

# 산업효소의 효모 표면발현(yeast surface display)과 응용

손정훈 · 김소영 · 최의성

한국생명공학연구원

### 서론

유용단백질의 표면발현 시스템은 비교적 최근에 발달한 유전공학 기술로서 자연적으로 미생물의 표면에 존재하는 단백질 유전자에 외래유전자를 연결하여 발현함으로써 외래단백질을 세포의 표면에 부착시키는 방법이다. 이러한 표면발현기술은 초기에는 미생물의 표면에 다양한 항원성 또는 항체성의 polypeptide를 노출시켜 항원 항체의 스크리닝에 목적을 두고 개발되었으며 각종 peptide 항체 library의 제조, 다양한 생백신(live vaccine)의 제조에 이용되고 있다. 뿐만 아니라 세포표면에 다양한 생리활성효소나 금속이온 결합단백질의 고정화를 통하여 고부가가치의 물질생산을 위한 전세포 생물촉매(whole cell biocatalyst) 및 폐수처리용 전세포 흡착제(whole cell adsorbent)의 개발등 그 이용성이 매우 다양하다[11, 21, 34]. 이러한 다양한 응용성 중 peptide library의 경우 최근 high throughput screening 기술로서 의약품 개발에 폭발적 발전을 가져오고 있다. 산업효소를 미생물의 표면에 발현한 전세포 생물촉매(whole cell biocatalyst) 시스템 경우의 장점은 다음과 같다.

- (1) 전통적 whole cell microbial catalyst의 사용에서 substrate와 product의 세포막 수송의 장벽을 제거하기 위하여 사용해야 했던 cell permeabilization이 필요없고 따라서 이에 의하여 야기되었던 효소의 불활성화를 방지할 수 있다.
- (2) whole cell biocatalyst의 경우 cytoplasm 내에서 반응하므로 발생되었던 경쟁적 부반응(side reactions)에 의한 생산성 저하의 문제를 피할 수 있다.
- (3) 세포외에서의 반응으로 reactant와 product의 세포막 통과와 mass transport 문제를 피할 수 있다.
- (4) 또한 표면발현은 세포표면에 immobilization으로 비유될 수 있는데 반응 후 반응액으로부터 사용한 biocatalyst를 회수하는 것이 매우 용이하다.
- (5) 전통적 immobilization에 비하여 biocatalyst의 regeneration이 가능하여 재사용 할 수 있다.

표면발현에 대한 연구는 bacteriophage나 원핵세포인 대장균 및 그람양성 세균 등에서 다양한 표면단백질을 매개로 이용하는 기술이 개발되었으며 산업적으로 응용성을 넓혀 나가

고 있는 추세이다. 그러나 bacteriophage의 경우 고밀도 표면발현이 가능한 경우는 약 50-60 amino acid로서 display할 수 있는 단백질의 크기에 한계가 있으며 대장균이나 그람양성세균의 경우에는 효소와 같은 분자량이 큰 단백질을 display할 수 있으나 표면발현의 밀도가 매우 낮은 문제점 등이 단점으로 지적되고 있다. 뿐만 아니라 식품이나 인체를 대상으로 하는 의약품 생산을 위한 효소반응의 경우 인체에 대한 안전성 문제도 심각하게 대두되고 있다. 따라서 최근에는 이러한 원핵세포를 이용한 표면발현의 단점을 보완할 수 있는 새로운 표면발현 시스템으로서 진핵세포인 효모 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하려는 시도가 활발히 진행되고 있다. 제빵효모 *S. cerevisiae*는 GRAS(generally recognized as safe)이며 오랫동안 많은 전통 생물공학산업에 이용되어 왔기 때문에 분자유전학 연구가 많이 되어 왔고 또 세포의 고농도 발효기술이 축적되어 있다. 뿐만 아니라 효모는 진핵세포로서 고등생물과 유사한 유전자 구조 및 glycosylation을 포함하는 번역후 단백질 수식(post-translational modification) 과정을 가지기 때문에 고등세포 유래의 단백질을 활성상태로 발현할 수 있다[28].

유용 효소유전자의 표면발현의 측면에서 효모는 다음과 같은 장점을 제공한다.

- (1) 효모는 다른 미생물에 비하여 외래단백질의 분비기구가 잘 발달하여 있으므로 표면발현의 전제조건인 목표단백질의 분비가 용이하다.
- (2) 효모는 다른 미생물에 비하여 세포벽이 매우 단단하며 표면에 부착되는 단백질들이 세포표면의 glucan 구조와 covalent bond에 의하여 결합되므로 반응 중 extraction 되지 않는 장점을 지니고 있어 산업적 응용에 있어서 life-time이 길다.
- (3) 표면발현시의 단백질의 표면밀도의 측면에서도 효모에서 현재 알려진  $\alpha$ -agglutinin의 경우 효모세포 1개당  $10^4$ 으로 원핵세포 시스템에 비하여 매우 높다는 장점을 지니고 있다.

따라서 본고에서는 효모 *S. cerevisiae*에서 유용 산업효소를 표면발현하기 위해 요구되는 발현 시스템과 현재까지 보고된 효모 표면발현 연구 및 응용에 대해 서술하고자 한다.

### 효모의 표면발현 시스템

효모에서 외래유전자의 표면발현은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 발현된 단백질이 세포벽으로 이동할 수 있도록 외래유전자의 N-terminal에 분비 signal이 필요하며 또한 단백질이 세포 밖으로 완전히 분비되지 못하게 잡아주는 역할을 하는 세포벽 부착 매개단백질이 요구된다. 효모의 genome sequencing이 완료된 후 발견된 6,000여개의 open reading frames(ORFs)에 Von Heijne algorithm을 적용한 결과 약 686개의 ORF가 N-terminal에 단백질 분비 signal을 함유하고 있는 것으로 알려졌다[7]. 이들 각각의 분비 signal들은 단백질 분비 효율의 차이는 있겠으나 이론적으로 단백질 표면발현을 위한 분비 signal로 이용이 가능하다. 효모에서 이용할 수 있는 매개단백질로는 자연적으로 효모 세포벽에 존재하는 다양한 세포벽 mannoprotein을 이용할 수 있는데, 대부분의 mannoprotein이 함유하는 C-terminal Serine/Threonine-rich domain과 GPI (glycosylphosphatidyl-inositol) attachment signal을 매개단백질로 이용할 수 있다.

효모의 세포벽에 존재하는 mannoprotein에는 추출하는 방법에 따라 적어도 두가지 type의 mannoprotein이 존재하는데 즉, sodium dodecyl sulfate(SDS)의 처리에 의해 추출되는 단백질과 glucanase를 처리하였을 때만 추출되는 단백질이 존재한다[10,18]. SDS처리에 의해 추출되는 mannoprotein들은 대부분 세포벽에 약하게 결합하는 단백질과 일부 plasma membrane 유래이며[44] 주로 분자량이 작은 단백질들이다 [43]. 이들은 세포벽과의 결합력이 약하거나 세포의 표면과의 거리가 먼 위치에 존재하기 때문에 이들을 매개로 하여 외래

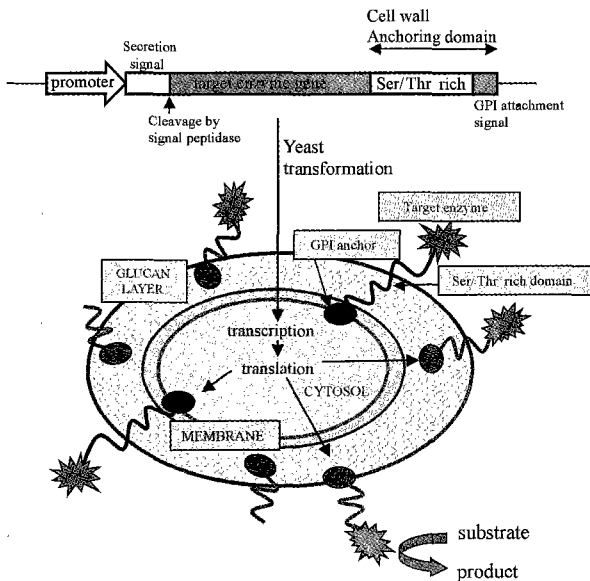


Fig. 1. Schematic diagram of yeast surface display and its use as a whole cell biocatalyst.

생물산업

단백질을 표면발현하였을 때 결합력이 약하거나 외래단백질이 충분히 표면에 노출되지 못하여 세포벽으로 흡수되지 못하는 기질과는 접촉할 수 없는 단점이 있다[44]. 따라서 SDS로 추출되는 mannoprotein은 표면발현을 위한 매개단백질로 적합하지 못한 반면 glucanase처리에 의해서만 추출되는 mannoprotein은 대부분 분자량이 크고[27] 세포벽의 glucan층이 분해된 후에만 추출되기 때문에 glucan과 결합하고 있다는 것을 알 수 있다. 따라서 외래단백질의 표면발현에서 안정한 표면부착을 위해서 자연적으로 세포벽의 glucan과 강하게 결합하고 있는 즉 glucanase에 의해서만 추출가능한 mannoprotein들이 적절한 것으로 알려졌다[34].

효모 *S. cerevisiae*에서 특성 확인된 세포벽 단백질은 Table 1과 같고 이들은 대부분 매우 유사한 특징을 가지고 있는데 주로 Ser/Thr-rich 단백질로 밝혀졌고 모두 hydrophobic한 C-terminal로 구성되었으며 대부분 putative GPI attachment signal을 가지고 있다[36]. Fig. 2에서 보는 바와 같이 GPI anchor는 ethanolamine-phosphate-(mannose)<sub>3</sub>-glucosamine-inositol로 구성된 glycan으로 endoplasmic reticulum(ER)에서 GPI anchor attachment signal을 가진 세포벽 단백질의 C-terminal의 일부 peptide가 제거된 후 결합된다. 이러한 GPI-anchored protein의 이후의 성숙과정은 아직 명확히 밝혀지지 않았으나 분비과정에서 plasma membrane의 phospholipid에 결합한 상태에서 세포벽 glucan과 결합하여 세포벽의 형성과정을 거치는 것으로 알려져 있다[10].

효모에서 현재까지 알려진 GPI type의 세포벽 단백질중 세포표면의 밀도가 가장 높은 단백질인 agglutinin은 세포당 약  $1 \times 10^4$ 개 존재하고 있으며 서로 다른 mating type의 세포간 부착(cell to cell adhesion)을 유도하는 단백질이다. 효모에서의 agglutinin의 존재는 1958년에 *Hansenula wingei*에서 처음으로 발견되어[5] 이후 여러 효모, *S. cerevisiae*, *S. kluyveri*,

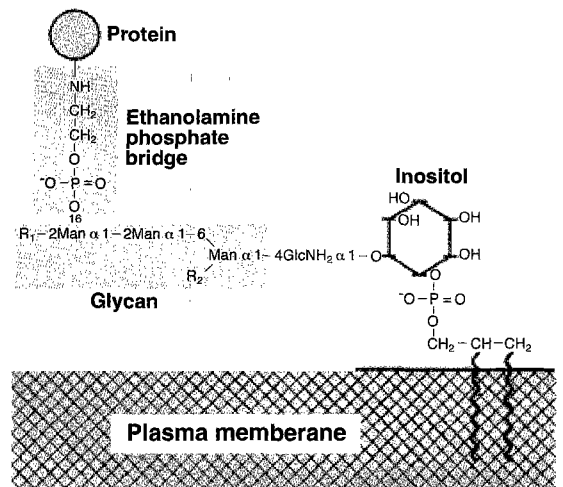


Fig. 2. General structure of a GPI anchor. Man, Mannose; GlcNH<sub>2</sub>, glucosamine[40].

*Pichia amethionina* 등에서 발견되고 그 특성이 규명되었다 [20]. *S. cerevisiae*의 agglutinin은 mating type에 따라 a- 및  $\alpha$ -agglutinin으로 나누는데 분자량은 140~400kDa의 다양한 크기로 발견되며 heavy glycosylation되어 있다[35, 37]. Agglutinin에 대한 분자생물학적 연구에서 a-agglutinin은 두 개의 subunit 즉, C-terminal에 의해 세포벽과 결합하고 N-terminal이 세포표면으로 노출된 core subunit 및 여기에 disulfide bridge를 형성하는 binding subunit로 구성되었고  $\alpha$ -agglutinin은 세포벽에 결합되는 하나의 core subunit로만 구성되었음이 확인되었다. Agglutinin을 coding하는 유전자로는 *AGA1*(a-agglutinin core subunit)[29], *AGA2*(a-agglutinin binding subunit)[6] 및 *AGal*( $\alpha$ -agglutinin core subunit)[14]가 알려졌다. *AGA1* 및 *AGal*은 각각 725, 650 아미노산을 coding 하고 있으며 Ser/Thr-rich이며 hydrophobic한 N- 및 C-terminal로 구성되어 있다. 또한 이들은 각각 C-terminal에 GPI-anchor attachment signal을 가지고 있다. Wojciechowicz 등[47]은  $\alpha$ -agglutinin의 functional domain을 조사하기 위해서 *AGal* 유전자를 C-terminal로부터 점차적으로 deletion하여 agglutinin의 localization을 조사한 결과 C-terminal의 hydrophobic region이 GPI anchoring을 통한 세포표면결합에 결정적인 역할을 한다는 것을 보고하였다.

Table 1에 나열한 대부분의 세포벽단백질이  $\alpha$ -galactosidase를 reporter로 사용하여 표면발현하였을 때 단백질간의 표면발현 효율의 차이는 있으나 대부분 전세포 활성을 보여 표면발현의 매개단백질로 사용 가능하였다[45]. 효모의 6,000여 ORF를 이용하여 GPI attachment signal을 검색한 결과 53개의 GPI anchor를 가진 plasma membrane 또는 cell wall protein이 존재할 것으로 예상되었고 이들 중 새로 발견된 38개를 선별하여  $\alpha$ -galactosidase의 표면발현 활성을 조사하여 외래단백질의 표면발현이 가능한 14개의 GPI-dependent 세포벽단백질을 추가로 확인하였고 이들 중 12개는 현재까지 알려지지 않은 세포벽단백질이 판명되었다[7, 12]. 이는 향후 효모의 세포벽 단백질이나 세포벽 형성 기작에 대한 기초연구뿐만 아니라 효율적인 외래유전자의 표면발현을 위해서도 많은 도움이 되리라 판단된다.

### 산업효소의 표면발현

산업효소의 효모 표면발현은 특정효소가 표면발현된 효모를 전세포 생물촉매로 이용하려는 시도와 원래 효모가 갖지 않는 효소 활성을 효모 표면에 도입함으로써 사용이 불가능한 기질을 이용할 수 있도록 새로운 기능을 부여하는 효모 대사공학적 분자육종 연구가 주로 진행되고 있다. 현재까지 효모 *S. cerevisiae*에서 GPI-anchored protein인  $\alpha$ -agglutinin을 매개단백질로 사용하여 산업효소들을 표면발현한 예를 Table 2에 요

**Table 1.** Cell wall proteins known in yeast *S. cerevisiae*

Protein	Gene	MW (kDa)	Putative GPI-anchor	Ser/Thr (%)	Reference
a-Agglutinin (anchor protein)	<i>AGA1</i>	74	+	50	[19]
a-Agglutinin (binding protein)	<i>AGA2</i>	9	-	30	[29]
$\alpha$ -Agglutinin	<i>AGal</i>	70	+	29	[6]
Cwp1p	<i>CWP1</i>	55	+	30	[44]
Cwp2p	<i>CWP2</i>	180	+	41	[44]
Flocculin	<i>FLO1</i>	156	+	46	[38]
Kre1p	<i>KRE1</i>	32	+	40	[3]
Sed1p	<i>SED1</i>	34	+	42	[13]
Tip1p	<i>TIP1</i>	80	+	15	[44]
Tir1p/Srp1p	<i>TIP1</i>	115	+	30	[4]
YCR89w		166	+	44	[31]
Gp33	<i>BGL2</i>	33	-	-	[17]
Gp115	<i>GGP1</i>	60	+	22	[42]
Gas1p	<i>GAS1</i>	60	+	-	[26]

약하였다.

#### ● $\alpha$ -galactosidase

1993년 Schreuder 등[33]이 처음으로  $\alpha$ -agglutinin을 이용하여 효모에서 외래유전자의 표면발현이 가능함을 입증하였다.  $\alpha$ -agglutinin의 C-terminal 320개의 아미노산을 N-terminal에 invertase의 분비 signal을 함유한 *Cyamopsis tetragonoloba* (guar) 유래의  $\alpha$ -galactosidase 유전자에 결합하여  $\alpha$ Gal/AC1 cassette를 제조하고 이를 효모에 도입하였다. C-terminal fusion을 하지 않은 경우에는  $\alpha$ -galactosidase 활성의 대부분이 배지에서 나타났고 세포에서 발견되는 활성의 대부분은 SDS 처리후 제거된 반면  $\alpha$ -agglutinin의 C-terminal이 fusion된  $\alpha$ Gal/AC1 cassette에서는  $\alpha$ -galactosidase 활성이 세포표면에서 발현되어 anti- $\alpha$ -galactosidase serum과 면역반응하였다. 이들은 일부 SDS에 의해서도 추출되었지만 대부분은  $\beta$ -1,3-glucanase의 일종인 laminarinase에 의해서만 추출됨으로써 대부분이 세포표면의 glucan과 안정하게 결합하고 있음을 알 수 있었다. 이들은 또한 세포배양중의 효소의 안정성도 조사를 하였는데 배지로 분비된  $\alpha$ -galactosidase는 정지기 배양중 활성이 급격히 감소한 반면 표면발현한 경우에는 정지기에 활성 차이를 보이지 않았다. 또한 표면발현한 경우 irreversible enzyme inhibitor에 의해 효소가 불활성화된 경우에도 세포를 새로운 배지에서 재배양하였을 때 배지로 분비하는 경우보다 약 4배정도 높은 효소의 활성이 재생되었다[34].

#### ● Lipase 및 cutinase

Lipase는 산업적으로 유용성이 매우 높은 효소로서 지방분해, ester synthesis, optical resolution 및 세제첨가제 등으로

**Table 2.** Examples of surface display in yeast *S. cerevisiae* using  $\alpha$ -agglutinin as an anchoring motif

Expressed protein	N-terminal gene	C-terminal gene	Immuno-fluorescence	Glucanase extractable	References
$\alpha$ -Gal-AG $\alpha$ 1	$\alpha$ -Galactosidase	$\alpha$ -agglutinin	+	+	[33]
Lipase-AG $\alpha$ 1	Lipase	$\alpha$ -agglutinin	+	nd <sup>a</sup>	[18]
Cutinase-AG $\alpha$ 1	Cutinase	$\alpha$ -agglutinin	+	+	[18]
Glucoamylase-AG $\alpha$ 1	Glucoamylase	$\alpha$ -agglutinin	+	+	[22]
Cellulase-AG $\alpha$ 1	Cellulase	$\alpha$ -agglutinin	+	+	[23]
$\beta$ -Glucosidase-AG $\alpha$ 1	$\beta$ -Glucosidase	$\alpha$ -agglutinin	+	nd <sup>a</sup>	[24]
CMCase-AG $\alpha$ 1	Carboxymethyl cellulase	$\alpha$ -agglutinin	+	nd <sup>a</sup>	[24]
$\alpha$ -Amylase-AG $\alpha$ 1	$\alpha$ -Amylase	$\alpha$ -agglutinin	+	+	[25]
GFP-AG $\alpha$ 1	Green fluorescence protein	$\alpha$ -agglutinin	+	+	[48]
Lipase-linker peptide-AG $\alpha$ 1	Lipase-linker peptide	$\alpha$ -agglutinin	+	nd <sup>a</sup>	[46]

<sup>a</sup>nd, not determined.

많이 이용되고 있다[32]. 이러한 lipase를 효모의 표면에 발현하여 새로운 biocatalyst를 개발하려는 시도는 처음으로 *Humicola lanuginosa* 유래의 lipase와 *Fusarium solani* f. sp. *pisi* 유래의 cutinase를 효모 *S. cerevisiae*에서 각각 표면발현한 것이다[18]. 두 유전자를 효모에 표면발현한 후 면역학적 방법으로 확인하였을 때 각각의 효소가 세포의 표면에 존재하였고 glucan에 안정하게 결합되어 있음이 확인되었다. 또한 C-terminal anchor가 제거된 경우에는 세포밖으로 분비되었다. 그러나 세포표면에 고정화된 *H. lanuginosa* 유래의 lipase는 olive oil에 대해서는 활성이 없었고 크기가 작은 기질, *p*-nitrophenyl butyrate에 대해서만 미약한 활성을 보였다. 이는 fatty acid와 결합하는 활성부위가 매개단백질과 연결된 C-terminal에 위치하여 기질과의 접촉이 방해되었기 때문으로 추측되었다. 그러나 활성부위가 반대쪽에 존재하는 *Fusarium solani* f. sp. *pisi* 유래의 cutinase의 경우에는 *p*-nitrophenyl butyrate에 대해서 강한 활성을 보였다. 그러나 역시 olive oil에 대해서는 활성이 없었는데 이는 이 기질에 대한 specific activity가 낮은 것으로 판단되었다. 최근 이러한 문제를 해결하기 위해서 *Rhizopus oryzae* 유래의 lipase의 활성부위와 매개단백질 사이에 적절한 크기의 linker peptide(Gly/Ser repeat)를 도입하여 효모의 표면에 발현하고 기질과 효소의 원활한 접촉을 유도함으로써 표면발현된 lipase가 soluble 2,3-dimercaptopropan-1-ol tributyl ester(BALB)와 insoluble triolein에 대해서 활성을 보였으며 또한 linker peptide의 길이에 따라서 활성의 차이를 보였다(Table 3)[46]. 이러한 결과는 효소를 세포벽에 표면발현할 때 최적의 효소활성을 얻기 위해서는 각 효소의 특성, 즉 단백질의 구조나 활성 domain의 위치에 따라서 표면발현 방법을 최적화할 필요가 있다는 것을 증명하였다.

#### ● Glucoamylase 및 $\alpha$ -amylase

전분으로부터 에탄올을 생산하는 기존의 방법은 전분 가수생물산업

**Table 3.** Lipase activity toward BALB. There was no significant difference in cell growth[46]

Length of linker peptide	Sequence of linker peptide	Lipase activity (U/g dry cell)
0		2.0±1.2
2	GS	3.0±1.7
7	GSSGGGS	3.4±0.5
9	GSSGGGSGS	3.9±2.1
14	GSSGGSGGSGGSGS	4.1±1.8
17	GSSGGSGGSGGSGGSGS	2.9±1.1

분해를 위해서 140~180°C가 되도록 가열하여야 하는데 상당한 비용이 드는 단점이 있어 오래전부터 효소학적으로 전분을 분해하려는 연구가 많이 진행되었다[15, 41]. 또한 유전공학적 방법을 이용하여 에탄올발효에 사용되는 효모가 전분을 탄소원으로 사용하여 에탄올을 생산할 수 있도록 glucoamylase 등의 전분가수분해효소를 분비생산하는 효모들이 제조되었다[1, 2, 39]. 최근에는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 전분이나 cellulose로부터 분해된 glucose를 보다 용이하게 세포로 흡수하고 에탄올을 생산할 수 있도록 세포표면에 glucoamylase나 cellulase 등의 가수분해효소를 표면발현하고 에탄올을 생산할 수 있는 효모의 개발이 진행되고 있다(Ueda and Tanaka 2000). 그 예로 일본 Suntory사의 Murai 등[22]은 *R. oryzae* 유래의 전분가수분해효소 glucoamylase를 효모 *S. cerevisiae*의 표면에 발현한 전분가용(starch-utilizing) 효모를 제조하였다. 이들은  $\alpha$ -agglutinin을 매개단백질로 하여 상기한 방법과 동일한 방법으로 유전자를 제조하고 효모 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(*GAPDH*) promoter를 사용하여 multicopy vector를 제조하였다. 형질전환된 효모의 배양매지에서는 glucoamylase 활성이 나타나지 않았으나 전세포에서는 활성이 나타났으며 이들은 glucanase 처리 후에만 세포에서 분리되어 세포벽의 glucan과 결합하고 있음을 알 수 있었다. Glucoamylase가 active form으로 표면발현되어 전분을 유

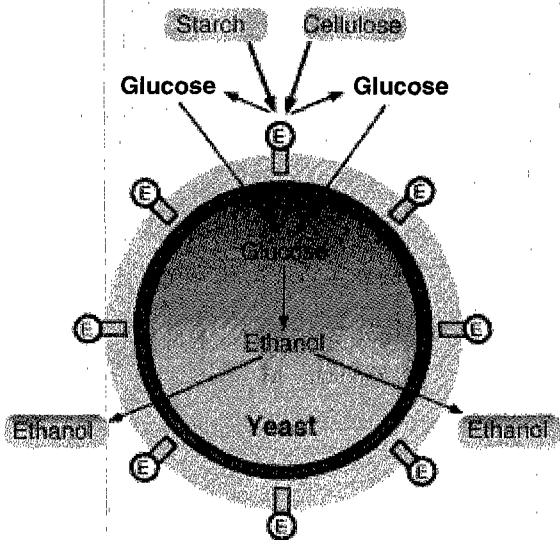


Fig. 3. A model of cell surface-engineered *S. cerevisiae*, displaying hydrolytic enzymes. E, Hydrolytic enzymes[40].

일한 탄소원으로 성장할 수 있었다. 또한 효과적인 전분의 효소적 분해를 위해서는 exoglucanase인 glucoamylase뿐만 아니라 endoglucanase인  $\alpha$ -amylase를 동시에 사용하는 것이 유리하기 때문에 두 효소를 효모의 표면에 동시발현한 경우도 보고되었다[25]. 두 효소가 동시발현된 효모를 배양한 배양액에서는 효소 활성이 관찰되지 않았으나 전세포에서는 각각의 활성이 나타났고 전분을 탄소원으로 사용한 배지에서 세포의 성장속도가 glucoamylase만을 표면발현한 균주보다 상당히 빠른 것이 확인되었다. 이러한 결과는 효모자체에 없는 효소를 도입하여 세포의 metabolic pathway 변화를 통해 세포의 기능을 향상시킨 예이다.

● Carboxymethylcellulase 및  $\beta$ -glucosidase

지구상에 가장 흔한 탄수화물인 cellulose를 탄소원으로 이용할 수 있는 효모를 개발하기 위해서 *Aspergillus aculeatus* 유래의 endo-type의 FI-carboxymethylcellulase(CMCase)를  $\alpha$ -agglutinin을 매개단백질로 사용하여 표면발현하였다[23]. 표면발현된 세포에서 전세포 CMCase활성이 관찰되었고 SDS에 의해서는 유리되지 않고 glucanase에 의해서만 유리되기 때문에 세포벽에 강하게 활성상태로 결합되어 있다는 것을 확인하였다. 그러나 CMCase가 표면발현된 효모가 유일탄소원으로 cellulose를 이용할 수 없었는데 이는 cellulose로부터 CMCase의 작용에 의해 유리된 cello-oligosaccharide를 효모가 이용할 수 없기 때문이다. 이를 분해하여 glucose를 얻기 위해서는  $\beta$ -glucosidase에 의한 분해가 필요하다[30]. 따라서 CMCase가 표면발현된 균주에 다시 *A. aculeatus* 유래의  $\beta$ -glucosidase를 동시에 표면발현한 균주를 제조하였고 이는 cellobiose와 수용성의 cello-oligosaccharide를 유일탄소원으

로 이용이 가능하였고 배양중 배지를 thin-layer chromatography를 이용하여 확인한 결과 cello-oligosaccharide가 분해되어 유리된 glucose가 탄소원으로 사용되고 있음을 확인하였다[24].

● Green fluorescent proteins(GFP)

Green fluorescent protein(GFP)은 jellyfish, *Aequorea victoria* 유래의 fluorescent chromophore를 함유하는 발광단백질이다[8]. 효모 *S. cerevisiae*의  $\alpha$ -agglutinin을 표면발현 매개로 사용하여 GFP를 표면발현하고 표면발현 유무를 확인하기 위해 형광현미경으로 발광단백질을 관찰하였으며 anti-GFP antibody를 사용한 confocal laser scanning을 통해 단백질의 표면 노출을 관찰하였다. 또한 cell free extract에서는 형광이 관찰되지 않으나 glucanase 처리후 얻은 fraction에서 형광이 관찰되었으므로 GFP가 세포표면에 정상적으로 발현되었음을 확인하였다[48]. 현재까지 표면발현에 사용된 enzyme type의 reporter에 비해 GFP는 visible reporter로서 표면발현하였을 때 세포를 파쇄하지 않고 단일세포 단위로 유전자 발현이나 단백질 localization 및 리간드 binding 등을 분석할 수 있는 살아있는 표지로 이용이 가능하다. 예를 들어 세포내의 특정 metabolite의 농도에 의해 발현이 조절되는 특정 promoter에 GFP 유전자를 결합시키고 표면발현하였을 때 표면발현된 GFP의 발광정도를 세포밖에서 측정하면 특정 metabolite의 농도를 세포의 파쇄없이 세포 단위로 측정이 가능하다. 현재 세포배양중 세포밖의 metabolite나 nutrient의 농도를 on-line으로 측정하는 것은 가능하나 세포내의 metabolite 농도를 on-line으로 측정할 수 있는 방법이 없다는 것을 고려하면 향후 이러한 기술의 개발은 다양한 biosensor의 개발 등 nanobiotechnology의 tool로서 이용 가능성이 매우 높을 것으로 기대된다.

결론

1992년 filamentous phage의 docking protein pIII를 표면발현 매개단백질로 하는 phage display system[9]이 개발된 후 다양한 박테리아에서도 표면발현 시스템이 개발되어 다양한 응용성 연구가 현재 활발히 진행중에 있다[11, 16, 21]. 그러나 표면발현한 효소의 용도가 인체를 대상으로 하는 식품, 주류, 의약 등의 생물산업분야에서 사용될 목적이라면 숙주세포의 인체안전성을 고려하지 않을 수 없는데 이러한 측면에서 효모 *S. cerevisiae*는 GRAS로서 산업적 중요성을 갖는 효소의 표면발현과 응용에 매우 적합하다고 할 수 있다. 또한 효모는 발현시스템의 개발 정도, 균주의 사용이나 배양의 용이성 등 원핵세포가 갖는 장점을 대부분 가지며 원핵세포에서 활성상태로 발현이 불가능한 고등세포유래의 단백질도 효율적으로 발현하고 번역 후 수식하여 활성상태로 발현할 수 있기 때문

에 그 사용범위가 매우 광범위하다. 현재 효모의 표면에 다양한 유용효소를 단독발현 또는 동시발현한 다기능의 “무장 효모(arming yeast)”의 개발이 활발히 진행중이다. 효모의 표면 발현 시스템은 본 고에서 기술한 전세포 생물촉매 용도 이외에도 재조합 생백신의 제조나 peptide 및 항체 library의 제조와 이를 통해 유용 epitope의 스크리닝용으로 사용이 가능하다. 또한 directed evolution을 통해 제조된 효소 library로부터 고활성의 변이단백질을 효소활성 검색이나 FACS(Fluorescence Activated Cell Sorter) 등을 이용하여 high throughput 스크리닝이 가능하다는 장점이 있다. 따라서 향후 효모 표면발현 시스템의 다양한 생물공학적인 응용성 개발을 위해서는 현재 한 두가지로 국한되어 있는 효율적인 표면발현 매개단백질의 추가 탐색이 요구되고 *Candida utilis*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis* 및 *Yarrowia lipolytica* 등의 산업적 유용성이 높은 다른 효모에서의 표면발현시스템의 개발 또한 절대적으로 필요하다고 사료된다.

### 참고문헌

- Ashikari T., N. Nakamura, Y. Tanaka, N. Kiuchi, Y. Shibano, T. Tanaka, T. Amachi and H. Yoshizumi. 1986. *Rhizopus* raw-starch-degrading glucoamylase: its cloning and expression in yeast. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 957-964.
- Ashikari T., S. Kunisaki, N. Matsumoto, T. Amachi, and H. Yoshizumi. 1989. Direct fermentation of raw corn to ethanol by yeast transformants containing a modified *Rhizopus* glucoamylase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 129-133.
- Boone, C., S. S. Sommer, A. Hensel, and H. Bussey. 1990. Yeast KRE genes provides evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. *J. Cell. Biol.* **110**: 1833-1843.
- Bourdineaud J. P., J. M. van der Vaart, M. Donzeau, G. de Sampaio, C. T. Verrips, and G. J. Lauquin. 1998. Pmt1 mannosyl transferase is involved in cell wall incorporation of several proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* **27**: 85-98.
- Brock, T. D. 1958. Mating reaction in the yeast *Hansenula wingei*. *J. Bacteriol.* **75**: 697-701.
- Cappellaro, C., K. Hauser, V. Mrsa, M. Watzele, G. Watzele, C. Gruber, and W. Tanner. 1991. *Saccharomyces cerevisiae* a-agglutinin and alpha-agglutinin. Characterization of their molecular interaction. *EMBO J.* **10**: 4081-4088.
- Caro, L. H., H. Tettelin, J. H. Vossen, A. F. Ram, H. van den Ende, and F. M. Klis. 1997. *In silico* identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **13**: 1477-89.
- Chalfie M, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* **263**: 802-805.
- Chiswell, D. J., and J. McCafferty. 1992. Phage antibodies: will new ‘coliclonal’ antibodies replace monoclonal antibodies? *Trends Biotechnol.* **10**: 80-84.
- Cid, V. J., A. Duran, F. Rey, M. P. Snyder, C. Nombela, and M. Sanchez. 1995. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **59**: 345-386.
- Georgiou, G., H. L. Poetschke, C. Stathopoulos, and J. A. Francisco. 1993. Practical applications of engineering Gram-negative bacterial cell surfaces. *Trends Biotechnol.* **11**: 6-10.
- Hamada, K., S. Fukuchi, M. Arisawa, M. Baba, and K. Kitada. 1998. Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* **258**: 53-59.
- Hardwick K. G., J. C. Boothroyd, A. D. Rudner, and H. R. Pelham. 1992. Genes that allow yeast cells to grow in the absence of the HDEL receptor. *EMBO J.* **11**: 4187-4195.
- Hauser, K. and W. Tanner. 1989. Purification of the inducible  $\alpha$ -agglutinin and molecular cloning of the gene. *FEBS Lett.* **255**: 290-294.
- Hayashida S., and P. Q. Flor. 1982. Raw starch-digestive chitin-immobilized amylase from a protease-glycosidase-less mutant of *Aspergillus awamori* var. *kawachi*. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 1639-1645.
- Jung H. C., J. M. Lebeault, and J. G. Pan. 1998. Surface display of *Zymomonas mobilis* levansucrase by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae*. *Nat Biotechnol.* **16**: 576-580.
- Kelbl, F., and W. Tanner. 1989. Molecular cloning of a cell wall exo-beta-1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **171**: 6259-6264.
- Klis, F. M. 1994. Cell wall assembly in yeast. *Yeast.* **10**: 851-869.
- Lipke, P., D. Wojciechowicz, and J. Kurjan. 1989. AG $\alpha$ -1 is the structural gene for the *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -agglutinin, a cell surface glycoprotein involved in cell-cell interactions during mating. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 3155-3165.
- Lipke, P., and J. Kurjan. 1992. Sexual agglutination in budding yeasts: Structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins. *Microbiol. Rev.* **56**: 180-194.
- Little, M., P. Fuchs, F. Breitling, and S. Dubel. 1993. Bacterial surface presentation of proteins and peptides: an alternative to phage technology? *Trends Biotechnol.* **11**: 3-5.
- Murai, T., M. Ueda, M. Yamamura, H. Atomi, Y. Shibasaki, N. Kamasawa, M. Osumi, T. Amachi, and A. Tanaka. 1997a. Construction of a starch-utilizing yeast by cell surface engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1362-1366.
- Murai T, M. Ueda, H. Atomi, Y. Shibasaki, N.

- Kamasawa, M., Osumi, T., Kawaguchi, M., Arai, and A. Tanaka. 1997b. Genetic immobilization of cellulase on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **48**: 499-503.
24. Murai T, M. Ueda, T. Kawaguchi, M. Arai, and A. Tanaka. 1998. Assimilation of cellooligosaccharides by a cell surface-engineered yeast expressing beta-glucosidase and carboxymethylcellulase from *Aspergillus aculeatus*. *Appl Environ Microbiol.* **64**: 4857-4861.
25. Murai T, M. Ueda, Y. Shibasaki, N. Kamasawa, M. Osumi, T. Imanaka, and A. Tanaka. 1999. Development of an arming yeast strain for efficient utilization of starch by co-display of sequential amylolytic enzymes on the cell surface. *Appl Microbiol Biotechnol.* **51**: 65-70.
26. Nuoffer, C., P. Jenö, A. Conzelmann, and H. Riezman. 1991. Determinants of glycosylphosphatidylinositol anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* GAS1 protein to the plasma membrane. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 27-37.
27. Pastor, F. I. J., E. Valetín, E. Herrero, and R. Sentandreu. 1984. Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. Mannoproteins released by zymolase and their contribution to wall architecture. *Biochem. Biophys. Acta.* **802**: 292-300.
28. Romanos, M. A., C. A. Scorer, and J. J. Clare. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast.* **8**: 423-88.
29. Roy, A., C. F. Lu, D. L. Marykwas, P. N. Lipke, and J. Kurjan. 1991. The *AGA1* gene product is involved in cell surface attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein  $\alpha$ -agglutinin. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 4196-4206.
30. Sakamoto R., M. Arai, and S. Murao. 1985. Enzymatic properties of the three  $\beta$ -glucosidases from *Aspergillus aculeatus* No. F-50. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 1283-1290.
31. Sapolsky, R. J., V. Brendel, and S. Karlin. 1993. A comparative analysis of distinctive features of yeast protein sequences. *Yeast.* **9**: 1287-1298.
32. Schmidt-Dannert C., J. Pleiss, and R. D. Schmid. 1998. A toolbox of recombinant lipases for industrial applications. *Ann. NY Acad. Sci.* **864**: 14-22.
33. Schreuder, M. P., S. Brekelmans, H. Van Den Ende, and F. M. Klis. 1993. Targeting of a heterologous protein to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **9**: 399-409.
34. Schreuder, M. P., A. T. A. Mooren, H. Y. Toschka, C. T. Verrips and F. M. Klis. 1996. Immobilizing proteins on the surface of yeast cells. *Trends Biotechnol.* **14**: 115-120.
35. Sijmons, P. C., A. J. Nederbragt, F. M. Klis, and H. Van den Ende. 1987. Isolation and composition of the constitutive agglutinins from haploid *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Arch Microbiol.* **148**: 208-12.
36. Stratford, M. 1994. Another brick in the wall? Recent developments concerning the yeast cell envelope. *Yeast.* **10**: 1741-1752.
37. Terrance, K., P. Heller, Y. -S. Wu, and P. N. Lipke. 1987. Identification of glycopeptide components of  $\alpha$ -agglutinin, a cell adhesion protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **169**: 475-482.
38. Teunissen, A. W. R. H., E. Holub, J. Vanderhucht, J. A. Vanderberg, and H. Y. Steensma. 1993. Sequence of the open reading frame of the *FLO1* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **9**: 423-427.
39. Tubb, R. S. 1986. Amylolytic yeasts for commercial applications. *Trends Biotechnol.* **4**: 98-104.
40. Ueda, M., and A. Tanaka. 2000. Genetic immobilization of proteins on the yeast cell surface. *Biotechnol. Advances.* **18**: 121-140.
41. Ueda S., and Y. Koba. 1980. Alcoholic fermentation of raw starch without cooking by using black-koji amylase. *J. Ferment. Technol.* **58**: 237-242.
42. Vai, M., E. Gatti, E. Lacanas, L. Popolo, and L. Alberghina. 1991. Isolation and deduced amino acid sequence of the gene encoding gp115, a yeast glycosylphosphatidylinositol-anchored protein containing a serine rich region. *J. Biol. Chem.* **266**: 12242-12248.
43. Valetín, E., E. Herrero, J. F. I. Pastor, and R. Sentandreu. 1984. Solubilization and analysis of mannoprotein molecules from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **130**: 1419-1428.
44. Van Der Vaart, J. M., L. H. P. Caro, J. W. Chapman, F. M. Klis, and C. T. Verrips. 1995. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **177**: 3104-3110.
45. Van der Vaart, J. M., R. te Biesebeke, J. W. Chapman, H. Y. Toschka, F. M. Klis, and C. T. Verrips. 1997. Comparison of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* as anchors for cell surface expression of heterologous proteins. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 615-620.
46. Washida, M., S. Takahashi, M. Ueda, and A. Tanaka. 2001. Spacer-mediated display of active lipase on the yeast cell surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 681-686.
47. Wojciechowicz, D., C. F. Lu, J. Kurjan, and P. N. Lipke. 1993. Cell surface anchorage and ligand-binding domains of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion protein  $\alpha$ -agglutinin, a member of the immunoglobulin superfamily. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 2554-2563.
48. Ye K., S. Shibasaki, M. Ueda, T. Murai, N. Kamasawa, M. Osumi, K. Shimizu, and A. Tanaka. 2000. Construction of an engineered yeast with glucose-inducible emission of green fluorescence from the cell surface. *Appl Microbiol Biotechnol.* **54**: 90-96.