

특집: 생물공정기술의 최적화(I-II)

효모 균주육종과 산업적 응용

— 재조합 단백질 생산을 중심으로 —

이 상 기

KIST 생명공학연구소 응용미생물연구부

전통적으로 효모는 주정, 이산화탄소, 단백질, 비타민류, 향미 성분 생산에 사용되어 왔으며 특히 *Saccharomyces cerevisiae*는 제빵, 양조, 공업용 주정생산 등에 광범위하게 사용되어 왔다. 또한 폐기물을 이용하여 단세포 단백질(SCP)로서의 효모를 생산하는 연구도 많이 이루어져 왔다. 그 예로서 제지공업 부산물인 sulphite liquor를 이용한 *Candida utilis*의 생산, 유청(whey)을 이용한 *Kluyveromyces marxianus*의 생산, 전분함유 부산물을 이용한 *Endomycopsis fibuligera*, *Candida utilis*의 생산("Symba" process), 값싼 탄소원인 methanol을 이용한 methanol 자화 효모 *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*의 생산 등을 들 수 있다. 이러한 SCP 생산이외에 효모는 carotene(*Rhodotorula*), astaxanthin(*Phaffia*) 등 색소생산, citric acid(*Yarrowia lipolytica*) 등 유기산 생산, steroid 전구체(*Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*), melibiase, invertase, glucoamylase(*S. cerevisiae*) 등의 효소, glycolipid(*Y. lipolytica*, *Torulopsis bombicola*) 등 biosurfactant 생산 등에 이용되어 왔다.

생물학적 혹은 산업적 중요성을 가지는 생물의 유전형질의 조명에는 유전학적 연구가 필수적이다. 그러나 약 500여종의 효모 중에서 현재까지 2종에서만 충분한 유전학적 연구가 이루어져 왔다. 이 중 *S. cerevisiae*의 경우 산업적 중요성으로 인하여 많은 유전학적 연구가 이루어져 왔고 최근에는 유전공학 기술의 적용으로 특히 재조합 단백질 생산 숙주로서의 산업적 중요성이 새로운 조명을 받고 있다. 반면에 *Schizosaccharomyces pombe*의 경우는 이분법(binary fission)에 의한 생식과 cell division cycle에 관한 진핵세포 생물 모델로서의 연구 등 주로 기초 생물학적 연구에 관련된 연구가 이루어져 왔다. 본고에서는 산업적 중요성이 큰 효모의 분자육종에 관한 연구현황, 특히 현재로서 산업적으로 가장 많은 관심의 대상인 재조합 단백질의 생산측면에서 전통적으로 가장 많이 사용되는 *S. cerevisiae*에 있어서의 새로운 연구 동향과 최근 급격한 진전이 있어 온 비전통 효모 시스템의 개발 현황을 살펴보고자 한다.

효모를 이용한 재조합 단백질의 생산

유전공학기술을 이용하여 재조합 단백질을 생산하기 위한

유전자 발현 시스템으로서 그동안은 주로 원핵 세포인 *E. coli*가 숙주세포로 사용되어 왔다. 그러나 대부분의 유용 생리활성 물질 생산 유전자는 진핵세포인 고등 생물로부터 기원한 것이므로 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 고등생물과 동일한 진핵세포로서 고등생물 유래의 유전자와 전사 및 번역 시스템이 유사하고 splicing을 통한 intron의 제거가 가능하며 고등동물의 Golgi체와 유사한 분비기관을 갖추고 있어서 번역후 수식(post-translational modification)을 통해 활성화된 단백질을 생산, 분비시킬 수 있다. 따라서 유용한 재조합 단백질의 유전자를 클로닝할 경우 유전자의 발현 효율을 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 세포내에서 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.

*S. cerevisiae*는 유전학적, 생리학적 연구가 많이 이루어져 있을 뿐만 아니라 영양요구성 표지(auxotrophic marker), 다수의 프로모터 및 플라스미드 벡터 등 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 무해함(GRAS: generally recognized as safe)이 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 다음

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

Category	Protein	
Lymphokines	Enzyme inhibitors	
	Interferon- α	
	Interferon- β	
	Interleukin-2	
Peptides	Oncogene proteins	
	Insulin	
	Epidermal growth factor	
	Insulin-like growth factor	
	Growth hormone	
	Atrial natriuretic factor	
	β -Endorphin	
	Enzymes	Others
		Tissue plasminogen activator
		Chymosin
Carboxypeptidase		
Lysozyme		
Superoxide dismutase		
HTLVIII protease		
Glucose oxidase		

과 같은 몇가지 문제점이 나타나고 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 세포증식률 및 재조합 단백질의 생산성을 감소시키는 원인이 되고 있다. 또한 당단백질 생산의 경우 분비된 단백질의 과glycosylation (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 숙주세포로 이용하기 위해서는 이들 효모에 적용시킬수 있는 형질전환법(transformation)과 더불어 형질전환체를 선별할 수 있는 방법의 개발이 선행되어야 한다. 따라서 이를 위한 많은 노력들이 경주되었고 이제까지 십여종이상의 효모를 대상으로 한 형질전환법이 개발되었으나 실제 상업적 이용목적으로 사용할 수 있는 시스템은 아직까지 수종의 효모에 불과한 상황이다. 이들 중 가장 대표적인 시스템으로서는 methanol 자화 효모인 *H. polymorpha* 및 *P. pastoris*, 분열형효모인 *S. pombe*, alkane

표 2. 비전통 효모로부터 생산된 재조합 단백질 (13)

Strain	Promoter	γ -Protein	Localization
<i>P. pastoris</i>	AOXI	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>	MOX	HBsAg	s
		HSA	s
		HBsAg	c
		HBsAg	c
		glucoamylase	s
		α -galactosidase	s
		<i>A. niger</i> glucose oxidase	s
		human lipase	s
		<i>C. theobroma</i> seed storage protein	s
		factor XIIIa	s
		α -1-antitrypsin	c
		prochymosin	s
		IL-1 β	s
HSA	s		
human anaphylatoxin C5a	s		
bovine prochymosin	s		
bovine prochymosin	s		
α 1 interferon	s		
human tPA	s		
cellulase	s		

*s=secreted, c=cytosolic

자화효모인 *Y. lipolytica*, 유당분해효소 생산효모인 *K. lactis* 및 amylose 분해효모인 *Schwanniomyces occidentalis* 등이 있다. 그러나 *S. pombe*를 제외하고는 이들 비전통 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),

표 3. *S. cerevisiae*와 비전통 효모의 재조합 단백질 생산수율 비교(13)

γ -Proteins	Host	Gene Copy Number	Promoter	Yield
HBsAg S monomer	<i>S. cerevisiae</i>	>50	<i>PGK1</i>	1~21
Murine EGF	<i>H. polymorpha</i>	1	<i>MOX</i>	0.15~0.2
IGF-1	<i>H. polymorpha</i>	~50	<i>MOX</i>	2.7~3.6
HSA	<i>P. pastoris</i>	1	<i>AOX</i>	2.3
Prochymosin	<i>S. cerevisiae</i>	>50	<i>GAL</i>	0.62
	<i>P. pastoris</i>	1	<i>AOX</i>	1.9
	<i>P. pastoris</i>	13	<i>AOX</i>	22.4
	<i>S. cerevisiae</i>	>50	<i>ADH2/GAPDH</i>	253
	<i>P. pastoris</i>	6	<i>AOX</i>	150
	<i>S. cerevisiae</i>	>50	<i>CUP1</i>	0.60
	<i>P. pastoris</i>	1	<i>AOX1</i>	15
<i>S. cerevisiae</i>	1	<i>GAPDH</i>	17.85	

α -galactosidase(12) 등 20여종의 산업적으로 유용한 재조합 단백질 생산이 성공적으로 보고되어 재조합 단백질 생산시 숙주 세포로서 *S. cerevisiae*의 단점을 보완할 수 있는 가장 최적의 대체효모균주로 간주되고 있다. 표 2에 *S. cerevisiae* 이외의 효모들로부터 생산된 재조합 단백질을 표시하였다. 동일한 재조합 단백질 생산시 *S. cerevisiae* 보다 다른 효모균주를 숙주세포로 사용할때 오히려 생산수율이 높게 나타나는 경우가 자주 있다(표 3). 예를 들면 간염표면항원 단백질의 경우 *S. cerevisiae*, *H. polymorpha* 및 *P. pastoris*를 각각 숙주세포로 사용하여 유전자를 발현시켰을 때 *S. cerevisiae* 균주가 양쪽 methanol 자화 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 20~40배정도 증가하는 것으로 보고된 바 있다(14-15). 이와 같이 *S. cerevisiae*와 비전통 효모간에 재조합 단백질의 수율이 차이가 나는 이유는 *S. cerevisiae*의 경우 재조합 단백질 유전자 발현에 이용되는 대부분의 프로모터가 포도당 가수분해 시스템에 관여하는 유전자로부터 유래되어 산소를 사용하는 호기성 발효를 통해 재조합 단백질을 생산할때 생성되는 ethanol에 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 ethanol에 의한 저해가 나타나지 않게 되어 재조합 단백질이 발현수율이 높게 나타난다.

재조합 단백질의 효율적 생산을 위한 주요인자

프로모터

재조합 단백질 유전자의 효율적인 발현을 위해서는 우수한 발현 벡터의 개발이 필요하다. 이러한 고효율 발현 벡터에는 효모내에서 활성을 나타낼수 있는 효모자체의 강력한 프로모터

를 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 *ADH1* (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 포도당 대신 galactose를 사용할때 유전자 발현율을 200배이상 증가시킬수 있는 *GAL1* 프로모터등이 이에 속한다(3). 한편 *H. polymorpha*나 *P. pastoris* 등 methanol 자화 효모의 경우에는 *AOX1* (alcohol oxidase) 또는 *MOX1* (methanol oxidase) 등의 조절적 프로모터 등이 사용되고 있으며 이밖에 *GAM*, *LAC4*, *XPR2* 프로모터 등이 *S. occidentalis*, *K. lactis*, *Y. lipolitica*에서 조절적 프로모터로 각각 사용되고 있다(13).

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 발현 벡터는 2 μ 유래의 벡터로서 염색체상의 ARS(autonomous replication sequence) 유래의 플라스미드 보다 높은 안정성을 나타내고 있으나 발효조를 이용하여 재조합 단백질을 대량 생산 할 경우 플라스미드가 안정성을 잃어 효모로부터 쉽게 상

실되므로 재조합 단백질의 생산성을 낮추는 요인이 되고 있다. 그러나 새로운 효모를 사용하면 재조합 단백질 유전자가 발현벡터와 더불어 숙주세포의 염색체상으로 수십 copy 이상 삽입(integration)되어 안정하게 유지될 수 있으므로 이러한 문제점을 해결할 수 있다. 실제로 *K. lactis*를 이용하여 재조합 *prochymosin*을 생산할 때 41 ton 규모의 발효조에서도 재조합 단백질 유전자의 안정성을 잃지 않았고(17), methanol 자화 효도로부터 간염표면 항원을 생산할 경우에도 최소 150세대 이상 유전자가 안정하게 유지되는 것(6,7)으로 알려졌다.

단백질 분비

재조합 단백질 생산시 숙주세포내에서 생산된 단백질을 체외로 효율적으로 분비시키는 것이 중요하다. 이를 통해 세포내에 축적된 단백질의 독성을 말소시키고 배지내로 분비된 단백질의 정제를 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 분비량이 작은 것으로서 통상 30 kDa 이상의 단백질은 체외분비가 어려우나 *H. polymorpha*나 *S. occidentalis* 등 새로운 효모를 숙주로 사용하면 150 kDa 이상의 재조합 단백질도 분비가 가능한 것으로 알려져 있다(8, 13, 18). 재조합 단백질이 체외로 효율적으로 분비되기 위해서는 KEX2와 같은 er.dopeptidase에 의해 체내에서 생성된 단백질의 N-말단부위가 정확히 절단되어야 한다.

번역후 수식 (post-translational modification)

개부분의 재조합 단백질이 생물학적 활성을 나타내기 위해서는 glycosyl화, N-acetyl화, fatty acyl화, 인산화 등 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 당 단백질의 경우 chain당 평균 40개 이상의 mannose로 과 glycosyl화 되어 분비효율이 떨어지는 것이 문제점이다. 그러나 *P. pastoris*, *S. occidentalis*, *Y. lipolytica*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.

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 albumin 처럼 비비비성 단백질의 경우 disulfide 결합이 부정확하게 임의로 형성됨에 따라 정확한 단백질의 folding이 일어나지 않아 활성을 일부 상실하는 수도 있다(3).

*Saccharomyces cerevisiae*의 분자육종

*S. cerevisiae*는 효모중에서 재조합 단백질 생산의 숙주로서 가장 많이 사용되어 왔으나 전술한 바와 같이 여러가지 개선되어야 할 단점이 지적되어 왔다. 본항에서는 재조합 단백질 생산에 있어서 여러 측면에서의 개선을 위한 효모 분자육종에 관련된 주요사항에 대하여 요약하였다.

다양한 숙주균주(host strain)의 선별

재조합 단백질 생산의 최적화 연구에서 종종 간과되는 경우가 많으나 유전학적 배경이 다른 다양한 숙주세포를 사용하여 최적 숙주균주를 선별하는 것이 매우 중요하다. 유전자 발현율은 특정한 유전학적 표지와 관련이 없는 것으로 보이며 다양한 유전학적 배경을 갖는 균주를 조사하였을 때 10배 이상의 발현율 차이를 보이는 경우도 있다. 이러한 시행착오적 방법은 번거로우나 충분한 가치가 있는 것으로 확인되고 있다(22).

GAL4 단백질의 과발현(overexpression)

재조합 단백질 생산의 많은 경우에 galactose에 의하여 발현 조절이 가능한 *GAL10* 혹은 *GAL1* 프로모터를 사용하며 이는 특히 발현된 단백질이 숙주세포의 성장을 저해하는 경우 매우 유용하다. 그러나 이들 프로모터의 유도적 발현에 관련되는 전사인자(transcription factor)인 GAL4 단백질은 세포내에 미량 존재하므로 목표유전자의 과발현의 경우 문제가 된다. 이를 해결하기 위하여 GAL4 단백질의 구성적(constitutive) 과발현 방법을 취하면 발현조절이 불가능하므로 조절적 발현을 유지하면서 염색체상의 GAL4 유전자나 GAL4 구조유전자에 *GAL10* 프로모터를 연결한 *GAL10p-GAL4* 융합 프로모터를 함유하는 발현 cassette를 *HIS3* 부위에 삽입시켜 사용함으로써 glucose 함유 배지에서는 억제(repression)되지만 glucose 고갈과 galactose 존재하에서는 급속한 발현유도가 가능한 균주가 개발되었다(23). 이 경우 GAL4 단백질양의 증가율은 약 60배에 달하며 이를 실제 재조합 단백질 생산에 적용하였을 때 EBV(Epstein Barr Virus) gp350 mRNA과 그 단백질의 경우

5~10배의 생산 증가를 얻을 수 있었다(24).

과glycosyl화 방지를 위한 MNN9 변이주의 사용

*S. cerevisiae*에서 분비되는 이종 단백질 중 glycoprotein은 N-연결과 O-연결 부위 공히 glycosyl화가 일어난다. N-glycosyl화의 경우 초기단계에서는 효모와 고등 진핵세포간에 커다란 차이가 없다. Endoplasmic reticulum(ER)에서 2개의 N-acetyl-glucosamine, 9개의 mannose 그리고 3개의 glucose로 구성된 핵심 oligosaccharide가 asparagine에 연결되며 3개의 glucose와 1개의 mannose는 추후에 제거된다.

이후의 processing은 golgi체에서 진행되며 이 단계부터 효모와 고등 진핵세포간의 차이가 나타난다. 포유동물 세포에서는 추가로 mannose가 제거되어 N-acetyl-glucosamine, galactose, fructose 및 sialic acid 등의 당이 부가된다. 반면에 효모에서는 mannose의 제거 대신 당이 더욱 부가되는 연장(elongation) 과정을 거치며 50개 이상의 mannose로 구성된 외당쇄(outer chain)를 이루게 된다. 그러나 이러한 과glycosyl화는 모든 N-연결 oligosaccharide에서 발생하는 것은 아니다. 대표적인 과glycosyl화의 예를 살펴보면 EBV gp350 막항원(membrane antigen)의 경우 야생주(wild type)에서 발현되면 경우 약 400 kDa의 크기를 나타내고 단일클론항체(monoclonal antibody)에 의한 인식도 저해된다. 이를 해결하기 위하여 *mnn9* 변이주를 도입한 경우 mannose 외당쇄를 부가하지 않는 것으로 알려져 있으며(25) 이 변이주에서 발현된 경우 약 220 kDa 크기의 단백질이 얻어졌다.

다른 예로는 hepatitis B virus(HBV) PreS2+S 항원의 발현의 경우로서 야생주를 사용하면 glycosyl화 되지 않은 p30과 glycosyl화된 gp34 이외에 50~300 kDa 크기의 다양한 과glycosyl화된 형태들이 생성되는 반면 *mnn9* 변이주를 사용하면 p30과 N-연결 부위에 핵심 oligosaccharide만 부가된 gp34 등 2종류만 생성되며 이의 당구성은 $\text{Man}_7\text{-GlcNAc}_2$, $\text{Man}_8\text{-GlcNAc}_2$, $\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2$ 가 각각 28 : 62 : 10의 비로 나타났다(26).

Proteinase 결핍 변이주의 사용

재조합 단백질의 생산에서 흔히 문제가 되는 것으로 단백질 분해 효소에 의한 분해를 들 수 있는데 세포파쇄액(cell lysate) 제조시에 protease 저해제를 첨가하여도 분해되는 경우가 많으며 이는 vacuolar protease의 작용에 기인하는 것으로 알려져 있다. *S. cerevisiae*에는 적어도 6종류의 vacuolar protease가 존재하며 주된 효소로서 proteinase A, proteinase B, carboxypeptidase Y 및 carboxypeptidase S의 4종류가 알려져 있고 이들은 각각 *PEP4*, *PRB1*, *PRC1*, *CPS1* 유전자에 의해 코딩된다(27). 이들 단백질 분해 효소는 배지내 탄소원 혹은 질소원이 고갈되거나 세포가 정지기(stationary phase)에 도달했을 생물산업

때 생성량이 증가된다.

재조합 인체 plasminogen activator inhibitor type 1(rPAI-1)의 경우 야생주에서는 분자량이 작은 다양한 종류의 분해된 형태들이 생성되나 *pep4*, *prb1* 변이주의 경우에는 분해되지 않은 단일한 형태가 생성된다. 65개의 아미노산으로 이루어진 재조합 hirudin의 경우에도 야생주에서는 C-말단 1~2개의 아미노산이 결손된 형태가 10~20%의 비율로 생성되는 반면 *prc1* 혹은 *pep4* 변이주를 사용하여 영양배지(rich medium)에서 배양하면 거의 분해되지 않았고 최소배지(minimal medium)의 경우에는 *prc1* 변이주는 효과가 있었으나 *pep4* 변이주에서는 여전히 분해된 형태로 생성되었다. 따라서 목표단백질에 따라서 어떤 protease 결핍변이주를 사용하여야 하는가를 결정하는 것이 중요하다.

Protein disulfide isomerase의 과발현

최근 disulfide 결합을 갖는 재조합 단백질의 분비를 증진시킬 수 있는 방법으로서 protein disulfide isomerase(PDI)를 과발현시키는 방안이 개발되고 있다. PDI는 thiol기와 disulfide 기 간의 상호변환(interchange) 반응을 촉매하는 효소로서 단백질 분비에 관여하는 세포의 endoplasmic reticulum의 lumen 내에 존재하는 주요 단백질이다. PDI는 단백질 folding과 분비에 중요한 역할을 하는 것으로 추정되는 여러가지 특성을 갖고 있다(28,29). 다양한 종류의 세포내 PDI 함량과 분비 단백질의 양과는 밀접한 연관관계가 있는 것으로 보이며 시험관내에서 PDI 활성이 결여된 microsome 막(membrane)은 co-translational disulfide 결합을 형성 할 수 없었으나 정제된 PDI를 첨가하면 이의 형성이 가능하였다.

지금까지 다양한 종류의 척추동물 PDI들이 분리정제되어 생화학적으로 연구되어 왔으나 효모 PDI의 경우 *S. cerevisiae*의 microsome 막이 PDI 활성을 가지고 있는 것이 밝혀진 이래 PDI 단백질이 순수 분리되었고 척추동물 PDI 활성부위의 conserved sequence인 FYAPWCGIICK에 대한 상동성(homology)을 이용하여 그 유전자도 클로닝 되었다(30). 효모 PDI 유전자를 분석한 결과 포유동물과 조류의 PDI와 상동성이 매우 높았으며 다른 생화학적 특성도 매우 유사하였다. 효모 PDI는 성장에 필수적인 것으로 보이며 Northern blot 분석에 의하면 glucose나 acetate 배지에서 성장할 때 1.8 kb의 PDI 전사체(transcript)가 세포성장의 대수기에서는 발견되나 정지기 전이되는 시점 이후의 세포에서는 발견되지 않았다.

PDI의 과발현이 disulfide 결합을 갖는 분비 단백질의 분비 효율을 증진시킬 수 있는지 알아보기 위하여 효모 혹은 인체 PDI 유전자를 효모의 *GAL10* 프로모터에 연결하고 이를 염색체에 삽입시켜 원래 효모가 갖고 있는 *PDI* 유전자 외에 추가로 *PDI* 유전자를 갖는 균주 JRY188를 제조하였다. Reporter 유전자로서 119개의 아미노산 중 20개가 cysteine으로 구성된

어 있는 antistansin을 사용하였으며 이 단백질은 disulfide 결합이 제대로 형성되어야 생물학적 활성이 나타난다. JRY188 균주에서 antistansin 유전자를 발현시켜 PDI의 과발현 효과를 조사한 결과 수배의 분비효율 증가를 확인한 바 있다(29).

비전통 효모의 분자육종

유전자 재조합기술

*S. cerevisiae*를 대상으로 개발되어 온 기술과 유사한 기술을 사용하면 거의 모든 종류의 비전통 효모를 형질전환 시킬 수 있다는 것이 현재 일반적인 인식이다. 그러나 이를 위해서는 다음과 같은 3가지 조건을 만족하여야 한다. 즉, 선택표지(selection marker)로 사용할 적절한 영양요구주와 이 선택표지를 complementation 할 수 있는 표지유전자 그리고 물리적으로 이 DNA를 세포내로 도입할 수 있는 방법 등이 그것이다. 일단 세포내로 도입된 DNA는 숙주 염색체로 recombination에 의해 삽입되거나 혹은 자기복제(autonomous replication) 되는데 후자의 경우 copy 수와 복제의 안정성이 또한 고려되어야 할 사항이다.

선택표지로서는 *S. cerevisiae* 유래의 *LEU2*와 *URA3*에 의하여 각각 코딩되는 β -isopropylmalate dehydrogenase와 orotidine 5'-phosphate decarboxylase가 주로 사용된다. 붉은 색을 띄는 *S. cerevisiae*의 *ade1*, *ade2*에 해당하는 adenine 요구주도 많이 사용된다. *Ura3⁻* 변이주는 5-fluoroorotic acid(FOA)에 대한 내성을 이용하여 비교적 용이하게 선별할 수 있으며 *URA3* 유전자의 존재에 대한 양성선별(positive selection)이나 *ura3⁻* 유도체(derivative)에 대한 음성선별(negative selection) 방법으로 매우 유용하게 선별할 수 있다. 이러한 변이주를 complementation 할 수 있는 유전자의 분리는 상응하는 *S. cerevisiae*나 *E. coli* 변이주의 complementation에 의한 방법, 혹은 *S. cerevisiae* 유래의 유전자를 probe로 사용하여 colony hybridization에 의하여 분리하는 방법을 사용할 수 있다. 그러나 종종 *S. cerevisiae* 유래의 이종유전자(heterologous gene)를 선택표지로 사용하여도 형질전환이 가능한 경우가 많으며 특수한 경우 이러한 "slow complementation"을 고copy 수의 clone 선별에 사용하는 경우도 있다. *URA3*나 *LEU2*와 같은 선택표지 사용에 필요한 변이주의 선별에 있어서 균주가 이수체(diploid) 혹은 다수체(polyploid)인 경우는 선별이 어려운 경우가 많으므로 우성선별표지(dominant selection marker)를 사용하게 된다. 세균의 Tn5 transposon 유래의 *NPTII* 유전자는 진핵세포에서 항생제 G418에 대한 내성을 유발한다. 이러한 방법은 변이주의 선별이 선행되지 않아도 되며 균주 특성에 관계없이 사용할 수 있다는 것이 장점이다.

*S. cerevisiae*에서 개발된 유전자 targeting이나 disruption 방법은 간혹 non-homologous recombination이 일어나는 경우도

있으나 일반적으로 사용이 가능하다. 이 방법은 다수의 선택 표지를 갖는 숙주의 제조에 사용할 수 있다. 우선 FAO에 대한 내성으로 *ura3⁻* 변이주를 선별하고 이를 *URA3* 염기배열(sequence)로 disruption된 선형(linear form)의 목표유전자를 사용하여 형질전환하며 이 때 *URA3*의 주위 염기배열이 제 3의 직접반복배열(direct repeat sequence)이 되도록 하면 *ura⁺* 형질전환주는 목표유전자 결핍주가 되며 이어서 FAO를 이용하여 *ura⁻* 변이주를 선별하면 *URA3* 유전자가 제거(deletion)되어 목표유전자의 disruption과 동시에 *ura3⁻* 표지를 갖는 균주를 얻을 수 있다(31).

*S. cerevisiae*의 ARS와 유사한 염기배열은 용이하게 분리할 수 있으며 이를 사용하면 형질전환 효율을 증가시킬 수 있으나 플라스미드의 복제는 불안정하다. *S. cerevisiae*의 ARS가 다른 종류의 효모에서 작용하는 경우도 있으나 매우 드문 편이며 *S. cerevisiae*의 2 m circle은 형질전환효율을 저하시키는 경우가 많다. 물리적인 DNA의 세포내 도입은 protoplast 사용법, Li^+ ion 사용법, electroporation 방법의 3가지가 사용된다(32). 최근 형질전환 방법의 개선에 관한 연구가 많이 보고되고 있다. *H. polymorpha*의 경우 개선된 Li^+ ion 사용법과 electroporation 방법이 보고 되었고 선형 DNA fragment를 사용한 *MOX* 부위로의 유전자 disruption 및 targeting 방법도 소개되었다. Kasuske 등(33)은 alkane 자화 효모 *Candida maltosa* 균주의 형질전환법을 개발하였고 Ohkuma 등(34)은 이 균주로부터 *URA3* 유전자를 클로닝하여 세가지 표지를 갖는 변이주의 제조에 사용하였다. 또한 *LEU2* 유전자의 경우 *H. polymorpha*, *K. marxianus*, *K. lactis*로부터 분리된 바 있다.

재조합 단백질 생산

전술한 바와 같이 몇몇 비전통 효모(alternative yeasts)들이 *S. cerevisiae*에 비하여 재조합 단백질 생산 측면에서 여러가지 장점을 보이고 있는데 예를 들면 강력하고 조절 가능한 프로모터를 사용할 수 있고 값싼 탄소원의 이용이 가능하며, 또한 산업적 규모의 발효에서 고농도 배양이 용이한 점과 안전성 등을 들 수 있다. Methanol 자화 효모인 *P. pastoris*와 *H. polymorpha*는 상기한 모든 장점을 갖추고 있으며 두 균주 모두 methanol을 formaldehyde와 hydrogen peroxide로 산화시키는 효소유전자의 프로모터를 사용한다. *H. polymorpha*의 경우는 methanol oxidase(MOX)로, *P. pastoris*의 경우는 alcohol oxidase(AOX)로 지칭되는 이들 효소는 균주가 methanol 배지에서 성장하였을 때 총 세포단백질의 35~40%까지 생산되나 glucose 배지에서는 거의 생성되지 않는다. 양자 모두 프로모터가 methanol에 의한 유도와 glucose에 의한 억제에 이중 조절 기작을 보이나 *H. polymorpha*의 경우 methanol이 없어도 glycerol과 같은 탄소원 배지, 혹은 glucose의 농도가 매우 낮은 배지에서 성장하게 되면 *MOX* 프로모터의 탈억제(de-

repression)를 기대할 수 있다. 이 때의 발현 정도는 단백질의 종류와 성장조건에 따라 다르나 glucose가 제한된 chemostat의 경우 최대 유도량의 약 20%에 이른다. 반면에 *P. pastoris*의 AOX 프로모터는 methanol의 존재가 필수적이다.

Alcohol oxidase의 프로모터는 알려진 다른 어떤 생물의 프로모터 보다 강력한 것으로서 재조합 단백질 생산 측면에서 뿐만 아니라 그 자체에 관한 학문적 연구도 활발하다. Goedecke 등(35)은 최근 *H. polymorpha* MOX 유전자 프로모터의 구조와 기능에 관한 조사를 보고하였다. 이 프로모터는 크기가 1.5 Kb로서 효모 프로모터로서는 매우 큰 편에 속하고 2개의 UAS와 1개의 URS가 복잡한 상호작용을 보인다. Gel retardation과 foot printing 분석으로 전사인자의 존재가 밝혀졌으며 앞으로 이에 대한 연구가 기대된다. 또한 MOX 프로모터 이외에 formate dehydrogenase, catalase, dihydroxyacetone synthase 유전자 프로모터등 methanol에 의해 유도될 수 있는 프로모터들도 *H. polymorpha*에서의 재조합 단백질 생산에 성공적으로 사용되고 있다.

Methanol 자화 효모의 장점은 프로모터 뿐만 아니라 가격이 저렴하고 대량발효에 적합한 배지("microbiologically clean")를 사용할 수 있고 발효조 운용이 용이하다는 점이다. 또한 Crabtree 효과가 나타나지 않아 glucose 배지에서 ethanol 생성에 의한 저해가 문제되지 않는다. *H. polymorpha*의 경우 고농도(약 150 g dry cell weight/liter) 배양이 용이한 장점 이외에 생육 적온이 42°C이고 45°C에서도 사멸하지 않으므로 특히 대용량 발효기에서의 냉각 문제를 감소시킬 수 있다.

지금까지 *H. polymorpha* 및 *P. pastoris* 두 균주에 대한 분자유전학 연구가 상당히 진척되어 있어 형질전환, 유전자 targeting, 벡터 등에 관한 시스템이 개발되어 있으며 벡터는 숙주염색체에 삽입(integration)되거나 자가복제된다. 그러나 재조합 단백질 생산의 경우 특히 대용량 발효에는 발현 cassette의 삽입이 유전자의 안정적인 발현에 유리하므로 선호된다. 또한 발현 cassette의 복수삽입(multi-copy integration)이 가능하며 10 copy까지는 비례적으로 단백질의 생산성이 증가하는 것으로 알려지고 있다. *H. polymorpha*에 있어서는 복수삽입을 위하여 특이한 숙주를 사용하고 *P. pastoris*의 경우는 발현 cassette에 *NPTII* 유전자를 삽입하여 G418에 대한 내성이 높은 형질전환주를 선별하는 방법을 사용한다.

Methanol 효모에서의 재조합 단백질 분비에도 *S. cerevisiae* 유래의 MF- α , 혹은 invertase의 leader 배열을 성공적으로 사용할 수 있으며 propro 혹은 pro- 단백질의 processing도 매우 효율적으로 일어나고 KEX2와 유사한 활성에 의하여 정확하게 lys-arg 부위에서 processing이 일어난다. 단백질 분비과정 중 glycosylation이 진행되고 N-연결 glycosylation의 경우 정확하게 분비경로에 targeting이 되는 것으로 알려지고 있다. 그러나 *S. cerevisiae*의 경우와 같이 심하지는 않으나 과glycosylation이 되 생물산업

는 경우가 있고 고등동물의 glycosylation과는 다른 양상으로 나타나는 경우가 많다.

*K. lactis*는 β -galactosidase 생산을 위하여 식품공업에서 많이 사용되는 균주로서 산업적 규모에서의 생산 경험이 많이 축적되어 있고 안전하며 유청 등의 부산물을 배지로 사용할 수 있다. 분자유전학적으로도 많이 연구되어 특히 killer 독소에 대한 분자생물학적 연구가 많이 이루어져 왔다(36). 또한 β -galactosidase 구조유전자 *LACR4*의 조절기작에 대하여도 많이 연구되어 *S. cerevisiae*의 *GAL* 유전자 조절기작과 매우 유사함이 밝혀졌으며 *S. cerevisiae*의 *GAL4* 전사인자에 상응하는 *LAC9*에 의한 조절기작이 밝혀졌다.

*K. lactis*에서의 재조합 단백질 생산은 *K. drosophilorum*에서 발견된 환형(circular) DNA 플라스미드, pKD1에 기초한 벡터를 사용한다. 이 플라스미드는 *S. cerevisiae* 2 μ 플라스미드와 구조적 유사성을 보이나 염기배열 상동성(homology)은 결여되어 있다. 이 플라스미드에 기초한 벡터들은 안정적인 high copy replication을 보이며 *Kluyveromyces* 유래의 *LAC4* 프로모터나 *S. cerevisiae* 유래의 *PGK* 프로모터를 사용한다. 또한 rDNA cistron에 targeting 함으로써 발현 벡터를 복수삽입시킬 수 있는 방법도 알려져 있다.

Y. lipolytica(32)는 산업적 응용성이 높은 효모로서 유기, 탄화수소 등을 배지로 이용할 수 있어 단세포단백질 생산, citric acid 등 유기산 생산에 이용되어 왔다. 또한 ribonuclease, lipase, protease 등 다양한 종류의 효소를 세포외로 분비하는 특성을 가지고 있다. 몇몇 종류의 균주는 또한 dsRNA genome을 가지고 있어 killer 형질을 띠는 경우도 있다. 재조합 단백질 생산은 AEP 유전자의 산물인 분비형 alkaline protease에 기초한 시스템을 사용한다. 이 유전자의 프로모터는 pH와 배지내 단백질 농도에 의하여 조절된다.

결론

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 문제점들 때문에 이를 개선하기 위한 많은 노력이 경주되어야 할 것이다. 즉 *S. cerevisiae*에 사용할 보다 강력한 프로모터의 개발이나 보다 안정된 벡터의 개발, 또는 초분비변이주(super-secreting mutant)의 개발 등이 이루어져야 하며 methanol 자화 효모 등 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 항바이러스 제제를 개발하는데도 이용될 수 있기 때문이다. 이와같은 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).
- Miyzjima, 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).
- Schuster, J. R. (1991) *Curr. Opinion Biotechnol.* **2**, 685.
- Mylin, L. M. *et al. (1990) Meth. Enzymol.* **185**, 297.
- Schultz, L. D. *et al. (1987) Gene* **61**, 123.
- Ballou, C. E. (1990) *Meth. Enzymol.* **185**, 440.
- Ip, C. C. Y. *et al. (1992) Biochem.* **31**, 285.
- Jones, E. W. (1991) *Meth. Enzymol.* **194**, 428.
- Freedman, R. B. *et al. (1989) Cell* **57**, 1069.
- Gething, M. J. & Sambrook, (1992) *J. Nature* **355**, 33.
- Farquhar, R. (1991) *Gene* **108**, 81.
- Alani, E. *et al. (1987) Genetics* **116**, 514.
- Sudbery, P. E. (1994) *The Yeasts Vol. 6, Yeast Genetics.* Academic Press, London.
- Kasuke, A. *et al. (1992) Yeast* **8**, 691.
- Ohkuma, M. *et al. (1993) Curr. Genet* **23**, 205.
- Goedecke, S. *et al. (1994) Gene* **139**, 35.
- Stark, M.J.R. *et al. (1990) Yeast* **6**, 19.