

재조합효모발현계구축을 위한 사람인슐린양성장인자-1 유전자의 합성과 클론화에 대한 연구

리광옥, 현철

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《새로운 의약품과 현대적인 의료기구를 적극 받아들이는것은 진단과 치료방법을 개선하기 위한 중요한 방도의 하나입니다.》(《김정일선집》증보판 제11권 77페이지)

사람인슐린양성장인자-1(hIGF-1)은 성장호르몬에 의한 대사과정에 골격의 자라기와 세포증식에서 중요한 작용을 하는 폴리펩티드성호르몬으로서 세계적으로 어린이들의 키크기 촉진과 난쟁이증, 인슐린저항성당뇨병, 중추신경계통질환 등의 치료에 리용[1, 2]되고있다.

효모 *Pichia pastoris*에서 외래유전자의 발현수준은 그 유전자의 유전암호리용률과 련관되어있는데 발현률을 높이기 위하여 일반적으로는 유전암호최적화한 합성유전자를 리용한다.[5]

우리는 hIGF-1을 분비하는 효모발현계를 제작하기 위하여 효모에서 리용률이 높은 유전암호에 기초하여 hIGF-1유전자를 합성하고 클론화하기 위한 연구를 하였다.

재료 및 방법

재료 클론화숙주로는 *E. coli* DH5 α 를, 클론화운반체로는 pGEM[®]-T easy vector를 리용하였다.

유전자조작 사람인슐린양성장인자-1 유전자는 NCBI의 GenBank에 등록된 IGF-1의 유전자배열(등록번호 CR541861)에 기초하여 hIGF-1의 전체 cDNA배열에서 성숙펩티드암호화령역을 *P. pastoris*에서 리용률이 높은 유전암호[5]로 유전암호치환을 진행하고 전문기관에 의뢰하여 합성하였다.

합성한 유전자가 들어있는 플라스미드(pUC57-IGF-1)를 주형으로 하여 유전자단편을 증폭하고 pGEM[®]-T easy vector에 클론화하였다. 유전자의 증폭 및 검정PCR에 리용한 프라이머의 배열은 다음과 같다.(프라이머에 삽입시킨 제한부위를 밑줄을 그어 표시하였다.)

IGF-1 상류프라이머 5'-CGGAATTCGGTGGTTCTAGAGCTAGAAGAGG-3'
(IGF-1_up) EcoRI

IGF-1 하류프라이머 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTAAGCAGACTTAGCTGGCTTCAATGG-3'
(IGF-1_down) NotI

PCR증폭산물을 PCR산물정제키트(《OMEGA bio-tek》)를 리용하여 정제하고 pGEM[®]-T easy vector(《Promega》)와 재조합하여 *E. coli* DH5 α 에 형질전환시켰다. 재조합효소로는 T4 DNA리가제(《Promega》)를, 제한분해검정에는 *EcoRI*, *NotI*과 *SalI*(《TaKaRa》)를 리용하였다. pGEM[®]-T easy vector에 클론화한 hIGF-1유전자의 염기배열을 전문기관에 의뢰하여 결정하였으며 DNAMAN(Version 5.2.2)프로그램을 리용하여 Genbank에 등록된 hIGF-1유전자와 비교분석하였다.

결과 및 고찰

1) IGF-1유전자의 설계와 합성

사람의 간에서 합성되는 IGF-1의 프레프로펩티드는 신호펩티드(S도메인), 성숙펩티드(B, C, A, D도메인), E도메인을 포함하여 462bp를 코드화하고있으며 생물학적활성을 나타내는 성숙펩티드(그림 1, 145-354bp부분을 회색배경 및 밑줄로 표시하였다.)는 70개의 아미노산에 해당된다.[3]

```

1 atgggaaaaa tcagcagtct tccaacccaa ttattttaagt gctgcttttg tgattttcttg
61 aaggtgaaga tgcacacccat gtcctcctcg catctcttct acctggcgct gtgcctgctc
121 accttcacca gctctgccac ggctggaccg gagacgctct gcggggctga gctgggtggat
181 gctcttcagt tcgtgtgtgg agacaggggc ttttatttca acaagcccac aggggatggc
241 tccagcagtc ggagggcgcc tcagacaggc atcgctggatg agtgctgctt ccggagctgt
301 gatctaagga ggctggagat gtattgcgca cccctcaagc ctgccaaagtc agctcgctct
361 gtccgtgccc agcgccacac cgacatgccc aagaccaga aggaagtaca tttgaagaac
421 gcaagtagag ggagtgcagg aaacaagaac tacaggatgt ag
    
```

그림 1. hIGF-1의 cDNA배열

*P. pastoris*에서 외래단백질의 발현은 리용하는 유전암호에 따라 많은 제한을 받는데 이로부터 고발현최적유전암호를 확정하여 발현수준을 높이고있다.

성숙펩티드에 해당하는 염기배열을 효모발현계통에서 리용률이 높은 동위유전암호로 치환하였으며 이때 아미노산배열에서는 변화가 없다.(표)

표. hIGF-1의 천연성숙펩티드의 유전암호와 합성한 유전자의 치환유전암호

아미노산	천연유전암호	치환유전암호	아미노산	천연유전암호	치환유전암호
Gly	gga	ggt	Arg	cgg	aga
	ggc	ggt		agg	aga
	ggg	ggt	Ser	tcc	tct
Pro	ccg	cca		agt	tct
	ccc	cca		agc	tct
	cct	cca	Ala	tca	tct
Glu	gag	gaa		gct	gct
	acg	act		gcg	gct
Thr	aca	act		gca	gct
	ctc	ttg		gcc	gct
	ctg	ttg	Ile	atc	att
	ctt	ttg		tgc	tgt
Leu	cta	ttg	Cys	aag	aag
	tgg	ttg		cag	caa
	gtg	gtt	Met	atg	atg
Val	gat	gat		ttc	ttt
	gac	gat	Phe	tat	tac
Asp					
			Tyr		

합성한 유전자배열에 대하여 천연hIGF-1의 성숙펩티드배열과 비교하여보면 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 합성한 IGF-1유전자는 천연hIGF-1에서 생물학적활성을 나타내는 70개의 아미노산을 코드화하는 영역과 유연성연결배열(-G-G-S-), 푸린인식부위(-R-X-

X-R-)[4]로 구성되어있다. 유연성연결배열과 푸린인식부위는 재조합단백질이 인체에 주입 될 때 체내의 푸린에 의하여 절단되어 천연IGF-1과 완전히 일치하는 펩티드로 가공되도록 한다.

```

I          GGACCGGAGACGCTCTGCGGGGCTGAGCTGGTGGATGCTCTTCAGTTCGTGTGGAGACAGGGGCTTTTATTCAACAAGCCCACAGGGAATGGC
          G P E T L C G A E L V D A L Q F V C G D R G F Y F N K P T G Y G
II GGTGGTCTAGAGCTAGAGAGGTCCAGAACTTTGTGTGGTCTGAATTGGTGTGATCTTTGCAATTTGTTTGGTGTAGAGGTTTTACTTTAACAAGCCAACGGTACGGT
   G G S R A R R G P E T L C G A E L V D A L Q F V C G D R G F Y F N K P T G Y G

I TCCAGCAGTCGGAGGGCGCCTCAGACAGGCATCGTGGATGAGTGTCTCCGGAGCTGTGATCTAAGGAGGCTGGAGATGTATTGCGCACCCCTCAAGCCTGCCAAGTCAGCT
   S S S R R A P Q T G I V D E C C F R S C D L R R L E M Y C A P L K P A K S A
II TCITCTTCTAGAAGAGCTCCACAACCTGGTATTGTTGATGAATGTTGTTTGTAGATCTGTGATTTGAGAAGATTGAAATGTACTGTCTCCATTGAAGCCAGCTAAGTCTGCT
   S S S R R A P Q T G I V D E C C F R S C D L R R L E M Y C A P L K P A K S A
    
```

그림 2. hIGF-1의 천연성숙펩티드배열(I)과 합성한 유전자배열(II)의 다중정렬

2) 재조합효모발현계구축을 위한 hIGF-1유전자의 클론화

합성된 IGF-1유전자가 들어있는 플라스미드를 주형으로 하여 LA Taq폴리메라제에 의한 PCR를 진행하였다. 반응조건은 초기변성 94°C 5min→변성 94°C 30s, 아닐링 58°C 30s, 연장 72°C 30s, 30회 순환→최종연장 72°C 7min으로 하였다.

PCR증폭산물의 전기영동상은 그림 3과 같다.

그림 3에서 보는바와 같이 예상되는 크기(258bp)에 해당하는 DNA단편이 증폭되었다.

정제한 핵산단편을 가지고 T4 DNA리가제에 의한 pGEM[®]-T easy vector에로의 재조합 반응을 4°C에서 16h동안 진행하고 *E. coli* DH5 α 에 형질전환하였다. LB평판(Amp 100 μ g/mL)상의 균무지들에서 6개의 균무지를 선택하여 검정PCR를 진행하고 양성클론을 선별하였다.(그림 4)

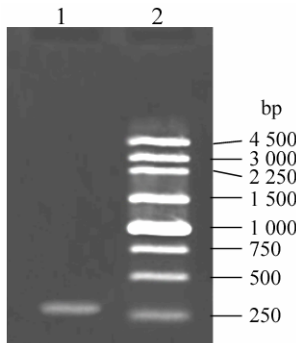


그림 3. IGF-1유전자증폭 산물의 전기영동상

1-PCR증폭산물, 2-DNA분자량 표식자(2K+DNA marker)

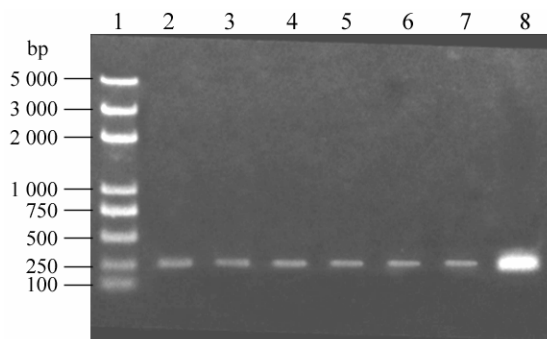


그림 4. IGF-1-pGEM[®]-T easy vector재조합 플라스미드의 검정PCR상

1-DNA분자량표식자(2K+DNA marker), 2-7은 PCR증폭산물, 8-pUC57-IGF-1플라스미드를 주형으로 한 증폭단편

그림 4에서 보는바와 같이 예상되는 크기의 단편(258bp)이 정확히 증폭되었다. 양성 균무지에 대하여 LB배지(Amp 100 μ g/mL)에서 하루밤 진탕배양한 다음 균체에서 재조합플라스미드를 분리하고 제한효소분해검정을 진행하였다.(그림 5)

그림 5에서 보는바와 같이 *Eco*RI, *Not*I에 의한 단일제한분해에서는 다같이 IGF-1유전자단편(0.26kbp)과 운반체(3.01Kbp)의 크기에 해당하는 DNA띠가, *Sa*II에 의한 단일제한분해에서는 3.26kb에 해당하는 띠가 나타났다. 이것은 *Eco*RI과 *Not*I의 인식배열이 pGEM[®]-T easy

vector의 다클론화영역의 양쪽에, *SalI*에 대하여서는 한쪽에만 존재하는것과 관련된다. 검정 PCR상과 2중제한효소분해검정을 통하여 목적하는 크기의 단편이 정확히 클론화운반체에 재조합되었다는것을 알수 있다.

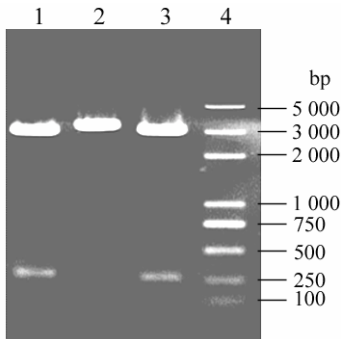


그림 5. IGF-1-T vector재조합 플라스미드의 제한분해검정상
1-*EcoRI* 단일제한분해, 2-*SalI* 단일제한분해, 3-*NotI* 단일제한 분해, 4-DNA분자량표식자 (2K+DNA marker)

유전자단편에 대한 배열분석을 통하여 조작의 정확성을 확인하였다.(그림 6)

```

1   TCGGAATTGGTGTCTAGAGCTAGAAGAGGTCCAGAACTTTGTGTGGTGCTGAATTG
1   EcoRI G G S R A R R G P E T L C G A E L

61  GTTGATGCTTTGCAATTTGTTTGTGGTGATAGAGGTTTTACTTTAACAAGCCAACTGGT
18  V D A L Q F V C G D R G F Y F N K P T G

121 TACGGTTCTTCTTCTAGAAGAGCTCCACAACTGGTATTGTTGATGAATGTTGTTTAGA
38  Y G S S S R R A P Q T G I V D E C C F R

181 TCTTGTGATTGAGAAGATTGGAATGTACTGTGCTCCATTGAAGCCAGCTAAGTCTGCT
58  S C D L R R L E M Y C A P L K P A K S A

241 TAAGCGGCGGCATTCTTATA
78  * NotI
    
```

그림 6. 클론화된 유전자의 염기배열과 추정아미노산배열

그림 6에서 보는바와 같이 효모발현계에서 리용률이 높은 유전암호를 고려하여 합성된 258bp의 hIGF-1유전자가 발현운반체재조합에 필요한 제한효소인식배열과 함께 정확히 클론화되었다.

클론화된 유전자단편은 77개의 아미노산으로 구성되는 폴리펩티드를 암호화하며 그것의 이론적인 분자량은 7.5kD, 등전점은 8.8이다.

맺 는 말

*P. pastoris*에서 리용률이 높은 유전암호에 기초하여 사람인슐린양성장인자-1(hIGF-1) 유전자를 설계하고 합성하였으며 발현운반체제작을 위한 단편을 pGEM®-T easy vector에 클론화하였다. 클론화한 DNA단편은 258bp의 크기를 가지며 77개의 아미노산으로 구성되는 폴리펩티드사슬을 암호화한다.

참 고 문 헌

- [1] J. D. Quin; Q. J. Med., 82, 81, 1992.
- [2] Jun Ren et al.; Biochemical Pharmacology, 93, 409, 2015.
- [3] A. Philippou et al.; In Vivo, 21, 45, 2007.
- [4] 叶玉珍 等; 生物化学与生物物理学报, 33, 5, 504, 2001.
- [5] 赵翔 等; 生物工程学报, 16, 308, 2000.

Study on Synthesis and Cloning of a Gene Encoding Human Insulin-Like Growth Factor-1 for Recombinant Yeast Expression

Ri Kwang Ok, Hyon Chol

We have designed and synthesized a gene segment encoding human insulin-like growth factor-1 on the basis of synonymous codon usage preference of *Pichia pastoris*. The synthesized gene was amplified and cloned into pGEM[®]-T easy vector with proper restriction sites for recombinant yeast expression system.

The cloned gene has 258bp length and the deduced peptide sequence consists of 77 amino acids.

Key words: human insulin-like growth factor-1, *Pichia pastoris*, codon usage