

재조합 *Saccharomyces cerevisiae*에서 Permeabilizing Agent를 이용한 HLY의 분비촉진

최선옥 · 하정옥 · 황용일[†]
경남대학교 식품공학과

Enhancement of Human Lysozyme Secretion with Permeabilizing Agents from the Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*

Sun-Uk Choi, Jung-Uk Ha and Yong-Il Hwang[†]

Dept. of Food Engineering, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

Abstract

We have intended to accelerate the secretion of human lysozyme(HLY) with permeabilizing agents from the cultivated cells of the recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. The five agents—CaCl₂, Tween 80, ethanol, Triton X-100, and cetyltrimethylammonium bromide(CTAB) were used as permeabilizing agents. Treatments of the yeast cell with CaCl₂, Tween 80, and ethanol were effective to increase the secretion from the yeast cells. Especially, treatment of 10% ethanol increased the extracellular HLY activity by 38.6% at 30°C for 48 h in culture broth. But Triton X-100 and CTAB unexpectedly didn't play a role in increase of HLY secretion. Recovery of a foreign protein by permeabilizing agents is easier than by osmotic shock, and is less expensive than enzymatic digestion.

Key words: permeabilizing agent, human lysozyme, secretion

서 론

Lysozyme[EC 3.2.1.17]은 세균의 세포벽 성분인 peptidoglycan의 β -1,4 glycosidic linkage를 가수분해하는 효소이다. 난백 유래의 lysozyme(CLY)이 항염증 작용, 혈액응고 작용, 화장품 첨가제, 식품산업 응용 등으로 광범위하게 이용되고 있으나 알레르기 유발의 가능성과 용균활성이 HLY과 비교할 때 3~4배 낮다는 것이 큰 단점이다. 이에 비하여 HLY는 인간과 면역거동의 일치, 근육 및 정맥주사 가능, 다형핵 백혈구에 의한 세포의 식작용 촉진 등의 뛰어난 효과로 안전하고 부작용없는 의약품으로서 CLY를 대체할 수 있지만 생산량이 미미하여 실용화되지 못하고 있다(1,2). 이러한 문제점을 해소하기 위해 이미 본 연구실에서는 HLY의 대량생산을 목적으로, 안정성이 보장되었으며 동물세포와 분비 기작이 거의 유사한 변역 후 수식과정을 가진 효모를 숙주로 이용하여 화학적으로 합성된 38개의 oligomer로부터 제작된 HLY 유전자를 고발현 벡터와

연결, 발현시킴으로써 대량생산을 위한 성공적인 기틀을 마련하였다(3). 하지만 효모와 같은 진핵생물은 세포벽이 견고하기 때문에 세포내에 존재하는 유전자 산물의 분비 및 회수가 어렵다. 따라서 최근에는 균체 내의 축적된 유전자 산물을 가능한 균체 밖의 배지로 분비시키고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 유전자 산물이 세포외로 분비되면 분리와 정제 공정의 용이, 분비시 당쇄첨가, 미생물의 성장 저해 감소 등의 장점이 있는 반면에 세포의 단백질분해 효소가 분비된 단백질을 쉽게 분해할 수 있는 단점이 있다. 그러나 이러한 단점에도 불구하고 장점이 매우 많으므로 재조합 유전자 산물의 세포외로의 분비 연구는 매우 중요한 분야가 되고 있다(4).

본 논문에서는 분비효율을 향상시킬 수 있는 여러 방법들 중 permeabilizing agent를 이용한 방법에 대하여 연구하였다. 계면활성제와 2가 금속이온, ethanol, 유기용매 등이 permeabilizing agent로써 사용되고 있는데(4-11), Joshi 등(6)은 양이온성 계면활성제인 0.1

[†]To whom all correspondence should be addressed

% CTAB와 비이온성 계면활성제인 1% Triton X-100을 사용하여 *Kluyveromyces fragilis*에서 β -galactosidase의 세포의 분비를 가능하게 하였고, Naglak와 Wang(11)은 Triton X-100과 guanidine hydrochloride를 사용하여 *Escherichia coli*의 periplasm에 축적된 재조합 단백질의 분비를 촉진시켰다. 또 Kurszewska 등(7)은 *Trichoderma reesei* 배양에서 20mM choline과 0.06% Tween 80을 배지에 첨가하여 cellulase의 분비를 촉진시켰고, Mizoguchi와 Hara(8-10)는 20% ethanol과 10mM CaCl₂를 사용하여 세포내의 저분자물질의 분비를 촉진시켰다. 따라서 본 연구에서는 효모세포 내에 합성된 HLY의 분비에 CaCl₂, ethanol, Tween 80, Triton X-100, CTAB가 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

균주

효모, *S. cerevisiae* HY-1(*a trp1 his3 leu2 can1 pho3 pho5*)(12)은 HLY의 발현 및 분비를 위한 숙주세포로 이용되었고, *Micrococcus luteus*는 HLY 활성측정의 기질로 이용되었다(13). 효모에서 HLY의 발현 및 분비를 측정하기 위하여 pHY101(*TRP1 ARS1 PHO5' CEN3 Amp'*)을 대조구로 하여, pHK501(*Amp' HLY' LEU2 ARS REP3*)을 HLY 발현벡터로 사용하였다(3). pHK501은 YEp type(50-100 copies/cell) shuttle vector인 YEp13을 근간으로 하여 제작한 것이고 *GAP* promoter, HLY의 signal peptide를 포함한 합성된 HLY 유전자, *PHO5* terminator로 구성되어 있으며 *GAP* promoter는 EMP 경로의 주 구성효소인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(EC 1.2.1.12) 구조유전자의 promoter(0.9 kb)로써 하류의 외래유전자를 구성적으로 발현한다. 또 세포내에 생산된 HLY는 HLY 자신의 signal peptide에 의해 세포 밖으로 분비된다(14).

배지

효모의 일반배양을 위해서는 YPD배지(2% glucose, 2% polypeptone, 1% yeast extract)를, 형질전환을 위해서는 SD합성배지(2% glucose, 0.67% yeast nitrogen base(without amino acids))를 사용하였다. 합성배지에는 효모의 영양요구성에 맞추어 아미노산을 적당하게 첨가하였다. 활성 측정에 기질로 쓰인 *M. luteus* 배양을 위해서는 ENB(1.25% heart infusion broth, 0.54% nutrient broth, 0.25% yeast extract)배지를 사용하였다. 평판배지는 상기 액체배지에 2%의 agar를 첨가하

여 조제하였다.

HLY의 정량분석

HLY 활성측정은 Mörsky의 방법(13)을 변용하였다. HLY standard는 Sigma Co.(USA)에서 구입한 것을 SD 합성배지에 녹여 각각의 unit에 해당하는 HLY 희석액 400 μ l를 55mM phosphate buffer(pH 6.2)에 녹아 있는 *M. luteus*(0.1mg/ml) 현탁액 1,600 μ l에 첨가한 다음 25°C, 450nm에서 10분 동안의 흡광도 감소율을 측정하였다. 배양 여액을 분비된 HLY의 unit수는 각각의 배양 여액을 상기와 동일한 방법에 의해 측정하여 HLY standard와 비교한 후 계산하였다. HLY 1 unit는 25°C, pH 6.2, 450nm의 흡광도로 측정하였을 때 *M. luteus*현탁액을 분당 0.001만큼 감소시키는 양으로 규정하였다.

형질전환체 배양

형질전환체 배양은 영양요구성에 맞추어 아미노산을 첨가한 SD 합성배지에 대수증식기 중기까지 배양한 전 배양액을 2%로 접종한 후 30°C, 180 rpm의 조건으로 진탕 배양하였다. 배양액에 대하여 균체농도, pH, turbidimetric method(13)에 의한 HLY 활성측정 등을 실시하였다.

세포분획

배양액을 원심분리하여 얻어진 세포침전물에 배양액과 동일한 인산용액(1.2M sorbitol, 10mM KH₂PO₄, pH 6.8)으로 세척하였다. 세척한 균체는 Zymolase 20T(7.7mg/ml, Seikagaku Corp., Japan)가 첨가된 인산용액에서 30°C, 30분간 반응시키고, 4°C에서 2분간 원심분리(600 \times g)하여 periplasmic HLY를 얻었다. 원심분리된 protoplast cell들은 동일한 buffer로 한 번 세척한 뒤 3분 동안 초음파 파쇄하고 15,000 \times g에서 2분간 원심분리하여 cytoplasmic HLY를 얻었다(15).

결과 및 고찰

발현된 HLY의 세포내 위치

Table 1에서와 같이 효모 형질전환체에 생산된 HLY은 시간의 경과에 따라 배지 중으로 분비되는 양이 증가하였고 periplasm과 cytoplasm에 존재하는 HLY는 감소하였다. 하지만 periplasm과 cytoplasm의 HLY의 감소 폭은 시간의 경과에 따라 줄어들었는데 이것은 합성된 cytoplasm의 HLY가 periplasm을 거쳐 배양 후

Table 1. The localization of HLY from the transformant pHK501

Day	Culture time		HLY activity(%)		
	Unit/ml ¹⁾	Medium	Periplasm	Cytoplasm	
1	7.1	10.3 ²⁾	70.0		16.7
2	20.5	43.7	36.5		19.8
3	25.9	54.8	29.1		16.1
4	41.4	68.0	24.3		7.7

¹⁾HLY activity in medium.

²⁾HLY activity(%). These data are the average of the duplicate. Cultivation was carried out in the SD medium at 30°C for 4 days.

반기에 배지 중으로 분비되었기 때문이다. 세포 내재성 단백질들의 분비와 비교해 볼 때 매우 높은 분비율을 보이고 있다. 하지만 전체 HLY의 30% 이상은 여전히 배양후기(96시간)까지 분비되지 않고 잔존하였다. 따라서 유전자 산물의 분비 유도 및 생산성 증대를 위해서는 permeabilizing agent를 사용하여 특히 periplasm에 존재하는 HLY의 강제적 분비가 필요하다. 앞에서 보고한(3) 내용에서 HLY생산을 위한 플라스크 배양시 효모의 형질전환체는 70시간에서 정지기에 도달하였으며 permeabilizing agent의 영향을 보기 위하여 이후의 모든 실험은 배양개시 72시간째의 배양액으로 실시하였다.

HLY 분비에 미치는 CaCl₂의 영향

2가 금속이온 중 대표적으로 세포벽과 막의 구조에 영향을 주는 Ca²⁺ 이온을 이용하여 세포에 대한 permeabilizer의 효과를 조사하였다. Mizoguchi 등(10)은 배양액 내에 탄소원인 glucose가 존재하게 되면 ATPase가 높은 활성으로 유지되고, 높은 활성의 ATPase는 막의 기능을 강화하는 역할을 한다고 보고하였다. 따라서 glucose가 완전히 소모된 배양액을 모든 실험에 사용하였다. 또 Ca²⁺은 세포막에 널리 존재하는 산성 phospholipids의 phosphatidylserine과 phosphatidylinositol에 상호 작용하여 막의 lateral phase separation을 증가시킨다. 이러한 변화는 세포막과 벽의 투과성에 변화를 줄 것이다. 따라서 72시간 배양한 배양액에 0~30 mM로 농도에 변화를 주어 CaCl₂를 첨가하였다.

그 결과 Fig. 1에서 보는 것과 같이 CaCl₂는 첨가 후 대부분의 농도에서 12시간 전까지 대조구에 비해 높은 HLY 활성을 보였다. 한편, 60시간까지 시간의 증가에 따라 HLY의 활성이 서서히 증가하는 대조구(12시간: 34.2 units/ml, 24시간: 41.4 units/ml, 60시간: 45.5 units/ml)에 비해 10mM CaCl₂의 처리에서는 12시간째의 분

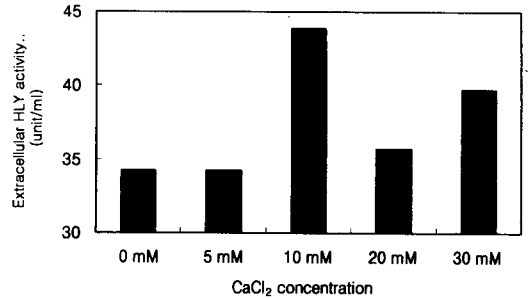


Fig. 1. The effect of CaCl₂ on HLY secretion from the recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for 12 h treatment.

CaCl₂ was added in culture broth at 72 h of cultivation. These data are the average of the duplicate.

비량은 43.9 units/ml이며 24시간은 39.8 units/ml, 60시간은 39.7 units/ml로 처리시간이 지날수록 분비량은 오히려 감소하는 경향을 볼 수가 있었다. 이는 세포 속에 내재하는 HLY가 CaCl₂의 처리 후에 짧은 기간동안 일시적으로 유도되어 CaCl₂ 처리 후반기에는 오히려 분비량이 감소할 수 있다. 그리고 CaCl₂의 농도가 증가할수록 전체적인 HLY의 분비량은 감소하는데 이는 배양액 중의 구성성분과 반응하여 백탁과 침전의 원인으로 작용할 수 있다는 것이다. 백탁이나 침전이 발생하게 되면 반응액의 흡광도가 증가하여 HLY의 활성 측정방법으로 쓰이고 있는 Mörsky 방법(13)으로 측정된 HLY활성은 크게 감소하는 경향을 보이게 된다.

HLY분비에 미치는 ethanol의 영향

일반적으로 효모는 ethanol 발효에 사용되는 균주로써 ethanol에 대한 내성이 뛰어나다. Mizoguchi와 Hara (8-10)의 보고에 의하면 막 분비의 증가는 ethanol에 의해 발생하는 hydrophobic core의 손상 때문이지만 오히려 배양초기부터 8% ethanol 존재 하에서 성장한 세포는 인지질 구성비율에서 palmitic acid가 증가하게 되고, 이러한 세포막 구성성분의 변화는 원형질막의 기능과 보존성, ethanol 내성 등의 면에서 향상되는 현상을 보였다고 보고하였다. 하지만 낮은 농도의 ethanol에서 성장한 효모를 고농도의 ethanol로 처리하였을 때는 심한 원형질막 누출이 발생함을 동시에 보이고 있다. 따라서 우리는 ethanol에 의한 HLY 분비 증대에 대한 가능성을 조사하기 위하여 호기적으로 72시간 배양한 배양액에 0~30%까지 ethanol 농도에 변화를 주어 첨가하였다.

Fig. 2에서와 같이 10% 이상의 농도에서 배양액 중의 HLY 활성이 증가하였고 특히 10% 처리에서는 HLY

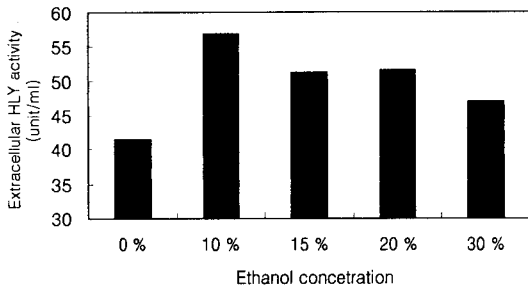


Fig. 2. The effect of ethanol on HLY secretion from the recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for 24 h treatment. Ethanol was added in culture broth at 72 h of cultivation. These data are the average of the duplicate.

활성이 38.6%나 증가하였다. 또 모든 처리형태에서 처리 말기에 걸쳐 비교적 높은 HLY활성을 유지하고 있는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 ethanol이 직접적으로 세포막과 벽에 변화를 주어 세포내에 존재하는 HLY의 분비를 촉진시켰고, 배지 속에 첨가된 고농도 ethanol은 분비된 HLY의 안정성을 증가시킨 것으로 생각된다. 즉 배양액 속에 존재하는 protease의 활성을 억제시켰다고 볼 수 있다(16,17). 그렇다면 10%보다 높은 농도의 ethanol 처리에서 더 높은 HLY 안정성을 보일 수 있지만 이러한 활성저해는 HLY에도 영향을 줄 수 있기 때문에 높은 농도의 ethanol 처리가 HLY에 변성을 주어 활성은 10% ethanol 농도보다 높지 않은 결과를 보인 것으로 추정된다.

HLY분비에 미치는 계면활성제의 영향

이미 여러 논문에서 Tween 80, Triton X-100, CTAB와 같은 이온성, 비이온성 계면활성제들이 세포내의 유전자산물 분비에 미치는 영향은 매우 큰 것으로 보고되었다(4-7,11). 본 실험에서도 Tween 80 처리의 경우 대조구에 비해 다소 높은 활성을 보였지만 농도변화에 대한 일관성은 부족하였다(Fig. 3). 그리고 Triton X-100과 CTAB 처리에서도 그 효과가 미미하거나 오히려 활성이 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4, 5). 이러한 결과는 계면활성제가 백탁을 유발하였기 때문이다. 따라서 Mörsky의 방법(13)에 의한 기존의 HLY 활성측정이 계면활성제를 이용한 실험에서는 부적합함을 알 수 있다. 또 계면활성제에 의한 직접적인 HLY활성저해에 대하여 조사한 결과 CTAB에 대해서만 HLY 활성 감소를 관찰할 수 있었고 나머지 Tween 80과 Triton X-100에 대해서는 아무런 저해도 일어나지 않았다. 따라서 이번 HLY 분비측진 실험에서 나타난 결과들만으로는 계면활성제들이 HLY 분비에 전혀 영향을

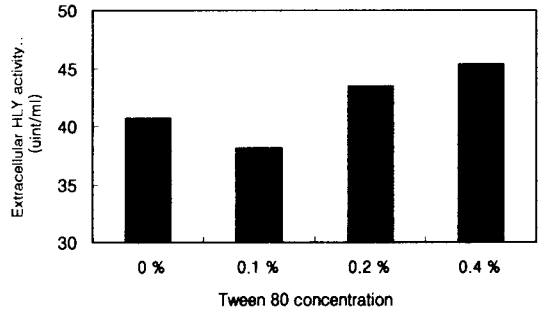


Fig. 3. The effect of Tween 80 treatment on HLY secretion from the recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for 24 h. Tween 80 was added in culture broth at 72 h of cultivation. These data are the average of the duplicate.

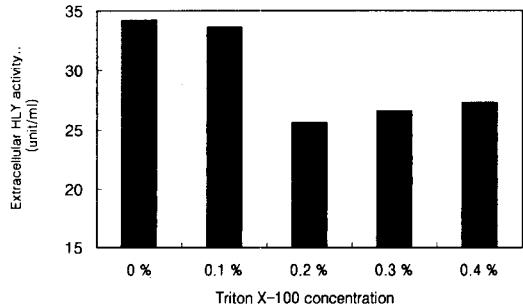


Fig. 4. The effect of Triton X-100 treatment on HLY secretion from the recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for 12 h. Triton X-100 was added in culture broth at 72 h of cultivation. These data are the average of the duplicate.

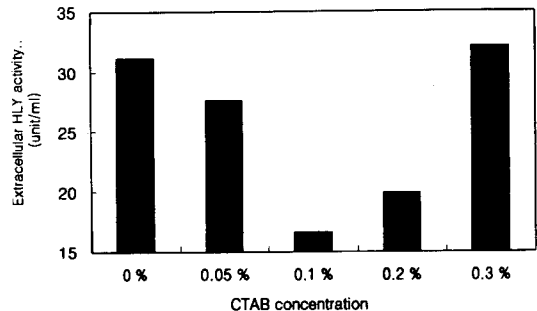


Fig. 5. The effect of CTAB treatment on HLY secretion from the recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for 5 min. CTAB was added in culture broth at 72 h of cultivation. These data are the average of the duplicate.

없다고는 단정 내릴 수 없다. 이미 여러 논문에서 계면활성제가 세포내 유전자산물 분비에 탁월한 효과를 보이고 있고(4-7, 11), 이번 Tween 80, Triton X-100, CT-

AB 처리 실험결과에서도 전반적인 HLY 활성은 대조구에 비해 낮지만 계면활성제의 농도가 올라감에 따라 조금씩 HLY 활성이 상승하는 경향을 보이고 있다. 이러한 결과들이 본 실험에 객관성과 일관성을 부여하지는 못하지만 HLY 활성 측정방법에 대한 문제점을 고려할 때 완전히 무시해서도 안될 것으로 생각된다.

요 약

배양 말기까지 세포내에 30% 이상 존재하는 유전산물인 HLY를 효과적으로 분비를 유도하기 위해 다섯가지의 permeabilizing agent—CaCl₂, ethanol, Tween 80, Triton X-100, CTAB—를 사용하였다. 그 결과 효모형질전환체에 대한 CaCl₂, Tween 80, ethanol의 처리에서는 HLY의 분비촉진을 확인할 수 있었다. 특히 10% ethanol의 처리에서는 HLY 활성을 38.6% 증가시켰다. 이러한 결과는 ethanol이 직접적으로 세포막과 벽에 변화를 주어 세포내에 존재하는 HLY의 분비를 촉진시켰고, 배지 속에 첨가된 고농도 ethanol은 분비된 HLY의 안정성을 증가시킨 것으로 생각된다. 하지만 기대했던 계면활성제의 효과는 거의 없었는데 이러한 결과는 계면활성제가 유전산물 분비에 미치는 영향이 없다고 단정 내리기보다는 측정방법의 문제인 것으로 보인다.

문 헌

1. Arnheim, N., Sobel, J. and Canfield, R. : Immunological resemblance between human leukemia and hen egg white lysozyme and their reduced carboxymethyl derivatives. *J. Mol. Biol.*, **61**, 237-240(1971)
2. Canfield, R. E., Collins, J. C. and Sobel, H. J. : Human leukemia lysozyme. In "Lysozyme" Osseman, E. F., Canfield, R. E. and Beychok, S.(eds.), Academic Press, New York, pp.63-70(1974)
3. Kim, K. W., Choi, S. U., Lee, S. C., Paik, H. D. and Hwang, Y. I. : Increased expression of a chemically synthesized human lysozyme gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 34-39(1998)
4. Cha, H. J. and Yoo, Y. J. : Effect of non-ionic surfactants on cloned glucoamylase production and secretion in recombinant yeast culture. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 712-716(1996)
5. Gowda, L. R., Bachhawat, N. and Bhat, S. G. : Permeabilization of baker's yeast by cetyltrimethylammonium bromide for intracellular enzyme catalysis. *Enzyme. Microb. Technol.*, **13**, 154-157(1991)
6. Joshi, M. S., Gowda, L. R. and Bhat, S. G. : Permeabilization of yeast cells(*Kluyveromyces fragilis*) to lactose by cetyltrimethylammonium bromide. *Bio-technol. Lett.*, **9**, 549-554(1987)
7. Kruszewska, J., Palamarczyk, G. and Kubicek, C. P. : Stimulation of exoprotein secretion by choline and Tween 80 in *Trichoderma reesei* QM 9414 correlates with increased activities of dolichol phosphate mannose synthase. *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 1293-1298(1990)
8. Mizoguchi, H. and Hara, S. : Effect of fatty acid saturation in membrane lipid bilayers on simple diffusion in the presence of ethanol at high concentrations. *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, 406-411(1996)
9. Mizoguchi, H. and Hara, S. : Ethanol-induced alterations in lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of exogenous fatty acid. *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 12-16(1997)
10. Mizoguchi, H. and Hara, S. : Permeability barrier of the yeast plasma membrane induced by ethanol. *J. Ferment. Bioeng.*, **85**, 25-29(1998)
11. Naglak, T. J. and Wang, H. Y. : Recovery of a foreign protein from the periplasm of *Escherichia coli* by chemical permeabilization. *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 603-611(1990)
12. Hwang, Y. I., Seo, A. R., Shim, S. K. and Chung, D. H. : Construction of an expression vector system with the GAP promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 568-574(1991)
13. Mörsky, P. : Turbidimetric determination of lysozyme with *Micrococcus lysodeikticus* cells: reexamination of reaction conditions. *Anal. Biochem.*, **128**, 77-85(1983)
14. Kim, K. W., Lee, S. C. and Hwang, Y. I. : Chemical synthesis of a human lysozyme gene and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 138-144(1995)
15. Jigami, Y., Muraki, M., Harada, N. and Tanaka, H. : Expression of synthetic human-lysozyme gene in *Saccharomyces cerevisiae*: use of a synthetic chicken-lysozyme signal sequence for secretion and processing. *Gene*, **43**, 273-279(1986)
16. Laszewicz, W., Solmiany, A., Murty, V. L., Liau, Y. H. and Slomiany, B. L. : Effect of ethanol on the peptic degradation of gastric mucus glycoprotein. *Digestion*, **31**, 47-53(1985)
17. Poso, A. R. and Hirsimaki, P. : Inhibition of proteolysis in the liver by chronic ethanol feeding. *Biochem. J.*, **273**(Pt 1), 149-152(1991)

(1998년 12월 8일 접수)