

# CspA의 발현이 저온에서의 재조합 단백질 생산성에 미치는 영향에 관한 연구

김수현<sup>1</sup> · 허미애<sup>2</sup> · 이선구<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>부산대학교 화학공학과, <sup>2</sup>부산대학교 환경기술산업개발연구소

## A study on the effect of CspA expression on the productivity of recombinant protein at low temperature

Su-Hyun Kim<sup>1</sup>, Mi-Ae Heo<sup>2</sup>, and Sun-Gu Lee<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, Pusan National University, Busan, 609-735, Korea.

<sup>2</sup>Institute of Environmental Technology and Industry, Pusan National University, Busan, 609-735, Korea.

**Abstract** One of the major drawbacks associated with the high-level expression of the recombinant proteins in *Escherichia coli* is the formation of insoluble inclusion bodies in the cytoplasm. Production of recombinant protein at reduced temperature has proven effective in improving the solubility of a number of structurally and functionally unrelated proteins, but a major limitation of using low temperatures for recombinant protein production in *E. coli* is the reduced rate of synthesis of the heterologous protein caused by the significant reduction of cell growth rate. Here we investigated the effect of co-expression of CspA, a cold-shock protein known to be RNA chaperone at low temperature, on the productivity of recombinant protein at various temperatures by using green fluorescence protein (GFP) as a model recombinant protein. We could observe that the co-expression of CspA enhanced the productivity of GFP at 15°C by accelerating the growth of *E. coli* at the temperature. On the other hand, the CspA coexpression didn't affect the cell growth rate as well as the specific GFP production rate at other tested temperatures, 20°C, 25°C, and 37°C.

**Keywords:** CspA, protein expression, protein folding, low temperature

## 서 론

유전자 재조합 기술을 이용한 대장균에서의 외래 단백질의 과발현은 발현 단백질의 둥침 현상으로 인한 불용성 단백질, 즉 inclusion body (IB) 형성의 문제를 종종 발생시킨다(1). 대장균에서의 IB 형성은 단백질 생산 공정에 있어 단백질 정제 과정에 유리한 측면을 제공하기도 하지만 많은 경우 생산하고자 하는 단백질의 재접힘 (refolding)이 쉽지 않기 때문에 IB 형성은 바람직하지 않은 현상이라고 할 수 있으며, IB 형성 문제는 높은 단백질 생산성에도 불구

하고 대장균을 효율적인 재조합 단백질 생산 균주로 사용할 수 없도록 만드는 요인 중의 하나이다(2).

단백질의 과발현시 일어나는 단백질의 불용성화를 방지하고 가용성으로 목표 단백질을 발현하기 위해 시도되어 온 대표적인 방법 중에 저온 발현은 다양한 재조합 단백질 발현 시 효율적으로 사용되어왔다(3). 저온에서의 재조합 단백질 발현은 발현 단백질의 가용성 증가 뿐 아니라 protease 등에 민감한 단백질의 생산에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다(3). 그러나 저온에서의 단백질 발현은 단백질 발현 속도의 감소에 의해 그 생산 효율이 상온 발현에 비해 떨어진다는 단점을 지니고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 다양한 연구가 이루어져 왔으며 특히 저온 유도 단백질인 CspA 유전자의 promoter를 이용한 저온 발현 시스템에 대한 연구가 주를 이루어 왔다. CspA는 저온 충격이 가해질 때

\*Corresponding author

Tel: +82-51-510-2786, Fax: +82-51-512-8563  
e-mail: sungulee@pusan.ac.kr

*E. coli*를 비롯한 여러 미생물들에서 발현이 되는 단백질로써 37°C에서는 거의 발현이 되지 않다가 15°C에서는 총 단백질의 10% 이상을 차지할 정도로 발현도가 높아진다고 알려져 있다(4). 이러한 이유로 인해 *cspA*의 promoter를 이용하면 저온에서 단백질 발현을 효율적으로 할 수 있다는 결과들이 발표되었으며 예를 들면 *cspA* promoter 시스템을 이용하여 15-23°C에서 tac promoter 수준의 발현 효율을 얻을 수 있는 보고가 있었다(4). 또한 최근 들어 *cspA*의 promoter 뿐 아니라 *cspA* mRNA의 5' UTR과 3' UTR을 이용하여 저온에서의 유전자 발현 유도 및 전사/번역 효율을 향상 시켜 저온에서의 단백질 발현 효율을 더욱 향상 시킬 수 있는 시스템에 대한 연구 결과가 발표되었다(5, 6).

한편 대장균 저온 충격 단백질인 CspA는 저온에서 RNA chaperone의 활성을 지니는 것으로 알려져 있다(7). 즉, 저온에서는 세포내의 mRNA들이 2차 구조 (secondary structure)를 형성하게 되어 번역 (translation)효율이 감소될 수 있는데, 저온에서의 CspA 발현은 mRNA의 2차 구조 형성을 제어하는 기능을 수행하여 저온에서의 세포내 번역 효율을 증진, 단백질 생성을 유도하고 이는 저온에서의 대장균 성장 및 생존과 관계가 있다는 것이다. 이에 본 논문에서는 CspA의 발현이 저온 및 상온에서 대장균 성장과 재조합 단백질 생산성에 미치는 영향을 조사하였으며, 이로부터 CspA를 이용한 저온에서의 재조합 단백질 생산 효율성 향상에 관한 가능성을 알아보기 하였다. 이를 위해 CspA를 목표 단백질인 Green Fluorescent Protein (GFP)과 동시 발현하는 시스템을 구축, 상온 및 저온에서의 목표 재조합 단백질 생산성 및 대장균 성장 속도에 관하여 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### Plasmids 제조

유전자 cloning은 Promega 사의 pGEM-T vector 시스템을 이용하였으며 cloning을 위한 균주로 *E. coli* XL1-blue를 사용하였다. pET24ma-GFP는 gfpmut<sub>3.1</sub> 유전자를 pGlnAp2-gfpmut<sub>3.1</sub>(8)로부터 5'-primer(ggattccgtaaa ggagaagaacttttc)와 3'-primer(gagcttattatttgtagttcatccat)를 이용, PCR 증폭하여 pET24ma의 BamHI, SacI를 이용하여 pET 24ma에 삽입, 제조하였다. pBAD-CspA는 *E. coli* JM109의 genomic DNA를 template로 하여 5'-primer(ccatggccggtaaaatgactgg)와 3'-primer(ctctcggtacaggctggttacgttacc)를 이용 212 bp의 *cspA* gene을 PCR 증하여 pBAD/HisC vector에 Nco I 와 Xho I의 restriction endonuclease를 이용하여 삽입, 제조하였다.

### 배양 및 GFP 발현

pET24ma-GFP와 pBAD-CspA를 시스템을 *E. coli* BL21(DE3)에 도입하여 다음과 같이 단백질 발현을 유도

하였다. 멸균된 시험관에 6 mL의 LB 배지 (ampicillin 100 µg/mL, kanamycin 50 µg/mL)를 넣고 클로닝된 균주 recombinant *E. coli* BCG와 recombinant *E. coli* BG를 접종한 후 37°C에서 12시간 이상 배양하였다. 배양된 미생물 0.5 mL을 15 mL의 LB 배지에 희석 후 배양하여 세포 농도 (O.D.<sub>600 nm</sub>)가 0.4 정도인 성장 단계에서 0.1%의 arabinose와 1 mM의 IPTG를 넣고 induction을 시킨 뒤 2시간 간격으로 세포를 수확하였다. GFP 발현을 위한 배양 온도는 15°C, 20°C, 25°C, 37°C를 사용하였으며, shaking incubator에서 200 rpm으로 호기적으로 배양하였다. 각 온도에서 CspA의 발현이 세포성장속도, GFP 발현 속도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포농도측정, SDS-PAGE 분석, GFP 형광도 측정을 수행하였다.

### GFP 형광도 측정

균주 배양액으로부터 1 mL씩 시료를 채취한 뒤 12000 rpm에서 5분간 원심분리를 하여 세포를 침전시킨 후 0.9% NaCl 1 mL로 혼탁하여 600 nm에서 OD를 측정하였다. OD 측정값이 0.1-0.2 사이가 되도록 0.9% NaCl 용액을 이용하여 희석한 후 0.2 µL씩 취하여 96 well plate에 각각 분주, Victor Multilabel Counter(1420-011) (Wallac, Finland)를 이용하여 excitation 파장 485 nm, emission 파장 515 nm에서 형광도 세기를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

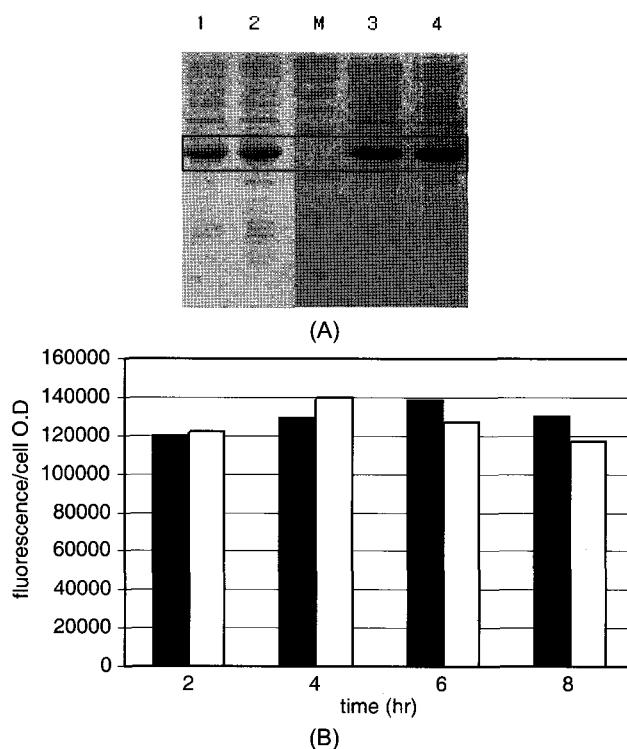
### GFP와 CspA 동시 발현 시스템 구축

저온 충격 단백질인 CspA의 발현을 위해 CspA 유전자를 BAD promoter 밸현 시스템인 pBAD/HisC에 클로닝, pBAD-CspA를 제조하였다. 저온 발현을 위한 재조합 단백질 모델로는 green fluorescent protein (GFP)를 이용하였으며 GFP 유전자를 T7 promoter 밸현시스템인 pET24ma에 클로닝 pET24ma-GFP를 제조하였다. pET24ma-GFP는 p15A replication origin을 pBAD-CspA는 pBR322 replication origin을 가지고 있어 하나의 대장균에서 양립, GFP와 CspA의 동시 발현이 가능하며, pET24ma-GFP는 IPTG에 의해, pBAD-CspA는 arabinose에 의해 유전자 발현이 제어될 수 있다. pET24ma-GFP와 pBAD-CspA를 *E. coli* BL21(DE3)에 도입 GFP와 CspA의 동시 밸현 시스템을 구축하였으며 이 균주를 *E. coli* BCG로 명명 하였다. 대조군으로 pET24ma-GFP와 pBAD/HisC vector를 가진 재조합 균주를 제조, *E. coli* BG로 명명하였다.

### 37°C에서의 CspA의 GFP 발현에의 영향

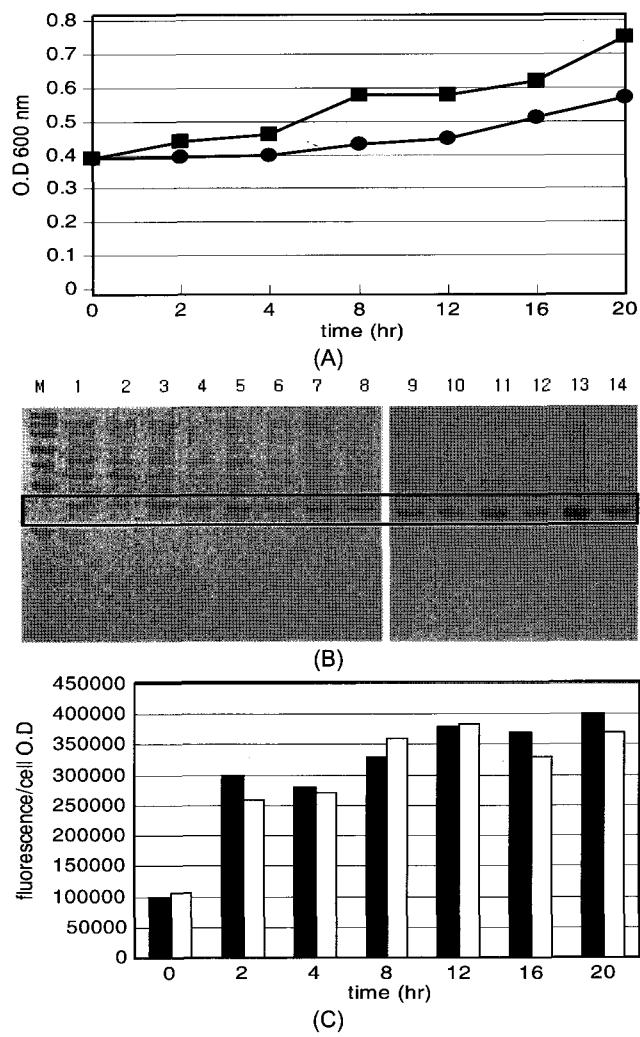
먼저 CspA의 대장균 생장 속도 및 단백질 발현 속도

에의 영향을 일반적인 재조합 단백질 생산 온도인 37°C에서 살펴보았다. *E. coli* BCG와 *E. coli* BG를 37°C에서 OD 0.4까지 배양한 후 후 0.1% arabinose와 1 mM IPTG를 첨가 CspA와 GFP의 발현을 유도하였으며, 이후 세포 성장과 총 GFP 발현도 및 활성 GFP 발현도를 측정하였다. 총 단백질 발현도는 SDS-PAGE를 이용하여 분석하였으며, 활성 GFP 발현도는 전세포 (whole cell)의 세포당 GFP의 형광도를 측정하여 분석하였다. GFP와 CspA의 발현 유도 후 BG와 BCG의 성장 측정 결과, 37°C에서의 CspA의 발현은 세포 성장 속도에 크게 영향을 미치지 않았다(data not shown). Fig. 1(A)는 GFP와 CspA의 발현 유도 후 6시간 및 8시간의 총 GFP 발현량을 SDS-PAGE로 분석한 결과이다. 분석 결과 BG, BCG 두 가지 균주 모두에서 약 27 kDa의 GFP의 과발현이 확인되었으며, 이 결과에서 볼 수 있듯이 CspA의 발현은 GFP 발현 속도에도 큰 영향을 미치지 않았다. 이 연구에서 사용한 모델 단백질은 GFP는 단백질 폴딩 (folding)이 완벽하게 이루어 졌을 때 발광하며, 따라서 세포의 형광도는 활성 GFP의 생산과 관계가 있다.



**Fig. 1.** Effect of CspA co-expression on the production of GFP at 37°C. BL21(DE3) transformants BG and BCG were grown to OD 0.4 at 37°C and induced with 1 mM IPTG and 0.1% arabinose. Samples were collected at 2 hr, 4 hr, 6 hr and 8 hr postinduction times. (A) SDS-PAGE analysis of the samples at 6hr and 8 hr. (M: size marker, lane 1: BG at 6 hr, lane 2: BCG at 6 hr, lane 3: BG at 8 hr, lane 4: BCG at 8 hr). The bands in the box indicate the expressed GFP. (B) The expression profile of functional GFP per cell for BG (■) and BCG (□).

활성 GFP의 생산속도를 알아보기 위하여 GFP와 CspA의 발현 유도 후 BG와 BCG의 형광도를 측정하여 활성 단백질의 생산량 속도를 비교하였으며, Fig. 2(B)에서 볼 수 있듯이 37°C에서 CspA의 발현이 활성 GFP 생산 속도에 크게 영향을 미치지 않음을 확인 할 수 있었다. 위의 결과들은 37°C에서는 CspA의 발현이 대장균 성장 속도, GFP의 총 생산 속도, GFP의 세포당 생산 속도 및 폴딩에 큰 영향을 주지 않음을 시사하고 있다.



**Fig. 2.** Effect of CspA co-expression on the production of GFP at 15°C. BL21(DE3) transformants BG and BCG were grown to OD 0.4 at 37°C, transferred to the shaker at 15°C, and induced with 1 mM IPTG and 0.1% arabinose for 20 hours. Samples were collected at the indicated postinduction times in the figure. (A) Growth of BCG (■) and BG (●) at 15°C. (B) SDS-PAGE analysis of the samples at various postinduction times. (M: size marker, lane 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13: BCG at 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 hrs, lane 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14: BG at 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 hrs) (C) The expression profile of functional GFP per cell for BCG (■) and BG (□).

## 15°C에서의 CspA의 GFP 발현에의 영향

Giuliodori 등 (2004)은 CspA가 저온에서 mRNA의 번역 효율을 증진시킴을 *in vitro* 실험을 통해 확인하였으며, 이는 CspA의 RNA 샤페론 활성에 기인할 것이라 제안하였다(7). 이에 본 연구에서는 저온에서의 CspA 효과를 알아보기 위하여 대장균에서 일반적으로 CspA의 발현을 유도하는 15°C에서 CspA 발현이 GFP 생산 균주의 성장 속도 및 단백질 발현 속도에 미치는 영향을 조사하였다. *E. coli* BCG와 *E. coli* BG를 37°C에서 OD 0.4까지 성장 시킨 후 두 균주를 15°C로 옮겨 배양하였으며, arabinose 와 IPTG를 첨가 CspA와 GFP의 발현을 유도한 후 이후 세포 성장과 총 GFP 발현도 및 활성 GFP 발현도를 측정하였다. Fig. 2(A)에서 볼 수 있듯이 재조합 균주 BCG와 BG는 성장속도에 차이를 보이고 있다. 두 균주 모두 OD 0.4에서 배양을 시작하였으나 20시간 동안 배양한 뒤 OD는 BCG의 경우 약 0.8, BG의 경우 약 0.6으로 더블링 타임이 약 1.5-2배 정도 차이가 나는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 CspA의 발현이 15°C에서 재조합 대장균의 성장속도에 영향을 미치고 있음을 보여주고 있다. Fig. 2(B)에서 볼 수 있듯이 SDS-PAGE 분석 결과 8시간 이후부터 BCG균주의 GFP 총 발현량이 BG균주보다 약 1.5-2배정도 많은 양을 보이고 있으며 이는 세포 성장 결과와 일치하는 결과이다. 한편 Fig. 2(C)의 세포 당 형광도의 측정 결과는 CspA의 발현이 GFP의 세포 당 발현도에 큰 영향을 미치고 있지 않음을 보여주고 있다. 따라서 Fig. 2(B)에서 관찰된 CspA에 의한 GFP의 총생산량 증가는 세포당 GFP의 발현량에 의한 증가가 아닌 세포농도의 증가에 의한 것이라는 것을 의미하고 있다.

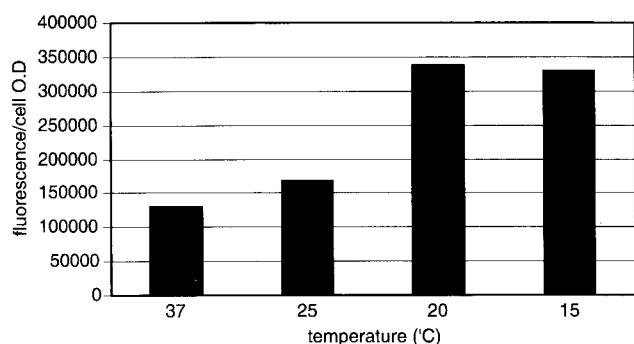
## 25°C와 20°C에서의 CspA의 GFP 발현에의 영향

위의 결과들에서 볼 수 있듯이 CspA의 발현은 15°C에서는 대장균 성장 속도 증가를 유도하여 GFP의 총 생산 속도를 증가 시켰으며, 37°C에서는 큰 영향을 미치지 않았다. 다음으로 GFP가 20°C 및 25°C에서 대장균 성장 속도 및 GFP의 발현도에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위한 실험을 수행하였다. *E. coli* BCG와 *E. coli* BG를 37°C에서 약 OD 0.4까지 성장시킨 후 두 균주를 25°C 및 20°C로 옮겨 배양하였으며, arabinose와 IPTG를 첨가 CspA와 GFP의 발현을 유도한 후 이후 세포 성장과 총 GFP 발현도 및 활성 GFP 발현도를 측정하였다. 25°C와 20°C 모두에서 CspA의 발현은 세포 성장 속도, GFP 발현도에 크게 영향을 미치지 않았으며, 활성 GFP의 생산 속도에도 큰 영향을 미치지 않았다(data not shown).

## 온도에 따른 활성 GFP 생산 효율

한편 본 실험을 통해 단백질 발현 온도를 감소시킴에

따라 활성 단백질의 생산 속도가 증가함을 다시 한번 확인 할 수 있었다. Fig. 3는 위의 실험에서 측정한 37°C, 25°C, 20°C, 15°C에서의 BG의 세포 당 형광도 중 GFP 발현 유도 후 8시간 째의 값을 정리한 것이다. GFP의 경우 폴딩이 올바르게 일어난 경우에만 형광을 보이며 따라서 세포당 형광도는 폴딩의 효율성에 대한 척도로 사용할 수 있다, 그럼에서 볼 수 있듯이 세포당 형광도는 온도가 감소함에 따라 증가하며 이는 저온 조건에서 단백질 폴딩 효율이 증가한다는 기준의 결과들(9, 10, 11)을 다시 한번 확인하여 주는 것이라 할 수 있다.



**Fig. 3. Effect of temperature on the productivity of functional GFP.**  
BL21(DE3) transformant BG was grown to OD 0.4 at 37°C, transferred to the shaker at various temperatures (15°C, 20°C, 25°C, and 37°C), and induced with 1 mM IPTG. The samples were collected after 8 hrs induction and their whole cell fluorescences were measured.

## 요약

본 연구에서는 저온에서의 재조합 단백질 생산성 향상을 위하여 저온에서 RNA 샤페론 활성을 지닌다고 알려진 CspA 단백질의 발현이 서로 다른 온도에서 대장균의 성장 및 GFP의 발현 속도에 어떻게 영향을 미치는지를 살펴보았다. 20°C, 25°C, 37°C에서는 세포 성장 및 GFP의 생산이 CspA의 발현에 영향을 받지 않았으나, 15°C에서는 GFP의 총 생산성이 CspA의 동시 발현에 의해 향상되었으며 이는 세포 성장 속도의 향상에 기인함을 확인하였다. 결론적으로 CspA의 발현은 15°C에서 세포 당 재조합 단백질 생산량의 증가에는 영향을 미치지 않으나, 즉 재조합 단백질의 번역 효율에는 큰 영향을 미치지 않으나, 대장균 성장 속도에 영향을 미치며, 이를 통해 재조합 단백질의 총 생산량 향상을 유도 할 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사

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

접수 : 2008년 10월 9일, 게재승인 : 2009년 1월 7일

## REFERENCES

1. Baneyx, F. (1999), Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 411-421.
2. Baneyx, F. and M. Mujacic (2004), Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1399-1408.
3. Mujacic, M., K. W. Cooper, and F. Baneyx (1999), Cold-inducible cloning vectors for low-temperature protein expression in *Escherichia coli*: application to the production of a toxic and proteolytically sensitive fusion protein. *Gene* **238**, 325-332.
4. Vasina, J. A. and F. Baneyx (1997), Expression of aggregation-prone recombinant proteins at low temperatures: a comparative study of the *Escherichia coli* cspA and tac promoter systems. *Protein Expr. Purif.* **9**, 211-218.
5. Qing, G., L. C Ma, A. Khorchid, G. V. Swapna, T. K. Mal, M. M. Takayama, B. Xia, S. Phadtare, H. Ke, T. Acton, G. T. Montelione, M. Ikura, and M. Inouye (2004), Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **22**, 877-882.
6. Fang, L., W. Jiang, W. Bae, and M. Inouye (1997), Promoter-independent cold-shock induction of cspA and its derepression at 37 degrees C by mRNA stabilization. *Mol. Microbiol.* **23**, 355-364.
7. Giuliodori, A. M., Brandi, A., Gualerzi, C. O., and C. L. Pon (2004), Preferential translation of cold-shock mRNAs during cold adaptation, *RNA* **10**, 265-276.
8. Bulter, T. S. G., Lee, W. W., Wong, E. Fung, M. R. Connor, and J. C. Liao (2004), Design of artificial cell-cell communication using gene and metabolic network. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 2299-2304.
9. Fernandez, L. A. (2004), Prokaryotic expression of antibodies and affibodies, *Curr. Opin. Biotech.* **15**, 364-373.
10. Swartz, J. R. (2001), Advances in *E. coli* production of therapeutic proteins, *Curr. Opin. Biotech.* **12**, 195-201.
11. Cavicchioli R., siddiqui K. S., Andrews D., and K. R. Sowers. (2002), Low-temperature extremophiles and their applications, *Curr. Opin. Biotech.* **13**, 253-261.