

Glucose Oxidase의 *Saccharomyces cerevisiae*에서의 대량생산 및 고효율 분비

홍성용 · 최희경 · 이영호 · 백운화 · 정준기^{1*}

두산인재기술개발원, ¹생명공학연구소 Bio-pilotplant, KIST

Overproduction and High Level Secretion of Glucose Oxidase in *Saccharomyces cerevisiae*.

Hong, Sung-Yong, Hee-Kyung Choi, Young-Ho Lee, Un-Hua Pek, and Joon-Ki Jung*. Doosan Training and Technical Center, Kyonggi-Do 449-840, Korea. *Biopilot Plant, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-606, Korea – The overproduction and high level secretion of Glucose Oxidase (GOD) from *A. niger* in *S. cerevisiae* was carried out by cloning GOD gene. For this purpose, using two different strong promotors (ADH1 promotor, GAL10 promotor) and signal sequences (α -MF signal sequence of *S. cerevisiae* and α -amylase signal sequence of *A. oryzae*) and GAL7- and GOD terminator, four expression vectors were constructed. All the expression vectors were transformed in *S. cerevisiae* 2805 using auxotroph method. By the flask culture, transformants of pGAL expression vector series containing GAL 10 promotor showed much higher GOD productivity than transformants of pADH expression vector series containing ADH1 promotor. Transformants of pGALGO2 containing GAL10 promotor and α -amylase signal sequence has shown the best productivity of GOD (GOD_{total}: 10.3 unit/mL, GOD_{ex}: 8.7 unit/mL) at 115 hr. This value was three fold higher than that of pGALGO1 containing GAL 10 promotor and α -MF signal sequence, even if the same promotor was involved. Through the α -amylase signal sequence of *A. oryzae*, GOD was secreted much more than the case of α -MF signal sequence from *S. cerevisiae*. These results suggest that signal sequence may play a important roles in not only the secretion but also the overproduction of foreign protein. Secretion rate of GOD in pGALGO1 and pGALGO2 was 89% and 84%, respectively. Because of the overglycosylation in *S. cerevisiae* the molecular weight of recombinant GOD in *S. cerevisiae* was much larger (250 kDa) than that of nature GOD in *A. niger* (170 kDa).

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, glucose oxidae, α -amylase signal sequence, α -MF factor

1928년 독일의 Müller가 *Aspergillus niger*와 *Penicillium glaucum*의 세포 추출액으로부터 산소 존재 하에 glucose를 glucon산으로 산화시키는 효소를 발견, 증명 [13] 하였으며 이 효소를 Glucose Oxidase(GOD; β -D-Glucose-Oxygen-1-Oxidoreductase, EC 1,1,3,4)로 명명하였다. *Penicillium* 경우 GOD가 세포막밖에 존재하고 있는 반면에[7] *A. niger*경우에는 GOD의 위치가 아직 불투명하다[13]. Reiss[16]와 van Dijken[20]는 *A. niger*의 GOD를 mycelia의 Peroxisome에서 발견, 증명하였으며 Müller는 submerged culture에서 발견하였다. 그러나 현재까지 알려진 바에 의하면 *A. niger*내의 GOD는 세포막 내에 존재하는 것으로 의견이 모아지고 있다.

*A. niger*내의 GOD는 분자량이 170-180 kDa로 FAD와 결합되어 있는[17] glycoprotein[14]이며 각 2개의 subunit(각 70-80 kDa)[24]로 이루어져 있으며 각 subunit는 한 분자 FAD와 매우 견고하게 결합되어 있다

(K_D=1.3 10⁻¹⁰ M)[18]. 또한 GOD의 structure gene은 1815 deoxynucleotides로 구성되어 있으며, 이것은 605 개의 아미노산과 coordination하여 이 유전자(gene)내에는 intron이 존재하지 않는다[6, 20]. GOD는 22개의 아미노산으로 된 signal sequence가 분해된 후(proteolysis) 활성의 단백질로 존재한다[22].

효소나 protein 등 많은 생물 공학 물질의 대량생산에 있어서 유전자 조작을 통한 recombinant-DNA 방법을 이용, 즉 강한 promotor와 terminator, 그리고 structure gene의 합성을 통하여 의약품이나 효소 등 목적 산물의 생산성을 높일 수 있다. 또한 세포막 내의 protein을 signal sequence를 이용하여 세포막 외로 분비시킴으로써 정제 과정을 줄일 수 있어 회수율의 향상과 생산비의 절감을 가져올 수 있다. 일반적으로 재조합 단백질 생산은 *E. coli*나 yeast를 이용하고 있지만 *E. coli*에서의 빌효시 endotoxin 물질 생성이 수반되고 당화(glycosylation)가 전혀 일어나지 않고 분비가 되지 않는다는 것은 이미 잘 알려져 있다. 그 반면에 yeast내에서의 발현은 효과적이고 분비가 잘 이루어지는 장점을 갖고 있지만

*Corresponding author
Tel. 82-42-860-4512, Fax. 82-42-860-4516
E-mail: jkjung@kribb4680.kribb.re.kr

과당화(overglycosylation)가 일어나는 단점이 있다[4]. GOD를 yeast 내에서 발현시킬 경우에도 과당화가 일어나지만 활성부위에서는 일어나지 않음으로 이 효소의 활성에는 영향을 주지 않는다고 한다[4]. *E. coli*나 yeast에 비해 fungi에서의 발현은 보다 많은 장점을 갖고 있다. Fungi는 다른 발현 system보다 자체에 훌륭한 분비체제를 갖고 있으며 아주 정확한 당화가 일어나 fungi에서 합성된 재조합 단백질들이 아주 안정하다[7]. 또한 발현벡터가 주로 chromosomal DNA에 삽입되기 때문에 대량 배양시 발생하는 발현벡터의 안정도에 전혀 문제가 되지 않으며 또한 이성체 발현(heterogeneous expression)이 가능해 재조합 단백질의 대량 발현에 무엇보다도 유리하다. Fungi 발현system에서의 단점은 무엇보다도 다른것에 비해 발효시간이 비교적 길다는 것이다. *E. coli*에서의 발효시간은 24시간, 효모에서의 발효시간은 2-3일 요하는 반면에 fungi에서는 발효시간을 일반적으로 7-8일 정도 요한다. 본 연구에서의 목적도 효모에서의 GOD발현량이 fungi에 비해 별 차이가 없는 것으로 보고되어[4] 보다 짧은 시간내에 GOD의 생산성을 높이기 위해 효모에서의 GOD발현을 시도하였다. 현재 순수한 GOD나 또는 GOD/Catalase혼합물은 공업적으로 중요한 곳에 많이 쓰이고 있고 주로 *A. niger*와 *Penicillium-Species*에서 생산하고 있다. GOD는 특히 β -D-glucose에 높은 친화력(100%)을 갖고 있어 인체 내 혈당 측정 진단 시약(진단 Kit)에 주로 사용된다[3, 16]. 또한 GOD의 산화 반응에 산소가 부 반응물로 필요하기 때문에 산소의 산화 반응으로 인한 식품의 맛이나 색깔 변화 방지등 많은 생활 식료품이나 청량 음료수의 산화 방지에 쓰이며 요즘은 유럽이나 일본에서는 레미콘 차의 콘크리이트 운반 시 콘크리이트 응고 지연제로 많이 쓰이는 글루콘산도 *A. niger*의 GOD로부터 생산된다.

본 연구에서는 yeast내의 강한 promotor인[4] ADH 1(alcohol dehydrogenase)과 GAL 10(galactose dehydrogenase), 그리고 terminator로는 *S.cerevisiae*의 GAL7 terminator 및 *A. niger*의 GOD terminator를 사용하고 세포막 밖으로의 GOD 분비를 위하여 *S. cerevisiae*의 α -MF signal sequence와 *A. oryzae*의 α -amylase signal sequence를 이용하여 *S. cerevisiae*내에 이성체 발현을 통한 GOD의 대량생산과 *A. oryzae*의 α -amylase signal sequence의 yeast내에서 효과적인 분비 기능 및 단백질 생산에 미치는 영향에 대해서 실험을 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmid

본 연구에서는 *E. coli* DH 5 α (F-, endA1, hsdR17(rk-, mk), supE44, thi-1, Lambda-, recA1, gyrA96, relA1,

ϕ 80dlacZ M15), BMH 71-18((lacproAB), supE, thi, F': lacq, lacZ Δ M15, proA $^+$ B $^+$)를 사용하였다. Yeast-strain은 *Saccharomyces cerevisiae* 2805를 host로 사용하였다. Plasmid cloning에는 pSK+(Stratagene), pP*p 4.13(NaeI)-Sal(J. K. Jung, 생명공학연구소), pYGMF(두산기술원), pYAMF(두산기술원) plasmid를 사용하였다.

Polymerase chain reaction(PCR)

GOD structure gene을 isolation하기 위해서 primer 1(5'- CGC CGT CTA GAT AAA AGG AGC AAT GGC ATT GAA GCC AGC CTC -3': 42 mer)과 primer 2(5'- GGA ACT CGA GAG TCG ACC TCA CTG CAT GGA AGC ATA ATC-3': 39 mer)를 작성하였고 *A. oryzae*의 α -amylase signal sequence를 isolation하기 위해서 primer 3(5'-GGA AGA ATT CCC ATG GTC GCG TGG TGG TCT CTA-3': 33 mer)과 Primer 4(5'-GTA GTC GAC CGT GCG GCC GGA GAC-3': 24 mer)를 작성하였다. PCR은 Ericomp Co.의 thermal cycler(Ericomp Co.)와 Taq DNA polymerase를 이용하여 25 cycle을 실행하였다.

Plasmid 제조

*E. coli*로부터 Plasmid-DNA 대량생산 및 분리를 위하여 Promega사의 Wizard Maxipreps DNA purification system을 사용하였다. Yeast 발현벡터 pYGMF는 yeast episomal plasmid YEP에서 유래한 plasmid로 GAL10 promotor, α -MF signal sequence, GAL7 terminator와 연결되어 있고 Amp r 과 URA3 유전자가 표시 인자로써 포함되어 있다. α -MF signal sequence와 GAL7 terminator사이에는 제한효소인 *Xba* I과 *Sal* I의 절단부위가 존재하여 이 부위에 primer 1과 2에 의해서 만들어진 GOD gene을 제한효소 *Xba* I과 *Xho* I으로 절단한 뒤 절단된 DNA 절편을 같은 제한 효소로 절단된 plasmid pYGMF에 T4 DNA ligase를 이용, 결합시켰다. 이렇게 제조된 발현벡터를 pGAL-GO1이라 명명하였다 (Fig. 1). Yeast 발현벡터인 pYAMF는 pYGMF와 마찬가지로 YEP에서 유래된 plasmid로 GAL10 promotor 대신에 ADH1 promotor만 치환되어 있다. pYAMF를 이용, 제한효소 *Xba* I와 *Xho* I 절단부위에 primer 1과 2의 PCR 반응산물을 결합시켜 제조된 발현벡터를 pADH-GO1이라 명명하였다(Fig. 1). Primer 3와 4에 의해 제조된 PCR 반응산물을 제한효소 *Eco*R I과 *Sal* I으로 절단하고 동시에 plasmid pYGMF를 같은 방법으로 절단하였다. 절단된 plasmid와 PCR product를 T4-DNA ligase로 결합시켰다. 이렇게 결합된 plasmid에는 GOD gene중 5' 말단부위에서 첫번째 *Sal* I사이의 부분

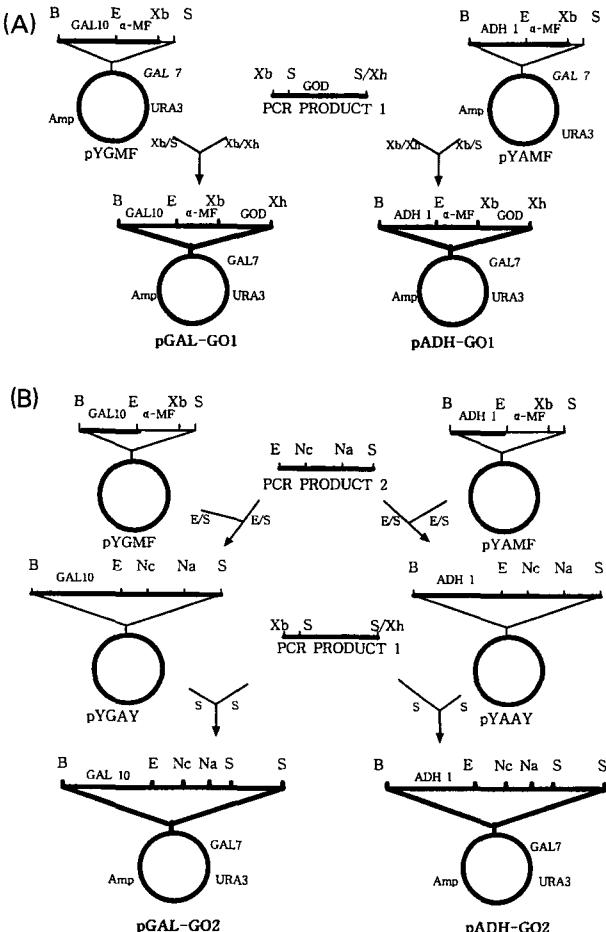


Fig. 1. Cloning strategy of pGAL-GO1, pADH-GO1 (A) and pGAL-GO2, pADH-GO2 (B).

(A) Cloning strategy of pGAL-GO1 and pADH-GO1. PCR product 1 was produced by primer 1 and 2 for cloning GOD structure gene. (B) Cloning strategy of pGAL-GO2 and pADH-GO2, PCR product 2 was produced by primer 3 and 4 for cloning of α-Amylase signal sequence with 5' region of GOD structural gene. Abbreviations used are: B=Bam HI, E=Eco RI, Na=Nae I, Nc=Nco I, S=Sal I, Xb=Xba I, Xh=Xho I.

만 포함되어 있다. 나머지 GOD를 결합시키기 위해서 primer 1과 2의 PCR 반응산물을 제한효소 *Sal* I으로 절단하고 절단된 *Sal* I DNA 절편을 *Sal* I 위치에 삽입하여 결합시켰다(GOD terminator가 포함되어 있다). 이렇게 제조된 발현벡터를 pGAL-GO2이라 명명하였는데 이것은 GAL10 promoter, *A. oryzae*의 α-amylase signal sequence와 GOD structure gene이 연결된 것이다(Fig. 1). Plasmid pYAMF를 이용하여 같은 방법으로 *EcoR* I과 *Sal* I의 제한효소 위치에서 pYAMF, primer 1과 2의 PCR 반응산물과 primer 3과 4의 PCR 반응산물을 결합시켰다. 이렇게 제조된 발현벡터를 pADH-GO2라 명명하였는데 이것은 ADH I promoter, *A. oryzae*의 α-amylase signal sequence와 GOD structure gene이 연결된 것이다(Fig. 1).

Saccharomyces cerevisiae로의 형질변환

Yeast로의 형질변환은 Ito[8]의 방법을 이용하였고 선택배지인 YNBD(Yeast nitrogen base without amino acid 0.67%, casamino acid 0.5%, glucose 2%)를 이용하여 *S.cerevisiae*의 형질변환체를 선별하였다.

Saccharomyces cerevisiae의 배양

발현 GOD의 정량분석을 위하여 pGAL-GO1, pGAL-GO2의 형질변환체는 100 ml YPDG 배지에(1% yeast extract, 2% peptone, 1% glucose, 1% galactose), pADH-GO1과 pADH-GO2는 YPD배지에 접종한 후 30°C, 200 rpm하에서 16시간 전배양한 후 baffle이 있는 1 liter Erlenmeyer flask내의 250 ml 동일 배지에 8% 접종하여 동일 조건으로 7일간 배양하였다.

Glucose Oxidase의 활성측정

GOD의 정성 분석 GOD의 정성 분석을 위하여 GOD의 산화반응시 1 mole glucose당 동량(1 mole)의 H₂O₂가 생성되기 때문에 H₂O₂의 농도 변화를 이용하여 측정하였다. 멸균된 배지(NaNO₃ 0.3%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, KCl 0.05%, FeSO₄ 0.001%, glycerin 2.0 %, agar 1.5%, glucose 0.5%, pGAL 계열의 형질변환체 효모의 경우 위 배지에 galactose 0.5% 첨가)에 chromogen인 1 mM o-dianisidine을 첨가하여 48°C로 냉각시킨 후 Horse Radish Peroxidase(HRP) 6000 U/l를 첨가하여 agar plate 제조후 균을 접종, 2-3일간 배양하여 petridish plate상의 환의 크기로 효소 활성도를 정성 분석 하였다.

GOD의 정량분석

정량분석에서는 chromogen으로 o-dianisidine대신 수용성이 좋은 ABTS(2,2'-Azino-di-[3-ethylbenz thiophene-6-sulfonic acid])를 사용하였으며 흡광도 측정은 420 nm에서 행하였다[E₄₂₀=43.2 mM⁻¹cm⁻¹]. 측정에는 Beckman DU-70의 kinetic program을 이용하였다. Yeast에서의 세포내 GOD 활성도를 측정하기 위해 세포를 배양한 후 원심 분리하여 100 μl 0.11 M sodium phosphate 완충용액으로 세척하고 동일한 완충용액으로 혼탁시킨다. 여기에 동량의 glass bead를 넣어 20초간 3회 혼탁하며 얼음에 냉각시켰다. 그 후 20% glycerol이 함유된 완충용액 100 μl로 혼탁한 후 원심분리하여 상등액을 추출한 후 세포내 GOD 활성도를 측정하였다.

Native Gradient Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Separating gel을 5-20%로 하고 stacking gel을 5%로 하여 native gradient gel을 제조하였다. Molecular weight marker와 *A. niger* GOD(Sigma), *S. cerevisiae*

GALGO2에서 추출한 GOD를 각각 5 µg씩 2중으로 loading한 후 20 Volts로 36시간 전기영동을 하였다. 종료 후 gel을 반으로 잘라 한 쪽은 coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 나머지 반쪽은 o-dianisidine과 horse radish peroxidase가 포함된 GOD activity plate로 덮은 후 37°C에서 2시간 반응시켰다.

결과 및 고찰

*Saccharomyces cerevisiae*에서의 발현을 위한 유전자 조작

*A. niger*의 GOD gene에서 signal sequence가 포함되지 않는 GOD structural gene(GOD terminator포함)을 얻기 위해서 primer 1과 2를 합성하였고 yeast 발현 벡터에 cloning하기 위해서 primer 1에는 *Xba* I 절단부위가, primer 2에는 *Xho* I과 *Sal* I 절단부위가 포함되어 있도록 하였다. Primer 3과 4는 plasmid pP*p4.13(*Nae*I)-*sal*를 이용하여 *A. oryzae*의 α-amylase signal sequence와 고유의 signal sequence가 제거된 GOD의 5' 말단 절편이 연결되어 있도록 합성하였다. Primer 3은 *A. oryzae*의 α-amylase signal sequence에서 나온 것으로 절단효소 부위로 *Eco*R I과 *Nco* I을 포함하고 translation initiation site를 포함하고 있는 33개의 nucleotides로 형성되어 있다. Primer 4는 GOD gene내에 존재하는 2개의

Sal I 절단부위중 5'-말단에 근접한 *Sal* I 절단부위를 포함하고 있는 24개의 nucleotides로 이루어졌다. 각각의 PCR 반응산물은 절단효소 mapping을 통해 확인하였다.

이들 PCR 반응산물은 yeast 발현 벡터인 pYGMF와 pYAMF에 ligation하여 다음의 발현 벡터들을 제조하였다. 각 발현 벡터의 구성은 Table 1과 같고 각각의 cloning map 을 Fig. 1에 표시하였다.

형질변환과 선별

합성된 4개의 발현 벡터를 auxotroph 방법을 이용[1, 5], *S. cerevisiae*에 형질변환한 후 선별 agar plate(YNBD)에서 형질변환체들을 선별하였다. 선별된 형질변환체들은 2-3회 계대를 행하여 안정을 시킨 후 o-dianisidine을 첨가한 agar plate에서 GOD 정성분석을 하였다. Agar diffusion test를 한 결과 같은 대부분의 형질변환체들이 비교적 비슷한 GOD 활성도를 나타내었다. 이 경우 host인 *S. cerevisiae*에 발현 벡터가 어느정도 유사한 copy number로 존재하기 때문으로 추측된다. 이 중 각 발현 벡터에 대해서 가장 높은 GOD 활성도를 나타내는 우량 형질변환체를 선정하여 정량분석을 위한 진탕배양을 진행하였다.

우량 형질 변환체의 GOD 정량분석

GAL 10 promotor는 glucose에 의해 발현이 억제되기

Table 1. Compositions of each expression vectors

Expression vector	Promotor	Signal Sequence	Structure Gene	Terminator
pGAL-GO1	GAL 10	α-MF from <i>S. cerevisiae</i>	GOD	GOD & GAL 7
pGAL-GO2	GAL 10	α-amylase from <i>A. oryzae</i>	GOD	GOD & GAL 7
pADH-GO1	ADH 1	α-MF from <i>S. cerevisiae</i>	GOD	GOD & GAL 7
pADH-GO2	ADH 1	α-amylase from <i>A. oryzae</i>	GOD	GOD & GAL 7

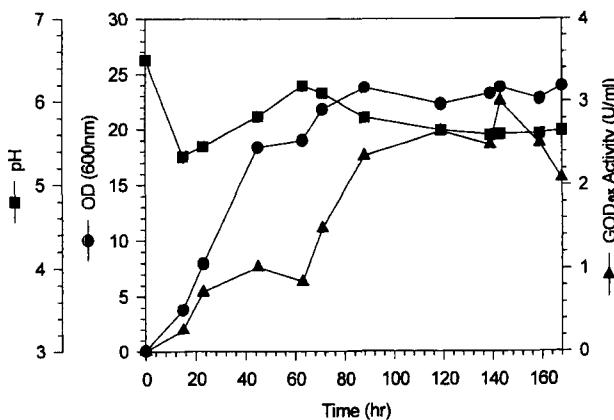


Fig. 2. Growth curve of *S. cerevisiae* 2805 carrying pGAL-GO1.

Cultivation was carried out in 1L flask containing 250 ml medium at 200 rpm and 30°C. GOD activity was assayed by the method as described in Material and Methods.

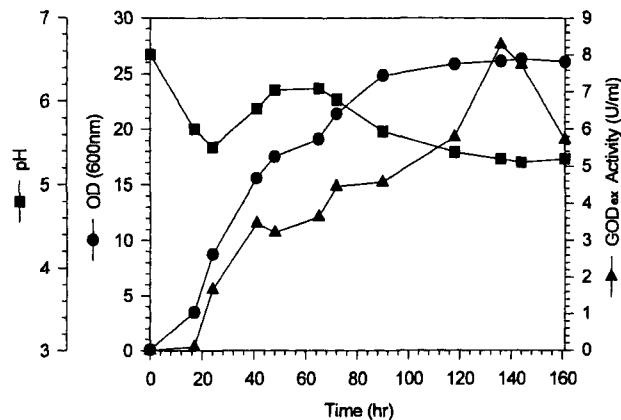


Fig. 3. Growth curve of *S. cerevisiae* 2805 carrying pGAL-GO2.

Cultivation was carried out in 1L flask containing 250 ml medium at 200 rpm and 30°C. GOD activity was assayed by the method as described in Material and Methods.

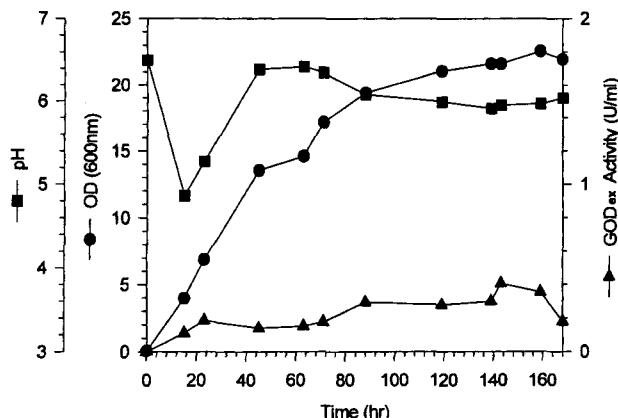


Fig. 4. Growth curve of *S. cerevisiae* 2805 carrying pADH-GO1.

Cultivation was carried out in 1L flask containing 250 ml medium at 200 rpm and 30°C. GOD activity was assayed by the method as described in Material and Methods.

때문에 pGAL계열의 형질 변환체를 배양시키기 위해서 1% glucose와 inducer로써 1% galactose를 사용하였다. pGAL-GO1(Fig. 2), pGAL-GO2(Fig. 3), pADH-GO1 (Fig. 4), pADH-GO2(Fig. 5)의 형질 변환체들의 세포 성장 경향을 살펴보면 균체는 pGAL계열의 경우 OD값이 140시간째에 25까지 성장하였고 pADH계열은 pGAL 계열보다 낮은 성장률을 보였다. OD가 증가함에 따라 GOD 활성도도 증가하지만 증가률은 α-MF보다 α-amylase signal sequence가 도입된 경우가 우수하였다. GOD 활성도는 α-MF 경우 140시간 이후로 감소 추세를 보여주었으나 α-amylase의 경우 배양 기간 끝까지 유지되었다. pH의 값은 모든 경우에 GOD에 알맞은 5-6사이로 비교적 잘 유지되었다. 각각의 세포의 GOD 활성도가 가장 높을 때를 비교하여 보면(Table 2), 유전자 재조합 균체인 *A. niger*GOD3-18[7]에서 1.8 unit/ml를 나타낸 반면 *S. cerevisiae*에서 발현 시 pGAL-GO2의 형질 변환 체들은 약 5배 많은 8.7 unit/ml를 나타내었다. 이 유전자 재조합 균체 *A. niger*GOD3-18의 발현 벡터 구성(pGOD3)은 *A. nidulans*의 glycerol-3'-phosphate-dehydrogenase(gpd) promotore, *A. oryzae*의 α-amylase signal sequence, *A. niger*의 GOD structure gene과 ter-

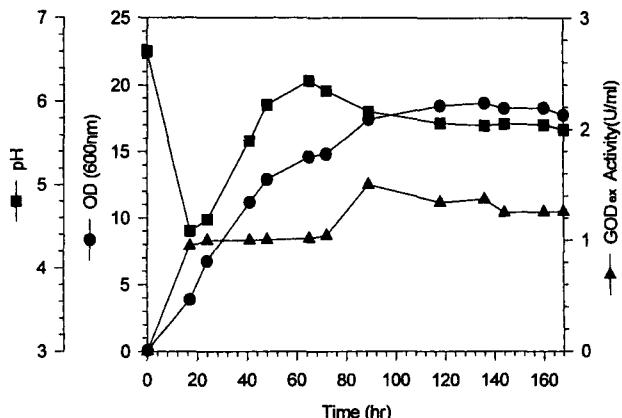


Fig. 5. Growth curve of *S. cerevisiae* 2805 carrying pADH-GO2.

Cultivation was carried out in 1L flask containing 250 ml medium at 200 rpm and 30°C. GOD activity was assayed by the method as described in Material and Methods.

minator로 이루어 져있다[7]. 위 결과에서 보는 바와 같이 GAL 10 promotore가 보다 효과적으로 발현을 유도하였으며 *A. oryzae*의 α-amylase signal sequence도 발현된 GOD를 효과적으로 분비시켰음을 알 수 있다. *S. cerevisiae* 배양 시 일반적으로 에탄올형성으로 인하여 pH변화가 많이 없는 것이 정상이며 본 재조합 균주의 배양 시에도 GOD 활성도에 영향을 주지 않는 pH 5-6사이에 머무는 것을 볼 수 있다.

재조합 GOD의 분자량 분석

*S. cerevisiae*에서는 과당화가 일어나기 때문에 일반적으로 효모에서 발현된 재조합 단백질의 분자량은 크게 나타나며 Frederick의 SDS-PAGE의 실험 결과[4]에서도 효모에서 발현된 재조합 GOD의 분자량이 *A. niger*의 GOD보다 크며 과당화가 이루어졌음을 보여주었다. 이 실험에서 만들어진 *S. cerevisiae*GALGO2에서 합성된 재조합 GOD의 분자량과 *A. niger*에서의 GOD의 분자량을 gradient native gel상에서 비교한 결과 재조합 GOD의 분자량이 약 1.5배정도 큰 것으로 나타났다(Fig. 6).

재조합 *S. cerevisiae*에서의 GOD 분비효율

Table 2. GOD productivity of transformants containing each vector

Transformant	Plasmid	O.D.	GOD _{ex} [u/ml]	Culture Time[hr]	pH
<i>A. niger</i> GOD3-18	pGOD 3	N.D.	1.8	140	6.5
<i>S. cerevisiae</i> GALGO1	pGAL-GO1	23.8	3.0	143	5.6
<i>S. cerevisiae</i> GALGO2	pGAL-GO2	26.1	8.7	136	5.3
<i>S. cerevisiae</i> ADHGO1	pADH-GO1	21.6	0.4	143	6.0
<i>S. cerevisiae</i> ADHGO2	pADH-GO2	17.4	1.5	89	5.9

* N.D.: Not Determined.

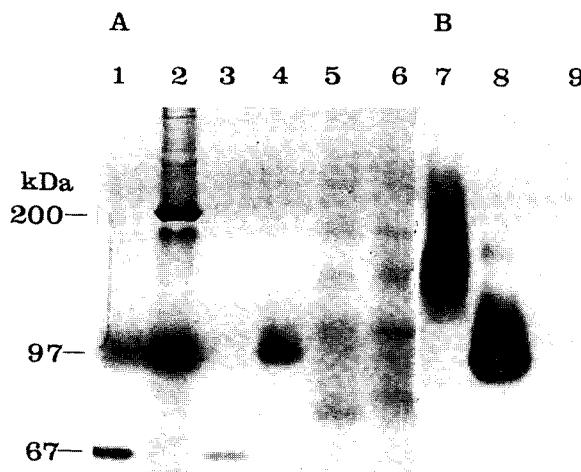


Fig. 6. Gradient native gel electrophoresis analysis of GOD from recombinant yeast and *A. niger*.

Approximately 5 µg of crude enzymes were run in duplicated on the same gel. An agar gel containing o-dianisidine, horse radish peroxidase was overlaid on the half of the protein gel as described in Material and Methods. The other half of the gel was stained with coomassie brilliant blue R.

(A) Coomassie Brilliant Blue R Staining

Lane 1, Low Molecular Weight Marker; 2, Broad Molecular Weight Marker; 3, Bovine Serum Albumin; 4, *A. niger*; 5, *S. cerevisiae* 2805; 6, *S. cerevisiae*GALGO2. The standard proteins used and their M.W were phosphorylase b (97.4 K), bovine serum albumin (67K) in L.M.W and myosin (200K), phosphorylase b (97.4K) in B.M.W.

(B) Activity Staining

Lane 7, *S. cerevisiae*GALGO2; 8, *A. niger*; 9, *S. cerevisiae* 2805.

합성된 단백질의 세포막 외로의 분비를 위하여 *A. oryzae*의 α-amylase signal sequence와 *S. cerevisiae*의 α-MF를 사용하였다. 각 형질 변환체들을 전탕 배양한 후 GOD의 분비효율을 측정하였다.

Table 3에서 보는 바와 같이 GAL 10 promotor를 사용할 때 ADH 1 promotor보다 GOD 생산성이 우수하며 특히 GAL 10 promotor와 *A. oryzae*의 α-amylase signal sequence 사용 시 가장 많은 10.3 unit/ml의 GOD가 생산이 되었다. 한편 GAL 10 promotor와 *S. cerevisiae*의 α-MF의 경우에는 3.4 unit/ml의 GOD가 생산되었다. 이들 둘의 분비효율을 비교해 보면 α-MF에서는 3.0 unit/ml가 분비되었고 *A. oryzae*의 α-amylase signal

sequence는 8.6 unit/ml가 분비되므로 분비효율은 각각 89%, 84%를 보여 α-MF의 경우에 분비 효율이 약간 높았다. 그리고 같은 GAL 10 promotor를 사용할 경우에도 signal sequence의 종류에 따라 전체 단백질의 생성에 많은 차이가 남을 알 수 있었다. 이런 점에서 promoter와 signal sequence의 조합 및 그 영향에 대한 연구로, Laing Elizna[11]는 *Erwinia chrysanthemi* peptidase lyase를 report gene으로 이용하여 조합된 여러 promoter와 signal sequence의 효율을 분석하였다. 이 결과 transcription과 translation level 비교시 같은 promoter 하에서도 이종의 signal sequence가 연결된 경우에 mRNA level에 많은 차이가 있으며 이는 조합된 조절부위의 구조 및 생성된 mRNA의 안정도의 영향으로 추정하였다. Xin-Liang Li[12]은 *S. cerevisiae*에서 *Aureobasidium pullulans* xylanase(20 kD) gene을 발현시킨 실험에서 signal sequence는 분비에 관여할 뿐만 아니라 총체적인 발현에도 영향을 주며 이는 발현 능력이 향상되거나 또는 생성 산물의 안정도 및 mRNA의 안정도의 영향 등으로 추측하였다. 비록 Northern blot 분석을 하지는 않았지만 상기 결과로 미루어 보면 mRNA의 안정도 영향뿐 아니라 post-translation, 즉 단백질 합성이 cytoplasm에서 합성이 시작되었더라도 signal sequence가 얼마나 빠르고 효과적으로 합성된 단백질을 endoplasmic reticulum(ER)으로 이송시키거나 단백질 생산량의 차이가 있는 것으로 나타나는 것 같다. 따라서 빠른 시간에 ER로 이송되지 않았거나 단백질 합성이 제대로 이루어지지 않은 불완전한 단백질들이 cytoplasm에 머물러 secretory pathway를 방해하고 단백질 합성을 방해함으로 생산에 많은 지장을 주고 있는 것 같다.

이상에서 보듯이 *S. cerevisiae*의 ADH 1과 GAL 10 promotor, 그리고 α-MF signal sequence와 *A. oryzae*의 α-amylase signal sequence를 이용하여 4개의 발현 벡터를 합성한 후 *S. cerevisiae*에 형질변환 시킨 후 발현을 해 본 결과 pGAL-GO2(GAL 10 promotor와 *A. oryzae*의 α-amylase signal sequence) 사용 시 가장 많은 10.3 unit/ml의 GOD가 생산이 되었는데 이 양은 *A. niger*에서의 발현 시보다 약 6배의 생산량 향상을 보였다. 일반적으로 constitutive promotor가 inducible promotor 보

Table 3. GOD secretion rate of transformants containing each vector

Transformant	Plasmid	Promotor	Signal Sequence	GOD _{ex} [unit/ml]	GOD _{in} [unit/ml]	GOD _{total} [unit/ml]	Secretion [%]
<i>S. cerevisiae</i> GALGO1	pGAL-GO1	GAL 10	<i>S. cerevisiae</i> 의 α-MF	3.0	0.4	3.4	89
<i>S. cerevisiae</i> GALGO2	pGAL-GO2	GAL 10	<i>A. oryzae</i> 의 α-amylase	8.7	1.6	10.3	84
<i>S. cerevisiae</i> GDHGO1	pADH1-GO1	ADH 1	<i>S. cerevisiae</i> 의 α-MF	0.2	0.05	0.25	78
<i>S. cerevisiae</i> GDHGO2	pADH1-GO2	ADH 1	<i>A. oryzae</i> 의 α-amylase	1.2	0.1	1.3	95

*GOD secretion (%) = GOD_{ex}/GOD_{total} × 100.

다 안정되고 또한 보다 효율적으로 발현을 유도하는 것으로 나타나 있지만 여기서는 GAL 10 promotor가 ADH 1보다 전체적으로 10배이상의 GOD를 만들어 냈으며 *A. oryzae*의 α -amylase signal sequence가 *S. cerevisiae*의 α -MF보다 3배정도 많은 8.7 unit/ml를 분비시켰고 이것은 전체적으로 합성된 GOD의 85-90%에 달한다. 똑같은 promotor를 사용하였을 경우 전체 합성된 GOD의 양에 차이가 있는 것으로 미루어 보아 signal sequence가 단백질 합성에 많은 영향을 주는 것으로 추측된다. 또한 *A. niger*에서 아주 효과적인 *A. oryzae*의 α -amylase signal sequence가 yeast내에서 GAL 10 promotor와 조합하여 보다 많은 GOD의 생산에 중요한 역할을 할을 알 수 있었다. 이 *A. oryzae*의 α -amylase signal sequence는 22개의 amino acid로 구성되어 있으며 hydrophobic한 성질을 갖고 있다. 이 signal sequence는 n-, h-, c- 등 3개의 부위로 되어있고 Heijne가 제안한 “(-3,-1)-rule”을 충족시키며 이 부위에는 alanine residue가 들어있다[8, 21].

*S. cerevisiae*에서의 진탕배양시 GOD생산에 적합한 pH값인 5-6을 유지하므로 교반 속도, 공기 주입등 발효 조건의 최적화 시 상당한 생산성의 효과를 가져 올 수 있으리라 사료된다.

요 약

*A. niger*의 GOD(Glucose Oxidase) 대량생산과 효율적인 분비를 protein의 대량생산에 많이 사용되는 strain인 *S. cerevisiae*에서 시도하였다. *S. cerevisiae*의 ADH 1과 GAL 10 promotor, 그리고 α -MF signal sequence와 *A. oryzae*의 α -amylase signal sequence 및 *S. cerevisiae*의 GAL7과 *A. niger*의 GOD terminator를 이용하여 4개의 expression vector를 합성한 후 *S. cerevisiae* 2805에 auxotroph 방법으로 형질변환시켰다. 변이체들을 배양하여 세포내와 세포외의 GOD 활성도를 분석한 결과 GAL 10 promotor가 삽입된 pGAL변이체들이 ADH1 promotor가 삽입된 pADH 변이체들 보다 GOD 생산성이 높았다. GAL 10 promotor와 *A. oryzae*의 α -amylase signal sequence가 삽입된 pGALGO2에서 115시간 배양시 GOD의 생산이 가장 높았다(GOD_{total}: 10.3 unit/mL, GOD_{ex}: 8.7 unit/mL). 이 수치는 같은 promotor인 GAL 10 promotor와 α -MF signal sequence가 삽입된 pGALGO1보다 3배정도 높다. 이 결과는 ADH 1 promotor를 사용하였을 경우에도 일치하였다. 또한 *A. oryzae*의 α -amylase signal sequence가 *S. cerevisiae*의 α -MF signal sequence보다 GOD를 더 효과적으로 분비시켰다. 상기 결과로 미루어 보면 signal sequence가 단백질의 분비 외에도 단백질 합성에도 많은

영향을 주는 것으로 추측된다. pGALGO1과 pGALGO 2의 GOD 분비효율은 각각 89%, 84%이었다. *S. cerevisiae*에서는 일반적으로 과당화가 일어나기 때문에 *S. cerevisiae*에서 합성된 재조합 GOD의 분자량은 250 kDa 으로 *A. niger*의 GOD(170 kDa)보다 더 컸다.

참고문헌

- Christensen, T., H. Woeldike, E. Boel, S. B. Mortensen, K. Hjortshoej, L. Thim, and M. T. Hansen. 1988. High level expression of recombinant genes in *Aspergillus oryzae*. *Bio/Technology* **6**: 1419–1422.
- De Baetselier, A., A. Vasavada, P. Dohet, V. Ha-Thi, M. De Beukelaer, T. Erpicum, L. De Clerck, J. Hanotier, and S. Rosenberg. 1991. Fermentation of a yeast producing *A. niger* glucose oxidase: scale-up, purification and characterization of the recombinant enzyme. *Bio/Technology* **9**: 559–561.
- Duke, F. R., M. Weibel, D. S. Page, V. G. Bulgrin, and J. Luthy. 1969. The glucose oxidase mechanism. enzyme activation by substrate. *J. Am. Chem. Soc.* **91**: 3904–3090.
- Frederick, K. R., J. Tung, R. S. Emerick, F. R. Masiarz, S. H. Chamberlain, A. Vasavada, S. Rosenberg, S. Chakraborty, L. M. Schopfer, and V. Massey. 1990. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of yeast-derived enzyme. *J. Biol. Chem.* **265**: 3793–3802.
- Gwynne, D. I., F. P. Buxton, S. A. Williams, S. Garven, and R. W. Davies. 1987. Genetically engineered secretion of active human interferon and a bacterial endoglucanase from *Aspergillus nidulans*. *Bio/Technology* **5**: 713–719.
- Heijne, von G. 1984. How signal sequence maintain cleavage specificity. *J. Mol. Biol.* **173**, 243–251.
- Hellmuth, K., S. Pluschkell, J. K. Jung, E. Ruttkowski, U. Rinas. 1995. Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger* using genetic- and process-engineering techniques. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 978–984.
- Ito, H., Y. Fukuoka, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163–168.
- Kriechbaum, M., H. J. Heilmann, F. J. Wientjes, M. Hahn, K. D. Jany, H. G. Gassen, F. Sharif, and G. Alaeddinoglu. 1989. Cloning and DNA sequence analysis of the glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* NRRL3. *FEBS-Letters* **225**: 63–66.
- Kusai, K., I. Sekuzu, B. Hagihara, K. Okunuki, S. Yamachuchi, and M. Nakai. 1960. Crystallization of glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. *Biochim. Biophys. Acta* **40**: 555–557.

11. Laing, E. and I. S. Pretorius. 1992. Synthesis and secretion of an *Erwinia chrysanthemi* pectate lyase in *Saccharomyces cerevisiae* regulated by different combination of bacterial and yeast promotor and signal sequences. *Gene* **121**: 35–45.
12. Li X. L. and L. G. Ljungdahl. 1996. Expression of *Aureobasidium pullulans* *xynA* in, and secretion of the xylanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 209–213.
13. Mueller, D. 1928. Study for the new enzyme: glucose oxidase. *Biochem. Z.* **199**: 36–170.
14. Nakamura, S. and F. Sumiko. 1968. Comparative studies on the glucose oxidase of *Aspergillus niger* and *Penicillium amagasakiense*. *J. Biochem.* **63**: 51–58.
15. Pazur, J. H., K. Kleppe, and A. Cepure. 1965. A glycoprotein structure for glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Arch. Biochem. Biophys.* **111**: 351–357.
16. Reiss, J. 1966. Cytochemical identification of glucose oxidase E.C. 1.1.3.4 by *Aspergillus niger*. *Histochemistry* **7**: 202–210.
17. Sols, A. and G. de la Fuente. 1957. On the substrate specificity of glucose oxidase. *Biochem. Biophys. Acta* **24**, 206–207.
18. Swoboda, B. E. P. 1968. The Relation between molecular conformation and the binding of flavine-adenin dinucleotide in glucose oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **175**: 365–379.
19. Tsuge, H., O. Natsuaki, and K. Ohashi. 1975. Purification, properties and molecular features of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J. Biochem.* **78**: 835–843.
20. Van Dijken, J. P. and M. Veenhuis. 1980. Cytochemical localization of glucose oxidase in peroxisomes of *Aspergillus niger*. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 275–283.
21. Wirsel, S., A. Lachmund, G. Wildhart, and E. Ruttkowski. 1989. Three α -amylase genes of *Aspergillus oryzae* exhibit identical intron-exon organization. *Molecular Microbiology* **3**: 3–4.
22. Wirsel, S., M. Kriechbaum, J. O. Koopmann, H. J. Heilmann, and H. G. Gassen. 1990. Glucose oxidase of *Aspergillus niger*: characterization of the structural gene and comparison of the expression in wild type and transformed *Aspergillus* strains. Dechema Biotechnology Conferences 4-VCH Verlagsgesellschaft.
23. Witteveen, C. F., M. Veenhuis, and J. Visser. 1992. Localization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1190–1194.
24. Yoshimura, T. and T. Isemura. 1970. Subunit structure of glucose oxidase from *Penicillium magasakiense*. *J. Biochem.* **69**: 839–846.

(Received July 14, 1997)