

E. coli 발현 시스템에 의해 생산된 recombinant human bone morphogenetic protein-2의 정제와 생물학적 활성

최경희¹, 문금옥¹, 김수홍¹, 윤정호², 장경립³, 조규성^{4*}

1. (주) 코웰메디, 기술연구소
2. 관동대학교 의과대학 명지병원 치과
3. 부산대학교 생명과학부
4. 연세대학교 치과대학 치주과학교실, 치주조직재생연구소

Purification and biological activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2 produced by E. coli expression system

Kyung-Hee Choi¹, Keumok Moon¹, Soo-Hong Kim¹, Jeong-Ho Yun², Kyung-Lib Jang³, Kyoo-Sung Cho^{4*}

1. Research Development Institute, Cowellmedi Co. LTD.
2. Department of Dentistry, College of Medicine, Kwandong University, Myongji Hospital
3. Department of Biological Science, College of Natural science, Pusan National University
4. Department of Periodontology, Research Institute for Periodontal Regeneration, College of Dentistry, Yonsei University

ABSTRACT

Purpose: Bone morphogenetic protein-2(BMP-2) has been shown to possess significant osteoinductive potential. There have been attempts to overcome a limitation of mass production, and economical efficiency of BMP. The aim of this study was to produce recombinant human BMP-2(rhBMP-2) from E. coli in a large scale and evaluate its biological activity.

Materials and Methods: The E.coli strain BL21(DE3) was used as a host for rhBMP-2 production. Dimerized rhBMP-2 was purified by affinity chromatography using Heparin column. To determine the physicochemical properties of the rhBMP-2 expressed in E. coli, we examined the HPLC profile and performed Western blot analysis. The effect of the purified rhBMP-2 dimer on osteoblast differentiation was examined by alkaline phosphatase (ALP) activity and representing morphological change using C2C12 cell.

Results: E. coli was genetically engineered to produce rhBMP-2 in a non-active aggregated form. We have established a method which involves refolding and purifying a folded rhBMP-2 dimer from non-active aggregates. The purified rhBMP-2 homodimer was characterized by SDS-PAGE as molecular weight of about 28kDa and eluted at 34% acetonitrile, 13.27 min(retention time) in the HPLC profile and detected at Western blot. The purified rhBMP-2 dimer stimulated ALP activity and induced the transformation from myogenic differentiation to osteogenic differentiation.

Conclusion: rhBMP-2 was produced in E. coli using genetic engineering. The purified rhBMP-2 dimer stimulated ALP activity and induced the osteogenic differentiation of C2C12 cells. (*J Korean Acad Periodontol 2008;38:41-50*)

KEY WORDS: E.coli; rhBMP-2; purification; alkaline phosphatase.

서론

골과 연골의 형성과 재생을 유도하는 조절인자인 bone morphogenetic proteins(BMPs)는 transforming growth fac-

tor- β (TGF- β) superfamily에 속하는 복합기능의 성장인자이다. 1965년 Urist¹⁾는 의해 탈회된 골편을 쥐의 피하근육내부에 이식하면 이식편 주위로 이소성 골형성(ectopic bone formation)이 일어나는 것을 관찰하고 그에 관계하는 물질을 추출하여 골 형성 단백질(bone morphogenetic proteins: BMPs)이라고 명명하였다. BMP는 몇몇 종류의 세포들의 성장과 분화를 조절하는 것으로 알려져 있다. BMP는 연골모세포를 자극하여 기질합성을 유도하고, 조골세포를 자극하여 alkaline phosphatase(ALP) 활성도를 증가시키고 콜라겐 합성을 자극한다²⁾. 아울러, monocyte의 chemo-

Correspondence: Dr. Kyoo-Sung Cho
Department of Periodontology, Research Institute for Periodontal Regeneration College of Dentistry, Yonsei University, 134 Shinchon-Dong 134, Seodaemun-gu Seoul, 120-752, Korea
e-mail: kscho@yuhs.ac, Tel: 82-2-2228-3188, Fax: 82-2-392-0398

* This work was supported by the Korea Research Foundation Grant funded by the Korean Government (MOEHRD) (KRF-2007-314-E00184).
접수일: 2008년 1월 30일; 채택일: 2008년 2월 28일

taxis³⁾와 neural cell의 분화⁴⁾에 관계하며 일반적으로 배발 생기에 중요한 역할⁵⁾을 한다. 또한, BMP는 생체 내(*in vivo*)에서 미분화 간엽 세포에 작용하여 연골내골화작용과 유사한 방식으로 골형성을 유도한다고 알려져 있으며, 성체에서도 새롭게 골이 형성되는 과정 동안 BMP의 농도가 형성되는 부위에서 증가됨이 관찰되었다⁶⁾.

1988년 Wozney²⁾ 등이 처음으로 클로닝(cloning)에 성공하면서부터 BMP에 관한 본격적인 연구가 시작되었으며, 이후 많은 연구를 통해 20종류 이상의 BMP 중 BMP-2, -4, -5, -6, -7 등이 골유도성이 있다고 밝혀졌다⁷⁻¹¹⁾. 그 중에서, 포유류 세포(CHO cell)로부터 재조합 DNA 기술로 얻어지는 recombinant human BMP(rhBMP)-2, -7이 골유도 능력이 가장 우수하다고 보고되어¹²⁾, 이를 이용하여 많은 연구가 이루어져 왔다. 특히 동물 모델을 이용하여 임상적 적용을 위한 많은 연구들이 있었다. rhBMP는 두개골, 하악골, 장골의 골결손부 재생을 촉진시켰다.¹³⁻¹⁵⁾ BMP-2의 효과와 임상적 응용범위는 정형외과 영역뿐만 아니라 치과 영역에서도 그 안전성과 효과가 증명되어지고 있다^{16,17)}.

대부분의 BMP들은 대용량 생산을 하기 위해 포유류 세포들을 이용하여 만들어졌다. Chinese hamster ovary(CHO) cell에서 BMP-2¹⁸⁾가 발현되었는데, 세포내에서 BMP 전구체가 생산된 후 modification되어 세포외로 native homodimer가 분비되었다. Human BMP-4는 mouse myeloma cell line(NSO)과 human embryonic kidney cell line(292)에서 생산되어졌고, human BMP-7(OP-1)은 CHO cell과 primate cell line에서 생산되어졌다¹⁹⁾. Maruoka 등²⁰⁾이 insect cell에서 baculovirus 세포 발현 시스템을 이용하여 human BMP-2 생산을 시도했으나 cellular lysate에서만 활성이 나타나고 상등액에서 나타나지 않았다. 또한 비슷한 시스템이 BMP-2와 BMP-7의 homodimer와 heterodimer를 생산하는데 이용되었으나 BMP 활성은 세포내에서만 나타났다²¹⁾.

이와 같이 생산되는 BMP의 골형성능을 임상에 효과적으로 적용하기 위해서는 생산이 용이하고 대량 생산이 가능하여 경제적인 가치와 충분한 골형성능을 동시에 지녀야 한다. 그러나, 기존의 포유류 세포를 이용하여 생산된 rhBMP는 골형성에 있어서 효과적인 것으로 입증되었으나, 생산 비용이 높아 일상적인 임상 시술에 적용시키는 데에는 한계점이 있어 왔다. 그러므로, 새로운 방식에 의해 BMP를 추출·정제하거나 인공적으로 생산하여 사용하고자 하는 노력들이 계속 있어 왔

다. 이와 같은 과정에서, *E. coli* 같은 박테리아 시스템을 이용하여 BMP-2와 BMP-4가 생산되어져 그 활성이 *in vivo*와 *in vitro*에서 확인되었다²²⁻²⁴⁾. *E. coli* 같은 박테리아를 사용한 rhBMP의 생산은 경제적으로 BMP의 생산 비용을 낮추어 BMP의 임상적용을 보다 용이하게 할 것으로 평가되었다.

본 연구는 *E. coli* 발현 시스템을 이용하여, rhBMP-2를 안정적으로 다량 생산하는 시스템을 갖추고 생산된 단백질을 활성이 있는 상태로 정제하는 것을 목표로 하였다. 그리고 생산된 rhBMP-2의 활성을 *in vitro*에서 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. *E. coli*를 이용한 human BMP-2의 발현 및 정제

1) Human BMP-2 유전자의 클로닝(cloning)

U2OS 세포를 10% 우태아혈청, 100unit/ml 페니실린, 100 ug/ml 스트렙토마이신을 첨가한 DMEM(Gibco BRL, NY, USA) 배지를 사용하여 5% CO₂를 공급하면서 37°C에서 CO₂ incubator(Thermo Electron Co, Ohio, USA)에서 배양하였다.

Human BMP-2 유전자를 얻기 위하여 U2OS 세포에서 total cellular RNA를 Trizol(Gibco BRL, NY, USA) 용액을 사용하여 추출하여 역전사반응을 실시하였다. cDNA를 주형으로 sense primer로 5'-AGAAGAACATATGCAAGCCAAA CACAAACAGCG G-3', antisense primer로 5'-AATTTT ACAGCTTCTAGCGACACCCACAACCCCT-3'을 사용하여 polymerase chain reaction(PCR)을 실시하였다. PCR 산물을 분리하여 pGEM-T vector(Promega, USA)에 삽입시킨 후 *E. coli*(DH5 α) 세포를 이용하여 클로닝하였다. 형질 전환체를 선별하여 rhBMP-2 유전자를 발현 벡터(pRSET(A))에 삽입하여 pRSET(A)/hBMP-2로 명명하였다. pRSET(A)/hBMP-2로 BL21(DE3)를 형질전환시켜 50 ug/ml ampicillin을 포함한 LB배지에 접종하여 37°C에서 배양하여 발현을 확인하였다.

2) 고밀도세포배양

발효조(KoBioTec, Incheon, Korea)를 이용하여 Fatemeh 등의 방법^{25,26)}을 응용하여 고밀도로 배양하였다. 단일 균체(a single colony) 한 개를 Ampicillin(200 ug/ml)이 첨가된 LB 액체배지 300 ml에 접종하여 진탕배양기(Shacking incubator)에서 37°C, 200 rpm의 회전속도로 16~18시간 동안

배양하여 전배양액(seed culture)을 만들었다. 이 전배양액을 본배양액(batch culture; yeast extract 1g/L, peptone 2 g/L)에 10%를 접종하였고, 본 배양액은 발효조를 이용하여 온도 30°C, 교반 속도 250 rpm으로 교반하면서 24시간 동안 배양하였다. 배양하면서 주기적으로 샘플을 채취하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. A600이 3~4 사이가 되면 멸균된 영양배지(Glucose 33.3 g/L, peptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, MgSO₄ 1 g/L, CaCl₂ 0.048 g/L, ZnSO₄ 0.0176 g/L, CuSO₄ 0.008 g/L)를 첨가하면서 24시간 동안 배양하였다.

3) 단백질 정제

24시간 동안 배양한 배양액을 수거하여 4°C, 8,000xg에서 10분 동안 원심분리(Sovall, CA, USA)하여 세포체를 침전시키고 상등액을 제거하였다. 세포침전체를 50 mM 인산나트륨 완충액(sodium phosphate buffer, pH 7.0)로 2회 세척한 후 220 mg(습량)/L의 농도로 현탁시켰다. 현탁액을 -80°C deepfreezer(Nihon Freezer, Japan)에 보관하였다. 냉동된 현탁액을 냉장온도에서 해동시킨 후 가압하여 세포를 파쇄한 후 5,500xg, 4°C에서 45분간 원심분리하였다. 원심분리 후 침전물에 50 mM 인산나트륨 완충액(pH 7.0)으로 재현탁시킨 후 다시 원심분리하여 침전물을 -80°C에 보관하였다.

냉동시킨 침전물을 2 mg(습량)/L 농도로 완충액 A(20 mM Tris-HCl(pH 8.5), 0.5 mM EDTA, 1%(v/v) Triton X-100)에 재현탁하여 현탁액을 26,000xg, 4°C에서 30분간 원심분리하여 inclusion bodies를 수거하였다.

Inclusion bodies를 용해 완충액(solubilization buffer: 4 M Guanidine-HCl, 0.1 M Tris-HCl(pH 8.5), 0.1 M di-thiothreitol, 1 mM EDTA)을 첨가하여 16~18시간 동안 천천히 교반시키면서 단백질을 용해시켰다. 용해시킨 후 26,000 xg, 4°C에서 45분간 원심분리하여 불용성 물질들을 침전시켜 제거하였다.

용해된 단백질 용액을 재변성화 완충액(renaturation buffer: 0.5 M Guanidine-HCl, 50 mM Tris-HCl(pH 8.5), 0.75 M 2-(cyclohexylamino) ethanesulfonic acid(CHES), 1 M NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM total Glutathione)으로 희석시켜 72시간 정도 둔 후 용해성 분획과 불용성 분획을 38,000 xg, 4°C에서 10분간 원심분리하여 분리하였다. 재변성과정 을 거친 mature rhBMP-2가 본래의 3차 구조를 가지게 되면

N-말단이 heparin-binding site를 가지게 된다²⁴⁾. 이 성질을 이용하여 refolded rhBMP-2 이량체(dimer)를 Heparin Sepharose 6 Fast Flow column(GE healthcare, USA)을 이용하여 단량체(monomer)와 분리하여 정제하였다. 재변성 과정을 지나온 대부분의 단백질은 heparin column에 결합하였으며 NaCl의 농도를 달리하여 용출(elution)시켰다. NaCl의 농도구배를 연속적으로 만들어 rhBMP-2의 용출을 확인한 후 3단계의 농도 구배를 주어 분리하였다.

2. 정제한 rhBMP-2의 생화학적 특성

1) HPLC(High performance Liquid Chromatography) 분석

정제된 rhBMP-2 이량체를 0.1% TFA(Trifluoroacetic acid)에 1 ug/ul의 농도로 녹여 C4 reversed-phase HPLC column(4.6 mm×50 mm, 300 Å, 5 um particle size; Grace vydac, CA, USA)에 10 ug을 로딩하고 유속(flow rate)은 1 ml/min으로 HPLC(Nanospace 51-2, Shiseido, Japan)로 chromatography를 실시하였다. 0.1% TFA로 수세 후 이동상을 0.1% TFA로 하면서 0~50% acetonitrile 구배로 용출하였다. 각 분획의 단백질 검출은 214 nm로 모니터링하였다.

2) Western Blotting 분석

rhBMP-2 이량체를 환원조건과 비환원조건에서 15% SDS-PAGE로 전기영동하여 Mini Trans-Blot cell(Bio-rad, CA, USA)을 이용하여 nitrocellulose membrane (Hybond PVDF, Amersham, USA)으로 단백질을 이동시킨다. 그 후 5% skimmed milk에 1시간 반응시키고 1차 항체는 monoclonal anti-bone morphogenetic protein-2 antibody(Sigma, Missouri, USA)를 1000:1, 2차 항체는 goat anti-mouse IgG(Bio-rad, CA, USA)를 2000:1로 사용하였다. 그리고 chemiluminescent ECL kit(Lab frontier, Korea)를 사용하여 검출하였다.

3. 정제한 rhBMP-2의 생물학적 활성(*in vitro* test)

정제한 rhBMP-2 단량체와 이량체 각각의 생물학적 활성을 측정하기 위하여 C2C12 cell에서의 alkaline phosphatase(ALP)의 활성과 세포의 형태변화를 관찰하였다.

6-well plate(SPL, Korea)에 세포들을 2×10^5 cells/ml 농

도로 접종하여 growth medium(DMEM containing 15% FBS)에서 배양하였다. rhBMP-2의 효과를 시험하기 위해 1일이 지난 후 growth medium을 rhBMP-2 단량체와 이량체가 각각 1 µg/ml의 농도로 포함된 low mitogen medium (DMEM containing 5% FBS)으로 교환하였다. 4일이 지난 후 rhBMP-2를 처리한 세포와 처리하지 않은 세포의 형태변화를 Inverted microscope(Nikon, NY, USA)로 40배의 배율에서 관찰하였다.

ALP 활성도 변화를 측정하기 위해 rhBMP-2 이량체를 농도별 (0, 0.2, 1, 5, 10 µg/ml)로 위와 같은 방법으로 각각 처리 후 3일간 배양한 후에 세포들을 lysis buffer(0.1 M Tris-HCL, pH 9.6, 1% NP-40, 1mM MgCl₂, 1mM ZnCl₂)를 첨가하여 세포를 해리시켰다. cell lysate 20 µl에 p-nitrophenyl phosphate Liquid Substrate system (Sigma, Missouri, USA) 200 µl를 첨가하여 혼합하여 37°C, 항온 수조에서 효소반응을 시킨 후 0.5 N NaOH 용액을 첨가하여 반응을 중지시켰다. ALP 활성도는 아래와 같이 상대적으로 측정하였다. 대조군에서의 A₄₂₀은 0.1 이하로 나타났다.

ALP 활성도 = 420 nm에서 반응액의 흡광도/cell lysate의 총 단백질 1 mg

단백질 정량 분석은 Bradford법으로 Bio-rad protein assay kit(Bio-rad, CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

결과

1. rhBMP-2 단백질의 생산 및 정제

Human BMP-2 생산 시스템을 구축하기 위해 인간 유래

골아세포주인 U2OS cell에서 human BMP-2의 mature form 유전자를 RT-PCR법으로 클로닝하여 확보하고자 하였다. 사람 세포에서 BMP-2가 만들어질 때 전구체로 만들어진 후 세포내 시스템에 의해 다듬어져 최종적으로 mature form이라 불리는 작은 이량체로 만들어져 세포외로 분비되어 작용한다. 표적세포의 세포막에 있는 수용체와 결합하여 신호전달(signal transduction) 과정을 거쳐 표적세포의 유전자 발현에 작용한다. 따라서 효과를 가지는 부분은 mature form이므로 본 연구에서는 mature form을 생산하고자 하였다. RT-PCR의 결과 369bp의 PCR product를 얻었다. 이를 pGEMT vector에 클로닝하여 sequenceing 한 결과 human BMP-2의 C-말단 쪽의 mature form의 114 아미노산 잔기의 핵산 서열과 일치하였다. 스크리닝한 형질 전환체 클론들을 각각 small-scale로 배양하여 IPTG induction시켜 재조합 단백질이 고농도로 발현되는 클론을 선별하여 실험에 사용하였다. 재조합 단백질은 soluble form이 아닌 insoluble form으로 inclusion body를 형성하였다(Fig. 1).

형질 전환체를 분리하여 발효조를 사용하여 영양매지를 첨가하면서 산소의 농도와 pH가 적당한 값을 나타내는 시기에 IPTG(isopropyl-β -D-thiogalactopyranoside)로 단백질 발현을 유도시켰다. 이후 24시간을 더 배양했을 때 평균적으로 600 nm에서의 흡광도(A600)가 12~14에 달했다. 이 이후로는 세포밀도를 나타내는 A600의 값이 지속적으로 증가하지 않았다. 이 때 배양을 중단하고 세포들을 수거하였다. 이 때의 세포 밀도는 15 g/L였다. 본 연구에서 플라스크를 이용한 배양에서는 세포밀도가 3~3.5 g/L로서 이와 비교할 때 플라스크 배양보다 5배정도 세포 밀도가 높는데, 이는 더 개선되어야 할 부분으로서 이 문제는 발효조의 조건과 배양 조건의 복합적인 문제라고 고려된다. 세포체를 수거하여 파쇄 후 inclusion body 분획을 모아서 용해·이량화시켜 Heparin col-

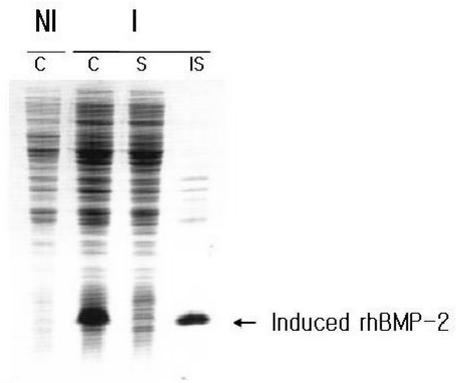


Figure 1. Expression and localization of rhBMP-2 protein in E. coli, Comassi blue-stained reduced 12% SDS-PAGE analysis. NI; cultivation in non-induced contition, I; cultivation in induced condition(1mM IPTG, 37°C for 3h). Lanes: C, crude extract of recombinant E. coli; S, soluble fraction of crude extract; IS, Insoluble fraction of crude extract.

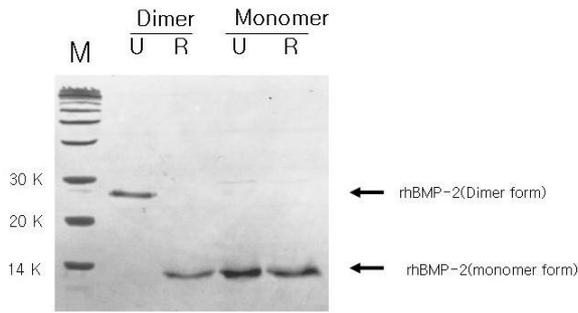


Figure 2. Identification of dimerized and purified rhBMP-2, commassie blue-stained 12% SDS-PAGE analysis. Lanes: M, protein marker; U, nonreduced rhBMP-2; R, reduced rhBMP-2. Dimer represents dimer fraction and Monomer represents monomer fraction.

umn으로 affinity chromatography를 실시하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보여지는 바와 같이 0.3 M NaCl 분획에서 대부분의 단량체와 소량의 이량체가 용출되었고 0.5 M NaCl 분획에서 이량체들이 용출되었다. 분리·정제된 rhBMP-2 단량체와 이량체를 SDS-PAGE로 분석하여 확인 하였다. 본 연구에서 생산된 단량체의 크기는 약 114 아미노산 잔기로 계산되며 단량체의 분자량은 약 14 kDa으로 나타났으며 이량체는 두 개의 단량체가 이황화 결합으로 연결되므로 비환원 조건에서 단량체와 같은 크기의 밴드로 나타났다. 이량체의 크기는 약 28 kDa으로 나타났다(Fig.2, Fig.3).

2. rhBMP-2의 생화학적 특성

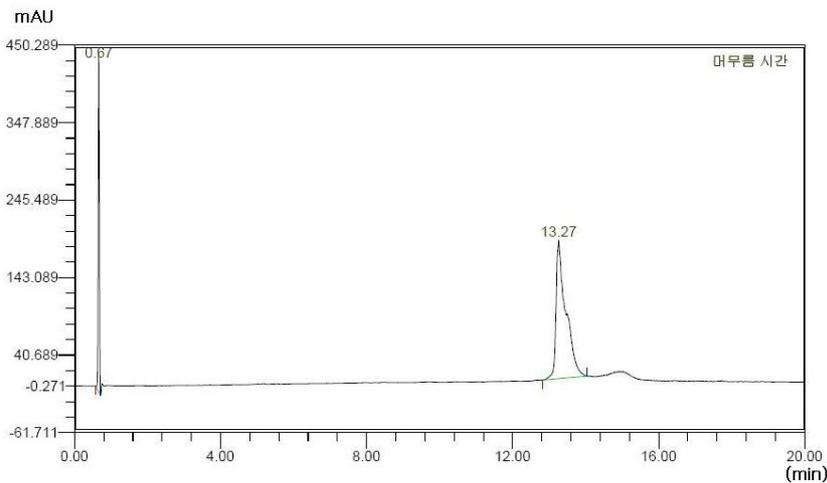


Figure 4. HPLC profile of purified rhBMP-2

순수 분리된 단백질의 정제도를 확인하기 위하여 HPLC와 western blotting, silver staining을 하였다. Fig.3의 Lane 5는 0.5M NaCl 분획을 비환원 조건에서 SDS-PAGE를 하여 silver staining을 한 것이다. 99% 이상의 정제도를 보여 준다. 정제된 rhBMP-2 이량체의 HPLC profile을 보면 머무름 시간(retention time)이 13.27분이며 33% acetonitril 분획에서 단백질이 용출되고 정제도는 99%이다(Fig. 4).

또한 면역학적 방법으로 rhBMP-2 이량체를 확인하였다. 그 결과 환원 조건과 비환원 조건에서 실시했을 때 이량체와 단량체, 둘 다에서 밴드가 나타났다. Fig. 5에서 R 라인에서 28 kDa의 크기를 가진 spot이 보이는데 이는 본래 단량체였던 단백질을 환원시키는 과정에서 미량이 다량체로 남아있었기 때문에 판단된다(Fig. 5).

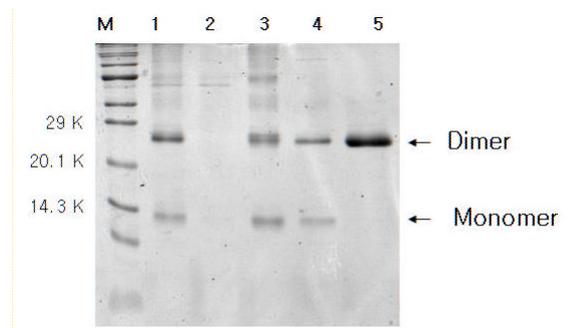


Figure 3. rhBMP-2 dimer purification in order to purified step by heparin affinity chromatography, silver-stained nonreduced 15% SDS-PAGE analysis. Lanes: M, protein marker; 1, dialysed renaturation mixture; 2, flow through fraction; 3, eluted fraction with 0.15M NaCl; 4, eluted fraction with 0.3M NaCl; 5, eluted fraction with 0.5M NaCl.

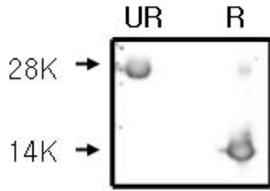


Figure 5. Western blotting of purified rhBMP-2
UR; nonreduced condition, R; reduced condition

3. rhBMP-2의 생물학적 활성(*in vitro* study)

본 연구에서 생산한 rhBMP-2의 생물학적 활성을 확인하기 위하여 C2C12 세포를 이용하였다. rhBMP-2가 배양액에 일정 농도 이상 함유되면 C2C12 세포는 분화경로의 변화로 세포의 형태가 변화하게 된다. 또한 세포들에게서 ALP의 활성이 나타나며 rhBMP-2의 농도가 증가하면 ALP의 활성도 증가된다고 알려져 있다.

rhBMP-2 단량체와 이량체의 생물학적 활성 차이를 보기 위하여 각각을 분리정제하여 myogenic differentiation 조건에서 C2C12 cell에 처리한 결과, 이량체를 처리한 세포군에서만 5일이 지나도 myotube가 형성되지 않았다(Fig. 6). 이로서 rhBMP-2는 이량체로 존재하여야 표적세포의 세포막에 있는 막 수용체와 결합하여 작용을 나타냄을 알 수 있다. 그래서 ALP 활성의 변화는 정제된 rhBMP-2 이량체만으로 측정하였다. rhBMP-2를 농도별로 달리 처리하였을 때 ALP 활성이 Fig. 5에 나타난 바와 같이 처리농도가 증가함에 따라 증가하였다. ALP 활성은 200 ng/ml에서 약하게 증가하다

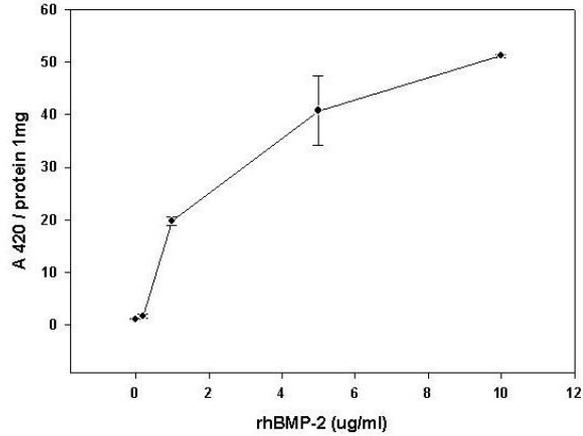


Figure 7. Dose response effects of a purified rhBMP-2 dimer on ALP activity in C2C12 cells. The cells were cultured for 3 days with different concentrations of rhBMP-2 dimer. The ALP activity of the cell lysate was measured using β -nitrophenylphosphate as a substrate.

가 500 ng/ml 이상의 농도에서 강하게 증가하였다(Fig. 7). 이는 Katagiri 등²⁷⁾의 결과와 유사하다.

고찰

골형성 유도 인자에 대한 많은 연구들이 일찍부터 있어 왔다. Urist 등¹⁾은 포유류의 피질골로부터 골형성 유도 인자를 추출하여 그 인자를 골 형성 단백질(Bone Morphogenetic protein: BMP)이라고 명명하였다. 초기에 골 형성 단백질은 비탈회골, 또는 탈회골에서 분리 정제되어 연구에 사용

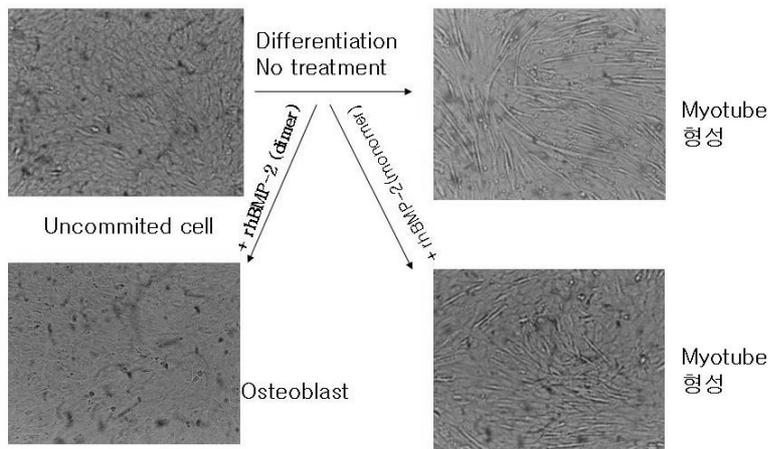


Figure 6. Photographs of Morphological change of C2C12 cells. We treated purified rhBMP-2 dimer fraction and monomer fraction to C2C12 cells. (Original magnification 1X40)

되었다. Anderson 등^{28,29)}은 Saos-2와 U2OS 두 인간유래 세포주에서 여러 가지 BMP와 transforming growth factor- β (TGF- β)의 발현을 비교하고 분리추출한 BMP가 동물 또는 세포배양 실험에서 각각 상이하지만 골유도능이 있음을 보고하였다. 그러나 자연골(native bone)에서 추출되는 BMP 함량은 1~2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (BMP/피질골) 수준이다. 현재 약 20여 종류의 BMP가 알려져 있는데 BMP-1을 제외한 모든 BMP는 TGF- β 의 한 부류로 간주되고 있다^{21,26)}. BMP-2는 4, 5, 6, 7형과 함께 경골과 연골의 신생을 유도하며 골이식을 위한 여러 가지 late-stage tissue engineering products의 강력한 골유도성분으로서 알려져 있다. 그 중 rhBMP-2와 rhBMP-7은 골 유도능이 가장 우수하다고 보고되어 주로 이들이 생산되어 여러 다양한 연구에 재료로 사용되어지고 있다¹²⁾.

BMP-2는 7개의 cystein domain을 가지고 있는 구조로 이는 TGF- β 의 1차구조와 유사하며 세포내에서 396개의 아미노산 잔기로 이루어진 전구체로 만들어져 이량화(dimerization)된 후 proteolytically cleaved 되어 mature form으로 만들어진 후 세포외로 분비되어 작용하는 paracrine type의 성장인자로서 osteoprogenitor 세포들을 유인하여 증식시키고 골 조직으로의 분화를 촉진한다¹³⁾. Human BMP-2는 1980년대 후반에 처음 클로닝 되었는데 동물세포인 CHO cell이나 E. coli를 이용하여 생산하여 사용되어지고 있다. 동물세포를 사용한 경우 세포외로 분비된 mature form을 분리 정제하여 사용하고 E. coli를 이용한 경우는 mature form을 만들 수 있게 클로닝하여 세포내에 inclusion body를 생성시켜 분리한 후 용해시켜 분리하여 *in vitro* renaturation을 시켜 사용하는 방법들이 보고되어져 있다^{23,30)}. 이런 유전 공학적 방법으로 만들어진 rhBMP-2는 대부분이 동질이량체(homodimer)형이다. Homodimeric bone morphogenetic protein-2(BMP-2)는 배발생기 뿐만 아니라 뼈조직 재생과 복구에 중요역할을 하는 TGF- β superfamily에 속하고 전임상 및 임상연구들에서 homodimeric BMP-2는 골 결손부, 비유합 골절, 골다공증, 척추 유합, 치근단 수술³¹⁾같은 다양한 치료과정에 유효함을 보여주었다.

본 실험에서는 활성이 있는 rhBMP-2를 생산하기 위해 BMP-2의 발현이 많이 되는 U2OS cell을 사용하여 BMP-2의 mature form 부분을 클로닝하여 E. coli를 형질전환시켜 생산하였다. E. coli에서 생산된 BMP-2는 당화(glycosylation)

가 되어있지 않는 점이 동물세포(CHO cell)를 이용하여 생산한 경우와 다르나 Vallejo 등²³⁾의 보고에 의하면 동물세포에서 생산한 rhBMP-2와 E. coli에서 생산한 rhBMP-2 homodimer의 생물학적 활성은 차이가 없다. 본 연구에서 동물세포에서 생산한 rhBMP-2와 직접 비교하지는 않았지만 그 활성은 충분히 나타났다.

Katagiri 등²⁷⁾은 마우스의 primary muscle cell과 C2C12 cell을 비교하여 실험했는데 myogenic phenotype을 억제하고 osteoblast phenotype을 유도할 수 있는 BMP-2의 유효량은 일치함을 보고하였다. 또한 C2C12 세포는 배양액에 포함된 FBS 농도가 15%에서 5%로 감소되면 multinucleated Myotube로 분화하였다. 이런 Myogenic differentiation 조건에서 BMP-2 이량체를 처리하면 Troponin T(Tn T)와 myosin heavy chain(MHC)의 발현이 저해되고 ALP와 osteocalcin의 발현이 증가되면서 myotube로의 발현이 저해되고 조골세포로 분화함을 보고하였다²⁷⁾. 본 연구에서 생산한 rhBMP-2 이량체와 단량체를 분리하여 C2C12 cell에 처리했을 때, 그 결과, rhBMP-2 이량체를 처리한 세포군에서는 myotube의 형성이 저해되어 나타나지 않음을 광학 현미경에서 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 한편, rhBMP-2에 의한 골유도 과정에서의 주 눈점은 국소적 rhBMP-2 농도와 골형성과의 상관관계이다. rhBMP-2는 myogenesis의 저해제²⁷⁾이고 adipogenesis의 저해제³²⁾이면서 여러 가지 세포계에서 osteogenesis의 강력한 촉진제이다. 전달체(carrier)로부터의 rhBMP-2의 initial burst는 rhBMP-2에 반응하는 세포들을 전달체가 있는 곳, 즉 고농도인 부분으로 끌어 모으는 역할을 하고 조금씩 방출되는 단백질은 모아진 세포들이 분화발달하도록 유도할 것이다³¹⁾. 이처럼 여러 가지 생분해성 소재들에 의한 rhBMP-2의 골조직 유도능의 증가는 소재 자체의 성질로 인한 rhBMP-2의 방출 양식에 의해서도 많은 영향을 받게 된다. rhBMP-2를 수용할 수 있는 전달체로서 gelatin/beta-TCP complex, poly-D, L-lactic acid-para-dioxanone-polyethylene glycol polymer³¹⁾, hydroxyapatite implant³³⁾, 콜라겐, Biphasic calcium phosphate³⁴⁻³⁶⁾ 다양한 생분해성 소재가 연구되어지고 있다. 그러므로 본 연구에서 생산한 rhBMP-2 이량체의 전달체 개발에 대한 후속 연구 또한 많이 이루어져야 하리라 생각된다.

결론적으로, 본 실험에서는 발효조를 이용하여 rhBMP-2 단백질을 안정적으로 발현하는 E. coli를 고밀도로 배양하

는 방법을 확립했으며 non-active aggregate로 만들어진 단백질을 세포외(*in vitro*)에서 용해시켜 이량화 반응(dimerization)을 조건을 맞추어 안정적으로 이루어지게 하여 충분한 활성을 가진 상태로 분리 정제하였다. 이를 이용하여 동물 실험을 통한 rhBMP-2의 *in vivo*에서의 활성을 검정하는 등, 추후의 다양한 실험을 통하여 본 방법으로 생산한 rhBMP-2 단백질의 효과를 검정하는 실험들이 필요할 것으로 사료된다. 또한 치과나 정형외과 영역에서 임상에 적용될 수 있도록, 보다 충분한 생물학적 안전성 검토가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Urist MR. Bone Formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-899.
2. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988;242:1528-1534.
3. Cunningham NS, Paralkar V, Reddi AH. Osteogennin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor β 1 mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11740-11744.
4. Paralkar VM, Weeks BS, Yu YM, Kleinman HK, Reddi AH. Recombinant human bone morphogenetic protein 2B stimulates PC12 cell differentiation and binding to type IV collagen. *J Cell Biol* 1992;119:1721-1728.
5. Hogan BLM. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996;10:1580-1594.
6. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 1999;14:1805-1815.
7. Wikesjö UM, Guglielmoni P, Promsudthi A, et al. Periodontal repair in dogs: effect of rhBMP-2 concentration on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. *J Clin Periodontol* 1999;26:392-400.
8. Kim CS, Choi SH, Choi BK, et al. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 on the osteoblastic differentiation of mouse calvarial cells affected by *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol* 2002;73:1126-1132.
9. Kingsley DM, Bland AE, Grubber JM, et al. The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF beta superfamily. *Cell* 1992;71:399-410.
10. Solloway MJ, Dudley AT, Bikoff EK, et al. Mice lacking Bmp6 function. *Dev Genet* 1998;22:321-339.
11. Jena N, Martin-Seisdedos C, McCue P, Croce CM. BMP7 null mutation in mice: developmental defects in skeleton, kidney, and eye. *Exp Cell Res* 1997;230:28-37.
12. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2220-2224.
13. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004;22:233-241.
14. Cook SD, Salkeld SL, Rueger DC. Evaluation of recombinant human osteogenic protein-1(rhOP-1) placed with dental implant in fresh extraction sites. *J Oral Implantol* 1995;21:281-289.
15. Cook SD, Wolfe MW, Salkeld SL, Rueger DC. Effects of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77:734-750.
16. Jones AL, Bucholz RW, Bosse MJ, et al. Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical defects: a randomized, controlled trial. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88:1431-1441.
17. Govender S, Csimma C, Genant HK, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84:2123-2134.
18. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2220-2224.
19. Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, et al. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem* 1992;267:20352-20362.
20. Maruoka Y, Oida S, Iimura T, et al. Production of functional human bone morphogenetic protein -2 using a baculovirus/Sf-9 insect cell system. *Biochem Mol Biol Int*

- 1995;35:957-963.
21. Hazama M, Aono A, Ueno N, Fujisawa Y. Efficient expression of a heterodimer of bone morphogenetic protein subunits using a baculovirus expression system. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;209:859-866.
 22. Kubler NR, Reuther JF, Faller G, et al. Inductive properties of recombinant human BMP-2 produced in a bacterial expression system. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998;27:305-399.
 23. Vallejo LF, Brokelmann M, Marten S, et al. Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *J Biotech* 2002;94:185-194.
 24. Ruppert R, Hoffmann E, Sebald W. Human bone morphogenetic protein-2 contains a heparin-binding sites which modifies its biological activity. *Eur J Biochem* 1996;237:295-302.
 25. Tabandeh F, Shojaosadati SA, Zomorodipour A, et al. Heat-induced production of human growth hormone by high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 2004;26:245-250.
 26. Korz DJ, Rinas U, Hellmuth K, Sanders EA, Deckwer W-D. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J of Biotechnology* 1995;39:59-65.
 27. Katagiri T, Yamaguchi A, Ikeda T, et al. The non-osteogenic mouse pluripotent cell line C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic proteins-2. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;172:295-299.
 28. Anderson HC, Hsu HH, Raval P, et al. The mechanism of bone induction and bone healing by human osteosarcoma cell extracts. *Clin Orthop Relat Res* 1995;313:129-134.
 29. Hoffmann A, Weich HA, Gross G, Hillmann G. Perspectives in the biological function, the technical and therapeutic application of bone morphogenetic proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001;57:294-308.
 30. Long S, Truong L, Bennett K, et al. Expression, purification, and renaturation of bone morphogenetic protein-2 from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 2006;46:374-378.
 31. Kato M, Toyoda H, Namikawa T, et al. Optimized use of a biodegradable polymer as a carrier material for the local delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2(rhBMP-2). *Biomaterials* 2006;27:2035-2041.
 32. Gimble JM, Morgan C, Kelly K, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit adipocyte differentiation by bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 1995;58:393-402.
 33. Koempel JA, Patt BS, O'Grady K, Wozney J, Toriumi DM. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the integration of porous hydroxyapatite implants with bone. *J Biomed Mater Res* 1988;41:359-363.
 34. Hong S-J, Kim C-S, Han D-K et al. The effects of a fibrin-fibronectin/ β -tricalcium phosphate/recombinant human bone morphogenetic protein-2 system on bone formation in rat calvarial defects. *Biomaterials* 2006;27:3810-3816.
 35. Kim C-S, Kim J-I, Kim J et al. Ectopic bone formation associated with recombinant human bone morphogenetic proteins-2 using absorbable collagen sponge and beta tricalcium phosphate as carriers. *Biomaterials* 2005;26:2501-2507.
 36. Song D-S, Kim T-G, Jung U-W, et al. Effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 loaded acellular dermal matrix on bone formation. *J Korean Acad Periodontol* 2007;37:511-522.