

음이온교환 크로마토그래피를 이용한 누에체액 유래 30K 단백질의 정제와 정제된 단백질이 인간세포 배양 증식에 미치는 영향

신현종 · 정찬희 · 최용수 · 임상민 · ¹한규범 · 구윤모 · ²박태현 · †김동일
인하대학교 생물공학과 및 초정밀생물분리기술연구센터, ¹(주)한센바이오텍, ²서울대학교 화학생물공학부
(접수 : 2005. 5. 10., 게재승인 : 2005. 6. 12.)

One-step Separation of 30K Protein from the Silkworm Hemolymph by Anion-exchange Chromatography and Its Effect on the Proliferation of Human Cells

Hyun-Chong Shin, Chan-Hi Joung, Yong-Soo Choi, Sang-Min Lim, Kyuboem Han¹, Yoon-Mo Koo, Tai Hyun Park², and Dong-Il Kim†

Department of Biological Engineering and Center for Advanced Bioseparation Technology, Inha University, Incheon 402-751, Korea

¹Hanson Biotech Co., Ltd., 201 IACRI, Han Nam University, 133 Ojung-dong, Daeduk-gu, Daejeon 306-791, Korea

²School of Chemical and Biological Engineering, Seoul National University, Seoul 151-744, Korea

(Received : 2005. 5. 10., Accepted : 2005. 6. 12.)

In order to investigate the feasibility of 30K protein from silkworm (*Bombyx mori*) hemolymph (SH) on the proliferation of human cells, a simple separating procedure by anion-exchange chromatography system with Q-Sepharose fast flow gel was established. The 30K protein was eluted with an optimized condition of 0.16 M sodium chloride in 20 mM tris buffer (pH 9.0). The separated 30K protein at three concentrations of 0.04, 0.12, and 0.4 mg/ml was added to the culture medium with various human cells, such as chondrocytes, periosteum-derived cells, and MRC-5 cells, and their growth rates were measured. The cell growth rate at protein concentration of 0.4 mg/ml was always higher than that without 30K protein in all human cells tested, suggesting that the 30K protein has positive effect on the increase of the life span of human cells.

Key Words : Anion-exchange, cell proliferation, human cells, one-step separation, silkworm hemolymph, 30K protein

서 론

곤충의 체액은 오래 전부터 곤충세포배양을 위한 배지의 첨가물로써 사용되어 왔다(1). 특히 누에 (*Bombyx mori*) 체액은 baculovirus나 actinomycin D, camptothecin, 그리고 staurosporine과 같은 다양한 화학물질들에 의한 세포의 자가 사멸을 억제함으로써 세포 수명을 연장시키는 효과가 있음이 알려져 있다(2-7). 누에체액에 있는 성분 중 세포의 사멸 억제에 가장 효과가 큰 것은 '저장 단백질'이라 불리는 플라즈마 단백질인 30K 단백질로, 누에가 번데기로 탈피하는 과정

에서 작용을 하는 것으로 알려져 있다(3-8). 30K 단백질은 또한 곤충세포 뿐만 아니라 현재 의료용 재조합 단백질 생산용 호스트로 많이 사용되고 있는 Chinese hamster ovary (CHO)와 같은 동물 세포주나 human embryonic kidney cell (HEK293)과 같은 인간 유래 암 세포주에서도 세포 사멸 억제에 의한 세포의 생존 연장에 효과적으로 작용하는 것으로 보고되었다(7). 따라서 30K 단백질을 동물세포 배양용 배지의 첨가물로 이용함으로써 세포배양을 통한 단백질 의약품 등의 생산 분야에서 생산량 증가와 같은 산업적인 이용 가치 뿐만 아니라 의료용 세포 배양 분야에서도 효과가 기대되고 있다(3-7). 그러나 세포치료제 분야에서 누에체액이 인간 유래의 정상세포에 대한 세포배양용 배지 첨가물로 이용된 연구는 아직 보고된 바 없다.

30K 단백질은 기존의 문헌에서는 누에체액으로부터 겔 투과 크로마토그래피 (gel-permeable chromatography)와 이온교

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel : +82-32-860-7515, Fax : +82-32-875-0827
E-mail : kimdi@inha.ac.kr

환 크로마토그래피 (ion-exchange chromatography)를 거쳐 정제 되었으나(3), 대량 생산하기 위해서는 정제 공정을 간략화 해야 할 필요가 있다. 이온교환 크로마토그래피는 각종 시료의 전하량과 충전제의 이온 상호작용의 차이에 따라 물질을 분획하는 방법으로서 간단한 과정으로 물질을 분획할 수 있기 때문에 단백질을 분리하는데 일반적으로 널리 사용되고 있다(9-10). 따라서 다량의 시료를 빠르게 분리해 낼 수 있는 fast protein liquid chromatography (FPLC) 시스템에 이를 적용하여 누에체액 유래 30K 단백질을 생산할 수 있다면, 공정의 간략화 및 생산단계 절감 측면에서 상업적인 생산 공정으로 유용하게 사용될 수 있다(11).

본 연구에서는, 누에체액에 의한 세포 생장의 증가가 연골 세포, 골막 유래 세포, 그리고 MRC-5 세포주와 같은 인간유래 정상세포에서도 나타남을 확인하였으며, 이온교환 크로마토그래피를 이용하여 누에체액으로부터 세포 사멸 억제 효과가 가장 뛰어나다고 알려진 30K 단백질을 빠르고 간단하게 분리할 수 있는 정제 조건을 확립하고자 하였다. 분획된 단백질 또한 인간 유래 정상세포에서 세포 증식 향상 효과를 가지고 있음을 확인하여 세포치료용 의료 분야로의 적용 가능성을 살펴보았다.

재료 및 방법

누에체액 전처리

누에체액은 실온에서의 산화 및 고형화를 막고, 누에체액에 존재하는 tyrosinase에 의해 생성되는 독성 quinone 단백질 등을 제거하기 위하여 전처리 후 사용하였다. 60°C에서 30분간 열처리한 뒤, 12,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리하고 상등액을 0.22 ml filter (Millipore, France)로 여과한 액을 원액으로 하여 사용하였다(2-3).

누에체액 유래 30K 단백질의 정제 (Ion-exchange)

30K 단백질을 분리하기 위하여 ÄKTA-FPLC system (Amersham Biosciences, Sweden)을 사용하였다. XK26/40 컬럼 (Amersham Biosciences, Sweden)에 Q-Sepharose FF (Amersham Biosciences, Sweden)를 200 ml 충전하여 이온교환 컬럼을 제작하였으며 이동상으로는 20 mM trizma-base 완충액 (pH 9.0)과 1 M NaCl이 들어있는 20 mM trizma-base 완충액 (pH 9.0)을 이용하여 농도구배 크로마토그래피를 실시하였다. 유속은 2 ml/min, 280 nm UV 파장에서 단백질을 검출하였다. 피크가 검출될 때 용출액을 40 ml씩 분획하였다. 얻어진 단백질 용액은 vivaflow 50 system (10,000 MWCO RC, Sartorius, Germany)을 이용한 투석법을 이용하여 PBS로 용매를 치환함과 동시에 용액을 농축하였다.

세포 배양

인간 유래의 연골세포를 분리하기 위하여 연골 조직을 잘게 자른 후 0.2% (w/v) type II collagenase (Washington, USA)를 녹인 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, USA) 배양액에 넣어 37°C에서 12~24시간 동안 처리하였다. 단일 세포로 분리되면 phosphate buffered saline (PBS,

Gibco, USA)으로 3회 세척하고 fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA)이 10% (v/v) 첨가된 DMEM 배양액을 넣어 5% CO₂, 37°C 조건에서 배양하였다.

사람의 골막유래 세포는 수술한지 24시간 이내에 확보한 골막조직으로부터 분리하였다. 골막조직을 70% 알코올에 30초 동안 넣었다가 PBS로 3회 세척을 하고 1 × 1 mm의 작은 절편으로 자른 후 다시 PBS로 세척하여 cambium 층이 배양 dish 쪽을 향하게 놓고 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액을 넣어주었다. 5% CO₂, 37°C 조건에서 7일간 배양하면 배양 접시로 골막세포가 분리되어 증식되었다.

MRC-5 (ATCC No. CCL-171) 세포주 역시 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액을 이용하여 5% CO₂, 37°C 조건에서 배양하였다.

세포 증식에 대한 누에체액 및 정제 단백질의 영향

12-well plate에 인간 유래 정상 연골세포와 (passage 2) 골막유래 세포 (passage 4), MRC-5 세포주 (passage 19)를 각 well 당 2 × 10⁴개의 세포 수로 접종하였다. FBS가 10% 첨가된 DMEM과 FBS가 첨가되지 않은 DMEM을 배양액으로 사용하는 well을 대조군으로 하여 FBS가 첨가된 DMEM 배양액과 첨가되지 않은 DMEM 배양액에 누에체액을 각각 1, 3, 10% (v/v) 씩 처리한 well, FBS가 첨가된 DMEM 배양액과 첨가되지 않은 DMEM 배양액에 정제·농축된 30K 단백질 용액을 누에체액을 1, 3, 10% 사용하였을 때 첨가되는 30K 단백질의 양만큼 (각각 0.04, 0.12, 0.4 mg/ml) 처리한 well을 비교하였다. FBS가 첨가된 배지의 경우 누에체액이 첨가되는 비율만큼 FBS의 양은 감소시켰다.

세포 수 측정

세포 수 확인을 위해서는 MTT assay를 수행하였다. 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma)를 PBS에 2 mg/ml이 되도록 녹인 후 배지와 1 : 4의 비율로 희석하여 사용하였으며, MTT 시약을 처리한 뒤 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응 후 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma)로 MTT formazan을 녹여내고 microplate reader (M-505, Biorad, USA)를 이용하여 595 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

전기영동

분획된 단백질들과 누에체액에 존재하는 단백질들의 유형을 SDS-PAGE를 통하여 확인하였다. 단백질 시료는 95°C에서 3분간 열처리한 후 사용하였으며, 12% polyacrylamide separating gel을 사용하여 단백질 패턴을 분석하였다. 전기영동 후 젤은 Coomassie brilliant blue R250 (CBB R250, Sigma)으로 염색하였다. 단백질의 정량을 위해서는 BCATM protein assay kit (Pierce, USA)를 사용하였다.

Western blot

분획된 단백질에 30K 단백질의 존재 유무를 확인하기 위하여 Western blot을 수행하였다. 분획된 단백질은

SDS-PAGE를 통해 분리하였으며, PVDF membrane (Invitrogen, USA)으로 단백질을 이동시켰다. 1차 항체인 mouse anti-silkworm 30K protein을 5,000배 희석하여 1시간 처리 후 trizma buffered saline with tween 20 (TBST)로 3회 세척한 뒤 2차 항체로 peroxidase labeled goat anti-mouse IgG (KPL, USA)를 처리하였다. 발색을 위해서는 TMB membrane peroxidase substrate (KPL, USA)를 이용하였다.

결과 및 고찰

누에체액의 세포 증식에 대한 영향

누에체액이 인간 유래 정상세포의 증식에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 대상 세포로서 연골세포, 골막유래 세포, MRC-5 세포주를 사용하였으며, 누에체액 원액을 여러 가지로 형태로 처리하여 누에체액이 세포 증식에 미치는 영향을 확인하였다. Fig. 1에 나타난 것과 같이 누에체액이 FBS가 첨가된 배지에 1%로 들어간 경우 누에체액이 첨가되지 않은 경우 보다 모든 세포 종류에서 세포 증식이 더욱 뛰어났음을 확인 할 수 있었다. 반면에 3% 농도로 첨가된 경우에는 연골세포의 경우 누에체액이 1% 첨가된 경우와 유사한 증식률을 보였으나, 골막 유래 세포의 경우에는 누에체액이 첨가되지 않은 경우와 유사하게, MRC-5 세포주에서는 누에체액이 사용되지 않았을 때 보다 현저하게 세포 성장률이 감소하는 것을 보였다. 또한 10% 농도로 첨가된 경우에는 모든 세포주에서 누에체액이 첨가되지 않은 경우보다 낮은 세포 증식률을 보였다. FBS가 사용되지 않은 경우에는 (SFM) 실험에 사용된 세포주 모두 세포 증식이 거의 이루어지지 않았다.

누에체액 유래 30K 단백질의 정제

누에체액 성분 중에 존재하는 30K 단백질의 정제에 있어서 보다 간단하면서도 대량 정제로의 scale-up이 용이한 정제 과정을 확립하기 위하여 Q-Sepharose FF를 이용한 이온교환 크로마토그래피법을 이용하였다. 컬럼에 20 mM trizma-base (pH 9.0) 이동상으로 희석한 누에체액을 주입하고 1 M의 NaCl이 첨가된 이동상을 이용하여 선형 농도구배 크로마토그래피를 수행하였다. 얻어진 단백질 분획들을 SDS-PAGE 및 Western blot을 통해 분석하여 0.16 M NaCl의 용출조건에서 얻어진 단백질에 30K 단백질이 존재함을 확인할 수 있었다. 위의 결과를 토대로 단계별 농도구배 크로마토그래피를 실시하였고(Fig. 2), 얻어진 단백질 분획들 또한 SDS-PAGE 및 Western blot을 통해 분석하였으며(Fig. 3), F4 와 F5 분획에 30K 단백질이 포함되어 있는 것을 확인하였다. 세포 성장에 대한 효과를 확인하기 위한 실험에 사용하기 위하여 분획의 용매를 PBS로 치환, 농축하였다(Fig. 4). 이 때, 단백질 획득 수율은 62 ± 9%였다.

정제된 30K 단백질의 세포 증식에 대한 효과

얻어진 단백질 분획이 세포 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 단백질 분획을 여러 가지 형태로 세포 배양액에 첨가하였으며, 그 결과는 Fig. 5에 정리한 것과 같다.

누에체액 1% 사용시의 결과와 마찬가지로 FBS가 들어있는 배지에서 단백질이 0.04 mg/ml 농도로 첨가되었을 때 첨가되지 않은 경우보다 실험에 사용된 세 가지 세포주 모두 세포 증식에 효과적이었다.

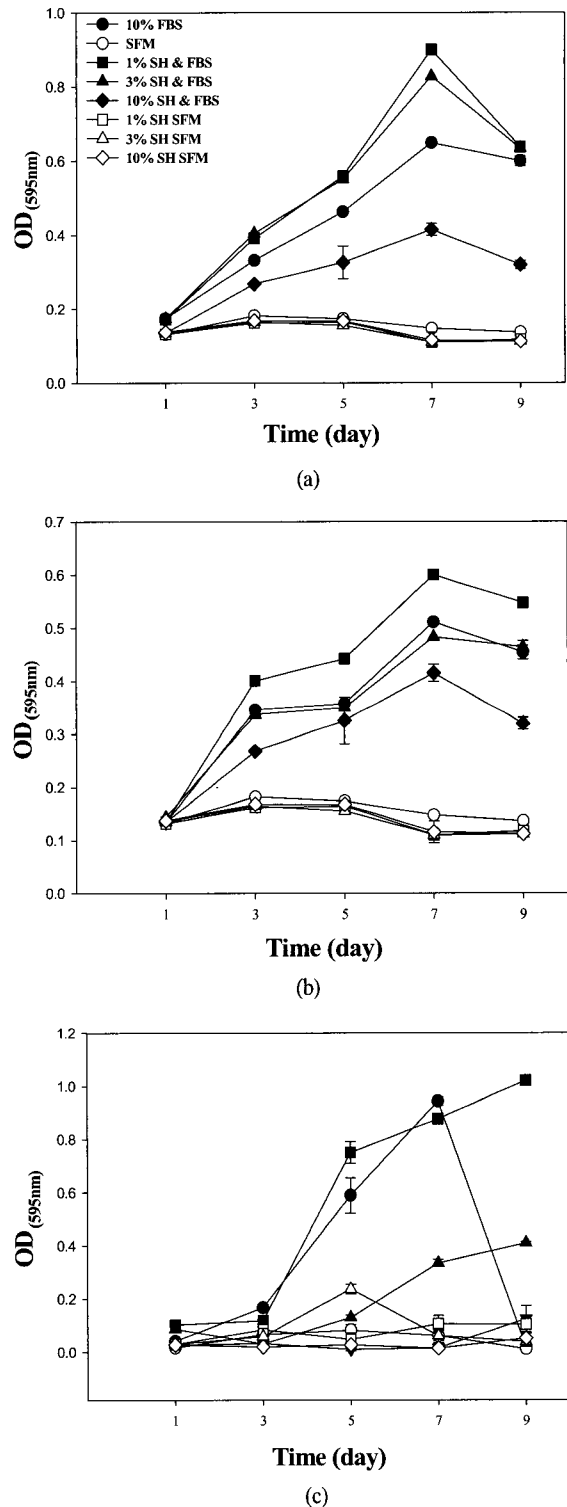


Figure 1. Effect of silkworm hemolymph (SH) on the growth of human normal cells. (a) chondrocytes, (b) periosteum-derived cells, and (c) MRC-5 cells. SFM means serum-free medium.

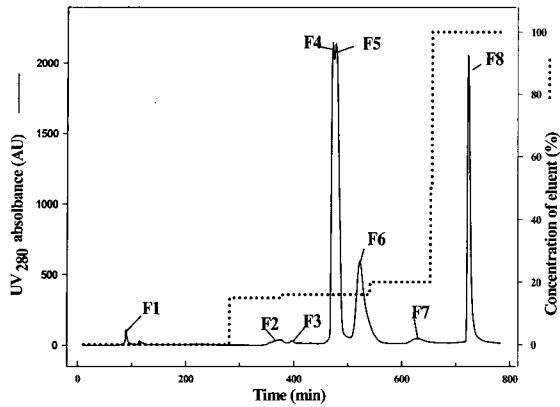


Figure 2. Stepwise gradient ion-exchange chromatography of silkworm hemolymph on Q-Sepharose FF in 20 mM trizma-base buffer(pH 9.0) with 1 M NaCl. F4 and F5 were eluted from the column at condition of 0.16 M NaCl.

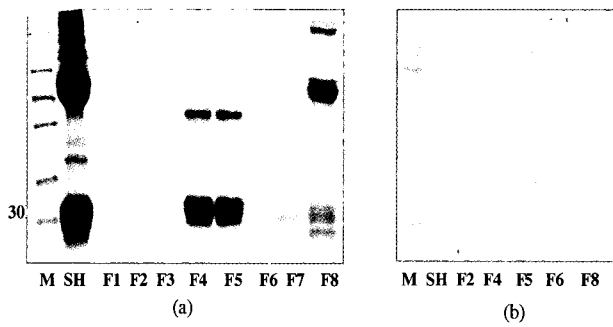


Figure 3. Analyses of separated fractions from silkworm hemolymph by ion-exchange chromatography. (a) SDS-PAGE and (b) western blot. The 30K protein was contained to the fractions of F4 and F5.

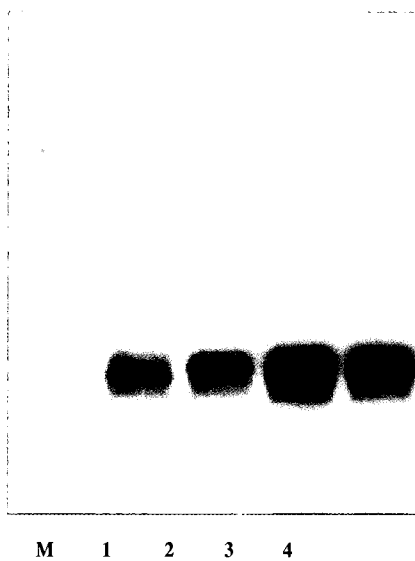
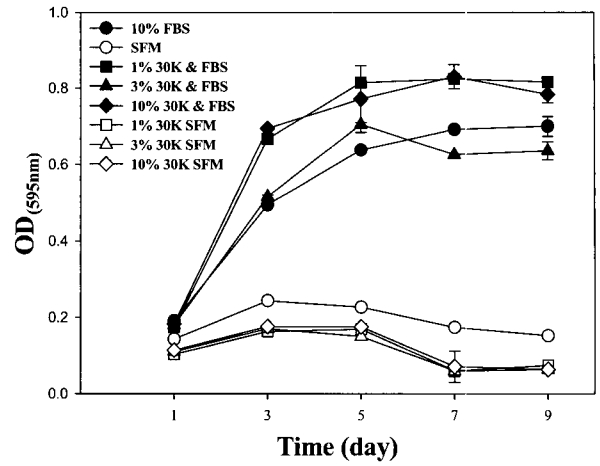
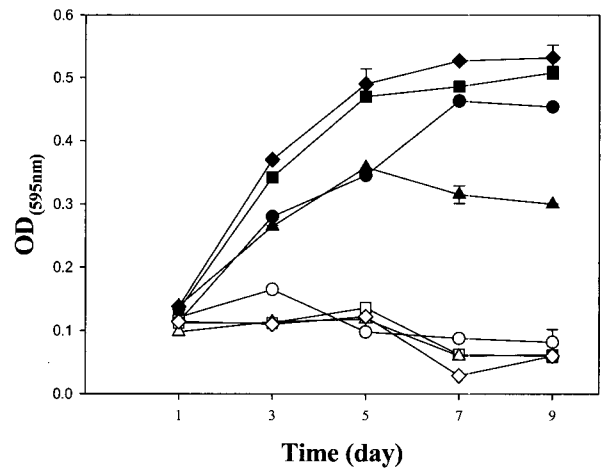


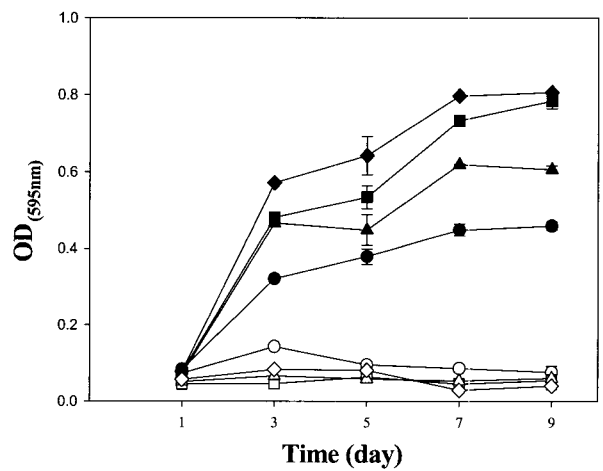
Figure 4. SDS-PAGE analysis of displaced fractions F4 and F5. lane 1, F4; lane 2, F5; lane 3, concentrated fractions (F4 and F5); lane 4, filtered fractions.



(a)



(b)



(c)

Figure 5. Effect of separated 30K protein on the growth of human normal cells. (a) chondrocytes, (b) periosteum-derived cells, and (c) MRC-5 cells.

그러나 누에체액 원액이 10% 첨가되었을 경우 첨가되지 않았을 때보다 낮은 세포 성장을 보인 것과 달리, 정제된

단백질을 0.4 mg/ml (누에체액 원액 10% 사용시 30K 단백질 함유량) 첨가하였을 때 실험에 사용된 모든 세포주에서 첨가하지 않은 경우보다 높은 세포 증식률을 보였을 뿐만 아니라 0.04 mg/ml (누에체액 1% 사용시의 함유량) 첨가하였을 때와 비슷한 세포 증식 결과를 얻었다. 0.12 mg/ml (누에체액 3% 사용시의 함유량) 첨가한 경우에는 FBS가 상대적으로 적게 들어가 0.04 mg/ml과 0.4 mg/ml 첨가된 경우 뿐만 아니라 단백질이 첨가되지 않은 경우보다 낮은 세포 성장을 보였다. FBS가 사용되지 않은 경우에는 누에체액 원액을 사용했을 때와 마찬가지로 거의 세포 증식이 이루어지지 않았다. 30K 단백질이 세포사멸을 억제하는 효과를 가지고 있음을 고려할 때 세포사멸 억제에 따른 세포 증식 향상을 위해서는 정제된 단백질이 0.04 mg/ml 농도로 배지에 첨가되는 것으로도 충분하다고 판단된다 (3-7).

이온교환 크로마토그래피로 얻어진 단백질 분획에는 세포사멸 억제효과가 높은 30K 단백질 이외에 일부 다른 단백질 또한 함께 얻어졌지만, 분획의 투석과정에서 상당 부분 제거가 되었다(Fig. 4). 또한 30K 단백질 이외의 누에체액의 다른 단백질 또한 세포사멸을 억제하는 효과가 있다고 알려진 것을 고려할 때(3), 세포증식에 대한 분획된 단백질들의 동반 상승효과가 기대되었으며 함께 포함된 단백질들이 세포 성장을 저해하지 않은 것으로 생각된다(Fig. 5). 또한 세포사멸 억제 효과를 위해 필요한 단백질의 양은 일정한 것으로 여겨지나, 누에체액에는 누에체액을 전처리하기 전에 이미 생성된 quinone 단백질이나 기타 세포의 성장을 저해하는 요소가 함께 포함되어 있어(3), 누에체액 원액을 세포배양 배지의 첨가물로 사용할 경우 Fig. 1에서 제시한 것과 같이 높은 농도일수록 세포 성장 저해 효과가 큰 것으로 보인다. 따라서 정제된 분획에는 성장 억제 요소가 상당 부분 제거되어 세포 증식이 향상된 것으로 사료된다.

요 약

누에체액 성분 중의 30K 단백질은 Q-Sepharose FF를 이용한 단계별 농도구배 이온교환 크로마토그래피로 0.16 M NaCl 용출 조건에서 쉽게 얻을 수 있었다. 얻어진 단백질을 인간유래 정상세포에 처리하여 세포 증식 향상이 확인되었고, 이는 30K 단백질이 인간을 위한 세포치료제에 이용되는 세포의 증식을 위한 첨가물로 사용될 수 있음으로써 의료 분야에의 적용 가능성을 확인하였다. 또한 본 연구를 통해 확립된 30K 단백질의 간단한 정제 공정은 향후 대량 생산 공정으로 scale-up이 용이하게 이루어질 것으로 기대된다. 이 결과들은 동물세포를 생산 숙주로 사용할 때 생산 물질 자체의 생산량 증대에도 효과적으로 이용될 수 있으며 세포치료제를 위한 세포의 증식에도 효과를 보일 수 있으므로 세포배양을 이용한 생산 공정 전반에 큰 영향을 미칠 수 있을 것이다.

감 사

본 연구는 초정밀생물분리기술연구센터 및 (주)헨슨바이오텍의 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Ha, S. H. and T. H. Park (1997), Efficient production of recombinant protein in *Spodoptera frugiperda*/AcNPV system utilizing silkworm hemolymph, *Biotechnol. Lett.* **19**, 1087-1091.
2. Rhee, W. J. and T. H. Park (2000), Silkworm hemolymph inhibits baculovirus-induced insect cell apoptosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**, 186-190.
3. Kim, E. J., W. J. Rhee, and T. H. Park (2001), Isolation and characterization of an apoptosis-inhibiting component from the hemolymph of *Bombyx mori*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 224-228.
4. Choi, S. S., W. J. Rhee, and T. H. Park (2002), Inhibition of human cell apoptosis by silkworm hemolymph, *Biotechnol. Prog.* **18**, 874-878.
5. Kim, E. J., H. J. Park, and T. H. Park (2003), Inhibition of apoptosis by recombinant 30K protein originating from silkworm hemolymph, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**, 523-528.
6. Park, H. J., E. J. Kim, T. Y. Koo, and T. H. Park (2003), Purification of anti-apoptotic recombinant 30K protein produced in *Escherichia coli* and its anti-apoptotic effect in mammalian and insect cell systems, *Enzyme Microbial Technol.* **33**, 466-471.
7. Kim, E. J., W. J. Rhee, and T. H. Park (2004), Inhibition of apoptosis by a *Bombyx mori* gene, *Biotechnol. Prog.* **20**, 324-329.
8. Izumi, S., J. Fujie, S. Yamada, and S. Tomino (1981), Molecular properties and biosynthesis of major plasma proteins in *Bombyx mori*, *Biochim. Biophys. Acta* **670**, 222-229.
9. Levison, P. R. (2003), Large-scale ion-exchange column chromatography of proteins: Comparison of different formats, *J. Chromatogr. B* **790**, 17-33.
10. Croguennec, T., F. Nau, S. Pezennec, and G. Brule (2000), Simple rapid procedure for preparation of large quantities of ovalbumin, *J. Agric. Food Chem.* **48**, 4883-4998.
11. Levison, P. R., S. E. Badger, D. W. Toome, M. Streater, and J. A. Cox (1994), Process-scale evaluation of a fast-flowing anion-exchange cellulose, *J. Chromatogr. A* **658**, 419.