

반복단위 단백질 고분자의 유전공학적 합성 및 응용

박 미 성 · 최 차 용 · † 원 종 인
서울대학교 화학생물공학부, ¹홍익대학교 화학공학과
(접수 : 2007. 4. 30., 게재승인 : 2007. 7. 11.)

Genetic Synthesis and Applications of Repetitive Protein Polymers

Mi-Sung Park, Cha-Yong Choi, and Jong-In Won[†]

School of Chemical and Biological Engineering, Seoul National University, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Korea

¹Department of Chemical Engineering, Hongik University, Mapo-gu, Seoul 121-791, Korea

(Received : 2007. 4. 30., Accepted : 2007. 7. 11.)

This study introduces the characteristics and some applications of repetitive polypeptides, especially to the biomaterial, tissue engineering scaffolds, drug delivery system, and DNA separation systems. Since some fibrous proteins, which consist of repeating peptide monomers, have been reported that their physical properties are changed dramatically by means of temperature alteration or pH shifting. For that reason, fibrous protein-mimetic polypeptides, which are produced by the recombinant technology, can be applied to the diverse biological fields. Repetitive polypeptides can also be used in the bioseparation area such as DNA sequencing, because they make DNA separation possible in free-solution electrophoresis by conjugating DNA fragments to them. Moreover, artificial synthesis of repetitive polypeptides helps to demonstrate the correlations between mechanical properties and structures of natural protein polymer, which have been proven that repetitive domains are affected by the sequence of the repeating domains and the number of repeating subunits. Repetitive polypeptides can be biologically synthesized using some special cloning methods, which are represented here. Recursive directional ligation (RDL) and controlled cloning method (CCM) have been proposed as excellent cloning methods in that we can control the number of repetition in the multimerization of polypeptides and the components of repetitive polypeptides by either method.

Key Words : Biomaterials, protein polymers, repetitive polypeptides, fibrous proteins, DNA multimerization cloning methods

서 론

인위적으로 합성된 단백질 (artificial proteins)은 조직공학 소재로서의 응용 잠재력이 높아서 의학적 관심을 많이 받고 있다. 특히 콜라겐 (collagen)이나 실크 (silk) 같은 섬유상 단백질의 경우 단백질 1차구조상 몇 개의 아미노산이 반복되는 구조를 가지고 있으며, 이러한 특정 아미노산 단위체 (monomer)의 반복은 섬유상 단백질의 특이적인 단백질 2차구조를 유발한다. 콜라겐의 triple helices 구조와 대부분의 실크에서 나타나는 β -keratin구조가 그 대표적인 예라고 볼 수 있으며, 이러한 단백질을 통틀어 반복단위 단백질 (repetitive polypeptides)이라 한다(1). 반복적 구조를 갖

는 단백질의 특이적 2차구조는 강도나 탄성, 녹는점 등의 물리적인 성질에 큰 영향을 미치며, 이러한 특이성 때문에 여러 분야에 이들 단백질의 응용에 대한 연구가 현재 활발히 진행되고 있다. 이러한 반복단위 단백질들은 다른 일반적인 단백질과 비교할 때, 전하 및 크기, 소수성 등의 물성을 엄격하게 조절할 수 있다는 특징을 가지고 있다. 구성하는 아미노산의 종류나 반복되는 단위체의 횟수를 조절함으로써 물성이 변화되는 특징을 이용해서, 우리가 원하는 물성을 갖는 단백질을 인공적으로 제작하는데 응용될 수 있다. 뒤에서 소개하겠지만, 실제로 이러한 반복단위 단백질은 단백질의 정제, 약물전달 시스템, 그리고 DNA 염기서열 분석 등에 응용되어 연구되고 있다. 또한 화학적으로 합성된 고분자 물질과 달리 반복단위 단백질은 생분해성 (biodegradable), 생체적합성 (biocompatibility) 등이 우수하여 조직공학의 생체재료로서의 응용이 용이할 뿐만 아니라, 균일한 (monodisperse) 특성을 요구하는 고분자를 유전공학적 방법에 의하여 얻을 수 있다는 장점을

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Hongik University, Sangsu-dong, Mapo-gu, Seoul 121-791, Korea
Tel : +82-2-320-1672, Fax : +82-2-3143-1129
E-mail : jiwon@hongik.ac.kr

가지고 있다.

본 논문에서는 반복단위 단백질의 생산방법과 함께 그 특징을 살펴보고, 반복단위 단백질의 응용 연구가 진행되고 있는 몇 가지 분야의 예를 제시함으로써, 반복단위 고분자의 유용성을 보이고자 한다.

반복단위 단백질의 합성

반복단위 단백질은 특정 아미노산으로 구성된 단위체가 반복되는 형태를 가지고 있기 때문에, 합성하는 과정에서 단위체의 반복 횟수를 정확하게 제어하는 것이 무엇보다 중요하다. 폴리펩타이드를 합성하는 방법은 크게 화학적 방법과 유전공학적 방법이 있는데, 화학적 합성의 경우 펩타이드 한쪽 끝을 불용성 고체 지지대 (solid support)에 부착한 상태에서 합성하는 방법이 일반적이다. 이러한 화학적 방법은 올리고 펩타이드 합성에는 효과적이거나, 펩타이드 사슬이 길어질수록 합성되는 아미노산의 수율이 현저히 떨어지게 되어, 긴 폴리펩타이드를 합성하는데 있어서 한계점을 나타낸다(2). 반면 유전공학적 방법은 화학적 방법에 비하여 상대적으로 과정이 복잡하고 시간도 오래 걸리지만, 길이에 따른 수율 저하가 적어 긴 단백질 (또는 긴 폴리펩타이드)을 생산할 경우 이용될 수 있다. 본 논문에서는 유전자 클로닝을 통한 유전공학적 방법에 대해서 자세히 다루어 보도록 하겠다.

클로닝 방법을 사용하여 반복단위 단백질을 합성한 것은 1990년대 초에 처음 보고되었다. 1992년에 발표한 한 논문에 의하면, (AlaGly)₃ProGluGly를 반복단위체로 하는 폴리펩타이드를 연속적으로 encoding한 DNA를 성공적으로 multimerization 하였다(3). DNA 단위체의 양쪽 끝에 *BanI* site를 디자인 한 후, self-ligation하여 일정한 방향성을 가진 DNA multimer를 얻을 수 있었다. 회문식 인식부위 (palindromic recognition site)를 갖는 일반적인 제한효소와 달리, *BanI*은 비회문식 인식부위 (non-palindromic recognition site)를 가지므로, DNA 단위체 양 끝에 *BanI* 인식부위가 있을 경우, 일정한 방향성 (head-to-tail)을 갖는 DNA 중합이 가능하다. 이 연구 보고에 의하면 27 repeats까지 DNA중합이 가능하였고, 이에 따른 단백질 발현도 성공적으로 이루어졌다. 그러나 이 방법은 실제로 self-ligation 정도를 조절할 수 없어 실험의 재현이 힘들고, *BanI* 인식부위가 DNA 단위체 양 끝에 존재해야만 한다는 제약이 뒤따랐다. 이 경우, 첨가한 *BanI* site가 원하지 않는 단백질을 발현시키므로 원하는 단백질 생산에 문제점으로 지적되었다.

이후, Prince *et. al.*은 self-ligation 정도를 제어함으로써, DNA 단위체의 중합도를 조절할 수 있는 방법을 고안하였다(4). 이 연구에서는 원하는 DNA fragments의 양쪽 끝을 같은 제한효소가 아닌 다른 효소로 자르는 것이 핵심인데, 이 연구그룹에서는 *NheI*과 *SpeI*을 사용하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이, *NheI*과 *SpeI*의 전체적인 인식부위 (recognition site)는 다른 반면, 효소처리 한 후 나타난 overhang 부분이 같다. 따라서 overhang 사이의 ligation이 가능한데, 일단 ligation이 head-to-tail 방향으로 진행된다면

*NheI*과 *SpeI* 어느 것으로도 잘릴 수 없게 된다. 하지만 head-to-tail 결합이 아닌 head-to-head (또는 tail-to-tail) 결합의 경우, *NheI*이나 *SpeI* 제한효소로 잘릴 수 있으므로, self-ligation 후 *NheI*과 *SpeI*으로 처리하면 head-to-tail 결합으로 중합된 DNA multimer만을 얻을 수 있다. 이 사실에 기초하여, 이 논문에서는 DNA fragments의 ligation의 제어가 가능함을 보였다. 하지만 이 방법 역시 DNA 단위체 양 끝에 *NheI*과 *SpeI*의 인식부위가 존재해야 한다는 제약이 뒤따랐다.

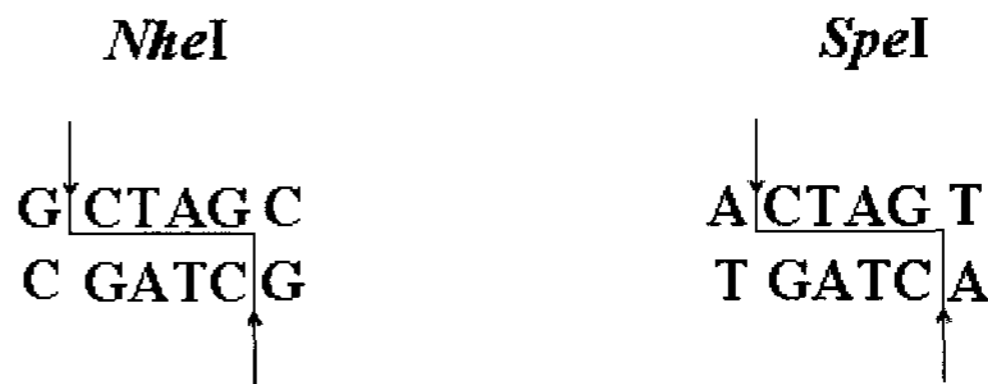


Figure 1. Recognition and cleavage sites of *NheI* and *SpeI*.

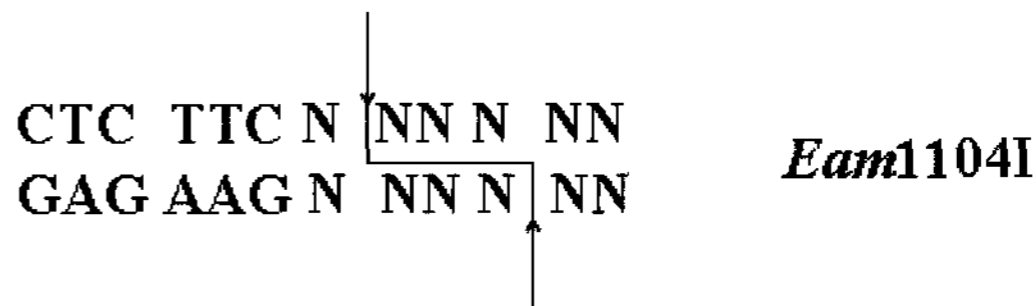


Figure 2. Recognition and cleavage sites of *Eam1104I*

1999년 한 논문에서는 특정 제한효소의 인식부위가 DNA 단위체에 요구되는 제약을 제거하는 방법이 소개되었는데, 이 논문에서는 특정한 제한효소를 사용함으로써 이 문제를 해결하였다(5). 이 논문에 소개된 *Eam1104I*이라는 제한효소는 Fig. 2에 나타내었으며, 인식부위와 절단부위 (cleavage site)가 떨어져 있다는 특징이 있다. Fig. 2에서 알 수 있듯이 절단부위에 어떤 염기가 위치해도 절단이 가능하므로, DNA 단위체에 인식부위가 존재함으로써 발생하는 원치 않는 단백질의 발현을 방지할 수 있었다. 또한 절단부위를 비회문구조로 디자인 할 경우, DNA 단위체를 일정한 방향 (head-to-tail)으로 self-ligation할 수 있었다. 하지만 이 방법은 위의 방법과 달리, 반복횟수를 제어할 수 없어 재현성이 떨어진다는 단점이 존재했다.

위에서 언급한 문제점들을 해결하기 위해서 2002년에 RDL (Recursive Directional Ligation)과 CCM (Controlled Cloning Method) 이라는 두 가지 클로닝 방법들이 소개되었다(6, 7). 이 방법들은 앞서 문제점으로 지적한 DNA 단위체의 반복횟수 조절의 어려움과 DNA 단위체에 인식부위가 존재함으로써 발생하는 원치 않는 단백질의 발현을 동시에 해결했다는 점에서 그 의의가 있다고 하겠다. 이러한 방법에 사용되는 제한효소들은 다음과 같은 특징을 가지고 있어야 했다. 클로닝 방법에 쓰이는 두 가지 제한효소는 서로 다르면서도 방향성 (head-to-tail)을 가지고 ligation 하기 위해서는 상보적인 overhang을 가지고 있어야 한다는 점이다. 그 다음으로는 두 가지 제한효소의 인식부위가 재조합 벡터 내에 각각 오직 한군데씩만 존재해야 한다는 점이다. 마지막으로 균일한 재조합 DNA를 얻기 위해 두 제한효소의 site는 발현될 DNA 염기서열에 영향을

미치지 않아야 한다는 점이다. 다만 CCM의 경우, PCR과 두 가지 제한효소의 유사성에 기초를 두어 진행하였다는 점에서 RDL 방법과 다소 차이를 보였다.

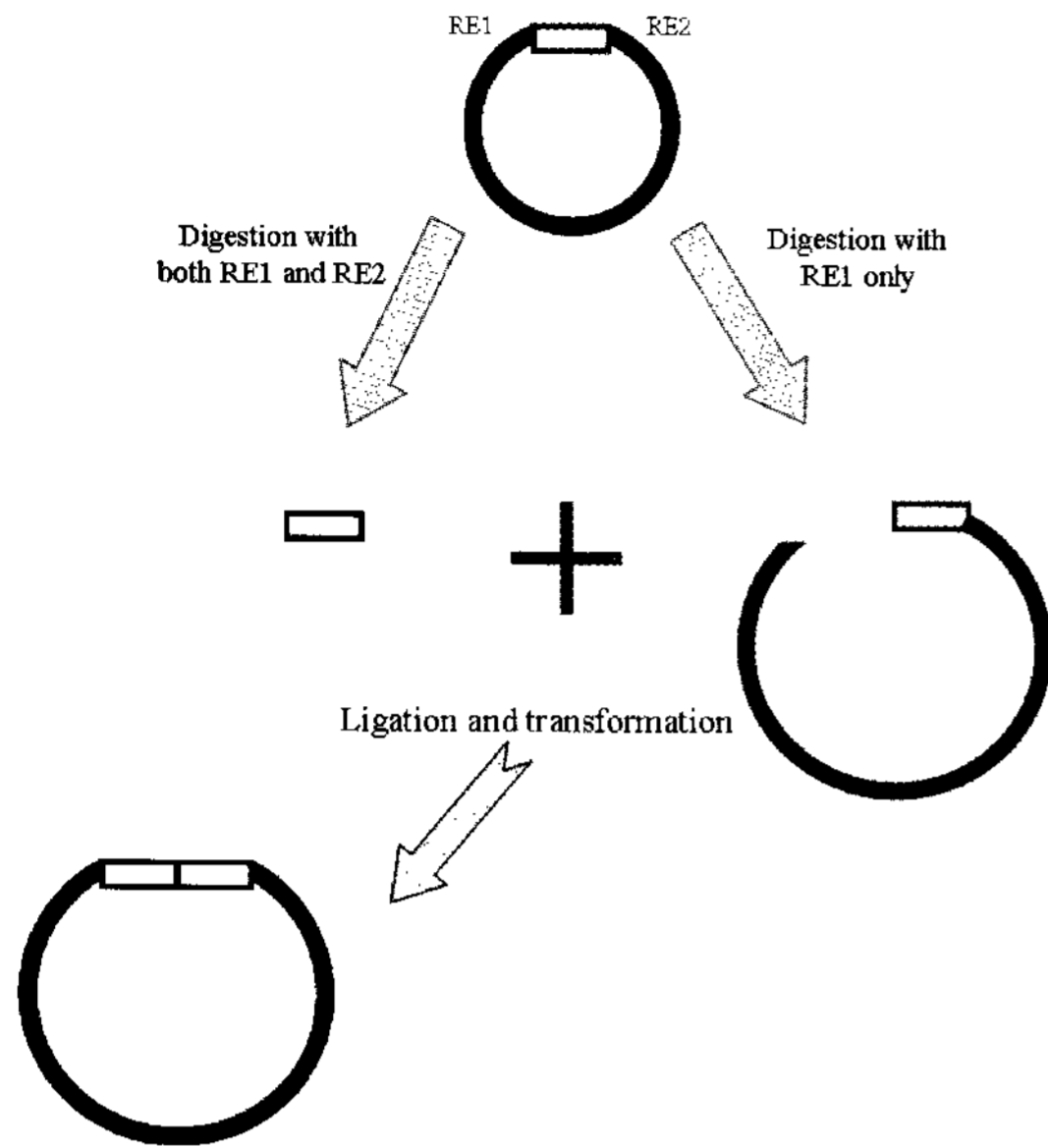


Figure 3. Schematic presentation of RDL(6).

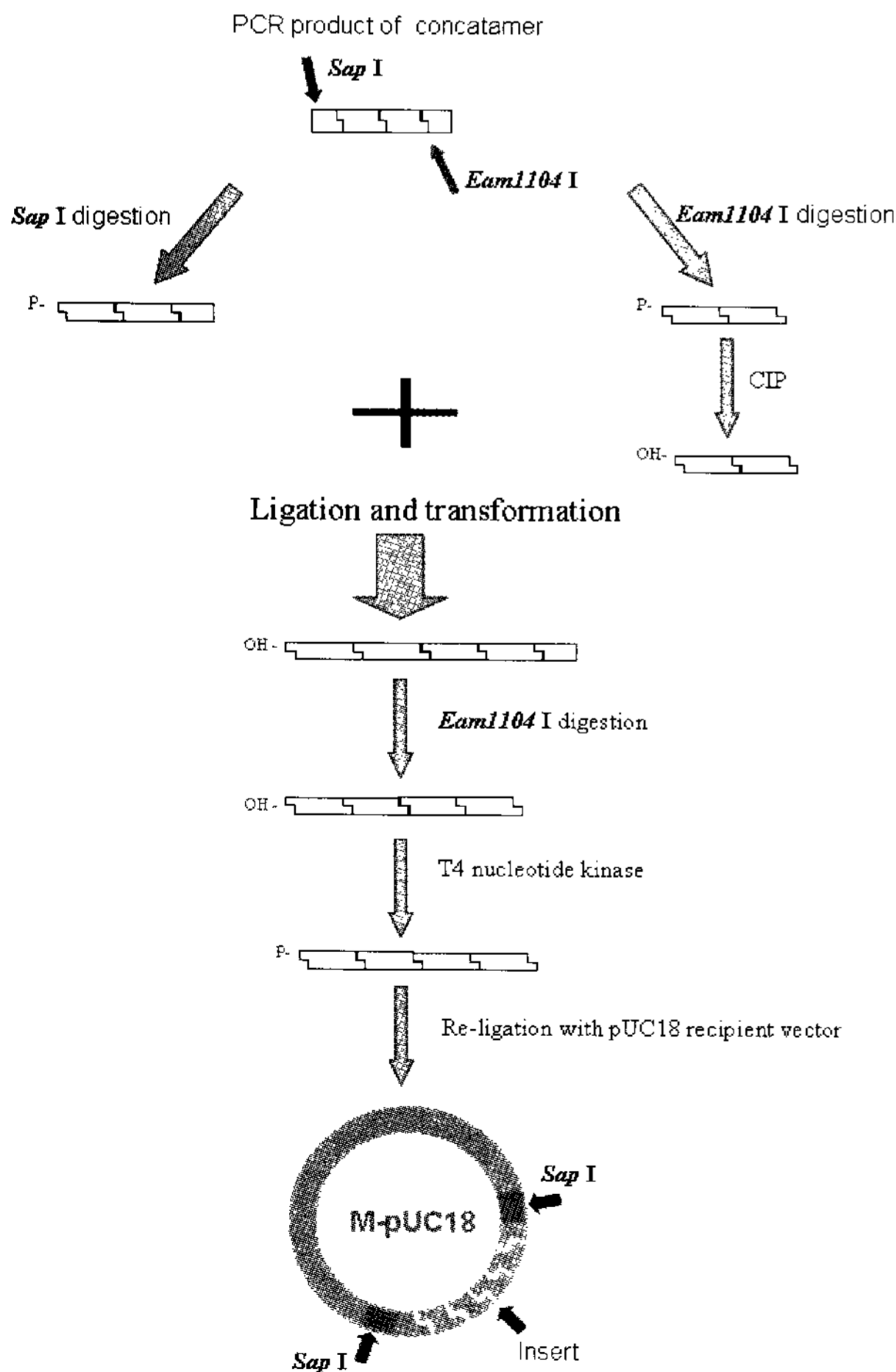


Figure 4. Schematic presentation of CCM(7).

Fig. 3에서는 RDL 방법의 모식도를 보여주고 있다. DNA 단위체 (monomer)가 클로닝된 plasmid의 일부를 두개의 서로 다른 제한효소인 RE1, RE2로 처리하여 단위체를 얻고, 나머지는 하나의 제한효소 (RE1)만으로 처리하여 단위체가 포함되어 있는 선형화된 벡터를 얻는다. 이렇게 얻은 두 종류의 DNA를 ligation하면, 처음과 비교하여 DNA 크기가 두 배로 늘어난 이합체 (dimer)를 얻을 수 있다. 길이가 늘어난 것이 확인되면, 다시 일부는 두개의 서로 다른 제한효소로 처리하고, 나머지는 하나의 제한효소로 처리한 후, 앞의 방법과 같이 ligation하면 처음 길이의 4배인 4합체 (tetramer)를 얻을 수 있다. 이러한 과정을 반복하면 원하는 길이의 재조합 DNA를 얻을 수 있는 것이다(6).

또 다른 클로닝 방법인 CCM은 Fig. 4에 간략히 설명되어 있다. CCM방법은 DNA가 삽입된 벡터를 PCR과정을 통하여 증폭한 후, 인식부위가 유사한 두 효소인 *Eam1104I* 과 *SapI*의 유사성에 기초하여 절단과 ligation을 통해 길이를 늘려나간다(7). *Eam1104I*과 *SapI*의 인식부위와 절단부위는 Fig. 5에 나타내었다.

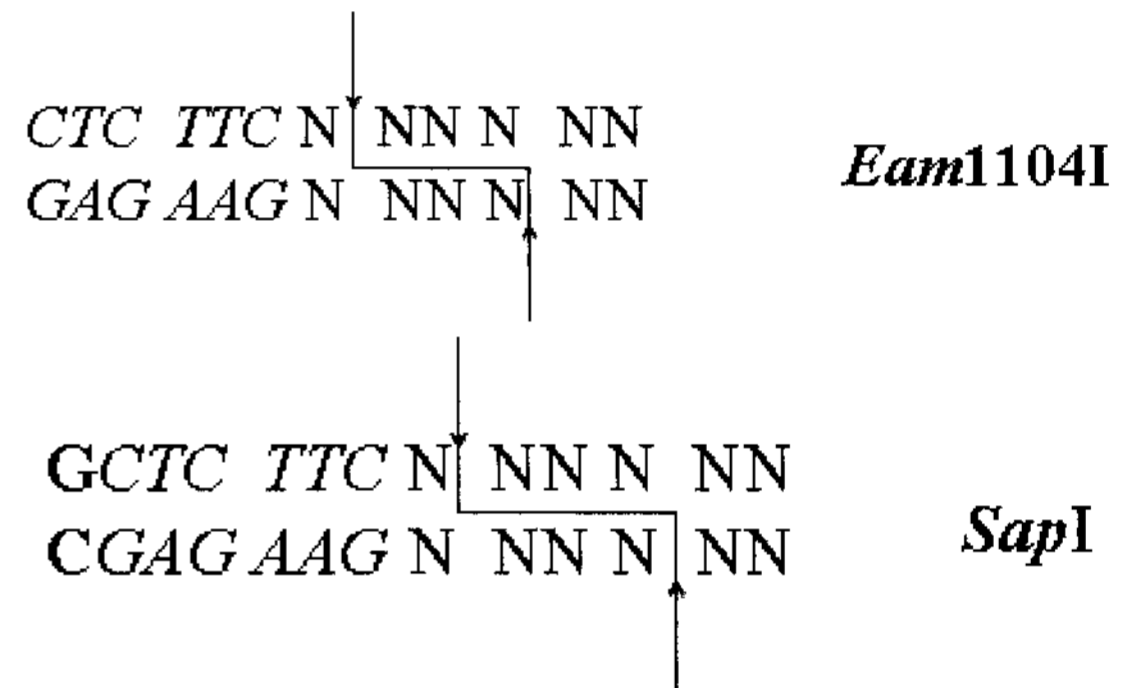


Figure 5. Recognition and cleavage sites of *Eam1104I* and *SapI*.

반복단위 단백질의 응용

반복단위 단백질 중에서 섬유상 단백질 (fibrous protein)은 유전자 재조합 방법으로 합성된 후 생체재료 및 분리 정제분야 등에 응용되고 있으며, 그 외의 반복단백질은 DNA 분석 및 sequencing, 기작 연구를 위한 인위적 단백질 합성 등에 응용되고 있다.

먼저, 섬유상 단백질인 elastin, collagen, silk 등의 경우, 반복되는 아미노산의 1차서열이 이미 보고되어 있으며, 최근 섬유상 단백질 구조에서 나타나는 반복 패턴을 가진 단백질을 유전자 재조합 기술을 이용하여 미생물로부터 생산하는 연구가 진행되고 있다. 촉매역할과 특이적인 분자를 인식하는 역할을 하는 구형 단백질 (globular protein)과 달리, 섬유상 단백질은 몇 가지 중요한 물리적인 특성을 가지고 있어서 약물방출, 생체재료, 조직공학에서의 뼈대역할을 하는데 응용이 되고 있다(23, 34). 의공학적으로 중요한 역할을 하는 섬유상 단백질을 목적에 맞게 인위적으로 합성하여 기존에 존재하는 단백질과의 구조적 차이에 기인한 물성 차이를 규명하려는 연구들이 현재 진행 중이다(8).

또 DNA 분석 및 DNA sequencing 분야에서 반복단위 단백질이 응용되는 사례도 있다(9-11). 이는 모세관 내에 점성이 있는 polymer gel을 채우는 대신 점성이 없는 수용액 상태에서 DNA와 단백질을 연결시킬 경우 DNA의 크기에 따라 물질이 분리되는 원리를 이용한 것이다. 그 외에도, 자연 상에 존재하면서 반복 도메인을 가지는 단백질을 인위적으로 합성할 때 반복되는 아미노산 서열이나 반복되는 횟수를 다르게 할 경우, 자연에 존재하는 단백질과 비교해서 물성이 얼마나 개선되었는지 밝히는 연구에도 응용되고 있다(12-14). 반복단위 단백질을 Elastin-like Polypeptides (ELP), Silk-like Polypeptides (SLP), 그리고 그 밖의 응용분야로 세분화시킨 후, 각각에 대하여 아래에 좀 더 자세히 기술해 놓았다.

Elastin like polypeptides (ELP)

섬유상 단백질의 한 종류인 엘라스틴은 조직들로 하여금 반복적이면서 가역적으로 변형시킬 수 있도록 신축성과 탄성을 부여하는 역할을 한다. 또한, 엘라스틴은 5개의 아미노산이 반복적으로 나타나는 폴리펩타이드로 전이온도 (T_i , transition temperature)를 가지고 있어서, 온도에 따른 가역적인 상전이가 일어난다. 수용액 상태에서 T_i 보다 온도가 낮다면 수용성 상태이지만, T_i 온도이상으로 온도가 올라가면 소수성 결합에 의한 삼차원적인 네트워크 구조가 형성되고, 이로 인해 침전이 일어나게 된다. 엘라스틴은 VPGXG라는 pentapeptide가 반복되는 형태로 이루어져 있으며, X자리에 Pro를 제외한 모든 아미노산이 위치함으로써 특정한 T_i 를 가지면서 엘라스틴과 비슷한 물리적 성질을 가지는 단백질을 인공적으로 만들 수 있는데, 이러한 단백질을 ELP (Elastin-like polypeptides)라 한다. ELP의 온도 변화에 따른 상전이 현상은 온도에 따른 흡광도의 변화를 측정함으로써 확인될 수 있으며, 이러한 물리적 성질을 이용하여 bioseparation, immunoassays, biocatalysis, drug delivery 등 다양한 분야에서 응용이 되고 있다(15).

CAT, BFP, Trx, CalM 등의 목적 단백질과 ELP를 결합시킨 융합 단백질 (fusion protein)의 경우, 상전이가 ELP 본래의 전이온도 근처에서 나타나는 특징을 보인다. 융합 단백질이 온도의 변화에 따라 가역적인 상전이가 일어나는 물리적 특성을 이용하여 단백질을 쉽게 분리, 정제하는 연구가 현재 진행되고 있다(15-17). 예를 들면, ELP와 융합시킨 단백질이 온도에 따른 가역적 상전이를 보인다면, 전이온도보다 높은 온도에서는 융합 단백질이 침전이 일어날 것이고, 이때 침전물만을 취해 1차 분리를 한다. 전이온도보다 낮은 온도로 유지할 경우, 침전물 중 융합 단백질은 다시 수용액상태가 되는데, 이 때 수용액 속에 침전물들을 버리고 수용액만을 취한다. 이 과정을 몇 차례 반복함으로써 ELP 융합 단백질만을 순수하게 얻을 수 있다. 이러한 일련의 과정을 Inverse Transition Cycling (ITC)이라고 하며, 크로마토그래피 방법을 사용하지 않고도 간단한 온도조절만으로 단백질의 분리 및 정제가 가능하다(15, 17).

생축매에 응용된 예로써는, 살충제의 주성분인 OP (organophosphorus)를 분해시키는 효소 OPH (organophosphorus hydrolase)를 ELP와 융합시킨 후 발현시켜 응용한 예도 보고

되어 있다. OP가 포함된 수용액 내에서 효소반응을 시키는 동시에, 온도 조절을 통한 가역적 침전을 이용하여 OPH의 고정화에 성공한 예도 있다(19). 또, 포유류 종에서 IgG와 결합하는 SpA (Staphylococcal protein A)와 ELP를 융합시켜 상 분리 면역분석 반응에 응용된 예도 보고되었다(19).

Silk-like polypeptides (SLP)

섬유상 단백질의 한 종류인 실크 (silk)는 예로부터 비단이나 수술용 봉합재료로서 사용되어 온 단백질이다. 주로 거미나 누에와 같은 인시류 유충 (lepidoptera larvae)에서 만들어진다고 알려져 있으며, 곤충의 종류에 따라 조성, 구조, 물성 등이 다르다(1). 실크는 다른 단백질과 비교했을 때, 매우 강한 인장력을 보이는 반면 수용액 상에서 용해도가 매우 낮으므로 재조합 실크를 이용한 대부분의 연구는 수용액상에서 실크 단백질의 용해도를 증가시키는 구조변화나 그에 따른 물성연구에 초점을 맞추어 왔으며 (20-23), 생체모방 섬유로의 방사 (biomimetic spinning into fibers) 연구도 진행되어 오고 있다(24).

정확한 크기를 가지면서 특정 아미노산으로 구성된 실크의 자기조립 (self-assembly) 기능을 이용하여 복합적 화합물의 구조를 형성한 연구 중에는, 치아의 상아질 단백질(dentin protein 1)의 카르복실 말단 도메인 (carboxyl-terminal domain) 과 거미실크 (spider dragline silk)를 혼합하여 발현시킨 후, 이 단백질을 광물화 (mineralizing)하여 생체 모방형 소재 (biomimetic material)로 합성한 연구가 최근 발표되었다(20). 이 논문에서는 상아질 막 단백질 (dentin matrix protein)과 실크와의 융합이 실크의 자기조립 특징을 그대로 유지하면서도, 상아질 막 단백질 (DMP, dentin matrix protein)의 수산화인회석 (HA, hydroxyapatite) 조핵 (nucleating) 기능을 가지는 융합 단백질을 생물학적으로 합성했다는 데 그 의의가 있다고 할 수 있다.

실크 중에서 거미로부터 얻어진 것은 탄력적이며, 합성 섬유에 비해 뛰어난 강도와 인성을 가진 가벼운 섬유이다. 60 kDa에서 140 kDa에 이르는 분자량 분포를 가진 수용성 재조합 거미실크 (soluble recombinant spider dragline silk)를 동물세포 (mammalian cell)를 이용하여 합성했다는 연구가 2002년에 발표되었다(24). 이 논문에서는 수용성 재조합 거미실크가 포함된 수용성 용액으로부터 뽑아져 나온 실크 모노필라멘트 (silk monofilaments)를 이용해서 습식방사 (wet spinning)에 성공하였고, 만들어진 섬유는 10 μ m에서 40 μ m의 직경을 가지며, 자연 상태에 존재하는 거미줄 (dragline silk)보다 점성은 떨어지나 뛰어난 인성과 탄성계수를 가지고 있었다.

그 외에도 실크는 ELP와의 공중합체를 이루는 SELP (SilkElastin-like protein)로 합성되어 연구되기도 하였다(25). 즉, silk fibroin의 기본적인 반복단위체인 GAGAGS와 동물세포내에 존재하는 엘라스틴 (mammalian elastin)의 반복단위체인 GVGVP를 포함하는 공중합체 형태로 유전공학적으로 합성되었는데, 합성결과 생긴 생체재료는 pH, 온도, 이온 세기, 농도에 특이적으로 민감한 결과를 보이기 때문에 약물의 방출을 엄격하게 조절해 줄 수 있는 약물전달 시스템으로의 응용가능성을 보여주었다.

그 밖의 응용

반복단위 단백질 고분자는 인공적인 섬유상 단백질 외에도 DNA를 크기에 따라 분리하기 위해 응용된 예도 있다. 모세관 내부에 점성이 있는 고분자를 채운 상태에서 DNA 크기별로 분리되는 성질을 이용한 현재의 모세관 전기영동 방법과는 달리, 점성이 없는 수용액 상태에서 DNA에 저항 물질을 결합하여 줌으로써 DNA가 크기별로 분리된다는 이론이 1990년대 초에 제시되었다(26). 이를 ELFSE (End-labeled free solution electrophoresis)라고 하며, 이 때 결합되는 저항물질을 drag-tag이라 하였다. DNA의 분리 효능은 drag-tag의 물성에 따라 크게 영향을 받는데, 유전공학적으로 합성된 반복단위 단백질이 drag-tag으로 사용될 경우 여러 우수한 물성을 보이고 있어 이에 대한 연구가 진행되고 있다(9). 이와 유사한 방법으로 반복단위 단백질은 유전자 돌연변이나 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 감지에 응용되기도 한다(10). ELFSE와 SBE (single base extension)를 접목시킨 방법을 통하여 여러 유전자 돌연변이를 최대 16개까지 동시에 검출하였고, 이를 초미세기판에 적용시켜 고성능 분석 (high-throughput analysis)을 수행하였다.

그 외에 빵의 질감을 결정하는 단백질 혼합물로 사용되는 prolamin의 단백질 1차구조가 proline과 glutamine이 풍부한 반복단위 도메인을 포함한다고 알려져 있다(14, 27). 이와 관련하여 prolamin의 구조와 물성에 대한 연구 뿐만 아니라(28, 29), prolamin을 생분해성 플라스틱 film이나 활성 분자들의 캡슐용 biomaterial에 적용하려는 연구들도 함께 진행되고 있다(30).

결론

반복단위 단백질은 특정 아미노산들의 단위가 반복되는 단백질 고분자로서, 그 단백질을 구성하는 아미노산들의 반복횟수를 조절 할 수 있는 RDL이나 CCM과 같은 클로닝 방법들의 개발로 인해 그 합성이 용이해졌다. 반복단위 단백질이 응용되는 사례로는 특정 아미노산들이 반복적으로 이루어진 섬유상 단백질, prolamin 등을 인위적으로 합성하여 응용하는 사례가 대표적이라고 할 수 있다. 기존에 존재하는 단백질을 구성하는 아미노산이 단백질 구조에 어떤 영향을 미치는지, 합성된 반복단위 단백질의 특이적 물성을 이용하여 어떻게 응용이 될 수 있는지 모색하는 연구들이 이루어지고 있다. 섬유상 단백질의 경우, 그 자체로 합성되기도 하지만 특정 단백질과의 융합을 통해서 섬유상 단백질의 자기조립성을 가지면서 특정 단백질의 물성을 유지하게 함으로써, 기존 단백질의 물성을 개선하는데 이용되기도 한다. 그 외에도 DNA 분석 및 sequencing 분야에서도 응용되기도 한다. 인위적으로 합성된 반복단위 단백질은 화학적으로 합성된 고분자에 비해 면역반응문제에 있어서 거부감이 적으며, 균일한 물성 (monodisperse)의 고분자를 얻을 수 있어서 고부가 가치를 지니는 조직공학에서의 활용도가 높다고 할 수 있다. 또, 화학적으로 합성된 고분자에 비해 비슷한 물성을 가지면서 생분해가 가능하다는 점은 약물전달시스템에서의 응용 가능성을 높일 수 있고, 환경에 유해한 영향을 최소화한다는 점에서 미래의 신소재로 기대되고 있다. 반복단위 단백질의 합성에서

단백질을 대량으로 생산할 수 있는 균주개발과 합성 공정이 보다 개선되어 생산성이 보다 향상 될 경우, 앞으로의 반복단위 단백질의 전망은 밝을 것이라 기대한다.

요 약

본 연구는 특정 아미노산들로 구성된 단위체가 반복되는 형태를 가지는 반복단위 단백질을 유전공학적으로 합성하는 방법들과 응용사례들을 소개하고 있다. 유전공학적인 합성법은 단위체의 반복횟수를 정확하게 제어하면서 인식 부위의 제한을 없애서 원하는 단백질만을 발현할 수 있도록 발전해왔으며, 최근 소개된 RDL과 CCM 방법에 의하여 가능해졌다. 반복단위 단백질의 응용사례로는 대표적으로 ELP, SLP, Prolamin 등의 단백질을 합성하여 생체재료나 약물전달시스템을 개발하는데 응용하거나, ELFSE의 drag-tag 개발에 응용되는 연구들이 진행되고 있다. 화학적으로 합성된 고분자에 비해 유전공학적으로 합성된 반복단위 고분자의 경우, 고유의 물리적 성질과 함께 환경에 미치는 유해함이 상대적으로 적다는 점 때문에 미래의 신소재로 기대되고 있다.

감 사

이 연구 논문은 2006년도 정부재원 (교육인적자원부 학술 연구 조성 사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었으며 (KRF-2006-D00456), 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Gragory, H. A., D. Frank, J. Caroline, C. Tara, H. L. Rebecca, C. Jingsong, L. Helen, R. John, and K. L. David (2003), Silk-based biomaterials, *Biomaterials* **24**, 401-416.
2. Cappello, J. (1990), The biological production of protein polymers and their use, *Trends in Biotechnology* **8**, 309-911.
3. McGrath, K. P., M. J. Fournier, T. L. Mason, and D. A. Tirrell (1992), Genetically directed syntheses of new polymeric materials. Expression of artificial genes encoding proteins with repeating -(AlaGly)₃ProGluGly - elements, *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 727-733.
4. Prince, J. T., K. P. McGrath, C. M. DiGirolamo, and D. L. Kaplan (1995), Construction, cloning, and expression of synthetic genes encoding spider dragline silk, *Biochemistry* **94**, 10879-10885.
5. McMillan, R. A., T. A. T. Lee, and V. P. Conticello (1999), Rapid assembly of synthetic genes encoding protein polymers, *Macromolecules* **32**, 3643-3648.
6. Meyer, D. E. and A. Chilkoti (2002), Genetically encoded synthesis of protein-based polymers with precisely specified molecular weight and sequence by recursive directional ligation: examples from the elastin-like polypeptide system, *Biomacromolecules* **3**, 357-367.
7. Won, J. I. and A. E. Barron (2002), A new cloning method for the preparation of long repetitive polypeptides without a sequence requirement, *Macromolecules* **35**, 8281-8287.
8. Wang, Xianyan, H. J. Kim, J. Wong, C. Vepari, A. Matsumoto, and D. L. Kaplan (2006), Fibrous proteins and tissue engineering,

- Materials today* **12**, 44-53.
9. Won, J. I., R. J. Meagher, and A. E. Barron (2005), Protein polymer drag-tags for DNA separations by end-labeled free-solution electrophoresis, *Electrophoresis* **26**, 2138-2148.
 10. Meagher, R. J., J. A. Coyne, C. N. Hestekin, T. N. Chiesl, R. D. Haynes, J. I. Won, and A. E. Barron (2007), Multiplexed p53 mutation detection by free-solution conjugate microchannel electrophoresis with polyamide drag-tags, *Anal. Chem.* **79**, 1848-1854.
 11. Won, J. I., R. J. Meagher, and A. E. Barron (2004), Characterization of glutamine deamidation in a long, repetitive protein polymer via bioconjugate capillary electrophoresis, *Biomacromolecules* **5**, 618-627.
 12. Topilina, N. I., S. Higashiya, N. Rana, V. V. Ermolenkov, C. Kossow, A. Carlsen, S. C. Ngo, C. C. Wells, E. T. Eisenbraun, K. A. Dunn, I. K. Lednev, R. E. Geer, A. E. Kaloyeros, and J. T. Welch (2006), Bilayer fibril formation by genetically engineered polypeptides: preparation and characterization, *Biomacromolecules* **7**, 1104-1111.
 13. Hamada, D., I. Yanagihara, and K. Tsumoto (2004), Engineering amyloidogenicity towards the development of nanofibrillar materials, *Trends in biotechnology* **22**, 93-97.
 14. Patachini, C., S. Masci, R. D'Ovidio, and D. Lafiandra (2003), Heterologous expression and purification of native and mutated low molecular mass glutenin subunits from durum wheat, *Journal of chromatography B-analytical technologies in the biomedical and life science* **786**, 215-220.
 15. Meyer, D. E. and A. Chilkoti (1999), Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides, *Nature Biotechnology* **17**, 1112-1115.
 16. Trabbic-Carlson, K., L. Liu, B. J. Kim, and A. Chilkoti (2004), Expression and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli*: Comparison of an elastin-like polypeptides fusion with an oligohistidine fusion, *Protein Science*, **13**, 3274-3284.
 17. Meyer, D. E., K. Trabbic-Carlson, and A. Chilkoti (2001), Protein purification by fusion with an environmentally responsive elastin-like polypeptide: effect of polypeptide length on the purification of thioredoxin, *Biotechnology Progress* **17**, 720-728
 18. Shimazu, M., A. Mulchandani, and W. Chen (2003), Thermally triggered purification and immobilization of elastin-OPH fusions, *Biotechnol. Bioeng.* **81**, 74-79.
 19. Kim, J. Y., S. O'Malley, A. Mulchandani, and W. Chen (2005), Genetically engineered elastin-protein A fusion as a universal platform for homogeneous phase-separation immunoassay, *Anal. Chem.* **77**, 2318-2322.
 20. Huang, J., C. Wong, A. George, and D. L. Kaplan (2007), The effect of genetically engineered spider silk-dentin matrix protein I chimeric protein on hydroxyapatite nucleation, *Biomaterials* **28**, 2358-2367.
 21. Szela, S., P. Avtges, R. Valluzzi, S. Winkler, D. Wilson, D. Kirschner, and D. L. Kaplan (2000), Reduction-oxidation control of beta-sheet assembly in genetically engineered silk, *Biomacromolecules* **1**, 534-542.
 22. Oroudjev, E., J. Soares, S. Arcidiacono, J. B. Thompson, S. A. Fossey, and H. G. Hansma (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 6460-6465.
 23. Valluzzi, R., S. Szela, P. Avtges, D. Kirschner, and D. Kaplan (1999), Methionine redox controlled crystallization of biosynthetic silk spidroin, *J. Phys. Chem. B* **103**, 11382-11392.
 24. Lazaris, A., S. Arcidiacono, Y. Huang, J. F. Zhou, F. Duguay, N. Chretien, E. A. Welsh, J. W. Soares, and C. N. Karatzas (2002), Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells, *Science* **295**, 472-476.
 25. Nagarsekar, A., J. Crissman, M. Crissman, F. Ferrari, J. Cappello, and H. Ghandehari (2003), Genetic engineering of stimuli-sensitive silkelastin-like protein block copolymers, *Biomacromolecules* **4**, 602-607.
 26. Mayer, P., G. W. Slater, and G. Drouin (1994), Theory of DNA sequencing using free-solution electrophoresis of protein-DNA complexes, *Anal. Chem.* **66**, 1777-1780.
 27. Sourice, S., A. Nisole, J. Gueguen, Y. Popineau, and K. Elmorjani (2003), High microbial production and characterization of strictly periodic polymers modelled on the repetitive domain of wheat gliadins, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **312**, 989-996.
 28. Mangavel, C., J. Barbot, Y. Popineau, and J. Guéguen (2001), Evolution of wheat gliadins conformation during film formation: a Fourier transform infrared study, *J. Agric. Food. Chem.* **49**, 867-872.
 29. Sanchez, A. C., Y. Popineau, C. Mangavel, C. Larré, and J. Guéguen (1998), Effect of different plasticizers on the mechanical and surface properties of wheat gliadins films, *J. Agric. Food. Chem.* **46**, 4539-4544.
 30. Ezpeleta, I., J. M. Irache, J. S. Stainmesse, C. Chabenat, J. Guéguen, Y. Popineau, and A. M. Orecchioni (1996), Gliadin nanoparticles for the controlled release of all-trans-retinoic acid, *Int. J. Pharm.* **131**, 191-200.
 31. Herrero-Vanrell, R., A.C. Rincon, M. Alonso, V. Rebotto, I. T. Molina-Martinez, and J. C. Rodriguez-Cabello (2005), Self-assembled particles of an elastin-like polymer as vehicles for controlled drug release, *Journal of Controlled Release* **102**, 113-122.