

유로키나제와 프로유로키나제의 정제 및 특성 비교

¹이 승 진 · †변 상 요
아주대학교 공과대학 화학·생물공학부, ¹(주)녹십자
(접수 : 1999. 12. 2., 게재승인 : 1999. 12. 15.)

Purification of Urokinase and Pro-urokinase and Comparison of their Characteristics

Seung Jin Lee¹ and Sang Yo Byun[†]
School of Chemical Engineering and Biotechnology, Ajou University, Suwon, Kyungki-do 442-749, Korea
¹Korea Green Cross Corp., Yongin, Kyunggi-do, Korea
(Received : 1999. 12. 2., Accepted : 1999. 12. 15.)

Characteristics and enzyme activity comparison was made between urokinase isolated from urine and pro-urokinase separated from CHO(Chinese Hamster Ovary) cell culture broth. Both of purified urokinase and pro-urokinase resulted 54Kd single band in electrophoresis. Urokinase which was proved as a single molecule by gel filtration showed two separated 33Kd and 21Kd bands by 2-mercaptoethanol reduction. Isoelectric focusing resulted same *pI* value of 8.6 for both of them. N-terminal amino acid sequence of urokinase after 159th Ile was Ile-Gly-Gly-Glu-Phe-Thr-Thr-Ile-Glu which was different from another N-terminal sequence of Ser-Asn-Glu-Leu-His-Gln-Val-Pro-Ser-Asn. Thrombolytic activities of both of them were proportional to the enzyme concentration. Urokinase showed thrombolytic activities in a short period of reaction time. Pro-urokinase, however, showed high thrombolytic activity for 2 hours or longer period of reaction time.

Key Words : urokinase, pro-urokinase, purification, thrombolysis, fibrin selectivity

서 론

여러가지 원인으로 혈관이 손상되면 출혈(bleeding)이 일어난다. 손상의 정도에는 차이가 있으나 일반적으로 출혈이 일어나면 혈관 내에서 생리적 방어기작인 지혈반응(haemostasis)이 일어나 혈액의 손실을 방지하게 된다. 지혈은 혈관의 손상에 의해 일어나는 모든 생리반응을 의미하며, 손상된 혈관의 회복을 통해 출혈을 신속하고 완벽하게 억제하는 과정을 말한다(1,2). 지혈과정이 완전히 이루어지고 혈관조직의 재생이 이루어지면 형성된 fibrin polymer는 fibrinolytic system에서 plasminogen이 활성화되어 생성된 plasmin에 의해 용해된다(3). Fibrin의 용해는 fibrinolysis의 주효소인 plasmin에 의해 일어나지만, plasmin은 혈액응고에 중요한 fibrinogen에 대해서도 높은 분해활성을 가지고 있다. 따라서 free한 plasmin이 과량 존재하면 출혈의 위험성이 높게되므로 이러한 문제를 극복하기 위해 α_2 -antiplasmin과

α_2 -macroglobulin같은 생체내 억제인자가 존재하고 있다(4). 또한 plasminogen activator에 의해 plasminogen의 활성화가 fibrin clot이 형성된 곳에서만 일어나도록 정교하게 조절되고 있다. 현재 까지 보고된 인체 내의 plasminogen activator로는 tissue-type plasminogen activator(tPA)와 urokinase-type plasminogen activator(uPA)가 있다(5). tPA는 혈전이 생성된 부위의 내피세포(endothelial cells)에서 분비되나, uPA는 대부분 신장(kidney)에서 생성되어 전구체상태로 혈액에 항상 존재하고 있으며(5), 이 plasminogen activator들도 억제인자인 PAI(plasminogen activator inhibitor)에 의해 활성이 조절되고 있다. 이들 저해제들은 모두 serine protease inhibitor에 속하므로 serpin superfamily라 불리고 있다(4). Fibrinolysis는 혈전의 용해뿐만 아니라 조직의 repair, cancer metastasis, macrophage의 기능, 난형성, 배이식 등에도 관련된다는 사실이 보고 되고 있다(6,7).

생체내에서 혈액은 응고와 용해작용이 항상 평형을 이루고 있으나, 여러가지 병적인 원인으로 그 균형이 깨지게 되면 혈전이 형성되어 혈관을 막게되므로 혈액의 순환이 정지되어 조직의 손상을 일으키게 된다. 그 결과로 뇌혈관이 막히게되면 뇌혈전증이 일어나 반신불수나 전신마비가 일어나며, 심장혈관이 막히게 되면 심장마비가 일어나 사망하게 된다(8). 따라서, 혈전(thrombus)의 형성을 방지하고 생성된 혈전을 용해하는 치료제를 개발하기

†Corresponding Author : School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon 442-749, Korea
Tel : 0331-219-2451, Fax : 0331-216-8777
E-mail : sybyun@madang.ajou.ac.kr

위하여 매우 활발한 연구가 진행되고 있다. 혈관내 생성 혈전을 직접 용해할 수 있는 혈전용해제(thrombolytic agent)의 사용은 임상학적으로 매우 중요한 의미를 갖는다. 혈전의 주요성분은 fibrin과 혈소판이며, 한번 혈전이 형성되면 용해가 좀처럼 일어나지 않는다. 따라서 생성된 혈전을 용해하기 위해서 혈전용해제를 사용해야 하는데, 현재 사용되고 있는 물질로는 streptokinase, urokinase, recombinant tPA가 있다. 최근에는 좀더 혈전에 대한 친화력이 높고, 혈전용해 활성이 높은 새로운 혈전용해제를 개발하고자 하는 연구가 매우 활발하다(9).

유로키나아제는 인노로부터 분리되어 지난 30여년간 혈전증치료제로 널리 사용되어 왔다(10). 그 뒤 fetal kidney cell의 배양으로도 대량생산이 가능해졌으며(11,12), 다른 여러가지 조직세포의 배양으로부터도 동정되고 분리된 바 있다. 최근 몇몇 연구자들은 유로키나아제가 인노(13), 혈장(14), 세포배양액(15-17)에서 protease inhibitor 존재 하에서 분리하였을 때, 활성이 약하기는 하나 효소활성을 가진 단일사슬형태(single chain-type)로 존재함을 확인하였다. Pro-urokinase 또는 single chain-urokinase로 명명된 이 단백질은 기존의 urokinase와 달리 SDS-polyacrylamide gel 전기이동 상에서 단일밴드로 이동하는 성질을 보이지만, 면역학적으로나 이화학적으로는 거의 동일한 성질을 갖고 있다고 확인되었다. 유로키나아제는 두개의 polypeptide chain(M.W. 20,000 및 34,000)으로 구성된 trypsin 유사 enzyme이며, 두가지 M.W. 중에서 S1(M.W. 31000)은 276개의 아미노산(amino acid) S2(M.W. 54000)은 411개의 polypeptide 아미노산으로 되어있고, S1, S2의 proteolytic degradation으로 생긴다. HMW form은 Urine유래 상업적 조제물에서 주로 발견되고(18), LMW form은 26-32주의 임신기간동안 수집된 인태아(human fetal)신장세포의 장기 배양물로부터 분리된다(19). 유로키나아제의 분자형식은 *in vitro*에서 일반적 pharmacological 성질을 갖고 임상결과측면에서도 다르지 않다. S1, S2 form 모두가 동일능력(equipotent)을 가지고 왔을지라도 HMW는 plasma를 순환하는 Glu-plasminogen을 더 activating하고 LMW는 Lys-plasminogen에 더 지배적으로 activating 한다(20). Lys-plasminogen은 specific한 Lys-binding 위치를 가지고 있어 분자가 fibrin표면에 결합하기 좋고 thrombus에 축적할 수 있다(21).

Single-chain urokinase는 활성형의 tc-uk(15-17)에 의해 제한적으로 plasmin을 분해해서 변환시키고 chromatographic 반응과 fibrin-celite(13-16)나 fibrin monomer-Sepharose(17)와의 반응에서 fibrin에 대한 명확한 친화성이 있다고 보고되었다. Single-chain urokinase 종류는 재조합 DNA 기술이나 인노로부터 정제되어 얻어지고 scu-PA의 성질에 대해 계속적인 연구가 진행되는 이 유는 fibrin-specific thrombolytic activity가 *in vitro*와 *in vivo* 둘 다 증명되었기 때문이다. 따라서, *in vitro*에서 scu-PA가 fibrin에 직접 결합하는가에 대한 논쟁은 남아 있으나, 실제 *in vivo*에서는 fibrin선택성(selectivity)이 입증되어 있기 때문에 기존의 tcu-PA (urokinase)보다 활성이 우수한 scu-PA(pro-urokinase)를 상업적으로 개발한다는 것은 매우 유용한 일이다. 따라서, pro-urokinase를 상업적으로 개발하기 위한 일련의 과정으로써, 기존의 urokinase와 pro-urokinase의 물리화학적 효소학적 특성을 비교하고, 또한 비교된 특성을 근거로 실험실 수준의 개발단계와 scale-up생산과정에서 각종정보를 제공함으로써, 실용화시기를 단축하고 품질 높은 신약개발을 지원하는데 본 연구의 목

적이 있다.

재료 및 방법

단백질원(urokinase와 pro-urokinase) 및 시약

Urokinase는 인노로부터 순수 정제된 제제로 (주)녹십자로부터 얻었고, pro-urokinase는 유전자재조합기술로 만들어진 동물세포유래 단백질로써 (재)목암생명공학연구소 정광희 박사로부터 분양받아 사용하였다.

Benzamidine-Sepharose 6 B, Sephadex G-100, FPLC MonoQ, Sephacryl S-100, PhastGel IEF4-9, SDS-polyacrylamide gels(PhastGel Homogeneous 12.5%, Phast Gel Gradient 8-25%), gel filtration용 standard molecular weight protein 등은 Pharmacia-LKB(Sweden)에서 구입하여 사용하였고, bovine serum albumin, Bradford's reagent, Coomassie brilliant blue R-250, low melting temperature agarose, Schiff's reagent등은 Bio-Rad Lab.(U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. Acrylamide, N,N'-methylene-bis-acrylamide, SDS, SDS-PAGE 용 molecular weight marker(pre-stained 및 non-stained)등은 BRL(U.S.A.) 제품을, chromogenic peptide인 Val-Leu-Lys-para-Nitroanilide과 pyro-Glu-Gly-Arg-para-Nitroanilide, pepstatin, leupeptin, phenyl-methyl-sulfonyl fluorophosphate, 2-mercaptoethanol, bovine fibrinogen, bovine thrombin, human plasmin, 등은 Sigma Co.(U.S.A.) 제품을, human fibrinogen, human thrombin, human plasminogen, urokinase등은 (주)녹십자제품을 사용하였다. High molecular weight UK는 National Institute for Biological Standard and Control(United Kingdom에서), Low molecular weight UK는 American Diagnostic Inc.(U.S.A.)로 부터 구입하여 사용하였다. 그 밖에 실험에 사용한 모든 시약은 시중에서 구입한 분석급, 또는 동등이상의 특급품만을 사용하였다.

Plasminogen-free fibrinogen의 제조

주사용으로 판매하고 있는 fibrinogen은 대부분 plasminogen을 포함하고 있기때문에 plasminogen-free fibrinogen을 제조하기 위하여 Deutsch와 Mertz(22)의 방법에 따라 lysine-Sepharose column을 통과시켜 plasminogen을 모두제거한 뒤 사용하였다. 이때 plasminogen의 제거여부는 다음에 서술할 fibrin plate법에따라 urokinase (10,000 IU/mL)를 10 μ l 점적한 후 하룻밤 반응하여 용해되지 않은 결과로 확인하였다.

항 urokinase 혈청 제조

Urokinase를 확인하기 위한 항혈청을 얻기위해 urokinase를 Sephadex G-100 chromatography 방법에 따라 재정제한 urokinase를 체중 2.3 Kg의 Newzilland white rabbit 3수에 urokinase 3 mL(protein 1.0 mg/mL)과 Freund's complete adjuvant 3 mL을 emulsifier로 충분히 emulsion시킨 후, 마리당 6-8부위에 각각 0.2mL 씩 토끼등에 피하 주사하여 면역하였다. 1차 면역 2주일 후에 동일한 방법으로 2차 면역을 실시하고 10일 경과 후 Freund's incomplete adjuvant을 사용하여 동일한 방법으로 3차 면역을 실시하였다. 최종면역 1주일 후 토끼심장에서 전체혈하고 혈액을 4°C에서 약 30분간 원심분리하여 상청액을 모았다. 상청액을 Ammonium sulfate로 침전시킨 후 0.5 M glycine로 용해하였으며, 그 다음 Sephadex G-100 chromatography로 정제한

후 항urokinase 혈청으로 사용하였다.

단백질 정량 및 SDS-PAGE에 의한 단백질 pattern 비교

Pro-UK 와 UK 단백질 정량은 Bio-Rad Lab. 사의 사용 지침에 따라 Bradford 방법(23)으로 측정하였고, 정제과정 중 column에서 용출되는 각 분획의 단백질은 UV monitor(Pharmacia-LKB)를 이용하여 파장 280 nm에서의 흡광도로 분석하였다. 비교 단백질 농도를 각각 1 mg/mL로 희석한 뒤 Laemmli법(24)에 따라 SDS-PAGE를 수행하여 단백질의 pattern을 분석하였다. 이때 사용한 gel은 4.5%의 stacking gel과 8-25%의 gradient separating gel로 구성되었으며, 시료의 전개는 자동 전기영동장치인 Phast System(Pharmacia-LKB)으로 수행하였다.

Fibrin 용해활성 및 Fibrinogen 분해활성 측정

Astrup과 Mullertz(25)의 fibrin plate법을 변형하여 0.7%(w/v) plasminogen-free fibrinogen용액 10 mL, plasminogen-rich fibrinogen용액 10 mL에 0.15 M NaCl과, 0.25% gelatin이 포함된 0.05 M sodium barbital완충액(pH 7.8)에 녹인 human thrombin(100 NIH units/mL) 0.1 mL을 가하여 잘 섞은 후 실온에서 30분 동안 방치하였다. Fibrin막이 형성되면 pro-U.K.와 U.K.용액을 10 μ l씩 점적하여 습기가 유지되는 37°C incubator에서 15-20시간 방치한 후 용해된 정도를 측정하였다. Fibrinogen 분해활성 측정은 Maeno와 Mitsuhashi(24)의 변형된 방법에 따라 0.1 mL의 시료와 0.9 mL의 0.4% human fibrinogen을 반응시킨 후, 10% trichloroacetic acid(TCA) 1 mL을 첨가하여 반응을 정지시켰다. Microcentrifuge (Fisher, U.S.A.)를 이용 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액만을 모아 UV spectrophotometer(Pharmacia-LKB)로 파장 280 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

Urokinase와 pro-urokinase의 정제

Urokinase를 정제하기 위하여 수거된 인노를 이용, ZnCl₂침전법과 CM-Toyopearl chromatography와 Benzamidine-Sepharose chromatography를 수행하였다. Pro-urokinase의 정제는 인체 신장 세포로부터 pro-urokinase유전자를 크로닝하여, CHO(Chinese Hamster Ovary)세포에 형질전환시켜 만든 MPUK 세포주를 대량 배양하여 수행하였다.

SDS-PAGE에 의한 순도 측정

정제한 urokinase(26)와 pro-urokinase를 Centriprep(Amicon사 제품, M.W. cut-off ; 10,000)으로 농축한 뒤 이 중 2 mL를 취하여 2% SDS, 5% mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue가 포함된 0.0625 M Tris-HCl 완충용액(pH 6.8) 2 mL와 혼합하여 상온에서 10분간 방치한 다음 Laemmli 방법에 따라 전기영동하였다. 전기영동은 8-25% separating gel과 4% stacking gel로 구성된 Phast Gel Gradient 8-25%를 사용하여 수행하였다.

Zymography에 의한 fibrin용해활성의 비교

Garneli-Piperno와 Reich(27)의 변형된 방법에 따라 SDS-PAGE가 끝난 후 20 mL의 2.5% Triton X-100으로 gel을 30분간 세척하여 gel속의 SDS를 모두 제거하였고, 계속하여 증류수로 Triton X-100을 씻어 내었다. Whatman No. 3 여과지로 남아 있는 물기

를 제거한 후 이미 만들어 놓은 Fibrin agar plate에 그 gel을 올려 놓아 clear zone이 형성될 때까지 37°C에서 반응시켰다. Fibrin agar plate의 제조는 2%(w/v)의 low melting temperature agar용액 5 mL을 42°C로 미리 맞춘 후 100 NIH unit/mL의 thrombin 10 μ l를 1차로 넣어 잘 섞은 다음 이어서 0.7%(w/v)의 fibrinogen용액 5 mL을 추가로 첨가하자마자 혼합하여 제조하였다.

Urokinase와 pro-urokinase의 분자량 측정

단백질의 분자량을 측정하기 위하여 표준단백질로 phosphorylase B(94 Kd), bovine serum albumin(M.W. 67 Kd), ovalbumin(M.W. 43 Kd), carbonic anhydrase(M.W. 30 Kd), trypsin inhibitor(M.W. 20.1 Kd), α -latalbumin(M.W. 14.4 Kd) 등의 혼합물을 사용하였다. 염색한 gel에 나타난 띠의 이동거리(Rf)를 측정하여 표준단백질과 비교함으로써 정제한 urokinase와 pro-urokinase의 분자량을 계산하였다. 또한 정제한 효소를 Sephadex G-100(14 mm \times 90 cm) column에 gel filtration system(Pharmacia-LKB)으로 gel filtration해서 분자량을 측정하였다. Void volume은 Blue Dextran 2000을 이용하여 측정하였고 용출속도는 6 mL/hr으로 일정하게 유지하였다. 표준단백질로는 BSA(67 kd), ovalbumin (43 kd), chymotrypsinogen A(25 kd)등을 사용하여 용출부피를 측정하고 그 결과로부터 계산한 partition coefficient에 따라 표준곡선을 그린 후 이 곡선에 따라 정제한 효소의 분자량을 계산하였다.

탄수화물 염색

PAS 염색법(28)에 따라 전기영동이 끝난 후 gel을 염색하여 glycosylation 여부를 확인하였다. Slab gel을 상온에서 isopropanol : acetic acid : water = 25 : 10 : 65(v/v)용액에 담가 한시간 동안 방치하여 SDS와 저분자물질을 제거 한 뒤, 0.2% periodic acid에 넣고 4°C에서 1시간 방치하였다. 이 gel을 Schiff's 시약에 즉시 넣고 4°C에서 1시간 방치시킨 다음, 10% 초산 용액으로 탈색시켜 나타나는 탄수화물 띠를 확인하였다.

등전점 측정

정제한 단백질의 농도를 각각 1 mg/mL가 되도록 Centricon (Amicon사, U.S.A.)을 이용 농축한 다음, 이 중 1 mL를 Phast Gel IEF media(pH 3.5-pH 9.0)에 loading하여 Phast System으로 analytical isoelectric focusing을 수행하였다. Focusing이 끝난 후 20% TCA로 고정시킨 뒤, Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 탈색, 건조시킨 다음 효소가 이동한 거리를 표준 단백질의 이동거리와 비교하여 등전점을 측정하였다. pI 표준 단백질로 Cytochrome c(9.6 Kd), lentil lectin(basic; 8.2 Kd, middle; 8.0 Kd, acidic 7.8 Kd), human haemoglobin γ (7.5 Kd), human haemoglobin α (7.1 Kd) Equine myoglobin(acidic)(7.0 Kd), human carbonic anhydrase (6.5 Kd), bovine carbonic anhydrase(6.0 Kd), β -lactoglobulin B(5.1 Kd), Phycocyanin(high; 4.75 Kd, middle; 4.65 Kd, low; 4.45 Kd)등의 혼합물을 사용하여 염색한 후 이동거리를 측정하여 표준곡선을 만든 다음 정제한 urokinase와 pro-urokinase의 등전점을 계산하였다.

아미노산 조성 및 N-말단 아미노산 서열 분석

정제한 효소 10 mg을 6 N HCl로 110°C에서 24시간 가수분

해하여 생성된 아미노산을 phenylisothiocyanate (PITC)로 coupling 한 다음, HPLC system(Pharmacia-LKB)을 이용하여 reverse-phase ODS column chromatography로 분석하였다(29). 또한 N-말단 아미노산 서열은 automatic peptide sequencer(Applied Biosystem Model 470A, U.S.A.)와 PTH analyzer, on-line separation system 120A로 분석하였다.

인공 순환계(artificial circulating system)에서의 효소활성 및 T₅₀ 측정과 fibrinogen 변화조사

건강한 성인으로부터 혈액을 채취한 뒤, 1/10부피의 3.8%(w/v) sodium citrate용액을 첨가하여 응고를 억제한 다음, 내경이 3 mm이고 길이가 250 mm의 polyvinyl chloride resin으로 구성된 tube에 0.8 mL의 상기 혈액과 0.1 mL의 3% CaCl₂ 용액을 혼합하여 넣고, 37°C에서 30분간(경사각 60°, 회전속도가 약 17내지 22 rpm) 회전시켜 혈전을 만들었다. 이어서 0.1 mL의 urokinase (농도; 0, 20, 40, 80, 160 IU/tube)와 pro-urokinase(0-300 mg/mL)을 넣고 1시간 더 반응한 뒤 남아있는 혈전을 회수하여 Bouin's 시약으로 고정한 다음 무게를 측정하였다. 이때 control대조로 plasmin(25-500 mg/mL)을 사용하여 혈전용해 활성을 비교하였으며, 혈전을 50% 용해하는 효소의 양인 T₅₀값을 계산하였다. 또한 urokinase와 pro-urokinase의 활성을 조사하면서, fibrinogen 농도를 동시에 조사하였다.

결과 및 고찰

Urokinase와 pro-urokinase의 정제

수거된 이뇨로부터 urokinase를 정제하였다. 먼저 2 mM ZnCl₂로 침전시킨 후 원심분리하였다. 0.1 M EDTA/ 0.5 M glycine으로 추출하고 CM-Toyopearl chromatography와 Benzamidine-Sepharose chromatography로 순수 정제하였다. 정제된 단백질은 SDS-PAGE 분석결과 비환원 조건에서는 54 kd의 단일 밴드를 보이나, 2-mercaptoethanol처리에 의한 환원조건에서는 33 kd와 21 kd으로 분리됨을 확인할 수 있었다. Pro-urokinase의 정제는 인체 신장세포로부터 pro-urokinase유전자를 크로닝하여, CHO(Chinese Hamster Ovary)세포에 형질 전환시켜 만든 MPUK 세포주를 대량 배양하여 수행하였다. Fetal calf serum이 없는 무혈청 배지에서 키운 배양액을 Zn-chelating agarose 컬럼과 CM-Toyopearl 컬럼을 통해 부분 정제한 뒤, 마지막 단계에서 Sephacryl S-200컬럼을 이용 분자량 크기별로 한번 더 정제하여 전체 urokinase를 얻은 뒤, 최종적으로 Benzamidine-Sepharose chromatography를 수행하여 결합하지 않는 pro-urokinase를 순수정제하였다. SDS-PAGE 결과 pro-urokinase는 단일 사슬로 되어 있기 때문에 환원을 시켜도 분자량의 차이가 나지 않음을 알 수 있었다.

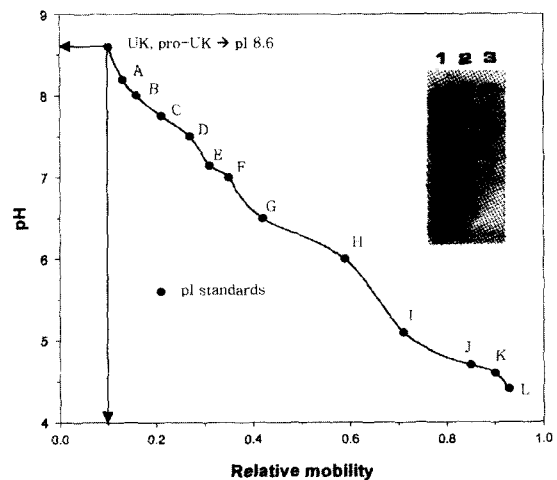
Urokinase와 pro-urokinase의 순도 및 분자량

정제된 urokinase와 pro-urokinase를 Centricon(Amicon사 제품 MW, cut off : 10,000)으로 농축한뒤 8-25% separating gel과 4% stacking gel로 구성된 disc slab gel인 phast gel Gradient을 사용하여 LamLi방법으로 전기영동한 결과, 하나의 단백질 띠로 이동하였고 표준단백질의 표준곡선에 근거하여 분자량을 결정하였을 때 54 Kd으로 측정되었다. 그 다음으로 Sephadex G-100 (glass, 14 mm×0.9 m)을 이용한 gel filtration chromatography방

법으로 원래의 분자량을 측정하였다. Void volume은 Blue Dextran 2000을 이용하여 측정하였고 용출 속도는 6 mL/hour로 일정하게 유지시켰다. 표준단백질의 용출 부피를 측정하여 semi-log 그래프 용지의 X축에는 log M.W., Y축에는 V_e/V_o의 계산한 값(partition coefficient)에 따라 표준곡선을 만든 다음, 정제한 urokinase의 분자량을 확인한 결과 54 Kd으로 확인되었다. 또한 PAS 염색법에 의한 결과는 자주색을 보임으로써 pro-urokinase와 urokinase는 당 단백질임을 알 수 있었다. 그리고 정제된 pro-urokinase가 실제로 활성을 가지고 있는지 확인하기 위해, SDS-PAGE gel을 fibrin plate에 올려놓고 반응시켰을 때 lysis zone이 형성됨을 확인되었다.

Urokinase와 pro-urokinase의 등전점

Urokinase와 pro-urokinase의 단백질 농도를 1 mg/mL이 되도록 Centricon(Amicon사, USA)를 이용하여 농축한 후, 이 중 1 μl를 phast gel IEP media(pH 4.45-9.6)에 loading하여 analytical isoelectric focusing을 수행하였다. pI 표준단백질 이동 등전점은 urokinase와 pro-urokinase의 경우, 모두 pI 8.6으로써 염기성 단백질임이 확인되었다(Figure 1).



Constituent Proteins of IEF Standards*

Protein	pI
Phycocyanin(3 bands)	4.45, 4.65, 4.75
β-Lactoglobulin B	5.10
Bovine carbonic anhydrase	6.00
Human carbonic anhydrase	6.50
Equine myoglobin(2 bands)	7.00
Human hemoglobin A	7.10
Human hemoglobin C	7.50
Lentil lectin(3 bands)	7.8, 8.0, 8.2
Cytochrome c	9.6

Figure 1. pI determination of the purified pro-urokinase and urokinase by analytical isoelectric focusing on phast Gel IEF 4-9. lane 1, IEF standards ; lane 2, urokinase ; lane 3, pro-urokinase

아미노산 조성 및 N-말단 아미노산 서열

정제한 urokinase와 pro-urokinase를 각각 6N 염산으로 가수분해한 뒤 아미노산을 phenylisothiocyanate(PITC)로 coupling한 후,

Table 1. Amino acid composition of urokinase and propurokinase. Purified urokinase and pro-urokinase(10 µg) was hydrolyzed in 6N HCl at 110°C for 24 hr in a sealed evacuated glass tube. After drying the samples in vacuum centrifuge for 1 hr, it was dissolved in 20 µg FITC coupling solution(70% ethanol, 10% triethanolamine, and 1% FITC) and incubated at room temperature for 20 min. The FITC-amino acid were applied onto reverse-phase ODS column(4×250 mm) and eluted by a linear gradient(buffer A, 12.5 mm phosphate, pH 6.4: buffer B, 70% acetonitrile). The Eluted amino acids were determined using a HPLC system(pharmacia-LKB) with detector.

Amino acids	No. of Amino acid residues		
	Deduced from cDNA	Pro-Urokinase	Urokinase
Asx	37	38	39
Thr	26	24	24
Ser	30	31	31
Glx	40	44	44
Pro	23	27	27
Gly	35	37	38
Ala	16	19	19
1/2 Cry	24	22	9
Val	19	22	22
Met	7	8	8
Ile	19	17	17
Leu	31	30	30
Tyr	18	17	17
Phe	12	9	9
His	17	19	19
Lys	27	29	29
Arg	22	20	25
Trp	8	N.D.	N.D.
Total	411	(414)	(408)

N.D.: Not determined

Table 2. N-terminal amino acid sequence of purified pro-urokinase and urokinase.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Deduced form cDNA sequence	Ser	Asn	Glu	Leu	His	Gln	Val	Pro	Ser	Asn-
Pro-Urokinase	1				5					10
	Ser	Asn	Glu	Leu	His	Gln	Val	Pro	Ser	Asn-
Urokinase	1				5					10
	Ser	Asn	Glu	Leu	His	Gln	Val	Pro	Ser	Asn-
	159				163					168
	Ile	Ile	Gly	Gly	Glu	Phe	Thr	Thr	Ile	Glu-

HPLC system(Pharmacia-LBK)을 이용하여 revers-phase ODS column chromatography로 분석한 결과, Table 1에서 제시된 cDNA와 거의 동일하게 아미노산을 함유하고 있음을 확인하였다. 이 결과는 isoelectric focusing으로 얻은 urokinase와 pro-urokinase의 등전점과 예측 비교해 볼 때 상이한 결과로 이해되는데 그 이유는 아미노산의 조성이 pI값과 직접연관을 가지고 있으나, 이들 아미노산들의 배열에 따라 단백질의 3차 구조가 어떻게 형성되느냐에 기인한다고 추측할 수 있다. 비록 산성 아미노산이 많이 있어도 이들이 내부에 존재하고, 상대적으로 작은 숫자인 염기성 아미노산이 표면에 노출되어 있기 때문으로 생각된다. 또한 N-말단 아미노산 서열을 automatic peptide sequencer (Applied Biosystem Model 470, USA)와 PTH analyzer, on-line

separation system 120 A로 분석한 결과 Ser-Asn-Glu-Leu-His-Gln-Val-Pro-Ser-Asn으로 결정되었으며 이미 보고된 N-말단 아미노산 서열과 비교해 보았을 때 매우 높은 서열 유사성(sequence homology)을 갖고 있음이 밝혀졌다(Table 2). 그러나 urokinase에서는 아미노산 서열 158(Lys)과 159(Ile)사이가 절단되어 있어 N-terminal 아미노산이 두개씩 존재하는 것을 알 수 있으며, 그 서열은 예측한 것과 동일함을 확인하였다.

혈장내에서 urokinase와 pro-urokinase의 용해활성

정제한 urokinase와 pro-urokinase가 plasma내에서의 용해활성, 반응성을 조사하기 위하여 fibrin agar plate에 plasminogen-rich 와 plasminogen-free 한 상태에서 용해활성을 수행한 결과 PLG(+)에서는 lysis well 이clear 하게 형성되었고, PLG(-) 상태에서는 lysis가 형성되지 않았다. In vitro 실험이기는 하지만 in vivo조건과 매우 유사한 결과와 양상을 보이는 chandler's loop방법으로 urokinase의 혈전 용해 활성과 T₅₀(50% thrombolysis시키는 효소의 양)을 측정하였다(Figure 2). Artificial circulating system에서

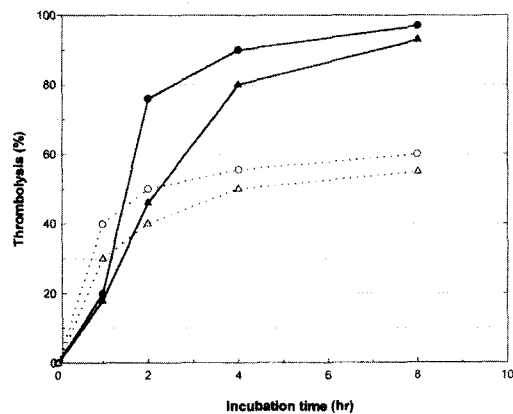


Figure 2. Lysis pattern of human blood colts by pro-urokinase and urokinase. ●, Pro-urokinase (3 µg/mL); ▲, Pro-urokinase (1 µg/mL); ○, Urokinase (3 µg/mL); △, Urokinase (1 µg/mL)

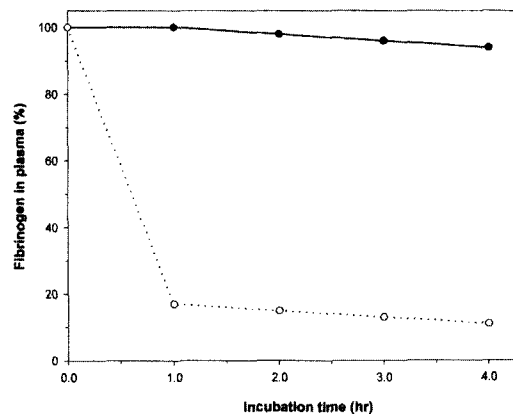


Figure 3. Change of plasma fibrinogen level at varing incubation time by pro-urokinase and urokinase. ●, Pro-urokinase (3 µg/mL); ○, Urokinase (3 µg/mL)

혈전의 용해도는 사용한 효소의 농도에 의존함을 확인하였다. 또한, 흥미로운 점은 혈전용해 능력이 초기에는 urokinase가 pro-urokinase 보다 우위에 있었으나, 시간이 경과하면서 놀랍게도 혈전 용해능력이 상대적으로 낮았던 pro-urokinase 혈전용해 능력이 높은 사실을 알 수 있었다. 또한 fibrinogen에 대한 분해활성을 조사한 결과, urokinase는 혈장내 fibrinogen을 상당히 손상시키지만, pro-urokinase는 거의 영향을 주지 않아 혈전선택성이 매우 좋음을 알 수 있었다(Figure 3).

본 연구는 pro-urokinase를 상업적으로 개발하기 위한 일련의 과정으로써, 기존의 urokinase와 pro-urokinase의 물리화학적 효소학적 특성을 비교 연구되었다. 또한 비교된 특성을 근거로 실험실 수준의 개발단계와 scale-up생산과정에서 각종정보를 제공함으로써, 실용화시기를 단축하고 품질 높은 신약개발을 지원하는 데 본 연구의 의의가 있다할 수 있다.

요약

본 연구에서는 인노에서 분리 정제한 urokinase와 유전자 재조합 CHO(Chinese Hamster Ovary) 세포 배양액으로부터 분리 정제한 pro-urokinase의 물리화학적 특성과 혈액 내에서의 효소활성을 비교 분석하였다. Two chain form인 urokinase와 single chain form인 pro-urokinase를 각각 순수 분리한 후, electrophoresis한 결과 모두 54 kd의 단일밴드를 나타냈다. 그러나 urokinase는 환원시켰을 때 33 kd과 21 kd으로 나누어짐을 확인하였으나 gel filtration결과 분자량이 54 kd 정도임을 확인되어 용액 내에서 단일분자로 존재함을 알 수 있었다. Urokinase와 pro-urokinase가 물리화학적으로 거의 동일한 구조를 가졌다는 사실은 isoelectro focusing에 의한 pI 값이 모두 8.6으로 동일하다는 점과, 아미노산 조성을 분석한 결과 동일하다는 사실로도 알 수 있었다. N-terminal 아미노산 서열을 분석한 결과, urokinase는 이중사슬 구조이므로 N-terminal이 두개 존재하여 pro-urokinase의 서열 (Ser-Asn-Glu-Leu-His-Gln-Val-Pro-Ser-Asn)이외에도, 159번째의 Ile 다음부터 Ile-Gly-Gly-Glu-Phe-Thr-Thr-Ile-Glu가 같은 peak로 나타남을 확인하였다. 효소활성 조사결과 pro-urokinase와 urokinase는 모두 농도 의존적으로 혈전용해 활성을 보였으나, 특이하게도 짧은 반응시간동안에는 urokinase가 동일 농도 하에서 강한 활성을 보인 반면, 2시간이 지난 오랜 반응조건에서는 pro-urokinase가 혈전용해활성을 나타내었다. Fibrinogen에 대한 분해활성을 조사한 결과, urokinase는 혈장 내 fibrinogen을 상당히 손상시키지만, pro-urokinase는 거의 영향을 주지 않아 혈전선택성이 매우 좋음을 알 수 있었다.

REFERENCES

- Zucker, M. B. (1980), The function of blood platelets, *Scien. Amer.* **242**, 86-103.
- Harker, L. (1987), Role of platelets and thrombosis in mechanisms of acute occlusion and restenosis after angioplasty, *Am. J. Cardiol.* **60**, 20-28.
- Bachmann, F. (1987), Thrombosis and Haemostasis, p.277, Leuven University Press, Leuven
- Carrell, R. W. and D. R. Boswell (1986), Protease inhibitors, p.403, Elsevier, Amsterdam
- Gurewich, V. (1988), Activation of fibrin-bound plasminogen by pro-urokinase and its complementariness with that by tissue plasminogen activator, *Enzyme* **40**, 97-108.
- Reich, E. (1975), Proteases and Biological Control, p.333, Cold Spring Harbor Lab.
- Strickland, S. (1978), Regulatory Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors, p.181, Pergamon Press, Oxford
- Sherry, S. (1992), Fibrinolysis, thrombosis, and Hemostasis, p.31, Lea & Febige, Philadelphia, London
- Lijnen, H. R. and D. Collen (1991), Strategies for the improvement of thrombolytic agents, *Tromb. Haemost. THHADQ* **66**, 88-110.
- White, W. F., G. H. Barlow, and M. M. Mozen (1966), The isolation and characterization of plasminogen activators (urokinase) from human urine, *Biochemistry* **5**, 2160-2169.
- Bernik, M. B.(1973), Increased plasminogen activator(urokinase) in tissue culture after fibrin deposition, *J. Clin. Invest.* **52**, 823-834.
- Nolan, C., L. Hall, G. Barlow, and I. I. E. Tribby (1977), Plasminogen activator from human embryonic kidney cell cultures. Evidence for a proactivator, *Biochem. Biophys Acta* **496**, 384-400.
- Husain, S., V. Gurewich, and B. Lipinski (1983), Purification and partial characterization of a single-chain high-molecular-weight form of urokinase from human urine, *Arch. Biochem. Biophys.* **220**, 31-38.
- Wun, T. C., W. D. Schleuning, and E. Reich (1982), Isolation and characterization of urokinase from human plasma, *J. Biol. Chem.* **257**, 3276-3283.
- Wun, T. C., L. Ossowski, and E. Reich (1982), A proenzyme form of human urokinase, *J. Biol. Chem.* **257**, 7262-7268.
- Nielsen, L. S., J. G. Hansen, L. Skriver, E. L. Wilson, K. Kaltoft, J. Zeuthen, and K. Dano (1982), Purification of plasminogen activator from human glioblastoma cells by affinity chromatography with monoclonal antibody, *Biochemistry* **21**, 6410-6415.
- Sumi, H., M. Maruyama, O. Matsuo, H. Mihara, and N. Toki (1982), Higher fibrin-binding and thrombolytic properties of single polypeptide chain--high molecular weight urokinase, *Thromb. Haemostasis* **47**, 297.
- White, W. F., G. W. Barlow, and M. M. Mozen (1966), The isolation and characterization of plasminogen activators (urokinase) from human urine, *Biochemistry* **5**, 2160-2169.
- Barlow G. H. (1976), Urinary and kidney cell plasminogen activator(urokinase), In *Methods in Enzymology*, Vol. 45, L. Lorand, ed., p.239-244, Academic Press, San Diego, CA
- Harpel P. C., T. S. Chang, and E. Verderber (1985), Tissue plasminogen activator and urokinase mediate the binding of Glu-plasminogen to plasma fibrin I, *J. Biol. Chem.* **260**, 4432-4440.
- Rakoczil, B. Wiman, and D. Collen (1978), On the biological significance of the specific interaction between fibrin, plasminogen and antiplasmin, *Biochim. Biophys. Acta* **540**, 295-300.
- Deutsch, D. G. and E. T. Mertz (1970), Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography, *Science* **170**, 1095-1096.
- Bradford M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.* **72**, 248-254.
- Maeno, H. and S. Mitsuhashi (1960), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Jap. J. Microbiol.* **4**, 1734-1738.
- Astrup, T. and S. Mullertz (1952), *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 346.

26. Chung, Kwang-Hoe, Myung-Whan Sunwoo, Han-Sang Woo, and Sung-Bok Baik (1990), A Simplified Procedure for the Large-Scale Purification of Urokinase from Human Urine, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **5**(2), 183-189.
27. Gameli-Piperno, A. and E. Reich (1978), Secretion of plasminogen activator by human polymorphonuclear leukocytes. Modulation by glucocorticoids and other effectors, *J. Exp. Med.* **146**, 1693-1706.
28. Fairbanks, G., T. L. Steck, and D. F. H. Wallach (1971), Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane, *Biochemistry* **10**, 2606-2617.
29. Heinrichson, C. L. and S. C. Meredith (1984), Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate, *Anal. Biochem.* **136**, 65-74.