

The screening & characterization of super-producing recombinant *Hansenula polymorpha* mutant

강환구¹, 박형수¹, 이충열¹, 유병일¹, 유은정, 이 선¹, 황선덕¹, 강현아², 이상기²
 한남대학교 화학공학과¹, 생명공학연구소²
 전화(042)629-8009 팩스(042)623-9489

Abstract

The super-producing recombinant *H. polymorpha* mutant is obtained by double membrane screening technique combined with optimum mutation method. The characterization of mutant is carried out to find the change of mutant in m-RNA level, cell wall leakage, protease level and methanol utilization metabolic flux. The change of these properties of mutant was figured out.

서론

유전자 재조합 단백질 생산을 위해 주로 쓰이고 있는 host로는 *E. coli*와 *S. cerevisiae* 등의 yeast 그리고 CHO cell들이 있으며 [1,2] 이들 중 Yeast인 *Hansenula polymorpha*는 매우 강하고 제어 가능한 MOX promoter를 지니고 있으며, 우수한 안정성과 산업체에서 대규모 공정에 쉽게 최적화가 가능하다는 장점을 지니고 있다. 본 연구에서는 이러한 장점을 지니고 있는 *Hansenula polymorpha*의 돌연변이를 통하여 재조합 단백질의 생산성이 증대된 돌연변이주를 획득하였고 이 돌연변이주의 characterization을 통해 m-RNA level, cell wall leakage, protease level 및 메탄올 대사과정의 flux의 변화등을 연구하였다.

재료 및 방법

본 연구에 사용되는 *Hansenula polymorpha* host는 leucine과 uracil auxotroph 이며 MOX promoter 균주이고, MOX terminator 이고 albumin gene segment를 가진 vector를 이용하였으며 이 균주의 종배양은 complex media(효모 추출물 2%, 글리세롤 1%)를 이용, 250rpm, 37°C에서 배양하였다. mutation을 통해 이러한 albumin 고분비생산 *H. polymorpha*를 개발하기 위해서 이중 여과막을 이용한 방법을 개발하여 단백질을 강하게 흡착하는 나이트로셀룰로스 여과막(0.45 μm)과 단백질을 잘 흡착하지 않는 셀룰로오스 아세테이트 여과막(0.45 μm)을 YED 한천배지위에 차례로 깔고 먼저 Cell을 O.D. 0.5에서 1까지 자라게 한 후, 배지 1ml을 12,000rpm으로 cell을 침전, 침전된 cell을 인산나트륨 완충용액(pH8.0)으로 세척 한 후, 인산나트륨 완충용액에 재현탁시키고 EMS(Ethyl Methane Sulfonate)를

3.8%(v/v) 농도로 넣고 37°C 진탕배양기에 30분동안 방치했다. 이 후 50배의 6% 농도의 티오황산나트륨으로 중화하였다. 상기액을 메탄올이 C-source로 함유된 YEP 한천배지상의 셀룰로오스 아세테이트 여과막 위에 도말하였다. 37°C에서 4일정도 배양한 후 나이트로셀룰로오스 여과막만을 들어내어 0.2% twein20을 함유한 인산염 완충용액으로 10분씩 2회 세척하고 아미도 블랙으로 5분간 염색한 후, 탈색용액(에탄올 40%, 초산 20%, 증류수 40%)으로 colony 부분 이외의 부분이 탈색될 때까지 탈염한 후 염색된 점의 크기와 진하기를 셀룰로오스 아세테이트 여과막에 남아 있는 colony와 비교하여 염색 정도가 매우 크고 진한 점들에 상응하는 colony를 고분비생산 변이주로 선별하였다. characterization은 bead beater를 이용하여 cell을 충분히 갠 후 MeOH, Formaldehyde와 Formate를 각각 적절한 농도로 첨가한 다음 짧은 시간 동안 소비속도를 측정하였다. MeOH과 Fomaldehyde 분석은 Gas Chromatograph(DS6200, Donam)에서 수행되었다. 사용된 column은 길이 6ft의 녹슬지 않는 stainless steel이고 충전물질은 Hayesep Q(CRS)이며 Flame ionization detector(Fid)를 이용하였다. carrier gas는 헬륨을 사용하였고 분석조건은 injector 180°C, oven 130°C, detector는 200°C이었고 Formate 분석은 영린기기 제품 HPLC로 분석하였다.

결과 및 토의

먼저 본연구를 통하여 획득되어진 *H. polymorpha* mutant를 살펴보면 control에 비해 expression level은 약 300% 정도로 증가된 수준이었으며 O.D. 23에서 최대 230 mg/L를 생산할 수 있었다. 이번 실험을 통하여 고분비 변이주를 얻는 돌연변이 방법을 최적화하였는데 먼저 처리한 EMS reagent양과 Incubation time 그리고 중화제인 sodium thiosulfate양에 따른 사멸율, 즉 최적 돌연변이조건은 EMS를 50 μ l / cell suspension sol'n 1ml 사용하여 incubation은 30분, 그리고 중화제로 sodium thiosulfate는 100 μ l / ml을 사용하였을 때이며 이때 사멸률은 99.999%이었다. 각 사멸률에 따른 고분비능 균주 획득확률은 사멸률 99.9999%에서 총 colony중 0.4%가 분비능 향상 돌연변이주임을 알 수 있었으며 이 방법으로 분비능이 향상된 여러 돌연변이주를 획득하였다. 이렇게 획득된 돌연변이주는 세포성장 및 발현 pattern이 control에 비해 많이 달라짐을 확인하였다. mRNA level과 detergent에 대한 내성을 통한 cell wall leakage를 조사한 결과 mutant에서 mRNA level이 증가됨을 알 수 있었고(Fig. 1) cell wall이 일부 leaky하게 변화되어 있음을 확인하였다. 또한 *H. polymorpha* mutant의 protease level 변화를 살펴보고자 culture후 상등액을 100 시간동안 37°C incubatere에 방치 하였다. 이결과 *H. polymorpha*의 mutant 경우, *pichia pastoris*, control(DL1), standard와 거의 비슷한 분해 pattern을 보였다. 즉 protease level의 큰 변화는 mutant의 경우 관측되지 않았다. (Fig. 2)

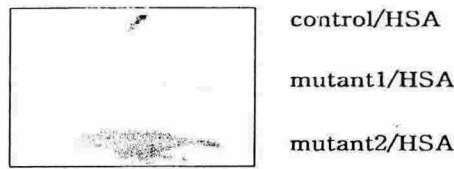


Fig. 1 m-RNA level 변화

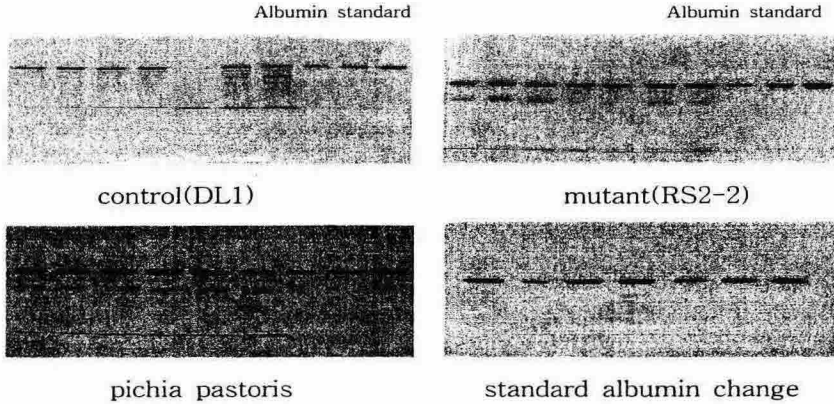


Fig. 2. protease level 변화

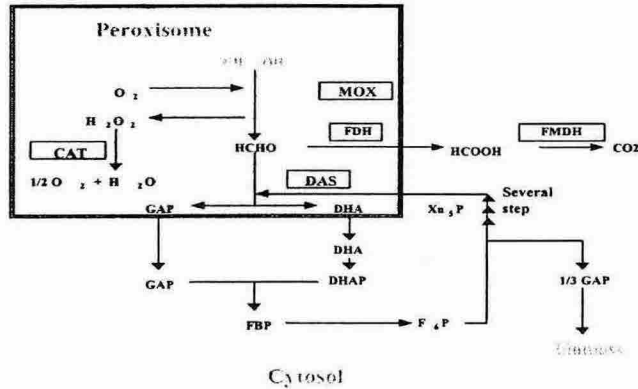


Fig. 3. Methabolic flux pathway

Methylotrophic yeast에서 공통적으로 일어나는 복잡한 메탄올을 이용하는 pathway[3]가 Fig. 3에 보여진다. mutant의 경우 methanol oxidase(MOX)에 의한 활성도가 control보다 뛰어남을 알 수 있고, formaldehyde dehydrogenase (FDH)활성도 또한 증가되었으나 formate dehydrogenase (FMDH)는 활성은 감소되었음을 알 수 있었다. 이로서 mutant의 경우는 더 많은 methanol이 이용되어져 이것이 그냥 CO로 가는 부분은 줄어들고 HCHO를 거쳐 DHA또는 GAP로 더 많은 methabolic flux가 진행되어 지는 것을 확인하였으며 이것으로 인하여 *H.polymorpha*의 cell mass증가뿐만 아니라 생산되는 재조합 단백질의 양도 증가됨을 알 수 있었고

이에 관한 체계적 실험이 진행 중이다. 이 mutant를 이용 약 5g/L의 알부민이 고농도 발효를 통하여 생성되었다.

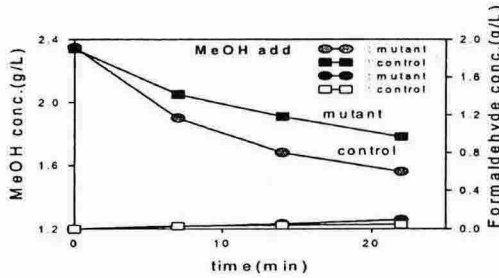


Fig. 4.1 MeOH consumption rate with mutant cell lysate

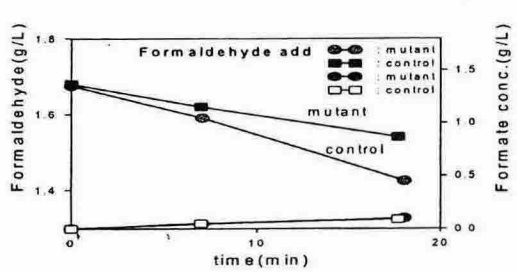


Fig. 4.2 Formaldehyde consumption ratio with mutant cell lysate

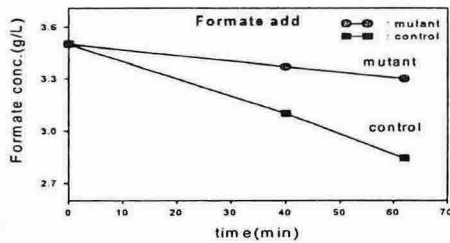


Fig. 4.3 Formate consumption rate with mutant cell lysate

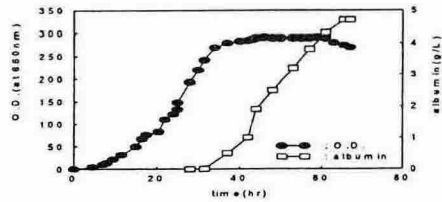


Fig. 4 Albumin expression profile in high cell density *H. polymorpha* mutant fed-batch

Between 15 and 40 hrs. glycerol was fed. μ change (0.1 \rightarrow 0.08 \rightarrow 0.05 \rightarrow 0.02 hr⁻¹)
After 40 hrs methanol was fed.

결론

본 연구에서는 Methylotrophic yeast 중 *H. polymorpha*의 mutant screening 과정에 서 사멸율이 99.999-99.99999%에 달하는 균주를 selection 한 결과 재조합 단백질 생산성은 control에 비해 약 300%까지 증가하였으며 이 mutant를 이용한 고농도 배양에서는 알부민을 5g/L를 발현 할 수 있었다. 이러한 mutant characterization을 통해 m-RNA level이 증가 하였고 cell wall leakage 현상이 관측되었고 또한 메탄올 대사과정의 flux 연구결과 HCDO로부터 GAP 또는 DHA로 DHAS 등의 활성이 mutant의 경우에 증가되어 이를 통한 *H. polymorpha* mutant의 cell mass 증가 뿐 아니라 재조합 단백질 증가도 관측되었다.

참고자료

1. Ellis, S., Brust, P.F., Koutz, P.Z., Waters, A.F., and Harpold, M.M., Mol. Cell Biol., 5, p111 (1985)
2. Roggenkamp R.O., Hansen H., and Hollenberg c.P., Mol. Gen. Genet., 202, p302 (1986)
3. Alan Smith, Gene Expression in Recombinant Microorganism, Marcel Dekker, Inc., New York, USA, p220 (1995)