

대장균내에서 발현된 돼지 TGF- β 1의 분리 및 면역학적 항원성 보유검증

최은영¹ · 김현태² · 김평현 · 변우현*

강원대학교 자연과학대학 생명과학부, ¹한림대학교 의과대학 생화학교실,
²삼진제약주식회사 중앙연구소

Expression of Immunologically Detectable Epitope Having Porcine Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) in *Escherichia coli*. Eun Young Choi, Pyung Hyun Kim and Woo-Hyeon Byeon*.
Division of Biological Science, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea - Porcine transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) was expressed in *Escherichia coli* using cDNA of TGF- β 1 and glutathione S-transferase (GST) fusion vector pGEX-1 λ T. An *ApoI-Tth111I* fragment of cDNA which correspond to the amino acid residues from 123 to 390 of the precursor TGF- β 1 was inserted into *EcoRI-Tth111I* digested pGEM-1 λ T and the recombinant plasmid was named pGET-12. Gene products from the cloned regions of the recombinant plasmids pGET-12 was not detected in soluble fraction of cell free extract but detected in insoluble fraction. The solubilization of insoluble gene product was achieved by the treatment of N-laurylsarcosine. Molecular weight of partially purified proteins determined by electrophoresis was same as expected from cloned fragment. The ELISA test results of the purified proteins showed that immunologically detectable epitope was preserved in recombinant protein.

여러 다양한 세포의 성장과 분화를 조절하는 cytokine 인 transforming growth factor (TGF)는 TGF- α 와 TGF- β 로 구성되며 TGF- β 는 현재까지 1, 2, 3, 4, 5의 5가지가 알려져 있다(2, 17). 이들 중 TGF- β 1은 25 Kd의 분자량을 가지는 동형이량체(homodimer)형태의 단백질로서 각각이 112개의 아미노산으로 구성되어 있다(3, 5). 활성화된 대식세포, T 세포, B 세포 등이 TGF- β 1을 합성하는데 이때 세포들이 분비하는 TGF- β 1은 거의 모두가 활성 잠재형이다. 이들 전구체 TGF- β 1은 390개의 아미노산으로 구성되어 있으며 활성형 TGF- β 1이 갖는 112개 아미노산 해당 부위는 전구체의 C 말단에 위치하고 있다. 활성형 TGF- β 1만이 TGF수용체에 결합할 수 있는데 생체 내에서 어떤 기작에 의해 활성화되는지 확실하게 알려져 있지 않지만 아마도 단백질 가수분해 과정이 전구체 TGF- β 1의 활성화 과정 중의 하나라고 알려져 있다(12, 15).

최근에 TGF- β 1이 LPS-stimulated B 세포에서 IgA의 isotype switching에 관여한다는 보고가 있는데(9, 10, 18) 생체 내에서 어떤 세포에 의해 어떤 기작으로 이 TGF- β 1이 합성되어 궁극적으로 B 세포 분화에 영향을 주는지는 알려지지 않고 있다. IgA는 장내에서 가장 많이 분비되는 immunoglobulin isotype이며 IgA 결핍증은 가장 흔하게 관찰되는 면역 결핍증(Immunodeficiency

syndrome)이다. 장내에는 각종 음식물 유래의 항원, 세균, 바이러스, 곰팡이 등이 항상 침입하는데 분비성 IgA (secretory IgA)항체는 이들 항원의 점액 조직 통과를 차단하는 역할을 하기 위하여 장내로 다량 분비되는 것으로 알려져 있다.

생체의 점액 조직에서의 IgA합성에 미치는 TGF- β 1의 역할을 알아보기 위해서는 TGF- β 1과 항TGF- β 1 항체가 다량으로 필요하다. 지난 20여 년 간 각종 진핵 및 원핵세포 유래의 단백질들이 *E. coli*내에서 다량 발현되어 왔다. 특정 단백질을 다량 발현시키기 위한 방법에는 재조합 DNA 구성에 따라 두 가지로 나눌 수 있는데 하나는 발현시키고자 하는 단백질의 구조유전자 부위만을 다른 유전자의 내부에 삽입, 연결하여 융합 단백질 상태로 발현시키는 방법이고 다른 하나는 발현시키고자 하는 단백질의 구조유전자를 다른 유전자의 promoter에 직접 연결시켜서 그 단백질만 발현하게 하는 직접 발현 방법이다(13). 본 연구에서는 glutathione S-transferase와의 융합 단백질 system을 이용하여 TGF- β 1 cDNA를 클로닝하였고 이 재조합 plasmid로부터 단백질을 발현시켰으며 이어 부분 정제하였다. 이렇게 분리된 단백질의 항원 결정기 기능 함유 여부를 ELISA로 검증한 결과 유의성이 있음이 밝혀졌다.

재료 및 방법

균주 및 plasmid

본 실험에서는 porcine TGF- β 1 cDNA가 Okayama와

*Corresponding author

Tel. 82-361-50-8542, Fax. 82-361-241-4627

E-mail: byeonwh@cc.kangwon.ac.kr

Key words: Porcine TGF- β 1, pGEX-1 λ T, Recombinant plasmid, *E. coli* system

Table 1. Plasmids

Plasmids	Relevant properties	Source
pTGFβ33	<i>Amp^r</i>	S. J. Kim (NIH, USA)
pGEX-1λT	<i>Amp^r</i>	Pharmacia Co.
pGET-12	<i>Amp^r</i>	this study

Berg cDNA 클로닝 vector인 pCDV1내에 삽입되어 있는 재조합 plasmid인 pTGFβ33을 김성진 박사(NIH, USA)로부터 기증 받아서 사용하였다.

발현 vector로는 Pharmacia Biotech로부터 구입한 glutathione S-transferase 융합 단백질 expression vector인 pGEX-1λT를 사용하였으며 재조합 plasmid의 형질전환에 사용된 숙주는 *Escherichia coli* HB101이었으며 미국 Pittsburg 대학의 G. Cooper 교수로부터 분양 받은 것을 사용하였다(Table 1).

제한효소 및 시약

실험에 사용된 제한 효소들 및 T4-DNA ligase 등은 New England Bio Lab. 에서 구입하여 사용하였고 DNA와 단백질의 분리 및 정제에 사용된 시약과 항생물질, lysozyme, RNase, isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG), 및 DNase 등은 Sigma Chemical Co.에서, 세균의 배양을 위한 배지 구성 성분들은 Difco Lab에서, 또한 glutathione 및 glutathione agarose bead는 Sigma Chemical Co.에서 각각 구입하여 사용하였다. ELISA에 사용된 standard TGF-β1은 mature porcine TGF-β1으로서 미국 R&D System (Minneapolis, MN)에서 구입하여 사용하였으며 TGF-β1에 대한 monoclonal antibody는 Dr. J. R. Dasch (Collagen Corporation, Palo Alto, CA, USA) 로 부터 기증받아 사용하였다.

SDS-Polyacrylamide gel 전기영동 및 Coomassie blue 염색

SDS-Polyacrylamide linear slab gel은 Hoefer Sci. Instrument의 Mighty Small Gel Kit를 이용하여 12% 혹은 15%로 만들어 10-15 mA로 진행시켰다. 전기영동이 끝난 gel은 Coomassie blue 염색 용액(Coomassie brilliant blue 0.1%, methanol 45%, acetic acid 10%)에서 1-4시간 동안 염색한 후 탈색용액(methanol 10%, acetic acid 10%)으로 탈색하여 gel 건조기로 건조시켰다.

Glutathione S-transferase (GST) 융합단백질의 발현 및 정제

재조합 plasmid로 형질전환 시킨 *E. coli*를 약 18시간 배양한 후 ampicillin(100 μg/ml)이 포함된 LB배지에 1:10으로 희석하여 1시간 동안 37°C에서 배양한 다음 IPTG를 최종농도 0.5 mM이 되도록 첨가하여 4시간 동

안 유전자 발현을 유도하였다. 발현 유도된 세포를 8.4 mM Na₂HPO₄, 1.9 mM NaH₂PO₄, pH 7.4, 150 mM NaCl농도의 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 두번 세척 한 후 초음파 세포파쇄장치로 1분간 세균 세포를 파괴하고 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 여기에 5×SDS sample buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)를 더하고 5분간 끓인 후 12% SDS-polyacrylamide gel상에서 전기영동하여 단백질의 발현여부를 확인하였다.

가용성 융합단백질을 분리하기 위해서는 배양된 균 현탁액을 원심분리 한 후 침전된 균체를 얼음으로 식힌 STE(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)로 세척하였다. Lysozyme(100 μg/ml)이 포함된 STE에 재 현탁하여 얼음에서 15분간 방치한 후 DTT(5 mM)와 N-laurylsarcosine(1.5%)을 처리하고 얼음에서 초음파 파쇄하여 세포를 파괴하였다. 4°C에서 15,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 얻은 상층액에 Triton X-100(2-4%)과 washed swollen glutathione agarose bead suspension(50% v/v in PBS)을 첨가한 후 4°C에서 15분간 방치한 다음 15,000 rpm으로 15초간 원심분리하였다. Bead를 얼음으로 식힌 PBS로 6-8번 세척하여 비특이적으로 결합한 단백질을 제거한 후 일부는 15% SDS polyacrylamide gel전기영동을 하고 나머지는 10 mM 환원된 glutathione이 포함된 buffer(75 mM HEPES, pH7.4, 150 mM NaCl, 10 mM reduced glutathione, 5 mM DTT, 0.1% Triton X-100)로 용출하였다. 융합단백질을 절단하기 위해서 thrombin을 0.2%(w/w)농도로 처리하고 reaction buffer(50 mM Tris, pH8.0, 150 mM NaCl 2.5 mM CaCl₂)를 첨가하여 25°C에서 30-60분간 처리하였다.

Inclusion body의 수용화

E. coli 내에서 pGET-1으로부터 만들어진 불용성형의 단백질의 가용화는 Marston의 방법(13)에 따랐다.

Sandwich ELISA

생산된 재조합 단백질들은 sandwich ELISA 방법으로 검출하였다. ELISA plate에 50 μl의 생쥐 monoclonal anti-TGF-β1(1 μg/ml)을 담아 4°C에서 약 18시간 방치함으로써 coating하였다. 200 μl의 PBST(0.01 M PBS-0.05% Tween 20)로 세척한 후 gelatin blocking 용액으로 한시간 동안 37°C에서 진탕함으로써 blocking 하였다. 표준 단백질과 시료 단백질을 0.5% bovine serum albumin을 포함한 PBST용액으로 희석한 후 plate에 담아 37°C에서 배양하고 이어 50 μl의 정제된 chicken anti-TGF-β1 항체(2 μg/ml)를 너허 다시 37°C에서 1시간 방

치한 후 200 μl의 PBST 용액으로 세척하였다. 50 μl의 서양고추냉이(horse radish) peroxidase (HRPO)-conjugated goat anti-chicken IgG 항체(1 μg/ml in 0.5% BSA-PBST)를 더해 37°C에서 1시간 동안 진탕하였다. ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonic acid) 기질 용액을 더해 1분간 실온에서 방치한 후 Flow Microscan ELISA 기기로 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

TGF-β1 유전자의 클로닝

약 2.2 kb 크기의 TGF-β1 cDNA를 Okayama와 Berg의 cDNA cloning vector인 pCDV1(16)에 cloning 하여 얻은 5.2 kb의 pTGFβ33은 그 염기서열 분석 결과 TGF-β1의 390개의 아미노산으로 구성된 '전구체 TGF-β1(precursor TGF-β1)'의 open reading frame이 포함되어 있으며 이는 전체 7개 exon을 망라한 서열에 해당된다(4, 11).

pTGFβ33내로 cloning된 TGF-β1 cDNA부위와 3'말

1 Met Pro Pro Ser Gly Leu Arg Leu Leu Pro Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Leu Leu Val	20
1 ATG CCC CCT TCG GGG CTG CGC CTC TTG CCG CTG CTG CTG CCG CTG CTG TGG CTG CTA GTG	60
21 Leu Thr Pro Gly Arg Pro Ala Ala Gly Leu Ser Thr Cys Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu	40
21 CTG ACG CCT GGC CGG CCG GCC GGC GGA CTG TCC ACC TGC AAG ACC ATC GAC ATG GAG CTG	120
41 Val Lys Arg Lys Arg Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala	60
121 GTG AAG CGG AAG CGC ATC GAG GCC ATT CGC GGC CAG ATT CTG TCC AAG CTT CGG CTC GCC	180
61 Ser Pro Pro Ser Gln Gly Asp Val Pro Pro Gly Pro Leu Pro Glu Ala Val Leu Ala Leu	80
181 AGC CCC CGG AGC CAG GGG GAC GTG CCG CCG GCC CCG CTG CCT GAG GCC GTA CTG GCT CTT	240
81 Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Val Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu	100
241 TAC AAC AGT ACC CGC GAC CCG GTA GCC GGG GAA AGT GTC GAA CCG GAG CCC GAG CCA GAG	300
101 Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr Arg Val Leu Met Val Glu Ser Gly Asn Gln Ile	120
301 GCG GAC TAC TAC GCC AAG GAG GTC ACC CGC GTG CTA ATG GTG GAA AGC GGC AAC CAA ATC	360
121 Tyr Asp Lys Phe Lys Gly Thr Pro His Ser Leu Tyr Met Leu Phe Asn Thr Ser Glu Leu	140
361 TAT GAT AAA TTC AAG GGC ACC CCC CAC AGC TTA TAT ATG CTG TTC AAC ACG TCG GAG CTC	420
141 Arg Glu Ala Val Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu Leu Arg Leu	160
421 CCG GAA GCG GTG CCG GAA CCT GTA TTG CTC TCT CCG GCA GAG CTG CGC CTG CTG AGG CTC	480
161 Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys Tyr Ser Asn Asp Ser Trp Arg	180
481 AAG TTA AAA GTG GAG CAG CAC GTG GAG CTA TAC CAG AAA TAC AGC AAT GAT TCC TGG CGC	540
181 Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro Ser Asp Ser Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val	200
541 TAC CTC AGC AAC CCG CTG CTG GCC CCC AGT GAC TCA CCG GAG TGG CTG TCC TTT GAT GTC	600
201 Thr Gly Val Val Arg Thr Arg Thr Arg Arg Glu Ala Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser	220
601 ACC GGA GTT GTG CCG CAG TGG CTG ACC CGC AGA GAG GCT ATA GAG GGT TTT CGC CTC AGT	660
221 Ala His Cys Ser Cys Asp Ser Lys Asp Asn Thr Leu His Val Glu Ile Asn Gly Phe Asn	240
651 GCC CAC TGT TCC TGT GAC AGC AAA GAT AAC ACA CTC CAC GTG GAA ATT AAC GGG TTC AAT	720
241 Ser Gly Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met Asn Arg Pro Phe Leu Leu Leu	260
721 TCT GGC CGC CGG GGT GAC CTG GCC ACC ATT CAC GGC ATG AAC CCG CCC TTC CTG CTC CTC	780
261 Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln His Leu His Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu	280
781 ATG GCC ACC CCG CTG GAG AGG GCC CAG CAC CTG CAC AGC TCC CCG CAC CGC CGA GCC CTG	840
281 Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile	300
841 GAT ACC AAC TAC TGC TTC AGC TCC ACG GAG AAG AAC TGC TGC GTG CCG CAG CTC TAC ATT	900
301 Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn	320
901 GAC TTC CGG AAG GAC CTG GGC TGG AAG TGG ATT CAT GAA ECC AAG GGC TAC CAT GCC AAT	960
321 Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu	340
951 TTC TGC CTG GGG CCG TGT CCC TAC ATC TGG AGC CTA GAC ACT CAG TAC AGC AAG GTC CTG	1020
341 Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala	360
1021 GCT CTG TAC AAC CAG CAC AAC CCG GGC CCG TCG GCG GCG CCG TGC TGC GTG CCG CAG GCG	1080
361 Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser	380
1081 CTG GAG CCA CTG CCC ATC GTG TAC TAC GTG GGC GCG AAG CCC AAG GTG GAG CAG CTG TCC	1140
381 Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser ***	390
1141 AAC ATG ATC GTG CGT TCC TGC AAG TGC AGC TGA GGCCCGCCCGCCACAGCCCGCCACCCGGCA	1208
1209 GGCCCGCCCGCCACCCCGCCCGCTCACCGGGCTGATTTAAGGACATCGTCCCAAGCCACCTGGGATCGATTAA	1287
TGF-β1 cDNA ←→ vector (pCDV1)	
1288 AGGTGGAGAGAGGACTGGGTCTCCGTGT	1316
7th1111	

Fig. 1. Base sequence of porcine TGF-β1 and deduced amino acid sequence. Nucleotides and amino acids are numbered from the beginning of those of the precursor TGFβ1 (Kondaiah et al., 1988). Amino acid sequence of the mature TGFβ-1 (from 279 to 390 residue of the precursor TGFβ-1) is underlined. Two restriction enzyme recognition sites (ApoI and Tth1111) used for cloning in E. coli are also underlined.

단에 연결된 vector 부위를 포함하는 약 3.1 kb 영역의 염기서열을 분석하여 mature TGF-β1 부위내에 인식부위가 없는 제한효소 ApoI 등 18종을 일단 선별하였다(자료는 제시하지 않았음). 이들 제한효소들에 의한 절단부위 염기서열을 발현 vector로 사용할 pGEX-1λT의 cloning site의 와 비교하여 cloning에 따른 가수분해 및 ligation 과정에서 open reading frame에 frameshift가 초래되지 않을 것으로 분석된 ApoI과 Tth1111을 선택, 두 효소로 잘린 절편을 cloning하였다(Fig. 1, 2, 3). pGEX-1λT는 taq promotor와 GST를 coding하고 있고 이 단백질의 N말단 부위에 클로닝 부위와 thrombin에 인식되어 절단되는 부위가 있으므로 재조합DNA를 만들어 융합 단백질이 만들어질 경우 분리 정제하기 용이하다(19, 20).

Mature TGF-β1에 해당하는 123-390번 아미노산이 포함되도록 ApoI과 Tth1111으로 자른 1.4 kb 크기 절편

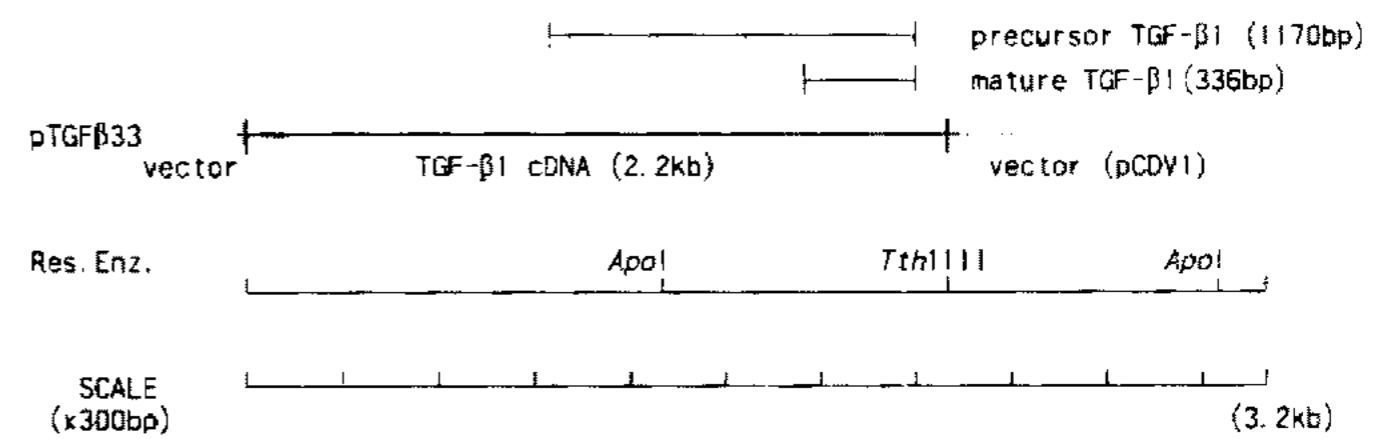


Fig. 2. Restriction enzyme recognition sites in 3.2 kb TGF-β1 cDNA in plasmid pTGFβ33 (5.2 kb) which containing precursor and mature TGF-β1

Eighteen restriction enzymes which have no recognition sites inside the nucleotide sequence of the mature TGF-β1 were screened for cloning TGF-β1 (data are not shown). Among these, ApoI and Tth1111 were chosen for easy cloning into pGEX-1λT expression vector.

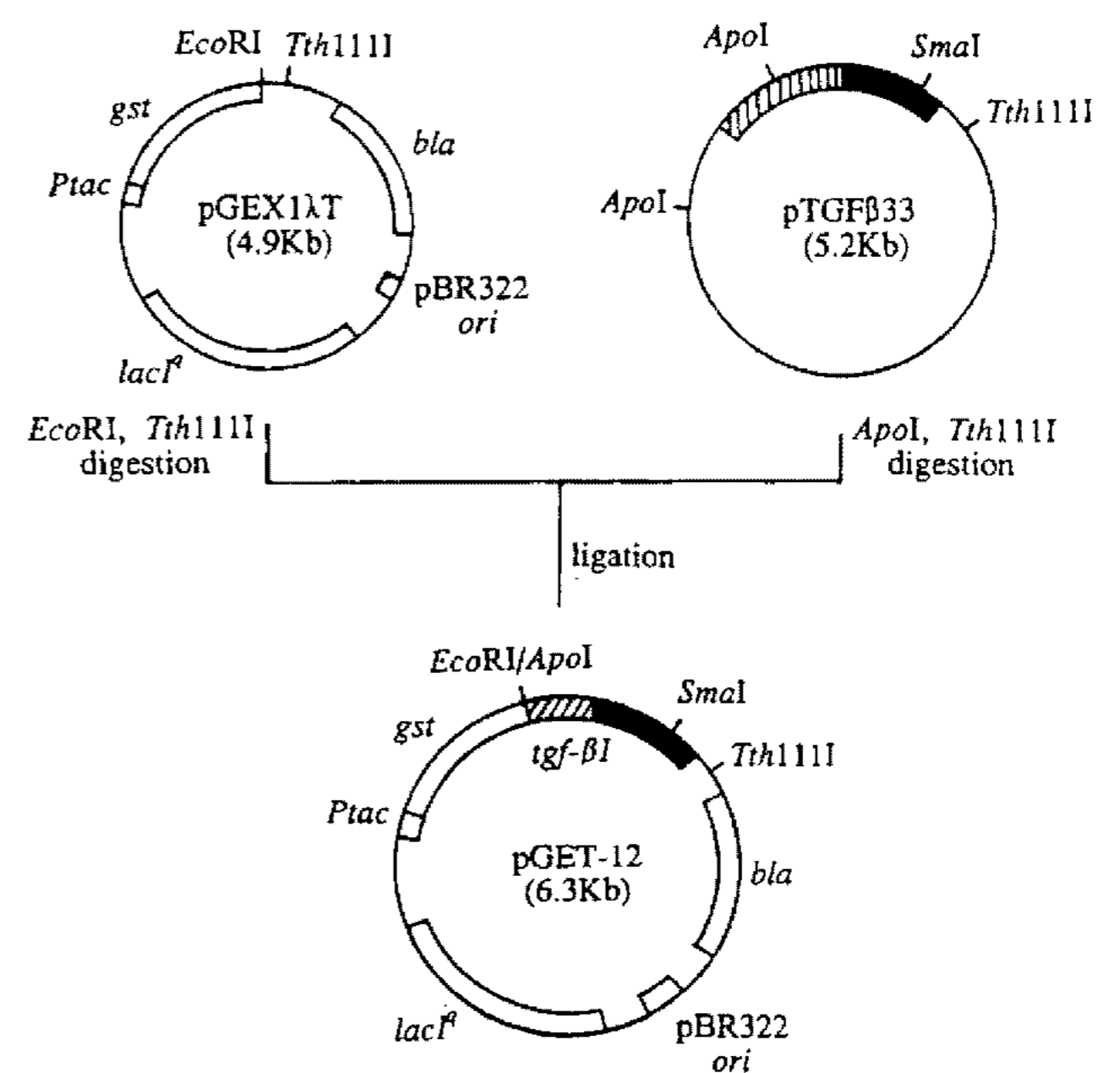


Fig. 3. Construction of pGET-12. ApoI-Tth1111 fragment from pTGFβ33 was ligated with EcoRI and Tth1111 digested pGEX-1λT.

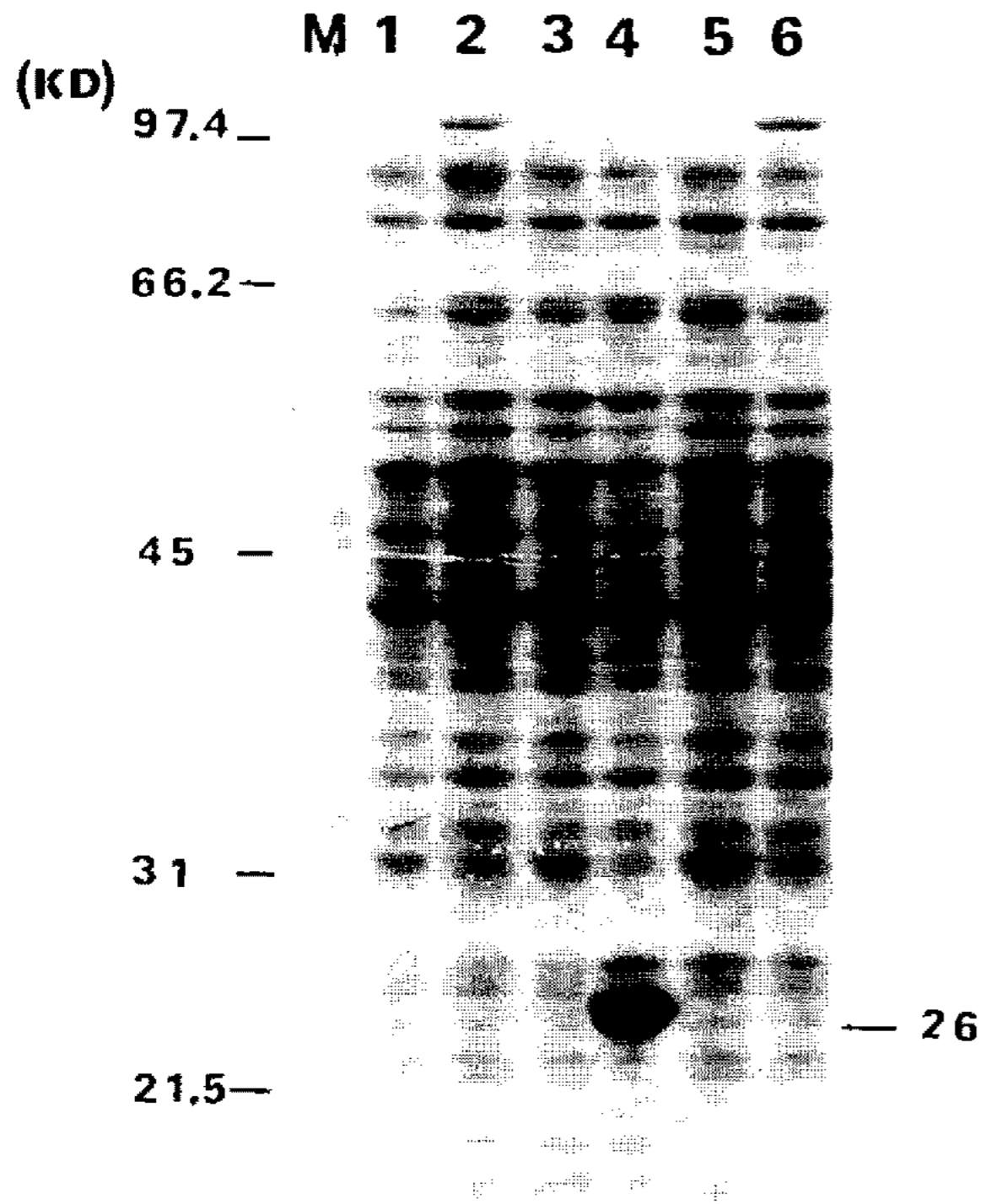


Fig. 4. Soluble protein within cell extract.

Lane 1, soluble proteins from *E. coli* HB101; lane 2, from *E. coli* HB 101 with IPTG induction; lane 3, from pGEX-1 λ T harboring cell; lane 4, from pGEX-1 λ T harboring cell with IPTG induction; lane 5, from pGET-12 harboring cell; lane 6, from pGET-12 harboring cell with IPTG induction. M, molecular weight marker.

을 agarose gel 전기영동으로 분리하여 pGEX-1 λ T를 *Eco*RI과 *Tth*111I으로 자른 부위에 연결시켰다. 이것을 *E. coli* HB101에 형질전환하여 ampicillin이 포함된 LB 배지에서 형질전환체를 얻어낸 다음 DNA minipreparation을 하여 agarose gel상에서 DNA크기가 4.9 kb에서 6.3 kb로 증가한 것을 선별한 후 인식부위가 vector에는 존재하지 않고 insert에는 single site로 존재하는 *Sma*I과 vector에는 two site, insert에는 single site로 존재하는 *Bgl*II으로 절단하여 insert가 vector내에 바른 orientation으로 클로닝되었는지를 확인하였다. *Sma*I 처리시 단일 가수분해되고 *Bgl*II처리시 2.64 kb, 2.3 kb대신 2.64 kb, 2.06 kb, 1.65 kb로 가수분해되는 재조합 plasmid pGET-12를 찾았다(Fig. 2, 3).

GST융합단백질의 발현 및 정제

운반체 plasmid pGEX-1 λ T와 재조합 plasmid인 pGET-12(123-390)를 *E. coli* HB101에 도입하여 얻은 형질전환체를 IPTG로 발현 유도하여 융합단백질을 발현시켰다. 세포를 모은 후 초음파 발생 장치로 세포를 파쇄하여 세포 추출물을 얻고 이를 원심분리하여 얻은 상층액을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동하였다. 그 결과

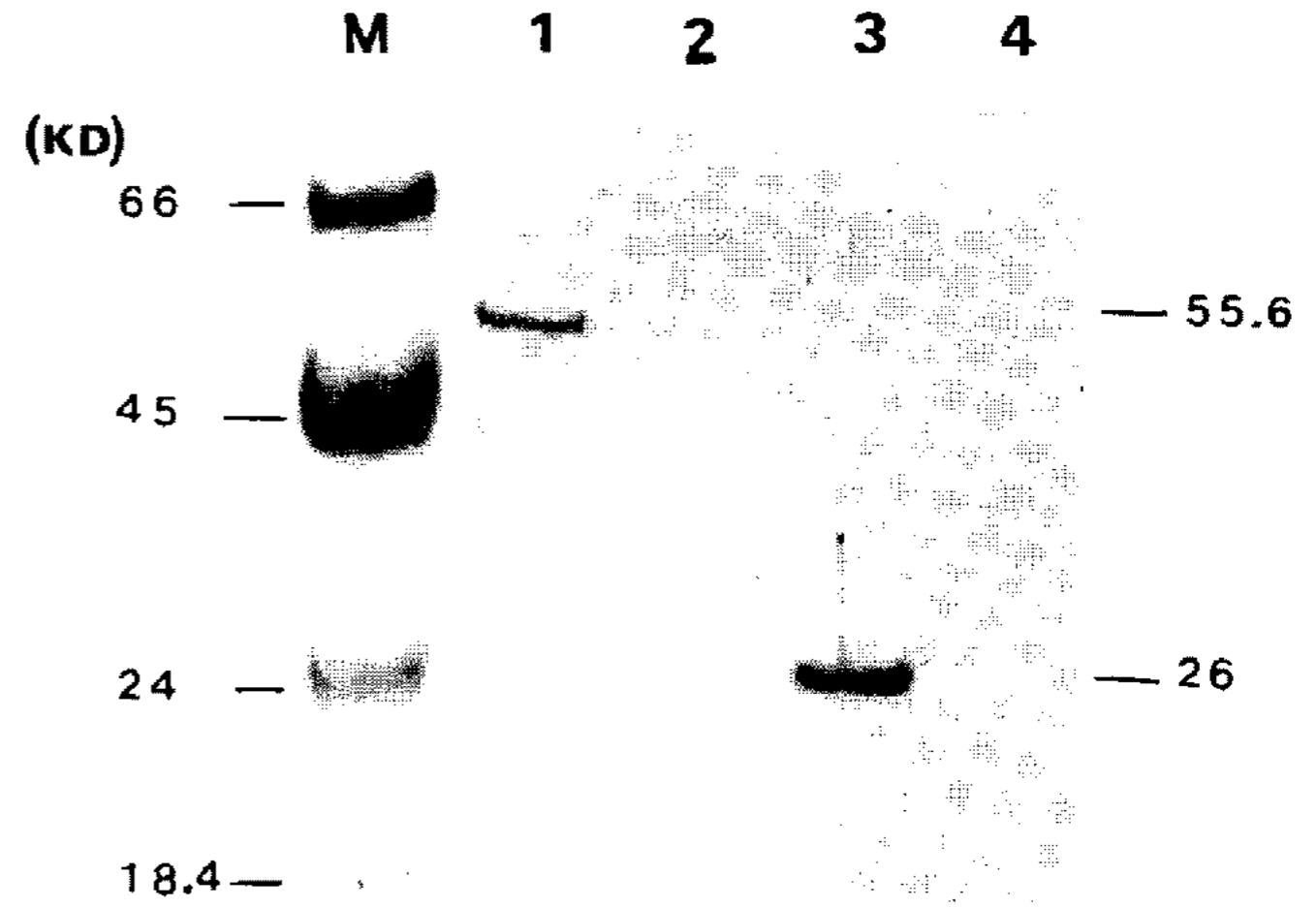


Fig. 5. Expression and purification of the GST fusion protein. Purified fusion protein using glutathione agarose bead; lane 1, from IPTG induced pGET-12 harboring cell; lane 2, from pGET-12 harboring cell without induction; lane 3, from IPTG induced pGEX-1 λ T harboring cell; lane 4, from pGEX-1 λ T harboring cell without induction. M, molecular weight marker.

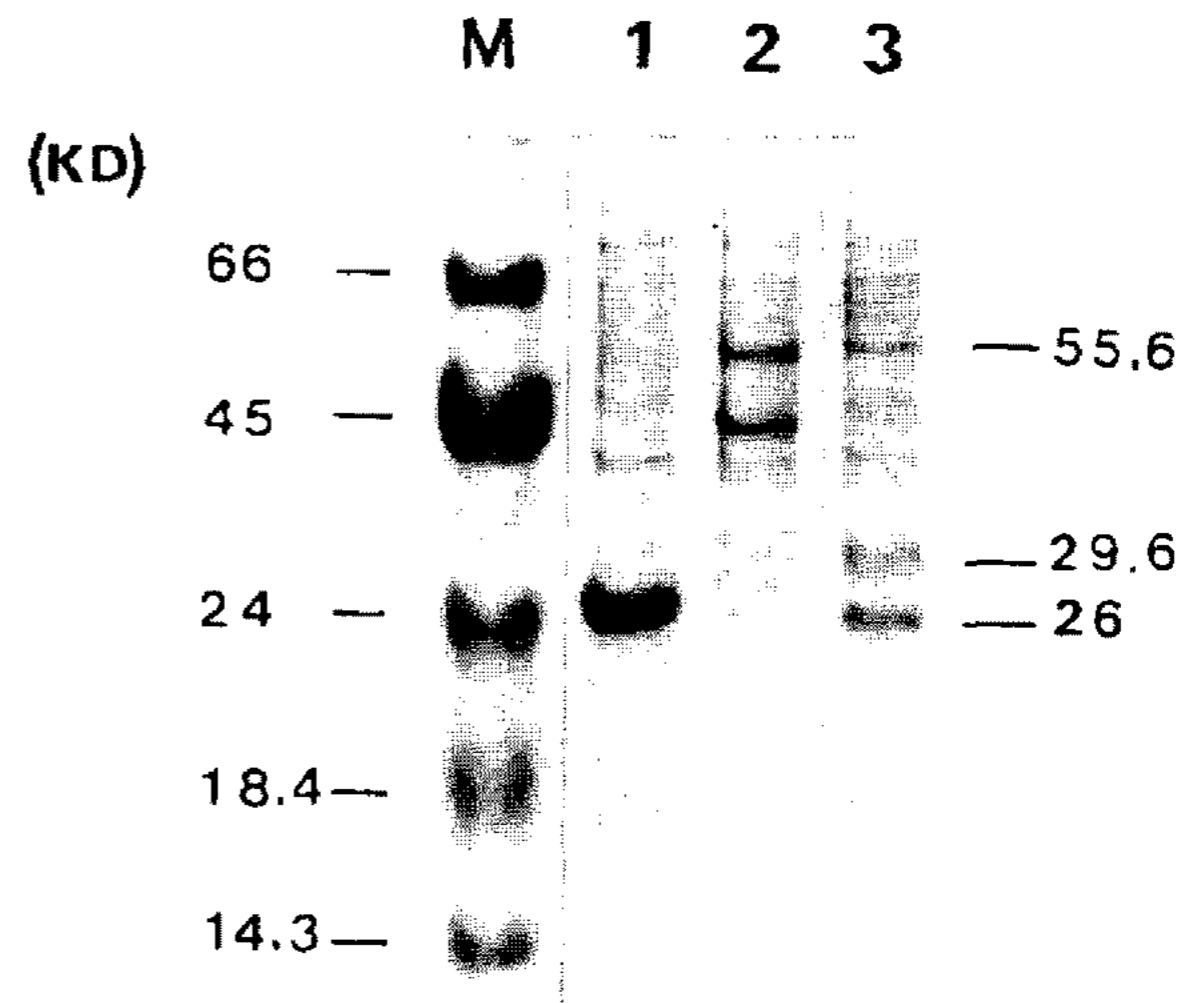


Fig. 6. Thrombin digestion of fusion protein.

Lane 1, GST protein from pGEX-1 λ T; lane 2, fusion protein from pGET-12 without thrombin digestion; lane 3, thrombin-digested fusion protein from pGET-12. Solubilized fusion protein added to glutathione-agarose bead for specific binding. Beads are collected and washed and then fusion protein eluted from beads using SDS-elution buffer. Eluted fusion protein was digested with thrombin and applied for electrophoresis. M, molecular weight marker.

pGEX-1 λ T에서는 단백질이 다량 발현하는 것이 확인되는데 비해 pGET-12에서는 융합단백질의 발현이 관찰되지 않았다. 이어 N-laurylsarcosine을 이용하여 불용성 상태의 단백질을 수용화 시키는 방법을 수행하였다(7, 8). N-laurylsarcosine으로 수용화 시킨 GST융합단백질과 glutathione agarose bead를 섞어 결합시키고 비특이적으로 결합한 단백질을 PBS로 세척하여 제거하였다. 단백질이 특이적으로 결합한 bead를 SDS sample buffer

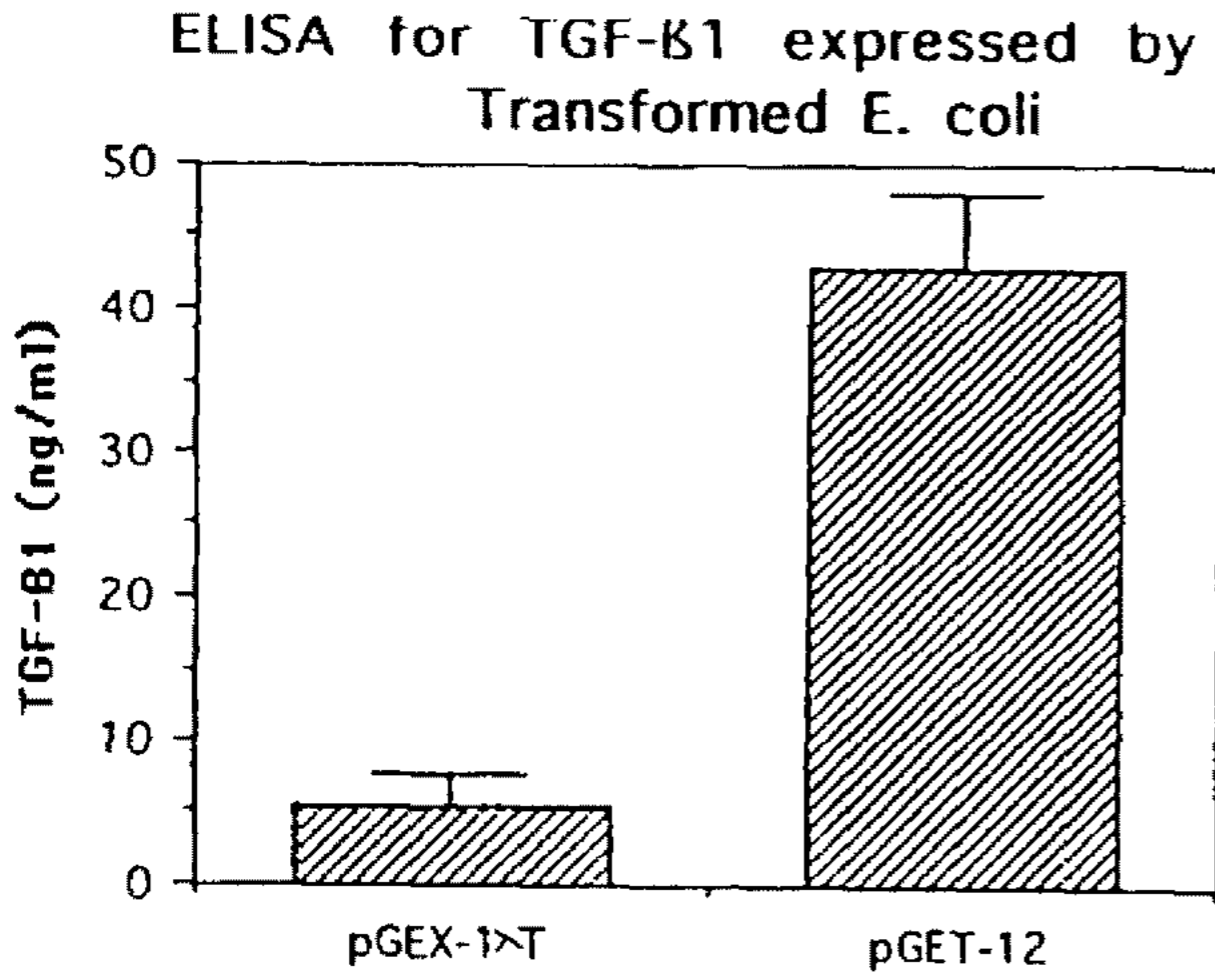


Fig. 7. Immunodetection of recombinant TGF-β1 protein from pGET-12 expressed in *E. coli*.

에 현탁시킨 후 끓여 단백질을 분리하였다. SDS-polyacrylamide gel 전기영동 결과 융합단백질이 검출되었고 이는 융합단백질이 대장균 내에서 불용성인 상태로 존재함을 의미한다(Fig. 4). GST단백질은 26 kDa 위치에서 glutathione agarose bead로 정제된 융합단백질은 56 kDa 위치에서 발견되며 IPTG로 발현유도시키지 않은 경우에는 단백질 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 5). 융합단백질이 bead에 부착된 상태에서 thrombin을 처리한 후(6, 20) SDS-polyacrylamide gel로 확인 한 결과 융합단백질이 분해되어 26 kDa 위치에서 GST단백질이, 29.6 kDa 위치에서는 TGF-β1(123-390아미노산)이 각각 분리되어 나타남이 관찰되었다(Fig. 6).

ELISA 측정

재조합 plasmid인 pGET-12상에 클로닝된 TGF-β1 유전자 절편으로부터 생산된 단백질을 ELISA 방법으로 검출을 시도하였다. 결과적으로 이들 대장균 내에서 발현, 부분 정제된 단백질들은 monoclonal anti-TGF-β1 항체와 반응함으로써 그 검출이 가능하였으며 이는 생산된 폴리펩티드들이 항체와 반응하는 항원결정기를 갖고 있음을 의미하는 것으로 해석되고 있다(Fig. 7).

고 찰

E. coli 내에서 진핵세포 유래의 유전자를 발현시키는 경우 진핵세포 단백질을 완전하게 folding 시켜 chaperon 등의 부재로 항상 활성 있는 단백질을 얻을 수 있다는 보장은 없지만 단백질을 간단하고 경제적으로 다량 얻을 수 있다는 장점을 가지고 있다. TGF-β1의 경우 전구체 TGF-β1과 활성형 TGF-β1의 크기가 큰 차이를 보이고 있으며 전술한 바와 같이 TGF-β1 생산세포 내에서의 활성화에 관여하는 효소 등은 아직 확실하게 밝혀

져 있지 않다. 이런 근거로 TGF-β1 cDNA를 클로닝할 때 활성형 TGF-β1의 폴리펩티드 부위와 최대한으로 근접한 제한효소 인식부위를 선택, 얻어진 절편을 vector 내에 삽입하였다. 서론에서 언급한 바처럼 TGF-β1 관련 연구를 위해서는 TGF-β1은 물론 anti-TGF-β1 항체를 다량으로 필요하다. 대장균 내에서 생산된 TGF-β1 유전자 절편으로부터 유래된 폴리펩티드들은 TGF-β1 활성을 갖고 있지 않음이 별도의 실험을 통해 밝혀졌다. 그러나 anti-TGF-β1 항체가 이들 폴리펩티드들을 인식함은 결과에서 언급된 바와 같다. 따라서 대장균으로부터 손쉽게 생산될 수 있는 이들 폴리펩티드들은 anti-TGF-β1 항체 생산을 위한 항원으로서의 이용 가능성은 있는 것으로 생각되고 있다. TGF-β1 ELISA에서 사용한 standard TGF-β1은 R&D System에서 구입한 mature porcine TGF-β1이었다. 본 실험에서 획득된 재조합 TGF-β1은 극히 소량으로 그 단백질 절대량을 계산하지 않았기 때문에 ELISA에 사용된 항체에 대한 상대적인 epitope의 세기는 알 수 없었으며 Fig. 7은 단지 standard curve에 근거하여 환산된 양을 표시하였다.

이전부터 insulin이나 사람 성장 호르몬, γ-interferon, IgG 등과 같은 진핵세포 유래의 단백질을 대장 균등과 같은 원핵세포로부터 다량으로 얻고자 하는 연구가 많이 시도되어 왔다(13, 21). 그러나 대장균 내에서 발현된 진핵생물 유전자 산물들의 경우 대부분 inclusion body를 형성하여 세포 내에서 응축되어 불용성인 상태로 존재함이 일반적인데(1, 7, 13, 14, 20) 본 실험에서도 같은 결과가 관찰되었다.

pGEX-1λT vector를 사용한 경우 GST단백질이 본래 수용성임에도 불구하고 pTGFβ33의 *ApoI-Tth111I* 절편을 클로닝하여 *E. coli* HB101내에서 발현시켰을 때 단백질 분리과정중 수용액 부위에서는 융합단백질이 발견되지 않았다. 이 재조합DNA(pGET-12)는 별도의 숙주 세포인 *E. coli* BL21(DE3)과 같은 결과를 보였으며 *Staphylococcus* 유래의 plasmid인 pE194와 다시 재조합하여 *E. coli-Bacillus* shuttle plasmid로 만든 후 *B. subtilis* BD170내에서 발현시켰을 경우에도 수용성 부위에서는 융합단백질이 발견되지 않았다(data not shown). pGET-12로 형질전환된 세균을 용균시킨 뒤 알킬 음이온성 계면활성제인 N-laurylsarcosine을 처리했을 때 이에 의해 수용화된 융합단백질이 수용액 부위에서 확인되었다. pGEX system은 carrier단백질로 GST를 가지고 있으므로 재조합DNA(pGET-12)로부터 분리한 융합단백질을 glutathione agarose bead를 이용하여 선택적으로 용이하게 얻을 수 있었다. Glutathione agarose bead에 특이적으로 결합한 단백질을 SDS-sample buffer와 섞어 끓인 경우에는 분리가 완전하게 되는 반면 glutathione이 포함된 elution buffer를 사용한 경우는 분리가 제대로

되지 않았다. 또 elution buffer내에 Tris나 HEPES가 포함될 경우 용합 단백질의 elution은 물론 thrombin에 의해 용합단백질이 분해가 되는 반면 6 M urea가 포함된 elution buffer에서는 elution은 되지만 thrombin에 의해 가수분해되지 않음을 볼 수 있었다. 이것은 urea가 단백질을 변성시켜 특이적으로 결합한 bead로부터 단백질을 elution하기에는 용이하지만 변성조건이라 thrombin이 활성을 제대로 갖지 못하기 때문이라 생각된다. pET 3b vector의 경우 T7 phage의 RNA polymerase expression system을 이용하여 클로닝된 단백질만을 선택적으로 발현시킬 수 있다.

요 약

cDNA로 제공받은 TGF- β 1 유전자를 glutathione S-transferase (GST)와의 용합 system을 이용하는 pGEX-1 λ T vector와 T7 RNA polymerase/promoter expression system을 이용하는 pET-3b vector에 각각 클로닝하여 *E. coli* 내에서 발현시켰다. 전구체 TGF- β 1의 123-390번 아미노산 부위를 포함하는 *ApoI*-*Tth111I* 절편을 pGEX-1 λ T의 *EcoRI*-*Tth111I* 부위에 클로닝하여 재조합 plasmid pGET-12를 얻었다. 이 재조합 plasmid에 의해 형질전환된 대장균은 세포 내에서 클로닝된 부위로부터 유래된 단백질을 불용성인 상태로 발현시킴이 확인되었고 따라서 이 단백질을 N-lauryl-sarcosine과 8 M urea를 사용하여 수용화시켜 분리, 확인하였다. 전기영동을 통해 확인된 이들 단백질의 분자량은 클로닝된 절편으로부터 예측된 크기와 일치하였다. 또한 ELISA를 사용한 실험에서 이들 단백질은 면역학적으로 검출 가능한 항원결정기를 갖고 있음이 확인되었다.

감사의 말

본 연구는 93년 교육부의 "유전공학 학술연구 조성비" 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

- Bowden, G. A., A. M. Paredes, and G. Georgiou. 1991. Structure and morphology of protein inclusion bodies in *E. coli*. *Bio/Technology* **9**: 725-726.
- Derynck, R. 1987. Structure of transforming growth factors- α and - β and their precursors, Pp. 133-163. In Garoff G.(ed.), *Oncogenes, genes and growth factors*, A Wiley-Interscience Publication.
- Derynck, R., J. A. Japrett, E. Y. Chen, D. H. Eaton, J. R. Bell, R. K. Assoian, A. B. Roberts, M. B. Sporn, and D. V. Goeddel. 1985. Human transforming growth factor- β 1 complementary DNA sequence and expression of normal and transformed cell. *Nature* **316**:701-705.
- Derynck, R., L. Rhee, E. Y. Chen, and A. V. Tilburg. 1987. Intron-exon structure of the human transforming growth factor- β precursor gene. *Nucleic Acids Res.* **15**: 3188-3189.
- Derynck, S. and L. Rhee. 1987. Sequence of the porcine transforming growth factor-beta precursor. *Nucleic. Acids Res.* **15**: 3187.
- Eaton, D., H. Rodriguez, and G. A. Vehar. 1986. Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry.* **25**: 505-512.
- Frangioni, J. V. and B. G. Neel. 1993. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal. Biochem.* **210**: 179-187.
- Frankel, S., R. Sohn, and L. Leinwand. 1991. The use of sarcosyl in generating soluble protein after bacterial expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 1192-1196.
- Kagnoff, M. F. and P-H. Kim. 1991. Effects of Transforming growth factor- β 1 and interleukin-5 on IgA isotype switching at the clonal level. *Immunologic Research* **10**: 396-399.
- Kim, P-H. and M. F. Kagnoff. 1990. Transforming growth factor- β 1 stimulates IgA isotype switching. *J. Immunol.* **145**: 3773-3778.
- Kondaiah, P., E. B. Obberghen-Schilling, R. L. Ludwig, R. Dhar, M. B. Sporn, and A. B. Roberts. 1988. cDNA cloning of porcine transforming growth factor- β 1 mRNAs. *J. Biol. Chem.* **263**: 18313-18317.
- Lyons, R. M., J. Keski-Oja, and H. E. Moses. 1988. Proteolytic activation of latent transforming growth factor- β 1 from fibroblast-conditioned medium. *J. Cell Biol.* **106**: 1659-1665.
- Marston, F. A. O. 1986. The purification of eucaryotic polypeptides synthesized in *E. coli*. *Biochem. J.* **240**: 1-12.
- Marston, F. A. O. and D. L. Hartley. 1990. Solubilization of protein aggregates. *Methods in Enzymology* **182**: 265-276.
- Miyazono, K., C. H. Heldin. 1989. Role of carbohydrate structures in TGF- β 1 latency. *Nature* **338**: 158-160.
- Okayama, H. and P. Berg. 1983. A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* **3**: 280-289.
- Roberts, A. B., S. J. Kim, P. Kondaiah, S. B. Jakowlew, F. Denhez, A. B. Glick, A. G. Geiser, S. Watanabe, T. Noma, R. Lechleider, and M. B. Sporn. 1990. Transcriptional control of expression of the TGF- β s. *Ann. New York Acad. Sci.* **593**: 43-58.
- Seo, K-B., S. E. Yie, I. Choi, K-H. Pyun, P-H. Kim, 1992. Regulation of transforming growth factor- β 1 synthesis by murine T lymphocytes and its effect on IgA antibody response. *Korean J. Immunology* **14**: 203-211.
- Smith, D. B., L. C. Berger, and A. G. Wildman. 1993.

- Modified glutathione S-transferase fusion proteins for simplified analysis of protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res.* **21**: 359-360.
20. Smith, D. B., and K. S. Johnson. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *E. coli* as fusion with glutathione S-transferase. *Gene* **67**: 31-40.
21. Tabor, S. and C. C. Richardson: 1985. A bacteriophage T7 polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 1074-1078.

(Received 11 August 1996)