

## 해당과정의 활성화를 통한 무세포 단백질 발현 시스템에서의 ATP 재생

† 김 동 명 · <sup>1</sup>김 정 원 · <sup>1</sup>김 태 완 · <sup>1</sup>오 인 석 · <sup>1</sup>최 차 용  
충남대학교 신소재공학부 정밀공업화학과, <sup>1</sup>서울대학교 응용화학부  
(접수 : 2004. 12. 2., 게재승인 : 2004. 12. 23.)

### Regeneration of ATP through an Activated Glycolytic Pathway in a Cell-free Extract and its Application for Protein Expression

Dong Myung Kim<sup>†</sup>, Jeong Won Keum<sup>1</sup>, Tae Wan Kim<sup>1</sup>, In Seok Oh<sup>1</sup>, and Cha-yong Choi<sup>1</sup>

Department of Fine Chemical Engineering and Chemistry, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

<sup>1</sup>Interdisciplinary Programs for Biochemical Engineering and Biotechnology, Seoul National University,

302-615 Shinlim-9dong, Kwanak-ku, Seoul 151-744, Korea

(Received : 2004. 12. 2., Accepted : 2004. 12. 23.)

We have investigated the key parameters affecting ATP regeneration in a cell-free protein synthesis system derived from *Escherichia coli*. When glucose-6-phosphate was used as an energy source, the efficiency of ATP regeneration sharply responded to pH change of reaction mixture. In addition, both productivity and reproducibility of protein synthesis was substantially enhanced by introducing appropriate amount of NAD into the reaction mixture. As a result, through the activation of glycolytic pathway under an optimal pH, the batch cell-free system produced over 300 µg of protein in a 1 mL reaction.

#### 서 론

인간 게놈 프로젝트를 포함한 다종의 생명체에 대한 유전자 시퀀싱 프로젝트들이 속속 종결됨에 따라 이후 포스트 게놈 연구를 위해 요구되는 다중 단백질의 고속발현에 있어서의 기존 단백질 발현 공정의 한계를 극복하기 위한 대안으로 최근 들어 무세포 단백질 발현공정이 많은 주목을 받고 있다. 살아있는 세포를 이용하는 대신 세포로부터 분리된 단백질 합성 기구들과 단백질 합성기질의 생화학적인 반응을 통하여 반응액에 입력된 DNA 상의 단백질을 발현하는 무세포 발현 기술은 유전자 클로닝 및 세포 배양 공정 등을 거치지 않고 수 시간 내에 유전자 상에 입력된 염기서열 정보를 단백질의 형태로 번역함으로써 단백질 구조 결정, 활성 분석, 단백질 상호 작용의 이해, 신규 단백질의 탐색 및 변형 등 프로테오믹스 제반 분야에 요구되는 단백질 분자의 수요를 충족시킬 수 있는 차세대 단백질 발현 기술의 가능성을 평가받고 있다(1, 2).

반면 이러한 가능성에도 불구하고 무세포 단백질 발현

기술은 낮은 생산성과 높은 비용이라는 문제점으로 인하여 현실적인 응용은 요원한 것으로 받아들여져 온 것이 사실이다. 최근 Kim and Swartz는 기존의 무세포 발현 시스템이 갖는 낮은 단백질 생산성이 비효율적인 ATP 재생에 기인하는 것임을 입증하고, 이를 해결하기 위한 방안으로 해당과정 (glycolytic pathway)의 중간물질들을 에너지원으로 사용함으로써 무세포 반응액 내에서의 ATP 재생을 향상시킬 수 있음을 보인 바 있다(3, 4). 해당과정의 첫 번째 중간체인 glucose-6-phosphate(G-6-P)를 에너지원으로 사용함으로써 기존의 무세포 발현 시스템에 일반적인 에너지원으로 사용되고 있는 phosphoenolpyruvate에 비하여 현저히 향상된 ATP 공급을 유도할 수 있었고 이를 통한 단백질의 생산수율 역시 향상되었음을 보고하였다. 기존의 대부분의 무세포 발현 시스템의 경우, ATP 재생을 위한 에너지원으로서 일반적으로 PEP를 사용하며 이 경우, pyruvate kinase에 의해 매개되는 substrate-level phosphorylation 반응에 의해 한 분자의 PEP는 한 분자의 ATP를 재생하며 pyruvate로 전환되게 된다. 반면 G-6-P는 해당과정을 통해 피루브산으로 전환되는 동안 한 분자의 ATP를 소모하고 네 분자를 생성하게 되므로 이론적으로 총 3 분자의 ATP를 재생함으로써 기존 시스템에 비하여 훨씬 효율적으로 무세포 단백질 합성을 위한 ATP를 공급할 수 있게 된다. Chatterjee 등은 또한 Chatterjee 등은 G-6-P 이외에도, 해당과정의 또 다른 중간물질인 3-phosphoglycerate (3-PGA) 역시 무세포 단

† Corresponding Author : Department of Fine Chemical Engineering and Chemistry, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Tel : +82-42-821-5899, Fax : +82-42-823-7692

E-mail : dmkim@cnu.ac.kr

백질 발현을 위한 에너지원으로 사용될 수 있음을 보고하였다(5). 그러나, 이들의 실험결과를 재현하기 위한 본 연구 그룹의 초기 실험결과는 보고된 바와 일치하지 않았다. G-6-P를 에너지원으로 사용한 무세포 단백질 합성 반응은 발현되는 단백질의 생산성에 있어서 매우 낮은 재현성을 보였고, 경우에 따라, PEP를 사용한 경우에 비하여 오히려 낮은 단백질 합성 수율을 보이기도 하였다. 본 연구에서는 이처럼 해당과정의 중간체를 에너지원으로 사용한 무세포 단백질 발현 반응에 영향을 미치는 주요 인자들을 탐색하고 이를 해결하여 고효율의 회분식 무세포 단백질 발현을 높은 재현성으로 수행할 수 있도록 하는 것을 목적으로 수행되었다.

**재료 및 방법**

Phosphoenolpyruvate (PEP), E.coli total tRNA (이상 Roche Applied Science), L-[U-<sup>14</sup>C]-leucine (Amersham Pharmacia Biotechnology)를 제외한 모든 시약은 Sigma 사로부터 구입하여 별도의 정제 없이 사용하였다. T7 프로모터와 T7 터미네이터 사이에 클로닝된 대장균 유래의 클로람페니콜 아세틸전이 효소 (chloramphenicol acetyltransferase, CAT) 유전자를 단백질 발현의 주형으로 사용하였으며, 플라스미드의 정제는 Qiagen 사의 Maxi kit을 사용하여 행하여 졌다. 유전자의 무세포 발현을 위한 리보조음과 단백질 번역 인자들은 BL21 (DE3) 대장균 균주로부터 제조된 S30 세포 파쇄액의 형태로 첨가되었으며, 보고된 파쇄액 제조 공정을 부분적으로 변형시켜 이용하였다(6, 7). 무세포 단백질 발현을 위한 표준 반응액의 조성은 다음과 같다.

57mM HEPES-KOH (pH 7.5); 1.2 mM ATP; 0.85 mM GTP, UTP, CTP; 1 mM DTT; 0.64 mM cAMP; 200 mM potassium glutamate; 80 mM ammonium acetate; 12 mM magnesium acetate; 34 µg/mL folinic acid; 6.7 µg/mL plasmid; 1 mM amino acids; 11 µM [<sup>14</sup>C]-leucine; 2% polyethylene glycol (PEG)8000; 33 mM PEP; 24% S30 파쇄액

또한 에너지원에 따른 반응액의 ATP 농도와 단백질 합성량의 변화를 조사하기 위하여 실험에 따라 PEP 대신 G-6-P, G6P/NAD, 혹은 G-6-P/NAD/CoA가 각각 다른 농도로 첨가되었다. 모든 반응은 37°C에서 주어진 시간동안 행하여졌다. 발현된 단백질의 확인 및 정량과 ATP 농도 분석은 보고된 방법(7)을 따라 이루어졌다.

**결과 및 고찰**

G-6-P를 이용한 무세포 단백질 발현의 초기 실험에서 G-6-P는 물에 녹인 1 M 용액으로 준비되어 사용되었다. 가해진 G-6-P 용액의 부피를 변화시켜 반응액 내의 초기농도를 0 mM에서 67 mM까지 증가시켰을 때, 발현된 단백질의 양은 표준반응조건의 PEP 농도와 마찬가지로 33 mM에서 최적의 결과를 보였으나 이 때 최종적으로 얻어진 단백질 (Chloramphenicol acetyltransferase, CAT)의 양은 PEP를 사용한 표준반응의 결과에 비하여 현저히 낮은 단백질 발현을 나

타내었다(data not shown). 두 경우에 있어서 에너지원을 제외한 모든 조건은 동등하였으므로 이러한 발현량의 차이가 반응액 내의 ATP 농도와 연관이 있는지를 조사하였다. PEP 및 G-6-P를 사용한 무세포 발현 반응 도중의 ATP 농도의 변화는 Fig. 1에 나타낸 바와 같았으며 단백질 발현을 위한 ATP의 재생이 PEP의 그것에 비하여 효과적이지 못함을 알 수가 있었고, 이 같은 낮은 효율의 ATP 재생으로 인해 G-6-P에 의한 단백질 생산이 제한을 받는 것으로 판단이 되었다. 이를 해결하기 위한 방안을 모색하던 과정에서, G-6-P에 의한 ATP 재생 효율은 반응액의 pH에 크게 의존한다는 사실을 알 수가 있었다.

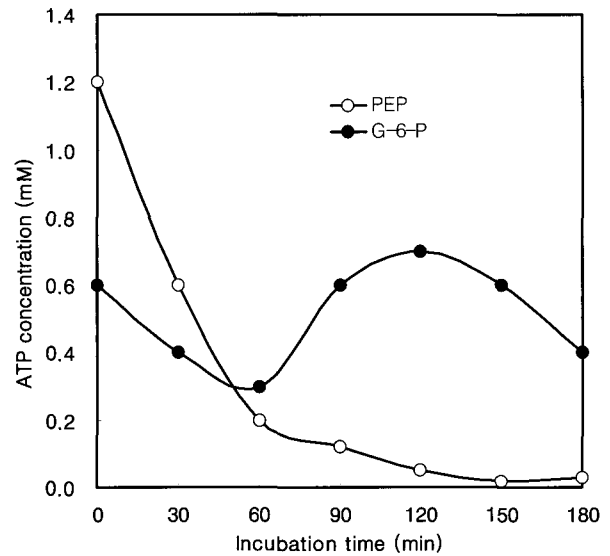


Figure 1. Time courses of ATP concentration with different energy source. Same concentration (33 mM) of PEP or G-6-P was used for the regeneration of ATP during cell-free protein synthesis. pH of stock solution was not adjusted.

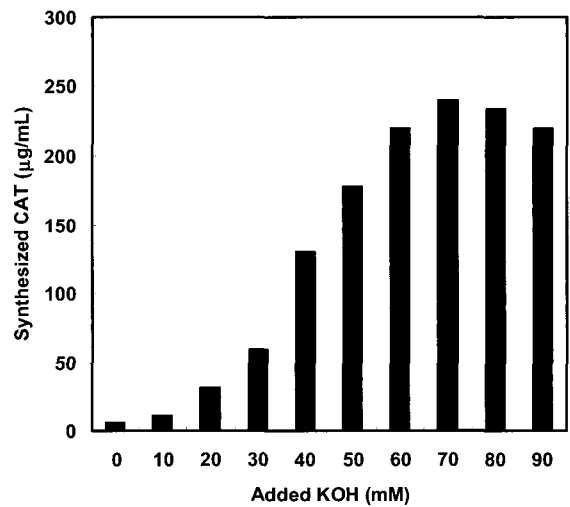


Figure 2. Effect of KOH addition on the final yield of cell-free synthesized CAT.

Fig. 2에서 보이는 바와 같이, 준비된 반응액에 KOH 용액을 가하여 pH를 변화시킴에 따라 최종적으로 발현되는 단

백질의 양은 점차로 증가하여 70 mM KOH 첨가시 약 250  $\mu\text{g/mL}$ 에 달하였다. 한편 이에 비하여, PEP 를 사용한 기존의 무세포 발현 시스템에서의 ATP 재생과 단백질 발현은 pH의 변화에 대하여 상대적으로 덜 민감하게 영향을 받았으며(data not shown) 이 같은 결과는 G-6-P 이후의 해당과정에 작용하는 9가지의 효소 중 하나 이상의 효소활성이 pyruvate kinase 에 비하여 pH에 영향을 크게 받기 때문으로 추정되었다.

이처럼 G-6-P를 사용한 반응액의 pH 조절을 통해 ATP 재생 효율을 향상시킴으로서 3시간의 회분식 반응 후, PEP를 사용한 표준 반응액에서의 약 2배에 이르는 양의 단백질을 발현할 수 있었으나, G-6-P가 이용된 무세포 반응에서 발현되는 단백질의 양은 PEP를 사용하는 경우에 비하여 실험에

따라 많은 편차를 보였고 특히, 새로 준비된 세포 파쇄액을 사용할 때마다 큰 차이를 보였다. 또한 PEP를 사용할 경우 첨가되는 파쇄액의 부피를 증가시키더라도 최종 단백질 합성량은 큰 영향을 받지 않은 반면 G-6-P를 이용한 발현 반응에서는 파쇄액 양의 증가에 따라 단백질 합성량 역시 현저히 증가하였다(Fig. 3A). 특히, 이 경우 파쇄액의 증가에 따라 반응액의 ATP 농도 변화 양상이 크게 바뀌어, 반응 초기의 ATP 공급이 향상되는 양상을 나타냄을 알 수가 있었다(Fig. 3B).

이상의 결과로부터, 파쇄액의 증량으로 인해 파쇄액에 잔류하는 조효소 NAD의 반응액 내의 농도가 증가되고 이로 인해 G-6-P의 해당과정이 활성화됨으로써 ATP 재생 및 단백질 합성이 향상되는 것으로 추정할 수 있었다. G-6-P가 해당

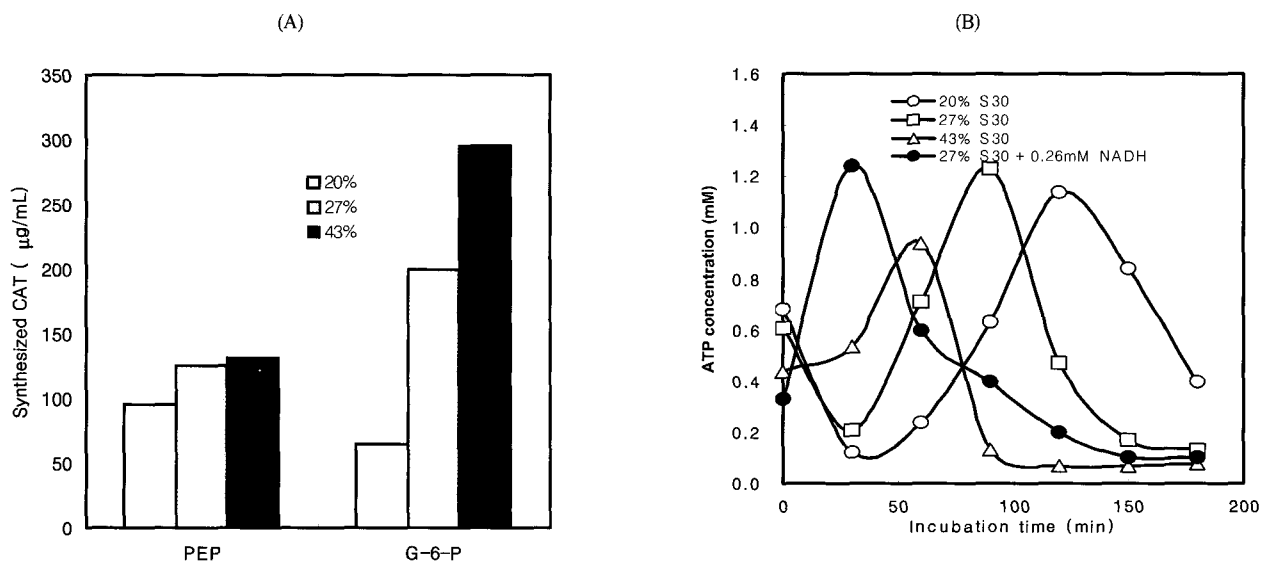


Figure 3. Effect of extract amount on the final yield of protein synthesis (A) and ATP concentration during the incubations (B). Panel B; Time course of ATP concentration was monitored when different volume of S30 extract was used in the reaction mixture. 27% volume of S30 extract and 0.25 mM of NAD were used for the reaction with NAD.

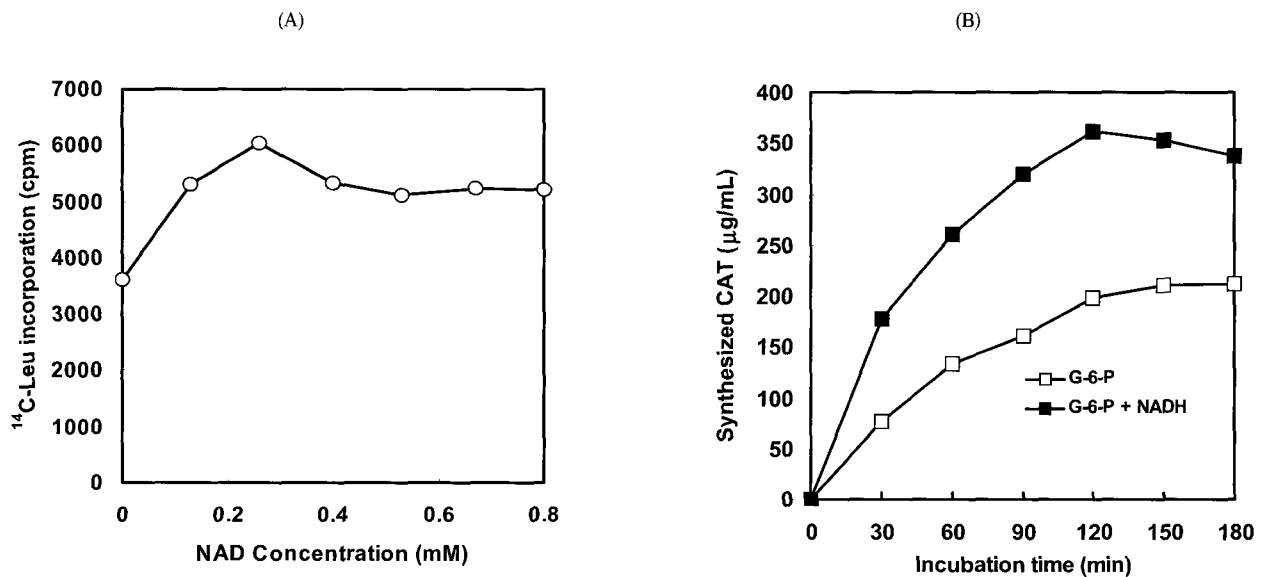
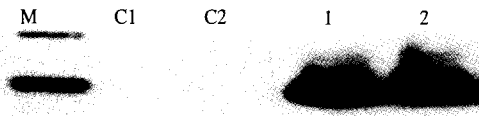


Figure 4. Effect of NAD concentration on the final yield (A) and time course (B) of protein synthesis.

작용과정을 거쳐 최종적으로 pyruvate로 전환되는 과정 중 glyceraldehyde-3-phosphate가 1,3-bisphosphoglyceric acid로 전환되는 단계는 조효소 NAD를 필요로 하므로 ATP의 연속적인 재생을 위해 반응액 내에는 NAD가 필수적으로 존재하여야 한다. 또한, 세포 파쇄액 내에는 제조과정에서 완전히 제거되지 않은 잔류 NAD가 존재하여 G-6-P의 사용을 가능하게 하나, 제조되는 파쇄액에 따라 그 농도가 달라 결과적으로 단백질 합성량의 차이를 유발하는 것으로 추측되었다. 이는 주로 파쇄액 제조 과정 중 투석 공정에서의 저분자 물질의 제거 효율의 가변성에 기인한 것으로 보인다. 이를 확인하기 위하여, 제조된 파쇄액들 중 PEP 사용시는 정상적인 단백질 발현을 나타내지만 G-6-P 사용시는 낮은 생산성을 보이는 파쇄액을 선정하여 이를 사용한 반응액에 NAD를 가하고 ATP 농도 및 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하였다. NAD의 첨가에 따라 단백질 발현량은 증가하였고 0.26 mM에서 최대 발현량을 나타내었다(Fig. 4A). NAD의 첨가는 초기 반응속도 및 반응지속시간 모두를 향상시켰고(Fig. 4B), 측정된 단백질의 생산은 가해진 주형 유전자 (CAT)로부터 발현된 것임을 Western blot에 의하여 확인하였다.



**Figure 5.** Western Blot analysis of synthesis reaction using G-6-P as an energy source. Lanes M; molecular weight markers, C1; reaction without the template plasmid, C2; reaction without any energy source, 1; reaction with G-6-P, 2; reaction with G-6-P and NAD.

## 요약

해당 작용의 중간체를 에너지원으로 이용한 무세포 단백질 발현 반응에서의 낮은 재현성 및 단백질 생산성은 반응액의 pH 및 NAD의 존재에 의해 크게 영향을 받는다는 사실을 밝혀내었다. 기존의 PEP를 사용하는 표준반응 용액에서 PEP를 G-6-P로 대체하고 동시에 반응액의 pH 및 NAD 농도를 최적화 함으로써 반응액 1 mL당 약 300  $\mu$ g에 이르는 단백질을 회분식 반응으로 발현할 수 있었다. ATP 재생 방법의 개선을 통한 회분식 무세포 단백질 발현의 생산성 향상은 다중 유전자의 고속 번역을 통한 기능 규명에 있어서 유용한 도구로서 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사

본 연구는 2004년도 과학재단 지역대학 우수연구자 지원사업에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Swartz, J. R. (2001), Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins, *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 195-201.
- Jermutus, L., L. A. Ryabova, and A. Pluckhun (1998), Recent advances in producing and selecting functional proteins by using cell-free translation, *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 534-548.
- Swartz, J. R. and D. M. Kim (1999), Prolonging cell-free protein synthesis with a novel ATP regeneration system, *Biotechnol. Bioeng.* **66**, 180-188.
- Swartz, J. R. and D. M. Kim (2001), Regeneration of adenosine triphosphate from glycolytic intermediates for cell-free protein synthesis, *Biotechnol. Bioeng.* **74**, 309-316.
- Sitaraman, K., D. Esposito, G. Klarmann, S. F. LeGrice, J. L. Hartley, and D. K. Chatterjee (2004), A novel cell-free synthesis system, *J. Biotechnol.* **110**, 257-263.
- Pratt, J. M. (1984), Coupled transcription-translation in prokaryotic cell-free systems, In *Transcription and Translation: A practical approach*, B. D. Hames and S. J. Higgins, Eds., p179-209, IRL Press, New York.
- Swartz, J. R. and D. M. Kim (2000), Prolonging cell-free protein synthesis by selective reagent additions, *Biotechnol. Prog.* **16**, 385-390.