

## 재조합 Yeast 균주의 알부민 발현 능력 비교 연구

강환구, 박형수, 이충열, 김원철, 윤지선, 강현아<sup>1</sup>, 이상기<sup>1</sup>, 최근범<sup>2</sup>

한남대학교 화학공학과, 생명공학연구소<sup>1</sup>, 동국제약주식회사<sup>2</sup>

전화(042)629-8009 팩스(042)623-9489

### abstract

Albumin is known to be used in many applications and to have huge market. Nowadays the importance of recombinant albumin is emphasized over albumin from serum because of elimination of viral disease problem.

However for commercialization of recombinant albumin, high titre of expression level is prerequisite for economic feasibility. Therefore in this study, several expression systems using different kinds of yeasts were tested and optimized and compared

### 서론

Human serum albumin (HSA)은 584개 amino acids의 single polypeptide으로 구성되고[1] disulfide bridge로 안정적인 구조를 이루고 있는 단쇄 단백질로서 간에서 생성된 후 혈액으로 분비되어 혈장의 주성분으로 존재하며[2] steroid hormone, bile pigment, 아미노산, metal ion 및 지방산등 체내 주요성분들의 transport를 위한 carrier로 작용한다. 또한 혈류의 삼투압을 일정하게 유지하는 등 매우 중요한 역할을 담당한다. HSA은 임상적으로 plasma expander로 이용되며 외과수술, 긴급사고 또는 출혈등으로 인한 혈액의 소실을 보충하기 위해서 사용되고 있다. 임상적으로 HSA의 일회사용량이 multi-gram 단위이기 때문에 HSA는 인체단백질의 세계시장에서 가장 중요한 단백질중의 하나로 알려져 있다. HSA 국내시장규모는 약 400억원 수준이다.

이러한 albumin을 유전자 재조합 방법으로 만들 경우 혈당유래 albumin의 바이러스 위험 등 여러 가지 부작용을 최소화 할수있게 되어진다. 따라서 재조합 albumin의 생산 필요성이 많이 대두되어지나 현재 일본 녹십자에서 매우 높은 albumin발현율을 가진 yeast 발현system을 사용하고있어 국내에서 일본녹십자와 경쟁할 수 있는 재조합 albumin 발현 system개발이 필요하게 되어서 본 연구에서 여러 가지 yeast 들을 이용한 재조합 albumin발현을 비교해 보았다.

## 재료 및 방법

본 연구에 사용되는 *P. pastoris*는 histidine auxotroph인 GS 115 strain이고 주로 AOX promoter[3]를 사용하였고 *H. polymorpha* host는 leucine 과 uracil auxotroph이며 albumin gene을 포함한 vector integratioin 후 *Mox*<sup>+</sup>, *mox* 성질을 가진 transformant 균주를 사용하였으며 이 경우 MOX, GAPDH promoter[4]등을 이용하였다. Fermenter에서의 실험은 5L fermenter (코비이오틱(주)와 Best Korea(주))를 사용하였다. 실험중 세포의 농도는 660nm에서의 흡광도(O.D. : optical density)로 측정하였으며 본 실험의 target 단백질인 알부민은 SDS PAGE / Silver, Coomassie staining 방법으로 알고있는 양의 알부민 standard와 비교하여 정량하였다.. 배지중 메탄올 분석은 Gas Chromatograph(DS6200, Donam)에서 수행되었다.

## 결과 및 토의

본 연구결과 얻어진 mutant들을 살펴보면 Methylotrophic yeast중 *Hansenula polymorpha*(MOX promoter)의 발현을 증가 시키기 위하여 획득된 *Mox*<sup>+</sup> mutant의 경우 control에 비해 알부민 생산성이 약 350%이상 증가하였으며 O.D 250에서 약 5 g/L 이였고 이 수치는 *P. pastoris*와 비교 40%수준임을 확인하였으며 *mox*<sup>-</sup> mutant는 control에 비해 약 300%이상 증가하였으며 알부민은 O.D 250에서 약 3.3 g/L를 발현, *P. pastoris*와 비교 30%수준임을 확인 하였다.

*Hansenula polymorpha*의 *GAPDH* promoter를 사용한 mutant는 control대비 200%정도 증가하였으며 O.D 250에서 약 2.3 g/L를 발현함을 확인하였고 *P. pastoris*와 비교 25%수준임을 확인 하였다.

*P. pastoris*균주의 경우 O.D 250에서 약 9 g/L의 발현양을 보였으며 고농도 발효시 albumin 발현에 있어서 발현양이 많고 expression rate가 빠른 *P. pastoris*균주가 상업적으로 적합함을 확인 하였다.

		Albumin (g/L)	Specific Exp. Rate (mg/L · h · O.D)	O.D
<i>P. pastoris</i> (AOX promoter)		9.7	1.05	260
<i>H. polymorpha</i> (MOX promoter)	control	0.9	0.201	260
	<i>Mo<math>\alpha</math>'</i> (RS2-2)	4.7	0.432	260
<i>H. polymorpha</i> (MOX promoter)	control	1.2	0.17	260
	<i>mo<math>\alpha</math>'</i> (EJ6123)	3.3	0.504	260
<i>H. polymorpha</i> (GAPDH promoter)	control	1.25	0.137	260
	mutant	2.3	0.21	260

표1. *P. pastoris*와 *H. polymorpha*균주의  
Albumin발현양과 Expression rate 비교

#### 참고문헌

1. Achilles Dugaiczky, Simon W. Law, Oliva E. Dennison P.N.A.S. 79, p71(1982)
2. Peters, T. Serum albumin, In F.W. Putnam(ed.), The plasma proteins, Vol. I, Academic Press Inc, New York.(1975)
3. Ellis, S., Brust, P.F., Koutz, P.Z., Waters, A.F., and Harpold, M.M., Mol. Cell Biol., 5, p111 (1985)
4. Roggenkamp R.O., Hansen H., and Hollenberg c.P., Mol. Gen. Genet., 202, p302 (1986)