

hEPO 당쇄부위 돌연변이체 제작 및 CHO 세포로부터 변이 단백질의 생산

이풍연, 이현기, 정희경¹, 이연근, 민관식², 장원경, 이훈택³

축산기술연구소 응용생명공학과, 성균관대학교 유전공학과¹,
한경대학교 생물정보통신대학원², 건국대학교 축산학과³

사람의 erythropoietin (hEPO)는 산성 당단백질 호르몬이며 적혈구 생산의 주요조절인자로서 적혈구의 분화와 hemoglobin (Hb) 형성을 촉진하여 빈혈치료제로 이용된다. 사람 EPO는 166개 아미노산으로 구성되어 있으며, 24, 38, 83번 아미노산은 N-glycosylation에 의해, 126번 아미노산은 O-glycosylation에 의해 변형되며, 특히 N-glycosylation은 hEPO의 세포의 분비 및 활성화에 관여한다고 보고된 바 있다. 본 연구에서는 부가적인 당쇄부위 (glycosylation site)의 추가 또는 기존 당쇄 부위의 제거가 hEPO의 생산 및 분비에 미치는 영향을 조사하고자 실시하였다. 먼저, 24번, 38번, 83번, 그리고 126번 아미노산을 asparagine(또는 serine)으로부터 glutamic acid로 치환하여 당쇄 부위를 제거하기 위해, Overlapping-Extension에 의한 Site-directed mutagenesis를 수행하여 hEPO cDNA의 151~153번 염기를 AAT에서 GAA (Asn24Glu)로, 187~189번 염기를 AAT에서 GAA (Asn38Glu)로, 338~340번 염기를 AAC에서 GAA (Asn83Glu)로, 457~459번 염기를 TCA에서 GAA (Ser126Glu)로 각각 치환하였다. 또한, 69번 아미노산과 105번 아미노산을 각각 leucine으로부터 asparagine으로 치환하여 당쇄 부위를 새로 도입하기 위해, hEPO cDNA의 286-288번 염기를 CTG에서 AAC로 (Leu69Asn), 394~396번 염기를 CTC에서 AAC (Leu105Asn)로 각각 치환하였다. 이를 CHO 세포에 transfection시켜 배양한 후, 배양액을 분리하여 생산된 변이 hEPO의 양을 monoclonal antibody를 이용한 EPO-ELISA medac kit (Medac Diagnostika, Germany)로 분석하였다. 배양 상층액에 존재하는 변이 hEPO의 양은 당쇄 부위를 제거한 경우(Asn24Glu의 경우), CHO 세포에서 생산된 정상 hEPO의 양과 차이가 없었으나, 당쇄 부위를 추가한 경우 변이 hEPO의 양(3.38 IU/ml)은 CHO 세포에서 생산된 정상 hEPO(35.28 IU/ml)보다 매우 낮게 나타났다. 이러한 결과가 생산량의 감소로부터 나타난 것인지 아니면 분비량의 감소로 인한 것인지 확인하기 위한 실험을 수행 중에 있다. 또한 분비된 변이 hEPO의 활성을 측정하기 위한 실험도 수행할 예정이다.

Key words) *hEPO, glycosylation site, site-directed mutagenesis, CHO cell culture, ELISA*