

제 6 회 유전자 재조합 단백질 이해 및 실습

주요 수업 내용	수업자료 및 방법
<ul style="list-style-type: none"> ○ 유전자 재조합 기술에 의해 발현되는 단백질의 특성을 파악 ○ 유전자 재조합 단백질 발현방법 연구 ○ 곤충(세포) 시스템을 이용한 유전자 재조합 단백질 발현 실험 ○ 곤충 특이적 재조합 바이러스 구성 	강의, 토론, 유인물, ppt 자료, 실험·실습

■ 단원의 개관

유전자 재조합 단백질은 두 개 혹은 그 이상의 DNA를 유전자 재조합 기술로 이어 붙여 만든 recombinant DNA에서 만들어지는 것을 지칭한다. 이러한 recombinant DNA기술의 발전으로 과거 자연 상태에서 아주 극소량으로 밖에는 얻을 수 없던 유용 단백질이나 상업용 효소도 현재는 미생물 (박테리아, 곰팡이, yeast 등)과 곤충·식물세포 및 동물세포 등을 이용해서 대량생산이 가능하게 되었다. 미생물을 이용한 재조합 단백질의 가장 큰 장점은 대량 생산으로 인한 가격 경쟁력에 있다. 하지만, 미생물을 생산 공장으로서 사용하기 때문에, glycosylation 등과 같은 post-translational modification이 필요한 단백질이나 구조가 복잡한 단백질의 대량 생산은 어렵다. 이러한 단점에도 불구하고 세계적으로 박테리아를 이용, 대량생산에 성공한 재조합 단백질로는 hGH (Human Growth hormone), INS (Insulin), Interleukine 등이 있다. 재조합 단백질은 세계 의약품 시장을 필두로 화장품, 식품시장에서 새로운 원료로서 크게 주목받고 있다[출처 : http://regeron.com/page.php?page=sub2_1].

■ 단원의 목표

1. 유전자 재조합 기술에 의해 발현되는 단백질의 특성 파악
2. 효과적인 바이오 의약품 개발을 위한 유전자 재조합 단백질 발현방법 연구
3. 실험을 통하여 곤충(세포) 시스템을 이용한 유전자 재조합 단백질 발현 실시
4. 곤충 특이적 재조합 바이러스 구성을 통하여 곤충(세포) 시스템 적용
5. 바이오 의약품 생산에 있어서 곤충(세포)가 가지는 장·단점 이해
6. 곤충 유래의 의약 단백질에 대한 시장의 동향 파악
7. 곤충 특이적 바이러스 발현체계 연구를 통하여 본 수업의 목표 및 과정 이해
8. 교역가의 곤충 특이적 유전자 재조합 바이러스 확립

■ 교재 연구

- ▣ 곤충의 생체공장화 [자료의 출처 : 곤충의 생체공장화, 국립농업과학원, 구태원]

- 생물공학의 발달에 의해서 인간에게 사용할 수 있는 생체 고분자물질이 실험관내 혹은 배양세포에서 만들어지고 있다.
- 그러나 이들 물질이 기대한 것과 같은 효과를 나타내지 못하는 경우가 종종 발생한다. 따라서 생물공학 분야에서 가장 중요한 이슈 중의 하나는 외부에서 도입된 유전자로부터 뛰어난 생체활성을 가지는 외부단백질(heterologous protein)의 생산이다. 목적으로 하는 유전자 (exogenous gene)를 발현시켜 생체활성물질을 대량생산하기 위하여 포유동물 세포와 유사한 번역 후 변형과정(post-translational modification process)을 가지는 새로운 단백질생산 시스템이 탐색되었는데, 최근에 곤충세포가 주목을 받고 있다.
- 왜냐하면 곤충세포는 포유동물 세포와 매우 유사한 번역 후 변형과정을 가짐으로서 단순한 발현 시스템 (예 : E. coli)에서 생산된 재조합단백질과는 달리 뛰어난 생체활성을 가지는 재조합단백질을 생산할 수 있으며, 또한 포유동물세포의 단백질생산 시스템에 비하여 생산비용을 상당히 절감할 수 있을 뿐만 아니라 월등히 많은 생체 활성물질을 얻을 수 있다는 장점이 있다.

■ 곤충 베쿨로바이러스를 이용한 유용물질 생산 [자료의 출처 : 곤충의 생체공장화, 국립농업과학원, 구태원]

- 곤충세포의 최대 장점은 베쿨로바이러스 발현 벡터 시스템(baculovirus expression vector system : BEVS)이 확립되어져 있다는 것
- 이 BEVS에 의한 단백질의 발현특성은 세포 내에서 생산된, 목적 단백질이 본래 국제하고 있는 바로 그 세포 소기관까지 이행됨으로써, 이후 단백질의 수정이나 안정성을 높여 준다
- 또한, 분비단백질에 대해 BEVS에 의한 발현은 분비 신호가 정확하게 인식, 절단되면서 목적 산물이 배지 안으로 분비되어짐이 확인되었으며, 누에에서도 이와 같은 과정이 정확하게 수행되어 체액 안으로 단백질이 분비되어, 체액내 단백질 분해효소 억제제(protease inhibitor)의 작용에 의해 분해되지 않고 안정적으로 축적된다는 것
- 분비단백질 또는 막단백질은 당사슬의 부가(glycosylation)가 그 활성에 중요한 역할을 담당
- 이러한 당사슬의 부가에 대해서, BEVS는 곤충 세포를 숙주로 이용함으로써 사람의 유전자 산물과 유사한 당사슬이 부가되고 있음이 밝혀졌으나 이러한 당사슬의 부가가 척추동물 세포에 의한 것에 비해서는 당사슬이 짧은 것으로 알려져 있으나, 당사슬의 부가가 일어나지 않는 대장균이나 당사슬의 부가가 일어나더라도 매우 긴 사슬이 결합되는 효모, 그리고 척추동물에는 없는 당이

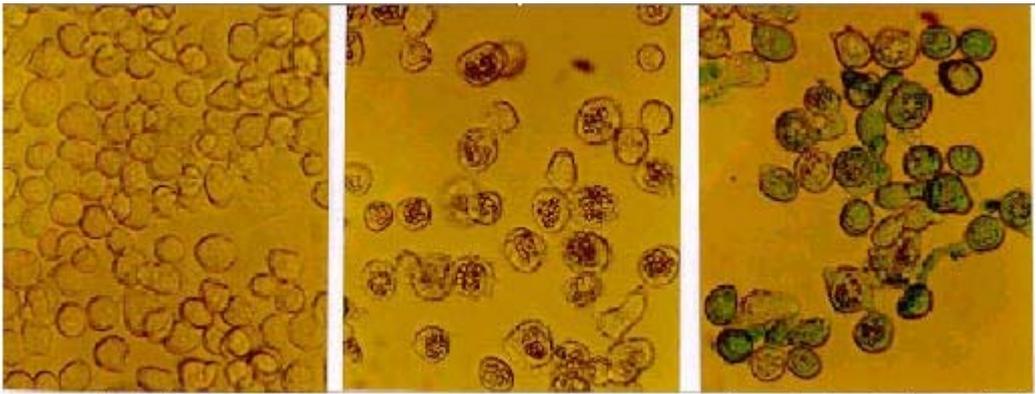
- 부가되거나 하는 식물 세포 등을 이용하는 경우에 비해서는 장점으로 인정
- 아미드화 (amidation)가 필요한 펩타이드(peptide)의 경우, 아미드화는 생물 활성이나 펩타이드의 안정성에 깊이 관련되나 배양 세포계에서는 척추동물 세포이든 곤충 세포이든 이러한 아미드화가 제대로 일어나지 않는 것으로 보고
 - 그러나 곤충 유충을 이용한 BEVS의 경우 이러한 아미드화가 완벽하게 일어나는 것으로 보고되고 있어 그 가치를 더욱 높여줌
 - 더욱이 BEVS는 단백질의 고차구조 (folding) 형성이나 항원성에 있어서도 우수한 것으로 보고
 - 이와 같은 특징 등으로 인하여 오늘날 많은 종류의 재조합 단백질이 BEVS를 사용하여 곤충세포에서 생산되고 있으며, 생산된 이들 재조합단백질은 진단학, 단백질의 구조와기능 연구 및 백신 등의 연구를 포함하여 많은 응용연구에 이용
 - BEVS에 주로 이용되는 핵다각체병 바이러스의 유전자는 다각체 단백질 유전자가 단연 압도적으로 이용
 - 그러나 목적에 따라서 또는 두 가지 이상의 목적 유전자를 동시에 발현시키기 위해서는 다각체 단백질 유전자 외에도 다른 유전자가 이용
 - 그 대표적인 것이 p10유전자의 프로모터를 이용하는 것으로, p10 역시 very late gene으로 다각체 단백질 다음으로 발현량이 높은 단백질임
 - 또한 그 기능이 완전히 밝혀지지 않았지만 바이러스의 증식에 필수적인 것은 아님이 밝혀져 벡터로 이용 가능함

표 1. BEVS와 여러 가지 발현벡터 비교

구 분	대장균	효모	동물세포	곤충세포
신호서열				
절단	O/X	O/X	0	0
당사슬부과	X	0	0	0
분비	O/X	0	0	0
고차구조형	O/X	O/X	0	0
성	X	0	0	0
인산화	X	X	0	0
아미드화	1~5	1	>1	30
효율 (%)				

주) 0 ; 반응, X ; 비발현, O/X ; 반응 또는 비발현

그림 1. 난소유래 누에 세포주 및 재조합바이러스 감염



정상세포주 야생형바이러스 감염 재조합바이러스 감염

- p10 프로모터를 이용한 발현벡터는 주로 재조합 바이러스 설균제 및 살충제 개발에 이용
- 바이러스 살충제 개발에 있어서는 다각체의 형성이 필수불가결하기 때문에 다각체 단백질 유전자를 그 자신의 프로모터 또는 p10 프로모터를 이용하여 발현시키고, 목적으로 하는 유전자를 p10 또는 다각체 단백질 프로모터를 이용하는 이중 발현계를 이용하게 된다. 또한 누에 유충 등 곤충 생체를 이용하여 물질을 발현시킬 경우 다각체가 형성되지 않으며, 일일이 바이러스를 충체에 주사 접종하여야 하는 불편함이 있어 역시 재조합바이러스가 다각체를 형성할 수 있도록 p10 유전자로 목적 유전자 또는 다각체 단백질 유전자를 발현할 수 있도록 재조합바이러스가 제작됨
- 따라서 p10 프로모터를 이용할 경우에는 주로 두 가지(다각체 단백질도 포함될 수 있음) 유전자를 동시에 발현시켜야 할 경우, 그것도 두 유전자의 발현량이 어느 수준 이상 높아야 할 경우에 이중 발현 벡터계로 주로 이용

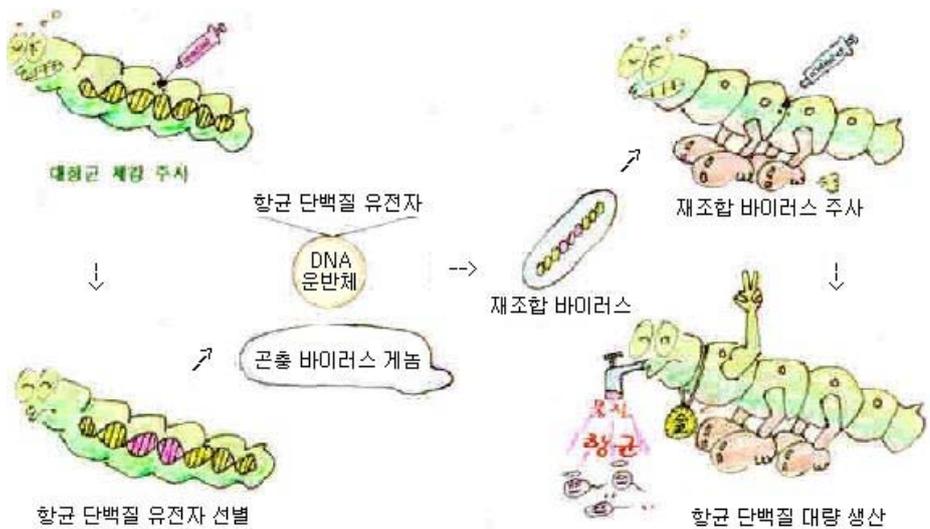


그림 2. 항세균단백질 '누에신' 개발 및 대량생산 모식도

■ 향후 전망 [자료의 출처 : 곤충의 생체공장화, 국립농업과학원, 구태원]

- 곤충(누에)은 자신의 삶을 영위하기 위하여 유충기간 동안에 먹이를 섭취
- 많은 물질을 생산하여 체내에 축적
- 번데기나 나방 및 알에서 이러한 물질을 변형시켜 이용
- 누에의 물질합성 기능은 인간이나 가축과 유사한 점이 많을 뿐만 아니라 총체가 크며 연중사육 및 취급이 매우 용이하여 유용물질 생산 공장으로서 이용하기에 매우 적합
- 즉 지금까지 실크만을 생산하는 누에를 고부가물질 생산에도 이용
- 첨단 양잠의 시발점은 1985년 마에다라는 일본 과학자가 누에에 기생하는 고름병바이러스를 이용하여 누에 생체를 통해 인터페론에 성공한데서 비롯
- 이후 전통 잠업국인 한국과 일본에서 지속적으로 누에의 생체공장화 연구가 추진
- 최근 일본의 벤처기업인 동양(주)에서 고양이 백신생산에 누에 생체를 가지고 기존의 대장균을 이용하여 1g당 생산비가 1억엔 소요되는 것을 2,000엔으로 대폭 절감하는데 성공
- 현재 사료 첨가제로 시판
- 이러한 성과는 멀지 않은 장래에 고부가 유용물질을 생산하는 누에를 치는 농가 탄생을 예견
- 결론적으로 곤충 생체공장화 연구의 최종목표는 직접적으로 양잠농가에 실적인 수익증대
- 누에 생체를 이용한 유용단백질의 대량생산, 생체활성을 가진 단백질의 대량생산시스템구축
- 약리학적 연구(환경친화성 살충제개발, 곤충의 약제저항성), 질병의 진단 및 치료제개발
- 단백질의 구조 및 기능연구용 단백질의 생산, 백신용 단백질개발, ERSD치료제개발(단백질이 ER에서 분비불량으로 인한 질병)
- 유전자치료용 BEVS개발(포유동물세포에서 적절한 발현을 할 수 있는 BEVS의 조절인자 규명)을 통하여 생체공장화의 다양화를 도모
- 아울러 곤충세포의 특이적인 분비단백질의 생성 기작규명, 곤충의 발생, 생리에 관련된 단백질의 기능분석과 같은 기초연구의 병행으로 곤충 생체공장화의 조기 실용화를 위한 많은 연구들이 수행되어야 함

▣ 곤충(세포) 발현 시스템의 특징 [자료의 출처 : Takara 연구지원 서비스, 재조합 Baculovirus를 이용한 단백질 발현의 total service; Baculovirus 발현벡터계를 이용한 단백질 생산]

- Baculovirus는 곤충에만 병원성을 가지고 있는 대표적인 곤충 병원성 바이러스
- 감염 말기에 세포 내 단백질량의 30% 이상의 다량체 단백질을 합성
- 생산된 재조합 baculovirus는 재조합 백신 생산, 진단 시약 개발, 단백질 연구 (3차원 구조, 단백질-단백질 간 상호작용, Protein modification 연구), Proteomics (Protein chip, 2D Gel electrophoresis)등 다양한 연구에 응용이 가능
- Baculovirus 발현벡터계에 의한 단백질의 발현 특성은 세포 내에서 생산
- 목적 단백질이 본래 세포 소기관까지 이행됨으로써, 이후 단백질의 수정이나 안정성 향상
- BEVS에 의한 발현은 분비 신호가 정확하게 인식, 절단되면서 목적 산물이 배지 안으로 분비
- BEVS는 곤충 세포를 숙주로 이용함
- 사람의 유전자 산물과 유사한 당사슬이 부가 (glycosylation) 되고 있음
- 다른 진핵세포 발현계와 비교할 때 가장 큰 장점은 발현효율
- 곤충세포는 intron/exon splicing 능력을 가짐
- BEVS는 하나의 세포 내에서 두 가지 이상의 유전자를 동시에 발현
- 이러한 동시발현이 가능한 두개 이상의 프로모터를 가진 다양한 전이벡터 역시 개발
- 다른 여러 가지 발현계와 마찬가지로 BEVS 역시 매우 다양한 종류의 정제용 tag를 가진 시스템이 개발
- 이들을 이용하여 매우 손쉽게 목적 단백질을 정제

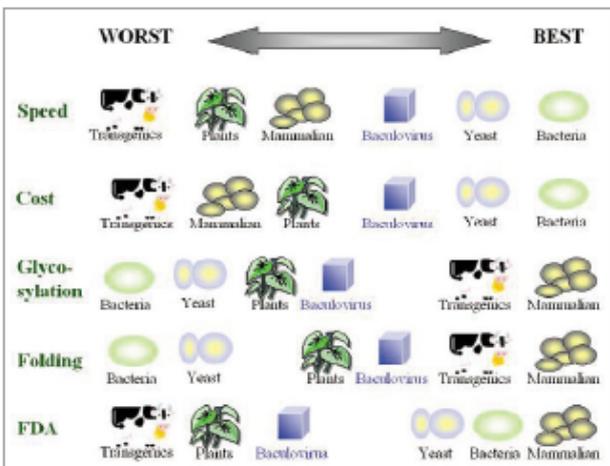


그림 1. 재조합 단백질 발현시스템의 비교

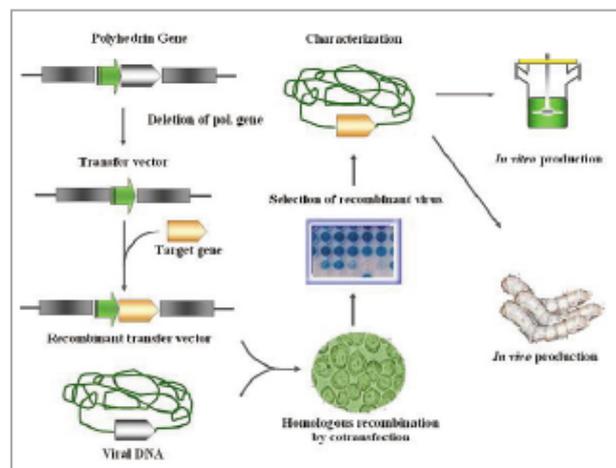


그림 2. Baculovirus 발현벡터계의 제작 과정

[자료의 출처 : Takara 연구지원 서비스, 재조합 Baculovirus를 이용한 단백질 발현의 total service]

- Baculovirus 발현벡터계는 가장 강력한 진핵발현계 중의 하나
- 다양한 응용이 가능한 유용한 발현계
- BEVS는 아데노바이러스 발현계나 레트로바이러스 발현계와는 달리 helper-independent 바이러스 시스템으로써 보다 간편
- 동물, 식물, 곰팡이, 세균, 바이러스 등 매우 다양한 이종 유전자의 발현에 현재 널리 이용
- 1980년대 초 처음 개발된 이래 다양한 형태의 벡터들이 개발되고 많은 연구자들이 이용하게 되면서 이제는 발현시스템을 대표
- 최근에는 유전자의 단순한 발현을 넘어서 유전자 치료를 목적으로 한 의약분야에서의 응용 등 그 이용분야가 더욱 확대
- Baculovirus는 크게 핵다각체병 바이러스 (Nucleopolyhedrovirus: NPV)와 과립병바이러스 (Granulovirus: GV)로 분류
- 현재까지 약 600여종 이상의 곤충에서 분리되고 있는 대표적인 곤충 바이러스
- 흔히 BEVS에 말하는 baculovirus는 이 중 NPV만을 일컫는 것
- NPV는 병원성을 가지고 있는 바이러스 입자 (virion)가 다각체 (polyhedra)라는 거대한 결정성 단백질의 봉입체 (occlusion body)내에 매립되어 있는 특이한 형태의 바이러스로서 광학현미경하에서도 쉽게 그 관찰이 가능
- 생명공학의 발달과 함께 다양한 유전자 재조합 기술이 개발됨으로써 근래에는 살충제로써 보다는 유전공학적 측면에서 더욱 관심의 대상
- NPV의 구조는 약 88 - 153 Kb 크기의 이중나선형 DNA (double-stranded circular supercoiled DNA)가 11 ~ 25 종의 구조 단백질과 함께 막대형의 뉴클레오캡시드 (nucleocapsid)를 구성
- 이 뉴클레오캡시드는 다시 막에 둘러싸여 직경 20 ~ 50 nm, 길이 200 ~ 400 nm의 바이러스 입자를 형성
- 바이러스 입자는 다시 분자량 약 28 ~ 33 kDa의 격자 구조의 결정성 단일 단백질인 다각체 단백질 (polyhedrin)에 매립되어 하나의 바이러스 다각체를 형성
- 크기는 0.5 μm 에서 15 μm
- 다각체는 야외 환경에서 바이러스 입자의 활성을 보호하고 유지하는 기능

■ 곤충을 이용한 생명과학 연구 동향 [자료의 출처 : 한국의 곤충자원, 농업과학기술원 농업생물부 유용곤충과, 황재삼]

- 생물학, 생명과학연구 분야에 있어서의 곤충연구는 주로 누에와 초파리를 각각 재료에 사용하여 행해져 왔음
- 특히 1910년대의 고전유전학에 있어서는 이들 2종류의 곤충이 학문적으로 크게 공헌
- 예를 들면 식물을 사용하여 멘델의 유전의 법칙이 발견된 것은 1865년이지만, 동물로 최초로 멘델의 법칙을 발견한 것은 누에를 재료로 한 동경제국대학의 外山龜太郎 박사의 연구로 1910년의 일
- 또한, 1910년대에 미국의 물간 박사(컬럼비아대학)가 초파리를 연구재료에 사용하여 돌연변이의 유발이나 타선염색체조작기술의 개발 등 유전학의 기초적 연구
- 미국 카네기연구소의 鈴木義昭 박사는 누에를 이용하여 1972년에 진핵생물로는 처음으로 유전자의 메신저 RNA(비단 단백질 피브로인)를 단리 하는데 성공

1. 동물계에 있어서의 곤충의 위치 부여와 곤충연구의 중요성

- 지구는 지금으로부터 46억 년 전에 탄생했고, 생명이 탄생한 것은 약 40억 년 전
- 곤충은 3억 5천만 년 전에 탄생
- 인간은 5십 만년 전에 탄생했다고 추정
- 약 100만종으로 추정되고 있는 동물종류 중 인간을 포함한 척추동물이 약4%인데 비해 곤충은 약70%를 차지
- 다양성을 가진 곤충은 생물자원이라고 하는 관점에서 대단히 매력적인 연구대상

2. 생명과학에 있어서의 곤충연구의 중요성

- 초파리와 누에를 이용한 연구로 의해 발생생물학, 유전학, 분자생물학 등의 기초적 지식을 얻고 있음
- 이 성과의 하나로서 초파리와 누에에 있어서 유전자 변환 조작이 가능
- 누에와 인간, 가축 사이에는 공통의 병원균이 없기 때문에 누에의 유전자 조작 수법에 의해 생산시킨 유용물질에는 인간이나 가축에의 병원균이 포함되지 않다고 하는 점에서 안전성이 높음
- 실제로 외래유전자를 도입한 바이러스를 사용하여 누에에서 인터페론(interferon) 등의 유용물질을 생산시키는 기술이 개발
- 현재 고양이의 인터페론에 대해서는 상품화
- 의료분야와 산업분야에 대한 응용연구로서의 곤충연구도 중요
- 말라리아 원충을 매개하는 학질모기나 잠자는 병의 원인이 되는 원충 trypanosoma를 매개하는 체체파리 등 병의 벡터(vector)가 되는 곤충에 관한 연구도 세계적으로 중요한 연구 분야
- 학질모기에 대해서는 초파리에 이어 곤충으로는 두 번째로 전 게놈이 해독되어 있다.

곤충 호르몬의 연구 등에 의해 인위적으로 곤충의 발육을 제어할 수 있게 되면 이들 벡터(vector)의 구제에도 도움이 될 것으로 기대

- 더욱이 곤충으로부터는 각종의 생리활성물질과 유용생체고분자물질이 발견되었으며 곤충이 산업에 유용한 새로운 화합물의 탐색원으로서 주목
- 예를 들면 곤충의 공생미생물이 생산하는 유용물질은 인간이나 가축 등의 의약품의 탐색원으로서 기대