

## 재조합 효모세포로부터 의약품 단백질의 분비생산

남 수 원\*

동의대학교 미생물학과

### 서 론

생명공학기술 제품으로 현재 가장 큰 시장을 갖고 있는 것이 생물약품(biopharmaceuticals)이며 대부분의 생명공학산업은 이와 관련된 기술개발에 몰두하고 있다. 특히, 단백질성 치료제, 백신, 의약품 다당류, 진단 시약류등이 여기에 포함된다. 주지하다시피 이와같은 제품들은 유전자 재조합 기술을 이용, 미생물 또는 동물세포의 발효배양을 통해 얻어지고 있으며 insulin, growth hormones/factors, interferons(IFNs), cytokines, tissue plasminogen activator (tPA), erythropoetin(EPO), 단일클론항체(Mab) 등이 대표적인 예라고 할 수 있다. 1981년 이후 16개의 생명공학 의약품(치료제 15개, 백신 1개)이 미국 FDA 승인을 받았다. 또한, 미국 의약생산자협회(PMA)에 의하면 현재 160개의 치료제 및 백신이 인체 임상실험중이거나 FDA심사과정에 있다고 하며 2003년 까지 20종 이상의 의약품이 개발될 것으로 예측된다 (Table 1).

재조합 단백질의 대량생산에 숙주세포로 대장균, 효모, 동물세포(hybridoma, CHO, 쥐 myeloma 세포등)가 사용되고 있으며, 1990년 까지 대장균이 가장 많이 사용되어 왔다(Table 2). 그러나 최근에는 대장균의 문제점(endotoxin, 재조합 단백질의 N-말단에 여분의 methionine 부가, inclusion body 형성, 당쇄부가와 같은 번역후 수식의 비발생)을 해결하기 위해 효모 또는 동물 세포를 숙주세포로 주로 사용하고 있다. 효모에서 재조합 단백질의 생산분야는 외래 유전자 발현 및 유전자 산물의 분비에 대한 지식의 진보로 지난 몇 년간 크게 발전하였다. 이런 정보와 지식을 바탕으로 재조합 단백질의 상업적 생산에 응용되어, 수많은 의약

용 고등진핵세포 단백질이 효모에서 생산되어 임상실험중이다. 효모는 유전자의 구조, 전사 및 번역계, 단백질 분비 경로, 번역후 수식개등이 동물 세포와 매우 유사하다. 따라서 유용 단백질의 유전자를 효모세포에 도입할 경우 대장균보다는 더욱 천연에 가까운 형태로, 동물세포보다는 더욱 효율적으로 분비 생산할 수 있다. 효모의 경우에도 당쇄부가 고등동물세포와 다른 것이 문제점으로 지적되고 있으나 최근 당쇄 공학의 발전으로 이 문제도 어느 정도 해결될 것으로 전망된다.

본고에서는 효모로 부터 의약품 단백질을 효율적으로 분비·생산하기 위한 고려요소들 중 숙주세포-발현vector계의 선별과 단백질 분비신호의 개발에 대한 최근의 연구동향과 결과를 소개하고자 한다.

### 숙주세포-발현vector계(host-vector system)

#### *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae*는 유전학적, 분자생물학적, 생리학적인 연구가 대장균 못지 않게 많이 진행되어진 효모이며 인체에 비병원성이며 무해한 GRAS(generally recognized as safe) 미생물이어서 식품 및 의약품 생산에 안전한 숙주세포로 입증되었다. 각종 영양요구표지(auxotrophic marker), ARS (autonomously replicating sequence), promoter, terminator등을 포함하는 다수의 벡터가 개발되어 있으나, 2 $\mu$  plasmid 유래의 복제원을 사용하는 episomal vectors (YEp)가 주류를 이루고 있다. 최근에 염색체 삽입벡터(Ty  $\delta$ -integrant, 약 20개의 유전자 copy수)도 개발되어 인간 신경성장인자(NGF)의 분비·생산(4mg/L)에 효율적으로

† Corresponding author

재조합 효모세포로부터 의약품 단백질의 분비생산

Table 1. 주요제품의 임상시험단계

Clinical Trials				Year of U.S. Regulatory Approval
Phase I	Phase II	Phase III	on Market	
			Insulin	'82
			Human Growth Hormone	'85
			alpha-Interferon	'86
			OKT3	'86
			Hep-B Vaccine	'86
			TPA	'87
			EPO	'89
			G-IFN	'90
			G-CSF	'91
			GM-CSF	'91
			IL-2	'92
			Factor VIII	'92
			beta-Interferon	'93
			<sup>1</sup> DNase	'94
			<sup>2</sup> rCeredase	'94
		<sup>3</sup> Hirulog		'96
		<sup>4</sup> Con-Interferon		'96
		<sup>5</sup> Thyrogen		'96
		Anti-TNF		'97
		<sup>6</sup> PDGF		'97
		Atrial Peptide		'97
		<sup>7</sup> PIXY 321		'97
		<sup>8</sup> HER-2 Mab		'97
	IGF-1			'98
	HIV Vaccine			'99
	Stem Cell Factor			'00
	IL-11			'00
BMP-2				'01
Antisense				'02
Gene Therapy				'02
<sup>9</sup> Nerve Growth Factor				'02

(출처: Consulting Resources Corporation)

<sup>1</sup>DNase : 방광섬유증(cystic fibrosis) 치료제, Genentech사 개발

<sup>2</sup>Ceredase : 가우서씨병(Gaucher's disease) 치료제, Genzyme사가 1993년 중반에 신약신청(NAD)허가 요청

<sup>3</sup>Hirulog : 혈전형성에 필수적 효소인 트롬빈의 억제인자, Biogen사가 임상시험 진행중, 헤파린 대체가능

<sup>4</sup>Consensus interferon : C형 간염치료제, Amgen사가 임상시험 진행

<sup>5</sup>Thyrogen : 미국에서 희귀약품으로 분류됨, 천연 갑상선 자극 호르몬의 재조합 판임, 갑상선 암환자에게 시험적으로 투여 예정, 3단계 임상시험 완료

<sup>6</sup>PDGF : 당뇨병환자의 만성 위궤양치료제, Chiron사가 임상시험 진행

<sup>7</sup>PIXY 321 : Immunex사가 임상시험 지원, 화학요법제와 방사선 치료로 유발된 적혈구 감소증(호중구와 혈소판 결핍증) 치료용

<sup>8</sup>HER-2 Mab : Genentech사에 의해 개발된 Mab치료제로 유방암과 난소암의 치료용

<sup>9</sup>NGF : Genentech사가 임상시험중, 말초성 신경증 환자 치료용

Table 2. Expression/production systems for recombinant proteins(43)

PRODUCT	EXPRESSION SYSTEM	PRODUCT	EXPRESSION SYSTEM
Immunomodulators		Blood proteinis	
INF- $\alpha$	<i>E. coli</i> , yeast	HSA	<i>E. coli</i> , yeast, potato tomato, <i>P. pastoris</i> , <i>H. polymorpha</i> , <i>K. lactis</i>
INF- $\beta$	Mouse cells, CHO mammalian cells		<i>E. coli</i> , yeast
INF- $\gamma$	<i>E. coli</i> , yeast, CHO mammalian cells	Hemoglobin	transgenic mice and pigs
IL-1	<i>E. coli</i> , yeast, surface adherent cells	Antithrombin III	CHO
IL-2	<i>E. coli</i> , yeast, surface adherent cells	Factor VII	BHK, yeast
	<i>P. pastoris</i>	Factor VIII	Surface adherent cells, CHO, <i>S. pombe</i>
IL-3	<i>E. coli</i> , yeast, CHO	Factor IX	BHK, transgenic sheep
IL-6	<i>E. coli</i>	Factor X III	<i>E. coli</i> , yeast
Tissue Necrosis Factor	<i>E. coli</i> , yeast, <i>P. pastoris</i>	von Willebrand factor	Surface adherent cells
TNF- $\beta$	<i>E. coli</i>	tPA	<i>E. coli</i> , yeast, CHO transgenic mice
Growth Factors		Urokinase	Surface adherent cells
G-CSF, M-CSF, GM-CSF	<i>E. coli</i> , yeast, CHO	Prourokinase	<i>E. coli</i> , yeast, surface adherent cells
Fibroblast growth factor(FGF)	<i>E. coli</i> , yeast	Streptokinase	<i>P. pastoris</i>
Tissue Growth Factor- $\alpha$	<i>E. coli</i> , yeast	Hirudin	Yeast, <i>H. polymorpha</i>
TGF- $\beta$	Yeast	Protein C	Surface adherent cells
EGF	<i>E. coli</i> , yeast, animal cells	Thrombomodulin	Mammalian cells
PDGF	<i>E. coli</i> , yeast, surface adherent cells	$\alpha$ -1-antitrypsin	<i>E. coli</i> , yeast, transgenic sheep
Connective tissue activator peptide	<i>E. coli</i>	Apolipoprotein A- I	<i>E. coli</i>
Angiogenin	<i>E. coli</i>	Apolipoprotein A-IV	<i>E. coli</i>
differentiation-inducing factor	Surface adherent cells	Apolipoprotein E	<i>E. coli</i> , yeast
Fibronectin	Yeast	Atrial natriuretic factor	<i>E. coli</i> , yeast
EPO	Surface adherent cells, CHO	Platelet factor 4	<i>E. coli</i>
Hormones		Inhibitors	
IGF-1	<i>E. coli</i> , yeast, <i>P. pastoris</i>	Mullerian inhibiting substance	CHO
IGF-2	<i>E. coli</i> , yeast	Elastase inhibiting substance	<i>E. coli</i>
h-GH	<i>E. coli</i> , yeast, CHO, surface adherent cells transgenic mice	Lipocortin	<i>E. coli</i> , yeast, <i>S. pombe</i>
h-GH releasing factor	<i>E. coli</i> , yeast	Enzymes	
Somatostatin	<i>E. coli</i> , yeast	Lysozyme	<i>E. coli</i> , yeast
Calcitonin	<i>E. coli</i> , yeast	SOD	<i>E. coli</i> , yeast, surface adherent cells, <i>P. pastoris</i>
h-Chorionic gonadotrophin	Yeast, murine cells	Renin	<i>E. coli</i> , CHO
Luteinizing hormone	Murine cells	Gastric lipase protein	Yeast
Relaxin	<i>E. coli</i>	Vaccines	
Insulin	<i>E. coli</i> , yeast	Hepatitis B	CHO, yeast, <i>P. pastoris</i> , <i>H. polymorpha</i>
Proinsulin	<i>E. coli</i> , yeast	Whooping cough	<i>E. coli</i>
$\beta$ -endorphin	<i>E. coli</i> , yeast	Malaria	yeast

사용되었다<sup>11</sup>. *S. cerevisiae*에서 발현된 재조합 단백질 예로는 lymphokines (IFNs 및 interleukins(ILs)), peptides (insulin, 각종 성장인자, hormones,  $\beta$ -endorphin, calcitonin, somatostatin 등), 효소(tPA, chymosin, lysozyme, superoxide dismutase(SOD) 등), 효소저해제( $\alpha$ 1-antitrypsin ( $\alpha$ 1-AT), hirudin 등), 바이러스항원(HBV 표면항원(HBsAg), HSV-1 glycoprotein D, influenza virus HA, polyoma virus middle T, HTLVIII Gag 등), oncogene 단백질(c-FOS, c-MYC, H-RAS 등), 기타 acetylcholine receptor, human serum albumin(HSA), 항체, 독소 등 수십 종이 있다<sup>12</sup> (Table 3). 이들 단백질의 생산에는 다양한 변이의 숙주세포가 사용되는 바 대부분 *S. cerevisiae*에 국한되어 개발되었다. 개발된 대표적인 변이주는 다음과 같다.

#### 당쇄결손 변이주

혈액응고인자, Mab, IFNs, hormones, 성장인자, virus항원 등 생체내에서 기능을 하는 단백질의 대부분은 당단백질이다. 당단백질의 당쇄부분은 세포간 인식, hormone-수용체 결합, folding, 단백질 targeting, 용해도, 안정성, 면역성 등 생체내에서 중요한 역할을 하고 있다<sup>51</sup>. 효모는 동물세포와는 달리 sial산이 부가되지 않으며 O-결합형 당쇄의 구조가 다른 것이 가장 큰 차이점이다<sup>61</sup>. 천연형 insulin-like growth factor-1(IGF-1), IL-1 $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 는 단순 단백질이지만 효모에서 생산시 특유의 O- 또는 N-결합형 당쇄가 부가되어 활성이 감소된다<sup>7, 81</sup>. Epstein-Barr virus(EBV) gp350 막항원과 HBV 표면항원의 경우 과당쇄화되어 항체 반응성을 저해한다<sup>9, 101</sup>. *S. cerevisiae*의 경우 당쇄부가는 40개 이상의 mannose에 의해 과당쇄화되어 재조합 단백질의 분비효율이 낮아지는 경향이 있다. 뒤에서 언급할 효모 *P. pastoris*, *Sch. occidentalis*, *Y. lipolytica*의 경우에는 당쇄 chain당 부가되는 mannose의 수가 8-10개 이어서 이들 균주를 사용하면 과당쇄화의 문제는 어느 정도 해결된다<sup>11</sup>. 또 다른 방법으로는 당쇄부가가 일어나는 아미노산(asparagine, serine, threonine)을 다른 아미노산으로 치환시키든지, N-결합형 당쇄결손 변이주(*alg*), mannan 생합성 변이주(*mnn*) 또는 *pnr1*의 초분비 변이주를 숙주세포로 선택할 수 있다. 실제로 tPA(scuPA) 분비생산시 당쇄화 부위 아미노산인 Asn<sup>302</sup>를 Ala로 치환하여 당쇄 특이적 면역성이 소실되고 완전한 활성형으로 분비생산에 성공하였다<sup>121</sup>. EBV gp350과 HBV preS 2+S 항원 생산시 야생균주에서 나타나는 고당쇄화는 *mnn9*

변이주를 사용하여 core형 당쇄만 붙은 당단백질 형태의 생산도 보고되었다<sup>131</sup>. 그러나, *mnn*변이주 사용시 균체증식속도가 크게 감소하고 삼투압에 민감해지므로 배양에 주의를 요한다.

#### Protease결손 변이주

*S. cerevisiae*는 40종류 이상의 proteases를 가지고 있으며 이들은 변성된 단백질이나 기능을 하지 않는 단백질을 분해한다.  $\beta$ -endorphin, parathyroid hormone(hPTH), 콜로니자극인자(GM-CSF)는 단백질 내부 절단(internal processing)이, hirudin과 epidermal growth factor(EGF)는 카복실-말단의 절단(C-terminal trimming)이, 인간 PA inhibitor type-1(hPAI-1)의 경우 액포 proteases에 의해 대부분이 저분자의 물질로 분해된다<sup>141</sup>. 액포 proteases중 중요한 것은 proteinase A(*PRAI*, *PEP4*) 또는 B(*PRB1*)와 carboxypeptidase Y(*PRC1*) 또는 S(*CPS1*)의 4 종류이며 이중에서 1-2 종류의 protease만 결손시켜도 재조합 단백질의 수율은 증가한다. 현재 여러 가지 protease결손 변이주가 개발되었으며 hPAI-1을 *pep4/prb1* 변이주에서 생산한 결과 천연의 것과 같은 크기의 hPAI-1가 생산되었고, hirudin의 경우 *prc1* 또는 *pep4* 변이주에서 C-terminal trimming이 크게 감소하였다<sup>151</sup>. 그외 세포의 protease결손 변이주(*SKI5*)도 보고되고 있으나 모든 재조합 단백질의 최대 수율을 보장하는 protease결손 변이들의 조합은 없으며 목적단백질에 따라 최적 변이조합을 찾아야 한다. 또한, 내부 절단이 발생하는 부위의 아미노산을 변화시키든지 배양조건(온도, pH)의 검토를 통해 생산된 단백질의 분해를 최소화하여야 한다.

#### 초분비 변이주(Supersecretor)

Prochymosin을 초분비 변이주를 이용하여 생산시 80-85%가 배지로 분비되었고 당쇄도 야생의 효모에 비하여 짧았다<sup>161</sup>. 관련 유전자는 *PMR1*(Ca<sup>++</sup> ATPase) 유전자이며, *pnr1* 변이주를 이용하여 bovine growth hormone과 scuPA 분비가 5-50 배 증가되었다<sup>16, 171</sup>. *pnr1/mnn9* 변이주는 Golgi체의 cis에서 trans까지의 단백질수송이 이루어지지않고 cis-Golgi체에서 세포막으로 bypass한 다음 exocytosis에 의해 당단백질로 분비되기 때문에 고분비 및 당쇄의 결손이 가능한 것으로 생각된다. 초분비 변이주를 이용하여 분비가 시도된 단백질로는  $\alpha$ 1-AT, tPA, HSA, hPAI-2등이 있으나 재조합 단백질의 분비 생산에 산업적으로 응용되지는 않고 있다.

기타 변이주

세포벽결손 변이주(leaky mutant : *kre1*, *hpo2*)를 이용한 단백질 분비능 증대, 자가선택 변이주(autoselective mutant : *ura3/fur1/urid-k*)를 이용한 plasmid 안정성 증대, IGF-1와 diphtheria toxin 생산시 산물의 독성에 내성을 가진 변이주의 개발도 보고되었다<sup>18)</sup>. 최근에 개발된 온도 감수성 용해 변이주(*lyt2* 변이주)의 경우 배양 말기에 온도 상승(37°C) 또는 삼투압 충격(1 M sorbitol)을 가하여 균체의 용해와 동시에 발현된 chloramphenicol acetyltransferase의 70%가 세포외로 유리되었다<sup>19)</sup>.

*Pichia pastoris*

*P. pastoris*의 host-vector계는 발현제어가 정교하고 강력한 AOX1(alcohol oxidase, 전세포단백질의 30%) promoter와 ARS서열(PARS1, PARS2)을 주로 이용하여 multi-copy integrant 형태로 개발<sup>20)</sup>되어 미국 Invitrogen사에서 시판하고 있다. HSA의 경우에 4g/L(secreted), tetanus toxin fragment C의 경우에는 12g/L(intracellular)의 놀라운 수율이 보고되었으며(Table 3), 재조합효모의 고농도세포배양과 scale-up이 용이하나 분비 단백질의 분해문제가 제기되고 있다.

*Hansenula polymorpha*

*H. polymorpha*의 host-vector계는 강력한 MOX(methanol oxidase, 전세포단백질의 37%) 또는 FMD promoter와 ARS서열(HARS1, HARS2)을 이용하여 multi-copy (100 copies) integrant 형태로 개발<sup>21)</sup>되어 독일의 Rhein Biotech사에서 시판하고 있다. 지금까지 HSA, hirudin, human lipase, HBsAg, bovine lysozyme, β-lactamase 등의 생산이 보고되어 있으며, *Schwanniomyces occidentalis* glucoamylase는 1.4 g/L 수준으로 분비되었다(Table 3)<sup>7)</sup>.

*Kluyveromyces lactis*

*K. lactis*는 β-galactosidase(lactase) 생산으로 식품공업에서 오랫동안 사용되어온 효모이며 배양조건(온도, 기질요구)도 까다롭지 않고 단백질 분비능도 우수한 편이다. *K. lactis*의 host-vector계는 삽입-, ARS-vector 및 전상 독소 plasmid (pGKL-1) 또는 *K. drosophilaram*의 1.6μm 환상 plasmid (pKD1)를 이용하는 vector<sup>22)</sup>가 개발되었으며 *LAC4* 또는 *PGK* promoter를 주로 사용한다. HSA 경우 1000 L 규모에서 수 g/L 수준으로 분비되며 prochymosin의 경우(single-copy 삽입) 95%의 분비능과 *S. cerevisiae*보다 수십배의 높은 수율을 보여 41,000 L까지 scale-up되었<sup>23)</sup>, 생산된 재조합

chymosin은 올해(1995년) FDA의 허가를 받을 것으로 예상되어<sup>24)</sup> 의약품 단백질의 생산에 차세대 숙주세포로 각광을 받고 있다. 기타 IL-1β, tPA, tissue specific inhibitor of metalloproteinases(TIMP) 등은 과당쇄형태로 분비됨이 보고되었다.

*Schizosaccharomyces pombe*

분열 효모 *Schi. pombe*는 *S. cerevisiae* 다음으로 분자 유전학적 및 생리학적 연구가 많이 진행되어 왔고, 번역후 수식계는 *S. cerevisiae*보다 고등동물에 더 가까우며 특히 galatylsation에 관여하는 효소를 가지고 있다. *S. cerevisiae*의 2μ plasmid 이용 vector (5-10 copies) 또는 *Schi. pombe*의 *ars1* 이용 vector(30 copies)가 개발되었고, plasmid 안정성 및 copy수 증대기능을 가진 *stb*를 함께 이용한 *ars1 stb* vector (pFL20, 80 copies)도 보고되었다<sup>25)</sup>. SV40 early promoter와 *ADH* promoter가 가장 많이 사용되고 있으며, 최근에 개발된 human cytomegalovirus(hCMV)의 promoter는 SV40 promoter보다 10배이상 강한 발현능을 보인다. *neo* 전사단위(copy수 증폭기능)를 SV40 promoter 하류에, 외래유전자를 hCMV promoter 하류에 각각 연결하는 새로운 발현계(200 μg/mL의 항생제 G418 존재시 170 copies)가 최근에 개발되어서 human lipocortin-1(10 g wet cell weight중 350 mg), rat arginase, rat NDP-kinase β subunit, hIL-6 등이 고효율로 생산되었다(Table 3)<sup>26)</sup>. Factor XIIIa와 α-amylase를 제외하면 대부분 세포내 축적되며 invertase와 antithrombin III는 과당쇄화된다.

*Yarrowia lipolytica*

*Y. lipolytica*의 alkaline extracellular protease(*XPR2*)는 1-2 g/L 수준으로 분비되어 이 효소 유전자의 promoter와 prepro배열을 사용하여 prochymosin, tPA, α-IFN 등의 분비생산이 시도되었다. 주로 ARS18 또는 ARS68를 이용한 vector(1-3 copies)가 사용된다<sup>27)</sup>.

기타 host-vector계 개발이 진행되고 있는 효모로는 *Candida*속, *Schwanniomyces*속, *Zygosaccharomyces*속, *Rhodospiridium*속, *Pachysolen*속 등이 있으나 아직 재조합단백질 생산에는 활발히 응용되고 있지 않다.

분비 신호

재조합 단백질이 효모세포내에 생산될 경우 불수용성, 불

Table 3. Recombinant proteins produced by yeast

Yeast	proteins				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	h-Insulin		Hirudin	Viral	
	h-Atrial Natriuretic Peptide		m- $\alpha$ -Amylase	haemagglutinin	
	h-INF- $\alpha$ 1		h-ProUrokinase	m-IG heavy chain	
	h-INF- $\alpha$ 2		r-GM-CSF	m-IG light chain	
	h-INF- $\gamma$		m-GM-CSF	H-EPO	
	Consensus $\alpha$ -INF		h-GM-CSF	h- $\alpha$ 1-Antitrypsin	
	h- $\beta$ -Endorphin		h-Calcitonin	h- $\alpha$ -Amylase	
	h-EGF		h-IL-1 $\alpha$	HSA	
	m-EGF		h-IL-1 $\beta$		
	h-Parathyroid Hormone		Cow IL-2		
	h-Tumor Necrosis Factor		m-IL-2		
	Angler Fish Somatomedin C		h-IL-2		
	Angler Fish Somatostatin		h-IL-5		
	Tetanus Toxin Fragment C		h-IL-6		
	h-IGF-1		h-Lysozyme		
	Epstein-Barr Virus Gp350		h-tPA		
	h-Vascular Endothelial Growth Factor		h-Lipocortin-1		
	h-Vascular Permeability Factor		Elafin		
	Pea Lipoxygenase-3		Echistatin		
	h-Protein Disulphide Isomerase		EGF		
	h-Connective Tissue Activation PeptideIII		Insulin		
	Immunoglobulin Heavy & Light Chain		Calf Prochymosin		
	Diphtheria Toxin-Hormone Fusion Protein		h-5-Lipoxygenase		
	h-Plasminogen Activator Inhibitor Type I		h-Growth Hormone		
	h-Nerve Growth Factor		h-Apolipoprotein E		
	<i>Pichia pastoris</i>	Tetanus toxin fragment C		Tumor Necrosis Factor	h-lysozyme
		h-IL-2		Kunitz protease inhibitor	h-IGF-1
HSA			Aprotinin analog	h-EGF	
Pertactin(P69)			Superoxide dismutase	m-EGF	
Streptokinase			Bovine lysozyme	HBsAg	
<i>Hansenula polymorpha</i>	HBsAg	HSA	h-lipase	Hirudin	
<i>Shizosaccharomyces pombe</i>	h-Lipocortin-1		P-glycoprotein	CAT	
	Factor XIIIa		Antithrombin III	IL-6	
	Lysozyme		$\alpha$ 1-antitrypsin	Cytochrome P-450	
	Polyoma middle T Ag		$\alpha$ -amylase	Epoxide hydrolase	
	NDP-kinase Arginase		D2s dopamine receptor		
<i>Kluyveromyces lactis</i>	HSA		prochymosin	II-1 $\beta$	
	$\beta$ -Lactamase		HSA-CD4 fusion protein	tPA	
	TiMP				
<i>Yarrowia lipolytica</i>	h-anaphylatoxin C5a		Bovine prochymosin	INF- $\alpha$ 1	
				h-tPA	

활성, 부정확한 아미노-말단등의 문제가 발생하며 이런 문제는 disulfide 결합과 당쇄부가의 결핍에 기인한다. Disulfide 결합과 당쇄부가는 효모 분비기관들 사이에서 발생하며 정확한 단백질의 고차구조 및 생물학적 활성을 위해 필요하다. 또한, 분리정제기술의 단순화 차원에서도 배지로의 분비 생산이 바람직하다. 따라서, 안정하고 활성형 단백질의 생산은 효모세포내 축적생산보다 분비생산에 집중되고 있다. 효모 *S. cerevisiae*에서 재조합 단백질의 성공적인 분비에는 주로 peptides (EGF, insulin)류이며, 고농도 세포배양에서 이들 peptides는 리터당 수백 mg 수준으로 분비된다고 알려져 있다.

고등동물세포처럼 효모에서의 단백질 분비는 소포체(ER)로의 cotranslational translocation을 중재하는 아미노-말단의 신호배열에 의해 좌우되며 그 신호배열은 signal peptidases에 의해 ER에서 절단된다. 그 후, 단백질은 Golgi체로 수송된 후 당쇄부가와 같은 여러가지 수식을 받는다. 단백질이 ER 또는 Golgi체 간존특정신호나 액포로의 이동특정신호 없으면 ER에서 원형질막으로 지도되는 분비경로 즉, Golgi체로부터 단백질은 분비 과립 (secretory vesicles)으로 packing된 후 budding하는 세포표면으로 이동하는 경로를 거친다. 효모에서의 단백질 분비경로와 각 분비단계에서의 관련 유전자를 Fig. 1에 나타내었다. 전체의 분비경로중 ER에서 Golgi체로의 수송단계가 단백질 분비생산에 가장 율속단계(rate-limiting step)인 것으로 알려지고 있다.

효모와 고등진핵세포의 분비성 단백질은 소수성 아미노-말단 신호배열을 함유하며, 이 배열은 분비경로의 첫 단계인 ER로의 단백질 수송에 관계한다. 신호배열은 ER로의 수송 후 signal peptidase에 의해 제거되는 신호부위(pre배열)로만 구성(약 20개 아미노산)되거나 pre배열뒤에 leader부위(leader 또는 pro배열; 단백질 전구체가 Golgi체에 도달되어 성숙 단백질로 될 때 제거)를 가진 prepro배열의 두가지 형태가 있다. 전통적인 신호배열은 전하를 띤 아미노-말단, 중앙의 소수성 core, ER의 signal peptidases에 의해 절단되는 특정배열등 세부분으로 이루어진다. 즉, 한개 이상의 염기성 아미노산 +  $\alpha$ -helix 구조의 소수성 core +  $\alpha$ -helix 구조를 파괴하는 중성 아미노산 + 절단부위로 구성되어 있다<sup>41)</sup>.

일반적으로 *S. cerevisiae*에서 가장 잘 기능하는 이중생물 유래의 외래신호배열은 식물 또는 곰팡이 단백질 유래의 것으로 알려져 있으며, 실제로 곰팡이 *Mucor pusillus* aspa-

rtic proteinase의 신호배열은 human growth hormone<sup>37, 38)</sup>, human apolipoprotein E, HSA의 분비생산에 응용되고 있다<sup>28, 29)</sup>. 그러나, 외래신호배열 사용시 효모에서의 기능여부는 예측하기 어렵고, 사용하더라도 효모세포내 축적

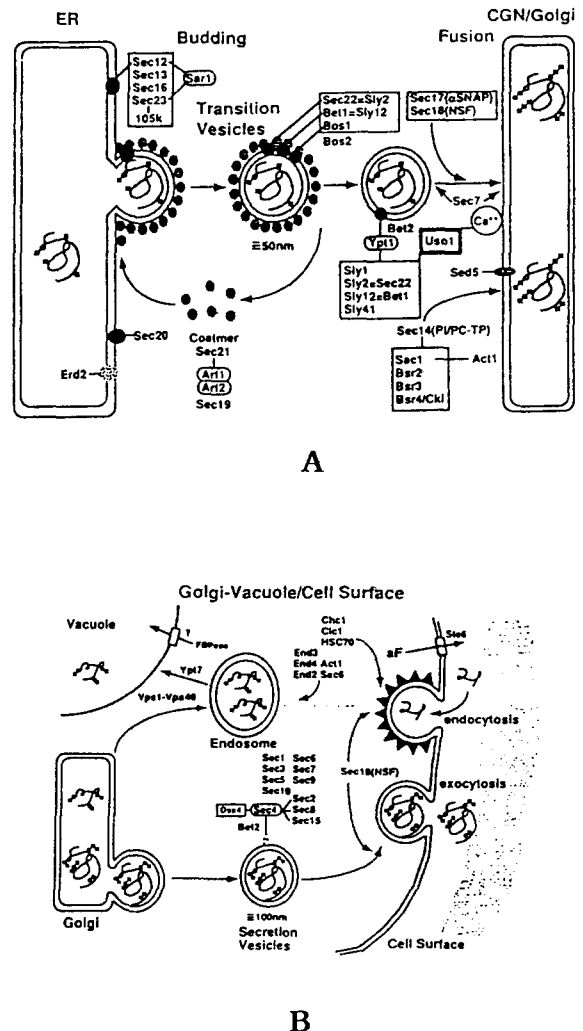


Fig. 1. Schematic diagram of protein secretion in yeast (44).  
 (A) related genes in pathway from ER to Golgi  
 (B) related genes in pathway from Golgi to vacuole/cell surface

되는 단백질( $\alpha$ -IFN,  $\alpha$ 1-AT)도 다수 있으며, 신호배열의 인식과 절단의 차이 문제도 있어, 효모에서의 이중단백질 분비에는 효모 유래의 신호배열을 사용함이 바람직하다.

#### Saccharomyces속 유래의 분비배열

Saccharomyces속 효모의 분비성 단백질인  $\alpha$ -factor (MFa1), invertase (SUC2), acid phosphatase (PHO5),  $\beta$ -glucanase (BGL2),  $\alpha$ -galactosidase (S. carlsbergensis MEL1) 및 glucoamylase (S. diastaticus STA1, DEX2) 유래의 분비배열이 사용되고 있으나 대부분의 분비연구는  $\alpha$ -factor의 prepro leader (ppL)배열에 집중되어 있다<sup>41</sup>.

MFa1 유전자 산물은 165개의 아미노산으로 구성되어 있으며 아미노-말단의 19개 소수성 아미노산은 신호배열(pre배열), 그 후 61개 아미노산의 pro배열 (3개 N-결합형 당쇄 부가 부위 가짐)로 구성되어 있다. 성숙  $\alpha$ -factor peptide(13개 아미노산)는 4개의 반복서열로 구성되어 있으며, spacer peptides (Lys-Arg-Glu-Ala-Glu(Asp)-Ala)에 의해 분리되어 있다. 성숙한  $\alpha$ -factor peptide는 3단계 절단기작을 받는다: (i) KEX2 유전자 산물(endopeptidase yscF)에 의한 Lys-Arg잔기의 카복실-말단 절단. (ii) STE13 유전자 산물(dipeptidylaminopeptidase A)에 의한 아미노-말단 dipeptides(Glu-Ala, Asp-Ala, 또는 Val-Ala) 절단. (iii) KEX1 유전자 산물(carboxypeptidase B-like protease)에 의한 카복실-말단 잔기 절단. 분비에 성공한 초기의 예는 hEGF이며 25%가 배지로 분비(MF 1 promoter, 온도감수성 SIR변이주사용)되었다<sup>30)</sup>. 효모에서 생산된 hEGF는 활성가지지만 ppL의 spacer peptide내 Lys-Arg부위만 절단되었다. 이러한 불완전 절단은  $\beta$ -endorphin, 합성 IFN- $\alpha$ , hIFN $\alpha$ 1등에서도 관찰되었다.  $\alpha$ -factor 사용시 또 다른 문제는 성숙단백질내 비특이적 부위에서 일어나는 내부절단문제로서  $\beta$ -endorphin, consensus  $\alpha$ 1-IFN, hPTH, GM-CSF등에서 관찰되었다. Pro배열의 당쇄부가가  $\alpha$ -factor의 효율적인 분비에 중요하나 aminoglycoside phosphotransferase와 hGM-CSF의 분비 및 절단에 pro배열은 중요하지 않고 IL-1 $\beta$ 에 ppL을 융합했을 경우 pre배열은 정확히 절단되지만 pro배열은 붙어있었다. hIGF-1의 분비시 pre배열은 충분치 않고 분비효율은 pro배열에 좌우되어 pro배열은 IGF-1의 ER로의 수송을 도울(ER에서의 folding을 도울) 것으로 생각되며,  $\alpha$ -globin의 수송에는 prepro배열 두개 다 필요하였다<sup>31)</sup>. hPTH의 경우 pre 배열만 사용시, hPTH

mRNA양과 배지 및 세포내 단백질 산물의 양이 상당히 감소됨이 관찰되어 pro배열은 mRNA 안정화 또는 전사에 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다<sup>32)</sup>. 그러나, 최근 hirudin, h-leucocyte protease inhibitor등의 분비에서 pro배열의 요구성은 절대적이 아님이 많이 보고되어 목적 단백질에 따라 pre 또는prepro배열의 분비 의존성은 달라지는 것으로 추정된다.

Invertase (SUC2) 및 acid phosphatase (PHO5)는 periplasmic space잔존효소이며 5-30% 정도만 배지로 분비된다. Invertase 분비배열을 사용할 경우 prochymosin은 10%만, hIFN- $\alpha$ 2 경우 30%만 분비되었다. 그 외 pea seed lipoxxygenase-3,  $\alpha$ 1-AT, prourokinase, mouse-human chimeric antibody등의 분비에 invertase 신호배열이 사용되었으나 대부분 균체내에 잔존하였다<sup>41)</sup>. PHO5 신호배열을 사용하여 hIFN $\alpha$ , tPA, ha-amylase등의 분비가 시도되었으나 대부분 세포벽 또는 세포내 잔존하였다.

재조합 단백질의 분비에 응용된 또 다른 신호배열로는 glucoamylase (STA1, DEX2유전자 산물),  $\alpha$ -galactosidase (S. carlsbergensis의 MEL1유전자 산물),  $\beta$ -glucanase(BGL2유전자 산물)등이 있으며 hIL2, h5-lipoxxygenase, hirudin, ethistatin, hPAI-1등의 분비에 이용되었다.

#### Kluyveromyces속 유래의 분비배열

자낭균 효모인 Kluyveromyces가 생산하는  $\alpha$ -factor와 killer toxins (pGKL1, pGKL2 plasmid가 코딩)의 신호배열 연구도 최근 다수 보고되고 있다.  $\alpha$ -factor와 killer toxin의 분비와 절단은 공통점이 많으며  $\beta$ -toxin subunit의 방출은 Lys<sup>232</sup>-Arg<sup>233</sup>잔기의 절단(KEX2유전자 산물에 의한) 후 이루어진다. K. lactis의 killer toxin ORF2 유전자(97 kDa subunit)의 leader배열 및 28 kDa subunit의 신호배열 응용으로는 mouse  $\alpha$ -amylase, hIL-1 $\beta$ , diphtheria toxin-hormone, HSA등이 있다<sup>33)</sup>.

최근 cloning된 K. marxianus inulinase 유전자(INU1, INU1A)를 S. cerevisiae에서 발현시켰을 때 총발현된 inulinase의 90% 이상이 균체외로 분비되었다<sup>34)</sup>. Inulinase 효소는 단백질 분비신호로 생각되는 아미노-말단의 23개 아미노산 배열(prepro배열; Table 4)을 가지고 있다. S. cerevisiae에서 기능을 한 여러가지 prepro신호배열이 Table 4에 요약되어 있으며 inulinase pro배열(SVINYKR)의 경우 Aspergillus awamori glucoamylase의 pro배열(NVISKR)과



Table 4. Prepro signals functioned in *S. cerevisiae*

Signal Source	Signal Peptide <sup>a</sup>
<i>Asp. awamori</i> Glucoamylase	MA <sup>-24</sup> ...GLA <sup>18</sup> NVISKR <sup>1</sup> ▲
<i>K. marxianus</i> Inulinase	MR <sup>23</sup> ...VSA <sup>16</sup> SVINYKR <sup>1</sup> ▲
<i>K. lactis</i> Killer toxin (97 kDa)	MN <sup>-29</sup> ...VQG <sup>-13</sup> LEHTRRGSLVKR <sup>1</sup> ▲
<i>S. cerevisiae</i> MFal	MR <sup>85</sup> ...SALA <sup>60</sup> AP...GVALDKR <sup>1</sup> ▲
Human Serum Albumin	MK <sup>24</sup> ...SAYS <sup>18</sup> RGVFRR <sup>1</sup> ▲
<i>Mucor pusillus</i> Aspartic Proteinase <sup>b</sup>	ML <sup>66</sup> ...AL TSA <sup>45</sup> RPVSKNKR <sup>1</sup> ▲

<sup>a</sup>The cleavage sites are represented by △(signal peptidase) and ▲(KEX2 endoprotease yscF).

Amino acids are denoted by 'one letter'.

The first amino acid of mature protein is +1.

<sup>b</sup>The Lys-Arg (KR) dipeptide was artificially created in the pro region of *M. pusillus* aspartic proteinase, and the short pro region (8 amino acids-long) was resulted.

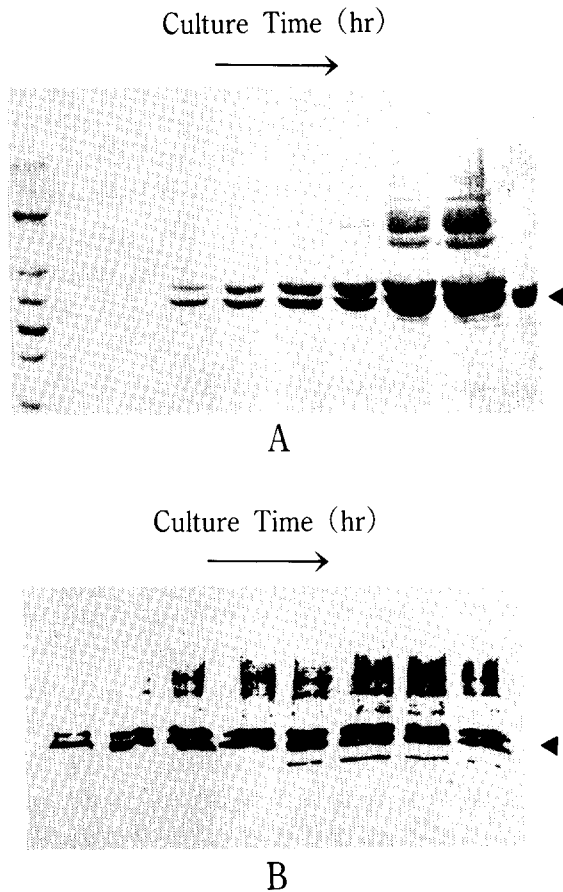


Fig. 2. Secretory production of lipocortin-1 (A: SDS-PAGE) and α1-antitrypsin (B: Western blotting) by fed-batch fermentation of recombinant *S. cerevisiae*.

유사하며, 이 pro배열의 역할은 (KEX2 protease의 공격을 쉽게 받도록) 단백질 구조를 변화시켜 분비율을 증대시키는 것으로 추정된다.

Inulinase 효소의 prepro배열을 이용하여 h-lipocortin-1, hIL-2, α1-AT 등의 생산시 (GAL10 promoter 사용) 효율적으로 분비됨을 관찰하였다(대한민국, 미국, 일본, 유럽 특허출원중). 발효조에서 유가배양(포도당과 galactose의 혼합배지를 공급)을 수행한 결과 세포중식과 함께 이들 재조합 단백질의 분비생산량은 증가하며, α1-AT은 약 80%가, hIL-2 및 h-lipocortin-1은 약 90% 이상이 세포의 배지로 분비되는 결과를 얻었다(Fig. 2). α1-AT의 경우 당체가 결합된 형태도 함께 분비됨을 알 수 있다.

### 결론

재조합 단백질은 의약품(치료제, 질병 진단 kit, 새로운 의약품 탐색계 개발), 연구용(세포주기의 해석, 정보전달계의 해석) 또는 공업용(반응촉매, 식품산업용 효소, 항체효소)으로써 광범위하게 사용될 수 있다.

효모에서 재조합 단백질의 분비효율을 증대시키기 위해 기존 신호배열의 개조가 가장 쉬운 방법이다. 고등진핵세포보다 효모세포에서 신호배열의 α-helix 2차 구조에 대한 요구는 더 엄격하다고 알려져 있어, 효모 신호 peptide의 아미노 말단에 (+)전하를 띤 아미노산을 도입하거나 소수성 core 영역에 α-helix 구조 갖도록 소수성을 증가 시키면 효모에서의 분비기능이 증대할 것으로 기대된다. 실제로 MEL1 신호배열의 경우 이러한 개조에 의해 ethistatin, PAI-1의 분비가 상당히 증가되었다<sup>35)</sup>. 기존 신호배열의 개

조외에도 chaperone 단백질의 동시 발현<sup>36)</sup>, disulfide isomerase 과발현<sup>37)</sup> 등의 도입이나, 당쇄부가 결손 변이주 또는 초분비 변이주 선별등에 의해서도 단백질 분비는 크게 향상될 수 있다. 또한, inulinase와 같이 효모의 균체외 단백질(효소) 유전자를 cloning함으로써 그 신호배열을 응용할 수도 있다. 그러나, 어떤 단백질 유래의 신호배열이든 모든 분비백터에 적용할 수 있는 만능의 배열은 없고 몇 가지 분비배열을 조사하여 목적 단백질의 분비에 최적인 조합을 결정해야 한다.

실제 산업적인 측면에서 기존의 분비신호들은 대부분 특허화 ( $\alpha$ -factor 신호배열의 경우 Chiron사<sup>38, 39)</sup>, invertase는 Genentech사<sup>40)</sup>, acid phosphatase는 Takeda와 Genex사<sup>41)</sup>, glucoamylase는 Bio Technica International사<sup>42)</sup>, killer toxin은 Mitsubishi kasei사) 되어 있거나, 20 kDa 이상 고분자 단백질의 경우 분비효율의 낮음으로 인해서 상업적 생산시 많은 제약이 따른다. 따라서, 신규의 효율적인 분비신호의 탐색 및 발현 분비 벡터의 개발은 이러한 문제를 해결할 것이며 분리정제공정의 단순화로 제조합 의약품의 원가절감에도 크게 기여할 것이다.

### 참고문헌

- Sakai, A., F. Ozawa, T. Higashizaki, Y. Shimizu and F. Hishinuma, *Bio Technol.* **9**, 1382-1385 (1991)
- Romanos, M.A., C.A. Scorer and J.J. Clare, *Yeast*, **8**, 423-488 (1992)
- Das, R.C. and D.A. Campbell. In *Yeast strain selection*, C.J. Panchal(ed). pp. 311-342, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel (1987)
- 남 수완, *생물산업*, **7**, 18-27 (1994)
- Rademacher, T.W., R.B. Parekh and R.A. Dwek, *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 785-838 (1988)
- Orlean, P., et al., *Methods Enzymol.* **194**, 682-697 (1991)
- Gellerfors, P., et al., *J. Biol. Chem.*, **264**, 11444-11449 (1989)
- Livi, G.P., et al., *J. Biol. Chem.*, **266**, 15348-15355 (1991)
- Schultz, L.D., et al., *Gene*, **54**, 113-123 (1987)
- Ellis, R.W., et al., In *Viral hepatitis and liver disease*, A.J. Zuckerman (ed), pp. 1079-1086, Alan R. Inc., New York (1988)
- Hodgson, J., *Bio/Technol.*, **11**, 887-893 (1993)
- Melnick, L.M., B.G. Turner et al, *J. Biol. Chem.*, **265**, 801-807 (1990)
- Schultz, L.D., et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, **721**, 148-157 (1994)
- Gardell, S.J., et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **278**, 467-474. (1990)
- Takabayashi, K., et al., *Yeast*, **6**, S490 (1990)
- Smith, R.A., M.J. Duncan and D.T. Moir, *Science*, **230**, 1219-1224 (1985)
- Turner, B.G., G.C. Avgerinos, L.M. Melnick and D.T. Moir, *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 869-875 (1991)
- 정봉현, 남수완, *생물공학 NEWS*, **2**, 16-24 (1995)
- Alvarez, P., et al., *J. Biotechnol.*, **38**, 81-88 (1994)
- Cregg, J.M., T.S. Vedvick and W.C. Raschke, *Bio/Technol.*, **11**, 905-910 (1993)
- Janowicz, Z.A., et al., *Yeast*, **7**, 431-443 (1991)
- Fleer, R., et al., *Bio Technol.*, **9**, 968-975 (1991)
- van den Berg, J.A., et al., *Bio Technol.*, **8**, 135-139 (1990)
- Bonekamp, F.J. and J. Oosterom, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 1-3 (1994)
- Broker, M. and O. Bauml, *FEBS Letts.*, **248**, 105-110 (1989)
- Giga-Hama, Y., et al., *Bio Technol.*, **12**, 400-404 (1994)
- Nicaud, J.M., et al., *J. Biotechnol.*, **19**, 259-270 (1991)
- Hiramatsu, R., S. Horinouchi, E. Uchida, T. Hayakawa, Yamashita, and T. Beppu, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2052-2056 (1991)
- Nomura, N., H. Yamada, N. Matsubara, S. Horinouchi and T. Beppu, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 382-387 (1995)
- Brake, A.J., J.P. Merryweather, D.G. Coit et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**, 4642-4646 (1984)
- Rothblatt, J.A., J.R. Webb, G. Ammerer and D.I. Meyer, *EMBO J.*, **6**, 3455-3463 (1987)
- Reppe, S., O.S. Gabrielsen, O.R. Blingsmo, K.M. Gautvik and T.B. Oyen, *Yeast*, **6**, S502 (1990)
- Baldari, C. J.A.H. Murray, P. Ghiara, G. Cesareni and C.L. Galeotti, *EMBO J.*, **6**, 229-234 (1987)
- Nam, S.W., K. Yoda and M. Yamasaki, *Biotechnol. Lett.*, **15**, 1049-1054 (1993)
- Hofmann, K. J. and L.D. Schultz, *Gene*, **101**, 105-111 (1991)
- Demolder, J., W. Fiers, R. Contreras, *J. Biotechnol.*, **32**, 179-189 (1994)
- Robinson, A.S., V. Hines and K.D. Wittrup, *Bio/Technol.*, **12**, 381-384 (1994)

남 수 완

38. Brake, A.J., U.S. *Patent*, 4588684 (1986)
39. Brake, A.J. and J.A. Van Den Berg, U.S. *Patent*, 5010182 (1991)
40. Chang, C.N. and R.A. Hitzeman, U.S. *Patent*, 5010003 (1991)
41. Strausberg, L. and S.L. Strausberg, U.S. *Patent*, 5013652 (1991)
42. Maine, G.T., R.S. Daves and R.R. Yocum, U.S. *Patent*, 5024941 (1991)
43. Hodgson, J., *Bio Technol.*, 11, 887-893 (1993)
44. 酵母とバイオ；酵母研究の新潮流, pp. 6-27, 醫學出版センター (1993)