

유전자 클로닝 기법에 의한 유전자 전달체의 생산

Production of Gene Carriers Using Gene Cloning Technology

오빛나 · 이민형 | Binna Oh · Minhyung Lee

Department of Bioengineering, College of Engineering, Hanyang University
17 Haengdang-dong, Seongdong-gu, Seoul 133-791, Korea
E-mail: minhyung@hanyang.ac.kr

1. 서론

유전자 치료는 치료유전자를 세포 안으로 전달하여 질병을 치료하는 방법을 말한다. 현재 혈우병 등의 유전병 이외에도 암, 심장병 등 다양한 후천적 질병에 유전자 치료를 적용하기 위하여 많은 연구가 진행되고 있다. 유전자 치료는 크게 다음과 같이 분류될 수 있다. 1) 치료유전자를 세포 안으로 전달하여 치료단백질을 발현시키는 방법, 2) 변이된 유전자를 정상유전자로 바꾸거나 정상적으로 작동하도록 바꿔주는 방법, 3) 특정 유전자의 발현을 조절할 수 있는 유전자를 이용하여 원하는 유전자를 활성화시키거나 억제시키는 방법, 4) 질병을 유발하는 유전자를 억제하는 방법 등이 있다.

이러한 치료목적을 달성하기 위해서는 인체에 무해하고, 효율이 우수한 유전자 전달체가 개발되어야 한다. 유전자 전달체는 바이러스성 전달체와 비바이러스성 전달체, 크게 두 그룹으로 대별된다.¹ 바이러스성 전달체는 바이러스의 감염 및 세포 내 이동 기전을 이용하므로, 가장 효율적인 유전자 전달체로 사용되고 있으나 대량생산에 어려움이 있고 생산비용이 많이 드는 단점을 가지고 있다. 바이러스성 전달체는 그 종류에 따라 각기 다른 특성을 가지고 있다. 아데노바이러스 벡터 등은 세포 내로의 유전자 전달 효율이 높은 장점을 가진 반면 면역반응을 유발하여 오랜 시간 동안 투여하기에는 어려움을 가지고 있으며, 레트로 바이러스 벡터 등은 장기간에 걸친 유전자 발현효과를 얻을 수 있으나, 바이러스가 감염 세포 내 염색체에 삽입되어 돌연변이를 유발하고, 암을 유발할 수 있는 단점을 가지고 있다.

비바이러스성 전달체는 면역반응에서 상대적으로 안전하고, 반복투여가 가능하다. 또한, 전달체의 대량생산이 가능하며 비용이 적게 드는 등의 장점을 가지고 있다. 그러나 바이러스성 전달체에 비해서 세포 내 전달 효율이 떨어지는 단점을 가지고 있다.² 이러한 비바이러스성 전달체 종류로는 양이온성 리포솜과 고분자 등이 있다.¹ 이들 리포솜 및 고분자들은 유전자와 고분자 전달체가 복합체를 형성함으로써 분해효소들로부터 유전자를 보호하고, 복합체의 표면이 양전하가 되도록 하여 음전하를 띠는 세포표면으로 효과적으로 접근하도록 하는 이점을 가지고 있다. 현재 유전자 전달을 위해 연구되고 있는 다양한 고분자 전달체 중에서, 많은 연구자들은 펩타이드를 유전자 전달체로서 사용하기 위하여 많은 노력을 하고 있다.³

Author



오빛나

2011
2011-현재
건국대학교 생명과학과(학사)
한양대학교 생명공학과
(석사과정)



이민형

1992
1994
1999
1999-2002
2002-2003
2003-2005
2005-현재
서울대학교 화학과(학사)
서울대학교 화학과(석사)
서울대학교 화학과(박사)
유타대학교 약대 박사후 연구원
유타대학교 약대 연구조교수
인하대학교 의대 전임강사
한양대학교 생명공학과 조교수/부교수

양이온성 펩타이드를 유전자 전달체로서 사용할 경우 다음과 같은 장점을 가지고 있다. 첫째, 펩타이드 전달체의 경우 핵산과 전기적 인력을 통하여 복합체를 형성하고, 핵산을 응축하여 작은 크기의 입자를 만들어 낼 수 있다. 둘째, 펩타이드 전달체에 수용체 특이적 리간드를 접합하면, 수용체에 특이적으로 결합하여 수용체 특이적 엔도사이토시스를 통해 효율적으로 유전자를 세포 내로 전달할 수 있다.⁴⁻⁶ 셋째, protein transduction domain(PTD)로부터 유래한 펩타이드 서열은 핵산-전달체 복합체가 엔도솜에서 라이소솜으로 가는 경로를 통해 복합체가 분해되는 것으로부터 벗어날 수 있도록 하여 유전자 전달 효율을 높인다.^{7,8} 넷째, Simian virus 40(SV40) large T antigen 등에서 유래한 짧은 nuclear localization signal(NLS) 펩타이드는 핵산-전달체 복합체를 핵으로 이동시켜 유전자가 더 많이 발현되도록 유도하는 장점을 가지고 있다.^{9,10}

짧은 펩타이드는 화학적 합성을 통하여 쉽게 대량으로 생산될 수 있다. 그러나 유전자 전달에 사용되는 펩타이드 중 몇몇 종류는 핵단백질에서 유래한 펩타이드로서 아미노산의 수가 100개가 넘는 긴 펩타이드로 구성되어 있다. 이러한 긴 펩타이드의 경우는 화학적 합성이 어려우므로, 생물학적 방법을 통하여 생산이 가능하다. 이 논문에서는 이러한 펩타이드 유전자 전달체에 대하여 기술하고, 더불어 유전자 클로닝 기법을 이용하여 이들을 생산하는 방법을 실례를 들어 설명하고자 한다.

2. 유전자 클로닝 기법을 이용하여 생산된 유전자 전달용 펩타이드

유전자 클로닝 기법을 이용하여 생산된 유전자 전달용 펩타이드에는 high mobility group box-1 A box(HMGB-1A), high mobility group box-2(HMGB-2), histone 등이 있는데 이들 모두 세포 핵에서 유래된 내인성 단백질들이다. 내인성 단백질을 유전자 전달체로 사용하게 되면 다음과 같은 장점이 있다. 첫째, 세포핵 유래의 내인성 단백

질들은 핵 안에서 DNA와 결합하여 chromatin 구조를 형성하는 단백질들이다. 따라서, 양이온성 단백질의 특징인 arginine과 lysine을 높은 비율로 가지고 있다.¹¹ 이러한 양이온성에 기인하여 전달될 핵산과 안정된 복합체를 형성할 수 있다. 둘째, 세포 유래 단백질로서, 합성 고분자에 비해 독성이 적을 뿐만 아니라 면역반응을 유발하지 않는다. 셋째, DNA 재조합기술을 이용하여 타겟 단백질에 융합 단백질 또는 기능성 펩타이드를 접합하여 효율이 개선된 유전자 전달체를 만들어 낼 수 있다. 넷째, 핵으로부터 유래한 핵 단백질들은 자체적으로 NLS를 가지고 있다. 따라서, 세포핵 내 전달 효율을 높임으로서 유전자 발현을 증가시킬 수 있다. 이러한 유전자 전달용 펩타이드의 각각의 특징은 다음과 같다.

2.1 High Mobility Group Box-1

High mobility group box-1(HMGB-1)은 핵과 세포질에 많이 들어 있는 non-histone 단백질로서 3개의 도메인으로 구성되어 있다.¹² HMGB-1은 chromatin 구조를 형성하는 단백질로 알려져 왔을 뿐만 아니라, 특정 유전자들에서 transcription factor 들의 결합을 조절하여 유전자의 발현을 조절하는 역할을 수행하는 것으로도 알려졌다.¹³ 또한, 세포 밖으로 HMGB-1이 분비되었을 경우에는, pro-inflammatory cytokine으로 작용하여 염증반응을 유발시키는 것으로 알려졌다.¹⁴ HMGB-1은 패혈증, 류마티스 등의 염증성 질병에서 염증을 유발하는 주된 인자로 확인되었으며, 뇌졸중, 심근허혈 등의 허혈성 질병에서도 염증반응을 유발하는 인자로 알려졌다.¹⁵⁻¹⁸ 특히, 허혈성 질병에서는 괴사된 세포로부터 유출된 HMGB-1이 Toll-like receptor(TLR) 및 receptor for advanced glycation end product(RAGE)에 결합하여, 염증 반응을 유도한다.¹⁹

HMGB-1의 3개의 도메인은 양전하를 갖고 있는 A box와 B box 그리고, 음전하를 갖고 있는 c-말단이다(그림 1). 특히, c-말단 부분은 다수의 aspartate를 갖고 있어 음전하를 띤다. 이 3개의 도메인 중 양전하를 띠고 있는 A box와 B box는 음전하를 띠고 있는 핵산과 전기적 상호작용을 통해 핵산/전달체 복합체를 형성할 수 있다. 그러나, c-말단 부분은 음전하를 띠고 있는 다수의 aspartate를 갖고 있어 핵산의 결합을 방해할 수 있다. 따라서 HMGB-1을 유전자 전달체로 이용하기 위해서는 c-말단 부분을 제거할 필요가 있다. 이렇게 c-말단을 제거하여 만들어진 HMGB-1 box A and B(HMGB-1AB)는 플라스미드 DNA와 안정한 복합체를 형성할 수 있었으며, poly-L-lysine과 유사한 유

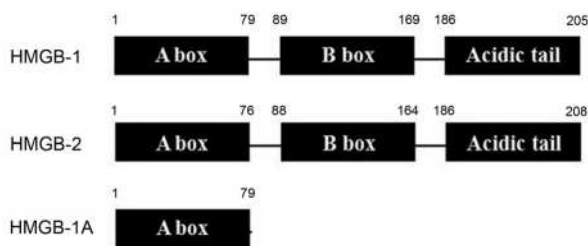


그림 1. HMGB-1, HMGB-2, HMGB-1A의 구조.

전자 전달 효율을 보였다.²⁰

HMGB-1은 세포 밖에서 pro-inflammatory cytokine으로 작용하는 문제점이 있다. HMGB-1의 수용체 결합부위는 B box에 존재하고 있으며, B box는 염증을 유발하는 기능을 가지고 있다. 그러므로 B box를 제거한 HMGB-1을 생산하면, 염증유발의 문제를 피할 수 있다. 실제로 B box를 제거한 HMGB-1 A box(HMGB-1A)는 wild-type의 HMGB-1의 염증 유발 기능을 억제하여 항염증 효과를 가지는 것으로 보고되었다.²¹ 이러한 기능 때문에 HMGB-1A를 뇌졸중 등의 치료 단백질로도 사용이 가능함이 제시되었다.²² 그러므로 HMGB-1A는 유전자 전달기능 뿐만 아니라 항염증 효과를 지닌 다기능성 펩타이드로 이용될 수 있다. 본 연구실에서는 HMGB-1A를 유전자 재조합 방법을 이용하여 생산하였으며, 이를 이용하여 대식세포에서 TNF- α 의 분비를 억제할 수 있음을 확인하였다.²³ 또한, HMGB-1A는 DNA나 siRNA 등의 핵산과 결합하여, 세포 내로 전달할 수 있음을 확인하였다.

HMGB-1A는 87개의 아미노산으로 구성된 펩타이드로서, 18개의 양이온성 아미노산과 10개의 음이온성 아미노산을 포함하고 있다. 따라서, 순수 전하는 +8로서, 비슷한 크기의 PLL보다 훨씬 작은 양전하를 가지고 있다. HMGB-1A는 HMG box의 일반적인 특징을 가지고 있는데, double strand DNA와 안정된 결합을 하며 이러한 DNA와 HMG box간의 결합 구조는 x-ray crystallography를 통하여 밝혀져 있다.²⁴ HMGB-1A는 DNA의 minor groove 쪽으로 주로 결합하며, 이 결합은 전기적 결합 이외에도, HMGB-1A 내의 소수성 아미노산과 DNA의 base 간의 소수성 결합을 포함하고 있다.

본 연구실에서는 추가적으로 PTD인 TAT를 HMGB-1A에 연결하여, DNA 재조합법으로 TAT-HMGB-1A를 생산하였다. TAT-HMGB-1A는 유전자를 좀더 효율적으로 세포 안으로 전달할 수 있어서, 유전자 전달의 효율을 개선할 수 있다.²⁵ 이렇듯 유전자 재조합 기술을 통하여 다양한 기능성 펩타이드를 HMGB-1A에 연결할 수 있는데, 본 연구실에서는 artery wall binding peptide(AWBP) 또는 VEGF receptor binding peptide(VRBP)가 연결된 HMGB-1A를 제조하였다.^{4,6} AWBP-HMGB-1A는 혈관내피세포에 높은 효율로 유전자를 전달하였으며, VRBP-HMGB-1A는 허혈성 혈관내피세포에 정상 혈관내피세포보다 높은 효율로 유전자를 전달하였다. 이렇듯 유전자 재조합 방법을 이용하여 이러한 특정 리간드를 붙여서 클로닝을 함으로써, 복잡한 서열의 펩타이드도 효율적으로 생산할 수 있다.

2.2 HMGB-2

HMGB-2도 HMGB-1과 유사한 구조를 가지고 있다 (그림 1). A box 와 B box, 그리고 음전하를 가지고 있는 acidic c-말단부분이다. HMGB2를 유전자 전달체로서 이용하기 위하여 유전자 클로닝 기법을 통해 HMGB-2의 A box, B box(1번~186번 아미노산) 부분을 발현하여 정제하였다.²⁶ 이 HMGB-2186은 DNA에 결합하여 안정된 복합체를 형성할 수 있으며, 이 복합체는 세포표면과의 높은 정전기적 친화성을 가지고 있어, 유전자 전달체로서의 기본 능력을 충족하였다. HMGB-2186은 기본적으로 lipofectamine보다 우수한 유전자 전달효율을 보여준다. HMGB-1과 마찬가지로, PTD인 TAT를 유전자 재조합을 통하여 HMGB-2에 접합하였을 때, 세포 내로의 이입효과가 증가하여 유전자 전달 효율을 개선할 수 있었다. HMGB-2도 HMGB-1과 유사하게 A box와 B box에 NLS 부분을 포함하고 있다. 그러나 SV40 large T antigen에서 유래된 NLS를 추가로 HMGB-2186에 연결한 융합 펩타이드를 제조하였을 때, NLS-HMGB-2186은 더 높은 유전자 전달 효율을 보였다. 이것은 HMGB-2 내의 NLS 단독으로는 세포 내 전달능력이 충분하지 않고, 추가적인 NLS를 통해서 핵으로의 유전자 전달을 보다 촉진할 수 있다는 것을 의미하기도 한다. 이외에도 importin- β -binding domain(IBM)을 융합한 펩타이드를 제조하였을 때도, 유전자 전달 효율을 증가시키는 것이 확인되었다. 이 유전자 전달 효율의 개선은 엔도사이토시스의 효율 개선과는 관계가 없고, 주로 핵으로의 유전자 전달 효율이 개선된 것에 기인한다. 그러나 SV40 large T antigen과 IBM는 다수의 lysine과 arginine을 가지고 있어서, HMGB-2186의 양이온성을 강화시키는 효과도 있다. 따라서, DNA와의 복합체가 보다 안정화되는 효과를 가짐으로써 유전자 전달 능력을 증진시킬 가능성도 있다.

2.3 Histone H1

Histone H1은 inter-nucleosome DNA 결합 단백질로서, 유전자 전달을 위한 전달체로 관심을 받아왔다. Histone H1은 DNA에 결합하여 안정된 복합체를 형성하고 핵산 분해효소로부터 DNA를 보호할 수 있다.^{11,27} 또한, CaCl₂ 및 클로로퀸의 존재 하에서 세포 내로 이입된 histone H1/DNA 복합체는 핵으로의 유전자 전달 효과를 증진시킬 수 있었다. 그러나 histone H1만으로는 충분한 유전자 전달 효과를 얻기는 어려웠는데, 이러한 이유에서 H1을 유전자 클로닝 기법을 이용하여 변형하려는 시도들이 있었다. 특히, histone H1의 c-말단부분이 DNA를 응축시키는 역할

을 하며, 이러한 능력이 세포 내 전달 효율을 높인다.²⁸ 여기에 SV40 large T antigen NLS를 융합한 펩타이드를 결합한 histone H1은 본래의 H1의 유전자 전달 효율을 개선하였다. 또한, 다른 연구에서는 human linker histone H1.4를 DNA 재조합법을 이용하여 여러 조각으로 나누어 발현하고 정제하여, 그 중에 유전자 전달 효율이 높은 조각을 스크리닝하였다.²⁹ 그 중에 277~657번 아미노산으로 구성된 H1.4F 조각이 가장 우수한 효과를 보여주었으며, 이것은 lipofectamine보다 우수한 유전자 전달 효율을 가지고 있다. 뿐만 아니라 H1.4F는 DNA 외에도 siRNA 전달에서도 우수한 효과를 보여주어 유전자 전달분야에서 다양한 응용성을 보여주었다.²⁹

3. 유전자 클로닝을 통한 유전자 전달용 펩타이드 생산

유전자 전달용 펩타이드는 유전자 클로닝 기법을 이용하여 생산해 낼 수 있으며, 다음 3단계로 이루어진다: 1) 목적유전자 cDNA 클로닝 및 발현벡터의 제조, 2) 펩타이드 과발현 조건의 확립 및 과발현된 펩타이드의 정제, 3) 정제된 펩타이드의 특성 확인. 여기서는 본 연구실에서 개발한 HMGB-1A의 생산과정을 예를 들어 설명하고자 한다.

3.1 목적유전자 cDNA 클로닝 및 발현벡터의 제조

먼저 제조하고자 하는 펩타이드에 발현할 수 있는 cDNA를 확보하여야 한다. 목적 cDNA의 확보는 cDNA 라이브러리 스크리닝 등을 통하여 할 수 있으나, 이미 염기서열 정보를 알고 있는 cDNA는 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)을 통하여 간단히 확보할 수 있다. 본 연구실에서는 HMGB-1AB cDNA를 확보하기 위하여 mRNA에 해당하는 특정 primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR은 human embryonic kidney 293(HEK293) 세포에서 얻어진 total RNA를 template로 이용하여 수행되었다. 사용된 primer의 서열은 다음과 같다. Forward primer: 5'-CCGGAATTCATGGGCAAAGGAGATCCTAAG-3', backward primer: 5'-CCCAAGCTTGTAGTTTTCATTTCTCTTTC-3'. 유전자 클로닝의 편의성을 위하여, EcoRI과 HindIII 자리(밑줄)를 각각의 primer에 도입하였다. RT-PCR 결과 얻어진 약 500 bp의 cDNA 조각을 pET21a 벡터의 EcoRI과 HindIII 자리에 삽입한 후, pET21a-HMGB1AB를 제조하였다. pET21a-HMGB1AB는 DNA sequencing을 실시하여 얻어진 cDNA를 염기서열을 확인하였다. 이 HMGB-

1AB cDNA는 A box와 B box를 모두 포함한 것으로서, 유전자 전달효과가 PLL보다 우수하였다. 앞서 설명한 바와 같이 B box는 염증을 유발할 수 있는 도메인으로서 유전자 전달체로서의 안전성에 문제가 있다. 따라서, 본 연구실에서는 A box만을 얻기 위하여, PCR을 실시하였다. 이 때 사용된 primer는 다음과 같은 염기서열을 가지고 있다. Forward primer: 5'-CCGGAATTCATGGGCAAAGGAGATCCTAAG-3', backward primer: 5'-CCCAAGCTT TTTTGTCTCCCTTTGGG-3'. Forward primer는 앞서 사용된 forward primer와 동일하며, 유전자 클로닝의 편의성을 위하여 EcoRI과 HindIII 자리(밑줄)를 각각의 primer에 도입하였다. PCR결과 얻어진 DNA 조각은 단백질 발현벡터인 pET21a에 삽입되었다(그림 2). 발현벡터는 목적 펩타이드의 발현 후, affinity chromatography를 통하여 정제를 하기 위해, 적절한 ligand가 융합단백질로 발현되도록 구성되어 있다. pET21a는 발현되는 펩타이드의 c-말단에 6개의 histidine이 목적 단백질에 융합단백질로서 발현되도록 구성되어 있다. 따라서, 펩타이드의 발현이 시작되는 start codon에서부터 c-말단의 histidine들이 적절히 발현될 수 있도록, cDNA 삽입되는 위치를 검토하여 reading frame이 유지되도록 해야 한다. 제조된 발현벡터는 DNA sequencing을 통하여, cDNA가 정확한 염기서열을 가지고 있는지 반드시 확인하여 mutant가 발현되지 않도록 주의해야 한다.

3.2 펩타이드 과발현 조건의 확립 및 펩타이드의 정제

제조된 pET21a-HMGB-1A는 펩타이드의 발현을 위하여 Escherichia coli BL21에 주입한다. pET21a는 lac operon

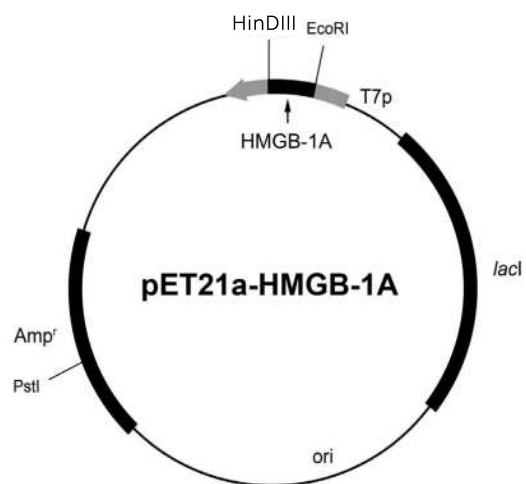


그림 2. HMGB-1A 발현벡터.

에 의해서 단백질의 발현이 조절된다. 따라서, 배지 내 박테리아 밀도를 적절한 정도까지 배양하고, 이후 IPTG를 배양액에 가하여, lac operon을 활성화시켜 펩타이드의 과발현을 유도한다.

각 펩타이드의 발현은 박테리아 밀도, IPTG의 농도, 박테리아 배양 온도, 시간 등 여러 조건에 따라 효율이 달라진다. 따라서, 펩타이드의 최적화된 발현 조건을 찾기 위하여 위의 조건들을 스크리닝 하여야 한다. pET21a- HMGB-1A의 최적화된 발현을 위하여, 박테리아는 0.6-0.8 optical density(260 nm)까지 배양하였으며, 이후 500 mM의 농도로 IPTG를 첨가하였다. 이후, 37 °C에서 6시간 동안 배양하여 펩타이드의 과발현을 유도하였다. 배양 후에 박테리아는 적절한 완충용액 속에서 sonication을 이용, 세포막을 파괴하여 세포내 단백질을 용출한다. 유전자 전달용 펩타이드는 양이온성 아미노산을 가진 친수성 펩타이드이므로, 주로 침전되지 않고 수용액 상에 존재하는 경향성이 있다. 따라서, 다른 단백질보다 높은 수득율로 생산, 정제될 가능성이 높다.

HMGB-1A의 정제를 위하여, 본 연구실에서는 3단계의 chromatography를 실시하였다(그림 3). 각각 affinity chromatography, cationic exchange chromatography, polymyxin B chromatography이다.

Affinity chromatography는 nickel chelate resin을 이용하는데, 목표 펩타이드의 c-말단에 존재하는 6-histidine에 결합하여 단백질을 분리한다. Resin에 결합한 단백질은 imidazole gradient나 NaCl gradient를 이용하여 용출한다. HMGB-1A는 150 mM imidazole 용액을 이용하여 용출하였다. 일반적으로 유전자 전달을 위한 펩타이드는 HMGB-1A와 같이 양이온성을 띠고 있는 경우가 많다. 이 경우 정제 과정에서 박테리아 DNA와 펩타이드가 결합된 상태로 분리되는 경우도 있다. 그러나 HMGB-1A에 결합된 박테리아 DNA는 HMGB-1A의 유전자 결합력을 약화시키고, CpG motif에 의한 면역반응 유발 등 많은 문제를 야기할 수 있으므로, 반드시 제거되어야 한다. 그러므로 affinity chromatography 단계에서 urea 등을 이용하여, denature 조건에서 단백질을 정제하는 것이 유리하다.

많은 경우, affinity chromatography 만으로 높은 순도의 단백질을 얻을 수 있다. 그러나 HMGB-1A의 경우 일부 다른 단백질이 같이 정제되므로, 두번째 chromatography를 실시하였다. HMGB-1A의 양이온성에 근거하여, CM sepharose cationic exchange chromatography를 실시하였다. NaCl gradient를 이용하여 resin에 결합된 단백

질을 분리하였으며 HMGB-1A는 450 mM NaCl 용액으로 용출되었다.

의료용으로 이용되는 펩타이드의 경우는 특히 endotoxin의 오염을 주의하여야 한다. 박테리아에서 발현된 단백질들은 endotoxin의 오염 가능성이 높으므로, 이를 제거하기 위한 단계가 포함되어야 한다. HMGB-1A의 경우는 유전자 전달체일뿐 아니라, 그 자체로 항염증 효과를 가지는 펩타이드이다. 따라서 소량의 endotoxin도 항염증 효과를 교란하여 문제를 일으킬 수 있기 때문에 endotoxin의 제거는 매우 중요하다. 특히, 이 연구에서 개발된 HMGB-1A는 직접 뇌졸중 동물 모델에서 항염증 효과를 통하여 뇌경색의 완화에도 이용되었다. 그러므로 HMGB-1A의 생산

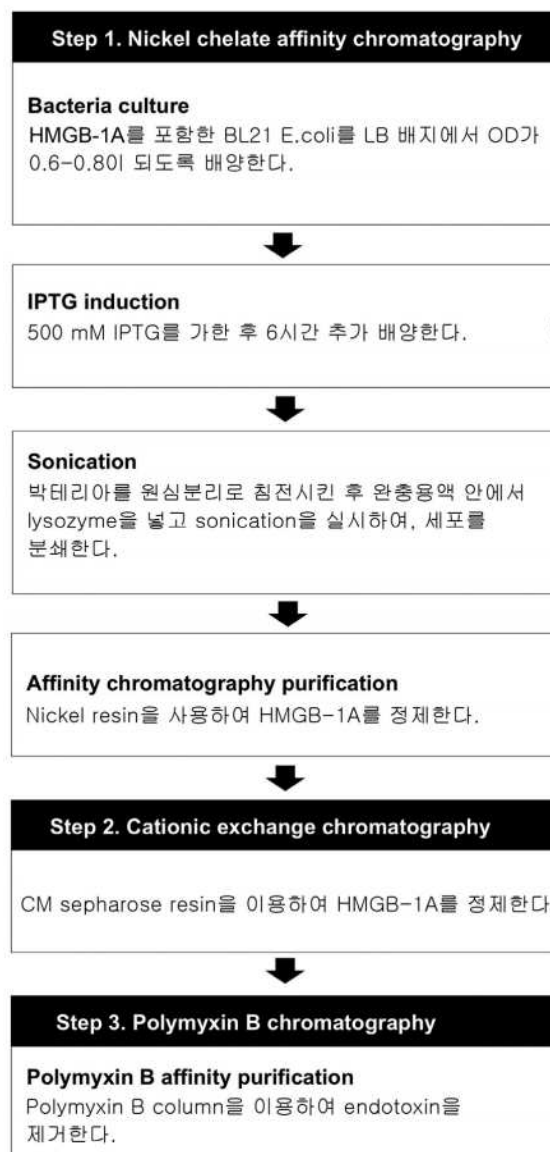


그림 3. HMGB-1A의 정제 과정.

에서 endotoxin의 제거는 매우 중요하다고 할 수 있다. 이를 위하여 polymixin B chromatography를 실시하여 endotoxin을 제거하였다. 최종적으로 polymixin B column에서 순수한 물로 펩타이드를 용출하였다.

3.3 정제된 펩타이드의 특성 확인 및 응용

정제된 펩타이드는 SDS-PAGE를 실시하여 단백질의 순도 및 정제 정도를 확인한다(그림 4). 이후 펩타이드의 유전자 전달 능력 검증은 일반 양이온성 고분자와 동일한 방법으로 실시한다. DNA와 HMGB-1A의 결합능력은 gel retardation assay, heparin competition assay 등을 이용하여 평가한다. Gel retardation assay는 DNA의 음전하가 결합된 양이온성 분자에 의해 가려지므로, DNA의 이동성이 gel electrophoresis에서 감소하게 된다. 결국 gel의 출발점에서 DNA가 전혀 이동하지 않게 되는데, 이러한 특성을 이용하여 DNA와 펩타이드의 결합능력을 평가한다(그림 5). Heparin competition assay는 DNA와 펩타이드의 복합체에 음전하를 갖고 있는 heparin을 가하여 실시하는데, heparin의 가해진 양이 증가함에 따라 점차 DNA를 대신하여 펩타이드에 결합하게 된다. 이 경우 분리된 DNA가 전기영동 상에서 점차 큰 이동성을 가지게 된다. 이외에도 dynamic light scattering을 통하여 복합체의 크기를 측정하기도 하며, 각종 전자현미경을 이용하여 복합체의 형태를 관찰하기도 한다.

HMGB-1A는 플라스미드의 전달 및 siRNA의 전달 등에 응용되었고, 또한 HMGB-1A의 펩타이드 고유의 특성을 이용하여 뇌졸중 동물모델에서 치료효과를 얻는데 이용되었다. 기존의 연구에서 두 개의 HMG box 단백질은

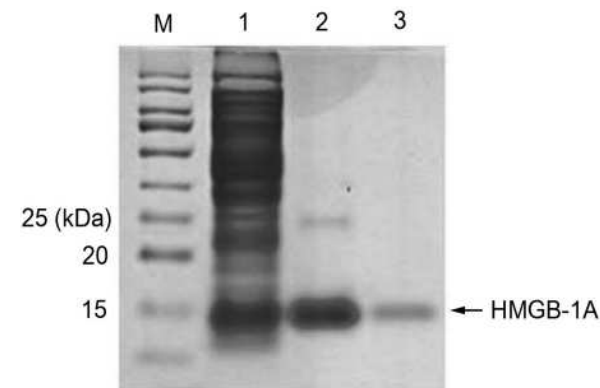


그림 4. 정제된 HMGB-1A의 SDS-PAGE 분석.
- M: Molecular weight marker
- Lane 1: IPTG induction 후 박테리아로부터 나온 crude lysates
- Lane 2: Nickel chelate affinity chromatography에 의해서 정제된 HMGB-1A
- Lane 3: Cationic exchange chromatography에 의해서 정제된 HMGB-1A

그림 4. 정제된 HMGB-1A의 SDS-PAGE 분석.

20 bp 정도의 double strand DNA에 결합한다는 것이 알려져 있다.²⁴ 이 크기는 siRNA의 크기와 매우 유사하며, siRNA와 안정된 복합체를 형성하여 효과적으로 전달할 가능성이 있다. 실제로 HMGB-1A는 플라스미드보다는 siRNA의 전달에 더 좋은 효과를 보여주었다. HMGB-1A의 플라스미드 전달 효과는 PLL과 유사하나, polyethylenimine (PEI, 분자량 25k)보다는 훨씬 낮다. 반면에 siRNA의 전달에서는 PEI와 유사한 결과를 보여주었다. 그러나 독성 평가에서는 HMGB-1A는 세포에 아무런 독성을 보여주지 않았다(그림 6). 반면, PLL과 PEI는 높은 독성을 가지고 있으므로, HMGB-1A와 같은 세포유래의 펩타이드의 안전성을 보여준다고 할 수 있다.

4. 결론 및 향후 전망

기존의 비바이러스성 전달체는 주로 합성 고분자 및 리포좀이 주종을 이루고 있다. 펩타이드 전달체도 기본적으로 화학적 합성이 가능한 작은 크기의 펩타이드를 주로 전

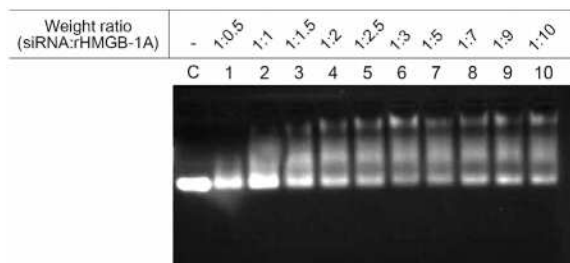


그림 5. Gel retardation assay: siRNA/HMGB-1A 복합체는 ethidium bromide가 들어있는 3% agarose gel에서 분석되었다. 고정된 양의 siRNA에 무게비를 달리하여 HMGB-1A를 추가하였다. 20분간 상온에서 방치하여 복합체 형성을 유도한 후, agarose gel에서 전기영동을 통하여 분석하였다.

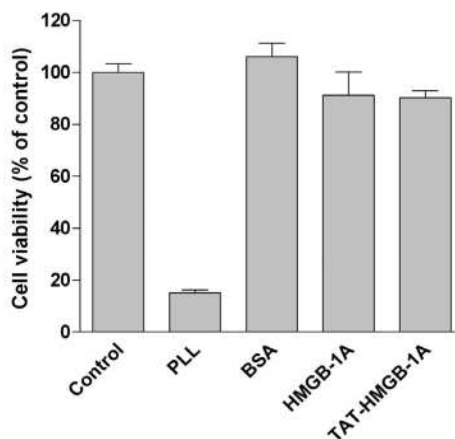


그림 6. Cytotoxicity assay: HMGB-1A와 TAT-HMGB-1A의 독성을 측정하기 위해서 MTT assay를 수행하였다. 그 결과 HMGB-1A와 TAT-HMGB-1A는 Raw264.7 cell에서 독성을 보이지 않았으나 PLL은 높은 독성을 보였다.

달체로서 사용해 왔다. 핵단백질과 같이 세포유래의 단백질들은 DNA와의 결합 능력 및 높은 안전성에도 불구하고 화학적 합성이 어려워 유전자 전달에 널리 이용되지 않았다. 유전자 클로닝 기법은 이러한 단백질의 대량생산을 가능하게 한다. 이렇듯 유전자 클로닝 기법에 의해 생산된 세포유래의 유전자 전달용 펩타이드 들은 그 자체로 DNA와 결합하여 유전자를 전달하는데 이용될 수 있을 뿐만 아니라, NLS 등을 포함하고 있는 특성 때문에 다른 고분자 및 리포솜과 연계하여 이들의 유전자 전달 효율을 개선하는 데에도 이용될 수 있다.³⁰

유전자 클로닝 기법을 이용한 유전자 전달용 펩타이드의 생산 방법은 여전히 몇 가지 단점을 가진다. 유전자 클로닝 기법에 의한 유전자 전달용 펩타이드의 생산 방법은 화학적 합성방법보다 길고 복잡한 과정을 거친다. 또한, 순수 펩타이드 결합으로만 연결되는 단순한 일자형 구조만 가능하다는 것과 아미노산이 아닌 다른 그룹들이 연결되지 못한다는 것은 유전자 클로닝 기법의 한계이다. 그러나 일단 생산 방법이 잘 정립되면, 유전자 전달용 펩타이드를 경제적으로 대량생산을 할 수 있는 방법을 확보할 수 있게 될 뿐만 아니라, DNA 재조합을 통하여 다양한 리간드 및 기능성 펩타이드를 연결한 융합단백질을 쉽게 만들어 낼 수 있다. 이와 같이 유전자 클로닝 기법은 다양하고 복잡한 기능의 유전자 전달용 펩타이드의 생산을 가능하게 한다. 따라서, 유전자 클로닝 기법은 앞으로의 지속적 연구를 통하여 보다 기능이 개선된 유전자 전달용 펩타이드의 개발에 기여할 것으로 기대된다.

참고문헌

1. H. C. Kang, M. Lee, and Y. H. Bae, *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **15**, 317 (2005).
2. M. Lee and S. W. Kim, *Pharm. News*, **9**, 407 (2002).
3. S. Abes *et al.*, *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 53 (2007).
4. J. S. Han, K. Kim, and M. Lee, *J. Cell. Biochem.*, **107**, 163 (2009).
5. N. Ma *et al.*, *Mol. Ther.*, **9**, 270 (2004).
6. J. S. Han *et al.*, *J. Cell. Biochem.*, **110**, 1094 (2010).
7. H. Hashida *et al.*, *Br. J. Cancer*, **90**, 1252 (2004).
8. L. Hyndman *et al.*, *J. Control. Release*, **99**, 435 (2004).
9. R. Cartier and R. Reszka, *Hum. Gene Ther.*, **9**, 157 (2002).
10. M. Keller *et al.*, *Chembiochem*, **4**, 286 (2003).
11. M. Kaouass, R. Beaulieu, and D. Balicki, *J. Control. Release*, **113**, 245 (2006).
12. J. O. Thomas, *Biochem. Soc. Trans.*, **29**, 395 (2001).
13. Y. S. Ji, Q. Xu, and J. F. Schmedtje, Jr., *Circ. Res.*, **83**, 295 (1998).
14. U. Andersson *et al.*, *J. Leukoc. Biol.*, **72**, 1084 (2002).
15. L. Ulloa and K. J. Tracey, *Trends Mol. Med.*, **11**, 56 (2005).
16. R. Pullerits *et al.*, *Arthritis Rheum.*, **48**, 1693 (2003).
17. J. B. Kim *et al.*, *J. Neurosci.*, **26**, 6413 (2006).
18. T. Kitahara *et al.*, *Cardiovasc. Res.*, **80**, 40 (2008).
19. M. A. van Zoelen *et al.*, *Shock*, **29**, 441 (2008).
20. K. Kim *et al.*, *Enzyme Microbial. Technol.*, **43**, 410 (2008).
21. R. Kokkola *et al.*, *Arthritis Rheum.*, **48**, 2052 (2003).
22. Y. C. Jin *et al.*, *Biomaterials*, **32**, 899 (2011).
23. S. Lee *et al.*, *J. Cell. Biochem.*, **113**, 122 (2012).
24. K. Stott *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **360**, 90 (2006).
25. K. Kim *et al.*, *Biotechnol. Lett.*, **30**, 1331 (2008).
26. A. Sloots and W. S. Wels, *FEBS J.*, **272**, 4221 (2005).
27. M. Bottger *et al.*, *Arch. Geschwulstforsch.*, **60**, 265 (1990).
28. J. D. Fritz *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, **7**, 1395 (1996).
29. I. Puebla *et al.*, *J. Biotechnol.*, **105**, 215 (2003).
30. Y. Shen *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **375**, 140 (2009).