

외래 단백질 발현을 위한 새로운 숙주 시스템으로서의 메탄올 자화효모

강현아 · 이상기

생명공학연구소 미생물공정 연구실

단세포 미생물이지만 효모는 진핵세포로서의 단백질 발현 및 분비 특징을 갖추고 있어 고등 진핵생물 유래의 재조합 단백질 생산을 위한 숙주로 매우 유용하게 사용되고 있다. 최근에는 산업적 생산 숙주로서 전통 효모 *Saccharomyce cerevisiae*가 갖는 단점들을 보완하기 위하여 여러 다른 효모 시스템이 대체숙주로서 개발되고 있다. Non-*Saccharomyces* 효모를 이용한 외래유전자 발현 시스템들 중 특히 메탄올 자화효모 *Hansenula polymorpha*와 *Pichia pastoris*는 여러 독특한 특징으로 인해 재조합 단백질 대량생산을 위한 이상적인 숙주 시스템으로 각광을 받고 있다. 이들은 값싼 원료물질인 메탄올을 에너지원과 탄소원으로 이용할 수 있고, 메탄올 대사에 관련되는 유전자들에서 유래된 발현 조절이 용이하면서도 매우 강력한 프로모터들을 갖고 있어 산업적 유용성이 매우 높다. 또한 간단한 합성배지에서 고농도 배양(100-130g DCW/L)이 용이하고, 형질 전환시 발현 목표유전자가 숙주의 염색체상으로 삽입되어 장기간의 배양에서도 도입된 발현벡터의 안정성이 뛰어나며, 이들 효모에서 발현된 당단백질들은 *S. cerevisiae*에서 발현된 당단백질들에 비해 훨씬 과당화되는 정도가 낮은 장점이 있다. (1, 2). 본 고에서는 두 메탄올 자화효모 발현 시스템간의 유사성 및 상이점을 비교 분석하면서 이들 발현 시스템의 개발 현황에 대해 살펴보았다.

메탄올 대사 및 조절(Methanol metabolism and regulation)

메탄올 자화효모에서의 메탄올 대사에는 퍼옥시솜(peroxisome)이라는 막으로 분리된 세포 기관(organelle)이 관여하며 메탄올에 의해 발현 유도되는 여러 특이한 효소들, alcohol oxidase (AOX), catalase (CAT), dihydroxyacetone synthase (DHAS), formaldehyde dehydrogenase (FLD)와 formate dehydrogenase (FMDH) 등의 작용으로 진행된다. 메탄올 자화효모로서 *H. polymorpha*와 *P. pastoris*는 동일한 메탄올 대사 경로를 지니고 있지만 다음과 같은 차이점들이 있다. 첫째로, *H. polymorpha*에는 메탄올 산화작용에 관여되는 알코올 옥시다제를 코딩하는 유전자로 MOX만 존재하는 반면 *P. pastoris*에는 두 유전자 AOX1와 AOX2가 존재한다. 둘째로, *H. polymorpha*에서는 메탄올 대사경로의 주요 효소인 MOX와 FMDH의 발현이 글루코즈나 에탄올에 의해서 억제되지만 글리세롤에 의해서는 그 발현억제가 상당히 풀리는 탄소원에 따른 억제/풀림/유도(repression/derepression/induction) 조절기작을 보인다. 이에 반해 *P. pastoris*의 AOX 유전자들은 반드시 메탄올이 존재해야만 발현 가능한 억제/유도(repression/induction) 조절기작을 보인다(3).

분자 유전학적 조작(Molecular genetic manipulation)

Homothallic ascomycetous 효모로 분류되는 *H. polymorpha*와 *P. pastoris*는 일반적인 배양 조건에서는 haploid 상태로 안정되게 유지되지만, 성장이 제한되는 특수한 배양조건에서는 diploid 형성 후 포자를 형성하므로 *S. cerevisiae*에서 수행된 고전적인 유전학 분석도 가능하다(4, 5). 또한 *S. cerevisiae*에서 이용되는 다양한 분자 유전학적 기술들도 두 효모 시스템에 적용 가능하다. *P. pastoris*에서는 상동 재조합(homologous recombination)이 꽤 높은 비율로 일어나므로 double cross-over recombination을 이용하여 숙주 염색체의 특정 부위로 발현카세트를 비교적 손쉽게 삽입시킬 수 있다. 그러나 특이하게도 *H. polymorpha*의 경우, 비상동 재조합(nonhomologous recombination)이 높은 빈도로 일어나서 도입된 외래 유전자가 주로 숙주 염색체의 비특정 부위로 다중 삽입된다. 이와 같은 높은 비상동 재조합 빈도는 *H. polymorpha*에서 외래 단백질 생산시 발현 벡터들을 숙주 염색체의 여러 부위로 쉽게 다중 삽입할 수 있다는 점에서는 큰 장점으로 작용하지만, 특정 유전자 파쇄(gene disruption) 등 double cross-over recombination을 활용하는 분자 유전학적 조작은 타 효모 시스템에 비해 쉽지 않은 단점이 있다.

발현 벡터(Expression vectors)

두 메탄올자화 효모에서 현재 가장 널리 상용되고 있는 발현벡터들은 숙주 염색체로 삽입되도록 고안된 삽입용 벡터(integrative vector)들이다. 여러 다양한 프로모터 및 선별표지를 지닌 다양한 *P. pastoris* 발현벡터들(6)이 이미 상품화되어 Invitrogen (www.invitrogen.com)에서 구입 가능하다. 일반적으로, *P. pastoris*의 발현벡터에 포함되어 있는 *P. pastoris* 유래의 유전자 부위를 절단하여 숙주로 도입하면 상동 재조합에 의해 발현벡터가 숙주 염색체상의 상동 유전자 부위에 삽입되도록 개발되어 있다. 이에 반해 *H. polymorpha* 삽입용 벡터는 *H. polymorpha* 유래의 자기복제서열을 갖고 있으며, 발현벡터를 절단하지 않고 원형(circular) 상태로 숙주에 도입시켜 숙주 염색체내의 비특정 부위로 삽입되도록 개발되었고 아직은 상업적으로 판매되는 *H. polymorpha* 발현 벡터는 없다. 메탄올자화 효모에서 외래 단백질의 대량 생산을 위해 가장 널리 상용되고 있는 프로모터들은 메탄올 대사에 관련된 유전자에서 유래된 프로모터들이다. 그러나 메탄올을 발현유도체로 할 때 수반되는 여러 문제점들로 인해 최근에는 이들을 대체할 만한 여러 다양한 프로모터 개발에 관한 연구들이 활발하게 진행되고 있다. 두 메탄올 자화효모의 형질전환에 사용할 수 있는 선별표지의 종류는 아직 *S. cerevisiae* 시스템처럼 다양하지 못한 상태지만, 여러 영양성 요구 선별표지 외에도 항생제 내성을 이용한 지배적 선별표지가 개발되어 있다(7). 특히 다중병렬 도입 형질전환체를 선별하는 과정을 간소화하기 위하여 삽입된 유전자의 카피 수에 따라 세포에 다양한 정도의 내성을 부여하는 지배적 선별 표지를 이용한 삽입 카피 수 조절 시스템(copy number-controlled integration system)이 개발되었다. 그 예로써, *H. polymorpha* 시스템에서는 다중삽입을 유도하는 telomere 유래의 자기복제서열과 함께 G418 내성 카세트 또는 Hygromycin 내성 카세트를 이용한 벡터가 제작되었고, *P. pastoris*에는 G418 내성 및 zeocin 내성 유전자를 이용한 시스템이 개발되어 있다.

숙주 균주(Host strains)

현재 상용되고 있는 모든 *P. pastoris* 숙주 균주들은 NRRL-Y11430에서 유래되었다(6).

외국에서 개발된 *H. polymorpha*를 이용한 외래 유전자 발현 시스템은 주로 *H. polymorpha* CBS4732 또는 NCYC495 주를 중심으로 진행되고 있지만, 국내에서는 DL-1 균주를 숙주로 이용한 재조합 단백질 발현 시스템이 개발되고 있다. *P. pastoris* 형질전환시 AOX1 프로모터와 터미네이터로 구성된 발현 카세트가 숙주 염색체상의 AOX1 유전자 부위에서 double cross-over recombination을 통해 삽입되는 경우에는 AOX1 유전자가 파쇄되어 *aox1*Δ 형질 전환체로 된다. 이 *aox1*Δ 균주는 메탄올에서 배양시 매우 느린 성장속도(methanol utilization slow: Mut^s)로 자라므로 AOX1 야생균주(Mut⁺)보다 훨씬 낮은 산소 요구성 및 메탄올 소모 속도를 보이는 장점을 갖으며, 일부 재조합 단백질의 대량생산의 경우에는 Mut⁺의 경우에 비해 높은 단백질 생산효율을 보이기도 한다. 그러나 *H. polymorpha*에서는 MOX 프로모터와 터미네이터를 이용한 발현 벡터가 도입되어도 발현벡터가 대부분 숙주 염색체의 비특정 부위로 삽입되므로 염색체상의 MOX 유전자가 파쇄된 형질전환체를 확보하기가 매우 어렵다. 따라서 MOX 유전자가 파쇄된 형질전환체만을 선별할 수 있도록 특별히 고안된 벡터 및 균주가 개발되었다(7). 그러나 *H. polymorpha*의 *mox*Δ 형질전환체는 AOX2 유전자가 남아있는 *P. pastoris aox1*Δ 형질전환체와는 달리 메탄올을 전혀 탄소원으로 이용할 수 없는 Mut⁻ (methanol utilization negative) 형질을 갖게 된다. 최근에는 *P. pastoris*에서도 메탄올을 전혀 탄소원으로 사용할 수 없는 Mut⁻ 균주(*aox1*Δ *aox2*Δ)도 개발되었다. 효모 세포막으로 분비된 외래단백질의 분해를 방지하기 위해서 *H. polymorpha*와 *P. pastoris*에서 우선적으로 효모 액포(vacuole)에 존재하는 단백질 분해효소들의 유전자, PEP4, PRB1, 또는 CPY가 파쇄된 균주들이 개발되어 있으며, 최근에는 골지체(Golgi)에 존재하는 카르복시펩티다아제 α를 코딩하는 KEX1 유전자가 파쇄된 *kex1*Δ 균주도 개발되었다.

단백질 합성 후 수식(Post-translational modification)

이들 메탄올 자화효모에서 고등 진핵세포 유래의 단백질들을 분비 생산하는 경우 외래 유전자 자체의 분비 신호 서열을 이용하기도 하지만 많은 경우 효모 유래의 분비 서열을 활용하고 있다. *H. polymorpha*와 *P. pastoris*에서 발현 분비된 재조합 당단백질들은 비록 본래의 단백질에 비해서는 과당화된 상태로 발현되지만 *S. cerevisiae*에서 발현된 재조합 단백질 보다는 전체적인 만노즈 당외쇄(mannose outer chain)의 길이가 상당히 짧다. 아직 *H. polymorpha*에서 발현된 당단백질들의 당쇄구조에 관한 연구는 거의 보고된 바가 없지만, *P. pastoris*에서 생산된 당단백질의 N-linked 당쇄에 대한 분석은 상당히 진행되어 있고 일부 재조합 단백질의 경우 mannose만으로 구성된 O-linked 당쇄가 부착됨이 밝혀졌다(6). 특히 *P. pastoris*에는 인체에서 면역성을 유발하는 α1,3-linked terminal mannose가 존재하지 않는다는 점에서 인체 의료용 단백질 생산 균주로서 전통효모 *S. cerevisiae*보다 월등한 숙주 시스템으로 여겨지고 있다. 이들 메탄올자화 효모에서는 막대한 퍼옥시솜의 증폭을 유도할 수 있어 재조합 단백질의 저장소로 퍼옥시솜을 이용할 수 있는 데 특히 독성을 지닌 단백질을 격리시켜 보관하는 장소로 개발할 수 있는 잠재성이 매우 크다. 또한 막대한 부피의 퍼옥시솜 막(membrane)은 외래 막 단백질들의 대량 발현을 위한 가장 적합한 장소로 개발될 수 있는 가능성 때문에 최근 퍼옥시솜 타겟팅에 대한 관심이 점차로 증가되고 있다(7).

고농도 배양(High cell density growth)

이들 메탄올 자화효모 *H. polymorpha*와 *P. pastoris*가 전통효모 *S. cerevisiae*에 비해 내

세울 수 있는 여러 장점들 중의 하나는 fermentation 활성은 매우 낮고 respiratory growth에 대한 활성이 매우 왕성해서 에탄올에 의한 저해현상이 아주 적어 고농도 배양이 매우 용이하다는 것이다. 따라서 이들 메탄올 자화효모 발현 시스템에서는 shake-flask로부터 high-density fermenter로의 scale-up이 매우 쉽다. 일반적으로, *AOX1* 프로모터를 이용하는 *P. pastoris* 발현시스템의 경우, 글리세롤이 탄소원으로 포함된 배지에서 일차적으로 배양하여 고농도로 균체를 축적한 후 점차로 발현 유도를 위해 메탄올과 글리세롤을 혼합하여 주입하는 two-carbon-source 방식이 사용되고 있다. 그러나 *H. polymorpha*의 경우는 메탄올 없이도 단지 글루코즈가 고갈되거나 낮은 농도의 글리세롤이 있는 상태에서도 *MOX* 또는 *FMDH* 프로모터로부터 상당한 수준의 발현이 일어나 글루코즈 또는 글리세롤만을 탄소원으로 이용하는 one-step-fermentation 방식으로 매우 높은 발현 수준을 얻을 수 있다(8). 따라서 *H. polymorpha*의 독특한 메탄올 대사 조절기작은 메탄올을 발현 유도체로 이용할 때 발생하는 여러 문제점들 및 복잡한 발효 공정을 피할 수 있다는 점에서 *P. pastoris* 보다 상당히 실용적이다. 또한 *H. polymorpha*는 *P. pastoris*에 비해 높은 온도(37-43°C vs. 30°C)에서 왕성한 성장을 유지할 수 있어 대형 발효조의 cooling management 및 다른 미생물에 의한 오염 위험에 대한 부담이 한결 적다.

결론

현재까지 매우 다양한 종류의 많은 외래 단백질들이 두 메탄올 자화효모 *H. polymorpha*와 *P. pastoris*에서 발현되었는데, 그 발현 수준은 대부분 발효조를 이용한 고농도 배양시 1 g/L 이상이었고 몇몇 재조합 단백질의 경우는 10 g/L 이상 생산으로 보고되어 현재 이용 가능한 여러 진핵세포 발현 시스템들 중에서 가장 강력한 시스템으로 부각되고 있다(8, 9). *H. polymorpha*와 *P. pastoris*에서 생산된 재조합 단백질들의 일부는 이미 임상실험을 통과하여 시장에 진출(예로써, Hepatitis B 백신)되거나 현재 제품 개발 단계에 있다. 향후 이들 효모 발현 시스템은 고등 진핵세포 유래의 유용 단백질 제품화를 위한 대량생산뿐만 아니라 신규 단백질들의 기능 및 구조분석에 필요한 재조합 단백질 발현 숙주로도 큰 일익을 담당할 것으로 기대된다.

참고 문헌

1. Romanos, M. A., C. A. Scorer, and J. J. Clare (1992) *Yeast* **8**, 423-488.
2. Hollenberg, C. P. and G. Gellissen (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 554-560.
3. Gellissen, G., C. P. Hollenberg, and Z. A. Janowicz (1995) Gene expression in recombinant microorganisms (Smith A. ed.), p.195, Marcel Dekker, New York.
4. Gleeson, M. A. and P. Sudbery (1988) *Yeast* **4**, 293-303.
5. Cregg, J. M., S. Sehn, M. Johnson, and H. R. Waterham (1998) *Methods Mol. Biol.* **103**, 17-26.
6. Cereghino, J. L. and J. M. Cregg (2000) *FEMS Microbiol. Review* **24**, 45-66.
7. van Dijk, R., Faber K. N., Kiel, A. K. W., Veenhuis M., and I. van der Klei (2000) *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 793-800.
8. Mayer, A. F., K. Hellmuth, H. Schlieker, R. Lopez-Ulibarri, S. Oertel, U. Dahlems, A. W. M. Strasser, A. P. G. M. van Loon (1999) *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 373-381.
9. Werten, M. W., van den Bosch T. J., Wind R. D., Mooibroek H., and F. A. de Wolf (1999) *Yeast* **15**, 1087-1096.