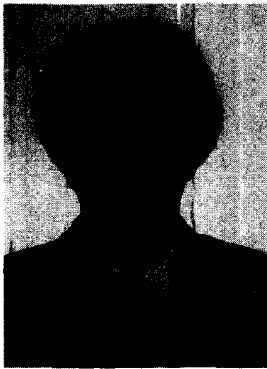


# Aspergillus 속의 유전자 해석 및 이종단백질의 생산



이 상 필

〈산업기술정보원 생명과학부 책임연구원〉

## I. 서 론

곰팡이는 균사에 의해 생육하기 때문에 사상균이라고 불려지고 있고 집합균류, 자낭균류 및 불완전균류의 일부가 포함되어 있으며 *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Penicillium*, *Aspergillus* 등이 잘 알려져 있다. 이들 곰팡이류는 지구상에 존재하는 여러가지 물질을 분해하고 영양원으로 섭취하여 생육하는 화학합성 종속영양 생물이기 때문에 많은 효소를 생산한다. 인류는 장구한 역사에 걸쳐서 안전한 곰팡이를 선택하고 이 곰팡이가 생산해 내는 효소를 이용하여 술, 된장, 치즈 등과 같은 발효식품을 만들어 왔기 때문에 풍요로운 음식문화를 향유할 수 있었다.

1970년부터 급속히 발전한 유전자재조합기술은 근간으로 한 생명공학의 목표는 여러가지 효소, 호르몬 등과 같은 유용 단백질을 유전자재조합체에서 대량으로 생산하는 것이었다. 이러한 목표의 달성을 위하여 현재 대장균, 고초균 등의 세균, 효모 또는 동물세포 등을 숙주로 이용한 이종단백질 생산계가 개발되어 있고 이들 중에는 인슐린, 인터페론, 에리스로포에틴 등과 같이 이미 상업화 규모로 생산되어 시판되고 있는 것이 적지 않다. 특히 대장균이나 효모와 같은 미생물은 취급하기에 간편하고 공업적 생산에도 적합한 것으로 여겨지고 있다. 그러나 대장균에서는 이종단백질이 대량 발현되었을 경우 균체 내에 불용성 인클루전 바디(inclusion body)가 형성되며 진핵생물의 단백질에 특징적인 당쇄가 부가되는 등의 유전자 번역후의 수식이 일어나지 않아 생리활성을 가지는 단백질을 얻기 어렵다. 또한, 효모에서는 당쇄의 부가가 일어나지만 단백질 생산량에 한계가 있다는 문제점을 안고 있다.

이러한 관점에서 대장균이나 효모를 대신하는 미생물로서 곰팡이를 숙주로 사용한 이종단백질의 분비 생산이 최근에 주목을 모으고 있다. 특

### ■ 目 次 ■

- I. 서론
- II. *Aspergillus* 속의 분류
- III. *Aspergillus* 속의 유전자 해석
- IV. *Aspergillus* 속에 있어서 유전공학의 응용
- V. 결론

히, *Aspergillus*속의 곰팡이는 예로부터 양조나 식품제조에 이용되어 왔었기 때문에 이중단백질의 생산 숙주로서 안전하다고 생각되어지고 있다.

그래서 본문에서는 먼저 *Aspergillus*속의 분류에 대해 살펴본 후, 분자생물학적 해석, 균주·육종과 *Aspergillus*속 곰팡이를 숙주로 이용한 이중단백질의 생산 실례에 대해 알아 보았다.

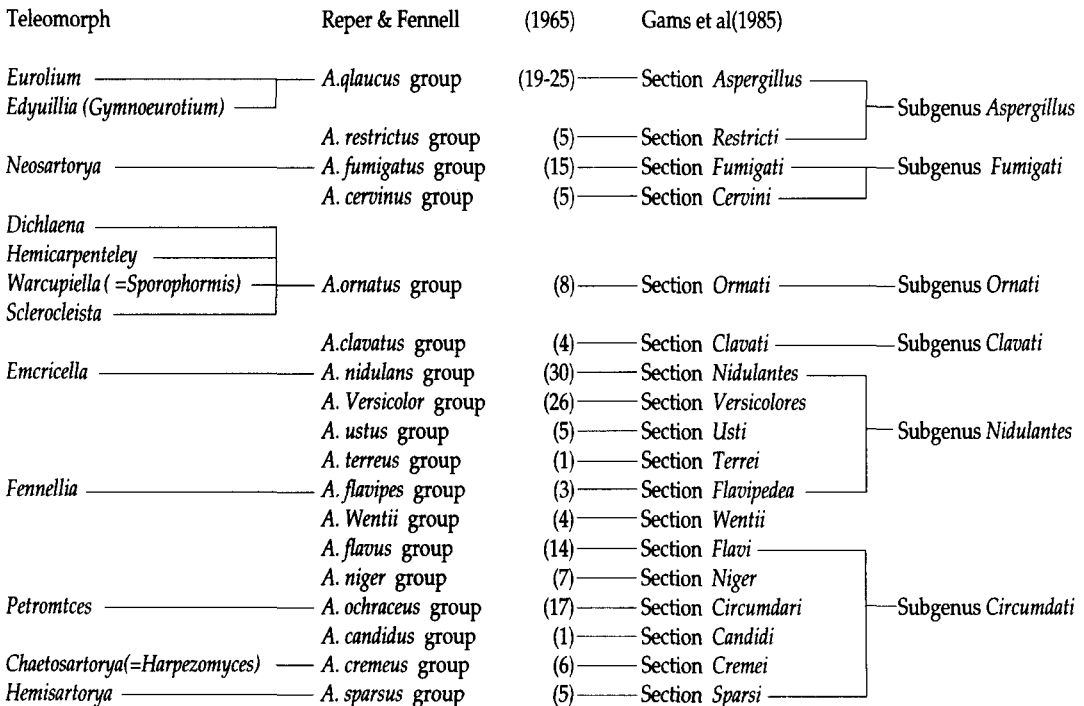
## II. *Aspergillus* 속의 분류

*Aspergillus*속의 분류는 지금까지 형태학적 관찰(분생자 머리 부분의 색깔·형태, 정낭의 형태 등)을 기준으로 실시되고 있는데 1965년에 Raper와 Fennell이 정리한 분류체계가 지금도 광범위하게 사용되고 있다. 그러나 Raper와

Fennell의 분류체계인 “그룹(Group)”은 국제식물명명규약에 일치하지 않기 때문에 네덜란드의 Gams 등에 의해 “아속-절(Subgenus-section)” 시스템이 제안되었다. Raper와 Fennell, Gams 등이 제안한 *Aspergillus*속의 분류체계 및 본속에 관련된 다른 속들과의 상호관계를 정리하면 [그림 1]과 같다.

*Aspergillus oryzae*는 우리나라, 일본, 중국 등의 대표적인 발효식품인 술, 된장, 장유등의 제조에 널리 이용되어 온 중요한 균주이다. *A. oryzae*는 강력한 발암성 물질인 아플라톡신 생산균인 *A. flavus*와 매우 가까운 균주이기 때문에 *A. oryzae*의 분류·동정은 매우 중요한 문제이다. 최근, 세균이나 효모에서 유효성이 실증되고 있는 화학분류학적 방법이 도입되어 분류체계의 재구축이 시도되고 있다.

[그림 1] *Aspergillus* 속의 분류체계



\* 균주명 뒤의 ( )는 균주 종류의 숫자임.

### III. *Aspergillus* 속의 유전자 해석

*Aspergillus nidulans*에 관한 유전학적 연구는 1980년 경부터 시작되었는데 이미 클로닝되어 염기서열까지 결정되어 있는 유전자만 하더라도 약 60종에 달해 *Aspergillus*속 중에서 유전학적 연구가 가장 진전되어 있는 균주라고 할 수 있다. 한편 공업적으로 중요한 누룩균인 *A. awamori*나 *A. niger*(지금까지 이 2균주는 분류학적으로 다른 것으로 여겨져 왔으나 최근의 유전자 해석에 의해 유전자의 상동성이 아주 높은 것으로 밝혀짐에 따라 동일한 종류도 간주하는 연구자가 늘고 있다.)로부터 1984년 글루코아밀라제 유전자가 클로닝되었다.

*A. niger*에 관해서는 유럽지역을 중심으로 산업상 중요한 비중을 차지하는 효소의 유전자들

약 30여종이 클로닝되어 현재 유전자 해석이 활발하게 진행되고 있다. (<표1>)

청주나 장유의 제조에 이용되고 있는 *A. oryzae*에 대해서는 1989년 알파 아밀라제 유전자가 일본, 독일, 캐나다의 연구진들이 각각 클로닝하여 염기서열을 결정하였다. 그리고 소주의 제조에는 *A. Kawachii* 및 *A. shirousamii*가 사용되고 있는데 이들로부터 글루코아밀라제, 알파 아밀라제, 키실라나제 등의 유전자가 클로닝되어 있다. 여기서는 현재 가장 많은 연구가 이루어지고 있는 *A. oryzae* 유래의 알파 아밀라제, 글루코아밀라제와 청주의 향미에 중요한 작용을 하는 것으로 여겨지는 제3의 아밀라제인 알파 글루코시다제의 유전자 해석에 대해 알아보았다.

<표 1> *Aspergillus niger*로부터 클로닝되어 염기서열이 결정된 주요 유전자 (1984~1993년)

효 소 (유전자명)	년 도 (국 가)
글루코아밀라제( <i>gla A</i> )	1984 (덴마크)
산성 포스퍼타제( <i>pac A</i> )	1988 (캐나다, 영국)
알데하이드 디하이드로게나제( <i>ald A</i> )	1989 (오스트랄리아)
알파 아밀라제( <i>amy A, amy B</i> )	1990 (미 국)
산성프로테아제( <i>pep A</i> )	1990 (미 국)
펙틴 리아제( <i>pel A</i> )	1990 (네덜란드)
펙틴 메틸 에스테라제( <i>pme A</i> )	1991 (독 일)
알파 갈락토시다제( <i>agl A</i> )	1992 (네덜란드)
피루빈산 키나제( <i>pki A</i> )	1992 (네덜란드)
카타라제( <i>cat R</i> )	1993 (미국, 필란드)
피타제( <i>phy A</i> )	1993 (네덜란드)
세린프로테아제( <i>pep C</i> )	1993 (스위스)
인베르타제( <i>suc I</i> )	1993 (프랑스, 영국)





한편, 글루코아밀라제를 코드하고 있는 CDNA를 분리하여 효모 발현용 벡터에 연결한 후, 효모에 형질전환시킨 결과, 형질전환주는 생전분 분해활성이 있는 글루코아밀라제를 생산하였다. 이 연구결과로부터 *A. oryzae* 유래의 글루코아밀라제가 생전분 분해활성이 매우 약한 것은 유전자 자체가 다른 것이 아니라 생산된 효소 단백질이 프로테아제 등의 프로세싱을 받아 생전분 분해활성이 없어지기 때문인 것으로 추정할 수 있다. [그림 3]에서 2개의 유전자를 비교해 보면 활성 도메인과 C말단 도메인을 연결하고 스키페온과 세린을 많이 가지고 있는 영역(TS 영역이라고 부른다.)의 29개 아미노산이 *A. oryzae*에서 거의 결실되어 있으므로 이 영역이 어떤 역할을 하고 있는 것으로 생각할 수도 있다.

### 3. 알파 글루코시다제

사상균 등의 곰팡이에서는 상기 2종류의 아밀라제 외에 알파 글루코시다제를 가지고 있다는 것이 밝혀졌다. *A. niger* 등에서는 이 효소의 활성이 높고 *Rhizopus delemar*에서는 거의 활성이 검출되지 않으며 그리고 *A. oryzae* 유래의 것은 중간 정도의 활성을 가지는 것으로 보고되고 있다. 청주양조에 있어서 알파 글루코시다제의 역할은 당전이 활성화에 의해 이소말토스 등의 비발효성 올리고당이나 알파 에틸글루코사이드를 생성시키는 것으로 알려져 있다.

*A. oryzae*로부터 클로닝한 알파 글루코시다제 유전자의 구조해석 결과, 3개의 인트론을 가지고 있고 985개의 아미노산을 코드하고 있었으며 *A. niger* 유래의 것과는 약 78%의 아미노산 상동성을 나타내었다. 제3의 아밀라제라고 일컬어지는 알파 글루코시다제는 청주의 향미 생성에 상당히 중요한 역할을 하고 있는 것으로 추측되고 있어 앞으로 구체적인 연구가 기대된다.

## IV. *Aspergillus*속에 있어서 유전공학의 응용

### 1. 유전자재조합에 의한 *Aspergillus oryzae*의 육종

청주 제조에 사용되는 코오지에서는 글루코아밀라제의 활성이 높은 것이 좋다. 클로닝한 글루코아밀라제 유전자(*gla A*)를 *A. oryzae* 도입용 벡터에 연결시켜 *A. oryzae*에 도입한 형질전환주에서는 원래의 균주에 비해 글루코아밀라제의 활성이 약 7배 정도 증가한 반면 알파 아밀라제의 활성은 오히려 30% 정도가 감소하였다. 이 실험은 전분 3%를 함유한 액체배지에서 30°C, 3일간 진탕배양시킨 결과이다. 유전자조작에 의한 효소활성의 증가는 액체배양에서는 명확하게 구별해 낼 수 있지만 고체배양인 실제의 제국단계에서는 만족할 만한 결과가 얻어지지 않는 경우가 많다. 이것은 유전학적인 측면 이외의 요인에 의해 제어되기 때문인 것으로 추측되고 있다.

청주의 양조에 있어서 유용한 균주의 성질로서는 아밀라제의 활성은 강하고 프로테아제의 활성은 약한 것이 좋으나 장유의 양조에 있어서는 증미성분인 아미노산의 함량을 높일 필요가 있기 때문에 반대로 프로테아제의 활성이 강한 것이 좋다. 현재 청주 제조시 사용되는 *A. oryzae*로부터 산성 프로테아제 유전자를 클로닝하여 유전자 구조 등에 대한 해석을 시도하고 있다. 클로닝된 유전자를 사용하여 그 유전자를 파괴하는 방법이 효모에서 개발되어 최근에는 *A. oryzae*에서도 응용되고 있다. 즉 산성 프로테아제의 유전자를 파괴함으로써 프로테아제 활성이 저하된 청주용 *A. oryzae*를 육종시키는 것이 가능하다.

이처럼 불필요한 유전자 산물을 제거하기 위해 유전자를 파괴하는 수법은 앞으로 광범위하게 사용될 것으로 전망된다.

## 2. *A. oryzae* 유래의 아밀라제를 생산하는 청주효모의 육종

청주의 양조공정은 수증기로 찢 쌀의 전분을 *A. oryzae*의 아밀라제로 당화시키고 당화과정에서 생성된 글루코스를 청주효모가 에탄올로 변환시키는 공정이라고 할 수 있다. 2종류의 미생물이 필요한 가장 큰 이유는 청주효모가 전분을 글루코스로 직접 분해할 수 없기 때문이다. 그래서 *A. oryzae*의 알파 아밀라제나 글루코아밀라제를 코딩하는 CDAN를 분리하여 청주효모에 도입시키면 *A. oryzae* 유래의 효소를 생산할 수 있는 효모를 육종할 수 있게 된다. 현재 수증기로 찢 쌀을 가지고 육종시킨 청주효모로 직접 발효시키는 것은 실험실 수준에서 가능하지만 발효 생산량이나 *A. oryzae*가 생산하는 다른 효소의 작용 등과 같은 제약이 있어 유전자재조합에 의해 육종시킨 청주효모만으로 청주를 생산한다는 것은 곤란하다.

## 3. *Aspergillus* 속 곰팡이를 숙주로 이용한 이종단백질의 분비생산

지금까지 보고된 *Aspergillus* 속 곰팡이에서의 이종단백질 분비생산례를 정리하면 <표 2>, <표 3>과 같다. <표 2>는 이종의 곰팡이 유래 단백질의 분비생산례이고 <표 3>은 식물 또는 고등동물 유래 단백질의 분비생산례이다.

연구초기에는 숙주·벡터 시스템이 갖추어져 있고 유전학적 정보가 많은 *A. nidulans*를 사용해 이종단백질의 분비생산을 시도하여 *Aspergillus*속 곰팡이를 숙주로 사용한 경우에도 활성이 있는 단백질을 균체외로 분비생산할 수 있다는 것을 입증하였다. 그러나 그 생산량은 일반적으로 낮아 공업적 규모의 생산과는 상당한 거리가 있었다. 이후에 분비 생산량의 개량이라는 실용적인 관점에서 *A. niger*나 *A. oryzae*를 숙주로 이용한 이종단백질의 생산이 시도되고 있다.

<표 2> *Aspergillus* 속에서 분비생된 곰팡이 유래의 이종단백질

숙 주	이 종 단백질 ( 유 래 )	수 량
<i>A. nidulans</i>	레 닌( <i>Mucor miehei</i> ) 글루코아밀라제( <i>A. niger</i> )	불 명 30mg/ l
<i>A. niger</i> ( <i>A. awamori</i> )	레 닌( <i>Mucor miehei</i> ) 리파제( <i>Mucor miehei</i> ) 세로비오하이드로라제( <i>Trichoderma reesei</i> ) 피타제( <i>A. ficuum</i> )	불 명 불 명 50mg/ l 2.8mg/ l
<i>A. oryzae</i>	레 닌( <i>Mucor miehei</i> ) 리파제( <i>Mucor miehei</i> ) 리파제( <i>Humicola lanuginosus</i> )	3.3g/ l 2 mg/ l 불 명

〈표 3〉 *Aspergillus* 속에서 분비생산된 고등생물 유래의 이종단백질

숙 주	이 종 단백질 ( 유 래 )	수 량
<i>A. nidulans</i>	TPA(인간)	1mg/ l
	인터페론 - $\alpha 2$ (인간)	"
	콜로니자극인자(인간)	"
	$\alpha 1$ - 안티트립신 (인간)	"
	인터루킨 - 6 (인간)	25 $\mu$ g-50mg/ l
	상피세포 증식인자 (인간)	2mg/ l
	성장호르몬(인간) 키모신(소)	" 2.5mg/ l
<i>A. niger</i> ( <i>A. awamori</i> )	키모신(소)	15mg-1.5g/ l
	라이소자임(닭)	12mg-1g/ l
	포스포리파제- A <sub>2</sub> (돼지)	10mg/ l
<i>A. oryzae</i>	소마틴 (식물)	50 $\mu$ g/ l
	락토페린 (인간)	25mg/ l
	키모신(소)	10mg/ l
	라이소자임(인간)	1mg/ l

### (1) 곰팡이 유래 단백질의 분비생산

곰팡이 유래의 효소 유전자를 *Aspergillus*에 도입한 경우에 분비 생산되는 양은 비교적 많아 *Aspergillus* 자신이 분비생산하는 효소와 거의 같은 수준의 생산량을 기대할 수 있다.

예를 들면 치즈제조에 이용되는 송아지 키모신의 대체 효소인 *Mucor* (*Rhizomucor*) *miehei* 유래의 아스팔틱 프로테아제(무코 레닌) 유전자를 *A. oryzae*에 도입하여 *A. oryzae*의 알파 아밀라제 유전자의 프로모터 지배하에서 발현시켰을 경우, 배양액 1 l 당 33g의 무코 레닌이 균체외로 분비생산되었다. 또한, *A. oryzae*를 숙주로 사용하여 *Humicola lanuginosus*의 리파제를 대량생산시키는 것이 가능하며 유전자재조합체에서 생산된 이 효소는 현재 세제용 효소로서 사용되고 있다. 그리고 최근에는 *A. niger*를 숙주로 이용한 *A. ficuum*의 피타제 생산도 이미 실용화되어 사료중에 함유되어 있는 인성

분을 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 추측된다.

이처럼 *Aspergillus*를 숙주로 이용하여 각종 곰팡이 유래의 유용 효소들을 대량으로 분비생산시킬 수 있는 길이 열렸으므로 앞으로 여러가지 효소들에 대해서도 이 방법의 적용이 검토되면 유전자재조합체에 의한 공업적 생산이 활기를 띠 것으로 예상된다.

### (2) 고등생물 유래 단백질의 분비생산과 생산성 개량

곰팡이 유래 단백질의 분비생산은 비교적 용이하지만 고등생물 유래의 단백질을 대량생산시킨 예는 적고 대부분 배양액 1 l 당 수mg 정도의 생산량에 불과하다. 특히, 고등생물 유래의 유용 단백질을 유전자재조합체에 의해 대량생산시킨다는 것은 경제성이나 이익면에 있어서 중요하다.



### ① 이종단백질 유전자의 전사·번역 효율

*Aspergillus*에 의한 이종단백질의 대량 분비 생산을 위해서는 먼저 이종단백질의 유전자가 숙주세포내에서 효율적으로 전사, 번역되어야 하며 생산된 이종단백질은 안정적이고 효율적으로 균체외로 분비되어야 한다. 통상적으로 이종단백질을 대량발현시키기 위해서는 숙주내에서 강력하게 작용할 수 있는 프로모터가 필요한데 *Aspergillus*에서는 자신의 균체내에서 강력하게 발현하는 해당계의 효소 유전자의 프로모터와 전분 등에 의해서 강하게 유도 발현되는 아밀라제 계통 유전자의 프로모터가 이용되고 있다. 이상과 같은 프로모터의 지배하에서 고등생물 유래의 유전자를 발현시킨 경우에 발현량은 그 프로모터가 가진 본래의 유전자와 거의 동등하거나 많고 또한 전사산물도 안정하다는 것이 노던블로팅(Northern blotting)에 의해서 입증되었으며 전사 수준에서는 충분한 양이 발현되고 있는 것으로 추정된다. 한편 고등생물 유래의 것은 아니지만 대장균의 베타 갈락토시다제 등의 유전자를 발현시킨 경우에는 균체내 단백질의 10~25%까지 분비생산될 수 있는 것이 확인되어 번역 수준에서도 효율적으로 이종단백질을 합성할 수 있다는 것이 규명되었다.

### ② 숙주 프로테아제에 의한 이종단백질 분해의 억제

앞에서 서술한 바와 같이 이종단백질의 전사, 번역 단계에서는 문제가 없기 때문에 단백질이 번역되어 분비된 후에 문제가 있다고 추측할 수 있다. 먼저 하나의 가능성으로는 이종단백질이 분비되는 과정 또는 배지 중에서 숙주 유래의 프로테아제에 의해 분해될 경우를 생각해 볼 수 있다. 예를 들면 *A. niger*에서 닭의 라이소자임을 분비생산시킨 경우, 영양원이 풍부한 배지에서는 배양시간이 길어질수록 생산물의 회수량이 감소하고 배양후의 배양액과 라이소자임을 혼합

해 두는 것만으로도 분해가 진행된다는 것을 확인할 수 있었다.

그리고 프로테아제가 생사되기 어려운 배지로 바꾸거나 배지에 프로테아제 저해제를 첨가함으로써 이종단백질의 분해를 막을 수 있었으므로 숙주에서 생산되는 프로테아제의 영향이 큰 것으로 추측된다.

이와 같이 프로테아제에 의해 분해되는 문제를 해결하기 위해 미국의 제넨코 (Genencor) 그룹은 *Aspergillus*에서 생산되는 주요 프로테아제인 산성 프로테아제(aspergillopepsin)의 결손주를 유전자 파괴에 의해 획득하였다. 이 결손주를 숙주로 사용하여 송아지 유래 키모신을 생산시킨 경우에는 생산된 키모신의 분해가 억제되어 생산량이 대폭 증가하였다. 그러나 단백질의 종류에 따라서 산성 프로테아제 결손주에서도 분해가 억제되지 않는 것도 있어 네덜란드의 TNO 그룹에서는 일반적인 변이처리 수법인 NTG 처리로 *A. niger*의 균체의 프로테아제 활성이 극단적으로 저하되는 변이주를 획득하였다. 이 변이주는 아스퍼질로펩신(Aspergillopepsin)을 비롯하여 중성 프로테아제 등의 각종 프로테아제 활성이 검출되지 않았다. 이 변이주를 숙주로 사용한 경우에 2~3주에 걸친 장기간의 배양에도 불구하고 생산된 이종단백질의 분해가 현저하게 억제되어 생산량이 비약적으로 향상되었다.

## V. 결 론

최근 눈부신 유전자조작기술의 진보에 의해 곰팡이 유래의 효소 유전자들이 연이어 클로닝되고 그 유전자의 구조 및 효소의 일차구조가 해명되어 단백질공학을 이용하여 효소의 성질을 개변시키는 것도 가능하게 되었다. 또한 X선구조해석에 의해 입체구조의 해석이 진행되어 지금까지 잘 알지 못했던 효소의 기질 결합부위의

구조와 기질 특이성과의 관계 및 촉매기구에 대해서도 서서히 해명되고 있다. 그러나 *Aspergillus*속을 비롯한 곰팡이는 다종다양한 효소를 생산하고 있는데 현재는 극히 일부 분만이 알려져 있다. 지금부터 *Aspergillus*속을 중심으로 곰팡이 유래의 효소에 대해서도 해석이 진행되면 효소의 구조와 기능의 관계가 보다 명확하게 되고 새로운 기능을 가진 유용한 효소들이 속속 개발될 것으로 기대된다.

### 【 참고 문헌 】

1. Verdoes, J. C. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 43(2), pp. 195~205, 1995
  2. 森明彦, 食品工業, 38(8), pp. 51-64, 1995.
  3. 和九豊, 日本醸造協會誌, 90(2), pp 111-120, 1995.
  4. 五味勝せ, 化學と生物, 32(4), pp. 269-275, 1994.
  5. 竹内道雄, 化學と生物, 32(3), pp 195-202, 1994.
  6. 比本勝ひこ, 食品工業, 37(2), pp 22-28, 1994.
  7. 五味勝せ, バイオサイエンスとインダストリー, 51(7), pp 568-571, 1993
1. Verdoes, J. C. et al., Appl. Microbiol.

矜高倨傲, 無非客氣, 降伏得客氣下, 而後正氣伸. 情欲意識, 盡屬妄心, 消殺得妄心盡, 而後真心現

뽐냄과 오만은 헛된 기운 아닌 것이 없다. 이 헛된 기운을 항복받아 물리친 뒤에라야 참된 기운이 자라난다. 욕망과 의식은 모두 헛된 마음이다. 이 헛된 마음을 소멸하여 다 없앤 뒤에라야 참된 마음이 나타나는 것이다.

- 菜根譚중에서 -