

활성화된 Sepharose Gels에 공유결합으로 고정화된 Urokinase를 이용한 융합단백질 절단반응

서창우·¹강관엽·¹이효실·²안상점·†이은규
한양대학교 화학공학과 생물공정연구실, ¹(재)목암연구소 단백질 연구실, 2(주)녹십자 GE팀
(접수 : 2000. 1. 10., 게재승인 : 2000. 2. 21.)

Fusion Protein Cleavage by Urokinase Covalently Immobilized to Activated Sepharose Gels

Chang Woo Suh, Kwan Yub Kang¹, Hyosil Lee¹, Sang Jum Ahn² and Eun Kyu Lee†
Bioprocessing Research Laboratory, Department of Chemical Engineering, Hanyang University,
¹Protein Laboratory, Mogam Biotechnology Research Institute
²Genetic Engineering Team, Korea Green Cross Corp.
(Received : 2000. 1. 10., Accepted : 2000. 2. 21.)

Urokinase (UK), a thrombolytic enzyme used to clear catheters obstructed by blood clots, can be also used industrially in the recombinant protein purification system to cleave a fusion protein linked with a certain fragment of GST. We have immobilized UK by covalent attachment to activated Sepharose 6B-Cl gels and evaluated its performance to cleave a fusion protein of hGH and GST. The Sepharose gels were activated by etherification with glycidol (2,3-epoxypropanol) and further oxidized with periodate resulting in glyceryl-Sepharose gels. After the activation treatment, surface density of the aldehyde groups was 7-30 $\mu\text{mol-aldehyde/mL-gel}$. Immobilization yield was higher than 99% at high pH (10.5), and the immobilized UK maintained ca. 80% specific activity of the soluble UK. In a column reaction the cleavage yield heavily depended on the feed rate, and it was nearly 86% of that from soluble UK. And the immobilized UK was successfully regenerated by unfolding and refolding with 6M GuHCl. After cleaving reaction, the monomeric hGH was purified by using expanded bed adsorption chromatography.

Key Words : urokinase, immobilized enzyme, covalent bond, cleavage, fusion protein

서 론

재조합 단백질의 생산 기술의 발달로 많은 수의 사람단백질이 대장균이나 효모를 통해 생산되고 있다. 특히 목적단백질이 융합단백질의 형태로 발현하는 경우가 증가하고 있다. 이러한 경우 융합단백질에서 목적단백질만을 절단하여 얻어내는 공정이 필요하다. 기존의 공정은 절단효소를 사용하여 대부분 회분식 공정으로 처리하고 있다. 이 경우 효소의 회수 및 재사용이 어려워 산업적 규모에서는 효소의 비용이 생

산공정에서 큰 부분을 차지하게 된다. 또한 교반에 의한 shear stress를 받기 때문에 효소의 불활성화가 일어나게 되고, 연속공정이 힘들고, 효소반응 후 생성된 생성물에 의한 효소저해 작용을 일으키기도 하며, 효소반응 후 반응물, 생성물 그리고 효소가 혼합되어있기 때문에 생성물 분리에 추가적인 공정이 필요하다.

따라서 고정화 효소반응을 도입함으로써 효소의 재이용과 반응 후 회수 및 정제공정이 용이하여 경제적인 공정구축이 가능해진다 또한 고정화 효소는 pH, 온도, 용매 등에 대한 안정성이 향상되고, 고농도 효소반응과 연속반응을 통해 높은 생산성을 가지며, 특정단계에서 반응을 조절할 수 있는 장점이 있다.

본 연구에서는 절단효소를 고정화하여 연속반응 공정과 반복사용을 가능하게 하였다. 사용된 절단 효소인 urokinase (UK, EC 3.4.21.31)는 plasminogen 활성체로 411개의 아미노

†Corresponding Author : Bioprocessing Research Laboratory,
Department of Chemical Engineering, Hanyang University,
1271 Sa-dong, Ansan, 425-791, Korea
Tel : +82-345-400-5275. Fax : +82-345-408-3779
E-mail : eklee@mail.hanyang.ac.kr

산으로 이루어져 있는 serine protease의 한 종류이다(1,2). 본 연구에 사용된 UK는 사람의 소변에서 분리한 것으로 섬유소 분해, cell migration, 피부재생, 배란, 상처치료 등의 기능을 가지고 있다(3)

현재 효소를 고정화하기 위한 방법으로는 가둠법, 흡착법, 공유결합법 등이 있고 각 방법에 모두 장단점이 있겠지만 효소의 재사용에 초점을 둔 본 연구에서는 높은 안정성을 얻기 위하여 공유결합법을 사용하였다.

본 연구에서는 효소의 고정화 부위를 아민기로 결정하였다. 단백질의 N-terminal과 lysine의 아민기는 대부분의 효소에서 catalytic site에 보통 존재하지 않는 것으로 알려져 있다. 또한 아민기는 극성을 띄고 있어 수용액상에서 단백질의 표면에 노출되어서 반응하기가 용이하고 반응성이 pH 변화에 매우 민감하게 변화함으로써 pH 변화로 반응속도를 조절할 수 있는 잇점이 있다(4, 5).

효소를 결합시키는 지지체로는 Sepharose CL-6B를 선택하였다. Sepharose CL-6B는 6%의 가교결합된 agarose로 구성되어 있어 물리적인 안정성이 높아 넓은 pH 영역(pH 3-13)과 교반에 의한 shear stress에 안정하다. 또한 화학적인 안정성이 높아 8M urea, 6M GuHCl, ethanol, DMF, THF, acetone, DMS, chloroform과 같은 강한 용매에서도 안정하고 121°C에서 멸균하여도 구조적인 변화가 없다는 장점이 있다.

지지체와 효소를 결합시키는 방법으로는 Sepharose gels의 표면을 직접 활성화하는 방법이 있고 연결물질을 사용하여 gels 표면에 활성화 부위를 만드는 방법이 있다. 연결물질을 사용하면 효소 표면의 활성화 부위가 지지체에 가려져 기질 결합이 방해받아서 효소활성이 감소하게 되는 것을 막을 수 있고 효소반응 후에 생성물의 확산이 용이하다는 잇점이 있다. 여러 가지 연결물질 중에서 본 연구에서는 epoxide 잔기를 가지고 있는 glycidol (2,3-epoxy-1-propanol)을 사용하였다 Glycidol은 지지체와 결합이 용이하고 결합부위가 안정하여 효소가 다시 떨어지지 않으며 pH 변화로 효소와의 반응을 조절할 수 있는 장점이 있다(6).

본 연구에서는 고정화 UK를 이용하여 융합단백질(hGH-GST)로부터 인성장호르몬(hGH)을 절단하여 얻는 공정을 대상으로 하였다 절단반응에서 회분식 반응기와 컬럼식 연속반응기의 장단점을 비교하고 고정화 효소의 재사용을 위한 방법에 중점을 두고 수행하였다. 또한 고정화 전후의 융합단백질의 절단반응 특성과 생화학적 특성을 비교하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 UK와 융합단백질(hGH-GST)은 (주)녹십자로부터 제공받았으며 UK는 352,000 IU/mL의 활성을 가지고 있다. Sepharose CL-6B는 Amersham Pharmacia Biotech사에서 구입하였고 gel 활성화물질로 사용된 glycidol(2,3-epoxy-1-propanol), sodium periodate, sodium borohydride 등의 시약들은 모두 Sigma에서 구입하였다 효소활성 측정을 위한 기질인 ALMe(N-α-acetyl-L-lysine methyl ester hydrochloride)와 perchloric acid, chromotropic acid 등의 시약을 역시 Sigma에서 구입하여 사용하였다.

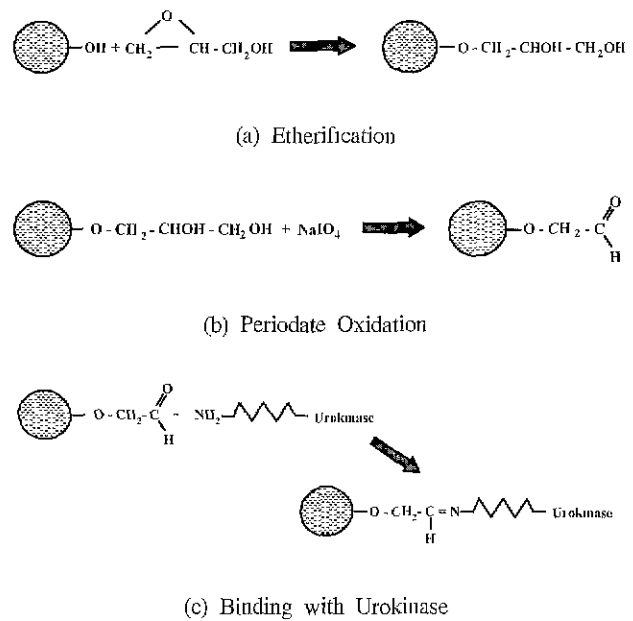


Figure 1. Activation reaction mechanisms of Sepharose CL-6B and urokinase immobilization.

Sepharose gel의 활성화

Gel의 활성화는 첫 번째 단계에서 Sepharose CL-6B와 glycidol을 12시간 반응하여 etherification을 시켜 glyceryl-Sepharose gels(Ag-O-CH₂-CHOH-CH₂OH)을 만든다. 두 번째 단계에서는 결합된 glycidol의 알콜기를 강한 산화제인 periodate(NaIO₄)를 사용하여 glyoxyl-Sepharose(Ag-O-CH₂-CHO)로 산화시킨다(7, 8). 이렇게 활성화된 bead의 알데하이드기는 단백질의 아민기와 공유결합반응을 일으킨다(Figure 1).

Sepharose gel의 활성화 정도는 glyceryl-Sepharose gels을 산화시킬 때 소모된 periodate의 량을 측정함으로써 계산되진다(9-11). Sepharose CL-6B를 periodate로 산화시키면 1 mL gel당 18 μmoles이 산화됨으로 총 산화된 periodate의 량에서 1 mL gel당 18 μmoles의 값을 뺀 것이 glyoxyl 잔기에 의해 활성화된 정도이다(4).

UK의 고정화

2 mL의 활성화 gel에 10 mL의 0.1M sodium phosphate buffer를 넣고 pH 10.5로 맞춘다. 상온에서 천천히 교반하면서 1~2 mL의 UK를 첨가하여 고정화 반응을 수행한다. 고정화 반응을 수행하면서 반응시간 별로 현탁용액의 시료를 취한 후 원심분리하여 상층액을 분리한 후 단백질농도와 효소역가를 측정한다 침전된 gel은 3회 세척하여 효소역가를 측정한다. 이때 단백질농도는 Lowry 단백질 검사 kit(Bio Rad)를 사용하여 측정하였다.

UK 효소역가분석

액상과 고정화된 UK의 활성 측정은 모두 Esterolytic 방법을 사용하였다(2) 이 측정법은 넓은 역가범위에서 측정할 수 있는 장점이 있다. UK 역가의 단위는 CTA unit(= I.U.)을 따랐다. UK 역가 1 unit은 37°C에서 1분 동안 5×10⁴ μM의

ALMe를 분해하는 것으로 정의되어진다. 실험에 사용된 UK 표준물질은 (주)녹십자로부터 제공받았다.

융합단백질 절단반응 평가

융합단백질은 절단되어 목적단백질인 hGH와 GST절편으로 분리되어진다. 융합단백질의 절단정도는 반응에 투입된 융합단백질의 질량 대비 절단된 융합단백질의 질량을 비교함으로써 평가하였다. 반응물인 융합단백질의 총량은 단백질 정량분석을 통해 측정하고 절단 후 생성된 hGH와 미반응 융합단백질은 SDS-PAGE와 RP-HPLC를 통해 분석하였다. 분석조건은 SDS-PAGE 15% gel을 사용하여 분석 후 densitometer를 통해 정량분석하였다. HPLC는 Gilson사의 302 모델을 사용하였다. 고정상으로 Shodcx사의 C18 역상 컬럼을 이용하였고 이동상으로 0.1% TFA를 포함한 증류수를 사용하였으며 구배를 주기 위해서 0.1% TFA를 포함한 acetonitrile을 사용하였다. 용출된 단백질은 220 nm에서 UV 흡광을 통해 검출하였다.

결과 및 고찰

Sepharose gel의 활성화

Sepharose gel을 etherification과 oxidation을 통해 활성화시켰다. Gel 표면의 활성화 정도는 초기 etherification 단계에서 glycidol의 농도에 따라 변화하는 것으로 나타났다. 동일한 glycidol 농도에서 etherification을 시킨 후에 periodate의 농도를 달리하여 oxidation을 시켰을 때 일경 농도 이상에서는 모두 동일한 농도의 glyoxyl기가 형성됨을 알 수 있었다. Figure 2에서 glycidol의 농도를 0.2M에서 2.0M로 변화시키면서 gel 표면을 활성화시켰을 때 단위 mL gel 당 glyceryl의 농도는 7 μ M에서 30 μ M까지 선형적으로 변화하였다. 활성화된 glyoxyl기의 농도는 gel의 1000 \AA^2 당 glyoxyl기의 개수로 표현할 수 있으며 1.7개에서 7.2개에 해당한다(4).

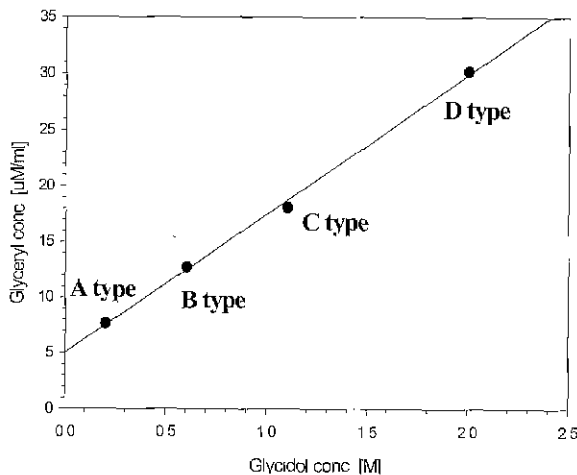


Figure 2. Glyceryl yield after Sepharose CL-6B activation using different glycidol concentration. 100 mL sepharose gel contained 60 mL antioxidant buffer (0.16M NaOH, 6 mg/mL NaBH₄) was reacted with glycidol at each concentration, 25°C, 12-18 hours. Surface density (number of residues of active groups per 1000 \AA^2 of gel surface) = $6.02 \times \text{aldehyde concentration} / \text{surface area}$ (μ moles per mL/ m^2 per mL). The surface area of Sepharose CL-6B is 25 m^2 per mL gel.

UK를 고정화하기 위해 D type의 활성화된 gel을 사용하였다. D type젤은 1000 \AA^2 당 7.2개의 glyoxyl기가 있으며 UK는 대략 6000 \AA^2 의 표면적을 가지고 있어 전체 표면적 중에서 1/6이 결합가능한 면적이라 가정하면 1000 \AA^2 에 해당한다 따라서 공유결합 가능한 개수는 최대 7개가 되어 'multi-covalent' 결합이 가능하게 되어 효소의 안정성이 증가하게 된다(4, 12).

UK의 고정화

UK의 고정화는 30분 이내의 빠른 반응속도를 보이나 고정화된 UK의 활성은 7시간 이후 급격히 떨어져 초기 활성의 80%를 나타내었다(Figure 3). 이때 UK의 고정화 정도는 99% 이상을 유지하는 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 고정화과정에서 UK의 고정화 속도는 매우 빠르면서도 불구하고 UK의 활성은 늦게 나타나는 이유는 UK와 gel 표면의 glyoxyl기와의 공유결합이 우선 one point covalent 결합이 매우 빠르게 형성되기 때문에 용액내에 free enzyme의 농도는 급격히 감소하지만 multi-covalent 결합의 형성은 비교적 느린 반응으로 완전한 자신의 3차원적 구조를 형성하는데 많은 시간이 필요한 것으로 생각되어진다.

Multi-covalent 결합은 6M의 GuHCl을 포함한 조건에서 UK 고정화 결합반응을 수행하여 확인할 수 있었다. Figure 3에 의하면 6M GuHCl을 포함한 조건에서는 공유결합반응이 진행됨에 따라 고정화 UK의 활성이 감소하였다. 이는 폴립형대의 효소가 여러 개의 공유결합을 함에 따라 자신의 본래의 3차원적 구조로 재접힘을 일으킬 수 없어서 효소의 활성을 완전히 잃어버린 것으로 생각된다. 그러나 효소 중에서는 어느 부위에서 결합이 일어나는가와 몇 개의 공유결합이 이루어졌는지는 아직 밝히지 못하였다.

고정화 UK의 특성

효소고정화의 가장 큰 이점은 효소의 반복사용과 안정성이 다. 많은 경우 고정화 후에 효소의 활성이 감소하지만 높은 안정성을 얻고자 사용하는 것이다. 이러한 고정화 효소의 안정성을 측정하기 위하여 37°C에서 24시간 방치 후에 효소의 활성을 측정하였다. 이때 고정화 UK는 98%의 활성을 유지한 반면 액상 UK는 65%의 활성만을 유지하였다. 이 결과는 김등이 발표한 70°C에서 열안정성 실험과 비교할 수 있다(13).

또한 pH의 안정성을 측정한 결과 낮은 pH에서 액상 UK 대비 10% 이상 높은 활성을 나타내었다(Figure 4). pH 7.5 이상에서는 기질인 ALMe의 자체 분해가 일어나서 측정할 수 없었다. 고정화 UK는 3차원적인 안정한 구조가 되기 때문인 것으로 생각된다. 고정화된 UK가 사용 중에 결합이 끊어져 유출되는지를 확인하기 위해 24시간동안 완충용액을 흘려준(2 bed volume/h) 후에 용출된 완충용액에서 UK의 활성을 측정할 결과 활성이 전혀 검출되지 않았다. 따라서 UK와 gel과의 결합은 안정한 것으로 생각된다.

고정화 후에 효소의 활성과 안정성만을 고려하여 선택하여서는 산업적 규모에서 적용이 어렵다. 고정화 효소반응에서 중요한 점은 물질전달이다. 기질과 생성물의 물질전달이 고정화로 인해 방해받아서 안 된다. 많은 경우 이러한 물질전달이 잘 이루어지도록 하기 위해 긴 연결물질을 사용하곤 한

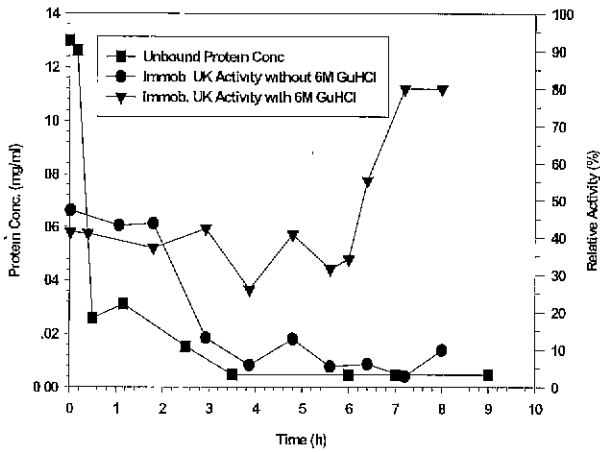


Figure 3. Time course of urokinase binding. Urokinase (4 mL, 1.3 mg/mL, 352,000 IU/mL) bound with activated Sepharose (10 mL gel, 30 mL buffer) at pH 10.5, ambient temperature, and mild agitation

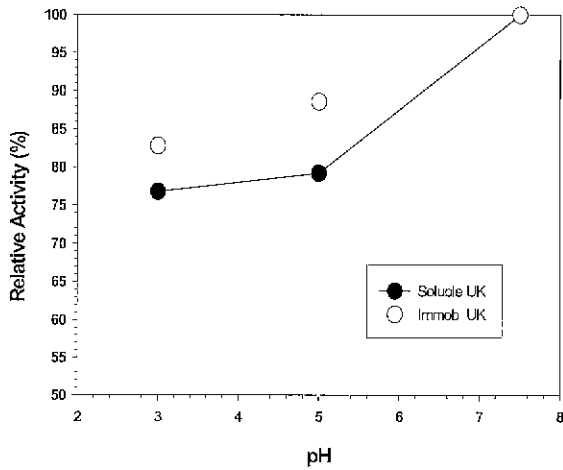


Figure 4. pH stability of immobilized urokinase

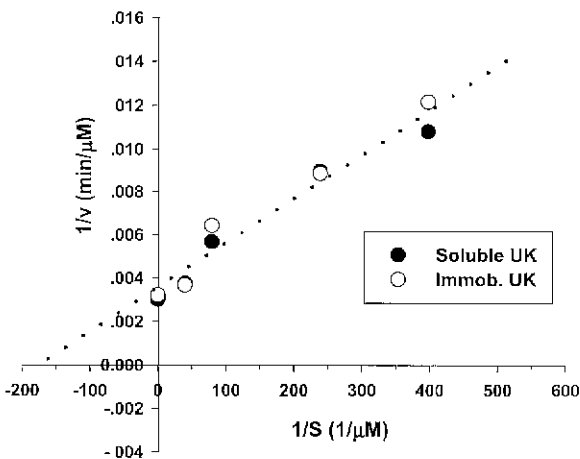


Figure 5. Comparison of K_m with the soluble and the immobilized urokinase.

다 하지만 대부분 사용되어지고 있는 연결물질이 '-(CH₂)_n'의 사슬로 이루어져 소수성을 띄기 때문에 소수성기를 가진 생성물이나 반응물이 상호작용을 일으켜 오히려 물질전달을 방해

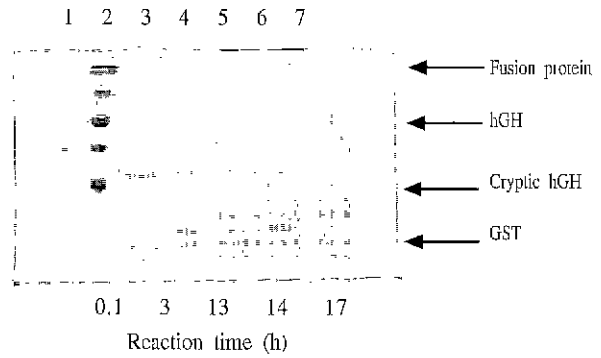


Figure 6. Cleavage yield of soluble urokinase at S/E ratio (20 : 1). Lane 1: fusion protein, Lane 2: marker proteins. Lane 3-7: cleavage reaction at each time

할 수 있기 때문에 연결물질의 종류와 길이를 신중히 고려하여 선택하여야 한다

본 실험에서는 이러한 물질전달의 영향을 측정하기 위해 기질농도 변화에 따른 반응속도를 측정하여 Lineweaver-Burk plot으로 표현하여 free UK와 고정화 UK의 V_{max} 와 K_m 값을 비교하였다(14). Figure 5에서 보듯이 고정화 전후의 UK의 기질농도 변화(0.1 - 10 mg/mL)에 따른 반응속도의 변화가 거의 없음을 알 수 있다. 따라서 고정화로 인한 물질전달의 변화는 무시할 수 있다는 결론을 얻었다

액상 UK의 용합단백질 절단반응

회분식 반응에서 UK의 농도를 달리하여 절단수율을 측정하였다 용합단백질과 UK와의 반응비는 질량비로 500대 1에서 20대 1까지로 점차적으로 효소의 양을 증가시키면서 실험하였다 500대 1에서는 17시간동안 반응한 경우 60%의 절단수율을 얻을 수 있었다. 효소의 양을 증가시킬수록 용합단백질의 절단수율은 높아지나 생성물인 hGH 단량체가 다시 UK에 의해 절단되는 부반응이 점차 증가하였다. Figure 6에서 20대 1의 반응비에서는 대부분의 용합단백질이 절단되었으나 3시간 이후부터 hGH가 절단되어 목적단백질인 hGH가 모두 절단되는 결과를 보이고 있다.

이러한 이유는 hGH내에 UK가 절단할 수 있는 절단부위 (Gly-Thr-Gly-Arg-/X)와 매우 유사한 구조(Asp-Gly-Ser-Pro/-Arg-Thr-Gly-Gln-Ile-Asn)를 가지고 있기 때문에 일차적으로 hGH와 GST사이를 먼저 절단하고 hGH내의 절단부위를 공격하는 것으로 생각된다(15). 높은 농도의 UK를 사용하는 것은 오히려 부반응을 일으켜 더 낮은 수율의 목적단백질을 얻게 된다. 본 실험에서는 최적화된 조건에서 70%의 목적단백질을 얻을 수 있었다.

고정화 UK의 회분식 절단반응

고정화 UK를 이용한 용합단백질의 절단반응에서 A type과 D type의 gel에 UK를 고정화하여 회분식 반응 형태로 실험하였다. Figure 7에서 A type과 D type의 고정화 UK가 반응 시간에 따른 용합단백질의 절단정도를 나타내고 있다. 이때 5.5시간 반응 후에 A type gel은 35%의 절단수율을 D type gel은 70%의 절단수율을 나타내었다 이 결과는 free UK를 이용한 절단반응과 비교해볼 때 절단수율은 같고 반응 3시간

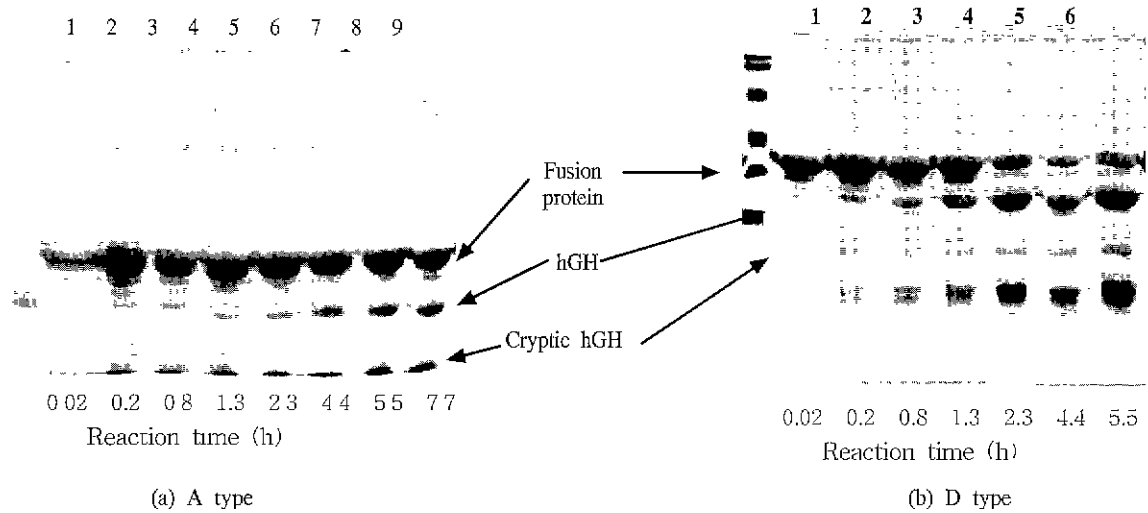


Figure 7. Cleavage reaction of immobilized urokinase (batch type reaction) Two mL of immobilized urokinase gel reacted with 5 mL fusion protein (5 mg/mL) for 5.5 hours. (a) A type (Lane 1: pure hGH, Lane 2-9: cleavage reaction at each time), (b) D type (Lane 1: marker proteins, Lane 2-8: cleavage reaction at each time)

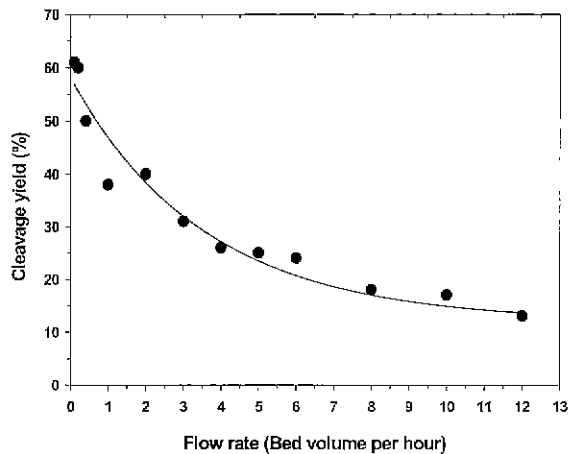


Figure 8. Cleavage reaction of immobilized urokinase (column type reaction) Three mL immobilized urokinase reacted with fusion protein (2.4 mg/mL) at each flow rate

절단반응은 대부분 이루어져 절단반응시간이 매우 단축하는 효과를 얻을 수 있었다 또한 특이적인 현상으로는 목적단백질인 hGH가 다시 절단되는 부반응이 현저히 줄어든 것을 볼 수 있다.

이러한 부반응의 감소는 고정화 UK는 3차원적 구조가 free UK와는 달리 비유동적으로 변화하기 때문에 융합단백질내의 UK 절단부위보다 기질 특이성이 낮은 hGH내의 절단부위의 공격이 어려워지기 때문인 것으로 생각된다.

고정화 UK의 컬럼 반응기에서의 연속식 절단반응

고정화 UK를 이용한 연속반응을 위해 컬럼 반응기를 도입하였다. 컬럼 반응에서는 기질의 유입속도에 따라 절단반응수율이 크게 변화하기 때문에 먼저 유속에 따른 절단반응수율을 측정하였다. 유속을 시간당 0.1에서 12 bed volume의 속도로 변화하면서 융합단백질의 절단정도를 측정하였다

(Figure 8). 유속변화에 따라 13%에서 61%까지의 다양한 절단수율을 얻을 수 있었다 본 실험에서는 컬럼 반응에서 절단수율을 free UK의 절단수율 대비 70% 이상을 유지하는 것을 원하였다. 그래서 50%의 절단수율을 보인 1 bed volume/h를 컬럼반응에서의 기질 유입속도로 결정하였다.

연속식 컬럼반응에서는 부반응이 전혀 나타나지 않았다. 이는 컬럼반응이 회분식반응에 비해 기질과 효소간의 반응시간이 짧기 때문에 부반응이 나타나지 않는 것으로 생각된다. 현재 컬럼반응의 반응수율을 높이고 반응시간을 줄이기 위한 최적화 실험을 수행하고 있다.

Expanded bed adsorption 크로마토그래피를 이용한 hGH 단량체의 분리

고정화 UK를 이용한 융합단백질의 절단반응 후에는 미반응 융합단백질과 목적단백질인 hGH 그리고 GST 단편이 함께 용출된다. 이러한 혼합물에서 목적단백질을 분리하는 방법으로 산침전법을 사용하였다. 용출액의 pH를 3에서 5까지 변화시키면서 산침전을 유도하고 침전물과 상층액을 원심분리를 통해 분리한 후에 침전물은 pH를 다시 올려주어 재용해시켜 각각의 총 단백질량을 측정하고 성분을 HPLC와 SDS-PAGE로 분석하였다. Figure 9에서 각 pH에서 왼쪽의 막대그래프는 상층액의 성분분석 결과이고 오른쪽의 막대그래프는 침전물을 재용해한 후 분석한 결과이다. 이 결과에 따르면 pH 3.5를 기준으로 낮은 pH에서는 상층액에 미반응 융합단백질이 존재하였고 높은 pH에서는 hGH가 함께 침전되었고 pH가 높아질수록 hGH가 침전되는 양은 증가하고 있다 따라서 혼합용출액 중에서 목적단백질의 분리는 pH 3.5가 최적임을 알 수 있다.

산침전 후에 원심분리를 통한 분리방법은 공정이 수작업화 되고 목적단백질이 외부에 노출되어 오염될 위험이 있어 hGH와 같은 의약품 단백질의 생산에는 적합하지 못하다. 따라서 침전물을 제거하는 공정으로 expanded bed adsorption

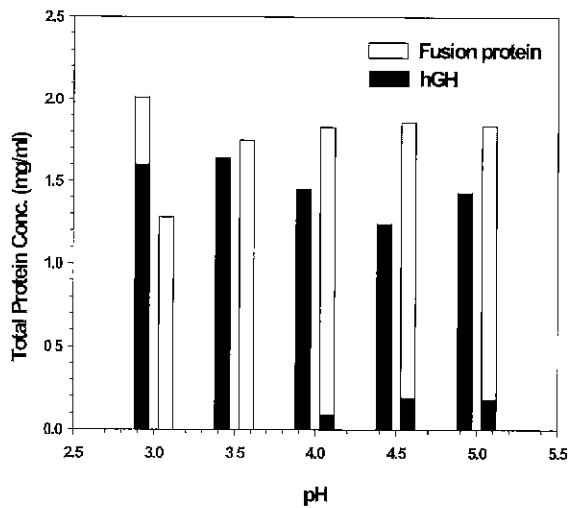


Figure 9. Acid precipitation of cleaved fusion protein at each pH. Left bar represents the supernatant, and the right bar is for the precipitate after acid precipitation of cleaved fusion protein at each pH.

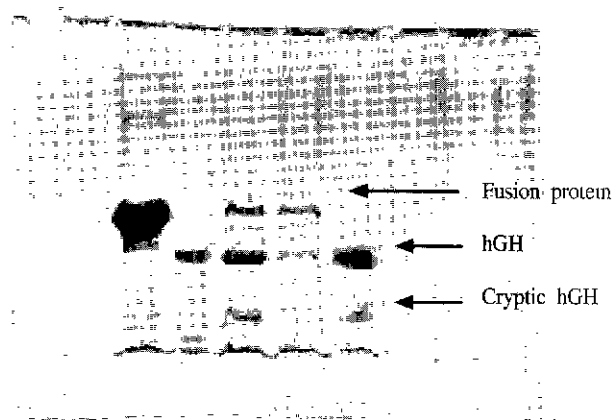


Figure 10. Purification of hGH monomer using Streamline column. Streamline 25 operating conditions (Bead: Streamline SP XL, Loading flow rate: 10 mL/min, Loading buffer 0.1M sodium phosphate at pH 4.0, Elution flow rate: 8 mL/min, Elution buffer 1M NaCl) (Lane 1: fusion protein, Lane 2: pure hGH, Lane 3: cleaved fusion protein, Lane 4: precipitate of cleaved fusion protein, Lane 5: eluted protein, Lane 6: flowthrough of loading)

크로마토그래피(Streamline™, Amersham Pharmacia Biotech)를 도입하였다(16, 17) 절단반응 후의 혼합용액을 pH를 4에 맞추어 주입하였다. 이때 침전물은 Streamline을 통과하여 용출되었고 목적단백질은 이온교환수지에 흡착되었다. Figure 10의 결과를 보면 컬럼을 통과 후의 미흡착 용출액을 원심분리 후 상층액과 침전물을 분석한 결과 상층액에는 아무런 단백질도 검출되지 않았고 침전물에는 융합단백질과 소량의 hGH 단량체가 존재하였다. 침전물내의 hGH 단량체는 pH 4에서 산침전시 함께 침전된 것으로 앞의 산침전 결과와 일치한다. 흡착된 단백질을 1M의 NaCl로 용출시켜 분석한 결과 100%의 hGH만이 존재하였다. 따라서 Streamline을 포함한 공정에 의해 융합단백질의 절단, 침전에 의한 불순물 분리, 침전물 분리 및 hGH의 정제 등의 다단계 공정을 통합시켜 운영할 수 있게 하였다.

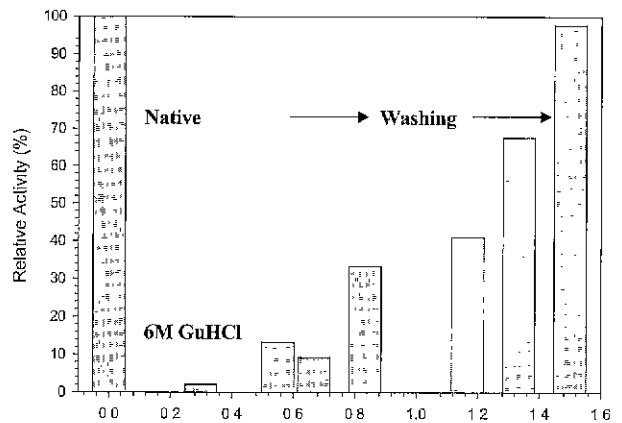


Figure 11. Reactivation of immobilized urokinase using unfolding/refolding strategies. The column equilibrated with 6M GuHCl was washed with 0.1M phosphate buffer, and the UK activity was measured.

고정화 UK의 풀림과 재접힘을 통한 반복사용

고정화 효소를 이용한 반응은 절단반응이 지속되면 반응물과 생성물이 gel내에 흡착되어 물질전달을 방해하기도 하고 pH, 온도, 용매 등에 의해 효소의 3차원적 구조가 변화하여 효소의 활성이 감소하는 문제점이 있다. 이러한 구조적 변형에 의한 활성감소를 다시 회복하기 위한 방법으로 solid state refolding 방법을 도입하였다. 고정화 효소에 변성제를 사용하여 고정화된 효소를 풀린 구조로 변환시킨 후에 변성제를 서서히 제거함으로써 재접힘을 유도하였다(18, 19). 이러한 재접힘을 통해 gel내의 이물질 제거와 함께 원래의 효소활성을 가진 3차원적 구조를 얻고자 하였다.

변성제로는 6M의 GuHCl을 30분간 주입하여 UK를 풀림반응시킨 후에 인산 완충용액을 주입하여 서서히 변성제를 제거함으로써 재접힘을 유도하면서 각 시간별로 고정화 UK의 활성을 측정하여 결과를 Figure 11에 나타내었다. 1시간동안 재접힘을 유도한 후의 효소활성은 초기의 98%까지 회복되었다. 이러한 재접힘을 통한 효소의 재생을 연속적으로 수행함으로써 20회 이상 반복함으로써 UK의 사용량을 약 1/8 이하로 줄일 수 있는 경제적인 효과를 얻을 수 있다. 현재 8회까지의 반복에서는 활성의 감소를 찾아볼 수 없었으며 최대 반복 사용횟수를 실험하고 있다.

요약

본 연구에서는 고정화 UK를 이용한 융합단백질의 절단반응에 대해 UK의 고정화, 고정화 UK의 특성과 절단반응, 절단반응 후의 분리정제 그리고 고정화 UK의 재생에 대해 실험하였다. 고정화 수율은 99% 이상이었으며 고정화 후의 효소활성은 80%를 유지하였다. 융합단백질 절단반응에서 액상 UK와 고정화 UK를 이용한 회분식 반응 모두 약 70%의 절단반응을 얻었고, 특히 고정화 UK의 사용시 부반응이 매우 낮은 이점이 있었다. 컬럼식 절단반응에서는 기질의 주입속도에 따라 절단수율은 크게 변화하였다. 최적의 유속은 50%의 절단수율을 얻은 1 bed volume/h로 설정하였다. 고정화 효소반응의 이점인 안정성과 반복사용 측면에서는 액상 UK

대비 고정화 UK가 높은 열안정성을 보였고 낮은 pH에서는 10% 이상 높은 활성을 유지하였다. 반복사용을 위해 6M GuHCl을 사용하여 인위적으로 폴림, 제접힘을 한 경우 98%의 활성을 얻음으로 타당성이 있음을 제시하였다. 또한 목적 단백질의 분리를 위하여 산침전 후 expanded bed adsorption 크로마토그래피를 이용함으로써 연속화된 고수율의 정제공정을 가능하게 하였다. 이러한 고정화 UK를 이용한 절단반응 및 정제시스템을 구축함으로써 융합단백질의 생산공정에 매우 유용하게 사용될 것으로 생각되어진다.

감 사

본 연구는 산업자원부의 1998년도 공업기반기술개발사업(공고번호 : 981-34-04) 연구비지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다. 본 연구에 참여한 연구원 서창우는 교육부지정 국책대학원인 한양대학교 신소재공정공학원의 장학지원에 대하여 감사의 뜻을 전합니다.

REFERENCES

- Harris, Y. J., Second-generation plasminogen activators, *Protein Engineering*, **1**(6), 449-458 (1987)
- Barlow, G. H., Urinary and kidney cell plasminogen activator (urokinase), *Methods in Enzymology*, **45**, 239-244 (1976).
- Tang, W., Z. Y. Sun, R. Pannell, V. Gurewich, and J. N. Liu, An Efficient system for production of recombinant urokinase-type plasminogen activator, *Protein Expression and Purification*, **11**, 279-283 (1997).
- Guisan, J. M., Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes, *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 375-382 (1988).
- Suh, C. W., and E. K. Lee, Characteristics and application of conjugation between protein and activated PEG, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **12**(3), 314-322 (1997)
- Zemanova, I., J. Turkova, M. Capka, L. A. Nakhapetyan, F. Svec, and J. Kalal, Effect of nature of proteins on their coupling to different epoxide-containing supports, *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 229-232 (1981).
- Shaimoff, J. R., Zonal immobilization of proteins, *Biochemical and Biophysical Res. Comm.*, **95**(2), 690-695 (1980).
- Blanco, R. M. and J. M. Guisan, Protecting effect of competitive inhibitors during very intense insolubilized enzyme-activated support multipoint attachments: typsin (amine)-agarose (aldehyde) system, *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 227-232 (1988).
- Winteron, R. I., Iodin, sodium thiosulphate, arsenious oxide, ferrous and mercurous, *Comprehensive Analytical Chemistry*, Wilson & Wilsons, 249-287.
- Standard Methods of Chemical Analysis, Sixth edition, D. Van Nostrand Company, Inc., New Jersey, London, 522-523.
- Quantitative Analysis, 6th edition, Prentice-Hall International, Inc., 301-306 (1991).
- Gusan, J. M., A. Bastida, C. Cuesta, R. Fernandez-Lafuente, C. M. Rosell, Immobilization-Stabilization of α -Chymotrypsin by Covalent Attachment to Aldehyde-Agarose Gels, *Biotech Bioeng.*, **38**, 1144-1152 (1991).
- Kim, H. P., S. M. Byun, Y. I. Yeom and P. W. Kim, Immobilization of Urokinase on Agarose Matrices, *J. Pharm. Sci.*, **72**(3), 225-228 (1983).
- Shuler, M. L. and F. Kargi, *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. PTR Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 58-102 (1992)
- Cooke, N.E., J. Ray, J. G. Emery, and S. A. Libhaber, Two distinct species of human growth hormone-variant mRNA in the human placenta predict the expression of novel growth hormone proteins, *J. Biol. Chem.*, **263**(18), 9001-9006 (1988)
- Wright, P. R., F. J. Muzzio, and B. J. Glasser, Effect of Resin Characteristics on fluidized Bed Adsorption of Proteins, *Biotechnol. Prog.*, **15**, 932-940 (1999)
- Frej, A. B. R. Hkorlu, and A. Hammarstrom, Pilot Scale Recovery of Recombinant Annexin V from Unclearified *Escherichia coli* Homogenate Using Expanded Bed Adsorption, *Biotech Bioeng.*, **44**, 922-929 (1994).
- Soler, G., A. Bastida, R. M. Blanco, R. Fernandez-Lafuente, and J. M. Guisan, Reactivation strategies by unfolding/refolding of chymotrypsin derivatives after inactivation by organic solvents, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1339**, 167-175 (1997).
- Nohara, D., H. Sakakibara, E. Kurimoto, T. Hayashi. and T. Sakai, A new method of media selection for protease relolding by application of immobilized Subtilisin preparation, *J. Ferm. Bioeng.*, **82**(3), 315-318 (1996).