(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
G01N 33/60

(11) 공개번호 특2003-0080734
(43) 공개일자 2003년10월17일

(21) 출원번호 10-2002-0019518
(22) 출원일자 2002년04월10일

(71) 출원인 이원태
서울특별시 서대문구 신촌동 134번지 연세대학교 이과대학 생화학과 신과학관 413호

(72) 발명자 이원태
경기도과천시주암동69-20청정드림빌트201호

홍은미
경기도부천시원미구상동사랑마을청구아파트1018-62

(74) 대리인 이후동
구현서

심사청구 : 있음

(54) 동위원소 표지방법

요약

본 발명은 동위원소 표지방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 ^{15}N/ ^{13}C로 표지된 단백질을 제조하는데 있어서 ^{13}C를 포함하는 화합물을 성장 단계(growth phase)시에 주입하는 것이 아니라, 종래 사용량보다 적은 양의 화합물을 사용하여 유도 단계(induction phase)시에 주입하는 것을 특징으로 하는 동위원소 표지방법에 관한 것이다.

이러한 본 발명에서는 동위원소를 포함하는 화합물을 성장 단계시에 주입하는 것이 아니라 유도 단계시에 종래 사용량보다 적은 양만을 주입하여도 95% 이상의 충분한 주입 효과를 달성할 수 있다.

대표도

도 3

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 M9 최소 배지를 사용하였을 때, 1g/L의 글루코스(도1a), 2g/L의 글루코스(도 1b)에 대한 OD_{600} 을 나타내는 그림.

도 2는 SH2 도메인을 ^{15}N와 ^{13}C로 표지하였을 때의 전형적인 성장을 도시한그림으로 IPTG 첨가 시점에서 1g/L의 $^{13}C_6$-D-글루코스을 포함하는 M9 배지로 치환한 경우(도 2a)와 2g/L의 $^{13}C_6$-D-글루코스을 포함하는 M9 배지로 치환한 경우(도 2b)를 도시한 그림.

도 3은 농도를 달리한 $^{13}C_6$-D-글루코스를 사용하여 단백질 발현 수준의 세기를 SDS-PAGE 밴드로서 나타낸 그림.

도 4는 *Total* Lab version 1.10을 사용하여 농도를 달리한 $^{13}C_6$-D-글루코스를 사용하여 유도된 발현단백질의 세기를 시간별로 나타낸 그림. 1g/L의 글루코스(도4a), 2g/L의 글루코스(도 4b), IPTG 첨가 시점에서 2g/L의 $^{13}C_6$-D-글루코스을 포함하는 M9 배지로 치환한 경우(도 4c)

도 5는 $^{13}C/^{15}N$이 표지된 SH2 도메인에서 잔기(residue) Arg ^{85} 내지 Qln ^{93} 의 $C_{??}$ 순차적 연결도를 나타내는 HNCA 스펙트럼으로부터 얻어진 스트립 플롯(strip plot)을 도시하고(도 5a), $^{13}C/^{15}N$이 표지된 MTH 1880에서 잔기(residue) Asn ^{38} 내지 Ser ^{44} 의 백본(backbone)의 순차적 연결도를 나타내는 HNCACB 스펙트럼으로부터 얻어진 스트립 플롯(strip plot)을 도시(도 5b)한 그림.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 동위원소 표지방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 $^{15}N/^{13}C$로 표지된 단백질을 제조하는데 있어서 ^{13}C를 포함하는 화합물을 성장 단계(growth phase)시에 주입하는 것이 아니라, 종래 사용량보다 적은 양의 화합물을 사용하여 유도 단계(induction phase)시에 주입하는 것을 특징으로 하는 동위원소 표지방법에 관한 것이다.

안정한 동위원소로 표지된 화합물은 추적자 연구 및 구조 연구시에 핵자기공명(Nuclear Magnetic Resonance; 이하 'NMR'이라 약칭함) 분광법 및 질량 분광법과 함께 많이 이용될 뿐만 아니라, 이핵 스핀 완화(hetronuclear spin relaxation) 연구, NMR에 의한 SAR과 같은 생물학적 스크리닝 및 구조 유전체학에 이용되고 있다.

NMR에 의해 해석되는 고분자 구조의 크기는 지난 10년간 3차원 및 4차원의 이핵 분광학의 출현으로 인해 극적으로 향상되었고, 이는 횡이완 최적화 분광학 (TROSY : transverse relaxtion optimized spectroscopy)을 이용한다.

근래에 3중 공명 NMR로부터 얻어진 고분해능을 갖는 단백질의 구조는 ^{13}C, ^{15}N 또는 ^{2}H 등의 동위원소로 표지된 단백질이 밀리그램(milligram)의 양으로 발생하는 데에 의존한다.

상기와 같이 NMR을 사용하여 단백질의 구조를 결정하는데 있어서 가장 중요한 사항은 잘 정제된 단백질 샘플을 얻는 것이다. 이처럼 고분자 단백질의 구조를 결정하기 위해 필요한 단계는 동위원소를 포함하는 화합물을 이용하여 박테리아 호스트 내에서 관심 단백질을 발현시키는 것에 의해 정제시키는 것인데, 이는 통상적으로 질소 및 탄소에 대한 소스로서 각각 ^{15}N 및 ^{13}C를 포함하는 성장 배지를 사용하여 *E.coli* 와 같은 박테리아 호스트 내에서 관심 단백질을 발현시킴으로써 수행된다.

현재까지 *E.coli* 의 성장과 단백질의 발현을 향상시키기 위한 여러 방법이 적용되어 왔다. 미량금속 혼합물, 비타민 칵테일 뿐만 아니라 상업적으로 사용가능한 조류 및 미생물의 가수분해물과 같은 최소 배양 공급(minimal media supplement)이 성장 및 발현에 있어서 증대됨을 보인다.

하지만 이러한 진보에도 불구하고, 통상적으로 사용되는 진탕 플라스크 배양(shake flask culture)을 이용하여 낮은 동위원소 비용으로 보다 높은 발현 수 율을 얻는 것이 바람직하게 여겨지고 있으나, $^{13}C_6$-D-글루코스와 같은 화합물의 경우 그 비용이 고가이기 때문에 그 사용량을 증대시키는 것이 부담스러운 문제점이 있었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 동위원소로 표지된 단백질을 제조하는데 있어서, 동위원소의 사용량을 감소시켜도 동위원소로 표지된 단백질을 높은 수율로 얻을 수 있도록 하기 위한 동위원소 표지방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에서는 $^{15}N/^{13}C$로 표지된 단백질을 제조하는데 있어서 ^{13}C를 포함하는 화합물을 성장 단계(growth phase)시에 주입하는 것이 아니라, 종래 사용량보다 적은 양의 화합물을 사용하여 유도 단계(induction phase)시에 주입하는 것을 특징으로 하는 동위원소 표지방법을 제공한다.

본 발명은 PTK6 SH2(Protein Tyrosine Kinase 6 Src Homology 2) 도메인과 MTH(Methanobacterium Thermoautotropy H) 1880을 사용하여 동위원소로 표지함으로써 수행되는 것으로, $^{15}NH_4Cl$ 및 $^{12}C_6$-D-글루코스를 포함하는 성장 배지(growing media)를 사용하여 셀의 밀도를 발생시킨다.

표지되지 않은 대사산물의 소모 후, M9 성장 배지에 $^{13}C_6$-D-글루코스를 첨가 하는 위한 시간의 두배에 해당되는 시간 후에 셀이 유도된다.

이때 자연상태에 존재하는 동위원소의 양을 갖는 배지에서 박테리아 셀을 성장시키고, 유도 직후에 동위원소가 표지된 화합물을 공급함으로써, 공급되는 화합물에 대하여 표지되는 단백질의 수율이 약 2배 가량 향상되어진다.

이하 실시예에서는 본 발명을 구체적으로 설명한다.

실시예

A. 실험과정

1. 단백질 발현(Protein expression)

SH2는 pGEX 4T-3/SH2 플라스미드 컨스트럭트(plasmid construct)와 함께 변형된 *E.coli* 균주 BL21 (DE3)에서 과 발현(over expression)되었고, MTH1880는 pET13d/MTH1880 플라스미드 컨스트럭트와 함께 변형된 *E.coli* 균주 BL21 (DE3) pLysS에서 과 발현되었다.

표준 M9 최소 배지(standard M9 minimum media)는 $^{14}NH_4Cl$ 또는 $^{15}NH_4Cl$과 $^{12}C_6$-D-글루코스 또는 $^{13}C_6$-D-글루코스로 보충되어진 기본적인 성장 배지로서 사용되었다. 이상적인 성장이 되도록 하기 위하여 250mL의 배양(培養)에는 0.1%의 티아민(thiamine)과 최종 농도가 50ug/mL인 암피실린(ampicillin)이 보충되었다.

^{15}N로 표지된 단백질 샘플을 제조하기 위하여 셀을 10g/L의 D-글루코스 및 1g/L의 $^{15}NH_4Cl$로 보충되어진 성장 배지에서 성장시켰고, $^{13}C/^{15}N$으로 표지된 단백질 샘플 제조시에는 ^{13}C-D-글루코스가 탄소의 공급원으로서 사용하였다.

종자 배양(seed culture)로부터 밤새도록 성장시킨 진탕 플라스크 세포 배양물 2mL을 37°C에서 M9 배지에 접종하였다. 셀은 600nm에서의 광학밀도(optical density) (이하 'OD_{600}'이라 약칭함)가 0.5 내지 0.6에 도달했을 때, 1mM의 이소프로필 β-D-티오갈락토피라노시드 (IPTG)로 유도시켰다.

2. 단백질 정제(Protein purification)

PTK6의 SH2 도메인은 Hong E, Shin J, Bang E, Kim MH, Lee ST 및 Lee W.(2001) *J.Biomol. NMR* , **19** , 291-292에 기재되어 있는 Superdex 75 HR 10/30 칼럼을 사용하여 고속단백질액체 크로마토그래피(fast protein liquid chromatography)에 의해 정제되어진 후에, GST 친화 크로마토그래피(affinity chromatography)에 의해 정제되었다. MTH 1880은 Ni-NTA 칼럼(Novagen)으로 정제되었고, 200mM의 이미다졸(imidazole)로 용리(熔離)되었다. (Yee A. et al (2002) *Proc Natl Acad Sci USA,* **99** , 1825-1830)

공급업자가 제공하는 지시에 따라, HisTag를 제거하기 위하여 단백질을 포함하는 분획을 소의 트롬빈(BioRad)과 함께 25°C에서 10unit/mg의 비율로 6시간동안 반응시켰다. 트롬빈 소화(digestion) 후에는 Acta 시스템 (등록상표)을 이용하여 단백질 용액을 겔 여과 칼럼(BioRad)에 통과시켰다. 이러한 실험과정에서 NMR 완충 액 (25mM 나트륨 인산염, 300mM 염화나트륨, 0.002% 소디움 아지드)으로 용리시켰다. 정제된 단백질은 5mm의 대칭 마이크로 셀(Shigemi)에서 Centricon-3 농축기를 사용하여 농축하였다.

단백질 농도는 표준으로서 소의 혈청 알부민을 사용하여 브래드포드 분석(Bradford assay)을 통해 결정하였다. 정제된 단백질의 농도는 정확히 BECKMAN DU 530 UV/VIS 분광광도계에서 280nm의 파장에 대한 흡광도로서 측정되어졌다. 정제된 SH2 도메인은 500mL의 배양에서의 농도가 약 1mM이었고, MTH 1880은 약 2mM이었다.

3. NMR 분광학(NMR spectroscopy)

모든 NMR 실험은 x축, y축 및 z축에 대하여 차폐되는 3중 공명 프로브를 구비하는 Bruker DRX-500MHz 또는 Varian Unity INOVA 500MHz 분광계를 사용하여 수행하였다. SH2 도메인의 NMR 데이타는 25°C에서 얻어졌고, MTH 1880의 NMR 데이타는 25°C에서 얻어졌다.

3차원 3중 공명 실험인 HNCN (Grzesiek,S.,Bax,A.(1992) *J.Magn.Reson* ., **96** ,432-440; Kay,L.E.,et al.,(1994) *J.Magn.Reson* .,A109,129-133; 및 Stonehouse, J., et al.,(1995) *J.Biomol.NMR* , **5** ,226-232), HN(CO)CA (Grzesiek,S.,Bax,A.(1992) *J.Magn.Reson* ., **96** ,432-440), HNCACB (Stonehouse, J., et al.,(1995) *J.Biomol.NMR* , **5** ,226-232;Muhandiram,D.R.et al.,(1994) *J.Magn.Reson* ., **B103** , 203-216),CBCA(CO)NH(Grzesiek,S.,Bax,A.(1992) *J.Magn.Reson* ., **99** ,201- 207),HNCO(Grzesiek,S.,Bax,A.(1992) *J.Magn.Reson* ., **96** ,432-440;Muhandiram,D.R.et al.,1994) *J.Magn.Reson* ., **B103** ,203-216;Ikura,M.,et al.,(1990) *Biochemistry* ,29, 4659-4967), HCACO(Grzesiek,A.,Bax,A.(1993) *J.Magn.Reson* ., **B102** ,103-106), HCCH-TOCSY(Kay,L.E.,et al.,(1993) *J.Magn.Reson* ., **B101** ,333-337) 및 13C-edited-NOESY (Davis,A.L.,et al.,(1992) *J.Magn.Reson* .,98,207-216) 실험은 [U-13C,U-15N] SH2 도메인과 MTH 1880에 대하여 수행되었다.

B. 결과 및 내용분석

1. 유전자 클로닝(gene cloning)

PTK6 SH2 도메인 (residues 75-174)을 인코딩하는 cDNA 단편이 표준길이의 PTK6 cDNA로부터 PCR에 의한 프라이머 페어 (5'-cGGgaTCcGAACCGTGGTTCTTTGGC-3'과 5'-ggaattcaCTCGTGCTTCCGGCAGG-3', 소문자는 제한 효소 사이트와 종결 코돈을 나타냄)을 사용하여 증폭되도록 하였고, E.coli 발현 벡터인 pGEX 4T-3 (Amersham Pharmacia Biotech) BamHI-EcoRI 사이트에 복제되도록 하였다.

발현된 재조합 단백질은 N-말단에 벡터 서열로부터 인코딩된 GST (Glutathione-S-transferase) 태그를 포함한다. 이 벡터는 융합 단백질 발현을 위해 E.coli 스트레인 BL21(DE3)pLysS를 변형하는데 사용되었다.

2. 단백질 발현(Protein expression)

SH2 도메인 및 MTH1880의 발현 수준은 SDS-PAGE 겔(15%)에 의해 시각화되어졌다. 쿠마쉬 블루 염색액으로 스테이닝 한 결과, SDS-PAGE 겔상에는 가용성 및 불용성의 단백질인 모든 융합 단백질이 오직 가용성 형태로 관찰되어졌다.

3. ^{13}C-동위원소로 단백질 표지

박테리아 셀 질량의 수율을 떨어뜨리지 않으면서 비용효과가 큰 동위원소로 표지된 단백질을 얻는 위한 첫번째 단계는 표지를 위해 예정된 대사산물에 대해 최소한의 필요조건을 확립하는 것이다. 그러한 이유로, 우선 셀의 질량과 성장 배지로부터 소비된 글루코스 사이의 관계를 정하는 실험을 수행하였다. 박테리아 성장에 대해 여러 상황의 조건 하(예, 온도)에서 글루코스의 양을 변화시키면서 수행하였다.

37℃의 온도에서 OD_{600} 값이 0.5 내지 0.6이 될 때까지 셀을 배양한 후, IPTG 유도 후에 25℃의 온도에서 계속 배양한 경우(SH2 도메인경우), M9 최소 배지를 사용하였을 때, 10g/L의 글루코스에 대해 OD_{600} 이 (2.441)이고, 2g/1L의 글루코스에 대해 (1.358)이며, 1g/1L의 글루코스에 대해 (0.769)인 결과를 얻었다(도 1 참조). MTH경우는 37℃의 온도에서 OD_{600} 값이 0.5 내지 0.6이 될 때까지 셀을 배양한 후, IPTG 유도 후에도 37℃의 온도에서 계속 배양하였다.

이러한 데이타는 ^{13}C-동위원소 표지를 위한 적절한 성장 배지의 디자인을 위한 기초를 제공한다. 또한 이러한 결과는 탄소 소스가 제한되었을 때 융합 단백질의 발현 수준을 확인하는데에 사용된다.

이러한 결과는 유도(induction)가 되기 전에 OD_{600} 이 0.5 내지 0.6에 도달하였음을 증명하는데에 사용한다. 본 발명자들은 500mL당 원하는 셀 량을 얻기 위해 필요한 탄소 소스의 첨가량이 0.5 내지 1.0g임을 확인하였다. 그리고, 1mM IPTG의 첨가에 의한 유도 이후, 원하는 단백질 발현이 이루어지도록 하는데 충분한 탄소 소스의 양은 약 2g이었다.

$^{13}C_6$-D-글루코스의 비용이 비싸기 때문에 탄소 소스가 제한된 배양 배지로부터 높은 수율의 단백질을 얻기 위해서, IPTG 유도를 수행하기 이전의 배양 배지의 탄소 소스로서 $^{12}C_6$-D-글루코스를 사용하였다.

따라서, 성장 배지에 공급된 탄소 소스로부터 원하는 단백질이 발현되는 양과 그 단백질이 발현되는 동안에 증식한 셀 질량의 관계를 확인하기 위하여, 우선 M9 배지의 탄산 소스로서 $^{12}C_6$-D-글루코스를 사용하고, 유도단계에서 $^{13}C_6$-D-글루코스로 교환하는 시도를 하였다.

도 2는 SH2 도메인을 ^{15}N와 ^{13}C로 표지하였을 때의 전형적인 성장을 도시하고 있다. 모든 경우에 있어서, 초기(a 시점)에서는 ^{12}C를 탄산 소스로서 사용하되, IPTG 첨가 시점 (c 시점)에서 1g/L의 $^{12}C_6$-D-글루코스, 1g/L의 ^{15}

NH_4Cl을 포함하는 M9 배지로 치환한 경우 (도 2a) 및 2g/L의 $^{12}C_6$-D-글루코스, 1g/L의 $^{15}NH_4Cl$을 포함하는 M9 배지로 치환한 경우 (도 2b)에 대해서 결과를 확인하였다.

셀이 OD_{600} 값이 0.55 내지 0.6이 되었을 때, 20분 동안 원심분리를 통해 펠렛화시키고, PBS 완충액(pH 7.4)으로 천천히 교환하였다. 셀의 회수와 배지 교환 과정은 한번 이상 반복하였다. 셀은 모든 탄소 소스가 배제된 M9 최소 배지에서 회수 및 재부유하였다. OD_{600} 값은 세정시의 셀의 감소로 인해 조금씩 감소하게 되고, 셀은 *E.coli* 가 두배가 되는 시간 (약 40분)동안에 글루코스가 존재하지 않는 성장 배지에서 배양되었다. c 시점에서 OD_{600} 값의 증가는 필수적 영양소 즉, 본 발명에서는 $^{12}C_6$-D-글루코스의 성장과 소비가 복원됨을 나타낸다. 이 시점에서 $^{12}C_6$-D-글루코스의 제거는 단백질 생성이 시작되기 전에 남아있는 적은 양의 표지되지 않은 $^{12}C_6$-D-글루코스가 소비되도록 한다. c 시점에서는 단백질 발현이 1mM의 IPTG와 $^{13}C_6$-글루코스의 첨가에 의해 유도되었다.

유도 후, 세포의 대사작용은 느려지고 OD_{600} 값은 점차 증가하였다. 셀은 유도 기간(d 시점) 즉, 모든 글루코스가 소비되는 시점 후에 회수되었다. 표지된 글루코스의 최종적인 양 뿐만 아니라 회수되는 시점은 실험에 의해 결정되어야만 하는데, 이는 유도될 때의 배양의 밀도, 적절한 수율의 단백질을 얻기 위한 유도 시간 및 발현된 단백질에 대한 호스트 셀의 반응에 의존하기 때문이다.

예를 들면, 도 2b에서 도시된 바와 같이 0.5L의 배양으로부터 약 4 내지 5g의 표지된 융합 단백질이 제조된다.

도 3은 농도를 달리한 $^{13}C_6$-D-글루코스를 사용하여 단백질 발현 수준의 세기를 SDS-PAGE 밴드로서 나타낸 것이다. 그 결과, 같은 양의 동위원소를 사용하여 배지의 이동 없이 진탕 플라스크에서 배양하였을 때보다 약 2배가 향상된 수율을 얻을 수 있었다.

도 4는 *Total* Lab version 1.10을 사용하여 농도를 달리한 $^{13}C_6$-D-글루코스를 사용하여 유도된 발현단백질의 세기를 시간별로 나타낸 그림으로 1g/L의 글루코스(도4a), 2g/L의 글루코스(도 4b), IPTG 첨가 시점에서 2g/L의 $^{13}C_6$-D-글루코스을 포함하는 M9 배지로 치환한 경우(도 4c)에 대해서 SDS-PAGE 세기를 보여주고 있다.

4. 동위원소가 표지된 단백질의 특징 부여

동위원소 보강의 수준은 NMR spectroscopy를 사용하여 결정되어졌다. 이 결과에 의해 ^{13}C이 약 95% 가량 표지되었음을 알수 있었다.

뚜렷하게 다른 재조합 단백질은 이러한 방법에 의해 발현되어지고, 모든 경우에 있어 동위원소 비용은 감소되나 동위원소가 표지된 단백질의 수율은 향상된다. 일반적으로 단백질의 구조를 결정하기 위해 적용되는 NMR 실험을 위해서는 동위원소가 95% 정도만 표지되면 충분하다

도 5a는 $^{13}C/^{15}N$이 표지된 SH2 도메인에서 잔기(residue) Arg ^{85} 내지 Qln ^{93} 의 $C_{??}$ 순차적 연결도를 나타내는 HNCA 스펙트럼으로부터 얻어진 스트립 플롯(strip plot)을 도시하고, 도 5b는 $^{13}C/^{15}N$이 표지된 MTH 1880에서 잔기(residue) Asn ^{38} 내지 Ser ^{44} 의 백본(backbone)의 순차적 연결도를 나타내는 HNCACB 스펙트럼으로부터 얻어진 스트립 플롯(strip plot)을 도시하는데, 이들 결과들로부터 본 발명에 따른 우수한 감도가 확인되었다.

발명의 효과

이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명에서는 동위원소를 포함하는 화합물을 성장 단계시에 주입하는 것이 아니라 유도 단계시에 종래 사용량보다 적은 양만을 주입하여도 95% 이상의 충분한 주입 효과를 달성할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

동위원소 표지방법에 있어서, 동위원소를 포함하는 화합물을 유도 단계시에 주입하는 것을 특징으로 하는 동위원소 표지방법.

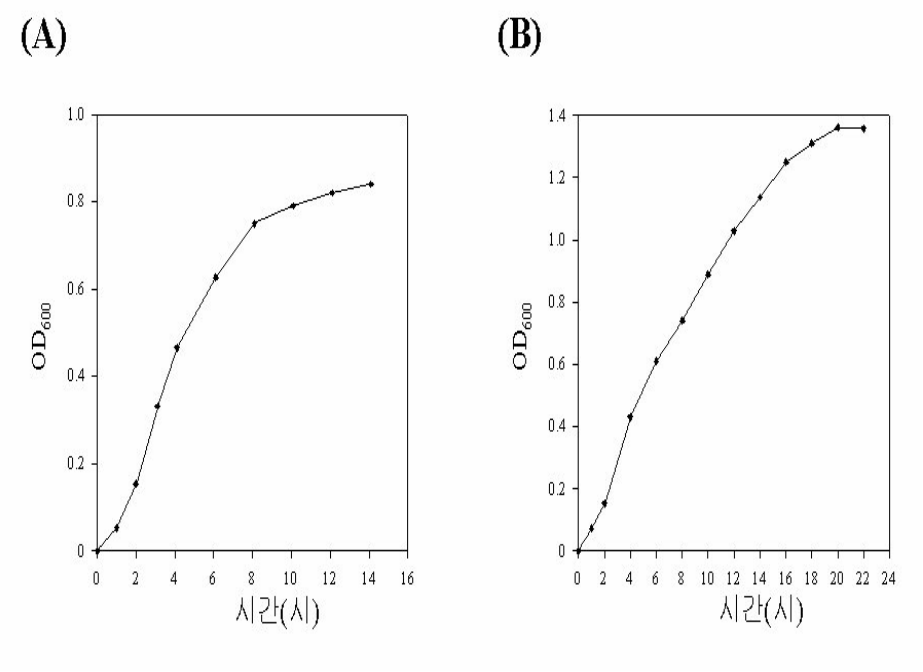
청구항 2.

제 1 항에 있어서,

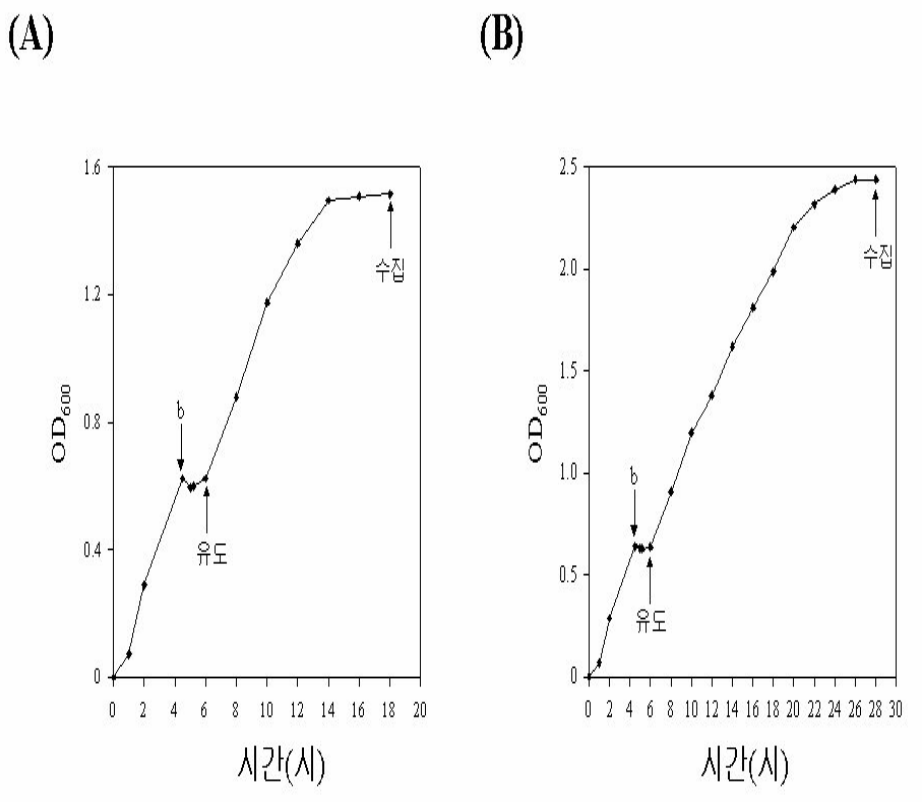
상기의 동위원소는 $^{15}N/^{13}C$인 것을 특징으로 하는 동위원소 표지방법.

도면

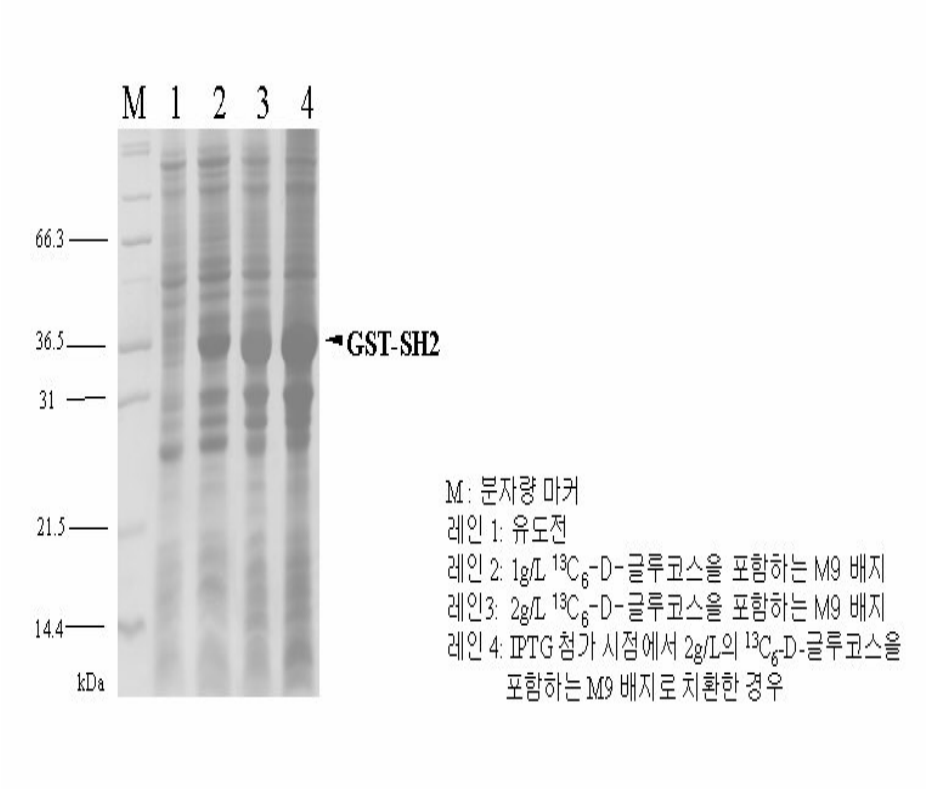
도면1



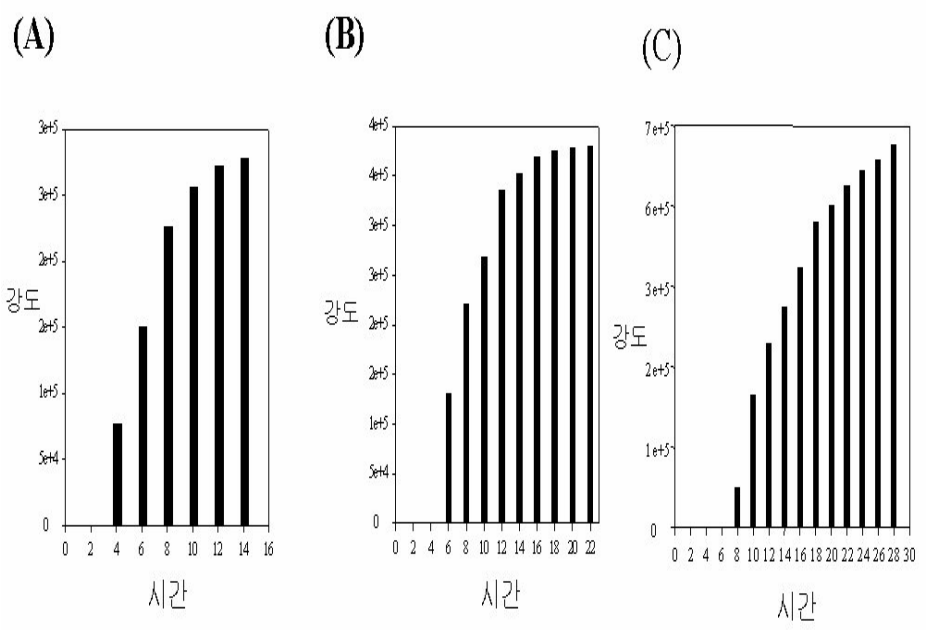
도면2



도면3

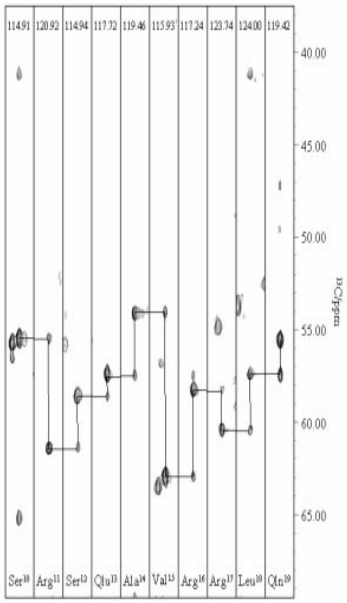

M 1 2 3 4
66.3
36.5
31
21.5
14.4
kDa
GST-SH2
M: 분자량 마커
레인 1: 유도전
레인 2: 1g/L $^{13}C_6$-D-글루코스을 포함하는 M9 배지
레인3: 2g/L $^{13}C_6$-D-글루코스을 포함하는 M9 배지
레인 4: IPTG 첨가 시점에서 2g/L의 $^{13}C_6$-D-글루코스을 포함하는 M9 배지로 치환한 경우

도면4

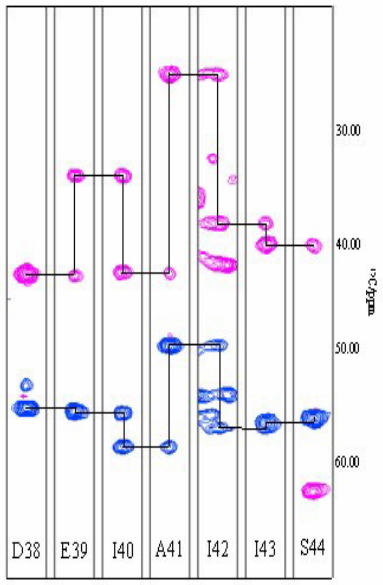

(A)
(B)
(C)
강도
시간

도면5

(A)


114.91
120.92
114.94
117.72
119.46
115.93
117.24
123.74
124.00
119.42
40.00
45.00
50.00
55.00
60.00
65.00
Ser10
Arg11
Ser12
Glu13
Ala14
Val15
Arg16
Arg17
Leu18
Gln19

(B)


30.00
40.00
50.00
60.00
D38
E39
I40
A41
I42
I43
S44