

Hansenula polymorpha와 Pichia pastoris의 비교를 통한 회분식 배양에서의 효과적인 재조합단백질 발현방법에 관한 연구

†강 환 구 · 김 재 호 · ¹전 희 진

한남대학교 공과대학 화학공학과, ¹(주)한국신약 자광연구소 발효연구소

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

The Study on the Effective Expression Strategy for Recombinant Protein Production with *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha*

Whankoo Kang[†], Jaeho Kim, and Heejin Chun¹

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

¹Ja Kwang Research Institute., Han Kook Sin Yak Pharm. Co., Ltd., Choongnam, Korea

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

As host for the production of eucaryotic heterologous proteins, methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha* are the most highly developed of a small group of alternative yeast species chosen for their perceived advantages. This paper describes the method to enhance the recombinant protein productivity with *P. pastoris* and *H. polymorpha*. In these experiments, the effects of methanol induction timing, induction method, pH, culture temperature and kinds of nitrogen sources on foreign protein production were tested with *P. pastoris* and compared with *H. polymorpha*. In addition, optimum methanol concentration as inducer and the effects of carbon sources on AOX1 or MOX promoter repression and secretion efficiency were also studied in both cases.

Key Words : *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, 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(1,2,3) 이들 중 Yeast는 *E. coli*와 비교하여 몇 가지 장점을 가지고 있다(4,5). 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(6) 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. 이러한 yeast 중에 대표적으로 사용하고 있는 *S. cerevisiae*는 1981년 이를 이용하여 유전자 재조합 단백질 생산이 보고된 이래 수 많은 연구자들에 의해 활발한 연구가 진행되어 왔고 실제 회사들에서

는 이 *S. cerevisiae*를 이용하여 의약품용 외래 단백질을 생산하고 있다. 그러나 이 *S. cerevisiae*에는 높은 expression level을 얻기 위해서는 multi-copy plasmid가 필요하게 되어서 큰 규모의 발효조 고농도 세포배양을 할 때 이들 plasmid의 distribution, copy number, stability등이 자주 문제가 되어서, glycolytic gene유래의 프로모터들은 대부분 constitutive 프로모터 이어서 이를 이용하여 단백질 발현을 하는 경우는 plasmid를 잃은 cell들이 dominating 해지므로 문제가 되어서 조절할 수 있는 프로모터들도 정확하게 control하기 어려운 문제점이 있다. 또한 대체로 낮은 재조합 단백질 발현율을 보여주고 있으며 glycosylation형태가 α 1,3-linkage mannose를 가지고 있어 의약품용 단백질로 사용되어질 때 어느정도의 antigenicity 문제를 보이는 점등이다(7).

이러한 문제를 해결하는 대안으로 최근에 두 개의 facultative methylotrophic yeast인 *Hansenula polymorpha*(8)와 *Pichia pastoris*가 주목을 받게 되었다. 이들의 유사점은 두 균주 모두 methylotrophic yeast이고 외래유전자가 chromosomal DNA에 integration되었으며 또한 methanol을 이용하는 pathway가 거의 비슷하고 이 pathway상의 enzyme으로부터 유래된 프로모터(MOX or AOX1)가 이용되어지며 이 프로모터가 매우 강력하다는데 있다. 그러나 이 두 균주는 다음과 같은 여러 가지 다른 성질을 가지고 있는 것으로 보고된다. *Hansenula polymorpha*는 *Pichia pastoris*와 다르게 thermotolerant methylotrophic yeast이므로 생육 특성 및 온도, pH, C source, N source등 생

† 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

육최적조건이 서로 다르다. 그리고 *H. polymorpha* 경우에는 재조합 단백질 발현을 위한 프로모터로 methanol oxidase로부터 유래된 MOX 프로모터 또는 formate dehydrogenase로부터 유래된 FMD 프로모터를 쓰는 반면 *P. pastoris*의 경우는 AOX1(alcohol oxidase 1) 프로모터를 주로 사용한다. 또한 *P. pastoris*와 *H. polymorpha*는 carbon source에 의한 repression 형태도 다른 것으로 보고 되므로 이 두 균주 경우에 있어서 batch 및 fed-batch의 최적 발현조건이 서로 다를 수 있다. 또한 두 균주에서의 외래단백질 분비효율 차이와 protease에 의한 외래 단백질 분해정도의 차이가 보고되어진다(9).

이러한 두 균주의 비교를 통한 재조합 단백질 발현 최적화는 이들 methylotrophic yeast를 재조합 단백질 host로 이용하는 경우, 특히 산업체에서 methylotrophic host를 선택하는 기초자료 및 재조합 단백질 생산 최적화 자료로 이용될 수 있다.

재료 및 실험방법

사용균주

본 연구에 사용되는 *P. pastoris*는 histidine auxotroph인 GS115 strain이며 이 *P. pastoris*와 expression kit는 invitrogen사에서 구입하였으며 실험에서 사용할 균주는 세포막 분비를 하게되는 알부민 유전자를 pHIL-S1 expression vector(AOX1 프로모터)에 넣어 host genome AOX1 locus에 integration된 GS115/His⁻ Mut⁻ 알부민 secreted strain이다. 그리고 *H. polymorpha* host는 leucine과 uracil auxotroph이며 MOX (Methanol oxidase) 프로모터, MOX terminator와 알부민 gene segment를 가진 vector를 이용하였다.

배지 및 배양방법

*P. pastoris*와 *H. polymorpha* 균주의 종배양은 minimal media에서 진행되었는데 글리세롤 10g/L, (YNB)yeast nitrogen base without amino acid 13.4g/L, biotin 4g/L가 포함되어 있다. 이 배지에 -70℃에서 보관되는 1ml seed stock vial로부터 종배양할 배지 100ml이 들어있는 멸균된 baffled flask로 접종하였고 배양조건은 *P. pastoris*의 경우 250 rpm, 30℃이었고 *H. polymorpha*는 250 rpm, 37℃이었는데 균주가 접종된 플라스크를 각각 진탕배양기에서 24시간 배양한 후 사용하였다. minimal media 경우는 50℃ 정도로 가열하여 YNB를 녹인 후 다른 구성성분을 섞어 필터로 멸균하며 그 외 complex media (효모추출물 2%, 글리세롤 1%)의 경우는 autoclave를 통해 멸균하고 배지에 사용되는 메탄올은 filter로 멸균한다. 기초적인 회분식 실험을 위한 플라스크 배양은 500ml의 baffled flask를 이용하였는데 100 ml의 배지에 종배양액 1%를 접종한 후 250rpm의 진탕배양기에서 실험하였다. complex 배지는 기본적으로 글리세롤 10g/L, 효모추출물 20g/L이었고 실험의 목적에 따라 글루코즈 또는 펩톤 등의 다른 질소원을 첨가하거나 제거하였고 메탄올은 메탄올 농도 실험을 제외하고 *P. pastoris*와 *H. polymorpha*의 경우 각각 8g/L, 13g/L 농도를 사용하였다. Fermenter에서의 실험은 5L fermenter(한국발효기(주))를 사용하였다. 글리세롤 10g/L, 효모추출물 20g/L로 조성된 배지에 종배양액을 5% 접종하여 실험을 진행하였다. 이때 배양조건은 *P. pastoris*의 경우 30℃, 300~800rpm, pH 5.5내지 6.0 이었고 *H.*

*polymorpha*의 경우 온도는 37℃이었고 다른 조건은 *P. pastoris*경우와 같았다.

분석방법

실험중 세포의 농도는 채취한 배양액을 적당한 배율로 희석하여 분광흡도계(Spectronic 21D, Milton Roy)를 이용하여 660nm에서의 흡광도(O.D. : optical density)로 측정하였다. 배양액 중의 포도당 농도는 배양액을 13,000g로 2분간 원심분리하여 얻은 상등액을 취하여 1.0g/L 이하가 되도록 희석한 후 글루코즈 분석 kit(Glucopac, Kagaku)을 이용하여 분석하였다. 배지 중의 글리세롤 농도는 포도당의 경우와 같이 배양액을 13,000g로 2분간 원심분리하고, 여기서 얻은 상등액을 글리세롤 농도 1g/L이하가 되게 희석한 후 글리세롤 분석용 시약(Triglyceride, Sigma)을 사용하여 분석하였는데 희석된 배지를 10 μ l 취하여 분석시약 1ml에 넣고 37℃ 항온조에 5분간 방치하여 540nm에서의 흡광도를 측정하고 이 값을 미리 구한 검량선과 비교하여 글리세롤의 양을 계산하였다. 본 실험의 target 단백질인 알부민은 secretion 형태로 발현되며 생성된 알부민의 양을 정량분석하기 위하여 세포배양 후 13,000g에서 2분간 원심분리하고 이때 상등액을 가지고 secretion된 알부민을 얻고 SDS PAGE / Silver, Coomassie staining 방법으로 알고있는 양의 알부민 standard와 비교하여 알게 되는데 이때 12% polyacrylamide gel과 5% stacking gel이 사용되어지고 이 경우 67KD band가 나타나게 된다. 또한 세포내에 존재하는 알부민의 정량을 위하여 위의 원심분리 후 얻어지는 세포침전을 beadbeater를 이용하여 분쇄하고 이를 다시 10,000g에서 1분간 원심분리하여 얻은 상등액을 SDS PAGE/ western blotting하여 알고 있는 양의 알부민 standard와 비교하여 정량하였다. 이때 standard 알부민은 sigma사의 제품을 이용하였다. 배지중 메탄올 분석은 Gas Chromatograph(DS6200, Donam)에서 수행되었다. 사용된 column은 길이 1.8 m의 stainless steel이고 충전물질은 Haysep Q(CRS)이며 Flame ionization detector(FID)를 이용하였다. carrier gas는 헬륨을 사용하였고 분석조건은 injector 180℃, oven 130℃, detector는 200℃이었다.

결과 및 고찰

메탄올 induction 시기가 발현에 미치는 영향

메탄올에 의한 induction 시기가 재조합 알부민 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 초기 세포성장단계에 메탄올을 첨가하여 induction시킨 경우와 발효시작 후 O. D. 4.0 정도 되는 exponential growth stage에서 메탄올을 첨가하는 경우를 비교하였다. 이 결과가 Figure 1, 2에 보여진다. 이때 사용한 배지는 글리세롤 1%, 효모추출물(YE) 2%였고 5g/L 메탄올을 이용하여 induction 시켰을 때 *P. pastoris*의 경우 메탄올을 첨가한 시기와 관계없이 최종 O.D.가 약 8정도로 비슷하였으나 알부민 생산량은 O.D. 4정도에서 메탄올을 첨가하여준 경우가 초기 세포 성장단계에 메탄올을 첨가한 경우에 비해 약 20% 정도 높아져 약 230 mg/L 정도였다. *H. polymorpha*의 경우도 이와 비슷한 경향을 보였는데 13 g/L 메탄올을 첨가하여 induction 시킨 경우 메탄올을 첨가한 시기와 관계없이 세포성장은 O.D. 23 정도로 차이가 없었으나 알부민 발현량은 초기에 메탄올을 첨가하는

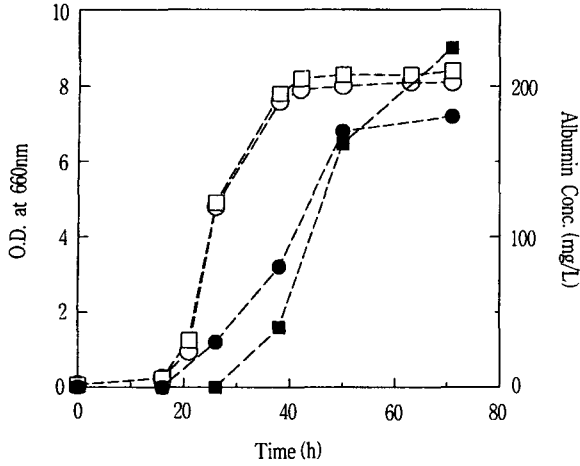


Figure 1. The effect of induction timing on cell growth and albumin expression with *P. pastoris*.

- : O.D. - methanol was added at initially
- : O.D. - methanol was added at 26hrs
- : albumin conc. - methanol was added at initia
- : albumin conc. - methanol was added at 26 hrs

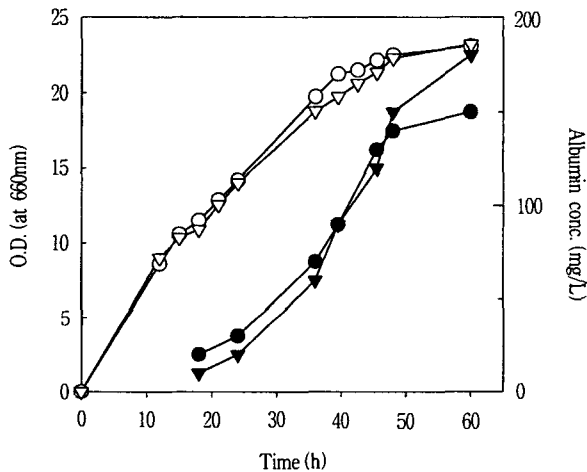


Figure 2. The effect of induction timing on cell growth and albumin expression with *H. polymorpha*.

- : O.D. - methanol was added at initially
- ▽-▽ : O.D. - methanol was added at O.D. 4
- : albumin conc. - methanol was added initially
- ▼-▼ : albumin conc. - methanol was added at O.D. 4

경우보다 O.D.가 약 4정도에서 메탄올을 첨가해 주었을 때 약 25%의 증가를 보여 알부민 발현양이 약 180 mg/L 이었다. 이는 생성된 알부민의 protease 노출시간이 짧고 또한 초기부터 생성된 알부민에 의한 균주의 load가 적었기 때문으로 생각된다. 따라서 이 실험의 결과를 바탕으로 본 연구에서는 회분식 실험시 exponential growth stage에서 메탄올을 induction방법으로 실험을 수행하였다.

Inducer로서 메탄올 농도가 발현에 미치는 영향

*P. pastoris*와 *H. polymorpha*를 이용하여 AOX 1 또는 MOX 프로모터를 유도하는 메탄올 농도가 알부민 발현에 미치

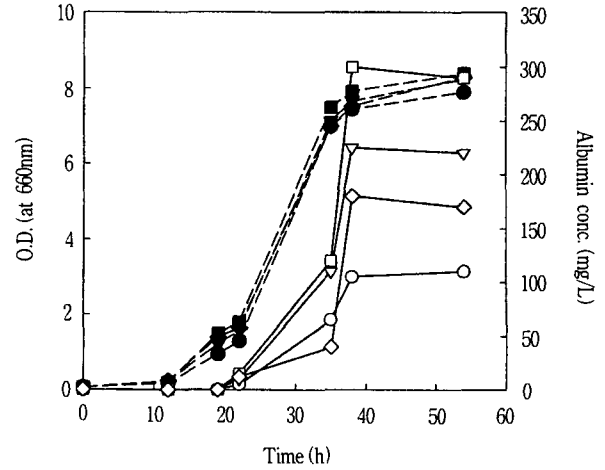


Figure 3. The effect of methanol concentration on cell growth and albumin expression with *P. pastoris*.

- : 메탄올 농도 3 g/L (O.D.)
- ▼-▼ : 메탄올 농도 5 g/L (O.D.)
- : 메탄올 농도 8 g/L (O.D.)
- ◆-◆ : 메탄올 농도 13 g/L (O.D.)
- : 메탄올 농도 3 g/L (albumin)
- ▽-▽ : 메탄올 농도 5 g/L (albumin)
- : 메탄올 농도 8 g/L (albumin)
- ◇-◇ : 메탄올 농도 13 g/L (albumin)

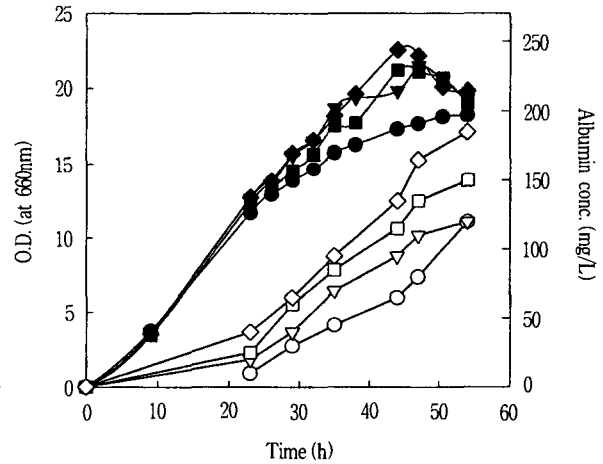


Figure 4. The effect of methanol concentration on cell growth and albumin expression with *H. polymorpha*.

- : 메탄올 농도 3 g/L (O.D.)
- ▼-▼ : 메탄올 농도 5 g/L (O.D.)
- : 메탄올 농도 8 g/L (O.D.)
- ◆-◆ : 메탄올 농도 13 g/L (O.D.)
- : 메탄올 농도 3 g/L (albumin)
- ▽-▽ : 메탄올 농도 5 g/L (albumin)
- : 메탄올 농도 8 g/L (albumin)
- ◇-◇ : 메탄올 농도 13 g/L (albumin)

는 영향을 조사 하였다. *P. pastoris*의 경우 메탄올 농도가 3g/L, 5g/L 그리고 8g/L로 증가할수록 세포성장은 O.D. 8정도로 거의 비슷했지만 알부민 생산성은 증가하여 8g/L에서는 약

300mg/L의 알부민이 생성되어 3g/L에 비해 약 3배 이상의 알부민을 생산하였으나 13g/L 이상에서는 8 g/L보다 낮은 것으로 조사되었고 이 결과가 Figure 3에 보여진다. Figure 4에는 *H. polymorpha*의 실험결과가 나타나 있는데 메탄올 농도 3 g/L, 5 g/L, 8 g/L, 13 g/L로 증가할수록 알부민 발현량도 증가하여 13 g/L에서 O.D. 23의 세포농도와 185 mg/L의 알부민을 발현함을 알 수 있었다. *H. polymorpha*의 경우 더 높은 메탄올 농도에서의 실험도 진행되었는데 30 g/L정도까지는 세포성장에 영향을 미치지 않았지만 알부민 발현량의 증가는 관측되지 않아 20g/L 메탄올 농도에서 약 180mg/L의 알부민을 생산하였고 20g/L 이상의 농도에서는 알부민발현량이 13g/L의 30%수준으로 감소하고 균주가 성장하지 않음을 확인하였다. 이 결과 *P. pastoris* 경우 최적 메탄올 농도가 *H. polymorpha*에 비해 낮음을 알 수 있었다.

알부민발현에 미치는 pH의 영향

배양액의 초기 pH를 5.0, 6.0, 7.0, 8.0등으로 바꾸어 pH가 알부민생산에 미치는 영향을 조사하였는데 이 결과가 Figure 5, 6에 보여지는데 *P. pastoris*의 경우 pH 5.0에서 가장 높은 알부민 생산성을 보이고 pH가 6.0, 8.0의 경우 생성 알부민의 분해가 일부 관측되어진다. *H. polymorpha*의 경우 세포성장에 별다른 차이를 보이지 않았으나 알부민 발현량은 pH 5.0과 6.0에서 거의 비슷하여 O.D. 23에서 약 180 mg/L의 알부민을 발현하였지만 pH 8.0에서는 이의 절반 수준에 그쳤다. 알부민의 분해정도에 있어서는 pH의 5.0일 때는 분해현상이 줄어들 반면 pH 6.0에서는 25% 그리고 pH 7.0, 8.0에서는 생성된 알부민의 약 50%정도가 분해됨을 확인 하였다. 이 결과를 통하여 *P. pastoris*의 경우 *H. polymorpha*보다 분해현상이 적음을 알 수 있었고 *P. pastoris* 및 *H. polymorpha*를 이용한 알부민 생산시 pH를 5.0에서 6.0 정도로 유지하는 것이 좋음을 알 수 있었다.

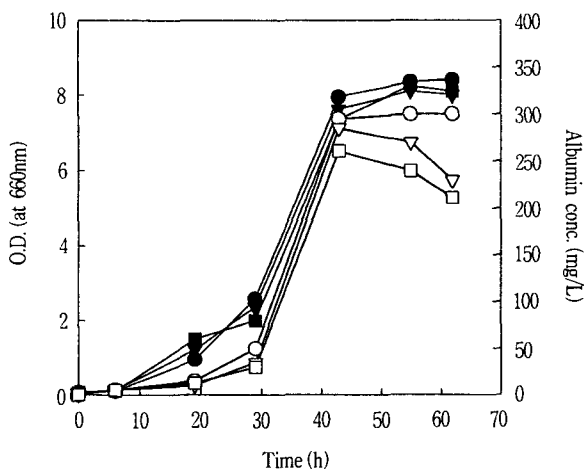


Figure 5. The effect of pH on cell growth and albumin expression with *P. pastoris*.

- : pH 5 (O.D.)
- ▼-▼ : pH 6 (O.D.)
- : pH 8 (O.D.)
- : pH 5 (albumin)
- ▽-▽ : pH 6 (albumin)
- : pH 8 (albumin)

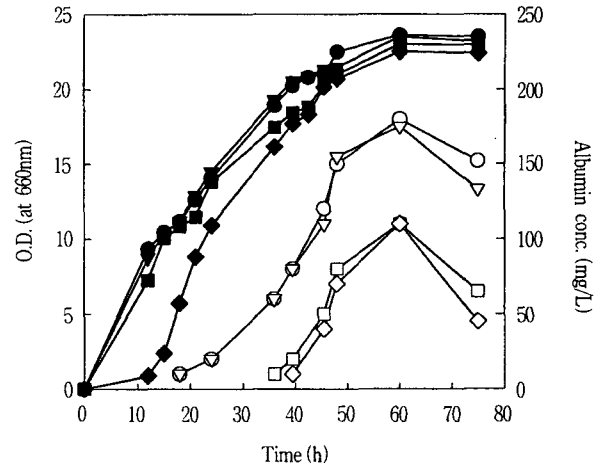


Figure 6. The Effect of pH on cell growth and albumin expression with *H. polymorpha*.

- : pH5 (O.D.)
- ▼-▼ : pH6 (O.D.)
- : pH7 (O.D.)
- ◆-◆ : pH8 (O.D.)
- : pH 5 (albumin)
- ▽-▽ : pH 6 (albumin)
- : pH 7 (albumin)
- ◇-◇ : pH 8 (albumin)

배양온도가 알부민 발현에 미치는 영향

*Hansenula polymorpha*는 *Pichia pastoris*와 다르게 thermotolerant methylotrophic yeast로 알려져 있는바 *P. pastoris*와 *H. polymorpha*를 이용하여 배양 온도가 두 균주의 알부민생산에 미치는 영향을 알아보았다. 이 결과를 Figure 7, 8에 나타내었는데 *P. pastoris*의 경우 30, 34, 37°C에서 실험을 진행하였는데 30°C의 경우에 약 300 mg/L의 알부민을 생산하였고 34, 37°C에서도 260 mg/L의 알부민을 생산하였지만 37°C의 경우 알부민을 발현하는데 걸리는 시간이 매우 길었고 그 분해정도도 높은 온도일수록 심해짐을 알 수 있었다. *H. polymorpha*의 경우는 30, 34, 37°C에서 실험을 진행하였는데 37°C에서 약 180 mg/L 알부민을 발현하여 가장 높은 발현율을 보였고 34°C에서 120 mg/L, 30°C에서 50 mg/L를 생산하였다. 따라서 이 두 균주를 이용하여 알부민을 생산시 *P. pastoris*는 30°C 부근이, *H. polymorpha*는 37°C 부근이 최적 온도임을 알 수 있었다.

알부민 발현에 미치는 질소원의 영향

*P. pastoris*와 *H. polymorpha*를 이용하여 질소원이 유전자 재조합 알부민생산에 미치는 영향을 알기 위하여 효모추출물 (YE), 펩톤, casamino acid(CA), yeast nitrogen base without amino acid(YNB) 등을 이용하여 실험하였고 배지에는 글리세롤(10g/L)과 메탄올을 사용하였다. 실험의 결과가 Figure 9, 10에 보여지는데 *P. pastoris*의 경우 구입처인 Invitrogen사에서는 ammonium sulfate에 vitamin과 trace metal이 강화된 배지인 YNB를 권하고 있으나 이 실험을 통하여 selective media의 기능만 있을뿐 high expression에는 적합하지 않은 배지임을 확인하였고 YE 2%를 사용한 경우 알부민 발현량이 YNB에 비해

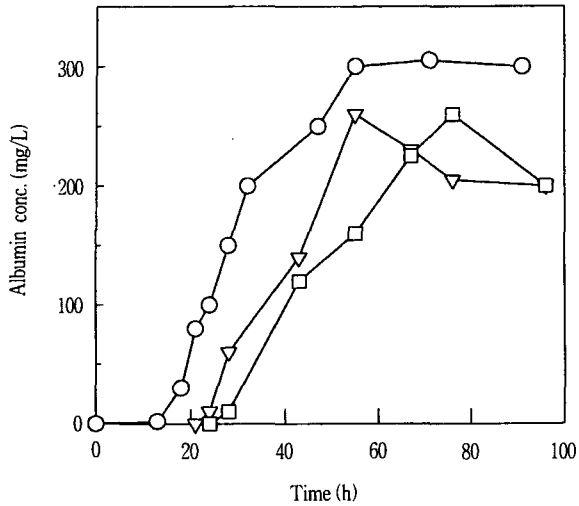


Figure 7. The effect of temperature on albumin expression with *P. pastoris*.

- : 30 도
- ▽-▽ : 34 도
- : 37 도

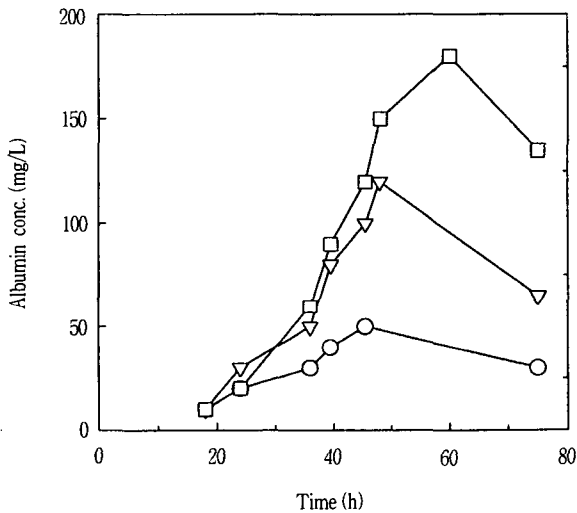


Figure 8. The effect of Temperature on albumin expression level with *H. polymorpha*.

- : 30 도
- ▽-▽ : 34 도
- : 37 도

8배이상 증가됨을 확인하였다. 그리고 기타 펩톤, casamino acid를 이용하는 경우에는 알부민 발현량이 YE를 사용한 경우의 30~40%정도에 불과함을 알 수 있었다. *H. polymorpha*의 경우에도 *P. pastoris*의 경우와 비슷한 양상을 보였는데 질소원으로 YE(2%)를 사용한 경우 O.D. 약 23에서 180mg/L의 알부민을 생산한 반면 펩톤, casamino acid, YNB등을 질소원으로 사용한 경우 균주성장 및 알부민발현량이 40%이상 감소함을 확인하였다. 또한 배양중 질소원(효모추출물)의 첨가가 알부민 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 일정 배지조건에서 일정 간격으로 질소원인 YE를 첨가해주는 방법으로 실험을 수행하였는데

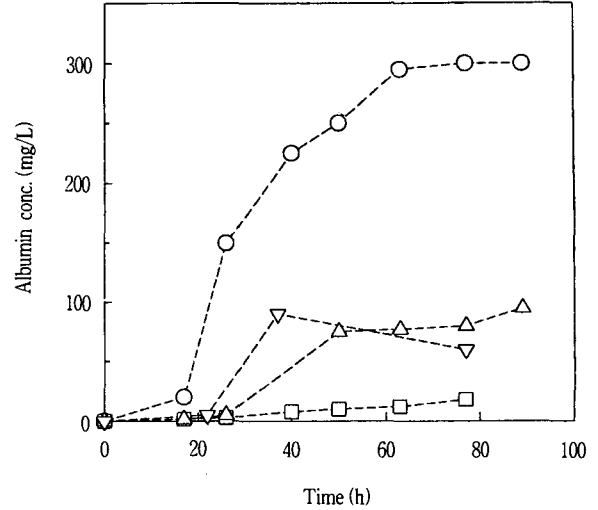


Figure 9. The Effect of N source on albumin expression with *P. pastoris*.

- : yeast extract(2%)
- : peptone(2%)
- △-△ : casamino acid(2%)
- ▽-▽ : yeast nitrogen base(YNB) w/o amino acid(2%)

* In all cases glycerol (10g/L) was contained in medium and methanol was regularly added.

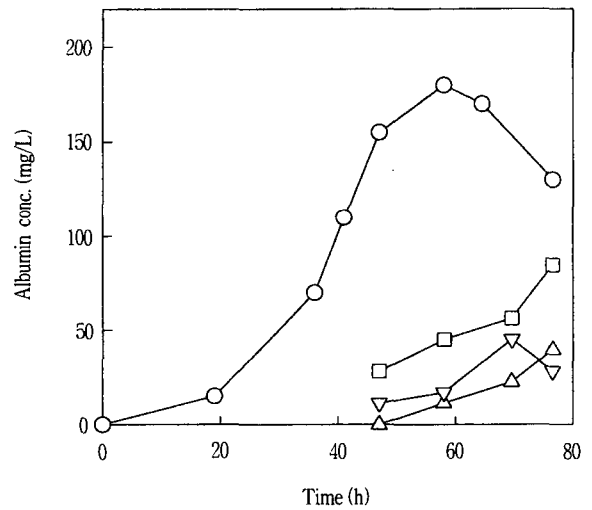


Figure 10. The effect of N source on albumin expression with *H. polymorpha*

- : yeast extract(2%)
- : peptone(2%)
- △-△ : casamino acid(2%)
- ▽-▽ : yeast nitrogen base(YNB) w/o amino acid(2%)

* In all cases glycerol (10g/L), leu(100mg/L) were contained in medium and methanol 8g/L was maintained during culture

이 결과가 Figure 11, 12에 나타나 있다. *P. pastoris*의 경우 알부민 발현량에는 큰 차이가 없었으나 *H. polymorpha*의 경우는 YE를 1회(1%) 첨가시 마다 알부민 발현량이 10%정도씩 증가하여 YE를 3회(total 3%) 첨가시 알부민 발현량이 30%정도 증가하였다. 이는 YE의 첨가가 필요한 아미노산을 비롯한 여러

영양원을 충분히 공급하여 발현된 알부민의 분해를 어느정도 막을 수 있었던 것으로 생각된다. 이의 확인을 위해 amino acid가 *H. polymorpha*의 알부민 expression level에 미치는 영향을 실험하였다. 이 실험의 결과는 Figure 13에서 보여지는 것처럼 여러 종류의 amino acid를 실험한 결과 그 중 glutamine, histidine, threonine을 각각 첨가해준 경우가 그렇지 않은 경우에 비해서 알부민 생산량이 상당부분 증가하였고 특히 histidine(350mg/L)을 첨가한 경우 250 mg/L 정도의 알부민을 발현하여 약 160%의 생산성 증가를 보였다.

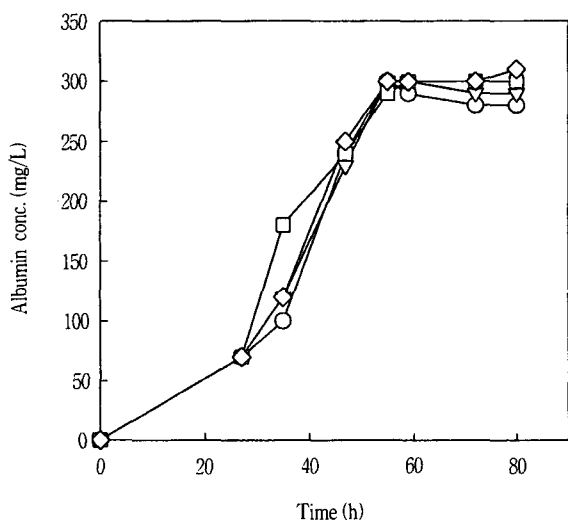


Figure 11. The effect of YE supplement on albumin expression with *P. pastoris*.

- : control
- ▽-▽ : 1회 add(at 20hr ; 1%)
- : 2회 add(at 20, 38hr ; 각 1%)
- ◇-◇ : 3회 add(at 20, 38, 50hr ; 각 1%)

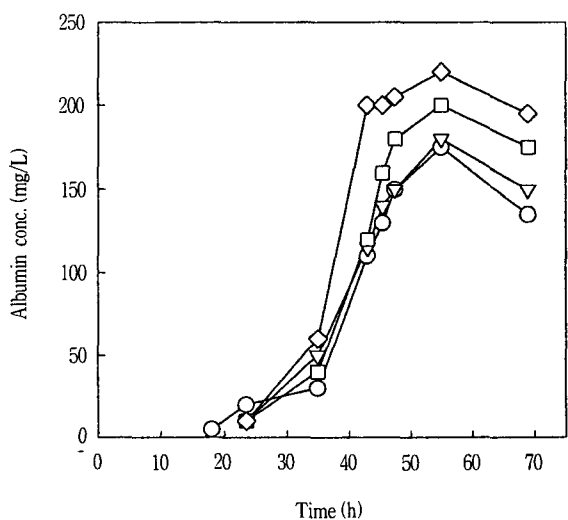


Figure 12. The effect of YE supplement on albumin expression with *H. polymorpha*.

- : control
- ▽-▽ : 1회 add(at 20hr ; 1%)
- : 2회 add(at 20, 38hr ; 각 1%)
- ◇-◇ : 3회 add(at 20, 38, 50hr ; 각 1%)

AOX1 과 MOX 프로모터 repression에 미치는 탄소원의 영향

본 실험에서는 탄소원이 AOX 1 및 MOX 프로모터 repression에 미치는 영향을 실험하기 위하여 YE 2%를 질소원으로 하고 탄소원으로 글루코즈 1%와 글리세롤 1%를 각각 사용하여 메탄올을 induction하는 경우를 비교하였다. 이 결과가 Figure 14, 15에 보여진다. *P. pastoris*의 경우 글루코즈를 탄소원으로 사용하였을 때 글루코즈가 모두 소비된 후에도 2~3시간 정도

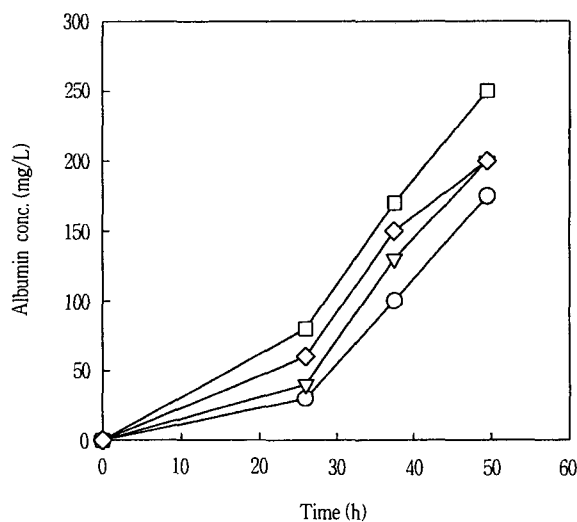


Figure 13. The effect of amino acid on albumin expression with *H. polymorpha*.

- : control
- ▽-▽ : glutamine (50mg/100ml)
- : histidine (35mg/100ml)
- ◇-◇ : threonine (50mg/100ml)

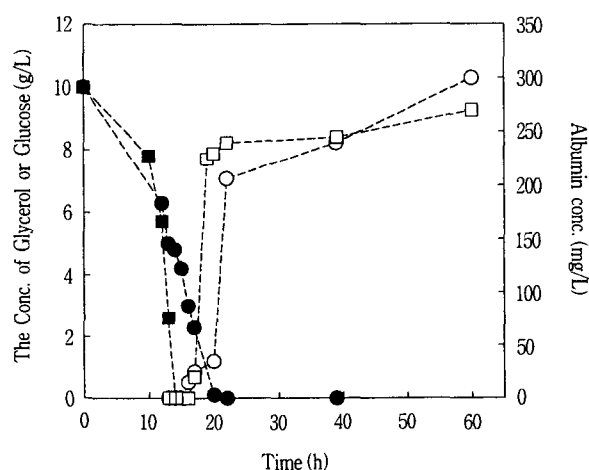


Figure 14. The effect of C source on albumin expression with *P. pastoris*.

- : glycerol conc.
- : glucose conc.
- : albumin conc. when glycerol was used
- : albumin conc. when glucose was used

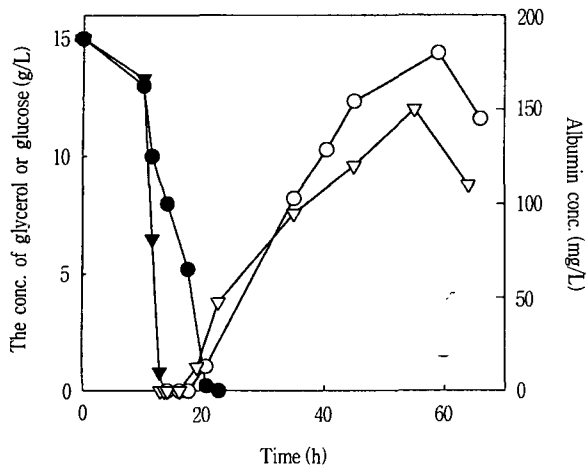


Figure 15. The effect of C source on albumin expression with *H. polymorpha*

- : glycerol conc.
- ▼-▼ : glucose conc.
- : albumin conc. when glycerol was used
- ▽-▽ : albumin conc. when glucose was used

발현이 이루어지지 않으나 글리세롤을 사용한 경우 글리세롤농도가 1g/L인 상태에서도 최대값의 약 10%정도 발현이 이루어짐을 알 수 있어 글리세롤에 의한 AOX 1 프로모터 repression이 글루코스에 비해 적음을 확인하였고 발효 후반부의 외래단백질 생산량은 글리세롤과 글루코즈 경우 거의 같음을 알 수 있었다. 따라서 Fed batch 시 글리세롤을 첨가하는 것이 탄소원에 의한 AOX 1 프로모터 repression을 줄일 수 있는 방법임을 알 수 있었다. *H. polymorpha*의 경우 글리세롤을 사용하였을 때 배지내 글리세롤의 농도가 0.5g/L 이하로 낮아질 때 알부민 발현이 미량 시작됨을 알 수 있었는데 글루코즈를 사용한 경우는 글루코즈가 모두 소비된 후에도 6시간 이상 발현이 이루어지지 않음을 알 수 있었는데 이 실험을 통하여 *H. polymorpha*가 *P. pastoris*보다 탄소원에 의한 프로모터 repression이 심함을 알 수 있었다.

발현된 알부민의 분비효율 비교

유전자 재조합 단백질 생산시 세포내에서 발현된 단백질을 세포밖으로 분비시키는 것은 매우 중요하다. 이러한 생성 단백질의 세포외로의 분비를 통해 세포내에서 축적된 단백질의 세포에 대한 부담을 없애고 생성 단백질의 분해를 감소시키며 배지내로 분비된 단백질의 정제를 용이하게 함으로써 재조합 단백질 생산의 경제성을 높일 수 있는바 본 실험에서는 *P. pastoris*와 *H. polymorpha*의 유전자 재조합 알부민의 세포내에서 세포외로의 분비효율을 살펴보았다. 이 결과가 Figure 16에 나타나는데 *P. pastoris*의 경우 95%이상이 extracellular 단백질이고 intracellular에는 발효후반부에 거의 5%미만이 남아있는 것으로 관측되었다. *H. polymorpha*의 경우는 extracellular에 80% 정도가 분포되어 있는 것으로 나타났다. 이 실험을 통하여 발현된 알부민의 분비효율은 *H. polymorpha*에 비해 *P. pastoris*가 높은 것으로 확인되었다.

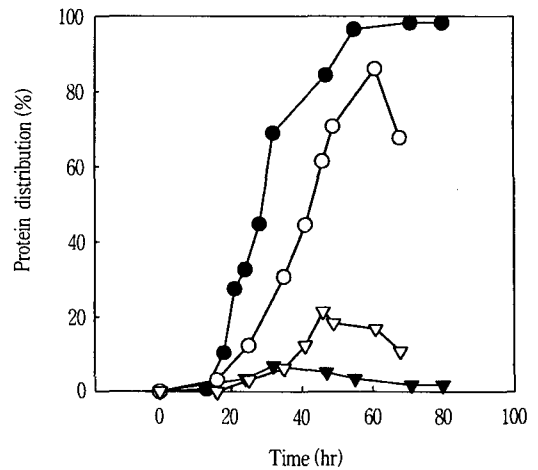


Figure 16. Localization of expressed albumin in *P. pastoris* and *H. polymorpha* (intra or extra / total protein).

- : secreted alb.(Pichia)
- ▼-▼ : expressed alb. in intracellular(Pichia)
- : secreted alb. (Hansenula)
- ▽-▽ : expressed alb. in intracellular(Hansenula)

요 약

본 연구에서는 다른 host cell에 비하여 여러 가지 장점을 가지고 있는 Methylo-trophic yeast중 *Pichia pastoris*와 *Hansenula polymorpha*의 회분식 실험을 통하여 유전자 재조합 단백질 최적발현조건을 비교하였고 이러한 비교를 통하여 각 균주의 유전자 재조합 알부민 발현 최적화 연구를 수행하였다. 두 균주의 프로모터를 induction시키는 최적 메탄올 농도는 *P. pastoris*의 경우 메탄올 8g/L부근, *H. polymorpha*의 경우는 13 g/L부근임을 알 수 있었다. 또한 메탄올에 의한 induction시키는 두 균주 모두 O. D. 4정도되는 exponential growth stage에서 메탄올을 첨가하는 경우가 초기 세포 성장단계에 메탄올을 첨가한 경우에 비해 약 20% 정도 높아짐을 확인하였다. 두 균주의 재조합 알부민 발현에 미치는 pH의 영향을 조사하였는데, *P. pastoris*의 경우 pH 5에서 가장 높은 알부민 생산성을 보여 약 300mg/L 알부민을 발현하였고 *H. polymorpha*의 경우 pH 5와 6에서 최대 약 180 mg/L의 알부민을 발현하였지만 pH 8에서는 이의 절반 수준에 그쳤다. 두 균주의 최적 배양온도는 *P. pastoris*의 경우 30℃, *H. polymorpha*의 경우 37℃에서 최대 알부민 생산성을 보였고, 이 조건에서 두 균주의 알부민 발현량은 각각 300mg/L, 180mg/L이었다. 또한 albumin 발현에 미치는 질소원의 영향을 조사하였는데 두 균주 모두 질소원으로 YE (2%)를 사용한 경우가 펩톤, casamino acid, YNB등을 질소원으로 사용한 경우보다 좋았다. 배양중 YE의 첨가가 알부민 발현에 미치는 영향을 조사하였다. *P. pastoris*의 경우 알부민 발현량에는 큰 차이가 없었으나 *H. polymorpha*의 경우는 YE를 1회(1%) 첨가시 마다 알부민 발현량이 10%정도씩 증가하여 YE를 3회(total 3%) 첨가시 알부민 발현량이 30%정도 증가하였다. 그리고 *H. polymorpha*의 경우 여러 가지 amino acid를 첨가하여 알부민 발현량 증가에 미치는 영향을 살펴보았는데 histidine(350mg/L)을 첨가한 경우 250 mg/L 정도의 알부민을

발현하여 약 150%의 생산성 증가를 보였다. 두 균주의 프로모터인 AOX 1과 MOX 프로모터 repression에 미치는 탄소원의 영향을 조사를 통하여 *H. polymorpha*가 *P. pastoris*보다 탄소원에 의한 프로모터 repression이 심함을 알 수 있었다. 두 균주의 발현된 알부민의 분비효율을 비교하였다. 이 결과 *P. pastoris*의 경우 발현단백질의 95% 이상이 extracellular에 존재하고 intracellular에는 발효후반부에 거의 5%미만이 남아있는 것으로 관측되었다. *H. polymorpha*의 경우는 extracellular에 80%정도가 분포되어 있는 것으로 나타났다. 이 실험을 통하여 발현된 알부민의 분비효율은 *H. polymorpha*에 비해 *P. pastoris*가 높은 것으로 확인되었다.

감 사

본 연구는 1997년도 교육부 학술연구조성비(생물화학공학)에 의하여 연구되었으며 이에 감사의 말씀을 드립니다.

참 고 문 헌

1. Cregg, J.M., and K.R. Madden(1988), Development of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins, *Dev. Ind. Microbiol.*, 29, p. 33.
2. Schekman, R., and P. Novick(1981), The secretory process

and yeast cell-surface assembly, *In: The molecular biology of the yeast Saccharomyces: Metabolism and gene expression*, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 361.

3. Schekman, R.(1985), Protein localization and membrane traffic in yeast *Ann. Rev. Cell Biol.*, 1, p. 115.
4. Cregg J.M., J.F. Tschopp, C. Stillman(1987), High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastiros*, *Bio/Technology*, 5, p. 497.
5. Cregg J.M., K. Hessler(1985), *Pichia pastoris* as a host system for transformation, *Mol. Cell. Biol.* 7, p. 3376.
6. Cregg, J.M., and C.R. William(1993), Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*, *Bio-technology*, 11, p. 905.
7. Grinna, L. S. and J.F. Tschlopp(1989), Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, *Yeast*, 5, p. 107.
8. Gellissen G., Z.A. Janowicz and C.P. Hollenberg(1992), Heterologous protein production in yeast, *Biotech. Adv.*, 10, p. 179.
9. Gellissen G. and C.P. Hollenberg(1995), Gene expression in methylotrophic yeasts, Marcel dekker, Inc.