

Hansenula polymorpha DL-10이 생산하는 재조합 알부민의 정제 및 특성

최근범* · 구선향 · 임채영¹ · 이동희² · 강현아 · 이상기³
¹동국제약(주) 중앙연구소, ²건국대학교 미생물공학과, ³생명공학연구원

Purification and Characterization of Recombinant Human Albumin from *Hansenula polymorpha* DL-1.
Choe Keun-Bum, Sun-Hyang Koo, Chae-Young Lim¹, Dong-Heui Yi², Hyun-Ah Kang, and Sang-Ki Rhee³. ¹DongKook Pharmaceutical Co., LTD., Jincheon-Gun 365-834, ²Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul 133-701, ³Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Yusong P.O. Box 115, Taejeon 305-600, Korea - Recombinant Human serum albumin (rHSA) was purified to near homogeneity from *H. polymorpha* using heat treatment, ultrafiltration and Phenyl Sepharose CL-4B and Mono Q column chromatographies with a recovery yield of 60%. The molecular weight of the purified rHSA was estimated to be about 65,000 Da by denaturing SDS-PAGE. The N-terminal amino acid sequence of the purified HSA determined by Edman degradation was turned out to be Asp-Ala-His-Lys-Ser-Glu-Val-Ala, suggesting that the rHSA expressed in *H. polymorpha* was efficiently secreted and correctly processed at the cleavage site of secretion signal sequence. The purified human albumin showed the pI value identical to that of authentic human serum albumin.

Key words: Human serum albumin, *Hansenula polymorpha*, purification

인체 혈청 알부민(Human serum albumin; HSA)은 간에서 생성되어 혈액에 분비되는 585 개의 아미노산으로 이루어진 분자량 65 kDa 크기의 단백질이다[1]. 혈장 단백질 함량의 약 60%를 차지하는 알부민은 혈장의 삼투압을 유지하는 역할과 더불어 지방산, 담즙 색소, 아미노산, 스테로이드 호르몬, 금속 이온들을 운반하는 기능을 지니 혈장 확장액의 대체용액 또는 출혈 시 혈액손실 보충액으로 사용되고 있어 치료제로서의 그 수요량이 크게 증가하고 있으며 그 외에도 다른 치료용 단백질 제조시 안정제 및 세포 배양 성분으로 또는 임상학적 화학 실험의 표준시약으로도 사용되는 등 그 용도가 다양하다 [15].

현재까지 인체 혈청 알부민은 혈액으로부터 분리 정제한 것을 주로 사용하고 있으나 혈액 공급의 부족으로 그 공급이 부족한 상황이고 최근에는 병원균 또는 바이러스의 오염에 의한 혈액 단백질의 안전성 문제가 크게 대두되고 있어서 재조합 알부민의 대량생산이 더욱 절실히 필요하며 유전공학 기법을 이용한 시도들이 미생물을 이용한 여러 발현 시스템을 이용하여 선진 각국에서 행하여져 왔고 현재 효모 발현분비 시스템을 이용한 재조합 인체 알부민의 대량 생산을 시도하고 있다[5,17-19]. 이러한 효모중에 대표적으로 사용되고 있는 *S. cerevisiae*뿐만 아니라 최근에는 메탄올 자화효모인 *Hansenula polymorpha*와 *Pichia pastoris*

를 이용한 유용 단백질 생산용 발현체계가 개발되어 이를 활용한 재조합 알부민 생산 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 일본의 Yoshitomi사는 최근 *Pichia pastoris*를 이용하여 세계 최초 유전자 재조합 알부민을 개발하였다[8-9]. 본 연구에서는 메탄올 자화효모 *Hansenula polymorpha*의 숙주세포로부터 재조합 인체 알부민을 분리 정제하여 그 성질을 조사하였다.

재료 및 방법

재조합 알부민의 배양

*H. polymorpha*에서의 알부민 생산을 위한 종배양은 1 ml seed stock vial을 glycerol 10 g/L, yeast nitrogen base w/o a.a.(YNB) 13.4 g/L, biotin 4 g/L가 포함된 배지 100 ml이 들어있는 멸균된 플라스크에 접종한 후 진탕 배양기(37°C, 250 rpm)에서 24 시간 배양하였다. 본배양을 위하여 glycerol 10 g/L, yeast extract 20 g/L, peptone 10 g/L, methanol 10 g/L가 기본배지로 조성된 5리터 발효기에 종배양액을 5% 접종하여 37°C, 300-800 rpm, pH 6.0에서 배양하였고 24 시간 배양한 후 배지내의 메탄올 농도가 2%가 되도록 매 12 시간마다 72 시간까지 메탄올을 첨가해 주었다.

HSA 정량

생산된 재조합 알부민은 Sigma사의 BCG Albumin reagent를 사용하여 bromocresol green과 결합한 알부민을 628 nm에서 흡광도로 정량하였다.

*Corresponding author
Tel. 82-43-535-3488, Fax. 82-43-535-2840
E-mail: kbchoe@wmail.dkpharm.co.kr

단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법[16]에 따라 Bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 계산하였으며 재조합 알부민의 정제 과정중의 단백질 농도는 280 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

재조합 알부민의 정제

효모 균체를 제거한 배양 상등액에 5 mM sodium caprylate, 10 mM cysteine, 100 mM aminoguanidine등 안정제를 첨가한 후 60°C에서 3시간 열처리하였다. 15°C까지 빠르게 냉각시킨후 한외여과장치(M.W. cut off 30,000)를 통하여 농축하고 NaCl을 최종농도 0.3 M 되게 가하였다. 열처리한 배양상등액을 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA가 함유된 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)로 평형시킨 Phenyl Sepharose CL-4B column (2.6×30 cm) (Pharmacia Co.)에 주입하고 동일 buffer로 washing한 후 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 이용하여 재조합 알부민을 회수하고 활성분획을 한외여과 장치를 이용하여 NaCl을 제거한 후 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 평형시킨 Mono Q HR column (1.6×10 cm) (Pharmacia Co.)에 주입하고 170 mM NaCl이 함유된 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 불순물을 제거하였고 280 mM NaCl이 함유된 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 용출시킨 후 정제된 알부민의 순도와 aggregate의 생성유무를 gel permeable HPLC column을 통하여 확인하였다.

SDS-PAGE

재조합 알부민의 분리정도와 분자량을 측정하기 위하여 Laemmli[14]의 방법에 따라 SDS-PAGE를 수행하였다. Separating gel은 10%, stacking gel은 4%로 조제하여 전개하였고, Coomassie blue R-250을 사용하여 염색한 후 탈색하여 단일 밴드를 확인하였다.

Western blot 분석

효모 배양액으로부터 최종 정제한 단백질과 농축한 배양 상등액을 SDS-PAGE를 수행한 후 Towbin[20]방법으로 nitrocellulose membrane에 붙인 후 인체 혈청 알부민에 대해 만들어진 폴리클로날 항체(Sigma Co.)로 반응시켰다. Alkaline phosphatase가 붙어있는 Anti-rabbit Ig에 대한 항

체(Sigma Co.)로 부차적 반응을 진행한 후 phosphatase에 의한 발색 반응으로 분석하였다.

아미노산 서열 및 조성분석

정제한 재조합 알부민을 SDS-PAGE로 전기영동한 뒤 아미노산 분석용 PVDF 막에 옮겨 폰소-S으로 염색한 후 알부민 65 kDa에 해당하는 단백질 밴드를 분리하여 Edman 방법을 사용하여 단백질을 분해한 후 Applied Biosystem model 476A automated sequencer(Applied Biosystem Inc., U.S.A.)로 분석하였다.

pI 값 측정

등전점을 분석하기 위해 상기 정제된 재조합 알부민을 미국 노벡스(Novex)사에서 판매하는 pI 3-7 비변성 등전점 측정 젤 (IsoElectric focusing gel)에 전기영동하였다. 이를 Tricine-Glycine 용액에 약 30분간 담근 후, PVDF 막에 blotting한 다음 웨스턴 블롯을 하여 pI 값을 측정하였다. 등전값 표준 단백질로서는 미국 BIO-RAD사에서 제작한 pI 4.45-9.6 값을 가지는 제품을 사용하였다.

결과 및 고찰

재조합 알부민의 정제

H. polymorpha DL-1이 생산하는 재조합 인체 알부민을 정제한 결과는 Table 1과 같다. 효모 균체를 제거한 배양 상등액을 안정제가 첨가된 상태에서 60°C에서 3시간 열처리하여 배양액내에 존재하는 단백질 분해효소를 불활화시킨후 한외여과장치(M.W. cut off 30,000)를 통하여 농축한 결과, 수율은 90%, 정제도는 1.27배였다. 이렇게 농축된 배양액으로부터 Phenyl Sepharose CL-4B column을 이용한 불순 단백질을 거의 제거하였으나, resin에 binding하지 않고 flow-through되는 손실이 있었으며 이어지는 Mono Q HR column을 통하여 정제된 알부민은 98% 이상의 순도와 60%의 회수율을 얻었다 (Fig. 1). Gel permeable HPLC column을 통하여 확인한 알부민의 순도는 98% 이상이었으며 알부민이 elution되기전에 나타나는 small peak를 분취하여 확인한 결과 aggregate된 소량의 알부민이었으며 HPLC에서의 정제된 알부민의 elution profile은 Fig. 2와 같다.

Table 1. Purification of recombinant HSA from *H. polymorpha*

Purification step	Total protein (mg)	Total HSA (mg)	Purification fold	Yield (%)
Culture supernatant	25,000	7,500	1.00	100
Heat treatment	19,790	7,039	1.16	94
Ultrafiltration	17,886	6,817	1.26	90
Phenyl Sepharose CL-4B	7,574	5,487	2.40	73
Mono Q	4,574	4,483	3.26	60

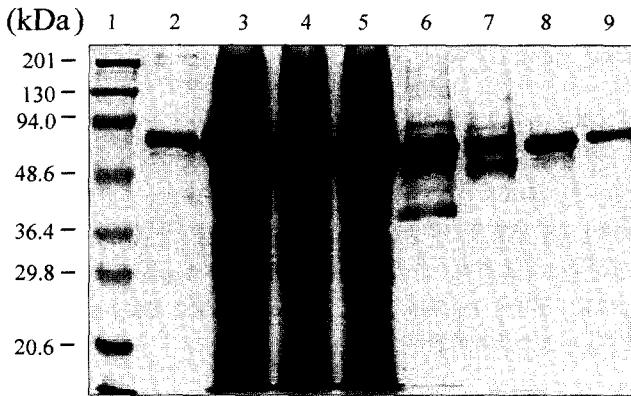


Fig. 1 Purification of the rHSA expressed in *H. polymorpha*. Lane 1, molecular weight standard; 2, serum HSA; 3, culture supernatant; 4, after heat-treated; 5, UF concentrate; 6, Phenyl Sepharose CL-4B; 7, Phenyl Sepharose flow-through; 8, Mono Q; 9, rHSA from *S. cerevisiae*.

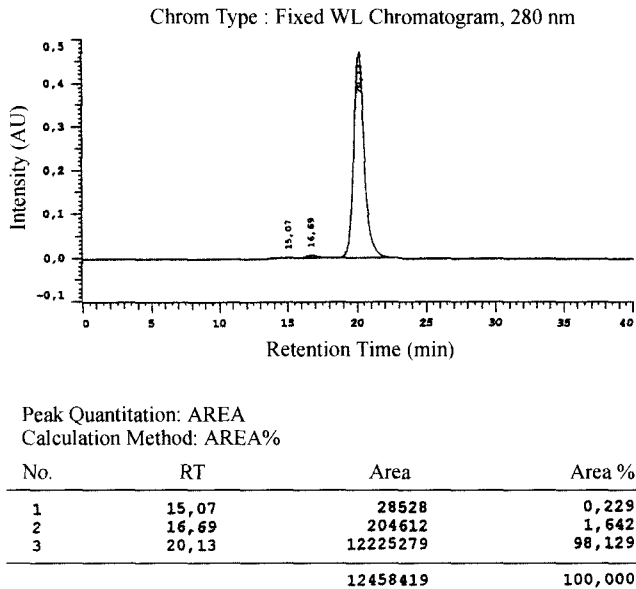


Fig. 2. Elution profile of the purified rHSA on gel permeable HPLC column.

분자량 측정

정제된 재조합 알부민의 순도 확인과 분자량의 측정을 위해 SDS-PAGE를 수행한 결과, Fig. 1과 같이 단일밴드로 나타나는 분자량 65,000 Da의 단백질을 알 수 있었고 혈청유래의 인체 알부민과 제빵효모 *S. cerevisiae*에서 생산

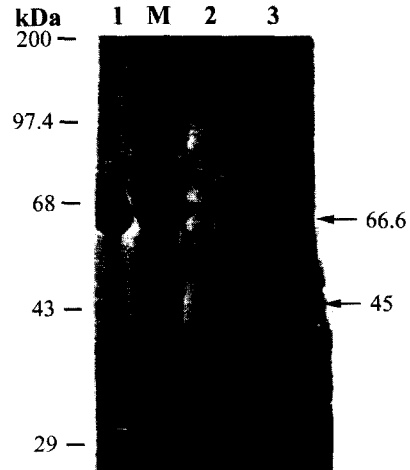


Fig. 3. Western blot analysis of the purified rHSA expressed in *H. polymorpha*.

M, molecular weight standard; lane 1, 0.5 µg of authentic human serum albumin; lane 2, purified rHSA from *H. polymorpha*; lane 3, concentrated culture supernatant.

된 재조합 인체 알부민과도 동일한 분자량을 확인하였다 (Fig. 1).

Western blot을 통한 rHSA의 면역학적 특성 분석

정제된 재조합 알부민을 웨스턴 블롯으로 분석한 결과 대부분의 재조합 알부민이 사람의 혈청에서 분리된 알부민과 동일한 크기인 65 kDa로 감지되었고 천연형 혈청 알부민을 인지하는 polyclonal 항체뿐만 아니라 monoclonal 항체와도 반응을 나타내어 천연형 인체 혈청 알부민과 거의 동일한 형태와 면역학적 특성을 지녔음을 확인하였다[17]. 그러나 Fig. 3과 같이 배양 상등액의 분석결과 배양액 내에는 완전한 형태의 65 kDa외에도 45 kDa 크기 정도의 알부민 분해산물이 소량 감지되었다[11-13].

재조합 HSA 아미노산 서열 및 조성분석

*H. polymorpha*에서 정제한 65 kDa 재조합 인체 알부민의 N-말단 아미노산의 서열은 Asp-Ala-His- Lys-Ser-Glu-Val-Ala이었다. Table 2는 *H. polymorpha*에서 정제한 재조합 알부민과 혈청에서 분리한 알부민, 그리고 제빵효모 *S. cerevisiae*가 생산하는 재조합 알부민의 N-말단 아미노산 서열을 비교한 결과이다. 표에서 보여 주듯이 본 연구의 정제된 재조합 알부민은 혈청유래 알부민과 다른 효모유래의 재조

Table 2. N-terminal amino acid sequence of the recombinant albumin from *H. polymorpha* with other from *S. cerevisiae*

Strain	N-terminal sequence	Reference
<i>H. polymorpha</i>	DAHKSEVAHRFKDLGEEFNFKAL-----	This study
<i>S. cerevisiae</i>	DAHKSEVAHRFKDLGEEFNFKAL-----	12
Serum HSA	DAHKSEVAHRFKDLGEEFNFKAL-----	12

합 알부민과 동일한 N-말단 아미노산 서열을 보였다[2,5-6]. 정제된 재조합 알부민의 아미노산 조성은 Table 3과 같다. 총 18종의 아미노산이 검출되었고 아미노산 잔기 중 cysteine, arginine, lysine 등이 이론치와 일치하였고, glutamic acid, alanine, leucine, lysine의 잠정적인 잔기수가 82, 62, 61, 59로 많이 함유되어 있는 것을 확인하였으며 일부가 이론치와 차이를 보인 것은 분석시의 기술적인 문제와 가수분해시의 degradation에 기인한 것으로 사료되며 일본의 Yoshitomi사의 *P. pastoris* 유래의 재조합 알부민도 차이점을 보였다[4,6].

Table 3. Amino acid composition analysis of rHSA

Amino acid	Composition (mol/mol of protein)		
	Theoretical	rHSAa	rHSAb
Aspartic acid	53	47.852	45.078
Glutamic acid	82	93.480	86.138
Cysteine	35	34.366	34.147
Serine	24	32.045	29.786
Glcine	12	21.967	21.232
Histidine	16	13.393	11.955
Arginine	24	24.041	20.460
Threonine	28	35.436	36.907
Alanine	62	56.291	60.352
Proline	24	29.876	35.350
Tyrosine	18	5.780	4.322
Valine	41	37.343	36.350
Isoleucine	8	11.050	10.174
Leucine	61	57.238	52.371
Phenylalanine	31	28.819	26.982
Lysine	59	58.704	56.027
Tryptophan	1	0.703	0.774
Methionine	6	5.607	5.112

a) Amino acid composition of rHSA *H. polymorpha*.
 b) Amino acid composition of rHSA *S. cerevisiae*.

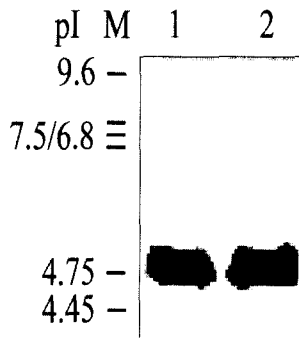


Fig. 4. Isoelectric focusing gel analysis of the recombinant HSA secreted from *H. polymorpha*. M, IEF standard mark; lane 1, authentic human serum albumin 2 µg; lane 2, the purified albumin from *H. polymorpha*. The samples were fractionated on the IEF gel (pI 3-7) and analyzed by Western blot.

재조합 HSA의 pI 값 측정

H. polymorpha 유래의 재조합 알부민을 미국 NOVEX사에서 구입한 pI 3-7 범위를 갖는 비변성 측정 겔 (Isoelectric focusing gel)에 전기영동 한 후 웨스턴 블롯하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 Sigma에서 구입한 혈청유래 알부민과 동일하게 약 pI 4.8 정도 값을 나타내어 재조합 단백질의 전반적인 아미노산 구성이 혈청 알부민과 동일함을 확인하였다[6,17].

요 약

메탄을 자화효모 *Hansenula polymorpha*가 생산하는 재조합 인체 알부민(human albumin)을 heat treatment, ultrafiltration, Phenyl Sepharose CL-4B, Mono Q 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 수율 60%로 정제하였다. 정제된 재조합 알부민은 SDS-PAGE를 수행한 결과 분자량이 65,000 Da으로 나타났고, 본 재조합 알부민의 N-말단 아미노산 서열은 Asp-Ala-His-Lys-Ser-Glu-Val-Ala으로 혈청유래 알부민 및 다른 효모 유래의 재조합 인체 알부민과 동일함을 보였다. 정제된 재조합 인체 알부민의 아미노산 조성은 총 18종의 아미노산이 검출되었고 아미노산 잔기 중 cysteine, arginine, lysine 등이 이론치와 일치하였으며 혈청 알부민과 동일하게 약 pI 4.8 정도 값을 나타내어 *H. polymorpha* 유래의 재조합 단백질의 전반적인 아미노산 구성이 혈청 알부민과 동일함을 확인하였다.

감사의 말

본 연구는 과학기술부 선도기술개발사업(G-08-03-A-09)의 연구비에 의하여 수행된 연구결과와 일부이며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Alexander, M. R., J. J. Ambre, B. I. Liskow, and D. C. Trost. 1979. Therapeutic use of albumin. *JAMA*, **241**: 2527-2529.
- Babin, D. R. and E. J. B. Gdds. 1973. Amino acid sequence of a peptide from human-serum albumin. *Eur. J. Biochem.* **34**: 409-414.
- Blondeau, K., H. Boze, G. Jung, G. Moulin, and P. Galzy. 1994. Physiological approach to heterologous human serum albumin production by *Kluyveromyces lactis* in chemostat culture. *Yeast* **10**: 1297-1303.
- Bos, O. J., M. J. Fischer, J. Wilting, and L. H. Janssen. 1988. Procedure for the isolation of a large peptic fragment of human serum albumin. *J. Chromatogr.* **424**: 13-21.
- Chan, B., N. Dodsworth, J. Woodrow, A. Tucker, and R. Harris. 1995. Site-specific N-terminal auto-degradation of human serum albumin. *Eur. J. Biochem.* **227**: 524-528.

6. Dodsworth, N., R. Harris, K. Denton, J. Woodrow, P. C. Wood, and A. Quirk. 1996. Comparative studies of recombinant human albumin and human serum albumin derived by blood fractionation. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **24**: 171–176.
7. Hao, Y. -I. 1985. Pilot-plant scale preparation of human serum albumin. *Vox Sang* **49**: 1–8.
8. Hollenberg, C. P and G. Gellissen. 1997. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**: 554–560.
9. Horie, S. and H. Nagai. 1998. Effectiveness of recombinant human serum albumin in the treatment of ascites in liver cirrhosis: evidence from animal model. *Gen. Pharmacol.* **31**: 811–815.
10. Ikegaya, K., M. Hirose, T. Ohmura, and K. Nokihara. 1997. Complete determination of disulfide forms of purified Recombinant Human Serum Albumin, secreted by the Yeast *Pichia pastoris*. *Anal. Chem.* **69**: 1986–1991.
11. Kang, H. A., E. S. Choi, W. K. Hong, J. Y. Kim, S. M. Ko, J. H. Sohn, and S. K. Rhee. 2000. Proteolytic stability of recombinant human serum albumin secreted in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 575–582.
12. Kang H. A., M. S. Jung, W. K. Hong, J. H. Sohn, E. S. Choi, and S. K. Rhee. 1998. Expression and secretion of human serum albumin in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 42–48.
13. Katoh, S. and K. Watanabe 1995. Immunoabsorption of impurities contained in recombinant human serum albumin secreted from Yeast. *J. Ferm. Bioeng.* **79**: 1201–1211.
14. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
15. Lin, J. J., J. D. Meyer, J. F. Carpenter, and M. C. Manning. 2000. Stability of human serum albumin bioprocessing: denaturation and aggregation during processing of albumin paste. *Phar. Res.* **17**: 391–396.
16. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Fae, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265–267.
17. Ohtani, W., Y. Nawa, K. Takeshima, H. Kamuro, K. Kobayashi, and T. Ohmura. 1998. Physicochemical and immunochemical properties of recombinant human serum albumin from *Pichia pastoris*. *Anal. Biochem.* **256**: 56–62.
18. Quirk, A. V., M. J. Geisow, J. R. Woodrow, S. J. Burton, P. C. Wood, A. D. Sutton, R. A. Johnson, and N. Dodsworth. 1989. Production of recombinant human serum albumin from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **11**: 273–287.
19. Sante, R. -P. 1989. Method for the microbiological preparation of human serum albumin and other heterologous proteins from yeast. European patent application 89 10480.
20. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 4350–4354.
21. Vasileva R., M. Jakab, and F. Hasko. 1981. Application of ion-exchange chromatography for the production of human serum albumin. *J. Chromatogr.* **216**: 279–284.

(Received Jul. 6, 2001/Accepted Sep. 10, 2001)