

박테리아 표면발현시스템

정홍채 · 반재구

생명공학연구소 미생물공정연구실

1. 개요

최근 박테리아 표면의 생화학적, 유전학적, 및 분자수준의 구조연구가 활발하게 진행되어 세포표면을 생물공학 분야에 응용하려는 시도가 점점 늘고 있다(Georgiou *et al.*, 1993, 1997; Fischetti *et al.*, 1993; Schreuder *et al.*, 1996). 예를 들어 백신을 안정적으로 생산하기 위해 항원성을 지닌 펩타이드 부위를 세포 표면에 발현시키면 live vaccine으로 사용가능한 백신을 개발할 수 있을 뿐만 아니라 효소 라이브러리를 직접 발현하여 초고속 스크리닝할 수 있는 환경으로 만들 수 있는 여러 가능성이 생겨난다(Georgiou *et al.*, 1993). 뿐만 아니라 이러한 박테리아나 효모 표면발현시스템은 이미 잘 알려진 phage display 기술과 상호보완적으로 쓰일 수 있다. 또한 그람양성세균이나 Archea에서 발견되는 표면단백질인 S-layer를 응용할 수 있는 가능성도 제시되었다(Sleytr and Sara, 1997). 본고에서는 필자의 연구실에서 수행중인 병해활성단백질을 이용한 미생물표면 발현시스템의 연구결과를 중심으로 미생물표면에 외래단백질을 안정적으로 발현시킬 수 있는 표면발현시스템을 살펴봄으로서 그 생물공학적 응용성 및 발전가능성을 제시하고자 한다.

2. 표면발현시스템(Surface Anchoring System)

박테리아의 표면은 외부환경과 직접 접촉하고 있으므로 주로 외부환경과 세포내부와의 신호전달(signal transduction)이나 물질전달에 관련된 porin과 같은 transporter등이 분포되어 있다(Ochs *et al.*, 1996; Schulz, 1993). 그러나 최근 항생물질에 저항성을 갖는 세균의 출현이나 biofilm 형성, 세균의 고정화, 강력한 면역반응을 유도할 수 있는 항원carrier 개발, 또는 biofilm을 형성한 후 biofilter로 활용하는 등 박테리아 표면이 생물공학적으로 중요해지고 있다. 박테리아표면의 이용은 외래단백질을 표면에 발현할 수 있는 표면발현시스템의 개발로 보다 적극적으로 이뤄지고 있다(Georgiou *et al.*, 1993; Fischetti *et al.*, 1993). 표면발현시스템은 박테리아의 표면단백질을 표면발현모체(surface anchoring motif)로 사용하여 외래단백질을 발현시킬 수 있는 기술이다. 다양한 motif를 이용한 표면발

현시스템이 개발되어 그 장단점이 보고되었다(그림 1, Georgiou *et al.*, 1993; Little *et al.*, 1993; Georgiou *et al.*, 1997).

그람음성세균의 표면발현시스템

그람음성 세균의 세포벽은 세포내막(cytoplasmic membrane)과 세포막공간(periplasmic space) 그리고 세포외막(outer membrane)으로 구성되어 있어 표면발현시스템은 세포외막에 존재하는 표면단백질을 표면발현모체로 사용하고 있다. 이러한 경우 세포내막을 통과할 수 있는 분비신호(secretion signal)와 세포표면에 부착하게 하는 표적 및 부착신호(targeting and anchoring signal)를 갖고 있는 표면단백질을 표면발현모체로 선택하는 것이 중요하다. 외래단백질의 표면발현에 사용된 표면단백질로는 세포외막 단백질(outer membrane protein), 지질단백질(lipoprotein), 분비단백질(secretory protein), 편모단백질과 같은 표면기관단백질 등 크게 4가지이며, 또한 각각은 그람음성 세균 표면단백질과 그람양성 세균의 표면단백질로 나눌 수 있다.

그람음성 세균의 세포외막 단백질로는 LamB(Charbit *et al.* 1988), PhoE(Agterberg *et al.* 1987), OmpA(Pister *et al.* 1989, Francisco *et al.* 1992) 등을 들 수 있는데, 이들 단백질을 이용한 경우 외래단백질을 세포표면에 돌출한 루프(loop)에 삽입시켜 성공적으로 표면에 발현되지만 삽입할 수 있는 단백질의 크기가 구조적으로 제한되어 있다. 또한 삽입될 외래단백질의 C말단과 N말단이 입체적으로 가깝게 위치하여야 하

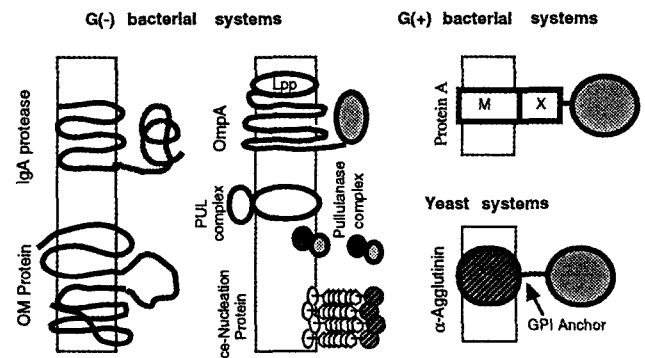


그림 1. 여러가지 표면발현시스템.

므로, 그 거리가 멀 경우에는 연결 펩타이드로 두 말단 사이를 가깝게 하여야 한다. 실제로 LamB 나 PhoE를 이용한 경우 50 - 60개 이상의 아미노산으로 이루어진 외래 폴리펩타이드를 삽입하면 구조적 제한을 가져와 안정한 막단백질을 형성하지 못하였다(Charbit *et al.*, 1987; Agterberg *et al.*, 1990). OmpA를 사용하여 외래단백질을 돌출된 루프에 삽입한 경우도 있지만 구조적 제한을 극복하기 위하여 세포외막에 부착하게 할 수 있는 최소한의 표적신호를 포함하는 일부 OmpA 단편만을 사용하였다. 이러한 방법으로 β -lactamase를 OmpA 표적신호 C말단에 연결하여 세포표면에 발현시켰다. 이 경우에 있어서 대장균의 세포외막에 안정적으로 발현되어 표면부착되는 것은 OmpA 단편에 의해, 세포질에서부터 세포외막까지의 이동은 대장균의 지질단백질 Lpp의 분비신호(signal sequence)를 암호하고 있는 9개 아미노산을 OmpA의 N말단에 융합하여 이루어졌다(Francisco *et al.*, 1992).

세포 표면단백질인 지질단백질(lipoprotein)도 표면발현에 이용되어 왔다. 대장균의 주지질단백질(major lipoprotein)은 그 N말단에 분비신호를 갖고 세포내막을 통과할 수 있어 세포외막에 결합된다. 반면 C-말단은 세포벽(peptidoglycan, PG)에 결합되어 있어 세포외막 단백질 OmpA 단편과 연결될 경우 안정적으로 외래단백질을 세포외막까지 분비하여 표면 발현할 수 있었다(Francisco *et al.*, 1992). 또 다른 지질단백질인 TraT는 지질단백질의 이러한 특성을 이용하여 폴리오바이러스의 C3 에피토프(epitope)과 같은 펩타이드를 표면발현하는데 사용되었다(Felici *et al.*, 1991). 정확한 기능은 밝혀지지 않은 세포벽 부착형 지질단백질(peptidoglycan-associated lipoprotein, PAL)도 재조합 항체의 표면발현에 사용되었다(Fuchs *et al.*, 1991). 이 경우 PAL의 C말단은 세포벽에 연결되고 N말단은 재조합 항체에 연결되어 융합단백질이 표면 발현되었다.

*Klebsiella oxytoca*가 분비하는 pullulanase는 지질단백질로 그의 N말단이 지방질로 치환되어 세포외막에 부착되어 있다. 성장휴지기에 세포 배양액 중으로 분비된다(d'Enfert *et al.*, 1987). Kornacker등이 pullulanase의 N말단 단편을 이용하여 β -lactamase를 세포표면에 발현시켰으나 발현된 pullulanase- β -lactamase 융합단백질은 잠시 세포표면에 부착되어 있다가 세포 배양액 중으로 유리되는 단점이 있었다(Kornacker and Pugsley 1990). 독특한 분비체계를 갖고 있는 병원 미생물 *Neisseria* 유래의 IgA protease는 C말단에 존재하는 단편에 N말단에 존재하는 protease를 세포외부로 분비하는 신호를 갖고 있다(Klauser *et al.*, 1993). 일단 세포외막에 도달하여 세포표면에 돌출한 protease는 자신의 가수분해능에 의해 세포 배양액으로 분비된다. Klauser등은 이 IgA protease 단편을 이용하여 12kDa의 콜레라 독소B 서브유니트를 안정적으로 세포표면에 발현시켰다(Klauser *et al.*, 1990, 1992). 그러나 분비과정중 세포막 공간에서 일어난 단백질의 접힘(protein 생물산업

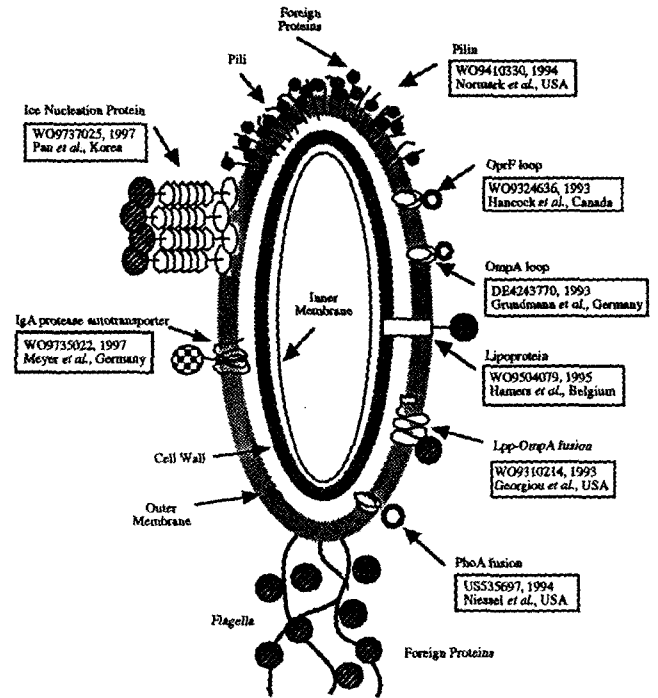


그림 2. 표면발현시스템 patent map.

folding)에 의해 융합단백질의 분비는 억제되었다.

이외에도 그람음성 세균의 경우 세포 표면에 존재하여 표면 발현에 응용할 수 있는 표면발현모체는 편모(flagella), 필리(Pili) 및 펄브리아(Fimbriae) 등의 세포표면 기관단백질을 들 수 있다. 편모의 구성 소단위인 편모단백질(flagellin)을 이용하여 콜레라 독소B 소단위와 B형 간염 바이러스로부터 유래한 항원성 펩타이드가 안정적으로 발현되었으며 이들은 그에 대한 항체와 강력하게 반응하였다(Newton *et al.*, 1989). 세포 표면에 실처럼 생긴 펄브리아의 구성단백질인 펄브린(fimbriin)을 이용하여 외래 펩타이드의 발현을 시도한 결과, 작은 펩타이드의 경우만 성공적으로 발현되었다(Hedegaard *et al.*, 1989).

그람양성세균의 표면발현시스템

위와 같은 그람음성 세균의 표면발현시스템 뿐 아니라 그람양성 세균의 표면단백질을 이용한 표면 발현이 최근에 시도되었다. *Staphylococcus hyicus* 유래의 lipase 분비신호를 사용하고, *S. aureus* 유래의 Protein A 를 막 부착모체로 사용하여 80개 아미노산으로 이루어진 말라리아 항원(malaria blood stage antigen)을 효과적으로 그람양성 세균의 표면에 발현하였다(Samuelson *et al.*, 1995). 젓산균의 표면protease 또는 표면coat protein을 이용한 표면발현시스템도 보고되었고(Palva *et al.*, 1994) 그람양성세균이나 아키아(archaea)의 세포표면에 존재하는 S-layer 구성단백질을 표면발현모체로 이용한 시스템도 최근 개발되었다(Sleytr and Sara, 1997). S-layer의 생물

표 1. Biotechnological and nanotechnological applications of S-layers.

1. S-layer ultrafiltration membranes(SUMs) with defined surface and molecular sieving properties.
2. SUMs, S-layer microparticles(SMPs) or S-layer self-assembly products(SAPs) for the controlled immobilization of functional molecules.
SUMs for covalent binding of enzymes for biosensors.
SUMs with immobilized mAb for immunoassays.
SUMs with immobilized Protein A for purification of Ab.
SUMs as carriers for weakly immunogenic antigens & haptens.
3. S-layers as supporting structures for Langmuir-Blodgett film & liposomes with incorporated functional molecules.
S-layers coated liposomes with surface-located molecules.
S-layers coated liposomes with Ag & haptens for vaccination.
4. Genetic manipulation of S-layer proteins for production of self-assembling fusion proteins.
Incorporation of functional domains as required for affinity matrices, vaccines, biosensors & diagnostics.
5. Matrices for controlled biomineralization.
6. Templates & nanonatural resists for semi-conductor technology.

공학적 이용으로는 vaccine개발, diagnostics, biomimetics, 그리고 molecular nanotechnology 등의 영역이 예상되고 있어 그 응용 분야를 표1에 나타내었다.

효모의 표면발현시스템

효모의 표면발현시스템은 세포표면 당단백질의 N말단이나 C말단에 융합하여 GPI(glycosylphosphatidylinositol) anchor에 의해 표면에 부착 발현할 수 있다(Ferguson, 1988). 효모는 전통적으로 안정성이 인정된 GRAS(Generally-Regarded-As-Safe)미생물이므로 식품 및 의약품생산에 직접 사용할 수 있다는 장점이 있고 세포표면의 세포벽구조가 비교적 상세히 밝혀져 있어 표면발현에 적합하다. 세포벽 구성 glycoprotein중의 하나인 α -agglutinin을 이용한 표면발현시스템이 개발되어 *Saccharomyces cerevisiae*의 표면에 발현된 외래단백질로는 -galactosidase, HBsAg fragments, lipase, cutinase, Single-chain(Fv) antibody 등이 보고되었다(참조 총설; Schreuder *et al.*, 1996).

파아지의 표면발현시스템(Phage display system)

박테리오파아지의 표면에 외래단백질 또는 펩타이드를 발현시키는 연구는 파아지의 표면이 박테리아보다 훨씬 단순하게 구성되어 있어 다량의 peptide library 또는 antibody library로

부터 원하는 하나의 clone을 찾고자 할때 유리하다(Chiswell and McCarferty, 1992). 파아지 표면의 주단백질인 단백질 VIII과 소수단백질인 단백질III의 N말단은 표면으로 돌출되어 있고 외래 폴리펩타이드나 단백질이 N말단에 삽입되어도 전체 파아지구조나 세균에 대한 감염성에는 영향을 주지 않는다. 하지만 삽입할 수 있는 전체길이는 제한되어 있어 작은 펩타이드를 다량으로 발현시켜 원하는 생활성 펩타이드를 찾는 데 사용될 수 있다. 실제로 파아지를 이용한 표면발현벡터는 현재 몇 개의 분자생물학 회사에 의해 판매되고 있다(Stratagene Co., USA; Pharmacia Co., Sweden). 그러나 그 원천기술은 Dyax나 Cambridge Antibody Technology 사들의 특허로 모두 그 기술을 보호받고 있어 과학적인 연구수준에서는 사용할 수 있으나 상업화를 목적으로 사용할 경우 기술 라이선스를 맺고 상당한 기술료를 지불해야 한다. 본고의 범위를 넘기 때문에 phage display 기술에 관한 내용을 소개하지 않는 것 뿐이지 미생물 표면 발현기술이 더 많이 이용되기 때문은 아니라는 사실을 밝혀 둔다.

표면발현시스템의 patent map

표면발현시스템은 그 응용분야가 매우 다양하여 그 원천기술을 특허출원하고 있다. 이 중에서 특히 그람음성 세균의 세포 외막 단백질을 이용한 경우가 가장 많아 5건(WO9504069, WO9324636, WO9310214, EP603672, US5356797)이 보고되었고, 세포표면 기관인 필리(pili)를 이용한 경우가 한 건(WO9410330)이 있으며, 또한 세포표면 지질단백질(lipoprotein)을 이용한 경우도 한 건(WO9504079)이 보고되었다. 그림2는 현재까지 개발된 그람음성세균의 표면발현시스템의 특허지도(patent map)를 그린 것이다. 그림에서 볼 수 있듯이 세균의 표면단백질은 대부분 표면발현모체로 사용될 수 있는 가능성이 있음을 보여준다. 파아지 표면발현시스템의 특허는 90년대 이후 수십 편에 이르지만 이는 본고의 범위를 벗어나므로 기술은 피한다.

표면발현모체의 선택 조건

이상과 같이 박테리아의 표면단백질을 이용하여 외래단백질을 세포 표면에 발현시키기 위해서 적당한 표면단백질과 외래단백질을 유전자 수준에서 서로 연결하여 융합단백질이 생합성 되도록 하고, 이들이 안정하게 세포내막을 통과하여 세포표면에 부착되어 유지되도록 해야 한다. 이를 위해서는 다음과 같은 성질을 갖는 표면단백질을 선정하여 표면발현의 모체로 사용해야 할 것이다.

- 첫째, 세포내막을 통과할 수 있는 secretion signal을 갖고,
- 둘째, 세포표면에 안정되게 부착될 targeting signal을 갖고며,
- 셋째, 세포표면에 다량으로 발현되면서,
- 넷째, 단백질의 크기에 관계없이 안정적으로 발현되어야 한다.

따라서 위 조건을 만족시키는 표면발현모체를 선택하거나 새로운 재조합 단백질을 만든다면 상기한 표면발현시스템의 단점을 보완하는 새로운 표면발현시스템을 개발할 수 있을 것이다.

3. 빙핵활성단백질을 이용한 표면발현시스템

빙핵활성 단백질(Ice Nucleation Protein, INP)은 *Pseudomonas* 속, *Erwinia*속, *Xanthomonas*속 등의 빙핵활성미생물에 존재하는 세포외막 단백질로 과냉각된 물에 존재할 경우 얼음 형성을 촉진하는 기능을 지니는 특수한 단백질이다(Wolber *et al.*, 1986). 여러 세균으로부터 분리된 빙핵활성 단백질의 구조를 유전자의 서열을 통해 살펴보면 특이하게도 단백질 중앙에 8개의 아미노산이 반복되어 나타나는데 주로 OH 잔기를 갖은 아미노산이 많으며 전체 단백질의 81%를 차지하고 있다(Gurian-Sherman and Lindow, 1993). 반복구간의 OH 잔기는 과냉각된 물분자들이 수소결합을 통해 얼음 입자처럼 잘 배열할 수 있는 틀을 제공하는 것으로 알려져 있다(Green *et al.*, 1985). 또한 N말단(전체 단백질의 15%)과 C말단(전체 단백질의 4%)에 특이한 아미노산 서열을 갖고 있어서 이들이 세포내막을 통과할 수 있는 분비신호 및 표적신호를 암호화하는 것으로 추측된다. 필자의 연구실에서는 이러한 빙핵활성단백

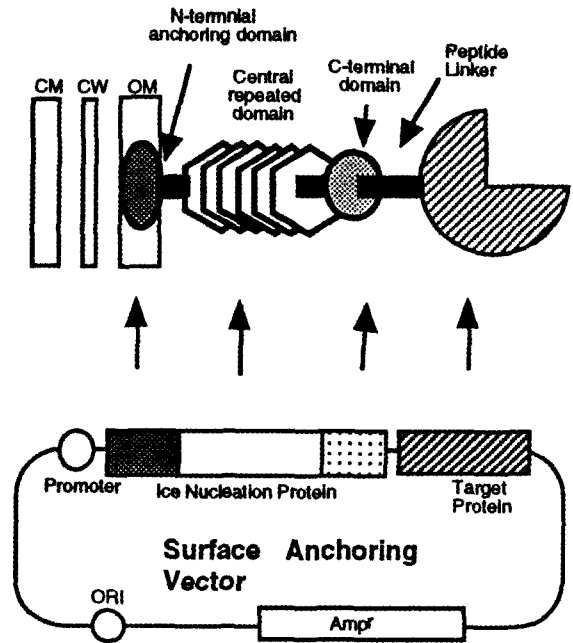


그림 3. 빙핵활성단백질의 구조와 표면발현벡터지도.

질의 아미노산 일차서열과 구조적 특성으로부터 빙핵활성단백질을 새로운 표면발현 motif로 사용한 신규 박테리아 표면발현시스템을 개발하였다. (그림 3) 위에서 설명한 표면발현모체

표 2. 빙핵활성단백질 표면발현시스템의 응용 연구사례.

Type of target proteins	Experimental results
Hydrolytic enzymes	
<i>Bacillus</i> Carboxymethylcellulase (CMCase)	enzyme activity, fluorescence microscopic observation
<i>Pseudomonas</i> lipase	enzyme activity whole cell lipid hydrolysis in aqueous 2 phases
<i>Serratia</i> metalloprotease	vector construction
<i>Serratia</i> chitinase	whole cell chitin hydrolysis fluorescence microscopic observation
<i>Zymomonas</i> levansucrase	fluorescence microscopic observation whole cell bioconversion of sucrose to levan
<i>Zymomonas</i> sucrose	growth of <i>E. coli</i> on sucrose
<i>Pseudomonas</i> phosphodiesterase	whole cell hydrolysis of toxic compounds
Library	
Cellulase variants library	high-throughput screening of improved enzyme variants
Antigen or epitopes	
Hepatitis B or C virus	vector construction, Western blotting
HIV type I gp 120	expression in <i>Salmonella</i> for oral vaccine production
CD8 ecto domain	expression on <i>E. coli</i>
	expression on <i>E. coli</i>
Antibody	
Single chain scFv antibody against hepatitis B virus surfac antigen preS2	whole cell ELISA, binding and elution of whole cell
Miscellaneous proteins	
Chloramphenicol acetyltransferase(CAT)	enzyme activity, western blotting immunogold electron microscopic observation
<i>E. coli</i> alkaline phosphatase	enzyme activity

로서 갖추어야할 조건의 관점으로 병핵활성단백질을 살펴보면 다음과 같은 독특한 성질을 갖고 있다.

첫째, 병핵활성 단백질은 세포외막단백질로 세포 표면에 다량 발현될 수 있고,

둘째, 발현된 병핵활성 단백질은 휴지기에서도 안정하게 유지되며,

셋째, 구조적으로 다른 막 단백질과 달리 세포 표면에 돌출되어 있으며,

넷째, 단백질 중앙에 존재하는 반복된 구간은 필요에 따라 발현될 외래 단백질과 세포 표면사이와의 길이를 임의로 조정하는데 modulatable spacer로 이용될 수 있으며,

다섯째로는 병핵활성 단백질은 다양한 그람음성 세균에서 안정되게 발현될 수 있어 다양한 그람음성 세균의 표면에 발현시킬 수 있다는 점이다.

병핵활성단백질을 이용하여 고초균 유래의 carboxymethyl-cellulase(CMCase)을 병핵활성단백질의 C말단에 융합하여 대장균의 표면에 발현하였을 경우 발현된 대부분의 효소활성은 표면에 존재하였다(Jung *et al.*, 1998). 표면에 발현된 CMCase는 성장휴지기에서도 배양액 중으로 유리되지 않고 매우 안정하게 그 활성을 유지하여 여타의 표면발현시스템보다 안정한 장점을 갖고 있다. CMCase와 융합된 병핵활성단백질도 역시 병핵활성을 유지하고 있으므로 이를 이용한 생물전환 최종산물의 동결농축 또는 동결건조등의 공정을 통해 손쉽게 농축 또는 분리할 수 있는 장점도 있다. 병핵활성이 필요 없는 경우 병핵활성단백질의 반복구간을 제거한 최소한의 분비 및 부착 신호를 갖는 N말단과 C말단이 융합된 새로운 재조합 표면발현모체도 개발하였다. N말단과 C말단이 융합되거나 N말단과 C말단사이에 타겟단백질을 삽입하여도 세포표면에 발현되었다(Jung *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000). 타겟단백질로는 효소(Jung *et al.*, 1998a, 1998b), 효소라이브러리(Kim *et al.*,

2000), 여러 가지 antigen 혹은 그 에피통(Lee *et al.*, 2000; Kim and Yoo, 1998, 1999; Kwak *et al.*, 1999) 등이 발현되었다. 특히 표면발현된 antigen들은 *in vivo* 실험시 immunization이 잘 일어나 항체생산을 확인할 수 있었다. 현재 본 연구실에서 수행중인 병핵활성단백질 표면발현시스템의 다양한 응용기술을 표 2에 요약하였다.

4. 표면발현시스템의 응용

생백신

현재까지의 백신은 약독화된 병원성 세균이나 바이러스를 사용하였다. 그러나 생백신(live vaccine)은 매우 강력한 면역 반응을 나타내고 숙주세포 내에 증식하면서 지속적으로 항원을 발현할 수 있어서 연구가 집중되고 있다. 특히 비병원성 대장균이나 살모넬라균의 표면에 병원성유래의 항원 에피통을 발현하여 살아있는 상태로 경구투여할 경우 훨씬 지속적이고 강력한 면역반응을 나타내는 것으로 알려져 있다. 간염바이러스 항원단백질, 에이즈바이러스 항원펩타이드, 폴리오바이러스 SC3 에피통, FMDV 에피통등 다양한 병원체로부터 유래한 펩타이드 항원이 대장균이나 살모넬라균 표면에 발현하였다. 사용된 표면발현모체는 다양하여 상기한 모든 경우에 시도되었다(표 3 참조)(Georgiou *et al.*, 1997).

펩타이드 및 항체 라이브러리 스크리닝

표면발현기술은 원하는 생활성 펩타이드나 항체의 스크리닝을 대폭 간소화할 수 있다. 예를들어 목적 Fab 또는 scFv 항체 단편의 라이브러리를 파아지 또는 박테리아 표면에 구축하고 이중 타겟항원과 높은 결합력을 갖는 파아지 또는 박테리아를 affinity chromatography 분리방법을 동원하여 선택적으로 분리할 수 있다. 이러한 탐색방법은 다량의 라이브러리(10^6-10^9

표 3. Expression systems for vaccine production in *E. coli* (Georgiou *et al.*, 1997).

Carrier	Type of fusion of epitope	Localization	Type of epitope
Outer membrane proteins			
<i>E. coli</i> LamB	sandwich fusion	cell surface	variety of viral peptide antigens
<i>E. coli</i> PhoE	sandwich fusion	cell surface	epitope from hsp65 of <i>M.tuberculosis</i>
<i>Pseudomonas</i> OprF	sandwich fusion	cell surface	4-aa epitope from malaria parasite
<i>E. coli</i> or other G(-) lipoproteins	C-terminal or sandwich fusion	periplasmic side of outer membrane/ cell surface	11-aa epitope of polio virus
<i>Neisseria</i> IgAβ	N-terminal fusion	cell surface	cholera toxin B subunit
<i>Pseudomonas</i>	C-terminal fusion	cell surface	HCV surface antigen Core antigen of HBV Hantaan virus surface antigen (Kim <i>et al.</i> , 1998, 1999; Lee <i>et al.</i> , 2000)
Subunits of surface appendages			
<i>Salmonella</i> Flagellin (FilC)	sandwich fusion	cell surface	18-aa epitope from HIV1 gp41
<i>E. coli</i> FimH (Type I pili)	sandwich fusion	cell surface	52-aa epitope from the preS2 of HBV

variants)에서 가장 빠르게 원하는 단일 클론을 획득하는데 유리하고 실제로 치료목적의 인간화된 항체(humanized antibody)의 생산이나 항체촉매(catalytic antibody)의 단백질공학에 응용할 수 있다.

항펩타이드[Anti-peptide] 항체

항원을 표면에 발현하는 박테리아는 동물에 투여시 항체를 생성하도록 하는 whole cell immunogen으로 매우 유용하다. Martineau 등은 대장균의 표면발현시스템을 이용하여 항펩타이드 항체를 생산하는 매우 간단한 방법을 보고하였다(Martineau *et al.*, 1991). 그들은 MalE와 세포외막단백질인 LamB의 표면돌출부위에 원하는 펩타이드를 발현하여 전세포(whole cells) 또는 분쇄된 세포(sonicated cells)를 동물에 투여하여 화학적으로 펩타이드를 합성하거나 이를 carrier protein에 부착하여 투여하지 않고도 항체를 생산할 수 있었다.

전세포 흡착제[Whole cell adsorbents]

Affinity chromatography에 사용되는 항체나 폴리펩타이드는 적당한 담체에 고정화하기 위해 발효를 통한 단백질의 생산, 순수한 상태로의 분리정제 그리고 담체에 고정화 과정을 거쳐야 한다. 그러나 대부분의 경우 이러한 바이오흡착제는 그 생산공정이 단순치 않다. 박테리아를 이용한 흡착단백질의 표면발현은 세포전체를 하나의 흡착제로 개발하는데 사용될 수 있다. 가장 잘 알려진 전세포 흡착제는 포유류 항체의 Fc도메인과 높은 친화성을 지닌 단백질A를 표면에 자연적으로 발현하는 *Staphylococcus aureus*일 것이다. 적당한 발현시스템을 이용한다면 다양한 세균에 이와 비슷한 전세포 흡착제를 개발할 수 있을 것이다. 미생물을 이용한 중금속의 제거 및 회수는 폐수처리등 bioremediation에 매우 중요한 기술이다. metallothionein과 같은 금속흡착 단백질을 세포표면에 대량 발현하면 기존의 금속흡착 미생물을 이용한 방법보다 훨씬 효과적으로 오염원으로부터 중금속을 제거 또는 회수할 수 있다.(Sousa *et al.*, 1996, 1998; Samuelson *et al.*, 2000).

전세포 생물전환[Whole cell bioconversion]

많은 생물전환에 사용되는 촉매는 값이 저렴하고 쉽게 생산할 수 있는 미생물을 사용하여 생산되고 있다. 그러나 대부분의 목적효소는 세포 내에 있으므로 세포를 배양하고 회수하여 toluene과 같은 permeabilizing agent를 사용하여 permeabilization하는 과정이 필수적이다. 또한 지속적으로 사용할 경우 효소가 실활되거나, 기질과 산물의 물질전달 문제점이 있어서 공정 전체의 생산성을 저하시키곤 한다. 이러한 문제점들은 효소를 지속적으로 세포표면에 발현시킴으로써 제거할 수 있다. 필자의 연구실에서는 빙핵활성단백질을 이용하여 levansucrase를 대장균의 표면에 발현시키고 이 대장균을 사용하여 sucrose로부터 생물산업

터 levan를 대량생산할 수 있었다(Jung *et al.*, 1998a; 1998b).

오염물질 제거

세포표면에 발현된 phosphodiesterase에 의한 매우 독성이 강한 organophosphorus계열의 parathion과 paraoxon의 분해는 표면발현기술이 환경정화공정에 사용될 수 있음을 보여준 좋은 예이다(Richins *et al.*, 1997).

초고속 스크리닝

효소의 라이브러리를 만드는 DNA shuffling 등의 혁신적인 기술이 생겨나고 있다. 라이브러리를 효율적으로 만들 수 있다면 그 다음 문제는 어떻게 빠르게 우리가 원하는 클론을 찾아내느냐 하는데 문제의 초점이 모아진다(Arnold and Volkov, 1999). 스크리닝 관점에서 본다면 효소나 단백질 라이브러리를 활성이 있는 형태로 세포표면에 디스플레이한다는 것은 아무런 전처리 필요없이 효소의 활성을 직접 측정하거나 미생물의 성장 등에 연결시킬 수 있다는 점에서 초고속 스크리닝(high-throughput screening) 환경을 제공한다. 필자의 연구실에서는 cellulase library를 표면발현하여 각각의 mutant enzyme의 활성이 미생물의 성장속도에 연결되도록 하여 단기간 내에 개량된 cellulase를 찾을 수 있었다(Kim *et al.*, 2000).

기타 나노테크놀로지로의 응용

세균 표면의 크리스탈단백질인 S-layer는 단백질 서브유니트가 평면구조로 세포표면을 덮고 있다(Beveridge and Graham, 1991). Sleytr 등은 S-layer의 생물공학적 중요성을 인식하고 S-layer의 응용가능분야를 표 2와 같이 제시하였다(Sleytr and Sara, 1997). 표에서 알 수 있듯이 세균의 표면을 분자생물학적으로 연구하면 그 성질과 구조적 특징으로부터 보다 다양한 분야에 응용할 수 있음을 보여준다.

5. 전망

미생물의 표면발현시스템의 중요성은 날로 증가하여 의학, 환경, 생물공정 등 생물공학 전반에 응용 가능하게 될 수 있는 platform technology로 발전할 것이다. 병원성미생물의 표면 연구는 새로운 형태의 백신 개발로 이어지게 될 것이고, 독성 물질 제거를 위한 미생물의 표면연구는 새로운 환경적응형 미생물의 디자인 또는 난분해성 오염물질을 분해할 수 있는 효소를 능동적으로 세균의 표면에 발현시킬 수 있는 분야까지 이를 것으로 전망된다. 아직 개발초기상태에 있는 표면발현기술은 향후 다양한 분야에 응용될 것으로 기대된다. 그 실현을 위한 핵심기술은 적당한 표면발현모체의 개발과 표면발현시스템을 각 목적에 맞도록 최적화하는 일일 것이다.

6. 참고문헌

1. Agterberg, M., Adriaanse, H. and Tommassen, J. Use of the outer membrane protein PhoE as a carrier for the transport of a foreign antigenic determinant to the cell surface of *Escherichia coli* K-12. *Gene* **59**: 145-150(1987).
2. Agterberg, M., Adriaanse, H., van Bruggen, A., Karperien, M. and Tommassen, J. Outer membrane PhoE protein of *Escherichia coli* K-12 as an exposure vector : possibilities and limitations. *Gene* **88**: 37-45(1990).
3. Arnold, F.H. and Volkov, A.A. Directed evolution of biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**: 54-59 (1999).
4. Beveridge, T.J. and Graham, L.L. Surface layers of bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**(4): 684-705(1991).
5. Charbit, A., Molla, A., Saurin, W. and Hofnung, M. Versatility of a vector for expressing foreign polypeptides at the surface of Gram-negative bacteria. *Gene* **70**: 181-189(1988).
6. Charbit, A., Sobczak, E., Michel, M.-L., Molla, A., Tiollais, P. and Hofnung, M. Presentation of two epitopes of the preS2 region of hepatitis B virus on live recombinant bacteria. *J. Immunol* **139**: 1644-1658(1987).
7. Chiswell, D.J. and McCafferty, J. Phage antibodies: will new 'coliclonal' antibodies replace monoclonal antibodies? *TIBTECH* **10**: 80-84(1992).
8. d'Enfert, C., Ryter, A. and Pugsley, A.P. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Klebsiella pneumoniae* genes for the production, cell surface localisation and secretion of the lipoprotein pullulanase. *EMBO J.* **6**: 3531-3538(1987).
9. Ferguson, M.A.J. and Williams, A.F. Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Ann.Rev.Biochem.* **57**: 285-320(1988).
10. Fischetti, V.A., Medagliani, D., Oggioni, M. and Pozzi, G. Expression of foreign proteins on Gram-positive commensal bacteria for mucosal vaccine delivery. *Curr. Opin. Biotechnol.* **4**: 603-610(1993).
11. Francisco, J.A., Earhart, C.F. and Georgiou, G. Transport and anchoring of β -lactamase to the external surface of *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **89**: 2713-2717(1992).
12. Fuchs, P., Breitling, F., Dubel, S., Seehaus, T. and Little, M. Targeting recombinant antibodies to the surface of *Escherichia coli*: fusion to a peptidoglycan associated lipoprotein. *Bio/Technology* **9**: 1369-1372(1991).
13. Georgiou, G., Poetschke, H.L., Stathopoulos, C. and Francisco, J.A. Practical applications of engineering Gram-negative bacterial cell surfaces. *TIBTECH* **11**: 6-10(1993).
14. Georgiou, G., Stathopoulos, C., Daugherty, P.S., Nayak, A.R., Iverson, B.L. and Curtiss III, R. Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: From the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nature Biotechnology* **15**: 29-34(1997).
15. Green, R.L. and Warren, G.J. Physical and functional repetition in a bacterial ice nucleation gene. *Nature* **317**: 645-648(1985).
16. Gurian-Sherman, D. and Lindow, S.E. Bacterial ice nucleation: significance and molecular basis. *FASEB J.* **7**: 1338-1343(1993).
17. Hedegaard, L. and Klemm, P. Type 1 fimbriae of *Escherichia coli* as carriers of heterologous antigenic sequences. *Gene* **85**: 115-124(1989).
18. Jung, H.C., Lebeault, J.M. and Pan, J.G. Surface display of *Zymomonas mobilis* levansucrase by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae*. *Nature Biotechnol.* **16**: 576-580(1998a).
19. Jung, H.C., Park, J.H., Park, S.H., Lebeault, J.M. and Pan, J.G. Expression of carboxymethylcellulase on the surface of *Escherichia coli* using *Pseudomonas syringae* ice-nucleation protein. *Enzyme Microb. Technol.* **16**: 576-580 (1998b).
20. Kim, E.J. and Yoo, S.K. Cell surface display of CD8 ecto domain on *Escherichia coli* using ice-nucleation protein. *Biotechnol. Tech.* **12**: 197-201 (1998).
21. Kim, E.J. and Yoo, S.K. Cell surface display of hepatitis B virus surface antigen on *Escherichia coli* using *Pseudomonas syringae* ice-nucleation protein. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**: 292-297 (1999).
22. Kim, Y.S., Jung, H.C. and Pan, J.G. Bacterial cell surface display of an enzyme library for selective screening of improved cellulase variants. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 788-793 (2000).
23. Kwak, Y.D., Kim, E.J. and Yoo, S.K. Cell surface display of human immunodeficiency virus type I gp120 on *Escherichia coli* by using ice-nucleation protein. *Clinic. Diag. Lab. Immun.* **6**: 499-503 (1999).
24. Klauser, T., Kramer, J., Otzelberger, K., Pohlner, J. and Meyer, T.F. Characterization of the *Neisseria* Iga β -core: The Essential unit for outer membrane targeting and extracellular protein secretion. *J. Mol. Biol.* **234**: 579-593(1993).
25. Klauser, T., Pohlner, J. and Meyer, T.F. Extracellular transport of cholera toxin B subunit using *Neisseria* Iga protease β -domain: conformation-dependent outer membrane translocation. *EMBO J.* **9**: 1991-1999(1990).
26. Kornacker, M.G. and Pugsley, A.P. The normally periplasmic enzyme β -lactamase is specifically and efficiently translocated through the *Escherichia coli* outer membrane when it is fused to the cell-surface enzyme pullulanase. *Mol. Microbiol.* **4**(7): 1101-1109(1990).
27. Lee, J.S., Shin, K.S., Pan, J.G. and Kim, C.J. *Nature Biotechnol.* (in press).
28. Little, M., Fuchs, P., Breitling, F. and Dubel, S. Bacterial

- surface presentation of proteins and peptides: an alternative to phage display technology? *TIBTECH* **11**: 3-5(1993).
29. Martineau, P., Charbit, A., Leclerc, C., Werts, C., O'Callaghan, D. and Hofnung, M. A genetic system to elicit and monitor antipeptide antibodies without peptide synthesis. *BioTechnology* **9**: 170-172(1991).
 30. Newton, S.M., Jacob, C.O. and Stocker, B.A.D. Immune response to cholera toxin epitope inserted in *Salmonella* flagellin. *Science* **244**: 70-72(1989).
 31. Ochs, M., Angerer, A., Enz, S. and Braun, V. Surface signaling in transcriptional regulation of the ferric citrate transport system of *Escherichia coli*: mutational analysis of the alternative sigma factor FecI supports its essential role in *fec* transport gene transcription. *Mol. Gen. Genet.* **250**: 455-465(1996).
 32. Palva, A.M. and Palva, I.A. *Lactobacillus* expression system using surface protein gene sequences, WO94/00581(1994).
 33. Richins, R.D., Kaneva, I., Mulchandani, A., and Chen, W. Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface-displayed organophosphorus hydrolase. *Nature Biotechnol.* **15**: 984-987(1997).
 34. Ruppert, A., Arnold, N. and Hobom, G. OmpA-FMDV VP1 fusion proteins: production, cell surface exposure and immune responses to the major antigenic domain of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* **12**(6): 492-498 (1994).
 35. Samuelson, P., Hansson, M., Ahlberg, N., Androoni, C., Gotz, F., Bachi, T., Nguyen, T.N., Binz, H., Ulhen, M. and Stahl, S. Cell surface display of recombinant proteins on *Staphylococcus carnosus*. *J. Bacteriol.* **177**(6): 1470-1476(1995).
 36. Samuelson, P., Wernerus, H., Svedberg, M. and Stahl S. Staphylococcal surface display of metal-binding polyhistidyl peptides. *Appl. Envir. Microbiol.* **66**: 1243-1248(2000).
 37. Schreuder, M.P., Mooren, A.T.A., Toschka, H.Y., Theo Verrips, C. and Klis, F.M. Immobilizing on the surface of yeast cells. *TIBTECH* **14**: 115-120(1996).
 38. Schulz, G.E. Bacterial porins: structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**: 701-707(1993).
 39. Sleytr, U.B. and Sara, M. Bacterial and archaeal S-layer protein: structure-function relationships and their biotechnological applications. *TIBTECH* **15**: 1-9 (1997).
 40. Sousa, C., Cebolla, A., and de Lorenzo, V. Enhanced metaloadsorption of bacterial cells displaying poly-His peptides. *Nature Biotechnol.* **14**: 1017-1020 (1996).
 41. Sousa, C., Kotrba, P., Ruml, T. Cebolla, A., and de Lorenzo, V. Metaloadsorption by *Escherichia coli* displaying yeast and mammalian metallothioneins anchored to the outer membrane protein LamB. *J. Bacteriol.* **180**: 2280-2284(1998).
 42. Taylor, I.M., Harrison, J.L., Timmis, K.N. and O'Conor, C.D. The TraT lipoprotein as a vehicle for the transport of foreign antigenic determinants to the cell surface of *Escherichia coli* K12: structure-function relationships in the TraT protein. *Mol. Microbiol.* **4**(8): 1259-1268(1990).
 43. Wolber, P.K., Deininger, C.A., Southworth, M.W., Vandekerckhove, Joel., Montagu, M.V. and Warren, G.J. Identification and purification of a bacterial ice nucleation protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **83**: 7256-7260(1986).
 44. 반재구, 정홍채, 신수안, 박승환, 정봉현, 한문희, 신득용, 황지숙, 홍효정, 박성섭, 김철중 이종수. 박테리아 표면발현시스템의 개발과 응용, *생명공학연구소보고서*(1997).