

제조합 *Escherichia coli* 시스템을 이용한
제조합 말라리아 항원의 발현 최적화 연구

홍성희*, 박도영, 황영보*, 박현, 황현아

*군산대학교 공과대학 화학공학과, 원광대학교 의과대학 기생충학 교실
전화 (063) 850-6768, FAX (063) 857-0342

ABSTRACT

The production of the recombinant *Plasmodium vivax* merozoite surface protein (PvMSP) has been investigated in the recombinant *E.coli* system. Experimental optimization of the culture conditions, such as the effect of initial pH, and operating temperature has been tried on the growth of recombinant *E.coli* and on the overproduction of the target foreign protein.

서론

후천성 면역 결핍증(AIDS) 그리고 결핵과 더불어 3대 주요 감염성 질환으로 널리 알려져 있는 말라리아는, *Anopheles sinensis*(학질모기)의 교자(咬刺)로 인하여 매개되는 plasmodia에 의한 원충성 감염 질환으로서 특이한 열발작을 되풀이 하는 열대병이다. 감염자는 처음에는 오한전율(瘧疾戰慄)로 시작하여 체온이 39~41℃에 이르는 작열기와 발한강열기를 거치게 되며, 마침내는 말라리아 원충이 뇌의 소혈관에 피어서 치명적인 뇌의 연화소(軟化巢)를 일으키게 되는데, 매년 전 세계적으로 3백만명 이상의 사망자를 내고 있다고 알려져 있다.

역사적으로 우리나라에서도 학질이라고 일컫는 삼일열 말라리아(*Plasmodium vivax*)가 오래 전부터 산발적으로 만연하였던 것으로 기록되어 있으며, 1960년대에 말라리아가 법정 전염병으로 규제되어 정부와 WHO의 공동 박멸사업이 거국적으로 시행되면서 서서히 감소하는 추세를 보여 오다가, 1984년 2월 이후로는 유행성 토착형 말라리아 발생이 완전히 중단되었다. 반면에, 1980년대 이후 말라리아 위험 지역-아프리카, 중동, 남미, 동남아시아 등지에서 장,단기간 체류하는 해외 취업 및 여행자들이 증가함에 따라, 삼일열 말라리아나 열대열 말라리아에 이환되어 귀국 후 발병하는 수입형 말라리아의 증례만이 꾸준히 증가되는 양상을 보여왔다. 그러나 최근에는 25℃ 이상의 기온이 2주간 이상 계속되는 이상 고온현상이 매년 발생됨에 따라 경기도 파주에서 다시 토착형 말라리아의 발생이 보고되기 시작하여 1994년 22예, 1995년 107예, 1996년 356예, 1997년 1,724예가 보고되고 있는 등, 말라리아 발병이 급속히 증가되는 추세에 있다.

말라리아 치료약으로는 퀴닌(kinine), 키놀라민(아테브린), 클로로퀸 등이 널리 쓰이고 있으나, 말라리아는 많은 경우 자주 그리고 쉽게 재발하기 때문에 현재로서는 토착형 말라리아에 대한 확실한 예방법이 없으며, 단지 조기 진단만이 전염 방지에 효과적인 것으로 알려져 있다. 따라서 감염자를 신속히 색출하여 조속히 투약 및 치료하고, 다시 재감염자를 집중 관리함으로써 그 발생률을 낮추어야할 필요성이 절실하게 요청되고 있다.

현재 실시되고 있는 말라리아의 진단 방법으로는 혈액 속에 말라리아 원충을 증명하기 위한 혈액의 도말표본법(塗抹標本法) 또는 말라리아 원충을 집충(集蟲)하는 방법, 그리고 보체결합반응(補體結合反應), 혈청 콜로이드반응 등이 있다. 최근에는 제조합 항원을 이용한 ELISA(효소 면역 표지법) kit 법과 RAPID kit 법이 말라리아 진단에 매우 효과적으로 응

용될 수 있음이 확인되고 있다.

본 연구에서는 말라리아 진단에 사용되는 재조합 말라리아 항원의 생물학적 대량 생산을 위하여, 보다 유용한 벡터 시스템을 숙주인 대장균에 도입하여, 보다 생산성이 뛰어난 재조합 미생물 시스템을 선별하는 동시에, 이렇게 개발된 균주 시스템의 최적 배양 및 발현 방법을 확립함으로써 보다 경제성이 있는 재조합 단백질의 제조 공정 및 배양전략을 확립하고자 한다.

제조 및 방법

재조합 *Echerichia coli*의 종균 배양은 LB배지를 사용하여 12시간 정도 진탕 배양기에서 실시하였고, 최적 배양조건 탐색을 위한 희분배양 실험을 위하여 modified LB 배지를 사용하여 1L baffled flask(working volume 300mL)에 종균 배양액을 1% 접종하여 37°C, 220rpm의 조건으로 진탕 배양기에서 실험을 수행하였다.

배양 온도에 따른 재조합 단백질의 발현양과 균체 성장 양상을 살펴보기 위해서 여러 가지 다른 온도(27, 32, 37°C)에서 배양 및 IPTG 유도발현을 별도로 각각 실시하였으며, 또한 초기 pH의 영향을 조사하기 위해서 재조합 단백질 생산 배지의 초기 pH를 1N-HCl 및 4N-NH₄OH 용액으로 pH 6~8까지 별도로 조절하여 각각 배양 및 IPTG 유도발현 시키면서 시간별로 시료를 채취하여 각 pH에서의 균체성장 및 재조합 단백질의 발현양을 측정하였다. 마지막으로 앞서 구한 최적 온도 및 pH 조건에서 발현 유도물질인 IPTG의 농도 영향도 더불어 살펴보았다.

배양 과정에서의 균체 증식도는 UV spectrophotometer를 이용하여, 배양액의 광밀도(OD600)를 측정함으로써 추정하였고, 다시 dry cell mass로 환산하였다. IPTG에 의한 재조합 외래 단백질의 발현 양상을 비교 검토하기 위하여, 시간별로 채취된 시료들을 12% polyacrylamide gel에서 SDS-PAGE 함과 동시에 최종적으로 얻어지는 gel을 다시 scanning 및 image analysis 하여 추정 농도를 살펴봄으로써 시간에 따른 목적 재조합 단백질의 발현 양상을 서로 비교하였다. 단백질 정량은 BSA(Bovine Serum Albumin)를 표준물질로 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 초기 pH의 영향

그림 1과 2는 초기 pH의 차이에 인한 재조합 대장균의 균체 성장과 재조합 말라리아 항원의 발현량 변화를 각각 나타내고 있다. 그림 1에서 나타난 바와 같이, pH 7, 8인 경우에는 비교적 빠른 균체 성장을 나타내고 있으며 pH 6에서는 상대적으로 낮은 균체 성장을 나타내고 있다. 이것은 균체가 성장 과정에서 체외 분비하는 초산과 같은 부산물로 인하여 배양액 pH가 점점 낮아지면서 균체 성장을 저해하는 것으로 판단된다.

그림 2에서는 초기 pH의 차이에 인한 재조합 대장균의 말라리아 항원의 발현량 차이를 서로 비교하고 있다. 그림 1의 경우와 마찬가지로 pH가 7 및 8인 경우에는 매우 유사한 결과를 보여주었으며, pH가 6인 경우에 한하여 상대적으로 낮은 발현량을 나타내고 있다.

2. 유도발현이후 온도의 영향

재조합 대장균 시스템에서의 외래 단백질의 유도 발현에서 가장 분제시되는 것은 목적 외래 단백질이 과잉 발현으로 인한 내포체(inclusion body) 형태로 형성됨으로써 목적 실효

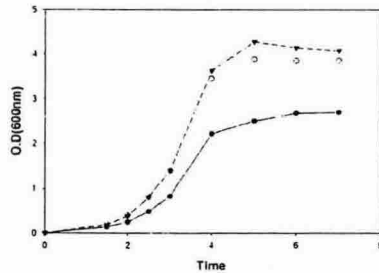


Fig 1. Effect of initial pH on the cell growth with the recombinant *E.coli*

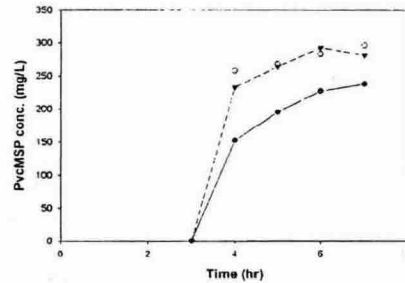


Fig 2. Effect of initial pH on the PvcMSP expression level with the recombinant *E.coli*

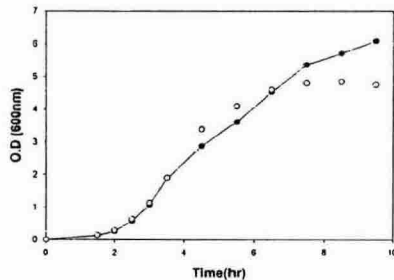


Fig 3. Effect of temperature of post induction on the cell growth with recombinant *E.coli*

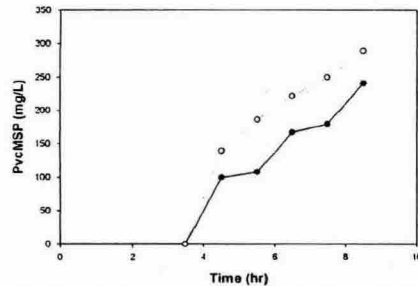


Fig 4. Effect of temperature of post induction on the PvcMSP expression level with the recombinant *E.coli*



성을 상실한다는 사실이다. 따라서 유도물질에 의한 발현 야기와 동시에 조업 온도도 함께 전이시킴으로써 내포체 형성을 줄일 가능성을 살펴보았다.

그림 3은 유도물질 투여에 의한 발현 이후 균체 성장 양상을 나타내고 있는데, 오히려 유도 발현 이후 조업 온도를 23°C로 내렸을 경우가 37°C로 유지하였을 경우보다 균체성장 속도가 높은 것으로 나타났다. 그림 4는 유도발현 이후 조업온도의 차이에 따른 말라리아 항원의 발현 양상의 변화를 서로 비교하여 나타낸 것이다. 그림 3의 균체 성장 곡선과는 반대로 37°C의 경우가 23°C인 경우보다 높은 발현량을 나타내고 있다. 따라서 균체 성장은 23°C인 경우가 빠른 균체성장을 나타내고 있으나 발현량은 많지 않았음을 확인할 수 있었다. 그러나 전술된 바와 같이 내포체의 형성을 줄이기 위한 방법으로서 유도발현과 동시에 조업 온도의 전이에 대한 실험을 별도로 실시하였으며 그 결과는 그림 5에 나타내었다. 유도발현 이후 23°C의 낮은 온도에서 배양하는 것이 내포체의 형성을 감소시키는데 효과가 확실함을 확인할 수 있었으며 이러한 결과는 유도발현과 동시에 상대적으로 낮은 온도에서 배양하는 것이 재조합 말라리아 항원 생산 속도를 낮추어 천천히 생산됨으로서 발현량은

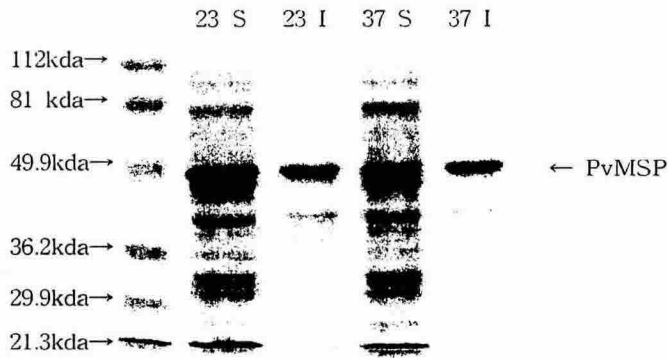


Fig 5. SDS-PAGE analysis of the expression and the solubility of recombinant PvMSP induced at 37°C and 25°C. Cells were harvested Soluble(S) and Insoluble (I).

떨어지나 내포체 형성을 줄일 수 있을 것으로 사려된다.

요약

본 연구에서는 말라리아 항원의 생물학적 대량 생산 공정을 디자인하기 위하여 자체 개발한 재조합 *E. coli* 시스템의 여러 가지 조업 조건들, 즉 균체 성장과 외래 단백질의 유도 발현에 영향을 미치는 초기 배지 pH, 유도 발현 이후의 조업 온도 및 타이밍, 그리고 기간 등을 조사함과 동시에 최적 배양 전략을 탐색하였다.

참고문헌

1. J. Shiloach, J. Kaufman, A. S. Guillard, 1995. Effect of glucose supply strategy on acetate accumulation, growth, and recombinant protein production by *E. coli* BL21(λ DE3) and *E. coli* JM109. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 421-428
2. Mark, S, H. L. George and S. W. Englander (1999), Chaperonin Function : Folding by Forced Unfolding, *Science.* **284**(5415): 822-825
3. Bowden, G. A., S. M. Paredes, and G. Georgiou (1991), Structure and morphology of protein inclusion body in *Escherichia coli*, *Bio. Technology,* **9**: 725-734
4. Kleman. G. L. Strohl. W. R. 1994. Acetate metabolism by *E.coli* in high-cell-density fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3952-3958