

형질전환된 식물세포에서 Sucrose 농도가 hGM-CSF 생산에 미치는 영향

이진옥¹, 심두희¹, 주치언¹, 김동일², 이동근¹, 이재화^{1*}
¹신라대학교 생명공학과, ²인하대학교 생명화학공학과 생명공학과

Effects of Sucrose Concentration on the Production of hGM-CSF in Transgenic Plant Cell Suspension Culture

Jin-Ok Lee¹, Doo-Hee Shim¹, Chi-Un Joo¹, Dong-Il Kim², Dong-Geun Lee¹, Jae-Hwa Lee^{1*}

¹Department of Bioscience and Biotechnology, College of Engineering, Silla University, Busan 617-736, Korea

²Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

ABSTRACT The effects of sucrose concentration on the secretion of hGM-CSF, total protein and protease into the medium were investigated in transgenic tobacco cells. The dry cell weight (11.22 g/L), hGM-CSF (181.53 µg/L) and total protein (66.8 mg/L) were detected as highest at 30 g/L sucrose and protease activity (2660 U/L) was highest at 120 g/L sucrose after 5-day culture. However after 10-day culture, the maximum dry cell weight (28.36 g/L) was found at 60 g/L sucrose while the maximum hGM-CSF (95 µg/L) was appeared at 150 g/L sucrose. The total protein and protease activity was secreted as 52.28 mg/L and 3430 U/L, respectively in the same culture.

Key words: hGM-CSF, plant cell culture, protein secretion, sucrose, transgenic plant

서 론

식물세포배양을 이용한 이차대사산물 생산은 동물이나 미생물에 비해서 상업적으로 여러 가지 장점이 있다. 이 방법은 재조합 단백질을 생산하는데 있어 환경 친화적인 생산 방법이며, 대량 배양 시스템에서도 인체에 유해한 바이러스의 2차 감염의 문제가 없고, 생산된 재조합 단백질의 분비가 용이하여 분리정제가 쉬워 이에 대한 집중적인 연구가 수행되고 있다 (Doran 2000). 형질전환된 식물세포를 이용한 재조합 단백질의 생산은 interleukin (Magnuson et al. 1998), mGM-CSF (Lee et al. 1997), hGM-CSF (James et al. 2000), G-CSF (Hong et al. 2001), 항체 (Lacount et al. 1997), β-glucuronidase (Kurata et al. 1998) 등이 이미 보고되어 있다. 하지만 식물세포배양을 이용한 경우에는 공통적으로 생산수율이 낮은 문제점이 지적되고 있어, 이를 개선시키기 위해 다양한 연구가 진행되고 있다. 특히 hGM-CSF 생산에

관하여는 국내의 연구진에 의하여 최대 약 100 mg/L의 수율을 보고하고 있다 (Shin et al. 2003). 현재 식물세포를 이용한 재조합 단백질 생산이나 분비된 재조합 단백질을 안정화시키는 방법 등 생산수율을 증대시키는 기술개발에 대한 연구가 진행되고 있으나, 여전히 미비한 상태이다. 그러나 삼투압을 이용하여 생산물을 세포 밖으로 유도 시키거나 (Lee et al. 2002a), 단백질 안정제인 gelatin, PVP, PEG를 첨가하여 비교해본 결과, gelatin을 넣어 주었을 때 단백질 안정화가 이루어 졌던 보고도 있었다 (Ceriotti et al. 1998; Lee et al. 2002b, 2003a). 한편 세포 밖으로 분비된 단백질은 여러 protease의 공격을 쉽게 받는다는 단점이 있다 (Wright et al. 1997). 이에 재조합 단백질 생산에 있어 protease를 억제시키기 위해 억제제의 일종인 bacitracin을 이용하여 단백질 안정성에 기여한 연구도 있었다 (Lee et al. 2003b).

GM-CSF는 조혈모세포에 작용하여 백혈구의 생성을 촉진하는 당단백질로서 항암 화학요법에 따른 호중구 감소증, 재생불량성 빈혈, 골수이형성증후군, 자가골수이식, 후천성면역결핍증에 대한 임상 보고가 있으며, 특히 호중구 감소증과 골수 이식의 환자에 매우 효과적임이 보고되어

*Corresponding author Tel 051-999-5748 Fax 051-999-5636

E-mail jhalee@silla.ac.kr

있다 (Champlim et al. 1989; Antman et al. 1998).

본 연구에서는 hGM-CSF가 형질전환된 식물의 현탁세포 배양시 sucrose의 농도가 hGM-CSF의 생산에 미치는 영향을 확인하고자 농도에 따른 세포의 성장양상, hGM-CSF 안정성에 영향을 미치는 protease양, 분리정제 효율에 영향을 미칠 수 있는 분비된 총단백질량, 최종적으로 생산된 hGM-CSF를 정량적으로 조사하였다.

재료 및 방법

형질전환된 세포의 현탁배양

본 연구에서는 hGM-CSF 유전자가 도입된 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 *Nicotiana tabacum* 세포에 형질전환시킨 세포주를 사용하였다 (Kwon et al. 2003). 성장배지는 pH 5.8, 2,4-D 1 mg/L, kinetin 0.02 mg/L, kanamycin 100 mg/L을 포함한 MS 액체배지 (Murashige and Skoog 1962)에 배양하였고, 50 ml의 액체배지에 초기 세포는 생체중량으로 2.5 g을 접종하였다. 배양은 25°C, 100 rpm에서 명배양 하였고, 300 mL Erlenmeyer flask를 이용하여 배양하였다. 배양된 현탁세포를 7일 간격으로 20%의 비율로 접종하면서 계대배양하였다.

세포량 측정

배양된 현탁세포를 각 시간별로 생체중량 (wet cell weight) 과 건조중량 (dry cell weight)을 측정하였다. 생체중량은 배양액을 Whatman No.1 여과지로 거른 후 얻은 세포의 무게를 측정하였으며, 여과액은 다른 분석실험에 이용하기 위하여 보관하였다. 건조중량은 생체중량을 확인한 세포를 60°C dry oven에 넣어 무게에 변화가 없을 때까지 건조한 후 시

료채취 시간에 따른 무게 변화를 관찰하였다.

총단백질과 단백질 분해효소 활성 측정

총단백질을 분석하기 위해 Bradford assay (Bio-rad, USA) 법을 이용하여 정량하였고, protease activity는 1% casein을 포함한 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 5.8) 200 µl와 현탁세포를 여과하여 얻은 여과액 200 µl를 섞어 25°C incubator에서 2시간 반응시킨 후 0.4 M trichloroacetic acid (TCA) 600 µl을 첨가하여 상온에서 5분 반응시켜 원심분리 (6000 rpm, 5 min)하여 상층액을 회수 하였으며, 이를 280 nm에서 측정하였다 (Lee et al. 2002b). Protease activity의 unit (U)는 최종 반응액 1 mL를 280 nm에서 측정했을 때 해당하는 absorbency 값을 U/L로 환산한 값이다.

hGM-CSF 측정

배양액 5 mL의 상등액을 분리한 후에 투석과정을 통하여 염분을 제거하였다. 투석을 통하여 탈염된 배양액을 Pharmingen Inc. (San Diego, CA, U.S.A)의 ELISA 분석 kit를 사용하여 생산된 hGM-CSF를 정량 하였다. 분석 방법은 제작 회사의 표준방법을 사용하였으며, 정량을 위한 표준 hGM-CSF로서는 곤충세포 유래의 hGM-CSF (Phamingen Inc., San Diego, CA, U.S.A)를 사용하였다.

결과 및 고찰

탄소원의 농도에 따른 생산

hGM-CSF 유전자가 도입된 형질전환 담배세포의 현탁배

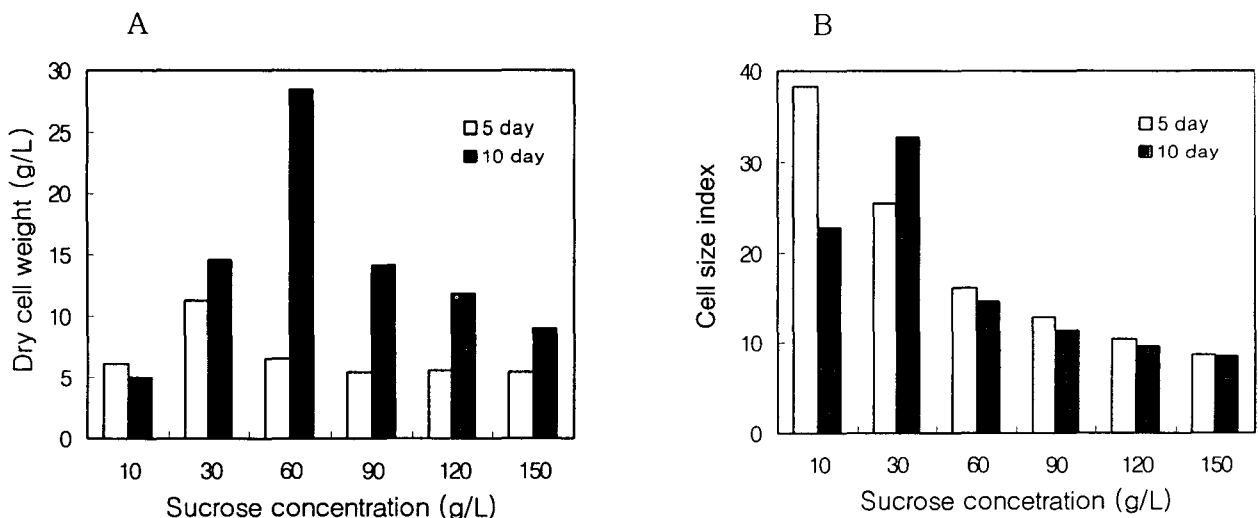


Figure 1. Effects of sucrose concentration on the dry cell weight and the cell size index during suspension culture. Cell size index was calculated by dividing wet cell weight (WCW) by dry cell weight (DCW). (A - dry cell weight, B - cell size index)

양 세포를 50 mL의 MS액체배지에서 14일 동안 현탁 배양하여 배양시간에 따른 현탁세포의 생체 및 건조중량과 cell size index를 측정하였으며 그의 결과를 Figure 1에 나타내었다. 시료채취는 hGM-CSF를 가장 많이 생산하는 5일 (대수기)과 식물세포의 생장이 최고로 달하는 10일 (지체기)을 선택하였다. 배양 5일째 세포생산량은 sucrose 농도가 30 g/L일 때 건조중량이 11.22 g/L로 가장 높았고, 이후 감소하는 경향을 나타내었다. 배양 10일째는 sucrose 농도가 60 g/L일 때 dry cell weight가 28.36 g/L로 가장 높았고, 역시 감소하는 경향을 나타내었다.

총단백질과 단백질 분해효소 활성 측정

Figure 2는 sucrose 농도를 10, 30, 60, 90, 120, 150 g/L로 변화시키면서 세포 삼투압이 총단백질과 단백질 분해효소에 미치는 효과를 나타낸 결과이다. 총단백질의 양은 배양 5일째 sucrose 농도 30 g/L일 때 66.89 mg/L, 배양 10일째는 sucrose 농도 60 g/L일 때 68.59 mg/L로 가장 높은 값을 나타내었다. 이러한 결과는 배양 초기 sucrose 농도 30 g/L는 세포가 성장함에 있어 에너지 공급원으로 가장 적절히 사용되었지만 배양 후기로 접어들면서 sucrose 농도 30 g/L는 에너지원으로 대부분 쓰여 세포 생산량에 그다지 영향을 주지 못한 것을 알 수 있었다. 반면 sucrose 농도가 60 g/L는 배양 시간이 길어짐에 따라 에너지원으로 계속 작용해 세포 생산량에 있어 크게 영향을 받는다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, sucrose 농도에 따른 세포배양액내의 단백질 분해효소의 활성을 확인한 결과 sucrose 농도가 120 g/L 일 때 5일과 10일째 모두 각각 3645, 4579 U/L로 가장 높은 값을 나타내었다. 이것은 sucrose 농도가 높아지면 protease의 활성이 높아져 생산된 hGM-CSF를 분해시킴

로서 결과적으로 hGM-CSF의 생산이 감소할 가능성이 있음을 시사하고 있다.

hGM-CSF의 정량 분석

Figure 3은 투석을 통하여 탈염된 시료를 이용하여 hGM-CSF를 ELISA kit로 정량하여 나타낸 결과이다. hGM-CSF 농도는 5일 째는 sucrose 농도 30 g/L에서 181.53 µg/L였고, 10일째는 sucrose 농도 60 g/L에서 95 µg/L로 가장 많이 생산되었다.

본 연구 결과로 볼 때 5일간의 배양에서는 sucrose농도 30 g/L가 세포 성장과 hGM-CSF 생산에 최적임을 알 수 있었다. 그러나 10일 간의 배양에서는 30g/L의 sucrose농도는 세포생장과 hGM-CSF 생산에 좋지 않음을 알 수 있었다. 이는 sucrose이 모두 에너지원 등으로 소모된 결과로 사료되었다. 한편 60 g/L의 sucrose농도는 10일간의 배양에서 세포 생산량과 hGM-CSF 생산량을 크게 증진시키는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 sucrose농도가 60 g/L를 초과하더라도 hGM-CSF 생산량의 증가도는 크지 않았고 protein 양은 감소하는 결과를 보였다.

본 연구결과에서는 배양 5일째 sucrose농도 10 g/L에서 건조중량이 최대 6.2 g/L로 나타났으며, sucrose농도 60, 90, 120, 150 g/L에서도 10 g/L에서 생산된 세포 생산량과 비교해 보았을 때 유사한 값을 나타내었다. 그러나 sucrose 농도가 30 g/L에서는 세포 생산량이 다른 당농도에 비해 약 2배로 높게 나타났다. 상기의 모든 결과를 종합하여 살펴보면 세포가 성장하는데 있어서 sucrose농도가 적거나 많으면 세포생장에 있어 좋지 않은 영향을 나타내어 식물세포배양을 이용하여 외래단백질을 생산하고자 할 때에는 sucrose의 적절한 농도가 매우 중요함을 나타내고 있다. 또

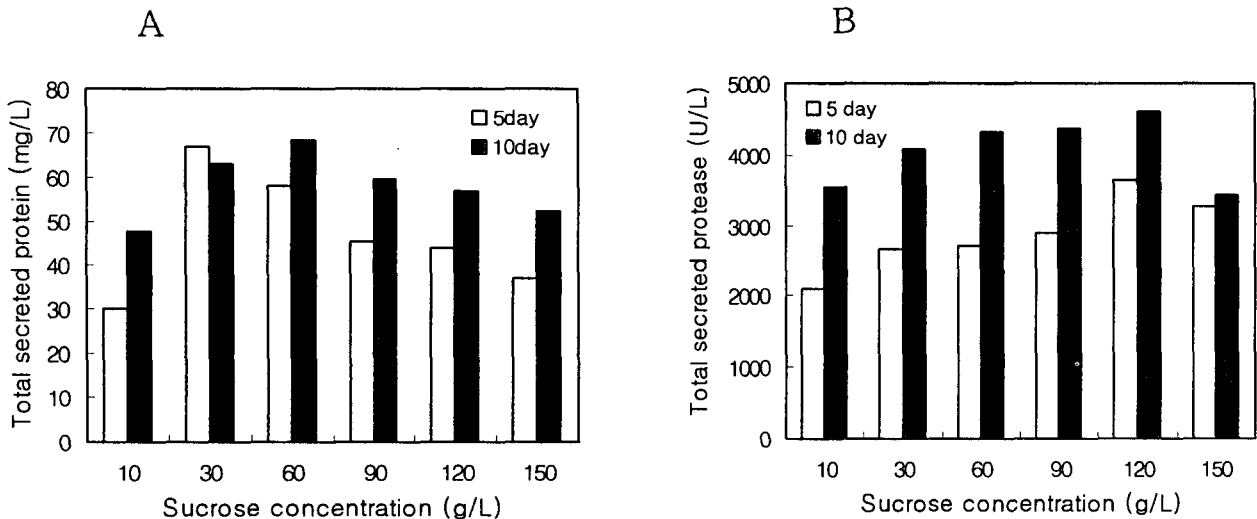


Figure 2. Effects of sucrose concentration on the secretion of total protein and protease during suspension culture. (A - total protein, B - total secreted protease).

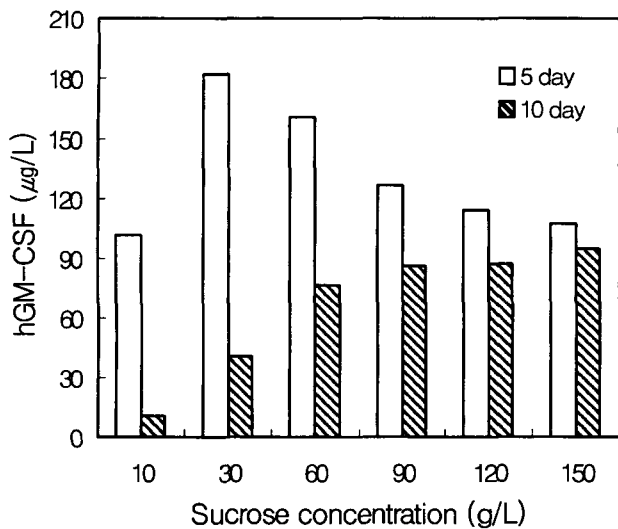


Figure 3. Effects of sucrose concentration on the secretion of hGM-CSF during suspension culture.

한, 상기의 Figure 3의 결과에서 배양 5일후 sucrose의 농도가 증가함에 따라서 hGM-CSF의 생산량이 감소한 결과도 sucrose 농도가 높아지면 protease의 활성이 높아져 생산된 hGM-CSF가 분해되어 전체적인 생산량이 감소한 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 hGM-CSF 유전자가 도입된 형질전환 담배세포에서 sucrose의 농도가 배양 배지내 분비된 hGM-CSF, 총단백질, 그리고 단백질 분해효소에 미치는 효과를 보았다. 10, 30, 60, 90, 120, 150 g/L의 sucrose 농도로 배양한 결과 sucrose농도가 30 g/L일 때 건조중량은 11.22 g/L, 분비된 hGM-CSF의 양은 181.53 µg/L, 그리고 총단백질은 66.8 mg/L로 시료채취 5일 때 가장 높은 값을 나타내었고, 단백질 분해효소는 sucrose농도가 120 g/L일 때 2660 U/L의 값을 나타내었다. 그러나 배양 10일째 sucrose농도 60 g/L에서 건조중량이 28.36 g/L로 가장 높은 값을 나타낸 반면 분비된 hGM-CSF의 최대 값은 95 µg/L로 sucrose농도가 150 g/L일 때 가장 높은 값을 나타내었다.

사 사

본 연구는 산업자원의 차세대기술개발사업에 의해 지원되었으며, 이진옥, 심두희는 부산광역시의 Brain Busan 21사업에서 인건비 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Antman KS, Griffin JD, Dlias A, Socinski MA, Ryan L, Cannistra SA, Oette D, Whitley M, 3rd Frei E, Schnipper LE (1998) Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on chemotherapy-induced myelosuppression. *J Med* 319: 593-598
- Cerioti A, Duranti M, Bollini (1998) Effects of N-glycosylation on the folding and structure of plant proteins. *J Exp Bot* 49: 1091-1103
- Champlim RE, Nimer SD, Ireland P, Oette DH, Golde DW (1989) Treatment of refractory aplastic anemia with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 73: 694-699
- Hong SY, Kwon Th, Kim OH, Lee JH, Jang YS, Yang MS (2001) Production of biologically active hGM-CSF by transgenic plant cell suspension culture. *Enzyme Microb Tech* 30: 763-767
- James EA, Wang C, Wang Z, Reeves R, Shin JH, Magnuson NS, Lee JM (2000) Production and characterization of biologically active human GM-CSF secreted by genetically modified plant cells. *Protein Expres Purifs* 19: 131-138
- Kurata H, Takemura T, Furusaki S, Kado CI (1998) Light-controlled expression of a foreign gene using the chalcone synthase promoter in tobacco BY-2 cells. *J Ferment Bioeng* 86: 317-323
- Kwon TH, Shin YM, Kim YS, Jang YS, Yang MS (2003) Secreted production of hGM-CSF with a high specific biological activity by transgenic plant cell suspension culture. *Biotechnol Bioprocess Eng* 8: 135-141
- LaCount W, An G, Lee JM (1997) The effect of polyvinylpyrrolidone (PVP) on the heavy chain monoclonal antibody production from plant suspension cultures. *Biotechnol Lett* 19: 93-96
- Lee JS, Choi SJ, Kang HS, Oh WG, Choi Kh, Kwon TH, Kim DH, Yang MS (1997) Establishment of a transgenic tobacco cell suspension culture system for producing murine granulocyte-macrophage colony stimulation factor. *Mol Cess* 7: 783-787
- Lee JH, Kim NS, Kwon TH, Yang MS (2002a) Effects of osmotic pressure on production of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in plant cell suspension culture. *Enzyme Microb Tech* 30: 768-773
- Lee JH, Kim NS, Kwon TH, Jang YS, Yang MS (2002b) Increased production of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) by the addition of stabilizing polymer in plant suspension cultures. *J Biotechnol* 96: 205-211
- Lee SY, Cho JM, and Kim DI (2003a) Stability enhancement of hGM-CSF in transgenic *Nicotiana tabacum* suspension cell cultures. *Biotechnol Bioprocess Eng* 8: 187-191
- Lee SY, Cho JM, Kim DI (2003b) Effect of bacitracin on hGM-CSF production in suspension cultures of transgenic *Nicotiana tabacum* cells. *Enzyme Microb Tech* 33: 353-357
- Magnuson NS, Linzmaier PM, Reeves R, An G, HayGlasee K,

- Lee JM (1998) Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture. *Protein Express Purif* 13: 45-52
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* 13: 473-479
- Pauline MD (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr Opin Biotech* 11: 199-204
- Wright A, Morrison SL (1997) Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering. *Trends Biotechnol* 15: 26-32

(접수일자 2004년 4월 7일, 수리일자 2004년 6월 1일)