

특집 : 포스트-게놈 시대의 단백질 발현 시스템(III)

Emerging new expression systems in post-genome research : Display technologies

김의중 · 반재구

미생물 디스플레이 국가지정연구실, (주) 제노포커스

Genomics, proteomic 연구 등의 급속한 발전으로 다가온 post-genome 시대의 연구에 있어서 방대한 DNA 염기서열 분석 결과로부터 신규 유전자의 발굴 및 초고속 발현, 기능 분석, 단백질 간의 상호작용 연구, 그리고 각종 연구 결과의 데이터 베이스 구축 등을 빠른 속도로 행하는 것은 매우 중요하다. 특히 게놈 스케일의 DNA-단백질, 단백질-단백질 간의 상호작용 네트워크를 연구하는 것이 매우 중시되고 있는데, 이를 위한 방법들로서는 전통적인 생화학 반응 연구에 이용되었던 co-immunoprecipitation, crosslinking 기법이나, 돌연변이 유발 및 분석법, 또는 two-hybrid 시스템 및 디스플레이 기술 등의 분자생물학적 방법 등이 있다. 이 중에 최근까지 가장 많이 이용되어 온 것은 효모에서의 two-hybrid 시스템이다. 효모 two-hybrid 시스템의 낮은 sensitivity 및 비 특이적 단백질 결합에 따른 false positive 탐색 등을 해결하고자 최근에는 three-hybrid 시스템이 개발된 바 있다. 하지만 단백질 상호작용이 효모 내에서만 이루어지기 때문에 외부에서 첨가해주는 어떤 신호에 대한 반응을 연구하기에는 한계가 있으며, 세포내 단백질 연구에 있어서는 효모 자체의 세포내 단백질과의 상호작용에 의하여 원하지 않는 방향으로 결과가 나타나는 경우가 많았다. 따라서, 한가지 단백질이 가질 수 있는 다양한 상호반응을 세포 외부에서 연구할 수 있으며, 또한 대량의 단백질을 초고속으로 분석할 수 있는 기술이 필요하게 되었다. 이런 요건을 만족시켜주는 기술이 디스플레이(display) 기술이다.

디스플레이 기술이란 유전형(genotype)과 표현형(phenotype)을 물리적으로 결합시키는 기술로서 정의할 수 있다. 작은 의미의 디스플레이 기술을 구체적으로 다시 표현하자면, 유전형은 표현형에 해당하는 특정 타겟 단백질을 암호화하는 유전자를 지칭하며, 유전자와 단백질이 미생물의 매개하에, 또는 생명체의 매개없이 결합되도록 하는 기술이다. 디스플레이 기술의 특징은 대규모의 다양한 타겟 단백질로 구성된 라이브러리를 구축할 수 있으며, 타겟 단백질은 외부의 물질과 반응할 수 있도록 노출되어 있고, 타겟 단백질의 유전자가 물리적으로 결

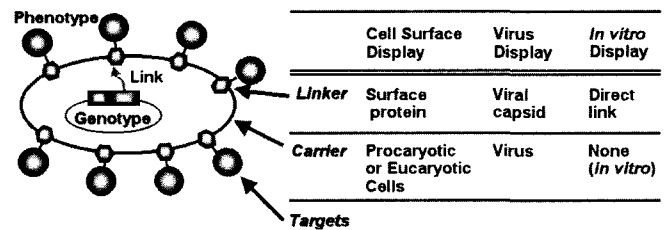


그림 1. 디스플레이 기술의 모식도 및 분류

합되어 있기 때문에 단시간내에 큰 규모의 라이브러리, 즉 cDNA/gDNA 라이브러리, 항체 라이브러리, 펩타이드 라이브러리, 특정 프로테옴 라이브러리 등의 탐색에 매우 용이하다. 특히 결합력에 근거하여 특정 활성의 타겟 단백질을 쉽게 선별할 수 있기 때문에 라이브러리 규모에서 단백질-단백질 상호작용을 분석하는데 탁월한 기술이다[1-3].

디스플레이 기술은 유전자와 단백질의 결합 방법에 따라 그림 1처럼 크게 세가지로 구분된다.

세포 디스플레이(Cell surface display)는 세포 표면 단백질과 특정 타겟 단백질의 유전자를 융합시켜서 발현시 세포 표면에 타겟 단백질이 표출되도록 하는 기술이다. 바이러스 디스플레이(Virus display)는 바이러스의 표면 단백질(capsid protein)과 타겟 단백질의 융합 단백질이 숙주세포에서 발현되어 바이러스가 형성시 바이러스 표면에 타겟 단백질이 표출되도록 하는 기술이다. 특히 바이러스가 박테리오파아지(bacteriophage)인 경우 파아지 디스플레이(phage display)라고 부른다. 무세포 디스플레이(in vitro display)는 유전자가 포함된 RNA 혹은 DNA와 단백질이 세포나 바이러스의 매개체 없이 직접 결합되도록 하는 기술이다.

위 디스플레이 기술들은 서로 상호보완적이거나 때로는 경쟁적인 기술로서 이용되고 있다. 본고에서는 다양한 디스플레이 기술들에 대하여 소개하고, 디스플레이 기술의 주요 응용분야에 대해서 설명하고자 한다.

다양한 디스플레이 기술

(1) 무세포 디스플레이(*in vitro* display)

최근 *in vitro* transcription/translation(IVTT) 시스템을 이용하여 유전정보와 단백질을 결합시키는 기술이 연구되어 왔다. 이 기술들은 숙주내로의 형질전환이 필요없기 때문에 다른 디스플레이 기술보다 훨씬 큰 규모의 라이브러리를 제조할 수 있다. 또한 인위적 돌연변이나 특이한 아미노산의 도입이 용이하며, selective labelling이 가능하고, panning 등을 통하여 원하는 클론을 얻기까지 단시간이 소요되는 등 장점이 많기에 단백질 라이브러리의 초고속 스크리닝이나 게놈 스케일의 라이브러리 탐색에 용이하다[4-5].

(2) 공유결합 디스플레이(Covalent display technology, CDT)

공유결합 디스플레이 기술은 타겟 단백질과 유전자를 포함하는 DNA를 공유결합시키는 기술이다. 대표적인 예로서 박테리오파지 P2의 viral A 유전자 산물인 P2A 단백질을 이용한 시스템이 있다. P2A는 DNA 복제를 개시하는데 필요한 단백질로서 replication origin (*ori*)에 결합하여 nick을 만들고 *ori* 부분의 5'에 공유결합한다. P2A는 자신이 발현된 모체의 DNA에만 특이적으로 결합하는 *cis*-activity가 있는데, 결합부위인 *ori*는 P2A를 coding하는 염기서열 내에 존재하므로, 결국 그림 2와 같이 P2A는 자신의 유전자 부위에 공유결합을 하게 된다[6].

P2A 유전자에 외래 단백질의 유전자를 결합시켜 발현시키면 결국 외래단백질도 자신을 coding하는 유전자가 있는 DNA에 결합하게 되는 것이다. 따라서 무작위 서열의 펩타이드나 무작위 돌연변이를 시켜 만든 단백질의 유전자를 P2A 유전자와 결합시킨 후 숙주세포로의 형질전환을 거치지 않고 *in vitro* transcription, translation을 시키면 약 10^{12} 이상 규모의 DNA-protein complex 라이브러리를 만들 수 있다. 위와 같이 제조한 라이브러리는 panning 등의 기술을 이용하여 원하는 활성의 단백질을 디스플레이하고 있는 complex를 분리할 수 있으며, 선별된 complex의 DNA를 template로 PCR을 하여 증폭하면 두 번째 round의 panning을 위하여 이용할 수 있다[4].

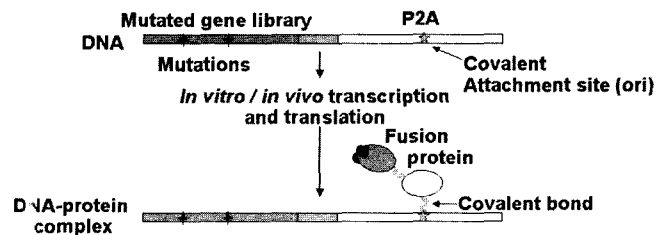


그림 2. P2A 단백질을 이용한 공유결합 디스플레이 모식도

(3) 라이보솜 디스플레이(ribosom display or polysome display)

라이보솜 디스플레이란 mRNA-ribosome-nascent polypeptide (RRP) complex를 이루도록 하여 단백질과 유전자가 포함된 RNA를 결합시키는 기술을 말한다[7]. 일반적으로 Mg^{2+} 이온 농도를 조절하여 라이보솜을 안정화시키고, translation 속도, 반응온도 등을 조절함으로써 RRP complex를 안정하게 유지시킨다. 초기 라이브러리 DNA가 확보되면 *in vitro* transcription을 이용하여 mRNA를 생산한다. 이후 *in vitro* translation시 안정한 RRP complex를 제조하도록 한다. 이를 panning 등을 통해서 타겟 분자에 결합력이 있는 단백질을 디스플레이하고 있는 RRP만을 선별한다. 그림 3에서와 같이 EDTA 처리로 mRNA, ribosome, 단백질을 분리시키고, mRNA는 RT-PCR을 이용하여 cDNA로 재차 증폭된다. 이때 변이를 유도하여 재차 라이브러리를 제조할 수도 있다. 이렇게 얻은 cDNA 라이브러리는 다시 RRP complex로 제조하여 2차 panning에 이용이 가능하다.

(4) 퓨로마이신-펩타이드-RNA 융합 디스플레이(Puromycin-peptide-RNA fusion display)

퓨로마이신(puromycin)이란 tRNA의 aminoacyl ends mimic으로서 라이보솜의 A 위치에 결합할 수 있으며, 라이보솜의 도움으로 translation중이던 단백질과 아미노 결합을 할 수 있는 항생물질이다. Puromycin-peptide-RNA(PPR) fusion 디스플레이의 원리는 그림 4에 나타나 있다[8]. 먼저 퓨로마이신에 단일가닥 DNA를 결합시킨 후 mRNA의 3'에 결합시킨다. 이후 *in vitro* translation을 시키면 라이보솜이 translation을 하다 mRNA-DNA 결합 부위에서 멈추게 되고, 이때 3'에 존재하는 퓨로마이신이 라이보솜의 A 위치에 삽입되어 합성된 단백질의 C-말단에 융합된다. 이후 라이보솜이 떨어져 나가면 RNA-단백질 complex가 만들어진다. 라이브러리 제조 및 스크리닝은 다른 무세포 디스플레이 기술과 유사하다.

(5) 이멀션 시스템(Emulsion compartments)

무세포 디스플레이의 transcription/translation 반응을 마치

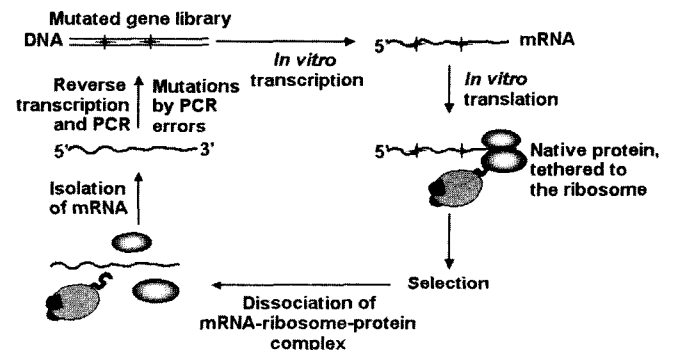


그림 3. RRP complex 형성 및 라이브러리 스크리닝 사이클

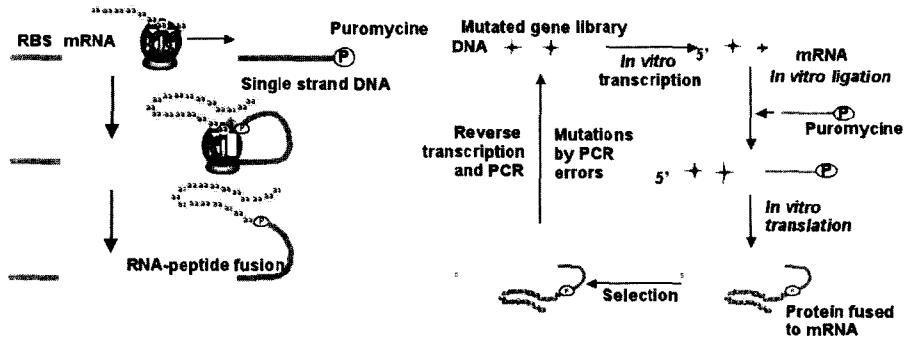


그림 4. PPR complex 형성 원리 및 라이브러리 스크리닝 사이클

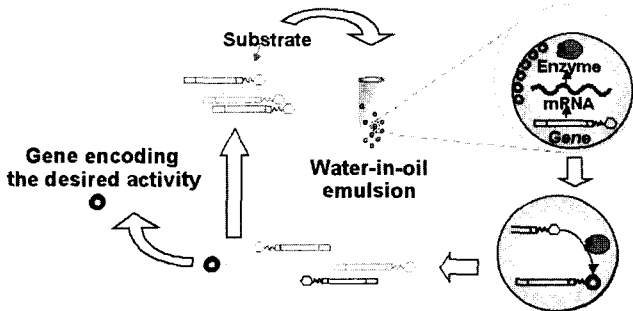


그림 5. 이멀션 시스템을 이용한 효소 라이브러리 스크리닝

하나의 세포내에서 이루어지듯이 water-in-oil emulsion에서 수행하여 마치 인공세포와 같은 환경을 제공하는 방법으로서, 오일에 박테리아 정도 크기(~2.6 μ m 직경)의 작은 물방울이 생성되도록 하고, 물방울 안에는 transcription, translation에 필요한 물질들과 한 분자의 DNA만이 들어가도록 조절한다[9]. 그림 5는 효소 유전자 라이브러리에 효소에 대한 기질을 물리적으로 결합시킨 후, 물방울 내에서 만들어진 효소가 자신의 유전자에 결합한 기질을 변환시켜 결국 효소 활성(phenotype)과 유전자(genotype)을 결합한 상태로 제공하도록 하는 것을 모식화 한 것이다.

(2) 파이지 디스플레이(Phage display)

파이지 디스플레이란 박테리오파이지의 표면 단백질과 외래 단백질을 융합시켜서 살아있는 바이러스 표면에 발현시키는 기술이다[10-11]. 대부분 M13, f1, fd 등의 filamentous 박테리오파이지의 소수 단백질인 cpIII나 주단백질인 cpVIII를 외래 타겟 단백질의 융합 파트너로 사용하며, 최근에는 T7 박테리오파지나 λ 박테리오파지의 표면 단백질을 이용하여 외래 단백질을 디스플레이하는 연구도 활발히 진행되어 왔다.

지금까지 파이지 디스플레이 기술은 펩타이드 라이브러리를 제조하고, 우리가 목적하는 활성의 펩타이드를 선별하는데 가장 많이 이용되어 왔다. 이 외에도 항원, 항체, 리셉터, 사이토카인, 효소 등을 발현시키고, 외래 단백질 유전자에 변이를 주어 변이 라이브러리를 제조하고, 원하는 방향으로 성질이 변화된 단백질의 선별에도 많이 이용되었다.

파이지 디스플레이 라이브러리로부터 원하는 활성의 펩타이드나 단백질을 선별하는 것은 주로 결합력에 근거한 선별법인 biopanning으로 이루어진다(그림 6). 즉, 어떠한 외부 타겟 물질에 친화도가 높은 펩타이드나 단백질의 선별을 위해, 고정화시킨 타겟 물질에 라이브러리를 반응시켜 친화도가 높은 펩타이드 또는 단백질을 발현하고 있는 파이지만이 결합할 수 있도록 한다. 결합하지 않은 파이지는 제거한 후, 결합한 파이지

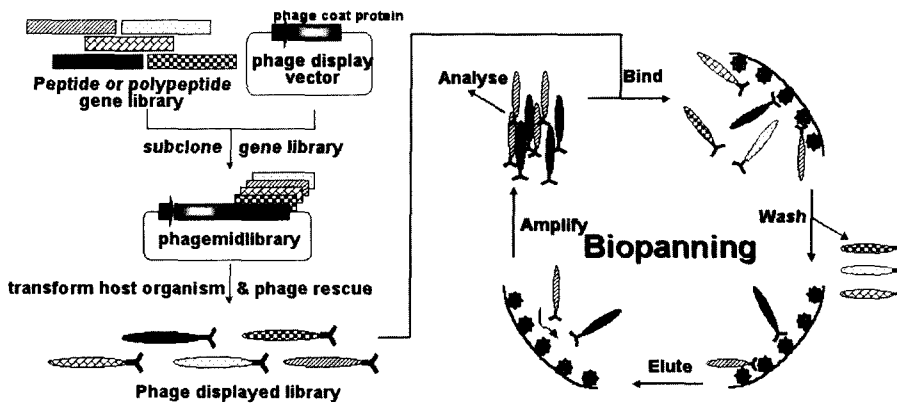


그림 6. 파이지 디스플레이 기술 모식도

를 분리하여 숙주세포에 감염시켜 증폭하고 이를 다시 타겟 물질과의 결합에 이용한다. 이 방법을 3~5회 반복하면 타겟 물질에 가장 높은 친화도를 보이는 펩타이드나 단백질을 얻을 수 있다. Biopanning의 장점은 극히 낮은 수준으로 존재하는 high-affinity phage 경우도 enrichment 과정을 통해 선별이 가능하며, 일단 선별된 파아지는 숙주세포에서 손쉽게 대량 증폭할 수 있고, 증폭된 파아지의 DNA로부터 우리가 알고자 하는 펩타이드나 단백질의 유전정보를 빠르고 용이하게 밝혀낼 수 있다는 것이다.

최근에는 특정 타겟 물질 한가지만이 아닌, 세포 전체를 고정화 시킨 후 세포 표면에 결합하는 펩타이드나 항체를 탐색하여 암세포 표지자의 탐색 등 프로테오믹스 연구에도 응용되고 있다. 또한 biopanning 외에도 *in vivo* selection이 개발되었는데, 이는 파아지 라이브러리를 체내에 주입하여 특정 조직에 결합하는 펩타이드나 항체를 탐색하는 방법이다.

(3) 세포 디스플레이(Cell surface display)

파아지 디스플레이 기술은 위에서 설명한 바와 같이 많은 장점을 가지고 있지만, 발현시킬 수 있는 단백질의 크기에 제한이 있고, 또한 대용량 고속으로 라이브러리를 탐색할 수 있는 flow cytometry를 이용하기에는 파아지 자체의 크기가 너무 작다는 단점이 있다. 이러한 점들을 보완할 수 있고, 또한 상당부분을 대체할 수 있으며, 그 외 여러 가지 새로운 응용분야가 있는 것이 세포 디스플레이 기술이다. 세포 디스플레이 기술이란 원하는 단백질을 세포 표면 발현 모체와 결합시켜 살아있는 세포 표면에 발현시키는 기술을 말한다[12-13]. 현재까지 박테리아 디스플레이 시스템이 가장 많이 연구되었으며, 효모 및 동물세포를 이용한 시스템도 개발되었다.

(1) 박테리아 세포 디스플레이(Bacterial display)

그램 음성 박테리아의 경우 주로 최외각막 단백질이 표면 발현 모체로서 많이 이용되어 왔다. 그 중에서도 LamB, P10E, OmpA가 초기에 가장 활발히 연구되었으나, 발현시키는 외래 단백질의 크기에 제한이 있고, 융합 단백질의 발현이 세포 외각막을 불안정하게 하고, 심지어는 세포의 사멸을 유발하는 경우가 많았다. 그 외에도 다양한 세포 최외각막 단백질들이 표면 발현 모체로서 이용되어 왔지만 여전히 많은 문제점들을 안고 있기 때문에 계속 새로운 모체의 탐색과 기존 모체의 변형 연구가 진행되어 왔다. 최근 지단백질의 분비신호와 OmpA의 세포막 통과부위를 결합시킨 Lpp-OmpA가 Georgiou 등에 의해서 개발되어 20~54 kDa에 해당하는 다양한 크기의 단백질들이 세포 표면에 발현됨을 확인하였으며, 초고속 항체, 효소 개량의 목적으로 연구가 진행되어 왔다[15].

국내에서는 *Pseudomonas syringae* 유래의 병핵활성단백질 (i.e. nucleation protein, INP)을 이용한 세포 디스플레이 기술

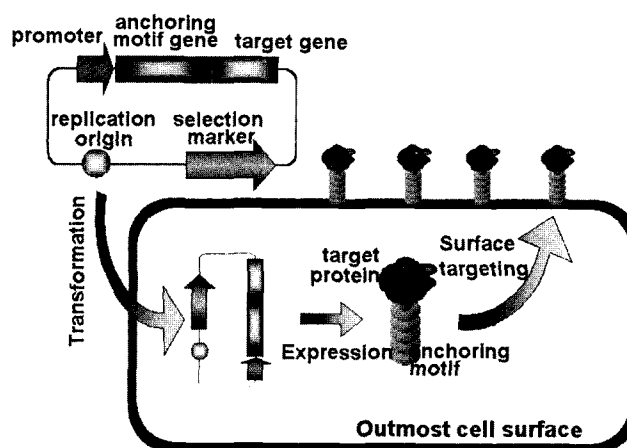


그림 7. 세포 디스플레이 모식도

이 개발되었다. 병핵활성단백질은 세포 최외막 단백질로 세포 표면에 다량 발현될 수 있고, 발현된 단백질은 휴지기에도 안정하게 유지되며, 구조적으로 다른 막 단백질과 달리 세포 표면에 돌출되어 있으며, 단백질 중앙에 존재하는 부위는 필요에 따라 발현될 외래 단백질의 세포 표면 사이의 길이를 임의로 조절할 수 있다. 또한 다양한 그램 음성 박테리아 및 효모에서도 표면 발현되는 등, 세포 표면 발현 모체로서 좋은 장점들을 가지고 있다. 현재까지 다양한 효소와 항원이 발현되었으며, 특히 초고속 효소 개량에 이용할 수 있음이 보고되었다 [16-19].

그램 양성 박테리아 표면 발현 기술 중에서 가장 많은 연구가 이루어진 것은 *Staphylococcus aureus* 유래의 proteinA (SpA)를 이용한 방법이다[20]. 이 경우 *S. hyicus* 유래의 리파제의 분비신호를 사용하며, 표면 결합 모체는 LPXTG로 밝혀졌다. 이 외에도 fibrillar M6, BspA, CwbA 등 다양한 그램 양성균 디스플레이 시스템이 개발되었다.

그램 양성 박테리아나 아키아(archaea)의 세포 표면에 존재하는 paracrystalline surface layer(S-layer) 구성 단백질을 표면 발현모체로 이용한 시스템도 개발되었다[21]. S-layer는 세포 표면을 거의 덮고 있으며, S-layer subunit을 분리하였다가 액상에서 self-assembly가 가능하다. 또한 S-layer의 pore의 크기나 형태가 일정하며, 전체 세포 단백질 중 5~15%를 차지한다. 이러한 특성 때문에 S-layer는 생물공학에 많은 응용이 가능하며, 특히 백신, 진단시약, biomimetics의 개발 및 신규 나노공학으로의 응용이 예상되고 있다.

(2) Yeast display

효모 디스플레이 시스템은 진핵세포 유래 단백질의 발현에 유용하고, 비교적 커다란 분자량의 단백질 발현이 가능하다는 이유로 많은 연구가 이루어졌다[13]. *S. cerevisiae*의 경우 주로 외래 단백질의 표면발현은 GPI(glycosyl phosphatidyl

inositol)-anchor 단백질인 agglutinin을 이용한 시스템이 대표적이며, 이외에도 flocculin, Cwp1P, Sed1P, Tip1P 등의 세포벽 단백질을 이용한 시스템이 개발되고 있다. 최근 국내에서는 *Hansenula polymorpha* 디스플레이 시스템을 세계 최초로 개발하여 효소 및 항체 개량에 이용하고 있다.

디스플레이 기술의 응용

(1) 펩타이드 및 항체 라이브러리 탐색

디스플레이 기술은 부작위 아미노산 서열의 다양한 펩타이드로 구성된 라이브러리 및 항체 라이브러리를 구축하고, 특정 타겟 물질에 특이적으로 결합하는 펩타이드 및 항체를 스크리닝하는데 매우 우수한 방법을 제공한다. 무세포 디스플레이, 파아지 디스플레이, 세포 표면 디스플레이 기술 모두 각각 장단점들이 있다. 무세포 디스플레이는 세포로의 형질전환 과정이 필요없기 때문에 10^{12-16} 정도로 가장 큰 규모의 라이브러리 구축 및 탐색이 가능하다. 단 그림 3, 4에서처럼 라이브러리 증폭시 *in vitro* 상에서 transcription, translation을 행해야 하는 등, 비교적 복잡한 과정을 거쳐야 한다는 단점이 있다. 파아지 디스플레이는 10^{6-11} 규모의 라이브러리로부터 그림 6과 같이 biopanning 방법을 통해서 특정 펩타이드 및 항체를 탐색하는데 이용할 수 있다. 펩타이드 라이브러리의 경우 현재 기술로서는 파아지 디스플레이를 통해서 구축하고, 탐색하는 것이 가장 이상적이다.

파아지 디스플레이 기술에 비하여 세포 표면 발현 기술을 이용한 펩타이드나 항체 라이브러리 탐색은 장단점이 있다. 가장 큰 단점은 라이브러리의 규모를 크게 만들기 어렵다는 것이다(10^9 이하). 하지만 FACS를 이용하면 무세포 디스플레이나 파아지 디스플레이에 비해서 대량의 라이브러리로부터 원하는 특성의 클론을 보다 초고속으로 선별해 낼 수 있다는 큰 장점이 있다. 따라서 출발물질이 될 수 있는 펩타이드나 항체

가 있을 경우, 유전자에 돌연변이를 주어 변이 라이브러리(mutational library)를 제조하고, 탐색하는데는 세포 표면 발현 기술이 갖는 경쟁력은 매우 크다고 할 수 있다.

항체 라이브러리의 경우 주로 기존의 항체를 개량하는데 많은 연구가 이루어 졌다. 그 방법은 주로 다음과 같다. (i) 항체 유전자를 error-prone PCR이나 DNA shuffling 등을 이용하여 돌연변이를 시키고 이를 세포 표면 발현 모체 유전자와 결합시킨다. (ii) 적절한 숙주세포에 형질전환을 시킨 후 융합 단백질을 세포 표면에 발현시킨다. (iii) 형광물질(fluorescein)으로 표식된 항원을 결합시킨다. 만약 항원과 항체간의 결합력이 비교적 큰 경우(Kd < 10nM)에는 추후에 형광물질이 표식되지 않은 항원을 competitor로서 첨가해 준다. (iv) 마지막으로 FACS을 이용하여 형광물질이 많이 결합한 세포를 분리하면 된다. 이렇게 분리한 세포들은 다시 배양하여 위의 과정을 다시 거치게 된다.

현재 개발된 디스플레이 기술들 중에서 항체 라이브러리 스크리닝을 위해서는 효모 디스플레이가 가장 적합하다고 알려져 있다.

(2) cDNA/gDNA/프로테옴 라이브러리 스크리닝

어떤 개체, 기관에서 분리한 cDNA나 gDNA로부터 타겟 단백질을 암호화하는 유전자를 선별하는 방법으로서 디스플레이 기술이 매우 유용함이 인식되고 있다. 특히 cDNA 라이브러리 구축을 파아지 디스플레이로 하는 것은 매우 보편적으로 이루어지고 있다. 디스플레이를 이용하여 구축된 라이브러리에서는 신약 개발의 타겟이 될 수 있는 리셉터나 리간드의 탐색이 많이 이루어졌으며, 또한 기존 개발된 신약의 기전을 밝히기 위하여 신약과 반응하는 단백질 탐색 및 신호전달 관련 단백질 네트워크 분석 등을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한 그림 9에서처럼 특정 병원성 미생물로부터 진단신약, 백신, 치료제 개발의 타겟이 될 수 있는 단백질 스크리닝이 가능하다.

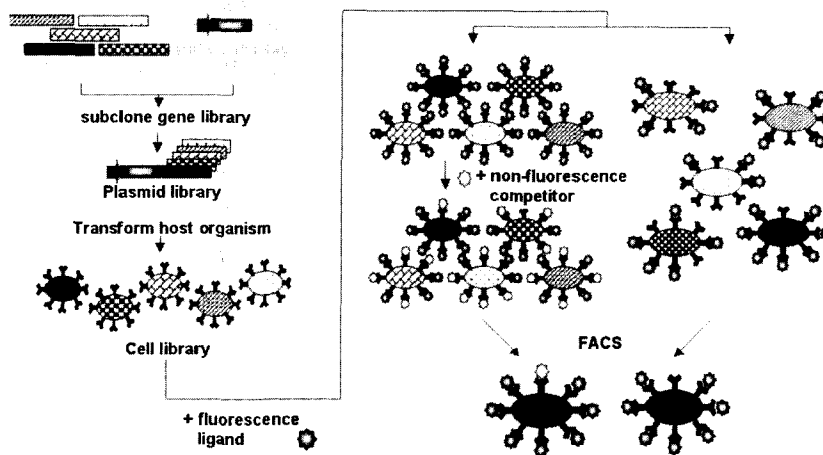


그림 8. 세포 표면 발현 라이브러리로부터 친화력이 증가된 항체의 탐색

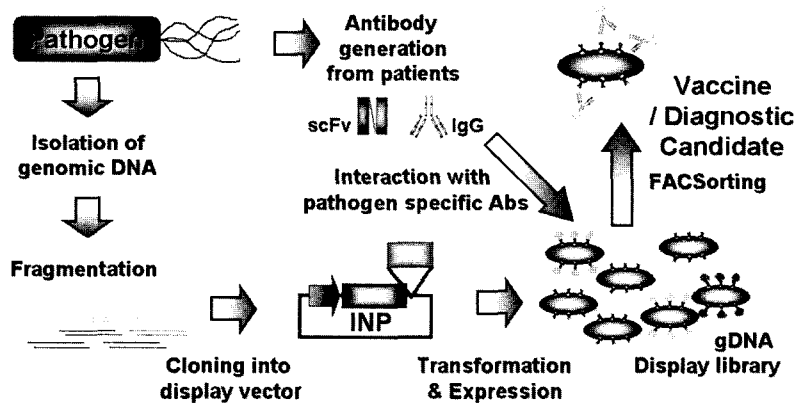


그림 9. 병원성 미생물 cDNA, gDNA 라이브러리부터 진단시약, 백신 개발용 항원의 탐색

(3) 단백질 초고속 발현, 분리, 정제

게놈 시퀀싱 이후 각 유전자의 기능을 밝히기 위해서는 대규모의 유전자를 단백질로 발현시키는 것이 필수적이다. 하지만 기존의 발현 시스템으로서 발현이 불가능한 단백질들이 매우 많음이 보고되면서, 새로운 발현 시스템이 요구되어 왔다. 이런 관점에서 디스플레이 기술은 상기 라이브러리 구축에서 언급한 것처럼 대량의 유전자 발현에 적합하며, 더욱이 기존의 방법으로는 불가능했던 단백질들의 발현에 성공적일 가능성이 있다.

특히 세포 디스플레이 기술 중에서 S-layer 디스플레이 기술을 응용하여 단백질을 쉽게 분리 정제할 수 있는 PurePro™ 발현 시스템이 개발되었으며, 이는 Invitrogen사에서 상품화되었다. 이 시스템은 S-layer 디스플레이의 표면 디스플레이 모티프로 사용되는 RsaA 단백질의 N-말단에 외래 단백질을 융합시켜서 *Caulobacter* 표면으로 발현시킨 후, 표면의 S-layer 층을 배지내에 분비시켜 순도가 90%에 가까운 단백질을 분리 정제할 수 있도록 한다.

빙핵활성단백질을 이용한 대장균 디스플레이는 세계 최초로 혈전형성방지 효과가 있는 살모빈(salmobin)이라는 thrombin-like enzyme을 유전자 재조합 기술을 이용하여 발현하는데 이용된 바 있다. 연세대 김두식 교수님 연구팀에서 발견한 살모사 혈액내 존재하는 살모빈은 6개의 disulfide 결합을 포함하며, N-말단에 분비신호 및 propeptide가 존재한다. 이 살모빈 단백질은 융합 단백질 기법 등 여러 가지 전통적인 방법으로는 활성을 가진 형태로 발현하는데 실패하였으나, mature form의 살모빈을 대장균 표면에 디스플레이한 후, 빙핵활성단백질과 살모빈 단백질 사이를 단백질 분해효소로 절단하여 활성이 있는 형태의 살모빈 효소를 얻을 수 있었다[19].

(4) 초고속 효소개량

Olsen과 Georgiou 등은 개량하고자 하는 효소를 세포 표면에 디스플레이시키고, 세포 표면에 결합할 수 있는 기질-형광물질 복합체를 제조하여, 세포 표면에서 효소 반응시 세포가 형광을 나타내도록 한 후, FACS를 이용하여 활성이 증가한

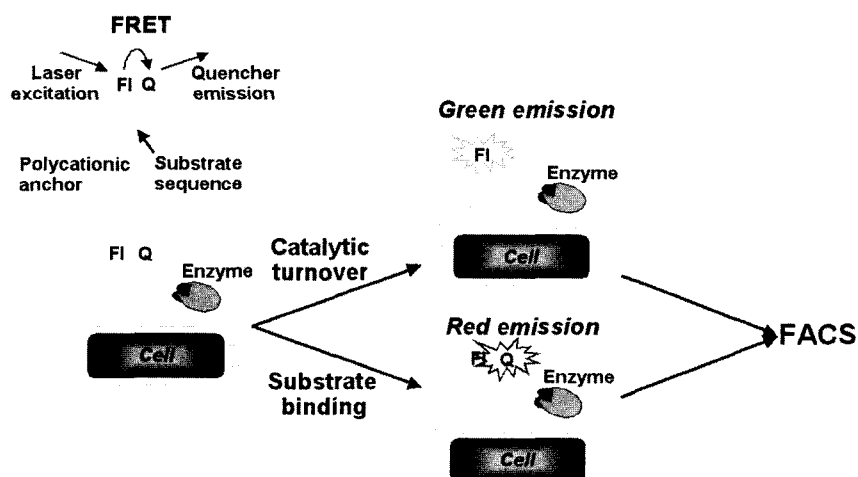


그림 10. FRET 기질을 이용한 표면 발현된 효소 활성 검출

클론을 탐색하는 방법을 개발하였다. 세포 표면은 - 전하를 띠고 있기 때문에 + 전하를 띠는 일종의 세포 표면 결합 모체에 BODIPY(F1), tetramethylrhodamine(Q) 형광물질, 그리고 효소에 대한 기질의 절단 부위가 결합한 FRET(fluorescence resonance energy transfer) 기질을 제조하여 사용하였다(그림 10). F1과 Q 사이에 기질 부위가 위치하므로, FRET 기질이 세포 표면에 결합한 후 디스플레이된 효소에 의해서 절단된다면 F1에 의해서 녹색 파장의 형광이 나타날 것이다. 그러나 단순히 효소가 기질 부위에 결합만 하고, 절단하지 않는다면 적색 파장의 형광이 나타날 것이다. 따라서 기질 분해능이 높은 클론을 효소 표면 발현 라이브러리로부터 FACS를 이용하여 탐색이 가능하다[15].

세포 디스플레이 기술을 이용한 효소 개량의 또다른 예로서 숙주세포의 증식이 표면 발현된 효소의 활성에 의존하도록 하는 방법(growth-linked evolution)이 있다. 과거에 이루어졌던 일반적인 genetic selection의 경우 효소 활성이 증가된 미생물을 탐색하여 그 효소에 대한 생화학적 분석을 해보면, 효소의 비활성이 증가한 것이 아니라 효소의 생산량이 증가한 경우가 대부분이었다. 하지만 표면 발현 기술을 통하여 세포 표면에 발현되는 용합 단백질의 양을 일정하게 유지시킨다면, 비활성이 증가된 돌연변이 클론을 얻을 수 있을 것이다. 미생물내로 들어갈 수 없는 거대 분자를 기질로 이용하는 가수분해 효소의 경우 그 기질의 분해산물을 미생물이 이용하여 생육할 수 있다면 효소 활성과 미생물의 생육을 연결시켜 라이브러리로부터 원하는 클론을 얻을 수 있을 것이다. 국내에서 개발된 병핵활성단백질을 이용하여 CMCcase를 대장균에 디스플레이한 후, 탄소원으로 CMC가 유일한 M9 고체배지(M9/CMC)에서 CMCcase를 표면 발현한 대장균만이 생육함을 보였다. 표면에 발현된 CMCcase의 활성이 좋을수록 M9/CMC 배지에서 빨리 생육할 것이라 판단하여, 효소 라이브러리로부터 활성이 2배 이상 증가한 CMCcase를 쉽게 선별하였다[17].

위와 같은 세포 디스플레이 기술 이외에도 무세포 디스플레이나 파이지 디스플레이 기술도 효소와 기질간의 결합력에 근거하여 효소 개량에 응용하고자 하는 연구가 많이 진행되었다.

(5) 생백신(live vaccine) 개발

항원을 무독화시킨 미생물이나 병원성이 없는 미생물 표면에 발현시켰을 경우 생백신의 개발이 가능하다. 그 이유로는, 첫째 다양한 숙주세포에서 epitope나 항원 단백질을 표면 발현시킬 수 있는 기술이 많이 개발되었으며, 둘째, 일단 세포 표면에 발현된 항원은 면역 시스템에 의해서 쉽게 인식될 수 있을 것이며, 셋째, 세포 표면에는 lipopolysaccharides(LPS) 등이 있어서 면역반응을 높이는 adjuvant 역할을 할 것이라 기대되기 때문이다. 많은 그램 음성 박테리아 시스템에서는 주로 항원을 대장균에서 발현시켜서 여러 가지 특성을 살펴본 후, 생물산업

무독화시킨 *Salmonella*균에서 표면 발현 후 동물 실험을 진행시켜 왔다[18]. 그램 양성 박테리아 표면 발현 시스템의 경우에도 독성이 없는 미생물을 숙주로 하여 생백신 개발이 진행되었다. 특히 최근에는 유산균을 이용한 경구용 생백신 개발이 활발히 진행중이며, BCG 균주나 *Bacillus* 균주에서의 표면 발현을 이용한 생백신 개발도 진행중이다. 효모의 경우에도 생백신 개발이 진행중이지만 박테리아에 비하여 표면에 존재하는 자체 단백질이 많기 때문에 외래 단백질에 대한 항체 생성이 잘 일어나지 않았다.

항원의 세포 표면 발현은 생백신 이외에도 항체를 생산하기 위한 immunogen으로서도 사용이 가능하다. 특히 adjuvant가 필요 없고, 항원의 별도 정제가 필요없기 때문에 비용과 시간을 줄일 수 있다.

(6) 기타

디스플레이 기술은 위 응용분야 이외에도 효소를 세포 디스플레이하여 일종의 고정화 효소와 같이 사용가능한 전세포 생물전환제(whole cell biocatalyst), 독성물질을 분해하거나 제거할 수 있는 단백질을 디스플레이하여 환경정화에 사용가능한 전세포 독성 제거제(whole cell detoxicant), 특정 단백질에 특이적으로 결합하는 단백질이나 펩타이드를 디스플레이하여 고정화지지체로 사용 가능한 전세포 흡착제(whole cell bioadsorbent), 외부 신호를 세포 내부로 전달가능한 단백질을 디스플레이하여 형광 등으로 신호를 가시화할 수 있는 바이오센서(biosensor), 디스플레이된 형태 자체를 단백질 chip으로 제작한 바이오칩(biochip) 등의 제조에 이용될 수 있다.

(http://www.genofocus.com/nrl/nrl_1.htm 참조)

참고 문헌

1. D. Ma and M. Li. 2001. Applications of display technologies to proteomics analyses. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **37**, 34-41.
2. M. Li. 2000. Applications of display technology in protein analysis. *Nat. Biotechnol.* **18**, 1251-1256.
3. G. Georgiou, 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.
4. K. FitzGerald. 2000. In vitro display technologies - new tools for drug discovery. *Drug Discov. Today* **5**, 253-258.
5. P.A. Lohse, W.C. Wright. 2001. In vitro protein display in drug discovery. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **4**, 198-204.
6. Y. Liu, S. Saha, and E. Haggard-Ljungquist. 1993. Studies of bacteriophage P2 DNA replication. The DNA sequence of the cis-acting gene A and ori region and

- construction of a P2 mini-chromosome. *J. Mol. Biol.* **231**, 361-374.
7. C. Schaffitzel, J. Hanes, L. Jermutus, and A. Pluckthun. 1999. Ribosome display: an *in vitro* method for selection and evolution of antibodies from libraries. *J. Immunol. Methods* **231**, 119-135.
 8. R.W. Roberts. 1999. Totally *in vitro* protein selection using mRNA-protein fusions and ribosome display. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 268-273.
 9. A.D. Griffiths and D.S. Tawfik. 2000. Man-made enzymes-from design to *in vitro* compartmentalization. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 338-353.
 10. S.S. Sidhu. 2000. Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 610-616.
 11. K. Johnsson and L. Ge. 1999. Phage display of combinatorial peptide and protein libraries and their applications in biology and chemistry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **243**, 87-105.
 12. W. Chen and G. Georgiou. 2002. Cell-surface display of heterologous proteins: from high-throughput screening to environmental applications. *Biotechnol. Bioeng.* **79**, 496-503.
 13. K.D. Wittrup. 2001. Protein engineering by cell-surface display. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 395-399.
 14. P.S. Daugherty, M.J. Olsen, B.L. Iverson, and G. Georgiou. 1999. Development of an optimized expression system for the screening of antibody libraries displayed on the *Escherichia coli* surface. *Protein Eng.* **12**, 613-621.
 15. M.J. Olsen, D. Stephens, D. Griffiths, P. Daugherty, G. Georgiou, and B.L. Iverson. 2000. Function-based isolation of novel enzymes from a large library. *Nat. Biotechnol.* **18**, 1071-1074.
 16. H.C. Jung, J.M. Lebeault, and J.G. Pan. 1998. Surface display of *Zymomonas mobilis* levansucrase by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae*. *Nat. Biotechnol.* **16**, 576-580.
 17. Y.S. Kim, H.C. Jung, and J.G. Pan. 2000. Bacterial cell surface display of an enzyme library for selective screening on improved cellulase variants. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 788-793.
 18. J.S. Lee, K.S. Shin, J.G. Pan, and C.J. Kim. 2000. Surface-displayed viral antigens on *Salmonella* carrier vaccine. *Nat. Biotechnol.* **18**, 645-648.
 19. H.S. Jeong, S.K. Yoo, and E.J. Kim. 2001. Cell surface display of salmabin, a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon halys* venom on *Escherichia coli* using ice nucleation protein. *Enzyme Microb. Technol.* **28**, 155-160.
 20. M. Hansson, P. Samuelson, E. Gunneriusson, and S. Stahl. 2001. Surface display on gram positive bacteria. *Comb. Chem. High. Throughput Screen.* **4**, 171-184.
 21. W.H. Bingle, J.F. Nomellini, J. Smit. 2000. Secretion of the *Caulobacter crescentus* S-layer protein: further localization of the C-terminal secretion signal and its use for secretion of recombinant proteins. *J. Bacteriol.* **182**, 3298-3301.