

S4

녹색형광단백질의 재조합 단백질 생산공정에서의 응용

차 형 준

포항공과대학교 화학공학과 및 분자생명과학부

처음으로 real time으로 유전자 발현을 visualization할 수 있는 marker를 이용할 수 있게 되었다. 이 maker가 바로 green fluorescent protein (GFP; 녹색형광단백질)이다. GFP는 1962년 Shimomura 등에 의하여 해파리인 *Aequorea victoria*에 존재함이 밝혀졌다(1). 그러나 30년이 지난 1992

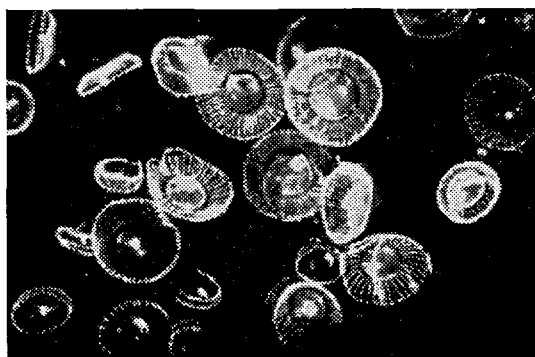


Fig. 1. Green fluorescence emitting jellyfish.

년이 되어서야 Prasher 등에 의하여 GFP의 cDNA가 클로닝 되었고(2) 이후 지금까지 약 10년 동안 GFP는 생명과학분야에서 가장 각광받는 유용한 단백질 중의 하나가 되어 매우 다양한 연구에 응용이 되고 있다. 이렇게 GFP가 생명과학분야에서 각광을 받게 된 이유로는 GFP가 모든 외래의 세포에서 형광을 발할 수 있는 활성을 가진 형태로 발현되기 때문이다(3). Chalfie 등은 처음으로 GFP를 대장균과 *Caenorhabditis elegans*에서 발현시켜 유전자의 발현을 모니터함으로써 GFP를 원핵 및 진핵세포 모두에서 사용할 수 있다는 것을 보고하였다(3). 이러한 발견을 통하여 GFP는 살아있는 세포, 조직 및 생물체에 해를 주지 않고 (non-invasive) 유전자의 발현을 측정하는 marker로서 사용할 수 있게 되어 cell biology, developmental biology, neurobiology 및 cytology 등의 연구분야에 널리 이용되고 있다.

GFP의 성질 및 특성

GFP는 다른 생물학적 발광성의 reporter와는 달리 자외선이나 청색광을 쬐여주 기만 하면 밝은 녹색의 형광을 발한다. 이러한 녹색형광의 발광은 광단백질인

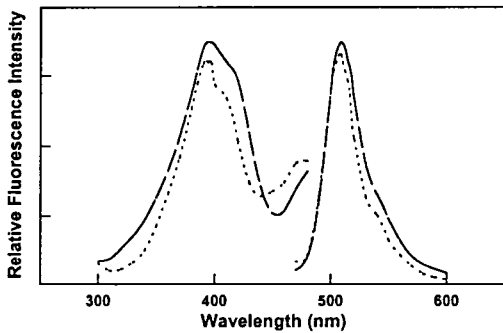


Fig. 2. Fluorescence excitation (left) and emission (right) spectra of insect cells-generated recombinant GFP (solid lines) and *E. coli*-generated recombinant GFP (dotted line).

aequorin으로부터 GFP로의 에너지 전달에 기인한다(4). GFP는 27 kDa의 분자량을 가지는 238의 아미노산으로 이루어진 단백질이며 주로 395 nm와 약간의 470 nm에서 자외선을 흡수하여 509 nm에서 녹색형광을 발한다(3). GFP는 열에 강하고 (65 °C 이상의 온도에서도 형광이 관찰된다) pH가 7.0 이하에서는 형광 강도가 줄어들기는 하나 5.5에서 12.2까지 폭 넓은 pH 범위에서 안정하다. 또한 화학물질에 대한 내성이 매우 강하여

6M guanidium hydrochloride, 8M urea, 1% SDS 그리고 적당한 농도의 유기용매에서도 그 형광을 어느 정도 유지할 수 있다. GFP를 변성화하려면 chaotropic agents, 강산 또는 강염기 (pH <4 또는 >11) 그리고 매우 높은 온도가 필요하다. GFP는 pronase를 제외하고는 대부분의 단백질 분해효소에 안정하다.

GFP는 그 발현이 종(species)에 관계없으며 녹색형광을 발하기 위하여 기질이나 보조인자 또는 다른 단백질들을 필요로 하지 않는 장점을 가지고 있어 새로운 genetic reporter molecule로 최근에 널리 연구되고 있다. GFP는 지금까지 대장균(3, 5, 6), 효모(7, 8), 동물세포(5, 9, 10), 곤충세포(*Drosophila*: 11, 12; Mosquitoes: 13; Sf9: 14, 15) 및 식물세포(16, 17) 등의 여러 가지 숙주 세포 및 생물체에서 성공적으로 발현되어 왔다. Figure 2에서 보는 것과 같이 진핵세포인 곤충세포에서 발현된 GFP의 흡수, 방출 스펙트럼은 원핵세포인 대장균에서 나오는 스펙트럼과 일치함을 알 수 있다. 또한 이 스펙트럼은 해파리 *A. victoria*에서 분리된 GFP의 스펙트럼과도 일치한다. 이로써 GFP가 형광을 띄기 위한 특별한 숙주세포에 관련된 GFP의 수정이 필요 없음을 알 수 있다. 또한 erase, β -galactosidase, 및 fluorescent-tagged antibody 등의 다른 reporter tag들과는 다르게 실험 도중에 세포에 커다란 해를 주게 되는 고정화(fixation) 기술이 필요하지 않다는 장점을 가지고 있다.

GFP의 구조

Fig. 3에서 보는 것과 같이 GFP의 3차원 구조에서 형광을 띄는데 필수적인 역할을 하는 것은 안에 존재하는 chromophore라는 구조이다(5, 18). Chromophore의 형성에는 번역후의 수정이 필요하게 되며 이러한 수정을 통하여 FSYGVQ라는 1차원의 6개의 peptide 서열이 cyclization된다. 이러한 chromophore는 GFP가 형광을 발하는데 필수적이기는 하나 chromophore 자체로는 형광을 띄지 않는다. 또한 chromophore의 형성에는 Tyrosine 66의 oxidation과 단백질 chain의 적당한 folding이 요구된다. Chromophore는 “can”이라고 불리는 바깥 단백질 안으로 묻혀져 있는 형태를 지님으로써 H₂O와 O₂로부터 보호된다. 바깥 단백질(can)은 cylinder 벽을 형성하는 일련의 11개의 β -sheets와 위와 아래를 닫는 구조로 형성시키는 두 개의 α -helices 구조로 이루어진다(18). 무산소 조건에서 자란 대장균으로부터 생합성된 GFP는 산소에 노출되기 전에는 형광을 띄지 않기 때문에 번역후 수정은 산소에 의존하는 것으로 알려져 있다(19).

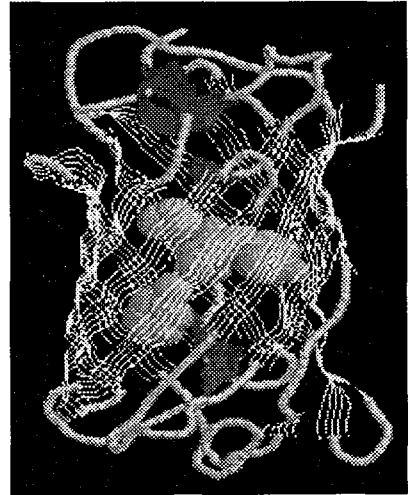


Fig. 3. Three-dimensional structure of GFP.

GFP variant들의 개발

많은 연구자들이 숙주세포에 더 잘 맞고 형광강도가 더 뛰어난 GFP를 만들기 위하여 노력하여 왔다(5, 10, 20). Heim 등은 hexapeptide chromophore안에 존재하는 3개의 peptide(Ser65, Tyr66, Gly67)의 cyclization에 대한 모델을 제안하였다(19). 이러한 모델은 Tyrosine66의 amino group과 Serine65의 carbonyl group이 ring의 형성에서 cyclization되고 산소의 존재 하에서 conjugated double bond가 형성됨을 제안하였다. Serine65를 Threonine(S65T)으로 돌연변이화 시킴으로써 형광강도가 4-6배 커졌고 395 nm의 흡수 peak가 사라졌다. 또한 Tyrosine 66을 Histidine

(T66H)으로 바꿈으로써 같은 흡수파장을 가지나 488 nm에서 청색 형광을 발하는 단백질을 얻을 수 있게 되었다(19). Delagrave 등은 흡수 파장이 적색파장 쪽으로 100 nm 정도 이동한 red-shift GFP(RSGFP)를 개발함으로써 현미경 상에서 wild-type GFP와 구별할 수 있게 함으로써 cascading signal transduction이나 유전자 발현 등을 연구할 수 있게 길을 개척하였다(21). 또한 395 nm의 흡수파장에 적합한 codon으로 바꿈으로써 같은 흡수파장과 방출파장을 가지고 형광강도만 18배 시킨 GFP (GFPuv)도 개발되었다(5). 현재 Clontech (www.clontech.com), Quantum Biotechnologies (www.qbi.com), Pharmingen (www.pharmingen.com) 등의 바이오 테크 회사들에서 많은 GFP variant들을 상업적으로 제공하고 있다.

GFP의 정량화 reporter로서의 생물공정에의 응용

GFP는 reporter 유전자로서의 여러 가지 장점으로 생물학 분야에서 많은 응용연구가 이루어져 왔다. 주로 유전자 발현을 위한 정성적(qualification)인 reporter로서 이용되어 왔으며 단백질의 localization이나 분비기작 연구에도 이용되어 왔다. 그러나 생물공정에의 응용연구는 1996

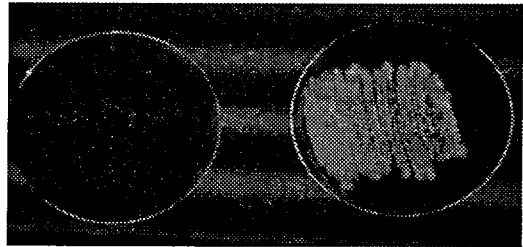


Fig. 4. GFP-expressing *E. coli* (right) and control (left) illuminated by UV.

년이 되어서야 시작되어 GFP를 정량적(quantification)인 reporter로서 이용하려는 가능성이 타진되었다(22). 대장균에서 GFP를 발현시키고 형광분석기로 측정된 GFP의 형광강도와 Western blot으로 정량화 된 GFP 양 사이에 선형의 관계가 있음을 알아냈다. 또한 Figure 4처럼 GFP를 발현하는 대장균을 streaking한 agar plate를 UV box에 올려 놓았을 때 녹색형광을 발하는 것을 눈으로 볼 수 있음으로써 원하는 외래 단백질을 visualize할 수 있는 reporter서의 GFP의 powerful함을 볼 수 있었다. 이로써 chloramphenicol acetyltransferase(CAT)와 β -galactosidase 등과 같은 기존의 유전자 발현 reporter와 달리 형광만을 측정함으로써 간단하게 정량화 할 수 있는 길이 열리게 되었다. 이러한 GFP의 진핵세포 시스템에서의 정량적인

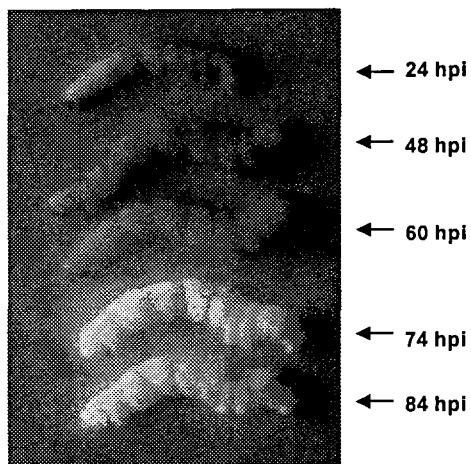


Fig. 5. Green fluorescent baculovirus-infected insect larvae illuminated by UV.

reporter로서의 가능성을 알아보기 위하여 곤충세포 및 곤충 애벌레(larvae) 시스템에서 연구가 수행되었다(15, 23). 곤충세포의 진핵세포 시스템에서도 발현된 GFP의 형광강도와 발현양 사이에 선형의 관계가 성립되어 GFP를 정량적인 reporter로서 사용할 수 있음을 알게 되었다. 이후 실제적인 GFP의 정량화 reporter로서의 가능성을 알아보기 위한 첫 번째 재조합 외래 단백질과의 fusion을 통한 연구가 수행되어 재조합 단백질의 양과 GFP 형광 강도사이의 선형 관계를 얻게 되었다(24). 그러나 이 경우는

외래 단백질을 박테리아 단백질인 CAT을 이용하였고 또한 CAT과 GFP의 fusion이 실제적인 translational fusion이 아닌 transcriptional fusion이었다. 그러므로 인간단백질인 human interleukin-2(hIL-2)와 GFP의 translational fusion을 통한 관계를 곤충세포 시스템을 통하여 알아보게 되었다(25, 26). Fig. 5에서 보는 것과 같이 fusion 단백질을 발현하는 곤충 애벌레는 형광을 발하는 것으로부터 목적 단백질인 hIL-2의 발현 여부와 애벌레로부터 단백질을 분리하여야 하는 시간의 결정이 가능하게 되었다(26). 발현된 GFP의 형광과 Western blot을 통한 hIL-2의 양의 시간에 따른 profile은 Fig. 6에서 보는 것과 같이 거의 같은 양상을 띠는 것을 알 수 있었고 이로부터 얻은 관계는 Fig. 7의 경우와 같이 선형으로 나타남으로써 GFP를 생물공정을 위한 정량화 reporter로서 성공적으로 사용할 수 있음을 알 수 있었다. 즉, hIL-2와 같이 분석이 어려운 (특히 real time으로) 목적 단백질의 경우 GFP를 사용하여 형광만을 측정함으로써 배양중의 발현 양상은 물론 그 정량도 가능하게 된 것이다. 이와 같은 GFP의 형광강도와 재조합 외래 단백질 농도 사이의 선형관계는 원핵세포인 대장균 시스템(27, 28)과 단순 진핵세포인 효모 *Pichia pastoris* 시스템(unpublished)에서도 확인됨으로써 GFP를 정량적 reporter로서 여러 재조합 단백질 생산 시스템에 응용할 수 있는 기술이 개발되었다. 또한 GFP를 on-line으로 측정할

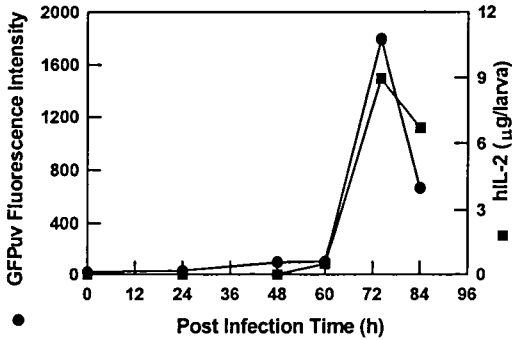


Fig. 6. Time course of GFPuv/hIL-2 fusion protein production in infected insect larvae.

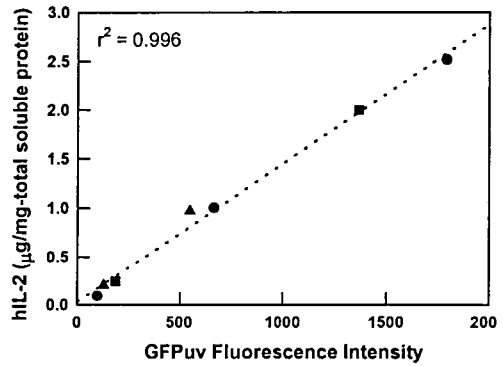


Fig. 7. Correlation between GFPuv fluorescence intensity and hIL-2 amount in infected insect larvae.

수 있는 sensor가 개발되었고(29) 이를 바탕으로 처음으로 on-line으로 GFP의 형광을 측정함으로써 목적 재조합 단백질의 정량화가 가능하게 되었으며 이를 배양의 제어를 위한 변수로 사용할 수 있는 기술이 확립되었다(30).

GFP의 분리정제 marker로서의 생물공정예의 응용

GFP는 또한 분리정제를 위한 marker로서 응용될 수 있다. Cha 등은 GFP와 hIL-2의 fusion을 Fig. 8과 같은 unique한 구조로 구성하였다 (25-27). GFP의 N-terminus부분에 6개의 Histidine으로 구성된 tag를 붙여 immobilized metal affinity chromatography (IMAC)으로 one-step으로 분리정제가 가능하게 하였으며 GFP와 hIL-2 사이에 enterokinase 효소에 의하여 절단이 되도록 하여 목적 재조합 단백질인 hIL-2의 순수분리가 가능하게 하였다. 이때 GFP는 Fig. 9에서 보는 것과 같이 분리

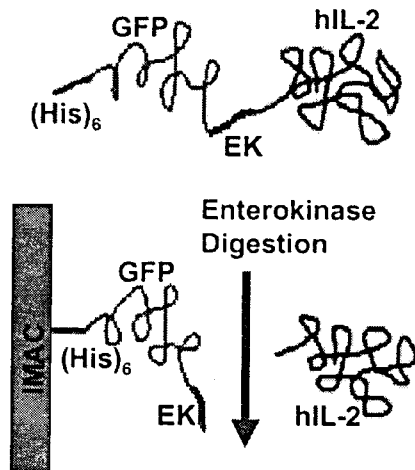


Fig. 8. Unique structure of GFP and hIL-2 fusion protein.

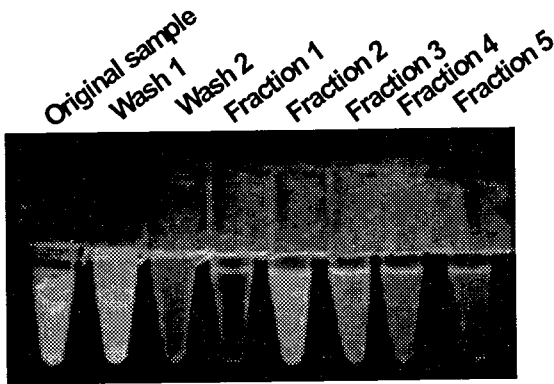


Fig. 9. Visualization of purification process for GFP/hIL-2 fusion protein using IMAC.

광도 측정 및 목적 단백질의 activity의 측정이 필요없이 GFP의 형광강도를 형광 분석기를 통하여 측정함으로써 대체할 수 있었다. 즉, 분리정제된 fusion 단백질이 들어 있는 fraction만이 형광강도를 나타내므로 chromatogram의 경우에도 하나의 단일 peak만을 보이게 된다. 또한 GFP의 형광강도를 측정함으로써 분리정제된 목적 재조합 단백질의 정량화도 가능하였다. 녹색의 형광은 IMAC column에서도 눈으로 측정이 가능하여 이를 통하여 분리정제시 분리할 수 있는 sample의 부피의 결정도 가능하였다.

정제를 위한 visual marker로서 사용이 가능하였다 (31). IMAC 분리 정제로부터 elution된 fraction을 sampling하여 UV box에 올려놓았을 때 GFP를 포함하는 분리정제된 fusion 단백질이 들어있는 sample은 형광을 발함으로써 간단하게 분리정제된 fraction의 결정이 가능하였다. 일반적으로 수행하여야 하는 단백질 양을 측정을 위한 280 nm에서의 흡

결 론

GFP만의 versatility와 많은 장점은 GFP를 유용한 reporter 유전자로서 많은 연구들에 응용할 수 있게 하였다. 1992년도에 cDNA가 cloning되었고 1994년도에서야 처음으로 재조합 시스템에서 발현이 보고되었으므로 이제 약 10년이 지난 시점에서 가장 powerful한 reporter로서 사용되고 있다는 것에 우리는 주목하여야 할 것이다. 많은 생명과학분야에서의 응용은 이루어지고 있으나 생물공정 특히, 재조합 단백질 발현 공정에서의 GFP의 응용 기술은 1996년이 되어서야 그 가능성이 타진되었고 1999년에 그 기술이 확립되었다고 할 수 있겠다. 이러한 기술의 개발을 통하여 생물공정에서 GFP를 목적 재조합 단백질, 특히 인간단백질과 같이 분석이 어려운 단

백질의 발현 측정을 위한 non-invasive한 정량적 reporter로서 사용할 수 있게 되었고 분리정제 시에도 GFP의 visual한 특성을 이용하여 분리정제 marker로서 사용할 수 있는 길이 열리게 되었다. 또한 real time으로 목적 단백질의 양을 측정할 수 있는 최초의 reporter로서 배양공정의 제어를 위한 변수로 목적단백질의 양(GFP의 형광으로부터 recalculation된 값이다)을 사용할 수 있게 된다는 중요한 의미를 부여하게 되었다. 물론 숙주세포의 translational capacity가 존재하므로 GFP가 fusion되지 않은 목적 단백질만을 생산하는 경우와 비교하여 발현수율 면에서는 손해를 볼 수 있다. 그러나 GFP를 정량화 발현 reporter로서 그리고 분리정제 marker로서 사용하였을 때 얻을 수 있는 공정측면의 이득을 고려하여 볼 때 발현수율의 손실은 마땅히 감수할 수 있을 것으로 사려된다.

참 고 문 헌

1. Shimomura, O., Johnson, F.H. and Saiga, Y. (1962) *J. Cell. Comp. Physiol.* 59: 223-227.
2. Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. and Cormier, M.J. (1992) *Gene* 111: 229-233.
3. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. and Prasher, D.C. (1994) *Science* 263: 802-805.
4. Johnson, F.H., Shimomura, O., Saiga, Y., Gershman, L.C., Reynolds, G.T., Waters, J.R. (1962) *J. Cell. Comp. Physiol.* 60: 85-103.
5. Crameri, A., Whitehorn, E.A., Tate, E. and Stemmer, W.P.C. (1996) *Nature Biotechnol.* 14: 315-319.
6. Cha, H.J., Srivastava, R., Vakharia, V., Rao, G., and Bentley, W.E. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 409-414.
7. Stearns, T. (1995) *Current Bio.* 5: 262-264.
8. Schlenstedt, G., Saavedra, C., Loeb, J.D.J., Cole, C.N., Silver, P.A. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 225-229.

9. Kain, S.R., Adams, M., Kondepudi, A., Yang, T.T., Ward, W.W., Kitts, P. (1995) *BioTechniques* 17: 982-987.
10. Stauber, R.H., Horie, K., Carney, P., Hudson, E.A., Tarasova, N.I., Gaitanaris, G.A. and Pavlakis, G.N. (1998) *Biotechniques* 24: 462.
11. Yeh, E., Gustafson, K. and Boulianne, G.L. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7036-7040.
12. Timmons, L., Becker, J., Barthmaier, P., Fyrberg, C., Shearn, A. and Fyrberg, E. (1997) *Dev. genetics* 20: 338-347.
13. Higgs, S., Traul, D., Davis, B.S., kamrud, K.I., Wilcox, C.L. and Beaty, B.J. (1996) *BioTechniques* 21: 660-664.
14. Reilander, H., Haase, W., Maul, G. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219: 14-20.
15. Cha, H.J., Gotoh, T., and Bentley, W.E. (1997) *BioTechniques*, 23: 782-786.
16. Niedz, R.P., Sussman, M.R. and Satterlee, J.S. (1995) *Plant Cell Reports* 14: 403-406.
17. Heinlein, M., Epel, B.L., Padgett, H.S., Beachy, R.N. (1995) *Science* 270: 1983-1985.
18. Yang, F., Moss, L.G. and Phillips Jr., G.N. (1996) *Nature Biotechnol.* 14: 1246-1251.
19. Heim, R., Prasher, D.C. and Tsien, R.Y. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12501-12504.
20. Yang, T.T., Sinai, P., Green, G., Kitts, P.A., Chen, Y.T., Lybarger, L., Chervenak, R., Patterson, G.H., Piston, D.W. and Kain, S.R. (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 8212-8216.
21. Delagrave, S., Hawtin, R.E., Silva, C.M., Yang, M.M. and Youvan, D.C. (1995) *Bio/Technol.*, 13: 151-154.
22. Albano, C.R., Randers-Eichhorn, L., Chang, Q., Bentley, W.E., Rao, G. (1996) *Biotechnol. Tech.* 10: 953-958.

23. Cha, H.J., Pham, M.Q., Rao, G., and Bentley, W.E. (1997) *Biotechnol. Bioeng.* 56: 239-247.
24. Albano, C.R., Randers-Eichhorn, L., Bentley, W.E., Rao, G. (1998) *Biotechnol. Progress* 14: 351-354.
25. Cha, H.J., Dalal, N.G., Vakharia, V., and Bentley, W.E. (1999) *J. Biotechnol.* 69: 9-17.
26. Cha, H.J., Dalal, N.G., Pham, M.Q., Vakharia, V., and Bentley, W.E. (1999) *Biotechnol. Bioeng.* 65: 316-324.
27. Cha, H.J., Wu, C.F., Valdes, J., Rao, G., and Bentley, W.E. (2000) *Biotechnol. Bioeng.* 67: 565-574.
28. Wu, C.F., Cha, H.J., Rao, G., Valdes, J.J., and Bentley, W.E. (2000) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 78-83.
29. Randers-Eichhorn, L., Albano, C.R., Sipior, J., Bentley, W.E., Rao, G. (1997) *Biotechnol. Bioeng.* 55: 921-926.
30. Chae, H.J., DeLisa, M.P., Cha, H.J., Rao, G., Weigand, W.A., and Bentley, W.E. (2000) *Biotechnol. Bioeng.* 69: 275-285.
31. Cha, H.J., Dalal, N.G., Pham, M.Q., and Bentley, W.E. (1999) *Biotechnol. Progress* 15: 283-286.