

## Development of Enhanced Yeast Expression System for GAP Promoter by Directed Evolution

Whankoo Kang<sup>1,3</sup>, Sun-Duk Hwang<sup>1</sup>, Bum-Chang Kim<sup>1</sup>, Chul-Woo Lee<sup>1</sup>, Jeong-II Son<sup>1</sup>,  
Hyoungh-Sik Kim<sup>1</sup>, Byung-Ryul Lee<sup>1</sup>, Bheong-Uk Lee<sup>2,3</sup>

Department of Chemical Engineering, Hannam University<sup>1</sup>

Department of Biological Science, Kosin University<sup>2</sup>

Gene to Protein, Inc.<sup>3</sup>

TEL: +82-42-629-8009, FAX: +82-42-623-9489

### Abstract

*Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* have been used as host for production of recombinant proteins. It is known that *S. cerevisiae* has advantages such as good folding and secretion capability, and safety as host over *E. coli*. But *S. cerevisiae* has shortcomings of low expression level which is just 20% of that of *E. coli*. To solve this problem, directed evolution method was tried to enhance the GAP promoter strength of *S. cerevisiae* in this study. As result, modified GAP promoter that has increased expression level of about 360% compared to that of wild type was selected.

### 서론

생명공학의 다양한 기술들 중에서도 특정 숙주로부터 외래 단백질을 발현시켜서 대량 생산하는 기술, 즉 heterologous protein expression technology가 가장 핵심일 것이다. 외래 단백질 생산을 위한 숙주로는 *Escherichia coli* 및 *Saccharomyces cerevisiae*를 포함한 효모 균주들이 수 십년 동안 이용되어져 왔다. 효모류는 진핵 미생물로서, 단백질의 대량 발현 시에 대장균에 비해서 많은 장점을 보유하고 있다. 즉 안전한 균주(GRAS)이며 또한 생산 단백질의 folding이 잘 되어진다고 보고 된다. 그러나 이들 효모의 단점은 낮은 외래 단백질 발현율에 있으며 이러한 문제점 해결의 중요성이 부각되고 있다. 예로 대장균에서의 대량 발현은 단백질이 활성을 갖지 못하는 inclusion body 형태로 생산되는 경우가 대부분으로서, 이런 경우에 urea 등을 이용하여 inclusion body를 denaturation시키고 다시 renaturation 과

정을 거쳐서 활성을 갖는 단백질을 생산하는 방법을 사용하곤 했다. 하지만 이 경우에도 정확한 folding이 언제나 가능한 것은 아니므로 성공률은 매우 낮았다고 볼 수 있다. 반면에 효모류로부터는 B형 간염바이러스 백신용 단백질 생산 등에서 보듯이 거대한 단백질의 경우에도 용해성이 높으며 정확한 구조를 갖는 활성 단백질의 생산이 가능하다. 하지만 효모에서의 promoter strength는 대장균의 promoter의 20%이하 정도 수준에 그치고 있는 실정이며 *S. cerevisiae*의 경우에는 *E. coli*와는 다르게 외래 단백질이 전체 단백질의 10%이상을 차지하도록 발현시키는 것이 매우 어려운 난제였다. 이는 효모류는 더 많은 유전자들을 보유하므로 각각 유전자의 발현이 매우 정밀하게 조절되는데 기인한다. 즉 단백질의 생산량은 전사(transcription) 빈도와 해독(translation)에 의해서 결정되는데 진행에서는 전사를 통제하는 조절 체계가 매우 발달되어 있는 것이다. 이에 따라서 효모류로부터 전사도가 높은, promoter strength가 강한 promoter를 탐색하는 연구는 매우 중요하였으며, 그 결과로 현재 *S. cerevisiae*의 경우에는 GAP 프로모터, GAL 프로모터를 포함하여 약 10여 종의 promoter가 사용되고 있다. 하지만 더욱 강력한 전사용 promoter가 요구되고 있다.

본 연구에서는 GAP promoter를 대상으로 분자진화를 이용하여 향상된 효모 발현 시스템을 개발하는 연구하였다.

### 재료 및 방법

#### 유전자 클로닝

GAP promoter가 있는 *S. cerevisiae* 발현 벡터를 이용하여 렙틴(leptin) 유전자를 클로닝하였으며, 렙틴이 세포외 분비될 수 있도록  $\alpha$ -factor 분비신호를 사용하였다.

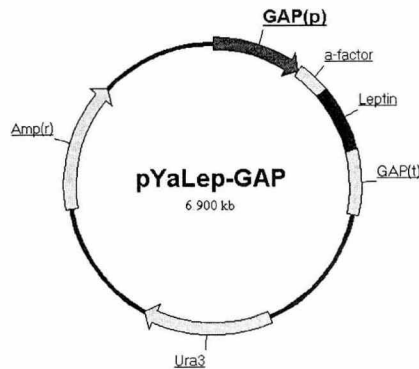


그림 1. *S. cerevisiae* leptin 발현 벡터

### 균주

분자진화에 의해 구성된 library를 transformation하기 위해 *E. coli* DH5a가 사용되었고, yeast 발현 균주는 *S. cerevisiae* Y2805(his<sup>-</sup>, ura<sup>-</sup>)가 사용되었다.

### 분자진화

분자진화 방법은 error-prone PCR<sup>1),2)</sup>과 DNA shuffling<sup>3),4),5),6)</sup>을 이용하였으며, DNA shuffling방법은 선별된 GAP promoter 변이체에서 얻은 GAP promoter 유전자를 같은 DNA 양으로 혼합 후 10X digestion buffer(500mM Tris-HCl pH7.4; 100mM MnCl<sub>2</sub>)와 DNaseI 0.2unit을 넣고 15°C에서 10분간 처리하여 50~100bp 조각을 만들고 agarose gel로 수거, 정제하였다. 수거, 정제된 유전자 조각들을 *Pfu* polymerase를 이용하여 primer 없이 PCR하여 유전자들을 reassembly하였다. Reassembly 조건은 정제된 유전자 조각, 10X *Pfu* buffer, 0.4mM dNTP, 1.25unit *Pfu* polymerase를 혼합 후 96°C 2분, 60cycles(94°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분+5초/cycle), 72°C 5분으로 하였다. Reassembly하여 얻어진 유전자를 주형으로 하여 5', 3' primer를 넣고 다시 PCR을 하여 shuffling된 GAP promoter 유전자를 얻었다. 얻은 유전자를 발현 벡터에 삽입하고 *Saccharomyces cerevisiae*에 형질전환하여 이것을 다시 스크리닝 하였다.

### 스크리닝 방법

Membrane을 이용하여 분자진화된 mutant를 선별하였는데, 이용된 membrane은 nitrocellulose 0.2 $\mu$ m와 cellulose acetate 0.45 $\mu$ m를 이용하였다. 방법으로는 선별 고체 배지 위에 nitrocellulose membrane과 cellulose acetate membrane을 붙인 후 membrane 위에 transformant를 도말하여 membrane 위에서 배양하였다. Nitrocellulose membrane에 흡착된 단백질을 아미도 블랙으로 염색하여 단백질의 발현 정도를 비교하여 향상된 promoter mutant를 선별하였다. 여기서 사용된 선별 배지는 yeast nitrogen base w/o amino acid 6.7g/L, histidine 20mg/L, glucose 2%, agar 2%를 사용하였다.

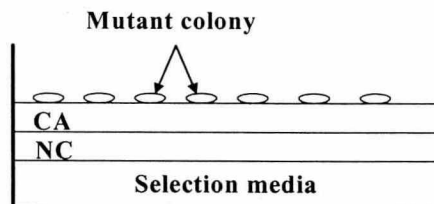


그림 2. 변이체 선별을 위한 double membrane 스크리닝

### 결과 및 고찰

GFP에 의해 1차 스크리닝된 GAP promoter 변형체를 대상으로 error-prone PCR 과 DNA shuffling을 실시하였으며, double membrane을 통한 스크리닝 결과 GAP promoter wild type에 비해서 360% 이상 증가된 렙틴 단백질을 발현하는 GAP promoter 변이체를 선별하였다. 선별된 변이체의 유전자 서열을 분석한 결과 685 개 염기서열 중 7~8개의 염기가 바뀐 것을 확인할 수 있었다.

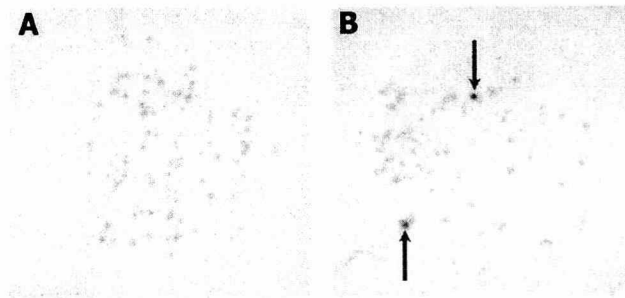


그림 3. Double membran을 이용한 GAP promoter 변이체 선별  
(A) Wild type GAP promoter, (B) 분자진화된 GAP promoter

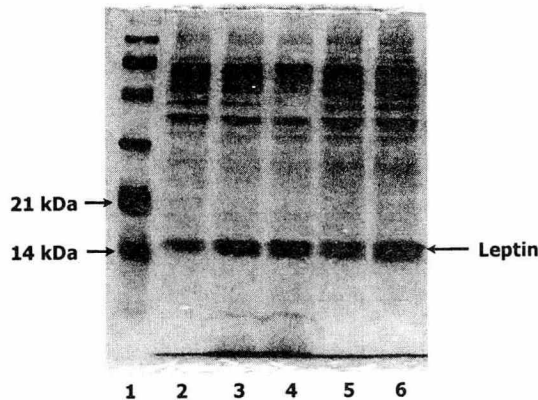


그림 4. 각 변이체별 렙틴 발현 비교 (Lane 1 : marker, Lane 2 : wild type, Lane 3 : S10, Lane 4 : 6F2, Lane 5 : 8H, Lane 6 : PSL4)

### 요약

외래 단백질 생산을 위한 숙주로는 *Escherichia coli* 및 *Saccharomyces cerevisiae* 를 포함한 효모 균주들이 이용되어져 왔다. *S. cerevisiae*는 대장균에 비해 단백질의 접힘과 분비 능력이 우수하며, 안전한 균주(GRAS)로 알려져 있다. 그러나 *S.*

*cerevisiae*의 단점은 대장균의 외래 단백질 발현량의 20% 이하 수준의 낮은 외래 단백질 발현율에 있다. 본 연구에서는 *S. cerevisiae*에서 외래 단백질의 발현을 향상시키기 위해 GAP promoter를 대상으로 분자진화를 수행하였으며, 이 결과 발현율이 360% 증가된 GAP promoter 변이체를 획득하였다.

## **References**

1. David W. Leung, Ellson Chen, David V. Goeddel, A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction (1989), *Technique*, Vol 1(1), page 11-15
2. Ian A. J. Lorimer, Ira Pastan, Random recombination of antibody single chain Fv sequences after fragmentation with DNaseI in the presence of Mn<sup>2+</sup> (1995), *Nucleic Acids Res.*, Vol. 23(15), page 3067-3068
3. Willem P. C. Stemmer, Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling (1994), *Nature*, Vol. 370(4), page 389-391
4. Ji-Hu Zhang, Glenn Dawes, Willem P. C. Stemmer, Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 94, page 4504-4509
5. Huimin Zhao, Frances H. Arnold, Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination (1997), *Nucleic Acids Res.*, Vol. 25(6), page 1307-1308
6. Huimin Zhao, Frances H. Arnold, Functional and nonfunctional mutations distinguished by random recombination of homologous genes (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 94, page 7997-8000