

환경스트레스에 내성을 갖는 펩타이드의 이용

박상면 | 아주대학교 의과대학 약리학 교실

단백질의 분리 및 보관 과정 중에 일어나는 응집현상은 단백질을 이용한 여러 가지 생물 의학 분야 및 생물 약제학 분야의 가장 큰 장애물이 되고 있다. 따라서 이러한 단백질의 응집현상을 줄이기 위한 여러 노력들이 이루어지고 있다. 단백질 수용액에 안정을 도모할 수 있는 물질을 첨가하거나 화학적인 변형, 단백질의 아미노산을 좀 더 안정적인 아미노산으로 바꿔 줌으로써 그러한 효과를 보고자 하는 노력들도 있으며 일부에서는 단백질의 안정성을 높일 수 있는 펩타이드와 융합단백질을 만듦으로써 그러한 효과를 보고자 하는 노력도 이루어지고 있다(1). 이러한 연구의 하나로 ATS(Acidic Tail of alpha-Synuclein)라는 펩타이드를 표적단백질과 융합시켜 융합단백질을 만듦으로써 여러가지 스트레스에 내성을 나타내고자 하는 노력이 있었다. 이 ATS 펩타이드는 alpha-synuclein이라는 단백질의 산성을 띠는 단백질이 많이 분포되어 있는 C-말단 산성 꼬리(잔기 96-140)로부터 유래된 펩타이드이다(2). Alpha-synuclein은 140개의 아미노산으로 구성된 시냅소전 단백질로서 열에 매우 안정하며 구조를 가지지

않는 비정형단백질이다(3). 이 단백질은 파킨슨병의 뇌조직에서 발견되는 Lewy Body라는 응집체를 이루는 주 단백질로 여러 연구결과를 통해 파킨슨병의 병인기전에 관련된 주요단백질의 하나로 알려져 있다(4). 이 단백질은 3개의 영역을 가지고 있는데 N-말단 양친매성 영역(잔기 1-60), 소수성 NAC 영역(잔기 61-95) 및 C-말단 산성꼬리(잔기 96-140)으로 구성되어 있다(4). 이러한 alpha-synuclein이라는 단백질의 C-말단 산성꼬리가 alpha-synuclein의 열 안정성에 매우 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 이 C-말단 산성꼬리를 열에 불안정한 단백질과 융합하여 융합단백질을 만든 경우, 그 단백질 역시 열에 안정한 형태로 변함을 살펴봄으로써 이 ATS 펩타이드의 응용분야에 대한 고려가 시작이 되었다. 이 ATS 펩타이드는 열에 의한 안정성 뿐만 아니라, pH나 금속이온에 의해서 유도되는 단백질 응집현상 역시 억제되는 것을 관찰할 수 있었고, 융합단백질에 샤페론(chaperone) 유사 단백질의 특성을 부여할 수도 있다라는 점도 관찰이 되었다(2,5). 또한 이러한 현상이 위의 연구결과에서 본 GST(Glutathion S

Transferase) 단백질 뿐만 아니라, DHFR(Dihydrofolate reductase) 이나 adiponectin과 같은 다른 단백질에도 똑같이 적용이 됨 이 보고 되었고(6), Growth hormone이나 G-CSF와 같은 단백질과 융합단백질을 구성했을 경우 원래의 단백질에 비해 agitation이나 freezing/thawing과 같은 운반이나 보관과정을 흉내낼 수 있는 실험에서도 역시 융합단백질의 안정성을 크게 증가시키는 것을 관찰할 수 있었다(7). 이러한 in vitro 관찰 뿐만 아니라, Leptin과의 융합단백질의 경우 in vivo 실험을 통해 약동학적으로도 생체내에서 오랫동안 안정적으로 유지됨을 보고함으로써 치료용 단백질 약제 분야에도 그 응용이 가능하다는 점이 제시되었다(7). 최근에 보고되어 소개하고자 하는 논문(Park SM and Kim J, J. Virol. Methods, 2008)(8)의 내용은 이러한 ATS 펩타이드를 통해 진단 목적의 단백질 안정화 및 특이성을 높이는 작용을 할 수 있을 거라는 점을 제시한 논문이라고 하겠다.

최근의 연구들은 병원체를 검출하거나 질병을 진단하는데 있어 좀더 정확하고, 편리하며, 또한 경제적인 새로운 방법을

고안하고자 많은 노력을 하고 있다. 특히 전염성이 강한 바이러스 질환의 경우 위의 노력 못지 않게 안전성 역시 높은 방법을 사용하고자 하는 노력을 하고 있다. 신증후군 출혈열(Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome)의 경우 한타바이러스에 의해 매개하는 발열, 출혈, 신증후군 등의 증상을 나타내는 호흡기계 전염성 질환으로 우리나라에서는 그 위험도에 따라 3종 법정 전염병으로 분류되어 있다. 이러한 한타바이러스 감염질환의 진단은 임상증상과 면역형광법 또는 효소면역반응법 등의 혈청학적 방법을 주로 이용하여 진단을 하게 된다. 이러한 혈청학적 진단방법에 원래의 바이러스나 원래의 바이러스에서 유래된 항원을 분리하여 사용할 경우, 면역반응이 가장 적절하게 일어날 수 있는 장점은 있으나 바이러스의 생물학적 위험 때문에 특별한 시설이 갖추어진 곳에서만 가능하다는 단점으로 주로 재조합 단백질의 사용에 대한 연구가 많이 되고 있는 실정이다. 그러나 이러한 재조합 단백질의 경우 분리과정 중에 필히 일어날 수 밖에 없는 다른 단백질의 오염에 대한 문제가 있어, 특히 진단방법으로

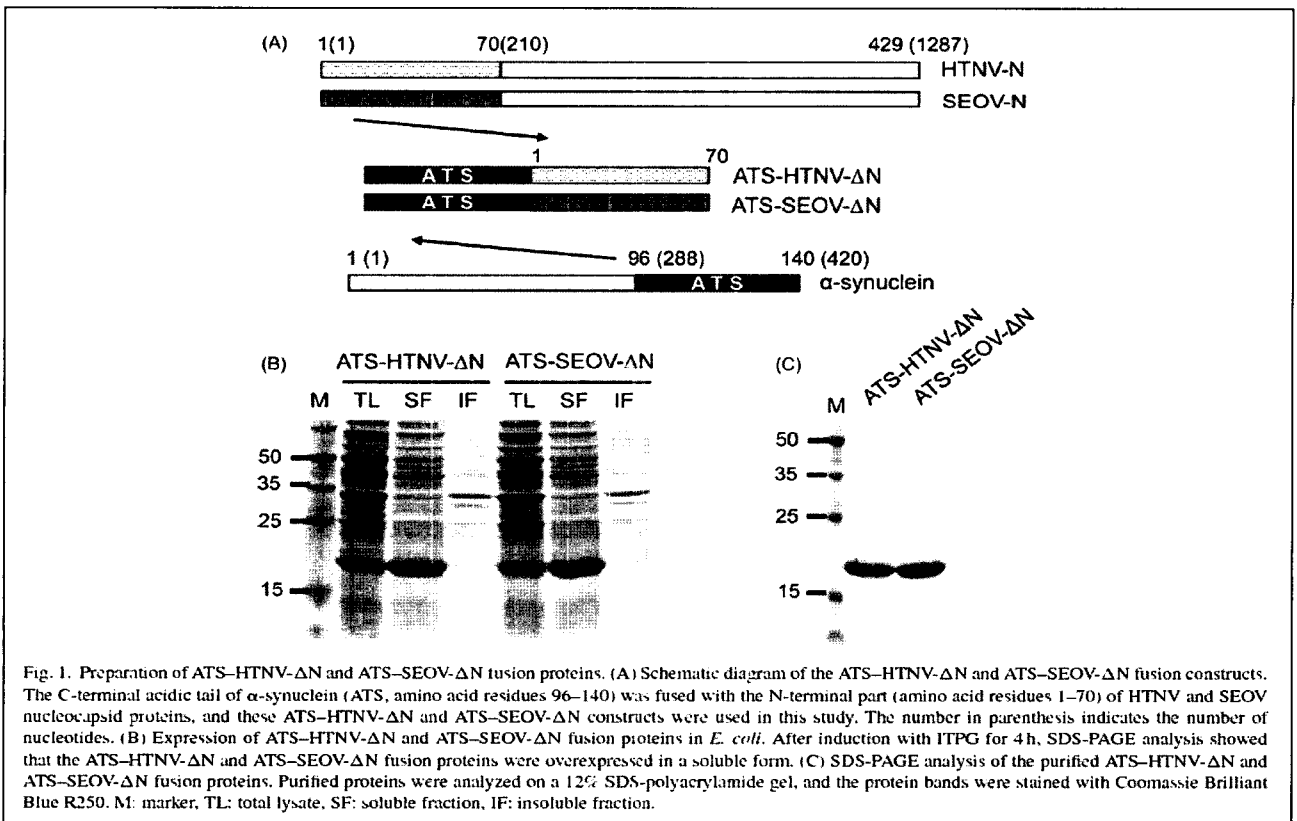


Fig. 1. Preparation of ATS-HTNV-ΔN and ATS-SEOV-ΔN fusion proteins. (A) Schematic diagram of the ATS-HTNV-ΔN and ATS-SEOV-ΔN fusion constructs. The C-terminal acidic tail of α-synuclein (ATS, amino acid residues 96-140) was fused with the N-terminal part (amino acid residues 1-70) of HTNV and SEOV nucleocapsid proteins, and these ATS-HTNV-ΔN and ATS-SEOV-ΔN constructs were used in this study. The number in parenthesis indicates the number of nucleotides. (B) Expression of ATS-HTNV-ΔN and ATS-SEOV-ΔN fusion proteins in *E. coli*. After induction with IPTG for 4 h, SDS-PAGE analysis showed that the ATS-HTNV-ΔN and ATS-SEOV-ΔN fusion proteins were overexpressed in a soluble form. (C) SDS-PAGE analysis of the purified ATS-HTNV-ΔN and ATS-SEOV-ΔN fusion proteins. Purified proteins were analyzed on a 12% SDS-polyacrylamide gel, and the protein bands were stained with Coomassie Brilliant Blue R250. M: marker, TL: total lysate, SF: soluble fraction, IF: insoluble fraction.

사용할 시 면역반응을 일으키는 다른 단백질의 오염으로 진단의 특이도가 많이 떨어지는 단점이 있어 분리 과정시 다른 단백질의 오염을 최소화한 대로 줄이고자 하는 연구가 요구되고 있다. 특히 대장균에서 유래된 재조합 단백질의 경우, 그 분리의 편리성과 경제성이 매우 높아 많이 이용되고 있으나, 건강한 사람이라도 대장균내의 단백질에 대한 면역반응을 일으키는 경우가 종종 있기 때문에 대장균 외의 곤충유래 세포와 같은 다른 세포 유래의 재조합 단백질을 쓰고자 하는 노력도 이루어지고 있으나 경제적인 면에서는 아직도 대장균 유래 재조합 단백질이 가장 뛰어나기에 아직도 많이 쓰이고 있다. 또한 대장균으로부터 재조합단백질을 순수 분리하기 위해서는 여러 가지 다른 특성을 가지는 컬럼들에 순차적으로 통과시킴으로써 순수한 재조합 단백질을 얻을 수가 있는데, 이러한 과정 중에 상당히 많은 양의 단백질을 잃어버림으로써 그 수득율을 높이기 위한 방법 역시 연구의 대상이 되고 있다. 본 논문에서는 지금까지 한타바이러스의 진단에 주로 사용되는 뉴클레오캡시드 단백질(N) 의 일부 절편을 ATS 펩타이드와 융합단백질(ATs-HTNV-ΔN, ATs-SEOV-ΔN)을 만들어 열에 안정하다는 점을 이용하여 좀 더 특이적인 항원을 만들어 한타바이러스의 진단에 사용하고자 하였다. 즉,

일반적인 컬럼분리 방법에 열을 가하는 과정을 한 번 더 거치면 열에 안정한 재조합 단백질의 손실은 최소한으로 줄이면서 열에 불안정한 대부분의 단백질을 제거함으로써 좀 더 순수한 재조합단백질을 얻을 수 있을 것이라는 아이디어를 가지고 한 실험이다. <그림 1>에서 보는바와 같이 ATS와 융합된 뉴클레오캡시드 단백질은 이전의 여러 융합단백질 실험과 마찬가지로 열에 매우 안정했으며, 그 안정도가 높아 상당히 많이 발현됨을 확인할 수 있었다. 이렇게 제작된 융합단백질을 일반적인 컬럼분리 방법과 열에 의한 분리방법을 거치므로써 좀 더 순수분리할 수 있었으며 이의 수득율 역시 대장균 1리터당 20~32mg 정도로 매우 높은 것을 알 수 있었다. 뿐만 아니라, 이렇게 만든 재조합 융합단백질은 4°C에서 6개월이상 보관해도 그 항원성이 떨어지지 않음을 관찰함으로써 매우 안정적인 단백질을 확인할 수 있었다. 이렇게 만들어진 단백질을 가지고 효소면역분석법을 시행했을 경우, <그림 2>에서 보는 바와 같이 매우 높은 민감도와 특이도를 보임을 알 수 있었으며, 환자의 혈청을 이용한 western blot 결과에서도 이 재조합단백질외의 어떠한 단백질도 검출되지 않음을 관찰함으로써 그 특이도가 매우 높은 순수단백질이 분리되었음을 알 수 있었다<그림 3>. 이러한 단백질을 이용

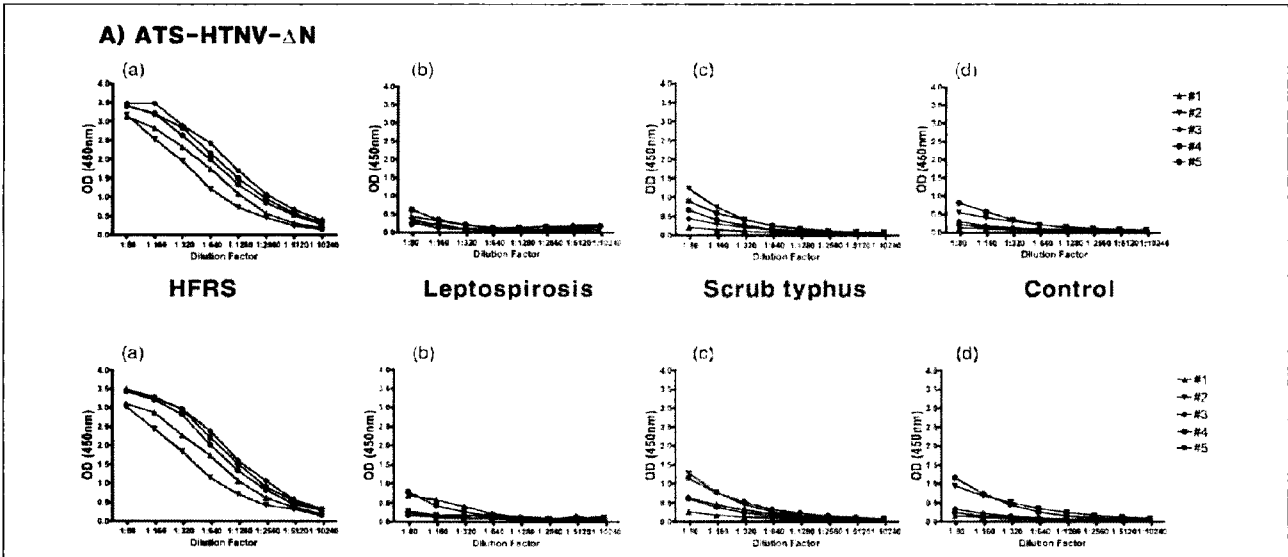
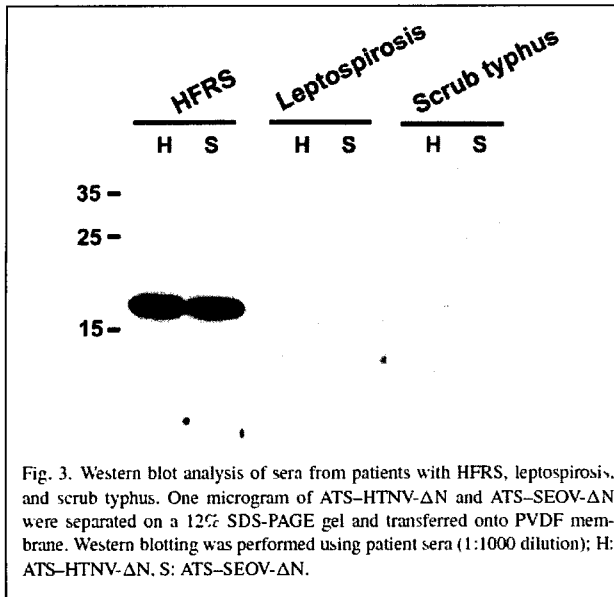


Fig. 2. Evaluation of recombinant antigens by IgG ELISA. Serially diluted sera (1:80~1:10,240) were examined by ELISA using ATs-HTNV-ΔN (A), and ATs-SEOV-ΔN (B) as an antigen; (a) sera from patients with HFRS, (b) sera from patients with leptospirosis, (c) sera from patients with scrub typhus, (d) sera from healthy controls.



하여 환자 20명을 대상으로 진단해 본 결과 각각 90%와 93.2%의 매우 높은 민감도와 특이도를 보임을 확인할 수 있었다.

본 논문은 비록 몇몇 대조실험과 환자샘플수의 부족으로 지금까지 나와 있는 진단법에 비해 더욱 높은 민감도와 특이도를 보이는지는 확인할 수 없었으나, ATS 펩타이드를 이용하여 좀더 간편하고 편리하게 또한 경제적으로 재조합 단백

질을 순수분리할 수 있으며 또한 이를 통해 좀더 환경 스트레스에 안정적인 재조합단백질을 얻을 수 있는 가능성을 제시해 주었으며 이를 이용하여 다른 병원체를 검출하거나 질병을 진단하는데에도 역시 응용할 수 있으리라는 점을 시사한 논문이라고 할 수 있겠다.

참고문헌

1. Manning, M. C., Patel, K., and Borchardt, R. T.(1989) *Pharm Res* 6, 903-918
2. Park, S. M., Jung, H. Y., Chung, K. C., Rhim, H., Park, J. H., and Kim, J.(2002) *Biochemistry* 41, 4137-4146
3. Ueda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Iwai, A., Yoshimoto, M., Otero, D. A., Kondo, J., Ihara, Y., and Saitoh, T.(1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11282-11286
4. Lucking, C. B., and Brice, A.(2000) *Cell Mol Life Sci* 57, 1894-1908
5. Park, S. M., Jung, H. Y., Kim, T. D., Park, J. H., Yang, C. H., and Kim, J.(2002) *J Biol Chem* 277, 28512-28520
6. Park, S. M., Ahn, K. J., Jung, H. Y., Park, J. H., and Kim, J.(2004) *Protein Eng Des Sel* 17, 251-260
7. Lee, E. N., Kim, Y. M., Lee, H. J., Park, S. W., Jung, H. Y., Lee, J. M., Ahn, Y. H., and Kim, J.(2005) *Pharm Res* 22, 1735-1746
8. Park, S. M., and Kim, J.(2008) *J Virol Methods* 147, 1-9