

고효율로 재조합 단백질을 생산하는 Baculovirus Expression System

AB Vector (www.abvector.com)

Baculovirus System은 곤충세포에서 단백질을 발현하는 viral system으로 baculovirus가 곤충세포에 감염되어 증폭되는 원리를 이용한다. 곤충세포는 대부분의 mammalian protein-targeting sequence를 인식하기 때문에 다양한 단백질을 발현시킬 수 있고, mammalian cell에서 수행되는 많은 post-translational modification이 일어난다는 장점이 있다. 본 고에서는 다카라코리아에서 판매되고 있는 AB Vector사의 다양한 baculovirus system 제품에 대해 소개하고자 한다.

[1] 개요 : Baculovirus 핵심기술

Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV)는 단백질 발현 연구에 범용적으로 사용되는 baculovirus로 거염벌레 (armyworm) *S. frugiperda*에서 유래한 cell line을 virus 증식에 주로 사용한다¹⁾. 특정 곤충 종에만 제한적으로 감염되는 virus의 특성상 mammalian cell에서 증식하지 않기 때문에 biosafety level I 실험실에서도 편리하게 이용할 수 있다. 또한, 다른 고등 진핵생물 발현시스템과 비교하여 매우 높은 효율로 목적 단백질을 발현시킬 수 있을 뿐만 아니라, 목적 단백질이 본래의 활성을 가지는데 필수적인 단백질 modification 과정이 대부분 진행된다는 큰 장점이 있다.

이러한 장점 때문에 baculovirus system은 약제 표적 단백질 (drug target protein) 연구에 필수적인 시스템으로 human protein kinase 90% 이상이 재조합 baculovirus로, 10% 이하가 *E. coli* system에 의해 생산된다. *E. coli*에서 발현시킬 경우 활성에 필수적인 phosphorylation 과정이 진행되지 않아 대부분의 kinase 단백질이 불활성화된다. 현재 상업적으로 판매되는 스테로이드 수용체 (steroid receptor) 역시 모두 재조합 baculovirus에서 생산된다. *E. coli*에서는 스테로이드 수용체 고유의 folding과 생물학적 활성을 유지해주는 Hsp90 chaperone system이 없기 때문에 생산된 스테로이드 수용체는 정확하지 않은 folding으로 인하여 약제 스크리닝에 적합하지 않다. 물론 *E. coli*는 Hsp90을 가지고 있지만 진화적으로 포유류의 Hsp90과는 확연한 차이가 있고, 포유류 Hsp90-dependent protein 고유의 folding을 형성할 수가 없다. 비용적인 측면에서 포유류 단백질 발현시스템은 스테로이드 수용체 및 kinase를 상업적으로 생산하기에 무리가 있다. 포유류와 baculovirus 시스템 모두 GPCRs와 같은 transmembrane protein의 발현을 위해 일상적으로 이용되고 있으나, 단지 발현적인 측면만 보면 포유류보다는 낫다²⁾.

단백질 발현을 위해 AcMNPV virus를 사용하는 것은 Smith 그룹³⁾과 Pennock 그룹⁴⁾에 의해 처음 보고되었다. 기초적인 baculovirus 기술은 이 두 실험실에서 독립적으로 발전하였고, 이는 virus plaque의 표현형을 확인하는 번거로운 선별과정이 포함되어 있었지만, transfection 후 얻어진 virus progeny의 단 1%만이 재조합체였다. Baculovirus system은 많은 과학자들의 연구를 거쳐 비약적으로 발전하였고, 1993년 재조합 baculovirus를 고효율로 생산하는 2 가지 방법이 확립되었다^{5, 6)}. 정형화된 실험방법으로 먼저 BaculoGold™ (BD Pharmingen), BacPAK™ (Clontech), ProEasy™, ProFold™ (AB Vector) 등의 vector가 상업적으로

판매되었고, 후에 Bac-to-Bac™과 같은 Invitrogen사의 vector가 판매되기 시작했다. 위의 모든 벡터는 baculovirus DNA 안에 polyhedrin site에 목적 유전자를 삽입하는 방법은 비슷하나, 재조합 baculovirus의 제조 방법과 순도 및 안정성을 얻은 재조합 baculovirus stock에는 차이가 있다. ProEasy™는 100% 순도와 안정적인 재조합 baculovirus stock을 얻기에 가장 편리한 vector이다. ProFold™ vector는 기존 vector와 달리 molecular chaperone을 이용하여 생물학적 활성을 가진 단백질의 생산을 늘리는데 효과적이며, GFP marker를 포함하고 있다.

핵심기술은 그림 1에 모식도로 나타내었다. 사이즈가 약 134 kb인 AcMNPV genome은 조작이 어렵기 때문에 두 과정을 거쳐 목적 유전자를 genome에 삽입한다. 첫 번째 단계에서는 *E. coli*에서는 복제되지만 곤충세포에서는 복제되지 않는 plasmid vector DNA의 MCS에 목적 유전자를 삽입한다. 이러한 plasmid vector를 일반적으로 plasmid transfer vector 또는 donor plasmid라 부른다. Plasmid의 MCS 양쪽으로 강력한 baculovirus polyhedrin promoter와 polyadenylation 서열, 필수적인 baculovirus 유전자 ORF 1629가 위치하고 있다.

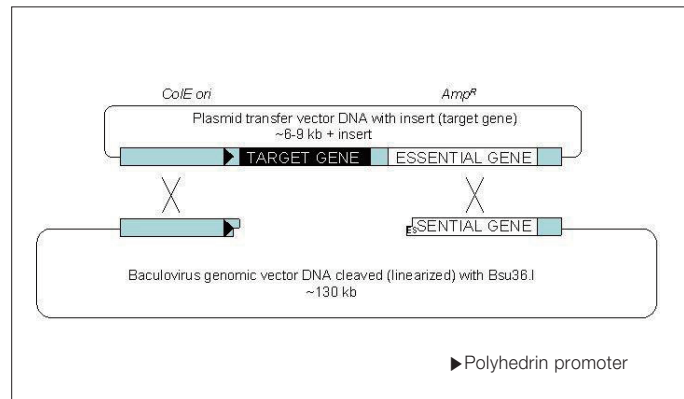


그림 1. Schematic representation of core baculovirus technology

두 번째는 baculovirus genomic DNA로 목적 유전자를 옮기는 ‘forced recombination’ 과정으로 genomic DNA 내에 insert가 삽입될 위치에 근접한 essential gene 서열을 Bsu36.I 제한효소로 절단한다. 제한효소 처리로 선형화되어 감염성이 없어진 baculovirus DNA를 insert가 포함된 plasmid transfer vector와 함께 곤충세포에 co-transfection한다.

2 가지 DNA 모두 polyhedrin locus에서 유래한 baculovirus 고유의 DNA 서열을 포함하기 때문에 곤충세포 안에서 이중 재조합 현상이 발생하여 transfer vector로부터 essential gene의 일부가 복원됨과 동시에 목적 유전자가 virus genome의 polyhedrin 영역으로 옮겨진다. 그 결과 baculovirus genomic DNA가 환상 (circular)이 되면서 감염성을 가지게 되고, 목적 단백질을 발현하는 재조합 baculovirus progeny만을 회수하게 된다. 강력한 polyhedrin promoter는 세포 전체 단백질의 30% 이상을 목적 단백질로 발현시킨다. Bsu36.I가 처리된 baculovirus DNA는

제한효소로 잘리지 않은 극소량의 baculovirus DNA를 제외하고는 거의 100%에 가까운 재조합 baculovirus를 생산해 낼 수 있다.

[2] AB Vector Technology – ProEasy™

■ ProEasy™ - the easiest generation of recombinant baculoviruses

ProEasy™ 기술은 transfection 후에 100% 재조합 virus의 생산을 보장한다. 위에 설명한 핵심기술을 기반으로 하지만 전 세대 ProEasy™ baculovirus (그림 2A)와는 달리 재조합 baculovirus의 생산, 번식을 위한 기본조건이 적합하지 않을 경우 바이러스가 복제되지 않는 치사 유전자 (lethal gene)를 포함하고 있어 더 높은 효율로 유전자를 발현시킬 수 있다 (그림 2B). 따라서 어떠한 경우여라도 재조합 baculovirus가 아닌 비재조합 virus DNA 등은 배재할 수 있다. TaKaRa Bio에서 판매되는 ProEasy™ DNA (TaKaRa Code AV109, AV110) 안의 치사유전자는 제한효소 Bsu36.1을 이용해 제거할 수 있다. 핵심기술에서와 같이 선형화된 ProEasy™ DNA와 insert를 포함하는 plasmid transfer vector 간의 이중 재조합이 일어나고 그 결과 높은 수준으로 목적 단백질을 발현하는 재조합 baculovirus를 제작하게 된다 (그림 1).

■ 차별화된 baculovirus system

위와 같은 장점에도 BaculoGold™ 또는 BacPAK6™ DNA 재조합 baculovirus stock에는 극소량의 비재조합 baculovirus가 포함되었을 가능성이 있다. 따라서 virus stock을 희석하거나 plaque-purification을 통해 virus stock을 정제하는 것을 추천하며, 특히 목적단백질이 세포독성이 있거나 단백질 대량생산에 이용하는 경우에는 stock 정제과정을 진행하도록 한다. 이 경우 낮은 효율로 증식하는 재조합 baculovirus를 선별하는 장점을 가지고 있기 때문에 작은 양의 parental baculovirus의 virus population이 증가할 수 있다. Plaque-purified BaculoGold™ 또는 BacPAK6™ virus stock은 많은 passage 동안 신뢰할 수 있으며, 실험실에서 지속적으로 사용하는데 문제가 없다.

Transfection 후에 재조합체의 100% 생산이 가능하다는 점에서 Invitrogen 사의 bacmid를 기본으로 한 Bac-to-Bac™ 기술을 선호하는 경우가 있다. 하지만, transposon 서열이 존재하는 Bac-to-Bac™ 재조합체는 불안정적일 가능성이 있고 그 결과 재조합 baculovirus의 목적 유전자가 결실되어 virus가 생산되는 동안 목적 단백질의 발현율이 낮아질 수 있다⁷⁾. 특히 목적 유전자가 세포독성이 있거나 초반에 과발현되는 경우에는 이러한 현상이 나타날 수 있다. 이러한 현상은 virus stock을 정제하더라도 개선되지 않으며, 근본적으로 재조합 baculovirus에 transposon이 존재하기 때문에 불안정하게 된다.

ProEasy™ 기술은 이러한 몇몇 단점을 피해 100% 순도의 안정적인 재조합 baculovirus stock을 만들 수 있다. ProEasy™ 기술을 통해 만든 재조합 baculovirus는 virus의 안정성에 문제를 유발할 가능성이 있는 transposon과 같은 유전인자를 포함하지 않고, 쉽고 간단한 방법으로 재조합 baculovirus를 제작하는 장점이 있다.

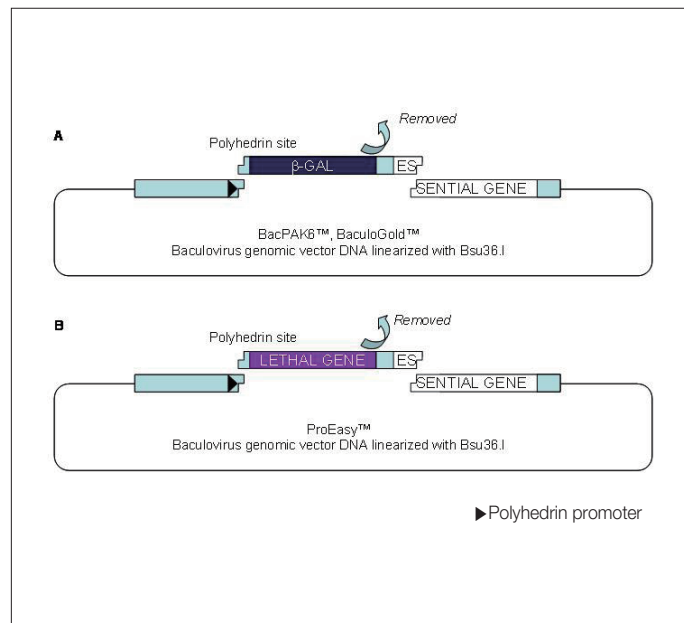


그림 2. Comparison of core and ProEasy™ technologies

- A. Core technology. Polyhedrin site in the parental baculovirus is occupied by the *E. coli* β - galactosidase gene which is removed using Bsu36.1 digestion in commercially available BacPAK6™ and BaculoGold™ vectors. Small amount of parental baculovirus arising from undigested DNA could contaminate baculovirus progeny after transfection as it efficiently propagates.
- B. ProEasy™ technology. Polyhedrin site in the parental baculovirus is occupied by a lethal gene which does not allow propagation of parental baculovirus. Therefore, obtained recombinant baculovirus stocks are 100% recombinant.

■ Plasmid Transfer Vector

AB vector에서는 ProEasy™ baculovirus genomic DNA와 함께 사용하는 매우 다양한 plasmid transfer vector (그림 3)를 판매하고 있다. 모든 plasmid transfer vector는 *E. coli*에서 복제 가능한 같은 backbone을 가지고 있고, polyhedrin promoter의 하류 일부만 다르게 구성되어 있다.

목적 단백질은 각각 GST, His, GFP, MBP 또는 dual His/ MBP, FLAG/ His tag와 함께 발현하거나 pVL1393 plasmid를 이용하여 tag 없이 목적 단백질만 발현시킬 수 있고, signal 서열이 포함된 pAB-bee™, pAB-bee™-8xHis, pAB-bee-FH™ plasmid를 이용하여 분비형단백질 또는 막 단백질로 발현시킬 수도 있다. pAB-bee™ 등에서 제공되는 C-terminal His tag는 목적 유전자의 ORF 마지막 stop codon 유무에 따라 tagging 여부를 결정할 수 있다. pAcAB3 vector를 이용하면 3종 이상의 목적 단백질을 함께 발현시킬 수 있다. BacPAK6™ 또는 BaculoGold™ vector와 함께 사용할 수 있는 plasmid transfer vector라면 모두 ProEasy™ DNA와 함께 사용할 수 있다.

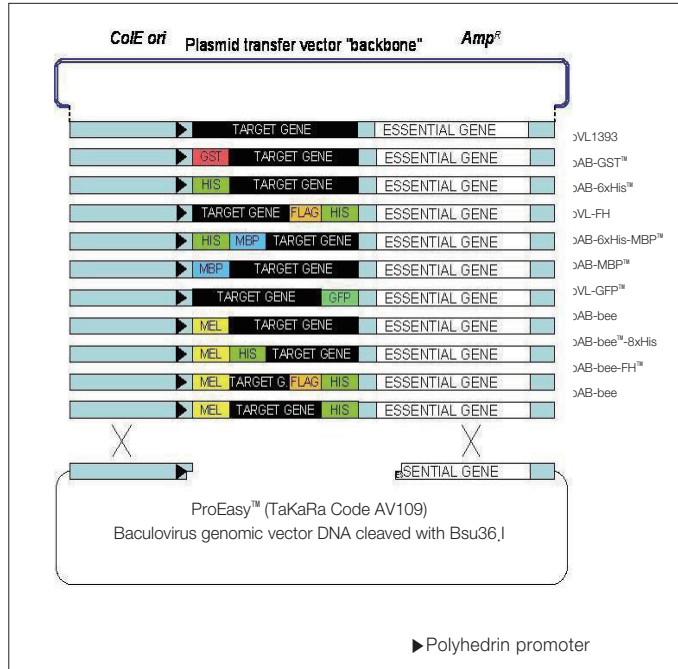


그림 3. Plasmid transfer vectors compatible with ProEasy™. Target gene can be cloned into any of these plasmid vectors and transferred by forced recombination into ProEasy™ baculovirus genomic DNA.

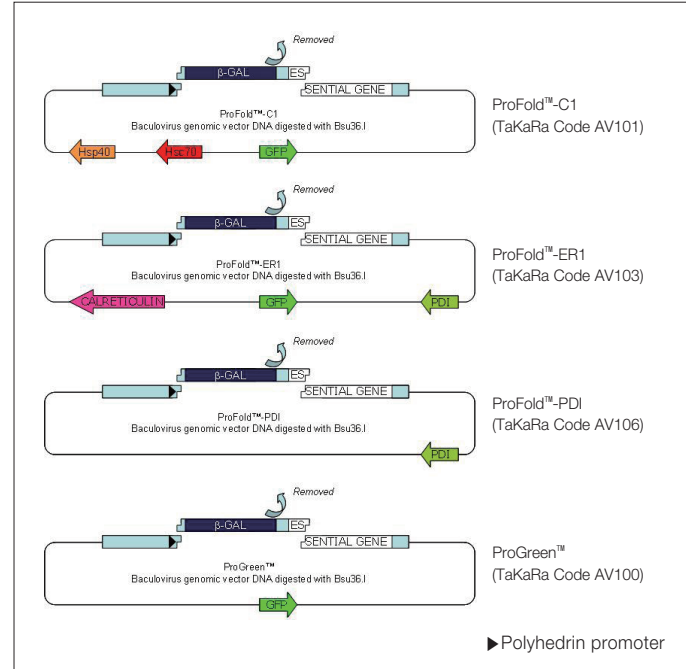


그림 4. Schematic representation of ProFold™ vectors

[3] AB Vector Technology– ProFold™

■ ProFold™ - 발현이 까다로운 단백질을 위한 chaperone vector

ProFold™은 하나의 vector에서 인간 chaperone 분자와 목적 단백질을 동시에 발현시키는 기술로 AB Vector를 통해서만 이용할 수 있다. AB Vector 사에 독점권이 있는 이 기술을 사용하여 chaperone 분자를 코딩하는 유전자를 polyhedrin 서열이 있는 (추후 목적 유전자의 삽입 시 이용) baculovirus DNA backbone에 삽입시킨다.

몇몇 목적 단백질은 제대로 된 folding을 형성하기 어렵거나, 단백질 응집 (inclusion body) 또는 분해현상이 일어나 고유의 생물학적 활성을 가진 단백질을 생산하기 힘들다. 이러한 문제의 핵심은 단백질이 세포집단에서 고유의 접힘구조를 형성하는데 도움을 주는 확실한 chaperone 분자를 필요로 한다는 것이다. 비록 곤충세포가 세포 기능 유지를 위해 적당한 chaperone을 합성하지만, 비정상적으로 많이 발현되는 목적 단백질의 folding에는 충분하지 않을 수 있다. Baculovirus System에서는 목적 단백질의 folding을 개선하기 위해 주요 chaperone 분자 코딩 유전자를 baculovirus genomic vector DNA에 삽입하게 된다 (그림 4).

ProFold™-C1 vector는 인간의 주요 chaperone인 Hsp40, Hsc70를 포함하고 있어 목적 단백질 발현에 기여한다. ProFold™-ER1은 ER에서의 단백질 folding을 돕는 소포체 (endoplasmic reticulum)의 주요 chaperone 분자를 포함하며, Aequorea victoria green fluorescent protein (GFP) 또한 발현하므로 재조합 baculovirus 제작과 함께 후속 실험에도 도움을 줄 수 있다. ProFold™- PDI는 cycteine-rich protein의 folding을 도와주는 disulfide isomerase (PDI)를 포함하여, GFP 유전자

는 포함되어 있지 않다. AB Vector의 ProGreen™ vector는 chaperone 분자 없이 GFP 유전자만 가지고 있어, 이를 이용하여 chaperone 분자 없이 발현시킨 단백질과 ProFold™ vector로 발현시킨 단백질을 비교하여 목적 유전자 고유의 활성을 가지는지를 확인하였다. 모든 vector가 목적 단백질을 높은 수준으로 발현시켰고, 단백질에 따라 차이는 있었지만 전체 세포 단백질의 약 30% 까지 목적 단백질을 발현시킬 수 있었다.

■ 함께 사용하는 plasmid transfer vectors

ProEasy™ baculovirus genomic vector DNA와 함께 사용하는 plasmid transfer vector의 선택범위는 매우 넓다. 그림 3에 나온 plasmid transfer vector는 모두 ProFold™ 또는 ProGreen™ baculovirus genomic DNA와 사용가능하다. 목적 단백질은 GST, His, GFP, MBP 또는 His/MBP, FLAG/His tag를 함께 발현시킬 수 있고 pVL1393 plasmid vector를 이용하면 tag없이 발현시킬 수 있다. 또한 분비형 또는 막단백질 발현을 위한 강력한 signal sequence를 가진 pAB-bee™, pAB-bee™-8xHis, pAB-bee-FH™ plasmid transfer vector도 판매하고 있으며, 3종 이상의 목적 단백질을 발현하는 경우에는 pAcAB3 vector를 추천한다. 또한, BaculoGold™, BacPAK6™ vector에서 추천하는 BD Pharmingen 또는 Clontech의 vector와도 함께 사용할 수 있다.

[4] 단백질 발현과 chaperone 분자

■ 단백질의 misfolding과 chaperone 분자

Ribosome으로부터 단백질이 빠져나올 때, 일반적으로는 구형으로 접힌 형태의 단백질 안쪽에 위치하는 소수성 아미노산이 밖으로 노출되어 있다. 마찬가지로 세포질에서 소포체의 lumen으로 단백질 사슬이 이동

할 때에도 소수성 아미노산은 노출될 수 있다. 노출된 소수성 아미노산 간의 결합으로 단백질 사슬이 일부 접히고 새로 합성되어 결과적으로 단백질 (nascent protein)이 응집하게 되고 inclusion body를 형성한다. Chaperone 분자는 소수성 아미노산간의 결합으로 인한 단백질 응집현상을 막고, ATP 가수분해에 의해 단백질 (nascent protein)의 folding을 활성화한다. 다만 chaperone은 새롭게 합성되는 단백질의 양에 따라 소수성 잔기를 모두 방어할 만큼 충분한 양을 필요로 한다.

어떠한 발현 시스템에서도 목적 단백질의 합성은 자연상태 보다 빠르게 진행되기 때문에 숙주세포가 충분한 양의 chaperone 분자를 제공하지 못하면 misfolding이 생길 수 밖에 없다. 예를 들면, polyhedrin promoter를 이용하는 일반적인 baculovirus system의 경우 세포내 전체 단백질 발현량의 30% 이상을 목적 단백질로 발현시킨다. Chaperone 의존적인 많은 목적 단백질이 misfolding 되는 것은 곤충의 chaperone을 목적 단백질과 같은 수준으로 발현시켜 해결할 수 있다. Misfolding된 단백질은 분해되거나, 효소적 분해가 어려운 형태로 응집된다. 보통 두 가지 과정은 얼마나 빨리 응집현상이 발생하느냐에 따라 응집이나 분해가 우세적으로 일어나고 정상적인 구조를 가진 단백질은 극히 적은 양만이 합성된다. 실험이 널리 보급됨에 따라, 단백질 misfolding은 단백질이 매우 낮은 수준으로 발현하거나 (misfolding 단백질은 분해됨) 목적 단백질이 높은 수준으로 발현시킬 수 있었지만 inclusion body를 형성하는 경우가 많았다. 현상은 매우 다르지만, 근본적으로 chaperone 발현율에 비해 목적 단백질이 높은 수준으로 발현된다는 점에서 문제의 원인은 같다. 이러한 문제는 AB Vector가 특허권을 가진 ProFold™ vector를 사용하여 목적 단백질과 chaperone을 함께 과발현시켜 해결할 수 있다 (그림 5).

■ ProFold™ vector의 사용

목적 단백질의 기원에 따라 ProFold™ vector를 선택한다. 예를 들어, ProFold™-ER1은 소포체에서 단백질 folding을 담당하는 Calreticulin과 Protein Disulfide Isomerase molecular chaperone을 발현한다⁸⁻¹⁰. ProFold™-C1은 세포질에서 단백질 folding을 담당하는 chaperone 분자 Hsc70과 Hsp40의 합성을 발현한다. 그림 7에서 Hsp40이 부분적으로 folding되지 않은 발생초기 단백질을 잡고 Hsc70로 제공하는 것을 확인할 수 있다. 그러면 Hsc70은 chaperone의 구조를 변화시키고 ATP 가수분해를 통해 단백질을 folding하여 밖으로 방출한다¹¹. Chaperone에 의한 단백질 folding 실험은 생물학적 활성을 가지기 위한 단백질의 가용성과 생산량을 늘리기 위해 *E. coli* expression system에서 널리 사용되고 있다¹²⁻¹⁵. 그렇지만 chaperone이 제공된 *E. coli* System에서도 대부분의 진행 유래 단백질의 생물학적인 활성에 필수적인 phosphorylation, disulfide bond 형성, N-linked glycosylation 등의 단백질 변형과정은 일어나지 않는다. 재조합 baculovirus system은 이러한 변형단계를 제공할 수 있고, 실제 많은 연구를 통해 baculovirus system에서 chaperone에 의한 단백질 folding이 성공적으로 진행됨을 확인하였다. 이러한 실험에서는 일반적으로 목적 유전자를 발현하는 재조합 baculovirus와 chaperone 분자를 발현하는 다른 타입의 baculovirus를 곤충세포에 함께 도입시키는 방법을 이용한다 (그림 6A). 이와는 반대로 ProFold™ vector는 하나의 genome에서 목적 단백

질과 다양한 chaperone 분자를 생산하여 효율을 높이고 목적 유전자와 chaperone간의 정확한 물비를 맞춰 최적의 활성을 낼 수 있다 (그림 6B).

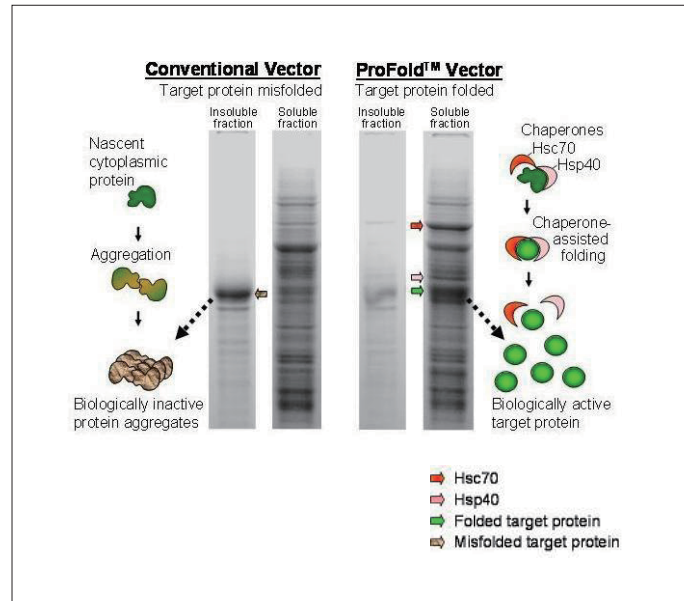


그림 5. ProFold™ vector improves the yield of soluble biologically active protein. *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells were infected with recombinant baculoviruses expressing a protein of interest using either a conventional baculovirus vector (BacPAK6™) or the ProFold™-C1 vector which overexpresses Hsp40 and Hsc70 molecular chaperones along with the protein of interest. Cells were harvested at 60 h post infection, lysed in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, and soluble and insoluble fractions were separated by centrifugation at 30,000g for 15 min. Proteins were separated in 11% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue.

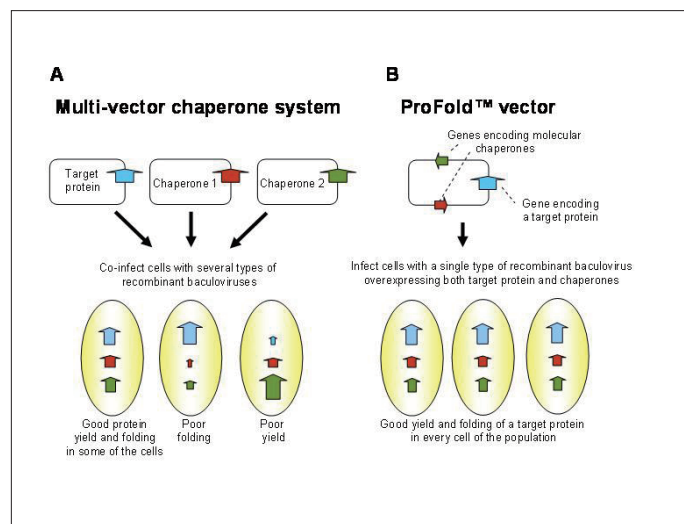


그림 6. Comparison of multi-vector chaperone systems used in prior studies (A) with ProFold™ single vector chaperone system (B).

ProFold™ vector는 multi-vector system으로 몇 가지 장점이 있다. 첫째, 복수의 genome 대신 하나의 vector genome을 사용하여 숙주세포에 대사적인 스트레스를 유발하지 않는다. 약 134 kb의 재조합 baculovirus genome은 바이러스 복제에 필수적인 많은 단백질을 암호화 하고 있고, 이는 세포내 단백질 합성 기구의 주요 용량을 차지하고 있다. 복수의 genome (그림 6A) 대신 1 개의 재조합 baculovirus genome을 도입함으로써 (그림 6B) 이러한 소모를 최소화하고 목적 단백질과 molecular chaperone의 발현을 최대화할 수 있다.

아마도 가장 중요한 ProFold™ 장점은 거의 모든 세포에서 동시에 molecular chaperone과 목적 단백질을 예정된 비율로 합성하는 것이다 (Fig. 6B). ProFold™ 시스템에서 목적 단백질의 합성율은 재조합 baculovirus 시스템에서 얻을 수 있는 최대치에 가깝다. 또한, molecular chaperone의 합성 수준은 잘 발현된 목적 단백질과 비교했을 때 더 높지만 이것이 목적 단백질의 발현을 약화시키는 것은 아니다. 예를 들면, chaperone에 대해 비의존적으로 folding이 일어나는 β-galactosidase를 발현시켜 일반적인 baculovirus vector와 비교하였을 때 ProFold™ vector는 목적 단백질을 고발현 시킬 뿐만 아니라, 동시에 발현된 molecular chaperones도 비슷한 수준 (ProFold™ -C2와 ProFold™-ER1 단백질 프로파일)으로 발현 시켰다. 이는 단백질을 코딩하는 유전자를 baculovirus genome 내에서 멀리 위치시켜 유전자발현을 조절하는 강력한 promoter간의 간섭현상을 줄임으로서 가능했다. 복수의 재조합 baculovirus를 함께 도입한 세포는 받아들인 3 가지 타입의 바이러스 입자를 얼마만큼 도입했는지에 따라 목적 단백질과 chaperone 분자를 다른 비율로 발현시켰고, 그 결과 몇몇 세포에서만 효율적으로 목적 단백질이 발현하고 folding하였다. 이러한 사실을 통해 상호작용을 하는 단백질의 대량생산에는 복수의 vector를 이용하는 것 보다 하나의 vector genome을 이용하는 것이 훨씬 더 효율적이라는 사실을 확실히 확인할 수 있다¹⁶⁾.

■ Hsp90 multi-chaperone system and target protein-chaperone complexes

Hsp90은 Hsp70에 비해 좀 더 특화된 molecular chaperone이다¹⁷⁾. 본질적으로 Hsp90은 Hsp70/Hsp40 folding 기작에 추가되며 몇몇 단백질의 고유 구조를 형성하기 위해서 필요하다. Hsp70은 소수성 아미노산이 노출되어 있는 다양한 종류의 단백질과 결합하는 반면, Hsp90 결합은 multi-protein hsp90/hsp70-based chaperone 기작에 의해 Hsp90과 복합체를 형성하는 signal transduction 단백질에 국한되어 있다. Hsp90과 결합하는 단백질은 간혹 Hsp90과의 복합체 형성으로는 불완전한 생물학적 활성을 나타내는 경우가 있다 (그림 7).

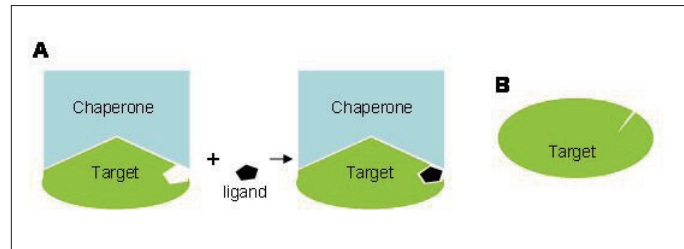


그림 7. Drug target dependence on a molecular chaperone. A, The target is in complex with chaperone that keeps the target ligand-binding pocket in the conformation that allows ligand to bind. B, An isolated target has a different protein conformation that either does not allow ligand to bind, or allows it to bind with low affinity. At the same time target may be able to bind with comparable or better affinity to a slew of other compounds that would produce hits during screening, but would have little relevance to *in vivo* trials. Well known example is Hsp90 molecular chaperone that modulates various targets¹⁸⁾.

AB Vector는 Hsp90에 의해 생산되는 단백질 양을 높일 수 있도록 Hsp90 multi-chaperone system을 발전시켰고, chaperone 분자와 복합체를 이룬 목적 단백질의 정제를 위한 기술도 함께 연구하였다. 목적 단백질-chaperone 복합체의 정제에는 그림 8에서 확인할 수 있다.

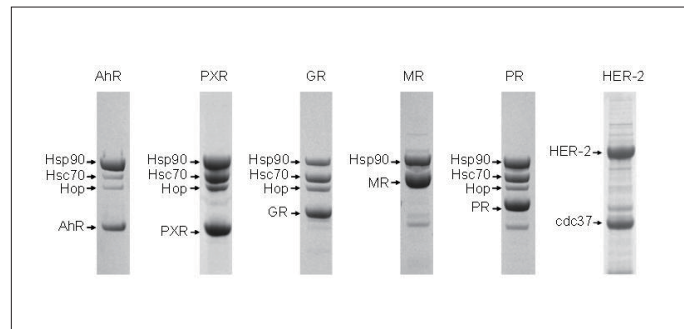


그림 8. Purified target protein-chaperone complexes. Ligand-binding domains of the following receptors were produced using Hsp90 multi-chaperone system and purified, AhR-aryl hydrocarbon receptor, major drug toxicity mediator; PXR- pregnane X receptor, major drug-drug interaction target; GR- glucocorticoid receptor, pain, depression, diabetes and obesity target ; MR-mineralocorticoid receptor, cardiovascular diseases target; PR-progesterone receptor, breast cancer, uterine fibrosis and endometriosis target target, HER-2- catalytic domain of HER-2 (ErbB2) receptor tyrosine kinase in complex with cdc37 molecular chaperone, major breast cancer target.

Hsp90 chaperone 분자는 protein kinase¹⁹⁾, steroid/nuclear receptor²⁰⁻²¹⁾, Hepatitis B, C, influenza와 herpes virus polymerase²²⁻²³⁾, inflammasome component²⁶⁾, eNOS-endothelial nitric oxide synthase²⁷⁾, prostaglandin E synthase²⁸⁾, telomerase²⁹⁾과 같은 많은 수의 목적 단백질의 특성을 조절하는 결합 파트너로서 제공된다. 이들 단백질은 주요 암, 당뇨, 염증, 통증, 알츠하이머, 심장혈관 장애 및 anti-viral target을 대표하며, 지금까지 완전한 생물학적 활성에 필요한 목적 protein-chaperone 복합체 형태로는 이용 불가능 하다.

■ 관련제품

제품명	용량	TaKaRa Code
ProGreen	2.5 µg	AV100
ProFold-C1	2.5 µg	AV101
ProFold-C2	2.5 µg	AV102
ProFold-ER1	2.5 µg	AV103
ProFold-PDI	2.5 µg	AV106
ProFold-PDI*	2.5 µg	AV107
ProFold-O	2.5 µg	AV108
ProEasy	25 µl	AV109
ProEasy	125 µl	AV110
pVL1393	25 µg	AV200
pAcAB3	25 µg	AV201
pAB-bee	25 µg	AV202
pAB-bee-8xHis	25 µg	AV203
pAB-bee-FH	25 µg	AV204
pAB-6xHis	25 µg	AV205
pAB-GST	25 µg	AV206
pAB-MBP	25 µg	AV207
pAB-6xHis-MBP	25 µg	AV208
pVL-GFP	25 µg	AV209
pVL-FH	25 µg	AV210
NC (negative control)	1 ml (10 ⁸ pfu/ml)	AV300
GC (green control)	1 ml (10 ⁸ pfu/ml)	AV301
GCP (green control plasmid)	50 µl (0.2 µg/µl)	AV302
FoldHelper-ER3	2 ml (5 × 10 ⁷ pfu/ml)	AV400
FoldHelper-104	1 ml (10 ⁸ pfu/ml)	AV401
FoldHelper-104P	1 ml (10 ⁸ pfu/ml)	AV402
FoldHelper-57P	1 ml (10 ⁸ pfu/ml)	AV403
FoldHelper-P	1 ml (10 ⁸ pfu/ml)	AV407
C1 Kit	1 Kit	AV500
C2 Kit	1 Kit	AV501
ER1 Kit	1 Kit	AV502
ER1-bee kit	1 Kit	AV503
Controls Kit	1 Kit	AV505

이와 같이 Baculovirus Expression System은 *E. coli* System에 비해 높은 효율로 생물학적 활성을 가진 목적 단백질을 생산할 수 있어 다양한 단백질 생산에 이용되고 있다.

Takara Bio에서는 Baculovirus Expression System에 사용되는 다양한 vector와 viral genomic DNA 관련 제품을 판매하고 있다 (자세한 정보는 www.takara.co.kr의 각 제품 페이지를 참조).

■ 참고문헌

1. Carmeron *et al.*, *Trends in Biotechnology*, **7**, 66–70, 1989
2. Akermoun *et al.*, *Protein Expr Purif* 2005., **44**: 65–74
3. Smith *et al.*, *Mol Cell Biol.*, **3**: 2156–65, 1983
4. Pennock *et al.*, *Mol Cell Biol.*, **4**: 399–406, 1984.
5. Kits and Possee, *Biotechniques*., **14**: 810–7, 1993
6. Luckow *et al.*, *J Virol.*, **67**: 4566–79,1993
7. Pijlman *et al.*, *J. Gen. Virol.*, **84**: 2669–2678, 2003
8. Ireland *et al.*, *Methods Mol. Biol.*, **347**:331–42, 2006;
9. Maattanen *et al.*, *Biochem. Cell Biol.*, **84**: 881–9, 2007
10. Appenzeller–Herzog and Ellgaard, *Biochim Biophys Acta.*, **1783**:535–48, 2008
11. Meimaridou E *et al.*, *J. Mol. Endocrinol.*, **42**: 1–9, 2009
12. Thomas *et al.*, *Appl Biochem Biotechnol.*, **66**: 197–238, 1997
13. Xu *et al.*, *Biotechnol Prog.*, **21**: 1357–65, 2005
14. Butcher *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol.*, **73**: 1282–9, 2007;
15. Bleimling *et al.*, *Protein Expr Purif.*, *Epub ahead of print*, 2008
16. Belyaev *et al.*, *Gene*, **156**: 229–233, 1995
17. Pratt and Toft, *Exp Biol Med (Maywood)*., **228**:111–33, 2003
18. Pratt *et al.*, *J Biol Chem.*, **283**:22885–9, 2008
19. Caplan *et al.*, *Trends Cell Biol.*, **17**:87–92, 2007
20. Pratt *et al.*, *J Biol Chem.*, **283**:22885–9, 2008
21. Sumanasekera *et al.*, *J Biol Chem.*, **278**:4467–73, 2003
22. Hu J *et al.*, *J Virol.*, **76**:269–79, 2002
23. Miyamura T *et al.*, *EMBO J.*, **25**:5015–25, 2006
24. Naito T *et al.*, *J Virol.*, **81**:1339–49, 2007
25. Burch & Weller. *J Virol.*, **79**:10740–9, 2005
26. Mayor A. *et al.*, *Nature Immunology.*, **8**:497–503, 2007
27. Chatterjee & Catravas. *Vascul Pharmacol.*, **49**:134–40, 2008
28. Tanioka *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.*, **303**:1018–23, 2003
29. Elmore *et al.*, *Oncol Rep.*, **20**:613–7, 2008