

6장 유전공학의 기본원리

유전공학이 하나의 학문으로서 인정받게 된 것은 1970년대에 들어와서의 일이다. 그러나 이 학문은 이미 오래 전부터 분자유전학, 조직배양학, 세포유전학, 분자생물학 등 여러 가지 형태의 학문으로 연구가 수행되어 왔다. 좁은 의미에서의 유전공학은 유전자의 조작 기술을 이용하여 세포외에서 핵산 분자를 바이러스 또는 박테리아의 플라스미드 등에 삽입시킨 다음, 숙주 생체에 넣어 계속 전파시켜 새로운 재조합의 유전 물질을 생성하는 학문이라고 할 수 있다. 1980년 유전학자들은 처음으로 인터페론(interferon)을 생성하는 유전자를 박테리아에 넣을 수 있었으므로 인해 바이러스 감염이나 암의 치료에 유용한 이 물질을 대량 생산하는 길을 열었다.

넓은 의미에서 유전공학은 1982년 과학기술처에 모인 국내 학자들에 의해 다음과 같이 정의되었다. “유전공학이란 유전자를 인공 조작하여 새로이 유용한 생명체를 개조 또는 창조하는 공학 기술을 말한다. 조작된 유전자가 고유의 기능을 발휘하기 위해서는 여러 가지 기법이 도입되지 않으면 안 되기 때문에 넓은 의미로 해석하여 유전자 조작, 염색체 조작, 게놈(genome) 조작, 세포융합, 핵 및 세포 기관의 치환, 조직배양에 의하여 새로운 생명체를 개조 또는 창조하는 공학 기술을 가리키는 것이다”.

한 세대에서 다음 세대로의 유전정보 전달은 생물체의 기본적인 생명 현상의 핵심이다. 이것은 자연발생적이지만 인공적인 방법에 의해서도 가능하며 한 세포 안에서도 유전정보가 재배열 또는 개조될 수 있다. 이번 장은 이와 관련된 여러 가지 메커니즘 및 그 응용에 대한 것이다.

6.1 돌연변이

돌연변이란 세포의 DNA가 화학약품, 자외선, 세포자체의 이상 등 다양한 원인에 의하여 원래의 정보와는 다른 정보를 지니는 DNA로 복제되는 현상이다. 돌연변이는 유전형과 표현형이 있다.

- 1) 유전형(genotype) : 유전자형이라고도 하며, 유전자를 구성하는 DNA 염기서열에 생기는 돌연변이이다.
- 2) 표현형(phenotype) : 돌연변이의 결과가 외부에 나타난 경우이다.

6.1.1 돌연변이 과정

돌연변이는 대부분 DNA를 합성할 때 발생한다. 점 돌연변이(point mutation)는 DNA상의 염기서열 중 한 개의 염기가 다른 염기로 변해서 발생한다. 그림 6.1에서 야생형(wild type) DNA에 점 돌연변이가 생겨서 염기 A가 염기 T로 바뀌었다. 또한 TCGTG가 없어진 삭제

(deletion) 과정을 보여주고 있다.

침묵 돌연변이(silent mutation)는 점 돌연변이 현상이 발생하여 DNA 염기서열이 바뀌었지만 여전히 같은 정보를 지니므로써 겉으로는 돌연변이가 발생하지 않은 것과 같아 보이는 경우이다. 이렇게 되는 이유는 하나의 아미노산에 해당하는 codon이 한 개가 아니라 여러 개(대개 2~6개)이기 때문이다. 점 돌연변이 중에서 활성부위의 아미노산 서열이 바뀐 경우는 단백질의 활성이 크게 변한다. 예를 들어, 점 돌연변이의 한 형태는 무의미(nonsense) 또는 정지(stop) 코드를 형성하여 단백질을 불완전하게 만든다. 무의미(nonsense) 코드란 유전암호 중에서 어떤 아미노산에도 대응하지 않는 암호로서 UAG,

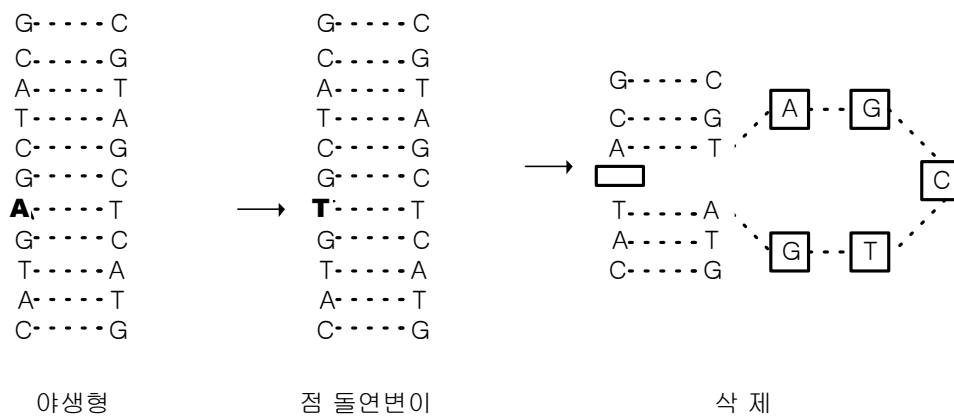


그림 6.1 점 돌연변이(point mutation)와 삭제(deletion)에 의하여 야생형의 DNA 염기서열이 바뀌는 예

UAA, UGA의 3가지가 있다.

삭제 돌연변이(deletion mutation)는 DNA상의 한 가닥에 있는 염기가 하나 또는 그 이상이 제거되어 아미노산 서열에 변화를 주게되는 것으로 결과적으로 DNA 번역과정에서 판독틀(reading frame)이 이동되어 단백질 전체조성이 변하게 된다.

역 돌연변이(reverse mutation) 또는 복귀(reversion) 현상도 발생하는데 복귀주(revertant)란 돌연변이가 발생한 세포에 다시 한번 돌연변이가 발생하여 원래 야생형이 갖는 표현형으로 되돌아 간 세포를 말한다.

6.1.2 원하는 돌연변이주(mutant)의 선별

수많은 세포 중에서 특정한 형태의 돌연변이 세포만을 효과적으로 선별함으로써 이를 원하는 목적에 적합하게 이용할 수 있다. 자연상태에서 세포가 10^6 회 분열시 한 유전자에서 1회 정도의 돌연변이가 발생할 확률이 있다. 이 돌연변이 발생 빈도를 증가시키기 위하여 돌연변이 유도물질(mutagen)로서 화학약품 또는 자외선이 이용된다.

돌연변이주의 직접선별은 항생제 또는 독성화합물에 대해 내성을 갖는 돌연변이주를 찾는 것이다. 즉, 고체배지 위에 항생제를 고루 바른 후 미생물을 배양하면 해당 항생제에 대해 내성을

갖는 세포만이 성장하여 군락체(colony)를 이루며 이 군락체는 동일한 미생물의 집합체이다.

간접선별은 생장에 반드시 필요로 하는 특정 성장인자를 만드는 능력이 부족하거나 없는 돌연변이를 분리하기 위해 사용된다. 야생형 대장균은 포도당과 무기염만을 이용하여 성장할 수 있으나 영양요구성 돌연변이(auxotroph)는 성장인자를 보충하지 않는 한 자랄 수 없다. 한편 이와 반대로 포도당과 무기염 등 최소영양분이 첨가된 배지에서 성장가능한 세포주를 프로토타프로프(protothroph)라 한다.

이러한 영양요구성 돌연변이 세포주를 구별하는 방법을 판 복제법(replica plating)이라 한다. 이 방법에는 완전한 고체배지 plate에서 키운 모든 군락체를 벨벳 형겅 위에 눌러서 묻힌 후 성장인자가 빠진 고체배지 plate를 준비하여 동일한 벨벳 형겅을 누르면 모든 군락체가 옮겨오기는 하지만 야생형만 자랄 수 있다. 완전한 배지로 만든 plate와 성장인자가 빠진 plate상의 군락체의 위치를 겹쳐서 비교해 보면 영양요구성 돌연변이 군락체의 위치를 확인하여 분리할 수 있다(그림 6.2).

6.1.3 Replica-plating법에 의한 영양요구성 돌연변이주(auxotroph)의 분리

라이신(lysine)을 생산할 수 없는 돌연변이 대장균을 일반 대장균으로부터 분리하기 위해서는 우선 라이신이 첨가된 고체배지와 첨가되지 않은 고체배지를 준비한다. 라이신이

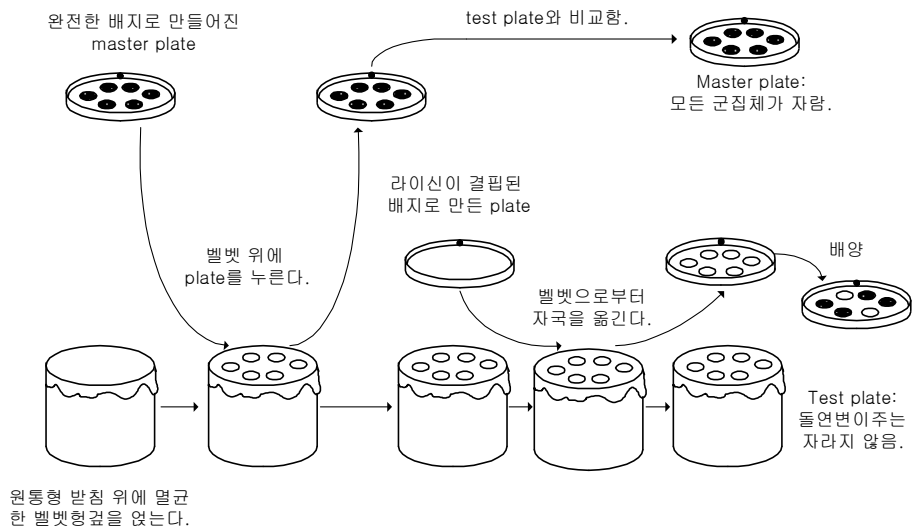


그림 6.2 영양요구성 돌연변이(nutritional mutants)를 찾아내기 위한 replica plating법

첨가된 배지에 리신 요구주와 일반대장균이 혼합된 상태의 대장균을 희석하여 배양한다. 이 배지에서는 라이신 요구주도 별 무리 없이 성장하여 군락체를 형성한다. 그런 다음 충분히 성장하면 멸균된 벨벳(velvet) 천을 대장균이 성장 중인 고체배지 위에 접촉시켜 대장균 군락체를 묻힌다. 이 벨벳 천을 그대로 라이신이 첨가되지 않은 고체배지 위에 얹어 벨벳에 묻은 군집을 배지에 묻힌다. 이렇게 함으로써 라이신이 첨가된 고체배지와 첨가되지 않은 고체배지에는 상응하는 위치에 군락체가 옮겨진다. 이 배지를 약 24시간 동안 배양실에 두면 라이신이 첨가되

지 않은 고체배지에서 일반 대장균은 성장하지만 라이신 요구주는 성장할 수 없다. 따라서 두 배지에 형성된 균락체의 위치를 비교하면 라이신이 첨가된 배지에서만 성장한 균락체의 위치를 파악할 수 있으며 이 균락체는 순수한 라이신 요구주만으로 형성되어 있다.

이러한 돌연변이 선별기법을 통하여 유용산물 생산균주의 개량이 실현되었으며 페니실린 생산 균주 개량의 경우 생산수율이 1939년 배양액 중 0.001 g/L에서 현재 약 50 g/L로 무려 50,000 배 증가하였다.

6.2 유전자 전달 및 재배열 메커니즘

6.2.1 유전자 재조합

유전자 재조합(genetic recombination)이란 두 개의 서로 다른 게놈(genome)으로부터 취한 유전요소(genetic element)들을 한 단위로 조합시켜서 돌연변이 없이도 새로운 유전형을 만드는 과정이다. 유전자 재조합법에는 형질변환(transformation), 형질도입(transduction), 그리고 접합(conjugation)이 있다.

- 1) 형질변환 : 한 균주의 DNA 추출물을 다른 균주에 인공적으로 집어넣어 박테리아의 형질을 바꾸는 방법.
- 2) 형질도입 : 박테리오파지(bacteriophage)에 의해 파지의 유전형질이 숙주세포에 전달되는 방법.
- 3) 접합 : 세포간 직접 접촉에 의해 DNA가 전달되는 현상.

DNA 일부가 세포 내부로 들어오면 어떤 과정으로 유입되었는지에 상관없이 대부분 재조합 과정을 거친다. 일반적인 재조합 과정은 그림 6.3과 같다.

이 경우 공여체(donor) DNA와 수령체(recipient) DNA는 상호 동종성(homologous)이거나 매우 유사한 관계이어야 한다. 적당한 조건하에서는 세포 내 효소들이 수령체 DNA의 동종성 부분을 잘라내어 공여체 DNA가 삽입되게 한 후 이 DNA의 끝을 수령체 DNA에 연결하여 준다. 자연조건하에서 유전자 공여체 DNA가 같은 종(species)은 가까이 연관된 종으로부터 온 것일 때 효과가 있다. 이러한 과정은 세포 내에 존재하는 제한효소

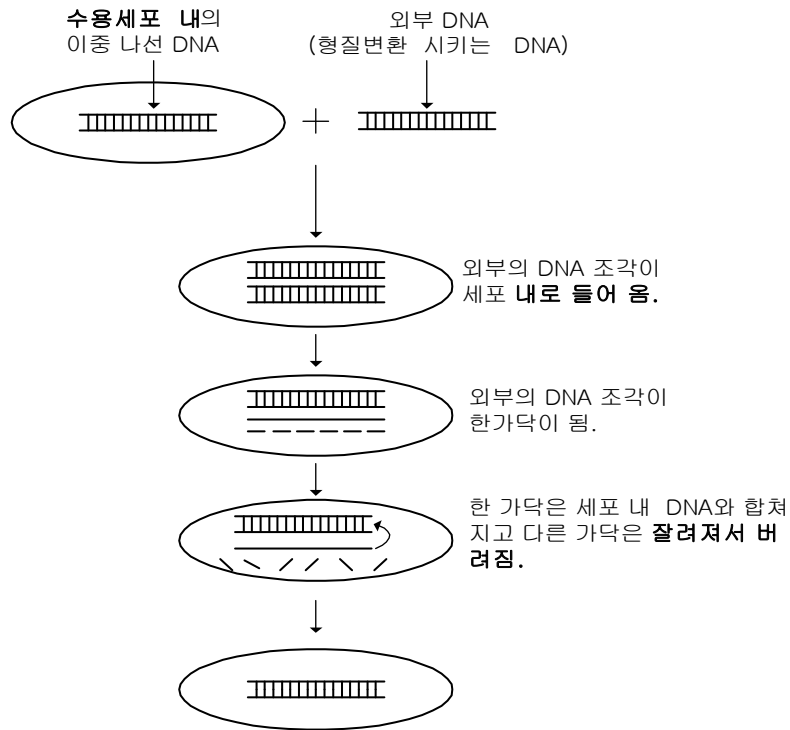


그림 6.3 형질변환 DNA와 수용세포(recipient cell)의 결합

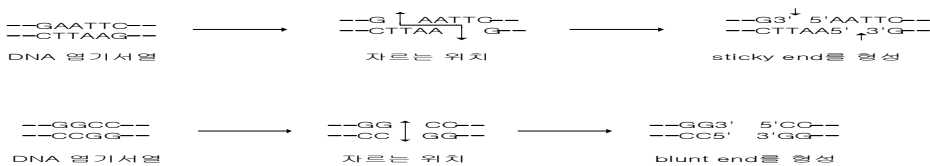
(restriction endonuclease)에 의하여 가능하다.

제한효소는 DNA상의 염기서열을 인식하고 특정 부위를 자르는 기능을 가진 효소이다. 제한효소는 수백 가지가 존재하는데 이들이 인식하는 DNA상의 염기서열은 4~6개의 뉴클레오티드로 형성된 것이 일반적이며 이 배열은 두겹 회전대칭(twofold rotational symmetry)이라는 대칭적 구조를 가지고 있다. 대표적인 제한 효소에는 EcoRI, HaeIII, PstI 등이 있다. 인식부위(recognition site)의 한쪽 끝과 다른 쪽 끝이 서로 상보적(complementary)이다.

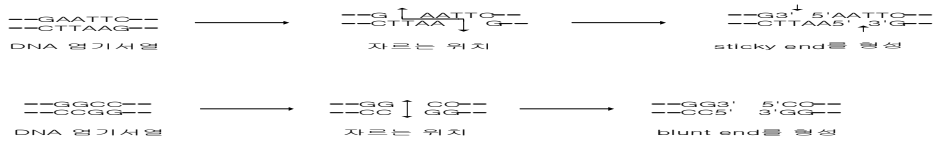
제한효소로 절단된 후 각 조각들의 절단 부위가 HaeIII 처럼 뭉툭해지는 경우 (blunt ends)와 EcoRI이나 PstI처럼 절단 부위 끝에 단일가닥 부분이 있는 경우 (cohesive ends or sticky ends)가 있다. 이러한 조각들을 다시 연결하는 데에는 리가아제(ligase)라는 효소가 작용한다. 이 효소는 두 개의 DNA 조각에서 당과 인산 사이의 포스포디에스터 결합(phosphodiester bond)을 만들어 연결시켜 준다.

EcoRI과 HaeIII가 자르는 공여체 DNA와 수령체 DNA상의 특정 염기서열은 다음과 같다.

(예1) 제한효소 EcoR1의 작용



(예2) 제한효소 HaeIII의 작용



6.2.2 형질변환

모든 박테리아에서 형질변환이 가능한 것은 아니며 형질변환이 가능한 경우라도 세포의 생리 상태에 따라 변환되는 정도가 다르다. 대장균은 정상적으로는 형질변환 능력이 없으나 유전상의 중요성으로 인해 형질변환 능력을 유도하는 과정이 확립되었다.

형질변환은 세포에 도입된 DNA가 다른 세포로 전달될 때 유효하며, 형질변환을 행할 때 보통 플라스미드(plasmid)라 불리는 운반체(vector)를 이용한다. 플라스미드란 염색체와는 별도로 세포에 존재하는 자율적(autonomous)인 DNA로서 자기복제(self-replication)가 가능하고 겹가닥(double-stranded) 구조를 갖는다. 플라스미드는 자신을 가지고 있는 세포에 중요한 잇점을 제공하는 단백질을 만드는 유전자 정보를 지니고 있는 경우가 있다. 예를 들어, 항생제 내성을 갖춘 플라스미드인 경우 항생제를 배지에 넣어 플라스미드를 갖고 있는 세포와 그렇지 않은 세포를 선별하는데 유용하다.

대표적인 플라스미드로는 pBR322가 있다. 플라스미드가 아닌 람다(λ) 바이러스와 같은 박테리오파지 게놈에 의해 DNA를 끼워서 박테리아 세포에 삽입시키는 방법도 개발되었다. 이와 같이 의해 DNA를 운반하는 플라스미드나 바이러스를 벡터(vector)라고 한다.

유전자 재조합과 관련된 여러 실험은 그의 잠재적인 위험성 때문에 많이 통제되고 있다. 그래서 재조합 DNA 실험에서 사용되는 박테리아는 실험실 밖에서는 생존할 수 없게 극도의 혐기성을 띠게 하는 등의 조작을 받게 되어 있다. 암세포에 관한 재조합 실험과 같은 아주 위험한 실험은 금지되고 있다.

6.2.3 형질도입

형질도입은 일반 형질도입(generalized transduction)과 특수 형질도입(specialized transduction)으로 구분된다(그림 6.4).

일반 형질도입(generalized transduction)이란 가장 보편적인 형태의 형질도입으로서 숙주세포가 감염되어 DNA가 많은 수의 조각으로 분리되고 그 중 일부 DNA 단편이 파지입자 안으로 들어간 경우이다. 이러한 결합이 있는 파지입자는 또 다른 세포를 감염시킬 때 자신이 가지고 있던 그 전 세포의 DNA 일부를 세포 내부로 주입하는데, 주입된 DNA는 원래의 DNA와 재조합될 수 있다.

특수 형질도입(specialized transduction)은 우선 파지가 세포를 감염시킨 후 숙주세포 염색체

의 특정 부위에 파지의 DNA를 편입(incorporation)하여 잠재세포(lysogenic) 과정을 거친다. 그 후 용혈과정(lytic cycle)에서 파지 DNA는 다시 세포 DNA와 분리되는데 이때 부정확한 절단으로 인하여 파지는 세포 DNA의 일부를 취하게 된다. 이러한 파지는 또 다른 세포를 감염하는 과정에서 그 전 세포 DNA의 일부를 다른 세포로 전달하게 된다. 유전자의 전달 빈도는 이것의 편입(incorporation) 위치로부터의 거리와 관계가 있다.

6.2.4 접 합

에피솜(episome)은 염색체와 함께, 또는 별도로 존재하는데 염색체 외부에 존재할 때는 플라스미드와 같은 기능을 갖는다. 이들 중 잘 알려진 것이 F, 또는 생식인자(fertility factor)이며 접합(conjugation)에 관여한다.

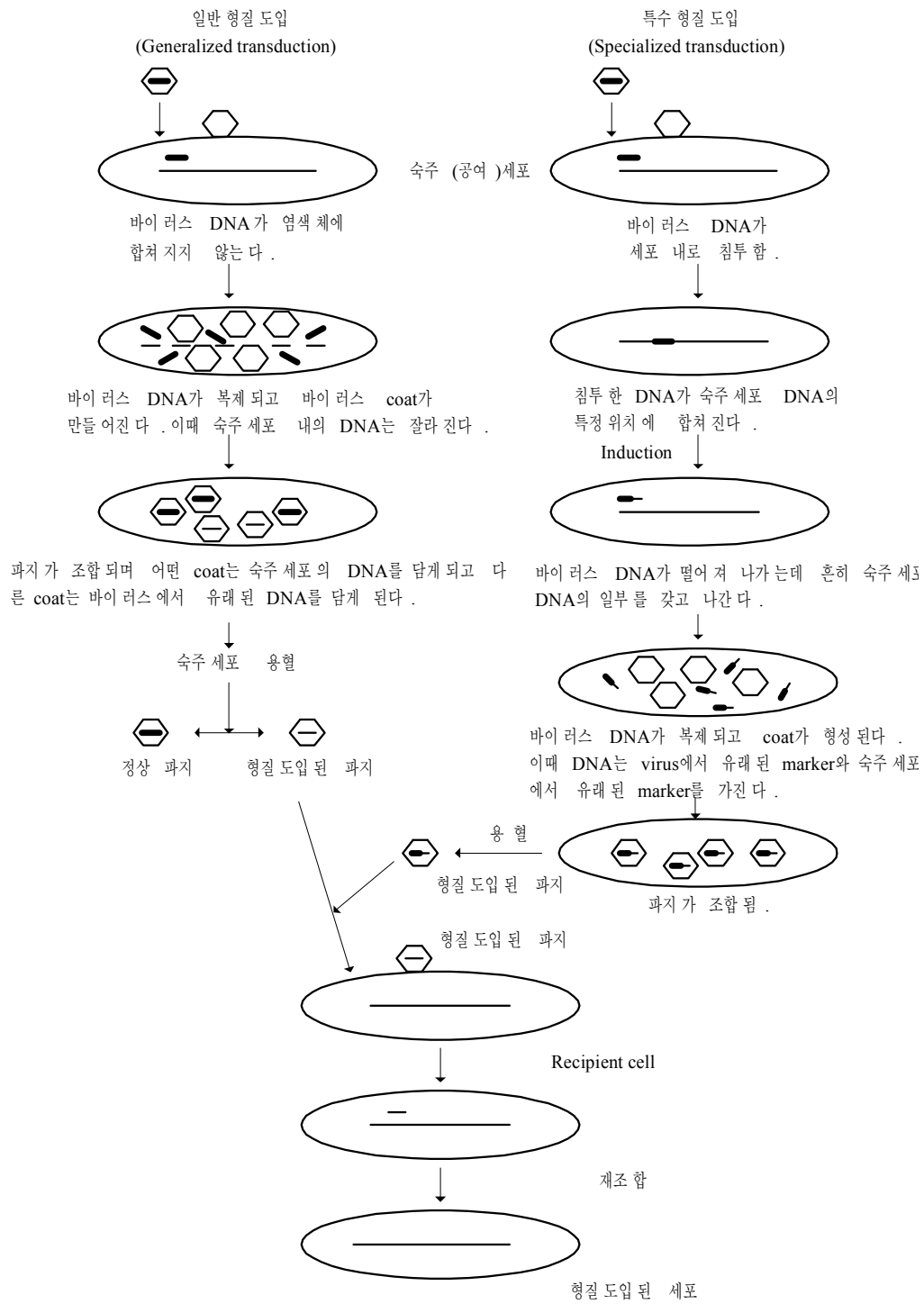


그림 6.4 바이러스에 의해 유전물질을 공여자(donor)로부터 수령자(recipient)로 전달하는 형질도입(transduction)

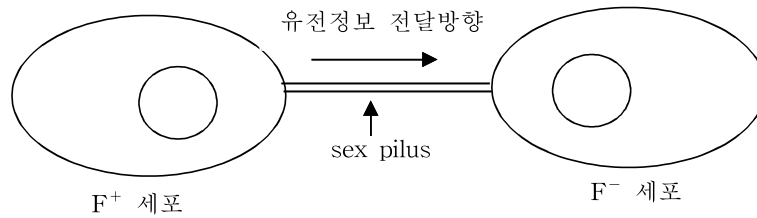


그림 6.5 두 개의 접합하는 박테리아가 성모(sex pilus)를 이용해 직접 접촉한다.

대장균의 집단에는 F 플라스미드를 갖춘 세포(F^+)와 그렇지 못한 세포(F^-)가 있다. 이들을 같이 섞어 주면 F^+ 세포에서 성모(sex pilus)가 F^- 세포로 연결되어 F 플라스미드 복제본과 염색체가 이동하는 통로 역할을 하여 F^- 세포의 성질을 바꾸기 위해 이용될 수 있다(그림 6.5).

그리고 어떤 경우에는 F 플라스미드가 염색체에 합체되어 하나의 커다란 원형분자를 형성하는데 이러한 세포를 Hfr(high frequency recombinant)이라 한다.

6.3 세포의 유전공학적 처리

6.3.1 유전공학의 기본요소

유전공학은 기본적으로 재조합 DNA 기술(recombinant DNA technique)의 발달로 가능하게 되었으며 그림 6.6은 그 대표적인 전략을 나타낸 것이다.

재조합 DNA 기술이란 한 생물의 유전자를 비슷하거나 심지어 전혀 연관이 없는 다른 숙주(host)로 옮겨 발현시키는 분자생물학적 기법이다. 그것을 단계별로 설명하면 다음과 같다.

1 단계: 절단

제한효소(restriction endonuclease)를 이용하여 적당한 생물로부터 목적하는 특정 DNA 절편을 얻는다. 이때 원하는 절편을 얻기 위해서 EcoRI, BamHI 등 DNA를 절단하는 위치가 서로 다른 다양한 제한효소를 용도에 맞게 이용한다. 제한효소로 절단된 게놈(genome)의 조각들은 그 크기가 다양하며 이를 라이브러리(library)라고 한다.

2 단계: 재조합 DNA의 제작

얻어진 DNA 절편을 운반체(vector) DNA 안으로 끼워 넣는다. 운반체 DNA는 시험관 내에서 자기복제 능력을 가진 고리모양의 DNA 분자이다. 예를 들어, DNA 절편을 EcoRI로 처리하여 얻을 경우 운반체 DNA도 동일한 EcoRI 효소로 처리하여 DNA간

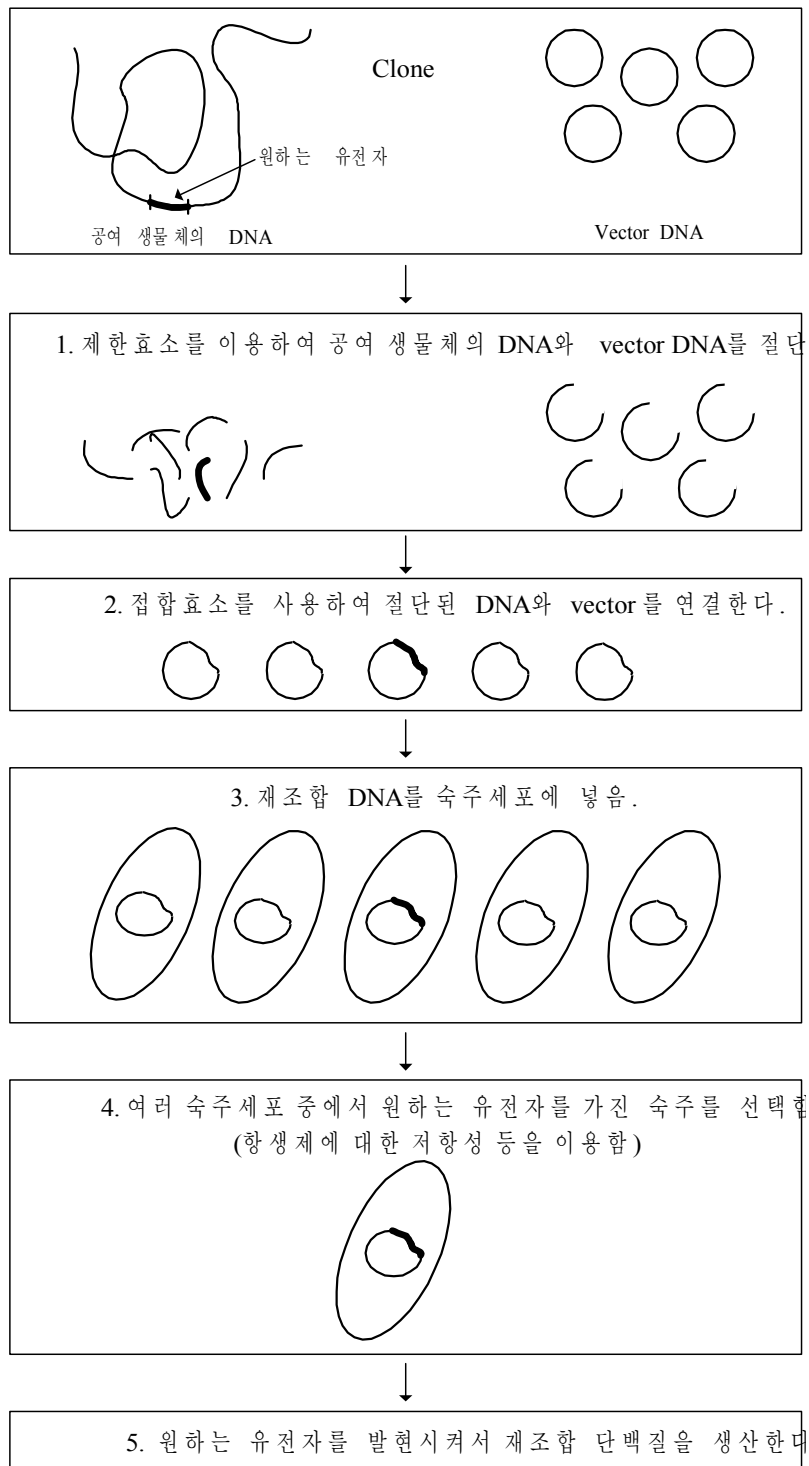
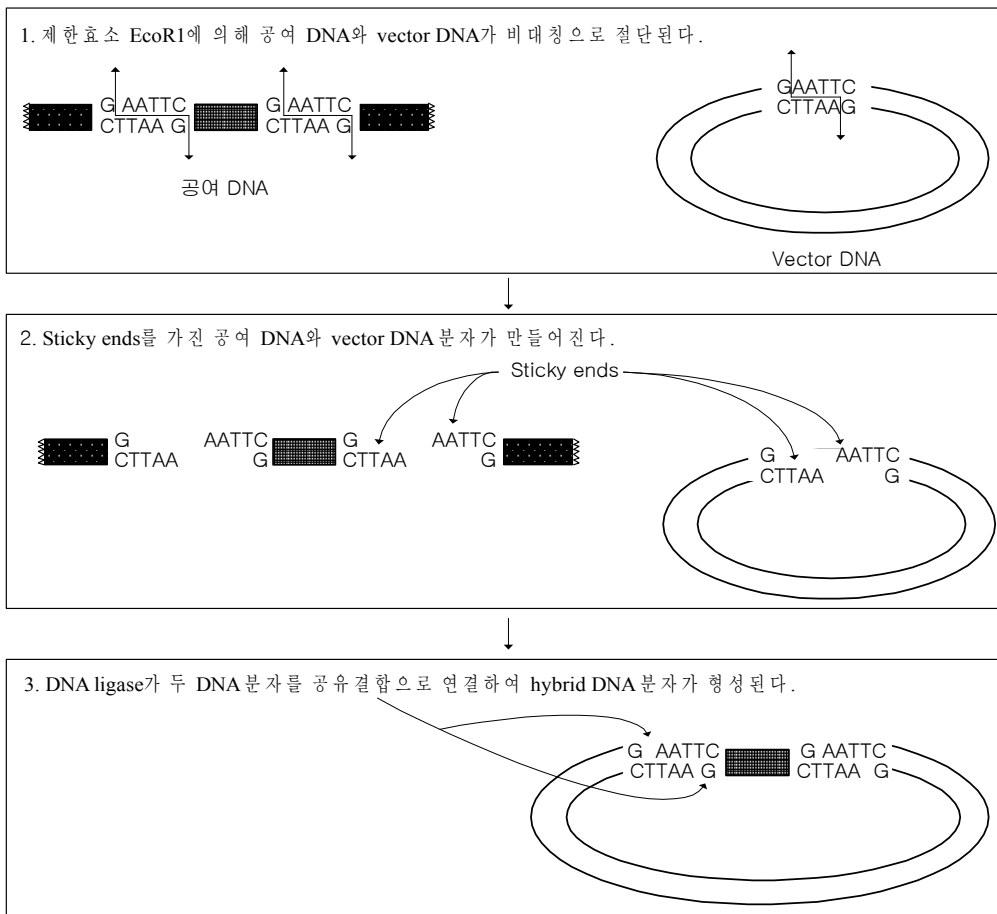


그림 6.6 유전공학의 핵심단계



- 1, 2. 제한효소로 DNA의 특정위치를 절단하여 양 끝 부분이 보완적 서열(sticky ends)을 갖춘다.
3. DNA 접합효소가 DNA 조각들의 sticky ends를 연결한다.

그림 6.7 유전공학에서 제한효소의 사용

에 서로 상보적인(complementary) 관계를 맺어 준다. 그리고 DNA 결합효소(ligase)를 이용하여 이들을 영구적으로 접합시킨다(그림 6.7). 재조합 DNA 제작 후 선별작업을 통해서 재조합되지 않은 벡터는 제거한다.

3 단계: 클로닝(cloning)

얻어진 재조합 DNA(chimeric DNA)가 삽입된 운반체가 숙주세포 안으로 들어가서 증식되게 한다. 온도를 적당히 조절하고, 화학물질 등으로 처리하여 숙주세포의 막이 느슨한 상태가 되게 하여 재조합 DNA가 들어가기 쉽게 한다.

4 단계: 스크리닝(screening)

운반체 내의 특정 DNA 절편이 세포의 DNA 안으로 들어가서 발현된 세포를 구별한다. 이때 세포의 구별을 쉽게 하기 위하여 선별용 표식(selectable marker)을 특정 DNA상에 미리 포함시킨다. 선별용 표식으로 가장 많이 사용하는 것이 항생제 저항유전자(antibiotics resistance gene)이며, 그 외에 영양요구성 돌연변이(auxotroph)를 이용하기도 한다(6.1.2 원하는 돌연변이

주의 선별 참조).

5 단계: 발현확인

선별에 의해 특정 DNA 산물이 숙주세포(host cell)에서 발현되는지 확인한다.

유전자 클로닝(cloning)은 원하는 유전자를 증폭시키기 위하여 사용하는 데 유전자 배열결정(sequencing) 및 분석을 가능하게 해준다. 수많은 DNA 조각들 중에서 원하는 유전자를 찾기 위한 방법으로 가장 유용한 것 중에 하나가 서던블롯(Southern blot)이다. 이 방법은 잘 정제된 mRNA를 탐침(probe)으로 이용하여 이 탐침과 상보적인(complementary) 조각 DNA와 상보적인 결합이 이루어지게 하여 찾아내는 방법이다. 방사성 동위원소로 표시한 탐침을 전기영동시킨 조각 DNA와 결합시켜서 찾아낸다. 위와 같이 찾아낸 원하는 유전자를 포함한 벡터를 박테리아에서 여러 대를 배양시켜 클론을 만든다.

최근에는 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 통하여 비교적 손쉽게 소량의 DNA로부터 유전자의 수를 증폭시켜 연구에 충분한 만큼 만들어 낼 수 있다. 이러한 기법들은 인간 게놈계획(human genome project), 병원성 미생물 및 바이러스의 진단, 진화, 범죄수사 등 다방면에서 유용하게 사용되고 있다. 피 한 방울이나 머리카락 한 개로 각 개인을 구별하는 것이 가능해진 것이다. 이 방법은 영화 'GATTACA'에서 인용이 되고 있다.

6.3.2 동·식물세포의 유전공학적 처리

일부 식물(토마토, 담배, 강낭콩 등)의 경우 T-DNA 플라스미드에 원하는 유전자를 삽입한 후 미생물인 *Agrobacterium tumefaciens*를 매체로 하여 감염시킴으로써 대상 식물의 염색체에 원하는 유전자를 결합시킨다. 이렇게 유전공학적으로 변형된 식물들은 질병, 서리 및 스트레스에 대한 저항성을 갖게 된다. 예를 들어, 살충 효과가 있는 단백질을 생성하는 유전자를 *Bacillus thuringiensis*에서 분리하고 Ti플라스미드를 이용하여 토마토와 담배 유전자에 삽입시킨다. 토마토나 담배 해충이 변형된 식물을 먹으면 식물체에 발현된 살충효과 단백질이 곤충을 죽게 하는 살충제 역할을 한다. 그러나 *A. tumefaciens*은 옥수수, 벼, 밀과 같은 곡류들은 감염시키지 못하므로 이들 식물에 대한 유전공학적 처리는 다른 방법을 개발하고 있다.

이외에도 식물의 형질변환에는 유전자를 텅스텐으로 피복된 탄환에 실어 세포에 고속으로 쏘아 넣는 방식, 세포에 단시간 동안 고압의 전압을 걸어 DNA가 세포를 관통할 수 있게 해 주는 전기천공법(electroporation) 및 이종간에도 변환이 가능한 원형체 융합(protoplast fusion) 등이 이용된다. 이러한 방법으로 두 염색체 상의 유전자들 간의 조합이나 또는 염색체 외부의 DNA 조각들 간의 조합을 통해 원하는 성질을 갖춘 잡종 식물을 만들 수 있다.

동물세포의 경우 바이러스가 운반체 역할을 하도록 개조하여 이용할 수 있다. 곤충세포-배칼로 바이러스 시스템(insect-baculovirus system)은 그 대표적인 예이다

6.4 생성물의 종류가 공정에 미치는 영향

유전자 조작된 생체를 이용하는 생물산업에서 최적의 생산체계를 확립하기 위해서는 여러 분야 간의 상호협력을 통해 최적의 공정전략이 구축되어야 한다. 유전자 조작된 세포의 주요 생산물은 크게 단백질과 비단백질로 나눌 수 있는데 생물산업의 초점은 단백질 제품에 집중되어 있다(표 6.1).

표 6.1 유전공학적으로 만들어진 세포에 의해 생산된 단백질의 제1세대

생 성 물	용 도
1. 인간 인슐린 인간 성장호르몬 Erythropoietin(EPO) 인터페론- α Interleukin-2	당뇨병 성장 부족 빈혈, 만성 신부전 허피스, AIDS 암 면역요법
2. 효소 Prourokinase/urokinase Superoxide dismutase	심장 마비 신장 이식
3. 백신 Hepatitis B AIDS	B형 간염 백신 AIDS 백신

6.5 숙주(host)-운반체(vector) 시스템 선정

적절한 숙주세포와 발현(expression) 시스템의 선정은 중요한 공정 전략의 하나이다. 표 6.2는 대표적인 숙주들의 특징을 요약하였다. 예를 들어, 동물세포는 배지 비용이 많이 소요되거나 당 첨가반응(glycosylation)이나 접힘(folding)이 우수하게 이루어진 단백질 생산에 적합하다. 당 첨가반응이란 세포가 생성한 단백질에 탄수화물을 부착시키는 반응을 말한다. 단백질은 당 첨가반응을 통하여 생물학적 활성, 안정성 및 특이성이 생긴다. 효모와 곰팡이는 단순한 당 첨가반응은 수행할 수 있으나 복잡한 당 첨가반응은 수행할

표 6.2 재조합 DNA를 이용하여 단백질을 생성하기 위해 사용되는 숙주의 특성 비교

특 성	대장균	고초균	효모	곰팡이	곤충세포	동물세포
빠른 성장속도	A	A	B	B-C	D-E	D-E
유전 시스템의 가용성	A	C	C	D	D	D
단백질 발현 수준	A	B	B	B	A-C	C-E
배지의 저렴성	A	A	A	A	E	E
단백질 접힘(folding)	D	D	C-D	C-D	A-B	A
단백질 분해수준이 낮음	C-D	E	C	C	B	B
단백질 분비와 배출	E	A	B	A	A-B	A
glycosylation	No	No	Yes(No)	Yes(No)	Yes	Yes

A: 대단히 좋다, B: 아주 좋다, C: 좋다, D: 그저 그렇다, E: 나쁘다

수 없다. 또한 곤충세포의 당 첨가반응은 그 형태가 동물세포와 다르다. 대장균 등 박테리아를 이용한 단백질 발현은 제품은 조잡하지만 고농도 배양이 가능하여 경제적인 장점이 있다.

6.5.1 대장균

대장균(*Escherichia coli*)은 그 생리 및 유전적 성질이 잘 알려져 있어서 번역 후 수정 과정(glycosylation, modification 등)이 필요 없는 단순한 단백질의 생산에 숙주로 사용하기 적합하다. 대장균은 성장속도가 빠르고 고농도 배양이 가능하며, 적절한 운반체-프로모터를 이용한 높은 발현율을 나타내므로, 생산성이 매우 높다. 또한 배지가 간단하고 저렴하다. 그러나 그람 음성균이기 때문에 생산된 단백질이 세포 밖으로 배출되지 않으며 세포 내에 고농도로 축적이 되면 단백질 분해효소의 공격을 받거나 내포체(inclusion body)가 생겨 활성을 잃게 된다. 인위적으로 단백질을 세포 외로 배출을 하기 위하여 단백질 배출을 유도하는 신호서열(signal sequence)을 이용하기도 한다. 또는 가벼운 삼투압 충격(osmotic shock)을 가하여 단백질을 세포 외부로 유출시키기도 한다. 이러한 방법들은 세포전체를 파괴시키는 경우보다 목적 단백질 이외의 기타 단백질 등에 의한 오염이 적어 분리정제에 유리하다.

6.5.2 그람양성 박테리아

그람양성균(Gram-positive bacteria)은 외세포막(outer cell membrane)이 없어 단백질을 효과적으로 배출할 수 있으므로 유전자 재조합 단백질 생산 측면에서 장점이 있을 것으로 예상된다. 그러나 많은 양의 단백질 분해효소들을 생산하기 때문에 생산물을 빠르게 분해시킬 수 있다. 또한 플라스미드의 불안정성이 대장균보다 크고 운반체와 프로모터의 숫자가 제한되어 있다. 대표적인 그람양성균에는 고초균(*Bacillus subtilis*)이 있다.

6.5.3 효모 및 곰팡이

효모(yeast)는 식품분야 및 발효산업에서 광범위하게 사용되어져 왔고 인간에 의해 오래전부터 이용되었다. 효모는 고농도 세포배양이 가능하며 성장속도가 빠른 편이다. 또한 박테리아보다 크기 때문에 발효배지에서 쉽게 회수될 수 있다. 그리고 간단한 당 첨가반응(glycosylation)이 가능하며 생성된 단백질을 분비할 수 있다. 제품의 판매허가를 얻는 측면에서 볼 때 안전하다고 여겨지는 목록(generally regarded as safe, GRAS list)에 올라 있어 식품의약품의 허가를 획득하기에 쉽고 식품관계 단백질을 생산하기에 특히 적당하다. 단점으로는 단백질의 발현이 높지 않고 배출효과가 낮으며, 이용할 수 있는 유전 시스템의 범위가 제한되어 있고 단백질 발현의 안정성이 대장균보다 낮다. 재조합 단백질을 생산하기 위한 효모로 *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris* 등이 개발되어 왔다. 효모는 복잡한 당 첨가반응이나 번역 후 수정을 수행할 수 없으므로 이러한 과정이 필요한 제품을 생산하려고 하는 경우에는 동물의 세포나 조직을 이용하여 배양한다.

*Trichoderma*나 *Aspergillus* 같은 곰팡이도 *S. cerevisiae*보다 단백질 분비능력이 크고 일반적으로 곰팡이로부터의 산업효소 생산공정이 확립되어 있기 때문에 숙주로서 가능성이 높다.

6.5.4 곤충 및 동물세포

곤충세포-배큘로바이러스(insect-baculovirus) 시스템은 포유동물세포배양을 대체하는 방안으로 연구되고 있다. 특정 곤충세포만을 감염시키는 배큘로바이러스를 DNA 운반체(vehicle)로 이용하여 곤충세포의 유전자를 재조합하고 이 세포로부터 유용한 단백질을 생산하는 방법에 대한 연구가 주류를 이루고 있다. 이 시스템은 발현율이 높고 포유동물-레트로바이러스(retrovirus) 시스템보다 안전하다는 장점이 있다. 또한 복잡한 당 첨가반응 등 번역 후 수정과 정도 수행할 수 있다. 그러나 몇몇 단백질은 고유 단백질과 동일하게 만들어지지 않는 문제점도 있다.

생산된 단백질이 원래 생체에서 만들어진 것만큼 완전하고 동일한 활성을 지녀야하는 경우에는 효모, 곰팡이 또는 곤충세포 등은 숙주로서 부적합하며 포유동물세포(mammalian cells)를 숙주로 하여야 한다. 포유동물세포배양의 장점은 생산물이 단백질 접힘(protein folding)이나 당 첨가반응(glycosylation) 등의 측면에서 자연적으로 만들어진 것과 가장 비슷하다는 것이다. 그리고 상업적으로 유용한 단백질을 생산하였을 때 대부분이 쉽게 동물세포 밖으로 배출된다는 점이다. 그러나 동물세포는 성장속도가 느리고, 배지 가격이 비싸며, 단백질 발현율이 낮기 때문에 전체적으로 생산 단가가 높다는 단점이 있다. 이러한 문제점을 보완하기 위하여 다양한 형태의 반응기를 개발중에 있다.

포유동물세포 배양에서 사용하는 대표적인 숙주세포는 CHO(Chinese hamster ovary) 세포이며 이 세포는 형질이 변형되어 지속적으로 세포분열이 가능하다. 동물세포 배양 및 그 생산물에 관하여 제7장에 자세히 설명되어 있다.

포유동물 단백질을 생산하기 위하여 세포배양을 하는 대신에 유전자 변형된 동물을 이용하여 그 동물의 젖(milk) 속에 특정 단백질이 분비되게 하는 방법도 연구되고 있다.