

*Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 온도조절형 발현 Vector의 개발

최진옥 · 황용일*

경남대학교 공과대학 식품공학과

Construction of a Temperature Controlled Expression Vector in *Saccharomyces cerevisiae*

Choi, Jin-Ok and Yong-Il Hwang*

Department of Food Engineering, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

Abstract — The mating type a of a yeast, *Saccharomyces cerevisiae* mutant with *hmla2-102* and *sir3-8th* was changed to type α by changing the growth temperature from 25°C to 35°C. A temperature-sensitive expression vector system was constructed using mating factor $\alpha 1$ (*Mfa1*) gene encoding α factor which is expressed in the type α cells. Vectors with different copy numbers were constructed by joining the promoter and pre or prepro-secretion signal sequence of *Mfa1* to promoterless *PHO5'* gene as a reporter gene. Acid phosphatase (APase) was produced with high level at permissive temperature (35°C), but not at the restrictive temperature (25°C). At the temperature between 25°C and 35°C, its activity showed intermediate level. Thus, the expression level of heterologous protein can be regulated by adjusting the growth temperature.

효모는 진핵세포로서 유전정보 전달 기구와 DNA 복제양식, RNA polymerase의 종류와 mRNA의 구조 등이 본질적으로 고등동물세포와 유사하며 ribosome에서 합성된 단백질분자는 일반 진핵세포와 동일한 경로를 거쳐 균체외로 분비된다. 최근까지 DNA 조작에 의한 유전자의 대량발현에 이용되어온 대부분의 세균 숙주·vector system은 원핵세포로서 기능의 한계, 즉 post-translational processing의 결여나 이종 단백질의 불용성 과립화로 인하여 숙주세포의 성장저해 내지는 생산물의 불활성화 등과 같은 문제점이 야기되고 있다. 효모는 오랫동안 발효공업에 이용되어 대량 배양기술의 확립은 물론, 그 안전성에 있어 이미 사회적 수용도가 높아졌다. 나아가 유전학적 지식의 축적과 더불어 분자생물학적 연구가 대장균의 수준에 이른 근래에 들어서 고등동물의 생리활성물질인 사람의 상피성장인자(Epidermal Growth Factor)(1), 쥐와 소의 interleukin-2(2, 3) 등의 생산에 이용되고 있는 실정이다. 그러나 대량생산을 목적으로

강력한 promoter를 이용하여 생성된 이종물질의 세포내 다량 축적은 숙주세포의 생리균형의 파괴 뿐만 아니라 생산물 역시 분해를 받아 생산량의 저하를 초래하기 쉽다. 이러한 문제의 해결방법으로 유전자의 산물을 인위적으로 조절하거나 균의 생육기간중 적절한 시기에 발현을 유도하는 vector system이 연구되어, phosphatase 생산계를 이용한 B형 간염 virus의 표면항원의 대량생산(4) 및 galactose 대사계(5)를 이용한 유전자의 발현 등에 널리 이용되고 있다. 이러한 것들은 생산유도를 위하여 배양액중의 인산의 제거나 탄소원의 대체 등이 대량배양에서는 불가능하므로 물리적 변화, 즉 온도조절에 따라 물질생산이 유도되는 생산계가 요구된다.

효모는 a 접합형과 α 접합형의 반수체 세포가 있으며 a 형 또는 α 형의 결정은 효모의 제 III번 염색체상의 *HML*(Mating type cassette)좌, *MAT*(Mating type locus)좌, *HMR*(Mating type cassette)좌에 의하여 결정된다. 일반적으로 *HML*좌와 *HMR*좌는 SIR(Silent Information Regulator)에서 SIR4에 해당하는 조절 단백질에 의하여 억제되어 발현되지 않으며 *MAT*좌만이 발현되어 *MAT a* 일 때는 a 형, *MAT α* 일 때는 α

Key words: Mating type, temperature-sensitive, pre-pro-secretion signal sequence

*Corresponding author

형의 세포가 된다(6). *MAT α* 에는 $\alpha 1$ 유전자와 $\alpha 2$ 유전자가 있으며 *MATa*에는 $a 1$ 유전자가 있어 각각의 단백질이 합성되어진다. 또한 효모에는 a 세포일 때만 발현하는 유전자군(a_{sg} : a specific gene)이 있는가 하면, α 세포일 때만 발현하는 유전자군(α_{sg} : α specific gene)이 있어 이들 유전자들의 발현은 *MAT*좌에서 합성되는 상기 a 와 α 유전자에 의하여 생성된 단백질에 의해 제어받는다. Mating pheromone α factor의 구조유전자 *Mfa1*은 α 형 유전자의 대표로 들 수 있다. 세포가 α 형, 즉 *MAT α* 일 때는 $\alpha 1$ 과 $\alpha 2$ 유전자가 발현하여 $\alpha 2$ 단백질이 a 세포 특이적인 유전자군(a_{sg})의 발현을 억제하므로 $\alpha 1$ 단백질은 *Mfa1*유전자를 포함하는 α 세포 특이적인 유전자군(α_{sg})의 발현만을 유도한다. 그 결과 세포는 α 형을 나타낸다. 세포가 a 형일 때 *MATa*에서 $a 1$ 단백질이 합성되지만 $\alpha 2$ 단백질이 없기 때문에 a_{sg} 이 발현하여 세포는 a 형을 나타낸다. a 형과 α 형 세포가 접합하여 이배체, 즉 *MATa*와 *MAT α* 가 함께 발현할 때 $\alpha 2$ 단백질은 a_{sg} 을 억제하는 한편 $a 1$ 단백질과 협조하여 $\alpha 1$ 유전자의 발현을 억제하기 때문에 세포는 비접합형(nonmating type)을 나타낸다.

효모의 acid phosphatase(EC 3.1.3.2; APase)는 *PHO3* 및 *PHO5*유전자에 의하여 합성되어 periplasmic space로 분비되며 *PHO3*의 발현은 구성적인 반면에 *PHO5*는 유도성 효소의 구조유전자로 Oshima 등(7)에 의하여 상세히 연구된 바 있다. 본 실험의 reporter 유전자로 이용되는 *PHO5*는 Hwang 등(8)에 의해 이미 유전자 발현 측정의 유용성이 보고되어 있으며, APase의 활성은 세포현탁액을 이용하거나(9) 배지상에 자라난 colony를 이용하여 쉽게 측정할 수 있다(10). 본 연구에서는 효모를 이용한 유용물질의 효율적인 발현을 위한 숙주·vector system을 구축하기 위하여 온도에 따라 세포의 접합형이 바뀌는 효모의 육종을 목적으로, 교잡 및 tetrad 분석 등을 통하여 다양한 영양요구성을 지닌 균주를 선별한다. 또한 외래유전자의 발현을 유도하기 위하여 상기의 *Mfa1*유전자의 promoter 부분을 분리, 발현량 측정을 위한 reporter 유전자로 이용되는 *PHO5*와 융합유전자를 구축함으로써 숙주내 copy수가 다른 각종의 발현 vector를 제작하여 온도변화 및 vector의 copy수 차에 따른 숙주·vector system의 효과적인 발현여부를 관찰하였다.

재료 및 방법

사용균주와 plasmid DNA

Saccharomyces cerevisiae 효모균주 PS3-8A-M1 (*hml $\alpha 2$ -102 MATa HMRA sir3-4 pho3-1 pho83 leu1 his5 his6*)와 효모 520(*HML α MATa HMRA sir3-8^{ts} his4 trp1 ade2 tyr1 lys2 sup4*) 및 효모 SH748(*MATa gcn2 trp1 his1 pho3 pho5 ura3*)은 균주개량용으로 이용하였으며, 효모 NBW7(*MATa ura3 trp1 his3 ade2 pho3*)과 NBW8(*MATa ura3 trp1 his3 ade2 pho3*)은 접합형 검정용으로 이용하였다. 대장균 JA221(*leuB6 trpE5 lacY hsdR recA*), HB101[*supE44 hsdS20(r_B m_B) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1*] 및 JM109[*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA 96 relA1 thi Δ (lac-proAB)*]는 plasmid DNA의 제조와 대량회수에 사용되었다. 각종 plasmid DNA의 제조에는 다음의 plasmid들을 이용하였다; p69A(*Ap^r 2 μ ori LEU2 Mfa1 15 kb*)(11), pVC727(*TRP1 ARS1 PHO5' CEN3 Ap^r 5.7 kb*)(8), pHRU1(*HIS5-PHO5 URA3 Ap^r 6.6 kb*)(12), YCp50(*Ap^r ARS1 CEN4 URA3 8.0 kb*)(13). 본 실험의 균주개량을 위하여 이용된 효모균주들은 Oshima연구실(Osaka Univ., Japan)에서 분양받은 것이다.

배지

효모의 일반적인 배양을 위해서는 YPD 배지(yeast extract 1%, polypeptone 2%, glucose 2%)를 사용하였다. 형질전환과 APase 활성측정을 위한 전배양에는 SD 합성배지[증류수 1 liter당 glucose 20 g, yeast nitrogen base(w/o amino acid) 6.7 g]를 사용하였으며 효소활성측정을 위한 전배양, 본배양 및 plate상의 활성측정을 위해서는 Burkholder의 +P합성배지(14)를 사용하였다. 각 합성배지에는 효모의 영양요구성에 따라 아미노산과 핵산을 첨가하였다. 대장균의 일반배양에는 L-broth(15)를 사용하였으며 plasmid의 다량정제시에는 M9 배지(15)를 사용하였다. 필요에 따라 1% thiamine과 sodium ampicillin 용액 (50 μ g/ml)을 첨가하였다. 평판배지는 위의 액체배지에 2%의 agar를 첨가하여 조제하였으며, 포자분리용 film 배지는 상기 YPD배지에 agar 25 g을 첨가하여 조제하였다.

효모의 유전학적인 실험방법

균주개량을 위한 잡종이배체의 형성은 Mass mating법(16)을 이용하였으며, 포자분리는 Sherman 등의 방법(17)을 응용하였다.

APase 활성 측정의 경우, 평판배지상에서 자란 콜로니를 이용한 직접염색은 Toh-e와 Oshima법(10, 18)을 따랐으며, 배양세포의 현탁액을 이용한 활성측정법은 Toh-e 등의 방법(9)을 이용하였다. 효소활성 1 unit(U)는 효소에 의하여 1분당 유리된 1 μ mol의 p-nitrophenol량으로 환산하였다.

대장균의 형질전환은 Morrison의 방법(19)에 따라 행하였으며, 효모의 형질전환은 Ito 등의 방법(20)을 응용하였다. 제한효소의 처리, ligation 등 DNA 분자의 조작은 Maniatis 등의 방법(15)에 따랐다.

결과 및 고찰

온도상승에 의한 접합형 변환 균주의 선별

세포증식의 일정기에 물질생산, 즉 유전자의 발현을 유도하는 숙주세포를 육종하기 위하여 온도변화에 의한 세포의 접합형 변환 균주의 분리에 착안하였다. 먼저 접합형 조절유전자 SIR3의 온도감수성 변이 *sir3-8^{ts}*는 25 $^{\circ}$ C에서는 HML좌 및 HMR좌의 유전자 발현을 억제하나 35 $^{\circ}$ C에서는 억제가 불가능한 변이이며, *hml α 2-102* 유전자 변이는 HML좌에서 생산된 α 2 변이 단백질 단독으로서는 a_{sg} 유전자들의 발현을 억제하나 a1단백질과의 결합이 불가능하므로 α 2와 a1 단백질의 공동작용에 의한 α 1 유전자의 발현 억제가 불가능한 변이이다. 상기의 변이 *hml α 2-102* 및 *sir3-8^{ts}*을 지닌 변이주의 접합형은 유전자형이 *hml α 2-102 MATa HMRa sir3-8^{ts}*일 때, 25 $^{\circ}$ C에서는 a형으로 35 $^{\circ}$ C에서는 α 형으로 바뀌는 것으로 추정된다(Fig. 1).

이러한 숙주의 육종 및 나아가 다양한 발현 vector의 도입을 가능하게 하기 위하여 수종의 영양요구성 표지를 지닌 균주의 선별 개량을 실시하였다. 먼저 *hml α 2-102*의 변이를 지닌 효모 PS3-8A-M1 (*hml α 2-102 MATa HMRa sir3-4 pho3-1 pho83 leu1 his5 his6*)과 효모 520(*HML α MATa HMRa sir3-8^{ts} his4 trp1 ade2 tyr1 lys2 sup4*)을 protoplast fusion으로 잡종 이배체를 형성시킨 후 tetrad 분석으로 분리된 반수체 효모들 중에서 plate 검정을 통하여 상기의 변이를 지닌 segregant(*hml α 2-102 MATa HMRa sir3-8^{ts} lys2 his*)를 분리하였다. 두개의 변이를 지닌 균주의 온도 shift에 의한 접합형의 변환을 확인하기 위하여 접합형은 상이하나 동일한 유전적 배경을 지닌 NBW7(a *ura3 trp1 his3 ade2 pho3*)과 NBW

Genotype:

<i>hmlα2-102</i>	<i>MATa</i>	<i>HMRa sir3-8^{ts}</i>
/ \	/ \	/ \
xa x α	xa x α	xa x α
Phenotype:		
a	α	α
25 $^{\circ}$ C	30 $^{\circ}$ C	35 $^{\circ}$ C

Fig. 2. Regulation of the cell type was generated by adjusting the growth temperature.

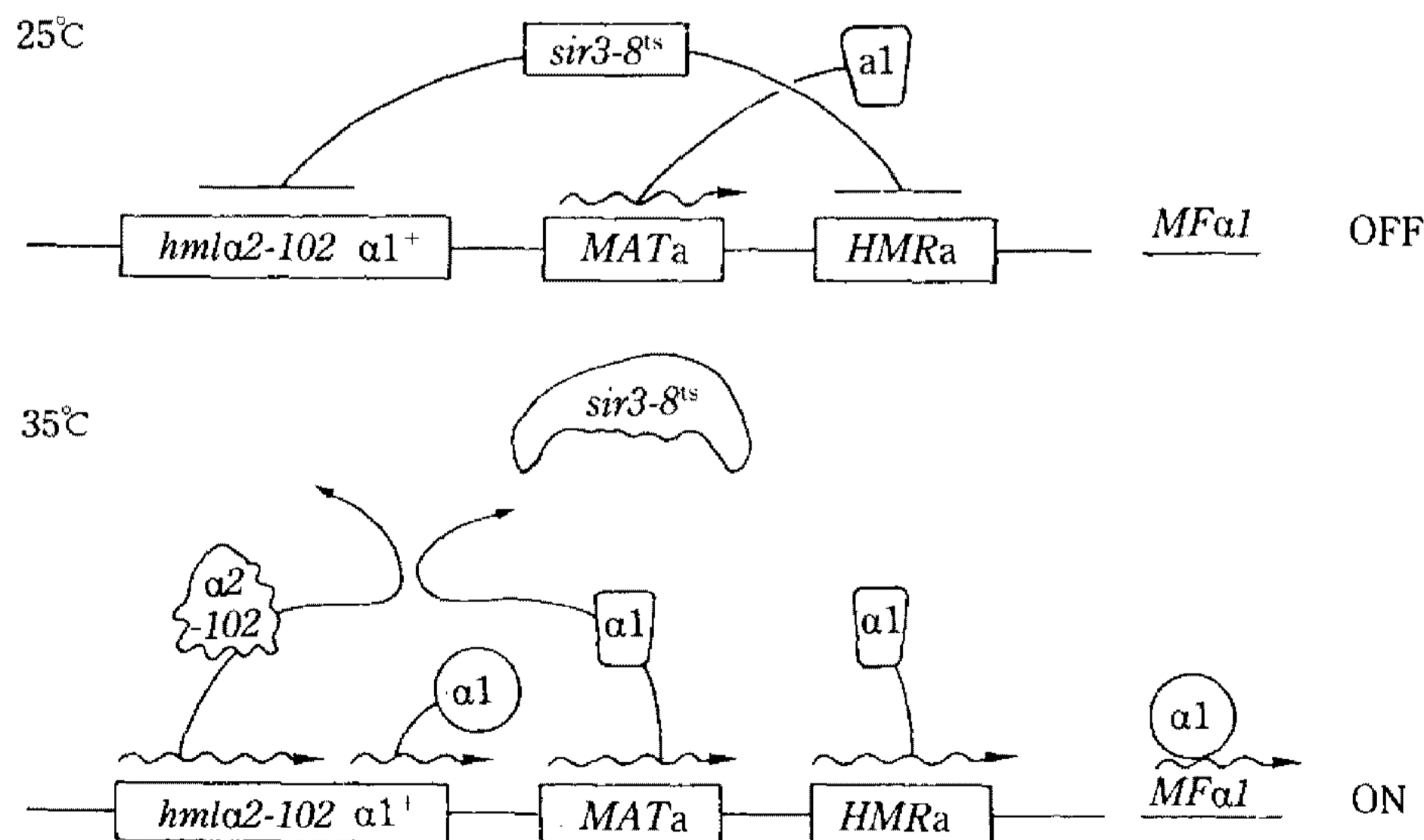


Fig. 1. Hypothesis of the function of *sir3-8^{ts}* protein at restrictive (25 $^{\circ}$ C) or permissive temperature (35 $^{\circ}$ C). Hypothesis is well described in the text.

8(α *ura3 trp1 his3 ade2 pho3*)을 검정균으로 하여 25°C, 30°C 및 35°C에서의 접합형을 조사하였다(Fig. 2). 이 결과로부터 25°C에서는 a형을 나타내며, 30°C에서는 어느 정도 a형의 세포도 존재하나 주로 α 형을, 35°C에서는 대부분의 모든 세포가 α 형으로 나타나는 것을 알 수 있었다. 분리된 segregant와 SH748(*MATa gcn2 trp1 his1 pho3 pho5 ura3*)과의 잡종 이배체의 형성과 tetrad 분석을 통하여 분리된 반수체 효모 중에서 본 실험에 적합한 효모인 HY51(*hmla2-102 MATa HMRA sir3-8^{ts} trp1 ura3 pho3 pho5*)을 plate상에서 검정을 통하여 선별하였다.

발현 vector의 제작

상기의 효모 HY51을 숙주로 이용하여 생육 특성에 발현이 유도되는 생산계를 구축하기 위해서 25°C에서 α_{sg} 에 속하는 유전자와, 35°C에서 α_{sg} 에 속하는 유전자의 promoter를 이용하여 각각 특정온도에서의 발현이 가능한 유도계의 설정을 시도하였다. 따라서 α_{sg} 에 속하는 α factor의 구조유전자 *Mfa1*을 이용하여 35°C에서 유전자 발현이 유도 가능한 물질생산계를 구축하기로 하고, 발현을 정확하게 측정하기 위한 reporter로서 생산된 효소의 활성측정이 용이한 효모의 APase를 사용하였다. *Mfa1* 유전자 산물인 α factor에는 pre와 pro의 양 secretion signal peptide가 있으며, 이에 의하여 세포외로 분비된다(11). Pre 또는 prepro-sequence를 포함하는 promoter와 APase의 구조유전

자 *PHO5*의 promoter부를 제거한 단백질 합성부분 (*PHO5*)을 연결하여 융합 유전자를 작성하였다. Fig. 3은 사용된 각 유전자 내지는 제작된 융합 유전자를 나타내며, 먼저 *PHO5'*와의 융합 유전자의 구축은 promoter 검색용 vector인 pVC727을 제한효소 *EcoRI* 및 *HincII*로 처리하여 *PHO5'*의 secretion signal peptide(S)를 제거한 후, p69A에서 *Mfa1*의 promoter(P) 및 pre-sequence를 포함하는 *EcoRI* 및 *HincII*의 DNA 단편을 삽입하거나, promoter 및 prepro-sequence를 연결시키기 위해서는 먼저 제한효소 *HindIII*로 절단하여 삽입한 다음 *EcoRI*으로 분해하여 정제한 DNA 단편을 삽입하여 제작하였다. 한편 발현 vector의 copy수 변동에 따른 생산량의 조절, 즉 gene dosage 효과를 조사하기 위하여 세 종류의 vector를 제작하였다. 우선 YIp형(1 copy/cell)의 제작은, YIp형 vector인 pHRU1(*HIS5-PHO5* promoter 융합 유전자)을 이용하여 *HIS5* promoter와 *PHO5'*의 일부를 포함하는 *BamHI* 및 *BstEII* 절단부위로 이루어지는 DNA 단편을 제거한 후 상기 제작된 vector에서 *Mfa1*의 promoter 부분과 *PHO5*의 일부를 포함하는 제한효소 *EcoRI*의 5' 상류 10 bp에 위치하는 *BamHI* 및 *BstEII*의 절단 DNA 단편을 삽입하여 이루어졌다. YCp형(1~3 copies/cell) vector의 제작은, YCp50의 제한효소 *BamHI* 및 *HindIII* 절단 부위 사이에 YIp형의 발현 vector에서 *Mfa1-Pho5* 융합 유전자를 포함하는 DNA 단편 *BamHI-HindIII*를 삽입하여 제

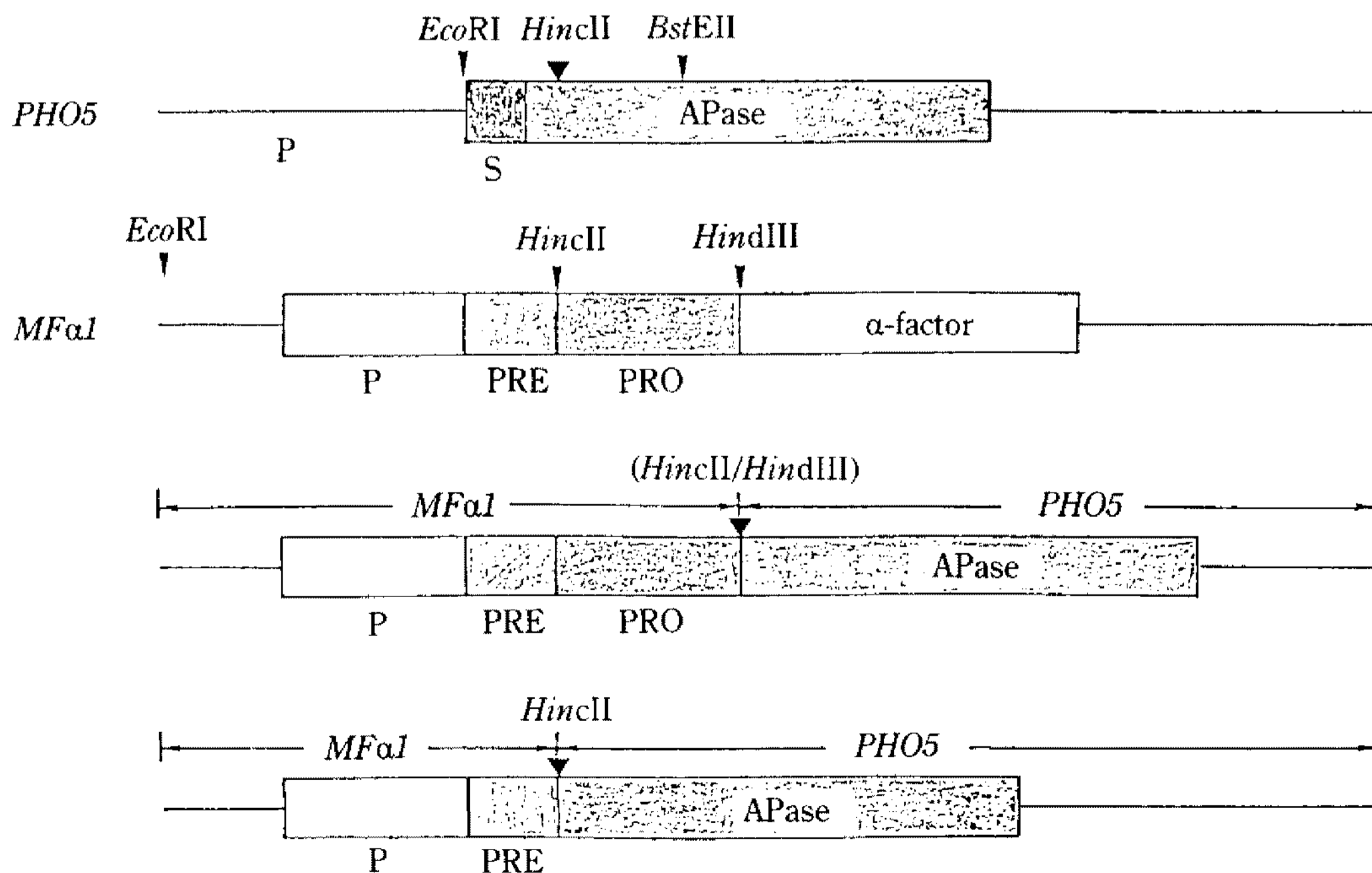


Fig. 3. Schematic structure of the genes used for constructing expression vectors.

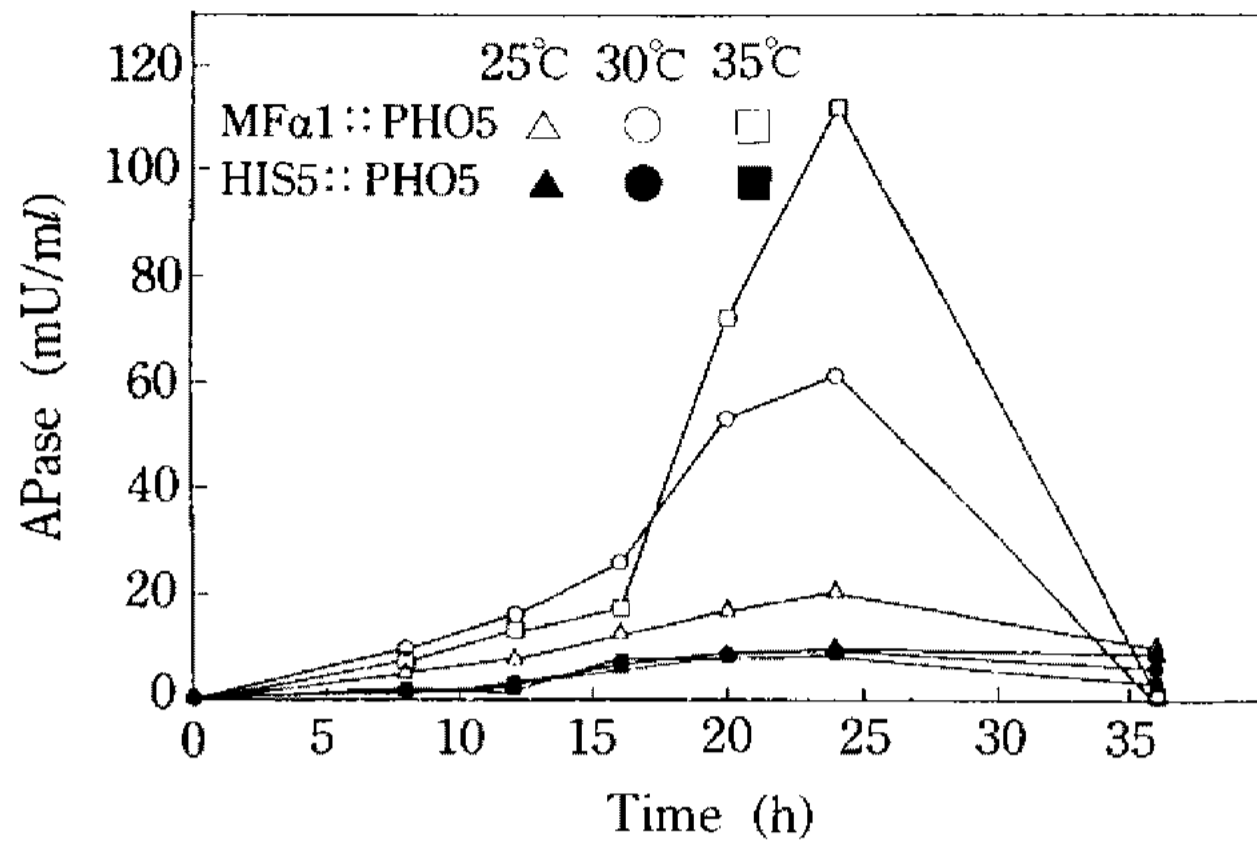


Fig. 4. APase production of the yeast transformants harboring the YRp type expression vector.

조하였다. YRp형(10~50 copies/cell)은 YRp17의 *Bam*HI-*Hind*III의 사이에 상기의 방법으로 제작되었다. 각각의 발현 vector의 효모 숙주내에서의 발현을 알아보기 위하여 효모 HY51을 숙주로 이용, 각각의 재조합 plasmid를 도입하여 *Ura*⁺ 형질전환체를 획득한 다음 plate상에 자라난 각 colony에 대한 온도 shift 후의 APase 활성을 plate에 자란 colony의 염색에 의해 조사한 결과, 25°C에서는 활성이 감지되지 않은(white) 반면, 30°C에서(pink)와 비교하여 35°C에서(red)의 활성이 높았으며 발현 vector의 copy수에 따라서도 활성에 차이(YRp형; dark red)를 보였다(결과 미제시).

온도에 따른 각 발현 vector의 APase 효소 생산량의 변화

상기 제작된 각종의 발현 vector를 효모숙주 HY51에 도입하여 *Mfa1*의 promoter에 의한 APase의 활성을 측정하였다. Fig. 4에서 경시적인 효소생산량의 측정에 이용된 발현 vector는 YRp형으로 25°C에서 전배양한 후 25°C, 30°C 및 35°C에서 본 배양을 실시하여 적절한 시기에 배양액을 분취하여 세포현탁액으로 정확한 효소생산량을 산출하였다. Control로는 *HIS5-PHO5* promoter 융합 유전자를 지닌 pHRU1을 이용하였다. *HIS5* promoter에 의한 APase의 생산량은 온도의 변화에 의하여 효소 생산량의 변화를 감지할 수 없으나 YRp형의 발현 vector의 효소 생산량은 온도변화에 의해 뚜렷한 차이를 보여, 배양 후 16시간이 경과되면서 차이가 나타나기 시작하여 24시간에 가장 큰 차이를 보였다. 이는 Fig. 2에서의 결과와 비교할 때 효모숙주의 α 형 접합형의 표현형의 정도에 따라 *Mfa1* promoter의 고발현이 야기되며 이에 의

Table 1. APase activities derived from the structural difference of expression vectors

Plasmid	APase (mU/ml)		
	25°C	30°C	35°C
YIp	2.1	25.1	29.2
<i>Mfa1::PHO5</i> (PRE)	1.6	30.4	73.3
YRp	20.4	60.8	112.0
<i>Mfa1::PHO5</i> (PRE-PRO)	1.5	30.8	12.1
<i>HIS5::PHO5</i> Vector	0.8	0.7	0.6
YCp	9.5	8.5	8.8

하여 APase의 생산량도 증가되는 것을 알 수 있다.

이를 본배양 개시 20시간 경과 후의 각 온도에서의 vector 구조 및 copy수에 따라 생산된 효소활성을 Table 1에 나타내었다. 먼저 control로 이용된 *Mfa1*의 promoter가 없는 pVC727의 경우에는 각 온도에서 효소활성이 거의 감지되지 않은 반면 *HIS5-PHO5*를 지닌 pHRU1은 온도의 변화에 상관없이 거의 동일한 효소활성을 보였다. 한편 *Mfa1*의 promoter 및 pre-sequence와의 fusion을 지닌 구조의 copy수가 상이한 발현 vector의 효소활성을 비교하여 보면, 25°C에서 YRp형의 경우만이 활성이 보일 뿐 YIp 및 YCp에서는 활성이 거의 감지되지 않았다. 30°C에서는 vector의 copy수에 따라 차이를 보였으며, 35°C에서는 YRp형(112 mU)이 YCp형(73.3 mU) 및 YIp형(29.2 mU)보다 각각 1.5배 내지 4배의 높은 효소생산량을 보였다. YRp형의 25°C에서의 활성은 *Mfa2* 억제계를 이용한 Sledziewski 등(21)의 β -galactosidase의 결과와 비교할 때 copy수에 의하여 어느 정도의 발현이 예상되었다. 한편 *Mfa1*의 promoter 및 prepro-sequence가 결합된 구조의 YCp형의 vector를 이용한 효소활성에서는 pre-sequence만을 지닌 경우와 비교할 때 35°C에서는 오히려 감소(73.3 mU→12.1 mU)되는 경향을 보였다. 이는 α factor의 분비에 작용하는 prepro-sequence 중에서 pre-sequence만 있으면 생산된 APase의 세포외 분비가 불충분하나 전부 존재하면 세포외로의 분비가 촉진되는데 기인하는 것으로 추정되며 배양세포를 제거한 배양상등액에서 APase의 활성이 감지되었다(결과 미제시). 이러한 결과는 *Mfa1-PHO5* 융합 유전자를 이용한 Sidhu와 Bollon(22)의 실험결과와 일치하였으며, 이는 본 발현계에서 생산

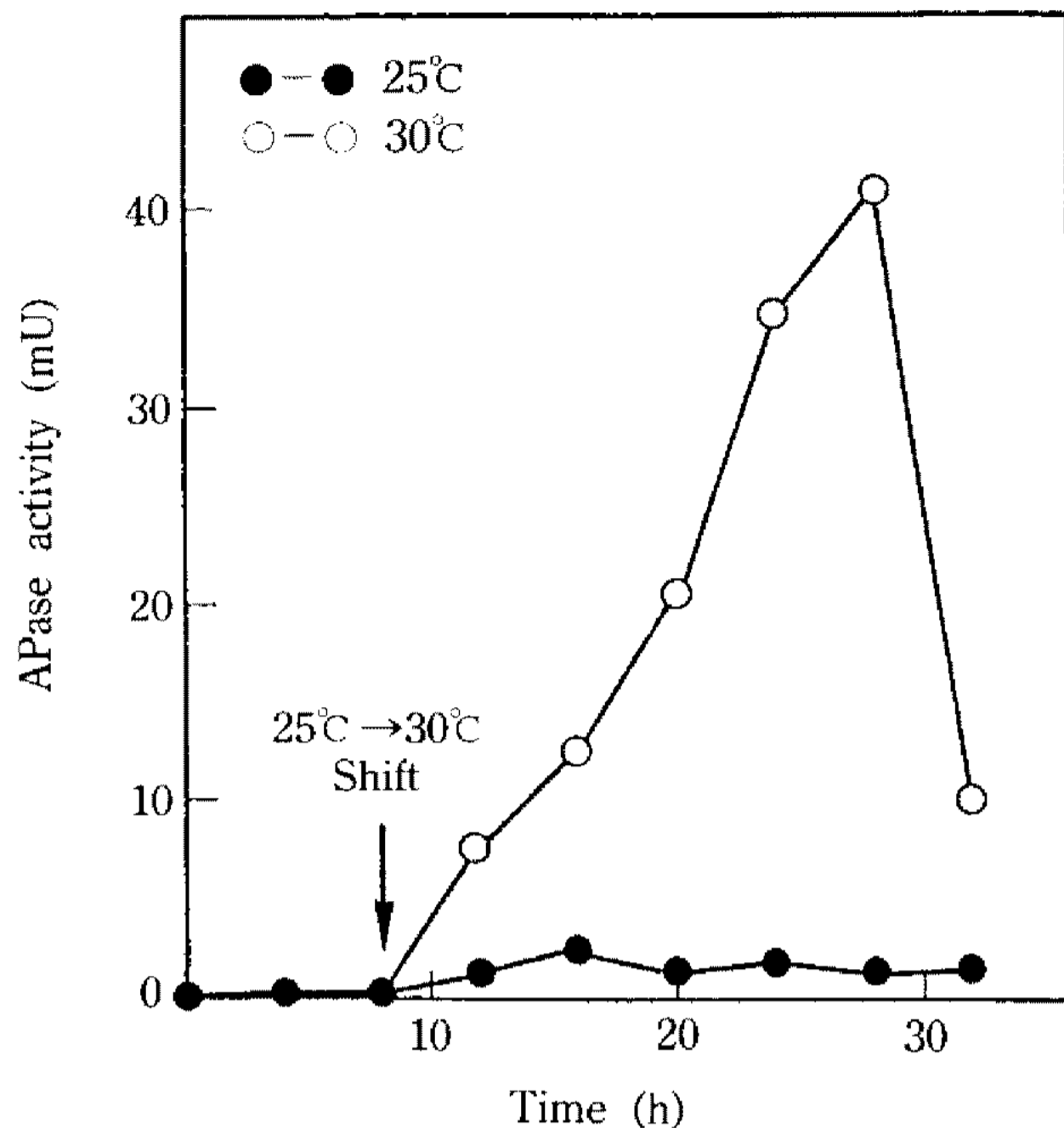


Fig. 5. Induction of APase production by adjusting the growth condition to permissive temperature.

Symbols of closed circle and open circle represent APase activity at 25°C and 30°C, respectively.

물질의 유도 분비의 가능성을 시사하는 것으로 사료된다.

온도 shift에 의한 효소생산의 유도

이상의 결과에서 각 온도에서의 APase의 효과적인 생산량의 증가를 보았으며, 적절한 온도에서의 배양후 먼저 배양세포가 일정농도에 이르면 목적생산물의 이중단백질 유전자 발현의 유도가 가능하였다. Fig. 5에서는 발현 vector 중에서 pre-sequence만을 지닌 YCp형을 이용하여 온도상승에 의한 효소활성의 증가를 경시적으로 나타내었다. 25°C에서의 배양중에는 효소활성이 감지되지 않았으나, 배양 8시간에서 25°C 및 30°C의 분리배양을 실시하여 온도 shift 12시간 후부터는 APase의 활성치가 두드러져 20시간 경과시에 가장 많은 효소활성을 보였다. 그러나 25°C에서는 배양시간에 관계없이 뚜렷한 활성이 감지되지 않았다. 따라서 이중유전자 산물의 대량생산시 문제점으로 나타난 세포내 다량 축적에 의한 분해, 숙주세포의 생리균형의 파괴 및 생육저지 등의 문제를 일거에 해소할 수 있는 가능성을 보여주었다.

요 약

진핵세포를 이용한 온도 조절형 유전자발현시스템

을 구축함에 있어 우선 효모의 성전환 기구를 이용, 온도에 의하여 효모의 접합형(a형 또는 α 형) 변환이 가능한 숙주세포를 유전학적 방법을 통하여 선별, 개량하였다. 개량된 균주의 온도 shift, 즉 25°C, 30°C, 35°C에서의 접합형 변환을 조사하였다. 실험 결과 25°C에서는 a형으로 35°C에서는 α 형으로 나타났다. 그리고 균의 생육 특정기에 발현을 유도할 수 있는 system으로, 발현용 vector 제작에는 35°C에서 접합형이 α 일 때 발현하는 *Mfa1*(α factor) 유전자의 promoter를 이용했다. 발현을 정확하게 측정하기 위한 reporter로는 생산된 효소의 활성측정이 용이한 효모의 APase를 사용하였다. 한편 gene dosage 효과에 의하여 생산되는 단백질의 양은 copy수가 상이한 세 종류의 발현 vector, 즉 YIp형(1 copy/cell), YCp형(1~3 copies/cell) 그리고 YRp형(10~50 copies/cell)을 제작하여 효소 활성을 비교한 결과, 35°C에서 YRp형이 112 mU로 YCp형(73.3 mU) 및 YIp형(29.2 mU)보다 각각 1.5배 내지 4배의 높은 효소 생산량을 보였다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단 일반기초연구비(903-0411-012-1)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Brake, A.J., J.P. Merryweather, D.G. Coit, V.A. Heberlein, F.R. Masiarz, M.S. Urdea, P. Valenquela and P.J. Barr. 1984. α -Factordirected synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 4642.
2. Miyajima, A., M.W. Bond, K. Otsu, K. Arai and N. Arai. 1985. Secretion of mature mouse interleukin-2 by *Saccharomyces cerevisiae*: Use of a general secretion vector containing promoter and lead sequences of the mating pheromone α -factor. *Gene* **37**: 155.
3. Price, V., D. Mochizuki, C.J. March, D. Cosman, M.C. Deeley, R. Kleinke, W. Clevenger, S. Gillis, P. Baker and D. Urdal. 1987. Expression, purification and characterization of recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and bovine interleukine-2 from yeast. *Gene* **55**: 287.
4. Miyano-hara, A., A. Toh-e, C. Nozaki, F. Hamada, N. Ohtomo and K. Matsubara. 1983. Expression

- of hepatitis B surface antigen gene in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 1.
5. Oshima, Y., A. Toh-e and K. Matsumoto. 1984. Regulatory circuits for gene expression: The metabolism of galactose and phosphate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein, Nucleic acid and Enzyme* **29**: 14.
 6. Herskowitz, I. and Y. Oshima. 1981. In J.H. Strathern, E.W. Jones and J.R. Broach (Eds.), *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, Cold Spring Harbor Lab., New York.
 7. Oshima, Y. 1981. In J.H. Strathern, E.W. Jones and J.R. Broach (Eds.), *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, Cold Spring Harbor, New York.
 8. Hwang, Y.I., S. Harashima and Y. Oshima. 1989. Improvement and application of a promoter-probe vector bearing the PHO5 gene as the indicator marker in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.* **67**: 1.
 9. Toh-e, A., Y. Ueda, S. Kakimoto and Y. Oshima. 1973. Isolation and characterization of acid phosphatase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **113**: 727.
 10. Toh-e, A. and Y. Oshima. 1974. Characterization of a dominant constitutive mutant, PHOO, for the repressible acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **120**: 608.
 11. Kurjan, J. and I. Herskowitz. 1982. Structure of a yeast pheromone gene (MF α): A putative α -factor precursor contains four tandem copies of mature α -factor. *Cell* **30**: 933.
 12. Hwang, Y.I. 1991. Elucidation of function and isolation of *trans*-acting factors regulating the basal level expression of eukaryotic genes. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 37.
 13. Johnston, M. and R.W. Davis. 1984. Sequence that regulate the divergent GAL1-GAL10 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 1440.
 14. Burkholder, P.R. 1943. Vitamin deficiencies in yeasts. *Am. J. Botany.* **30**: 206.
 15. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Enzymes used in molecular cloning. *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Lab., New York.
 16. Lindegren, C.C. and G. Lindegren. 1943. A new method for hybridizing yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **29**: 306.
 17. Sherman, F., G.R. Fink and J.B. Hicks. 1982. *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Lab., New York.
 18. Toh-e, A. and Y. Oshima. 1974. Characterization of a dominant constitutive mutation, PHOO, for the repressible acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **113**: 727.
 19. Morrison, D.A. 1977. Transformation in *Escherichia coli*: cryogenic preservation of competent cells. *J. Bacteriol.* **132**: 349.
 20. Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163.
 21. Sledziewski, A.Z., A. Bell, K. Kelsay and V.L. Mackay. 1988. Construction of temperature regulated yeast promoters using the MAT α 2 repression system. *Bio/Technology* **6**: 411.
 22. Sidhu, R.S. and A.P. Bollon. 1987. Analysis of α -factor secretion signals by fusing with acid phosphatase of yeast. *Gene* **54**: 175.

(Received April 1, 1993)