

분자 샤페론을 사용한 연속확산식 무세포단백질 발현 시스템에서의 재조합 Plasminogen Activator의 효율적 발현

¹박 창 길 · ²김 태 완 · ²최 차 용 · † ¹김 동 명

¹충남대학교 공과대학 정밀공업화학과, ²서울대학교 공과대학 화학생물공학부

(접수 : 2005. 9. 21., 게재승인 : 2006. 4. 12.)

Enhanced Synthesis of Active rPA in the Continuous Exchange Cell-free Protein Synthesis (CECF) System utilizing Molecular Chaperones

Chang-Gil Park¹, Tae-Wan Kim², Cha-Yong Choi², and Dong-Myung Kim^{1†}

¹Department of Fine Chemical Engineering and Chemistry, School of Engineering,
Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

²School of Chemical and Biological Engineering, College of Engineering,
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received : 2005. 9. 21., Accepted : 2006. 4. 12.)

In this report, we describe that the use of GroEL/GroES-enriched S30 extract remarkably enhances the solubility and enzymatic activity of cell-free synthesized rPA, which requires the correct formation of 9 disulfide bonds for its biological activity. We found that the stable maintenance of redox potential is necessary, but not sufficient for the optimal expression of active rPA. In a control reaction without using additional molecular chaperones, most of the rPA molecules were aggregated almost instantly after their expression and thus failed to exhibit the enzymatic activity. However, by the use of GroEL/GroES-enriched extract, combined with IAM-treatment, approximately 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of active rPA was expressed in the cell-free synthesis reaction. This result not only demonstrates the efficient production of complex proteins, but also shows the control and flexibility offered by the cell-free protein synthesis system.

Key Words : rPA, CECF (continuous exchange cell-free protein synthesis), molecular chaperone, IAM

서 론

기존의 일반적인 단백질 발현 공정은 목적 단백질의 해당 유전자를 플라스미드에 클로닝하고 이를 세포에 도입한 후 단백질의 발현을 유도하는 과정을 거치게 된다. 이러한 단백질 발현 공정의 각 단계는 많은 시간과 노동력을 요구하게 되므로, 각종 유전자 시퀀싱 프로젝트의 종결로 인해 현재 요구되고 있는 고속·병렬 단백질 생산 수단으로 이용되기 위해서는 한계를 가지게 된다. 또한 단백질 분해효소에 의한 생산 단백질의 분해, 과발현된 단백질의 내포체 형성(1) 등과 같은 단백

질 발현 공정상의 문제점들을 해결하기 위한 적극적인 대처 수단이 극히 제한되게 되는데, 이는 기본적으로 단백질 발현 반응이 세포막, 세포벽이라는 물리적인 장벽 내에서 이루어짐에 따라 단백질 분자의 발현 및 폴딩에 영향을 미치는 반응 인자들의 직접적인 조절이 불가능하기 때문이다. 한편, 세포로부터 추출된 단백질 합성기구들을 이용하여 생화학적인 과정을 통해 단백질을 발현하는 무세포 단백질 발현 공정은 세포 배양공정이 갖는 이러한 한계들은 효과적으로 극복할 수 있는 가능성을 가지고 있어 포스트게놈 연구에 요구되는 다중 단백질들의 고속 생산수단으로의 응용이 기대되고 있다(2). 세포 내 공간이라는 '닫힌 계'에서의 단백질 합성 반응에 의존하는 세포 배양공정과 달리 무세포 발현 시스템은 일반적인 생화학 반응과 마찬가지로 완전히 '열린계'에서 단백질 합성 반응을 진행시키게 되므로 반응조건의 정확하고 직접적인 조절은 물론 다양한 화학물질의 인위적인 첨가를 통해 단백질의 발현

† 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

효율 및 발현된 단백질의 폴딩을 최적화할 수 있을 것이다.

예를 들어, 최근 Kim과 Swartz는 화학적으로 처리된 세포 파쇄액의 사용을 통하여 이황화결합을 포함하고 있는 동물세포 유래 단백질을 활성 단백질의 형태로 생산해 낼 수 있는 무세포 발현 시스템의 개발을 보고한 바 있다(3). 세포질은 매우 낮은 산화환원전위로 인하여, 폴딩 및 활성을 위하여 복수의 이황화결합을 필요로 하는 단백질 분자의 세포질 내의 발현이 불가능하며, 무세포 단백질 합성 시스템 역시 기본적으로 세포질의 추출액 (S30 extract)을 리보솜 등의 단백질 합성 기구의 공급원으로 사용하게 되므로 이황화결합의 형성이 제약을 받게 되나, 이들은 S30 extract를 iodoacetamide (IAM) 용액으로 처리하여 파쇄액 내에 존재하는 환원효소들을 비활성화시킨 후 적정 비율의 글루타치온 완충액 (glutathione buffer)를 사용하여 산화환원전위를 유지함으로써 재조합 유로키나아제 (recombinant urokinase) 등의 단백질을 성공적으로 발현할 수 있었다.

그러나, 본 연구 팀에서 같은 방법을 rPA의 무세포 발현에 적용한 결과, 안정적인 산화환원전위의 유지에도 불구하고, 발현된 rPA의 낮은 가용성으로 인해 활성을 갖는 rPA가 성공적으로 발현되지 않았다. 또한, 이에 더하여, 기존의 회분식 반응은 총 단백질 생산성의 한계로 인하여 실질적인 단백질 생산 수단으로 사용되기에는 한계를 가지고 있다. 본 논문에서는 회분식 반응이 갖는 낮은 생산성의 문제점을 극복하고 이황화결합 함유 단백질들의 무세포 발현 시스템에서의 생산성을 향상시키기 위한 시도의 일환으로, 분자 샤페론이 첨가된 무세포 단백질 시스템의 구축 및 이를 적용한 연속확산식 무세포 단백질 발현 시스템(4)에서의 재조합 tissue plasminogen activator (rPA)의 발현 결과를 기술하고 있다. 이 과정에서, Kim과 Swartz에 의해 보고된 바와 같은 IAM 처리 세포 파쇄액의 사용 기법이 연속확산식 단백질 발현 공정에도 적용될 수 있음을 확인하였고, 또한 화학적으로 처리되어 안정한 산화환원전위를 유지하고 있는 무세포 단백질 발현 용액에 대장균 유래의 분자 샤페론을 과량으로 가함으로써 활성 rPA의 발현량이 현저히 증가함을 알 수 있었다. 이를 통하여 발현된 rPA는 IAM으로 처리되지 않은 세포 파쇄액을 사용한 표준 반응에 대해서는 물론, Kim과 Swartz의 방법에 따라 구축된 반응에 비하여도 현저히 향상된 활성 수율을 나타냄이 확인되었다. 이러한 결과는 무세포 단백질 발현 시스템의 반응 조건 및 반응 환경의 조작을 통하여 세포 배양 공정을 통한 생산에 난점을 가지는 단백질들을 효과적으로 발현할 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

재료 및 방법

사용 균주 및 플라스미드

무세포 단백질 합성 반응의 template로서, 재조합 plasminogen activator (rPA)의 유전자 서열이 pIVEX2.4d 벡터 (Roche Applied Science)의 T7 promoter와 T7 terminator 서열 사이에 클로닝된 플라스미드 pIVEX2.4d-rPA를 사용하였다. 리보솜과 기타 단백질 합성 기구들을 제공하기 위한 세포 추출액 (S30추출액)은 대장균 균주 A19로부터 문헌에 보고된 방

법(3)을 따라 제조되었다. 또한, 분자 샤페론의 효과를 조사한 실험에서는, GroEL/GroES 혹은 DnaK/DnaJ/GrpE가 과발현된 BL21(DE3) 균주로부터 S30 추출액을 제조하여 (각각을 GroE-S30 추출액, Dna-S30 추출액으로 명명함) A19 균주 유래의 S30 추출액 부피의 30%를 첨가하여 사용하였다.

무세포 단백질 발현 반응

표준반응액은 57 mM HEPES-KOH (PH 8.2), 1.2 mM ATP, 1.2 mM GTP, 0.85 mM의 GTP, UTP 및 CTP, 0.64 mM cAMP, 200 mM potassium glutamate, 80 mM ammonium acetate, 12 mM magnesium acetate, 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ folic acid, 6.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ plasmid, 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ T7 RNA polymerase, 각 1.5 mM의 20종 아미노산, 2% PEG8000, 33 mM phosphoenolpyruvate (PEP), 24% (v/v) S30 extract로 구성되었으며, 이황화결합의 형성에 요구되는 산화환원 환경을 제공하기 위하여 산화글루타치온과 환원글루타치온을 실험에 따라 각기 다른 비율로 혼합한 글루타치온 완충액 (glutathione buffer)을 최종농도가 5 mM이 되도록 첨가하여 주었다. 무세포 반응액의 산화환원전위를 안정적으로 유지하기 위한 실험에서는 S30 추출액을 반응액에의 첨가 이전에 1.0 mM의 iodoacetamide (IAM)을 가한 후 상온에서 5분간 방치하여 S30 추출액에 포함된 환원효소의 활성을 제거한 후에 사용하였다. 또한 이황화결합의 isomerization 반응의 촉진을 위하여 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 DsbC를 실험에 따라 첨가하였다(5). 연속확산식 무세포 단백질 합성 반응 (Continuous Exchange Cell-Free synthesis system, CECF)는 Roche Applied Science사로부터 제공받은 반응기와 반응장치 (ProteoMaster)를 이용하여, 반응액 100 μl 및 기질공급용액 (Feeding solution) 1 ml의 규모로 30°C에서 800 rpm의 교반과 함께 행하여졌다. 기질공급용액의 조성은 반응액의 조성 과 동일하되, S30 extract, tRNA, DNA가 제외되었다.

발현된 rPA의 정량 및 활성분석

발현된 단백질의 정량은 보고된 문헌(6)의 방법을 따라 행하여졌고 발현 단백질의 가용성은 anti-Histidine tag antibody를 이용한 Western blot 분석을 통하여 확인하였다. rPA의 활성은 Kim 등에 의해 보고된 방법(7)에 따라 rPA의 발광기질인 S2288의 흡광도 변화를 405 nm에서 측정하여 분석하였다.

결과 및 고찰

연속확산식 무세포 단백질 발현 반응을 수행하기 이전에, 단백질 발현에 영향을 미치는 주요 기질들의 농도를 15 μl 규모의 회분식 반응에서 최적화하였다. 최적화 실험은 DNA (pIVEX2.4d-rPA), 마그네슘, 아미노산 및 에너지원 (PEP)에 대하여 행하여졌으며, 얻어진 결과를 반영속식 무세포 단백질 반응의 반응액 및 기질제공용액의 조성에 적용하였다. 최적화 실험에서, 플라스미드의 농도를 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 증가시킴에 따라 단백질 발현량 역시 증가함을 알 수 있었고, 그 이상의 플라스미드 농도에서는 큰 변화를 보이지 않았다(Fig. 1A). 한편, 단백질 발현의 에너지원으로 사용되는 PEP의 농도를 변화시켜 본 결과 Fig. 1B에서 보이는 바와 같이 33 mM의 PEP 농도에서

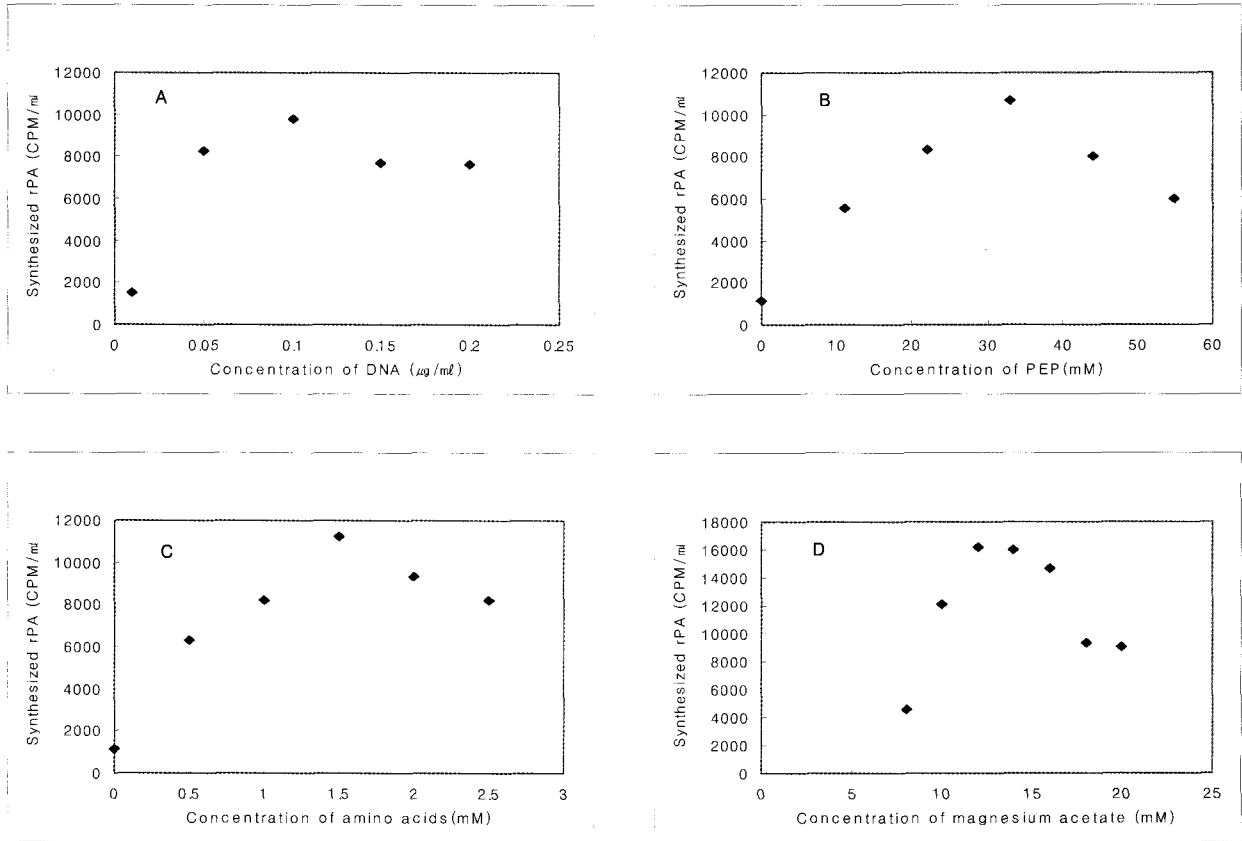


Figure 1. Optimization of the reaction components for the cell-free synthesis of rPA (Panel A, varying amounts of the plasmid pIVEX2.4d-rPA were added to a reaction mixture containing 10 mM magnesium acetate, 1 mM amino acids, and 24 mM PEP; panel B, varying amounts of PEP were added to a reaction mixture containing 0.1 µg/ml DNA, 1 mM amino acids, and 10 mM magnesium acetate; panel C, varying amounts of amino acids were added to a reaction mixture containing 0.1 µg/ml DNA, 10 mM magnesium acetate, and 33 mM PEP; panel D, varying amounts of magnesium acetate were added to a reaction mixture containing 0.1 µg/ml DNA, 1.5 mM amino acids, and 33 mM PEP. Synthesized protein was quantified by measuring the insoluble radioactivity of reaction samples as described in the Materials and Methods).

최대의 단백질 발현량을 보였다. 또한 아미노산 및 magnesium acetate의 농도는 각각 1.5 mM 및 12 mM에서 최적의 결과를 보였다(Fig. 1C, Fig. 1D).

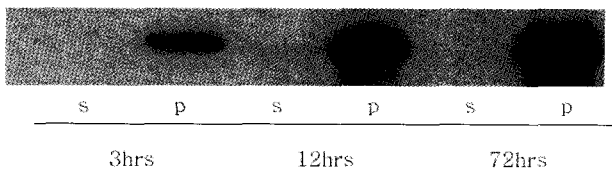


Figure 2. Solubility of the cell-free synthesized rPA under the standard conditions. 100 µl of the standard reaction mixture for cell-free protein synthesis was prepared and incubated as described in the Materials and Methods. 20 µl samples were withdrawn at the indicated time-points and the relative amounts of the soluble and insoluble products were analyzed by Western blot assay. S, soluble fraction; P, insoluble pellet fraction.

이상에서 최적화된 발현조건 (0.1 µg/ml DNA; 12 mM magnesium acetate; 1.5 mM 아미노산; 33 mM PEP) 하에서 발현된 rPA 분자가 정확한 구조 및 활성을 가지기 위해서는 9쌍의 이황화결합의 형성이 필수적이므로 이황화결합의 형성에 요구되는 산화조건의 제공을 위하여 산화글루타치온 (4 mM)과 환원글루타치온 (1 mM)의 혼합액으로

이루어진 산화환원완충액을 연속확산식 무세포 단백질 발현 반응의 반응액 및 기질제공용액에 가하였다. 그러나, 이같은 표준 반응액을 사용하여 무세포 발현된 단백질들은 산화환원완충액의 첨가 여부와 무관하게 활성을 나타내지 않음을 알 수가 있었다(data not shown). 이는 연속확산식 무세포 발현 시스템에서 urokinase의 protease domain을 발현한 Kim and Swartz의 결과와 상이한 것으로, 그들의 실험에서 발현된 urokinase는 발현 반응의 개시 후 약 10시간 정도의 지연 시간 후부터 활성을 나타내기 시작하였다(3). 이는 단백질 발현 반응의 초기에는 세포 파쇄액 내에 존재하는 환원효소들의 활성에 의하여 이황화결합의 형성이 적극적으로 방지되는 반면 반응이 지속됨에 따라 이들 환원효소들의 환원력이 소진되어 urokinase 분자 내의 시스테인 잔기 간의 이황화결합이 가능해지기 때문인 것으로 가정된 바 있다. 그러나, 본 실험의 연속확산식 시스템에서 발현된 rPA가 장시간의 반응시간에도 불구하고 활성을 나타내지 못하는 것은 발현된 rPA 분자가 가용성을 유지하지 못하고 매우 빠른 속도로 침전되기 때문인 것으로 판단되었다. Fig. 2에서 보이는 바와 같이 연속확산식 무세포 시스템에서 발현된 rPA 분자는 반응초기부터 거의 100% 비가용성 상태로 존재하게 됨을 알 수 있었고, 따라서 일정 시간이 지나 반응액 내의 환원효소 활성이 소진

되더라도 이황화결합의 형성을 통한 활성 rPA 분자의 생성이 원천적으로 불가능하게 됨을 추측할 수 있었다. 따라서, 본 실험에서 시도된 rPA 등과 같이 매우 낮은 가용성을 보이는 이황화결합 함유 단백질의 생산을 위해서는 반응 초기부터 이황화결합의 형성이 가능한 정도의 높은 산화환원전위를 유지하는 것이 필수적이라고 판단되었으며 이에 따라 반응에 사용되는 세포 파쇄액을 ‘재료 및 방법’에 기술된 바와 같이 1.0 mM의 IAM으로 처리한 후 무세포 발현 반응에 사용하여, 발현된 rPA의 활성을 측정하여 보았다. 그 결과, IAM으로 처리된 S30 추출액은 산화환원 완충액의 존재 하에서 반응 초기부터 활성 rPA를 발현함을 관찰할 수 있었다(data not shown). 이러한 결과로부터, 활성 rPA의 수율을 높이기 위해서는 일차적으로 발현된 단백질의 가용성을 최대화하는 것이 중요하다는 사실을 예측할 수 있었고, 이에 따라, 무세포단백질발현 용액에 대장균 유래의 분자샤페론인 GroEL/GroES 및 DnaK/DnaJ/GrpE 을 첨가함으로써 발현되는 rPA의 가용성 향상 및 향상된 가용성에 따른 활성 단백질 수율의 증가를 시도하였다. ‘재료 및 방법’에 기술된 바와 같이 GroEL/GroES 또는 DnaK/DnaJ/GrpE가 과발현된 대장균으로부터 준비된 세포 파쇄액을 A19 균주로부터 준비된 S30 extract와 1 : 3 (샤페론 함유 파쇄액: S30 extract)의 비율로 혼합하여 무세포 발현 반응에 사용한 결과, Fig. 3에서 보이는 바와 같이 분자샤페론의 첨가를 통한 단백질의 용해도 증가를 확인할 수 있었고 특히 GroEL/GroES의 첨가시 용해도의 증가가 확연하게 나타났다. DnaK/DnaJ/GrpE의 첨가 역시 용해도의 증가를 가져왔으나 GroEL/GroES 첨가의 효과에는 미치지 못하였고, 이 두 종류의 샤페론을 동시에 사용하였을 경우에도 용해도의 상승효과는 관찰되지 않았으므로 S30 extract와 GroEL/GroES의 혼합 파쇄액을 반연속식 무세포 발현 시스템에 적용하여 발현된 rPA의 활성을 측정하여 보았다. 그 결과, GroEL/GroES의 첨가로 인하여 증가된 용해도를 나타낸 발현 반응액에서 rPA의 활성 역시 현저히 증가되었음을 관찰하였다(Fig. 4).

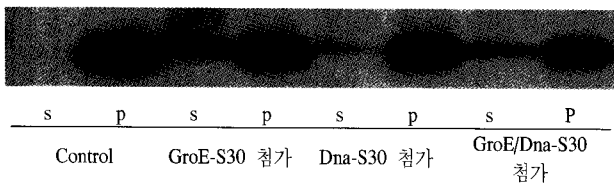


Figure 3. Effect of molecular chaperones on the solubility of the cell-free synthesized rPA (GroE-S30 extract, Dna-S30 extract or their 1:1 mixture) was mixed with the standard S30 extract and added to a reaction mixture for the expression of rPA. After 3 hours of incubation at 30°C, the reaction mixture was centrifuged for 5 min at 12,000 rcf in order to separate the soluble and insoluble fractions. The resulting supernatant and pellet were analyzed by Western blot for the comparative examination of the product solubility. S, soluble fraction; P, insoluble pellet fraction).

이상의 결과는 rPA 등과 같이 다수의 이황화결합을 가진 단백질 분자의 활성 발현을 위해서는 분자샤페론 등을 이용한 용해도의 증가, 세포 파쇄액의 환원활성 제거를 통한 안정적

산화환원전위의 유지, 산화환원완충액의 사용을 통한 적절한 산화환원전위의 제공 등의 조건이 복합적으로 이루어져야 함을 나타내고 있으며 이러한 결과는 본 실험의 모델 단백질로 사용된 rPA 뿐만 아니라 일반적으로 복수의 이황화결합을 포함하고 있는 인간 세포 유래의 많은 의학 단백질들의 발현 및 연구에 중요한 기반을 제공할 것으로 기대된다

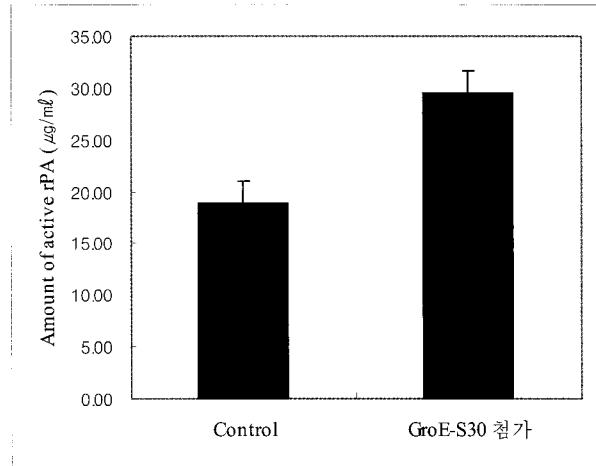


Figure 4. Effect of GroEL/GroES on the enzymatic activity of rPA synthesized during the CECF reaction. Cell-free synthesis of rPA was carried out in a CECF reactor with 100 µl of the reaction mixture and 1 ml of the feeding solution, respectively. After 24 hours of incubation, 20 µl of samples were withdrawn and the rPA activity was measured as described in the Materials and Methods.

요 약

본 연구에서는 연속확산식 무세포 단백질 발현 시스템을 이용한 이황화결합 함유 단백질의 생산 시, 발현된 단백질의 응집으로 인한 비활성화의 문제점이 분자샤페론을 통한 발현 단백질의 용해도 증가, 세포 파쇄액의 화학적 처리를 통한 환원활성 제거, 산화환원완충액을 이용한 적절한 산화환원전위의 제공 등을 통해 단백질의 폴딩에 유리한 반응조건을 구축함으로써 해결될 수 있음을 보였다. 이러한 연구 결과는 각종 계층 시퀀싱 프로젝트의 빠른 진척에 따라 현재 요구되고 있는 고속, 고효율의 단백질 발현 수단으로써 무세포 단백질 발현 시스템이 적용될 수 있는 가능성을 높여 줄 수 있을 것으로 기대된다.

감 사

본 연구는 한국학술진흥재단의 ‘지역대학 우수과학자 지원사업’의 지원을 통해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Baneyx, F. and M. Mujacic (2004), Recombinant protein folding and misfolding in *E.coli*, *Nat. Biotechnol.* **22**, 1399-1408.
2. Katzen, F., G. Chang, and W. Kudlicki (2005), The past, present

- and future of cell-free protein synthesis, *Trends Biotechnol.* **23**, 150-156.
3. Kim, D. M. and J. R. Swartz (2004), Efficient production of a bioactive, multiple disulfide-bonded protein using modified extracts of *Escherichia coli*, *Biotechnol. Bioeng.* **85**, 122-129.
 4. Kim, D. M. and C. Y. Choi (1996), A semicontinuous prokaryotic coupled transcription/translation system from using a dialysis membrane, *Biotechnol. Prog.* **12**, 645-649.
 5. Yin, G. and J. R. Swartz (2004), Enhancing multiple disulfide bonded protein folding in a cell-free system, *Biotechnol. Bioeng.* **86**, 188-195.
 6. Kim, D. M. and J. R. Swartz (1999), Prolonging cell-free protein synthesis with a novel ATP regeneration system, *Biotechnol. Bioeng.* **66**, 180-188.
 7. Kim, D. M., E. Fernholtz. and J. R. Swartz (2003), Cell-free expression of proteins containing multiple disulfide bonds, In Cell-free protein expression, J. R. Swartz, ed., pp125-132, Springer, Germany.