

Human Lysozyme 유전자의 화학적 합성과 *Saccharomyces cerevisiae*에서의 발현

김기운 · 이승철 · 황용일*
경남대학교 공과대학 식품공학과

Chemical Synthesis of a Human Lysozyme Gene and Expression in *Saccharomyces cerevisiae*

Ki-Woon Kim, Seung-Cheol Lee and Yong-Il Hwang*

Department of Food Engineering, Kyungnam University, Masan 630-701, Korea

Abstract — The cDNA, encoding human lysozyme (HLY) which was isolated from a human placenta cDNA library, has been well characterized (Yoshimura *et al.*, 1988). Based on the communication, we have prepared an artificial *HLY* gene from chemically synthesized 38-oligomer with high codon usage in *Saccharomyces cerevisiae*. For directing the synthesis and secretion of *HLY* in *S. cerevisiae*, an expression vector, pHK1 was constructed by inserting the *HLY* gene, containing a synthetic *HLY* secretion signal sequence, between the yeast *GAP* promoter and *PHO5* terminator. From a lysoplate assay, we have confirmed a yeast transformant harboring a pHK1 which makes a clearing zone on the overlaid *Micrococcus luteus*. This result means a chemically synthesized *HLY* gene which was normally expressed and secreted in yeast.

다당체 분해효소로서 보편적으로 알려진 lysozyme [EC 3,2,1,17]은 세균벽 성분인 peptidoglycan의 N-acetylglucosamine 사이의 β 1-4 결합을 가수분해한다. 1909년 Laschtchenko에 의해 hen egg white lysozyme(이하 CLY)이 세균에 용균작용이 있음을 발표한 이후, T4 phage의 lysozyme의 유전학적 및 구조해석에 관한 연구 결과가 다수 발표되었다(1, 2).

130개의 아미노산으로 이루어진 human lysozyme(이하 HLY)은 현재 소염제 등으로 광범위하게 이용되는 CLY와는 염기 및 아미노산 배열상 각각 60.1%, 56.8%의 높은 상동성을 보인다(3). 한편 HLY은 CLY와 그 성질을 비교할 때 용균활성이 3~4배 높으며 다형핵 백혈구에 의한 세포의 식작용 촉진, 면역억제의 일차, 근육 및 정맥주사 가능 등(4, 5) 그 뛰어난 효과를 기대할 수 있다. HLY은 사람의 여러 조직세포 및 분비물 등에서 분리되나 그 양이 미미하여 의약품 등을 위한 공업적인 생산은 불가능한 실정이다. Yoshimura 등(6)에 의하면 미생물에서의 HLY의 생산은 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*를

숙주로 이용한 경우 세포내에서 생산되어 불용성 내지 불활성 단백질의 형태로 얻어지며, 효모, *Saccharomyces cerevisiae*의 경우에는 분비용 signal peptide를 chicken 내지는 *S. cerevisiae*의 α -factor의 것을 이용하여 정상적인 생산이 됨이 보고되어 있다(7, 8). 그리하여, 본 연구는 HLY의 대량생산을 목적으로 생리활성물질 생산 분비계가 확립된 *S. cerevisiae*를 숙주로 이용하였다. 나아가 HLY은 현재 cDNA가 분리되어 그 구조가 완전히 밝혀져 있으므로(3, 8), 유전자 합성법을 이용하여 *S. cerevisiae*에서의 고빈도의 codon(9)을 채용한 새로운 *HLY* 유전자를 제조하였다. 정제의 간편성을 고려하여 분비용 signal peptide는 HLY 본래의 염기배열을 합성유전자 앞부분에 연결하여 효모 세포외로 발현과 더불어 분비되게 하였다. 이들 결과는 *Micrococcus luteus*를 이용한 lysoplate assay를 통하여 확인하였다.

재료 및 방법

사용 균주와 plasmid DNA

효모, HY-1(α *trp1 his3 leu2 can1 pho3 pho5*)(10)은 HLY의 발현용 숙주로, 대장균 JA221, DH10B는 plas-

Key words: Chemical synthesis, lysozyme gene
*Corresponding author

염기배열 중 Bennetzen과 Hall(9)의 *S. cerevisiae*에
서의 고빈도 codon을 참고로 하여 새로운 HLY의
DNA염기 배열을 Fig. 1에서 나타내었다.

HLY 유전자를 인공적으로 합성하기 위하여 Fig. 1
에서 나타내는 바와 같이 전단백질 code 부분을 세
부적으로 나누어 38개의 10~33 mer에 이르는 oligo-
mer를 합성키로 하였다. 이를 먼저 크게 세부분(1~
12, 13~26, 27~38)으로 나누어 Fig. 2에서와 같이

HLY 유전자의 화학적 합성 및 제작

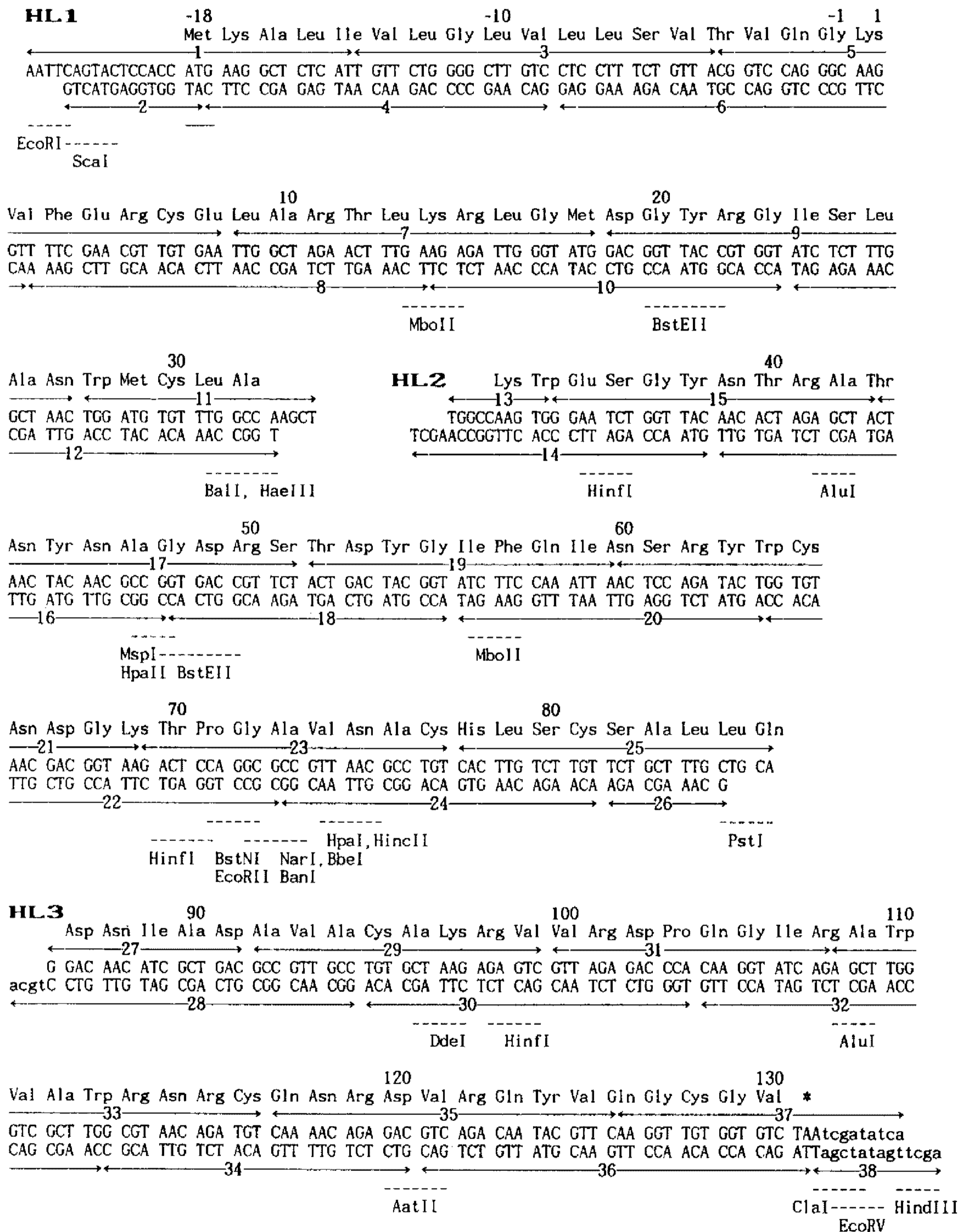


Fig. 2. Nucleotide sequence and restriction enzyme sites of the synthetic HLY DNA. The HLY DNA was synthesized with three fragments of HL1, HL2 and HL3 DNAs.

Individual oligomers are indicated by numbers with arrow. Each restriction enzyme site was underlined. Others are as described in the legend to Fig. 1.

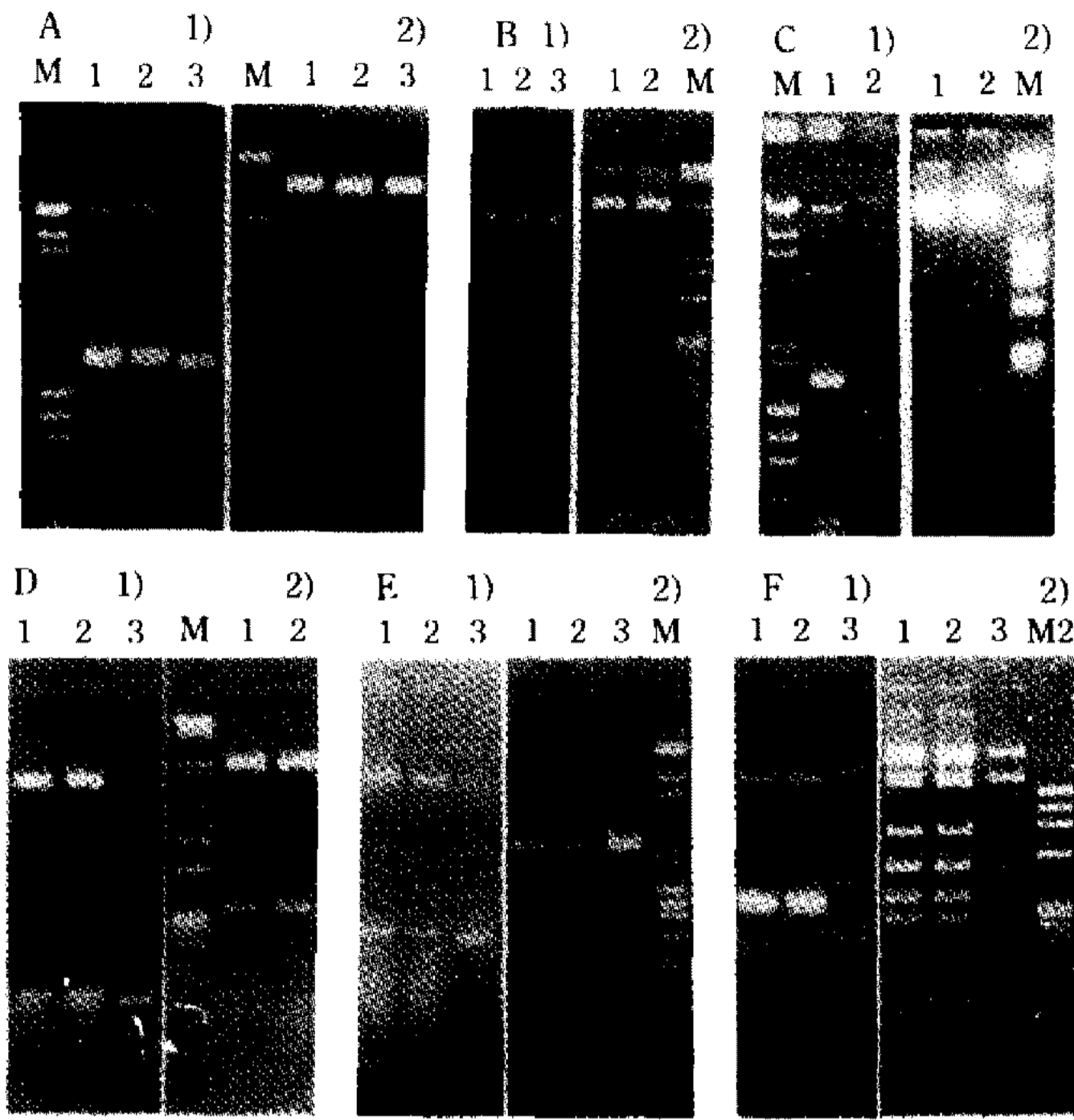


Fig. 3. Electrophoresis pattern of intact or digested plasmid DNA on agarose gel.

A-1), B-1), C-1), D-1), E-1), 2) and F-1) are 1% agarose gels and the others are 1.5% gels. M is mixture of molecular weight marker of *HindIII* digested λ DNA and *HaeIII* digested ϕ X 174 DNA. M2 is only *HaeIII* digested ϕ X 174 DNA. Each lane is detailed in the text.

HL1, 2, 3으로 각각 조립하였다. Tanaka 등(18)의 방법을 변용하여 먼저, Fig. 2의 HL1 DNA 단편의 조립은 각 100 pmole의 1~12의 oligomer와 10 mM의 ATP 존재하에서 10 units의 T4 kinase 하에서 각 말단을 인산화하였다. 이를 spin column을 이용하여 단백질과 미반응 ATP 등을 제거하였다. 정제된 oligomer를 100 mM NaCl 존재하에서 95°C 5분간 처리하여 방냉하였다. 이 반응액을 상기방법으로 염을 제거 후 Ligation kit를 이용하여 16°C, 24시간 ligation 처리하였다. 이 ligation 반응액을 2%의 agarose gel 전기영동 후 170 bp 부근의 band 만을 취하여 DNA 단편을 정제하여 미리 제한효소 *EcoRI*과 *SacI*으로 완전 절단시킨 pUC12 plasmid의 개환부에 도입하여 plasmid pHL1(Fig. 4)를 제작하였다. 이는 Fig. 3의 agarose gel 전기영동에서 A-1의 결과와 같이 단편 삽입 후 영동속도가 차이가 났다. 분리된 plasmid DNA를 제한효소 *EcoRI*과 *BalI*으로 처리 후 약 160 bp의 band가 A-2의 gel 상에 나타났다.

이하, 상기의 방법으로 동일 처리하여 13~26 및 27~38의 oligomer 들에서 각각 Fig. 2의 HL2 및 HL3 를 얻었다. 이들 HL2 및 HL3를 제한효소 *BalI-PstI*과 *PstI-HindIII*로처리 pUC12 DNA에 삽입한 것이 Fig. 4

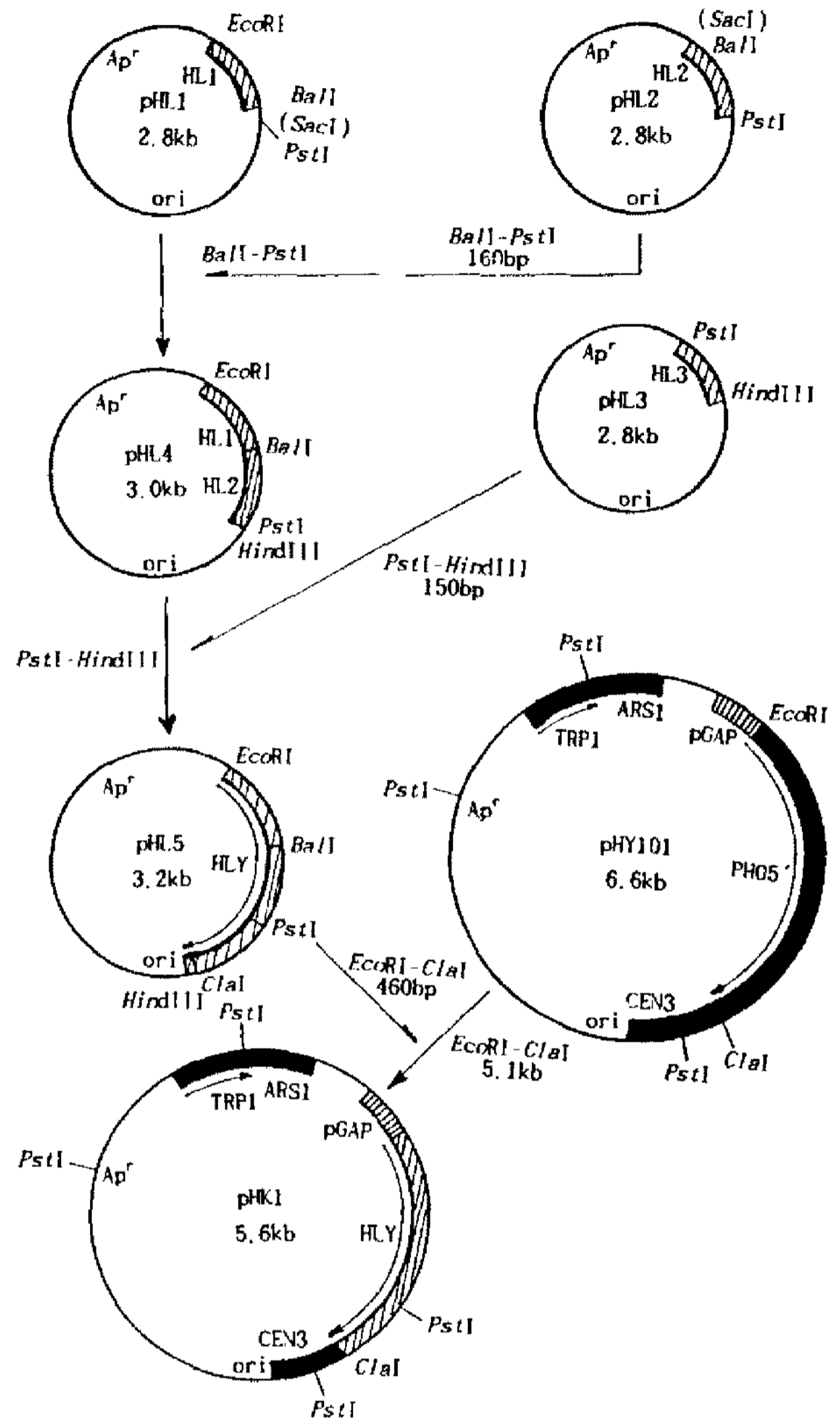


Fig. 4. Construction of a human lysozyme expression vector, pHK1.

Construction procedures are detailed in the text. The inner arcs represent the region and direction of translation of these genes. Thick lines represent DNAs derived from *S. cerevisiae*. The striped and oblique fragments bear the GAP promoter and HLY gene, respectively.

의 pHL2 및 pHL3이며 이들은 Fig. 3의 B-1 및 C-1에서와 같이 영동속도의 차가 보였다. 이를 분리한 plasmid DNA 들은 각각 *BalI-PstI*, *PstI-HindIII*와 *PstI-EcoRI*로 처리하여 얻은 결과가 Fig. 3의 B-2 및 C-3에서 나타내고 있다. 제조된 이들 세 DNA 단편들을 연결하기 위하여 먼저, Fig. 4의 plasmid pHL2를 *BalI-PstI* 처리 후 agarose gel에 전기영동하여 분리 정제한 약 160 bp의 HL2 DNA 단편을 plasmid pHL1의 *BalI-PstI*의 부위 사이에 삽입하여 plasmid Fig. 4의 pHL4를 얻었다. 이는 Fig. 3의 D-1에서 나타내는 바와 같이 pHL1보다 영동속도가 늦음을 알 수 있고, *EcoRI*과 *PstI* 완전분해 후에는 Fig. 3의 D-2에서 보는

바와 같이 약 340 bp의 DNA 단편이 나타났다. HL1과 HL2 DNA 단편이 삽입된 plasmid를 pHL4라 정하고 여기에 HL3를 연결시키기 위하여 Fig. 4의 plasmid pHL3을 *Pst*I과 *Hind*III로 완전 분해하여 얻어진 DNA 단편 HL3를 plasmid pHL4의 *Pst*I-*Hind*III 부위 사이에 도입하여 얻어진 plasmid가 Fig. 4의 pHL5이다. plasmid pHL4와 pHL5를 각각 agarose gel 전기영동한 결과가 Fig. 3의 E-1이며 이를 확인하기 위하여 제한효소 *Eco*RI과 *Cla*I으로 분해한 결과 약 480 bp의 DNA 단편이 분리되었다(Fig. 3, E-2).

합성된 *HLY* 유전자의 세 DNA 단편 HL1, 2, 3의 염기배열이 본래의 설계와 동일한지의 여부를 확인하였다. 말단 형광 primer를 이용하여 autoDNA sequencer에서 염기배열을 결정된 결과 본래의 설계와 동일함을 알 수 있었다(결과 미제시).

합성 *HLY* 발현용 vector plasmid의 제작

*S. cerevisiae*를 숙주세포로 이용함을 전제로 하여 효모용 발현 vector를 제작하기로 했다. 발현 vector의 모체는 본 연구실에서 개발된 plasmid pHY101을 이용하였다(10). pHY101 DNA 상에서의 외래유전자 고발현용 promoter는 *S. cerevisiae*의 가용성 단백질의 5%를 차지하는 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase의 구조유전자, *GAP*에서 전사개시점과 promoter 활성을 지니는 영역 0.9 kb 만을 인위조작하여 얻은 *GAP* promoter를 이용하였다. 이 promoter의 하류 *Eco*RI 부위에 상기의 *HLY* 유전자를 연결시키면 glucose 하에서 배양할 때 *GAP* promoter에 의하여 *HLY*의 생산 분비가 예상된다. 또 일반적인 유전자의 발현에는 terminator에 의해서 mRNA의 생산율이 증감된다. 그리하여 본 실험에서는 *S. cerevisiae*에서 그 발현양이 비교적 높은 repressible acid phosphatase의 구조유전자 *PH05*의 terminator 부분을 이용했다. Fig. 4의 plasmid pHY101에서 Δ *PH05*의 *Cla*I 이하 약 200 bp가 이러한 terminator 부분에 해당된다(19).

먼저, Fig. 3의 E-2로부터 480 bp의 *HLY* DNA 단편 *Eco*RI-*Cla*I을 분리 정제하여 plasmid pHY101의 1.5 kb의 *Eco*RI-*Cla*I DNA 단편을 제거 후 연결시켰다. 조작 후 얻어진 발현용 plasmid pHK1은 Fig. 3의 F-1에서와 같이 분자량이 줄어든 것을 알 수 있다. 이를 확인하기 위하여 제한효소 *Eco*RI과 *Pst*I으로 완전분해하면 Fig. 3의 F-2와 같이 *HLY* 유전자 내의 *Pst*I 부위에 의하여 새로운 절단 DNA 단편이 나타남을 알 수 있다. 제작된 *S. cerevisiae*에서의 *HLY* 발현용 plasmid를 pHK1이라 하고 향후의 실험에 이용하였

다. Plasmid pHK1은 *S. cerevisiae*의 동원체 *CEN3*를 지니고 있으므로 체세포 분열시 비교적 높은 plasmid 보지율(60~70%)을 보이나 세포당의 copy 수가 낮아 (1~3개 plasmid) 전체 생산량은 다 copy 수 plasmid보다 낮을 것으로 예상되며 이는 향후 생산량 제고를 위하여 vector의 개량이 요구된다.

*S. cerevisiae*에서의 합성 *HLY* 유전자의 발현 확인

상기 실험에서 제작된 *HLY* 발현용 vector pHK1의 *S. cerevisiae*에서의 발현을 조사하기로 하였다. 실험용 *S. cerevisiae* 균주는 본 실험실에서 육종된 *S. cerevisiae*, HY-1(*trp1*)을 숙주로 이용하였다. HY-1을 배양하여 대수증식기 초기에 이들 세포를 Lithium-acetate 완충액으로 처리하여 polyethyl glycol 존재 하에서 plasmid pHK1을 효모세포내로 도입하였다. 도말 후 SD-Trp 평판배지 상에 자라나는 Trp^+ 형질전환체는 간접적으로 plasmid pHK1을 지니는 것으로 간주된다. pHK1 형질전환체에서 *HLY*의 생산 분비는 *M. luteus*를 이용한 lysoplate assay 법으로 확인하였다. 중층배지는 *M. luteus*를 24시간 배양하여 여기에 0.8% 되게 멸균 agar 용액을 첨가하여 조제하였다. 상기의 효모 형질전환액을 SD-Trp 평판배지에 도말하여 30°C 에서 이틀간 배양한 후 여기에 상기의 조제된 중층배지를 가하여 30°C 에서 계속 배양하였다. Plasmid pHY101의 형질전환체에서는 뚜렷한 변화가 형질전환체 주위에 나타나지 않았으나(결과 미제시) Fig. 5에서와 같이 *HLY* 발현용 plasmid pHK1의 형



Fig. 5. Lysoplate assay of Trp^+ transformant harboring plasmid pHK1.

After 2 days incubation of the transformant on SD-Trp plate at 30°C, *M. luteus* culture containing 0.8% agarose was overlaid.

질전환체 주위에는 배양 시간의 경과에 따라 다소의 차이는 있으나 투명환이 형성됨을 알 수 있었다. 이는 pHK1 형질전환체에서 생성분비되었다고 인정되는 HLY에 의하여 주변의 *M. luteus*의 생육이 저지되었음이 확인되었다. 나아가, 인공 합성된 유전자 *HLY*가 *GAP* promoter 및 *PH05* terminator, 그 자신의 분비 signal에 의하여 효모에서 생산 분비되었음을 시사한다. 본 논문에서는 제시하지 않았으나, SDS-PAGE를 통한 예비실험에서 pHK1 형질전환체의 SD-Trp⁻ 배지에서 24시간 배양 후, 배양액 중에 약 0.5 µg/ml의 HLY가 얻어짐을 알 수 있었다. 이는 HLY의 cDNA를 이용하여 효모에서 생산한 Yoshimura 등(6)의 5.5 µg/ml와 Castanon 등(7)의 1.6 µg/ml와 비교할 때 생산효율이 낮으나, 이들이 사용한 다 copy 수(세포당 100~200개)의 발현 vector를 사용한 점과 배양조건을 고려한다면 향후, 고생산의 가능성이 충분하다. 현재 새로운 promoter와 함께 다 copy 수의 *HLY* 발현용 vector를 제작 중에 있으며, 고순도의 분리정제체를 검토 중에 있다.

요 약

소염작용, 혈액응고작용, 식품과 화장품공업 등에 폭 넓게 이용되는 라이소자임은 종래 난백유래의 것이 대부분이었으나 면역거부성과 정맥주사용 등을 고려할 때 그 활성이 뛰어난 인간의 라이소자임의 대량 생산이 요구된다. 효모, *S. cerevisiae*를 숙주로 한 고생산 발현계를 확립하기 위하여 먼저, 화학적 유전자 합성법을 이용하여 적절한 *HLY* 유전자를 합성하였다. 전 DNA 영역을 38개의 oligomer로 나누어 합성 후 크게 세부분(HL1, HL2, HL3)으로 각각 조립하였다. 이들 DNA 단편을 연결하여 최종적 자체의 분비 signal을 지닌 구조유전자 *HLY*를 제조하였다. 합성된 유전자 *HLY*를 이용하여, 효모에서의 고발현을 위하여 세포내 가용성 단백질의 5%를 차지하는 *GAP* 유전자의 promoter와 repressible acid phosphatase 유전자 *PH05*의 terminator를 연결하여 *HLY* 발현분비용 vector pHK1을 제작하였다. plasmid pHK1을 효모에 도입하여 얻어진 형질전환체에서 생산분비되는 HLY은 검정균 *M. luteus*의 생육저지를 lysoplate assay 방법으로 검정하였다. 이로써 합성유전자 *HLY*은 효모 내에서 정상적으로 발현되고 그 산물이 세포외로 분비됨을 확인하였다.

감사의 말

본 연구는 1992년도 교육부지원 학술진흥재단의 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Remington, S.J., W.F. Anderson, J. Owen, L.F. Ten Eyck, C.T. Grainger, and B.W. Matthews. 1978. Structure of the lysozyme from Bacteriophage T4: An electron density map at 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **118**: 81-98.
2. Streisinger, G., F. Mukai, W.J. Dreyer, B. Miller, and S. Horiuchi. 1961. Cold Spring Harbor *Smy. Quant. Biol.* **26**: 25.
3. Yoshimura, K., A. Toibana, and K. Nakahama. 1988. Human Lysozyme: Sequencing of a cDNA, and Expression and Secreyion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**: 794-801.
4. Canfield, R.E., J.C. Collins, and H.J. Sobel. 1974. Human leukemia lysozyme, Pp. 63-70. In E.F. Osserman, R.E. Canfield, and S. Beychok (Eds), Academic Press, New York.
5. Arnheim, N., J. Sobel, and R. Canfield. 1971. Immunochemical resemblance between human leukemia and hen egg white lysozyme and their reduced carboxymethyl derivatives. *J. Mol. Biol.* **61**: 237-250.
6. Yoshimura, K., A. Toibana, K. Kikuchi, M. Kobayashi, T. Hayakawa, K. Nakahama, M. Kikuchi, and M. Ikehara. 1987. Differences between *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus Subtilis* in Secretion of Human Lysozyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **145**: 712-718.
7. Jigami, Y., M. Muraki, N. Harada, and H. Tanaka. 1986. Expression of synthetic human-lysozyme gene in *Saccharomyces cerevisiae*: use of a synthetic chicken-lysozyme signal sequence for secretion and processing. *Gene* **43**: 273-279.
8. Castanon, M.J., W. Spevak, G.R. Adolf, E.C. Sledziewska, and A. Sledziewski. 1988. Cloning of human lysozyme gene and expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **66**: 223-234.
9. Bennetzen, J.L. and B.D. Hall. 1982. Codon selection in yeast. *J. Biol. Chem.* **257**: 3026-3031.
10. 황용일, 서애란, 심상국, 정동효. 1991. 효모, *Saccharomyces cerevisiae*의 *GAP* 유전자를 이용한 발현 벡터계의 개발. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 568-574.
11. Osserman, E.F. and D.P. Lawlor. 1966. Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. *J. Exp. Med.* **124**: 921-951.
12. Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning. 2nd ed. Cold Spring Harbor

- Lab., Cold Spring Harbor, New York.
13. Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983 Transformation of intact yeast cell treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.
 14. Cohen, S.N., A.C.Y. Chang, and L. Hsu. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. natl. Acad. Sci. USA.* **69**: 2110-2114.
 15. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
 16. Jolles, P. and J. Jolles. 1984. What's new in lysozyme research. *A review. Mol. Cell. Biochem.* **63**: 165-189.
 17. Smith, R.A., M.J. Duncan, and D.T. Moir. 1985. Heterologous Protein Secretion from Yeast. *Science* **229**: 1219-1224.
 18. Tanaka, S., T. Oshima, K. Ohsue, T. Ono, S. Oikawa, I. Takano, T. Noguchi, K. Kangawa, N. Minamoto, and H. Matsuo. 1982. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized gene for a novel opiate peptide α -neo-eudorphin. *Nucleic Acids Res.* **10**: 1741-1754.
 19. Arima, K., T. Oshima, I. Kubota, N. Nakamura, T. Mizunaga, and A. Toh-e. 1983. The nucleotide sequence of the yeast PH05 gene: a putative precursor of repressible acid phosphatase contains a signal peptide. *Nucleic Acids Res.* **11**: 1657-1672.

(Received 25 November 1994)