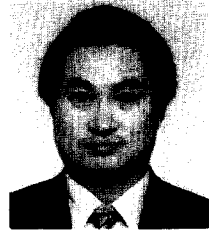


효모를 이용한 재조합 단백질의 생산



KIST유전공학연구소 이 상 기

1. 서 론

유전공학기술을 이용하여 재조합 단백질을 생산하기 위한 유전자 발현 시스템으로서 그동안은 주로 원핵 세포인 *E. coli*가 숙주세포로 사용되어 왔다. 그러나 대부분의 유용 생리활성물질 생산 유전자는 진핵세포인 고등 생물로부터 기원한 것이고 원핵세포와 진핵세포의 유전자 구조 및 전사, 번역시스템의 차이로 인해 *E. coli* 내에서는 재조합 단백질 유전자가 기대한 만큼 효율적으로 발현되기 어려웠다. 이에 반해 효모는 *E. coli*와 달리 유전적으로 고등 생물과 동일한 진핵세포로서 고등생물 유래의 유전자와 전사 및 번역 시스템이 유사하고 splicing을 통한 intron의 제거가 가능하며 고등동물의 골지체와 유사한 분비기관을 갖추고 있어서 번역 후 수식(post-translational modification)을 통해 활성화된 단백질을 생산, 분비시킬 수 있다. 따라서 유용한 재조합 단백질의 유전자를 클로닝할 경우 유전자의 발현 효율을 증대시킬 수 있을 뿐만 아니라 세포 내에서 생산된 유용단백질을 체외로 자체 분비시킬 수 있어 분리공정을 용이하게 할 수 있다는 장점이 있다. 이러한 이유로 인해 최근에 이루어지고 있는 재조합 단백질의 생산연구에서는 숙주세포로서 효모가 가장 많이 사용되고 있다. 이제까지 숙주세포로 이용하기 위한 효모균주의 개발은 제빵효모인 *Saccharomyces cerevisiae*를 주대상으로 수행되어 왔다. 그러나 최근에는 *Hansenula*속, *Pichia*속, *Kluyveromyces*속, *Schizosaccharomyces*속, *Schwanniomyces*속

및 *Yarrowia*속 등 특이한 성질을 갖는 희귀효모 균주를 숙주세포로 한 새로운 유전자 발현시스템의 개발이 활발히 추진되고 있다. 본고에서는 *S. cerevisiae*를 위시하여 이들 희귀효모로부터 생산되고 있는 재조합 단백질의 연구현황과 문제점 및 재조합 단백질의 효율적인 생산을 위해 고려해야 할 요인들에 대해 고찰해 보기로 한다.

2. 효모를 이용한 재조합 단백질의 생산 연구현황

*S. cerevisiae*는 유전학적, 생리학적 연구가 많이 이루어져 있을 뿐만 아니라 영양요구성 표지(auxotrophic marker), 다수의 프로모터 및 플라스미드 벡터등 유전공학연구에 필수적인 인자들이 잘 개발되어 있어 그동안 효모를 대상으로한 재조합 단백질 생산 연구에 숙주세포로서 가장 많이 이용되어 왔다. 또한 오랜 기간동안 제빵 및 양조산업에서 이용되어 오면서 인체에 전혀 무해함이 입증된 것도 이 균주가 숙주세포로서 각광받게 된 이유중의 하나였다.

1981년 *S. cerevisiae*를 이용해 사람 인터페론의 생산이 최초로 보고(1)되었고 다음해 FDA로부터 같은 방법으로 생산된 간염백신(HBsAg)에 대한 인체사용허가를 얻은 이래(2) 지난 10년간 수십종의 재조합 단백질이 *S. cerevisiae*로부터 생산되었고 이중 일부는 전임상 및 임상시험을 거쳐 현재 시판중에 있다(표 1). 그러나 *S. cerevisiae*에서 재조합 단백질을 생산할 경우 다음과 같은 몇가지 문제점이 나

표 1. *S. cerevisiae*로부터 생산되는 재조합 단백질(3)

Lymphokines	Enzyme inhibitors
Interferon- α	α 1-Antitrypsin
Interferon- β	Hirudin
Interferon- γ	Lipocortin
Interleukin-2	
	Oncogene proteins
Peptides	c-FOS
Insulin	c-MYC
Epidermal growth factor	H-RAS
Insulin-like growth factor	Viral antigens
Growth hormone	HBV surface antigen
Atrial natriuretic factor	HSV-1 glycoprotein D
β -Endorphin	Influenza virus HA
	Polyoma virus middle T
	HTLVIII Gag
Enzymes	
Tissue plasminogen activator	Others
Chymosin	Acetylcholine receptor
Carboxypeptidase	Cytochrome P450
Lysozyme	Human serum albumin
Superoxide dismutase	
HTLVIII Protease	
Glucose oxidase	

타나고 있다. 즉 *S. cerevisiae* 자체의 강력하고 정교하게 조절 될수 있는 프로모터가 존재하지 않으므로 superoxide dismutase(4)나 glucose oxidase(5)와 같은 몇가지 예외를 제외하고는 대부분의 재조합 단백질의 경우 생산수율이 매우 낮아 전체 단백질의 1~5% 정도만 생산되거나, 재조합 단백질의 유전자를 포함하고 있는 플라스미드의 안정성이 떨어져 효모의 세포증식을 및 재조합 단백질의 생산성을 감소시키는 원인이 되고 있다. 또한 당단백질 생산의 경우 분비된 단백질의 고glycosyl화 (hyperglycosylation)에 의해 면역성이나 활성이 감소되는 결점이 있다. 이러한 문제점들을 해결하기 위해 *S. cerevisiae* 자체의 유전자 발현 시스템을 개선하기 위한 연구가 세계도처에서 진행되고 있으나 차체에 *S. cerevisiae*보다 우수한 새로운 효모균주를 숙주세포로 이용하기 위한 연구가 국제적으로 많은 관심을 끌고 있다.

새로운 효모균주를 재조합단백질 생산의 숙주세

포로 이용하기 위해서는 이들 효모에 적용시킬 수 있는 형질전환법(transformation)과 더불어 형질전환체를 선별할 수 있는 방법의 개발이 선행되어야 한다. 따라서 이를 위한 많은 노력들이 경주되었고 이제까지 십여종 이상의 효모를 대상으로한 형질전환법이 개발되었으나 실제 상업적 이용목적으로 사용할 수 있는 시스템은 아직까지 수종의 효모에 불과한 상황이다. 이들 중 가장 대표적인 시스템으로는 메타놀자화효모인 *Hansenula polymorpha* 및 *Pichia pastoris*, 분열형효모인 *Schizosaccharomyces pombe*, *alkane* 자화효모인 *Yarrowia lipolytica*, 유당 분해효소생산효모인 *Kluyveromyces lactis* 및 *amylose* 분해효모인 *Schwanniomyces occidentalis* 등이 있다. 그러나 *S. pombe*를 제외하고는 이들 효모에 대한 실험실적인 기초 연구가 충분히 이루어지지 않은 상태이므로 아직까지는 산업적인 활용이 적극적으로 이루어지지 않고 있다. 이들 효모의 공통점은 재조합 단백질 생산시 목적 유전자의 안정성을 유지하면서 세포의 대량 증식이 가능하기 때문에 재조합 단백질의 대량생산이 가능하다는 점이다. 특히 *H. polymorpha* 나 *P. pastoris*의 경우에는 지금까지 22 nm 감염표면항원 단백질(6,7), EGF(epidermal growth factor)(8), IGF-1(insulin-like growth factor)(9), glucoamylase(10), invertase(11), α -galactosidase(12) 등 20여종의 산업적으로 유용한 재조합 단백질 생산이 성공적으로 보고되어 재조합 단백질 생산시 숙주세포로서 *S. cerevisiae*의 단점을 보완할 수 있는 가장 최적의 대체효모균주로 간주되고 있다. (표 2)에 *S. cerevisiae* 이외의 효모들로부터 생산된 재조합 단백질을 표시하였다. 동일한 재조합 단백질 생산시 *S. cerevisiae*보다 다른 효모균주를 숙주세포로 사용할 때 오히려 생산수율이 높게 나타나는 경우가 자주 있다(표 3). 예를 들면 감염표면항원 단백질의 경우 *S. cerevisiae*, *H. polymorpha* 및 *P. pastoris*를 각각 숙주세포로 사용하여 유전자를 발현시켰을 때 *S. cerevisiae* 균주가 양쪽 메타놀자화 효모균주보다 재조합 단백질의 생산수율이 50% 정도 낮게 나타났다. 재조합 prochymosin이나 IL-1 β /1 생산의 경우에도 *S. cerevisiae*와 비교하여 *K. lactis*의 경우 약 20~40배 정도 증가하는 것으로 보고된 바 있다(14-15). 이와 같이 *S. cerevisiae*와 다른 효모간에 재조합 단백질의 수율이 차이가 나는 이유는 *S. cere-*

표 2. 새로운 효모로부터 생산되는 재조합 단백질 (13).

Strain	Promoter	r-Protein	Localization*	
<i>P. pastoris</i>	<i>AOXI</i>	HSA	s	
		human EGF	s	
		HBsAg	c	
		bovine lysozyme	s	
		human lysozyme	s	
		human IGF-1	s	
		aprotinin	s	
		SOD	c	
		streptokinase	c	
		human tPA	s	
		IL-2	c	
		IL-2	s	
		HIV gp120	s	
		SIV gp120	c	
		pertactin	c	
		murine EGF	s	
		human TNF	c	
<i>H. polymorpha</i>	<i>MOX</i>	HBsAg	s	
		HSA	s	
		HBsAg	c	
		hirudin	s	
		HBsAg	c	
	<i>FMD</i>	glucoamylase	s	
		<i>MOX</i>	α -galactosidase	s
			<i>A. niger</i> glucose oxidase	s
			human lipase	s
			<i>C. theobroma</i> seed storage protein	s
<i>S. pombe</i>	<i>ADH</i>	factor XIIIa	s	
	<i>ADH</i>	α -1-antitrypsin	c	
<i>K. lactis</i>	<i>LAC4</i>	prochymosin	s	
		IL-1 β	s	
		HSA	s	
<i>Y. lipolytica</i>	<i>GAM1</i>	human anaphylatoxin C5a	s	
	<i>XPR</i>	bovine prochymosin	s	
	<i>LEU2</i>	bovine prochymosin	s	
	<i>XPR2</i>	α 1 interferon	s	
	<i>XPR2</i>	human tPA	s	
<i>S. occidentalis</i>	<i>GAM1</i>	cellulase	s	

표 3. *S. cerevisiae*와 새로운 효모의 재조합 단백질 생산수를 비교(13).

r-Protein	Host	Gene Copy Number	Promoter	Yield
HBsAg S monomer	<i>S. cerevisiae</i>	>50	<i>PGK1</i>	1-2 ¹
	<i>H. polymorpha</i>	1	<i>MOX1</i>	0.15-0.2
	<i>H. polymorpha</i>	~50	<i>MOX1</i>	2.7-3.6
	<i>P. pastoris</i>	1	<i>AOX1</i>	2.3
Murine EGF	<i>S. cerevisiae</i>	>50	<i>GAL7</i>	0.6 ²
	<i>P. pastoris</i>	1	<i>AOX1</i>	1.9
	<i>p. pastoris</i>	13	<i>AOX1</i>	22.4
IGF-1	<i>S. cerevisiae</i>	>50	<i>ADH2/GAPDH</i>	25 ³
	<i>P. pastoris</i>	6	<i>AOX1</i>	150
HSA	<i>S. cerevisiae</i>	>50	<i>CUP1</i>	0.60 ⁴
	<i>P. pastoris</i>	1	<i>AOX1</i>	15
Prochymosin	<i>S. cerevisiae</i>	1	<i>GAPDH</i>	17.8 ⁵
	<i>K. lactis</i>	1	<i>LAC4</i>	345

¹mg HBsAg monomer per 100 mg protein; ²mg mEGF per liter of culture; ³mg IGF-1 per liter of culture; ⁴mg HSA per OD per liter of culture; ⁵milk clotting units per ml of culture.

*visiae*의 경우 재조합 단백질 유전자 발현에 이용되는 대부분의 프로모터가 포도당 가수분해 시스템에 관여하는 유전자로부터 유래되어 산소를 사용하는 호기성 발효를 통해 재조합 단백질을 생산할 때 생성되는 에타놀에 의해 프로모터의 전사가 저해를 받기 때문이다. 따라서 *S. cerevisiae*의 경우 제어 프로모터를 사용하는 것이 중요하다. 반면 다른 효모의 경우 대부분 고효율 발현 프로모터를 사용하므로 에타놀에 의한 저해가 나타나지 않게 되어 재조합 단백질이 발현수율이 높게 나타난다.

3. 재조합 단백질의 효율적 생산을 위한 주요인자

(1) 프로모터

재조합 단백질 유전자의 효율적인 발현을 위해서는 우수한 발현 벡터의 개발이 필요하다. 이러한 고효율 발현 벡터에는 효모내에서 활성을 나타낼 수 있는 효모자체의 강력한 프로모터를 사용해야 한다. 효모의 프로모터는 발현 형태에 따라 구성적 발현(constitutive expression)과 조절적 발현(regulatory expression) 프로모터로 구분된다. *S. cerevisiae*의 경우 많이 사용되는 구성적 발현 프로모터로서 *ADH*

1(alcohol dehydrogenase)을 위시하여 *GPD*(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *PYK*(pyruvate kinase), *PGK*(3-phosphoglycerate kinase) 등이 있으나 이들을 사용할 경우 일반적으로 발현효율이 낮은 것으로 알려져 있다. 그 이유로서는 구성적 발현 프로모터들이 대부분 해당과정(glycolysis)에 관여하는 효소 유전자로부터 유래되어 유전자 발현이 발효초기부터 지속적으로 이루어짐에 따라 에너지 손실이 크거나 또는 초기에 생산된 재조합 단백질이 숙주세포에 독성을 나타내기 때문이다(15). 이러한 문제점을 극복하기 위해 개발된 것이 조절적 발현 프로모터로서 배지내 인산염의 농도를 낮추면 유전자 발현율이 200배 이상 증가하는 *PHO5* 프로모터나 탄소원으로 포도당대신 galactose를 사용할 때 유전자 발현율을 200배 이상 증가시킬 수 있는 *GAL1* 프로모터 등이 이에 속한다(3). 한편 *H. polymorpha*나 *P. pastoris* 등 메타놀자화 효모의 경우에는 *AOX1* (alcohol oxidase) 또는 *MOX1* (methanol oxidase) 등의 조절적 프로모터 등이 사용되고 있으며 이밖에 *GAM*, *LAC4*, *XPR2* promoter 등이 *S. occidentalis*, *K. lactis*, *Y. lipolitica*에서 조절적 프로모터로 각각 사용되고 있다(13).

(2) 플라스미드 및 유전자의 안정성

재조합 단백질 유전자의 발현시 프로모터와 더불어 고려되어야 할 중요한 인자로서 벡터 플라스미드 및 재조합 단백질 유전자의 안정성이다. *S. cerevisiae*에 이용되는 대부분의 발현벡터는 2 μ 유래의 벡터로서 염색체상의 ARS(autonomous replication sequence) 유래의 플라스미드 보다 높은 안정성을 나타내고 있으나 발효조를 이용하여 재조합 단백질을 대량 생산할 경우 플라스미드가 안정성을 잃어 효모로부터 쉽게 상실되므로 재조합 단백질의 생산성을 낮추는 요인이 되고 있다. 그러나 새로운 효모를 사용하면 재조합 단백질 유전자가 발현벡터와 더불어 숙주세포의 염색체상으로 수직 copy 이상 삽입(integration)되어 안정하게 유지될 수 있으므로 이러한 문제점을 해결할 수 있다. 실제로 *K. lactis*를 이용하여 재조합 prochymosin을 생산할 때 41 ton 규모의 발효조에서도 재조합 단백질 유전자의 안정성을 잃지 않았고(17), 메타놀산화 효모로부터 간염 표면 항원을 생산할 경우에도 최소 150세대 이상 유전자가 안정하게 유지되는 것(6,7)으로 알려졌다.

(3) 단백질분비

재조합 단백질 생산시 숙주세포내에서 생산된 단백질을 체외로 효율적으로 분비시키는 것이 중요하다. 이를 통해 세포내에 축적된 단백질의 독성을 말소시키고 배지내로 분비된 단백질의 정체를 용이하게 함으로써 재조합 단백질 생산의 경제성을 높일 수 있다. 단백질의 체외분비는 분비벡터를 이용함으로써 달성할 수 있는데 이때 신호부위(signal sequence)로서는 효모의 접합 pheromone인 α -factor와 invertase(*SUC2*) 유전자의 신호부위가 가장 많이 사용되고 있다(18). 실제로 이들을 이용함으로써 *S. cerevisiae*로부터 EGF(19), IL-2(16), IFN- α (20) 등이 성공적으로 분비되었다. 그러나 분비단백질의 대부분은 분자량이 작은 것으로서 통상 30 KD 이상의 단백질은 체외분비가 어려우나 *H. polymorpha*나 *S. occidentalis* 등 새로운 효모를 숙주로 사용하면 150 KD 이상의 재조합 단백질도 분비가 가능한 것으로 알려져 있다(8,13,18). 재조합 단백질이 체외로 효율적으로 분비되기 위해서는 KEX2와 같은 endopeptidase에 의해 체내에서 생성된 단백질의 N-말단부위가 정확히 절단되어야 한다.

(4) 번역후 수식 (post-translational modification)

대부분의 재조합 단백질이 생물학적 활성을 나타내기 위해서는 glucosyl화, N-acetyl화, fatty acyl화, 인산화등 단백질 번역후의 적당한 수식이 필요하다. *S. cerevisiae*의 경우 재조합 단백질의 glycosyl화는 전부 mannose에 의한 것이므로 mannose 이외에 다른 당류가 필요한 재조합 단백질은 활성을 잃게 된다. 따라서 이 경우에는 필요한 당류를 화학적으로 첨가시키는 것이 중요하다. 또한 *S. cerevisiae*에서 분비되는 당단백질의 경우 chain당 평균 40개 이상의 mannose로 고glycosyl화 되어 분비효율이 떨어지는 것이 문제점이다. 그러나 *P. pastoris*, *S. occidentalis*, *Y. lipolitica*의 경우에는 chain당 mannose의 수가 8~10개에 불과해 이들의 glycosyl화 형태가 *S. cerevisiae* 보다 고등동물 쪽에 가까운 것으로 알려져 있다(13). 따라서 생물학적으로 활성이 있는 재조합 단백질의 생산숙주로서 이들 새로운 효모를 이용하는 것이 더욱 효과적이다.

(5) 단백질 folding

효모로부터 생산된 재조합 단백질이 생물학적인 활성을 유지하기 위해서는 정확한 삼차원적 구조를 유지해야 한다. 22 nm 간염표면 항원(1,2), prochymosin(21) 등 *S. cerevisiae*에서 생산된 많은 재조합 단백질들이 원래 단백질들과 동일한 삼차원적 구조를 형성함으로써 생물학적 활성을 유지하고 있다. 그러나 t-PA나 인체혈장 albumin처럼 비분비성 단백질의 경우 disulfide 결합이 부정확하게 임의로 형성됨에 따라 정확한 단백질의 folding이 일어나지 않아 활성을 일부 상실하는 수도 있다(3).

4. 결 론

재조합 단백질 생산에 있어 효모가 숙주세포로서 각광받게 된 가장 큰 이유는 전술한 바와같이 진핵세포로서의 여러가지 장점을 지니고 있기 때문이었다. 그러나 효모사용 초기에는 예상하지 못했던 여러가지 문제점들을 때문에 이를 개선하기 위한 많은 노력이 경주되어야 할 것이다. 즉 *S. cerevisiae*에 사용할 보다 강력한 프로모터의 개발이나 보다 안정된 벡터의 개발, 또는 초분비균주(super-secreting

mutant)의 개발 등이 이루어져야 하며 메타놀자화 효모등 비 *S. cerevisiae*계의 효모를 대체숙주로서 이용하기 위한 연구도 활발히 진행되어야 할 것이다. 최근들어 baculovirus 등과 같이 재조합 단백질 생산을 위한 새로운 숙주-벡터 시스템이 개발되고 있으나 효모는 여전히 상업적으로 가장 중요한 균주로 간주되고 있다. 그 이유로서 효모는 재조합 단백질 생산의 숙주세포 이외에도 receptor 작용기작 연구의 모델시스템으로서 새로운 의약품 개발에 중요한 도구로 사용되거나 효모에 기생하는 바이러스의 생활환(life cycle) 연구를 통해 새로운 항바이러스제를 개발하는데도 이용될 수 있기 때문이다. 이와 같은 관점에서 이제까지 드러난 여러가지 문제점들이 개선되고 새로운 효모시스템이 개발된다면 효모는 재조합 단백질 생산의 가장 유망한 숙주로서 특히 제약사업에서 계속적으로 각광 받을 것으로 예상된다.

참고문헌

- Hitzeman, R.A. *et al.* Nature **293**: 717 (1981).
- Valenzuela, P. *et al.* Nature **298**: 347 (1982).
- Kingsman, S.M. *et al.* TIBTECH **5**: 53 (1987).
- Hallewell, R.A. *et al.* Bio/Technology **5**: 363 (1987).
- De Bactselier, A. *et al.* Bio/Technology **9**: 559 (1991).
- Cregg, J.M. *et al.* Bio/Technology **5**: 479 (1987).
- Janowicz, Z.A. *et al.* Yeast **7**: 431 (1991).
- Siegel, R.S. *et al.* European Patent Application W090/10697 (1989).
- Brierley R. Per. Com. (1991).
- Gellissen, G. *et al.* Bio/Technology **9**: 291 (1991).
- Tschopp, J.F. *et al.* Bio/Technology **5**: 1305 (1987).
- Fellinger, A.J. *et al.* Yeast **7**: 463 (1991).
- Buckholz, R.G. and Gleeson M.A.G. Bio/Technology **9**: 1067 (1991).
- Baldara, C. *et al.* EMBO J. **6**: 229 (1987).
- Fleer R. *et al.* Gene (1991).
- Miyajima, A. *et al.* Gene **37**: 155 (1985).
- Van den Berg, J. A. *et al.* Bio/Technology **8**: 135 (1990).
- Rammanos, M.A. *et al.* Yeast **8**: 423 (1992).
- Brake A.J. *et al.* PNAS **81**: 4642 (1984).
- Singh, A., *et al.* Nucleic Acid Res. **11**: 4049 (1983).
- Mellor J. *et al.* Gene **24**: 1 (1983).