

재조합 단백질 발현 시스템의 연구개발 동향

이 상 기

한국생명공학연구원 책임연구원, 대사공학연구실장

1. 재조합 단백질 발현 시스템의 중요성

재조합 단백질 및 펩타이드 발현기술은 21세기 미래 산업을 선도할 생명공학의 핵심 분야다. 또한 최근 급성장하고 있는 생물 의약품 생산에 필수적인 기반기술로서 치료 및 진단용 의약품은 물론 화학, 식품, 농업 등에 응용할 산업용 효소의 대량생산 및 특성개량에도 기본이 되는 핵심 기술이다. 재조합 단백질이 대부분인 생물 의약품은 주로 치료용으로 사용되나 자연계에서의 생산량은 한정되어 있고 virus 감염 등 위험요소가 상존하므로 재조합 기술이 필수적으로 요구되며, 또한 산업용 효소의 경우에도 경쟁력 강화를 위한 전략으로 재조합 기술의 적용이 필요하다. 이러한 재조합 단백질 시장의 급속한 확대와 재조합 기술에 의한 단백질의 성능 향상 가능성은 새롭고 다양한 발현 기술의 개발을 요구하게 되어 세계적인 제약업체와 바이오 관련 기업들은 재조합 단백질의 대량생산 기술개발에 총력을 기울이고 있다. 따라서 재조합 단백질 생산기술의 근간이 되는 독자적인 발현 시스템의 개발은 국제시장 개방과 함께 국가 경쟁력 강화를 위한 중요한 분야로 대두되고 있다.

The U.S. Biotechnology Industry(1997년)의 조사에 따르면, 소득 증가와 재조합 단백질의 사용량은 비례 관계에 있는 것으로 나타나고 있으며 새로운 질병치료용 후보 단백질들의 개발이 속속 보고되고 있다. 또한 FDA 조사 결과에 따르면(2002년 6월) 2001년 승인된 신약 중 16개 품목이 생물공학기술과 관련되어 있고, 현재 시판 중인 133개의 생물약품 중 50% 이상이 최근 5년 이내에 승인된 것이었다. 또한 350개의 생물약품이 임상시험 중이거나 FDA 승인을 기다리고 있는 것으로 나타나 재조합 의약품의 중요성이 더욱 증대되고 있음을 알 수 있다.

재조합 단백질이 대부분을 차지하고 있는 생명공학 의약품 시장 규모는 미국의 경우 2004년 예상치 158억불로 연간 12%의 고속성장이 예상되고 있다(Genetic Engineering News, 2001년). 국내 생명공학 의약품 시장 규모는 1989년 200억원대에서 1995년에는 1,878억원으로 수직상승을 계속해 왔으나

수입 의존도가 매우 높은 구조를 보이고 있는 실정이다. 2005년 예상치는 약 15억불로서 일본의 약 1/8 규모에 이를 것으로 추정된다(TIBTECH, 1999년). 또다른 거대 영역인 의약품 효소의 세계 시장은 1999년 44억불로 이 중 재조합 단백질이 50% 이상을 점유하고 있으며 2009년에는 재조합 효소의 시장 규모가 95억불에 달할 것으로 추정되는 등 실제로 재조합 효소의 시장 점유율은 지속적으로 증가하고 있다(일경 바이오연감 99, 1999). 한국 바이오 연감(2000년)에 따르면 효소의 국내 생산 규모는 57억원, 국산 수출이 5억원, 수입 203억원이지만 효소 자체보다는 효소이용공정의 시장 규모가 훨씬 큰 것으로 알려져 있다. 의약품 효소 중에는 소염진통제로 사용되는 pronase나 혈전용해제로 사용되는 streptokinase 및 streptodornase 등의 다양한 효소의 수요가 급속히 늘어나고 있으나 생산 기술이 일부 다국적 기업에 의해 독점되고 있으므로 국내에서도 재조합 방법에 의해 이 효소들을 생산하는 기술의 개발이 시급한 실정이다.

2. 재조합 단백질 발현의 핵심기술

재조합 단백질 발현 기술의 핵심은 promoter, 분비 signal, vector의 안정성 등 고효율 발현 vector를 구성하는 요소들의 확보, 수용성 발현(soluble expression) 기술, 발현된 단백질의 targeting(intracellular, membrane, periplasm, cell surface, extracellular 등) 기술, 원형 재조합 단백질 생산을 위한 수식 기술, 재조합 단백질의 분해 및 변형 방지 기술과 최적화된 숙주 세포 개발을 위한 세포공학(cellular engineering)기술 등이다. 특히 이들 요소 중 수용성 발현을 위해, carrier 기술을 이용하여 분비가 용이한 signal peptide를 재조합 단백질에 결합시키거나 합성 leader와의 융합(translational fusion)을 통해 분비를 촉진시키거나, 자체 단백질의 접힘 현상(folding)이나 maturation을 유도함으로써 분비를 촉진하는 chaperone을 도입하여 그 농도를 조절함으로써 목표 단백질의 발현을 증가시키는 등의 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한 한 가지 중요한 요소인 재조합 단백질의 분해 및 변형을 방지하기 위한 연구

로는 체외 단백질 분해효소(extracellular protease)에 대한 유전적 정보를 이용하여 관련 유전자를 결손시킨 단백질분해효소 결핍 균주의 개발이 이루어지고 있다.

재조합 단백질의 발현 양상은 숙주 세포나 목적 생산물의 종류에 따라 각기 달라 목적 생산물에 가장 적합한 발현 시스템을 선택해야 효율적인 생산 시스템을 구축할 수 있으므로 세균, 효모, 곰팡이, 식물 및 동물을 포함한 여러 다양한 발현 시스템이 개발되고 있다. 그러나 재조합 단백질이 시장 경쟁력을 갖기 위해서는 저렴한 비용으로 대량생산이 가능해야 하므로 짧은 시간 내 고농도 균체 배양이 가능하고 유전자 조작이 용이한 미생물이 주된 발현 시스템으로 개발되고 있으며, 이들 중에서도 특히 유전학적, 생리·화학적 특징이 잘 밝혀져 있는 대장균, 고초균 등 원핵세포 생명체가 일차적인 숙주 세포로 가장 많이 이용되어 왔다. 그러나, 원핵 미생물 발현 시스템을 활용할 경우 고등생물과 상이한 유전자 구조 및 발현시스템, 단백질의 번역 후 수식(post-translational modification), 분비 과정 및 활성형의 3차원 구조, 단백질의 안정성 등의 차이로 인해 인간을 비롯한 고등생물로부터 유래한 재조합 단백질의 발현율이 낮아지거나 inclusion body 형성 등 비활성 상태로 발현되는 등 많은 문제점들이 여전히 해결해야 할 과제로 남아있다. 이러한 측면에서 최근 고등생물과 진화학적으로 유사한 효모, 사상성 진균류, 곤충 세포, 포유동물 세포 등을 재조합 단백질 생산의 숙주 세포로 개발하거나 활용하는 사례가 늘고 있다.

3 재조합 단백질 발현 시스템의 종류 및 특징

재조합 단백질을 발현하기 위한 시스템은 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* 등과 같은 원핵세포로부터 *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia*

표 1. 재조합 단백질 발현시스템의 종류

구분	시스템	구분	시스템
Prokaryotic	<ul style="list-style-type: none"> · <i>E. coli</i> · <i>B. subtilis</i> · Other bacteria e.g. <i>Lactococcus lactis</i> 	Mammalian cells	<ul style="list-style-type: none"> · Viral infection e.g. adenovirus, semliki forest virus · Inducible expression 시스템
Yeast	<ul style="list-style-type: none"> · <i>P. pastoris</i> · <i>S. cerevisiae</i> · <i>H. polymorpha</i> · <i>Y. lipolytica</i> 	In vitro expression 시스템	<ul style="list-style-type: none"> · Rabbit reticulocyte lysate (red blood cells) · Wheat germ extract · <i>E. coli</i> extract
Fungi	<ul style="list-style-type: none"> · <i>Aspergillus nidulans</i> · <i>Aspergillus oryzae</i> · <i>Neruospora crassa</i> 	Others	<ul style="list-style-type: none"> · <i>Xenopus</i> oocytes and cell-free extract · Transgenic mice · Milk of transgenic animals · Transgenic plants
Insect cells	<ul style="list-style-type: none"> · Baculovirus · Stable recombinant cell lines e.g. Insect select 시스템 - Invitrogen · Schneider cells (<i>Drosophila</i>) 		

lipolytica 등과 같이 단세포 진핵세포인 효모 계열, *Aspergillus nidulans* 등의 사상성 진균류(filamentous fungi), 곤충세포(insect cells), 포유동물 세포(mammalian cells) 등 고등생물에 이르기까지 다양하게 개발되고 활용되어 왔다. 지금까지 개발된 대표적인 재조합 단백질 발현시스템의 종류를 살펴보면(표 1)에 표시한 바와 같다. 각각의 발현시스템은 고유한 특징을 가지고 있으며, 이러한 차이가 원하는 단백질을 발현시키기 위한 시스템을 선택하는데 있어 주요한 기준이 되고 있다.

가. 원핵세포 시스템

균주에 대한 많은 지식과 경험이 축적되어 있는 *E. coli*는 재조합 단백질을 대량 생산하는데 있어서도 가장 널리 이용되고 있는 원핵세포 시스템이다. 생리구조가 단순하고, 성장속도가 빠르며, 목표 단백질의 생성량이 전체의 10%에 이르러 재조합 단백질의 생산 비용이 저렴하다는 장점으로 인해, insulin, 인체 성장 호르몬(human growth hormone)을 생산하는데 숙주 세포로 사용되어 왔다. 그러나 발현된 단백질의 접힘 현상(folding)이 제대로 이루어지지 않아 활성을 나타내지 않는 경우가 많으며, 발현산물이 독성을 나타내어 세포 자체의 성장을 저해함으로써 생산효율을 떨어뜨리거나, 번역 후 수식(post-translational modifications)에 관련된 효소가 결핍되어 원하는 단백질을 생산하지 못하는 단점이 있다. 즉, 활성을 가지기 위해서 당화과정(glycosylation)과 같은 번역 후 수식이 필요한 당단백질이나 크고 매우 복잡한 구조를 가지고 있는 단백질의 생산에는 한계가 있지만 insulin, beta-endorphin과 같은 호르몬에서 interferon, interleukin과 같은 immunomodulator에 이르기까지 많은 유용 재조합 단백질이 *E. coli*를 숙주 세포로 하여 성공적으로 생산되어 왔다.

*E. coli*로 부터 재조합 단백질을 생산함에 있어 *lac*, *tac*, *trc*, T7(pET vectors, Novagen)과 같은 강력하면서도 유도 가능한

promoter를 갖춘 다양한 발현벡터가 개발되어 외래단백질(heterologous proteins)의 생산에 이용되어 왔지만, 이러한 재조합 단백질의 과다 발현시 inclusion body로 알려진 불용성 결합체를 형성하는 경우가 종종 보고되어 왔다. Inclusion body의 형성은 초기 분리단계가 용이하고, 세포내 단백질분해 효소에 의한 분해를 감소시킨다는 장점을 보이지만, 활성을 나타내기 위해 단백질 변성이나 재접힘(denaturation/refolding) 과정이 필요하고 그 과정에서 분리효율이 낮아진다는 단점이 있다. 이를 피하기 위한 방안으로, 생성된 재조합 단백질, 특히 disulfide 기의 형성이 필요한 단백질을 cytoplasm에 수용성 형태로 생산하기 위해 발현시스템을 제작하거나 배양 조건을 조절하기도 하고, inclusion body 형태로 생산한 후 다시 활성이 있는 단백질로 만들기 위해 복잡하고 비용이 많이 드는 변성 및 재접힘 과정을 거치기도 한다. 그러나 비용 및 효율성 측면에서 상당히 불리한 점이 있으며, 따라서 대상 단백질을 세포내에서 수용성 형태로 대량 생산하는 방법에 관심이 높아지고 있으며, 이를 위해 chaperone의 일종인 Sec 단백질 기구를 이용하거나, Signal Recognition Particle(SRP)를 이용한 단백질 분비 방법, endoxylanase 분비 신호 서열을 이용한 재조합 단백질의 분비 생산 등의 연구가 활발히 진행되고 있다.

한편 *E. coli*를 이용한 재조합 단백질의 생산에서 각광받는 분야는 세포 표면발현(cell surface display) 기술이다. 세포 표면발현 기술이란 원하는 단백질을 세포 표면에 부착하여 발현시키는 것을 말하며, 어떤 단백질을 세포 표면에 발현시키기에 따라 산업적 응용 잠재력은 상당하다고 할 수 있다. 표면 단백질을 표면 부착(surface anchoring) motif로 사용하여 외래 단백질을 표면에 발현시킴으로써 재조합 생백신, 펩타이드/항체 library 제작 및 screening, 전세포(whole cell) absorbent, 전세포 생물 전환 촉매 등 다양한 응용성을 가지고 있다. 초기에는 phage의 표면이 bacteria 보다 단순하기 때문에 phage 표면에 외래 단백질을 발현시키는 연구가 먼저 진행되었으나 phage 유전자가 DNA 증식과 coat 단백질을 만들기 위하여 필수적인 것으로만 구성되어 있고 phage 자체의 크기도 bacteria와 비교하여 매우 작기 때문에 삽입되어 표면에 발현될 수 있는 외래 단백질의 길이가 매우 제한되고 응용범위에도 한계가 나타났다. 반면 *E. coli*의 경우 phage와는 달리 세포내막, periplasmic space, 세포외막으로 이루어진 매우 복잡하고 독특한 막구조를 가지고 있으며, 세포 외막 단백질, lipoprotein, 분비 단백질, 편모 단백질 등 발현시키고자 하는 외래 단백질을 세포 표면까지 안정적이며 효율적으로 이동시킬 수 있는 단백질 표면 발현 모체가 다양하게 개발되고 있어 점차 그 활용 가능성이 높아지고 있다.

나. 효모(yeast) 시스템

재조합 단백질 생산의 숙주 세포로 이용하기 위한 효모 시 생물산업

시스템으로 최근 활발히 이용되고 있는 것은 전통 효모인 *S. cerevisiae*와 *H. polymorpha*, *P. pastoris*, *P. methanolica* 등의 methanol 자화 효모, 그리고 기타 시스템으로 최근 관심을 끌고 있는 *Y. lipolytica* 등이 있다. 이들은 인간 유래 단백질 생산을 위해 필수 과정인 번역 후 수식(post-translational modifications)이 가능하며, 원하는 단백질을 배지에 분비하도록 유도시킬 수 있다는 장점이 있다. 특히 methanol 자화 효모들의 경우 methanol 대사경로에서 유래된 강력하고 조절이 가능한 promoter 시스템을 기반으로 재조합 단백질의 산업적인 생산 시스템으로 각광받고 있다. 그러나 가장 큰 문제점은 자체적으로 보유하고 있는 단백질분해 효소의 활성으로 인해 발현된 단백질이 분해되어 생산 수율이 떨어질 수도 있다는 점이다.

외래 유전자의 발현을 위해 도입된 promoter 중 유용한 것으로는 alcohol oxidase 유전자 계열로서 *AOX1(P. pastoris)*, *AUG1(P. methanolica)*, *AOD1(Candida boidinii)*, *MOX(H. polymorpha)* 등이 있고, 이 외에 *FLD1(formaldehyde dehydrogenase, P. pastoris)*, *FMD(formate dehydrogenase, H. polymorpha)* promoter가 있다. 이들 promoter는 서로간의 생리적 특성이 비슷한 반면, 효소 생산에 관련되어 탄소원에 따른 대사제어(carbon-source-dependent regulation)에 있어 큰 차이점을 보인다. 즉 *AOX1*, *AUG1*의 경우 활성화를 위해서는 methanol의 유무에 따라 크게 영향을 받는데 반해, *MOX*, *FMD*의 경우 적절한 양의 glycerol, glucose를 사용함으로써 높은 발현수율을 얻을 수 있다는 것이다. 이들 methanol에 관련된 promoter 이외에도 *GAPI(P. pastoris)*, *PMAI(H. polymorpha)*, *GAP(H. polymorpha)* 등의 항시 발현(constitutive) promoter도 널리 이용되고 있다. 유전자의 도입을 위해 사용되는 vector로는 일반적으로 효모와 bacteria 간의 잡종 DNA 염기서열(yeast / bacterial sequence hybrid)을 사용하며, 그 중 원핵 세포로부터는 *ori*, antibiotic resistance sequence(propagation, selection) 등이, 효모로부터는 selection(marker)을 위한 요소가 유래된다. 한편 목적 유전자의 도입을 위한 형질전환(transformation) 과정은 일반적으로 PEG, electroporation 등을 사용하며, 외래 유전자는 *P. pastoris*의 경우 *AOX1*, *HIS4* 유전자에, *P. methanolica*의 경우 *AUG1* 유전자에, *H. polymorpha*의 경우에는 무작위로 도입된다. 이러한 차이점으로 인해, *P. pastoris*의 경우 생장에 영향을 미치는 *AOX1* 유전자의 구조가 파괴되어 세포의 증식이 늦어지는 현상(growth retardation)이 나타나며, 또한 도입되는 유전자의 copy 수가 10개 이내로 제한되는 단점이 있다. 반면에 *H. polymorpha*의 경우 생장에 영향을 받지 않고, 외래 유전자가 150개까지도 도입될 수 있다. 생성된 단백질의 분비를 위한 secretion leader로는 *S. cerevisiae*에서 유래된 *MF α* 와 *PHO1(H. polymorpha, P. pastoris)*, *CHH*, *GAM1(H.*

po ymorpha for hirudin) 등이 이용되고 있다.

단백질의 당화과정과 관련하여 효모의 경우 O-, 또는 N- 부위와 결합된 탄수화물을 분비단백질에 부착시킬 수 있다. 그러나 이 경우 mannose가 탄소원으로 필요하며, mammalian cell과 같이 galactose, N-acetylgalactosamine, sialic acid 등의 다양한 당을 활용하지 못하는 단점이 있다. 따라서 대개 효모 시스템의 사용은 비당화성 단백질(non-glycosylated proteins)이나 정확한 당화과정이 필요하지 않은 단백질에 적용되는 경우가 많으며, 이를 해결하기 위해 많은 연구가 진행되고 있다. 또 한가지 문제점인 단백질 분해효소 활성의 경우 생산된 단백질의 수율을 떨어뜨리는 가장 큰 요소가 되고 있으며 이를 위해 *ypsΔ(S. cerevisiae)*, *cpyΔ / kex1Δ(H. po ymorpha)* 등의 단백질 분해효소 유전자 자체를 결손시킴으로써 생성된 단백질의 말단 분해를 방지하는 시스템을 개발하기도 하였다. 이러한 효모 시스템을 이용하여 생산된 단백질을 살펴보면 HBV antigen, hEGF, HSA, hPTH, μ -Opioid receptor, Human endostatin, Urokinase 등의 인간유래 단백질과 기타 phytase, glycolate oxidase, Dipeptidyl-peptidase V, Adenylate kinase, Glucoamylase 등의 효소가 있다.

다. 사상성 진균(filamentous fungi) 시스템

*Aspergillus*로 대표되는 사상성 진균류는 다양한 돌연변이(mutagenesis)에 입각한 전통적인 균주 개량을 통해 산업적으로 유용한 효소, 대사산물(항생물질, 유기산, 색소, 식품첨가물) 등을 생산하기 위한 숙주로서 널리 활용되어 왔다. 최근에는 사상성 진균류에 대한 분자 유전학적 연구가 진행됨에 따라 이들을 숙주로 이용해 인간을 비롯한 고등동물 유래의 의약품, 단백질, 치료 및 진단용 항체, 백신, 희귀한 non-ribosomal peptide antibiotics 등을 발현시키고자 하는 연구가 활발히 시도되고 있다. 차세대 외래 단백질 발현 시스템으로 사상성 진균류가 각광을 받고 있는 이유는 전통적인 타 발현 시스템과 비교하여 많은 장점을 가지고 있기 때문이다. 즉, 진핵세포의 발현체계를 가지고 있어 전사, 가공, 변형공정 등이 제대로 이루어지기 때문에 사람을 비롯한 진핵세포 유래의 외래 단백질을 효율적으로 생산할 수 있으며, 효율적인 분비 체계를 갖추고 있어 분비 단백질을 농축하여 정제하는데 있어 유리하다. 또한 유전공학적으로 형질전환에 의한 유전자 copy 수를 높일 수 있으므로 유전자 증폭에 의한 목적 단백질의 대량생산이 가능하며, 전통적으로 효소, 항생제, 유기산, 등의 생산에 활용되어 온 바, 현재까지 다양한 형태의 발효공정에 관한 data들이 축적되어 있어, 구축된 재조합 균주에 원용이 가능한 장점을 가지고 있어 발효공정의 효율적인 관리와 개선에 유리하다. 또한, 사상성 진균류의 많은 균주들은 GRAS(generally recognized as safe) 균주로 분류되고 있어 식품 관련 단백질 생산에 적용이 가능하다. 그러나 매우 복잡한 유전

학적, 형태학적, 생리학적 특성을 보이기 때문에 외래 단백질 발현의 숙주로 활용하기 위한 연구가 아직 초보 수준에 머물고 있는 실정이다.

사상성 진균을 이용한 외래 단백질 발현 시스템을 실질적으로 산업생산에 적용하기 위해서 수행되고 있는 핵심 연구개발 분야는 분비 시스템과 promoter의 개발이며 이와 관련된 전사 조절(transcriptional regulation)과 번역 후 수식에 대한 연구들이 분자생물학적 연구의 주류를 이루고 있다. 사상성 진균류에서 지금까지 개발된 대표적인 promoter로는 *A. nidulans* 유래의 항시 발현 *gdaA* promoter와 *A. niger* 유래의 유도성 *glaA* promoter를 들 수 있으며, 번역 후 수식 중의 하나인 단백질의 재접힘 현상의 경우 hsp70 group ER-specific chaperone의 일종인 BiP-Protein이 관여하는 것으로 밝혀지고 있다. 특히 당화 현상은 효모와 비교할 때 과마노실화(hypermannosylation) 현상이 없다는 점에서 고등 진핵생물체와 유사하며, 고등동물에서 흔한 N-부위 및 O-부위와 결합된 당화 과정이 발견되었지만 그 복잡한 기작에 대한 연구는 미비한 실정이다. 개념정보를 활용한 분비경로에 관한 연구는 가장 중요한 분야임에도 불구하고 아직 초기단계에 머물러 있다. 단백질 분해효소의 생산 또는 작용을 최소화하기 위한 연구는 재래적인 돌연변이 방법이나 분자생물학적 방법으로 단백질 분해효소가 결합된 균주를 개발하는 방법과 병행하여 발효기술에 의한 효소활성 또는 생성을 억제하는 연구가 수행되고 있다. 발효분야에서는 고점도의 발효액 중으로 산소전달을 최대화하기 위한 연구와 균사와 펠렛(pellet) 형성을 조절하여 발현율을 제고하는 연구들이 수행되고 있으며, 이 외에도 일반적인 액침발효(submerged culture) 외에 전통적으로 식품발효에 사용되어 온 고상발효(solid state culture)에 관한 연구가 발현율을 최대화하기 위한 목적으로 수행되고 있다. 특히 최근에는 사상성 진균류 중 먼저 *Neurospora crassa*와 *Aspergillus fumigatus*의 유전체 정보가 밝혀지고 있고, 다양한 다른 진균류 유전체학(fungal genomics)으로 연구가 확산되고 있는 추세여서 향후 발전 가능성이 매우 높은 시스템이라 할 수 있다.

라. 곤충세포(insect cells) 시스템

곤충세포 시스템의 경우 원핵세포 시스템과 포유동물 세포 시스템에 비해 발현율이 높으며, 당화과정(glycosylation), 인산화(phosphorylation), palmitation, myristylation, 단백질 분해 과정(proteolytic processing) 등의 번역 후 변형이 일어날 뿐 아니라, 배양이 용이하고, 유전자의 크기에 구애받지 않으며 여러 유전자의 동시 발현이 가능하다는 장점을 가지고 있다. 또한, 곤충 세포에 이용되는 baculovirus는 척추동물과 식물에 무해하며, 강력한 polyhedrin promoter를 가지고 있어서 전체 단백질의 50%까지 재조합 단백질의 발현이 가능한 것으로 알려져 있다. 재조합 단백질 생산에 사용되고 있는 곤충 세

포로는 나비나 나방과 같은 인시류(lepidopteran cell)에서 유래된 것과 모기나 초파리 같은 쌍시류(dipteran cell)에서 유래된 것이 있다. Baculovirus를 이용한 재조합 단백질의 생산에는 인시류 세포인 *Spodoptera frugiperda*(Sf) 세포와 *Trichoplusia ni*(Tn) 세포가 주로 사용되는데, Sf 세포가 재조합 단백질 생산을 위해 가장 많이 사용되어 왔고, 최근에는 Tn 세포에 대해서 연구가 많이 진행되고 있다. Tn 세포는 Sf 세포보다 재조합 단백질의 발현율이 높고, 번역 후 수식 기능이 Sf 세포보다 정확하여 본래의 단백질과 더 유사한 재조합 단백질을 생산할 수 있다는 장점이 있다. 한편, *Drosophila melanogaster*와 같은 쌍시류 세포는 인시류 세포에 비해 Baculovirus vector에 대한 감염율이 낮아 잘 사용되지 않았으나 최근 초파리에서 유래한 Schneider S2 세포의 유전체(genome)에 높은 복제수의 vector를 삽입하는 연구가 진행되고 있다. 인시류 세포는 세포 용해(cell lysis) 시스템으로 virus의 감염 후 세포가 파괴되는데 반해, 비해 쌍시류 세포는 외부 유전자가 안정되게 계속해서 발현된다는 장점이 있다.

유전자의 도입과 관련하여, 먼저 Baculovirus 시스템의 경우 곤충세포가 이 virus에 감염되면 약 1mg/ml의 polyhedrin 단백질이 발현되는데 그 양은 전체 단백질의 약 50%를 차지하고 있다. 이 polyhedrin 유전자는 virus의 복제나 ECV의 생산에 필수적인 유전자가 아니므로 이 유전자 대신에 외부 유전자를 삽입할 수 있고, 세포 배양을 통해 원하는 재조합 단백질의 생산이 가능하다. Baculovirus는 강력한 promoter를 가진 polyhedrin 유전자 부분을 미생물, 무척추동물, 포유동물, 식

물 등의 외부 유전자로 대체시켜 다양한 종류의 재조합 단백질을 생산할 수 있다. 외부 유전자가 들어간 재조합 virus에 감염된 plaque는 occlusion이 생기지 않아 확인이 쉽고, 또 강력한 polyhedrin promoter의 발현으로 재조합 단백질의 생산에 유리하다. 한편 Baculovirus와는 달리, plasmid 시스템은 plasmid vector를 형질전환 과정을 거쳐 숙주 세포의 염색체 내에 재조합된 외부 유전자를 복수(multi-copy)로 병합(integration) 시키는 방법으로, virus의 감염성(infectivity)이 낮아 그동안 잘 이용되지 않았던 쌍시류의 곤충 세포를 그 대상으로 한다. 특히 염기 서열이 모두 밝혀진 초파리 세포로부터 유래한 Schneider S2 세포의 유전체에 높은 복제수의 vector를 삽입하는 연구가 활발히 진행되고 있다. Baculovirus에 비해 발현 효율이 떨어지는 단점이 있으나 용해 시스템인 Baculovirus와는 달리 이 배양 방법은 비용해 분비(non-lytic secretion) 시스템으로 재조합 단백질의 생산 과정에서 분리 및 정제가 용이할 뿐만 아니라 세포 내에서 외래 유전자가 계속해서 발현된다는 장점을 가지고 있다. Promoter로는 주로 pMT promoter(Metallothionein promoter)를 이용하는데, 이는 제어가 가능한 promoter로서 금속 ion을 유도제(inducer)로 사용, 단백질의 발현을 조절한다.

마. 포유동물 세포(mammalian cells) 시스템

포유동물 세포는 복잡한 당단백질(glycoproteins)을 생산하기 위한 발현시스템으로 각광받고 있다. 현재 제품화되거나 개발되고 있는 대부분의 의약품은 당단백질의 형태를 가지고 있

표 2. 유도 발현 시스템 비교

시스템		특징
Lac-inducible 시스템	장점	- 기존에 많이 연구된 lac operon 사용 - 무독성이며 유도시간이 빠른 IPTG 유도제
	단점	- High basal levels of expression - 외래 유전자 도입에 있어 cloning option이 제한됨 - Two vector 시스템
	발현사례	CAT, H-Rase, β -Galactosidase, csk tyrosine kinase, p53 등
Tetracycline-regulated expression 시스템	장점	- 기존에 많이 연구된 tet operon 사용 - Repression에 필요한 tetracycline의 필요량이 적으며, 세포내로 빨리 전달됨 - Transgenic mice의 생산 가능
	단점	- High basal levels of expression - 안정된 clone의 생산이 어려움 - 외래 유전자 도입에 있어 cloning option이 제한됨
	발현사례	Luciferase, ICP47, β -Galactosidase, RAG, Cyclin, Dynamin 등
Ecdysone-inducible 시스템	장점	- Low basal levels of expression / 단백질 발현조절이 가능 - 강한 유도과정 - Multiple cloning sites를 가진 vector - Transgenic mice의 생산 가능
	단점	- Two vector 시스템으로 인해 안정된 clone을 얻기 위해서 dual selection이 필요 - 최근에 개발되어 아직 검증단계
	발현사례	Luciferase, β -Galactosidase, GFP, H-Rase 등

어 점차 그 사용이 늘고 있는 추세이다. 포유동물 세포의 장점으로 들 수 있는 것은 단백질 접합 및 번역 후 수식 등이 정확하다는 점이며, 단점으로는 다루기가 곤란하며, 비용이 비싸고, 성장이 느리다는 것이다. 재조합 단백질 생산에 사용되고 있는 포유동물 세포로서 가장 대표적인 것으로 CHO(chinese hamster ovary) 세포를 들 수 있는데, CHO 세포의 경우 배양을 위해서는 배지 속에 fetal calf serum이나 다른 mitogen을 공급해야 하므로 생산비용이 비싸고, 분리정제 과정이 어려워지게 된다. 따라서 이러한 cell line을 유전학적으로 개량하여 무혈청 배지(serum free medium)에서도 잘 자라고, zinc 등을 첨가하여 발현을 조절할 수 있는 시스템의 개발이 활발히 진행되고 있다.

포유동물 세포의 경우 크게 adenovirus, semliki forest virus 등을 통한 virus 감염을 이용하는 방법과 유도성 발현(inducible expression) 시스템을 활용하는 방법 두 가지로 나눌 수 있다. Virus 감염의 경우 virus의 promoter나 vector를 이용하여 외래 유전자를 도입, 발현시키며, 사용되는 virus는 단순한 증식경로(replication pathway)를 가지며, 다양한 진핵세포류에서 높은 수준의 단백질 발현이 가능하도록 세포 종류(cell types)에 맞춰 가장 효율적으로 진화되어 있다. 예를 들어 Sindbis 발현 시스템의 경우 도입된 RNA genome이 세포질 내에서 증폭이 되어 높은 수준의 발현을 나타내며, 특히 DNA 증식이 세포질 내에서 이루어지므로 splicing이나 mRNA 이동 등의 문제점을 해결할 수 있다. Virus 감염의 문제점으로는 숙주 세포의 단백질 합성을 방해하거나, 발현된 단백질이 숙주 세포에 해를 끼침으로써 결과적으로 숙주 세포의 사멸을 유도하여 재조합 단백질의 수율이 떨어진다는 점이다. 유도성 발현 시스템의 경우 앞서 말한 virus 감염의 단점을 보완하기 위해 개발되고 있는 시스템이다. 이상적인 단백질 발현 시스템을 구축하기 위해서 필수적으로 갖추어야 할 요소로는 원하는 단백질의 발현 수준이 높고 동시에 가역적이어야 하며, 유도체가 숙주 세포에 대해 다형질 발현성(pleiotropic)을 보이지 않아야 하며, vector가 여러 요소를 두루 갖추어 사용하기 편해야 한다는 것이다. 아직까지 완벽하지는 않지만 앞서 말한 요소를 갖추기 위해 개발되고 있는 시스템으로는 Lac 유도 시스템, tetracycline 제어 시스템, ecdysone 유도 시스템 등이 있으며, 각 시스템의 장단점을 살펴보면(표 2)와 같다.

4. 향후 전망

Post-genome 시대에 새로운 방법론이 등장함에 따라 의약품, 산업용 재조합 단백질을 활용해 인류의 삶의 질 향상 및 난치병 해결을 위한 다양한 연구가 시도되고 있다. 이를 위해 질적 단백질 및 치료용 단백질을 산업적으로 생산하기 위해 사육성 진균류, 포유동물 세포, 곤충 등 전통적인 발현 시스템

의 한계를 극복할 수 있는 새로운 발현 시스템의 개발 경쟁이 치열하게 전개되고 있다. 발현시스템의 확립은 의약품 재조합 단백질 생산의 핵심기반기술로서 급속히 발전하는 추세이며 경쟁력을 갖추기 위해서는 연구 개발의 속도가 중요하므로 향후의 연구 방법에 있어서도 전통적인 탐색 및 돌연변이주 선별의 방식보다는 유전체학(genomics), 단백질체학(proteomics), 대사체학(metabolomics) 등 첨단적인 방법론이 결합되어 수행될 것이다.

치료제로 사용될 생물의약품은 자연계에서의 생산량이 한정되어 있어 재조합 기술이 필수적으로 요구되는데 최근 virus 감염과 더불어 여러 유럽 국가에 확산된 prion 감염을 통한 광우병 문제는 동물 세포를 이용한 재조합 단백질 생산 시스템의 위험 요소로 제기되어 이러한 시스템을 개선하거나 GRAS 미생물로 안전성이 입증된 다른 발현 시스템을 이용하는데 대한 관심이 높아질 것이다. 특히 조만간 유전체 정보(genome informatics) 및 유전체 발현양상(genome expression profiles)을 이용한 신 개념의 기능성 재조합 단백질 생산 수요가 증가될 것으로 예측되고 있어, 경제성과 기능성을 지닌 발현 시스템 개발의 핵심 기반기술인 생체 재설계 기술의 수요는 앞으로 크게 증가될 것으로 예측된다.

5. 참고 문헌

- Higgins, S. J. & Hames, B. D., eds(1999), Protein Expression. A practical approach, Oxford University Press
- Fernandez J.M. & Hoeffler, J.P., eds(1999), Gene Expression 시스템. Using nature for the art of expression, Academic Press, San Diego
- Kane, J. F.(1995), Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. Current Opinions Biotechnol. 6, 494-500.
- Zhang, S., Zubay, G. & Goldman, E.(1991), Low-usage codons in *Escherichia coli*, yeast, fruit fly and primates. Gene 105, 61-72.
- Novy, R., Drott, D., Yaeger, K. & Mierenhof, R.(2001), Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. inNovations 12, 1-3.
- G. Gellissen(2000), Heterologouse protein production in methylotrophic yeasts. Appl Microbiol Biotechnol, 54:741-750
- http://mbel.kaist.ac.kr/research/protein_ko.html
- Joseph M. Fernandez, James P. Hoeffler(1999), Gene expression 시스템, Academic Press.
- Peter J. Punt et al.(2000) Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. TRENDS in Biotechnol. 20, 200-206.
- Process Biochemistry, vol 32, 529-539(1997)
- TIBTECH, vol 20, 200-206(2002)
- Fungal Genetics and Biology, vol 33, 155-171(2001)