

재조합 대장균을 이용한 외래 단백질 생산기술의 현황과 전망

박용철¹, 권대혁, 이대회, 서진호*

¹서울대학교 협동과정 생물화학공학전공, 서울대학교 식품공학과*

전화(031) 290-2583, FAX(031) 293-4789

1. 서론

대장균을 이용한 외래유전자의 발현은 연구 또는 상업적인 목적에서 일차적으로 고려되는 가장 간단하고 경제적인 방법이다. 재조합 유전자 조작법의 발전, 다양하게 개발된 강력한 프로모터, 전사(transcription) 및 번역(translation) 효율의 개선 등을 통해 더욱 효과적으로 이루어지게 되었으며 값싼 기질을 이용하여 대장균을 고농도로 빠르게 성장시킬 수 있는 장점을 가지고 있다.^{1,2)} 그러나 번역 후 수정과정(post-translational modification)이 없으며, 종종 대장균 내에 목적 단백질이 활성이 없는 응집체인 내포체(inclusion body) 형태로 축적되기도 하는 단점을 가지고 있다. 대장균에서 단백질을 생산하기 위한 재조합 시스템 개발에 있어서 고효율 생산을 위한 시스템, 내포체 형성의 해결에 대한 발효공학적 방법과 샤페론 및 접힘 촉진 효소의 동시 발현, 융합시스템을 이용한 단백질 생산에 대한 최근의 연구 결과에 대해 발표하고자 한다.

2. 재조합 시스템을 이용한 발효공학적 접근

외래 단백질의 발현수준을 결정하는 프로모터는 목적 단백질을 총 세포 단백질의 10~30 % 정도 이상으로 발현할 수 있을 만큼 강력해야 하며, 발현이 유도되지 않은 상태에서는 최소한으로 억제되어야 하고 간편하고 경제적인 방법으로 유도될 수 있는 것이 좋다.³⁾ 현재 lac, trp, phoA, araBAD, nar, tac, trc, P_L, P_R, T7 프로모터 등과 다양하게 융합(hybride)된 프로모터들이 개발되어 있다. T7 프로모터를 이용한 발현 시스템은 대부분 목적 단백질을 총 단백질량의 40~50% 수준으로 발현하며 *Bacillus* 유래의 cyclodextrin glucanotransferase⁴⁾, phytic acid를 가수분해하는 phytase⁵⁾, human growth hormone⁶⁾ 등 다양한 외래단백질 생산연구에 이용되었다. L-arabinose의 첨가로 araBAD 프로모터에 의한 전사가 조절되는 시스템이 개발되었는데 고농도배양에 유리하고 값싼 탄소원을 inducer로 사용할 수 있지만 세포마다 L-arabinose uptake rate이 달라 정확한 발현조절을 하기 힘든 단점이 있으며 발효공정에 대해 interferon- α 의 대량생산에 대한 연구가 보고되었다.⁷⁾

3. 재조합 대장균에서의 활성형 단백질의 생산

대장균에서 외래단백질을 발현하는 경우 종종 활성이 없는 내포체 형태로 생산되는데 순도가 높은 단백질 응집체를 손쉽게 분리할 수 있어 효율적인 정제를 가능하게 하고 단백질 분해 효소의 공격을 받지 않는 등 여러 가지 장점을 가지고 있지만 내포체의 활성을 회복하기 위해 복잡한 가용화(solubilization)와 재접힘(refolding) 과정을 거쳐야 하며 최종 수율이 낮은 단점을 가지고 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해 in vivo에서 내포체 생성을 억제하여 생리활성이 있는 단백질을 생산하는 발효공정 및 시스템이 개발되고 있다.

(1) 발효공정에 의한 가용성 단백질의 생산 : 발효조건 최적화를 통해 생리활성이 유지되는 가용성 단백질을 증가시키는 방법으로 배양온도의 감소, sucrose와 raffinose 등과 같은 비대사 탄소원의 첨가, glycine betaine, sodium chloride, calcium chloride, ethanol, 요오드 등의 첨가, 발현균주의 변이, 배양 pH의 변화, 단백질 아미노산 서열의 교체, 영양분 공급, thioredoxin의 융합 등에 대한 연구가 보고되었다.^{1,8)}

(2) 샤페론 및 단백질 접힘 효소의 동시 발현을 통한 가용성 단백질의 생산 : 샤페론(molecular chaperone)은 단백질이 원하는 3차 구조를 가질 수 있도록 도와주며, 불필요한 분자간 또는 분자내 상호작용을 방지하며 대장균에는 GroEL, GroES, DnaK, HtpG, SecB, PapD 등이 있다. 접힘촉진효소(foldase)는 접힘(folding)단계에 있어 율속단계인 공유결합 또는 이성화 단계를 용이하게 하는 역할을 하는 효소로 DsbA, DsbB, DsbC와 DsbD 등이 있다. 또한 프로린(proline)의 이성화를 촉진시키는 peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase(PPIase)가 있다.⁹⁾ 1989년 대장균에서 GroEL과 GroES의 동시발현을 통해 in vivo에서 외래단백질의 접힘에 대한 연구결과가 발표된 후 샤페론이나 접힘촉진효소를 동시 발현시켜 내포체 형성을 감소시키려는 연구가 많이 시도되었다.¹⁰⁾ 최근 연구에서 DsbC의 동시발현으로 disulfide 결합이 많은 단백질을 생산한 연구결과가 보고되어¹¹⁾ in vivo 접힘 기술의 발전은 현재까지 매우 어렵게 여겨지고 있는 disulfide 결합이 여러 개 존재하는 단백질의 directed evolution을 가능하게 해 줄 것으로 여겨지며, 또한 bacterial surface display 기술에 적용되어 high throughput screening system의 발전 및 다양한 응용이 가능할 것으로 기대된다.

4. 단백질 융합기술

단백질 융합 기술은 외래유전자의 C-말단이나 N-말단에 특정 기능을 가진 펩타이드 또는 단백질의 유전자를 결합하여 여러 가지 특성을 가진 융합단백질을 생산하는 방법이다.¹²⁾ 분리, 정제 공정의 효율을 증진시킨 단백질 정제단계의 단순화, 내포체 생성의 억제, 접힘(folding) 특성의 개선, 가수분해 억제 등의 장점이 있으며

최근 최근에 세포표면 발현을 위한 융합시스템¹³⁾이 개발되고 있다. 단백질 융합체로는 staphylococcal protein A, streptococcal protein G, *Schistosoma japonicum* glutathione-S-transferase, maltose-binding protein, thioredoxin, DsbA 와 ubiquitin 등이 있고, 정제를 위한 FLAG, His₆와 c-Myc 등의 펩타이드와 같은 친화성꼬리(affinity tag)를 이용한다. 한편 연속된 양이온성 아미노산을 융합 파트너로 하여 한단계의 이온교환수지만으로도 목적 단백질을 단일하게 정제할 수 있었는데, 이는 모든 대장균 세포 단백질이 제거될 수 있는 이온교환강도를 프로테오믹 분석과 실험을 통하여 살펴본 다음, 목적 단백질에 그 이상의 흡착강도를 지닐 수 있는 적정 종류와 길이의 양이온성 아미노산을 고찰하여 부착함으로써 이루어졌다 (unpublished data). 재조합 단백질의 용해도를 높여서 내포체 형성을 억제하기 위해서 사용되는 융합체로 주로 thioredoxin이 사용되고 glutathione S-transferase 와 *Staphylococcus aureus* protein A, 세균성 lamda head protein D와 His-tagged 유도체를 융합한 시스템도 효과적인 것으로 알려져 있다.

5. 결론

재조합 단백질 발현에 있어 대장균을 이용한 방법은 가장 널리 사용되는 경제적인 방법으로 인식되어왔으나 대장균 내 번역 후 수정과정의 부재로 인한 내포체의 생성은 생리활성이 있는 단백질 생산의 저해요인으로 작용해 왔다. 하지만 대장균의 생리적 특성에 대한 이해와 유전자의 염기서열 결정과 같은 분자생물학적 기술의 발달 등으로 활성단백질의 생산이 가능해져 외래단백질 발현에 있어 대장균의 이용이 더욱 증대되고 있다. 또한 유전자 융합시스템의 개발로 affinity-tag을 이용하여 분리-정제 공정을 단순화시킬 수 있을 뿐만 아니라 재접힘 공정의 속도 및 효율의 증대, 단백질 생리활성 유지, 가수분해 억제 등 재조합 대장균에서 외래단백질의 생산과 관련된 많은 문제점을 해결할 수 있어 새로운 기능을 가진 재조합 대장균 시스템을 구축할 수 있을 것이다.

6. 참고문헌

- 1) Baneyx, F., "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*" (1999), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10, 411-421.
- 2) Seo, J. H., "Production of proteins in recombinant *Escherichia coli*" In *Recent Advance in Bioprocess Engineering* (1995), Vol. 3, H. N. Chang, Y. K. Chang and S. Y. Lee, Eds., p63, Bioprocess Engineering Research Center, Taejon.
- 3) Hannig, G. and S. C. Makrides, "Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*" (1998), *TIBTECH.*, 16, 54-60.
- 4) Park, Y. C., C. S. Kim, C. I. Kim, K. H. Choi and J. H. Seo, "Fed-batch

fermentations of recombinant *Escherichia coli* to produce *Bacillus macerans* CGTase" (1997), *J. Microbiol. Biotechnol.*, **7**, 323-328.

5) Sunitha, K., Y. O. Kim, J. K. Lee and T. K. Oh, "Statistical optimization of seed and induction conditions to enhance phytase production by recombinant *Escherichia coli*" (2000), *Biochem. Eng. J.*, **5**, 51-56.

6) Shin, N. K., D. Y. Kim, C. S. Shin, M. S. Hong, J. W. Lee and H. C. Shin, "High-level production of human growth hormone in *Escherichia coli* by a simple recombinant process" (1998), *J. Biotechnol.*, **62**, 143-151.

7) Lim, H. K., K. H. Jung, D. H. Park and S. I. Chung, "Production characteristics of interferon- α using an L-arabinose promoter system in a high-cell density culture" (2000), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 201-208.

8) Jin, H. H., N. S. Han, D. H. Kweon, Y. C. Park and J. H. Seo, "Effects of environmental factors on *in vivo* folding of *Bacillus macerans* cyclodextrin glycosyltransferase in recombinant *Escherichia coli*" (2000), *J. Microbiol. Biotechnol.*, submitted

9) Gottesman, M. E. and W. A. Hendrickson, "Protein folding and unfolding by *Escherichia coli* chaperones and chaperonins" (2000), *Curr. Opin. Microbiol.*, **3**, 197-202.

10) Georgiou, G. and P. Valax, "Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*" (1996), *Curr. Opin. Biotechnol.*, **7**, 190-197.

11) Bessette, P. H., F. Aslund, J. Beckwith and G. Georgiou, "Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm" (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 13703-13708

12) La Vallie, E. R. and J. M. McCoy, "Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*" (1995), *Curr. Opin. Biotechnol.*, **6**, 501-506.

13) Ståhl, A. and M. Uhlén, "Bacterial surface display: trends and progress" (1997), *TIBTECH.*, **15**, 185-192.