

Glucoamylase 분비신호서열의 돌연변이에 의한 효모에서 세균의 Endo-1,4-β-D-glucanase의 분비능 증진

이 준원 · 강 대욱 · 김 보연 · 오 원근 · 민 태익 · 이 상원 · 변 유량¹ · 안 종석*
생명공학 연구소, ¹연세대학교 생명공학과

Improvement of Bacterial Endo-1,4-β-D-glucanase (CMCase) Secretion in Yeast by Mutagenesis of Glucoamylase Signal Sequence. Lee, Jun-Won, Dae-Ook Kang, Bo-Yeon Kim, Won-Keun Oh, Tae-Ick Mheen, Sang-Won Lee, Yu-Ryang Pyun¹, and Jong-Seog Ahn*. Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology PO Box 115, Yusong Taejeon 305-600, Korea, ¹Department of Biotechnology, Yonsei University, 134 Shinchon-Dong, Sudaemun-Ku, Seoul 120-749, Korea – Glucoamylase of *Saccharomyces diastaticus* is produced as a large precursor composed of signal peptide (21 amino acid residues). Thr and Ser-rich region and functional glucoamylase. To evaluate the utility of the glucoamylase signal peptide (GSP) for the secretion of foreign proteins, four types of GSP mutants (m1 : Pro⁻¹⁸→Leu⁻¹⁸, m2 : Tyr⁻¹³→Leu⁻¹³, m3 : Ser⁻⁹→Leu⁻⁹, m4 : Asn⁻⁵→Pro⁻⁵) were constructed and secretion efficiency of each mutant was compared with that of native GSP by the expression and secretion of *Bacillus subtilis* CMCase under the control of GAP promoter and GAL7 terminator in *S. diastaticus*. Mutants 1, 2 and 3 had a higher hydrophobicity than wild type GSP in N-terminal domain and hydrophobic domain. In mutant 4, a polar amino acid was replaced by a helix - breaking Pro residue. CMCase activity assay and Western blot analysis revealed that CMCase secretion by GSP mutants replaced by Leu were increased compared with native GSP. In the case of m2 and m3, the substitution of Leu for Tyr⁻¹³ and Ser⁻⁹ in the hydrophobic region resulted in a twofold increase in the extracellular CMCase activity.

Key words: Glucoamylase signal peptide, *Bacillus* CMCase, mutagenesis, *Saccharomyces diastaticus*

효모는 이종단백질의 생산시 유망한 숙주로 인식되어 광범위하게 사용되고 있으며 지금까지 많은 이종단백질이 효모에서 성공적으로 발현되었음이 보고되었다. *Saccharomyces cerevisiae*는 고등 진핵세포와 유사한 분비계가 존재하여 세포 외로 분비되는 단백질은 소포체, 골지체 및 분비낭 등의 분비과정을 거쳐 세포 외로 분비되며 또한 분비되는 동안 진핵세포에 특이적인 당쇄가 일어난다. 이러한 당쇄는 단백질 구조의 안정성, 용해도와 활성등에 중요한 것으로 알려져 있다[1].

분비 단백질의 N-말단에 존재하는 signal peptide는 전이되는 단백질을 소포체로 이동시키는 기능을 수행하며[2], 일반적으로 약 20개의 아미노산으로 이루어져 있고 positively-charged N-terminal region (n-region), central hydrophobic core region (h-region) 및 polar C-terminal region (c-region) 등의 세 부위로 구성되어 있다.

효모에서 생성된 단백질을 세포 외로 분비시키고자 α-factor [3], killer toxin[4], invertase[5] 및 acid phosphatase[6] 등의 분비신호서열을 사용한 연구가 보고되었다. 또한, 효모

세포에서 이종 단백질의 분비를 증진시키기 위한 다양한 연구가 단백질공학 기법을 이용하여 보고되었다. 분비신호서열을 변형시켜 분비 효율을 높인 보고로는 *S. carlsbergensis*의 MEL 유전자가 만드는 α-galactosidase의 분비신호서열에 양전하를 갖는 아미노산을 첨가하거나 소수성을 높여줌으로써 (Phe⁻¹⁷→Arg⁻¹⁷, Tyr⁻¹⁴→Leu⁻¹⁴) echistatin의 분비를 높였으며[7], 닭의 lysozyme 분비신호서열 n-region의 Leu 소수성 잔기들의 수를 조절함으로써 인간 lysozyme의 분비를 높인 연구가 있다[8]. 이 연구에서 분비신호서열에 8개의 Leu 잔기를 가지도록 유전공학적으로 조작하였을 때 인간 lysozyme의 분비가 가장 효과적이었다. 또한, 소의 prolactin 분비신호서열의 -18 위치의 Gly를 Ala로 대체하여 효모 invertase의 분비를 높인 보고도 있다[9].

효모 *S. diastaticus*는 *S. cerevisiae*와 유전적, 생리적으로 매우 유사하며 glucoamylase를 세포외로 분비하여 전분을 분해할 수 있는 효모이다[10]. 효모 *S. diastaticus*에서 세포외로 분비되는 전분질 분해 효소인 glucoamylase I의 유전자 (*STAI*)는 signal sequence 역할을 하는 21개의 아미노산, threonine과 serine이 많은 구역, 그리고 glucoamylase 효소 기능을 하는 구역 등의 전구체로 합성된다[11]. *STAI* 유전자를 이용한 효모에서 외래 유전자의 발현과 단백질의 분비에 관한 보고는 Vanoni 등[12]이 대장균의 β-galactosidase의

*Corresponding author

Tel. 82-42-860-4312, Fax. 82-42-860-4595
E-mail: jsahn@kribb4680.kribb.re.kr

부분적인 분비와 Nakamura 등[13]이 사람의 5-lipoxygenase 유전자의 발현에 부분적으로 성공한 경우가 있다. 본 연구실에서는 이미 효모에서 glucoamylase 유전자의 promoter와 분비신호서열을 이용하여 *Bacillus* CMCCase [14], *B. stearothermophilus* α -amylase[15], 그리고 human lipocortin-1 (LC-1)[26] 분비에 성공하여 효모에서 이종단백질의 분비를 위한 glucoamylase signal peptide (GSP)의 이용성을 조사하였다.

본 연구에서는 CMCCase 구조 유전자를 *GAP* promoter와 *STAI* 유전자의 변이형 GSP에 재조합하여 secretion vector를 제작하고 효모에서 이종단백질의 분비를 시도하고 분비되는 CMCCase를 비교 분석함으로써 GSP의 효율이 증대된 mutant를 선별하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 플라스미드

본 연구에 사용된 효모는 *S. diastaticus* Y1Y 345 (α *ura3 leu2-3 112 his4 sta^o inh^o*)으로 *B. subtilis* CMCCase 유전자의 발현 및 분비용 숙주로 이용하였다. 새로이 제작한 플라스미드의 증폭을 위해 *E. coli* DH5 α (*supE44 lacZ* *lacY169* (ϕ 80*lacZAM15*) *hsdR17 recA1 endA1 gvrA96 thi-1 relA1*)를 사용하였다. 본 연구실에서는 *S. diastaticus*의 glucoamylase 유전자 (*STAI*)를 이미 cloning 하였고[16] 분석한 유전자의 분비신호염기서열을 기초로 하여 변이형 GSP oligonucleotide를 화학 합성하였다. pHY101 plasmid로부터 *GAP* promoter를 분리하여 분비 vector의 제조에 사용하였다. 변이형 GSP들의 정확한 염기 서열분석을 위하여 pBluescript 벡터를 사용하였다.

배지

대장균의 배양을 위해 LB 배지 (1% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 1% NaCl)를 사용하였으며 효모의 배양을 위한 복합배지로는 YPD 배지 (1% yeast extract, 2% Bactopeptone, 2% glucose)를 사용하였다. 효모형질전환체의 1차 선별을 위한 최소배지로 YNBD 배지 (0.67% Bacto-yeast nitrogen base without amino acids, 2.0% dextrose, 0.002% L-His, 0.003% L-Leu, 2.0% agar)를 사용하였다.

효모의 형질전환과 형질전환체의 선별

효모에서 CMCCase의 발현, 분비를 위한 재조합 플라스미드를 숙주인 효모에 도입하기 위해 Dohmen 등[17]의 방법으로 효모의 형질전환을 수행하였다. YNBD 한천배지에서 1차적으로 선별된 형질전환체들 중 CMCCase를 세포외로 분비하는 균주들을 선별하기 위해 모든 형질전환체들을 YNBDSC 한천배지 (0.67% Bacto-yeast nitrogen base without

amino acids, 2.0% dextrose, 1% CMC, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, 0.002% L-His, 0.003% L-Leu, 2.0% agar)에 tooth-picking한 후 30°C에서 2일간 배양하였다. 0.2% Congo Red 용액으로 30분간 염색하고 1 M NaCl 용액으로 세척하여 균체 주위에 투명환이 생성된 형질전환체를 선별하였다[27].

CMCCase의 활성측정

효모형질전환체가 생산하는 CMCCase 활성을 정량적으로 분석하기 위해 효소액 50 μ l에 멸균수 0.45 ml와 0.5 ml의 50 mM sodium citrate buffer (pH 5.0, 1% CMC)를 첨가하고 56°C에서 30분간 반응시켰다. DNS 용액 3 ml를 첨가하고 5분간 끓인 후 발색된 정도를 550 nm의 파장에서 흡광분석하여 효소활성을 표준곡선으로부터 포도당의 양으로 환산하였다[18]. 효소역가 1 unit는 1분당 1 μ mole의 포도당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

분비된 CMCCase의 특성조사

100 ml의 YPD 배지에서 4일간 배양한 효모 세포를 원심분리하여 배양 상등액 (extracellular fraction)을 회수하였다. 효모세포는 찬 증류수로 세척한 후 1 ml의 원형질체 완충액 (50 mM Tris, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 M sorbitol, 1 mM DTT)에 현탁하고 zymolyase 60T (20 μ g/ml of packed cells)를 첨가한 후에 37°C에서 1시간 반응시켜 원형질체를 제조하였다. 이 반응액을 원심분리하여 원형질체를 상등액으로부터 분리한 후 1 ml의 lysis 완충액 (50 mM Tris, pH 7.5, 10 mM MgSO₄, 1 mM EDTA, 10 mM potassium acetate, 1 mM PMSF)를 첨가하여 원형질체를 완전히 파괴하여 세포질의 효소액을 준비하였다[25]. 효모세포 내에서 CMCCase의 processing pattern을 조사하고 효모에서 분비된 CMCCase 양을 조사하기 위해 배양 상등액을 ammonium sulfate로 농축하여 SDS-PAGE를 수행한 후 대장균 형질전환체에서 정제한 CMCCase에 대한 rabbit antibody를 사용하여 Western blot를 수행했다.

결과 및 고찰

Glucoamylase signal peptide (GSP) mutant를 가지는 재조합 플라스미드의 제조

효모에서 이종단백질의 분비에 있어서 GSP의 이용성을 높이기 위해 야생형과 4개의 변이형을 제조하였다. GSP와 재조합 CMCCase는 *GAP* promoter와 *GAL7* terminator에 의해 조절 받도록 하고 GSP가 자신의 분비신호서열을 제외한 CMCCase 구조 유전자와 프레임이 일치하도록 구성하였다 (Fig. 1). 변이형 m1 (Pro¹⁸→Leu¹⁸)은 야생형보다 n-region의 소수성이 높고, m2 (Tyr¹³→Leu¹³)와 m3 (Ser⁹→Leu⁹)는 h-region의 소수성이 야생형보다 높다. 분비신호

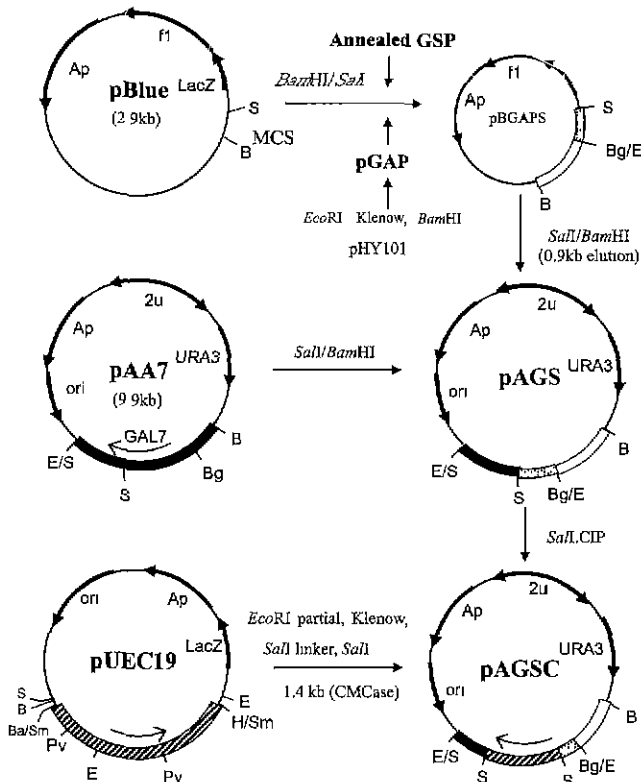


Fig. 1. Construction of *Bacillus* CMCCase expression and secretion vector.

Open box, GAP promoter; closed box (tGAL7), GAL7 transcriptional terminator; hatched box, CMCCase structural gene. dotted box, GSP; B, BamH I; E, EcoR I; H, Hind III; S, Sal I; Ba, Bal I; Bg, Bgl II; Pv, Pvu II; Sm, Sma I

서열에 소수성 잔기를 갖는 아미노산을 첨가함으로써 분비 신호서열의 α -helix 구조를 더 많이 갖도록 하였다. 변이형 m4 (Asn⁻⁵→Pro⁻⁵)은 극성 아미노산을 제거하고 단백질의 2차 구조를 파괴하는 proline으로 대체하였다. Proline은 일반적으로 분비신호서열의 -4, -5, 그리고 -6 위치에 위치한다고 알려져 있다.

화학적으로 합성된 GSP mutants의 5'와 3' 양끝은 pPHY101 vector를 EcoRI로 절단하고 Klenow enzyme을 처리한 후, BamHI으로 절단하여 얻은 0.8 kb DNA 단편인 GAP promoter의 blunt end와 CMCCase 구조 유전자의 SalI site에 각각 연결할 수 있도록 구성하였다. 각 합성된 야생형과 변이형 GSP들은 GAP promoter와 함께 pBluescript 벡터에 재조합한 후 변이된 염기서열을 확인하고 BamHI과 SalI으로 절단하여 0.9 kb DNA 단편을 분리하고 대장균과 효모의 shuttle vector인 pAA7에 연결하였다. 이렇게 제조된 pAGSwT, m1, m2, m3, m4 플라스미드에 CMCCase 구조 유전자를 각각 도입하여 *B. subtilis*의 CMCCase 분비에 사용하였다.

CMCCase 구조유전자를 갖는 재조합 플라스미드의 제조

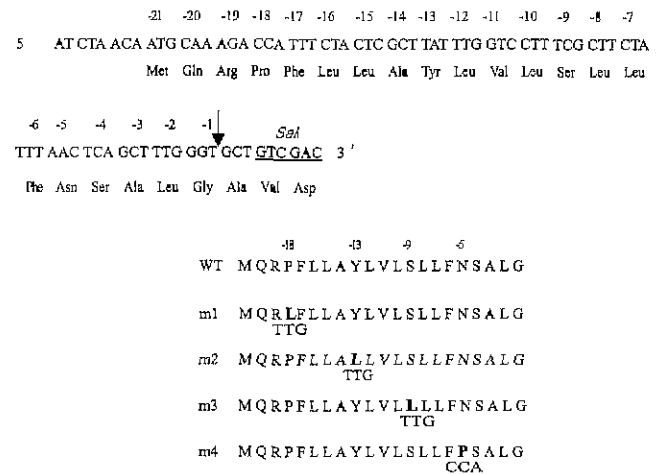


Fig. 2. Nucleotide sequence and corresponding amino-acid sequence of wild type and mutant GSP.

Mutated amino acids mismatched with the wild type GSP are bold-faced one letter code. The numbers above the wt sequence show the location relative to the signal peptidase cleavage site (↓)

*B. subtilis*의 CMCCase는 약 1.5 kb의 open reading frame에 의해 만들어지며 분비신호서열은 N-말단 29개의 아미노산으로 구성되어 있다. Promoter와 분비신호서열 이외에 mature CMCCase N-말단 아미노산 11개가 추가로 제거되어도 CMCCase의 기능에 별다른 영향이 없음을 확인되었다[14].

GAP promoter와 돌연변이형 GSP들을 함유하고 있는 재조합 플라스미드 pAGSwT, m1, m2, m3, m4를 SalI 제한 효소로 처리한 후 얻은 10.8 kb DNA 단편에 재조합 플라스미드 pUEC19[14]를 EcoRI으로 부분 절단하고 Klenow enzyme을 처리하고 SalI linker를 부착한 후 SalI으로 절단하여 얻은 CMCCase 구조유전자 1.4 kb DNA 단편을 서로 연결하였다. 이렇게 제작한 재조합 플라스미드 pAGSwT, pAGScm1, pAGScm2, pAGScm3, pAGScm4에는 CMCCase 구조 유전자의 upstream에 GAP promoter와 야생형, 그리고 변형된 GSP 아미노산 21개가 존재한다. GSP와 CMCCase 구조 유전자 간 연결부위의 아미노산의 서열을 Fig. 2에 나타내었다.

재조합 플라스미드의 제한효소 절단 및 전기영동분석

본 연구에서 제작한 여러 재조합 플라스미드가 원하는대로 구성되었는지 확인하기 위해 몇 종류의 제한효소로 절단한 후 0.8% agarose에서 전기영동한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Lane 2는 pBGAPS를 BamHI과 SalI으로 절단한 것으로 3.0 kb의 벡터 외에 GAP promoter와 GSP를 포함하는 0.9 kb의 단편이 나타난 것으로 보아 원하는 대로 도입되었음을 알았다. pAGSwT 벡터에는 pAA7 벡터에서 유래된 EcoRI 인식부위가 두 군데 존재하고 있다. Lane 3과 4는 pAGSwT와 pAGSwT를 EcoRI으로 각각 절단한

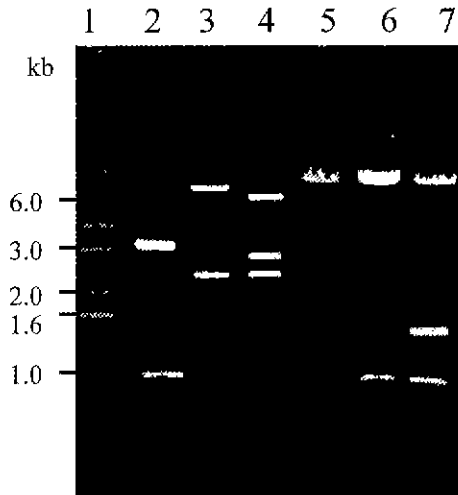


Fig. 3. Agrose gel electrophoretic analysis and restriction enzyme mapping analysis of pAGSw and pAGSCwt plasmid. Lane 1, 1 kb DNA ladders; 2, pBGAPS (*BamH I-SalI*); 3, pAG-Swt (*EcoRI*); 4, pAGSCwt (*EcoRI*); 5, pAA7 (*BamHI-SalI*); 6, pAGSw (*BamH I-SalI*); 7, pAGSCwt (*BamH I-Sal I*)

것으로 lane 3에서는 벡터에서 유래된 2.2 kb 단편을 확인하였고 Lane 4에서는 벡터에서 유래한 2.2 kb 단편과 벡터, *GAP* promoter, *GSP*, 그리고 *CMCase* 일부를 포함하는 2.8 kb 단편이 나타나는 것으로 보아 *CMCase* 구조 유전자가 pAG에 원하는 방향으로 도입되었음을 확인하였다. Lane 5, 6과 7에서는 pAA7, pAGSw와 pAGSCwt를 *BamHI*과 *SalI*으로 각각 절단한 것으로 lane 5에서는 9.2 kb의 벡터를 확인할 수 있었다. Lane 6에서는 *GAP* promoter와 *GSP*를 함유한 0.9 kb 단편을 확인할 수 있었다. Lane 7에서는 0.9 kb 단편과 1.4 kb *CMCase* 단편을 확인하였다. 이상으로부터 본 연구에 사용한 재조합 플라스미드가 의도한 대로 정확하게 제작되었음을 확인하였다.

CMCase를 분비하는 효모형질전환체의 선별과 분비효율

제조한 pAGSC 야생형과 변이형 플라스미드를 효모에 형질전환시키고 *CMCase*가 세포외로 분비됨을 YPD 한천배지에서 Congo Red 염색법으로 확인하였다 (Fig. 4). 형질전환체에서는 *CMCase*의 작용으로 *CMC*가 분해되어 생성된 투명환을 확인할 수 있었으나 모균주에서는 전혀 나타나지 않았다. 또한, 야생형 플라스미드를 가지고 있는 효모세포보다 변이형 m2 와 m3를 가지고 있는 효모세포에서 투명환의 직경이 더 크게 관찰되었다. 따라서 간접적으로 이들 변이형의 플라스미드를 가지고 있는 효모에서 분비효율이 높음을 확인하였다. 이렇게 확인한 결과들을 토대로 이들 균주에서 *CMCase* 활성과 분비능을 조사하기 위해 숙주 효모 세포와 각 플라스미드를 가지고 있는 형질전환 세포를 YPD 배지에서 배양하였다. 야생형과 변이형을 가지고 있는 효모 세포들은 같은 성장을 보였으며 72시간 이후로는 차

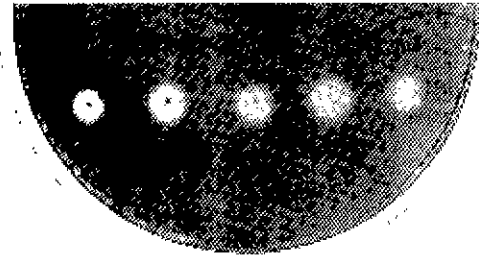


Fig. 4. Confirmation of CMCase secretion from yeast transformants by Congo-Red staining.

Yeast cells were grown on selective minimal agar media containing 1% CMC at 30°C for 2 days. The agar plate was stained with 0.2% Congo red solution followed by washing with 1.0 M NaCl solution. The clear zones around colonies indicate CMC hydrolysis resulting from CMCase secretion.

춤 세포성장이 감소하였다. 시간별로 세포성장에 따른 효모 세포의 *CMCase*의 분비를 측정 한 결과 약 72시간에서 가장 높은 활성을 보였으며 96시간까지 차츰 증가하였다 (Fig. 5).

발현된 *CMCase*는 470개의 아미노산으로 구성되어 있고 추정할 수 있는 분자량은 약 52,000 이다. 그러나 Western blot (Fig. 6A)에서 보여진 것처럼 대장균 세포내에서 발현된 *CMCase*는 약 52 kDa과 40 kDa의 두 밴드를 확인할 수 있었다. 작은 밴드는 단백질이 분해되었거나 또 다른 processing이 일어났음을 알 수 있었다[18]. 그러나 효모세포내에서 *CMCase*의 발현은 다른 양상을 보여주고 있다. 대장균 세포내에서처럼 processing이 일어났으나 약 46 kDa의 밴드가 나타났다. 단백질이 세포내에서 발현된후에 소포체와 골지체를 통과하며 발생하는 당쇄로[19] 인한 약 60 kDa의 밴드와 *CMCase* 본래 크기의 52 kDa의 밴드가 발생하였다.

한편 한 [21]등의 연구에 따르면 *S. cerevisiae* M1-2b에서 Western blot 분석을 통하여 *CMCase*의 분비를 확인하였을 때 35.8 kDa과 43.0 kDa의 두 단백질을 확인할 수 있었다. 이러한 연구결과는 본 연구에서 확인한 *CMCase*의 processing 양상과 다르다. 효모 숙주 세포를 제외한 재조합 플라스미드를 가지고 있는 야생형과 변이형들의 모든 효모 세포에서 이중의 분자량이 큰 단백질들을 (90-100 kDa) 분비하였다 (Fig. 6B). 이러한 차이점은 다른 효모숙주에서 이중단백질의 분비를 시도함으로써 나타나는 결과로 해석된다. 한편 *Bacillus CMCase*에는 효모에서 발현되어 분비될 경우 N-glycosylation 부위로 작용할 수 있는 아미노산 서열(Asn-X-Ser or Thr)이 5곳에 존재하고 있다. 따라서 효모에서 분비된 *CMCase*에서 당쇄가 일어났음을 추정할 수 있다.

분비신호서열에 있어서 n-region, h-region, 그리고 c-region은 단백질의 분비에 있어서 중요한 역할을 하며 이중

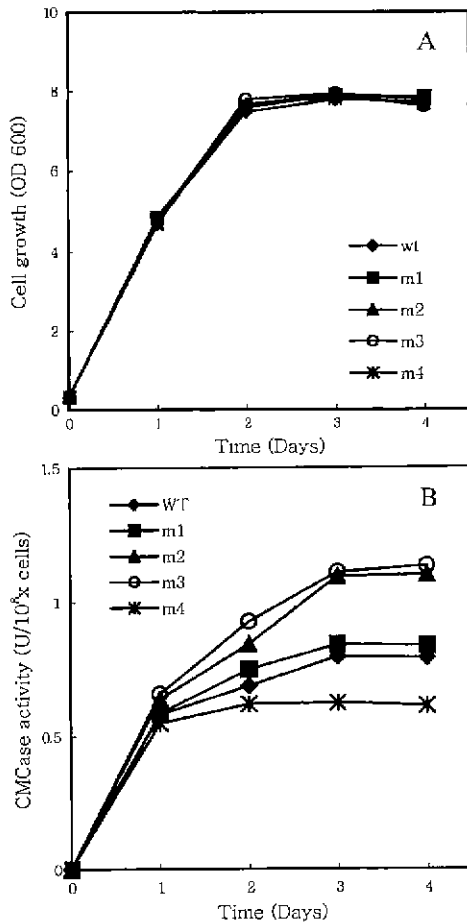


Fig. 5. Time course of cell growth (A) and CMCase secretion (B). Yeast cells were grown in 100 ml YPD broth at 30°C for 5 days. Cultures were sampled at an interval of 24 h and centrifuged to separate the cells from culture supernatant (extracellular fraction). CMCase activity was determined by measuring the amount of reducing sugars released from carboxymethyl cellulose (CMC) by the method of nitrosalicylic acid (DNS) [23]. One unit of enzyme is defined as the amount of enzyme releasing 1 μ mole of glucose equivalent per min.

c-region은 분비신호서열절단효소 (signal peptidase)와의 상호작용에 중요하다고 알려져 있다. 또한 분비신호서열의 형태는 단백질의 분비에 있어서 가장 중요한 요소로 알려져 있고 형태적으로 가장 특이한 특징으로는 소수성 구역이 α -helix을 가지고 있다고 알려져 있다[20]. 따라서 효모에서 이중단백질의 분비에 있어서 GSP의 변이형이 효과적으로 작용할지를 연구하는 것은 흥미로운 일이다. 이러한 관점에서 GSP의 2차구조가 CMCase의 분비효율을 높이도록 하기 위해서 위와 같은 특징을 가지도록 GSP 구조에 돌연변이를 도입하였다. 시간에 따른 분비효능과 Western blot 분석에 의해서 변이형 m4를 제외한 모든 변이들을 가지고 있는 효모세포에서 야생형의 플라스미드를 가지고 있는 효모세포와 비교했을 때 분비효율이 증가하였음을 볼 수 있

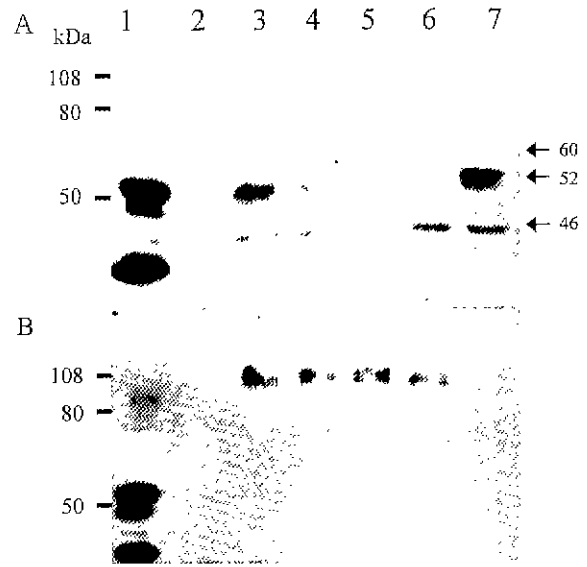


Fig. 6. Western blot analysis of cytoplasmic fraction (A) and extracellular fraction (B).

Extracts equivalent to 1×10^6 cells and 100 μ l of supernatant were analyzed. Samples were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-CMCase raised in a rabbit against CMCase purified from *E. coli*. Lane 1, CMCase expressed in *E. coli*; 2, *S. diastaticus* YIY 345; 3, wt; 4, m1; 5, m2; 6, m3; 7, m4

었고 특히 m2와 m3를 가진 효모세포에서 약 2배의 분비효율이 증가하였다(Fig. 5B, 6B). 따라서, h-region에 소수성을 가진 아미노산을 첨가하였을 때 분비효율이 가장 높음을 알 수 있다.

이직 효모의 분비효율에 영향을 미치는 요인들에 대해 정확하게 규명되지 않았지만 일반적으로 효모의 분비효율은 분비신호서열의 특성, 분자량, net charge 등의 분비하고자 하는 단백질 자체의 특성, 당체의 정도 및 숙주의 종류 등과 같은 복합적인 요인에 영향을 받는 것으로 알려져 있다[3]. 그리고, 기존 연구 결과들에서도 효모세포에서의 이중단백질의 분비효율은 매우 다양하다[22,23]. 이미 *STAI* 유전자의 자체 promoter와 분비신호서열을 이용한 CMCase 분비는 효율적임을 알 수 있었다[14]. 분비신호서열의 변이를 통해 분비효율을 높임으로써 *STAI* 유전자를 이용한 효모의 분비 vector 개발 및 이를 이용한 유용한 외래 유전자의 발현과 생산에 매우 유익하게 이용될 수 있을 것이다.

요 약

*S. diastaticus*에서 이중단백질의 분비에 대한 GSP의 이용성을 증대시키기 위하여 CMCase 구조 유전자를 *GAL1* terminator, *GAP* promoter, 그리고 *STA* 유전자의 변이형 GSP (m1:Pro⁻¹⁸→Leu⁻¹⁸, m2:Tyr⁻¹³→Leu⁻¹³, m3:Ser⁻⁹→Leu⁻⁹, m4:Asn⁻⁵→Pro⁻⁵)에 재조합하여 secretion vector를 제작하였다.

변이형 m1, m2, 그리고 m3 은 야생형보다 아미노 말단과 소수성 구역에 더 높은 소수성을 가지도록 하였다. 변이형 m4은 극성 아미노산을 제거하고 단백질의 2차 구조를 파괴하는 proline으로 대체하였다. 배양시간에 따른 CMCase 활성측정과 Western blot 분석 결과 변이형 m4를 제외한 모든 변이형의 경우 Leu으로 대체된 변이형 GSP에 의한 CMCase의 분비가 본래의 야생형 GSP에 의한 분비보다 높았으며 특히 m2와 m3에서 약 2배 높았다. 효모 숙주 세포를 제외한 재조합 플라스미드를 가지고 있는 야생형과 변이형들의 모든 효모세포에서 당쇄로 인하여 증가된 이종의 분자량이 큰 단백질들이 (90-100 kDa) 분비되었다. 효모 세포내에서 발현된 CMCase는 약 60, 52, 그리고 46 kDa의 분자량을 보였다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부에서 지원되는 연구비에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 이에 깊이 감사드립니다.

REFERENCES

- Schekman, R. 1985. Protein localization and membrane traffic in yeast. *Annu Rev Cell Biol.* 1: 115-143.
- Walter, P. and A. E. Johnson. 1994. Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol.* 10: 87-119.
- Zsebo, K. M., H. S. Lu, J. C. Fieschko, L. Goldstein, J. Davis, S. V. Suggs, P. H. Lai, and G. A. Bitter. 1986. Protein secretion from *Saccharomyces cerevisiae* directed by the pre- α -factor leader region. *J. Biol. Chem.* 261: 5858-5865.
- Tokunaga, M., N. Wada, and F. Hishinuma. 1987. A novel yeast secretion vector utilizing secretion signal of killer toxin encoded on the yeast linear DNA plasmid pGKL1. *Biochem Biophys Res Commun.* 144: 613-619.
- Moir, D. T. and D. R. Dumais. 1987. Glycosylation and secretion of human alpha-1-antitrypsin by yeast. *Gene* 56: 209-217.
- Hinnen, A., B. Meyhack, and R. Tsapis. 1983. *Gene Expression in Yeast*, Vol. 1: 157.
- Hofmann, K.J. and L. D. Schultz. 1991. Mutations of the α -galactosidase signal peptide which greatly enhance secretion of heterologous proteins by yeast. *Gene.* 101: 105-111.
- Yamamoto, Y., Y. Taniyama, M. Kikuchi, and M. Ikehara. 1987. Engineering of the hydrophobic segment of the signal sequence for efficient secretion of human lysozyme by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149: 431-436.
- Ngsee, J.K. and M. Smith. 1990. Changes in a mammalian signal sequence required for efficient protein secretion by yeasts. *Gene.* 86: 251-255.
- Yamashita, I. and S. Fukui. 1984. Genetic background of glucoamylase production in the yeast *Saccharomyces*. *Agri. Biol. Chem.* 48: 137-141.
- Yamashita, I., K. Suzuki, and S. Fukui. 1986. Proteolytic processing of glucoamylase in yeast *Saccharomyces diastaticus*. *Agri. Biol. Chem.* 50: 475-482.
- Vanoni, M., D. Porro, E. Martegani, and L. Alberghina. 1989. Secretion of *Escherichia coli* beta-galactosidase in *Saccharomyces cerevisiae* using the signal sequence from the glucoamylase-encoding *STA2* gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 164: 1331-1338.
- Nakamura, M., T. Matsumoto, M. Noguchi, I. Yamashita, and M. Noma. 1990. Expression of a cDNA encoding human 5-lipoxygenase under control of the *STA1* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 89: 231-237.
- Ahn, J. S., D. O. Kang, I. K. Hwang, S. H. park, M. Y. Pack, and T. I. Mheen. 1992. Secretion of *Bacillus subtilis* Endo-1,4- β -D-Glucanase in yeast using promoter and signal sequence of glucoamylase gene. *Kor. J. Microbiol.* 30: 403-409.
- Kang, D. O., I. K. Hwang, B. Y Kim, S. C. Ahn, T. I. Mheen, J. S. Ahn, and S. M. Byun. 1996. Secretion of *Bacillus* alpha-amylase from yeast directed by glucoamylase 1 signal sequence of *Saccharomyces diastaticus*. *Biochem Mol Biol Int.* 39: 181-190.
- Ahn, J. S., I. K. Hwang, M. S. Jung, and T. I. Mheen. 1989. Effect of plasmid stability on the glucoamylase productivity of *S. diastaticus* harboring recombinant plasmid containing glucoamylase gene, *STA1*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 17: 606-610.
- Dohmen, R. J., A. W. Strasser, C. B. Honer, and C. P. Hollenberg. 1991. An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast.* 7: 691-692.
- Park, S. H., H. K. Kim, and M. Y. Pack. 1991. Characterization and structure of the cellulase gene of *Bacillus subtilis* BSE 616. *Agri. Biol. Chem.* 55: 441-448.
- Orlean, P., D. J. Kuranda, and C. F. Albright. 1991. Analysis of glycoprotein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* 194: 682-697.
- Von Heijne, G. 1985. Signal sequences. *J. Mol. Biol.* 184: 99-105.
- Han, Y. J., D. O. Kang, S. C. Lee, B. Y. Kim, H. H. Suh, J. M. Kim, T. I. Mheen, and J. S. Ahn. 1994. Secretion of *Bacillus* endoglucanase in *Saccharomyces cerevisiae* by its own signal sequence. *J. Microbiol. Biotechnol.* 4: 24-29.
- Thomsen, K. K. 1983. Mouse α -amylase synthesized by *Saccharomyces cerevisiae* is released into the culture medium *Carsberg Res. Commun.* 48: 777-780.
- Van Arsdell, J. N., S. Kwok, V. L. Schweickart, M. B. Ladner, D. H. Gelfand, and M.A. Innis. 1987. Cloning, characterization and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of endoglucanase I from *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology.* 5: 60-64.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 55: 952-959.
- Lundblad, V. 1989. *Saccharomyces cerevisiae* in *Current*

- Protocols in Molecular Biology*. Unit 13.13. John Wiley & Sons, Inc., New York.
26. Nam, S. W., B. M. Kim, B. H. Chung, D. O. Kang, and J. S. Ahn. 1994. Expression and secretion of human lipocortin-1 by promoter and signal sequence of *STA1* from *Saccharomyces diastaticus*. *Biotechnol. Lett.* **16**: 897–902.
27. Theater, R. M. and P. J. Wood. 1982. Use of Congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 777–780.

(Received February 22, 2000)