

의약품 재조합 단백질 분비생산을 위한 효모 분비 발현 시스템 개발

강현아 · 김무웅 · 고수민 · 손정훈 · 최의성 · 이상기
생명공학연구소

효모 발현 · 분비 시스템

최근 난치성 질환의 증가와 국민의료 수준의 향상에 따라 고순도 단백질성 의약품의 수요가 급증하면서 의약품 재조합 단백질이 건강 관련 생명공학 분야에서 차지하는 비중이 매우 높아지고 있다. 이에 따라 의약품 재조합 단백질 대량생산을 위한 숙주 시스템으로 단세포 진핵미생물인 효모를 이용하는 빈도가 점차로 증가되고 있다. 특히 고등 동물세포와 매우 유사한 단백질 분비 경로를 지녔기에 효모는 인체 유래의 분비 단백질 생산을 위한 미생물 숙주시스템으로 애용되고 있다. 근래에는 전통효모 *Saccharomyces cerevisiae* 외에도 *Hansenula polymorpha*와 *Pichia pastoris*를 필두로 하는 non-*Saccharomyces* 효모들을 이용한 혈청 단백질, 백신 및 여러 다양한 의료용 단백질들의 대량생산이 성공적으로 진행되고 있다. 본 고에서는 세 종류의 인체 단백질들, 혈청 알부민, 부갑상선 호르몬, 그리고 알파1-안티트립신의 분비 생산을 위한 효모 발현 시스템 개발 연구에 관한 저자들의 최근 연구사례를 소개하면서 효모 분비 시스템을 이용한 이들 외래 단백질 생산시 당면했던 문제점들과 이를 극복하기 위해 사용한 연구 전략들에 관하여 간략히 서술하고자 한다.

수 천년동안 인류와 매우 밀접한 관계를 유지하며 제빵 및 양조 산업에 유용하게 이용되어온 효모 *S. cerevisiae*는 인체에 무해한 GRAS(Generally Recognized As Safe)로 잘 알려져 있다. 따라서 *S. cerevisiae*에 대해 오랫동안 축적된 풍부한 유전학, 분자 생물학 및 생리학적 정보로 인해서 효모를 숙주 시스템으로 이용한 외래 단백질 생산에 관한 초기 연구는 전통 효모 *S. cerevisiae*를 대상으로 시작되었다. 그러나 외래 단백질 생산 숙주로서 *S. cerevisiae*가 갖는 여러 제약성들, 예로써 발효 배양중 발현 벡터의 불안정성, 분비된 당단백질의 과당화(hyperglycosylation), 또한 박테리아 발현시스템에 비해 낮은 생산성 등의 문제점이 제기되었다[19]. 이를 해결하기 위하여 다양한 대체효모에 대한 연구가 최근에 많이 진행되어 *H. polymorpha*, *P. pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida utilis* 및 *Yarrowia lipolytica* 등 산업적 가치가 매우 높은 non-*Saccharomyces* 효모를 이용한 외래유전자 발현 시스템이 개발되고 있다(Table 1). 이들 중 특히 메탄올자화 효모인 *H.*

Table 1. Non-*Saccharomyces* yeasts for heterologous gene expression

Yeast	Attributes
<i>Candida utilis</i>	Can assimilate cheap biomass-derived sugars, such as sugar molasses and spent sulfite liquor. GRAS status.
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Lactose-fermenting and growth on cheap C-sources such as cheese whey GRAS status. Very high cell density (>100g DCW/L) Contains endogenous plasmids to be used as vectors.
<i>Pichia pastoris</i>	Methanol-inducible AOX promoter (tightly regulated) High cell densities (up to 150g DCW/L) on simple growth media High heterologous protein expression levels (5-40% of cell protein) with efficient secretion (>1g/l) Frequent absence of hyperglycosylation
<i>Hansenula polymorpha</i>	Stringently regulated strong promoters (MOX, FMDH etc.) Stable, multi-copy integration of foreign DNA Growth up to 45°C. Crabtree effect absent.
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Grows on n-paraffins as sole C-source Efficient secretion-signal recognition resembles that of higher eukaryotes
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Can correctly splice mammalian introns Transcription start site similar to that in higher eukaryotes Galactosylates proteins (as in higher eukaryotes)

*polymorpha*와 *P. pastoris*는 외래 단백질 대량 생산을 위한 이상적인 숙주시스템으로서의 여러 독특한 특징을 지니고 있다[8]. 즉, 이들은 값싼 원료물질인 메탄올을 에너지원과 탄소원으로 이용할 수 있어 *S. cerevisiae*에 비해 경제성이 높고, 또한 메탄올 대사에 관련되는 메탄올 옥시다제(Methanol oxidase: MOX) 또는 알코올 옥시다제(Alcohol oxidase: AOX) 유전자의 프로모터처럼 비교적 조절이 용이하면서도 매우 강력한 프로모터를 갖고 있어 산업적 응용 측면에서 응용성이 매우 높다. 또한 고농도 배양(100-130g DCW/L)이 용이하고 형질 전환시 발현 목표유전자가 숙주의 염색체상으로 다수 도입되어 비선택 배지에서 도입된 발현백터의 안정성이 뛰어난 장점이 있다. 더 나아가 이들 효모에서 발현된 당단백질들은 *S. cerevisiae*에서 발현된 당단백질들에 비해 훨씬 과당화되는 정도가 낮은 것으로 보고되어 있다.

진핵 미생물로서, 효모는 포유동물 세포와 거의 동일한 방법으로 단백질을 분비하며 유사한 단백질 수식 및 절단과정을 갖고 있다. 분비 경로를 거치게 되는 단백질들은 소포체에서 그들의 최종적인 삼차구조를 갖추게 되고 당단백질인 경우 N- 및 O-linked glycan들이 부착된다. 추후 골지체로 운송된 단백질들은 올리고당의 첨가 또는 단백질 절단 같은 단백질 수식 과정을 좀더 거친 후 여러 기관으로 운송되거나, 세포막의 성분으로 삽입되거나, 또는 세포 밖으로 배출된다. 진핵세포에서의 단백질 분비과정은 여러 종류의 번역 후 수식(post-translational modification) 과정을 포함하고 있어 외래 단백질을 효모에서 분비 생산하고자 할 때 이에 따른 여러 문제점들이 발생될 수 있다(Table 2). 일반적으로 외래 숙주에서 발현 분비되는 재조합 단백질의 양과 질을 향상시키기 위해서 (i) 발현 카세트의 카피수 최적화, (ii) 발현카세트 효율 극대화, (iii) gene fusion technique, (iv) 숙주 균주의 분자적 육종, 그리고 (v) 배지 및 배양조건의 최적화 등 여러 다양한 전략을 시도할 수 있다. 그러나 외래 숙주에서 재조합 단백질을 분비 생산할 때 각 목적 단백질 및 숙주 시스템 자체의 고유한 특징으로 인해 각기 특유의 문제점이 제기되므로 각 특정 단백질의 분비 발현시스템마다 생산 최적화를 위한 전략 및 접근 방

법이 달라지게 된다.

전통효모 *S. cerevisiae*에서의 인체 혈청 알부민 발현 · 분비

인체 혈청 알부민(Human Serum Albumin: HSA)은 분자량이 약 66.6 kDa 정도의 단일 펩타이드로 구성되어 있다. 알부민은 혈장내 총 단백질량의 약 60% 정도를 차지하는 가장 높은 함량으로 존재하는 혈장 단백질이다. 단백질 의약품으로서의 알부민 수요량이 크게 증가됨에 따라, 재조합 단백질 생산 기술을 통해 인체 병원균 및 바이러스가 감염되지 않은 재조합 알부민을 대량 생산하기 위해 *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces sp.*, *P. pastoris*를 포함한 여러 효모 숙주를 이용한 생산 시스템 개발 연구가 유럽, 일본 및 미국 등에서 활발하게 진행되고 있다[10].

알부민 발현 벡터 최적화

본 저자들은 전통효모 *S. cerevisiae*에서 재조합 HSA를 고효율로 발현 분비시키기 위해 알부민 발현에 영향을 미칠 수 있는 여러 요인들, 즉 프로모터, 5' untranslated region(5' UTR), 분비 신호 시그널, 발현백터의 선별표지 등을 체계적으로 분석하여 알부민 발현 벡터의 최적화를 시도하였다. 제작된 여러 알부민 발현 카세트들 중에서 *GAL10* 프로모터, HSA cDNA 유래의 5' UTR, HSA 유래의 prepro sequence로 구성된 경우 가장 높은 효율로 *S. cerevisiae*에서 재조합 HSA가 발현 · 분비되었다[13].

재조합 알부민의 분해 방지

Shake-flask 배양에서 *GAL10* 프로모터로부터 지속적인 재조합 HSA의 발현을 유도하기 위해 계속적인 갈락토즈 공급을 시도한 결과, 예상과는 달리 배양액으로 분비된 알부민의 분해가 오히려 촉진되는 현상이 관찰되었다. *S. cerevisiae* 배양액으로 분비된 알부민 분해는 배양액의 pH가 저하되어 산성화되면서 활성화된 단백질 분해효소에 의해 야기되므로 배양액

Table 2. The putative limiting steps encountered in the secretory production of heterologous proteins using yeast as host system

	Nucleus	ER	Golgi	Post-Golgi
Key processes	<ul style="list-style-type: none"> • Transcription 	<ul style="list-style-type: none"> • Translation • Signal recognition • Folding/modification • Glycosylation 	<ul style="list-style-type: none"> • Protein processing • Glycosylation 	<ul style="list-style-type: none"> • Post-Golgi process • Cell wall passage
Putative bottlenecks	<ul style="list-style-type: none"> • Stability of expression vector • Fortuitous transcriptional termination • mRNA stability 	<ul style="list-style-type: none"> • Poor translation • Misfolding • ER proteolytic degradation 	<ul style="list-style-type: none"> • Incorrect processing • Hypermannosylation 	<ul style="list-style-type: none"> • Proteolysis

의 pH가 5.0 이상으로 유지되거나 배양배지에 아미노산이 풍부한 질소원을 첨가되면 알부민 분해가 상당히 방지되었다 [16].

갈락토즈 대사 결손 균주 제작

재조합 알부민 생산 균주 배양시 발현 유도원으로 사용되어야 할 갈락토즈가 주로 세포 성장을 위한 탄소원으로 소모되는 문제점을 해결하기 위해, 갈락토즈 대사에 작용하는 첫 번째 효소인 갈락토키나제를 코딩하는 *GAL1* 유전자가 파쇄된 숙주 균주를 제작하였다. 갈락토즈를 거의 탄소원으로 사용할 수 없는 $\Delta gal1$ 변이주의 경우 *GAL1* 야생주에 비해 약 20분의 1 정도 소량의 갈락토즈만으로도 *GAL1* 야생주에 거의 견줄만한 최대 알부민 생산성을 보였다. $\Delta gal1$ 균주의 경우 최소 0.05 g/L 갈락토즈 농도에서 알부민 발현이 최대에 도달하고 이후로는 넓은 범위의 갈락토즈 농도에 상관없이 상당히 일정한 발현 수준을 보였다. 따라서 발현카세트 안정화를 위해 알부민 발현카세트를 숙주 염색체내로 다중 도입시킨 $\Delta gal1$ 형질전환체가 추후 대량 발효를 통한 알부민 생산을 위한 산업용 생산 균주로 유용하게 이용될 것으로 기대된다[18].

메탄올자화 효모 *H. polymorpha*에서의 인체 혈청 알부민 분비생산

메탄올자화 효모 *H. polymorpha*는 글라이세롤과 메탄올 같은 값싼 탄소원에서 고농도 배양이 가능할 뿐만 아니라, 형질전환시 주로 비상동성(non-homologous)에 의해 외래 유전자가 숙주 염색체내로 다중 삽입되는 독특한 특징을 갖고 있다. 이 같은 특징은 높은 발현율을 얻기 위해서는 많은 카피수의 외래 유전자가 존재해야만 되는 경우에 매우 유용하게 활용될 수 있다. 따라서 본 저자들은 효모 발현시스템에서 재조합 HSA 생산 수율을 보다 증가시키기 위한 노력의 일환으로 *H. polymorpha*를 알부민 생산 숙주로 개발하고자 알부민 발현 카세트가 숙주 염색체로 다양한 수로 삽입된 재조합 균주들을 제작하였다(Kang et al., manuscript in preparation).

알부민 발현 카세트의 5' UTR 및 카피수 최적화

H. polymorpha DL-1 균주에서 메탄올에 의해 발현이 유도되는 *MOX* 프로모터 또는 강력한 구성적 발현 프로모터인 *GAP* 프로모터로부터 재조합 HSA이 고효율로 발현되도록 알부민 발현 카세트의 5' UTR 및 카피수 최적화를 도모하였다. P_{MOX} -HSA 카세트의 경우는 HSA cDNA에서 유래된 5' UTR이 제거된 경우에 알부민 단백질 합성 단계에서 약 5 배 정도의 발현효율 증가를 보였다. 5' UTR 최적화 후에는 알부민 카세트의 카피 수 증가에 따른 알부민 발현 증가가 더 이상 일어나지 않아 단지 한 카피만 숙주 염색체로 삽입된 경우에 최대 생물산업

알부민 발현을 보였다. 이와는 달리 P_{GAP} -HSA의 경우는, HSA 5' UTR의 제거가 오히려 *GAP* 프로모터로부터 발현된 HSA transcript의 안정성 및 translation 효율을 크게 저하시켜서 HSA 5' UTR의 존재가 *GAP* 프로모터로부터 알부민을 고효율 발현시키기 위해서 필요한 것으로 분석되었다. 그러나 최적화된 P_{GAP} -HSA 발현 카세트 경우도 단지 두 카피만 존재해도 최대 알부민 발현을 보였다. 이와 같은 결과들은 5' UTR이 발현효율에 미치는 영향은 각 특정 발현 카세트마다 다르게 작용하며, 또한 발현카세트의 카피수가 외래 단백질 발현에 미치는 영향은 발현카세트 자체의 발현효율에 의해 크게 좌우됨을 시사하고 있다. 최종 선별된 재조합 *H. polymorpha* 생산 균주들은 고농도 배양시 리터당 수 그램 정도의 알부민을 분비 생산할 수 있어 *H. polymorpha*가 재조합 알부민 대량 생산에 적합한 숙주임이 입증되었다.

메탄올 대사 결손 균주 제작

MOX 야생형 형질전환체의 경우, 강력한 메탄올 옥시다제 활성으로 인해 세포자체가 마치 효소 반응기처럼 작동하여 fed-batch 발효시 발현 유도를 위해 주입한 메탄올이 단지 효소 반응을 위한 기질로서 매우 빠른 속도로 소모되어 버리는 문제점이 제기되었다. 더욱이 *MOX* 단백질 자체가 메탄올에서 배양된 세포의 총 수용성 단백질 중 30% 이상을 차지하게 된다. *MOX* 야생형 형질전환체에서 제기된 상기 문제점들을 해결하기 위해 염색체상의 *MOX* 유전자가 제거되고 그 자리에 알부민 발현 카세트가 삽입된 Δmox 형질전환체를 제작하였다. 메탄올을 탄소원으로 소모하지 못하는 Δmox 형질전환체에 비해 월등하게 증가된 균체당 생산성을 보였다.

*S. cerevisiae*에서의 인체 부갑상선 호르몬 분비 생산

인체 부갑상선 호르몬(Human Parathyroid Hormone: hPTH)은 인체의 부갑상선에서 생산되는 84개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드 호르몬으로서 신장과 뼈에서 칼슘의 항상성을 조절하여 신진대사와 골형성을 촉진시키는 생리활성을 지니고 있다. hPTH의 총괄적인 생리적 기능은 Ca^{2+} 의 농도 조절을 통한 골형성 촉진 작용이어서 재조합 hPTH를 골다공증 치료제로 개발하기 위한 연구가 선진국의 우수 제약사들을 중심으로 활발하게 진행되고 있다[24]. 특히 현대사회가 점차로 노령화되면서 골다공증의 예방과 치료에 대한 관심이 고조되고 있어, 기존의 골다공증 치료제를 효과적으로 대체할 것으로 기대되고 있어 재조합 단백질 생산기술을 이용하여 hPTH를 대량생산하고자 하는 개발연구가 본격적으로 수행되고 있다.

Table 3. Protease-deficient strains of *S. cerevisiae* useful for heterologous protein production

Mutant	Enzymes	Type	Location	Application
<i>pep4</i>	Proteinase A (PrA)	Aspartic protease; endoproteinase	Vacuole	HBsAg [4] Human nerve growth hormone [19]
<i>prb1</i>	Proteinase B (PrB)	Serine protease-subtilisin family Endoproteinase	Vacuole	Intracellular production [1]
<i>prc1</i>	Carboxypeptidase Y (CpY)	Serine carboxypeptidase	Vacuole	Hirudin [11]
<i>kex2</i>	Kexin	Serine protease; endoproteinase Cleavages on the C-terminal side of dibasic residues	Golgi	<i>Rhizopus oryzae</i> lipase [21]
<i>kex1</i>	Carboxypeptidase D	Serine carboxypeptidase Cleavages on the C-terminal side of basic residues	Golgi	Hirudin [11]
<i>vps1</i>	Yapsin 1 (YAP3p)	Aspartic protease; endoproteinase Cleavages on the C-terminal side of basic residues	Plasma-membrane	Insect diuretic hormone [6] Human parathyroid hormone [13]
<i>vps2</i>	Yapsin 2 (MKC7p)	Aspartic protease; endoproteinase Cleavages on the C-terminal side of basic residues	Plasma-membrane	Insect diuretic hormone [6]

효모 *S. cerevisiae*에서 분비된 hPTH의 분해

효모 *S. cerevisiae*를 발현 숙주로 이용한 재조합 hPTH 분비 생산의 경우, 효모 숙주자체의 단백질 분해효소에 의해 세포 밖으로 분비된 대부분의 hPTH가 절단되는 것이 효모를 이용한 hPTH 생산시스템을 산업적으로 활용하는 데 큰 걸림돌이었다. 고농도의 L-아지닌(arginine)을 배양매지에 첨가하면 hPTH 절단이 현저하게 저해된다는 선행 연구결과[5]에 기초하여, 앱신 1 프로테아제(yapsin1; previously named YAP3)에 대한 유전자가 파쇄된 숙주 균주를 제작하였다. 효모 아스파티크 프로테아제의 subfamily에 속하는 앱신 1은 세포막에 존재하면서 단일 또는 쌍으로 존재하는 basic amino acids를 인지하여 절단한다. Shake-flask 배양시 *YPS1* 야생형 형질전환체에 비해 $\Delta yps1$ 형질전환체에서 hPTH의 분해가 현저하게 감소됨이 관찰되었다[14]. 그러나 fed-batch 배양 말기에서 $\Delta yps1$ 형질전환체에서도 상당한 hPTH 분해가 관찰되었다[21]. 배양 말기에 일어나는 hPTH 분해 문제를 해결하기 위해 현재 다른 앱신 계통의 단백질 분해효소가 부가적으로 결손된 균주의 분자 육종이 진행되고 있다(Tabel 3).

효모에서의 인체 당단백질 알파1-안티트립신 분비 발현

의학적으로 중요한 인체 단백질의 상당수는 분비 과정 중에 당쇄(oligosaccharide)가 공유결합을 통해 부착되는 당단백질이다. 효모는 단백질의 당화과정(glycosylation)이 존재하는 단세포 진핵 세포이기에 인체 당단백질의 분비 발현에 이용 가능한 숙주로 개발되고 있다. 당단백질에 부착된 탄수화물의 구조와 종류가 당단백질의 폴딩, 분비, 안정성, 혈장내 반감기 및

항체 유발성 등에 영향을 미치므로 적합한 당화과정을 거친 재조합 단백질의 생산과 정확한 당화상태의 분석은 효모와 같은 외래 숙주로부터 대량생산을 도모하는 생물공학 분야에서 하나의 관건으로 대두되었다. 인체 알파1-안티트립신(α_1 -Antitrypsin; α_1 -AT)은 394개의 아미노산으로 구성된 당단백질로써 간에서 일차적으로 합성된 후 세 개의 asparagine 잔기에 complex type의 당쇄가 부착되는 당화과정을 거쳐 혈장으로 분비된다[2]. 단백질 분해효소 저해 활성을 지닌 주요 혈장 단백질인 α_1 -AT의 생리적인 기능은 간에서 엘라스타제(elastase)의 활성을 저해하는 역할을 하는 것이다.

***S. cerevisiae*와 메탄올 자화 효모에서의 당화 형태 비교**

효모 *S. cerevisiae*에서 inulinase 유래의 분비 표지 서열에 연결된 인체 α_1 -AT는 당화된 상태로 높은 효율로 발현·분비되지만[12], 분비된 재조합 α_1 -AT는 두 개 또는 세 개의 모든 asparagine 잔기에 핵심 당쇄(core oligosaccharide)만 부착된 주된 형태 외에도 다양한 수의 만노즈가 핵심 당쇄에 부가적으로 부착된 과당화 형태가 공존하는 매우 불균일한 당화 형태를 보였다. 이와 같이 *S. cerevisiae*에서의 hypermannosylation 문제에 대한 부분적인 해결 방법으로 non-Saccharomyces 효모에서 α_1 -AT을 발현하여 본래의 α_1 -AT 당화 형태에 보다 가까운 당화 형태를 지닌 재조합 α_1 -AT의 분비 생산을 시도하였다. 메탄올 자화 효모 *H. polymorpha*와 *P. pastoris*에서 inulinase 표지 서열을 이용하여 세포막 배지로 분비된 재조합 α_1 -AT들도 과당화된 상태로 발현되지만 *S. cerevisiae*에서 분비 발현된 α_1 -AT에 비하여 전체적인 만노즈 당외쇄(mannose outer chain)의 길이는 상당히 짧았다. 특히 *P. pastoris*에는 인체에 항원성을 갖는 α 1,3-linked terminal mannose가 존재

하지 않으며 또한 가장 큰 비율로 완전하게 당화된 형태의 α_1 -AT가 분비되었다는 점에서, 비교 분석해 본 세 종류의 효모 발현 시스템 중에서 *P. pastoris*가 당화된 재조합 α_1 -AT 생산을 위한 가장 적합한 숙주로 볼 수 있다[15].

당화 과정 결손 변이주들의 활용

효모에서 발견되는 당단백질들의 과당화 문제 해결을 위한 또 다른 방법은 *mnn1 mnn9*과 *och1 mnn1* 이중 돌연변이주와 같이 당화 과정 결손 돌연변이주를 숙주로 이용하여 외래 당단백질을 생산하는 것이다[7]. 이러한 돌연변이 균주에서는 N-glycosylation이 높은 항원성을 지니는 말단 $\alpha 1,3$ -glycan linkage가 없는 핵심 당쇄 형태로만 일어나게 된다. 하지만 *och1*과 *mnn9* 돌연변이의 심각한 성장 저해는 이들 변이주들이 재조합 단백질 대량을 위한 숙주로 활용되는 데에 큰 제한점이 되고 있다. 최근 *S. cerevisiae*의 $\Delta pmr1$ 변이주에 관한 연구 결과는 *pmr1* 변이주에서 분비되는 재조합 당단백질들은 거의 핵심 당쇄 형태의 당단백질로 분비됨을 보여주었다. 더욱이 $\alpha 1,3$ -mannose 항체를 통한 분석 결과는 *pmr1* 변이주에서 분비된 재조합 당단백질들이 말단 $\alpha 1,3$ -linked mannose를 지니지 않음을 시사하였다[17]. 따라서 *och1*과 *mnn9* 변이주에 비해 *pmr1* 변이주가 빠른 성장 속도를 보이며 별도로 $\alpha 1,3$ -glycan linkage 과정이 결손된 *mnn1* 돌연변이를 필요로 하지 않음을 고려하면, $\Delta pmr1$ 변이주는 말단 $\alpha 1,3$ -mannose가 결여된 핵심 당쇄만 지닌 재조합 당단백질을 대량 생산하는 데에 실질적으로 활용 가능한 숙주로 사료된다.

앞으로의 동향

1986년 Merck사에서 효모 *S. cerevisiae*에서 생산한 간염백신(HBsAg)을 "Recombivax"라는 제품으로 인체 의약품 단백질로서는 처음으로 상업화된 이래로 수십 종의 재조합 단백질이 효모 발현 시스템을 이용하여 생산되었고 이중 일부는 전 임상 및 임상시험을 거쳐 이미 시판 중에 있으며 현재 많은 재조합 단백질들이 임상 시험중이거나 연구 개발 단계에 있다 [23]. 주목할 점은 인간 유래의 의약품 재조합 단백질 생산을 위한 발현 시스템으로 *non-Saccharomyces* 효모들의 역할이 점차 증가하고 있다는 것이다[3,9]. 따라서 효모에서 보다 자연 원형 상태에 가까우면서 생리활성이 유지된 상태로 재조합 단백질을 생산하며 그 생산성을 극대화하기 위한 공동의 노력이 생리학자, 분자 유전학자, 그리고 발효 기술자간의 연계적 연구를 통해 계속적으로 지속되는 한 우리의 오랜 친구 효모는 재조합 의약품 생산을 위한 숙주 시스템으로서 그 인기를 앞으로도 상당히 누릴 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Alvarez P., Sampedro M. Molina M. and Nombela C. 1994. A new system for the release of heterologous proteins from yeast based on mutant strains deficient in cell integrity. *J. Biotechnol.* **38**, 81-88.
2. Carrell R. W. 1986. Reactive-centre variants of α_1 -antitrypsin. A new range of anti-inflammatory agents. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **4**, 292-309.
3. Cereghino J. L. and Cregg J. M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Review.* **24**, 45-66.
4. Chen D. C., Chuang L. T., Chen W. P., and Kuo T. T. 1995. Abnormal growth induced by expression of HBsAg in the secretion pathway of *S. cerevisiae pep4* mutants. *Curr Genet.* **27**, 201-206.
5. Chung B. H. and Park K. S. 1998. A simple approach to reducing the proteolysis during the secretory production of human parathyroid hormone in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **57**, 245-249.
6. Copley K. S., Alm S. M., Schooley D. A., and Courchesne W. E. 1998. Expression, processing and secretion of a proteolytically-sensitive insect diuretic hormone by *Saccharomyces cerevisiae* requires the use of a yeast strain lacking genes encoding the Yap3 and Mkc7 endoproteases found in the secretory pathway. *Biochem. J.* **330**, 1333-1340.
7. Dean N. 1999. Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. *Biochim e Biophys Acta* **1426**, 309-322.
8. Gellissen G., Hollenberg C. P., and Janowicz Z. A. 1995. *Gene expression in methylotrophic yeasts*. Ed. Smith A. In *Gene expression in recombinant microorganisms*. New York, Marcel Dekker, pp. 195-239.
9. Gellissen G. and Melber K. 1996. Methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* as production organism for recombinant pharmaceuticals. *Drug Research* **46**, 943-948.
10. Goodey A. R. 1993. The production of heterologous plasma proteins. *TIBTECH.* **11**, 430-433.
11. Hinnen A., Buxton F., Chaudhuri B., Heim J., Hottiger T., Meyhack B., and Pohlig G. 1995. Gene expression in recombinant yeast. Ed. Smith A. In *Gene expression in recombinant microorganisms*. New York, Marcel Dekker, pp. 121-193.
12. Kang H. A., Nam S. W., Kwon K.-S., Chung B. H., and Yu M.-H. 1996. High-level secretion of human α_1 -antitrypsin from *Saccharomyces cerevisiae* using inulinase signal sequence. *J. Biotechnol.* **48**, 15-24.
13. Kang H. A., Jung M. S., Hong W.-K., Sohn J.-H., Choi E.-S., and Rhee S.-K. 1998. Expression and secretion of human serum albumin in the yeast *Saccharomyces*

- cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 42-48.
14. Kang, H. A., Kim S. J., Choi E.-S., Rhee S.-K., and Chung B. H. 1998. Efficient production of intact human parathyroid hormone in a *Saccharomyces cerevisiae* mutant deficient in yeast aspartic protease 3(YAP3). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 187-192.
 15. Kang, H. A., Sohn J.-H., Choi E.-S., Chung B.-H., Yu M.-H., and Rhee S.-K. 1998. Glycosylation of human α_1 -antitrypsin in *Saccharomyces cerevisiae* and methylotrophic yeasts. *Yeast* **14**, 371-381.
 16. Kang H. A., Choi E.-S., Hong W.-K., Kim J.-Y., Ko S.-M., Kim J. Y., Sohn J.-H., and Rhee S.-K. 2000. Proteolytic stability of recombinant human serum albumin secreted in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 575-582.
 17. Kim, M. W., Ko S.-M., Kim J.-Y., Sohn J. H., Choi E.-S., Kang H. A., and Rhee S.K. 2000. Effect of a *PMRI* disruption on the processing of heterologous glycoproteins secreted in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Bioprocess Eng.* **5**, 234-241.
 18. Ko, S.-M. 2000. Secretion of recombinant human serum albumin in *Saccharomyces cerevisiae* strain lacking galactokinase encoded by *GAL1*. Master. Chungnam National University, Taejon.
 19. Romanos, M. A., Scorer C. A., and Clare J. J. 1992. Foreign gene expression in yeast: a Review. *Yeast* **8**, 423-488.
 20. Sakai A., Ozawa F., Higashizaki T., Shimizu Y., and Hishinuma F. 1991. Enhanced secretion of human nerve growth factor from *Saccharomyces cerevisiae* using an advanced delta-integration system. *Biotechnology* **9**, 1382-1385.
 21. Song G. Y. and Chung B. H. 2000. Overproduction of human parathyroid hormone by fed-batch culture of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking yeast aspartic protease 3. *Process Biochem.* **35**, 503-508.
 22. Takahashi S., Ueda, M., and Tanaka A. 1999. Independent production of two molecular forms of a recombinant *Rhizopus oryzae* lipase by KEX2-engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 534-540.
 23. Walker G. M. 1998. *Yeast technology*. In *Yeast physiology and Biotechnology*. John Wiley & Sons, Chichester. pp265-320.
 24. Whitfield J. F. and Morley P. 1995. Small bone-building fragments of parathyroid hormone: new therapeutic agents for osteoporosis. *Trends Pharmacol. Sci.* **16**, 382-386.