

β-Lactamase 접합 단백질 발현 시스템을 이용한 가용성 재조합 단백질 탐색 기술 개발

이재현 · 황범열 · 김병기 · 이선구*[†]

서울대학교 협동과정 생물화학공학전공 & 서울대학교 화학생물공학부
151-744 서울시 관악구 신림동 산 56-1
*부산대학교 응용화학공학부
609-735 부산광역시 금정구 장전동 산 30
(2009년 6월 1일 접수, 2009년 8월 18일 채택)

Development of Screening Method for the Soluble Recombinant Protein using β-Lactamase as a Fusion Partner

Jae-Hun Lee, Bum-Yeol Hwang, Byung-Gee Kim and Sun-Gu Lee*[†]

Interdisciplinary Program for Biochemical Engineering and Biotechnology, & School of Chemical and Biological Engineering, Seoul National University, San 56-1, Shilim-dong, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Korea

*Department of Chemical Engineering, Pusan National University, 30 Jangjeon-dong, Geumjeong-gu, Busan 609-735, Korea
(Received 1 June 2009; accepted 18 August 2009)

요 약

분자진화방법을 이용하여 불용성 단백질을 가용성 단백질로 개량하고자 할 때 가장 중요한 과정은 발현 단백질의 세포 내 폴딩 및 용해도를 어떻게 측정하고 선별할 수 있는가에 있다. 본 연구에서는 ampicillin에 저항성을 가지는 beta-lactamase를 목적 단백질과 접합 형태로 발현하여 목적 단백질의 용해도를 측정 및 선별할 수 있는 방법을 구축하였다. 이를 위하여 먼저 beta-lactamase C-말단에 목적 단백질을 링커를 이용하여 접합단백질 형태로 발현시킬 수 있는 발현 시스템을 구축하였고, 구축된 발현시스템이 대장균의 ampicillin의 저항성을 향상시킴을 확인하였다. 구축된 발현시스템에 용해도가 비교적 높은 adenine deaminase와 aspartate aminotransferase, 용해도가 매우 낮은 GlcNAc-2-epimerase 세가지 단백질의 유전자를 클로닝하여 Ampicillin 농도에 따라 목적 단백질의 용해도가 세포 성장에 미치는 영향을 조사하였다. Ampicillin 농도 200 µg/mL에서 가용성 단백질인 adenine deaminase와 aspartate aminotransferase의 접합 단백질 발현은 세포 성장을 보이는 반면, 불용성 단백질인 GlcNAc-2-epimerase 접합 단백질 발현은 세포 성장을 저해함을 확인하였다.

Abstract – It is the most important step to screen soluble and insoluble proteins when we attempt to improve the solubility of recombinant proteins through directed evolution approach. Here we show that the solubility of a recombinant protein *in vivo* can be examined by expressing the recombinant protein with beta-lactamase as a fusion partner. First we constructed an expression system which can produce a fusion protein with the C-terminal of beta-lactamase. Two soluble proteins, i.e. adenine deaminase and aspartate aminotransferase, and insoluble GlcNAc-2-epimerase were cloned into the developed expression vector, respectively. We investigated the effect of the expression of the three recombinant fusion proteins on the growth of *E. coli*, and confirmed that the solubilities of the recombinant proteins correlated with cell growth rates.

Key words: Over-Expression, Inclusion Body, Antibiotic Resistance Protein, Protein Solubility, Reporter Protein

1. 서 론

유전자 재조합 기술을 이용한 단백질 발현 및 생산 기술은 생명공학 연구 및 산업에 있어서의 중요한 기반 기술이다. 특히 대장균을 이용한 단백질 생산 방법은 유전자 조작과 배양의 수월성 및 뛰

어난 단백질 발현성 등으로 인해 생명 관련 연구 및 산업적으로 유용한 다양한 단백질들의 생산 공정에 이용되고 있다[1]. 그러나 유전자 재조합 기술을 이용한 대장균에서의 외래 단백질의 과발현은 발현 단백질의 뭉침 현상으로 인한 불용성 단백질, 즉 inclusion body (IB) 형성의 문제를 종종 발생시키는 데, 특히 진행 생물 유래의 단백질을 대장균에서 발현할 때 흔히 관찰할 수 있다[1,2]. 대장균에서의 IB 형성은 단백질 생산 공정에 있어 단백질 정제 과정에 유리한 측면을 제공하기도 하지만, 많은 경우 생산하고자 하는 단백질의

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: sungulee@pusan.ac.kr

*이 논문은 부산대학교 박상욱 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

재접힘(refolding)이 쉽지 않기 때문에 IB 형성은 바람직하지 않은 현상이라고 할 수 있다. 실제로 IB 형성 문제는 뛰어난 단백질 생산 능력에도 불구하고 많은 단백질의 생산 공정에 있어 대장균을 생산 세포로 사용할 수 없도록 만드는 요인 중의 하나이다[1]. 따라서 대장균에서 단백질을 발현할 때 IB의 형성을 방지하고 활성이 있으며 가용성으로 발현시키는 기술은 생물 산업의 핵심 기술로 인식되고 있으며, 특히 유전체 후 시대에 있어 유전체로부터 다량의 미지 단백질을 발현하여 분석하고자 하는 구조 유전체학/단백질체학 등의 발전을 위해서는 반드시 필요한 기술이라 할 수 있다[2].

IB 형성, 즉 불용성 단백질의 생산을 결정하는 중요한 요인은 유전자 재조합 단백질 발현 시 세포 안에서의 단백질 폴딩(folding)의 효율성인데, 단백질 폴딩이 올바르게 일어나지 않을 경우 발현 단백질의 뭉침 현상으로 인하여 불용성 단백질이 생성되며, 효율적으로 폴딩이 일어날 경우는 활성이 있는 가용성 단백질이 생산된다[1,2]. 단백질의 과발현시 일어나는 단백질의 불용성화를 방지하고 가용성으로 목표 단백질을 발현하기 위한 일반적인 방법으로는 i) 발현 온도를 낮추어 발현단백질의 폴딩 효율을 높이는 방법[3], ii) 발현 프로모터를 변화시켜 발현속도를 조절함으로써 가용성 단백질의 발현 정도를 증가시키는 방법[4], iii) 발현 단백질을 maltose binding protein 등과 같이 용해도가 높은 단백질과 결합시켜 발현시킴으로써 목표 단백질의 가용성을 증가시키는 방법[5] 등이 있으며, 단백질을 불용성으로 얻고 이를 분리하여 화학적으로 녹인 후 다시 재접힘을 시도하여 활성 단백질을 얻고자 하는 방법 등이 있다[6]. 그러나 이러한 방법들은 많은 문제점을 지니고 있는데, 예를 들면 발현 온도 및 발현 프로모터의 변화에 의하여 가용성 단백질을 발현하고자 하는 방법은 각각의 단백질에 대해 최적화해야 하고 그 효율성에 한계가 있다. Maltose binding protein과 같은 용해도가 높은 단백질을 결합시켜 발현하는 방법은 단백질의 종류에 관계없이 범용적으로 사용될 수 있는 장점이 있으나 발현 후 결합 단백질에 의해 목표 단백질의 활성 및 구조가 크게 바뀌는 문제점이 발생한다. 특히 다중구조로 이루어진 단백질의 경우는 원래의 단백질 활성을 얻기가 용이하지 않다. 단백질을 IB로 발현시키고 화학적으로 재접힘을 시도하는 방법은 역시 단백질마다 그 조건을 최적화해야 하며, 그 효율성이 단백질마다 다르며, 또한 다중구조로 이루어진 단백질의 경우 원래의 활성 및 구조로 복원하는 데 어려움이 따른다.

최근 들어서 단백질 개량 기술을 이용하여 발현 단백질의 용해도를 증가시키는 방법들이 발표되었는데, 이는 단백질의 아미노산 서열들을 변화시킴으로써 단백질의 세포 안 접힘 효율 및 용해도를 증가시킬 수 있다는 것이다[2]. 단백질 개량 방법 중 특히 단백질의 성질 및 구조에 대한 자료 없이도 단백질을 원하는 방향으로 변화시킬 수 있는 방향성 분자 진화(directed molecular evolution) 기술을 이용하여 불용성 단백질을 가용화시킬 수 있다는 몇몇 연구 논문들이 주로 발표되었는데, 방향성 분자 진화법을 이용한 가용성 단백질 발현 기술은 특히 발현하고자 하는 단백질에 대한 큰 정보 없이도 단백질의 용해도를 증가시킬 수 있으며, 발현 후에도 단백질의 구조 및 활성에 대한 큰 변화가 없는 것으로 알려져 있어 대장균을 이용한 단백질의 생산 공정뿐 아니라 구조 유전체학과 같이 다량의 미지 단백질 발현을 요하는 생명과학 연구에 응용될 수 있다는 장점을 지니고 있다[2,7].

한편 방향성 분자진화방법을 이용하여 불용성 단백질을 가용성 단백질로 개량하고자 할 때 가장 중요한 과정 또한 발현 단백질의

세포 내 폴딩 및 용해도를 어떻게 측정하고 선별할 수 있는가에 있다. 물론 일반적인 방법으로 발현 단백질의 활성 등 단백질의 특성을 이용하여 개량 단백질의 폴딩 및 용해도를 선별할 수도 있겠지만 이것은 활성을 재기 어려운 단백질에는 적용되기 어려운 방법이다. 특히 유전체로부터 미지의 단백질을 발현하고자 할 때는 목표 단백질에 대한 정보가 전혀 없는 상태에서 출발하는 것이므로 단백질의 특성을 이용하여 개량 단백질을 선별하는 것은 불가능하게 된다. 따라서 이러한 문제점을 극복하기 위해서는 단백질의 종류에 관계없이 세포 내 발현 단백질의 폴딩 상태 및 용해도를 측정할 수 있는 기술이 필요한 데 리포터 단백질과의 접합 단백질을 이용한 방법이 발표되었고 이 방법은 많은 불용성 단백질을 가용성으로 변환시키는 데 이용되었다[2].

본 논문에서는 ampicillin에 저항성을 가지는 beta-lactamase를 목적 단백질과 접합 형태로 발현시킬 수 있는 신규 시스템을 구축, 이를 이용해 목적 단백질의 세포 내 용해도를 ampicillin 하에서의 세포 성장을 통해 선별할 수 있음을 보여주고자 한다. 또한 세포 내의 단백질 폴딩 및 용해도 측정 기술이 어떻게 응용될 수 있는지 살펴보고자 한다.

2. 재료 및 실험

2-1. 발현 시스템 제조

Ampicillin 저항성을 가지는 beta lactamase 유전자를 PCR을 이용해 증폭, pET 28a에 있는 NdeI과 BamHI 사이에 클로닝, pET-bla를 제조하였다. 이때 beta-lactamase 유전자의 stop codon을 제거하여 링커와 목적 단백질이 발현될 수 있는 벡터로 구축하였다. BamHI과 EcoRI 사이에 링커(Linker: GGT CGC GGA TCC GCT GGC TCC GCT GCT GGT TCT GGC GAA TTC GAG CTC(BamHI, EcoRI))를 삽입하여 넣었다. 용해도가 다른 세 단백질을 beta-lactamase c-terminal에 접합 단백질 형태로 발현하기 위하여 다음의 primer들을 이용 각각의 유전자를 증폭하였다. Aspartate aminotransferase 유전자의 증폭을 위해서 5'primer: TCT GGC GAA TTC TTT GAG AAC ATT ACC(EcoRI), 3'primer:GTG GTG CTC GAG TTA CAG CAC TGC CAC(XhoI)를 사용하였고, adenine deaminase 유전자는 5'primer: TCT GGC GAA TTC AGC GCT GCC AAA CTG CCC GAC C(EcoRI), 5'primer: GTG GTG CTC GAG AGC CAC TTC CTT GAG CAC CTT GC(XhoI)를 이용 증폭하였으며, GlcNAc-2-epimerase 유전자는 5'primer: TCT GGC GAA TTC GAG AAA GAG CGA GAG(EcoRI), 5'primer: GTG GTG CTC GAG TTA TTC CGC GCC TCG(XhoI)를 이용 증폭하였다. 증폭된 유전자들을 EcoRI과 XhoI 등 이용 beta-lactamase 접합 발현시스템에 클로닝, pET-bla-asp, pET-bla-ad, pET-bla-GlcNAc를 제조하였다.

2-2. 균주 배양 및 단백질 발현

리포터 단백질에 클로닝된 pET-bla-asp, pET-bla-ad, pET-bla-GlcNAc가 각각 포함된 대장균 BL21(DE3)를 각각 5 mL의 LB broth에 넣고 37 °C에서 14시간 배양 후 새로운 LB broth를 96 well plate에 200 uL씩 채우고 ampicillin 농도를 0, 50, 100, 200, 400, 800 μ g/mL 농도로 맞추고 네 종류의 대장균 균주를 OD(wavelength: 600 nm) 값이 0.05가 되도록 동일하게 맞추고 37 °C에서 rpm 200으로 배양시켰다. 그리고 36시간까지 대장균 성장 속도를 기록하였

다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 접합 단백질을 이용한 가용성 단백질 선별 원리

미국 Los Alamos 연구소의 Waldo 연구팀은 1999년 세포 내의 발현 단백질 폴딩 및 용해도를 단백질의 특성 및 종류에 관계없이 측정할 수 있는 간단하면서도 효율적인 방법을 고안, 발표하였다[8]. 이 방법은 목표 단백질에 리포터 단백질을 결합시켜 발현시키면 목표 단백질의 폴딩 및 세포 내의 용해도가 리포터 단백질에도 영향을 미치는 것을 기본 원리로 하고 있으며, Fig. 1은 이 방법의 원리를 간단하게 보여주고 있다. 즉, 가용성 리포터 단백질을 목표 단백질에 약 10~20개의 펩타이드 링커를 이용하여 결합 단백질 형태로 발현시켰을 때 목표단백질이 가용성이라면 결합 단백질도 폴딩이 원활하게 이루어진 가용성 단백질로 발현되어 리포터 단백질의 기능이 정상적으로 작동하고, 목표단백질이 불용성으로 발현된다면 결합 단백질 역시 뭉침 현상으로 인해 불용성으로 발현되어 리포터 단백질의 기능이 작동하지 않는다. 따라서 이 방법을 이용하면 리포터 단백질의 활성에 의해 목표 단백질의 폴딩 및 용해도를 측정 또는 판별할 수 있게 되며, 목표 단백질의 구조 및 특성과 관계 없이 단백질의 폴딩 및 세포 내의 용해도에 의해서만 리포터의 활성이 영향을 받게 된다.

Fig. 1의 결합 리포터 단백질을 이용한 세포 내의 발현 단백질 폴딩 및 용해도 탐지 시스템에서 현재 사용되고 있는 측정방법은 green fluorescence protein(GFP)과 같이 발현 단백질의 양을 정량적으로 측정할 수 있는 리포터 단백질을 이용한 방법과 chloramphenicol acetyltransferase(CAT)와 같은 항생제 저항성 단백질을 이용하여 유전자적 선별을 할 수 있는 방법이 있다.

GFP를 리포터 단백질로 이용하여 목표 단백질의 세포 내의 폴딩 및 용해도를 측정하는 방법은 Waldo 연구팀이 폴딩 리포터 방법을 소개하면서 사용하였는데, 이들은 형광 단백질인 GFP를 목표 단백질의 N-terminal에 결합시켜 발현시켰을 때 GFP의 폴딩이 목표 단백질의 폴딩 및 가용성에 영향을 받아 세포의 GFP 발현 형광도를 측정함으로써 목표 단백질의 세포 내 폴딩 및 용해도를 판별할 수 있음을 증명하였다[8]. Jellyfish *Aequorea victoria* 유래의 본래의 GFP의 경우 폴딩 효율이 안 좋아 대장균에서 불용성 형태로 발현되는 경우가 많으므로 세포 내 발현 단백질의 용해도 측정을 위해 폴딩 효율이 좋고 가용성으로 발현되는 개량된 GFP 단백질을 리포터 단백질로 사용하였다. 이들은 고안한 폴딩 리포터 시스템이 올

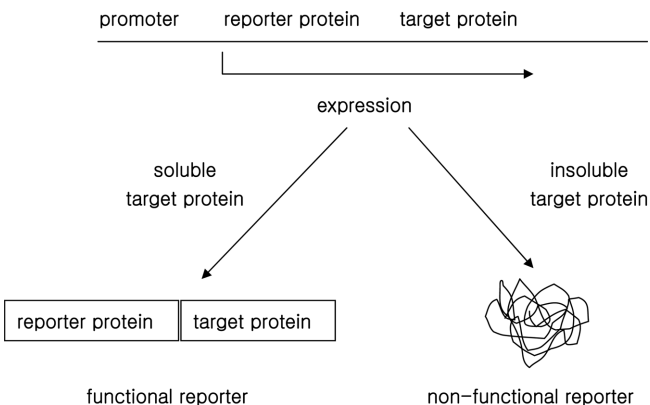


Fig. 1. Folding analysis using reporter protein system in *in vivo*.

바로 작동하는지를 증명하기 위해서 *Pyrobaculum aerophilum*으로부터 20가지 단백질을 리포터 단백질과 결합형태로 발현되도록 또는 리포터 단백질 없이 발현되도록 클로닝한 후 대장균에서 발현하고 이들의 용해도와 형광 측정도 사이에 관련이 있는지 조사하였고 이들이 서로 밀접한 관련성이 있음을 알 수 있었다. 이러한 리포터 단백질을 이용한 발현 단백질의 용해도 측정은 세포 안에서뿐 아니라 세포 외 단백질 발현(*in vitro* translation)에서도 이용할 수 있음을 확인하였다.

리포터 단백질로 항생제 저항성 단백질을 이용하는 방법으로 1999년 Maxwell 등에 의해 CAT를 이용하여 단백질의 세포 내 가용성 정도를 측정할 수 있는 방법이 발표되었다[9]. 이들은 HIV integrase와 CAT를 결합시켜 발현하였을 때 Fig. 1의 원리에 의해 목표 단백질의 폴딩 및 가용성 정도가 CAT의 폴딩 및 활성에도 영향을 미쳐 발현 단백질의 세포 내 용해도와 세포가 chloramphenicol 하에서 자라는 성장과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다.

3-2. Beta-lactamase 단백질을 이용한 접합 단백질 발현 벡터 구축

본 연구에서는 항생제 저항성 단백질 중 beta-lactamase를 이용하여 단백질의 가용도를 선별할 수 있는 시스템을 구축하고자 하였다. Beta-lactam의 링 구조를 깨버리는 beta-lactamase의 경우 Plasmid 클로닝을 위한 marker로 널리 사용되는 대표적 항생제 저항성 단백질이다. 이를 위하여 Fig. 2와 T7 프로모터 하에 beta-lactamase를 발현하는 bla 유전자를 클로닝 목표 단백질을 결합 단백질로 발현

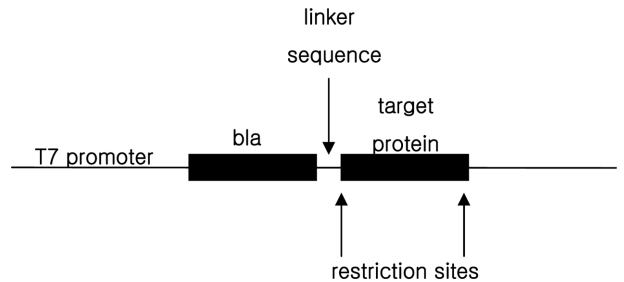


Fig. 2. Construction of antibiotic resistance reporter using beta-lactamase. The expression of target protein was followed after beta-lactamase. The linker is consisted of 12 amino acids.

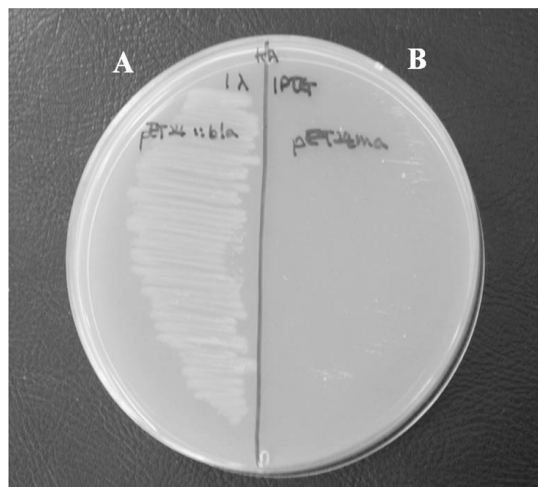


Fig. 3. Growth of *E. coli* BL21(DE3) harboring pET-bla (A) and *E. coli* BL21(DE3) harboring pET28a (B) on antibiotic agar plate (50 µg/mL).

하기 위한 벡터 시스템(pET-bla)을 구축하였다. 구체적인 방법은 “재료 및 방법”에 기술되어있다.

제조된 pET-bla이 가용성 단백질의 선별 시스템으로 사용되기 위해서는 대장균에서 ampicillin에 저항성을 보여야 하므로 이를 확인하기 위하여 pET-bla를 대장균 BI21(DE3)에 도입한 후 IPTG를 이용 beta-lactamase의 발현을 유도 항생제 저항성을 확인하였다. Fig. 3에서 보는 바와 beta-lactamase의 발현이 유도되지 않는 pET28a 벡터가 도입된 대장균은 ampicillin을 포함한 고체 배지에서 성장을 보이지 않는 반면, pET-bla가 도입된 대장균은 성장을 보였다.

3-3. 접합 단백질 발현 시스템을 이용한 세포 내 단백질 용해도 선별

제조된 pET-bla를 이용 단백질의 대장균 내 발현 용해도가 서로 다른 단백질들의 접합 단백질의 세포 내 가용도를 선별할 수 있는지 알아보기 위하여 세포 내 용해도가 다른 접합 단백질 발현 시스템을 구축하였다. 대장균 내에서 용해도가 높은 aspartate aminotransferase와 adenine deaminase(Ad)를 beta-lactamase의 C 말단에 linker를 이용하여 연결 pET-bla-asp와 pET-bla-ad를 제조하였으며, 대장균에서 발현될 때 몽침 현상을 일으키는 GlcNAc-2-epimerase를 같은 방법으로 클로닝하여 pET-bla-GlcNAc를 제조하였다.

이들 세가지 접합 단백질 발현 시스템을 대장균에 도입하여 접합 단백질의 발현을 유도하였으며, 이를 이용하여 목표 단백질 용해도와 엠펜실린이 첨가된 배지에서 대장균의 성장에 대한 관계성을 살펴 보았다. 본 실험에서 사용한 beta-lactamase는 T7 promoter를 이용한 과발현 시스템을 사용하고 있으며, 대장균에서 과발현되는 beta-lactamase의 활성 농도 범위의 검증 실험을 먼저 수행하였다. 이를 위하여 다양한 농도의 ampicillin가 포함된 배지(100, 200, 400 μg/mL)에서 pET-bla, pET-bla-asp, pET-bla-ad, pET-bla-GlcNAc가 도입된 네 가지 균주의 성장 속도를 비교하여 보았다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 Ampicillin 100 μg/mL에서 beta-lactamase와 beta-lactamase 접합 단백질을 포함하는 대장균의 성장 속도를 비교해 볼 때, 용해도가 매우 낮은 GlcNAc-2-epimerase의 접합 단백질을 발현하는 대장균은 다른 균주들에 비해 성장 속도가 늦어지기 시작하는 것을 확인할 수 있었다. Ampicillin 200 μg/mL에서 beta-lactamase와 beta-lactamase 접합 단백질을 포함하는 대장균의 성장 속도를 비교

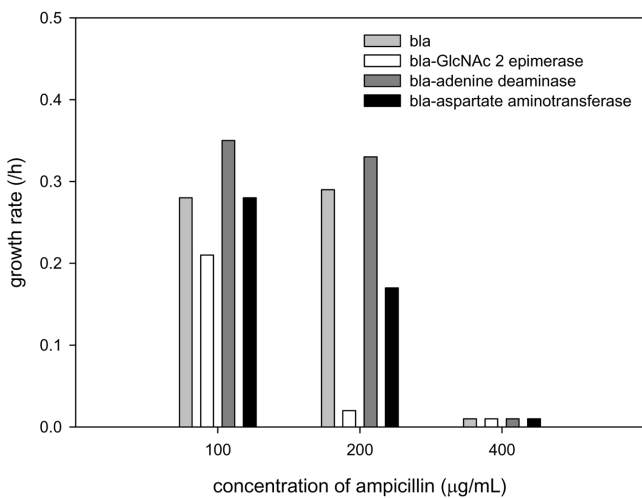


Fig. 4. Cell growth rates of *E. coli* harboring pET-bla, pET-bla-asp, pET-bla-ad, and pET-bla-GlcNAc at various concentration of ampicillin (100, 200, 400 μg/mL).

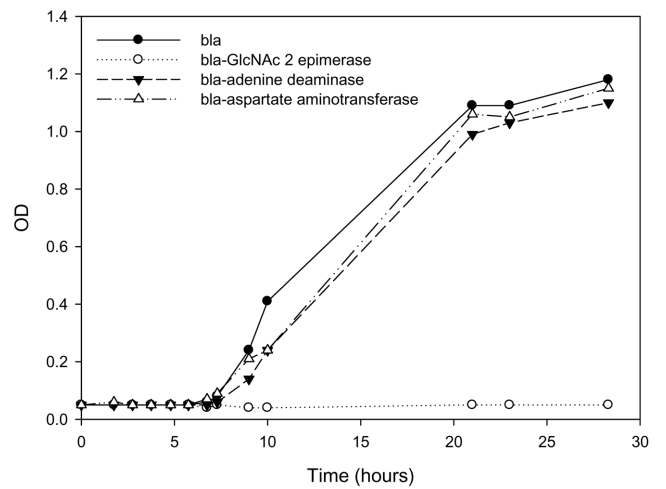


Fig. 5. Cell growth curve of *E. coli* harboring pET-bla (●), pET-bla-asp (△), pET-bla-ad (▼), and pET-bla-GlcNAc (○) at 200 μg/mL of ampicillin. The cell were incubated at 37 °C for 30 hours. 1 mM IPTG was added to each medium to induce gene expression.

해 볼 때, 용해도가 매우 낮은 GlcNAc-2-epimerase의 접합 단백질을 발현하는 대장균은 다른 균주들에 비해 성장 속도가 매우 늦어져 거의 성장이 일어나지 않는 것을 확인할 수 있었으며, ampicillin 400 μg/mL에서는 네 가지 균주 모두 성장이 일어나지 않음을 알 수 있었다. Fig. 5는 ampicillin 200 μg/mL에서 네 가지 균주의 실제 성장 곡선을 보여 주고 있으며, 가용성 단백질인 adenine deaminase와 aspartate transaminase를 beta-lactamase와 접합시킨 단백질 발현 대장균의 성장이 원활하게 일어남을 관찰할 수 있었는데 반해, 불용성 단백질인 GlcNAc-2-epimerase의 접합 단백질을 발현시킨 균주의 경우 성장이 일어나지 않음을 보여 주고 있다.

위의 결과는 다음의 사실을 말해주고 있다. 첫째, ampicillin 100 μg/mL과 ampicillin 200 μg/mL의 결과에서 볼 수 있듯이 beta-lactamase 접합 단백질 시스템은 목표 단백질의 용해도를 세포 성장 속도를 이용해 선별할 수 있는 방법으로 사용될 수 있을 것이다. 둘째, 구축된 시스템을 선별 시스템으로 이용할 수 있는 최적 조건은 ampicillin 200 μg/mL이다. Ampicillin 100 μg/mL 농도는 GlcNAc-2-epimerase의 접합 단백질을 발현하는 대장균의 성장 속도가 낮아 지기는 가용성 단백질과의 접합 단백질 발현 균주와 성장 속도를 통해 선별할 수 있는 농도가 아니며, ampicillin 400 μg/mL에서는 모든 균주가 성장을 보이지 않는데 이는 발현되는 beta-lactamase의 활성이 ampicillin 400 μg/mL 농도의 항생제를 모두 분해하지는 못한다는 것을 암시하고 있다.

3-4. 리포터 단백질을 이용한 불용성 단백질의 개량 및 응용성 고찰

서론에서 언급한 바와 같이 리포터 단백질을 이용한 세포 내의 단백질 폴딩 및 가용성 측정 방법은 방향성 분자 진화 기술을 이용하여 불용성 단백질을 가용성 단백질로 개량하고자 하는 연구에 유용하게 사용될 수 있다. Fig. 6은 방법의 개략을 도시한 것이다. 즉, 불용성 목표 단백질의 유전자에 error-prone PCR이나 gene shuffling 등의 유전자 돌연변이 기법을 이용하여 무작위로 돌연변이를 도입한 후 그 라이브러리를 Fig. 2와 같은 폴딩 리포터의 목표 단백질 부분에 클로닝하고 발현 대장균에 도입하여 이로부터 리포터 시스

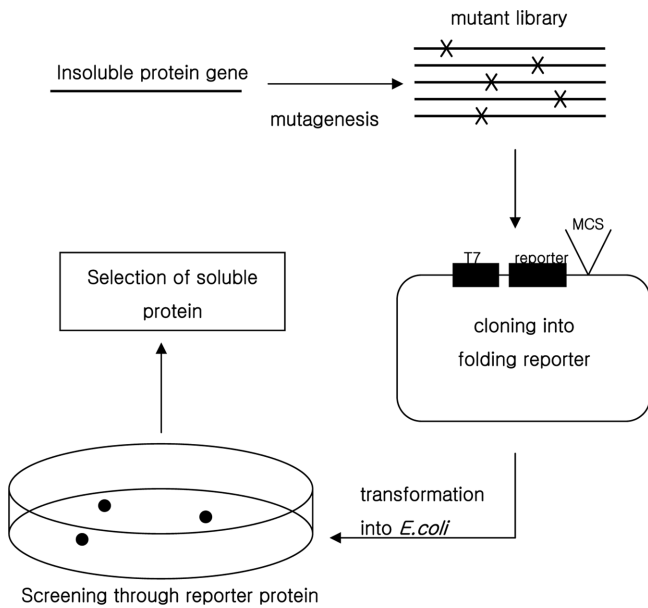


Fig. 6. Scheme of directed molecular evolution to engineer an insoluble protein to soluble protein.

템을 이용하여 가용성으로 개량된 단백질을 얻는 것이 이 방법의 일반적인 순서이다. 이때 리포터 단백질의 종류에 따른 특징을 살펴보면 다음과 같다.

GFP를 리포터 단백질로 이용하고 목표 단백질을 방향성 분자 진화 기술을 이용하여 개량하고 선별하는 방법은 목표 단백질의 가용성 정도를 GFP 단백질을 이용하여 정량적으로 분석할 수 있다는 장점이 있는 반면, 세포의 형광 정도에 의해 $10^4 \sim 10^9$ 정도의 세포 군으로부터 목적 세포를 선별해야 하므로 image analyzer나 flow cytometry 등의 값비싼 장비를 이용하는 해야 하는 단점이 있다.

방향성 분자 진화 기술을 이용하여 단백질을 개량하고 원하는 성질을 지닌 단백질을 선별할 때 보다 효과적인 방법은 세포의 개량 단백질의 성질이 세포의 생사와 관련이 있어 이를 이용한 유전자적 선별(genetic selection)이 가능한 경우이다. 따라서 항생제를 리포터 단백질로 이용하여 발현 단백질의 폴딩 및 가용성 정도를 선별하는 경우가 GFP 단백질을 이용하여 세포 각각에 대해 발광도를 측정하여 선별하는 경우에 비해 용이하며 이러한 방법의 경우 선별 가능한 라이브러리의 용량이 커지고 선별 작업 시 특별한 장비가 필요 없다는 장점이 있다. 그러나 GFP 단백질을 리포터로 이용한 경우에 비해서 발현 단백질의 가용성 정도를 측정하는데 있어 정량성은 떨어진다.

리포터 단백질을 이용하여 세포 내 단백질의 폴딩 및 가용성 정도를 측정하는 방법은 앞에서 언급한 바와 같이 불용성 단백질을 가용성으로 개량하는 방법의 선별 방법으로 유용하게 사용되어 왔는데 이 방법은 대장균에서의 IB 형성으로 인하여 어려움이 있던 연구들을 가능하게 해주었다. 예를 들면 GFP를 이용한 폴딩 리포터 시스템을 고안한 Waldo 연구팀은 폴딩 리포터 시스템과 방향성 분자 진화 기술을 이용하여 대장균에서 불용성으로 발현되는 *P. aerophilum* 유래의 nucleoside diphosphate kinase, methyl transferase, tartrate dehydratase beta-subunit 세가지 단백질을 가용화시킨 후 이들 단백질의 구조 및 특성을 X-ray crystallography를 이용하여 조사하였다[10]. 서세원 교수 연구팀 또한 같은 방법을 이용하여 유전자

만 알려졌을 뿐 단백질의 특성 및 구조가 밝혀지지 않은 *Mycobacterium tuberculosis* Rv2002 유전자를 대장균에서 가용성으로 발현하여 이 단백질의 구조 및 dehydrogenase로서의 효소적 특성을 분석하였다[11]. 이러한 연구들은 폴딩 리포터 방법이 유전체 정보로부터 단백질을 발현하여 그 특성을 조사하고자 하는 구조 유전체학의 연구에 응용될 수 있음을 나타내고 있다.

이외에도 Arnold 연구팀은 2001년 Nature biotechnology에 CAT를 폴딩 리포터로 이용하여 가용성 cytochrome P450을 얻는데 성공하였음을 발표하였다[12]. 이들은 아미노산 서열의 호몰로지가 서로 다른 인간유래의 cytochrome P450 단백질과 Bacillus 유래의 P450 단백질 두개의 도메인(domain)을 이용하여 하이브리드 단백질 라이브리리로부터 가용성 단백질을 선별하는데 폴딩 리포터 방법을 사용하였다. 또한 Bowie 연구팀은 전사 조절인자인 TEL-SAM 단백질 도메인의 구조 및 역할에 대하여 연구하기 위하여 이들을 발현 및 분리할 필요가 있었는데, 이들 단백질의 IB 형성 문제를 GFP 폴딩 리포터와 분자 진화기술을 이용하여 가용성 단백질로 변화시킴으로서 해결하여 후속 연구를 진행할 수 있었다[13].

폴딩 리포터 기술을 이용한 또 다른 연구 성과로는 2001년 발표된 Kawasaki와 Inagaki의 연구를 들 수 있는데 이들은 GFP를 폴딩 리포터로 사용하여 Vav 단백질로부터 가용성 도메인을 찾아 내었다[14]. 무작위 프라이머와 PCR을 이용하여 Vav 유전자로부터 도메인 라이브러리를 만들고 GFP 폴딩 리포터를 이용해 12 부분의 가용성 도메인을 선별하였는데, 이는 NMR 등을 이용한 단백질 도메인의 구조 연구에 응용될 수 있음을 제시하였다.

4. 결 론

본 논문에서는 beta-lactamase를 이용하여 단백질의 세포 내 용해도를 측정 및 선별할 수 있는 시스템을 구축, 이를 실험적으로 증명하였다. Beta-lactamase C-말단에 목적 단백질을 접합단백질 형태로 발현시킬 수 있는 발현 시스템을 구축, 용해도가 비교적 높은 adenine deaminase와 aspartate aminotransferase, 용해도가 매우 낮은 GlcNAc-2-epimerase 세가지 단백질과의 접합 단백질 발현시스템을 제조하였으며, 이를 이용하여 목적 단백질의 용해도가 세포 성장에 영향을 미침을 확인하였다. 이 방법은 기존의 CAT를 리포터 단백질로 이용한 방법과 더불어 불용성 단백질을 가용성 단백질로 변환시키는데 이용되어 구조 유전체학과 같은 생명 과학 연구에 있어 유용하게 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

감 사

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었습니다.

참고문헌

- Swartz, J. R., "Advances in *Escherichia coli* Production of Therapeutic Proteins," *Curr. Opin. Biotech.*, **12**, 195-201(2001).
- Waldo, G. S., "Genetic Screens and Directed Evolution for Protein Solubility," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7**, 33-38(2003).
- Mujacic, M., Cooper, K. W. and Baneyx, F., "Cold-inducible Cloning Vectors for Low-temperature Protein Expression in *Escheri-*

- chia coli*: Application to the Production of a Toxic and Proteolytically Sensitive Fusion Protein," *Gene*, **238**, 325-32(1999).
- Makrides, S. C., "Strategies for Achieving High-level Expression of Genes in *Escherichia coli*," *Microbiol Rev.*, **60**, 512-538 (1996).
 - Kapust, R. B. and Waugh, D. S., "*Escherichia coli* Maltose-binding Protein is Uncommonly Effective at Promoting the Solubility of Polypeptides to Which it is Fused," *Protein Sci.*, **8**, 1668-1674(1999).
 - Li, M., Su, Z. G. and Janson, J. C., "In vitro Protein Refolding by Chromatographic Procedures," *Protein Expr Purif.*, **33**, 1-10(2004).
 - Stemmer, W. P. C., "Rapid Evolution of a Protein *in-vitro* by DNA Shuffling," *Nature*, **370**, 389-391(1994).
 - Waldo, G. S., Standish, B. M., Berendzen, J. and Terwilliger, T. C., "Rapid Protein-folding Assay Using Green Fluorescence Protein," *Nat Biotech.*, **17**, 691-695(1999).
 - Maxwell, K. L., Mittmaier, A. K., Forman-Kay, J. D. and Davidson, A. R., "A Simple *in vivo* Assay for Increased Protein Solubility," *Protein Sci.*, **8**, 1908-2911(1999).
 - Pedelacq, J. D., Piltch, E., Liang, E. C., Berendzen, J., Kim, C. Y., Rho, B. S., Park, M. S., Terwilliger, T. C. and Waldo, G. S., "Engineering Soluble Proteins for Structural Genomics," *Nat Biotechnol.*, **20**, 927-932(2002).
 - Yang, J. K., Park, M. S., Waldo, G. S. and Suh, S. W., "Directed Evolution Approach to a Structural Genomics Project: Rv2002 from *Mycobacterium Tuberculosis*," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 455-460(2003).
 - Sieber, V., Martinez, C. A. and Arnold, F. H., "Libraries of Hybrid Proteins from Distantly Related Sequences," *Nat Biotech.*, **19**, 456-460(2001).
 - Kim, C. A., Phillips, M. L., Kim, W., Gingery, M., Tran, H. H., Robinson, M. A., Faham, S. and Bowie, J. U., "Polymerization of the SAM Domain of TEL in Leukemogenesis and Transcriptional Repression," *EMBO J.*, **20**, 4173-4182(2001).
 - Kawasaki, M. and Inagaki, F., "Random PCR-based Screening for Soluble Domains Using Green Fluorescent Protein," *Biochem Biophys Res Commun.*, **280**, 842-844(2001).