

## 단백질 기능 향상을 위한 방향적 진화

<sup>1</sup>강 환 구 · <sup>†</sup>김 학 성

<sup>1</sup>한남대학교 화학공학과 생물화공실험실, 한국과학기술원 생물과학과 생물화학공학 연구실  
(접수 : 2001. 1. 12., 게재승인 : 2001. 4. 25.)

## Directed Evolution in Protein Functionality Improvement

Whankoo Kang<sup>1</sup> and Haksung Kim<sup>†</sup>

<sup>1</sup>Department of chemical engineering, Univ. of Hannam, Taejon 306-791, Korea

Department of Biological Sciences, KAIST, Taejon 305-701, Korea

(Received : 2001. 1. 12., Accepted : 2001. 4. 25.)

The dynamic evolution process has resulted in the myriad shapes, functions, and systems evident in every living organism. For centuries, people have been harnessing the power of evolution to produce new varieties of plants and animals, such as producing tomatoes from berries and Chihuahuas from wolves. Now scientists are using it to produce better molecules, ranging from drugs to industrial chemicals, and doing it in days or weeks rather than eons. The ingenious process, which creates genetic diversity and selects those with desired features in the laboratory, is called directed evolution or test tube evolution. In this paper, concepts of directed molecular evolution and some examples will be discussed.

**Key Words :** directed evolution, protein functionality, improvement, shuffling, screening

### 서 론

생물체내에 존재하는 단백질과 효소는 생명체의 유지에 필 요한 기능을 효율적으로 수행 하도록 매우 오랜 시간 동안에 걸쳐 진화되어 왔다. 이러한 단백질이나 효소를 실제 산업 적으로 활용하기 위해서는 단백질이나 효소의 기능을 목적에 맞도록 개량하여야 한다. 예를 들어 의약용 단백질의 경우 생체내에서의 안정성, 면역 반응성, 약리 활성 등을 개량할 경우 여러 가지 측면에서 의미가 있다. 또한, 생체내에서 단 백질의 발현을 조절하는 regulator를 변형시킴으로써 산업적 으로 중요한 단백질들의 생산성을 획기적으로 증대시킬 수 있다. 특히 효소의 경우 활성, 열 및 유기용매에 대한 안정 성, enantioselectivity, 기질에 대한 특이성 등을 목적에 맞도록 개량하게 되면 산업적 응용을 크게 증대시킬 수 있다.

지금까지 단백질이나 효소의 기능을 개량하기 위한 연구는 주로 효소에 국한되어 집중적으로 진행되어 왔으며, 구체적인 방법으로는 무작위로 효소의 유전자에 변이를 유도하는 방법, 그리고 효소의 구조, 또는 기능과 구조와의 관련성등 이 미 알려진 정보를 기반으로 하는 단백질공학(Protein Engineering)

에 의존하여 왔다. 그러나, 이러한 방법은 효소의 기능을 산업적 이용이 가능한 수준까지 효율적으로 개량하는데 한계가 있는 것으로 보고되고 있다. 최근 기존의 방법보다 매우 빠르고 획기적으로 효소의 기능을 개량할 수 있는 방향적 진화 (Directed evolution) 방법이 보고되면서 이를 효소뿐만 아니라 단백질에도 광범위하게 활용하고자 하는 연구가 급속도로 증가하고 있다. 본 고에서는 단백질과 효소의 기능을 획기적 으로 개량하는 방향적 진화 방법과 이의 구체적인 적용사례에 대해 기술하고자 한다.

### 방향적 진화 (Directed evolution) 의 기본 개념

단백질 혹은 효소의 구조나 기능에 대한 구체적인 data가 없는 경우에 매우 효율적으로 단백질이나 효소의 기능을 개량할 수 있는 방법으로 이의 기본 개념은 Figure 1 과 같다. 즉, 먼저 단백질이나 효소의 유전자에 여러 가지 방법으로 변이를 유도한 다음 이를 적당한 속주세포에 발현 시켜 mutant library를 구축한다. Library로부터 특성이 개량된 positive mutants를 적당한 방법으로 선별하고 이를 다음 단계의 template로 사용하여, 단백질이나 효소의 기능이 목적하는 만큼 개량될 때까지 이러한 과정을 반복한다. 여기서 단백질이나 효소의 유전자에 돌연변이를 가하여 다양한 mutant library를 구축하는 방법에 따라 단백질 및 효소의 진화 속도가 결정되며 이는 곧 기능이 개량된 단백질과 효소를 얼마나

<sup>†</sup>Corresponding Author : Department of Biological Sciences, KAIST, Taejon 305-701, Korea

Tel : +82-42-869-2656, Fax : +82-42-869-2610

E-mail : hskim@mail.kaist.ac.kr

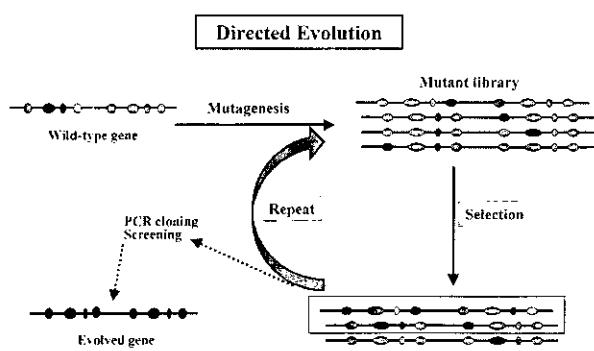


Figure. 1 Directed evolution

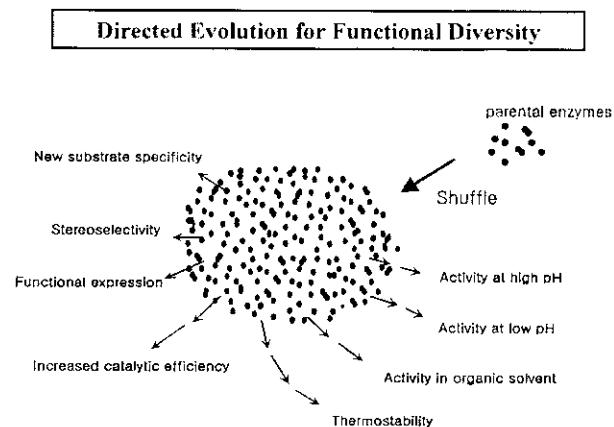


Figure. 2 Directed evolution for functional diversity

빠르게 얻을 수 있는지와 직결된다. 또한, 수 많은 변이주로부터 원하는 방향으로 기능이 향상된 변이단백질을 선별하는 방법도 단백질의 방향적 진화 효율을 결정하는 주요한 요인이 된다. Directed evolution 과정에서 mutant library를 구축하기 위해 변이를 가하면 주로 negative 방향으로 진화된 변이주들이 대부분이고 원하는 방향으로 진화된 것은 매우 드물다. 따라서, 방향적 진화를 효율적으로 진행하기 위해서는 mutation rate 또는 mutation space를 적당히 조절하는 일이 중요하다. 일단 mutant library가 구축되면 이로 부터 여러 가지 functional diversity를 갖도록 selection pressure를 가하여 방향적 진화를 유도하면 Figure 2와 같이 목적하는 기능을 갖는 단백질이나 효소를 얻을 수 있다.

단백질 및 효소의 방향적 진화는 이를 coding 하는 유전자에 돌연변이를 가하여 mutant library를 구축하는 것으로부터 시작되는데 mutant library를 구축하는 일반적인 방법은 다음과 같다.

#### A. Chemical mutagenesis

DNA의 nucleotide에 변이를 주는 방법은 in-vitro DNA 합성, 또는 in-vivo DNA 복제동안에 염기들끼리의 mis-incorporation을 유발한다. 이러한 방식은 유전자안에 적은 수의 mutation을 유발시킬 때 많이 이용되어 왔다. 전통적으로 EMS (Methylsulfonateethylester), MNNG (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine;NTG) 등이 돌연변이를 유발하는데 주로 이

용되어왔으며, 근래는 nitrous acid( $HNO_2$ ), formic acid, sodium bisulfate, hydrazine, dimethylsulfate 등의 chemical들이 DNA의 damage에 이용되고 있다.

#### B. Error-prone PCR (Mutagenic PCR)

PCR 반응의 주요목적은 특정 유전자를 높은 정확도로 증폭하는 것이다. DNA polymerase의 높은 fidelity ( $3' \rightarrow 5'$  exonuclease activity (proof reading activity라고도 함))를 이용하여 유전자를 증폭하는 것인데 전형적인 반응조건은  $1.5 \text{ mmol l}^{-1} MgCl_2$ ,  $50 \text{ mmol l}^{-1} KCl$ ,  $10 \text{ mmol l}^{-1}$ ,  $10 \text{ mmol l}^{-1} Tris-HCl$ , pH 8.3,  $0.2 \text{ mmol l}^{-1}$ 의 각각의 dNTP,  $0.3 \text{ mol l}^{-1}$ 의 각 primer, 2.5 unit thermostable DNA polymerase를 충부피가  $100 \text{ l}\mu\text{g}$  되게 하여  $94^\circ\text{C}$ 에서 1분,  $45^\circ\text{C}$ 에서 1분,  $72^\circ\text{C}$ 에서 1분간의 thermal cycle을 반복하는 것이다. Thermostable DNA polymerase로 Taq polymerase를 사용할 경우 amplification과정에서 nucleotide 당  $0.1 - 2 \cdot 10^{-4}$ 의 빈도로 다른 nucleotide가 결합하여 돌연 변이가 발생하게 된다. Mutation frequency를 증가 시키기 위해 보통  $MgCl_2$ 의 농도를  $7 \text{ mmol l}^{-1}$  까지 증가시키거나  $0.05 \text{ mmol l}^{-1}$ 의  $MnCl_2$ 를 첨가하거나 dCTP와 dTTP의 농도를  $1 \text{ mmol l}^{-1}$ 로 올려주고, 또는 Taq polymerase를 5 unit 정도 첨가하면 된다. PCR 수행조건을 다르게 하면 mutation rate의 조절이 가능하고 이를 바탕으로 mutant library를 구축할 수 있다.

같은 맥락에서 PCR 반응에 기존에 알려진 mutagenic nucleoside analog를 보통의 deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) pool에 첨가하여 변이를 유발시키는 방법이 있다. 8-OxodG를 포함하는 8-oxo-substituted nucleoside가 library 제작에 이용되어 왔고 이 방법을 통해 mutant library를 얻을 수 있다. 또한 보통 이용되는 dNTPs의 성분비율을 한쪽으로 편향되게 하여 mutation을 유발시킬 수 있다. 이때 incorrect base는 원래의 base에 비해 incorporation되는 속도는 느리지만 충분히 library를 만들 수 있다. Deoxyinosine triphosphate (dITP)도 정상적인 dNTP 위치에 misincorporation하여 변이를 유발시킬 수 있다. 최근에는 error-prone mutant Taq polymerase가 PCR을 통한 mutagenesis에 이용되어오고 있다.

이러한 PCR을 통한 방법들은 크게 다음과 같은 단점을 가지고 있다. 하나는 짧은 길이의 유전자 부위안에서 돌연변이가 일어날 빈도가 낮아서 효소의 활성부위 안에 multiple mutation을 유발시키기에 충분치 못하다는 것이고 또 한 가지는 발생하는 mutation이 완전히 random하지 않다는 것이다. 바꿔 말하면 damage/incorporation이 아주 잘 되는 부위가 있어서 mutation space가 넓지 않게 된다.

#### C. Mutagenic PCR with Random oligonucleotides

특정위치에 4 가지의 nucleotide의 random한 조합을 가지고 있는 oligonucleotide를 이용하여 효소를 coding하는 유전자의 부분을 바꾸는 방법으로 유전자 diversity를 얻는데 유용하다. 이 방법에 의하면 원하는 위치의 base가 random하게 바뀐 재조합 plasmid의 library를 만들 수 있다. Randomization의 정도와 각각의 아미노산 치환 정도는 원래의 염기와 다른 3가지 염기간의 비율로 조절할 수 있다. 그래서 원래의 염기로 편향된 random oligonucleotides를 이용하면 치환될 아미노산

의 수를 제한할 수 있다. 이 방법을 tetracycline resistance gene의 promoter region과 b-lactamase의 활성부위를 무작위로 변형시킨 연구가 보고되었다.

#### D. Saturation mutagenesis

이 방법은 유전자의 특정 아미노산을 가능한 모든 아미노산으로 치환하여 변이를 유발시키는 것이다. 가장 직접적인 방법은 site-directed mutagenesis를 통하여 모든 아미노산으로 치환되도록 필요한 nucleotide exchange를 도입하는 것인데, 이는 많은 mutagenic oligonucleotide primer를 요구하며, 생성된 변이주의 변이 여부를 DNA sequencing으로 확인하여야 한다. 일반적으로 이 방법은 특정 gene fragment를 제한 효소로 절단하여, bacteriophage M13 phage에 삽입한 후, C to A transversion, T to G transversion, A to C transversion이 가능한 primer를 제작하여, T4 DNA polymerase, T4 DNA ligase를 이용하여, circular DNA를 만든 후, 이를 *E.coli*에 transformation 시킨다. 이렇게 생성된 circular DNA에 ATP를 labeling한 wild-type DNA를 probe로 이용하면 한 개의 mismatch codon을 갖고 있는 phage DNA는 wild-type DNA와 hybridization하지 않으므로 따로 분리할 수 있다.

#### E. Cassette mutagenesis

일반적으로 Cassette는 한 개에서 수백 개의 아미노산을 coding하는 3개에서 수백개의 nucleotide로 정의된다. 구체적인 방법은 먼저 combinatorial cassette mutagenesis(CCM)를 통하여 이미 알려진 3차원적 구조의 정보를 이용하여 유전자의 특정 부위를 치환한다. CCM은 randomized codon을 함유한 oligonucleotide를 이용하여 이를 유전자의 특정 부위에 mutagenic cassette로 도입하여 돌연변이를 유발시킨다.

#### F. Incremental truncation

대상이 하나의 유전자(ORF1)를 phagemid vector에 cloning하고 동일한 방법으로 다른 유전자(ORF2)를 같은 replication origin을 갖는 vector에 cloning 한다. 이때 용이한 선별을 위해 각각의 vector는 서로 다른 항생제 내성을 갖도록 구축한다. 제한 효소의 절단부위를 이용하여 3' 말단으로부터 internal truncation을 수행한 ORF1과 5' 말단으로부터 internal truncation을 실행한 ORF2를 확보한다. 이로부터 하나의 library의 유전자 단편을 분리하여 다른 library의 유전자에 fusion시키게 되면 mutant library가 구축된다.

#### G. Homologous recombination

먼저 대상이 되는 하나의 유전자(ORF1)를 특정한 vector에 cloning 한다. Homologous recombination을 유도하기 위해 다른 하나의 유전자(ORF2)는 자체를 이용한다. 두 개의 유전자를 electro-transformation을 통하여 동시에 하나의 숙주세포에서 발현시킴으로써 mutant library를 구축하는 방법이다. 이때 숙주세포는 homologous recombination에 필요한 효소가 발현되는 시스템을 이용하여야 한다.

#### H. Bacterial mutator strain

생물체는 chemical agent나 UV irradiation, 효소자체의

error rate 등 여러 가지 요인에 의해 자연적으로 발생할 수 있는 mutation을 극복하기 위해서 다양한 mechanism을 이용한다. 만약 이러한 repair mechanism을 억제한다면 DNA 복제시 mutation frequency가 높아질 것이고 유전자의 library 구축에 사용할 수 있다. 이를 기초로 고안된 방법이 *E.coli* mutator strain을 이용하는 것이다. DNA repair mechanism인 mismatch repair(mutS), oxo-GTP repair(mutT) 그리고 DNA pol III의 3'-5' exonuclease activity(mutD)가 결여된 *E.coli* 균주는 wild type에 비해서 mutation rate가 5000 배나 높은 것으로 확인되었고, 이러한 균주를 이용하면 특정유전자의 mutant library를 구축하는데 유용하게 활용될 수 있다. Mutator strain을 이용할 경우 다른 방법과는 달리 in-vitro에서 mutation을 일으켜 숙주에 transformation하는 과정을 생략하고 바로 selection이나 screening 할 수 있는 장점을 가지고 있다.

#### I. Staggered Extension Process

하나의 특정 primer를 template DNA에 부착하여 DNA polymerase에 의한 primer extension reaction을 진행하다가 이를 다시 annealing 하여 다른 DNA template에 부착시켜 extension reaction을 진행한다. 이러한 반응을 full-length gene이 만들어질 때까지 반복하여 mutant library를 구축하는 방법이다. 비슷한 방법으로 random-primer recombination으로 random primer를 이용하여 target DNA의 각각 다른 segment에 상보적인 50-500 bp의 short DNA fragment를 만든다. 다음 단계로는 mispriming과 base misincorporation에 의해 생성된 short DNA fragment를 서로 priming하게 하여 full-length recombination gene을 만드는 것이다. 이 과정을 그림으로 도식화하면 아래 그림과 같다. 이러한 방법이 DNA shuffling에 비하여 갖는 이점은 mRNA를 포함하여 single strand template를 이용하므로 template DNA의 모든 nucleotide의 mutation rate를 유사하게 조절할 수 있다는 것이다.

#### J. DNA shuffling

현재 유전자의 mutant library를 구축하는데 가장 효율적인 방법으로 이용되는 것이 1994년 Stemmer에 의해 개발된 DNA shuffling 또는 sexual PCR이다. DNA shuffling이라고 불리는 이유는 마치 카드를 섞듯이 DNA 유전자 조각들을 무작위로 순서없이 섞어서 매우 다양한 mutant library를 구축하기 때문이다. 또한 sexual PCR이라고도 하는 이유는 sequence space를 확대하기 위해 같은 family에 속하는 homologous 유전자를 template로 사용하거나 하나의 template로부터 유래한 다양한 유전자를 template로 사용하므로 이것의 sexual reproduction과 유사한 방법으로 매우 다양한 변이 유전자를 생성시키기 때문이다. 전자의 경우를 family shuffling이라고 부른다.

DNA shuffling은 염기 서열이 비슷한 유전자들 또는 mutation에 의해 발생한 유전자들로부터 다양한 조합을 만들어 library를 구축한다. 염기서열이 비슷한 유전자들은 DNase I에 의하여 자르면 random한 DNA 조각들이 만들어진다. 이러한 조각들을 이용하여 PCR을 하게 되는데, 이때 각각의 조각들은 비슷한 염기서열을 가지고 있는 다른 조각에 대해

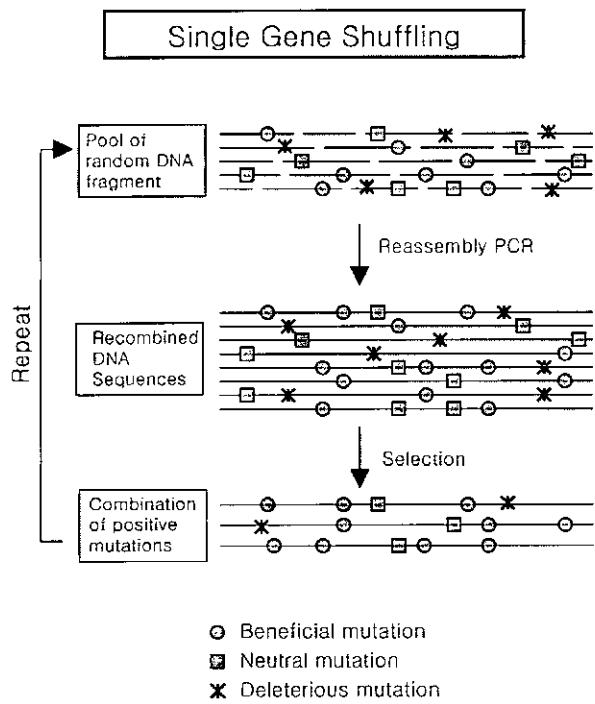


Figure. 3 Single gene shuffling

primer로 작용하게 된다. 예를 들어 A라는 유전자의 조각은 비슷한 서열을 가지고 있는 B라는 유전자 조각에 primer로 작용하게 되어 A 유전자 조각과 B 유전자조각이 동시에 PCR에 의해 증폭이 된다. 이렇게 reassembly 된 조각들은 다시 PCR을 통해 full-length를 갖는 전혀 새로운 유전자가 된다. 이 방법은 유전자 조각들의 순서를 바꿀 뿐 아니라 DNase I 자체의 randomness, 그리고 PCR을 거칠 때의 error가 겹쳐지면서 훨씬 다양한 유전자 library가 만들어지게 한다. 반면 만약 이미 밝혀진 유용한 mutation을 가지고 있는 유전자를 이용하여 shuffling할 때는 염기의 치환은 바람직하지 않기 때문에 DNase I fragmentation 과정에서 Mg 대신 Mn을 이용하거나, 가능한 한 PCR회수를 줄이고, high fidelity를 갖는 DNA polymerase를 이용하여 PCR을 하여야 한다.

Single gene에 대한 DNA shuffling 방법을 도식적으로 나타내면 Figure 3과 같고 유사한 여러 유전자를 template로하여 출발하는 family shuffling은 Figure 4와 같다. Single gene shuffling과 family shuffling의 경우 예상되는 mutant들의 sequence space는 Figure 5와 같다.

또한 최근에는 RACHITT (RAnDom CHImeragenesis on Transient Templates) 방법의 family DNA shuffling이 소개되었다.

#### Gene Expression System

효소의 방향적 진화를 위해서는 위에 열거한 방법으로 변이 유전자를 만든 다음 이를 적절한 숙주세포에서 발현시켜야 한다. 최근까지 대장균이 숙주세포로 많이 이용되었는데 목적하는 유전자를 적당한 promoter와 결합하여 발현 vector에 삽입한다. 많이 사용되는 promoter로는 lac, tac, T7-lac 등

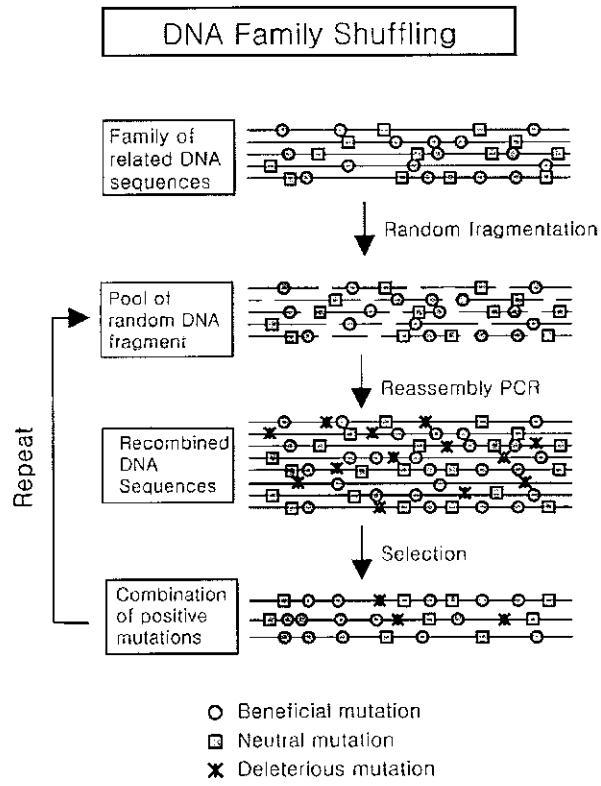


Figure. 4 DNA family shuffling

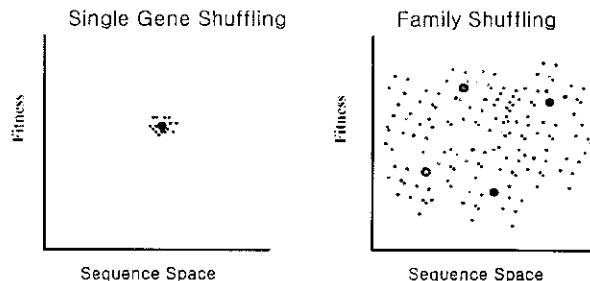


Figure. 5 Sequence space in single gene and family shuffling

이 있다. 한편, lipase나 protease 등과 같은 분비 단백질은 세포내에서 발현될 경우 folding 등의 문제로 활성이 없거나 매우 낮은 경우가 발생하므로 이들을 효율적으로 분비시키는 숙주세포의 구축이 요구된다. 효소의 방향적 진화에서 대장균과 더불어 사용될 수 있는 숙주세포로는 gram-positive에 속하는 *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactococcus*, *Staphylococcus* 등이 있다. 최근에는 yeast가 eukaryotic expression host로 중요성이 점차 증가하고 있다.

#### 변이주의 screening

위에 설명된 방법들을 이용하면 대강  $10^{10}$  까지의 거대한 mutant library가 구축된다. 이러한 library에서 기능이 향상된 변이 효소를 선별하는 것이 방향적 진화의 성패를 좌우 할 수도 있다. 많이 사용되는 방법으로는 효소의 활성을 비교할 수 있는 activity staining method, colorimetric method, 숙주세포의 성장과 관련된 complementation method 등이 있는데 각

각의 효소에 따라 민감도가 충분한 선별방법을 구축하는 것이 요구된다. 예를 들어 최근에 개발된 thermographic method는 chiral alcohol의 R, S-configured enantiomer의 반응에 의해 생성되는 black-body radiation을 IR-camera로 시간의 흐름에 따라 선별하는 방법이다.

## 효소의 방향적 진화와 관련된 최근의 연구

### (1) DNA SHUFFLING에 관한 특허

제    목 : Methods for in vitro recombination

발명자 : Stemmer W.P.C (Feb. 25. 1997)

특허번호 : US 5605793

이 특허는 Stemmer가 1994년 Proc. Natl. Acad. Sci. USA지 및 Nature지에 발표한 DNA shuffling에 대한 자신의 논문을 바탕으로 출원해서 1997년 등록이 된, 기본이 되는 특허이다. 이 특허에서의 Claim은 다음과 같다.

1. 돌연변이 된 double-stranded polynucleotide의 random fragment를 만드는 방법
  - a) DNaseI이나 restriction enzyme 등의 enzyme를 이용하거나 sonication 등의 physical method를 통해 double-stranded random fragment를 얻음. 여기에 random double-stranded nucleic acid를 첨가하여 heterogeneity를 증가시킬 수 있다.
  - b) 90-96°C로 denature시켜 single-stranded fragment로 만듬.
  - c) 40-65°C 정도로 온도를 낮추어 homology가 있는 fragment끼리 reassembly 되도록 한다.
  - d) b, c과정을 최소 10회 이상 반복한다.
  - e) full-length gene을 얻는다.
2. 전체 double-stranded random fragment 중 한 종류의 농도는 0.1%정도일 때 가장 효율적이다.
3. Template double-stranded polynucleotide는 5-5000bp 정도로 최소 100종류 이상이다.

본 특허에서 error-prone PCR과 cassette mutagenesis의 한계를 분석했는데 error-prone PCR의 경우, 첫째 polymerase 자체가 낮은 processibility를 가지고 있어서 평균 크기의 유전자를 random mutagenesis 하기에 충분하지 못하다는 것과, 둘째 그 유전자의 information content가 증가할수록 기능이 나빠진 mutant의 비율이 높아져 선별이 힘들어진다는 것, 그리고 셋째 PCR를 계속할수록 neutral mutation이 축적되어 immunogenicity를 초래할 수 있다는 것이다. Cassette mutagenesis의 경우 random sequence block의 크기와 개수의 한계 때문에 다른 중요한 부분을 놓칠 가능성이 많다는 한계가 있다. 이에 반해 이 특허에서 말하는 DNA shuffling은 in-vitro 상에서 여러 종의 origin으로부터 유래한 sequence를 뿐 아니라 한 sequence의 random mutant까지 다양한 조합을 만들 수 있어 유전자의 방향적 진화에 매우 효과적이다. Random mutation을 가진 다양한 recombinant DNA fragment를 포함한 library는 적당한 선별과정을 거쳐서 다음 단계의 shuffling에 이용된다. 본 특허는 현재까지 알려진 방법중에서 가장 효율적으로 유전자의 mutant library를 구축할 수 있는 방법을 포함하고 있다.

### (2) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling

Stemmer W.P.C., Nature, 370, 389-391, 1994

p182Sfi를 통해 발현되는 TEM-1  $\beta$ -lactamase를 가지고 있는 재조합 대장균에 대한 cefotaxime의 MIC는 0.02  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이다. 이 TEM-1 유전자의 DNA shuffling을 통해서 mutant를 얻었을 때, error prone PCR과 비슷한 0.7%의 point mutation이 발생하였으며, 3번에 걸친 round를 통해 MIC가 320  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 내성을 가진 것을 얻을 수 있었다. 이렇게 선택된 transformant의 mutant  $\beta$ -lactamase 유전자(ST-1)는 9개의 염기치환과 4개의 silent mutation을 가지고 있었다.

이 유전자가 가지고 있는 non-essential mutation을 없애기 위해 ST-1을 40배 많은 WT DNA와 함께 2번 shuffling한 결과 silent mutation이 제거된 640  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 MIC를 갖는 새로운  $\beta$ -lactamase(ST-2)를 얻었다. 결과적으로 3번의 shuffling을 통하여 32,000배의 resistance 향상을 얻을 수 있었다. 이것은 3번의 연속적 selection을 통한 error-prone PCR을 통해 얻을 수 있었던 최고치인 0.32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 비교할 수 없이 뛰어난 결과이다.

### (3) Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling

Cramer, A., White E. A. Tate C. and Stemmer W.P.C., Nature Biotechnol., 14, 315-319, 1996

Aequorea victoria의 green fluorescent protein(GFP)은 gene expression과 regulation의 receptor gene으로 이용되어왔다. 그러나 특히 진핵생물에서는 더 강한 형광이 필요하다. 이 연구에서는 이를 위해 codon usage 변경과 DNA shuffling을 이용하여 mutant library를 만든 다음 가장 밝은 E. coli colony를 screening하였다.

Codon usage 변화에 의한 GFP는 기준으로 쓰인 Clontech plasmid pGFP보다 whole cell fluorescence가 3배 증가하였다. 이 WT GFP를 3번의 DNA shuffling하여 fluorescence가 45배 증가한 mutant를 최종적으로 screening하였다. Cycle3의 mutant는 WT와 달리 대부분 soluble form으로 존재하였으며, 이는 hydrophilic mutation이 일어남으로써 aggregation을 막을 수 있기 때문으로 생각되어진다.

또한 이 cycle 3 GFP를 mammalian cell인 CHO cell에서 발현시킨 결과 역시 WT에 비해 42배의 fluorescence 증가를 보임으로서 eucaryotic cell에서도 충분히 reporter gene으로 이용될 수 있음을 보여주었다.

### (4) Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for a queous organic solvents

Moore J.C. and Arnold F. H., Nature Biotechnol., 14, 458-467, 1997

Cephalosporin으로부터 반합성 항생제를 생산하는 과정에서 carboxylic acid의 보호기로 para-nitrobenzyl alcohol (pNB-OH)가 이용되는데 반응이 끝난 후 보호기를 제거하기 위해 esterase를 이용하는 것이 가능하다. 그러나, 이러한 반응은 주로 유기용매에서 진행되므로 유기 용매에 대해 pNB esterase의 안정성을 증가시키기 위해 방향적 진화를 시도하였다. 구체적인 방법으로 유전자 1 kb 당 1-3개의 치환을 유발하도록 error-prone PCR을 수행하여 mutant library를 만든 후 유기용매인 dimethylformamide(DMF)와 완충용액 및 pNP

기질과 함께 mutant를 반응시켜 노란색을 발색하는 colony를 선별하였다. 4번의 반복적인 진화과정을 통해 50-60배 정도 안정성이 증대된 효소를 얻을 수 있었다.

(5) DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerate directed evolution

Cramer A., Raillard S. A., Bermudez E., and Stemmer W.P.C., *Nature*, **391**, 288-291, 1998

한 종류의 유전자를 template로 하여 방향적 진화를 진행할 경우 deleterious mutation이 축적되어 원하는 방향으로의 진화가 늦게 진행될 수 있다. 그러나, 자연적으로 존재하는 유사한 염기서열을 갖는 유전자군은 deleterious mutation보다는 beneficial mutation이 축적되어 functional diversity가 충분하므로 이를 이용할 경우 진화과정을 가속화시킬 수 있을 것이다. 본 연구에서는 *C. cephlaosporinases*를 coding하는 1.6kb 유전자 중 58-82%의 DNA sequence 동일성을 갖는 4개의 유전자들을 각각 또는 한꺼번에 shuffling하였다. 이들의 moxalactam에 대한 저항성을 측정한 결과 4가지 유전자를 각각 shuffling한 것은 모두 8배의 향상을 보인 반면, 4가지 유전자를 한꺼번에 family shuffling한 것은 270-540배의 향상을 보였다. 이렇게 얻은 resistant clone은 다른  $\beta$ -lactam antibiotic에 대한 저항성도 증가하였다. Clone A는 acrbenicillin과 cephalexine에 대해서도 4-16배 저항성이 향상되었는데 이것은 지금까지의 효소의 새로운 기질에 대한 활성향상을 원래기질에 대한 활성감소를 유발한 결과와는 대조되는 것이다.

이러한 결과들은 family shuffling에 의한 diversity의 창출이 보다 많은 mutant library를 만드는데 효과적인 방법임을 보여준다.

(6) Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase

H. Zhao and F. H. Arnold

*Protein Engineering*, **12(1)**, 47-53, 1999

본 논문에서는 directed evolution을 이용하여 *Bacillus subtilis* subtilisin E를 *thermactinomyces vulgaris*의 thermophilic enzyme인 thermitase의 기능을 갖도록 converting하는 연구를 수행하였다. subtilisin E를 error-prone PCR에 의하여 random mutagenesis를 수행하고 이를 staggered extension process (StEP)에 의하여 *in vitro* recombination한 후 이를 *B. subtilis*에 transformation하고 이를 96-well plates 방법을 통하여 screening하였다. 이 결과 83°C에서 이 enzyme의 half life가 200배 이상 증가되었고 optimum temperature가 76°C로 증가됨을 보였다. 또한 succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide의 hydrolysis activity가 10°C로부터 90°C 전 범위에 걸쳐 크게 향상되었다. 또한 directed evolution된 subtilisin E는 약 8개의 amino acid 치환이 주효한 것으로 나타났으며 이들 amino acid들은 enzyme의 표면에 위한 것으로 밝혀졌다. 결론적으로 이 논문을 통하여 directed evolution은 enzyme의 thermostability 증가를 이루는 효율적 방법임을 알 수 있고 또한 thermophilic enzyme의 생성에 관한 mechanism을 알게 해 주었다.

(7) Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling

F.C. C., Scapazza L., Cramer A., Folkers G., and

Stemmer W.P.C., *Nature Biotechnol.*, **17**, 259-264, 1999

Herpesviral thymidine kinase(TK)는 human thymidine kinase에 비해 상대적으로 낮은 기질 특이성을 가지고 있어서 항바이러스제나 자살 유전자 치료에 이용되는 acyclovir와 ganciclovir와 같은 nucleoside analog의 효능을 일으키게 한다. 이의 활성을 증진시키기 위해 78%의 동일성을 갖는 HSV-1, HSV-2의 TK 유전자를 가지고 family shuffling을 하였을 때, 각 단계에서 활성이 증가된 mutant를 얻었다.

3번째 cycle에서는 더 낮은 활성을 보이는 sequence를 추가하여 diversity를 높이는 것이 유리한지 아닌지를 test하였는데, 더 다양한 parent를 이용해 shuffling했을 때 sensitivity가 증가한 clone수도 많고 sensitivity도 높아졌다. 이 결과는 낮은 활성을 갖는 single gene mutant를 추가하여 diversity를 높이면 오히려 더 낮은 향상을 보인다는 이전 결과와 상반되는 결과이다.

(8) DNA shuffling of subgenomic sequences of subtilisin

N. J.E., Welch M., G. L., Bueno M., Cherry J.R., Borchert T.V., Stemmer W.P.C., and Minshull J., *Nature Biotechnol.*, **17**, 893-896, 1999

Subtilisin은 상업적으로 중요한 serin endoprotease이다. 이 효소는 peptide bond에 넓은 특이성을 가지고 있고 생산하기 쉬워서 식품, 가죽공정, 세제첨가제에서 매우 중요하다. 그 중요성 때문에 subtilisin은 매우 활기차게 연구되어왔고 100개가 넘는 crystal structure가 분석되었다. 본 연구에서는 다양한 subtilisin을 family shuffling하여 4가지의 성질과 이들의 조합에 대한 성능 향상을 평하였다.

25개의 subtilisin과 상업적으로 이용되는 subtilisin인 Savinase를 shuffling하여 *Bacillus subtilis* 168에 transformation하고 screening하였다. 654개의 clone을 4개의 성질 - 23°C에서의 활성, 열안정성, 유기용매 안정성, pH 영향성-에 대해 조사하였다. 종종 효소의 한 성질을 향상시키면 다른 성질은 떨어지는 경우가 있었는데 본 연구에서는 molecular breeding이 이러한 점을 극복하고 좋은 성질만을 조합시킬 수 있는가를 알아보기 위한 것을 목적으로 하였으므로 654개의 clone을 5가지 조건에서 활성을 측정한 결과 모든 기존의 효소보다 뛰어난 mutant를 얻을 수 있었다. 이는 molecular breeding이 자연계에서 쉽게 존재할 수 없는 두 가지 이상의 유익한 성질을 한 효소 안에 조합시킬 수 있는 방법임을 제시한다.

(9) Directed evolution of new catalytic activity using the a/b-barrel scaffold

M. M. Altamirano, J. M. Blackburn, C. Aguayo, A. R. Fersht, *Nature*, **403**, 617-621, 2000

기능은 다르지만 scaffold는 비슷한 생물촉매의 경우는 자연적으로 오랜 시간 진화해 오면서 새로운 기능이 획득되었을 것으로 추정된다. 이런 자연계의 진화를 실험실에서 수행함으로서 자연계의 진화에 대한 이해와 함께 산업적으로도 가치가 있는 새로운 기능을 갖는 새로운 효소를 창출할 수 있다. 이 논문에서는 indole-3-glycerol-phosphate synthase (IGPS)를 phosphoribosylanthranilate isomerase (PRAI)로 변화시켰는데, 이들은 모두 a/b-barrel 형의 구조를 갖고 있으며, tryptophan biosynthesis에 관여한다. 이미 알려진 효소의 3 차

원 구조를 비교함으로서 superimpose 되지 않는 3 부분을 찾아내고 이들 부분에 적당한 크기의 random peptide를 삽입하여 IGPS를 PRAI로 진화시켰다.

- (10) Directed evolution of a novel N-carbamoylase/D-hydantoinase fusion enzyme for functional expression with enhanced stability  
G.J. Kim, Y. H. Cheon, H.S. Kim, *Biotechnol. Bioeng.*, **68**, 211-217, 2000

D-amino acid는 비천연 아미노산으로 반 합성 항생제나 제초제등의 원료물질로 광범위하게 사용된다. 이러한 비천연 아미노산의 생산은 hydantoin 유도체를 기질로 하여 D-hydantoinase와 N-carbamoylase를 이용하는 효소공정이 매우 경제적인 것으로 알려지고 있고 실제 전 세계적으로 많은 기업이 사용하고 있다. 본 연구에서는 두 효소를 fusion 시켜 반응에 사용할 경우 보다 효율적으로 생산공정을 개발할 수 있을 것이라 생각하여 두 효소를 coding하는 유전자를 fusion 시키고 이를 대장균에 발현시켰다. 그러나, 이 경우 fusion enzyme의 안정성이 낮은 것으로 관찰되어 fusion gene을 template로 하여 방향적 진화를 시도하였다. Mutant library로부터 D-Hydantoinase와 N-carbamoylase 활성을 동시에 나타내는 변이주를 선별하고 이로부터 다시 안정성이 증대된 변이주를 선별하였다. 결과적으로 3번의 반복적인 방향적 진화 과정을 거쳐 안정성이 증대된 변이주를 선별하였고 이를 비천연 아미노산 생산에 적용하였다.

이는 앞으로 분자 생물학, 세포 생물학, Biotechnology 분야에서 특정 단백질의 발현 monitoring, localization, 단백질의 folding 정도 측정, phenotype의 screening 등에 광범위하게 이용되는 fusion protein의 functional expression에 적용할 수 있다. 또한, 매우 큰 fusion protein의 folding이나 expression을 몇 개의 아미노산을 치환함으로써도 가능하다는 것을 보여주고 있다.

### 향후 연구 방향

가장 효율적으로 생물촉매의 mutant library를 구축할 수 있는 DNA shuffling 방법은 전술한 대로 특허로 등록되어 있기 때문에 산업적 목적으로 사용 시 특허에 위배된다. 따라서 생물촉매의 기능을 목적에 맞게 개량하기 위해서는 DNA shuffling 방법과 비교할 만한 새로운 방법을 개발하거나, 특허 사용료를 지불하거나, error-prone PCR과 같은 기존의 방법을 활용하는 것이 가능하다. 이러한 경우에도 생물촉매의 mutant library를 효율적으로 구축하기 위해서는 mutation frequency와 mutation space의 최적 조건 및 초고속 선별시스템의 구축이 요구된다.

### REFERENCES

- Cadwell, R. C. and G. F. Joyce, Mutagenic PCR. *PCR Methods Appl.*, 1994. 3(6): p. S136-40.
- Myers, R. M., L. S. Lerman, and T. Maniatis, A general method for saturation mutagenesis of cloned DNA fragments. *Science*, 1985. 229(4710): p. 242-7.
- Greener, A., M. Callahan, and B. Jerpseth, An efficient random mutagenesis technique using an *E. coli* mutator strain. *Methods Mol Biol.*, 1996. 57: p. 375-85.
- Black, M. E., et al., Creation of drug-specific herpes simplex virus type 1 thymidine kinase mutants for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(8): p. 3525-9.
- Delagrange, S., E. R. Goldman, and D. C. Youvan, Recursive ensemble mutagenesis. *Protein Eng.*, 1993. 6(3): p. 327-31.
- Stemmer, W. P., DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(22): p. 10747-51.
- Stemmer, W. P., Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*, 1994. 370(6488): p. 389-91.
- Crameri, A., et al., DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature*, 1998. 391(6664): p. 288-91.
- Chang, C. C., et al., Evolution of a cytokine using DNA family shuffling. *Nat Biotechnol.*, 1999. 17(8): p. 793-7.
- Arnold, F. H., Design by directed evolution. *Acc. Chem. Res.*, 1998. 31(3): p. 125-131. 11. Zhang, J.H., G. Dawes, and W.P. Stemmer, Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(9): p. 4504-9.
- Yano, T., S. Oue, and H. Kagamiyama, Directed evolution of an aspartate aminotransferase with new substrate specificities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998. 95(10): p. 5511-5.
- Zhao, H. and F. H. Arnold, Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase. *Protein Eng.*, 1999. 12(1): p. 47-53.
- Hoseki, J., et al., Directed evolution of thermostable kanamycin-resistance gene: a convenient selection marker for *Thermus thermophilus*. *J Biochem (Tokyo)*, 1999. 126(5): p. 951-6.
- May, O., P. T. Nguyen, and F. H. Arnold, Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine. *Nat Biotechnol.*, 2000. 18(3): p. 317-20.
- Matsumura, I., et al., Directed evolution of the surface chemistry of the reporter enzyme beta-glucuronidase. *Nat Biotechnol.*, 1999. 17(7): p. 696-701.
- Arnold, F. H. and A. A. Volkov, Directed evolution of biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol.*, 1999. 3(1): p. 54-9.
- Giver, L. and F. H. Arnold, Combinatorial protein design by in vitro recombination. *Curr Opin Chem Biol.*, 1998. 2(3): p. 335-8.
- Boer, H., T. T. Teeri, and A. Koivula, Characterization of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A secreted from *Pichia pastoris* using two different promoters. *Biotechnol Bioeng.*, 2000. 69(5): p. 486-94.
- Chen, K. and F. H. Arnold, Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(12): p. 5618-22.
- Forrest, S., Genetic algorithms: principles of natural selection applied to computation. *Science*, 1993. 261(5123): p. 872-8.
- Zhao, H., et al., Methods for optimizing industrial enzymes by directed evolution, in *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2nd Ed., A.L. Demain

- and J.E. Davies, Editors. 1999, ASM Press: Washington, DC. p. 597-604.
23. Zhao, H. and F. H. Arnold, Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Res*, 1997. 25(6): p. 1307-8.
24. Zhao, H. and F. H. Arnold, Functional and nonfunctional mutations distinguished by random recombination of homologous genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(15): p. 7997-8000.
25. van Tilbeurgh, H., et al., Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. Reaction specificity and thermodynamics of interactions of small substrates and ligands with the 1,4-beta-glucan cellobiohydrolase II. *Eur J Biochem*, 1985. 148(2): p. 329-34.
26. Coco W. M. et al. *Nature Biotechnology*. 19, 2001