

그림 1. 효모 *S. cerevisiae*의 당단백질의 일반적 당쇄구조 및 *mnn* 변이주의 결손부위. 야생형효모의 α -1,6 결합의 mannose 당외쇄의 길이(\times)는 약 10개 정도이지만 *mnn7*, *mnn8*, *mnn10* 변이주에서는 α -1,6 결합의 mannose 당외쇄 길이(\times)가 작아진다. GNAC: N-acetylglucosamine, M: mannose *: 인산화가능부위

생합성과정이다. Core당쇄를 형성한 다음 일어나는 골지체에서의 당쇄수식은 효모와 동물세포에서 각각 다르게 일어난다. 당단백질에 N-결합형 당쇄가 결합되는 과정은 단백질에 당잔기가 순차적으로 결합되는 것이 아니라 다음과 같은 과정을 거쳐게 된다. 당쇄는 ER의 막에 존재하는 지질인 dolichol-phosphate(Dol-P)에 당nucleotide로부터 단당이 순차적으로 결합해서 14개의 당잔기(GlcNAc₂Man₅Glc₃)로 구성된 Dol-PP-올리고 당복합체가 ER의 lumen 쪽으로 이동해 온 단백질의 asparagine 잔기에 전이된다. 그후 3분자의 glucose와 1분자의 mannose가 제거되는 과정도 ER의 lumen에서 일어난다(그림 2). Core당쇄가 형성된 당단백질은 ER로부터 파생된 운송소포에 싸여 골지체로 이동된 후, 30-100분자의 mannose가 순차적으로 첨가되어 당외쇄가 형성된다. 효모의 당외쇄는 주로 mannose로 구성되어 있지만 galactose나 N-acetylglucosamine을 포함하는 효모들도 있다.

효모의 ER에서 일어나는 core당쇄 생합성경로는 당쇄 생합성과정의 각 단계가 결손된 여러 변이주를 분리하고, 이들 변이주를 생화학적으로 해석하여 밝혀진 결과이다(그림

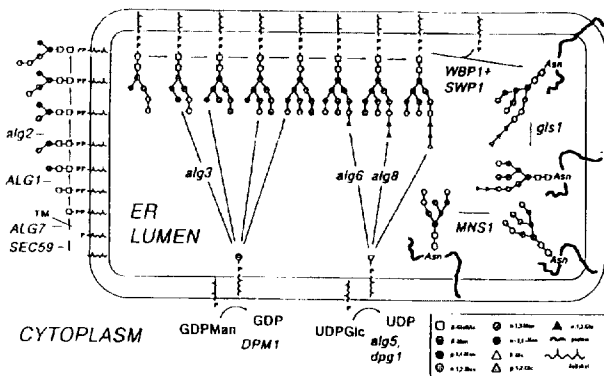


그림 2. ER에서 일어나는 N-결합형당쇄의 전구체 형성과 단백질로의 당쇄전이. 대분자표기는 당쇄형성과정에 관련된 유전자가 밝혀진 경우이고, 소문자 표기는 당쇄생합성결손변이주가 단리된 경우이다.

표 1. ER에서의 당쇄생합성 관련 효모변이주

변이주	비허용온도에서의 축적산물
<i>alg7</i>	UDP-GlcNAc (Dol-P-GlcNAc-1-P 전이효소유전자의 변이)
<i>alg1</i>	Dol-PP-GlcNAc ₂
<i>alg2</i>	Dol-PP-GlcNAc ₂ Man _{1,2}
<i>alg3</i>	Dol-PP-GlcNAc ₂ Man ₅
<i>alg4 (sec53)</i>	Dol-PP-GlcNAc ₂ Man _{1,8}
<i>alg5</i>	Dol-PP-GlcNAc ₂ Man ₆
<i>alg6</i>	Dol-PP-GlcNAc ₂ Man ₆
<i>alg8</i>	Dol-PP-GlcNAc ₂ Man ₆ Glc1
<i>alg1</i>	(GlcNAc ₂ Man ₈ Glc ₃ 함유 당단백질)

alg: asparagine-linked glycosylation, Dol-P: dolichol-phosphate, Man: mannose, GlcNAc: N-acetylglucosamine, Glc: glucose

2). 표 1에서 지금까지 분리된 ER에서의 당쇄합성과 관련된 당쇄변이주와 그들이 축적하는 당쇄를 요약하였다(4, 5). Man₅GlcNAc₂보다 짧은 불완전한 당쇄를 축적하는 *alg1*과 *alg2* 변이주는 생육시 온도감수성을 나타내지만, Man₅GlcNAc₂보다 긴 당쇄를 축적하는 다른 *alg* 변이주들은 온도감수성을 나타내지 않는 것으로 밝혀졌다(6). 또한 Man₅GlcNAc₂보다 긴 당쇄에는 당외쇄가 첨가되지만 그 당쇄보다 짧은 당쇄에는 당외쇄가 첨가되지 않는 것이 알려져, 생육의 온도감수성과 당외쇄 첨가와 밀접한 관계가 있을 것으로 추측되었다. 뿐만 아니라 온도감수성을 나타내는 *alg4* 변이주는 단백질의 ER막 투과에 결손을 가지고 있는 분비변이주 *sec53*과 동일한 유전자에 발생한 변이로, 이때 발생하는 당쇄의 변화는 2차적으로 일어나는 현상임을 알게 되었다(2). Man₅GlcNAc₂-PP-Dol을 합성하는 과정은 ER막의 세포질 쪽에서 일어나지만 그후 ER막의 반전이 일어나서, 반전후의 반응은 막의 lumen쪽에서 일어나는 것으로 추측되고 있다(7). 그러나 당쇄는 세포질쪽 ER에 존재하는 UDP-GlcNAc, GDP-Man, UDP-Glu 등의 당nucleotide 형태의 전구체로부터 당이 공급되어, dolichol-phosphate(Dol-P)에 전이되는 과정을 거쳐 형성된다.

골지체에서 일어나는 당단백질의 수식은 동물세포와 효모에서 크게 차이가 있다. 동물세포에서는 core당쇄가 결합된 당단백질로부터 5분자의 mannose가 더 제거되어 Man₃GlcNAc₂의 당쇄구조를 형성한 후 sialic acid, galactose, N-acetylglucosamine 등이 첨가된다. 효모에서는 ER에서 만들어진 core당쇄(Man₈GlcNAc₂)에 7-100분자의 mannose가 순차적으로 첨가되어 당외쇄를 형성한다(2).

효모 당외쇄의 화학구조와 그 첨가기구는 분비경로의 여러 단계에서 단백질의 분비운송이 차단된 *sec* 변이주와 당외쇄의 생합성능력을 상실한 여러 종의 *mnn* 변이주를 이용하여 변이주가 생성하는 당쇄의 구조해석으로부터 당외쇄의 생합성경로가 추측되었다(8). ER에서 만들어진 core당쇄에 최초의 mannose를 α -1,6 결합으로 부가하는 연장개시 반응은 그 이후에 α -1,6 결합으로 mannose를 부가하는 반응과는 서로 다른 효소의 작용으로 진행된다고 생각되고 있다. 또한 당외쇄의 골격을 형성하고 있는 α -1,6 결합의 mannose에는 α -1,2 결합의 형태로 mannose가지가 존재하고, 이

가지의 先端에는 α -1,3 결합으로 mannose가 첨가되어 있다. 이러한 구조해석의 결과로부터 당외쇄의 α -1,3-mannose 결합은 가지를 형성한 α -1,2 결합의 연장을 정지시키는 시그널로 작용하고 있다고 추측된다(9). 또한 당외쇄 내부에 α -1,2 결합 mannose가지를 도입하는 mannose 전이효소(mannosyltransferase)와 다른 수용체 특이성을 나타내는 mannose α -1,2-전이효소의 존재가 보고되어, 이 효소의 당쇄연장반응 정지 또는 제어의 관여 가능성도 추측되고 있다(10).

Ballou를 중심으로한 그의 공동연구자들은 당외쇄를 가지고 있는 *S. cerevisiae*를 변이 처리한 후, 당외쇄에 대한 항체반응을 못하게 된 변이주를 cell sorter를 이용하여 농축하는 방법을 사용하여 당쇄 첨가부위의 여러 곳에 결손을 가진 세포들을 선별하였다(그림 1). 이들 *mnn* 변이주들은 효모의 당전이효소(glycosyltransferase)와 당쇄형성기작을 밝히는 연구에 커다란 기여를 하였다. *mnn* 변이주들 중 *mnn2* 변이주는 당외쇄의 α -1,6 골격으로부터 α -1,2 결합이 생기는 분기점의 단계에 생긴 변이이고, *mnn1* 변이주는 α -1,2가지 先端에 α -1,3의 mannose를 생성하는 단계에 결손을 가지고 있다. 그러나 이들 변이주들은 당외쇄의 골격인 α -1,6 결합 mannose형성에는 결손을 가지고 있지 않아 긴 당외쇄를 형성한다. 반면 *mnn9* 변이주는 α -1,6 결합에 결손이 있어, core당쇄에 2분자의 mannose가 첨가된 상태의 당쇄를 생성한다. *mnn9* 변이가 생기게 되면 1분자의 mannose는 core당쇄에 첨가되지만, 두 번째 결합하는 mannose에는 당쇄연장을 정지하는 기능을 가진 α -1,2 결합의 mannose가 한 분자 첨가되는 당쇄구조를 가지게 된다(11). *mnn9* 변이주에서 일어나는 현상은 당외쇄의 연장개시와 그후의 부가연장을 촉매하는 것으로 생각되는 효소 α -1,6-mannosyltransferase의 활성수준이 야생주와 차이가 없는 것으로 보아, 이 변이주는 당전이효소를 code하는 유전자에 발생한 변이가 아닌 다른 유전자의 변이에 의한 2차적 영향으로 당외쇄의 첨가에도 결손이 발생한 것으로 추측하고 있다(12). 당외쇄의 부가와 관련된 변이주는 *mnn9* 외에도 mannose의 α -1,6 결합을 4-15분자 정도까지밖에 생합성하지 않는 *mnn7/8*, *mnn10* 변이주들이 분리되었지만, 이들 변이주들이 생성하는 당외쇄의 길이가 짧아진 원인에 대해서는 아직 밝혀지지 않은 상태이다(9, 13).

Jigami 그룹은 당외쇄 형성에 결손을 가지고 있는 온도감수성 변이주를 보완하는 *OCHI* 유전자를 분리하였다(14). 이 유전자 산물은 core당쇄($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$)를 수용체기질로 하고 GDP-mannose를 공여체 기질로 하여 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 의 구조를 가지는 당쇄를 형성하는 것이 밝혀졌다. 또한 *OCHI* 단백질은 골지체 막에 존재한다는 것이 밝혀져 α -1,6 결합 당쇄의 연장을 개시하는 α -1,6-mannosyltransferase로 추측되고 있다(15, 16).

최근 *mnn10* 변이주를 보완하는 *mnn10* 유전자가 분리되어 염기배열을 밝혀본 결과, *Schizosaccharomyces pombe*의 α -1,2-galactosyltransferase와 높은 상동성을 가지고 있는 것이 보고되었다(17, 18). 이 결과 *mnn10* 유전자가 *OCHI* 유전자산물이 core당쇄에 mannose 한 분자를 첨가하여 생성된 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 의 당쇄에 mannose를 계속적으로 첨가하여 mannose의 α -1,6결합을 연장시키는 α -1,6-mannosyltransfer-

ase의 구조유전자일 가능성을 뒷받침하고 있다. 이들 변이주 외에도 당외쇄의 인산화와 관련된 *mnn4*, *mnn6* 변이주가 선별되었다.

효모에서의 O-결합형 당쇄의 생합성

당단백질의 경우, 한 단백질 분자 내에 N-결합형 당쇄와 O-결합형 당쇄를 복합적으로 가지고 있는 경우가 흔히 발견되지만 O-결합형 당쇄에 대해서는 자세히 알려진 것이 별로 없다. O-결합형 당쇄의 생합성과정은 비교적 간단하다. 당쇄합성의 시작은 Dol-P-mannose의 mannose 잔기를 ER에 존재하는 단백질의 serine 또는 threonine 잔기에 전이하는 것으로부터 시작된다. 다음 GDP-mannose로부터 mannose가 4분자까지 첨가되는 반응으로, 동물세포와는 구분되는 방식으로 골지체에서 일어난다. Dol-P-mannose와 GDP-mannose의 존재 하에서 O-결합형 당쇄의 생합성의 *in vitro* 실험결과, 당쇄가 첨가되는 acceptor인 펩타이드의 serine과 threonine 잔기주변의 아미노산배열은 당쇄첨가와 관계없다는 것이 알려졌다(19).

전 망

기원이 다른 異種 당단백질을 효모에서 발현시키면, 숙주인 효모 자신의 당질합성계가 당단백질생성에 이용되어 과도한 mannose 당외쇄가 첨가된 당쇄를 형성한다. 효모의 당쇄는 연구초기에는 단백질의 안정성과 효소의 활성발현의 측면에서 타기원의 당쇄와 대체성이 있는 것으로 생각되었으나, 숙주-vector계가 확립된 *S. cerevisiae*를 이용한 여러 연구에서 문제점이 보고되면서 현재는 해결해야 할 문제점이 구체화되었다. 호르몬과 같은 동물기원 생리활성물질은 생리활성이 당쇄의 구조와 깊은 관련이 있어, 효모에서 생산한 경우 생리활성이 나타나지 않는 것으로 보고되었다. 따라서 효모 숙주를 異種단백질 생산에 이용하기 위해서 다음과 같은 방향으로 연구가 진행되고 있다. 1) 고등생물이 생산하는 당쇄구조에 가까운 당쇄를 생합성 하는 효모의 검색, 2) 당쇄 생합성경로를 변환시킨 숙주의 개발, 3) 고등생물유래의 당쇄 생합성관련 유전자를 도입한 숙주개발이 그것이다. 기본적으로 대부분의 효모는 mannose를 다량 함유한 당쇄를 생합성 하는 것으로 알려져 있어 1)의 방법만으로는 성공을 거둘 가능성은 크지 않다. 2)의 효모가 생성하는 당쇄구조를 변환시키는 방법의 실현을 위해서, 가장 많이 알려진 효모 *S. cerevisiae*의 당쇄합성 결손변이주의 분리 및 당쇄구조의 해석이 활발하게 진행되고 있다. 그러나 당쇄합성 결손변이주는 분비단백질의 당쇄의 구조만을 변환시키는 것이 아니라 당단백질을 포함하고 있는 세포벽구조 등 세포자신의 생장에 영향을 미치게 된다. 3)의 방법의 경우, 쥐의 N-acetylglucosamine 전이효소의 막관통영역(trans-membrane-domain)을 효모의 mannose전이효소의 막관통영역으로 치환한 유전자 재조합 단백질이 효모에서 발현된 예가 보고되었지만 수십 종에 달하는 고등생물의 당쇄생합성관련 유전자를 효모에서 발현시키는 것은 매우 정교하게 조절되는 많은 유전자산물에 의하여 만들어지는 초대작

이라고 표현해도 과언이 아니다. 따라서 앞에서 열거한 것과 같이 효모의 생육에 영향을 미치지 않는 한도 내에서 목적하는 당단백질의 당쇄만을 변화시키는 방법은 현실적으로는 불가능한 것처럼 보인다. 그러나 장래, 효모와 고등진핵생물이 공통적으로 생성하는 core당쇄가 첨가된 당단백질을 효모를 이용해서 생산한 후, 고등생물의 당전이효소와 당질분해효소 등의 여러 종류의 효소를 이용해서 당단백질의 당쇄를 개조해 가는 방법의 병용이 문제해결의 열쇠가 될 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Herscovics, A. and P. Orlean. 1993. *FASEB J.*, **7**, 540-550.
2. Kukuruzinska, M.A., M.L.E. Bergh, and B.J. Jackson. 1987. *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 915-944.
3. Moreme, K.W., R.B. Trimble, and A. Herscovics. 1994. *Glycobiology*, **4**, 113-125.
4. Jigami, Y. 1994. 蛋白質 核酸 酵素, **39**, 357-366 (in Japanese).
5. Tanner, W. and L. Lehle. 1987. *Biochim. Biophys. Acta*, **906**, 81-99.
6. Huffaker, T.C. and P.W. Robbins. 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 7466-7470.
7. Abeijon, C. and C.B. Hirschberg. 1992. *TIBS*, **17**, 32-36.
8. Ballou, L., L.M. Hemandez, E. Alvarado, and C.E. Ballou. 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 3368-3372.
9. Ballou, L., E. Alvarado, P. Tsai, A. Dell, and C.E. Ballou. 1989. *J. Biol. Chem.*, **264**, 11857-11864.
10. Lewis, M.S. and C.E. Ballou. 1991. *J. Biol. chem.*, **266**, 8255-8261.
11. Hemandez, L.M., L. Ballou, E. Albarado, B.L. Gillece-Castro, A.L. Burlingame, and C.E. Ballou. 1989. *J. Biol. Chem.*, **264**, 11849-11856.
12. Gopal, P.K., C.E. Ballou. 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8824-8828.
13. Ballou, L., R.E. Cohen, and C.E. Ballou. 1980. *J. Biol. Chem.*, **255**, 5986-5991 (1980).
14. Nagasu, T., Y.-I. Shimma, Y. Nakanishi, J. Kuromitsu, K. Iwama, K.-I. Nakayama, Suzuki, K., and Y. Jigami. 1992. *Yeast*, **8**, 535-547.
15. Nakayama, K.-I., T. Nagasu, Y.-I. Shimma, J. Kuromitsu, Y. Jigami. 1992. *EMBO J.*, **11**, 2511-2519.
16. Nakanishi, Y., K.-I. Nakayama, A. Tanaka, T. Toda, and Y. Jigami. 1993. *J. Biol. Chem.*, **35**, 26338-26345.
17. Dean, N., and J.B. Poster. Submitted data.
18. Lee, J.-H., Y. Jigami. Unpublished data.
19. Bause, E., and L. Lehle. 1979. *Eur. J. Biochem.*, **101**, 531-540.