

GAL promoter에 적합한 효모변이주 Y334의 회분식 배양에서의 재조합 단백질 발현특성

†강 환 구 · ¹이 문 원 · ²전 희 진

한남대학교 공과대학 화학공학과, ¹(주)셀 바이오 테크 발효팀

²(주)한국신약 자광연구소 발효연구실

(접수 : 1999. 6. 18., 게재승인 : 1999. 8. 5.)

The Study on Recombinant Protein Production using *S. cerevisiae* Mutant Y334 Suitable for GAL Promoter

Whankoo Kang[†], Moonwon Lee¹, and Heejin Chun²

Department of Chemical Engineering, Hannam University, Taejon 306-791, Korea

¹Fermentation team, Cell Biotech Co., Ltd., Kyongki-Do, Korea,

²Ja Kwang Research Institute., Han Kook Sin Yak Pharm. Co., Ltd., Choongnam, Korea

(Received : 1999. 6. 18., Accepted : 1999. 8. 5.)

S. cerevisiae mutant(reg1-501, gal1), which cannot use galactose and has alleviated glucose repression level, is used as host for optimizing induction of GAL promoter. The optimum concentration of galactose as inducer for recombinant protein production and the galactose consumption rate have been tested with *S. cerevisiae* mutant and compared with conventional *S. cerevisiae*. The extent of glucose repression were investigated for both strain and the degradation pattern of produced foreign protein have been compared in both cases. The effect of pH on foreign protein degradation pattern were studied for both strains. The secretion efficiency of both strains were carried out. Through these experiments, optimum condition of recombinant protein production by GAL promoter using *S. cerevisiae* mutant (reg1-501, gal1) were found.

Key Words : *S. cerevisiae* mutant, GAL promoter, recombinant protein production

서 론

현재 유전자재조합 단백질 생산을 위해 주로 쓰이고 있는 host로는 *E. coli*와 *S. cerevisiae* 등의 yeast 그리고 동물세포인 CHO cell 등이 있으며 이들 중 Yeast는 *E. coli*와 비교하여 몇 가지 장점을 가지고 있다(1). Yeast는 *E. coli*와 달리 유전적으로 고등생물과 동일한 진핵세포로서 고등 생물 유래의 유전자와 전사 및 번역 시스템이 유사하고, splicing을 통한 intron의 제거가 가능하며 고등 동물의 골지체와 유사한 분비기관을 갖추고 있어서 번역후 수식(post-translational modification)을 통해 활성화된 단백질을 생산, 분비시킬 수 있다. 또한 yeast는 *E. coli*에 비해(2) 유전자 재조합 단백질을 더 효율적으로 세포 밖으로 분비 생산하여 이 단백질의 분리 정제에 도움을 줄 수 있고, yeast에서 단백질을 생산할 때에는 의약품 단백질의 경우에 꼭 제거되어야만 하는 Endotoxin 등이 *E. coli*와는 다르게 문제가 되지 않는 장점을 가지고 있다.

*S. cerevisiae*에 이용되어지는 promoter는(3) 여러 가지가 있는데(4,5,6,7,8) 그 중 보편적으로 이용되는 GAL promoter는 글루코스가 고갈된 상태에서 갈락토스에 의해 induction되어지는 유도성(inducible) 프로모터로서 균체증식과 유전자 발현을 분리하여 조절하여 높은 발현율을 가지는 regulated promoter이나 이를 사용하는 경우는 다음과 같은 문제점이 있는 것으로 보고된다(9). 첫째, GAL promoter는 글루코스가 완전히 고갈된 상태에서 갈락토스에 의해 induction 되어지므로(10,11) 갈락토즈만의 존재 하에서는 균주의 성장이 둔화되어지며 또한 글루코즈가 완전히 고갈되어야하므로, *S. cerevisiae*의 여러 protease가 글루코스에 의해 repression되는 점을 감안할 때 이러한 글루코즈 고갈 조건에서 protease에 의한 생성 단백질 분해 문제가 발생하게 되어진다. 둘째, GAL promoter의 inducer인 갈락토즈는 매우 비싼 탄소원인데 일반적으로 GAL promoter에 이용하는 *S. cerevisiae*는 갈락토즈를 이용하게 되어 배지원가 상승이 불가피하게 되어지며 이렇게 발효중에 탄소원으로 이용되어 낮아지는 갈락토즈 level은 낮은 발현율을 유발하게 되어지므로 저부가 가치 대량생산을 요하는 재조합 단백질 생산의 경우에 사용하기 어려워진다.

이러한 문제점을 해결하기 위해서 본 연구에서는 GAL promoter의 glucose repression이 줄어들도록 reg1-501 muta-

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Hannam University, Taejon 306-791, Korea
Tel : 042-629-7932, Fax : 042-623-9489
e-mail : wkang@eve.hannam.ac.kr

tion이 되었으며 갈락토즈 이용의 단계중 첫번째로 작용하는 galactokinase효소가 결손 되도록 gal1 mutation이 되어 갈락토즈를 이용하지 못하고 낮은 갈락토즈 농도에서도 높은 발현율을 보이는 *S. cerevisiae* 변이주를 이용하여 GAL promoter로부터의 발현 특성을 연구하였다.

재료 및 실험방법

사용균주

본 연구에 사용한 *S. cerevisiae* mutant는 Y334 (MAT α pep4-3 prb1-1122 ura3-52 leu2-3,112 reg1-501 gal1)로서 reg1-501 mutation에 의해 glucose repression을 적게 받는 균주이며 gal1 mutant로서 갈락토즈의 사용단계의 첫 번째 이용되는 galactokinase효소가 결손되어 갈락토즈를 거의 사용하지 못하게 되는 strain이다. 또한 대조구로 쓴 *S. cerevisiae*는 Y2805 (MAT α pep::HIS3 prb- Δ 1.6R can1 his3-20 ura3-52)로서 일반적으로 GAL promoter의 host로 쓰이는 *S. cerevisiae*이며 이들 strain에 GAL promoter를 가진 human serum albumin gene을 포함하는 vector를 집어넣어 사용하였다. 이들 Y334 mutant와 Y2805는 생명공학연구소 이상기 박사팀으로부터 받아 사용하였다.

배지 및 배양방법

본 실험에 사용된 배지는 YD(Yeast Extract 2%, glucose 2%) 배지이며 실험조건에 따라 갈락토즈를 첨가하게 되고 질소 원으로서 필요에 따라 펩톤등이 사용되어지게 된다. 전배양은 yeast nitrogen base without amino acid(YNB) 0.67g/L, amino acid solution(adenine 0.2g/L, tryptophane 0.1g/L, tyrosine 1.5g/L, lysine 0.15g/L, phenylalanine 0.25g/L, threonine 2g/L, histidine 1g/L, leucine 1g/L) 40ml/L, 글루코즈 20g/L가 포함된 minimal media를 사용하여 250rpm, 30°C의 진탕배양기에서 24시간 배양한 후 사용하였다. 실험을 위한 플라스크 배양은 500ml baffled flask의 100ml 배지에 전배양 용액을 1% 접종한 후 250rpm의 진탕배양기에서 수행했다. 또한 발효기를 이용한 실험은 글루코즈 20g/L, 효모추출물(YE) 20g/L, 갈락토즈 30g/L 조성의 배지에 전배양용액을 1% 접종하였고 30°C, 800rpm, pH 5.5의 조건으로 배양하였다. 갈락토즈 농도에 대한 실험은 발효기에서 일정농도로 유지하면서 수행하였다.

분석방법

실험중 세포의 농도는 채취한 배양액을 적당한 배율로 희석하여 600nm에서의 O.D.(optical density)를 분광흡도계(spectronic 21D, Milton Roy)를 사용하여 측정하였고, 배양액 중의 포도당 농도는 glucose assay kit (glucopat, Kagaku)을 이용하여 분석하였다. 배지 중의 갈락토즈의 양은 modified DNS 방법을 사용하여 측정하였다. DNS용액은 0.25g 3,5-dinitrosalicylic acid, 75g sodium potassium tartarate (Rochelle salt)를 50ml의 2M NaOH용액에 녹인 후 다시 물로 희석하여 최종부피 250ml로 만들어서 사용하였다. 배양액의 상등액을 갈락토즈 농도가 1g/L 이하가 되도록 희석한 sample 1ml에 DNS용액 1ml를 넣고 100°C에서 5분간 반응시킨 후 찬물에서 급속히 냉각하여 반

응을 정지시킨 다음 550nm에서의 흡광도를 측정하고 이 값을 미리 구한 검량선에 비교하여 갈락토즈의 양을 계산하였다. 목적 단백질인 albumin은 분비 형태로 발현되며 생성된 albumin의 양은 SDS PAGE/silver, coomassie staining 및 western blotting 방법에 의하여 알고 있는 양의 albumin standard와 비교하여 정량 하였고 이때 12% gel을 사용하여 67KD band에 대해 분석하였다. 배지중 에탄올 분석은 Gas Chromatograph (Donam, DS 6200)에서 수행되었다. 사용된 G.C. column은 길이 6ft의 녹슬지 않는 stainless steel이고 충전물질은 Hayesep Q(CRS)이며 Flame ionization detector (FID)를 이용하였다. carrier gas는 헬륨을 사용하였으며 실험조건은 injector 180°C, oven은 130°C, detector는 200°C이었다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 GAL promoter의 glucose repression이 줄어들도록 reg1-501 mutation이 되어 갈락토즈 이용의 단계중 첫 번째로 작용하는 galactokinase효소가 결손 되도록 gal1 mutation이 되어 갈락토즈를 이용하지 못하고 낮은 갈락토즈 농도에서도 높은 발현율을 보이는 *S. cerevisiae* 변이주 Y334와 대조구 Y2805를 비교함으로써 이들 strain에 있어서 GAL promoter로부터의 발현 특성을 비교 연구하였다.

효모 변이주 Y334와 대조구 Y2805에서 GAL promoter의 glucose repression정도 비교 실험

이 실험에서는 2% 글루코즈, 2% 효모추출물(YE) 그리고 3% 갈락토즈를 배지로 사용하여 30°C, 800rpm, pH 5.5에서 실험을 수행하였고 이 때의 glucose repression 결과가 Figure 1과 Figure 2에 보여진다. mutant인 Y334의 경우에는 글루코즈가 0.5g/L의 농도로 존재할 때에도 최대발현량의 25% 정도가 발현되는 것으로 보여지며 글루코즈가 고갈되는 시점에서는 최대 발현량의 약 65%가 발현되어지는 것을 알 수 있었다. 반면 대조구인 Y2805의 경우에는 배지중 글루코즈가 남아있을 때에는 albumin이 전혀 발현되지 않았고 또한 글루코즈가 완전히 소비된 뒤에도 약 2~3시간 후에 발현이 시작되는 것을 알 수 있었다. 이 결과 대조구 Y2805에 비해서 mutant인 Y334에 있어서는 GAL promoter에 미치는 glucose repression 정도가 매우 적음을 알 수 있었다. 이와 같은 것은 Y334의 경우 reg1-501 돌연변이에 의하여 glucose repression이 줄어들음에 기인하였으며 이와 같은 특성은 향후 fed-batch시의 feeding 방법개발에도 장점으로 작용되어 질 수 있다. 이 이유로는 fed-batch의 바람직한 mixed feeding방법은 글루코즈와 갈락토즈를 적절한 비율로 섞어 feeding 하여 cell의 성장에 더 도움이 되는 글루코즈가 먼저 소비되고 동시에 갈락토즈를 소비하며 목적 외래단백질을 발현하는 방법인데 이 경우 장점으로서는 글루코즈가 완전히 고갈되어져 생길 수 있는 protease에 의한 생성단백질 분해 문제를 해결할 수 있음에 있다. 그러나 글루코즈의 repression을 심하게 받을 경우에는 이러한 글루코즈와 갈락토즈의 mixed feeding을 이용함이 어렵게 된다. 본 실험에서 실험한 mutant Y334는 GAL promoter에 미치는 glucose repression 정도가 매우 적은 장점을 지닌 점이 확인되었으며 이는 fed-batch실험을 통하여 적용되어질 수 있었다.

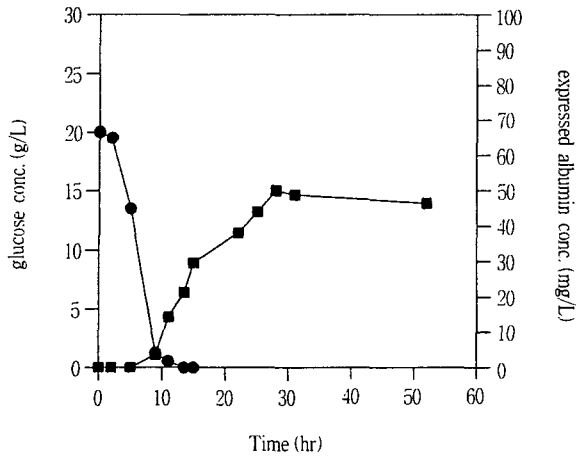


Figure 1. The extent of glucose repression on albumin expression with *S. cerevisiae* mutant Y334 ■: glucose conc. g/L; ●: albumin conc. mg/L.

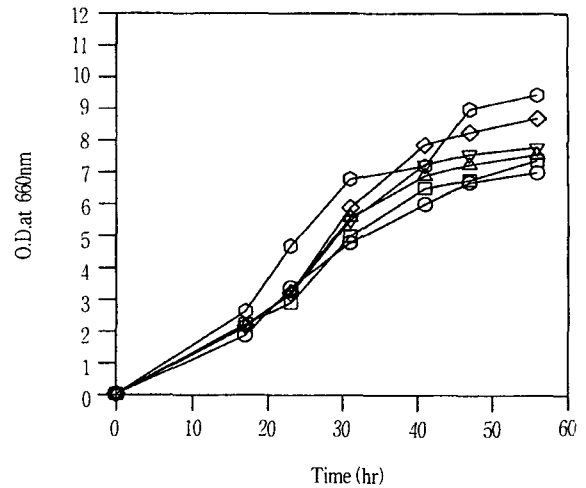


Figure 3. The effect of galactose concentration on cell growth with *S. cerevisiae* mutant Y334 ○: 3% galactose, □: 2% galactose, △: 1% galactose, ▽: 0.5% galactose, ◇: 0.1% galactose, ○: 0.01% galactose.

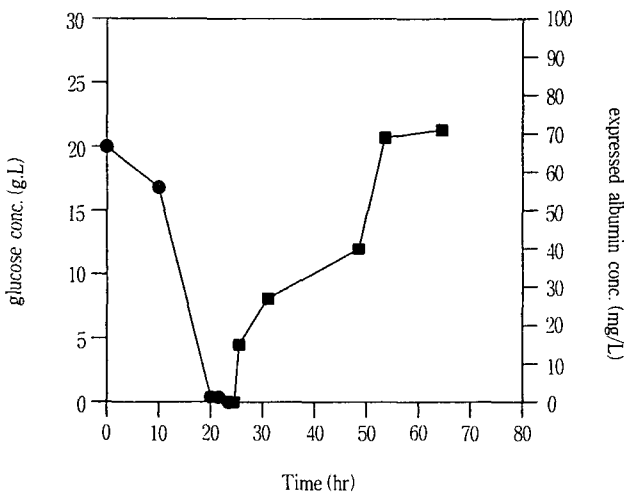


Figure 2. The extent of glucose repression on albumin expression with *S. cerevisiae* conventional host Y2805 ●: glucose conc. g/L; ■: albumin conc. mg/L.

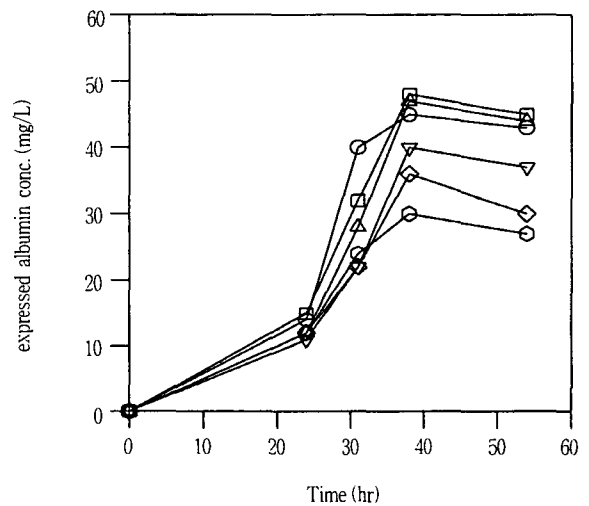


Figure 4. The effect of galactose concentration on albumin expression with *S. cerevisiae* mutant Y334 ○: 3% galactose, □: 2% galactose, △: 1% galactose, ▽: 0.5% galactose, ◇: 0.1% galactose, ○: 0.01% galactose.

갈락토즈 농도가 GAL promoter로부터 외래단백질 발현율 및 세포 성장에 미치는 영향

배지성분은 2% 글루코스와 2% 효모추출물(YE)이었으며 갈락토즈 농도는 각각 0.01%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%이었고 발효기에서 30℃, 800rpm, pH 5.5의 조건으로 수행되었다. 이 결과가 Figure 3, 4, 5, 6에 보이는데 mutant Y334의 경우에는 갈락토즈 농도가 증가함에 따라 최종세포농도가 낮아짐이 관측되었는데 이는 높은 갈락토즈 농도에 의한 growth inhibition으로 생각되어지며 albumin 발현량의 경우는 갈락토즈 농도 1, 2, 3%에서 거의 비슷하게 최대 약 50mg/L의 albumin을 생성하였고 갈락토즈 농도가 낮아져도 albumin의 발현량이 많이 감소하지 않아 갈락토즈 0.01%에서 최대 발현량의 약 60%에 이르는 약 30mg/L의 albumin을 생성하였다. 이 이유는 mutant Y334의 경우는 거의 갈락토즈를 사용하지 않음으로 세포안의 갈락토즈 농도 pool이 상대적으로 Y2805에 비해 높게 유지되는 것으로 사려되어지며 그 결과 낮은 갈락토즈 농도에서도 높은

발현율을 보이는 것으로 생각된다. 그러나 대조구 Y2805에 있어서는 갈락토즈 농도가 증가될수록 세포최종농도도 증가함을 알 수 있었고 albumin 발현의 경우에 있어서도 갈락토즈 농도 3%에서 약 80 mg/L의 최대발현량을 보였고 갈락토즈 농도가 0.1%에서는 최대치의 10%가 발현되었으며 갈락토즈 농도가 0.01%에서는 albumin이 전혀 발현되지 않음을 확인할 수 있었다. 이 결과는 두 균주에 이용되어지는 GAL promoter의 inducer인 갈락토즈는 매우 비싼 탄소원인데 대조구 Y2805의 경우 갈락토즈를 이용하여 cell이 자라게 됨에 따라 배지중의 갈락토즈 농도가 계속 낮아지게 되고 albumin의 발현량이 갈락토즈 농도에 관계되어짐을 생각할 때 배지중 많은 양의 갈락토즈

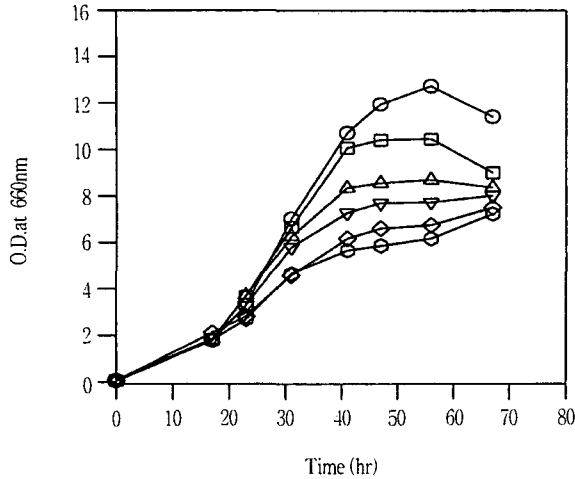


Figure 5. The effect of galactose concentration on cell growth with *S. cerevisiae* conventional host Y2805 ○ : 3% galactose, □ : 2% galactose, △ : 1% galactose, ▽ : 0.5% galactose, ◇ : 0.1% galactose, ○ : 0.01% galactose.

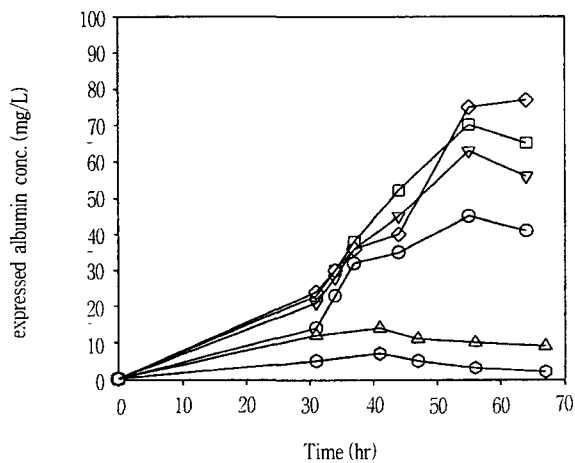


Figure 6. The effect of galactose concentration on albumin expression with *S. cerevisiae* conventional host Y2805 ○ : 3% galactose, □ : 2% galactose, △ : 1% galactose, ▽ : 0.5% galactose, ◇ : 0.1% galactose, ○ : 0.01% galactose.

가 필요하게 되어지는 반면 mutant Y334의 초기에 낮은 수준의 갈락토즈를 첨가하고 발효중 갈락토즈가 소비되지 않음으로 더 이상의 갈락토즈 첨가는 필요하지 않음을 고려할 때 두 균주를 이용하여 상업적으로 albumin을 생산할 때 배지 원가에도 상당한 영향을 미치게 되어 data로 보여지지는 않지만 mutant의 경우 배지원가는 약 1/20 로 낮아짐을 알 수 있었다. 여기서 갈락토즈 농도에 따른 단위 O.D.의 cell당 최대 albumin 생산성을 mutant Y334와 대조구 Y2805에 대하여 계산하여 이 결과를 Table 1에 나타내었는데 갈락토즈 3% 농도하에서 mutant Y334경우는 약 7.1mg/L/O.D.이고 control 효모 경우는 약 6.1mg/L/O.D.로서 mutant의 경우가 높음을 알 수 있다.

또한 Y2805와 Y334의 경우에 글루코즈, 갈락토즈, 에탄올의 소비속도를 측정하여 이를 Table 2에 나타내었는데 mutant Y334

Table 1. Y334와 Y2805의 갈락토즈 농도에 따른 단위 O.D. 당 albumin 생산성.

갈락토즈 농도(%)	단위 O.D. 당 albumin 생산성 (mg/L/O.D.)	
	Y334	Y2805
0.01	3.64	0
0.1	4.1	2
1	6.09	6.2
2	6.62	6.16
3	7.1	6.1

Table 2. Y334와 Y2805의 글루코즈, 갈락토즈, 에탄올의 소비 속도.

소비속도 (g/O.D./hr/L)	Y334	Y2805
글루코즈	1.7519	2.0793
갈락토즈	0.0131	0.1232
에탄올	0.1417	0.1087

의 경우는 갈락토즈의 소비속도가 매우 낮아 약 0.0131 g/L/O.D./hr 이었으며 글루코즈의 소비속도는 1.7519g/L/O.D./hr이었고 대조구 Y2805의 경우는 갈락토즈와 글루코즈의 소비속도가 각각 0.1232, 2.07 g/L/O.D./hr임을 알 수 있었다. 이 결과를 볼 때 Y334의 galactose의 소비속도는 Y2805의 1/10 이하 정도임을 알 수 있었다.

pH가 albumin의 발현에 미치는 영향

배지의 pH가 albumin 발현에 미치는 영향을 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 배지 조성은 글루코즈 2%, 효모추출물(YE) 2%, 갈락토즈 2%이었고 실험조건은 30°C, 250rpm이었다. Y2805의 경우 pH 3.5, 4.5, 5.5, 6.5등에서 실험을 수행한 결과 pH 5.5에서 80mg/L로서 최대 발현량을 보였고 분해현상도 작은 것으로 확인되었다. pH 3.5에서는 발효 후 배지중의 albumin양은 10 mg/L로서 최대치에 비해 매우 적음을 알 수 있다. 또한 Y334의 albumin 발현에 관한 최적 pH를 조사하였는데 O.D.의 경우는 각 pH에서 큰 차이를 보이지 않았으나 albumin생산의 경우 Y2805의 경우와 마찬가지로 pH 5.5에서 약 50 mg albumin/L로서 최대가 됨을 알 수 있었다. 이 실험의 결과 Y2805, Y334 모두에서 pH가 albumin 생산성 향상에 매우 중요한 인자임을 알 수 있었다.

변이주 Y334와 대조구 효모 Y2805의 Plasmid stability

배양 중 재조합 미생물인 두 균주, 변이주 Y334와 대조구 효모 Y2805의 대규모 발효조에서의 대량 생산시 plasmid의 안정성문제에 기인한 plasmid 감소에 의하여 외래 단백질 생산성 감소가 예상되어 plasmid stability에 대해 조사하였다. plasmid stability는 각 시간에 따라 채취한 배양액을 petri dish의 complex 한천배지위에 약 150~200 colony 정도가 생기도록 희석하여 도말한 후 약 24시간 동안 30°C의 항온배양기에서 배양한 후, 이 때 나타나는 colony를 글루코즈 10g/L, 효모추출물

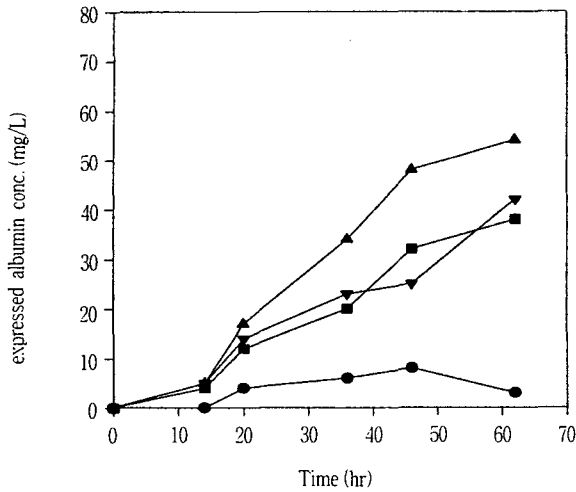


Figure 7. The effect of pH on albumin expression with *S. cerevisiae* mutant Y334 ●: pH 3.5, ■: pH 4.5, ▲: pH 5.5, ▼: pH 6.5.

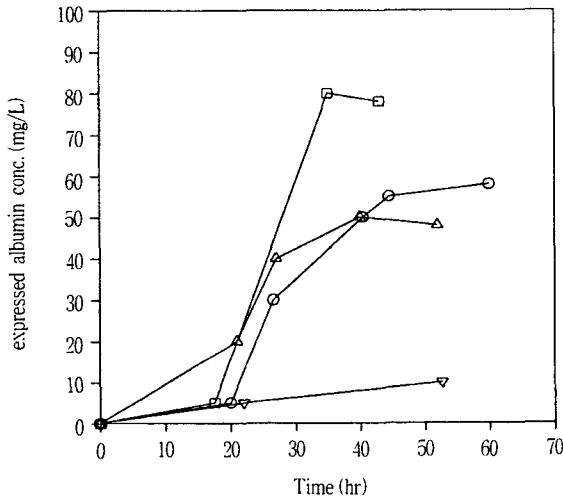


Figure 8. The effect of pH on albumin expression with *S. cerevisiae* conventional host Y2805 ○: pH 3.5, □: pH 4.5, △: pH 5.5, ▽: pH 6.5.

10g/L, 한천 15g/L의 조성을 가진 complex 한천배지와 글루코즈 10g/L, yeast nitrogen without amino acid(YNB) 0.67g/L, amino acid solution 40ml/L의 조성인 selective 한천배지에 각각 전이시킨 후 다시 30°C의 항온배양기에 배양하여 생기는 colony 개수의 비율을 plasmid stability로 표현하였다. 이 실험 결과 mutant Y334의 경우 generation number가 13에 이를 때까지 plasmid stability는 거의 95%로 유지되어 매우 안정한 균주임을 알 수 있었으며 대조구 Y2805의 경우도 plasmid stability는 90%로 유지됨을 알 수 있었다. 따라서 mutant Y334를 사용하는 경우 plasmid stability 문제점은 없는 것으로 확인되었다.

효모 변이주 Y334와 control Y2805의 secretion efficiency 비교

*S. cerevisiae*의 분비 경로에 대해 알아보면 새롭게 생성된 단

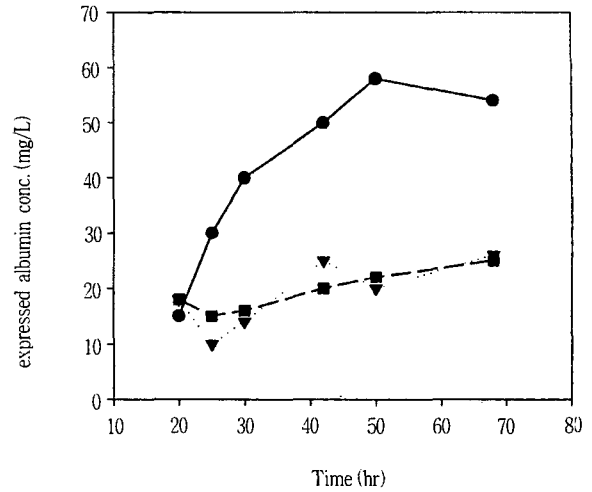


Figure 9. Localization of expressed albumin in *S. cerevisiae* mutant Y334 ●: secreted albumin, ▼: expressed albumin in preplasm, ■: expressed albumin in cytoplasm.

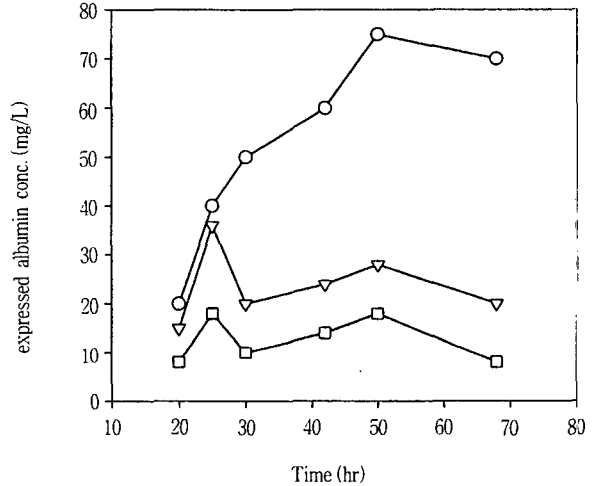


Figure 10. Localization of expressed albumin in *S. cerevisiae* conventional host Y2805 ○: secreted albumin, ▽: expressed albumin in preplasm, □: expressed albumin in cytoplasm.

백질은 leader signal sequence에 의해 endoplasmic reticulum(ER)로 translocate되어진다. ER의 lumen에서 asparagine-linked glycosyl structure가 붙을 수 있고 O-linked oligosaccharide도 붙을 수 있다. 그 후 단백질은 Golgi로 이동되어져 plasma membrane으로 이용되고 이곳으로부터 periplasmic space를 거쳐 세포벽을 통과하여 밖으로 분비되어진다. 그러나 이렇게 복잡한 분비과정중 어떤 것이 속도단계(rate limiting step) 일수도 있고 외래 단백질 생성속도가 너무 빨라 생성된 외래단백질의 misfolding이 발생하게 되는 경우 ER또는 Golgi에서 머물게 되다 vacuole로 보내져 분해되는 경우가 생기게 되고 glycosylation 단계에 문제가 생기게 되며 또한 세포벽 통과에도 문제가 생겨 periplasmic space에 머무르게 되는 경우도 생기게 되어진다. 이때 외래 단백질의 분비 효율(secretion efficiency)에 미치는 여러 영향인자로는 단백질의 특성,

host cell의 성질, signal leader sequence, 프로모터의 강도, chaperone availability 등이라고 발표되어지나 이러한 연구는 거의 되어있지 않은 실정이다. *S. cerevisiae*를 이용한 albumin 생산연구에 있어서 albumin의 생산성이 비교적 낮은 것이 문제가 되어지므로 실제 Y2805와 Y334의 분비효율을 조사하고 혹시 secretion의 bottleneck이 문제점으로 드러나면 mutation을 통한 접근 및 여러 발효변수 최적화를 통한 분비효율 증가를 목적으로 Y2805와 Y334의 경우에 albumin 발현시 cell 내 (cytoplasmic, periplasmic) 그리고 cell외(배지중)의 albumin 분포 pattern을 분석하였다. cell외의 albumin은 앞서 설명한 것과 같이 발효액을 원심분리후 상등액을 이용하여 정량하였으며 cell 내의 albumin은 배양액 1ml을 원심분리하여 얻어진 cell을 0.5mm glass bead 300 μ l와 8M urea 200 μ l를 넣고 0°C의 차가운 물에 담근 후 bead beater를 이용하여 4500rpm에서 20초간격으로 15회 분쇄한다. 이 sample을 13000 rpm에서 1분간 원심분리하여 상등액만을 취한후 SDS PAGE/silver, coomassie staining 및 western blotting 방법에 의하여 분석하였다. 이 결과를 Figure 11, 12에 보였는데 Y2805의 경우에는 발효후반부에 total 생산 albumin 중 약 70%는 secretion되고 약 30%는 cytoplasmic, periplasmic등 cell 내 위치하는 것을 알 수 있었고 Y334의 경우에는 발효후반부에 total albumin중 약 50%는 secretion되고 나머지 50%는 cytoplasmic, periplasmic등 cell 내에 위치하는 것으로 확인되었다. 이 결과는 Y334의 해결해야 할 단점으로 생각되어지며 이러한 문제의 해결을 위해 albumin 생산성이 2~3배 증가된 초분비 *S. cerevisiae* 돌연변이주 개발 및 돌연변이주의 세포벽 leakage, protease의 knock-out 등등의 돌연변이주 동정이 현재 본 연구팀에 의해서 진행중이다.

요 약

본 연구에서 갈락토즈를 거의 이용하지 않고 glucose repression 정도가 줄어든 변이주를 이용하여 발현최적화를 수행하였다. 두 균주에서의 GAL promoter에 의한 외래단백질 생산시 glucose repression 정도에 대해 조사하였는데 대조구 Y2805는 glucose가 다 소비된 후 2~3시간 지난 후 발현이 시작되나 변이주 Y334는 약 0.5g/L 글루코즈 농도에서 25%정도의 발현이 이루어짐에 따라 변이주 Y334는 GAL promoter에 미치는 glucose repression 정도가 매우 약한 장점을 확인하였다. GAL promoter에 의한 외래 단백질 생산시 발현을 위한 최적 갈락토즈 농도를 조사하였는데, Y2805는 3% 까지의 높은 갈락토즈 농도에서, 변이주 Y334는 1%정도의 낮은 갈락토즈 농도에서 각각 최대 발현량을 보였으며 변이주 Y334는 특히 0.01%정도의 낮은 갈락토즈 농도에서도 최대 발현의 60%량을 발현하였고 오히려 높은 갈락토즈 농도에서는 성장장애 현상을 보였다. 두 균주를 이용하여 배지중 pH가 외래 단백질 생산에 미치는 영향을 조사하였는데 두 균주 모두 pH 5근처에서 최대 발현량을 보임을 알 수 있었다. GAL promoter에 의한 외래 단백질 생산시 글루코즈와 갈락토즈, 에탄올의 소비속도를 조사하였는데, 글루코즈와 에탄올의 소비속도는 거의 비슷하였으나 갈락토즈 소비속도는 Y2805는 0.1232 g/L/hr/O.D.이고, 변이주 Y334는 0.0131g/L/hr/O.D. 이다. 또한 두균주의 분비효율을 조사하였는데 Y2805는 발효후반부에 총 생산 albumin중 약 70%는 분비되었고

30%는 cell 내 위치하는 것을 알 수 있었고 Y334의 경우에는 발효후반부에 총 생산 albumin중 50%가 cell 밖으로 분비되고 50%는 cell 내에 존재하는 것으로 확인되었다. 이는 Y334의 해결해야 할 단점으로 생각 되어지며 이러한 문제의 해결을 위해 albumin 생산성이 2~3배 증가된 초분비 *S. cerevisiae* 돌연변이주 개발이 현재 진행중이다.

감 사

본 연구는 1996년도 교육부 학술연구조성비(생물화학공학)에 의하여 연구되었으며 이에 감사의 말씀을 드립니다.

참 고 문 헌

1. Cregg, J.M., K. Hessler,(1985), *Pichia pastoris* as a host system for transformation, Mol. Cell. Biol., 5, p. 3376.
2. Cregg, J.M., C.R. William(1993), Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*, Biotechnology, 11, p. 905.
3. Sleep, D., G. P. Belfield and A.R. Goodey.(1990), The secretion of human serum albumin from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* using five different leader sequences. Bio/Technology 8. p. 42.
4. Hitzeman, R.A., F.E. Hagie, H.L. Levine, and B.D. Hall, (1981), Expression of a human gene for interferon in yeast, Nature, 293, p717.
5. Tuite, M.F., C.S. McLaughlin,(1982), Endogenous read-through of a UGA termination codon in a *Saccharomyces cerevisiae* cell-free system: evidence for involvement of both a mitochondrial and nuclear tRNA, Mol. Cell. Biol. 2, p. 490.
6. Innis, M.A., M.J. Holland, P.G. McCabe, and J.H. Meade, (1985), Expression, glycosylation and secretion of an *Aspergillus* glucoamylase by *Saccharomyces cerevisiae*, Science, 228, p. 21.
7. Ammerer, G.(1983), Expression of genes in yeast using the ADCI promoter, Methods Enzymol., 101, p. 192.
8. Rosenburg, S., P.J. Barr, R.C. Najarian, and R.A. Hallelwell,(1984), Synthesis in yeast of a functional oxidation-resistant mutant of human alpha-antitrypsin, Nature, 312, p. 77.
9. Hovland, P., J. Flick, M. Johnston, and R.A. Sclafani, (1989), Galactose as a gratuitous inducer of GAL gene expression in yeasts growing on glucose, Sclafani. Gene, 83, p. 57.
10. Johnston, M.,(1987), A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*, Microbiol. Rev, 51, p. 458.
11. Mylin, L.M, K.J Hofmann, L.D Schultz and J.E. Hopper, (1990), Regulated GAL4 expression cassette providing controllable and high-level output from high-copy galactose promoters in yeast, Methods Enzymol, 185, p. 297.