

AI 설계 단백질 바인더 Wet-lab 검토 매뉴얼 : 구조에서 실제 발현까지

AI 단백질 엔지니어링 연구팀

2026년 7월 13일

요약

AI 모델(AlphaFold, RoseTTAFold, RFdiffusion 등)이 예측한 높은 인터페이스 신뢰도($ipTM$, pTM)는 단백질 간의 이론적 결합 가능성을 나타낼 뿐, 실제 세포 내에서의 발현(Expression), 가용화(Solubility), 정제(Purification) 및 비특이적 결합(Non-specific binding) 방지를 보장하지 않습니다. 본 매뉴얼은 계산과학적으로 도출된 바인더 후보물질을 Wet-lab 실험에 도입하기 전, 생물물리학적 병목 현상을 방지하기 위해 반드시 수행해야 하는 구조 검토 및 서열 엔지니어링 지침을 제공합니다.

1 AI 지표의 함정과 Wet-lab 실패 요인 분석

AI 디자인 도구는 주로 결합 자유 에너지(ΔG)를 최적화하거나 기하학적 상보성을 극대화하는 방향으로 단백질을 설계합니다. 이 과정에서 다음과 같은 잠재적 실패 요인이 간과되기 쉽습니다.

- **용해도 저하 및 봉입체(Inclusion Body) 형성:** 단백질 표면의 국소적 소수성 노출로 인해 번역(Translation) 직후 응집(Aggregation) 발생.
- **비특이적 결합(Non-specific Binding):** 지나치게 소수성이 강하거나 극단적인 전하를 띤 바인더가 타겟 외 세포 성분이나 멤브레인에 부착.
- **발현 차단(Low Expression Yield):** 숙주 세포가 선호하지 않는 코돈 사용, 혹은 mRNA 이차구조 형성으로 인한 번역 효율 저하.
- **접힘 오류(Misfolding) 및 분해(Degradation):** 숙주 세포 내 프로테아제(Protease) 표적 서열 존재 또는 비천연(Non-native) 이황화 결합 유도로 인한 구조 불안정화.

2 단백질 표면 소수성 패치(Hydrophobic Patch) 분석 및 완화 가이드

바인더 설계 시 표면 결합 면적을 넓히기 위해 소수성 잔기(Trp, Phe, Tyr, Leu, Ile, Val)를 밀집시키는 경향이 있습니다. 이는 용해도를 심각하게 떨어뜨리는 주원인입니다.

2.1 소수성 패치 식별 방법

1. 공간적 응집 경향성(Spatial Aggregation Propensity, SAP) 분석:

- 잔기별로 노출된 표면적(SASA)과 주변 탄소 원자의 밀도를 계산하여 용매에 노출된 소수성 잔기군(Patch)을 정량화합니다.
- SAP 값이 +0.5 이상인 영역은 응집 취약 지역으로 분류합니다.

2. PyMOL을 이용한 시각화:

- Color h 스크립트 또는 Eisenberg 소수성 척도를 적용하여 표면의 소수성 잔기가 노출되어 결합되어 있는지 분석합니다.
- 타겟 단백질과의 결합 인터페이스(Paratope) 바깥쪽 표면에 큰 소수성 패치가 형성되어 있다면 최우선 수정 대상입니다.

2.2 소수성 패치 완화 및 엔지니어링 가이드

- 인터페이스 외부 잔기 치환(Peripheral Mutation):

- 결합력에 직접 참여하지 않는 바인더의 배면(Backside) 및 측면 표면에 노출된 소수성 잔기(예: Leu, Ile)를 친수성/전하성 잔기(예: Ser, Thr, Asp, Glu, Lys)로 치환합니다.
- 추천 치환 패턴: *Leu* → *Ser*, *Phe* → *Thr*, *Val* → *Glu*

- 인터페이스 경계면 제어:

- 결합 인터페이스 내부의 소수성 코어는 유지하되, 인터페이스를 둘러싸고 있는 '경계 고리(Rim)' 구역에 친수성 잔기(Arg, Lys, Glu, Asp)를 배치하여 '친수성 실드(Hydrophilic Shield)' 효과를 유도합니다.

3 전하량(pI) 조절 및 정전기적 표면 분석을 통한 용해도 개선

단백질의 알짜 전하(Net Charge)와 등전점(pI)은 수용액 내에서의 분산성과 정전기적 반발력에 결정적인 영향을 미칩니다.

3.1 pI와 버퍼 pH의 매칭 이론

단백질은 자신의 등전점과 동일한 pH를 가진 완충용액 내에서 알짜 전하가 0이 되며, 이때 정전기적 반발력이 사라져 가장 쉽게 응집(pI 침전)됩니다.

- **기본 규칙:** 실험에서 사용할 정제/결정화 완충용액의 pH와 설계된 단백질의 이론적 pI 사이에 최소 1.0 ~ 1.5 단위 이상의 차이를 확보해야 합니다.

$$|pH_{buffer} - pI_{protein}| \geq 1.0 \quad (1)$$

- 일반적인 대장균 정제 버퍼(pH 7.4 ~ 8.0)를 사용하는 경우, 단백질의 pI가 7.0 ~ 8.5 범위에 위치하면 용해도가 극도로 저하됩니다.

3.2 전하량 조절 엔지니어링 전략

1. 표면 전하 비대칭 완화(Charge Supercharging):

- 바인더 표면에 특정 부호의 전하가 지나치게 밀집되어 있으면(예: 양전하 패치), 바인더 간 정전기적 반발력은 우수하나 DNA/RNA 등 음전하를 띤 숙주 성분과 비특이적 결합을 일으켜 발현 효율이 저하됩니다.
- 바인더 표면 전체에 양전하와 음전하가 균일하게 분포하도록 설계하되, 알짜 전하는 가급적 약한 음전하(예: Net Charge -3 ~ -8 at pH 7.4)를 띠도록 유도하는 것이 대장균 세포질 발현에 가장 유리합니다.

2. 루프(Loop) 영역의 전하 삽입:

- 구조적 유연성이 높은 루프나 턴(Turn) 영역에 Asp(D) 또는 Glu(E) 잔기를 추가 배치하여 바인더 전반의 용해도를 능동적으로 개선합니다.

4 발현 및 정제 최적화를 위한 구조/서열 체크리스트

실제 Wet-lab에 들어가기 전, 최종 디자인 서열에 대해 아래 체크리스트를 검토하여 발생할 수 있는 병목 현상을 차단하십시오.

5 단계별 Wet-lab 실험 검증 파이프라인

설계된 바인더의 실험적 타당성을 효율적으로 검증하기 위해 다음과 같은 점진적 스크리닝 파이프라인을 구축하십시오.

1단계: 소규모 테스트 (Small-scale Expression Screen)

대장균 BL21(DE3) 기준 1mL ~ 10mL 소량 배양 후, 가용성 분획(Soluble Fraction)과 불용성 분획(Pellet)을 SDS-PAGE로 비교 분석하여 발현 양상을 파악합니다.

2단계: 가용성 확인 및 1차 정제 (Affinity Chromatography)

His-tag 등을 이용한 IMAC 정제를 진행하고, 정제 완충용액 상에서 단백질 농도를 1 mg/mL 이상으로 농축했을 때 자발적 침전이 발생하는지 면밀하게 관찰합니다.

표 1: 발현 및 정제 최적화 사전 체크리스트

분류	검토 항목	판단 기준 및 대응 방안
이황화 결합	세포질 발현 시 Disulfide bond 존재 여부	대장균 세포질은 환원 환경이므로 형성이 어려움. Origami/SHuffle 숙주 사용 또는 가용성 태그(Trx, GST) 융합.
구조 유연성	고도로 유연한 Unstructured 꼬리 (N/C-Terminus)	말단의 긴 무정형(Disordered) 영역은 단백질 분해 효소의 표적이 됨. 해당 영역 절단(Truncation) 또는 링커 길이 최적화.
코돈 최적화	발현 숙주(E. coli / HEK293 등) 맞춤형 코돈	야생형 서열을 그대로 쓰면 희귀 코돈으로 인해 번역 중단 발생. Codon Adaptation Index (CAI)가 0.8 이상이 되도록 코돈 최적화 진행.
융합 태그	Solubility Tag 선정 및 위치 (N- or C-term)	가용성 및 올바른 접힘 향상을 위해 MBP, GST, SUMO, NusA 등 활용. 말단 배치 최적화.
프로테아제	인공적인 프로테아제 절단 부위 노출	정제 시 원치 않는 절단 방지를 위해 절단 서열(Thrombin, TEV 등) 및 숙주 프로테아제 민감 지역 제거/보존적 치환.

3단계: 응집 분석 (SEC 및 Dynamic Light Scattering)

SEC(크기 배제 크로마토그래피)를 수행하여 단량체(Monomer) 분획인지, 혹은 올리고머/응집체인 지 확인하며 DLS 또는 SEC-MALS를 통해 단일 피크가 형성되는지 분석합니다.

4단계: 표적 결합 특이성 검증 (ELISA / SPR / BLI)

바인더의 실제 타겟 결합력(K_D)을 측정하며, 이와 동시에 빈 플레이트 및 비특이 대상 단백질(BSA 등)과의 대조군 실험을 수행하여 비특이 결합 유무를 최종 판정합니다.

6 요약 및 Quick Checklist

실험 진행 직전 최종 점검을 위해 다음 4가지 항목을 필수로 확인하시기 바랍니다.

1. **소수성 비율 검토:** 전체 표면적 대비 소수성 표면 노출도(SASA)가 35% 이하인가?
2. **등전점 확인:** 내 단백질의 pI 가 완충용액의 pH 와 최소 1.5 이상 벌어져 있는가?
3. **용해도 태그 고려:** 단독 발현 성공률이 낮은 도메인이라면 우선적으로 MBP 또는 SUMO 태그 부착을 계획했는가?
4. **인터페이스 최적화:** 결합 경계면(Rim)에 극성/전하성 잔기를 적절히 배치하여 가용성 실드를 확보했는가?