

모듈성 단백질의 재설계 및 개량

이승구* · 나유진 · 하재석 · 이정민 · 김선화
한국생명공학연구원 시스템미생물연구센터

Engineering Hybrid Proteins by Modular Recombination and Evolutionary Optimization. Lee, Seung-Goo*, Eugene Rha, Jae-Seok Ha, Jeong-Min Lee, and Sun-Hwa Kim. *Systems Microbiology Research Center, KRIBB, Daejeon 305-806, Korea* – Many proteins consist of distinctive domains that can act independently or cooperatively to achieve a unique function. As these domains evolve from a naturally existing repertoire of functional domains, this implies that domain organization is an intrinsic element involved in building the complex structure and function of proteins. Thus, identifying functional domains would appear to be critical to the elucidation of questions related to protein evolution, folding, and the engineering of hybrid proteins for tailored applications. However, the simple application of “Lego-like assembly” to the engineering of hybrid proteins is an oversimplification, as many hybrid constructs lack structural stability, usually due to unfavorable domain contacts. Thus, directed evolution, along with computational studies, may help to engineer hybrid proteins with improved physico-chemical properties. Accordingly, this paper introduces several approaches to functional hybrid protein engineering that potentially can be used to create modulators of gene transcription and cell signaling, and novel biosensors to analyze biological functions *in vivo*.

Keywords: Modularity, protein engineering, directed evolution, domain, redesign

서 론

단백질 및 효소의 재설계기술은 유전체 및 환경유전자로부터 유용한 유전자원을 확보하여, 안정성 및 기능을 개량하고 바이오촉매로 활용하는 원리 및 기술이다. 이 기술은 에너지, 산업, 농업, 환경, 보건 분야에서 지속가능한 성장을 위한 해결책을 제시할 것으로 예측되며, 구조예측 및 분자진화를 결합하여 실용적 기술로 활용하기 위한 기대가 높아지고 있다. 이는 점차 현실화 되고 있는 화석연료의 고갈 및 자원무기화에 대비하여 새로운 성장산업을 발굴하려는 세계적인 노력의 일면을 보여주는 것으로, 우리나라에서도 단백질/효소공학기술의 경쟁력을 강화하기 위한 노력이 필요하다 하겠다.

그동안 단백질/효소공학기술은 키랄 화합물의 효율적 합성을 위하여 특이적 효소를 발굴, 발견 및 개량하는 연구가 주를 이루어 왔는데, 이는 의약, 농약, 향료, 색소 등 대부분의 물질이 R- 또는 S-형의 한 형태만이 생리활성을 나타내는 키랄 화합물임에 기초한 것이다. 최근에는 이러한 전통적 주제 외에도, 대사 제어를 위한 조절단백질의 개량, 대사 효소의 개량, 바이오나노목적 소재의 개발 등 다양한 바이오소재 개발에도 활용이 증가되고 있다. 이러한 노력들은 합

성생물학(synthetic biology), 즉 규명발굴중심의 BT분야를 엔지니어링 중심으로 재조명하여 다양한 가공 및 활용이 가능하도록 재구성하는 학문분야의 등장과 궤를 같이 한다. 단백질공학자들에게 있어서 합성생물학은 단백질, 핵산 등의 도메인을 재설계하거나 기능을 조합하여 상호결합, 세포신호조절, 신호방출 등의 프로그래밍에 이용할 수 있는 바이오브릭(bio bricks)의 창출기술로 대변될 수 있다. 예를 들면, 우라늄·TNT같은 물질들을 검출하는 생물학적 체계를 구축하거나, 질병 바이러스나 암세포를 선택적으로 공격하도록 하는 지능형 미생물을 구축하는데 필요한 여러 기능을 조합한 융합단백질을 개발하는 연구를 예시할 수 있다.

이러한 합성생물학적 연구를 수행하기 위해서는 바이오분자의 기능을 재설계하여 관련분야에 폭넓게 활용할 수 있도록 하는 요소기술들, 특히 바이오소재의 구조·기능적 재설계와 분자진화연구에 대한 이해가 중요하다. 따라서 아래에서는 1) 분자진화기술, 2) 모듈성 기반 단백질설계기술, 3) 단백질공학기술의 새로운 적용에 대하여 살펴보고자 한다.

본 론

방향성 분자진화기술(directed evolution)

방향성 분자진화기술은 자연계에서 오랜 시간에 걸쳐 일어나는 진화를 연구실의 인위적인 공간 내에서 단시간에 모방하는 과정으로서, 유전자정보를 다변화하는 분자생물학적 라이브러리의 제조기술을 근간으로 한다(Fig. 1). 즉 다양한

*Corresponding author

Tel: 82-42-860-4373, Fax: 82-42-860-4379

E-mail: sglee@kribb.re.kr

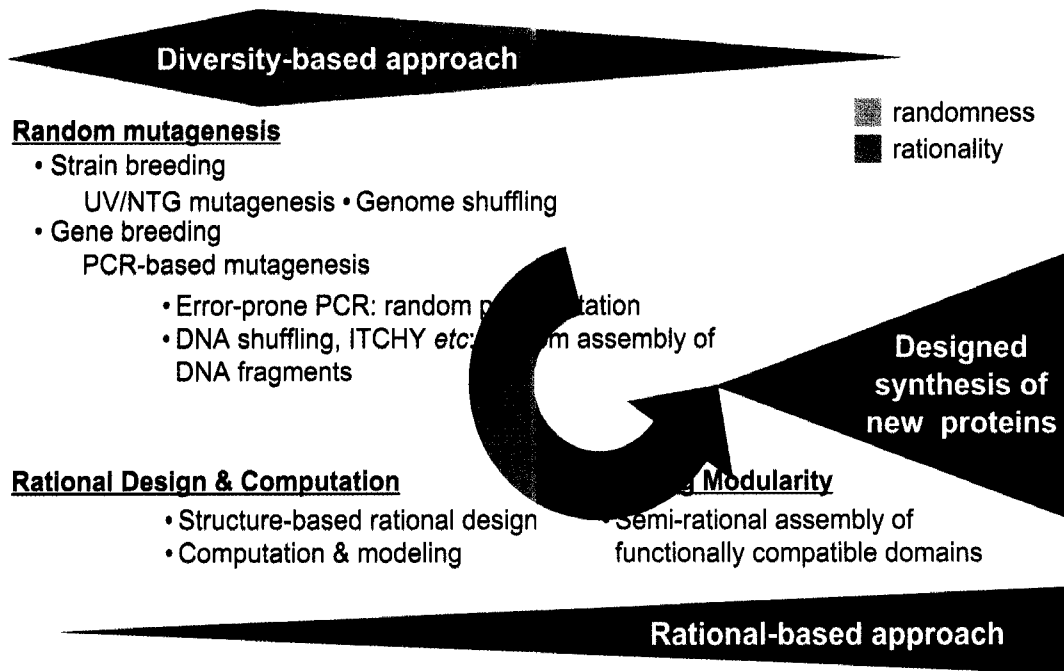


Fig. 1. Protein redesign/engineering by rational and combinatorial approaches.

염기서열 변이체로 이루어진 효소 라이브러리를 생성시킴으로써, 물리적 생화학적 특성이 다양화된 변이체 집합군을 확보하는 것이 일차적인 과정이다. Maxygen사는 조합적 라이브러리기술, 탐색기술로 이어지는 단계를 반복적으로 수행하여 “선택”에 의한 “진화”를 달성하는 DNA shuffling기술을 개발하여 최초로 사업화하였으며, 최근에는 바이오촉매의 개량뿐만 아니라, 항체 및 백신 개발, 유전자 치료, 신약 개발, 유용 균주 개발이나 벡터 개량연구로도 활용분야가 확대되고 있다(Table 1).

라이브러리 조성, 관리: 분자진화의 방향성은 기질 특이성과 기질에 대한 활성 및 조효소와 결합 능력, 열이나 유기용매에서의 안정성, 광학 이성질체에 대한 선택성 등 여러 가지 방향으로 선택될 수 있다. 라이브러리 생성 기술은 다양하게 발전하고 있으며 변이유발 PCR, 화학적 변이유발, 돌연변이 유발 숙주 세포의 이용 등과 같은 무작위적 변이법과 DNA shuffling[43, 47]과 같은 조합적 기술이 있다[26](Fig. 1). 조합적 라이브러리 제조기술에는 상동성이 높은 유전자의 조합을 유도하는 기술인 DNA shuffling, Rachitt, Rett 등이 있고, 상동성이 낮은 경우에도 도메인 조합을 통한 라이브러리의 제조가 가능한 ITCHY(truncated head-to-tail fusion), SHIPREC(single crossover products), GeneReassembly(high crossover products) 등의 방법도 있다[2, 10, 25, 40, 43]. 무작위 돌연변이 라이브러리의 제조에는 변이유발 PCR 방법으로 돌연변이 라이브러리를 제조하여 간편하게 적용할 수 있는 키트(Stratagene, Genofocus 등)를 이용할 수도 있다.

효과적인 분자진화연구를 수행하기 위한 유전자 변이정도

는 탐색가능한 라이브러리의 규모에 따라 달라지지만[3], 스크리닝 규모가 제한적인($<10^5$) 조건에서는 돌연변이 비율이 1 kb당 1~2개 아미노산 보다 많지 않고, 유전자 변이도 일부 구간에 편향되지 않고 목표하는 유전자부위에 고르게 분포되도록 하는 것이 중요하다. 일반적으로 DNA shuffling에는 50-200 bp 크기의 DNA 단편을 연결하는 과정에서 재조합(recombination)과 돌연변이가 동시에 유발되는 방식이 사용되고 있으나, 대량의 라이브러리를 스크리닝하기 어려운 일반적인 경우에서는, 두 과정을 독립적으로 수행하는 방식이 더 효과적일 수 있다. 즉 변이유발 PCR을 통하여 무작위 돌연변이 라이브러리의 검색을 통해 특성이 개선된 개체를 선별한 후, 변이를 유발하지 않는 STEP shuffling 조건에서 돌연변이체들을 조합하는 방법이 유용하다[47].

한편 최근 들어서는 구조분석 및 모델링을 바탕으로 가장 적합한 재설계 후보부위(engineering hotspot)를 선정하여, 이성적 설계기술(rational design) 및 실험적 라이브러리 조성 기술을 조합적용하는 방식이 새로운 흐름으로 나타나고 있다[1, 7, 41]. 이러한 방식은 대량의 라이브러리 검색에 필요한 노력을 최소화 하면서 목표달성의 확률을 높이는 등 효율적 대안을 제시하는 방법으로 판단된다(Fig. 1).

고속탐색기술: 유전자 라이브러리 제조, 회수, 관리과정은 반복된 연구를 기초로 여러 가지 프로토콜이 제시되어 있다. 변이 유발 PCR 라이브러리의 품질평가는 형질전환 미생물을 다양한 배유로 희석하고, 평판 배지에 도말하여 콜로니 수를 측정하는 방법에 의하여 수행 한다[9]. 총 라이브러리의 규모는 방법에 따라 달라지지만, 대개 약 10^5 - 10^7 개 수준이며, 콜로니 PCR을 수행하여 insert 유전자를 함유하는 양

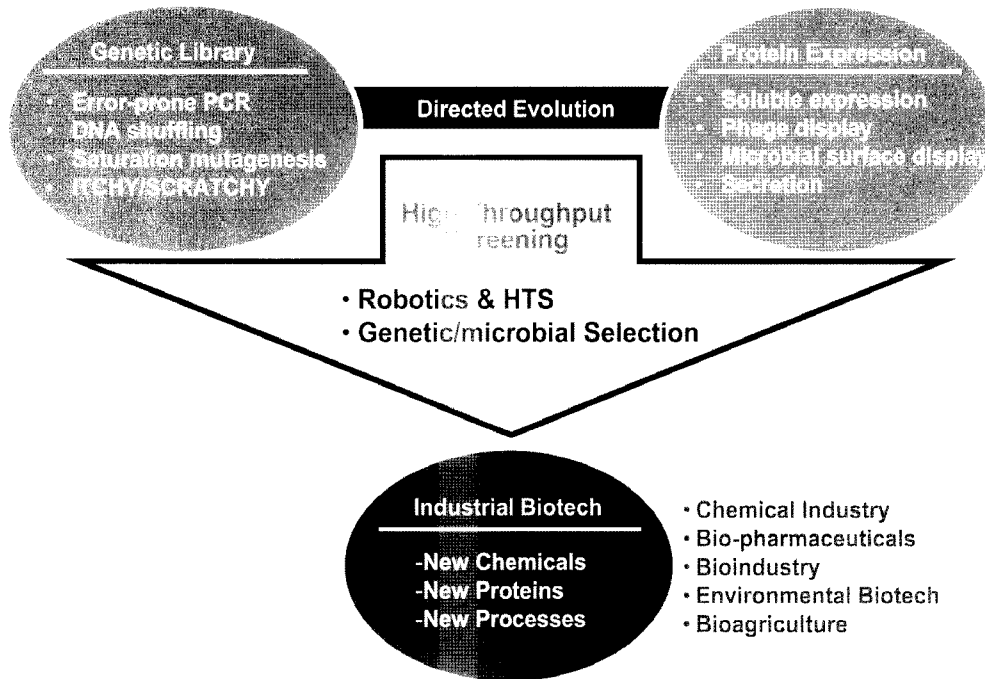


Fig. 2. Directed evolution technology: construction of genetic library, protein expression, and high throughput screening.

질의 라이브러리를 확인한다. 일반적으로 라이브러리의 탐색 기술은 항생제에 대한 저항성, 특정 영양 요구성 균주를 이용한 탐색, 한천 배지상에서 투명화의 생성, 형광물질의 발현, 유색발현에 의한 고체상의 선별, 로봇시스템으로 자동화가 가능하고 소량의 활성차이를 민감하게 인식할 수 있는 웰플레이트(wellplate) 방법이 사용된다(Fig. 2).

대량 미생물의 배양에는 96-웰플레이트 배양장치(바이오니아, 한국)를 이용하며, 효소활성화를 최소화 하면서 세포용해가 가능한 Cellytic B(시그마, 미국)등 시약을 이용하여 조효소액으로 제조할 수 있다. 효소 활성에 의하여 생성된 산물의 분석에는 다양한 발색방법을 적용하는 분석기를 이용할 수 있다[3]. 웰플레이트 발색에 의한 방법은 소량의 샘플로 미량의 활성이라도 민감하게 분석할 수 있다는 장점이 있는 반면, 고체상의 탐색 방법에 비해 많은 시간과 비용을 소모하고, 특히 고가의 분석장비를 필요로 하는 단점이 있다[39].

모듈성(modularity) 기반 단백질설계기술

단백질의 모듈성(modularity): 모듈개념은 단백질이 자연에서 어떻게 생성·진화하고 있는지에 대한 해석의 하나로써, 복잡한 구조의 단백질이 작고 독립적인 이차구조의 조합에 의하여 복잡한 기능의 3, 4차 구조를 형성하는 방법에 대한 것이다[18, 42]. 모듈성에 의하여 복잡한 구조 및 기능을 형성하는 전형적인 예는 polyketide synthase 및 nonribosomal peptide synthetase 등에서 관찰된다. 이 효소들은 개별적인 기능을 가지는 여러 도메인이 클러스터 형태로 조합되어, 2차 대사산물 합성에 필요한 연속적인 효소반응경로를 구성

하고 있다[35]. 모듈성은 다기능 복합효소가 아닌 단순구조의 단백질에서도 발견되는데, 예를 들면 8개의 반복적인 strand-turn-helix를 갖는 (β/α)₈-barrel 단백질을 half-barrel로 나누거나, loop구조의 일부를 대체하는 경우에 모듈조립성에 의하여 기능을 보전하거나 새로운 기능을 형성하는 것이 그 예이다[6,23,29,46].

따라서 새로운 기능이 필요한 경우, 독립적 도메인을 조립하는 과정(recombination)과 분자진화에 의한 최적화 과정을 거쳐서 목적기능을 갖춘 복합기능의 새로운 단백질이 만들어지는 것이 가능하다(Fig. 3). 이러한 모듈성은 생명체가 새로운 기능을 획득하는 것을 용이하게 하므로, 자연계에 매우 광범위하게 분포하고 있다. 예를 들어 (β/α)₈-barrel 단백질의 경우 구조가 알려진 효소의 약 10%에서 유사한 구조가 발견되고 있다.

INRA, EXPACY, NCBI, EBI 등 생물정보서비스기관에서는 도메인의 동정 및 기능규명에 필요한 정보를 일괄적인 DB로 구축하고, 임의단백질을 기존 도메인집합과 비교하여 분석하는 기능을 제공하고 있다. 프랑스의 INRA에서 운영하는 Prodom은 염기서열의 유사성분석에 기초한 상동성 모델링(homology modeling)방식으로 도메인을 예측해주며, HMM(Hidden Marcov Model)서비스를 통합하여 Pfam (Sanger Institute, UK)으로 발전하였다. 스위스의 EXPACY 역시 도메인분석에 유용한 Prosite(Swiss Institute of Bioinformatics)를 운영 중에 있다.

영국의 DALI(EMBL-EBI)는 PDB와의 연계하여, 단백질 구조 DB로부터 약 4,000여개의 도메인을 동정하고 Protein Data Bank (PDB)에 등록된 입체구조와 직접 비교하여 구조

Table 1. Leading companies and products based on directed evolution technology.

Company	Technology	Applications	Products
Maxygen	<ul style="list-style-type: none"> • MolecularBreeding™ • directed evolution • DNAShuffling process • MaxyScan™ 		<ul style="list-style-type: none"> • www.maxygen.com
Diversa Corp.	<ul style="list-style-type: none"> • DirectEvolution™ • Gene Site Saturation • Mutagenesis™ • Tunable Gene Reassembly™ 	<ul style="list-style-type: none"> • Agro, chemical, industrial and pharma applications 	<ul style="list-style-type: none"> • Luminase™ • Cottonase™ • Phytase Enzymes • Pyrolase™ • DiscoveryPoint™ • Fluor Proteins • DNA Polymerase • www.diversa.com
Cambrios Tech.	<ul style="list-style-type: none"> • Peptide agents that control synthesis and assembly of inorganic materials • Precise placement of nanostructures via self-assembly and molecular affinity. 	<ul style="list-style-type: none"> • Electronics, chemicals, coatings, and healthcare industries 	<ul style="list-style-type: none"> • NBE® technology • DBT-P2, a lead compound candidate for rheumatoid arthritis • www.cambrios.com
Direvo Biotech AG	<ul style="list-style-type: none"> • Direvo Process: Selection with Cyclic Optimization 	<ul style="list-style-type: none"> • Pharma proteins • Industrial enzymes • Biocatalysts 	<ul style="list-style-type: none"> • www.direvo.com
MiliGen Prologue Biotech	<ul style="list-style-type: none"> • MutaGen™ • MutaGen™ Analysis Platform (MAP) • MutaScreen 		<ul style="list-style-type: none"> • www.millegen.com
Proteus	<ul style="list-style-type: none"> • L-Shuffling™ 		<ul style="list-style-type: none"> • www.proteus.fr

Source: Beachhead Consulting

적 유사체 (structural neighbours)를 찾는 도메인분석을 제공 하였으나 현재는 업데이트를 중단하였고, 대신에 Secondary Structure Matching (SSM) 방식의 분석을 제공하고 있다.

도메인 예측뿐만 아니라, 도메인사이의 계통분류학적 연관성에 대한 이해도 단백질공학 연구에 유용하게 이용될 수 있다. 단백질도메인 구조를 계통분류학적으로 분류하는 연구로는 SCOP (structural classification of proteins, EBI-EMBL)이 잘 알려져 있으며, Univ. Coll. London에서 제공하는 CATH에서도 유사한 서비스를 제공하고 있다. CATH는 4단계 분류체계인 Class, Architecture, Topology, Homologous superfamily의 약자이며 내용에 있어서는

- The independent domains can be more easily copied in the genome by recombination (Bhattacharyya RP *et al.* 2006)
- Increase 'evolvability' by natural selection (Fraser HB 2005)

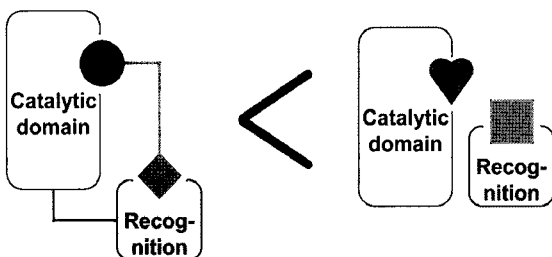


Fig. 3. Modularity increases the evolvability of proteins [4, 18].

SCOP과 유사하다. 미국의 NCBI도 Conserved Domain DB 및 3D-Structure를 통하여 도메인에 관련된 탐색 및 구조분석 서비스를 제공하고 있고, 최대의 구조DB를 구축하고 있는 PDBsum에서는 Pfam, SCOP, CATH, Brenda를 모두 링크하여 종합적인 분석기법을 제공하고 있다.

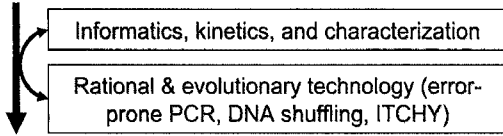
최근 부각되고 있는 합성생물학은 구조적/기능적 기본단위라 할 수 있는 도메인을 재설계하거나 기능을 조합하여 보다 복잡한 기능을 창출하는 기술이 핵심을 이루는 바, 도메인DB는 새로운 융합단백질을 개발하는 기술의 개발에 있어서 많은 기여를 할 것으로 기대된다(Fig. 4).

이성적 재설계 및 분자진화에 의한 신기능 융합단백질 창출: 단백질 모듈은 재조합(recombination)에 의하여 다른 단백질과의 조합이 가능하며, 자연선택에 의한 진화-가능성 (evolvability)을 촉진하는 효과가 있다(Fig. 3)[4, 18, 19]. 모듈성에 기초하여 새로운 기능의 생체분자를 창출하기 위해서는 도메인 사이의 물리적 접촉면에서의 상호작용을 예측하여 최적의 구조를 가지도록 하는 재설계기술과, 무작위 조합한 하이브리드 라이브러리에 분자진화원리를 적용하는 기술이 보완적으로 이용된다(Fig. 4).

도메인사이 접촉면의 설계에는 단백질구조의 예측 및 리간드 결합에 따른 구조변화 등 복잡한 계산을 요하며, 최근 두 미생물에서 유래하는 동일기능 효소(dihydrofolate reductase)의 하이브리드를 만드는 연구에서 개별 아미노산

● Finding Modularity

- Shotgun proteolysis
- Bioinformatics on exon boundary
- Structural analysis



● Use of Modularity

- Functional assembly of building blocks for complex structures (rational design, split protein, inframe fusion)
- Fine tuning: reduce pleiotropy for a specific trait



● Novel Hybrid Proteins

Fig. 4. Finding and using the modularity of proteins.

간 충돌을 예측하고, 이를 최소화하는 설계기법이 보고된 바 있다[34]. 또한 두 homing endonuclease의 접촉면을 설계하여 하나의 효소로 만들어서 자연에서는 기대할 수 없었던 고도의 정밀성을 보유하는 새로운 제한효소가 개발된 바 있다 [8]. 이러한 도메인 조합기술에 있어서도 선택-진화의 원리를 적용하는 실험적 접근방법은 이론적 예측기술과 융합되어 다양한 특성의 복합단백질을 획득하는 기술로 발전하고 있다[24].

최근 단백질공학기술을 적용함으로써 인공적인 수용체 전사조절인자를 개발하고 미생물 세포신호 전달경로를 재구성한 연구가 보고되었다[14, 28]. 이 연구는 세포막간단백질(periplasmic protein)과 신호전달 기구인 histidine kinase의 융합단백질을 개발한 것으로, 세포의 신호를 세포내로 전달하고 프로그래밍된 세포기능을 수행하는 맞춤형 미생물을 개발한 것이다. 한편 orthogonal ligand와 orthogonal protein을 design함으로써 여러 가지 세포신호전달에 관여하는 단백질의 기능을 *in vivo*에서 연구할 수 있는 기술도 개발되었다[5]. 이는 리보솜에 결합하는 elongation factor의 하나인 EF-Tu에서 GDP 결합부위를 XDP에 결합하도록 단백질공학기술을 적용하고, 방사성 표지된 XTP를 기질로 사용하여 *in vivo*인 조건에서 세포대사를 분석하는 것이었다. 이 방법은 복잡한 생체반응이 존재하는 세포내 조건에서 특정 세포기능만을 독립적으로 관찰할 수 있어서 생명기능의 규명 뿐만 아니라 의약품질의 탐색 등에 유용성이 기대되고 있다.

이외에도 UC Berkeley에서는 외래 유전자들을 대장균에 도입한 후 대사공학기술을 이용하여 대사경로를 최적화함으로써 합성이 어렵고 가격이 비싼 말라리아 치료제인 artemisinin을 다량으로 생산하는 대장균을 만드는데 성공하였으며, 이 합성경로가 terpene 생합성 경로를 기초해서 만들어졌기 때문에 이 경로를 약간 변형함으로써 또 다른 유용한 terpenoid 물질인 항암제 택솔을 생산할 수 있을 것으

로 기대하고 있다[7].

리포터단백질을 적절한 위치에서 분할하여 제조한 split protein을 모듈로 이용하여 세포내 단백질의 상호작용을 감지하는 PCA(protein fragment complementation assay)기술도 개발되었다. 이 기술에 대해서는 의약산업체의 관심이 매우 높아서 특허기술이 급속하게 증가되고 있는 분야이고, dihydrofolate reductase(DHFR), 형광단백질, beta-lactamase 등 활성검출이 용이한 단백질이 이용된다. 즉, 각 단백질을 이분하여 단편을 상호작용이 예상되는 타겟 단백질에 결합시키고, 각 상호작용 단백질 사이에 결합이 나타나는 경우 이분된 DHFR 단편의 근접에 의한 접힘 및 활성회복을 유도하게 되는 원리를 이용하는 것이다[31].

또 다른 방향의 연구로 ribose-binding protein을 유전자 조작에 의해 TNT와 같은 환경유해물질들과 결합할 수 있는 단백질로 재구성한 형태의 새로운 바이오센서 개발이 있었으며[28], maltose의 결합으로 구조변화를 수반하는 maltose-binding protein(MBP)의 특정부위에 β-lactamase를 삽입한 융합단백질의 구조적 연동을 기반으로, maltose 결합부위에 sucrose가 결합할 수 있는 새로운 결합단백질의 재설계도 성공한 예가 있다[21].

모듈성 기반 단백질공학기술의 새로운 적용

형광단백질 바이오센서: 바이오센서는 질병 진단, 환경오염 물질 측정, 생물공정분석, 식품품질분석 등으로 이용분야가 확대되고 있으며, 다양한 측정방식 및 소재가 활발하게 개발되고 있다. 최근에는 단백질 공학기술을 이용하여 단백질 간 또는 기질-단백질 결합 시 형광을 유발하도록 하는 센서 개발 연구가 주목을 받고 있다. 이는 형광에너지전이(FRET)이 가능한 두 형광단백질들 사이에 결합단백질을 융합시킨 형태의 센서로서, 감지하고자 하는 물질이 융합단백질에 결합하면 구조와 함께 FRET값에 변화가 나타나게 되는 원리를 이용한 것이다. 특히 FRET센서기술은 세포이미지분석을 통하여 생체 내 대사물질의 농도를 분석하여, 살아있는 세포에서 주요 생체물질의 이동 및 생화학적 변화를 추적가능하게 할 수도 있다.

FRET 현상을 이용한 융합단백질 센서는, San Diego 대학의 Tsien 그룹에서 1997년 calmodulin 및 이와 상호 작용하는 M13 peptide에 BFP와 GFP를 융합시켜서 세포내 칼슘 농도를 측정하면서부터 시작되었다[32, 45]. 또한, 1997년 Hellinga 그룹에서는 리간드의 결합에 의해 구조가 바뀌는 미생물의 periplasmic-binding proteins(PBPs)의 일종인 MBP에 형광 염료를 결합시켜 생체외부에서 높은 감지 신호를 갖는 센서를 구축하였으며, 다양한 종류의 PBPs에 적용한 사례가 보고되어 있다[11, 30]. 일본의 RIKEN 등에서는 calmodulin이 생체 내 칼슘과 결합하면 특정 펩타이드와 결합력을 갖는 원리와 형광단백질 간 에너지 전이현상을 결합하여 생체 내 칼슘농도를 추적하는 기술을 개발하였으며 세

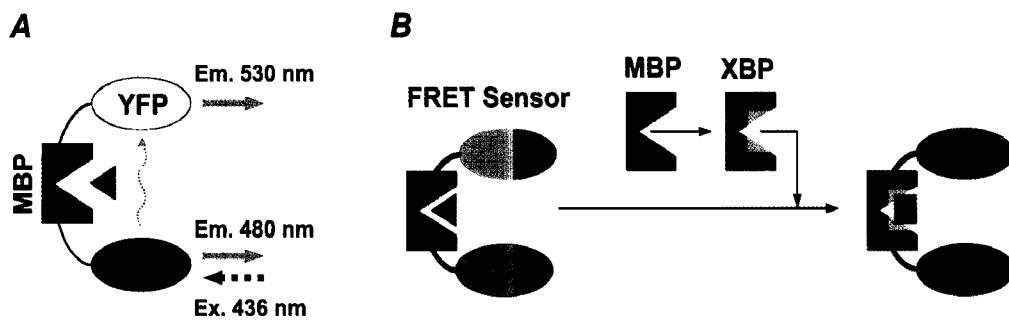


Fig. 5. FRET-based molecular sensor. Detection principle (A); Redesign of binding moiety and assembly to produce a FRET-based sensor with novel specificity (B).

포내 칼슘신호 전달연구에 활용하고 있다[32].

이러한 연구를 바탕으로 하여, 미생물 세포막간단백질 (PBPs)가 리간드 결합 시, 분자구조에 급속한 변화가 오는 것을 이용하여 형광발색을 유도하는 연구도 추진되어 왔다. 즉, FRET이 가능한 형광단백질을 결합한 경우 다양한 동물 세포 내에서 당, 아미노산의 흡수 및 대사과정을 영상화할 수 있었다[15, 16, 20, 21, 27, 38]. 이 밖에도 세포내 신호 전달에 중요한 역할을 하는 GTP/GDP의 농도변화를 살아있는 세포에서 실시간으로 관찰한 연구[33]와 *Clostridium botulinum*의 신경독소 활성을 측정하는 연구[13], 세포내 inositol 1,4,5-trisphosphate를 정량적으로 측정하는 연구[44] 등에 cameleon과 유사한 형태의 융합단백질들을 이용하여 보다 다양한 물질들을 감지할 목적으로의 기술 발전이 이루어져 왔다.

초기에 개발되었던 상기 융합단백질들은 매우 미약한 수준의 감지능을 보이는 단점이 있어, 보다 정확하며 정량적

인 측정수단으로의 활용을 위해서는 감지능이 우수한 융합단백질의 개발이 요구되었다[17]. 이러한 단점을 보완하기 위하여 RIKEN에서는 cameleon의 YFP 유전자를 개량하거나, 순차치환 (circular permutation)하는 방법으로 감지능을 증가시킬 수 있다는 연구결과를 발표하였다[36, 37]. 또한, Stanford 대학에서는 GGBP 또는 GlnBP 등의 유전자에 형광단백질을 삽입시키는 in-frame fusion으로 각 융합단백질들의 감지능을 크게 증가시킬 수 있다는 연구결과를 발표하였다[12]. 그러나, 융합단백질의 감지능을 증가시킬 목적으로 상기의 방법들을 적용하기 위해서는 유전자 조작에 많은 노력이 소요되며, 구조와 동적 특성이 다른 결합단백질들과 형광단백질들로 구성된 새로운 융합단백질의 제작에는 모든 개발과정이 초기부터 다시 설계되어야 하는 문제점이 있었다. 최근 본 연구팀은 결합단백질과 형광단백질 사이의 링커를 최적화하여 고도의 신호강도를 나타내는 “디자인 단백질”을 제조한 후, 물질이 결합하는 특정 부위에

Table 2. Bio-nano application of protein design and directed evolution technology.

Company	Technology	Products	Researcher
Maxygen	<ul style="list-style-type: none"> • Protein engineering • Molecular breeding 	<ul style="list-style-type: none"> • DNA shuffling 	<ul style="list-style-type: none"> • William Stemmer
Scripps	<ul style="list-style-type: none"> • Catalytic antibodies • Aminoacyl-tRNA Synthetases • Expanding Genetic Code 	<ul style="list-style-type: none"> • Cofounder of Affymax, Symyx 	<ul style="list-style-type: none"> • Peter Schultz
NASA	<ul style="list-style-type: none"> • Ames Biomolecular and Cellular Modeling Program 	<ul style="list-style-type: none"> • COSMOS (Computer Simulations of Molecular Systems) 	<ul style="list-style-type: none"> • Chris Henze
MIT	<ul style="list-style-type: none"> • Hybrid organic-inorganic electronic and magnetic materials 	<ul style="list-style-type: none"> • Directed Nanocrystal Assembly 	<ul style="list-style-type: none"> • Angela Belcher
Univ. Washington	<ul style="list-style-type: none"> • Biomimetics • Nanocomposite • Bio-inorganic interface 	<ul style="list-style-type: none"> • Gold binding peptide 	<ul style="list-style-type: none"> • Mehmet Sarikaya
UCSD	<ul style="list-style-type: none"> • Fluorescent sensors • FRET imaging 	<ul style="list-style-type: none"> • Pioneering in vivo sensors 	<ul style="list-style-type: none"> • Roger Tsien
RIKEN	<ul style="list-style-type: none"> • GFP based sensor • FRET 	<ul style="list-style-type: none"> • Circularly permuted GFP 	<ul style="list-style-type: none"> • Atsushi Miyawaki
Univ. Tokyo	<ul style="list-style-type: none"> • Biomolecular engineering • Protein sensors 	<ul style="list-style-type: none"> • Homogeneous sandwich immunoassay 	<ul style="list-style-type: none"> • Teryyuki Nagamune

이성적 재설계 및 분자진화원리를 도입하는 방법으로, 측정 농도범위 및 결합물질에 대한 특이성을 개선한 융합단백질의 맞춤형 제작이 가능하다는 사실을 보고한 바 있다 [22](Fig. 5).

나노바이오 융합단백질 소재: 단백질, 핵산은 고유의 인식 특이성 및 자기조립성에 의하여 고도의 물리생화학적 기능을 나타내게 되며, 유전자조작을 통하여 구조-기능을 정밀하게 조작할 수 있다. 미국의 MIT, 워싱턴 주립대에서는 금, 반도체 등 무기표면에 특이적인 결합력을 갖는 단백질 소재를 제조하는 기술을 제시한 바 있으며, 다양한 유무기 나노구조물에 친화성을 갖는 나노센서, 나노로봇, 바이오적합 표면, 조직공학에 활용될 것으로 기대되고 있다(Table 2).

나노바이오분야(NBT)는 융합학문에서 새로운 발전전략을 발굴하려는 대표적 사례로 제시되고 있으며, 신 의약개발 분야에 있어서는 나노 바이오기술을 이용한 초소형 고속탐색 기술이 개발비용절감 및 산업경쟁력 확보를 위한 핵심기술로 인식되고 있다. 또한 기능 유전체학, 단백질체학, 대사체학 연구에 있어서도 초미량분석을 가능케 하는 나노 바이오 이용 미세분석기술의 개발이 강조되고 있다. 이러한 나노분석을 위해서는 나노장치와 바이오시스템을 연계하는 새로운 바이오소재, 즉 광학적 또는 전기화학적 신호를 낼 수 있는 신기능 융합단백질의 개발 및 환경적합화(acclimation for nano application)연구가 필요할 것으로 판단된다. 특히 이러한 바이오테크놀로지의 개발에도 단백질, 핵산 등의 모듈성을 조합하여 보다 복잡한 기능의 바이오분자를 디자인하는 분자공학설계기술, 표면인식-모듈간 결합 등을 최적화하는 분자진화기술이 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

바이오테크놀로지는 발전은 1차적으로는 의약산업, 2차적으로 농업분야에 혁명적 발전을 초래하였고, 최근에는 바이오기술이 산업생명공학(industrial biotechnology)분야에도 혁명적 발전을 가져올 것이라 기대가 커지고 있다. 즉 생명공학기술을 적용하여 지속가능한 생물화학산업 창출을 본격화할 것이며, 경제적으로는 생산가 절감과 신산업 기회를 창출하고, 환경적인 측면에서는 재생가능자원활용과 환경부하를 줄일 수 있고, 사회적인 관점으로는 자원부가가치 제고 및 삶의 질 향상을 통하여 "Bio-based Economy"를 구현할 것이라는 기대가 그것이다. 미국의 경우 2020년까지 화학원료의 20%, 2050년에는 50%, 2090년에는 100%를 재생가능한 생물자원으로 대체하는 것으로 목표로 하고 있다.

모듈성은 자연선택에 의한 단백질 분자진화의 효율성을 결정짓는 주요 요소이며, 이는 분자진화에 의한 단백질/효소 공학기술에 있어서도 모듈성의 효과적 활용이 중요한 영향

을 미칠 수 있음을 반증하는 것으로 사료된다. 따라서 생리적, 생화학적 현상만을 목표로 blind search를 반복하는 분자진화연구보다는, 단백질 내부의 모듈성에 기초하여 보다 세분화된 특성의 획득을 목표로 하는 접근방식에 대한 보다 높은 관심이 요구된다. 요약하면 1) 새로운 모듈성에 대한 이해 및 유전자원의 확보, 2) 이성적 설계기술(rational design) 및 분자진화(directed evolution)기반 단백질공학기술의 발전, 3) 모듈성 조립기술을 기반으로 한 신기능 융합단백질의 개발노력이 필요하다. 이러한 융합단백질은 바이오 촉매기술 뿐만 아니라, 세포내 상호작용연구, 생체물질의 다중 고감도 분석, 신약탐색, 공정모니터링 등 다양한 분야에 활용될 수 있다.

감사의 글

본 연구는 한국생명공학연구원 기관고유사업, 과학기술부 바이오기술개발사업의 지원을 받았으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Allert, M., M. Dwyer, and H. W. Hellinga. 2007. Local encoding of computationally designed enzyme activity. *J. Mol. Biol.* **366**: 945-953.
- Arnold, F. H. 2001. Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature* **409**: 253-257.
- Arnold, F. H. and G. Georgiou. 2003. *Method in Molecular Biology*, vol.230, Directed enzyme evolution: Screening and selection methods, Human Press Inc. Totowa, NJ.
- Bhattacharyya, R. P., A. Remnyi, B. J. Yeh, and W. A. Lim. 2006. Domains, motifs, and scaffolds: the role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits. *Annu. Rev. Biochem.* **75**: 655-680.
- Bishop, A., O. Buzko, S. Heyeck-Dumas, I. Jung, B. Kraybill, Y. Liu, K. Shah, S. Ulrich, L. Witucki, F. Yang, C. Zhang, and K. M. Shokat. 2000. Unnatural ligands for engineered proteins: new tools for chemical genetics. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**: 577-606.
- Bogarad, L. D. and M. W. Deem. 1999. A hierarchical approach to protein molecular evolution. *PNAS* **96**: 2591-2595.
- Chang, M. C. Y., R. A. Eachus, W. Trieu, D.-K. Ro, and J. D. Keasling. 2007. Engineering *Escherichia coli* for production of functionalized terpenoids using plant P450s. *Nat. Chem. Biol.* **3**: 274-277.
- Chevalier, B. S., T. Kortemme, M. S. Chadsey, D. Baker, R. J. Monnat, and B. L. Stoddard. 2002. Design, activity, and structure of a highly specific artificial endonuclease. *Mol. Cell.* **10**: 895-905.
- Choi, S.-L., E. Rha, D. Y. Kim, J. J. Song, S.-P. Hong, M.-H. Sung, and S.-G. Lee. 2006. High throughput screening and directed evolution of tyrosine phenol-lyase. *Kor. J. Microbiol.*

- Biotechnol.* **34**: 58-62.
10. Cramer, A., S.-A. Raillard, E. Bermudez, and W. P. C. Stemmer. 1998. DNA shuffling of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature* **391**: 288-291.
 11. De Lorimier, R. M., J. J. Smith, M. A. Dwyer, L. L. Looger, K. M. Sali, C. D. Paavola, S. S. Rizk, S. Sadigov, D. W. Conrad, L. Loew, and H. W. Hellinga. 2002. Construction of a fluorescent biosensor family. *Protein Sci.* **11**: 2655-2675.
 12. Deuschle, K., S. Okumoto, M. Fehr, L. L. Looger, L. Kozhukh, and W. B. Frommer. 2005. Construction and optimization of a family of genetically encoded metabolite sensors by semirational protein engineering. *Protein Sci.* **14**: 2304-2314.
 13. Dong, M., W. H. Tepp, E. A. Johnson, and E. R. Chapman. 2004. Using fluorescent sensors to detect botulinum neurotoxin activity in vitro and in living cells. *PNAS* **101**: 14701-14706.
 14. Dwyer, M. A., L. L. Looger, and H. W. Hellinga. 2003. Computational design of a Zn²⁺ receptor that controls bacterial gene expression, *PNAS* **100**: 11255-11260.
 15. Fehr, M., W. B. Frommer, and S. Lalonde. 2002. Visualization of maltose uptake in living yeast cells by fluorescent nanosensor. *PNAS* **99**: 9846-9851.
 16. Fehr, M., S. Lalonde, I. Lager, M. W. Wolf, and W. B. Frommer. 2003. In vivo imaging of the dynamic of glucose uptake in the cytosol of COS-7 cells by fluorescent nanosensors, *J. Biol. Chem.* **278**: 19127-19133.
 17. Fehr, M., D. W. Ehrhardt, S. Lalonde, and W. B. Frommer. 2004. Minimally invasive dynamic imaging of ions and metabolites in living cells, *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 345-351.
 18. Fraser, H. B. 2005. Modularity and evolutionary constraint on proteins. *Nat. Genet.* **37**: 351-352.
 19. Frase, H. B. 2005. Coevolution, modularity and human disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**: 637-644.
 20. Frommer, W. B., M. Fehr, and S. Lalonde. WO 03/025220, 27 March 2003.
 21. Guntas, G., T. J. Mansell, J. R. Kim, and M. Ostermeier. 2005. Directed evolution of protein switches and their application to the creation of ligand-binding proteins. *PNAS* **102**: 11224-11229.
 22. Ha, J. S., J. J. Song, Y. M. Lee, J.-H. Sohn, C.-S. Shin, and S.-G. Lee. 2007. Design and application of highly responsive fluorescence resonance energy transfer biosensors for detection of sugar in living *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 7408-7414.
 23. Hocker, B., C. Jurgens, M. Wilmanns, R. Sterner. 2001. Stability, catalytic versatility and evolution of the (β/α)₈-barrel fold. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 376-381.
 24. Joern, J. M., T. Sakamoto, A. Arisawa, and F. H. Arnold. 2001. A versatile high throughput screen for dioxygenase activity using solid-phase digital imaging. *J. Biomol. Screen* **6**: 219-23.
 25. Kawarasaki, Y., K. E. Griswold, J. D. Stenson, T. Selzer, S. J. Benkovic, B. L. Iverson, and G. Georgiou. 2003. Enhanced crossover SCRATCHY: construction and high-throughput screening of a combinatorial library containing multiple non-homologous crossovers. *Nucleic Acids Res.* **31**: e126.
 26. Kuchner, O. and F. H. Arnold. 1997. Directed evolution of enzyme catalysts. *Trends Biotechnol.* **15**: 523-530.
 27. Lager, I., M. Fehr, W. B. Frommer, and S. Lalonde. 2003. Development of a fluorescent nanosensor for ribose. *FEBS Lett.* **553**: 85-89.
 28. Looger, L. L., M. A. Dwyer, J. J. Smith, and H. W. Hellinga. 2003. Computational design of receptor and sensor proteins with novel functions. *Nature.* **423**: 185-190.
 29. Mainfroid, V., K. Goraj, F. Rentier-Delrue, A. Houbrechts, M. E. M. Noble, T. V. Borchert, R. K. Wierenga, and J. A. Martial. 1993. Replacing the (β)₀-unit 8 of *E. coli* TIM with its chicken homologue leads to a stable and active hybrid enzyme. *Protein Eng.* **6**: 893-900.
 30. Marvin, J. S., E. E. Corcoran, N. A. Hattangadi, J. V. Zhang, and H. W. Hellinga. 1997. The rational design of allosteric interactions in a monomeric protein and its applications to the construction of biosensors. *PNAS* **94**: 4366-4371.
 31. Michnick, S. W. 2003. Protein fragment complementation strategies for biochemical network mapping. *Curr. Opin. Biotech.* **14**: 610-617.
 32. Miyawaki, A., J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, and R. Y. Tsien. 1997. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**: 882-887.
 33. Mochizuki, N., S. Yamashita, K. Kurokawa, Y. Ohba, T. Nagai, A. Miyawaki, and M. Matsuda. 2001. Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1, *Nature* **411**: 1065-1068.
 34. Moore, G. L. and C. D. Maranas. 2003. Identifying residue-residue clashes in protein hybrids by using a second-order mean-field approach. *PNAS* **100**: 5091-5096.
 35. Mootz, H. D., D. Schwarzer, and M. A. Marahiel. 2000. Construction of hybrid peptide synthetases by module and domain fusions. *PNAS* **97**: 5848-5853.
 36. Nagai, T., A. Sawano, E. S. Park, and A. Miyawaki. 2001. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺. *PNAS* **98**: 3197-3203.
 37. Nagai, T., S. Yamada, T. Tominaga, M. Ichikawa, and A. Miyawaki. 2004. Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca²⁺ by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *PNAS* **101**: 10554-10559.
 38. Okumoto, S., L. L. Looger, K. D. Micheva, R. J. Reimer, S. J. Smith, and W. B. Frommer. 2005. Detection of glutamate release from neurons by genetically encoded surface-displayed FRET nanosensors. *PNAS* **102**: 8740-8745.
 39. Olsen, M., B. Iverson, and G. Georgiou. 2000. High-throughput screening of enzyme libraries. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 331-337.
 40. Ostermeier, M., J. H. Shim, and S. J. Benkovic. 1999. A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. *Nat. Biotechnol.* **17**: 1205-1209.

41. Park, H.-S., S.-H. Nam, J. K. Lee, C. N. Yoon, B. Mannervik, S. J. Benkovic, and H.-S. Kim. 2006. Design and evolution of new catalytic activity with an existing protein scaffold. *Science* **311**: 535-538.
42. Ponting, C. P. and R. R. Russel. 2002. The natural history of protein domains. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**: 45-71.
43. Stemmer, W. P. C. 1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *PNAS* **91**: 10747-10751.
44. Tanimura, A., A. Nezu, T. Morita, R. J. Turner, and Y. Tojyo. 2004. Fluorescent biosensor for quantitative real-time measurements of inositol 1,4,5-triphosphate in single living cells. *J. Biol. Chem.* **279**: 38095-38098.
45. Tsien, R. Y. and A. Miyawaki. WO 98/40477, 17 September 1998.
46. Voigt, C. A., C. Martinez, Z. G. Wang, S. L. Mayo, and F. H. Arnold. 2002. Protein building blocks preserved by recombination. *Nat. Struct. Biol.* **9**: 553-558.
47. Zhao, H. 2004. Staggered Extension process in vitro DNA recombination. *Methods Enzymol.* **388**: 42-49.

(Received Mar. 31, 2008/Accepted May 20, 2008)