

재조합사람섬유아세포성장인자1(rhFGF1)변이체 (Q55P/S62I/H108G)의 제작

정예진, 한명성, 어동주, 허명식

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《현시기 질병과의 투쟁에서 중요한것은 심장혈관계통질병, 암성질병, 물질대사질병을 비롯하여 병걸린률과 노동능력상실률이 높은 질병을 미리막기 위한 대책을 바로세우는것입니다.》(《김정일선집》 증보판 제11권 72페이지)

섬유아세포성장인자1(FGF1)은 자가분비 또는 방분비형으로 작용하는 조절인자로서 세포의 증식과 물질대사조절을 비롯하여 여러가지 생물학적과정들에 작용한다. 최근에 FGF1을 전신주입 또는 중추신경내주입하면 2형당뇨병모형동물에서 혈당값이 정상수준에서 지속적으로 유지된다는것이 밝혀졌다. 그러나 천연형의 FGF1은 자체의 구조적불안정성으로 하여 변성온도가 낮고 단백질분해효소의 작용을 매우 쉽게 받는다. 이로부터 FGF1의 안정성을 높이고 유사분렬활성을 제거하기 위한 여러가지 변이체들에 대한 연구[1-3]가 진행되였다. 그중에서 사람섬유아세포성장인자1(hFGF1)의 구조관련상동단백질들의 아미노산배열 비교분석을 통하여 추리해낸 3중변이체(Q55P/S62I/H108G)는 FGF1의 생물학적활성을 그대로 유지하면서도 야생형보다 더 높은 열안정성과 긴 반감기, 단백질분해에 대한 저항성, FGFR와의 결합에 헤파린류를 필요로 하지 않는 특성을 보여주었다.[4-6]

이로부터 우리는 FGF1의 안정성을 높이기 위하여 FGF1변이체(Q55P/S62I/H108G)를 제작하였다. FGF1변이체(Q55P/S62I/H108G)의 CDS(hFGF1-CDS)를 만들고 pET-30 Ek/Lic운반체에 재조합하여 *Escherichia coli* BL21(DE3)발현계를 구축하였다. 안정화hFGF1은 당뇨병치료제와 같은 FGF1에 기초한 약물들의 현실적적용에 널리 리용될수 있다.

재료 및 방법

형질전환숙주로는 *Escherichia coli* Top10을, 유전자발현숙주로는 *Escherichia coli* BL21(DE3)을 리용하였다. 유전자발현운반체로는 pET-30 Ek/Lic를 리용하였으며 설계한 FGF1유전자가 클론화된 플라스미드인 pUC57-vrhFGF1은 전문기관에 의뢰하여 합성한것을 리용하였다.

유전자재조합실험에서는 TIANGEN pure Midi플라스미드분리정제키트, YPH-Bio아가로즈겔DNA회수키트, SanPrep PCR산물정제키트, KOD-Plus-Neo pol 키트(《TOYOBO》), LC Taq pol 키트(《Thermo SCIENTIFIC》), T4 DNA리가제(《Promega》) 등을 리용하였다. pUC57플라스미드에 재조합된 안정화사람FGF1 DNA배열을 그것의 증폭프라이머들(표)을 리용하여 KOD-Plus-Neo폴리메라제키트로 PCR증폭(94℃ 2min→(98℃ 10s, 68℃ 30s) 35회순환→68℃ 7min)하였다. PCR산물을 정제한 다음 그것과 발현운반체 pET-30 Ek/Lic를 제한효소 *Nde*I + *Xho*I로 각각 2중절단하고 T4 DNA리가제로 연결한 다음 *E. coli* Top10에 Inoue법[7]으로 형

질전환하였다. 50 μ g/mL 카나미친(Km)평판배지에서 자란 형질전환균무지들로부터 플라스미드를 분리하고 PCR와 *NdeI*+*XhoI*제한효소로 검정한 다음 재조합플라스미드를 최종적으로 전문기관에 의뢰하여 DNA배렬을 결정하였다. 재조합플라스미드를 *E. coli* BL21(DE3)숙주에 Inoue법으로 형질전환하여 발현균그루를 제작하였다. 형질전환균무지를 50 μ g/mL의 Km이 들어있는 LB배지(5mL)에 접종하고 37°C에서 하루밤 진탕배양하였다. 이 배양액을 50mL의 같은 배지에 1% 접종하고 37°C에서 진탕배양하다가 OD₆₀₀값이 0.6~1.0이 되었을 때 IPTG를 1mmol/L로 첨가하였다. 37°C에서 3h동안 유도배양한 후 18% SDS-폴리아크릴아미드겔전기영동(PAGE)으로 재조합단백질의 발현을 확인하고 색밀도분석으로 그 발현수준을 평가하였다. 기타 유전자조작은 선행방법[7]에 준하여 진행하였다.

결과 및 논의

1) 안정화된 사람섬유아세포성장인자1변이체(vrhFGF1)의 CDS와 증폭프라이머의 설계

인간게놈자료기지의 FGF1 mRNA배렬을 대장균에서 리용빈도가 높은 코돈으로 치환하여 코돈최적화된 hFGF1의 CDS를 얻었다. 여기에 안정성을 높인 3중변이체를 만들기 위하여 55번 아미노산인 Gln을 Pro로, 62번 아미노산인 Ser를 Ile로, 108번 아미노산인 His를 Gly로 코돈치환하였다. 이렇게 얻은 안정화된 rhFGF1변이체(vrhFGF1)의 CDS의 5'-말단과 3'-말단에 각각 제한효소 *NdeI*와 *XhoI*의 인식배렬과 보호염기들을 붙여주었다.

이렇게 설계되어 합성한 DNA배렬은 다음과 같다.(네모칸친것은 안정성을 높이도록 치환된 코돈을, 밑줄친것은 제한효소인식부위를 표시함)

5'-ACTCATATGgctgaaggtgaaatcaccacgttcactgccctgaccgagaagtttaacctg
cctccaggtaattacaagaaacgaaactgttgtagtagcaacgggtggccacttcctgcg
tatcctgccggatggcaccgtggatggtactcgtgaccgcagcgacCCgcacattcaactgc
agcttATtgcggaagcgtgggtgaggtgtatatcaagtccaccgagactggccagtacctg
gcgatggacaccgacggtctgtttatacggctctcagactccaaacgaggaatgtctgttcct
ggaacgtctggaagagaacGGttacaacacctatatctccaagaaacatgcagagaagaact
ggtttggttgccctgaagaaaaatggtagctgcaaacgcggtcctcgactcactatggccag
aaagcaatcctgttttctcccgctgccagtctcttccgattaaCTCGAGAACCGG-3'(486bp)

이상의 코돈최적화된 vrhFGF1를 증폭하기 위한 PCR증폭프라이머들을 설계하였다.(표) 정방향프라이머들에는 제한효소 *NdeI*인식배렬과 그에 따른 보호염기들을, 역방향프라이머들에는 제한효소 *XhoI*인식배렬과 그에 따른 보호염기들을 각각 첨부하였다.

또한 pET-30 Ek/Lic운반체에 재조합된 삽입단편의 배렬을 결정할수 있게 삽입단편으로부터 70bp 떨어진 위치에서 정방향과 역방향의 배렬결정프라이머들을 설계하였다.(표)

표. vrhFGF1제작을 위한 프라이머들			
PCR산물	방향	배렬(5'-3')	
FGF1	정방향	ggAAGTCgCATATggCTgAAgg	
	역방향	CCggTTCTCgAgTTAATCggAAg	
배렬결정 프라이머	정방향	TCCCGcGAAATTAATACg	
	역방향	AAACCCCTCAAgACCCg	

2) vrhFGF1발현운반체의 제작

우에서 설계한 대장균발현용으로 코돈최적화를 한 vrhFGF1의 DNA가 삽입된 플라스미드 pUC57-vrhFGF1을 전문기관에 의뢰하여 구입하였다.

pUC57-vrhFGF1을 주형으로 하여 FGF1 PCR증폭프라이머(표)를 리용하여 486bp의 vrhFGF1에 해당하는 PCR산물을 얻어냈다.(그림 1)

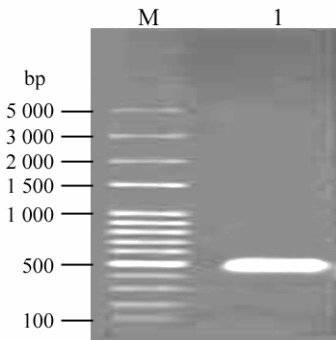


그림 1. PCR산물들의 아가로스겔전기영동상
1 - vrhFGF1의 PCR산물,
M은 DNA분자크기표식자

우의 PCR산물들과 IPTG유도발현운반체 pET-30 Ek/Lic를 제한효소 *NdeI*+*XhoI*로 각각 2중절단하고 T4 DNA리가제로 연결하여 *E. coli* Top10에 형질전환하였다. 50 μ g/mL 카나미핀(Km)을 포함한 LB배지에서 자라난 균무지들에 대하여 PCR증폭에 리용하였던 프라이머들로 PCR검정을 진행하였는데 그 결과는 그림 2의 1)와 같다.

그림 2의 1)에서 보는바와 같이 균무지들로부터 분리한 시료의 영동띠가 예상되는 위치에 나타났다. 이것은 우리가 vrhFGF1이 재조합된 플라스미드를 가지고있는 균그루들을 정확히 선발하였다는것을 보여준다. 3개의 선발된 균그루들을 배양하여 플라스미드를 분리정제하고 그 크기를 확인하였으며 *NdeI*+*XhoI* 2중제한효소절단으로 삽입단편에 해당하는 절단산물(약 486bp)이 정확히 나타나는가를 확인하였다.(그림 2의 2))

PCR검정과 제한단편분석으로 확인한 재조합플라스미드들을 전문기관에 의뢰하여 배열분석한 결과 vrhFGF1의 CDS영역이 설계된대로 정확한 읽기틀을 가지고 재조합되었으며 pET-30발현운반체의 프로모터영역과 전사조절영역, 전사종결배열, 리보솜결합부위 등 기타 구조영역들이 그대로 보존되었다는것이 확인되었다. 이렇게 만들어진 발현운반체들에는 pET-30에서 제공하는 히스티딘표식자와 같은 분리정제관련친화성표식자들이 존재하지 않는다.

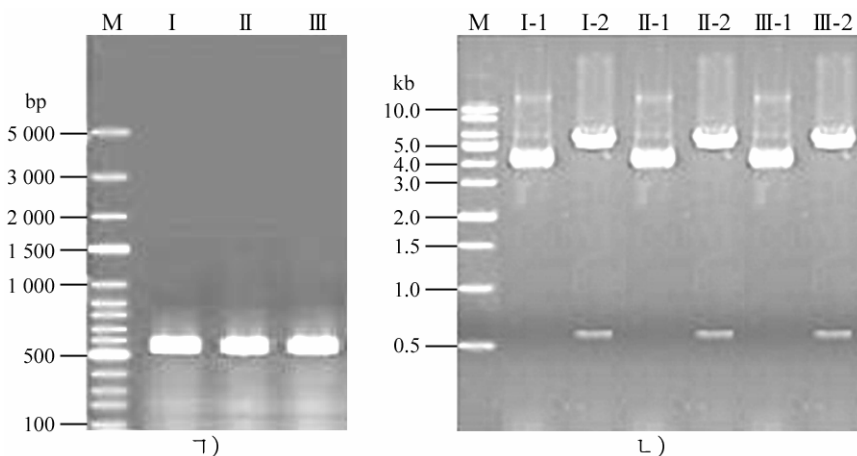


그림 2. 재조합플라스미드들의 확인

- 1) 플라스미드들의 PCR검정산물, 2) 플라스미드들과 제한효소(*NdeI*+*XhoI*)절단산물의 전기영동상; I, II, III은 각각 vrhFGF1을 가지고있는 균무지시료들,
1 - 플라스미드, 2 - 제한효소절단산물, M은 DNA분자크기표식자

3) 2중TD1모리프를 연결한 vrhFGF1발현균그루의 제작

우에서 선발된 vrhFGF1발현운반체를 함유한 *E. coli* Top10 균그루들을 배양하여 플라스미드를 분리하고 발현숙주인 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환하였다. 형질전환된 균무지들을 플라스미드분리와 PCR검정으로 확인하였다.

선발된 *E. coli* BL21(DE3)균그루들을 지수증식기 중기($OD_{600}=0.6\sim1.0$)까지 배양하고 IPTG를 1mmol/L로 배양액에 첨가하였다. 37°C에서 3h 동안 유도배양한 후 배양액을 1mL씩 취하여 균체를 수집하고 총단백질을 18% SDS-폴리아크릴아미드겔전기영동(PAGE)하였다.(그림 3)

SDS-PAGE상에서 vrhFGF1단백질에 해당하는 띠(약 17kD)가 정확히 나타났으며 색밀도분석법으로 측정한 결과 단백질의 발현률은 세포내총단백질의 25%이상이었다.

이렇게 우리는 vrhFGF1발현운반체인 pET-30-vrhFGF1을 제작하고 그것의 대장균고발현계를 구축하였다.

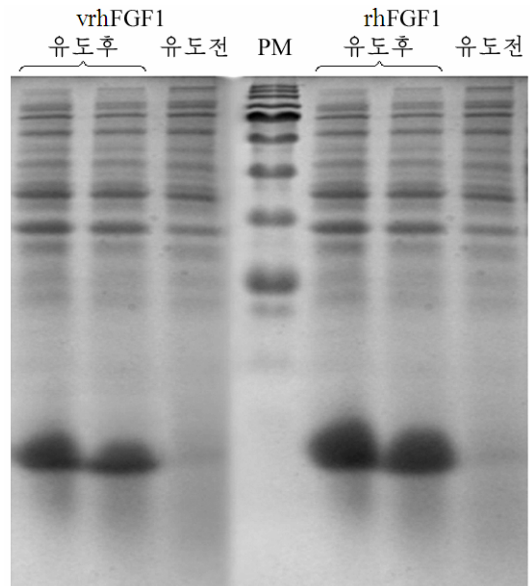


그림 3. 유도배양한 *E. coli* BL21(DE3)에서 vrhFGF1의 발현상
PM은 단백질분자량표식자

맺는 말

안정화된 vrhFGF1의 CDS와 그 증폭용프라이머를 설계합성하였다.

합성한 vrhFGF1을 발현운반체인 pET-30Ek/Lic에 재조합하여 vrhFGF1발현운반체인 pET-30-vrhFGF1을 제작하고 발현균주인 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환하였다.

37°C에서 3h동안 IPTG유도배양후 SDS-PAGE한 결과 SDS-PAGE상에서 vrhFGF1단백질에 해당하는 띠(약 17kD)가 정확히 나타났으며 색밀도분석법으로 측정한 결과 단백질의 발현률은 세포내총단백질의 25%이상이었다.

참고 문헌

- [1] R. A. Copeland et al.; Arch. Biochem. Biophys., 289, 53, 1991.
- [2] K. Agnieszka et al.; Protein and Peptide Letters, 21, 5, 434, 2014.
- [3] X. Xia et al.; PLoS One, 7, e48210, 2012.
- [4] M. Zakrzewska et al.; J. Mol. Biol., 352, 860, 2005.
- [5] A. Szlachcic et al.; Acta. Cryst., D 65, 67, 2009.
- [6] M. Zakrzewska et al.; Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 45, 1, 91, 2008.
- [7] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 18~2222, 2001.

Production of Recombinant Human FGF1 Variants(Q55P/S62I/H108G)

Jong Ye Jin, Han Myong Song, O Tong Ju and Ho Myong Sik

Fibroblast growth factor 1(FGF1), which acts as autocrine or paracrine factor, promotes various biological processes including proliferation of cells and control of metabolism. Recently it has been explored that the whole injection or central injection of FGF1 sustained diabetes remission in mouse models of type 2 diabetes. At the physiological temperature, wild-type FGF1 is denatured and much more sensitive to protease action and exhibits short half-lives. Since several mutations have been studied and introduces in the sequence of FGF1 in order to increase protein stability based on the analysis of aligned homologous sequences.[1—3] Among them, the most efficiently stabilizing mutations turned out to be substitutions, Q55P/S62I/H108G was selected. This mutation exhibited the biological activities of FGF1 as well as effective thermal stability, extended half-life, resistance to proteolysis and binding activity to FGFR in the absence of heparin sulfate.[4—6]

Thus, we produced FGF1 mutations in order to increase stability of FGF1. Stabilized hFGF1 can be applied to actual adaptation of medicaments based on FGF1 including diabetic medicines.

Key words: fibroblast growth factor1(FGF1), acidic fibroblast growth factor(aFGF), diabetes