

대장균과 식물시스템에서 재조합 인간 prominiinsulin 생합성 분석

최유진 · 박수현 · 김지수 · 위수진 · 박기영

Biosynthesis of recombinant human prominiinsulin in *E. coli* and plant systems

Yu Jin Choi · Su Hyun Park · Ji Su Kim · Soo Jin Wi · Ky Young Park

Received: 7 September 2013 / Accepted: 13 September 2013
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Recently, the number of people with diabetes is rapidly increasing, coupled with the fact that the insulin market is remarkably increasing. Therefore, molecular farming for plant-derived pharmaceutical protein production is reported as becoming more attractive than ever. In this study, we carried out experiments step by step for development of recombinant insulin constructs, which were transformed into *E. coli* system, *in vitro* transcription and translation system, and tobacco cells. At first, recombinant proinsulin protein was successfully produced in *in vitro* transcription and translation system with wheat germ extract. After which, recombinant construct of prominiinsulin encoded a fusion protein of 7.8 kDa with trypsin cleavage sites at N terminus and C terminus of minimized C-peptide was tried to *in vitro* expression using *E. coli* culture. After purification with His-tag column, the resulting recombinant prominiinsulin protein was processed with trypsin, and then checked insulin biosynthesis by SDS-PAGE and western blot analysis with anti-insulin monoclonal antibody. The immunoreactive product of trypsin-treated miniinsulin was identical to the predicted insulin hexamer. The construct of 35S promoter-driven preprominiinsulin recombinant gene with signal peptide region for ER-targeting and red fluorescence protein gene [N terminus → tobacco E2 signal peptide → B-peptide (1-29 AA) → AAK → A-peptide (1-21 AA) → RR → His6 → KDEL → C terminus] was transformed into BY-2 tobacco cells. A polypeptide corresponding to the 38-kDa molecular

mass predicted for fusion protein was detected in total protein profiles from transgenic BY-2 cells by western analysis. Therefore, this recombinant preprominiinsulin construct can be used for generation of transgenic tobacco plants producing therapeutic recombinant insulin.

서론

인슐린은 척추동물의 이자(췌장)의 β세포 속의 소포체에서 생성되는 단백질로서 식후에 분비되어 혈액 속의 포도당의 양을 일정하게 유지시키는 대사 조절에 중요한 역할을 하는 호르몬이다. 인슐린은 1916년 당대사를 조절하는 물질로 처음 명명된 이후 1926년에는 단백질로는 최초로 결정체 형태로 분리되었으며, Sanger에 의하여 아미노산 서열이 처음 결정되었고, 이후 인류가 최초로 합성한 단백질이 되었다.

인슐린은 21개의 아미노산 잔기를 갖고 있는 A 펩타이드와 30개의 아미노산 잔기를 갖고 있는 B 펩타이드의 두 개의 펩타이드 사슬로 이루어져 있는 구형의 단백질이다. 인슐린 유전자는 preproinsulin이라는 1개의 사슬로 이루어진 전구체 단백질을 유도하는 유전자이다(Weiss 2013). 단백질 합성이 소포체에서 이루어지게 유도하는 24개의 아미노산 잔기로 구성되어 있는 시그널 펩타이드를 N 말단에 갖고 있어 인슐린 단백질을 소포체 내로 이동시킨 후 시그널 펩타이드가 잘려져 나감으로서 proinsulin을 형성하게 된다. 소포체의 내강 속으로 합성되어 들어간 proinsulin은 B-펩타이드의 C 말단과 A-펩타이드의 N 말단 사이에 31개의 아미노산 잔기로 이루어진 연결 도메인인 C-펩타이드를 갖고 있으며 접힘이 일어나기 전 상태이다. 소포체에서 proinsulin 단량체가 접힘이 완성되

Y. J. Choi · S. H. Park · J. S. Kim · S. J. Wi · K. Y. Park (✉)
순천대학교 생명산업과학대학 생물학과
(Department of Biology, Suncheon National University, Suncheon,
Chonnam 540-742, Korea)
e-mail: plpm@suncheon.ac.kr

는 과정에서 A6-A11, At-B7, A20-B19의 아미노산 잔기에 있는 3쌍의 시스테인 사이에서 이황화다리가 형성되어 생리적 활성을 갖는 형태로 전환되며, 이후 소포체의 내강 속에서 이량체를 형성하게 된다(Liu et al. 2010).

이후 proinsulin이 골지체로 이동한 다음 미성숙한 분비과립을 형성하는 과정에서 proinsulin이 아연과 결합하여 저장형태의 인슐린으로서 hexamer를 이루게 된다(Qiao et al. 2003; Dunn 2005). 아연과 칼슘의 농도가 높은 골지체 유래의 분비/저장 소포에서 아연과 칼슘 결합 인슐린 구조($(Zn^{2+})_2(Ca^{2+})(Proinsulin)_6$)가 단백질 분해성 절단효소의 작용에 의해 C 펩타이드가 절단되면서 활성형의 인슐린 hexamer인 ($(Zn^{2+})_2(Ca^{2+})(insulin)_6$) 구조로 전환된다(Dunn 2005). ($(Zn^{2+})_2(Ca^{2+})(insulin)_6$)는 용해도가 낮아져 소포 내에서 저장형태로서 인슐린 결정체를 이루게 된다. C-펩타이드는 양 말단에는 알기닌-알기닌, 리신-알기닌의 염기성 아미노산의 쌍이 존재하는데 이들 아미노산이 C-펩타이드의 절단에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 따라서 C 펩타이드는 proinsulin의 접힘 과정이 용이하게 일어나도록 용해도를 높은 상태로 유지시켜 주는 기능을 하는 것으로 여겨진다. 생물체 내에 C-펩타이드의 수용체가 세포막에 존재하며, G-단백질연관수용체를 경유하여 인슐린 신호 전달을 증강시킨다는 생리적 기능이 보고되기는 하였지만 생리적 활성은 거의 나타내지 않는 부위로 여겨진다(Wahren and Jörnval 2003).

인슐린의 C-펩타이드 등의 기능이 proinsulin의 용해도를 유지하면서 이황화다리의 생성을 용이하게 하는 역할이 중요한 기능인 것으로 고려할 때 특히 인슐린의 구조와 안정성 및 수용체 결합 활성을 위해서는 이황화다리의 유지가 필요하다(Weiss 2013). 최근에는 소포체에서 일어나는 misfolding에 의해 야기되는 소아당뇨가 보고되고 있다(Kim and Park 2008). 또한 인슐린 유전자의 염기서열에 돌연변이가 생겨 7번째 아미노산인 시스테인이 티로신으로 치환되어 이황화다리가 형성되지 못하면 C-펩타이드가 분리되지 않아 활성형 인슐린으로 전환되지 못한다(Liu et al. 2010).

인슐린은 근육으로의 포도당 흡수를 촉진하여 글리코겐 합성을 촉진하고 간에서의 포도당 생성을 억제하여 혈당량을 낮추주고, 섭취한 포도당을 지방으로 저장하며, 간과 지방조직에서 지방산 분해를 억제하며, 단백질 분해를 억제시키는 등 탄수화물과 지방 및 단백질의 대사에 관여한다. 체내에서 인슐린이 부족해지면 근육이나 간의 세포에서 포도당의 흡수가 감소하고 혈당이 상승함으로써 당뇨병이 발생한다.

당뇨병을 치료하기 위한 치료용 인슐린을 생산한 것은 소나 돼지의 췌장에서 분리한 것이 처음이다. 이후 미국의 Eli Lilly사가 1982년 대장균을 이용하여 유전자재조합 방식으로 인간 인슐린 Humulin을 생산하였는데 proinsulin

을 발현시켜 실험실 조건에서 이황화다리를 생성시켜 접힘을 완성한 다음 C-펩타이드를 잘라내었다(Cowley and Mackin 1997). 1988년 덴마크의 제약회사인 Novo Nordisk사가 C-펩타이드 없이 B-펩타이드와 A-펩타이드로 이루어진 miniproinsulin을 효모에서 발현시켜 실험실 조건에서 트립신을 처리하여 인슐린을 생산하였는데 이 과정에서 이황화다리가 형성되는 장점을 나타내었다. 식물에서 유전자재조합 인슐린을 생산하기 위한 연구는 캐나다의 SemBioSys Genetics Incorporated가 홍화씨에서 인간 인슐린을 생산하는데 성공하여 현재 임상 실험을 수행 중에 있다.

최근 식생활의 변화로 당뇨병 환자의 수가 급격하게 증가하여 WHO의 발표에 의하면 향후 20-30년 내에 당뇨병 환자가 현재의 거의 2배 달할 것으로 예측하고 있으며, 세계 인슐린 시장은 연간 5% 이상 증가할 전망이라고 한다. 따라서 식물에서의 유전자재조합 인슐린 생산 기술 개발은 상업적 가치가 매우 클 것으로 예상되므로 이 논문에서는 우선적으로 식물에서 유전자재조합 인슐린의 생성 가능성을 확인하는 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

Total RNA 분리

담배(*Nicotiana tabacum* L. cv Wisconsin 38) 식물체의 잎조직 0.1g에 액체질소로 넣어 얼린 후 막자사발로 완전히 간 다음 3 ml RNA extraction buffer (4M guanidinium thiocyanate, 25 mM sodium citrate, 0.5% sarkosinate, 0.1 M β -mercaptoethanol)를 넣어 30초간 섞은 후 2M sodium acetate (pH 4.0) 0.3 ml을 첨가하여 다시 섞는다. 이후 페놀 3 ml을 첨가하여 섞은 후 chloroform:isoamylalcohol (24:1, v/v) 0.5 ml을 넣은 후 3,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액을 회수한 다음 동량의 cold ethanol을 넣어 -20°C 에서 24시간 방치한 후 10,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 얻은 침전물을 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 1 ml에 녹인다. 이후 10 M LiCl을 첨가한 후 15,000 rpm에서 다시 원심분리하여 얻은 침전물을 DEPC에 녹여 사용하였다.

RT-PCR 수행

인간 인슐린 유전자를 분리하기 위하여 Human Pancreas QUICK-Clone cDNA library (Clontech)를 구입하여 주형으로 이용하여 RT-PCR을 수행하였으며, 담배 식물체의 ER-targeting signal peptide는 담배 식물체에서 분리한 total RNA 1 μg 을 reverse transcriptase (High Fidelity RNA PCR Kit, Takara Bio Inc.)를 사용하여 first strand cDNA를 합성한 후 이 cDNA

를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. 각각의 유전자 특이적인 primer를 주문제조한 후 PCR 반응은 94°C에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후, 94°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 과정을 20 cycles로 하였으며 1% (w/v) agarose gel 상에서 증폭된 밴드를 확인하였다.

Large-scale 플라스미드 분리

CsCl-EtBr density gradient를 이용한 방법을 사용하였다 (Sambrook et al. 2001). DNA construct를 함유한 균주를 항생제(ampicillin)가 들어 있는 LB 고체배지에 도말하여 37°C에서 배양하여 단일 균주를 선발한 후 항생제가 들어 있는 LB 액체배지에 접종한 후 37°C에서 16시간 이상 진탕 배양하였다. 이를 원심분리하여 균주 세포를 수거한 후 lysozyme을 함유한 용액을 첨가하여 균주세포를 용해시킨 다음 CsCl과 EtBr를 첨가하여 고속원심분리(50,000 rpm, 16시간)시킨 후 DNA 플라스미드를 분리한 후 EtBr을 제거하였다. 이후 에탄올 침전 방법을 사용하여 깨끗한 DNA 플라스미드를 회수하였다.

In vitro transcription/translation (TNT) 반응

Promega의 transcription과 translation coupled (TNT[®]) wheat germ extract system을 사용하여 반응을 수행하였다. T3 RNA polymerase와 wheat germ extract를 사용하여 30°C에서 in vitro transcription/translation시켰으며 이 때 주형 DNA로 플라스미드 DNA 1µg을 사용하였고 반응 후 생성되는 단백질은 ³⁵[S]-methionine (1000Ci/mmol)을 사용하여 radio-labelling 시켰다. 이 후 SDS-PAGE sample loading buffer와 섞어 곧바로 100°C에서 10분간 가열하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 이 SDS-PAGE gel을 Coomassie Brilliant Blue R-250에 염색하여 5% methanol과 7.5% acetic acid 용액에서 탈색시켰다. 그리고 Amplify (Amersham) 용액에 30분간 담가 두었다가 gel을 말린 후 -70°C에서 X-ray film에 감광시켰다.

E.coli에서 재조합 인슐린 유전자의 단백질 발현 분석

인슐린 유전자의 단백질 발현을 확인하기 위하여 박테리아 발현 벡터인 pET-3a(+)[®]의 NdeI과 BamHI 사이에 mini-proinsulin (B-chain+AAK+A-chain+RR+His6)을 삽입하여 재조합시킨 후 E.coli BL21(ED3) 균주에 형질전환 하였다. 37°C에서 OD₆₀₀에서 0.5~0.6 값이 될 때까지 배양하였으며 0.4 mM IPTG를 첨가하여 3~4시간 더 배양하여 인슐린 단백질이 과발현 되도록 유도하였다. 이후 배양액을 4°C, 15,000 rpm에서 2분간 harvest하여 얻은 pellet을 멸균수에 녹여 10% 혹은 12% SDS-PAGE를 통해 단백질 발현

정도를 확인하였다.

SDS-PAGE에 의한 단백질 분석

단백질 발현 양상을 관찰하기 위해 단백질을 추출한 후 SDS-PAGE로 확인하였다. 단백질 추출을 위해 마쇄한 시료 0.2g에 600µl의 extraction buffer (25 mM Tris, pH7.8, 75 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 15 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM NaF, 0.5 mM NaVO₃, 15 mM β-glycerophosphate, 15 mM p-nitrophenylphosphate, 0.1% Tween 20, 0.5 mM PMSF, Protease inhibitor cocktail)를 이용하여 추출하였으며(Cardinale et al. 2002), 4°C, 15,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상등액만을 취하였다. SDS-PAGE는 Bio-Rad사의 proteinIII를 사용하였으며 전기영동시 10% 혹은 12%의 separating gel과 5%의 stacking gel을 사용하여 1시간 30분간 실시하였다. 염색은 staining solution (0.5% coomassie blue R-250, 40% methanol, 10% acetic acid)에서 3시간 염색 후 destaining solution (40% methanol, 10% acetic acid)에서 탈색하여 밴드의 양상을 분석하였다.

Western blot 분석

인슐린 유전자가 도입된 형질전환 담배 배양세포를 4일 동안 배양하여 western blot 분석을 위한 재료로 사용하였다. 약 0.2g을 채취하여 600µl의 extraction buffer (25 mM Tris, pH7.8, 75 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 15 mM EGTA, 1mM DTT, 1mM NaF, 0.5 mM NaVO₃, 15 mM β-glycerophosphate, 15 mM p-nitrophenylphosphate, 0.1% Tween 20, 0.5 mM PMSF, Protease inhibitor cocktail)를 이용하여 추출하였으며 (Cardinale et al. 2002), 약 30 µg의 총 단백질을 10% SDS-PAGE에 전기영동한 후 Trans-Blot Cell (Bio-Rad)을 이용하여 nitrocellulose membrane에 transfer 하였다. 이후 nitrocellulose membrane을 5% skim milk로 4°C에서 2시간 동안 blocking하고 0.1% Tween 20이 첨가된 TBS buffer로 5분간 6회 세척한 후 Anti-insulin monoclonal antibody E2E3 (ab9569; Abcam)를 1:250으로 희석하여 1시간 동안 실온에서 반응한 후 0.1% Tween 20이 첨가된 TBS buffer로 세척한 후 peroxidase-labeled secondary antibody (sc-2005; SANTA CRUZ)를 1:1000으로 희석하여 실온에서 1시간 반응한 후 다시 세척하였다. 이후 nitrocellulose membrane을 West-ZOL[®] (plus) Western Blot Detection System을 이용하여 X-ray 필름에 exposure 한 후 검출된 인슐린 단백질을 확인하였다.

BY-2 세포 형질전환

BY-2 세포를 MS [4.3 g MS salt, 3% sucrose, 0.37 g KH₂PO₄, 0.1 g myo-inositol, 1 ml thiamine HCl (1 mg/ml), 181 µl 2,4-D

(5 mM), pH5.7, 1 L 제조시] 액체 배지에서 4일 동안 현탁 배양시킨 야생형 BY-2 cell의 5 ml과 인슐린 유전자가 도입된 *Agrobacterium* 배양액(OD₆₀₀=1.5) 100 µl을 petri-dish에서 섞은 후 25°C에서 2일 동안 공동 배양하였다. 이후 MS 액체배지를 이용하여 *Agrobacterium*을 제거하고 100 mg/L kanamycin과 300 mg/L cefotaxim이 첨가된 BY-2 세포를 MS 고체 배지에 살포한 후 2~3주 동안 25°C에서 암 배양하였다. 배양 후 캘러스화 된 세포를 선별한 후 100 mg/L kanamycin이 첨가된 배지로 옮겨 2주 간격으로 계대배양하면서 왕성하게 자라는 캘러스를 선별하였다. 이후 선별된 캘러스를 BY-2 세포의 MS 액체 배지에서 지속적으로 현탁 배양 하였다.

결과 및 고찰

인간 preproinsulin 유전자(GenBank X70508) 분리 및 무세포 식물 전사번역시스템에서의 단백질 발현 확인

인간 preproinsulin 유전자를 분리하기 위하여 NCBI GenBank X70508의 염기서열을 바탕으로 *Bam*HI 제한효소 site를 포함한 forward 방향 primer와 *Sac*I 제한효소 site를 포함한 reverse 방향 primer를 주문 제조하였다(Fig. 1A). 제조된 각각의 primer를 이용하여 Human Pancreas QUICK-Clone cDNA library (Clontech, Mountain View, CA, USA)를 구입하여 주형으로 사용하여 PCR 분석을 수행하여 1% agarose gel 전기영동을 실시하였다. 이 결과 예상된 DNA 크기의 345 bp의 PCR 산물을 확인하고 최종적으로 염기서열분석을 의뢰하여 인간 preproinsulin 유전자를 획득하였다.

획득된 인간 preproinsulin 유전자는 *Bam*HI과 *Sac*I 제한효소 site를 포함하고 있으므로 transit peptide를 결합한 *in vivo* 발현용 construct 제조가 용이하도록 T&A cloning vector (RBC Bioscience)에 먼저 ligation 하였다. 그 결과 2,728 bp의 vector 단편과 345 bp의 insert (human preproinsulin) 단편을 획득하여 construct의 재조합 유무를 확인하였으며 최종적으로 염기서열분석을 통하여 확인하였다. 이후 이 인간 preproinsulin 유전자를 이용하여 식물 유래의 인간 인슐린을 생산할 수 있는 발현시스템을 탐색하기 위하여 우선 식물 시스템을 이용하여 *in vitro* 발현용 재조합된 preproinsulin construct 제조를 완성하였다(Fig. 1B).

in vitro TNT 시스템 분석용 preproinsulin 재조합 construct를 이용하여 *in vitro* 상에서 단백질 합성 여부를 조사하였다. 해당 construct는 full-length의 preproinsulin 유전자가 *Xba*I과 *Bam*HI 제한효소 site에 삽입되어 T3 promoter의 조절을 받는 것으로 식물체 단백질 발현 시스템인 wheat germ extract와 동위원소(³⁵S)를 사용하여 30°C에서 90분 동안 *in vitro* TNT 분석을 수행하였다. 반응이 끝난 산물들은

바로 12.5% SDS-PAGE 분석을 실시하였으며, BAS image analyzer를 이용하여 분자량이 약 12kDa인 preproinsulin 단백질을 확인하였다(Fig. 1C). 물론 아직 preproinsulin 단백질 상태이므로 insulin의 생리적 활성을 측정할 수는 없지만 인간의 preproinsulin 단백질이 식물체의 전사 및 해독을 통한 단백질 발현 시스템에서 단백질 합성이 성공적으로 이루어지는 것을 확인 할 수 있었다.

A

Primer name	Sequence	Tm(°C)	Base length
Forward	<i>Xba</i> I 5'-GGGTCAGAAATGGCCTGTGGATGCGCCT-3'	69.7	29
Reverse	<i>Bam</i> HI 5'-GGGGGATCCCTAGTTCAGTATTCTCCA-3'	66.8	29

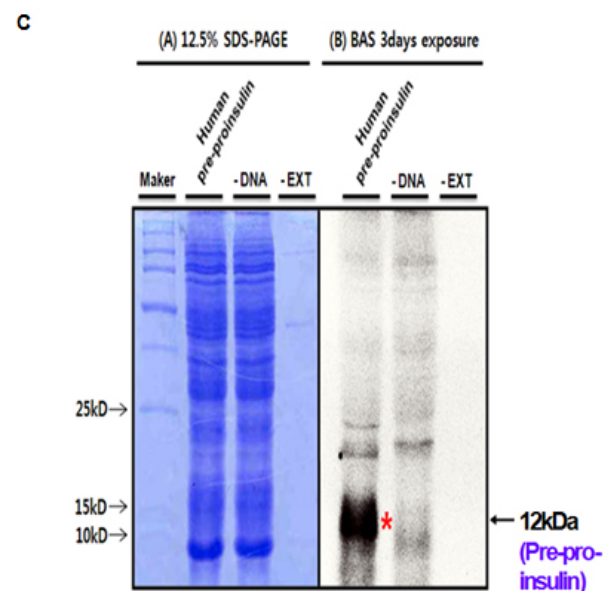
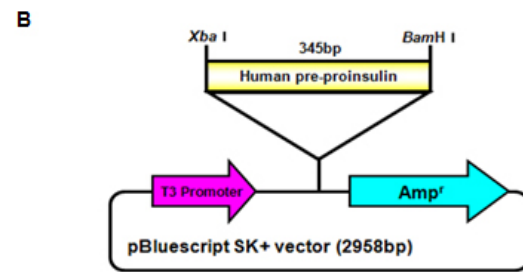


Fig. 1 Diagram representing the construction of the human preproinsulin expression plasmid and the analysis of its resulting protein. A. The PCR primers of human preproinsulin. B. The PCR amplified human preproinsulin cDNA containing *Xba*I and *Bam*HI restriction sites and pBluescript SK+ vector. C. Human preproinsulin was expressed in wheat germ extract for *in vitro* transcription/translation. The S³⁵-labeled preproinsulin protein was extracted from *in vitro* transcription/translation reaction mixture and then was purified samples in SDS-PAGE after staining with coomassieblue (left), and was exposed to X-rayfilm (right)

대장균 배양용 인간 prominiinsulin 재조합단백질의 construct 제조

Preproinsulin이 식물의 발현 시스템에서 단백질로 발현된다는 것을 확인하였으므로 실제 식물에서 인간 인슐린 재조합 단백질을 발현시키기 위하여 인슐린 재조합 construct를 제조하였다. 인슐린은 [N 말단 → 소포체 targeting 시그널 펩타이드 → B-펩타이드 → 단백질 분해성 절단효소 부위 → C-펩타이드 → 단백질 분해성 절단효소 부위 → A-펩타이드 → C 말단]의 순서로 이루어져 있다. 특히 C-펩타이드는 최근 연구 결과에 의하면 인슐린 합성 과정에서 파생되어 분비된 후 면역 반응이나 혹은 당뇨병 진전에 영향을 주는 요인으로 알려지면서 주목을 받기는 하지만 C-펩타이드는 인슐린 단백질의 구성 성분이 아니므로 C-펩타이드가 인슐린 단백질이 활성을 갖는데 참여하는 부위는 아니다(Pietro Paolo 2013). 따라서 인슐린 재조합 단백질 construct에서 C-펩타이드 부위를 최소화시킨 miniinsulin을 제조하기로 하였다. 특히 C-펩타이드 부위가 제거된 miniinsulin이 발현되어 인슐린으로서 활성을 갖는 것으로 보고된 내용을 참조하였다(Nykiforuk 2006; 공개특허 WO 10-2006-0052705).

인슐린 단백질이 활성을 갖기 위해서는 B-펩타이드와 A-펩타이드가 절단된 후 이황화다리가 형성되어야 하는데 A-펩타이드와 B-펩타이드는 적절한 분해효소에 의해

적절하게 단백질 분해가 이루어지면 이황화다리가 형성된다는 보고가 있어(Liu et al. 2010) A-펩타이드와 B-펩타이드 사이에 최소화된 C-펩타이드를 연결하면서 그 사이에 trypsin cleavage site로서 Ala-Ala-Lys (AAK) 사이트를 추가하였다. 기존의 보고에 의하면 트립신에 의하여 단백질이 가수분해되기 위해서는 가수분해가 일어나는 절단부위의 C 말단에 알기닌과 라이신이 존재해야 한다는 보고가 있다(Olsen et al. 2004).

따라서 B-펩타이드 C 말단에서 트립신에 의하여 절단이 이루어지도록 B-펩타이드의 Lys29 잔기 뒷부분과 A-펩타이드의 N 말단 부분의 Gly1 사이에 AAK (GCTGCTAAG)의 염기서열을 첨가하였다. 또한 인간 재조합 인슐린 단백질의 정제를 용이하도록 만들기 위하여 His6-tag의 염기서열(CATCATCATCATCATCAT)을 첨가하였다. 또한 A 사슬과 His6-tag 사이에 Arg(R), Arg(R) dibasic processing site (AGAAGA)를 첨가함으로써 트립신 처리로 한번에 C-펩타이드와 KDEL 서열에 연결된 His6-tag까지 잘라내어 간단하게 인슐린 단백질을 정제할 수 있도록 하였다.

이렇게 제조한 인간 prominiinsulin이 대장균에서 발현될 수 있는 codon usage를 이용하여 발현 수준을 분석해주는 값인 Codon Adaptation Index (CAI) 값을 분석사이트 (GenScript Rare Codon Analysis Tool, CAI calculator)를 이용하여 분석하였다(Puigbò et al. 2008) (Fig. 2A). 보정된 CAI 값을 보면 일반적으로 0.8 이상이면 발현 수율이 높은 것으

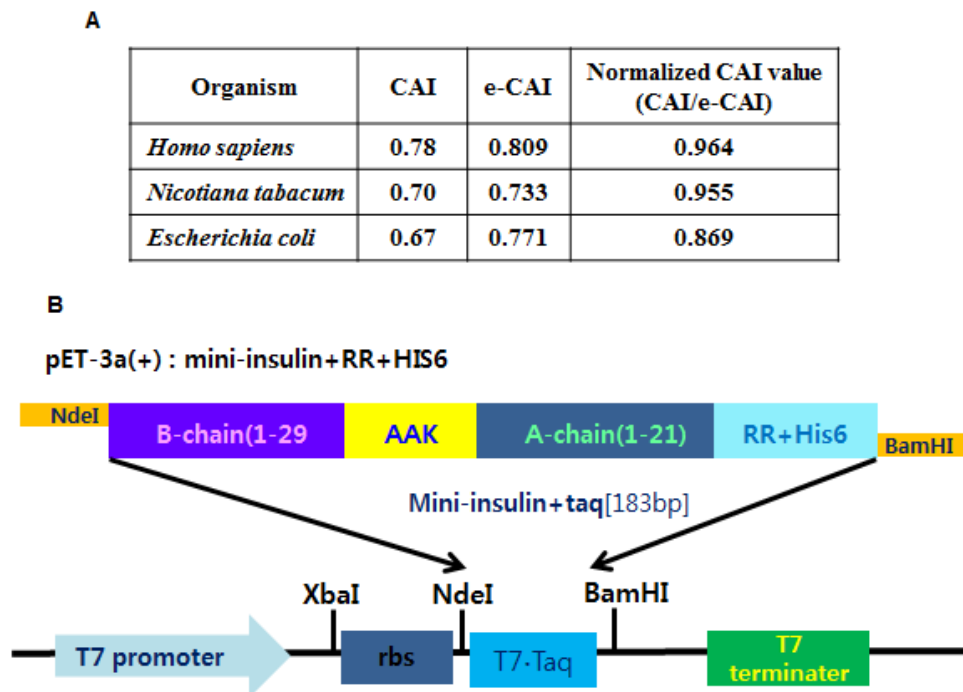


Fig. 2 Analysis of Codon Adaptation Index (CAI) of human prominiinsulin in several organisms and construct diagram. A. CAI of human prominiinsulin gene sequence in *Homo sapiens*, *N. tabacum* and *E. coli* was analyzed by GenScript Rare Codon Analysis Tool, CAI calculator. B. Diagram representing the construction of the human prominiinsulin expression plasmid [N terminus: T7 promoter → B-peptide (1-29 AA) → AAK → A-peptide (1-21 AA) → RR → His6 → C terminus]

로 나타내는데 본 연구에서 재조합한 인간 prominiinsulin은 대장균, 담배 식물체 모두에서 높은 CAI 값을 갖는 것으로 나타났으므로 재조합된 인간 prominiinsulin의 염기서열은 대장균과 담배 식물체에서 발현이 용이한 것으로 분석되었다.

따라서 이렇게 제조된 prominiinsulin 유전자의 construct를 pET-3a(+) 발현 벡터의 T7 프로모터 뒤의 제한효소 부위를 이용하여 결합시켜 대장균 발현용 인간 prominiinsulin 재조합 플라스미드를 제조하였다(Fig. 2B).

인간 prominiinsulin 재조합단백질을 함유하는 형질전환 *E. coli* 배양 및 miniinsulin 발현 확인

앞의 과정을 거쳐 제조된 재조합 *pET::prominiinsulin*이 들어간 재조합 유전자 플라스미드를 도입하기 위하여 *E. coli* BL21에 형질전환 후 LB 배지에서 ampicillin과 0.4 mM IPTG를 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 대장균 세포를 배양한 후 대장균 lysate로부터 인간 재조합 miniinsulin 단백질을 분리한 후 His tag 컬럼을 통과하여 재조합 His-tagged prominiinsulin 단백질을 분리한 후 SDS-PAGE 분석을 수행하였다. 그 결과 7.8 kDa 크기의 prominiinsulin을 얻은 것으로 보아 full-length의 prominiinsulin 단백질이 성공적으로 합성된 것으로 여겨진다(Fig. 3A, lane 1).

이렇게 생성된 prominiinsulin에 존재하는 trypsin 절단부위가 정확하게 절단되어 A-펩타이드와 B-펩타이드로 나뉘어 인슐린의 활성을 갖게 되는가를 조사하기 위하여 트립신의 농도를 높여가면서 단백질 패턴을 알아보기 위한 10% SDS-PAGE를 수행하였다. 이 결과에서 보면 lane 1

에서 보여지는 His-tag 컬럼에 의해 분리된 재조합 miniinsulin 단백질이 7.8 kDa 부위에서 관찰되었지만 트립신의 농도를 높여갈수록 7.8 kDa의 밴드의 양은 감소하면서 약 25 kDa의 부위의 밴드의 양은 증가하였다. 또한 2.4 kDa 크기에 달하는 A-펩타이드와 3.3 kDa 크기의 B-펩타이드의 밴드의 양도 증가하였다. 이는 이 연구에서 설계되어 재조합된 인간 prominiinsulin이 적절하게 트립신에 잘려서 인슐린 단백질로 전환됨을 확인할 수 있었다. 그러나 A-펩타이드와 B-펩타이드가 이황화다리로 연결되어 3차 구조를 형성하여 monomer가 된다면 약 6 kDa의 밴드가 증가하여야 함에도 불구하고 이보다 훨씬 큰 크기로서 약 25 kDa 밴드가 증가하였다.

이를 좀 더 확인하기 위하여 인간 인슐린에 대한 monoclonal antibody (ab9569; Abcam, Cambridge, MA, USA)를 활용하여 western 분석을 수행하였다. 특히 이 연구에서 사용한 인간 항인슐린 항체는 proinsulin은 인지하지 않는 것이 특징이다. 이 결과에서 보면 lane 1의 7.8 kDa의 6His-tag prominiinsulin은 이 항체에 의해 인지되지 않았다(Fig. 3B, lane 1). 그러나 이 6His-tag prominiinsulin에 트립신의 농도를 높여가면서 첨가할 때 항체가 인지한 약 25 kDa 크기의 단백질은 그 양이 점차 증가하였다. 따라서 이 25 kDa의 밴드는 A-펩타이드와 B-펩타이드로 절단된 후 이황화다리가 형성되어 monomer로 완성된 후 저장형태의 인슐린이 되기 위하여 hexamer로 조립되는데 바로 이렇게 형성된 hexamer 인 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서 설계되어 *in vitro* 시스템에서 발현된 재조합된 proinsulin이 된 다음 트립신에 의해 효과적으로 절단되어 인슐린으로 전환되었음을 확인할 수 있었다.

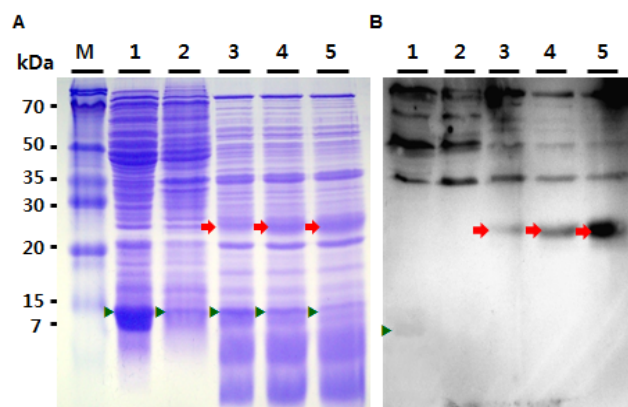


Fig. 3 Expression of human prominiinsulin protein in SDS-PAGE and western analysis. A. After expression of recombinant human prominiinsulin construct in *E. coli* culture, His-tagged prominiinsulin proteins were analyzed in SDS-PAGE. Trypsin-treated proteins were stained with coomassie blue. B. His-tagged prominiinsulin was reacted with anti-insulin monoclonal antibody E2E3 (ab9569, Abcam) in western blot analysis. The molecular weight markers (M) are showed in left side. Red arrows denote the insulin hexamer and green triangles denote prominiinsulin

인슐린 생산용 형질전환담배 식물체 발현용 재조합 construct 제조

실제 효과적으로 식물에서 인슐린을 생산하도록 분자농업에 활용하기 위해서는 식물에서 안정적으로 재조합 인슐린이 생산되어야하므로 옥수수(Farinas et al. 2005), 애기장대의 종자(Nykiforuk et al. 2006) 등 여러 식물에서 인슐린 단백질의 형질전환이 시도되었다. 따라서 식물 세포에서 인슐린 유전자 발현을 유도하기 위해서는 원래 인간의 인슐린 단백질은 소포체로 표적시키는 시그널 펩타이드를 갖고 있는 특성을 그대로 반영하여야 하므로 식물 세포에서 작동하는 시그널 펩타이드를 탐색하였다. 기존에 보고된 연구결과 및 특허의 정보들을 탐색할 결과 pathogenesis-related (PR) protein인 PR-5 thaumatin-like 단백질의 N 말단에 존재하는 시그널 펩타이드가 존재한다는 보고가 있으며(Cornelissen et al. 1986; van Loon et al. 1987), 이를 활용하여 식물체에서 외래 도입 유전자를 발현시켰을 때 효율적으로 재조합 단백질이 발현된다는 보

고가 있었다(Hu and Reddy 1997; Zamani et al. 2004). 특히 담배(*Nicotiana tabacum* L. cv Samsun NN)에서 분리된 PR 유전자인 PR-S 유전자는 쉐바이오시스 제네텍스사에서 인간 재조합 인슐린을 발현시키기 위하여 이 유전자의 시그널 펩타이드 정보를 사용하였는데 이는 담배의 thaumatin-like 유전자인 E2 유전자(X15223)와 95%의 상동성을 갖고 있었다(van Kan et al. 1989). 따라서 preprominiinsulin의 시그널 펩타이드로는 PR-5 thaumatin-like 단백질의 N 말단 부위의 25개 아미노산 서열 부위(MNFLKSFPFYAFLCFGQY-FVAVTHA)를 RT-PCR로 증폭시켜 시그널 펩타이드로 사용하였다. 또한 생성된 단백질을 소포체 내에 높은 효율로 축적하여 인슐린 단백질을 합성할 수 있도록 최대화하기 위하여 ER retention signal인 KDEL 서열을 추가하였으며, 그 사이에 트립신의 절단부위인 RR의 아미노산 잔기를 추가하였다.

식물에서 고효율로 발현되는 의약품 단백질을 생산하기 위한 식물세포용 프로모터로는 독일 프라운호퍼 연구

소 소장인 R. Fisher 박사와의 논의를 거쳐 35S 프로모터의 발현효율을 더 향상시킨 변형 35S 프로모터를 갖고 있는 식물발현용 pTRakt vector를 분양 받아 사용하였다. 이 벡터를 이용하여 앞에서 설계된 재조합 preprominiinsulin의 construct를 ligation하여 식물세포 발현용 construct를 제조하였다(Fig. 4A). 이의 유전자 구성은 [N 말단 → tobacco E2 시그널 펩타이드 → B-펩타이드(1-29 AA) → AAK → A-펩타이드(1-21 AA) → RR → His6 → KDEL → C 말단]으로 이루어져 있다(Fig. 4B).

인간 preprominiinsulin이 도입된 형질전환 담배세포 제조 및 재조합 인슐린 유전자 발현 분석

재조합 preprominiinsulin 단백질 발현을 위한 형질전환 담배식물체를 제조하기 위하여 앞에서 제조된 재조합 construct를 담배현택배양세포인 BY-2 세포에 도입시켜 형질전환하였다. 우선 식물체에서 발현을 쉽게 확인하기 위하여

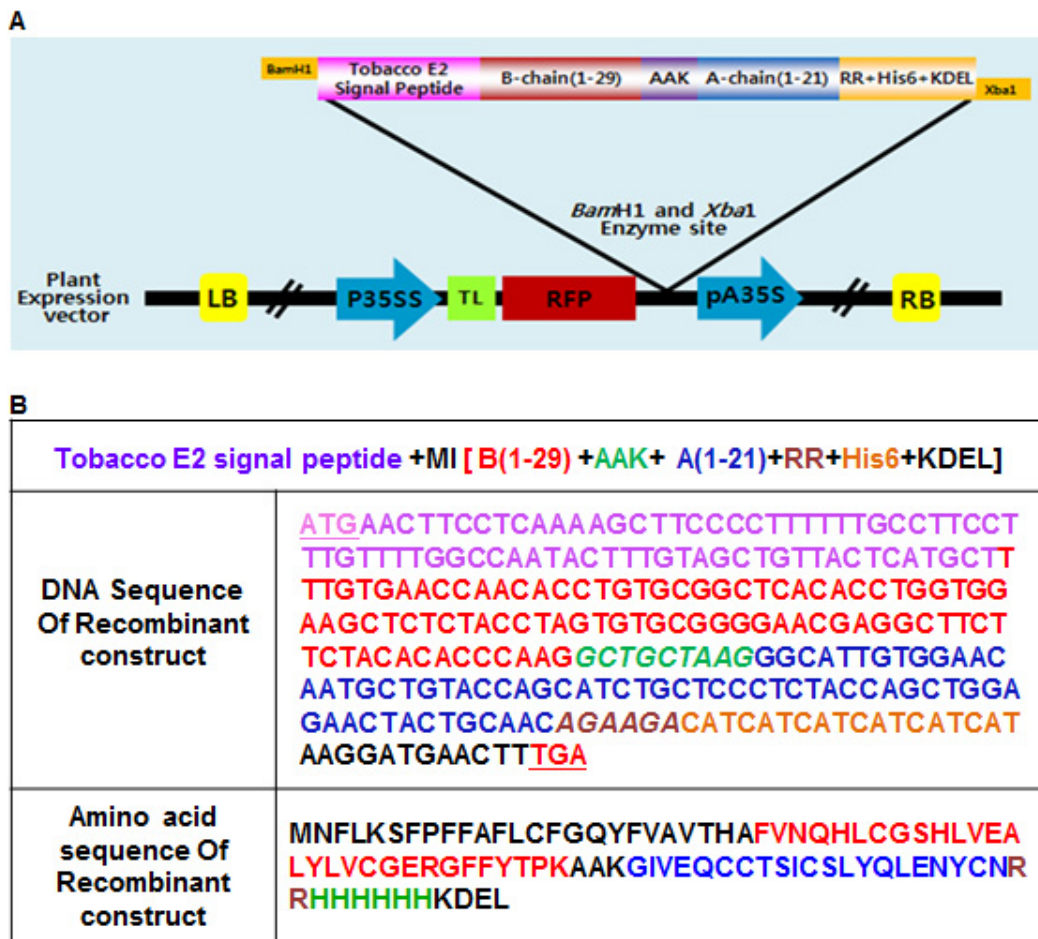


Fig. 4 Diagram and sequence representing the construction of the human preprominiinsulin expression plasmid. A. The PCR amplified human preprominiinsulin cDNA driven by 35S promoter, which was fused to C-terminus of RFP was ligated with plant expression pTRakt vector. The diagram of human preprominiinsulin recombinant gene was showed as [N terminus → tobacco E2 signal peptide → B-peptide (1-29 AA) → AAK → A-peptide (1-21 AA) → RR → His6 → KDEL → C terminus]. B. The sequences of nucleotides and amino acids of recombinant preprominiinsulin

리포터 유전자인 red fluorescence protein (RFP)에 결합된 재조합 preprominiinsulin 상태의 construct를 도입시켜 형질 전환식물체를 제조하였다. BY-2 세포에 재조합 플라스미드 DNA를 함유하고 있는 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101을 감염시켜 kanamycin이 함유된 고체 배지에서 배양하면서 형질전환 담배세포를 선별하였다. 이러한 선별 과정을 거쳐서 선별된 다수의 형질전환 BY-2 세포로부터 재조합 단백질을 분리하여 10% SDS-PAGE에서 분리한 후 N 말단 부분에 RFP 단백질이 연결되어 있으므로 트립신을 처리하지 않은 상태에서 인간 항인슐린 항체를 이용하여 western 분석을 수행하여 보았다.

그 결과에서 보면 인슐린 항체가 인지한 단백질의 크기는 약 40 kDa 부근에서 나타났는데 이는 RFP 단백질의 크기가 27 kDa이며 preprominiinsulin의 크기가 10.7 kDa 이므로 RFP와 preprominiinsulin이 연결되어 발현된 총 37 kDa 크기의 재조합 단백질이 성공적으로 발현된 것으로 확인되었다. 실제로 이 연구에서 사용한 인간 항인슐린 monoclonal 항체는 processing이 적절하게 되어 활성을 갖는 인슐린만을 인지하는 항체인 것으로 보고되었지만 트립신을 처리하지 않았음에도 불구하고 RFP::preprominiinsulin을 인지하였는데 이는 RFP가 결합하여 preprominiinsulin의 3차구조에 영향을 주어 항체에 의해 인지된 것으로 여겨진다.

그러나, BY-2 세포에서의 재조합 인슐린 유전자를 도입시켜 발현시킨 목적은 담배 식물체에서 재조합 인슐린이 발현되는가를 확인해보기 위한 것이었으므로 재조합 인슐린 DNA가 제대로 발현됨을 확인한 것은 다음 단계

로 진행할 수 있는 토대가 될 수 있어 의미가 있는 연구라고 판단된다.

이상의 연구 결과에서 prominiinsulin이 식물체에서 발현되고, 또한 트립신에 의해 A-펩타이드와 B-펩타이드로 절단되며, 이후 효과적으로 접힘이 일어나며, 이어서 인슐린의 저장형태인 hexamer로까지 조립됨을 확인하게 되었다. 이는 본 논문에서 설계된 preprominiinsulin이 식물 세포에서 발현되어 인슐린으로서 활성을 갖는 형태로 접힘과 조립이 가능한 것으로 판단되었기 때문에 향후 식물을 이용한 분자농업용 인슐린 생산용 재조합 유전자로 활용할 수 있을 것으로 여겨진다. 이러한 성공적인 연구 결과를 토대로 향후 이 construct는 RFP 단백질을 제거하고 35S 프로모터에 직접 유도되는 [N 말단 → tobacco E2 시그널 펩타이드 → B-펩타이드(1-29 AA) → AAK → A-펩타이드(1-21 AA) → RR → His6 → KDEL → C 말단] construct를 제조하여 담배 식물체에 형질전환시켜 분자농업을 통해 인간 인슐린 단백질을 생산하는데 활용하고자 한다.

적 요

최근 급속도로 당뇨병 환자가 증가하면서 인슐린 시장이 크게 성장하고 있다. 또한 최근 식물체를 이용하여 의약품 단백질 생산이 경제적인 측면과 안정성 측면에서 매우 효과적임이 보고되고 있어 이를 이용한 분자농업이 주목을 받고 있다. 본 연구에서는 인슐린 단백질을 식물체에서 생산하기 위한 유전자 발현 construct를 설계하기 위한 실험으로서 식물발현용 preprominiinsulin construct를 제조하기 위한 단계적 실험을 수행하였다. 우선 proinsulin이 무세포 식물 전사/번역시스템에서 성공적으로 발현됨을 확인하였다. Prominiinsulin construct를 제조하여 대장균에서 발현시키는데 성공하였으며, 이를 트립신으로 절단한 후 인간 항인슐린 항체를 이용한 western 분석을 통하여 효과적으로 A-펩타이드와 B-펩타이드가 형성되며 이후 적절하게 접힘이 일어나고 hexamer로 조립됨을 확인하였다. 이후 식물체에서 재조합 인슐린 유전자가 발현되는지를 확인하기 위하여 RFP 결합 construct를 제조하여 담배의 현탁배양세포인 BY-2 세포에 형질전환시켜 RFP 결합 preprominiinsulin이 성공적으로 발현됨을 확인하였다. 이러한 성공적인 연구 결과를 토대로 향후 이 construct는 RFP 단백질을 제거하여 35S 프로모터에 직접 유도되는 [N 말단 → tobacco E2 시그널 펩타이드 → B-펩타이드(1-29 AA) → AAK → A-펩타이드(1-21 AA) → RR → His6 → KDEL → C 말단] construct를 제조하여 담배 식물체에 형질전환시켜 분자농업을 통해 인간 인슐린 단백질을 생산하는데 활용하고자 한다.

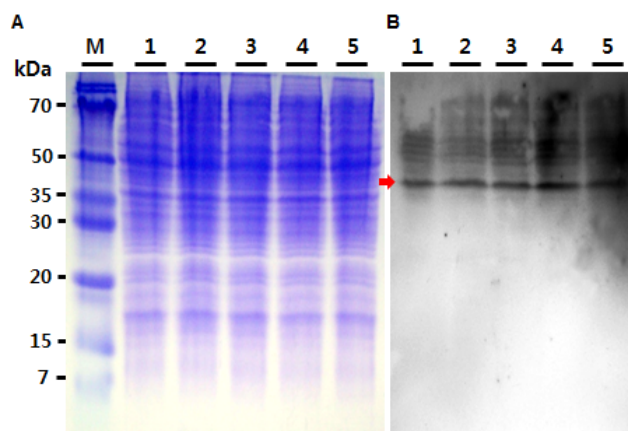


Fig. 5 Expression of human preprominiinsulin protein in SDS-PAGE and western analysis. A. After expression of recombinant human prominiinsulin construct in BY-2 tobacco cell culture, His-tagged prominiinsulin proteins were analyzed in SDS-PAGE after coomassie blue staining. B. Recombinant preprominiinsulin fused to RFP was reacted with anti-insulin monoclonal antibody E2E3 (ab9569, Abcam) in western blot analysis. The molecular weight markers (M) are showed in left side. Red arrows denote the RFP::preprominiinsulin fusion proteins

사 사

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원의 첨단생산기술 개발사업 (312037-5)의 지원을 받아 수행하였다.

인용문헌

- Cardinale F, Meskiene I, Ouaked F, Hirt H (2002) Convergence and Divergence of Stress-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways at the Level of Two Distinct Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases. *Plant Cell* 14:703-711
- Cornelissen BJ, Hooft van Huijsduijnen RA, Bol JF (1986) A tobacco mosaic virus-induced tobacco protein is homologous to the sweet-tasting protein thaumatin. *Nature* 321:531-532
- Cowley DJ, Mackin RB (1997) Expression, purification and characterization of recombinant human proinsulin. *FEBS Lett* 402:124-130
- Dunn MF (2005) Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer - a review. *Biometals* 18:295-303
- Farinas CS, Leite A, Miranda EA (2005) Aqueous extraction of recombinant human proinsulin from transgenic maize endosperm. *Biotechnol Prog* 21:1466-1471
- Hu X, Reddy AS (1997) Cloning and expression of a PR5-like protein from *Arabidopsis*: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein. *Plant Mol Biol* 34:949-959
- Kim MK, Park KG (2008) Endoplasmic reticulum stress and diabetes. *J Kor Soc Endocrinol* 23:1-8
- Liu M, Hodish I, Haataja L, Lara-Lemus R, Rajpal G, Wright J, Arvan P (2010) Proinsulin misfolding and diabetes: mutant INS gene-induced diabetes of youth. *Trends Endocrinol Metab* 21:652-659
- Nykiforuk CL, Boothe JG, Murray EW, Keon RG, Goren HJ, Markley NA, Moloney MM (2006) Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Biotechnol J* 4:77-85
- Olsen JV, Ong SE, Mann M (2004) Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues. *Mol Cell Proteomics* 3:608-614
- Pietro Paolo M (2013) Persistent C-peptide: what does it mean? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 20:279-284
- Puigbò P, Bravo IG, Garcia-Vallvé S (2008) E-CAI: a novel server to estimate an expected value of Codon Adaptation Index (eCAI). *BMC Bioinformatics* 9:1471-2105-9-65
- Qiao ZS, Min CY, Hua QX, Weiss MA, Feng YM (2003) In vitro refolding of human proinsulin. Kinetic intermediates, putative disulfide-forming pathway folding initiation site, and potential role of C-peptide in folding process. *J Biol Chem* 278:17800-17809
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- van Kan JAL, van de Rhee MD, Zuidema D, Cornelissen BJC, Bol JF (1989) Structure of tobacco genes encoding thaumatin-like proteins. *Plant Mol Biol* 12:153-155
- van Loon LC, Gerritsen YAM, Ritter CE (1987) Identification, purification, and characterization of pathogenesis-related proteins from virus-infected Samsun NN tobacco leaves. *Plant Mol Biol* 9:593-609
- Wharen J, Jörnvall H (2003) C-peptide makes a comeback. *Diabetes Metab Res Rev* 19:345-347
- Weiss MA (2013) Diabetes mellitus due to the toxic misfolding of proinsulin variants. *FEBS Lett* 587:1942-1950
- Zamani A, Sturrock RN, Ekramoddoullah AK, Liu JJ, Yu X (2004) Gene Cloning and Tissue Expression Analysis of a PR-5 Thaumatin-Like Protein in *Phellinus weirii*-Infected Douglas-Fir. *Phytopathology* 94:1235-1243
- WO 10-2006-0052705 (2006) Methods for the production of insulin in plants. SemBioSys Genetics Incorporated