

## Enterokinase에 의한 Glucagon · 3-Interleukin-2 (G · 3-IL-2)의 단백질 분해 연구

이운영 · <sup>1</sup>이지원 · \*김인호  
충남대학교 공과대학 화학공학과 · <sup>1</sup>생명공학 연구소  
(접수 : 2000. 4. 17., 게재승인 : 2000. 6. 15.)

## Study on Proteolysis of Glucagon · 3 - Interleukin-2 (G · 3-IL-2) Using Enterokinase

Woon-Young Lee, JeeWon Lee<sup>1</sup>, and In-Ho Kim\*

Department. of Chemical Engineering, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

<sup>1</sup>Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology(KRIBB), P.O. Box 115, Yusong, Taejon 305-600, Korea

(Received : 2000. 4. 17., Accepted : 2000. 6. 15.)

A fusion protein of human interleukin-2(hIL-2) and glucagon, which was expressed in *Escherichia coli.*, was digested with enterokinase for recovery of hIL-2 from the fused protein. To obtain hIL-2 of optimum recovery, hydrolysis reaction were performed under various conditions of urea, additives and reaction time. hIL-2 was finally purified by RP-HPLC(reversed phase-HPLC) to remove cleaved G3 fusion partner and residual uncleaved G3-IL-2. hIL-2 was eluted in a single peak at 100% acetonitrile at 28 min. Optimum urea concentration was found to be 0.5 M and 24 h reaction time was sufficient without any additive such as CaCl<sub>2</sub> and Tween-20.

**Key Words :** human interleukin-2 , enterokinase, hydrolysis, RP-HPLC

### 서론

인터루킨-2(IL-2)는 특정한 T세포가 생산하는 단백질로서 'T세포 증식 인자 (T cell growth factor; TCGF)'라고 하며 T세포를 증식시키는 활성 및 B 세포를 자극하는 활성이 있어 면역에 중요한 작용을 한다(1,2). IL-2는 항암 효과 및 HIV의 치료에 효능이 있으며 *E. coli*에서 유도된 재조합 인간 인터루킨-2(rhIL-2)는 1992년부터 미국의 Chiron사에 의해 Proleukin이라는 상표명으로 신장암 치료제로서 판매되고 있다.

인터루킨-2는 아미노산으로 구성된 소수성이 강한 단백질로서 분자량은 약 15 kDa이며, 세 개의 cystein 잔기를 가지고 있는데, Cys-58과 Cys-105 사이에 하나의 이황화 결합을 형성하고 있고, 나머지 하나의 Cys-125는 결합하지 않은 채로 존재하며, 알파 나선구조의 형태로 존재한다(2-4). 재조합 인간 인터루킨-2는 cDNA 기술을 이용하여 *E. coli* 등의 미생물에서 발현, 생산하여 정제되며 이에 관해 많은 연구 결과가 보고되고 있다(5,6).

최근에 hIL-2에 친수성이 있고, 강한 접힘(robust folding)을 보이는 펩타이드나 단백질을 융합시켜 refolding의 효율을 높이고 정제 공정을 용이하게 한 연구가 본 실험실에서 수행되었다(1).

융합 파트너로서 글루카곤(glucagon)을 사용하여 rhIL-2 분자끼리의 S-S 결합을 억제하여 균일(homogeneous)한 집합체를 형성하도록 하였으며 N-말단에 글루카곤 분자를 포함시켜 융합 단백질로 *E. coli* 내에서 발현시킨 rhIL-2를 정제하였다. Inclusion body(IB) 알칼리 용액으로 pH를 shift함으로써 융합 단백질(G3-IL-2)을 용해시켜 회수한 후, 글루카곤과 rhIL-2 사이의 tag를 enterokinase으로 절단할 수 있는데, 이 과정에서 반응시키는 조건에 따라 최종적으로 얻을 수 있는 순수한 IL-2의 양이 결정된다. 사용된 효소는 trypsinogen의 생리학적 활성제로서, (Asp)<sub>4</sub>Lys 서열에 대한 특이성을 보이는 serine 단백질 분해 효소인 enterokinase이다(7).

Enterokinase에 의한 G3-IL-2의 가수 분해 시에 최종적으로 얻을 수 있는 IL-2의 양을 용액의 조성과 반응 시간을 변화시켜 SDS-PAGE와 RP-HPLC (Reversed-phase HPLC)를 사용하여 비교해 보았다(1,4).

### 재료 및 방법

#### G3-IL-2의 정제

실험 방법은 (1)의 연구 방법과 동일하였다.

\*Corresponding Author : Department. of Chemical Engineering,  
Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea  
Tel : 042-821-5685, Fax : 042-822-8995  
E-mail: ihkim@hanbat.chungnam.ac.kr

### Enterokinase 용해

효소 반응에 사용한 enterokinase(Sigma)는 500 unit (380 mg)의 분말로, 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0) 2.5 mL에 천천히 녹여 5  $\mu$ L당 1 unit가 되도록 하였다. 희석시킨 enterokinase 용액을 밤새 투석시킨 후, 냉장 보관하였다.

### Enterokinase 효소 반응

접혀진 G3-IL-2용액에 enterokinase 0.1 unit 당 1  $\mu$ g의 G3-IL-2를 혼합한 반응 용액을 37°C의 수조에서 분해 반응을 수행하였다(7). 단백질 용액 100  $\mu$ L와 enterokinase 희석 용액 100  $\mu$ L, 그리고 urea나 첨가제를 넣은 Tris-HCl 완충용액 200  $\mu$ L를 혼합하여 최종적으로 단백질 용액이 4배 희석이 되도록 하였다. 반응 조건을 구하기 위해 용합 단백질의 절단 부위의 노출을 도와주는 urea의 농도와 enterokinase의 활성에 도움을 주는 첨가제(CaCl<sub>2</sub>, Tween-20)의 유무, 그리고 가수분해 반응 시간을 변화시켰다. Urea의 농도는 0 M(Tris-HCl buffer only), 0.5 M, 1.0 M, 1.5 M, 2.0 M로 변화시켰고, 첨가제는 1 mM CaCl<sub>2</sub>만 넣은 것, 0.1% Tween-20만 넣은 것, 그리고 두 가지 모두 넣은 것으로 실험하였다. 그리고 반응시간은 12 h, 20 h, 22 h, 24 h, 26 h로 5가지의 변화를 주었다.

### Reversed-phase HPLC (RP-HPLC)

Enterokinase에 의해 잘려진 글루카곤 3분자와 IL-2를 분리하기 위하여 RP-HPLC를 이용하였다. HPLC는 펌프(영인과학, M910), UV-검출기(Waters, Model 440), 기록계(영인기기, D520B)로 구성되어 있고, 칼럼은 Kromasil사의 분석용(4.6 mm×250 mm) C8 칼럼을 사용하였다. 주입한 샘플의 양은 20  $\mu$ L이고 샘플이 칼럼 안에서 이동상과 혼합되었을 때 침전이 생겨 칼럼이 막히는 것을 방지하기 위해 샘플을 주입하기 전에 40% 아세트나이트릴로 미리 처리하여 생기는 침전은 원심 분리하여 제거하였다. 이동상으로는 아세트나이트릴과 물을 사용하였다. 이동상의 구배 조건은 아세트나이트릴의 농도를 단계적으로 증가시켜 30%(5분)-80%(15분)-100%(20분)로 하였다. Chiron 사의 Proleukin을 표준 시약으로 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### Enterokinase 효소 반응

G3-IL-2와 효소 반응 후 단백질의 변화를 전기 영동 사진을 Figure 1에 나타내었다. 글루카곤 한 분자의 분자량이 약 4000 Da이고 IL-2의 분자량이 약 15000 Da이므로 전기영동 상의 약 27000 Da의 위치에 G3-IL-2의 밴드가 나타난다.

Enterokinase는 용합 단백질을 분해하는 serine 단백질 분해효소인데, Figure 1의 SDS-PAGE상에서는 43000 Da과 55000 Da의 분자량 위치에서 두 밴드로 나타난다. 그리고 G3-IL-2의 위치에 넓게 퍼져 있는 밴드가 있는데, 그것은 덜 반응된 G3-IL-2이고, 15000 Da에 위치한 밴드가 잘려진 IL-2의 밴드이다. 그리고 IL-2 밴드의 위에 또 하나의 흐릿한 밴드가 나타나는데 이것은 enterokinase 효소 반응 후 IL-2가 dimer나 trimer와 같은 oligomer의 형태로 응집되어 좀더 큰 분자량의 위치에 나타나는 것을 알 수 있다. 첨가제(CaCl<sub>2</sub>, Tween-20)를 넣은 것이 반응 후에 흰 침전이 약간 생김을 관찰할 수 있었다.

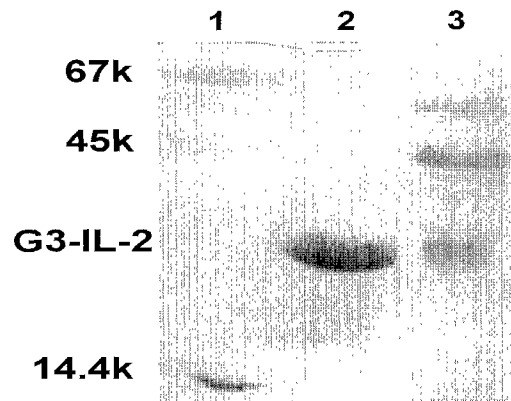


Figure 1. SDS-PAGE analysis of G3-IL-2 and digested G3-IL-2.  
lane 1 : MW marker (BSA 67k, ovalbumin 45k, lysozyme 14.4k)  
lane 2 : G3-IL-2  
lane 3 : sample after enterokinase digestion

### Proleukin의 시간에 따른 RP-HPLC 피크의 변화

Chiron 사의 제품 Proleukin은 Aldesleukin(재조합 인터루킨-2)이 1 바이알 당  $18 \times 10^6$  IU이 들어 있는데, 이 바이알에 50 mM Tris-HCl 2 mL을 주사기로 천천히 주입하여 녹인 후 소량을 취하여 RP-HPLC에 주입하였다. IL-2가 시간에 따라 안정도가 매우 떨어지는데 이것을 크로마토그램으로 확인하였다. 시간에 따른 Proleukin의 크로마토그램의 변화는 Figure 2와 같다. 그림에서 보는 바와 같이 28분대에 크게 나오는 피크가 IL-2의 피크이며 이것은 시간에 지남에 따라 점점 작아지고 반면에 12분대 피크가 점점 커진다. 이것은 monomer 형태의 IL-2가 서로 응집하여 형성된 oligomer 형태의 IL-2가 빨리 용리 되어 나옴을 알 수 있었다. 또한 크로마토그램에서 보는 바와 같이 1일째에 비해 5일째의 oligomer 피크의 크기가 더 커짐이 관찰되었는데, 이것은 시간이 지남에 따라 IL-2 응집이 형성됨을 알 수 있었다.

### Urea의 농도의 영향

Urea는 G3-IL-2가 용액 내에 존재할 때 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)에 의한 멀티머로 존재한다고 추정되어 enterokinase가 글루카곤과 IL-2를 분리하고자 하는 데에 필요한 절단 부위가 잘 노출되도록 도움을 주는 역할을 한다(1,8). 이때 높은 농도의 urea는 절단 부위를 노출시키는 것뿐만 아니라 원하는 단백질의 변성을 초래할 수 있으므로 2 M 이하의 농도 범위에서 실험하였다.

Urea의 농도에 따른 RP-HPLC의 크로마토그램의 결과는 Figure 3과 같다. 구배 조건을 단계적으로 아세트나이트릴의 조성을 증가시켜 얻은 크로마토그램을 관찰하여 보면 처음 1분대에 공통적으로 나오는 큰 피크는 비교적 친수성인 enterokinase와 글루카곤, 그리고 덜 반응된 G3-IL-2이다. 주입 후 5분대에 이러한 친수성 물질들은 이동상의 조성이 30% 아세트나이트릴에서 모두 용리되어 나온다. 12분대에 나오는 피크는 IL-2의 dimer나 trimer와 같은 oligomer로, IL-2가 응집되어 생성되는 것으로 IL-2의 monomer보다 분자의 크기가 커서 빨리 용리 되어 나옴을 알 수 있었다. Monomer 형태의 IL-2는 매우 소수성이 강한 단백질이기 때문에 이동상의 조건 또한 유기용매인 아세트나이트릴 100%에서 용리 되었다. IL-2의 체류 시간은 28분으로

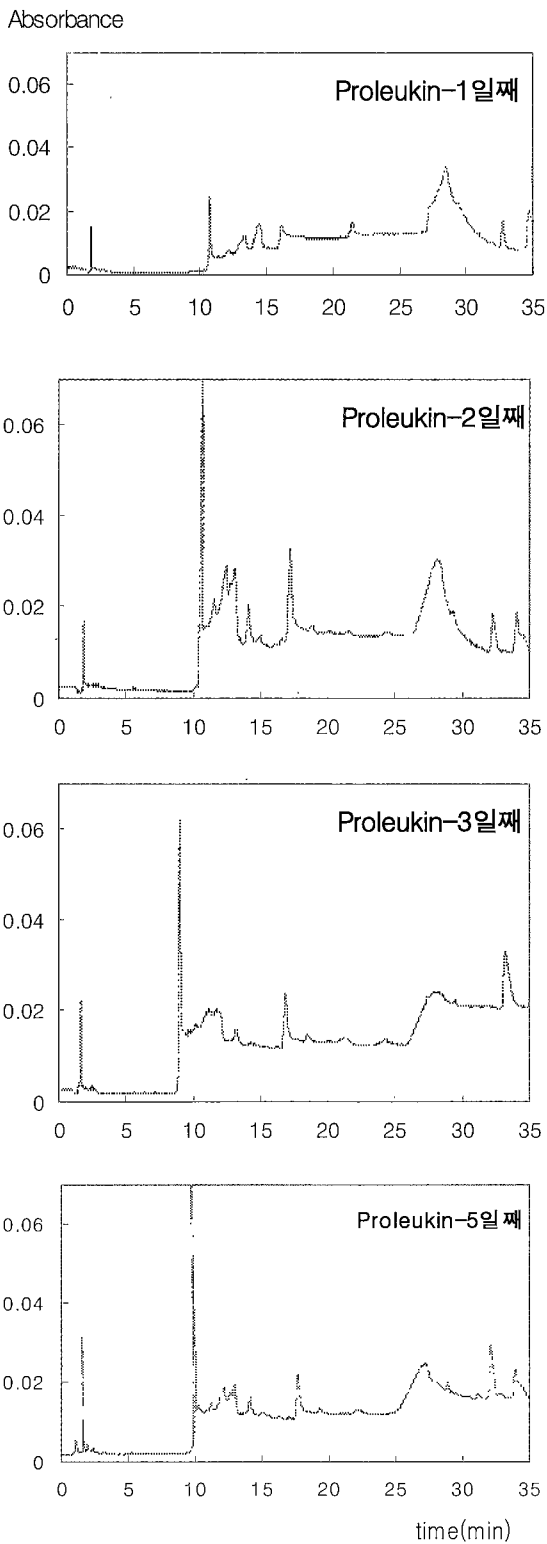


Figure 2. HPLC chromatograms showing stability of Proleukin.

가장 나중에 용리 되었는데, 피크의 모양을 살펴보면 넓게 퍼짐을 관찰할 수 있다. 즉, 처음에 천천히 용리 되고 maximum point 이후에도 base line에 도달하기까지 약 5분의 시간이 걸린다. 이것으로 IL-2는 칼럼 내에서 고정상에 대한 분배계수가 큼을 알 수 있었다. IL-2 이후에 나타나는 피크들은 칼럼 내에서

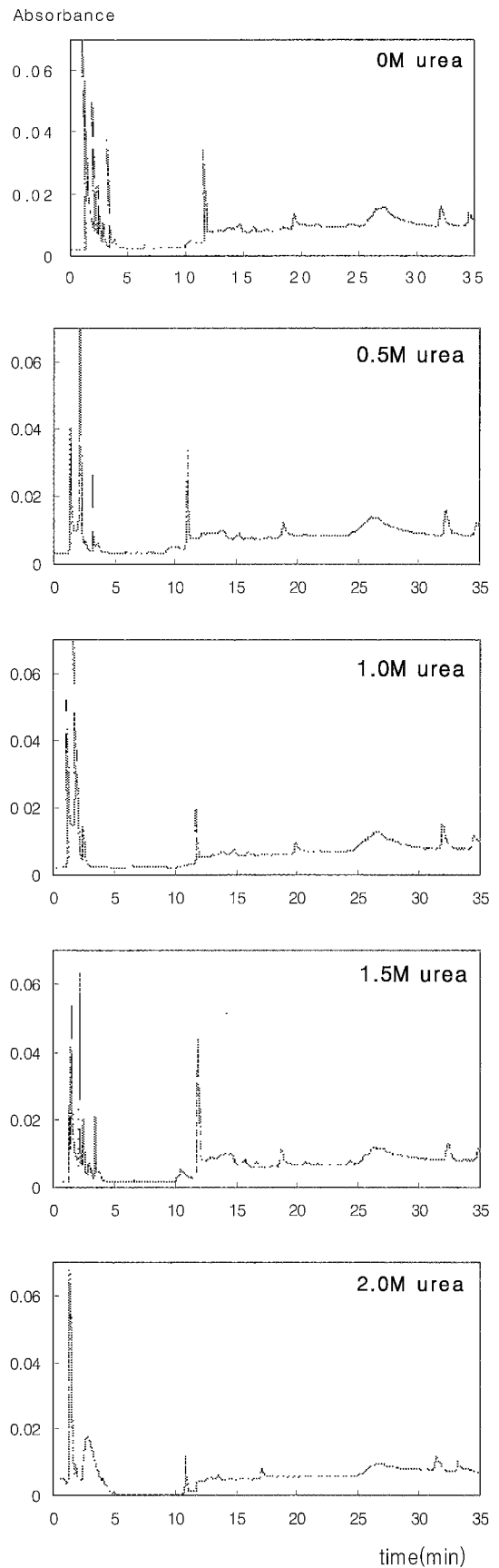


Figure 3. HPLC chromatograms with variation of urea concentration.

Table 1. Peak areas and area percentages of chromatograms with variation of urea concentration.

Urea conc. (M)	Area	Area %
0	772166	25
0.5	887949	36
1.0	868764	25
1.5	779629	24
2.0	874537	20

비가역적으로 흡착되었다가 용리 되어 나오는 것이다. IL-2 피크의 전체 피크에 대한 백분율은 약 25~30% 정도였으며 urea의 농도에 따라 달랐다. 크로마토그램을 살펴보면 urea를 첨가하지 않고 반응을 시킨 것보다는 0.5 M urea를 넣은 것의 결과가 더 좋았지만 그 이상의 urea의 농도에서 오히려 IL-2의 피크가 더 작아짐을 알 수 있었다. 0.5 M urea에서의 IL-2의 피크가 전체 면적에 대한 백분율의 값도 가장 큼을 각 크로마토그램의 면적과 %를 같이 비교해 놓은 Table 1에서 관찰할 수 있다.

#### 첨가제의 영향

첨가제는 가수분해 반응 시 효소의 활성화에 도움을 주는 역할을 하는데 본 실험에서는 1 mM CaCl<sub>2</sub>와 0.1 % Tween-20을 각각 첨가해 보았다. Urea의 영향에 따른 실험 결과를 바탕으로 각각의 조건에 모두 0.5 M urea를 공통적으로 첨가하였다. 첨가제의 조건에 대한 실험 결과는 urea의 농도에 따른 결과보다 IL-2의 피크는 더 작아지고 oligomer 피크의 크기는 현저하게 커짐을 알 수 있었다. 따라서 첨가제는 앞서 논의한 바와 같이 IL-2가 응집되도록 하는 결과를 가져왔다. Table 2에서 보면 IL-2의 피크가 첨가제를 넣지 않은 것에 비해 두 가지 모두 넣은 것의 피크의 면적이 더 크지만, 전체 피크의 면적에 대한 %는 넣지 않은 것에 비해 더 작다. 이것은 첨가제를 넣음으로 해서 IL-2의 피크의 면적은 커졌지만 oligomer 형태의 IL-2가 같이 커져 monomer 형태의 IL-2의 %는 오히려 감소했음을 짐작할 수 있었다. 따라서 첨가제는 효소의 활성화에 도움을 준다 하더라도 원하는 단백질의 응집을 초래하여 넣지 않는 것이 더 효과적이라는 결과를 얻을 수 있다.

#### 반응시간의 영향

효소의 가수분해 반응의 적절한 시간을 알아보기 위한 실험으로서 각 반응 시간에 대한 결과를 Table 3에 나타내었다. Table 3에서 보는 바와 같이 반응 시간을 길게 할수록 IL-2의 피크의 면적이 커졌지만 첨가제의 영향에 대한 실험 결과와 마찬가지로 IL-2의 oligomer 형태의 피크도 같이 커져 면적의 증폭에 비해 %는 24시간 이후에는 거의 증가하지 않음이 관찰되었다. 따라

Table 2. Peak areas and area percentages of chromatograms with presence of additives.

Additives	Area	Area %
0.5 M urea only	821086	15
1 mM CaCl <sub>2</sub>	1165315	11
0.1% Tween-20	978205	14
1 mM CaCl <sub>2</sub> + 0.1% Tween-20	1975700	13.8

Table 3. Peak areas and area percentages of chromatograms with variation of reaction time.

Reaction time (h)	Area	Area %
12	1182797	9
20	873046	11
22	1315925	17
24	1906890	18.5
26	2650822	19

서 가수분해 반응에서 24시간 이후에는 효소의 활성화에 있어서 더 좋은 결과를 얻지 못했다.

#### 요 약

Enterokinase에 의한 G3-IL-2 가수분해 반응에 있어서의 urea는 글루카곤과 IL-2를 분리하고자 하는 데에 필요한 절단 부위가 잘 노출되도록 도움을 주는 역할을 하는데 1.0 M이상의 높은 농도에서 오히려 원하는 단백질의 변성에 영향을 미침을 알 수 있었다. 그리고 효소 반응 시에 효소의 활성화에 도움을 주는 첨가제는 반응 후에 침전이 생기고, IL-2의 회수율에는 오히려 나쁜 영향을 주었다. 그리고 반응시간에 따른 반응의 효과는 24시간 이후에는 효소에 의한 가수분해 반응이 진행되지 않음이 관찰되었다. 가수분해 반응 후의 순수한 IL-2의 회수율은 약 15~35% 정도였고, 반응 조건에 따라 수율은 차이가 있었다. IL-2는 시간이 지남에 따라 분자 상호 간의 응집에 의해 oligomer의 형태가 되어 본래의 크기보다 더 커져 RP-HPLC에서 더 빨리 용리되는 결과를 얻을 수 있었다.

#### 감 사

본 연구는 산업자원부(통상산업부) 공업기술개발사업에 의해 지원을 받았으며 연구비 지원에 감사드립니다.

#### REFERENCES

1. Won, H. S., J. W. Lee, I. H. Kim, and Y. H. Park (2000), Simple Purification of *Escherichia coli*-Derived Recombinant Human Interleukin-2 Expressed with N-terminus Fusion of Glucagon, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **5**, 13-16.
2. Liang, S. M., B. Allet, K. Rose, M. Hirschi, C. M. Lian, and D. R. Thatcher (1985), Characterization of Human Interleukin-2 Derived from *Escherichia coli*, *Biochem. J.* **229**, 429-439.
3. Bernhard, F., I. Sumner, and P. Goodenough (1993), Isolation, Renaturation, and Formation of Disulfide Bonds of Eukaryotic Proteins Expressed in *Escherichia coli* as Inclusion Bodies, *Biotechnol. and Bioeng.*, **41**, 3-13.
4. Jeffery, L. B., R. J. Mattaliano, E. P. Chow, S. M. Liang, B. Allet, J. Rosa, and J. E. Smart (1986), Disulfide Scrambling of Interleukin-2: HPLC Resolution of the Three Possible Isomers, *Anal. Biochem.*, **155**, 123-128.
5. Cha, H. J., N. G. Dala, M. Q. Pham, and W. E. Bentley (1999), Purification of Human Interleukin-2 Fusion Protein Produced in Insect Larvae is Facilitated by Fusion with Green Fluorescent Protein and Metal Affinity Ligand, *Biotechnol.*

- Prog.*, **15**, 283-286.
6. Euan, L., J. F. T. Griffin, N. Chinn, E. Lavallie, and G. Buchan (1996), The Cloning, Expression and Purification of Cervine Interleukin-2, *Cytokine*, **8**, 603-612.
  7. Tanya, H. and Q. Lu (1999), Influence of Amino acid Residue Downstream of (Asp)<sub>4</sub>Lys on Enterokinase Cleavage of a Fusion Protein, *Anal. Biochem.*, **269**, 10-16.
  8. Boris, B., C. Schiraldi, and J. B. Chaudhuri (1999), Inclusion Body Purification and Protein Refolding Using Microfiltration and Size Exclusion Chromatography, *J. Biotechnol.*, **68**, 149-158.