

Expression of SARS-3CL Protease in a Cell-Free Protein Synthesis System

Sun Joo Park¹ and Yong-Tae Kim^{2*}¹Department of Chemistry, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea²Department of Food Science and Technology, Kunsan National University, Kunsan 573-701, Korea

Received February 28, 2012 / Revised April 13, 2012 / Accepted April 16, 2012

Severe acute respiratory syndrome (SARS) is a severe respiratory infectious disease caused by a novel human coronavirus, SARS-CoV. The 3CL protease is a key enzyme in the proteolytic processing of replicase polyprotein precursors, pp1a and pp1ab, which mediate all the functions required for viral genomic replication and transcription. Therefore, this enzyme is a target for the development of chemotherapeutic agents against SARS. A large quantity of active SARS-3CL protease is required for development of anti-SARS agents. Here we have constructed overexpression vector for the production of the SARS-3CL protease. The gene encoding SARS-3CL protease was amplified using polymerase chain reaction and cloned into the pET29a expression vector, resulting in pET29a/SARS-3CLP. Recombinant SARS-3CL protease was successfully synthesized by the dialysis mode of the cell-free protein expression system, and purified by three-step fast protein liquid chromatography using HighQ and MonoP column chromatographies and Sephacryl S-300 gel filtration. In addition, the produced SARS-3CL protease was found to be an active mature form. This study provides efficient methods not only for the development of anti-SARS materials from natural sources, but also for the study of basic properties of the SARS-3CL protease.

Key words : Cell-free protein synthesis, 3CL protease, coronavirus, protein expression, SARS

서 론

사스(Severe acute respiratory syndrome, SARS)는 사람의 신종 폐렴인 중증 급성 호흡기 질환으로 2002년에 중국의 광둥성에서 최초로 발생하여 아시아를 중심으로 세계 여러 나라로 급속히 확산되어 인류의 생존을 위협했다. 세계보건기구의 보고에 의하면 2003년 8월까지 약 8500명 이상의 사스 감염자가 발생하였으며 그 중 800명 이상이 사망했다[4,18]. 그 후, 이 질병을 일으키는 원인으로 신종의 RNA 바이러스인 SARS-Coronavirus (SARS-CoV)가 2003년에 발견되었다[5,7,13]. SARS-CoV는 나도바이러스목 코로나바이러스과에 속하는 positive-sense, single-stranded RNA 바이러스로 사람이외의 동물의 소화기관 및 호흡기관에서 염증을 일으키는 바이러스가 돌연변이를 일으켜 사람에게 전염된 것으로 감염 경로는 동물의 분비물이나 배출물의 접촉에 의한 것으로 밝혀졌다[9,16,17]. 원인 바이러스인 SARS-CoV에 노출된 후 2~7일 정도의 잠복기가 지나면 발열, 무력감, 두통, 근육통 등의 신체 전반에 걸친 증상이 나타난다. 심한 경우에는 증상이 2주 이상 지속되며 호흡 기능이 크게 나빠지고 급성 호흡곤란 증후군 및 다기관 부전증으로 진행되어 사망에 이르는 경우도 있다[4,14,18].

SARS-CoV가 숙주 세포 표면에 흡착하면 세포 내 전송 및

막 융합 과정을 거쳐 숙주 세포 내부에 침입하게 되며, 침입한 바이러스는 대량으로 복제·증폭되고, 복제된 바이러스는 다시 숙주 세포 밖으로 방출되어 확산 된다. 이런 SARS-CoV의 복제, 전사 및 단백질 합성 과정은 2개의 복제효소 복합 단백질, pp1a (486 kDa)와 pp1ab (790 kDa)에 의해 결정되는데, pp1a와 pp1ab는 불활성형으로 합성된 후 3C-like protease (3CL protease) 및 papain-like protease (PL2 protease)에 의해 특정 절단부위가 절단됨으로써 여러 가지 활성형 단백질로 전환되어 바이러스의 복제를 개시한다[16,19,21,22]. 따라서, SARS-CoV의 3CL protease와 PL2 protease는 SARS-CoV의 복제, 전사 및 단백질 합성 과정을 조절하는 복제효소 복합체의 프로세싱에 결정적인 역할을 담당하는 효소들이며 이들 효소의 활성을 저해함으로써 바이러스의 복제 및 증식을 차단할 수 있다. 특히 3CL protease의 효소활성을 저해하면 복제효소 복합체의 특정 절단부위 14 곳 중 11 곳이 절단되지 않아 활성형 복제효소관련 단백질들이 생산되지 않으며 그 결과, SARS-CoV가 숙주 세포 내부에 침입하여도 세포 내부에서 바이러스의 복제반응이 개시되지 않고 바이러스의 증식이 억제되어 사스의 치료에 크게 효과를 나타낼 수 있다. 이러한 이유로 3CL protease는 사스 치료제 개발의 중요한 표적으로 주목받고 있다[1,6]. 사스가 출현한 2003년 이후 현재까지 SARS-3CL protease의 저해제 개발을 위해 여러 연구자들이 High-Throughput Screening (HTS) 법을 이용한 compound library screening법 및 *In silico* screening법을 이용하여 SARS-3CL protease의 효소활성을 저해하는 다양한 종류의 화

*Corresponding author

Tel : +82-63-469-1824, Fax : +82-63-469-1821

E-mail : kimyt@kunsan.ac.kr

합물을 발견하였다[2,3,8,23-25]. 그러나 신약 후보 물질로 이용할 수 있는 높은 저해활성과 안정성을 가지면서 인체에 안전한 물질은 현재까지 발견되지 않고 있다. SARS-3CL protease의 저해활성물질의 스크리닝 뿐 만 아니라 효소활성발현 메커니즘의 명확한 해명은 유사 바이러스성 질환의 치료제 개발을 위해서도 중요하다.

본 연구에서는 SARS-3CL protease의 구조 및 기능 상관에 관한 연구 및 저해활성물질 탐색에 필요한 활성형 3CL protease를 생산하는 최적 방법을 고안하고자 하였다. 다양한 발현계를 작성하여 효소 생산에 최적인 발현 벡터 및 단백질 발현 방법을 검토하였다. 그 결과 pET29a/3CLP 발현 벡터를 이용한 무세포 단백질 합성방법이 SARS-3CL protease의 단백질 발현 및 생산에 최적인 것으로 확인되었다. 또한 발현된 SARS-3CL protease의 정제를 위해 High Q column, Mono P column, 및 Sephacryl S-300 겔 여과법을 이용한 3단계의 간단한 정제방법을 확립하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 시약

본 연구에서 사용한 *E. coli* strain DH5a, BL21 (DE3) 및 plasmid pET29a는 Novagen (Madison, USA)으로 부터 구입하였다. ATP, UTP, GTP, CTP, Creatine phosphate (CP), Creatine kinase (CK), phosphor-*enol*pyruvate, *Escherichia coli* total tRNA mixture, T7 RNA polymerase 및 S30 extract는 Roche Applied science (Indianapolis, USA)에서 구입하였다. Pyruvate kinase, L(-)-5-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid (folinic acid), cAMP, potassium glutamate, polyethylene glycol (PEG) (average MW 8,000) 및 acetyl coenzyme A는 Sigma Aldrich사로부터 구매하여 사용하였다. 각종 아미노산, dithiothreitol (DTT) 및 diethylpyrocarbonate (DTNB)는 Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)로부터, Recombinant *Pfu* DNA polymerase, T4 DNA ligase, alkaline phosphatase (CIP) 및 제한효소는 Stratagene (La Jolla, USA)에서 구입하였다. 그 외에 본 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

발현 벡터의 구축

SARS-3CL protease의 유전자를 pMAL vector (New England BioLabs Inc., USA)의 cloning site에 재조합한 pMAL/3CLP plasmid (N. Yamamoto, Tokyo Medical and Dental University, Japan) DNA를 *E. coli* DH5a에서 발현·정제한 후 template DNA로 사용하였다. SARS-3CL protease 유전자의 증폭은 아래의 primers를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR) 법으로 실행하였다. Forward primer (5'-CGTGGATCCCAGACATCAATCACTTCTGCTGTTCTG

CAGAGTGGTTTTAGGAAAATGGC-3')에는 *Ban*HI site (밑줄)와 친연 pp1ab polyprotein의 SARS-3CLP의 N-말단의 상부에 해당하는 10개의 아미노산(QTSITSAVLQ)을 코딩하는 30 nucleotides를 도입하였다. Reverse primer (5'-GGTGTCTCGAGAGTGGCCCTTAACAATTTTCTTGAACCTTACCTTGGAAGGTAACACCAGAGC-3')에는 *Xhd* site (밑줄)와 친연 pp1ab polyprotein의 SARS-3CLP의 C-말단의 하부에 해당하는 10개의 아미노산(GKFKKIVKGT)을 코딩하는 30 nucleotides를 도입한 것을 사용하였다. PCR 조건은 변성 온도 95°C, annealing 온도 55°C, 합성 온도 68°C이었고, 총 25 cycle을 수행하였다. PCR 생성물은 1% agarose gel 전기영동으로 확인한 후, PCR purification kit (Quagen)로 정제하여 발현계의 구축에 사용하였다. 정제된 SARS-3CL protease 유전자와 발현벡터 pET29a를 제한효소 *Ban*HI과 *Xhd*로 절단한 다음, 재조합 pET29a/3CLP 벡터를 작성하였다. 그 결과 생성되는 예상 단백질인 SARS-3CL protease의 도식은 Fig. 1A에 나타내었다.

무세포 단백질 발현 반응 및 정제

SARS-3CL protease의 단백질 발현은 Kigawa 등[10,11]의 무세포 단백질 합성 반응법에 따라 실시하였다. 반응액은 다음과 같이 조제하여 사용하였다: 55 mM Hepes-KOH buffer (pH 7.5); 1.7 mM DTT; 1.2 mM ATP (pH 7.0); 각 0.8 mM의 CTP (pH 7.0), GTP (pH 7.0), 및 UTP (pH 7.0); 80 mM CP; 250 µg/ml CK; 4.0% PEG 8000; 0.64 mM 3',5'-cyclic AMP; 68 µM folinic acid; 175 µg/ml *E. coli* total tRNA; 210 mM potassium glutamate; 27.5 mM ammonium acetate; 10.7 mM magnesium acetate; 각 1.0 mM의 20종 아미노산; 2~32 µg/ml 발현벡터(pET29a/3CLP plasmid); 93 µg/ml T7 RNA polymerase; 30% (v/v) S30 세포 파쇄액; 0.05% sodium azide. 투석액은 반응액에서 CK, *E. coli* total tRNA, 발현벡터, T7 RNA polymerase, 및 S30 세포 파쇄액을 제외하고 조제하여 사용하였다. 반응액을 투석막(Spectra/Por 7 MWC0: 15,000, Spectrum Laboratories, Inc., USA)에 넣고 투석액에 대하여 30°C에서 6시간 투석하여 발현 반응을 실행하였다.

단백질 합성반응이 종료한 반응액을 회수하여 완충액 A (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA, 1 mM DTT)로 투석하고 원심분리(12,000×g 20 min, 4°C)하였다. 상층액을 완충액 A로 평형화시킨 High Q (12.6×40 mm, Bio-Rad) 컬럼에 주입하고, 충분한 양의 완충액 A로 세척한 후, 완충액 A의 NaCl 농도가 0~0.2 M에 이르도록 농도 기울기법으로 분별 용출하였다. 효소 단백질이 함유된 분획을 회수하여 완충액 B (25 mM Imidazole-HCl, pH 7.6, 1 mM DTT)로 투석하여, 원심분리(12,000×g 20 min, 4°C)하였다. 동일한 완충액 B로 평형화시킨 Mono P 컬럼(5×200 mm, GE Healthcare)에 위의 상층액을 주입하고, 비흡착 단백질을 완충액 B로 세척한 후, 완충액

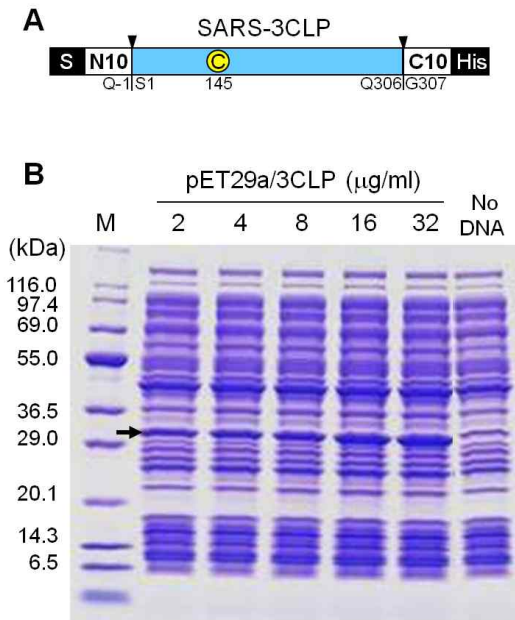


Fig. 1. Schematic diagram and expression analysis of SARS-3CL protease. (A) A schematic view of the expressed SARS-3CL protease. S, S-tag protein; N10, 10 amino acids to the N-terminal (QTSITSAVLQ); C145, Cys¹⁴⁵; C10, 10 amino acids to the C-terminal (GKFKKIVKGT); His, 6×His; Q-1, Gln⁻¹; S1, Ser¹; Q306, Gln³⁰⁶; G307, Gly³⁰⁷. (B) SDS-PAGE profiles of 3CL protease induced by various concentration (0, 2, 4, 8, 16, 32 µg/ml) of pET29a/3CLP plasmid. The expression of the recombinant protein SARS-3CL protease was confirmed by the SDS-PAGE and Coomassie brilliant blue staining. M, molecular weight markers; No DNA, blank.

C (1/8 Polybuffer74, 1 mM DTT)로 분별 용출시켰다. 효소 단백질이 함유된 Mono P 컬럼 분획을 회수하여 완충액 D (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 M NaCl)로 투석하였다. 이 단백질용액을 완충액 D로 평형화된 Sephacryl S-300 컬럼(26×600 mm, GE Healthcare)에 주입하여 동일한 용액으로 단백질을 분별 용출시켜 SARS-3CL protease의 효소활성을 나타내는 분획을 회수하였다. 이상의 과정으로 정제한 효소를 4℃에 보관하면서 정제 효소의 특성 실험에 사용하였다. 정제 효소의 단백질 정량은 소 혈청 알부민을 표준 단백질로 사용하여 Bicinchoninic acid (BCA)법으로 측정하였다.

효소 활성 측정

SARS-3CL protease의 효소 활성은 형광 펩타이드 기질, Nma-Thr-Ser-Ala-Val-Leu-Gln-Ser-Gly-Phe-Arg-Lys(Dnp)-NH₂ (Peptron, Korea)을 사용하여 분석하였다. 효소활성은 100 mM Tris-HCl (pH7.3)/1 mM DTT 완충액 150 µl, 1 mM 기질 용액 20 µl, 및 효소용액 30 µl를 혼합하여 37℃에서 30분간

효소 반응을 연속적으로 측정하였다. 효소 반응은 기질 첨가로 시작되고, 효소활성은 microplate reader (Tecan Infinite 200, Austria)를 사용하여 excitation wavelength, 320 nm 및 emission wavelength, 420 nm에서 연속적으로 형광의 세기를 측정하여 분석하였다. 기질의 분해 정도는 Nma/Dnp type fluorescence-quencing 기질에 대한 표준형광물질인 D-A2pr(Nma)-Gly 및 Ala-Phe-Pro-Lys(Dnp)-D-Arg-D-Arg (Peptide, Japan)의 혼합물의 농도로 환산하여 계산하였다. 3CL protease의 효소 활성 1 unit는 1 min 당 생산된 1 nmol 기질 분해 펩타이드 농도로 정의하였다.

Western Blot 분석 및 기타

무세포 단백질 합성법으로 발현된 단백질 용액은 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)로 분리하여, polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad, USA)에 전사하였다. 이 PVDF membrane을 5% skim milk로 1시간 동안 blocking 한 후, TBS-T 완충액(20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20)으로 10분간 3회 세척하였으며 적정 희석된 1차 항체, anti-SARS-CoV 3CL protease, mouse mAb (Genesis Biotech Inc., Taiwan)로 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 TBS-T 완충액으로 세척하고 2차 항체, ECL HRP-conjugated anti-mouse antibody (Amersham Biosciences, NJ, USA)로 추가 반응시켰다. 반응 후 TBS-T 완충액으로 다시 10분간 3회 세척하였으며, ECL Western detection reagents (Amersham Biosciences, USA)를 사용하여 반응시키고, LAS-3000 Luminescent Image Analyzer (FUJIFILM, Japan)로 발현 수준을 분석하였다.

정제 단백질의 분자량은 MALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems Voyager-DE STR mass spectrometer, USA)를 사용하여 측정하였다. N-말단 아미노산 서열 분석은 Porcise[®] cLC System Model 492 cLC (Applied Biosystem, USA)를 사용하여 Edman 분해법으로 분석하였다.

결과 및 고찰

SARS-3CL protease의 발현 벡터 구축

3CL protease는 사스의 원인 물질인 SARS-CoV의 복제 및 증식에 중요한 역할을 담당하는 효소로서, 본 효소의 효소학적 특성 및 저해물질을 탐색하기 위해서는 다량의 활성형 3CL protease를 생산할 필요가 있다[1]. 본 연구에서는 효소활성을 가지고 있는 SARS-3CL protease를 다량으로 생산하기 위하여, 그 유전자를 함유하고 있는 pMAL/3CLP plasmid로부터 PCR법으로 3CL protease의 유전자를 증폭하고, pET29a 발현 벡터의 *Bam*HI과 *Xhd* 제한효소 자리에 삽입하여 pET29a/3CLP 발현 벡터를 구축하였다. 이 벡터에서 발현되는 SARS-3CL protease의 전체 단백질은 Fig. 1A에 도식으로

나타내었다. 발현단백질의 N-말단에는 S-tag protein (S)과 천연 pp1ab polyprotein의 3CL protease의 N-말단의 상부에 해당하는 10개의 아미노산(N10), QTSITSAVLQ이 추가되었다. 또한, 단백질의 C-말단에는 천연 pp1ab polyprotein의 3CLP의 C-말단의 하부에 해당하는 10개의 아미노산(C10), GKFKKIVKGT와 His-tag (His)가 발현되도록 디자인하였다. 발현되는 효소단백질의 N-말단 및 C-말단에 천연 pp1ab polyprotein의 아미노산을 각각 10개씩 삽입시킨 것은 SARS-3CL protease 자신의 자가분해를 유도하여 재조합 효소의 N-말단에 존재하는 S-tag 및 N10 그리고 C-말단에 존재하는 C10 및 His-tag를 제거하여 천연 활성형 SARS-3CL protease를 생산하기 위해서이다[16,19,22].

SARS-3CL protease의 최적 발현조건을 검토하기 위하여 우선 대장균 BL21, BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS 및 TB1을 pET29a/3CLP 발현 벡터로 각각 형질전환시켰다. 각 형질전환된 숙주의 3CL protease의 발현은 각각의 대장균을 37°C에서 $A_{600}=0.6$ 로 배양하여, 1 mM IPTG를 첨가하여 단백질 발현을 유도하였다. 4시간의 배양 후, 각 배양균체의 단백질을 SDS-PAGE 전기영동으로 분리하여, 그 효소 발현량을 검토하였다. 그 결과, 어떤 종류의 대장균에서도 자가분해된 성숙체 3CL protease (306 아미노산; 33.8 kDa) 및 불활성형 3CL protease (367 아미노산; 40.5 kDa)에 해당되는 새로운 단백질의 발현을 확인할 수 없었다(결과 생략). 더구나 추가로 구축한 pGEX-4T/3CLP 및 pGEX-6P/3CLP 발현 벡터로 각각 형질전환된 대장균에서 동일한 방법으로 발현 실험을 수행하였으나, SARS-3CL protease의 발현을 확인할 수 없었다(결과 생략).

무세포 단백질 합성법을 이용한 SARS-3CL protease의 발현

SARS-3CL protease를 발현시키기 위하여, 투석방법을 이용한 무세포 단백질 합성법을 실행하였다[10,11,20]. 이 단백질 합성법의 template DNA는 위에서 구축한 pET29a/3CLP 벡터를 사용하였다. 우선 단백질 발현에 영향을 미치는 template DNA의 농도를 최적화하기 위하여 미량 투석 합성방법(30 μ l 반응액 규모)으로 pET29a/3CLP plasmid의 농도를 2, 4, 8, 16, 32 μ g/ml로 변화시키면서 3CL protease를 발현시킨 후, 각 반응액을 SDS-PAGE 전기영동방법으로 그 효소 단백질의 발현량을 비교 검토하였다. 그 결과는 Fig. 1B에 나타난 것과 같이, 전기영동 겔 사진의 lane 2부터 lane 6까지는 template DNA의 농도별 반응액, 그리고 lane 7에는 template DNA를 첨가하지 않은 반응액(Blank)의 전기영동 패턴을 나타내고 있다. Blank와 각 농도별 template DNA 반응액의 전기영동 패턴을 비교해 보면 DNA의 농도가 증가함에 따라 3CL protease (33 kDa 부근)의 단백질 밴드가 비례적으로 두꺼워지는 것을 확인할 수 있다. 따라서, 무세포 단백질 합성법을 이용한

SARS-3CL protease의 발현량은 pET29a/3CLP 벡터의 농도에 의존적으로 증가하는 것을 알 수 있었으며, SARS-3CL protease의 무세포 단백질 합성법에서 단백질 발현량을 최대한 높이기 위해서는 pET29a/3CLP plasmid의 농도를 16~32 μ g/ml로 조절하여 단백질 합성을 실행하는 것이 최적인 것으로 확인되었다. 또한, 발현된 효소 단백질이 SARS-3CL protease인지를 규명하기 위하여, SARS-3CL protease의 항체를 사용하여 Western Blotting 방법으로 분석한 결과 Fig. 2B의 전기영동 사진에 보이는 것처럼 3CL protease의 분자량과 일치하는 33 kDa 부근에서 단백질 밴드를 확인할 수 있었다. 따라서 pET29a/3CLP 발현 벡터를 이용한 무세포 단백질 합성법으로 발현된 단백질은 SARS-3CL protease인 것이 명확히 밝혀졌다.

SARS-3CL protease의 정제 및 효소 활성

무세포 단백질 합성법을 이용한 SARS-3CL protease의 대량 발현 반응은 20 μ g/ml pET29a/3CLP plasmid 농도의 template DNA 존재 하에서 9 ml 반응액 규모로 실행하였다. 합성반응이 종료된 단백질 반응액을 회수하여 완충액 A로 투석하고, 원심분리하여 저분자 물질 및 불용성 물질을 제거하였다. 단백질 발현을 확인하기 위하여 상층액 일부를 전기영동을 실시하여 3CL protease의 단백질 발현 유무를 확인하였다. 그 결과는 Fig. 2A, lane 1에 나타난 것과 같이 33 kDa

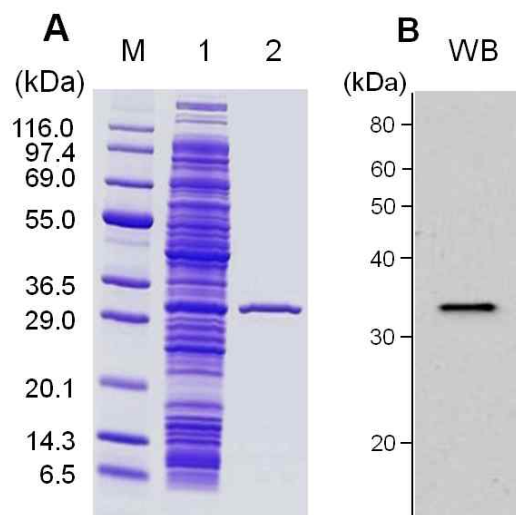


Fig. 2. SDS-PAGE and Western blot analysis of expressed SARS-3CL protease. Total protein extract synthesized in cell-free system and purified 3CL protease were subjected to 15% SDS-PAGE and analyzed by Coomassie brilliant blue staining (A) and Western blot with anti-SARS-CoV 3CL protease antibody (B). Lane M, molecular weight markers; 1, protein synthesized in cell-free system; 2, purified 3CL protease; WB, western blotting result of the purified 3CL protease.

Table 1. Purification of SARS-3CL protease^a

Purification steps	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity ^b (units/mg)	Purification (-fold)	Yield (%)
Cell-free synthesis	623.6	517.6	0.83	1	100
High Q	11.9	264.8	22.25	27	51
Mono P	3.1	186.9	60.30	73	36
Sephacryl S-300	2.9	178.5	61.54	74	34

^aThe results obtained using a 9 ml reaction mixture are shown.

^b1 unit=activity hydrolyzing 1 nmol of synthetic peptide per min.

부근에 굵은 단백질 밴드가 확인되었다. 따라서, 무세포 단백질 합성법을 이용한 3CL protease 단백질의 대량 발현 반응이 성공적으로 잘 진행된 것을 알 수 있었다. 발현된 3CL protease를 정제하기 위하여, 위의 상층액을 High Q 컬럼 크로마토그래피, Mono P 컬럼 크로마토포커싱, 그리고 Sephacryl S-300 겔 여과 방법을 이용하여 3CL protease를 완전 정제하였다. 최종적으로 정제한 효소의 정제도를 확인하기 위하여 전기영동을 실시한 결과, 표준 단백질 마크의 분자량 33 kDa 부근에서 단일 밴드가 확인되어(Fig. 2A의 lane 2) 균일하게 정제된 것으로 판단되었다. 이상의 정제과정의 결과를 Table 1에 나타낸 것과 같이, 9 ml 규모의 무세포 단백질 합성 반응액으로부터 완전 정제한 SARS-3CL protease를 약 3 mg 생산할 수 있는 것으로 확인되었다.

정제한 3CL protease의 효소 활성을 측정하기 위하여, 형광기질 (Nma-Thr-Ser-Ala-Val-Leu-Gln-Ser-Gly-Phe-Arg-Lys(Dnp)-NH₂)을 합성·정제하여 사용하였다. 합성한 형광기질은 2-(N-methylamino)benzoyl (Nma)/2,4-dinitrophenyl (Dnp) type fluorescence-quenching 기질의 일종으로 펩타이드 배열은 SARS-3CL protease의 N-말단에 있는 자가분해 부위 (Gln-Ser) 상류의 6번째 아미노산 잔기부터 하류의 5번째 아미노산 잔기까지의 배열(Thr-Ser-Ala-Val-Leu-Gln ↓ Ser-Gly-Phe-Arg-Lys)과 일치한다[1]. 이 형광 기질을 이용하여 측정된 완전 정제된 SARS-3CL protease의 효소의 비활성은 61.5 unit/mg으로 확인되었다. 또한 정제한 SARS-3CL protease의 정제도는 단백질 합성 반응액에 비해 74배로 증가하였으며, 총 효소활성의 수율은 34%였다(Table 1).

SARS-3CL protease의 분자량 및 N-말단 아미노산 서열 결정

최종적으로 정제한 효소 단백질의 분자량은 MALDI-TOF mass spectrometer를 이용하여 측정하였다. 그 결과는 Fig. 3에 나타낸 것과 같이 m/z=33792.74 (M+H)⁺이었다. SARS-3CL protease는 306개의 아미노산으로 구성되어있고, 그 분자량은 33,845인 효소 단백질이라는 것이 여러 연구자에 의해 보고되어있다[1,12,16,19]. 본 실험에서 정제한 효소 단백질과 3CL protease의 이론적인 분자량을 비교해 보면 그 분자량이 약 0.1%의 오차 범위인 것으로 확인되어 정제한 단백질과

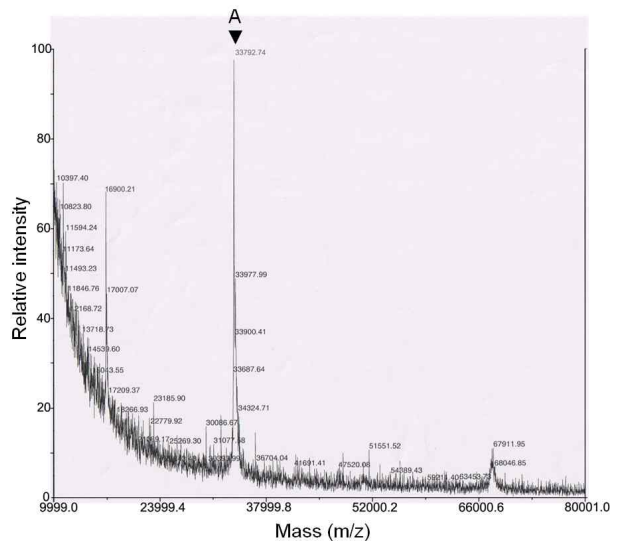


Fig. 3. Mass spectrum of purified SARS-3CL protease. Peak A (m/z=33792.74) indicates the deduced mass of the SARS-3CL protease.

SARS-3CL protease의 분자량은 일치하는 것으로 판단하였다. 한편, 정제한 효소의 N-말단 아미노산 배열을 알아보기 위해 에드만 서열 분석을 한 결과, Ser-Gly-Phe-Arg-Lys-Met-Ala-Phe의 8개의 아미노산 배열을 확인하였다. 이 배열은 SARS-3CL protease의 1번 아미노산부터 8번 아미노산까지의 배열에 해당한다. 또한 본 실험에서 3CL protease를 생산하기 위하여 디자인한 pET29a/3CLP 벡터의 발현 단백질(367 아미노산)은 S-tag protein, N10, 3CL protease, C10, 및 His-tag로 구성되어있다(Fig. 1A). 효소 활성이 없는 불활성형 3CL protease가 발현되면 367개의 아미노산(분자량: 40,530)으로 구성된 단백질이 생산될 것이다. 그러나 활성형 3CL protease가 발현되면 N-말단에 첨가되어 생성되는 S-tag protein 및 N10 과 C-말단에 첨가되어 생성되는 C10 및 His-tag가 자가분해에 의해 절단되어 306개의 아미노산(분자량: 33,845)으로 구성된 천연 활성형 3CL protease와 동일한 단백질이 생산된다 [1,12,16,19]. 위의 정제한 단백질의 분자량 측정 및 N-말단 아미노산 분석 결과를 종합해 보면, 본 실험에서 발현된 SARS-3CL protease는 자가분해에 의해 N-말단 및 C-말단의

자가분해 부위가 절단된 활성형 3CL protease (306 아미노산; 분자량: 33,845)인 것으로 확인되었다.

이상의 결과처럼, 우리는 본 연구에서 구축한 pET29a/3CLP 발현 벡터를 이용하여 무세포 단백질 합성법으로 SARS-3CL protease를 성공적으로 발현시킬 수 있었다. 또한 SARS-3CL protease의 효율적 정제법으로 High Q 컬럼 크로마토그래피, Mono P 컬럼 크로마토포커싱, 및 Sephacryl S-300 겔 여과 방법을 이용한 3단계의 정제방법을 확립하였다. 또한 정제한 3CL protease의 효소활성 및 그 특성을 확인한 결과, 재조합 3CL protease는 천연 3CL protease와 동일한 방법으로 활성화 과정을 거쳐 생산된 활성형 성숙체 효소로서 효소활성발현 메커니즘 규명 및 SARS-3CL protease의 저해활성물질의 탐색에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2011-0005390).

References

- Anand, K., Ziebuhr, J., Wadhwani, P., Mesters, J. R. and Hilgenfeld, R. 2003. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science* **300**, 1763-1767.
- Blanchard, J. E., Elowe, N. H., Huitema, C., Fortin, P. D., Cechetto, J. D., Eltis, L. D. and Brown, E. D. 2004. High-throughput screening identifies inhibitors of the SARS coronavirus main proteinase. *Chem Biol.* **11**, 1445-1453.
- Chou, K. C., Wei, D. Q. and Zhong, W. Z. 2003. Binding mechanism of coronavirus main proteinase with ligands and its implication to drug design against SARS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**, 148-151.
- Donnelly, C. A., Ghani, A. C., Leung, G. M., Hedley, A. J., Fraser, C., Riley, S., Abu-Raddad, L. J., Ho, L. M., Thach, T. Q., Chau, P., Chan, K. P., Lam, T. H., Tse, L. Y., Tsang, T., Liu, S. H., Kong, J. H., Lau, E. M., Ferguson, N. M. and Anderson, R. M. 2003. Epidemiological determinants of spread of causal agent of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *Lancet* **361**, 1761-1766.
- Drosten, C., Günther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H. R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R. A., Berger, A., Burguière, A. M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J. C., Müller, S., Rickerts, V., Stürmer, M., Vieth, S., Klenk, H. D., Osterhaus, A. D., Schmitz, H. and Doerr, H. W. 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1967-1976.
- Fan, K., Wei, P., Feng, Q., Chen, S., Huang, C., Ma, L., Lai, B., Pei, J., Liu, Y., Chen, J. and Lai, L. 2004. Biosynthesis, purification, and substrate specificity of severe acute respiratory syndrome coronavirus 3C-like proteinase. *J. Biol. Chem.* **279**, 1637-1642.
- Fouchier, R. A., Kuiken, T., Schutten, M., van Amerongen, G., van Doornum, G. J., van den Hoogen, B. G., Peiris, M., Lim, W., Stöhr, K. and Osterhaus, A. D. 2003. Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* **423**, 240.
- Kao, R. Y., Tsui, W. H., Lee, T. S., Tanner, J. A., Watt, R. M., Huang, J. D., Hu, L., Chen, G., Chen, Z., Zhang, L., He, T., Chan, K. H., Tse, H., To, A. P., Ng, L. W., Wong, B. C., Tsoi, H. W., Yang, D., Ho, D. D. and Yuen, K. Y. 2004. Identification of novel small-molecule inhibitors of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus by chemical genetics. *Chem Biol.* **11**, 1293-1299.
- Kathryn, V. H. 2003. SARS-associated coronavirus. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1948-1951.
- Kigawa, T., Yabuki, T., Matsuda, N., Matsuda, T., Nakajima, R., Tanaka, A. and Yokoyama, S. 2004. Preparation of *Escherichia coli* cell extract for highly productive cell-free protein expression. *J. Struct. Funct. Genomics* **5**, 63-68.
- Kigawa, T., Yabuki, T., Yoshida, Y., Tsutsui, M., Ito, Y., Shibata, T. and Yokoyama, S. 1999. Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of protein. *FEBS Lett.* **442**, 15-19.
- Krokhin, O., Li, Y., Andonov, A., Feldmann, H., Flick, R., Jones, S., Stroehrer, U., Bastien, N., Dasuri, K. V., Cheng, K., Simonsen, J. N., Perreault, H., Wilkins, J., Ens, W., Plummer, F. and Standing, K. G. 2003. Mass spectrometric characterization of proteins from the SARS virus: a preliminary report. *Mol. Cell Proteomics* **2**, 346-356.
- Ksiazek, T. G., Erdman, D., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J. A., Lim, W., Rollin, P. E., Dowell, S. F., Ling, A. E., Humphrey, C. D., Shieh, W. J., Guarner, J., Paddock, C. D., Rota, P., Fields, B., DeRisi, J., Yang, J. Y., Cox, N., Hughes, J. M., LeDuc, J. W., Bellini, W. J. and Anderson L. J.; SARS Working Group. 2003. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1953-1966.
- Lee, N., Hui, D., Wu, A., Chan, P., Cameron, P., Joynt, G. M., Ahuja, A., Yung, M. Y., Leung, C. B., To, L. F., Lui, S. F., Szeto, C. C., Chung, S. and Sung, J. J. 2003. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1986-1994.
- Liu, Z., Huang, C., Fan, K., Wei, P., Chen, H., Liu, S., Pei, J., Shi, L., Li, B., Yang, K., Liu, Y. and Lai, L. 2005. Virtual screening of novel noncovalent inhibitors for SARS-CoV 3C-like proteinase. *J. Chem. Inf. Model.* **45**, 10-17.
- Marra, M. A., Jones, S. J., Astell, C. R., Holt, R. A., Brooks-Wilson, A., Butterfield, Y. S., et al. 2003. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* **300**, 1399-1404.
- Myint, S. H. 1995. Human coronavirus infections, pp. 389-401, In Siddell S. G. (eds.), *The coronaviridae* Plenum Press.
- Peiris, J. S., Yuen, K. Y., Osterhaus, A. D. and Stöhr, K. 2003.

- The severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **349**, 2431-2441.
19. Ruan, Y. J., Wei, C. L., Ee, A. L., Vega, V. B., Thoreau, H., Su, S. T., Chia, J. M., Ng, P., Chiu, K. P., Lim, L., Zhang, T., Peng, C. K., Lin, E. O., Lee, N. M., Yee, S. L., Ng, L. F., Chee, R. E., Stanton, L. W., Long, P. M. and Liu, E. T. 2003. Comparative full-length genome sequence analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection. *Lancet* **361**, 1779-1785.
 20. Seki, E., Matsuda, N., Yokoyama, S. and Kigawa, T. 2008. Cell-free protein synthesis system from *Escherichia coli* cells cultured at decreased temperatures improves productivity by decreasing DNA template degradation. *Anal. Biochem.* **377**, 156-161.
 21. Thiel, V., Herold, J., Schelle, B. and Siddell, S. G. 2001. Viral replicase gene products suffice for coronavirus discontinuous transcription. *J. Virol.* **75**, 6676-6681.
 22. Thiel, V., Ivanov, K. A., Putics, A., Hertzog, T., Schelle, B., Bayer, S., Weissbrich, B., Snijder, E. J., Rabenau, H., Doerr, H. W., Gorbalenya, A. E. and Ziebuhr, J. 2003. Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J. Gen. Virol.* **84**, 2305-2315.
 23. Wu, C. Y., Jan, J. T., Ma, S. H., Kuo, C. J., Juan, H. F., Cheng, Y. S., Hsu, H. H., Huang, H. C., Wu, D., Brik, A., Liang, F. S., Liu, R. S., Fang, J. M., Chen, S. T., Liang, P. H. and Wong, C. H. 2004. Small molecules targeting severe acute respiratory syndrome human coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 10012-10017.
 24. Xiong, B., Gui, C. S., Xu, X. Y., Luo, C., Chen, J., Luo, H. B., Chen, L. L., Li, G. W., Sun, T., Yu, C. Y., Yue, L. D., Duan, W. H., Shen, J. K., Qin, L., Shi, T. L., Li, Y. X., Chen, K. X., Luo, X. M., Shen, X., Shen, J. H. and Jiang, H. L. 2003. A 3D model of SARS-CoV 3CL proteinase and 54 inhibitors design by virtual screening. *Acta Pharmacol. Sin.* **24**, 497-504.
 25. Zhang, X. W., Yap, Y. L. and Altmeyer, R. M. 2005. Generation of predictive pharmacophore model for SARS-coronavirus main proteinase. *Eur. J. Med. Chem.* **40**, 57-62.

초록 : 무세포 단백질 합성법을 이용한 활성형 SARS-3CL protease의 발현

박선주¹ · 김용태^{2*}

(¹부경대학교 화학과, ²군산대학교 식품생명공학과)

사스(Severe acute respiratory syndrome, SARS)는 사람의 신종 폐렴인 중증 급성 호흡기 질환으로 신종 코로나바이러스, SARS-CoV에 의해 유발된다. 3CL protease는 SARS-CoV의 복제, 전사 및 단백질 합성을 조절하는 복제효소 복합단백질의 프로세싱에 결정적인 역할을 담당하는 중요한 효소이다. 따라서, 이 효소를 저해함으로써 SARS-CoV의 증식을 억제하고 사스의 증폭 및 확산을 막을 수 있다. SARS-3CL protease의 활성 저해물질의 탐색은 사스의 치료제 개발에 중요한 목표 중의 하나로 인식되고 있으며 이를 위해서는 활성형 SARS-3CL protease의 대량 생산이 필요하다. 본 연구에서는 활성형 SARS-3CL protease를 대량 생산하기 위하여 여러 가지 발현 벡터 및 단백질 발현 방법 등을 검토하였다. 그 결과, pET29a/3CLP 발현 벡터를 이용한 무세포 단백질 합성법이 SARS-3CL protease 생산에 최적 조건인 것으로 확인되었다. 또한 발현된 효소를 완전히 정제하여 그 특성을 분석한 결과, 본 효소는 무세포 단백질 합성계에서 전구체로 합성됨과 동시에 자가분해됨으로써 모든 단백질이 활성형인 성숙체 단백질로 전환되어 간단히 활성형 SARS-3CL protease 효소를 생산할 수 있음을 확인하였다.