

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0015967 (43) 공개일자 2014년02월07일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/52 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01) C12P 21/00 (2006.01)		(71) 출원인 울산대학교 산학협력단 울산광역시 남구 대학로 93
(21) 출원번호	10-2012-0082550	(72) 발명자 최한석
(22) 출원일자	2012년07월27일	서울특별시 송파구 풍납동 현대해미리타운 B동 901호
심사청구일자	2012년07월27일	배지영
		서울특별시 종로구 경운동 64-34
		구본경
		서울 송파구 토성로3길 12, 201동 201호 (풍납동, 칼라하우스)
		(74) 대리인 특허법인태백

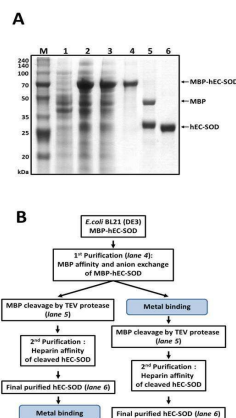
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 생물학적 활성을 가진 인간 EC-SOD 재조합 단백질의 대장균 내 수용성 과발현 및 정제방법

(57) 요약

본 발명은 생물학적 활성을 가진 인간 EC-SOD 재조합 단백질의 대장균 내 수용성 과발현 및 정제방법에 관한 것으로서, 수용성 향상 태그(solubility enhancing tag) ; 및 인간 세포막 수퍼옥사이드 디스뮤타제(extracellular superoxide dismutase; EC-SOD)를 코딩하는 유전자 또는 C-말단의 헤파린 결합 도메인(heparin binding domain; HBD)이 절단된 인간 EC-SOD(HBD truncated EC-SOD; EC-SOD^{△HBD})를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다. 또한, 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공하며, 상기 인간 EC-SOD 재조합 단백질(rhEC-SOD) 또는 인간 EC-SOD^{△HBD} 재조합 단백질(rhEC-SOD^{△HBD}) 생산방법 및 상기 생산방법에 의해 생산된 인간 EC-SOD 재조합 단백질(rhEC-SOD) 또는 인간 EC-SOD^{△HBD} 재조합 단백질(rhEC-SOD^{△HBD})을 제공한다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110003215

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기본연구지원사업

연구과제명 hEC-SOD의 구조와 기능에 관한 연구

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2012.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

수용성 향상 태그(solubility enhancing tag); 및 인간 세포막 수퍼옥사이드 디스뮤타제(human extracellular superoxide dismutase; hEC-SOD)를 코딩하는 유전자 또는 상기 유전자의 단편을 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 유전자의 단편은 C-말단의 헤파린 결합 도메인(heparin binding domain; HBD)이 절단된 인간 EC-SOD(HBD truncated EC-SOD; EC-SOD^{△HBD}) 유전자인 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 수용성 향상 태그는 말토스 결합 단백질(Maltose Binding Protein, MBP), N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance Protein A; NusA) 또는 인간 단백질 이황화물 이성질화효소(human protein disulfide isomerase; hPDI)인 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 인간 EC-SOD 유전자는 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 5

제 2항에 있어서, 상기 인간 EC-SOD^{△HBD} 유전자는 서열번호 2로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 6

제 3 항에 있어서, 상기 MBP 유전자는 서열번호 3이고, 상기 NusA 유전자는 서열번호 4이고, 상기 hPDI 유전자는 서열번호 5로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 재조합 발현벡터는 도 1c(iv)의 개열지도를 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 8

제 1 항 또는 제 2 항에 따른 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 대장균은 BL21(DE3)인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 11

제 8 항에 따른 재조합 미생물을 배지에서 배양하여 수용성 향상 태그-인간 EC-SOD 재조합 단백질을 발현시키는 단계;

상기 재조합 단백질에 구리 또는 아연을 결합시키는 단계;

담배 식각 바이러스(Tobacco Etch Virus; TEV) 프로테아제(protease)를 처리하여 상기 수용성 향상 태그를 제거하는 단계; 및

상기 수용성 향상 태그가 제거된 인간 EC-SOD 재조합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 인간 EC-SOD 재조합 단백질 생산방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 수용성 향상 태그는 말토스 결합 단백질(Maltose Binding Protein, MBP), N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance Protein A; NusA) 또는 인간 단백질 이황화물 이성질화효소(human protein disulfide isomerase; hPDI)인 것을 특징으로 하는 인간 EC-SOD 재조합 단백질 생산방법.

청구항 13

제 11 항에 있어서, 상기 인간 EC-SOD 재조합 단백질은 전체 길이가 발현된 인간 EC-SOD 재조합 단백질(rhEC-SOD) 또는 C-말단의 HBD 절단된 인간 EC-SOD 재조합 단백질(rhEC-SOD^{△HBD})인 것을 특징으로 하는 인간 EC-SOD 재조합 단백질 생산방법.

청구항 14

제 11 항에 따른 생산방법에 의해 생산된 인간 EC-SOD 재조합 단백질.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 인간 EC-SOD 재조합 단백질은 전체 길이가 발현된 인간 EC-SOD 재조합 단백질(rhEC-SOD) 또는 C-말단의 HBD 절단된 인간 EC-SOD 재조합 단백질(rhEC-SOD^{△HBD})인 것을 특징으로 하는 인간 EC-SOD 재조합 단백질.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 생물학적 활성을 가진 인간 EC-SOD 재조합 단백질의 대장균 내 수용성 과발현 및 정제방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 수퍼옥사이드(superoxide) 음이온(O_2^-)은 그 홀전자(unpaired electron)로 인해 우리의 신체에 상당히 독성이 강하다. 자유 라디칼은 뇌졸중, 심장마비, 방사능 중독, 과산소에 의한 손상(hyperoxic injuries)과 같은 많은 질환의 발병에 관여하고, 심지어 노화를 촉진하고 수명을 단축시킨다(Circulation. (2000) 101:2264-2270; Nutrition. (2002) 18:872-879; Arterioscler. Thromb. Vac. Biol. (2004) 24:1367-1373). 수퍼옥사이드(superoxide)는 수퍼옥사이드 디스무타제(superoxide dismutase; SOD)에 의해 제거되는데, 이는 자유 라디칼을 과산화수소 및 산소로 전환시킨다. 상기 효소는 극히 효율적인데, SOD-촉매 반응의 속도상수($\sim 4 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$, Cu 원자당)는 비타민C($\sim 1.4 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$) 또는 플라보노이드($\sim 5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$)와 같은 다른 항산화제에 의한 촉매 반응보다 더 빠르다(Arterioscler. Thromb. Vac. Biol. (2002) 22:1367-1368).

[0003] 크기 및 위치에 따라 구별되는 SOD는 세 가지 타입이 있다(Free Radic. Biol. Med. (2002) 33:337-349). SOD1(Cu, Zn-SOD)은 세포의 세포질 및 핵의 구획(compartments)에서 발견된 두 개의 $\sim 16kDa$ 서브유닛으로 구성된 동종이합체(homodimer)이다. 반면, SOD2(Mn-SOD)는 주로 미토콘드리아에 위치하는 네 개의 $\sim 24kDa$ 서브유닛으로 구성된 4량체(tetramer)이다. 또한 세 번째 SOD인 SOD3는 세포밖 수퍼옥사이드 디스무타제(extracellular superoxide dismutase; EC-SOD)로 불리는데(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1982) 79:7634-7638), 이는 구리 및 아연을 포함하는 당단백질이고, 세포밖 공간에서는 유일한 항-수퍼옥사이드 효소이다. 222개의 아미노산 잔기를 포함하는 인간 EC-SOD 서브유닛은 다른 이황화물결합(disulfide bridge) 패턴을 갖는 각각 두 가지 형태로 존재한다(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2003) 100:13875-13880). 하나의 형태(aEC-SOD)는 효소적으로 활성이 있는 반면, 나머지(iEC-SOD)는 SOD-활성이 없다(도 1a). EC-SOD가 결핍된 마우스에서의 연구는 상기 효소가 과산소에 대한 폐의 보호, 과산화아질산염(peroxynitrite)을 형성할 수 있는 수퍼옥사이드를 제한함에 따른 일산화질소(nitric oxide)의 보존, 안지오텐신(angiotensin)-2-유도된 고혈압의 감소, 신혈관형성(neovascularization)의 촉진 및 기억 유지를 포함하는 다양한 역할을 수행한다는 것을 알아냈다(Circ. Res. (2002) 91:1031-1037; Blood. (2004) 104:43-50; Curr Alzheimer Res. (2005) 2:191-196). 따라서, 상기 효소는 단백질 치료를 위한 좋은 표적물질이다.

[0004] 이러한 치료제로서의 가능성 때문에, 인간 재조합 EC-SOD는 중국햄스터난소세포(Chinese hamster ovary cells), 곤충세포, *P. pastoris* 및 *E. coli*와 같은 여러 발현시스템에서 이중적으로 발현시키려는 시도가 있었다(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1987) 84:6634-6638; Protein Expression Purif. (2002) 24:13-17; Journal of agricultural and food chemistry. (2006) 54:8041-8047; Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). (2005) 37:265-269; J Microbiol Biotechnol. (2008) 18:1648-1654; Applied Biochemistry and Biotechnology. (2010) 162:1585-1598). 비록 진핵세포가 접힌(folded) 수용성 EC-SOD를 생산한다 하더라도, 그 EC-SOD의 양은 적은 비용으로 산업적 규모로 생산하기에는 충분하지 않다. 원핵세포 발현시스템에서는 과발현시킬 수는 있으나, 봉입체(inclusion body)의 형태로 발현되고 EC-SOD 활성을 나타내기 위해서는 재접힘(refold)을 해야만 한다. 재접힘 과정은 비효율적일 뿐만 아니라 일관적이지도 않고, 단백질 접힘이 제대로 되기 어렵다.

[0005] 한편, 한국특허출원 제10-2007-0056973호는 재조합 EC-SOD 단백질, 그의 제조방법 및 용도에 관한 것으로서, 상기 단백질을 대량으로 발현하고 이로 인해 생성된 상기 단백질의 내포체를 용해 및 재접힘을 유도하여 재조합 EC-SOD 단백질을 제조하는 방법 및 상기 재조합 EC-SOD 단백질의 용도에 관해 개시하고 있지만, 태깅시스템을 이용한 수용성 재조합 EC-SOD의 과발현 및 정제방법에 대한 언급은 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 수용성 향상 태그(solubility enhancing tag); 및 인간 세포밖 수퍼옥사이드 디스뮤타제(extracellular superoxide dismutase; EC-SOD)를 코딩하는 유전자 또는 C-말단의 헤파린 결합 도메인(heparin binding domain; HBD)이 절단된 인간 EC-SOD(HBD truncated EC-SOD; EC-SOD^{ΔHBD}) 유전자를 포함하는 재조합 발현백터를 제공하는데 있다.

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

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 인간 EC-SOD 재조합 단백질(rhEC-SOD) 또는 인간 EC-SOD^{ΔHBD} 재조합 단백질(rhEC-SOD^{ΔHBD}) 생산방법 및 상기 생산방법에 의해 생산된 인간 EC-SOD 재조합 단백질(rhEC-SOD) 또는 인간 EC-SOD^{ΔHBD} 재조합 단백질(rhEC-SOD^{ΔHBD})을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 최초로 말토스 결합 단백질(Maltose Binding Protein; MBP), N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance Protein A; NusA) 및 단백질 이황화물 이성질화효소(Protein Disulfide Isomerase; PDI)가 *E. coli*의 세포질 내에서 수용성 EC-SOD의 과발현을 가능하게 할 수 있다는 것을 밝혀내고 본 발명을 완성하였다.

[0010] 이들 태그된 융합 단백질들 사이에서, 크기 및 분리의 편리성이 고려되어 MBP-EC-SOD가 선택되었으며, 과발현된 MBP 태그 EC-SOD는 MBP 친화 및 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 효과적으로 분리되었다. EC-SOD는 담배 식각 바이러스(Tobacco Etch Virus; TEV) 단백질분해효소(protease)에 의해 MBP 태그로부터 완전히 분리되었으며, 분리된 단백질은 시험관 내(*in vitro*) 효소 분석을 통하여 좋은 효소 활성을 가진 것으로 나타났다. 이는 최초로 수용성 hEC-SOD를 분리한 것이라는 점에서 주목할 만하고, 수용성 hEC-SOD의 구조적 안정성을 Cu/Zn 결합과 관련하여 분석했다는 점에서 중요성을 가진다.

[0011] 본 발명은 수용성 향상 태그(solubility enhancing tag) 및 인간 세포밖 수퍼옥사이드 디스뮤타제(extracellular superoxide dismutase; EC-SOD)를 코딩하는 유전자 또는 상기 유전자의 단편을 포함하는 재조합 발현백터를 제공한다. 상세하게는 상기 유전자의 단편은 C-말단의 헤파린 결합 도메인(heparin binding domain; HBD)이 절단된 인간 EC-SOD(HBD truncated EC-SOD; EC-SOD^{ΔHBD}) 유전자인 것을 특징으로 한다.

- [0012] 본 발명에 있어서, 상기 수용성 향상 태그는 인간 EC-SOD 재조합 단백질(rhEC-SOD) 또는 인간 EC-SOD^{△HBD} 재조합 단백질(rhEC-SOD^{△HBD})을 수용성 형태로 발현시킬수 있는 것이면 어느 것이든 제한 없이 이용가능하다. 예를 들어, 상기 수용성 향상 태그는 말토스 결합 단백질(Maltose Binding Protein, MBP), N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance Protein A; NusA) 또는 인간 단백질 이황화물 이성질화효소(human protein disulfide isomerase; hPDI) 중 어느 하나일 수 있다.
- [0013] 상세하게는, 상기 인간 EC-SOD 유전자는 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 하고, 상기 인간 EC-SOD^{△HBD} 유전자는 서열번호 2로 표시되는 것을 특징으로 한다. 또한, 상기 MBP 유전자는 서열번호 3이고, 상기 NusA 유전자는 서열번호 4이고, 상기 hPDI 유전자는 서열번호 5로 표시되는 것을 특징으로 한다. 보다 상세하게는 상기 재조합 발현벡터는 도 1c(iv)의 개열지도를 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0014] 본 발명에 있어서, “벡터”는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA분자를 의미한다.
- [0015] 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.
- [0016] 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 치환 되어진다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다. 상세하게는 상기 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하고, 보다 상세하게는 대장균은 BL21(DE3)인 것을 특징으로 한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 재조합 미생물을 배지에서 배양하여 수용성 향상 태그-인간 EC-SOD 재조합 단백질을 발현시키는 단계; 상기 재조합 단백질에 구리 또는 아연을 결합시키는 단계; 담배 식각 바이러스(Tobacco Etch Virus; TEV) 프로테아제(protease)를 처리하여 상기 수용성 향상 태그를 제거하는 단계; 및 상기 수용성 향상 태그가 제거된 인간 EC-SOD 재조합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 인간 EC-SOD 재조합 단백질 생산방법을 제공한다. 상세하게는 상기 인간 EC-SOD 재조합 단백질은 전체 길이가 발현된 인간 EC-SOD 재조합 단백질(rhEC-SOD) 또는 C-말단의 헤파린 결합 도메인(heparin binding domain; HBD)이 절단된 인간 EC-SOD 재조합 단백질(rhEC-SOD^{△HBD})인 것을 특징으로 한다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 수용성 향상 태그는 말토스 결합 단백질(Maltose Binding Protein, MBP), N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance Protein A; NusA) 또는 인간 단백질 이황화물 이성질화효소(human protein disulfide isomerase; hPDI)인 것을 특징으로 한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 생산방법에 의해 생산된 전체 길이가 발현된 인간 EC-SOD 재조합 단백질(rhEC-SOD) 또는

인간 EC-SOD^{△HBD} 재조합 단백질(rhEC-SOD^{△HBD})을 제공한다.

[0021] 본 발명에서 사용한 유전공학적인 기술과 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

[0022] 본 발명은 인간 EC-SOD 재조합 단백질의 대장균 내 수용성 과발현 및 정제방법에 관한 것으로서, MBP, NusA 및 PDI 태깅을 통해 대장균 내에서 수용성으로 과발현시키고, MBP 태깅된 hEC-SOD의 정제에 대한 것이다. 이렇게 얻어진 인간 EC-SOD 단백질은 각종 질병에 관련된 활성산소의 하나인 슈퍼옥사이드(superoxide)를 제거하는 역할을 하므로, 바이오의약품의 좋은 후보물질이 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 His6-MBP-hEC-SOD의 발현벡터 제작과정을 나타내고, 도메인 구조를 도식적으로 표현하였다. (A) 전체 길이(시그널 펩타이드 제외: -18~0) 및 헤파린 결합 도메인(heparin binding domain; HBD)이 잘린 EC-SOD에 있어서, EC-SOD 서열상 모든 시스테인을 표시하였다. aEC-SOD 및 iEC-SOD의 이황화결합(disulfide bridge) 패턴을 표시하였다. (B) 전체 크기의 His6-, Trx-, GST-, MBP-, NusA- 및 hPDI-hEC-SOD 6개 융합 단백질에 대한 모식도를 나타낸다. 화살표는 TEV 단백질 분해효소의 절단 위치를 나타낸다. (C) pHMGWA-His6-MBP-TEVrs-hEC-SOD의 벡터 개열지도도를 나타낸다. *E. coli* 내에서 융합 단백질의 발현은 IPTG 유도성 T7 프로모터에 의해 조절되고, 선택마커는 암피실린(ampicillin; Amp(R))이다.

도 2는 *E. coli* 에서 SDS-PAGE를 사용하여 6개의 여러 태그들이 융합된 rhEC-SOD의 발현을 분석한 것이다. 시그널 펩타이드를 포함하는 전체 길이가 hEC-SOD(A) 및 HBD 잘려진 hEC-SOD(B)의 발현은 0.5mM IPTG에 의해 37℃ 및 18℃에서 유도되었다. His6, 헥사(폴리)히스티딘(hexa(poly)histidine); Trx, 티오레독신(thioredoxin); GST, 글루타치온-S-트랜스퍼라제(Glutathione-S-transferase); MBP, 말토스 결합 단백질(maltose binding protein); NusA, N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance protein A); hPDI, 전체길이의 인간 PDI; M, 분자량 사이즈 마커(molecular weight size marker); C, 음성대조구로서 IPTG 유도 전의 총 세포 단백질; T, IPTG 유도 후의 총 세포 단백질; S, 세포 초음파 처리 후의 수용성 상등액.

도 3은 *E. coli*에서 rhEC-SOD의 분리 과정에 대한 SDS-PAGE 분석 결과를 나타낸다. (A) *E. coli*로부터 His-MBP-hEC-SOD가 MBP 친화, 양이온 교환 및 헤파린 컬럼의 조합을 통해 분리되었다. 레인 5는 MBP 태그가 거의 완전히 절단된 것을 보여준다. M, 분자량 마커; 레인 1, 음성대조구로서 IPTG 유도 전의 총 세포; 레인 2, IPTG와 함께 처리된 총 세포; 레인 3, 세포 초음파 처리 후의 수용성 분획; 레인 4, 말토스 친화 및 Q Sepharose chromatography를 사용하여 분리한 His-MBP-hEC-SOD 융합 단백질(69.8 kDa); 레인 5, TEV 단백질 분해효소로 절단된 His-MBP 태그: His-MBP (44.8 kDa) 및 rhEC-SOD (25 kDa); 레인 6, 최종 분리된 rhEC-SOD (25 kDa). (B) rhEC-SOD 분리 과정을 나타내는 모식도이다. 분리된 rhEC-SOD의 효소 활성은 MBP 태그 절단 전 또는 후의 Cu/Zn 금속 치환 단계에 따라 비교되었다.

도 4는 *E. coli*로부터 분리된 hEC-SOD의 MALDI-TOF MS 분석결과를 나타낸다. (A) hEC-SOD의 트립신 처리 펩타이드 지도(222 aa). 환원 조건(B, D) 및 비환원 조건(C, E)에서 각각 분리된 hEC-SOD¹(B, C) 및 hEC-SOD²(D, E). ¹태그 절단 후에 최종 분리 단백질로 Cu/Zn 치환, ²태그 절단 전에 Cu/Zn 치환.

도 5는 hEC-SOD의 이황화 결합에 의한 단량체화를 나타낸다. 0-10mM DTT 처리된 hEC-SOD는 비환원 조건 및 분석용 크기별 배제 컬럼(analytic size-exclusion column)을 사용하여 웨스턴 블랏 분석을 통해 분석하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0025] <실시예 1> 여러 융합 단백질을 이용한 *E. coli* 에서 수용성 형태로서 EC-SOD의 발현

[0026] 1. 플라스미드 제작 및 균주에서의 발현

[0027] N-말단 부근에 다양한 융합 단백질을 가진 pET22b-기반 목적 벡터가 발현 스크리닝을 위해 사용되었다(Anal. Biochem. (2005) 343:313-321). 엔트리벡터를 제작하기 위해서, EC-SOD 유전자(연세대학교 간호대학 이향규 교수님 제공)를 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 포워드 프라이머 5'-accgcgccgcttgacggcgaggactcg-3'(서열번호 6) 및 리버스 프라이머 5'-ggctctagatcaggcgcccttgactcgctc-3'(서열번호 7) 또는 C-말단의 13개 아미노산이 잘린 EC-SOD 증폭을 위한 리버스 프라이머 5'-ggctctagatcactctgagtgtctcccgccc-3'(서열번호 8)가 사용되었다. PCR 반응은 PTC-200 DNA Engine (MJ 84 Research, Waltham, MA, USA)을 이용하여 98℃, 30초 동안의 변성 과정, 55℃, 30초 동안의 결합 과정 및 72℃, 30초 동안의 중합 과정을 30 사이클 반복하여 수행하였다. PCR 산물은 Not I 및 Xba I으로 처리한 후에, pENTR-His-ccdB 플라스미드에 붙였다(Plasmid. (2003) 49:179-183). EC-SOD로부터 융합 파트너를 분리하기 위해서, TEV 단백질 분해효소 인식 사이트(TEV protease recognition site; TEVrs)를 EC-SOD 서열의 앞에 삽입하였다. 전체 길이 및 잘려진 EC-SOD는 게이트웨이 시스템에 의해 pHGWA (His6-), pHXGWA (His6-Trx-), pHGGWA (His6-GST-), pHMGWA (His6-MBP-), pHNGWA (His6-NusA-) 발현 벡터에 클로닝되었고(Invitrogen, CA, USA), *Escherichia coli* BL21(DE3) 균주에 각각 형질전환되었다. hPDI 태그된 EC-SOD 구조체를 위해서, Epoch사에서 합성한 *E. coli*와 *B. subtilis* 발현을 위해 코돈을 최적화시킨 hPDI(pBSK-hPDI)를 SacI/KpnI (Enzymomics, Daejeon, Korea)으로 처리하였고, pDEST-OGWA 벡터에 서브클로닝되었다. 이는 pDEST-PGWA로 명명되었으며, *E. coli* BL21(DE3) 균주에 형질전환되었다.

[0028] 모든 형질전환체는 37℃로, 앰피실린(50ug/ml)이 포함된 LB 배지에서 0.D.₆₀₀이 0.3~0.4에 도달할 때까지 배양하였다. 그 후, 세포들은 0.5mM 이소프로필 1-티오-β-d-갈락토피라노사이드(isopropyl 1-thio-β-d-galactopyranoside)로 30℃에서 3시간 동안 유도되었다. 세포들은 원심분리에 의해 수확되고, 사용 전까지 동결되었다.

[0029] 2. 결과

[0030] 여러 융합 파트너들이 *E. coli*에서 단백질의 발현 및 접힘(folding)에 도움을 준다는 사실이 알려졌기 때문에, 본 발명자들은 5개의 잘 알려진 융합 단백질들, 말토스 결합 단백질(maltose binding protein; MBP), N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance Protein A; NusA), 티오레독신(thioredoxin; Trx), 글루타치온-S-트랜스퍼라제(Glutathione-S-transferase; GST) 및 단백질 이황화물 이성질화효소(Protein Disulfide Isomerase; PDI)를 전체길이 및 잘려진 EC-SOD의 N-말단에 게이트웨이 시스템(Invitrogen, CA, USA)을 이용하여 결합하였다(도 1b 및 도 1c). His6는 모든 종류의 태그 단백질의 N-말단에 삽입되었다. 이러한 5개의 태그들 사이에서, 3개의 태그들(즉, MBP, NusA, and PDI)은 융합 단백질이 수용성이었다(도 2A 및 표 1). MBP-hEC-SOD의 발현 수준 및 용해도는 각각 75.1% 및 86.7%였다. 총 용해도는 NusA-태그된 hEC-SOD의 85.4% 또는 hPDI-태그된 hEC-SOD의 83.2%보다 약간 높았다. 또한, MBP 태그의 크기(40.3 kDa)는 NusA (54.9 kDa) 및 hPDI (55.1 kDa) 보다 작았다. 그래서 MBP 태그는 다른 것들과 비교했을 때, 높은 용해도 및 분리의 편리성으로 인해 가장 적합한 것으로 판명되었다. 따라서, MBP 태그된 EC-SOD가 분리 및 후속 연구를 위해 세 개의 태그들(MBP, NusA 및 hPDI) 사이에서 선택되었고, 이는 hEC-SOD 단백질의 수용성 발현을 가능케 하였다.

표 1

[0031]

		태그 크기 (kDa)	융합 단백질 크기 (kDa)	발현 수준 (%)	용해도 (%)
hEC-SOD (24.1 kDa)	His6 ⁻¹	0.8	29.5	77.2	22.9
	His6-Trx-	11.8	41.3	77.0	25.7
	His6-GST-	25.7	55.2	42.4	60.4
	His6-MBP-	40.3	69.8	75.1	86.7
	His6-NusA-	54.9	84.3	70.5	85.4
	His6-hPDI-	55.1	86.7	77.3	83.2

hEC-SOD ^{△HBD} (22.6 kDa)	His6 ⁻¹	0.8	26.0	80.9	6.0
	His6-Trx-	11.8	37.8	87.9	11.9
	His6-GST-	25.7	51.7	76.9	12.9
	His6-MBP-	40.3	66.3	91.8	85.0
	His6-NusA-	54.9	80.9	88.3	81.8
	His6-hPDI-	55.1	81.3	82.6	82.7
hEC-SOD-C195S	His6-MBP-	40.3	69.8	74.7	88.8

[0032] ¹TEVrs 제외

[0033] 전체 길이의 인간 EC-SOD는 222개의 아미노산으로 구성되었다(N-말단의 신호 펩타이드 제외-18개 아미노산). 조직으로부터 분리되었을 때, EC-SOD는 두 가지 형태로 존재한다(J. Biol. Chem. (1999) 274:14818-14822; J. Biol. Chem. (2004) 279:22152-22157). 1) 온전한 EC-SOD 및 2) 분비되기 전에 두 개의 단백질 분해효소에 의해 세포 내에서 C-말단의 13개 아미노산이 절단된 잘려진 EC-SOD. 절단된 C-말단은 헤파린 결합 도메인(heparin binding domain; HBD) 및 이합체화(dimerization)를 위한 분자 간 이황화 결합에 관련되어 있는 Cys219를 포함한다(도 1a)(Biochemistry (Mosc). (2002) 41:3168-3175; Biomed. Pharmacother. (2005) 59:175-182). 그리고 상기 잘려진 부분은 세포 외 매트릭스(extracellular matrix)에서 EC-SOD의 분포 및 형태를 조절한다. 본 발명자들의 이전 연구에서는, His6-태그된 잘려진 EC-SOD가 불용성이라는 것을 알아냈다. 또한, HBD 절단 EC-SOD(HBD truncated EC-SOD; EC-SOD^{△HBD})는 우리 신체에서 다른 분포를 갖고, 다른 단백질 치료의 다른 표적이 될 수 있기 때문에, 본 발명자들은 태그들이 EC-SOD^{△HBD}의 용해도에 어떤 영향을 미치는지 시험하였다. 그 결과, 세 개의 태그들, 즉, MBP, NusA 및 PDI가 hEC-SOD 전체길이와 같은 정도로 EC-SOD^{△HBD}를 수용성으로 만들 수 있다는 것을 알아냈다(도 2B).

[0034] <실시예 2> 수용성 hEC-SOD 분리 및 SOD 효소 활성 측정

[0035] 1. 재조합 EC-SOD의 분리

[0036] MBP 태그된 EC-SOD의 세포 펠렛은 부유 완충액(20mM Tris-HCl, pH 8.0, 단백질 분해효소 억제자 칵테일(EDTA-free, Roche), 5% 글리세롤, 0.1% Triton-X100)에 부유되었고, 초음파처리(Vibra-Cell Ultrasonic Processor)에 의해 얼음에서 용해되었다. 전체 용해물은 세포 찌꺼기를 제거하기 위해서, 4℃, 12,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하였다. 상등액을 MBP Trap HP 컬럼(GE Healthcare Life Sciences)에 적용하였는데, 완충액 A(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 5% 글리세롤, 1 mM DTT)로 전평형화하였다. 로딩 후에, 컬럼은 5 컬럼 부피의 완충액 A로 씻어냈고, 완충액 B(20 mM 말토스가 첨가된 완충액 A)로 녹였다. 그 후, 5% 글리세롤 및 1 mM DTT가 포함된 20 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 투석한 후, 녹여진 샘플을 HiTrap Q HP 음이온-교환 컬럼(GE Healthcare Life Sciences)에 로딩하였다. His6-MBP-EC-SOD은 같은 완충액에 0-1M NaCl의 선형 구배(linear gradient)로 녹여서 분리되었다. 4.0 ml의 분획을 매 2분 마다 수집하였고, 280nm에서 관찰하였다. 300-400 mM의 NaCl에 녹인 각 분획을 함께 모으고, 염(salt) 농도를 감소시키기 위해서 희석하였다. His6-MBP와 EC-SOD 사이에 TEV 절단 사이트(ENLYFQ/G)를 포함한 His6-MBP-EC-SOD 융합 단백질을 2ug을 1ug의 TEV 단백질 분해효소로 18℃에서 16시간 동안 처리하였다. 처리된 기질을 HiTrapTM Heparin HP 컬럼(GE Healthcare Life Sciences)을 통해 더 분리하였는데, 완충액 C (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5% 글리세롤, 1 mM DTT)로 전평형화하거나 또는 잘려진 EC-SOD를 위해 HiTrap Q HP 음이온 교환 컬럼(GE Healthcare Life Sciences)으로 다시 처리하였다. EC-SOD는 컬럼에 결합하였고, 같은 완충액에서 300-500mM 농도의 NaCl에 녹였다. 최종 단백질은 >95% 분리되었고, 상기의 모든 단계는 SDS-PAGE에 의해 판단되었다.

[0037] 2. hEC-SOD의 Cu/Zn 결합

[0038] hEC-SOD에 Cu/Zn 결합을 위해서, 분리된 재조합 hEC-SOD(또는 MBP-hEC-SOD)가 단백질 안정화를 위해서 먼저 완

충액 D(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 500 mM L-Arg, 5 mM DTT)에 투석되었다. 두 번째로, 완충액 Zn(50μM 아연(10배 몰비)이 첨가된 완충액 C)에 투석되었고, 그 후, 완충액 Cu/Zn(50μM 구리(10배 몰비)가 첨가된 완충액 Zn)에 투석되었다. 마지막으로, 구리, 아연 및 DTT는 Hiprep™ Desalting 26/10 컬럼(GE healthcare)을 통해 완충액으로부터 제거하였다.

[0039] 3. hEC-SOD 활성에 대한 시험관 내(*in vitro*) 효소 측정

[0040] 재조합 인간 EC-SOD의 활성은 WST-1 방법을 사용하여 측정하였다(J. Immunol. Methods. (2000) 238:59-68). 분리된 EC-SOD는 최종 농도 0.05M의 소듐 카보네이트(sodium carbonate)(pH 9.0), 1.0 U 카탈라아제(catalase), 10^{-4} M 잔틴(xanthine), 5.6×10^{-6} M WST-1, 3.7 mU 잔틴 옥시다아제(xanthine oxidase)가 포함된 반응 혼합물과 함께 25°C, 20분 동안 분광광도계의 격실(cell compartment)에서 반응시켰고, 450nm에서 관측하였다. SOD1 단백질(Worthington)의 알려진 농도로부터 같은 실험을 하는 동안의 표준 곡선을 만들기 위해서, 블랭크-기질 샘플(blank-subtracted sample)의 EC-SOD 활성을 참조로 측정하였다.

[0041] 4. 전기영동 및 웨스턴 블랏(Western blot)

[0042] 단백질들은 SDS-PAGE 겔에서 분리되었다. 단백질 샘플은 20 mM DTT가 포함된 샘플 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS (w/v), 0.04% 쿠마시 브릴런트 블루(Coomassie Brilliant Blue), 2% 글리세롤 (v/v))으로 100°C에서 10분 동안 변성시켰다. 샘플들은 10% 폴리아크릴아미드(polyacrylamide) 겔에 로딩되었다. 단백질 밴드들은 쿠마시 블루 염색(Coomassie blue staining)에 의해 확인되었고, ImageJ 프로그램(Wayne Rasband, <http://imagej.nih.gov/ij>)에 의해 분석되었다.

[0043] 분리된 EC-SOD는 12% 글리신 SDS-PAGE 겔에 의해 분획화된 후, PVDF 멤브레인(Pall Corp.)에 옮겨졌다. 옮긴 후에, 멤브레인은 10분 동안 TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween)로 씻어냈고, 멤브레인의 비특이적 사이트는 TBST에 녹인 5% 스킵 밀크 분말(skim milk powder)로 30분 동안 차단하였다. 차단 후에, 멤브레인은 5% 스킵 밀크 분말(skim milk powder)가 포함된 TBST에 녹인 단일클론 항-SOD3 항체(1:10000)(labfrontier, cat. LF-MA0121)와 함께 4°C에서 하룻밤 동안 처리하였다. 그리고 난 후, TBST로 세 번 씻어냈고, 멤브레인은 2차 항체(1:5000, horseradish peroxidase (HRP) conjugated Anti-Mouse IgG, VECTOR)로 상온에서 90분 동안 처리하였다. 멤브레인은 1×TBST로 씻어냈고, picoEPD (Elpis Biotech)로 각각 확인하였다.

[0044] 5. 결과

[0045] N-말단에 MBP-태그된 hEC-SOD는 MBP 친화 및 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 분리되었다(도 3, 라인 4). hEC-SOD는 HiTrap™ Heparin HP 컬럼을 통해 태그로부터 거의 완전히 분리되었고(도 3, 라인 5), 매우 순수한 hEC-SOD를 얻었다(1리터 당 ~0.6mg)(도 3, 라인 6). rhEC-SOD의 모든 분리 단계는 SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏 분석을 통하여 확인하였다.

[0046] Cu 및 Zn이 결합된 hEC-SOD의 효소 활성을 측정하였다(표 2). MBP-hEC-SOD는 모두 SOD 활성을 나타내지 않았고, 심지어는 금속 결합 단계 후에도 SOD 활성을 나타내지 않았기 때문에, hEC-SOD의 N-말단에 융합된 MBP는 효소 기능을 방해하는 것으로 나타났다. 수용화된 hEC-SOD의 최종 효소 활성은 124.7 ± 1.63 U/mg 이었다. 이는 재접힘된 EC-SOD의 48.6 ± 1.20 U/mg 보다 높은 수치이고, 심지어는 본 발명자들의 이전 연구와 비교해서 재접힘으로 얻은 hEC-SOD의 활성형태 돌연변이(ref-hEC-SOD-C195S)의 80.7 ± 2.76 U/mg 보다 더 크다. 그리고 MBP 융합으로부터 분리된 hEC-SOD 돌연변이(sol-hEC-SOD-C195S)의 수용화된 활성 형태인 121.6 ± 3.59 U/mg와 유사하다. 흥미롭게도, Cu 및 Zn을 TEV 단백질 분해효소에 의한 MBP 태그 절단 전에 결합시킬 때, hEC-SOD의 효소 활성이 MBP 태그 절단 후에 Cu/Zn 첨가된 hEC-SOD의 수치인 72.6 ± 1.54 U/mg 보다 높았다.

표 2

[0047]

효소	발현 형태	특이적 활성 (U/mg)
Apo hEC-SOD	수용성 형태	7.4 ± 2.14

hEC-SOD ¹	수용성 형태	72.6 ± 1.54
hEC-SOD ²	수용성 형태	124.7 ± 1.63
Apo MBP-hEC-SOD	수용성 형태	10.5 ± 0.16
MBP-hEC-SOD ³	수용성 형태	17.9 ± 0.41
hEC-SOD-C195S ²	수용성 형태	121.6 ± 3.59
His6-hEC-SOD ³	봉입체 (Inclusion body)	10.6 ± 2.81
His6-hEC-SOD ⁴	봉입체 (Inclusion body)	48.6 ± 1.20
His8-hEC-SOD ^{ΔHBD4}	봉입체 (Inclusion body)	58.1 ± 1.20
His8-hEC-SOD ^{ΔHBD} -C195S ⁴	봉입체 (Inclusion body)	80.7 ± 2.76

[0048] ¹태그 절단 후에 최종 분리 단백질로 Cu/Zn 치환

[0049] ²태그 절단 전에 Cu/Zn 치환,

[0050] ³최종 분리 단백질로 Cu/Zn 치환,

[0051] ⁴분리 도중 Cu/Zn 치환

[0052] 한편, EC-SOD의 Cu/Zn 치환을 준비하기 위해서, 아연 및 구리가 포함된 버퍼들에 차례차례 투석되는 동안에, 최종 완충액 조건(완충액 C; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5% 글리세롤, 1 mM DTT)은 침전을 줄이고 단백질 상태를 안정화시키기 위한 NaCl 및 L-Arg가 첨가된 완충액 D로 변경되었다(EMBO J. (1997) 16:2171-2178; J. Mol. Biol. (2006) 356:1152-1162; Anal. Chem. (2008) 80:8246-8252). 이는 Cu²⁺/Zn²⁺와 결합하지 않은 apo-EC-SOD는 매우 불안정하기 때문이다. 효소 활성은 오직 Cu 및 Zn이 DTT 존재 하에서 투석에 의해 결합 되었을 때에만 검출되었고, 그 후 완충액으로부터 DTT가 제거되었다. 그러나, EC-SOD의 Cu/Zn 결합 도중에 완충액에 DTT가 포함되지 않으면 EC-SOD의 효소 활성은 검출할 수 없었다. 5 mM의 DTT는 시험관 내에서(*in vitro*) hEC-SOD의 촉매 사이트를 유연하게 만드는 데 필요한 것으로 나타났다.

[0053] 본 발명자들은 ICP-MS에 의해 EC-SOD에 Cu/Zn가 결합하는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 기초로, 금속 결합 과정 후에, hEC-SOD 단량체 1 몰은 3.6 몰의 구리 및 0.54 몰의 아연을 포함한다는 것을 알아냈다(표 3).

표 3

[0054] 분리된 hEC-SOD의 금속 원소의 농도(ppb=ug/kg)

	Ni	Cu	Mn	Zn
Apo hEC-SOD	5.3	4.1	1.2	4.8
hEC-SOD with Cu/Zn	10.5	279.2	0.8	42.6

[0055] 질량 분해능(mass Resolution) : 0.3-3.0 amu

[0056] <실시예 3> MALDI-TOF MS 분석에 의한 rhEC-SOD의 확인

[0057] 1. MALDI-TOF 질량 분석

[0058] 트립신에 의해 샘플을 처리하기 위해, 10ug의 분리된 rEC-SOD 단백질을 10%(v/v) 트리클로로아세트산

(trichloroacetic acid; TCA)으로 침전시켰고, 20 mM 이오도아세트아미드(Iodoacetamide; IAA)(sigmaUltra, Sigma-Aldrich)로 상온에서 1시간 동안 처리하였다. 그리고, IAA(sigmaUltra, Sigma-Aldrich)로 알킬화시킨 후, 비-환원 트리신 젤(non-reducing tricine gel)에 로딩하였다. 표적 단백질을 포함하는 추출된 젤 단편은 완충액을 포함하는 200 mM 암모늄 하이드로젠 카보네이트(Ammonium Hydrogen carbonate)로 추출하였고, 그 후 서열분석 등급 개량 트립신(Sequencing Grade Modified Trypsin)(Promega)으로 37℃에서 하룻밤 동안 처리하였다.

[0059] MALDI-TOF MS 분석은 Voyager-DE Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems Inc., CA, USA)을 사용하여 수행되었다. 반사 모드-레이저 강도(reflector mode-laser intensity) 2,000 ~ 3,000V, 펄스 지연 시간(pulse delay time) 120 nsec, 가속 전압(acceleration voltage) 20,000 V 에서 분석을 수행하였고, 데이터는 각 스펙트럼마다 평균을 냈다. 최종농도 0.05%(v/v) TFA를 포함하는 탈이온수와 50% 아세토나이트릴(acetonitrile)에 녹인 α -CHCA가 매트릭스 용액으로 사용되었다. 0.5 μ l의 샘플과 매트릭스 혼합 용액(1:1 v/v)을 스테인레스 철 용기에 보관하였고 공기 중에서 건조시켰다. 데이터는 Biospectrometry Workstation software를 이용하여 분석하였다.

[0060] 금속 이온을 정량하고 hEC-SOD가 Cu^{2+} , Zn^{2+} 및/또는 다른 금속 이온들로 치환되었는지 확인하기 위한, 유도 결합 플라즈마 질량분석(inductively coupled plasma-mass spectrometry; ICP-MS)는 서울대 농생명과학공동기원(National Instrumentation Center for Environmental Management; NICEM)에 요청하였다.

[0061] 2. 결과

[0062] 분리된 rhEC-SOD를 확인하기 위해서, MALDI-TOF MS 분석을 환원 및 비환원 조건에서 수행하였다. 분리된 rhEC-SOD의 MALDI-TOF MS 분석은 대부분의 트립신 처리에 의한 펩타이드 질량이 rhEC-SOD와 관련되어 있는 것으로 나타났다(도 4). 10 mM DTT로 처리된 환원조건의 hEC-SOD에서, IAA로 변형된 Cys45, Cys107, Cys189/Cys190/Cys195 및 Cys219를 포함하는 4개의 단편이 발견되었다. 즉, T4 + IAA (2537.1 Da), T8 + IAA (4491.1 Da), T13 + 3IAA (1832.8 Da) 및 T15 + IAA (652.2 Da)이다. 처음에, 구리 및 아연을 분리된 rhEC-SOD에 완전히 결합시켰고, 그 후, MALDI-TOF MS 데이터를 수집하였다. EC-SOD의 Cys107 및 Cys219의 피크는 비변성 hEC-SOD로 이동하였고, 상기 시스테인 잔기는 이황화 결합에 관여하는 것으로 확인되었다. 또한, T13 트립신 처리 펩타이드 피크는 사라졌다. 그러나, hEC-SOD N-말단의 Cys45 잔기는 여전히 비환원 조건에서는 존재했고(도 4C), 이는 금속과 결합하지 않은 상태에서 MBP와 분리된 hEC-SOD의 시스테인이 자유롭다는 것을 의미한다. 또한 본 발명자들은 Cys45의 상태를 조사하기 위해서, 금속 결합 과정 없이 MBP 융합된 hEC-SOD의 MALDI-TOF MS 데이터를 얻었다. 그 결과, MBP-hEC-SOD에 있는 Cys45가 이황화 연결 형성에 관여한다는 것을 밝혀냈다. 따라서, TEV에 의한 MBP의 단백질 분해 절단이 Cys45-Cys190의 이황화 결합을 불안정하게 한다는 사실이 명백하다. 결국, 구리 및 아연은 MBP-hEC-SOD에 먼저 결합되고 난 후, MBP는 TEV에 의해 절단되었다. 이 경우, MALDI-TOF MS는 Cys45가 이황화 결합을 유지한다는 것을 나타낸다(도 4D 및 E). Cys219s (1188.47 Da or 1500.68 Da) 사이의 분자간 이황화 결합의 단편은 sol-hEC-SODs의 모든 다른 조건에서도 검출되었다.

[0063] <실시예 4> 분자간 이황화 결합을 통한 8량체(octamer)를 형성하는 sol-hEC-SOD의 분리

[0064] 1. hEC-SOD의 DTT 적정

[0065] 분리된 rhEC-SOD는 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 500 mM L-Arg에 녹인 여러 농도의 DTT(0-10mM)로 4℃에서 30분 동안 처리되었다. 4℃에서 10분 동안 10% 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid; TCA) 처리하여 원심분리하고 상등액을 버린 후에 펠렛은 재부유되었고, 0.5 M Tris-HCl (pH8.0), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2% SDS, 5% 글리세롤에 녹인 20 mM 이오도아세트아미드(iodoacetamide; IAA)(sigmaUltra, Sigma-Aldrich)로 25℃에서 1시간 동안 알킬화되었다. 모든 샘플은 비환원 샘플 완충액(DTT 제외)으로 재부유되었고, 10% SDS-PAGE 젤에 로딩되었고, 쿠마시 브릴런트 블루(Coomassie Brilliant Blue)로 염색되었다.

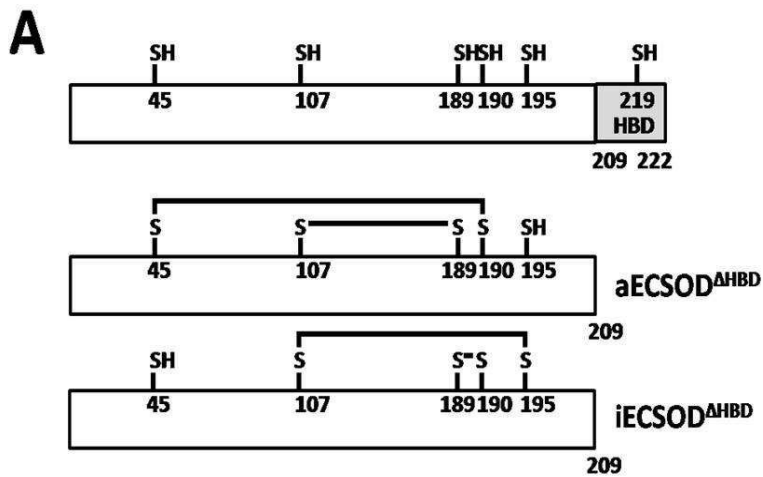
[0066] 2. 결과

[0067]

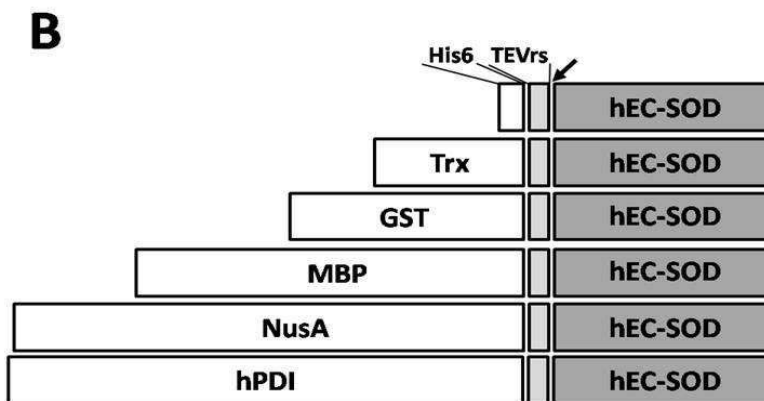
EC-SOD의 다중합체화를 확인하기 위해서, 본 발명자들은 완충액 E(20mM Tris-HCl, pH 8.0, 5% 글리세롤) 및 DTT 적정된 일반적인 이동상을 사용하여 젤 여과 크로마토그래피를 수행하였다. 최종 분리된 hEC-SOD는 완충액 E로 평형화된 HiLoad 26/100 Superdex-200 HR (GE Healthcare)에 로딩하였다. 그 결과, 분리된 hEC-SOD는 적어도 8량체인 것을 알아냈다. 또한 DTT 적정은 7 및 10% SDS-PAGE 분석으로 수행하였다(도 5). 비환원 sol-hEC-SOD는 8량체 크기인 240 kDa에서 검출되었다. DTT 처리시, 단량체 및 이량체 밴드가 진하게 나타났고, 10 mM 농도의 DTT에서는 30 kDa hEC-SOD의 단량체가 70%, 60 kDa의 이량체가 30%로 존재했다. 이는 8량체 hEC-SOD의 분자간 이황화 결합이 환원제에 의해 깨지지만, 여전히 hEC-SOD의 이량체 형성에 몇몇 다른 상호작용이 부분적으로 존재한다는 것을 나타낸다.

도면

도면1a

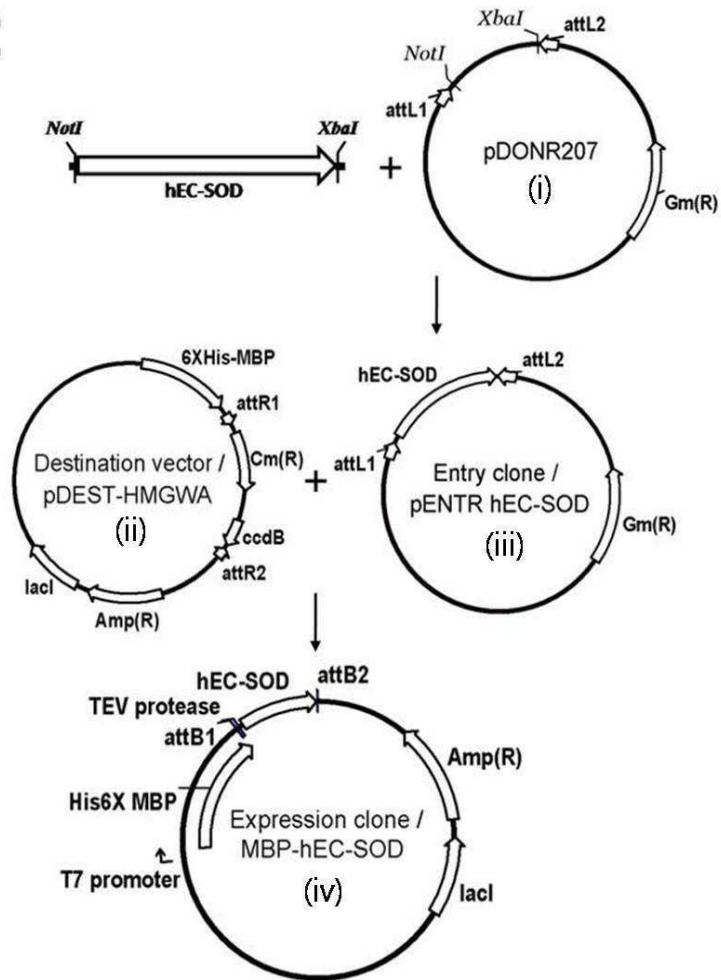


도면1b

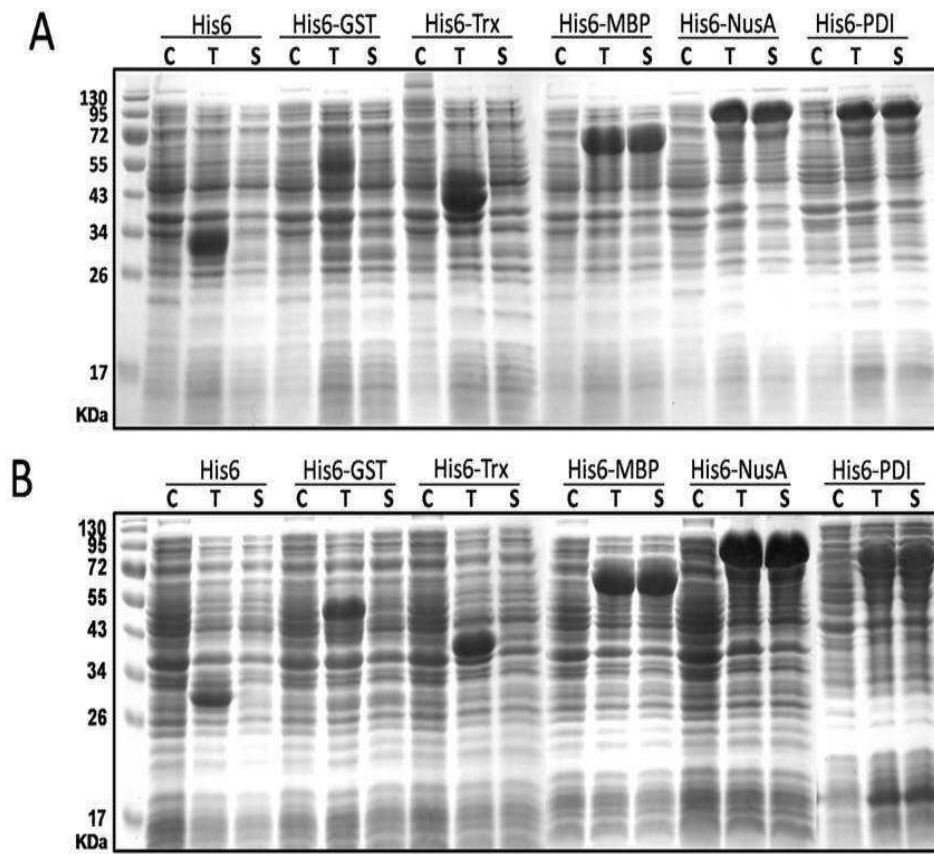


도면1c

C

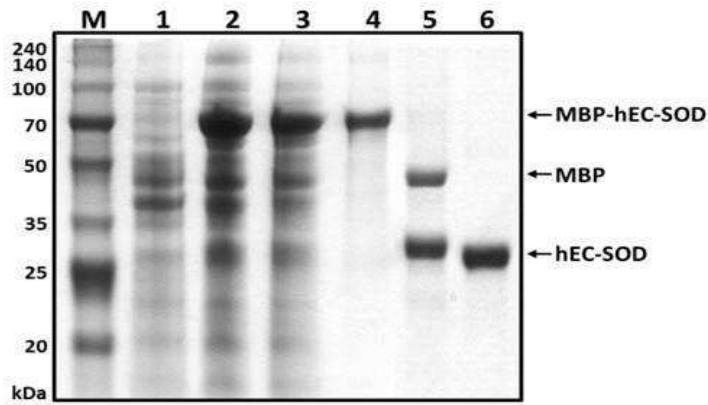


도면2

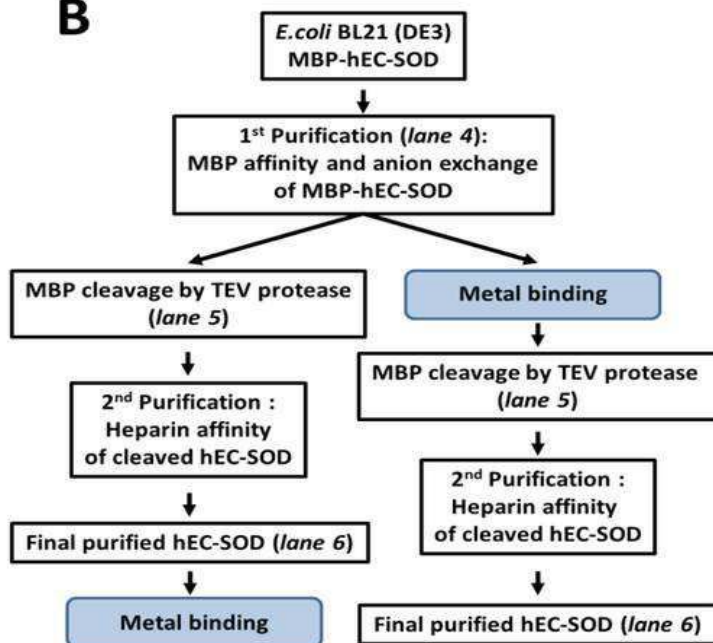


도면3

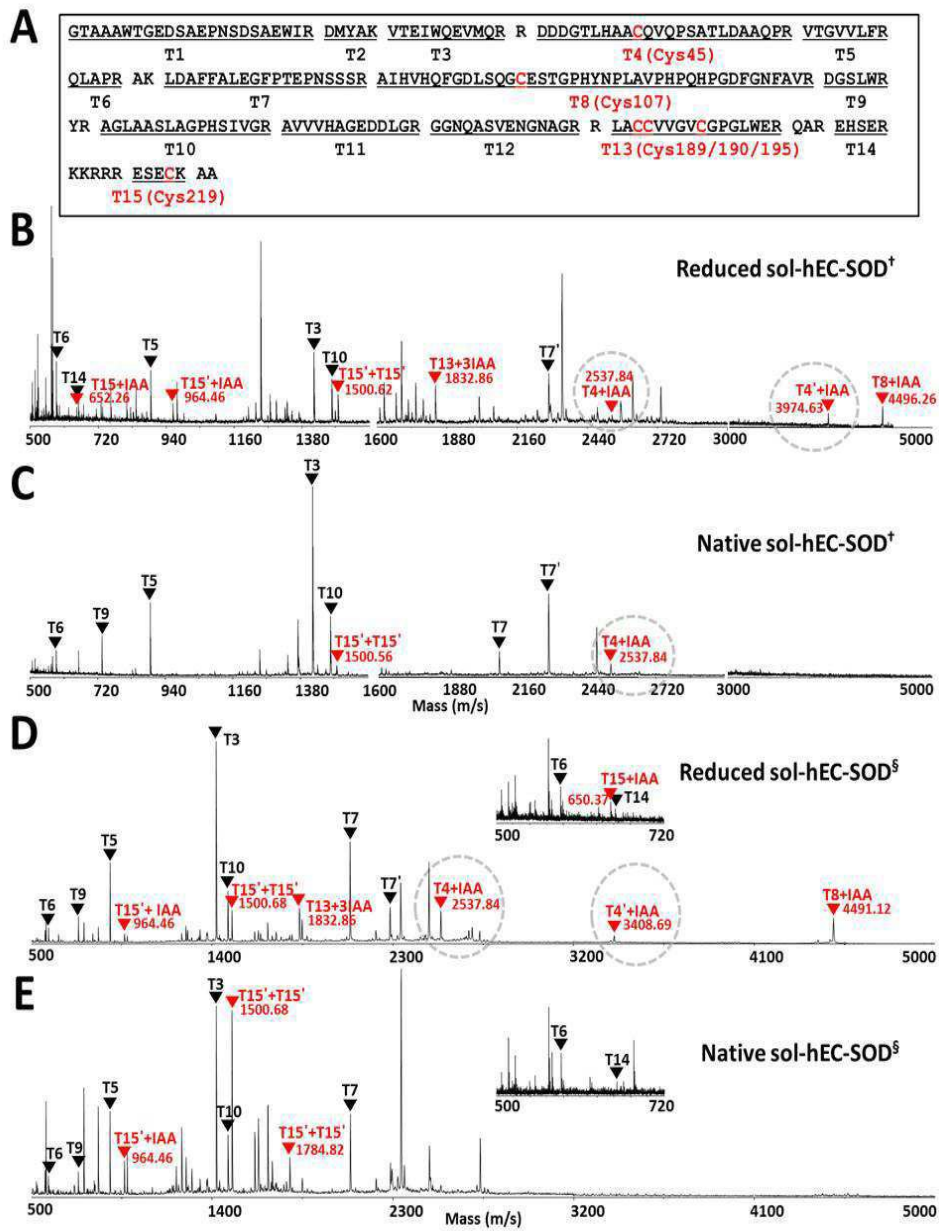
A



B

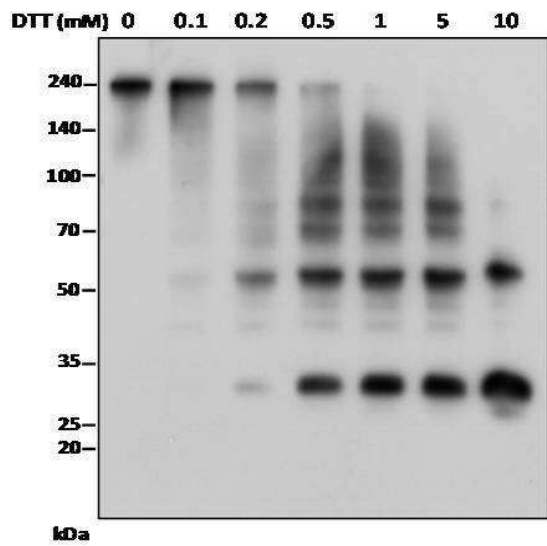


도면4

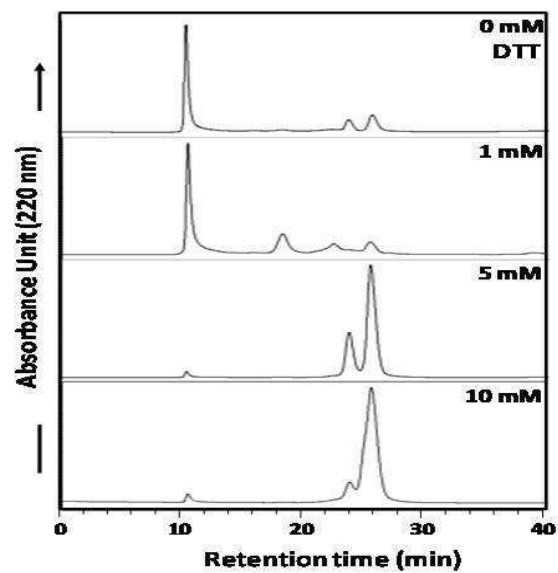


도면5

A



B



서열 목록

- <110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
- <120> Soluble overexpression and purification method of biological
active recombinant human EC-SOD in Escherichia coli
- <130> DP-2012-0437
- <160> 8
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 669

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

tggacgggcg aggactcggc ggagcccaac tctgactcgg cggagtggat ccgagacatg	60
tacgccaagg tcacggagat ctggcaggag gtcattgcagc ggccgggacga cgacggcacg	120
ctccacgccg cctgccaggt gcagccgtcg gccacgttgg acgccgcgca gccccgggtg	180
accggcgtcg tctctttccg gcagcttgcg ccccgcgcca agctcgacgc cttcttcgcc	240
ctggagggtt tcccgaccga gccgaacagc tccagccgcg ccatccacgt gcaccagttc	300
ggggacctga gccagggtcg cgagtcacc ggccccact acaaccgct ggccgtgccg	360
caccgcagc acccgggcga cttcggcaac ttgcggtcc gcgacggcag cctctggagg	420
taccgcgcg gcctggccgc ctgcctcgcg ggcccgact ccatcgtggg ccgggcccgtg	480
gtcgtccacg ctggcgagga cgacctgggc cgcggcgga accaggccag cgtggagaac	540
gggaacgcgg gccggcggtt ggcctgctgc gtggtggcg tgtgcgggcc cgggctctgg	600
gagcgccagg cgcgggagca ctcagagcgc aagaagcggc ggccgcgagag cgagtgcgaag	660
gccgcctga	669

<210> 2

<211> 627

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

tggacgggcg aggactcggc ggagcccaac tctgactcgg cggagtggat ccgagacatg	60
tacgccaagg tcacggagat ctggcaggag gtcattgcagc ggccgggacga cgacggcacg	120
ctccacgccg cctgccaggt gcagccgtcg gccacgttgg acgccgcgca gccccgggtg	180
accggcgtcg tctctttccg gcagcttgcg ccccgcgcca agctcgacgc cttcttcgcc	240
ctggagggtt tcccgaccga gccgaacagc tccagccgcg ccatccacgt gcaccagttc	300
ggggacctga gccagggtcg cgagtcacc ggccccact acaaccgct ggccgtgccg	360
caccgcagc acccgggcga cttcggcaac ttgcggtcc gcgacggcag cctctggagg	420
taccgcgcg gcctggccgc ctgcctcgcg ggcccgact ccatcgtggg ccgggcccgtg	480
gtcgtccacg ctggcgagga cgacctgggc cgcggcgga accaggccag cgtggagaac	540
gggaacgcgg gccggcggtt ggcctgctgc gtggtggcg tgtgcgggcc cgggctctgg	600
gagcgccagg cgcgggagca ctcagag	627

<210> 3
 <211> 1098
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Maltose Binding Protein(MBP)
 <400> 3
 aaaactgaag aaggtaaact ggtaatctgg attaacggcg ataaaggcta taacggtctc 60
 gctgaagtcg gtaagaaatt cgagaaagat accggaatta aagtcaccgt tgagcatccg 120
 gataaactgg aagagaaatt cccacagggt gcggcaactg gcgatggccc tgacattatc 180
 ttctgggcac acgaccgctt tgggtggctac gctcaatctg gcctgttggc tgaaatcacc 240
 ccggacaaag cgttccagga caagctgtat ccgtttacct gggatgccgt acgttacaac 300

 ggcaagctga ttgcttacc gatcgtctgt gaagcggtat cgctgattta taacaaagat 360
 ctgctgccga acccgccaaa aacctgggaa gagatcccg cgctggataa agaactgaaa 420
 gcgaaaggta agagcgcgt gatgttcaac ctgcaagaac cgtacttcac ctggccgctg 480
 attgctgctg acgggggtta tgcgttcaag tatgaaaacg gcaagtacga cattaagac 540
 gtggcgctgg ataacgctgg cgcgaaagcg ggtctgacct tcctggttga cctgattaaa 600
 aacaaacaca tgaatgcaga caccgattac tccatcgag aagctgcctt taataaaggc 660
 gaaacagcga tgaccatcaa cggcccgctg gcatggtcca acatcgacac cagcaaagtg 720

 aattatggtg taacggtact gccgaccttc aagggtcaac catccaaacc gttegttggc 780
 gtgtgagcg caggtattaa cgccgccagt ccgaacaaag agctggcaaa agagttcctc 840
 gaaaactatc tgctgactga tgaaggtctg gaagcggtta ataaagaca accgctgggt 900
 gccgtagcgc tgaagtctta cgaggaagag ttggcgaaag atccacgtat tgccgccacc 960
 atggaaaacg ccagaaagg tgaaatcatg ccgaacatcc cgcatgtc cgctttctgg 1020
 tatgccgtgc gtactgcgt gatcaacgc gccagcggtc gtcagactgt cgatgaagcc 1080
 ctgaaagacg cgcatgact 1098

<210> 4
 <211> 1482
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NusA
 <400> 4
 aacaaagaaa ttttggctgt agttgaagcc gtatccaatg aaaaggcgct acctcgcgag 60

aagattttcg aagcattgga aagcgcgctg gcgacagcaa caaagaaaaa atatgaacaa 120
gagatcgacg tccgcgtaca gatcgatcgc aaaagcgggtg attttgacac tttccgtcgc 180
tggttagttg ttgatgaagt caccagccg accaaggaat tcacccttga agccgcacgt 240
tatgaagatg aaagcctgaa cctgggcgat tacgttgaag atcagattga gtctgttacc 300
tttgaccgta tctactacca gacggcaaaa caggttatcg tgcagaaagt gcgtgaagcc 360

gaacgtgcga tgggtggtga tcagttccgt gaacacgaag gtgaaatcat caccggcgtg 420
gtgaaaaaag taaaccgcga caacatctct ctggatctgg gcaacaacgc tgaagccgtg 480
atcctgcgcg aagatatgct gccgcgtgaa aacttccgcc ctggcgaccg cgttcgtggc 540
gtgctctatt ccgttcgccc ggaagcgcgt ggcgcgcaac tgttcgtcac tcgttccaag 600
ccggaatgct tgatcgaact gttccgtatt gaagtgccag aaatcggcga agaagtgatt 660
gaaattaaag cagcggctcg cgatccgggt tctcgtgcga aaatcgcggt gaaaaccaac 720
gataaacgta tcgatccggt aggtgcttgc gtaggtatgc gtggcgcgcg tgttcaggcg 780

gtgtctactg aactgggtgg cgagcgtatc gatatcgtcc tgtgggatga taaccggcg 840
cagttcgtga ttaacgcaat ggcaccggca gacgttgctt ctatcgtggt ggatgaagat 900
aaacacacca tggacatcgc cgttgaagcc ggtaaatctgg cgcaggcgat tggccgtaac 960
ggtcagaacg tgcgtctggc ttcgcaactg agcggttggg aactcaactg gatgaccgtt 1020
gacgacctgc aagctaagca tcaggcggaa gcgcacgcag cgatcgacac cttcaccaaa 1080
tatctcgaca tcgacgaaga cttcgcgact gttctggtag aagaaggctt ctgcacgtg 1140
gaagaattgg cctatgtgcc gatgaaagag ctgttggaat tcgaaggcct tgatgagccg 1200

accgttgaag cactgcgcga gcgtgctaaa aatgcactgg ccaccattgc acaggcccag 1260
gaagaaagcc tcggtgataa caaacggct gacgatctgc tgaaccttga aggggtagat 1320
cgtgatttgg cattcaaaact ggccgcccgt ggcgtttgta cgctggaaga tctcgccgaa 1380
cagggcattg atgatctggc tgatatgaa gggttgaccg acgaaaaagc cggagcactg 1440
attatggctg cccgtaatat ttgctggttc ggtgacgaag cg 1482

<210> 5
<211> 1461
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 5
gacgcaccgg aagaagagga tcatgtctg gttctgcgca aaagcaactt cgcggaagca 60

ctggccgcac ataaatatct gctggtggaa ttttatgctc cttggtgcgg tcattgcaaa 120

gccctggccc cggagtacgc caaagccgca ggtaactga aagctgaagg tagcgaaatc 180
 cgcctggcaa aggttgatgc tacggaagag agtgacctgg cgcagcagta tgggtgccgc 240
 ggctatccta caattaaatt ctccgtaac ggtgataccg catctccaaa agaataatc 300
 gctggtcgcg aggcggacga tattgttaac tggctgaaga aacgcactgg cctgcccga 360
 accaccctgc ctgatggcgc tgcgtccgaa agcctggctg aaagtagcga agttgccgtc 420
 attggtttct ttaaggatgt agaattcgc agtgccaaac agtttctgca agcggcagag 480

gctatcgatg acatcccgtt cggcatcacc tctaacagtg acgtattcag taaataccta 540
 ctggataaag acggcgttgt gctgttcaag aaatttgatg aaggtcgcaa caactttgag 600
 ggtgaggatga ccaaggagaa cctgctggat ttatttaagc acaaccaact gccgctggtt 660
 attgaattta cagaacaaac ggccgcaaaa attttcggcg gtgagattaa aacacatc 720
 ctgctgtttc tgccgaagag cgtttctgat tacgatggta aactgagtaa ttttaaaacc 780
 gccgcagaat ctttcaaagg taagattctg ttcattttca ttgatagcga ccacacggac 840
 aatcagcgta tcctggagtt ctttggctcg aagaaagagg aatgcccggc tgtgcgtctg 900

attacgctgg aagaggaaat gacaaagtac aagccggaga gcgaggaact gactgcagaa 960
 cgtatcaccg aattttgtca tcgtttcctg gaggggaaga ttaagccgca tctgatgagc 1020
 caggaaactgc cggaggattg ggacaaacag ccagtgaag ttctggtggg 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 gcgagcgagg atcgtactgt cattgattat 1320

aatggcgaac gtactctgga cggctttaag aaatttctgg aaagcggcgg ccaggatggc 1380
 gcgggcgatg atgatgacct ggaagacctg gaagaagcgg aggaaccaga catggaggag 1440
 gatgacgacc agaaagcggc c 1461

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 6

accgcggccg cttggacggg cgaggactcg 30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> reverse primer

<400> 7

ggtctagatc aggcggcctt gcactcgctc 30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 8

ggtctagatc actctgagtg ctcccgcgcc 30