

(19)대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C07K 1/00 (2006.01)

C07K 1/02 (2006.01)

(11) 공개번호

10-2006-0117543

(43) 공개일자

2006년11월17일

(21) 출원번호 10-2005-0039464

(22) 출원일자 2005년05월11일

(71) 출원인 인하대학교 산학협력단
 인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자 구윤모
 서울 강남구 도곡2동 우성4차아파트 5동 203호
 이상목
 제주 서귀포시 회수동 792

(74) 대리인 이원희

심사청구 : 있음

(54) 이온성 액체를 이용하여 단백질을 재접힘시키는 방법

요약

본 발명은 이온성 액체를 이용하여 단백질을 재접힘시키는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 재접힘시키고자 하는 단백질 시료를 준비하는 단계 및 이온성 액체를 포함하는 재접힘 버퍼를 이용하여 단백질을 재접힘시키는 단계를 포함하는 이온성 액체를 이용하여 단백질을 재접힘시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 단백질 응집체를 재접힘시키는 방법은 종래의 공정에서 사용되는 용매를 대체할 수 있으며 또한, 이온성 액체의 특이적인 성질을 이용할 경우 분리 및 정제에도 효과를 볼 수 있어 산업발전에 이바지 할 수 있다.

대표도

도 2

색인어

이온성 액체, 단백질 재접힘, 단백질 재접힘 버퍼

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 DTT 농도에 따른 재접힘에 의한 라이소자임의 활성도를 나타낸 그래프이고,

도 2는 이온성 액체 및 요소(urea)를 이용한 재접힘 라이소자임 20 mg/ml의 활성도를 나타낸 그래프이고,

도 3은 이온성 액체 및 요소를 이용한 재접힘 라이소자임 50 mg/ml의 활성도를 나타낸 그래프이고,

도 4는 1-에틸-3-메틸이미다졸륨 테트라플루오로보레이트의 농도에 따른 재접힘 라이소자임의 활성도를 나타낸 그래프이고,

도 5는 1-에틸-3-메틸이미다졸륨 트리플루오로메탄설포네이트의 농도에 따른 재접힘 라이소자임의 활성도를 나타낸 그래프이고,

도 6은 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 테트라플루오로보레이트의 농도에 따른 재접힘 라이소자임의 활성도를 나타낸 그래프이다.

<도면의 주요부분에 대한 부호의 설명>

A : 1-에틸-3-메틸이미다졸륨 테트라플루오로보레이트를 포함하는 재접힘 버퍼

B : 1-에틸-3-메틸이미다졸륨 트리플루오로메탄설포네이트를 포함하는 재접힘 버퍼

C : 1-에틸-3-메틸이미다졸륨 메틸설포네이트를 포함하는 재접힘 버퍼

D : 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 테트라플루오로보레이트를 포함하는 재접힘 버퍼

E : 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 헥사플루오로포스페이트를 포함하는 재접힘 버퍼

F : 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 비스(트리플루오로메틸설포닐)이미드를 포함하는 재접힘 버퍼

G : 1-메틸-3-옥틸이미다졸륨 메틸설포네이트를 포함하는 재접힘 버퍼

H : 1-페닐프로필-3-메틸이미다졸륨 트리플루오로메탄설포네이트를 포함하는 재접힘 버퍼

I : 1-헥실-3-메틸이미다졸륨 헥사플루오로포스페이트를 포함하는 재접힘 버퍼

J : 요소를 포함하는 재접힘 버퍼

K : 이온성 액체 및 요소를 포함하지 않는 재접힘 버퍼

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 이온성 액체를 이용하여 단백질을 재접힘시키는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 이온성 액체를 포함하는 재접힘 버퍼를 이용하여 단백질을 재접힘시키는 단계를 포함하는 이온성 액체를 이용하여 단백질을 재접힘시키는 방법에 관한 것이다.

유전자 재조합 기술의 발달과 더불어 산업적으로 유용한 단백질을 대량으로 생산하기 위한 목적으로 미생물을 이용한 재조합 단백질 형태의 유용 유전자 산물을 대량 생산하려고 하는 시도가 많이 이루어지고 있다. 이러한 재조합 단백질을 생산하기 위해 이용되는 미생물로는 대장균이 유전적으로 가장 잘 알려져 있고, 발현 벡터가 다양하게 개발되어 있다. 이러한 대장균을 이용하여 단백질의 대량 생산을 위한 고농도의 세포 배양 기술이 개발되어 있고, 이러한 기술은 재조합 단백질 생산에 가장 많이 이용되고 있는 실정이다.

그러나, 이와 같은 미생물을 이용한 재조합 단백질을 대량 생산하는 경우 단백질의 3차 구조와 관련된 문제가 있다. 즉, 대장균에서 생산된 상당수의 재조합 단백질들이 활성이 없는 형태로 응집된 내포체(inclusion body)로 존재하는 경우가 흔

히 발생한다. "내포체"란 단백질 접힘이 제대로 이루어지지 못하여 올바른 단백질 3차 구조가 형성되지 않기 때문에 생기는 균체 내의 비수용성의 침전물을 말한다. 이러한 내포체는 단백질 접힘 과정 중 부분적으로 접혀진 동역학적 중간물질 분자들 사이에 노출된 소수성 부위들간의 비공유성 결합에 의해 접힘 과정이 비정상적인 경로로 진행되어 결국 응집현상이 유발된다고 밝혀진 바 있다 (Cleland, T.L., Wang, I.C., *Biochemistry*, **29**, 11072-11078, 1990).

현재, 재조합 단백질의 생산에 있어서, 상기의 내포체 형태로 발현되는 재조합 단백질을 활성을 가진 단백질로 회수하는 재접힘(refolding) 기술이 잘 발전되어 있다. 이러한 재접힘 공정은 변성제(denaturant)를 이용한 내포체의 가용화 단계와 단백질의 올바른 접힘 유도를 위한 변성제 제거 공정으로 구성된다.

상기 변성제의 제거 방법에 따라 단순 희석, 단계적 희석, 유가식 희석, 투석, 겔 여과 크로마토그래피 등의 방법이 사용되고 있다. 전통적인 방법인 단순희석법에 의한 단백질 재접힘 방법은 일반적으로 시료를 4 내지 100배 이상의 부피로 희석하는 과정이 필요하기 때문에, 반응을 위하여 커다란 반응기(reactor)가 필요하다는 점, 매우 저농도의 단백질 농도에서만 적용 가능하여 그 수율이 낮고, 공정에서 처리해야 하는 부피가 매우 크기 때문에 농축 공정을 요구하여 재조합 단백질 생산 및 정제비용이 높다는 점 및 무작위적인 이황화결합이 발생할 수 있다는 점 등이 단점으로 지적되고 있다.

이러한 단순희석법에 있어서의 문제점을 해결하기 위하여, 최근에는 크기 배제 회분식 크로마토그래피를 이용한 단백질 재접힘 방법이 개발되어 활용되고 있다. 이러한 크기 배제 회분식 크로마토그래피(size exclusion batch chromatography)를 이용한 단백질 재접힘 방법은 컬럼 크로마토그래피 방법을 사용하기 때문에 원하는 버퍼 조성으로 치환이 가능하다는 점과 재생이 불완전하게 이루어진 단백질 부분 및 재접힘 공정에 사용된 단백질 변성제(denaturant) 등의 제거가 용이하다는 점과 같은 장점이 있다. 또한, 단순희석 방법으로는 일반적으로 10 mg/ml 이상의 농도에서는 단백질의 재접힘 공정이 어려운 것으로 알려져 있는 것에 비하여 크기 배제 회분식 크로마토그래피 방법에 의한 재접힘 공정은 80 mg/ml 이상의 단백질 농도에서도 재접힘 공정이 가능한 것으로 알려져 있다. 특히, 크기 배제 회분식 크로마토그래피 방법의 경우 단순희석 방법에 비하여 전체 공정의 자동화가 가능하여 재접힘 공정의 표준화 및 효율적인 관리가 가능하다는 장점도 있다.

상기에서 언급한 단순희석법 또는 회분식 크로마토그래피에 의한 단백질 재접힘 공정에서는 재접힘 버퍼로서 요소를 포함하는 버퍼를 사용한다. 요소는 단백질을 재접힘시키는 공정에서 중요한 역할을 한다. 앞서 언급한 바와 같이, 미생물을 이용한 재조합 단백질을 대량 생산하는 경우 미생물에서 생산된 상당수의 재조합 단백질들이 활성이 없는 형태로 응집된 내포체로 존재하는 경우가 흔히 발생하게 된다. 따라서, 단백질을 재접힘시키기 위해서는 변성제를 이용하여 재조합 대장균에 의해 생산된 단백질 내포체를 풀어주는(unfolding) 과정이 필요하게 된다. 이를 위해 요소가 주로 사용된다. 예를 들면, 재조합 대장균에 의해 생산된 내포체를 풀어주기 위해 8 M의 요소를 사용하고, 희석과정을 거쳐 2 M의 요소를 사용할 때 높은 재접힘 수율을 나타내는 것으로 알려져 있다.

한편, 소금과 같이 금속 양이온과 비금속 음이온으로 이루어진 이온성 염 또는 염화합물이 통상 800 °C 이상의 고온에서 녹는 것과는 달리 100 °C 이하의 온도에서 융점이 형성되어 있는 염이나 염화합물을 이온성 액체라고 하며, 특히 상온에서 액체로 존재하는 이온성 액체를 상온 이온성 액체(room temperature ionic liquid)라고 한다. 이러한 이온성 액체는 유기 양이온과 음이온으로 구성되어 있으며 양이온으로는 디알킬이미다졸륨, 알킬피리디늄, 4급 암모늄, 4급 포스포늄 등이 있고, 음이온으로는 NO_3^- , BF_4^- , AlCl_4^- , Al_2Cl_7^- , AcO^- , PF_6^- , TfO^- (trifluoromethanesulfonate, CF_3SO_3^-), Tf_2N^-

(trifluoromethanesulfonylamide, $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}$), $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CO}_2^-$ (L-lactate), SbF_6^- 등이 있다. 이온성 액체의 특성으로는 강유전성, 비가연성에 의한 우수한 열적 안정성, 비휘발성, 무독성, 이온전도도를 가지고 있고 높은 극성을 이용하여 무기 및 유기 금속 화합물들을 쉽게 용해시킬 수 있으며 광범위한 온도 범위에서 액체로 존재할 수 있음을 들 수 있다.

현재, 이러한 특성을 갖는 이온성 액체는 촉매, 분리, 전기화학 등의 광범위한 화학분야에서 응용되고 있다. 예를 들면, 이온성 액체를 이용한 분리, 유기금속화합물을 함유한 고활성 촉매로서의 이온성 액체의 합성 및 응용에 대한 연구, 이온성 액체를 첨단 유기합성 기술인 광학활성 화합물 제조기술 개발에의 적용, 이온성 액체를 고정화 촉매로 이용하여 이차 알코올의 트랜스에스테르화(transesterification) 반응을 통한 화합물의 합성 등의 분야에서 높은 활성과 재사용성 및 친환경성 등으로 주목을 받고 있다.

이러한 이온성 액체는 균일계 촉매반응의 용매, 촉매, 분리매개체, 나노화학, 전해질, 초임계 유체-이온성 액체 등을 연계하는 방법 등에서 그 이용이 고려되고 있으나, 아직까지 생물공학에서 사용되는 예는 극히 제한적이다.

종래 보고된 연구결과에 의하면 단백질 재접힘을 위한 재접힘 버퍼로서 상기 요소가 포함된 재접힘 버퍼 중에 이온성 액체로서 0.54 M의 질산 에틸암모늄(ethylammonium nitrate)을 첨가제로 사용하여 라이소자임의 재접힘 효율을 90%까지 향상시킨 보고가 있다(Catherin A. Summers and Robert A. Flowers II, Protein Science 9, 2001-2008, 2000년).

그러나, 단백질 재접힘 공정에 사용되는 재접힘 버퍼에 있어서 요소를 완전히 대체하여 이온성 액체를 사용할 경우에는 상온에서 이온성 액체는 기화되지 않고 100 °C에서도 끓지 않기 때문에 물로부터 손쉽게 분리할 수 있다. 따라서 재접힘 공정 후 이온성 액체를 손쉽게 회수하여 재활용할 수 있을 것으로 기대된다.

이에, 본 발명자들은 단백질 재접힘 버퍼에 포함되어 재접힘 과정에 관여하는 요소를 완전히 대체할 수 있는 이온성 액체를 선별하는 시도를 하였다. 그리하여 이러한 이온성 액체를 이용하여 단백질 재접힘 과정을 수행하고 종래의 방법에 의한 수율에 상응하는 수율을 얻어냄으로써 추후 이온성 액체를 이용하여 단백질 재접힘 공정을 수행할 수 있음을 밝히고 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 이온성 액체를 이용하여 단백질을 재접힘시키는 방법을 제공함에 있다.

발명의 구성 및 작용

상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 단백질을 재접힘시키는 방법에 있어서, 재접힘시키고자 하는 단백질 시료를 준비하는 단계; 및 이온성 액체를 포함하는 재접힘 버퍼를 이용하여 단백질을 재접힘시키는 단계를 포함하는 이온성 액체를 이용하여 단백질을 재접힘시키는 방법을 제공한다.

본 발명에 의하여 재접힘시키고자 하는 단백질의 종류에는 특별한 제한이 있는 것은 아니며, 단순화식법 또는 회분식 크로마토그래피 등에 의해 분리될 수 있는 모든 단백질에 적용이 가능하다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 재접힘시키고자 하는 단백질 시료로서 환원 및 변성된 라이소자임(lysozyme)을 사용하였다.

또한, 단백질 재접힘 버퍼로는 Tris-HCl(pH 8.2), EDTA, 환원된 글루타치온, 산화된 글루타치온으로 구성되는 버퍼에 하기의 이온성 액체를 포함하는 것을 사용할 수 있다. 본 발명에 따른 상기 재접힘 버퍼는 단백질의 재접힘 효율을 최적화하고 올바른 이황화결합을 형성시키기 위해 첨가제로서 변성제 또는 환원제를 포함하는 것이 바람직하다.

본 발명에 따른 상기 이온성 액체는 친수성 이온성 액체인 것이 바람직하다. 소수성 이온성 액체이더라도 온도, 다른 이온의 농도 등에 따라 물에 녹는 현상을 나타내므로 본 발명에 따른 이온성 액체를 포함하는 재접힘 버퍼로서 사용될 수 있다. 예를 들면, 1-에틸-3-메틸이미다졸륨 테트라플루오로보레이트(Emim[BF₄]), 1-에틸-3-메틸이미다졸륨 트리플루오로메탄설포네이트(Emim[CF₃SO₃]), 1-에틸-3-메틸이미다졸륨 메틸설페이트(Emim[CH₃SO₄]) 또는 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 테트라플루오로보레이트(Bmim[BF₄])에 있어서, 앞의 세가지 이온성 액체는 친수성 이온성 액체이고 뒤의 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 테트라플루오로보레이트(Bmim[BF₄])는 온도에 따라서 친수성과 소수성 성질을 모두 갖는 이온성 액체이다.

본 발명에 따른 상기 이온성 액체는 바람직하게는 1-에틸-3-메틸이미다졸륨 테트라플루오로보레이트(Emim[BF₄]), 1-에틸-3-메틸이미다졸륨 트리플루오로메탄설포네이트(Emim[CF₃SO₃]), 1-에틸-3-메틸이미다졸륨 메틸설페이트(Emim[CH₃SO₄]), 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 테트라플루오로보레이트(Bmim[BF₄]), 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 헥사플루오로포스페이트(Bmim[PF₆]), 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 비스(트리플루오로메틸설포닐)이미드(Bmim[(CF₃SO₂)₂N]), 1-메틸-3-옥틸이미다졸륨 메틸설페이트(Omim[CH₃SO₄]), 1-페닐프로필-3-메틸이미다졸륨 트리플루오로메탄설포네이트(Pmim[CF₃SO₃]) 또는 1-헥실-3-메틸이미다졸륨 헥사플루오로포스페이트(Hmim[PF₆]) 및 그 혼합물 가운데 어느 하나일 수 있다. 이 가운데 1-에틸-3-메틸이미다졸륨 테트라플루오로보레이트, 1-에틸-3-메틸이미다졸륨 트리플루오로메탄설포네이트 또는 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 테트라플루오로보레이트가 재접힘 효율 향상의 관점에서 더욱 바람직하다.

본 발명에 따른 상기 이온성 액체의 농도는 소정 농도 범위를 갖도록 특정될 수 있다. 이온성 액체의 농도는 5 내지 35%(v/v)가 바람직하며, 10 내지 25%(v/v)가 더욱 바람직하다. 실시예에서 보는 바와 같이 상기 범위를 벗어나는 경우에는 재접힘 효율이 크게 저하되는 것을 알 수 있다.

이하, 첨부된 도면들을 참조하여 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.

도 1에서는 본 발명의 일 실시형태에 따른 재접힘 라이소자임의 활성화도에 미치는 DTT(dithiothreitol) 농도의 영향을 요소를 재접힘 버퍼로 사용한 경우와 비교하여 보여주고 있다. 이온성 액체를 포함하는 단백질 재접힘 버퍼는 첨가제로서 변성제 또는 환원제를 포함하는 것이 바람직하다. 그 이유는 단백질의 재접힘 효율을 최적화하고 올바른 이황화결합을 형성시키기 위함이다. 일반적으로 내포체를 용해 및 환원시키기 위해서는 8 M의 요소와 일정량의 DTT가 필요하다. 여기서 DTT는 환원제로서의 역할을 함으로써 풀어진 내포체가 원하지 않는 수소결합을 형성하는 것을 막는다. 이 때 재접힘시키 고자 하는 단백질 시료용액을 준비하는 경우, 시료용액 내의 DTT의 농도에 따라 단백질이 용해 및 환원되는 정도의 차이는 없는 것으로 알려져 있다. 그러나, DTT가 단백질 시료용액에 잔존할 경우 그 잔존 농도에 따라 단백질의 재접힘을 저하시킬 수 있기 때문에 단백질을 재접힘시키는 과정에서는 DTT의 농도를 최적화하는 것이 요구된다. 본 발명의 일 실시형태에 따른 라이소자임의 재접힘 효율을 높이기 위한 DTT의 농도는 도 1에서 보는 바와 같이 0.75 mM 이하가 바람직하고, 0.3 mM 이하가 더욱 바람직하다.

도 2 및 도 3에서는 요소를 이용한 재접힘 라이소자임 및 본 발명의 실시형태에 따른 이온성 액체를 포함하는 재접힘 버퍼에 의해 재접힘된 라이소자임의 활성화도를 요소를 포함하는 재접힘 버퍼 및 상기 양자를 모두 포함하지 않는 버퍼에 의해 재접힘된 결과와 비교하여 보여주고 있다. 친수성 이온성 액체들은 대체적으로 라이소자임 재접힘 활성이 요소와 비슷하게 나타나는 것으로 밝혀졌다. 이 결과에 대해서는 실시예에서 더욱 구체적으로 설명하기로 한다.

도 4 내지 도 6은 본 발명의 일 실시형태에 따른 재접힘 라이소자임의 활성화도에 상기 이온성 액체인 Emim[BF₄](A), Emim[CF₃SO₃](B) 또는 Bmim[BF₄](D)의 농도가 미치는 영향을 요소를 재접힘 버퍼로 사용한 경우와 비교하여 보여주고 있다. 라이소자임의 재접힘 효율은 도 4에 나타난 바와 같이, Emim[BF₄](A)의 농도가 5%(v/v) 이상 35%(v/v) 이하인 것이 바람직하고, 10%(v/v) 이상 25%(v/v) 이하가 더욱 바람직하다. Emim[CF₃SO₃](B)의 경우에는 도 5에 나타난 바와 같이, 10%(v/v) 이상 35%(v/v) 이하인 것이 바람직하고 15%(v/v) 이상 25%(v/v) 이하가 더욱 바람직하다. 또한, Bmim[BF₄](D)의 경우에는 도 6에 나타난 바와 같이, 5%(v/v) 이상 35%(v/v) 이하가 바람직하며 10%(v/v) 이상 25%(v/v) 이하가 더욱 바람직하다.

이하, 본 발명을 실시예 및 비교예에 의하여 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

<단백질 재접힘의 효율에 미치는 DTT 농도의 영향 측정>

단백질 재접힘 효율을 높이기 위한 재접힘 단백질 시료 내의 최적 DTT 농도범위를 결정하기 위한 하기의 실험을 실시하였다.

단백질 시료로는 용해 및 환원된 단백질을 사용하기 위하여, 8 M 요소 및 0.015, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125 M DDT를 각각 포함하는 0.1 M Tris-HCl(pH 8.6) 용액에 라이소자임을 상온에서 10시간 동안 방치한 용액을 사용하였다. 단백질 재접힘 버퍼로는 0.1 M Tris-HCl(pH 8.2), 1 mM EDTA, 5 mM 환원된 글루타치온, 0.5 mM 산화된 글루타치온, 2 M 요소로 구성되는 버퍼를 사용하였다. 라이소자임의 활성화는 0.1 M 인산칼륨(pH 6.2) 버퍼에 *M.lysodeikticus*를 0.5 mg/ml가 되도록 용해하여 상온에서 450 nm 흡광도의 감소를 측정함으로써 결정하였다. 라이소자임의 용해 및 환원되는 정도는 DTT의 농도에 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 이를 바탕으로 상기 라이소자임 시료를 100배 희석하여 단순희석법에 의한 재접힘 실험을 실시하였다. 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 DTT 농도가 증가함에 따라 재접힘되는 라이소자임의 효율이 영향을 받음을 알 수 있었다. 0.25 mM 정도까지는 라이소자임 재접힘 효율에 대한 DTT 농도의 영향이 거의 없음을 알 수 있고, 0.75 mM 정도까지는 완만하게 영향을 미치는 것을 알 수 있다. 그러나 DDT 농도가 0.8 mM 내외에서는 급격하게 재접힘 효율이 영향을 받으며, 1 mM 이상일 때는 라이소자임의 활성이 거의 나타나지 않는 결과를 보임으로써 재접힘 효율이 크게 영향을 받는 것으로 나타났다. 이를 바탕으로 단백질 재접힘 과정에서의 DTT의 농도를 최적화하여 실시예 및 비교예 실험을 하였다.

<실시예 1> 이온성 액체를 포함하는 재접힘 버퍼를 이용한 라이소자임 20 mg/ml의 재접힘

단백질 시료로는 용해 및 환원된 단백질을 사용하기 위하여, 8 M 요소 및 0.05 M DTT를 포함하는 0.1 M의 Tris-HCl (pH 8.6) 용액에 라이소자임 20 mg/ml를 10시간 동안 상온에서 방치한 용액을 사용하였다. 단백질 재접힘 버퍼로는 0.1 M Tris-HCl(pH 8.2), 1 mM EDTA, 5 mM 환원된 글루타치온, 0.5 mM 산화된 글루타치온, 12%(v/v) 이온성 액체를 포함하는 버퍼를 사용하였다. 상기 이온성 액체로는 Emim[BF₄](A), Emim[CF₃SO₃](B), Emim[CH₃SO₄](C), Bmim[BF₄](D), Bmim[PF₆](E), Bmim[(CF₃SO₂)₂N](F), Omim[CH₃SO₄](G), Pmim[CF₃SO₃](H) 및 Hmim[PF₆](I)를 사용하였다. 또한, 상기 이온성 액체 대신 2 M 요소가 포함된 재접힘 버퍼(J)를 사용하여 라이소자임을 재접힘시킴으로써 기존의 재접힘 버퍼에 의한 재접힘 효율 즉, 재접힘 라이소자임의 활성과 비교할 수 있는 자료를 얻기 위한 실험을 병행하였다. 환원된 라이소자임을 재접힘시키는 단계에서의 DTT 농도는 0.25 mM이었고 이 농도에서 라이소자임의 재접힘이 영향을 받지 않는 것으로 밝혀졌다. 도 2에는 상기 이온성 액체를 포함하는 재접힘 버퍼를 이용하여 재접힘된 라이소자임의 활성도를 측정하여 나타내었다. 도 2에서 보는 바와 같이, 친수성 이온성 액체들은 라이소자임 재접힘 활성이 대체로 요소와 비슷하게 나타났으나, 소수성 이온성 액체들은 활성이 거의 없는 것으로 나타났다. 이 결과로부터 친수성 이온성 액체들은 라이소자임 재접힘에 긍정적인 영향을 주고 있음을 알 수 있다.

<실시예 2> 이온성 액체를 포함하는 재접힘 버퍼를 이용한 라이소자임 50 mg/ml의 재접힘

실시예 1에서와 동일한 방법으로 라이소자임 50 mg/ml의 재접힘 실험을 실시하였다. 또한, 라이소자임 재접힘 버퍼에 포함되는 이온성 액체도 실시예 1에서와 동일한 것을 사용하였다. 다만, 용해 및 환원된 라이소자임 시료를 준비하기 위한 DTT 농도는 0.15 M로 하였고, 재접힘 버퍼 내에서의 DTT 농도는 0.3 mM 정도까지 희석하여 유지하였다. 도 3에는 상기 이온성 액체를 포함하는 재접힘 버퍼를 이용하여 재접힘된 라이소자임의 활성도를 측정하여 나타내었다. 실시예 1에서와 마찬가지로 친수성 이온성 액체들은 라이소자임 재접힘 활성이 대체로 요소와 비슷하게 나타났으나, 소수성 이온성 액체들은 활성이 거의 없는 것으로 나타났다. 따라서, 친수성 이온성 액체들은 라이소자임 재접힘에 긍정적인 영향을 주고 있음을 다시 한 번 확인할 수 있었다.

<실시예 3> 라이소자임 재접힘 효율과 이온성 액체의 농도와의 관계

실시예 1 및 실시예 2의 결과로부터 밝혀진 라이소자임 재접힘 효율이 우수한 이온성 액체 Emim[BF₄](A), Emim[CF₃SO₃](B) 및 Bmim[BF₄](D)를 이용하여 재접힘 버퍼 내의 이온성 액체의 농도가 라이소자임의 재접힘 효율에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험을 실시하였다. 용해 및 환원된 라이소자임 시료를 준비하기 위한 DTT의 농도와 재접힘 버퍼 내의 DTT의 농도는 실시예 2에서와 동일하게 하였고, 상기 이온성 액체의 농도만을 달리하여 재접힘 라이소자임의 활성도를 측정하고 그 결과를 도 4 내지 도 6에 나타내었다.

Emim[BF₄](A)의 농도가 5%(v/v) 이상 35%(v/v) 이하인 범위에서 재접힘 활성이 대체로 60% 이상이었으며 15%(v/v)에서 87%로 최대였다(도 4). Emim[CF₃SO₃](B)의 경우에는 10%(v/v) 이상 35%(v/v) 이하인 범위에서 재접힘 활성이 20% 이상이었으며 21%(v/v)에서 49%로 최대였다(도 5). 또한, Bmim[BF₄](D)의 경우에는 5%(v/v) 이상 35%(v/v) 이하인 범위에서 재접힘 활성이 대체로 60% 이상이었으며 12%(v/v)에서 91%로 최대였다(도 6).

<비교예> 요소를 포함하는 재접힘 버퍼 및 요소 및 이온성 액체를 모두 포함하지 않는 재접힘 버퍼를 이용한 라이소자임의 재접힘

실시예 1 및 2와 동일한 방법 및 조건하에서 실시예 1 및 2의 결과와 비교하기 위하여 요소를 포함한 재접힘 버퍼(J) 및 이온성 액체와 요소를 모두 포함하지 않는 재접힘 버퍼(K)에 의해 재접힘된 라이소자임의 활성도를 측정하여 도 2 및 도 3에 함께 나타내었다. 요소 및 이온성 액체를 모두 포함하지 않는 재접힘 버퍼(K)의 활성은 20% 내외 정도로 측정되었고, 요소를 포함하는 재접힘 버퍼에 의한 라이소자임의 재접힘 활성은 재접힘 활성이 우수한 이온성 액체를 사용한 경우와 비교할 때 비슷한 결과를 보였다.

발명의 효과

따라서, 본 발명은 단백질 재접힘 과정에서 단백질 재접힘 버퍼에 포함되는 요소를 완전히 배제하고, 그 대신에 이온성 액체를 사용하여 요소를 포함하는 재접힘 버퍼에 의한 단백질 재접힘 효율에 상응하는 효율로 단백질을 재접힘시킬 수 있다.

요소를 대체할 수 있는 이온성 액체로는 특히, 친수성 이온성 액체가 효과적이며 일부 소수성 이온성 액체들도 요소 대체 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. 단백질을 대량으로 생산 또는 회수하는 공정에 본 발명을 적용한다면 이온성 액체가 갖는 용매로서의 청정성, 무독성 및 재사용성 등으로 인하여 단백질 재접힘 또는 회수 공정은 보다 환경친화적인 산업으로 전환될 수 있을 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

단백질을 재접힘시키는 방법에 있어서,

재접힘시키고자 하는 단백질 시료를 준비하는 단계; 및

이온성 액체를 포함하는 재접힘 버퍼를 이용하여 단백질을 재접힘시키는 단계를 포함하는 이온성 액체를 이용하여 단백질을 재접힘시키는 방법.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 재접힘 버퍼는 단백질의 재접힘 효율을 최적화하고 올바른 이황화결합을 형성시키기 위해 첨가제로서 변성제 또는 환원제를 포함하는 것을 특징으로 하는 이온성 액체를 이용하여 단백질을 재접힘시키는 방법.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 상기 이온성 액체는 친수성 이온성 액체인 것을 특징으로 하는 이온성 액체를 이용하여 단백질을 재접힘시키는 방법.

청구항 4.

제 1항에 있어서, 상기 이온성 액체는 1-에틸-3-메틸이미다졸륨 테트라메탄플루오로보레이트, 1-에틸-3-메틸이미다졸륨 트리플루오로메탄설포네이트, 1-에틸-3-메틸이미다졸륨 메틸설페이트, 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 테트라플루오로보레이트, 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 헥사플루오로포스페이트, 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 비스(트리플루오로메틸설포닐)이미드, 1-메틸-3-옥틸이미다졸륨 메틸설페이트, 1-페닐프로필-3-메틸이미다졸륨 트리플루오로메탄설포네이트 또는 1-헥실-3-메틸이미다졸륨 헥사플루오로포스페이트 및 그 혼합물 가운데 어느 하나인 것을 특징으로 하는 이온성 액체를 이용하여 단백질을 재접힘시키는 방법.

청구항 5.

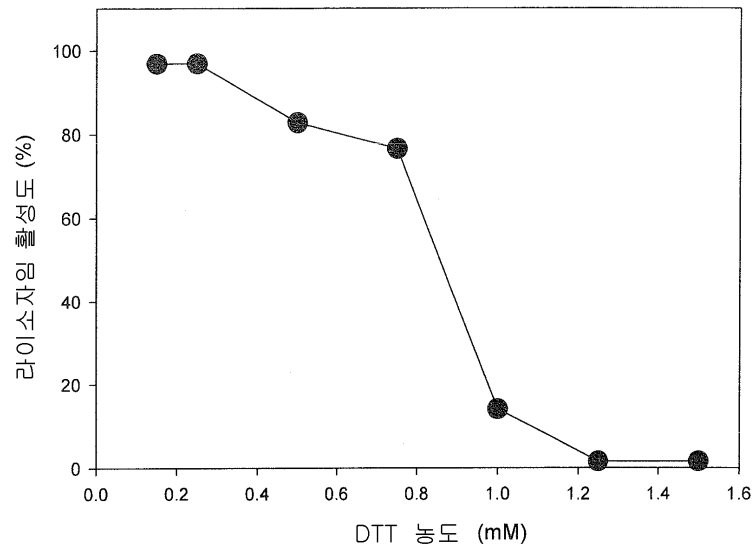
제 4항에 있어서, 상기 이온성 액체의 농도는 5 내지 35%(v/v)인 것을 특징으로 하는 이온성 액체를 이용하여 단백질을 재접힘시키는 방법.

청구항 6.

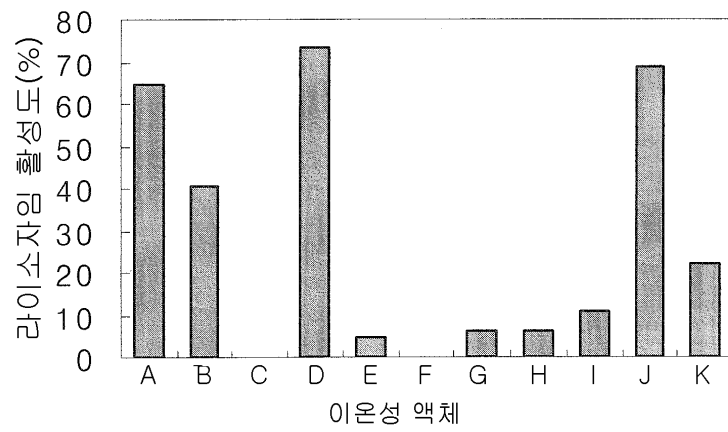
제 5항에 있어서, 상기 이온성 액체의 농도는 10 내지 25%(v/v)인 것을 특징으로 하는 이온성 액체를 이용하여 단백질을 재접힘시키는 방법.

도면

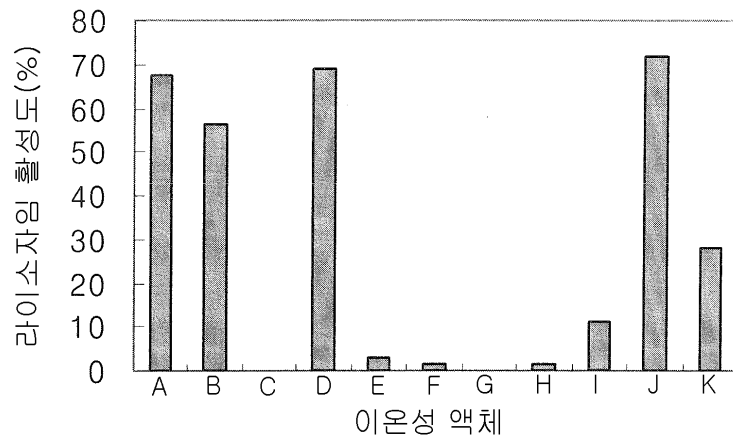
도면1



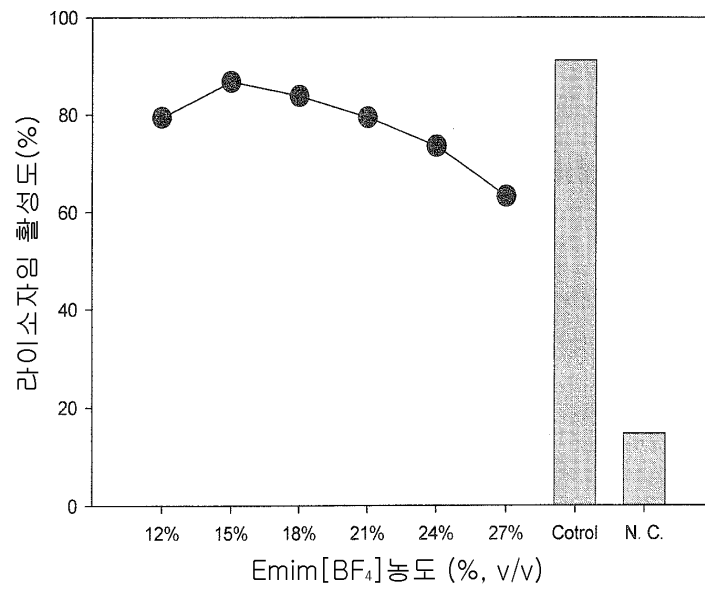
도면2



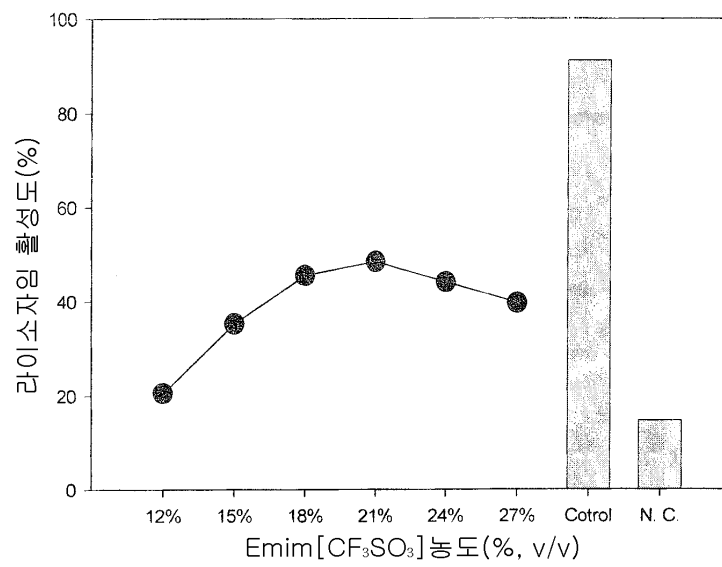
도면3



도면4



도면5



도면6

