



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시, 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리, 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지, 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학석사 학위논문

상피세포 성장인자와 콜라겐 결합능이
있는 기능성 단백질의 개발



2008년 8월

부경대학교 대학원

생물공학과

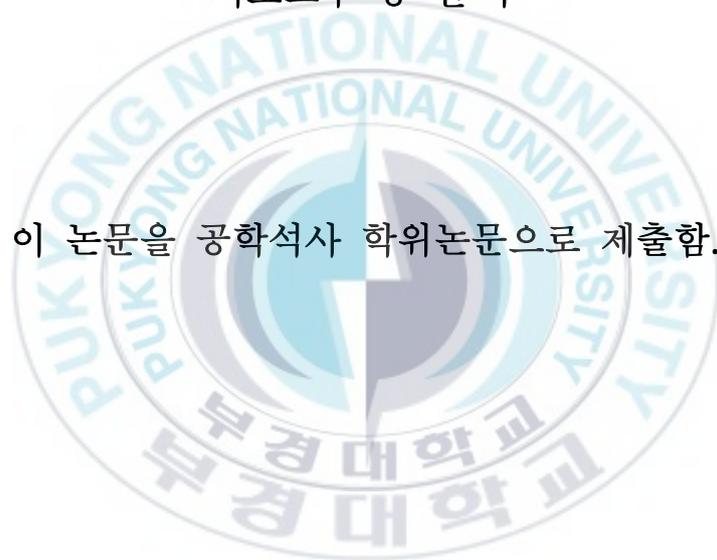
민문경

공학석사학위논문

상피세포 성장인자와 콜라겐 결합능이
있는 기능성 단백질의 개발

지도교수 공인수

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함.



2008년 8월

부경대학교대학원

생물공학과

민문경

민문경의 공학석사 학위논문을 인준함.

2008년 8월 31일



주	심	이학박사	이	형	호	인
위	원	공학박사	김	중	균	인
위	원	공학박사	공	인	수	인

목차

Abstract	ii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. Reagents	4
2. Bacterial strains, cell line and plasmid	4
3. Construction of plasmid for hEGF-CBD fusion protein	6
3-1. Synthesis of hEGF and collagen-binding domain for expression vector	6
3-2. Preparation for recombinant plasmid	7
4. Purification of expressed fusion protein	7
5. Assay of human cell growth activity	8
6. Collagen binding assay	8
III. 결과	10
1. Construction of hEGF-CBD plasmid	10
2. Expressed recombinant protein purification	13
3. Cell growth assay	15
4. Collagen binding activity	17
IV. 고찰	19
V. 요약	23
VI. 감사의 글	24
VII. 참고문헌	25

Title: Construction and Expression of Biofunctional Fusion Protein Consist of hEGF and Collagen-binding domain from *Vibrio mimicus* metalloprotease

Mun-Kyeong Min

Department of Biotechnology
Graduate School Pukyong National University

Abstract

Human epidermal growth factor (hEGF) is a polypeptide with 53 amino acids in mammalian species, a one of the important autocrine/paracrine factor of human body and applied in pharmaceutical and cosmetics industries because of its biochemical multifunction. However, low level of production from natural sources, limited target specificity and short half-life of this useful factor make problems as therapeutic agent. To avoid these troubles, we constructed the fusion hEGF proteins with collagen-binding domain (VMCBD) from *Vibrio mimicus* metalloprotease. This collagen-binding domain, peptide with 33 amino acids, has shown previously that essential for the collagen binding activity of *V. mimicus* metalloprotease and fused at the C-terminal of hEGF protein and the fusion proteins were expressed in *Escherichia coli*. Treatment of C-terminal fused hEGF protein was revealed more promoted growth number of human/A431 cells than control hEGF. These results suggest that VMCBD fused recombinant hEGF proteins can be used for the epidermal cell healing agent.

I. 서론

사람의 신체 내에는 다양한 펩타이드성 신호전달 물질이 있다. 최근에 밝혀진 결과에 의하면 이러한 물질들은 적어도 100 가지 이상이 있으며, 대표적으로 peptide hormone, growth factor, 그리고 lymphokine 등이 있다 [15]. 또한 전달 물질들은 전과양식 및 특성에 따라서 두 가지로 분류되는데 각각 hormone 류의 endocrine 과 autocrine/paracrine 으로 분류 할 수 있다 [15]. 신체내의 autocrine/paracrine 중에서 epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor (TGF), keratinocyte growth factor (KGF), hepatocyte growth factor (HGF), platelet-derived growth factor (PDGF), insuline-like growth factor (IGF) 등의 대표적인 성장인자들이 있으며 [7], 또한 작용 메커니즘에 따라서 autocrine (TGF), paracrine (KGF, HGF), 그리고 autocrine/paracrine (EGF, PDGF)으로 분류 할 수 있다 [7, 22]. 이러한 성장인자들은 다양한 생화학적 특성이 있기 때문에 의료용 치료제 또는 화장품의 원료 등으로 다양하게 사용된다.

Human epidermal growth factor (hEGF)는 다양한 세포에서 분비되는 53 amino acids 로 구성된 6045 dalton 의 single-chain polypeptide 로써 [7, 11, 16], 손상된 조직세포의 기능유지 및 회복에 중요한 세포 착생, 이동, 분열, 유착, 그리고 조직의 재배열등에 중요한 관련이 있기 때문에 각막, 피부, 혈관 및 점막세포 등의 다양한 세포의 손상에 유용하게 사용된다 [4, 7, 11, 14, 16, 18,

22]. 그러나 hEGF 등의 autocrine/paracrine 은 세포내의 낮은 생산성 및 정제의 어려움, 목적세포와의 낮은 특이성, 그리고 지속시간이 짧기 때문에 hEGF 자체만으로는 치료 또는 화장품의 원료로써 사용하기가 힘들다 [5, 6, 15, 21]. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위하여 hEGF 에 대한 다양한 응용이 연구되었다 [11, 5, 6, 15, 12]. Chen. *et al.* [21]은 *Escherichia coli* 를 이용하여 hEGF 의 대량생산을 위한 배양 과정에서의 acetic acid 의 축적을 방지하여 host cell 의 growth 및 recombinant hEGF 의 생산 수율을 증가시키는 방법을 연구 하였으며, Liu. *et al.* [11] 등은 hEGF 를 미생물 유래 signal peptide 와 fusion 하여 hEGF 의 세포외부로의 분비를 유도하였다. Date. *et al.* 등은 *Corynebacterium glutamicum* 의 cell surface protein 의 발현시스템을 hEGF 와 함께 접목하여 target protein 의 분비를 유도 하였으며 대량발현 host 를 *E. coli* 대신 *C. glutamicum* 을 사용하여 *E. coli* 를 이용하여 발현시의 문제점인 inclusion body 및 정제과정을 해결하였다. Nishi. *et al.* [15]은 hEGF 의 C-terminal 에 cell binding 과 관련한 polypeptide anchor protein 인 *Clostridium histolyticum* collagenase 유래의 collagen-binding domain 을 fusion 시켰으며, Ishikawa. *et al.* [5, 6]은 hEGF 의 N-terminal 에 delivery 또는 cell binding 과 관련한 fibronectin collagen-binding-domain 을 fusion 시킴으로써 목적 세포와의 낮은 기질 특이성과 지속시간이 짧다는 문제를 해결하고자 하였다.

Collagen-binding domain 또는 fibronectin collagen-binding domain 의 target 이 되는 collagen 은 mammalian cell 의 extracellular matrix (ECM)에 다수 존재하는 단백질이며 다양한 조직에 풍부하게 존재한다 [8]. 또한 ECM 의 기본 골격구조를 구성하는 collagen 은 다양한 growth factor 의 저장을 위한 장소 또는 target 이 되는 물질이다.

본 연구에서는 hEGF 에 미생물 유래의 collagen-binding domain 을 PCR 방법만으로 융합시킨 plasmid 를 구축한 뒤 *E. coli* 를 이용하여 대량 발현함으로써 hEGF 의 낮은 생산성, 정제 과정의 어려움, 낮은 기질 특이성 및 짧은 half-life 문제를 해결하였다. hEGF 와 같이 발현된 collagen-binding domain 은 본 연구실에서 그 기능 및 구조를 모두 밝힌 *Vibrio. mimicus* 의 metalloprotease 에서 유도된 것으로써 [8], protease 내의 여러 domain 중에서 기질과의 부착과 관련된 collagen-binding domain (CBD)만을 hEGF 와 hybrid 하였다. 따라서 hEGF 와 CBD 를 fusion 함으로써 binding 및 delivery system 을 구축하였다.



II. 재료 및 방법

1. Reagents

DNA endonuclease 는 Promega Co. (USA)에서 구입하여 사용하였으며 균주의 배양을 위한 배지는 Difco Co. (USA)로부터 구입하여 실험하였다.

2. Bacterial strains, cell line and plasmids

본 실험에서 수행한 hEGF 의 증폭 주형으로 사용한 plasmid 는 human epidermal growth factor mature form 이 들어간 plasmid 를 부산대 의대 안순철 교수님께 받았으며 *V. mimicus* metalloprotease CBD 의 증폭을 위한 주형 plasmid 는 Lee *et al.* 의 plasmid 를 사용하였다 [13]. Cloning 에 사용한 vector 및 host cell 은 Table 1 에 나타내었다. Cloning host 인 *E. coli* DH5α와 BL21(DE3)은 Luria Bertani (LB, Difco) 배지를 사용하여 37°C에서 배양하였다. 단, overexpression 에 쓰이는 *E. coli* 의 배양에는 각각 kanamycin (50 µg/ml)을 넣어 배양하였다.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used

Bacterial strains/ plasmids	Genotype or relevant characteristics	Reference or source
Strain		
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	SupE44 ΔlacU169 (φ80 lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Invitrogen co.
BL21(DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3)	Novagen co.
Plasmid		
VMCBD	Apr, derivative of pETMETA62 truncated 102bp.	[13]
pET 28a(+)	His tag fusion expression vector; Km,T7 promoter, six His-tag coding sequence	Novagen co

3. Construction of plasmid for hEGF-CBD fusion protein

3-1. Synthesis of hEGF and collagen-binding domain (CBD) for expression vector

hEGF 가 CBD 과의 합성을 위하여 *Bam*H1 site (underlined)를 가진 forward primer epid-Bam-up (5'-GGCCGATCCAATAGTGA CTCTGAATGTCCC-3')와 hEGF 뒤로 연결될 CBD 에 결합할 수 있도록 CBD 의 5' frame 에 상보적인 sequence 를 가진 reverse primer epid-Hind-rp (5'-AGACAGTACCAAGCGCAGTTCCCACCAC-3') 사용하여 PCR 로 증폭시켰다. 또한 CBD 는 N-terminal 에 연결될 hEGF 에 결합할 수 있도록 hEGF 3' frame 에 상보적인 sequence 를 가진 forward primer CBD-Hind-up (5'-TGGGA ACTGCGGTTGGTACTGTCTCGACCA-3'), *Eco*R1 site (underlined)를 가진 reverse primer CBD-Eco-rp (5'-GGCCG AATTCCTATGTATCAAGCCAGACTGCAA-3') 을 사용하여 PCR 로 증폭시켰다. 증폭된 hEGF 와 CBD 는 forward primer epid-Bam-up 과 reverse primer CBD-Eco-rp 을 사용하여 PCR 에 의해 *Bam*H1 site 와 *Eco*R1 site 를 가지는 hEGF-CBD 를 construction 하였다.

3-2. Preparation for recombinant plasmid

hEGF-CBD 를 construction 하기 위해 *Bam*H1 site 를 가진 forward primer epid-Bam-up 와 *Eco*R1 site 를 가진 reverse primer CBD-Eco-rp 을 사용하여 PCR 로 ligation 된 EGF-CBD 를 PCR 로 증폭시켰다. 약 170bp 의 PCR product 는 *Bam*H1 와 *Eco*R1 restriction enzyme 으로 digestion 하여 미리 동일한 enzyme 을 처리하여 둔 overexpression vector 인 pET-28a(+)에 ligation 하였다. 재조합된 hEGF-CBD 를 *E. coli* DH5 α 에 transformation 하고 난 후 다시 overexpression host 인 *E. coli* BL21 (DE3)에 re-transformation 시켰다.

4. Purification of expressed fusion protein

hEGF-CBD 를 함유한 형질전환 *E. coli* BL21 (DE3) 를 kanamycin 이 첨가된 LB 배지에서 O.D₆₀₀=0.4 이 될 때까지 배양한 뒤 Isopropyl- β -D-thiogalactose (IPTG) 의 최종 농도가 1mM 이 되도록 첨가한 뒤 37°C에서 4 시간 더 배양하였다. 이것을 4°C에서 4,000 rpm 으로 10 분간 원심분리하여 cell 을 모은다. Pellet 상태의 cell 을 50mM Tris-HCl (pH 8.0)에 resuspension 시켜 sonicator (sonifier 250, Branson Co.)를 이용하여 cell 을 파쇄시킨 후 12,000 rpm 에서 10 분간 원심분리하여 inclusion body 를 축적하였다. 얻어진 inclusion

body 는 20mM Tris-HCl buffer (pH8.0)에 dialysis 하여 refolding 하였다. His-bind column (Novagen)을 이용하여 fusion protein 을 정제하였다. Bradford method 에 의해 정량하였으며 protein standard 는 bovine serum albumin(BSA)을 사용하였으며 이를 이용해 정량에 필요한 standard curve 를 작성하였다.

5. Assay of human cell growth activity

Human A431 cell line 을 48-well 에 5×10^3 cells/well 이 되도록 분주하고 하룻동안 배양하였다. hEGF 와 hEGF-CBD 를 각각 농도별로 10pg, 100pg, 1ng, 10ng, 100ng 을 투여한 뒤 이틀 동안 배양한 뒤 PBS 로 washing 한 다음 RPMI 가 없는 배지를 넣고 이틀 동안 다시 키운다. MTT assay 법으로써 growth activity 를 측정하였다.

6. Collagen binding assay

Purified EGF-CBD 에서 CBD 에 의한 collagen binding activity 를 알아보기 위해 collagen 과 binding 시킨 purified hEGF-CBD 를 원심분리 및 filtration 한 뒤 SDS-PAGE 를 통하여 확인하였다. Insoluble collagen type I (Sigma. USA) 100mg 을 5mM CaCl_2 를 함유한 50mM Tris-HCl (pH8.0) 4°C에서 overnight

동안 pre-swelling 시킨다. Swelling 된 collagen 을 10,000 X g 으로 10 분간 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤, purified hEGF-CBD 0.1mg 를 첨가하여 room temperature 에서 6 시간 동안 반응 시킨다. 원심분리를 통하여 상층액을 모은 뒤 0.22 μm -pore-size membrane (Corning. USA)을 통해 filtration 시킨 후 SDS-PAGE 를 하였으며, coomassie brilliant blue G250 으로 staining 하였다. 또한 collagen 과 반응 후 0.1% SDS 로 1hr 반응하여 collagen 과 fusion protein 이 결합하였는지를 확인 하였다.



Ⅲ. 결과

1. Construction of hEGF-CBD plasmid

hEGF 와 CBD 는 각각 상보적인 sequence 를 가진 primer 로 PCR 하였고 *Bam*H1 과 *Eco*R1 site 를 가진 primer 로 PCR 하여 hEGF-CBD 를 합성 할 수 있었다. 이를 overexpression vector 인 pET-28a(+)에 ligation 하여 *E.coli* DH5α 에 transformation 하고 난 후 다시 overexpression host 인 *E.coli* BL21 (DE3)에 re-transformation 시켰다.

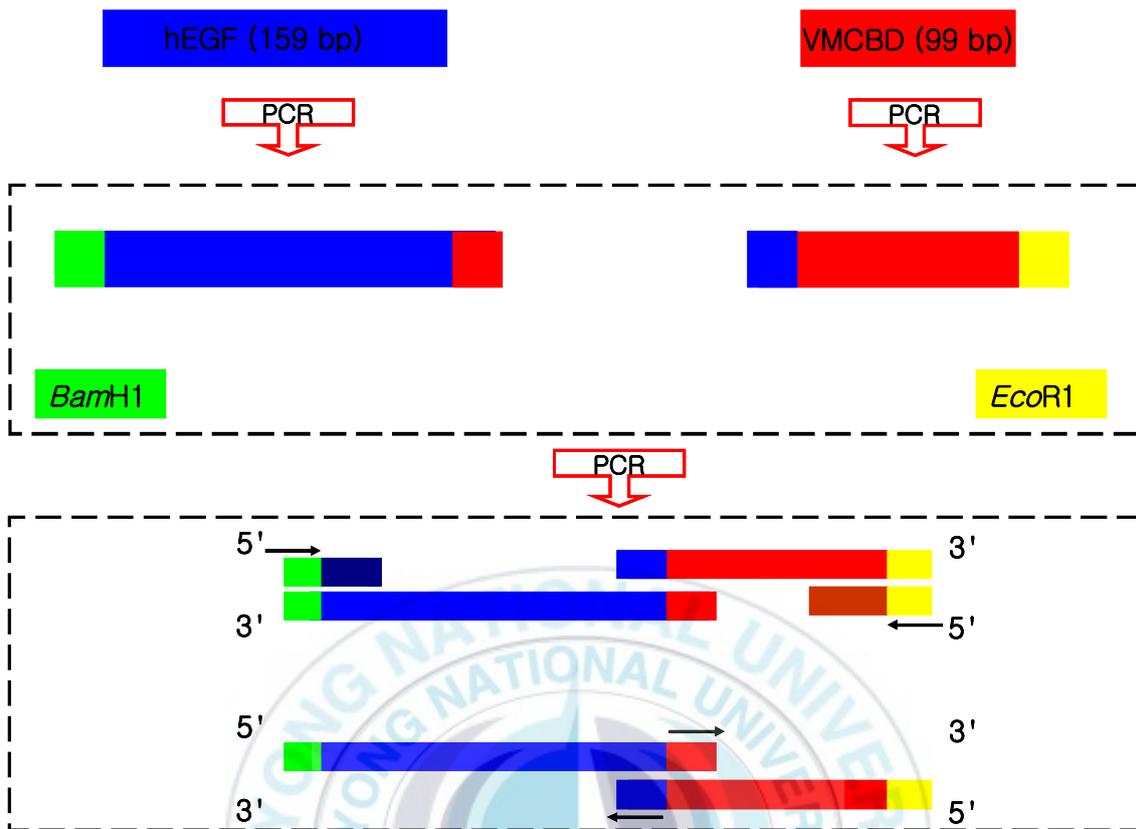


Fig. 1. Scheme for synthesis of hEGF and CBD

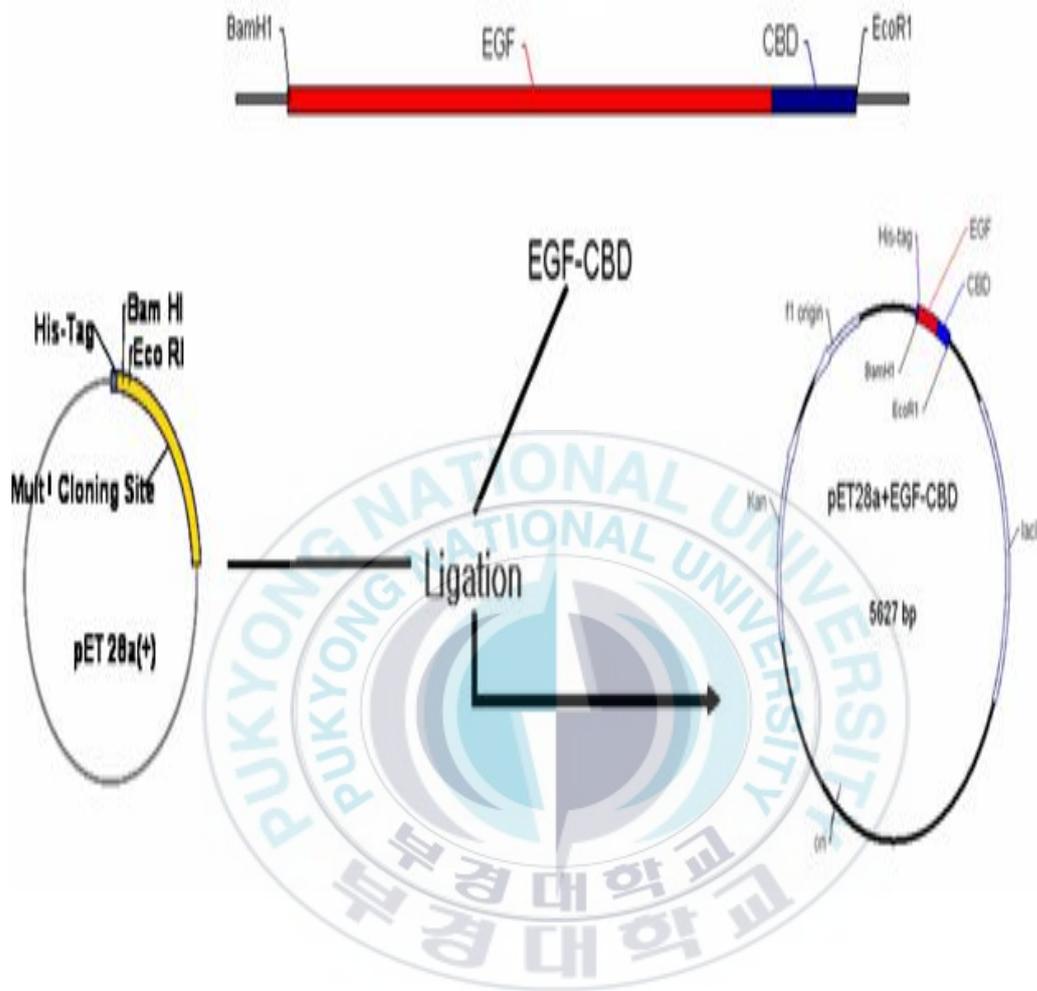


Fig. 2. Scheme for construction of hEGF-CBD overexpression vector

2. Expressed recombinant protein purification

hEGF-CBD 를 overexpression 하기 위하여 PCR 로 ligation 된 hEGF-CBD 를 pET-28a(+)에 cloning 하여 overexpression host 인 *E.coli* BL21 (DE3)에 transformation 한 균주를 kanamycin (50 $\mu\text{g/ml}$)이 첨가된 LB 배지에 배양하여 IPTG 를 이용하여 과발현시켰다. hEGF-CBD 가 과발현된 cell 을 파쇄하여 얻은 활성이 없는 inclusion body 를 6M urea/20mM Tris-HCl (pH8.0)으로 renaturation 시킨 후 20mM Tris-HCl (pH8.0)에서 dialysis 하여 refolding 하였다. 재조합된 protein 말단에 fusion 된 his-tag 이 Ni_2^+ 에 affinity 를 가지는 특성을 이용하여 Ni-NTA resin 에 protein sample 을 apply 하여 1M imidazole 로 elution 하였다. 정제과정 중 각 단계에서의 protein 은 SDS-PAGE 를 수행하여 9 kDa 의 크기로 overexpression 된 것을 확인하였다 (Fig. 3).



Fig. 3. SDS-PAGE of the purified hEGF-CBD

Lanes are as follows: M; protein marker, lane 1; crude extraction, lane 2; after induction, lane 3; soluble protein, lane 4; inclusion body, lane 5; purified EGF-CBD

3. Cell growth assay

Human A431 cell 에 대한 hEGF-CBD 의 growth activity 를 다양한 농도에서 측정하였다 (Fig.4). 1ng 에서는 control 로 쓰인 hEGF 와 비슷하게 측정되었지만 이를 제외한 10pg, 100pg, 10ng, 100ng 에서 높게 측정된 것으로 보아 hEGF 보다 fusion protein 이 cell growth activity 가 높다는 것을 확인할 수 있었다.



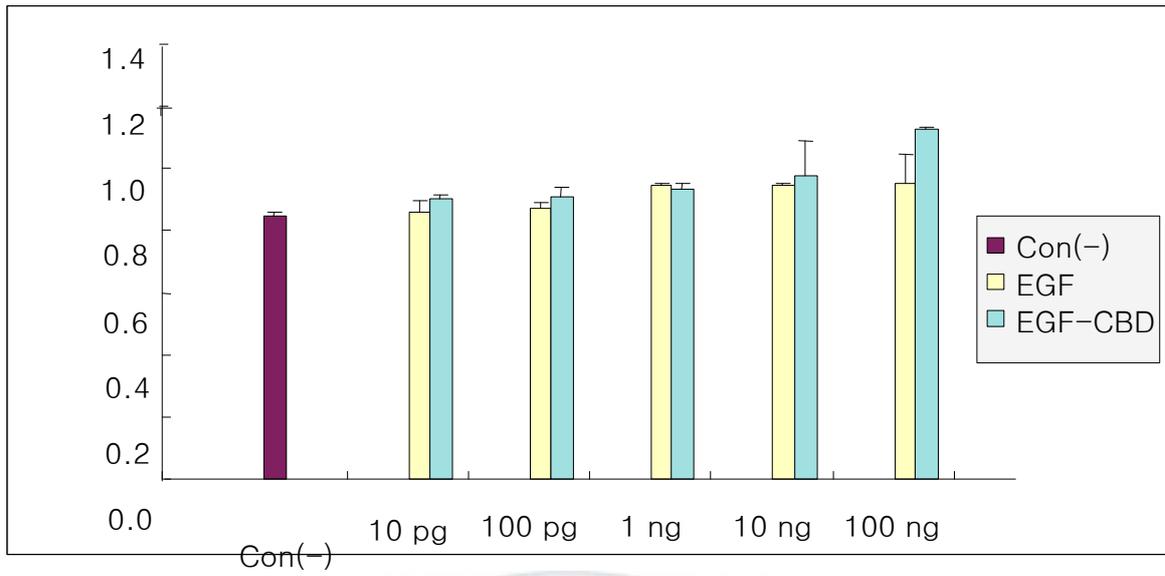


Fig. 4. Cell growth activity of hEGF and hEGF-CBD with A431 cells



4. Collagen binding activity

Purified EGF-CBD 에서 CBD 에 의한 collagen binding activity 을 알아보기 위해 purified EGF-CBD 와 insoluble collagen type I 100mg 을 binding 시킨 후 filtration 하여 SDS-PAGE 를 수행하였다. Control 에서 collagen 없이 incubation 시킨 EGF-CBD 는 collagen 과 binding 되지 않아 membrane 을 통과하여 SDS-PAGE 에서 약 9kDa 에서 확인되었지만 collagen 과 incubation 시킨 EGF-CBD 는 collagen 과 binding 하여 membrane 을 통과하지 못하였으며, 따라서 SDS-PAGE 에서 확인되지 않았다 (Fig. 5). 또한 collagen 과 반응 후 0.1% SDS 를 처리하였을 때 collagen 부착되었던 fusion protein 이 떨어져 나오는 것을 확인 하였다 (Fig. 5.).

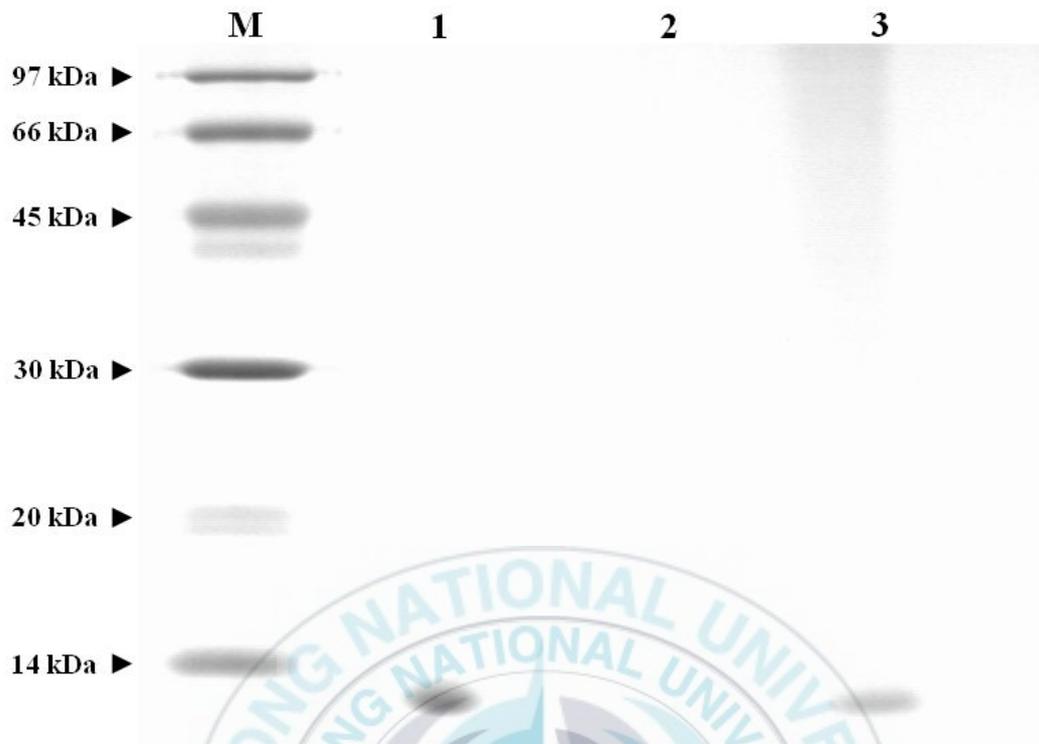


Fig. 5. Collagen binding activity.

Recombinant proteins were incubated with or without collagen at room temperature. After incubation, filtrates were analyzed on SDS-PAGE gels stained with coomassie brilliant blue G250. lane 1: hEGF-CBD incubated without collagen; lane 2: hEGF-CBD incubated with collagen; lane 3: hEGF-CBD incubated with collagen treated 1hr of incubated with 0.1% SDS

IV. 고찰

V. mimicus 는 수해양성 병원균으로써, 특히 *V. cholerae* non-O1 type 과 유사한 strain 으로 잘 알려져 있다 [8]. *V. mimicus* 는 사람에게 감염시 설사, 구토 및 복부 통증을 유발한다고 밝혀 졌으며 [1, 20], 감염과정에서 phospholipase [10], hemolysin [3], cholera toxin [19], heat stable enterotoxin [12], hemagglutinin [13], 그리고 protease [9] 등의 다양한 병원성 인자들을 분비한다. 이러한 병원성 물질 중에서도 세포외부로 분비되는 metalloprotease 는 숙주세포로의 침투와도 연관이 있다고 밝혀졌다 [9]. Lee. *et al.* [8]의 metalloprotease 의 연구결과 metalloprotease 의 C-terminal 부위는 collagenase activity 에 밀접한 영향을 미침을 알 수 있었으며, 이 부위에는 collagen-binding domain 이 있음을 알 수 있었다 [8]. 따라서 이러한 collagen-binding domain 을 분석 할 수 있었으며 33 개의 아미노산이 collagen-binding 에 필수적임을 알 수 있었다 [8].

Mammalian matrix metalloprotease (MMPs) 등의 mammalian collagenase 의 연구는 기능 및 domain 에 관하여 연구가 활발하게 되어 있으나, bacterial collagenase 의 연구 및 산업적인 응용 실태는 보다 미비한 실정이다 [8]. 하지만 Nishi. *et al.* [15] 등은 *C. histolyticum* 유래의 collagenase 에서 collagen-binding domain 을 분리하였으며, 이를 hEGF 와 연결된 fusion protein 을 만듦으로써 hEGF 의 단점을 보완한 fusion growth-stimulator 로써 연구하였다. 하지만 이들의 연구에 사용된 fusion protein 은 *in vitro* 상에서 cell stimulating activity 가 control 보다 낮았으며, *in vitro* 실험에 사용된 대부분의 collagen-binding

substrate 들과 binding activity 를 보이지 못하였다. 또한 *in vivo* 실험 결과는 growth activity 가 거의 없음을 알 수가 있었다. 하지만 recombinant fusion protein 의 지속시간 및 cell 에 부착이 잘됨은 확인할 수 있었다. *in vitro* 실험의 cell growth proliferation 이 낮은 결과는 hEGF 와 함께 발현된 collagen-binding domain 이 hEGF 와 hEGF receptor 사이의 반응을 방해하거나 protein expression 시의 hEGF 의 misfolding 에 의하여 발생한다고 설명하였다. 또한 *in vivo* 실험의 낮은 growth activity 의 결과는 cell 의 growth factor 의 종류에 따른 cell 의 susceptibility 가 차이가 나기 때문이거나, fusion protein 이 cell 에 부착시 binding 위치와 receptor 가 있는 위치의 차이에 의한 receptor 와의 반응이 어렵기 때문이라고 설명하고 있다. 따라서 Nishi. *et al.* [15] 등은 새로운 anchoring peptide 의 개발, hEGF moiety 와 CBD 사이의 linker peptide 의 연결 또는 chemical linking 등이 필요하다고 주장한다 [15].

Ishikawa. *et al.* [5, 6] 은 fibronectin collagen-binding domain (FNCBD)의 collagen-binding activity 를 이용한 delivery system 의 개발에 관하여 연구하였다. 그들은 human 유래의 fibronectin collagen-binding domain (FNCBD)을 이용하여 hEGF 를 목적 세포까지 운반, 치료의 효과를 높이는 연구를 하였다. 이들이 hEGF 의 functional partner 로 사용한 40 kDa 의 FNCBD 는 C-terminal 이 매우 길었으며 이러한 특이성이 FNCBD 와 hEGF 의 개별적인 기능성에 좀 더 유동성을 부여하여 Nishi. *et al.* [15]의 문제점을 보완하였다 [5, 6]. 또한 이들의 *in vivo* 실험 결과, 손상된 부위의 조직세포에서는 기대하였던 것보다 낮은 collagen 의 존재를 확인 할 수 있었으며, 이러한 collagen 의 부족에 의한 fusion protein 의 부착 및 활성의 저하를 우려하여 fusion protein 을 collagen sponge 에 부착시킨 뒤 목적 cell 에 사용하는 새로운 delivery system 으로서 극복하였다 [6].

Liu. *et al.* [11], Ishikawa. *et al.* [5, 6], Date. *et al.* 등은 fusion protein의 activity 를 유지하기 위하여 정제에 필요한 tag-peptide 를 제외한 fusion protein 만을 대량생산하는 방법을 사용하였다. 따라서 이러한 fusion protein 을 대량생산 후 회수하기 위하여 column chromatography 등의 목적 단백질의 정제과정이 필수적이다 [5, 6, 11]. 하지만 이러한 정제과정의 단계가 늘어날수록 목적 단백질의 정제 수율은 감소하게 되며 시간 및 노동력이 더욱 필요하다. 또한 Nishi. *et al.* [15] 등은 대량발현 및 정제를 위하여 glutathione S-transferase (GST) tag 을 이용한 *E. coli* 의 대량발현 system 을 사용하였다. 하지만 GST-tag 을 이용한 발현 system 은 정제 과정 중 thrombin 으로 처리하여 GST-tag 을 분리한 후 또다시 column 을 사용하여 목적 단백질만 분리하여야 하는 과정을 수행하여야 한다. 따라서, 본 연구에서는 pET-28a(+) vector 를 이용한 6 his-tag 을 발현 및 정제의 목적으로 부착하였으며 이로 인하여 정제과정을 줄일 수 있었으며, 여분의 histidine peptide 가 존재하더라도 fusion protein 의 activity 는 control hEGF protein 보다 우월하였다.

본 연구에서는 hEGF 와 미생물 유래의 collagen-binding domain 의 fusion 으로서 hEGF 의 문제점을 극복하려 하였다. 또한 hEGF 의 functional partner 로써 *V. mimicus* collagen-binding domain (VMCBD)을 사용하였으며, binding domain 에서 밝혀진 activity 의 필수적인 최소부위를 hEGF 와 같이 발현함으로써 fusion protein 의 길이가 늘어남으로 인한 misfolding 및 post-translational modification 의 작용을 최소화 하고자 하였다. 그 결과 9 kDa 의 fusion protein 은 *in vitro* 실험에서 control 인 hGEF 보다 높은 cell growth activity 를 관찰 할 수 있었으며, 또한 collagen binding activity 또한 있음을 알 수 있었다.

Proteineous drugs 의 짧은 retention time 또는 낮은 target specificity 에 의한 activity 가 낮은 문제는 처리량을 늘림으로써 극복 할 수가 있다. 하지만 이러한 방법은 또한 부작용의 증가로 발전 할 수 있으며 [5], 따라서 효과적인 proteineous drug 로 사용하기 위해서는 기존 약물의 system 보다 retention time, target specificity 의 증진, 효율적인 delivery system 이 필수 적이라고 할 수 있다 [5, 6, 15]. 본 실험의 결과만으로써 본 연구과정에서 개발한 hEGF-CBD fusion protein 을 이용한 약품의 개발이라고 하기에는 *in vivo* 연구 및 다양한 임상학적 연구결과를 필요하다. 하지만 본 연구의 결과로써도 hEGF-CBD fusion protein 이 충분히 의약품 및 화장품의 원료로써의 잠재력이 크다고 생각한다.



V. 요약

사람의 상피세포 성장인자 (hEGF)는 53 개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 인체내의 중요한 autocrina/paracrine 중 하나이며, 생화학적으로 다양한 기능이 있기 때문에 의약 및 화장품의 중요한 원료로써 사용된다. 하지만 이와 같은 autocrina/paracrine 은 직접 분리하기에는 너무나 양이 적고 따라서 정제하기가 힘들며, 낮은 target 특이성 및 지속시간이 짧다는 문제점이 있기 때문에 hEGF 그 자체만으로 사용하기에 많은 제약이 따른다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위하여 본 연구과정에서는 해양미생물인 *Vibrio mimicus* 의 metalloprotease 의 collagen-binding domain (VMCBD)을 hEGF 와 융합하여 발현하였다. Metalloprotease 유래의 collagen-binding domain 은 33 개의 아미노산으로 이루어진 peptide 로써 collagen binding 활성화에 필수적인 역할을 한다. 본 연구에서는 collagen-binding domain 을 hEGF 의 C-terminal 에 융합시켜 *Escherichia coli* 에서 대량발현 후 정제하였다. hEGF 와 collagen-binding domain 이 융합된 재조합 단백질을 human/A431 cell line 에 처리를 하였더니 조직세포의 수가 hEGF 만을 처리한 대조군 보다 높은 수의 세포수를 확인 할 수 있었다. 이러한 결과를 미루어 볼 때 hEGF 와 collagen-binding domain 이 융합된 재조합 단백질은 의약품 및 화장품의 원료로써 상피세포의 치료에 도움이 되리라고 사료 된다.

VI. 감사의 글

본 논문이 완성 되기까지 부족한 저에게 진심 어린 충고와 따뜻한 격려로 이끌어 주신 공인수 교수님께 깊은 감사 드립니다. 또한 학문의 길로 이끌어 주시고 관심을 아끼지 않으셨던 홍용기 교수님, 이형호 교수님, 김중균 교수님, 박남규 교수님, 김성구 교수님께 감사 드립니다.

제가 여기까지 올 수 있도록 도와주신 윤수철, 하정철, 김구택, 김영옥, 박기재, 김대경, 이종희, 김현국, 최선영, 이상봉, 강정화, 진철호, 신승렬, 김남현, 한정현, 최윤혁, 박제현, 임준혁, 이은미, 박은미, 안선희 선배님들께 감사 드립니다.

그리고 석사학위 동안 처음부터 끝까지 마음으로 이끌어 주신 김동균 선배님께 특히 감사 드립니다.

어렵기만 하던 초기 타과생활에 따뜻하게 맞아 주셨던 홍경은 선배님, 친구같이 의지할 수 있었던 힘의 그녀 김은영양, 어디서나 살아남을 귀여운 까만 콩 김유리, 선 후배의 짓궂은 실험실 생활 속에서도 끝까지 웃는 한성욱군 그리고 유전공학 이름아래 짧고도 긴 시간을 함께한 모든 이들에게 감사 드립니다.

만남이 축복인 오밀이 아람언니, 기쁠 때나 슬플 때나 함께한 부산가족 정경언니, 나의 모든 취향이 똑 같은 부산가족 수희 언니, 서로에 대해 모르는 것 없는 10 년지기 든든한 버팀목들 진영, 주상, 재우, 나를 웃게 만드는 칼있으마 현진이, 새벽에도 밥을 차려주는 언니같은 혜진이, 모든 일에 자신의 일 같이 맘써 주신 항상 고마운 맘 뿐인 준영선배, 문제 생기면 달려가는 친정 양식학과 사료영양학 실험실 선배들, 5 층에서 실험에 많은 도움을 주시고 소소한 즐거움을 함께한 생물공학과 선후배 동기님들께 감사 드립니다.

마지막으로 지금까지의 제가 있도록 뒤에서 애쓰시고 저의 최고의 지원군인 사랑하는 부모님과 사랑하는 두 언니들에게 이 논문을 바칩니다.

VII. 참고문헌

1. B. R. Davis, G. R. Fanning, J. M. Madden, A. G. Steigerwalt, H. B. Bradford Jr., H. L. Smith Jr., D. J. Brenner. 1981. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. J. Clin. Microbiol. 14, 631-639.
2. De Angeli S., Buoro S., Fandella A., Anselmo G., Palù G., Mingrino R., Parnigotto P. P. 2000. Production of epidermal growth factor in human prostatic cells cultured in vitro. Ann. Anat. 182, 249-258.
3. G.T. Kim, J.Y. Lee, S.H. Huh, J.H. Yu and I.S. Kong. 1997. Nucleotide sequence of the *vmhA* gene encoding hemolysin from *Vibrio mimicus*, Biochim. Biophys. Acta. 1360, 102-104.
4. Hong J. P., Jung H. D., Kim Y. W. 2006. Recombinant human epidermal growth factor (EGF) to enhance healing for diabetic foot ulcers. Ann. Plast. Surg. 56, 394-398.
5. Ishikawa T., H. Terai, T. Yamamoto, K. Harada, T. Kitajima. 2003. Delivery of a growth factor fusion protein having collagen-binding activity to wound tissue. Artificial. Organs. 27, 147-154.

6. Ishikawa T., H. Terai, T. Kitajima. 2001. Production of a biologically active epidermal growth factor fusion protein with high collagen affinity. *J. Biochem.* 129, 627-633.
7. J. Imanishi, K. Kamiyama, I Iguchi, M. Kita, C. sotozono, S. Kinoshita. 2000. Growth factors: Importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog. Retin. Eye. Res.* 19, 113-129.
8. Jong-Hee Lee, Sun-Hee Ahn, Eun-Mi Lee, Seung-Ha Jeong, Young-Ok Kim, Sang-Jun Lee, In-Soo Kong, 2005, The FAXWXXT motif in the carboxyl terminus of *Vibrio mimicus* metalloprotease is involved in binding to collagen, *FEBS Lett.*, 579, 2507-2513.
9. Jong-Hee Lee, Gu-Teak Kim, Jong-Young Lee, Hong-Ki Jun, Ju-Hyun Yu, In-Soo Kong. 1998. Isolation and sequence analysis of metalloprotease gene from *Vibrio mimicus*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1384, 1-6
10. J.H. Kang, J.H. Lee, J.H. Park, S.H. Huh and I.S. Kong. 1998. Cloning and identification of a phospholipase gene from *Vibrio mimicus*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1394, 85-89.
11. Liu Y. L., L. M. Huang, W. P. Lin, C. C. Tsai, T. S. Lin, Y. H. Hu, H. S. Chen,

- J. M. Han, H. J. Wang., Y. T. Liu. 2006. Secretion of biologically active human epidermal growth factor from *Escherichia coli* using *Yersinia pestis* Caf1 signal peptide. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 39, 366–371.
12. M. Nishibuchi and R.J. Seidler. 1983. Medium-dependent production of extracellular enterotoxins by non-O-1 *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, and *Vibrio fluvialis*, *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 228–231.
13. M. Alam, S. I. Miyoshi, K.I. Tomochika and S. Shinoda. 1996. Purification and characterization of novel hemagglutinins from *Vibrio mimicus*: a 39-kilodalton major outer membrane protein and lipopolysaccharide, *Infect. Immun.* 64, 4035–4041.
14. Nakagawa S., Yoshida S., Hirao Y., Kasuga S., Fuwa T. 1985. Biological effects of biosynthetic human EGF on the growth of mammalian cells in vitro. *Differentiation.* 29, 284–288.
15. N. Nishi, O. Matsushita, K. Yuube, H. Miyanaka, A. Okabe, F. Wada, 1998, Collagen-binding growth factors: Production and characterization of functional fusion protein having a collagen-binding domain, *P.N.A.S.*, 95, 7018–7023.
16. Schlessinger J., Schreiber A. B., Levi A., Lax I., Libermann T., Yarden Y.

1983. Regulation of cell proliferation by epidermal growth factor. CRC Crit. Rev. Biochem. 14, 93-111.
17. S. Y. Shin, J. H. Lee, S. H. Huh, Y. S. Park, J. M. Kim, I. S. Kong. 2000. Overexpression and characterization of *Vibrio mimicus* metalloprotease. J. Microbiol. Biotechnol. 10, 612-619.
18. Werner S., Grose R. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Physiol. Rev. 83, 835-870
19. W.M. Spira and P.J. Fedorka-Cray. 1984. Purification of enterotoxins from *Vibrio mimicus* that appear to be identical to cholera toxin, Infect. Immun. 45, 679-684.
20. W. X. Shandera, J. M. Johnson, B. R. Davis, P. A. Blake. 1983. Disease from infection with *Vibrio mimicus*, a newly recognized *Vibrio* species. Ann. Intern. Med. 99, 169-171.
21. X. Chen, P. Cen, J. Chen. 2005. Enhanced production of human epidermal growth factor by a recombinant *Escherichia coli* integrated with in situ exchange of acetic acid by macroporous ion-exchange resin. J. Biosci. Bioeng. 100, 579-581.

22. Yin J., K. Xu, J. Zhang, A. Kumar, F. X. Yu. 2007. Wound-induced ATP release and EGF receptor activation in epidermal cells. *J. Cell. Sci.* 120, 815-825

