

붕지체 단백질의 개선된 대규모 재접힘 방법

Improved Large-Scale Refolding Techniques for Inclusion Body Proteins

김 인호* 정 봉현¹

*충남대학교 화학공학과, ¹생명공학연구소 미생물공정연구실

In Ho Kim* and Bong Hyun Chung¹

Dept. CHem. Eng., Chungnam National University Kungdong 220, Yusong, Taejon, 305-764

¹Microbial & Bioprocess Eng. Lab. Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
P.O. Box 115, Yusong, Taejon, 305-600

I. 서론

단백질의 1차 서열로부터 단백질이 3차원 입체구조를 짧은 시간 내에 이루는 단백질 접힘 (Protein Folding) 현상은 1970년 대 초부터 연구된 이래로 많은 진보가 있었다(1). 발현된 재조합 단백질을 회수하기 위한 정제공정은 숙주 세포내의 붕지체를 분리하는 공정부터 정상적인 3차 입체구조를 갖는 단백질을 갖게 되는 재접힘에 이르는 공정을 의미한다. 공정의 경제성을 제고하기 위해서는 정제공정의 수율이 중요하게 되는데, 특히 재접힘 과정중의 여러 공정 변수(pH, 온도, 재접힘용액 조성 등)가 재접힘 수율에 영향을 미치며 최종 정제 수율을 결정하게 된다. 본 고에서는 단백질의 접힘 메카니즘과 단백질 구조연구 그리고 1990년대 재접힘공정 연구의 진보를 반영하여 재접힘의 공학적 측면을 강조하여 서술하고자 한다.

II. 본론

기본적인 재접힘 공정으로는 재접힘 용액에 의한 희석과 투석공정을 언급할 수 있다. 재접힘 용액으로는 통상 Tris 완충액, Glutathion 산화/환원쌍 또는 Mercaptoetanol, Arginine 같은 아미노산 등이 사용되고 있다. 희석과 투석공정은 다량의 재접힘 용액을 필요로 하며, 접촉의 효율성을 고려하여 막을 이용한 방법, 젤여과 크로마토그래피법, 그리고 교반조를 연속적/반연속적으로 조업하는 방법 등을 사용할 수 있다. 이런 개념을 도식화하면 Figure 1과 같이 표현되고 재접힘 공정을 일종의 반응공정으로 간주하여 화학반응공학의 개념으로 설명할 수 있다.

예를 들어 재조합 단백질의 재접힘과정을 모델화하면 Figure 2처럼 반응단계를 생각할 수 있는데, 여기서 N은 원 상태의 단백질, X는 안정한 중간체, Y는 전이 상태의 다른 중간체, D는 변성된 단백질, I는 비가역적으로 불활성화 된 물질, A는 응집단백질을 의미한다. 변성된 단백질 D는 중간과정을 거쳐 원상화(N의 상태)가 되던지 잘못된 구조를 갖게 되어 I 상태를 거쳐 응집체 A가 된다. 이 모델에 근거하여 여러 개의 미분방정식으로 표현되는 다수의 속도식을 결정할 수 있고 이 식을 수치 모사하여 시간변화에 따른 N, D, X, I의 변화를 도표화 할 수 있다(2). 이는 전형적인 화학반응공학의 문제이고 생화학자들이 접근하기 어려운 재접힘 공정을 기술하는 방법이 된다. 이론식의 수치모사 결과를 실험적으로 증명하기 위해서는 시간에 따른 단백질의 구조변화를 추적할 필요가 있으며 이를 위해 분광학적 방법(Circular dichroism 분광법, Dynamic Light Scattering 법, 수소치환 질량분광분석법)이 많이 이용되고 있다.

앞서 설명한 화학공학적 접근법은 아직은 한계가 있다. 다시 말하자면 속도식에서 수치모사

에 필요한 매개변수를 실험적으로 결정하기가 매우 어렵고 매개변수의 값이 제한적으로만 알려져 있기 때문이다. 실험실 규모에서 최적 재접힘 반응조건이 결정되면 스케일업과정은 선형적이며 반응기 부피를 변성된 단백질 처리량에 따라 조절하게 된다. 현재까지 재접힘 공정에서 재접힘 반응기구의 이해가 작고 반응차수의 결정도 어렵기 때문에 최적 반응기 설계는 경험에 의존할 수밖에 없다. 한가지 예로서 GDF-5의 재접힘 공정의 스케일업 과정을 간략하게 표현하면 Figure 3과 같다.

앞서 논의한 내용은 *In vitro* refolding인데 세포내에서 Chaperonin이 단백질의 바른 접힘을 도와주는 것을 발견한 이후 이를 재접힘 공정(*In vivo* refolding)으로 도입한 연구가 있다 (3). Chaperonin은 ATPase 역가가 있고 Heat-shock 단백질로서 단백질이 리보솜에서 합성될 때 구조가 안정하도록 도와주며 막을 통한 단백질 이동을 조절한다고 알려져 있다. 따라서 고온에서 자라는 미생물에 열로 충격을 가하고 Ssocpn chaperonin을 얻은 후 변성된 리소자임의 재접힘 과정에 응용하였으며 사용된 Chaperonin은 변성된 단백질과 결합하고 ATP의 가수분해에 의해 단백질과 분리되는 과정에 의해 재순환될 수 있다. 다른 한가지 예로 단백질분해효소가 재접힘 과정에 도움을 줄 때가 있는데 봉지체로 발현된 CPY의 재접힘 반응을 수행할 때 pro-CPY가 활성형 CPY를 만드는데 아주 효과적임을 발견하였고, pro-CPY가 Chaperonine과 같은 작용을 한다는 것이 입증되었다.

III. 결론

재조합 단백질의 대량생산을 위해 단백질의 변성 그리고 재접힘공정의 최적 설계가 경제성 제고에 있어 관건이다. 이를 위해 재접힘 반응기의 효과적 운전이 필요하다. 재접힘 용액조성의 최적화, 반응기 운전법 (회분식, 반연속식, 연속식) 연구, 막이나 크로마토그래피 장치 도입 등 새로 연구할 주제가 다양하다고 하겠다.

IV. 참고문헌

1. 김 인호 (1993), 단백질의 접힘, 생물공정의 최근동향, p.79-81, 생물공정연구센터.
2. Vicik, S. and E. Bernandez-Clark (1991), An Engineering Approach to Achieving High Protein Refolding Yield, in Protein Refolding, p. 180-196, ACS Symp. Series 470.
3. Cerchia, L., M. Rossi and A. Guagliardi (2000), An Archaeal Chaperonin-based Reactor for Renaturation of Denatured Proteins, *Extremophils*, 4, 1-7.

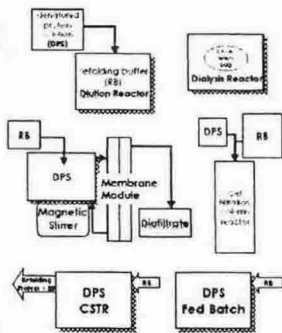


Figure 1. Refolding reactors

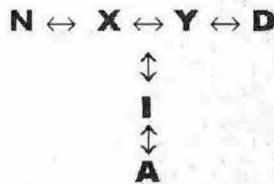


Figure 2. Protein status in refolding modeling

Purification scheme	Small scale	Large scale
Solubilization	1L (8M Urea, DTT)	40L (8M Urea, DTT)
Refolding	3L (20mM CHAPS, 2.5M Urea, 0.5M NaCl, GSH, Arginine)	150L (same as the small scale)
Ion Exchange Chromatography	0.8L eluent	30L eluent
Reversed phase HPLC	0.3L EtOH elution	13L EtOH elution

Figure 3. Scale-up of refolding process