단백질공학의 원리와 그 전략

서울대 자연대 **양 철 학**

지난 4~5년동안에 유전자 재조합 방법이 단백질 구조를 체계적으로 조작 가능하게된 이래, 가장 신속히 발전되는 새로운 연구기술분야로 단백질공학(Protein engineering)이 각광을 받기 시작하고 있다. 여기서 유전자의 순서를 변경 시킴으로 단백질에서 아미노산을 대체가능한 연구방법에 공학이란 어휘를 사용하고 있는데, "공학"이란 언어의 정의를 살펴보면 "순수과학의 지식을 실질적으로 응용되게 하는 과학 또는 예술"로서 어떻게 단백질을 engineering 할 것인가는 단백질의 1차 구조 즉 아미노산의 순서가 여러 level의 단백질의 구조를 결정하게 되고 그 구조가 기능을 결정하게 된다는 생화학에서 단백질의 구조와 기능의 기본 상호관계를 이해함으로 가능하기 때문이다. 그래서 혹자는 단백질 공학기술을 "Knowledge based design of protein"으로 요약하고 있는데 대단히 적절한 표현이라고 본다. 이러한 유전자 조작기술과 단백질 화학기술의 긴밀한 협력으로 탄생된 이 새로운 학문분야는 앞으로 무한한 가능성 즉 유용한 생체물질의 창조에 의한 의약품 제조 및 산업에 기여나, 단백질의 기능과 구조의 상호관계의 연구를 통한 이해 등 여러 연구분야에서 획기적인 발전을 기약해 주고 있다.

유전자의 돌연변이를 통하여 효소의 반응성을 변화시키는 작업은 물론 새로운 것은 아니다. 오래전부터 약품제조 산업에서 세포효소의 얼마간 불규칙적인 돌연변이를 통하여 향상된 생산균주를 선별하는 방법을 사용하여 왔는데 이는 박테리아 유전자의 돌연변이를 통한 생체내에서의 단백질공학을 성공시킨 것이라고 볼수 있다. 한 가지 좋은 예로 지난 40여년간 페니실린을 생산하는 박테리아의 성능을 약 10,000배나 개선시킨 것이다. 더욱 최근에는 Cetus사에서 이러한 전통적인 기술로 glycol을 생산하는 효소의 유전자를 변형시켜 제조과정에 사용되는 세 효소의 적정 pH가 3 pH단위나 차이가 있었으나 같은 pH의 조건하에서 세 효소를 동시에 사용할 수 있도록 개선한 것이다. 따라서 단백질공학에서 근본적으로 전통적인 기술과 다른 점은 연구자가 단백질 분자내의 대체시켜야 할 특별한 아미노산을 선정하여 원하는 다른 아미노산으로 유전자의 Code를 변경시키므로 구체적으로 가능성을 가지고 효소나 단백질의 기능의 개선에 착수할 수 있다는 점이다. 이렇게 변화된 생리적 특성을 나타내는 단백질이나 효소를 얻기 위해서 유전자의 특정 위치를 변경시켜 돌연변이 유전자를 얻는 실험방법을 Site-directed mutagenesis라 하고 최근 이러한 일련의 효소기능의 개선연구를 Enzyme Engineering이라고도 부른다. 이렇게 단백질 유전자의 돌연변이를 일으키는 Site-directed mutagenesis중에는 광범위한 유전인자에 걸쳐 일부의 유전자의 삽입이나 제거를 통하여 수행하거나 또는 한개의 염기쌍만을 제거하는 방법들이 사용되고 있다. 그 중에서도 정확도나 응용범위가 넓은 합성된 Oligodeoxyribonucleotide를 사용하는 방법은 유전자의 특정 위치에 정확하게 돌연변이를 일으킬 수 있기 때문에 단백질공학에서 가장 유용하게 쓰이고 있다. 이러한 방법을 Oligonucleotide directed mutagenesis라고 하며 Shortle(1), 최와 양(2) 또는 Smith와 Gillam(3)에 의해 잘 정리된 총설이 발표되었고 본 산업과 미생물에 이에(4) 의해 최근의 여러 방법들이 논의되고 있다. 특히 본 총설에서는 단백질공학의 기본원리와 어떠한 연구방법이 이용되는가 또는 필요한 여러 연구결과를 어떻게 상호연계 시키므로 가장 효과적인 단백질변형이 가능한지를 다루어 보려고 한다.

1. 단백질공학의 기초원리

(1) 단백질에서 변경시켜야 할 부위의 결정

단백질의 여러 아미노산 가운데 변경시켜야 할 부위를 찾아내는 작업은 대단히 정교하고 복잡한 화학적인 기술을 필요로 하게된다. 특히 효소의 경우를 예로들면, 먼저 효소의 연구에 가장 선결되어야 할 것은 순수한 효소를 다량 얻어내는 일이다. 그동안 개발된 affinity chromatography나 FPLC 등의 기기의 출현으로 실험실에서의 정제는 상당히 수월하게 되었으며 유전공학적인 기술로 같은 세포 내에서 수십배 많은 단백질을 얻게된 이후 상당히 손쉽게 얻어낼 수 있게 되었다. 다만 단백질의 공장수준의 정제는 아직도 해결되어야 할 가장 큰 문제로 남아 있다. 얻어진 단백질을 사용하여 단백질내의 기능을 하는 중요한 몇몇 아미노산을 결정하는 작업은 활성부위나 접착부위에 특수하게 반응하는 화합물을 사용하는 화학변형(Chemical modification)방법이 쓰이고 있다. 화학변형에 관한 여러 총설 등이 있으나 근래 김과 이(5)의 총설이 발표되어 있다. 활성부위가 알려지면 그 부분의 펩타이드 순서를 결정하는 단백질의 1차구조를 얻어야 하고 전체구조와 기능의 연구를 위해서는 2차, 3차구조도 규명되어야 한다. 특히 2차, 3차구조는 여러가지 물리화학적인 연구기술이 응용되고 있으며 특히 단백질의 folding은 Circular Dichroism이나 Optical Rotatory Dispersion 또는 hydrodynamic volume을 측정하는 Diffusion 등이 이용되고 있다. 물론 3차구조는 단백질의 결정을 얻은 다음 X-선 결정법을 통하여 알아낼 수 있는데 대단히 어려운 기술적인 뒷받침과 시간을 요하게 된다. 특히 근래에 Computer의 발전으로 고분해능의 NMR을 사용하면 용액상태의 단백질을 사용하여 상당한 수준의 3차구조로도 알아볼 수 있음이 알려졌다. 효소의 반응메카니즘의 이해는 여러 효소반응의 Kinetics나 Binding 연구를 통하여 실제 관여하는 아미노산의 확인 및 단백질중의 몇번째의 아미노산인가 또는 3차구조도 어느 위치에 있는가를 이해함으로 가능하다. 이와같은 여러가지 정보를 종합하면 변경시켜야 할 단백질내의 아미노산은 그 기능에 따라 다음의 아래와 같이 요약 될 수 있다.

① 활성부위의 아미노산(Active site)

② 접착부위의 아미노산(Binding site)

③ 단백질구조에 영향을 주는 아미노산들(예 disulfide 결합, 수소결합 등)

④ 분자량 감소를 위한 절단부위들

위에 해당하는 아미노산이 확인되면 이 아미노산 주위의 펩타이드 순서가 어느정도 결정되어야 한다. 그 이유는 유전자중에서 이 아미노산에 해당하는 순서를 쉽게 찾아낼 수 있기 때문이다.

(2) 유전자의 Cloning 및 변형

단백질의 변형에 유전자를 이용하기 위하여는 먼저 유전자 재조합 방법에 의해 해당하는 단백질의 유전자를 확인하여 운반체에 조합시키는 일이 필요하다. 물론 이 유전자의 순서도 결정 되어야 하며 단백질의 아미노산의 순서와 서로 비교되어야 한다.

단백질의 특정부위 변형에는 두 가지 중요한 방법이 있으며 이들 모두 단백질을 합성하는 유전자를 pBR322 plasmid나 또는 bacteriophage vector인 M_{13} 같은 적당한 운반 유전자에 결합시키는 것이다. 첫째방법은 원래 단백질 유전자에 한두개의 데옥시뉴클리오타이드를 변형시킨 올리고데옥시뉴클리오타이드 primer를 이용하는 것인데 이 primer는 보통 15개 내지 20개 정도의 뉴클리오타이드로 이루어져 있고 이러한 뉴클리오타이드를 합성하는 과정은 자동합성기로 아주 짧은 시간에 가능하다. 이렇게 합성한 올리고데옥시뉴클리오타이드는 원래 효소의 유전자와 대단히 유사성을 가지고 있으므로 Single-strand template에 붙게 될 것이다. 그후에 DNA polymerase를 사용해서 primer로 부터 plasmid 또는 Vector의 Complement Strand를 합성하도록 만들어서 원래유전자와 새로이 합성된 변형유전자를 분리해낸 후 적당한 균주에 transformation시켜서 새로운 단백질을 생산하도록 한다(그림 1).

또 다른 방법은 재조합된 유전자에서 변형시키고 싶은 곳을 절단한 후에 원하는 변화가 되어있는 합성된 조각으로 바꾸어 넣기만 하는 것이다(그림 2). 이 방법의 문제점은 transformation시킨 균

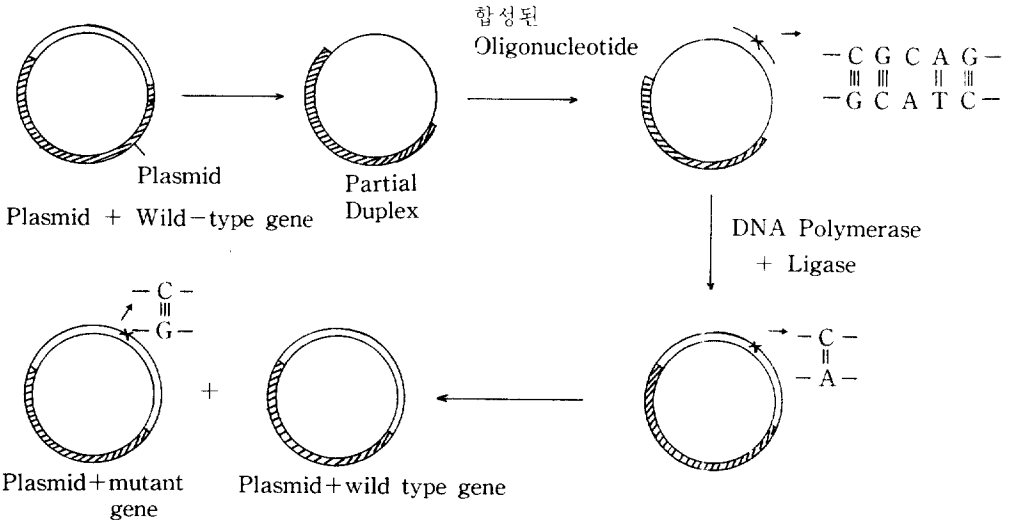


그림 1.

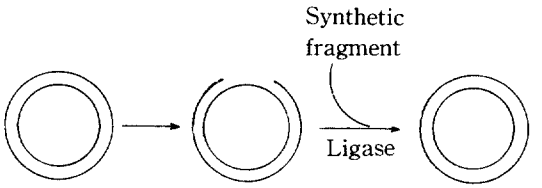


그림 2.

주에서 이 유전자가 적당한 양으로 단백질을 형성하는가에 달려있다. 이러한 유전자의 일부를 변형시키는 방법은 방사선 물질로 표지된 뉴클리오타이드를 사용함으로 새로 만들어진 단백질의 유전자의 확인도 할 수 있다. 이러한 여러가지 유전자의 변형방법은 최근에 급속히 발전된 유전자재조합 기술에 크게 의존하고 있으며 또한 단백질을 다량 생산토록 하는 기술이나 세포밖으로 단백질을 배출시켜 얻어내는 여러가지 유전공학 기술들이 단백질공학에서 이용되고 있다.

2. 단백질공학의 전략

그러면 단백질공학 기술로 단백질이나 효소의 기능의 어떤 성질을 개선할 수 있을지 또한 어떤 방법으로 이러한 작업은 성공시킬지 알아보기로 하자. 먼저 단백질 특히 효소 등의 성능이나 특성이 어떻게 개선될 수 있는지 열거하면 아래와 같다.

① 단백질 및 효소의 성능의 증감(Kinetic Parameter 즉 Km, KcaL 또는 흡수능력의 개선)

② 효소의 기질 특이성의 변경

③ pH에 대한 안정성 및 적정점의 변경

④ 단백질 분해효소에 대한 내성의 향상

⑤ 한 효소에 두개나 그 이상의 기능을 하도록 활성부위 첨가

⑥ 용제에 대한 안정성의 향상

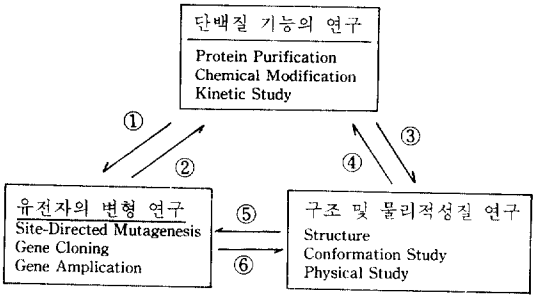
⑦ 단백질 분자의 산화·환원에 대한 내성의 향상

⑧ 단백질의 분자량의 감소(고정화에 용이) 등

위의 열거한 외에 경우에 따라 여러 특성이 개선 응용될 수 있을 것이다.

위와같은 목적을 달성하기 위해서 단백질 공학에서 여러 학문분야의 상호관계를 아래 그림 3에 잘 나타내고 있다.

단백질공학 연구에 응용되는 여러기술들 중에 특히 DNA의 합성기술은 가장 중요하고 돌연변이를 일으키는 가장 간편한 방법을 제공하고 있다. 그 이외에도 Computer의 이용을 들수 있는데 수백개의 뉴클리오타이드 순서중에서 제한효소 절단부위를 알아낸다든가 펩타이드 순서와 연결시키는



① 유전자에서 변형시켜야 할 부위의 결정
② 변형된 유전자의 유전자 재조합 및 발현
③ 변형된 단백질의 정제와 성능의 연구
④ 변형된 단백질의 구조와 기능의 관계
⑤ 변형된 단백질의 구조와 유전자의 관계
⑥ 변형된 유전자의 단백질 구조 관계

그림 3. 단백질공학 연구의 상호관계.

등의 여러 작업이 Computer 없이는 도저히 불가능한 일들이다. 그림에서 나타내듯이 단백질의 생화학적인 연구 즉 1, 2차구조 및 활성부위 연구나 Kinetic 연구 등의 기본 지식은 개선해야 할 부분의 확인이나 변형된 효소나 단백질의 확인에 필수적인 연구분야이다. 유전자의 변형이나 재조합도 단백질기능의 연구와 밀접하게 연관되어 수행되어야 하고 구조나 물리적 성질의 연구도 기능의 연구나 유전자 변형의 연구와 긴밀하게 연계지어 연구되어야 하는 근래에 보기드문 다양한 학문의 연구기술이 조합하여 성취하는 흥미로운 연구분야이다. 그래서 어떤 학자는 이 분야의 연구를 과학적 혁명(Scientific revolution)이라고 하고 현재 구미 각국에서나 가까운 일본에서도 이 분야의 연구소, 학회, 잡지 등이 만들어지고 있는 실정이다.

이와같은 단백질공학의 연구결과는 장차 초능력의 효소(Super enzyme)개발로 생명연장, 노화방지, 기타 의약산업에 획기적인 기여를 하게 될 것이다. 유기용매에 작용되는 인조촉매도 가능하게 될 것이며 환경오염 및 Bio에너지 연구에도 큰 기여를 하게되리라 본다. 또한 신진대사 과정에서 중요한 기능민을 강화하거나 유전자의 결핍으로 인한 선천성질환에 대한 유전자치료(gene theraphy)도 가능하게 할 수 있을 것이다. 이 분야는 대단히 새로운 지식을 필요로 하는 분야이므로 국내에서도 집중적으로 지원만 된다면 선진기술개발 특히 물질특허로 첨단기술 보호에 단백질공학이 크게 도움을 줄 것으로 본다.

참고문헌

1. Shortle, D.(1981) Ann. Review Genet. 15. 265-294.
2. 최석정, 양철학(1985) 유전공학(여름호).
3. Smith, M and Gillam, M.(1981) in Genetic Engineering Vol.3 ed J.D. Setlow & A Hollander
4. 이세영(1988) 미생물과 산업.
5. 김수자, 이현재(1985) 생화학뉴스 Vol. 3