

특집 : 포스트-게놈 시대의 단백질 발현 시스템(IV)

재조합 단백질 수탁생산 시스템 개발 사례

성 문 희
(주)바이오리더스

재조합 단백질 대량생산을 위하여 (주)바이오리더스에서는 자체 개발된 항시적 고발현기술(High Constitutive Expression System; HCE System)(표 1 참조)을 핵심원천기술로 활용하여 대장균 및 한국전통 발효식품 미생물인 바실러스 청국장균 등의 다양한 미생물을 재조합 단백질 생산 균주로 사용하는 재조합 단백질 수탁생산 시스템의 개발을 수행하고 있다. 이와 같은 대장균 및 식품미생물 등의 다양한 미생물에서 재조합 단백질의 고발현기술을 바탕으로 고객의 요구에 부응하는 맞춤형 재조합 단백질 수탁생산 체제도 구축하고 있다.

표 1. (주)바이오리더스 재조합 단백질 대량생산 핵심원천기술

- 대장균이용 재조합 단백질 고발현 시스템
- 항시적 고발현 시스템(HCE system)
- 항생물질 비의존형 고발현 시스템(AMPFREE system)
- 식품미생물이용 재조합 단백질 분비발현 시스템

대장균 이용 재조합 단백질 고발현 시스템

1) 항시적 고발현 시스템(High Constitutive Expression System; HCE System)

(주)바이오리더스가 개발한 HCE system은 목적으로 하는 재조합 단백질 발현율이 재조합 대장균 총 단백질의 20~70% 이상의 높은 수율을 보이며(그림 1), 재조합 단백질 발현 시 사용되는 고가의 유도물질의 첨가가 불필요하여 재조합 단백질 생산원가를 크게 절약할 수 있다(그림 2).

(주)바이오리더스의 HCE system은 단백질 기능연구자 및 단백질 소재산업에 부응하는 고객 맞춤형 신속 고발현 체제로서 산업화를 목표로 한 재조합 단백질 생산에 최적의 시스템으로 사료된다.

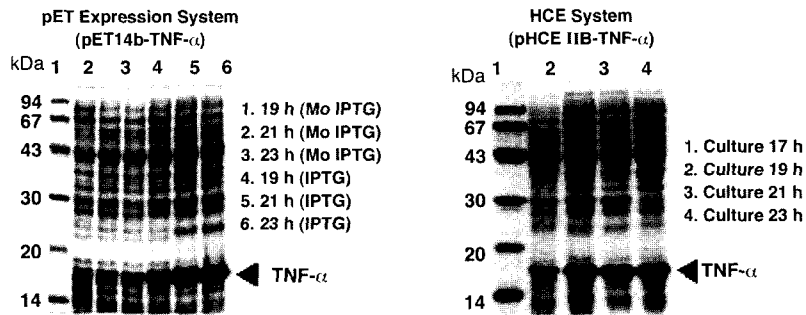


그림 1. TNF - α의 발현율(SDS-PGA분석)

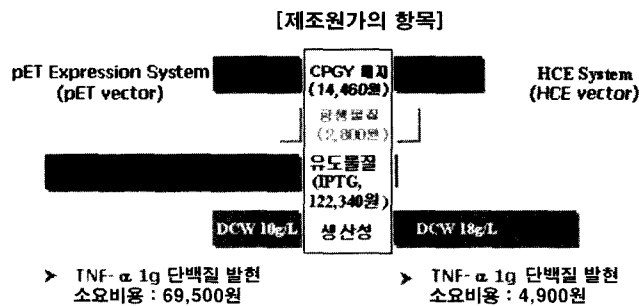


그림 2. 재조합 단백질 생산원가 비교(10L J/F 배양기준)

2 항생물질 비의존형 고발현 시스템(AMPFREE System)

기존 항시적 고발현 시스템에 D-아미노산 합성유전자를 도입하여 항생물질과 inducer의 첨가가 필요없는 새로운 발현시스템 개발에 성공하였다(그림 3). 항생물질 및 inducer의 사용은 배양 scale이 커질수록 원가 및 환경적 측면에서 산업적 생

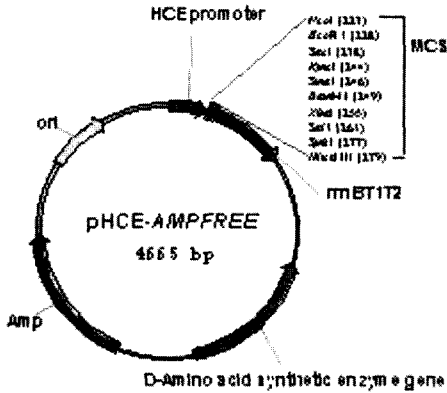


그림 3. pHCE-AMPFREE DNA Vector

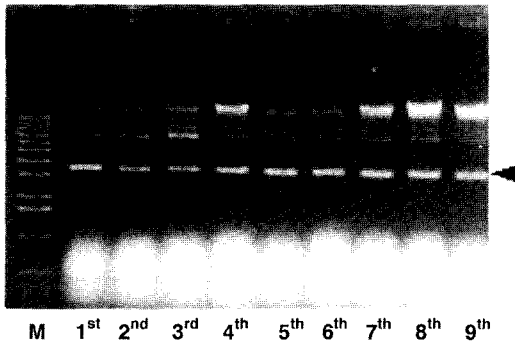


그림 4. 9회 계대배양 후의 plasmid의 안전성(Agarose gel 전기영동)

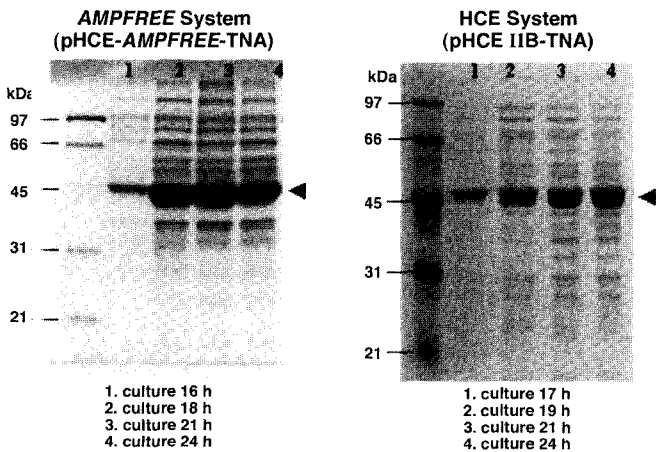


그림 5. 항생물질 비의존형 고발현시스템(AMPFREE System)과 항시적 고발현 시스템(HCE System) 간의 재조합 단백질 발현 비교

산 문제점을 야기시킬 수 있으므로, 이런 면에서 항생물질과 inducer의 첨가없이 발현 plasmid의 안정성도 높은 항생물질 비의존형 고발현 시스템(AMPFREE system)은 재조합 단백질의 산업적 생산에 있어 최적의 발현계로 판단된다(그림 4, 그림 5).

식품미생물 이용 재조합단백질 분비발현 시스템

1) 한국전통 발효식품미생물 *Bacillus subtilis* Chungkookjang균 이용 분비발현계

재조합 단백질의 분비발현 생산을 위하여 분비발현 숙주로 사용되는 *Bacillus subtilis* Chungkookjang은 한국전통 콩발효식품인 '청국장(Chungkookjang)'에서 분리한 균주이며, GRAS(Generally Recognized as Safe) 미생물로 식품 안전성을 확보하고 있다(그림 6). 일반적인 바실러스 균주와 달리 자체 plasmid를 가지고 있지 않아 유전자 조작이 용이하며(그림 7), 그리고 lipase, YncM 및 NK의 분비시그널을 N-말단 측에 배열시켜 배양 상등액으로 재조합 단백질을 효율적으로 분비가능한 재조합 단백질 분비발현 생산 시스템이다(그림 8). 또한 재조합 균주의 배양 및 세포외로 분비된 재조합 단백질의 정제가 비교적 용이하며, scale-up이 간단하여 식품·의약품 단백질의 산업적 생산에 유용한 생산 시스템으로 판단된다.

2) 분비 발현숙주 *B. subtilis* Chungkookjang의 안전성

분비발현숙주인 *B. subtilis* Chungkookjang의 안전성을 조

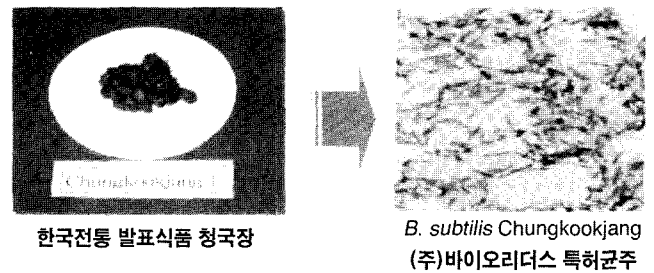


그림 6. 특허균주 *Bacillus subtilis* Chungkookjang

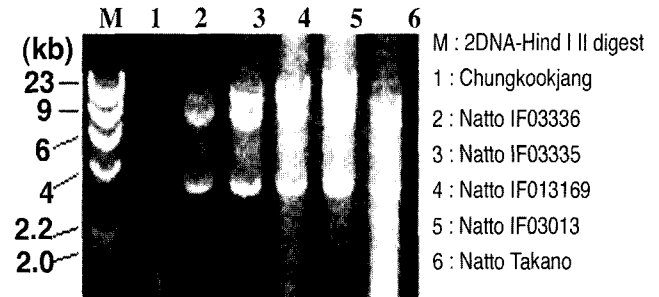


그림 7. 식품유래 바실러스 균주별 플라스미드 보유 여부 비교(Agarose gel 전기영동)

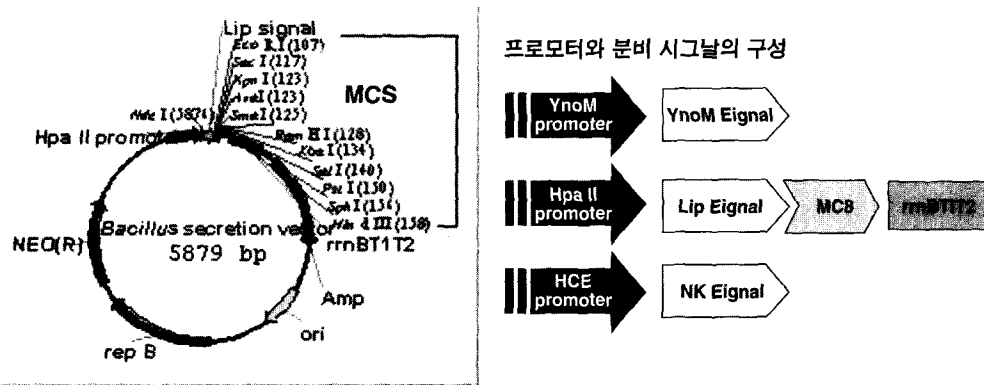


그림 8. *Bacillus* Secretion DNA Vector.

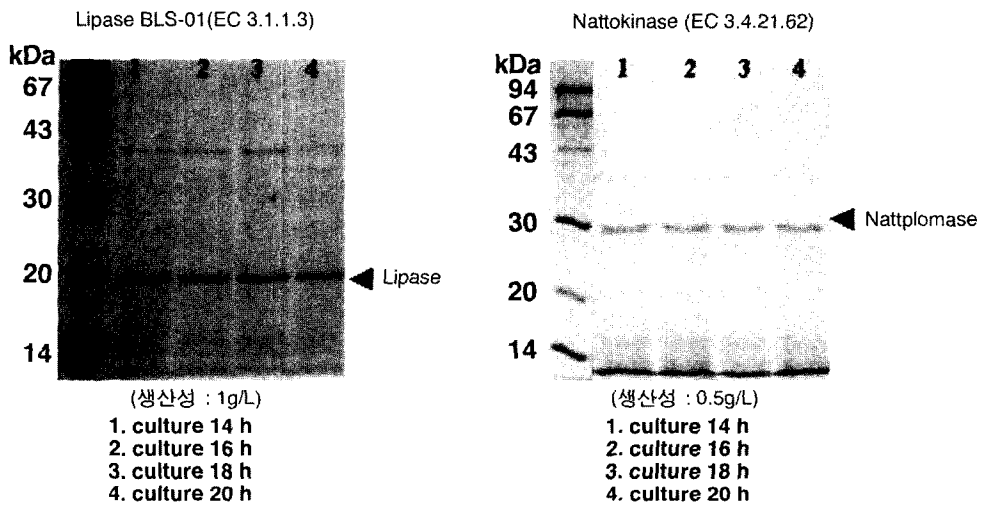


그림 9. *Bacillus* 분비발현계를 이용한 재조합 단백질 생산사례.

표 2. 분비발현숙주 *B. subtilis* Chungkookjang 경구급성독성 시험결과

Death	Clinical signs	Differences in BW changes	LD50	Acute toxicity
0/6	0/6	No	Not accessible	No

(충남대학교 수의과대학 수의학과 전염병학 연구실)

사하기 위하여 경구급성독성(10^{10} cfu/ml, 0.5ml Balb/c mouse 경구투여)을 조사한 결과, 투여 후 14일간 관찰했을 때 체중도 순조로이 진행되었고 해부소견에도 이상이 없었음을 확인하였다.

끝으로 다양한 미생물 이용 재조합 단백질 고발현기술을 핵

심원천기술로 사용한 재조합 단백질 수탁생산 시스템의 활용성을 높이기 위하여 최근에는 장내 정착형 유산균을 포함한 식품 미생물인 유산균을 분비 발현숙주로 사용한 재조합 단백질 및 펩타이드 분비발현기술 개발을 적극적으로 추진하고 있다.