

## Mouse Dual Ig Domain Containing Cell Adhesion Molecule Protein Expression and Purification Using the Baculovirus Expression Vector System

Seung-Won Park<sup>§</sup>, Ji-Hyun Choi<sup>§</sup>, Tae-Won Goo, Seong Ryul Kim, Gwang-Gill Lee and Seok-Woo Kang\*

Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon, Korea

A baculovirus expression vector system (BEVS) is used routinely to produce recombinant proteins in the milligram scale. Dual Ig domain containing cell adhesion molecule (DICAM) belongs to the type I class of transmembrane proteins. It consists of a signal peptide, two V-type Ig domains in the extracellular region, and a short cytoplasmic tail of 442 amino acids. To purify the recombinant DICAM protein from cells overexpressing the mouse full-length DICAM gene, recombinant baculovirus is infected and recovered in the Sf9 cells. As a result, mouse DICAM protein was efficiently expressed and extracted from the insect cells using the BEVS. This recombinant protein can be used in further studies for functional test of DICAM protein in the cells.

**Key Words:** Baculovirus expression vector system, Dual Ig domain containing cell adhesion molecule, Recombinant protein

### 서론

유전자 재조합 벡로 바이러스 시스템 (baculovirus expression vector system; BEVS)은 곤충세포에서 특이적으로 외래 유전자를 발현하기 위해 광범위하게 이용되는 단백질 발현 체계로서 *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV)로 부터 유래된 곤충 특이적 바이러스를 사용한다 (1, 2). BEVS는 동물세포를 이용한 단백질 발현 체계보다 더 많은 양의 단백질을 생산할 수

있고, 대장균을 이용한 발현 체계보다 고품질의 목적하는 단백질 생산 가능성이 더욱 큰 것이 장점으로 알려져 있다 (1, 3). 최근 보고에 따르면, BEVS는 동물세포에서 증식하는 바이러스 벡터 (아데노와 레트로 바이러스 등)에 비하여 곤충세포에서만 특이적으로 발현 및 증식이 가능하다는 이유 때문에 유전자 치료 등 여러 다양한 목적으로 응용이 가능한 것으로 인정을 받고 있다 (4, 5). AcNPV는 약 130 kb의 환형 이중나선의 DNA를 게놈으로 가지기 때문에 다른 바이러스 벡터와 비교하여 상당히 큰 외부 유전자 (12 kb 이상)를 바이러스 게놈 내로 도입 가능한 것이 큰 장점으로 알려져 있다 (6). 이러한 이유 때문에 BEVS는 여러 종류의 재조합 단백질을 생산하기 위한 발현 체계로서 이용되고 있으며 향후 적용 범위 역시 증대될 것으로 생각된다.

CTX 단백질 그룹에 속하는 dual Ig domain containing cell adhesion molecule (DICAM)은 type I 막관통 특성을 가지며, 세포의 기질에 두 개의 V-type Ig 부위와 세포 내로 짧은 꼬리 부위를 가지는 세포막 단백질 구조를 가지

Received: November 16, 2009/ Revised: July 1, 2010

Accepted: July 7, 2010

<sup>§</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author: Seok-Woo Kang. Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-100, Korea.

Phone: +82-31-290-8503, Fax: +82-31-290-8536

e-mail: microsw@korea.kr

\*\*This work was supported by a grant (2008 10 FTH 01 01 02 001) from BioGreen21 Program, Rural Development Administration, Republic of Korea.

고 있다. DICAM의 주요 기능은 세포와 세포간의 결합에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다. 간 조직을 제외한 각 기관에서 고르게 발현이 되고 있으며, 췌장과 같은 특정 조직에서는 발현된 단백질의 크기가 다른 조직에서 발현되는 단백질에 비해 작아지는 현상 (70 kDa → 60 kDa)을 보인다. 변이를 이용한 연구에서 두 개의 V-type Ig 부위 가운데 첫 번째 부위의 변이를 형성한 경우 세포간 결합력에는 변화가 없었으나, 두 번째 부위에 변이가 발생한 경우는 세포간 결합력이 50% 정도 감소하는 경향을 보였으므로 이 부위가 세포간 결합에 중요한 역할을 하는 것으로 예상된다. 현재 DICAM의 정확한 기능은 밝혀져 있지 않지만,  $\alpha\beta 3$  integrin과 DICAM 단백질이 상호작용하는 것으로서 이는 DICAM 단백질이 파골세포의 분화 억제와 연관되어 있음이 시사된다 (7).

따라서, 본 연구에서는 BEVS를 이용하기 위하여 마우스에서 유래한 전체 DICAM 유전자 (1,346 bp, 442 아미노산)를 가지는 재조합 벡클로 바이러스를 형성하고, 곤충세포 (Sf9)에서 증식하여 목적하는 재조합 단백질인 DICAM을 발현 및 정제하는 과정을 확립하였다. BEVS에서 polyhedrin (polh) 프로모터는 곤충세포 특이적 발현을 형성하기 위한 강력한 프로모터로서 본 연구에서는 DICAM 유전자를 발현하기 위해 사용하였다. 또한 본 연구에서 사용된 BEVS는 효과적인 단백질 정제를 위하여 목적하는 재조합 단백질의 C-말단에 6개의 His를 융합하여 발현될 수 있도록 디자인되어 있다. DICAM 유전자를 포함하는 재조합 바이러스는 역가 측정 (플라크 분석) 방법을 통하여 바이러스의 정확한 수를 검사하였으며, 목적 유전자가 삽입된 재조합 벡클로 바이러스를 순수 분리하기 위하여 각 플라크 별로 바이러스를 순수 분리하고 증식하는 과정을 수행함으로써 DICAM을 발현하는 재조합 벡클로 바이러스만을 순수 분리하여 본 연구에 사용하였다. 이상의 방법을 통하여 정제된 재조합 단백질인 DICAM은 약 51 kDa의 크기를 보였고, 본 연구에서 재조합 DICAM 단백질이 곤충세포를 이용하는 BEVS를 통하여 최초로 형성되었다는 점에 의의가 있다. 이러한 방법을 통하여 분리 및 정제된 재조합 단백질은 세포와 세포간 접촉 및 파골세포 억제 효과 등의 분석을 통하여 향후 DICAM의 명확한 기능을 규명하기 위한 더 많은 연구가 필요하다.

## 재료 및 방법

### 유전자 클로닝

DICAM 유전자 (pcDNA3.1-myc/his-his-C-DICAM [full])는 Dr. Jung (Kyungpook National University, Daegu, Korea) 으로부터 제공받았다. 전체 DICAM 유전자는 각 Bam-DF (5'-GGATCCCACCATGGAAGTCTGCTGCCCGTGT-3')와 DF-Not (5'-GCGGCCGCTTTGCAGTACTCCTTCCTGAA-3') 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 각각의 프라이머는 특정한 제한효소 인식 부위 (*Bam*H I과 *Not* I)를 포함하며, 해당하는 염기서열은 밑줄로 표시하였다. 증폭된 유전자의 크기는 제한효소 부위를 포함하여 1,365 bp이다. PCR 증폭된 유전자는 pGEM-T Easy 벡터 (Promega, Madison, WI, USA)에 삽입한 다음 염기서열 분석 방법을 이용하여 염기서열을 확인하였다. 다음으로 *Bam*H I과 *Not* I (Takara, Otsu, Shiga, Japan) 제한효소를 사용하여 plasmid DNA를 절단한 다음 pBACgus4X-EGFP 서플 벡터의 동일한 제한효소 위치에 삽입하였다. pBACgus4X-EGFP plasmid DNA는 하나의 polh 프로모터 하위에 형광발현 유전자인 EGFP를 삽입한 것으로 반대방향으로 존재하는 polh 프로모터 하위에 DICAM 유전자를 삽입하였고, 최종적으로 완성된 벡터는 pBAC-DF라 명명하였다. pBAC-DF는 *Bam*H I과 *Not* I 제한효소를 사용하여 해당 유전자를 절단함으로써 벡터 내에 DICAM 유전자 삽입이 되었음을 확인하였다.

### 재조합 바이러스 형성 및 확인

Sf9 세포는 바이러스 형성을 위한 유전자를 도입하기 24시간 전에 6-well plate에 분주한 다음 25°C 배양기에서 배양하였다. 6-well plate 바닥에 대략 80% 정도로 자란 세포를 이용하여 바이러스 형성 실험에 사용하였다. pBAC-DF plasmid DNA는 Sf9 세포에서 재조합 벡클로 바이러스를 형성하기 위하여 BacVector®-3000 DNA (Novagen, Darmstadt, Germany) kit와 함께 사용하였다. 방법을 간략히 기술하면, 클로닝을 통하여 형성한 2 µg의 pBAC-DF plasmid DNA와 키트에 포함된 AcNPV genome DNA를 실온에서 함께 혼합한 다음, Fugene Transfection Reagent (Roche, Mannheim, Germany) 8 µl를 첨가하고, 최종적으로 100 µl 부피가 될 수 있도록 멸균 증류수를 첨가하여 주었다. 100 µl 부피의 유전자 도입을 위한 혼합

액은 이 후 상온에서 15분 동안 더 정치한 다음, 각 Sf9 세포가 자라고 있는 well에 첨가하여 주었다. 재조합 바이러스 형성을 확인하기 위하여 72시간 후 형광현미경을 통하여 EGFP 유전자의 발현을 확인하였다. 재조합 바이러스 (AcDF로 명명함) 수득은 5일 후 제조사에서 제시한 방법을 이용하여 수득하였고, 바이러스 증식 및 단백질 정제를 위한 연구에서 사용될 때까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동 보관하였다. 목적 유전자의 발현을 확인하기 위하여 재조합 AcDF 수득 전 일정양의 AcDF 감염세포를 이용하여 RNA를 추출하였고, cDNA를 합성하여 RT-PCR을 실시함으로써 목적 유전자인 DICAM의 발현을 확인할 수 있었다. RT-PCR을 수행하기 위하여, TRIZOL Reagent (MRC, Cincinnati, OH, USA)를 사용하여 AcDF 감염세포로부터 total RNA를 분리하였고, 5 unit의 DNase I 효소를  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 처리하여 genome DNA를 모두 제거하였다. Phenol/chloroform/isoamylalcohol (PCI) 추출 방법을 사용하여 RNA를 순수 분리하고 내재 유전자인 GAPDH를 PCR 증폭하여 DNase I 효소에 의한 genome DNA의 제거를 확인하였다. 최종적으로 cDNA 합성은  $1\ \mu\text{g}$ 의 RNA를 *MaXim* RT-PCR Premix (iNtRON Biotechnology, Sungnam, Korea) kit를 사용하였고, 제조사가 지시한 방법에 따라 실험을 실시하였다. DICAM cDNA 유전자의 발현 확인을 위한 PCR 수행은 위에서 설명한 Bam-DF와 DF-Not 각 프라이머를 사용하여 실시하였다.

#### Western blotting

각 일정량의 단백질은 12% SDS-PAGE 겔을 사용하여  $100\ \text{V}$ 에서 2시간 동안 전기영동하였다. 전기영동 후 PVDF membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 해당 단백질을 전사하였고, 6개의 His에 대항하는 일차 항체인 anti-mouse His-Ab (IG Therapy, Chuncheon, Korea)는 1:2,500의 비율로 희석하여 사용하여 2시간 동안 실온에서 단백질이 전사된 막과 반응시켰으며, 이차항체로 동일한 비율의 anti-mouse IgG-HRP (Abcam, Cambridge, MA, USA)를 1시간 동안 반응시켰다.

#### 재조합 바이러스 역가 확인 및 순수한 바이러스 선발

AcDF의 역가 확인은 Novagen사에서 제공하는 방법에 따라 실시하였다. AcDF의 희석배율은  $10^{-3}$ 부터  $10^{-8}$ 까지 희석하여 triplicate로 6-well plate에서 배양한 Sf9 세포를 이용하여 실시하였다. 5일 후 Novagen사에서 제시한 방법

에 따라  $300\ \text{ng/well}$  농도로 X-gal을 첨가하여 AcDF의 플라크를 확인하였다. 최종 역가는  $6 \times 10^6$  plaque forming unit (PFU)가 됨을 확인하였고, DICAM 유전자를 발현하는 재조합 바이러스의 순수한 분리를 위하여 6개의 플라크를 선발하여 새로운 Sf9 세포가 자라고 있는 6-well plate에 각각 감염시켰다. 5일 후 감염된 세포를 분리하였고, DICAM 단백질의 발현을 확인하기 위하여 I-PER Insect Cell Protein Extraction Reagent (PIERCE, Rockford, IL, USA)를 사용하여 세포파쇄를 실시하였으며, Western blot을 실시하여 재조합 DICAM 단백질의 발현을 재차 확인하였다.

#### 재조합 DICAM 단백질의 순수 분리 및 정제

재조합 바이러스 감염을 위하여 24시간 전에 새로운 Sf9 세포를 T75 flask의 바닥에 세포가 75% 정도 되도록 배양한 다음, 위의 방법에 의해 확인된 첫 번째 passage AcDF 재조합 바이러스를 감염시켰다. 감염 3일 후 재조합 바이러스 AcDF의 증식을 확인하기 위하여 형광현미경 하에서 EGFP 유전자의 발현 산물인 형광을 관찰하였고, 최종적으로 6일이 지난 다음 바이러스를 수득하기 위하여  $346 \times \text{g}$ 에서 10분간 원심분리하였다. AcDF 바이러스가 포함된 상층액은  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하여 다음 연구에서 사용할 수 있도록 하였다. 재조합 단백질인 DICAM을 분리하고 정제하기 위하여 원심분리 후 남은 세포는 MagExtractor-His-tag kit (TOYOBO, Osaka, Japan)를 사용하였다. 분리 및 정제의 과정은 TOYOBO사에서 제공하는 방법에 따라 실시하였으며, anti-His Ab가 붙어있는 자성 구슬  $40\ \mu\text{l}$ 를 사용하여 분리하였고, 최종적으로 부피는  $90\ \mu\text{l}$ 가 되도록 용출액을 사용하여 재조합 DICAM을 정제하였다. 재조합 DICAM 단백질의 분리 조건 비교를 위하여 변성 (insoluble form)과 비 변성 (soluble form) 형태 두 가지 다른 방법을 사용하여 분리하였다.

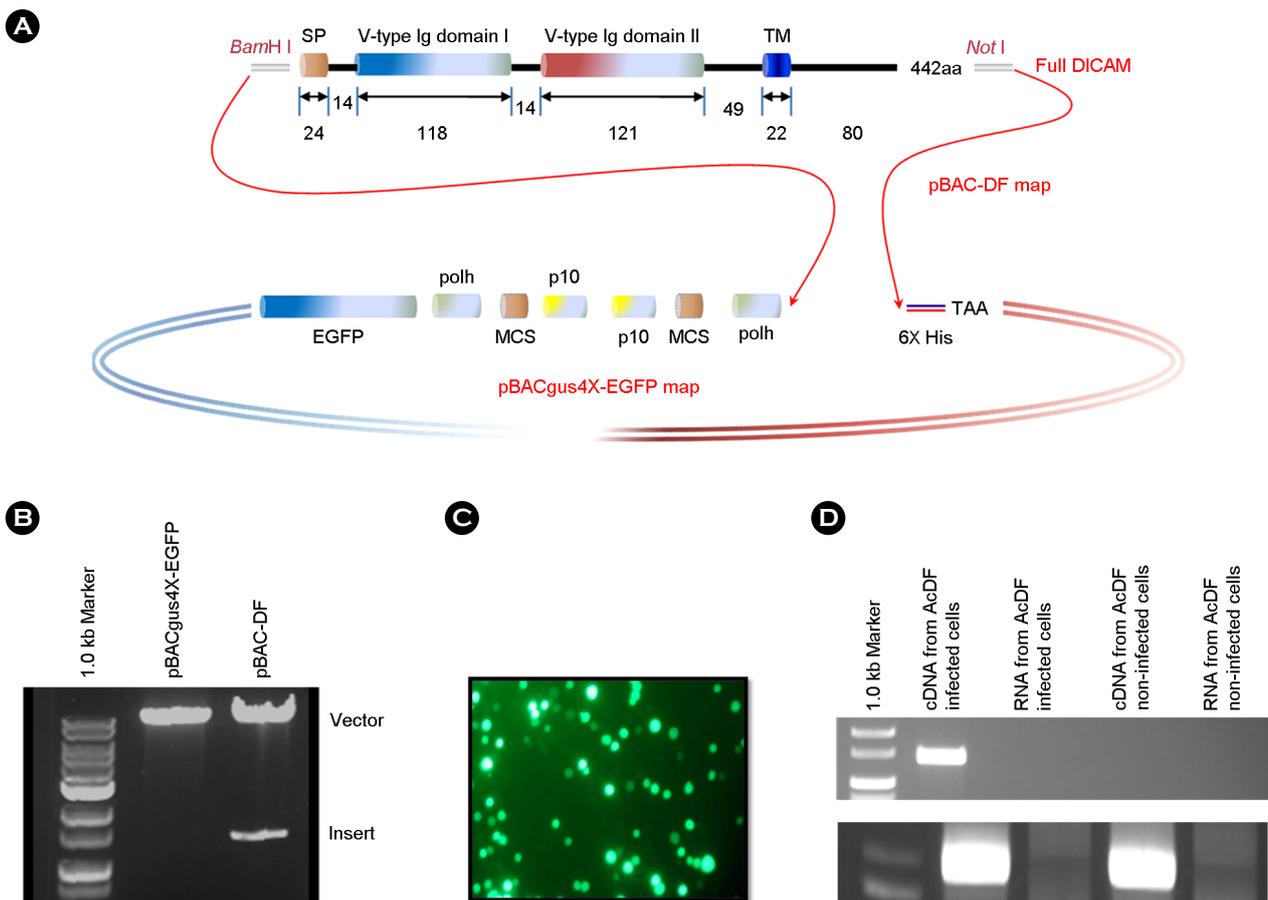
## 결 과

유전자 재조합 단백질 생산을 위한 바이러스 벡터 구축과 형성

Dr. Jung에 의해 제공받은 마우스 DICAM 유전자 plasmid DNA는 Bam-DF와 DF-Not 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 각각의 프라이머들은 서틀 벡터에 목적 유전자 (DICAM) 삽입을 위하여 *Bam*H I과 *Not* I 제한효소

부위를 5'-말단에 포함하였다. 최종 PCR 산물은 1,365 bp 이며, 이를 우선 TA 클로닝 벡터인 pGEMT-Easy vector에 삽입하였고, pGEMT-DF라 명명하였다. pGEMT-DF는 염기 서열 분석을 통하여 전체 염기서열의 변이 유무를 확인하였다. Figure 1에서 보여진 것처럼 위에서 설명한 두 개의 서로 다른 제한효소를 사용하여 pGEMT-DF와 재조합 베클로 바이러스 형성을 위한 서플 벡터인 pBACgus-

EGFP를 절단한 다음, pGEMT-DF로부터 분리한 전체 DICAM 유전자를 pBACgus-EGFP 벡터에 삽입하였다. 이러한 방법으로 클로닝된 바이러스 벡터는 아가로스젤에서 동일한 제한효소를 사용하여 절단한 다음 전기영동 방법을 사용하여 확인하였다 (Fig. 1A, B). 삽입된 DICAM 유전자는 C-말단에 6개의 His가 부가하여 발현되도록 디자인되어 His 특이적 단백질 발현체의 분리 및 정제가



**Figure 1. Recombinant AcDF baculovirus with mouse DICAM gene.**

**A.** Recombinant baculovirus transfer plasmids contain a mouse DICAM gene under the control of an AcNPV polyhedrin (polh) promoter. DICAM gene cassette (6) inserted into the pBACgus4X-EGFP plasmid DNA with *Bam*H I and *Not* I restriction enzymes is terminated by stop codon of vector and added 6× His amino acids to 3'-end region. pBACgus4X-EGFP vector contain the 0.7 kb Enhanced Green Fluorescence Protein (EGFP) downstream of the other polh promoter.

**B.** Specifically, about 1.3 kb full length DICAM gene was cloned into the pBACgus4X-EGFP transfer vector. To confirm of our clone pBAC-DF plasmid, vector was double digested by *Bam*H I / *Not* I. Expected patterns were obtained, confirming targeted disruption. Lane 1, 1.0 kb DNA ladder; lane 2, pBACgus4X-EGFP; lane 3, pBAC-DF.

**C.** Sf9 cells were infected with recombinant AcDF baculovirus and were examined and photographed by epifluorescence microscopy. Original magnification: × 100.

**D.** RT-PCR analysis of DICAM expression with RNA extracted from different cells of AcDF infected and uninfected. A PCR product was detected for DICAM with RNA from AcDF infected Sf9 cells. Primers designed to amplify a 654 bp fragment of a Sf9 GAPDH were used for the internal control. Amplification for the GAPDH was detected following 35 cycles of PCR amplification. RNA extracted from non-infected cells was used as a negative control, and no amplicons were detected after 35 cycles of PCR amplification. A 1.0 kb DNA ladder was run in Lane 1.

가능하도록 하였다. pBACgus-EGFP vector는 pBACgus4X-1 (Novagen)를 이용하여 polh 프로모터에 외래 EGFP 유전자를 도입한 것을 본 연구에 사용하였다. pBACgus4X-1의 경우 각 p10과 polh 프로모터가 2개씩 서로 다른 방향으로 존재하여 한꺼번에 4개의 서로 다른 유전자의 발현이 가능하도록 디자인되어 있으며, 이 가운데 하나인 polh 프로모터의 경우 삽입된 유전자의 C-말단에 6개의 His가 첨가되도록 디자인되어 있어 특이적 발현 단백질의 분리 및 정제가 가능하도록 되어 있다. 특별히 본 연구에서 사용한 pBACgus-EGFP의 경우 기존의 바이러스 벡터 (pBACgus4X-1)와 달리 내부에 형광 단백질인 EGFP 유전자를 발현할 수 있도록 하여 재조합 바이러스 형성 유무를 쉽게 관찰할 수 있도록 한 것이 특징이다. 이러한 이유로, 형성된 재조합 베컬로 바이러스의 증식 유무는 감염 3일 후부터 형광현미경 하에서 쉽게 EGFP 발현을 통하여 확인이 가능하였으며 (Fig. 1C), 감염 5일 후 재조합 바이러스가 증식된 Sf9 세포에서 DICAM 유전자의 발현 유무는 RT-PCR을 이용하여서도 확인할 수 있었다 (Fig. 1D). 즉, DICAM 유전자를 발현하는 재조합 베컬로 바이러스인 AcDF가 형성될 경우 감염된 세포에서 관찰 가능한 일반적인 형태의 바이러스 증식 현상에 더하여 형광을 관찰 방법으로 쉽게 예측할 수 있었다. 또한 목적 단백질의 발현을 미리 RT-PCR을 통하여 확인함으로써 재조합 AcDF의 형성 유무에 대한 빠른 판단이 가능하였다.

#### AcDF 역가 확인 및 순수 바이러스 선별

최초 형성된 재조합 베컬로 바이러스 가운데 바이러스 게놈 내에 DICAM 유전자가 삽입된 AcDF만을 순수하게 분리하기 위하여 바이러스 역가 측정 및 선별 실험을 실시하였다. 우선 바이러스 역가 측정을 위하여 6-well plate에 적당한 양의 Sf9 세포를 배양하고 최초 형성된 바이러스를  $10^{-3}$ 부터  $10^{-8}$ 까지 점진적으로 희석하여 6-well plate에 접종하였다. 5일 째 되는 날 X-gal 용액을 사용하여 각 well의 세포를 염색하여 바이러스 역가를 확인하였다. 최종 역가는  $6 \times 10^6$  PFU로 가장 높은 희석배율에서 보여진 6개의 플라스크들을 선별하여 순수 분리를 위하여 사용하였다.

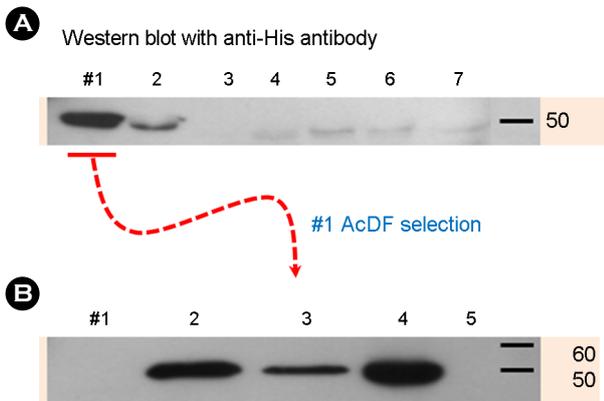
재조합 바이러스 순수 분리를 위하여 동일한 방법으로 일정한 양의 Sf9 세포를 6-well plate에 배양 후, 위에서 선별된 6개의 플라스크들을 서로 다른 well의 Sf9 세포에

감염시켰다. 바이러스의 감염 및 증식을 위하여 플라스크를 첨가한 세포는 25°C 배양기에서 6일 동안 배양하였다. 3일 후부터 형광현미경을 사용하여 수시로 형광발현을 관찰하여 AcDF 바이러스의 증식 상황을 확인하였다. 최종 6일 후 감염된 세포에서 최대의 형광을 발현함을 관찰하였고, 이 때 원심분리를 통하여 재조합 AcDF 바이러스를 수득 (재조합 바이러스 부피는 2 ml/well)하여 -80°C에서 보관하였다. #1부터 #6까지의 각 AcDF 바이러스가 감염된 세포는 분리하여 DICAM 단백질 발현 확인에 사용하였다. Figure 2A에서 보여준 것처럼 #1과 #2 플라스크로부터 유래한 재조합 AcDF 바이러스가 증식한 Sf9 세포의 경우 Western blot 결과 His에 대항하는 항체에 반응하는 것을 알 수 있었다. 나머지 4개의 플라스크 (#3 ~ #6)들은 #7의 비 감염 정상 Sf9 세포주와 동일하게 His 항체에 반응을 보이지 않는 것으로 보아 재조합 AcDF 바이러스 게놈 내에 DICAM 유전자를 포함하지 못한 바이러스로 확인되었다. 재조합 AcDF 바이러스를 통하여 곤충세포에서 발현된 DICAM 단백질의 크기는 Western blot 결과 약 51 kDa의 크기로 확인되었다. 이는 약 460개의 아미노산을 형성하는 재조합 DICAM 전체 유전자를 웹사이트 ([http://www.bioinformatics.org/sms/prot\\_mw.html](http://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html))에서 계산하고 확인한 예상 크기와 일치함을 알 수 있었다 (Fig. 2A).

#### 재조합 DICAM 단백질의 분리 및 정제 조건 확립

곤충세포인 Sf9 세포에서 발현된 재조합 DICAM 단백질의 분리 및 정제 조건을 확립하기 위하여 본 실험에서는 변성과 비 변성 형태의 두 가지 다른 분리 및 정제 방법을 사용하여 실험하였다. 우선 Sf9 세포를 T75 flask를 사용하여 배양하였다. 다음으로 각 플라스크에  $3 \times 10^6$  PFU의 #1 순수 분리주 재조합 AcDF 바이러스를 감염하여 6일 동안 배양하였다. 이후 재조합 AcDF 바이러스 상층액은 분리하여 4°C에 보관하여 AcDF 재감염에 사용하였다. 세포 침전물은 MagExtractor-His-tag kit를 사용하여 재조합 단백질의 분리 및 정제를 시도하였다. 최종 용출 부피는 각 90  $\mu$ l가 되었으며, 각각의 농도는 498 ng/ $\mu$ l와 579 ng/ $\mu$ l를 나타냈다.

이상에서 분리된 재조합 DICAM 단백질을 확인하기 위해 Western blot을 실시하였다. 우선 DICAM 단백질이 발현 후 세포 외로 분비되는지 확인하기 위한 세포배양액 시료, 변성과 비 변성의 형식을 알기 위해 두 가지



**Figure 2. Western blot analysis of DICAM protein induction in Sf9 cells infected with the recombinant AcDF baculovirus.**

**A.** For the selection of AcDF with DICAM, 6 different AcDF infected Sf9 cells were harvested at 6 days post infection and then examined for DICAM protein expression using anti-His-Ab (see Materials and Methods). Positions and molecular weights of protein size markers are indicated on the right (51 kDa; black bar). From Lane 1 to Lane 6 are represent #1 plaque and #6 plaque, respectively. Lane 7; Non-infected Sf9 cells.

**B.** For the confirmation of recombinant DICAM protein purification condition, #1 selected recombinant AcDF from A was infected in Sf9 cells and harvested at 6 days post infection. Positions and molecular weights of protein size markers are indicated on the right (51 kDa; black bar). Lane 1; Culture media, Lane 2; Insoluble, Lane 3; Soluble, Lane 4; Beads after purification, and Lane 5; Mock.

다른 방식으로 분리한 각 시료, 용출조건 유무를 확인하기 위한 시료로서 용출 후의 자성 구슬, 그리고 마지막으로 mock으로 나누어 실시하였다. Figure 2B에서 보여준 것처럼 세포외부로 분비되는 재조합 DICAM 단백질은 없는 것으로 보인다 (Lane #1). 다음으로 두 가지의 서로 다른 방법으로 정제한 실험에서 용출된 단백질의 양적인 차이는 있지만, 두 가지 모두 정제가 가능한 것으로 확인되었다 (Lane #2와 #3). 마지막으로 자성 구슬을 실험한 결과는 다량의 재조합 단백질이 완전히 용출되지 못하고 여전히 결합되어 있음을 확인할 수 있었다 (Lane #4).

## 고 찰

BEVS는 현재 진행발현계 가운데 가장 강력한 발현 체계를 갖고 있기에 다양한 방면에서 응용이 가능한 주요 발현 체계 가운데 하나이다 (1, 8). 원핵세포계를 이용한 단백질 발현 체계는 고유의 단백질과 다른 특성의 단백질을 발현하는 예가 종종 발생하게 되는 단점을 가지

고 있다 (9). 그러나 BEVS를 이용할 경우 진행세포를 발현 체계로 이용하게 됨으로써 고유의 단백질과 발현된 재조합 단백질이 거의 비슷한 특성을 지니게 되어 원핵세포계를 이용한 발현 체계의 한계를 극복할 수 있다 (10, 11). 동물세포를 이용한 발현 체계와 비교하였을 때 역시 목적 단백질의 생산성 측면에서 장점이 있기에 최근 BEVS를 이용한 재조합 단백질 발현 체계에 대한 관심이 증대되고 있다.

DICAM 유전자는 type I 막관통 단백질 그룹의 특성을 가지는 유전자로서 Jung 등의 보고에 따르면, 전체는 2,192 bp의 유전정보를 가지고 442개의 아미노산으로 번역이 된다. 현재까지 알려진 기능은 세포간 결합에 작용하는 것으로 알려져 있고, 세포막뿐 아니라 특이적으로 세포핵에서도 일부 기능을 가지고 nuclear matrix에 연관되어 핵산에 결합하는 일부 기능이 보고되었기에 정확한 기능에 대한 더 많은 연구가 필요한 실정이다 (7). 본 연구를 통하여 전체 DICAM 유전자 cDNA (1,346 bp)는 재조합 벡로 바이러스 polh 프로모터에 의하여 발현되도록 디자인하였다. 이 경우 목적하는 단백질이 재조합 바이러스가 감염된 세포에서 총 단백질의 50% 정도까지 발현이 가능하다는 장점이 있다 (1~3, 11~13). 바이러스 벡터인 pBAC-DF와 AcNPV 계통을 Sf9 세포에 최초 도입 후 증식하는 재조합 바이러스들은 목적 단백질인 DICAM을 바이러스 계통 내에 포함하는 AcDF와 그렇지 않은 경우가 혼재되어 있다. 따라서 목적 단백질 발현 효율을 증가시키기 위하여 DICAM 유전자가 계통 내에 삽입되어 있는 재조합 AcDF 바이러스만을 순수하게 선별하여야 한다 (1, 2). 최초 감염 및 증식된 바이러스를 이용하여 바이러스 역가를 측정하였고, 6개의 플라크를 선별하였으며, 이 가운데 2개의 바이러스가 AcDF 재조합 바이러스로 확인되었다. 또한 본 연구에서는 목적하는 단백질의 분리 및 정제를 간편화하기 위하여 목적 단백질의 C-말단에 6개의 His가 첨가되도록 디자인하였다. 그러나, 연구 결과에서 보여지듯 용출 후 다량의 단백질이 여전히 자성 구슬에 결합되어 있음을 알 수 있었다. 향후 목적 단백질의 수득 효율을 높이기 위하여 용제 (Tween-20 또는 Triton X-100 등)를 첨가하는 방식을 적용함으로써 용출 방법을 개선하는 노력이 필요한 것으로 판단된다.

재조합 단백질 생산에서 가장 중요한 요소 가운데 하나는 목적 단백질의 당사슬 첨가 (glycosylation)이다

(8~11). 이유는 목적 단백질이 작용하기 위하여 정확한 활성을 가질 수 있는지가 재조합 단백질 생산에 있어서 결정적으로 중요한 요인이 되기 때문이다. 이 때문에 당사슬 첨가 문제에 있어서 곤충세포 발현 체계를 이용할 경우 당사슬의 첨가가 전혀 일어나지 않는 대장균에 의한 방법 또는 매우 긴 사슬이 결합하게 되는 효모, 그리고 척추동물에는 없는 당사슬 첨가가 일어나는 식물을 이용한 발현 체계보다 동물에서 생산되어지는 단백질과 유사한 당사슬 첨가가 이루어지도록 하는 것이 본 연구에서 사용한 곤충세포 발현 체계의 장점이다 (8~11). 물론 동물세포를 이용한 발현 체계의 경우가 가장 유사한 당사슬 첨가 현상을 가지는 것이 사실이나, 발현의 비용 및 효율적인 측면을 고려하였을 때 곤충세포를 이용한 재조합 단백질 생산 방법보다 크게 우수한 장점은 아니다. 또한 현재까지도 BEVS를 이용한 발현 체계에서 정확한 당사슬 첨가가 이루어지지 못하는 단점을 극복하기 위한 노력이 계속되고 있으며, 하나의 해결 방법으로서 BEVS를 이용한 목적 단백질의 생산 시 척추동물의 당사슬 첨가 효소인 glycosyltransferase를 첨가하는 방법도 도입되어 어느 정도 이 문제에 대한 해결 가능성이 확인되었다 (14~17). 따라서 본 연구에서 생산된 목적 단백질인 재조합 DICAM 단백질의 경우 향후 고유의 척추동물에서 생산되는 단백질과 비교하여 당사슬 첨가에 대한 검증이 필요하며, 정확한 목적 단백질의 기능 연구를 위하여 척추동물의 glycosyltransferase가 이미 도입된 Sf9 형질전환 세포주 (16, 17)를 사용하여 재조합 AcDF를 발현하는 방식의 개선 역시 필요할 것으로 사료된다.

이상에서 보여준 것과 같이 최근 밝혀진 DICAM 유전자를 BEVS를 이용하여 발현 및 정제하여 세포에서 기능 규명 연구와 응용 연구에 사용하고자 본 연구를 수행하였다. 따라서 본 연구과정을 통하여 발현 및 정제된 재조합 DICAM 단백질은 생체 내에서 발현된 고유의 단백질과 거의 유사한 재조합 단백질의 특성을 지니게 되어 보다 정확한 기능 연구 및 응용 연구에 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

#### Acknowledgement

The authors are grateful to Tae-Won Goo (National Academy of Agricultural Science, Suwon, Korea) for the kind gift of pBAC gus4X-EGFP plasmid DNA. We thank Waterborne Virus Bank for the technical support of real-time RT-PCR work.

#### 참 고 문 헌

- Hitchman RB, Possee RD, King LA. Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect cells. *Recent Pat Biotechnol* 2009;3:46-54.
- O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA. Baculovirus expression vectors: A laboratory manual. New York: Oxford University Press, 1994.
- Philipps B, Forstner M, Mayr LM. A baculovirus expression vector system for simultaneous protein expression in insect and mammalian cells. *Biotechnol Prog* 2005;21:708-11.
- Park SW, Lee HK, Kim TG, Yoon SK, Paik SY. Hepatocyte-specific gene expression by baculovirus pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289:444-50.
- Aucoin MG, Jacob D, Chahal PS, Meghrou J, Bernier A, Kamen AA. Virus-like particle and viral vector production using the baculovirus expression vector system/insect cell system: adeno-associated virus-based products. *Methods Mol Biol* 2007;388:281-96.
- Bishop DHL, Entwistle PF, Cameron IR, Allen CJ, Posse RD. Field trials of genetically engineered baculovirus pesticides. In: Sussman M, Collins FA, Skinner FA, Stewart-Tull DE, editors. *The Release of Genetically Engineered Microorganisms*. New York: Academic Press; 1998. p.143-79.
- Jung YK, Jin JS, Jeong JH, Kim HN, Park NR, Choi JY. DICAM, a novel dual immunoglobulin domain containing cell adhesion molecule interacts with alphavbeta3 integrin. *J Cell Physiol* 2008;216:603-14.
- Fraser MJ. The baculovirus-infected insect cell as a eukaryotic gene expression system. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992; 158:131-72.
- Lebacq-Verheyden AM, Kasprzyk PG, Raum MG, Van Wyke Coelingh K, Lebacq JA, Battey JF. Posttranslational processing of endogenous and of baculovirus-expressed human gastrin-releasing peptide precursor. *Mol Cell Biol* 1988;8:3129-35.
- Hollister J, Conradt H, Jarvis DL. Evidence for a sialic acid salvaging pathway in lepidopteran insect cells. *Glycobiology* 2003;13:487-95.
- Jarvis DL. Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production. *Virology* 2003;310:1-7.

- 12) Weyer U, Possee RD. A baculovirus dual expression vector derived from the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin and p10 promoters: co-expression of two influenza virus genes in insect cells. *J Gen Virol* 1991;72: 2967-74.
  - 13) Kim JY, Choi JW, Park SW, Lee SG, Kim JM, Jheong WH, *et al.* Purification of protein expressed from three different regions of Norovirus (NoV). *J Bacteriol Virol* 2008;38:235-7.
  - 14) Chang GD, Chen CJ, Lin CY, Chen HC, Chen H. Improvement of glycosylation in insect cells with mammalian glycosyltransferases. *J Biotechnol* 2003;102:61-71.
  - 15) Morais VA, Costa MT, Costa J. N-glycosylation of recombinant human fucosyltransferase III is required for its *in vivo* folding in mammalian and insect cells. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1619:133-8.
  - 16) Palomares LA, Joosten CE, Hughes PR, Granados RR, Shuler ML. Novel insect cell line capable of complex N-glycosylation and sialylation of recombinant proteins. *Biotechnol Prog* 2003; 19:185-92.
  - 17) Yun EY, Goo TW, Kim SW, Choi KH, Hwang JS, Kang SW, *et al.* Galatossylation and sialylation of mammalian glycoproteins produced by baculovirus-mediated gene expression in insect cells. *Biotechnol Lett* 2005;27:1035-9.
-