
38. G. Falconi and G. L. Rossi(1964),

- Endocrinology*, **74**, 301.
39. S. A. Maisonneuve(1987), *European Pharmacopoeia 2nd ed.*, Part II, Eleventh Fascicule, p. 556-1.
40. K. G. Thorngren and L. I. Hansson(1974), *Acta Endocrinologica*, **75**, 653.
41. R. P. Ambler(1967), *Methods Enzymol.*, **11**, 436.
42. K. Kato, T. Yamada, K. Kawahara, H. Onda, T. Asamo, H. Sugino and A. Kakinuma (1985), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **130**, 692.