

TAT-Protein Transduction Domain을  
이용한 BMP-7의 전달과 생물학적 효과

연세대학교 대학원

치 의 학 과

임 소 연

TAT-Protein Transduction Domain을  
이용한 BMP-7의 전달과 생물학적 효과

지도 교수 정 문 규

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2006년 6월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

임 소 연

# 임소연의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

치 의 학 과

2006년 6월 일

## 감사의 글

논문이 완성되기 까지 항상 격려하시고 이끌어주신 정문규 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 많은 관심과 조언을 주신 이근우 교수님, 조규성 교수님, 차인호 교수님께도 진심으로 감사드립니다. 특히 논문의 시작부터 끝까지 많은 지도와 조언을 주시고 세세한 관심과 정성을 보여주셨던 육종인 교수님께 존경과 감사의 마음을 전합니다.

아울러 본 연구에 언제나 수고를 아끼지 않았던 김남희 선생님, 정말 고맙습니다. 논문이 완성되기까지 늘 도움을 주시고 따뜻하게 대해주신 구강병리학 교실 김현실 선생님과 류주경, 차소영 선생님께 감사드리며 박사과정동안 늘 가르침을 주신 보철학 교실 교수님들께도 감사의 마음 전합니다.

논문에 전념할 수 있도록 배려해주시고 늘 힘이 되어주시는 21세기 치과병원 원장님들과 모든 직원 여러분께 감사드리며 항상 편안함과 위로가 되어주는 소중한 친구들에게 고마움을 전합니다.

마지막으로 항상 저를 배려하시고 학업과 일에 열중할 수 있도록 도와주시는 시부모님, 늘 든든하게 곁을 지켜주는 남편과 사랑하는 딸 유진에게 고마운 마음 전하며 늘 염려하시고 사랑을 주시는 부모님, 특히 힘든 투병을 잘 견뎌주신 사랑하는 엄마께 이 논문을 드립니다.

저자 씀

# 차례

국문 요약 .....	1
I. 서론 .....	3
II. 실험 재료 및 방법 .....	7
1. TAT-BMP-7의 발현 및 정제 .....	7
1) 발현 벡터의 제작 .....	7
2) TAT-BMP-7 단백질의 발현 및 정제 .....	7
2. 세포 내에서의 TAT-BMP-7의 특성 .....	8
1) 세포 배양 .....	9
2) TAT-BMP-7의 세포내 투과.....	9
3) Western Blot analysis .....	9
4) 면역 침전법 분석 .....	9
5) 면역 형광 염색 .....	10
3. TAT-BMP-7 processing 분석 : TAT-BMP-7의 in vitro furin cleavage 분석.....	10
4. TAT-BMP-7의 활성화도 .....	11
1) ALPase 활성화도 측정.....	11
2) 동물 실험.....	11
3) 조직학적 관찰.....	11
III. 결과.....	12
1. TAT-BMP-7 제작 및 발현.....	12
2. TAT-BMP-7 단백질의 특성.....	12
1) 시간 및 농도에 따른 transduction.....	12

2) 온도에 따른 transduction.....	14
3) 세포 종류에 따른 transduction.....	15
4) F-actin과의 결합.....	16
3. TAT-BMP-7의 processing.....	17
4. TAT-BMP7의 활성화.....	19
1) ALPase 활성화.....	19
2) 동물 실험 결과.....	19
IV. 총괄 및 고찰.....	21
V. 결론.....	30
참고 문헌.....	32
영문 요약.....	43

## 국문요약

### TAT-Protein Transduction Domain을 이용한 BMP-7의 전달과 생물학적 효과

구강 및 악안면 영역에서 골 형성 유도는 중요한 임상적 의미를 갖는다. 이를 위해 지금까지 다양한 매개체와 인자 개발이 이루어져 왔다. 특히 BMP와 같은 생물학적 활성 단백질은 골 형성 유도에 가장 우수한 효과를 보이지만, 이의 경제성과 수용성(soluble in nature)으로 인한 이차적인 문제를 야기하였다. 따라서 본 연구는 세포내로 자발적 투과가 가능한 단백질 전달 영역(Protein transduction domain: PTD)을 가진 HIV-1 TAT 펩타이드를 이용하여 재조합 BMP-7을 박테리아에서 생합성 및 정제하였고, 이들의 세포내 투과성과 세포내 processing 과정, 활성 BMP-7의 효과를 in vivo에서 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 박테리아에서 발현하여 분리 정제된 TAT-BMP-7 융합 재조합 단백질은 농도, 시간 및 온도 의존적인 방식으로 세포내로 전달되었다. 이러한 전달은 다양한 세포에서 일관되게 관찰되어 이는 재조합 단백질이 수용체를 통하지 않고 세포막을 투과한다는 것을 제시하였다. 또한 TAT-BMP-7의 이러한 세포막 투과 과정은 TAT 아미노산 배열에 의존적이었다.
2. 세포내부로 전달된 TAT-BMP-7는 세포질에 주로 존재하였고, 특히 세포 내부의 스트레스 섬유인 F-actin과 특이적으로 결합하고, 이러한 결합이 TAT 아미노산 배열에 의한 것임을 알 수 있었다.
3. TAT-BMP-7는 proprotein convertase인 furin에 의해 절단됨을 확인하였고, 또한 세포내에서  $\alpha$ 1-PDX에 의한 furin 억제는 세포내에 전달된 PTD-BMP

-7의 활성화 반감기를 증가시키고, 이는 furin에 의한 절단과정이 활성화 BMP-7의 분비에 결정적인 역할을 한다는 것을 의미하였다.

4. 세포내로 전달된 TAT-BMP-7은 간엽기원 세포의 ALPase 활성을 증가시켰고, 나아가 실험동물의 대둔근에서 이소성 석회화 유도의 가능성을 확인하였다.

본 연구에서 이상과 같은 결과로 TAT PTD 재조합 BMP-7 단백질을 박테리아에서 대량 생산하여 세포내로 성공적으로 전달하였고, 전달된 TAT-BMP-7은 F-actin과 결합하여 재구조화 (refolding) 과정과 furin에 의한 절단 과정을 거쳐 활성화 BMP-7을 분비하였다. 향후 TAT-BMP-7의 전달 및 활성화 단백질 분비 기전에 대한 연구와 함께 골 결손 모델이나 개체 발생 모델을 이용한 다양한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

---

핵심되는 말 : 골 형성 단백질(BMP), 단백질 전달 영역(Protein transduction domain; PTD), TAT-BMP-7, 세포내 processing 과정, furin



# TAT-Protein Transduction Domain을 이용한 BMP-7의 전달과 생물학적 효과

연세대학교 대학원 치의학과

(지도 교수 정 문 규)

임 소 연

## I. 서론

구강 악안면 영역에서의 골 재건은 외상이나 종양수술과 같은 광범위한 골 결손의 치료와 치주질환에 의한 치주조직 결손 치료, 임플란트 식립을 위한 치조골 재건 등 그 임상적 중요성이 크다. 지금까지 골 재건을 위해서 자가골 및 수많은 생체 재료를 이용한 골 이식술이 이용되었고, 최근에는 분자 생물학의 발전으로 조직 치유에 관여하는 성장인자와 매개물질이 발견되어 이를 조직 재생에 응용할 수 있게 되었다 (Clark and Henson 1988). BMPs (Bone morphogenetic proteins)는 transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily에 속하는 복합기능의 성장인자로서 골과 연골의 형성과 재생을 유도하는 강력한 조절인자이다. BMP는 피질골의 탈회 과정에서 이소성 연골 형성과 골 형성을 일으키는 인자로 발견되었고, 탈회된 골 기질에 존재하며 미분화 간엽세포를 골아세포로 분화시키고 증식을 유도한다 (Urist 1965). 그러나 BMP 연구 초기의 문제점은 포유류 동물의 뼈에서 충분한 양의 BMP를 얻기 어렵다는 점이다. 실제로 충분한 순도의 단백질을 얻기 위해서는 300,000배 이상의 정제가 필요했고, 이 작업에서 BMP는 골 중량에 비해 매우 적은 양 (약 1,000kg당 1 $\mu$ g의 BMP)이 분리되었다 (Gerhart et al 1993).

현재까지 BMPs는 20종류 이상의 유전자가 알려져 있으며, 그 중 BMP-2, 4, 5, 6, 7은 다양한 동물에서 골유도성 인자임이 증명되었다 (Sampath et al 1992, Giltman et al 1994). 또한 적절한 운반체와 결합시킨 재조합 BMP는 치주, 임플란트, 구강악안면외과적 결손, 정형외과적 결손 등 임상적용을 모방한 많은 임상 전 단계의 동물연구에서 골 결손부를 치유함으로써 골 형성 능력이 입증되었다 (Sigurdsson et al 1996, 1997, Hanisch et al 1997, Boyne et al 1996, Swiontkowski et al 1997). 이 중 BMP-7은 Osteogenic protein-1(OP-1)이라고도 불리는 골 형성 단백질로 동물이 발달하는 동안 간엽상피 유도, 골 유도 같은 다양한 기능을 가진다 (Stephen et al 1996, Vukicevic et al 1994). BMP-7은 1990년에 cDNA가 분리되었고 (Ozkaynak et al 1990), 골아세포의 증식과 분화를 자극하여 골을 형성하며 (Sampath et al 1992) 재조합된 BMP-7은 이미 여러 임상 전 모델에서 골 형성 효과가 있음이 밝혀져서 (Cook et al 1994, Cook et al 1995, Terheyden et al 1999, Terheyden et al 2001, Friedlaender et al 2001) 최근 여러 나라에서 재조합 BMP-7의 임상적 적용이 허용되었다. 또한 각각의 BMP군은 골유도성의 기능 이외에도 여러 장기에 존재하여 특정 세포 분화에도 작용하는데 (Solursh et al 1996, Asahina et al 1996, Vukicevic et al 1994, Vukicevic et al 1996, Jena et al 1997), 특히 BMP-7은 신장에 유일하게 발현하며, 최근에는 상피세포를 간엽세포로 전환시키는데 작용하는 TGF- $\beta$ 를 억제하는 역할이 밝혀져 손상된 신장에서 신장이 섬유화되는 것을 억제하는 약리작용이 있음이 보고되기도 하였다 (Zeisberg et al 2003, Zeisberg et al 2004).

BMPs는 생체 세포내에서 genomic DNA에서 전사되어 mRNA를 형성하고, mRNA는 ribosome에서 전구체 (precursor)를 형성한다. 전구체는 골지복합체등으로 이동하여 furin에 의해 절단-활성화 되어 세포 외부로 분비되고 (Israel et al 1992), 분비된 BMP는 세포의 고유 수용체와 결합하고 이를 통한 Smad 신호 전달체계를 통해 해당 세포가 골 형성 세포로 분화되는 약리학적 기전을 가진다 (Heldin et al 1997, Massague et al 1996.) 현재까지 가장 많이 사용되고 있는 재

조합 BMP-2는 CHO 세포의 형질 전환을 통해 세포 배지에 분비된 활성 BMP를 분리 정제한 것이다. 즉, CHO 세포에 사람의 BMP-2 유전자를 안정적으로 발현 시키고, 발현된 유전자에 의해 합성되어 세포 배지로 분비된 활성 BMP를 분리하는 것이다. 그러나 이 방법은 (1) 낮은 농도의 배지에서 BMP의 분리 농축을 위한 대규모의 분리 정제 시설과 장비가 필요하고, (2) 분리-정제된 단백질은 수용성이므로 생체 조직 내에서 혈액이나 조직 삼출물에 의해 쉽게 확산되어 다량의 BMP를 투여해야 한다는 결함을 가지고 있다.

최근 세포막 투과가 어려운 단백질을 효과적으로 세포 내부에 운반할 수 있는 매개물질에 대한 연구가 활발한데, 특히 단백질 전달 영역(Protein transduction Domain, PTD)이라고 불리는 특정 아미노산 배열은 자발적으로 세포막을 투과하여 세포내로 침투할 수 있다는 특성이 있다 (Frankel and Pabo 1988, Watson et al 1999, Lindgren et al 2000, Schwarze et al 2000). 따라서 다양한 생체 기능 목표 단백질들에 PTD를 재조합하여 단백질을 세포 내부로 전달하는 방식은 해당 단백질의 세포내 활성화에 대한 연구에 도움을 줄 뿐 아니라 임상적 적용 가능성을 높이고, 이를 치료제로 실용화 시키는 것을 목표로 하고 있다. 단백질 전달 영역(PTD)은 세포내로 전달이 어려웠던 단백질, DNA, 펩타이드 또는 거대 화학 물질 등을 효과적으로 세포내로 전달시키는 기능을 가진 물질 전달 펩타이드이다 (Lewin et al 2000, Torchilin et al 2002, Tseng et al 2002). 이러한 단백질 전달 영역을 구성하는 전형적인 펩타이드로는 human immunodeficiency virus (HIV)에서 유래한 transactivator of transcription (TAT), Antennapedia (Antp) homeodomain과 HSV VP22 전사 인자 등이 있다 (Derossi et al 1994, Elliott and O'Hare 1997, Joliot et al 1991, Park et al 2002, Wender et al 2000). 특히 TAT PTD는 단독으로 또는 다른 단백질에 붙어서도 세포막을 통과할 수 있으며 10~120kDa에 이르는 단백질을 수용체와 상관없이 세포내로 운반할 수 있음이 보고되었다 (Fawell et al 1994, Schwarze et al 2000 Nagahara et al 1998). 또한 박테리아 재조합 PTD를 이용할 경우 다량의 생체 단백질을 쉽게 얻을 수 있는 장점이 있어, PTD를 이용하여 다양한 단백질을 세포내로 전달하고 이를 이용하여 새

로운 치료법 개발이 시도되고 있다. 그러나 BMP와 같이 분비되는 단백질은 다양한 세포내 활성화 과정을 거치는 것으로 알려져 있지만 PTD를 이용한 분비 단백질의 전달법은 아직 연구된 바가 없다.

이번 연구에서는 세포내 자발적 침투가 가능한 HIV-1 TAT PTD를 이용하여 재조합 BMP-7을 박테리아에서 대량 생합성 및 정제하고 이들의 세포내 투과성과 활성 BMP-7의 분비를 유도하며, 나아가 이를 이용한 *in vivo* 골 형성 효과를 관찰하고자 하였다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. TAT-BMP-7의 발현 및 정제

#### 1) 발현 벡터 제작

인간 골 형성 단백질 BMP-7의 cDNA는 Saos-2 세포(ATCC)에서 RT-PCR을 이용하여 클로닝 하였다. 이때 사용한 primer 염기 배열은 아래와 같다.

forward : 5'-gagttttccatgtggacgctctt-3'

reverse : 5'-tttgctgtacatgacacccaca-3'

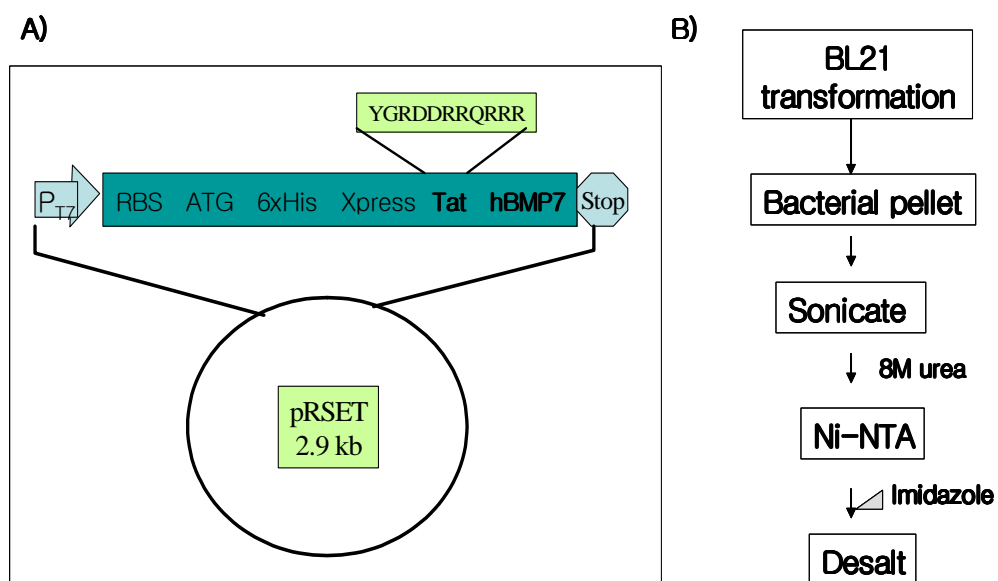
이 유전자는 유전자은행(gene bank, NCBI)에서 염기 서열을 확인하여 NM\_001719의 hBMP-7 염기서열과 동일함을 확인하였다. 클로닝된 BMP-7는 pRSET 박테리아 발현 벡터(bacterial expression vector, Introgen, Inc)에 Kpn I 위치에 다시 클로닝하고, 상기 BMP 유전자의 5' 부위에 HIV-1 TAT peptide (YGRKKRRQRRR) 염기서열을 삽입하였고, 그 앞에 X-press (Invitrogen, Inc) 태그(tag)를, 마지막으로 분리 정제를 위한 6개의 히스티딘 (Histidine)과 시작 염기 서열인 ATG를 삽입하여 골 형성 단백질(BMP)의 발현을 위한 재조합 발현 벡터 (expression vector)를 제작하였다. 이때, TAT이 삽입되지 않는 벡터 (BMP-TAT[-])는 음성 대조군으로 사용하였다. (Fig. 1-A)

#### 2) TAT-BMP-7 단백질의 발현 및 정제

제작된 재조합 벡터를 열 충격 (heat shock)을 이용하여 박테리아 형질 전환을 유도 하였다. 형질 전환 박테리아로는 대장균 BL21 (E-coli BL21; Invitron Inc)을 사용하였으며, 37°C에서 2~3시간 배양하고 IPTG (isopropylthio-galactoside) 1

mM을 첨가하고 8~18시간 동안 추가 배양하여 골 형성 단백질 발현을 유도하였다.

상기 배양이 완료되면 배양물에서 대장균을 원심분리로 분리한 다음, 펠렛 (cell pellet)에 8M의 요소 용액을 첨가하여 골 형성 단백질의 이차 및 삼차 구조를 제거한 다음, 니켈-티타늄 비드(Ni-Ti beads, Qiagen)을 이용하여 TAT-BMP-7을 비드에 결합시키고, 제조자의 지시에 따라 이를 세척한 후에 imidazole 용액을 사용하여 용출하여 정제된 TAT-BMP-7을 수득하였다 (Fig. 1-B). 형질 전환된 대장균 BL21을 배양 후 IPTG로 단백질 발현을 유도하기 이전과 이후의 대장균 전체 단백질을 전기영동으로 확인하였고, 정제한 TAT-BMP-7과 BMP-7/TAT(-)는 SDS-PAGE와 western blot analysis로 정제도를 조사하였다.



**Fig. 1.** A) TAT-BMP-7 recombinant protein expression vector  
 B) The purification procedure of TAT-BMP-7

## 2. TAT-BMP-7의 특성 분석

#### 1) 세포배양

C3H10T1/2 세포주와 osteosarcoma 유래 세포주인 OS는 10% FBS가 포함된 DMEM 배지 (Gibco BRL, Grand island, NY)에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 배양하였다.

#### 2) TAT-BMP-7의 세포내 투과

TAT-BMP-7의 세포 내에서의 특성을 파악하기 위하여, C3H10T1/2 세포를 12 well plates에 90% 들어차게 키운 뒤에 다양한 시간별, 농도별로 TAT-BMP-7을 처리하였다. 온도별 세포 내 유입을 관찰하기 위하여 C3H10T1/2 세포를 TAT-BMP-7을 처리하여 각각 37, 25, 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. 처리 후, 세포를 PBS로 세척하고, 세포 용해물을 수득하였다.

#### 3) Western blotting

각 세포 용해물(cell lysate)을 얻어 동량의 sample에 sample buffer (50mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 25% glycerol, 14.1mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)를 사용하여 SDS-acrylamide gel을 통해 전기 영동하여 분리한 후, nitrocellulose membrane (Pall Corp., NY)으로 이동시켰다. 이 membrane은 5% fat-free dry milk에서 2시간 동안 blocking한 후에 일차 항체를 넣어 3시간 반응시켰다. 일차 항체로는 anti-Xpress (monoclonal, Invitrogen), anti-actin (polyclonal, Sigma)을 이용하였다. 단백질 발현 정도는 enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit (Amersham)를 사용하여 x-ray 필름에 감광하여 관찰하였다.

#### 4) 면역 침전법 (Immunoprecipitation)

100mm 배양접시에 꼭 차게 자란 OS 세포에 1% triton x-100 buffer를 처리하여 세포 용출액을 준비하였다. 200ul의 세포 용출액에 각각 1ug의 TAT-BMP-7 과 BMP-7/(TAT-)을 넣어 4°C에서 2시간 동안 반응시킨 후에, 이를 Ni-NTA bead 에 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. bead는 1% triton x-100 buffer를 사용하여 4 번 세척한 후, sample buffer를 사용하여 단백질을 용해시킨 후, anti-F actin을 일차항체로 사용하여 western blotting과 같은 방법으로 확인하였다.

#### 5) 면역형광염색과 공초점 현미경 관찰

OS세포를  $2 \times 10^4$  cells/chamber 농도로 chambered slide glass에 넣고 시간별, 온도별로 TAT-BMP-7 및 BMP-7/(TAT-)처리하였다. 5% acetic acid in ethanol로 약 10분간 고정한 후 2mg/ml bovine serum album을 30분간 반응시켰다. 일차 항체로 anti-Xpress, phalloidin-alexa-594 (Invitrogen)를 사용하여, 투과된 TAT-BMP-7과 F-actin을 염색하였고, 핵은 far red를 이용하여 1시간 적용시켰다. 세척 후 Alexa Fluor 488 dye (Molecular Probes Inc., Eugene, OR)가 부착된 이차 항체를 적용 후 ice-cold methanol에 10분간 고정하였다. 염색된 세포는 공초점 현미경 (confocal microscope)으로 관찰하였다.

### 3. TAT-BMP-7의 Processing: TAT-BMP-7의 in vitro furin cleavage 분석

20ul의 완충용액 (200mM HEPES, pH 7.2)에 1ug의 TAT-BMP-7와 1unit의 furin (Sigma)을 넣어 37°C에서 2시간동안 반응 시킨 후, 이를 전기영동하고 anti-Xpress로 western blot하여 furin에 의해 잘린 밴드를 확인하였다. 또한 alpha-1-PDX를 이용한 furin cleavage의 억제를 확인하기 위해, 293 세포에 plasmid pcDNA3과 alpha-1-PDX 발현 벡터를 lipofectamin reagent (invitrogen)을 이용하여 통상적인 방법으로 transfection하였다. 2일 후, 새로운 배지에 TAT-BMP-7을 넣어 2시간동안 배양한 후에, PBS로 세척하고, 각각 0, 4시간 후 trypsin을 처리하여 세포를 모았다. 이를 anti-Xpress 및 실험상의 transfection control로 anti-alpha1-PDX (Sigma)를 western blotting하였다.



#### 4. TAT-BMP-7의 활성화

##### 1) ALPase 활성화 측정

TAT-BMP-7에 따른 ALPase의 활성도를 측정하기 위하여 C3H10T1/2 세포를 12well plate에 90%되게 분주하여, 10nM의 TAT-BMP-7 및 BMP-7/(TAT-) 단백질을 1주간 처리한 후, PBS로 세척하고 0.1% triton x-100 200ul로 처리된 세포 용해물을 p-nitrophenyl phosphate (Sigma, Saint Louis, MO)와 반응시켜 분광측정기로 405nm에서 효소에 의해 생성된 p-nitrophenol의 흡광도를 측정하여 유출액 내의 ALPase 활성도를 측정하였다.

##### 2) 동물실험

생후 4주된 20±2g의 암컷 누드마우스(Balb/c Slc-nu, Japan SLC, Inc)의 대둔근에 3일 간격으로 같은 부위에 2주 동안 1ug의 TAT-BMP-7을 주사하였다. 마지막 주입 후 5일 후에 실험동물을 희생하고 주사한 주위 조직을 절제하여 포르말린 고정액에 보관하였다.

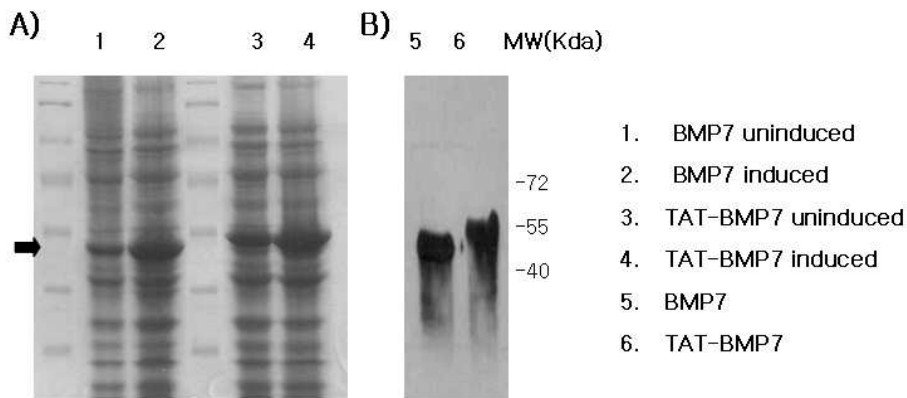
##### 3) 조직학적 관찰

채취한 조직은 10% formalin에 고정한 후 파라핀에 포매하여 4um 두께의 조직 표본을 만들어 통상적인 방법으로 H/E 염색, Masson's trichrome(TRC) 염색, von Kossa 염색을 시행하였다.

### III. 결과

#### 1. TAT-BMP-7 제작 및 발현

HIV-1 TAT peptide를 재조합한 pRSET-TAT-BMP-7 plasmid를 제조하였으며, 이의 음성 대조군으로 TAT 아미노산 배열이 없는 pRSET-BMP-7/(TAT-)을 제조하였다 (Fig. 1-A). SDS-PAGE 상에서 TAT-BMP-7은 TAT peptide에 의해 BMP-7/(TAT-)보다 2kDa 정도 크게 나타났으며 (Fig. 2-A), 정제된 단백질은 anti-Xpress로 발현된 크기로써 순도를 확인하였다 (Fig. 2-B).



**Fig. 2.** Identification of TAT-BMP-7 recombinant protein synthesis.

A) SDS-PAGE and Commaie blue stain of transformed bacteria sample

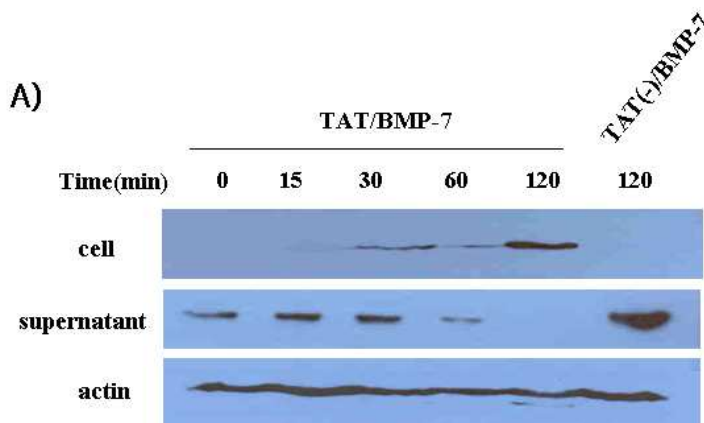
B) Western blot analysis

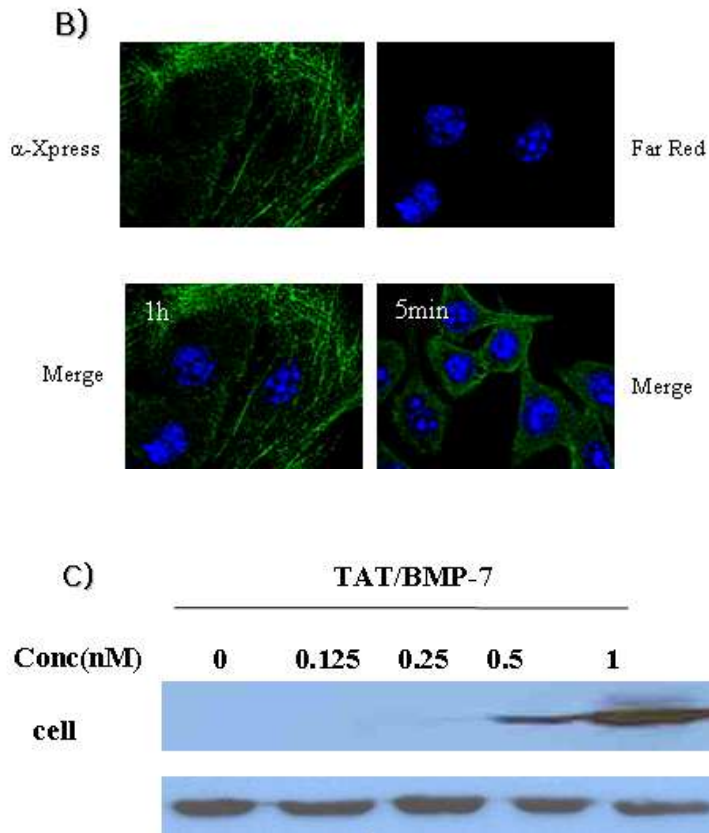
uninduced : before IPTG induction, induced : after IPTG induction in 8 hours over

#### 2. TAT-BMP-7 단백질의 특성

##### 1) 시간 및 농도에 따른 세포내로의 transduction

C3H10T1/2 세포에 4 nM의 TAT-BMP-7 단백질을 시간별로 0, 15, 30, 60, 120 분간 각각 처리한 후 이를 anti-Xpress로 관찰한 결과, 15분부터 세포 내로 단백질이 유입되는 것을 확인하였으며, 120분에 최대치를 나타냈다. 시간에 따라 세포 내로의 유입량이 증가하였고, 반면 배양 배지에서는 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 3-A). 또한 TAT가 없는 경우에는 120분 처리 후에도 세포 내부로의 transduction이 관찰되지 않아 TAT-BMP-7의 세포내 전달에 TAT 염기배열이 결정적인 것을 알 수 있었다. 이는 형광 염색과 공초점 현미경 관찰을 통해서도 확인할 수 있었고, 세포내로 투과된 대부분의 재조합 단백질이 세포질에 존재함을 알 수 있었다 (Fig. 3-B). 또한 농도별로 2시간 동안 TAT-BMP-7을 처리한 후 western blot analysis로 확인한 결과 농도에 의존적으로 세포내로 들어가는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3-C).





**Fig. 3.** Intracellular transduction of TAT-BMP-7 .

A) Recombinant TAT-BMP-7 was successfully transduced into the cells by time-dependent. negative control is BMP-7 without TAT.

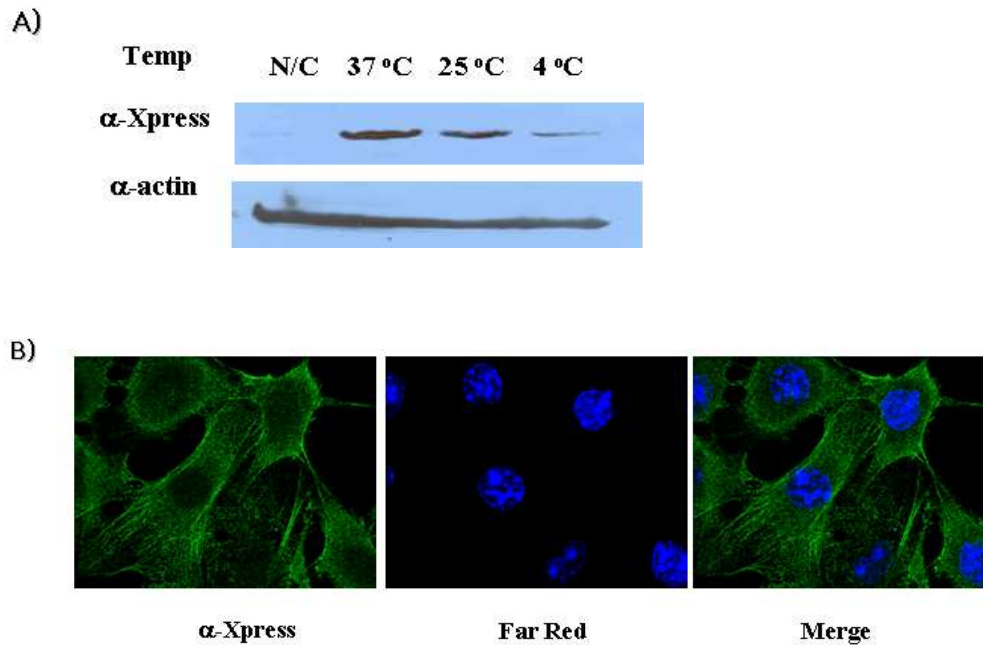
B) Immunofluorescent stain and identification with confocal microscope in 5 minute after treatment TAT-BMP-7.

C) Results of intracellular transduction of TAT-BMP-7 with various concentration.

2) 온도에 따른 TAT-BMP-7의 transduction

37, 25, 4°C 온도별로 4nM의 TAT-BMP-7를 처리하여 western blotting 및 공초점 현미경로 확인한 결과, 4°C에서도 TAT-BMP-7이 세포 내로 들어가는 것을

확인할 수 있었으며, 온도가 낮아짐에 따라, 세포 내로 들어가는 TAT-BMP-7의 양이 감소하는 것을 알 수 있었다.



**Fig. 4.** Intracellular transduction of TAT-BMP-7 in temperature-dependent manner.

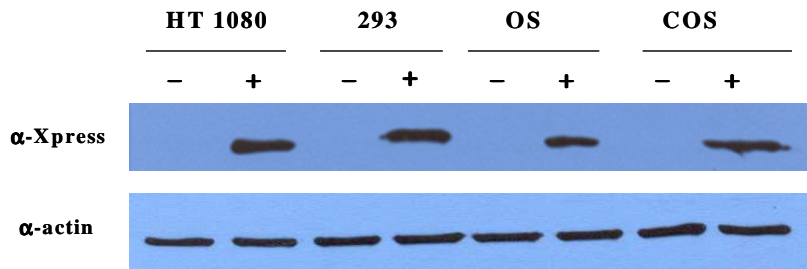
A) Western blotting after 1 hour treatment of 5 nM TAT-BMP-7 at 37 °C, 25 °C, and 4 °C.

B) Immunofluorescent stain and identification with confocal microscope of transduced TAT-BMP-7 at 4 °C

### 3) 세포 종류에 따른 transduction

섬유 육종 기원의 HT1080, embryonal 신장 기원의 293, 골육종 기원의 osteosarcoma 세포주 (OS), 원숭이 신장 기원의 Cos와 같은 다양한 세포에 5nM의 TAT-BMP-7 단백질을 처리한 후, western blot analysis로 확인하였다. 그 결

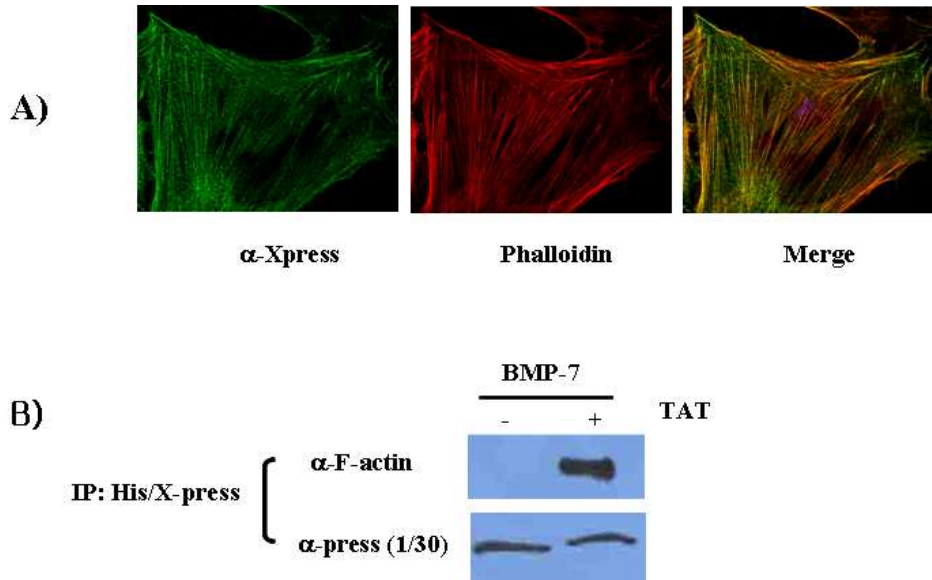
과, 실험에 사용된 모든 세포에 TAT-BMP-7이 세포 내로 들어가는 것을 관찰하였다(Fig. 5).



**Fig. 5.** Transduction of TAT-BMP-7 in various cell line ( HT 1080, 293, OS, Cos cell line)

#### 4) F-actin과의 결합

세포내로 transduction된 TAT-BMP-7을 공초점 현미경으로 관찰하였을 때 대부분의 재조합 단백질은 세포질에 존재하고, 특히 핵 하방의 세포 바닥 부착 부위에서 부채살과 유사한 특정 배열 형태를 가지는 것을 알 수 있었다. 이러한 TAT-BMP-7 배열은 세포의 스트레스 섬유로 알려진 F-actin과 유사한 구조를 보여, F-actin에 특이적으로 결합하는 phalloidin으로 염색하여 공초점 현미경으로 관찰하였다. 이때 transduction된 TAT-BMP-7의 배열이 F-actin과 정확하게 일치하는 것을 알 수 있었고 (Fig. 6-A), 이러한 결합은 면역 침전법에서도 확인할 수 있었다 (Fig. 6-B). 이때 TAT 배열이 없을 때에는 F-actin과 결합하지 않은 것으로 보아 TAT 아미노산 배열에 의해 F-actin과 결합함을 알 수 있었다.



**Fig. 6.** Binding to F-actin of transduced TAT-BMP-7.

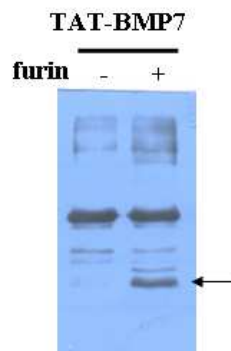
- A) Intracellular distribution of transduced TAT-BMP-7 was accorded with that of F-actin in confocal microscope.
- B) TAT-BMP-7 was bound to F-actin in vitro immunoprecipitation in TAT sequence-dependent manner

#### 4. TAT-BMP-7의 processing

- 1) proprotein convertase Furin에 의한 TAT-BMP-7의 cleavage

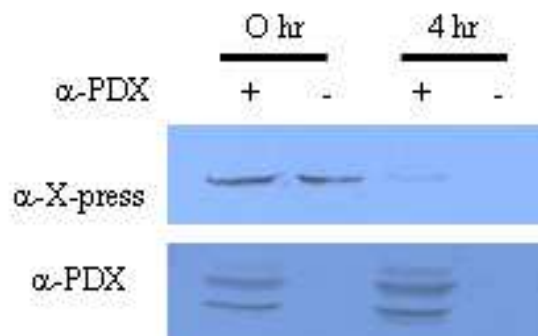
세포 내로 들어간 TAT-BMP-7이 furin에 의해서 성숙한 형태로 전환할 수 있는지를 확인하기 위해서 in vitro furin cleavage analysis를 시행하였다. TAT-BMP-7과 furin을 37°C에서 함께 배양한 결과, furin에 의해서 c-terminus한 부분이 잘려진 43 kDa정도의 크기가 확인되어, BMP-7이 furin에 의해 절단되어

성숙한 BMP-7으로 전환된다는 것을 알 수 있다 (Fig. 7). 이러한 furin cleavage 과정에 세포내로 transduction된 TAT-BMP-7의 processing과 활성화에 중요한 기전인지를 확인하기 위하여 293 세포주에 proprotein convertase 억제 단백질인  $\alpha$ 1-PDX의 과발현을 유도하고, 세포에 TAT-BMP-7을 transduction하여 단백질의 활성화 반감기를 western blot으로 확인하였다. 이를 통해 세포에  $\alpha$ 1-PDX 발현을 유도하면, 즉 furin의 기능을 억제하면 세포내의 TAT-BMP-7의 세포내 활성화 과정이 지연됨을 알 수 있어, furin에 의한 cleavage가 활성화 BMP-7을 분비하는데 중요한 기전임을 제시한다 (Fig. 8).



**Fig. 7.** In vitro cleavage of TAT-BMP-7.

100 ng TAT-BMP-7 was cleaved with furin and then western blotted. C-terminal cleavage site was observed (arrow).





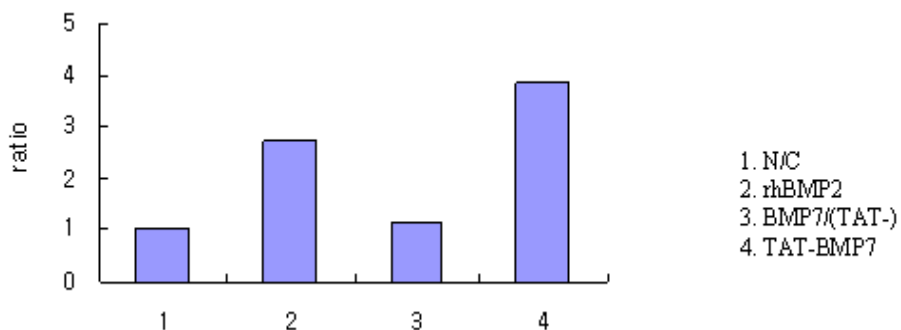
**Fig. 8.** Half life change of transduced TAT-BMP-7 in  $\alpha$ 1-PDX induced 293 cell line at 0 hour and after 4 hours.

When  $\alpha$ 1-PDX expression induced, the half life of TAT-BMP-7 was increased.

## 5. TAT-BMP-7의 생물학적 활성도

### 1) TAT-BMP-7에 의한 ALPase (Alkaline phosphatase) 활성

C3H10T1/2 세포에서 TAT-BMP-7이 골세포 분화 효과를 지니는지 확인하기 위하여, 10nM의 TAT-BMP-7과 BMP-7/TAT(-)을 1주일간 처리한 후에, ALPase activity를 확인하였다. 배지만 처리한 음성 대조군에 비해 TAT-BMP-7을 처리한 결과, activity가 약 3.84배 증가하였고, TAT가 없으면 활성을 나타내지 못함을 보여준다. 이러한 생물학적 활성은 TAT 아미노산 배열에 의존적임을 보여준다. 이때 시판중인 재조합 BMP-2를 양성대조군으로 사용하였다.

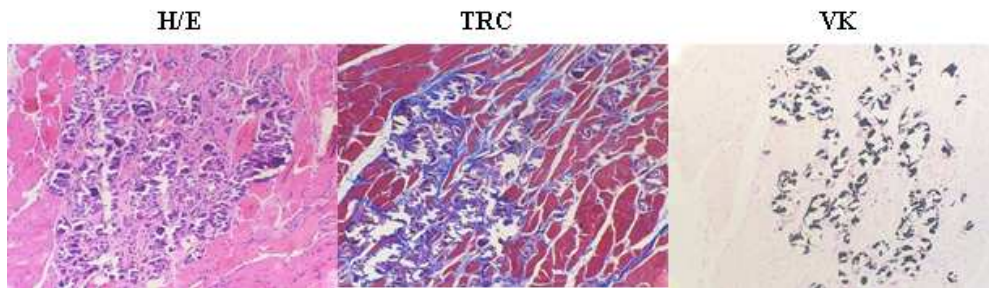


**Fig. 9.** The comparative value of ALPase activity by TAT-BMP-7.

1. N/C; negative control using media only.
2. rhBMP2; selling recombinant BMP2 at present.
3. BMP7(TAT-); recombinant BMP-7 without TAT sequence,
4. TAT-BMP-7; recombinant TAT-BMP-7.

### 2) 동물실험

TAT-BMP-7이 이소성 석회화를 유도하는 지 알아보기 위하여 누드마우스의 대둔근에 3일 간격으로 2주 동안 1ug의 TAT-BMP-7을 주입하였다. 마지막 주입한 날로부터 5일 후에 생검하여, H/E, Masson's trichrome (TRC), von Kossa 염색을 시행하고 광학 현미경을 관찰하였다. 이때 TAT-BMP-7을 투여한 4마리 중 3마리에서 근육세포내의 이소성 석회화 물질 형성을 관찰할 수 있어, TAT-BMP-7이 생체에서도 석회화 물질 형성 능력이 있음을 알 수 있었다.



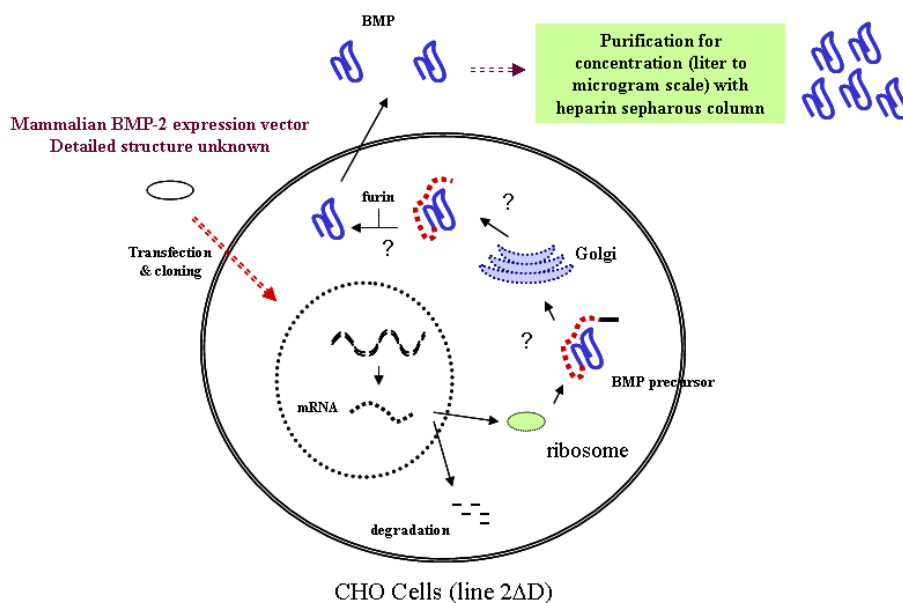
**Fig. 10.** Ectopic calcified materials formation in skeletal muscle of nude mice by TAT-BMP-7. It was expressed at H/E (hematoxylin/eosin), Masson's trichrome (TRC), von Kossa (VK)

#### IV. 총괄 및 고찰

BMP가 소의 탈회 골에서 분리 정제된 이후 (Urist 1965), 지난 40여년간 이 단백질의 생물-생화학적 특성에 대한 연구가 진행되어왔다. 특히 1980년 수많은 BMP 유전자 군이 클로닝 되면서 이러한 연구는 더욱 가속도를 가지게 되었다. BMP-1은 골 형성 능력과는 상관이 없는 matrix metalloproteinase 유전자로 분류되고, 그 외 지금까지 BMP-2에서 BMP-15 까지 클로닝 되어 있다 (Wang et al 1988). 그중 BMP-2, -4, -7 유전자는 골 형성 능력이 탁월하여 임상 적용 가능성에 대한 수많은 연구가 진행되었다 (Groeneveld and Burger 2000; Chen et al 2004). 나아가 BMP-2 유전자를 이용한 재조합 BMP의 생산은 대규모 연구를 위한 다량의 BMP를 공급할 수 있도록 해주었고 (Wang et al 1988, Wozney et al 1988), 이를 통해 BMP 유전자는 성체의 골 형성 유도 능력뿐만 아니라 발생 과정에서 세포군의 fate 결정, patterning 조절, 줄기세포의 분화 조절과 같은 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

대량의 재조합 단백질을 얻는 가장 손쉬운 방법은 박테리아 (E. Coli)의 형질전환을 이용하는 것이다. 그러나 이 경우 전술한 바와 같은 post-translational modification 과정을 재현하지 못하여 생물학적 활성도가 매우 낮아, 생물학적 실험이나 임상 적용 가능성이 거의 없다. 따라서 cloning된 유전자를 이용하여 생물학적 활성을 가진 BMP의 대량 생산을 시도하게 되었고, 이를 통해 충분한 생물학적 활성도를 가진 BMP가 대량 생산되었다 (Itoh et al 1999). 이러한 방식을 간략히 설명하면 다음과 같다. 동물 발현 벡터 (Eukaryotic expression vector)에 cloning된 사람 BMP 유전자를 CHO 세포 (Chinese hamster ovary)에 도입하여 형질 전환시킨 후 일련의 과정을 거치면 CHO 세포는 세포 외부로 BMP를 분비한다 (Wang et al 1990). 이렇게 분비된 BMP를 대규모의 세포 배지에 모으고 점차 더 큰 부피의 성장배지로 비율을 늘리며, 상업적인 생산은 1,000리터 이상의 큰 발효탱크에서 일어나는데 세포들은 걸러져서 제거되고 BMP는 일련의 column

chromatography 단계를 거쳐 정제된다 (Fig. 11). 결과적으로 pg/ml 이하의 농도를  $\mu\text{g/ml}$  이상으로 백만 배 이상 농축하는 과정에서 매우 복잡한 고가의 장비와 시설이 필요하여 많은 비용이 소요될 수밖에 없다.

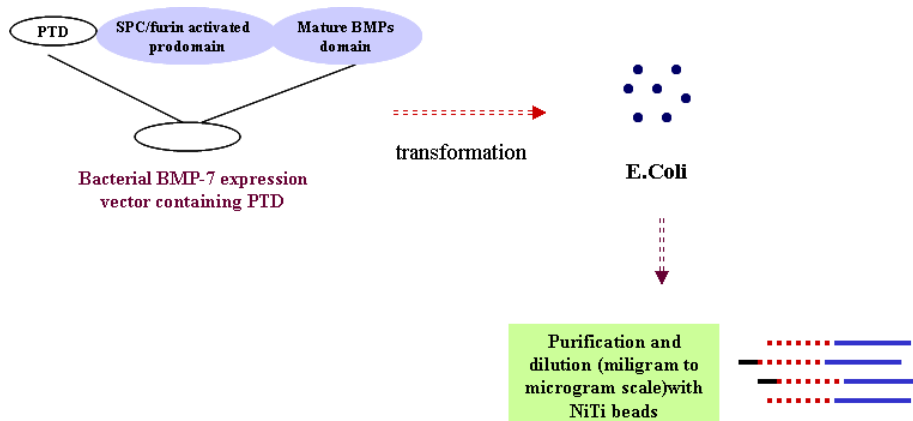


**Fig. 11.** Purification procedure of existing recombinant BMP.

BMP gene transfected and transformed at CHO cells, then this CHO cells secrete mature BMP. This secreted BMP is collected at large scale cell media and then purified concentrated using heparin sepharous colume.(Wang et al, 1990)

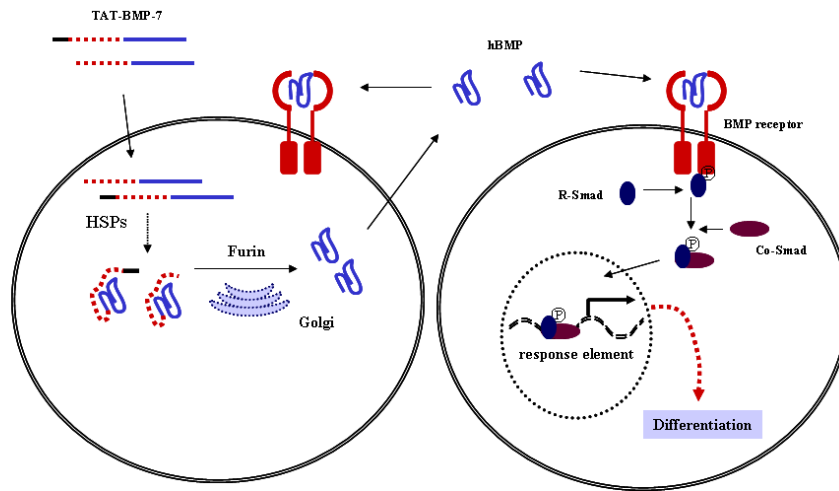
그러나 이렇게 고농도로 농축한 BMP라도 soluble한 형태의 단백질로서 혈액이나 체액으로 빠르게 확산 되어 국소적 효과가 떨어지는 문제점이 있으며, 따라서 이 단백질을 어떻게 운반하고 점진적으로 유리되도록 하느냐가 중요하였고 이제까지 이에 관한 여러 운반매체나 이식재(carrier)에 대한 연구가 주를 이루어 왔다 (Sigurdsson et al 1996, Oda et al 1997, Cook et al 2005, Terheyden et al 1997, Hong et al 2006). 또한 성장인자, 즉 단백질 자체를 적용할 때 발생하는 이러한 문제점과 운반매체(delivery vehicle)의 용해성 등의 문제를 해결하기 위해 최근에

는 바이러스 등을 이용하여 유전자를 전달하는 방법, 즉 DNA 전달체계 (DNA delivery system)가 그 대안으로 연구된 바 있다 (Winn et al 2000, Baum et al 2002). BMP-2 유전자를 결합시킨 adenoviral vector를 제조하여 토끼의 대퇴부 골 결손 부위에 직접 주사하는 방법으로 골 형성 효과를 연구한 바도 있고 (Baltzer et al 2000), 또 특정세포에 BMP를 형질 도입하여 유전자 전이된 세포 자체를 목표 부위에 이식하는 방법도 보고된 바 있는데, 이때 이식된 유전자 전이 세포가 BMP를 분비하여 골 형성 기능을 나타낸다는 것이다 (Krebsbach et al 2000, Jin et al 2003). 그러나 이러한 유전자 전달법은 정상 세포의 유전자 변형 가능성과 유전자 발현을 조절할 수 없다는 결정적인 문제로 인해 임상적용 가능성은 매우 낮은 상황이다. 따라서 BMP와 같이 유용한 분비 단백질을 충분한 임상적인 안전성과 유효성을 확보하면서 쉽고 대량으로 생산할 수 있는 방법으로 PTD를 이용한 단백질 전달법을 고안하게 되었다 (Fig. 12, 13).



**Fig. 12.** Procedure of TAT-BMPs recombinant protein synthesis using bacteria.

Bacterial BMP-7 recombinant vector containing protein transduction domain(PTD) and furin activated prodomain is transformed into bacteria, and then carried out purification and dilution.



**Fig. 13** Intracellular transduction and activation processing of TAT-BMP-7

Recombinant TAT-BMPs obtained from bacteria are transduced into the cells in a receptor-independent manner and then reorganized by HSPs. Reorganized TAT-BMPs are cleaved and activated by furin in golgi-complex, and mature TAT-BMPs are secreted to outside of the cells. Secreted TAT-BMPs bind BMP receptors in autocrine and paracrine manner, and then the cells differentiate into osteogenic cells through the Smad signal transmission system.

1988년 Frankel 등은 단백질 전달 영역 (Protein transduction Domain, PTD)이라고 불리는 작은 아미노산 구조가 단백질과 같은 거대분자를 세포내로 자발적으로 침투, 또는 전달 할 수 있음을 밝혔다 (Frankel and Pabo 1988). 지금까지 알려진 PTD로는 HIV에서 유래한 TAT (YGRKKRRQRRR)가 가장 흔히 사용되고 있으며 (Green and Loewensein 1988; Ford et al. 2001), 본 연구에서도 이를 사용하였다. 본 연구를 통해 PTD가 재조합 사람 BMP-7을 세포내로 전달하는데 성공적임을 보여주었다. 이러한 전달 과정은 세포의 종류와 상관없이 일관성이 있는 것으로 보아 수용체의 유무나 세포의 종류와는 상관이 없었다. 처음 PTD 융합 단백질이 개발되었을 때 이의 세포내 전달과정은 재조합 단백질의 고표면 에너지 (high  $\Delta G$ )로 인한 직접적인 투과로 추론 되었으나 (Fawell et al 1994, Frankel and

Pabo 1988), 최근에는 세포내 유입되는 기전이 온도에 따른 차이를 보이는, 에너지 의존적인 과정 (energy-dependent pathway)이라는 보고가 있고 (Leifert et al 2003), 본 연구에서도 재조합 단백질이 온도가 높을수록 세포 내부로 잘 전달되는 것으로 보아 이 과정이 에너지 의존적인 과정이라는 점을 뒷받침 하고 있다. 그러나 이와는 대조적으로 낮은 온도에서나 세포내 ATP를 제거한 상황에서도 PTD 융합 단백질의 세포내 유입이 감소하지 않는다는 보고도 있으며 (Thoren et al 2003), 본 연구에서도 4 °C에 충분한 양의 단백질이 전달되는 것으로 보아 PTD에 의한 단백질의 세포내 전달 기전에는 아직도 논란의 여지가 있다. 낮은 온도에서 세포내로 유입되는 정도의 차이는 PTD 재조합 단백질의 크기에 따라 다르며 (Silhol et al 2002) 나아가 full length protein인 경우 TAT과 같은 PTD와 융합시켜도 세포내 유입이 불가능하다는 연구 결과도 있다 (Leifert et al 2002). 이러한 상반된 연구 결과는 분리 정제된 단백질의 크기와 각 단백질의 화학적 특성, 특히 분리 정제 과정에서 고표면 에너지를 얻기 위한 다양한 처리 방법의 차이에서 기인할 것이다. PTD 재조합 단백질을 세포내에 전달할 때 단백질은 그 2차, 3차 구조가 모두 해체된 denature 상태에서 보다 효과적으로 세포 내부로 transduction 될 수 있다 (Nagahara et al 1998, Kwon et al 2000). 본 연구에서는 재조합 단백질의 denature를 위해 8M urea를 사용하였고, 정제된 단백질에 농도 충격 (concentration shock)을 가하여 세포 투과에 충분한 표면 에너지를 얻을 수 있었다. 그러나 연구자마다 PTD 융합 단백질을 제조하는데 다양한 방법의 농도 충격을 사용하므로 본 연구와 같은 분비 단백질에 있어 단백질의 세포내 전달과 효율적인 분비 유도를 위해 가장 적절한 방법을 고안하고 표준화하는 연구가 필요할 것이다.

PTD 융합 단백질이 세포내에 전달되었을 때 세포질과 핵에 균일하게 분포하는지, 아니면 특정한 세포내 소기관에 분포를 보이는지에 대한 보고는 거의 없다. 본 연구 결과에서 세포내로 transduction된 TAT-BMP-7을 공초점 현미경으로 관찰했을 때 핵에도 미량이 존재하지만 대부분 세포질에 분포하는 것을 알 수 있었다. 나아가 세포질에 존재하는 TAT- BMP-7 단백질도 세포 바닥의 부착 표면 쪽에

주로 분포하면서 일정한 부채살 모양의 양상을 보임을 알 수 있었고, 이는 세포질에 존재하는 스트레스 섬유 F-actin의 배열과 유사하였다 (Amano et al, 1997). 이를 확인하기 위해 phalloidin 염색을 시행하였을 때 transduction된 BMP-7이 F-actin과 결합하여 존재함을 알 수 있었다. 최근 PTD-Rho GTPase 융합 단백질을 transduction 시켰을 때 PTD 재조합 단백질이 F-actin과 결합함이 보고되어 있으나 (Amano et al. 1997), 이러한 결합이 F-actin과 Rho GTPase간의 결합인지, PTD에 의한 것인지는 알려져 있지 않다. 이를 확인하기 위해 본 연구에서 면역침전법을 시행하였을 때 TAT-BMP-7이 F-actin과 결합하고, TAT가 없는 음성 대조군에서는 이러한 결합이 없는 것으로 보아 PTD-BMP-7과 F-actin의 결합은 BMP-7 단백질보다는 TAT 아미노산 배열에 의한 것임을 알 수 있다. 따라서 이러한 PTD와 F-actin 결합 현상은 다양한 단백질을 대상으로 확인해야 할 것으로 생각되었고, F-actin이 세포 분열, 이동, apoptosis 조절에 중요 인자라는 점에서 (Amano et al. 1997, Bradke and Dotti 1999) PTD 융합 단백질과 F-actin 결합의 생물학적, 임상적 의의에 대한 연구가 필요할 것이다.

BMP는 세포내에서 생합성 되어 세포외로 분비되는 단백질이다. 단백질 구조상 TGF- $\beta$ 와 유사성이 높아 생물학적으로는 TGF- $\beta$  유전자군 (superfamily) 로 분류되고, 실제로 BMP가 수용체를 통해 신호를 전달하는 과정도 TGF- $\beta$ 와 매우 유사하고, 대부분의 신호 전달 체계를 공유한다. BMP/TGF- $\beta$ 군 단백질이 세포내에서 생합성 될 때 400여개의 아미노산으로 합성되며, BMP-7의 경우 431개의 아미노산이 mRNA로부터 합성된다. 이들은 다양한 post-translational modification 과정을 거치는바, 특히 아미노산 289~292부위에 존재하는 RXXR (R-Arg, X-any amino acids) motif는 proprotein convertase인 furin에 의해 절단이 예상되는 부위이다 (Constam and Robertson 1999). 이를 확인하기 위해 TAT-BMP-7 재조합 단백질을 furin과 in vitro에서 반응하였을 때 약 43kD의 N-terminal fragment가 관찰되는 것으로 보아 BMP-7은 furin에 의해 절단되어 활성화 과정을 거치는 것으로 판단된다 (Fig. 13). 즉, 세포내로 투과된 TAT-BMP-7은 HSP (heat shock protein)등에 의해 재구조화 (refolding) 과정을 거친 후 활성화된 형태의 BMP를



분비하기 위해 furin cleavage 된다는 것을 유추할 수 있다. 실제로 furin의 내인성 억제자 (endogenous inhibitor)인  $\alpha 1$ -PDX 발현을 유도했을 때 세포내에 투과된 TAT-BMP-7의 반감기가 증가하는 것으로 보아 투과된 TAT-BMP-7의 processing 과정은 furin 절단에 의존적임을 알 수 있다. 따라서 향후 세포내로 투과된 BMP-7의 재구조화와 furin 절단, glycosylation과 같은 post-translational process에 대한 연구가 진행된다면 BMP-7의 생합성과 활성화에 대한 이해를 넓힐 수 있을 것으로 생각된다.

활성화된 분비 BMP/TGF- $\beta$ 군 단백질은 하나의 disulfide bond에 의해 두개의 동일한 펩티드가 서로 연결된 dimer로 구성된다. 이때 각각의 펩티드는 BMP의 종류에 따라 120-140개의 아미노산으로 구성되고, 각 BMPs 내부에 존재하는 7개의 시스테인 단말기중 하나가 다른 펩티드의 동일 부위와 disulfide bond를 형성함으로써 dimer를 구성하게 되며, 나머지 6개의 시스테인은 동일 아미노산내에서 3개의 disulfide bond를 형성하여 (intrachain disulfide bond) 독특한 3차원 구조를 가지게 된다 (Griffith et al. 1996; Reddi 2001). 대부분의 BMP/TGF- $\beta$  유전자는 C-terminal 부위에 전술한 바와 같이 1-2개의 furin cleavage 부위가 잘리고, 잘린 C-terminal 절단부는 다시 glycosylation과 같은 과정을 거쳐 활성화된 형태로 분비된다. 이때, BMP-2의 경우 114개의 아미노산, BMP-7은 139개의 아미노산, TGF- $\beta 2$ 와  $\beta 3$ 는 112개의 아미노산으로 구성된다 (Ruppert et al. 1996; Scheufler et al. 1999). 이는 궁극적으로 BMP가 수용체에 결합하여 적절한 신호를 전달하기 위해서는 생물학적 활성을 가지는 BMP 단백질 구조를 가져야 한다는 것을 의미한다. 본 연구에서는 mRNA가 coding하는 아미노산 서열 전부를 cloning 하여 PTD 제조합 단백질을 만들었으며, 이들이 세포내로 transduction된 후 HSP등에 의해 단백질의 재구조화와 furin에 의한 절단에 의해 활성화 단백질이 분비될 것으로 추론할 수 있었다. 실제로 골세포 분화의 표지자로 사용되는 ALPase 활성화도 실험에서 TAT-BMP-7은 시판중인 rhBMP-2와 마찬가지로 골세포 분화 능력이 있음을 보여 주었고, 나아가 실험동물에 직접 주입하여 이소성 석회화를 관찰함으로써 PTD 제조합 단백질 전달이 in vitro 뿐만 아니라 in vivo에서도 생물학적 효

과가 있음을 증명할 수 있었다. TAT-BMP-7에 의한 활성화 BMP-7의 분비를 확실하게 증명하기 위해서는 장차 세포 배양 배지에서 western blot이나 immunoprecipitation, ELISA와 같은 직접적인 방법을 통해 활성화 BMP-7을 직접 검출하는 작업과 분비된 단백질의 post-translational modification에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

지금까지 PTD 융합 단백질을 이용하여 수용체와 상관없이 세포내에 유용한 단백질을 전달하는 기법은 다양한 유전자를 대상으로 시도되었다 (Frankel and Pabo 1988). 실제로 재조합 TAT 단백질은 p53과 같은 암 억제 유전자에 적용하여 암 치료제로써 개발되기도 하였고 (Takenobu et al 2002), 각종 유전자 질환에서 결손된 단백질을 대체하는 등 유전자 질환 치료제로도 개발되고 있다 (Wadia and Dowdy 2002). 또한 뇌-혈액 장벽에 의해 약물 투과가 제한적이던 중추신경계 치료에도 적용할 수 있다. 예를 들어 뇌 손상 시 뇌신경세포의 손상을 억제하는 anti-apoptotic 유전자인 Bcl-XL에 TAT 단백질을 결합시켜 적용하면 허혈성 뇌 손상시 뇌세포의 apoptosis를 억제할 수 있음이 보고되었다 (Cao et al 2002). 이 밖에도 각종 효소, 항산화 단백질 등 치료 효과는 우수하나 세포내로 전달이 어려웠던 치료용 단백질과 펩타이드에 PTD를 융합하는 기법을 이용하여 노화, 당뇨병, 피부질환 등 각종 치료 약물이 개발되고 있어 (Wadia et al 2003) 이는 차세대 신약 개발의 핵심 기술로 각광 받고 있다. 특히 이 PTD 융합 단백질 기법은 바이러스나 발현 벡터를 사용하던 기존의 유전자 치료 기술에서 우려되었던 세포의 유전적 손상 가능성이 거의 없고, 정확한 용량을 투여할 수 있다는 점에서 안전성과 효율성을 모두 증대시킬 수 있는 유효 단백질 전달 체계가 될 수 있을 것으로 생각된다. 아울러 PTD를 이용할 경우 분리 정제된 단백질이 표면 에너지 (high  $\Delta G$ )를 가져 인접 세포나 조직에 수분 이내에 상당량의 단백질이 투과되고, 1-2 시간 내에 대부분 전달된다는 점에서 골 형성 유도과 같은 국소적 치료 적용 시 기존의 수용성 재조합 BMP에 비해 적은 양을 투여하고도 동등한 약리효과를 기대 할 수 있을 것으로 판단되며, 골 결손부나 개체발생 모델을 이용하는 보다 광범위한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 특히 지금까지 사용되었던 재조합

BMP의 국소적인 전달을 위해 다양한 운반체가 개발, 연구되어 있으므로 TAT-BMP-7에서도 이를 응용한 연구를 통하여 TAT-BMP-7의 생체 전달에 가장 효율적인 운반체를 개발하는 연구도 필요 할 것이다 (Hong et al, 2006). 아울러 분리 정제된 TAT-BMP-7은 고표면 에너지, 비친수성 (hydrophobic), 고농도로 인해 쉽게 응결(aggregation)되는 화학적 특성을 보이므로 분리 정제된 재조합 단백질을 일관성 있게 전달하는 용매나 매개체의 개발도 매우 유용할 것으로 생각된다.

최근 성인에서 BMP-7은 신장에 유일하게 발현하는 것으로 알려져 있으며, 신장의 만성 염증이나 약물 등에 의한 신장 경화 (renal fibrosis) 과정에서 발현이 급격히 감소한다 (Zeisberg et al 2003, Zeisberg et al 2004). 즉, 염증에 의해 유도되는 TGF- $\beta$ 에 의해 상피 세포가 간엽 세포로 전환시키는 과정에서 BMP-7 발현이 소실되며, 나아가 신장 경화 과정 중에 재조합 BMP-7을 투여하면 TGF- $\beta$  신호 전달을 차단함으로써 신장 경화를 강력하게 억제하고, 나아가 정상적인 상피 재생을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Zeisberg et al 2003, Zeisberg et al 2004). 그러나 지금까지 사용되었던 재조합 BMP-7은 높은 비용 때문에 신장이나 간 조직의 경화를 억제하는 동물 실험에 광범위하게 사용될 수 없었다. 따라서 저렴한 비용으로 대량 생산이 가능한 TAT-BMP-7을 이용한다면 만성 염증이나 약물에 의한 신장, 간 경화 억제와 나아가 재생 효과를 검증하는 광범위한 연구가 가능할 것이다. 아울러 본 연구와 같이 PTD 재조합 단백질 기법을 이용한다면 임상적인 유용성이 높은 성장 호르몬과 같은 호르몬 단백질, 인슐린과 같은 내분비 단백질, EGF (epidermal growth factor)나 TGF와 같은 다양한 성장인자, noggin이나 Dickkopf와 같은 수용체 억제인자를 경제적이고 효율적으로 전달하고, 이에 의한 활성화된 분비 단백질에 의한 임상적인 효과를 기대할 수 있을 것이다.

## VI. 결론

본 연구는 세포내로 자발적 투과가 가능한 단백질 전달 영역(Protein transduction domain: PTD)을 가진 HIV-1 TAT 펩타이드를 이용하여 재조합 BMP-7을 박테리아에서 생합성 및 정제하였고, 이들이 세포내 투과성과 세포내 processing, 활성 BMP-7 효과를 in vivo에서 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 박테리아에서 발현하여 분리 정제된 TAT-BMP-7 융합 재조합 단백질은 농도, 시간 및 온도 의존적인 방식으로 다양한 세포내로 전달되었다. 이러한 전달은 다양한 세포에서 일관되게 관찰되어 수용체를 통하지 않고 세포막을 투과한다는 것을 제시하였다. 이러한 TAT-BMP-7의 세포막 투과 과정은 TAT 아미노산 배열에 의존적이었다.
2. 세포내부로 전달된 TAT-BMP-7는 세포질에 주로 존재하였고, 특히 세포 내부의 스트레스 섬유인 F-actin과 특이적으로 결합하고, 이러한 결합이 TAT 아미노산 배열에 의한 것임을 알 수 있었다.
3. TAT-BMP-7은 proprotein convertase인 furin에 의해 절단되었고, 또한 세포 내에서  $\alpha$ 1-PDX에 의한 furin 억제제는 세포내에 전달된 TAT-BMP-7의 활성화 반감기를 증가시키고, 이는 furin에 의한 절단과정이 활성화 BMP-7의 분비에 결정적인 역할을 한다는 것을 의미하였다.
4. 세포내로 전달된 TAT-BMP-7은 간엽기원 세포의 ALPase 활성을 증가시켰고, 나아가 실험동물의 대둔근에서 이소성 석회화 유도의 가능성을 제시하였다.

본 연구에서 이상과 같은 결과로 TAT-PTD 재조합 BMP-7 단백질을 박테리아에

서 대량 생산하여 세포내로 성공적으로 전달하였고, 전달된 TAT-BMP-7은 F-actin과 결합하여 재구조화 (refolding) 과정과 furin에 의한 절단과정을 거쳐 활성화 BMP-7을 분비하였다. 향후 TAT-BMP-7의 전달 및 활성화 단백질 분비 기전에 대한 연구와 함께 골 결손 모델이나 개체 발생 모델을 이용한 다양한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 참고 문헌

- Amano M., Chihara K., Kimura K., Fukata Y., Nakamura N., Matsuura Y., and Kaibuchi K.: Formation of actin stress fibers and focal adhesion enhanced by Rho-Kinase. *Science* 275, 1308-1311, 1997.
- Asahina I., Sampath T.K., and Hauschka P.V.: Human osteogenic protein-1 induces chondroblastic, osteoblastic, and/or adipocytic differentiation. *Exp. Cell Res.* 222, 38-47, 1996.
- Baltzer A.W., Lattermann C., Whalen J.D., Wooley P., Weiss K., Grimm M., Ghivizzani S.C., Robbins P.D., and Evans C.H.: Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene. *Gene therapy.* 7, 734-739, 2000.
- Baum B.J., Kok M., Tran S.D., and Yamano S.: The impact of gene therapy on dentistry. *J. Am. Dent. Assoc.* 3, 129-139, 2002.
- Bradke F. and Dotti C.G.: The Role of Local Actin Instability in Axon formation. *Science* 283, 1931-1934, 1999.
- Boyne P.J.: Animal studies of the application of rhBMP-2 in maxillofacial reconstruction. *Bone.* 19, S83-92, 1996.
- Cao G., Pei W., Ge H., Liang Q., Luo Y., Sharp F.R., Lu A., Ran R., Graham S.H. and Chen J.: In Vivo Delivery of a Bcl-xL Fusion Protein Containing the TAT Protein Transduction Domain Protects against Ischemic Brain Injury and Neuronal Apoptosis. *J. Neurosci.* 22, 5423-5431, 2002.

- Chen D., Zhao M., and Mundy G.R.: Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 22, 233-241, 2004.
- Clark R.A.F and Henson P.M.: The molecular and cellular biology of wound repair, New York : Plenum press, 1988.
- Cook S.D., Baffes G.C., Wolfe M.W., Sampath T.K., Rueger D.C., and Whitecloud T.S. : The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. *J. Bone Joint Surg. Am.* 176, 827-838, 1994.
- Cook S.D., Baffes G.C., Wolfe M.W., Sampath T.K., and Rueger D.C.: Recombinant human bone morphogenic protein-7 induces healing in a canine long bone segmental defect model. *Clin. Orthop.* 301-312, 1994.
- Cook S.D., Salkeld S.L., and Patron L.P.: Bone defect healing with an osteogenic protein-1 device combined with carboxymethylcellulose. *J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater.* 75, 137-145, 2005.
- Cook S.D., Wolfe M.W., Salkeld S.L., and Rueger D.C.: Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. *J. Bone Joint Surg. Am.* 77, 734-750, 1995.
- Constam, D.B., and Robertson E.J.: Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J. Cell Sci.* 144, 139-149, 1999.
- Derossi D., Jiliet A.H., Chassaing G., and Prochiantz A.: The third helix of the

- Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 10444-10450, 1994.
- Elliott G. and O'Hare P.: Intracellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell.* 88, 223-233, 1997.
- Fawell S., Seery J., Daikh Y., Moore C., Chen L.L., Pepinsky B. and Barsoum J.: Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 664-668, 1994.
- Frankel A.D. and Pabo C.O.: Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell.* 55, 1189-93, 1988.
- Friedlaender G.E.: OP-1 Clinical studies. *J. Bone Joint Surg. Am.* 83A, S160-161, 2001.
- Ford K.G., Souberbielle B.E., Darling D. and Farzaneh F.: Protein transduction: an alternative to genetic intervention? *Gene therapy.* 8, 1-4, 2001.
- Gerhart T.N., Kirker-Head C.A., Kriz M.J., Holtrop M.E., Hennig G.E., Hipp J., Schelling S.H., and Wang E.A.: Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenic protein. *Clin. Orthop.* 293, 317-326, 1993.
- Gitelman S.E., Kobrin M.S., Ye J.Q., Lopez A.R., Lee A., and Derynck R.: Recombinant Vgr-1/BMP-6 expressing tumors induce fibrosis and endochondral bone formation in vivo. *J. Cell Biol.* 126, 1595-1609, 1994.



- Green M., and Loewenstein P.M.: Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat *trans*-activator protein. *Cell*, 55, 1179-1188, 1988.
- Griffith D.L., Keck P.C., Sampath T.K., Rueger D.C., and Carlson W.D.: Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: Structural paradigm for the transforming growth factor  $\beta$  superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93, 898-883, 1996.
- Groeneveld E.H., and Burger E.H.: Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur. J. Endocrinol.* 142, 9-21, 2000.
- Hanisch O., Tatakis D.N., Boscovic M.M., Rohrer M.D., and Wikesjo U.M.E.: Bone formation and reosseointegration in peri-implantitis defects following surgical implantation of rhBMP-2. *Int. J. Oral Maxillofacial Implants.* 12, 604-610, 1997.
- Hong S.J., Kim C.S., Han D.K., Cho I.H., Jung U.W., Choi S.H., Kim C.K., and Cho K.S.: The effect of a fibrin-fibronectin/ $\beta$ -tricalcium phosphate/recombinant human bone morphogenetic protein-2 system on bone formation in rat calvarial defects. *Biomaterials.* 27, 3810-3816, 2006.
- Israel D.I., Nove J., Kerns K.M., Moutsatsos I.K., and Kaufman R.J.: Expression and characterization of bone morphogenic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. *Growth factors.* 7, 139-150, 1992.
- Itoh H., Ebara S., Kamimura M., Tateiwa Y., Kinoshita T., Yuzawa Y., and Takaoka K.: Experimental spinal fusion with use of recombinant human

- bone morphogenic protein 2. *Spine*. 24, 1402-1405, 1999.
- Jena N., Martin-Seisdedos C., McCue P., and Croce C.M.: BMP-7 null mutation in mice: developmental defects in skeleton, kidney, and eye. *Exp. Cell Res.* 230, 28-37, 1997.
- Jilliot A., Pernell C., Deagostini-Bazin H., and Prochiantz A.: Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88, 1864-1868, 1991.
- Jin Q.M., Anusaksathien O., Webb S.A., Rutherford R.B., and Giannobile W.V.: Gene therapy of bone morphogenetic protein for periodontal tissue engineering. *J. Periodontol.* 74, 202-213, 2003.
- Krebsbach P.H., Gu K., Franceschi R.T., and Rutherford R.B.: Gene therapy-directed osteogenesis: BMP-7-transduced human fibroblasts form bone in vivo. *Hum. Gene Ther.* 11, 1201-1210, 2000.
- Leifert J.A., and Whitton J.L.: "Translocatory proteins" and "protein transduction domains": a critical analysis of their biological effects and the underlying mechanisms. *Mol. Ther.* 8, 13-20, 2003.
- Lewin M., Carlesso N., Tung C.H., Tang X.W., Cory D., Scadden D.T., and Weissleder R.: Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat. Biotechnol.* 18, 410-414, 2000.
- Lindgren M., Hallbrink M., Prochiantz A., and Langel U.: Cell penetrating

- peptides. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 99-103, 2000.
- Ludwig S.C., and Boden S.D.: Osteoinductive bone graft substitutes for spinal fusion: a basic science summary. *Orthop. Clin. North Am.* 30, 635-645, 1999.
- Molloy S.S., Anderson E.D., Jean F., and Thomas G.: Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol.* 9, 28-35, 1999.
- Nagahara H., Vocero-Akbani A.M., Snyder E.L., Ho A., Latham D.G., Lissy N.A., Becker-Hapak M., Ezhevsky S.A. and Dowdy S.F.: Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat. Med.* 4, 1449-1452, 1998.
- Oda S., Kinoshita A., Higuchi T., Shizuya T., and Ishikawa I.: Ectopic bone formation by biphasic calcium phosphate (BCP) combined with recombinant human bone morphogenic protein-2. *J. Med. Den. Sci.* 44, 53-62, 1997.
- Ozkaynak E., Rueger D.C., Drier E.A., Corbett C., Gidge R.J., Sampath T.K., and Oppermann H.: OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF- $\beta$  family. *EMBO J.* 9, 2085-2093, 1990.
- Park J., Ryu J., Kim K.A., Lee H.J., Bahn J.H., Han K., Choi E.Y., Lee K.S., Kwon N.Y., and Choi S.Y.: Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1-Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells. *J. Gen. Virol.* 83, 1173-1181, 2002.

- Reddi A.H.: Bone Morphogenetic Proteins: From Basic Science to Clinical Applications. *J. Bone Joint Surg. Am.* 83: S1-S6, 2001.
- Ruppert R., Hoffmann E., and Sebald W. : Human morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *Eur. J. Biochem.* 237, 295-302, 1996.
- Sampath T.K., Maliakal J.C., and Hauschka P.V.: 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.* 267, 20352-20362, 1992.
- Scheufler C., Sebald W., and Hulsmeier M.: Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 287, 103-115, 1999.
- Schwarze S.R., Hruska K.A., and Dowdy S.F.: Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? *Trends Cell Biol.* 10, 290-295, 2000.
- Schwarze S.R., and Dowdy S.F.: In vivo protein transduction: intracellular delivery of biological active proteins, compounds and DNA. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 45-48, 2000.
- Sigurdsson T.J., Nygaard L., Tatakis D.N., Fu E., Turek T.J., Jin L., Wozney J.M. and Wikesjö U.M.: Periodontal repair in dogs: evaluation of rhBMP-2 carriers. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* 16, 524-537, 1996.

Sigurdsson T.J., Fu E., Tatakis D.N., Rohrer M.D. and Wikesjo U.M.: Bone morphogenetic protein-2 for peri-implant bone regeneration and osseointegration. *Clin. Oral Implants Res.* 8, 367-374, 1997.

Solursh M., Langille R.M., WOOD J., and Sampath T.K.: Osteogenic protein-1 is required for mammalian eye development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218, 438-443, 1996.

Stephen D., Cook S.D., David C., and Rueger D.C.: Osteogenic protein-1: Biology and application. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 324, 29-38, 1996.

Swiontkowski M., Goulet J., Paiement G., Bucholz R., Jones A., Fitzpatrick M., and Valentin-Opran A.: Safety and feasibility of implanting recombinant human BMP-2/absorbable collagen sponge in patients with open tibial shaft fractures. *Presented at the Annual meeting of orthopaedic Trauma Association*, 1997

Takenobu T., Tomizawa K., Matsushita M., Li S.T., Moriwaki A., Lu Y.F., and Matsui H.: Development of p53 protein transduction therapy using membrane-permeable peptides and the application to oral cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 1, 1043-1049, 2002.

Terheyden H., Jepsen S., Vogeler, Tucker M., and Rueger D.C.: Recombinant human osteogenic protein-1 in the rat mandibular augmentation model; difference in morphology of the newly bone are dependent on the type of carrier. *Mund. Kiefer. Gesichtschir.* 1, 272-275, 1997.

Terheyden H., Jepsen S., and Rueger D.R.: Mandibular reconstruction in

- miniature pigs with prefabricated vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1 : a preliminary study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 28, 461-463, 1999.
- Terheyden H., Jepsen S., Moller B., and Rueger D.: Sinus floor augmentation with simultaneous implant insertion using recombinant human osteogenic protein-1. *Laryngorhinootologie.* 80, 47-51, 2001.
- Torchilin V.P.: TAT peptide-modified liposomes for intracellular delivery of drugs and DNA. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 7, 265-267, 2002.
- Tseng Y.L., Liu J.J., and Hong R.L.: Translocation of liposomes into cancer cells by cell-penetrating peptides penetratin and tat: a kinetic and efficacy study. *Mol. Pharmacol.* 62, 864-872, 2002.
- Urist M.R.: Bone Formation by autoinduction. *Science.* 150, 893-899, 1965.
- Vukicevic S., Latin V., Chen P., Batorsky R., Reddi A.H., and Sampath T.K.: Localization of osteogenic protein-1( Bone morphogenic protein-7) during human embryonic development: High affinity binding to basement membranes. *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 198, 693-700, 1994.
- Vukicevic S., Kopp J.B., Luyton F.P., and Sampath T.K.: Induction of nephrogenic mesenchyme by osteogenic protein-1(Bone morphogenic protein-7). *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 9021-9026, 1996.
- Wadia J.S., and Dowdy S.F.: Protein transduction technology. *Curr. Opinion Biotechnol.* 13, 52-56, 2002.

- Wadia J.S., and Dowdy S.F.: Modulation of cellular function by TAT mediated transduction of full length proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 4, 97-104, 2003.
- Wang E.A., Rosen V., Cordes P., Hewick R.M., Kriz M.J., Luxenberg D.P., Sibley B.S., and Wozney J.M.: Purification and Characterization of other distinct bone-inducing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 9484-9488, 1988.
- Wang E.A., Rosen V., D'alessandro J.S., Bauduy M., Cordes P., Harada T., Israel D.I., Hewick R.M., Kerns K.M., Lapan P., Luxenberg D.P., Mcquaid D., Moutsatsos I.K., Nove J., and Wozney J.M.: Recombinant human bone morphogenic protein induces bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2220-2224, 1990.
- Watson K., and Edwards R.J.: HIV-1-trans-activating(Tat) protein: both a target and a tool in therapeutic approaches. *Biochem. Pharmacol.* 58, 1521-1528, 1999.
- Wender P., Mitchell D., Pattabiraman K., Pelkey E., Steinman L., and Rothbard J.: The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptide molecular transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 13003-13008, 2000.
- Winn S.R., Hu Y., Sfeir C., and Hollinger J.O.: Gene therapy approaches for modulating bone regeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 42, 121-138, 2000.
- Wozney J.M., Rosen V., Celeste A.J., Mitsock L.M., Whitters M.J., Kriz R.W.,

Hewick R.M., and Wang E.A.: Novel regulators of formation: Molecular clones and activities. *Science*. 242, 1528-1534, 1988.

Zeisberg M., Hanai J., Sugimoto H., Mammoto T., Charytan D., Strutz F., and Kalluri R.: BMP-7 counteracts TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverse chronic renal injury. *Nature Med*. 9, 964-968, 2003.

Zeisberg M., and Kalluri R.: The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J. Mol. Med*. 82, 175-181, 2004.



Abstract

## **The effect of BMP-7 by TAT-PTD and its Activation Processing**

So Yeon Lim

Department of Dentistry

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Moon Kyu Jung, D.D.S., M.S.D., Ph.D)

The purpose of this study was intracellular transduction of PTD, derived from HIV TAT sequence, fusion BMP-7 by which biosynthesis of bacterial recombinant protein and purification. And its intracellular processing and biologic function were studied. The results were as follows;

1. Recombinant TAT-BMP-7 protein, obtained from bacterial expression and purification, was successfully transduced into the cells by concentration- and time-dependent manner. This transduction was consistently observed among the various cell type, suggesting that this process was not required the membrane receptor. The transduction was TAT-dependent process.
2. Transduced recombinant protein was mainly localized in the cytoplasm, especially the protein was selectively binds to stress fiber F-actin. This binding was also dependent on TAT sequence.
3. Recombinant TAT-BMP-7 contains proprotein convertase cleavage site at amino acid 289~292, and this site was cleaved by proprotein convertase furin. And the over-expression of  $\alpha$ 1-PDX to inhibit furin resulted in increased half-life of transduced TAT-BMP-7, suggesting that furin cleavage is critical for intracellular processing and following secretion of active BMP-7.

4. Transduction of TAT-BMP-7 into the mesenchymal cells induced alkaline phosphatase activity, and furthermore the direct injection of the protein into the skeletal muscle of mice resulted in ectopic calcification.

These results demonstrate that TAT PTD recombinant BMP-7 obtained from bacteria mass production was successfully transduced into the cells. The transduced protein was selectively binds to F-actin and following refolding, furin cleavage process was proceed to secretion of biologically active BMP-7. Further study for the cellular mechanisms of intracellular transduction to secretory process and variable animal study may elucidate the possibility of clinical potential of this protein.

---

Key Words : Bone morphogenetic protein, Protein transduction domain, TAT-BMP-7, intracellular processing, furin