

내포체 단백질의 개선된 대규모 재접힘 기술

†김인호 · ¹정봉현

충남대 화학공학과 대전시 유성구 궁동 220 305-764

¹생명공학연구소 대전시 유성사서함 115, 305-600

(접수 : 2001. 1. 12., 게재승인 : 2001. 2. 21.)

Improved Large-Scale Refolding Techniques for Inclusion Body Proteins

In Ho Kim† and Bong Hyun Chung¹

Department Chem.Eng., Chungnam National University Kungdong 220, Yusung, Taejon, 305-764

¹Kor. Res. Inst. Biosci. Biotechnol. P.O. Box 115, Yusung, Taejon, 305-600

(Received : 2001. 1. 12., Accepted : 2001. 2. 21.)

Techniques for protein refolding from inclusion body are discussed in view of its engineering application to large scale protein purification. Among the techniques, dilution and dialysis are mainly utilized due to simple operation. Membrane reactor, gel filtration chromatography, and continuous tank operation are emerging tools for their process-scale possibility in refolding. Reaction engineering approaches could be used to analyze the kinetic behaviour in the process scale refolding reactor. The kinetic analysis is helpful in the optimization of refolding yield in the refolding reactor.

Key Words : refolding reactor, inclusion body

서 론

단백질의 1차 서열로부터 단백질이 3차원 입체구조를 짚은 시간 내에 이루는 현상(단백질 접힘, Protein Folding)을 1970년 대 초에 관심을 가지고 연구를 시작한 이래 많은 진보가 있었다. 여기에 대해 필자(1)가 총설을 작성한 후 기타 여러 총설이(2,3) 근래 발표되었다. 재조합 단백질이 숙주 세포 내에서 과량 발현될 때 흔히 내포체(Inclusion body)라고 불리는 단백질 덩어리가 세포 내에서 관찰이 되고 이를 변성제(Denaturation Agent, Chaotropic Agent)에 녹여 재조합 단백질의 정제가 시작된다. 정제 수율은 정제과정에서 변성된 단백질을 변성제를 제거하는 공정을 거쳐 원상화(Renaturation)하면서 크게 변화한다. 원상화는 단백질 입장에서 보면 재접힘(Refolding)이고 정상의 3차원 입체구조를 갖게 됨을 의미한다. 재접힘과정에서 여러 공정 변수가(pH, 온도, 재접힘용액 조성 등) 재접힘 수율에 영향을 미치며 최종 정제 수율을 결정한다. 총설 (1)에서는 단백질의 접힘(Folding) 메커니즘과 단백질 구조연구 그리고 재조합 단백질의 재접힘의 기초 원

리를 설명하였고 1990년대 재접힘 공정 연구의 진보를 반영하여 본 총설에서는 재접힘의 공학적 측면을 강조하여 서술하고자 한다.

본 론

기본적인 재접힘 공정으로는 재접힘 용액에 의한 희석(4)과 투석공정(5)을 언급할 수 있다. 재접힘 용액(6)에는 통상 Tris 완충액, Glutathion 산화/환원쌍 또는 Mercaptoetanol, Arginine 같은 아미노산 등이 포함되어 있다. 이 재접힘용액은 고농도의 요소 또는 Guanidine HCl 같은 변성제를 희석시켜 단백질이 다시 접히도록 유도한다. 희석과 투석공정은 다량의 재접힘 용액을 필요로 하며 이 다량의 용액과 변성된 단백질 용액의 접촉방법을 대규모로 하기 위해 공학적 개념이 필요하다(7). 접촉 방법의 효율을 고려하여 막을 이용한 방법(8), 젤여과 크로마토그래피법(9), 그리고 교반조를 연속으로 조업(10)하거나 반연속으로 조업(11)하는 방법을 사용할 수 있다. 이런 여러 개념을 도식화하면 Figure 1과 같이 표현되는데, 재접힘공정을 일종의 반응공정으로 보면 화학반응공학의 개념으로 설명할 수 있다(12).

예를 들면 인간 Carbonic Anhydrase B의 재접힘과정을 모델화하면

†Corresponding Author : Department Chem. Eng., Chungnam National University Kungdong 220, Yusung, Taejon, 305-764

Tel : +82-42-821-5685, Fax : +82-42-822-8995

E-mail : ihkim@hanbat.chungnam.ac.kr

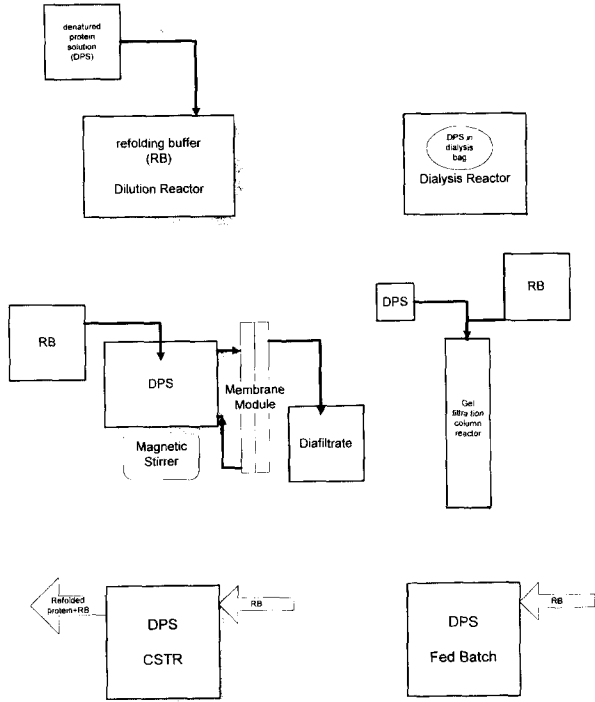
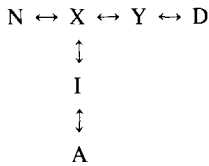


Figure 1. Refolding Reactors.



로 반응단계를 생각할 수 있다.

여기서 N은 원 상태의 단백질, X는 안정한 중간체, Y는 천이 상태의 다른 중간체, D는 변성된 단백질, I는 비가역적으로 불활성화된 물질, A는 응집단백질을 의미한다. 변성된 단백질 D는 중간과정을 거쳐 원상화(N의 상태)가 되던지 잘못된 구조를 갖게 되어 I 상태를 거쳐 응집체 A가 된다. 이 모델에 근거하여 여러 개의 미분방정식으로 표현되는 다수의 속도식을 쓸 수 있고(12) 이 식을 수치 모사하여 시간변화에 따른 N, D, X, I의 변화를 도표화 할 수 있다. 이는 전형적인 화학반응공학의 문제이고 생화학자들이 접근하기 어려운 재접힘 공정을 기술하는 방법이 된다. 이론식의 수치모사 결과를 실험적으로 증명하기 위해서는 시간에 따른 여러 구조의 단백질 농도를 추적할 필요가 있다. 이 때 단백질 생화학 분석법을 동원하여야 한다.

단백질의 구조(Conformation)변화를 추적하기 위해 분광학적 방법이 많이 사용되고 있다 (1). 이 중 Circular Dichroism (CD) 분광법이 단백질 2차구조 변화를 추적하여 재접힘 수율을 계산하기 위해 사용되고 있다(13). 불활성화되어 단백질이 침전이 될 때 단백질의 크기가 변하는데 이를 추적하는 Dynamic Light Scattering 방법이 제시되었고 (14), 또한 수소 치환 질량 분광 분석에 의해 N, D, X, Y의 비율을 손쉽게 계산할 수 있는 방법이 제시되었다(15). 질량 분석 방법은 근래 프로테오믹스에서 감초의 역할을 하는 강력한 생화학 분

Purification Scheme	Small scale	Large scale
Solubilization	1 L (8M Urea, DTT)	40 L (8M Urea, DTT)
Refolding	4 L (20mM CHAPS, 2.5 M Urea, 0.5 M NaCl, GSSG, Arginine)	150 L (same as the small scale)
Ion Exchange Chromatography	0.8 L eluent	30 L eluent
Reversed Phase High Performance Chromatography	0.3 L EtOH elution	13 L EtOH elution

Figure 2. Scale-up of Refolding Process.

석 도구이다. 이방법은 종래의 단백질 서열 실험기의 기능을 대체하며, 분자량 측정, 아미노산 조성 분석, 펩타이드 맵핑 등 다양한 기능을 수행하고 있다.

재접힘 반응에서 재접힘용액 조성을 조정함으로써 정제 수율을 높인 연구가 다수 발표되었다. Triton X-100과 같은 계면활성제를 사용한 재접힘용액이 단백질 효율을 높인 보고(16)가 있으며 BSA를 포함한 용액으로 재접힘 반응을 효율적으로 시킨 예가 있다(17). 기타 아미노산, 당류, 폴리올 등을 넣어 단백질을 안정화 시키는 연구도 있다(18). 이상의 연구는 실험적으로 재접힘 용액의 조성을 변화시켜 재접힘 효율을 올렸으며 이론적 근거는 미약하다.

앞서 설명한 화학공학적 접근법은 아직은 한계가 있다. 다시 말하자면 속도식에서 수치모사에 필요한 매개변수를 실험적으로 결정하기가 매우 어렵고 매개변수의 값이 제한적으로만 알려져 있기 때문이다. 따라서 재접힘 반응기의 설계와 재접힘 용액 조성 결정은 실험실 규모에서 생화학적 지식에 근거할 경우가 많다. 실험실 규모에서 최적 재접힘 반응 조건이 결정되면 Scale-up 과정은 선행적이며 반응기 부피를 변성된 단백질 처리량에 따라 조절하게 된다. 막을 사용할 때는 막모듈의 표면적을 늘리며, 크로마토그래피 칼럼은 변성 단백질 주입량에 비례하여 부피가 증가한다. 바이오공정의 Scale-up에 대해 필자가 논한 바(19)와 같이 바이오공정은 규모의 장점이 작다. 현재까지 재접힘 공정에서 재접힘반응기구의 이해가 작고 반응차수의 결정도 어렵기에 최적반응기 설계는 경험에 의존할 수 밖에 없다. GDF-5의 재접힘 공정(11)의 Scale-up 과정을 도식화 하면 Figure 2와 같다..

이 때 다량의 요소, DTT, GSSG, CHAPS 완충용액이 소모되며 시약 비용 중에서 차지하는 %가 아주 크다(Table 1 참고). 특히 DTT, GSSG와 같은 산화/환원제의 값이 매우 크므로 이 시약들을 적게 쓰는 것이 경제적 정제공정에서 필수적이다.

앞서 논의한 내용은 *In vitro* refolding인데 세포내에서 Chaperonin이 단백질의 바른 접힘을 도와 주는 것(*In vivo* refolding)을 발견 후 이를 공정에 도입한 연구가 있다(8).

Table 1. Reagent Cost Percentage in GDF-5 Purification Process.

Reagent	Percentage	Price(dollars/Kg)
CHAPS	28	
EtOH	25	
NaOH	12	
Urea	11	
DTT	9	320
GSSG	15	530

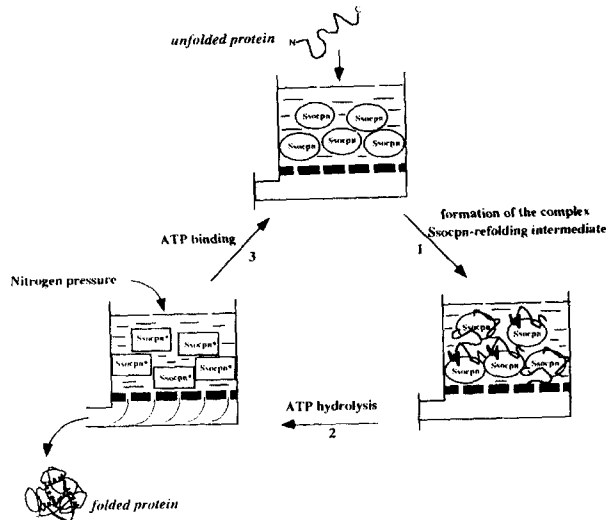


Figure 3. Chaperonin-Assisted Membrane Refolding Reactor.

Chaperonin은 ATPase 역가가 있고 Heat-shock 단백질로서 단백질이 리보솜에서 합성될 때 구조가 안정하도록 도와주며 막을 통한 단백질 이동을 조절한다고 알려져 있다. 고온에서 자라는 미생물을 열로 충격을 가하고 Ssocpn chaperonin을 얻은 후 변성된 리소자임을 재접히게 할 때 사용하였다. 이 공정의 모식도를 Figure3에 보였다.

Chaperonin은 변성된 단백질과 결합하고 ATP의 가수분해에 의해 단백질과 분리된다. 분리된 단백질은 활성을 갖는 구조를 갖고 막을 통해 빠져 나오고, Ssocpn chaperonin은 막에 의해 보전된다. 보전된 Ssocpn은 ATP와 다시 결합하고 재순환된다.

단백질분해 효소가 재접힘에 도움을 줄 때가 있는데(20) 붕지체로 발현된 pro-carboxypeptidase Y (pro-CPY)를 녹인 후 재접힘 반응을 수행할 때 proteinase K가 활성형 CPY를 아주 효과적으로 만듦을 발견하였다. CPY가 Chaperonin과 같은 작용을 함(21)이 입증되었다.

결론

재조합 단백질의 대량생산을 위해 단백질의 변성 그리고 재접힘공정의 최적 설계가 경제성 제고에 있어 관건이다. 이를 위해 재접힘반응기의 효과적 운전이 필요하다. 재접힘용액 조성의 최적화, 반응기 운전법 (회분식, 반연속식, 연속식) 연구, 막이나 크로마토그래피 장치 도입등 새로 연구할 주제가 다양하다고 하겠다.

REFERENCES

- Kim, I. H. (1993), Protein Folding, Recent Advances in Bioprocess Engineering, Vol. 2, p.79-81, Bioprocess Engineering Research Center.
- Kim, K. H. (1999), Folding and Refolding of Recombinant Proteins, *Bioindustry News (Korea)*, **12**, 6-12.
- Rudolph, R. and H. Lilie (1996), *In vitro* Folding of Inclusion Body Proteins, *FASEB J.*, **10**, 49-56.
- Babu, K.R., S. Swaminathan, S. Marten, N. Khama and U. Rinas (2000), Production of Interferon-alpha in High Cell Density Cultures of Recombinant *E.coli* and Its Single Step Purification from Refolded Inclusion Body Proteins, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 655-660.
- Lopez-Vara, M. C., M. Gasset and M. A. Pajares (2000), Refolding and Characterization of Rat Liver Methionine Adenosyltransferase from *E. coli* Inclusion Bodies, *Protein Express. Purif.*, **19**, 219-226.
- Ueda, T., Y. Maeda, T. So and T. Imoto (1997), Favorable Interaction between Heavy and Light Chains Arrests the Undesirable Oligomerization of Heavy Chains in the Refolding of Denatured and Reduced IgG, *Cell Mol Life Sci*, **53**, 929-934.
- Bernandez-Clark, E. and G. Georgiou (1991), Inclusion Bodies and Recovery of Proteins from the Aggregated State in Protein Refolding, p. 1-20, ACS Symp. Series 470.
- Cerchia, L., M. Rossi and A. Guagliardi (2000), An Archaeal Chaperonin-based Reactor for Renaturation of Denatured Proteins, *Extremophils*, **4**, 1-7.
- Gauthier, M. and P. A. Patston (1997), Reactivation of C1-inhibitor Polymers by Denaturation and Gel-filtration Chromatography, *Anal. Biochem.*, **248**, 228-233.
- Rudolph, R.(1999), New Method for *in vitro* Folding of Complex Inclusion Bodies, International Conference on Bioseparation Engineering, July 4-7, Nikko, Japan.
- Honda, J.(1999), Large-Scale Refolding of Therapeutic Protein, International Conference on Bioseparation Engineering, July 4-7, Nikko, Japan.
- Vicik, S. and E. Bernandez-Clark (1991), An Engineering Approach to Achieving High Protein Refolding Yield, in Protein Refolding, p. 180-196, ACS Symp. Series 470.
- Kuwajima, K., H. Yamaya, S. Miwa, S. Sugai and T. Nagamura (1987), Rapid Formation of Secondary Structure Framework in Protein Folding Studied by Stopped-flow CD, *FEBS Lett*, **221**, 115-118.
- Gast, K., A. Noepfert, M. Mueller-Frohne, D. Zirwer and G. Damaschun (1997), Stopped-flow Dynamic Light Scattering as a Method to Monitor Compaction during Protein Folding, *Eur. Biophys. J.*, **25**, 211-219.
- Deng, Y. and D. L. Smith (1999), Rate and Equilibrium Constants for Protein Unfolding and Refolding Determined by Hydrogen Exchange-Mass Spectrometry, *Anal. Biochem.*, **276**, 150-160.
- Sunitha, K., B. H. Chung, K.-H. Jang, K.-B. Song, C. H. Kim, and S.-K. Rhee (2000), Refolding and Purification of *Z. mobilis* Levansucrase Produced as Inclusion Bodies in Fed-Batch Culture of Recombinant *E. coli*, *Protein Express. Purif.*, **18**, 388-393.
- Stefanova M. E., R. Schwerdtfeger, G. Antranikian, and R. Scandurra (1999), Heat Stable Pullulanase from *B. acidopullulyticus*: Characterization and Refolding after

- Guanidinium Chloride-induced Unfolding, *Extremophiles*, **3**, 147-152.
18. Tams, J.W. and K. G. Welinder (1996), Unfolding and Refolding of *C. cinereus* Peroxidase at High pH, in Urea, and at High Temperature. Effect of Organic and Ionic Additives on These Processes, *Biochemistry*, **35**, 7573-7579.
 19. Kim, I. H. (1995) , Principles and Applications of Biopilot Plant , *Bioindustry*, Fall, 12-15.
 20. Hahm, M.S., J. H. Bae, E. S. Choi and B. H. Chung (1999), *In vitro* Activation of Yeast Pro-Carboxypeptidase Y Expressed as Inclusion Bodies in *E. coli*, *Biotech. Lett.*, **21**, 881-885.
 21. Winther, J. R. and P. Sorensen (1991), Properties of Carboxypeptidase Y Provides a Chaperone-like Function as well as Inhibition of the Enzymatic Activity, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 9330-9334. .