

외래 단백질 발현을 위한 새로운 숙주 시스템으로서의 메탄올 자화효모

강 현 아 · †이 상 기
생명공학연구소 미생물공정 연구실
(접수 : 2001. 1. 12., 게재승인 : 2001. 2. 21.)

Methylotrophic Yeasts as a New Host for Heterologous Protein Expression

Hyun Ah Kang and Sang Ki Rhee†
Microbial & Bioprocess Engineering Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
P.O. Box 115, Taejeon, Korea
(Received : 2001. 1. 12., Accepted : 2001. 2. 21.)

The development of expression systems for heterologous proteins has been greatly demanded not only for the study of the structure/function relationships of these proteins but also for their biotechnological and pharmaceutical applications. During the past decades, the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* have drawn attention as one of promising hosts for the production of a variety of heterologous proteins. The increasing popularity of *H. polymorpha* and *P. pastoris* as the host systems can be attributed to the several advantages over the traditional yeast *Saccharomyces cerevisiae*, such as the availability of very strong and tightly regulated promoters from the enzymes involved in the metabolism of methanol, a very high-cell density even on simple mineral media, and a high stability of expression plasmids. Furthermore, it has been observed that glycoproteins from these two yeasts are less hyperglycosylated compared to those from *S. cerevisiae*. Despite substantial similarities as methylotrophic yeasts, however, these two expression systems have some unique features distinguished from each other. In this paper we present a brief overview on the present status of the expression systems developed in methylotrophic yeasts, mainly focusing on the similarities and differences between the *H. polymorpha* and *P. pastoris* systems.

Key Words : *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, heterologous protein production

서 론

최근 인체 지놈(genome)의 완독을 위시하여 여러 생명체에서의 유전체 정보가 밝혀지고 이에 따른 다양한 단백질의 유용한 기능과 역할이 속속 규명됨에 따라 생산량이 한정된 유용단백질을 다양한 숙주세포에서 대량 발현시키는 "재조합 단백질 발현기술"이 핵심 기반기술로 인식되고 있다. 외래 단백질을 대량 발현하는 경우 숙주세포나 목적 단백질의 특징에 따라서 단백질의 발현양, 수용성 여부, 발현 장소, 수식(modification) 등이 각기 다르므로 목적 단백질에 가장 적합한 발현 시스템을 선택해야만 효율적인 생산 시스템을 구축할 수 있다. 대량 발현을 위한 숙주시스템으로는 박테리아,

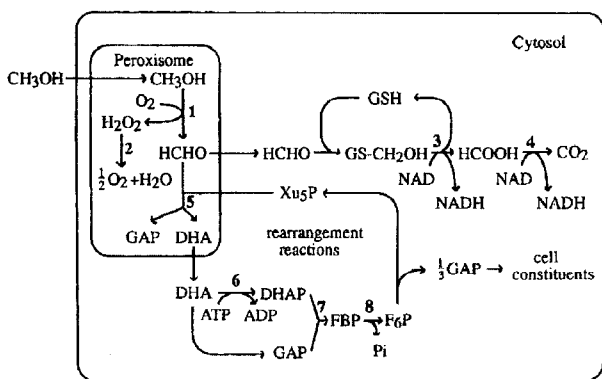
효모, 곰팡이, 식물 및 동물을 포함한 여러 다양한 시스템이 개발되고 있는데, 적은 비용으로 고농도 균체 배양이 용이한 미생물 숙주 시스템이 일차적인 발현 시스템으로 활용되고 있다. 여러 유용한 미생물 숙주시스템들 중에서도 많은 경우 유전학적, 생리 화학적 특징이 가장 잘 밝혀져 있는 원핵 세포인 박테리아와 전통효모 *Saccharomyces cerevisiae*가 일차적인 숙주 세포로 이용되어 왔다. 특히 미생물이면서도 진핵생물의 단백질 발현 및 분비 특징을 갖는 효모는 고등 진핵생물 유래의 재조합 단백질을 대량 생산하기 위한 미생물 숙주로 유용하게 사용되고 있다. 최근에는 산업적 생산 속도로서 전통 효모 *S. cerevisiae*가 갖는 단점들, 예로써 장기간 발효시 발현 벡터의 불안정성, 당단백질의 과당화(hyperglycosylation), 또한 박테리아 발현시스템에 비해 낮은 생산성 등의 문제점들을 보완하기 위하여 여러 다른 효모 시스템이 대체숙주로서 개발되고 있다(1).

Non-*Saccharomyces* 효모를 이용한 외래유전자 발현 시스템들 중 특히 메탄올 자화효모 *Hansenula polymorpha*와 *Pichia pastoris*는 여러 독특한 특징으로 인해 재조합 단백질

†Corresponding Author : Microbial & Bioprocess Engineering Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. Box 115, Taejeon, Korea
Tel : +82-42-860-4450, Fax : +82-42-860-4594
E-mail : rheesk@mail.kribb.re.kr

Table 1. Differences between two methylotrophic yeasts *H. polymorpha* and *P. pastoris*

	<i>H. polymorpha</i>	<i>P. pastoris</i>
Alcohol oxidase gene	<i>MOX1</i>	<i>AOX1, AOX2</i>
Regulation of methanol metabolism	Repression/derepression/induction	Repression/induction
Fermentation	One-step fermentation on glycerol or on glycerol/methanol possible	Two-step fermentation: growth on glycerol followed by induction with methanol
Growth temperature	37-43°C	30°C
Recombination	Mostly nonhomologous	Homologous
Integration	High-copy integration	Mainly single-copy integration



1. Alcohol oxidase (*MOX* in *H. polymorpha*, *AOX1* and *AOX2* in *P. pastoris*)
2. Catalase (*CAT*)
3. Formaldehyde dehydrogenase (*FLD*)
4. Formate dehydrogenase (*FMDH*)
5. Dihydroxyacetone synthase (*DHAS*)
6. Dihydroxyacetone kinase
7. Fructose 1,6-bisphosphate aldolase
8. Fructose 1,6-bisphosphatase

Figure 1. Methanol utilization pathway and its compartmentalization in methylotrophic yeasts. The *H. polymorpha* and *P. pastoris* genes, whose expression are induced by methanol, are indicated as abbreviation. The figure is partly modified from Cereghino and Cregg (25).

대량생산을 위한 이상적인 숙주시스템으로 각광을 받고 있다(2,3). *H. polymorpha*와 *P. pastoris*는 값싼 원료물질인 메탄올을 에너지원과 탄소원으로 이용할 수 있고 메탄올 대사에 관련된 유전자들에서 유래된 발현 조절이 용이하면서도 매우 강력한 프로모터들을 갖고 있어 산업적 응용 측면에서 *S. cerevisiae* 보다 그 유용성이 매우 높다. 또한 간단한 합성배지에서도 고농도 배양(100-130g DCW/L)이 용이하고, 형질 전환시 발현 목표유전자가 숙주의 염색체상으로 삽입되어 비선택 배지를 사용한 장기간의 배양에서도 도입된 발현벡터의 안정성이 뛰어난 장점이 있다(4). 더 나아가 이들 효모에서 발현된 당단백질들은 *S. cerevisiae*에서 발현된 당단백질들에 비해 훨씬 과당화되는 정도가 낮은 것으로 보고되었다(5, 6). 그러나 이 두 발현시스템은 메탄올 자화효모로서 갖는 상당한 유사성에도 불구하고 여러 주목할 만한 상이성을 보이고 있다(Table 1). 본 고에서는 두 메탄올 자화효모 *H. polymorpha*와 *P. pastoris*를 이용한 발현 시스템간의 유사성 및 상이점을 비교 분석하면서 이들 발현 시스템의 개발 현황에 대해 살펴보고자 한다.

메탄올 대사 및 조절(Methanol metabolism and regulation)

여러 종류의 효모들 중 *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*와 *Torulopsis* 속(genus)에 해당되는 효모들만이 메탄올을 유일한 에너지 및 탄소원으로 이용하여 성장할 수 있다. 메탄올 자화효모들은 원래에는 1970년 초반에 동물 사료로 사용할 single-cell protein (SCP)을 메탄올처럼 값싼 탄소원을 사용하여 대량 생산하고자 하는 산업적 측면에서 관심을 끌기 시작하였다(7). 그 후 지속적으로 수행된 이들 효모에 대한 생리학, 생화학, 세포 구조학에 관한 연구결과들에 의해서 메탄올 대사에는 퍼옥시솜(peroxisome)이라는 막으로 분리된 세포 기관(organelle)이 관여하며 메탄올에 의해 발현 유도되는 여러 특이한 효소들의 작용으로 진행됨이 밝혀졌다. 즉, 메탄올 대사 경로는 퍼옥시솜에서 알콜 옥시다제(alcohol oxidase; AOX)라는 효소에 의해 메탄올이 산화되어 formaldehyde와 hydrogen peroxide로 분해됨으로써 시작된다(Figure 1). 이때 생성된 hydrogen peroxide는 퍼옥시솜에 존재하는 또 다른 효소 catalase (CAT)에 의해 산소와 물로 분해되고, 생성된 일부 formaldehyde는 퍼옥시솜에서 효소 dihydroxyacetone synthase (DHAS)의 작용에 의해 glyceraldehyde 3-phosphate와 dihydroxyacetone으로 합성되어 xylulose 5-monophosphate 생성을 통한 동화과정에 이용된다. 일부 formaldehyde은 퍼옥시솜에서 방출되어 세포질에 있는 두 종류의 효소 formaldehyde dehydrogenase (FLD)와 formate dehydrogenase (FMDH)의 작용으로 결국 CO₂로 산화되어 메탄올에서 성장하는 세포의 에너지원으로 이용된다.

메탄올에서 배양된 이들 효모의 특징은 현저한 퍼옥시솜의 증폭인 데, 메탄올에 의해 세포 성장이 제한되는 배양 조건에서는 퍼옥시솜이 전체 세포 부피의 80%까지 차지하기도 한다(8). 이런 세포들에선 AOX와 DHAS 단백질이 전체 세포 단백질의 60% 이상에 해당되어 이들 단백질을 코딩하는 유전자들의 프로모터가 매우 강력함을 반영하고 있다. 메탄올 자화효모로서 *H. polymorpha*와 *P. pastoris*는 동일한 메탄올 대사 경로를 지니고 있지만 여러 주목할 만한 차이점들을 보여준다. 첫째로, *H. polymorpha*에는 메탄올 산화작용에 관여되는 알콜 옥시다제를 코딩하는 유전자로 *MOX*만 존재하는 반면 *P. pastoris*에는 두 유전자 *AOX1*와 *AOX2*가 존재한다. 둘째로, *H. polymorpha*에서는 메탄올 대사경로의 주요 효소인 *MOX*와 *FMDH*의 발현이 글루코즈나 에탄올에 의해서 억제되지만 글리세롤에 의해서는 그 발현억제가 상당히 풀리는 탄소원에 따른 억제/풀림/유도(repression/derepression/induction) 조절기작을 보인다(9). 이에 반해 *P. pastoris*의 *AOX* 유전자

들은 반드시 메탄올이 존재해야만 발현 가능한 억제/유도 (repression/induction) 조절기작을 보인다(10).

분자 유전학적 조작(Molecular genetic manipulation)

메탄올 자화효모들에 대한 유전학적 분석은 이들 효모에 대한 생리학적 연구에 비해서는 아직은 미진한 상태이다. Homothallic ascomycetous 효모로 분류되는 *H. polymorpha*와 *P. pastoris*는 일반적인 배양 조건에서는 haploid 상태로 안정되게 유지되지만, 성장이 제한적인 특수한 배양조건에서는 diploid 형성 후 sporulation 과정을 거치므로 고전적인 유전학 분석도 가능하다(11,12). 또한 *S. cerevisiae*에서 이용되는 분자 유전학적 기술들, 즉 외래 유전자 도입을 통한 형질전환, 유전자 targeting 및 replacement, functional complementation에 기초한 유전자 클로닝 등 다양한 유전학적 조작이 두 효모 시스템에 적용 가능하다(13).

*P. pastoris*에서는 비록 *S. cerevisiae*에 비해서는 비교적 낮은 비율이지만 상동 재조합(homologous recombination)이 꽤 높은 비율로 일어나므로 double cross-over recombination을 이용하여 숙주 염색체의 특정 부위로 발현카세트를 비교적 손쉽게 삽입시킬 수 있다. 그러나 특이하게도 *H. polymorpha*의 경우, 비상동 재조합(nonhomologous recombination)이 높은 빈도로 일어나서 도입된 외래 유전자가 주로 숙주 염색체의 비특정 부위로 다중 삽입된다. 이와 같은 높은 비상동 재조합 빈도는 *H. polymorpha*에서 외래 단백질 생산시 발현 벡터들을 숙주 염색체의 여러 부위로 쉽게 다중 삽입할 수 있다는 점에서는 큰 장점으로 작용하지만(14), 특정 유전자 파괴(gene disruption) 등 double cross-over recombination을 활용하는 분자 유전학적 조작은 타 효모 시스템에 비해 쉽지 않다는 것이 *H. polymorpha* 발현시스템의 단점으로 지적되고 있다(15).

대부분의 다른 효모들과는 달리 *H. polymorpha*에서는 자기 복제서열을 지닌 벡터도 비록 일시적으로는 플라스미드 상태로, 즉 숙주 염색체 DNA와는 별도로 복제되어 유지되지만, 매우 높은 빈도로 비상동 재조합에 의해 숙주 염색체의 비특정 부위로 삽입된다. 따라서 일반적으로 *H. polymorpha*에서 재조합 단백질 생산 균주를 제작하는 경우, 일차적으로 선별된 형질전환체들을 selection pressure 없이 연속적으로 배양한 후 다시 선택배지에서 선별하는 과정을 거쳐서 발현 벡터가 숙주 염색체내로 안정되게 삽입된 형질전환체들만 확보하는 안정화(stabilization) 과정이 필요하게 된다. 이러한 안정화 과정동안 숙주의 염색체내로 도입된 벡터의 수가 수십 카피까지 되는 형질전환체를 얻게 된다(14). *H. polymorpha*에서 외래 유전자가 숙주 염색체의 비특정 부위로 쉽게 다중 삽입되는 특징은 특히 여러 종류의 재조합 단백질 발현 카세트를 숙주 염색체내로 삽입하여 동시에 여러 다른 재조합 단백질을 발현하는 균주를 제작하는 경우에는 매우 유용하게 활용되고 있다(17,18).

발현 벡터(Expression vectors)

두 메탄올 자화효모에서 현재 가장 널리 상용되고 있는 발현벡터들은 숙주 염색체로 삽입되도록 고안된 삽입용 벡터(integrative vector)들이다. 일반적으로 *P. pastoris* 벡터에는 *E.*

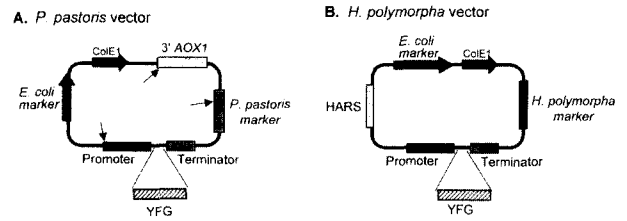


Figure 2. General diagram of *P. pastoris* (A) and *H. polymorpha* (B) expression vectors. The arrows in (A) indicate the restriction sites used to linearize the *P. pastoris* vectors for transformation. YFG, Your Favorite Gene; HARS, *Hansenula* autonomously replicating sequence.

*coli*에서 증폭되기 위한 replication origin이 포함되어 있지만 *P. pastoris* 유래의 자기복제서열(autonomously replicating sequences:ARS)은 포함되지 않는다. 따라서 발현벡터에 포함되어 있는 *P. pastoris* 유래의 유전자, 예로써 *AOX1* 프로모터나 *HIS4* 유전자, 부위를 절단하여 숙주로 도입하면 상동 재조합에 의해 발현벡터가 숙주 염색체상의 상동 유전자, 즉 *AOX1* 유전자나 *HIS4* 유전자, 부위에 삽입되도록 개발되어 있다(Figure 2A). 여러 다양한 프로모터 및 선별표지를 지닌 다양한 *P. pastoris* 발현벡터들(18)이 이미 상품화되어 Invitrogen (www.invitrogen.com)에서 구입 가능하므로 *P. pastoris*는 현재 신규 단백질의 구조 및 기능 분석을 위한 기초연구에서도 유전자 발현을 위한 중요한 숙주로 많이 사용되고 있다.

H. polymorpha 삽입용 벡터는 *H. polymorpha* 유래의 자기 복제서열을 갖고 있으며, 발현벡터를 절단하지 않고 원형(circular) 상태로 숙주에 도입시켜 숙주 염색체내의 비특정 부위로 삽입되도록 개발되었다(Figure 2B). 아직은 상업적으로 판매되는 *H. polymorpha* 발현 벡터는 없으며, 독일의 Rhein Biotech GmbH와 국내의 생명공학연구소(KRIBB)에서 독자적인 기술로 개발되고 있는 데 주로 재조합 단백질의 제품 개발을 목적으로 하는 대량생산을 위한 발현 시스템으로 이용되고 있다.

프로모터(Promoters)

메탄올자화 효모에서 외래 단백질의 대량 생산을 위해 가장 널리 상용되고 있는 프로모터들은 메탄올 대사에 관련된 유전자에서 유래된 프로모터들로 이들은 매우 강력하면서도 메탄올 존재 여부에 따라 발현 조절이 가능한 장점이 있다. *H. polymorpha*의 경우 *MOX1*, *DHAS* 또는 *FMDH* 프로모터가 보편적으로 활용되어 있고 *P. pastoris*의 경우는 *AOX1* 프로모터가 주로 사용되고 있다. 그러나 식품으로 개발될 재조합 단백질을 생산하고자 하는 경우 메탄올은 발현 유도체로 사용하기에 적합하지 않으며, 또한 대규모 발효에 필요한 대량의 메탄올은 화재 위험성을 내포하고 있으며, 더욱이 메탄올에 의한 발현 유도 최적화를 위한 발효 공정은 매우 복잡하다는 점들이 메탄올을 필요로 하는 이들 프로모터들의 단점으로 지적되고 있다. 따라서 최근에는 이들을 대체할 만한 여러 다양한 프로모터 개발에 관한 연구들이 활발하게 진행되고 있다(Table 2). 특히 *P. pastoris*의 glutathion-dependent formaldehyde dehydrogenase (*FLD1*) 프로모터는 메탄올뿐만 아니라 methylamine을 사용하여 발현을 조절할 수 있으면서

Table 2. Promoters and selectable markers used for protein expression in the methylotrophic yeast *H. polymorpha* and *P. pastoris*

	<i>H. polymorpha</i>	<i>P. pastoris</i>	Characteristics
Promoters	<i>MOX1</i> , <i>DHAS</i> , <i>FMD</i> <i>YNT1</i> , <i>YNII</i> , <i>YNRI</i> , <i>PHO1</i> <i>GAP</i> , <i>PMA1</i> <i>PEX</i>	<i>AOX1</i> , <i>FLD1</i> <i>GAP</i> <i>PEX8</i> , <i>YPT1</i>	Strong regulatable Moderate regulatable Strong constitutive Moderate constitutive
Markers	<i>LEU2</i> , <i>URA3</i> , <i>TRP3</i> , <i>ADE11</i> G418 ^r , Hyg ^r , Zeo ^r	<i>ADE1</i> , <i>ARG4</i> , <i>HIS4</i> , <i>URA3</i> G418 ^r , Zeo ^r	Auxotrophic Dominant

도 *AOX1* 프로모터만큼 매우 강력하다는 장점이 있다(19). 또한 강력한 구성적 프로모터로 개발된 *H. polymorpha*의 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAP*) (Kang H. A et al. unpublished result), plasma membrane ATPase (*PMA1*) (20), *P. pastoris*의 *GAP*(21) 프로모터들도 지금까지 재조합 단백질 대량생산을 위해 가장 널리 사용되어오던 *MOX1* 나 *AOX1* 프로모터에 필적할 만한 발현 수준을 보이고 있다. 일부 외래 단백질들의 경우 강력한 프로모터를 사용하는 경우 오히려 단백질 폴딩 및 프로세싱(processing)에 문제가 생기므로 오히려 중간 정도의 활성을 갖는 프로모터들이 필요한 경우가 있다. 이런 경우에는 *H. polymorpha*에서는 nitrate 동화 과정에 관여하는 세 종류의 유전자 *YNT1*, *YNII* 및 *YNRI* (22) 유래의 프로모터들과 알카리 포스파타제 유전자 *PHO1* (23) 유래의 프로모터를 사용할 수 있고, *P. pastoris*에서는 단백질 분비과정에 관여하는 GTPase 유전자인 *YPT1* 유래의 프로모터를 이용할 수 있다(24).

선별표지(Selectable markers)

전통효모 *S. cerevisiae*에 비해 이 두 메탄을 자화효모의 형질전환에 사용할 수 있는 선별표지의 종류가 아직은 다양하지 못한 상태이다(Table 2). 영양성 요구 선별표지로 이용할 수 있는 유전자들로 *P. pastoris*의 경우 *ADE1*, *ARG4*, *HIS4* 및 *URA3*가 확보되어 있고(25), *H. polymorpha*의 경우 *LEU2*, *URA3*, *TRP3* 및 *ADE11* 유전자가 확보되어 있다(26). *S. cerevisiae*의 *LEU2*, *URA3*, *ARG4*, 또는 *HIS4* 유전자들도 가끔은 이들 메탄을 자화효모의 선별표지로 이용되기도 한다. 항생제 내성을 이용한 지배적 선별표지(dominant selection marker)로는 transposon 유래의 *APH* 유전자를 이용한 G418-내성(27, 28), *Streptoalloteichus hindustanus* 유래의 *ble* 유전자를 이용한 zeocin (bleomycin or phleomycin)-내성(18, 29), 대장균 유래의 *hph* 유전자를 이용한 hygromycin B-내성(30) 등이 현재 개발되어 있다.

삽입 카피 수 조절 시스템(Copy-number controlled integration system)

발현벡터가 숙주 염색체내로 삽입되는 시스템에서는 벡터의 삽입 위치 및 카피 수에 따라 외래 유전자 발현 정도가 크게 영향을 받게 되므로 많은 형질전환체들의 발현정도를 분석하여 가장 높은 발현을 보이는 형질전환체를 찾아내는 소모적인 탐색 과정이 필요하게 된다. 일반적으로는 발현 카세트의 삽입수가 많을수록 비례적으로 높은 발현을 얻게 되지만, 일부 재조합 단백질들의 경우, 특히 분비 단백질을 생산하는 경우, 오히려 발현벡터 카피 수가 많을수록 발현이

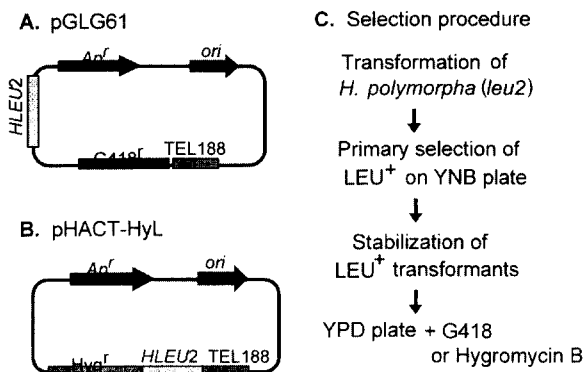


Figure 3. *H. polymorpha* vectors designed for copy-number controlled gene integration. (A) pGLG61, a vector containing the G418 resistance cassette, (B) pHACT-HyL, a vector containing the hygromycin B resistance cassette. These vectors contain a telomeric autonomous replication sequence, TEL188 (36), to direct tandemly repeated integration of the vector into the ends of chromosomes. (C) Selection scheme for multiple gene integratns using the antibiotic resistance as a dominant selectable marker.

저하시키는 사례들도 종종 보고되고 있으므로 최대 발현에 가장 적당한 카피 수를 지닌 형질전환체를 선별하는 과정이 매우 중요하다(31).

다른 효모 시스템에 비해 비록 *H. polymorpha* 시스템에서는 외래 유전자가 숙주 염색체로 다중삽입되는 빈도가 상당히 높음에도 불구하고, 발현 벡터가 다중으로 삽입된 형질전환체를 얻을 확률은 일반적으로 낮은 편이다. 따라서 다중병렬 도입 형질전환체를 선별하기 위해서는 많은 시간과 집약적 노력이 요구되는 지루한 선별과정을 거치게 된다. 이와 같은 선별과정을 간소화하기 위하여 삽입된 유전자의 카피 수에 따라 세포에 다양한 정도의 내성을 부여하는 지배적 선별 표지를 이용한 삽입 카피 수 조절 시스템(copy number-controlled integration system)이 개발되어 있다. *H. polymorpha* 시스템에서는 다중삽입을 유도하는 *H. polymorpha* telomere 유래의 자기복제서열과 함께 G418 내성 카세트(32) 또는 hygromycin 내성 카세트(30)를 이용한 다중병렬 도입형 벡터가 개발되었다(Figure 3, A and B). 상기 시스템에서는 *LEU2* 와 같은 영양 요구성 선별표지를 이용하여 일차적으로 형질전환체를 선별한 후 이차적으로 여러 다른 농도의 항생제가 포함된 배지에 확보된 형질전환체를 도말하거나 replica-plate하여 항생제 내성을 갖는 형질전환체를 재선별하게 된다(Figure 3C). 따라서 단지 항생제 농도를 달리하여 형질전환체를 선별함으로써 1-2 카피에서 수십 카피까지 이르는 다양한 카피 수의 발현카세트가 삽입된 형질전환체들을 비교적

간단하게 선별할 수 있는 장점이 있다. 이와 비슷하게 *P. pastoris*에서도 G418 내성 유전자(28) 및 zeocin 내성 유전자를 이용하여 다중 도입 형질전환체를 제때 선별하는 시스템이 개발되어 있다(18). G418과는 달리 zeocin을 사용하는 경우 *P. pastoris* 형질전환체를 곧바로 항생제가 포함된 배지에서 선별할 수 있다는 점에서 편리하다.

숙주 균주(Host strains)

현재 상용되고 있는 모든 *P. pastoris* 숙주 균주들은 NRRL-Y11430 (Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL)에서 유래되었다(25). 대부분 이들은 하나 또는 그 이상의 영양요구성 형질을 지닌 돌연변이주들(*ade1*, *arg4*, *his4*, and *ura3*)이어서 해당되는 영양요구성 선별 표지를 이용하여 형질전환시킬 수 있다. 지금까지 외국에서 개발된 *H. polymorpha*를 이용한 외래 유전자 발현 시스템은 주로 *H. polymorpha* CBS4732 (synonymous ATCC34438, NRRL-Y-5445) (33) 또는 NCYC495 (synonymous CBS 1946, ATCC 14754, NRRL-Y-1789)(11)주를 중심으로 진행되고 있지만, 국내에서는 DL-1 (synonymous ATCC 26012, NRRL-Y-7560)(34) 균주를 숙주로 이용한 재조합 단백질 발현 시스템이 개발되고 있다(32,35-37). *H. polymorpha* CBS4732와 NCYC495는 교배 및 포자 형성 과정이 비교적 용이하여 고전적 유전학적 분석이 용이하지만, DL-1 균주는 교배 및 포자 형성 효율이 극히 낮아서 고전적 유전학적 분석이 제한되는 단점이 있다(K. Lahtchev, personal communication). 그러나 DL-1주는 두 다른 균주에 비해 메탄올 및 글라이세롤을 포함한 여러 배양배지에서 더 빠른 성장 속도를 보이며 다른 배양배지로 옮긴 후에도 더 빠른 적응능력(Kang H. A. et al., unpublished results)을 보이는 등 재조합 단백질 생산 숙주로서 보다 유리하게 활용될 수 있는 생리적 특징을 갖고 있다. 또한 DL-1이 CBS주에 비해 상동재조합 효율이 높아서 균주의 분자 유전학적 조작이 비교적 용이하다(Agaphonov M. O. et al. unpublished results).

메탄올 소모 형질(Methanol utilization phenotype)

상동 재조합 빈도가 높은 *P. pastoris* 발현시스템에서는 형질전환시 *AOX1* 프로모터와 터미네이터로 구성된 발현 카세트가 숙주 염색체상의 *AOX1* 유전자 부위에서 double cross-over recombination을 통해 삽입되는 경우에는 *AOX1* 유전자가 파쇄되어 *aox1Δ* 형질전환체로 된다. 이 *aox1Δ* 균주는 메탄올에서 배양시 많은 양으로 생성되던 *AOX1* 효소를 더 이상 만들지 않으며 매우 느린 성장속도(methanol utilization slow: *Mut^s*)로 자라므로 *AOX1* 야생균주 (*Mut⁺*)보다 훨씬 낮은 산소 요구성 및 메탄올 소모 속도를 보이는 장점을 갖게 된다. 실제로 *Mut^s* 재조합 균주와 *Mut⁺* 균주를 이용한 발효를 비교 분석했을 때 *Mut^s* 균주에서 재조합 단백질 생산효율이 *Mut⁺*의 경우에 비해 우수했다고 보고한 몇몇 연구 사례들이 있어 *Mut^s* 균주가 일부 재조합 단백질의 대량생산의 경우에는 보다 유용한 균주임을 시사하고 있다(38,39).

*P. pastoris*와는 달리 *H. polymorpha*에서는 *MOX* 프로모터와 터미네이터를 이용한 발현 벡터가 도입되어도 발현벡터가 대부분 숙주 염색체의 비특정 부위로 삽입되며, 설혹 매우

낮은 빈도로 *MOX* 유전자 부위로 삽입된다고 해도 원형상태로 벡터가 삽입되기 때문에 염색체상의 *MOX* 유전자가 파쇄된 형질전환체를 확보하기가 매우 어렵다. 따라서 *MOX* 프로모터와 터미네이터로 구성된 발현 카세트가 *MOX* 유전자 부위로 삽입되면서 *MOX* 유전자가 파쇄된 형질전환체만을 선별할 수 있도록 특별히 고안된 벡터 및 균주가 개발되었다(40). 즉, 메탄올 옥시다제를 코딩하는 *MOX* 유전자에 바로 근접한 *TRP3* 유전자가 파쇄된 *H. polymorpha* 변이주(*trp3Δ*)를 제작하고 *MOX* 프로모터와 *TRP3* 유전자 일부를 양쪽 끝에 지닌 발현카세트를 상기 *trp3Δ* 균주에 도입하여 *TRP3*로 전환되는 형질전환체를 트립토판이 결여된 배지에서 선별함으로써 double cross-over recombination을 통해서 발현카세트가 *MOX* 유전자로 삽입된 형질전환체를 선별하게 된다. 이와 같이 *MOX* 유전자가 파쇄된 *H. polymorpha* 형질전환체는 낮은 알콜 옥시다제 활성을 지닌 *AOX2* 유전자가 남아있는 *P. pastoris aox1* 형질전환체와는 달리 메탄올을 전혀 탄소원으로 이용할 수 없는 *Mut⁻* (methanol utilization negative) 형질을 갖게 된다. 최근에는 *P. pastoris*에서도 *AOX1*뿐만 아니라 *AOX2* 유전자까지 파쇄되어 메탄올을 전혀 탄소원으로 사용할 수 없는 균주(*aox1Δ aox2Δ*)도 개발되었고 이들 *Mut⁻* 균주는 메탄올에 의한 *AOX1* 프로모터의 발현 유도 활성을 그대로 유지하고 있음이 확인되었다(41).

단백질 분해효소 결손 균주(Protease-deficient strains)

효모를 이용하여 재조합 단백질을 생산할 때 생산성의 증가를 위해서는 효율적인 발현 및 분비 시스템의 사용은 필수적이지만 생산 분비된 외래단백질의 분해를 방지하는 것도 매우 중요하다. 특히 재조합 효모를 고농도로 발효조에서 장시간 배양할 때 숙주세포로부터 자연적으로 분비되거나 또는 세포 분해(cell lysis)를 통해서 세포내에 존재하는 단백질 분해효소가 배지로 배출되어 생산된 재조합 단백질을 분해하여 전체적인 재조합 단백질의 생산성을 저하하는 문제가 생긴다. 이를 해결하기 위해 *H. polymorpha*와 *P. pastoris*에서 여러 단백질 분해효소 결손 균주들이 개발되고 있는 데 일차적으로 효모 액포(vacuole)에 존재하는 분해효소들을 코딩하는 유전자들, *PEP4*, *PRB1*, 또는 *CPY* 유전자가 파쇄된 균주들이 제작되어 있다(Bae J. H. et al., unpublished result, 42). 최근에는 골지체(Golgi)에 존재하는 카복시펩티다아제 α 를 코딩하는 *KEX1* 유전자가 파쇄된 *kex1Δ* 균주가 개발되어 *H. polymorpha*의 경우 human epidermal growth factor의 C-말단 분해를 방지하는 데에 효과가 큼이 관찰되었다(J. H. Bae et al., unpublished result). *P. pastoris*의 경우에도 murine 및 human endostatin의 C-말단 분해가 *kex1Δ* 균주에서 상당히 감소됨이 보고되었다(43).

단백질 합성 후 수식(Post-translational modification)

효모 발현시스템이 박테리아 발현시스템에 비해 갖는 주된 장점은 진행 미생물로서 진행 고등 생물과 매우 유사한 단백질 분비기관을 갖추고 있어 분비서열의 절단, disulfide bond 형성, 당화과정(glycosylation) 등의 단백질 합성 후 수식(post-translational modification)을 통해 활성화된 단백질을 발현 분비시킬 수 있다는 것이다. 더구나 대부분의 효모는 평

상시 세포 밖으로 분비하는 단백질 수가 아주 적기 때문에 효모로부터 분비되는 재조합 단백질은 쉽게 회수되고 정제될 수 있는 장점도 있다. *H. polymorpha*와 *P. pastoris*도 세포 밖으로 매우 낮은 수준의 단백질을 분비하기 때문에 대체로 분비 발현된 재조합 단백질이 배지에 존재하는 전체 단백질 양의 90% 이상을 차지하게 된다.

분비 신호 서열(Secretion signal sequence)

이들 메탄올자화 효모에서 고등 진핵세포 유래의 단백질을 분비 생산하는 경우 외래 유전자 자체의 분비 신호 서열을 이용하거나 효모 유래의 분비 서열을 활용하고 있다. 일부 재조합 단백질들은 자체의 분비 서열로도 매우 효율적으로 효모에서 분비되지만 효모 유래의 분비서열을 이용해야만 되는 경우가 더 많다. 현재까지 가장 많이 상용되고 있는 효모 유래의 분비 신호 서열로는 *S. cerevisiae* α -factor prepro 서열이며, 이외에도 *S. cerevisiae* invertase, *Schwanniomyces occidentalis* glucoamylase, *Aspergillus niger* glucoamylase, *Kluyveromyces lactis* killer toxin, *Kluyveromyces marxianus* inulinase 등에서 유래된 분비서열이 사용되고 있다. 현재까지 *H. polymorpha* 또는 *P. pastoris* 자체 유전자 유래의 분비 서열로는 acid phosphatase (PHO1) 서열이 확보된 상태이다(25, 26). 분비 신호 서열들의 효율성은 각 재조합 단백질마다 달라서 어떤 단백질들의 분비에서는 매우 효과적이거나 다른 단백질들의 분비에는 전혀 적합하지 않는 경우가 있다. 이런 경우 때로는 아예 합성된 분비 신호 서열을 개발해야만 되는 경우도 있다(44, 45).

당화과정(Glycosylation)

의학적으로 중요한 인체 단백질의 상당수는 분비 과정 중에 당쇄(oligosaccharide)가 공유결합을 통해 부착되는 당단백질(glycoprotein)이다. 당단백질에 부착된 탄수화물의 구조와 종류가 단백질의 풀딩, 분비, 안정성, 혈장내 반감기 및 항체 유발성 등에 크게 영향을 미치므로 적합한 당화과정을 거친 재조합 단백질의 생산은 외래 숙주로부터 대량생산을 도모하는 생물공학 분야에서 하나의 관건으로 대두되었다. *S. cerevisiae*에서 발현되는 재조합 당단백질들의 경우 종종 핵심당쇄(core oligosaccharide)에 40 개 이상의 mannose가 부가적으로 첨가되는 과당화(hypermannosylation)와 인체에 항원으로 작용하는 α 1,3-linked terminal mannose 존재가 당단백질 생산을 위한 숙주로서의 큰 제한점으로 제기되었다(1). 이에 반해 대체로 메탄올자화 효모 *H. polymorpha*와 *P. pastoris*에서 발현 분비된 재조합 단백질들은 비록 본래의 단백질에 비해서는 과당화된 상태로 발현되지만 *S. cerevisiae*에서 발현된 재조합 단백질보다는 전체적인 만노즈 당외쇄(mannose outer chain)의 길이가 상당히 짧다(5, 6). 아직 *H. polymorpha*에서 발현된 당단백질들의 당쇄구조에 관한 연구는 거의 보고된 바가 없지만, *P. pastoris*에서 생산된 당단백질의 N-linked 당쇄에 대한 분석은 상당히 진행되어 있고 일부 재조합 단백질의 경우 mannose만으로 구성된 O-linked 당쇄가 부착됨이 밝혀졌다(46). 특히 *P. pastoris*에는 인체에서 면역성을 유발하는 α 1,3-linked terminal mannose가 존재하지 않는다는 점(47)에서 인체 의료용 단백질 생산 균주로서 전통

효모 *S. cerevisiae*보다 월등한 숙주 시스템으로 여겨지고 있다.

비록 효모의 소포체(ER)에서 형성된 당단백질의 핵심당쇄 부분은 모든 진핵세포에서 공통적으로 형성되는 생합성 중간체이지만, 그 후 골지체(Golgi)에서 이 중간체에 첨가되는 당외쇄(outer chain)은 고등 진핵세포에서 일어나는 당단백질 수식과는 큰 차이를 보이고 있다. 이와 같은 최종 당쇄구조의 근본적인 차이는 고등 생물, 특히 인체 유래의 당단백질을 의약품으로 개발하기 위한 발현 숙주로서 효모 시스템이 지난 가장 큰 취약점으로 지적되고 있다. 따라서 인체에서의 당단백질과 동일한 당쇄구조를 지닌 재조합 당단백질을 효모에서 생산하기 위한 노력의 일환으로 *S. cerevisiae*에서는 효모 특유의 당쇄 생합성 경로가 차단되고 그 대신에 고등생물 유래의 당쇄 생합성 관련 유전자가 도입된 효모 숙주를 개발하는 연구가 활발히 진행되고 있다(48). 이에 반해 아직은 메탄올자화 효모에서의 당화과정에 대한 연구는 아주 초기 단계이어서 당쇄생합성 경로 변경을 위한 균주 육종에 관한 시도는 *P. pastoris*에서 *Trichoderma* 유래의 α 1,2 mannosidase를 발현시킨 연구 사례(49)외에는 아직 거의 보고된 바가 없다.

퍼옥시솜 타겟팅(Sorting of heterologous proteins to peroxisome)

이들 메탄올자화 효모에서는 퍼옥시솜이 세포성장에 불필요한 배양조건에서도 막대한 퍼옥시솜의 증폭을 유도할 수 있어, 재조합 단백질의 저장소로 퍼옥시솜을 이용할 수 있는 잠재성이 매우 크다. 또한 재조합 단백질을 퍼옥시솜으로 타겟팅(targeting)하는 경우 단백질 분해효소에 의한 절단같이 원하지 않는 단백질 수식을 일으키는 효소들의 작용을 피할 수 있다는 이점도 있다. 특히 퍼옥시솜을 독성을 지닌 단백질을 격리시켜 보관하는 장소로 이용할 수 있으며, 막대한 부피의 퍼옥시솜 막(membrane)은 외래 막 단백질들의 대량 발현을 위한 가장 적합한 장소로 개발될 수 있는 가능성으로 인하여 퍼옥시솜 타겟팅에 대한 관심이 점차로 증가되고 있다(26,50). 외래 단백질을 퍼옥시솜으로 타겟팅하기 위해서는 퍼옥시솜 매트릭스(matrix) 단백질의 C-말단에 존재하는 PTS1(51)이나 N-말단에 존재하는 PTS2(52) 신호서열을 사용하게 된다. 반딧불의 luciferase에서 최초로 관찰된 PTS1 서열은 세 개의 아미노산 (-SLK-COOH)으로 구성되었는데, 그 후 연구결과들은 PTS1 서열에서 여러 아미노산 치환이 일어나도(예로써, -ARF, -NKL, -SLI 등) 퍼옥시솜 타겟팅 기능이 그대로 유지됨을 보여주었다(53). PTS1을 이용하면 상당한 양의 외래 단백질을 *H. polymorpha*의 퍼옥시솜에 축적시킬 수 있음이 보고된 바 있다(54, 55). (R/K)(L/V/D)X₅(H/Q)(L/A)로 구성된 PTS2 서열은 배양조건에 상관없이 작동되는 PTS1 서열과는 달리 amine이 주된 질소원으로 포함된 배지에서 배양된 경우에만 퍼옥시솜으로 타겟팅되는 특징이 있다(56).

고농도 배양(High cell density growth)

이들 메탄올자화 효모 *H. polymorpha*와 *P. pastoris*가 전통 효모 *S. cerevisiae*에 비해 갖는 여러 장점들 중의 하나는 fermentation 활성이 매우 낫다는 점이다. 높은 농도의 탄소원을 사용하는 고농도 배양시, *S. cerevisiae*의 경우는 많은 양의 에탄올이 부산물로 축적됨에 따라 숙주 성장과 더불어 재

조합 단백질의 생산성도 심각하게 저하되는 문제점이 있다. 그러나 respiratory growth에 대한 활성이 fermentation 활성보다 훨씬 강한 *H. polymorpha*와 *P. pastoris*의 경우는 에탄올에 의한 저해현상이 아주 적어 매우 높은 균체 생산율(cell yield: $Y_{x/s}$)를 보이므로 고농도 배양이 매우 용이하게 된다(57). 따라서 이들 메탄올 자화효모 발현 시스템의 내세울 만한 특징은 shake-flask로부터 high-density fermenter로의 scale-up이 매우 쉽다는 것인데, *P. pastoris*의 경우는 fed-batch 및 continuous culture에 대한 protocol이 이미 잘 확립되어 널리 보급되어 있다(58). 일반적으로, *AOX1* 프로모터를 이용하는 발현시스템의 경우, *P. pastoris*를 글리세롤이 탄소원으로 포함된 배지에서 일차적으로 배양하여 고농도의 균체를 축적한 후, 글리세롤이 고갈되는 시기부터 성장이 제한되는 속도로 글리세롤을 주입하는 transition phase를 시작하고 이후 점차로 발현 유도를 위해 메탄올과 글리세롤을 혼합하여 주입하는 two-carbon-source 방식이 사용되고 있다.

그러나 *P. pastoris*와는 달리 *H. polymorpha*의 경우는 메탄올 없이도 단지 글루코스가 고갈되거나 낮은 농도의 글리세롤이 있는 상태에서도 *MOX* 또는 *FMDH* 프로모터로부터 상당한 수준의 발현이 일어나므로 글루코스 또는 글리세롤만을 탄소원으로 이용하는 one-step-fermentation 방식으로도 매우 높은 발현 수준을 얻을 수 있다(59). 따라서 *H. polymorpha*에서는 메탄올에 의해 발현이 유도되는 프로모터를 이용한 발현시스템이라도 메탄올을 사용하지 않고도 외래 단백질의 발현을 균체 성장 후 배양 말기에 높은 수준으로 유도할 수 있다. 이와 같은 *H. polymorpha*에서의 독특한 메탄올 대사 조절기작은 메탄올을 발현 유도체로 이용할 때 발생하는 여러 문제점들 및 복잡한 발현 공정을 피할 수 있다는 점에서 *P. pastoris* 보다 상당히 실용적이다. *H. polymorpha*가 대형 발효조를 이용한 고농도 배양에서 갖는 또 하나의 장점은 다른 효모들보다 높은 온도(37-43°C vs. 30°C for *C. boidinii*, *P. pastoris*, and *S. cerevisiae*)에서도 왕성한 성장을 유지할 수 있어 대형 발효조의 cooling management 및 다른 미생물에 의한 오염 위험에 대한 부담이 한결 적다는 것이다.

결론

현재까지 매우 다양한 종류의 많은 외래 단백질들이 두 메탄올자화 효모 *H. polymorpha*와 *P. pastoris*에서 발현되었는데, 그 발현 수준은 대부분 발효조를 이용한 고농도 배양시 1 g/L 이상이었고 몇몇 재조합 단백질의 경우는 10 g/L 이상 생산되었다. 예로써 *P. pastoris*에서 14.8 g/L 정도의 재조합 gelatin이, *H. polymorpha*에서는 13.5 g/L 정도의 재조합 phytase의 분비·생산이 보고되어 이 두 발현시스템은 현재 이용 가능한 여러 진행세포 발현 시스템들 중에서 가장 강력한 시스템으로 부각되고 있다(59, 60). 또한 baculovirus나 *S. cerevisiae* 발현 시스템에서 성공적이지 못했던 재조합 단백질들이 종종 이들 메탄올자화 효모 발현 시스템에서는 높은 수준으로 발현되는 예들도 있어, *H. polymorpha*와 *P. pastoris* 발현 시스템은 단백질 발현을 위한 "toolbox"에서 매우 중요한 대체 시스템으로 자리잡고 있다.

*H. polymorpha*에서 초기에 생산된 재조합 단백질들의 일부

는 이미 임상실험을 통과하여 시장에 진출(예로써, Hepatitis B 백신)되거나 현재 제품 개발 단계에 있다(27). 한편 *P. pastoris*에서 생산된 재조합 단백질들 중에서도 IGF-1 (Brierley R. A., unpublished results), human serum albumin (61) 등은 임상실험 통과 후 최종 승인을 기다리고 있는 단계이어서 앞으로 이들 메탄올 자화효모 발현 시스템에서 생산되어 의약품으로 개발된 재조합 단백질들의 목록은 매우 빠른 속도로 길어질 것이다. 이들 메탄올 자화효모를 이용한 발현 시스템 개발에 관한 연구, 특히 단백질 합성 후 수식 과정에 관한 문제점들을 해결하여 보다 자연 형태에 가까운 재조합 단백질을 대량 발현하고자 하는 연구 개발이 지속적으로 진행됨에 따라 향후 이들 효모 발현 시스템은 고등 진핵세포 유래의 유용 단백질의 대량생산뿐만 아니라 신규 단백질들의 기능 및 구조분석에도 큰 일익을 담당할 것으로 기대된다.

REFERENCES

- Romanos, M. A., C. A. Scorer, and J. J. Clare (1992), Foreign gene expression in yeast: a Review. *Yeast* **8**, 423-488.
- Faber, K. N., W. Harder, G. AB, and M. Veenhuis (1995), Review; Methylo-trophic yeasts as factories for the production of foreign proteins. *Yeast* **11**, 1331-1344.
- Hollenberg, C. P. and G. Gellissen (1997), Production of recombinant proteins by methylo-trophic yeasts. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 554-560.
- Gellissen, G., C. P. Hollenberg, and Z. A. Janowicz (1995), Gene expression in methylo-trophic yeasts, Gene expression in recombinant microorganisms (Smith A. ed.), p. 195, Marcel Dekker, New York.
- Bretthauer, R. K. and F. Castellino (1999), Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30**, 193-200.
- Kang, H. A., J.-H. Sohn, E.-S. Choi, B.-H. Chung, M.-H. Yu, and S.-K. Rhee (1998), Glycosylation of human α -1-antitrypsin in *Saccharomyces cerevisiae* and methylo-trophic yeasts. *Yeast* **14**, 371-381.
- Wegner, G. (1990), Emerging applications of methylo-trophic yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**, 279-284.
- Veenhuis, M., J. P. van Dijken, S. A. Pilon, and W. Harder (1978), Development of crystalline peroxisomes in methanol-grown cells of the yeast *Hansenula polymorpha* and its relation to environmental conditions. *Arch. Microbiol.* **117**, 153-163.
- Roggenkamp, R. O., Z. A. Janowicz, B. Stanikowski, and C. P. Hollenberg (1984), Biosynthesis and regulation of peroxisomal methanol oxidase from the methylo-trophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Mol. Gen. Genet.* **194**, 489-493.
- Tschopp, J. F., P. F. Brust, J. M. Cregg, C. A. Stillman, and T. R. Gingeras (1987), Expression of the *LacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.* **15**, 3859-3876.
- Gleeson, M. A. and P. Sudbery (1988), Genetic analysis in the methylo-trophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **4**, 293-303.
- Cregg, J. M., S. Sehn, M. Johnson, and H. R. Waterham (1998), Classical genetic manipulation. *Methods Mol. Biol.* **103**, 17-26.

13. Gellissen, G., U. Weydemann, A. W. M. Strasser, M. Piontek, C. P. Hollenberg, and Z. A. Janowicz (1992), Progress in developing methylotrophic yeasts as expression system. *TIBTECH* **10**, 413-485.
14. Gatzke, R., U. Weydemann, Z. A. Janowicz, and C. P. Hollenberg (1995). Stable multicopy integration of vector sequences in *Hansenula polymorpha*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 844-849.
15. Gonzalez, C., G. Perdomo, P. Tejera, N. Brito, and J. M. Siverio (1999), One-step, PCR-mediated, gene disruption in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **15**, 1323-1329.
16. Janowicz, Z. A., K. Melber, A. Merckelbach, E. Jacobs, N. Harford, M. Comberbach, and C. P. Hollenberg (1991), Simultaneous expression of the S and L surface antigens of Hepatitis B, and formation of mixed particles in the methylotrophic yeast, *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **7**, 431-443/14.
17. Gellissen, G., M. Piontek, U. Dahlems, V. Jenzelewski, J. E. Gavagan, R. DiCosimo, D. L. Anton, and Z. A. Janowicz (1996), Recombinant *Hansenula polymorpha* as a biocatalyst: coexpression of the spinach glycolate oxidase (GO) and the *S. cerevisiae* catalase T (CTT1) gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 46-54.
18. Higgins, D. R. and J. M. Cregg (1998), *Pichia* Protocols. Human Press, Totowa, New Jersey.
19. Shen, S., G. Sulter, T. W. Jeffries, and J. M. Cregg (1998), A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **216**, 93-102.
20. Cox, H., D. Mead, P. Sudbery, R. M. Eland, I. Mannazzu, and L. Evans (2000), Constitutive expression of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* using the *PMA1* promoter. *Yeast* **16**, 1191-1203.
21. Waterham, H. R., M. E. Digan, P. J. Koutz, S. V. Lair, and J. M. Cregg (1997), Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* **186**, 37-44.
22. Brito, N., M. D. Perez, G. Perdomo, C. Gonzalez, P. Garcia-Lugo, and J. M. Siverio (1999), A set of *Hansenula polymorpha* integrative vectors to construct lacZ fusions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 23-29.
23. Phongdara, A., A. Merckelbach, P. Keup, G. Gellissen, and C. P. Hollenberg (1998), Cloning and characterization of the gene encoding a repressible acid phosphatase (*PHO1*) from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 77-84.
24. Sears, I. B., J. O'Connor, O. W. Rossanese, and B. S. Glick (1998), A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast* **14**, 783-790.
25. Cereghino, J. L. and J. M. Cregg (2000), Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Review.* **24**, 45-66.
26. van Dijk, R., K. N. Faber, A. K. W. Kiel, M. Veenhuis, and I. van der Klei (2000), The methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: a versatile cell factory. *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 793-800.
27. Gellissen, G. and K. Melber (1996), Methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* as production organism for recombinant pharmaceuticals. *Drug. Res.* **46**, 943-948.
28. Scorer, C. A., J. J. Clare, W. R. McCombie, M. A. Romanos, and K. Sreekrishna (1994), Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Biotechnology* **12**, 181-184.
29. Zureck, C., E. Kubis, P. Keup, D. Horlein, J. Beunink, J. Thommes, M.-R. Kula, C. P. Hollenberg, and G. Gellissen (1996), Production of two Aprotinin variants in *Hansenula polymorpha*. *Process Biochem.* **7**, 679-689.
30. Kang, H. A., W.-K. Hong, J.-H. Sohn, E.-S. Choi, and S. K. Rhee, (2001) Molecular characterization of the actin-encoding gene and the use of its promoter for a dominant selection system in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* in press
31. Wittrup, K. D., A. S. Robinson, R. N. Parekh, and K. J. Forrester (1994), Existence of an optimum expression level for secretion of foreign proteins in yeast. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **745**, 321-330.
32. Sohn, J.-H., E.-S. Choi, H. A. Kang, J.-S. Rhee, M. O. Agaphonov, M. D. Ter-Avanesyan, and S.-K. Rhee (1999), A dominant selection system designed for copy number-controlled gene integration in *Hansenula polymorpha* DL-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 800-807.
33. Veale, R. A., M. L. F. Giuseppin, H. M. J. van Eijk, P. E. Sudbery, and C. T. Verrips (1992), Development of a strain of *Hansenula polymorpha* for the efficient expression of guar α -galactosidase. *Yeast* **8**, 361-372.
34. Levine, D. W. and C. L. Cooney (1973), Isolation and characterization of a thermotolerant methanol-utilizing yeast. *Appl. Microbiol.* **26**, 982-990.
35. Sohn, J.-H., E.-S. Choi, C.-H. Kim, M. O. Agaphonov, M. D. Ter-Avanesyan, J.-S. Rhee, and S.-K. Rhee (1996), A novel autonomously replicating sequence(ARS) for multiple integration in the yeast *Hansenula polymorpha* DL-1. *J. Bacteriol.* **178**, 4420-4428.
36. Sohn, J.-H., E.-S. Choi, H. A. Kang, J.-S. Rhee, and S.-K. Rhee (1999), A family of telomere-associated autonomously replicating sequences and their functions in targeted recombination in *Hansenula polymorpha* DL-1. *J. Bacteriol.* **181**, 1005-1013.
37. Kang, H. A., J.-Y. Kim, S.-M. Ko, C. S. Park, D. Y. Ryu, J.-H. Sohn, E.-S. Choi, and S.-K. Rhee (1998), Cloning and characterization of the *Hansenula polymorpha* homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* *PMR1* gene. *Yeast* **14**, 1233-1240.
38. Cregg, J. M., J. F. Tschopp, C. Stillman, R. Siegel, M. Akong, W. S. Craig, R. G. Buckholtz, K. R. Madden, P. A. Kellaris, G. R. Davis, B. L. Smiley, J. Cruze, R. Torregrossa, G. Velicelebi, and G. P. Thill (1987), High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Biotechnology* **5**, 479-485.
39. Romanos M. A., J. J. Clare, K. M. Beesley, F. B. Rayment, S. T. Ballantine, A. J. Makoff, G. Dougan, N. F. Fairweather, and I. G. Charles (1991), Recombinant *Bordetella pertussis* pertactin (P69) from the yeast *Pichia pastoris*: High-level production and immunological properties. *Vaccine* **9**, 901-906.
40. Agaphonov, M. O., M. Y. Beburow, M. D. Ter-avaniesyan, and V. N. Smirnov (1995), A disruption-replacement approach for the targeted integration of foreign genes. *Yeast* **11**, 1241-1247.
41. Chiruvolu, V., J. M. Cregg, and M. M. Meagher (1997) Recombinant protein production in an alcohol oxidase-

- defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations. *Enzyme Microb. Technol.* **21**, 277-283.
42. Gleeson, M. A. G., C. E. White, D. O. Meininger, and E. A. Komives (1998), Generation of protease-deficient strains and their use in heterologous protein expression. *Methods Mol. Biol.* **103**, 81-94.
 43. Boehm, T., S. Pirie-Shepard, L. B. Trinh, J. Shiloach, and J. Folkman (1999), Disruption of the *KEX1* gene in *Pichia pastoris* allows expression of full-length murine and human endostatin. *Yeast* **15**, 563-567.
 44. Martinex-Ruiz, A., A. Martinez del Pozo, J. Lacadeba, J. M. Mancheno, M. Onaderra, C. Lopez-Otin, and J. G. Gavilanes (1998), Secretion of recombinant pro-and mature fungal α -sarcin ribotoxin by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: the Lys-Arg motif is required for maturation. *Protein Expr. Purif.* **12**, 315-322.
 45. Kjeldsen, T., A. F. Pettersson, and M. Hach (1999), Secretary expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **29**, 79-86.
 46. Duman, J. G., R. G. Miele, H. Liang, C. K. Grella, and K. L. Sim (1998) O-mannosylation of *Pichia pastoris* cellular and recombinant proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **28**, 39-45.
 47. Montesino, R., R. Garcia, O. Quintero, and J. A. Cremata (1998), Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **14**, 197-207.
 48. Roy, S. K., Y. Chiba, and Y. Jigami (2000), Production of therapeutic glycoproteins through the engineering of glycosylation pathway in yeast. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **5**, 219-226.
 49. Martinet, W., M. Maras, X. Saelens, W. M. Jou, and R. Contreras (1998), Modification of the protein glycosylation pathway in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* **20**, 1171-1177.
 50. Veenhuis, M. A., M. Kram, W. H. Kunau, W. Harder (1990), Excessive membrane development following exposure of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* to oleic acid-containing media. *Yeast* **6**, 511-519.
 51. Rachubinski, R. A. and S. Subramani (1995), How proteins penetrate peroxisomes. *Cell* **83**, 525-528.
 52. Subramani, S. (1996), Convergence of model systems for peroxisome biogenesis. *Curr. Opin. Cell.* **8**, 513-518.
 53. Elgersma Y., A. Vos, M. van den Berg, C. W. van Roermund, P. van der Sliujs, B. Distel, and H. F. Tabak (1996), Analysis of the carboxyl-terminal peroxisomal targeting signal I in a homologous context in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**, 26375-26382.
 54. Hansen, H., T. Didion, A. Thiemann, M. Veenhuis, and R. Roggenkamp (1992), Targeting sequences of the two major peroxisomal proteins in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Mol. Gen. Genet.* **235**, 269-278.
 55. Faber, K. N., S. Westra, H. R. Waterham, I. Keizer-Gunnink, W. Harder, G. AB, and M. Veenhuis (1996), Foreign gene expression in *Hansenula polymorpha*. A system for the synthesis of small functional peptides. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **45**, 72-79.
 56. Faber, K. N., P. Haima, C. Gietl, W. Harder, G. AB, and M. Vennhuis (1994), The methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* contains an inducible import pathway for peroxisomal matrix proteins with an N-terminal targeting signal (PTS2 proteins). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12985-12989.
 57. Chiruvolu, V., K. Eskridge, J. Cregg, and M. Meagher (1998), Effect of glycerol concentration and pH on growth of recombinant *Pichia pastoris* yeast. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **75**, 163-173.
 58. Stratton J., V. Chiruvolu, and M. Meagher (1998), High cell-density fermentation. *Methods Mol. Biol.* **103**, 107-120.
 59. Mayer, A. F., K. Hellmuth, H. Schlieker, R. Lopez-Ulibarri, S. Oertel, U. Dahlems, A. W. M. Strasser, and A. P. G. M. van Loon (1999), An expression system matures: A highly efficient and cost-effective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 373-381.
 60. Werten, M. W., T. J. van den Bosch, R. D. Wind, H. Mooibroek, and F. A. de Wolf (1999), High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*, *Yeast* **15**, 1087-1096.
 61. Ohtani, W., Y. Nawa, K. Takeshima, H. Kamuro, K. Kobayashi, and T. Ohmura (1998), Physicochemical and immunochemical properties of recombinant human serum albumin from *Pichia pastoris*. *Anal. Biochem.* **256**, 56-62.