

메타놀 자화 효모 *Hansenula polymorpha*를 이용한 재조합 인체 표피 성장인자 유전자의 발현 및 분비

오용익¹ · 손정훈 · 최의성 · 김희철¹ · 이상기*

한국과학기술연구원 부설 유전공학연구소, 응용미생물연구그룹, ¹(주) 녹십자 종합연구소

Gene Expression and Secretion of Human Epidermal Growth Factor in a Methylophilic Yeast *Hansenula polymorpha*

Oh, Yong-Ik¹, Jung-Hoon Sohn, Eui-Sung Choi,
Hee-Chul Kim¹ and Sang-Ki Rhee*

Applied Microbiology Research Group, GERI, KIST, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea

¹Central Research Institute, Korea Green Cross Corporation, 227, Kugal-Ri,
Kiheung-Eup, Kyungki-Do, Korea

Abstract — Using a methylophilic yeast *Hansenula polymorpha*, a heterologous gene expression and secretion system was developed for the production of hEGF(human Epidermal Growth Factor) which has been shown to promote epithelial cell proliferation and to inhibit gastric acid secretion. The hEGF gene was chemically synthesized according to the preferred codon usage in *H. polymorpha* and expressed under the control of the strong and inducible methanol oxidase(MOX) promoter. The mating factor α pre-pro leader sequence of *Saccharomyces cerevisiae* was employed for hEGF to be secreted into the extracellular medium. This expression cassette was stably integrated into the host chromosomal DNA. Mature hEGF was efficiently expressed and secreted into the extracellular medium. About 24 mg/l of hEGF was detected in the culture supernatant of a transformant with pA-EGF3 under the suboptimal culture conditions.

최근까지 재조합 효모 균주의 개발은 생리학적 및 유전학적 연구가 많이 진행되어 온 *Saccharomyces cerevisiae*를 중심으로 이루어져 왔다. *S. cerevisiae*는 이종 단백질을 발현시킬 때 높은 생산성과 고등진핵세포의 일반적인 번역후 수식 양상을 보여주기 때문에 산업적, 특히 제약 산업에서 숙주세포로 많이 이용되어 왔다. 그러나 산업적 응용의 측면에서 볼 때 *S. cerevisiae*는 이종 단백질의 대량 생산시 강력하고 정교하게 조절될 수 있는 promoter가 없고 고농도 배양시 유가식 배양이 필요하며 발현된 이종 단백질들이 glycosyl화 된다는 점에서 비적절한 숙주로 간주되고 있다(1). 이와 같은 단점을 보완하는 외래단백질 발현 시스템이 메타놀 자화 효모인 *Pichia pastoris*에서 개발되었으며(2, 3) 최근에는 또 다른 메타놀 자화 효모인 *Hansenula polymorpha*를 이용한 이종 단

백질 발현 시스템의 개발 연구가 활발히 진행되고 있다(4, 5).

*H. polymorpha*는 메타놀을 에너지원과 탄소원으로 이용할 수 있어 경제성이 높고 MOX(Methanol Oxidase) 유전자의 promoter와 같은 강력하고 비교적 조절이 용이한 promoter를 가지고 있어 산업적 응용성이 높다. 또한 고농도 배양(100 g DCW/L)이 용이하고 형질전환시 발현 목표유전자가 숙주의 염색체상으로 수개씩 도입됨으로써 외래 단백질의 발현량을 증가시킬 수 있다. 그리고 비선택 배지에서 도입된 plasmid의 안정성이 뛰어나며 외래단백질의 발현시 일반적으로 고 glycosyl화가 일어나지 않는 것이 큰 장점으로 알려져 있다(4, 5).

인체 표피 성장인자(Epidermal Growth Factor : EGF)는 53개의 아미노산으로 구성된 6 KDa의 비교적 작은 단백질의 polypeptide로서 상피세포(epithelial cell) 및 섬유아세포(fibroblastic cell)의 성장을 자극하고(6, 7) 궤양 억제작용을(8) 하는 것으로 알려져 있다. EGF의 이러한 성질을 이용하여 창상이나 화

Key words: Human Epidermal Growth Factor (hEGF), *Hansenula polymorpha*, Expression and secretion

*Corresponding author

상치료, 각막 표층 상처의 치료, 각막 이식 수술 후, 그리고 위궤양 치료와 같은 치료용으로 개발되고 있다. 이러한 생물학적, 약리학적 중요성과 동물세포로부터는 극소량만이 추출가능하다는 점에 기인하여 EGF를 유전자 재조합 기술에 의해 대량생산 하려는 연구가 시도되어 왔다. 즉 합성된 인체 EGF 유전자를 *Escherichia coli*(9), *Bacillus brevis*(10)에 도입하여 발현시키거나 *S. cerevisiae*를 숙주세포로 하여 세포내 발현(11) 혹은 교배 pheromone인 α -factor 유래의 pre-pro leader 서열을 이용하여 효과적으로 세포외로 분비시켰다(12). 또한 쥐의 EGF를 pre-pro leader 서열을 이용하여 메타놀 자화 효모인 *P. pastoris*에서 분비시킨 보고도 있다(13).

본 연구에서는 *H. polymorpha*를 숙주세포로 이용하여 인체 EGF를 발현, 분비시키기 위하여 화학적으로 합성된 인체 EGF 유전자의 발현 및 분비 vector를 제조하였고 이를 이용하여 형질전환된 재조합 *H. polymorpha*를 배양한 배지에서 소변 유래의 인체 EGF와 동일한 epitope을 갖는 재조합 인체 EGF를 확인하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 plasmid

본 연구에서는 메타놀 자화 효모 균주로서 *H. polymorpha* DL-1(*leu2*), A16(*leu2*), 및 HPB1(*ade2 leu2*)을 사용하였고(14) 일반적인 DNA 조작과 plasmid 분리를 위하여 *E. coli* DH5 α (*F lacZ* Δ M15 *hsdR17*(*r m*) *gyrA36*)를 이용하였다.

사용한 plasmid로는 MOX promoter와 MOX terminator를 함유하는 pMOX7 Δ RI(20)과 *H. polymorpha*의 *LEU2* 유전자와 *HARS*(Autonomously Replicating Sequences of Hansenula)를 함유하는 pA3를 M.D. Ter-Avanesyan(Cardiology Research Center, 러시아)으로부터 분주 받아 사용하였다. *H. polymorpha*의 염색체 DNA에 외래 유전자를 도입하기 위한 vector의 제조를 위해 pUC19(15)를 이용하였다.

사용 배지

메타놀 자화 효모의 배양을 위하여 사용한 영양배지는 YPD(yeast extract 1%, bacto-peptone 2%, dextrose 2%)배지와 YPD 한천(YPD broth, agar 2%)배지이고 선택표지와 외래 유전자로 형질전환된 형질전환체의 배양을 위한 최소배지로서는 YNB(yeast nitrogen base w/o amino acid) 0.67%, dextrose 2%의 조성을 가지는 배지를 사용하였다. 형질전환된

효모에서의 인체표피 성장인자 유전자의 발현을 위한 발현유도 배지로는 YNB 0.67%, glycerol 0.5%, methanol 1%, casamino acid 1%의 조성을 가지는 배지를 사용하였다. 또한 nitrocellulose disk 상에 있는 colony들로부터 인체 표피 성장인자 유전자의 발현 유도를 위해서는 yeast extract 1%, bacto-peptone 2%, methanol 1%, agar 2% 조성의 한천 유도배지를 사용하였다.

제한 효소 및 시약

DNA 재조합을 위해 사용한 제한효소, T4 DNA ligase, calf-intestine alkaline phosphatase, RNase 등은 Boehringer Mannheim에서 구입하여 사용하였다. ³⁵SdATP α S는 Dupont사에서, mouse anti-hEGF antibody는 Pierce사에서, AP(Alkaline Phosphatase)로 표지된 anti-mouse IgG는 Bio-Rad사에서, HRP(Horse radish peroxidase)로 표지된 anti-mouse IgG는 Vector사에서 각각 구입하였으며 완충용액에 사용된 시약과 항생제, X-Gal 및 표준 재조합 인체 EGF는 Sigma에서 구입하여 사용하였다. Agarose gel로부터 DNA의 분리 정제는 Bio101사로부터 GENE CLEAN II와 MERMAID kit를 구입하여 사용하였다.

DNA 재조합, 형질전환 및 DNA의 분리

DNA 재조합 과정은 Sambrook 등(16)의 방법에 준하였고 *E. coli*의 형질 전환은 Inoue 등(17)의 방법을 따랐으며 *H. polymorpha*의 형질전환 및 DNA의 분리는 손 등(14)의 방법에 따랐다.

Oligonucleotide의 합성 및 인체 EGF 유전자의 염기서열 확인

Oligonucleotide의 합성과 정제는 Korea Biotech.사에서 행하였다. 정제된 각 oligonucleotide의 annealing과 ligation은 손 등(18)의 방법에 따랐고 ligation된 유전자를 0.8% agarose gel 전기영동하여 적절한 크기의 DNA band를 잘라 MERMAID kit를 이용하여 인체 EGF 유전자를 분리하였다. 합성된 인체 EGF 유전자의 DNA 서열의 확인은 분리된 DNA 절편을 pBluescript에 subcloning하여 dideoxy chain-termination 방법(19)에 따랐다.

인체 EGF 분비 형질전환주의 선별

형질전환되어 선택배지에 나타난 colony들을 tooth picking 하여 YPD 한천배지에 옮긴 다음 37°C에서 24시간 배양하였다. 이를 nitrocellulose disk로 replica를 한 다음 한천유도배지로 옮긴 후 37°C에서 20

시간 배양하였다. Colony가 부착된 nitrocellulose disk를 20 mM Tris-HCl(pH 7.5)/500 mM NaCl로 씻어낸 후 5%(W/V) 탈지 분유로 처리하고 이를 TBST (10 mM Tris, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4)로 씻어내었다. 쥐의 anti-hEGF antibody를 TBS(10 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4)에 희석한 다음 nitrocellulose disk에 1시간 동안 처리하였다. 이를 다시 TBST로 씻어내고 AP로 표지된 anti-mouse IgG로 1시간 동안 처리, 세척 후 NBT(p-nitroblue tetrazolium chloride)와 BCIP(5-bromo-4-chloro-indoyl phosphate)로 발색시켜 발색된 부위와 대응하는 YPD 상의 colony를 선별하였다.

인체 EGF의 활성 측정

일차적으로 선별한 인체 EGF 분비 균주들을 발현 유도 배지를 함유한 시험관에서 37°C에서 24시간 동안 진탕배양한 다음 1%의 메타놀을 추가하여 다시 37°C에서 24시간 동안 진탕배양하였다. 세포외로 분비된 인체 EGF의 활성 측정은 세포 배양액을 PBS (0.008 M Na₂HPO₄, 0.002 M KH₂PO₄, 0.14 M NaCl, 0.01 M KCl, pH 7.4)로 100배 희석한 다음 희석액 100 µl을 microtiter well(Nunc-immuno module)에 각각 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 이를 TBST로 씻어내고 쥐의 anti-hEGF antibody로 1시간 처리한 다음 다시 TBST로 세번 씻어내었다. 이를 HRP로 표지된 anti-mouse IgG로 1시간 처리하고, 세척 후 ABTS(2,2'-azino- di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)], H₂O₂를 1 : 1로 섞은 혼합액 100 µl를 첨가하여 발색시켜 96-well plate autoreader(THERMOmax, Molecular Devices, USA)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 분비된 인체 EGF를 정량적으로 측정하기 위해서 표준 인체 EGF를 50 ng에서 1 ng까지 희석하여 각각 반응시켜 표준곡선을 작성하였다.

Southern hybridization

분리된 *H. polymorpha*의 전체 DNA를 적절한 제한효소로 처리하고 gel electrophoresis에 의해 DNA를 전개한 다음 Sambrook 등(16)의 방법에 따라 Southern hybridization 하였으며 사용한 probe로는 pA-EGF3 과 pMOX7ΔRI을 제한효소로 처리하고 DIG labelling kit(Boehringer Mannheim)을 이용하여 설명서에 따라 표지하였다.

분비 단백질의 확인분비

분비 신호가 포함된 plasmid에 의해 형질전환된

형질전환체를 발현 유도 배지에서 24시간 배양 후 메타놀을 1% 추가하여 다시 24시간 배양한 다음 원심분리하였다. 배양 상등액에 50% TCA(trichloroacetic acid)를 첨가한 다음 0°C에서 15분간 방치한 후 10000 rpm으로 10분간 원심분리하여 침전물을 ether : ethanol이 1 : 1로 혼합된 혼합액으로 잔여 TCA를 세척하고 실온에서 건조시켰다. 이를 Laemmli 방법(20)에 따라 SDS-PAGE 하고 인체 EGF specific monoclonal antibody를 이용하여 Western blotting 하였다.

결과 및 고찰

인체 EGF 유전자의 합성

알려진 인체 EGF의 아미노산 서열(21)을 *H. poly-*

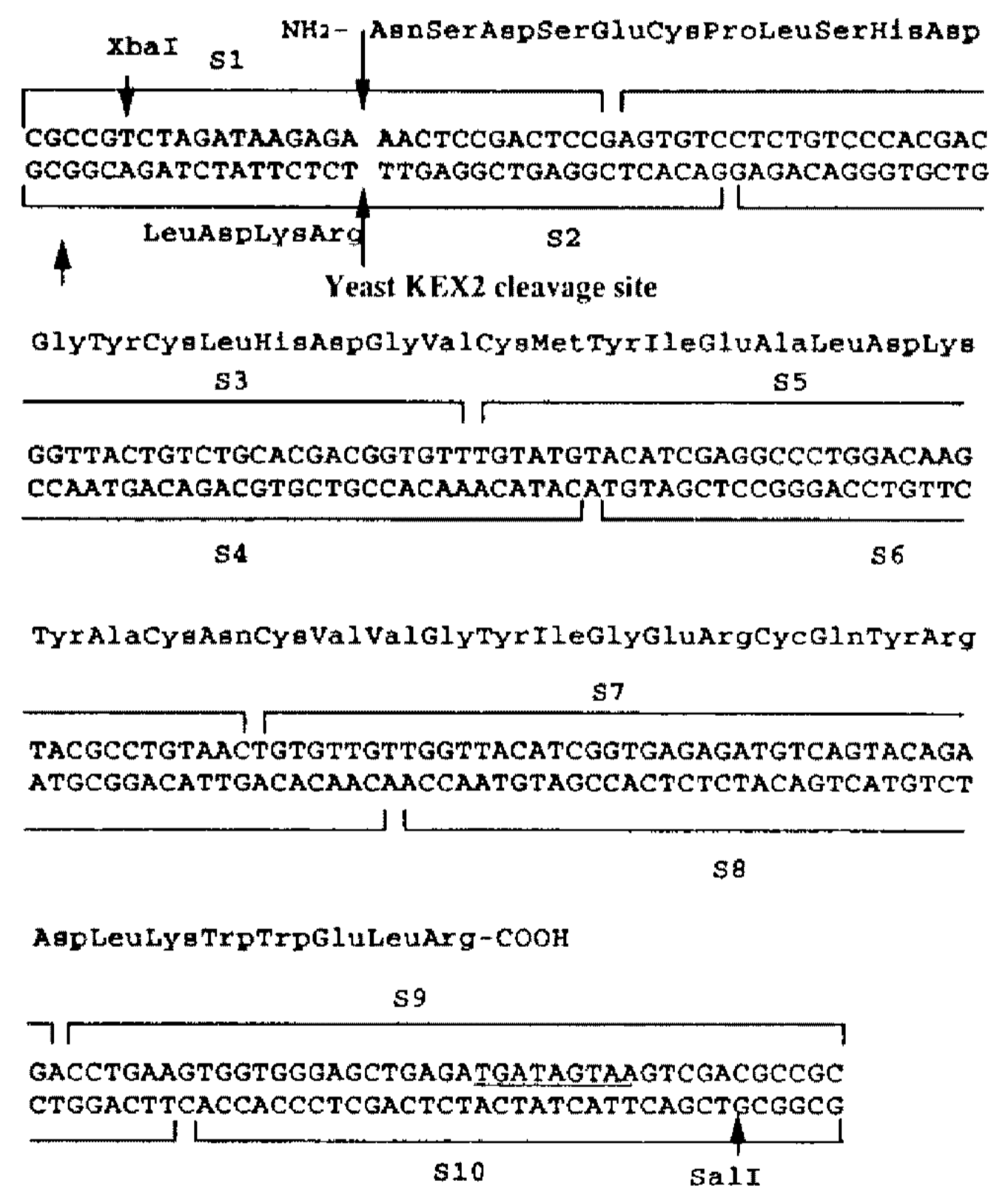


Fig. 1. Nucleotide and amino acid sequences of synthetic hEGF gene.

The sequence was constructed from ten overlapping synthetic oligonucleotides that ranged in length of 33 to 43 nucleotides. Synthetic oligomers (S1-S10) are bracketed. XbaI and SalI restriction sites at each end and the adapter sequence (dCGCCGTCTAGATAAGAGA) were co-synthesized with hEGF gene. Adapter coding for a peptide (Leu-Asp-Lys-Arg) was needed for the expression of a fusion protein composed of secretion signal peptide and hEGF to be processed correctly by yeast KEX2 protease. Three consecutive translational stop codons are underlined.

morpha MOX 유전자의 codon usage에 준하여 인체 EGF 유전자 염기서열을 결정하였고 그에 따라 인체 EGF 유전자를 화학적으로 합성하였다. Fig. 1에서 나타낸 바와 같이 말단이 순차적으로 상보적인 10개의 overlapping oligonucleotide로 나누어 33~43 mer의 길이로 합성한 다음 이들을 분리, 정제하여 동일 농도의 각각의 oligonucleotide를 사용하여 annealing 및 ligation 하여 인체 EGF 유전자를 완성하였다. 합성된 인체 EGF 유전자에는 5' 말단에 교배인자 α 의 KEX2 endopeptidase에 의해 인식되어 정확한 processing이 일어날 수 있도록 Lys-Arg에 해당되는 DNA 서열 및 제한 효소 XbaI 인식부위를 첨가한 adapter DNA 서열(dCGCCGTCTAGATAAGAGA)을 도입하였고 3' 말단에는 SalI의 인식부위를 도입하였다. 이 합성 유전자를 XbaI, SalI으로 절단하여 pBluescript KS+의 Xba I-SalI site에 도입하여 염기서열을 확인한 바 인체 EGF 유전자가 완전하게 합성되었음을 알 수 있었다.

발현 및 분비 vector pA-EGF3의 제조

*H. polymorpha*를 이용하여 인체 EGF를 발현 및 분비시키기 위해서 Fig. 2에서 보는 바와 같이 pMOX7 Δ RI으로부터 MOX terminator의 절편을 분리하여 pUC19에 재조합시켜 pUC-Tmox를 제조하고 YEp13 으로부터 SalI-XhoI 단편인 LEU2 유전자를 분리하여 pUC-Tmox에 재조합시켜 pUC-TaLE를 제조하였다. 또한 MOX promoter와 *S. cerevisiae* 유래의 분비 신호서열인 교배인자 α pre-pro leader(ppL) 서열이 정확하게 연결되어 재조합된 pBKS-K3로부터 이들 단편을 분리하고 이에 합성된 인체 EGF 유전자가 재조합되어 있는 pBEGF1로부터 인체 EGF 유전자의 단편을 분리하여 연결시켰다. 이렇게 연결된 MOX promoter-ppL-hEGF 단편을 순서에 맞게 pUC-TaLE에 재조합시켜 pU-EGF2를 제조하였다. 또한 HARS를 형질 전환용 vector에 도입할 때 형질 전환 효율이 훨씬 증가하는 것으로 알려져 있어(22) pU-EGF2로부터 분리된 MOX promoter-ppL-hEGF-MOX terminator의 발현 및 분비 카세트를 분리하여 *H. polymorpha* LEU2 유전자와 HARS를 함유한 pA3 plasmid에 재조합하여 pA-EGF3을 제조하였다.

재조합 인체 EGF 분비 균주의 선별

pA-EGF3를 수종의 *H. polymorpha*에 형질전환시켜 5일 후 선택배지상에 나타난 약 2000개의 colony 들을 YPD 한천배지에 tooth picking 하여 24시간 배양한 후 nitrocellulose disk에 replica transfer 한 다음

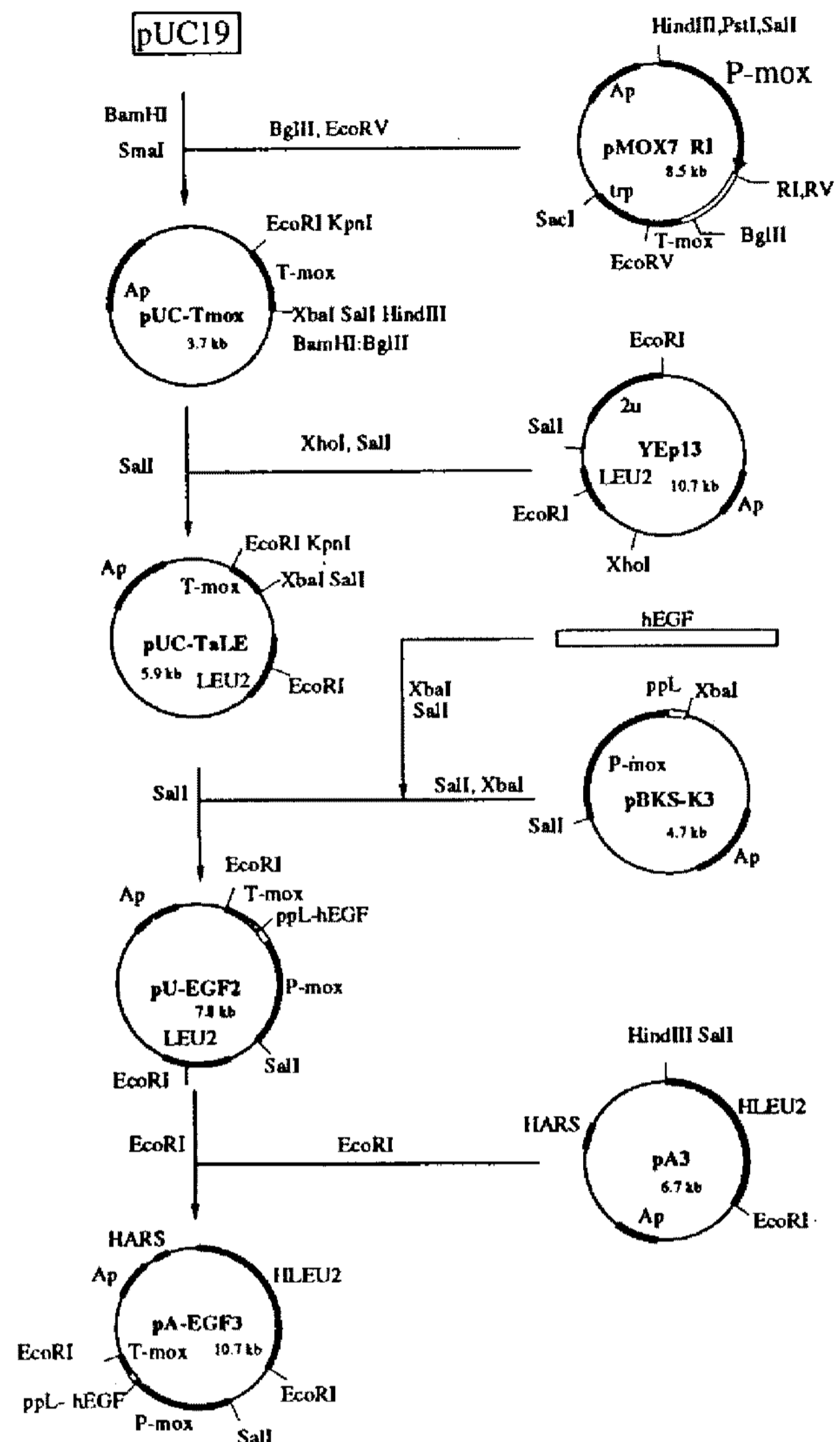


Fig. 2. Construction of *H. polymorpha* integration vector, pA-EGF3.

Abbreviations: P-mox, MOX promoter; T-mox, MOX terminator; ppL, pre-pro leader sequence of mating factor α ; HLEU2, LEU2 of *Hansenula polymorpha*; HARS, Autonomously replicating sequence of *Hansenula polymorpha*

메타놀이 함유된 한천 유도배지에서 20시간 발현 유도시켰다. 증식한 세포들을 씻어내고 nitrocellulose disk에 분비되어 남아 있는 인체 EGF를 immunoassay 하여 발색된 부위와 상응하는 위치에 있는 YPD 상의 colony를 선별하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 발색정도가 형질전환체마다 각각 다르게 나타났고 이들 중 강한 신호를 보이는 인체 EGF 분비 균주 240주를 일차적으로 선별한 후 각 균주들을 발현 유도배지에서 발현시켜 배양 상청액중 인체 EGF의 농도를 ELISA로 측정해 본 결과 Table 1과 같은 양상을 보였다. 이는 nitrocellulose disk 상의 immunoassay 결과와 동일한 것으로서 각 균주마다 인체 EGF의

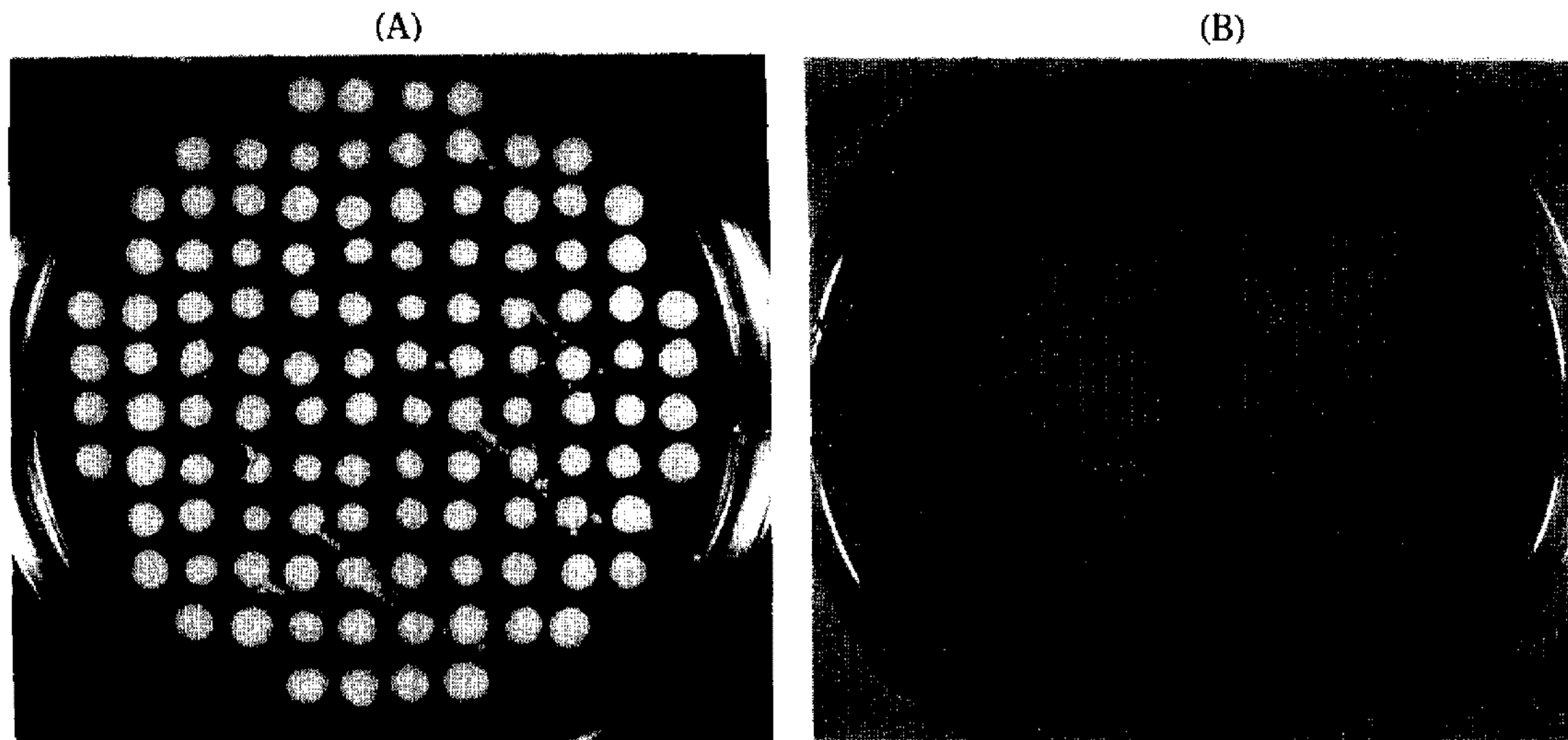


Fig. 3. Screening of *H. polymorpha* colonies for secretion of human Epidermal Growth Factor.

A: *H. polymorpha* colonies grown on YPD agar plate, B: Dark circles shown in nitrocellulose are the positive signals by immunostaining with hEGF specific monoclonal antibodies.

Table 1. Gene expression and secretion level of hEGF in various transformants of *H. polymorpha*

Colony No.	Cell growth (OD ₆₆₀)	Strain	hEGF (mg/l)
1- 2	27	DL-1	8.5
1- 6	29	DL-1	11.3
1- 7	28	DL-1	14.5
1-16	28	DL-1	14.6
1-28	32	A16	11.3
1-37	37	A16	10.4
1-40	33	A16	7.5
1-58	23	HPB1	2.5
1-59	23	HPB1	2.6
1-60	22	HPB1	2.5
1-71	33	DL-1	23.8
2-11	33	DL-1	22.6
2-21	32	DL-1	24.0
2-23	31	DL-1	17.3
2-53	38	A16	19.5
2-59	43	A16	23.4
2-76	45	DL-1	23.9
2- 6	18	DL-1	16.0
2-11	32	DL-1	12.0
2-20	16	DL-1	14.0
2-25	33	DL-1	12.0

분비량이 다른 것은 인체 EGF 유전자가 숙주세포의 염색체 DNA로 도입된 정도가 각각 다르기 때문인 것으로 알려져 있다(1,5). 1차 선별된 약 240주의 배양상청액의 ELISA 측정 결과 실험비교한 세가지 *H. polymorpha* 균주들 중에서 DL-1이 인체 EGF 생

산율이 가장 높을 뿐만 아니라(colony No. 2-21, 24 mg/l) 다른 균주(HPB1 및 A16)에 비해 메타놀에 대한 저항성이 높고 세포의 성장속도가 빠르기 때문에 인체 EGF 생산 균주로서 적합한 것으로 판단되었다.

재조합 인체 EGF의 확인

인체 EGF 생산 균주들을 배양한 배지내의 단백질 양상을 확인하기 위해서 대조구로 DL-1과 vector pA3를 가지는 균주를, 그리고 인체 EGF 분비 균주로 확인된 5주를 발현유도배지에서 60시간 배양시켰다. 이들의 배양상청액을 TCA로 처리하여 단백질을 얻고 이를 SDS-PAGE 하여 분자량을 확인하여 본 결과 *S. cerevisiae*에서 발현된 재조합 인체 EGF와 동일한 양상을 보여주었다(Fig. 4). 또한 이들 균주의 배양액중 한 균주의 배양 상청액을 선택하여 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 사용하여 얻은 crude 인체 EGF를 SDS-PAGE 하고 인체 EGF specific monoclonal antibody로 immunoblotting을 한 결과 *H. polymorpha*에서 발현된 재조합 인체 EGF가 소변 유래의 인체 EGF와 동일한 epitope을 가지고 있는 것이 확인되었다(Fig. 5).

Vector pA-EGF3의 *H. polymorpha* 염색체로의 도입 확인

pA-EGF3의 *H. polymorpha* 염색체로의 도입을 확인하기 위해서 pA-EGF3, pA-EGF3과 숙주의 전체 DNA, 숙주의 전체 DNA 및 인체 EGF를 분비하는 균주 10주의 전체 DNA를 *Hind*III 및 *Eco*RI로 각각 처리하여 agarose gel에서 전기 영동한 후 이를 nylon

membrane filter로 전이하고 *Hind*III로 처리된 pA-EGF3를 DIG-labelling 하여 probe로 사용, 도입 여부를 확인하였다. Fig. 6에서 나타난 결과와 같이 EGF 활성을 보이는 모든 형질전환체의 염색체 DNA에서 plasmid 유래의 유전자가 존재하고 있음을 확인할 수 있었고 No. 1-7, 1-71, 2-21, 2-76, 3-6, 3-25주의 경우에는 Fig. 6(A)에서 대조구로 사용한 9.2 kb의 pA-EGF3/*Hind*III 절편과 Fig. 6(B)에서 pA-EGF3/*Eco*RI

절편인 5.8 및 3.4 kb와 각각 동일한 위치에서 다른 band보다 상대적으로 강한 신호를 보이는 band가

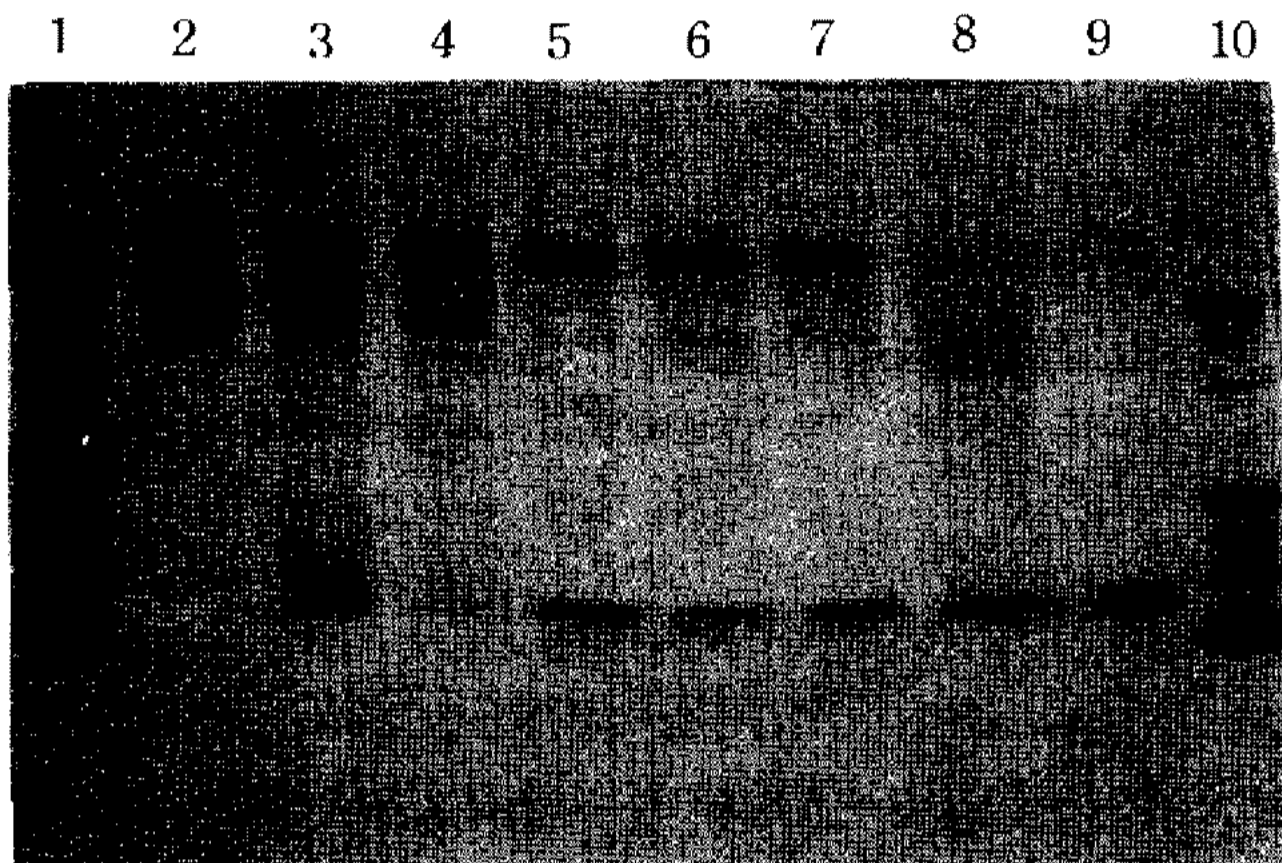


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of culture supernatants containing pA3 or pA-EGF3 grown on 0.67% YNB, 0.5% glycerol, 1% methanol and 1% casamino acid.

Lane 1 and 10: Standard molecular weight markers (43.0, 29.0, 18.4, 14.3, 6.2 and 3.0 KDAs), lane 2: DL-1, lane 3: DL-1 containing pA3, lane 4, 5, 6, 7 and 8: DL-1 containing pA-EGF3, lane 9: hEGF secreted from *S. cerevisiae*. Proteins in culture supernatants were precipitated with TCA and separated on SDS-PAGE through 10~20% gradient gels.

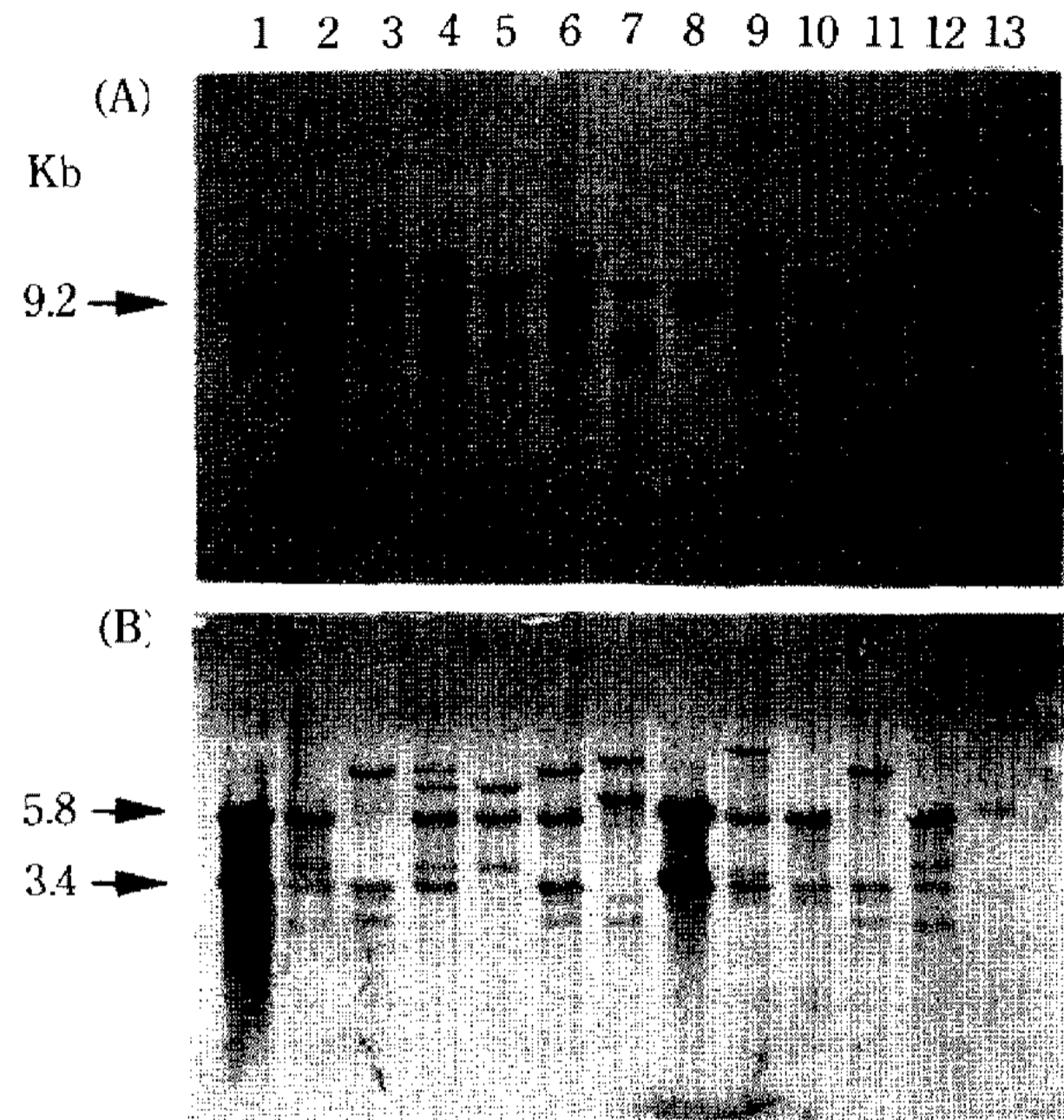


Fig. 6. Southern blot analysis of various formants 10 μ g of DNA from different transformants were digested with *Hind*III (A) or *Eco*RI (B), separated on 0.8% agarose gels, transferred to nylon membrane filters and hybridized with a DIG-labelled probe.

Probe: Entire pA-EGF3 digested with *Hind*III, lane 1: pA-EGF3, lane 8: untransformed DL-1 plus pA-EGF3, lane 13: untransformed DL-1, lane 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11 and 12: transformant 1-7, 1-16, 1-71, 2-11, 2-21, 2-23, 2-76, 3-6, 3-11 and 3-25, respectively.

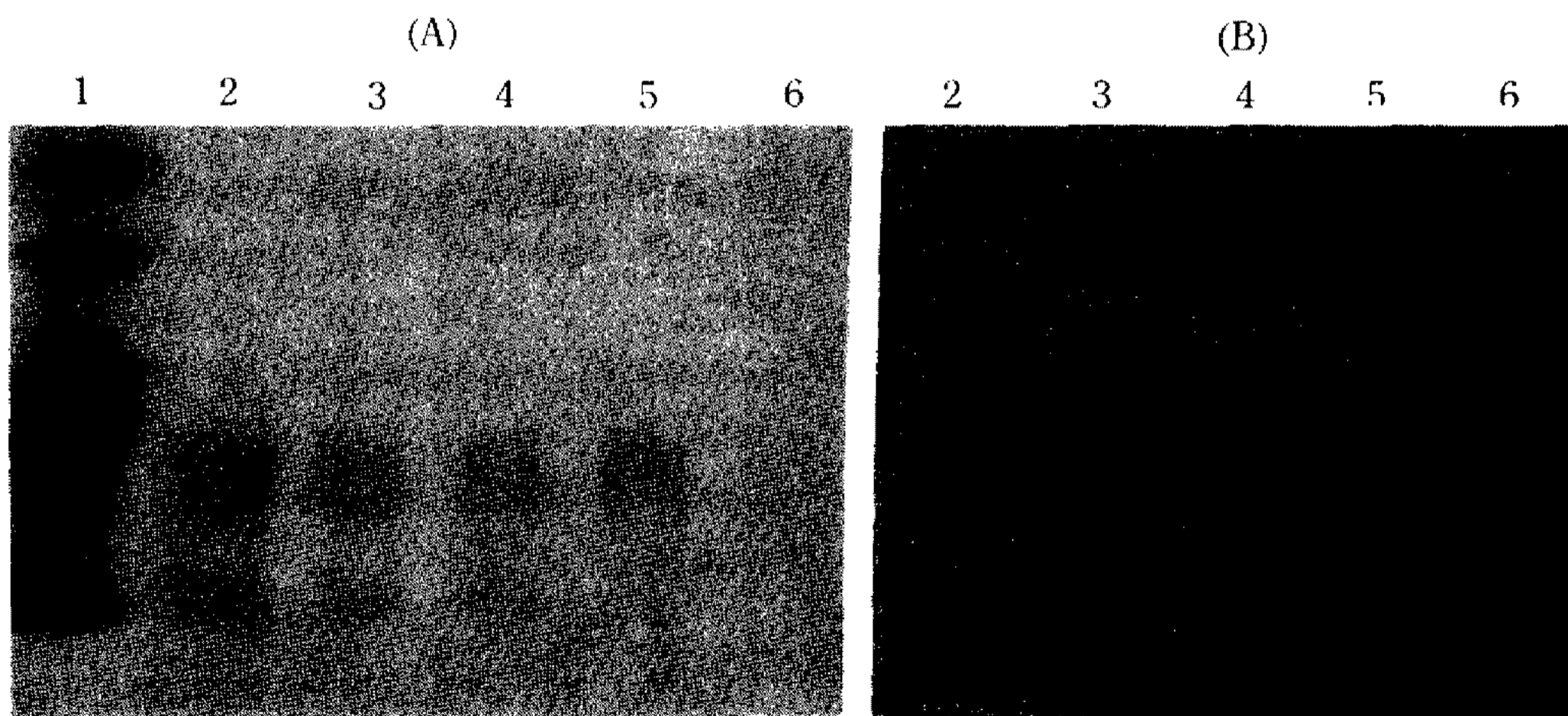


Fig. 5. Western blot analysis of hEGF: Culture supernatants were passed through Sep-Pak and separated on SDS-PAGE through 10~20% gradient gels (A) and subsequently transferred onto a nitrocellulose filter. The filter was then reacted with specific monoclonal antibodies to detect the hEGF (B).

Lane 1: Molecular weight markers (43.0, 29.0, 18.4, 14.3, 6.2 and 3.0 KDAs), lanes 2, 3, 4, 5 and 6 contained 8, 6, 4, 2 and 1 μ g of crude protein, respectively. Culture supernatants were adjusted to 20% acetonitrile/0.1% TFA and passed through a Sep-Pak C-18 cartridge. Bound hEGF was then eluted with 50% acetonitrile/0.1% TFA.

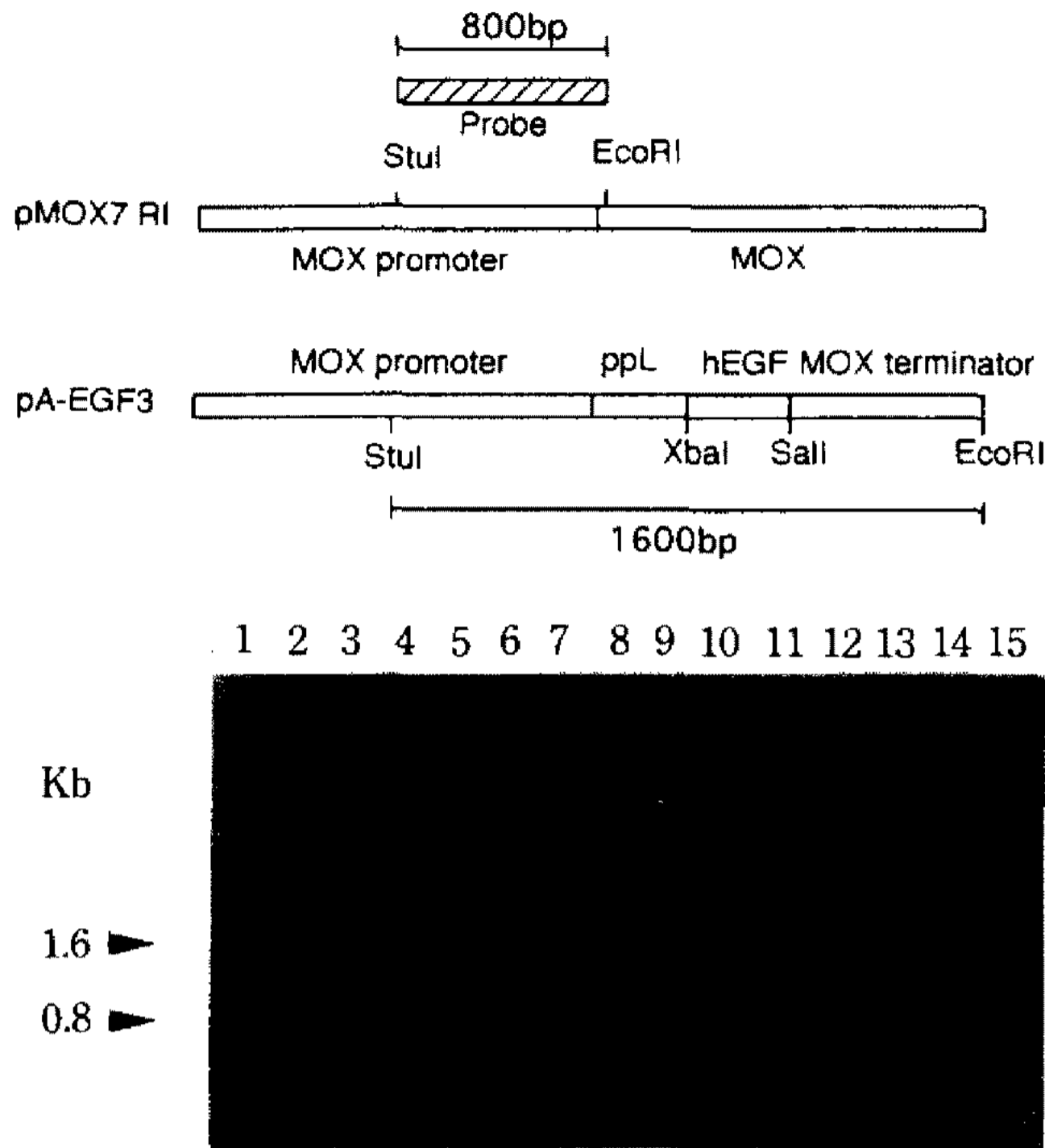


Fig. 7. Copy number determination of the integrated heterologous DNA.

The genomic DNA of an untransformed host strain and various recombinant isolates of a particular construct were digested with restriction enzymes *StuI*/*EcoRI*. The restricted DNA was separated on 0.8% agarose gels, transferred to nylon membrane filters and hybridized to a DIG-labelled *StuI*/*EcoRI* fragment of pMOX7ΔRI containing *MOX* promoter. The hybridization pattern revealed two signals in electroposition, one for the genuine single copy *MOX* gene and the second originating from the larger heterologous fusion. It thus enabled the estimation of signal intensity of the integrated DNA compared with the intrinsic single copy control. The *StuI*/*EcoRI* *MOX* promoter fragments of the cloned heterologous DNA (upper scheme) and the genuine *MOX* gene (lower scheme) are drawn to scale. Lane 1, 15: pMOX7ΔRI, lane 2: pA-EGF3, lane 9: untransformed host strain, pA-EGF3, lane 14: untransformed host strain, lane 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12 and 13: transformant 1-7, 1-16, 1-71, 2-11, 2-21, 2-23, 2-76, 3-6, 3-11 and 1-25, respectively.

관찰되었다. 이들은 최소한 2개 이상의 plasmid DNA가 숙주세포의 염색체에 tandem-repeat로 도입된 경우의 양상이며 특히 colony No. 2-21에 해당하는 lane에서는 상대적 신호강도의 차이가 다른 lane에 비해 가장 큼을 확인할 수 있었다. 이는 tandem-repeat로 도입된 plasmid 수가 가장 많다는 것을 보여 주며 동균주의 인체 EGF 생산성이 가장 높은 것과 일치된 결과였다. 그러나 colony No. 2-11의 경우처럼 tandem-repeat의 형태는 보이지 않으나 인체 EGF의 생산성이 높은 균주도 관찰되었다.

Vector pA-EGF3의 도입 copy 수의 확인

각 형질전환체가 갖는 plasmid 유래의 유전자 copy 수를 확인하기 위하여 pA-EGF3, pMOX7ΔRI, 숙주 전체 DNA, pA-EGF3 및 숙주전체 DNA를 *StuI*/*EcoRI*으로 처리하고 agarose gel에서 전기영동하여 nylon membrane filter로 전이하였다. 그리고 pMOX7ΔRI을 *StuI*/*EcoRI*을 처리하여 얻은 *MOX* promoter 단편을 DIG-labelling 하여 probe로 사용하여 조사하였다. Fig. 7에 나타난 바와 같이 숙주의 *MOX* promoter 단편에 해당하는 신호는 0.8 kb 근처에 나타났고 plasmid pA-EGF3 유래의 DNA에 해당하는 신호는 1.6 kb 근처에서 나타났다. 이들 두 band의 신호 강도의 차이는 숙주 *H. polymorpha* DL-1의 원래 가지고 있는 단일 copy의 *MOX* promoter 단편과 형질전환되어 가지고 있는 pA-EGF3 유래의 *MOX* promoter 단편의 수적 차이를 의미하기 때문에 형질전환체의 염색체 DNA에 도입된 plasmid pA-EGF3의 copy 수를 확인할 수 있었다. 결과에서 보는 바와 같이 colony No. 1-7, 1-16, 2-21, 2-76, 3-6, 3-11, 3-25에서는 예상한 바와 같이 1.6 및 0.8 kb의 신호가 나타났다. 이들 두 신호 강도를 비교할 때 약 2~5배 정도의 차이가 나타났고 colony No. 2-21의 경우 가장 신호 강도가 차이가 나서 약 5 copy 정도가 염색체에 도입되었음을 알 수 있었다. 그리고 No. 1-71, 2-11, 2-23주는 비교할 상대 band가 나타나지 않았는데 이는 plasmid 유전자가 염색체 DNA에 도입될 때 염색체상에 존재하는 *MOX* 유전자 주변에 도입되어 이들의 hybridization 양상이 변화된 것으로 추정되었다.

요 약

인체 표피세포의 성장을 촉진하고 위산의 분비를 억제하는 인자인 인체 EGF(human Epidermal Growth Factor)의 유전자를 메타놀 자화 효모인 *Hansenula polymorpha*를 이용하여 발현시키고 이를 배지 내로 효율적으로 분비시키기 위해서 *H. polymorpha*의 methanol oxidase(*MOX*) 유전자의 codon usage에 따라 이 유전자를 화학적으로 합성하였다. 메타놀에 의해 발현 유도되는 강력한 promoter인 *MOX* promoter와 *S. cerevisiae*의 교배인자 α의 분비 신호인 pre-pro leader 서열을 이용하여 인체 EGF의 발현 및 분비 vector를 제조하였으며 이 vector가 효과적으로 숙주세포의 염색체 DNA에 도입됨을 확인하였다. 재조합 *H. polymorpha*는 소변 유래의 인체 EGF와 동일한 epitope을 지니는 재조합 인체 EGF를 효과적으로 발현시켰고 이를 세포외로 분비하여 준최적화

배양조건에서 최대 24 mg/l의 생산수율을 나타내었다.

감사의 말

본 연구는 1993년도 상공자원부에서 시행한 공업 기반기술사업의 기술개발과제 및 과학기술처에서 시행한 국제협력과제로 연구된 것입니다.

참고문헌

- Romanos, M.A., C.A. Scorer, and J.J. Clare. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**: 423-488.
- Cregg, J.M., J.F. Tschopp, C. Stillman, R. Siegel, M. Akong, W.S. Craig, R.G. Buckholz, K.R. Madden, P.A. Kellaris, G.R. Davis, B.L. Smiley, J. Cruze, R. Torregrossa, G. Velecebebi, and G.P. Thill. 1987. Efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *BIO/TECHNOLOGY* **5**: 479-485.
- Clare, J.J., F.B. Rayment, S.P. Ballontine, K. Sreerakrishna, and M.A. Romanos. 1991. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integration of the gene. *BIO/TECHNOLOGY* **9**: 455-460.
- Gellissen, G., Z.A. Janowicz, A. Merckelbach, M. Piontek, P. Keup, U. Weydemann, C.P. Hollenberg, and A.W.M. Strasser. 1991. Heterologous gene expression in *Hansenula polymorpha*: efficient secretion of glucoamylase. *BIO/TECHNOLOGY* **9**: 291-295.
- Janowicz, Z.A., K. Melber, A. Merckelbach, E. Jacobs, N. Harford, M. Comberbach, and C.P. Hollenberg. 1991. Simultaneous expression of the S and L surface antigens of hepatitis B, and formation of mixed particles in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **7**: 431-443.
- Carpenter, G. and S. Cohen. 1975. Human epidermal growth factor and the proliferation of human fibroblast. *J. Cell. Physiol.* **88**: 227-238.
- Carpenter, G. 1978. The regulation of the cell proliferation: Advances in the biology and mechanism of action of epidermal growth factor. *J. invest. dermatol.* **71**: 283-287.
- Gregory, H. 1975. Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature* **257**: 325-327.
- Fumitaka, K., G. Hideyuki, K. Masaharu, N. Tomoyuki, K. Tomoko, A. Hideo, S. Seizo, and O. Shigeo. 1986. Direct expression of urogastrone gene in *Escherichia coli*. *Gene* **45**: 311-316.
- Hideo Y., N. Kazuo, S. Yutaka, and K. Atsushi. 1989. Use of *Bacillus brevis* for efficient synthesis and secretion of human epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3589-3593.
- Urdea, M.S., J.P. Merryweather, G.T. Mullenbach, D. Coit, U. Heberlein, P. Valenzuela, and P.J. Barr. 1983. Chemical synthesis of a gene for human epidermal growth factor urogastrone and its expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **80**: 7461-7465.
- Brake, A.J. J.P. Merryweather, D.G. Coit, U.A. Heberlein, F.R. Masiarz, G.T. Mullenbach, M.S. Urdea, P. Valenzuela, and P.J. Barr. 1984. α -factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Sacharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **81**: 4642-4646.
- Clare, J.J., M.A. Romanos, and F.B. Rayment. 1991. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* **105**: 205-212.
- Sohn, J.H. M.Y. Beburow, E.S. Choi, and S.K. Rhee. 1993. Heterologous gene expression and secretion of the anticoagulant hirudin in a methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 65-72.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp8 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Sohn, J.H., S.K. Lee, E.S. Choi and S.K. Rhee. 1991. Gene expression and secretion of the anticoagulant hirudin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 266-273.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **74**: 5463-5467.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Harper, R.A., J. Pierce, and C.R. Savage, Jr. 1987. Purification of human epidermal growth factor by monoclonal antibody affinity chromatography, pp. 3-11. In D. Barnes and D.A. Sirbasku (eds), *Methods in Enzymol.*, Vol. 146, Academic Press, New York, London.
- Roggenkamp, R., H. Hansen, M. Eckart, Z. Janowicz, and C.P. Hollenberg. 1986. Transformation of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* by autonomous replication and integration vectors. *Mol. Gen. Genet.* **202**: 302-308.

(Received February 28, 1994)