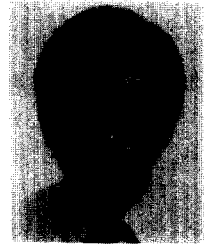


단백질공학을 통한 새로운 효소개발



한국과학기술원 유전공학센터 **합 경 수**

지난 10여년간에 걸쳐 급속히 발전한 유전공학 기술로 인해서 자연계에 존재하는 단백질이면 어느 단백질이나 그 유전자를 clone할 수 있게 되었으며, 그 유전자의 정확한 조작으로 원하는 단백질을 박테리아 등에서 대량 생산할 수 있게 되었을 뿐 아니라 최근 DNA 합성기술의 발달로 거의 무제한으로 유전자를 변형시킬 수 있게 되었다. 따라서 자연계에 존재하지 않는 새로운 단백질을 창출하고자 하는 기술인 단백질공학기술의 개발이 가능해진 것이다. 단백질공학기술은 실제로 무한한 응용성을 갖고 있는 기술로서 단백질의 구조 및 기능을 연구하는 기본적인 문제점을 해결하는 데 이용될 수 있을 뿐 아니라 새로운 세대의 의약품이나 산업용 효소 등을 비롯한 보다 경제적이고 생산성 높은 유용단백질의 설계에도 이용될 수 있다.

생화학자들에 의해서 수천개의 효소가 현재까지 밝혀진 바 있으나, 공업용 또는 산업용으로 이용되고 있는 효소는 맥주의 발효, 빵의 생산, 세척제의 세척기능을 갖게 하는 등 불과 몇개 되지 않는다. 실제로 세계적으로 연간 매출고가 천만불 이상인 효소는 오직 10여개 뿐이며 이들이 전체 효소시장의 90% 이상을 차지하고 있는 것이다¹⁾. 어떤 효소를 공업적으로 이용하는데 있어서의 제한효소는 흔히 필요한 양의 단백질을 정제하는데 드는 비용 때문인데, 이는 미생물에서 대량생산할 수 있는 유전공학기술의 발달로 일부 해결되었다고 볼 수 있으나, 실제로 어떤 효소를 공업적으로 이용할 수 있기 위해서는 생산비용이외에 다른 큰 문제점이 있다. 즉 공업적으로 효소를 이용하기 위해서는 원래 그 효소가 작용하는 생리적인 조건과는 지극히 거리가 먼 상태에서 이용할 수 있어야 한다는 점이다. 특히 공업적으로 이용하기 위해서는 원하는 공정상태에서 반감기가 긴 효소가 필요

하며, 원하는 기질이나 산물도 흔히 생리적인 경우와 차이가 나며, 그 효소가 촉매하는 반응의 화학적인 조건도 생리적인 경우와 크게 차이가 나는 것이다. 따라서 극단적인 pH, 온도 혹은 농도를 필요로 하며 효소를 공업적 촉매로 널리 이용할 수 있기 위해서는 우리가 바라는대로 그 효소의 성질을 바꿀 수 있는 방법이 개발되어야 한다. 효소의 경우 우리가 바라는대로 변화시키고 싶은 성질에는 다음과 같은 것이 있다. 즉 ① 효소의 turn over수나 K_m 와 같은 반응속도의 성질, ② 열에 대한 안정성 및 적정온도, ③ 수용액이 아닌 용액에서의 안정성 및 활성, ④ 기질이나 반응에 대한 특이성, ⑤ 조효소에 대한 필요조건, ⑥ 적정 pH, ⑦ 단백질분해효소에 대한 저항성, ⑧ Allosteric 조절 및 ⑨ 분자량이나 소단위 구조 등이 있다.

위와 같은 문제점을 해결하는 방법으로는 첫째, 자연계에 존재하는 효소중에서 가장 적합한 효소를 탐색하거나, 둘째, 자연계에 존재하는 효소의 성질을 개량하기 위한 mutation 혹은 selection 방법, 세째, 화학적으로 변형시키거나 고정화시킴으로서 안정되고 기능적인 촉매를 얻는 방법 등이 오늘날까지 이용되어 왔으며, 이상의 모든 노력의 결과로 효소의 여러 성질이 일반적으로 개선될 수 있음을 알았다. 이와같이 해서 얻어진 지식을 토대로 단백질공학기술이 어떻게 개발됨으로서 개선된 효소를 얻을 수 있는가에 대해서 예를 들어 다음에 기술한다.

같은 종류의 효소이지만 분리한 종이나 조직에 따라 turn over수, K_m 치, 분자량, 적정온도, 열에 대한 안정성, 적정 pH 및 안정도 등에 있어서 많은 차이가 나는 것은 흔한 일이다. 예를 들어서 glucose isomerase (E. C. 5.3.1.5)²⁾중에는 60°C

에서 1분 동안에 변환시키는 glucose 분자의 수가 63에서 2151까지 차이가 있으며, Km치도 10배 이상의 차이가 나기도 한다(0.086~0.920 molar). 분자량 또한 52,000에서 191,000으로 다양하고 적정온도도 50°C에서 90°C로 다양하다. 어떤 glucose isomerase는 열에 매우 불안정하여 60°C에서 10분간만 노출되면 활성을 다 잃어버리는 반면, 70°C에서 10분간 노출되어도 활성을 100% 유지하는 효소도 있다. 적정 pH도 다양하여 어떤 glucose isomerase는 pH 7~9로 그 범위가 좁은 반면에 어떤 효소는 그 범위가 pH 4에서 11로 매우 넓은 것도 있다. 어떤 특정한 용도에 이용하기 위한 최적조건을 찾는 일은 쉬운 일이 아니다. 예를 들어서 활성도가 높다고해서 반드시 가장 안정된 상태는 아닌 것이다. 그러나, 각각의 효소에 있어서 그 효소로 하여금 특정한 성질을 나타내게 하는 구조적인 정보를 알 수 있으면, 이를 이용하는 단백질공학기술에 의해서 우리가 원하는 효소를 새로이 창제할 수 있을 것이다. 이와 같은 것을 현재 이용되고 있는 mutagenesis 기술로 성취한다는 것은 상상하기 어려운 일이지만, 적절한 구조에 대한 정보를 알고 이를 토대로 단백질을 변형하고자 하는 방법을 취한다면 가능할 것이다.

열에 대한 안전성에 대한 일반적인 규칙을 알아낼 수도 있다. 지금까지의 여러 연구결과로 특정한 아미노산 잔기가 단백질의 2차 구조 및 2차 구조간의 상호반응에 관여하는 바와 같이 salt bridge나 전기적 상호작용이 열에 대한 안정도에 기여함이 밝혀진 바 있다^{3,4)}. 미세한 변화로도 열에 대한 안정성에 큰 영향을 미칠 수 있으나 단백질 공학기술은 단순히 적은 변화만 단백질에 가하는 것이 아니라 새로운 S-S bridge를 만든다거나, 다른 여러 변환방법을 복합적으로 이용함으로써 가장 적합한 효소를 만들 수 있는 것이다.

Mutagenesis 기술 또한 효소의 특정한 성질을 효과적으로 개량하는데 이용할 수 있다. 예를 들어서 tyrosyl-tRNA synthetase의 Kcat/Km을 증가시키거나⁵⁾, Kcat과 Km치를 변화시킴으로써 기질의 농도의 차이에 따라서 가장 활성도가 높은 효소가 만들어 지기도 한다⁶⁾. 기질에 대한 특이성 또한 효소가 갖는 중요한 성질로서, mutagenesis

를 이용하여 trypsin의 기질에 대한 특이성을 변화시키거나⁷⁾, β -lactamase의 경우 active site의 serine을 cysteine으로 치환시킴으로서 penicillin이나 ampicillin에 대한 반응성에 변화를 가져오게 하거나⁸⁾, α_1 -antitrypsin의 활성부위의 아미노산 배열순서를 바꾸어 줌으로써 elastase로부터 특이성을 thrombin으로 바꾸어준 경우도 있다⁹⁾. 또한 분자의 크기나 소단위구조, 적정 pH 등 효소의 물리적인 여러 성질도 아미노산 배열순서에 의해서 결정이 되며 따라서 단백질공학기술에 의해 변화될 수 있다. 단백질공학기술의 중요한 목표중의 하나가 열에 대한 안정도가 향상된 효소를 생산하고자 하는 것이다. 그러나 아직 열에 약하게 만들거나 혹은 열에 강하게 만드는 자세한 인자에 대한 우리의 지식은 충분하지 못하지만, 효소의 분자에 disulfide 결합을 첨가시킴으로써 단백질을 보다 더 견고하게 만들고 따라서 안정성을 증가시키고자 하는 연구노력이 진행중이다. 예를 들어서 T4 lysozyme¹⁰⁾, subtilisin¹¹⁾ 및 dihydrofolate reductase¹²⁾ 등의 효소에 disulfide 결합을 첨가시킨 바 있으며, T4 lysozyme과 dihydrofolate reductase의 경우 결과적으로 생성된 효소가 자연계의 효소에 비해 열에 대한 안정도가 증가되었으나, subtilisin의 경우 그 안정도에 변화가 없거나 오히려 떨어뜨린 결과를 얻은 바 있다. 따라서 보다 일반적인 규칙이나 방법이 개발되기 위해서는 단백질의 구조-기능간의 보다 많은 정보가 필요한 것이다.

단백질공학기술이 성공할 수 있다는 또 다른 증거는 효소의 화학적인 변형 연구결과로부터도 얻을 수 있다. Flavopapain¹³⁾과 같은 semisynthetic 효소의 성공은 결정구조에 대한 적절한 정보로부터 효소를 변형시킬 수 있는 가능성을 제공한다. 이 경우 단백질분해효소인 papain의 활성부위에 flavenoid cofactor를 부착시킴으로써 효소의 active site에 기질과 반응할 수 있는 부위와 더불어 flavo 효소로 작용할 수 있는 효소로 기대했던 대로 변화시킨 것이다.

이상에서 본 바와 같이 효소분자에 있어서 구조에 변화를 주고, 변화된 분자를 분석하고 생산하는 기술이 발달함으로 해서 단백질의 구조-기능간

의 관계가 정립되고, 그와 같은 지식을 토대로 산업적으로 응용성이 있는 새로운 효소를 창제할 수 있는 것이다. Ulmer가 1983년¹⁾ 효소에 있어서 변화시키고자 하는 여러 성질들에 대해 기술한 이래 지난 3~4년간 이미 이들 모든 성질에 대한 변화가 앞에서 기술한 바와 같이 성취된 바 있다. 특히 중요한 것은 어떻게 그와 같은 성질들을 새로운 단백질 분자내에 부여할 수 있는가에 대한 원리도 최근 하나 하나 밝혀지고 있으므로 다음 단계는 이와 같은 지식을 토대로 새로운 단백질을 창제하고자 하는 것이며, 필요에 따라 적합한 효소를 design 하여 창제하고자 하는 연구가 최근 많이 진행되고 있다.

참고문헌

1. Ulmer K.M., *Science* **219**: 666, 1983.
2. Chen W., *Process Biochem* **15**: 36, 1980.
3. Argos P., *et al.*, *Biochemistry* **18**:5698, 1979.
4. Grutter M.G., *et al.*, *Nature* **277**: 667, 1979.
5. Wilkinson A.J., *et al.*, *Nature* **307**:187, 1984.
6. Fersht A.R., *et al.*, *Biochemistry* **24**:5858, 1985.
7. Craik C.S., *et al.*, *Science* **228**:291, 1985.
8. Sigal, I.S., *et al.*, *J. Biol Chem* **259**:5327, 1984.
9. Courtney M., *et al.*, *Phil Trans R Soc London* **A317**:381, 1986.
10. Perry L.J. & Wetzel R. *Science* **226**:555, 1984.
11. Wells J.A. & Powers D.B. *J. Biol Chem* **261**: 6564, 1986.
12. Villafranca J.E., *et al.*, *Phil Trans R Soc Lond* **A317**:405, 1986.
13. Slama J.T., *et al.*, *J. Am Chem Soc* **103**:6211, 1981.