

## 재조합 대장균에서 외래단백질 발현을 위한 기술개발

<sup>1</sup>박 용 철 · 권 대 혁 · 이 대 희 · 서 진 호  
<sup>1</sup>서울대학교 협동과정 생물화학공학 전공, 서울대학교 식품공학과  
(접수 : 2001. 1. 12., 게재승인 : 2001. 2. 21.)

### Improved Technologies to Produce Heterologous Proteins in Recombinant *Escherichia coli*.

Yong-Cheol Park<sup>1</sup>, Dae-Hyuk Kweon, Dae-Hee Lee, and Jin-Ho Seo<sup>†</sup>

<sup>1</sup>Interdisciplinary Program for Biochemical Engineering and Biotechnology, Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received : 2001. 1. 12., Accepted : 2001. 2. 21.)

*Escherichia coli* has been used as an expression work horse for foreign genes. This article summarized recent development in genetic engineering techniques for overproduction of medical proteins and industrial enzymes. Special emphasis was placed upon research activities concerning folding and refolding of inclusion bodies at genetic and fermentation levels. Plasmid and mRNA stabilization, development of strong inducible promoters, modification of translational elements and reduction of proteolytic degradation were carried out to elevate an expression level of a target protein. Optimization of culture conditions, improvement of denaturation and renaturation steps and coexpression of molecular chaperones or foldase were accomplished to produce active proteins in soluble form. Fusion protein systems with selective separation and surface display technology were also performed in an effort to make the *E. coli* expression system more effective and versatile.

**Key Words :** *Escherichia coli*, expression, inclusion body, refolding chaperone, fusion protein

#### 서 론

의약품 단백질 또는 공업용 효소의 경제적인 생산을 위해 이들 단백질을 효과적으로 생산할 수 있는 숙주 또는 재조합 시스템의 선정은 생산성, 생산된 단백질의 활성 여부 및 이후 모든 공정에 영향을 미친다는 측면에서 매우 신중히 고려되어야 한다. 현재 주로 이용되고 있는 외래 단백질 생산 숙주로는 대장균을 비롯하여, 그람 양성 세균, 효모, 곰팡이, 곤충 세포 그리고 동물 세포 등이 있다. 이중 대장균을 이용한 외래유전자의 발현은 연구 또는 상업적인 목적에서 일차적으로 고려되는 가장 간단하고 경제적인 방법으로서, 재조합 유전자 조작법의 발전, 다양하게 개발된 강력한 프로모터, 전사(transcription) 및 번역(translation) 효율의 개선 등을 통해 더욱 효과적으로 이루어지게 되었으며 값싼 기질을 이용하여 대장균을 고농도로 빠르게 성장시킬 수 있는 장점을 가지고 있다(1-4).

그러나 당화(glycosylation), 인산화(phosphorylation) 등의 번역 후 수정(post-translational modification)이 없으며, 종종 대장균 내에 목적 단백질이 활성이 없는 응집체인 내포체(inclusion body) 형태로 축적되기도 하는 단점을 가지고 있다. 생성된 내포체의 활성 회복을 위해서 가용화(solubilization)와 재접힘(refolding) 과정을 거쳐야 하고 활성화 단계가 복잡하기 때문에 발효과정에서 내포체 생성을 억제하는 방향으로 유도하고 있으나, 재접힘 과정이 단순하고 효율이 좋은 경우에는 단백질의 분리가 간편하기 때문에 경제적으로 유리한 측면도 있다. 번역 후 수정이 필요없는 단백질의 경우 최근 들어 *in vivo* 및 *in vitro* folding 기술의 발전으로 말미암아 지금까지 활성 형태로 생산하기가 불가능하다고 여겨져 왔던 단백질들이 활성 단백질로 발현되거나 재접힘 공정을 통하여 활성이 회복되었다고 보고되고 있어 외래단백질 발현에 있어 대장균의 이용이 더욱 증대될 것으로 기대된다.

최근에 박테리아를 이용한 재조합 단백질의 생산에 있어 제기되는 많은 문제들을 대장균의 유전자 융합시스템을 이용하여 극복하고 있다(5). 이러한 시스템은 부착특이성을 가지는 펩타이드 또는 단백질의 활성을 결정하는 강력한 수단으로 이용된다. 유전자 융합기술은 새로운 융합파트너와 정제 기술 개발, 검출액(tag)과 분리 약품에 관한 연구, 박테리아의

<sup>†</sup>Corresponding Author : Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea  
Tel : +82-31-290-2583, Fax : +82-31-293-4789  
E-mail : jhseo94@snu.ac.kr

**Table 1.** Programmed cell death in *E. coli*: selected approaches to enhance plasmid stability(1).

Genetic tool	Principle of action
<i>hoh/sok</i> ( <i>parB</i> ) locus of plasmid R1	Hok is a 52 amino acid-long membrane-damaging protein encoded on a very stable but translationally inactive transcript. Sok is a highly unstable antisense RNA that binds to the <i>hok</i> mRNA leader region. Rapid decay of the Sok pool in plasmid-free cells leads to the processing of the end of <i>hok</i> to yield an active transcript. Related system: <i>pndAB</i> of plasmid R483.
<i>ccdAB</i> locus of plasmid F	CcdB is a proteolytically stable 11 kDa protein that inhibits DNA gyrase. CcdA is a 9 kDa protein that binds to CcdB and blocks its action. Because the half-life of CcdA is much shorter than that of CcdB, plasmid-free segregants are killed upon degradation of the 'antidote'. Related systems: <i>parDE</i> of plasmids RP4/RK2, <i>phd/doc</i> of plasmid P1, <i>parD/pem</i> of plasmids R1/R100.
Complementation	An essential chromosomal gene is deleted or mutated and an intact copy or a suppressor is supplied in <i>trans</i> on a plasmid. Plasmid loss leads to cell death under non-permissive growth conditions. Examples of chromosomal alterations include deletions of genes necessary for the synthesis of essential amino acids, and thermosensitive and nonsense mutations in essential chromosomal genes.

표면을 이용한 펩타이드의 발현 등 여러 분야로 연구되어지고 있다.

본 논문에서는 대장균을 이용한 단백질 생산 시 그 동안 문제점으로 지적되어 왔던 내포체 형성의 해결을 비롯하여 그간 개발되어진 기술적인 진보에 대해서 개략적으로 살펴보고자 한다. 여기에는 분자생물학적인 수준의 발전, 발효공학적인 방법(2), 샤페론 및 접힘 촉진 효소의 동시 발현(6-7), 융합단백질(5) 등이 포함된다.

### 생산성 향상을 위한 분자 생물학적, 발효 공학적 접근

#### 플라스미드의 안정성

세포 내 목적 유전자의 농도를 높게 유지하기 위해서 적게는 10에서 많게는 수 백 복제수(copy number)에 이르는 플라스미드를 이용한다. 그러나 선택 압력(selective pressure)이 없는 상태에서 한 세대 당 약  $10^{-5}$  에서  $10^{-6}$  의 빈도로 플라스미드를 함유하지 않은 세포가 생성되는데, 이는 주로 플라스미드의 다중화(multimerization)에 기인하는 것으로 알려져 있다(8). 플라스미드의 안정적인 유지를 위해서 선택 압력을 첨가하는 방법이 일반적으로 사용되고 있으나 쉽게 분해되거나 최종 산물에 잔존할 우려가 있다는 단점으로 인해서 플라스미드 소실 시 세포가 스스로 죽게하거나(Table 1), 목적 유전자를 염색체 상에 삽입하는 방법도 사용된다.

#### 전사

외래 단백질의 발현 수준은 프로모터에 의해 크게 좌우된다. 프로모터는 목적 단백질을 총 세포 단백질의 10~30% 정도 이상으로 발현할 수 있을 만큼 강력해야 하며, 발현이 유도되지 않은 상태에서는 최소한으로 억제되어야 한다. 또한 프로모터는 간편하고 경제적인 방법으로 유도될 수 있는 것이 좋다. 대장균에서 높은 발현 효율을 보이는 프로모터들을 Table 2에서 보았다(9). 특히 Novagen사에 의해 상용화된 T7 프로모터를 이용한 발현 시스템인 pET 벡터 시스템이 널리 사용되는데 이 시스템은 많은 양의 mRNA를 만들어내며 대부분의 경우 목적 단백질이 매우 높은 농도(총 단백질량의 40~50%)로 발현한다. Park 등(10)은 *Bacillus macerans* 유래의 cyclodextrin glucanotransferase (CGTase)를 T7프로모터 시

스템을 이용하여 대량발현하였는데 고가의 IPTG를 유당으로 대체한 유가식 배양으로 효소역가를 31배 증가시켰다. 이와 같은 시스템은 phytic acid를 가수분해하는 phytase(11), human growth hormone(12), chicken muscle Troponin C(13), *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A(14) 등 다양한 외래단백질 생산에 이용되었다. 최근에 L-arabinose 대사과정에 연관된 프로모터를 도입한 시스템이 Invitrogen사에 의해 상용화되었는데 L-arabinose의 첨가로 *araBAD* 프로모터에 의한 전사가 조절된다. 다른 induction 프로모터에 비해 고농도배양에 유리하고 값싼 탄소원을 inducer로 사용할 수 있다. 하지만 세포마다 L-arabinose uptake rate이 달라 정확한 발현조절을 하기 힘든 단점이 있다. Lim 등(15)은 이러한 *P<sub>araBAD</sub>* 시스템을 이용하여 유가식 배양으로 interferon-를 대량 생산하였는데 다른 induction 프로모터에 비해 낮은 속도로 외래단백질이 발현되어 외래유전자 발현에 의한 metabolic burden을 줄여 세포생장을 증진시킬 수 있었다고 보고하였다.

프로모터의 앞쪽(upstream)에 전사종결자(transcription terminators)를 위치시키면 목적 유전자가 유도되지 않은 상태에서 전사되는 것을 방지할 수 있다. 강력한 프로모터에 의한 전사가 복제에 관여하는 부분까지 진행될 경우 플라스미드 안정성을 저해할 수 있으며, 전사종결자가 mRNA의 안정성을 증가시켜 단백질 발현 수준을 향상시킨다는 보고도 있다. 대장균의 mRNA는 그 반감기가 30초에서 20분 정도로 매우 불안정한데, 대장균 *ompA* mRNA의 5' UTR 중의 특이 부위를 다양한 이종 단백질에 융합시킨 경우 mRNA 안정성이 상당히 증가하였다는 보고가 있다(16). 이는 5' 헤어핀(hairpin) 구조에 기인한 것으로 여겨지며, 한편 3'-UTR 유래의 스템루프(stem-loop)를 형성하는 서열 또한 mRNA 안정성에 기여하는 것으로 보고되었으나 아직까지 모든 mRNA에 적용될 수 있는 '일반적인 안정화 서열'은 밝혀지지 않고 있다.

#### 번역

번역의 효율을 결정하는 가장 중요한 요인 중의 하나는 mRNA의 5' 쪽의 구조로 여겨지고 있는데, 이 부위의 2차 구조의 형성을 억제하기 위해 리보솜 결합 부위(ribosome binding site, RBS)의 아데닌(A)과 티민(T)의 함유율을 높이거나 Shine-Dalgarno(SD) 서열을 consensus 서열과 유사하게 만

**Table 2.** Promoters used for the high-level expression of genes in *E. coli*(9).

Promoter (source)	Regulation	Induction
<i>lac</i> ( <i>Escherichia coli</i> )	<i>lacI</i> , <i>lacI</i> <sup>a</sup>	IPTG <sup>a</sup>
	<i>lacI</i> ts <sup>b</sup> , <i>lacI</i> <sup>Q</sup> ts <sup>b</sup>	Thermal
	<i>lacI</i> ts <sup>c</sup>	Thermal
<i>trp</i>		Tryptophan starvation, indole acrylic acid
<i>lpp</i>		IPTG, lactose <sup>d</sup>
<i>phoA</i>	<i>phoB</i> (positive) <i>phoR</i> (negative)	Phosphate starvation
<i>recA</i>	<i>LexA</i>	Nalidixic acid
<i>araBAD</i>	<i>AraC</i>	L-Arabinose
<i>proU</i>		Osmolarity
<i>cst-I</i>		Glucose starvation
<i>tetA</i>		Tetracycline
<i>cadA</i>	<i>CadR</i>	pH
<i>nar</i>	<i>fnr</i>	Anaerobic conditions, nitrate ions
<i>tac</i> (hybrid)	<i>lacI</i> , <i>lacI</i> <sup>Q</sup>	IPTG
	<i>lacI</i> <sup>e</sup>	Thermal
<i>trc</i> (hybrid)	<i>lacI</i> , <i>lacI</i> <sup>Q</sup>	IPTG
	<i>lacI</i> ts <sup>b</sup> , <i>lacI</i> <sup>Q</sup> ts	Thermal
<i>lpp-lac</i> (hybrid)	<i>lacI</i>	IPTG
P <sub>syn</sub> (synthetic)	<i>lacI</i> , <i>lacI</i> <sup>Q</sup>	IPTG
P <sub>LtetO-1</sub>		Anhydrotetracycline
P <sub>lacara-1</sub>		IPTG, arabinose
Starvation promoters		
P <sub>L</sub> (bacteriophage $\lambda$ )	<i>lacts857</i>	Thermal
P <sub>L</sub> -9G-50 (mutant) ( $\lambda$ )		Reduced temperature (<20°C)
<i>cspA</i>		Reduced temperature (<20°C)
P <sub>R</sub> , P <sub>L</sub> (tandem) ( $\lambda$ )	<i>lacts857</i>	Thermal
T7 (T7)	Cascaded system <sup>f</sup>	IPTG
T7-lac operator (T7)	<i>lacI</i> <sup>Q</sup>	IPTG
$\lambda$ P <sub>L</sub> , P <sub>T7</sub> (tandem) ( $\lambda$ , T7)	<i>lacts857</i> , <i>lacI</i> <sup>Q</sup>	Thermal, IPTG
T3-lac operator (T3) $\lambda$	<i>lacI</i> <sup>Q</sup>	IPTG
T5-lac operator (T5)	<i>lacI</i> <sup>Q</sup> , <i>lacI</i>	IPTG
T4 gene 32 (T4)		T4 infection
<i>nprM-lac</i> operator ( <i>Bacillus</i> )	<i>lacI</i> <sup>Q</sup>	IPTG
VHb ( <i>Vitreoscilla</i> )		Oxygen, cAMP-CAP <sup>g</sup>
Protein A ( <i>Staphylococcus aureus</i> )		

<sup>a</sup> Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside.

<sup>b</sup> *lacI* gene with single mutation, Gly187Ser.

<sup>c</sup> *lacI* gene with three mutations, Ala241Thr, Gly265Asp, Ser300Asn.

<sup>d</sup> The constitutive *lpp* promoter (P<sub>lpp</sub>) was converted into an inducible promoter by insertion of the *lacUV5* promoter/operator region downstream of the P<sub>lpp</sub>. Thus, expression occurs only in the presence of a *lac* inducer.

<sup>e</sup> Wild-type *lacI* gene.

<sup>f</sup> Expression of T7 RNA polymerase is controlled by the *lacUV5* promoter, which is regulated by the *lac* repressor. Production of T7 RNA polymerase causes transcription of the recombinant gene which is under the control of the f10 promoter.

<sup>g</sup> Cyclic-AMP-catabolite-activator protein.

드는 방안이 고안되었다. 한편 SD 서열과 번역개시코돈 (transcriptional initiation codon) 사이의 거리는 8 뉴클레오타이드(nt) 정도가 적당하다고 알려져 있는데, 4 nt 보다 가깝거나 14 nt 보다 멀면 번역의 개시가 심각하게 저해받는다(17).

개시 코돈 이후에 번역촉진서열(translational enhancers)를 추가하는 것도 번역의 효율을 높일 수 있는 좋은 방법인데, 이 서열은 16S rRNA의 1469-1483 부위의 상보적 염기서열과 같은데, 5'-AUGAAUCACAAAGUG-3'와 같다. 그러나 이 또

한 모든 단백질에 적용할 수 있는 것은 아니며 최종 단백질의 아미노산에 부가적으로 삽입되어 버리는 단점이 있다. 대장균의 번역종결자(translational terminators)로서 정지 코돈은 UAA가 가장 효율적이라고 알려져 있으며, UAAU의 서열일 때 가장 효과적이라고 알려져 있다(18). 원핵생물과 진핵생물 사이에는 코돈의 사용법이 다르다. 예로, 아르기닌을 코딩하는 코돈 AGA와 AGG는 거의 대장균에서 발견되지 않는데 반해 효모 등의 진핵생물에서는 흔히 사용된다. 따라서 이러한 코돈의 존재는 일치하는 tRNA의 희소성을 의미하며 최종 단백질의 발현 수준에 큰 영향을 미친다.

### 단백질 분해

발현된 단백질 분해는 단백질 접힘과 밀접한 관련이 있는데, 이는 제대로 3차 구조를 갖추지 못한 단백질 또는 손상된 단백질을 분해하여 아미노산으로 전환함으로써 세포 내 조성물의 효율적인 사용을 가능하게 한다. 대장균의 세포질 내에서는 ATP를 이용하는 5 종류의 Hsps(heat shock proteins)에 의해서 초기 단백질 분해과정이 수행되며, 이의 방식을 위해서 단백질 분해 효소 유전자 변이주를 사용하는 방법, 생산된 단백질을 periplasm으로 분비시키는 방법, 저온에서 단백질 생산을 유도하는 방법, 단백질의 N- 또는 C-말단에 다른 단백질을 융합시키는 방법, 유전자를 반복적으로 융합시키는 방법, 샤페론 또는 T4 pin 유전자를 동시발현시키는 방법, 단백질 분해효소의 인식부위를 다른 아미노산으로 치환하는 방법, 목적 단백질의 소수성을 바꾸는 방법, 발효 조건을 최적화하는 방법 등이 사용될 수 있다. 단백질을 내포체 형태로 발현시켜 재접힘으로 활성을 회복하는 방법도 단백질 분해의 문제를 해결할 수 있는 좋은 방법이지만 OmpT 같은 단백질은 내포체의 표면에 흡착되어 있다가 정제 공정 중에서 목적 단백질을 분해하는 경우도 있으므로 이를 충분히 고려하여야 한다.

### 제조합 대장균에서의 활성형 단백질의 생산

#### 단백질의 발현 위치 및 배양 환경 조절을 통한 단백질의 세포 내 접힘

세포질(cytoplasm)에 단백질을 발현시키면 종종 내포체가 만들어진다. 세포질 내에 내포체 형태로 단백질을 발현시키는 것은 효율적인 정제를 가능하게 한다는 것 외에도, 단백질 분해 효소의 공격을 받지 않고, 목적 단백질이 세포에 유해한 것일 경우에도 세포가 손상되지 않고, 대개는 단백질 발현양이 매우 높고, 발현 벡터의 제조가 용이하다는 장점이 있다. 반면에, 다량의 내포체를 성공적으로 *in vitro* 재접힘 공정을 통하여 활성을 회복할 수 있을 지에 대해서는 보장이 없으며, 재접힘 공정은 대체로 수율이 낮고, 공정의 부피가 매우 크며, 많은 시간과 노동력을 요구하여 생산 비용이 매우 높아지는 문제가 있다. 또한 세포질 내에서 가용성 단백질로 발현되는 경우에도 이황결합(disulfide bond)이 일어나지 않으며, 단백질의 아미노말단의 분비신호가 잘리지 않아 메티오닌이 그대로 남아있고, 단백질 분해효소에 의해 많은 공격을 받는다는 문제가 있다.

페리플라즘(periplasm)에 발현 단백질을 분비시키면, 정제가

단순해지며, 단백질 분해 효소에 의한 분해가 세포질에 비해서 낮아지며, 상대적으로 산화적인 환경에 의해 이황결합 등이 어느 정도 가능해지며, 아미노말단의 분비신호가 절단되어 원본(authentic) 단백질을 얻을 수 있다는 장점이 있으나, 분비신호가 여러 단백질에 항상 잘 적용되는 것은 아니며 분비된 단백질 또한 서로 응집되어 내포체로 만들어 질 수도 있다. 페리플라즘에서 이황결합의 형성은 다음 장에서 좀더 자세히 설명하고자 한다.

한편, 배지 중으로 단백질을 분비시키면 단백질의 접힘 문제를 해결할 수 있는 좋은 방법 중의 하나이지만, 대체로 대장균에서는 배지 중으로 단백질이 거의 배출되지 않으며 또한 배출되었다고 하더라도 단백질이 많이 희석되어 오히려 정제를 어렵게 할 수도 있다.

발효공정의 조건을 조절하는 것도 가용성 단백질을 증가시키는 방법으로 자주 사용되며(Table 3) 많은 경우 가장 경제적인 방법이기도 하다. 모든 단백질에 적용되는 것은 아니지만 일반적으로 배양온도를 감소시켜 단백질 응집체의 생성을 억제하는 방법이 주로 사용되는데(19-20), 이는 단백질의 생성 속도를 단백질의 접힘 속도 이하로 늦추어 상호 응집성이 강한 접힘 중간체의 축적이 일어나지 않게 하기 때문에 매우 많은 경우 매우 효과적인 방법이다. 배지에 여러 가지 성분을 첨가시켜 내포체의 형성을 억제하기도 하였다. 대장균이 대사할 수 없는 탄소원인 설탕과 라피노스(raffinose) 등을 첨가하여  $\beta$ -lactamase의 내포체의 형성을 획기적으로 줄일 수 있었는데 이는 비대사 탄소원이 단백질 전구체간의 결합을 억제시키는 효과를 가져왔기 때문이라고 밝혔다(21). Glycine betaine, sodium chloride, calcium chloride, ethanol 등도 각각 추정되는 기작은 다르지만, 효과가 있는 것으로 보고되었다. 또한 배지 중에 요오드를 첨가한 경우에 수용성 단백질의 생성이 4배 증가되었다는 보고가 있다(22). 많은 종류의 단백질 발현 시 heme이나 flavins와 같은 prosthetic groups을 필요로 하기도 하는데, human cystathionine  $\beta$ -synthase의 경우 heme 전구체인  $\delta$ -aminolevulinic acid( $\delta$ -ALA)를 배지 중에 첨가함으로써 활성단백질이 8 배가 증가하였다는 보고가 있으며(23), 본 연구실에서는 전분분해효소에 일반적으로 prosthetic group으로 필요한 칼슘이온을 첨가함으로써 cyclodextrin glycosyltransferase(CGase)의 *in vivo* 접힘 효율을 높인 바 있기도 하다(24) 그러나 이와 같은 발효공정을 이용한 내포체 생성 억제공정은 속도론적인 장벽을 가진 단백질 즉, 이황결합, peptidyl-prolyl 이성화, subunit 간의 구조 형성 등이 필요한 단백질의 경우에는 거의 적용될 수 없다는 단점이 있다.

#### 샤페론 및 단백질 접힘 효소의 동시 발현을 통한 단백질의 세포 내 접힘

샤페론(molecular chaperone)은 단백질이 원하는 3차 구조를 가질 수 있도록 도와주며, 불필요한 분자간 또는 분자내 상호작용을 방지하는 역할을 담당하는 보조 단백질을 말한다. 접힘 중간체를 보호하여 단백질간 응집 및 침전을 방지하는 역할을 하는데, 대장균에서는 GroEL, GroES, DnaK, HtpG, SecB, PapD 등이 있으며, PapD(세포막 막에 존재)를 제외하고는 모두 세포질에 존재한다(25-26) 접힘촉진효소(foldase)는 접힘(folding)단계에 있어 율속단계인 공유결합 또

**Table 3.** Pragmatic approaches to the alteration of protein solubility(4)

Approach	Target Protein	Result
Reduced temperature	Human interferon- $\alpha$ 2 Human interferon- $\gamma$	Protein accumulated in inclusion bodies at 37°C, but at 23~30°C, 30-39% accumulated in soluble form.
Addition of non-metabolizable sugars	$\beta$ -Galactosidase	Formation of inclusion bodies reduced by presence of non-metabolizable sugars such as sucrose and raffinose
Alternative strains	$\beta$ -Lactamase Polio virus 3C protease HIB GAG-9	Solubility of expressed proteins varied in 11 strains tested
Altered pH	Salmon growth hormone	Inclusion body formation increased at higher culture pH
Osmotic stress /glycine betaine	<i>Agrobacterium</i> dimethylallyl pyrophosphate : 5'-AMP transferase	Modest increase in enzyme activity following growth of cells in presence of glycine betaine plus sorbitol. Large increase in activity and corresponding decrease in inclusion-body formation when fermentation temperature also decreased to 25°C
Amino acid substitution in protein	P22 tailspike protein	<i>tsf</i> alleles are temperature sensitive for folding and form inactive aggregates at the non-permissive temperature. Other mutations increase the proportion of soluble : insoluble portion.
Use of rich media	T4-phage deoxycytidylate deaminase	Enzyme accumulated to 20% total microbial protein in soluble, active form in rich media, but in inclusion bodies in minimal media.
Killing of cells with non-polar solvents	Human growth hormone	Treatment of cells with phenol or toluene before disruption increased recovery of protein from inclusion bodies.
Fusion proteins	Several human cytokines	Expression of thioredoxin fusion at low temperature achieved high-level accumulation of soluble protein.

는 이성화 단계를 용이하게 하는 역할을 하는 보조 단백질군을 말한다. 단백질의 이황결합 형성을 촉진하는 DsbA(세포막에 위치)와 환원된 DsbA를 재산화 시켜주는 DsbB, 이황결합의 이성화를 수행하는 DsbC와 DsbD 등이 있다. 또한 프로린(proline)은 구조적 특성상 *cis* 형과 *trans* 형을 둘다 가질 수 있는데, 이들간의 이성화를 촉진시켜 주는 peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase(PPIase)가 있다(27-28).

1989년 Goloubinoff 등(29)은 최초로 대장균에서 GroEL과 GroES의 동시발현(co-expression)에 의해 *Rhodospirillum rubrum* ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase(Rubisco)의 이중구조와 16개의 subunit으로 이루어진 *Aspergillus nidulans* Rubisco와 같은 외래단백질의 접합을 성공적으로 수행한 바 있으며, 이후 단백질의 접합 현상에 대한 체계적인 연구결과(30)로 사페론이나 접합촉진효소와 동시 발현시켜 내포체 형성을 감소시키려는 연구가 많이 시도되었다(Table 4). 팔복합만한 성과로는 최근 연구에서 DsbC의 동시발현으로 제조한 대장균에서 human tissue plasminogen activator(tPA), bacterial alkaline phosphatase, mouse urokinase 등과 같은 disulfide 결합이 많은 단백질을 생산한 연구결과가 보고되었다(31). 이 실험에서 그들은 대장균의 세포질을 산화적인 환경으로 바꾸면이주를 사용함으로써 이황결합이 일어나기 좋은 환경을 만들고, 이황결합의 이성화를 촉진하는 DsbC를 과발현시킴으로써 지금까지 불가능하게 여겨져 왔던 tPA의 *in vivo* 발현을 가능하게 하였다. 이들의 보고에서 한가지 흥미로운 점은 대장균의 대표적인 환원제인 thioredoxin이 작동 못하게 함으로써 세포질이 환원적인 환경에서 산화적인 환경으로 바뀌었음에도 불구하고 대장균이 생육할 수 있었다는 점이다. 현재 이러한 *in vivo* 접합 기술의 발전은 현재까지 매우 어렵게 여겨지고 있는 이황결합이 여러 개 존재하는 단백질의 directed

evolution을 가능하게 해 줄 것으로 여겨지며, 또한 bacterial surface display 기술에 적용되어 high throughput screening system의 발전 및 다양한 응용이 가능할 것으로 기대된다.

사페론의 동시발현은 세포가 필라멘트 형 또는 예상치 못한 표현형(phenotype)을 보이기도 한다(32). 사페론 또는 접합촉진효소 등의 대량동시발현은 세포에 큰 부담으로 작용할 수 있으므로 이들의 발현수준을 최적화하여 하며, 현재까지 고농도 세포 배양에서도 이러한 기술들이 잘 적용될 수 있는 지에 대한 연구는 보고되어 있지 않다.

#### 융합단백질(fusion protein)

단백질 융합 기술은 발현하고자 하는 외래유전자의 C-말단이나 N-말단에 여러 가지 특정 기능을 가진 펩타이드 또는 단백질의 유전자를 결합하여 생리활성이 유지되는 외래단백질을 생산하는데 용이하도록 할 뿐만 아니라 downstream 공정을 단순화시킬 수 있고 여러 가지 새로운 기능을 부여할 수 있는 수단이다. 원하는 단백질을 다른 단백질과 결합시켜 융합 단백질 형태로 생산하는 것은 몇 가지 장점을 지닌다. 분리, 정제 공정의 효율을 증진시킬 수 있고 정확하게 정량할 수 있는 생물적 기능을 제공하여 준다(33). 또한 내포체 생성의 억제, 접합(folding) 특성의 개선, 가수분해 억제와 단백질 정제단계의 단순화 등이 있다. 융합시스템을 이용하여 최근에 세포표면 발현을 위한 시스템이 개발되고 있고 발효 공정을 모니터링할 수 있는 단백질 지시제에 대한 연구도 진행되고 있다.

널리 쓰이는 단백질 융합체로는 staphylococcal protein A, streptococcal protein G, *Schistosoma japonicum* glutathione-S-transferase, maltose-binding protein, thioredoxin, DsbA와 ubiquitin 등이 있다. 또한 FLAG, His<sub>6</sub>와 c-Myc 등의 펩타이드

**Table 4.** Enhancing soluble protein production by co-expression of chaperones or foldases (7).

Chaperone/ foldase	Protein product	Chaperone/ foldase co-expression mode	Results
GroES/EL	p50csk	GroES/EL genes are expressed from an artificial operon on a compatible plasmid	No soluble protein is observed in the absence of GroES/EL co-expression; > 50% of p50cskis soluble following GroES/EL overexpression
	Rat neuronal nitric oxide	GroES/EL genes are expressed under the control of both native and lac promoters on pGroESL (a pBR322 compatible plasmid with a p15A origin)	Synthase 20-24 mg/L, 1 of active enzyme containing protoporphyrin IX, FAD, FMN and tetrahydrobiopterin prosthetic groups is expressed. Essentially no soluble enzyme is observed in the absence of the GroESL plasmid
	Rubisco	GroES/EL expression from pGroEL, as above	Increased production of assembled and active Rubisco proteins from various species is observed. Soluble <i>A. nidulans</i> Rubisco is produced at a level up to 6% of the total cell protein. Heat shock is found to improve the production of soluble protein
	Ferredoxin NADP-oxido-reductase	GroES/EL operon from <i>Chromatium vinosum</i> cloned on a low-copy number compatible plasmid (pACYC184 derivative)	In a GroE-conditional mutant <i>E. coli</i> strain, enzyme assembly is partially impaired at 30°C. Accumulation of inclusion bodies is observed at 42°C. Expression of heterologous bacterial GroES/EL restores protein solubility in mutants and results in a twofold increase in enzyme levels in wild-type cells
	Catalytic subunit of bovine pyruvate dehydrogenase phosphatase	GroES/EL expression from pGroESL	A combination of lower rates of protein synthesis, growth at 30°C and co-expression of GroES/EL results in active pyruvate dehydrogenase phosphatase at a level ~ 23% of soluble protein
Plant Cpn60	Cyanobacterial Rubisco or plant Rubisco	<i>B. napus</i> cpn60 and cpn60 genes expression with <i>E. coli</i> GroES from co-transformed pKK plasmid	Expression of Cpn60 results in enhanced (twofold to fourfold) cyanobacterial Rubisco. Co-expression of Cpn60 and Cpn60 blocks assembly (a 50-fold decrease compared with Cpn60 alone), an effect that is reversed by GroES overexpression. For the plant Rubisco chaperone, co-expression increases the amount of soluble protein, but does not enhance the extent of correct assembly or enzymatic activity
GroES/EL and/or DnaK/J	All cellular proteins	Not applicable	Enhanced aggregation of cellular proteins is observed in <i>E. coli</i> rpoH-mutants exhibiting lower expression of heat-shock proteins. Protein aggregation can be inhibited by overexpression of either GroES/EL or DnaK/J
	Human procollagenase	GroES/EL operon transcribed from a tac promoter on a pACYC plasmid; DnaK gene transcribed from its own promoter also on a pACYC plasmid	A 10-fold increase in soluble procollagenase accumulation is obtained by overexpression of either GroES/EL or DnaK. DnaK, but not GroES/EL, causes a partial block in the secretion of a procollagenase fusion to a bacterial leader peptide
	Protein tyrosine kinases	GroES/EL and DnaK/J expressed from an IPTG-inducible promoter on a compatible plasmid (pREP4 derivative)	Overproduction of the GroES/EL and DnaK/J chaperone systems is shown to increase the solubility of Csk, Fyn and Lck in <i>E. coli</i>
DnaK	Human growth hormone	DnaK expressed from its own promoter on a pACYC plasmid	Co-expression of DnaK inhibits human growth hormone inclusion body formation and increases the amount of soluble product from 5% to > 85%
DsbA	$\alpha$ -amylase/ trypsin inhibitor	DsbA is expressed from a dicistronic operon transcribed from a lac promoter	Although expression of equimolar amounts of DsbA does not improve the synthesis of the inhibitor, a 14-fold increase in the amount of soluble protein is reported in cells grown with 5 mM glutathione
Human PDI	Pectate lyase C	PDI is expressed with an OmpA leader peptide and is transcribed from a trp promoter	Pectate lyase C activity in wild-type <i>E. coli</i> is increased up to fivefold by co-expression of optimal levels of PDI
Human PDI	BPTI	PDI is expressed with an OmpA leader peptide from a tac promoter	A sixfold to sevenfold increase is obtained in the amount of correctly folded BPTI. A > 15-fold increase in the level of correctly folded protein in cells grown with reduced glutathione is observed. Activity of PDI is dependent on DsbB
DsbA and RpoH	T-cell receptor	Overexpression of $\alpha^{32}$ (RpoH) and DsbA on the same plasmid as the T-cell receptor	Overexpression of both DsbA and 32 at low temperature is necessary for the formation of soluble single-chain T-cell receptor in the periplasm of <i>E. coli</i>

**Table 5.** Fusion tags for use in protein purification and detection(5)

Peptide tag	Ligand	Utility	References
Polyhistidine	Nickel ions	Purifications	34
FLAG peptide	Anti-FLAG antibody	Purifications/detection	35
Strep-tag	Streptavidin	Purifications/detection	36
<i>In vivo</i> biotinylated peptide	Avidin/streptavidin	Purifications/detection	37
Polyaspartic acid	Anionic resins	Purifications	38
Polyarginine	Cationic resins	Purifications	39
Polyphenylalanine	HIC resins	Purifications	40
Polycysteine	Thiols	Purifications	41
Heart muscle kinase site	None	<i>In vitro</i> phosphorylations	42
Calmodulin-binding peptides	Calmodulin	Purifications/detection	43
Green fluorescent protein	None	Detection	44

HIC, hydrophobic interaction chromatography.

드와 같은 친화성꼬리(affinity tag)를 이용하여 단백질 발현의 확인과 정제를 쉽게 하기도 한다. 단백질 융합체 시스템 중 정제 및 검출용으로 이용되는 융합체의 종류와 사용을 Table 5에 나타내었다. 본 연구실에서는 연속된 양이온성 아미노산을 융합 파트너로 하여 한단계의 이온교환수지만으로도 목적 단백질을 단일하게 정제할 수 있었는데, 이는 모든 대장균 세포 단백질이 제거될 수 있는 이온교환강도를 프로테오믹스 분석과 실험을 통하여 살펴본 다음, 목적 단백질에 그 이상의 흡착강도를 지닐 수 있는 적정 종류와 길이의 양이온성 아미노산을 고찰하여 부착함으로써 이루어졌다(unpublished data).

재조합 단백질의 용해도를 높여서 내포체 형성을 억제하기 위해서 사용되는 융합체로 주로 thioredoxin이 사용되고 있는데, cytokines를 비롯한 다양한 단백질의 용해도를 높였다고 보고되었으며(44-46), glutathione S-transferase와 *Staphylococcus aureus* protein A(47)도 효과적인 것으로 알려져 있다. 그러나 융합파트너로 대장균의 maltose-binding protein(MBP)과 thioredoxin(trx)를 이용하여 대장균에서 procathepsin D-MBP와 procathepsin D-trx를 발현할 경우 융합단백질이 내포체 형태로 발현되었는데, 융합단백질을 재접힘 시킬 경우 융합시키지 않은 경우보다 수율이 상당히 높았고 MBP 융합의 경우 효과가 더욱 좋았다(48). 세균성 lamda head protein D와 His-tagged 유도체를 융합한 시스템을 이용하여 재조합 단백질을 생산한 경우 수용성의 단백질을 대량생산하였다(49)

#### 세포표면발현기술(surface display technology)

세포막에 부착된 형태로 세포외부로 외래 단백질을 발현시키는 세포표면 발현기술은 미생물학, 분자생물학, 바이러스학과 생물공학의 기초, 응용기술 연구에 중요한 수단으로 자리매김하고 있는데 필라멘트형의 phage를 이용한 표면발현기술이 가장 널리 이용되지만 다양한 세포를 이용한 발현기술이 개발되고 있다(50). 대장균의 외부세포막 단백질인 LamB, OmpA, PhoE 등에 짧은 유전자 조각을 접합(fusion)시켜 발현시킨 결과가 10년 전에 발표된 이후로 외래단백질을 박테리아의 세포표면에 발현시키는 연구는 점차 중요한 분야로 대두되고 있다(51-54). 그람 음성의 박테리아 외부 표면에 재조합 단백질을 발현하는 기술은 생 박테리아 백신(live-bacterial

vaccine), 전 세포 흡착물(whole-cell absorbent), 전 세포 촉매제(whole-cell catalyst)의 생산과 펩타이드, 항체 라이브러리의 표현과 선택 등 새로운 분야로 생물공학을 적용할 수 있는 수단이 되고있다(55). 대장균을 숙주세포로 한 세포표면 발현 기술의 예를 Table 6에 정리하였다. 대부분의 외래유전자는 외부세포막 단백질인 maltoporin LamB, phosphate-inducible porin PhoE, OmpA 등이나 지질단백질인 Lpp, TraT lipoprotein과 펩티도그라이칸(peptidoglycan)에 연결된 지질단백질(PAL)의 유전자와 접합(fusion)되어 발현된다. 또한 필라멘트와 같은 구조를 가진 단백질도 접합물질로 이용되는데 fimbria 단백질, flagellar 단백질인 flagellin과 pili 단백질 등이 있다.

접합기술을 이용한 외래단백질의 세포표면 발현기술을 통해 최근 'live-bacterial vaccine delivery' 시스템에 대한 연구가 진행되고 있고 살아있는 재조합 세포를 면역체계에 있어 항온-항체 반응의 항온으로 사용할 수 있다는 장점을 지니고 있다(53,57). 또한 'whole-cell monoclonal antibodies'에 대한 연구가 진행되어 진단과정에 사용되는 monoclonal 항체를 값싸게 생산할 수 있는 방법을 고안하고 있고 폴리히스티딘 펩타이드의 유전자와 결합하여 분리도 쉽게 할 수 있는 결과가 보고되었고 카드늄 등 중금속제거와 같은 환경분야에도 적용이 되었다(58)

#### 결론

재조합 단백질 발현에 있어 대장균을 이용한 방법은 가장 널리 사용되는 경제적인 방법으로 인식되어왔다. 대장균 내 번역 후 수조과정의 부재로 인한 내포체의 생성은 생리활성이 있는 단백질 생산의 저해요인으로 작용해 왔다. 하지만 대장균의 생리적 특성에 대한 이해와 유전자의 염기서열 결정과 같은 분자생물학적 기술의 발달 등으로 활성단백질의 생산이 가능해져 외래단백질 발현에 있어 대장균의 이용이 더욱 증대되고 있다. 또한 유전자 융합시스템의 개발로 affinity-tag을 이용하여 분리·정제 공정을 단순화시킬 수 있을 뿐만 아니라 재접힘 공정의 속도 및 효율의 증대, 단백질 생리활성 유지, 가수분해 억제 등 재조합 대장균에서 외래단백질의 생산과 관련된 많은 문제점을 해결할 수 있고 다양한 단백질 indicator를 이용하여 발효공정을 모니터링 할 수 있

**Table 6.** Examples of surface-display systems for *E. coli* with some of application(56)

Display system(origin)	Displayed protein	Comment
<u>Antigenic determinants</u>		
LamB( <i>E. coli</i> )	C3 epitope of poliovirus	Positive immunolabelling on bacteria
PhoE( <i>E. coli</i> )	VP1 of FMDV	Epitope recognized on bacteria by Mab
TraT lipoprotein( <i>E. coli</i> )	C3 epitope of poliovirus	Retained function of the TraT lipoprotein
Flagellin( <i>E. coli</i> )	Hen-egg-lysozyme epitope	Functional flagella with accessible epitope
Fim A protein( <i>E. coli</i> )	Epitopes from HBV, FMDV and poliovirus	Epitopes accessible at cell surface
Iga( <i>N. gonorrhoeae</i> )	Vibrio cholerae CTB	CTB anchored at outer cell surface
AIDA-I( <i>E. coli</i> )	Vibrio cholerae CTB	CTB anchored at outer cell surface
P fimbriin( <i>E. coli</i> )	Epitope from FMDV	Epitope recognized in fimbriae by Mab
<u>Enzyme</u>		
Pullulanase( <i>K. pneumoniae</i> )	<i>E. coli</i> $\beta$ -lactamase	Initial anchoring followed by slow release
Lpp-OmpA chimera( <i>E. coli</i> )	<i>Cellulomonas fimi</i> cellulase	90% of hydrolase activity at bacterial surface
<u>Antibody fragments</u>		
PAL( <i>E. coli</i> )	Chick-lysozyme-specific scFv	Surface accessibility demonstrated by IF
Lpp-OmpA chimera( <i>E. coli</i> )	Digoxin-specific scFv	Enrichment by FACS of correct clones
<u>Other proteins</u>		
LamB/Pap pili( <i>E. coli</i> )	SpA domains	IgG-binding activity at bacterial surface
Thioredoxin-flagellin( <i>E. coli</i> )	Random 20-amino-acid library	Mab epitopes could be mapped by isolation of specific bacteria in a panning procedure
LamB( <i>E. coli</i> )	Hexahitidyl peptide	Bacteria able to adsorb cadmium ions

Abbreviations : AIDA-I, adhesin involved in diffuse adherence; CTB, cholera toxin B subunit; FACS, fluorescence-activated cell sorting; FMDV, foot-and-mouth-disease virus; HBV, hepatitis B virus; IAV, influenza A virus; IF, immunofluorescence; Iga $\beta$ , immunoglobulin A protease precursor  $\beta$ ; Mab, monoclonal antibody; OmpA, outer membrane protein A; PAL, peptidoglycan-associated lipoprotein; scFv, single-chain Fv antibody fragment; SpA, *S. aureus* protein A.

게 되었다. 더욱이 세포 표면발현 기술의 개발로 새로운 기능을 가진 재조합 대장균 시스템을 구축할 수 있을 것이다.

## REFERENCES

- Baneyx, F. (1999), Recombinant protein expression in *Escherichia coli*, *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 411-421.
- Seo, J. H. (1995), Production of proteins in recombinant *Escherichia coli*, In *Recent Advance in Bioprocess Engineering* Vol. 3, H. N. Chang, Y. K. Chang and S. Y. Lee, Eds., p63, Bioprocess Engineering Research Center, Daejun.
- Georgiou, G (1995), Expression of proteins in bacteria. In *Principles and practice of protein engineering* J. L. Cleland and C. S. Craik, Eds., p101, Betterworths, New York..
- Hockney, R. C. (1994), Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*, *TIBTECH.* **12**, 456-463.
- La Vallie, E. R. and J. M. McCoy (1995), Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*, *Cuur. Opin. Biotechnol.* **6**, 501-506.
- Wall, J. G. and A. Pluckthun (1995), Effects of overexpressing folding modulators on the in vivo folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*, *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 507-516.
- Georgiou, G. and P. Valax (1996), Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*, *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 190-197.
- Summers, D. (1998), Timing, self-control and a sense of direction are the secrets of multicopy plasmid stability, *Mol. Microbiol.* **29**, 1137-1145.
- Hannig, G. and S. C. Makrides (1998), Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*, *TIBTECH.* **16**, 54-60.
- Park, Y. C., C. S. Kim, C. I. Kim, K. H. Choi and J. H. Seo (1997), Fed-batch fermentations of recombinant *Escherichia coli* to produce *Bacillus macerans* CGTase, *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**, 323-328.
- Sunitha, K., Y. O. Kim, J. K. Lee and T. K. Oh (2000), Statistical optimization of seed and induction conditions to enhance phytase production by recombinant *Escherichia coli*, *Biochem. Eng. J.* **5**, 51-56.
- Shin, N. K., D. Y. Kim, C. S. Shin, M. S. Hong, J. W. Lee and H. C. Shin (1998), High-level production of human growth hormone in *Escherichia coli* by a simple recombinant process, *J. Biotechnol.* **62**, 143-151.
- Kilikian, B. V., I. D. Surez, C. W. Liria and A. K. Gombert (2000), Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction, *Process Biochem.* **35**, 1019-1025.

14. Fass, R., M. van de Walle, A. Shiloach, A. Joslyn, J. Kaufman and J. Shiloach (1991), Use of high density cultures of *Escherichia coli* for high level production of recombinant *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 65-69.
15. Lim, H. K., K. H. Jung, D. H. Park and S. I. Chung (2000), Production characteristics of interferon- using an L-arabinose promoter system in a high-cell density culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 201-208.
16. Hansen, M., L. Chen, M. Fejzo and J. Belasco (1994), The *ompA* 5' untranslated region impedes a major pathway for mRNA degradation in *E. coli*. *Mol. Microbiol.* **12**, 707-716.
17. Ringquist, S., S. Shinedling, D. Barrick, L. Green, J. Blinky, G. D. Stormo and L. Gold (1992), Translation initiation in *Escherichia coli*: sequences within the ribosome binding site, *Mol. Microbiol.* **6**, 1219-1229.
18. Poole, E. S., C. M. Brown and W. P. Tate (1995), The identity of the base following the stop codon determines the efficiency of in vivo translational termination in *Escherichia coli*, *EMBO J.* **14**, 151-158.
19. More, J. T., A. Uppal, F. Maley and G. F. Maley (1993), Overcoming inclusion body formation in a high-level expression system, *Protein. Expr. Purif.* **4**, 160-163.
20. Park, Y. C. (1996), Overexpression of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus macerans* in recombinant *Escherichia coli*, (M. S. Thesis), Interdisciplinary Program for Biochem. Eng. Biotechnol., Seoul National University, Seoul.
21. Bowden, G. A. and G. Georgiou (1990), Folding and aggregation of  $\beta$ -lactamase in the periplasmic space of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* **265**, 16760-16766.
22. Proudfoot, A. E., L. Goffin, M. A. Payton, T. N. Wells and A. R. Bernard (1996), In vivo and in vitro folding of a recombinant metalloenzyme, phosphomannose isomerase, *Biochem. J.* **318**, 437-442
23. Kery, V., D. Elleder and J. P. Kraus (1995), d-aminolevulinate increases heme saturation and yield of human cystathionine  $\beta$ -synthase expressed in *Escherichia coli*, *Arch. Biochem. Biophys.* **316**, 24-29.
24. Jin, H. H., N. S. Han, D. H. Kweon, Y. C. Park and J. H. Seo (2000), Effects of environmental factors on in vivo folding of *Bacillus macerans* cyclodextrin glycosyltransferase in recombinant *Escherichia coli*, *J. Microbiol. Biotechnol.* submitted.
25. Hartl, F. U., R. Holdan and T. Langer (1994), Molecular chaperones in protein folding : the art of avoiding sticky situations, *Trends Biochem. Sci.* **19**, 20-25.
26. Bernadez-Clark, E. and G. Georgiou (ed) (1994), Protein Folding, American Chem. Soc. Symp. Ser. Vol. 470, ACS.
27. Creighton, T. E., A. Zapun and N. J. Darby (1995), Mechanisms and catalysts of disulfide bond formation in proteins, *TIBTECH.* **13**, 18-27.
28. Gottesman, M. E. and W. A. Hendrickson (2000), Protein folding and unfolding by *Escherichia coli* chaperones and chaperonins, *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 197-202.
29. Goloubinoff, P., A. A. Gatenby and G. H. Lorimer (1989), GroE heat shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*, *Nature* **337**, 44-47.
30. Pain, R. H. (1994), Mechanism of protein folding. Oxford Univ. Press, Oxford.
31. Bessette, P. H., F. Aslund, J. Beckwith and G. Georgiou (1999), Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 13703-13708.
32. Blum, P. J. Ory, J. Bauernfeind and J. Krska (1994), Physiological consequences of DnaK and DnaJ overproduction in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* **174**, 74367444.
33. Nygren, P. A., S. Stahl and M. Uhlen (1995), Engineering proteins to facilitate bioprocessing, *TIBTECH.* **13**, 18-27.
34. Crowe, J., H. Dbeli, R. Gentz, E. Hochuli, D. Stber and K. Henco (1994), 6 HisNi-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification, *Methods Mol. Biol.* **31**, 371387.
35. Hopp, T. P., K. S. Prickett, V. Price, R.T. Libby, C. J. March, P. Cerretti, D. L. Urdal and P. J. Conlon (1988), A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification, *Biotechnology* **6**, 12051210.
36. Schmidt, T. G. M. and A. Skerra (1993), The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment, *Protein. Eng.* **6**, 109122.
37. Schatz, P. J. (1993), Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*, *Biotechnology* **11**, 11381143.
38. Dalbge, H., H. H. M. Dahl, J. Pedersen, J.W. Hansen and T. Christensen (1987), A novel enzymatic method for production of authentic hGH from an *Escherichia coli*-produced hGH precursor, *Biotechnology* **5**, 161164.
39. Brewer, S. J., and H. M. Sassenfeld (1985), The purification of recombinant proteins using C-terminal poly-arginine fusions, *TIBTECH.* **3**, 119122.
40. Persson, M., M. G. Bergstrand, L. Bulow and K. Mosbach (1988), Enzyme purification by genetically attached polycysteine and polyphenylalanine tags, *Anal. Biochem.* **172**, 330337.
41. Blonar, M. A. and W. J. Rutter (1992), Interaction cloning: identification of a helix-loop-helix zipper protein that interacts with *c-fos*, *Science* **256**, 10141018.
42. Neri, D., C. De Lalla, H. Petrul, P. Neri and G. Winter (1995), Calmodulin as a versatile tag for antibody fragments, *Biotechnology* **13**, 373377.
43. Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward and D. C. Prasher (1994), Green fluorescent protein as a marker for gene expression, *Science* **262**, 802805.
44. Chopra, A. K., A. R. Brasier, M. Das, X. J. Xu, and J. W. Peterson (1994), Improved synthesis of *Salmonella typhimurium* enterotoxin using gene fusion expression systems, *Gene* **144**, 8185.
45. La Vallie, E. R., E. A. Diblasio, S. Kovacic, K. L. Grant, P. F. Schendel, and J. M. McCoy (1993), A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm, *Biotechnology* **11**, 187193.
46. Wilkinson, D. L., N. T. Ma, C. Haught and R. G. Harrison (1995), Purification by immobilized metal affinity chromatography of human atrial natriuretic peptide expressed in a novel thioredoxin fusion protein, *Biotechnol. Prog.* **11**, 265269.
47. Samuelsson, E., T. Moks, B. Nilsson and M. Uhlen

- (1994), Enhanced in vitro refolding of insulin-like growth factor I using a solubilizing fusion partner, *Biochemistry* **33**, 42074211.
48. Sachdev, D. and J. M. Chirgwin (1998), Solubility of proteins isolated from inclusion bodies is enhanced by fusion to maltose-binding protein or thioredoxin, *Protein. Expr. Purif.* **12**, 122-132.
  49. Forrer, P. and R. Jaussi (1998), High-level expression of soluble heterologous proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* by fusion to the bacteriophage Lambda head protein D, *Gene* **224**, 45-52.
  50. Bradbury, A. (2000), Evolution of the display technology, *TIBTECH.* **18**, 183-184.
  51. Charbit, A., J. C. Boulain, A. Ryter and M. Hofnung (1986), Probing the topology of a bacterial membrane protein by genetic insertion of a foreign epitope; expression at the cell surface, *EMBO J.* **5**, 3029-3047.
  52. Freudl, R., S. MacIntyre, M. Degen and U. Henning (1986), Cell surface exposure of the outer membrane protein OmpA of *Escherichia coli* K-12, *J. Mol. Biol.* **188**, 491-494.
  53. Georgiou, G., C. Stathopoulos, P. S. Daugherty, A. R. Nayak, B. L. Iverson and R. Curtiss (1997), Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines, *Nat. Biotechnol.* **15**, 29-34.
  54. Fischetti, V. A., D. Medaglini and G. Pozzi (1996), Gram-positive commensal bacteria for mucosal vaccine delivery, *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 659-666.
  55. Francisco, J. A. and G. Georgiou (1994), The expression of recombinant proteins on the external surface of *Escherichia coli*. Biotechnological applications, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **30**, 372-382.
  56. Sthl, A. and M. Uhln (1997), Bacterial surface display: trends and progress, *TIBTECH.* **15**, 185-192.
  57. Nguyen, T. N., M. H. Gourdon, M. Hansson, A. Robert, P. Samuelson, C. Libon, C. Andreoni, P. A. Nygren, H. Binz and M. Uhlen (1995), Hydrophobicity engineering to facilitate surface display of heterologous gene products on *Staphylococcus xylosus*, *J. Biotechnol.* **42**, 207-219
  58. Sousa, C., A. Cebolla and V. de Lorenzo (1996), Enhanced metalloadorption of bacterial cells displaying poly-His peptides, *Nat. Biotechnol.* **14**, 1017-1020.