

Protein Engineering을 위한 Site-Specific Mutagenesis의 이용



고려대학교 농과대학 농화학과 이 세 영

1. 서 론

DNA 클로닝과 조작기술의 발전은 어떤 유전자의 특정한 위치에 선택적으로 돌연변이를 도입할 수 있는 site-specific mutagenesis 기술을 창출해 내었다. 이 기술로 DNA 염기의 치환, 결실, 삽입 등을 클론된 유전자에 직접 도입할 수가 있게 되어 생체의 유전자 조작이나 유전자의 산물인 단백질의 구조와 기능을 의도적으로 변화시키는 protein engineering에 광범위하게 이용되고 있다. Protein engineering은 주로 단백질의 촉매 및 생리활성의 증가, 효소의 특성 및 기질 특이성의 변화, 단백질 구조의 안정화 및 내열성 증가, 분자량의 감소, 효소 및 생리활성 단백질의 구조의 안정화 및 내열성 증가 등에 활용되고 있으며 산업적 유용성이 큰 새로운 단백질의 창조에도 기여할 것으로 기대를 모으고 있다. Site-specific mutagenesis 기술로 현재 가장 널리 이용되는 것이 *in vitro* 상에서 수행하는 oligonucleotide-directed site specific mutagenesis 이다. 이 방법은 생화학적으로 합성한 특정한 염기서열을 가진 oligonucleotide들을 일종의 mutagen으로 사용하거나 효소적 DNA 합성을 위한 primer로 사용하여 클론된 DNA의 염기서열을 선택적으로 개조하거나 혹은 다른 조작을 하는 것이다.

Oligonucleotide-directed site specific mutagenesis를 위하여 현재까지 많은 방법들이 고안되었는데 이들 대부분의 방법들은 mutagenic oligonucleotide를 연장하여 돌연변이를 유발하고자 하는 표적유전자를 포함하고 있는 ssDNA (single-stranded DNA) template를 효소적으로 한바퀴 복제하여 ligase로 연결함으로써 새로 합성된 가닥이 돌연변이를 포함하도록 한다. 이

mismatch duplex DNA는 숙주세포에 도입되어 복제되고 돌연변이체와 야생형의 daughter molecule로 분리되면 돌연변이체를 선별하는 것이다. 돌연변이체의 선별은 그 유전적 표현형을 이용하든가 mismatch primer로 이용한 oligonucleotide를 probe로 이용하여 야생형 DNA는 hybridize 되지 않고 변이형 DNA만 hybridize되는 조건에서 differential hybridization(1)을 수행함으로써 선택적으로 선별된다.

Template는 유전자를 클로닝할 수 있고 복제기능이 있는 ssDNA(single-stranded DNA)이어야 하므로 pBR 322과 같은 double-stranded 플라스미드 DNA에 유전자가 클로닝된 재조합 DNA를 ssDNA로 만들어 template로 사용할 수 있지만 (2) ϕ X174(3), fd(4), M 13(5) 같은 ssDNA 파아지로부터 유도된 재조합 DNA가 직접 template로 사용될 수가 있어 site-specific mutagenesis에서 oligonucleotide의 template로 보편적으로 사용되고 있는데 이중에서도 M 13 파아지 DNA가 클로닝 vector로 개발되어 있어(6, 7) 특히 자주 이용된다.

M 13 파아지를 이용하는 대부분의 oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis 방법들은 합성 mutagenic oligonucleotide를 M 13 파아지의 ssDNA의 template에 hybridize하고 이것을 primer로 하여 DNA polymerase I(Klenow fragment)로 template를 한바퀴 완전히 복제하여 T₄-DNA ligase로 연결시켜 환상의 dsDNA(double-stranded DNA)를 만든다. 그런데 *in vitro*에서 DNA polymerase I(Klenow fragment)에 의한 M 13 DNA template와 oligonucleotide primer에 의하여 형성된 hybrid DNA로부터 full-length complementary DNA

합성을 한다는 것은 대단히 비효율적이다. 그 이유는 아마 2차 구조의 장애 때문이거나 M13 DNA 상에 "pause site"들이 있어 complementary strand 합성을 저해하는 것으로 생각되고 있다. 이런 경우, 만약 cccDNA (covalently closed circular DNA) duplex가 완성되지 않으면 mutagenic oligonucleotide의 5'-말단이 숙주 세포에서 exonuclease의 작용을 받아 mismatch base pair가 제거되고 결과적으로 돌연변이체가 얻어지는 확률이 대단히 낮아진다. 이러한 결점을 보완하여 돌연변이율을 높이는 여러가지 개량된 방법들이 나왔으며 그중의 몇가지를 소개하면 다음과 같다.

2. Double-Primer 법

Double primer 법 (8)은 mutagenic primer의 upstream에 또 하나의 oligonucleotide를 사용하여 노출된 mutagenic oligonucleotide의 5'-말단을 이 둘째 primer까지 연장하여 보호하는 것이다. M13 시스템에서 이 둘째 primer로 보통 M13 sequencing primer가 이용되고 있다. 이 두 primer를 M13 ssDNA에 동시에 annealing하여 Fig. 1에서와 같이 DNA polymerase I(Klenow fragment)로 두 primer를 연장하고 연장된 upstream primer를 mutagenic primer의 5'-말단에 ligase로 연결하여 gapped duplex를 만들어서 이것을 직접 *E. coli* 숙주에 transformation

시켜 돌연변이체를 선별하는 것이다.

이 방법으로 돌연변이체가 클론된 유전자에 따라 최고 50%까지도 얻어지는 것으로 발표되었지만 보통은 이보다 낮은 10% 이하다. Double primer 법의 변형된 방법들이 (10, 11) 여러가지 고안되어 있으나 이 Zollar와 Smith의 방법이 그중 얻어지는 돌연변이율도 높고 또 많이 이용되는 것 같다.

3. Gapped Duplex Intermediate 법

Gapped duplex intermediate 법 (9)은 M13 DNA의 complementary strand를 효소적으로 합성하는 대신에 클로닝에 vector로 사용한 M13 DNA의 RF형 (replicative form)을 선상으로 끊고 denaturation하여 이것을 유전자가 클로닝된 M13의 ssDNA와 annealing하여 환상의 gapped duplex DNA를 만드는 것이다. 여기에 mutagenic oligonucleotide를 hybridize하여 나머지 gap들을 DNA polymerase I(Klenow fragment)로 채우고 DNA ligase로 연결하여 Fig. 2와 같이 cccDNA를 만들어서 *E. coli* 숙주에 transfection 한다. 이 방법은 실제로 double primer법 보다 훨씬 간단하고 transfection율도 높다. Gapped duplex intermediate 법의 또 하나의 장점은 genetic selection을 기용할 수 있다는 점이다. 사실 oligonucleotide-directed mutagenesis에서 가장 큰 난관이 개조되지 않은

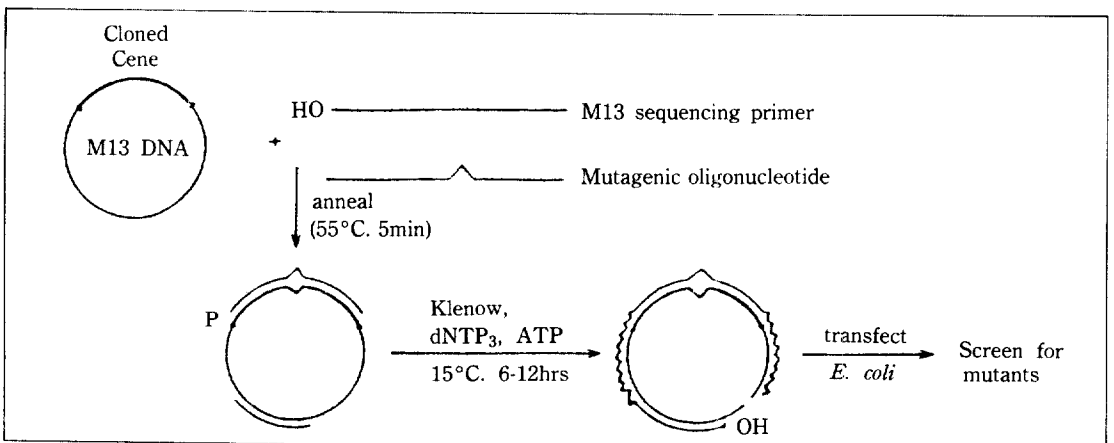


Fig. 1. Scheme for M13-based double-primer method of site-specific mutagenesis

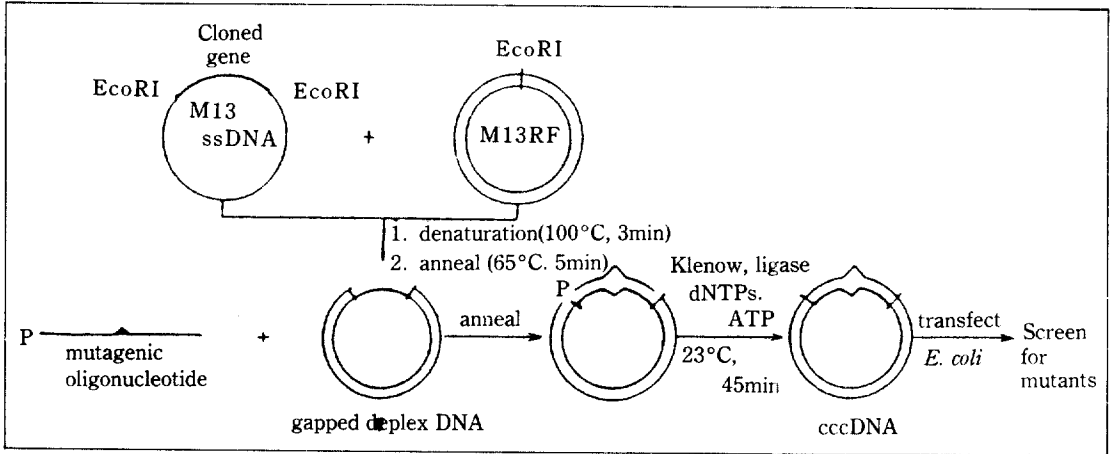


Fig. 2. Scheme for M13-based gapped duplex intermediate method for site-specific mutagenesis

DNA의 배경으로부터 원하는 돌연변이체 DNA를 확인하는 것이다. 특히 클론된 DNA가 *E. coli*에서 확인될 수 있는 표현형질 (assayable phenotype)이 없을 때는 더욱 어렵다.

4. Bauer 등의 방법

원하는 돌연변이 빈도를 높이기 위하여 genetic selection을 이용하는 방법들이 여러가지 고안되어 있지만 그중 가장 효과적인 방법은 Bauer 등(12)의 *am* enrichment 방법이다. 이 방법은 간단하면서도 높은 빈도로 특정한 돌연변이를 얻을 수 있기 때문에 현재 대단히 인기가 좋다. 이 방법은 본 연구실에서 직접 실험하여 확인하여 본 것이기 때문에 여기에 소개하고자 한다.

Bauer 등의 방법은 M13 시스템을 이용한 gapped duplex intermediate 법의 하나로 M13 template DNA로 파아지 생장에 필수적인 두 유전자 *gene I* (*gp I*)과 *gene II* (*gp II*)에 amber 변이들을 가지고 있는 것을 사용하므로써 야생형 파아지와 변이형 파아지의 유전적 차이를 돌연변이체의 선별에 이용하는 것이다.

실험의 개략은 먼저 돌연변이를 일으키고자 하는 유전자를 amber 변이들을 가지고 있는 M13 vector에 클로닝하고 이것을 *E. coli* suppressor 균주에 길러서 single strand 파아지 DNA를 만

들고 여기에 야생형 M13 파아지의 RF DNA를 유전자를 클로닝할 때 사용한 제한효소를 사용하여 선형으로 끊어서 denaturation시킨 것은 hybridize하여 ss template DNA와 gapped hetero-duplex DNA를 만든다. 이 gapped hetero-duplex DNA에 원하는 염기변화를 가지고 있는 합성 oligonucleotide를 hybridize시키고 나머지 gap들을 DNA polymerase I (Klenow fragment)로 채워서 T4 DNA ligase로 연결한다. 이렇게 만들어진 cccDNA를 suppressor 변이를 가지고 있지 않은 야생형 숙주에 transfection시키면 원래의 ss template는 amber 변이들을 가지고 있기 때문에 plaque를 형성하지 못하고 mutant oligonucleotide를 포함하고 있는 complementary strand에서 유래된 유전자를 가지고 있는 파아지는 amber 변이를 가지고 있지 않은 야생형 파아지가 되기 때문에 plaque를 형성한다.

물론 이때 나타나는 plaque는 모두가 변이유전자를 포함하고 있는 파아지는 아니고 mismatch DNA repair, 클론된 유전자를 포함하고 있지 않은 야생형 파아지 등의 배경 (background)도 포함하고 있기 때문에 transfect된 세포의 표현형질이나 differential plaque hybridization 혹은 colony hybridization(13)에 의한 돌연변이체 screening 단계를 필요로 하지만 보통 10-20%의 높은 빈도로 돌연변이체가 얻어진다.

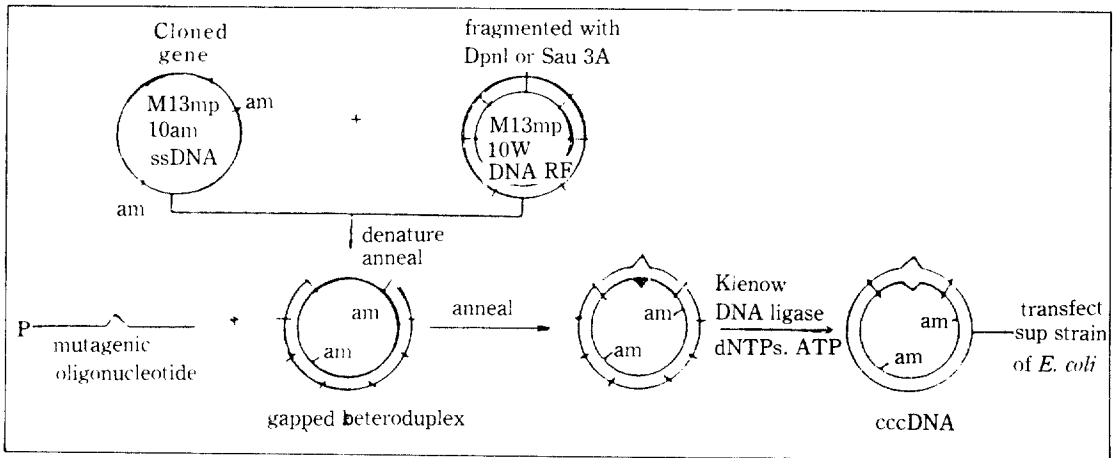


Fig. 3. Scheme for M13-based site-specific mutagenesis using *am* selection method

야생형 파아지에 의한 배경은 RF 파아지 DNA를 선형으로 만들때 *DpnI*이나 *Sau3A* 제한효소를 끊어서(M13 DNA가 7토막으로 잘림) denaturation시킨 것을 gapped heteroduplex를 만들 때 사용하므로써 상당히 줄일 수 있다.

Bauer 등의 논문에 있는 *E. coli*의 *dam* repair 시스템을 이용하는 mismatch repair enrichment는 별 효과가 없는 것으로 사용되고 있는 Bauer 등의 방법을 도식하면 Fig. 3과 같다.

5. Kunkel의 방법(14)

이 방법은 thymine 대신 uracil을 가지고 있는 DNA를 template로 사용하여 돌연변이를 일으키는 것이다. Uracil-containing DNA template *E. coli dut⁻, ung⁻* strain(15)에 M13 파아지를 감염시킴으로써 쉽게 얻을 수 있다.

E. coli dut⁻, ung⁻ strain은 *dut* 유전자의 산물인 dUTPase 효소가 결여되어 세포내 dUTP 농도가 증가하여 이들이 TTP와 상호경쟁적으로 DNA 내에 삽입된다(16). 또한 *ung* 유전자의 산물인 uracil glycosylase(17)의 결손으로 삽입된 uracil이 제거되지 않은 채 DNA상에 남아 있는 특성을 가지고 있다. 이러한 uracil-containing template는 야생형 *E. coli*로부터 제조된 template와 *ung⁻* 숙주에서 -complementation의 상실을 비교해 볼때 단지 2배의 높은 돌연변이 빈도

를 보여주고 있을 뿐이다. 이것은 uracil이 thymine 대신, 그리고 thymine 같이 code 한다는 사실과 일치하는 것이다.

그러나 이러한 uracil-containing template는 DNA의 uracil염기를 제거해 주는 uracil glycosylase의 작용에 의해서 불활성화 되고(18), 이것은 single-strand DNA를 치명적으로 만들게 된다.

이 uracil-containing template가 일반적인 site-specific mutagenesis protocol에 사용될 때, uracil이 없이 원하는 돌연변이를 가지고 있는, *in vitro*상에서 새로이 합성된 DNA는 선별력이 매우 강하게 되는 것이다.

이 방법을 도식하면 Fig. 4와 같다.

돌연변이를 일으키고자 하는 부분과 complementary 한 oligonucleotide를 합성하여 이 oligomer의 5'-OH 말단을 phosphorylation시킨 다음 dNTPs, Klenow fragment, ATP, dUTPase를 사용하여 DNA 복제를 시킨 후, DNA-ligase로 연결시켜 heteroduplex를 만든다. 이들은 *E. coli ung⁺* strain에 transfection시켜 돌연변이체를 선별한다. Uracil이 포함된 ssDNA는 *ung⁺* strain 내에서 불활성되거나 돌연변이된 oligonucleotide를 가지고 새로 합성된 야생형 DNA만이 이 strain에서 성장하여 plaque를 형성하게 된다.

이 방법에 의한 돌연변이체의 선별은 상당히 높

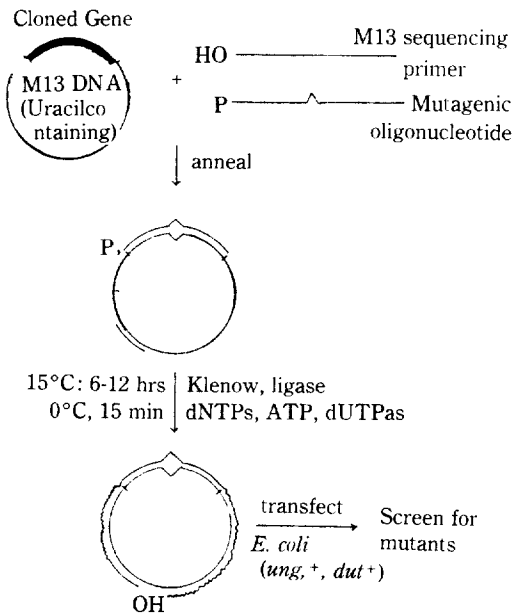


Fig. 4. Scheme for site-specific mutagenesis using uracil-containing template method.

은 빈도를 나타내는데 transfection시키기 전에 glycosylase를 미리 처리할 경우 돌연변이 빈도가 50% 이상, glycosylase와 alkali처리를 할 경우는 89% (*ung⁻*)의 돌연변이 빈도를 보이는 보고가 있다.

6. Khorana 등의 방법

Khorana 등은 (20) synthetic DNA duplex를 이용한 새로운 mutagenesis 방법을 보고하였는데 이는 mutagenic synthetic DNA duplex를 원래의 restriction fragment 대신 유전자에 삽입하는 방법이다.

이 방법은 우선 목적 유전자 밖에 새로운 제한효소 절단부위를 oligonucleotide-directed point mutagenesis로 만들어낸 다음 (21) 이 새로운 제한효소 절단부위와 이와는 다른 방향에 있는 기존의 제한효소 절단부위를 사용하여 변이시키는 방법으로 일반적으로 사용되는 M13 bacteriophage vector를 사용하지 않고 double stranded expression vector를 직접 사용하는 것이다. 즉, 목적유전자 upstream에 있는 기존의 제한효소 절

단부위를 ethidium bromide와 제한효소로 처리하여 nick 형태로 만들고 여기에 exonuclease III를 가해 gapped DNA를 제조한다. 이렇게 만들어진 gapped DNA에 mutagenic oligonucleotide와 dNTPs, ATP, Klenow fragment 그리고 T_4 -DNA ligase로 ccc형태의 plasmid를 구성하여 이를 *E. coli*에 형질전환시켜 새로운 제한효소 절단부위를 가지고 있는 mutant plasmid를 선별한다. 이 mutant plasmid를 원하는 목적유전자의 변이에 사용하는데 목적유전자의 upstream에 있는 두곳을 (A, B) 제한효소로 절단하여 DNA fragment를 얻고 (A...B) 여기에 기존의 제한효소 절단부위 (A)와 목적유전자의 downstream 상에 있는 새로 만든 절단부위 (C)를 절단하여 얻은 vector fragment를 섞는다. 여기에 mutagenic synthetic DNA duplex를 가해 T_4 -DNA ligase로 ligation을 시킨다. 이때 mutagenic synthetic DNA duplex의 한쪽 끝은 (B)와 완전히 일치하고 다른 한쪽은 (C)와는 ligation을 하지만 ligation 이후 동일제한효소로 재절단이 되지 못하도록 하여 (C)', mutant의 확인이 용이도록 하는 것이다.

7. Bauer의 방법과 Kunkel 방법은 혼합한 site-specific mutagenesis

이미 전술한 바 처럼 Bauer의 amber enrichment 방법은 M13 template DNA로 파아지 생육에 필수적인 두 유전자 gene I 과 gene II에 amber 변이들을 가지고 있는 것을 사용함으로써 야생형 파아지와 변이형파아지의 유전적 차이를 돌연변이체의 선별에 이용하는 것이다. 또한 Kunkel 법은 thymine 대신 uracil을 가진 DNA를 template로 사용하여 돌연변이체를 선별하는 것이다. 이 두 가지 방법은 각각 높은 돌연변이 빈도를 보이고는 있으나 이 두 방법의 장점을 혼합하여 site-specific mutagenesis 빈도를 높인 방법이 개발되었다.

이 세가지 방법을 비교하기 위한 실험으로 Fig. 5와 같이 β -galactosidase의 α -fragment를 code하는 M13 파아지내 *lacZ* 유전자가 amber

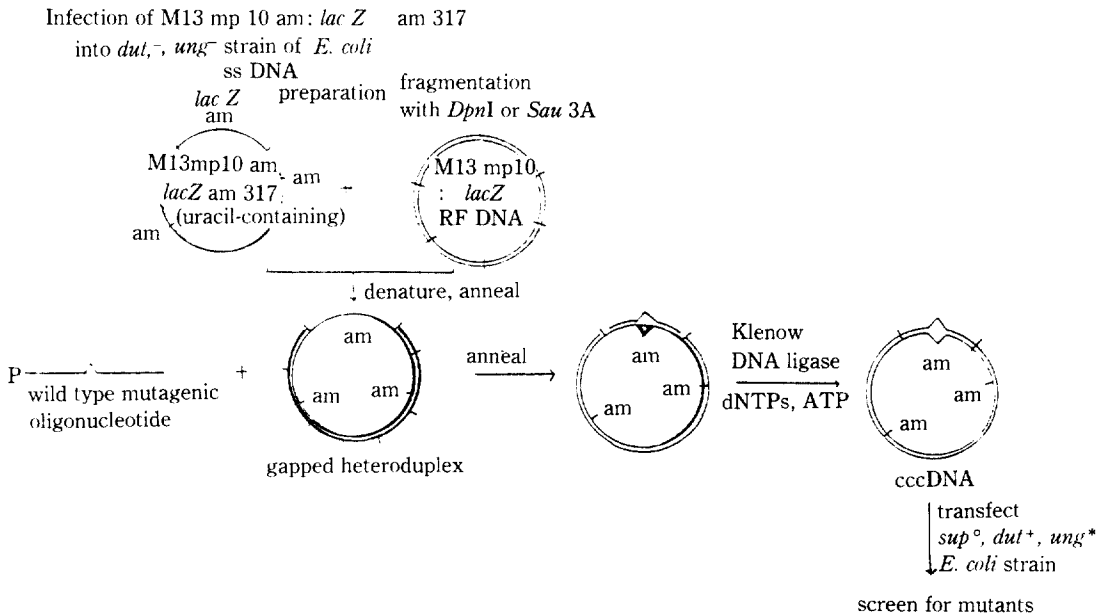


Fig. 5. Scheme for M13-based site specific mutagenesis using *am* selection and uracil-containing template method.

변이되어 suppressor free(*sup⁰*)인 숙주에서 Lac⁻인 M13 mp 10 am: *lacZ* am 317 파아지 DNA를 site-specific mutagenesis시켜 야생형 *lacZ*로 전환시켰으며 이때 새로 형성되는 *Hind* III 절단부위를 절단시킴으로써 돌연변이체를 확인하였다. 그 결과 Bauer 방법만 사용했을 경우 40%, Kunkel 방법만 사용하였을 때 5.9%의 돌연변이 빈도를 나타내었는데 Bauer 법과 Kunkel 법을 혼합사용하였을 때는 거의 100%의 높은 돌연변이 빈도를 나타내었다.

대부분의 oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis는 특정한 염기서열을 미리 정해진 대로만 변화되도록 계획되어 있기는 하지만 간혹 표적이 아닌 다른 염기에 변화가 오는 경우가 있으므로 (22-24) DNA sequencing이나 유전적 혹은 생화학적 분석을 통해 계획된 대로 돌연변이가 수행되었는지는 반드시 확인해야 한다.

REFERENCES

- Wallace, R.B., J. Shaffer, R.F. Murphy, J. Bonner, T. Hirose, and K. Itakura. 1979. *Nucl. Acids Res.* **6**, 3543-3557.
- Wallace, R.B., M. Schold, M.J. Johnson, P. Demberk, and K. Itakura. 1981. *Nucl. Acids Res.* **9**, 3647-3656.
- Razin, A., T. Hirose, K. Itakura, and A.D. Riggs. 1978. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **75**, 4268-4270.
- Wasylyk, B., R. Derbyshire, A. Guy, D. Milko, A. Roget, R. Teoule, and P. Chambon. 1980. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **77**, 70244.
- Zoller, M.J., and M. Smith. 1982. *Nucl. Acids Res.* **10**, 6487-6500.
- Messing, J., B. Gronenborn, B. Muller-Hill, and P.H. Hofschneider. 1977. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **74**, 3642-3646.
- Messing, J. 1983. *Methods in Enzymol.* **101**, 20-78.
- Zoller, M.J., and M. Smith, 1984. *DNA* **3**, 479-488.
- Kramer, W., V. Druitsa, H.W. Jansen, B. Kramer, M. Pflugfelder, and H.J. Fritz. 1984. *Nucl. Acids Res.* **12**, 9441-9456.
- Norris, K., F. Norris, L. Christiansen and N. Fiil. 1983. *Nucl. Acids Res.* **11**, 5103-5112.

11. Schold, M., A. Colombero, A.A. Reyes, and R.B. Wallace. 1984. *DNA* **3**, 469-477.
12. Bauer, C.E., S.D. Hesse, D.A. Waechter-Brulla, S.P. Lynn, R.I. Gumpert, and J.F. Gardner, 1985. *Gene* **37**, 73-81.
13. Wallace, R.B., J. Shaffer, R.F. Murphy, J. Bonner, T. Hirose, and K. Itakura. 1979. *Nucl. Acids Res.* **6**, 3543-3557.
14. Thomas A. Kunkel. 1985. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **82**, 488-492.
15. Tye, B., Chien, J., Lehman, I., Duncan, B., and Warner, H. 1978. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **75**, 233-237.
16. Tye, B., and I.R. Lehman, 1977. *J. Mol. Biol.* **117**, 293-306.
17. Warner, H.R., Duncan, B.K., Garrett, C., and Neuhard, J. 1981. *J. Bacteriol.* **145**; 687-695.
18. Lindahle, T. 1979. *Proc. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.* **22**, 135-192.
19. Kunkel, T.A. 1984. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **81**, 1494-1498.
20. Kin-Ming Lo, Simon, S. Jones, Neil R. Hackett, and H. Gobind Khorana. 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 2285-2289.
21. Dalbadie-McFarland, G., Cohen, L.W., Riggs, A.D., Morin, C., Itakura, K., and Richard, J.H. 1982. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 6409-9413.
22. Larson, G.P., K. Itakura, H. Ito, and J.J. Rossi. 1983. *Gene* **22**, 31-39.
23. Osinga, K.A., A.M. Vander Bliet, G. Van Der Horst, M.J.A. Groot Koerkamp, H.F. Tabak, G.H. Veenman, and J.H. Van Boom. 1983. *Nucl. Acids Res.* **11**, 8589-8608.
24. Villafranca, J.E. E.E. Howell, D. Voet, M.J. Strobel, R.C. Ogden, J.N. Abelson, and J. Kraut. 1983. *Science* **222**, 782-788.