

## 소의 히아론산 분해효소(PH-20)의 *Pichia pastoris*에서의 생산 최적화

신화숙 · 김은기<sup>†</sup>

인하대학교 생물공학과  
402-701 인천시 남구 용현동 253  
(2008년 3월 31일 접수, 2008년 5월 21일 채택)

### Optimization of Bovine Testicular PH-20 hyaluronidase Production in *Pichia pastoris*

Hwa Shook Shin and Eunki Kim<sup>†</sup>

Department of Biological Engineering, Inha University, 253 Yonghyun-dong, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea  
(Received 31 March 2008; accepted 21 May 2008)

#### 요 약

소 고환 유래의 hyaluronidase 효소 PH-20을 pPIC9 expression vector를 사용하여 *Pichia pastoris*에서 발현하였다. 생산된 재조합 단백질 rPH-20b는 75 kDa의 분자량을 보였고 7460 units/L의 효소활성을 보였다. 세포내보다 세포외의 효소활성이 두배 높았다. pH의 경우 buffer를 사용 안 한 경우가, 또한 30 °C 배양 조건에서 높은 활성을 보였다. 1 M sorbitol 삼투압조건과 0.3% 메탄올의 생산유도인자를 사용시 성장과 생산에 유리하였으며 0.4 M 아르기닌을 첨가시 재조합 단백질의 분해가 감소하였다.

**Abstract** – Bovine testicular hyaluronidase PH-20 was cloned into pPIC9 vector and expressed in *Pichia pastoris*. Recombinant PH-20 was 75 kDa MW and 7460 units/L activity. Extracellular hyaluronidase activity was two times higher than that of intracellular activity. Non-buffered medium and 30 °C cultivation was favorable for PH-20 production. 1M sorbitol as an osmotic pressure and 0.3% methanol inducer increased cell growth and enzyme activity. 0.4 M arginine augmentation decreased the proteolytic degradation of recombinant hyaluronidase.

**Key words:** Bovine Testicular, Hyaluronidase, PH-20, *Pichia pastoris*

#### 1. 서 론

히아론산 분해효소는 히아론산을 분해하는 효소로, 그 작용 기작 및 소재에 따라 3가지 그룹 즉, 고환형태 히아론산 분해효소와 거머리 히아론산 분해효소, 박테리아 히아론산 분해효소가 존재한다. 이 가운데 고환형태(PH-20)은 정자의 첨체부분의 GPI anchor에 부착되어 있어서, 난자 외부의 두꺼운 외벽층을 분해하여 수정을 일으키는 중요한 효소이다. 현재 히아론산 분해효소는 수용성 효소로서 세포 매트릭스의 구성성분인 히아론산을 분해하여 물질의 이동을 용이하게 한다. 이러한 이유에서 주로 안과수술의 안구이완제 및 마취 주사 첨가제로 이용되고 있다. 또한 약물전달체로서 water-in-oil 형태의 에멀전화를 통해 미세구 형태로 약물전달에 이용이 가능하다. 이외에도 상처치료 및 부종억제, 히아론산 및 콜라겐의 생산 등에 이용이 된다. 히아론산 분해효소를 이용하여 전이과정의 암세포를 억제시키고 항암제의 전달효율을 높이는 데 관한 연구가 이루어지고 있으며, 암세포에서의 히아론산 분해효소의 고 발현 특징을

이용하여 암 진단 키트 개발에 대한 연구 또한 진행중이다. 이와 같이 많은 분야에서 히아론산 분해효소가 이용되고 있고 앞으로도 많은 개발이 이루어 질 것이다. 이로인해 히아론산 분해효소의 대량 생산의 필요성이 대두되고 있으며, 현재 대부분이 소나 양의 고환 으로부터 추출/생산 되고 있다. 그러나 광우병으로 인해 그 생산 및 이용에 많은 제한이 따르게 되어 재조합 형태의 단백질로 생산하는데 연구가 절실하다.

메탄이용 효모인 *Pichia pastoris*는 진핵세포의 단백질의 생산에 이용되는 시스템이다. 이 시스템은 알콜산화효소(AOX) 프로모터에 조절되며, 메탄올에 의해 유도 되고, 다른 탄소원에 의해 억제되는 시스템이다. AOX(alcohol oxidase gene)은 메탄올 분해 경로의 첫 단계에서 사용되어 포름알데히드와 과산화수소를 생성한다. 포름알데히드는 세포내 탈수소효소에 의해 포르메이트와 이산화탄소로 산화가 된다. 이 일련의 과정을 통해 세포성장을 위한 에너지를 공급 받게 된다. 이 강한 프로모터는 고농도 배양(high cell density fermentation)을 통하여 높은 농도로 재조합 단백질을 생산하게 된다.

시그널 펩타이드인 알파 인자를 이용하여 배양 상등액상으로 분리하였고 Ni-resin을 이용하여 히스티딘이 부착된 단백질을 분리할 수 있다.

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

E-mail: ekkim@inha.ac.kr

<sup>‡</sup>이 논문은 인하대학교 정성택 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

효모발현 시 그 효율을 높이기 위해 많은 연구들이 이루어지고 있다. 메탄올의 농도 및 배양온도, pH 등 배양조건과 배지 조성의 변화 및 삼투압을 주어 발현을 증대 시키는 연구가 많이 이루어지고 있다. *P. pastoris*의 경우 0.5% 이하의 메탄올 농도를 유지하는 것이 무엇보다 중요하네, 이는 저농도일 경우 발현유도에 어려움이 생기고, 고농도에서는 세포사멸을 일으키기 때문이다. 배양온도는 30 °C 이하에서 실험이 되며, 저온에서 배양시 세포성장이 적절히 감소되므로 과량의 단백질이 급속히 배출되는 것을 막고 단백질이 안정하게 배출되도록 한다. pH는 산성에서 단백질 분해효소의 활성이 저기 때문에 생산된 단백질의 분해를 줄 일수 있지만 목적 단백질의 변성을 일으킬 수 있다. 또한 배지조성 가운데 질소원을 조절함으로써 단백질 분해효소의 생산 억제 및 경쟁적 저해를 기대 할 수 있다.

본 연구에서는 소 고환에서 클로닝 된 PH-20 히아론산 분해효소를 *P. pastoris*에 클로닝, 생산을 최적화 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2-1. 사용 균주, plasmid 및 배양방법

사용균주로는 *Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$ , *Pichia pastoris* GS115 (*his4*, *Mut<sup>+</sup>*)을 사용하였으며 배지는 각기 LB와 YPD 배지를 사용하였다. pDrive TA cloning vector (Qiagen)와 pPIC9 expression vector (Invitrogen)을 클로닝 및 발현 벡터로 사용하였다. 소 고환 유래 재조합 PH-20 단백질(rPH-20b)을 생산하는 효모 세포의 배양 및 안정한 단백질 획득을 위해 pH, 온도, inducer (메탄올) 농도, 삼투압, 배지 조성을 달리하여 최적의 배양 조건을 연구하였다. *Pichia* 균주는 배지에 완충용액 처리가 되지 않을 경우 발현과정에서 산성을 띄며 pH 3 또는 그 이하로 내려간다. 실험에서는 기본 배지 BMGY/BMMY (buffered complex glycerol or methanol medium) 배지와 MGY/MM (minimal glycerol or minimal methanol medium)을 사용하였으며 온도는 15 °C와 30 °C에서 배양하였다. 발현 균주의 발현유도인자인 메탄올 농도를 0.1~1.0% 사이에서 24 h 간격으로 첨가하여 그 영향을 살펴보았다. PH-20 단백질 발현 균주의 단일 콜로니를 BMGY 배지에 접종하고 30 °C에서 250 rpm으로 24시간 배양한다. 발현 유도전에 삼투압을 가하기 위해 BMGY 배지는 K-BMGY, Na-BMGY, S-BMGY 각각의 배지를 사용하였다. 배양 후 세포농도와 효소활성을 조사하였다. 단백질 발현을 위한 배지 BMMY 배지에 5 mM EDTA, 2% 카사미노산(CA), 0.4 M 알기닌을 각각 첨가하였다. 24시간 간격으로 메탄올을 처리하면서 세포 성장과 효소활성을 측정하였다.

### 2-2. 히아론산 분해효소 활성측정 및 단백질 정제

히아론산 분해효소 효소활성은 흡광도 방법을 사용하였다. 흡광도 방법은 히아론산과 시럽 알부민을 혼합하여 히아론산 분해효소에 의해 히아론산이 분해되면서 흡광도가 감소되는 수치를 흡광도로 측정하는 방법이다.

300  $\mu$ l 효소시료를 200  $\mu$ l 희석액(0.02 M sodium phosphate buffer, pH 6.9, 0.45% NaCl, 1 mg/ml BSA)에 혼합한 후 500  $\mu$ l의 기질(0.4 mg/ml HA)을 첨가하여 37 °C에서 30분간 효소 반응시킨다. 반응 후 5 ml의 산성 알부민용액을 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 37 °C에서 10분간 방치 후 600 nm에서 흡광도를 측정한다.

소고환 유래 재조합 PH-20 (rPH-20b) 단백질의 정제를 위해 Ni-NTA(Nitrilotriacetic acid) 컬럼을 이용하였다. Ni-NTA 컬럼은 immobilized-metal affinity chromatography (IMAC)의 하나로 6 $\times$  His-tagged 단백질을 강력하게 부착시킨다.

배양액을 원심분리하여 cell pellet을 세포용해용액(50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)에 다시 분산시킨 후 혼합액을 초음파파쇄 후, 원심분리하여 상등액을 분리한다.

위에서 채취한 배양 상등액 및 파쇄상등액을 Ni<sup>2+</sup>-nitrilotriacetic acid-Sepharose resin (Ni-NTA) (Qiagen)에 주입하였다. 레진에 세척 완충용액(50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 20mM imidazole, pH 8.0)를 흘려보내어 A<sub>280</sub>에서 용출용액(50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0)을 첨가하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3-1. *P. pastoris*에서의 PH-20 단백질 발현

Bovine 유래의 재조합 PH-20 (rPH-20b)은 약 75 kDa의 당이 첨가된 단백질로 배양 2-3일 사이에 효소 활성 및 단백질 생산이 가장 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 1, 2). 일반적으로 알려진 PH-20의 분자량은 65 kDa 정도로 당쇄화 된 부분이 10 kDa를 차지하고 있다. 위의 결과와 비교해 볼 때 약 10 kDa의 당쇄부분이 더 첨가된 것으로 사료된다.

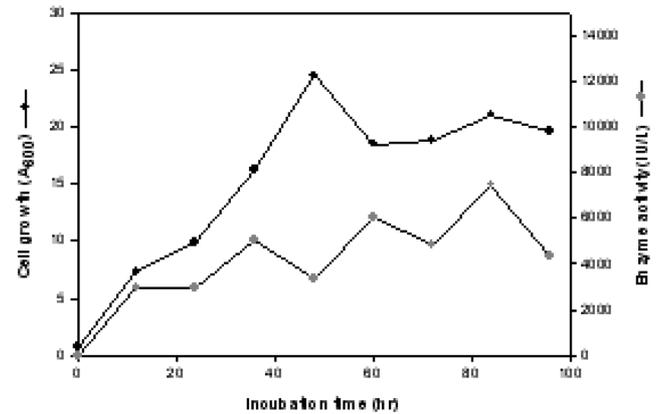


Fig. 1. PH-20 expression in *Pichia pastoris*.

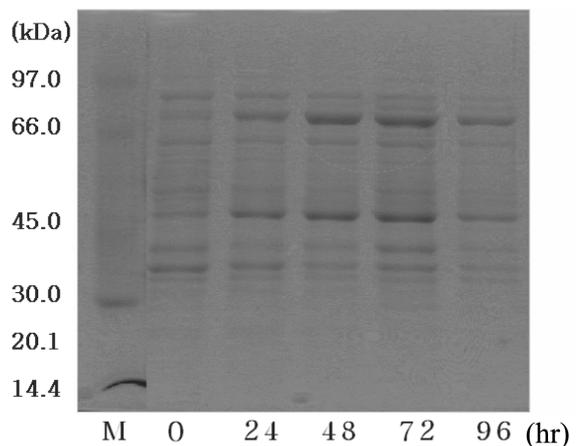


Fig. 2. Increase of rPH-20b protein of intracellular protein was monitored by SDS-PAGE.

단백질의 배출 효율을 살펴보기위해 세포안의 단백질과 세포밖의 단백질의 효소활성을 비교하였다. 아래 Fig. 3 결과에서 보듯이 세포내부에 두배 정도의 효소활성이 존재하는 것을 알 수 있고, 이는 많은 단백질이 세포밖으로 배출되지 못함을 나타내고 있다.

단백질은 c-말단 부분에 his-tagging이 된 상태로 Ni-column에 특이적으로 부착 하게 된다. Ni-column은 Hig-tag의 높은 친화력으로 인하여 매우 강력한 도구로서 이용이 되고 있다. 이를 이용하여 rPH-20b를 분리하였고 아래 Fig. 4에서 보듯이 용출시료(lane 4, 5, 6)에서 75 kDa과 40 kDa의 밴드가 나타났다. 75 kDa은 당쇄화된 단백질이고, 40 kDa은 배양과정이나 정제과정에서 분해된 C-말단 부분이라 생각되며, 위쪽의 75 kDa은 Ni-resin의 결합부위인 c-말단 부위의 당쇄화 부착 및 단백질의 3차 구조로 인해 부착이 잘 되지 않았고, 40 kDa의분해산물만이 수지에 쉽게 부착 한 것으로 사려된다.

3-2. PH-20 단백질 배양 최적화

시그널 단백질을 이용하여 배양 상등액 상으로 단백질을 분리하는 시스템을 이용하였고, 세포내 단백질 형태로 세포외 단백질의 2 배 가량이 존재함을 알 수 있었다. 그러므로 배양 환경의 변화를 통해 단백질의 생산 및 분비 효율 및 생산 단백질의 안정성을 높이기 위해 pH, 온도, 메탄올 농도, 삼투압 및 기질조성에 대한 영향을 살펴보았다. pH는 산성과 중성 조건에서 이루어졌으며, 완충이 되지 않은 산성 조건하에서(MGY 효소활성이 더 높은 것을 알 수 있고 이는 중성 조건에서 활성을 갖는 단백질 분해효소의 억제효과 결과로 사료된다. 온도는 15 °C와 30 °C에서 측정 되었으며 30 °C에서 세포성장이나 효소활성이 높은 것을 알 수 있었다(Fig. 5). 높은 농도의 메탄올은 세포내에 포름알데히드 및 과산화수소의 축적을 일으킴으로 유도 상태를 유지하면서 메탄올을 적절한 농도로 유지시

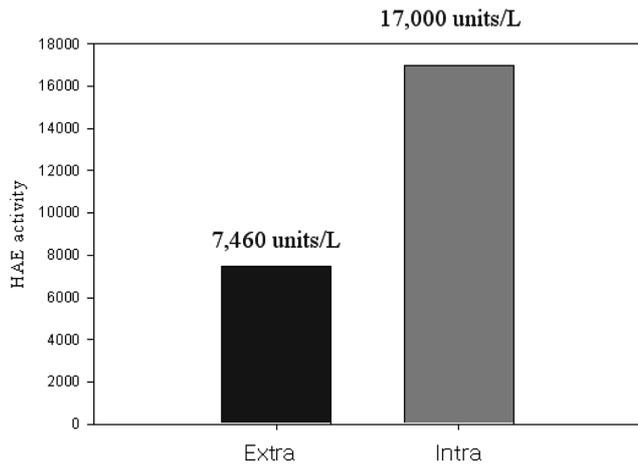


Fig. 3. Comparison of HAE activity of intra and extra phase.

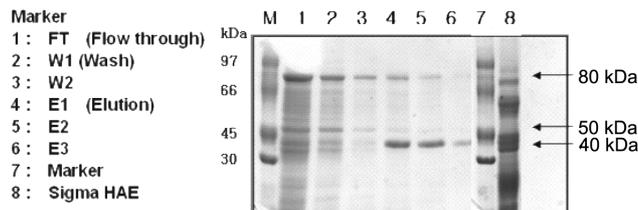


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of His-tagged protein by Ni column purification.

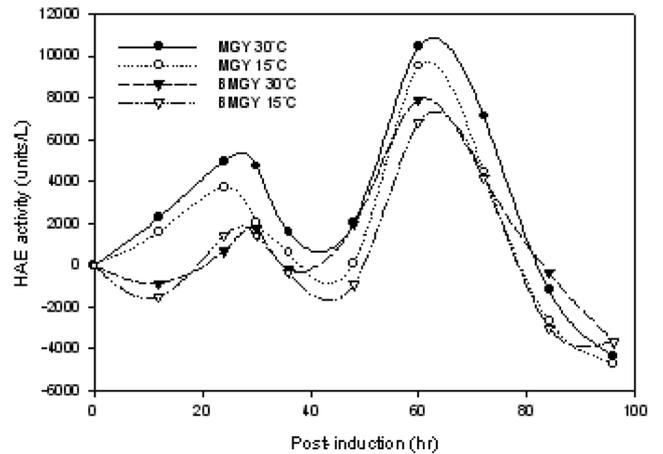


Fig. 5. Effect of medium pH and temperature.

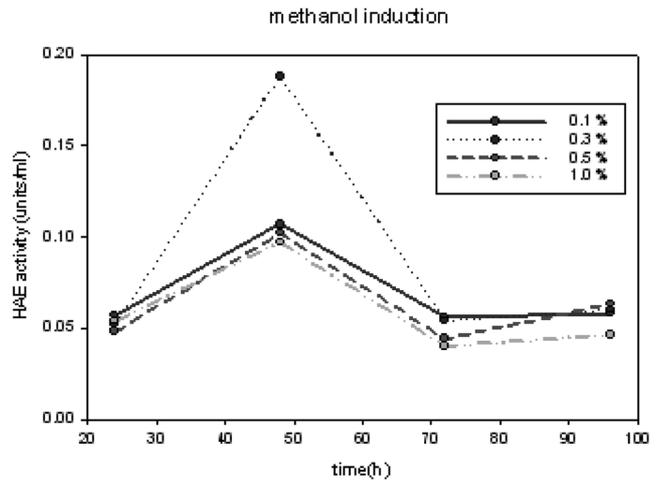


Fig. 6. Effect of methanol concentration for induction (every 24 hr).

키는 것이 필요하다. 메탄올 농도는 0.3%일 때 가장 효소활성이 높았고 이보다 낮은 농도에서는 발현유도가 잘 되지 않으며, 높은 농도에서는 세포 독성을 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 6).

재조합 단백질의 분비 효율이 낮은 관계로 많은 부분이 세포안에 함유 되어 있음을 알 수 있었고, 이를 개선하기위해 발현유도 전에 삼투압을 주어 분비효율을 살펴보았다. 솔비톨이나 만니톨 등은 높은 삼투압을 세포에 가하게 되어 단백질의 발현 및 분비를 증가시키는 것으로 보고되어있다. 0.4 M KOAc 및 0.35 M NaCl, 1 M 솔비톨 가운데 1 M 솔비톨에서 효소 활성이 가장 높게 증가 되었으며, 세포성장에도 향상을 보였다(Fig. 7).

배양과정 가운데 생산되는 단백질 분해효소의 활성은 많은 차이가 있지만 높은 경우에는 24 h 안에 생산된 재조합 단백질의 대부분이 분해 될 만큼 강력하다. 그러므로 단백질 분해효소의 생산 및 활성을 억제시킴으로서 단백질 생산을 안정화 시킬 수 있겠다. 카자미노산은 카제인의 분해물로 일기닌과 더불어 단백질 분해효소의 생산 및 활성을 억제시키는 것으로 알려져 있다. 세포에 아미노산을 공급해 주어서 단백질 분해효소의 생산 필요성을 감소시키며, 단백질 분해효소의 활성부위에 경쟁적 기질로 작용하기 때문에 생산 및 활성이 감소하게 된다.

2%의 카자미노산 첨가시 효소 활성이나 세포성장에는 효과가 없

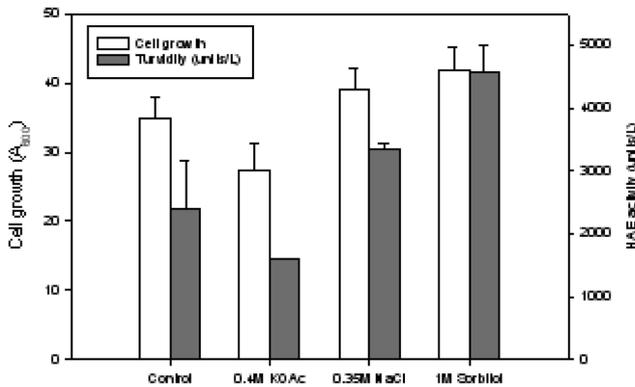


Fig. 7. Effect of osmotic stress on post-induction phase.

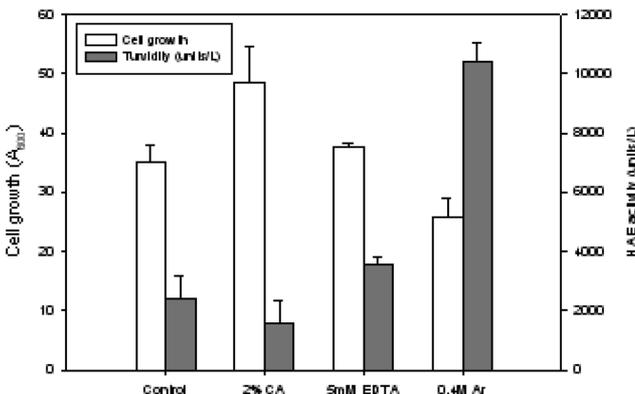


Fig. 8. Effect of media composition on post-induction phase.

었으며, 0.4 M 알기닌에서 세포성장은 약간 감소했지만 높은 효소 활성을 보였다(Fig. 8). 5 mM EDTA를 첨가하였을 경우 세포성장은 유지시키면서 효소활성이 증가 된 것을 알 수 있었다. 이로써 *P. pastoris*에는 중성, 알칼리성 단백질 분해효소등이 존재하는 것으로 사료되며, 알기닌과 EDTA는 각각 단백질 분해효소 억제 효과를 보이는 것을 알 수 있다.

#### 4. 결 론

소의 고환으로 추출된 PH-20 히아론산 분해효소를 클로닝하여 효모 발현 시스템인 *P. pastoris* 에서 생산하였다. 생산시 관련 인자인 pH, 온도 및 배지 조건등을 조사하였다. 또한 발현 유도인자인 메탄올의 사용조건 그리고 재조합 단백질의 분해를 방지하기 위한 삼투압 증가제, 알기닌 사용 효과를 검토하여 생산 최적 조건을 확립하였다. 최적조건에서 7460 u/L의 효소가 생산되었다. 이는 현재 소의 고환에서 생산되는 것에 주로 의지하고 있는 상태에서 새로운 생산법으로서 상업적인 효과가 기대된다. 더구나 광우병등으로 소의 고환에서 추출하는 히아론산 분해효소의 사용이 우려되는 가운데 효모에서 생산되는 히아론산 분해효소는 새로운 대체제로서 가능성을 제시하였다.

#### 참고문헌

1. Muchenschnabel, I., Bernhardt, G., Spruss, T., Dietl, B. and Buschauer, A., "Quantitation of Hyaluronidases by the Morgen-

Elson Reaction: Comparison of the Enzyme Activities in the Plasma of Tumor Patients and Healthy Volunteers," *Cancer Letter* **131**, 13-20(1998).  
 2. Menzel, E. J. and Farr, C., "Hyaluronidase and Its Substrate Hyaluronan: Biochemistry, Biological Activities and Therapeutic uses," *Cancer Letter* **131**, 3-11(1998).  
 3. Gase, K., Ozegowski, J. and Malke, H., "The Streptococcus Agalactiae hylB Gene Encoding Hyaluronate Lyase: Completion of the Sequence and Expression Analysis," *Biochimica et Biophysica Acta* **1398**, 86-98(1998).  
 4. Lin, B., Hollingshead, S. K., Coligan, J. E., Egan, M. L., Baker, J. R. and Pritchard, D. G., "Cloning and Expression of the Gene for Group B Streptococcal Hyaluronate Lyase," *The Journal of biological Chemistry*, **269**(48), 30113-30116(1994).  
 5. Seaton, G. J., Hall, L. and Jones R., "Rat Sperm 2B1 Glycoprotein (PH20) Contains a C-Terminal Sequence Motif for Attachment of a Glycosyl Phosphatidylinositol Anchor. Effects of Endoproteolytic Cleavage on Hyaluronidase Activity," *Biology of reproduction*, **62**, 1667-1676(2000).  
 6. Rutlant, J. and Meyers, S. A., "Posttranslational Processing of PH-20 During Epididymal Sperm Maturation in the Horse," *Biology of reproduction*, **65**, 1324-1311(2001).  
 7. Dabid, H., "Novel Medicinal Composition, Especially for the Treatment of Cellulitis," US patent No. 4191748(1955).  
 8. Carpio Aragon Gabriel Arturo, Gutierrez Flores Jose Luis, Nesburn Anthovny B., Karageozian Hampar L., Karageozian Vicken H., Kenney Maria Christina, "Method for Accelerating Clearance of Hemorrhagic Blood from the Vitreous Humor with Hyaluronidase," US patent No. 5866120(1999).  
 9. Nikolayevich, B. S., Nikolayevic, F. S., Viktorovich, L. Y. and Borisovich, M. V., "Method of Preparing a Biological for Use in Ophthalmology," US patent No. 5936256(1999).  
 10. Belousov Anatoly A., Mamonov Nikolaid, Sevastyanov Boris A., Shilov Gennady G. and Stekolnikov Leonid I., "Method for Preparing Enzymatic Composition for Acceleration of Ageing of Meat Products," US patent No. 4195097(1980).  
 11. Johnsson, C., Hallgren, R., Elvin, A., Gerdin, B., Tufveson, G., "Hyaluronidase Ameliorates Rejection-induced Edema," *Transpl Int*, **12**, 235-243(1999).  
 12. Amar Alwitry, Sanjay Chaudhary, Keshkar Gopee, Tom K. H. Butler, Roger Holden, "Effect of Hyaluronidase on Ocular Motility in sub-Tenon's Anesthesia: Randomized Controlled Trial," *J. Cataract Refract Surg*, **28**, 1420-1423(2002).  
 13. Brown, S. M., Coats, D. K., Louise, M., Collins, Z., Underdahl, J. P., "Second Cluster of Strabismus Cases After Periocular Anesthesia Without Hyaluronidase," *J. Cataract Refract Surg*, **27**, 1872-1875(2001).  
 14. Stern, R., Frost, G. I., Csoka, A. and Wong, T. M., "Use of Human Plasma Hyaluronidase in Cancer Treatment," US patent No. 20030170243 A1(2001).  
 15. Gokcen, M., "Method and Composition for Treating Prostate Cancer," US patent, No. 20020061300A1(2002).  
 16. Modena, T., Conti, B., Genta, I., Pauanetto, F., Tira, M. E., Sini, P. and Gazzaniga, A., "Hyaluronidase-injectable Microparticles Intended for the Treatment of Extravasation," *J. Microencapsulation*, **15**(1), 85-92(1998).  
 17. Dorfman, A., "Mucopolysaccharidases," *Method. Enz.* **1**, 166

- (1955).
18. Yang, C.-H. and Srivastava, P. N., "Purification and Properties of hyaluronidase from Bull Sperm;" *J. Biological chemistry*, **250**(1), 79-83(1975).
  19. Csoka, A. B., Frost, G. I. and Stern, R., "The Six Hyaluronidase-like Genes in the Human and Mouse Genomes;" *Matrix Biology*, **20**, 499-508(2001).
  20. Meyer, M. F., Kreil, G. and Aschauer, H., "The Soluble Hyaluronidase from Bull Testes is a Fragment of the Membrane-bound PH-20 Enzyme;" *FEBS Lett*, **413**, 385-388(1997).
  21. Shi, X., Karkut, T., Chamankhah, M., Alting-Mees, M., Hemmingsen, S. M. and Hegedus, D., *Protein Expression and Purification*, **28**, 321-330(2003).