

액체 크로마토그래피에 의한 Human Neutrophil Granular Proteases의 분리

고신대학 의학부 약리학교실

정혜영, 김사열, 강구일

Purification of Human Neutrophil Granular Proteases by Liquid Chromatography

Hye Young Jeong, Sa Youl Ghim, Kooil Kang

*Department of Pharmacology,
Kosin Medical College, Pusan, Korea*

= Abstract =

Human leukocyte elastases were purified by gel filtration and ion exchange-chromatography. For gel filtration step, Ultrogel AcA 54 gave extremely good resolution and separation for highly positive charged proteins. Ultrogel AcA 54 also showed excellent separation characteristics of two different size of highly positive charged molecules like elastase and cathepsin G.

Both CM-Cellulose and CM-Sephadex showed the possibility to separate the individual molecules of three isozymes. CM-Sephadex showed the better resolution for separation of individual isozyme without contamination of cathepsin G molecules.

I. 서 론

사람의 백혈구 protease가 폐기종, 염증, 류마티스 관절염 등의 진행과정에 깊이 관련되고 있음은 널리 알려진 사실이다.^{6,8)} 그러한 질병의 병리학적, 생리학적 규명을 위하여 백혈구 protease에 관한 근본적인 연구가 활발하게 진척되어 왔고, 특히 collagenase,^{11,12)} elastase,^{9,13)} cathepsin G¹⁴⁾ 등에 관한 연구가 집중적으로 이루어졌으며, 그 중 elastase는 기질특이성이 다양하므로^{3,15,16)} 크게 관심을 일으켜 왔다.

이 연구를 위하여서는 효소를 분리해야 하는 것이 필연적인 연구과정이며, 그 방법으로는 겔 여과법,^{13,15)} 이온교환 크로마토그래프,^{1,13,15)} 전기영동,¹³⁾ 염 분획법,^{1,5)} 친화성 크로마토그래프^{1,9,18)} 등이 개발되었다. 그러나 이러한 분리방법들은 그 순도가 떨어지고 효율적인 분리가 이루어지지 않아서 본 실험에서는 고순도의 백혈구 elastase를 대량 생산할 수 있는 효율적인 방법을 찾기 위하여 첫 단계로서 Sephadex G-75와 Ultrogel AcA 54를 이용한 겔 여과법을 적용하였고, 두번째로 CM-Sephadex와 CM-Cellulose 이온교환 크로마토그래프를 시행하여 그 결과를 보고하고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

Sephadex G-75와 CM-Sephadex C-25는 Pharmacia사 제품, CM-Cellulose, N-Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanyl-p-nitroanilide(SANA), N-Benzoyl-DL-phenyl-alanine- β -naphthylamide(BPNE), Fast Garnet GBC Base, Brij-35는 Sigma사, Ultrogel AcA54는 LKB사 제품을 사용하였고, 이 외의 시약은 모두 특급을 사용하였다.

또 투석용 막(Spectrapor)은 Spectramedical사 제품을, 초여과막(Ultrafiltration membrane)은 Amicon사 제품을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 백혈구성분 추출

지원자로부터 채취한 혈액을 원심분리하여 적혈구와 혈장을 제거하고 얻은 buffy coat leukocytes를 다시 원심분리하여 순도 높은 백혈구로 만들었다. 이것을 생리식염수로 세척하고 증류수로 osmotic shock을 가하여 남은 적혈구를 완전히 없앤 다음 원심분리를 하였다. 그 침전물을 10×TNC(0.5M Tris-HCl, 2M NaCl, 0.05M CaCl₂, pH 7.3)와 동량으로 섞어 세포분쇄기를 사용하여 완전히 분쇄한 후 16,000 rpm에서 1시간 원심분리하여 그 상등액을 사용하였다.¹⁰⁾

2) 추출물로부터 elastase의 분리

a) Sephadex G-75에 의한 크로마토그래프

Sephadex G-75 칼럼(2.5×90cm)에 백혈구 추출물 10.6ml를 주입하여 1×TNC(0.1% Brij 35 용액 함유) 완충용액(pH 7.3)으로 매 8.4ml 분획단위, 25.2ml/hr 속도로 유출시켰고, 분리된 분획들의 단백질과 헤모글로빈 함량, elastase와 cathepsin G 두 효소의 활성도를 측정하였으며, elastase의 활성이 높은 분획을 모아서 농축시켜 다음 실험에 사용할 때까지 -20℃에서 보관하였다.¹⁰⁾

b) Ultrogel AcA 54에 의한 크로마토그래프

Ultrogel AcA 54 칼럼(2.5×90cm)의 겔 상단에 백혈구 추출물 7.3ml를 주입한 후 1×TNC(0.1%

Brij 35 용액 함유) 완충용액(pH 7.3)으로 매 8.4ml 분획단위, 25.2ml/hr 속도로 유출시켰다. 각 분획들의 단백질과 헤모글로빈의 농도, elastase 및 cathepsin G의 활성도를 측정하여 elastase와 cathepsin G의 활성이 높은 분획을 각각 모아서 Amicon membrane으로 초여과(ultrafiltration)한 후 1/10로 농축시켜 -20℃에서 보관하였다.

c) CM-Sephadex와 CM-Cellulose에 의한 이온교환 크로마토그래프

Baugh 등(1976)¹¹⁾의 방법을 응용하였다. 즉, Ultrogel AcA 54 칼럼에서 얻어진 분획 50ml를 4℃에서 10mM NaAc 완충용액(pH 5.5)으로 투석시키고, 같은 완충용액으로 미리 평형시킨 CM-Sephadex 칼럼(1.6×15cm), CM-Cellulose 칼럼(1.6×25cm)에 각각 주입한 후 칼럼부피의 3배 정도의 완충용액으로 비특이적으로 결합되어 있는 단백질을 씻어 내고, 20mM에서 1M까지의 NaCl 농도경사(linear gradient)를 시작하여 매 2ml 분획단위, 40ml/hr 속도로 유출된 분획들의 elastase와 cathepsin G의 활성도를 측정하였다.

3) 효소의 활성도 측정

a) Elastase

분획 270ul를 취하여 5mM SANA 30ul를 가하고 잘 혼합한 후 37℃에서 100분간 반응시켜 생성된 nitroaniline의 농도를 410nm에서 흡광도로 측정하였다.^{2,4)}

b) Cathepsin G

분획 400ul에 1M Tris-HCl 50ul, 4mM BPNE 10ul를 가하여 잘 혼합한 후 37℃에서 40분간 반응시키고 발색시약 0.6ml를 가하여 3,000rpm에서 5분간 원심분리한 다음 520nm에서 그 상등액의 흡광도를 측정하였다.¹⁷⁾

발색시약은 얼음상에서 0.2M NaNO₂ 1ml에 base stock 용액 1ml를 가하여 잘 혼합하고 20분간 방치한 후에 4%(v/v) Brij 35 용액을 넣어 50ml로 만들었다. 또 base stock 용액의 조제방법은 4-amino-2,3-dimethylazobenzene 225mg을 ethanol 50ml와 1M HCl 30ml의 혼합용액에 완전히 녹인 후 물로써 100ml 채우고 4℃에서 보관하였다.

4) 단백질과 헤모글로빈의 농도 측정

단백질은 280nm, 헤모글로빈은 410nm에서 각각의 흡광도를 읽어 농도를 측정하였다.

III. 결 과

1. 젤 여과법

a) Sephadex G-75 크로마토그래프

Fig 1.에서 볼 수 있는 것과 같이 헤모글로빈과 elastase의 일부는 겹쳐 있고(①), elastase의 활성이 높게 나타난 부분이 cathepsin G와 섞여 있으나(②) cathepsin G의 뒷부분은 elastase와 잘 분리되었다.(③)

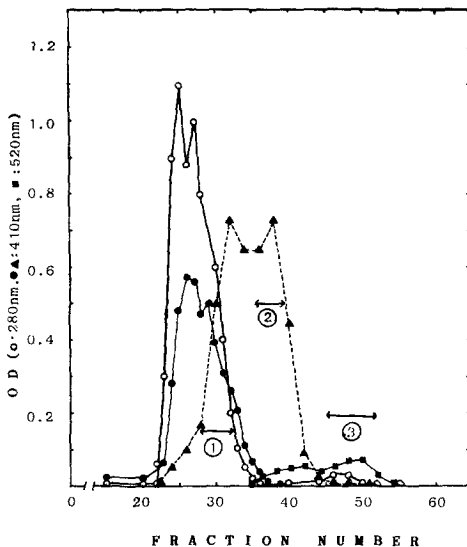


Fig. 1. Chromatography of Human Leukocyte Extract on Sephadex G-75.

The column(2.5×90cm) was equilibrated with 50mM of Tris-Cl(pH 7.3) containing 0.2M NaCl, 5mM CaCl₂ and 0.1% Brij 35 solution at 4°C. 10.6ml of leukocyte extract was loaded and eluted at a flow rate of 25.2ml/hr and 8.4ml fractions were collected. Fractions 28 to 42 were pooled for the next ion exchange chromatography step. (○-○): protein profile(absorbance at 280nm), (●-●): haemoglobin profile(absorbance at 410nm), (▲-▲): elastase activity with SANA(absorbance at 410nm), (■-■): cathepsin G activity with BPNE(absorbance at 520nm).

b) Ultrogel AcA 54 크로마토그래프

Fig 2.에서 보여주는 바와 같이 비특이적으로 결합되어 있는 단백질(①), elastase(②), cathepsin G(③)가 겹치지 않고 완전하게 잘 분리되었으므로 얻고자 하는 효소 이외의 물질 제거가 용이하였다.

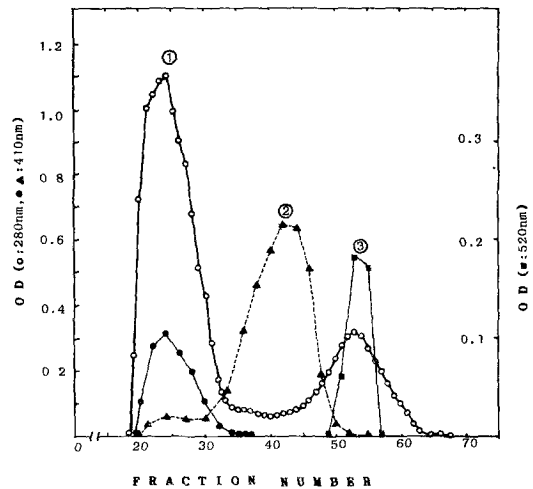


Fig. 2. Chromatography of Human Leukocyte Extract on Ultrogel AcA 54.

The column(2.5×90cm) was equilibrated with 50mM of Tris-Cl(pH 7.3) containing 2.0M NaCl, 5mM CaCl₂ and 0.1% Brij 35 solution at 4°C. 7.3ml of leukocyte extract was loaded and eluted at flow rate of 25.2ml/hr and 8.4ml fractions were collected. Fractions 34 to 50 and 51 to 56 were pooled for the next ion exchange chromatography step. (○-○): protein profile(absorbance at 280nm), (●-●): haemoglobin profile(absorbance at 410nm), (▲-▲): elastase activity with SANA(absorbance at 410nm), (■-■): cathepsin G activity with BPNE(absorbance at 520nm).

2. 이온교환 크로마토그래프

a) CM-Sephadex 크로마토그래프

Fig. 3.에서 보면, 앞 부분에서는 elastase와 cathepsin G가 혼합되어 유출되었으나, NaCl의 농도가 0.5M, 0.6M일 때에 두 개의 다른 순수한 elastase가 cathepsin G와 섞이지 않고 잘 분리되었으

며, NaCl농도가 0.76M에서는 elastase와 cathepsin G의 성질 모두를 나타내었다.

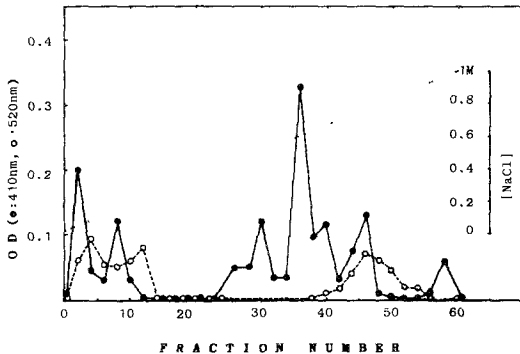


Fig. 3. Ion-exchange Chromatography of Elastase on CM-Sephadex.

The column(1.6×15cm) was equilibrated with 10mM NaAc(pH 5.5). The concentrated and dialyzed enzyme mixture from the gel filtration step was applied to the column. The NaCl linear gradient(0.02M~1M, 160ml) was started and 2ml fractions were collected at a flow rate of 40ml/hr. (●-●): elastase activity at 401nm, (○···○): cathepsin G activity at 520nm.

b) CM-Cellulose 크로마토그래프

CM-Cellulose 크로마토그램을 Fig 4.에 나타내었다. 0.45M NaCl에서 유출된 elastase를 제외하고는 전반적으로 cathepsin G와 섞여져 있었다.

IV. 고 찰

사람의 혈액으로부터 순도 높은 백혈구 elastase를 대량으로 분리하는 새로운 방법을 개발해 보고자 젤 여과법과 이온교환 크로마토그래프를 하였다.

Sephadex G-75와 Ultrogel AcA 54를 이용한 젤 여과법에서는 Fig.1.과 Fig.2.에서 볼 수 있듯이 Sephadex G-75보다 Ultrogel AcA 54 크로마토그래프의 분리기능이 우수하였다. 즉 단백질과 elastase, cathepsin G 3개의 분리가 뚜렷하여(Fig.2. ①,②,③), 비특이적으로 결합되어 있는 단백질의 제거 뿐만 아니라 elastase와 cathepsin G 두 효소간

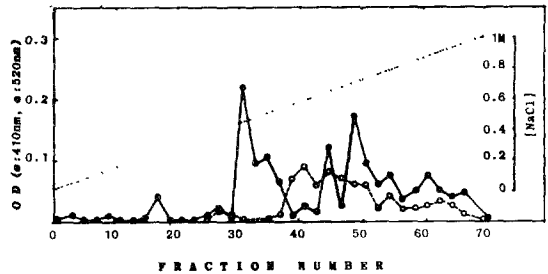


Fig. 4. Ion-exchange Chromatography of Elastase on CM-Cellulose.

The column(1.6×25cm) was equilibrated with 10mM NaAc(pH 5.5). The concentrated and dialyzed enzyme mixture from the gel filtration step was applied to the column. The NaCl linear gradient(0.02M~1M, 200ml) was started and 2ml fractions were collected at a flow rate of 40ml/hr. (●-●): elastase activity at 410nm, (○···○): cathepsin G activity at 520nm.

의 분리도 용이하였다. 또한 단백질의 함량이 적은 분획에서 elastase의 활성이 높게 나온 것은(Fig.2. ②), 이 효소의 순도가 높다는 것으로 사료되었고, 하루동안에 분리가 끝나서 대량생산이 가능하였다.

그런데 Sephadex G-75의 경우에는 헤모글로빈과 elastase가 일부는 혼재하여 있고(Fig.1. ①), 일부 분은 높은 활성을 지닌 분획으로 유출되었으나 cathepsin G가 섞여 있어 elastase의 순도가 떨어졌고(Fig.1. ②) cathepsin G의 뒷부분에서는 활성은 적지만 elastase와 잘 분리되었다. (Fig.1. ③)

동일 조건하에서 젤 여과법을 시행하였는데 분리의 차이가 나는 것은 두 젤의 특성이 다른 것으로 사료되어 그 특성을 살펴보면, Sephadex는 구조의 대부분이 수산기로 되어 있어 친수성이지만 이온강도가 낮은 카르복실기를 다소 포함하고 있으므로 양전하를 띤 용질과 기질(matrix)간의 결합을 초래하고, 따라서 양이온 성질을 띤 물질은 유출이 지연되는데, elastase와 cathepsin G는 강한 양이온을 띤 효소이므로 분리에 어려움이 있음을 알 수

있다.

또한 Ultrogel AcA 54는 polyacrylamide 5%와 agarose 4%로 되어 있어 이전에 사용해 왔던 젤에 비하여 화학물질 구성 자체의 잇점이 있고, 입자가 단단하며 그 크기가 균일하고, 안정된 화학구조와 분리능이 높은 특성을 지니고 있다. 이러한 성질을 지닌 Ultrogel AcA 54를 이용하여 실험한 결과, 효소의 분리가 다른 젤을 이용한 방법보다 효율적이었음을 알 수 있었다.

한편으로 이온교환 크로마토그래프에서는 Baugh 등(1976)¹⁾과 Heck 등(1985)⁷⁾의 보고와는 달리 CM-Sephadex가 CM-Cellulose보다 다소 분리가 잘 되었다. Baugh 등(1976)¹⁾은 20mM NaAc 완충용액(pH 5.5)으로 0.15M에서 0.3M까지의 NaCl농도경사를 이용하였고, Heck 등(1985)⁷⁾은 100mM NaAc 완충용액(pH 4.5)으로 0.1M~0.6M NaCl농도경사를 시행하였는데 본 연구에서는 10mM NaAc완충용액(pH 5.5)으로 20mM~1M까지의 NaCl농도경사를 이용하였다. 따라서 10mM NaAc 완충용액을 사용함으로써 이온강도가 세어 분리하고자 하는 효소와의 결합력이 강하여 좋은 분리결과를 얻지 못하였으나, 적절한 완충용액의 선택과 NaCl농도경사를 서서히 올리는 등 방법을 개선하면, 3개의 분자가 섞여 있는 isozyme들을 각각 분리할 수 있는 가능성 뿐만 아니라 이들 isozyme의 혼합물을 동시에 얻는 데에도 좋은 성적을 얻을 수 있을 것이다.

그러나 본 연구 중 Ultrogel AcA 54를 이용한 젤 여과법은 다른 방법보다 시간을 단축할 수 있고, elastase와 cathepsin G의 성질의 유사점 때문에 보통의 크로마토그래프로는 분리가 어려웠으나 이 방법을 사용하면 두 효소의 확실한 1차 분리가 가능하므로 다음 단계의 연구에 큰 역할을 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

고순도의 백혈구 elastase를 효율적으로 분리하고자 그 첫 단계로서 Sephadex G-75와 Ultrogel AcA 54 젤 여과법을 하여 비교한 결과 Ultrogel AcA 54 크로마토그래프의 분리능이 다음과 같은 점에서 우

수하였다.

- 1) 비특이적 단백질의 제거가 용이하였고,
 - 2) Elastase와 cathepsin G의 분리가 확실하였으며,
 - 3) 단백질 함량이 적은 분획에서 elastase의 활성이 높아 순도가 높은 효소를 분리할 수 있었다.
- 또한 CM-Sephadex를 이용한 이온교환 크로마토 그래프를 하면, 보통의 분리방법으로는 3개의 isozyme의 혼합물로 얻어지는 elastase를 그 각각의 isozyme으로 분리할 수 있었다.

REFERENCES

1. Baugh RJ, Travis J : Human leukocyte granule elastase; rapid isolation and characterization Biochemistry 15 : 836, 1976
2. Bieth J, Spiess B, Wermuth CG : The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastase Biochem Med 11 : 350, 1974
3. Blow AM : Action of human lysosomal elastase on the oxidized β -chain of insulin Biochem J 161 : 13, 1977
4. Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W : The preparation and properties of two new chromogenic substrate of trypsin. Arch Biochem Biophys 95 : 271, 1961
5. Feinstein G, Janoff A : A rapid method for purification of granulocyte cationic neutral proteases : purification and characterization of human granulocyte chymotrypsin-like enzyme. Biochim Biophys Acta 403 : 477, 1976
6. Glynn LE : Occasional survey, Royal Cameron Lecture, 1971. Pathology, pathogenesis, and aetiology of rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 31 : 412, 1972
7. Heck LW, Darby WL, Hunter FA, Bhowan A, Miller EJ, Bennett JC : Isolation, characterization, and amino-terminal amino acid sequence analysis of human neutrophil elastase from normal donors. Anal Biochem 149 : 153, 1985
8. Janoff A : Neutrophil proteases in inflamma-

- tion. *Ann Rev Med* 23 : 177, 1972
9. Janoff A : Purification of human granulocyte elastase by affinity chromatography. *Lab Invest* 29 : 458, 1973
 10. Kang K : Characterization of human leukocyte elastase. University Microfilms International, Ann Arbor, Mi., 1985
 11. Lazarus GS, Daniels JR, Lian J, Burleigh MC : Role of granulocyte collagenase in collagen degradation. *Am J Pathol* 68 : 565, 1972
 12. Ohlsson K, Olsson I : The neutral proteases of human granulocytes; isolation and partial characterization of two granulocyte collagenases. *Eur J Biochem* 36 : 473, 1973
 13. Ohlsson K, Olsson I : The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial characterization of granulocyte elastases. *Eur J Biochem* 42 : 519, 1974
 14. Rindler-Ludwig RH, Branustein : Cationic proteins from human neutrophil granulocytes; evidence for their chymotrypsin-like properties. *Biochim Biophys Acta* 379 : 606, 1975
 15. Schmidt W, Havemann K : Isolation of elastase-like and chymotrypsin-like neutral proteases from human granulocytes. *Hoppe-Seyler's Z Phy Chem* 355 : 1077, 1974
 16. Starkey PM, Barrett AJ : Neutral proteinases of human spleen. Purification and criteria for homogeneity of elastase and cathepsin G. *Biochem J* 155 : 255, 1976
 17. Starkey PM : Elastase and cathepsin G : The serine proteinases of human neutrophil leukocytes and spleen. In "Proteinases in mammalian cells and tissues" (ed) Barrett, Elsevier/North Holland, 1977, pp57~89
 18. Taylor JC, Crawford IP : Purification and preliminary characterization of human leukocyte elastase. *Arch Biochem Biophys* 169 : 91, 1975
-