



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](#)

공학박사 학위 논문

피부 손상 치료제로의 응용을 위한 상피세포  
성장인자와 콜라겐 부착 단백질 융합체 개발



생물공학과

김 동 균

공학박사 학위 논문

피부 손상 치료제로의 응용을 위한 상피세포  
성장인자와 콜라겐 부착 단백질 융합체 개발



2012년 8월

부경대학교 대학원

생물공학과

김동균

# 김동균의 공학박사 학위논문을 인준함

2012년 8월 24일



주심 공학박사 김 중 균 (인)

위원 공학박사 공 인 수 (인)

위원 이학박사 이 상 준 (인)

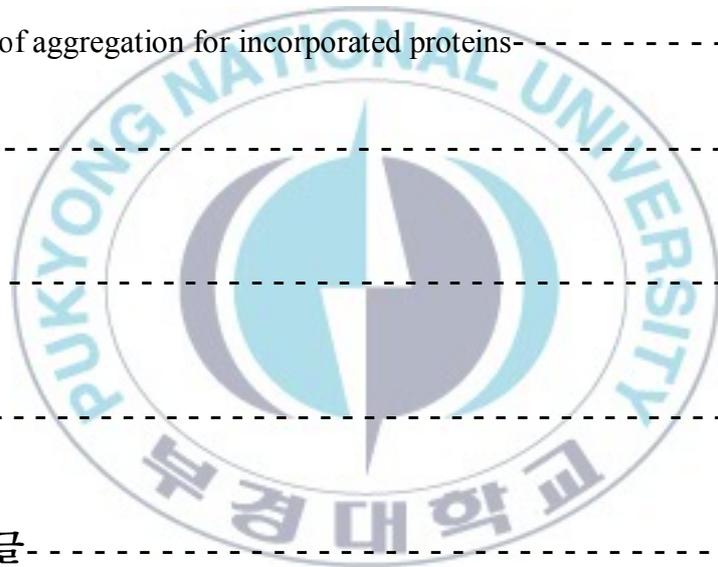
위원 공학박사 김 영 옥 (인)

위원 공학박사 정 귀 택 (인)

# 목차

Abstract-	-----	
I. 서론	-----	-1
II. 재료 및 방법	-----	-20
1. Reagents-	-----	-20
2. Bacterial strains, cell lines and plasmids-	-----	-21
3. Construction of plasmid for hEGF and CBD fused chimeric proteins-	-----	-23
4. Expression and purification of fusion proteins-	-----	-28
5. Collagen binding activities-	-----	-30
6. Assay for cell proliferation of human epidermal cell lines-	-----	-31
7. Mitogenetic activities of fusion protein with collagen coated well plate	-----	-32
8. Analysis of phosphorylation of human cell lines with western blotting	-----	-33
9. Aggregation of recombinant proteins-	-----	-35
III. 결과	-----	-36

1. Construction of recombinant plasmid for over-expression of fusion proteins - - - -	36
2. Expression and purification of chimeric fusion proteins -- - - - - - - - - - -	41
3. Assay of binding activity using CBD anchoring recombinants - - - - - - - - - -	46
4. Influences of cell growth activity -	51
5. Efficiency of collagen coated well plates - - - - - - - - - - - - - - - - -	56
6. The degree of intensity of phosphorylation signal - - - - - - - - - - - - -	62
7. Evaluation of aggregation for incorporated proteins- - - - - - - - - - - - -	65
IV. 고찰- -	68
V. 요약- -	85
VI. 참고문헌- -	87
VII. 감사의 글- -	97



Development of chimeric human epidermal growth factor containing short collagen-binding domain moiety for application of wound tissue healing agent

Dong-Gyun Kim

Department of Biotechnology, Graduate School,

Pukyong National University

Abstract

Among the human growth factors, epidermal growth factor (hEGF) consisting of 53 amino acids exhibits various effects on epidermal cell regeneration, stimulation of proliferation and migration of keratinocytes, promote formation of granulation tissues, and stimulates fibroblast motility, which are important in the process of wound healing. For these multifunctional activities, EGF is employed as useful implement for pharmaceutical and cosmetics agents. But, low productivity, limited target specificity and short-half life inhibits the application of EGF as therapeutic instrument. To overcome these obstacles, we have constructed collagen-binding domain (CBD) of *Vibrio mimicus* metalloprotease fused chimeric EGF proteins. 18 and 12 amino acids portions of 33 amino acids, which was essential for collagen binding activity, were combined with N-terminus and C-terminus of EGF. We have constructed EGF(52aa)-CBD(18aa), EGF(53aa)-CBD(12aa), CBD(18aa)-

EGF(53aa) and CBD(12aa)-EGF(53aa), and expressed, produced and purified using pET-22b vector, *Escherichia coli* BL21(DE3) expression system and Ni-NTA column chromatography, respectively. Purified four recombinant proteins revealed enhanced A-431 and HaCaT cell numbers than non-treated specimen and similar numbers of control hEGF. The collagen-binding activities with type I collagen were also observed. Furthermore, CBD hybridized hEGF amplified phosphorylation signals of EGF receptor. These results suggest that fusion proteins may be able to recommend as a therapeutic agent in wound tissue healing.



## I. 서론

만성질환, 상처, 수술, 선천적인 기형 및 암으로 인한 조직세포 또는 기관의 피해는 매우 빈번하게 발생하며, 이러한 손상된 조직의 치유를 위한 다양한 기술의 발달은 각광 받고 있다(Rustad et al, 2010). 하지만 이러한 상처의 치유를 위한 방법들 중 이식과정을 통한 방법은 기증자와 수혜자의 불균형, 수술과정 및 수술후의 감염, 조직의 거부반응, 이식 후 이식 물질의 파괴라는 단점이 있으며, 조직배양을 통한 인공조직을 활용한 기술은 실험실 밖에서 실제로 필요한 장기를 위한 scale-up 및 복잡한 complex-tissue의 생산 등의 많은 어려움을 겪고 있다(Rustad et al, 2010). 따라서 이러한 어려움을 극복하기 위하여 많은 연구가 이루어 졌으며 이는 다양한 tissue engineering technology의 개발 및 발전으로 이어졌다(Rustad et al, 2010).

Tissue engineering 기술은 합성물질을 이용한 대체물질 개발, 이종간의 이식기술, cell을 동봉하는 기술, 다양한 활성 물질을 특정 tissue나 cell의 site에 전달하는 방법개발, tissue complex의 생산을 위해 뼈대물질(bioactive scaffold)등과 같은

biomaterials의 개발, 다양한 조직세포의 회복을 촉진하는 cells, 세포와 조직의 분화, 재생 및 발생을 조절하는 growth factor 등의 bioactive materials 활용, 그리고 이러한 물질들을 이용한 복합체의 개발과 restore, maintain 및 활성증가를 위한 응용 등을 통하여 손상된 세포의 치유, 재생 그리고 교체를 연구하는 기술들을 포함한다(Nimni M., 1997, Rustad et al, 2010). 따라서, 본 연구에서는 tissue engineering 방법들 중에서 다양한 cell type에 적용할 수 있는 multifunctional growth factor를 응용한 새로운 상처 치유제의 개발에 중점을 두고 연구를 하였다.

세포들은 그들이 가지고 있는 membrane molecular에 의하여 직접적으로 signal을 주고받거나 또는 세포에서 생산된 peptide 또는 steroid등의 molecular들의 이동에 의하여 떨어진 다른 cell 들과 signal을 주고 받으며, 이러한 signal molecular들과 receptor의 상호작용에 의하여 cell의 function이 나타난다(Nimni et al., 1997, Nishi et al., 1998). 이러한 cell에 신호전달을 유발하는 molecular들 중에서 후반에 설명된 cellular activity에 영향을 미치는 signal을 전달하는 poly peptide들을 growth factor 라고 한다(Nimni et al., 1997, Nishi et al., 1998). 또한, hormone의 경우 glandular tissues에

서 합성되어 hormone 각각의 특정 조직 또는 세포가 target이 되지만, growth factor의 경우 embryos를 포함하는 모든 organism, organs, tissues와 심지어 배양중인 세포 조직에서도 발견된다(Nimni et al., 1997, Nishi et al., 1998). 따라서 특정 growth factor의 경우 cell culture과정으로써 획득이 가능하기도 하며(Nimni et al., 1997, Nishi et al., 1998), 이렇게 다양한 세포에서 발현되는 growth factor는 특정 target 조직이 아닌 다양한 tissue의 생산, 재생, 그리고 분화 및 이러한 활성의 촉진 등의 과정에서 핵심적인 역할을 하기 때문에 tissue engineering에서 매우 유용한 소재로 주목 받고 있다(Rustad et al, 2010). 그리고 세포배양(cell culture), 재조합 단백질 생산 기술(recombinant protein technology)과 growth factor의 functional understanding 및 clinical application, useful pharmaceutical form들의 개발 및 발달은 growth factor들의 유용성을 더욱 증가시켰다(Nimni, 1997).

성장인자(growth factor)들은 합성이 되는 곳과 작용이 일어나는 곳 사이의 물리적인 거리 또는 작용 메카니즘에 따라서 분류 되기도 한다(Nimni, 1997, Nishi et al., 1998, 그림 1). 이는 특정 조직에서 생산되어 혈류를 통하여 다른 표적조직에

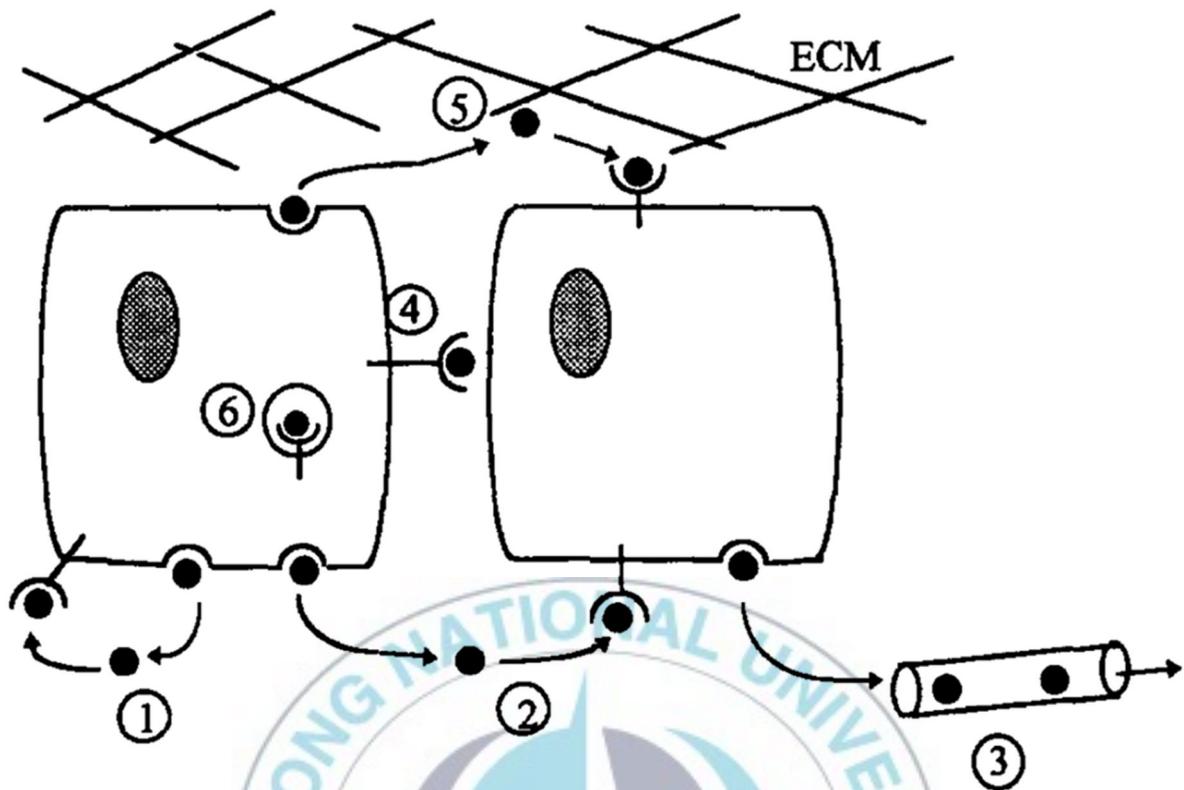


Figure 1. The ways of production and functional mechanism of growth factors<sup>a</sup>.

Black dots present growth factors that produced and act in diverse process. ① autocrine, ② paracrine, ③ endocrine, ④ juxtacrine, ⑤ intracrine.

<sup>a</sup>This figure was taken from Nimni et al., 1997.

이동하여 작용하는 endocrine, 생산 조직 주변의 다른 표적 조직에 영향을 미치는 paracrine, 그리고 생산 조직과 표적 조직이 같은 autocrine으로 분류되며 이는 이동 거리에 따른 활성 또는 존재하는 농도의 감소를 주로 반영하여 분류한다(Nimmi M., 1997, Nishi et al., 1998). 또한 작용범위에 따라서 조직에서 생산된 뒤 세포막에 결합된 상태로 자신 또는 인접한 세포에 신호를 전달하는 juxtacrine과 한 세포에서 생산되어 같은 세포 내에 active한 형태로 남아 있는 intracrine 으로 분류되기도 한다(Nimmi M., 1997). 따라서, 다양한 growth factor들은 작용기작에 따라서 주로 endocrine과 autocrine/paracrine의 두 group으로 나누어진다(Nishi et al., 1998). Autocrine 또는 paracrine group은 transforming growth factor (TGF), keratinocyte growth factor (KGF), hepatocyte growth factor (HGF), epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF), insulin-like growth factor (IGF) 등의 성장인자들이 있다(Imanishi et al., 2000). Autocrine/paracrine으로 분류되는 성장인자는 그 작용 특성에 따라서 autocrine (TGF), paracrine (KGF, HGF), 그리고 autocrine/paracrine (EGF, PDGF)으로 구분할 수 있다(Nimmi et al., 1997).

지금까지 발견된 수많은 growth factor들을 structural homology로써 분류했을 때 20개의 family 또는 super-family로 분류되며, 크게 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), epidermal growth factor (EGF), nerve growth factor (NGF), platelet-derived growth factor (PDGF), 그리고 fibroblast growth factor (FGF)의 5 family로 분류할 수 있다 (Nimni M., 1997, 그림 2). 이렇게 분류되는 growth factor들은 각각의 multi-biological function을 가지기 때문에 의학, 약학 그리고 화장품 산업 등에서 치료제 및 치료제로의 응용을 위해 주목 받았다(Kim et al., 2009). 그러나 growth factor라고 하여 모든 종류의 growth factor가 모든 type의 cell의 proliferation을 유도하지 않는다 (Nimni M., 1997). 즉, growth factor는 target cell type에 따라서 cell division, differentiation, migration 또는 gene expression을 stimulate 하거나 inhibit하며 이는 growth factor 또는 target cell type에 따라서 활성 및 방식이 다르다(Nimni M., 1997). 예를 들면 TGF- $\beta$ 의 경우 fibroblast의 stimulatory에 관여하나 keratinocytes에는 inhibitor로 작용하기 때문에 잦은 상처 또는 높은 수준의 TGF- $\beta$ 의 발현은 fibroblast의 fibrosis를 방해하기 때문에 dark side라는 상처의 흉터를 만들게 되기 때문에 적절한 optimal 농도가 중요하다(Nimni M., 1997). 또한 2주간의 정맥주사

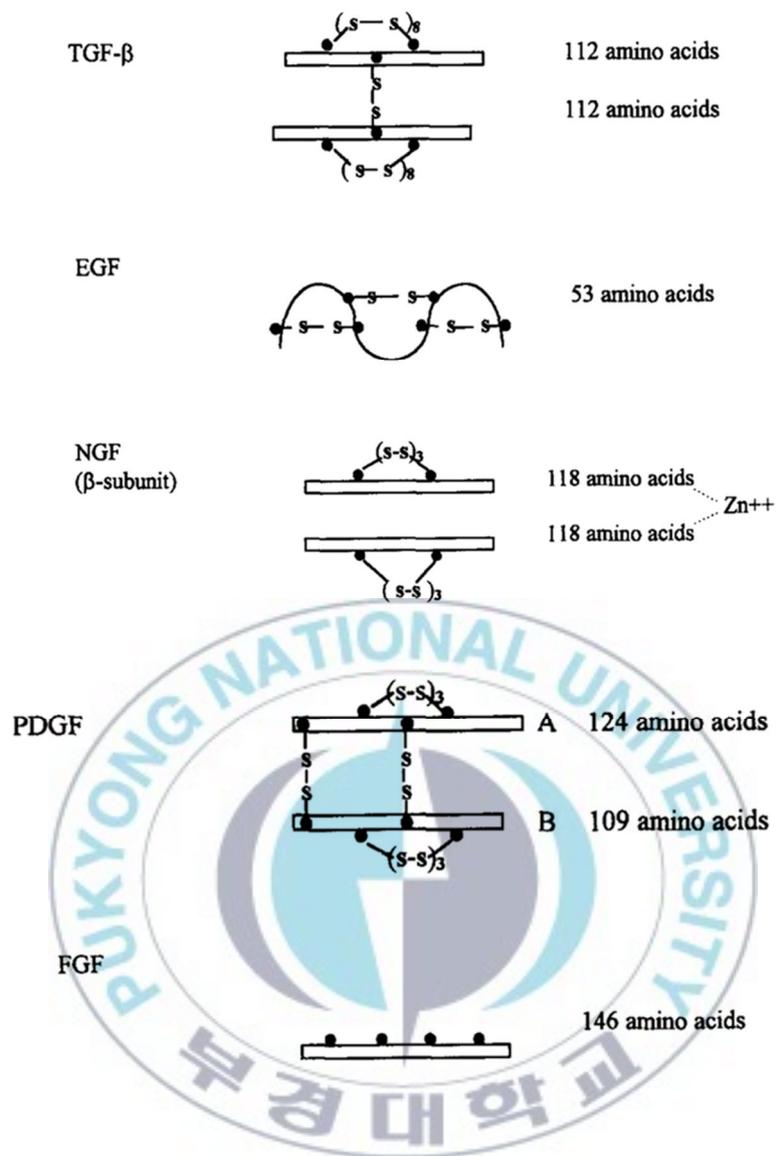


Figure 2. Schematic illustration of five families of growth factor<sup>a</sup>.

Dots present cycteine residue and '-s-' mean disulfide bond.

<sup>a</sup>This figure was taken from Nimni et al., 1997.

실험을 통한 결과 rat의 신장, 장 그리고 주사부위에 심각한 손상이 발견되었다 (Nimni M., 1997). 이와 같이 효과적인 상처 치유 및 이를 위한 치료제의 개발을 위해서는 다양한 cell type, side effect, target specificity, stability 등을 고려한 적합한 성장인자의 선택, 이러한 인자들의 제어기술 개발 및 표적세포로의 전달 등이 중요하다(Nimni M., 1997).

다양한 growth factor들의 wound healing 효과가 밝혀졌으며, epidermal growth factor 는 이러한 growth factor 중 가장 먼저 분리가 되었다(Carpenter & Cohen 1979, Hardwicke et al., 2008). 그리고 recombinant DNA 기술로써 최초로 합성된 growth factor로써 다양한 type의 cell에 많은 활성이 있는 growth factor로 알려져 있으며, 물리적, 화학적 그리고 생물학적 특성이 가장 잘 밝혀진 growth factor이다 (Carpenter & Cohen 1979). EGF family로 형성되는 growth factor들은 trans-membrane glycoprotein precursor에서 파생되며, structural homology와 biological activity에 의하여 epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor-alpha (TGF-alpha), heparine-binding EGF like growth factor (HB-EGF), amphiregulin (AR), betacellulin (BTC), epiregulin (EPR), epigen 그리고 4개의 neuregulins (NRG)으로 분류된다(Dreux et al.,

2006, Hardwicke et al., 2008). EGF family의 growth factor들은  $CX_7CX_{4-5}CX_{10-13}CXCX_8GXRC$  (C: cystein, G: glycine, R: arginine, and X: any amino acid)의 형태인 6개의 cystein이 포함된 motif를 가지는 공통점이 있으며, 6개의 cystein은 C1-C3, C2-C4 and C5-C6이 결합되는 구조의 3개의 disulfide bond를 형성한다(Dreux et al., 2006). 이러한 3개의 disulfide bond는 구조적 안정성을 확보해줌에 동시에 receptor에 높은 binding affinity를 제공한다(Dreux et al., 2006). 또한 mercaptoethanol 또는 urea를 이용한 disulfide bond의 제거 시 EGF의 활성이 사라졌으나, 투석과정 등을 통한 reduction agent들을 제거와 re-folding 과정을 거친 뒤 활성이 다시 나타남이 보고되어 disulfide bond는 EGF의 활성에 매우 중요함이 밝혀졌다(Carpenter & Cohen, 1979).

EGF는 53개의 아미노산으로 이루어진 약 6kDa 크기의 single-chain polypeptide로써 사람의 표피뿐만 아니라 다양한 동물의 상피 층의 증식을 촉진함이 충분히 증명되었으며, 다양한 *in vivo* 실험을 통하여 여러 종류의 cell type의 증식촉진에도 관여함이 알려졌다(Carpenter & Cohen, 1979, Hardwicke et al., 2008, Imanishi et al., 2000, Liu et al., 2006, Schlessinger et al., 1983). 또한 중앙 신경계의 발달, 두개 안면의 형

태형성 발생 및 상처치유에도 관여함이 밝혀졌다(Jyung et al., 1992). 이러한 EGF는 1962년 Stanley Cohen에 의해 쥐의 nerve growth factor를 연구하던 중 우연히 발견 되었으며, 사람의 EGF는 1975년에 urine으로부터 발견 및 정제 되었다(Carpenter & Cohen, 1979, Hardwicke et al., 2008). 그 후 human EGF에 대한 연구는 다양한 활성 및 특성이 발견되었으며 이러한 효과 때문에 집중적으로 연구되었다(Carpenter et al., 1976, Carpenter et al., 1979, Chen et al., 2005, Chung et al., 2006, Cohen et al., 1988, Dreux et al., 2006, Hardwicke et al., 2008, Hayashi et al., 2001, Imanishi et al., 2000, Imen et al., 2009, Ishikawa et al., 2003, Kim et al., 2009, Nishi et al., 1998, Simmons et al., 2004, Yang et al., 2009). 동물실험, 조직 및 세포 배양법을 이용한 연구로써 EGF의 다양한 활성이 증명 되었으며, 가장 큰 활성은 cell의 proliferation, development 그리고 differentiation을 촉진하는 활성이며, 이를 포함하는 다양한 특성을 표1에 설명하였다(표1). 그리고 이러한 작용은 DNA의 합성을 개시하는 신호, cell 증식 촉진, RNA와 protein의 생합성을 활성화, 그리고 ECM의 합성의 활성화 등의 작용에 의하여 발생한다(Chung et al., 2006).

다양한 활성을 보이기 때문에 상처치유 (wound healing) 제제로 각광받는 EGF는 young male의 urine에서 발견 되었기 때문에 초창기에는 urine을 정제하여 EGF를 생산하였다. 하지만 이러한 방법은 시간, 돈 그리고 노동력이 많이 소요되고 또한 다양한 analog들이 포함되어있어 어려움이 많았다(Chen et al., 2005, Cohen et al., 1988). 따라서 이러한 EGF를 bacterial에서 과량 발현하는 방법을 발전 시켰다. 그러나 이러한 방법들은 또한 세포 내에서의 낮은 발현량과 박테리아의 protease 등에 의하여 회수 수율이 매우 낮다는 문제가 발생하였다(Chen et al., 2005, Cohen et al., 1988). EGF는 만성적 상처 부위에는 낮은 치유효과를 나타내었으며, EGF만을 동물의 상처 부위에 처리하였을 때 치유효과가 좋지 않음이 여러 실험에서 증명되었다(Hardwicke et al., 2008, Ishikawa et al., 2006). 이러한 문제는 EGF를 포함하는 다양한 growth factor의 단점인 짧은 half-life에 의하여 발생한다(Hardwicke et al., 2008, Ishikawa et al., 2006, Chung et al., 2006, Carpemter et al., 1976).

Growth factor들의 biological function은 매우 뛰어나지만 이러한 growth factor의 사용에 문제가 되는 것은 short biological half-life 이다(Hardwicke et al., 2008, Ishikawa et al., 2006, Chung et al., 2006, Carpemter et al., 1976, Nishi et al., 1998). 예를 들

면, PDGF의 경우 정맥을 통한 혈액 내로 투입 시 half-life가 2분 이내였으며, 활성 상태의 TGF- $\beta$ 1 형태의 경우 수분(few minutes) 이었다(Chung et al., 2006). EGF의 경우에도 receptor에 부착된 상태에서 빠르게 내화되어버리거나 짧은 시간 내에 분해가 되어버린다(Chung et al., 2006, Carpenter et al., 1976). EGF의 분해는 온도에 dependant하게 이루어 지며, 0°C에서는 매우 낮은 속도로 분해가 되지만 37°C에서는 세포(fibroblast에 부착된)에 부착된 상태에서도 1-2분 내에 반 이상이 분해되었다(Carpenter et al., 1976). 또한 다양한 growth factor에서 나타나는 문제인 낮은 target specificity와 세포 내에서의 짧은 지속시간은 EGF등의 growth factor의 상처치유제로의 응용 또는 사용을 어렵게 만드는 요인이다(Ishikawa et al., 2001, Hayashi et al., 2001, Hardwicke et al., 2008). 따라서 상처치유를 위해서 EGF의 사용량 또는 빈도는 점점 증가 할 수 밖에 없으며, 이에 따른 표적세포의 EGF에 대한 susceptibility가 감소하거나 다른 side effect가 발생 할 수 있기 때문에 손상된 세포의 치유에 필요한 부위에 역치값 이상의 EGF의 존재 및 유지가 매우 중요하다(Hayashi et al., 2001). 또한 피부상처 부위에는 다양 cytokine류 및 protease가 분비된다. 이러한 물질에 의하여 EGF등의 peptide성 growth factor등은 쉽게 분해가 되

어버린다(Hardwicke et al., 2008). 따라서 상처부위의 체액성 물질들에 의하여 분해 및 확산이 빠르게 발생하는 것을 방지, 세포 내로의 유입 감소, 상처부위의 proteolytic enzyme으로부터 보호, 표적세포에 높은 특이성 또는 감수성을 나타내어야 하며 그리고 짧은 반감기라는 다양한 문제점을 해결하여 EGF를 치료목적 부위에 일정 농도 이상으로 전달 및 유지하는 새로운 target delivery system의 개발이 필요하다(Hayashi et al., 2001).

Growth factor 또는 이를 coding 하고 있는 mRNA의 경우 보통 생체 내에서는 불활성을 띠는 형태 또는 일부의 전구체의 형태의 복합체로 생산하며 이러한 방식으로 발현되는 growth factor들의 activation을 위해서는 proteolytic activity에 의한 분해가 필요하며, 이러한 active한 형태의 growth factor들은 활성의 유지 및 안정화를 위하여 cellular matrix molecular에 binding 하여 존재한다(Nimni, 1997, Nagaoka et al., 2010). 또한, 손상된 세포들의 치유 또는 회복을 위해서는 목적세포에 대한 분열촉진 및 분열의 활성화 유도라는 신호를 전달할 growth factor와 함께 세포들이 분열할 수 있는 scaffold를 제공하는 extra-cellular matrix (ECM) 성분들이 필수적이

다(Nimni, 1997, Nagaoka et al., 2010).

조혈세포, 종양세포 그리고 생식세포를 제외한 모든 종류의 포유류세포는 분열 활성화와 기능을 유지하기 위하여 ECM 등의 solid substrate 또는 scaffold에 부착을 하여야 한다(Nimni, 1997). 이러한 결과는 fibronectin, collagen, gelatin 등을 이용한 실험에서 증명되었으며, 그리고 이러한 실험들의 결과는 solid substrate 또는 scaffold 등과 함께 growth factor가 cell growth 또는 differentiation에 밀접한 관계가 있음을 한 번 더 증명하였다(Nimni, 1997).

Extra-cellular matrix는 생체의 cell들을 둘러싸고 있는 비세포성의 물질들을 총칭하는 말로써 그 기능 및 종류가 매우 다양하다(Weinbaum et al., 2010). 이러한 ECM 들은 cell 또는 tissue의 기계적인 지지, cell과 tissue간 interaction의 전달, cell의 모양, 움직임, 성장 및 분화에 영향을 미치며 세포들의 막수용체 들과 함께 cellular function 또는 signal을 조절하기도 하며, 세포외부의 신호전달 물질들의 저장 및 상호작용에 관여한다(Nishi et al., 1998, Field et al., 1996, Flaumenhaft et al., 1992, Khachigian et al., 1994, Sakasela et al., 1990, Bouhadir et al., 1998, Ishikawa et al., 2003,

Nimni 1997, Rustad et al., 2010, Weinbaum et al., 2010). 따라서 이러한 ECM은 tissue engineering에 있어서 growth factor와 함께 매우 중요한 역할을 한다. ECM은 구조적으로 섬유조직(fibers), 프로테오글리칸(proteoglycans) 그리고 접착성의 당단백질(adhesive glycoproteins) 등으로 구성되어 있으며, 섬유조직은 대표적으로 collagen과 elastin 등이 있으며 이러한 조직으로 인하여 cell의 강도 및 유연성을 가지게 된다(Weinbaum et al., 2010). 프로테오글리칸은 단백질과 당의 복합체의 형태이며 이로 인하여 세포의 용적이 유지되며 대표적으로 aggrecan 및 syndecan 등이 알려져 있다(Weinbaum et al., 2010). 마지막으로 fibronectin과 laminin등으로 알려진 접착성 당단백질은 proteoglycan 또는 collagen 등의 ECM과 cell의 membrane을 연결하는 역할을 한다(Weinbaum et al., 2010).

이렇게 다양한 ECM 중에서 collagen은 포유동물의 체내 단백질의 약 25%를 차지 할 정도로 가장 풍부하게 존재하고 있으며, 25개의 iso-form이 발견되었다(Weinbaum et al., 2010). Collagen의 분자구조 및 구조적인 특징에 의하여 근섬유를 구성하는 I, II, III, V와 이러한 근섬유와 연관한 VI 그리고 IX로 나누어 질 수 있

으며, 피부, 골조직, 인대(tendon), 연골조직, 치아의 상아질, 근육, 혈관, 각막 및 유리체액 등에서 발견되며 각각의 조직 구조를 지지, 연결 그리고 조직의 보호에 작용한다(Weinbaum et al., 2010). 따라서 생체 내에 가장 풍부하게 존재하며 다양한 세포의 골격이 되는 특성 및 in vitro 상에서는 self-assemble 과정을 통하여 불용성의 섬유조직을 만드는 특성 등의 다양한 장점들 때문에 collagen을 이용한 tissue engineering agent로의 사용 또는 응용을 위한 다양한 연구가 이루어졌다.

Bovine의 collagen을 이용한 growth factor의 전달매개체로서 사용하는 방법은 높은 순도의 collagen의 생산가능, 피부에 저자극성, diffusion이 늦게 됨, 그리고 다양한 처리방법이 가능하기 때문에 수술절개부위에 이용하기 쉽다(Rustad et al., 2010, Chung et al., 2006, Ishikawa et al., 2003). 또는 collagen을 이용한 growth factor들의 delivery system의 개발 등에 많은 응용이 이루어졌다(John et al., 2009). 그리고 이러한 연구는 collagen의 native한 형태에서부터 산 처리과정 등의 다양한 처리가 된 형태의 collagen을 응용하였다(John et al., 2009). 이러한 collagen은 자연상태의 ECM polymer와 여러 가지 특성이 본래의 tissues와 비슷하여 이미 tissue engineering에

대한 scaffold로써 그 효능이 검증 되었지만, 장기간에 걸친 주입 및 착상의 형태로 사용시 바이러스 감염, 항원-항체반응 그리고 낮은 안정성 등의 문제가 발생한다(Nagaoka et al., 2010). 따라서 본 연구팀은 이러한 ECM scaffold인 collagen을 직접 사용 또는 응용하는 것 보다 생체내의 풍부하게 존재하는 collagen을 target으로 하여 부착하는 방식을 이용한 EGF의 전달방식을 개발함으로써 EGF의 상처치료제로 사용시의 문제점들을 극복하고자 하였다(Kim et al., 2009).

*Vibrio mimicus*의 metalloprotease의 CBD region의 연구 및 이전의 실험과정을 통하여 33개의 아미노산이 collagen-binding 활성에 중요함을 알 수 있었다(Lee et al., 1998, Lee et al., 2003, Lee et al., 2005). 따라서 이러한 특징에 착안하여 본 연구팀에서는 33개의 CBD를 이용한 EGF fusion 단백질을 연구하였고 그 결과 EGF에 의한 cell proliferation과 CBD에 의한 collagen binding 활성을 나타냄을 확인하였다(Kim et al., 2009). 그리고 이러한 33개의 collagen-binding region의 domain 분석결과 domain 내에서 FAXWXXT motif가 두 번 반복됨을 알 수 있었으며, 반복되는 FAXWXXT motif 중에서 C-term의 FAXWXXT motif가 binding 활성에 더욱 중요함을 알 수 있

었다(Lee et al., 2005). 따라서 CBD 내부 C-term의 FAXWXXT motif를 포함하는 18개의 아미노산과 12개의 아미노산을 이용하여 상처치료제로의 응용을 위한 EGF chimeric recombinant protein을 개발하고자 하였다.



Table 1. Various biological effects of epidermal growth factor<sup>a</sup>

**Biological effect**

***In vivo***

Accelerated proliferation/differentiation of	skin tissue corneal epithelial tissue lung and trachea epithelia
Formation of fatty liver	
Potentialiation of cleft palate	
Inhibition of gastric acid secretion	
Hepatic hypertrophy and hyperplasia	
Increase of disulfide group content in skin	
Potentialiation of methylcholanthrenecarcinogenesis	
Increased activity of ornithine decarboxylase and accumulation of putrescine	

***Organ cultures***

Acceleration of proliferation/differentiation of	skin tissue corneal epithelial tissue mammary gland epithelial tissue
Inhibition of palate fusion	
Enhanced protein synthesis and RNA synthesis	
Induction of ornithine decarboxylase and accumulation of putrescine	

***Cell culture***

Increased transport	$\alpha$ -aminoisobutyrate deoxyglucose K <sup>+</sup>
Activation of glycolysis	hyaluronic acid
Stimulation of macromolecular synthesis	RNA protein DNA
Enhanced cell multiplication	
Alteration of membrane properties	
Stimulated human chorionic gonadotropin	
Increased biogenesis of LETS protein	
Enhanced prostaglandin biosynthesis	
Alteration of viral growth	
Increased squame production by keratinocytes	

<sup>a</sup> Table taken from Carpenter et al. (1979)

## II. 재료 및 방법

### 1. Reagents

DNA work에 사용한 endonuclease, polymerase는 각각 Promega (USA)와 Takara (Japan)에서 구입하여 사용하였으며, 균주의 배양에 필요한 배지의 경우 Difco (USA)사의 배지를 사용하였다. 재조합 단백질의 발현을 위한 vector와 발현된 단백질의 분리 및 정제에 사용한 Ni-NTA kit는 Novagen (Germany)과 Qiagen(Germany)에서 구입하여 사용하였다. 발현된 fusion 단백질의 collagen-binding assay 실험을 위하여 Sigma (USA)사의 bovine type I collagen과 Corning (USA)사의 filtration 제품을 이용하였다. Cell proliferation test를 위하여 Gibco (USA )사의 Dulbecco's Hamster Eagle Media (DMEM), fetal bovine serum (FBS) 등을 사용하여 cell 배양을 하였으며, MTS assay를 위하여 Promega (USA)사의 MTS kit를 사용하였다. EGF에 의한 EGF receptor의 phosphorylation을 확인하기 위하여 invitrogen (USA)사의 antibody를 구입하여 western blotting을 수행 하였다.

## 2. Bacterial strains, cell lines and plasmids

Human epidermal growth factor의 증폭 주형으로 사용한 plasmid는 부산대 의대 안순철 교수님께 hEGF mature form이 cloning 된 plasmid 형태로 받았으며, *V. mimicus*의 collagen binding domain의 증폭 주형으로는 Lee 등의 VMCBS가 cloning 된 plasmid를 사용하였다(Lee et al., 2005). 본 cloning에 사용한 vector와 host *Escherichia coli* cell은 표 2에 나타내었다. Recombinant fusion protein 생산을 위한 cloning host인 *E. coli* DH5 $\alpha$  및 발현 host인 *E. coli* BL21(DE3)는 Luria-Bertani (LB, Difco USA) 배지에 kanamycin (50 $\mu$ g/ml) 또는 ampicillin (50  $\mu$ g/ml)을 각각 첨가하여 37°C에서 배양하였다. EGF 및 fusion 단백질의 cell mitogenesis의 측정을 위한 human cell line은 human epidermoid cell line인 A-431 (ATCC CRL-1555)과 human skin keratinocyte인 HaCaT (Boukamp et al., 1988) cell line을 이용하였다.

Table 2. Bacterial strains, plasmids and cell lines used.

Bacterial strains/ plasmids	Genotype or relevant characteristics	Reference or source
<b>Strain</b>		
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	SupE44 $\Delta$ lacU169 ( $\Phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 end A1 gyrA96 thi <sup>-1</sup> relA1	Invitrogen co.
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)	Novagen co.
<b>Plasmid</b>		
VMCBD	Apr, derivative of pETMETA62 truncated 102 bp	Lee et al (2005)
hEGF	cDNA of mature type human epidermal growth factor cloned plasmid	Kim et al (2009)
pET-22b(+)	His-tag fusion expression vector, Amp <sup>r</sup> , T7 promoter, 6 His-tag coding sequence	Novagen co.
<b>Human cell line</b>		
A-431	Human epidermoid carcinoma cell line	ATCC CRL-1555
HaCaT	Human adult skin keratinocytes	Boukamp et al (1998)

### 3. Construction of plasmid for hEGF and CBD fused chimeric proteins

18개의 CBD moiety와 12개의 CBD moiety가 융합된 재조합 EGF fusion 단백질의 발현을 위한 plasmid를 구축하기 위해 overlapping PCR을 수행하였다. 그림 2와 같이 EGF의 C-말단과 N-말단에 18개와 12개의 아미노산으로 이루어진 CBD moiety를 부착하기 위하여 사용한 11개의 primer를 표 3에 나타내었다. 각각의 primer의 이름을 편의상 숫자로 표기하였다(표 3). 먼저 ①번과 ②번 primer, ③번과 ④번 primer, ①번과 ⑤번 primer, ⑥번과 ④번 primer, ⑨번과 ⑩번 primer set를 이용하여 human mature type EGF를, ③번과 ④번 primer, ⑦번과 ⑧번 primer set를 이용하여 18개의 아미노산으로 이루어진 CBD moiety를, 그리고 ⑥번과 ④번 primer, ⑪번과 ⑧번 primer set를 이용하여 12개의 아미노산으로 이루어진 CBD moiety를 각각 증폭하였다(그림3). ③번 primer의 3' 말단은 18개의 아미노산으로 이루어진 CBD moiety의 5'말단에 상보적인 서열을, ②번 primer의 3' 말단은 EGF의 3'말단에 상보적인 서열을, ⑥번 primer의 3'말단은 12개의 아미노산으로 이루어진 CBD moiety의 5'말단에 상보적인 서열을, ⑤번 primer는 EGF의 3'말단에 상보적인 서열을, ⑨번 primer의 3'말단은 EGF의 5'말단에 상보적인 서열을, 그리고 ⑧번 primer의 3'

말단은 12개의 아미노산으로 이루어진 CBD moiety의 3'말단에 상보적인 서열을 가지고 있기 때문에 이러한 primer set를 이용한 증폭산물들은 overlapping PCR을 수행 시 변성과정에서 각각의 fusion partner fragment의 primer로써 작용한다(표 3, 그림 3). 따라서 먼저 실행한 PCR 증폭산물과 함께 ①번과 ④번 primer set, ⑦번과 ⑩번 primer set, 그리고 ⑪번과 ⑩번 primer set를 첨가한 overlapping PCR을 수행함으로써 EGF의 C-말단에 18개의 아미노산으로 이루어진 CBD moiety, 12개의 아미노산으로 이루어진 CBD moiety가 부착된 EC1과 EC2 증폭산물이 각각 만들어지며 그리고 EGF의 N-말단에 18개의 아미노산으로 이루어진 CBD moiety, 12개의 아미노산으로 이루어진 CBD moiety가 부착된 CE1과 CE2 증폭산물이 만들어진다(그림 3). 이렇게 만들어진 증폭산물은 각각의 5'말단과 3'말단에 첨가된 *Nde*I과 *Xho*I endonuclease 부위가 있기 때문에 overlapping PCR amplicon인 EC1, EC2, CE1, CE2들과 발현 벡터인 pET-22B(+)를 각각의 제한효소로 자른 뒤 Quick ligation kit (NEB, USA)를 이용하여 각각의 대량발현 plasmid를 구축하였다. 이렇게 구축한 각각의 plasmid들은 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 형질 전환하여 plasmid를 안정화 시킨 뒤, 다시 plasmid를 분리하여 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질 전환시켜 재조합 용합 단백질들의

대량생산을 위한 벡터를 구축하였다. 이렇게 구축된 형질전환 대장균들은 ampicillin이 첨가된 Luria-Bertani (LB) 배지를 이용한 선별 및 colony PCR법을 이용하여 일차적으로 도입된 plasmid를 확인한 뒤 각각의 plasmid를 분리한 뒤 제한효소를 처리하여 vector내에 삽입된 각각의 overlapping PCR 산물을 확인하였다.



Table 3. Primer sequences for amplification of hEGF and CBD fusion proteins.

Name and number of primer	Sequence (5'→3') <sup>a</sup>
EC1-EGF-up (forward)-①	GGCC <b><i>CATATG</i></b> AATAGTGA CTCTGAATGTCCC
EC1-EGF-rp (reverse)-②	<u>TAAGTTTTTCAC</u> GCGCAGT TCCCACCACTTC
EC1-CBD-up (forward)-③	<u>TGGGAACTGCGC</u> GTGAAAAACTTAGGTGAAC
EC1-CBD-rp (reverse)-④	GGCC <b><i>CTCGAG</i></b> TGTATCAAGCCAGACTGCAAAC
EC2-EGF-rp (reverse)-⑤	<u>GGCGTTGTATTG</u> GCGCAGT TCCCACCACTTC
EC2-CBD up (forward)-⑥	<u>TGGGAACTGCGC</u> CAATACAACGCCGAGTTTG
CE1-CBD-up (forward)-⑦	GGCC <b><i>CATATG</i></b> GTGAAAAACTTAGGTGAACAA
CE1-CBD-rp (reverse)-⑧	<u>AGAGTCACTATT</u> TGTATCAAGCCAGACTGCAA
CE1-EGF-up (forward)-⑨	<u>TGGCTTGATACA</u> AATAGTGA CTCTGAATGTCC
CE1-EGF-rp (reverse)-⑩	GGCC <b><i>CTCGAG</i></b> GCGCAGT TCCCACCACTTCAG
CE2-CBD-up (forward)-⑪	GGCC <b><i>CATATG</i></b> CAATACAACGCCGAGTTTGCA

<sup>a</sup>The underlined letters in primer sequences mean complemented sequences for over lapping PCR and marked in bold italic letters indicate restriction endonuclease sites.

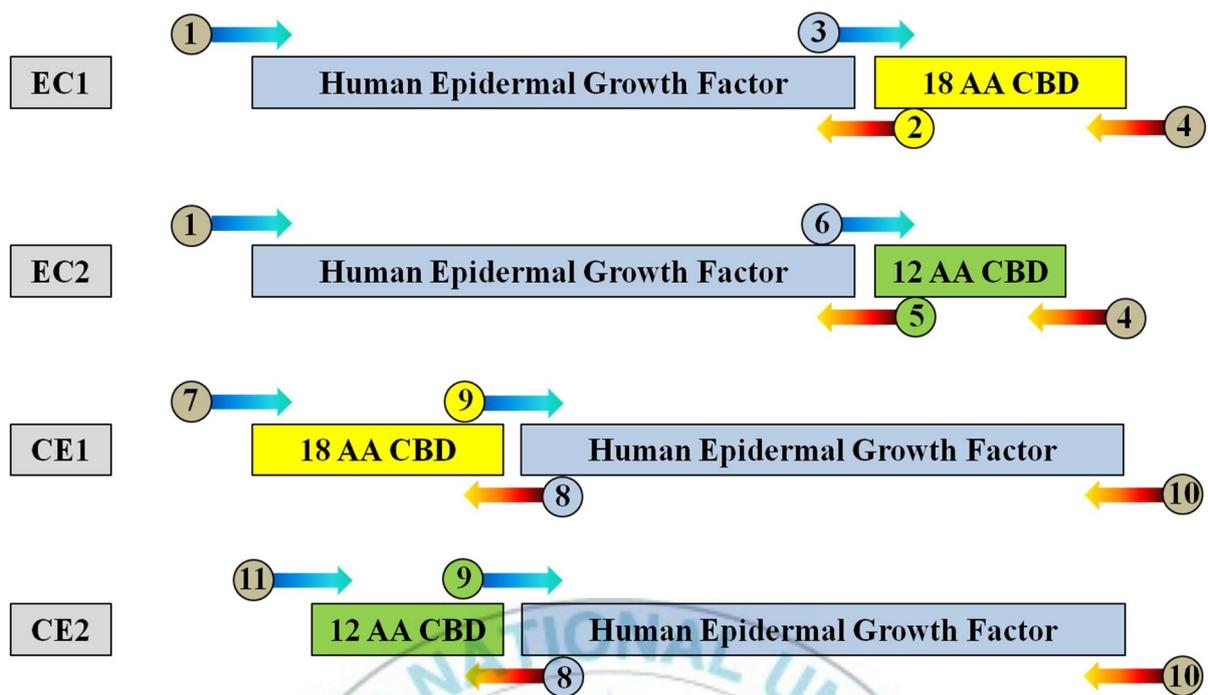
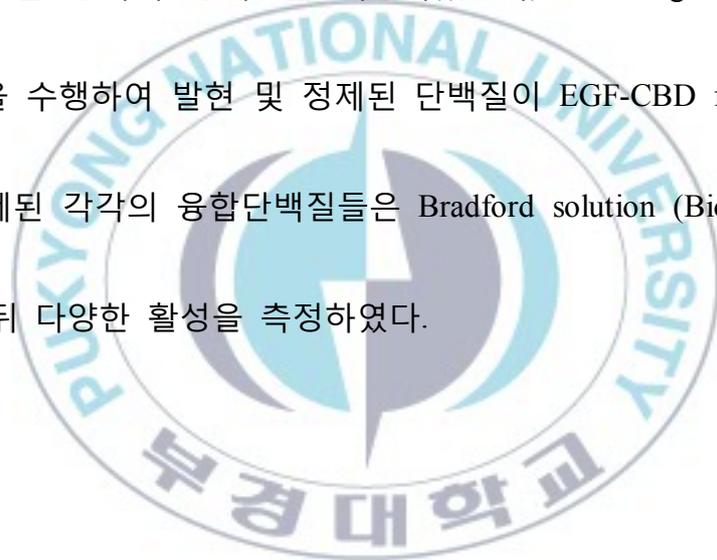


Figure 3. Schematic illustration of overlapping PCR for EGF and CBD fusion plasmid.

#### 4. Expression and purification of fusion proteins

Overlapping PCR 방법으로 만들어진 EGF fusion CBD plasmid를 가지는 각각의 형질전환 대장균체들은 ampicillin이 첨가된(50 $\mu$ g/ml) LB 액체배지를 이용하여 37°C에서 하룻밤 동안 전배양을 하였다. 이렇게 배양한 배양액을 starter로 이용하여 ampicillin이 첨가된 배지에 재접종 한 뒤 600nm에서의 흡광도가 0.4가 될 때까지 37°C에서 배양하였다. 그리고 1M isopropyl  $\beta$ -D-thio-galactopyranoside (IPTG)의 농도가 1mM이 되도록 첨가하여 대량발현을 유도한 뒤 4시간 동안 배양하여 각각의 융합단백질을 과발현하였다. 각각의 대장균 배양액은 4°C에서 3,000 rpm의 속도로 30분 동안 원심 분리하여 배지성분과 균체를 분리한 뒤 50mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 녹여 초음파를 이용한 파쇄를 하였다. 파쇄된 cell 용해물(lysate)들은 4°C에서 12,000 rpm의 속도로 10분 동안 원심 분리하여 불용성 단백질과 수용성 단백질로 분리를 하였다. 분리한 단백질은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 통하여 과발현된 단백질의 발현특성을 분석하였다. Inclusion body 형태로 발현된 융합단백질들은 6M urea가 포함된 50mM Tris-HCl buffer를 이용하여 변성시킨 뒤 50mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)을 이용하여 4°C에서

투석하여 단백질의 원래 구조를 회복하도록 하였다. 투석과정 후 fusion protein들을 정제하기 위하여 각각의 융합 단백질에 부착된 hexa-histidine tag의 특성을 이용한 metal affinity column (Ni-NTA)을 사용하여 정제하였다. 용출용액(elution buffer, 20mM Tris-HCl pH8.0 containing 60mM imidazole and 0.5M NaCl)을 이용하여 추출된 융합단백질들은 50mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)을 이용하여 4°C에서 투석한 뒤 Tricine-SDS-PAGE를 통하여 정제도를 확인하였으며, 6-his tag antibody를 이용한 western blotting을 수행하여 발현 및 정제된 단백질이 EGF-CBD fusion 단백질임을 확인하였다. 정제된 각각의 융합단백질들은 Bradford solution (Bio-rad)을 이용하여 농도를 측정한 뒤 다양한 활성을 측정하였다.



## 5. Collagen binding activities

재조합 단백질들의 collagen binding 활성을 확인하기 위하여 Lee의 방법을 수정하여 수행하였다(Lee et al., 2005, Matsushita et al., 1998). 10mg의 bovine type I collagen (Sigma, USA)을 5mM CaCl<sub>2</sub>를 포함하는 50mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 1시간 동안 반응시켜 pre-swelling한 뒤 0.4 µm pore size filter tube (Corning, USA)를 이용하여 4°C에서 12,000rpm의 속도로 10분간 원심 분리하여 buffer 성분을 제거한다. 5mM CaCl<sub>2</sub>를 포함하는 50mM Tris-HCl buffer에 0.1 mg의 정제된 fusion 단백질을 각각 첨가한 뒤 pre-swelled collagen과 상온에서 6시간 동안 반응시켰다. Collagen-binding 반응 후 filter tube를 이용하여 4°C에서 12,000rpm의 속도로 10분간 원심분리 과정을 수행 후 남은 collagen을 1% SDS 용액과 함께 1시간 동안 상온에서 반응시켜 collagen에 부착된 재조합 단백질을 떼어낸다. 각각의 과정에서 획득한 원심분리 후의 용액은 Tricine-SDS-PAGE를 이용하여 용액 내에 존재하는 재조합 단백질의 유무를 측정하였으며, MULTI GUAGE V 3.0 program (FUJIFILM)을 이용하여 gel 상의 재조합단백질의 농도 및 부착활성의 정도를 비교하였다.

## 6. Assay for cell proliferation of human epidermal cell lines

본 연구에서 제작한 CBD moiety가 융합된 EGF 재조합 단백질의 cell에 대한 분열촉진 효과를 보기 위하여 A-431과 HaCaT human cell line을 이용한 MTS assay 방법으로 실험을 수행하였다(Promega, USA). A-431과 HaCaT cell line을 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 각각의 cell line들은 배양 후 PBS로 씻은 뒤 trypsin-EDTA를 이용하여 culture dish에서 분리하였으며,  $5 \times 10^3$  cells/well의 밀도로 96-well plate에 분주하였다. 24시간 배양한 cell line plate들은 PBS로 두 번 씻은 뒤 serum free 배지로 교체하여 12시간을 더 배양한 뒤 각각의 재조합 단백질을 10pg에서 100ng의 농도로 처리하였으며, negative control은 아무런 첨가물이 없는 serum free DMEM 배지를 처리하였으며 positive control로써 Sigma사의 human EGF를 사용하였다. 각각의 재조합 단백질과 cell line들을 한 시간 동안 37°C에서 배양하고 PBS로 씻은 뒤, Promega사의 MTS assay kit를 이용하였다. 37°C에서 30분간 배양한 뒤 serum free DMEM 배지를 분주한 well을 blank로 하여 Perkin-Elmer사의 Wallac Victor 2로 OD<sub>490</sub> nm에서 각 well의 흡광도를 측정하여 cell의 수를 측정하였다.

## 7. Mitogenetic activities of fusion protein with collagen coated well plate.

EGF와 CBD moiety가 fusion 된 4개의 chimeric protein의 cell proliferation 활성을 테스트하기 위하여 type I collagen이 coating 된 96 well culture plate를 사용하였다. 96-well plate에 collagen을 coating 하는 방법은 Lin et al (2006)의 방법을 변형하여 수행하였다. Bovine type I collagen (Sigma, USA)을 0.25 g/ml의 농도로써 0.1M acetic acid에 첨가하여 실온에서 녹인 뒤 고온고압멸균을 하였다. 멸균 후 실온에서 collagen 용액을 식힌 뒤 0.1mg/well의 농도로 각각의 96 well에 분주하였다. 분주 후 1시간 동안 무균대에서 반응 시킨 뒤 PBS 용액을 이용하여 3차례 씻어내었다. hEGF를 비롯한 활성을 확인하고자 하는 recombinant fusion protein들을 10pg에서 100ng의 농도로 serum free DMEM배지와 섞어서 각각의 well에 분주하였다. 분주 후 1시간 동안 37°C에서 반응 시킨 후 다시 PBS로써 3회 씻은 후 각각  $5 \times 10^3$  cells/well의 A-431 cell line과 HaCaT cell line을 분주하였다. 분주 후 2일간 배양하였으며 배양 후 MTS kit을 이용하여 흡광도 490 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 well당 cell의 수를 측정하였다.

## 8. Analysis of phosphorylation of human cell lines with western blotting.

Collagen에 부착 활성을 부여한 EGF fusion 재조합 단백질들의 EGF receptor에 신호전달과정을 통한 A-431과 HaCaT cell line의 phosphorylation 신호활성을 측정하기 위하여 Sahasrabuddhe의 방법을 이용하여 실험을 수행하였다(Sahasrabuddhe et al., 2006). A-431과 HaCaT cell line은 위에서 언급한 조건에서 배양하였다. 각각의 cell line들은 배양 후  $5 \times 10^5$  cells/well의 밀도로 6-well plate에 분주하였다. 24시간 배양한 plate들의 각각의 well은 PBS를 이용하여 두 번 씻은 뒤 serum free 배지로 교체하여 12시간을 더 배양하였다. 각각의 재조합 단백질 100ng을 처리하였으며, negative control로써 아무런 첨가물이 없는 serum free DMEM을, positive control로써 Sigma사의 human EGF를 사용하였다. 각각의 재조합 단백질을 처리한 cell line들은 5분간 37°C에서 배양한 뒤 PBS로 씻은 뒤 cell scraper를 이용하여 얼음 위에서 well에 부착된 cell을 수거하였다. 수거한 각각의 cell sample들은 PBS를 이용하여 washing 과정을 거친 뒤 PAGE sample loading buffer를 첨가하여 10분간 boiling 하였다. 얼음에서 10분간 식힌 후 spin-down 과정을 통하여 cell debris를 제거한 뒤 8% SDS-PAGE를 수행하였다. Transfer를 이용하여 15V로 한 시간 동안 작동하여

SDS-PAGE에 있던 단백질을 모두 nitrocellulose membrane에 이동시켰다. 이렇게 이동한 단백질은 ponceau S 염색약을 통하여 확인 한 뒤 western breeze kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 western blotting을 수행하였다. Primary 항체는 antiphosphotyrosine (Invitrogen, USA)을 이용하였다.



## 9. Aggregation of recombinant proteins

본 연구에서 제작한 EGF-CBD fusion 단백질들의 aggregation 정도를 확인하는 실험을 위하여 Ni-NTA column chromatography를 이용하여 정제한 각각 단백질들의 투석 후 aggregation 정도를 확인하였다. 투석과정 후 각각의 재조합 단백질을 dialysis membrane에서 수거한 뒤 aggregation이 발생한 protein의 농도를 bradford solution으로 측정함으로써 융합단백질들의 aggregation ratio를 측정하였다. 투석 후 총 단백질량을 각각의 기준으로 하였으며, 4°C에서 12,000 rpm의 속도로 10분간 원심분리 과정을 통하여 aggregates를 제거하고 상층액의 soluble한 단백질 양을 상대적인 값으로 하여 재조합 단백질들의 aggregation 정도를 측정하였다.



### III. 결과

#### 1. Construction of recombinant plasmid for over-expression of fusion proteins.

18개와 12개의 아미노산으로 구성된 *V. mimicus* metalloprotease 유래의 collagen-binding domain과 human EGF가 융합된 재조합 단백질의 대량발현을 위해 각각의 유전자를 PCR 증폭과정을 통하여 획득하였다(그림 4). EC1-EGF-up와 EC1-EGF-rp, EC1-EGF-up와 EC2-EGF-rp, 그리고 CE1-EGF-up와 CE1-EGF-rp primer 조합을 통하여 각각 18개와 12개의 아미노산으로 이루어진 CBD를 N 말단과 C 말단에 부착할 수 있는 EGF 유전자를 증폭하였으며 약 180 bp의 증폭산물이 존재함을 agarose gel 전기영동과정으로 확인하였다(그림 4). 또한 EC1-CBD-up와 EC1-CBD-rp 그리고 CE1-CBD-up와 CE1-CBD-rp primer set를 이용하여 증폭된 EGF 산물의 5'과 3'에 융합 시킬 18개의 아미노산으로 이루어진 CBD를 포함하는 유전자를 증폭하였으며 약 80 bp의 amplicon을 확인하였다(그림 4). EGF에 부착할 12개의 아미노산으로 이루어진 collagen-binding domain을 증폭하기 위하여 EC2-CBD-up와 EC1-CBD-rp 그리고 CE2-CBD-up와 CE1-CBD-rp primer 조합을 이용하여 PCR을 수

행하였으며 약 60 bp의 증폭체를 확인하였다(그림 4). 각각의 융합 단백질을 위한 PCR product들은 증폭 효율이 다름이 알 수 있었으며 EGF 증폭체들에 비하여 CBD을 증폭시킨 PCR product들은 그 효율이 낮음을 알 수 있었다(그림 4). 그러나 이러한 증폭산물들과 각각의 primer set를 이용한 over-lapping PCR 결과 그림 4에 나타낸 EGF-CBD 또는 CBD-EGF의 순서로 융합된 약 230 bp와 210 bp의 PCR 결과물을 얻을 수 있었으며 증폭효율이 매우 높음을 알 수 있었다(그림 4, 5). 이러한 PCR 증폭산물은 gel purification 과정을 통하여 순수하게 분리하였으며, *Nde*I 과 *Xho*I endonuclease 효소를 이용한 절단과정을 통하여 대량발현 vector인 pET-22b(+)에 ligation 하였다(그림 6). Ligation 과정 후 각각의 plasmid는 *E. coli* DH5 $\alpha$  cell에 transformation시켜 구축된 vector를 안정화 시켰다. *E. coli* DH5 $\alpha$  내에 존재하는 재조합 plasmid는 순수하게 추출한 뒤 대량발현 숙주인 *E. coli* BL21 (DE3)에 재 도입 하였다. 이렇게 cloning 된 발현 plasmid는 pEGF-CBD-12, pEGF-CBD-34, pCBD-EGF-56 그리고 pCBD-EGF-78이라고 각각 명명하였으며 EGF-CBD fusion protein들의 발현, 정제 및 활성 측정을 위하여 사용되었다.

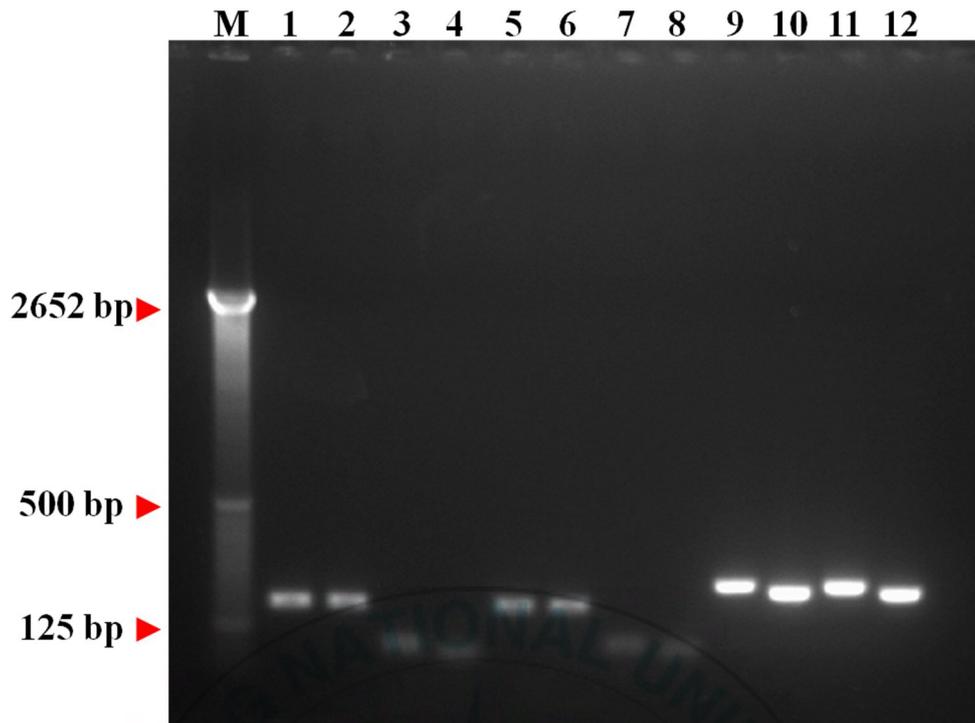


Figure 4. Conventional PCR and overlapping PCR amplification for EGF-CBD fusion plasmid. Lanes are as follow. Lane M, DNA ladder; lane 1 and 2, amplified human mature EGFs for C-termius fusion; lane 3and 7, CBD of 18 amino acids; lane 4 and 8, CBD composed of 12 amino acids; lane 5 and 6, amplicons of hEGF for N-term fusion; lane 9, EGF-CBD (18aa) amplicon; lane 10, EGF-CBD (12aa); lane 11, CBD (18aa)-EGF; lane 12, CBD(12aa)-EGF.

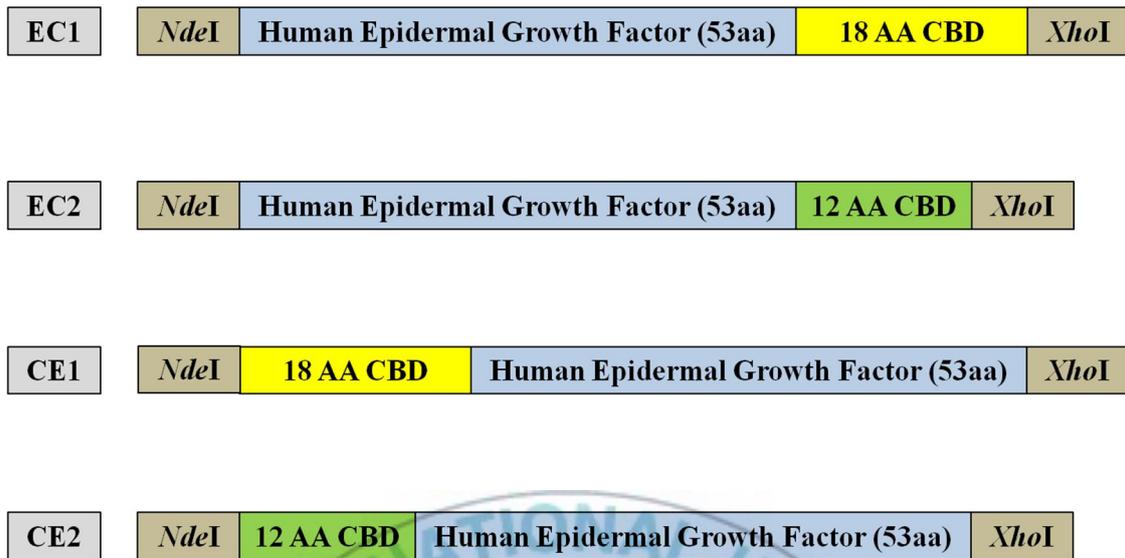
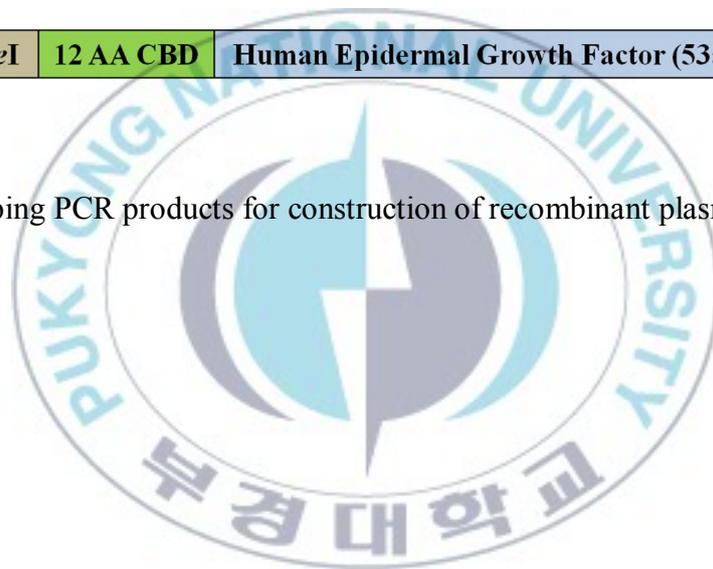


Figure 5. Overlapping PCR products for construction of recombinant plasmids.



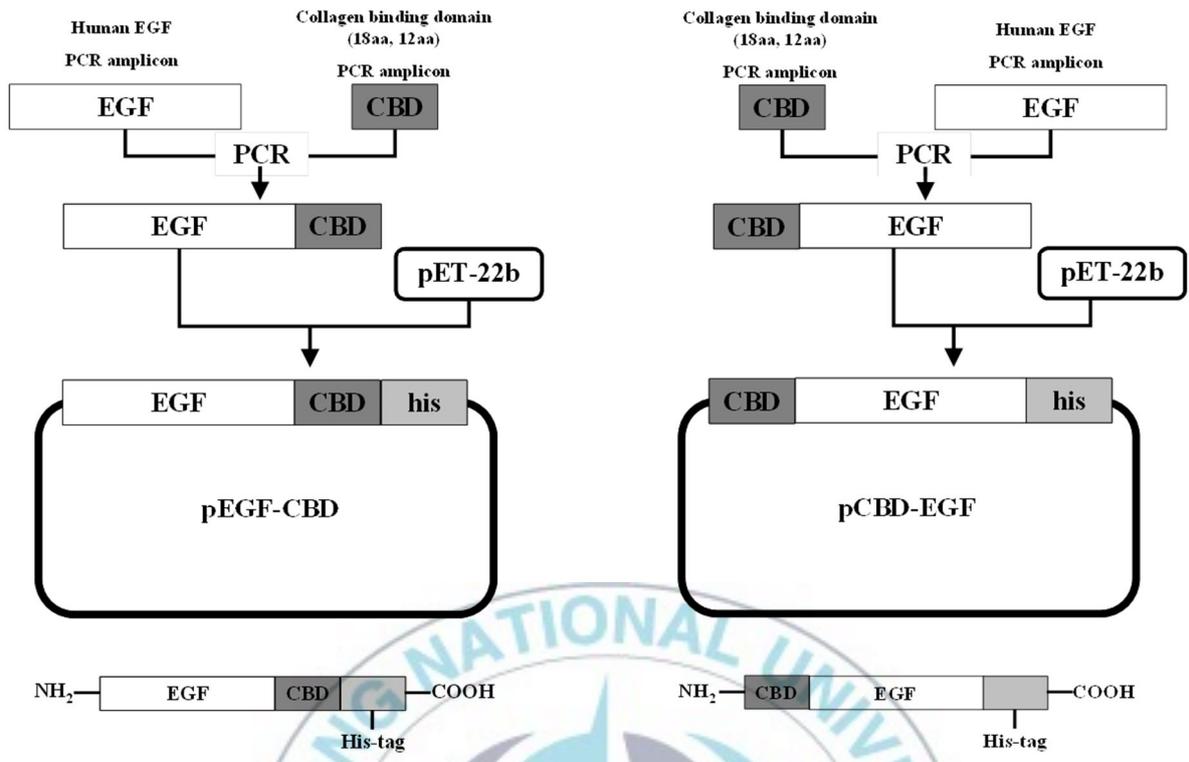
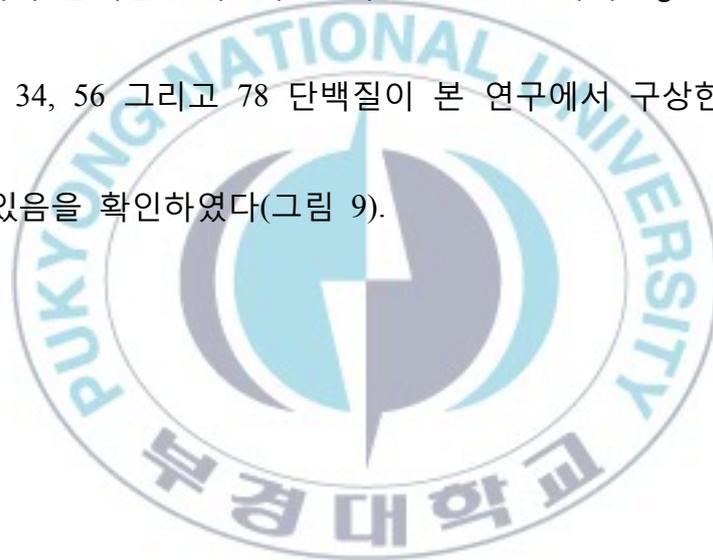


Figure 6. Construction processes of pEGF-CBD-12, pEGF-CBD-34, pCBD-EGF-56 and pCBD-EGF-78 plasmid.

## 2. Expression and purification of chimeric fusion proteins.

pEGF-CBD-12, pEGF-CBD-34, pCBD-EGF-56과 pCBD-EGF-78을 가지는 형질전환 *E. coli* BL21 (DE3)에 IPTG를 이용하여 EGF-CBD 융합 단백질만을 과발현 시켰다. 과발현 뒤 원심분리를 통하여 집균하였으며, cell pellet들은 초음파 파쇄법을 통하여 파쇄하여 목적 단백질들의 발현 특징을 분석하였다. Crude 세포 파쇄물은 원심분리를 통하여 soluble fraction과 inclusion body fraction으로 분리를 하였으며, 각 단계의 total 단백질을 SDS-PAGE를 통하여 분석하였다(그림 7). 발현된 각각의 단백질은 12, 34, 56, 그리고 78이라고 명명하였으며, 모든 목적 단백질들은 insoluble 한 형태의 inclusion body로 발현됨을 알 수 있었다(그림 7). 과발현된 불용성 융합 단백질들은 urea를 이용한 변성 후 투석방법으로 urea 성분을 제거한 뒤 정제과정을 수행하였다. C-말단에 부착되어 있는 6-his tag를 이용한 Ni-NTA affinity column을 이용하여 융합단백질들을 정제하였다(그림 8). 과발현된 목적 단백질들은 약 7-8 kDa으로 분자량이 예상되었으며 따라서 SDS-PAGE보다 저분자 단백질을 분리 가능한 tricine-SDS-PAGE 후 comassie blue 염색법으로 gel을 염색하여 12, 34, 56, 그리고 78 단백질이 성공적으로 발현 및 정제되었음을 알 수 있었다(그림 8). 이

렇게 정제된 융합단백질을 확인하기 위하여 western breeze kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 western blotting을 수행하였다. Tricine-SDS-PAGE 후 gel 상의 단백질을 15V로 1시간 동안 nitrocellulose membrane (GE health care, USA)으로 transfer 시켰다. Blotting을 위한 primary 항체는 anti C-term histidine antibody (Invitrogen, USA)를 사용하여 수행하였다. Nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (NBT/BCIP) 용액과 발색반응 후 약 7.1과 7.8 kDa 크기의 signal band들을 확인할 수 있었으며 12, 34, 56 그리고 78 단백질이 본 연구에서 구상한 것과 같이 발현 및 정제 할 수 있음을 확인하였다(그림 9).



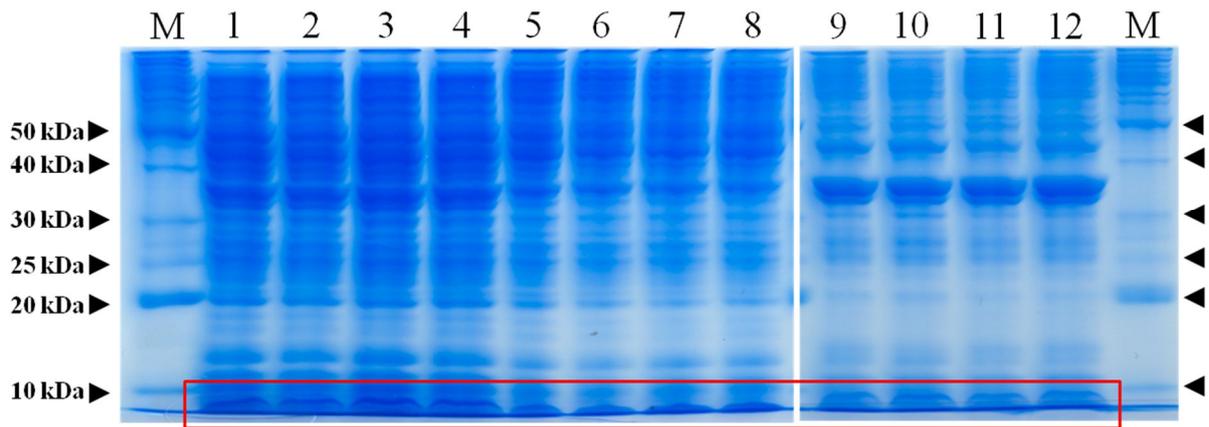
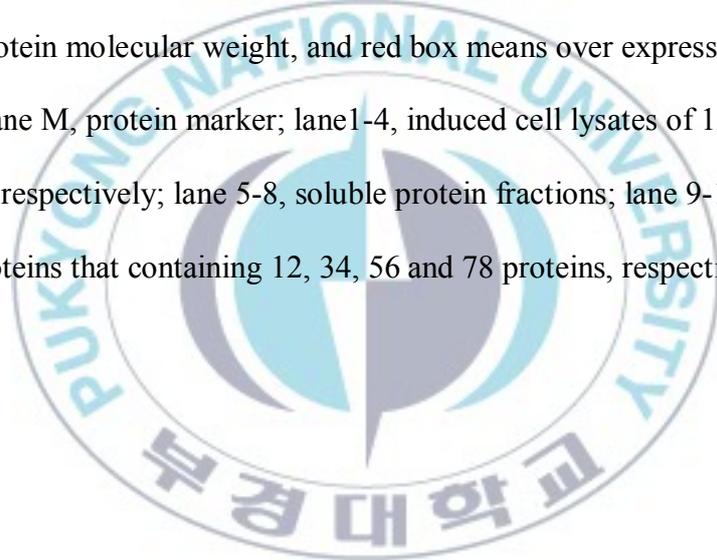


Figure 7. Induced protein profiles of *E. coli* lysates, soluble fraction and inclusion body. The arrows indicate protein molecular weight, and red box means over expressed recombinant fusion proteins. Lane M, protein marker; lane 1-4, induced cell lysates of 12, 34, 56 and 78 chimeric proteins, respectively; lane 5-8, soluble protein fractions; lane 9-12, insoluble inclusion body proteins that containing 12, 34, 56 and 78 proteins, respectively.



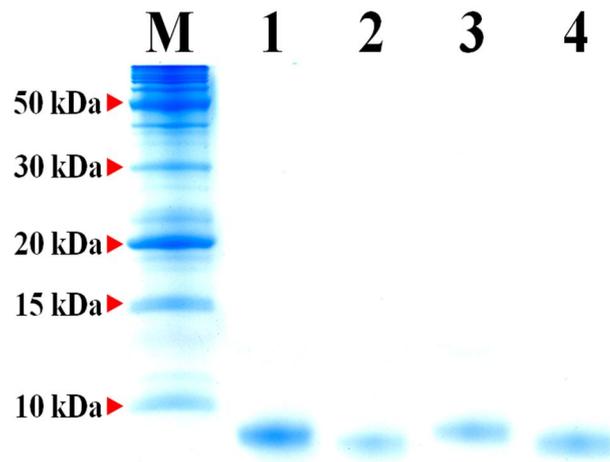
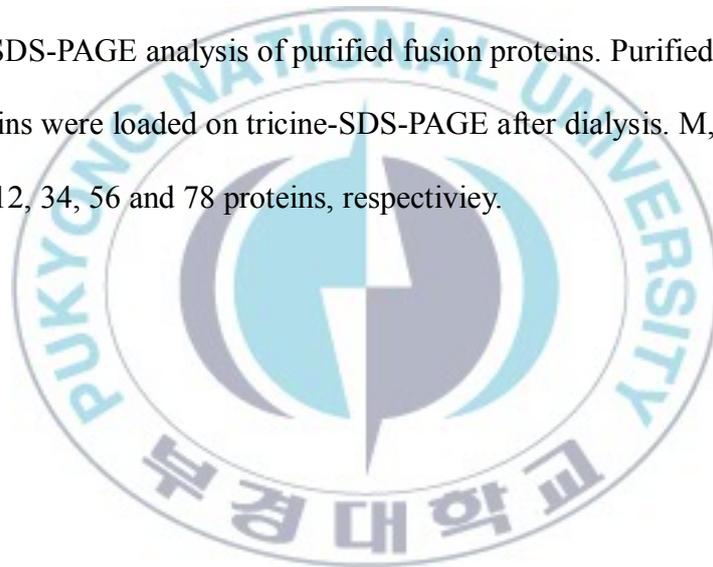


Figure 8. Tricine-SDS-PAGE analysis of purified fusion proteins. Purified 12, 34, 56 and 78 recombinant proteins were loaded on tricine-SDS-PAGE after dialysis. M, protein marker; lane 1-4, purified 12, 34, 56 and 78 proteins, respectively.



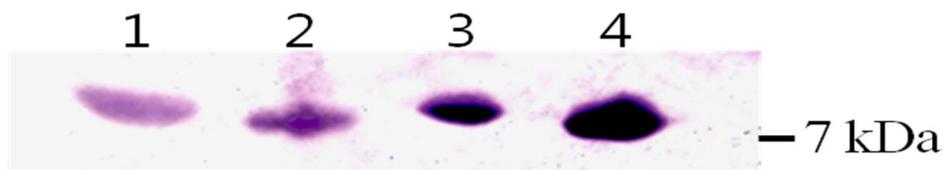


Figure 9. Western blotting analysis of purified 12, 34, 56 and 78 chimeric proteins. Purified 12, 34, 56 and 78 proteins were analyzed using western blotting with anti C-terminus 6-histidine antibody. Lane 1-4, purified 12, 34, 56 and 78, respectively.



### 3. Assay of binding activity using CBD anchoring recombinants.

Human EGF와 융합된 CBD 단백질의 활성 유무를 확인하기 위하여 collagen에 부착활성이 있는지를 평가하였다. Lee 등의 연구결과 VMCBD의 단백질 부착활성은 type I bovine collagen에서 가장 크다는 사실이 이미 알려져 있기 때문에 본 연구에서 12, 34, 56 그리고 78 융합 단백질의 collagen 부착활성 평가를 위하여 type I collagen을 사용하였다(Lee et al., 2005). 순수하게 정제된 융합단백질들은 투석과정을 한 번 더 실시하여 정제과정에 포함된 elution buffer내의 imidazole의 영향을 최소화 하여 실험하였다. 투석과정 후 회수한 단백질들은 재료 및 방법에서 서술한 것과 같이 미리 swelling 되어 있는 collagen과 상온에서 6시간 동안 반응하였으며, 반응 후 filtration 과정을 통하여 unbound filtrate들을 분리하였다. 그리고 융합 단백질이 실제 swelled collagen fiber에 부착이 되어 filtrates에서 확인이 되지 않는 것 인지를 증명하기 위하여 filter tube에 남아있는 collagen을 1% SDS 용액과 상온에서 한 시간 동안 반응시켜 부착되어 있는 단백질들을 탈락을 유도한 뒤 원심분리로써 회수하였다. 모든 filtrate들을 Tricine-SDS-PAGE을 이용하여 분석한 결과 collagen과 반응하지 않은 재조합 융합단백질과 1% SDS 용액을 첨가하여 반응한

샘플에서만 PAGE상에서 약 7 kDa의 band가 나타남을 알 수 있었다(그림 10). 따라서 이러한 작은 크기의 CBD단백질들은 EGF에 부착된 상태에서도 EGF에 의하여 collagen 부착활성이 방해 또는 저해 받지 않음을 알 수 있었다. Pre-swelled collagen에 100  $\mu$ g의 12, 34, 56, 그리고 78 단백질을 정량 하여 반응을 하였으며 상온에서 반응 후 SDS 용액을 이용하여 elution 시킨 각각의 부착활성은 비교하였다. SDS 성분에 의하여 용출 된 단백질은 Tricine-SDS-PAGE 분석과정을 통하여 특성을 확인하였으며 염색과정 후 단백질 band들의 명암도를 비교하여 분석하였다(그림 11, 12). 12, 34, 56, 그리고 78 단백질의 부착활성은 뛰어나게 두드러지는 점을 발견하지는 못하였으나, 12개의 아미노산으로 이루어진 CBD가 부착된 융합 단백질보다 18개의 아미노산이 있는 EGF 복합체가 좀 더 높은 부착활성을 보였다(그림 11, 12). 또한 18개의 아미노산으로 이루어진 CBD가 EGF의 N-말단부위에 조합된 56 재조합 단백질에서 높은 부착활성을 기록하였다(그림 12).

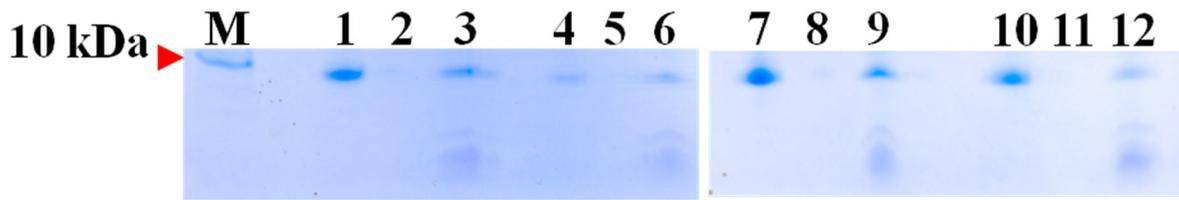


Figure 10. Collagen binding activities of EGF-CBD fusion proteins. 18 and 12 amino acids CBD fused EGF recombinant proteins were reacted with/without type I bovine collagen. After reaction, bound fusion proteins were incubated with 1% SDS solution for elution. Filtrated protein specimens were analyzed using Tricine-SDS-PAGE. M, protein marker; lane 1, 12 without type I collagen; lane 2, 12 with type I collagen; lane 3, eluted 12 protein; lane 4, 34 without type I collagen; lane 5, 34 with type I collagen; lane 6, eluted 34 protein; lane 7, 56 without type I collagen; lane 8, 56 with type I collagen; lane 9, eluted 56 protein; lane 10, 78 without type I collagen; lane 11, 78 with type I collagen; lane 12, eluted 78 protein.

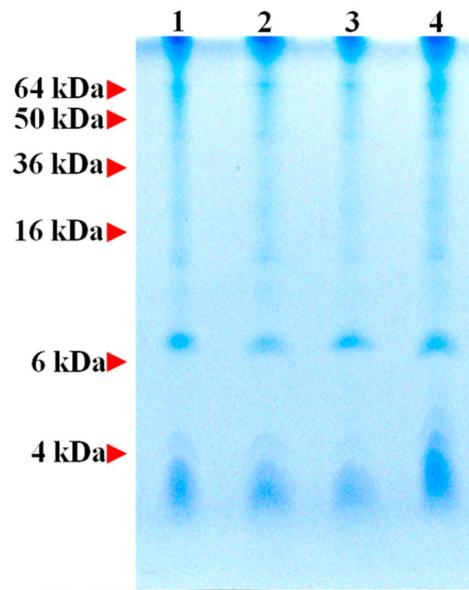


Figure 11. Degree of collagen binding ability of chimeric CBD proteins. The same concentration of purified EGF fused CBD proteins were incubated with type I collagen and eluted by 1% SDS solution. Each proteins exhibited similar binding activities. Lane 1, EGF-CBD(18aa); lane 2, EGF-CBD(12aa); lane 3, CBD(18aa)-EGF; lane 4, CBD(12aa)-EGF.

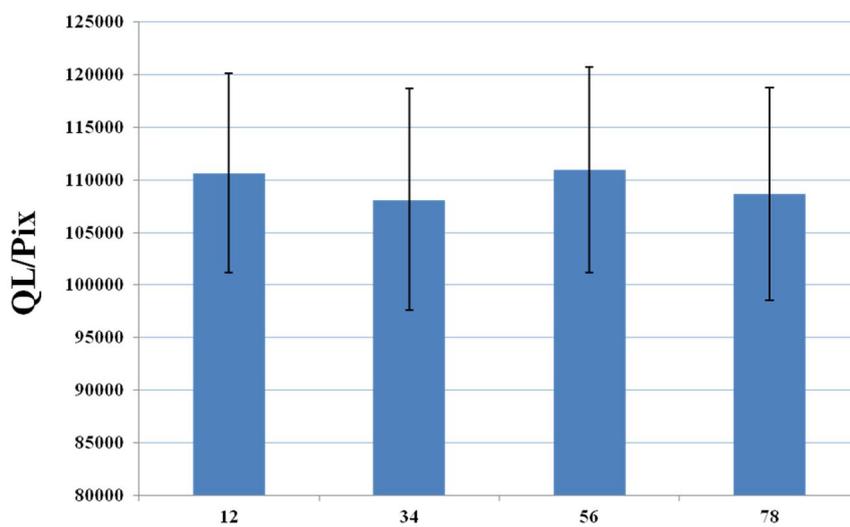
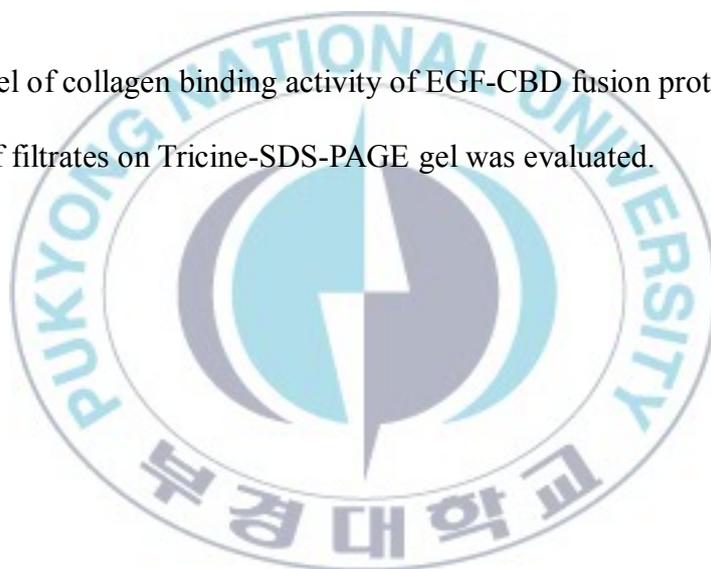


Figure 12. The level of collagen binding activity of EGF-CBD fusion proteins. The intensity of protein bands of filtrates on Tricine-SDS-PAGE gel was evaluated.



#### 4. Influences of cell growth activity.

A-431과 HaCaT cell line을 이용하여 12, 34, 56, 그리고 78 fusion protein의 EGF ligand의 세포 성장촉진활성을 각 재조합 단백질의 농도에 따라 평가하였으며, 이러한 활성을 시판되는 sigma사 hEGF의 성장촉진 활성을 비교평가 하였다. A-431 세포주는  $5 \times 10^3$  cell/well의 밀도로 각 well에 분주한 뒤 하룻동안 배양하여 well에 부착 시켰으며, 12시간 동안 serum-free DMEM 배지로써 starvation시켜 EGF의 활성에 susceptibility를 높게 만들었다. 모든 sample은 100 pg에서 100 ng 사이의 농도를 처리하여 농도에 따른 EGF ligand의 성장촉진 활성을 비교하였으며, 이러한 활성은 MTS assay kit를 이용한 OD<sub>490</sub> 값을 이용한 세포의 수를 반영하는 법으로 평가하였다(그림 13). 아무런 처리를 하지 않은 serum-free DMEM 배지를 control로 사용하여 OD<sub>490</sub> 값을 1로 환산하여 비교하였다(그림 13). 다양한 연구결과에서 epidermal growth factor의 cell에 대한 mitogenic 활성은 농도에 의존하여 그 활성이 증가한다고 보고되었다(Imen et al., 2009). 그러나 측정결과 100 pg의 농도의 sample의 활성은 모든 protein들에서 높게 나왔으며, 100 ng 농도의 활성은 모든 샘플에서 낮게 나왔다(그림 13). 78 recombinant fusion protein은 모든 농도에서 Sigma사의

hEGF보다 활성이 낮았으며, control군과는 비슷한 활성을 보였다(그림 13). 78 재조합 단백질과 12 재조합 단백질의 100 ng 농도의 세포 성장 촉진활성을 제외하고는 모든 농도의 재조합 단백질의 mitogenic 활성은 시판되는 hEGF와 비슷하거나 높게 나왔으며, CBD가 fusion 되더라도 서로의 function 발현에서 아무런 영향이 없는 것으로 보인다. 이러한 결과는 Kim 등의 연구와 비슷한 결과를 나타내며 (Kim et al., 2009), 재조합 단백질들 중에서 34 또는 56 재조합 단백질이 높은 활성 유도 효능을 가짐을 보였다(그림 13).



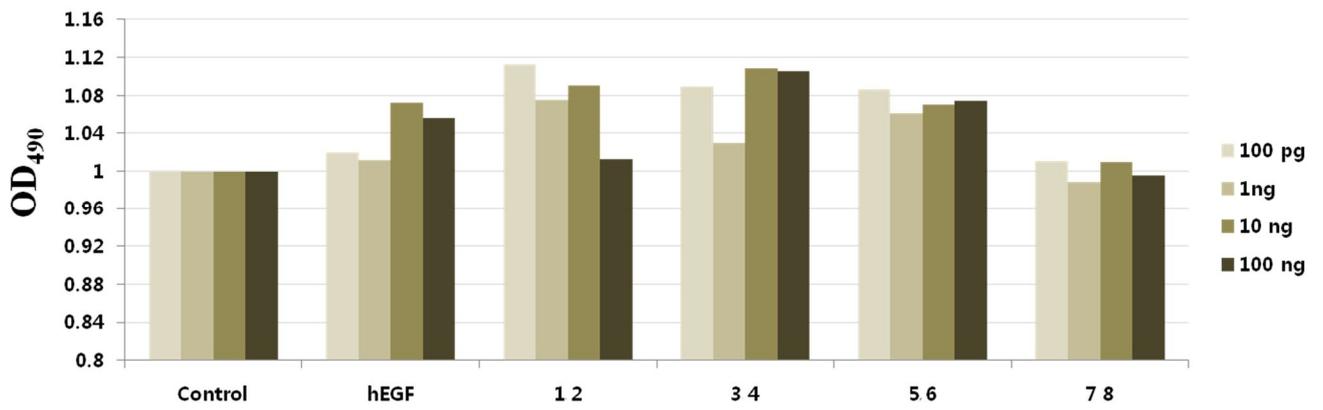
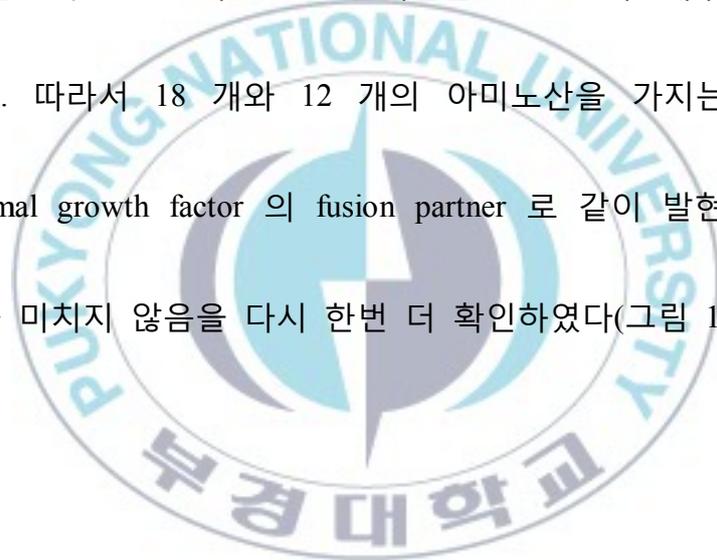


Figure 13. Cell proliferation effects of fusion proteins with A-431 human cell line.



Epidermal growth factor 는 세포주에 따른 susceptibility 가 다르기 때문에 A-431 과 함께 HaCaT cell line 을 이용하여 growth factor 의 성장촉진활성을 비교하였다(Nishi et al., 1998). 모든 실험은 A-431 cell line 과 동일한 방법으로 수행하였다. 각 농도별로 각각의 growth factor 를 처리한 결과 78 protein 을 제외하고 모든 샘플에서 농도에 의존성 활성 증가의 경향을 관찰하였다(그림 14). 또한 78 fusion 단백질을 제외한 12, 34 그리고 56 단백질은 hEGF 와 매우 유사한 활성을 보였다(그림 14). 따라서 18 개와 12 개의 아미노산을 가지는 CBD anchoring 단백질이 epidermal growth factor 의 fusion partner 로 같이 발현되더라도 서로의 활성에는 영향을 미치지 않음을 다시 한번 더 확인하였다(그림 14).



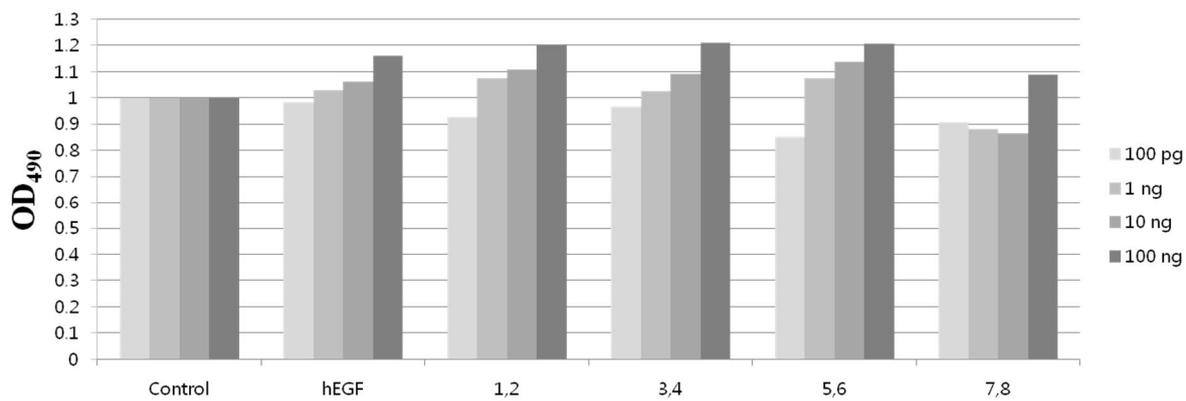


Figure 14. Cell mitogenic activity of fusion proteins on HaCaT human cell line.



## 5. Efficiency of collagen coated well plates.

본 연구에서 개발한 EGF와 CBD moiety 들이 fusion 된 단백질들의 collagen binding 활성과 human cell에 대한 proliferation 활성을 모두 가지는지 알아보기 위하여 cell 배양을 위한 plate에 collagen을 coating 시킨 뒤 fusion protein과 대조군인 hEGF를 처리하고 PBS로 wash 시킨 뒤 A-431 또는 HaCaT cell line들의 cell growth를 측정하였다. Collagen coating 과정과 growth factor와 fusion protein들을 반응시키는 단계를 제외하고는 모든 실험과정을 동일하게 수행하였다. Collagen을 coating 한 뒤 fusion protein들을 농도 별로 처리하여 A-431 cell line의 growth에 미치는 영향을 평가하였다(그림 15). 이전의 cell proliferation test와 동일하게 아무런 처리를 하지 않은 cell line을 control로 하여 세포수를 측정하여 fusion 단백질과 hEGF에 대한 cell proliferation 활성을 비교하였다(그림 15). 12와 78 fusion 단백질들은 A-431 cell에 대한 촉진 활성이 거의 없어 대조구 샘플과 비슷하거나 낮은 수의 세포수를 보였다(그림 15). 그러나 34와 56 fusion 단백질들은 hEGF와 비슷하게 1 ng 이상의 농도에서 대조구보다 높은 세포 성장 촉진 활성을 보였다(그림 15). hEGF, 34, 그리고 56 fusion 단백질들은 다른 fusion 단백질이 성장촉진 활성이 대조구보

다 낮은 값을 기록한 것과는 대조적으로 배양 plate를 collagen으로 coating 하기전 보다 더욱 높은 세포 증식활성을 보였다(그림 15). 또한 1 ng의 각각의 hEGF 및 fusion 단백질 샘플을 처리한 결과를 제외하고 모든 농도에서 농도에 증가에 따른 증식활성을 촉진하는 특징을 보였다(그림 15). 실험군 중에서는 18개 아미노산 잔기로 구성된 CBD가 N-term에 융합된 EGF 단백질인 56 fusion 단백질이 hEGF와 비슷하거나 더욱 높은 증식활성을 나타내었다(그림 15).



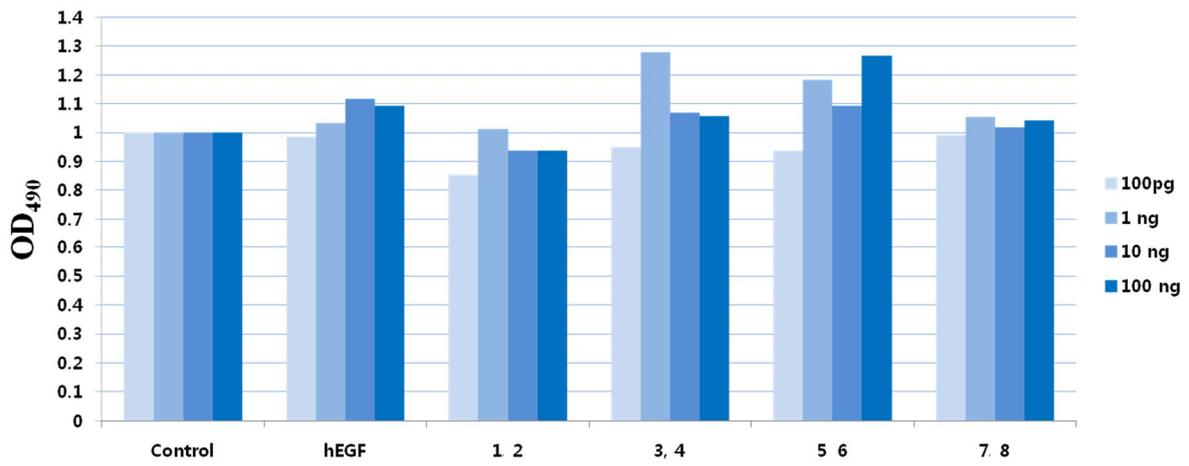
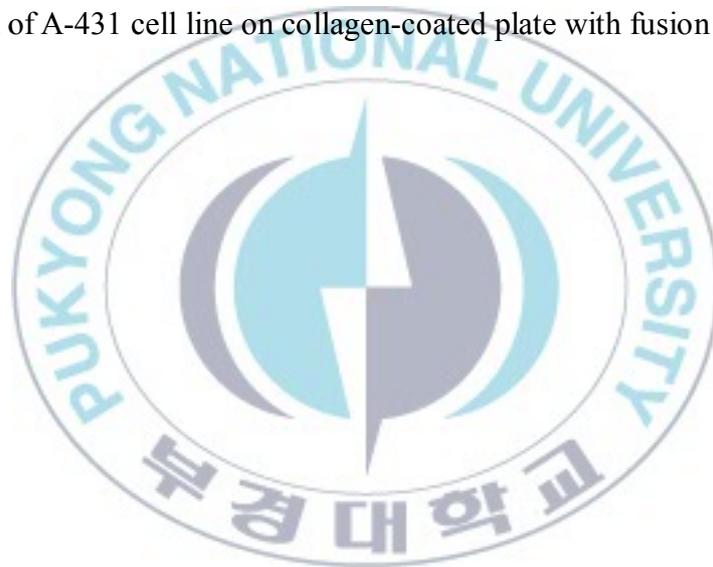


Figure 15. Growth of A-431 cell line on collagen-coated plate with fusion proteins.



Collagen coating 이 된 culture plate 를 이용한 HaCaT cell line 의 실험결과 collagen 을 coating 하기전의 결과와 비슷한 양상을 보였다(그림 16). 대조구와 비교하였을 때 hEGF 와 fusion 단백질에 따른 성장촉진 효과가 농도에 의존성으로 증가함을 알 수 있었으며, collagen 을 coating 하기전의 실험보다 높은 cell proliferation 활성을 나타냈다(그림 16). 특히 78 단백질의 경우 A-431 세포에서는 EGF ligand 의 활성이 거의 없었으며, collagen 을 coating 하기 전에는 100ng 의 고농도로 처리를 하지 않으면 그 활성을 알 수 없었으나 collagen 이 coating 된 배양 plate 를 사용한 결과 hEGF 와 비슷한 성장촉진 활성을 나타내었다(그림 16). 그리고 이러한 현상은 모든 fusion 단백질에서도 관찰 할 수 있었다(그림 16). 100 pg 의 recombinant fusion 단백질들을 HaCaT cell 에 처리하였을 때 그 활성이 대조구보다 낮음을 알 수 있었으나, collagen 을 plate 에 coating 한 뒤 실험을 하였을 때는 100 pg 에서도 control 샘플보다 높거나 비슷한 활성을 보였다(그림 16). 또한 모든 농도의 12, 34, 그리고 56 fusion 단백질은 hEGF 와 비슷한 cell 증식촉진 활성을 나타내었으며, 심지어 78 fusion 단백질 또한 hEGF 와 비슷한 활성을 기록하였다(그림 16). 따라서 배양용 plate well 에 collagen coating 은 EGF-fusion

단백질들의 활성을 증가 시킴을 알 수 있었다(그림 16). 그리고 이러한 활성의 증가는 well 에 coating 된 fusion 단백질의 부착에 의하여 발생하였음을 추측해볼 수 있었다(그림 16). 따라서 본 실험에서 사용된 EGF fusion 단백질들은 서로의 활성 부위에 서로 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.



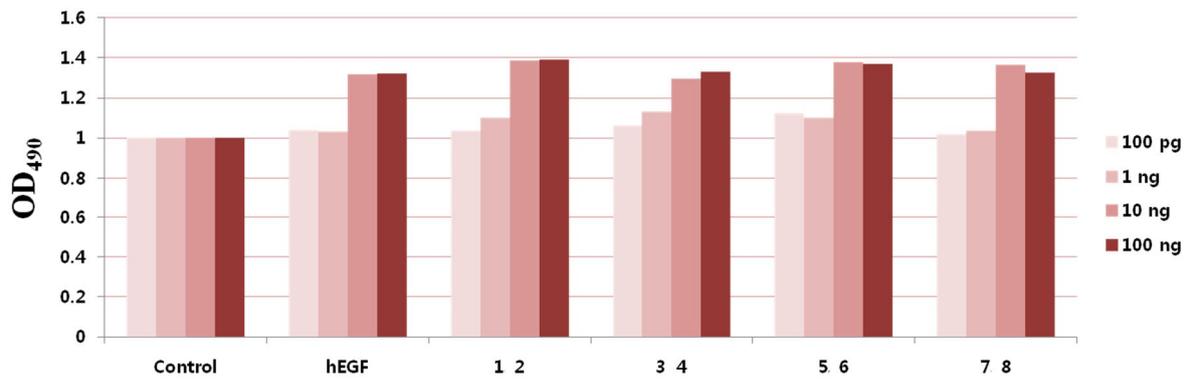


Figure 16. HaCaT cell mitogenic activities of fusion proteins on collagen-coated culture plates.



## 6. The degree of intensity of phosphorylation signal.

다양한 연구 결과 growth factor에 의한 cell proliferation 또는 mitogenic 효과는 cell의 수적인 증가와 함께 receptor와 growth factor의 상호작용에 의한 신호전달에 영향을 미친다는 것이 알려졌다. 따라서 본 연구에서도 재조합 fusion 단백질에 의한 proliferation 효과를 증명하기 위하여 MTS법을 이용한 cell 수의 변화를 측정, 비교하였으며 또한 이러한 단백질에 의한 EGF receptor의 phosphorylation에 의한 신호전달 정도를 평가하였다(그림 17). A-431과 HaCaT cell line을 이용하여 fusion 단백질을 처리한 뒤 receptor의 phosphorylation 정도를 anti phosphotyrosin antibody를 이용하여 western blotting으로 측정하였다. Secondary antibody에 존재하는 alkaline-phosphatase conjugator에 의한 NBT/BCIP의 발색 신호로써 EGF receptor의 phosphorylation을 확인하였다(그림 17). 그 결과 A-431 cell에 fusion protein을 처리하였을 때 hEGF와 비슷하거나 더욱 높은 활성을 관찰 할 수 있었다(그림 17). 12와 78 fusion 단백질은 signal의 정도가 34와 56 fusion 단백질보다 신호의 정도가 약하였다(그림 17). 이러한 결과는 100 ng의 fusion 단백질을 A-431 cell line에 처리했을 때의 MTS assay와 결과와 일치함을 알 수 있었다(그림 13, 그림 17). 그러나

이러한 phosphorylation 활성이 HaCaT cell에서는 매우 약함을 알 수 있었으며, 이는 HaCaT cell이 growth factor에 대한 receptor의 또 다른 경로의 신호전달이라는 방법으로써 cell proliferation을 촉진함을 생각해볼 수 있었다(data not shown).



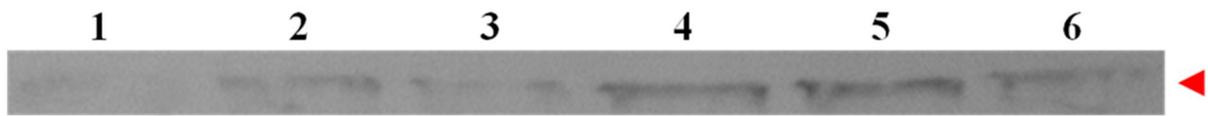


Figure 17. Influence of EGF fusion proteins on the phosphorylation of EGF receptor. Lane 1, control A-431 cell treated with serum free DMEM; lane 2, hEGF (Sigma) treated A-431; lane 3, EGF-CBD (18aa) treated A-431; lane 4, EGF-CBD (12aa) treated A-431; lane 5, CBD (18aa)-EGF treated A-431; lane 6, CBD (12aa)-EGF treated A-431.



## 7. Evaluation of aggregation for incorporated recombinant proteins.

재조합 단백질 또는 유용한 단백질을 이용한 치료제의 발현, 정제 및 가공 시에 발생하는 불용성의 aggregates의 발생은 이미 많은 분야에서 보고 되었으며, 이러한 현상은 매우 다양한 인자들에 의해 발생함이 보고되었으나 정확한 기작 또는 해결방법에 대한 연구는 아직 부족하다(Cromwell et al., 2006). 본 연구에서 발현한 fusion 들은 모두 inclusion body의 형태로 발현 되었으며, urea를 이용하여 변성 시킨 뒤 정제를 하였고, 이후 투석과정을 통하여 elution buffer내의 imidazole 등의 물질을 제거하고 목적 단백질의 refolding을 수행하였다. 그러나 4°C에서 투석을 수행한 뒤에는 aggregation 된 물질을 발견할 수 있었으며, 각각의 fusion 단백질에 대한 aggregates들을 특성을 분석하여 투석 후 발생하는 aggregation의 농도 및 비율을 나타내었다(그림 18). 또한 이전의 연구에서 개발한 33개의 아미노산으로 이루어진 CBD가 C-term에 연결된 EC full 단백질과 aggregation의 정도를 비교하였다(그림 18). 그 결과 33개의 아미노산으로 이루어진 CBD moiety가 융합된 EC full 단백질의 aggregation 단백질 비율이 가장 높았으며, EGF-CBD(18aa)와 CBD(18aa)-EGF 단백질의 aggregator이 가장 적었다(그림 18). EC full 단백질인

EGF-CBD (33a)의 경우 urea를 이용한 변성 후 투석과정에서도 높은 양의 aggregate를 목격하였다(Data not shown). 그리고 56 fusion 단백질이 가장 낮은 aggregate를 투석과정에서 생산함을 알 수 있었다(그림 18).



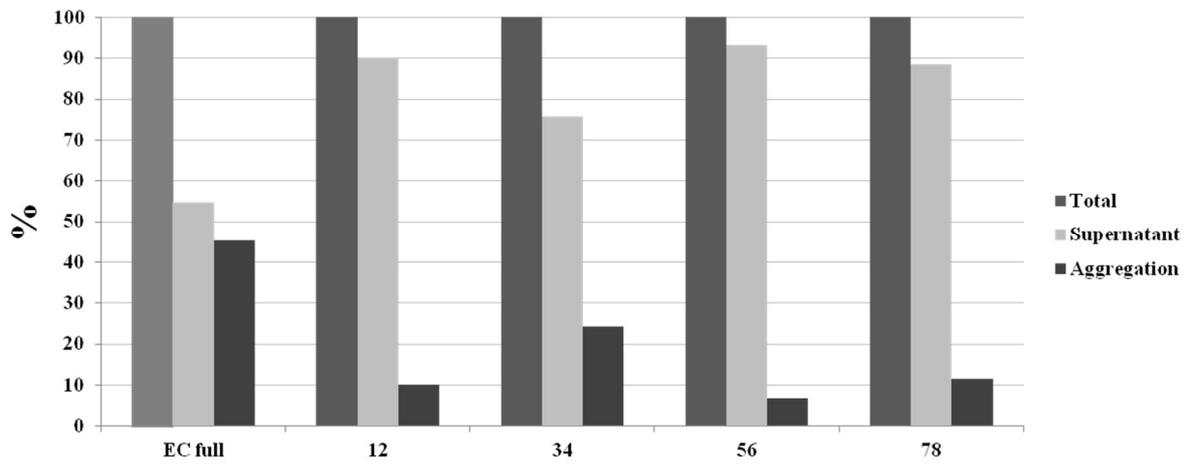
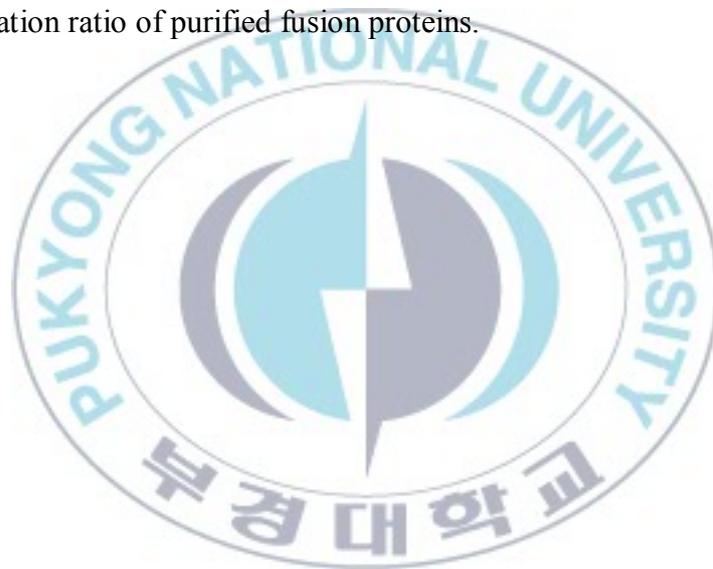


Figure 18. Aggregation ratio of purified fusion proteins.



#### IV. 고찰

*Vibrio* sp.는 가장 대표적인 수, 해양유래의 미생물로서, gram-negative, rod형태의 통상 혐기성 발육을 하며, polar flagellum으로써 운동을 하는 미생물이다(Janda et al., 1988, Shinoda et al., 2011). 현재 35종 이상의 *Vibrio* 종들이 알려져 있으며, 약 13종의 *Vibrio* 종들이 인체에 감염을 일으키는 것으로 알려져 있다(Janda et al., 1988, Shinoda et al., 2011). 이중에서 *V. cholera*, *V. parahaemolyticus*, 그리고 *V. vulnificus*는 매우 높은 위험성을, *V. hollisae*, *V. damsela*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. harveyi*, *V. metschnikovii*, 그리고 *V. mimicus*는 비교적 낮은 위험성을 보인다고 알려져 있다(Janda et al., 1988, Shinoda et al., 2011). 또한 *V. aestuarianus*, *V. anguillarum*, *V. carchariae*, *V. harveyi*, *V. pelagius*, *V. penaeicida*, *V. proteolyticus*와 *V. tubiashii* 등의 *Vibrio* 종들은 다양한 수, 해양동식물에 병원성을 보이며 이로 인한 양식산업의 막대한 영향을 미치기도 한다(Shinoda et al., 2011).

이러한 병원성 *Vibrio* 종들의 연구는 host cell에 피해를 유발하는 다양한 독성인자들에 대하여 연구 되었으며, 이러한 병원성 인자들은 *V. cholerae*의 CTX,

hemolysion, protease, *V. parahaemolyticus*의 hemolysion, lethal toxin, metalloprotease, vascular permeability factor, 그리고 *V. vulnificus*의 hemolysin, metalloprotease, lipopolysaccharides (LPS) 등이 가장 대표적으로 알려져 있다(Dotevall et al., 1985, Nishibichi et al., 1992, Sarkar et al., 1987, Kreger et al., 1981, Wright et al., 1991, Cheng et al., 1996, Moncada et al., 1991).

다양한 *Vibrio* 종들의 병원성 인자들 중에서 protease는 hemagglutinin/protease, elastase, metalloprotease와 collagenase 등이 보고 되어 있으며 주요 기작은 host cell의 receptor를 파괴하여 다른 cell로의 이동에 중요한 역할을 하는 것으로 추정하고 있다(Booth et al., 1984, Kothary et al., 1987, Cheng et al., 1996, Lee et al., 1998). *Vibrio* 종들이 생산하는 protease 중 metalloprotease들은 *V. alginolyticus* (VAC), *V. anguillarum* (EmpA), *V. cholerae* (Hap and VCC), *V. fluvialis* (VFP), *V. parahaemolyticus* (VPPRT and VppC), *V. proteolyticus* (Nprv) 그리고 *V. vulnificus* (VVP) 등의 다양한 병원성 *Vibrio* sp.에서 발견되고 감염증상 및 초기 감염에 매우 중요함이 밝혀졌으며, host cell의 ECM 성분인 collagen, fibrinogen과 gelatin에 특이적으로 분해하는 활성

을 보이므로 host cell에 감염 시에 매우 중요한 역할을 할 것으로 생각된다(Milton et al., 1992, Chowdhury et al., 1990, Takeuchi et al., 1992, Hase et al., 1991, Yamamoto et al., 1986, Miyoshi et al., 2002, Lee et al., 1995, Kim et al., 2002, David et al., 1992, Chuang et al., 1997). 다양한 *Vibrio* sp. 유래의 metalloprotease는 염기서열 분석에 의한 아미노산 서열의 유사도에 따라서 2가지 group으로 분류하였다(Lee et al., 1998). 첫 번째는 약 45 kDa 정도의 mature type의 protease로 발현된 뒤 C-말단이 autocatalytic으로 절단되어 약 35 kDa의 protease가 되는 group으로써 active site의 구성이 HEXXA+E로 알려진 MA group으로 분류되고, *V. proteolyticus*, *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. vulnificus*, *V. anguillarum*이 속하는 metalloprotease group이다(Lee et al., 1998). 그리고 첫 번째 그룹과는 다르게 N-말단의 신호서열이 제거되는 과정이 없는 아무런 processing이 없으며, HEXXH+H의 zinc binding region을 가지는 MB metalloprotease group으로써 현재까지 *V. cholerae* 569B, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*에서 발견되는 protease group이다(Lee et al., 1998, Rao et al., 1998). *Vibrio* sp. 에서 발견되는 다양한 virulence factor들은 서열 상동성 및 특징이 비슷함에도 불구하고 두 group의 metalloprotease는 아미노산의 서열 뿐 아니라 생화학적인 특

정도 크게 차이가 나는 것으로 밝혀졌다(Lee et al., 1998). *Vibrio* sp.의 class I metalloprotease의 경우 C-말단위치에 autocatalytic 과정으로 제거가 되고 이에 따라서 insoluble collagen에 대한 분해활성이 감소한다는 보고가 있으며, 이는 다른 bacterial metalloprotease에서도 유사한 연구결과가 알려졌으며, 이러한 C-말단부위의 연구를 통하여 collagen에 부착할 수 있는 binding domain이 있음이 밝혀졌다(Miyoshi et al., 1997, Matsushita et al., 2001). 그러나 class II의 *Vibrio* metalloprotease의 경우는 이러한 C-말단에 대한 연구가 매우 부족하다. 따라서 Lee 등은 class II에 속하는 *V. mimicus*의 metalloprotease에 대한 연구를 수행하였으며, 이러한 metalloprotease의 C-말단에 대한 특성 및 domain 분석을 하였다(Lee et al., 2005).

본 연구에서 사용한 *V. mimicus*의 경우 탈수현상 유발의 독소로 잘 알려진 cholera toxin (CTX)로 유명한 고병원성 미생물인 *V. cholerae*와 매우 유사하며 이전의 분류 동정 방법으로는 non-sucrose fermenting *V. cholerae* non-O1으로 분류되어 *V. cholerae*에 속하여 있었으나, Davis 등에 의하여 *V. mimicus*로써 새롭게 분류되었다(Davis et al., 1981). *V. mimicus*의 연구에서 밝혀진 병원성 인자들로는 cholera toxin,

phospholipase, hemolysin, metalloprotease, heat stable enterotoxin, hemagglutinin 그리고 protease 등의 다양한 인자가 밝혀졌으며, 이러한 인자들 역시 *V. cholera* 또는 *Vibrio* sp.와 유사함이 알려져 있다(Lee et al., 2005, Kim et al., 1997, Spira et al., 1984, Nishibuchi et al., 1983, Alam et al., 1996, Lee et al., 1998, Kang et al., 1998). *V. mimicus*의 metalloprotease는 *Vibrio* metalloprotease의 특징인 N-말단의 신호서열, cleavage site, 그리고 zinc-binding motif를 포함하는 catalytic domain 등을 가지며, 1,611 bp의 537개의 아미노산으로 이루어진 약 61 kDa의 extracellular type임이 밝혀졌다(Lipscomb et al., 1996, Lee et al., 2003). 또한, 57 kDa (503 aa), 53 kDa (470 aa), 50 kDa (437 aa), 48 kDa (424 aa) 그리고 42 kDa (370 aa)의 C-말단이 잘려진 truncate들을 제작하여 collagen 분해 활성을 측정한 결과 57 kDa와 53 kDa의 truncate들은 활성이 비슷하게 유지되나, 100여개 이상의 아미노산이 제거된 50 kDa, 48 kDa 그리고 42 kDa의 truncate는 분해 활성이 사라짐을 발견하였다(Lee et al., 2005). 따라서 C-말단의 100여 개의 아미노산은 metalloprotease의 catalytic 활성에 중요한 역할을 한다는 것을 착안하였다(Lee et al., 2005). *Vibrio* metalloprotease class I의 경우 C-말단 domain은 autocatalytic domain이지만 mammalian matrix metalloprotease와 다른 bacterial metalloprotease

(collagenase)의 경우 collagen-binding domain인 hemopexin C domain으로 잘 알려져 있어 이러한 100여개의 아미노산에 대한 collagen binding 활성을 연구하였다 (Matsushita et al., 1998, Matsushita et al., 2001, Lee et al., 2005, Overall, 2001). C-말단을 제거한 truncate들의 collagen binding 활성을 분석한 결과 L<sup>529</sup>에서 T<sup>628</sup>의 100개의 아미노산 중에서 L<sup>529</sup>에서 T<sup>561</sup>을 포함하는 33개의 아미노산이 binding 활성에 핵심적인 domain임을 밝혀 내었으며, 이러한 C-말단과 glutathione S-transferase (GST)를 이용한 fusion 단백질을 제작하여 FAXWXXT의 아미노산 서열이 두 번 반복되는 구조의 33개의 아미노산이 *V. mimicus* metalloprotease의 collagen-binding domain임을 밝혀 내었다(Lee et al., 2005). Class II에 속하는 *Vibrio* metalloprotease의 C-말단분위의 33개의 아미노산의 서열분석 결과 C-말단의 FAXWXXT 부분이 더욱 conserve한 결과를 보였고, 이러한 결과들을 바탕으로 N-말단쪽의 FAXWXXT motif보다 C-말단의 FAXWXXT motif가 부착활성에 더욱 중요하다고 보고하였다 (Lee et al., 2005).

Collagen 또는 fibronectin과 같은 ECM 성분에 부착활성이 있는 단백질의 응용을 통하여 growth factor를 이용한 상처치료제로의 사용시 문제가 되는 낮은 target

specificity, 짧은 반감기, 그리고 체액성 성분에 의한 빠른 확산을 극복하고자 하는 새로운 delivery system의 개발이 요구되었다(Kim et al., 2009, Nishi et al., 1998, Ishikawa et al., 2001, Ishikawa et al., 2003, Hayashi et al., 2001, Imen et al., 2009, Yang et al., 2009). Nishi 등의 연구팀은 *C. histolyticum*의 collagenase에 존재하는 CBD를 이용한 EGF와 basic fibroblast growth factor (bFGF)이 융합된 fusion을 연구하였다(Nishi et al., 1998). Ishikawa 등의 연구팀과 Imen 등의 연구팀은 인간의 fibronectin collagen-binding domain (FNCBD)를 이용한 EGF 융합단백질을 개발하였다(Ishikawa et al., 2001, Ishikawa et al., 2003, Imen et al., 2009). Yang 등의 연구팀은 mammalian collagenase에서 유래한 CBD를 이용한 EGF를 제작하였다(Yang et al., 2009). 그리고 Kim 등의 연구팀은 *V. mimicus*의 metalloprotease에서 유래한 CBD를 EGF에 융합시킨 chimera 재조합 단백질을 만듦으로써 이러한 EGF의 단점을 극복하고자 하였다(Kim et al., 2009). 그러나 *C. histolyticum* 유래의 CBD는 약 23 kDa이며, fusion protein의 경우 약 40 kDa의 비교적 거대한 크기를 보였다. 또한 *C. histolyticum* 유래의 CBD가 부착된 EGF와 bFGF는 binding 활성은 보이나 cell proliferation 활성은 높지 않음을 보고하였다(Nishi et al., 1998). 그러나 Yang 등의 연구에서는 ECM에

binding 활성을 부여하는 anchoring 단백질을 단 7개의 아미노산만으로 이루어진 mammalian collagenase 유래의 'TKKTLRT'를 사용하여 높은 활성을 보고하였다 (Yang et al., 2009). 그러나 이러한 실험에서는 7개의 아미노산으로 이루어진 binding domain과 EGF 사이에 15개의 아미노산으로 이루어진 linker 단백질을 삽입하여 두 functional ligand의 interaction을 방지하려고 하였다(Yang et al., 2009). 그 결과 재조합 growth factor는 높은 활성에도 불구하고 약 9.5 kDa의 chimeric 단백질의 형태로 발현되었다(Yang et al., 2009). CBD와 EGF 사이의 이러한 peptide성의 ligand의 삽입은 각각의 functional domain의 flexibility를 증가시키고 binding 되어 있는 collagen과 EGF receptor에 거리적인 여유를 제공하여 EGF의 활성을 확보한다고 알려져 있다(Nishi et al., 1998). 그러나 이러한 여분의 ligand 또는 분자량이 큰 binding domain의 fusion은 miss-folding 또는 단백질의 구조적인 문제로 인하여 서로의 활성에 영향을 미치거나 활성이 사라져버린다(Nishi et al., 1998).

본 연구팀에서는 overlapping PCR 법을 이용하여 33개의 아미노산으로 이루어진 비교적 짧은 collagen binding domain을 fusion 함으로써 EGF와 CBD의 open reading

frame (ORF)를 제외한 제한효소의 인식 site등의 다른 서열을 모두 제거하였으며, hexa-his tag을 이용함으로써 affinity column을 이용한 정제가 용이하며, 높은 collagen binding 활성과 함께 시판되는 Sigma 사의 mature type의 hEGF와 비슷한 cell proliferation 효과를 보여 이를 이용한 상처치료제로의 가능성을 제시하였다 (Kim et al., 2009). 또한, 본 연구에서는 이전의 연구를 발전시켜 33개의 아미노산에서 크기가 훨씬 줄어든 18개와 12개의 아미노산으로 이루어진 C-말단 부위의 FAXWXXT motif를 이용하여 EGF fusion chimeric protein을 만들었다.

단백질의 응집현상(aggregation)은 protein을 이용한 bio-therapeutic의 생산단계에서 자주 발생하는 현상이며, 이러한 현상을 주로 목적 단백질의 over-expression을 통한 발현과정과 정제 단계에서 발생하며, 단백질 자체의 구조 또는 발현, 정제 및 보관 등의 과정에서 단백질이 포함되어 있는 주변환경인 온도, 단백질 농도, pH 그리고 이온세기 등에 의하여 발생한다(Cromwell et al., 2006). 이러한 현상을 제어하기 위해서는 culture 및 정제 단계에 걸쳐 수많은 condition 변화 등의 다양한 조건의 조절이 필요하며, 어떠한 type을 막론하고 면역반응 또는 투약 단계에 있어

서의 부정적인 영향을 미친다(Cromwell et al., 2006). 따라서 본 연구에서는 각각 7.1 kDa와 7.8 kDa로써 지금까지 보고된 EGF fusion 단백질 중 가장 작은 크기의 융합 단백질을 개발하였으며 재조합 단백질의 크기를 줄임으로써 예상하지 못한 단백질 잔기들의 간섭작용으로써 발생하는 정제 후 aggregation 현상을 예방하고자 하였다. 또한 최소 크기의 외부 단백질이 첨가된 재조합 fusion 단백질을 만듦으로써(그림 8, 9), 투약단계에 있어서 발생 할 수 있는 human immune 반응을 최소한 하고자 하였다(Kim et al., 2009).

*V. mimicus*의 metalloprotease에서 분리한 33개의 collagen-binding domain에서 유래한 18개와 12개의 아미노산으로 이루어진 collagen-binding moiety들은 N-말단 또는 C-말단에 부착됨에 상관없이 collagen-binding 활성을 보였다(그림 10, 11). 그리고 또한 cell proliferation에 영향을 미치는 EGF의 활성 또한 CBD region의 위치에 상관없이 세포증식 촉진 효과를 증명하였다(그림 13-16). Nishi 등의 연구결과에 따르면, growth factor와 융합하는 binding-domain의 위치 또한 각각의 활성에 영향을 미칠 수 있다고 주장하고 있다(Nishi et al., 1998). 즉, growth factor와 결합하는

anchoring 단백질의 위치가 N-말단 또는 C-말단이나에 의하여 각각의 활성화에 영향을 미치거나 또는 서로 간섭하는 효과를 가져 올 수 있다고 설명하고 있다(Nishi et al., 1998). 그러나 본 연구 결과 18개와 12개의 CBD protein이 N-말단 또는 C-말단에 부착이 되어도 각각의 collagen binding 활성화와 human cell line 증식 촉진이라는 각 domain의 function에는 아무런 간섭을 하지 않는 것으로 나타났으며 18개와 12개의 아미노산 및 N-말단과 C-말단이라는 부착 단백질의 크기와 위치적인 차이에 의하여 활성의 높고 낮음은 발생함이 관찰되었다(그림 10, 11, 13-16). 이러한 결과를 통하여 EGF와 *V. mimicus* 유래의 CBD는 서로의 활성화에 아무런 영향을 미치지 않으며, 이러한 조합을 이용한 융합 재조합단백질의 wound healing agent로서의 응용 및 활용 가능성을 유추 할 수 있었다.

다양한 연구에서 EGF와 함께 fusion 된 anchoring protein partner의 binding 활성을 보고하였다 (Nishi et al., 1998, Ishikawa et al., 2001, Ishikawa et al., 2003, Imen et al., 2009, Yang et al., 2009). 제작한 각각의 fusion binding protein들은 substrate 물질들과 반응시켰을 때 binding 되어 SDS-PAGE 상에서 사라지는 결과를 보였다(Nishi et al.,

1998, Ishikawa et al., 2001, Ishikawa et al., 2003, Imen et al., 2009, Yang et al., 2009). 하지만 어떠한 연구에서도 이렇게 binding 된 fusion protein의 회수에 대하여서는 언급을 하지 않았으며, 오직 Kim등의 연구에서만 1% SDS solution을 이용하여 collagen에 binding 된 EGF fused collagen binding protein의 회수 및 collagen에 binding 되어 있음을 확인하였다(Kim et al., 2009). 본 연구에서도 이러한 방법을 이용하여 collagen에 binding 된 4가지의 fusion protein의 존재를 확인하였다(그림 10, 11). 이러한 결과가 없음은 binding 된 후 growth factor의 짧은 half-life에 의하여 분해되어 SDS-PAGE에는 나타나지 않기 때문에 마치 binding 된 것과 같이 보임을 증명하는 것이며 나아가 본 실험에서 제작한 4가지 fusion protein들의 collagen binding 활성이 있음을 더욱 확고하게 증명하는 결과이다(그림 10, 11). 또한 이러한 단백질을 1% SDS solution으로써 용출 한 뒤 image analyzer를 이용한 분석으로써 탈락한 단백질 band들의 intensity를 측정하였다(그림 12). 0.1%에서 2%에 이르는 다양한 농도의 SDS solution을 이용하여 bound protein의 용출을 실험한 결과 1%에서 가장 높은 세기의 단백질 band가 나옴을 알 수 있었으며 그 이상의 농도에서는 그 강도가 같음을 알 수 있었다(data not shown). 그 결과 18개의 아미노산으로 구

성된 12와 56 재조합 CBD fusion protein에서 좀 더 높은 binding 활성을 보였다(그림 12).

Fusion protein 또는 growth factor들은 표적이 되는 target cell line의 종류에 따라서 활성에 대한 susceptibility가 차이가 난다고 알려져 있다(Nishi et al., 1998). 따라서 본 연구에서는 두 가지 cell line type (A-431과 HaCaT)을 실험에 사용함으로써 EGF의 활성에 대한 두 가지 cell type의 변화 및 차이를 관찰하였다(그림 13-16). A-431은 다양한 epidermal cell 연구에 사용되었으며, 여성의 상피세포 종양 tissue에서 유래한 다형배수체의 human cell line이며, HaCaT cell line은 정상적인 분화와 human cell의 kerationization에 대한 조절에 관하여 많은 연구가 된 최초의 epithelial cell line이다(Boukamp et al., 1988). 두 가지의 cell을 배양한 뒤 100 pg에서 100 ng에 이르는 농도의 EGF fusion 단백질을 처리한 뒤 MTS assay 방법을 통하여 cell number를 측정 하였다(그림 13-16). 또한 culture plate에 collagen을 coating 한 뒤 fusion protein을 부착시킨 뒤 A-431과 HaCaT cell을 분주하여 collagen의 유무에 따른 세포주의 성장활성에 대한 fusion protein의 활성을 평가하였다(그림 15, 16). 실험결과

A-431 cell line에 비하여 HaCaT cell line이 fusion protein에 대하여 높은 감수성을 보였으며, 다양한 연구결과에서 보고된 것과 같이 dose-dependent한 활성의 증가를 기록하였다(그림 14, 16). A-431 cell line은 HaCaT cell과는 다르게 용량에 따른 활성의 증가는 일부 농도에서 발생하였으며, CBD(12aa)-EGF의 형태인 78 융합단백질은 세포에 대한 촉진 활성이 거의 없었다(그림 13, 15). 또한 EGF-CBD(18aa)인 12단백질은 collagen이 도포된 culture plate에서 더욱 낮은 성장촉진 활성을 나타내었다(그림 15). A-431 cell line을 이용한 세포성장 활성 평가 결과는 34와 56 단백질에서만 hEGF 보다 높은 활성을 나타내었다(그림 13, 15). 또한 A-431 cell line을 이용한 collagen coating 효과는 없는 것으로 나타났다(그림 15). 이와는 반대로 HaCaT cell line의 경우 78 단백질을 제외한 모든 구간에서 dose-dependent 결과를 기록하여, A-431에 비하여 EGF에 대하여 감수성이 높은 것으로 나타났다(그림 14, 16). 또한 12 단백질의 경우 A-431 cell line과는 다르게 collagen coating 후 더욱 높은 성장 촉진 활성을 나타내었으며, 이러한 결과는 모든 fusion protein에서 비슷한 결과를 보였다(그림 14, 16). HaCaT cell line에서는 collagen을 도포하지 않은 well plate를 이용한 실험의 100 pg 결과를 제외하고 모든 실험 결과에서 hEGF와 비슷

하거나 더욱 높은 활성을 기록하였다. 또한 A-431 cell line과는 다르게 collagen을 coating 하였을 때 더욱 높은 cell mitogenic 활성을 기록하였으며 Imen 등의 연구 결과와 일치하였다(Imen et al., 2009, 그림 16).

또한 이러한 cell proliferation 활성이 EGF fusion 단백질에 의한 EGF receptor으로 신호 전달로 인하여 발생하는 process 인가를 확인하기 위하여 EGF receptor의 phosphorylation을 western blotting 방법으로 확인하였다(그림 17). Phosphorylation의 활성은 anti-phosphotyrosin antibody를 이용하여 확인하였으며, 모든 fusion protein에서 hEGF와 비슷하거나 높은 phosphorylation signal을 볼 수 있었다(그림 17). 따라서 본 연구과정에서 개발한 EGF-CBD fusion의 cell proliferation 활성은 EGF와 EGF receptor의 결합으로 인한 signal transduction 과정을 걸쳐 일어남을 알 수 있었으며, MTS assay 결과와 같이 34와 56 fusion 단백질에서 가장 큰 활성을 기록하였다(그림 13-17).

본 연구에서는 다양한 활성을 보이는 EGF의 문제점인 낮은 생산 수율, 짧은 half-life 그리고 낮은 target specificity를 해결하고자 *V. mimicus*의 metalloprotease 유

래의 collagen-binding domain을 융합하여 EGF의 단점을 해결하고자 하였다. 18개와 12개의 아미노산으로 이루어진 CBD anchoring protein을 이용하여 EGF fusion 재조합 단백질을 성공적으로 발현, 정제하였으며 이러한 융합단백질의 각각의 functional region의 활성을 확인하였다. 그 결과 12, 34, 56 그리고 78 단백질 모두 collagen-binding 활성이 있음을 알 수 있었으며 18개의 CBD가 융합된 12와 56 재조합 단백질들이 12개의 CBD 융합 단백질보다 활성이 높음을 알 수 있었다. 또한 A-431과 HaCaT cell line을 이용한 proliferation 활성은 34와 56 단백질이 mitogenic 활성이 가장 높음을 알 수 있었다. 이러한 cell proliferation 효과는 phosphorylation의 signal 분석을 위한 western blotting 결과의 signal과도 일치함을 알 수 있었다. 재조합단백질을 이용한 치료제를 생산하는 과정에서는 다양한 공정에 따른 protein aggregation이 문제가 됨을 언급하였다. 따라서 본 연구과정에서 생산한 12, 34, 56 그리고 78 재조합 융합 단백질과, Kim 등이 개발한 33개의 아미노산으로 이루어진 *V. mimicus* metalloprotease 유래의 CBD가 융합된 EGF의 정제 후 투석과정을 통한 aggregation의 정도를 분석하였다(그림 18). 5가지의 재조합 단백질은 투석 후 원심분리과정으로 aggregation된 단백질과 soluble한 단백질로 분

류할 수 있었으며 그 결과 33개의 아미노산으로 된 EC full 단백질에서 단백질의 응집 현상이 가장 크게 발생하였다(그림 18). 그리고 34, 78 단백질의 순서로 aggregation이 크게 발생하였다(그림 18). 따라서 이러한 aggregation의 발생은 치료제로의 응용 및 활용에 문제를 야기 할 수 있으므로 본 연구에서 실험한 모든 결과는 56 재조합 융합 단백질이 EGF-CBD fusion 단백질의 방법을 통한 상처 치료제로의 가능성이 가장 높음을 알 수 있었다. 따라서 56 단백질 등을 이용한 다양한 동물실험 등의 *in vivo* 실험을 통하여 이러한 가설을 증명하고 그 활성을 평가한다면 매우 유용한 상처 치료제 후보 물질이 될 것이라고 사료된다.



## V. 요약

사람의 성장인자(growth factor)들 중에서 53 개의 아미노산으로 이루어진 상피세포 성장인자(human epidermal growth factor, hEGF)는 상피세포의 재생 및 성장촉진, 상피세포내의 keratinocyte 세포의 이동, 육아세포(granulation tissue)의 형성 촉진, 그리고 섬유아세포(fibroblast) 세포의 운동성의 증진 등의 다양한 활성을 나타내기 때문에 상처치유 과정에서 매우 중요한 물질이며, 이러한 다기능성 활성 때문에 의학 및 화장품 산업에서 매우 유용한 도구로 각광받고 있다. 그러나 hEGF 는 체내에서의 낮은 생산량, 혈류로의 확산으로 인한 낮은 농도로의 존재, 한정된 표적 특이성, 그리고 짧은 반감기 때문에 치료제로써의 활용이 제한되어 왔다. 본 연구에서는 이러한 hEGF 의 단점을 보완하기 위하여 *Vibrio mimicus* 의 metalloprotease 에서 분리한 collagen-binding domain (CBD)이 융합된 재조합 단백질을 만들었다. 기존의 연구에서는 33 개의 아미노산으로 이루어진 융합단백질을 개발하였으나 더욱 크기가 줄어든 18 개와 12 개의 아미노산으로 이루어진 CBD moiety 를 EGF 의 C-말단과 N-말단에 각각 부착하였다. 이러한

fusion protein 들은 pET vector system 을 이용하여 대장균에서 insoluble inclusion body 의 형태로 발현되었으며, urea 를 이용한 변성 후 투석방법과 Ni-NTA column 을 이용하여 각각 순수하게 정제하였다. 네 개의 fusion 단백질은 hEGF 를 부착한 상태에서도 높은 collagn-binding 활성을 나타내었으며, A-431 과 HaCaT 세포주를 이용한 실험 결과 대조구 보다 높고 EGF 와 비슷한 세포 증식 활성을 보였다. 이러한 binding 활성과 세포증식 촉진효과는 본 연구에서 개발한 fusion protein 들이 상피세포 치료제로써의 높은 활용 가능성을 의미한다.



## VI. 참고문헌

- Alam M., Miyoshi S. I., Tomochika K. I. and Shinoda S. (1996) Purification and characterization of novel hemagglutinins from *Vibrio mimicus*: a 39 kDa major outermembrane protein and lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **64**: 4035-4041.
- Booth B. A., Boesman-Finkelstein M. Finkelstein R. A. (1984) *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease nicks cholera enterotoxin. *Infect. Immun.* **45**: 558-560.
- Borselli C., Storrie H., Benesch-Lee F., Shvartsman D., Cezar C., Lichman J. W., et al. (2010) Regenerative medicine special feature: Functional muscle regeneration with combined delivery of angiogenesis and myogenesis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 3287-3292.
- Bouhadir K. H. and Mooney D. J. (1998) *In vitro* and *in vivo* models for the reconstruction of intracellular signaling. *Ann. NY Acad. Sci.* **842**: 188-194.
- Boukamp P., Petrussevska R. T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A. and Fusenig N. F. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* **106**: 761-771.
- Carpenter G. and Cohen S. (1976) <sup>125</sup>I-labeled human epidermal growth factor. binding internalization, and degradation in human fibroblast. *J. Cell Biol.* **71**: 159-171.
- Carpenter G. and Cohen S. (1979) Epidermal growth factor. *Ann. Rev. Biochem.* **48**: 193-216.

- Cheng J. C., Shao C. P. and Hor L. I. (1996) Cloning and nucleotide sequencing of the protease gene of *Vibrio vulnificus*. *Gene*. **183**: 255-257.
- Chen X., Cen P. and Chen J. (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.* **5**: 579-581.
- Chowdhury M. A. R., Miyoshi S. and Shinoda S. (1990) Purification and characterization of a protease produced by *Vibrio mimicus*. *Infect. Immun.* **58**: 4159-4162.
- Chung K. H., Park S. H., Kim M. K., Park H. D. and Son T. I. (2006) Stabilization of epidermal growth factor on thermal and proteolytic degradation by conjugation with low molecular weight chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.* **102**: 5072-5082.
- Chung Y. C., Chang T. M. and Chang M. C. (1997) Cloning and characterization of the gene (*empV*) encoding extracellular metalloprotease from *Vibrio vulnificus*. *Gene* **189**: 163-168.
- Cohen C. M. and Crea R. (1988) Process for producing human epidermal growth factor and analog thereof. *United States patent*. 4,743,679.
- Cromwell M. E., Hilario E. and Jacobson F. (2006) Protein aggregation and bioprocessing. *The AAPS Journal* **8**: article 66.
- Davis B. R., Fanning G. R., Madden J. M., Steigerwalt A. G., Bradford H. B., Smith H. L. and Brenner D. J. (1981) Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholera* strains and

- designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. *J. Clin. Microbiol.* **14**: 631-639.
- David V. A., Deutch A. H., Sloma A., Pawlyk D., Ally A. and Durham D. R. (1992) Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding the extracellular natural protease, vibriolysin, of *Vibrio proteolyticus*. *Gene* **112**: 107-112.
- Dotevall H. G., Jonson-Stromberg G., Sanyal S., Holmgren J. (1985) Characterization of enterotoxin and soluble hemagglutinin from *Vibrio mimicus*: identity with *Vibrio cholera* O1 toxin and hemagglutinin. *FEMS Microbiol. Lett.* **27**: 17-22.
- Dreux A. D., Lamb D. J., Modjtahedi H. and Ferns G. A. A. (2006) The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis. *Atherosclerosis.* **186**: 38-53.
- Flaumenhaft R. and Rifkin D. B. (1992) The extracellular regulation of growth factor action. *Mol. Biol. Cell.* **3**: 1057-1065.
- Hardwicke J., Schmaljohann D., Boyce D. and Thomas D. (2008) Epidermal growth factor therapy and wound healing – past, present and future perspective. *Surgeon.* **6**: 172-177.
- Hase C. C. and Finkelstein R. A. (1991) Cloning and nucleotide sequence of the *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease (HA/protease) gene and construction of an HA/protease-negative strain. *J. Bacteriol.* **173**: 3311-3317.
- Hayashi M., Tomita M. and Yoshizato K. (2001) Production of EGF-collagen chimeric

- protein which shows the mitogenic activity. *Biochem. Biophys. Acta.* **1528**: 187-195.
- Imanishi J., Kamiyama K., Iguchi I., Kita M., Sotozono C. and Kinoshita S. (2000) Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog. Retin. Eye Res.* **19**: 113-129.
- Imen E. H., Nakamura M., Mie M. and Kobatake. (2009) Construction of multifunctional proteins for tissue engineering: Epidermal growth factor with collagen binding and cell adhesive activities. *J. Biotechnol.* **139**: 19-25.
- Ishikawa T., Terai H. and Kitajima T. (2001) Production of a biologically active epidermal growth factor fusion protein with high collagen affinity. *J. Biochem.* **129**: 627-633.
- Ishikawa T., Terai H., Yamamoto T., Harada K. and Kitajima T. (2003) Delivery of a growth factor fusion protein having collagen-binding activity to wound tissues. *Artif. Organs.* **27**: 147-154.
- Janda J. M., Powers C., Bryant R. G. and Abbott S. L. (1988) Current perspective on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**: 245-267.
- John E. P., Sistiabudi R., Ivanisevic A. and Panitch A. (2009) Collagen-binding peptidoglycans: A biomimetic approach to modulate collagen fibillogenesis for tissue engineering applications. *Tissue Eng.* **15**: 2991-2999.

- Jyung R. W. and Mustoe T. A. (1992) Role of cytokines in wound repair. In clinical application of cytokines: role in pathogenesis, diagnosis, and therapy, ed. A. Gearing et al. *Oxford University Press*, pp. 307-628.
- Kang J. H., Lee J. H., Park J. H., Huh S. H. and Kong I. S. (1998) Cloning and identification of a phospholipase gene from *Vibrio mimicus*. *Biochim. Biophys., Acta.* **1394**: 85-89.
- Khachigian L. M. and Chesterman C. N. (1994) Structural basis for the extracellular retention of PDGF A-chain using a synthetic peptide corresponding to exon6. *Peptides.* **15**: 133-137.
- Kim D. G., Min M. K., Ahn S. C., Kim J. K, and Kong I. S. (2009) Expression of a fusion protein containing human epidermal growth factor and the collagen-binding domain of *Vibrio mimicus*. *Biotechnol. Lett.* **31**: 259-264.
- Kim G. T., Lee J. Y., Huh S. H., Yu J. H. and Kong I. S. (1997) Nucleotide sequence of the *vvhA* gene encoding hemolysin from *Vibrio mimicus*. *Biochim. Biophys., Acta.* **1360**: 102-104.
- Kim S. K., Yang J. Y. and Cha J (2002) Cloning and sequence analysis of a novel metalloprotease gene from *Vibrio parahaemolyticus* O4. *Gene* 283: 277-286.
- Kreger A. and Lockwood D. (1981) Detection of extracellular toxin(s) produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **33**: 583-590.
- Kothary M. H. and Kreger A. S. (1987) Purification and characterization of an elastolytic

- protease of *Vibrio vulnificus*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 1783-1791.
- Lee C. Y., Su S. C. and Liaw R. B. (1995) Molecular analysis of an extracellular protease gene from *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol.* **141**: 2569-2576.
- Lee J. H., Ahn S. H., Lee E. M., Jeong S. H., Kim Y. O., Lee S. J. and Kong I. S. (2005) The FAXWXXT motif in the carboxyl terminus of *Vibrio mimicus* metalloprotease is involved in binding to collagen. *FEBS Lett.* **579**: 2507-2513.
- Lee J. H., Ahn S. H., Lee E. M., Kim Y. O., Lee S. J. and Kong I. S. (2003) Characterization of the enzyme activity of an extracellular metalloprotease (VMC) from *Vibrio mimicus* and its C-terminal deletions. *FEMS Microbiol. Lett.* **223**: 293-300.
- Lee J. H., Kim G. T., Lee J. Y., Jun H. K., Yu J. H., and Kong I. S. (1998) Isolation and sequence analysis of metalloprotease gene from *Vibrio mimicus*. *Biochim Biophys Acta* **1384**:1-6.
- Lin H., Chen B., Sun W., Zhao W., Zhao Y. and Dai J. (2006) The effect of collagen-targeting platelet-derived growth factor on cellularization and vascularization of collagen scaffolds. *Biomaterials.* **27**: 5708-5714.
- Lipscomb W. N. and Strater N. (1996) Recent advances in zinc enzymology. *Chem. Rev.* **96**: 2375-2433.
- Liu Y. L., Huang L. M., Lin W. P., Tsai C. C., Lin T. S., Hu Y. H., Chen H. S., Han J. M.,

- Wang H. J. and Liu Y. T. (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.
- Matsushita O., Jung C. M., Minami J., Katayama S., Nishi N. and Okabe A. (1998) A study of the collagen-binding domain of a 116-kDa *Clostridium histolyticum* collagenase. *J. Biol. Chem.* **273**: 3643-3648.
- Matsushita O., Koide T., Kobayashi R., Nagata K. and Okabe A. (2001) Substrate recognition by the collagen binding domain of *Clostridium histolyticum* class I protease. *J. Biol. Chem.* **276**: 8761-8770.
- Milton D. L., Norqvist A. and Wolf-Watz H. (1992) Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **174**: 7235-7244.
- Miyoshi S., Sonoda Y., Wakiyama H., Rahman M. M., Tomochika K., Shinoda S., Yamamoto S. and Tobe K. (2002) An exocellular thermolysin-like metalloprotease produced by *Vibrio fluvialis*: purification characterization, and gene cloning. *Microb. Pathog.* **33**: 127-134.
- Miyoshi S., Wakae H., Tomochika K. and Shinoda S. (1997) Functional domains of a zinc metalloprotease from *Vibrio vulnificus*. *J. Bacteriol.* **179**: 7606-7609.
- Moncada S. Palmer R. M. J. and Higgs E. A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**: 109-142.

- Nagaoka M., Jiang H., Hoshiba T., Akaike T. and Cho C. (2010) Application of recombinant fusion proteins for tissue engineering. *Ann. Biomed. Eng.* **38**: 683-693.
- Nishibuchi M. and Seidler R. J. (1983) Medium-dependant production of extracellular enterotoxins by non-O-1 *Vibrio cholera*, *Vibrio mimicus*, and *Vibrio fluvialis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 228-231.
- Nishibuchi M., Khaomance-iam V., Honda T., Kaper J. B. Miwatani T. (1990) Comparative analysis of the hemolysin genes of *Vibrio cholerae* non-O1, *Vibrio mimicus*, and *Vibrio hollisae* that are similar to *tdh* gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **67**: 251-256.
- Nishi N., Matsushita O., Yuube K., Miyanaka H., Okabe A. and Wada F. (1998) Collagen-binding growth factors: production and characterization of functional fusion protein having a collagen-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 7018-7023.
- Overall C. M. (2001) Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules and exosites. Overview and experimental strategies. *Methods Mol. Biol.* **151**: 79-120.
- Rao M. B., Tanksale M. A., Ghatge M. S. and Deshpande V. V. (1998) Molecular and biotechnological aspect of microbial protease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 597-635.
- Rustad K. C., Sorkin M., Levi B., Longaker M. T. and Gurtner G. C. (2010) Strategies for organ level tissue engineering. *Organogenesis.* **6**: 151-157.

- Sahasrabudde A.A., Ahmed N. and Krishnasastry M. V. (2006) Stress-induced phosphorylation of caveolin-1 and p38, and down-regulation of EGFr and EPK by the dietary lectin jacalin in two human carcinoma cell lines. *Cell Stress Chaperones* **11**: 135-147.
- Sakar B. L., Kumar R., De S. P. and Pal S.C. (1987) Hemolytic activity of and lethal toxin production by environmental strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2696-2698.
- Saksela O. and Rifkin D. B. (1990) Release of basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity. *J. Cell Biol.* **110**: 767-775.
- Schlessinger J., Schreiber A. B., Levi A., Lax I., Libermann T. and Yarden Y. (1983) Regulation of cell proliferation by epidermal growth factor. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **14**: 93-111.
- Shinoda S. and Miyoshi S. (2011) Proteases produced by *Vibrios*. *Biocontrol Sci.* **16**: 1-11.
- Simmons C. A., Alsberg E., Hsiong S., Kim W. J. and Mooney D. J. (2004) Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone.* **35**: 562-569.
- Spira W. M. and Fedorka-Cray P. J. (1984) Purification of enterotoxins from *Vibrio mimicus* that appear to be identical to cholera toxin. *Infect. Immun.* **45**: 679-684.

- Takeuchi H., Shibano Y., Morihara K., Fukushima J., Inami S., Keil B., Gilles A. M., Kawamoto S. and Okuda K. (1992) Structural gene and complete amino acid sequence of *Vibrio alginolyticus* collagenase. *Biochem. J.* **281**: 703-708.
- Weinbaum J. S., Tranquillo R. T. and Mecham R. P. (2010) The matrix-binding domain of microfibril-associated glycoprotein-1 targets active connective tissue growth factor to a fibroblast-production extracellular matrix. *Macromol. Biosci.* **10**: 1338-1344.
- Wright A. C. and Morris J. G. (1991) The extracellular cytotoxin of *Vibrio vulnificus*: inactivation and relationship to virulence in mice. *Infect. Immun.* **59**: 192-197.
- Yamamoto K. Ichinose Y., Nakasone N., Tanabe M., Nagahama M. J., Sakurai J. and Iwanaga M. (1986) Identity of hemolysin produced by *Vibrio cholerae* O1, biotype El Tor. *Infect. Immun.* **51**: 927-931.
- Yang Y., Zhao Y., Chen B., Han Q., Sun W., Xio Z. and Dai J. (2009) Collagen-binding human epidermal growth factor promotes cellularization of collagen scaffolds. *Tissue Eng. Part A* **15**: 3589-3596.

## VII. 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 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 교수님, 그리고 정귀택 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 선배님, 그리고 많은 걸 가르쳐 주신 안선희 선배님께 감사 드립니다.

부족한 저를 믿고 늘 한결같이 따랐던 재간둥이들, 김은영 그리고 김유리에게 감사의 말을 전합니다. 많은 도움을 준 유전공학 연구실 후배님들, 저와 함께 같은 꿈을 꾸던 모든 연구실 원들과 9 호관 5 층에서 저와 함께 생활했던 모든 생물공학과 선후배 그리고 동기님들께 감사의 말을 전합니다.

항상 저를 응원해준 장가, 진환, 김사장과 99~00 모임 일동, 그리고 용호동 친구들에게 또한 감사의 말을 드립니다.

진심 어린 격려와 따뜻한 마음으로 격려해주신 이상준 과장님, 지영주, 박중연, 김봉석 연구관님, 안혜숙, 김우진, 김형수, 김영옥, 강정하, 공희정, 남보혜 박사님과 김외숙 선생님께 감사의 말씀을 전합니다.

마지막으로 지금의 제가 있도록 해주신 존경하는 부모님과 내 동생 동우, 그리고 사랑하는 장인, 장모님, 아내 지영이에게 이 논문을 바칩니다.