

제 3 차년도
최종보고서

유전공학에 의한 의료용 신기능 단백질의 개발
Developments of new medical proteins using genetic engineering

신기능 혈전치료제의 개발
Developments of streptokinase

신규 조절 단백질 호르몬 및 항균
Studies on the regulatory hormone structure and antibiotics

신규 항암제 합성효소의 개발
Developments of new anti-cancer drugs synthesis enzyme

신규 단일군 항체 및 백신 개발
Developments of new monoclonal antibody and vaccine

연구기관
한국과학기술원

과 학 기 술 처

최종연구보고서

1996년도 특정연구개발사업에 의하여 완료한 (개발중인) 유전공학에 의한 의료용 신기능 단백질의 개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨부 :
1. 최종보고서 3부.
 2. 자체평가 의견서 1부.
 3. 최종보고서 전산입력부 1부.

1996년 12월 31일

주관 연구 기관 : 한국과학기술원

총괄연구책임자 : 김 형 만 (인)

주관연구기관장 : 윤 덕 용 직인

과학기술처장관 귀하

제 출 문

과 학 기 술 처 장 관 귀하

본 보고서를 “유전공학에 의한 의료용 신기능 단백질의 개발에 관한 연구” 과제의 (세부과제 “신기능 혈전치료제의 개발, 신규 조절단백질 호르몬및 향균, 신규 항암제 합성효소의 개발, 신규 단일군 항체및 백신개발에 관한 연구”의 최종보고서로 제출합니다.

1996. 12. 31.

주관연구기관명 : 한국과학기술원

총괄연구책임자 : 김 형 만

연 구 원 : 변 시 명

연 구 원 : 강 창 원

연 구 원 : 이 균 민

여 백

제 1 세 부 과 제

여 백

요 약 문

I. 제목

신기능 혈전증 치료제의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

스트렙토키나제(SK)는 혈액속의 plasminogen을 plasmin으로 활성화 시킴으로서 혈전(blood clot)을 분해하기 때문에 혈전증 치료제로서 tPA, UK등과 함께 널리 쓰이고 있다. 국내의 여러 제약회사 에서도 수입 또는 생산하고 있으며 최근에는 주사용 제제를 개발하고 있다. 주사제 개발에는 고순도의 SK가 요구되는바 본 연구에서는 이를 해결하기 위한 대량발현 균주와 정제방법등을 개발하고 SK의 단점으로 지적되어온 항원성을 줄이기 위한 방안을 강구하고자 한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구의 내용은 먼저 대량발현 균주를 개발하기 위해 본 연구실에서 클로닝한(Rho et al., 1986) SK 유전자를 이용하여 대장균에서 대량발현하는 벡터시스템을 개발하고 단순한 조작을 통해 효과적으로 분리할 수 있는 정제방법을 개발하고자 한다. 더 나아가 결손(deletion) 돌연변이에 의한 항원성이 감소된 SK를 개발하고자 한다.

IV. 연구개발결과

본 연구에서는 계획 하였던 목표를 성공적으로 달성하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 인체 Plasminogen을 이용한 친화성 크로마토그래피를 이용하여 효과적으로 SK를 분리할 수 있는 방법을 개발하였다.
2. SK를 대량으로 발현할 뿐만 아니라 고순도 형태로 분비하는 벡터 및 대장균 균주를 개발하였다.

3. C-terminal deletion mutagenesis를 통하여 활성은 유지되나 항원성이 감소된 신기능 SK를 개발하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구에서 개발된 SK 생산균주는 대규모로 배양하는 연구를 거쳐 산업적인 SK생산에 활용될수 있으며 항원성이 감소된 SK를 의약품으로 개발하기 위해서는 임상적인 연구가 필요하다고 사료된다.

S U M M A R Y

(영 문 요약 문)

Recently, it was reported that C-terminal amino acids of streptokinase may have potential importance in structural and functional aspects. To elucidate the structural and functional roles of C-terminal amino acids of streptokinase, several C-terminal deleted streptokinase genes were constructed by nested deletion of streptokinase coding gene with exonuclease III and PCR method. The C-terminal deleted streptokinases were expressed in *E.coli* and purified by affinity chromatography using plasminogen-coupled Sepharose 4B. SKP373 (mutant SK lost 41 amino acids from the C-terminus of a native SK) behaved like as native SK in the column. On the other hand, SKE368 and SKE367 showed a smaller peak than a native streptokinase and SKs lost 50 residues or more did not bind to the column. CLN hydrolysis test of purified DSKs showed that 41 residues deletion from the C-terminus did not affect the activation activity. However, deletion of 46 or more amino acids resulted in dramatically reduced plasminogen activation activity. These results propose that residues 41 to 46 from C-terminus consist of a binding site of streptokinase with plasminogen. Although the SKE388, SKE381, SKE376, SKE374 and SKP373 have smaller size than the native SK, the SKs retain same activities as native SK. So, the SKs can be candidates for the fibrinolytic agent having decreased antigenicity. For the high-level expression of the SK, we constructed a expression vector for SK, pSK100. *E.coli* JM109 carrying pSK100 expressed and secreted about 5,000 unit/ml of SK. As the secreted SK showed high purity, the SK expression vector and the bacteria were thought to be useful for the development of injection of SK.

여 백

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction	13
part 1. Background	
part 2. Objectives	
Chapter 2. Current research status of the field	15
part 1. international condition	
part 2. Domestic condition	
Chapter 3. Research subject and Result	16
part 1. Research subject	
part 2. Results	
Chapter 4. Degree of object accomplishment	28
part 1. Degree of object accomplishment of annual object	
part 2. Degree of object accomplishment of overall object	
Chapter 5. Application plan of the accomplishment	30
part 1. Necessity of additional work	
part 2. Application plan	
Chapter 6. References	31

여 백

목 차

제 1 장 서 론	13
제 1 절 연구 배경	
제 2 절 연구개발의 목적 및 필요성	
제 2 장 국내외 기술개발 현황	15
제 1 절 국외 현황	
제 2 절 국내 현황	
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	16
제 1 절 연구개발 수행내용	
제 2 절 연구개발 결과	
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도	28
제 1 절 연차별 연구개발 목표 달성도	
제 2 절 최종 연구개발 목표의 달성도	
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	30
제 1 절 추가연구의 필요성	
제 2 절 타 연구에의 응용 및 활용방안	
제 6 장 참고문헌	31

여 백

제 1 장. 서 문

제 1 절. 연구 배경

Streptokinase(SK)는 Streptococcus속의 여러 균주에서 생성되는 세포외 단백질 이다 (Tillet et al., 1933). SK는 혈액속의 plasminogen을 plasmin으로 활성화 시킴으로서 혈전(blood clot)을 분해하기 때문에 혈관 내의 혈액응고에 의해 생기는 뇌졸중, 급성 심근경색 등의 치료제로서 tPA, UK 등과 함께 널리 쓰이고 있다. Streptokinase는 414개의 아미노산 잔기로 구성된 single polypeptide이며 Cys이 없는 것이 특징이다.

SK의 plasminogen 활성화 기작의 이해는 학문적으로 뿐 아니라 임상적인 약리기전의 이해와 새로운 혈전증 치료제의 개발을 위해서도 매우 중요하다. 현재 streptokinase의 작용 기작은 streptokinase가 plasminogen과 complex 를 이루면 conformation 변화가 일어나 complex의 plasminogen 부분에 새로운 active site가 생성 되고 이 complex가 plasminogen을 plasmin으로 활성화시킨다고 알려졌다 (Reddy et. al., 1972). 그러나 Streptokinase는 X-ray crystallography가 되어있지 않아 정확한 3차 구조는 알 수 없고 현재까지 여러 분석방법을 써서 SK의 구조와 기능에 관한 연구가 진행되어 왔다. SK의 작용기작에 관한 연구는 주로 binding site와 활성화에 중요한 아미노산 잔기를 중심으로 활발히 연구 되어왔다.

1992년 Damaschun등은 dynamic light scattering과 X-ray scattering 그리고 circular dichroism spectroscopy를 통하여 SK는 4개의 domain으로 구성되어 있으며 'flexible string-of-bead'의 구조를 가진다고 제안 하였다(Damaschun et al., 1992).

1989년 Radek과 Castellino등은 단백질과 단백질간의 interaction은 단백질의 표면에 위치하고, 친수성이 강한 잔기가 많은 부분에 의하여 매개될 것이라는 사실에 착안하여 SK가 plasminogen과 interaction할 가능성이 높은 부분을 추측 하였는데 그 부분은 SK의 (1) His 140 - Glu 161 (2) Asp 238 - Glu 249 (3) C-terminal 부분의 약 50 아미노산 등이다(Radek et al., 1989).

1994년 Shi등은 Streptokinase를 인체 plasmin과 반응시켜 생성된 fragment를 분리하여 조사한 결과 Ser 60 - Lys 333 peptide는 plasmin에 거의 binding하지 않고 1% 미만의 활성을 나타낸 반면 Ser 60 - Lys 387 peptide는 plasmin에 tight binding을 보이며 1/6의 활성을 보이는 사실로 부

터 Ala 334 - Lys 387 부위가 plasmin에 대한 high affinity를 나타내는데 중요함을 보고 하였다(Shi et al.,1994).

이상과 같은 지금까지의 연구 결과를 종합하면 streptokinase는 multi-domain구조를 이루고 있으며 plasminogen과 결합은 C-terminal domain이 관여하리라고 알려졌을 뿐 구체적인 잔기들이 규명되지 않았다. SK의 plasminogen binding 또는 활성화에 관여하는 잔기들의 규명과 작용기작에 관한 연구가 시급한 실정이다. 이와 더불어 SK는 현재 치료제로 쓰이므로 대량생산에 관한 연구 또한 산업적으로 중요하다.

제 2 절. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 현재 SK는 혈전증 치료제로써 널리 쓰이고 있는 SK의 plasminogen의 활성화 기작을 분자 수준에서 규명하고 이를 토대로 기능이 개선된 SK를 개발하는 것이다. 이를 달성하기 위한 구체적인 목표는 다음과 같다.

첫째, 유전공학적으로 SK를 대량생산하는 균주를 개발하고자 한다. 이는 향후 학문적인 연구 뿐 아니라 산업적으로 주사용 SK제제의 개발에 중요하다.

둘째, C-terminal deletion mutagenesis를 통하여 plasminogen활성화 또는 결합에 중요한 부위를 찾아 내하고자 한다. 또한 분자량이 감소되고 활성이 유지된 SK를 찾고자한다. 이러한 SK는 항원성이 감소된 신기능 혈전증 치료제로 쓰일 수 있다.

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국외 현황

SK에 대한 연구는 작용기작의 규명과 항원성의 감소를 위한 연구가 활발히 연구되고 있다.

(1). SK의 작용기작에 관한 연구

SK의 작용기작에 관한 연구는 약리작용의 이해와 신약 개발을 위해서도 매우 중요 하므로 많은 연구가 수행되고 있다. 지금까지 연구들은 주로 SK의 구조와 plasminogen과의 binding site의 규명에 집중되고 있다.

(2). SK의 항원성 감소를 위한 연구

응용적인 측면에서는 SK의 단점으로 알려진 항원성의 감소를 위한 연구가 활발히 연구되고 있다. 외부 단백질의 항원성을 없애는 것은 현실적으로 거의 불가능 하지만 단백질의 기능에 불필요한 부분을 제거 함으로써 항원성을 줄이고자하는 시도들이 보고되고 있다(국제특허출원의 출원공개공보, 1993).

제 2 절. 국내 현황

현재 SK의 작용기작과 기능의 증진에 관한 학문적 연구는 거의 전무한 실정이다. 산업적으로는 국내의 제약회사들 (미원, 제일제당, 이연합성 제약 주식회사 등) 에서 경구용 SK제제를 수입 또는 직접 생산하여 판매 하고 있으며 주사용 제제는 개발중에 있다. 산업체에서 이용하는 SK 생산균주는 모두 야생에서 탐색한 것으로 유전공학적 기법을 이용하여 균주가 개발된 예는 없는 것으로 사료된다.

제 3 장. 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구내용

1. 친화성 크로마토그래피법에 의한 SK의 정제

야생형 및 C-말단이 제거된 돌연변이 SK를 *E.coli* JM109에서 발현 및 plasminogen coupled sepharose 4B를 이용한 affinity chromatography를 통해 정제하였다.

2. SK의 C-terminal deletion mutagenesis에 의한 plasminogen활성화 또는 결합에 중요한 부위의 규명 및 항원성이 감소된 SK의 개발

(1). C-terminal deletion mutagenesis

대장균 발현벡터 pKK223-3에 스트렙토키나제 유전자를 삽입하여 제조한 스트렙토키나제 발현벡터 pKS601을 exonuclease III로 Serial deletion시켜 C-terminal deleted streptokinase의 발현벡터 (pDSK series)를 제조하였다.

(2). SK의 활성측정

C-terminal deleted streptokinase의 활성을 Casein/plasminogen overlay test와 N-alpha-carbobentoxyl-L-Lys- ρ -nitrophenyl ester (CLN)을 이용한 spectrophotometer법으로 측정하였다.

3. SK의 대량생산 균주의 개발

SK의 대량발현을 위해 발현벡터 pSK100을 개발하였고 이를 대장균에 형질전환하여 SK의 대량생산균주를 개발하였다.

4. Random mutagenesis

SK의 활성 또는 plasminogen과의 결합에 중요한 잔기를 찾아내기 위하여 특정 dNTP(예 dATP)-limiting 조건하에서 Taq polymerase를 이용한 PCR법을 이용하여 돌연변이를 도입하고 활성

이 감소된 변이주를 plasminogen-casein overlay test를 통하여 선발하였다

제 2 절. 연구개발 결과

1. 친화성 크로마토그래피법에 의한 SK의 정제

인체 plasminogen이 SK와 친화성에 갖는점에 착안하여 친화성 크로마토그래피를 개발하였다. CNBr-activated Sepharose를 1mM HCl로 불린후 coupling buffer(0.1M NaHCO₃, pH8.3)로 씻고 다시 coupling buffer에서 SK와 4℃에서 24시간동안 반응 시켰다. 젤을 coupling buffer와 PBS(phosphate buffered saline)로 차례로 씻은후 column에 충전 시켰다. pKS601을 갖는 대장균을 37℃에서 키우다가 OD600 이 약 0.8에 도달했으면 1mM IPTG농도로 발현을 유도하고 3시간동안 배양하였다. 세포를 수확한후 PBS에 현탁하고 sonication으로 세포질분획을 얻어 친화성 크로마토그래피에 이용하였다. 먼저 plasminogen-coupled Sepharose컬럼을 washing buffer(0.2M ε-amino caproic acid in PBS)로 씻고 단백질용액을 통과시킨후 다시 washing buffer로 씻었다. 결합된 SK는 elution buffer(50mM glycine,0.2M ε-amino caproic acid)를 흘려보냄으로써 회수하였다. 그림 1에 친화성 크로마토그래피를 이용해서 정제된 SK의 SDS-PAGE결과를 나타내었다.

2. SK의 C-terminal deletion mutagenesis에 plasminogen활성화 또는 결합에 중요한 부위의 규명 및 항원성이 감소된 SK의 개발

(1). Exonuclease III와 PCR방법을 이용한 SK 유전자의 순차적 결손

대장균 발현벡터 pKK223-3에 스트렙토키나제 유전자를 삽입하여 제조한 스트렙토키나제 발현벡터 pKS601(Park et. al., 1991)을 exonuclease III로 Serial deletion시켜 그림2과 같이 C-terminal deleted streptokinase의 발현벡터 (pDSK series)를 제조하였다. 이들을 *E.coli* JM109에 형질전환하여 264 colonies를 얻었다. pDSK series의 염기서열 분석을 통해 결손부위를 확인한 결과 C-terminal로 부터 각각 26(SKE388), 33(SKE381), 37(SKE376), 40(SKE374), 46(SKE368), 47(SKE367), 70(SKE344), 97(SKE317)개의 아미노산 잔기가 결손 되었음을 확인하였다. 그 결과는 그림3와 같다. 그림3에서 deleted mutant 의 결손부위와 XbaI linker의 삽입으로 인한 extra amino acid의 존재

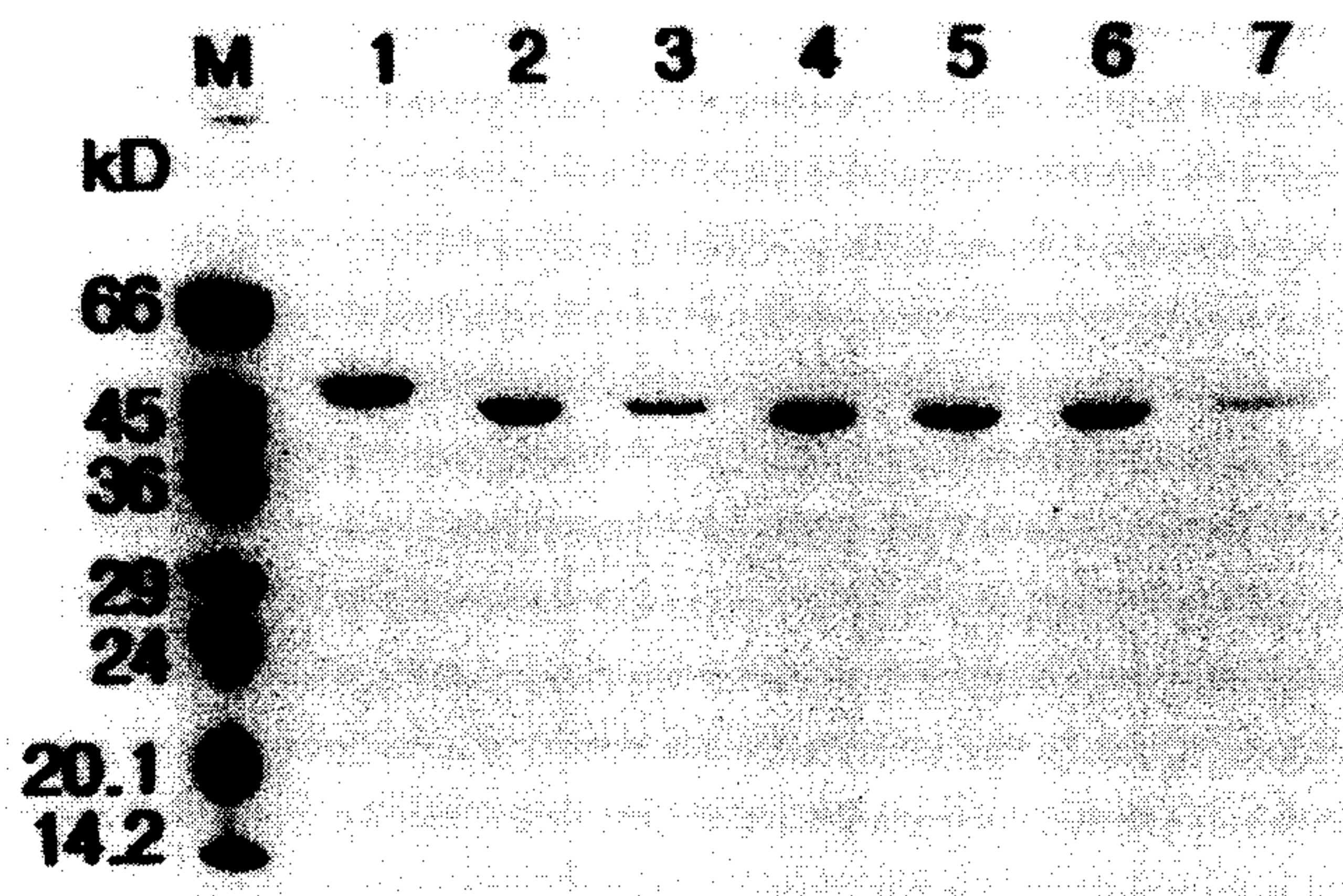


그림 1. 친화성 크로마토그래피 칼럼을 이용하여 정제한 SK의 SDS-PAGE 결과
M, protein size marker; 1, 야생형 SK; 2, SKE388; 3, SKE381;
4, SKE376; 5, SKE374; 6, SKP373; 7, SKE368

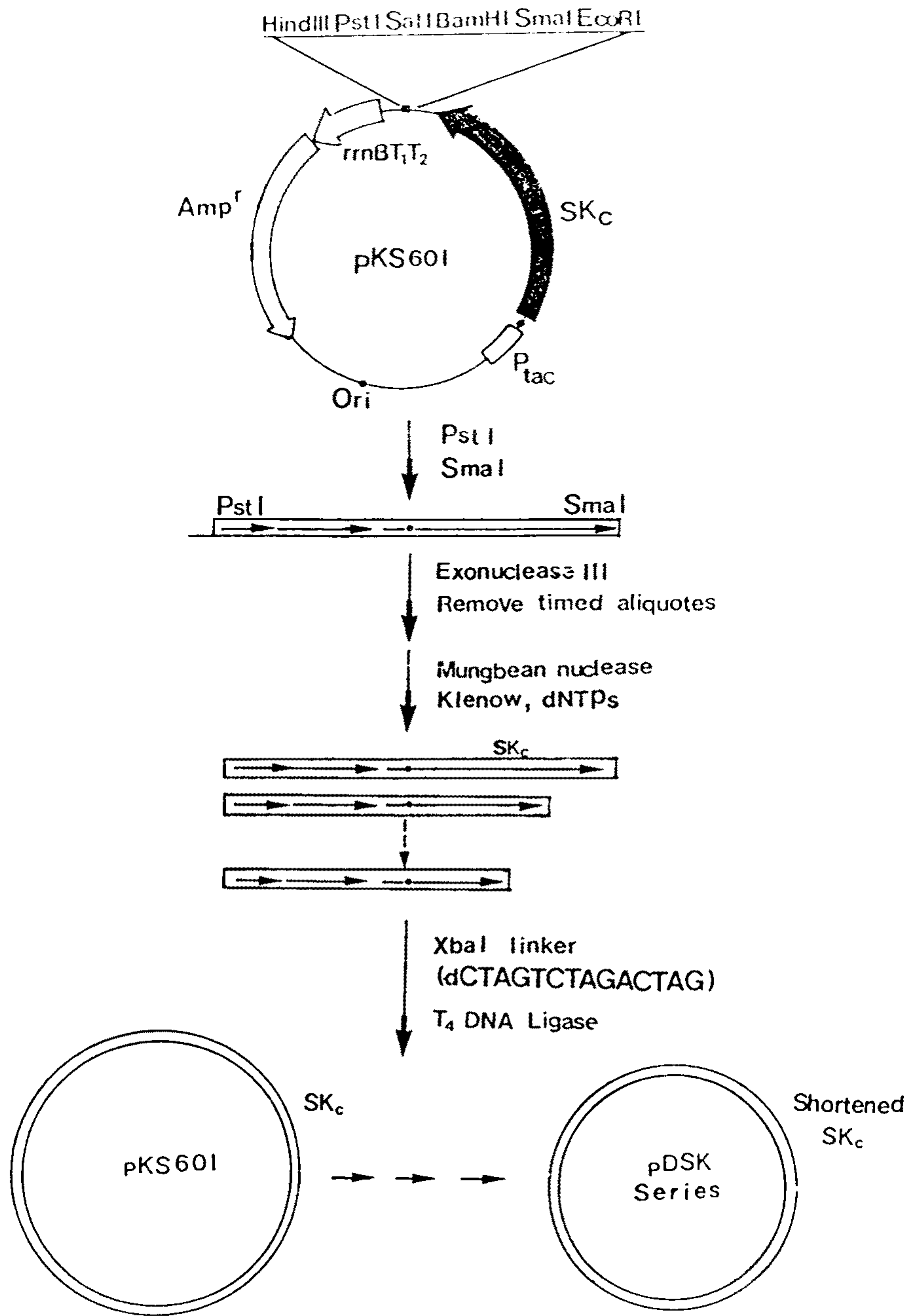


그림 2. Exonuclease III를 이용한 SK 유전자의 C-terminal deletion mutagenesis과정

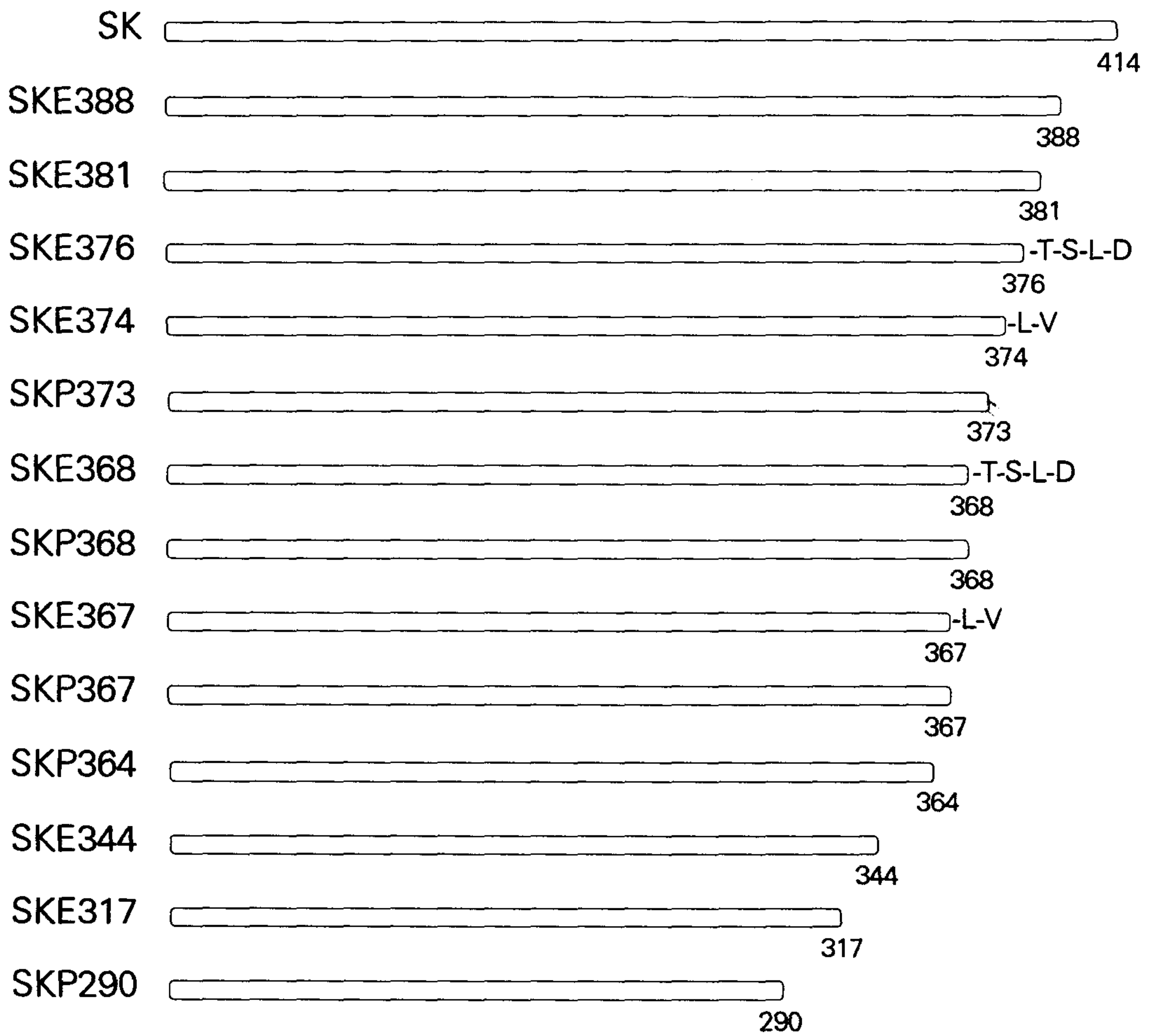


그림 3. C-terminal region이 결손된 돌연변이 SK의 도식적인 구조. 문자는 Xba I linker의 삽입에 의해 첨가된 아미노산의 single letter abbreviation을 나타낸다.

도 확인할 수 있다. extra amino acid 잔기의 SK활성에 미치는 효과를 배제하기 위하여 PCR법을 통하여 각각 41(SKP373), 46(SKP368), 47(SKP367), 50(SKP364), 124(SKP290) 잔기가 결손된 SK를 만들었다.

(2) Casein/plasminogen overlay test에 의한 C-terminal deleted SK의 활성측정

Mutant proteins의 SK활성을 측정하기 위하여 pDSK plasmid series를 E. coli JM109에 transformation 시킨 후 casein/plasminogen overlay test를 수행하였다.(그림 4) 그림 18에서 보면 SKE388, SKE381, SKE376, SKE374, SKP373은 정상 SK와 거의같은 활성을 갖는 반면 SKE368, SKP368, SKE367, SKP367 감소된 활성을 그리고 SKP364, SKE344, SKE317, SKE290은 활성을 보이지 않았다.

(3) SK의 정제 및 정량적인 활성측정

SK의 C-말단으로부터 47개 이상이 제거된 돌연변이 SK들은 plasminogen-coupled sepharose 4B column에 붙지 않는 특성을 보였다. Affinity chromatography를 통하여 야생형 및 SKE388, SKE381, SKE376, SKE374, SKP373, SKE368, SKP368, SKE367, SKP367을 정제할 수 있었다. 이들의 elution profile은 그림 5에 나타내었다. SKE388, SKE381, SKE376, SKE374, SKP373의 경우 야생형 SK와 거의 비슷한 profile을 보였다. 반면 SKE368, SKP368, SKE367, SKP367의 경우는 야생형보다 small peak를 보였으며 SKP364, SKE344, SKE317, SKE290의 경우 거의 column에 binding 하지 않았다. 이결과는 돌연변이 streptokinase의 activity assay결과와도 일치하며 이러한 사실은 SK의 C-말단으로부터 41-46번째 아미노산 잔기들이 plasminogen과 binding시 관여할 가능성을 시사해준다 (Kim et.al., 1996). SKP364, SKE344, SKE317, SKE290는 DEAE-column과 Mono-Q column을 이용하여 정제하였다. 정제한 Mutant SKs의 plasminogen 활성화를 정량적으로 측정하기 위해서 artificial substrate인 N-alpha-carbobenzyloxy-L-Lys- ρ -nitrophenyl ester(CLN)의 가수분해를 Beckman DV-65 Spectrophotometer 를 이용하여 측정하였다. 그 결과를 그림 6에 나타내었다.

이러한 결과들을 고려할때 streptokinase C-말단의 41에서 47번째 사이의 잔기들이 plasminogen과 binding시 관여할 것으로 사료된다.

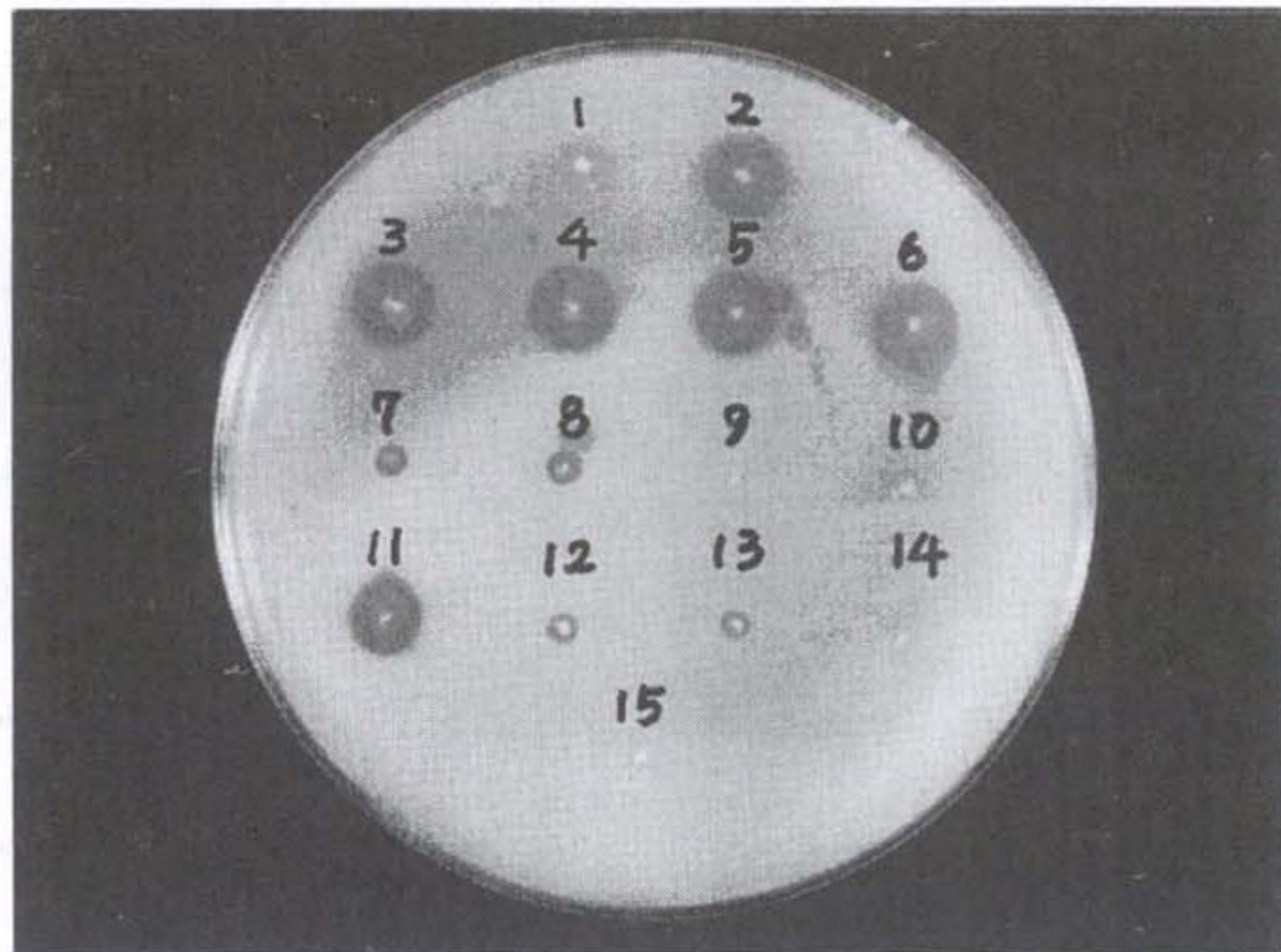
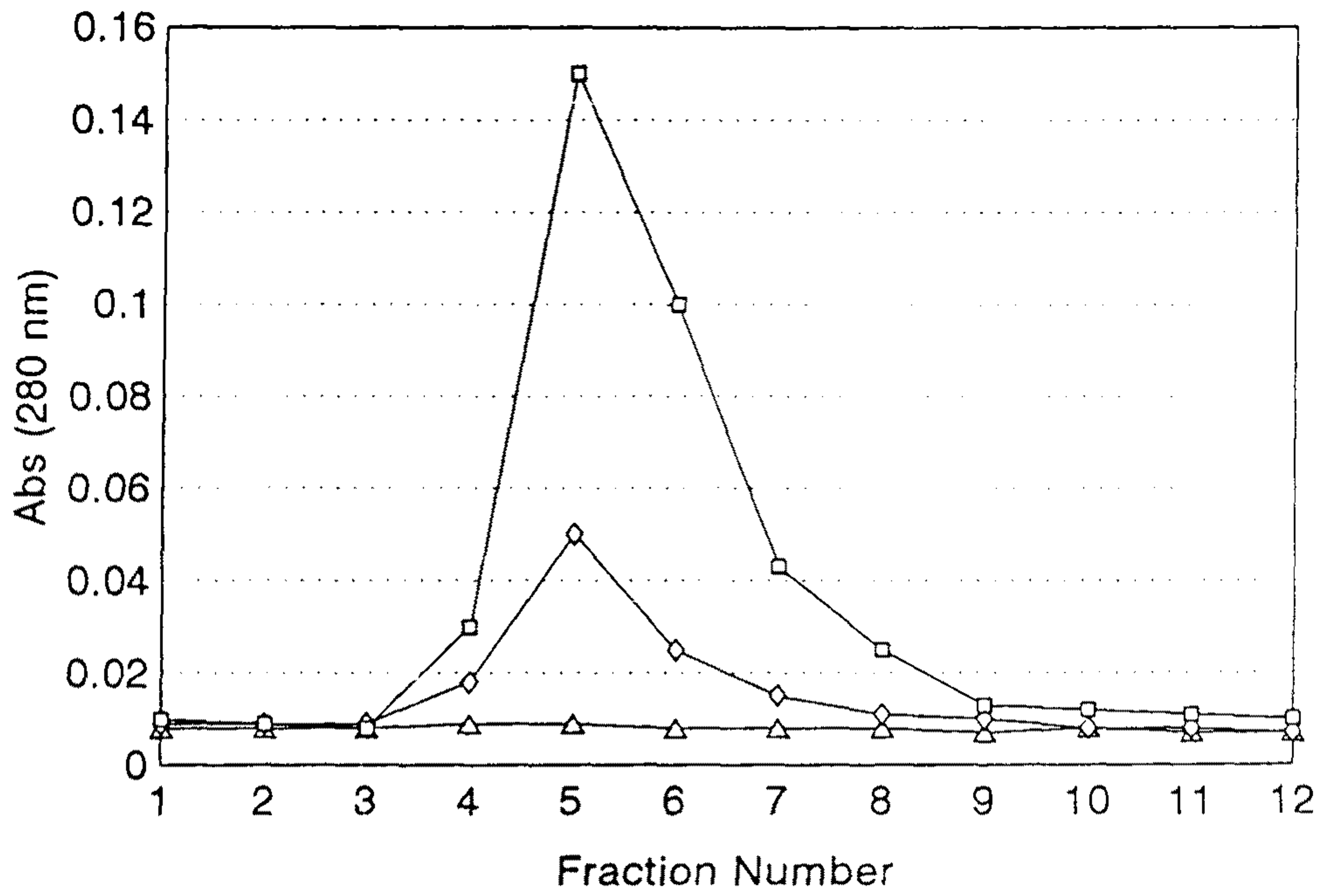


그림 4. Casein/human plasminogen overlay test에 의한 C-terminal region이 결손된 돌연변이 SK의 활성측정.

숫자는 다음의 plasmid를 갖는 E.coli JM109를 나타낸다. 1, pKK-ompA; 2, pSK100; 3, pSKE388; 4, pSKE381; 5, pSKE376; 6, pSKE374; 7, pSKE368; 8, pSKE367; 9, pSKE344; 10, pSKE317; 11, pSKP373; 12, pSKP368; 13, pSKP367; 14, pSKP364; 15, pSKP290.



□ 야생형 SK ◇ SKP373 △ SKP364

그림 5. C-terminal region이 결손된 돌연변이 SKs의 친화성 크로마토그래피에서의 elution profile.

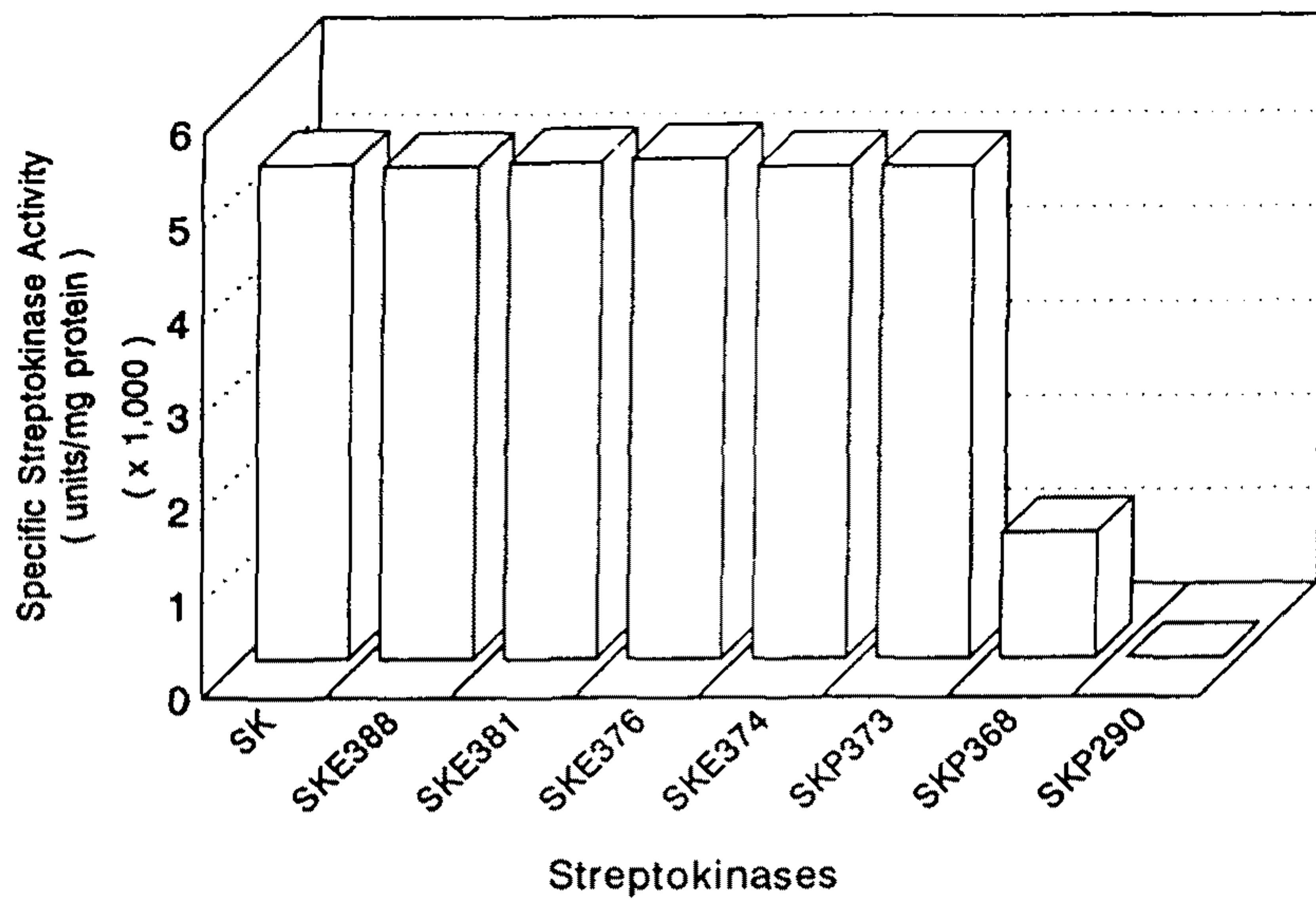


그림6. C-terminal region이 결손된 돌연변이 SK의 활성측정.

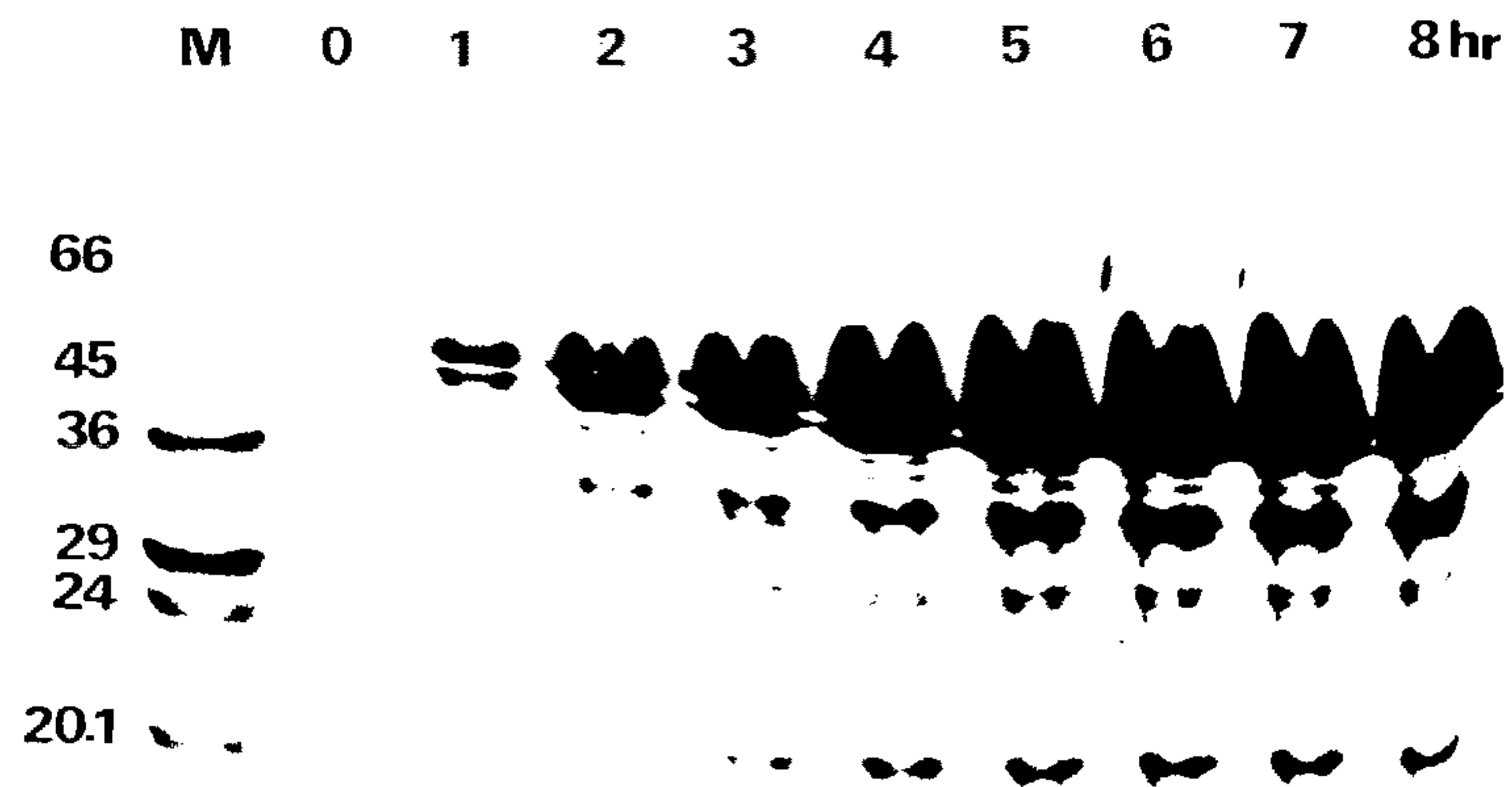
2. SK의 대량생산 균주의 개발

대장균에서 SK를 대량발현하기 위해서 강한 tac 촉진제를 갖는 pKK223-3을 이용하였다. ompA 신호서열을 pIN-III-ompA-Hind (Rentier-Delrue et al., 1988)로 부터 분리하여 pKK223-3의 tac 촉진제 downstream에 서브 클로닝 하고 이를 pKK-ompA라 명명하였다. SK의 구조유전자 만을 PCR법으로 증폭하여 pKK-ompA의 ompA신호서열 downstream에 서브클로닝하고 이를 pSK100이라 명명하였다. pSK100의 구조를 그림 7 에 나타내었다. pSK100을 *E.coli* JM109에 형질전환하여 배양하면서 SK의 발현을 조사한 결과는 그림 8 과 같다. 그림 에서 보는바와 같이 pSK100을 갖는 *E.coli* JM109는 1ml 배지당 5,000 단위의 SK를 약 80%정도의 매우 순수한 형태로 페리플라즘과 배양액에 축적하였다. 이와같이 SK가 배양액으로 분비된 현상은 Malke등에 의해 보고된바 있다 (Malke et.al., 1984).

3. SK의 Random mutagenesis

SK의 활성 또는 plasminogen과의 결합에 중요한 잔기를 찾아내기 위하여 SK 유전자를 template로 하여 특정 dNTP(예 dATP)-limiting 조건하에서 Taq polymerase를 이용한 PCR 반응을 수행하였다. PCR product를 SK 발현벡터인 pSK100에 삽입 하고 활성이 증가 하거나 감소된 변이주를 plasminogen/casein overlay test를 통하여 선별하였다 현재 SK 활성이 소실된 mutant SK를 3종 분리 하였으며 mutation 부위를 찾기 위하여 DNA sequencing을 수행하고 있다.

A. Periplasmic fractions



B. Extracellular fractions



그림 8. pSK100을 갖는 E.coliJM109의 페리플라즘과 배양액의 SDS-PAGE 분석결과

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

제 1 절 연구개발 목표의 달성도

1. 연차별 연구개발 목표의 달성도

가. 1년차 연구개발 목표의 달성도

1년차 연구에서는 exonuclease III를 이용하여 C-terminal deleted SK 유전자를 제조하였고 DNA sequencing을 통하여 결손부위를 결정하였으며 SK의 효율적인 분리를 위한 친화성 크로마토그래피를 성공적으로 개발하였다.

나. 2년차 연구개발 목표의 달성도

2년차 연구에서는 C-terminal deleted SK 유전자를 대장균에서 발현시켰으며 이를 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제한후 활성도를 조사한결과 SK의 C-terminal로 부터 41-46번째 잔기가 SK활성에 중요함을 규명하였다. C-terminal deleted SK중 SKE388, SKE381, SKE376, SKE374, SKP373 등 크기의 감소로인한 항원성이 감소된 SK제제를 개발하였다.

다. 3년차 연구개발 목표의 달성도

3년차 연구에서는 SK의 대량발현및 분비하는 재조합 대장균을 성공적으로 개발하였다. 이 대장균은 1 리터 배지당 200mg이상의 SK를 80% 이상의 순도로 페리플라즘과 배양액에 축적하므로 향후 주사용 SK제제의 개발에 유용하리라 사료된다. Random mutagenesis를 이용한 스트렙토키나제의 기능에 중요한 부위의 규명은 현재 5종의 SK활성이 소실된 mutant SK를 탐색하였으며 이들의 염기서열을 규명하는 중이다.

2. 최종 연구개발 목표의 달성도

본 연구를 통하여 계획하였던 SK의 대량발현 시스템을 성공적으로 개발하였고 C-terminal deletion mutagenesis를 통하여 크기는 감소하였으나 활성이 유지된 돌연변이 SK를 개발하였다. 이

들은 항원성이 감소된 SK제제로서 쓰일 수 있을 것으로 사료되며 SK의 대량발현 대장균과 친화성 크로마토그래피에 의한 정제법은 주사제의 개발에 이용될 수 있다고 사료된다.

제 5 장. 연구개발 결과의 활용계획

제 1 절. 추가 연구의 필요성

스트렙토키나제는 독특한 작용기작을 가지고 있어 학문적으로 매우 흥미로운 연구대상일 뿐 아니라 현재 혈전증 치료제로서 널리쓰이고 있으므로 산업적으로도 매우 중요한 단백질이다. 최근 우리나라에서도 주사용 제제와 Plasminogen과의 complex 제제등을 개발하고 있는 시점이며 이러한 고부가가치 제제의 개발을 위해서는 지속적인 연구가 필수적이다. 특히 random mutagenesis의 지속적인 수행과 이로부터 얻은 정보를 토대로 site-directed mutagenesis를 수행할 경우 우수한 기능을 갖는 혈전증 치료제를 개발 할 수 있을 것으로 사료된다.

제 2 절. 타연구에의 응용, 기업화 추진 방향

1. SK의 대량발현 미생물과 친화성 크로마토그래피에 의한 정제방법

본 연구에서 개발한 SK의 대량발현 미생물은 지금까지 보고된 어떤 생산균주 보다 다량의 SK를 생산 하므로 산업적인 응용가치가 매우 높다고 사료된다. 특히 약 80%의 매우 순수한 형태로 발현 및 분비 하므로 주사용 제제의 개발에 적합하다. 이와 더불어 친화성 크로마토그래피에 의한 SK의 정제방법 또한 단일 조작으로 고순도의 SK를 얻을 수 있기 때문에 주사제 및 plasminogen과의 complex제제등의 고순도가 요구되는 제제의 생산에 이용될 수 있다.

2. C-terminal deleted SK

C-terminal deletion mutagenesis에 의해 개발된 SKE388 ,SKE381 ,SKE376, SKE374, SKP373 등은 크기는 줄어들었으나 활성은 정상SK와 비슷하므로 항원성이 감소된 SK제제로서 쓰일 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 치료제로 쓰이기 위해서는 임상적인 연구가 필요하다.

참고문헌

Damaschun,G., Damaschun,H., Gast,K.,Gerlash,D., Misselwitz,R., Welfle,H., and
Zirwer,D. (1992) *Eur.Biophys.J.* 20:355

Kim,I.C., Kim,J.S., Lee,S.H., and Byun,S.M. (1996)
Biochem. Mol. Biol. Int. in press

Malke,H., and Ferreti, J.J. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3557-3561

Park,S.K., Lee,B.R. and Byun,S.M. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*
174: 282 - 286

Radek,J.T. and Castellino,F.J. (1989) *J.Biol.Chem.* 264:9915

Reddy,K.N. and Markus,G. (1972) *J.Biol.Chem.* 247:1683

Rho,D.C., Kim,J.H., Park,S.K., Lee,J.W., and Byun,S.M. (1986)
Korean Biochem.J. 19:391

Shi,G.Y., Chang,B.I., Chen,S.M., Wu,D.H. and Wu,H.L. (1994)
Biochem.J. 304:235-241

Tillet, W.S. and Garner,R.L.(1933) *J.Exp.Med.* 58:485

Wu,T.P., Padmanabhan,K., Tulinsky,A. and Mulichak,A.M. (1991)
Biochemistry 30:10589-10594

국제특허출원의 출원공개공보 제1159호 137-141
출원번호 93-701826.

여 백

제 2 세 부 과 제

여 백

요 약 문

I. 제목 신규 조절단백질 호르몬 및 항균

제 1 절.

NMR을 이용한 펩티드 호르몬 LHRH의 구조 연구

제 2 절.

우울증 호르몬과 모델 인지질막의 상호작용

II. 연구개발의 목적 및 필요성

제 1 절.

LHRH는 성호르몬으로서 생식 기능에 중요한 역할을 한다. 이 호르몬의 구조 연구를 통하여 그 구조와 기능간의 관계를 밝히고 그럼으로써 더 향상된 기능의 펩티드 유도체를 만들어 낼 수 있다. 이 구조 연구는 치료제 개발에 필수적인 일이다.

제 2 절.

Corticotropin-Releasing Factor(CRF)는 스트레스에 대한 생체내 대부분의 반응을 주관하며 우울증 호르몬으로 불리고 있다. 최근 들어 스트레스는 현대인의 주된 고민거리가 되고 있다. 산업사회가 고도화 되어감에 따라 정신질환의 빈도 또한 기하급수적으로 증가하고 있으며, 치료의 필요성 또한 중요시되고 있다. CRF의 활성을 변화시킨 analog들의 생산을 하기 위해서는 활성에 중요한 구조가 어떠한 특성을 가지고 있는지를 파악하는 것이 매우 중요하다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

제 1 절.

NMR을 사용하여 물과 물/TFE, 두가지 용매를 사용하였고 pH 3과 pH 7의 조건에서

실험을 수행하였다. 온도에 따라서 실험을 하였고 중수소 치환 실험을 통하여 수소결합과 구조의 안정성 여부를 구하였다. 그리고 분자 모델링을 통하여 3차원 구조를 결정하였다.

제 2 절.

CRF는 아미노산 서열상으로 볼때, amphipathic α -helix를 가지고 있는데, 이는 생체막과의 결합에 중요한 구조로 알려져 있다. 따라서, Circular Dichroism을 이용하여 CRF가 모델 생체막 시스템과 결합했을 때, 일어나는 구조적인 변화를 측정하였고, trypsin을 이용한 CRF 가수분해실험을 통해서 중요한 구조적인 motif가 어느 부분인지를 추적하였다.

IV. 연구개발결과

제 1 절.

LHRH는 Tyr5-Arg8 까지 β -turn이 있고 Ser4-Gly6 까지는 특이한 turn의 구조가 있는 것으로 보여졌다. 이 구조는 물/TFE 용매에서 pH 7일 때 가장 안정화 되는 것으로 보여졌다. 분자 모델링을 통해서 pGlu1-Ser4 영역에도 bend가 있어서 pGlu1-Arg8 범위를 helical하게 만들어 주는 것으로 보여졌다. 이 구조에서는 Trp3과 Leu7의 side chain이 가까이 있고 다른 polar side chain과는 떨어져 있다.

제 2 절.

CRF는 모델 생체막 시스템에서 α -helix 구조가 증가했고, 이러한 α -helix구조의 안정화를 위해서는 인지질막 표면의 (-)전하 뿐만 아니라 인지질막의 표면 구조 또한 중요한 역할을 한다. 이 모델 시스템은 생체막에 존재하는 수용체 주위의 생체막 구조와 연관된다고 생각된다.

V. 연구개발결과의 활용계획

제 1 절.

지금 실험에서는 물과 TFE 용매에서 구조를 연구하였는데 최종적인 목표는 생체막이나 수용기에서 어떤 구조인가를 밝히는 것이다. 그래서 기능을 할 때의 정확한 구조를 얻고 이로부터

터 더 좋은 유도체를 설계할 수 있다.

제 2 절.

모델 생체막과 결합했을 때, CRF는 α -helix 구조를 가지므로 이 사실을 기초로 해서 새로운 analog들을 design할 수 있을 것이다. 하지만 NMR을 이용한 보다 구체적인 실험적인 결과가 필요되어 진다.

여 백

S U M M A R Y

(영 문 요약 문)

제 1 절 : NMR을 이용한 펩티드 호르몬 LHRH의 구조 연구

NMR studies on the structure of the luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) in aqueous and trifluoroethanol (TFE) / aqueous (1:1, v:v) solution were performed. The NMR data under these conditions suggested a unique conformation which include a β -I turn fo the Tyr5-Arg-8 segment and an unusual turn of Ser4-Gly6 segment staggered with the β -I turn. The Arg8-Gly10 region is in an extended form. This conformation was most stable in TFE/aqueous buffer at pH 7. Restrained molecular modelling calculation showed that the N-terminal pGlu1-Ser4 region forms an additional bend, making the overall featureof the pGlu1-Arg8 region helical. In this conformation, the polar side chain of Trp3 and Leu7 are locatedin close proximity and ther are from the polar side chains.

제 2 절 : 우울증 호르몬과 모델 인지질막의 상호작용

Corticotropin-Releasing Factor(CRF) which is related about almost stress-responses in the animals is composed of 41 amino acids and has amphipathic α -helix between leusine 8 and arginine 23. The α -helical structure of CRF was induced in the condition of amphiphilic environments. Even if CRF bind on phosphatidylcholine small unilamellar vesicle(SUV), there was not any differences in structure compared with in the buffer solution. But, about 54% of α -helix was induced when bound on phosphatidylserine(PS) SUV. In addition, the reasons of induction of α -helix in PS SUV solution was not only charge interaction, but also membrane surface structure from the experiments with PS+NaCl SUV. It is thought that PS SUV system was related about the interface between receptor and lipid bilayer.

여 백

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction	45
part 1. 3-D structural studies on LHRH by NMR	
part 2. Interactions between CRF and model membrane	
Chapter 2. Current research status of the field	46
part 1.	
part 2.	
Chapter 3. Research subject and Result	47
part 1.	
part 2.	
Chapter 4. Degree of object accomplishment	77
part 1.	
part 2.	
Chapter 5. Application plan of the accomplishment	77
part 1.	
part 2.	
Chapter 6. References	78

여 백

목 차

제 1 장 서 론	45
제 1 절. NMR을 이용한 펩티드 호르몬 LHRH의 구조연구	
제 2 절. 우울증 호르몬과 모델 인지질막의 상호작용	
제 2 장 국내외 기술개발 현황	46
제 1 절.	
제 2 절.	
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	47
제 1 절.	
제 2 절.	
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도	77
제 1 절.	
제 2 절.	
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	77
제 1 절.	
제 2 절.	
제 6 장 참고문헌	78

여 백

제 1 장. 서 론

제 1 절.

LHRH는 여성의 배란조절에 관계되는 호르몬으로 임신조절의 주된 수단으로 사용되고 있을 뿐만 아니라, 생식과 관련된 암의 치료제로도 연구되고 있다. 실질적으로 단백질 호르몬 제제는 여러 가지 문제점들로 인해 그렇게 많이 상품화되지는 않았지만, LHRH analog는 현재 전세계적으로 사용되는 임신관련 약품이다. 대부분의 단백질 제제 약품개발에 있어서, 가장 먼저 필요 되어지는 것은 목표 물질의 구조를 알고 있어야 한다는 것이다. 국내의 의과학 관련 기술력 축적이라는 차원에서, 더 나아가 새로운 LHRH analog의 개발을 위해, NMR을 이용하여 3차구조를 규명하고, 컴퓨터를 이용한 모델링의 노하우를 획득하고자 한다.

제 2 절.

우울증 호르몬이라 불리는 corticotropin-releasing factor(CRF)는 스트레스에 대한 생체반응을 조절하는 것으로 보고 되어있는데, 정신적인 작용뿐만 아니라, 에너지 대사, 생식기능 등과 같은 전반적인 생체기능을 조절한다. 따라서 CRF는 머지 않아 스트레스에 대한 치료제로써 중요한 연구물질이 될 것이다. 대부분의 호르몬들이 그러하듯이 CRF 또한 생체막에 결합할 수 있는 능력을 지닌다. 생체막에 결합하므로써, 생체막 표면에 있는 호르몬 수용체에 보다 효과적으로 작용할 수 있기 때문이다. 보다 효과적인 analog들을 design하기 위해서 필요되는 CRF가 CRF 수용체에 결합했을 때에 가지는 구조를 밝혀내는 것이지만, 먼저 CRF가 일차적으로 작용하는 생체막과 결합했을 때, 가지는 구조 또한 매우 중요한 의미를 지닌다. 본 연구에서는 일차적으로 spectropolarimeter와 다른 생화학적인 방법을 이용해서 생체막 모델 시스템에서 보여지는 CRF의 구조적인 변화를 규명하고자 했다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절.

현대사회로 접어들면서, 임신조절이라는 과제는 사회적인 문제와 맞물려 많은 연구가 이루어지고 있을 뿐만 아니라 부가가치에 있어서도 매우 뛰어나다. 이러한 과제에 있어서 주된 연구재료는 임신에 관계되는 호르몬 종류들이다. 그 중에서도 특히 LHRH는 중심적인 작용을 하기 때문에 많은 연구가 이루어져 왔고, 현재 일본 회사에서 만든 analog가 대부분의 시장을 잠식하고 있고, 미국에서도 곧 새로운 상품이 시판될 예정이다. 하지만, 국내에서는 엄청난 개발비와 함께 경험부족 때문에 이에 대한 연구는 전무한 실정이다. 본 과제는 새로운 LHRH analog 개발에 앞서 LHRH의 구조를 규명하여 상품화를 위한 기초를 마련하고자 한다.

제 2 절.

Anxiety(우울증)에 관한 연구는 사람이 느끼는 공포와 불안에 대한 기작을 연구하는 neurobiology가 최근에 이룬 급속한 발전과 병행된다. 실제로 이러한 정신적인 현상에 여러가지 생체내 물질이 관계하는 것이 밝혀짐에 따라 우울증과 같은 여러가지 정신질환에도 직접적인 약물치료가 훨씬 용이하게 되었다. 이러한 맥락에서 CRF(corticotropin releasing factor)는 여러 가지 stress에 관계하는 hormone으로 알려져 있고 작용 기작과 여러 가지 analog와 antagonist들이 연구되고 있다. 이러한 우울증을 치료하기 위한 여러 가지 방법들 중 가장 기본이 되는 것은 효과적인 CRF의 구조를 밝혀내는 것이다. 하지만 특정한 구조가 중요하다는 것과 같은 추정만 있을 뿐, 구체적인 증거는 거의 없는 상황이다. 따라서 활성도에 보다 중요한 구조가 어떠한 것인지를 직접적으로 규명하는 것이 매우 중요시된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절.

NMR을 이용한 펩티드 호르몬 LHRH의 구조 연구

1. LHRH의 구조적인 특성 및 생체내 활성

LHRH (luteining hormone releasing hormone)는 luliberin, 또는 gonadotropin -releasing hormone이라 불리며 10개의 잔기를 가지고 pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly의 서열을 가진다(Burgus et al., 1972; Matsuo at al., 1971). LHRH와 그 유도체들은 성기능 조절에 효과적이고 성출문에 관계 있는 암의 치료에 사용될 수 있으므로 많은 연구가 되어 왔다. 그러나 용액 상에서 매우 유동적인 관계로 그 정확한 구조는 아직 밝혀지지 않았다. 이 문제는 작은 펩티드에 대해서 흔히 있는 일이다(Dyson et al. 1988a, 1988b).

CD (circular dichroism) 연구로는 중성인 물에서는 구조가 없지만 온도와 pH를 올려 가면 정돈된 구조의 증가가 보여졌다(Marche et al. 1973). 물과 TFE (trifluoroethanol) 용액은 양친성 환경을 만들어 주는 것으로 알려져 있는데 이는 또한 일반적으로 2차 구조의 안정성을 증가시켜 주는 것으로 알려져 있다(Mcknight et al. 1989; Chi et al. 1995). 이 용액에서 CD 연구를 통하여 β strand의 구조가 제시되었다. 그리고 Gly-6이 다른 D-아미노산들로 치환되었을 때 호르몬의 기능이 향상되는 것으로부터 type II β -turn이 Ser-4에서 Leu-7에 걸쳐 있고 이 부분이 중요하다는 것이 알려졌다. Tyr-5에서 Arg-8까지 변형된 type II β turn이 생긴다는 것이 empirical energy calculation에서 제안되었다(Monamy et al. 1976a,b). 한편 최근의 conformational energy calculation 연구에서는 Tyr-5에서 Arg-8까지에 type II, II', III' 등의 다른 turn을 갖는 8개의 구조가 계산되었고 알려진 turn에 들어가지 않는 새로운 세개의 turn이 보고되었다. 이 실험에서는 이러한 구조들의 차이를 해명하기 위해서 물과 TFE의 용액에서 pH 7과 3에서의 구조가 2D NMR 분광법을 통하여 연구되었다. 이 연구에서는 LHRH가 His-2부터 Arg-8 보통과 다른 구조를 가지고 있고 Arg-8에서 Gly-10까지는 β strand를 가지는 것으로 보여졌다.

2. 연구 재료 및 방법

펩티드는 Sigma Chemical Co.로부터 98% 순도를 가지는 것을 구입하였다. TFE-d₃는 Cambridge Isotope laboratory로부터 구입하였고 D₂O는 Aldrich Chemical Co.로부터 구입하였다. 모든 다른 시약들은 분석용 등급을 사용하였다.

LHRH는 50 mM phosphate buffer나 50% 50 mM phosphate buffer와 TFE (1:1 부피비)에 녹였다. pH는 3 또는 7로 조정되었고 LHRH의 농도는 280 nm에서 absorption coefficient를 이용하여서 결정되었다.

LHRH는 lyophilize 되어서 pH 3이나 7의 수용액 또는 물/TFE 용액에 녹여졌다. DQF-COSY (double quantum filtered-correlation spectroscopy)를 제외한 모든 실험은 10°C에서 행해졌다. pH는 마지막으로 NMR tube 내에서 NaOD나 DCI을 사용하여 맞추어졌다. NMR 실험은 Bruker DMX 600 spectrometer를 사용하여 행해졌고 UXNMR이나 FELIX program을 사용하여 process 되었다. Sequential assignment와 구조 정보들이 DQF-COSY와 TOCSY (total correlation spectroscopy) 그리고 NOESY (nuclear Overhauser enhancement spectroscopy)를 사용하여 얻어졌다. TOCSY는 60ms와 75ms를 사용하였고, MLEV-17 composite pulse를 이용하여 spin locking을 하였다(Bax et al. 1985). NOESY는 mixing time을 50ms에서 400ms 까지 사용하였다. NOESY에서 물의 resonance는 WATERGATE (GrAdient-Tailored Excitation) 방법을 이용하여 suppress 하였다. 다른 spectra에서는 presaturation을 사용하여 relaxation delay 동안 water resonance를 irradiation 시키는 방법으로 water peak을 suppress 하였다. 1.7초의 relaxation delay가 사용되었고 carrier frequency는 water resonance로 맞추어졌다. NOESY와 TOCSY 실험에서, data는 t₂ dimension으로 2048 point와 512개의 t₁ increment를 사용하였고 64 번 scan을 하여 average 하였다. DQF-COSY에서는 4k x 1k data point를 사용하였다. TPPI (time proportional phase increment) 방법을 사용하여 phase sensitive mode로 detect 하였다 (Marrion et al. 1983). 1D NMR로 283K에서 341K까지 온도에 따라서 실험을 하였다.

Backbone amide의 수소에 대하여 deuterium exchange 실험을 하였다. 이 실험에서는 lyophilize 된 펩티드를 10°C에서 TFE-d₃와 D₂O의 용액에 녹이고 1D NMR을 얻었다. 7분 부터 3시간 까지 얻은 5개의 스펙트럼에 대하여 NH resonance의 면적이 Trp C₇H에 대하여 normalize 되었고 exponential function을 사용하여 curve-fitting을 하여 rate을 결정하였다.

구조 계산은 Indigo 2 (Silicon Graphics Inc.) workstation과 SERI (System Engineering

Research Institute)에 있는 Cray Y-MP C916/16512 supercomputer 에서 수행되었다. pH 7에서 물/TFE 용매에 녹아 있는 LHRH의 NOESY spectra로 부터 40개의 거리 constraint가 얻어졌다. NOESY의 mixing time을 50 ms에서 350 ms 까지의 spectra에 대하여 각각 volume integration 을 하였고 거리는 upper bound를 2.8, 3.7, 5.0 Å의 세개로 분류를 하였다. reference distance는 Tyr-5의 2H와 3H의 사이로 사용하였다. 4개의 $J_{HN\alpha}$ 값들이 DQF-COSY로부터 구해졌고 ϕ dihedral angle의 upper bound로 사용되었다. DGII (Biosym, Inc.)를 사용하여 NMR constraint 를 넣고 완전한 extended backbone과 side chain conformation에서 출발하여 30개의 초기 구조를 만들고 minimize 시켰다.

Constraint 들에 대하여 가장 작은 violation을 보인 구조들에 대하여 NMR chitec (Biosym, Inc.) 을 이용 SA (simulated annealing)과 함께 restrained molecular dynamics를 해 주었다. Molecular dynamics 계산에는 DISCOVER 2.9 (Biosym, Inc.)의 consistent valence force field (CVFF)가 사용되었다. SA 과정은 먼저 steepest descent minimization을 사용하여 100 iteration 으로 minimize를 시켜주고 conjugate gradient minimization으로 500 iteration을 해주었다. 다음 으로 300K에서 0.5 ps의 RMD로 더 minimization을 하였다. 이 과정이 끝난 후에 온도를 1000K 까지 올리고 RMD를 50 ps 동안 수행해 주었다. 그 다음 온도를 점차적으로 낮추어서 300K에 이르기까지 5 단계로 각각 2 ps 동안 RMD를 해주었다. 마지막으로 steepest descent minimization (100 step)과 뒤이어 conjugate gradient minimization (1000 iteration)을 두번 수행 하였다.

3. 실험 결과

가. NMR 실험

NMR 실험은 물에서는 pH 3에서, 물/TFE에서는 pH 3과 pH 7에서 수행하였다. 1차적인 CD 실험 결과로 물에서 pH 3과 pH 7에서의 구조는 같다고 나왔다. LHRH의 완전한 assignment는 DQF-COSY, TOCSY, NOESY spectra를 사용하여 얻어졌고 그 결과는 table 1에 있다.

여러 solvent에서 NOESY spectra의 NH/NH 영역이 그림 1에 나와있다. pH 3 의 물과 물/TFE 용액에서 pGlu-1 부터 Arg-8까지 NH-NH connectivity가 나와 있는데 물에서는 1/2, 2/3 및 3/4

TABLE 1 NMR assignments for LHRH in various solvents

Residues	Chemical shift (ppm)*			
	HN	H ^α	H ^β	Others
H₂O , pH 3 , 10°C				
pGlu-1	7.85	4.22	1.65, 2.36	H ^γ 2.26, 2.29
His-2	8.58	4.65	3.09,3.24	2H 8.55; 4H 7.17
Trp-3	8.40	4.69	3.18	2H 7.17; 4H 7.58; 5H 7.09; 6H 7.23; 7H 7.49; NH 10.16
Ser-4	8.27	4.38	3.82; 3.95	
Tyr-5	8.16	4.43	2.92, 3.06	2,6H 7.11; 3,5H 6.82.
Gly-6	8.40	3.82, 3.95		
Leu-7	8.12	4.37	1.60, 1.64	H ^γ 1.57; H ^δ 0.87 0.93
Arg-8	8.46	4.33	1.65, 1.75	H ^γ 1.53; H ^δ 3.10; NH 7.17
Pro-9		4.36	1.92, 2.26	H ^γ 2.03, 2.26; H ^δ 3.52, 3.67
Gly-10	8.68	3.86, 3.94		
NH ₂ -11	7.54			
TFE/H₂O, pH 3 , 10°C				
pGlu-1	7.73	4.20	1.65, 2.37	H ^γ 2.28, 2.33
His-2	8.41	4.68	3.07,3.18	2H 8.53; 4H 7.19
Trp-3	8.21	4.70	3.24	2H 7.18; 4H 7.59; 5H 7.11; 6H 7.22; 7H 7.48; NH 9.97
Ser-4	7.98	4.37	3.62; 3.79	
Tyr-5	7.81	4.39	2.93, 3.06	2,6H 7.09; 3,5H 6.84.
Gly-6	8.22	3.80, 3.99		
Leu-7	7.88	4.42	1.61, 1.68	H ^γ 1.61; H ^δ 0.86 0.93
Arg-8	8.10	4.63	1.68, 1.83	H ^γ 1.58; H ^δ 3.13; NH 7.17
Pro-9		4.33	1.92, 2.24	H ^γ 2.06, 2.26; H ^δ 3.54, 3.67
Gly-10	8.47	3.76, 3.99		
NH ₂ -11	7.53			
TFE/H₂O, pH 7 , 10°C				
pGlu-1	7.80	4.21	1.74, 2.38	H ^γ 2.25, 2.30
His-2	7.95	4.45	2.74, 3.03	2H 7.99; 4H 6.99
Trp-3	7.43	4.50	3.17, 3.36	2H 7.08; 4H 7.40; 5H 7.10; 6H 7.27; 7H 7.54; NH 10.04
Ser-4	8.10	4.15	3.18; 3.76	
Tyr-5	7.86	4.42	3.11, 3.15	2,6H 7.14; 3,5H 6.84.
Gly-6	8.21	3.92, 3.98		
Leu-7	7.79	4.44	1.65, 1.79	H ^γ 1.71; H ^δ 0.95 1.02
Arg-8	7.98	4.68	1.76, 1.88	H ^γ 1.63; H ^δ 3.17; NH 7.20
Pro-9		4.39	1.97, 2.20	H ^γ 2.11; H ^δ 3.62, 3.79
Gly-10	8.54	3.77, 4.04		
NH ₂ -11	7.58			

*Chemical shifts were referenced to TSP. The estimated error is ±0.01ppm. pGlu ; pyroglutamic acid. NH₂-11 ; C-terminal amide NH₂.

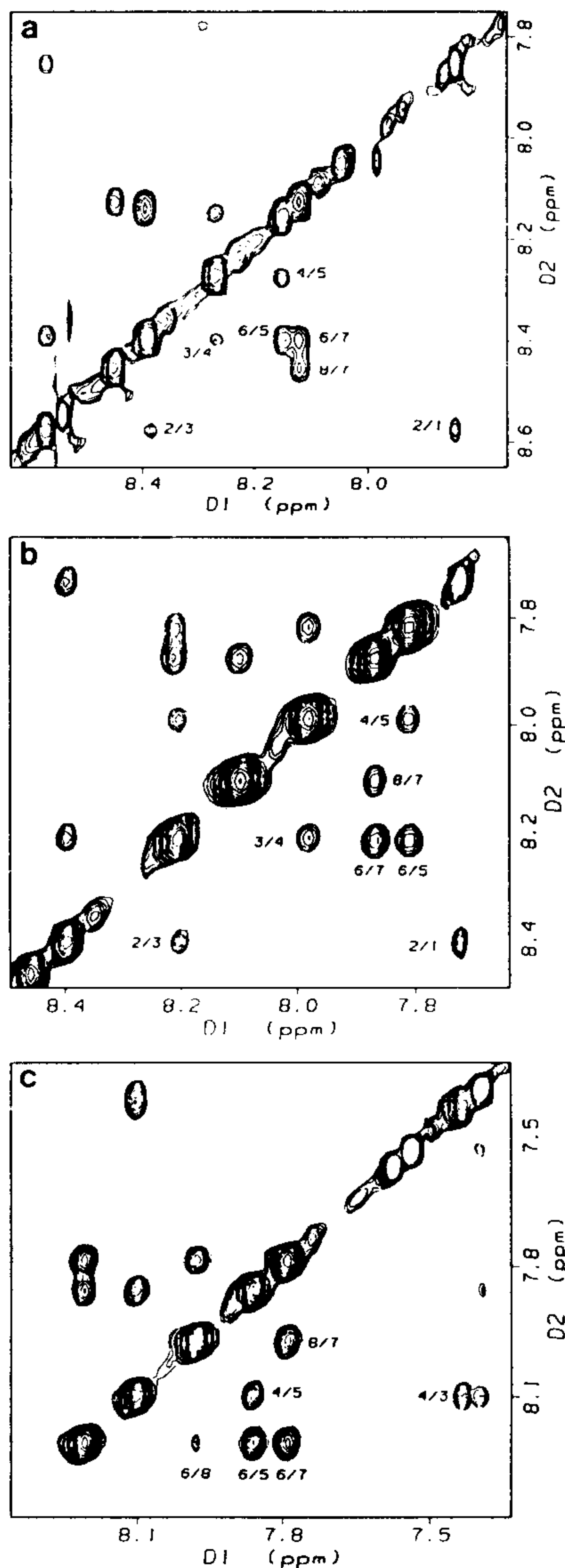


FIGURE 1 NH/NH region of NOESY spectra of the LHRH under various solvent conditions. All the experiments were performed at 10°C. (a) 50mM phosphate buffer at pH 3. (b) TFE/50mM phosphate buffer (1:1, by volume) at pH 3. (c) TFE/50mM phosphate buffer (1:1, by volume) at pH 7.

의 connectivity가 다소 약하다. pH 7의 물/TFE 용액에서는 1/2, 2/3의 connectivity는 보이지 않고 그대신 그 다음부터 7/8까지 connectivity는 매우 강하다. 그림 2에 모든 connectivity와 그 세기가 도시되어 있다. 위에서 말한 바처럼 pH 7에서 물/TFE 용액의 sequential interaction은 다른 용액보다 매우 크다. 또한 medium range NOE도 pH 7에서 TFE/H₂O에서 더 많이 보여진다. 그림 2에서 Ser-4에서 Arg-8까지 부분의 구조는 모든 용매에서 똑같지만 pH 7, 물/TFE 용매에서 다른 경우보다 훨씬 더 안정화되어 있다. 따라서 정밀한 구조 계산은 pH 7에서 물/TFE의 경우에 대해서 수행하였다.

pH 7, 물/TFE 용매에서 Tyr-5/Gly-6과 Gly-6/Leu-7 그리고 Leu-7/Arg-8 사이에 강한 NOE가 있는 것은 이 부분에 안정된 구조가 있다는 것을 의미한다. 이 용매에서 Gly-6/Arg-8 사이의 α N(*i, i+2*) NOE, 그리고 Gly-6/Arg-8 사이의 NN(*i, i+2*) NOE, 또한 Tyr-5/Arg-8 사이의 α N(*i, i+3*), Leu-7/Arg-8 사이의 sequential NOE가 보여졌다. 또한 Gly-6에서 Arg-8 사이에는 NN(*i, i+1*) NOE가 α N(*i, i+1*) 보다 훨씬 강하였다. 이러한 NOE connectivity들은 Tyr-5부터 Arg-6 까지가 β turn을 이루고 있다는 것을 시사한다.

Ser-4와 Leu-7 사이의 α N(*i, i+3*) NOE는 또한 구조가 Ser-4까지 연장되어 있다는 것을 의미한다. 그러나 Ser-4에서 Gly-6까지는 지금까지 알려진 어떤 구조에도 부합하지 않는다. Tyr-5와 Gly-6 사이의 강한 α N(*i, i+1*) NOE는 규칙적인 α -helix나 3_{10} -helix에서는 생길 수 없다. 한가지 가능성 있는 구조는 type II β turn이다. Tyr-5의 작은 $J_{HN\alpha}$ 값도 type II turn을 제시한다. 그러나 Tyr-5와 Gly-6사이의 medium range NOE는 잘 들어맞지 않아서 이 구조가 다소 특이한 turn의 구조를 가질 것이라는 것을 보인다.

Deuterium exchange 실험 결과와 thermal coefficient는 또한 펩티드 내에 안정한 구조가 있을 것이라는 것을 뒷받침한다 (table 2). Leu-7과 Arg-8의 exchange rate은 다른 것들의 1/3 밖에 되지 않는다. 이는 10°C에서 수소결합이 있고 이것이 구조를 안정화 할 것이라는 것을 나타낸다. Tyr-5와 Leu-7의 thermal coefficient는 가장 작은 값을 보인다. 펩티드 내에 NH가 수소결합을 할 때 이 값은 4에서 6 ppb 사이이고 그렇지 않을 때는 10 ppb라고 알려져 있다. 이 Tyr-5와 Leu-7이 매우 작은 값을 가지는 것은 이들이 안정된 구조안에서 수소결합이나 주변 소수성 환경에 의하여 용매로 부터 보호되어져 있다는 것을 암시한다. pH에 따른 결과로는 이들이 pH 3에서도 유지가 되나 그보다 pH 7에서 더욱 안정하다는 것을 보인다.

TABLE 2 Hydrogen-duterium exchange rate constants in TFE/H₂O(D₂O) at pH 3 and the thermal coefficients in TFE/H₂O(H₂O) at pH 7 and at pH 3 of amide protons in LHRH

Residues	H/D exchange rate constants (10 ⁻² min ⁻¹)*	Thermal coefficient (ppb/deg) [‡]	
		pH 7	pH 3
pGlu-1	-	-	6.5
His-2	3.2	-	6.1
Trp-3	3.1	4.7	5.6
Ser-4	-	4.8	4.1
Tyr-5	3.1	1.4	3.7
Gly-6	3.1	5.6	5.2
Leu-7	1.2	2.9	4.6
Arg-8	1.0	4.7	5.2
Gly-10	3.2	7.9	7.1

*The signals were obtained after dissolving the peptide in D₂O/TFE at pH 3, 10°C. The area of each NH peak was calculated from the 5 time intervals ranging 7 min to 3 hr. [‡]The data were obtained between 10°C and 68°C.

TABLE 3 The backbone dihedral angles of LHRH

Residue	Angle	References*		8 Selected Conformers from SA calculation							
		A	B	1	2	3	4	5	6	7	8
pGlu1	ψ	173	171	125	-49	-48	-47	-49	124	-48	-46
His2	ϕ	-65	-65	-123	-90	-87	-84	-89	-142	-90	-82
	ψ	-33	-31	-61	128	120	-59	127	124	128	-54
Trp3	ϕ	-68	-68	-135	-144	-143	-141	-141	-142	-144	-136
	ψ	-43	-39	81	87	88	87	86	88	87	83
Ser4	ϕ	-63	-71	-149	-142	-143	-145	-146	-141	-145	-147
	ψ	-40	-33	-64	-47	-48	-51	-52	-44	-47	-59
Tyr5	ϕ	-73	-79	-59	-60	-68	-70	-57	-62	-59	-65
	ψ	-28	-22	-28	-24	-3	1	-25	-28	-25	-27
Gly6	ϕ	-69	-87	-57	-61	-63	-65	-57	-63	-59	-62
	ψ	-40	-38	-45	-27	-30	-26	-49	-17	-36	-23
Leu7	ϕ	-82	-81	-99	-77	-78	-78	-80	-78	-78	-78
	ψ	-28	-44	45	-13	-8	-15	15	-22	-5	-17
Arg8	ϕ	-139	59	-152	-137	-141	-146	-142	-148	-137	-140
	ψ	87	75	147	147	118	117	138	121	148	113
Pro9	ψ	175	-20	113	115	103	113	103	137	116	138
Gly10	ϕ	86	-79	-173	-92	-152	-92	-91	-175	-174	175
	ψ	144	75	-87	-87	85	-87	-87	-88	-87	-84

*The most populated two conformers obtained by Nikiforovich and Marshall (1993) which shows distorted type III β -turn in Tyr5-Arg8 segment. The A and B in this Table correspond to 2 and 3, respectively, used by these authors.

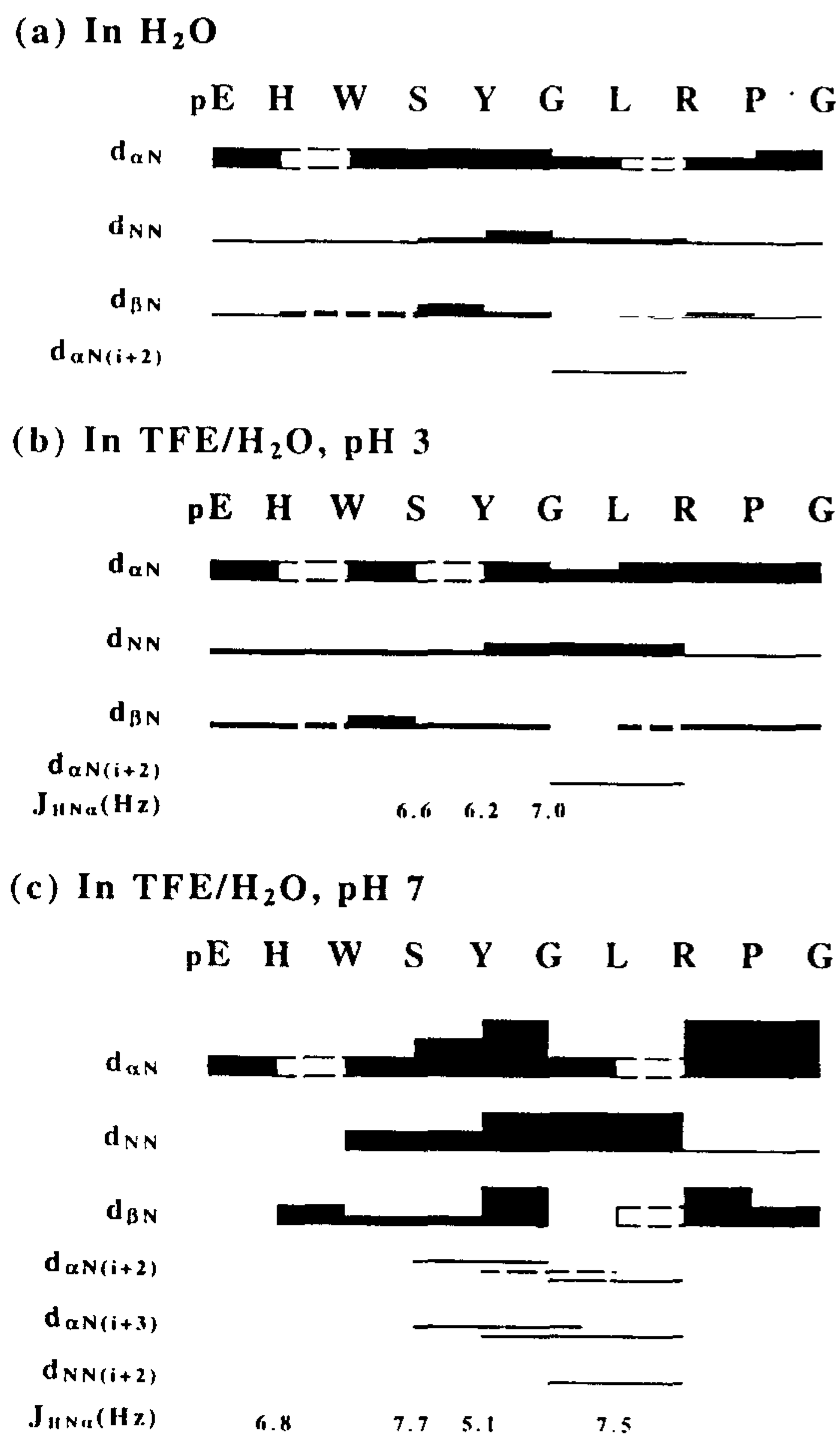


FIGURE 2 Summary of the sequential and medium-range connectivities and some coupling constants ($J_{HN\alpha}$) of LHRH under various conditions. The strength of observed NOEs are presented by thickness of bars. The dashed line and boxes enclosed with dashed lines represent the overlapped crosspeaks.

물에서와 물/TFE에서 비교적 높은 thermal coefficient와 낮은 NOE 세기를 보이는 것은 LHRH가 이 조건에서 다소 flexible하다는 것을 제시한다. NMR 실험에 의하면 LHRH는 pH에 따른 물과 물/TFE 조건에서 random coil과 구조들이 섞여 있는데 구조가 있는 곳은 같은 부분이라는 것을 보인다.

나. 분자 모델링

그림 3에서는 SA 과정에 의해서 40개의 처음 구조로부터 생성된 8개 conformer를 보인다. 이들은 distance violation을 가장 적게 하면서 average RMSD 또한 작은 구조들이다. 계산된 구조는 Ser-4에서 Arg-8까지 구조를 가지며 Ser-4, Tyr-5, Gly-6이 특이한 turn을 가지며 이는 NMR 결과와 잘 들어맞는다. 또한 RMSD도 펩티드내에 다른 부분보다 작아서 이 부분이 안정하다는 것을 잘 보인다. 그림 3에 있는 전체 구조는 반시계 방향으로 도는 coil이다. 여기서 Arg-8의 NH와 Tyr-5의 C=O, 그리고 Leu-7의 NH와 Ser-4의 C=O 사이의 거리가 각각 2.34, 2.36Å으로서 수소결합을 할 수 있다는 것을 눈여겨 볼 필요 있다. 또한 그림 4에서는 전체 에너지가 가장 낮은 구조를 보이는데 Gly-6의 NH와 Tyr-5의 N, 그리고 pGLU-1의 NH와 Ser-4의 O가 수소결합을 이룰 수 있다는 것을 보인다. 그림 4는 또한, Trp-3과 Leu-7의 side chain이 pGlu-1, His-2, Tyr-5, Gly-10의 side chain과 반대 편에 있다는 것을 볼 수 있다. 이 결과는 long-range NOE와 잘 부합된다. Trp-3 (7H, 6H, NH)과 Leu-7의 δ H 사이에 또한 NOE가 있고 Gly-10의 NH와 Tyr-5의 2H, 4H 사이에도 NOE가 있다. 따라서 이들로부터 LHRH는 양친성을 가지는 것을 보이는데 이는 fluorescence resonance energy transfer 실험과 일치한다.

4. 고찰

지금까지 많은 펩티드들에 대해서 물이나 TFE에서, 또는 lipid vesicle이나 micelle등의 양친성 표면에서 구조가 연구되어져 왔다. 이들 작은 펩티드들은 물에서는 보통 구조를 가지지 않으며 TFE나 양친성 표면에서 구조를 가지는 것으로 보여졌다. 보통의 구조는 α -helix, β -sheet 또는 β -turn 등이 보고 되었다. LHRH에서 보여진 구조는 turn들로 구성된 독특한 나선형 구조이다. 이것은 LHRH가 TFE안에서 β strand를 갖는다고 보고된 CD 실험과 일치하지 않는다. 이 복잡한

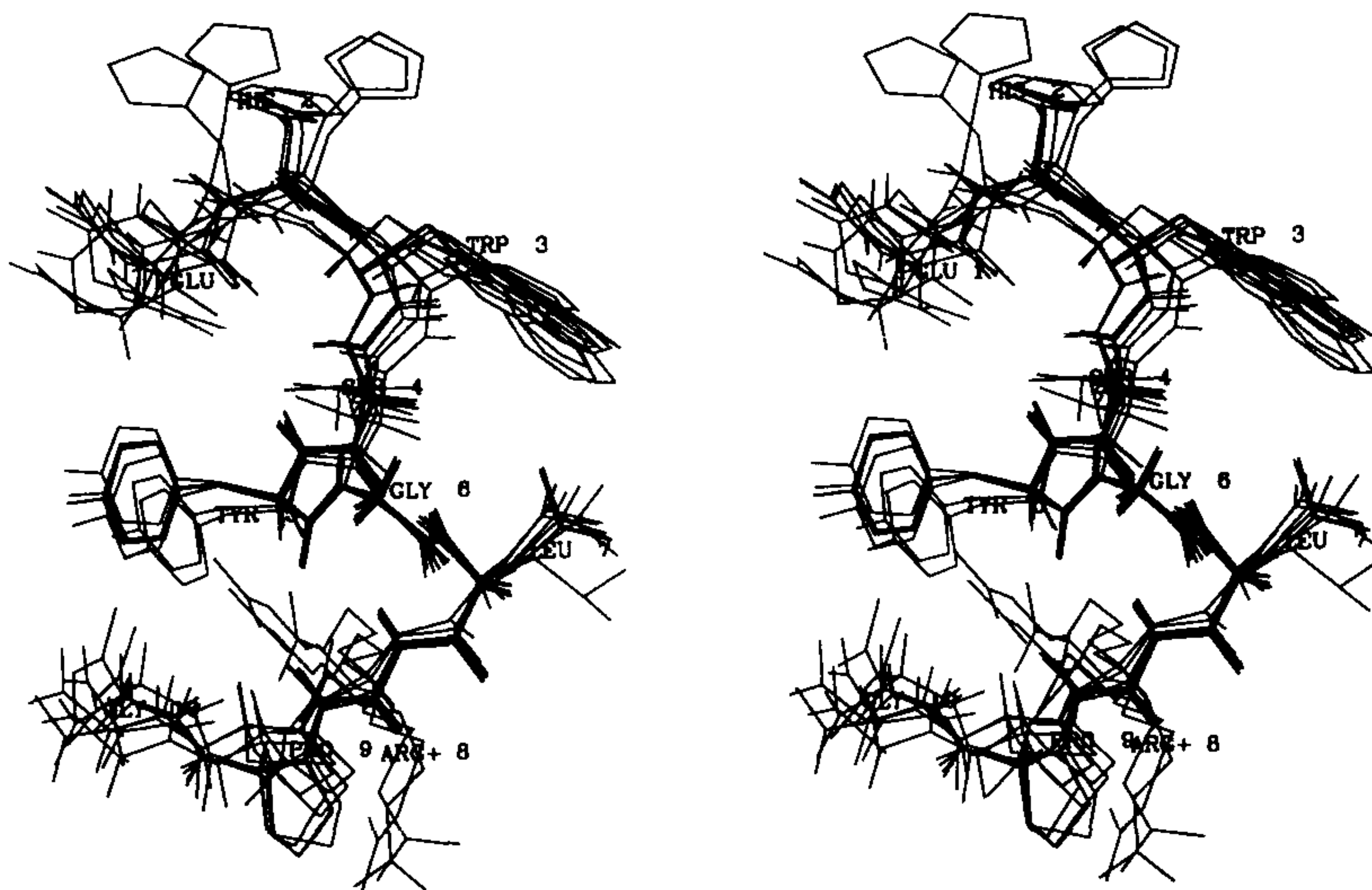


FIGURE 3 Stereoview of the heavy atoms of the 8 converged structures of LHRH. The structure calculations used the NMR constraints obtained from the LHRH in TFE/Water at pH 7, 10°C. The structures are superimposed on the Ser4-Arg8 region.

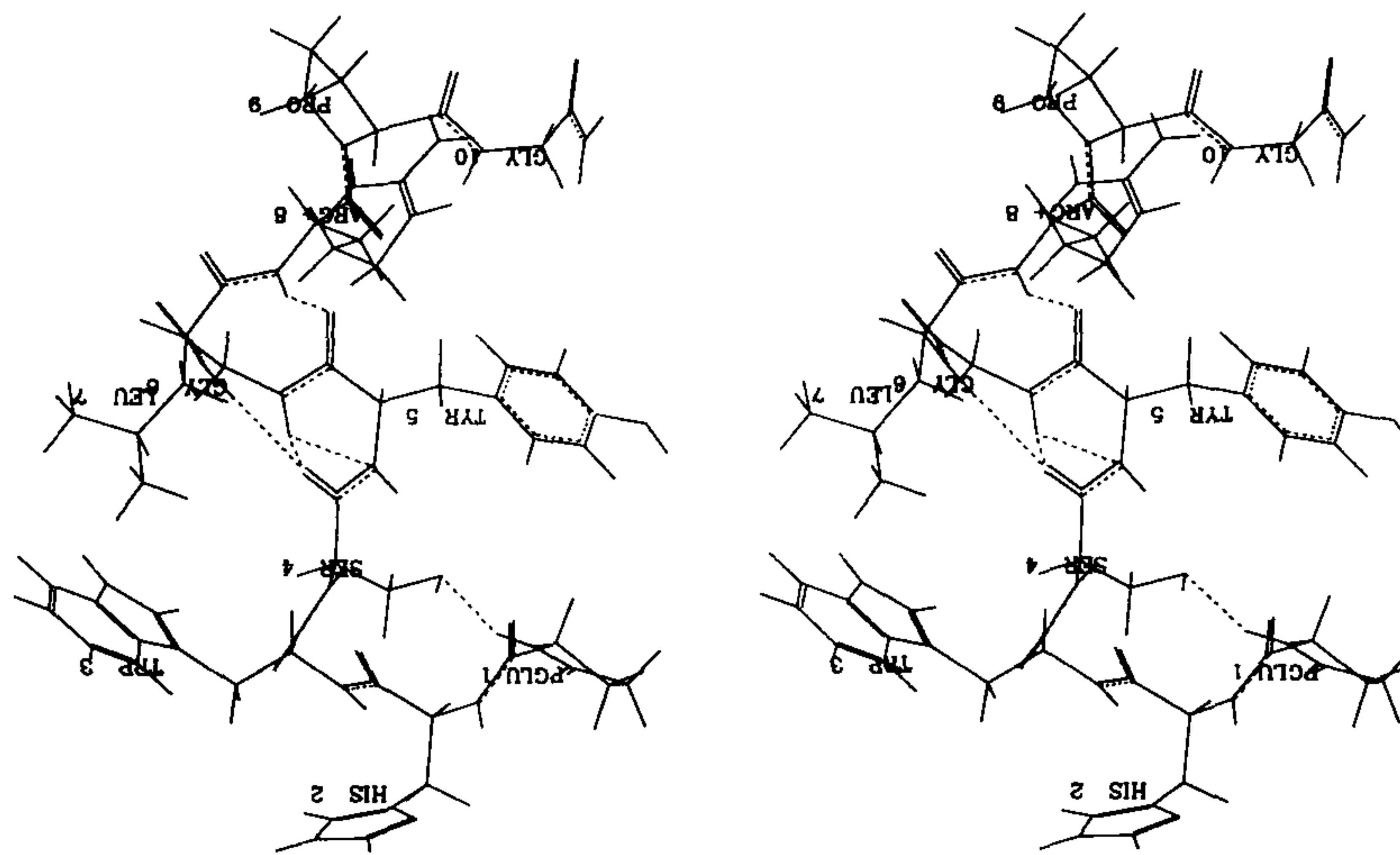


FIGURE 4 Stereoview of one of 8 converged conformers which shows the lowest total energy. Dashed lines show H-bonds.

구조를 CD로 연구하다는 것은 무리가 따르고 오히려 NMR이 더 정확한 정보를 줄 수 있다. β -turn에 대한 처음 보고는 D-아미노산으로 치환했을 때 turn이 증가한다는 것에서 처음 보고되었다. 그뒤 여러 계산 결과 이 펩티드 내에 강한 turn이 있으리라는 보고가 되어져 왔다. 여기에는 type II turn이나 type III turn이 있을 것이라는 제안이 있었다. 이 실험에서는 type I turn의 구조가 보이는데 type I turn은 type III turn의 구조를 포함하므로 이 것과는 어느정도 일관성이 있다. 또한 LHRH내의 각 아미노산들의 낮은 에너지를 계산하여 flexibility를 검사한 보고가 있다. 그 연구에서는 Tyr-5가 가장 rigid하고 Tyr-5에서 Arg-8까지가 전체에서 가장 rigid한 부분이라고 결론이 나오고 이는 지금의 실험과 부합된다.

양친성 α -helix는 펩티드 홀몬이 생체막이나 수용기에 가서 붙을 때 작용하는 구조일 것이라고 제안되어 왔다. 이렇게 볼 때 LHRH는 물/TFE에서 α -helix를 이루지 않으며 양친성을 가진다는 점이 흥미롭다. 그러나 물론 LHRH가 생체막이나 수용기에서 어떠한 구조를 가질 지는 알 수 없다. 양친성 표면을 가진 LHRH의 구조는 생체막이나 수용기에서도 유지될 지 모른다.

제 2 절.

우울증 호르몬(corticotropin-releasing factor)의 구조에 관한 연구

1. Corticotropin-Releasing Factor의 구조적인 특징

Corticotropin-releasing factor(CRF)는 41개의 아미노산으로 이루어지는 호르몬으로, 이와 비슷한 sequence를 가진 sauvagine과 urotensin I을 묶어서 CRF Family라 부른다. 전체 아미노산 서열은 다음과 같은데, C-말단은 amidation이 되어 있다.

Ser-Gln-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-NH₂

CRF family의 아미노산 서열을 통계적으로 비교 분석해 보면, amphipathic한 부분을 포함하는 아미노산 30개 이상으로 구성되는 긴 α -helix를 형성할 수 있음을 예측할 수 있다(Fig. 1). 호르몬이나 다른 여러 가지 수용체들과 작용하는 ligand들이 생체막과 작용하는 것은 아주 중요한 의미를 가진다. 먼저, targeting하는 차원이 3차원에서 2차원으로 줄어들기 때문에 실질적인 생체내 호르몬의 농도를 효과적으로 증가시킬 수 있고, 생체막과 상호작용하면서 receptor와 이루는 결합을 강화시키거나 조절하기 때문이다[Deborah R. Fattal & Avinoam Ben-Shaul]. Amphipathic α -helix는 인지질 막과 작용하는 peptide들이 가질 수 있는 여러 가지 구조 중의 하나이다. 비록, 전체의 hydrophobicity가 그렇게 높지 않더라도 hydrophobic한 아미노산들이 α -helix의 한쪽 표면에 모여 있기 때문에 이 hydrophobic cluster로 인하여, 전체의 α -helix의 축이 인지질 막과 평행한 형태로 결합하게 된다. 실제로 amphipathic α -helix를 가지는 CRF는 PC SUV에 아주 낮은 dissociation 상수를 가지면서 결합을 하는 것으로 보고되었다[S. H. Lau et al.]. 이러한 amphiphilicity가 hydrophobic 결합에 중요한 것은 reverse-phase HPLC를 이용해서 증명되었다[Eberhard Krause et al.]. 이러한 사실들은 CRF의 작용에 있어서 인지질 막이 중요하다는 것을 의미한다. 그럼에도 불구하고, 지금까지의 CRF의 구조에 관한 연구는 H₂O와 TFE 용액 속에서만 부분적으로 이루어져 왔고, 아미노산 치환을 통한 CRF 활성의 변화와 강력한 antagonist 개발에 관한 연구만이 되어 있다[W. Vale et al., E. T. Wei & H.A. Thomas, D. Richard]. 하지만, 하지만 실질적으로 생체막에서 CRF가 가진 amphipathic helix가 CRF의 활성에 어떠한 영향을 주는지를 고찰하는 것은 앞으로의 새로운 analog들의 개발에 커다란 도움을 줄

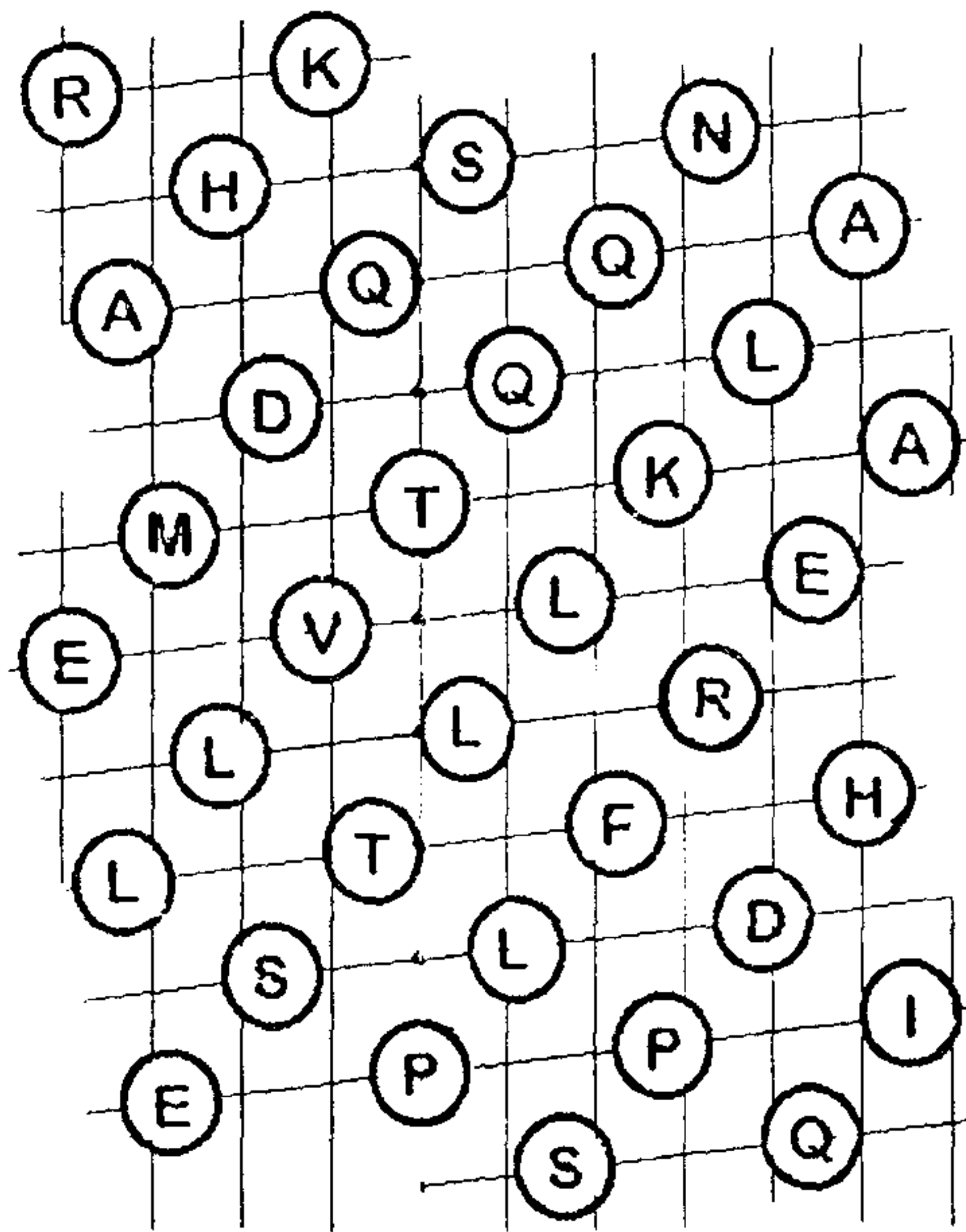
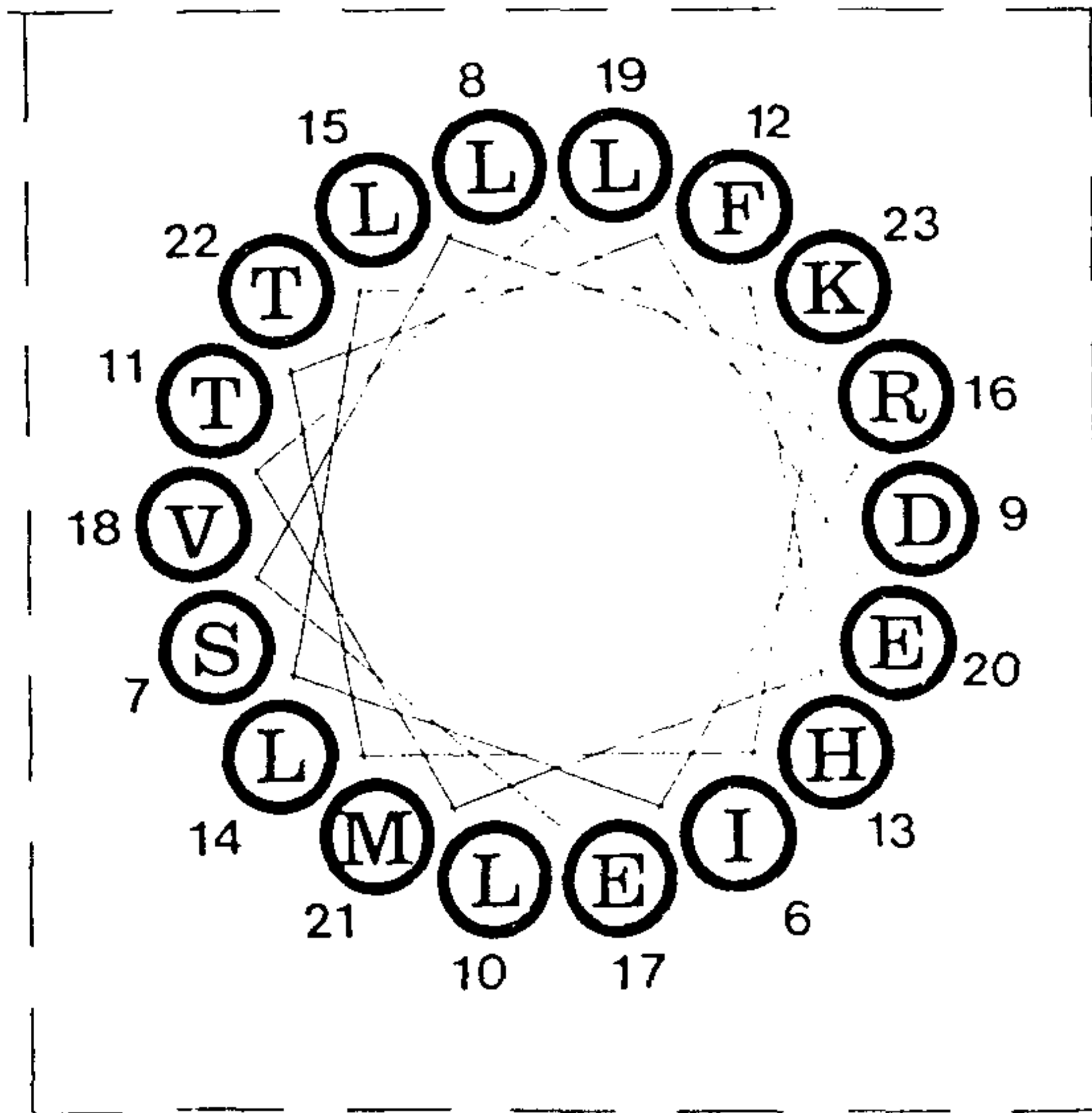


Figure 1. Helical wheel and helical net representation of CRF.

Helical net representation includes amino acids from 1 to 36 of CRF

것으로 생각된다.

2.. 연구 재료 및 방법

Ovine corticotropin-releasing factor는 SIGMA사로부터 구입했고, 500 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도로 산소를 제거한 증류수에 녹여서, 200 μl 로 분주해서 $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 보관했다. HPLC와 capillary zone electrophoresis로 CRF stock 용액을 확인해 보면, 약 6개월 정도까지 별 이상이 없었다. Phosphatidylcholine(PC), phosphatidylethanolamine(PE) 와 phosphatidylserine(PS)는 bovine brain에서 얻어진 것을 사용했고, SIGMA사로부터 구입했다. Pamitoyl lyso-phosphatidylcholine(Lyso-PC) 와 bovine brain lyso-PC는 SIGMA사로부터 구입했다. sodium-dodecylsulfate(SDS)와 cetyltrimethylammonium chloride(CTAC)를 포함한 그 외의 시약들 대부분을 SIGMA사로부터 구입했다. CRF binding test에 사용된 Centricon의 molecular cutoff는 100,000 이었고, AMICON사로부터 구입했다.

가. Small unilamellar vesicle(SUV) 만들기

각각의 lipid를 30 ml들이 유리 vial에 담아서 질소 gas를 불어넣어 말리면서 lipid-film을 만든 뒤에 적당한 buffer를 첨가하여 vortexing하면서 녹였다. 이 상태가 multilamellar vesicle(MLV) 용액인데, sonicator(Heat system-ultrasonics, INC. Ultrasonic processor W-370)를 써서 약 1분간 용액이 투명해 질 때까지 강하기 3정도에서 sonication을 했다. Sonication시 열이 심하게 발생하기 때문에 얼음으로 식혀 주어야 하고, 중간에 쉬는 시간을 두어야 한다. 대부분의 MLV 들은 이때 SUV로 바뀌는데, 바뀌지 않고 남아 있는 작은 MLV나 LUV들 그리고, sonicator의 tip으로 부터 떨어져 나온 titanium 알갱이들을 제거하기 위해서 Beckman TL-100 ultracentrifuge에서 고정된 rotor를 사용해서 45,000 rpm으로 1시간 30분 가량 ultracentrifugation을 수행했다. 그러나, CD를 실험을 할 때, ultracentrifugation을 하지 않은 SUV도 별 문제가 없었기 때문에, 나중에는 sonication만 한 SUV로 실험하였다.

나. Vesicle 농도 정량

적당한 부피의 vesicle solution을 cap tube에 넣었고, standard curve를 결정하기 위해서 1 mM K₂HPO₄ 용액(0~280 µl)을 사용했다. 각 sample들을 dry-oven에 말린 뒤, 200 µl의 perchloric acid(HClO₄, 60%)를 첨가한 뒤 cap tube의 뚜껑을 닫고 180 °C 정도에서 15 분간 phosphodiester bond를 가수분해시켰다. 4.8 ml의 working 용액을 첨가하고 약 20 분가 물 중탕으로 100 °C에서 반응시켰다. 완전히 발색 반응이 끝났을 때, 750 nm의 파장에서 흡광도를 측정해서 농도를 결정하였다.

* Working 용액 *

(4 ml of stock solution + 1.38 ml of 95% H₂SO₄ + DW) in final 100 ml

* Stock solution *

Stock 용액은 6 개월 이상 저장이 가능하다.

1. 14 ml of 4 N HCl + 400 mg of Hydrazinium chloride(or sulfate)

4 N HCl = 33 ml of 37% HCl / 100 ml

2. 60 ml of 4 N HCl + 10 g of sodium molybdate slightly heated in the dark

3. Mix 1 and 2, boiled for 20 min in 100 °C water keeping dark

4. After cooled, 14 ml of sulfuric acid added

5. Final to 100 ml with DW

다. SUV에 대한 CRF binding 실험

SUV의 농도를 0.4 mM로 고정하고 CRF의 농도를 0.61에서 2.42 mM 까지 변화시켰다. Reaction mixture의 부피는 1.5 ml 이었고, 30분간 incubation한 뒤에 molecular cutoff 100,000의 Centricon을 써서 centrifugal force가 1000 g 이하가 되도록 해서 filtration을 했다. 처음의 약 50 µl에 해당하는 양을 버리고, 그 이후의 450 µl의 부피를 받아서, fluorescamine 정량에 사용했다. 각각의 sample들로부터 400 µl를 Eppendorf-tube에 넣고, 동결건조기를 이용해서 물을 제거한 뒤에 0.5 M NaOH를 50 µl를 첨가하여 30분간 autoclave를 함으로 CRF hydrolysis를 수행했다. 반응이 끝난 뒤에 0.5 HCl을 50 µl를 첨가해서 중화시킨 뒤 0.5 M sodium-borate buffer(pH:8.5)를 1 ml를 넣어서 10분 정도 incubation했다. 마지막으로, fluorescamine이 녹아 있는 acetone 용액(30 mg/100 ml) 200 µl를 첨가한 뒤 곧 vortexing을 했다. Fluorescence는

excitation 을 390 nm, emission은 480 nm로 해서 측정하였다. Fluorescamine-derived 아미노산 들은 빛이 없는 상태에서 1시간 이상 안정하고, 아미노산과 반응하지 않은 fluorescamine은 1분 안에 깨어져 fluorescence를 내지 않는다. Filtration할 때 vesicle이 소량 새어나옴이 lipid 정량에 의해서 확인되었다.

라. CD(Circular dichroism) 측정과 분석

모든 CD 결과들은 Jasco-720 spectropolarimeter를 써서 얻었다. 사용된 cell은 314 μ l의 용량을 가진 path length가 0.1 cm이었다. 얻어진 데이터는 MRE(mean residue ellipticity)로 변환해서 분석했다.

마. Fluorescence 측정과 scattering 측정

SHIMADZU RF-5301PC를 사용했고, 사용된 cell의 용량은 3 ml이었고 pathlength는 1 cm이었다.

바. 모델 시스템에서의 CRF trypsin 가수분해 실험

CRF stock 35 μ l를 5 mM MOPS buffer(pH:7.0), 2 mM PC SUV, 그리고 2 mM PS SUV의 조건에서 전체 부피가 200 μ l가 되게 해서 CRF(g):trypsin(g)의 비가 50:1되는 조건에서 시간별로 반응시킨 뒤에 바로 dry-ice:Ethanol 용액에서 얼려서 반응을 중지시켰고, HPLC에 주입 하기 바로 전에 녹여 injection을 했다. 각각의 retention time에 해당하는 peak를 모아서 MALDI Mass spectroscopy를 이용해서 CRF의 fragment들을 확인했다.

3. 실험 결과

가. TFE(trifluoroethanol) solution에서 CRF의 구조

TFE titration 결과는 일반적으로 peptide가 TFE의 농도에 따라 전체적으로 어떠한 구조적인 변화를 나타내는가를 알려줄 수 있고, amphiphilic한 환경에서 CRF가 가지는 구조를 비교하기 위한 비교자료로 사용될 수 있다. TFE는 solution의 polarity를 감소시켜서 peptide hormone

주위에 인지질 막에서의 상태와 비슷한 환경을 만들어준다고 보고되어 있다. TFE의 percentage가 증가함에 따라 CRF의 α -helix 양이 증가했고(Fig. 2), 보고된 결과와 차이가 없었다[18]. Greenfield-Fasman의 reference spectrums을 써서 curve-fitting하는 방법으로[Greenfield N., & Fasman G. D.] CRF의 이차 구조의 양을 결정해 보았고 또한, 222 nm의 한가지 파장을 읽어서 [Chen et al] α -helix의 양만 계산해 보았다(표 1).

나. Micelle solution에서 CRF의 구조

Micelle 상태는 detergent가 물 속에서 이루는 구조인데, 친수성 머리부분을 물에 접하고 소수성 꼬리부분을 내부로 향하므로, 인지질 막과 보다 비슷한 환경을 이룬다. 여러가지 micelle이 존재할때 CRF는 α -helix구조의 증가를 보여주었다(Fig. 3). 사용된 detergent들은 머리부분의 전하에 따라 [+]인 것은 CTAC(cetyl-trimethyl ammonium chloride)와 중성인 lyso-PC(lyso-phosphatidylcholine), 그리고 [-]인 SDS(sodium dodecyl sulfate)와 Na-deoxycholate(sodium deoxycholate)를 사용했는데, 머리부분의 전하에 따른 뚜렷한 특징을 나타내지 않았다. 하지만 lyso-PC micelle에서는 CRF가 매우 많은 양의 α -helix를 가졌는데, 이는 각각의 detergent들에 따른 micelle의 크기나 내부가 가지는 소수성 정도의 차이에 기인하는 것으로 추정된다.

다. Model 인지질 막인 liposome에서 CRF의 구조

실험에 사용된 model 인지질 막인 small unilamellar vesicle(SUV)는 약 250 Å 정도의 지름을 가지며 bilayer를 형성하는데, 실제 세포막과 구조적으로 아주 유사하다. 사용된 인지질막 모델 시스템으로는 PC(phosphatidylcholine) SUV와 PS(phosphatidylserine) SUV를 사용했는데, PC SUV는 기본적으로 머리부분이 중성인 인지질로써 기본적인 liposome 시스템에 많이 사용된다. 하지만 세포막은 표면에 음전하를 가지고 있는데, 이를 모사하기 위해서 머리부분의 전하가 -1인 PS 인지질을 도입했다. 각각의 모델시스템에 대한 CRF의 결합정도를 비교해 보면, PC SUV보다는 음전하를 지닌 PS SUV에 더 잘 결합함을 알 수 있다(표 2). CD 결과로부터 얻어진 결과는 두가지 모델시스템에서 CRF가 결합했을 때, 보여주는 이차구조는 PC SUV에는 결합했음에도 불구하고 α -helix의 양이 20% 정도로 buffer상태와 별다른 차이가 없었고, PS SUV에

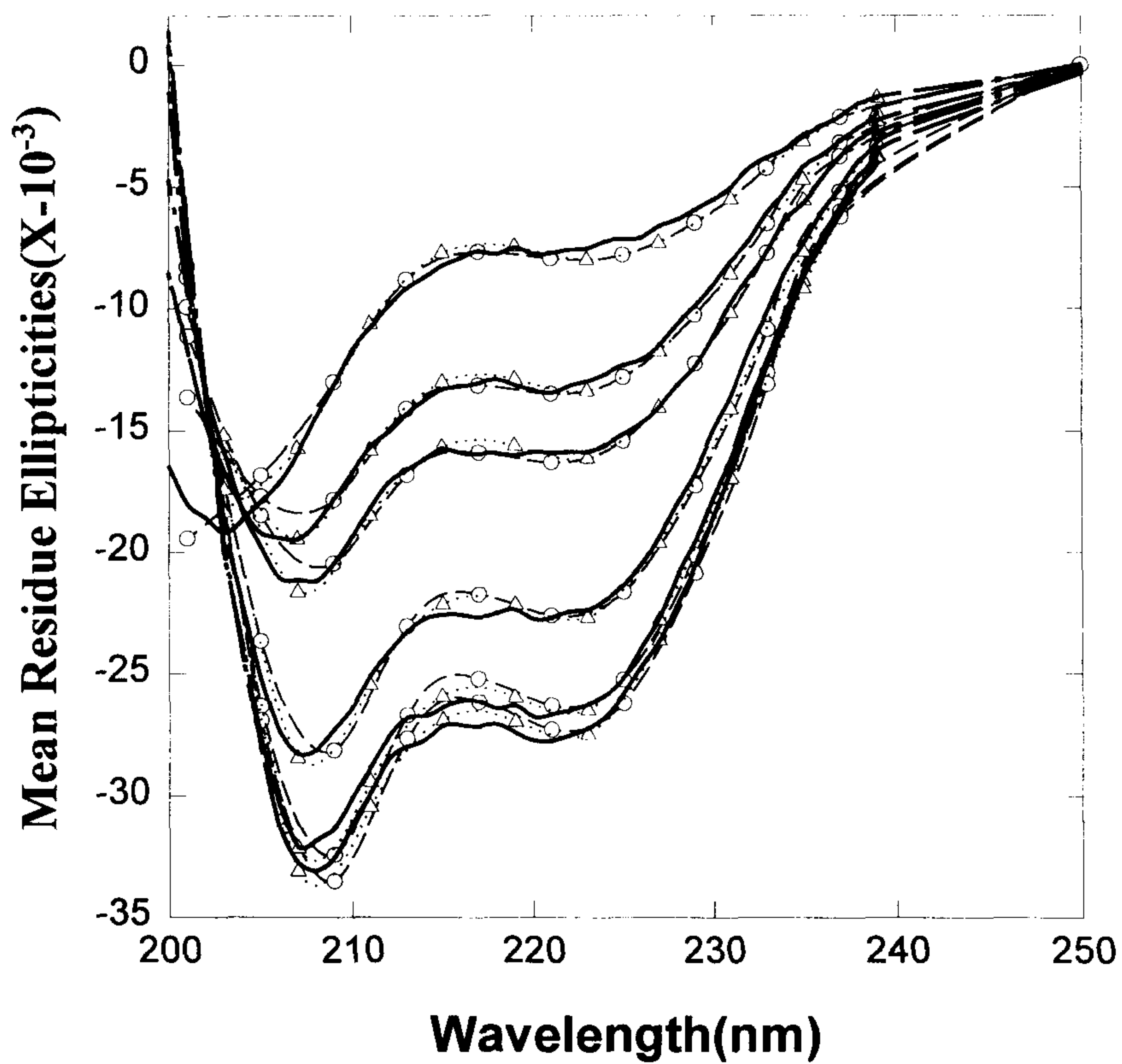


Figure 2. Curve-fitting results of CRF spectra.

Curve-fitted CD spectra were very similar to native spectra. Triangle represents the curve-fitted results when constraint of the sum of α -helix, β -sheet and random coil is 1. Circle represents curve-fitted results without this constraint. There is no obvious difference between two results. From up to down, the results in the conditions of TFE 0, 5, 10, 20, 30, and 40% are represented

Table 1. Curve-fitting Results

	TFE 0%	TFE 5%	TFE 10%	TFE 20%	TFE 30%	TFE 40%	TFE 80%
α -Helix	21	34	40	61	73	76	78
β -sheet	13	16	16	6	1	0	0
Random	66	50	43	33	26	24	22
No. of residues in α -helix ^a	8.61	13.9	16.4	25.0	29.9	31.2	32.0
No. of residues in α -helix ^b	7.11	14.6	18.3	27.2	32.7	34.1	34.8

* Curve-fitting Method : Greenfield-Fasman

a : Number of residues from above curve-fit

b : Number of residues from Chen method

$$\% \text{ of } \alpha\text{-Helix} = (-[\theta]_{222 \text{ nm}-2340})/30300 \times 100$$

Table 2. Comparison of Binding Efficiency

	PC SUV	* PS+NaCl SUV	PS SUV
% of Binding	70%	83%	95%
Error ranges	+10 ~ -15	one sample	one sample

* PS+NaCl SUV : PS SUV was made in 100 mM NaCl buffer

* Vesicle concentration was 0.2 mM and L/P ratio was 100

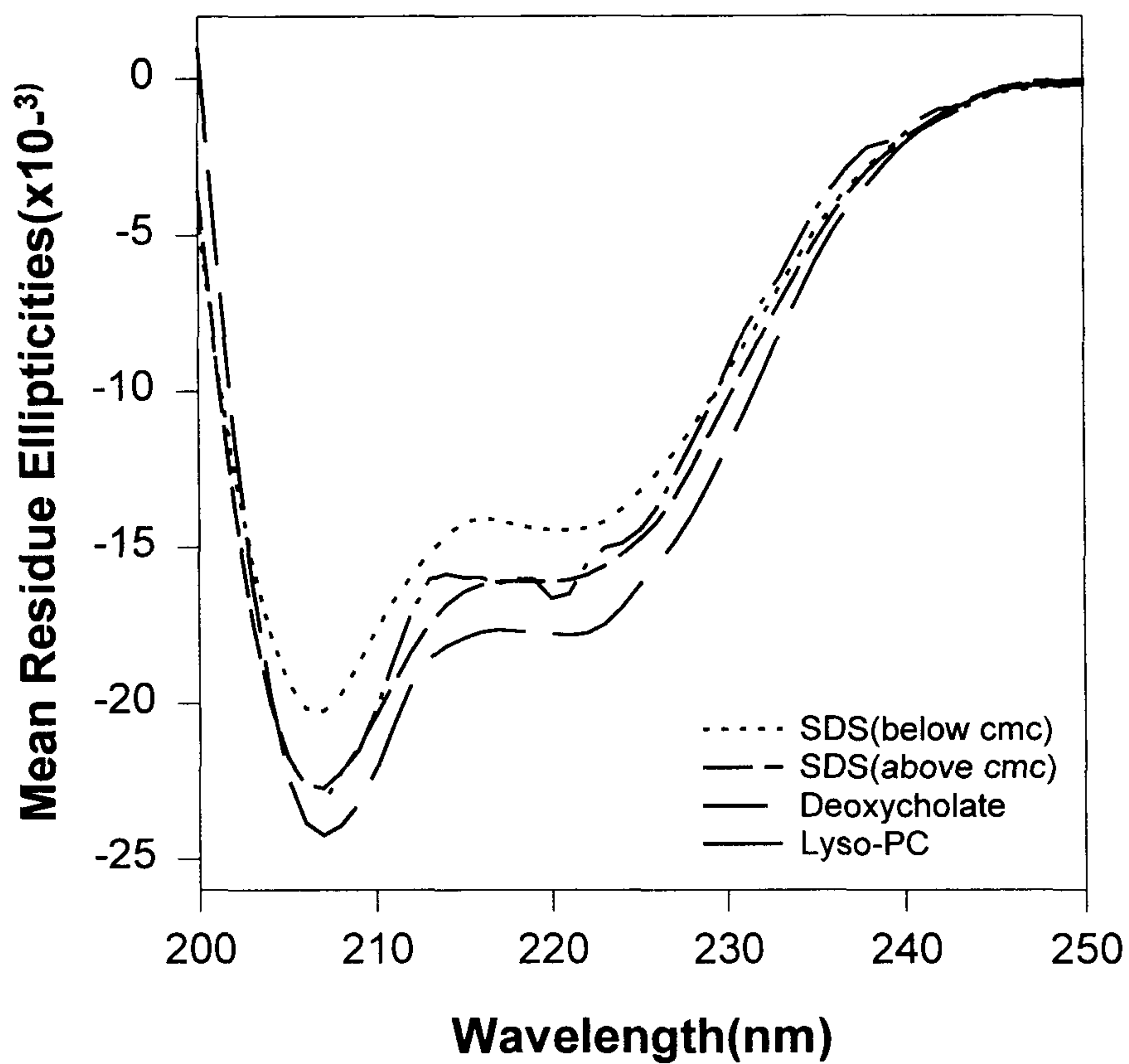


Figure 3. CD spectra of CRF in the various micelle solutions.

"below cmc" means SDS concentration was 1 mM which is below critical micelle concentration (cmc) of 1.33 mM. "above cmc" means > 10 mM of SDS. There is obvious decrease of ellipticity at 222 nm in the condition of 20 mM Lyso-PC micelle solution.

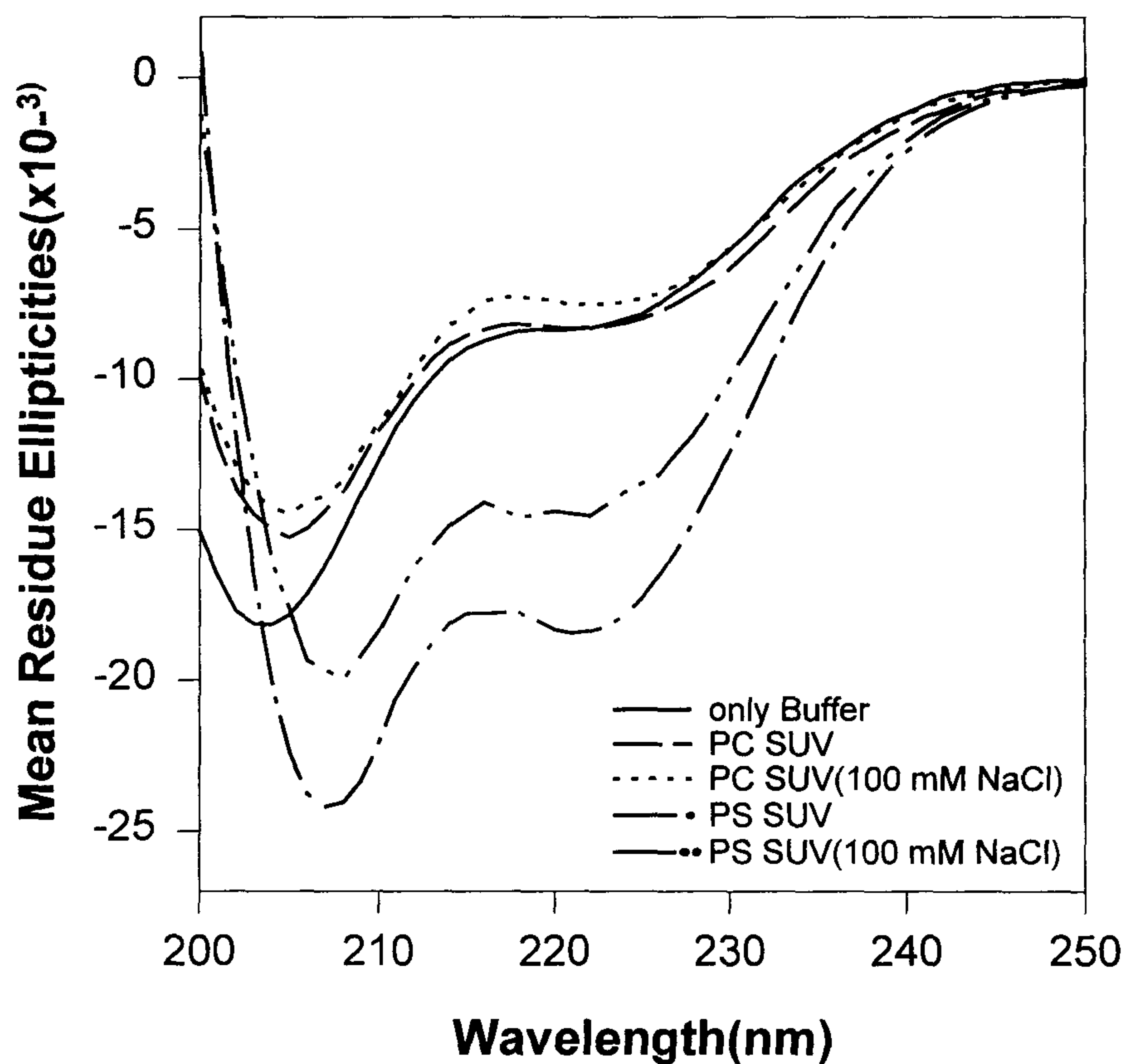


Figure 4. CD spectra of CRF in the condition of SUV solutions.

SUV concentration was fixed at 1 mM and CRF concentration was varied from 5 μM to 10 μM . Path-length of CD cell was 1 mm. There were problems result from light-scattering by SUV when SUV concentration was greater than 1 mM. CD ellipticity of CRF was markedly decreased when PS SUV existed.

Table 3. Mean Residue Ellipticities at 222 nm and % of α -Helix

Conditions of Experiment		Average MRE ^a ($\times 10^{-3}$)	Error % (# of data)	% of α -Helix ^b	No. of amino acid residues	No. of α -Helix turns
TFE 66%		-27.8	? (1)	78	32.0	8.9
A	Buffer (Pi, MOPS)	-7.91	9 (11)	18	7.4	2.0
	PC SUV	-8.35	7 (5)	20	8.2	2.3
	PC+NaCl(100 mM)	-7.48	? (1)	17	7.0	1.9
SDS below cmc		-14.3	2 (4)	39	16.0	4.4
B	SDS (> 10 mM)	-15.8	9 (5)	44	18.0	5.0
	SDS+NaCl(>100 mM)	-15.9	5 (3)	45	18.5	5.1
	Sodium deoxycholate	-15.6	? (1)	44	18.0	5.0
	PS+NaCl(100 mM)	-15.2	9 (5)	42	17.2	4.8
PS:PC(1:1)+NaCl(100 mM)		-9.64	? (1)	24	9.9	2.7
C	Lyso PC	-18.0	10 (3)	52	21.3	5.9
	PS SUV	-18.7	3 (5)	54	22.1	6.1
CTAC		-16.4	3 (2)	46	18.9	5.3
CTAC +NaCl(100 mM)		-15.6	? (1)	44	18.0	5.0
Oxidized CRF in Buffer		-5.47	? (1)	10	4.1	1.2
Oxidized CRF in PC		-6.47	? (1)	14	5.7	1.6
Oxidized CRF in PS		-17.8	11 (3)	51	20.9	5.8

^a MRE; mean residue ellipticity

^b Chen method [% of α -Helix = $((-[\theta]-2340)/30300)\times 100$]

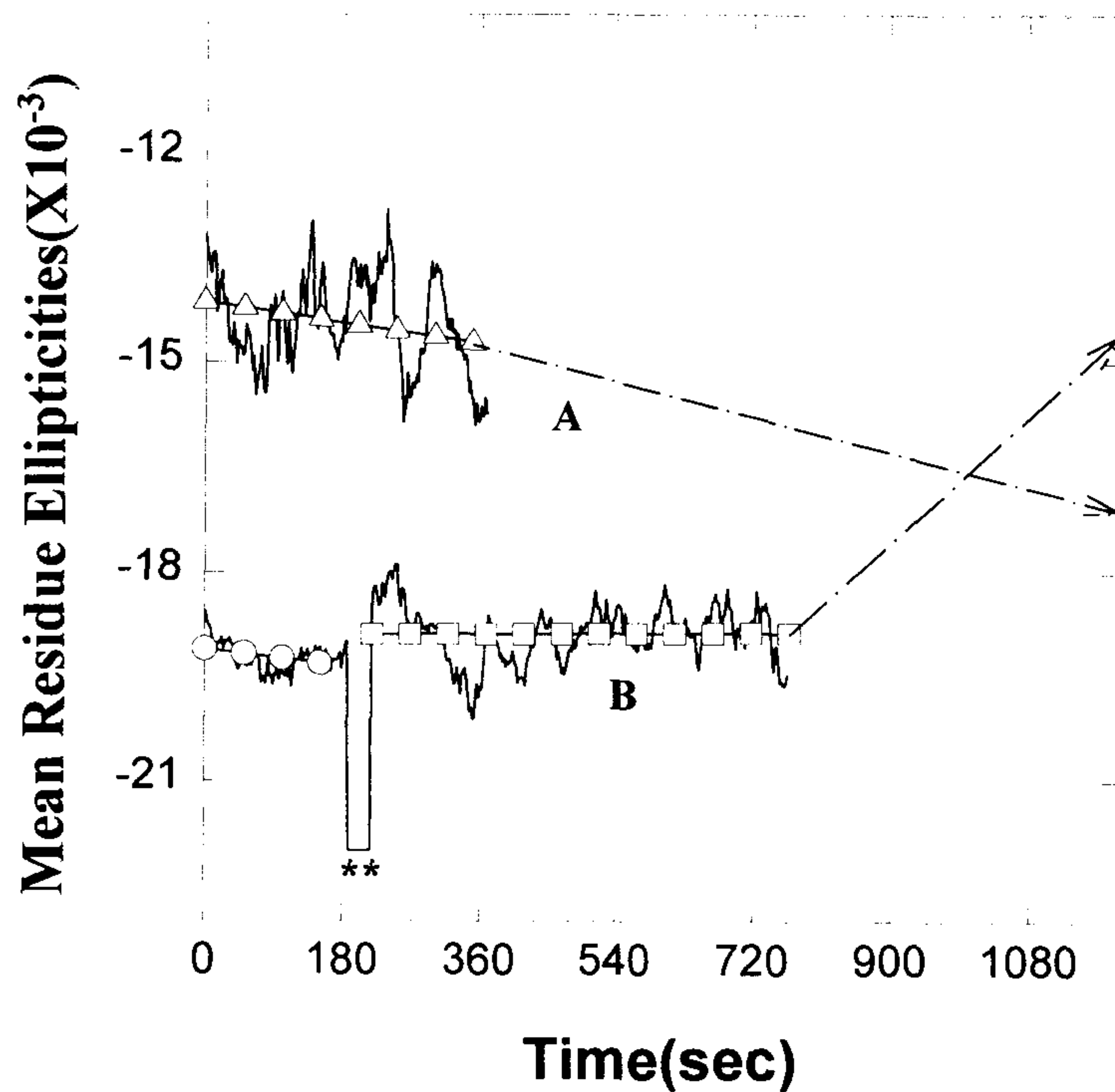


Figure 5. CD time scanning at 222 nm.

a. PS SUV solution containing 100 mM NaCl was added to CD cell containing only CRF solution, and then final NaCl concentration was 40 mM. The linear-fitting equation is $Y=-0.0011*X-14.2$. b. First, CRF and PS SUV without NaCl were mixed and then CD spectrum was measured. Second, NaCl was added to CD cell containing free mixed sample at the time indicated by **. Final NaCl concentration was 100 mM. Linear-fitting equation is $Y=0.0001*X-18.9$. For each cases, mean residue ellipticities of a. and b. were measured as -17,000 and -15,000, respectively, after over-night incubation.

결합했을 때에는 α -helix의 양이 54%로 증가했음을 지시해 준다(Fig. 4 과 표 3). 이는 다른 micelle 시스템과 비교해서 훨씬 더 큰 양인데, 모델 인지질막 시스템이 훨씬 더 많은 양의 α -helix를 유도 함을 결론지을 수 있다. 또한 PS SUV에 NaCl 100 mM을 첨가한 모델 시스템에서는 NaCl이 없을 때 보다 약 12%의 α -helix가 감소했는데, 이는 단순한 전기력의 작용이 아닌 인지질막 자체의 구조적인 특성이 관계함이 밝혀졌다(Fig. 5). NaCl이 포함되지 않은 PS SUV에 NaCl을 첨가하면, SUV의 크기가 천천히 증가함이 관찰되었는데, SUV의 크기가 커질수록 인지질 막의 머리부분들 사이의 간격이 줄어든다.

라. 모델 시스템에서 CRF의 Trypsin 가수분해 형태

Proteolytic 효소를 사용해서 짧은 시간 안에 peptide나 단백질을 자르는 방법은 CRF가 모델 인지질 막에 결합된 상태와 결합되지 않은 상태의 구조적인 차이를 규명할 수 있는데, trypsin은 arginine이나 lysine의 C-terminal 부분을 자르기 때문에, 이 아미노산을 포함하는 부분의 구조적인 특성을 규명할 수 있다. 각각의 모델 시스템에서 이루어진 CRF의 가수분해 형태로 부터, 대략적인 모델 인지질 막과의 상호작용 위치를 추론해 볼 수 있는데, 전체적인 가수분해 정도는 buffer 용액 > PC SUV > Lyso-PC > PS SUV 이다. 또한 23번 lysine의 C-terminal만 잘린 fragment는 찾을 수가 없었는데, 이러한 사실은 16번 arginine과 35-36번의 arginine-lysine sites가 trypsin에 의해서 훨씬 더 잘 잘린다는 사실을 알 수 있다(Fig. 6와 Fig. 7). 그리고, PS SUV에서는 CRF의 C-terminal 부분만이 가수분해되고 나머지 모든 부분들은 trypsin으로 가수분해되지 않았다. 이는 PS SUV와 CRF가 매우 안정된 결합을 이룸을 알 수 있다. HPLC retention time이 39 min에 해당하는 peak는 21번 methionine이 sulfoxide(O) 형태로 oxidation된 상태이다.

4. 고 찰

amphipathic α -helix를 가진 CRF는 여러가지 생체막 모델시스템에서 α -helix의 양이 증가함이 밝혀졌는데, 음전하를 가진 인지질인 PS SUV에서 특별히 많은 양의 α -helix가 유도되었다. 또한 NaCl이 첨가된 PS SUV에서의 결과와 비교해 볼 때, 최대의 α -helix양은 단지 전기적인 상호작용이 아닌 SUV 자체의 표면 구조 또한 매우 중요한 인자라고 생각해볼 수 있다. 음전

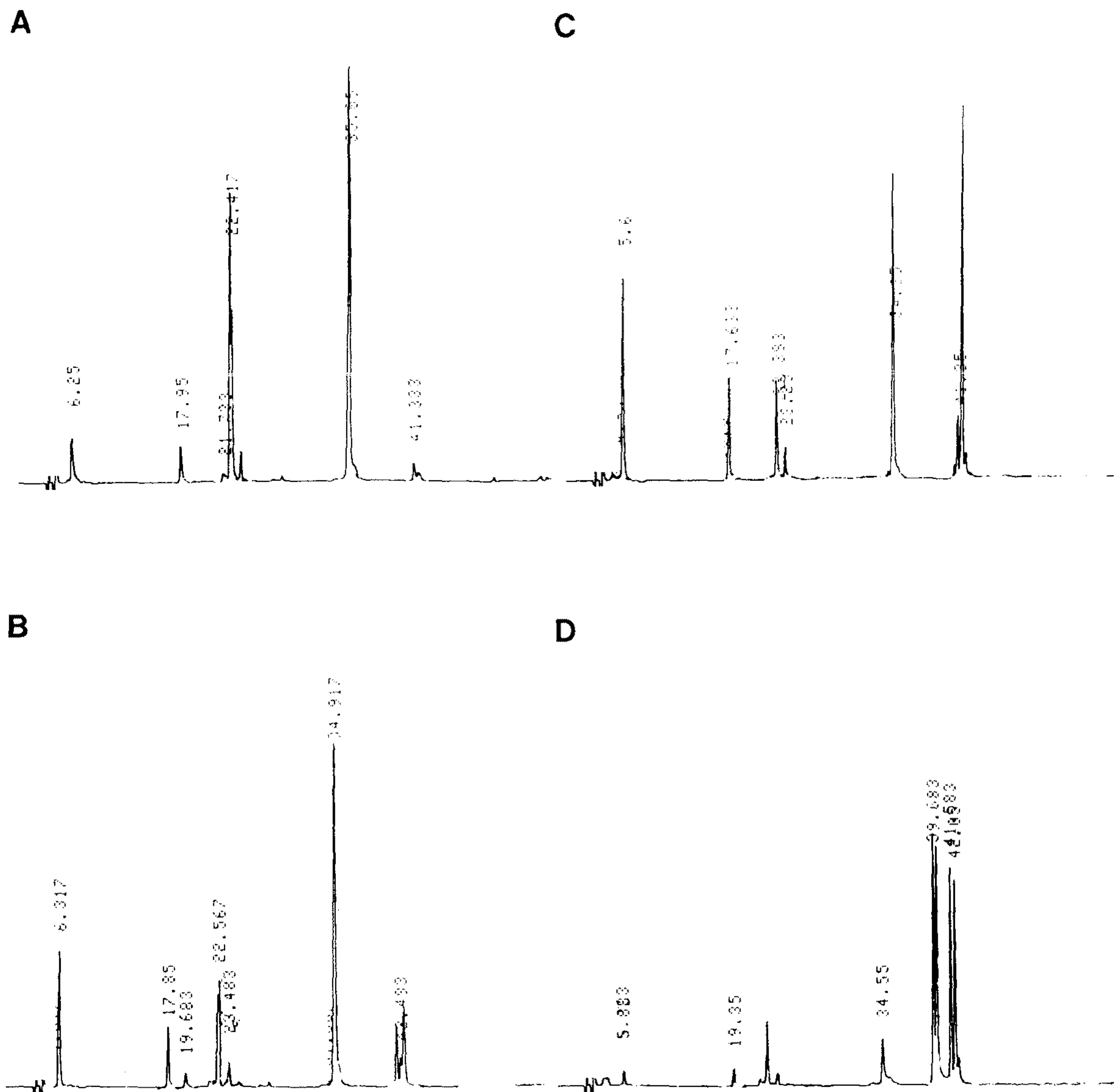


Figure 6. HPLC profiles of trypsin-digested CRF in the various conditions.

A. CRF solution was incubated with trypsin at the ratio of 50/1. Reaction mixture of B., C., and D. are containing 2 mM PC SUV, 2 mM PS SUV and 20 mM Lyso-PC, respectively. The ratios of CRF and trypsin were same to A.

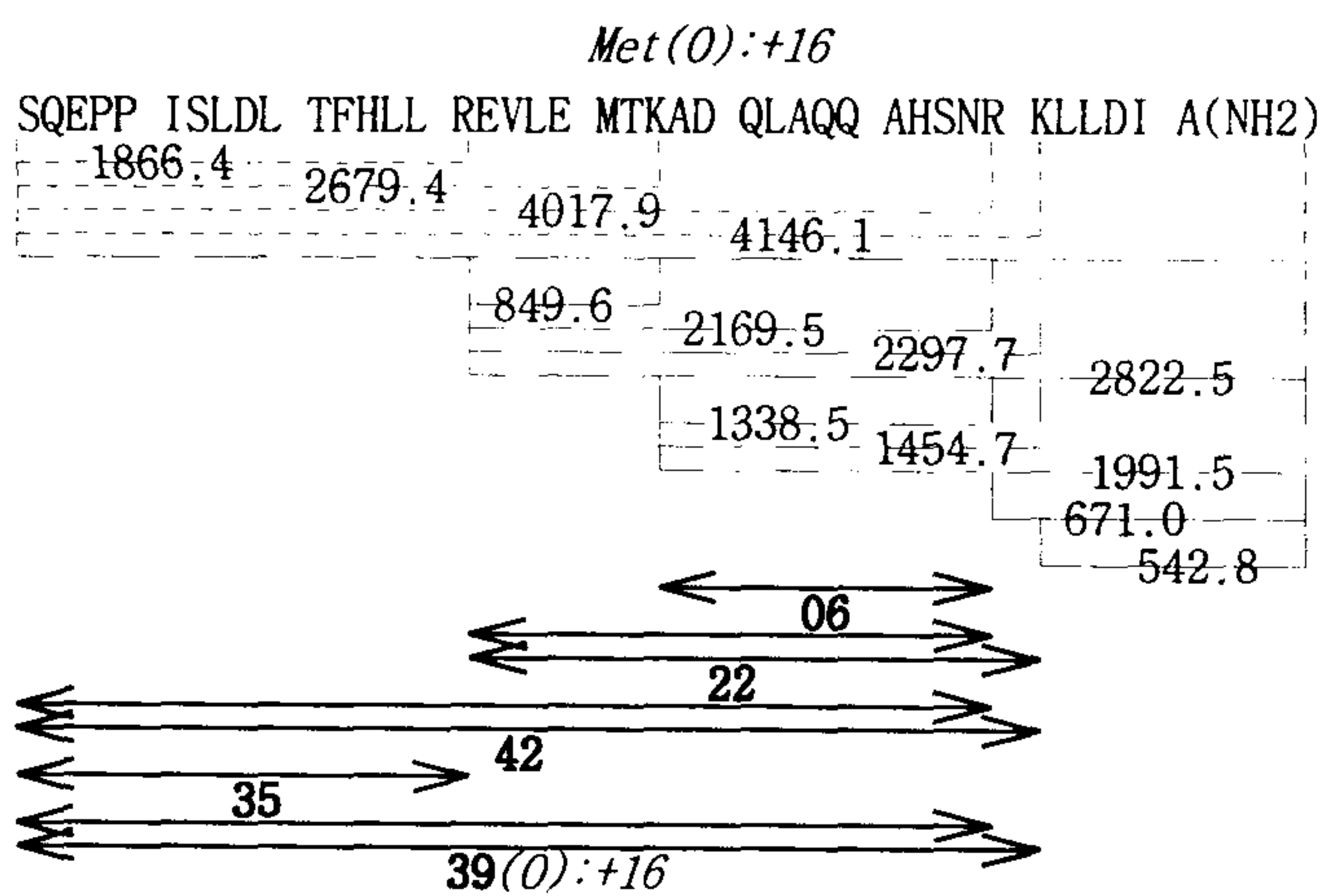
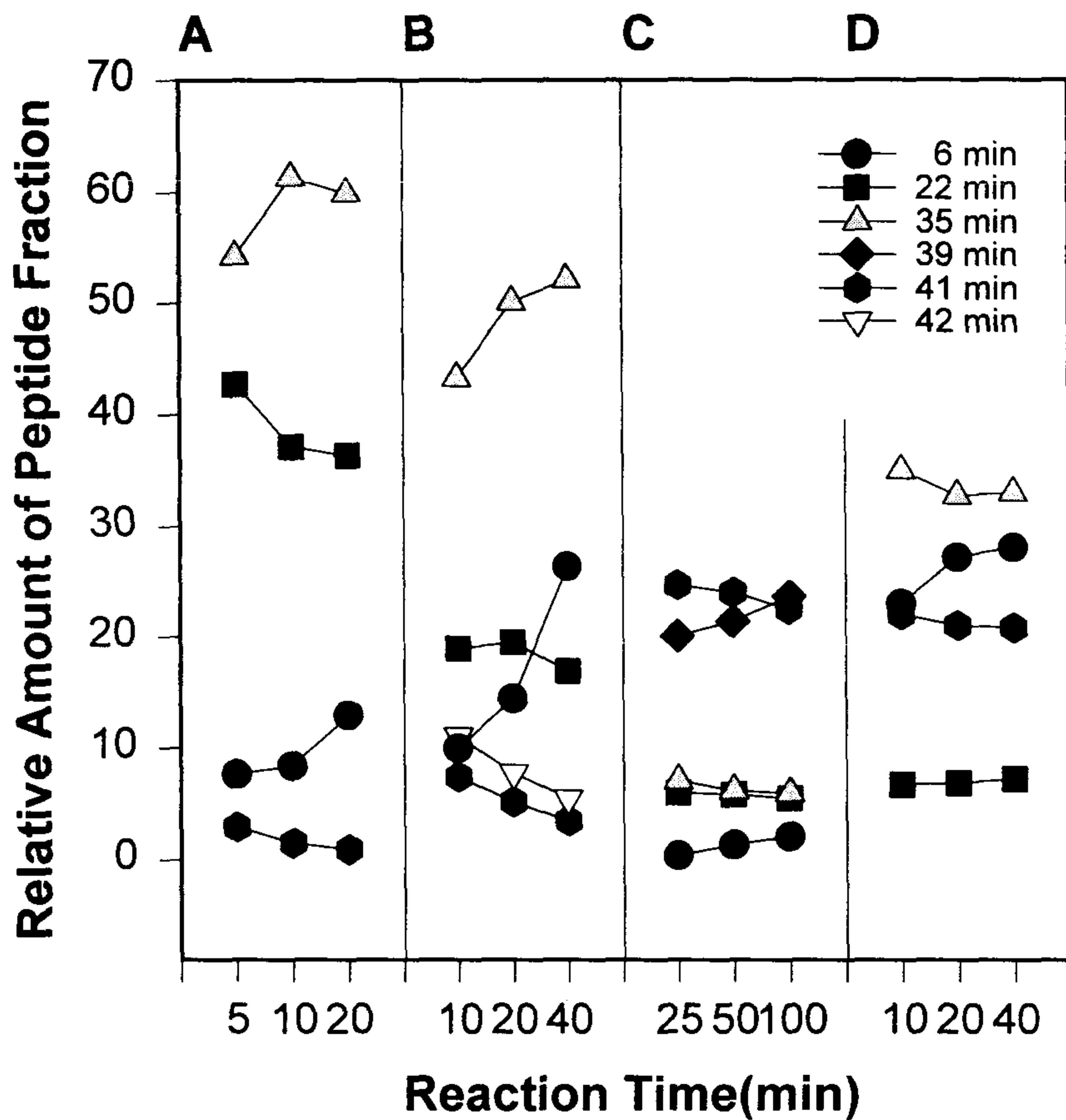


Figure 7. Time-dependent variation of peaks-area.

All conditions were same to figure 7. The important peaks were identified with MALDI Mass spectroscopy and represented according to HPLC retention times.

하를 가진 인지질에 아주 특이적인 α -helix 구조의 증가를 보이는 펩타이드의 특성에 관계하는 인자들을 살펴볼 필요가 있다. 먼저 amphipathic α -helix를 인지질 막에 결합되도록 하는 인자는 소수성 아미노산들이 인지질 막의 내부로 들러감으로 Free 에너지가 낮아지기 때문이고, 이에 반대되는 인자는 인지질 막의 packing된 정도이다. benzene이나 hexane의 물과 인지질막 내부 사이에서 partition coefficient는 인지질 막의 packing된 밀도에 관계한다고 보고되었다[De Young, L. R. & Dill K. A.]. PS SUV와 CRF의 결합 kinetics 실험에 의하면, NaCl의 첨가에 의해서 CD의 mean residue ellipticity값의 감소가 유도되는 시간이 길다는 점을 생각해 볼 때, CRF의 인지질 모델시스템과의 안정한 결합은 인지질 막의 물리적인 packing 정도에 영향을 받는다고 생각할 수 있다. 인지질 막의 compressibility coefficient 는 $-(1/V)(\delta V/\delta P)T$ 으로 정의되고, 다른 organic 용매가 갖는 값과 비슷한 정도로 낮지만, 표면에 대해서는 비교적 팽창과 수축이 자유롭다. 따라서, 인지질 막의 내부에너지를 면적(A)에 관계하는 식으로 나타낼 수 있다[G. Beschiasvili & J. Seelig].

$$\text{Elation : } (\delta U/\delta A)T = T(\delta S/\delta A) - \pi = T(\delta \pi/\delta T)A - \pi = T(\alpha/\chi) - \pi = \pi i$$

α 는 $(1/A)(\delta A/\delta T)\pi$ 로 정의되는 면적 팽창도 이고, π 는 인지질 막의 장력을 나타낸다. χ 는 $-(1/A)(\delta A/\delta \pi)T$ 로 정의되고, isothermal area compressibility라고 한다. Amphipathic α -helix가 깊숙이 인지질 막에 들어가자 위해서는 인지질 막의 표면적을 많이 팽창시켜야 한다. 이때에, 인지질 막은 팽창 정도에 따라 높은 free 에너지 상태를 가지게 되는데, 이에 해당하는 에너지 이상을 peptide가 인지질 막과 결합함으로써 충족시킬 수 있는 경우에 한해서 Amphipathic α -helix는 깊숙이 인지질 막을 파고 들어갈 수 있다. PC SUV와 PS SUV를 이러한 관점에서 비교해 보면, PC와 PS는 거의 같은 분자량을 가진 머리 부분을 갖고 있고 다른 점은 PC는 전기적으로 중성이고, PS는 -1에 해당하는 음전하를 가지고 있다는 점이다. PS의 경우, 이러한 음전하 사이의 반발력으로 인하여 표면의 머리 부분은 실제 분자가 물리적으로 갖는 크기 보다 훨씬 더 큰 것처럼 작용하게 된다. 따라서, PS SUV의 경우 PC SUV보다 큰 표면 팽창력을 가지므로, Amphipathic α -helix가 PS SUV의 인지질 막에 깊숙이 들어가는 것이 더 쉽다. 또 한가지, CRF에서 생각할 수 있는 조건은 CRF의 Amphipathic α -helix의 hydrophobic cluster의 한쪽에 16번 lysine과 23번 arginine이 있는데 이 부분이 PS가 가지는 음전하에 ion 결합을 함으로써 더 안정된 결합 에너지를 가질 수 있기 때문이다.

실제 생체막에서도 위와 비슷한 경우를 생각해 볼 수 있는데, hormone ligand는 작용하기 위해서 생체막 표면에 있는 수용체와 결합되어한다. 이때, 수용체 주위의 인지질 막의 구조는 위의 PS SUV 모델시스템과 유사한 형태를 가질 수도 있기 때문이다. CRF의 Amphipathic α -helix 구조는 모델 인지질 막과 결합을 유도하고 α -helix 구조를 유도하고 안정화시킴으로써 활성화에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절.

LHRH의 solution에서의 구조가 CD와 NMR을 이용해서 밝혀졌고, NMR의 NOE 결과로부터 얻어지는 거리 정보를 이용하여 computer modeling을 해서 LHRH의 3차원적 구조를 결정지을 수 있었다. 연구과정 중에 얻어진 결과와 노하우를 이용하여 보다 다양한 단백질 호르몬들을 연구하는데 많은 도움을 주었을 뿐만 아니라 새로운 analog들의 개발을 위한 기초적인 토대를 마련할 수 있었다.

제 2 절.

CRF가 모델 생체막과 작용할 때 나타나는 구조적인 변화를 추적할 수 있었고, 생체막과의 결합해서 유도된 구조를 안정화시키는데 필요한 기본적인 원리를 추측할 수 있었다. 모델 생체막 시스템은 호르몬들이 수용체와 결합하는 과정 중에 일어날 수 있는 전 단계를 설명해 주는데 적절한 기초가 될 수 있을 뿐만 아니라 호르몬 활성화에 필요한 구조연구에 여러 가지 실마리들을 제공해 주었다. 하지만 보다 확실한 증거로써, 현재까지 알려진 CRF의 여러 가지 analog들을 이용한 구체적인 비교실험과 NMR을 통한 3차원구조의 연구가 필요 되어진다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구과제를 통하여 얻어진 기본 지식과 연구 방법들은 여러 가지 약제로 이용될 수 있는 단백질 호르몬들의 활성을 증대 시키거나, 또는 활성을 억제하는 analog들의 개발에 기본적인 토대를 제공해줄 수 있기 때문에 여러 가지 구체적인 신약개발에 이용될 수 있으리라고 생각된다.

제 6 장. 참고 문헌

- Antonio Miranda et al., 1994, *J. med. chem.*, 37, 1450-1459.
- Bax, A., and D. G. Davis. 1985. *J. Magn. Reson.* 65:355-360.
- Billeter, M., W. Braun, and K. Wüthrich. 1982. *J. Mol. Biol.* 155:321-346.
- Burgus, R., M. Butcher, M. Amoss, N. Ling, M. Monahan, J. Rivier, R. Fellows, R. Brackwell, W. Vale, and R. Guillemin. 1972. *Proc. Nat. Acac. Sci. USA.* 69:278-282.
- Cagas, P. M., and J. L. Corden. 1995. *Proteins* 21:149-160.
- Chen Y. H., Yang J. T., & Chau K. H., 1974, *Biochemistry* 13, 3350-3359.
- Chi, S. -W., G. -S. Yi, J. -Y. Suh, B. -S. Choi, and H. Kim. 1995. *Biophys. J.* 69:2703-2709
- Davis, D. G., and A. Bax. 1985. *J. Am. Chem. Soc.* 107:2820-2823.
- Deborah R. Fattal and Avinoam Ben-Shaul, 1993, *Biophysical Journal*, 65, 1759~1809.
- Denis Richard, 1992, Involvement of corticotropin-releasing factor in the control of food intake and energy expenditure, *Annals New York Academy of Sciences*, 155~172.
- De Young, L. R. & Dill, K. A., 1990, *J. Phys. Chem.*, 94, 801~809.
- Dutta, A. S., J. J. Gormley, P. F. McLachlan, and J. R. Woodburn. 1989. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 159:1114-1120.
- Dyson, H. J., M. Rance, R. A. Houghten, P. E. Wright, and R. A. Lerner. 1988a. *J. Mol. Biol.* 201:161-200.
- Dyson. H. J., M. Rance, R. A. Houghten, P. E. Wright, and A. R. Lerner. 1988b. *J. Mol. Biol.* 201:201-217.
- Eberhard Krause et al., 1995, *Anal. chem.*, 67, 252-258.
- Eberle, W., C. Sander, W. Klaus, B. Schmidt, K. Figura, and C. Peters. 1991. *Cell* 67:1203-1209.
- Edward T. Wei, Holly A. Thomas, 1994, *European J. of Pharmacology*, 263, 319~321.
- Fan, F., and K. H. Mayo. 1995. *J. Biol. Chem.* 270:24693-24701.
- Georgi Beschiasvili and Joachim Seelig, 1992, *Biochemistry*, 31, 10044~10053.
- Greenfield N., & Fasman G. -D., 1969, *Biochemistry*, 8, 4108~4116.
- Havel, T. F. 1991. *Prog. Biophy. Mol. Biol.* 56:43-78.

- Jasanoff, A., and A. R. Fersht. 1994. *Biochemistry* 33:2129-2135.
- Jean-Francois Hernandez et al., 1993, *J. med. chem.* 36, 2860-2867.
- Jean Rivier et al., 1993, *J. med. chem.*, 36, 2851-2859.
- Mabrey, S., and I. M. Klotz. 1976. *Biochemistry* 15:234-242.
- Macura, S., Huang, D. Suter, and R. R. Ernst. 1981. *J. Magn. Reson.* 43:259-281.
- Marche, P., J. -L. Morgat, and P. Fromageot. 1973. *Eur. J. Biochem.* 40:513-518.
- Marion, D., K. Wüthrich. 1983. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 113:967-974.
- Matsuo. H., Y. Baba, R. M. G. Nair, A. Arimura, and A. V. Schally. 1971. *Biochim. Biophys. Res Commun.* 43:1334-1339.
- McKnight, C. J., M. S. Briggs, and L. M. Gierasch. 1989. *J. Biol. Chem.* 264:17293-17297.
- Momany, F. A. 1976a. *J. Am. Chem. Soc.* 98:2990-2996.
- Momany, F. A. 1976b. *J. Am. Chem. Soc.* 98:2996-3000.
- Wylie Vale, Joachim Spiess, Catherine Rivier, Jean Rivier, 1981, *Science*, 213, 18, 1394-1397.

여 백

제 3 세 부 과 제

여 백

요 약 문

I. 제목 신규 항암제 합성효소의 개발

제 1 절.

SP6 RNA polymerase gene에 돌연변이 도입 및 기능 연구

제 2 절.

TNF- α 에 결합하는 핵산성 aptamer의 선별

II. 연구개발의 목적 및 필요성

제 1 절.

리보핵산효소, antisense RNA, aptamer 등 RNA의 생산에 RNA 중합효소의 연구가 필수적이며 보다 효율적으로 이들을 생산하기 위해서는 기존의 RNA 중합효소에 비하여 유리한 성질을 갖는 효소의 개발이 중요하다. 따라서 본 연구에서는 특정한 돌연변이가 RNA 중합효소의 기능에 미치는 영향을 연구하여 전사과정에서 각 부분의 역할을 연구하고, 열안정성의 증가, promoter의 인지도 증가, 효소활성의 증가등과 같은 유용한 성질을 갖는 돌연변이 RNA 중합효소를 개발하고자 한다.

제 2 절.

Aptamer 기술은 핵산 분자가 각각의 염기서열에 따라 갖는 삼차구조가 무궁무진하므로 이런 구조적인 특성에 의해 특정 생체 물질에 결합할수 있도록 선별될수 있다는 사실에서 출발한다. 이를 응용하여 특정 단백질의 핵산 결합 consensus sequence를 결정한다거나 특정 생리 활성 물질의 기능을 조절하는 aptamer를 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이런 일환으로 본 연구에서는 중요한 면역 조절 물질인 TNF- α 에 특이적으로 결합할수 있는 핵산성 aptamer를 선별하고자 한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

제 1 절.

SP6 RNA polymerase 유전자를 cloning한 후 여기에 돌연변이를 유도하고 그 중 기능 및 성질이 변한 것을 탐색할 수 있는 system을 개발한다. 이로부터 얻어진 돌연변이 SP6 RNA polymerase의 기능을 시험관내 및 생체내에서 연구하여 구조와 기능간의 상관관계를 연구하고 유용한 성질을 획득한 돌연변이를 얻어 ribozyme이나 antisense RNA등의 개발 및 합성에 이용할 수있을 것이다.

제 2 절.

TNF- α 에 결합하는 핵산성 aptamer를 선별하는 연구를 통해 첫째 DNA 및 RNA aptamer 개발 및 선별 기술을 확립하고 둘째 특정 단백질에 특이적으로 결합하는 aptamer의 결합 특성을 조사하며 차후 산업적인 응용 가능성을 타진해 본다.

IV. 연구개발결과

제 1 절.

PCR을 이용하여 SP6 RNA polymerase 유전자에 돌연변이를 도입하였으며, 돌연변이를 탐색할 수 있는 two vector system을 개발하였다. 제조된 돌연변이중 19개는 point mutant였으며 6개는 multiple site에 돌연변이가 생긴것이였다. 나머지는 silent, deletion, nonsense mutation이 일어난 것이였다. 얻어진 돌연변이를 시험관내와 생세포내에서 기능을 연구하였다. 돌연변이 SP6 RNA polymerase 중 일부는 wild type과 활성이 비슷하거나 약간 감소한것이고 일부는 promoter는 인지하나 catalytic activity가 없는 것이였고, catalytic activity는 있었으나 promoter를 인지하지 못하는 mutant(R744H)도 있었다. R744H가 catalytic activity는 유지하고 있으므로 R744H가 특이적으로 인지하는 promoter를 탐색하는 실험을 수행한 결과 -7의 C가 T로 바뀐 것을 찾았다.

제 2 절.

TNF- α 에 결합하는 핵산성 aptamer로 DNA와 RNA aptamer의 두가지 경우에 대한 실험을 수행한 결과 단일 가닥으로 삼차구조를 쉽게 가질수 있는 특성을 가진 RNA가 효과적인 aptamer로 선별될수 있음을 확인하였고 선별된 aptamer의 TNF에 대한 결합 능력도 확인하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

제 1 절.

본 실험에서 탐색하여 얻은 돌연변이를 분석한 결과 684번 Phe 이 Tyr으로, 687번 Ile이 Met으로, 739번 Thr이 Ala으로, 780번 Cys이 Gly으로, 856번 Ser이 Pro으로, 862번 Asp가 Glu으로 바뀐 것은 그 활성에 영향이 없었으며, His 779, His805, Ser641, Glu671, Phe808, Val820, Ala835, His843 그리고 Met848은 promoter 인식에는 영향을 주지 않으나 catalytic activity에는 중요한 역할을 한다. Arg744는 promoter의 인지에 직접관여하며 특히 promoter의 -7 부분과 interaction하는 것으로 밝혀졌다.

제 2 절.

본 연구를 통해 기본적인 aptamer 개발 기술의 기초가 확립되었다고 할수 있다. 이를 토대로 하여 보다 응용성이 높은 aptamer 변형 기술에 대한 연구를 수행할수 있고 또 산업적인 측면에서 여러 가지 질병을 일으키는 물질의 생체 활성을 조절하는 새로운 의약품 개발에 aptamer 기술을 이용할수 있을것이다.

여 백

S U M M A R Y

(영 문 요약 문)

제 1 절.

In order to identify and characterize functional amino acid residues of the SP6 RNA polymerase, its gene was first cloned and the cloned gene was randomly mutagenized by PCR under conditions of reduced Taq polymerase fidelity. Through the two vector system that permits phenotypic isolation of SP6 RNA polymerase mutants with reduced enzymatic activity, 12 single- and 2 multiple mutants were isolated. Then, the properties of mutant polymerases were analyzed for promoter binding activity, solubility, non-specific catalytic activity, ability to produce short and long RNAs, and recognition of T7 termination signal. The characterization of these SP6 RNA polymerase mutants showed the following: (a) Substitutions of Phe for Tyr684, Ile for Met687, Thr for Ala739, Cys for Gly780, Ser for Pro856 and Glu for Asp862 did not give rise to significant changes in enzyme properties, although the change of Pro856 to Ser resulted in slight changes in processivity and solubility. (b) Arg744 is essential for SP6 promoter binding activity. The Arg744 lies in the same region with the T7 RNA polymerase Asn748 residue that is involved in discrimination of T7 and T3 promoters. (c) His 779 and His805 are essential for catalytic activity of SP6 RNA polymerase. These His residues are highly conserved in phage RNA polymerases and especially His805 lies in motif C found in many nucleotide polymerases. (d) Two multiple mutants (B66 and D32) retained normal promoter binding activity but lost the catalytic activity, implying that Ser641, Glu671, Phe808, Val820, Ala835, His843 and Met848 residues are not related to the promoter binding, and some of these residues play roles for the catalytic activity. (e) In three mutants (R714P, Q735R and L788P), only a small amount was obtained in soluble form. Substitutions of Pro for Arg714 and Arg for Gln735 resulted in considerable decrease of the promoter binding activity and the loss of catalytic activity, while the change of Leu788 to Pro slightly reduced only the catalytic activity. (f) Two mutant polymerases, A739T and R744H, appear to

be more susceptible to protease than the wild type enzyme. In the search of a new promoter that the mutant R744H can recognize, we found one that -7 cytosine was replaced with thymine.

제 2 절.

Nucleic acid aptamers which might specifically bind to TNF- α were selected by Systematic Evolution of Ligand by Exponential enrichment(SELEX) method. DNA aptamers were isolated by rounds affinity column works and PCR amplification steps. Membrane filtration protocols instead of re-uses of affinity column were exploited in order to avoid degradation of RNA molecules. Compared to DNA, RNA aptamers showed higher binding affinity to TNF- α . It might result from the fact that RNA molecules could easily form wide variety of three dimension conformations. Selected aptamer molecules were cloned into plasmid vectors and analyzed further to get information about sequences and secondary structures. Aptamer clones of no sequence homology showed similar binding affinity for TNF on gel mobility shift assay. Therefore primary sequences of individual clones seemd not to be the major determinants of TNF binding affinity of RNA aptamers. Rather secondary structural motifs such as tetra-loop and tertiary structural conformations in RNA affect more on TNF binding affinity.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction	93
part 1. Studies on SP6 RNA polymerase mutants	
part 2. Screening of the aptamer binding to TNF- α	
Chapter 2. Current research status of the field	93
part 1.	
part 2.	
Chapter 3. Research subject and Result	96
part 1.	
part 2.	
Chapter 4. Degree of object accomplishment	135
part 1.	
part 2.	
Chapter 5. Application plan of the accomplishment	136
part 1.	
part 2.	
Chapter 6. References	138

여 백

목 차

제 1 장 서 론	93
제 1 절. SP6 RNA polymerase gene에 돌연변이 도입 및 기능 연구	
제 2 절. TNF- α 에 결합하는 핵산성 aptamer의 선별	
제 2 장 국내외 기술개발 현황	93
제 1 절.	
제 2 절.	
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	96
제 1 절.	
제 2 절.	
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	135
제 1 절.	
제 2 절.	
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	136
제 1 절.	
제 2 절.	
제 6 장 참고문헌	138

여 백

제 1 장 서 론

제 1 절.

SP6 RNA polymerase는 단일 polypeptide로 구성된 비교적 간단한 RNA polymerase이지만 다른 여러개의 polypeptide로 구성된 것들과 마찬가지로 작용하므로 전사의 기작을 연구하는데 중요한 대상이 되며, 시험관내에서 대량으로 RNA를 합성하는데 이용되고 있다. 본 연구에서는 SP6 RNA polymerase에 무작위로 돌연변이를 유도하여 그 기능의 변화를 살핍으로써 각 아미노산 잔기의 기능을 밝혀 전사기작의 이해에 근거가 될 수 있는 정보를 얻으려 하였다. 또한 돌연변이 SP6 RNA polymerase중에 열 안정성의 증가, promoter인지도 및 효소 활성의 증가와 같은 유용한 성질을 갖는 것을 탐색하였다. 이러한 개선된 성질의 SP6 RNA polymerase는 ribozyme이나 antisense RNA등의 대량합성에 이용할 수 있을 것이다.

제 1 절.

Aptamer 기술은 핵산 분자가 각각의 염기서열에 따라 갖는 삼차구조가 무궁무진하므로 이런 구조적인 특성에 의해 특정 생체 물질에 결합할 수 있도록 선별될 수 있다는 사실에서 출발한다. 이를 응용하여 특정 단백질의 핵산 결합 consensus sequence를 결정한다거나 특정 생리 활성 물질의 기능을 조절하는 aptamer를 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이런 일환으로 본 연구에서는 중요한 면역 조절 물질인 TNF- α 에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산성 aptamer를 선별하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절.

시험관내에서 RNA를 합성하는 것은 주로 화학적 방법이나 phage RNA polymerase를 이용한다. 이 중 T7 이나 SP6 RNA polymerase를 이용한 합성은 분자량이 큰 RNA의 합성등에 유리하며 경제적이어서 많이 이용되고 있다. 이 들 phage RNA

polymerase에 대한 연구는 가장 간단한 RNA polymerase로서의 전사기작연구와 응용으로 나눌 수 있다. 이들은 세균이나 진핵세포의 RNA polymerase가 여러개의 subunit으로 이루어진 거대분자인 것에 비하여 약 800여개의 아미노산으로 구성되어있는 비교적 간단한 구조를 하고 있다. 그럼에도 불구하고 높은 효율을 가지며 initiation, elongation, termination등에서 유사한 성질을 보인다. 따라서 이들을 통해 전사기작에 대한 연구를 수행하고 있다. DNA polymerase와 달리 primer없이도 promoter부분에서 RNA 합성을 개시하는 성질을 이용하여 염기서열 분석에 이용하려는 연구가 진행중이다. 네 종류의 nucleotide중 하나가 부족하거나 nucleotide analogue가 incorporation된 경우 특정염기에서 합성이 멈추는에 이를 분석함으로써 염기서열을 알 수 있다. 이러한 목적에 적합하도록 promoter 인식도가 증가하거나 다른 nucleotide analogue를 잘 incorporation시키는 RNA 중합 효소의 개발도 진행중에 있다.

제 2 절.

1. 국외 현황

Aptamer 기술은 Ellington과 Szotak에 의해 특정 organic dye에 특이적으로 결합할수 있는 핵산성 분자를 선별 및 대량 증폭할수 있다는 실험 결과가 나온 이래 많은 연구자들의 주목과 관심을 끄는 연구 대상이 되고 있다. 이것은 근본적으로 aptamer 개발 기술이 개념적인 측면뿐만 아니라 현실적인 이용 가능성의 측면에서도 매우 간단하고 경제적인 기술이기 때문이다. 현재 외국의 aptamer 관련 기술의 연구 방향은 대략 다음과 같은 세가지로 구분하여 생각해볼수 있다.

가. DNA 및 RNA aptamer 선별 기술

이것은 애초에 aptamer에 대한 개념이 정립될때부터 줄곧 수행되어온 연구 분야이다. Transcription factor와 같이 원래 핵산 결합 능력이 있는 단백질의 consensus sequence 를 찾는 일과 다양한 생체 고분자의 활성을 변화시킬수 있는 aptamer를 선별

하고자 하는 목표에 의거 연구가 진행된다.

나. Aptamer 변형 기술

이것은 이미 선별된 aptamer의 생체 고분자 결합 능력 및 활성 조절 능력을 향상키기 위해 핵산을 이루는 일부 nucleotide를 다양한 화학적 형태로 변형시키는 연구분야이다. 최근 들어 활발한 연구가 진행되고 있으며 phosphate group에 amide bond 등을 도입하여 단백질 결합 능력을 많이 향상시켰다는 보고가 있다.

다. Aptamer를 이용한 의약품 개발

아직까지는 그 가능성을 탐색하는 정도에서 연구가 진행되고 있으나 이러한 가능성 타진 실험들이 성공적으로 수행될 경우 매우 활발한 연구 분야로 떠오를 전망이다. HIV의 tat, rev 등에 결합할수 있는 핵산성 decoy 혹은 aptamer를 선별해서 AIDS 바이러스의 감염 및 증식을 억제하고자 하는 연구가 대표적인 경우이다. Bracht나 DeAnda의 보고에 의하면 개발된 aptamer가 파일럿 스케일의 모델 실험에서 부작용 없이 혈전 용해에 효과를 보임에 따라 heparin을 이용했을 때의 부작용을 없애는 좋은 대체 방법으로 각광받는 등 그 이용 가능성이 점차 높아지고 있다. (Bracht *et al.* , 1994; DeAnda *et al.*, 1994).

2. 국내 현황

Aptamer 선별 및 응용 기술이 알려지면서 국내의 여러 실험실에서도 이에 관심을 갖고 몇가지 기본적인 실험을 수행하고 있다. 그러나 아직까지는 aptamer 선별 기술의 최적화라든지 aptamer 변형 기술 나아가 aptamer 응용 기술 등 보다 고차적인 문제에 대해서는 이렇다할 실험결과가 나오고 있지 않은 실정이다. 그렇지만 Aptamer의 개발 및 응용 기술이 개념적으로 단순한 편이특별히 고도한 technique을 요구하는 것이 아니기 때문에 머지 않아 이 분야에 대한 know-how 가 쌓이면 관련 연구 분야에서 좋은 결과가 많이 나올 것으로 예측된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. SP6 RNA polymerase gene에 돌연변이 도입 및 기능 연구

1. SP6 RNA polymerase gene의 Random Mutagenesis

SP6 RNA polymerase gene의 N-terminal 부분(272개의 아미노산 잔기)과 C-terminal 부분(240개의 아미노산 잔기)을 대상으로 reduced Taq DNA polymerase fidelity 조건에서 PCR을 수행 하여 무작위로 돌연변이를 유도하였다. C-terminal 부분의 Hpa I, Nde I, Stu I, Spe I, Sna BI site를 이용하여 네 부분으로 나누었으며 각 fragment (Hpa I - Nde I, Nde I - Stu I, Stu I - Spe I, Spe I - Sna BI)을 A, B, C, D로 명명하였다. N-terminal 부분의 경우에는 Apa LI, MunI, Bst EII site를 이용하여 두 부분으로 나누어 각 각 G(Apa LI - Mun I), H(Mun I - Bst EII)로 명명하였다(Figure 1).

PCR 반응에 template DNA로는 Pst I으로 linearize한 pACSP6를 이용하였으며, 반응 조건은 low fidelity condition(20 mM MgCl₂, 1 mM dNTP and pH 8.3 at room temperature)에서 수행하거나 dITP를 넣어 수행하였다. 얻어진 PCR 산물은 각 각 Hpa I - Nde I, Nde I - Stu I, Stu I - Spe I, Spe I - Sna BI, Apa LI - Mun I, Mun I - Bst EII로 자른 후 pACSP6의 해당 부위와 교환하였다. 이 들은 각 각 pACSP6A, pACSP6B, pACSP6C, pACSP6D, pACSP6G, pACSP6H로 명명하였다. 이렇게 얻은 plasmid들은 JM109-pKSP6CAT cell에 transformation하였다.

2. Mutant screening

Plasmid pACSP6R은 p15A에서 유래된 pACYC184에 pSP618의 lac promoter와 SP6 RNA polymerase gene에 도입하여 제조하였다. Cat assay를 위한 vector는 pKK232-8에 SP6 RNA polymerase의 promoter를 subcloning하여 발현된 SP6 RNA polymerase에 의해 cat gene이 발현되도록 제조하였으며 이를 pKSP6CAT이라 명명하였다(Figure 2). pKSP6CAT은 ColE1 origin을 갖고 있고 있어 pACSP6R과 E.coli 내에서 동시에 존재 할 수 있다.

E. coli cell내에 pACSP6R와 pKSP6CAT가 동시에 존재하여 wild type polymerase에 의해 cat(chloramphenicol acetyl transferase) gene이 발현되면 750 g/ml chloramphenicol가 포함된

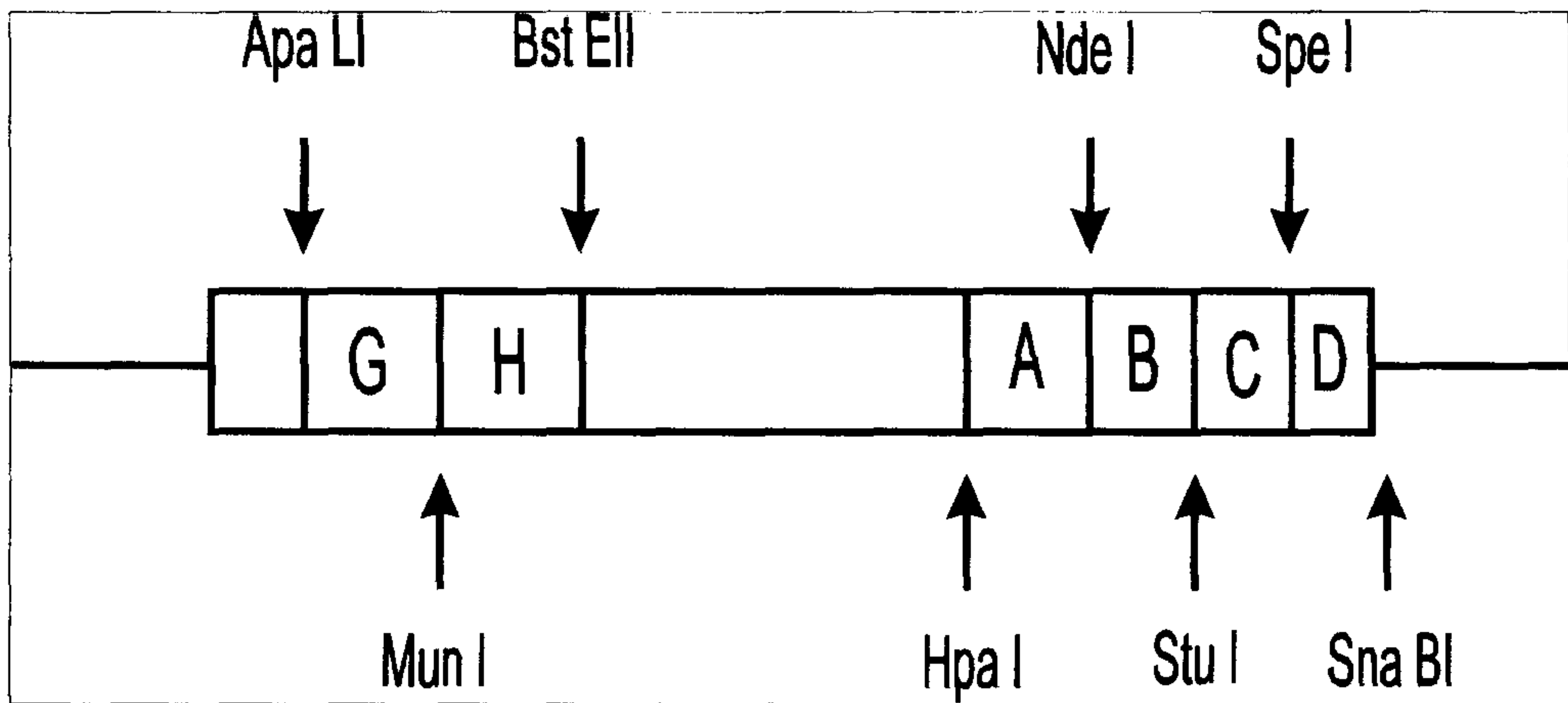


Figure 1. SP6 RNA polymerase의 유전자중 mutation을 도입한 부분.

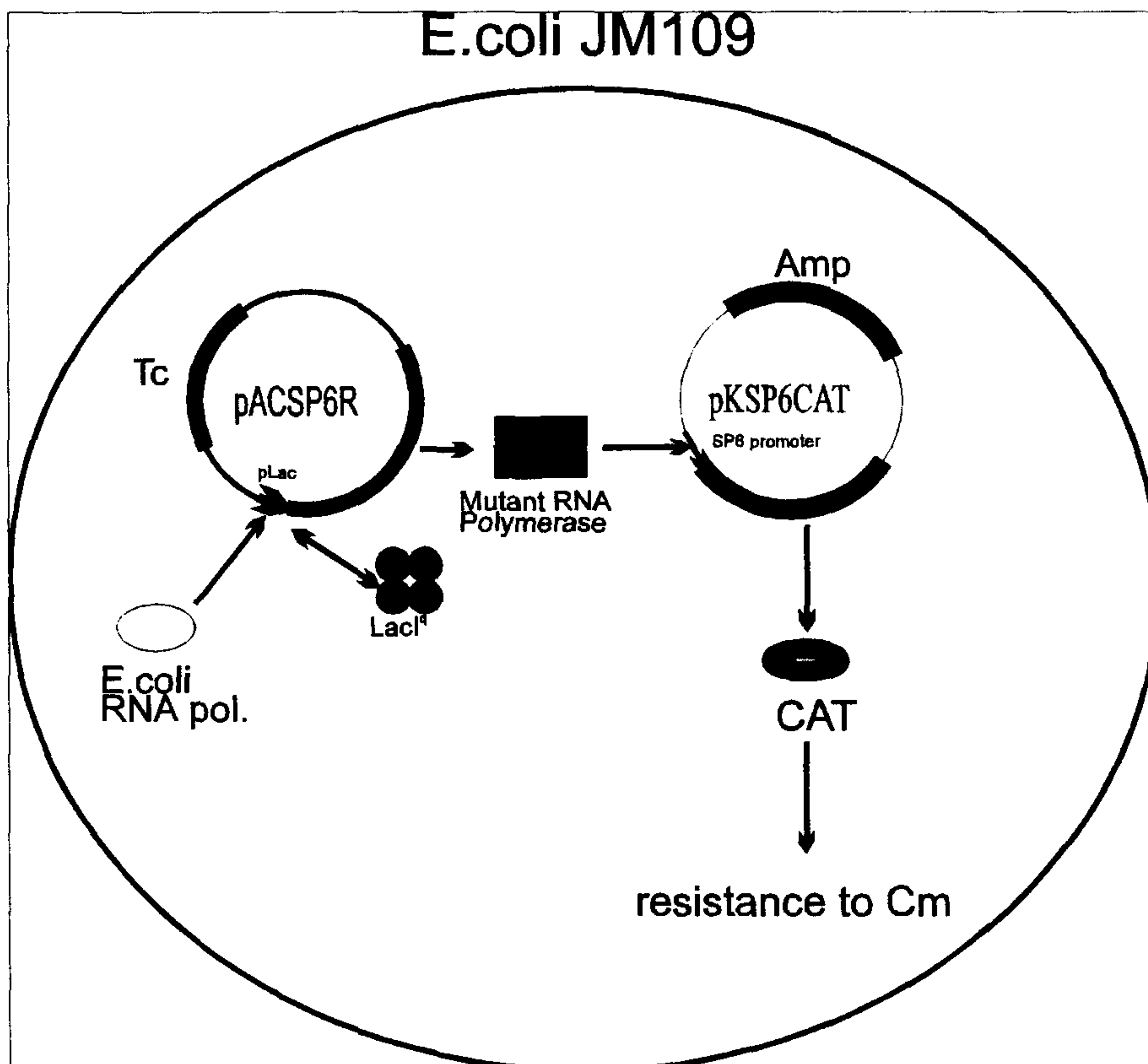


Figure 2. pACSP6R과 pKSP6CAT의 dual vector system.

plate에서도 자랄 수 있다. pACSP6R 대신 돌연변이를 도입한 plasmid를 transformation하면 cat gene의 발현 양상으로부터 활성이 변화한 mutant polymerase를 골라낼 수 있다. 각 plasmid(pACSP6A, -B, -C, -D, -G, -H)를 transformation 한 후에 500-700 g/ml chloramphenicol, 50 g/ml ampicillin and 15 g/ml tetracycline 이 포함된 plate에서 screening 하였다. Wild type 과 비교하여 chloramphenicol 에 대한 저항성이 감소한 clone 들을 각 각의 series로부터 얻었다. 이 들의 염기서열을 확인한 결과 25개의 point 또는 multiple mutant를 얻었 으며 나머지는 silent, frame shift, 그리고 large deletion mutant들이 발견되었다(Table 1).

3. SP6 RNA polymerase mutant들의 안정성 및 용해도

돌연변이가 유도된 SP6 RNA polymerase들이 안정하게 세포내에 존재하는지를 알아보 기위해서 각 mutant RNA polymerase를 가지는 host cell을 sonication하여 파괴한 후에 soluble fraction과 insoluble fraction으로 나눈 후 각 각 SDS-PAGE 와 Western blot analysis를 수행하 였다(Figure 3, 4). SDS-PAGE에서는 overexpression된 protein들이 wild type과 비교해 보았을 때 차이를 발견할 수 없었다. Immunoblotting analysis에서는, 모든 SP6 RNA polymerase mutant들이 antiserum(SP6 RNA polymerase에 대한 것으로 이는 T7에 대해서는 전혀 binding하 지 않음) 대해서 아주 잘 인식 되었다. 몇가지 경우에 있어서 RNA polymerase mutant들의 solubility가 변형된 것으로 보이고 이로인해 soluble fraction 에서 적은 양만을 얻을 수 있는 경 우도 있었다. 다섯 개의 mutant RNA polymerases (Δ Asn559, L605P, R714P, Q735R and L788P) 이 심각하게 insoluble했다. 두 mutants (A739T and R744H) proteolytic cleavage 에 매우 약한 것으로 보였다. 그래서 80K의 cleavage product 를 보였다.

Plasmid	Position	Amino acid change		Plasmid	Position	Amino acid change
A34	558	Deletion of Asn		D93	872	Val→His
A65	605	Leu→Pro			873	Phe→Arg
B52	687	Met→Ile			874	Ala→Lys
B59	684	Tyr→Phe			875	Addition of Gln
B66	641	Ser→Pro			876	Addition of Leu
	671	Glu→Gly		D120	856	Pro→Ser
B104	714	Arg→Pro		D134	805	His→Gln
C24	779	His→Asn		D153	862	Asp→Glu
C44	780	Gly→Cys		G6	138	Ser→Leu
C63	744	Arg→His		G7	117	Asp→Val
C75	739	Ala→Thr		G101	139	Leu→Pro
C94	735	Gln→Arg			144	Thr→Ala
C109	788	Leu→Pro		G104	80	Cys→Thr
D32	808	Phe→Ser		H23	179	Glu→Pro
	820	Val→Ala		H66	231	Lys→Ile
	835	Ala→Val		H75	182	Ile→Phe
	843	His→Tyr			184	Thr→Ala
	848	Met→Thr		H79	190	Leu→Pro
					196	Tyr→Cys
					232	Ser→Gly

Table 1. Assignment of mutation

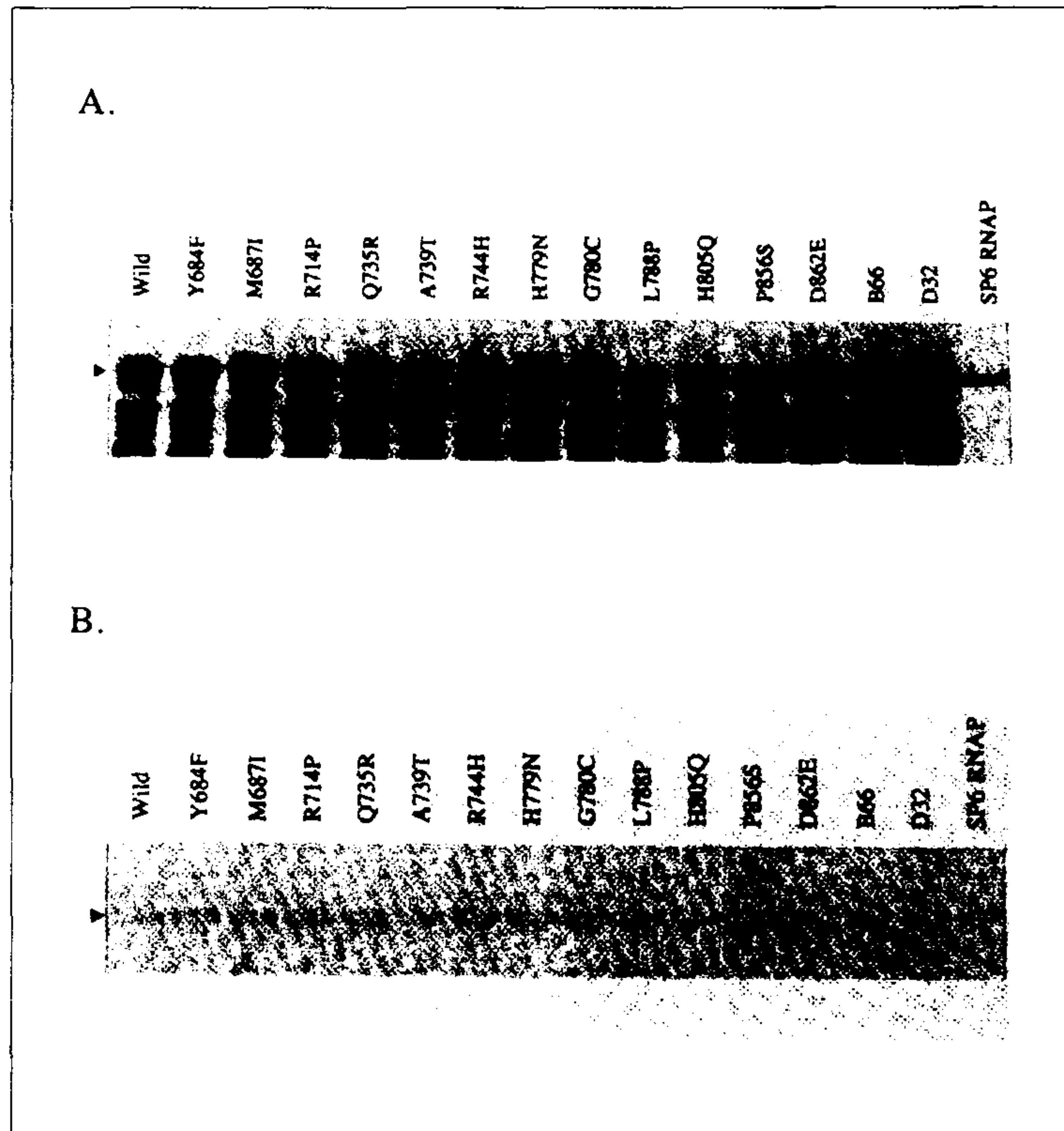


Figure 3. Integrity of mutant RNA polymerases. (A) IPTG induction 후 4시간이 지난 다음 SDS-PAGE를 걸어 확인하였다. 화살표는 SP6 RNA polymerase. (B) Immunoblot analysis of mutant RNA polymerases.

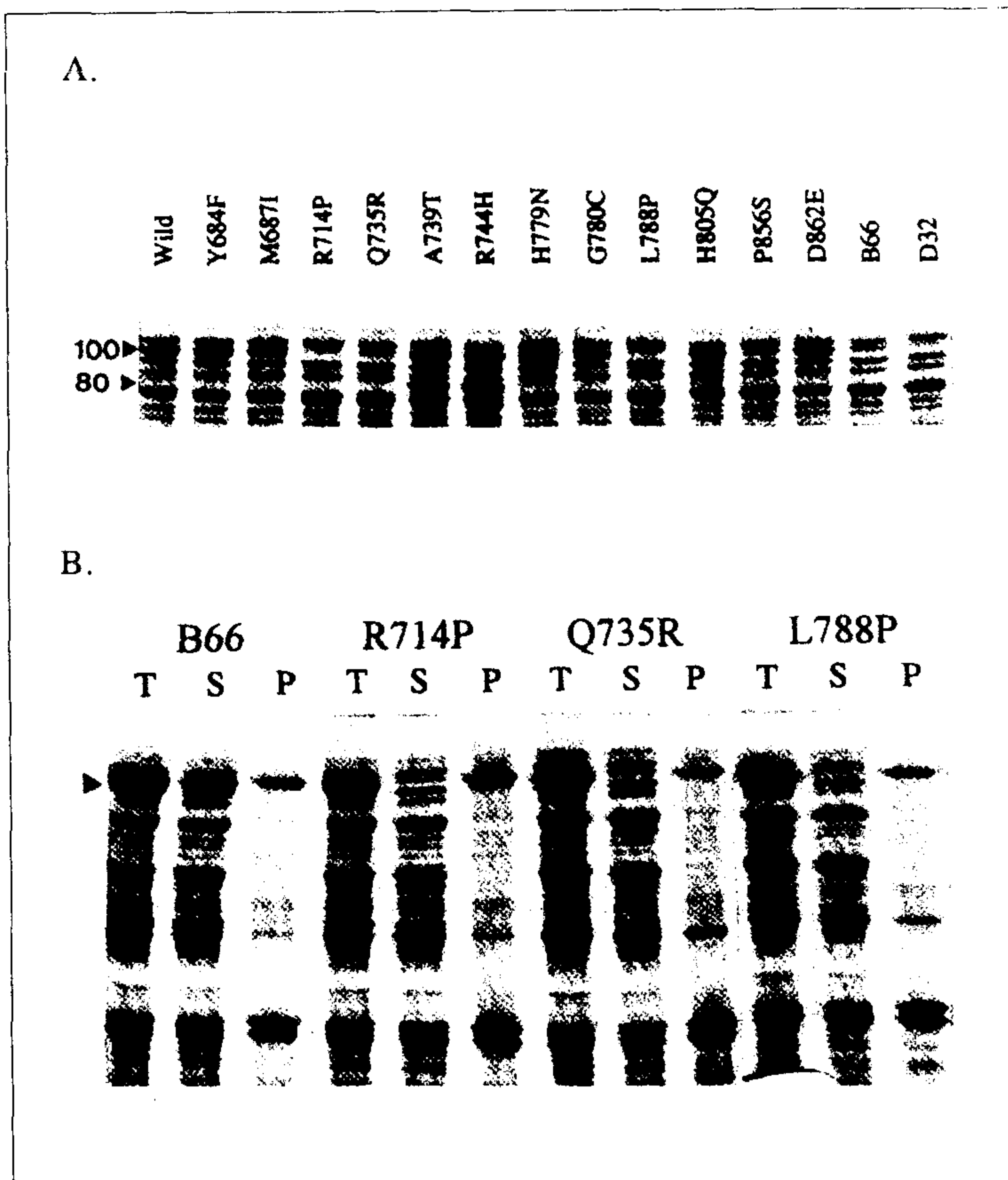


Figure 4. Mutant RNA polymerase들의 용해도. (A) 수합한 cell을 sonication 하여 파괴한 후 원심분리하여 debris를 제거한 다음 나머지로 SDS-PAGE를 수행하였다. (B) Total lysate(T), clarified supernatant(S), resuspended pellet(P)을 각각 SDS-PAGE를 걸어 확인하였다.

4. SP6 RNA polymerase mutants in vivo에서의 활성

Mutant polymerases의 활성을, in vivo 에서 측정하기 위해서 pKSP6CAT와 wild type 또는 mutant SP6 RNA polymerase를 포함한 E. coli JM109 를 다양한 농도의 chloramphenicol가 포함된 LB plate에 streak하여 그 성장 정도로부터 chloramphenicol에 대한 저항성을 보았다. Mutant RNA polymerase중 , B66, D32, Q179P, H75, H79, R744H, H779N, H805Q, B66 and D32 들은 낮은 농도의 chloramphenicol에서만 자랐다. S138L, D117V, C80T, K231I, G101, R714P, Q735R, L788P은 중간정도의 chloramphenicol 농도에서 성장이 가능하였으며, Y684F, M687I, A739T, G780C, P685S, D862F는 700 μ g/ml까지의 범위에서는 wild type과 차이를 보이지 않았다. 좀더 정밀한 측정을 하기위해서 mutant polymerase들을, 실험 방법에 명시된 대로 standard CAT assay를 실시 하였다. 다섯 종류의 mutant가 상대적으로 낮은 CAT activity (less than 1%)를 보였다. 또 세가지의 polymerase mutant가 상대적으로 낮지 않았던 것도 (R714P, Q735R and L788P) 또한 1%정도의 상대적 activity를 보였다. 이러한 것의 원인은 낮은 농도만이 soluble fraction에 존재 하기 때문으로 밝혀졌다. 또한 이 결과를 confirm하기 위해서 CAT assay와, 1 mM IPTG로 induction한 JM109 cells (pKSP6CAT and recombinant plasmids of interest) 그리고 SDS-PAGE 실시한 것과 비교하였다. 6 종류가 (Y684F, M687I, A739T, G780C, P856S and D862F), cat gene이 잘 발현된 것으로 보였다(Figure 5).

5. Promoter binding

Polymerase 의 promoter DNA에 bind하는 능력을 보기 위해서 cell extracts를 SP6 promoter를 포함한 24 base pair 짜리 end-labeled oligonucleotide와 incubation한 후, PAGE를 걸어서 이들의 mobility가 retardation되는 것으로 측정하였다(Figure 6). Control로서 wild type SP6 DNA polymerase는 salmon sperm DNA를 competitor로 참가 하였을 경우나 그렇지 않은 경우 모두 promoter binding을 확인 할 수있었다. Null extract와 비교하여 보았을 때 약 50배 정도 희석하여도 잘 binding한 것을 확인할 수 있었는데 이는 다른 mutant의 농도와 비교하여 보았을 때 모두 이 범위에 들어 간다고 볼 수 있다. In vivo 에서 inactive한 것으로 보였던 H779N, H805R, B66 and D32 mutants 들도 promoter에 bind 한다는 것을 확인 하였다. 따라서 이들은 promoter 의 인식에는 영향을 주지 않지만 catalytic activity가 없거나 또는 promoter의 melting, elongation step으로의 전이 등의 단계에서의 작용이 억제된 것으로 보인다.

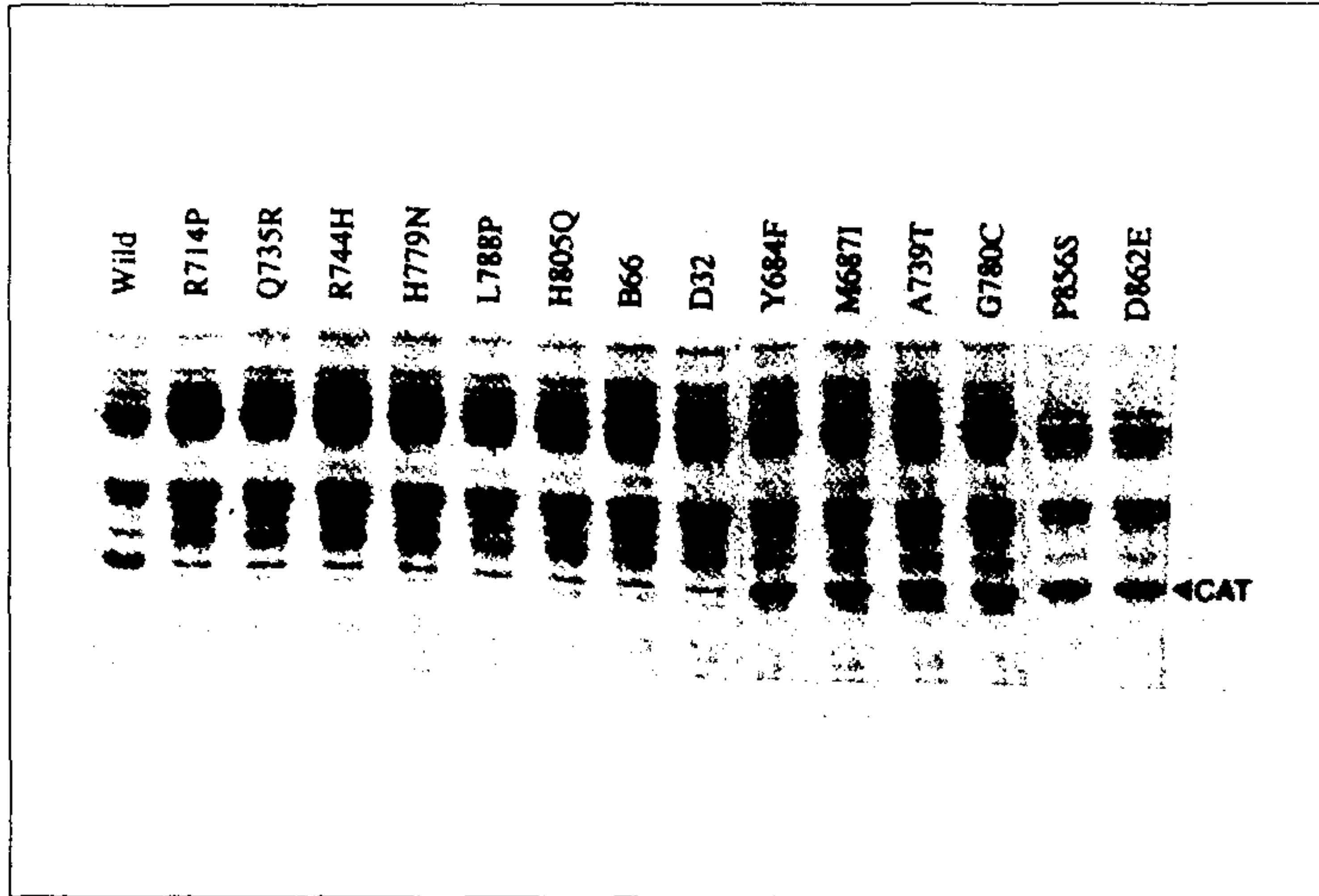


Figure 5. Mutant RNA polymerase에 의한 CAT gene의 발현

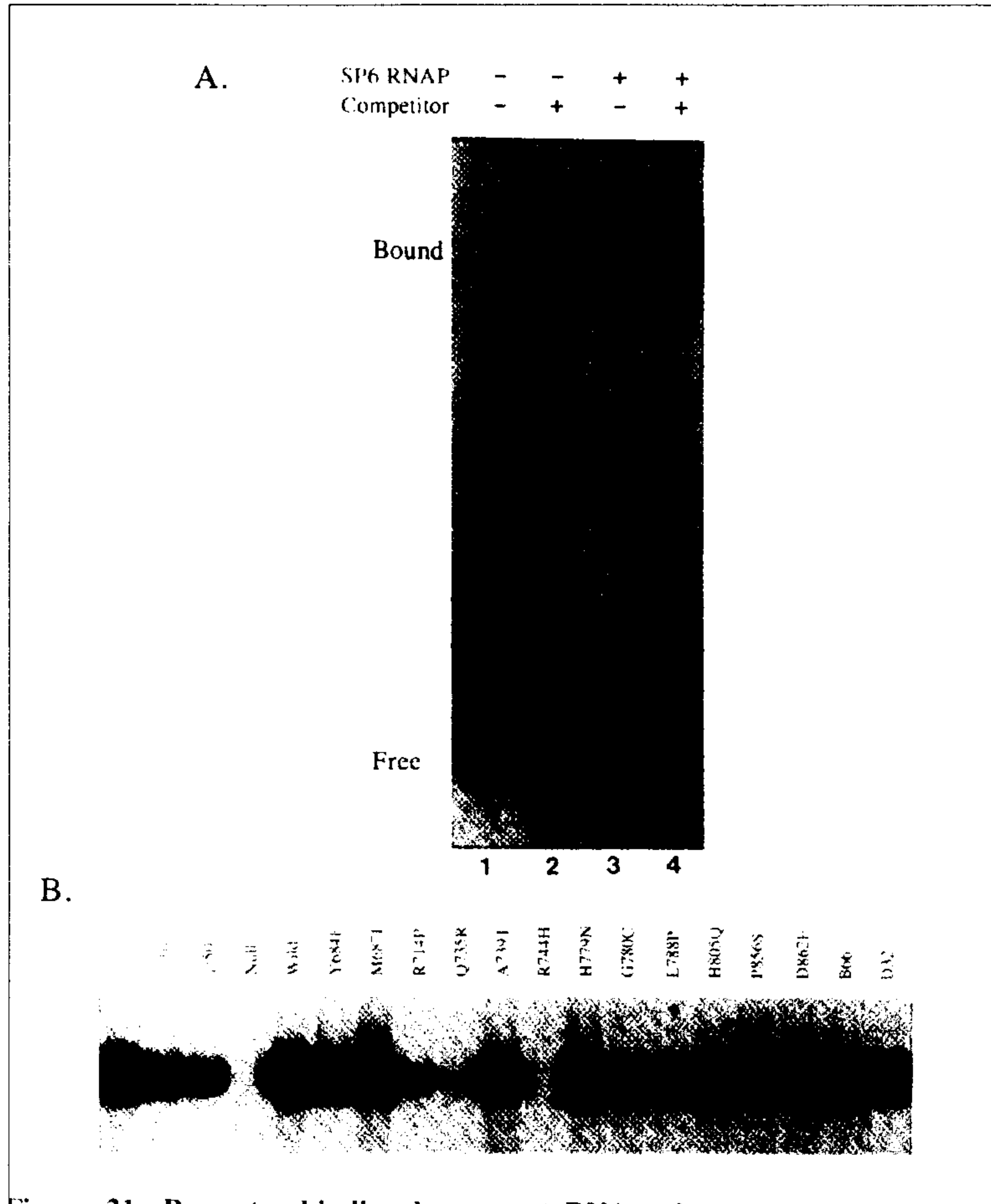


Figure 6. Mutant RNA polymerase에 의한 promoter binding. (A) SP6 promoter를 갖는 24 base pair의 oligomer로 gel retardation assay를 수행하였다. Salmon sperm DNA를 competitor로 사용하였다. (B) 각 mutant RNA polymerase의 crude extract로 competitor 존재하에서 gel retardation assay를 수행하였다.

R744H는 promoter binding activity는 완전히 사라진 반면, 다른 기능(non-specific activity)은 살아있는 것으로 보여서 흥미로웠다. 또한 3가지의 낮은 solubility를 나타냈던 것 중, R714 과 Q735R 는 약한 promoter binding activity를 보였는데, L788P는 정상적인 promoter binding activity보였다. 다른 일반적인 polymerase mutants들은 promoter에 잘 binding 했다.

6. Non-specific catalytic activity

SP6 RNA polymerase의 non-specific catalytic activity 관한 것(즉, 알려진 promoter sequence가 없는 template에 대한)은 (poly dI:dC):(poly dI:dC) template 대한 RNA oligomer 형성 능력으로 알 수 있다. In vivo에서 active한 모든 enzyme들은 non-specific catalytic activity를 가지고 있다. 그런데 inactive enzyme들중 두 종류(R744H와 L788P)는 non-specific catalytic activity를 나타내고 있다(Figure 7). Mutant R744H는 promoter에 binding하지는 못하지만 non-specific catalytic activity를 가지고 있는데 이러한 사실은 744R이 promoter binding에 필수적인 residue라는 것을 시사한다.

7. Initiation at the synthetic promoter

Promoter binding과 open complex형성후 transcription은 몇개의 phosphodiester bonds를 형성한다. 안정한 elongation complex는 T7의 경우 8- 12개의 nucleotides 가 형성된 다음에 이루어 진다(Martin et al., 1988). SP6 RNA polymerase의 경우, 6-mer이상이 만들어 져야 효과적으로 abortive cycle을 벗어난다(Nam and Kang, 1988). 역시 24 base pair synthetic promoter fragment 에서도 5개 이하와 run-off product가 만들어 졌다. Promoter-binding activity와 non-specific catalytic activity를 가지는 모든 polymerase가 synthetic promoter로부터 RNA synthesis를 initiation할 수 있다. 또한 in vivo에서 inactive한 대부분의 효소들은 거의 abortive initiation products를 만들지 못하지만, 그중 둘(R744H and L788P) 은 abortive initiation products를 만들 수 있다(Figure 8).

8. Elongation과 Processivity

24 base pair의 합성한 promoter는 polymerase의 initiation step을 연구하는 데에는 유용하게 사용할 수 있으나, elongation step이 후의 과정을 연구하는데 이용하기에는 어려움이 있다.

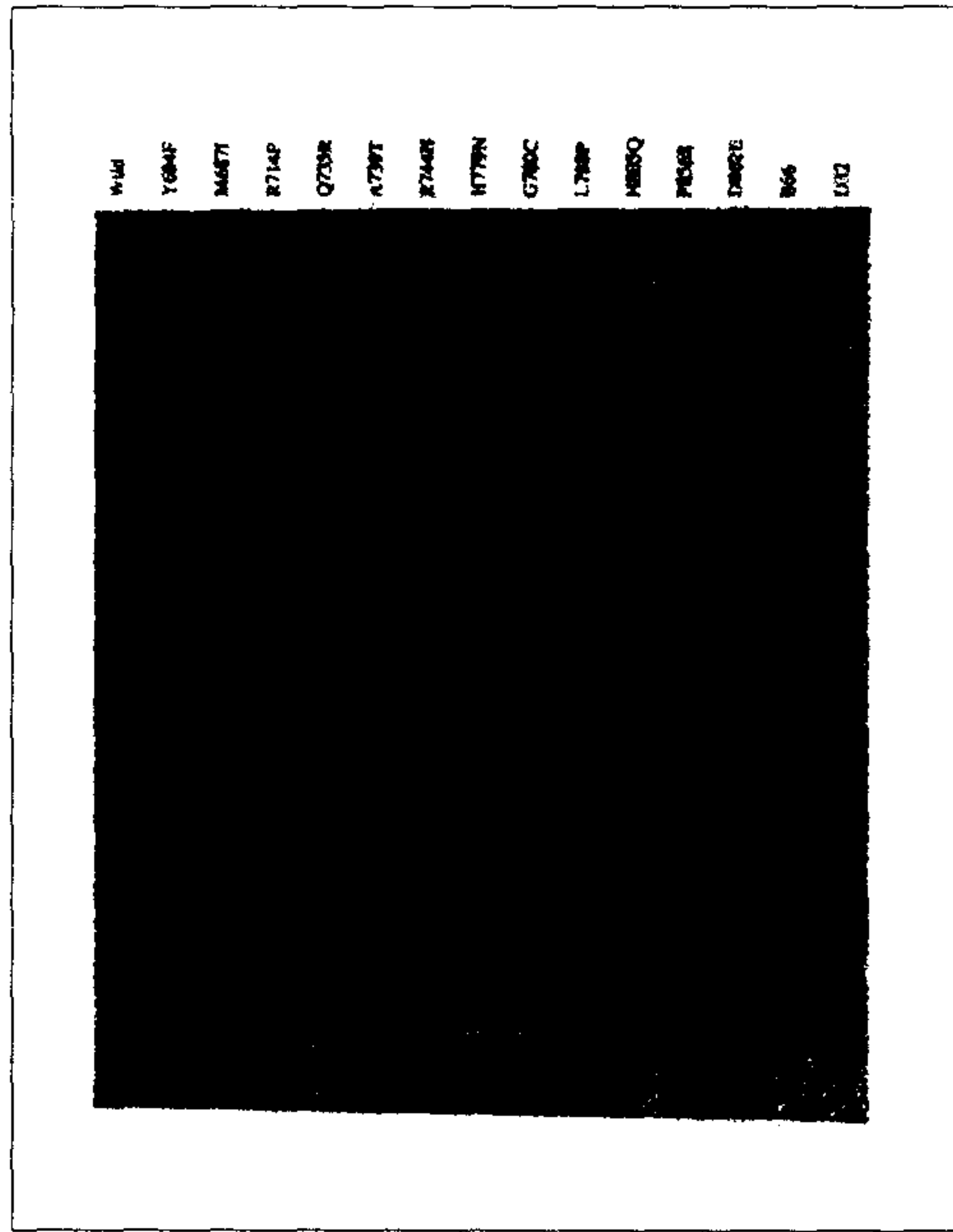


Figure 7. Non-specific catalytic activity of mutant RNA polymerases

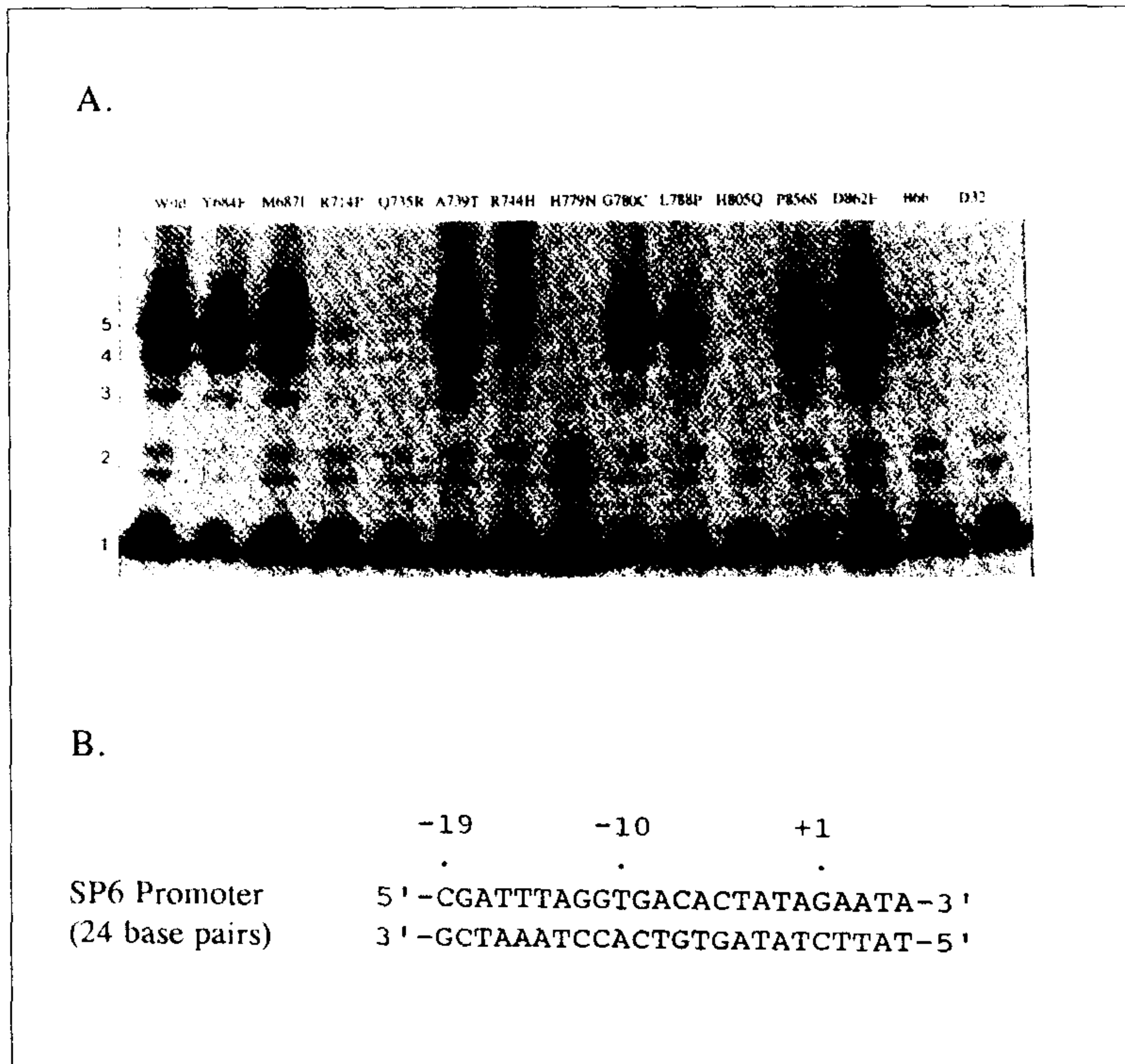


Figure 8. 합성한 promoter에서 전사 개시. (A) Mutant RNA polymerase의 crude extract로 합성한 promoter에서 전사반응을 수행하였다. Transcript는 2 μ Ci [α - 32 P] GTP로 표지하였으며 20% denaturing PAGE에서 확인하였다. (B) 합성한 promoter DNA의 염기서열.

따라서 plasmid pSPTATA를 ScaI으로 절단한 것을 template로 하여 연구에 이용하였다. 이 template에서는 약 1.4kb의 run-off transcript가 만들어진다. In vivo에서 활성을 보이는 대부분의 mutant polymerase가 1.4kb 이상의 transcript를 만드는 것으로 보아 이들은 processivity가 높다. 활성을 보이지 않던 대부분의 mutant는 예상대로 processivity가 없었으나 L788P의 경우에는 약한 processivity를 나타내었다(Figure 9).

Termination되는 기작은 아직 알려지지 않았으나 terminator RNA의 thermodynamic stability, RNA stem과 polymerase의 interaction, RNA polymerase의 processivity등이 termination efficiency에 영향을 미치는 요인으로 추정된다. Termination step에서 mutant polymerase들의 성질을 관찰 하기위하여 SmaI으로 절단한 plasmid pGEM3ZS를 이용하였다. Termination site에서 정지한 경우 150mer의 transcript가 만들어지며, run-off transcript의 경우 185mer 이다. 1.4Kb 이상의 transcript를 만들지 못하는 대부분의 polymerase는 150mer의 transcript만을 소량 생산하였다. SP6 RNA polymerase는 T7 DNA의 T ϕ terminator를 인식한다. In vivo에서 약한 활성을 보이는 mutant들이 band로는 약하게 나타나지만 T7 terminator를 인식하는 능력에는 변화가 없었다(Figure 10).

9. Promoter selection of R744H

R744H는 non-specific activity는 보이지만 promoter를 인식하여 transcript를 만들어내지는 못한다. T3와 T7 RNA polymerase의 비교 연구에서 각 polymerase의 promoter specificity의 결정에 관여하는 아미노산 잔기가 T7 RNA polymerase의 748번 asparagine이라는 연구결과가 있는데 이 위치는 SP6 RNA polymerase의 744번과 근접해 있다. 따라서 744번 arginine도 promoter recognition에 관여할 가능성이 있으므로 R744H가 인식하는 promoter를 탐색하는 연구를 수행하였다.

Plasmid pKSP6CAT의 SP6 promoter부분에 염기서열중 일부를 single-base pair substitution의 빈도가 가장 높게 무작위로 합성하여 이를 pACSP6R744H plasmid가 들어 있는 JM109 cell에 transformation하였다. R744H mutant polymerase가 무작위로 합성한 염기서열중 일부를 promoter로 인식하여 CAT gene을 발현하면 chloramphenicol 배지에서 생존하는 것을 찾는 system을 구축하였다. 약 1000개의 colony중 2개가 500 μ l/ml의 chloramphenicol에서 생존하는 것을 확인 하였으며, 염기서열을 확인하여 본 결과 모두 -7위치의 C가 T로 바뀐 것이었다. 이

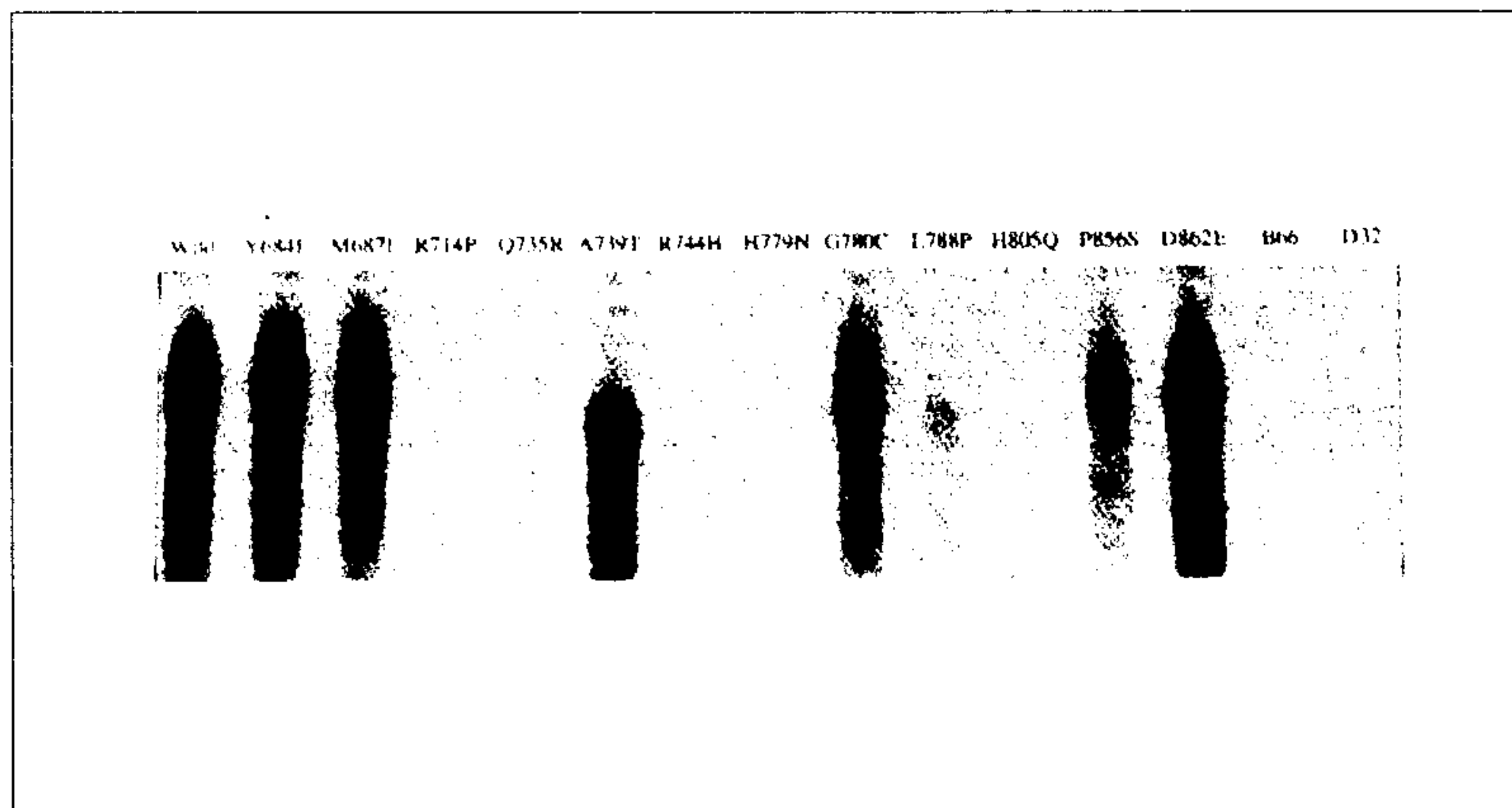


Figure 9. Long transcript의 합성. ScaI으로 절단한 pSPTATA를 template로 하여 전사반응을 진행시킨후 1.4kb의 transcript를 8% PAGE에서 확인하였다.

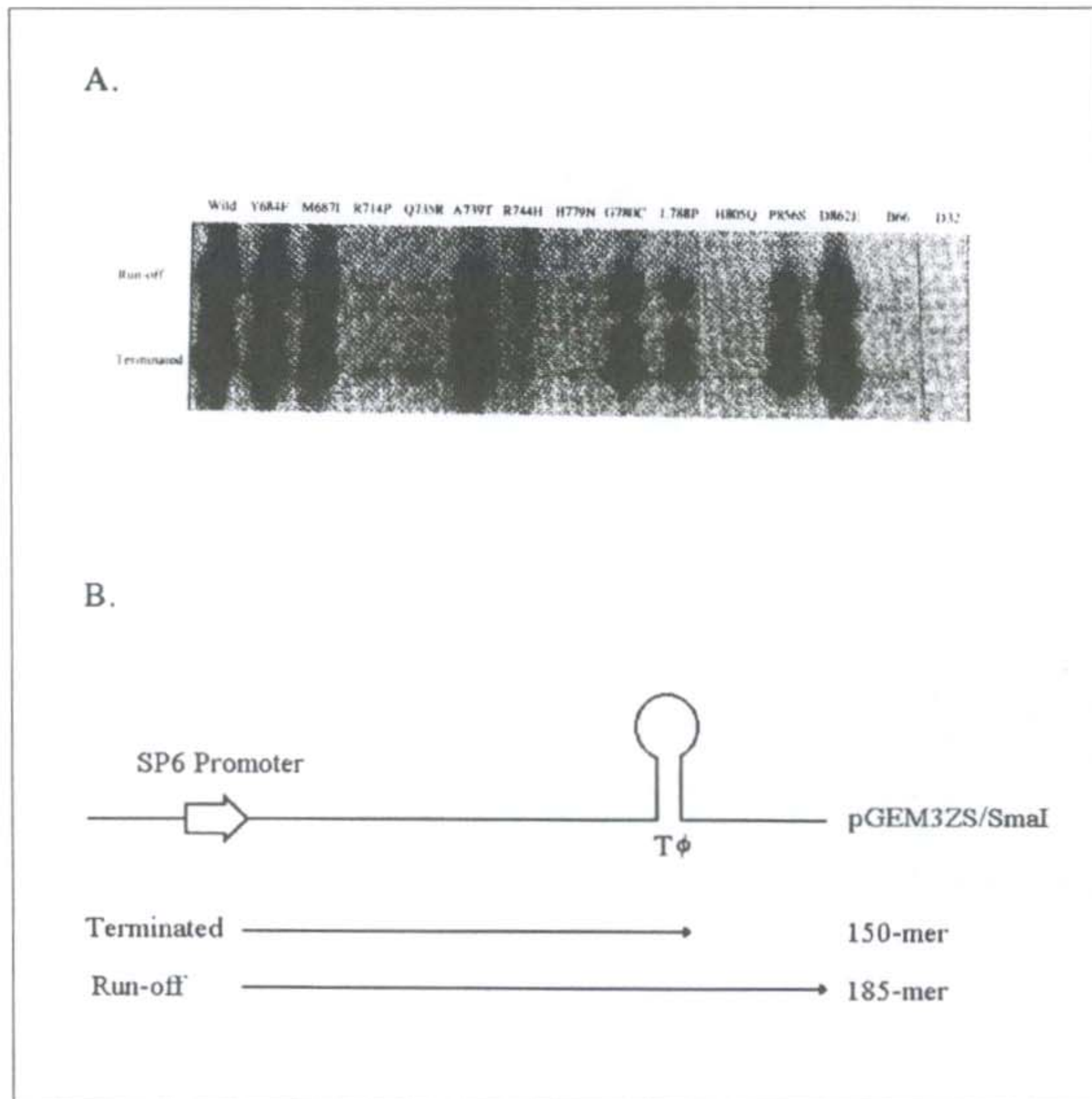


Figure 10. Termination by T7 terminator(T ϕ) (A) Sma I 으로 절단한 pGEM3Z를 template로 하여 전사반응을 진행시킨후 8% PAGE에서 확인하였다. (B) pGEM3Z에서 promoter와 terminator의 구조.

plasmid를 분리하여 in vitro transcription assay를 수행한 결과 transcript를 만들어내는 것을 확인하였다. 이 arginine이 SP6 뿐 아니라 T3, T7, K11 RNA polymerase에서도 conserved되어있으며, promoter의 -7 부분도 conserved되어 있으므로 이 들 polymerase에서 arginine은 -7 위치의 CG pair를 인식하는 것으로 생각된다.

-22 -10 -7 +1 +5

SP6 Wild Type Sequence : 5'-ATTTAGAGGTGACACTATAGAAGA-3'

R744H Promoter Sequence : -----T-----

10. 고찰

본 연구를 통하여 SP6 RNA polymerase의 기능에 중요한 역할을 하는 아미노산 잔기들을 확인하였다. SP6 RNA polymerase와 비슷한 구조를 가질것으로 생각되는 T7 RNA polymerase는 그 3차 구조가 밝혀져 있으며 본 연구와 마찬가지로 일부의 아미노산 잔기들의 기능에 관한 연구가 진행되어있다. 따라서 이러한 결과와 본 연구의 결과가 RNA polymerase의 전사기작 및 구조와 기능간의 상관관계를 연구하는데 중요한 정보가 될 것이다.

리보핵산효소, antisense RNA, aptamer등이 차세대의 신약으로서 부각되기 시작하였다. 이 들은 모두 RNA로 이루어져 있으므로 이들의 효율적인 생산에 필요한 RNA polymerase의 연구가 매우 중요하다. 본 연구를 통해 RNA polymerase의 기능에 가장 중요한 promoter의 인식과 catalytic activity에 관여하는 아미노산 잔기들을 인지하였으므로 이를 효율적인 전사 system의 개발에 이용할 수 있을 것이다.

제 2 절. TNF- α 에 결합하는 핵산성 aptamer의 선별

1. TNF- α 유전자의 클로닝 및 단백질의 발현

가. TNF- α 유전자의 클로닝에 사용된 PCR primers

hT5 : 5' CGGGATCCGT CAGATCATCT TCTCG 3'

BamHI site

hT3 : 5' TCCTCACAGG GCAATGATCC C 3'

나. TNF- α 발현 벡터로의 클로닝

human T cell/macrophage cDNA library로부터 hT5와 hT3의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하고 사람 TNF- α cDNA를 클로닝했다. PCR에 의해 증폭된 사람 TNF- α cDNA는 프라이머에 존재하는 BamHI 부위를 제한효소로 절단하고 3'은 klenow 효소에 의해 fill-in 시킨후 대장균내에서의 대량 발현을 위해 QIAexpressionistTM(QIAGEN)의 QE30 vectorTM에 open reading frame이 맞도록 삽입하였다.

다. 순수 분리된 TNF- α

제조된 QE30 발현벡터를 *E. coli* XL1-blue strain에 도입했다. 이 균주의 400 ml culture로부터 sonication에 이어 발현벡터의 Histidine tag에 affinity를 가진 Ni-NTA resin을 통과시켜 재조합된 사람 TNF- α 를 순수 분리하였다(실험 세부 내용은 제조회사의 지시대로 행하였음). 순수 분리된 TNF- α 를 Poly-acrylamide gel에 걸어 확인하였다 (Fig. 1)

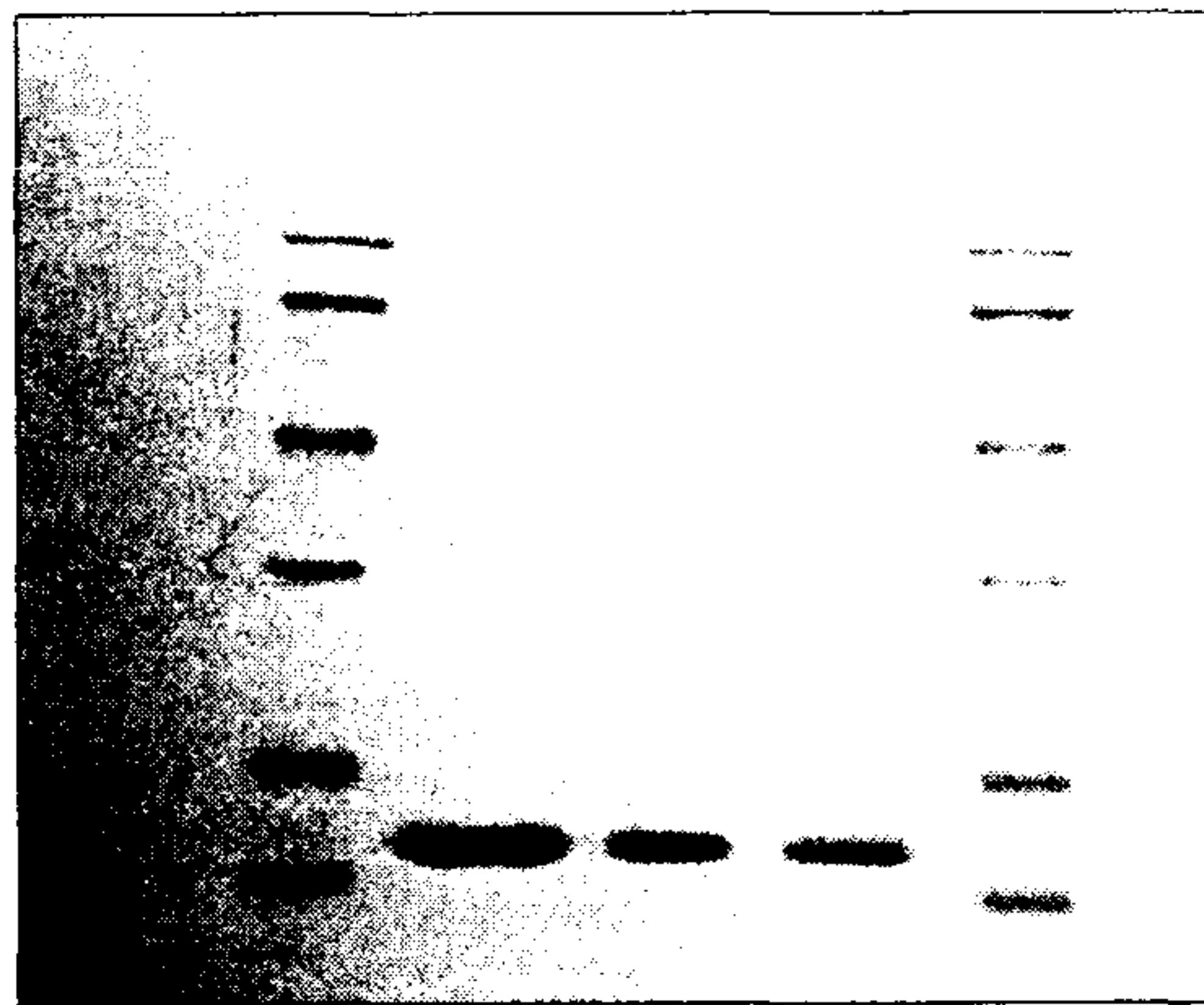


Figure 1 정제된 TNF- α 의 PAGE 확인. 좌로부터 size marker,
TNF 3, 2, 1 μ g

2. Random DNA pool의 제조

가. Random DNA pool : 총 102 bp

5' TCAGATCTCT CGAGTAGAGC TCGC- (N)60 -TGGTGCAACA
GCAGAAGA 3'

선별된 aptamer를 PCR 증폭할수 있게 하기 위해 지정된 두 개의 primer 를 포함하고 60개의 random oligonucleotide를 갖는 aptamer pool을 합성하였다. 이 pool은 4^{60} 의 complexity를 갖는다.

나. aptamer 증폭용 PCR primers

5' PCR 프라이머(RP5)

5' AGTCTAGAGA GTCATCTCG AGCG 3'

3' PCR 프라이머(RP3)

5' AGAAGACGAC AACGTGGT 3'

다. DNA pool의 대량 증폭 및 폴리아크릴아마이드 젤로부터의 elution

합성된 random DNA pool을 200개의 aliquot으로 나누고 지정된 프라이머를 이용하여 large scale PCR을 수행하였다. 이것을 denaturing polyacrylamide gel에서 크기를 확인하고 crush and soak 방법에 의해 elution 하였다(Fig.2)

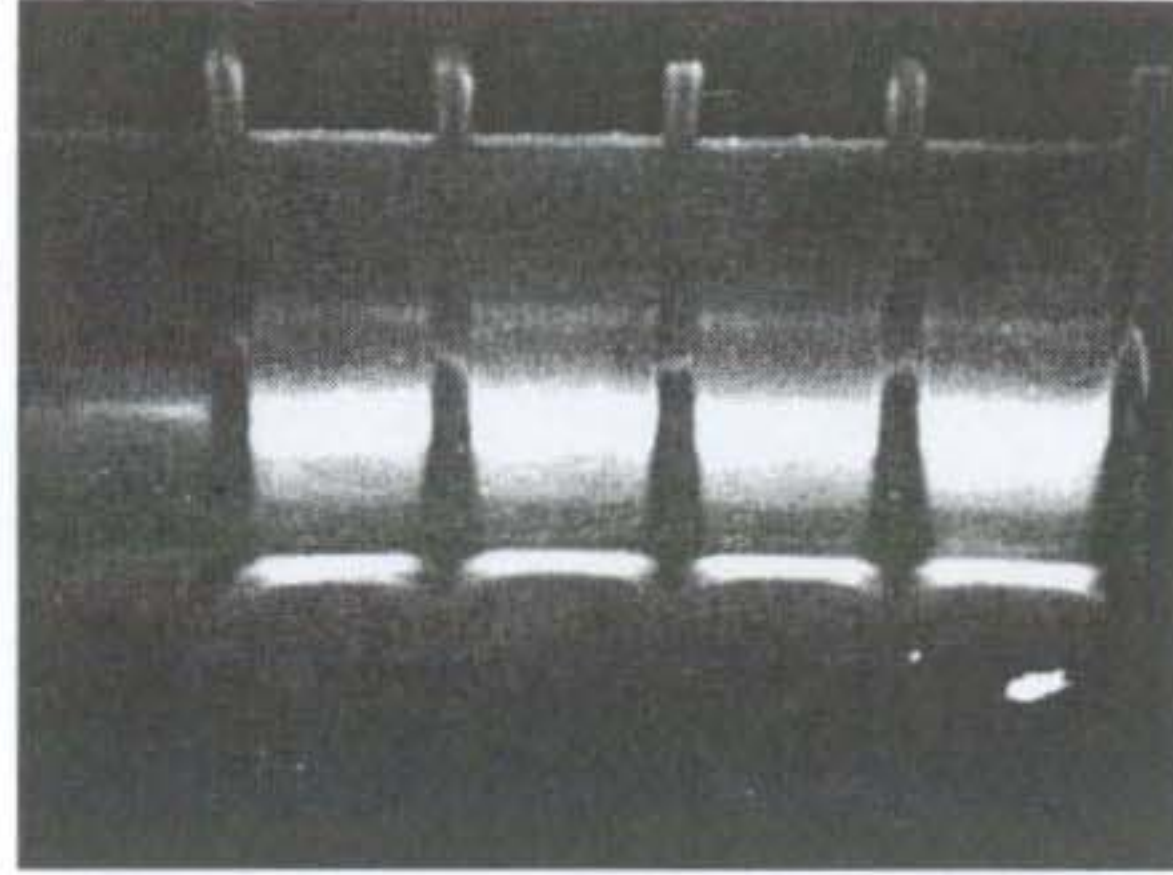


Figure 2 대량 증폭된 random pool DNA의 PAGE elution.
맨 아랫 밴드는 PCR primer, 맨 윗 밴드는 single
strand DNA

3. TNF- α affinity column의 제조

순수분리된 800 μg 의 재조합 TNF- α 를 Sepharose CH-4B resin에 부착시켜 aptamer 선별을 위한 affinity column을 제조하였다. 동시에 단백질을 붙이지 않은 control column도 제조하였다.

4. TNF- α 결합 aptamer의 선별

Selection buffer에 녹인 random DNA pool은 5분 동안 끓여서 single strand로 만든다. 이를 affinity column에 loading하고 20분간 방치해 둔후 결합하지 않은 DNA를 흘려보내기 위해 15ml의 selection buffer로 씻어준다. TNF에 결합한 DNA는 물을 이용해 elution 시키고 이는 지정된 프라이머를 이용해 PCR 증폭한다. 증폭된 DNA는 폴리아크릴아마이드 겔에서 elution하고 다시 column에 통과시키는 작업을 반복한다. 네번째 반복 과정부터는 TNF가 아닌 Sepharose resin 자체에 결합하는 false positive를 제거하기 위해 아무것도 부착되지 않은 control column에 먼저 통과시킨후 흘러 나오는 분량만을 가지고 선별한다. 이렇게 선별과 증폭의 반복 횟수가 늘어남에 따라 random pool 중에서 TNF에 결합할수 있는 분자의 비율이 증가하는 것을 elution한 DNA의 양을 spectrophotometer를 통해 측정함으로써 확인하였다(Fig. 3)

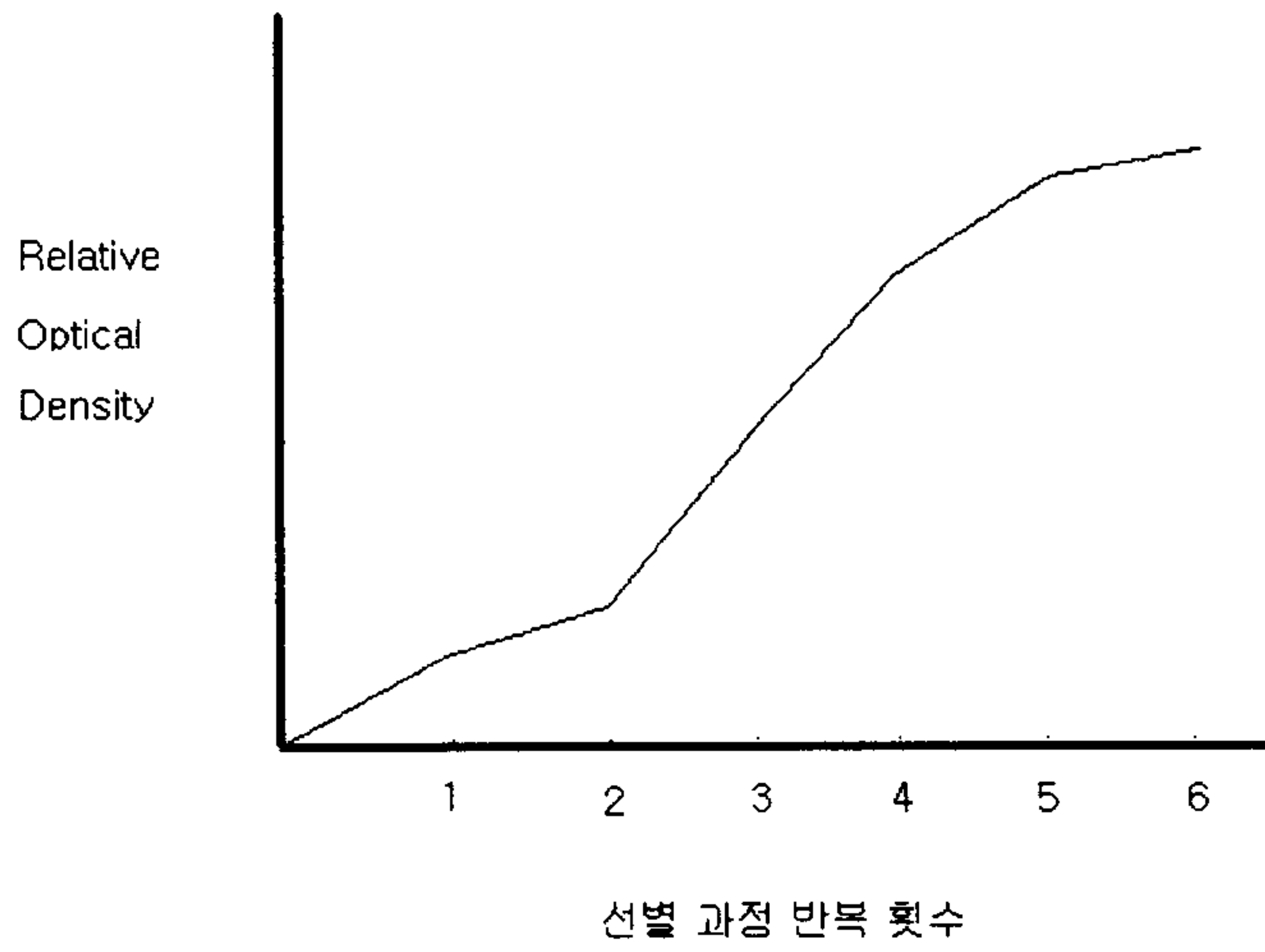


Figure 3. Aptamer 선별 과정의 반복에 따라 affinity column으로부터 elution 돼 나오는 DNA 양의 증가. O.D는 상대적인 양으로 표시하였음.

5. 선별된 aptamer의 TNF- α 결합 능력 조사

선별된 aptamer 분자들이 실제로 TNF- α 에 대한 결합능력을 보이는지 확인하기 위해 여섯 번째 반복 과정에서 얻은 fraction을 end-label 하여 gel shift assay를 수행하였다. non-denaturing PAGE 상에서는 다양한 DNA single strand conformation이 존재하므로 명확한 단일 밴드를 보이지는 않았지만 단백질과의 결합에 의해 전기 영동 능력이 감소한 부분을 관찰할 수 있었다(Fig. 4)

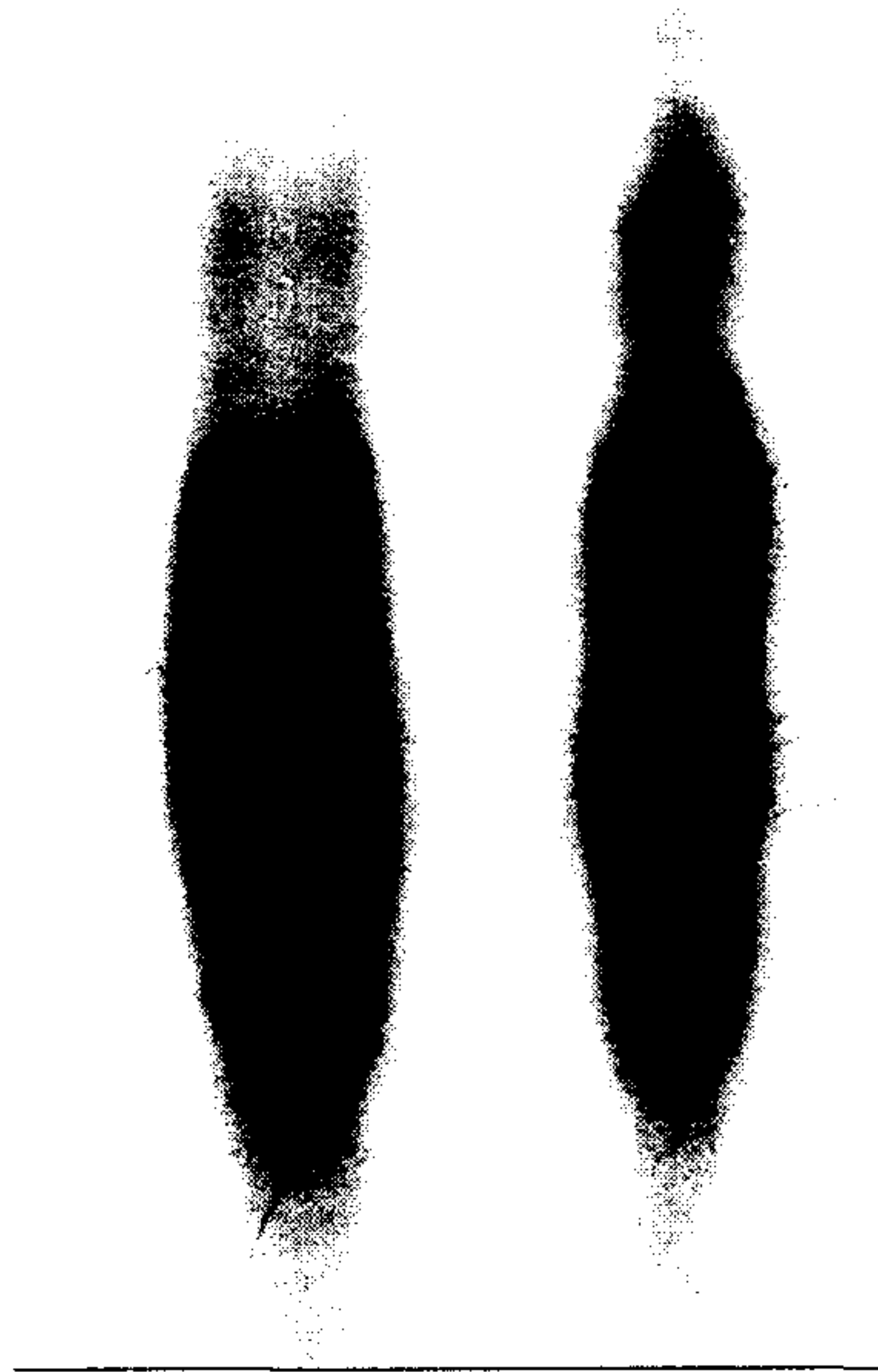


Figure 4. 여섯 번 반복 선별된 DNA pool의 TNF 결합능력 확인.

1번 lane이 선별되기 전의 DNA pool, 2번 lane은 선별 후의 DNA pool

6. DNA aptamer의 클로닝 및 염기서열 분석

과정 5에서 얻은 aptamer DNA를 플라스미드 벡터에 클로닝하고 염기서열을 분석하였다. 여기서 얻은 클론들의 염기서열에서는 특별한 consensus sequence를 얻을 수 없었고 개별 클론들의 특이적인 TNF- α 결합 능력도 확인되지 않았다.

7. Random RNA pool의 제조

DNA aptamer를 선별하는 작업이 좋은 결과를 내지 못함에 따라 보다 다양한 이차 및 삼차구조를 가질 수 있는 RNA pool을 이용해 RNA aptamer를 선별하는 작업을 수행하였다. 여기에 사용된 random RNA pool과 aptamer의 선별 과정은 in vitro transcription, reverse transcription 과정에 이용될 수 있게 하고 또 RNase에 의한 RNA의 파괴를 막기 위해 새로운 프로토콜을 도입하였다.

가. Random RNA pool 및 RNA aptamer 선별 과정

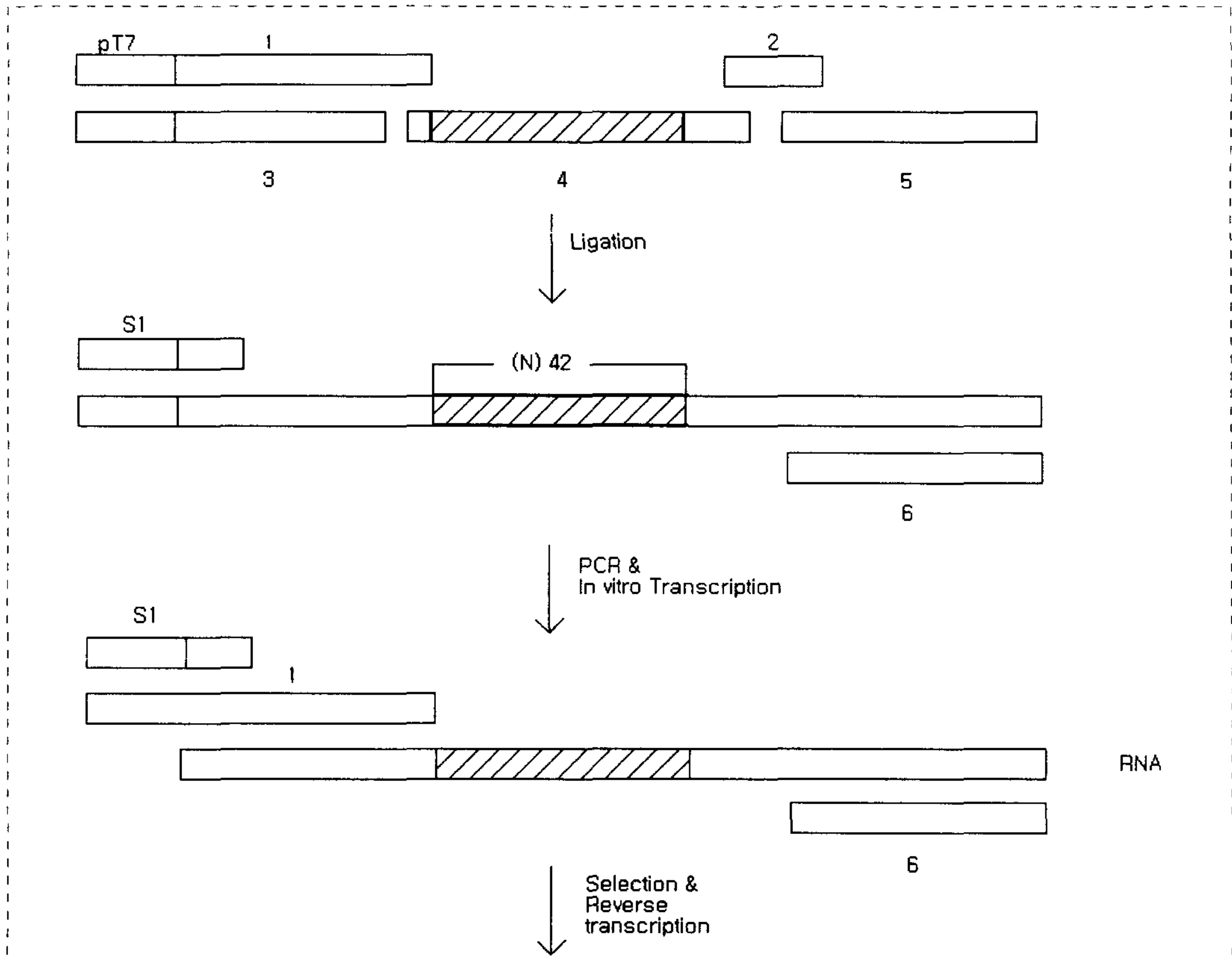


Figure 5. Construction of random RNA pool and selection procedure for TNF- α binding RNA aptamers

나. Aptamer 선별 및 증폭에 사용된 Oligonucleotide primers

Primer S1 : 24 bases

TAATA CGACT CACTA TAGGG AGCC

Primer #1 : 45 bases

TAATA CGACT CACTA TAGGG AGCCA ACACC ACAAT

TCCAA TCAAG

Primer #2 : 24 bases

ATCTA TGAAA GAATT TTATA TCTC

Primer #3 : 37 bases

GAATT GTGGT GTTGG CTCCC TATAG TGAGT CGTAT TA

Primer #4 : 60 bases, 42개의 무작위 염기 순서 포함

TTTCA TAFAT-(N)42-CTT GATTG

Primer #5 : 23 bases

GTTTC AATAG AGATA TAAAA TTC

Primer #6 : 31 bases

GTTTC AATAG AGATA TAAAA TTCTT TCATA G

Primer #8 : 31 bases, BamHI site 포함

CCGAA TCCGT TTCAA TAGAG ATATA AAATT C

Primer #9 : 32 bases, HindIII site 포함

CCGAA GCTTC TAATA CGACT CACTA TAGGG AG

8. TNF- α 에 결합하는 RNA aptamer의 선별

가. Selection procedure

RNA aptamer의 선별 과정에서는 새로운 random RNA pool을 제조하였다

Fig.5에 표시된 바대로 무작위 RNA pool을 제조하였으며 이로부터 reverse transcription, PCR 및 In vitro transcription 과정을 통해 RNA를 얻어서 membrane filtration 방법에 의해 TNF에 결합하는 aptamer를 선별하였다. 처음에는 RNA와 단백질의 몰수 비를 10-100 대 1로 하였다가 차츰 pool의 TNF affinity가 증가함에 따라 1 대 1 정도까지 줄여서 binding reaction 및 선별 작업을 수행하였다.

나. Filter binding protocols

affinity column을 이용하는 방법은 한 번 만들면 반복해서 사용할수 있다는 점에서 매우 편리한 방법이기 하지만 RNA의 경우에는 RNase의 오염에 의해 파괴될 가능성이 매우 높으므로 이 방법을 사용할 수가 없었다. 따라서 다른 연구자들의 보고에 따라 0.45 μm 의 직경을 갖는 nitro-cellulose membrane이 free RNA에는 결합하지 않고 단백질과 결합해 있는 상태의 RNA만 선택적으로 걸러낼수 있음을 이용하여 TNF 결합 RNA aptamer를 선별하였다.

다. Reverse transcription 및 PCR 증폭

filter에 결합해 있는 단백질과 RNA 복합체를 7 M urea가 들어있는 buffer를 이용해 떼어내고 다시 단백질을 제거하기 위해 phenol extraction과 ethanol precipitation 작업을 수행하였다. 이렇게 얻어진 RNA는 primer #6를 이용해 reverse transcription 시키고 이를 PCR 증폭 과정에 이용하였다.

라. PCR 증폭된 aptamer의 정제 및 In vitro transcription

primer #1과 #6를 이용해 PCR 증폭 과정을 수행하였다. 이때 너무 많은 cycle이 진행되어 불필요한 DNA 구조가 나오는 것을 막기 위해 미리 작은 규모로 단일 밴드가 나오는 조건을 잡은 다음에 PCR을 수행하였다. 이렇게 증폭된 PCR product를 elution 및 정량해서 약 0.5 μg DNA를 이용해 in vitro transcription을 수행하였다. 이 과정에서

얻은 RNA는 순수 분리 및 정량하여 이중 약 3 μ M 정도가 다시 membrane filtration 방법에 의해 TNF에 결합하도록 선별되었다.

9. 선별된 aptamer의 TNF- α 결합 능력 확인

가. 적정량의 aptamer 증폭에 필요한 PCR cycle 수의 변화

aptamer 선별 과정이 반복됨에 따라 TNF에 결합하는 RNA 분자수가 증가하고 있다는 사실은 PCR 증폭시 단일 밴드를 형성하게 하는 cycle 수가 변한다는 사실로부터 추론이 가능했다. 이것은 binding affinity에 대한 직접적인 실험을 수행하지 않고서도 선별 작업이 성공적으로 수행되고 있다는 간접 증거가 되었다. 단일 밴드를 형성할수 있는 최소한의 cycle 수는 첫 번째 반복 과정에서 24 cycle이었고 마지막 여섯 번째 반복과정에서는 16 cycle이었다.

나. Gel shift assay

aptamer 선별이 성공적으로 수행되고 있다는 사실을 확인하기 위해 각 과정에서 선별된 RNA aptamer를 이용해 gel mobility shift assay를 수행하였다. in vitro transcription에 의해 생성된 RNA를 [γ - 32 P] ATP를 이용해서 end-label하고 PBS buffer를 binding condition으로 15분 incubation 한 후 이를 5 % PAGE에서 mobility의 변화를 조사하였다. Fig. 6에서 보듯이 증류수를 binding condition으로 한 경우에는 TNF와의 결합에 의해 이동한 band가 관찰되지 않았고(lane 4) 처음 시작한 pool에서도 역시 band 이동이 관찰되지 않았다(lane 1). 반면 두 번째 반복과정을 거친 RNA 분자에서는 희미한 band shift가 관찰되었다(lane 2 : 5 μ g의 TNF- α , lane 3 : 10 μ g의 TNF- α).

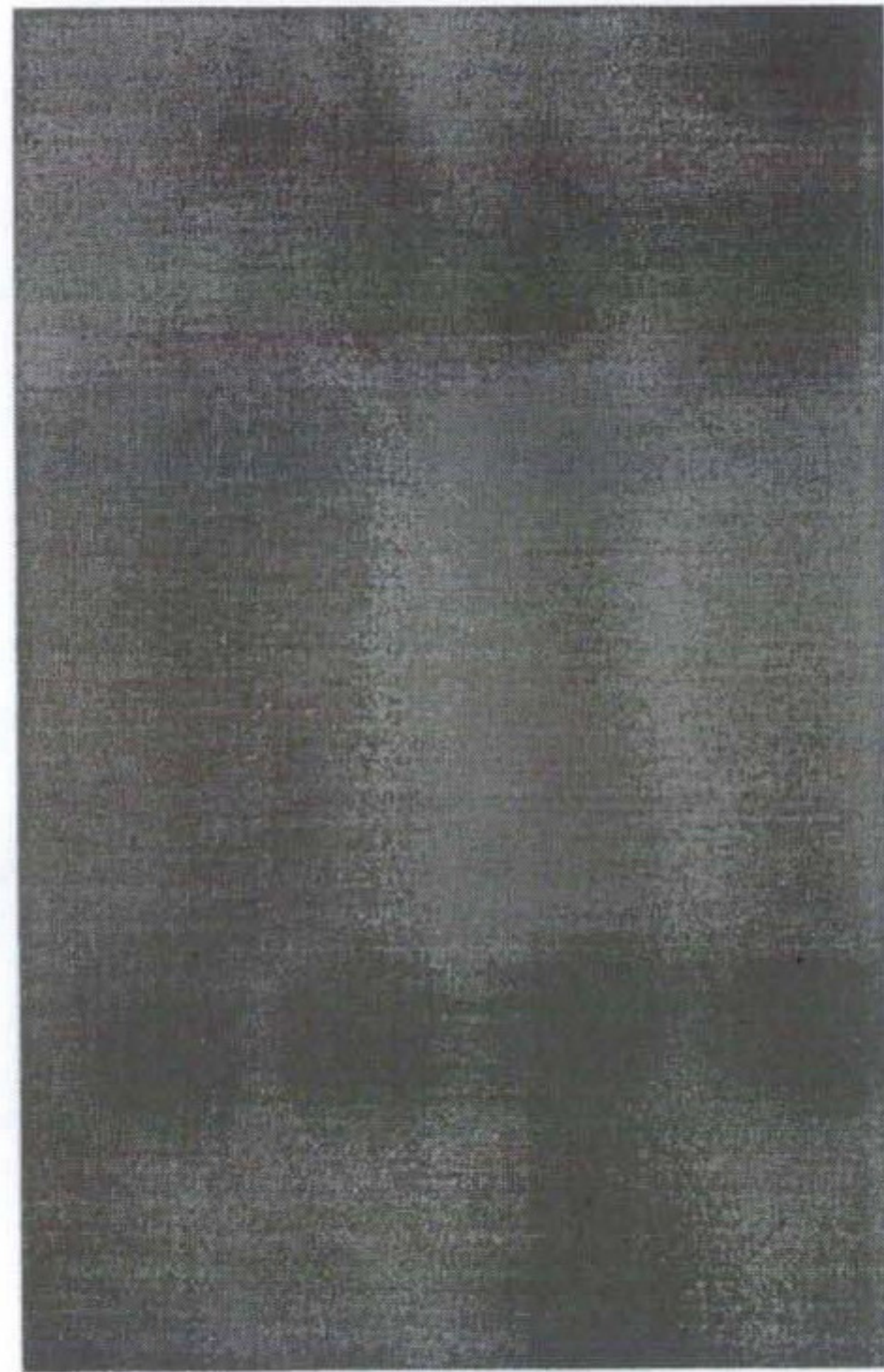


Figure 6. 선별된 RNA aptamer와 TNF의 gel shift assay

lane 1 : 선별 전의 RNA pool 및 TNF

lane 2 : 2회 선별 후의 RNA와 TNF 5 μ g

lane 3 : 2회 선별 후의 RNA와 TNF 10 μ g

lane 4 : 증류수 binding condition

10. 선별된 aptamer의 클로닝 및 염기 서열

가. Cloning

최종적으로 선별된 RNA aptamer는 primer #8과 primer #9을 이용해서 PCR로 증폭하였다. 이는 PAGE에서 elution 되어서 각각의 primer가 가지고 있는 제한효소 위치에 맞게 BamHI과 HindIII를 이용해 절단되었다. 클로닝에 쓰인 pGEM 3 Zf+ 벡터 역시 같은 제한효소로 절단되었고 이 위치에 aptamer의 cDNA를 도입하였다. 플라스미드 mini-preparation 에 이은 제한효소 절단 방법과 PCR을 이용해 올바른 insert가 도입되었는지 확인하고 TNF-aptamer(TA) 1 부터 TA 80까지의 단일 클론을 확보하였다.

나. Sequence

염기서열 결정은 플라스미드 벡터에 맞는 forward sequencing primer를 이용해 일반적인 double strand sequencing 방법으로 수행했다. 다음은 그중 몇 클론의 염기서열이다. 각 밑줄 친 부분은 PCR에 사용된 primer와 벡터 위치를 표시한 것이다.

TA13 : AAAAT TCTTT CATAG ATGTT GGTTA GGATA GAGAT TGTAT
TGACA GGTTA CTGGT AGTCT AGTAG TTGTG GGTGC GACCTA
TA

TA16 : AAAAT TCTTT CATAG ATTCG GGGGA ATTAG TGGAG TCAGG
TCTAA TGGTA TTAAT ATATC CATTG GATTG GACAT TAGTT
GGATT GTGGT TGGGC TCCTA TATGG ATCGT GATTA AGAC

TA17 : AAAAT TCTTT CATAG ATTGG GAGTA TCGGT TAAAT AGGTT
GATGA TTTAT CAAGG GTATC GTTGA TGGAA TTGTG GTGTT

GGCTC CTATA GTGAG TCGTA TTAGA CCTTG AAGTA TTCTA
TAGTT GCACT

TA21 : AAAAT TCTTT CATAG ATTGG TTATC GAGTA TTGAT TCAAT
GTTGG ATCTA CTAAT TGTCT GATTG GATTG TGGTG TTGGC
TCCTA TAGTG AGTGC ATTAG AGCTG AGATT CATAG GTACC
ATATA GCTTG GCAA

11. 염기서열에서 추론한 consensus sequence 및 RNA 이차구조

가. Consensus 염기 서열

확보된 일부 클론의 염기서열로부터 CLUSTAL W라는 프로그램을 통해 sequence alignment를 시켜보았다. 염기 서열 아래에 별표로 표시된 바와 같이 프라이머 위치와 벡터 위치를 제외하고는 특별한 consensus sequence는 발견되지 아니 하였다. 그러나 이들 클론들 각각이 gel mobility shift assay에서 TNF 결합능력을 보여주었다는 점을(Fig. 11) 주목할 때 이들은 일차적인 염기서열에서가 아니라 RNA의 이차구조 혹은 삼차구조 상에서 어떠한 동질성을 가지고 있을것이라는 사실을 추론할 수 있다.

TA13	AAAATTCTTTCATAGATG-TTGGTTAGGATAGAGATTGTATTGA-----CAGGTTACT
TA16	AAAATTCTTTCATAGATTCGGGGGAATTAGTGGAGTCAGGTCTAATGGTATTAATATATC
TA17	AAAATTCTTTCATAGATT-GGGAGTATCGGTTAAAT-AGGTTGA-----TGATTTATC
TA21	AAAATTCTTTCATAGATT-GGTTATCGAGTATTGATTCAATGTT-----GGATCTACT

***** * * **

TA13 GGTAGTCT-----AGTAG--TTGTGGGTGCGA--CCTATA
 TA16 CATTGGATTGGACATTAGTTGGATTGTGGT-TGGGCTCCTATA
 TA17 AAGGGTATCG----TTGATGGAATTGTGGTGTGGCTCCTATA
 TA21 AATTGTCT-----GATTGGATTGTGGTGTGGCTCCTATA

* * * * ***** * *****

나. 각 aptamer 클론의 추론된 RNA 이차구조

선택된 네 개의 aptamer cDNA 클론의 sequence로부터 RNA의 염기순서를 결정하고 이를 이용해 최소 에너지를 갖는 RNA 이차구조를 계산 및 예측해보았다. TA 13 과 TA 16 클론의 경우에는 약 50번째 염기 전후로 RNA의 중요한 이차구조로 알려진 tetra-loop이 형성돼 있음을 알수 있었다. TA 17 과 TA 21 클론은 그 구조가 매우 복잡하여 계산된 RNA 이차구조에 대한 정확성은 떨어지지만 TA 21의 경우에는 역시 50번째 염기 부근에 tetra-loop이 형성될 가능성이 높음을 시사한다. 따라서 네 개중 세 개의 클론에서 유추해볼 때 RNA aptamer와 TNF-alpha의 결합에는 정확한 consensus sequence 보다는 tetra-loop과 같이 특별히 안정화된 RNA 이차 구조가 관여하고 있을것 이라고 추정된다. TA13, 16, 17, 21 클론의 염기서열에서 유추한 RNA 이차구조는 그림 7부터 10에 예시하였다(Fig. 7, 8,, 9, 10)

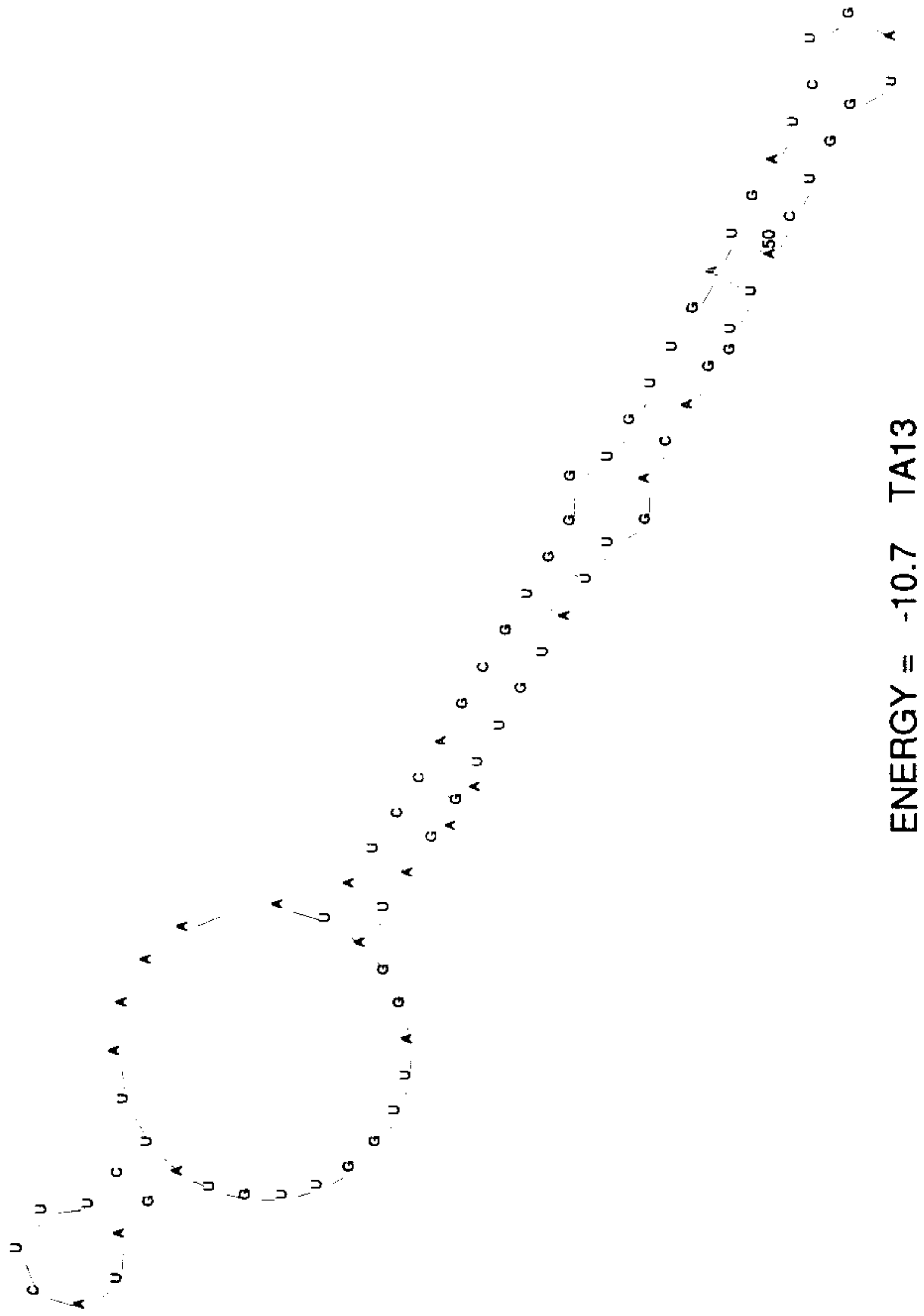


Figure 7. Predicted secondary structure of aptamer TA13

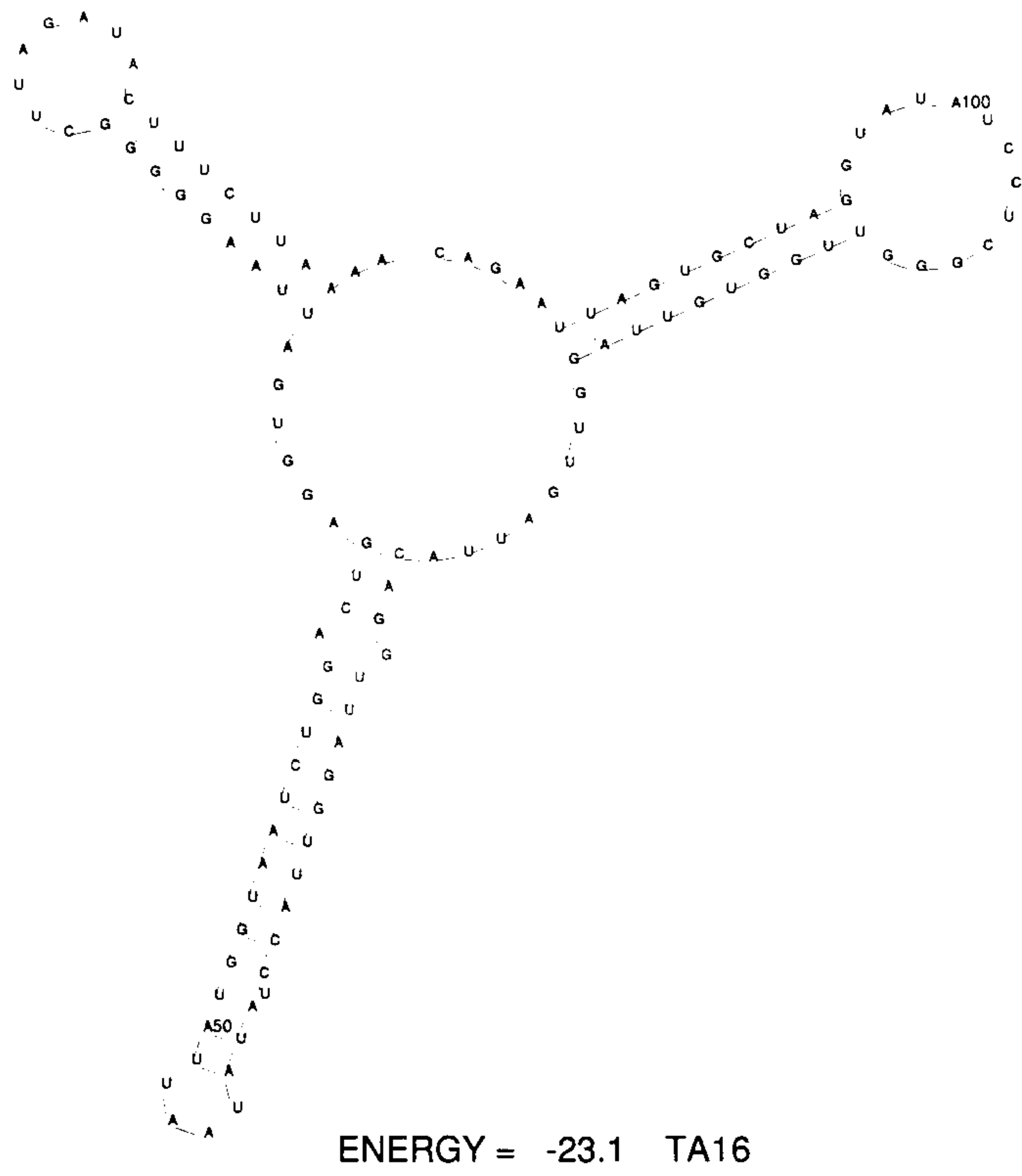


Figure 8. Predicted secondary structure of aptamer TA16

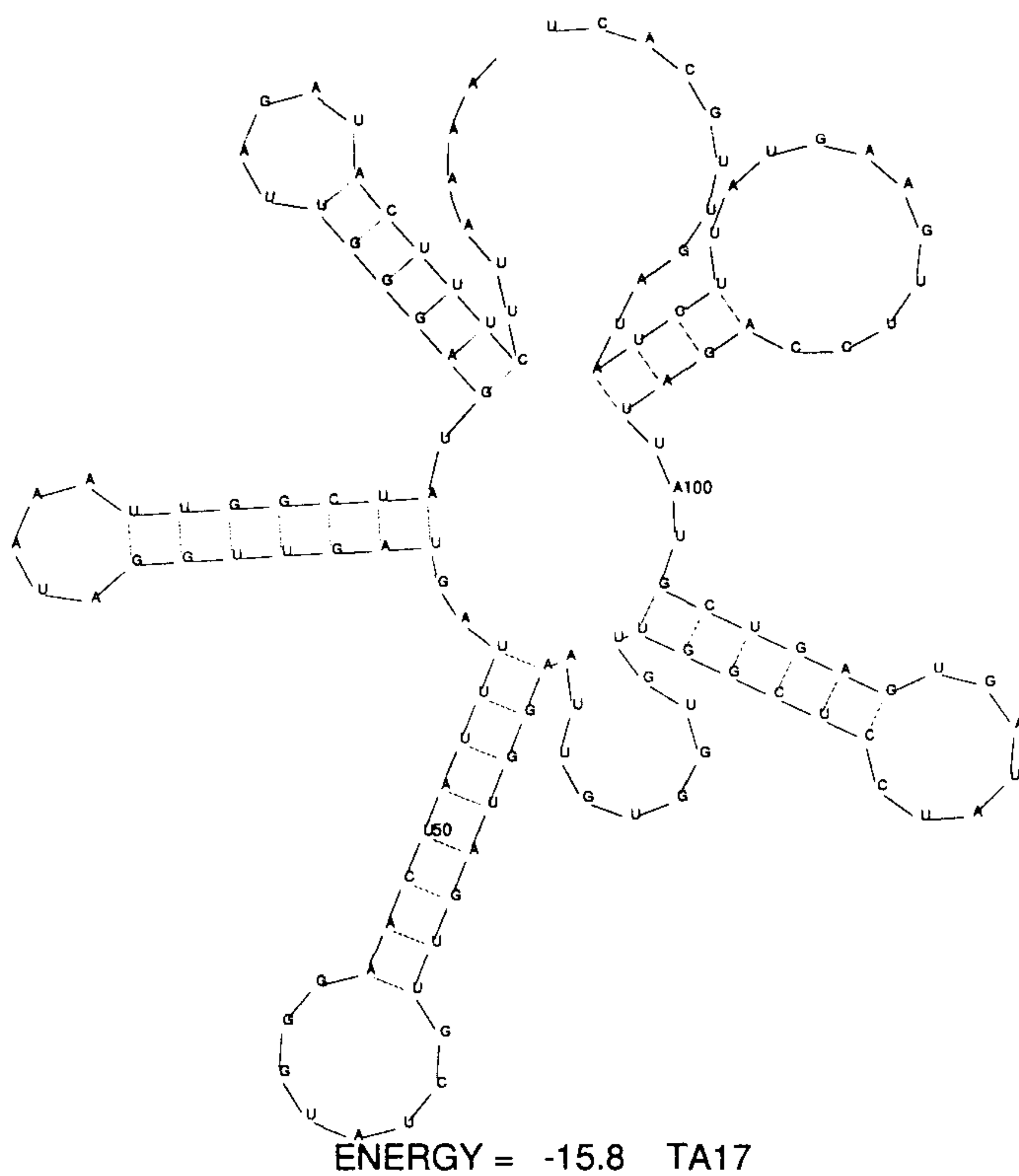
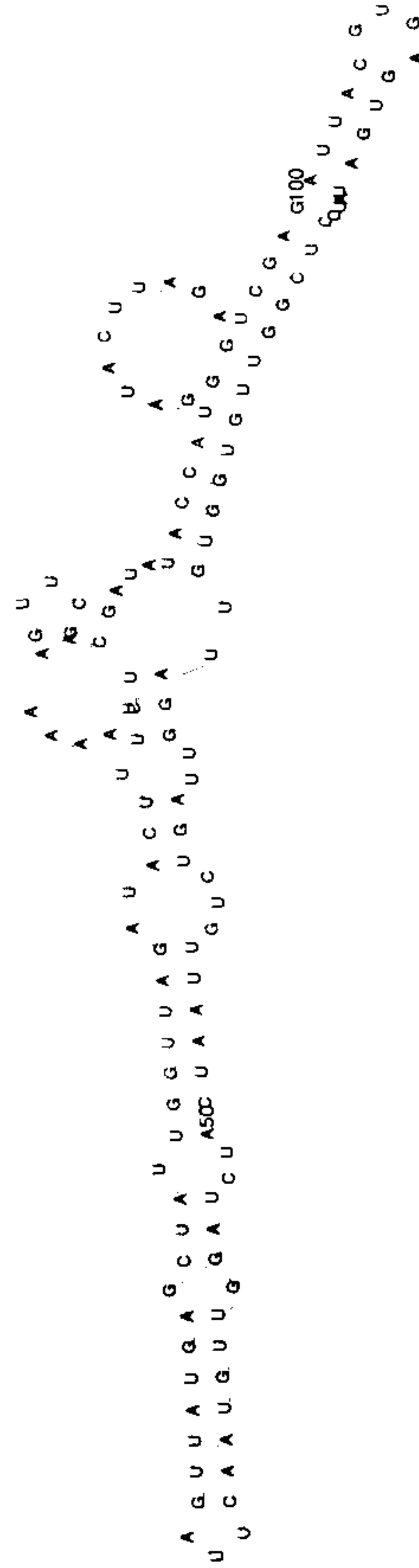


Figure 9. Predicted secondary structure of aptamer TA17



ENERGY = -19.2 TA21

Figure 10. Predicted secondary structure of aptamer TA21

12. 개별 aptamer 클론의 TNF- α 결합 능력

이번에는 각 개별 클론을 가지고 gel mobility shift assay를 수행함으로써 염기 서열 및 RNA 이차구조와 TNF- α 결합 능력과의 상관 관계를 조사하고자 했다. 그림 11에서 보듯이 네가지 클론 모두가 어느 정도의 TNF- α 결합 능력을 보여주고 있다. 따라서 10항에서 설명하였듯이 RNA aptamer와 단백질의 결합에는 특정한 consensus sequence보다는 RNA 이차구조가 더 깊게 관여한다고 할수 있다. 또 TA13, 16, 21과 비슷한 정도로 TA17도 TNF- α 결합 능력을 보인다는 사실로부터 컴퓨터 프로그램이 예측한 이차구조를 인정한다면 RNA aptamer의 단백질 결합은 삼차구조가 더욱 중요할 것이라는 사실을 암시한다. 다른 해석으로는 TA 17 클론은 나머지 클론과 다른 구조를 가진 채로 TNF의 다른 부위에 결합할 가능성에 대해서 배제할수 없다는 것이다.

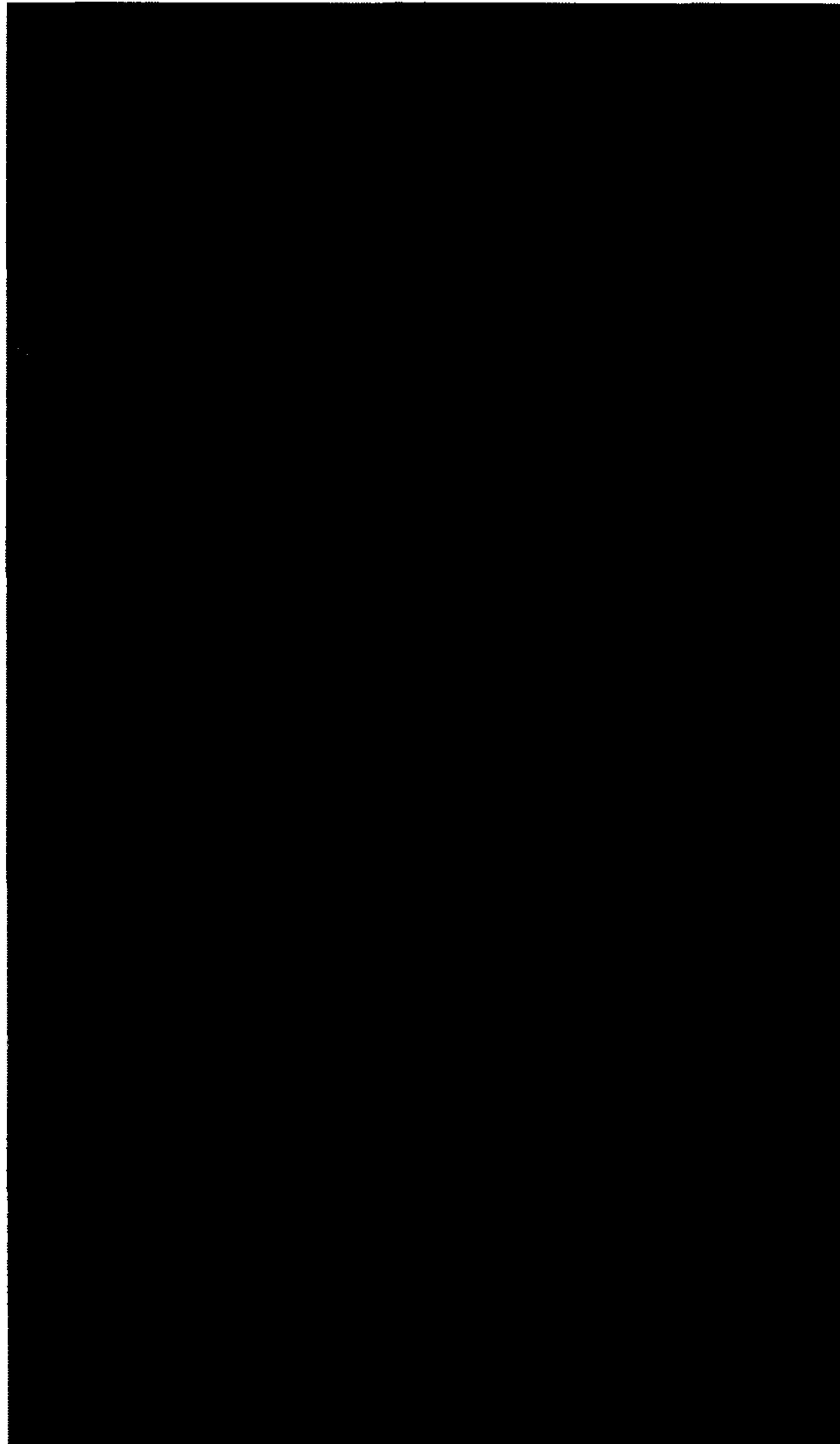


Figure 11 개별 RNA aptamer 클론의 TNF 결합능력 확인을 위한

Gel mobility shift assay

lane 1 : TA 13, lane 2 : TA 16

lane 3 : TA 17, lane 4 : TA 21

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절.

항암제로 쓰일 리보자임을 시험관 내에서 대량으로 합성하기 위하여 RNA 중합효소의 활성도 증가와 열에 대한 내성의 증가를 목표로 하였다. 이에 파아지 SP6 RNA 전사 시스템을 모델로 하여 SP6 RNA 중합효소에 무작위적 돌연변이를 유발하였고 이들 돌연변이에 의한 중합효소의 활성 변화를 알아보았다. 또한 이들 돌연변이체들의 활성변화의 원인을 분자수준에서 규명하고 중합효소의 활성에 중요한 아미노산 잔기를 선택하는 연구를 진행 중이다.

제 2 절.

1 년차 연구에서는 aptamer selection을 위한 random DNA pool의 고안 및 제조와 affinity column 제조를 위한 TNF- α 단백질의 생산이 차질 없이 수행되었고, 2년차 연구는 제조된 DNA pool과 TNF-affinity column을 이용해서 DNA aptamer를 선별하고 이들의 염기서열과 TNF- α 결합능력의 상관관계를 조사하는 실험을 수행하였다. DNA aptamer의 선별과 단백질 결합능력의 확인 과정까지는 차질 없이 실험이 수행되었으나 이후 클로닝된 DNA aptamer의 염기서열과 단백질 결합능력과 상관관계를 밝히는데는 실패했다. 따라서 생체 고분자와 결합할 수 있는 구조 형성이 용이한 RNA aptamer의 선별이라는 새로운 방법을 강구하게 되었다. 그리고, 3 년차 연구에서는 새로이 random RNA pool을 고안 제조하고 RNA를 다루는 특성에 맞게 실험 방법도 수정하여서 aptamer를 선별하였다. 선별된 aptamer는 TNF 특이적인 단백질 결합 능력을 보여 주었으며 이들 aptamer 클론 간에는 consensus sequence 이상으로 중요한 이차 및 삼차 구조의 동질성이 존재할 것이라는 추론이 가능했다. 3년차 연구에서는 RNA aptamer의 선별 기술을 확립하였고 애초 목표했던 TNF 결합 RNA aptamer 선별을 차질 없이 수행해 냈다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절.

본 연구를 수행하기 위하여 SP6 RNA polymerase의 발현시스템을 구축하여 대량으로 RNA 중합효소를 생산할 수 있게 되었다. 돌연변이를 탐색하기 위해 개발한 two vector system을 이용하여 특정 promoter에 대한 인지도가 증가한 polymerase의 개발 및 다른 종류의 RNA 중합효소나 promoter에 대한 연구에 이용할 것이다. 본 실험에서 탐색하여 얻은 돌연변이를 분석한 결과 catalytic activity나 promoter binding에 관여하는 아미노산 잔기들을 파악하였다. 특히 744번 arginine은 promoter의 -7 부분과 interaction하는 것으로 밝혀졌으며 그 주변의 아미노산들도 promoter의 인지에 관여할 것으로 생각된다. 따라서 이를 바탕으로 전사기작 특히 initiation 과정에 대한 심도있는 연구를 수행할 것이다. 또한 본 연구에서 파악한 아미노산 잔기들의 역할을 다른 종류의 polymerase에 대해서도 비교 연구함으로써 전반적인 polymerase에 대한 연구를 진행할 것이다.

제 2 절.

1. 추가 연구의 필요성

Aptamer 개발 기술은 순수한 학문적으로나 의약 등 산업적 응용성의 측면에서 대단히 높은 효용가치를 가진 기술이다. 그러나 우리나라에서는 이에 대한 기초 기술의 개발 및 확립 차원에서의 연구 정도만 이루어질 뿐 좀 더 고부가 가치적인 응용 기술에 대한 연구는 미미한 실정이다. 따라서 이미 확립된 aptamer 기본 기술을 바탕으로 의약품, 생리 조절 물질 개발 등의 첨단 응용 연구에 대한 추가 연구가 필요하다.

2. 타 연구에의 응용, 기업화 추진 방향

가. Aptamer 변형 기술

DNA나 RNA aptamer가 매우 다양한 생체 분자에 특이적으로 결합할 수 있는 삼차 구조를 형성할 수는 있지만 아직까지 보고된 바에 의하면 그 결합 능력은 10^8 정

도의 dissociation constant로 그다지 강력한 결합능력을 보이지는 못하고 있다. 따라서 해외 연구의 추세는 선별된 aptamer의 특정 화학 구조를 변형하여 특정 분자결합 능력이나 활성 조절 능력을 향상시키고자 하는 연구를 수행하는 경향이다. 그러므로 aptamer 개발 기술을 보다 현실적이고 경제적인 성과에 연관시키기 위해서는 이러한 aptamer 변형 기술에 대한 연구가 많이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

나. 새로운 의약 및 생리 활성 조절제로서의 aptamer 개발

개발된 aptamer를 pilot 동물 실험에서 thrombin의 기능을 억제할 수 있는 혈전 치료제로서의 쓰일 수 있는 가능성을 확인한 경우처럼 특정 리간드에 선택적으로 결합할 수 있는 aptamer는 우리 몸에서 불필요한 작용을 하는 생체 물질의 활성을 조절하고 나아가서는 새로운 의약으로 쓰일 수 있는 잠재력이 풍부하다. 특히 다른 단백질 등의 활성 저해제가 분리 및 생산이 어려운 점, 면역체계에 의한 거부반응이 있는 단점 등에 비추어 볼 때 핵산성 aptamer는 개발이 간단하고 경제적이며 다양한 물질에 대해 동일한 기술을 이용할 수 있다는 점, 또 단백질에 비해 면역 거부 반응이 적다는 점등의 장점을 가지고 있으므로 새로운 개념의 의약으로 개발될 수 있는 잠재력이 매우 크다. 따라서 생리 활성의 조절이나 의약으로서의 aptamer를 개발하고자 하는 고부가 가치적인 응용 기술의 개발에 좀 더 많은 연구가 집중돼야 할 것으로 생각된다.

제 6 장 참고문헌

- Akiyama, Y. and Ito, K (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167, 711
- Axelrod V. D. and Kramer, F. R. (1985) *Biochemistry* 24, 5716-5723
- Basu, A. and Modak, M. T. (1987) *Biochemistry* 26, 7104-7109
- Basu, S. and Maitra (1986) *J. Mol. Biol.* 190, 425-437
- Beck, P. J., Gonzalez, S., Ward, C. L. and Molineux, I. J. (1989) *J. Mol. Biol.* 210, 687-701
- Botstein, D. and Shortle, D. (1985) *Science* 229, 1193-1201
- Brown, J. E., Klement, J. F. and McAllister, W. T. (1986) *Nucl. Acids Res.* 3521-3526
- Busby, S., Irani, M. and de Crombrughe, B. (1982) *J. Mol. Biol.* 154, 197-209
- Chamberlin, M., McGrath, J. and Waskell, L. (1970) *Nature* 228, 227-231
- Chapman, K. A. and Burgess, R. R. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15, 5413-5432
- Daielk, Mullerm. (1988) *Biochemistry* 27, 5763-5771
- Davanloo, P., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Studier, F. W. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 2035-2038
- Dietz, A., Weisser, H.-J., Kossel, H. and Hausmann, R. (1990) *Mol. Gen. Genet.* 221, 283-286
- Dunn, J. J. and Studier, F. W. (1983) *J. Mol. Biol.* 166, 477-535
- Dunn, J. J., Krippel, B., Bernstein, K. E., Westphal, H. and Studier, F. W. (1988) *Gene* 68, 259-266
- Evstafieva, A. G., Arya, B., Pragai, B. and Toth, M. I. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16, 1624
- Green, M. R., Maniatis, T., and Melton, D. A. (1983) *Cell* 32, 681-694
- Grodberg, J. and Dunn, J. J. (1988) *J. Bacteriol.* 170, 1245-1253
- Gross, L., (1993) *J. Mol. Biol.* 228, 488-505
- Gunderson, S. I., Chapman, K. A. and Bergess, R. R. (1987) *Biochemistry* 26, 1539-1546
- Gurevich, V. V., Pokrovskaya, I. D., Obukhova, T. A. and Zozulya, S. A. (1991) *Anal. Biochem.* 195, 207-213
- Hubner, P., Iida, S. and Arber, W. (1988) *Gene* 73, 319-325

- Ikeda, R. A. and Richardson, C. C. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 3614-3618
- Ikeda, R. A., and Richardson, C. C. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 3790-3799
- Jobling, S. A. and Gehrke, L. (1987) *Nature* 325, 622-625
- Kassavetis, G. A., Butler, E. T., Roulland, D. and Chamberin, M. J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 5779-5788
- Kim, S. S., Hong, Y. J. and Kang, C. (1993) *Biochem. Mol. Biol. Int.* 31, 153-159
- King, G. C., Martin, C. T., Pham, T. T. and Coleman, J. E. (1986) *Biochemistry* 25, 36-40
- Konarska, M. M., Padgett, R. A. and Sharp, P. A. (1984) *Cell* 38, 731-736
- Kotani, H., Ishizaki, Y., Hiraoka, N., and Obayashi, A. (1987) *Nucl. Acids. Res.* 15, 2653-2664
- Krieg, P. A. and Melton, D. A. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12, 7057-7070
- Krieg, P. A. and Melton, D. A. (1987) *Methods Enzymol.* 155, 397-415
- Lee, S. S. and Kang, C. (1992) *Biochem. Mol. Biol. Int.* 26, 1-5
- Lee, S. S. and Kang, C. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 19299-19304
- Lehtovaara, P. M., Koirula, A. K., Bamford, J. and Knowles, J. K. C. (1988) *Prot. Engin.* 2, 63-68
- Liao, X. and Wise, J. A. (1990) *Gene* 88, 107-111
- Loeb, L. A. and Kunkel, T. A. (1982) *Annu. Rev. Biochem.* 52, 429-457
- Maksimova, T. G., Mustayev, A. A., Zaychikov, E. F., Lyakhov, D. L., Tunitskaya, V. L., Akbarov, A. K., Luchin, S. V., Rechnisky, V. O., Chernov, B. K. and Kochettov, S. N. (1991) *Eur. J. Biochem.* 195, 841-847
- McAllister, W. T. and Raskin, C. A. (1993) *Mol. Microbiol.* 10, 1-6
- McGraw, N. J., Bailey, J. N., Cleaves, G. R., Dembinsky, D. R., Gocke, C. R., Colliffee, L. K., MacWright, R. C. and McAllister W. T. (1985) *Nucl. Acids Res.* 13, 6753-6766
- Melton, D. A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 144-148
- Mizutani, S. and Colonno, R. J. (1985) *J. Virol.* 56, 628-632
- Moffatt, B. A. and Studier, F. W. (1987) *Cell* 49, 221-227
- Morris, C. E., McGraw, N. J., Joho, K., Brown, J. E., Klement, J. F., Ling, M. L., and McAllister, W. T. (1987) in *RNA Polymerase and the Regulation of Transcription.* (Rozenicoff, W. S. et al. eds),

pp. 47-58, Elsevier Science Publishing Co., New York

Mookhtiar, K. A., Peluso, P., Muller, D. K., Dunn, J. J. and Coleman, J. E. (1991) *Biochemistry* 30, 6305-6313

Muller, D. K., Martin, C. T. and Coleman, J. E. (1988) *Biochemistry* 27, 5763-5771

Muller, D. K., Martin, C. T. and Coleman, J. E. (1989) *Biochemistry* 28, 3306-3313

Nam, H. G., Loechel, S. and Fried, H. M. (1986) *Gene* 46, 57-64

Nam, S.-C. and Kang, C. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 18123-18127

Oakley, J. L., Strothkamp, R. E., Sarris, A. H. and Coleman, J. E. (1979) *Biochemistry* 18, 528-537

Oeser, B. and Tudzynski, P. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 217, 132-140

Ollis, D. L., Brick, P., Hamlin, R., Xoung, N. G. and Steitz, T. A. (1985) *Nature* 313, 762-766

Osterman, M. L. and Coleman, J. E. (1981) *Biochemistry* 20, 4884-4892

Osumi-Davis, P. A., de Aguilera, M. C., Woody, R. W. and Woody, A.-Y. M. (1992) *J. Mol. Biol.* 226, 37-45

Pandey, V. N., Williams, K. R., Stone, K. L. and Modak, M. J. (1987) *Biochemistry* 26, 7744-7748

Patra, D., Sousa, R. and Lafer, E. M. (1992) *J. Mol. Biol.* 224, 307-318

Polesky, A. H., Steiz, T. A., Grindley, N. D. F. and Joyce, C. M. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 14579-14591

Polesky, A. H., Dahlberg, M. E., Benkovic, S. J., Grindley, N. D. F. and Joyce, C. M. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 8417-8428

Raskin, C. A., Diaz, G., Joho, K. and McAllister, W. T. (1992) *J. Mol. Biol.* 228, 506-515

Raskin, C. A., Diaz, G. and McAllister, W. T. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 3147-3151

Rice G. C., Goeddel, D. V., Cachianes, G., Woronicz, J., Chen, E. Y., Williams, S. R. and Leung, D. W. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 5467-5471

Rodriguez, R. L. and Tait, R. C. (1983) *Recombinant DNA techniques: an introduction*, pp. 187-192

Rush, J. and Konigsberg, W. H. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 4821-4827

Sabatino, R. d., Myers, T. W., Bambara, R. A., Kwon-Shin, O., Marraccino, R. L. and Frickey, P. H. (1988) *Biochemistry*, 27, 2998-3004

Sanger, F., and Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463-5467

Schaffner, A., Jorgensen, E. D., McAllister, W. T. and Hartmann, G. R. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15, 8773-8781

Schneider, T. D. and Stormo, G. D. (1989) *Nucl. Acids Res.* 17, 659-674

Shaw, W. V. (1975) *Methods Enzymol.* 43, 737-755

Smeekens, S. P. and Romano, L. J. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14, 2811-2827

Sousa, R., Chung, Y. J., Rose, J. P. and Wang, B.-C. (1993) *Nature* 364, 593-599

Sousa, R., Patra, D. and Lafer, E. M. (1992) *J. Mol. Biol.* 224, 319-334

Studier, F. W. (1973) *J. Mol. Biol.* 79, 237-248

Studier, F. W. and Moffatt, B. A. (1986) *J. Mol. Biol.* 189, 113-130

Tabor, S., and Richardson, C. C. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 1074-1078

Taylor, D. R. and Mathews, M. B. (1993) *Nucl. Acids Res.* 21, 1927-1933

Tunitskaya, V. L., (1990) *Eur. J. Biochem.* 191, 99-103

Zheleznaya, L. A., Savchenko, R. S. and Matvienko, N. I. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18, 4295

Zinder, N. D. (1961) *Science* 133, 2069

Wang-KY; Gerena-L; Swaminathan-S; Bolton-PH, *Nucleic-Acids-Res.* 1995 Mar 11; 23(5): 844-8

Huizenga-DE; Szostak-JW, *Biochemistry.* 1995 Jan 17; 34(2): 656-65

Latham-JA; Johnson-R; Toole-JJ, *Nucleic-Acids-Res.* 1994 Jul 25; 22(14): 2817-22

Bracht-F; Schror-K, *Biochem-Biophys-Res-Commun.* 1994 Apr 29; 200(2): 933-7

Schultze-P; Macaya-RF; Feigon-J, *J-Mol-Biol.* 1994 Feb 4; 235(5): 1532-47

Lorsch-JR; Szostak-JW, *Biochemistry.* 1994 Feb 1; 33(4): 973-82

Padmanabhan-K; Padmanabhan-KP; Ferrara-JD; Sadler-JE; Tulinsky-A, *J-Biol-Chem.* 1993 Aug 25; 268(24): 17651-4

Griffin-LC; Toole-JJ; Leung-LL, *Gene.* 1993 Dec 27; 137(1): 25-31

Crameri-A; Stemmer-WP, *Nucleic-Acids-Res.* 1993 Sep 11; 21(18): 4410

Paborsky-LR; McCurdy-SN; Griffin-LC; Toole-JJ; Leung-LL, Paborsky-LR; McCurdy-SN;

Griffin-LC; Toole-JJ; Leung-LL

Macaya-RF; Schultze-P; Smith-FW; Roe-JA; Feigon-J, Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. 1993

Apr 15; 90(8): 3745-9

Wang-KY; McCurdy-S; Shea-RG; Swaminathan-S; Bolton-PH, Biochemistry. 1993 Mar 2;

32(8): 1899-904

제 4 세 부 과 제

여 백

요 약 문

I. 제목 신규 단일군 항체 및 백신 개발

제 1 절.

재조합 CHO Cell을 이용한 키메라 항체의 생산

제 2 절.

저밀도 지질 단백질 측정용 면역센서의 개발 및 조건의 최적화

제 3 절.

백신 및 외래단백질 생산에 관한 산소분압의 효과

II. 연구개발의 목적 및 필요성

제 1 절.

하이브리도마 기술에 의하여 대량 생산이 가능한 생쥐 단일군 항체는 진단 시약이나 기초 연구에 유용하지만, 치료 목적으로 인체 내에 반복 투여할 경우 인체 내에서 생쥐 항체에 대한 면역 반응이 생겨 그 효과가 감소하고 부작용이 초래되는 경우가 많다.

이러한 문제를 해결하기 위한 방법으로 유전 공학을 이용한 다양한 항체 단편을 만들게 되었는데 이러한 재조합 항체 중 본 실험에서는 키메라 항체의 variable region과 인간 항체의 constant region을 결합시킨 키메라 항체를 생산하였다.¹ 이러한 키메라 항체는 생쥐 항체가 갖고 있는 특이성과 친화력을 갖고 있을 뿐만 아니라 적절한 antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC)를 나타내는 장점을 갖고 있다.²

인간화된 재조합 항체를 임상적으로 실험하고 나아가서 상품화하기 위해서는 경제적인 대량 생산이 필수적이다. 현재까지 glycosylation과 같은 번역후 수정 및 수식 과정을 거친 기능적인 전체 항체 분자의 생산에는 동물 세포를 발현 host로 사용하는 것이 적합한 것으로 알려져 있으며,³ 특히 이들 재조합 항체의 대량 발현을 위해서 항체 유전자를 증폭한 재조합 Chinese hamster ovary (CHO) 세포가 가장 널리 사용되고 있다.^{4,5} 그러나 국내에서는 유전자 증폭을 이용한 고생산성 재

조합 CHO 세포주의 선발 및 선발된 고생산성 재조합 CHO 세포의 대량 배양 기술이 확립되어 있지 않은 실정이다. 따라서 이 기술이 확립되면 인간화된 항체의 생산뿐만 아니라 각종 치료용 단백질의 생산에도 이용할 수 있을 것이다.

제 2 절.

스테로이드(steroid)계 화합물로서 가장 광범위하게 자연에 분포하는 콜레스테롤은, 동물 생리조절에 중요한 여러 스테로이드계 호르몬(hormone)과 담즙산(bile acid)의 전구체이며 진핵세포막의 구성성분으로서 세포막의 유동성을 조절하는 중요한 역할을 맡고 있다. 체내 각 조직세포에서는 콜레스테롤을 자체적으로 합성하지 못하고, 식이(diet)에 의해 섭취하거나 간에서 합성되어지며, 이는 주로 LDL로 전환되어 혈액을 통해 주변 세포로 운반되고, LDL receptor와의 특이적 상호작용을 통해 내재화(internalization)된 후 대사된다.¹ 이러한 내재화 단계에 이상이 있는 경우, 혈액내의 LDL 농도가 증가하게 된다. 이 경우 피부, 건(tendon), 혈관 등에 침착하게 되며, 특히 혈관에서는 동맥경화(atherosclerosis)를 유발하여 심장마비, 뇌일혈, 고혈압의 직접적 원인이 된다. 따라서 LDL의 농도 측정은 임상진단학적으로 매우 중요하며, 본 연구에서는 LDL에 특이성(specificity)을 가지는 항체를 수정진동소자에 고정화시킨후 LDL 시료와 반응시킴으로써 이로 인해 생기는 수정진동소자의 질량변화를 관찰함으로써 시료의 LDL 농도를 빠르고 정확하게 측정할 수 있는 LDL 측정용 면역센서를 개발하고자 한다.

제 3 절.

1980년대 중반부터 생물공학 분야에서 의약품 개발의 일환으로 동물세포에서 대량배양을 통한 단일클론항체, 백신, 혈압강하제, 그리고 TPA 등과같은 고부가가치의 단백질 제재들을 생산하고자 하는 연구와 산업화에 대한 노력이 선진각국에서 앞다투어 활발히 진행되고 있다. 1970년 후반부터 유전자 재조합법에 의한 우수한 미생물의 개발로 인하여 생물공업은 미래의 첨단산업으로 각광을 받게된것은 주지의 사실이다. 그러나 원래 동물세포에 생성되던 단백질을 미생물을 통해 생산하는 과정에서 단백질분자의 불완전한 Folding 과 post-translational modification과 같은

미생물세포의 제한된 능력 때문에 활성을 갖는 완전한 구조를 갖는 단백질을 생산하는데는 한계점이 있다는 것이 문제점으로 대두되고 있다. 또한 미생물에서는 대부분 단백질들이 세포밖으로 분비가 잘 안되기 때문에 세포를 파괴한후 원하는 단백질만 순수 분리정제하는 과정이 복잡하고 소요되는 비용이 고가일 뿐만아니라 endotoxin의 오염가능성도 있기 때문에 개발된 의약품의 허가규제가 더욱 엄격히 적용되어야 한다는 점도 지적되고 있다.

외부단백질생산에 가장 많이 이용되고 있는 박테리아 세포와 동물세포를 비교할때 단백질의 합성과정과 분비과정을 살펴보면 뚜렷한 차이가 있다. 박테리아 세포에서는 Ribosome에서 단백질이 생합성되면서 바로 세포질 (cytoplasm)에 노출된다. 그런데 세포질은 주로 환원상태가 강하기 때문에 단백질의 -SH기가 서로 산화되어 -S-S-결합을 거의 이룰수가 없다. 즉, 단백질은 unfolding 상태에 있다가 signal peptide에 의하여 또는 인위적으로 세포를 파괴할때 환경조건이 산화상태의 세포밖으로 빠져나오면서 무작위하게 -S-S-결합이 형성되어 folding 되고 독특한 입체구조를 갖게 된다. 그러나 동물세포에서는 Rough Endoplasmic Reticulum (RER)에서 Ribosome에 의하여 생합성된 단백질은 막으로 보전된 상태로 Golgi체 (약한 환원상태)로 넘어가 계속 효소반응에의해 post-translational modification 이 정확하게 이루어진후 역시 막으로 보호된 상태로 원형질막까지 이동되어 그대로 세포밖으로 분비된다. 그러므로 -S-S-결합도 이미 세포내에서 정확하게 이루어진 상태로 단백질이 세포밖으로 분비되기 때문에 그 구조를 그대로 유지할수 있으며 또한 세포내 단백질 구조중 모든 불필요한 부분도 끊어버리기 때문에 대부분 활성이 있는 구조를 갖게 된다.

이와 같은 이유로 1980년대 이후 동물세포배양의 주관심사는 동물세포에 외래 유전자를 도입하여 그 생산성을 높이고자 하는것이였으나 Eucaryotic gene 의 특성상 그 실용 예가 많지 않았다. 이에 Virus 를 이용하여 백신을 만드는 방법을 이 재조합기술에 접목하여 Virus를 원하는 단백질 생산의 Vector로 이용하는 기술이 발달하기 시작하였다. 이러한 Virus vector 를 이용하였을 경우, 동물세포의 발현 system을 이용하기에 많은 post-translational modification이 일어나 원하는 단백질이 활성을 가진채로 빠르게 합성될수있고 단위시간당 많은 단백질을 합성할수 있다. 또한 여러 cell type과 심지어는 살아있는 동물에서도 생산할 수 있게되어 실제 생산 가능하고 Vaccine으로도 사용할수 있다. 이상과 같은 이유등으로 인해 세계시장 규모 200억불에 가까운 동물세포에서 유래된 의약품 물질들을 개발생산하고자 cell line의 개발과 더불어 동물세포의 대량배양공학 기술에 대한 관심이 선진각국에서 고조되고 있는 실정이다. 상기 시장규모는 현재까지 전통적인 생물

공업에서 대량생산되고 있는 항생제, 아미노산 및 비타민류의 총세계시장 규모의 3배에 이르는 규모이다. 그러므로 선진 각국에서는 앞을 다투어 동물세포에서 유래된 제품을 개발하고자 수많은 기업들이 치열한 경쟁을 벌이고 있는 실정이다. 이에 미국이 그중 단연 우세하여 약 580 업체가 관여하고 있고 일본이 100개 사 등이며, 우리나라는 겨우 3개 회사 정도가 관여하고 있으나, 세계적인 추세로 보아 수년내에 이 분야에 대기업의 제약회사 및 화학회사들이 참여하지 않을 수 없는 상황이 도래할것으로 예측된다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

제 1 절.

간염 바이러스의 표면 항원 중 preS2 부위에 특이성을 갖는 키메라 항체의 발현 벡터를 여러 동물세포주에서 강력한 것으로 알려진 human β -actin promoter와^{6,7} 유전자 증폭 system의 일종인 dhfr gene amplification system을^{8,9,10} 이용하여 제작하고, 인간 재조합 단백질의 생산에 가장 많이 사용되고 있는 CHO 세포에 도입한 뒤, dhfr 효소의 기질 억제제인 methotrexate (MTX)의 농도를 단계적으로 높여줌으로써 gene amplification을 통하여 고생산성의 세포주를 선발하고자 하였다.

제 2 절.

본 연구에서는 혈액내의 농도가 건강 진단에 중요한 판단 근거가 되는 LDL을 측정 대상 물질로 하고 이를 측정하기위해 수정진동소자(quartz crystal resonator)를 이용한 QCM(Quartz Crystal Microbalance) 시스템을 개발하고자 한다.² 질특이성을 증가시키기 위해, 항체가 지닌 항원에 대한 친화성을 이용하여, LDL에 특이적인 항체를 이용하여 이를 quartz crystal 에 고정화 하고, 응답 시간을 단축시키기 위해 액체 상태로 측정하는 시스템을 도입한다.

제 3 절.

동물세포 배양을 통해 획득할수 있는 고부가가치 산물인 Vaccine 및 Recombinant protein

생산을 위해 먼저, 다공성 젤라틴 미립담체인 K-bead, 담체 Cytodex-3, T-25 조직배양용 플라스크를 이용할때 동물세포 Vero(African Green Monkey Kidney cell)의 증식을 관찰했고 이를 숙주세포로 Vesicular Stomatitis Virus(VSV)를 생산할때에 spinner flask 그리고 1L 동물세포 반응기, 각각 수준에서 산소분압이 바이러스의 생산에 주는 효과를 조사하였다. 두번째로, 다공성 젤라틴 미립담체, 담체 Cytodex-3, T-25 조직배양 플라스크를 이용할때 동물세포인 Chicken Embryo Fibroblast(CEF)의 증식을 관찰했고 이를 숙주세포로 Newcastle disease virus(NDV)를 생산할때에 T-25 조직배양 플라스크 수준에서 산소분압이 바이러스의 생산에 미치는 효과를 조사하였다. 세번째로는, 동물세포 Vero를 숙주세포로 Recombinant protein 생산에 널리 이용되고 있는 Vaccinia virus를 생산할때에 T-25 조직배양용 플라스크에서 산소분압이 바이러스 생산에 미치는 효과를 조사하였다. 그리고 마지막으로, 산소에 의해 생성되는 유해 라디칼의 제거를 위해 ascorbic acid 를 첨가하여 그 효과를 관찰하고 또한 EDTA가 바이러스에 감염에 미치는 영향도 조사하였다.

IV. 연구개발결과

제 1 절.

dhfr 유전자가 존재하지 않는 돌연변이종으로 CHO 세포의 한 종류인 DG44 세포를 숙주 로하여 항체의 kappa light chain과 heavy chain을 coding하는 유전자가 각각 cloning 되어있는 pH β Apr-3P-KC-dhfr Δ E와 pH β Apr-3P-neo-HC plasmids를 transfection하여 parents를 얻었고 MTX의 농도를 각각 0.02, 0.08, 0.32 μ M로 높여주면서 항체 유전자의 copy수를 증가시켰다. 0.08 μ M의 MTX에서 adaptation시킨 cell로부터 비항체생산성이

제 2 절.

QCM 시스템을 이용하여 저밀도 지질 단백질 측정용 면역센서를 개발하였다. 이를 위해 QCM 시스템을 개발하였으며, 항체를 고정화하는 방법을 최적화하였다. LDL에 특이적인 항체를 고정화하는 방법으로는 polyethylenimine(PEI)³를 이용한 방법이 민감도 측면과 비특이적결합 측면에서 가장 우수한 것으로 나타났다. PEI 방법에 의해 제조된 LDL 측정용 면역센서의 경우, 200 - 800 μ g/ml의 LDL 농도에서 직선적으로 응답했으며, 1200 μ g/ml이상의 LDL 농도에서

saturation되었다.

제 3 절.

다공성 젤라틴 미립담체가 고농도 세포배양에 적합함으로 이를 이용한 바이러스 생산시스템과 산소분압이 생산시스템에 미치는 영향을 연구하였다. 다공성 담체를 이용한 Vesicular Stomatitis virus(VSV) 생산시 일반담체인 Cytodex-3 보다 바이러스 생산이 2 - 4배로 증가 했으며 또한 산소 분압효과를 살펴본 결과 10% 산소분압에서 VSV의 생산수율이 21% 산소 분압에서보다 130배 증가되었다. 역시 다공성 담체를 이용하여 정상세포인 Chicken embro Fibroblast(CEF)의 배양시 세포의 최종농도가 Cytodex-3보다 2 - 3배높았고, 또한 Newcastle disease virus(NDV)의 생산수율도 3 - 4배 증가되었다. 그러나, NDV에대한 산소 분압효과는 나타나지 않았다. 이 NDV를 Vero세포에 접종하여 산소분압효과를 살펴본 결과 1% 산소분압에서 바이러스 생산수율이 약 20배 증가 하였다. 또 다른 바이러스인 Vaccinia virus를 Vero 세포에 접종한후 산소분압 효과를 살펴본 결과 낮은 산소 분압에서 바이러스 생산수율이 약 180배 증가 하였다. 산소에 의해 생성되는 유해 라디칼을 제거하기위해 ascorbic acid를 첨가한 결과 최대 virus titer가 Vero/VSV 시스템에서는 140배가량 증가하였으나 CEF/NDV 시스템에서는 큰 영향이 없었다. 또한 EDTA를 1mM 첨가해주었을 경우 감염의 증가로 약200배의 증가된 virus titer를 보였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

제 1 절.

MTX의 농도를 약 1.0 μM 수준까지 올린 다음 adaptation cell pool 중에서 비항체생산성이 가장 높은 pool을 확보한 뒤 cell의 molecular analysis를 통하여 characterization 하고 부유배양을 이용한 고농도 세포배양을 통하여 상업적으로 필요한 키메라 항체의 대량생산에 응용할 예정이다.

제 2 절.

LDL의 농도를 신속하고 정확하게 측정할 수 있는 면역센서가 개발됨에 따라, 이를 상용화할 예정이며, 또 항체만 바꿈으로써 다른 물질을 측정할 수 있는 면역센서를 개발할 예정이다.

제 3 절.

현재까지 백신의 생산은 동물생체에 바이러스를 감염시킴으로 증식시키는 방식이나 달걀을 이용하는 방식과 같이 소규모로 이루어지고 있었으나 본 연구를 통해 백신 생산에 동물세포 최적배양 기술을 도입함으로써 대량배양의 길을 확립할 수 있고, 또한 Virus를 vector로 이용하는 외래 유용단백질 생산에 적용함으로써 고부가가치 산물의 대량배양이 산업화 되리라 본다.

여 백

S U M M A R Y

(영 문 요 약 문)

제 1 절. 제조합 CHO cell을 이용한 키메라 항체의 생산

The chimeric antibody directed against pre-S2 surface antigen of hepatitis B virus was produced by recombinant Chinese hamster ovary (CHO) cells. The copies of immunoglobulin light and heavy chain gene were amplified by dihydrofolate reductase (dhfr) -mediated gene amplification method. The expression of heavy and light chain gene was controlled by constitutively strong promoter in various cell types, β -actin promoter. Two plasmids, pH β Apr-3p-KC-dhfr Δ E and pH β Apr-3P-neo-HC, in which kappa light chain gene and heavy chain gene were cloned, were cotransfected into dhfr negative mutant CHO cell line, DG44, using lipofection method. 23 transformants was isolated in 96 well culture plates. Colonies which survived the selective medium (ribonucleosides and deoxyribonucleosides free α -minimum essential medium) were pooled by trypsinization and subjected to three fold (0.02, 0.08, 0.32 μ M)-stepwise increment of methotrexate (MTX) concentration. At 0.08 μ M MTX concentration, the cell pools high producing chimeric antibody could be obtained, of which specific antibody productivity was as much as 6.34 μ g/10⁶ cells/day. But the heterogeneity in the extents of enhanced specific antibody productivities among cell populations appeared during gene amplification. Therefore, in order to obtain antibody-high producer, transformant cells as many as possible at first step should be subjected to gene amplification .

제 2 절. 저밀도 지질 단백질 측정용 면역센서의 개발 및 조건의 최적화

Immunosensor for the determination of LDL(Low-Density Lipoprotein) was developed by using

quartz crystal microbalance(QCM) system. LDL is known to be a good indicator for the diagnosis of atherosclerosis and hypercholesterolemia. The immunosensor system consists of flow-through cell, oscillating circuit, oscilloscope, and frequency counter. This was interfaced with personal computer for signal processing. The flow-through cell containing an AT-cut quartz crystal on which gold was coated was connected to oscillating circuit to determine the resonant frequency. FIA(Flow Injection Analysis) was applied to the QCM system for measurement in liquid phase. Antibody showing binding affinity against LDL was immobilized on the gold electrode of a quartz crystal by covalent coupling via polyethylenimine(PEI) / glutaraldehyde film. LDL was injected and bound to the antibody immobilized on the QCM immunosensor. The response of the immunosensor ($F_0 - F_1$) was found to be proportional to the LDL concentration from 200 $\mu\text{g/ml}$ to 800 $\mu\text{g/ml}$. Optimal conditions for the development of immunosensor were also investigated in terms of sensitivity and non-specific binding.

제 3 절. 백신 및 외래단백질 생산에 관한 산소분압의 효과

Heterologous protein production using biological technologies has been advanced in quite a recent years. These technologies had been initially developed in microorganism system(bacteria, yeast, etc) and are keep developing actively at this present. But more recently the recombinant DNA technology was applied to the animal cell culture systems and made a considerable progressive results due to their better ability in the aspects of protein folding, post-translational modification, and reduction of serious contaminants which are one the problems that can be found in microorganism culture system and etc. These systems then was investigated in high interest among many biotechnologists. Consequently, the development of animal cell culture systems drew revolutionary changes not only in heterologous protein production but also in vaccine production, an another important bio-industry, since vaccine production has been resided in the level of laborious animal tissue infection and small scale chicken embryo infection. Observing such current trend, it is highly required to do research on animal cell culture in order to industrialize recombinant protein production and vaccine production.

Using above advanced system, and immobilization of animal cells onto novel macroporous gelatin

microcarriers (K-beads) developed in our laboratory we investigated the production of viruses (Vesicular stomatitis virus, Newcastle disease virus, Vaccinia virus) and observed the effect of O₂ partial pressure in this system in order to optimize the condition and maximize the yield.

Since K-beads promised the mass production of anchorage-dependent animal cells, K-beads was applied for the maximization of virus production. In case of Vesicular stomatitis virus (VSV) production system in Vero (African green monkey kidney) K-bead, among various matrices tested, provided the highest VSV production (5.7×10^3 pfu/ml). At reduces O₂ partial pressure (10%), VSV titre was increase by 130-folds higher than the control (21%). The O₂ effect was further confirmed in more scaled-up bioreactor (1L). The maximum virus titre was appeared to be 4×10^{15} pfu/ml at 10% of O₂ partial pressure for VSV. In case of controlling the dissolved oxygen (DO) at 30% during overall cultivation period, virus titre was decreased at lower O₂ partial pressure oppositely. When NDV was infected into Vero cells, maximum virus titre was appeared at 1% of O₂ partial pressure which corresponded to 20 folds higher than virus titre obtained at 21% of O₂ partial pressure. It was further conformed with Vaccinia virus with Vero cells. It appeared that virus titre (2.4×10^{11} pfu/ml) was increased at 10% and 1% of O₂ partial pressure. In order to understand the effect of O₂ partial pressure on virus propagation, cellular toxicity which can be expressed as a intracellular superoxide level was overcome by the addition of ascorbic acid. This is one of the strong anti-oxidants. When 0.5mM of ascorbic acid was added to the culture medium, VSV titer was increased by 140 times as compared with virus titre obtained without addition of ascorbic acid. In order to enhance the propagation of virus in culture supplementation of EDTA was treated on to the culture. At concentration of 1mM of EDTA showed the increase of virus titer to 200-fold.

여 백

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction	161
part 1. Production of chimeric anti-body using recombinant CHO cell	
part 2. The development and optimization of immune-sensor for LDL	
part 3. The effects on production of vaccines and extrinsic proteins	
Chapter 2. Current research status of the field	164
part 1.	
part 2.	
part 3.	
Chapter 3. Research subject and Result	169
part 1.	
part 2.	
part 3.	
Chapter 4. Degree of object accomplishment	194
part 1.	
part 2.	
part 3.	
Chapter 5. Application plan of the accomplishment	196
part 1.	
part 2.	
part 3.	
Chapter 6. References	198

여 백

목 차

제 1 장 서 론	161
제 1 절. NMR을 이용한 펩티드 호르몬 LHRH의 구조연구	
제 2 절. 우울증 호르몬과 모델 인지질막의 상호작용	
제 2 장 국내외 기술개발 현황	164
제 1 절.	
제 2 절.	
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	169
제 1 절.	
제 2 절.	
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도	194
제 1 절.	
제 2 절.	
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	196
제 1 절.	
제 2 절.	
제 6 장 참고문헌	198

여 백

제 1 장 서 론

제 1 절.

단일군항체는 그 자신이 지니는 기질 특이성 때문에, 여러 분야, 특히 질환의 진단과 예방 및 치료에 다양한 형태로 이용되고 있다. 그러나, 생쥐 유래의 단일클론 항체는 인체내에 반복적으로 투여하였을 때 이 생쥐 단일클론 항체에 대한 면역반응 (HAMA response)을 유발할 뿐만 아니라 항체에 의한 effector기능의 유도에 결함이 있다. 따라서 환자의 immune surveillance를 피하기 위해서 개발된 항체로는 생쥐 항체의 variable region과 사람 항체의 constant region을 fusion시킨 키메라 항체와 사람 항체에 생쥐의 항원결합부위인 CDR을 도입한 인간화된 항체가 있다. 이러한 항체는 생쥐 단일클론 항체의 기질 특이성과 친화도를 갖고 있을 뿐만 아니라 인간 항체의 ADCC 기능 또한 갖고 있다.^{1,2,11,12}

이러한 재조합 항체를 임상적으로 실험하고 나아가서 상품화하기 위해서는 대량생산에 필요한 효율적인 발현시스템 개발이 중요하다. 재조합 항체의 발현을 위해 지금까지 사용된 host cell 중 인간항체의 glycosylation pattern이 가장 유사하다고 생각되는 mammalian cell을 host로 사용하는 것이 적합한 것으로 알려져 있다.^{4,5}

본 연구에서는 간염 바이러스의 표면항원 중 preS2 부위에 특이성을 갖는 키메라 항체의 발현 벡터를 여러 동물 세포주에서 강력한 것으로 알려진 human β -actin promoter와 유전자 증폭 system의 일종인 dhfr gene amplification system을 이용하여 제작하고, 동물 host 중 Chinese hamster ovary 세포에 도입한 뒤, dhfr 효소의 기질 억제제인 methotrexate (MTX)의 농도를 점차 높여줌으로써 항체유전자를 증폭하여 고생산성 세포주를 선발하고자 하였다.

제 2 절.

스테로이드(steroid)계 화합물로서 가장 광범위하게 자연에 분포하는 콜레스테롤은, 동물 생리조절에 중요한 여러 스테로이드계 호르몬(hormone)과 담즙산(bile acid)의 전구체이며 진행세포막의 구성성분으로서 세포막의 유동성을 조절하는 중요한 역할을 맡고 있다. 그러나 혈청내 콜레스테롤 농도가 높으면 심장 질환(cardiovascular disease) 발생률도 높아짐은⁴ 이미 잘 알려진

사실이다. 현대 산업 사회에서 가장 큰 사망원인중의 하나인 심장 혈관 질환은 유전적 요인 외에도, 식이(diet) 습관에 의한 콜레스테롤의 과다한 섭취가 큰 영향을 끼친다는 것이 많은 연구에서 지적되어왔다. 이미 1885년부터 미국의 국립보건원(National institutes of Health)에서는 National Cholesterol Education Program(NCEP)을 조직하는 한편 가정의학과에서의 정규 건강 검진에서도 혈청내 콜레스테롤 수치 측정을 포함할 것을 역설하였다⁵.

정상적인 성인의 경우, 하루 약 1100mg의 스테롤(sterol)을 분비하며, 이중 식이 섭취를 제외한 약 850mg의 콜레스테롤이 간과 장에서 생합성되어 진다. 그 외 장기, 세포에서는 생합성이 없이 혈액을 통해 운반된 콜레스테롤을 흡수하며 대사하게 된다. 이 경우 콜레스테롤의 물에 대한 낮은 용해도 때문에, 생체내에서는 지질단백질(lipoprotein)이란 복합체의 형태로 운반되어 진다. Lipoprotein의 구조는 친수성을 증대시키기 위하여 표면에는 인지지방질(phospholipid), 단백질, 유리(free) 콜레스테롤이 위치하며, 내부는 triacylglycerol과 콜레스테롤 에스테르로 구성되어 있다. 이러한 lipoprotein은 구성성분의 비율에 따라 고유한 밀도를 갖는데, 이에 근거해 high-density lipoprotein(HDL), low-density lipoprotein(LDL), very-low-density lipoprotein(VLDL), chylomicron 등으로 분류되며 각각 수행하는 역할도 다르다.

간에서 생합성 된 콜레스테롤은 주로 LDL에 의해 주변 세포로 운반되고, LDL receptor와의 특이적 상호작용을 통해 내재화(internalization)된 후 대사된다.¹ 이러한 내재화 단계에 이상이 있는 경우, 혈액내의 LDL 농도가 증가하게 된다. 이 경우 피부, 건(tendon), 혈관 등에 침착하게 되며, 특히 혈관에서는 동맥경화(atherosclerosis)를 유발하여 심장마비, 뇌일혈, 고혈압의 직접적 원인이 된다.

이러한 의미에서 LDL을 빠르고, 손쉬운 조작으로, 정확하게 측정할 수 있는 바이오센서의 개발은 매우 중요하다. 바이오센서는 전기화학식(amperometric)⁶, 광학식(optic)^{7,8}, 압전효과식(piezoelectric)⁹ 등 그 측정원리에 따라 구분할 수 있는데, 전기화학식 바이오센서의 경우 특정한 전기 화학적 특성을 가지는 측정대상물질에 적용될 수 있는데, 이는 극심한 간섭현상을 야기시키는 주원인이 된다. 특정한 전기 화학적 특성이란 전기적인 산화환원능이 다른 간섭물질과는 달라야하는데, LDL의 경우 이러한 특정한 전기 화학적 특성이 없다. 또 전기화학식 바이오센서의 경우 측정제한범위(detection limit)가 다소 높은 단점이 있다. 광학식 바이오센서는 전기화학식 바이오센서가 가진 이러한 단점들을 극복할 수 있으나 장비가 비싸고, 또 소형화(miniaturization)가

힘든 단점이 있다. 이에 비해 압전효과식 바이오센서의 경우 측정제한범위가 매우 낮으며 (nanogram단위까지 측정 가능), 또 수정진동소자(quartz crystal resonator)를 포함한 작은 반응기 (reaction cell)와 간단한 증폭회로만으로 구성되므로 장비가 값싸며, 소형화(miniaturization)가 가능하다는 장점들이 있다. 또 항체가 가진 높은 선택성(selectivity)를 이용하기 때문에 측정하고자 하는 물질만을 정확하게 선택적으로 측정할 수 있고, 간섭물질에 의한 간섭현상을 최소화할 수 있다.

본 연구에서는 LDL에 특이성(specificity)을 가지는 항체를 수정진동소자에 고정화시킨 후 LDL 시료와 반응시킴으로써 이로 인해 생기는 수정진동소자의 질량변화를 관찰함으로써 시료의 LDL 농도를 빠르고 정확하게 측정할 수 있는 LDL측정용 면역센서를 개발하고자 하였다.

제 3 절.

1980년대 중반부터 생물공학 분야에서 의약품 개발의 일환으로 동물세포에서 대량배양을 통한 단일클론 항체, 백신, 혈압 강하제, 그리고 TPA 등과 같은 고부가가치의 단백질 제재들을 생산하고자 하는 연구와 산업화에 대한 노력이 선진각국에서 앞다투어 활발히 진행되고 있다. 1970년 후반부터 유전자 재조합 법에 의한 우수한 미생물의 개발로 인하여 생물공업은 미래의 첨단산업으로 각광을 받게 된 것은 주지의 사실이다. 그러나 원래 동물세포에 생성되던 단백질들을 미생물을 통해 생산하는 과정에서 단백질분자의 불완전한 Folding 과 post-translational modification 과 같은 미생물세포의 제한된 능력 때문에 활성을 갖는 완전한 구조를 갖는 단백질을 생산하는데는 한계점이 있다는 것이 문제점으로 대두되고 있다. 또한 미생물에서는 대부분 단백질들이 세포 밖으로 분비가 잘 안되기 때문에 세포를 파괴한 후 원하는 단백질만 순수 분리 정제하는 과정이 복잡하고 소요되는 비용이 고가일 뿐만 아니라 endotoxin의 오염가능성도 있기 때문에 개발된 의약품의 허가 규제가 더욱 엄격히 적용 되어 한다는 점도 지적되고 있다. 이상과 같은 이유 등으로 인해 세계시장 규모 200억불에 가까운 동물세포에서 유래된 의약품 물질들을 개발 생산하고자 cell line의 개발과 더불어 동물세포의 대량배양공학 기술에 대한 관심이 선진각국에서 고조되고 있는 실정이다. 상기시장규모는 현재까지 전통적인 생물공업에서 대량생산되고 있는 항생제, 아미노산 및 비타민류의 총 세계시장 규모의 3배에 이르는 규모이다. 그러므로 선진 각국에서는 앞

을 다투어 동물세포에서 유래된 제품을 개발하고자 수많은 기업들이 치열한 경쟁을 벌이고 있는 실정이다. 이에 미국이 그중 단연 우세하여 약 580 업체가 관여하고 있고 일본이 100개 사 등이며, 우리 나라는 겨우 3개 회사 정도가 관여하고 있으나, 세계적인 추세로 보아 수년 내에 이 분야에 대기업을 제약회사 및 화학회사들이 참여하지 않을 수 없는 상황이 도래할 것으로 예측된다.

동물세포를 이용한 단백질 생산에 대한 주된 이유로는 다음과 같다.

가. 고분자 물질의 합성 및 분비가 쉬워 분리정제 과정이 손쉽게 해결된다.

나. 동물세포의 세포질 내에서 단백질이 정확히 folding을 함으로 미생물에서 유전자조작으로 얻은 단백질보다 역가가 월등히 뛰어나다.

다. Post-translational modification 이 정확하다.

라. 단백질이 multimer일 경우 assembly가 정확하다.

마. FDA 승인이 쉽다.

특히, 박테리아 세포와 동물세포에 있어서 단백질의 생합성과정과 분비과정을 살펴보면 뚜렷한 차이가 있다. 박테리아 세포에서는 Ribosome에서 단백질이 생합성되면서 바로 세포질(cytoplasm)에 노출된다. 그런데 세포질은 주로 환원상태가 강하기 때문에 단백질의 -SH기가 서로 산화되어 -S-S-결합을 거의 이룰 수가 없다. 즉, 단백질은 unfolding상태에 있다가 signal peptide에 의하여 또는 인위적으로 세포를 파괴할 때 환경조건이 산화상태의 세포 밖으로 빠져 나오면서 무작위하게 -S-S-결합이 형성되어 folding 되고 독특한 입체구조를 갖게 된다. 그러나 동물세포에서는 Rough Endoplasmic Reticulum (RER)에서 Ribosome에 의하여 생합성 된 단백질은 막으로 보전된 상태로 Golgi체 (약한 환원상태)로 넘어가 계속 효소반응에 의해 post-translational modification 이 정확하게 이루어진 후 역시 막으로 보호된 상태로 원형질막까지 이동되어 그대로 세포 밖으로 분비된다. 그러므로 -S-S-결합도 이미 세포 내에서 정확하게 이루어진 상태로 단백질이 세포 밖으로 분비되기 때문에 그 구조를 그대로 유지할 수 있으며 또한 세포내 단백질 구조중 모든 불필요한 부분도 끊어버리기 때문에 대부분 활성이 있는 구조를 갖게 된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절.

미국의 Biotrends Research의 조사 내용에 의하면, 국외의 경우 항체를 이용하여 암, 에이즈, 자가 면역 질환 및 타 감염성 질환에 대한 예방 및 치료제 개발에 참여하고 있는 기업의 수는 현재 55개 이상이며, 1990년의 시장 규모는 항체 공학 기술을 이용하지 않은 생쥐 단일클론 항체를 사용한 이식 수술 용도의 면역 억제제가 유일하게 3,400 만 불을 기록하고 있다. 그러나, 1992년부터는 항체 공학 기술을 이용한 항체의 시장 진출이 시작되고 임상 시험의 검사 절차가 점점 빨라지고 있는 추세이므로, 1995년과 2,000년의 시장 규모를 각각 10억 1,900만 불과 39억 8,200만 불로 전망하고 있다. 또한 Frost & Sullivan Market Intrelligence (미국)도 인체에 사용할 진단 및 치료용 항체의 개발로 인하여 1993년도의 7억 4,000만 불의 단일클론항체 판매고가 1998년도에는 38억불로 크게 증가하리라 예측하고 있다.

암이나 여러 감염성 질환 혹은 자가 면역 질환의 진단이나 예방과 치료를 위한 단일클론항체의 대량생산은 1975년 영국의 Dr. Milstein과 Dr. Kohler에 의하여 생쥐 하이브리도마 기술이 개발됨으로써 가능해졌다. 그러나 쥐의 단일클론 항체는 인체에 임상적으로 반복 투여하였을 경우 인체의 면역 반응을 유발하여 부작용이 생기거나 그 효과가 감소하므로, 최근에는 생쥐 단일클론항체를 유전 공학 기술과 단백질 공학 기술을 이용하여 인간화시키는 기술들, 즉 키메라 항체나 인간화된 항체의 생산 기술들이 현재 선진 각국에서 경쟁적으로 여러 가지 다양한 질환의 예방 및 치료제 개발에 이용되고 있다. 현재 기업 및 연구소에서 연구 중인 항체와 항체 단편의 종류는 아래 표1과 같다.

우리 나라의 경우, 각종 암이나 감염성 질환 혹은 자가 면역 질환 환자 수가 계속 증가 추세에 있고 점차 첨단 기술을 이용한 전문적인 방법으로 질병을 *in vitro imaging*하거나 치료할 필요성이 있으므로, 항체 공학 기술을 이용한 단일클론 항체의 수요가 앞으로 상당히 클 것으로 예상된다. 그러나, 아직까지 재조합 항체의 생산 기술은 시작 단계에 있으므로 이 기술의 시급한 개발이 요구된다.

표 1. 기업 및 연구소에서 연구 중인 항체와 항체 단편¹³

Antigen binding fragment type	Reagent name	Potential Use	Source
Cardiovascular			
MRU	Thromboscan	Imaging	Cytogen Co.
Fab	Anti-Platelet	Imaging	Centocur Co.
Fab	Anti-Fibrin	Imaging	Centocur Co.
Immunoregulatory			
Chimeric	Anti-IL2	Therapeutic	Nat. Inst. Health
Chimeric	Anti-Tac	Therapeutic	Protein Design Lab.
Chimeric	Anti-IgE	Therapeutic	Tanox Biosystems
Infectious Diseases			
Humanized	Anti-RSV	Therapeutic	Scotgen/Beecham
Chimeric	XmenE5	Therapeutic	Xoma Co.
Cancer			
Humanized	Campath-1H	Therapeutic	Wellcome
scFv	Anti-Tag-72	Imaging	Genex
Humanized	p185HER2	Therapeutic	Genentech
Chimeric	B72.3	Therapeutic	Celltech
Chimeric-Fab	C3347-Fab	Therapeutic	INGENE-Xoma
Humanized-Fab	h4D5-Fab	Therapeutic	Genentech
Miscellaneous			
scFv	Anti-digoxin 26-10	Therapeutic	Creative Biom.
Chimeric-toxin	Anti-GD2-lymtoxin	Therapeutic	Abbot Biotech.
scFv-toxin	OVB-3PE40	Therapeutic	Nat. Inst. Health
Chimeric	CEA-bifunctional	Therapeutic	Hybritech Inc.
Fab-enzyme	β -Lactam-Fab	Therapeutic	Hybritech Inc.
scFv	IgM-sFVs	Immunoassay	Genex

제 2 절.

바이오센서(Biosensor)는 효소, 미생물, 항원-항체 등의 분자 식별 능력을 가진 생물활성물질을 전기, 물리, 화학소자와 결합하여 생리적 지표물질을 측정 할 수 있도록 하는 장치를 일컫는다. 외국의 경우, 임상측정, 환경, 공정제어에의 응용^{10,11,12}이 가능한 바이오센서들이 개발되어 상업화 되기에 이르렀으며, 현재는 이러한 센서 시스템의 고감도화, 다기능화, 초소형화에 대한 연구가 다각도로 추진되고 있다. 또한 이러한 센서 기술은 미래 생물전자공학(Bioelectronics)¹³의 기본 연구로 인식되어 그 중요성이 새로이 인식되고 있다.

바이오센서는 전기화학, 광학, 압전효과 등 그 측정원리에 따라 구분할 수 있으며 현재까지는 전기화학식 바이오센서의 개발이 주요 연구방법이었으나, 그 자체의 단점(감도가 낮고, 간섭 현상극복이 어려우며, 측정대상물질에 한계가 있다는 등)들에 의해 새로이 QCM(Quartz Crystal Microbalance) 시스템이 각광을 받고 있다. 이는 1950년대 후반 Sauerbrey에 의해 수정진동소자 전극에 적립된 물질의 질량과 주파수 변화량과의 관계가 밝혀짐으로써 시초가 되었으며, 본격적으로 발전하기 시작한 것은 1980년대 초반, G.G.Guilbault를 비롯하여 Adler 등에 의해서다. 이들의 연구는 기체상태에 국한되었었으며, 액체상태에서의 QCM 시스템에 대해 언급하기 시작한 것은 1980년대 중반에 들어서이다. 액체 상태의 경우 위에서 언급한 Sauerbrey의 공식이 적용될 수 없고, 액체가 가진 점 탄력성(viscoelasticity)에 의한 영향을 받는다는 등 여러 가지 현상들이 알려져 있으나, 아직까지는 완전한 이론적 근거가 부족한 형편이다. QCM을 이용한 면역센서 개발에 관한 연구는 1990년대 들어 각광받기 시작했으며, 미국을 비롯하여 독일, 영국, 스웨덴, 일본등에서 많은 연구가 수행되고 있어 현재 우수한 국외잡지에 많은 발표가 진행 중이다. 국내의 경우, QCM을 이용한 바이오센서에 대한 연구는 거의 없는 상태이고 외국의 연구수준에 비해 그 격차가 크므로 이에 대한 연구가 절실히 요구된다.

제 3 절.

미국의 Genentech 사에서는 1982년 재조합 E.coli를 이용하여 혈전용해제인 Human TPA의 개발을 성공하여 생산단계까지 왔으나 활성과 FDA의 사용허가문제 때문에 포기하고, 다시 1984

년 재조합 효모를 이용하였으나 역시 역가문제로 포기하고, 1986년 재조합 동물세포를 이용하여 1988년 FDA의 승인을 얻어 현재 동물세포인 Chinese hamster ovary cell을 이용하여 생산 시판하고 있다.

위와 같은 이유로 1980년대 이후 동물세포배양의 주관심사는 동물세포에 외래 유전자를 도입하여 그 생산성을 높이고자 하는 것이었으나 Eucaryotic gene 의 특성상 그 실용례가 많지 않았다. 이에 Virus 를 이용하여 백신을 만드는 방법을 이 재조합 기술에 접목하여 Virus를 원하는 단백질생산의 Vector로 이용하는 기술이 발달하기 시작하였다. 이러한 Virus vector 를 이용하였을 경우, 동물세포의 발현 system을 이용하기에 많은 post-translational modification이 일어나 원하는 단백질이 활성을 가진 채로 빠르게 합성될 수 있고 단위시간당 많은 단백질을 합성할 수 있다. 또한 여러 cell type과 심지어는 살아있는 동물에서도 생산할 수 있게되어 실제 생산 가능하고 Vaccine으로도 사용할 수 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 재조합 CHO cell을 이용한 키메라 항체의 생산

1. 연구 재료 및 방법

가. 세포 배양

dhfr 유전자가 없는 DG44 세포주를 10 % fetal bovine serum (FBS)가 함유된 DMEM/F12 배지에 hypoxanthin (10 µg/ml), thymidine (10 µg/ml), glycine (50 µg/ml), glutamine (587 µg/ml), glucose (4.5 mg/ml), penicillin-streptomycin (100 IU/ml)을 첨가하여 37 °C 5 % CO₂가 유지되는 incubator에서 계대배양하였다.

나. 키메라 항체 발현 벡터의 제조

키메라 항체의 heavy chain 발현 벡터는 human β-actin promoter와 neo selectable marker를 가진 pHβApr-3p-neo의 SalI site에 키메라 항체의 heavy chain cDNA를 집어넣어서 cloning하였다. 키메라 항체의 kappa light chain의 발현 벡터는 kappa chain cDNA를 pHβApr-3p-neo의 SalI site에 subcloning 하여 pHβApr-3p-neo-KC를 제작하고 이것의 3'UT+KC 부위를 weakened dhfr을 가지고 있는 pSV2-dhfrΔE와 pHβApr-3P-neo의 EcoRI/BamHI fragment의 합성으로 이루어진 pHβApr-3P-dhfrΔE의 BamHI site에 subcloning 함으로써 완성하였다.

다. DNA transfection 및 parental transformant selection

Transfection에 사용될 벡터 DNA는 대량 분리한 후 초원심분리기를 사용하여 정제하였다. 본 실험에서는 liposome mediated DNA transfection 방법을 사용하여 kappa chain 벡터와 heavy chain 벡터를 동시에 cotransfection 하였다. 먼저 DG44 cell line을 60 mm dish에 80 % confluency에 도달하도록 키운 뒤, 원래의 배지를 제거하고 Opti-MEM으로 serum을 제거하고 lipofectin-DNA mixture를 세포위에 골고루 간 후, CO₂ incubator에서 약 6시간 동안 배양한다.

이후에 원래의 20 % FBS DMEM/F12 배지를 3ml 첨가하여 24-40 시간 정도 유지하였다. neo/dhfr positive cell을 선별하기 위해서 이들 세포를 trypsin을 사용하여 dish 표면으로부터 떨어뜨린 후, 96 well plate에 well 당 10^4 cell이 되도록 분주한다. 이 때, 선별배지는 10 % dialyzed serum과 G418 (550 μ g/ml)을 포함한 α -MEM을 사용하였다.

라. Gene amplification

neo/dhfr positive cell 중에서 productivity가 높은 23 개의 parental cell pool을 MTT assay와 ELISA를 통하여 얻었다. 이 parental cell을 dhfr 요소의 기질 저해제인 methotrexate (MTX)을 culture 배지에 첨가하여 MTX resistant colony가 나타날 때까지 배지를 갈아주며 배양하였다. 이 때, 초기 MTX의 농도는 0.02 μ M이었으며 이 후에 adaptation 된 colony를 중심으로 MTX의 농도를 0.08, 0.32 μ M로 단계적으로 올려주면서 항체 유전자를 증폭시켰다. 각 MTX 농도에서 adaptation이 끝나면 MTX resistant colony를 회수하여 productivity를 검사하였다.

마. Antibody productivity 산출

각 cell pool이 생산하는 항체의 productivity는 다음과 같은 방법을 사용하였다. 60 mm dish에 10^6 세포를 5 ml의 10 % dialyzed α -MEM media와 함께 seed 하고, 24 시간이 지난 뒤 상등액을 sampling하여 sandwich ELISA를 통하여 생산된 키메라 항체의 농도와 생산성을 계산하였다. Sandwich ELISA에서 anti-human IgG를 coating에, horse radish peroxidase (HRP) labeled anti-human IgG (Fc specific)를 secondary antibody로, OPD를 HRP의 substrate로 사용하여 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 키메라 항체 발현 벡터의 제조

키메라 항체의 발현 벡터의 도식적 그림은 그림1과 같다. Kappa light chain을 발현하는 pH β Apr-3P-KC-dhfr Δ E는 selectable/amplifiable marker인 dhfr 유전자를 포함하고 있다. 또한 항체유전자의 증폭과정을 효과적으로 유도하기 위하여 dhfr 유전자의 전사는 SV40 early promoter

를 약화시켰다. 이렇게 함으로써 아주 적은 농도의 MTX에서도 dhfr 유전자가 대량으로 증폭된 cell pool 만이 살아남을 수 있도록 하였다.¹⁴ Heavy chain의 경우 kappa light chain과 마찬가지로 human β -actin promoter와 polyadenylation/termination signal에 의해 통제받도록 하였고 selectable marker로 neo 유전자를 포함시켜 G418 가 들어있는 배지에서 selection되도록 하였다.

나. 키메라 항체의 발현

키메라 항체의 발현벡터를 DG44 cell line에 lipofection 방법으로 cotransfection 한 다음 96 well culture plate로부터 neo/dhfr double positive colony를 현미경 아래에서 확인하였다. 이러한 parent cell 들은 다시 96 well culture plate로 옮겨준 뒤 MTT assay로 상대적인 세포 농도를 구하고 culture supernatant를 취하여 ELISA를 사용하여 각 cell pool이 내놓는 항체의 상대 농도를 구하여 위에서 구한 세포 농도와 비교하여 비교적 항체 생산성이 좋을 것으로 판단되는 23 개의 cell pool을 얻을 수 있었다. 23 개의 cell pool을 24 well 및 6 well culture plate에서 expansion 한 다음 cell stock을 확보하였고 일부는 MTX의 농도를 0.02 μ M로 맞춘 α -MEM media가 들어있는 100 mm dish에서 약 10^6 cell을 adaptation 시켰다. 약 3 주 동안 adaptation시킨 다음 각 resistant cell pool의 항체 생산성을 측정하였다. Parental cell 과 각 MTX 농도에서 adaptation 시킨 cell pool의 항체 생산성은 표 2와 같다. Cell pool 마다 다양한 항체생산성의 증가 분포를 얻을 수 있었는데 이러한 항체생산성 증가의 다양성의 원인을 조사하기 위해서 초기 0.02 μ M 에서 크게 향상된 항체 생산성을 보이는 세포 pool 뿐만 아니라 같은 MTX의 농도에서 항체생산성이 별로 증가하지 못한 cell pool중 일부를 0.08 μ M 과 0.32 μ M에서 순차적으로 adaptation 시켰다. Parental cell 에서 hu20 cell pool처럼 1000 ng/ 10^6 cells/day의 아주 높은 비항체생산성을 보이는 cell pool이 나타나는 경우가 있는가 하면 ELISA 방법으로는 거의 측정이 불가능할 정도로 비항체생산성이 낮은 cell pool도 나타났다. 또한 MTX로 항체유전자를 증폭하는 과정에서 비항체생산성이 증가하는 비율 또한 cell pool 마다 다양하게 나타났으며 hu13의 경우처럼 전혀 비항체생산성이 증가하지 않는 경우도 있었다. 이러한 cell pool의 경우에는 MTX에 대한 affinity가 낮은 dhfr 효소의 돌연변이 종이 나타나거나 MTX의 세포내 uptake가 이루어지지 않음으로써 MTX에 대해 저항성을 갖는 mechanism을 획득하였을 것으로 여겨진다.¹⁵ 특이한 현상은 MTX의 농도를 높여주더라도 비항체생산성이 반드시 증가하는 것은 아니며 오히려 감소하는 경

우도 있다는 점이다. 이러한 경우엔 유전자 증폭과정에서 나타나는 저생산성의 variant들이 cell pool의 population을 overtake하기 때문인 것으로 여겨진다. 따라서 최종적으로 높은 MTX 농도로 항체유전자를 증폭시키는 경우 가능한 많은 cell pool을 얻어 연속적으로 비항체생산성이 증가하는 cell pool을 얻는 방법을 택해야 할 것이다.

그림1. Chimeric antibody expression vectors

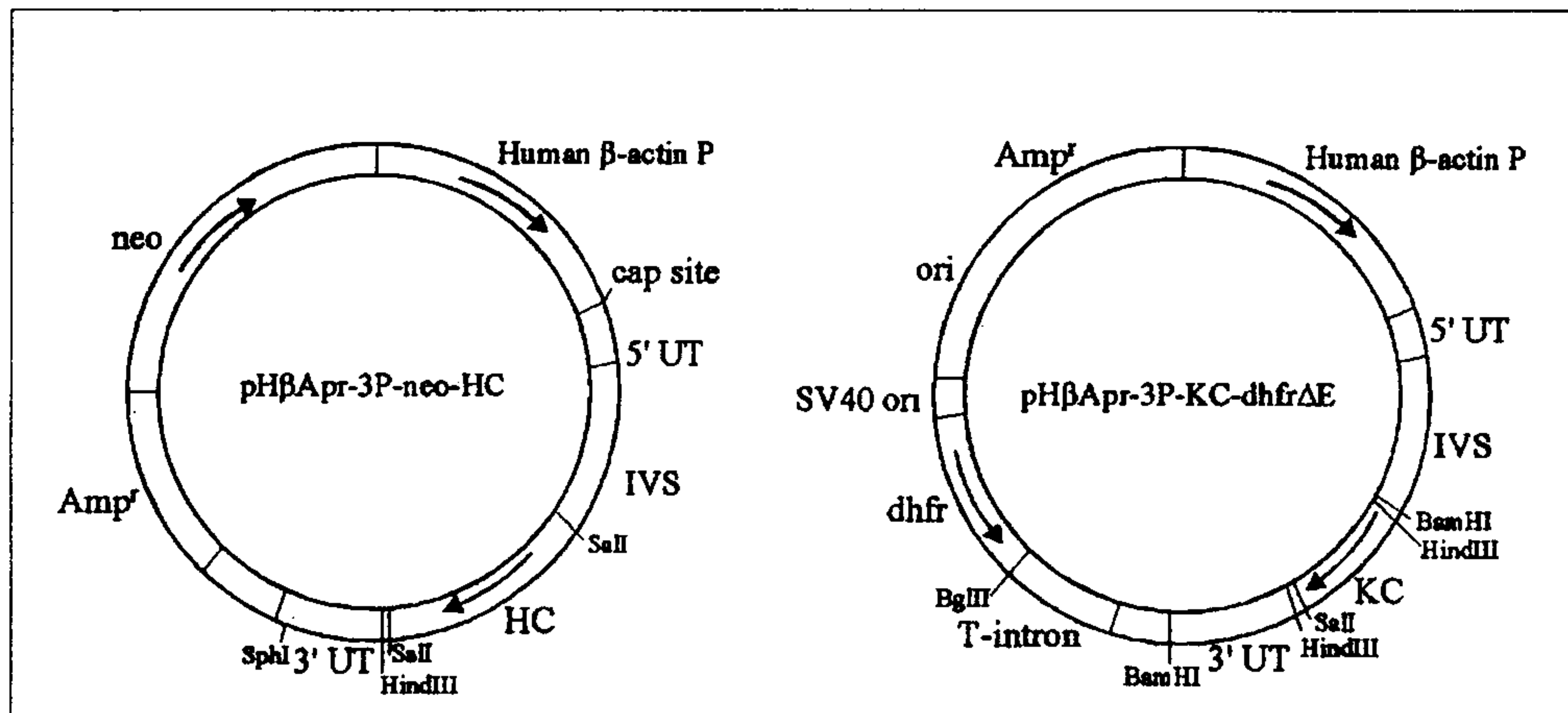


표 2. Antibody productivity of parental and amplified CHO cell pools

(단위 : ng/10⁶ cells/day)

Pool	Parent	0.02 μM MTX	0.08 μM MTX
hu-1	0.73	0	0
hu-2	1.45	41.68	315.26
hu-3	3.72	68.98	ND
hu-4	2.56	0	ND
hu-5	0	0	0
hu-6	933.68	3899.45	1650.31
hu-7	1.57	241.29	0
hu-8	169.52	728.43	32.81
hu-9	101.52	439.03	ND
hu-10	1.52	0	ND
hu-11	157.32	0	338.20
hu-12	374.10	1242.26	0
hu-13	6.30	0	0
hu-14	0	ND	ND
hu-15	56.77	3903.21	964.41
hu-16	4.29	23.39	ND
hu-17	640.89	4631.68	6345.95
hu-18	43.90	1518.73	0
hu-19	0.40	2885.35	644.11
hu-20	1033.68	2881.54	5328.10
hu-21	31.14	1671.13	376.53
hu-22	63.47	1003.51	387.80
hu-23	8.64	406.92	0

* ND : not determined

제 2 절. 저밀도 지질 단백질 측정용 면역센서의 개발 및 최적화

1. 연구개발수행 내용

위에서 언급한 여러가지 질병들의 판단근거가 될 수 있는 LDL을 측정대상물질로 삼아서 이를 가장 간단하고, 민감하며, 경제적으로 측정할 수 있는 면역 바이오센서의 개발을 위한 구체적인 연구내용은 다음과 같다.

가. QCM 시스템의 개발

LDL 면역 바이오센서의 transducer로 이용하는 QCM 시스템은 그 자체의 고민감도 (hypersensitivity), 원리의 단순성(simplicity), 기기의 소형화(miniaturization)가 가능한 장점들이

있다. 본 연구에서는 다음과 같은 구성요소로 이루어진 QCM 시스템을 개발한다. Teflon으로 만들어진 반응기는 화학적으로 안정하며, 수정진동소자를 장착하여 고유의 공진주파수로서 진동하게 만들고 동시에, 수정진동소자의 한쪽면을 sealing하고 다른 한쪽면만 노출시켜 항원항체반응을 진행하게 만드는 역할을 한다. 수정진동소자 자체의 주파수는 일정한 전기적신호로 표현되는데 이 신호를 증폭해주는 증폭회로를 제작한다. 이는 자체적으로 매우 민감하므로 제작시 세심한 주의가 요구된다. 증폭된 전기신호의 안정여부를 확인하기 위해 오실로스코프를 QCM 시스템에 연결한다. 오실로스코프(oscilloscope)상에 나타나는 신호의 떨림여부는 면역센서의 안정성과 밀접한 관계가 있다. 오실로스코프상에 나타난 신호는 analog신호로서 이는 주파수 카운터(frequency counter)에 의해 digital화 되어 수치로 나타나게 된다. 이는 오실로스코프상에 검출되지 않은 noise를 확인할 수 있게 해주며 최종적인 주파수를 출력해준다. 주파수 카운터상에 나타난 수치를 GPIB(General Purpose Interface Bus) 보드를 이용하여 개인용 컴퓨터에 연결시켜서 실험결과를 파일로 저장하고, 또 이를 프린터를 통해 출력시키는 장치를 만든다. 이를 위해서 개인용 컴퓨터 상에 전산 언어인 C 언어를 사용하여 program을 작성한다.

나. 항체의 고정화를 위한 박막 제조

수정진동소자의 한면은 sealing되고 다른 한면에 LDL에 특이성을 보이는 항체를 고정화해야 하는데 이를 위해서는 금전극과 항체사이를 연결시켜주는 박막이 필요하다. 이에 polyethylenimine³이 가장 많이 쓰이고 있고, 때로는 aminopropyltriethoxysilane(APTES)이나 nyabar C, protein A가 이용되기도 한다. 보고된 방법들중에서 항체를 고정화하는데 가장 효율적인 방법을 선택하고 이에 대한 최적조건을 확립한다.

다. 항원-항체 반응의 최적화

QCM을 이용한 측정방법은 먼저 크게 기체상체로 측정하는 방법과, 액체상태로 측정하는 방법이 있는데, 기체 상태의 경우 반응기내에 넣은 시료를 제거하고 완전히 말린 후 주파수를 측정함으로써 항원의 농도를 측정하는 방법으로서, 액체 상태에 비해 더욱 안정된 신호를 얻을 수 있다는 장점은 있으나 항원항체반응 후 시료를 제거한 후에야 항원의 농도를 측정할 수 있기때문에 측정속도가 느리다는 단점이 있다. 반면에 액체 상태에서 측정하는 경우 항원이 포함된 시료

를 반응기에 넣은 후 이를 제거할 필요가 없이 바로 항원의 농도를 측정할 수 있기 때문에 측정 속도가 빠르고 그 조작이 간편하다는 장점이 있으나 기체에 비해 신호(주파수)가 불안정하며 현재까지는 액체상태에서의 QCM 시스템에 대한 이론적인 근거가 불충분하며, 앞으로의 높은 응용 가능성에도 불구하고 많은 연구가 진행되지 않은 상태이다.

라. 항원항체 복합체로부터 항원의 제거

면역센서를 재사용(reuse)하기 위해서는 항원과 결합한 항체를 효과적으로 제거하여야 하는데, 8M urea, 0.2M glycine-HCL(pH2.8), 0.2M ethanolamine(pH8.0)등에 의한 방법들이 언급되어 있으며, 이 중 항체의 활성을 약화시키지 않는 범위안에서 가장 효율적으로 항원을 제거할 수 있는 방법을 찾고 이에 대한 최적조건을 확립한다.

마. 간섭현상의 최소화

QCM 시스템을 이용한 면역센서의 경우, 항원항체가 갖는 특이성에 의해 간섭현상이 전기화학식 등에 비해 적은 것이 사실이나 비특이적인 결합에 의한 간섭현상이 있을 수 있다. 문헌 조사를 통해 이를 극복할 수 있는 방법을 모색한다.

바. 자동측정시스템 개발

액체상태의 시료를 QCM 시스템을 이용하여 측정할 경우 측정의 신속, 정확성 및 재현성을 위해서는 시료의 주입과 세척 등이 자동적으로 이루어져야 한다. 이를 위해 소형 pump와 valve를 이용하여 개인용컴퓨터로 조정되는 자동측정시스템을 개발한다.

2. 결과 및 고찰

위에서 언급한 여러가지 질병들의 판단근거가 될 수 있는 LDL을 측정대상물질로 삼아서 이를 가장 간단하고, 민감하며, 경제적으로 측정할 수 있는 면역 바이오센서를 개발하였다.

가. QCM 시스템의 개발

본 연구에서는 다음과 같은 구성요소로 이루어진 QCM 시스템을 개발하였다

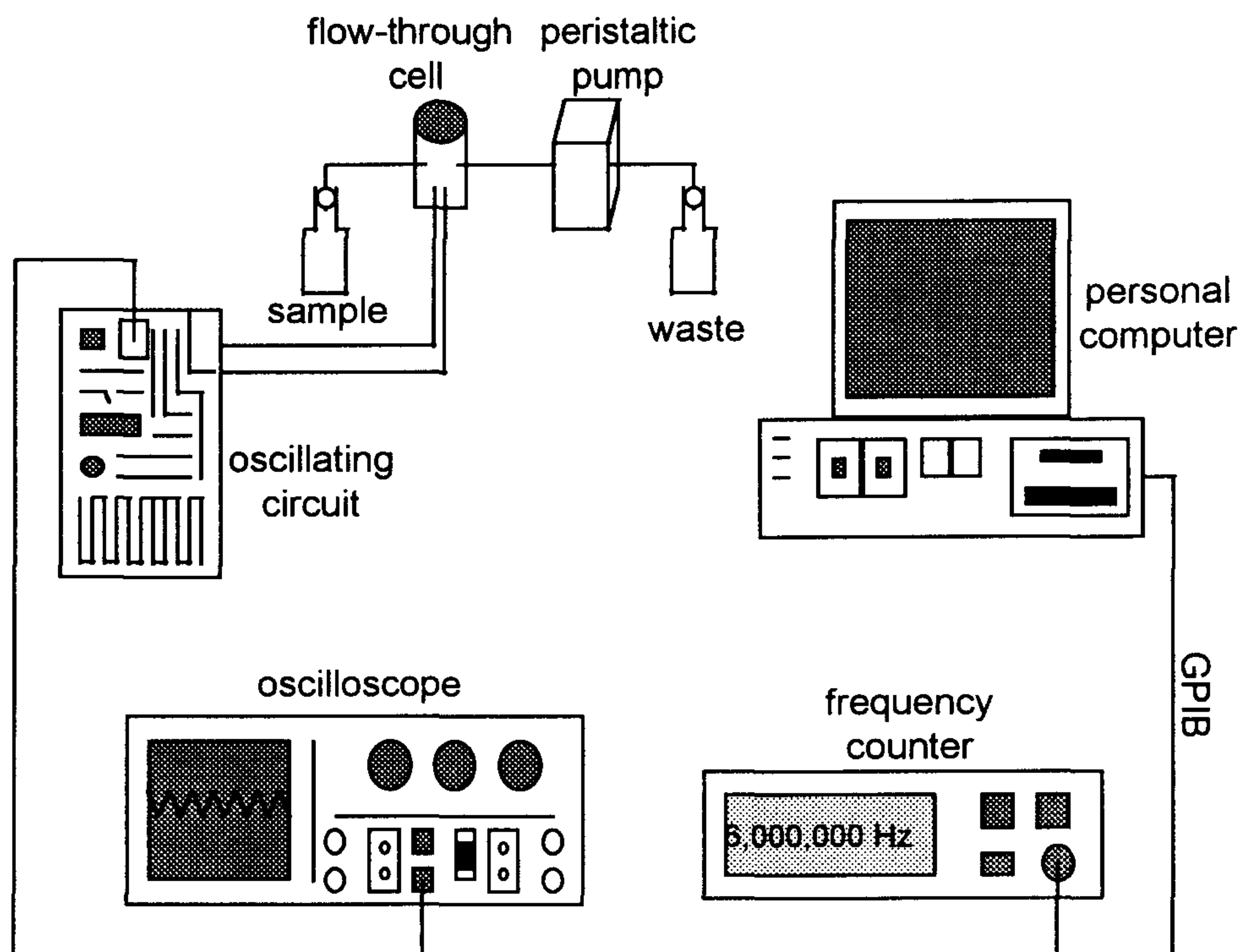


Figure 1. Schematic diagram of QCM system

Flow-through cell 내에는 quartz crystal 이 고정되어 있고, 이에는 oscillating circuit 이 연결되어 quartz crystal 의 공진주파수를 측정하고 증폭시킨다. 이에 oscilloscope 가 연결되어 회로의 안정성을 확인하며, oscilloscope 에 frequency counter 가 연결되어 quartz crystal 의 공진주파수를 digital 화 한다. Frequency counter 는 GPIB 를 이용하여 personal computer 에 interfacing 된다(Figure 1).

나. 항체의 고정화

Quartz crystal 의 금전극위에 항체를 고정화시키는 여러 방법들이 개발되었고, 이 중에서 가장 효율적인 고정화 방법을 찾기 위해 대표적인 3가지 방법 즉, physical adsorption 을 이용하여 금전극위에 직접 항체를 고정화시키는 방법, polyethylenimine(PEI) 을 이용하여 항체를 고정화시키는 방법, protein A 가 항체에 가진 결합친화력을 이용하여 항체를 고정화시키는 방법을 선택하였고, 이에 각각 LDL 농도에 대한 주파수변화량을 비교하였다(Figure 2). 이는 두 번의 반복 측정 후 이를 평균낸 결과이며, PEI 방법과 protein A 방법이 직접적 흡착 방법보다 민감도(sensitivity)가 높은 것으로 나타났고, PEI 방법과 protein A 방법간에는 민감도(sensitivity)가 거의 비슷한 것으로 나타났다.

다. 항원-항체 반응의 최적화

액체 상태에서 항원-항체 반응 역가를 실시간으로 측정하기위해 FIA 시스템을 도입하였고 이에 대한 조건을 확립하였다.

항 목	조 건
cell 부피	180 μ l
시료 주입량	200 μ l
유 속	62 μ l/min.
tubing 내경	0.8 mm

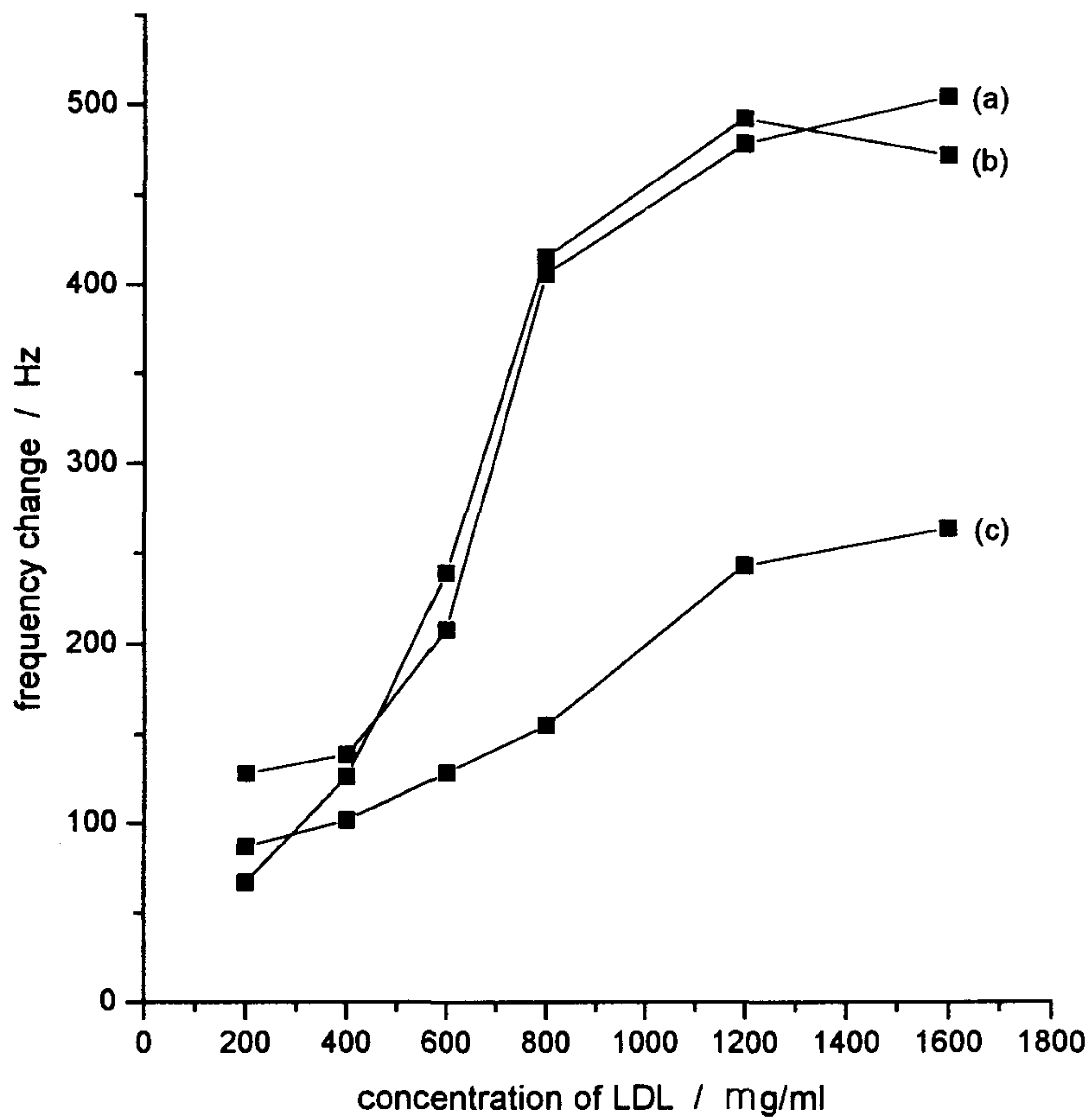


Figure 2. Comparison of immobilization methods in terms of sensitivity ; (a) Protein A method, (b) polyethylenimine(PEI) method, (c) direct adsorption method

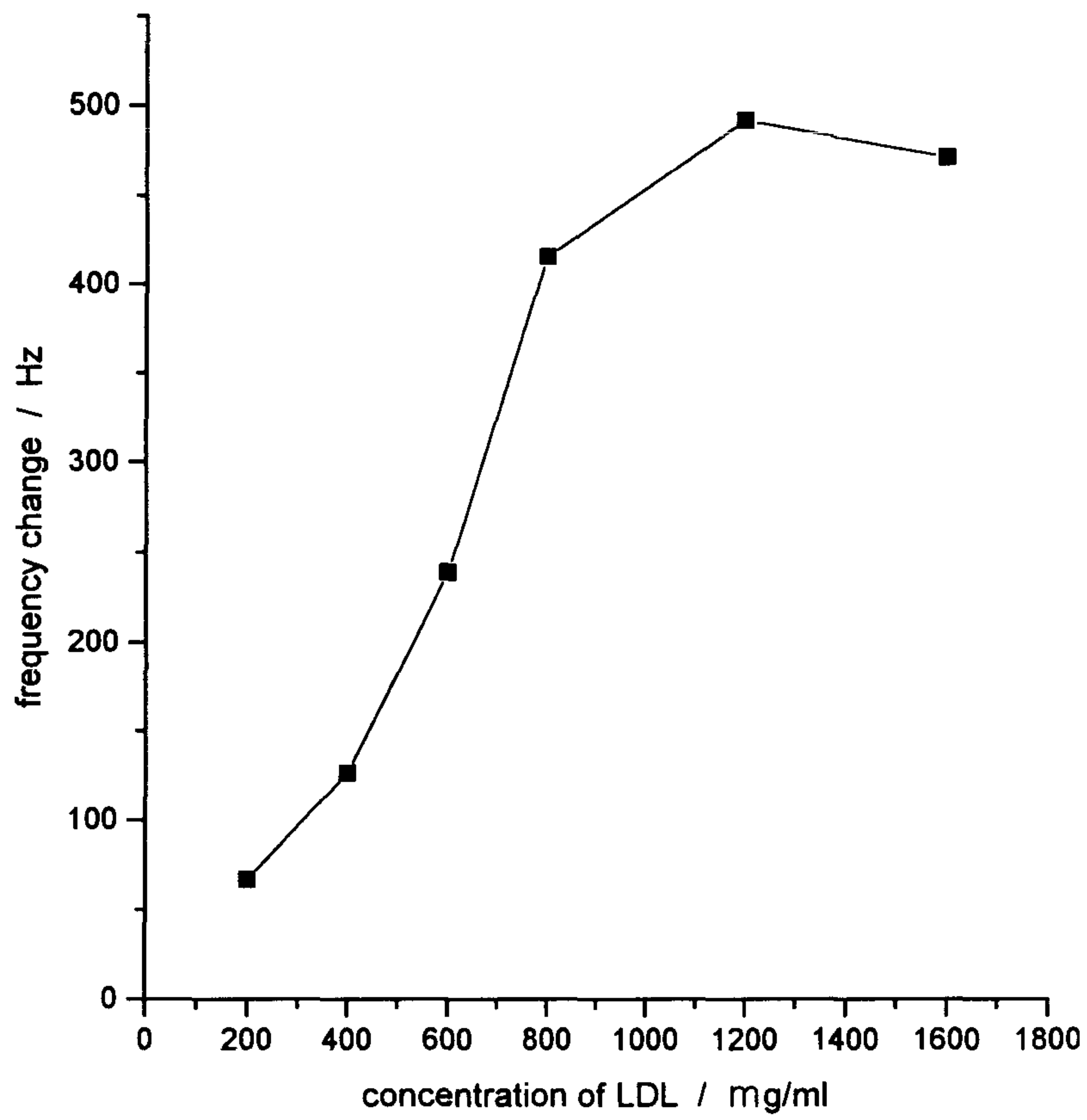


Figure 3. LDL calibration curve

라. LDL calibration curve

polyethylenimine 방법을 이용하여 항체를 고정화시킨 후 LDL 에 대하여 calibration curve를 잡아보았다(Figure 3). 200 - 800 $\mu\text{g/ml}$ 에서 직선영역이었고, 1200 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 saturation 되었다.

마. 항원항체 복합체로부터 항원의 제거

면역센서를 재사용(reuse)하기 위해서는 항원과 결합한 항체를 효과적으로 제거하여야 하는데, 8M urea, 0.2M glycine-HCL(pH2.8), 0.2M ethanolamine(pH8.0)등에 의한 방법들이 언급되어 있으나, 이 중 항체의 활성을 약화시키지 않는 범위안에서 가장 효율적으로 항원을 제거할 수 있는 방법은 0.2 M glycine(pH2.8)이 가장 우수한 것으로 나타났다.

바. 간섭현상의 최소화

QCM 시스템을 이용한 면역센서의 경우, 항원항체가 갖는 특이성에 의해 간섭현상이 전기화학식 등에 비해 적은 것이 사실이나 비특이적인 결합에 의한 간섭현상이 있을 수 있다. 이를 극복하기 위한 방법으로 LDL에 대한 단일클론 항체를 사용하였고, 0.1M glycine(in 20 mM phosphate-buffered saline, pH 7.0) 용액을 처리함으로써 간섭현상을 최소화하였다.

사. 자동측정시스템 개발

액체상태의 시료를 QCM 시스템을 이용하여 측정할 경우 측정의 신속, 정확성 및 재현성을 위해서는 시료의 주입과 세척 등이 자동적으로 이루어져야 한다. 이를 위해 소형 pump와 valve를 이용하여 개인용컴퓨터로 조정되는 자동측정시스템을 개발하였다.

제 3 절. 백신 및 외래단백질 생산에 관한 산소분압의 효과

1. 연구개발 수행내용

본 연구에서는 동물세포 배양을 통해 획득할수 있는 고부가가치 산물인 Vaccine 및 Recombinant protein 생산을 위해 다음과 같은 범위의 내용과 방법으로 연구를 하였다.

- 가. 다공성 젤라틴 미립담체인 K-bead, 담체 Cytodex-3, T-25 조직배양용 플라스크를 이용할 때 동물세포 Vero(African Green Monkey Kidney cell)의 증식을 관찰했고 이를 숙주 세포로 Vesicular Stomatitis Virus(VSV)를 생산할 때에 spinner flask 그리고 1L 동물세포 반응기, 각각 수준에서 산소분압이 바이러스의 생산에 미치는 영향을 조사하였다.
- 나. 다공성 젤라틴 미립담체, 담체 Cytodex-3, T-25 조직배양 플라스크를 이용할 때 동물세포인 Chicken Embryo Fibroblast(CEF)의 증식을 관찰했고 이를 숙주세포로 Newcastle disease virus(NDV)를 생산할 때에 T-25 조직배양 플라스크 수준에서 산소분압이 바이러스의 생산에 미치는 영향을 조사하였다.
- 다. 동물세포 Vero를 숙주세포로 Recombinant protein 생산에 널리 이용되고 있는 Vaccinia virus를 생산할 때에 T-25 조직배양 플라스크에서 산소분압이 바이러스 생산에 미치는 영향을 조사하였다.
- 라. 산소에 의해 생성되는 유해 라디칼의 제거를 위해 ascorbic acid 를 첨가하여 그효과를 관찰하고 또한 EDTA가 바이러스에 감염에 미치는 영향도 조사하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 산소분압이 바이러스 생산에 미치는 효과

(1) 바이러스 생산 시스템

최근 부착성 동물세포의 대량생산에서 바이러스나 외부단백질의 대량생산에 제래의 Roller bottle 이나 조직배양용 플라스크보다 미립담체를 더욱 많이 이용하고 있는 추세이다. 이것은 이들 Roller bottle 이나 조직배양용 플라스크에서의 배양이 까다롭고 고가이며 오염의 위험이 있음에 기인한다. 이에 미립담체는 바이러스와 외부단백질의 대량생산에 널리 이용되고 있는데 종래의 미립담체가 갖는 낮은 표면적/부피 비율을 극복하기 위해 본 실험실에서 개발한 다공성 젤라틴 미립담체 (일명 K-bead) 를 이용하여 다음 바이러스들의 대량생산 시스템은 구축하고자 한다.

(2) Vero/Vesicular stomatitis virus (VSV) 시스템에서 산소분압의 효과

(가) Vesicular stomatitis virus

Vesicular stomatitis virus(VSV) 는 소, 말, 돼지등의 가축에 전염되는 급성질환의 병원균이다¹. 임상적으로 VSV는 아구창 (Foot and Mouth disease)와 유사하나 족부나 구부에 수포가 발견되는 경우가 드물며 소에 경우 유두에 상처를 유발하고 우유생산량을 급격히 저하시킨다. 인체에 감염이 되었을 경우 인플루엔자와 유사한 증상을 일으키므로 이 바이러스를 이용한 백신 생산은 축산업 상으로나 인체 보건상 크게 요구되는 것이다.

(나) 다양한 담체에서의 바이러스 생산

VSV 생산을 위하여 숙주세포로 적합한 Vero세포를 T-25 조직배양 플라스크와 K-bead, Cytodex-3 의 미립담체를 이용했다. T-25 조직배양 플라스크에서는 10ml 의 배지에서 배양했으며 미립담체의 경우 60rpm으로 도는 250ml spinner에서 100ml 배지에서 배양을 시켰다. 양쪽모두 5% CO₂ incubator에서 배양을 시켰다. 배양 6일째 0.1 MOI의 VSV를 Vero cell에 접종을 하였고 pH는 7.2에서 유지시켰다. 이때 K-beads가 가장 높은 바이러스 생산량(5.7×10^{13})을 보였다. (Figure 1 참조)

(다) 산소분압이 바이러스 생산에 미치는 영향

K-beads 를 이용한 spinner 배양에서 배양 6일째 배양기들의 산소분압을 1%, 5%, 10%,15%, 21% 각기 다르게 하였다. 그리고 0.1 MOI 의 virus titre 를 1시간후 접종한후 배양하였다. 최종 바이러스 생산량 (최대량)중 10%의 산소분압에서 배양된 샘플이 가장 높은 virus 생산량을 나타내었다. 산소분압이 10% 일때 바이러스 수는 control인 21%(공기중 산소 분압)에 비해 130배 높은 차이를 나타내었다. (Figure 2, Table 1 참조)

(라) 1L 동물세포반응기에서의 바이러스 생산과 산소가 이에 미치는 영향

바이러스 생산을 위해 control 이 가능한 반응기를 이용하였다. 용존산소를 30%로 맞추기 위해 공기,질소,산소, 이산화탄소 혼합가스를 용기내에 주입시켰다. pH 는 6.9 - 7.4 사이로 보정시켰다. 바이러스의 생산량은 21%의 산소분압일때 1×10^{14} pfu/ml 이었고, 10% 에서 4×10^{15} pfu/ml로 나타났다.(Figure 3, table 2 참조)

(3) Chicken embyo fibroblast(CEF)/Newcastle disease virus(NDV) 시스템에서 산소분압의 효과

(가) Newcastle disease virus

Newcastle disease 는 가금류에 전염되는 전염성이 높은 가축병으로 Paramyxovirus 계의 Newcastle disease virus 가 병원균이다². 닭, 칠면조, 꿩에 주로 감염되며, 오리, 거위, 비둘기에도 전염 가능한 것으로 보고되고 있다. 전염경로는 호흡기나 오염된 음식의 섭취로 알려져 있으며 증상으로는 식욕부진, 설사, 호흡곤란, 타액 분비로 나타난다. NDV로인 한 농가가축 피해를 막기 위해 동물세포 배양을 이용한 백신 생산이 시급하다.

(나) 다양한 담체에서 Chicken embryo fibroblast(CEF)의 배양 및 바이러스 생산

CEF는 10일된 닭의 수정란에서 채취한 1차세포(primary cells)로 NDV의 적합한 숙주로 알려져 있다. Cytodex-3 와 변형된 K-beads, T-25 조직배양용 플라스크에서 배양하였는데 여기서 변형된 K-beads는 담체표면에 양이온기 (DEAE-CH₃HCl)를 붙여 세포의 부착성과 밀집성을 높인 것이다. CEF배양 1일 만에 0.1 MOI의 바이러스(NDV)를 접종하고 3일간 지속 배양하였다(Figure 4). 그 결과 table 3과 같이 변형된 K-beads가 최고의 바이러스 생산량(2.1×10^{10} pfu/ml)을 기록할 수가 있었다.

(다) 산소분압이 NDV에 미치는 영향

CEF/NDV system에서 산소분압영향에 대한 연구는 Vero/VSV system 의 결과를 토대로 진행되었다. T-25 조직배양플라스크에서 세포밀도가 1.2×10^6 cell/ml 에 달했을 때 배양기를 각기 다른 산소분압의 조건으로 설정하고 1시간 후 0.1 MOI 의 virus titre로 접종하였다. 각 조건에 따른 바이러스 최종 생산량은 table 4 와 같다. 그런데 산소분압 10% 경우 Vero/VSV 만큼 영향을 주지 못하는 것을 볼 수가 있는데, 산소 분압이 낮을수록 바이러스 생산이 오히려 저하되는 것을 볼 수 있었다. 산소분압차이에 따라 NDV 생산에 차이를 비교하기 위해 NDV를 Vero세포에도 감염시켜보았다. table 5 에 보는 바와 같이 이 경우 control인 21%의 산소분압에 비해 산소분압이 1%의 조건에서 최종 생산량이 20배가 증가하였다.

(4) Vero/Vaccinia 시스템에서 산소분압의 효과

Vaccinia 바이러스는 천연두백신으로 전통적으로 이용되온 바이러스이며 진핵세포에서 유전자발현에 널리 이용되는 vector이기도 하다. 다양한 산소 분압조건에서 T-25 조직배양용 플라스크에서 배양한 Vero 세포에 1.0 MOI로 감염시켰을 때, table 6에서 보는 바와 같이 산소 분압이 10%와 1%에서 바이러스의 수가 높은 것으로 볼 수 있었다. 상기 모든 결과를 종합해볼 때 Vero cell

은 산소에 CEF보다 더 민감함을 알수 있으며 배양시 생성되는 superoxide 이온이 바이러스의 활성화와 생산에 영향을 주는것으로 추론된다.

나. 바이러스 생산에 Ascorbic acid 가 미치는 영향

이상의 연구결과를 고려할때 바이러스 접종후 숙주세포내에서 superoxide 이온 등의 라디칼들이 생성되어 바이러스의 생성 및 불활성에 영향을 미치는것으로 판단되므로 현재 효과적인 환원제를 이용한 라디칼의 제거가 필요하다.

산소 라디칼은 생체내의 다양한 효소에의해 산소가 물로 전환되는 산화환원과정중에 생성되는 활성 부산물이다. 여기에 작용하는 다양한 효소로는 oxidase, superoxide dismutase, catalase 그리고 cytochrome oxidase등이 있다³. 일반적으로 미토콘드리아 내에서 한분자의 산소가 두분자의 물로 바뀌는에는 4개의 전자가 요구되는데 이러한 산소의 완전환원은 생체내에 매우중요한 의미를 갖는다. 한개의 전자에 의해 환원된 산소는 superoxide 라디칼인 O_2^- 을 생성하며 두개의 전자에 의한 부분환원은 hydrogen peroxide 라는 매우 반응성이 크고 파괴적인 분자를 만들게 되는데 이 분자들은 생체내에서 강한 독성물질로 작용하기 때문이다⁴. 이들 라디칼들은 생체의 DNA, RNA, 그리고 단백질을 파괴하던가 구조를 변성시키며 이로 인해 생 합성과정의 억제되기도 한다. 따라서 이는 바이러스의 생산에 또한 영향을 줄 수 있다. 바이러스의 생장은 anoxic state의 증가 또는 산소분압의 저하로 증가될 수 있다는 보고가 있는데 이와 같은 사실은 라디칼 생성과 밀접한 연관이 있음을 추론할 수 있다⁵⁻¹¹. 본 연구에서는 이러한 산소분압에 따른 라디칼의 생성 그리고 이로 인한 바이러스 생장의 영향을 알아보기 위해 강력한 환원제인 Ascorbic acid를 이용하였다. Ascorbic acid는 T-25에서 바이러스의 감염 전에 0.1 에서 1.0 mM의 농도로 첨가되었다. Vero / VSV 시스템에서 ascorbic acid 첨가시 최대의 virus titer가 첨가하지 않은 경우에 비해 100배 가량 증가하는 모습을 보였다. (Table 7 참조) 이에 비교해 볼 때 CEF / NDV 시스템의 경우에는 큰 차이가 없음으로 나타났다. 이와 같은 결과로 미루어 볼 때 세포내의 superoxide는 바이러스 생산 저해와 바이러스 번식 억제역할을 하는 것으로 다시 한번 확인 할 수 있다.

다. EDTA가 바이러스의 감염에 미치는 영향

EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid)는 착화합물을 형성하는 분자로 일반적으로 Ca^{2+} , Mg^{2+} 와 같은 2가 양이온의 금속이온에 작용한다¹. 세포와 바이러스의 표면은 음이온으로 덮여있는데 이론적으로 금속성 양이온은 음전하를 막아 세포와 바이러스의 접촉을 증진시키는 것으로 알려져 있는데 EDTA에 의한 작용은 오히려 숙주세포에 대한 바이러스의 감염을 저해할 수도 있음에도 불구하고 본 실험의 결과는 오히려 EDTA의 첨가에 의해 바이러스의 감염이 증가됨을 볼 수 있었다. (Table 8 참조) 또한 첨가되는 EDTA의 농도를 증가시킬수록 더욱 높은 바이러스 생산을 보였다. (Table 9 참조) 이는 EDTA가 종래에 알려지지 않은 새로운 방식으로의 작용으로 바이러스의 감염을 상승시킨 것으로 볼 수 있었다.

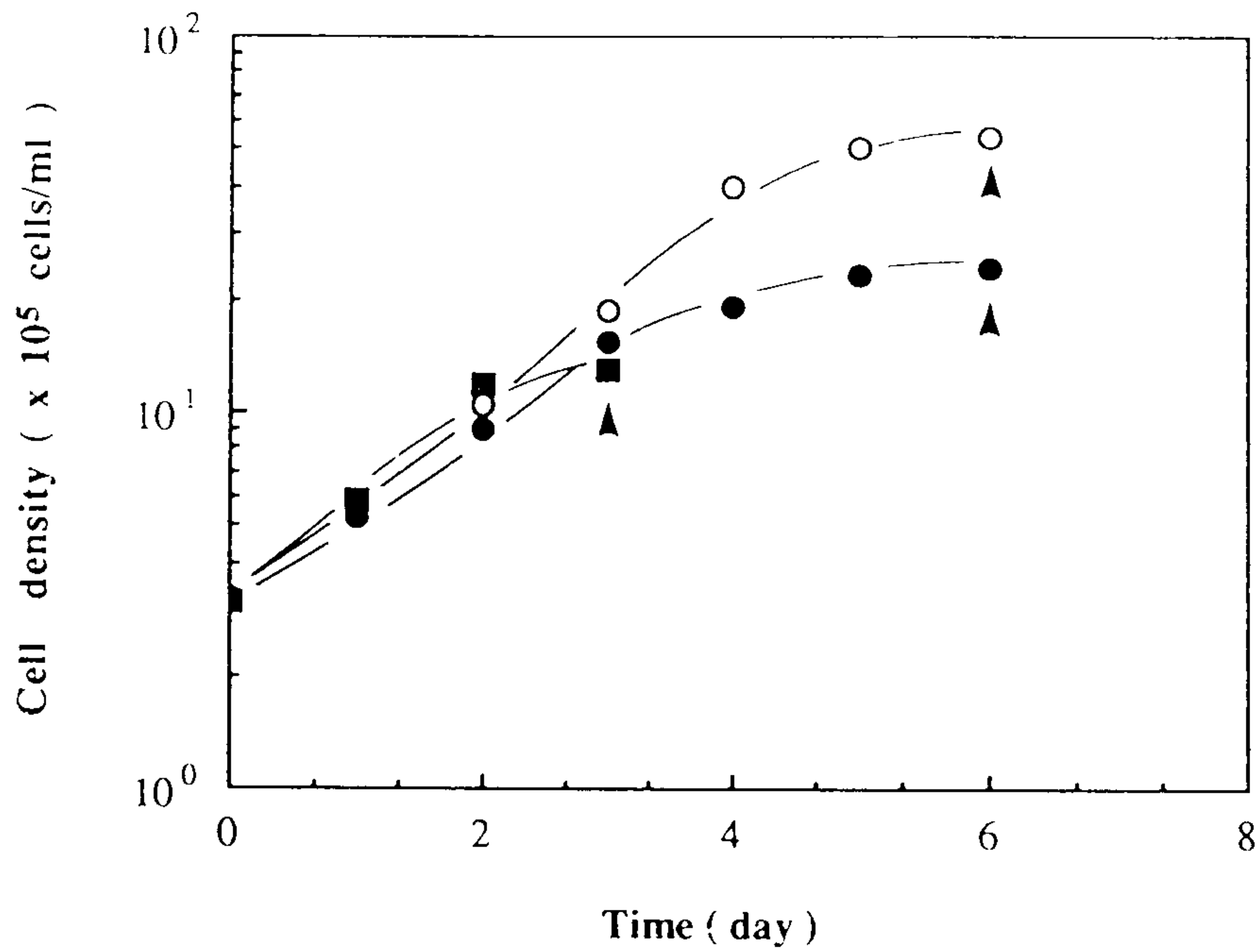


Figure 1. Growth kinetics of Vero cells on various matrices. Viruses were infected at late exponential phase (▲). Symbols are as follow: cells on macroporous gelatin microcarriers (○), cells on Cytodex - 3 (●), cells on tissue culture flasks (25 cm²) (■).

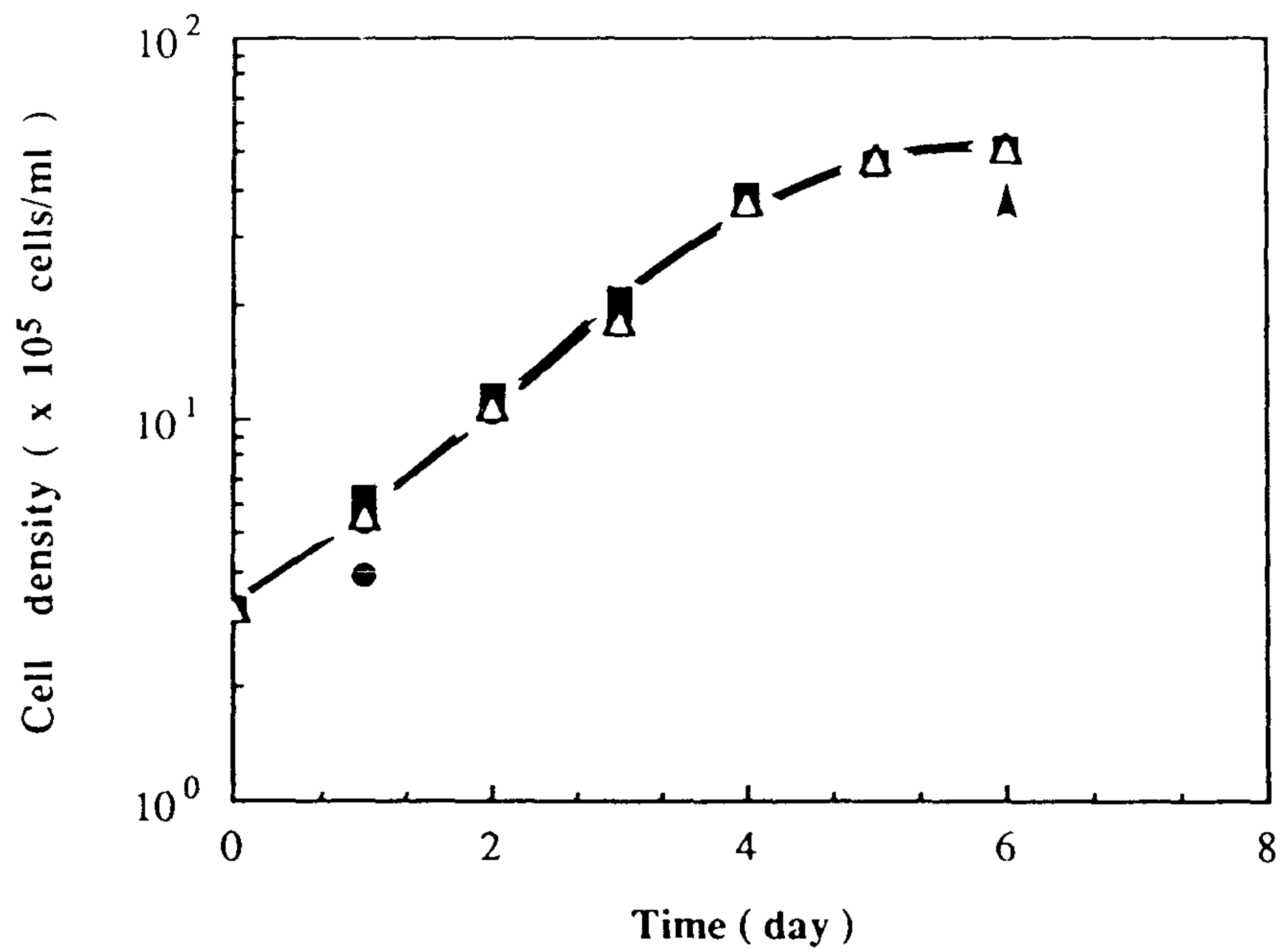


Figure 2. Growth kinetics of Vero cells on macroporous gelatin microcarriers. Each O₂ partial pressure in chamber was fixed at 1 (○), 5 (□), 10 (●), 15 (■), and 21 % (Δ) just before VSV infection (▲).

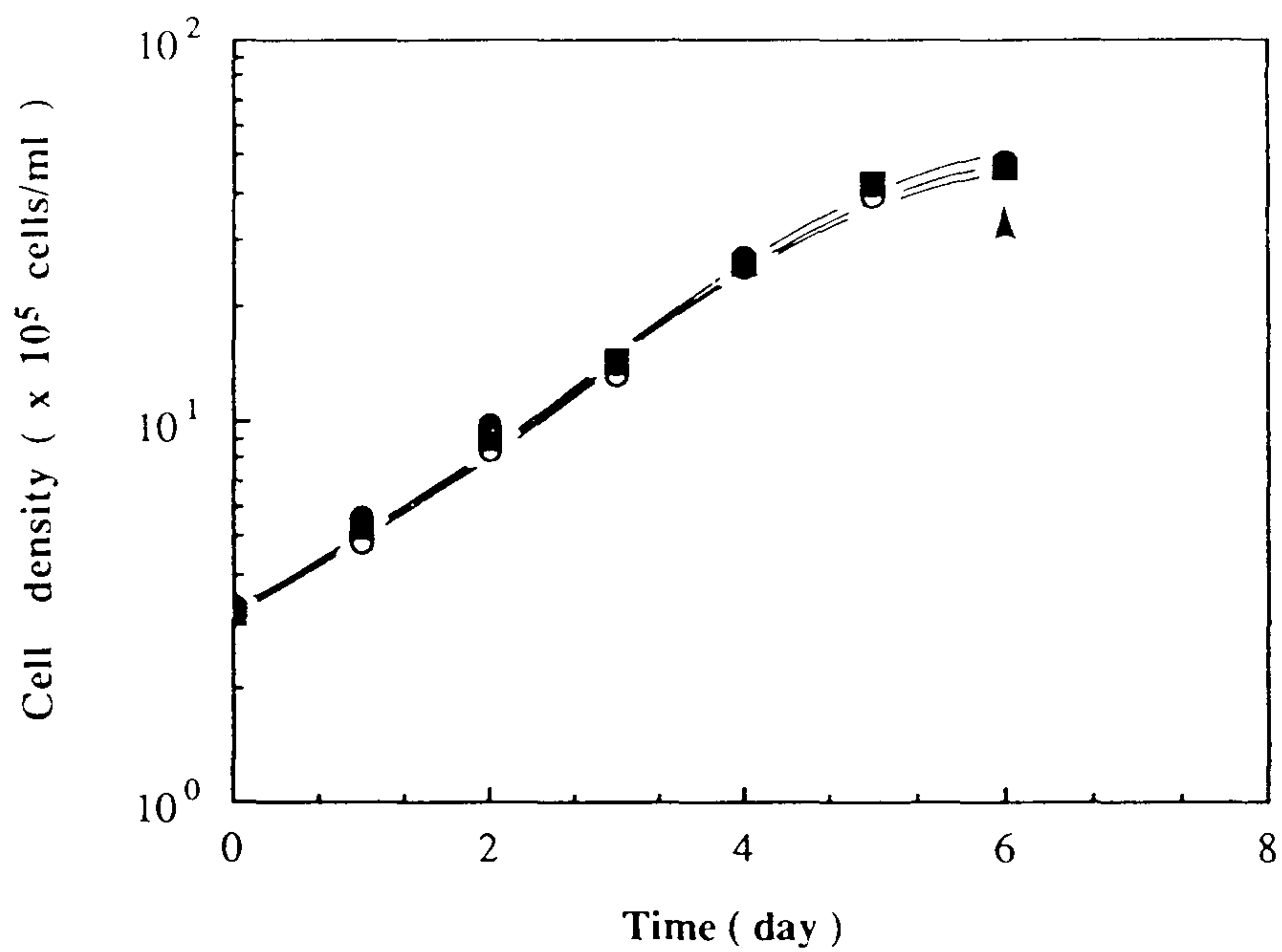


Figure 3. Growth kinetics of Vero cells in 1 l bioreactor. Each O₂ partial pressure in bioreactor was fixed at 10 (○) and 21 % (■) just before VSV infection (▲), also, 30 % of dissolved oxygen was maintained during overall culture (●).

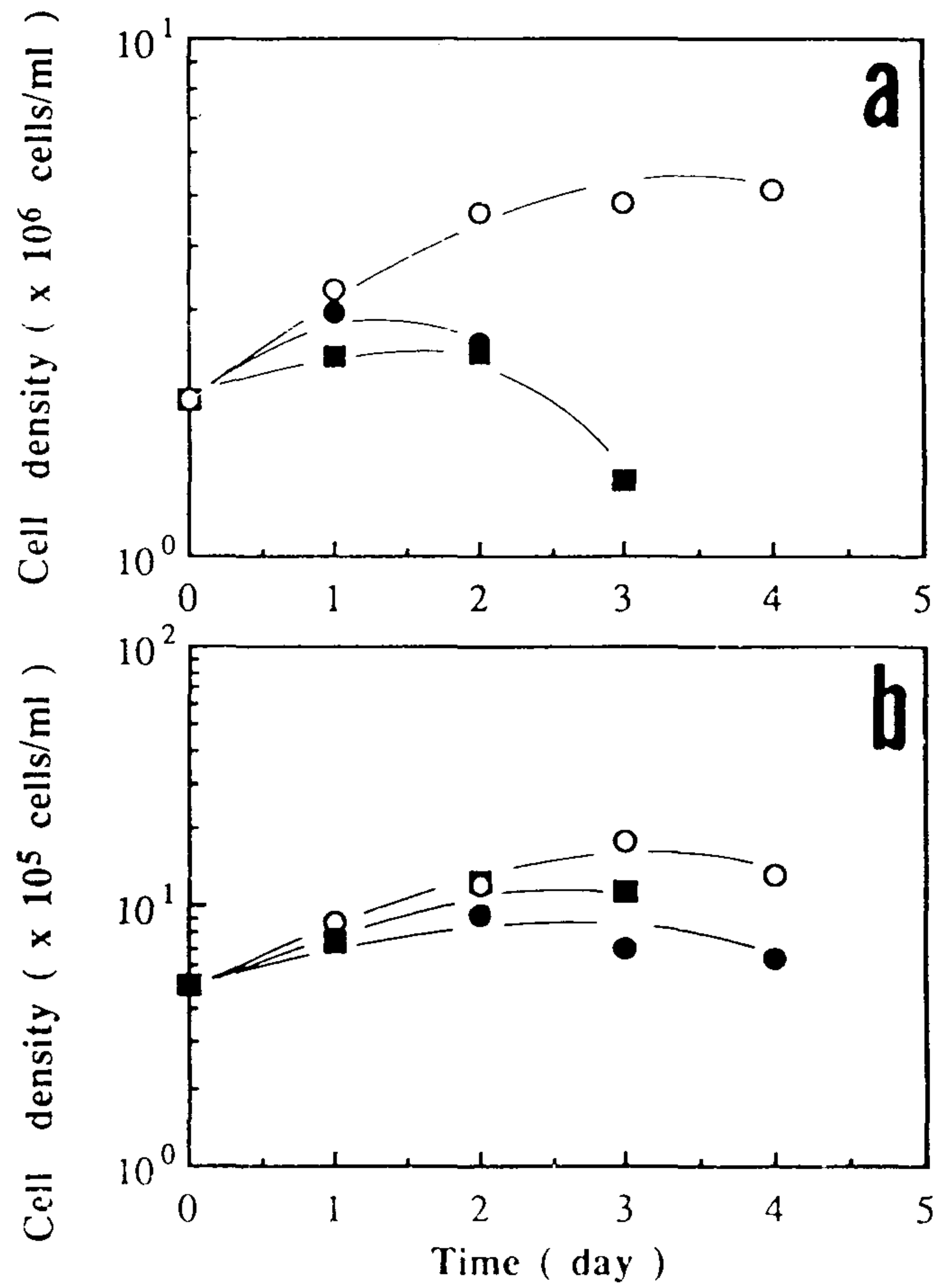


Figure 4. Growth kinetics of CEF cells on various matrices. Each 2×10^6 cells/ml (a) and 5×10^5 cells/ml (b) was inoculated in vessels. Symbols are as follow ; cells on macroporous gelatin microcarriers (○), cells on Cytodex - 3 (●), cells on tissue culture flasks (25 cm^2) (■).

Table 1. The effect of O₂ partial pressure on VSV production on Vero cells.

O ₂ partial pressure	Virus titer	
	(x10 ¹³ pfu/ml)	(x10 ¹³ pfu/10 ⁶ cells)
1	2.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1
5	260 ± 80	51.0 ± 15.7
10	780 ± 100	152.9 ± 19.6
15	91 ± 7.0	17.8 ± 1.4
21	6.0 ± 0.9	1.18 ± 0.2

Table 2. The effect of O₂ partial pressure on VSV production in Vero cells.

O ₂ partial pressure(%)	Virus titre	
	(x10 ¹³ pfu/ml)	(x10 ¹³ pfu/10 ⁶ cells)
10(0%)	400 ± 8.0	85.1 ± 1.7
21(3 - 5%)	11 ± 0.5	2.3 ± 0.1
(30%)	0.8 ± 0.1	0.2 ± 0.0

* () indicate the dissolved O₂ concentration in 1L reactor.

Table 3. The NDV production in CEF cells on various matrices

Matrices	Virus	
	(x10 ⁸ pfu/ml)	(x10 ⁸ pfu/10 ⁶)
Tissue culture flask(25cm ²)	7 ± 0.3	3.0 ± 0.1
Cytodex-3	57 ± 2.0	19 ± 0.7
Macroporous gelatin	210 ± 50	44.7 ± 10.6

Table 4. The effects of O₂ partial pressure on NDV production in CEF cells.

O ₂ partial pressure(%)	Virus titre	
	(x10 ⁷ pfu/ml)	(x10 ⁷ pfu/10 ⁶)
1	2.4 ± 0.6	2 ± 0.2
5	0.8 ± 0.0	0.7 ± 0.0
10	60 ± 5.0	50 ± 4.2
21	64 ± 2.0	53.3 ± 1.7

Table 5. The effects of O₂ partial pressure on NDV production in Vero cells

O ₂ partial pressure (%)	Virus titre	
	(x10 ⁸ pfu/ml)	(x10 ⁸ pfu/10 ⁶ cells)
1	94 ± 3.0	62.7 ± 2.0
5	7.3 ± 0.8	4.9 ± 0.5
10	5.5 ± 0.5	3.3 ± 0.3
21	5.1 ± 0.3	3.4 ± 0.2

Table 6. The effects of O₂ partial pressure on Vaccinia virus production in Vero cells

O ₂ partial pressure(%)	Virus titre	
	(x10 ⁹ pfu/ml)	(x10 ⁹ pfu/10 ⁶ cells)
1	260 ± 15	173 ± 10
10	290 ± 90	193 ± 60
21	1.7 ± 0.2	1.1 ± 0.1

Table 7. The effect of ascorbic acid on virus production

Cell / Virus	Concentration	Virus titer	
		(x 10 ¹³ pfu / ml)	(x 10 ¹³ pfu / 10 ⁶ cells)
Vero / VSV	0.0	1.4 ± 0.2	1.1 ± 0.2
	0.1	112 ± 8.0	86.2 ± 6.2
	0.5	200 ± 12.0	153.8 ± 9.2
	1.0	160 ± 6.0	123 ± 4.6
		(x 10 ⁸ pfu / ml)	(x 10 ⁸ pfu / 10 ⁶ cells)
CEF / NDV	0.0	6.4 ± 0.7	5.3 ± 0.6
	0.1	4.9 ± 0.5	4.1 ± 0.4
	0.5	5.4 ± 0.6	4.5 ± 0.5
	1.0	6.2 ± 0.5	5.2 ± 0.4

*Cells were grown in tissue culture flask (25 cm²)

*Ascorbic acid was added to the flask at set value before virus infection.

Table 8. Effect of EDTA addition on virus propagation in microcarrier culture with macroporous microcarrier

Concentration (mM)	Virus titre (pfu / ml)		
	Day 1	Day 2	Day 3
0	3.2 x 10 ⁸	2.8 x 10 ¹⁰	3.0 x 10 ¹⁰
0.1	1.6 x 10 ¹⁰	4.8 x 10 ¹⁰	2.4 x 10 ¹¹

Table 9. Effect of EDTA addition on virus propagation in static culture

Concentration (mM)	Virus titre after 3 days (pfu / ml)
0	3.2×10^8
0.1	4.0×10^8
0.5	1.3×10^9
1	6.5×10^{10}
5	5.0×10^{10}
10	2.0×10^{10}

* The final cell density(Vero) was 1.1×10^6 cells/ml for NDV infection.

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외여도

제 1 절.

제 1차 및 2차 년도를 통하여 동물 세포를 이용한 단일클론항체 생산을 위한 기초 실험 및 예비 실험을 거쳐 HBV의 preS2 표면 항체에 대한 효율적인 단일클론항체의 발현 벡터를 구축하였다. 3차 년도에서는 이러한 발현벡터를 재조합 단백질 생산에 가장 많이 이용되는 host인 CHO cell 에 lipofection 방법을 이용하여 co-transfection 하였고 neo/dhfr double phenotype를 ribonucleosides와 deoxyribonucleosides가 없는 α -MEM 배지에서 selection 하는데 성공하였다. 현재 parental cell을 단계적으로 높여준 MTX 농도에 adaptation시킴으로써 항체 유전자를 증폭하는 과정에 있다. 초기 adaptation 과정에서 예상 밖으로 오랜 기간이 걸림으로써 당해 년도에 후반기 목표인 선발된 세포주의 안정성 조사는 아직 실시하지 못하고 있다.

국내의 경우 유전자 증폭을 이용한 재조합 단백질의 상업적 생산은 아직 초보단계에 있다. CHO cell을 이용한 재조합 항체 생산 기술은 키메라 항체의 immunogenecity를 개선한 인간화된 항체 (humanized antibody) 생산뿐만 아니라 다른 치료용 재조합 단백질의 합성에 기초가 될 것이다.

제 2 절.

LDL에 특이적인 항체를 이용하여 LDL 측정용 QCM 면역센서를 개발하고자 하였고, 개발된 QCM 면역센서의 경우 높은 민감도와 기질 특이성, 빠른 응답시간 등의 장점을 가짐으로써 상용화에 바로 이용될 수 있는 단계에까지 와있다. 따라서, 본 연구에 있어 개발목표가 충분히 달성되었다고 사료된다.

미국을 비롯한 독일, 스웨덴, 일본 등지에서는 바이오센서의 필요성을 절감하고 이의 개발에 많은 투자를 하고 있고, 연재 급격히 발전하고 있다. 바이오센서 세계시장은 해마다 증가하고 있으며, 오는 2000년까지 약 110억 달러 정도로 확대될 전망이다. 현재 바이오센서로 측정할 수 있는 측정대상물질은 매우 많이 알려져 있지만 상용화된 것은 매우 적은 실정이며, 국내의 경우, 바이오센서의 연구가 거의 이루어지지 않고 있다. 이러한 시점에서 본 연구에 의한 LDL 측정용 QCM 면역센서의 개발은 국내 바이오센서의 연구에 촉진제 역할을 하고, 국내 바이오센서 시

장을 개척하는 데 선구적인 역할을 할 것으로 기대된다.

제 3 절.

1. 연구개발목표 달성도

가. 산소분압이 바이러스 생산에 미치는 영향

(1) 산소분압이 10%일 때 VSV titre는 21%의 산소조건에 비해 100 - 120 배까지 증가했다.

(2) 1L 동물세포반응기에서 21%의 산소분압조건에서 1×10^{14} pfu/ml을 기록하였다. 용존산소를 controlling 했을 경우 virus titre가 7.2×10^{12} pfu/ml로 저하했다.

(3) CEF/NDV시스템의 경우 10%의 산소분압에서 증가를 볼 수 없음에 반해 낮은 산소분압에서 바이러스의 생산이 저하되었다. NDV 생산에서 이러한 차이를 확인하기 위해 NDV를 Vero 세포에 감염시킨 결과 1%의 산소분압에서 최종바이러스 생산량이 21%의 경우와 비교할 때 20배 높았다.

(4) Vero/Vaccinia 시스템에서 역시 10% 와 1% 산소분압일 때 virus titre가 가장 높았다.

나. 바이러스 생산에 ascorbic acid가 미치는 영향

(1) Vero / VSV 시스템에서 ascorbic acid 첨가시 최대의 virus titer가 첨가하지 않은 경우에 비해 100배 가량 증가하는 모습을 보였다.

(2) CEF / NDV 시스템의 경우에는 ascorbic acid 에 큰 영향이 없음으로 나타났다.

다. EDTA가 바이러스 감염에 미치는 영향

EDTA를 1mM 첨가해주었을 때 감염의 증가로 넣어주지 않았을 때와 비교해 약200배의 증가된 virus titer를 보였다.

2. 대외 기여도

종래의 바이러스백신을 제조 방법은 생체에 직접 접종하는 방법 (예, 유정란에 직접접종)을 이용하였으나 이와 같은 방법은 단가가 높고 노동력이 많이 든다는 결정적인 단점이 있다. 그러나 본 연구에서와 같은 동물세포 배양을 이용한 바이러스 생산방식을 이용할 경우 경제성과 효율을 모두 획득할 수 있으므로 앞으로 백신 제조, 특히 동물용 백신 제조에 이용될 큰 잠재성을

가지고 있다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절.

제 3 차년도에 실행하고자 하였던 항체 고생산 세포주의 장기간 배양시 안정성 조사를 실시해야 할 것이다. 이러한 안정성 조사는 실제로 상업적으로 항체를 대량 생산하기 위해서는 재조합 CHO 세포의 비항체생산성 뿐만 아니라 장기간 배양시 증폭시킨 비항체생산성이 얼마나 오랫동안 지속되는가 역시 중요하기 때문이다. 따라서 적절하게 MTX의 농도를 높여주어 항체 유전자를 증폭시킨 다음 limiting dilution cloning 방법 및 stability test를 통하여 고생산성 세포 pool로부터 비항체생산성이 높으면서도 안정성이 뛰어난 세포주를 선별하여 실제 상업적 생산에 응용해야 할 것이다. 또한 재조합 항체를 생산함에 있어서 혈청이 없는 배지를 사용하는 것이 생산 process 중 purification 과정을 쉽게 할 뿐만 아니라 생산에 드는 비용을 대폭 감소시킬 수 있기 때문에 고생산세포주에 대한 무혈청 배지 개발을 반드시 실행하여야 한다.

지금까지 재조합 단백질을 생산하는데 있어서 가장 많이 사용된 host로는 yeast 와 bacteria를 많이 사용하였다. 그러나 이러한 단백질들은 실제로 치료용 단백질로 사용되기 보다는 진단 시약이나 다른 기초 실험에 사용되는 시약으로 이용되었을 뿐이다. 또한 bacteria를 host로 사용하는 경우 외래 단백질이 세포안에서 합성된다 하더라도 이러한 단백질들이 세포 밖으로 secretion 되지 않고 inclusion body를 형성하기 때문에 단백질의 purification 과정이 복잡하게 된다. 재조합 단백질이 치료용 단백질로 사용되기 위해서는 secretion 문제의 해결과 단백질의 sequence 뿐만 아니라 post-translational modification 즉 정확한 disulfide bond 형성이나 oligomerization, glycosilation 및 그 밖의 peptide processing이 필요하다. 이러한 복잡 다단한 factor들을 고려해 보았을 때 동물 세포를 이용한 재조합 단백질의 생산은 점점 그 중요성이 증대되고 있다. 따라서 지금까지 재조합 항체의 CHO 세포로부터의 대량 생산 과정에서 축적된 기술은 의료용 치료 항체 생산 뿐만 아니라 여타의 다른 mammalian 단백질들을 생산하는데 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

제 2 절.

본 연구는 바이오센서를 이용하여 기존의 개발된 신규 단일군 항체를 산업화에 이용하는 데 중점이 두어졌고, 따라서 개발된 여러 항체를 응용하여 여러 측정대상물질에 대한 바이오센서를 개발할 계획이다. 가령, 소변내의 요산의 농도를 결정하는 바이오센서, 또 채액내의 젖산 등을 농도를 측정함으로써 신체의 피로 여부를 판단할 수 있는 바이오센서 등을 개발하여 상용화할 계획이다

제 3 절.

현재 국내에서 수공업적으로 생산되고 있는 가축 바이러스 백신 생산방법을 기업체와 연계하여 기술 집약적이고 무공해 산업형의 세포배양법으로 대체시키며 본 과제에서 개발한 원리를 여타의 다른 동물백신제조에 적용하여 생산방법을 효율적인 세포 배양법으로 대체시킨다.

제 6 장 참고문헌

제 1 절.

1. Morrison, S. L., Canfield, S., Porter, S., Tan, L. K., Tao, M., wims, L., A. (1988) Clin. Chem. 34:1668-1672.
3. Hayter, P. M., Curling, E. M. E., Baines, A. J., Jenkins, N., Salmon, I., Strange, P. G., 2. Jolliffed, L. K. (1993) Int. Rev. Immunol. 10: 241-250.
4. Coppen, S. R., Newsam, R., Bull, A. T., and Baines, A. J. (1995) Biotechnol. Bioeng. 46: 147-158.
5. Wurm, F. M. and Petropoulos, C. J. (1994) Biologicals 22: 95-102.
6. Ng, S. Y., Gunning, P., Liu, S. H., Leavtt, J., and Kedes, L. (1989) Nucl. Acids Res. 17: 601-615.
7. Gunning, P., Leavitt, J., Muscat, G., Ng, S. Y., and Kedes, L. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 4831-4835.
8. Dorai, H. and Moore, G. P. (1987) J. Immunol. 139: 4232-4244.
9. Kaufman, R. J. and Schimke, R. T. (1981) Mol. Cell. Biol. 1: 1069-1076.
10. Kaufma, R. J., Wasley, L. C., Spiliotes, A. J., Gossels, S. D., Latt, S. A., Larsen, G. R., and Kay, R. M. (1985) Mol. Cell. Biol. 5: 1750-1759.
11. Page, M. J. and Sydenham, M. A. (1991) Bio/Technology 9: 64-68.
12. Sahagan, B. G., Dorai, H., Saltzgaber, J., Toneguzzo, F., Guindon, C. A., Lilly, S. P., McDonald, K. W., Morrisey, D. V., Stone, B. A., Davis, G. L., McIntosh, P. K., and Moore, G. P. (1986) J. Immunol. 3: 1066-1074.
13. Rapley, R. (1995) Molecular Biotechnology 3: 139-154.
14. Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991) Gene 108: 193-200.
15. Pendse, G. J., Karkare, S., and Bailey, J. E. (1992) Biotechnol. Bioeng. 40: 119-129.

제 2 절.

1. Goldstein, J., Kita, T., Brown, M.S. ,New Engl. J. Med., 1983, 309, 288
2. Sauerbrey, G.Z.Phys., 1959, 155, 206
3. Bernd Konig and Michael Gratzel, Anal. Chim. Acta, 1993, 276, 329
4. Levy, R. I., Clin. Chem. 1981, 27/5, 653
5. Laboratory Standardization Panel, Clin. Chem. 1988, 34, 183
6. L. R. Russel and K. W. Rawson, Biosensors, 1986, 2, 311
7. J. Alarie, M. Stepaniak, and T. V. Dinh., Anal. Chim. Acta, 1990, 229, 169
8. S. Gauter, and L. Bllum., et al., Biosensors, 4, 181
9. G. G. Guilbault and R. D. Schmidt, Advance Biosens., 1990, 1, 257
10. R. Keeler, R & D Magazine, 1991 May, 62
11. R. E. Shamel and S. A. Brown, Chem. Eng. Progress, 1992, 7, 63
12. K. R. Rogers and J. N. lin, Biosensors & Bioelectronics, 1992, 7, 315
13. F. Hong., et al., Molecular Electronics. Biosensors anf Biocomputers, Plenum Press, NY, 1989

제 3 절.

1. P. Singleton and Sainsbury, In "Dictionary of Microbiology and Molecular biology", John Wiley and Sons, New York, 635 (1987)
2. M. Brunori and G. Rotilio, In "Method in Enzymology", L. Paker, Ed., Academic Press, Orlando, 105, 22-35 (1984)
3. A. L. Lehinger, In "Biochemisty", Worth Publishers, New York, 477-542 (1975)
4. V. R. Polonis, G. R. Anderson, M.T. Vahey, P. J. Morrow, D. Stoler, and R. Redfield, J. Biol. Chem., 266, 11421-11424 (1991)
5. P. R. Scheuermann, S. R. Farrah, and G. Bitton, Water Res., 25, 241-245 (1991)

6. S. Legrand-Poel, D. Vaira, J. Pincemail, A. van de Vorst, and J. Piette, *AIDS Res. Human Retroviruses*, 6, 1389-1398 (1990)
7. G. R. Anderson, and L. M. Matovcik, *Science*, 197, 1371-1374 (1977)
8. P. A. Whitaker-Dowling, K. R. Marotti, and G. R. Anderson, *J. Virol.*, 32, 234-239 (1979)
9. G. R. Anderson, D. L. Stoler, and L. A. Scarcello, *J. Mol. Biol.*, 205, 765-769 (1989)
10. G. R. Anderson, D. L. Stoler, and L. A. Scarcello, *J. Biol. Chem.*, 264, 14885-14892 (1989)
11. P. Ebbesen, F. D. Toth, J. A. Villadsen, and N. Norkov-Lauritsen, *In Vivo*, 5, 355-358 (1991)