

## Affinity Chromatography를 이용한 재조합 *Helicobacter pylori* urease의 분리 정제

이주연 · 이만형\*

대구가톨릭대학교 약학대학

### Purification of the Recombinant *Helicobacter pylori* Urease by Affinity Chromatography

Ju Youn Lee and Mann Hyung Lee\*

College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Hayang Kyongsan, Kyongbook 712-702, Korea

#### Abstract

*Helicobacter pylori* is the etiologic agent of human gastritis and peptic ulceration and produces urease as the major protein component on its surface. *H. pylori* urease is known to serve as a major virulence factor and a potent immunogen. Recombinant *H. pylori* urease expressed in *E. coli* was purified by simple purification procedures utilizing CNBr-activated Sepharose-anti-urease IgG immunoaffinity chromatography or epoxy-activated Sepharose-urea affinity chromatography. Urease was apparently bound so tightly to the anti-urease IgG resin that it could not be eluted at various elution conditions except at certain extreme pH, including 100 mM carbonate (pH 10.5) buffer solution, which was shown to elute slightly inactivated but relatively pure enzyme. Urease eluted from the epoxy-activated Sepharose-urea affinity column showed higher activity, but the smaller UreA subunit of the enzyme appeared as a fainter band of diminished intensity when subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

**Key words** – *Helicobacter pylori*, urease, affinity, CNBr, epoxy

#### 서 론

인간의 위염[1,3], 위궤양[6] 및 위암[17]의 원인 균인 *Helicobacter pylori*는 그람 음성 미세 호기성 나선균으로서 이 세균의 가장 큰 특징은 균체 표면에 전체 세포 단백질의 6%를 차지하는 고 활성의 urease 효소를 갖고 있다는 점이다[7,18]. Urease는 다수의 미생물과 식물에서 발견되고 있으며 이 중 특히 세균의 urease는 인체와 동물의 질병원

인, 반추 동물의 질소대사 및 영양, 농경지를 포함한 자연에서의 질소화합물의 환경적 변환에 중요한 역할을 담당하고 있다[15,16]. *H. pylori* urease는 그 천연 분자량이 약 550 kDa이고 니켈을 활성부위에 함유하는 metalloenzyme 으로서 기질인 요소(urea)를 가수 분해하여 암모니아를 생성함으로써 극저적인 pH의 상승을 초래, 강산성인 위 내에서의 *H. pylori* 의 생존을 가능케 하는 생존인자이자, 중요한 병원성 인자로 작용한다[3,4,19]. *H. pylori* urease는 또한 대부분의 세균 urease가 3개의 subunit로 이루어진 것과는 대조적으로 2개의 subunit, 즉  $\alpha$  (66 kDa, UreB)와  $\beta$  (30 kDa, UreA) subunit로 구성된 heterohexamer ( $\alpha$

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : 053-850-3611 Fax: 053-850-3602  
E-mail : mhlee@cuth.cataegu.ac.kr

$\beta_6$ 로서 존재하며[2] 최근에는 그 3차 구조가 *Klebsiella aerogenes* 효소[9]에 이어 X-선 결정분석에 의하여 밝혀진 바 있다[5]. *H. pylori* 세균은 그 배양조건이 까다로운 관계로 urease 관련 유전자군을 대장균에 도입한 재조합 균주를 이용하여 활성 효소를 다량 발현하여 연구 재료로서 이용하여 왔다[8,12]. *H. pylori* urease는 이온 교환, gel-filtration 및 hydrophobic interaction 등의 성질을 이용한 3~4 단계의 크로마토그래피를 거쳐 정제하여 왔는데[2,7,8,12], 본 연구에서는 재조합 대장균에서 다량 발현하여 정제한 *H. pylori* urease를 이용하여 토끼에 투여하여 제조한 항체 또는 기질인 urea를 coupling 시켜서 제조한 affinity column을 이용하여 최소 한도의 크로마토그래피 과정을 통하여 효소를 고도 정제하는 방법을 모색하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양

*Helicobacter pylori* urease gene cluster 전체(*ureA-ureH*)를 포함하는 재조합 플라스미드인 pHU1013[12]를 *E. coli* BL21(DE3) 균주에 transform 시켜서 얻은 *E. coli* BL21(pHU1013) 또는 double transformant인 *E. coli* SE5000(pHP808/pHP902)[7]을 각각 재조합 *Helicobacter pylori* urease의 발현에 사용하였다. *E. coli* BL21(pHU1013) 균주는 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ampicillin과 1 mM  $\text{NiCl}_2$ 를 함유하는 LB 배지, *E. coli* SE5000(pHP808/pHP902)의 경우는 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ampicillin, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  chloramphenicol 및 1 mM  $\text{NiCl}_2$ 를 함유하는 LB 배지에 각각 접종하고 37°C에서 지수 증식기 후반까지 진탕 배양하였다.

### CNBr-activated Sepharose-Anti-*H. pylori* urease IgG column의 제조

CNBr-activated Sepharose 4B 수지 (Pharmacia, Sweden) 동결 건조 분말 2 g을 Buchner funnel에 가하여 실온에서 1 mM HCl 용액 400 mL로 습윤 및 세척하고 소량의 coupling 완충액 (0.1 M  $\text{NaHCO}_3$ , 0.5 M NaCl, pH 8.3)에 현탁시켰다. 여기에 전보[12]에서 보고한 바대로 protein A-Sepharose column으로 정제한 40 mg의 rabbit anti-*H. pylori* urease IgG를 함유한 10 mL coupling 완충액을 가하고 4°C에서 16 시간 서서히 교반 하였다. Coupling 되지

않은 과잉의 항체를 제거하기 위하여 gel 부피의 5배량 (35 mL)의 coupling 완충액으로 세척하고, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 용액을 가하여 실온에서 2 시간 방치함으로써 치환되지 않은 CNBr-activated Sepharose 수지의 잔여 활성 부위를 차단하였다. 이를 0.5 M NaCl을 함유하는 0.1 M acetate 완충액 (pH 4.0) 및 0.5 M NaCl을 함유하는 0.1 M Tris-HCl 완충액 (pH 8.0) 각 50 mL로 교대로 세척한 다음 Pharmacia XK16/20 column에 충전하고 5배 column부피의 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM ethylenediaminetetraacetate (EDTA), 1 mM dithiothreitol (PED, pH 7.2) 완충액으로 평형화시켰다.

### Epoxy-activated Sepharose- urea column의 제조

Epoxy-activated Sepharose 6B 수지 (Pharmacia, Sweden) 동결 건조 분말 2 g을 Buchner funnel에 가하여 실온에서 멸균 증류수 400 mL로 습윤 및 세척하고 소량의 coupling 완충액 (10 mM boric acid, pH 9.3)에 현탁시켰다. 여기에 144 mg의 urea가 녹아 있는 15 mL coupling 완충액을 가하고 실온에서 16 시간 서서히 교반 하여 coupling 시켰다. Coupling 되지 않은 과잉의 urea를 제거하기 위하여 gel 부피의 5배량 (35 mL)의 coupling 완충액으로 세척하고, 1 M ethanolamine (pH 8.0) 용액을 가하여 40°C에서 6 시간 방치 함으로써 치환되지 않은 epoxy-activated Sepharose 수지의 잔여 활성 부위를 차단하였다. 이를 0.5 M NaCl을 함유하는 0.1 M acetate 완충액 (pH 4.0) 및 0.5 M NaCl을 함유하는 0.1 M Tris-HCl 완충액 (pH 8.0) 각 50 mL로 교대로 세척한 다음 Pharmacia XK16/20 column에 충전하고 5배 column부피의 20 mM N-(2-hydroxyethyl) piperazine)-N'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES), 1 mM EDTA, 0.5 mM 2-mercaptoethanol (HEB, pH 7.5) 완충액으로 평형화시켰다.

### 재조합 *H. pylori* urease의 정제

*E. coli* BL21(pHU1013) 배양액을 4°C, 8,000 xg에서 15 분간 원심 분리하여 회수하고 cell pellet을 빙냉한 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoethanol (이하 PEB, pH 7.2) 완충 용액으로 2 회 세척한 후, 동량의 PEB에 현탁 시켰다. Phenylmethylsulfonyl fluoride를 최종 농도 1 mM로 하여 가하고 French pressure cell (Aminco,

USA) 을 18,000 psi의 압력으로 3회 반복 통과시켜서 세포를 파쇄하였다. 이를 4°C, 100,000×g에서 90 분간 원심 분리하고 그 상등액을 취하여 조 추출물로 하였다. PEB (pH 7.2)완충액으로 미리 평형화 시킨 DEAE-Sepahrose CL-6B (Pharmacia, Sweden) column (2.5×16 cm)에 조 추출물을 적용하고 50 mL PEB로 세척한 후, KCl 농도를 0에서 1 M 까지 직선적으로 증가시켜서 흡착된 단백질들을 용출시켰다. 각 분획에 대하여 indophenol 법[15]에 준하여 urease 효소 활성 측정을 행하였으며 이 중 활성 분획만을 모아 50 mL-stirred ultrafiltration cell (Amicon, USA)에서 농축과 동시에 용매 교환을 시행하였다. 이를 전 항에서 제조하여 pH 7.2 PED 완충액으로 미리 평형화시킨 CNBr-anti *H. pylori* urease IgG column (1×6.4 cm)에 적용하여, 4 배 column 부피의 PED 완충액으로 세척한 다음, 1 M KCl, 20% dimethylsulfoxide(DMSO)를 각각 함유하는 PED (pH 7.2) 완충액, 냉 초순수 (Milipore 급), 1 N NaOH용액, 100 mM glycine HCl (pH 3.2) 완충액 및 100 mM 탄산(pH 10.5) 완충액 등으로 각각 용출을 시도하였다.

한편으로, 동일한 DEAE 분획 수거 시료를 역시 전 항에서 제조하여 pH 7.5 HEB 완충액으로 미리 평형화 시킨 epoxy-urea column (1×6.4 cm)에 적용한 후, 100 mM urea를 함유하는 HEB (pH 7.5)완충액으로 용출시켰다. 용출된 단백질 시료는 적용 시 사용한 완충액 (PEB 및 HEB)에 대하여 4°C에서 각각 투석하여 다음 단계의 분석에 사용하였다.

#### Urease 활성 측정

Urease 활성은 urea로부터 ammonia가 방출되는 양을 측정 함으로써 결정하였다. 즉, ammonia가 phenol-hypochloride와 반응하여 생성된 indophenol을 625 nm에서 흡광도를 측정하는 fixed-time point assay를 시행하였다[12]. Assay buffer (50 mM urea, 25 mM HEPES, 0.5 mM EDTA (pH 7.75)에 37°C에서 효소를 첨가함으로써 반응을 시작하였으며, 방출되는 ammonia 농도는 Microsoft Excel 2000 프로그램 상에서 직선형 상관 회귀 분석에 의해 결정되었다. Urease 활성의 1 unit는 urea를 기질로 하여 37°C, 표준 assay buffer에서 매 분당 1 μmol의 urea를 가수 분해하는데 필요한 효소의 양으로서 정의하였다.

#### SDS-Polyacrylamide 전기영동

각 정제단계에서의 단백질 순도는 Laemmli 법[11]에 의한 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 시행하여 확인하였다. 각각의 시료는 3% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol을 함유하는 0.0625 M Tris buffer (pH 6.8)에 가하여 100°C에서 5분간 denature시킨 후 사용하였다. 이 시료를 두께 1.5 mm의 4.5% stacking gel과 12% polyacrylamide resolving gel에 적용하여 39 mA로 4 시간 동안 전기영동한 다음 0.1% Coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 후 탈색하였다. 시료 중 단백질의 농도는 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 Lowry법[13] 또는 MicroBCA Protein Assay Kit (Pierce, USA) 를 이용하여 측정하였다.

### 결과 및 고찰

의약학적으로 매우 중요한 *Helicobacter pylori* urease를 재조합 plasmid를 이용하여 다량의 고 순도의 재조합 효소를 정제하는 방법에 관한 연구는 이미 보고한 바 있다[12]. 본 연구에서는 최소한의 크로마토그래피 과정을 통하여 효소를 고도 정제하기 위하여 항원-항체 간의 상호 작용 또는 기질-효소 간의 결합 친화력을 바탕으로 한 affinity column을 이용한 간편한 정제 방법의 개발을 모색하고자 하였다.

먼저, 정제한 rabbit anti-*H. pylori* urease IgG를 CNBr-activated Sepharose 수지에 coupling시켜서 제조한 column에 핵산성분 등 기타 세포 내 고분자를 제거하기 위해 DEAE-Sepharose column으로 1차 정제한 재조합 *H. pylori* urease 함유 시료를 적용시켜 보았을 때, 항원-항체 반응이 매우 강력하게 일어났음을 알 수 있었다. 즉, column을 초기 적용 완충액인 PED (pH7.2)로 충분히(4배 column 부피) 세척한 후에 1 M KCl, 20% DMSO를 각각 함유하는 PED(pH 7.2) 완충액, 냉 초순수 (Milipore 급) 등으로 각각 용출시켜 보았으나 urease활성이나 단백질은 검출되지 않았다. 1 N NaOH 용액을 가하였을 때에야 높은 pH에 의해 활성이 소실된 *H. pylori* urease가 용출되어 나온 것을 분획의 SDS-polyacrylamide 전기 영동 분석으로 확인할 수 있었다. 따라서 용출 용매의 pH 변화에 의거하여 항체 affinity chromatography column에 흡착된 urease를 분

리할 수 있는 가능성을 확인하였다. PED (pH 7.2) 완충액으로 시료를 다시 적용한 후 100 mM glycine HCl (pH 3.2)

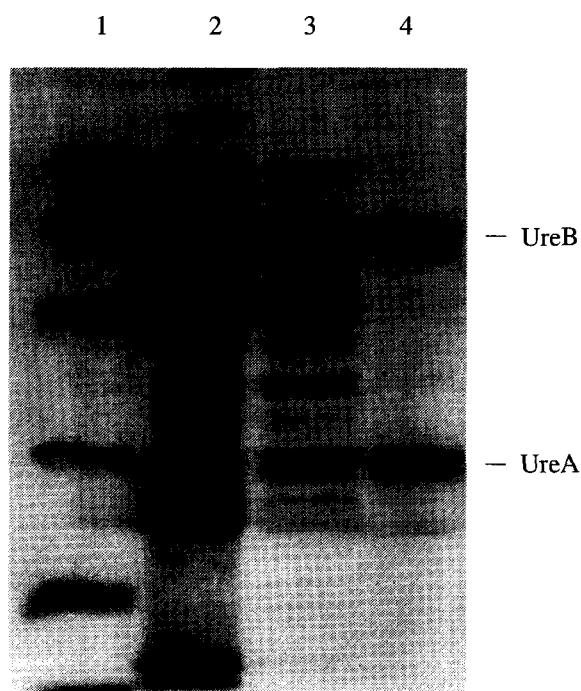


Fig. 1. 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the *H. pylori* urease purified by immunoaffinity chromatography. Cell extracts from *E. coli* BL21 (pHU1013) (lane 2), DEAE-Sepharose pool (lane 3), anti-*H. pylori* urease IgG-Sepharose pool (lane 4) were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, respectively, followed by Coomassie blue staining. Molecular weight markers (lane 1) were phosphorylase b, Mr=97,400; bovine serum albumin, Mr=66,200; ovalbumin, Mr=45,000; carbonic anhydrase, Mr=31,000; soybean trypsin inhibitor, Mr=21,500; and lysozyme Mr=14,400. Arrow heads are indicating the locations of the two urease subunits.

및 100 mM 탄산 (NaHCO<sub>3</sub>-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 10.5) 완충액으로 각각 용출한 결과 100 mM 탄산 완충액에서 Fig. 1의 12% SDS- polyacrylamide 전기 영동의 결과에 제시된 바와 같이 비교적 순수한 urease 효소가 분리됨을 확인 하였다(lane 4). 그러나 정제된 효소는 column에서 분리된 직후, 다량의 중성 인산 완충액으로 즉시 투석하였음에도 불구하고 그 비활성 (specific activity)이 35.8 U/mg으로서 외견상 정제된 정도에 비하여 다소 감소된 것으로 나타나 높은 pH에의 노출이 효소 활성의 감소를 초래한 것으로 추정된다. 항원-항체 간의 상호작용을 이용하는 affinity chromatography에서는 그 해리 상수가 10<sup>-8</sup>~10<sup>-12</sup> M로 매우 높아서 통상적으로 꽤 혹독한 조건 하에서만 용출되는 예가 흔한 것으로 알려져 있다[10,14,20]. 한편 DEAE-Sepharose column으로 1차 정제한 시료를 urease 효소의 기질인 urea를 epoxy- activated Sepharose 6B에 coupling시킨 epoxy-urea affinity column에 적용하여 기질-효소 간의 친화력을 이용하여 효소를 정제하고자 하였다. Epoxy-activated Sepharose 6B는 Sepharose 6B resin에 1,4 bis-(2, 3-epoxypropoxy-) butane과 같은 비교적 긴 친수성 spacer arm을 함유하고 있으며, -OH, -SH 혹은 -NH<sub>2</sub> 기를 함유한 저 분자량의 리간드를 coupling할 수 있는 특성을 가지고 있다. 이 경우에는, 앞의 항체-affinity chromatography에서와는 대조적으로, 결합되었던 효소가 본래의 기질을 함유한 100 mM urea-HEB (pH 7.5) 완충액으로 용이하게 용출되었는데 비교적 높은 순도와 비활성 (87.9 U/mg)의 urease 효소를 얻을 수 있었다 (Table 1). 단지 이 경우에는 urease의 smaller subunit인 UreA peptide band의 강도가 다소 감소한 것이 관찰되었으나 그 이유는 분명치 않다 (Fig. 2, lane 4). 결론적으로, 본 연구에서는 특히 항체 및 기질을 이용한 affinity column chromatography를 이용하여 의약학적으로 중요한 *H.*

Table 1. Affinity purification of the recombinant *H. pylori* urease from *E. coli* BL21(pHU1013).

Purification steps	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)
Crude extract	5.7	1.0
DEAE-Sepharose	28.9	5.1
CNBr-Sepharose-Anti-urease-IgG *	35.8	6.3
Epoxy-Sepharose-Urea *	87.9	15.4

\*CNBr-Sepharose-anti-urease-IgG chromatography and epoxy-activated Sepharose-urea chromatography were performed independently, with the sample from DEAE-Sepharose pool. Refer to the 'Materials and Methods' section for details.

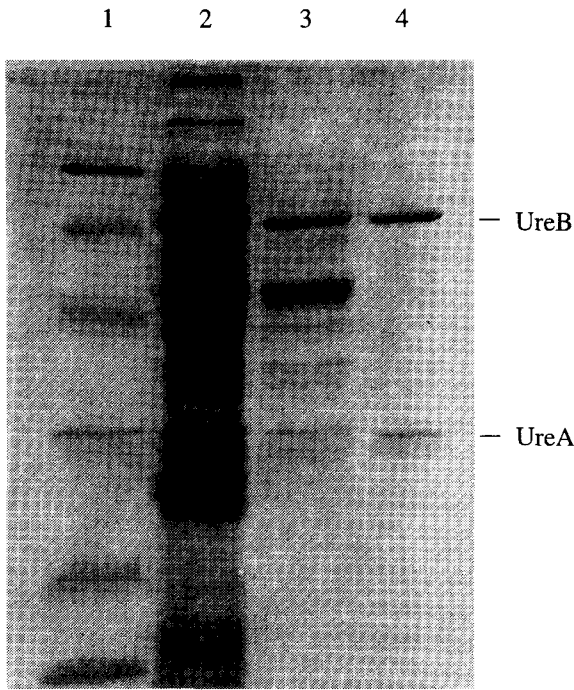


Fig. 2. 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the *H. pylori* urease purified by ligand-affinity chromatography. Cell extracts from *E. coli* BL21 (pHU1013) (lane 2), DEAE-Sepharose pool (lane 3), urea-Sepharose pool (lane 4) were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, respectively, followed by Coomassie blue staining. Molecular weight markers (lane 1) used were identical as in Fig. 1.

*pylori* urease를 간단한 방법으로 정제하는 방법을 모색하였는데 항체 affinity chromatography의 경우 효소의 천연 활성이 유지될 수 있도록 좀더 온화한 용출 방법의 모색이 필요한 것으로 나타났다.

### 요 약

위염, 위궤양 및 위암의 원인 균인 *Helicobacter pylori*가 균체 표면에 다량 함유하며 주된 생존 인자이며 병원성 인자인 urease를 대장균에서 발현시키고 이 효소에 대한 항체 또는 기질과의 특이 상호 작용을 이용하여 두 단계의 간편한 방법에 의하여 정제하였다. 우선 anti-*H. pylori* urease IgG-Sepharose column과 urea-Sepharose column을 각각 제조하고 DEAE-Sepharose 음이온 교환수지를 통하

여 1차 정제한 시료를 각각 적용하고 제반 조건에서 용출시켰다. Anti-*H. pylori* urease IgG-Sepharose column의 경우에는 urease 시료가 너무 강력하게 결합함으로써 극단적인 pH조건에서만 용출이 가능함이 관찰되었으므로, 100 mM 탄산 완충액(pH 10.5)으로 최종 용출하였을 때 비교적 순수한 효소를 얻었으나, 비활성이 다소 감소된 것으로 나타났다. 한편, urea-Sepharose에 적용시킨 시료는 100 mM urea-HEB 완충액(pH 7.5)으로 비교적 용이하게 용출되어 비교적 높은 순도와 비활성의 urease 효소를 얻을 수 있었으나 이 경우에는 urease의 smaller subunit인 UreA peptide band의 강도가 다소 감소한 것이 관찰되었다.

### 감사의 글

본 연구는 대구가톨릭대학교 일반 연구비 지원에 의한 것임을 밝히며 이에 감사 드립니다.

### 참 고 문 헌

1. Bayerdorffer, E., H. Dertel, N. Lehn, G. Kasper, G. A. Manners, T. Sauerbruch, and M. Stolte. 1989. Topographic association between active gastritis and *Campylobacter pylori* colonization. *J. Clin. Pathol.* **42**, 834-839.
2. Dunn, B. E., G. P. Campbell, G. I. Perez-Perez and M. J. Blaser. 1990. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* **265**, 9464-9469.
3. Eaton, K. A., C. L. Brooks, D. R. Morgan and S. Krakowka. 1991. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* **59**, 2470-2475.
4. Eaton, K. A. and S. Krakowka. 1994. Effects of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **62**, 3604-3607.
5. Ha, N. C., S. T. Oh, J. Y. Sung, K. A. Cha, M. H. Lee and B. H. Oh. 2001. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nature Struc. Biol.* **8**, 505-509.
6. Graham, G. Y. 1989. *Campylobacter pylori* and peptic ulcer disease. *Gastroenterol.* **96**, 615-625.
7. Hu, L. T. and H. L. T. Mobley. 1990. Purification and

- N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **58**, 992-998.
8. Hu, L. T. and H. L. T. Mobley. 1993. Expression of catalytically active recombinant *Helicobacter pylori* urease at wild-type levels in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **61**, 2563-2569.
  9. Jabri, E., M. B. Carr, R. P. Hausinger and P. A. Karplus. 1995. The crystal structure of urease from *K. aerogenes*. *Science*. **286**, 998-1004.
  10. Johnson, G. and J. S. Garvey. 1977. Improved methods for separation and purification by affinity chromatography. *J. Immunol. Method.* **15**, 29-37.
  11. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**, 680-685.
  12. Lim, Y. M., J. Y. Sung and M. H. Lee. 1998. Polyclonal antibody against the active recombinant *Helicobacter pylori* urease expressed in *Escherichia coli*. *J. Biochem. Mol. Biol.* **31**, 240-244.
  13. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. J. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
  14. Mendes, M. J., A. Karmali and P. Brown. 1988. One step affinity purification of urease from jack beans. *Biochimie* **70**, 1369-1371.
  15. Mobley, H. L. T. and R. P. Hausinger. 1989. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol. Rev.* **53**, 85-108.
  16. Mobley, H. L. T., M. D. Island and R. P. Hausinger. 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* **59**, 451-480.
  17. Parsonnet, J., G. D. Friedmann, D. P. Vandersteen, Y. Chang, J. H. Vogelman, N. Orentreich and R. K. Sibley. 1991. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1127-1131.
  18. Perez-Perez, G. I. and Blaser, M. J. (1987) Conservation and diversity of *Campylobacter pyloridis* major antigens. *Infect. Immun.* **55**, 1256-1263.
  19. Solnick, J. V. and D. B. Schauer. 2001. Emergence of Diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 59-97.
  20. Turbett, G. R., P. B. Hoj, R. Horne and B. J. Mee. 1992. Purification and characterization of urease enzyme of *Helicobacter* species from humans and animals. *Infect. Immun.* **60**, 5259-5266.

(Received October 25, 2002; Accepted February 18, 2003)