

유전자 재조합기법을 통한 신물질 창출

한국과학기술연구원 유전공학센터 **유 명 회**

1970년대에 개발된 유전자 재조합기술이 생명공학 및 산업계에 기여한 것은 두 종류로 구분할 수 있는데, 하나는 희귀한 유용물질들을 미생물에서 다량생산할 수 있게 한 것이고 다른 하나는 유용단백질의 아미노산서열을 체계적으로 조작하는 것을 가능하게 해준 것이다. 유전자 재조합기법을 통한 신물질 창출은 후자에 속하는 것으로서 소위 말하는 단백질공학기술이라 할 수 있다. 단백질공학은 유전자 재조합기술이 정립되면서 시작되었는데, DNA 변이를 통해 단백질의 물리화학적 성질을 변화시키고 생물학적 기능을 개선할 뿐만 아니라 나아가서는 자연계에 존재하지 않는 새로운 단백질을 창출하고자 하는 연구를 말한다. 현재 단백질공학의 성공사례로 간주되는 효소의 활성 또는 안정성의 증가, 효소의 활성조건 개선 등과 같은 기능개선은 기존하는 단백질 구조에 조그마한 변화를 주어 가능하게 할 수 있지만 완전히 새로운 단백질의 창출은 아미노산서열로부터 3차구조를 정확히 예측하고, 다음 단계로 활성부위를 디자인 할 수 있어야 하겠다. 아미노산서열로부터 단백질 2차구조를 예측하는 것(1)은 지난 10년간 계속 발전하여 현재는 어느 정도의 신빙성을 지니고 있다. 따라서 몇몇 연구팀에서는 단백질 구조의 기본이 되는 α -helix 또는 β -sheet 몇 개를 조합하여 간단한 3차구조를 만들려는 시도가 있다(2). 예를 들어 미국 DuPont 회사의 DeGrado 박사팀은 16개 아미노산 잔기로 구성된 α -helix 네 개가 원통을 형성할 수 있도록 아미노산서열을 디자인하여 폴리펩티드를 유전공학적인 방법으로 생산하는데 성공하였다(3). 생산된 단백질은 수용액 상태에서 단합체로 존재하며 ΔG 값이 -22.5 kcal/mole 로서 상당히 안정한 형태이었다. 이와 같이 비교적

단순한 구조를 만드는 연구는 몇 개의 성공사례가 있으나, 보다 크고 복잡한 구조를 만드는 것은 정확한 3차구조의 예측을 필요로 하기 때문에 아직까지는 불가능하다.

1. 문제점

단백질의 3차구조를 유지하는 힘은 소수성결합을 포함한 van der Waals 인력, 수소결합 및 정전기인력 등이 복합적으로 작용하여 전체적인 안정화에너지는 불과 수 kcal/mole 밖에 안된다. 단백질의 일차구조인 폴리펩티드가 기능을 지닌 3차구조로 형성되는 것을 단백질폴딩이라 한다. 현재까지의 폴딩에 대한 연구는 *in vitro*에서 크기가 작은 단백질들을 대상으로 denaturant(또는 열, pH)에 의해 unfolding 되고 다시 folding 되는 기작을 연구한 것으로서 대부분의 경우 아미노산서열에는 3차구조를 형성할 수 있는 충분한 정보가 담겨있다고 판명되었으며, native 상태는 열역학적으로 가장 안정한 형태로서 폴딩이 spontaneous 하게 일어난다고 보고 있다. 하지만 짧은 시간내에 폴딩이 이루어지기 위해서는 일정한 pathway를 통해 폴딩이 진행될 것으로 가정하고 현재의 폴딩연구는 주로 intermediate를 탐지하고 그 구조결정에 의해 폴딩 pathway를 규명하는데 중점을 두고 있다(4). 최근 폴딩 intermediate에 대한 pulse-labeling 기술과 NMR 기술의 향상으로 이 분야에 급속한 발전이 이루어지고 있는 하지만(5, 6), 단백질 폴딩기작을 완전히 이해하기까지는 아직도 많은 연구가 필요하다.

세포 안에서 단백질이 폴딩되어가는 과정은 *in vitro* 폴딩과정과 비교해 근본적인 차이점이 있다.

In vitro 폴딩은 이미 세포 안에서 폴딩된 단백질을 분리 정제한 후 *unfolding* 시키고 이를 다시 폴딩하는(*refolding*)하는 것이지만 *in vivo* 폴딩은 리보솜에서 폴리펩티드가 생성되면서 또는 생성된 직후 3차구조를 형성하는 “vectorial folding”이다. 따라서 *in vivo* 폴딩에 대한 연구는 접근방법의 기술적 문제점 때문에 극히 제한되어 있다. 여기에서 *in vivo* 폴딩연구를 더 어렵게 하는 것은 최근에 밝혀지기 시작한 폴딩에 관여하는 단백질들의 존재이다. 그러한 단백질들로서는 protein disulfide isomerase(7), peptidyl-prolyl cis-trans isomerase(8), molecular chaperone(9, 10)이라 일컫는 단백질들이 있다. *In vivo* 폴딩 기작을 이해하기 위해서는 상기 단백질들의 기작을 이해하는 것 또한 중요할 것이다.

이와 같이 단백질 폴딩문제는 아직 해결되지 않은 상태이며, 비록 아미노산치환을 통해 단백질기능을 개선한 성공사례도 많이 보고되어 있기는 하지만 일반적으로 특정 아미노산치환에 따른 효과의 예측은 시행착오의 단계를 벗어나지 못하고 있다. 단지 여기서 한 가지 강조할 점은 그러한 실패한 결과들로부터 단백질의 특성에 대해 무엇인가 배울 수 있다는 것이 기존의 유전공학 기술분야와 다른 점이다. 이러한 관점에서 볼 때 단백질공학은 단지 “공학”적 의미를 갖을 뿐만 아니라 기초 단백질 연구분야에 기여하고 있다고 볼 수 있다.

2. 접근방법

2.1. 특정부위 변이유도법

단백질공학에 있어서 가장 중요한 문제는 어느 부위를 어떻게 변화시켜야 원하는 성질의 단백질로 전환시킬 수 있는가이다. 단백질의 3차구조와 활성부위 및 그 기작이 잘 알려져 있을 경우에는 특정 아미노산치환에 따른 결과를 보다 정확히 예측할 수 있으며 부위특이 변이유도법(oligonucleotide-directed mutagenesis)을 사용하여 원하는 성질의 단백질을 생산하는 것이 가능하다. 특히 어떠한 뚜렷한 가설이 있을 경우 이를 시험해 볼 때에 부위특이 변이유도법이 적합하다. 예를 들어 S-S 본드는 크기가 작은 단백질에서 많이 발

견되고 단백질을 안정화하는데 중요한 역할을 한다는 사실을 이용해 미국 Genetech 회사의 Wetzell 박사팀은 파지 T4의 lysozyme에 X-선 결정구조를 토대로 적당하다고 예측되는 부위에 S-S 본드를 넣어줌으로써 효소의 내열성을 증가시킬 수 있었다(11). 또한 프로테아제 subtilisin의 경우에는 기질결합부위의 바닥부분에 존재하는 166번 glycine을 전하를 띤 잔기로 바꾸어주어 반대전하를 띤 기질에 대한 촉매효과를 증진시킬 수 있었으며, 166번 위치에 소수성이 큰 잔기를 넣어 줌으로써 크기가 작고 소수성을 띤 기질에 대한 촉매효과를 증가시킬 수 있었다(12).

Subtilisin의 경우 활성잔기인 222번 serine 옆에 위치하는 221번 methionine은 쉽게 산화되어 효소의 활성을 떨어뜨리는데, 이 잔기는 X-ray 결정구조분석에 의하면 단백질 내부에 존재하여 다른 잔기들의 측쇄들로 싸여있지만 다른 화학적 실험결과에 의하면 용매와 접하고 있는 것으로 밝혀져 있기 때문에 이 잔기를 실제로 어떤 아미노산으로 치환해 주어야 활성을 유지하면서 산화에 대한 내성을 증가시킬 수 있을지 예측할 수 없었다. 이러한 경우에 흔히 쓰이는 방법으로는 그 부위를 다른 19개 아미노산으로 각각 다 치환해 보고 그 결과를 분석하는 방법(site-saturation)이 효과적이라 하겠다. 상기 실험의 결과는 기대했던 것과는 달리 자연형인 methionine과 유사한 leucine, valine, isoleucine 등이 최선의 것이 아니고 크기가 작은 alanine, serine, glycine, threonine 등이 오히려 더 효과적임을 알 수 있었다(13).

최근 Oregon 대학의 Matthews 박사팀은 어떤 아미노산잔기를 펩티드주쇄의 자유도가 낮은 proline으로 치환시키거나 또는 자유도가 높은 glycine을 다른 아미노산으로 치환시킴으로써 *unfolding entropy*를 감소시킬 수 있다는 열역학적 이론을 시험해 볼 수 있었다 T4 lysozyme 구조에서 활성에 영향을 안미치고 steric hindrance를 일으키지 않는 범위 내에서 82번의 alanine을 proline으로, 77번의 glycine을 alanine으로 치환시킨 결과 각각의 치환은 단백질의 안정도를 약 1 kcal/mole씩 증가시킴을 알 수 있었다(14).

상기 몇 가지의 예에서 볼 수 있듯이 정확한 3차

구조가 밝혀져 있는 단백질의 경우에, 또 무엇을 어떻게 치환해야 될지 뚜렷한 이론적 뒷받침이 있을 경우에는 특정부위치환에 의해 원하는 형태의 단백질을 생산할 수 있겠다. 하지만 문헌에 보고된 성공사례들의 이면에는 정확한 3차구조를 알고 있음에도 불구하고 불충분한 이론과 단백질폴딩과 문제점 때문에 실패한 예도 많으리라 예상된다.

2.2. 무작위 변이유도법

원하는 기능의 단백질을 얻기 위해서는 상기의 특정부위 변이유도법 외에도 무작위로 변이를 유도한 후 형질에 따라 선별하는 방법이 있다. 이 방법은 단백질의 3차구조가 안 밝혀졌거나 또는 구조가 알려져 있다 하더라도 어떤 부위에 변화를 주어야 할지 모를 때 효과적으로 사용된다. 즉, 대상 단백질의 유전자에 임의의 한 개 아미노산이 치환된 변이들을 많이 유도한 후 원하는 변이체를 선별하는 방법이다. 예를 들어 내열성이 증가된 T4 lysozyme 변이를 고전적인 변이스크린에 의해 얻을 수 있었다(15). 파지 T4를 hydroxylamine으로 처리하여 변이를 유도시킨 후 대장균에 감염시키고 한천배지에서 33°C로 6시간 배양시키고 자연형 및 내열성이 떨어진 변이효소들을 불활성화시키기 위해 55°C에서 한시간 동안 방치시켰다. 그 후 클로로폼 증기를 처리해 주면 잔재의 lysozyme 과 클로로폼이 함께 작용하여 주위 박테리아의 세포벽을 분해하여 halo를 형성하기 시작한다. 내열성이 증가된 변이 lysozyme을 만들어 낼 경우에는 halo의 크기가 자연형의 것보다 크게 되어 쉽게 구별될 수 있었다. 이와 같은 스크린방법은 배지위에서 활성측정이 가능한 프로티아제, 뉴클리아제, 아밀라제 및 반응결과 주위의 pH가 바뀌는 효소들에 대해 쉽게 적용될 수 있으며, 또한 항체를 사용할 경우에는 그 적용범위가 보다 광범위할 것이다. 비슷한 방법으로 Genex에서는 subtilisin의 클론된 유전자에 bisulfite를 처리하여 DNA 변이를 유도한 후 높은 온도에서도 에스테라제 활성을 유지하는 재조합 균주를 얻을 수 있었고(16), Genetech에서도 AMV polymerase를 사용하여 α -S-dNTP를 삽입시켜 변이를 유도한 후 내염기성이 증가된 변이 subtilisin을 생산하는 균주를 카제인배지에서 선별할 수 있었다

(17).

이외에도 호열성 숙주를 이용하는 것으로서 대상단백질의 유전자를 호열성 박테리아에 옮긴 후 고온에서 변이를 선별하는 방법이 있다. 오오사카 대학의 Matsumura 박사팀 및 Synergen에서는 항생제 카나마이신에 대한 내성의 원인인 kanamycin nucleotidyltransferase의 유전자를 *Bacillus stearothermophilus*에 클론시킨 후 높은 배양온도에서 카나마이신 존재하에 자랄 수 있는 자연발생변이 균주를 선별함으로써 내열성이 증가된 효소를 얻을 수 있었다(18, 19).

한편 기능이 개선된 변이를 직접 얻기가 힘들 경우 일단 기능이 떨어진 온도감수성변이 같은 것을 얻은 후 revertant를 유도하면 진정한 revertant 외에도 suppressor를 얻을 수 있다. 이들 suppressor를 본래의 변이로부터 독립시켰을 경우 때로는 기능이 자연형보다 증가되는 현상을 나타낸다. 이러한 방법으로 파지람다의 repressor 경우에 operator DNA와 결합능력이 증가된 변이들(Glu 34→Lys, Gly 48→Ser)을 얻을 수 있었는데(20), 상기의 결과는 미리 예측할 수 없었던 것으로서 특정부위 변이유도법에 의해서는 얻을 수 없었던 것이다. 또한 이러한 결과들은 단백질의 구조-기능 관계에서 예측하지 못했던 중요한 요인들을 규명하기도 한다.

3. 결 론

단백질의 아미노산서열에 변화를 줄려고 할 때 대상단백질의 3차구조에 대한 충분한 정보가 있고 시험해 보고자 하는 가설이 확실할 때에는 특정잔기를 다른 특정잔기로 치환시켜 효능을 전환시키는 것이 효과적이었고, 3차구조가 안 밝혀져 있거나 어떻게 치환해야 할지 모를 경우에는 무작위 변이유도법과 세포에 의한 형질선별법이 바람직하다 하겠다. 이러한 관점에서 볼 때 유전자 재조합기법을 통한 신물질창출을 성공적으로 수행하기 위해서는 유전자 조작기술과 단백질 분석기술은 물론 단백질생화학, 분자유전학, 미생물생리학 등에 대한 충분한 이해를 바탕으로 하여 여러 분야에서 협동적으로 연구되어야 하겠다.

참고문헌

1. P.Y. Chou and G.D. Fasman, *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 251-276 (1978).
2. J.V. Brunt, *Biotechnology* **4**, 277-283 (1986).
3. L. Regan and W.F. DeGrado, *Science* **241**, 976-978 (1988).
4. P.S. Kim and R.L. Baldwin, *Ann. Rev. Biochem.* **51**, 459-489 (1982).
5. J.B. Udgaonkar and R.L. Baldwin, *Nature* **335**, 694-699 (1988).
6. H. Roder, G. Elove and S.W. Englander, *Nature* **335**, 700-704 (1988).
7. N.J. Bulleid and R.B. Freedman, *Nature* **335**, 649-651 (1988).
8. K. Lang, F.X. Schmid and G. Fischer, *Nature* **329**, 268-270 (1987).
9. P. Goloubinoff, A.A. Gatenby and G.H. Lirimer, *Nature* **337**, 44-47 (1989).
10. M.Y. Cheng *et al.*, *Nature* **337**, 620-625 (1989).
11. L.J. Perry and R. Wetzel, *Science* **226**, 555-557 (1984).
12. D.A. Estell *et al.*, *Science* **233**, 659-663 (1986).
13. D.A. Estell, T.P. Graycar and J.A. Wells, *J. Biol. Chem.* **260**, 6518-6521 (1985).
14. B.W. Matthews, H. Nicholson and W.J. Becktel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 6663-6667 (1987).
15. T. Alber and J.A. Wozniak, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 747-750 (1985).
16. P.N. Bryan *et al.*, *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **1**, 326-334 (1986).
17. B.C. Cunningham and J.A. Wells, *Prot. Eng.* **1**, 319-325 (1987).
18. M. Matsumura and S. Aiba, *J. Biol. Chem.* **260**, 15298-15303 (1985).
19. H. Liao, T. McKenzie and R. Hageman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 576-580 (1986).
20. M.H. Hecht and R.T. Sauer, *J. Mol. Biol.* **186**, 53-63 (1985).