

# 단백질 재접힘 방법 및 기술개발 동향

(주)에이티젠

김영목 ● biokimok@atgen.co.kr

## ▶ 단백질 재접힘 기술의 필요성

재조합 단백질은 치료용 단백질, 진단 및 연구시약용 단백질, 산업용 단백질 등 다양한 분야에서 널리 이용되어 왔으며 지금도 활발히 이용되고 있다. 특히, 최근의 항체 치료제의 등장으로 더욱더 이러한 재조합 단백질의 시장이 확대되고 있는 실정이다. 이러한 단백질 시장은 분석기관에 따라 약간의 차이가 있으나 산업연구원의 생물산업발전 전략에 따르면 2006년에 610억 달러, 2011년에는 1,100억 달러로 그 시장을 예측하고 있다. "The Therapeutic Protein outlook to 2007"을 참조하면 2002년에 이미 치료용 단백질 시장이 333.4억 달러를 넘어선 것으로 보고 하고 있다.

재조합 단백질 시장은 매년 꾸준히 증가하고 인간의 게놈 프로젝트가 끝나 20,000~25,000개의 인간 유전자가 확인되고 구조생물학자와 치료용 단백질을 개발하고자 하는 관련자들에게는 연구해야 할 target이 그만큼 더 많이 늘어난 것으로 이러한 관점에서 단백질의 재접힘 기술 또한 더욱더 중요한

미를 지니는 것 같다.

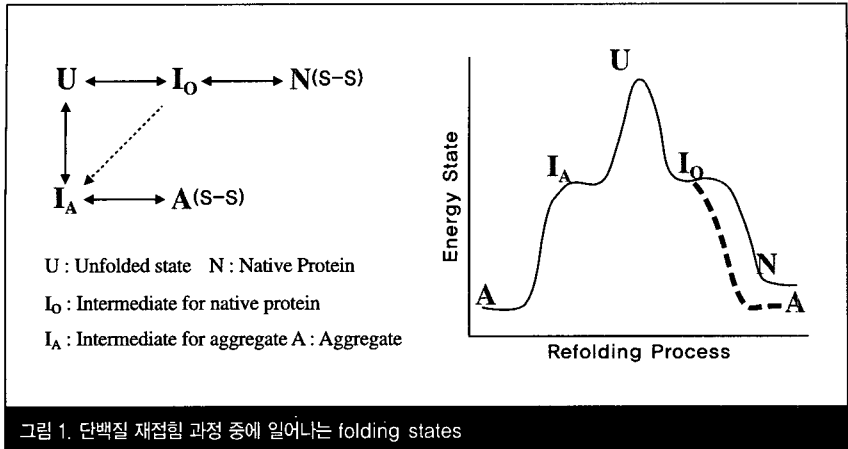
1982년 Eli Lilly사의 당뇨병 치료제인 insulin을 필두로 인간 성장 호르몬, 인터페론 알파 와 베타, G-CSF 등 많은 단백질들이 대장균으로부터 생산되어 이러한 단백질 재접힘 기술에 의해 상업화 되어 왔다. 그러나, 대장균에서 생산 되는 재조합 단백질의 경우 당쇄화(glycosylation)와 같은 번역 후 과정(post-translational modification)이 일어나지 않아 동물세포에서 발현, 정제된 단백질에 비해 in vitro, in vivo stability가 떨어져 체내 반감기가 짧다는 단점을 지니고 있고 동물세포의 배지 비용도 예전에 비해 많이 저렴해 졌으며 동물세포의 발현 시스템도 발전이 많이 이루어져 대장균에 갖는 많은 단점을 충분히 보상하고 있다. 이러한 측면에서 일부 연구자들은 앞으로 많은 부분을 동물세포가 대장균의 시장을 많이 대체하고 그만큼 대장균을 이용한 재조합 단백질 시장의 축소를 예측하는 사람도 있다.

그러나, 대장균에서 생산된 단백질에 Pegylation과 같은 변형을 통해 체내 반감기

를 월등히 증가시키고 있고 예로, G-CSF의 미국 Amgen사의 pegylation제품인 Neulasta®(Pegfilgrastim)는 기존 시장을 빠르게 대체하고 있다. 특히, 치료용 단백질이나 산업용 단백질과 같이 경제적인 목적이 아닌 단백질의 구조연구나 기능연구를 위한 연구자들에게 가장 손쉽게 접할 수 있는 균주가 대장균이기 때문에 아직까지도 대장균이 갖는 발현의 편이성과 비용, 시간적인 면에서 경쟁할 만한 host는 없는 것 같다. 그래서 아직도 대장균의 발현 시스템이 널리 이용되고 단백질 재접힘 기술에 대한 관심과 발전도 지속적으로 이루어지는 것 같다.

## ▶ 단백질 재접힘 기술의 이론적 배경

인간의 단백질과 같이 이종 단백질을 대장균과 같은 다른 host에서 발현할 경우(Heterologous expression), 많은 단백질들이 불용성 단백질인 Inclusion body로 발현된다. 대장균에서는 매 35초 마다 하나의 단백질이 리보솜에서 발현, 배출되며 단백질의 농도가 300~400mg/ml에 도달할 때 대장균



의 재접힘 기능은 한계에 달하고 molecular chaperones을 포함한 재접힘 보조자들을 필요로 하게 된다. 대장균에서 이중단백질 발현 시 Inclusion body로 발현되는 이유는 이중단백질의 과다 발현뿐만 아니라, 목적 단백질의 고유한 아미노산 서열 및 그 성질(친수성, 소수성) 그리고 glycosylation과 같은 post-translational modification등 다양한 이유가 존재한다.

단백질의 재접힘 과정은 크게 응집체를 풀어주는 solubilization과정과 이를 다시 native한 단백질 구조로 만들어 주는 refolding과정으로 나눌 수 있다.

불용성 응집체로 발현된 단백질은 단백질의 정상적인 3차적 구조를 이루고 있지 않기 때문에 활성이 없어 이를 다시 8M의 urea나 6M의 Guanidine HCl과 같은 denaturants에 의해 잘못된 구조를 풀어 준 후 적절한 재접힘 반응 용액과 시간, 온도등을 설정하여 단백질의 재접힘반응을 실시하게 된다. 불용성 응집체(Inclusion body)는 매우 안정적이어서 고농도의 denaturants를 통해서만 풀림 작업이 가능하며 이때 불용성 응집체를 완전히 풀어주지 못할 경우 정상적인 단백질 구조를 갖지 못하고 응집체의 중간체(I<sub>A</sub>)를 통해 다시 inclusion body를 형성하게 된다.(그림1.)

Unfolded state에 있는 단백질들은 반응성이 매우 높으나 높은 농도의 denaturant에 의해 그 반응이 저해되고 그 농도를 희석해 줌에 따라 안정적인 3차적 구조의 native protein을 얻을 수 있다. 물론 이러한 재접힘

반응 중에도 많은 단백질이 다른 3차적인 구조를 형성하여 다시 응집체를 형성하기도 한다.

단백질의 재접힘공정에 영향을 주는 요인으로는 denaturants의 농도, DTT와 같은 reducing agent의 첨가, disulfide bond형성을 도와주는 redox system(GSSG, GSG), 빠른 반응에 의해 단백질이 응집체를 형성하는 것을 막아주는 L-Arginine, PEG, glycerol과 같은 보조 첨가제들 그리고 정제된 Inclusion body의 순도와 재접힘 반응 시 단백질의 농도, 재접힘 pH, 재접힘 온도, 재접힘 반응 시간, 재접힘 반응 방법의 선택등 다양한 요인이 존재한다.

모든 단백질의 재접힘 반응에 적용되는 단일화된 방법과 요인은 존재하지 않으며 그 단백질의 특성 및 목적에 따라 다양한 방법이 존재할 수 있다. 예로, disulfide 결합이 없는 단백질의 재접힘 반응을 유도할 때는 redox system이 필요치 않으며, 단백질 내에 free cysteine이 존재할 때는 DTT와 같은 reducing agent의 첨가가 필요하다. 또한, 재접힘 반응에 들어가는 Inclusion body의 순도는 높을수록 좋으며 이를 위하여 목적단백질이 8M Urea에 녹을 지라도 2M, 4M, 6M의 urea로 순차적으로 녹여 목적으로 하는 단백질 이외의 단백질을 최대한도로 제거시킬수록 단백질의 refolding 효율은 증가한다. 그러나, 재접힘 반응에 적절한 IB의 농도, 재접힘 반응용액의 pH, 온도, 시간 등은 trial and error에 의해 적정 조건을 잡는 것이 바람직하다.

◎ 단백질 재접힘 기술의 방법 및 동향

단백질의 재접힘 방법에는 크게 투석(dialysis)법, 희석(dilution)법 그리고 컬럼 크로마토피(column chromatography)법이 있으며 방법의 선택은 목적단백질의 특성에 따라 좌우되고 각 방법 안에서도 다양한 응용 방법들이 존재한다.

>> 투석법(Dialysis)

대표적으로 이용되는 방법 중에 하나로 denaturant로 풀어준 IB를 투석백(dialysis bag)에 담은 후 재접힘 용액에서 계속적으로 투석시킴으로 투석백안에 denaturant의 농도를 낮추어 줌으로써 재접힘 반응을 유도하는 것으로 여기에도 denaturant의 농도를 한번에 낮추어 주는 one step dialysis와 여러 단계에 걸쳐 그 농도를 낮추어 주는 step-wise dialysis방법이 존재한다.

만일, 목적으로 하는 단백질이 disulfide 결합이 많거나 구조적으로 단순하지 않을 경우에는 step-wise방법을 추천하며 고농도의 단백질일 때 불안정할 경우에는 dialysis법 보다는 dilution방법을 추천할 수 있다. 그 이유는 단위 부피 안에 단백질의 농도가 dialysis법이 더 높기 때문이다. 그러나, dilution법보다 갖는 장점으로는 이미 단백질이 농축되어 있는 상태로 존재하기 때문에 쉽게 Gel-filtration에 적용할 수 있어 그 이후 정제가 용이하다.

>> 희석법(Dilution)

가장 널리 그리고 손쉽게 이용되는 방법으로 준비된 불용성 응집체(IB)를 재접힘 용액(refolding buffer)에 첨가해 줌으로써 denaturant의 농도를 낮추어 재접힘 반응을 유도하는 방법이다. 여기에도 direct dilution 방법과 step-wise dilution법이 존재한다. Direct dilution법은 IB용액을 100정도 부피의 refolding용액에 교반 하면서 첨가해주는 것으로 denaturant를 직접적으로 refolding 용액에 노출 시킴으로써 재접힘 반응을 유도하게 되는데 구조적으로 적절한 3차적 구조를 이룰 수 있는 시간이 짧아 많은 부분이 잘못된 구조를 가져가는 경우가 많으며 심할 경우

IB를 첨가하면서 응집체를 형성하는 것을 지켜볼 수 있다. 이 경우에는 3차적 구조를 지닐 수 있도록 그 시간을 좀 더 지속해 주는 것이 좋으므로 8M urea의 IB용액을 6M, 4M, 2M 그리고 순수한 refolding 용액의 순으로 서서히 denaturant의 농도를 낮추어 줌으로써 해결할 수 있는데 이러한 방법을 step wise dilution법으로 부를 수 있다.

>> 컬럼상에서 재접힘

(On-column refolding)

이 방법은 앞의 두 방법으로 잘 이루어 지지 않을 때 또는 His-tag이 있는 단백질의 재접힘 반응을 유도할 때 주로 이용하는 방법으로 His-tag된 IB 단백질을 Ni+ resin에 흡착시킨 상태에서 서서히 denaturant의 농도를 낮추어 단백질의 재접힘 반응을 유도하고 재접힘이 끝난 후 imidazole로 단백질을 용출시킨 후 gel-filtration을 통하여 정확한 3차적 구조를 지닌 단백질을 선별할 수 있다. 이외에도 IB용액 자체를 Gel-filtration column에 적용하여 흘러주는 용액의 denaturant 농도를 서서히 낮춤으로써 단백질의 재접힘 반응을 유도하는 방법도 이러한 on-column refolding방법에 속한다.

이 밖에도 앞의 3가지 방법들을 융합한 다양한 방법들이 존재하며 특허화 되고 있다. 실제로 미국특허에서는 “Universal procedure for refolding recombinant proteins” 이라는 제목으로 모든 단백질에 적용될 수 있는 확실화된 재접힘 반응 기술을 소개하고 있다.(USP6,583,268) 그러나, 필자도 이러한 방법에 따라 여러 단백질을 시도하였으나 실패하였고 앞에서도 언급하였듯이 많은 부분이 재접힘 기술은 trial and error에 의해 습득되는 부분이 있다. 그러나, proteomics 및 Bioinformatics등의 발달로 실험을 하기 전에 이제는 그 단백질에 대하여 상당부분 많은 정보를 습득할 수 있으며 이러한 정보를 토대로 재접힘 반응을 시도한다면 반복적인 실수를 덜 할 수 있으며 나름대로의 규칙을 발견할 수 있지 않을까 한다. 또한, 목적으로 하는 단백질이 이미 재접힘 기술이 알려져 있나

Automation Implements Pt-Fold Refolding

Helping to turn refolding from "art into science"

- Automatic pH adjustment of specimen
- Optimized refolding conditions
- Refolding screening finds optimum conditions
- One skilled tech can handle 10-20conditions per day, PTR-96
- Protocols can be stored for reuse

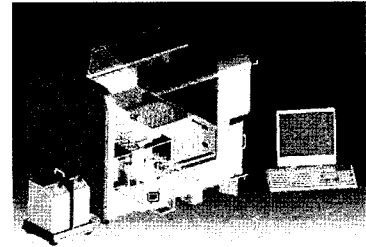


그림 2. ProteomTech사의 고속탐색기술(HTS)을 이용한 refolding system

표 1. 단백질 재접힘 관련 최근 국내외 특허

Publication No.	Publication date	Title	Applicant
US7186539	2007.03.06	Method for refolding enzymes	UPJOHN CO(US)
WO2007017637	2007.02.15	Protein refolding agent and refolding method	SANYO CHEMICAL IND LTD(JP) 외 2개사
WO2007016272	2007.02.08	Method and system for in vitro protein folding	NOVATIS AG(CH) 외 3개사
KR20060117543	2006.11.17	Method for protein refolding using ionic liquids	INHA INDUSTRY PARTNERSHIP INST(KR)
WO2007008697	2007.01.18	Composition and methods for refolding of denatured protein	UNIV CHICAGO(US)
US2006287504	2006.12.21	Universal procedure for refolding recombinant proteins	OKLAHOMA MED RES FOUND

찾아보고 우선 알려진 tool에 의해 재접힘 반응을 유도하는 것이 바람직하며 실제로 <http://refold.med.monash.edu.au/default.php> 의 사이트에서는 재접힘을 유도한 단백질들의 data를 공개하고 있으며 참고하면 매우 이로운 것으로 판단된다.

또한, ProteomTech사는 자동화된 고속탐색기술(High Through Screening)을 재접힘 기술에 도입하여 짧은 시간 안에 가장 효율적인 재접힘 방법을 찾는 기술을 선보이고 있으며 동시에 scale-up을 위한 조건도 찾아주고 있다.(그림 2.)

재접힘 관련 특허도 국내외 특허를 조사한 결과 637건이 검색되며 제약회사를 포함한 많은 회사에서 매년 꾸준히 특허 출원을 하고 있고 특정 단백질에 대한 재접힘 기술에 대한 특허는 물론 일반적인 단백질의 재접힘 방법 및 시약등에 대해서도 특허를 출원, 등록하고 있다.(표 1.) 지금도 분자적 수준에서 단백질

의 재접힘 구조연구(molecular chaperone)와 대장균에서의 재접힘 경로(folding pathway), 재접힘 유도를 위한 protein translocation, 단백질 folding을 도와주는 chaperone과 같은 조절자들에 대한 연구등 많은 연구가 다방면으로 진행되고 있으며 이러한 연구결과로 더욱더 재접힘 기술의 진보를 기대한다.

참고문헌

- Lisa D. Cabrila and Stephen P. Bottomley 2004 Protein expression and refolding-A practical guide to getting the most out of inclusion bodies. *Biotechnology Annual Review*, 10, 31-50
- Kouhei Tsumoto, et. al. 2003 Practical consideration in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression & Purification*, 28, 1-8
- Francois Baneyx & Mirna Mujacic 2004. Recombinant protein folding and mistfolding in Escherichia coli. *Nature Biotechnology*, 22(11) 1399-1408