연구동향

포스트 게놈 시대의 단백질공학 접근 동향

이정임, 김태두, 이정걸
건국대학교 화학공학과

1. 개요

단백질 공학은 신규 기능 또는 특성을 유도하기 위한 단백질에 들어 있는 아미노산의 자연적 서열을 바꾸는 것이 목적인 접근법이다. 궁극적으로 이 과정은 특정 목적을 달성하거나 해당 단백질에 대한 구조-기능 관계를 이해하기 위해 이루어진다. 단백질에 대한 아미노산의 자연적 서열은 1가지 이상의 아미노산 잔기를 대체, 삽입 또는 삭제를 통해 이루어진다. 방향적 진화와 합리적 설계는 목적 단백질의 자연적인 아미노산 서열에 원하는 돌연변이를 도입할 수 있는 2가지 접근법이다. 자연 선택 및 다양성 이론은 방향적 진화의 기초이다. 반대로 합리적 설계는 단백질의 서열 및 3차원 결정 구조에 대한 이전의 정보를 기반으로 한다. 하지만 포스트 게놈 시대에 단백질 서열 및 구조에 대한 정보가 증가하면서 여러 가지 방법이 진화하여 단백질 구조를 변경하는 과정이 덜 노동 집약적인 과정이 되고 그 효율성이 높아졌다. 또한 컴퓨터 생명 공학이 발전하면서 단백질 공학을 *de novo* 설계로 확대하였다. *de novo* 설계에서는 전산학적 단백질 설계 알고리즘을 사용해 천연 단백질의 사용 가능한 3차원 구조 및 절척(folding rule)을 기반으로 합성 단백질을 맞춘다.

천연 단백질은 대개 분자 형태로 기능을 수행하며, 이러한 단백질은 대부분 미생물의 영향을 받는다. 단백질 공학을 통해 단백질의 구조-기능 상관관계를 해석할 수 있으며, 이어서 단백질의 중요한 특징을 지배하는 아미노산을 밝혀낼 수 있다. 단백질 서열, 구조 및 기능 특성에 대한 정보를 대량으로 이용할 수 있는 포스트 게놈 시대에는 단백질 공학을 편리하게 활용하여 여러 가지 단백질의 생물물리학적 특성(예, 단백질 안정성, 활성, 거울상 선택성, 용해성, 억제제 내성 및 조절 기능)을 업그레이드했다. 예를 들어 올리고머화 과정을 줄이고 그로 이해 흡수율을 높이는 돌연변이를 처리하는 속효성 인슐린 변형이 개발되었다.

그 외에도 단백질 공학은 특히 신약 설계 및 효능 향상과 관련하여 의료 기술 분야에 엄청난 기여를 하고 있다. 예를 들어 탄수화물 차단제로 알려져 있고 비만 억제제로 사용되는 아밀라아제 저해제는 단백질 공학을 이용하여 만들어졌다. 부흐홀츠(Buchholz) 등은 포스트 게놈 시대의 DNA 처리 효소의 공학을 설명했다. 퀠호퍼(Koellhoffer) 등은 최근에 단백질 공학

접근법을 요약하여 바이러스 백신 및 면역치료제를 개발했다. 그들은 합리적, 전산학적 및 결합 전략을 활용하여 새로운 백신과 면역치료제를 개발하는 최근 연구를 강조했다. 이 보고에서는 최근의 단백질 공학 접근법 및 포스트 게놈 시대의 과제 및 한계를 강조 및 검토한다.

2. 단백질 공학의 접근법: 다양성과 특수성

단백질 공학의 궁극적 목적은 특정 단백질에 대한 원하는 기능 또는 특성을 얻는 것이다. 단백질 공학 접근법은 지금까지 크게 2가지 유형(화학적 조정 및 유전자 조작)으로 분류되었다. 화학적 조정에서는 돌연변이 유발물질이 있는 상태에서 목적 단백질로 불특정 돌연변이 되는 과정이 발생한다. 이러한 장점에도 불구하고, 화학적 조정 과정에서는 불특정 돌연변이가 생성되며, 특정 위치의 단백질 서열에서 삽입 및 삭제 돌연변이를 생성하기가 어려운 단점이 있다. 유전자 조작도 단백질 공학에서 공통적으로 사용되는 방법이다. 유전자 조작 방법은 다양하지만 다양성과 특수성을 기준으로 분류할 수 있다. 다양성의 원칙을 따르는 방법은 공통적으로 방향적 진화라고 한다. 반면에 특수성의 원칙을 따르는 방법은 합리적 설계라고 한다. 합리적 설계에서는 원하는 기능 또는 특성을 가진 단백질을 설계할 수 있도록 단백질 구조 및 기능을 이해해야 한다 (Fig. 1).

2.1. 방향적 진화

방향적 진화는 단백질 공학에서 가장 주요한 기술 중 하나가 되었다. 원하는 기능 특성을 가진 변종을 식별하기 위해 다윈 진화론을 흉내 내고 반복적 선별 및 선택 과정이 포함되는 자연적 선택을 통해 과정을 이해하게 된다. 여러 단백질 공학 접근법에서 사용된 방향적 진화 접근법에서는 다양한 인상적인 결과가 보고되었다. 방향적 진화는 전반적인 정보 및 목적 단백질의 3차원 결정 구조에 의존하지 않는다. 하지만 실제로 연구자들은 대개 방향적 진화의 효율성을 극대화하기 위해 목적 단백질의 구조 및 생화학 정보를 사용한다. 이 절차의 시작은 목적 단백질을 선택하는 것이며 다음으로 해당 유전자의 클로닝이다. 이 유전자는 에러 프론 PCR, DNA 셔플링 및 StEP(staggered extension process) 같은 기술을 사용하여 변이체 라이브러리를 구성할 수 있도록 무작위 돌연변이 된다. 그런 다음 엄격한 선별 및 선택 절차를 거쳐 원하는 특성을 가진 돌연변이체가 선별된다. 방향적 진화를 사용해 목적 단백질의 전체 서열에 대한 돌연변이를 만들 수 있으며, 연구자들은 단백질의 활성 자리에서 떨어진 아미노산도 선별할 수 있다. 하지만 방향적 진화의 주요한 단점은 엄청난 라이브러리 크기이다. 실제로 큰 라이브러리 크기를 생각하면 가장 강력한 선별 또는 선택 방법을 사용하더라도 전체 서열 다양성을 조사하기는 어렵다. 많은 연구에서는 초고속 선별 시스템을 적용하여 대량 라이브러리를 선별했지만, 어렵고 노동 집약적인 작업이다. 단백질의 mRNA 발현, 비색분석법,

같은 유전자 발현 및 세포 표면 발현 돌연변이체, 군집 크기 기반 증식 측정 및 개별 박테리아 세포의 마이크로캡슐에 대한 통합 같은 활성 평가 방법이 발전하면서 가능한 큰 라이브러리를 선별하는 과정을 만들었다. 이러한 방법들은 단백질 공학 적용에 적합하도록 만들어졌지만, 유전자 합성을 하는 동안 제어된 서열 변이체를 도입하는 슬로노믹스 기술은 비교적 새로운 방법이다. 방향적 진화는 탄산탈수효소, 베타-글루쿠로니다제, 베타-락타마제, 포스포트리에스터라아제, 포스포네이트 모노에스테르 가수분해효소, DNA 폴리메라아제, 글리코실트랜스퍼라제, 양고추냉이과산화효소, 니트로환원효소, P450 등에 효율적으로 적용할 수 있는 것으로 알려졌다. 단백질 공학에서 방향적 진화의 다른 성공 사례는 치료학 분야에서 프로테아제의 변형이다. 프로테아제는 프로테아제 억제제 약물의 관련 특수성 및 약물 내성 분석을 위한 치료 목적으로 사용된다.

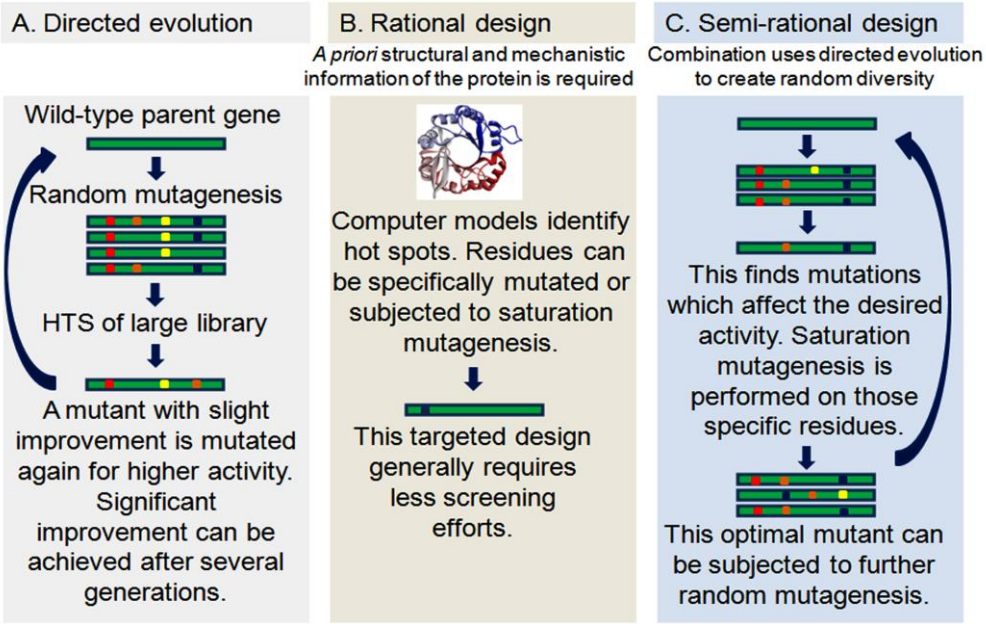

Fig. 1. A schematic of the main protein engineering approaches consisting of directed evolution, rational design, and semi-rational design approach. (A) Directed evolution involves the iterative rounds of genetic diversity, being screened/selected for higher activity. (B) Rational design identifies residues which are expected to increase the desired activity through a priori sequence or structure knowledge. (C) Though the methodology to combine these strategies can vary, one example of the conjoined method is using directed evolution to identify hotspots, and then rational design to target residues proximal to those hot-spots [Eriksen et al., 2014].

2.2. 합리적 설계

최근에 포스트 게놈 시대의 실험 기술이 발전하면서, 서열 수준 정보가 단백질 구조 정보를 통해 입증되었다. 이러한 정보 풀에는 단백질의 구조-기능 관계에 대한 엄청난 양의 지식이 수용된다. 단백질 공학의 합리적 설계 접근법은 목표 단백질의 서열, 구조 및 메커니즘 같은 단백질에 대해 이전에 획득된 정보를 분석하여, 목표 단백질에 원하는 특징을 도입하기 위해 특정 아미노산을 돌연변이 시킨다. 좀 더 구체적으로 말하면, 이 기술에는 대체, 삽입 또는

결실을 통해 목표 단백질의 특정 위치에서 특정 잔기 또는 일련의 잔기의 돌연변이 또는 잔기의 가 포함되어 있다. 돌연변이 될 잔기의 선택은 목표 단백질의 특징을 결정하는 중요한 단계이다. 돌연변이의 결과를 예측하기는 대단히 어렵기 때문에 적절한 결과를 얻으려면, 기능 및 촉매 메커니즘과 함께 목표 단백질의 서열 및 구조에 대한 정밀한 정보가 필요하다. 전략에 따라 무작위 돌연변이 기반 방향적 진화를 통해 생성되는 엄청난 양의 라이브러리를 선별하는 힘든 작업을 없앨 수 있으며, 따라서 합리적 설계에서 전략은 방향적 진화에서보다 중요하다.

합리적 설계는 2가지 유형의 전략(서열 기반 접근법 및 구조 기반 접근법)으로 이루어져 있다. 서열 기반 접근법에서는 원하는 단백질 특성이 될 가능성이 있는 아미노산을 식별하기 위해 동족 단백질 서열의 체계적 정렬에 대한 분석 및 그 비교를 수행한다. 목표 단백질에서 돌연변이에 대한 잔기의 근거를 선택하는 기준 단백질 서열의 특징을 적절하게 분류해야 한다. 3차원 결정 구조를 가진 단백질의 경우에는 활성 자리 내에 있는 아미노산의 구조-기능 관계를 예측할 수 있다. 단백질 구조 가시화 도구를 사용하면 활성 자리를 다시 설계하여 단백질의 촉매 측정을 변형할 수 있다. 지난 10년 동안 많은 계산 도구가 동적 서열 및 구조 데이터베이스를 비교할 수 있을 정도로 진화해서 목적 단백질에 대한 가변 지도를 생성했다. 쟌(Zhan) 등은 인간 텐키라제 억제제(TNKSI)의 구조 기반 합리적 설계가 진보했음을 설명했으며, 마샬(Marshall) 등은 치료 단백질의 공학에 대한 상세한 리뷰를 제공했다.

2.2.1 구조 기반 합리적 설계의 최근 진보

구조 정보를 이용할 수 없고 목적 단백질을 결정화할 수 없는 경우에는 2차원 결정화가 아주 유용할 수 있다. 2차원 결정화는 인터페이스에서 단백질을 결정화하기 위해 표면 히스티딘에 대한 금속 이온의 조정을 근거로 한다. 구조 유도 컨센서스는 서열 기반 및 구조 정보를 결합하는 최근에 있었던 다른 접근법이다. 이러한 접근법은 많은 효소의 내열성을 향상하기 위해 널리 사용되었다. 단백질의 내열성을 향상시키기 위한 다른 접근법은 SCHEMA라고 하는 계산 알고리즘을 사용하는 구조 유도 재조합을 기반으로 한다. 이 기술에서는 상위 단백질에서 서열 일치성이 낮은 단백질 단편을 선택하여 구조적 변화가 가장 적은 것과 상호 교환한다. 이러한 접근법을 사용하면서 셀룰라아제, I종 셀로비오하이드로라제, 베타-락타마제 및 시토크롬 P450의 내열성이 향상되었다. 베이어-빌리거 산화(Baeyer-Villiger monooxygenase)의 경우에 유사한 효과가 발표되었다.

2.3. 반합리적 설계

방향적 진화 및 합리적 설계 전략에는 각각 자체 한계가 있다. 특히 몇 가지 아미노산에서 동시에 변화가 일어나야 하는 경우에 방향적 진화나 합리적 설계로는 원하는 변화가

이루어지지 않는 경우가 많다. 이런 전략에서는 원하는 기능이 있을 것으로 예측되는 선택된 잔기 또는 영역에 대해 포화변이를 수행한다. 지식 주도 방법에서는 단백질 공학에 대한 계산 예측 알고리즘은 물론이고 주요 아미노산 잔기를 선택할 수 있는 단백질 서열, 구조, 기능 및 반응 메커니즘에 대한 사전 정보를 활용한다. 연구자들은 목적 단백질에 대한 이러한 사전 지식을 이용하여 선택적 돌연변이를 수행하고 그럼으로써 선별할 라이브러리의 크기를 줄인다. 라이브러리의 크기를 줄이는 것은 목적 단백질의 주요 잔기 또는 도메인의 식별 여부에 따라 달라진다. 돌연변이 효과에 대한 기능-구조 관계 및 지식은 주요 잔기 또는 영역을 식별하는 데 중요한 역할을 한다. 이러한 접근법이 성공한 사례로는 위치지정 및 위치 특이적 돌연변이의 조합을 사용하여 *로도코커스 로도크로스*에서 추출된 할로알칸 데할로게나제의 촉매 활성이 32배 증가한 경우가 있다. 항-당뇨병 화합물 시타글립틴에 대한 산업용 합성 생촉매로서 입체선택성 전달 효소의 진화에는 포화 돌연변이 및 합리적 설계의 조합이 채택되었다. 활성 자리에서 돌연변이 핫스팟을 식별하기 위해서는 터널 분자 동역학 시뮬레이션이 적용되었다. 드와이어(Dwyer) 등은 구조 기반 계산 설계를 사용하여 3탄당인산 이성질체화효소 활성을 기능적으로 불활성인 리보스 결합 단백질 골격을 결합한다. 실험은 다음과 같이 수행되었다. (1) 촉매적 기관이 제작됨, (2) 활성 자리에서 기질 결합 및 촉매 자리를 찾기 위해 조합적 검색이 수행됨 및 (3) 활성 자리는 14가지의 다른 설계를 생성하여 최적화되었다. 방향적 진화를 사용하여 운동 효율이 더욱 향상되었다. 로스리스버거(Rothlisberger) 등은 신규 합리적 단백질 설계를 따라 촉매 잔기를 켐프 제거 촉매(Kemp elimination catalysts)의 활성 자리에서 정확하게 배치한 다음 방향적 진화를 적용했다(Fig. 2).

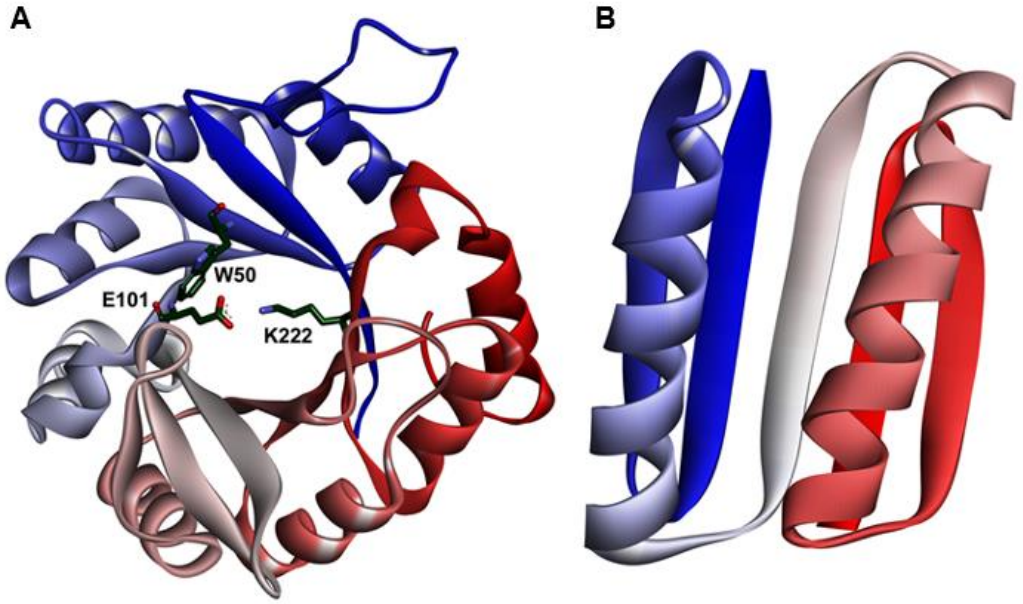

Fig. 2. (A) Structure of designed Kemp eliminase showing the catalytic residues in the active site [105]. (B) Structure of a novel 93-residue protein called Top7 with atomic-level accuracy [Kuhlman et al., 2003].

다른 연구에서는 라이브러리 생성 과정이 진행되는 동안 인공적인 켐프 에리미나제의 컨센서스 돌연변이로 인해 촉매 효율이 2000배 이상 늘어난 돌연변이가 진화되었다. 다른 사례로, 고리화 첨가반응을 위한 효율적인 생촉매로 변이된 인공 딜스-알더레이즈(Diels-Alderase) 효소가 있다. 이러한 변이는 합리적 설계의 돌연변이를 에러 프론 PCR와 결합하여 이루어졌다. 요시쿠니(Yoshikuni) 등은 γ-후물렌 신타아제의 활성 자리 주머니의 내부 또는 가까이에서 포화변이 및 체계적 재결합을 사용해 여러 세스퀴테르펜을 합성했다. 챔피언(Champion) 등은 *나이세리아 폴리사카리아* 아밀로슈크라제의 기질 특이성을 변이시켰다. 스크린된 변이체는 공여 수크로오스(donor sucrose) 및 비천연 수용체 기질 알릴기 2-아세트아미도-2-데옥시-D-루코피라노사이드에 대해 400배 이상 높은 촉매 효율성을 나타냈다.

2.4. *de novo* 설계

de novo 설계는 지식 기반 접근법이다. 계산 단백질 설계 알고리즘을 사용해 천연 단백질의 3차원 구조와 그 절척에 대한 정보를 사용하는 합성 단백질을 설계할 수 있다. 아미노산의 서열 및 여러 측쇄의 특정 상호 작용은 접힘 경로를 결정한다. 최근에 실험 기법과 분자 모델링이 발전하면서 천연 단백질의 서열에 근거한 계산 단백질 설계에 자극을 주었으며, 특정 구조 및 기능을 가진 신규 단백질을 만드는 데 사용되었다. 단백질 접힘, 안정성 및 기능의 근거에 대한 이해는 *de novo* 접근법을 사용하여 원하는 특성을 가진 새로운 단백질 설계에 필수적이다. *de novo* 단백질 설계에는 구조 예측 및 실험 안정성 사이의 상관관계가 필요하다(Fig. 3). 하지만 계산 단백질 설계에서는 주 사슬 아미노산 좌표 및 힘의 장만 처리하여 안정성에 최적인 아미노산 기하학을 결정한다. 계산 기법을 사용해 *de novo* 단백질 같이 스크래치에서 단백질 토폴로지와 활성 자리가 모두 구축되는 인공 효소를 설계했다. 기질 및 제품 사이의 최저 자유에너지 장벽을 생산하는 방식으로 활성 자리 아미노산의 기능 그룹을 배치하여 이상적인 활성 자리가 구성되었다. 시겔(Siegel) 등은 딜스-알더레이즈(Diels-Alderase) 반응에 촉매 작용을 할 수 있는 *de novo* 단백질을 설계했다.

활성 자리 설계는 합리적 및 직관 기반 접근법을 사용하여 *de novo* 설계의 발전과 함께 점차로 진보했다. 탄산탈수효소(Human carbonic anhydrase, HCAIII)는 단백질과 기질 공학을 적용하여 에스테라제 활성이 결합된 탁월한 사례이다. 계산 단백질 설계는 또한 다양한 기능을 가진 단백질을 설계하는 데 성공적인 도구였다. 이러한 업적 중 대부분은 최초의 3차원 결정 구조에서 관찰된 고정된 뼈대 접근법에 따라 다르며, 측쇄를 모델링하는 데 초점을 둔다. 계산 단백질 설계 도구에는 보통 2가지의 주요한 요소(에너지 또는 점수화 함수 및 검색 함수)가 포함된다. 에너지 또는 점수화 함수에서는 골격이 있는 특정 아미노산 서열의 호환성을

분석하며, 검색 함수에서는 뼈대 및 측쇄의 형태와 함께 아미노산 서열을 표본 조사한다. 굴만(Kuhlman) 등은 서열 및 구조 예측을 반복함으로써 계산 접근법을 사용하여 α/β 단백질 접힘이 있는 93-잔존 길이 신규 단백질을 설계했다(Fig. 2). 비슷하게 카플란(Kaplan)과 디그라도(DeGrado)는 성공적으로 계산 기법을 사용하여 새롭게 설계된 페놀옥시다제가 포함된 이철 단백질을 보고했다. 이러한 두 가지 사례는 모두 만들어진 단백질이 일반적으로 자연적으로 발생하는 단백질에 비해 부족하기는 하지만 실제로 *de novo* 단백질을 설계할 수 있다는 것을 나타낸다.

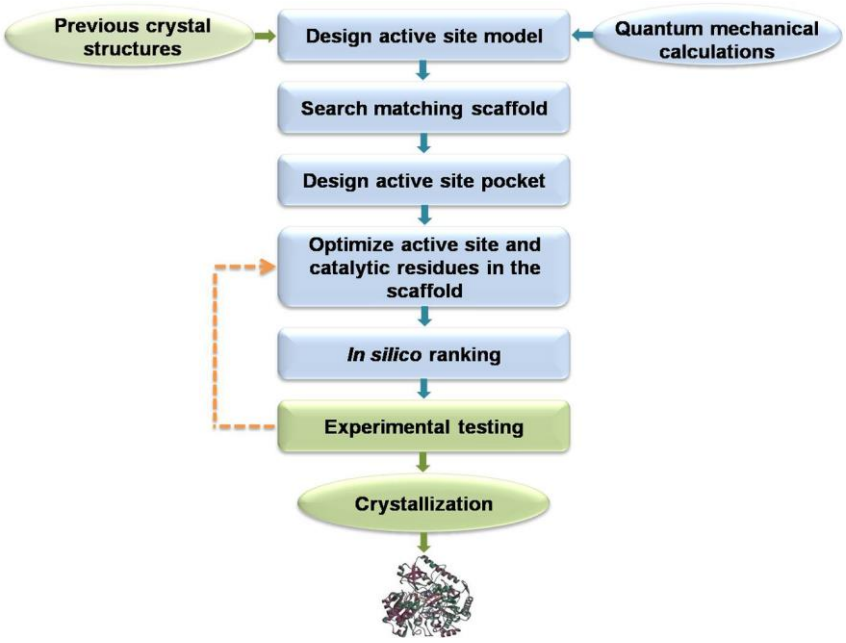

Fig. 3. Schematic representation of various steps in the *De novo* protein design approach. Computational steps and experimental steps are in light blue and light green [Zanghellini, A. 2014].

천연 단백질이 없는 신규 단백질의 *de novo* 설계는 유례없이 발전했다. 연구자들은 원하는 생물물리학적 특성을 가진 단백질의 설계 및 제작을 지원하기 위해 다양한 계산 도구를 설계했다 (Fig. 3). METAL SEARCH, DEZYMER, ORBIT 및 ROSETTA 같은 프로그램은 *de novo* 단백질의 발전에 필요한 강력한 근거를 제공했다. ROSETTA는 데이비드 베이커(David Baker)의 실험실에서 도입한 계산 도구 묶음이다. 이 도구는 *de novo* 접힘 예측에 가장 광범위하게 사용되는 도구이다. Rosetta가 다양한 활성 단백질을 설계하는 데 성공하기는 했지만, 이렇게 설계된 단백질은 대부분 그리 대단한 활성을 나타내지 않으며 그 중 많은 것은 전혀 활성을 나타내지 않았다. 또한 *de novo* 설계를 생산하기 위해 일부 다른 신규 방법이 사용되었다. 그런 방법 중 한 가지 방법에서는 단백질 데이터 뱅크(Protein Data Bank)를 활용해 신규 *de novo* 단백질을 설계할 수 있는 적절한 뼈대를 찾는다. 이 방법은 삼탄당 이성질화효소를 사용해 검증되었다. 철 결합 이산소를 템플릿으로 사용하여 티오레독신 접힘에서 금속 단백질을

설계한 여러 가지 사례가 있다. 이러한 설계된 단백질은 철을 결합할 수 있었으며 촉매 특성을 나타냈다. *de novo* 설계를 통해 개발된 단백질의 활성 향상은 방향적 진화를 통해 보고된 향상보다 효율적이지 않을 가능성이 있으며, 따라서 연구자들은 여전히 촉매를 향상하기 위해 방향적 진화 기법에 의존한다. 그럼에도 불구하고, 신규 기능을 가진 단백질을 설계하는 데에는 *de novo* 설계를 적용할 수 있다. *de novo* 설계는 신규 기능을 가진 단백질 설계에 대한 엄청난 잠재력이 있으며, 치료학 분야에서도 유용하게 사용될 수 있다.

2.5. 비천연 아미노산을 이용한 단백질 공학

지난 10년 동안에는 원하는 또는 신규 특성을 가진 단백질을 만들 수 있는 종합적이고 계산적인 기법이 나타났다. 원하는 목적에 단백질을 사용할 수 있는 가능성을 이해하고 조사할 수 있도록 더 이상은 단백질 서열이 표준 유전 암호의 기능으로 제한되지 않는다. 이제는 in vivo 및 in vitro 단백질의 경우에 모두 비천연 아미노산(unnatural amino acid, UAA)의 결합이 가능하다. 토마스 J. 맥길러리(Thomas J. Magliery)는 in vivo 및 in vitro 기법을 사용하여 여러 가지 유형의 비천연 아미노산을 단백질에 결합하는 데 성공했다. UAA 결합에는 단백질에 대한 새로운 기능을 생성할 수 있는 능력이 있다. 하지만 UAA을 포함하는 단백질은 대개 낮은 단백질 수율을 나타내며, 자연 활성을 줄이고 안정성을 낮춘다. UAA를 결합하는 기술의 발전과 함께 단백질 공학에서는 UAA을 포함하는 단백질 특성을 향상시킬 수 있다. UAA를 포함하는 단백질의 실험실 진화를 보여주는 첫 번째 사례는 웡(Wong) 이 보고했으며 이후 브루스타드(Brustad) 및 아놀드(Arnold)는 비천연 단백질 기능에 대한 방향적 진화 접근의 효용을 증명했다. 리우(Liu) 등은 신규 결합 서열(UAA를 함유한)의 발견 및 진화를 연구하였으며, 리우(Liu)와 슐츠(Schultz)는 리뷰에서 UAA의 in vivo 결합에 대한 상세 개요를 설명했다.

그뤼네발트(Grunewald) 등은 면역 요법에서 UAA의 역할을 강조했다. 면역성 *p*-니트로페닐알라닌 아미노산을 면역 요법을 위한 새로운 도구로서 단백질에 통합하는 방법을 사용했다. UAA에는 또한 니트로리덕타제 활성을 효과적으로 비자연성 기질로 조절할 수 있는 능력이 있다. 분자 생물학이 발전하면서 비천연 단백질 공학이 진화했으며 이제는 기능 연구, 단백질 가시화 및 생물물리학적 분석에 기여하고 있다. UAA를 포함한 단백질 공학은 재래식 단백질 공학 접근법에 비해 상대적으로 단백질의 기능을 조절하는 데는 영향을 거의 주지 못하였는데, 원인은 UAA를 포함한 단백질 공학의 경우 대규모 선별 실험에 제한이 있다는 것이다.

3. 결론

지난 10년 동안 단백질 공학은 단백질의 특성을 조절하거나 원하는 기능을 이용해 신규

단백질을 설계할 수 있는 주요한 기술로 등장했다. 기술이 진화하면서 서열에 대한 정보, 3차원 구조 및 단백질의 기능은 새로운 단백질 변형 또는 접근법을 개발 및 적용하도록 하였다. 이러한 과정을 통해 단백질 공학 접근법은 방향적 진화 및 합리적 설계에서 계산 *de novo* 설계 및 반합리적 설계로 진화했다. 단백질 공학 전략이 많음에도 불구하고, 단백질의 특성을 향상하기 위해 단백질을 조절할 수 있는 특정한 이론은 없다. 하지만 단백질을 변형하기 위한 적절한 단백질 공학 접근법의 선택은 목적 단백질에 따라 크게 달라진다. 신규 단백질의 설계 및 UAA의 결합이 성숙함은 결코 아니다. 최근 *de novo* 단백질의 계산 설계는 단백질을 조절할 수 있는 방법을 바꾸었으며 신규 단백질을 설계할 때 선택하는 방법 중 하나가 되었다.

이 보고에서는 최근의 단백질 공학 접근법 및 그 과제와 한계를 강조 및 요약하였다. 적절한 사례를 이용하여 UAA의 사용은 물론 방향적 진화, 합리적 설계, *de novo* 설계 및 반합리적 설계를 설명했다. 단백질 구조 및 고도로 복잡한 계산 알고리즘의 지속적으로 증가하는 데이터베이스를 사용할 수 있음에도 불구하고, 단백질 공학은 여전히 단백질 기능, 접힘, 유연성 및 구조적 변화로 인해 제한적이다. 반합리적 설계가 향상된 특징을 이용하여 단백질의 생산을 위해 유망한 접근법으로 발전할 것이다.

4. 참고문헌

Arnold, F. Directed enzyme evolution. Available from: http://www.che.caltech.edu/groups/fha/directed_evolution.html.

Ashworth, J.; Havranek, J. J.; Duarte, C. M.; Sussman, D.; Monnat, R. J., Jr.; Stoddard, B. L.; Baker, D. Computational redesign of endonuclease DNA binding and cleavage specificity. Nature 2006, 441 (7093), 656-9.

Badran, A. H.; Liu, D. R. *In vivo* continuous directed evolution. Curr Opin Chem Biol 2015, *24*, 1-10.

Brustad, E. M.; Arnold, F. H. Optimizing non-natural protein function with directed evolution. Curr Opin Chem Biol 2011, 15 (2), 201-10.

Buchholz, F. Engineering DNA processing enzymes for the postgenomic era. Curr Opin Biotechnol 2009, 20 (4), 383-9.

Champion, E.; Guerin, F.; Moulis, C.; Barbe, S.; Tran, T. H.; Morel, S.; Descroix, K.; Monsan, P.; Mourey, L.; Mulard, L. A.; Tranier, S.; Remaud-Simeon, M.; Andre, I. Applying pairwise combinations of amino acid mutations for sorting out highly efficient glucosylation tools for chemo-enzymatic synthesis of bacterial oligosaccharides. J Am Chem Soc 2012, 134 (45), 18677-88.

Cochran, F. V.; Wu, S. P.; Wang, W.; Nanda, V.; Saven, J. G.; Therien, M. J.; DeGrado, W. F. Computational de novo design and characterization of a four-helix bundle protein that selectively binds a nonbiological cofactor. J Am Chem Soc 2005, 127 (5), 1346-7.

Cox, V. E.; Gaucher, E. A. Molecular evolution directs protein translation using unnatural amino acids. Curr Protoc Chem Biol 2015, *7* (4), 223-8.

Cunha, K. C.; Rusu, V. H.; Viana, I. F.; Marques, E. T.; Dhalia, R.; Lins, R. D. Assessing protein conformational sampling and structural stability via de novo design and molecular dynamics simulations. Biopolymers 2015, 103 (6), 351-61.

Currin, A.; Swainston, N.; Day, P. J.; Kell, D. B. Synthetic biology for the directed evolution of protein biocatalysts: navigating sequence space intelligently. Chem Soc Rev 2014, *44* (5), 1172-239.

Dickinson, B. C.; Packer, M. S.; Badran, A. H.; Liu, D. R. A system for the continuous directed evolution of proteases rapidly reveals drug-resistance mutations. *Nat Commun* 2014, *5*, 5352.

Dwyer, M. A.; Looger, L. L.; Hellinga, H. W. Computational design of a biologically active enzyme. Science 2004, 304 (5679), 1967-71.

Eriksen, D. T.; Lian, J.; Zhao, H. Protein design for pathway engineering. J Struct Biol 2014, 185 (2), 234-42.

Fleishman, S. J.; Whitehead, T. A.; Ekiert, D. C.; Dreyfus, C.; Corn, J. E.; Strauch, E. M.; Wilson, I. A.; Baker, D. Computational design of proteins targeting the conserved stem region of influenza hemagglutinin. Science 2011, 332 (6031), 816-21.

Grunewald, J.; Tsao, M. L.; Perera, R.; Dong, L.; Niessen, F.; Wen, B. G.; Kubitz, D. M.; Smider, V. V.; Ruf, W.; Nasoff, M.; Lerner, R. A.; Schultz, P. G. Immunochemical termination of self-tolerance. Proc Natl Acad Sci U S A 2008, 105 (32), 11276-80.

Hart, D. J.; Waldo, G. S. Library methods for structural biology of challenging proteins and their complexes. Curr Opin Struct Biol 2013, *23* (3), 403-8.

Havranek, J. J. Specificity in computational protein design. J Biol Chem 2010, 285 (41), 31095-9.

Host, G. E.; Razkin, J.; Baltzer, L.; Jonsson, B. H. Combined enzyme and substrate design: grafting of a cooperative two-histidine catalytic motif into a protein targeted at the scissile bond in a designed ester substrate. Chembiochem 2007, 8 (13), 1570-6.

Huang, P. S.; Feldmeier, K.; Parmeggiani, F.; Fernandez Velasco, D. A.; Hocker, B.; Baker, D. *De novo* design of a four-fold symmetric TIM-barrel protein with atomic-level accuracy. *Nat Chem Biol* 2016, *12* (1), 29-34.

Jiang, L.; Althoff, E. A.; Clemente, F. R.; Doyle, L.; Rothlisberger, D.; Zanghellini, A.; Gallaher, J. L.; Betker, J. L.; Tanaka, F.; Barbas, C. F., 3rd; Hilvert, D.; Houk, K. N.; Stoddard, B. L.; Baker, D. De novo computational design of retro-aldol enzymes. Science 2008, 319 (5868), 1387-91.

Jo, M.; Jung, S. T. Engineering therapeutic antibodies targeting G-protein-coupled receptors. Exp Mol Med 2016, 48, e207

Kaplan, J.; DeGrado, W. F. De novo design of catalytic proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 2004, 101

(32), 11566-70.

Khan, F. I.; Wei, D. Q.; Gu, K. R.; Hassan, M. I.; Tabrez, S. Current updates on computer aided protein modeling and designing. *Int J Biol Macromol* 2016, *85*, 48-62.

Khersonsky, O.; Kiss, G.; Rothlisberger, D.; Dym, O.; Albeck, S.; Houk, K. N.; Baker, D.; Tawfik, D. S. Bridging the gaps in design methodologies by evolutionary optimization of the stability and proficiency of designed Kemp eliminase KE59. Proc Natl Acad Sci U S A 2012, 109 (26), 10358-63.

Kiss, G.; Celebi-Olcum, N.; Moretti, R.; Baker, D.; Houk, K. N. Computational enzyme design. Angew Chem Int Ed Engl 2013, 52 (22), 5700-25.

Koellhoffer, J. F.; Higgins, C. D.; Lai, J. R. Protein engineering strategies for the development of viral vaccines and immunotherapeutics. FEBS Lett 2013, 588 (2), 298-307.

Kuhlman, B.; Dantas, G.; Ireton, G. C.; Varani, G.; Stoddard, B. L.; Baker, D. Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy. Science 2003, 302 (5649), 1364-8.

Li, Y.; Drummond, D. A.; Sawayama, A. M.; Snow, C. D.; Bloom, J. D.; Arnold, F. H. A diverse family of thermostable cytochrome P450s created by recombination of stabilizing fragments. Nat Biotechnol 2007, 25 (9), 1051-6.

Liu, C. C.; Schultz, P. G. Adding new chemistries to the genetic code. Annu Rev Biochem 2010, 79, 413-44.

Magliery, T. J. Unnatural protein engineering: producing proteins with unnatural amino acids. Medicinal Chemistry Reviews 2005, 2, 303-323.

Marshall, S. A.; Lazar, G. A.; Chirino, A. J.; Desjarlais, J. R. Rational design and engineering of therapeutic proteins. Drug Discov Today 2003, 8 (5), 212-21.

Meyer, M. M.; Hochrein, L.; Arnold, F. H. Structure-guided SCHEMA recombination of distantly related beta-lactamases. Protein Eng Des Sel 2006, 19 (12), 563-70.

Otey, C. R.; Landwehr, M.; Endelman, J. B.; Hiraga, K.; Bloom, J. D.; Arnold, F. H. Structure-guided recombination creates an artificial family of cytochromes P450. PLoS Biol 2006, 4 (5), e112

Preiswerk, N.; Beck, T.; Schulz, J. D.; Milovnik, P.; Mayer, C.; Siegel, J. B.; Baker, D.; Hilvert, D. Impact of scaffold rigidity on the design and evolution of an artificial Diels-Alderase. Proc Natl Acad Sci U S A 2014, 111 (22), 8013-8.

Ravikumar, Y.; Nadarajan, S. P.; Yoo, T. H.; Lee, C. S.; Yun, H. Unnatural amino acid mutagenesis-based enzyme engineering. Trends Biotechnol 2015, *33* (8), 462-70.

Rothlisberger, D.; Khersonsky, O.; Wollacott, A. M.; Jiang, L.; DeChancie, J.; Betker, J.; Gallaher, J. L.; Althoff, E. A.; Zanghellini, A.; Dym, O.; Albeck, S.; Houk, K. N.; Tawfik, D. S.; Baker, D. Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. Nature 2008, 453 (7192), 190-5.

Steiner, K.; Schwab, H. Recent advances in rational approaches for enzyme engineering. Comput

Struct Biotechnol J 2012, 2, e201209010.

Siegel, J. B.; Zanghellini, A.; Lovick, H. M.; Kiss, G.; Lambert, A. R.; St Clair, J. L.; Gallaher, J. L.; Hilvert, D.; Gelb, M. H.; Stoddard, B. L.; Houk, K. N.; Michael, F. E.; Baker, D. Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular Diels-Alder reaction. Science 2010, 329 (5989), 309-13.

van Beek, H. L.; de Gonzalo, G.; Fraaije, M. W. Blending Baeyer-Villiger monooxygenases: using a robust BVMO as a scaffold for creating chimeric enzymes with novel catalytic properties. Chem Commun 2012, 48 (27), 3288-90.

Wong, T. S.; Tee, K. L.; Hauer, B.; Schwaneberg, U. Sequence saturation mutagenesis (SeSaM): a novel method for directed evolution. Nucleic Acids Res 2004, 32 (3), e26.

Woolfson, D. N.; Bartlett, G. J.; Burton, A. J.; Heal, J. W.; Niitsu, A.; Thomson, A. R.; Wood, C. W. *De novo* protein design: how do we expand into the universe of possible protein structures? Curr Opin Struct Biol 2015, *33*, 16-26.

Zanghellini, A. De novo computational enzyme design. Curr Opin Biotechnol 2014, 29, 132-8.

Zhan, P.; Song, Y.; Itoh, Y.; Suzuki, T.; Liu, X. Recent advances in the structure-based rational design of TNKSIs. Mol Biosyst 2014, 10 (11), 2783-99.