새로운 기능기를 갖는 비천연아미노산의 단백질 내 도입

영남대학교 생명공학부
윤형돈
E-mail : hyungdon@ynu.ac.kr

1. 서론

DNA의 위치특이적 (point-specific) 뮤테이션은 지난 25년간 생물학 분야에서 가장 중요한 진보 중에 하나이다. 단백질 내에서 특정 아미노산을 다른 19개 아미노산으로 치환하는 것이 가능해지면서, 단백질의 구조, 안정성, 접힘, 기능 등에 각각의 아미노산이 미치는 영향을 연구할 수 있게 되었다. 하지만 이 방법이 가져다 주는 많은 정보에도 불구하고 이 방법은 단지 자연계에 존재하는 19개의 아미노산으로 치환하는 것만 가능하다는 단점이 있다.

단백질 내에 새로운 기능기를 가진 비천연아미노산을 도입하는 것은 새로운 성질을 가지는 새로운 생물재료의 생산을 위한 방법을 제공 할 뿐만 아니라, 비천연아미노산을 함유한 단백질은 단백질의 구조 및 기능에 관한 연구, 단백질-단백질 상호작용, 단백질 공학 등에 유용하게 이용될 수 있다[그림1]. 비천연 아미노산은 소수성, 친수성, 또는 다른 사슬 길이의 아미노산, 산 또는 염기성을 띠는 아미노산, 그리고 photoaffinity probe, fluorescent probe, spectroscopic probe, heavy atom label, chemically reactive side chain, phosph-amino acid 등의 아미노산 유도체를 일 컷 는다. 새로운 성질을 갖는 새로운 생물재료의 생산을 위한 방법을 제공할 뿐만 아니라, 비천연 아미노산을 함유한 단백질은 단백질 결정학적 구조분석, spectroscopic 연구 등에 매우 유용할 것이다. 또한 단백질의 기능, 안정성, 접힘, 구조에 관한 연구 등에 유용하게 사용된다. Azido- 또는 keto- 같은 화학적으로 반응성이 있는 기능기를 가진 아미노산을 함유한 단백질은 유도체가 가능하여 또 다른 기능을 단백질에 부여할 수 있다 (1). Photoactivatable한 비천연 아미노산을 함유한 단백질은 단백질-단백질 또는 단백질-membrane 상호작용을 연구하기 위한photocrosslinking에 사용될 수 있다 (2). 이 연구방법은 yeast two hybrid system, co-immunoprecipitation, co-affinity 등의 분리의 방법을 보완 또는 대체 할 수 있다 (3). 유사하게 형광 (fluorescent) 아미노산을 함유한 단백질은 단백질의 세포내의 위치를 연구하는데 이용될 수 있다. 현재 사용되고 있는 green fluorescent protein fusion 단백질 그리고 직접 또는 간접적인 immunofluorescence의 방법을 대체할 수 있다. 특정 위치에 형광 아미노산을 함유하고 있는 단백질은 단백질의 접힘 연구에 사용될 수 있다. 부가적으로 서로 다른 형광 아미노산을 한 단백질 내에 도입된 경우 세포 내에서 단백질의 dynamic 또는

단백질의 conformation 연구를 위한 FRET 분석에 사용될 수 있다 (4). 앞으로 응용 가능성이 매우 높은 단백질 내 비천연 아미노산을 도입하는 기술의 현황을 다루고자 한다.

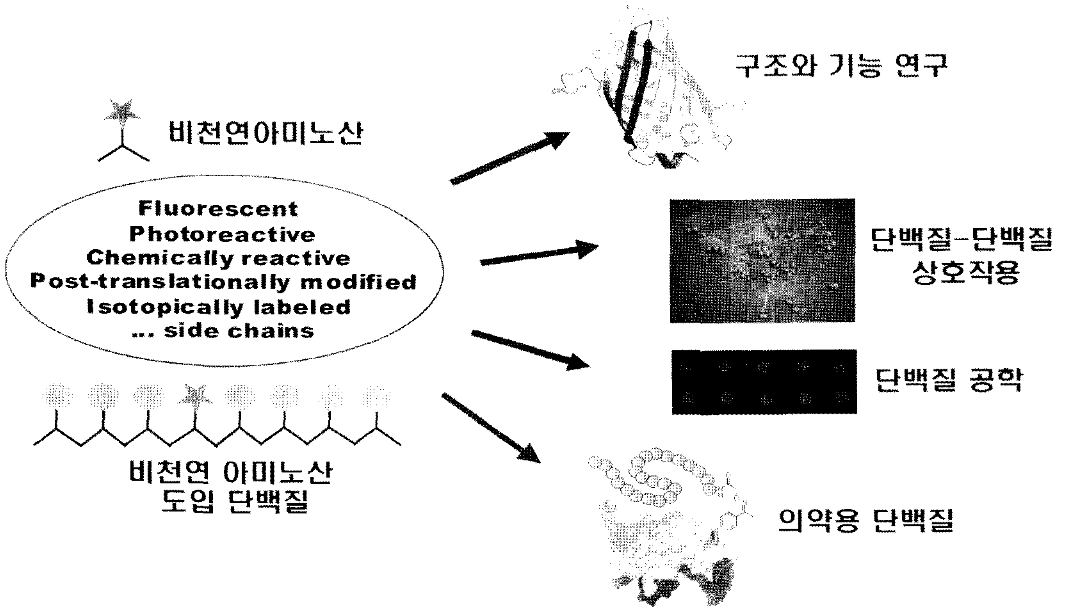

그림 1. 비천연아미노산이 도입된 단백질의 이용.

2. 비천연 아미노산의 *in vitro* 단백질 내 도입

비천연 아미노산을 *in vitro* 단백질 내에 도입할 수 있는 방법은 여러 가지가 알려져 있다. 대표적으로는 크게 (1) total chemical synthesis, (2) 다른 단백질 또는 펩타이드에 아미노산 유사체를 가지고 있는 합성 펩타이드 단편을 화학적 또는 효소적으로 ligation 시키는 semi-synthesis 그리고 (3) 단백질 내에 있는 시스테인을 이용한 위치특이적인 modification 등을 들 수 있다 (5). 각각의 특정한 경우에 유용성이 있음이 보고 되었음에도 불구하고 이 방법들은 범용으로 이용되기에는 단백질 크기의 제한 또는 특정 잔기만을 이용할 수 있다는 점 등의 각각의 특정 한계를 가지고 있다.

In vitro 단백질 합성을 통하여 비천연 아미노산을 단백질 내 도입할 수 있는 보다 일반적인 방법은Hecht와 그의 공동연구자 들에 의해 진행된 초기연구를 바탕으로 Schultz, Chamberlin 그리고 공동연구자들에 의해 개발되었다 (4). 원하는 특정 위치에 amber 종결 코돈이 도입된 mRNA와 원하는 비천연 아미노산으로 aminoacylation된 suppressor tRNA를 이용한 suppression 방법이다. 비천연 아미노산이 결합된 suppressor tRNA는 pCpA-amino acid dinucleotide의 5'말단과 pCpA 서열이 없는 suppressor tRNA transcript의 3'말단에 연결하여 만든다. 이 방법은 단백질 구조, 안정성과 기능, 세포내 소기관으로 단백질의 이동, 단백질-단백질 상호작용에 관한 *in vitro* 연구에 성공적으로 사용되었다 (4). *in vitro* transcription/translation system을 이용하여 목적 비천연 아미노산이 위치특이적으로 도입된 단백질을 생산한다. 이와 유사한 연구로 방사능 동위원소를 포함하는 천연 아미노산을 aminoacyl-tRNA synthetase를 이용하여 아미노아실레이션된 suppressor tRNA얻고 이를 이용하여 ^{2}H- 그리고 ^{13}C—을 포함하는 아미노산을 단백질 내 *in vitro* 도입하고 이를 이용하여 photocycle 동안에 bacterioopsin 내에서 단일 아미노산들의 level이 구조에 미치는 영향에 대한 연구를 수행하였다 (6). 이 방법은 특정 코돈이 미생물 내에서 아주 드물게 이용된다는 사실에 기반한 네 개의 nucleotides로 이

루어진 코돈을 이용한 방법으로 발전되기도 하였다 (7). 현재 Benner, Chamberlin 그리고 공동연구자들은 새로운 수소결합 패턴을 갖는 비천연 뉴클레오사이드 염기를 이용한 65번째 코돈-안티코돈 쌍을 통해서 새로운 유전자코드의 확장을 꾀하고 있다. 이와 같은 방법들은 단백질의 구조 안정성 기능 그리고 단백질의 세포 소기관으로 이동연구 그리고 *in vitro* 단백질-단백질 상호작용을 위한 연구를 위해서 많은 그룹에 의해서 성공적으로 이용되었다 (8). 하지만 이 방법은 *in vitro* translation system을 이용하기 때문에 *in vivo* 생합성 된 단백질과 그 구조가 다를 수 있다는 단점과 비천연 아미노산으로 aminoacylation된 tRNA양의 제한과 *in vivo* translation system의 한계로 인하여 비천연 아미노산을 함유하고 있는 단백질의 대량생산이 어렵다는 단점이 있다.

3. Engineered genetic code를 이용한 비천연 아미노산의 단백질 내 *in vivo* 도입

"Genetic code engineering"은 비천연아미노산을 배지 내에 공급하여 sense 코돈을 천연아미노산이 아닌 비천연아미노산으로 치환하는 방법을 말한다. Aminoacyl-tRNA synthetase는 해당 천연 아미노산과 비슷한 구조를 가지고 있는 비천연 아미노산에 반응성이 있다. 예를 들면, 대장균 TryRS 와 5-hydorxytryptophan, ProRS 와 azetidine carboxylic acid, LeuRS와 azaleucine, PheRS와 fluorophenylalanine 등등이 있다 (4). 효율적으로 천연 아미노산을 대신하여, 유사한 구조를 가지는 비천연 아미노산을 단백질에 도입하기 위해, Cohen 그룹에서는 해당 천연 아미노산을 생합성 할 수 없는 auxotroph를 이용하였다 (4). 이 방법은 해당 천연 아미노산을 제거된 배지에 비천연 아미노산을 넣고, 단백질의 발현을 유도한다. 그 결과로 해당 천연 아미노산 대신 비천연 아미노산을 포함하는 단백질이 발현된다. Tirrell 그룹에서는 이 방법을 더욱 발전시켜 해당하는 aminoacyl-tRNA synthetase가 과발현 된 아미노산 auxotroph을 이용하여 거의 완벽하게 천연 아미노산을 비천연 아미노산으로 치환하는데 성공하였다 (9). phenylalanine auxotroph 대장균을 이용하여 beta-galactosidase에 *p*-fluorophenylalanine을 성공적으로 도입하였고, methionine 영양요구주를 이용하여 같은 효소에 selenomethionine이 도입하였다. 현재는 이 방법으로 60개 이상의 비천연 아미노산을 단백질에 도입 가능함이 보고 되었다 (4,9).

기본적으로 이 방법은 aminoacyl-tRNA synthetase의 기질 특이성이 허용하는 범위 내에서 이루어 진다. aminoacyl-tRNA synthetase는 단백질 해독과정에서 아주 높은 fidelity를 보장하기 위해서 두 가지 기능을 수행한다. 첫째는 20개 아미노산 중 해당 아미노산을 구별하여 tRNA에 aminoacylation하는 단계이고, 둘째는 aminoacylation된 아미노산 중 잘못된 아미노산이 결합했을 경우 proofreading을 통하여 가수분해하는 기능이다. 따라서 aminoacyl-tRNA synthetase의 엄격히 통제되는 기질 특이성을 완화 하려는 연구가 활발히 진행 되고 있다. 예를 들면, 대장균의 phenylalanyl-tRNA synthetase의 Ala294를 Gly로 치환 할 경우 효소의 기질 binding pocket 크기가 증가되어 다양한 비천연 아미노산을 tRNA에 aminoacylation 할 수 있다. 이 효소를 이용하여 pyridylalanine, *p*-azido-, *p*-ethynyl-, *p*-bromo-, *p*-iodo- 그리고 *p*-cyanophenlyalanine이 효과적으로 단백질 내에 도입되었다 (9). aminoacyl-tRNA synthetase의 proofreading 기능을 약화 시키면 효과적으로 단백질에 비천연 아미노산을 도입할 수 있다. 그 대표적인 예는 대장균의 valyl-tRNA synthetase (ValRS)이다. ValRS는 해당 tRNA에 시스테인과 트레오닌 또는 aminobutyrate로 misaminoacylation 한다. 이후 proofreading 기능에 의해서 misaminoacylation된 아미노산을 제거 하는데 이 proofreading 기능이 잘못 된 변이효소를 이용하여 효과적으로 aminobutyrate를 단백질 내에 도입하였다. Tirrell 그룹에서는 이후 Thr252가 Tyr252로 변경된 mutant ValRS를 이용하여 서로 다른 6종류의 루신 유사체를 단백질 내에 성공적으로 도입하였다 (9). 이 방법으로 도입된 새로운 기능기는 단백질을 계량할 수 있는 아주 중요한 도구가 되었다. 예를 들

면 목적단백질의 phenylalanine을 electroactive한 3-thienylalanine으로 치환 하거나 methionine을 alkene 또는 alkyne 기능기를 가진 유사체로 치환 하였다. methionine auxotroph를 이용하여 azidohomoalanine을 단백질내 도입하고 다시 azido 기능기를 이용하여 Staudinger ligation에 의해서 triarylphophine으로 선택적으로 단백질을 modification 하거나 (9), alkyne 기능기에 copper (I)-catalyzed cycloaddition 반응을 통하여 단백질을 modification 할 수 있었다. 대장균의 PheRS 변이 효소를 이용하여 *p*-acetylphenylalanine을 단백질 내 도입하고 (10) 이 케톤 기능기를 순차적으로 생리활성 조건에서 biotin hydrazide를 이용하여, 바이오틴을 단백질에 conjugation할 수 있었다 (11).

이 방법의 가장 큰 장점은 그 방법론 자체의 용이성과 한 단백질 내에 비천연아미노산을 여러 유치에 도입이 가능함으로 시너지 효과를 얻을 수 있다는 장점이 있다. 다양한 성공에도 불구하고 이 방법은 본질적으론 해당 천연 아미노산과 경쟁하면서 비천연 아미노산을 무작위 적으로 단백질 내 도입하는 방법이다. 이 방법은 천연 아미노산의 유사체 만을 도입할 수 있다는 한계와 비천연 아미노산을 도입한다는 것은 그에 해당되는 천연 아미노산이 단백질 합성에 이용 될 수 없다는 제한이 있다.

4. Expanded genetic code를 이용한 비천연 아미노산의 단백질 내에 *in vivo* 도입

"Genetic code expansion"방법은 DNA뮤테이션을 통해서 종결 코드를 이용하거나, quadruplets 코드를 blank 코드로 이용하여 자연계의 celluar code를 확장하는 것을 말한다. 기본적인 원리는 suppression 방법과 원리는 동일하다. 단, *in vitro* translation system을 대신하여 생체 내에서 (*in vivo*) 비천연 아미노산이 단백질 내 도입된다는 점이 다르다. 화학적 방법으로 비천연 아미노산을 suppressor tRNA에 결합시키는 것이 아니라 aminoacyl-tRNA synthetase에 의해서 비천연 아미노산이 tRNA에 aminoacylation된다. 이를 위해서는 천연 아미노산에는 활성이 없고 오직 비천연 아미노산에만 활성이 있는 aminoacyl-tRNA synthetase의 변이효소가 필요하다. 이를 위해서 전제 조건이 있다. 첫째, suppressor tRNA는 세포 내에 존재하는 aminoacyl-tRNA synthetase에 의해 aminoacylation 되지 않아야만 한다. 둘째, 새롭게 도입된 tRNA synthetase는 오직 suppressor tRNA와 반응을 하고 세포 내에 존재하는 tRNA와 반응을 하지 않아야만 한다. 모든 생물에는 20개의 아미노산에 각각 활성이 있는 20개의 aminoacyl-tRNA synthetase가 존재한다. 따라서 새롭게 도입된 aminoacyl-tRNA synthetase와 tRNA 짝을 21번째 synthetase-tRNA 또는orthogonal tRNA/synthetase 짝이라 한다. 이렇게 확보된 21번째 synthetase와 tRNA짝을 이용하면 단백질 내 위치특이적으로 비천연 아미노산을 도입할 수 있다 (4).

Orthogonal tRNA/synthetase pair를 확보하는 가장 일반적인 방법은 대장균에 다른 유기체에서 유래된 heterologous tRNA/synthase pair를 발현하는 것이다. 그 중 고세균 유래의 tRAN/synthetase pair가 많이 쓰인다. 고세균의 aminoacyl-tRNA synthetase는 상동성과 tRNA recognition 요소 등이 원핵생물 보다는 진핵생물에 더욱 유사성을 보이며, 대장균 내에서 발현이 잘 안 되는 진핵생물의 synthetase와 달리 고세균 유래의 synthetase는 대장균 내에서 활성 형태로 발현이 잘 되기 때문이다. 고세균의 synthetase 유전자의 경우 인트론이 없기 때문에 발현하기 쉽다는 장점도 있다. 이렇게 확보된 tRNA의 엔티코돈을 amber 종결코돈을 인식할 수 있도록 변경된 suppressor tRNA를 제작하여 원하는 위치에 비천연 아미노산을 도입할 수 있다. 가장 대표적인 예는 *Methanococcus jannashi* 유래의 tyrosyl-tRNA /synthetase 짝이다 (4).

Orthogonal suppressor tRNA/synthetase를 이용하여 비천연 아미노산을 단백질 내에 위치특이적으로 도입하기 위해서는, 돌연변이 그리고 선별을 통해서 천연 아미노산에는 활성이 없고 오직 목적 비천연 아미노산

에만 활성이 있는 synthetase의 변이 효소를 확보해야 한다. 여러 성공적인 선별 방법이 Schultz PG 그룹에서 보고 되었다. 그 중 가장 대표적인 방법은 다음과 같다. synthetase의 active site를 구성하고 아미노산 잔기에 random mutation을 도입하여 mutant library를 만든다. 원하는 변이 효소를 찾기 위해서는 positive 그리고 negative selection 방법이 필요하다. Positive selection 방법은 amber 종결 코돈을 가지고 있는 chloramphenical acetyltransferase (CAT)의 유전자를 이용한다. Chloramphenical과 목적 비천연 아미노산이 함유된 고체 배지에 mutant library를 배양할 경우 해당 비천연 또는/그리고 천연 아미노산에 활성이 있는 변이 효소는 CAT 유전자의 amber 종결 코돈을 suppression 할 수 있다. 따라서 이 대장균은 chroamphenical을 포함하는 고체 배지 내에서 자랄 수 있다. 천연 아미노산에 활성이 있는 변이효소와 비천연 아미노산에 활성이 있는 변이효소를 구별하기 위한 negative selection 방법이 필요하다. positive selection에서 선별된 균주를 비천연 아미노산과 항생제를 모두 포함하는 배지와 비천연아미노산은 없고 항생제만을 포함하는 플레이트의 replica를 통하여 쉽게 원하는 변이효소를 확보할 수 있다. 비천연 아미노산에만 활성이 있는 synthetase 변이효소를 발현하는 대장균은 오직 비천연 아미노산이 포함 된 배지 내에서 만 자랄 수 있다 (4).

미국의 Scripps Research Institute에 있는 Schultz 그룹은 하나의 종결코돈을 선택하고 그 코돈에 비천연 아미노산을 도입하는 suppression 방법을 개발하였으며, Methanococcus jannashi 유래의 tyrosyl-tRNA synthetase 뮤턴트를 이용하여 대장균 내에서 아지도 (azido), 케톤, 요오드 등을 포함하는 50여 개 이상의 비천연 아미노산을 단백질 내 성공적으로 도입하였다. 이를 이용하여 단백질 구조분석, 단백질-단백질 상호작용, 효소의 활성증대가 가능함 등을 증명하였다 (4). 이와 유사한 원리를 이용하여 yeast 내에서 비천연 아미노산을 위치특이적으로 도입하는 방법이 개발되었으며, yeast 숙주로 positive 그리고 negative 방법으로 선별된 비천연 아미노산에 활성이 있는 suppressor tRNA/ mutant synthetase 짝은 동물세포에서도 사용될 수 있음을 보였다 (12).

보통 위치 특이적 단백질 내에 비천연 아미노산의 도입하는 경우는 한 개의 종결코돈을 이용하여 한 개의 비천연 아미노산을 도입한다. 이 방법은 이론적으로 종결 코돈 수의 제한과 종결코돈을 사용할 경우 세포의 toxicity로 인하여 단백질의 대량생산에는 제한이 있다는 점이다. 진핵생물에서는 nonsense mediated decay에 의해서 종결코돈을 포함하고 있는 mRNA가 분해되기 때문에 이를 극복할 수 있는 방법이 개발되어야 한다. 단백질 해독의 측면에서 보면, 리보솜에 suppressor tRNA와 단백질 해독을 종료시키는 release factor 사이의 경쟁이다. 어떻게 하면 suppression의 효율성을 높일 것인가에 대한 연구가 더욱 진행되어야 한다.

5. 두 종류 이상의 비천연 아미노산의 단백질 내에 *in vivo* 도입

현재까지 진행된 대부분의 연구는 단백질 내 하나의 기능성 비천연아미노산을 도입하고 그 도입된 비천연아미노산을 이용하는데 국한되어 있었다. 서로 다른 두 종류의 비천연아미노산을 동시에 단백질내 도입하는 것은 그 응용성을 극적으로 확대시킬 수 있음은 자명하지만, 이것은 단백질의 생산량을 생각할 때 매우 어려운 일임 분명하다. 최근에 Liu 그룹에서 서로 다른 종에서 기인한 두 종류의 tRNA/synthetase 짝과 두 개의 종결 코돈을 (amber 코돈과 ochre 코돈) 이용하여 서로 다른 두 종류의 비천연아미노산을 도입에 성공하였다 (13). 또한 같은 시기에 amber 코돈과 quadruplet 코돈을 이용하고 단백질 생산 수율을 증대시키기 위해 새롭게 개발된orthogonal ribosome을 이용하여 두 종류의 비천연아미노산의 도입에 성공하였다 (14). 두 그룹은 모두 "Genetic code expansion" 방법을 이용하였다. 한편 Budisa 그룹은 "Genetic code engineering" 개념을 확장하여 다중 영양요구주를 통하여 트립토판 유사체와 프로린 유사체 그리고 메티오닌 유사체인 세 종류의 비천

연아미노산을 단백질내 동시 도입하는 데 성공하였다 (15). 최근에는 "Genetic code engineering" 와 "Genetic code expansion" 방법을 조합하여 두 종류의 비천연아미노산을 도입에 성공하였다 (그림 2) (16,17). 이 방법은 "Genetic code engineering"의 장점인 비천연아미노산을 다중 위치에 도입하여 비천연아미노산 도입의 시너지 효과를 얻을 수 있고, 동시에 "Genetic code expansion"의 장점인 위치특이적 비천연아미노산 도입의 장점을 모두 얻을 수 있다.

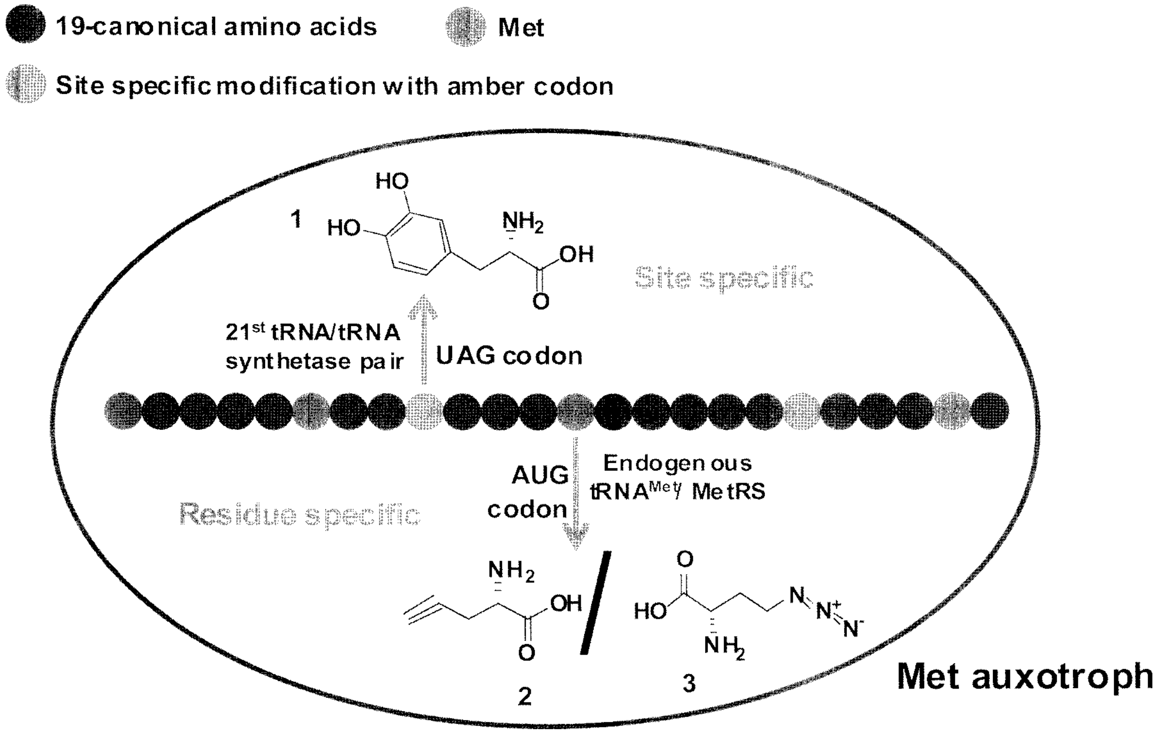

그림 2. "Genetic code expansion" (site specific)과 "Genetic code engineering" (residue specific) 방법의 조합을 통하여 단백질내 두 종류의 비천연아미노산 도입 (17).

6. 맺음말

비천연 아미노산을 단백질내 도입하는 방법은 단백질의 구조 및 기능분석에 강력한 도구로 이용될 것이다. 또한 새로운 성질을 갖는 단백질의 evolution이나 rational design을 가능케 할 것이다. 예를 들면 치료용 단백질을 homogeneous하게 glycosylation 하거나, PEG를 도입하여 의약적 효과를 증대시킬 수 있다. 또한 작은 분자의 sensor로써 작동할 수 있도록 형광을 도입하는 것을 가능케 할 것이다. 세포 내에서 (*in vivo*) 단백질-단백질 상호작용을 가능하게 할 것이며, 더 나아가 완전히 새로운 단백질의 backbone을 만들 수도 있고 이를 이용한 전혀 새로운 생물재료의 생산이 가능할 것이다. 더 나아가 새로운 형태의 아미노산으로 이루어진 새로운 생명체를 만들거나, 현재 우리가 상상할 수 없는 일들을 이 기술을 통해서 미래에 성취할 수 있을 것이다.

REFERENCES

1. Cropp, T. A., and P. G. Schultz (2004) *Trends Genet.* **20**, 625-30.
2. Eichler, J., Brunner, J., and W. Wickner (1997) *EMBO J.* **16**, 2188-2196.

3. Kumar, A., Agarwal, S., Heyman, J. A., Matson, S., Heidtman, M., Piccirillo, S., Umansky, L., Drawid, A., Jansen, R., Liu, Y., Cheung, K. H., Miller, P., Gerstein, M., Roeder, G. S., and M. Snyder (2002) *Genes Dev.* **16**, 707-719.
4. Wang, L., and P. G. Schultz (2005) Angew. *Chem. Int.* Ed. **44**, 34-66.
5. Wilken, J., and S. B. Kent (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 412-26.
6. Liu, X. M., Sonar, S., Lee, C. P., Coleman, M., RajBhandary, U. L., and K., J. Rothschild (1995) *Biophys. Chem.* **56**, 63-70.
7. Sisido, M., and T. Hohsaka (2001) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 274-281.
8. Bain, J. D., Switzer, C., Chamberlin, A. R., and S. A. Benner (1992) *Nature* **356**, 537-539.
9. Montclare, J. K., and D. A. Tirrell (2006) *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 4518-4521.
10. Link, A. J., and D. A. Tirrell (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 11164-11165.
11. Datta, D., Wang, P., Carrico, I. S., Mayo, S. L., and D. A. Tirrell (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 5652-5653.
12. Chin, J. W., Cropp, T. A., Chu, S., Meggers, E., and P. G. Schultz (2003) *Chem Biol.* **10**, 511-519.
13. Wan, W., Huang, Y., Wang, Z. Y., Russell, W. K., Pai, P. J., Russell, D. H., and W. R. Liu (2010) *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 3211-3214.
14. Neumann, H., Wang, K., Davis, L., Garcia-Alai, M., J. W. Chin (2010) *Nature* **464**, 441-444.
15. Lepthien, S., Merkel, L., and N. Budisa (2010) *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 5446-5450.
16. Hoesl, M. G. and N. Budisa (2011) *Chem. Bio. Chem.* **12**, 552-555.
17 Ayyadurai, N., Deepankumar, K., Prabhu, N. S., Lee, S.-G., and H. Yun (2011) *Chem. Commun* **47**, 3430-3432.