

# 박테리아 디스플레이 기술: 백신에서 나노바이오테크놀로지까지



한국생명공학연구원  
정흥채 박사



시스템미생물연구센터  
(주)제노포커스  
김의중 박사



미생물디스플레이기술  
국가지정연구실  
반재구 박사

**세포** 표면에 존재하는 단백질들은 세포외부의 환경과 직접적으로 접촉하고 있어 다양한 외부물질들과 상호작용이 끊임없이 일어나고 있고 이를 통하여 세포의 기능을 조절하고 있다. 이러한 세포표면단백질로서는 다양한 결합단백질, 영양분의 흡수단백질, 단백질분해관련 단백질, DNA의 세포간 전달을 위한 응집관련 단백질 등이 있다. 하지만 기능성이 있는 외래단백질을 이들 표면단백질에 융합하여 발현함으로써 박테리아 표면에 디스플레이하면 박테리아 세포를 다양한 바이오융합 기술분야에 활용될 수 있게 되었다. 현재까지 디스플레이기술에 대하여 다양한 형태의 리뷰논문(16, 17, 26)이 발표되었기 때문에 본 고에서는 다양한 디스플레이기술의 세세한 기작이나 작용방식에 대해서는 가급적 언급을 회피하고 디스플레이 기술의 응용분야를 중심으로 현재의 기술의 수준과 미래 기술분야를 조사하여 바이오융합 기술분야에 핵심적으로 활용되는 플랫폼기술임을 보이고자 한다. 비록 파아지 디스플레이기술이나 효모 디스플레이기술이 많은 발전과 응용분야가 있지만 박테리아 디스플레이기술을 중심으로 기술하고자 한다. 박테리아 디스플레이도 이에 못지 않게 다양한 시스템이 개발되어 있고 응용분야도 현재 나노바이오분야까지 확장되고 있는 것은 기술의 중요성의 반증이다.

## 1. 박테리아 디스플레이 기술

박테리아 표면에 외래 단백질을 디스플레이하는 기술은 1986년도에 처음으로 보고(5, 10) 된 후 20년 동안 그람음성균에서는 22가지, 그람양성균은 8가지 등 최소한 30여 가지 이상의 박테리아 표면단백질을 활용하여 효과적으로 디스플레이 시스템이 개발되었다(26). 그람음성균에서는 OmpA, LamB, OprF, Lpp'OmpA, EaeA, INP 등과 같은 outer membrane protein (OMP) 들과 IgAb, AIDA-I, Ag43, MisL 등과 같은 autotransporter 들이 가장 일반적으로 사용되었고, 그람양성균에서는 Protein A와 같이 LPXTG 모티프를 갖는 cell-wall anchoring 단백질이 효과적이었다. 현재까지 대표적인 그람음성균과 그람양성균에서의 디스플레이 모티프와 타겟단백질을 <표 1>과 <표 2>에 각각 요약하였다(26). 하

지만 특정 디스플레이 시스템이 전체적으로 우수하다기 보다는 장단점을 가지고 있어 상호보완적이다 하겠다. 시스템 자체의 특징보다는 food-grade 디스플레이 시스템 또는

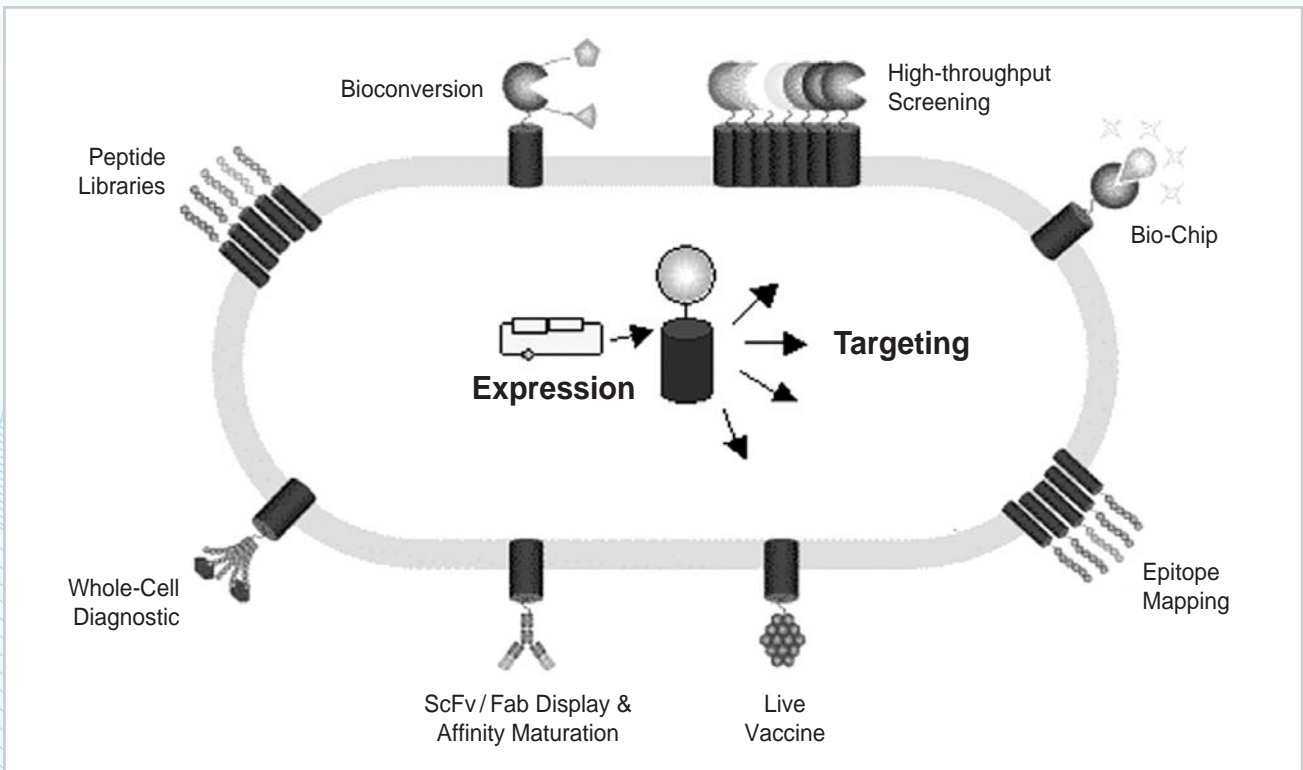
non-GMO 디스플레이 시스템과 같이 어떤 응용분야에 활용하고 있는지가 중요하다 하겠다.

〈표 1〉 개량신약기술이 기술분류체계

Display system	Target proteins	
OMPs	OmpA	Peptides, malarial antigens
	LamB	C3 epitope of poliovirus, peptide library, peptide
	OprF	Malaria epitope
	PhoE	Part of FMDV
	OmpS	Epitopes
	OmpC	(His)6
	FhuA	T7 tag, myc epitope
	BtuB	T7 tag, myc epitope
	Lpp'ompA	GFP, phytochelatin, β-lactamase, scFv, OPH
	Invasin	Peptide library
	EaeA intimin	Epitope mapping
Autotransporters	Inp	CMCase, amylase, lipase, salmabin, OPH, scFv, enzyme library, chitinase, levansucrase
	IgAb	CTB, metallothionein,
	AIDA-I	Peptide antigen, β-lactamase
	Ag43	FimH lectin domain
Extracellular appendages	MisL	Malaria epitope
	Fimbriae	Peptide library
Other systems	Flagella	Peptide library
	PAL	Antibody fragments
	TraT	Poliovirus epitope
	Pullulanase	β-Lactamase

〈표 2〉 대표적인 그람양성균의 디스플레이 시스템

Display system	Target proteins
Protein A	scFv, RSV G protein, IgA- and IgE-specific affibodies, Polyhistidyl peptides, streptavidin
FnBPB	Lipase, $\beta$ -lactamase
M6	E7 protein of human papillomavirus, White faced hormet antigen, tetanus toxin fragment C, nuclease
SpaPI	<i>Bordella pertussis</i> S1 subunit
CwbA	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> invasin
CotB	Tetanus toxin
Mtb19	OspA lipoprotein from <i>Borrelia burgdorferi</i>
SLH	Tetanus toxin fragment C



〈그림 1〉 박테리아 디스플레이 기술의 대표적인 응용분야

## II. 박테리아 디스플레이 기술을 활용한 바이오융합분야

박테리아 디스플레이기술의 초기 연구분야는 주로 생백신개발에 집중되었으나 항체, 효소, 항원, 펩타이드 또는 이들 라이브러리등이 디스플레이됨에 따라 응용분야를 획기적으로 넓여가고 있다. 중요한 응용분야를 <그림 1>에 나타내었다.

### 1) 생백신전달수단(vaccine-delivery vehicle)

초기 박테리아 디스플레이기술은 점막면역유도(mucosal immunization)을 위한 백신전달수단이 주를 이루었다. 점막면역유도는 비경구투여와 같은 전통적인 방법에 비해 국지적으로 항원특이적 분비 IgA의 유도생산이 가능한 장점 때문에 매우 유용한 방법으로 인식되어 왔다. 일반적으로 바이러스나 박테리아의 감염이 호흡기나 장내의 점막을 통해 이뤄지므로 국지적인 점막면역도가 효과적인 백신의 개발의 하나의 전략이 된 것이다. 일반적으로 2가지의 살아있는 박테리아 생백신개발방법이 있는데 *Salmonella*나 *M. bovis* BCG (Baille Calmette-Guerin)와 같이 병원성 미생물을 약독화하여 사용하거나 비병원성 commensal 또는 food-grade 박테리아를 사용하는 것이다. 최근 약독화된 병원성 미생물의 사용시 어린이나 노약자등에 대한 안정성 때문에 비병원성 commensal 또는 food-grade 박테리아를 이용하는 것에 대한 관심이 높아지고 있어 그람양성균인 *S. carnosus*을 이용한 생백신의 개발은 주목할 만 하다 (26). 항원 에피토프(epitope)이 박테리아 표면에 디스플레이된 형태의 서브유닛 백신전달(subunit vaccine delivery) 시스템이다. 초기에는 낮거나 일정치 않는 면역반응을 보였지만 현재는 항원 에피토프와 항원이 점막에 잘 부착되도록 adhesin을 같이 디스플레이함으로써 효과를 극대화하였다. 대장균의 heat-labile toxin의 면역조절 B monomer (LTB)와 HIV-I gp120의 V3 도메인을 표면발현한 *S. gordonii*는 V3 도메인단독으로 발현한 세포에 비해 V3특이적 항체반응이 4배나 증가하였다(20).

박테리아를 활용한 백신개발에 있어서 또 하나의 중요한 사항은 저장과 운반시 안정하게 유지되어야 한다. 이러

한 관점에서 열이나 극한 조건에서 매우 안정한 박테리아 스포아를 기반으로 하는 생백신의 개발이다. 최초의 시도는 *B. subtilis*의 세포벽단백질인 CwbA에 *Yersinia* 유래의 invasion (Inv)단백질을 융합하여 발현하여 스포아 형태로 경구투여하여 강력한 면역반응이 일어남을 실험용 쥐에서 확인하였다(1). 보다 직접적으로 스포아를 이용한 경우는 *B. subtilis*의 스포아코트 단백질인 CotB에 tetanus toxin의 C말단(TTFC)를 결합하여 스포아에 디스플레이한 예이다(12). 이처럼 박테리아 디스플레이기술을 이용한 백신개발은 상업적인 활용이 가장 왕성한 분야라 하겠다.

### 2) White biotechnology를 위한 바이오촉매(whole-cell biocatalyst)

최근 바이오와 화학산업의 융합분야에서 관심이 고조되고 있는 것은 바이오촉매를 활용한 생물전환공정개발을 통해 기존화학산업의 석유자원의존도를 낮춰 환경적, 경제적, 사회적인 이익을 실현하는 데 있다. 전통적인 바이오촉매반응 특히 효소반응을 위해서는 촉매에 해당하는 효소를 발현하고 정제해서 사용하거나 유기용매내 반응과 같은 특정반응을 위해서는 고정화와 같은 안정화과정을 거쳐야 한다. 따라서 효소 생물전환공정 개발을 위해서는 효소생산비용이 가장 중요한 경제성 결정요인이 되고 있고, 고정화과정 또한 대부분 화학적인 반응을 통해 이뤄지고 있어 효소 활성을 낮추거나 안정성에 변화를 줄 수 있다. 최근 효소나 노입자화를 통해서 일부 해결할 수 있음이 보고 되고 있으나 실제 산업적인 스케일에 적용하기에는 아직도 고가인 단점이 있다. 또한 고정화가 가능할 지라도 화학합성 레진등에 고정화된 효소를 이용한 반응에서는 기질이나 산생산물의 물질전달문제가 여전히 남아 있다. 고정화 담체를 이용할 경우 반응액의 약 10% 이상을 사용할 수 없는 점은 단위 고정화 담체당 활성을 갖는 효소의 절대량(enzyme loading capacity)이 높아야 하는 제한점도 발생하게 된다.

반면 박테리아에 디스플레이된 효소의 경우 매우 다양한 장점을 갖게 된다. 우선 효소를 분리정제하지 않고 단순히 세포를 배양하고 회수하는 것으로 효소를 대량으로 준비할 수 있다. 따라서 효소생산 코스트를 획기적으로 낮추어

효소가 고가이기 때문에 상업화가 되지 못한 공정이 경제적 경쟁력을 갖을 수 있게 된다. 화학합성 고정화담체는 대부분 수백  $\mu\text{m}$ 이며 박테리아 세포는 대부분 1~2 $\mu\text{m}$ 이다. 따라서 단위부피 표면적이 박테리아가 수백배 더 높게 되어 단위 부피당 enzyme loading capacity가 훨씬 높고 결과적으로 고정화 효소의 비활성(specific activity)이 높은 장점이 있다. 최근 효소고정화를 위해 100nm 이하의 나노입자화하는 경향도 같은 이유라 하겠다.

박테리아 디스플레이기술을 이용하여 효소를 디스플레이하여 산업적인 적용이 가능한 생물전환공정을 개발한 예를 살펴보면 위와 같은 장점을 확인할 수 있다. 필자의 연구실에서는 *Zymomonas mobilis* 유래의 levansucrase를 대장균의 표면에 디스플레이하여 고정화하였고 단순히 배양 후 세척하여 sucrose 기질이 고농도로 존재하는 반응액에 넣어 레반을 45g/L 이상 제조할 수 있었다(14). 또한 효소반응이 유기용매내에서의 반응이 증가하고 있는 것에 착안하여 리파제를 유기용매내성 박테리아인 *Pseudomonas putida*의 표면에 디스플레이하고 유기용매내 합성반응, chiral resolution 등에 활용이 가능하다고 보고하였다(13). 대장균의 표면에 CBD(cellulose binding domain)과 OPH(organophosphorous hydrolase)를 함께 디스플레이하여 효과적인 신경독가스분해 공정에 활용될 수 있는 예 또한 주목할 만 하다. 특히 셀룰로스에 결합한 형태의 대장균은 45일간 OPH의 활성이 100% 유지되었다. 디스플레이되는 효소가 cofactor가 없는 단순한 monomer인 경우가 대부분이지만 cofactor가 존재하는 reductase도 디스플레이가 됨이 최근 보고되었다(27).

### 3) 흡착을 위한 마이크로입자 (whole-cell bioadsorbent)

생체분자 또는 화학물질등의 리간드와 결합할 수 있는 생체결합단백질(binding protein)등이 코팅되어 있는 마이크로입자 또는 나노입자의 활용은 진단, 센서, 환경정화등 매우 광범위하게 이뤄지고 있다. 박테리아를 마이크로입자로 간주하여 다양한 생체결합단백질을 디스플레이한다면 기존의 화학합성 유기/무기입자로 제조된 결합입자(binding

particle)의 기능을 대체할 수 있는 좋은 신소재가 될 수 있다. 상기한 효소와 마찬가지로 생체결합단백질을 코팅한 입자제조를 위해서는 다양한 방법으로 생체결합단백질을 발현하고 정제하여 화학합성 입자에 부착하는 화학적인 공정을 거쳐야 하지만 박테리아 디스플레이기술을 이용하면 박테리아를 배양하기만 하여 생체결합단백질이 코팅되어 있는 박테리아 마이크로입자를 대량으로 제조가 가능하게 된다. 이러한 박테리아 입자가 다양한 극한 반응조건에서 세포표면이 불안정하여 깨지고 부서지는 단점을 예상할 수 있으나 그런 경우 glutaraldehyde와 같은 cross-linking agent를 활용하여 박테리아 표면을 튼튼하게 만들 수 있고 또 다른 방법으로 매우 튼튼한 박테리아를 활용한다면 쉽게 문제를 해결할 수 있다. 유기용매내성 박테리아등의 활용은 좋은 예이다.

박테리아 디스플레이 기술을 활용한 흡착 마이크로입자 제조 및 활용의 경우는 많은 보고가 있는데 대표적인 예를 다음에 요약하였다. 항체는 대표적인 결합단백질(binding protein)로써 박테리아에 디스플레이하면 박테리아를 기반으로 하는 solid-phase immunoassay에 활용될 수 있는 마이크로입자가 된다(3, 9, 11). 항체를 생산을 위해 수행하는 하이브리도마 배양에 비교할 수 없을 정도의 경제적인 가격과 간단한 배양으로 제조가 가능하다. 또한 분석조건의 최적화를 통하여 나노몰까지 매우 빠르고 정확하게 측정이 가능하였다(6). 항체나 다른 결합단백질의 디스플레이를 통하여 만든 흡착박테리아는 여타의 immunoprecipitation 또는 면역관련 중요한 단백질의 분리정제를 위한 whole-cell bioadsorbent로 활용은 자명하다 하겠다. 반대로 항원에피토프를 디스플레이한 박테리아는 폴리클로날항체 라이브러리로부터 모노클로날항체를 순수하게 분리정제할 수 있다. 예를 들어 100ml 액체배양으로부터 얻어진 박테리아를 이용한다면 적어도 1mg이상의 항체를 분리정제가 가능하였다(7, 25).

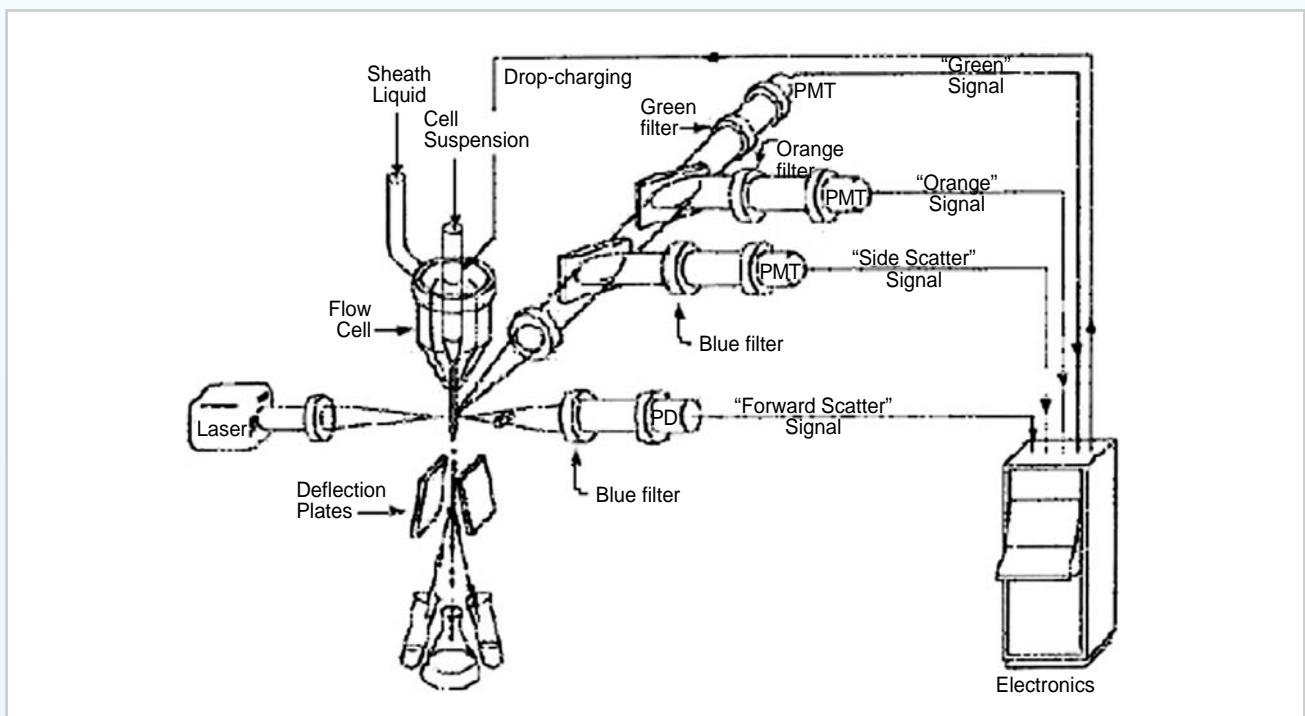
중금속을 선택적으로 결합하는 metallothionein / phytochelatin 또는 histidine-rich 펩타이드등을 디스플레이한 박테리아는 중금속으로 오염되어있는 폐수나 토양을 정화할 수 있는 마이크로입자이다. Metallothionein를 디스

플레이한 대장균의 경우 Cd를 15-20배 이상 축적하였고 phytochelatin를 디스플레이한 *Moraxella*는 10배 이상의 수은을 농축할 수 있었다(2, 23). 이러한 중금속결합박테리아는 특히 저농도로 존재하고 있어 문제가 되는 경우 효과적으로 회수제거할 수 있는 장점이 있다. 중금속으로 오염되어 있는 토양이나 폐수처리에 효과적이지만 단위 박테리아당 흡착할 수 있는 중금속의 양이 낮은 단점이 있는데 현재 디스플레이되는 흡착단백질의 분자수를 획기적으로 높이거나 단백질공학 및 설계기술을 활용하여 중금속과의 결합력을 높이는 노력을 기울이고 있어 멀지 않아 산업적으로 중금속흡착박테리아를 이용할 수 있게 될 것이다.

**4) 초고속 스크리닝 툴  
(combinatorial protein engineering)**

90년대 이후 유전자셔플링(gene shuffling)기술의 도입으로 단백질의 분자진화(directed evolution) 기술은 바이오분자공학의 근본을 바꿀 수 있는 획기적인 기술이 되었

다. 이제 분자진화기술에 의해 활성과 성능이 크게 개선된 산업용 효소는 시장에서 한 부분을 차지하고 있으며 그 비율이 점점 높아가고 있고 단백질의약의 경우 generic을 중심으로 제품 차별화에 적용되고 있다. 그러나 현실적으로 분자진화기술의 실현이 쉽지 않는 것 같다. 왜냐하면 다양하게 제조된 유전자라이브러리(약  $10^6 \sim 10^{11}$ 로 구성)로부터 원하는 유전자를 어떻게 찾을까하는 스크리닝이 매우 어렵고 노동집약적이고 다양한 고가의 기기가 필요한 경우가 많다는 제한점이 있다. 하지만 파아지디스플레이된 항체라이브러리로부터 바이오판닝(biopanning)법이라는 기술을 이용하여 성공적으로 높은 결합력을 갖는 항체를 스크리닝할 수 있게 되어 디스플레이기술이 새로운 초고속 스크리닝(high-throughput screening) 툴로 자리잡게 되었다. 또한 박테리아 또는 효모 디스플레이기술이 세포가  $\mu\text{m}$ 이상의 크기 때문에 유세포분석기(flow cytometry)를 활용할 수 있는 장점이 있어 false positive를 크게 줄이게 되었고 파아지디스플레이 기술을 대체하거나 보완할 수 있게 되었다.



〈그림 2〉 세포나 입자의 레이저빔을 통과해 나오는 세포나 입자의 형광신호를 분석하는거나 초고속으로 분리해 낼 수 있는 flow cytometry.

현재는 항체라이브리리 스크리닝은 1차적으로 파아지 디스플레이 라이브러리로부터  $\mu\text{mol}\sim\text{nmol}$  단위의 결합력을 갖는 후보항체와 2차적으로 후보항체를 다시 라이브리리를 만들어 미생물디스플레이기술과 flow cytometer를 결합하여 affinity maturation하는 방식으로 최종 서브나노몰이하의 결합력을 갖는 항체를 만들어 내고 있다.

현재 flow cytometer는 초당 50,000개의 세포를 분석할 수 있어 박테리아에 구축한 라이브리리는 대부분 1시간 안에 모두 분석할 수 있는 초고속스크리닝기술이 되었다(그림 2 참조). 또한 디스플레이된 결합단백질의 결합 kinetics를 flow cytometer를 활용하여 정확하게 측정할 수 있다. 한 가지 단점은 라이브리리 사이즈가 박테리아의 transformation efficiency에 달려 있다는 것인데 요즘은 대장균에서는  $\mu\text{g}$  DNA당  $10^{10}$ 이상의 클론을 얻을 수 있게 되어 많은 경우 라이브리리 사이즈는 문제가 되지 않게 되고 있다.

박테리아 디스플레이기술을 활용하여 초고속스크리닝에 활용한 예를 살펴보면 ① protein-protein 상호작용, ② 항체엔지니어링(antibody engineering), ③ 효소개량(enzyme engineering), ④ 특정 세포 타겟팅 펩타이드 스크리닝, ⑤ 중금속 흡착단백질 개량등으로 나눌 수 있다. 아래에 대표적인 예를 살펴보았다.

### ① Protein-protein 상호작용

단백질간 상호작용을 위한 응용으로는 항원의 에피토프 mapping을 위하여 항원단백질의 무작위 절편을 박테리아에 디스플레이하고 flow cytometer를 이용하여 스크리닝하는 것은 가장 신속한 방법으로 셋업되었고 새로운 항원에피토프를 찾기 위하여 병원균의 genomic DNA 라이브리리를 디스플레이하여 형광시약과 표식된 항체와의 결합 후 flow cytometer로 스크리닝하는 것을 통해 새로운 백신 후보 에피토프를 확보하는 기술로 활용하고 있다. 대장균의 flagella에 12개의 아미노산으로 이뤄진 펩타이드라이브리리가 구축된 FliTrx™ 시스템(Invitrogen사, 미국)이 판매되고 있어 단백질-단백

질 상호작용시 서로 결합할 수 있는 최소단위 펩타이드 모티프를 탐색하고자 할 때 매우 유용하다(19).

### ② 항체엔지니어링(antibody engineering)

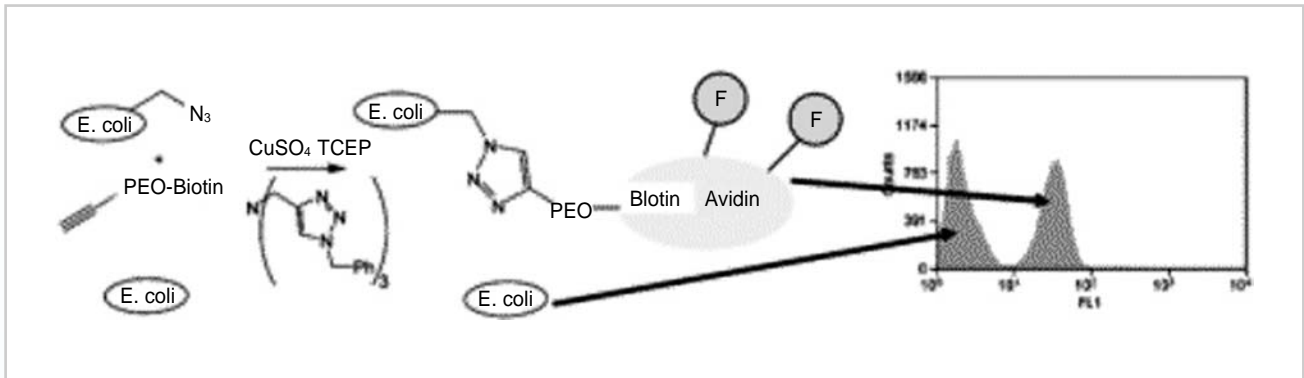
박테리아 표면에 특정 단선허체(scFv)의 라이브리리를 디스플레이하여 결합력이 높아진 항체변이체를 flow cytometer를 통해 성공적으로 스크리닝할 수 있었다(8). 하지만 아직 나이브항체라이브리리(naive antibody library)와 같은 항체라이브리리를 박테리아 표면에 구축한 경우는 보고되지 않았다. 하지만 현재 파아지 디스플레이나 효모 디스플레이에 의한 항체라이브리리는 구축되어 있는 점을 감안한다면 박테리아 디스플레이를 이용한 항체라이브리리를 구축하는 것도 좋은 대안일 수 있다.

### ③ 효소개량(enzyme engineering)

항체와 같은 결합단백질과 달리 효소는 결합과 동시에 촉매반응이 일어나기 때문에 그 활성이 증가한 효소변이체를 디스플레이 라이브리리로부터 스크리닝하기는 매우 어려운 일이다. 그런 측면에서 본 연구팀이 대장균의 표면에 cellulase의 라이브리리를 디스플레이하여 cellulose가 유일탄소원으로 하는 고체배지에서 빠른 성장을 보이는 콜로니를 선택하는 것으로 그 활성이 증가한 효소변이체를 확보할 수 있는 전략은 매우 유용하다. Olsen등이 protease(OmpT)의 기질특이성이 변화한 변이체를 flow cytometer를 이용하여 스크리닝할 수 있는 특수 형광기질을 디자인한 경우는 매우 놀라운 결과이지만 일반화된 효소기질을 디자인하기에 아직도 어려운 전략이다(22).

### ④ 특정 세포 타겟팅 펩타이드 스크리닝

특정 세포를 타겟팅할 수 있는 펩타이드들이 drug delivery 등과 같은 분야에서 중요해지면서 효과적으로 확보하는 기술에 관심이 집중되고 있다. 현재까지는 주로 파아지 디스플레이 펩타이드 라이브리리를 활용하였지만 최근 대장균에 디스플레이된 펩타이드라이브리



〈그림 3〉 디스플레이기술을 활용하여 대장균 표면에 biotin을 디스플레이한 후 형광으로 표식된 avidin과의 결합정도를 비교한 실험결과.

리로부터 인간세포와 결합할 수 있는 펩타이드를 스크리닝할 수 있게 되었다(21). 또한 fibronectin결합단백질을 디스플레이하고 있는 대장균이 non-phagocytic eukaryotic cell에 결합후 세포내로 도입될 수 있는 예는 박테리아 디스플레이 기술이 새로운 peptide entry motif를 찾는데 매우 유용함을 보이고 있다(24).

⑤ 금속 흡착펩타이드 스크리닝

특정 금속과 결합하는 펩타이드는 자연계에 존재하지 않는 경우가 많아 유기/무기 분자 설계 및 이들 컨주게이트를 제작하는 유용하지만 확보하는데 어려움이 있어왔다. 하지만 새로운 금속 흡착펩타이드가 박테리아 디스플레이 펩타이드 라이브러리로부터 쉽게 얻을 수 있게 되었다. 예를 들면 대장균의 OMP LamB에 구축된 펩타이드 라이브러리로부터 iron oxide, gold, chromium등에 결합하는 펩타이드를 확보할 수 있었고(4), FimH adhesin에 구축된 펩타이드 라이브러리로부터 Zn<sup>2+</sup>와 결합하는 새로운 펩타이드를 찾을 수 있었다(15). 이렇게 확보된 새로운 결합기능을 갖는 펩타이드는 바이오센서나 환경정화를 위한 whole-cell bioadsorbent로 개발될 수 있을 것이다.

5) 나노바이오테크노로지

현재까지는 자연계에 존재하는 20개의 아미노산으로 구성되어 있는 단백질이나 펩타이드등을 디스플레이하였기

때문에 응용할 수 있는 분야가 제한될 수 있었다. 하지만 대장균의 표면에 다양한 chemical functionality를 부여하여 나노바이오테크놀로지 분야의 혁신적인 응용분야를 창출하고 있다(18). 예를 들어 Link등은 azidohomoalanine 이 methionine을 대체할 수 있는 점을 이용하여 대장균의 OMP인 OmpC의 C말단에 6개의 methionine을 붙이고 세포표면에 디스플레이되도록 한 후 methionine 대신 azidohomoalanine이 있는 최소배지에 대장균을 배양하여 azidohomoalanine 이 methionine을 대체하고 세포밖으로 노출될 수 있도록 하였다. 이런 후 [3+2]Cu-mediated Azide-alkyne cycloaddition반응을 통해 대장균세포를 biotin으로 코팅할 수 있게 되었다. Biotin이 디스플레이된 대장균입자를 만들 수 있게 되었고 형광으로 표식된 avidin과의 결합이 이뤄짐을 알 수 있었다(〈그림 3〉 참조). 이렇게 제조된 박테리아입자는 바이오센서, 세포칩등 나노바이오 융합분야의 기술발전을 촉발할 수 있으리라 기대된다.

III. 결 언

박테리아 디스플레이 기술은 타겟단백질이나 펩타이드의 기능에 따라 매우 다양한 응용분야를 창출할 수 있어서 바이오융합분야의 연구개발 및 제품개발을 위한 플랫폼기술로 자리를 잡았다. 개발초기에 디스플레이되는 타겟단백질의 세포당 수가 낮은 단점들은 다양한 보완적인 디스플레



이 시스템의 개발로 극복할 수 있었고 박테리아가 1 $\mu$ m 정도의 작은 입자임에 따라 부피당 표면적이 넓고 적용시 대부분 10<sup>8</sup>~10<sup>11</sup> 이상의 세포를 활용하기 때문에 총 디스플레이 되는 타겟분자의 총 수는 매우 높다고 하겠다. 최근 단백질이나 펩타이드 디스플레이뿐 아니라 다양한 chemical functionality를 갖는 분자들을 in vivo 및 in vitro 방법을 통해 디스플레이가 가능함에 따라 디스플레이의 응용분야는 상상을 뛰어 넘고 있다. 따라서 이제는 디스플레이 시스템 자체를 개발하는 것보다 개발된 디스플레이 기술을 활용한 다양한 바이오융합기술분야의 혁신적인 적용이 훨씬 중요한 시대가 되었다. 머지않아 파아지 디스플레이처럼 박테리아 디스플레이 기술도 산업적으로 중요한 플랫폼기술로 자리잡을 것이다. ㉔

〈참고 문헌〉

1. Acheson, D. W. K., A. L. Sonenshein, J. M. Leong, and G. T. Keusch. 1997. Heat-stable spore-based vaccines: Surface expression of invasins-cell wall fusion proteins in *Bacillus subtilis*. *Vaccines* 97:179-184.
2. Bae, W., A. Mulchandani, and W. Chen. 2002. Cell surface display of synthetic phytochelatin using ice nucleation protein for enhanced heavy metal bioaccumulation. *Journal of Inorganic Biochemistry* 88:223-227.
3. Bassi, A. S., D. N. Ding, G. B. Gloor, and A. Margaritis. 2000. Expression of single chain antibodies (ScFvs) for c-myc oncoprotein in recombinant *Escherichia coli* membranes by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae*. *Biotechnology Progress* 16:557-563.
4. Brown, S. 1997. Metal-recognition by repeating polypeptides. *Nature Biotechnology* 15:269-272.
5. 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 Journal* 5:3029-3037.
6. Chen, G., J. Cloud, B. L. Iverson, and G. Georgiou. 1996. A quantitative immunoassay utilizing *Escherichia coli* cells possessing surface-expressed single chain Fv molecules. *Biotechnology Progress* 12:572-574.
7. Christmann, A., A. Wentzel, C. Meyer, G. Meyers, and H. Kolmar. 2001. Epitope mapping and affinity purification of monospecific antibodies by *Escherichia coli* cell surface display of gene-derived random peptide libraries. *Journal of Immunological Methods* 257:163-173.
8. Daugherty, P. S., G. Chen, M. J. Olsen, B. L. Iverson, and G. Georgiou. 1998. Antibody affinity maturation using bacterial surface display. *Protein Engineering* 11:825-832.
9. Francisco, J. A., R. Campbell, B. L. Iverson, and G. Georgiou. 1993. Production and fluorescence-activated cell sorting of *Escherichia coli* expressing a functional antibody fragment on the external surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:10444-10448.
10. Freudl, R., S. MacIntyre, M. Degen, and U. Henning. 1986. Cell surface exposure of the outer membrane protein OmpA of *Escherichia coli* K-12. *Journal of molecular biology* 188:491-494.
11. Gunneriusson, E., P. Samuelson, M. Uhlen, P. A. Nygren, and S. Stahl. 1996. Surface display of a functional single-chain Fv antibody on staphylococci. *Journal of Bacteriology* 178:1341-1346.
12. Isticato, R., G. Cangiano, H. T. Tran, A. Ciabattini, D. Medaglini, M. R. Oggioni, M. De Felice, G. Pozzi, and E. Ricca. 2001. Surface

- display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology* 183:6294–6301.
13. Jung, H. C., S. J. Kwon, and J. G. Pan. 2006. Display of a thermostable lipase on the surface of a solvent-resistant bacterium, *Pseudomonas putida* GM730, and its applications in whole-cell biocatalysis. *BMC Biotechnol* 6:23.
  14. Jung, H. C., J. M. Lebeault, and J. G. Pan. 1998. Surface display of *Zymomonas mobilis* levansucrase by using the ice- nucleation protein of *Pseudomonas syringae*. *Nature Biotechnology* 16:576–580.
  15. Kjaergaard, K., M. A. Schembri, and P. Klemm. 2001. Novel Zn<sup>2+</sup>-Chelating Peptides Selected from a Fimbria-Displayed Random Peptide Library. *Applied and Environmental Microbiology* 67:5467–5473.
  16. Kondo, A., and M. Ueda. 2004. Yeast cell-surface display – Applications of molecular display. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64:28–40.
  17. Lee, S. Y., J. H. Choi, and Z. Xu. 2003. Microbial cell-surface display. *Trends in biotechnology* 21:45–52.
  18. Link, A. J., and D. A. Tirrell. 2003. Cell surface labeling of *Escherichia coli* via copper(I)-catalyzed [3+2] cycloaddition. *J Am Chem Soc* 125:11164–5.
  19. Lu, Z., K. S. Murray, V. Van Cleave, E. R. LaVallie, M. L. Stahl, and J. M. McCoy. 1995. Expression of thioredoxin random peptide libraries on the *Escherichia coli* cell surface as functional fusions to flagellin: A system designed for exploring protein-protein interactions. *Bio/Technology* 13:366–372.
  20. Maggi, T., M. Spinoso, S. Ricci, D. Medaglini, G. Pozzi, and M. R. Oggioni. 2002. Genetic engineering of *Streptococcus gordonii* for the simultaneous display of two heterologous proteins at the bacterial surface. *FEMS Microbiology Letters* 210:135–141.
  21. Nakajima, H., N. Shimbara, Y. Shimonishi, T. Mimori, S. I. Niwa, and H. Saya. 2000. Expression of random peptide fused to invasins on bacterial cell surface for selection of cell-targeting peptides. *Gene* 260:121–131.
  22. Olsen, M. J., D. Stephens, D. Griffiths, P. Daugherty, G. Georgiou, and B. L. Iverson. 2000. Function-based isolation of novel enzymes from a large library. *Nature Biotechnology* 18:1071–1074.
  23. Sousa, C., P. Kotrba, T. Ruml, A. Cebolla, and V. De Lorenzo. 1998. Metalloadsorption by *Escherichia coli* cells displaying yeast and mammalian metallothioneins anchored to the outer membrane protein LamB. *Journal of Bacteriology* 180:2280–2284.
  24. Taschner, S., A. Meinke, A. Von Gabain, and A. P. Boyd. 2002. Selection of peptide entry motifs by bacterial surface display. *Biochemical Journal* 367:393–402.
  25. Wentzel, A., A. Christmann, T. Adams, and H. Kolmar. 2001. Display of passenger proteins on the surface of *Escherichia coli* K-12 by the enterohemorrhagic *E. coli* intimin EaeA. *Journal of Bacteriology* 183:7273–7284.
  26. Wernerus, H., and S. Stahl. 2004. Biotechnological applications for surface-engineered bacteria. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 40:209–228.
  27. Yim, S. K., H. C. Jung, J. G. Pan, H. S. Kang, T. Ahn, and C. H. Yun. 2006. Functional expression of mammalian NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase on the cell surface of *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.*