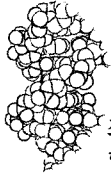


## 막단백질 발현을 위한 Mistic Technology



최종순  
한국기초과학지원연구원

**수용성** 단백질의 구조 결정은 보편화되고 있지만 막단백질 구조연구에 대한 이해는 충분한 양의 단백질을 획득하거나 규칙적인 결정을 얻는데 어려움 때문에 기술적인 제한을 가지고 있다. 계놈 내 막단백질을 코딩하는 유전자는 약 1/3 정도 되지만 단백질 구조 데이터뱅크인 PDB (Protein Data Bank)에는 1% 이하만이 등록되어 있다. 세포내 막단백질은 에너지 대사, 외부 신호 감지, 물질 수송 및 통로 등 세포의 중요한 생리기작을 담당하며 시판되는 의약품적 단백질의 80% 이상이 막단백질로서 질환 치료를 위한 중요한 표적이 되는 연구 대상이다. 막단백질의 특징은 양수성 표면 (amphiphatic surface)을 가지고 있는데 소수성 (hydrophobicity) 부분은 주로 막지질에 위치하고 있어서 숙주세포 막상의 체적의 한계 (원핵생물 내막의 체적은 전체의 ~5% 차지)로 인하여 제한된 양으로 생산되며 정제과정에서 detergent micelle이 필요하며 *in vitro* 조건에서 정제하는 과정에서는 매우 불안정해진다. 막단백질

들이 숙주세포 내에서 과발현되면 세포내에서 aggregation이 일어나 세포내 inclusion body를 형성하며 많은 경우 세포내 독성을 나타내어 발현하기가 어려워진다. 현재까지 막단백질 (integral membrane protein)의 발현 방법은 (1) low-copy-number plasmid를 weak promoter를 이용하여 소량의 단백질 생산을 배양액의 체적을 scale-up하는 방법과 (2) inclusion body로 막단백질을 표적화한 다음 재변성 과정을 유도하는 방법을 주로 사용하여 왔으나 성공률은 낮은 편이다. 최근 *Bacillus subtilis*에서 110개 아미노산으로 구성된 독특한 13 kD 'Mistic' (Membrane-Integrating Sequence for Translation of IM protein Construct) 단백질을 정제하여 대장균에서 발현시켰을 때, 대장균 막내에서 강하게 발현되는 것을 발견하였다. Mistic vector는 인식 가능한 signal sequence가 없으며 강한 친수성 특징을 보이며 detergent에 용해된 Mistic은 micelle과 강하게 결합하여 surfactant 처리에 의해 빠르게 응축되는 현상이 관찰된다. 핵자기 공명 분광법 (nuclear

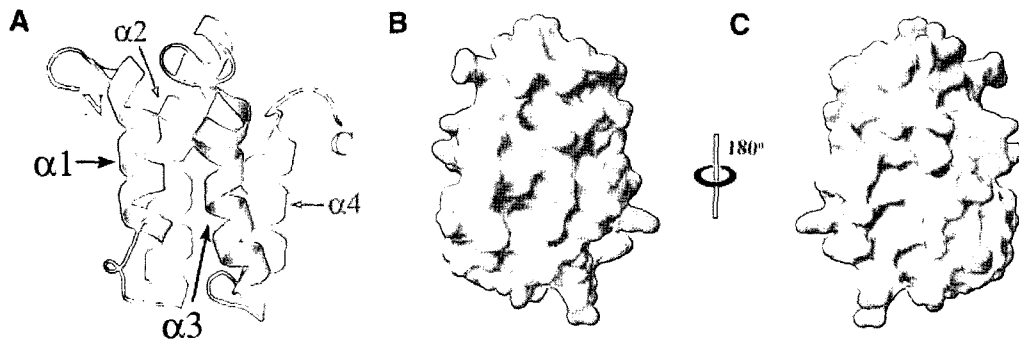


그림 1. Mistic 단백질의 구조. (A) 4개의 alpha-helix bundle로 구성, (B, C) Electrostatic potential로 mapping된 Mistic 단백질의 표면 구조 (Blue color, positive charged amino acids; red color, negative charged amino acid; white, neutral amino acid)

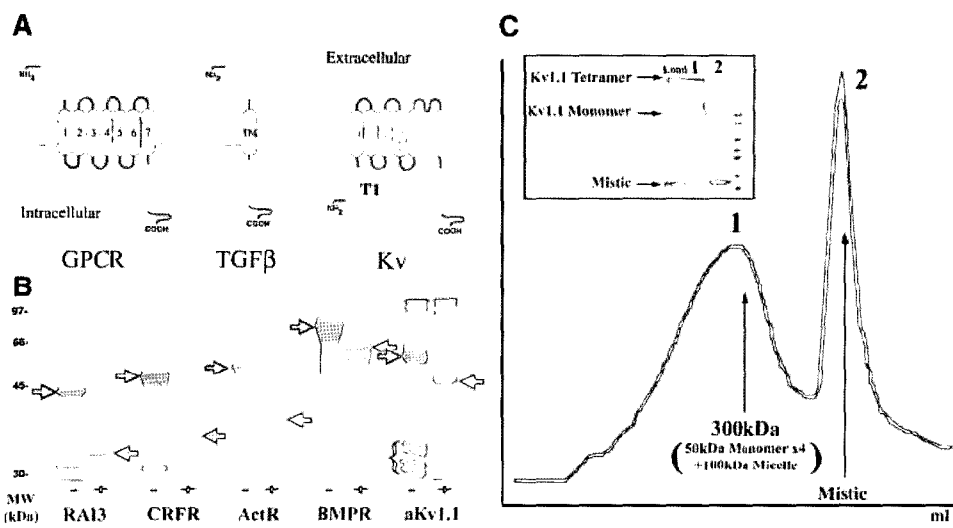


그림 2. Mistic-assisted 진핵생물 막단백질의 발현. (A) GPCR, TGF-β family receptor, voltage-gated K<sup>+</sup> channels (Kv)의 topological prediction, (B) 다양한 진핵생물 막단백질의 SDS-PAGE 결과 (white arrow, Mistic-fused protein; black arrow, thrombin으로 digestion한 후의 정제 단백질), (C) Superose-6 column상에서 3 mM LDAO상에서 thrombin-digested aKv1.1의 gel filtration profile

magnetic resonance spectroscopy)을 이용하여 Mistic 단백질의 구조를 결정한 결과 특이하게도 극성 lipid-facing surface를 갖는 helical bundle을 갖는다는 사실을 발견하였다 (그림 1). 진핵생물 유래의 대표적인 막단백질인 GPCR, TGF-β, voltage-gated K<sup>+</sup>

channel 단백질을 Mistic vector를 이용하여 성공적으로 발현 (그림 2)시켜 구조결정에 성공함으로써 많은 막단백질 후보 유전자들의 구조 결정에 새로운 돌파구를 제시할 것으로 기대된다(Science 307, 1317, 2005).