재조합 단백질 분비생산을 위한 효모 합성생물학 연구 동향

문혜연, 유수진, 탁은정, 강현아

중앙대학교 생명과학과

서론

진핵 미생물인 효모는 산업용 효소로부터 의약용 단백질에 이르기까지 다양한 단백질 생산 숙주로서 각광을 받고 있는 숙주이다. 특히 효모의 단백질 분비 경로가 고등 진핵 생명체와 매우 유사하므로 인체 유래의 재조합 단백질 분비 생산용 숙주로서 주목을 받고 있다. 인류의 오랜 역사와 함께 제빵 또는 맥주와 와인 같은 발효식품에서 유래된 전통 효모 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) 이외에도 최근에는 비전통 효모로 총칭되는 *Ogataea polymorpha* (*Hansenula polymorpha)*, *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*), *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* 등 새로운 효모 종들도 재조합 단백질 생산 숙주로 유용하게 활용되고 있다. 그러나 단백질 생산성(yield) 및 품질(quality) 측면에서 분비 단백질 대량 생산을 위한 실용적인 숙주로 효모를 사용하는 것에는 여러 애로사항들이 존재하고 있다.

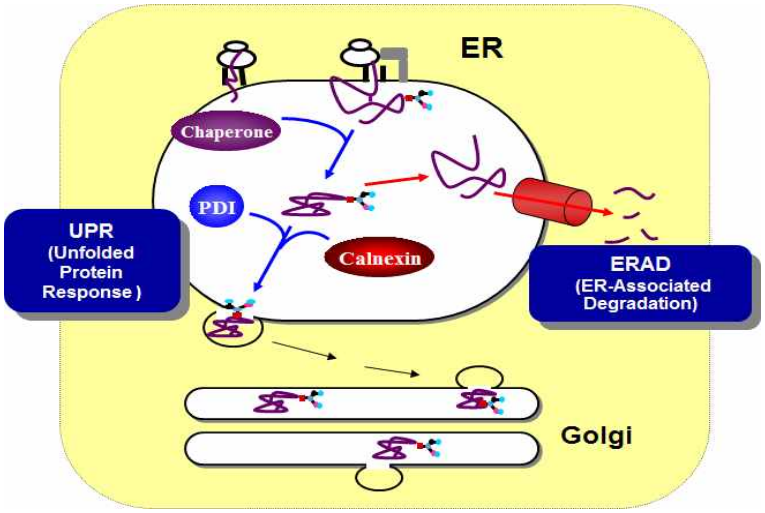
세포내에서 만들어진 단백질이 분비되는 과정은 수백 개의 단백질 인자들이 관여하는 여러 복잡한 단계들로 구성되어 있다. 가장 기본적으로 합성된 단백질이 소포체(Endoplasmic Reticulum; ER) 막을 통과하는 translocation 단계, 소포체에서의 단백질 폴딩 및 품질 조절, 소포체와 골지체(Golgi)에서의 단백질 당질화(Glycosylation) 그리고 소낭(Vesicle)에 의한 단백질의 소포체에서 골지체, 세포막으로의 수송 단계들로 구성되어 있어, 재조합 단백질 분비 생산을 시도할 때 특정 단백질에 따라 각기 다른 단계에서 예기치 않은 문제가 발생할 수 있다. 본고에서는 다양한 효모 종들의 단백질 분비 경로의 개별 단계를 독립적인 모듈 형태로 조작하고 조립하여 단백질 폴딩 및 분비 용량을 증대시키거나 특정 목적에 맞게 단백질 수식과정을 재설계하는 효모 합성생물학 연구 동향에 대해 살펴보고자 한다.

1. 단백질 분비 경로 엔지니어링

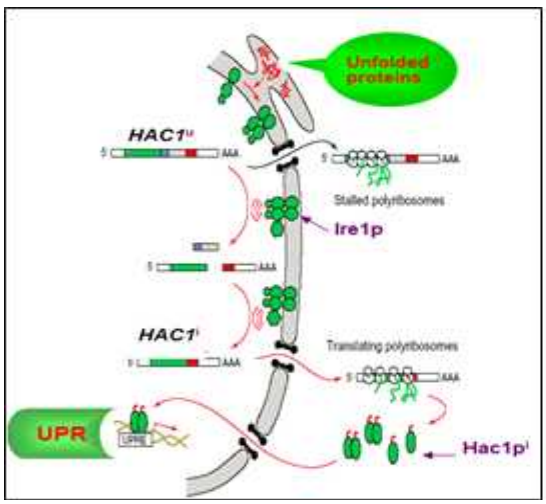
소포체(ER)는 단백질 폴딩이 일어나는 분비 경로의 출발점이다(그림 1A). 효모에서 재조합 단백질의 분비 생성에서 큰 한계 중 하나는 소포체에서의 단백질 폴딩 능력

이다. 특히, 항체와 같은 복잡한 3차 구조를 갖는 단백질의 과발현은 소포체에서의 폴딩 효율성이 큰 장애가 된다. 동물 세포와 비교하여 효모 세포는 적은 수의 샤페론을 가지고, 소포체 막의 제한된 확장성을 가지고 있어 전체 항체의 산업적 생산을 위한 숙주로서 한계가 있다. 초기 펩티드의 잘못된 접힘, 분비 단백질의 과부하는 소포체(ER) 스트레스를 유발하고 이는 미접힘 단백질 반응(Unfolded Protein Response; UPR) 및 소포체 연계 단백질 분해(ER associated protein degradation; ERAD) 반응을 유도한다(Payne et al., 2008). 따라서, 효모 소포체에서 정확한 단백질 폴딩은 소포체에서 골지를 통한 단백질 분비 발현에 관련된 UPR 및 ERAD에 매우 중요하다.

A.



B.



C.

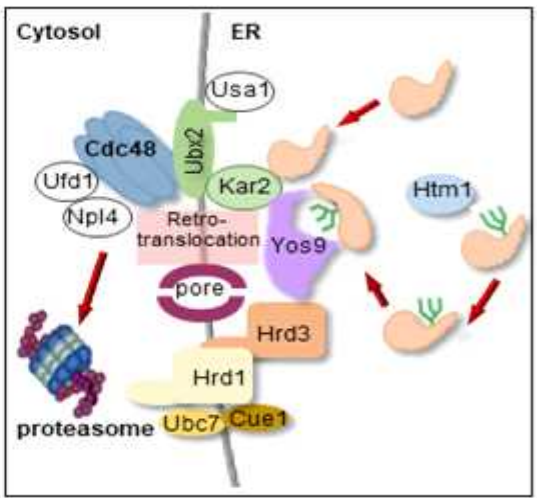


그림 1 소포체에서 단백질 폴딩 및 미접힘 스트레스에 대한 반응(A), 미접힘 단백질 반응(Unfolded protein response; UPR) (B), 소포체 연계 단백질 분해(ER associated protein degradation; ERAD) 반응(C)

UPR 및 ERAD 조정을 통한 소포체 엔지니어링

소포체에서 단백질 폴딩 인자(Chaperones)의 과발현 또는 산화 환원 효소의 과발현이 *S. cerevisiae*, *P. pastoris, K. lactis*에서 단백질 분비 능력을 향상시키기 위해 여러 번 시도되어 왔다(Kim et al., 2015). 특히 소포체에서 개별 단백질 폴딩 인자의 과발현 대신에, Hac1p의 과발현에 의한 전체 UPR 경로의 활성화는 몇몇 효모 종에서 시도되었다. Hac1p는 단백질 폴딩 및 잘못 폴딩된 단백질 분해에 관여하는 유전자들을 유도하는 UPR 신호 경로 조절 전사 인자이다(그림 1B). 따라서 Hac1p에 의해 매개되는 UPR의 체계적인 조작은 올바르게 접히고 가공된 재조합 단백질의 분비 생산을 위한 효모 세포 공장을 개발하는데 있어 훌륭한 전략이 된다. 여러 연구에 따르면 Hac1p 과발현은 일부 재조합 단백질의 분비 생성을 개선하고 (Valkonen et al., 2003), *P. pastoris*에서 분비, 표면 발현, 막 단백질의 생산을 증가시켰다(Guerfal et al., 2010). 그러나 표적 단백질에 따라 Hac1p의 발현은 재조합 단백질의 양을 감소시키거나 또는 효과가 없기도 하므로 각 목표 단백질에 따라 Hac1p 과발현 효과를 확인할 필요가 있다(Valkonen et al., 2003, Guerfal et al., 2010, Gasser et al., 2006). *H. polymorpha*의 경우는 활성형 HpHac1p 과발현이 *N*-당질화 효율 및 tunicamycine (ER stress 유도제) 저항을 증가시킴이 보고되어 Hac1p 활성 조절은 효율적인 단백질 당질화 조절을 위한 주목할 만한 전략으로 제시되었다(Moon et al., 2015). Hac1p 상위의 조절 인자를 활용한 UPR의 조절은 소포체 엔지니어링을 위한 또 다른 접근법이 될 수도 있다. 그 상위 조절 인자인 Ire1p는 소포체(ER) 스트레스 감지 및 반응에 중요한 UPR 경로의 필수 구성 요소이다. 막 단백질인 Ire1p는 *HAC1* mRNA intron 부위의 스플라이싱을 통해 Hac1p 합성을 조절함으로써 UPR을 매개한다(그림 1B). 최근의 연구에서, 골지내 수송에 관련된 Ypt32p 결손 균주에서 *IRE1* 과발현은 야생형 균주에 비해 2.12 배 HBsAg 발현을 증가시키는 것으로 나타났다(Sheng et al., 2017).

ERAD에 의한 재조합 단백질의 제거율을 감소시키기 위해 Ire1p의 존재 및 부재하에 *HTM1*, *YOS9*, *HRD1*, *HRD3*, *UBC7* 유전자의 결실을 수행하였다(그림 1C). Δ*yos9*Δ*ire1* 및 Δ*htm1*Δ*ire1* 균주에서 생산된 IgG의 분해가 지연되었다. 즉, ERAD 매개 단백질 분해에 필요한 단백질에 부착된 당사슬 신호 성분의 생성 및 제거는 IgG의 ER 체류 시간을 증가시키는 좋은 전략이 될 수 있다(de Ruijter and Frey, 2015). 한편, 음성 지질 조절 유전자 *OPI1*의 결손을 통해 지질의 신생 합성을 증가시킴으로 인한 효모의 소포체 확장 유도는 새로운 전략이다(Schuck et al., 2009). 소포체가 확장된 효모 균주, Δ*opi1* 균주에서 폴딩 인자 과발현 라이브러리를 스크

리닝하여 항체의 분비를 향상시키는 단백질을 확인하였다. 확인된 6 개의 유전자 중 펩티딜프롤릴 이소머라제 Cpr5p 첨가는 특정 생성물 수율에 가장 좋은 효과를 보였으며, Δ*opi1* 균주와 *CPR5* 과발현을 조합한 결과 비교 균주에 비해 항체 생성 수율이 10 배 증가되었다(de Ruijter et al., 2016). 이는 합리적인 변형 설계 및 스크리닝 응용 프로그램을 결합한 소포체 엔지니어링을 위한 새로운 전략의 좋은 예이다.

세포 내 단백질 수송 경로 엔지니어링

최근의 연구에 소포체-to-골지체 및 골지체-to-세포막에서 소낭 수송에 관여하는 단백질의 발현 조절은 효모에서 단백질 분비를 향상시키는 것으로 나타났다. 수용성 N-에틸말레이미드 민감성 인자 부착 수용체 단백질(SNARE)은 효모 단백질 수송 기구의 필수 성분이며 세포에서 SNARE 매개된 단백질의 수송 소낭, 다양한 막으로 둘러싸인 소기관, 원형질막 사이의 융합과 같은 세포 막 융합에서 중요한 기능을 가진다 (그림 2A). 실제 *S. cerevisiae* 소포체-to-골지체(ER-to-Golgi) SNARE 유전자의 과발현은 재조합 셀룰로오스 분비를 증가시켰다(Van Zyl et al., 2016). 일반적으로 소포체에서 cis-골지체로 올바르게 폴딩된 단백질의 수송은 주로 Sar1p, Sec16p, Sec23p/Sec24p, Sec13p/Sec31p에 의해 진행되고 소포체 출구 부위에서 생성되는 COPII-코팅 소낭에 의해 운반된다. COPI 소낭은 cis-골지체 및 소포체로의 역수송을 담당한다(그림 2A).

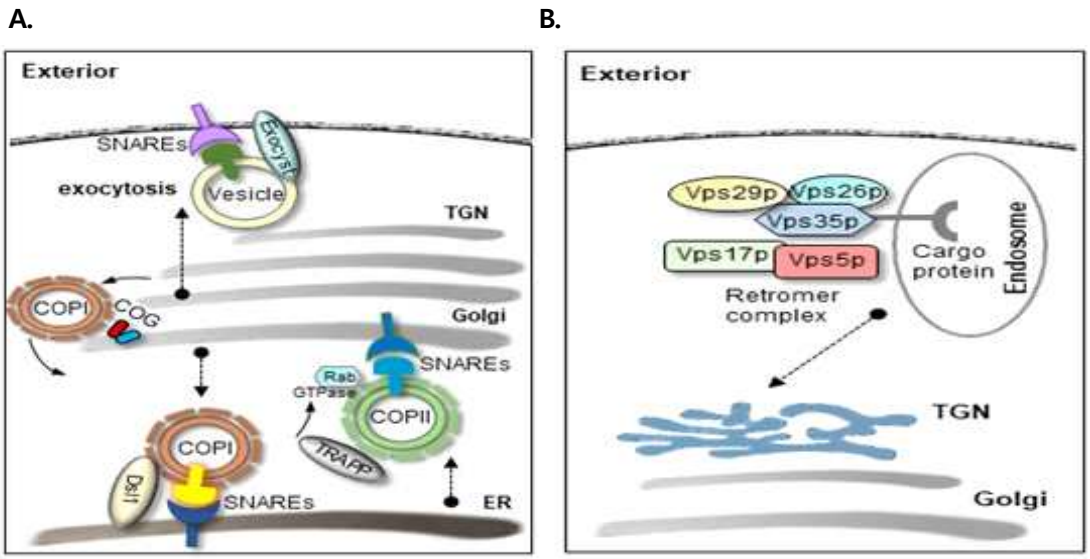


그림 2. 세포 내 단백질 수송 경로. ER-to-Golgi-to-세포막 단백질 수송(A), Endosome -to-Golgi 단백질 역수송(B)

최첨단 바이오나노 기술을 활용한 미세 유체 스크리닝와 연계된 전체 게놈 시퀀싱 분석 기반의 최근 연구에서 분비를 위한 COPII 소낭와 관련된 *ERV29* 및 *COG5*와 같은 수송 유전자의 제거는 α 아밀라제 분비를 감소시켰고 골지체 수송 역행에 관련된 *GOS1*의 제거는 분비 효율을 증가시킴이 보고되었다(Huang M, et al., 2015). 그 후속 연구에서 골지체와 엔도솜 사이의 수송과 관련된 *VPS5* 및 *VPS17*의 결실이 세포 내 재조합 단백질 보유를 감소시키면서 재조합 단백질 분비를 실질적으로 향상시킴이 관찰되었다(Huang et al., 2018). Vps5p는 Vps17p와 역전성 복합체를 형성하며, Vps26p, Vps29p, Vps35p로 구성되는 다른 복합체와 상호작용하는데 이는 모두 후기 엔도솜(Endosome)에서 골지체까지 단백질 수송에 관여한다. 따라서 *VPS5* 및 *VPS17* 결실의 결과로 증가된 단백질 분비 생산은 엔도좀에서 골지체 수송의 변형이 단백질 분비 증가 외에 단백질 보유를 효과적으로 감소시킬 수 있음을 보여준다. 이런 결과는 소낭 수송 경로의 엔지니어링이 재조합 단백질 생산을 위한 효율적인 설계 방법임을 보여준다.

액포(Vacuole) 수송 경로 엔지니어링

몇몇 최근 논문에 따르면, 액포 수송 돌연변이 Δ*vps* 균주들은 다양한 재조합 단백질의 효율적인 생산에 효과를 나타냈으며, 액포로 잘못된 수송을 억제하는 경우 분비 효율을 증가되었다. 특히, CORVET(클래스 C 코어 액포/엔도좀 테더링) 복합체의 서브 유닛의 결손은 여러 효모에서 재조합 단백질의 분비 기능을 향상시키는 것으로 반복적으로 나타났다. Δ*vps8* 및 Δ*vps21* 균주에 세린 프로테아제 유전자 *PRB1*을 제거하여 액포 프로데아제와 액포 수송 결손을 동시에 유도한 균주는 재조합 단백질의 분비 생산을 증가시켰다(Marsalek et al., 2017). 동형 융합 및 단백질 수송 복합체(Homotypic fusion and protein sorting complex) 액포 수송 성분인 *YPT7* 결손은 *P. pastoris* 에서의 재조합 단백질의 분비를 증가시켰다. 또한 소포체 전위 기공의 서브 유닛인 Sbh1p의 과발현은 HyHEL-Fab 분비를 유의하게 증가시켜 Δ*ypt7* 균주에서 세포 외 Fab 수준을 4 배까지 높였다(Marsalek et al., 2019). 이는 재조합 단백질이 액포로 잘못 수송되어 올바르게 폴딩된 활성 단백질에 영향을 줄 가능성이 높으므로 이들 경로의 파괴 또는 액포 수송 경로 초기 단계의 엔지니어링은 재조합 단백질 분비를 증가시킬 수 있음을 시사한다. 또한, 자가 포식 조절에 관여하는 단백질인 Mtc6p 결손 균주는 자가 포식을 약화시키고 *K. marxianus*에서 재조합 단백질의 분비 발현을 개선시켰다(Liu et al., 2018). 이런 결과는 자가 포식을 약화시키거나 저해하는 것이 효모에서 재조합 단백질의 수율을 극적으로 향상시킬 수 있음을 제시하고 있다.

2. 효모에서 당질화 경로의 재설계

단백질의 다양한 번역 후 수식(Post-Translational Modification, PTM) 종류 중에서도 당질화는 가장 흔하지만 매우 복잡한 과정으로 이루어진다. 효모가 단백질의 *N*-, *O*-당질화를 수행할 수 있지만, 최종적인 효모의 당사슬 구조는 인체의 당사슬 구조과는 매우 상이하여 치료용 재조합 단백질의 잠재적인 면역원성 유발을 초래한다. 효모의 경우 오직 과만노실화 *N*-당사슬 구조만을 만들며 포유류의 복합형 *N*-당사슬을 합성할 수 없다. *S. cerevisiae*에서 생산되는 당단백질에 부착된 과만노실화와 말단의 α-1,3-만노오즈 연결(결합)은 혈청 반감기를 줄이거나 치료용 단백질의 면역 유발성을 야기시키는 것으로 알려져 왔다(De Pourcq et al., 2010; Walsh 2010). 다양한 효모 종의 *N*-당사슬 구조에 대한 연구들은 비전통 효모의 *N*-당사슬이 전통 효모인 *S. cerevisiae*에 비해 비교적 간단하다는 것을 밝혀냈다. *O*-당사슬 구조는 진핵 생물 사이에서 뿐만 아니라 효모의 종간에도 상당히 다양하다. 대부분의 효모에서 α-1,2-연결의 만노트리오즈(Mannotriose)는 *O*-당사슬의 공통적인 주요 핵심구조를 형성하며, 이는 종에 따라 상당히 다르게 연장된다(Thak et al., 2018). 당사슬 생합성 경로에 관여하는 효모 특이적 유전자를 제거하고 다양한 효모 종에서 인간화 당사슬 생합성에 관여하는 외래(이종) 유전자를 도입함으로써, 인간화 당사슬 구조를 생합성할 수 있는 지능형 합성 효모 균주를 개발하고자 하는 도전적인 시도들이 꾸준히 진행되어 왔다.

효모에서 인간화된 *N*-당질화 경로 재설계

S. cerevisiae 뿐만 아니라 다양한 비전통성 효모 종에서도 인간화된 *N*-당질화 경로를 구현하려는 시도들이 보고되었다(그림 3A). 효모에서 인간화 호환성 만노오즈 *N*-당구조($Man_5GlcNAc_2$)를 생산하기 위한 당질화 경로 재설계의 첫번째 시도로는 효모 특이적인 외부 *N*-당사슬 합성 유전자 *OCH1*을 제거하고 ER 내부에서 α-1,2 결합(linkage)을 잘라내는 α-1,2 만노시데이즈(α-1,2 mannosidase)를 도입함으로써 달성되었다. 이러한 재설계는 *S. cerevisiae* (Chiba et al., 1998), *H. polymorpha* (Kim et al., 2006), *K. lactis* (Liu B et al., 2009), *P. pastoris* (Choi et al., 2003), *Y. lipolytica* (De Pourcq et al., 2012b)에서 진행되었다. 인간화 혼합형(hybrid) *N*-당구조를 생산하기 위해서 추가적으로 골지에서 *N*-아세틸글루코사민(*N*-acetylglucosamine, GlcNAc)을 당사슬에 부가시켜주는 β-1,2-*N*-아세틸글루코사민 전이효소(β-1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase I)가 *H. polymorpha* (Cheon et al., 2012)와 *P. pastoris* (Choi et al., 2003)에 추가적으로 도입되었다. 또한 골지에 충분

한 UDP-*N*-아세틸글루코사민(GlcNAc)을 공급하기 위해 *K. lactis* 유래의 UDP-*N*-아세틸글루코사민 운반체(UDP-GlcNAc transporter)가 도입되었다(Choi et al., 2003). 다음으로 만노오즈 잔기를 자르는 만노시데이즈 II(mannosidase II)와 *N*-아세틸글루코사민(GlcNAc)을 부가시켜 주는 β-1,2-*N*-아세틸글루코사민 전이효소 II (β-1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase II)를 *P. pastoris*에 도입함으로써 인간화 복합형 당을 생산해낼 수 있었다(Hamilton et al., 2003). 그 다음 단계인 *N*-당사슬 말단에 갈락토오즈를 부착시키기 위해 UDP-만노오즈(UDP-mannose)를 UDP-갈락토오즈(UDP-galactose)로 변환시키는 UDP-갈락토오즈 에피머레이즈(UDP-galactose 4-epimerase)와 함께 갈락토오즈 전이효소(β-1,4-galactosyl transferase, GalT)를 발현시켰다(Bobrowicz et al., 2004).

이러한 외래 당사슬 수식 효소들의 최적 발현을 위해서는 소포체-골지 분비 경로에 따른 정확한 공간적인 위치 선정이 매우 중요하다. 이를 위해 효모의 골지막에서 기능적으로 정확한 발현을 위해 C-말단 촉매 영역 및 막 횡단 단편들의 다양한 조합으로 구성된 합성 당전이효소와 당분해효소 라이브러리를 구축하였다. 이러한 합성 당전이/분해 효소 라이브러리와 고속 대량 선별법을 통해 *P. pastoris*와 *H. polymorpha*에서 외래 당화 경로가 최적으로 조립된 형질전환체를 선별 할 수 있었다(Choi et al., 2003, Cheon et al., 2012). 최종적으로 효모와 곰팡이에는 존재하지 않는 부가적인 외래(이종) 유전자를 도입함으로써 시알산 생합성 경로를 *P. pastoris*에 조립하여 말단에 시알산이 첨가된 인간화 복합형 당단백질 생산에 최초로 성공하였다(Hamilton et al., 2006).

또 다른 인공 당질화 경로 구축을 위한 시도로서, 효모에서 인간화된 *N*-당사슬 생합성을 위해 필요한 만노오즈 잔기를 잘라내는 만노시데이즈 II (mannosidase II)의 도입없이 짧은 당사슬을 합성해 낼 수 있도록 소포체 막에 존재하는 α-1,3 만노실 전이효소를 암호화하는 *ALG3* 유전자를 제거하였다. 추가적으로 도입된 α-1,2 만노시데이즈가 발현되는 인공적인 당질화 경로 도입은 단백질에 부착된 형태의 당사슬로 $Man_3GlcNAc_2$를 생성하며 이는 GnTI에 대한 직접적인 기질로서 작용하게 된다(Cheon et al., 2012, De Pourcq et al., 2012a). *P. pastoris*에서 골지체로 표적화된 외래의 GnTI, GnTII, GalT의 도입은 말단에 갈락토오즈를 갖는 인간화 복합형 당 단백질을 성공적으로 생산할 수 있게 했다. 더 나아가 *ALG3/ALG11* 이중 돌연변이는 *S. cerevisiae*에서 바로 3개의 만노오즈로 이루어진 핵심 당사슬 합성이 가능하게 하였다(Nasab et al., 2013). *H. polymorpha*에서도 이와 유사한 당질화 경로 변형으로 *ALG3/ALG11* 이중 변이주를 제작하고 추가적으로 *OCH1*을 결실

시킨 후 인간 유래의 GnTI, 쥐 유래의 GnTII, 인간 유래의 GalTI 가 포함된 외래의 당전이 유전자들을 발현시킴으로써 말단에 갈락토오즈를 가진 인간화 복합형 당사슬이 부착된 단백질을 생산하게 되었다(Wang et al., 2013). *S. cerevisiae ALG3/ALG11* 돌연변이체에 대한 후속 연구로 *MNN1* 유전자를 결실시키고 골지 내부로 UDP-*N*-아세틸글루코사민이 충분히 공급되도록 *K. lactis* 유래 UDP-*N*-아세틸글루코사민 운반체(UDP-GlcNAc transporter)를 도입하였다(Piirainen et al., 2016). 이를 통해 당사슬 구조의 균질성 및 복합형 당질화 효율 관점에서 재설계된 효모 균주의 당화 양식은 현저하게 개선되었다.

효모에서 인간화된 *O*-당질화 경로 재설계

단순히 만노즈로만 구성된 효모 *O*-당사슬과는 달리 인체의 단백질 *O*-당질화는 단백질의 세린/트레오닌 잔기에 여러 종류의 당을 첨가하여 비교적 짧지만 다양한 구조를 지닌 당사슬을 부착한다. 다양한 인체 *O*-당질화 경로를 지닌 인공 효모 세포 개발 연구도 수행되고 있다(그림 3B). 인체의 뮤신 타입의 *O*-당질화를 생합성할 수 있게 재설계된 *S. cerevisiae*는 효모에는 존재하지 않는 UDP-Gal/GalNAc 4-epimerase, UDP-Gal/GalNAc transporter, polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase 1 (ppGalNAc-T1), core1 β1–3GalT와 같이 다양한 외래의 효소들이 도입되었다(Amano et al., 2008). *S. cerevisiae*에서 인공적인 *O*-푸코실화 체계는 세포질의 GDP-만노오즈를 GDP-푸코오즈로 전환시키고 골지체 내부로 운반하며, 푸코오즈를 단백질에 부착하는 *O*-푸코실전이효소(O-FucT-1) 유전자들을 도입시킴으로써 완성되었다(Chigira et al., 2008). GDP-만노오즈에서 GDP-푸코오즈로의 효율적인 전환은 GDP-만노오즈-4,6-탈수효소를 암호화하는 *Arabidopsis thaliana* 유래의 *MUR1*와 GDP-4-케토-6-디옥시-만노오즈-3,5-에피머레이즈/4-환원효소를 암호화하는 *AtFX/GER1*의 동시발현에 의해 가능하게 되었다(Chigira et al., 2008). 또한 α-dystroglycan 타입과 구조적으로 유사한 인간화 시알화 *O*-당사슬이 부착된 재조합 단백질을 생산하기 위해서는 *P. pastoris* 특이적 당 구조인 β-, 인산화-만노오즈 말단이 결손된 변이주(Δ*och1*, Δ*pno1*, Δ*mnn4b*, Δ*bmt1-4*)에 시알산 생합성 경로 및 시알산전이효소가 이미 도입되어 있는 엔지니어링된 재조합 균주에 α-1,2-결합을 제거시켜주는 α-1,2-만노시데이즈와 단백질-*O*-연결-만노오즈 β-1,2-*N*-아세틸클루코사민 전이효소(PomGnT1)를 도입하였다(Hamilton et al., 2013). 효모에서 다양한 유형의 *O*-연결 당사슬 생합성 경로의 성공적인 구축은 *N*-당질화 재조합 단백질 생산 플랫폼으로서 효모 숙주의 활용성을 보다 넓게 확장시켰다.

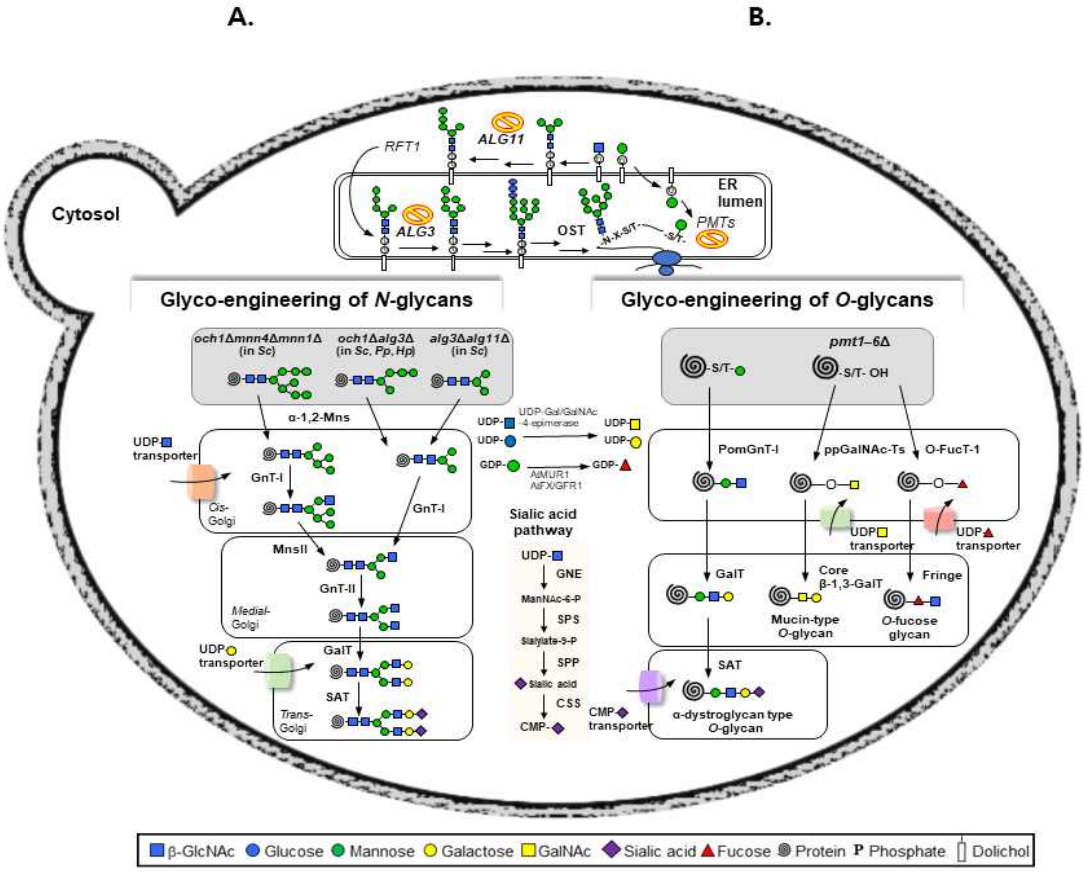


그림 3. 인간화 *N*-당사슬(A) 및 *O*-당사슬(B) 생합성 경로가 정착된 인공 효모세포

N-당사슬 부착 효율 향상을 위한 합성 도구 상자(Tool boxes)

효모에서 생산되는 재조합 당단백질의 당질화가 적게 될 수도 있는데 특히 당단백질이 과발현될 때 *N*-당사슬 부착이 완벽하지 않을 수 있다. 소포체 내에서 초기 폴리펩티드로 올리고당의 이동은 올리고당 전이효소(OST)에 의해 전달된다. 효모의 OST 복합체는 Ost1p, Ost2p, Ost3p, Ost4p, Ost5p, Ost6p, Stt3p, Swp1p, Wbp1p로 이루어져 있다. *P. pastoris*에서 치료용 당단백질 *N*-당사슬 부착 효율이 원생동물 유래의 올리고당 전이효소 OST (*Leishmania major* STT3D)의 과발현에 의해 상당히 향상됨이 보고되었다(Choi et al., 2012). *ALG3* 또는 *ALG3*/*ALG11* 이중 돌연변이의 합성 *N*-당질화 경로는 짧은 길이의 핵심 당사슬을 생산하는데 이는 효율이 좋지 않은 기질로써 OST에 의한 *N*-당사슬 부착 효율이 저하되는 문제를 일으킨다. 뿐만 아니라 짧은 길이의 지질 연결 *N*-당사슬(lipid-linked *N*-glycans)은 낮은 플리핑(flipping) 효율로 인해 세포질에 축적된다. *ALG3*/*ALG11*의 이중 변이주의 당사슬 부착 효율 향상을 위해 올리고당 및 단백질 수용체 부위에 대해 특이성을 변경된 인

공 플립파제(flippase)와 원생동물 유래의 OST가 활용되었다(Nasab et al., 2013). 인공 플립파제에 의해 지질 연결 올리고당의 소포체 내부로의 플립핑이 개선되고 공여체인 지질로부터 단백질로의 올리고당 이동은 원생동물 OST에 의해 최적화 될 수 있음이 입증되었다(Piirainen et al., 2014).

3. 생성물 회수 증대를 위한 효모 세포벽 엔지니어링

글루칸, 매넌, 키틴질로 구성된 매우 복잡한 구조의 효모 세포벽은 효모 세포의 형태를 결정하고 변화무쌍한 환경으로부터 효모 세포를 보호한다(Orlean 2012). 그러나, 두껍고 견고한 세포벽은 효모 세포 내용물 회수에 주요 장애물이다. 세포벽의 주요 요소들의 생합성 경로와 신호 전달 경로에 관여하는 유전자들의 돌연변이 균주들을 이용하는 것은 효모 세포 내용물을 효율적으로 회수하는데 있어 기계적/화학적 방법보다 더 값싸고 에너지 효율적인 대안이 될 수 있다. 세포벽 견고성을 조절하고자 효모 세포벽 보전(cell wall integrity, CWI) 경로에 관여하는 *SRB1*/*PSA1*, *MPK1*/*SLT2*, 그리고 *PKC1*와 유전자들의 발현을 메티오닌 존재 여부에 따라 발현이 조절되는 *MET3* 프로모터와 같은 억제성 프로모터를 이용한 감소가 이전 연구들에서 시도되었다(Zhang et al., 1999a; Zhang et al., 1999b). *SRB1*과 *PKC1*의 조건적 세포벽 돌연변이 균주들은 인간의 장 조건에서 발현이 증가되는 일부 유전자의 프로모터들을 이용하여 단백질 의약품의 경구 운반 매개체로서의 가능성이 검토되었다(Omara et al., 2010).

세포벽 구성 요소의 제거를 통한 세포벽 견고성 조절

S. cerevisiae Gas1p는 β-1,3-글루칸 전이효소를 암호화하는 GPI 닻을 통해 원형질막에 존재하는 당단백질로서 세포벽 중합체의 정확한 조립을 위해 필수적인 기능을 수행한다. 세포벽의 구성과 구조 변화로 인해, Δ*gas1* 변이주는 비정상적인 형태, 출아 성숙의 결함과 세포 분리 및 성장 속도의 변화 등 다양한 형태적 결함을 보인다(Popolo and Vai, 1998). *S. cerevisiae* Δ*gas1* 변이주를 이용하여 재조합 인간 인슐린 유사 성장 인자(rhIGF1)의 분비가 향상되었다는 연구가 보고되었다(Vai et al., 2000). 유가 배양에서 Δ*gas1* 변이주는 모균주와 비교하여 7배 이상의 훨씬 높은 수율로 rhIGF1을 생산하였다. 이와 같은 결과는 전반적인 단백질 분비 증가가 세포벽 구성 단백질들의 결합 감소와 같은 세포벽의 구조 변화와 연관되어 있으며, 이로 인해 재조합 단백질이 배양액에 더 효율적으로 축적될 수 있음을 제시한다. 이전 연구 결과와 일치하게, 최근 세포벽 만노단백질을 암호화하는 *CWP2*의 파쇄가 *S. cerevisiae*에서 셀로비오하이드롤라아제(CBH)의 생산을 향상시켰다고 보고되었다(Li

et al., 2019). 세포벽의 두께와 바깥 세포벽의 밀도 감소에도 불구하고, *CWP2* 파쇄는 대조군 균주에 비해 성장의 차이를 보이지 않았으나 세포외 CBH 활성은 현저하게 증가시켰다. 전체 전사체 분석을 통해 tRNA와 리보솜 생합성과 같은 단백질 합성 관련 유전자들과 소포체 표적화, 골지체 운반, 소낭 수송과 같은 분비 경로에 관여하는 일부 유전자들의 발현이 증가되었음이 밝혀졌다. 또한, *CWP2* 파쇄는 소포체에서 미접힘 단백질 반응(UPR) 스트레스를 완화하는 것으로 보인다. 결과적으로, 이 연구는 효모 세포벽 단백질이 재조합 단백질 분비 생산 향상을 위한 엔지니어링에 좋은 표적 중 하나가 될 수 있음을 증명하였다.

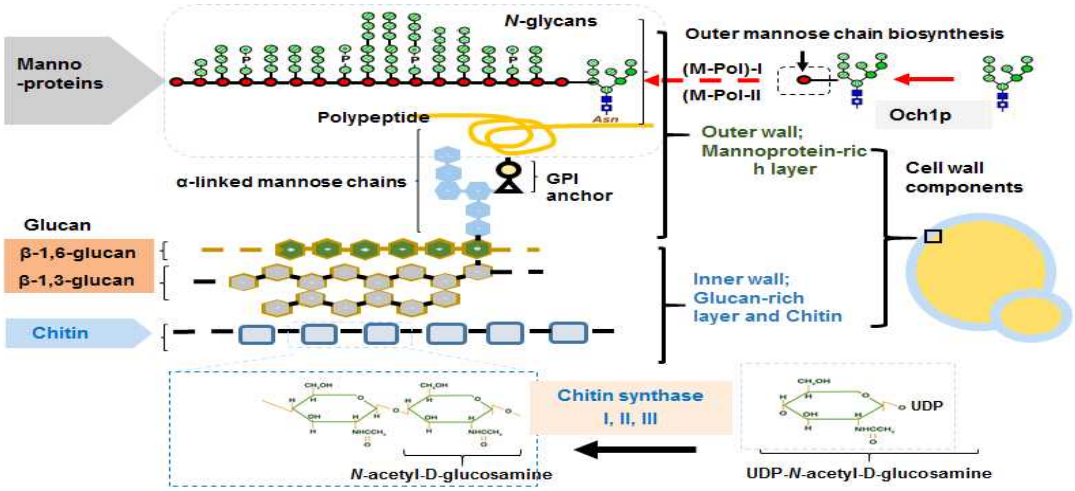
단백질 당화 조작을 통한 세포벽 엔지니어링

몇몇 연구들은 세포벽 구조와 매넌 구성요소의 변화가 배양액으로의 단백질 분비 마지막 단계에 크게 영향을 줄 수 있음을 강하게 뒷받침한다. *S. cerevisiae*를 대상으로 수행된 최근 연구는 Och1p, Mnn9p, Mnn1p과 같은 *N*-당사슬 바깥 사슬 생합성에 관여하는 만노오스 전이효소를 암호화하는 유전자 파쇄가 β-글루코시다아제, 엔도글루카나제, CBH와 같은 재조합 단백질의 분비를 향상시킨다고 보고하였다(Tang et al., 2016). 이 균주들에서 세포벽은 손상되어 세포외 분비 단백질의 배출을 향상시켰다. 흥미롭게도, 이 돌연변이 균주들에서 단백질 접힘과 소낭 수송과 같은 분비 경로에 관여하는 일부 핵심 유전자들의 발현이 증가되었다. *ScOCH1* 파쇄 균주의 심각한 성장 지연과 세포 응집을 회복시키기 위해, 세포벽 보전 경로에 관여하는 *RHO1*와 *PKC1* 유전자를 추가적으로 과발현시키는 전략이 시도되었다(Tang et al., 2016).

매우 최근의 연구는 *MET3* 프로모터를 이용하여 *OCH1*과 풍부한 세포벽 키틴질의 합성에 필요한 *CHS3* 유전자 발현 조절을 통해 일련의 조건적 세포 용해 돌연변이 *S. cerevisiae* 균주들을 보고하였다(그림 4). 메티오닌 존재 하에 배양된 조건적 돌연변이 균주들을 삼투적 용해함으로써, 세포내 재조합 노다바이러스 외피 단백질이 글라스 비즈 파쇄의 60% 정도로 방출되었다. 또한, 이 돌연변이 균주들은 과만노실화가 매우 감소된 재조합 세포외 당단백질인 *Saccharomycopsis fibuligera* β-글루코시다아제의 분비를 특히 P_{MET3}-*OCH1* 균주에서 3배 증가시켰다(Luu et al., 2019). *och1* 파쇄 균주와 비교하여, 조건적 P_{MET3}-*OCH1* 균주와 P_{MET3}-*OCH1*/P_{MET3}-*CHS3* 균주는 메티오닌이 없는 조건에서 세포 응집 없이 성장 결함이 덜하였다. 억제적 조건에서조차, 조건적 돌연변이 균주들은 적은 세포 응집과 더욱 활발한 성장을 보여, 숙주 세포로서의 장기적인 지속 가능성과 산업적 생산을 위한 고밀도 세포 배양의 측면에서 *och1* 파쇄 균주보다 유리함을 명백하게 제시하

고 있다. 그러나, 유가 배양에서의 수행 능력을 분석하여 실제적인 숙주 세포로서의 이 균주들의 잠재성을 평가하기 위한 후속 연구가 요구된다. 또한, 값비싼 메티오닌을 대체할 더 값싼 화학 물질을 이용하여 조절하는 다른 프로모터, 예를 들면, 테트라사이클린으로 억제되는 *tetO* 프로모터 이용도 추후 실용적 응용을 위해 고려되어야 한다.

A.



B.

그림 4. 효모 세포벽 구성(A) 및 *MET3* 프로모터를 이용한 세포벽 구성성분 생합성 유전자 *OCH1* 및 *CHS3* 발현 조절 장치(B)

고찰 및 전망

세포내에서 합성된 단백질의 분비는 소포체로의 단백질 수송, 폴딩, 단백질 합성 후 수식, 여러 막 기관들 간의 소낭의 수송 등 복잡한 여러 단계들로 구성되어 있어 단백질 분비 효율의 최적화는 매우 도전적이다. 따라서 단백질 분비 경로의 각 단계를 하나의 독립적인 모듈 형태로 조작 개발하려는 합성생물학적 엔지니어링 시도가 더욱 큰 주목을 받고 있다. 본 고에서 살펴보았듯이 재조합 단백질 분비 생산용

효모 세포 공장 개발에 유용한 많은 유전학적 도구들이 개발되었고, 각 모듈 형태로 조작 후 조립된 합성 단백질 분비 및 수식 경로 구축을 통해 총체적으로 단백질 분비 생산 및 품질이 크게 향상된 연구사례들의 보고가 점차로 증가되고 있다. 좋은 일례로, UPR 유도, 타겟 단백질 특이적 폴딩 인자 동시 발현, 당질화 경로 엔지니어링, 단백질 분해 효소 결손을 포함한 4 개의 조작된 합성 모듈을 제작하고 이들을 조립한 인공 단백질 분비 경로를 구성하여 디자인된 특정 당사슬 구조가 부착된 막단백질의 생산 효율을 크게 증가시켰다(Claes et al., 2016).

또한 보편화된 분석 기술로 자리잡은 유전체, 단백질체, 당질체 등 오믹스 분석 기반의 연구와 더불어 빠른 속도로 발전하고 있는 바이오나노 기술이 접목된 유전체 수준의 신규 스크리닝 시스템의 개발 연구들은 이전 기술로는 발굴되지 못했던 새로운 엔지니어링 타겟 발굴을 가속화시키고 있다(Love et al., 2012, Huang et al., 2015, Wang et al., 2019). 유전체 편집 기술과 같은 다양한 최신 유전체 조작 기술 개발과 더불어 합성생물학적 단백질 분비 경로 재설계 연구 추세들은 기초 연구와 산업화를 위한 재조합 분비 단백질의 생산 효율의 극대화 및 품질 최적화가 보증되는 인공 효모 세포 공장의 성공적인 개발을 더욱 촉진시킬 것으로 기대된다. 인류 역사상 가장 오랫동안 길들어진 생명체인 효모가 미래 사회에서도 다양한 재조합 단백질과 유용 대사산물들을 고효율로 대량생산하는 인공 세포 공장으로 우리의 일상 삶에 큰 영향력을 발휘하여 그 진가를 발휘할 것이다.

***본 논고는 2020년 *FEMS Yeast Research* 저널(Thematic issue "Yeast Synthetic Biology")에 게재될 본 연구팀의 논문 중 일부 발췌 수정되어 작성되었습니다.**

인용문헌

Amano K, Chiba Y, Kasahara Y *et al.* Engineering of mucin-type human glycoproteins in yeast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**: 3232-7.

Bobrowicz P, Davidson RC, Li H *et al.* Engineering of an artificial glycosylation pathway blocked in core oligosaccharide assembly in the yeast *Pichia pastoris*: production of complex humanized glycoproteins with terminal galactose. *Glycobiology* 2004;**14**: 757-66.

Cheon SA, Kim H, Oh DB *et al.* Remodeling of the glycosylation pathway in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* to produce human hybrid-type N-glycans. *J Microbiol* 2012;**50**: 341-8.

Chiba Y, Suzuki M, Yoshida S *et al.* Production of human compatible high mannose-type (Man5GlcNAc2) sugar chains in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1998;**273**: 26298-304.

Chigira Y, Oka T, Okajima T *et al.* Engineering of a mammalian O-glycosylation pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: production of O-fucosylated epidermal growth factor domains. *Glycobiology* 2008;**18**: 303-14.

Choi BK, Bobrowicz P, Davidson RC *et al.* Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**: 5022-7.

Choi BK, Warburton S, Lin H *et al.* Improvement of N-glycan site occupancy of therapeutic glycoproteins produced in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;**95**: 671-82.

Claes K, Vandewalle K, Laukens B *et al.* Modular Integrated Secretory System Engineering in *Pichia pastoris* To Enhance G-Protein Coupled Receptor Expression. *ACS Synth Biol* 2016;**5**: 1070-5.

De Pourcq K, De Schutter K, Callewaert N. Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;**87**: 1617-31.

De Pourcq K, Tiels P, Van Hecke A *et al.* Engineering *Yarrowia lipolytica* to produce glycoproteins homogeneously modified with the universal Man3GlcNAc2 N-glycan core. *PloS one* 2012a;**7**: e39976.

De Pourcq K, Vervecken W, Dewerte I *et al.* Engineering the yeast *Yarrowia lipolytica* for the production of therapeutic proteins homogeneously glycosylated with $Man_8GlcNAc_2$ and $Man_5GlcNAc_2$. *Microbial cell factories* 2012b;**11**: 53-.

de Ruijter JC, Koskela EV, Frey AD. Enhancing antibody folding and secretion by tailoring the *Saccharomyces cerevisiae* endoplasmic reticulum. *Microbial cell factories* 2016;**15**: 87.

Gasser B, Maurer M, Gach J *et al.* Engineering of *Pichia pastoris* for improved production of antibody fragments. *Biotechnol Bioeng* 2006;**94**: 353-61.

Guerfal M, Ryckaert S, Jacobs PP *et al.* The *HAC1* gene from *Pichia pastoris*: characterization and effect of its overexpression on the production of secreted, surface displayed and membrane proteins. *Microbial cell factories* 2010;**9**: 49.

Hamilton SR, Bobrowicz P, Bobrowicz B *et al.* Production of complex human glycoproteins in yeast. *Science* 2003;**301**: 1244-6.

Hamilton SR, Cook WJ, Gomathinayagam S *et al.* Production of sialylated O-linked glycans in *Pichia pastoris*. *Glycobiology* 2013;**23**: 1192-203.

Hamilton SR, Davidson RC, Sethuraman N *et al.* Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science* 2006;**313**: 1441-3.

Huang M, Bai Y, Sjostrom SL *et al.* Microfluidic screening and whole-genome sequencing identifies mutations associated with improved protein secretion by yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;**112**: E4689-96.

Huang M, Wang G, Qin J *et al.* Engineering the protein secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* enables improved protein production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;**115**: E11025-e32.

Kim H, Yoo SJ, Kang HA. Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. *FEMS Yeast Res* 2015;**15**: 1-16.

Kim MW, Kim EJ, Kim JY *et al.* Functional characterization of the *Hansenula polymorpha HOC1*, *OCH1*, and *OCR1* genes as members of the yeast OCH1 mannosyltransferase family involved in protein glycosylation. *J Biol Chem* 2006;**281**: 6261-72.

Li J, Zhang MM, Wan C *et al.* Improved cellulase production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by disrupting the cell wall protein-encoding gene CWP2. *J Biosci Bioeng* 2019, DOI 10.1016/j.jbiosc.2019.08.012.

Liu B, Gong X, Chang S *et al.* Disruption of the *OCH1* and *MNN1* genes decrease N-glycosylation on glycoprotein expressed in *Kluyveromyces lactis*. *J Biotechnol* 2009;**143**: 95-102.

Liu Y, Mo WJ, Shi TF *et al.* Mutational Mtc6p attenuates autophagy and improves secretory expression of heterologous proteins in *Kluyveromyces marxianus*. *Microbial cell factories* 2018;**17**: 144.

Love KR, Politano TJ, Panagiotou V *et al.* Systematic single-cell analysis of *Pichia pastoris* reveals secretory capacity limits productivity. *PloS one* 2012;**7**: e37915.

Luu VT, Moon HY, Yoo SJ *et al.* Development of conditional cell lysis mutants of *Saccharomyces cerevisiae* as production hosts by modulating *OCH1* and *CHS3* expression. *Appl Microbiol Biotechnol* 2019;**103**: 2277-93.

Marsalek L, Gruber C, Altmann F *et al.* Disruption of genes involved in CORVET complex leads to enhanced secretion of heterologous carboxylesterase only in protease deficient *Pichia pastoris*. *Biotechnol J* 2017;**12**.

Marsalek L, Puxbaum V, Buchetics M *et al.* Disruption of vacuolar protein sorting components of the HOPS complex leads to enhanced secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Microbial cell factories* 2019;**18**: 119.

Moon HY, Cheon SA, Kim H *et al.* Hansenula polymorpha Hac1p Is Critical to Protein N-Glycosylation Activity Modulation, as Revealed by Functional and Transcriptomic Analyses. *Appl Environ Microbiol* 2015;**81**: 6982-93.

Nasab FP, Aebi M, Bernhard G *et al.* A combined system for engineering glycosylation efficiency and glycan structure in *Saccharomyces cerevisiae*.

Appl Environ Microbiol 2013;**79**: 997-1007.

Omara WA, Rash BM, Hayes A *et al.* Conditional cell-wall mutants of *Saccharomyces cerevisiae* as delivery vehicles for therapeutic agents in vivo to the GI tract. *J Biotechnol* 2010;**147**: 136-43.

Payne T, Hanfrey C, Bishop AL *et al.* Transcript-specific translational regulation in the unfolded protein response of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 2008;**582**: 503-9.

Piirainen MA, Boer H, de Ruijter JC *et al.* A dual approach for improving homogeneity of a human-type N-glycan structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycoconj J* 2016;**33**: 189-99.

Piirainen MA, de Ruijter JC, Koskela EV *et al.* Glycoengineering of yeasts from the perspective of glycosylation efficiency. *N Biotechnol* 2014;**31**: 532-7.

Schuck S, Prinz WA, Thorn KS *et al.* Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *J Cell Biol* 2009;**187**: 525-36.

Sheng J, Flick H, Feng X. Systematic Optimization of Protein Secretory Pathways in *Saccharomyces cerevisiae* to Increase Expression of Hepatitis B Small Antigen. *Front Microbiol* 2017;**8**: 875.

Tang H, Wang S, Wang J *et al.* N-hypermannose glycosylation disruption enhances recombinant protein production by regulating secretory pathway and cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep* 2016;**6**: 25654.

Thak EJ, Kim J, Lee DJ *et al.* Structural analysis of N-/O-glycans assembled on proteins in yeasts. *J Microbiol* 2018;**56**: 11-23.

Vai M, Brambilla L, Orlandi I *et al.* Improved secretion of native human insulin-like growth factor 1 from *gas1* mutant *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl Environ Microbiol* 2000;**66**: 5477-9.

Valkonen M, Penttila M, Saloheimo M. Effects of inactivation and constitutive expression of the unfolded- protein response pathway on protein production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 2003;**69**: 2065-72.

Van Zyl JH, Den Haan R, Van Zyl WH. Overexpression of native *Saccharomyces cerevisiae* ER-to-Golgi *SNARE* genes increased heterologous cellulase secretion. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016;**100**: 505-18.

Walsh G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. *Drug Discov Today* 2010;**15**: 773-80.

Wang G, Bjork SM, Huang M *et al.* RNAi expression tuning, microfluidic screening, and genome recombineering for improved protein production in

Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;**116**: 9324-32.

Wang H, Song HL, Wang Q *et al.* Expression of glycoproteins bearing complex human-like glycans with galactose terminal in *Hansenula polymorpha*. *World J Microbiol Biotechnol* 2013;**29**: 447-58.

Zhang N, Gardner DC, Oliver SG *et al.* Down-regulation of the expression of *PKC1* and *SRB1/PSA1/VIG9*, two genes involved in cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*, causes flocculation. *Microbiology* 1999a;**145 (Pt 2)**: 309-16.

Zhang N, Gardner DC, Oliver SG *et al.* Genetically controlled cell lysis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* 1999b;**64**: 607-15.