

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0136593 (43) 공개일자 2014년12월01일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/63 (2006.01) C12N 15/61 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)	(71) 출원인 울산대학교 산학협력단 울산광역시 남구 대학로 93	(72) 발명자 최한석 서울특별시 송파구 풍납동 현대해미리타운 B동 901호 정승미 서울 강동구 천중로55길 58, (길동) 유한봉 서울 동작구 사당로8길 30, 4층 (사당동)
(21) 출원번호 10-2013-0056597 (22) 출원일자 2013년05월20일 심사청구일자 2013년05월20일	(74) 대리인 특허법인태백	

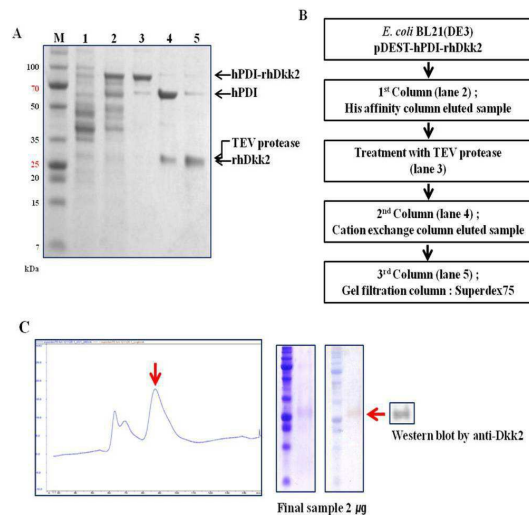
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 생물학적 활성을 가진 인간 Dkk2 재조합 단백질의 수용성 발현 및 정제방법

(57) 요약

본 발명은 인간 PDI 태그를 이용한 생물학적 활성을 가진 인간 Dkk2 재조합 단백질의 수용성 발현 및 정제방법에 관한 것으로서, 인간 단백질 이황화물 이성질화효소(human protein disulfide isomerase; hPDI)를 코딩하는 유전자 및 인간 Dickkopf2(hDkk2) 유전자를 포함하는 재조합 발현백터를 제공한다. 또한 상기 재조합 발현백터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공하며, 상기 hDkk2 재조합 단백질(rhDkk2)의 생산방법 및 상기 생산방법에 의해 생산된 hDkk2 재조합 단백질(rhDkk2)을 제공한다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2009-0094050

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중점연구소 지원사업

연구과제명 암 발생 및 내성 기전 연구

기 여 율 1/2

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2007.12.01 ~ 2013.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0029522

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초의과학지원사업

연구과제명 인간지방줄기세포 이용 역분화 만능 줄기세포 개발연구

기 여 율 1/2

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2008.09.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

인간 단백질 이황화물 이성질화효소(human protein disulfide isomerase; hPDI)를 코딩하는 유전자 및 인간 Dickkopf2(hDkk2) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 hDkk2 유전자는 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 hPDI 유전자는 서열번호 2로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 4

제 1 항에 따른 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 대장균은 BL21(DE3)인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 7

제 4 항에 따른 재조합 미생물을 배지에서 배양하여 hPDI 태그-hDkk2 재조합 단백질을 발현시키는 단계;

담배 식각 바이러스(Tobacco Etch Virus; TEV) 단백질 분해효소(protease)를 처리하여 상기 hPDI 태그를 제거하는 단계; 및

상기 hPDI 태그가 제거된 hDkk2 재조합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 hDkk2 재조합 단백질(rhDkk2) 생산 방법.

청구항 8

제 7 항에 따른 생산방법에 의해 생산된 hDkk2 재조합 단백질(rhDkk2).

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 hDkk2 재조합 단백질은 서열번호 3으로 표시되는 것을 특징으로 하는 hDkk2 재조합 단백질(rhDkk2).

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 PDI 태그를 이용한 생물학적 활성을 가진 인간 Dkk2 재조합 단백질의 수용성 발현 및 정제방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] Wingless-type (Wnt) 신호전달 기작은 Wnt/ β -카테닌(catenin) 신호전달을 조절하는 주요 단백질인 β -카테닌(catenin) 양에 의해 조절되고, 배발생(embryogenesis) 및 세포 항상성 과정에서 다양한 세포 형태로의 세포 증식, 분화 및 이동을 포함하는 다중 발달 과정에 관련되어 있다. 분비 당지질 단백질(glycolipoprotein)인 Wnt

단백질의 돌연변이는 종종 여러 암 및 퇴행성 질환을 일으킨다. 이러한 이유로, 분비 프리즐드 연관 단백질(secreted Frizzled related proteins; sFRPs), Wnt 억제 단백질(Wnt inhibitory protein; WIF), 시사 단백질(Shisa proteins), Norrin, Wise/SOST 및 Dickkopf (Dkk) 패밀리와 같은, Wnt 신호전달 기작의 억제제가 항암 및 항-혈관신생(anti-angiogenesis)을 위해 연구되고 있다.

[0003] 인간 Dkk(hDkk) 패밀리는 Wnt 신호전달 기작에 대응하는 길항제(antagonist)의 하나로서, 4개의 멤버(Dkk1, 2, 3, 4)로 구성되는데, N- 및 C-말단에 각각 10개의 시스테인-잔기를 가진 두 개의 보존 도메인(conserved domains)(Cys1 및 Cys2)을 포함하고, 몇몇 암세포에서 Wnt 신호전달을 음성적으로 조절한다. hDkk 패밀리 중, Dkk2는 Wnt 신호전달의 잠재적 억제제로서, LRP5/6 및 크레멘 수용체(Kremen receptor; Krm) 유사 Dkk1에 함께 결합함으로써 프리즐드 수용체(frizzled receptor; FzR)-Wnt-저밀도 지단백질 수용체 관련 단백질 5/6(LRP5/6)의 형성을 억제한다. Dkk2의 Wnt 신호전달 저해 기능은 세포사멸을 유도하고, 신장 암세포에서 세포 주기-관련 유전자를 조절한다. 따라서, 다른 Wnt 길항제 뿐만 아니라 Dkk2는 암 치료제 및 암 진단용 바이오마커로서 사용될 수 있다.

[0004] 하지만, 치료용 단백질로 사용하기 위해 대장균(*Escherichia coli*)에서 수용성 Wnt 단백질을 분리하기 위한 시도에도 불구하고, 보존된 시스테인-풍부 도메인으로 인한 팔미트화(palmitoylation) 및 소수성 특성을 가진 Dkk2은 다른 Wnt 단백질들과 마찬가지로 수용성 형태로 정제가 불가능하였다. 불용성 성질을 가진 Wnt 단백질을 수용성화시키고 이의 수율을 향상시키기 위해서, 글루타치온 S-트랜스퍼라제(glutathione S-transferase; GST), 티오레독신(thioredoxin; Trx) 및 말토즈 결합 단백질(maltose binding protein; MBP)과 같은 많은 수용성 태그들을 사용하였다. 최근에, 본 발명자들은 이황화물 이성질화 및 샤페론(chaperon) 및 항-샤페론(chaperon) 유사 작용을 포함하는 이중 기능을 갖고, 강력한 수용성 태그 중 하나인 인간 단백질 이황화물 이성질화효소(human protein disulfide isomerase; hPDI)를 대장균(*E. coli*)으로부터 분비 단백질의 수용성 발현 및 정제에 사용하였다.

[0005] 한편 국제공개특허 제 2010-075194호는 solubilization molecule로서 티오레독신을 이용한 티오레독신(Trx)-Dkk2c 융합단백질을 통해 수용성 활성 Dkk를 생산하는 방법에 관해 개시하고 있지만, 본원발명의 Dkk2를 분리하기 위한 인간 PDI 태그 시스템에 대한 언급은 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 인간 단백질 이황화물 이성질화효소(human protein disulfide isomerase; hPDI)를 코딩하는 유전자 및 인간 Dickkopf2(hDkk2) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공하는데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 hDkk2 재조합 단백질(rhDkk2)의 생산방법 및 상기 생산방법에 의해 생산된 hDkk2 재조합 단백질(rhDkk2)을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 여러 태그를 가지고 재조합 인간 Dkk2(recombinant human Dkk2; rhDkk2)의 발현 수준을 확인하였고, hPDI로 태그된 rhDkk2를 선별하였다. 본 발명자들은 최초로 수용성 rhDkk2를 정제하였고, 웨스턴 블랏 및 MALDI-TOR MS 분석을 통하여 동정하였으며, HEK293 세포를 이용하여 생물학적 활성을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0010] 본 발명은 인간 단백질 이황화물 이성질화효소(human protein disulfide isomerase; hPDI)를 코딩하는 유전자 및 인간 Dickkopf2(hDkk2) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다. 상세하게는, 상기 hDkk2 유전자는 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 하고, 상기 hPDI 유전자는 서열번호 2로 표시되는 것을 특징으로 한다.

[0011] 본 발명에 있어서, “벡터”는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는

DNA분자를 의미한다.

[0012] 본 발명에서 있어서, “발현 벡터”는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질 전환된 세포를 비 형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 암피실린(ampicilin), 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에 의해 적절히 선택 가능하다.

[0013] 본 발명에서 사용한 Gateway Vector system은 엔트리벡터와 목적벡터로 구성되며, 상기 엔트리벡터는 목적유전자의 양말단에 attL1, attL2를 갖는 벡터이며, 목적벡터는 attR1, attR2를 포함하는 벡터이다. 상기 엔트리벡터와 상기 목적벡터는 목적벡터의 attR1 및 attR2가 엔트리벡터의 attL1 및 attL2와 재조합효소에 의해 LR반응을 일으키며, 이 과정에서 엔트리벡터에 포함되어 있던 목적유전자가 목적벡터로 전달되게 되고, attR1과 attR2는 attB1과 attB2 서열로 치환되어진다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다. 상세하게는 상기 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하고, 보다 상세하게는 대장균 BL21(DE3)인 것을 특징으로 한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 재조합 미생물을 배지에서 배양하여 hPDI 태그-hDkk2 재조합 단백질을 발현시키는 단계; 담배 식각 바이러스(Tobacco Etch Virus; TEV) 단백질 분해효소(protease)를 처리하여 상기 hPDI 태그를 제거하는 단계; 및 상기 hPDI 태그가 제거된 hDkk2 재조합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 hDkk2 재조합 단백질(rhDkk2) 생산방법을 제공한다.

[0016] 한편, 본 발명의 실시예에서는 담배 식각 바이러스(Tobacco Etch Virus; TEV) 단백질 분해효소(protease)를 사용했지만, 상기 단백질 분해효소(protease)는 당업계에서 통상적으로 사용될 수 있는 트롬빈(Thrombin), 엔테로키나제(Enterokinase), Factor Xa, 유비퀴틴-특이적 단백질 분해효소(Ubiquitin-specific protease), 푸린(Furin), 유전자 분해효소 I(Genease I) 또는 단백질 분해효소 K(Proteinase K)등을 적용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 생산방법에 의해 생산된 hDkk2 재조합 단백질(rhDkk2)을 제공한다.

[0018] 본 발명에서 사용한 유전공학기술과 관련된 사항은 샘브룩 등의 문헌(Sambrook, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.(2001)) 및 프레드릭 등의 문헌(Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in molecular biology volume 1,2,3, John Wiley & Sons, Inc.(1994)) 등을 참조할 수 있다.

발명의 효과

[0019] 본 발명은 인간 PDI 태그를 이용한 인간 Dkk2 재조합 단백질의 수용성 발현 및 정제방법에 관한 것으로서, hPDI 도메인과의 태깅을 통해 대장균 내에서 용해도 및 안정도가 증가된 Dkk2 단백질을 분리, 정제하는 방법에 대한 것이다. 이렇게 얻어진 Dkk2 단백질은 항암 및 항-혈관신생을 위한 치료제로서 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0020]

도 1은 rhDkk2 과발현을 위한 발현벡터의 제작 과정을 나타낸다. (A)는 게이트웨이 클로닝 시스템에 통한 여러 태그들을 가진 rhDkk2 단백질 발현벡터를 제작과정을 나타낸다. (B) 재조합 단백질의 모식도를 나타낸다. 각 단백질은 여러 태그 및 TEV 인식 사이트(화살표)를 가진다.

도 2는 *E. coli* BL21(DE3)에서의 rhDkk2 발현을 나타낸다. 각각 10ug 단백질이 10% 트리스-트리신 SDS-PAGE 겔에 로딩되었다. M, 분자량 사이즈 마커; C, 0.5mM IPTG 유도 전의 총 세포 용해물; T, 유도 후의 총 세포 용해물; S, 유도 후세포 용해물의 상등액.

도 3은 rhDkk2의 분리에 대한 것이다. (A) rhDkk2는 His 친화, 이온 교환 및 겔 여과 컬럼 크로마토그래피를 통해 대장균으로부터 분리되었다. Lane 4는 hPDI-rhDkk2가 TEV 단백질 분해효소 처리 후에 절단된 것을 보여준다. 음이온 교환 컬럼 후, 겔 여과 컬럼을 사용하여 rhDkk2를 분리하였다. M: 분자량 마커; lane 1, IPTG 유도 전 대장균 세포 용해물; lane 2: 유도 후 세포 용해물의 상등액; lane 3: hPDI-rhDkk2 융합 단백질(84.6kDa)의 1st 분리; lane 4: TEV 단백질 분해효소로 처리한 hPDI 태그 절단(hPDI: 53.8kDa, Dkk2: 25.1 kDa); lane 5: 음이온 교환 크로마토그래피에 의한 rhDkk2의 2nd 분리. (B) hPDI-rhDkk2의 분리 과정을 나타내는 모식도이다. (C) 최종 분리된 rhDkk2에 대한 겔 여과 크로마토그램(왼쪽) 및 10% 트리스-트리신 SDS-PAGE 분석(오른쪽) 결과이다. 최종 분리된 rhDkk2의 SDS-PAGE 겔은 쿠마시 블루(Coomassie blue)(왼쪽 겔) 및 실버 염색(오른쪽 겔) 용액으로 확인하였다. 그리고 최종적으로, 분리된 rhDkk2는 항-Dkk2 항체로 웨스턴 블랏 분석하여 확인하였다(삽입 박스).

도 4는 rhDkk2의 MALDI-TOF MS 분석결과를 나타낸다. rhDkk2를 확인하기 위해서, 10mM 디티올트레이톨(dithiolthreitol; DTT)의 조건 하에서 환원된 샘플을 최종농도 10% 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid; TCA)으로 침전시켰다. 침전된 단백질의 모든 시스테인 잔기는 25mM 이오도아세트아미드로 변형시켰다. 샘플을 14.4% 트리스-트리신 SDS-PAGE 겔에 로딩하였다. 겔을 염색한 후에, 예측되는 단백질 크기와 관련된 각 단백질 밴드들을 잘라냈고, 트립신으로 37°C에서 밤새도록 처리하였다. 트립신-처리된 샘플을 겔로부터 추출한 후에, 분리된 단백질을 동정하기 위해서 MALDI-TOF MS 분석(Voyager-DETM STR)을 수행하였다.

도 5는 rhDkk2의 생물학적 활성을 나타낸다. (A) HEK293 세포들은 분리된 rhDkk2로 24시간 동안 처리되었다. 각 단백질들은 0, 10, 100, 250, 500 ng/ml 농도로 각각 처리되었다. 20ug 단백질의 전체 세포 용해물을 10% 트리스-트리신 SDS-PAGE 겔에 로딩하였다. Wnt 신호 전달 기작에 있어서 하류 조절 단백질들은 웨스턴 블랏을 통해 검출하였다. (B) 웨스턴 블랏 분석을 숫자로 표시한 그래프이다. 단백질 수준은 표준방법으로서 GAPDH 농도로 계산되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021]

이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0022]

<실시예 1> 게이트웨이 클로닝(Gateway cloning)에 의한 여러 태그를 가진 발현벡터의 제작

[0023]

259개의 아미노산을 코딩하는 hDkk2(GeneBank: BC075078.2)의 DNA 서열은 유전자 합성 서비스에 의해 합성되었다(Source BioScience Lifesciences, UK, Clone ID 30915595). 신호전달 펩타이드를 코딩하는 DNA 서열을 제거하고 유전자를 증폭시키기 위해서, 다음 2개의 프라이머를 사용하였다. 정방향 5'-AGTTCGGGTACCAAACTCAACTCCATCAAGTCC-3' 및 역방향 5'-CCTCAATCTAGATCAAAATTTCTGACACACATG-3'이고, 밑줄 친 부분은 각각 *KpnI* 및 *XbaI*의 제한효소 사이트를 나타낸다. 증폭된 DNA는 N-말단에 담배 식각 바이러스 인식 사이트(tobacco etch virus recognition site; TEVrs; ENLYFQ~G)를 가진 pDONR207 벡터로 서브 클로닝하였고, pENTR-Dkk2를 얻었다. hDkk2 과발현을 위한 여러 태그를 포함하는 발현벡터를 만들기 위해서, pENTR-Dkk2는 LR 재조합(Invitrogen, CA, USA)을 통해 목적 벡터인 pHGWA (pDEST-His6), pHGWA (pDEST-GST), pHXGWA (pDEST-TRX), pHNGWA (pDEST-NusA), pHMGWA (pDEST-MBP) 및 pDEST-hPDIb'a'로 각각 서브 클로닝되었다(도 1A). 여러 태그를 가진 hDkk2 융합 단백질을 코딩하는 최종 구조체(constructs)는 DNA 서열분석을 통해 확인되었다(Macrogen, Inc., Daejeon, Korea). 태그를 절단하기 위해서 태그 및 표적 단백질 사이에 TEV 인식 사이트를 삽입하였다(도 1B).

[0024] <실시예 2> hPDI-rhDkk2의 발현

[0025] 여러 태그 플라스미드의 rhDkk2를 컴피턴트(competent) *E. coli* BL21(DE3)(Norvagen) 숙주세포로 형질전환하였다. 단일 콜로니를 50ug/ml 암피실린이 포함된 2mL LB 배지에서 37℃로 배양하였다. 600 nm에서 배양액의 광학 밀도(OD)가 0.4~0.5에 이르렀을 때, 융합 단백질 발현을 위하여 최종 0.5mM 이소프로필-β-D-티오갈락토시드(isopropyl-β-D-thiogalactoside; IPTG)를 배양 배지에 첨가하였다. 그 후, 배양 조건을 180 rpm, 30℃로 변경하였다. 박테리아 세포는 추가적으로 3시간 동안 더 배양하였다. 배양된 세포는 13,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하여 수확한 후, 세포 펠렛은 200 uL 용해 완충액(lysis buffer) (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 5% glycerol (v/v))에 재현탁하였다. 초음파에 의해 세포를 깬 후에, 융합 단백질의 발현 및 용해도 수준을 10% 트리스-트리신 SDS-PAGE에 의해 분석하였고, ImageJ program (<http://imagej.nih.gov/ij>)으로 계산하였다.

[0026] 여러 태그를 가진 모든 구조체들은 rhDkk2 단백질을 과발현시켰으나, MBP, NusA 및 hPDI 태그를 가진 rhDkk2만이 수용성으로 발현되었다(도 2). 이들 중에서, hPDI-rhDkk2를 가진 균주가 높은 용해도 및 안정도를 나타냈다(표 1). 따라서 정제를 위하여, 최종적으로 hPDI-rhDkk2를 가진 균주를 선택하고 배양하였다.

표 1

[0027] 여러 태그를 가진 rhDkk2의 발현 및 용해도 수준

Tagging protein	발현수준 (%)	용해도 (%)
	rhDkk2	rhDkk2
His6- (3.1 kDa)	98.7	3.7
Trx- (15.7 kDa)	80.6	17.2
GST- (30 kDa)	85.1	32.4
MBP- (43.4 kDa)	79.7	75.7
NusA- (57.8 kDa)	90.6	21.6
hPDI- (58.3 kDa)	91.9	91.9

[0028] <실시예 3> rhDkk2의 분리 및 정제

[0029] 대장균(*E. coli*)에서 수용성 rhDkk2를 분리하기 위해서, hPDI-TEVrs-rhDkk2 구조체를 *E. coli* BL21 (DE3)로 형질전환하였다. 단일 콜로니는 50ug/ml 암피실린이 포함된 2mL LB 배지에 전-접종하였고, 37℃에서 밤새도록 배양하였다. 최종 농도 0.5%의 전-배양 세포를 50ug/ml 암피실린이 함유된 1L 새로운 LB 배지에 접종하였고 상기와 같은 조건으로 배양하였다. 세포가 OD600에서 0.5~0.7에 이르렀을 때, 최종농도 0.5mM IPTG를 배양 배지에 첨가하고, 융합 단백질의 수용성 발현 수준을 개선시키기 위해서 18℃에서 18시간 동안 더 배양하였다. 배양된 세포는 3500rpm에서 30분 동안 원심분리를 통해 수확하였고, 그 후 20 mL/g의 세포 건조 중량비 당 완충액으로 세포 펠렛을 용해 완충액(50 mM Tris-HCl, pH8.0, 0.5 mM EDTA, 5% glycerol (v/v))에 재현탁하였다. 세포 파괴를 위하여 세포 용해물은 20회 초음파처리하였고, 18,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하였다. 상등액을 0.45um WhatmanTM 실린지 필터(GE Healthcare, Bucks, UK)를 통해 여과하였고, 결합 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 5% glycerol (v/v))으로 전-평형화된 미리 패키징된 5mL HisTrapTM FF column (GE Healthcare, Bucks, UK)을 사용하였다. 모든 컬럼 작업은 AKTA explorer system (Amersham Pharmacia Biotech, Bucks, UK) 상에서 수행하였다. 미결합된 단백질을 제거하기 위해서 HisTrapTM FF 컬럼은 2-4 컬럼 볼륨(column volume; CV)의 결합 완충액으로 씻어냈고, 비특이적 결합 단백질을 제거하기 위해서 8-10 CV의 세척 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 110 mM imidazole, 5% glycerol (v/v))으로 씻어냈다. 그 후, hPDI-rhDkk2 융합 단백질을 용출 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 200 mM imidazole, 5% glycerol (v/v))으로 용출하였다. hPDI-rhDkk2 융합 단백질을 포함하는 분획을 모았고, 완충액 A(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 5% glycerol (v/v))에 1:40 (v/v) 비율로 녹인 분자량 컷-오프 12-14 kDa (Viskase

Companies, Inc, USA)의 투석막으로 이미다졸(imidazole) 및 NaCl을 희석하기 위해서 4℃에서 2시간 동안 세 번 투석하였다. 다음으로, 분리된 총 단백질을 TEV 단백질 분해효소 비율 20:1 (w/w)의 TEV 단백질 분해효소 처리하여 용합 단백질을 절단하였다. 절단은 18℃에서 14-16 시간 동안 수행하였다. 단백질 분해 절단 후에, 절단 반응 혼합물을 0.45um Whatman™ 실린지 필터로 여과하였고, 음이온 교환 컬럼을 통하여 rhDkk2를 분리하기 위해서 완충액 A로 평형화된 미리 패키징된 5 mL HiTrap SP™ column (GE Healthcare, Bucks, UK)에 로딩하였다. 컬럼은 4-6 CV의 완충액 A로 씻어낸 후, 완충액 B(완충액 A에 1 M NaCl 첨가)에 선형 구배(linear gradient)로 용출하였다. rhDkk2를 포함하는 분획은 분자량 컷-오프 10 kDa (Millipore Corp., MA, USA) 이상의 원심분리 필터를 이용하여 1mL로 농축하였고, 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상등액을 수집하였다. 추가적인 분리를 위하여, 수집된 샘플은 저장 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 mM DTT, 5% glycerol (v/v))으로 전-평형화된 Superdex 75 16/60 (GE Healthcare, Bucks, UK)에 로딩하였다. 최종적으로, 분리된 rhDkk2는 농축되었고, 10% 트리스-트리신 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 분리 과정에서 단백질 농도는 표준방법으로 BSA를 이용한 Bradford assay에 의해 측정되었다. 그 결과는 도 3에 나타났다. rhDkk2의 최종 수율은 0.073mg/g(*E. coli* 세포 건조 중량)이었고, 순도는 94%였다(표 2).

표 2

[0030]

분리 단계	부피 (ml)	습중량 (Wet weight) (g)	총 단백질 (mg/g)	순도 (%)
Bacterial culture	200	0.98	-	-
Supernatant	20	-	81.6	-
1 st purification	42.5	-	4.03	-
TEV protease treatment	42.5	-	5.03	-
2 nd purification	0.9	-	0.39	-
Gel filtration	1.3	-	0.07	94

[0031]

<실시예 4> MALDI-TOF MS 분석에 의한 재조합 용합 단백질의 확인

[0032]

MALDI-TOF MS 분석을 통해 분리된 rhDkk2를 확인하기 위해서, 10mM DTT를 분리된 rhDkk2에 첨가한 후에 최종 농도 10% 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid; TCA, 6.1 N, Sigma-Aldrich Corp.)을 샘플에 첨가하였다. 그 후, 재빨리 5분 동안 얼음에 두었다. 샘플을 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후에, 침전된 샘플을 50 mM 이오도아세트아미드(iodoacetamide; IAA, Sigma-Aldrich Corp.) 9 uL IA 완충액 (0.5 M Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2% SDS, 5% glycerol)에 재현탁하였고, 그 후 어두운 곳에서 상온으로 30분 동안 반응시켰다. 단백질 샘플 12uL를 10% 트리스-트리신 SDS-PAGE 겔에 로딩하였다. rhDkk2와 관련된 밴드를 겔로부터 잘라냈고, 밤새도록 20uL 트립신 용액으로 처리하였다. 1uL 단백질 반응물 전체를 동일 부피의 α-시아노-4-하이드록시시나믹산(10 mg/mL) 용액에 혼합하였고, Voyager-DE™ STR (Applied Biosystems)을 이용하여 MALDI-TOF MS를 수행하였다. 데이터 해석은 Data Explorer™ software (Applied Biosystems)를 이용하여 수행하였다. 트립신 처리 펩타이드의 질량은 모두 일치했다. 분리된 rhDkk2는 웨스턴 블랏(도 3C 삽입박스) 및 MALDI-TOF MS 분석(도 4)에 의해 확인되었다.

[0033]

<실시예 5> 트리톤(Triton) X-114 상 분리 및 엔도톡신(endotoxin) 분석

[0034]

분리된 rhDkk2에서 엔도톡신을 제거하기 위해서, 최종 농도 1% 트리톤 X-114를 샘플에 첨가하였고, 혼합 샘플을 4℃에서 30분 동안 반응시켰다. 재빨리 37℃로 옮긴 후에, 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. rhDkk2를 포함하는 상층의 수용성 상(aqueous phase)을 조심스럽게 모았고, 엔도톡신 분석에 사용하였다.

[0035]

rhDkk2를 포함하는 수용성 상에서의 잔여 엔도톡신의 양을 측정하기 위해서, Endpoint Chromogenic Limulus

Amebocyte Lysate (LAL) 시험 (Lonza, Basel, Switzerland)을 수행하였다. 1ug/mL 농도의 샘플을 37℃에서 미리 데운 무-엔도톡신-마이크로플레이트 웰에 50ul씩 분주하였고, 동일 부피의 LAL 시약을 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 37℃에서 10분 동안 반응시킨 후, 미리 데운 100ul 색소 기질 용액(chromogenic substrate solution)을 각 웰에 첨가하였고, 37℃에서 6분 동안 반응하였다. 그리고 난 후, 100ul 정지 시약 (25% 아세트산 (v/v))을 첨가하였고, 분광 광도계를 이용하여 405 nm에서 분석하였다. 흡광도 분석 후에, 엔도톡신 표준용액(1.0, 0.5, 0.25, 0.1 EU/ml)으로부터 얻어진 표준 곡선을 이용하여 엔도톡신 농도를 계산하였다.

[0036] 그 결과, 트리톤 X-114를 처리하기 전에는 분리된 단백질의 엔도톡신의 양이 2 EU/ug 보다 높았으나, 처리 후에는 엔도톡신 수준이 0.15 EU/ug 보다 낮아졌다(표 3).

표 3

TritonX-114 처리	분리된 단백질의 엔도톡신 수준 (EU/ug)
처리 전	2.449
처리 후	0.115

[0038] <실시예 6> rhDkk2의 활성 측정

[0039] rhDkk2의 생물학적 활성을 측정하기 위해서, 이를 정상적인 Wnt 신호전달 과정을 보이는 HEK293 세포에 처리하였다. HEK293 세포는 10% 열-불활화시킨 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS), 소듐 바이카보네이트(sodium bicarbonate; Sigma #S8875), MEM 소듐 피루베이트(MEM sodium pyruvate; Gibco, #11360-070), MEM 비-기본 아미노산(MEM non-essential amino acid; MEM NEAA) (Gibco, #11140-050) 및 항생제(100 U/ml 페니실린 G, 100 ug/ml 스트렙토마이신 설페이트(streptomycin sulfate)가 첨가된 최소 기본 배지(minimum essential medium; MEM) (Gibco, #61100-061)에서 37℃, 5% CO₂를 함유하는 배양기에서 배양하였다. 4~5×10⁵ 세포는 6-웰 조직 배양 시험 플레이트(SPL life sciences, Inc., Korea)에서 배양시켰다. 24시간 동안 FBS 배지를 제외한 세포 밀집도(cell confluency)가 70~80%일 때, rhDkk2를 0, 10, 100, 250, 500 ng/ml의 농도로 각각 처리하였다. 전체 세포 용해물은 NP-40 용해 완충액(150 mM sodium chloride, 10% NP-40, 50 mM Tris inhibitor)으로 모았고, 20ug의 단백질을 트리스-트리신 SDS-PAGE에 로딩하였다.

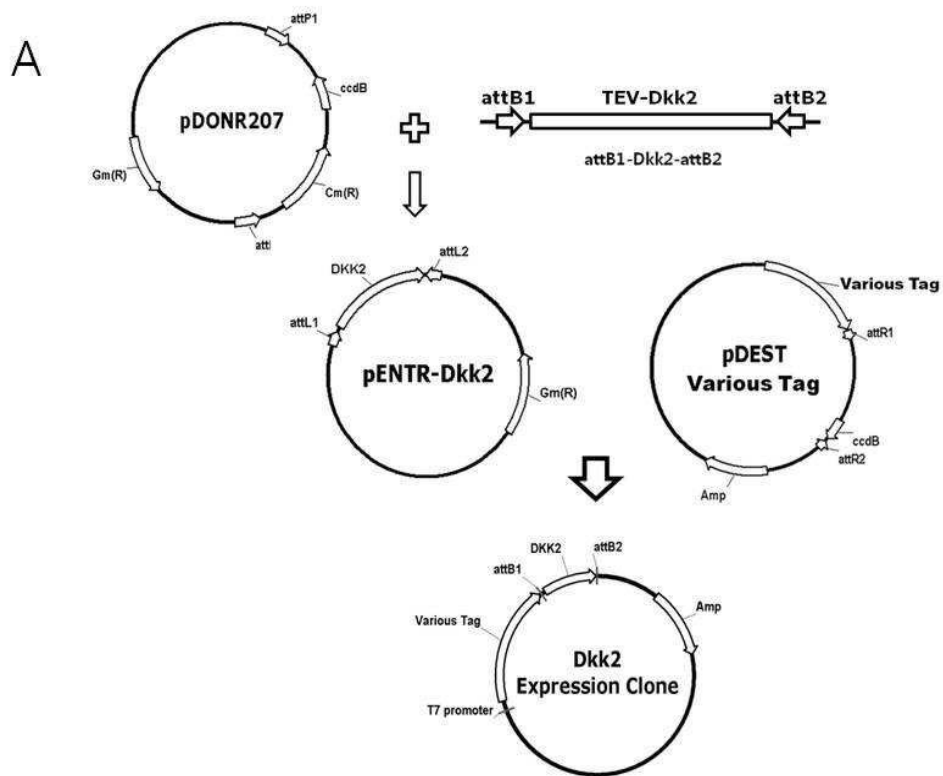
[0040] 웨스턴 블랏 분석을 위해, 젤을 PVDF 멤브레인(Pall Corp.)으로 옮긴 후, 멤브레인을 차단 용액 (5% skim milk powder, 10 mM Tris-Cl, pH 7.4, 150 mM NaCl)으로 차단하였다. rhDkk2 검출을 위해서, 멤브레인을 항-Dkk2 항체(1:200, Abcam, Ab38594)로 차단 용액에서 밤새도록 4℃로 반응시켰다. 그 후, 멤브레인을 TBST (10 mM Tris-Cl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)로 10분 동안 4번 씻어냈다. 씻어낸 멤브레인은 TBST 완충액에 녹인 퍼옥시다제(oxidase) 표지된 항-토끼 IgG (1:5000, Abclon, AbC-5003)와 상온에서 1시간 동안 반응시켰고, TBST로 4번 씻어냈다. 씻어낸 후에, 멤브레인은 picoEPD (Elpis biotech, Daejeon, Korea)를 이용하여 분석하였다.

[0041] Wnt 신호 전달에 있어서, rhDkk2-관련 단백질의 발현 수준은 rhDkk2의 생물학적 활성을 측정하여 확인하였다. β-카테닌(β-catenin)(1:1000, Cell signaling, #9562), c-Myc (1:1000, Sigma, M4439), cyclin D1 (1:1000, cell signaling, #2978), GAPDH (1:1000, Ab frontier, LF-PA0209) 및 β-actin (1:2000, Ab frontier, LF-PA0018)을 사용하였다.

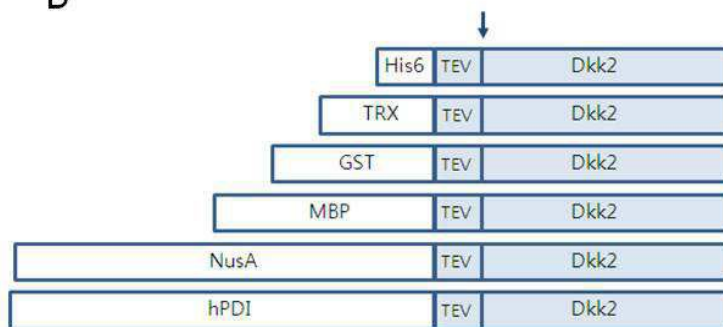
[0042] 그 결과, rhDkk2를 HEK293 세포에 처리하였을 때, Wnt 신호 전달 기작의 모든 하류(downstream)-관련 단백질이 감소하였다(도 5). 따라서, 본 발명자들은 Wnt 신호 전달 기작 유사 인간 Dkk1에 대응하는 억제자로서의 rhDkk2 기능을 확인할 수 있었다.

도면

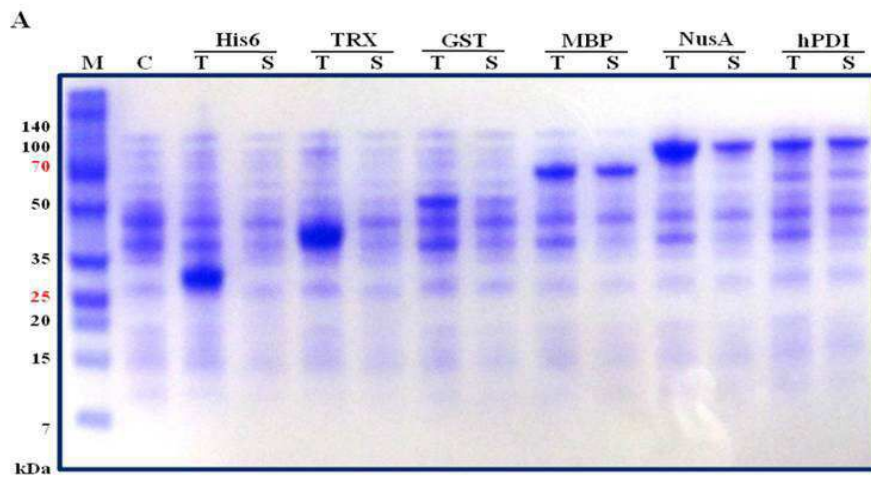
도면1



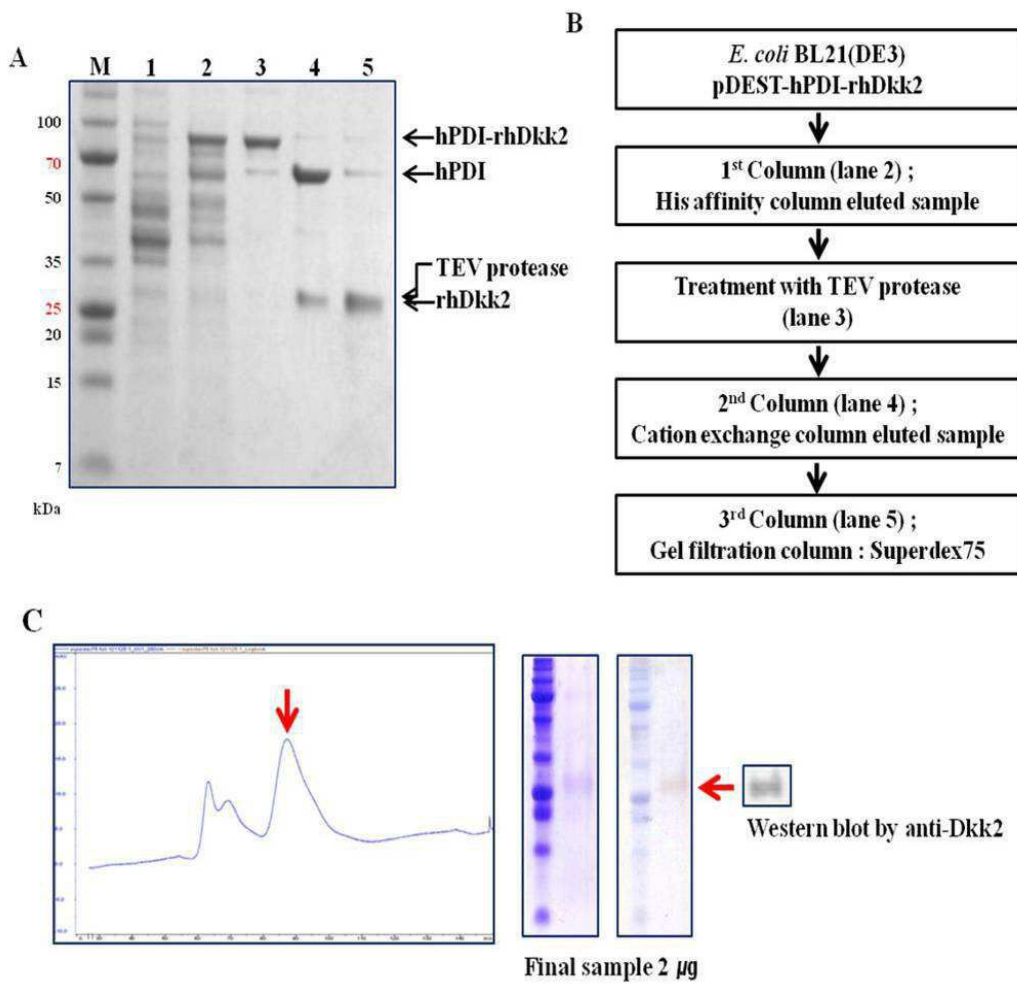
B



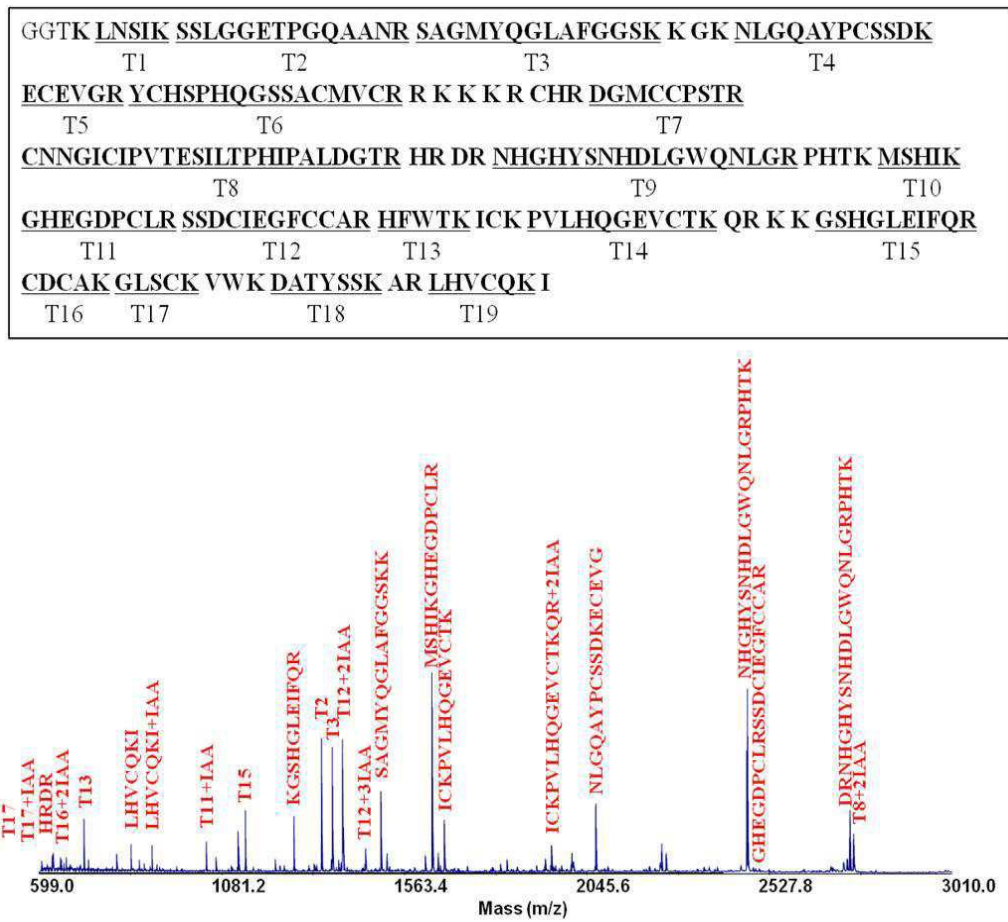
도면2



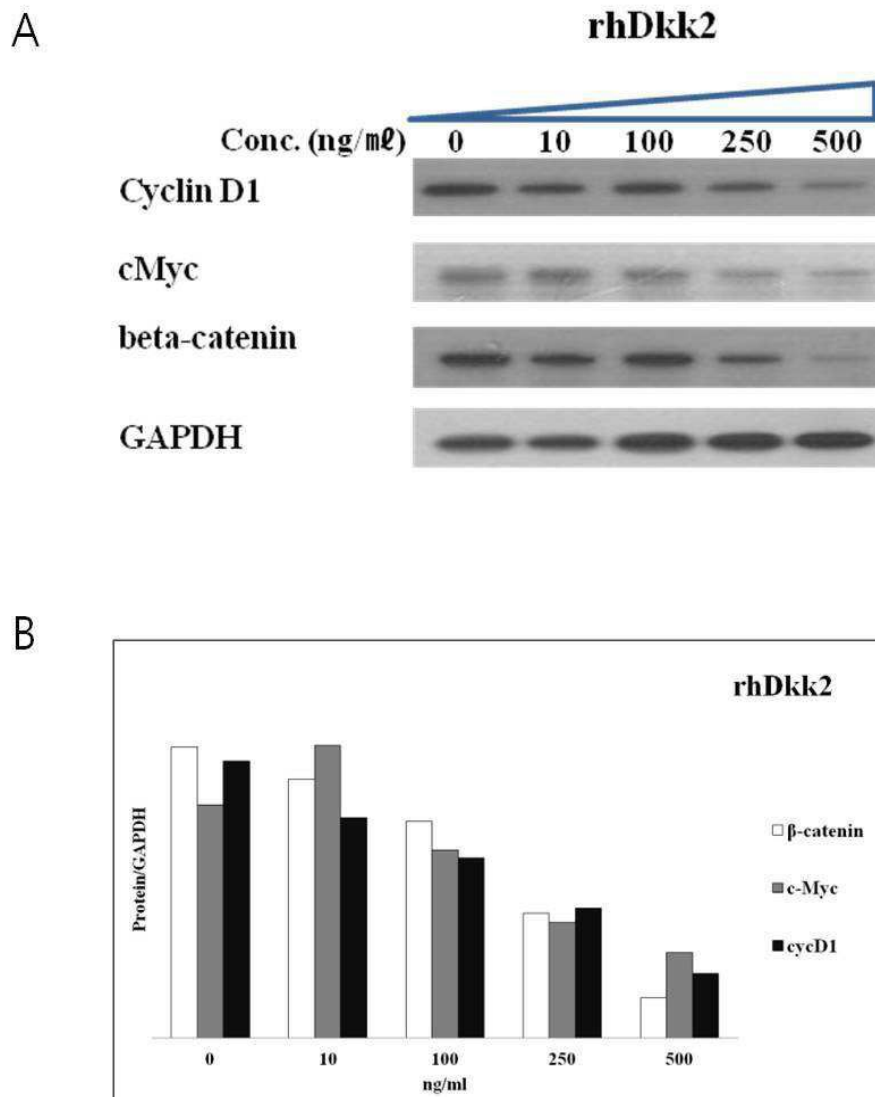
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
- <120> Soluble expression and purification method of active recombinant
 human Dkk2
- <130> ADP-2013-0143
- <160> 3
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 681
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

aaactcaact ccatcaagtc ctctctgggc ggggagacgc ctggtcaggc cgccaatcga	60
tctgcgggca tgtaccaagg actggcattc ggcggcagta agaagggcaa aaacctgggg	120
caggcctacc cttgtagcag tgataaggag tgtgaagttg ggaggtattg ccacagtccc	180
caccaaggat catcggcctg catggtgtgt cggagaaaaa agaagcgctg ccaccgagat	240
ggcatgtgct gccccagtac ccgctgcaat aatggcatct gtatcccagt tactgaaagc	300
atcttaacct ctcacatccc ggctctggat ggtactcggc acagagatcg aaaccacggt	360
cattactcaa accatgactt gggatggcag aatctaggaa gaccacacac taagatgtca	420
catataaaag ggcatgaagg agaccctgc ctacgatcat cagactgcat tgaagggttt	480
tgctgtgctc gtcatttctg gacaaaaatc tgcaaaccag tgctccatca gggggaagtc	540
tgtaccaaac aacgcaagaa gggttctcat gggttgaaa tttccagcg ttgcgactgt	600
gcgaagggcc tgctttgcaa agtatggaaa gatgccacct actctccaa agccagactc	660
catgtgtgtc agaaaatttg a	681
<210> 2	
<211> 1461	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 2	
gacgcaccgg aagaagagga tcatgtcctg gtctctgcga aaagcaactt cgcggaagca	60
ctggccgcac ataaatatct gctgttgga ttttatgctc cttgtgcgg tcattgcaaa	120
gccctggccc cggagtacgc caaagccgca ggtaaactga aagctgaagg tagcgaaatc	180
cgcttgcaa aggttgatgc tacggaagag agtgacctgg cgcagcagta tgggtgccgc	240
ggctatccta caattaaatt cttccgtaac ggtgataccg catctccaaa agaataatcc	300
gctggtcgcg aggcggacga tattgttaac tggctgaaga aacgcactgg ccctgccgca	360
accaccctgc ctgatggcgc tgctgccgaa agcctggtcg aaagtagcga agttgccgtc	420
attggtttct ttaaggatgt agaatctgac agtgccaaac agtttctgca agcggcagag	480
gctatcgatg acatcccgtt cggcatcacc tctaacagtg acgtattcag taaataccaa	540
ctggataaag acggcgttgt gctgttcaag aaatttgatg aaggtcgcaa caactttgag	600
ggtgaggtga ccaaggagaa cctgctggat ttatttaagc acaaccaact gccgctggtt	660
attgaattta cagaacaaac ggccgccgaaa attttcggcg gtgagattaa aacacatatc	720
ctgctgtttc tgccgaagag cgtttctgat tacgatggtg aactgagtaa ttttaaacc	780
gccgcagaat ctttcaaagg taagattctg ttcattttca ttgatagcga ccacacggac	840

aatcagcgta tcctggagtt ctttggcttg aagaaagagg aatgcccggc tgtgcgtctg 900
 attacgtgg aagaggaat gacaaagtac aagccggaga gcgaggaact gactgcagaa 960
 cgtatcaccg aattttgtca tcgtttcttg gaggggaaga ttaagccgca tctgatgagc 1020
 caggaactgc cggaggattg ggacaaacag ccagtgaag ttctgggtggg gaagaatttt 1080

gaagatgtgg ctttcgatga gaagaagaat gtgtttgtgg agttctacgc cccgtggtgt 1140
 gggcactgta aacagctggc gccgatctgg gacaaactgg gcgaaacgta taaagatcac 1200
 gaaaatattg tgatcgcgaa aatggattct accgcgaatg aagtagaagc ggtaaaagta 1260
 cactcttttc cgacgtgaa attctttcca gcgagcgcgg atcgtactgt cattgattat 1320
 aatggcgaac gtactctgga cggctttaag aaatttctgg aaagcggcgg ccaggatggc 1380
 gcgggcgatg atgatgacct ggaagacctg gaagaagcgg aggaaccaga catggaggag 1440
 gatgacgacc agaaagcggc c 1461

<210> 3
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

Gly Gly Thr Lys Leu Asn Ser Ile Lys Ser Ser Leu Gly Gly Glu Thr
 1 5 10 15

Pro Gly Gln Ala Ala Asn Arg Ser Ala Gly Met Tyr Gln Gly Leu Ala
 20 25 30

Phe Gly Gly Ser Lys Lys Gly Lys Asn Leu Gly Gln Ala Tyr Pro Cys
 35 40 45

Ser Ser Asp Lys Glu Cys Glu Val Gly Arg Tyr Cys His Ser Pro His

50 55 60
 Gln Gly Ser Ser Ala Cys Met Val Cys Arg Arg Lys Lys Lys Arg Cys

65 70 75 80
 His Arg Asp Gly Met Cys Cys Pro Ser Thr Arg Cys Asn Asn Gly Ile

85 90 95
 Cys Ile Pro Val Thr Glu Ser Ile Leu Thr Pro His Ile Pro Ala Leu

100 105 110
 Asp Gly Thr Arg His Arg Asp Arg Asn His Gly His Tyr Ser Asn His

115 120 125
 Asp Leu Gly Trp Gln Asn Leu Gly Arg Pro His Thr Lys Met Ser His
 130 135 140
 Ile Lys Gly His Glu Gly Asp Pro Cys Leu Arg Ser Ser Asp Cys Ile
 145 150 155 160
 Glu Gly Phe Cys Cys Ala Arg His Phe Trp Thr Lys Ile Cys Lys Pro
 165 170 175
 Val Leu His Gln Gly Glu Val Cys Thr Lys Gln Arg Lys Lys Gly Ser
 180 185 190
 His Gly Leu Glu Ile Phe Gln Arg Cys Asp Cys Ala Lys Gly Leu Ser
 195 200 205
 Cys Lys Val Trp Lys Asp Ala Thr Tyr Ser Ser Lys Ala Arg Leu His
 210 215 220
 Val Cys Gln Lys Ile
 225