

재조합 인성장호르몬의 *in vitro* 풀림과 재접힘 과정의 구조변화 모니터링

조 태 훈 ·¹채 영 규 ·²안 상 점 ·[†]이 은 규
한양대학교 화학공학과 생물공정연구실, ¹한양대학교 생화학과, ²(주)녹십자
(접수 : 1999. 11. 3., 게재승인 : 1999. 12. 18.)

Monitoring of Structural Changes during *in vitro* Unfolding and Refolding of Recombinant Human Growth Hormone

Tae Hoon Cho, Young Kyu Chai¹, Sang Jeom Ahn², and Eun Kyu Lee[†]
Bioprocessing Research Laboratory, Dept. of Chem. Eng., ¹Dept. of Biochemistry and
Molecular Biology, Ansan 425-791, Korea and ²Korea Green Cross Corp., Seoul, Korea
(Received : 1999. 11. 3., Accepted : 1999. 12. 18.)

Using recombinant human growth hormone as a model protein, we carried out unfolding by adding a denaturant such as urea, guanidine HCl, or SDS followed by refolding by dilution and dialysis. The objectives were to monitor the structural changes during *in vitro* refolding process and, based on the results, to develop a quantitative method of refolding progress assessment. The changes in surface hydrophobicity were measured by fluorescence tagging of 1-anilino-naphthalene-8-sulfonate(1,8-ANS) to the hydrophobic portions, and those in the secondary structure were monitored by using far UV-CD(circular dichroism) spectroscopy. Also, we used RP-HPLC to separate and quantify the folded and unfolded proteins to correlate the result with the structure analysis. Our results indicate the surface hydrophobicity are well correlated with the formations of the secondary structure, primarily α -helices, as well as the disulfide bridges. We expect this monitoring technique can be applied in industrial fields as a means to quantitatively assess the progress of in-vitro refolding of recombinant proteins.

Key Words : unfolding, refolding, 1,8-ANS, hydrophobicity, α -helices

서 론

변성된 상태에서부터 단백질을 *in vitro*에서 재접힘하기 위한 다양한 기술들이 생물학의 단백질 산업에서 광범위하게 연구되어 왔다. 이러한 재접힘 공정은 각각의 단백질의 형태와 특성에 의존하여 폭넓게 변화하지만, 그것의 핵심은 재접힘 공정동안의 단백질의 구조변화를 수반하는 것이다. 중요한 구조로는 표면 소수성과 2차원적인 구조(예를 들어 α -helices와 β -sheets)를 포함한다. 이번 연구에서는 모델 단백질로 인성장 호르몬을 사용하여 urea, guanidine hydrochloride 또는 SDS와 같은 변성제를 첨가함으로써 풀림시켰고 회석 또는 투석을 통하여 재접힘 시켰다. 이러한 연구의 목표는 각 변성제의 풀림 및 재접힘 기작을 비교하고 재접힘의 kinetics를 연구하기 위함이다. 표면 소수성은 소수성기에 1-anilino-naphthalene-8-sulfonate(1,8-ANS)을 결합시킨

후 형광값을 측정하였고, 2차원 구조변화는 far UV-CD(circular dichroism) spectroscopy에 의해 모니터링하였다. 구조분석 결과와 RP-HPLC를 사용하여 접힌 단백질과 풀린 단백질을 분리하여 정량분석한 결과를 연관시켰다.

재료 및 방법

동결건조된 분말형태의 native한 재조합 인성장호르몬(rhGH)은 (주)녹십자에서 제공받았다. Unfolding buffer로는 6 M Gu-HCl, 8 M urea 또는 0.5%(w/v) SDS의 변성제와 5 mM DTT 환원제를 포함한 46 mM sodium bicarbonate buffer(pH 9.1)를 사용하였다. 이 단계는 상온에서 2시간 동안 수행하였다. 초기 rhGH 농도는 0.5 mg/mL로 고정시켜 재접힘 성능에 대한 단백질 농도 의존성을 배제시켰다. 재접힘을 시작하기 위해 풀린 단백질 용액을 4배 희석하여 변성제의 농도를 줄였다. 남아있는 urea와 Gu-HCl을 완전히 제거하기 위해 4°C에서 16시간동안 투석하였다(1). SDS의 경우 저온(4°C)침전 후 음이온 교환 수지(IRA 402)를 사용하여 제거시켰다(2). 풀린 단백질을 4배 희석한 용액을 24시간 동안 상온에서 공기 중 산화(air oxidation)를 수행하

[†]Corresponding Author : Bioprocessing Research Laboratory, Dept. of Chem. Eng., Hanyang University, Ansan 425-791, Korea
Tel : 0345-400-5275, Fax : 0345-408-3779,
E-mail : eklee@mail.hanyang.ac.kr

였다. 변성제의 완전 제거를 위해 4°C에서 16시간동안 MWCO 3,000 membrane(Millipore, USA)을 사용하여 0.01 M potassium phosphate buffer로서 투석하였다. 1,8-ANS에 결합된 단백질 표면의 형광값은 fluorometer(Turner Desings, model 10-AU, USA)에 의해 측정하였다. 이때 excitation 파장은 390 nm이고 emission 파장은 475 nm이었다(3). 이 방법은 molten globule 상태의 단백질 구조에서 표면에 노출된 소수성 아미노산 잔기들과 1,8-ANS의 친화력에 기초한다(3,6). 접힌 단백질과 풀린 단백질의 분리 및 정량화는 RP-HPLC(Gilson, model 302, USA)로 C18 컬럼을 사용하여 220 nm에서 수행하였다(2). Far UV-CD 측정은 25°C에서 spectropolarimeter(Jasco, model J-715)를 사용하였다. 이때 path length는 0.5 mm이었다. 각 시간별 sample의 구조 변화가 계속해서 일어나지 않아야 하므로 acidification이라는 quenching method를 사용하였다. 이 방법은 각 sample에 100 mM HCl을 첨가하여 pH 2로 낮추어 thiol-disulfide의 변화를 방지하는 것이다(13).

결과 및 고찰

형광측정

1,8-ANS는 소수성 작용을 통해 그 자신이 높은 비극성 환경에 있을 때 형광을 나타낸다(4,9). 먼저 단백질이 없는 상태에서의 변성제(Gu-HCl, urea, SDS, Sarkosyl)와 환원제(DTT)는 형광값에 미치는 영향이 없음을 확인하였다. 풀림 공정 동안 rhGH의 형광값은 높은 증가를 보였다. 이는 풀림 공정 동안 단백질 3차원적 구조가 붕괴되면서 내부에 가려져 있던 소수성 부위가 표면으로 노출되면서 단백질의 표면 소수성이 서서히 증가하는 것을 의미한다. 형광 증가 속도는 각 변성제마다 비교적 일정하나 증가의 폭은 변성제 종류에 따라 달랐다. Urea나 Gu-HCl을 사용한 경우보다 SDS나 Sarkosyl를 사용한 경우 형광값의 증가가 훨씬 컸다. 단백질이 재접힘되면서 형광값이 native한 단백질의 약 90% 정도까지 단계적으로 감소하였다(Figure 1). 이 결과 단백질 표면 소수성의 변화는 풀림-재접힘 과정에서 매우 중요하게 작용함을 확인하였다.

풀림-재접힘에서 변성제의 비교

Figure 2에 각 변성제의 농도에 따른 형광변화 경향을 보였다.

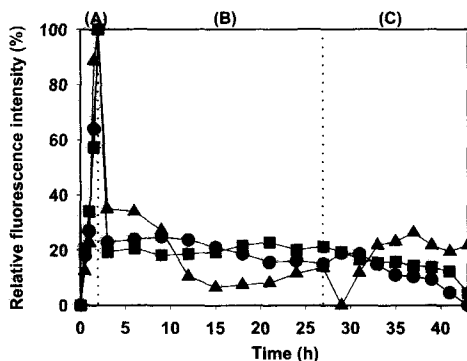


Figure 1. Fluorescence profile of ANS-tagged rhGH in: (A) unfolding (for 2h), (B) dilution followed by air oxidation (for 24h), and (C) dialysis (for 16h) steps using ●: Gu-HCl, ▲: Urea, and ■: SDS.

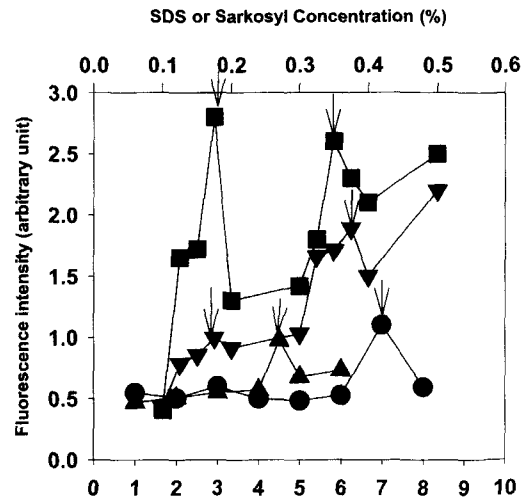


Figure 2. Fluorescence of 1,8-ANS bound rhGH at various concentrations of denaturants(▲: Gu-HCl, ●: Urea, ▼: SDS, and ■: Sarkosyl). Vertical arrows indicate local maxima.

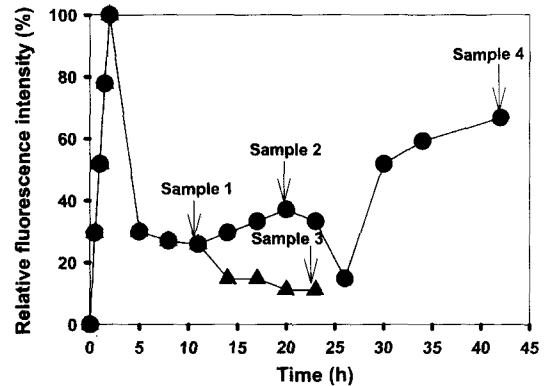


Figure 3. Shortened air-oxidation time followed by dialysis could prevent the fluorescence increase observed in the refolding process using urea (air-oxidation for 24h (●) and 10h (▲)).

Urea와 Gu-HCl가 같은 형광변화 경향을 나타내었고 반면에 SDS와 Sarkosyl이 유사한 경향을 보였다. SDS와 Sarkosyl의 경우, 임계 micelle 농도(CMC)에서 형광값이 증가함을 볼 수 있었다. 다른 연구자들은 molten globule 상태의 중간체를 형성하는 변성제의 농도를 찾아내기 위한 방법으로 사용하였다(4-8). 이 중간체는 단백질의 3차원적 구조는 거의 없지만 2차원적 구조는 거의 포함한다. 이 중간체는 intermolecular interaction을 억제하여 aggregation 현상을 최소화하는 것으로 알려져 있다. 본 실험 결과 urea는 약 7 M에서 Gu-HCl은 4.5 M에서 중간체를 형성하는 것으로 보였는데 이것은 문헌에서 제시된 농도와 같았다(5). Urea와 Gu-HCl과는 달리 SDS와 Sarkosyl은 0.15%와 0.35%의 두 농도에서 극부적인 최대값을 보였다. 그 이유는 아직 명확히 규명되지 않았다. 또한 Gu-HCl과 SDS와는 달리 Urea의 경우, 공기 중 산화와 투석 후에 형광값이 증가하는 것을 보였다(Figure 3). 이것이 aggregation의 영향인지를 FPLC로 확인해 본 결과 aggregation의 영향은 아닌 것으로 나타났다. 공기 중 산화와 투석에서 형광값의 증가를 막기 위하여 공기 중 산화시킨 후

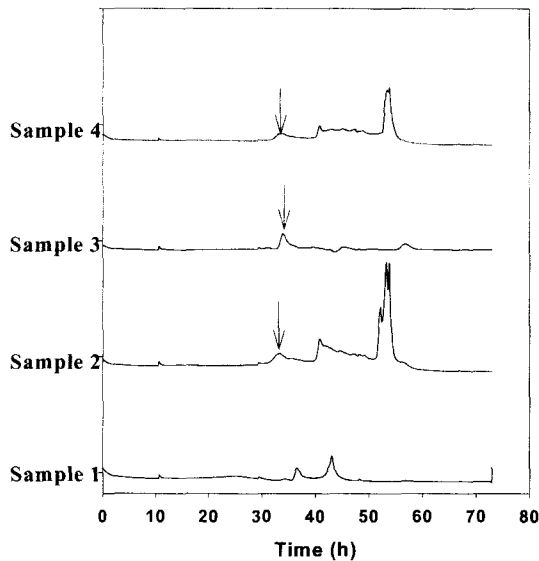


Figure 4. FPLC chromatograms indicate the fluorescence increase in the urea process is not due to aggregate formation. Each sample is represented by the numbers denoted in Figure 3.

형광값이 증가되기 전에 투석을 시킨 결과 더 좋은 재접힘 결과를 얻을 수 있었다(Figure 4). 그 결과는 아직 규명 되지 않았다.

RP-HPLC 분리에 의한 재접힘 모니터링

rhGH의 산화된 형태(즉, 접힌 형태)와 환원된 형태(즉, 풀린 형태)는 acetonitrile의 농도가 24%부터 75%까지 35분간 선형적으로 변할 때 가장 잘 분리되었다(2). 재접힘 동안 환원된 형태가 산화된 형태로 점차적으로 바뀌어 가는 것을 정상적으로 측정하였다(Figure 5). 결과적으로 산화된 형태와 환원된 형태의 생성 및 소멸 속도의 차이를 볼 수 있는데 단백질 재접힘이 되면서 산화된 형태는 점차적으로 증가하지만, 환원된 형태는 buffer와 다른 영향에 의하여 급격히 감소함을 볼 수 있었다. 산화된 rhGH의 peak area는 형광값의 변화와 반대로 변화하였다. 이 결과로 thiol기의 산화에 의해 이황화결합이 형성되는 것은 표면 소수성이 감소되는 것과 밀접하게 관련됨을 확인할 수 있었다(Figure 6).

2차 구조의 변화

rhGH의 far UV-CD spectrum은 192, 209, 222 nm에서 3개의 주요한 peaks로 구성되었다. 209와 222 nm에서의 peaks는 α -helices를 나타내는 것이고, 이 구조는 native한 상태의 α -helices 함유도와 거의 같은 molten globule의 구조를 밝히는데 사용된다(10). Figure 7에서 완전히 풀린 형태와 공기중 산화, 투석이후의 완전히 재접힘된 형태와 native한 rhGH의 CD spectra를 나타내었다. SDS를 사용한 경우, 풀린 상태에서 α -helices의 붕괴정도가 Gu-HCl을 사용한 경우보다 더 높은 것을 볼 수 있었다. 이는 앞에 언급한 풀림과정에서의 형광값의 증가도와 연관시켜 SDS나 Sarkosyl 등의 계면활성제가 Gu-HCl 같은 염보다 2차구조를 더욱 심하게 붕괴시킨다고 유추할 수 있겠다. 재접힘된 rhGH의 molar ellipticity(222 nm에서 측정)는 native한 단백질과 거의 같게 나타났다(11-12). Native한 형태와 비교해 보면 재접힘된 형태가 native한 단백질의 2차원적 구조의 약 90%를 얻었다.

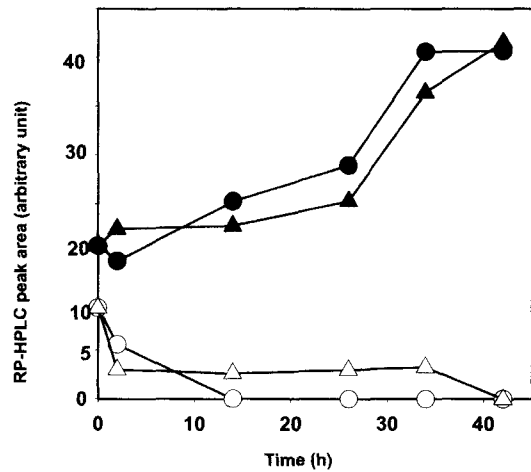


Figure 5. Time-course changes in the RP-HPLC peak areas of oxidized (filled symbols) and reduced (open symbols) rhGH monomer during unfolding (2h), dilution and air-oxidation (for 24h), and dialysis (for 16h) step s. Symbol: oxidized rhGH peak area using ●: Gu-HCl, ■: SDS and reduced rhGH peak area using ○: Gu-HCl △: SDS.

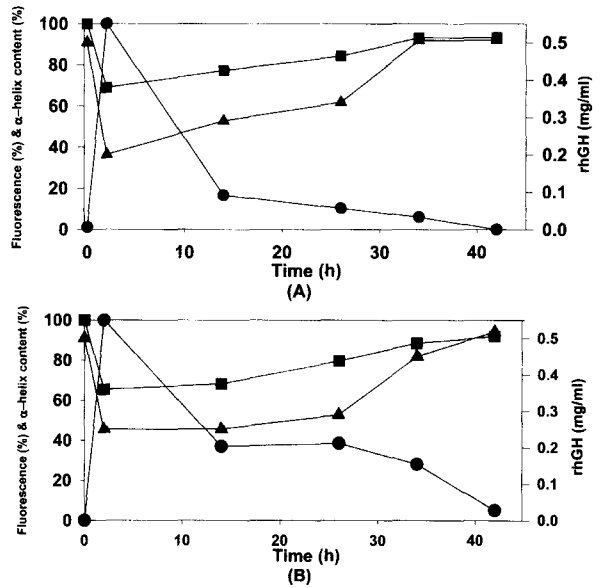


Figure 6. Correlation between the changes in ANS fluorescence intensity (circles), RP-HPLC peak area for oxidized form (triangles), and α -helix content (rectangles) during unfolding (for 2h), dilution followed by air-oxidation (for 24h), and dialysis (for 16h) steps. Figure 7 (A) and (B) are for using Gu-HCl and SDS, respectively. ●: Fluorescence, ▲: rhGH (mg/mL), and ■: Far-UV CD.

형광, RP-HPLC, 그리고 CD 분석결과의 상호연관성

Figure 6에 Gu-HCl과 SDS가 매우 유사한 변화유형을 보였다. 산화된 단량체의 농도변화 속도는 α -helix와 함께 변화하였고 이와는 반대로 형광값은 변화하였는데 이것은 2차와 3차구조가 공정과 직접적으로 연관되어 있음을 의미한다. 이 실험 결과를 통하여 native한 형광값이 증가하는 것은 단백질의 풀린상태를 나타낸 것으로 볼 수 있고 형광값이 감소하는 것으로부터 단백질의 동서에 만들어짐을 보여준은 물론 표면 소수성이 재접힘질의 접힌 상태를 예측해 볼 수 있다. 또한 완전한 재접힘이 이

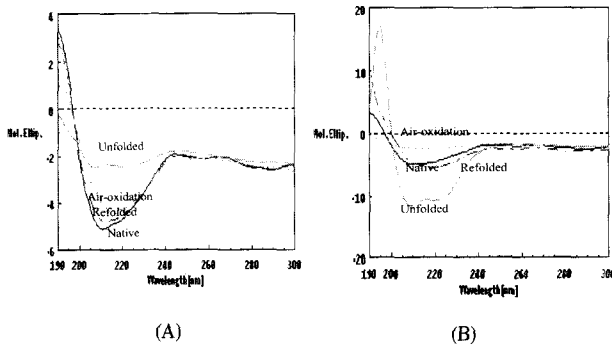


Figure 7. Comparison of CD spectra of the unfolded, air-oxidation, fully refolded, and native hGH. (A): with Gu-HCl, and (B): with SDS.

루어지기 위해 공기 중 산화과정에서 형광값의 변화를 지켜 본 후 투석 시기를 결정해야 한다는 것을 알 수 있었다.

요 약

재조합 인성장호르몬을 사용하여 *in vitro* 재접힘 공정(폴림, 회석에 의한 공기 중 산화, 그리고 투석)을 수행하였다. 표면소수성이 폴림-재접힘 공정에 중요한 역할을 한다는 것을 형광값의 변화를 통하여 알 수 있었다. 변성제의 intermediate 농도는 Urea와 Gu-HCl 경우 하나의 peak로 SDS와 Sarkosyl의 경우 두 개의 peak로 나타났다. 형광값의 변화 중 특이한 점은 Urea의 경우 공기 중 산화와 투석 중의 후반부에 형광값이 증가한다는 것이다. 따라서 공기 중 산화도중 형광값이 증가하기 전에 투석을 시킨 결과 형광값이 증가를 막을 수 있었다. 아직 이 원인에 대해 자세히 알 수 없지만 계속 실험 중에 있다. 이번 실험에서 표면소수성 변화와 연관시켜 fluorescence를 이황화결합에 의한 산화된 형태를 알아보기 위한 방법으로 RP-HPLC를 마지막으로 단백질의 2차원적인 구조를 알아 보기 위해 CD를 사용하였다. CD측정 결과 Gu-HCl보다 SDS의 경우 α -helices의 파괴가 더 많음을 볼 수 있었다. 재접힘된 rhGH는 본래의 2차원적 구조의 90%이상을 얻을 수 있었다. 이 실험이 가지는 의의는 이 모든 실험결과를 토대로 단백질 재접힘을 모니터링 하였다는 점이다. 즉, 형광값의 변화를 통하여 형광값이 증가하는 것은 표면 소수성이 증가함을 보이는 것으로 단백질의 폴림이 일어난 것이고 3차원적 구조가 깨지고 2차원 구조를 알아 볼 수 있는 α -helices의 감소를 의미하였다. 이와는 반대로 형광값이 감소하는 것을 통해 재접힘이 일어남을 알 수 있었고, 이러한 결과를 바탕으로 단백질의 재접힘 공정의 변화과정을 형광값을 통하여 모니터링 할 수 있었다. 또한 이 실험의 목적 단백질은 rhGH이지만 다른 단백질에 적용이 될 경우 단백질 재접힘 과정을 수시로 모니터링하고 상태를 예측할 수 있으므로 산업현장에서 소량의 sample로 재접힘 상태를 쉽고 빠르게 판단할 수 있을 것이다. 단백질 재접힘 과정에서 이러한 개념의 성공적 도입은 단백질 회수율을 높임으로써 생물분리공정 분야의 기술 발전에 이바지 하리라 사료된다.

감 사

본 연구는 1998년도 학술진흥재단 과학기술기초 중점연구과제 (과제번호 1998-020-E00075) 연구비지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다. 본 연구에 참여한 조태훈은 교육부지정 국책대학원인 한양대학교 신소재공정공학원의 장학지원에 대하여 감사의 뜻을 전합니다.

REFERENCES

- Kelly, R. F. and M. E. Winklen (1990), Folding of Eukaryotic Proteins Produced in *Escherichia coli*, *Genetic Engineering*, **12**, 5-7.
- Kim, C. S. and E. K. Lee (1998), Comparative Analysis of Dissolution and Refolding Processes for Inclusion Body Protein Renaturation, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **13**(2), 133-140.
- Turner, D. C. and L. Brand (1968), Quantitative Estimation of Protein Binding Site Polarity. Fluorescence of N-Arylamionaphthalenesulfonates, *Biochemistry*, **7**, 3381-3390.
- Cleland, J. L. and L. C. Wang (1990), Refolding and Aggregation of Bovine Carbonic Anhydrase B: Quasi-Elastic Light Scattering Analysis, *Biochemistry*, **29**, 11072-11078.
- Bam, N. B., J. L. Cleland, and T. W. Randolph (1996), Molten Globule Intermediate of Recombinant human Growth Hormone: Stabilization with Surfactants, *Biotechnol. Prog.*, **12**, 801-809.
- Goto, Y. and A. L. Fink (1989), Conformational States of β -Lactamase: Molten Globule states at Alkaline pH with High Salt, *Biochemistry*, **28**, 945-952.
- Fink, A. L., L. J. Calciano, Y. Goto, T. Kurotsu, and D. R. Palleros (1994), Classification of Acid Denaturation of Proteins: Intermediates and Unfolded States, *Biochemistry*, **33**, 12504-12511.
- Ptitsyn, O. B., R. H. Pain, G. V. Semisontnov, E. Zerovnik, and O. I. Razgulyaev (1990), Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding, *FEBS*, **262**(1), 20-24.
- Semisotnov, G. V., N. A. Rodionova, O. I. Razgulyaev, V. N. Uversky, A. F. Gripas, and R. I. Gilmanshin (1991), Study of the 'molten globule' intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescence probe, *Biopolymers*, **31**, 119-128.
- Uversky, V. N. and O. B. Ptitsyn (1996), Further Evidence on the Equilibrium 'pre-molten Globule State': Four-state Guanidinium Hydrochloride-induced Unfolding of Carbonic Anhydrase B at Low Temperature, *J. Mol. Biol.*, **255**, 215-228.
- Peterson, F. C. and C. L. Brooks (1997), Identification of a Motif Associated with the Lactogenic Actions of Human Growth Hormone, *J. Biol. Chem.*, **272**(34), 21444-21448.
- Sreerama, N., S. Y. Venyaminov, and R. W. Woody (1999), Estimation of the number of α -helical and β -strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy, *Protein Science*, **8**, 370-380.
- Darby, N. and T. E. Creighton (1997), Probing Protein Folding and Stability Using Disulfide Bonds, *Molecular Biotechnology*, **7**, 57-77.