

*Saccharomyces cerevisiae*에서 *GAL* 또는 *GAP* 프로모터 조절에 의한 재조합 Inulinase의 발현 및 분비

*남 수 완 · 임 현 정 · †정 봉 현 · **장 용 근

생명공학연구소 생물분리공정 Research Unit, *동의대학교 미생물학과,
**한국과학기술원 화학공학과 및 생물공정연구센터

Expression and Secretion of Recombinant Inulinase under the Control of *GAL* or *GAP* Promoter in *Saccharomyces cerevisiae*

Soo Wan Nam*, Hyun Joung Lim, Bong Hyun Chung[†], and Yong Keun Chang**

Bioseparation Process Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and
Biotechnology, KIST, Taejon 305-600, Korea

*Dept. of Microbiology, College of Natural Science, Dong-eui University, Pusan 614-714, Korea

**Dept. of Chemical Engineering and BioProcess Engineering Research Center,
Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea

ABSTRACT

To investigate the promoter effect on heterologous gene expression in *S. cerevisiae*, the recombinant plasmids pYI11, pYI12, pYI10-2, and pYIGP were constructed to contain the inulinase gene (*INU1*) as a reporter under the control of *GAL10*, *GAL7*, *GAL1*, and *GAP* promoters, respectively. When the yeasts transformants were cultivated on galactose-containing rich media, the cell growth reached to 36-39 OD₆₀₀ at 72 hours of cultivation. The specific growth rates of the cells harboring the four different plasmids decreased similarly : they dropped from 0.24 h⁻¹ during the glucose-consuming period to 0.04-0.10 h⁻¹ during the galactose-consuming period (gene expression phase for *GAL* promoter system). After the depletion of glucose, the expression of inulinase gene was started and reached to maximal levels of 4.3(*GAL1* promoter), 4.0(*GAL10* promoter), 3.8(*GAL7* promoter), and 1.6(*GAP* promoter) unit/mL at 72 hours of cultivation. Based on the maximal expression level and activity staining on the plate, the promoter strength was in the order of *GAL1*, *GAL10*, *GAL7* and *GAP* promoter. While the *GAL*-promoter systems showed a high plasmid stabilities of more than 78%, the *GAP*-promoter plasmid revealed a lower plasmid stability of 55%. Most of inulinase activity (98%) was found in the extracellular medium, indicating that the secretion efficiency of inulinase is independent on the type of promoter.

† Corresponding Author

서 론

*Saccharomyces cerevisiae*는 생리학적, 유전학적 및 분자생물학적 정보가 많이 축적되어 있고 동물 세포와 유사한 단백질 분비 체계를 가지고 있다는 장점 때문에 외래 단백질 생산을 위한 숙주 세포로써 다양하게 응용되고 있다. 최근 외래 단백질의 상업적인 생산이 크게 강조되고 있어 cloning된 유전자의 고발현을 위한 효모 숙주세포의 변이주 및 고발현 vector계 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 재조합 효모에서 외래 유전자 발현시 주요 고려인자로는 plasmid copy number, 전사효율, repressor나 inducer의 농도, mRNA의 안정성, 사용된 promoter의 강도, plasmid 안정성 등이 있으며 이들 인자에 의해 최종 산물(단백질) 생산성이 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다(1).

일반적으로 높은 plasmid copy number는 고발현을 유도시키지만(gene dosage effect), copy number가 너무 높거나 과발현은 숙주 세포에 대사적 불균형을 초래하여 균체 증식속도나 증식수율을 감소시키고 plasmid 불안정을 유발하여 재조합 단백질의 전체 생산성을 감소시키는 원인이 되기도 한다(1-3). 이러한 문제점을 해결하기 위해 유도성(inducible) promoter를 도입하여 균체증식과 유전자 발현을 분리하여 조절한다(4). 효모 *S. cerevisiae*에서 사용되는 유도성 promoter로는 *SUC2*, *PHO5*, *CUP1* 및 *GAL* 등이 있으나 이 중 *GAL* promoter들이 강력한 유도능(inducibility) 때문에 가장 널리 사용되고 있다. *GAL* promoter(*GAL1*, *GAL7* 및 *GAL10*)는 포도당 존재시 전사가 억제되며, 포도당 고갈 후 galactose에 의해 전사가 개시되는 catabolite repression 조절을 받는다(5, 6). 이들 *GAL* promoter의 세기(유도능)는 외래 단백질(유전자)에 따라 달라짐이 보고되었다. 즉, *E. coli* β -galactosidase 발현에서는 *GAL1* promoter가 *GAL10* promoter보다 강력하며(7), hirudin과 β -galactosidase의 발현·생산에서는 *GAL10* promoter가 *GAL1* promoter보다 훨씬 높은 발현량을 보였다(8, 9). 이상의 결과들은 *GAL* promoter 중에서 주로 *GAL1*과 *GAL10* promoter에 대하여 연구한 것이며 *GAL7* promoter와의 직접적인 비교 연구는 없는 실정이다. 또한, promoter 강도 차이는 재조합 plasmid 구축시 발생한 염기서열의 변화와 사용하는 숙주세포의 유전적, 생리적 특성 차이, 발현되는 재조합 단백질의 특성, 또는 외래 유전자의 codon

usage 차이 등에도 기인한다고 알려지고 있다(1). 따라서, 본 연구에서는 promoter 이외 인자들의 영향을 배제하고 외래 유전자의 발현에 미치는 *GAL* promoter들의 영향을 상호비교하고자 한다.

유도성 promoter외에 구성적(constitutive) promoter로는 *PGK*(phosphoglycerate kinase), *GAP*(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *ADH1*(alcohol dehydrogenase I) 등 glycolytic promoter들이 알려져 있으나, 본 연구에서는 대표적으로 *GAP* promoter를 선택하여 *GAL* promoter들과 비교하였다. 즉, *GAL1*, *GAL7*, *GAL10* 및 *GAP* promoter 하류에 reporter 유전자인 *Kluyveromyces marxianus*의 inulinase 유전자(*INU1*)를 연결하여 각각의 재조합 plasmid들을 구축하고 *S. cerevisiae*에 형질전환시킨 후 복합유도배지에서의 균체 증식, inulinase 발현양, plasmid 안정성 및 inulinase 분비 특성 등을 조사하여 외래 유전자 발현에 미치는 promoter의 영향을 비교·검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 Plasmids

본 연구에서는 *K. marxianus* inulinase 유전자(*INU1*)의 발현 및 분비를 위한 숙주 세포로 *S. cerevisiae* SEY 2102 (*MAT α ura3-52 leu2-3 leu2-112 his4-519 suc2- Δ 9*) (10)를 사용하였다. *K. marxianus* ATCC 12424의 diploid형인 *K. marxianus* Y-610을 inulinase 생산 야생균주로 사용하였다. *INU1*은 pYI10 plasmid(11)로부터, *GAL10*, *GAL7*, *GAL1* 및 *GAP* promoter는 pYGILP-10(12), pAA7(13), pYES2.0 (Invitrogen Co., U.S.A.) 및 pYG-Hir (S.-K., Rhee; 생명공학연구소) plasmid로부터 각각 얻었다.

재조합 Plasmids 구축과 효모의 형질전환

pYI10의 *INU1*과 pYGILP-10의 *GAL10* promoter를 pBluescript SK (Stratagene Co., U.S.A.)로 subcloning한 후 *Bam*HI과 *Sal*I로 절단하여 1.71 kb DNA 단편을 얻었다. 이 단편을 이미 *Bam*HI과 *Sal*I로 절단한 pYGILP-10에 ligation시켰다. 그 결과 *GAL10* promoter-*INU1*-*GAL7* terminator을 갖는 pYI11 (8.2 kb) plasmid를 구축하였다(Fig. 1a). *INU1*을 pAA7에 subcloning한 다음 *Bam*HI과 *Xba*I로 처리하여 *GAL7* promoter와 *INU1*을 가진 단편을 얻고, 이 단편을 *Bam*HI

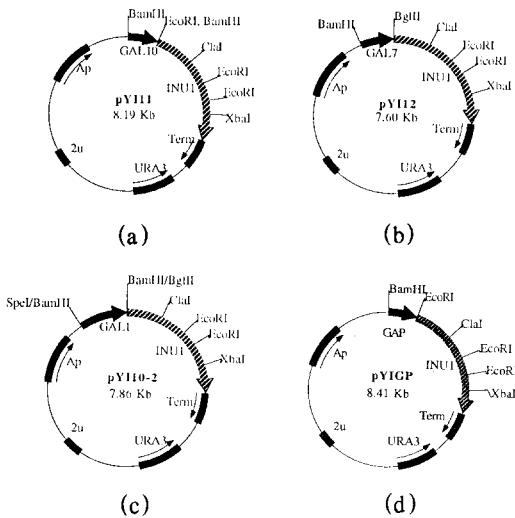


Fig. 1. Restriction maps of recombinant plasmids pYI11 (*GAL10* promoter), pYI12 (*GAL7* promoter), pYI10-2 (*GAL1* promoter), and pYIGP (*GAP* promoter). Abbreviations: *INU1*, inulinase gene; *Term*, *GAL7* terminator; *URA3*, orotidine-5'-phosphate-decarboxylase gene; *2u*, *2u*-replicon origin; *Ap*, β -lactamase gene.

과 *XbaI* 처리한 pYI11에 ligation시켰다. 이로써 구축된 pYI12(7.6 kb)는 *GAL7* promoter-*INU1*-*GAL7* terminator를 포함한다(Fig. 1b). pYI10을 *SpeI*과 Klenow enzyme으로 처리한 후 다시 *Clal*으로 잘라서 *GAL1* promoter와 일부의 *INU1*이 포함된 0.94 kb DNA를 분리하였다. 분리된 단편과 이미 *BamHI*-Klenow-*Clal* 처리된 pYI12와 ligation시켜서 pYI10-2을 얻었다(Fig. 1c). pYG-Hir을 *EcoRI*-*Sall* 처리로 얻은 6.6 kb의 DNA 단편 (*GAP* promoter와 *GAL7* terminator 포함)과 PCR로 증폭된 *INU1* (*EcoRI*-*Sall*으로 절단)을 ligation시켜 pYIGP plasmid를 얻었다(Fig. 1d). 이 상에서 구축된 pYI11(*GAL10* promoter), pYI12 (*GAL7* promoter), pYI10-2(*GAL1* promoter) 및 pYIGP(*GAP* promoter)는 각 promoter만 다를 뿐, 그 외의 부분은 동일한 구조를 갖는다. 각 재조합 plasmid는 Ito 등(14)의 방법으로 *S. cerevisiae* SEY 2102에 형질전환시켰다.

배지 및 배양방법

효모 숙주세포와 재조합 효모의 배양을 위한 일반

배지로 YPD (1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% dextrose)를 사용하였고, 효모 형질전환체를 선별하기 위한 선택배지로는 YNBCAD (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% casamino acid, 2% dextrose)를 사용하였다. *INU1* 발현유도 복합배지로는 YPDG(1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, 1% dextrose, 1% galactose)를 사용하였다. 재조합 효모 균주는 500 mL baffled-flask (working volume; 100 mL)로 30°C, 170 rpm에서 96 시간 배양하였다.

분석방법

균체농도는 일정시간마다 채취한 배양액을 적당한 비율로 희석하여 분광광도계(UVICON 930, Switzerland)를 사용하여 600nm에서 탁도(OD₆₀₀)를 측정하였다. 배양액을 5,000 rpm에서 5분 동안 원심 분리한 후 배양 상등액을 얻고, dinitrosalicylic acid 방법(15)을 사용하여 총환원당량을 측정하였으며 포도당 농도는 Sigma Kit(# 510A)을 사용하여 측정하였다. 총환원당량에서 포도당양을 감하여 galactose농도를 계산하였다.

숙주 세포와 재조합 세포는 YPS 평판배지(1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% sucrose, 2% agar)에서 36시간 배양한 다음 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride(TTC) 염색법(16)으로 inulinase 활성을 확인하였다. 배양상등액을 사용하여 세포의 inulinase 활성을 측정하였고, glass beads (0.4-0.5 mm)로 과쇄한 전세포분획으로 세포내 inulinase 활성을 측정하였다(16). Inulinase 활성도는 inulin(Jerusalem artichoke)으로부터 pH5.1, 37°C에서 1분당 1 μ mole의 환원당을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다. 비활성도 (specific activity)는 inulinase 활성도를 OD₆₀₀ 값으로 나누어서 계산하였다. Inulinase의 분비효율은 전체 효소 활성(세포외 활성 + 세포내 활성)에 대한 세포외 효소 활성비를 백분율로 나타내었다.

Plasmid 안정성은 배양액을 적당히 희석하여 YPD 평판배지에 도말한 후 자란 100-200개의 colony를 선별배지(YNBCAD)로 toothpicking한 다음 형성된 colony 수의 비(백분율)로 측정하였다.

결 과

INU1 발현 재조합 Plasmids의 구축

본 연구에서 구축한 pYI11, pYI12, pYI10-2 및

pYIGP plasmid들은 각각 *GAL10*, *GAL7*, *GAL1* 또는 *GAP* promoter 하류에 *K. marxianus*의 inulinase 유전자(*INU1*)를 연결한 *INU1* 발현 plasmid이며 promoter를 제외한 나머지 염기 부분 (*GAL7* terminator, 2- μ m origin, *URA3*, Amp^r)은 유전자 source와 방향면에서 모두 동일하다(Fig. 1). 특히, Abe 등(17)은 인간 adenovirus E1a 단백질 생산에서 *GAL7* terminator 함유 plasmid가 terminator없는 plasmid에 비해 발현양이 3배 정도 증가된 것으로 보고하였다. 따라서, 본 연구에서도 효과적인 inulinase 발현을 위해 *INU1* 하류에 *GAL7* terminator를 공통적으로 연결하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 각 plasmid의 크기가 다른 것은 각 promoter의 길이가 다르거나 *INU1*의 5'-noncoding 영역의 길이 차이에 기인한다.

효모 형질전환체의 선별 및 Inulinase 활성 염색 pYI11, pYI12, pYI10-2 및 pYIGP 각 plasmid를 *S. cerevisiae* SEY 2102에 형질전환시킨 후 uracil이 결핍된 최소선택배지(YNBCAD)에서 형질전환체들을 1차 선별하였다. 각 형질전환체들을

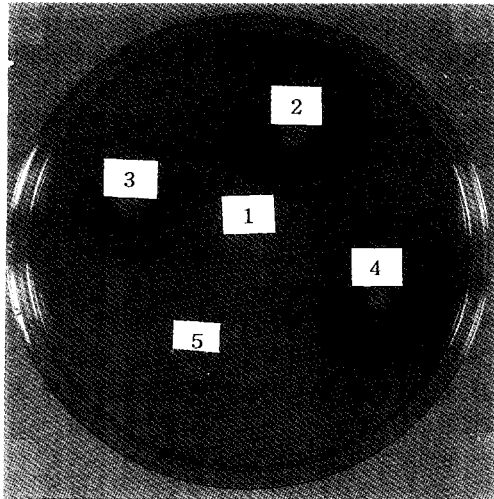


Fig. 2. Activity staining of inulinase expressed from recombinant yeasts which were grown on sucrose medium. (1) *S. cerevisiae* SEY2102 host cell, (2) *S. cerevisiae* SEY2102 harboring pYI11 plasmid, (3) *S. cerevisiae* SEY2102 harboring pYI12 plasmid, (4) *S. cerevisiae* SEY2102 harboring pYI10-2 plasmid, (5) *S. cerevisiae* SEY2102 harboring pYIGP plasmid.

YPS 평판배지에서 36 시간 배양한 다음 TTC 염색을 통해 inulinase 활성을 조사하였다. 각 plasmid에 대한 50개의 형질전환체 중에서 가장 큰 환(halo)을 보이는 재조합 효모세포를 선별하여, *K. marxianus*의 inulinase 활성과 비교하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이, 발현·생산된 inulinase는 TTC 염색으로 colony 주위에 적색의 환을 형성하며 *K. marxianus*에 비교할 만한 환은 pYI10-2(*GAL1* promoter)를 함유한 효모 형질전환체로부터 얻었다. pYI11(*GAL10* promoter) 함유 효모가 작은 환을 나타내며 pYI12(*GAL7* promoter) 또는 pYIGP(*GAP* promoter) 함유 효모가 가장 작은 환을 보였다. 따라서 재조합 inulinase 발현에 대한 promoter 강도는 *GAL1*, *GAL10*, *GAL7*, *GAP* promoter 순임을 알 수 있었다.

균체증식과 Inulinase 발현

Inulinase 발현과 균체증식에 미치는 promoter의 영향을 조사하기 위해 각 재조합 효모세포를 baffled flask에서 유도배지인 YPDG로 회분배양하였다. 각 재조합 효모세포의 균체증식(OD₆₀₀), 균체내의 inulinase 활성, plasmid 안정성 및 탄소원 소모 결과들을 Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5 및 Fig. 6에 나타내었다. 배양액내 포도당은 배양 12시간 이내 완전히 소모되었고, 이후 galactose가 이용되기 시작하였으며 plasmid 종류에 관계없이 최종 세포농도(OD₆₀₀)는 36-39에 도달하였다. 포도당 소모기간 동안 비증식속도는 평균 0.24 h⁻¹로 유지되다가 galactose 소모기간(유전자 발현 유도기간) 동안에는 0.04-0.06 h⁻¹으로 약 80% 정도 비증식속도의 감소를 보였다. pYIGP 함유 재조합 효모의 경우 동일한 배양조건(YPDG 배지)에서 inulinase 발현 양상을 비교하였다(Fig. 6). 포도당 고갈 후 배양 12-72 시간 사이(galactose 소모기간)에서 비증식속도는 평균 0.10 h⁻¹으로 유지되어 *GAL* promoter plasmid 함유 효모보다 약 2배 높은 증식속도를 보였다.

배양액에서 포도당이 고갈되었을 때(배양 12시간 이후), inulinase 발현은 시작되었고(1-3 시간의 lag time 보임), 동시에 균체증식도 점차적으로 증가되었다. 균체의 inulinase의 발현 수준은 배양 60-72 시간 경에 최고치에 도달했고, 그 후 약간 감소하였다. Inulinase 최고 활성은 pYI10-2, pYI11, pYI12를 포함한 세포에서 각각 4.3, 4.0 및 3.8 unit/mL로 나타났으며, pYIGP를 포함한 세포에서는 1.6 unit/mL로 배양 72시간에 최고 수준을 보였다.

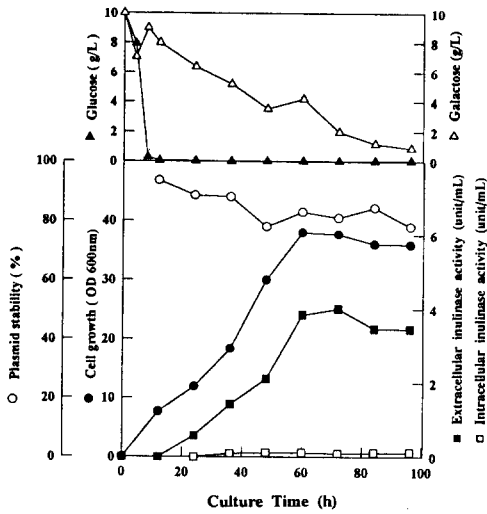


Fig. 3. Time courses of cell growth and inulinase production by *S. cerevisiae* SEY2102 harboring pYI11 plasmid(*GAL10* promoter). Symbols: (●), cell concentration (OD₆₀₀); (■), extracellular inulinase activity (unit/mL); (□), intracellular inulinase activity (unit/mL); (○), plasmid stability (%); (▲), glucose concentration (g/L); (△), galactose concentration (g/L).

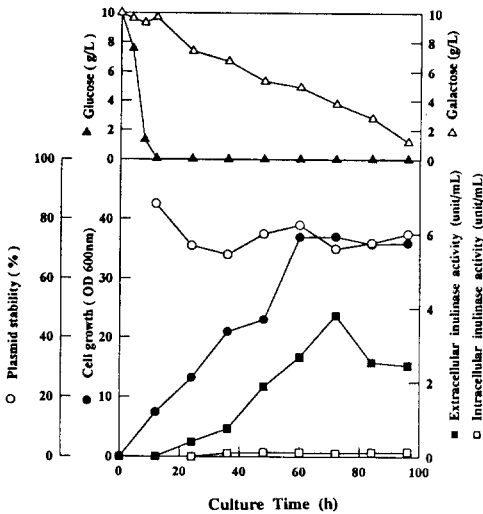


Fig. 4. Time courses of cell growth and inulinase production by *S. cerevisiae* SEY2102 harboring pYI12 plasmid(*GAL7* promoter). Symbols are the same as Fig. 3.

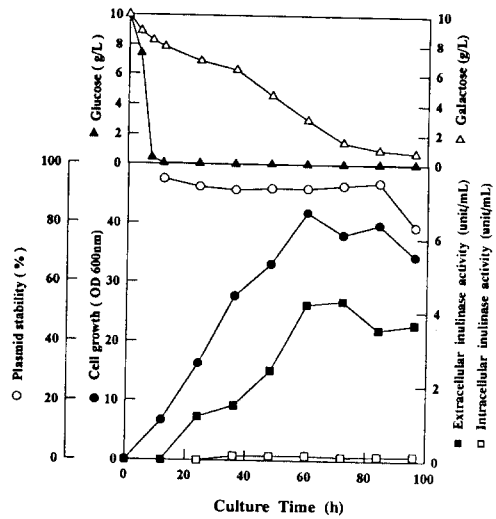


Fig. 5. Time courses of cell growth and inulinase production by *S. cerevisiae* SEY2102 harboring pYI10-2 plasmid(*GAL1* promoter). Symbols are the same as Fig. 3.

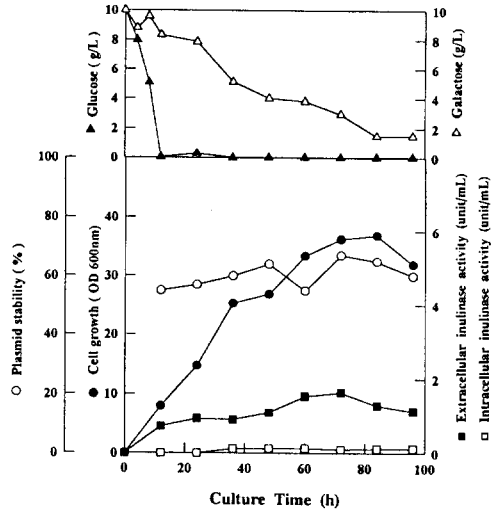


Fig. 6. Time courses of cell growth and inulinase production by *S. cerevisiae* SEY2102 harboring pYIGP plasmid(*GAP* promoter). Symbols are the same as Fig. 3.

다. 이러한 inulinase 발현 결과로 볼 때, *GAL10* 과 *GAL1* promoter는 promoter 강도가 비슷함을 알 수 있고, *GAL7* promoter는 galactose에 의해

가장 낮은 유도능(inducibility)을 보여 주었다. 이런 결과는 inulinase 활성 염색법에 의해서도 확인되었다(Fig. 2).

Plasmid 안정성과 Inulinase 분비효율

유전자 산물의 생산성과 외래 단백질의 분비효율은 plasmid 안정성, 재조합 효모의 배양 조건, promoter 강도 및 signal peptide 등을 포함한 여러 인자들에 의해 좌우되므로(12, 18-20), 상기 재조합 plasmid들을 이용하여 plasmid 안정성과 inulinase의 분비효율에 미치는 세개의 GAL promoter와 GAP promoter의 영향을 자세히 조사하였다.

Fig. 3, Fig. 4 및 Fig. 5에서 보여주는 바와 같이, GAL-promoter plasmid 함유 효모들에서 배양 말기(96시간)까지 78% 이상으로 plasmid가 안정하게 유지되었으나, GAP-promoter plasmid 함유 효모는 55%의 낮은 plasmid 안정성을 보여주었다(Fig. 6). pYIGP 함유 효모세포의 경우 배양초기부터 plasmid 불안정성이 심각하게 나타나며 이는 전 배양하는 동안에 (YNBCAD 선택배지에서) 벌써 plasmid-free 세포가 발생했음을 시사한다. 재조합 효모의 세포내 분획에서 측정된 inulinase활성은 배양액 mL당 0.01-0.1unit였다. 그러므로 전체 발현된 inulinase의 98% 이상이 배양액으로 분비되었음을 알 수 있다. 이들 결과로 볼 때, 본 연구에 이용된 GAL promoter는 GAP promoter에 비해 모두 높은 plasmid 안정성을 보이며, 재조합 inulinase의 분비 효율성은 promoter 종류에 상관없이 98% 이상 유지되었다.

고 찰

본 연구에서는, GAL 또는 GAP promoter 하류

에 *K. marxianus INU1*을 연결한 재조합 plasmid들을 구축하고 이들에 의해 형질전환된 *S. cerevisiae*로부터 균체증식과 유전자 발현양 및 plasmid 안정성과 inulinase의 분비효율에 미치는 각 promoter들의 영향을 조사하였다. 이상의 회분배양 결과(배양 72시간째)를 Table 1에 요약하였다.

재조합 효모의 최종 균체농도는 YPDG 복합유도 배지에서 36-39 OD₆₀₀ 값을 보여 promoter에 따른 큰 차이를 보이지 않았으나, galactose 소모기간에서의 비증식속도는 GAL과 GAP promoter 사이에 큰 차이를 보였다. 즉, galactose 소모기간동안 GAL plasmid 함유 효모배양의 비증식속도(평균 약 0.05 h⁻¹)보다 pYIGP (GAP promoter) 함유 세포배양의 비증식속도는 약 2배 정도 높은 0.10 h⁻¹ 값을 보이며, 그 이유는 다음과 같이 생각할 수 있다. 즉, 재조합 세포배양에서 유전자 발현시 일반적으로 비증식속도의 감소를 수반하며(2, 3)(GAL plasmid 함유 효모의 경우 galactose 소모기간은 유전자 발현 유도기간에 해당), pYIGP 함유 세포의 경우 초기의 낮은 plasmid 안정성(Fig. 6)으로 인해 plasmid-free 세포의 비율이 증가하고, plasmid-free 세포의 비증식속도는 재조합 세포보다 일반적으로 높으므로(2, 7) pYIGP 함유 효모 배양 전체가 나타내는 총괄 비증식속도(overall specific growth rate)는 증가한 것으로 사료된다.

평관배지에서의 활성염색과 회분배양의 결과, inulinase 발현에 미치는 promoter 세기는 GAL1 > GAL10 > GAL7 > GAP 순으로 나타났다. 그러나, 최종 발현양이 ±0.3 unit/mL 정도의 차이만 있을 뿐 GAL promoter는 대체로 비슷한 발현강도를 보였다(Table 1). 비활성의 비교에서도 비슷한 발현강도가 GAL promoter사이에서 관찰된다. 실제로 *S. cerevisiae* 염색체상의 GAL1 유전자 산물인

Table 1. Comparison of cell growth and inulinase expression level by recombinant *S. cerevisiae* cells containing pYI11 (GAL10 promoter), pYI12 (GAL7 promoter), pYI10-2 (GAL1 promoter), or pYIGP (GAP promoter) plasmid. All measurements were made at 72 hr cultivation on YPDG media.

Promoter	Cell Growth (OD ₆₀₀)	Extracellular Inulinase Activity (unit/mL)	Specific Activity (unit/mL/OD ₆₀₀)	Plasmid Stability (%)	Secretion Efficiency (%)
GAL10	37	4.0	0.11	81	98
GAL7	37	3.8	0.10	78	98
GAL1	39	4.3	0.11	93	98
GAP	36	1.6	0.05	55	98

galactokinase의 세포내 농도는 *GAL10* 유전자 산물(epimerase) 보다 4배 정도 높다고 알려져 있다(21). 하지만 *E. coli* β -galactosidase와 hirudin의 발현·생산에서 *GAL10*이 *GAL1* promoter 보다 약 2배 정도 높은 발현양을 보였으며(8, 9), Da Silva 등(7)은 *GAL1*이 *GAL10* promoter에 비해 약 2배 높은 β -galactosidase 발현양을 보였으나 초기발현속도는 *GAL1* promoter가 4-5배 높음을 보고하였다. 본 연구 결과를 배양 12시간부터 36시간까지의 초기 inulinase 발현속도(unit/mL/h) 관점에서 살펴보면 *GAL1* : *GAL10* : *GAL7* = 0.67 : 0.62 : 0.03 비를 보여 *GAL1* promoter가 *GAL10* 보다 더 강함을 알 수 있다.

Galactose농도가 약 4 g/L에 도달한 배양 60시간에 재조합 세포의 증식이 정지하였고 더 이상의 inulinase 활성 증가도 없었다. 이와 같은 증식과 발현의 정지는 배양말기에 배지의 pH가 4.6-4.8로 떨어지므로(data not shown) 유기산이나 에탄올과 같은 대사 부산물의 축적때문이라 사료된다. 실제로 *S. cerevisiae*에서 mouse α -amylase이나 lipocortin-1의 발현시 propionate, acetate, malate, ethanol 등의 축적에 의한 증식저해가 보고되었다(22, 23). 또한, 균체증식 기간 동안 유도체(galactose) 농도의 감소로 인해 *E. coli* β -galactosidase와 mouse α -amylase 발현의 감소가 보고되었다(18, 24, 25). 따라서, 재조합 효모세포의 증식과 외래 유전자 발현을 더욱 증가시키기 위해서 배지의 pH 조절외에도 유도물질인 galactose의 농도를 최소한 4g/L 이상으로 조절해야 할 것으로 사료된다.

K. marxianus 야생균주에서 inulinase 분비효율은 탄소원에 따라 43-97%에 이르며(26), 재조합 *S. cerevisiae* (*INU1* 자체 promoter와 signal sequence 사용)에서는 64-76%의 분비효율을 보이고 있다(27). *S. cerevisiae*에서 재조합 단백질의 분비효율 또는 국제성은 사용한 promoter, 배양조건 및 숙주세포에 따라 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있어(18-20), 본 연구에서의 높은 inulinase 분비효율성은 이들 인자들의 차이에 기인한 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 *GAL1*, *GAL7*, *GAL10* 및 *GAP* promoter 하류에 reporter 유전자인 *K. marxianus*의 inulinase 유전자(*INU1*)를 연결하여 각각의 재

조합 plasmid들을 구축하고, 이들로 형질전환된 *S. cerevisiae*를 회분배양(YPDG 배지)하여 외래 유전자 발현에 미치는 promoter의 영향을 비교·검토하였다. 재조합 효모의 최종 균체농도는 36-39 OD₆₀₀ 값을 보여 promoter에 따른 큰 차이를 보이지 않았으나, 포도당 소모기간 동안 비증식속도는 평균 0.24 h⁻¹로 유지되다가 galactose 소모기간 동안에 *GAL* promoter 함유 효모배양의 경우 0.04-0.06 h⁻¹, pYIGP 함유 재조합 효모배양은 0.10 h⁻¹로 감소하였다. 포도당 고갈 후 inulinase 발현은 시작되었고 균체의 inulinase의 발현 수준은 배양 72시간에 4.3 (*GAL1* promoter), 4.0 (*GAL7* promoter), 3.8 (*GAL10* promoter) 및 1.6 (*GAP* promoter) unit/mL에 도달하였다. 평판배양에서의 활성영색과 회분배양의 결과(최종발현양 및 초기 inulinase 발현속도), inulinase 발현에 미치는 promoter 세기는 *GAL1* > *GAL10* > *GAL7* > *GAP* 순임을 알 수 있었다. *GAL* promoter가 배양말기까지 78% 이상의 높은 plasmid 안정성을 보인 반면에, *GAP* promoter의 경우 55%의 낮은 plasmid 안정성을 보였다. 또한, 재조합 inulinase는 promoter 종류에 상관없이 98% 이상 배양액으로 분비되었다.

감 사

본 연구는 과기처의 선도기술개발사업에 의해 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다. 또한, SEY2102 균주를 공여해 주신 서울대 서진호 교수님과 pYG-Hir plasmid를 공여해 주신 생명공학연구소 이 상기 박사님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. M. A. Romanos, C. A. Scorer, and J. J. Clare (1992), *Yeast*, **8**, 423.
2. F. Srien, J. C. Campbell, and J. E. Bailey (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 996.
3. A. H. Stouthamer and E. J. van Verseveld (1987), *Trends Biotechnol.*, **5**, 149.
4. J. C. Fieschko, K. M. Egan, T. Ritch, R. A. Koski, M. Jones, and G. A. Bitter(1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 1113.
5. M. Johnston(1987), *Microbiol. Rev.*, **51**, 458.
6. L. M. Mylin, K. J. Hofmann, L. D. Schultz,

- and J. E. Hopper(1990), *Methods Enzymol.*, **185**, 297.
7. N. A. Da Silva and J. E. Bailey(1991), *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 318.
 8. J. H. Sohn, S. K. Lee, E. S. Choi, and S. -K. Rhee(1992), *J. Microbiol. Biotechnol.*, **1**, 266.
 9. E. S. Choi, J. H. Shon, and S. -K. Rhee (1994), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 587.
 10. S. D. Emr, R. Schekman, M. C. Flessel, and J. Thorner(1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 7080.
 11. S. W. Nam, K. Yoda, and M. Yamasaki (1993), *Biotechnol. Lett.*, **15**, 1049.
 12. B. H. Chung, S. W. Nam, B. M. Kim, and Y. H. Park(1996), *Biotechnol. Bioeng.*, **49**, 473.
 13. M. Tajima, Y. Nogi, and T. Fugasawa(1986), *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 246.
 14. H. Ito, Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura (1983), *J. Bacteriol.*, **153**, 163.
 15. G. L. Miller(1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426.
 16. S. W. Nam, M. H. Woo, B. M. Kim, B. H. Chung, and Y. H. Park(1994), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 152.
 17. A. Abe, T. Wada, H. Handa, Y. Nogi, and T. Fukasawa(1988), *Agri. Biol. Chem.*, **52**, 2035.
 18. Y. S. Park, S. Shiba, S. Iijima, and T. Kobayashi(1993), *Biotechnol. Bioeng.*, **47**, 854.
 19. M. Broker, O. Bauml, A. Gottig, J. Ochs, M. Bodenbenner, and E. Amann(1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 756.
 20. J. F. Ernst(1986), *DNA*, **5**, 483.
 21. R. R. Yocum, S. Hanley, Jr. R. W. West, and M. Ptashne(1984), *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 1985.
 22. K. H. Lin, S. Iijima, G. -Y. Huang, F. Hishinuma, and T. Kobayashi(1991), *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 187.
 23. S. W. Nam, D. J. Seo, S. -K. Rhee, Y. H. Park, and B. H. Chung(1993), *J. Microbiol. Biotechnol.*, **3**, 168.
 24. N. A. Da Silva and J. E. Bailey(1989), *J. Biotechnol.*, **10**, 253.
 25. P. Hovland, J. Flick, M. Johnston, and R. A. Scalfani(1989), *Gene*, **83**, 57.
 26. R. J. Rouwenhorst, L. E. Visser, A. A. Van Der Baan, W. A. Scheffers, and J. P. Van Dijken(1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1131.
 27. O. Laloux, J. P. Cassart, J. Delcour, J. Van Beeumen, and J. Vandenhaute(1991), *FEBS Lett.*, **289**, 64.