

형질전환된 벼세포 배양에 있어서 삼투압 조절에 따른 hCTLA4-Ig 생산성 변화

최 성 훈 · ¹이 승 재 · 홍 석 미 · 조 지 속 · † 김 동 일
인하대학교 공과대학 생명화학공학과, ¹(주)보령제약 중앙연구소
(접수 : 2005. 3. 23., 게재승인 : 2005. 6. 24.)

Effect of Osmotic Pressure on hCTLA4-Ig Production in Transgenic Rice Cell Suspension Cultures

Sung-Hun Choi, ¹Song-Jae Lee, Seok-Mi Hong, Ji-Suk Cho, Dong-Il Kim†
Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

¹Boryung Central Research Institute, Boryung Pharmaceutical Co. Ltd., Ansan, Kyungki-Do 425-120, Korea
(Received : 2005. 3. 23., Accepted : 2005. 6. 24.)

An immunosuppressive agent, human cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (hCTLA4), is used for the prevention of graft rejection and treatment of autoimmune diseases. hCTLA4-Ig, a CTLA4-immunoglobulin fusion protein, was produced and secreted from transgenic rice cell suspension cultures using rice α -amylase (*RAmy3D*) expression system. In this system, hCTLA4-Ig expression was regulated metabolically by sugar starvation. For the purpose of improving hCTLA4-Ig production, the effects of osmotic pressure was investigated in suspension cultures of transgenic rice cells. The highest production level was achieved at 40 mM sorbitol (140 mOsm · kg⁻¹ H₂O). Using the medium with 8 mM glucose, the level of hCTLA4-Ig in the medium reached 45.3 mg/L. By adjusting the osmotic pressure of induction medium, it was found that the hCTLA4-Ig production could be increased up to 2.1-fold compared with that in batch culture.

Key Words : Osmotic pressure, sorbitol, *RAmy3D* promoter, *Oryza sativa* L., hCTLA4-Ig

서 론

유전자 재조합 기술의 발달과 계놈 프로젝트의 완성은 고부가가치의 유용 단백질 생산 산업을 더욱 부각시키게 되었고, 재조합 외래단백질 생산은 지금까지는 주로 *E. coli*, *Bacillus*, yeast, *Aspergillus*, 곤충세포와 동물세포에서 연구되어왔다(1, 2). 그러나 미생물배양을 이용한 재조합 단백질 생산은 빠른 성장속도와 높은 세포농도, 조작의 편리성과 간단한 배지조성 등으로 많은 연구가 진행되어 왔지만, 원핵세포의 특성상 진핵세포가 가지는 다양한 post-translation modification을 수행하지 못함으로써 충분한 생리활성을 지닌 단백질을 생산하기 어렵고 다량 발현시 inclusion body 형성으로 용해가 어려운 단점을 가지고 있다(3). 또한 동물세포배양에서는 post-translation modification으로 인해 높은 생리활성물질의 생산이 가능하지만, shear

stress에 의해 대량배양의 어려움과 혈청사용으로 인한 비싼 배지 가격, 분리 정제의 어려움으로 인한 높은 생산비용, 인체에 유해한 바이러스 오염 가능성 등의 단점을 가지고 있다(1).

이러한, 단점을 극복하기 위해 식물체를 이용한 연구가 대두되었으며, 식물세포를 이용한 연구도 저렴한 배지 가격, 용이한 scale-up, 바이러스나 독소의 감염성에 대한 안전성 등의 장점을 갖고 있지만, 생산된 단백질이 세포벽과 세포의 배지의 환경 등 여러 가지 장애들로 인하여 완벽하게 분비되지 못하고, 동물세포와의 미묘한 post-translation modification 차이의 문제점이 있어 이를 해결하기 위한 연구도 함께 진행되고 있다(4-7).

식물세포에서의 외래 단백질 생산은 아직까지 배가시간이 느리고 형질전환된 클론을 얻기까지 너무 오랜 시간이 걸린다. 또한, 유전자 발현의 경로를 조절하는 것이 복잡하여서 constitutive promoter인 cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter 이용한 현재의 외래 단백질 발현량은 약 0.1~1 mg/L로 동물세포에 비하여 현저히 낮은 수준이다(8, 9). 이를 보완하기 위해 inducible 시스템에서의 분자생물학적 연구가 진행되었으며, inducible 시스템의 개발

† 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

을 통하여 선단계에서는 세포생장에 초점을 맞추어 세포의 농도를 올리고 후단계에서는 단백질 생산의 최적조건을 맞추므로써 두 가지 과정을 분리해 목적 단백질의 생산성을 높일 수 있게 되었다(10). 이미 벼세포에서 당 고갈을 시점으로 목적단백질의 유전자를 발현시키는 *a-amylase* gene *Amy3D*의 inducible promoter를 이용하여 재조합 *a1-antitrypsin*의 발현수준을 수십 mg/L 이상으로 증가시키고 있다(11). 또한 담배세포에서 constitutive promoter를 이용해 수백 mg/L 수준으로 생산되던 human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF)를 벼세포를 통한 inducible promoter를 이용해 수백 mg/L 이상으로 증가시킨 보고도 있다(12).

본 연구에서는 이러한 *Amy3D* inducible promoter가 장착된 형질전환된 벼세포를 이용하여 장기이식시에 면역기능을 억제하고 자가면역질환과 같은 염증성질환을 치료하는데 사용되는 hCTLA4-Ig의 생산성을 높이는 연구를 수행하였다. 이러한 hCTLA4-Ig는 CTLA4의 C말단에 immunoglobulin (Ig)의 Fc부분을 융합시킨 단백질로서, 이러한 융합으로 CD28보다 B7에 대한 친화도가 약 20배 증가하였고, 효과적으로 CD28-B7의 결합을 억제시켜 T 세포의 활성을 저하시켰으며, 투여 후 반감기는 4~30시간 정도에서 약 4일까지 연장되었다(13, 14). 또한, 종전에 쓰이던 steroid 계열 등의 면역억제제는 비특이적 면역억제 반응에 의한 부작용 위험성이 있는 반면에 CTLA4의 경우 CD28과 B7의 결합에 의한 T 세포 활성화 과정만 선택적으로 억제하기 때문에 기존 치료제들보다 부작용을 줄일 수 있는 장점이 있다(15).

식물세포배양에서 재조합 단백질의 생산성에 영향을 주는 인자들에는 반응기의 교반속도, 형태, 통기조건 뿐만 아니라 pH, 온도, 배지 성분 농도 등이 알려져 있다(2). 이러한 생산성에 영향을 주는 인자들 가운데 배지 삼투압 변화는 세포의 생리학적 변화, 세포사멸과 세포파괴로 인한 배지내의 protease 유출과 목적단백질 분해로 목적단백질 생산 감소의 주요 원인으로 알려져 있다(2, 16, 17). 따라서 본 연구에서는 당 고갈 유도발현 시스템을 고려할 때, 여러 삼투압 조절제를 첨가하여 생장배지에 첨가했던 sucrose의 소비와 induction 배지로의 교환에서 오는 배지내의 삼투압을 조절하여 줌으로써 생산성 증대를 높이고자 하였다.

재료 및 방법

세포주

생산중대 연구에 사용된 세포주는 보령제약으로부터 분양 받은 hCTLA4-Ig를 생산하는 형질전환 벼 (*Oryza sativa* L.) 현탁 세포이며, 벼의 *a-amylase* gene family인 *RAmy3D* inducible promoter를 삽입하였고, 이 promoter는 당이 고갈된 상태에서 작동된다.

세포배양 및 배지

생장배지로는 amino acid (AA)기본배지(11)를 사용하였으

며, 탄소원으로는 30 g/L sucrose를 사용하였고, 성장조절제로는 2.0 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)와 0.2 mg/L kinetin을 사용하였다. 배지 pH는 5.8로 조절하였고, 500-mL Erlenmeyer 플라스크에 분주한 다음, 가압증기멸균하여 사용하였으며, 0.1 mg/L gibberellin (GA), 50 mg/L hygromycin과 아미노산 혼합용액 (1.0 mM glycine, 6.0 mM glutamine, 2.0 mM aspartic acid, 1.3 mM arginine)을 농축한 다음 0.2 mm membrane filter로 여과해 첨가하였다. 현탁배양은 회전식 진탕배양기에서 28°C, 120 rpm, 암조건에서 7일 간격으로 계대 배양하였다.

플라스크 배양

배지는 0.2 mm membrane filter로 여과해 100-mL Erlenmeyer 플라스크에 30 mL씩 분주하여 실험을 수행하였으며, 세포배양과 동일한 조건의 배지를 사용하였다. 효과적인 단백질을 생산하기 위한 induction을 위해서는 생장조건의 배지에서 sucrose만을 제외한 배지로 실험을 수행하였다. 배양은 28°C, 120 rpm, 암조건에서 수행하여 시료를 취하였다.

Bioreactor 배양

교반배양기를 이용한 세포배양을 위해 5-L bioreactor (Kobitech Co., Incheon, Korea)를 사용하였으며, 2 L의 working volume으로 실험을 수행하였다. 접종농도는 15% (v/v)로 하였고, 교반속도는 80 rpm을 유지하였다. 공기는 0.1 vvm으로 공급하여 28°C에서 배양하였다. Induction은 당 고갈 시점인 배양 7일째에 induction 배지로 working volume의 75%를 교환해 주었다.

세포량 측정

세포의 생장을 측정하기 위해서 dry cell weight를 측정하였다. 100-mL Erlenmeyer flask에서 배양한 현탁세포를 Buchner funnel을 이용하여 Whatman No. 1 여과지 상에서 시료의 배양액을 걸러내었다. 배지와 동량의 증류수로 2~3회 세척한 후, 진공펌프를 이용하여 수분을 제거하고 미리 무게를 측정한 weighing dish에 세포를 옮겨 담아 60°C의 건조기에서 24시간 동안 항량이 될 때까지 건조시켜 dry cell weight를 측정하였다.

당분석

배지 내의 총 당량은 HPLC를 이용하여 측정하였다. HPLC system은 영인 pump (model 910)와 Waters사의 refractive index (RI) detector를 사용하였다. Waters사의 carbohydrate column (4.6 × 250 mm)을 이용하였고 이동상으로는 acetonitrile과 water를 85 : 15의 비율로 혼합하여 1.2 mL/min의 유속으로 분석하였다.

배지내 hCTLA4-Ig 정량

배지로 분비된 hCTLA4-Ig의 양은 ELISA 분석법을 이용하여 정량하였다. Capture 항체로 Goat anti-human IgG (KPL, USA)를 사용하였으며, capture 항체와 coating 버퍼 (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6)를 1 : 1000으로

회석하여 well당 100 mL씩 분주하여 4°C overnight한 후, blocking 버퍼 (8 g/L NaCl, 0.2 g/L KH_2PO_4 , 1.15 g/L Na_2HPO_4 , 0.2 g/L KCl, 2% FBS, pH 7.4)를 well당 200 mL씩 분주하여 1~2시간 상온에서 incubation시켰다. Standard는 human IgG (Pierce, USA)를 사용하여 assay diluent를 well당 100 mL씩 분주하고 시료 및 standard 200 mL씩 넣고 1/2씩 희석하여 상온에서 2시간 incubation시켰다. Detection 항체인 peroxidase labeled goat anti-human IgG (KPL, USA)와 assay diluent를 1 : 5000으로 혼합하여 well당 100 mL씩 분주하고 상온에서 1시간 incubation한 후, ABTS peroxidase substrate (KPL, USA)를 well당 100 mL씩 분주하여 상온에서 20분 동안 incubation시켰다. 그 후 stop 버퍼를 well 당 100 mL씩 분주하여 microplate reader (Bio-Rad, USA)를 이용하여 405 nm에서 측정하였다.

총단백질 정량

총 단백질의 양은 Bio-Rad (USA)사의 Bradford assay kit을 사용하여 정량하였다. 표준물질로는 bovine serum albumin을 사용하여 microplate reader (Bio-Rad, USA)로 595 nm에서 흡광도를 측정하고 표준농도식을 구하여 이후 정량분석에 사용하였다.

Protease 활성 측정

배지 내에 존재하는 hCTLA4-Ig의 안정성에 미치는 protease의 영향을 알아보기 위해 수정된 Anson's method에 의해 protease 활성을 측정하였다(18). 1% Na-caseinate (67 mM phosphate buffer, pH 7.0) 용액 0.5 mL에 배지 시료 0.2 mL을 첨가하여 50°C에서 20분간 반응시켰다. 또한 30% TCA 용액 0.3 mL을 첨가하여 50°C에서 30분간 정치시킨 후 12,500 rpm에서 7분간 원심분리하였다. 상등액 0.5 mL을 취한 후 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 tyrosine 용액을 사용하였으며, 1 unit (U)은 위와 같은 조건에서 분당 tyrosine 1 mg이 생산되는 효소의 양으로 정의하였다.

삼투압 측정

삼투압 측정을 위해서는 Osmette Model 5002 (Fisher Scientific, PA, USA)를 사용하였으며, 측정원리는 빙점강하를 이용하여 시료의 어는점보다 1~2°C 낮은 온도로 supercooling시킨 후 vibration으로 얼음결정을 생성하여 얼음과 액체간의 평형상태를 만들어 빙점을 측정하는 방법이다. 삼투압 측정을 위해 각 시료를 2 mL씩 취한 후, 분석용 test tube를 사용하여 각각의 삼투압을 측정하였다. 시료 측정 전, 100 mOsm \cdot kg⁻¹ H₂O과 500 mOsm \cdot kg⁻¹ H₂O의 표준시료를 이용해 측정기를 보정하였다. 단위는 mOsm \cdot kg⁻¹ H₂O를 사용하였다.

결과 및 고찰

Induction 시기에 따른 영향

본 연구에서 사용된 *RAmy3D* promoter가 당 고갈에 의한

inducible 시스템인 것을 고려할 때, 세포생장의 단계에서 성장시기에 따라 각기 다른 세포와 배지조건 상태를 가지기 때문에 당이 없는 배지로의 적절한 교환시기의 결정은 목적단백질의 생산에 있어 중요하다. Fig. 1에서 볼 수 있듯이 성장곡선에 있어 대수증식기인 4일째와 7일째, 당 고갈에 의해 정지기로 들어서는 10일째를 선택하여 배지교환을 통한 인위적인 induction을 시켰다. 10일째의 induction에서는 생산 초반 다른 실험구들과 거의 같은 생산성을 보였지만, 생산기간이 길어지더라도 뚜렷한 생산증대 없이 최대 15.7 mg/L hCTLA4-Ig 생산에 그쳤다. 이는 너무 늦은 교환시기로 인하여 상대적으로 좋지 않았던 세포상태 때문으로 생각된다. 왕성한 세포생장을 하는 시기인 4일째와 7일째의 경우에는 너무 이른 시기인 4일째보다 어느 정도의 세포생장이 이루어진 7일째 교환시에 최대 32.3 mg/L hCTLA4-Ig 생산을 보였다. 이를 근거로 이후의 모든 실험은 배양 7일째 당을 제거한 배지로의 교환을 실시하여, 목적단백질인 hCTLA4-Ig 생산성을 높이고자 하였다. 플라스크 수준에서의 배지교환은 배양 7일째의 세포를 당이 없는 배지로 재접종하여 실시하였다.

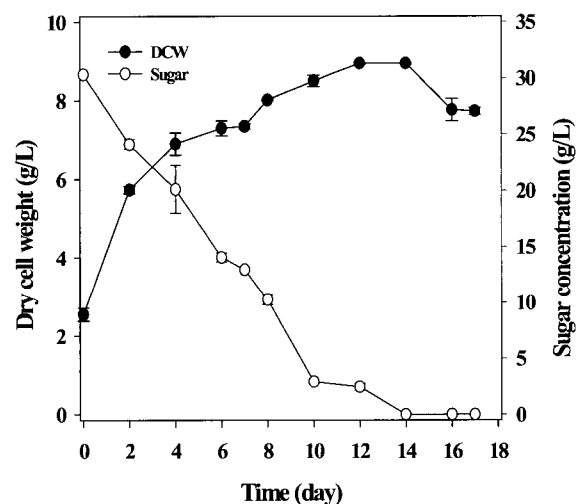


Figure 1. Time course changes of cell growth and sugar consumption during batch culture in flasks.

삼투압 조절제 종류에 따른 영향

배양 7일째, 성장배지조건에서 당만을 제외한 배지로의 교환시 mannitol, sorbitol, NaCl, KCl, PEG 3,350과 같은 삼투압 조절제를 교환 배지에 첨가해 줌으로써 보다 높은 hCTLA4-Ig 생산량을 높이고자 하였다. 적절한 삼투압 조절제 농도를 위해 성장배지의 삼투압 (180 mOsm \cdot kg⁻¹ H₂O)을 기준으로 배지에 첨가하여 실험을 진행하였다. 먼저, 배지를 교환한 이후 대조구에 속하는 AA(-S) 배지에서는 급속한 세포농도의 감소를 보였지만, mannitol과 sorbitol의 첨가에 있어서는 약간의 세포생장을 보였으며, 그 이후에도 낮은 세포농도 감소율을 보였다. Fig. 2(a)와 같이 중요한 삼투압 조절작용에 있어서는 PEG 3,350 경우를 제외하고는 안정적인 조절작용을 보여 주었다. 80 mM sorbitol에서는 약 170 mOsm \cdot kg⁻¹ H₂O 정도의 삼투압을 유지하

고, 상대적인 세포생존도에 있어서도 induction 후 5일째까지 50%의 높은 생존도와 대조구에 비해 1.5배의 생존도를 보였다. hCTLA4-Ig 생산량을 보면, Fig. 2(b)에 나타난 바와 같이 induction 초반에는 비슷한 생산량을 보이지만 1일째 이후에는 80 mM sorbitol 첨가에서 대조구와 다른 실험구에 비해 최대 1.7배의 생산량을 보였으며, 3일째 14.6 mg/L의 최대생산량을 보였다. 총단백질량에서도 다른 실험구에 비해 80 mM sorbitol 첨가시 많은 생산을 보이며, Fig. 2(b) 및 3(a)의 결과로부터 hCTLA4-Ig는 총단백질의 6%를 차지하고 있음을 알 수 있다.

Fig. 3(b)는 protease 활성을 나타내고 있는데, 80 mM sorbitol 첨가시 현저히 낮은 수치를 보였다. 이는 형질전환 벼 현탁세포 배양시 세포사멸로 인한 배지 내로 sulfhydryl

protease가 유출된다는 점을 고려할 때, 상대적으로 높았던 생존도와 더불어 삼투압 조절제로 첨가된 sorbitol이 높은 생산성을 보일 수 있었던 근거라 사료된다(19).

또한, induction 초반 약간의 세포생장을 유발하는 sorbitol은 식물세포의 조직배양이라든가 callus 생장에 있어서 탄소원의 사용으로 인하여 생장을 촉진하고 sucrose와의 복합첨가에 의해서는 더 높은 생장촉진을 유도하는 것으로 보고되고 있다(19-21).

Sorbitol 농도의 영향

배지내 삼투압을 효과적으로 조절해 줌으로써 생산성을 높였던 sorbitol에 있어서 최적의 농도 선정을 통하여 hCTLA4-Ig 생산량을 높이고자 하였다. Fig. 4(a)에서 볼 수

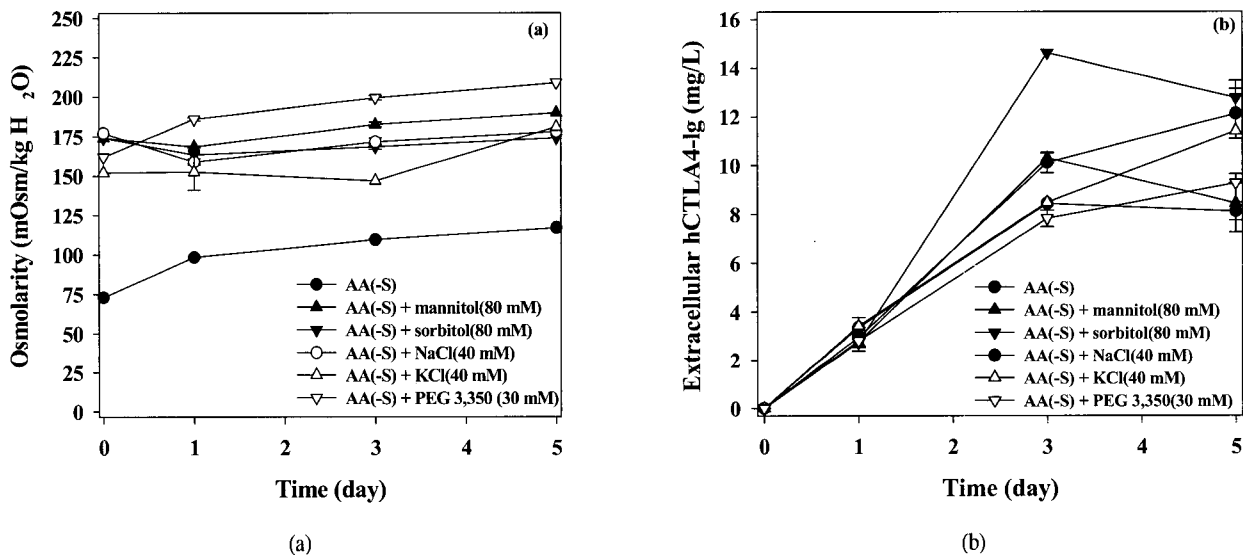


Figure 2. Comparison of osmotic effects of mannitol, sorbitol, NaCl, KCl, and PEG 3,350 on (a) medium osmolarity and (b) the production of extracellular hCTLA4-Ig after induction.

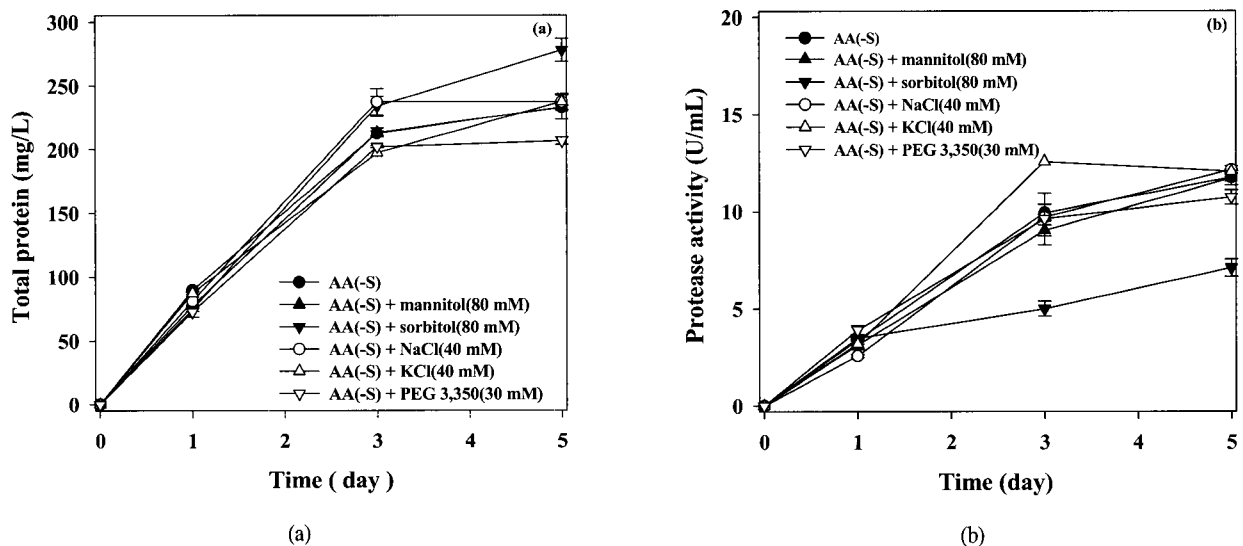


Figure 3. Comparison of osmotic effects of mannitol, sorbitol, NaCl, KCl, and PEG 3,350 on (a) total protein and (b) protease activity after induction.

있듯이 높은 농도였던 160 mM sorbitol 첨가에서는 대조구와 비슷한 생산유형을 보였다. 다른 농도에서는 induction 후 5일째까지는 비슷한 생산량을 보였지만, 5일째 이후 80, 120 mM에서는 급격한 감소를 보였다. 그러나 40 mM에서는 5일째 이후에도 증가를 보이며 최대 20 mg/L의 hCTLA4-Ig 생산을 보였다. Fig. 4(b)에서와 같이 배양 7일째 induction 시점에서의 배지 삼투압이 140 mOsm · kg⁻¹ H₂O인데, 40 mM 첨가시에는 130~150 mOsm · kg⁻¹ H₂O로 유지됨을 확인할 수 있다. 이 결과는 40 mM의 sorbitol 첨가가 배지교환시 발생하는 삼투압 스트레스를 완화시켜줌으로써 세포생존도를 더 높게 유지하게 하고 생산량도 증가시키는 것으로 사료된다.

Glucose 첨가가 미치는 영향

본 연구에서 사용한 *RAmy3D* promoter는 당 고갈에 의해 작동하여 목적단백질을 생산함을 고려하여 기초대사만이 가능할 수 있을 정도의 저농도 glucose 첨가를 통하여 세포농도를 유지해 줌으로써 생산량을 높이고자 하였고, Fig. 5에 결과를 정리하였다. Induction 이후 glucose를 첨가하는 모든 경우에 세포농도의 증가를 확인할 수 있었고, 8, 10 mM glucose에서는 다른 경우에 비해 낮은 세포농도 감소를 볼 수 있었다. hCTLA4-Ig 생산량에 있어서는, 2 mM의 경우를 제외하고는 초반에 억제를 받지만 1일째 이후부터는 급격한 생산량 증가를 보여 주었다(Fig. 5(b)). 3일째까지는 5 mM에서 가장 높은 생산량을 나타냈지만, 7일째까지 생산량을 비교해 본 결과 8 mM 경우에 최대 37.3

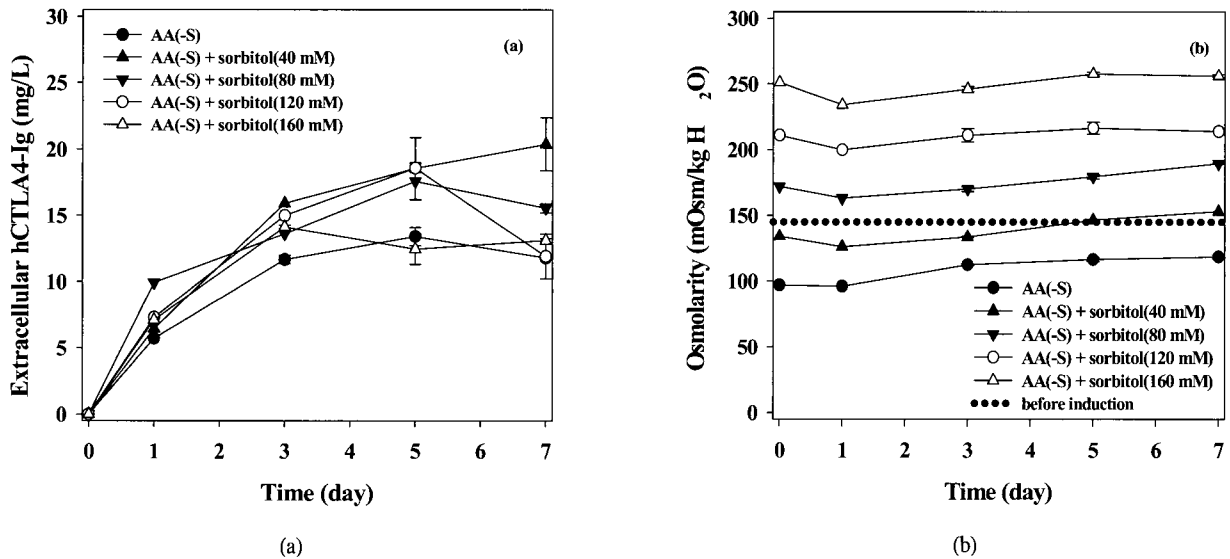


Figure 4. Effect of sorbitol concentration on (a) the production of extracellular hCTLA4-Ig and (b) medium osmolarity after induction.

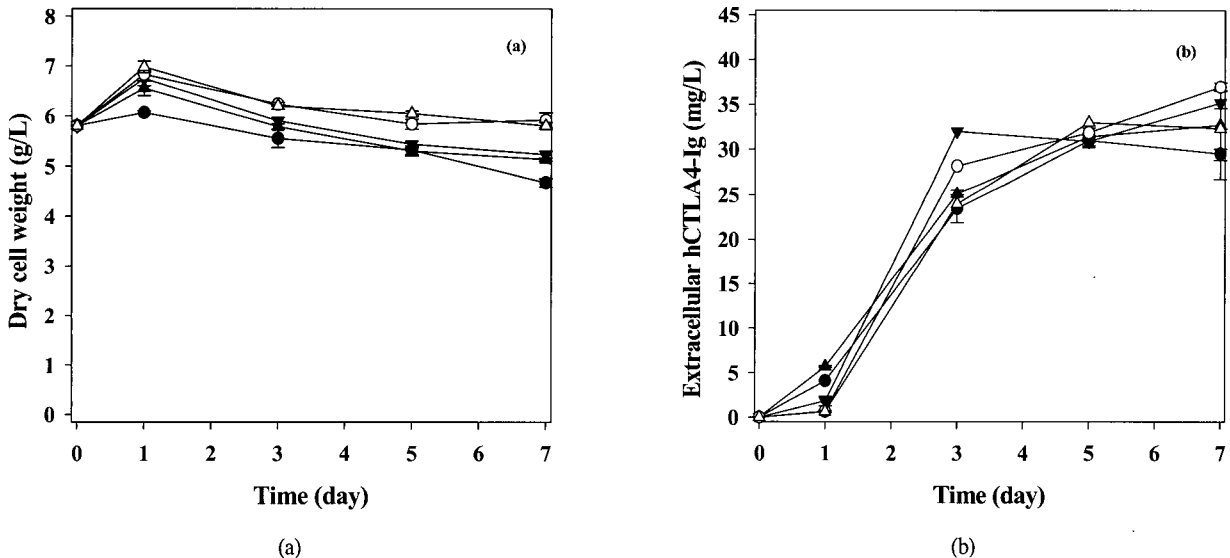


Figure 5. Effect of glucose concentration on (a) cell growth and (b) the production of extracellular hCTLA4-Ig after induction. ●, 40 mM sorbitol; ▲, 38 mM sorbitol + 2 mM glucose; ▼, 35 mM sorbitol + 5 mM glucose; ○, 32 mM sorbitol + 8 mM glucose; △, 30 mM sorbitol + 10 mM glucose.

mg/L의 생산량을 보였다. 예상과 같이 glucose 첨가로 세포 농도를 유지할 때 생산량 증대를 확인할 수 있었으며, induction시 교환해 주는 배지조성으로 AA(-S)에 32 mM sorbitol과 8 mM glucose를 첨가해 사용하기로 결정하였다. 또한, 생산 중간에 일정한 시간을 두고 저농도의 glucose를 지속적으로 첨가하는 유가식 배양을 사용함으로써 생산량을 높일 수도 있는 가능성을 제시할 수 있었다.

Bioreactor 배양

이상에서 hCTLA4-Ig의 생산량을 증가시키기 위해 얻어진 결과들을 근거로 5-L bioreactor에서 회분식 배양과 induction시의 생산량을 비교하고, 또한 scale-up 가능성을 확인하고자 하였다.

먼저, Fig. 6에 나타난 세포생장을 살펴보면 당의 자연고

갈에 의한 회분식 배양에 있어서는 약 6일 정도의 빠른 성장을 보였으며, 사멸기에도 완만한 세포농도 감소를 보였다. 배지의 pH 변화에 있어서도 사멸기에 접어드는 8일째를 기점으로 서서히 증가하다가 배양 12일째 이후 급속히 증가하여 배양 20일째에는 pH 7에 이르렀다. 생장 7일째 induction를 통한 배양에 있어서는 배양 7일째까지는 회분식 배양과 같은 성장곡선을 보였고, 배지교환 이후 급속한 세포농도감소를 보였다. pH 변화는 회분식 배양에 비해 점진적인 증가를 보였다.

hCTLA4-Ig 생산량에 있어서는, 배양 12일째 이후 pH가 급속히 증가하는 모습을 보였던 회분식 배양에서는 pH 증가와 함께 12일째 이후 생산량이 급속히 증가하여 배양 20일째 최고 21.3 mg/L의 hCTLA4-Ig 생산을 확인할 수 있었다(Fig. 7(a)). 배지내의 인위적인 당 고갈을 통하여 생산

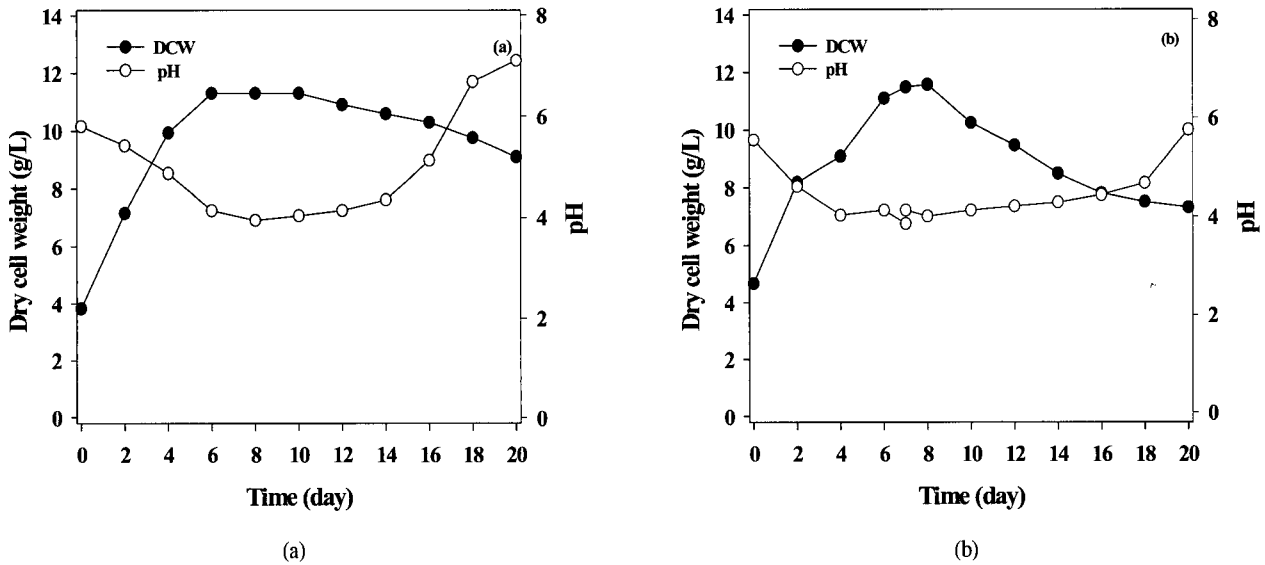


Figure 6. Comparison of transgenic *Oryza sativa* L. cell growth and pH during (a) batch culture and (b) induction in a 5-L bioreactor.

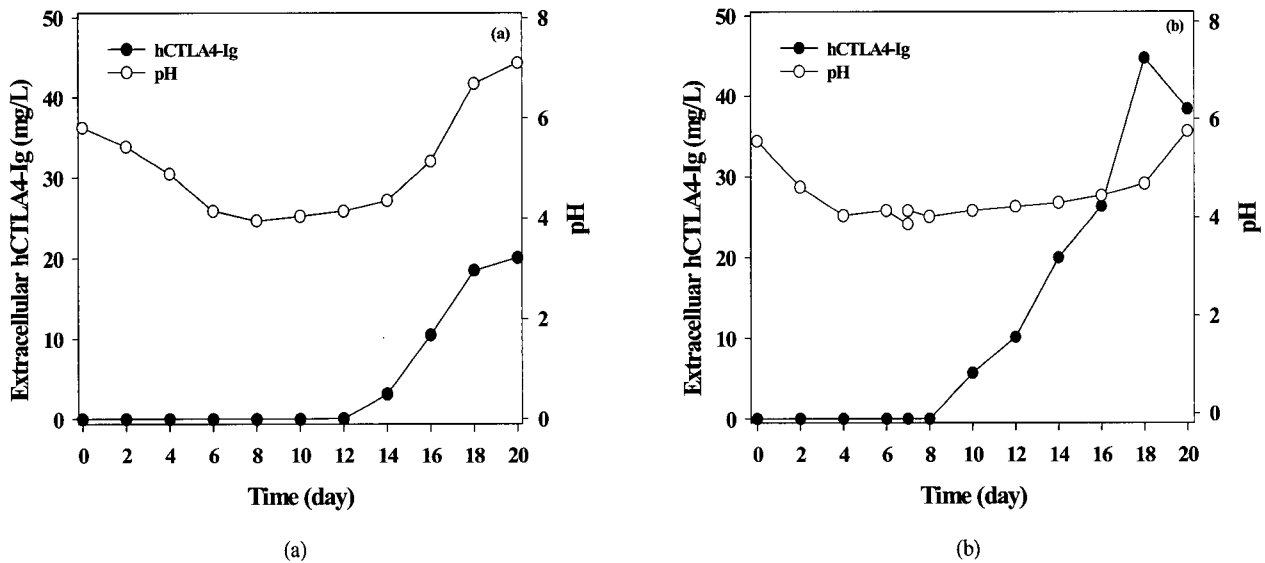


Figure 7. Time course change of extracellular hCTLA4-Ig production and pH during (a) batch culture and (b) induction in a 5-L bioreactor.

량 증대를 높이하고자 했던 induction 배양에서는 배지교환 1 일 이후부터 hCTLA4-Ig 생산을 보이면서 배양 18일째 최고 45.3 mg/L의 hCTLA4-Ig의 생산량을 보였다(Fig. 7(b)).

Bioreactor 배양을 통하여 Fig. 1에서 보았던 플라스크 배양과 비교하여 보았을 때, 더 빠른 세포생장과 1.3배 높은 세포농도를 확인할 수 있었으며, hCTLA4-Ig 생산에 있어서도 1.2배 높은 결과를 보였다. 식물세포배양에서 세포생장과 재조합 단백질의 생산성을 높이기 위해서는 적절한 pH와 기체조성, 교반조건, 통기조건 등이 중요한 인자로 작용하는데(11, 22, 23), 플라스크보다 bioreactor에서 이러한 인자들의 제어나 유지가 잘 이루어짐으로써 더 좋은 세포생장과 많은 생산량을 보인 것으로 사료된다.

또한, 회분식 배양보다는 인위적으로 induction을 시켜줌으로써 2.1배의 생산성 증대 효과를 얻을 수 있었으며, 이는 저농도 당과 함께 다른 배지성분과 당 고갈에 의해 생기는 배지내의 삼투압을 적절히 완화시켜주는 배지 공급하여 줌으로써 얻어진 결과라 생각된다.

요 약

식물세포의 느린 생장과 낮은 생산량의 이유로 지금까지는 주로 미생물이나 동물세포에서 유전자 재조합 단백질을 생산하여 왔다. 그러나 저렴한 배지 가격, 동물 유래 바이러스 감염 위험성으로부터의 안정성, glycosylation 등의 post-translational modification이 가능하다는 장점들로 인하여 최근 들어 식물세포배양은 생물학적 활성을 가진 고부가가치의 단백질을 생산하는데 많이 이용되고 있다. 본 연구에서는 성장배지에 첨가했던 sucrose의 소비와 induction 배지의 교환에서 오는 배지내의 삼투압을 조절하여 hCTLA4-Ig의 생산성을 높이하고자 하였다. 다양한 삼투압 조절제 첨가 실험을 통해 sorbitol을 선별하고, 40 mM의 sorbitol 첨가에서 상대적으로 높은 생존도와 induction 후 7일째 대조구보다 1.7배 높은 생산성을 확인하였다. 또한, 저농도의 glucose 첨가를 통한 생산성 증대에 있어서는 8 mM glucose에서 induction 이후에도 높은 세포농도를 유지하면서 최대 37.3 mg/L까지 hCTLA4-Ig 생산량을 증가시켰다. 5-L bioreactor에서 회분식 배양과 induction시의 hCTLA4-Ig 생산량을 비교한 결과 induction시 배양 18일째 최고 45.3 mg/L까지 높일 수 있었으며, 회분식 배양에 비해 2.1배 증가됨을 확인하였다.

감 사

본 논문은 산업자원부 산업기술개발사업 (과제번호 A18-014) 및 한국과학재단 지정 초정밀생물분리기술연구센터 (BSEP)의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Kusnadi, A. R., Z. L. Nikolov, and J. A. Howard (1997), Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations, *Biotechnol. Bioeng.* **56**, 473-484.
- Terashima M., Y. Ejiri, N. Hashikawa, and H. Yoshida (1999), Effect of osmotic pressure on human α_1 -antitrypsin production by plant cell culture, *Biochem. Eng. J.* **4**, 31-36.
- Buchner J. and R. Rudolph (1991), Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in *Escherichia coli*, *Biol. Technol.* **9**, 157-162.
- Doran, P. M. (2000), Foreign protein production in plant tissue cultures, *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 199-204.
- Gomord, V. and L. Faye (2004), Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants, *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 171-181.
- Matsumoto, S., K. Ikura, M. Ueda, and R. Sasaki (1995), Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells, *Plant Mol. Biol.* **27**, 1163-1172.
- Miele, L. (1997), Plants as bioreactors for biopharmaceutical: regulatory considerations, *Trends Biotechnol.* **15**, 45-50.
- James, E. A. and J. M. Lee (2001), The production of foreign protein from genetically modified plant cells, In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology- Plant Cells*, (Eds. J. J. Zhong), **72**: 127-156 Springer, Berlin, Germany.
- Sharp, J. M. and P. M. Doran (2001), Characterization of monoclonal antibody fragments produced by plant cells, *Biotechnol. Bioeng.* **73**, 338-346.
- Taka-aki U., P. Pierdomenico, F. Yuzuo, and Y. Junji (1998), Sugar sensing and α -amylase gene repression in rice embryos, *Planta* **204**, 420-428.
- Terashima M., Y. Murai, M. Kawamura, S. Nakanishi, T. Stoltz, L. Chen, W. Drohan, R. L. Rodriguez, and S. Kotoh (1999), Production of functional human α_1 -antitrypsin by plant cell culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 516-523.
- Shin, Y. J., S. Y. Hong, T. H. Kwon, Y. S. J., and M. S. Yang (2003), High Level of expression of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in transgenic rice cell suspension culture, *Biotechnol. Bioeng.* **82**, 778-783.
- Lui, V. C. H., P. K. H. Tam, M. Y. K. Leung, J. Y. B. Lau, J. K. Y. Chan, V. S. F. Chan, M. Dallman, and K. S. E. Cheah (2003), Mammary gland-specific secretion of biologically active immunosuppressive agent cytotoxic-T-lymphocyte antigen 4 human immunoglobulin fusion protein (CTLA4-IgG) in milk by transgenesis, *J. Immunol.* **277**, 171-183.
- Jeanne G. D. and A. T. Laurence (1994), New biologic immunosuppressive agents in transplantation, *Curr. Opin. Nephrol.* **3**, 596-601.
- David, E. and S. Herb (2000), Immunological disorders, *Text Book of Medicine.* **4**, 79-104.
- Terashima M., Y. Ejiri, N. Hashikawa, and H. Yoshida (2001), Utilization of an alternative carbon source for efficient production of human α_1 -antitrypsin by genetically engineered rice cell culture, *Biotechnol. Prog.* **17**, 403-406.
- Yu, S. M., Y. C. Lee, S. C. Fang, M. T. Chan, S. F. Hwa, and L. F. Liu (1996), Sugars act as signal molecules and osmotica to regulate the expression of α -amylase genes and metabolic activities in germinating cereal grains, *Plant Mol. Biol.* **30**, 1277-1289.
- Battaglino, R. A., M. Huergo, A. M. R. Pilosof, and G. B. Bartholomai (1991), Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 292-296.
- Bakos, A., M. Fari, O. Toldi, and M. Lados (1995), Plant regeneration from seeding-derived callus of dodder, *Plant Sci.* **109**, 95-101.
- AL-Khayri, J. M. and A. M. Bahrany (2002), Callus growth and proline accumulation in response to sorbitol and sucrose-induced osmotic stress in rice, *Biol. Planta* **45**(4), 609-611.
- Kadota, M., K. Imizu, and T. Hiano (2001), Double-phase in vitro culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear, *Scientia Horticulturae* **89**, 207-215.
- Sajc, L., D. Grubisic, and G. Vunjak-Novakovic (2000), Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research, *Biochem. Eng. J.* **4**, 89-99.
- Terashima M., N. Hashikawa, M. Hattori, and H. Yoshida (2002), Growth characteristic of rice cell genetically modified for recombinant human α_1 -antitrypsin production, *Biochem. Eng. J.* **12**, 155-160.