

Production of Recombinant Protein, Human Stem Cell Factor, Using Insect Cell Line

Sang-Mi Park¹, Kisang Kwon¹, Tae Won Goo², Eun Young Yun², Seok Woo Kang²,
Sung Wan Kim³, Kweon Yu⁴ and O-Yu Kwon^{1,†}

¹Department of Anatomy, Graduate School of Medicine, Chungnam National University Taejon 301-747, Korea

²Department of Agricultural Biology, NIAST, RDA61, Suwon 441-100, Korea

³Department of Emergency Medicine, Chungnam National University Hospital Taejon 301-721, Korea

⁴Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-333, Korea

Insect cell cultures have become important tools in the production of biological substances for use in a variety of research, human and veterinary medicine, and pest control applications. These applications often require the introduction of foreign DNA into the cells and have generally used methods originally developed for use with human and other mammalian cell cultures. While these methods can be successfully employed, they are often less efficient with insect cells and frequently involve complex procedures or require specialized equipment. Even when they do work, they may require substantial modification because of differences in the culture medium or growth patterns of insect cells. In this study, We have optimized transfection conditions of Sf9 cell line using insect expression vector pIZT/V5-His which expresses green fluorescent protein effectively. Human stem cell factor (hSCF) is a glycoprotein that plays a key role in hematopoiesis acting both as a positive and negative regulator, often in synergy with other cytokines. It also plays a key role in mast cell development, gametogenesis, and melanogenesis. It can exist in membrane-bound form and in proteolytically released soluble form. As determined by an enzyme-linked immunosorbent assay performed, hSCF level in supernatant averaged 995 ng/ml. The human hSCF was partially purified by immunoaffinity chromatography and analyzed with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting. The results show that the hSCF has N-linked carbohydrate and corresponds to the soluble form, at or about 223 amino acids in length. The findings suggest functional importance for soluble hSCF in cells.

Key Words: Insect cell (Sf9), Human stem cell factor (hSCF)

서 론

최근의 생명공학 및 의약품의 발달로 인간에게 사용할 수 있는 생체활성물질은 배양세포에서 재조합 단백질 형태로 생산되어 단백질 치료제로 사용하고 있다. 단백질 치료제로서 시장성이 높은 재조합 단백질의 대부분은 체액성 단백질 (분비 단백질)이며, 이 단백질들은 숙주세포의 secretory process에 의해서 발현된다 (Berg et al., 1993; Doyon, 2002; Fiedler and Simons, 1995; Flesher et al.,

1995; Tang et al., 1999).

재조합 단백질의 생산을 위한 발현을 위해 숙주로서 포유동물세포에 초점을 맞추어, 유일하게 포유동물세포만이 정확한 번역 후 변형과정 (post-translational modification process)을 수행할 수 있으므로 치료적 가치가 높은 대부분의 단백질에 대하여 고유의 생체활성을 나타내게 할 수 있다고 판단하였다. 그러나 포유동물세포를 이용하여 재조합 단백질 생산을 위한 숙주로 사용할 경우에는 포유동물세포를 배양하고 유지하기 위한 포유동물 유래의 배양에 필수적인 호르몬과 생장조절물질이 다량으로 필요함으로써 상당한 비용이 요구되어 경제적인 해결을 요한다. 따라서 포유동물세포와 유사한 번역 후 변형과정을 가지면서 저비용으로 재조합 단백질을 생산할 수 있는 새로운 생산 시스템이 탐색되었는데, 최근에 곤충생체 및 곤충세포가 주목을 받고 있다 (Possee, 1997). 의약

*논문 접수: 2009년 2월 5일

수정재접수: 2009년 3월 9일

†교신저자: 권오유, (우)301-747 대전광역시 중구 문화동6,

충남대학교 의과대학 해부학교실

Tel: 042-580-8206, Fax: 042-586-4800

e-mail: oykwon@cnu.ac.kr

품으로 많이 사용되는 인간 단백질의 대량 생산은 학문적 요구뿐 아니라 실생활적인 측면에 있어서도 매우 중요한 문제이다. 직접 추출로 인한 생산에는 양과 비용에 있어서 한계가 있으므로 유전자 조작을 통해 다른 세포 시스템에서 생산하는 방법을 많이 사용한다. 대장균의 경우 대량 생산이 가능하나 인간 단백질의 복잡한 3차 구조를 제대로 갖추지 못하고, 인간세포와 같은 동물세포는 그 반대로 단백질의 구조와 기능은 정상적으로 발현되지만 생산할 수 있는 양이 많지 않다. 따라서 생산량은 동물세포보다 많으면서 단백질의 구조를 어느 정도 갖추고 있는 중간 단계인 곤충세포 시스템을 대안으로 하여 연구가 진행되고 있다. 여러 가지 곤충세포 시스템이 있지만 이 중에서 세포가 비교적 안정적이며 지속적인 생산이 가능한 거염나방 (*Spodoptera frugiperda*; fall armyworm) 번데기의 ovary에서 수립된 Sf9 세포를 선택하였고 목적 단백질로는 주로 조혈촉진인자 중 가장 초기의 조혈전구세포에 작용하는 인자로 알려져 있는 Human Stem Cell Factor (hSCF)를 사용하였다.

hSCF는 c-kit protooncogene 즉, 세포분열을 가속시키거나 억제시키는 등 세포분열에 관련된 유전자에 의해 생성되는 tyrosine kinase 및 수용체의 ligand로서, mast cell growth factor, c-kit ligand, steel factor 등으로도 불린다 (Besmer, 1997; Broudy, 1997; Galli et al., 1994). c-kit 수용체는 초기 조혈전구세포, 비만세포, 멜라닌세포 등에서 발견되며, 다른 조혈촉진인자처럼 다능성 조혈모세포 뿐 아니라 더 성숙한 조혈세포에도 영향을 미친다 (Lev et al., 1994; Martin et al., 1990; Zsebo et al., 1990). 사람에서는 soluble glycoprotein 또는 골수 간질세포의 세포의 세포막에 붙은 형태의 두 가지로 존재한다 (Lu et al., 1995). hSCF 단독으로는 골수세포에 별 영향을 주지 않으나 다른 조혈촉진인자와 더불어 골수구, 적혈구, 거핵구 계열 세포집락의 숫자와 크기를 증가시키고, 정화된 전구세포에 직접 작용하는 것이 확인되었다 (Dexter and Spooner, 1987; Wu et al., 1995). 현재 체외에서 조혈모세포를 증폭시키는데 이용되는 여러 종류의 cytokine cocktail에는 대개 hSCF가 포함되어 있다 (Bruno et al., 1987; Gabbianelli et al., 1995; Metcalf, 1993). 또한, hSCF는 kit-tyrosine kinase receptor를 가진 피부의 비만세포와 멜라닌세포의 성숙과 증식을 조절하는 물질로서 상피에서 유래한 또는 간엽에서 유래한 hSCF에 반응을 한다. 이러한 인자들을 면역염색하면 생장기 모낭에서 강한 면역반응을 나타내며, 주로 색소침착부위나 진피유두에 강한 양성반응을 나타낸다

하였고 털의 성장주기에 의존적으로 강하게 반응을 한다고 하였다 (Peters et al., 2003).

합성된 유용 단백질을 세포막 밖으로 분비시키는 방법은 재조합 단백질의 생산 측면에서 많은 장점이 있기 때문에 재조합 단백질을 효과적으로 분비시키기 위한 연구가 많이 이루어졌다. 과도 발현된 외래 단백질과 숙주세포의 단백질 합성 저해는 결과적으로 단백질 분비를 위한 단백질 고차구조 형성촉진인자인 molecular chaperone 이나 foldase의 공급을 제한하기 때문에 세포 내 생산된 외래 단백질에 비하여 훨씬 적은 양의 외래 단백질만이 세포 외로 분비된다 (Frard et al., 2000; Jarvis and Garcia, 1994; Zapun et al., 1999).

본 실험에서는 곤충세포를 발현백터 시스템으로 구축하여 조혈촉진인자 중 가장 초기의 조혈전구세포에 작용하는 인자의 역할을 하는 hSCF를 재조합 단백질로 생산하는 것을 목표로 하였다. 발현백터에서 형광표지로 형광 현미경으로 목표하고자 하는 유전자가 발현되었음을 가시적으로 확인하여 screening하였으며, RT-PCR과 면역학적 분석으로 재조합 단백질의 발현을 검증하였다. 곤충세포에서 hSCF 발현이 확인된 세포주를 확립하였다. 곤충세포에 발현된 hSCF의 당단백질 확인 및 그 특성을 알아보기 위해 소포체에서 당화 초기 단계에 당화가 일어나지 못하게 저해하는 역할의 tunicamycin을 처리하였다. 그 결과 tunicamycin 처리 후, 대조구에 비하여 세포 내에서의 발현은 확인되었으나 세포 밖으로 발현 단백질의 분비가 이루어지지 않은 것으로 보아 hSCF는 당쇄를 형성하여 분비되는 단백질이며 glycoprotein임을 증명하였다. 세포 내에서 세포 밖으로 발현 단백질의 분비되는 시간과 그 활성을 측정하는 실험을 수행하여 곤충세포에서 hSCF는 약 10분 경과 후부터 분비가 시작되어 1시간 이후부터는 완벽하게 분비가 활성화됨을 알 수 있었다. 곤충세포에서 발현된 hSCF의 분비된 단백질을 발현백터의 His-tag을 이용하여 Ni⁺ 친화력으로 column을 통한 순수 분리를 하였다.

재료 및 방법

1. 재조합 발현백터의 제작 및 구축

SCF의 재조합 발현백터를 제작하기 위하여 human stem cell factor (Accession No. BC074725) 유전자의 sense primer는 5'-CTG GTA CCC ATG AAG AAG ACA CAA ACT-3'으로 Kozak의 법칙 (Kozak, 1999)을 고려하여 번역 개시 코

돈을 포함하여 합성하였으며, antisense primer는 5'- CTG ATA TCC ACT TCT TGA AAC TCT CTC T -3'으로 벡터의 His-tag 발현을 고려하여 번역 종결 코돈을 제외하여 합성하였다. PCR 반응에 의해 open reading frame (ORF)에서 DNA 절편을 증폭시킨 후, pGEMT 벡터 (Promega, USA)에 cloning하여 pGEMT-hSCF를 제작하였다. 이 때 PCR 반응 조건은 94°C에서 5분 동안 초기 변성을 시켜준 후 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 40초로 29회 반복한 후 마지막 합성은 72°C에서 5분으로 수행하였다. pGEMT-hSCF의 *Kpn* I와 *EcoR* V 제한효소 부위의 DNA 절편을 전이 벡터인 pIB/V5-His와 pIZT/V5-His (Invitrogen, USA)의 *Kpn* I과 *EcoR* V 제한효소 부위 사이에 삽입하여 hSCF 재조합 발현벡터인 각각 pIB-hSCF와 pIZT-hSCF를 제작하였다.

2. 세포 배양

재조합 단백질을 발현시키기 위해 거염나방 (*Spodoptera frugiperda*; fall armyworm) 번데기의 난소 (ovary)조직에서 수립된 Sf9 곤충세포주를 농진청에서 분양받았다. 곤충세포는 10% (v/v) Fetal bovine serum (GIBCO)와 1% Antibiotics-Antimycotics Solution (WelGENE, Korea)이 첨가된 Grace's Insect Medium (WelGENE) 배양액으로 26°C 세포 배양기에서 습도 90%를 유지시켜 배양하였다. 부착세포 형태의 세포이므로 계대 배양 시 scrapper를 이용하여 배양용기에서 분리시킨 후 원심분리한 후 세포와 배양액을 부유시켜주는 방식으로 5~6일 간격으로 계대 배양하였다.

3. 곤충세포주에 재조합 발현벡터 도입

재조합 단백질을 생산하기 위해 세포주의 계대 배양 직후 재조합 발현벡터 4 µg과 transfection reagent인 Lipofectin Reagent (Invitrogen) 2 µl를 serum free 배양액에서 최종 25 µl이 되도록 하여 잘 혼합하여 상온에서 15분 동안 반응시킨 후, 세포 배양액에 첨가하였다. 세포주에 transfection 후, 48시간 후 pIB-hSCF는 pIB/V5-His 벡터의 Blastcidin에 대하여 항생제 저항성을 가지고 있으므로 10 µg/ml로 배양액에 처리하였으며, pIZT-hSCF는 pIZT/V5-His 벡터에 Zeocin 내성을 갖고 있어 100 µg/ml의 농도로 처리하여 각각의 재조합 발현세포주를 선별하였다.

4. RNA 추출 및 RT-PCR

재조합 발현벡터 도입의 발현을 확인하기 위해 형질전

환 곤충세포주에서 RNA isolation reagent (TRI-REAGENT)를 이용하여 배양세포의 전체 RNA를 분리하였다. 세포 배양 plate에 배양된 부착세포의 배양액을 가볍게 흡입 제거시키고 찌꺼기나 불순물의 제거를 위해 PBS로 세척해 준 다음 TRI-reagent 시약인 페놀과 guanidinium isothiocyanate의 단일상 용액을 500 µl를 넣은 뒤 반복적으로 피펫팅에 의해 용해시켜 세포에서 DNA와 RNA를 분리시켜주고 실온에서 5분간 숙성시켰다. Scrapper를 이용하여 부착되어 있는 세포를 회수하여 chloroform에 의해 RNA를 제외한 DNA와 protein이 응집되면 (100 µl/500 µl of TRI-reagent) 12,000 rpm에서 15분간 원심분리해서 상대적으로 무거운 TRI-reagent와 DNA, protein 등을 아래로 침전시킨다. 무색의 상부 수용액은 깨끗한 시험관에 옮긴 후 500 µl의 isopropanol을 첨가하여 RNA를 침전시켰다. 이후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리시켜 RNA pellets을 얻은 다음 75% ethanol을 이용하여 2회 세척 후 RNA pellet을 건조시켜 DEPC 처리된 증류수로 용해시켰다. 위의 모든 RNA 처리과정 시 원심분리기의 조건 및 시료의 처리 시 얼음에 시험관을 두고 처리하여 4°C를 유지하도록 수행하였다. RNA 산출량은 260 nm에서 최종용액의 흡광도를 측정함으로써 계산하였다. 총 RNA (3 µg)와 2 µl의 oligo dT를 혼합하여 80°C에서 3분간 배양시킨 후 얼음을 이용하여 즉시 냉각하였다. M-MLV (Promega, USA)를 이용하여 10 × buffer 3 µl, 0.1 M DTT, 10 mM dNTP, reverse transcriptase와 RNase inhibitor를 넣고 반응 용량을 DEPC 처리된 증류수를 이용하여 30 µl로 보정하였다.

역전사반응은 42°C에서 90분간, RTase 비활성화 반응은 94°C에서 2분간 수행하였으며 이후 4°C에서 보관하였다. 위의 과정에 의해 합성된 cDNA는 MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (BIO-RAD, USA) PCR 기기를 이용하여 RT-PCR을 수행하였으며 주형으로는 재조합 발현벡터의 제작에서 사용된 primer와 함께 합성된다. RT-PCR의 반응 조건은 94°C에서 5분 동안 초기 변성을 시켜준 후 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 40초로 29회 반복한 후 마지막 합성은 72°C에서 5분으로 수행하였다. 증폭된 PCR 산물을 1% agarose gel에 전기영동시켜 확인하였다.

5. Fluorescence image 관찰

pIZT/V5-His 벡터를 이용한 pIZT-hSCF는 green fluorescence protein (GFP) 표지를 가지고 있어 형광현미경

(OLYMPUS DP70)으로 대조군과 비교하여 발현된 세포주의 형광 상을 관찰하였다.

6. Western blot 분석

형질전환 곤충세포주의 hSCF 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여 형질전환 곤충세포주를 회수하여 단백질 전기영동을 하였다. 세포 배양액을 모아서 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 취하여 2배 농도의 단백질 시료 용액 (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue)을 혼합하고 100°C에서 10분간 가열하여 시료를 준비하고 이를 protein electrophoresis kit (ATTO Co., Japan)을 이용하여 10% SDS-PAGE에 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 후 semi dry transfer kit (Bio-RAD)를 이용하여 PVDF membrane (PALL corporation)에 transfer buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM glycine, 20% methanol, pH 8.3)를 사용하여 1시간 30분 동안 transfer하였다. Transfer 후 membrane을 blocking buffer (1 × PBS, 0.05% Tween-20, 3% skim milk)에 사용하여 상온에서 1시간 동안 담근 후 1차 항체를 처리하고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. Primary antibody 반응 후 PBST (1 × PBS, 0.05% Tween-20)로 10분씩 3회 세척하였으며 HRP-linked anti-mouse IgG secondary antibody를 1:2,000의 비율로 희석하여 상온에서 1시간 처리하였다. 반응 후 10분씩 5회 세척한 후, West save (Lab Frontier, Korea)을 이용하여 발색시키고 X-ray film에 감광시켰다.

7. hSCF의 당화 분석

Tunicamycin은 소포체에서 당화 초기 단계에서 N-linked glycosylation을 저해하는 약품이다. 목적하는 유전자에서 번역된 단백질에 당화가 일어나는 당단백질인지 확인하기 위하여 곤충세포에 발현된 hSCF의 세포에 실험군을 일정한 세포수로 6 well plate에 2 ml의 배양액으로 $4\sim 5 \times 10^5$ cells를 seeding하여 실험당일 85~95% confluent 되도록 배양하였다. 실험 전 serum free 배양액 (EXPRESS FIVE® SFM, Invitrogen)으로 14~16시간 전 처리한 후 대조군에는 정상 배양액을 처리하고 실험군에는 20 μ g/ml의 tunicamycin을 배양액에 처리한 후 4시간 동안 배양하였다. 처리 후 western blot 분석을 수행하기 위해 부착 세포 부분과 상층액 부분으로 나누어 각각의 시료를 회수하여 2배 농도의 단백질 시료 용액을 즉시 처리하였다.

8. Enzyme-linked immunoadsorbant assay

hSCF의 활성 및 정량적 분석은 Human SCF ELISA Kit (KOMA MIOTECH, Korea)를 사용하여 수행하였다. 96 well ELISA plate에 coating 항체와 coating buffer (50 mM carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6)를 1:100의 비율로 희석한 후 100 μ l씩 각각의 well에 분주하여 4°C에서 overnight coating하였다. 반응 후 PBST (1 × PBS, 0.1% Tween-20)로 3회 세척한 후 blocking solution (10 mM phosphate, 0.14 M NaCl, 1% BSA, pH 7.4)을 200 μ l 분주하여 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 다시 PBST를 이용하여 세척해 주고 standard protein을 assay diluent (10 mM phosphate, 0.14 M NaCl, 0.1% BSA, pH 7.4)를 이용하여 각 단계마다 순차적으로 희석시켜 농도별 standard protein과 목적하는 시료를 100 μ l 넣고 상온에서 3시간 반응시켰다. 반응 후 PBST로 충분히 세척하여 주고 0.5 μ g/ml의 detection antibody (biotinylated rabbit anti-human SCF)를 100 μ l씩 분주하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 PBST로 3회 세척해 주고 avidin-HRP를 1:2,000으로 희석시켜 각각의 well에 넣어준 후 상온에서 40분간 반응시켜주고 마지막으로 PBST로 세척하였다. TMB 발색시약을 100 μ l 넣고 상온에서 약 10분간 교반하여 반응시켜주고 2 M H₂SO₄로 반응을 정지시켜주고 곧바로 microtiter plate reader를 이용하여 450 nm의 파장에서 읽어주고 540 nm 까지 보정하여 측정하였다. 위의 실험은 실험의 재현성을 위해 4회 반복 실험하였다.

9. hSCF의 발현 및 순수분리

곤충세포를 발현벡터로 한 hSCF의 분비된 단백질을 순수분리하기 위하여 Ni-NTA agarose beads (Qiagen)를 사용하여 단백질의 발현벡터의 C-말단부위에 6 × His tag 부위를 이용한 순수분리를 수행하였다. 가용성의 단백질로 nature condition의 실험으로 Ni-NTA resin을 column에 packing한 후 10 mM imidazole buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)를 이용하여 평형을 유지시켜주고 packing 완료가 되면 5 CV (column volume)으로 10 mM imidazole 용액을 흘려주었다. 계대 배양 후 3일된 발현세포의 배양액의 상층액을 약 25~30 ml 얻어 상층액에 다른 부유물질이 없도록 약하게 원심분리한 후의 시료만을 column에 흘려준다. Column을 통과한 시료들은 모두 4°C로 유지될 수 있도록 얼음 속에 튜브를 넣고 회수하도록 하였다. 30 mM imidazole buffer (pH

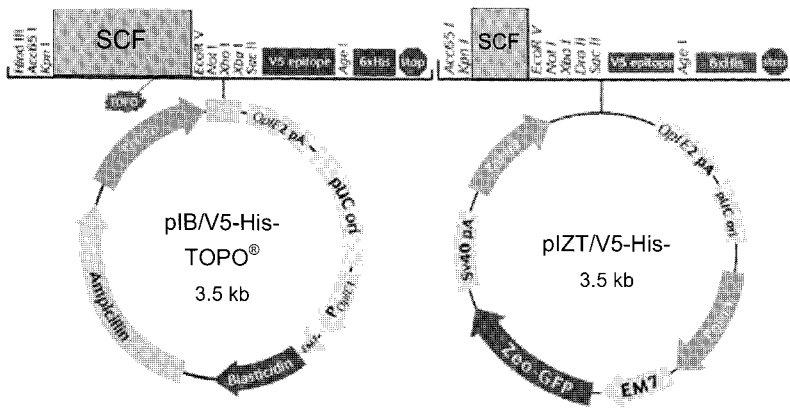


Fig. 1. Schematic representation of expression vector for recombinant hSCF. The PCR product of hSCF was digested with *Kpn* I and *EcoR* V and ligated into an insect expression vector pIB/V5-His and pIZT/V5-His which was cut with the same restriction enzymes. Both expression vector contain V5 and 6 × His epitope.

8.0)로 3 CV으로 column 세척을 하였고 다시 50 mM imidazole buffer (pH 8.0)로 2 CV으로 column을 세척하였다. 250 mM imidazole buffer (pH 8.0)를 이용하여 5 CV으로 elution을 하였으며 이때, 각각의 tube에 1 CV씩 elution 하였다. 목적하는 단백질이 순수분리의 확인을 위해 각각의 fraction은 SDS-PAGE 수행 후 silver staining을 하여 단백질의 유무와 정제 순도를 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 재조합 유전자 발현벡터의 구조 및 특성

hSCF의 유전자는 homodimer의 형태의 구조로 822 bp의 뉴클레오타이드로 구성되며 hSCF의 open reading frame은 273개의 아미노산을 coding하며 분자량은 약 30,899 Da이다. 1번째 아미노산 methionine과 25번째 아미노산 threonine 사이에 소포체가 단백질을 인식하는 서열인 signal peptide가 있다. Human stem cell factor (Accession No. BC074725) 유전자를 주형으로 pfu PCR을 하여 pGEMT vector에 sub-cloning을 한 후, *Escherichia coli* (DH 5α)를 숙주로 하여 곤충형태의 발현벡터인 pIB/V5-His와 pIZT/V5-His 벡터에 hSCF 유전자를 *Kpn* I과 *EcoR* V 제한효소 부위 사이에 삽입하여 형질전환을 하여 목적하는 유전자를 발현시켰다 (Fig. 1). 재조합 유전자는 pIB/V5-His, pIZT/V5-His 벡터에 존재하는 OpIE2 promotor의 영향을 받아 작용한다. 벡터의 C-말단에는 V5 epitope과 6개의 histidin이 tagging 되어 있어, 세포 내에서 단백질로 발현이 되면 pIB/hSCF-V5-His, pIZT/hSCF-V5-His 형태의 단백질이 생산된다.

2. 곤충세포 내 재조합 단백질의 발현

Escherichia coli (DH 5α) 숙주로 재조합 유전자를 확보

하여 DNA를 배양중인 곤충세포 내로 유입시켜 외부 DNA가 세포 내에서 발현되도록 하는 것이 transfection의 목적이다. DNA는 negative charge를 띠는 분자이고 cell membrane 또한 (-) charge를 띤다. DNA를 cell 내로 유입시키는 방법은 크게 chemical method, physical method, virus mediated method 등 3가지로 분류할 수 있는데 본 연구에서는 chemical method의 한 가지인 cationic liposome을 이용한 transfection reagent (Lipofectin) 사용하여 수행하였다.

3. Fluorescence image assay

형질전환된 세포주 발현의 확인은 발현벡터의 형태에 따라 선발할 수 있는데 pIB 벡터는 blasticidin 저항성 유전자를 가지고 있으며, pIZT/hSCF-V5-His 발현 단백질은 pIZT 벡터에 zeocin 저항성 유전자와 함께 GFP (green fluorescence protein) 유전자가 존재하여 녹색 형광으로 형질전환 세포의 선발을 가지적으로 가능하게 한다. Transfection 후 72시간 후 pIZT 벡터는 zeocin (200 μg/ml)를 처리하여 정상세포주인 Sf9 세포를 대조군으로 하여 시간이 경과됨에 따라 정상세포는 서서히 세포가 사멸하였으며 목적하는 형질전환 세포주는 녹색 형광을 띠는 세포수가 점점 증가하는 것을 형광현미경을 통해 관찰하였다. 최종적으로 목적하는 형질전환 세포주의 선발은 전체 대조군의 세포사멸과 비교하여 약 10~14일이 소요되었다.

4. 곤충세포주 내의 재조합 발현벡터 도입

형질전환 세포주 내에서 mRNA level에서 발현벡터의 정상적인 발현을 확인하기 위하여 재조합 발현벡터 작성에 사용된 sense 및 antisense primer를 이용하여 PCR을 수행한 후 그 증폭산물을 확인하였다. 그 결과, 정상

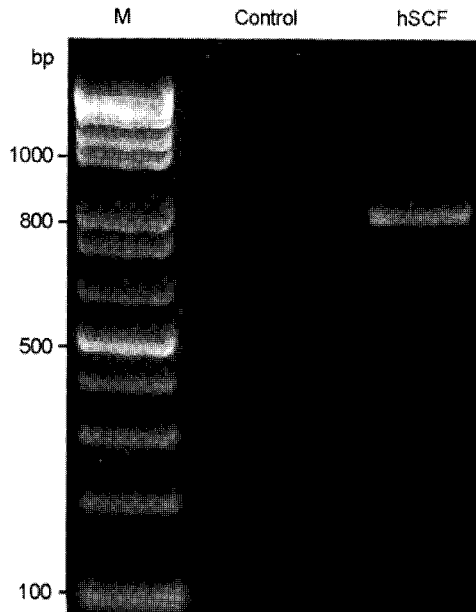


Fig. 2. The expression of the hSCF mRNA in Sf9 cells. Total RNA was extracted from each sample and RT-PCR was performed. The conditions of thermal cycling was performed 94°C for 5 min (pre-denaturation), 94°C for 30 sec (denaturation), 56°C for 30 sec (annealing), 29 cycles of 72°C for 40 sec (extension), 72°C for 5 min (final extension). PCR product of 822 bp hSCF was detected on the gel.

Sf9 곤충세포주를 주형으로 한 경우에는 PCR 증폭산물을 확인할 수 없었으나, 재조합 단백질을 주형으로 한 경우에는 약 822 bp의 뚜렷한 증폭산물을 확인할 수 있어 목적 유전자가 정상 곤충세포주 내에 도입되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

5. 곤충세포주 내의 hSCF 발현 확인

hSCF 유전자가 도입된 재조합 발현벡터를 곤충세포에 형질전환시키고 hSCF 단백질의 세포 내 발현을 확인하기 위해 재조합 발현세포주를 72시간 후에 수집하여 Anti-V5 epitope 항체를 사용하여 Western blot 분석을 수행한 결과, 정상세포주에서는 관찰되지 않은 단백질 밴드가 약 38 kDa 위치에서 뚜렷이 관찰되어 이를 재조합 hSCF 단백질로 추정할 수 있었다 (Fig. 3).

6. 당단백질 (glycoprotein)의 확인

hSCF는 N-linked glycosylation, O-linked glycosylation 되어 형성되는 glycoprotein이다 (Jiang et al., 2000). 재조합 발현벡터에서 생산된 hSCF 단백질이 당화가 이루어진 단백질임을 확인하기 위하여 tunicamycin은 소포체에서 당화 초기 단계에 당화가 일어나지 못하게 저해하는 역할

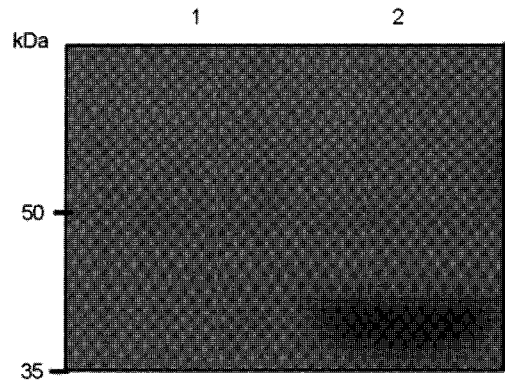


Fig. 3. Western blot analysis of hSCF. The expressed protein was analyzed by the immunoblotting with the antibody against the anti-V5 epitope. Lane 1, Sf9 cells. Lane 2, Sf9 cells transfected with hSCF. 38 kDa hSCF protein was detected in the lane 2, but the calculated molecular weight of hSCF protein is 31 kDa, because of post-translation modification in ER.

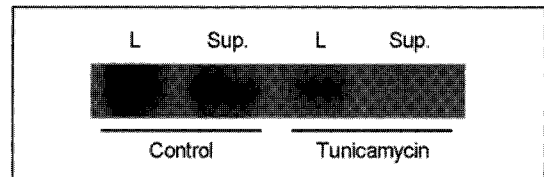


Fig. 4. Recombinant hSCF is a glycoprotein. Tunicamycin treatment inhibits N-linked glycosylation on the glycoprotein, and then no secretory glycoprotein detected in the supernatant of cultured cells. It indicates that hSCF is a glycoprotein. L: Cell lysates, S: culture supernatants

을 하기 때문에 20 µg/ml의 농도로 발현 세포주에 4시간 동안 처리하여 배양하였다. 대조군으로는 재조합 발현 단백질 곤충세포주에 정상적인 세포 배양액에 배양하였으며, 실험군에는 tunicamycin을 첨가하여 4시간 동안 배양하도록 하였다. 약품처리 후, 세포 내와 세포 밖으로의 발현 단백질의 분비를 알아보기 위해 배양세포와 상층액으로 각각 나누어 시료를 처리하여 Western blot 분석을 수행하였다. 그 결과 정상적인 조건의 재조합 발현세포주에는 세포와 상층액 모두에서 hSCF 단백질이 확인되었으며, tunicamycin을 처리한 재조합 발현세포주에는 세포 내에서는 단백질이 확인되었으나 배양세포의 상층액에는 hSCF 단백질이 확인되지 않았다 (Fig. 4).

Tunicamycin 처리 후 상층액에서 hSCF의 분비가 확인되지 않은 것은 정상적인 N-linked glycosylation이 일어나지 못했을 것이라 추정된다. hSCF의 N-linked glycosylation이 일어날 수 있는 부위를 예측하는 프로그램을 이용하여 (NetNGlyc 1.0 Server, Denmark) 4개의 부위에서 일어날 수 있음을 확인하였다.

7. 시간에 따른 hSCF의 발현 분석

Sf9 형질전환 세포주에서 hSCF 단백질의 분비 시간과 시간별 분비량을 알아보기로 세포 충실도가 90% 이상의 세포에서 실험을 수행하기 전 PBS로 2회 세척해 준 후 14~16시간 serum free 배양액으로 starvation을 시켜준 후 0, 30분, 1시간의 간격을 두고 세포와 상층액의 부분으로 나누어 수집한 후 Western blot 분석을 수행하였다. 세포 내에서는 hSCF가 생성되었으나 세포 밖으로는 30분부터 hSCF의 분비가 확인되어 1시간에는 정점에 도달하였다 (Fig. 5). hSCF의 분비 시간에 대하여 더욱 면밀한 분석을 하기 위하여 ELISA를 수행하였다. 분비되는 시간을 초점을 두고 시행하였기에 배양된 상층액만을 취하여 시간 간격을 더 조밀하게 0, 10분, 20분, 30분, 1시간, 2시간까지의 간격을 두고 측정하였으며, 정상적인 Sf9 곤충세포를 대조군으로 하였다. 그 결과 약 10분 이후부터 hSCF (330 pg/ml)의 증가의 추세를 볼 수 있으며 약 30분부터는 hSCF (498 pg/ml)의 분비량의 절반가량이 분비되어 나오고 약 1시간부터는 약 991 pg/ml 분비량으로 정점에 이르러 이후에는 분비량에 큰 변화가 없이 유지되는 것

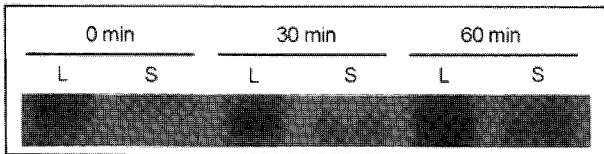


Fig. 5. Time chase of hSCF protein expression in Sf9 cells. Cell lysates and supernatants were collected at different time intervals for testing protein expression. hSCF protein was obviously detected from 30 min after translation. L: Cell lysates, S: culture supernatants

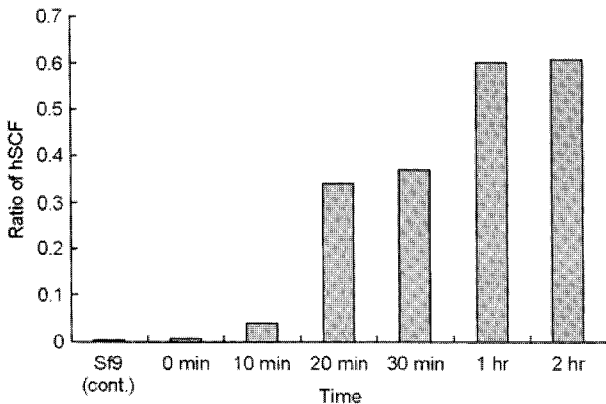


Fig. 6. Time course experiments of secreted of hSCF proteins. The supernatants were collected at different time intervals for testing protein secretion. At each time point, the ELISA was performed.

으로 확인된다 (Fig. 6). Western blot 분석을 통해서도 약 30분부터 translation이 이루어진다고 예상하였으며 보다 더 정확한 정량적 분석을 하고자 면역효소기법 (ELISA)를 수행을 한 결과 재조합 단백질은 약 10분 후부터

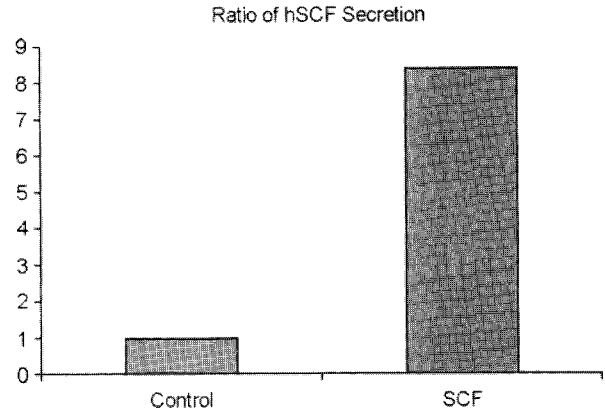


Fig. 7. Quantity of the secreted hSCF protein from transfected insect cells. hSCF secretion of Sf9 cells was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Soluble SCF protein was detected in the supernatant of insect cells. Control: wild type Sf9 cells (WT), 119 pg/ml SCF: hSCF from transfected Sf9 cells, 995 pg/ml

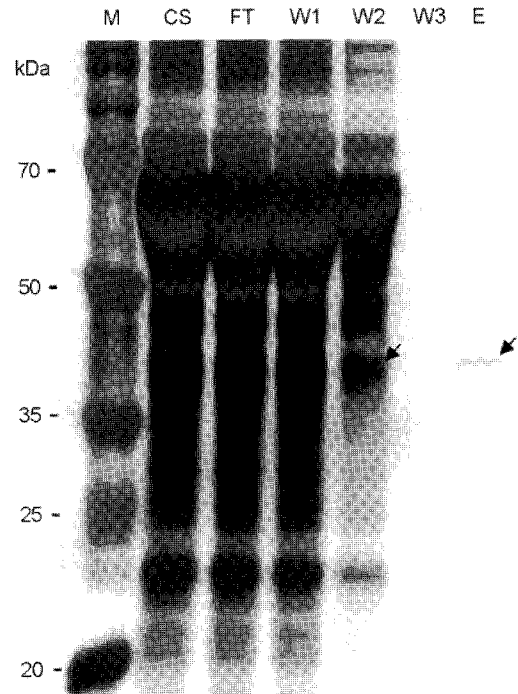


Fig. 8. Purification of hSCF. hSCF in the pIB/V5-His vector was expressed in Sf9 cells and purified using Ni-NTA Agarose with different imidazole concentrations in the wash and elution steps. Proteins were visualized by the silver staining. M: protein molecular weight marker; CS: cell supernatants; FT: flow-through; W1 & W2: 30 mM wash; W3: 50 mM wash; E: 250 mM elution.

translation이 이루어진다고 판단하였다.

8. hSCF의 분비량 및 정량적 분석

형질전환된 Sf9 곤충세포주로부터 hSCF의 활성과 그 정량적 분석을 위해 효소면역기법 (ELISA)을 통하여 수행하였다. 정상 Sf9 세포주와 비교하여 세포 밖으로 분비되는 soluble form의 hSCF의 분비량은 계대 배양 후 72 시간 후의 세포 배양액의 상층액을 수집하여 측정된 결과 약 995 ng/ml의 hSCF가 분비되었다 (Fig. 7).

hSCF의 초기 배아의 조혈작용을 하는 역할을 하므로 TF-1 (human, erythroleukemia cell line) 혹은 UT-7 (human megakaryoblastic leukemia cell line) 세포를 이용하여 cell proliferation assay를 수행하여 (Erickson-Miller et al., 2000) 생리적 활성 (bioactivity)에 대한 연구가 필요하다. 또한 hSCF는 erthropoietin (EPO)과 함께 적혈구 집락의 형성을 유도하고 (Gouilleux et al., 1995), IL-3, GM-CSF 및 G-CSF 등에 의한 비적혈구계 집락 형성을 증진시킨다. SCF가 단독으로 거핵구 집락의 형성을 유도하지는 않으나 IL-3 및 GM-CSF에 의한 거핵구 집락 형성을 증진시키고, 장기 골수 배양 시 장기적인 거핵구 생성에 IL-3와 상승적으로 작용한다 (Briddell et al., 1991). 이러한 연구를 기반으로 하여 임상적으로 재생불량성 빈혈 환자에서 유리형 SCF이 생성이 저조하며 (Krieger et al., 1995; Wodnar-Filipowicz et al., 1993), SCF가 이들 환자의 시험관 내 조혈 집락 형성을 촉진하는 등 (Wodnar-Filipowicz et al., 1992) SCF의 이 질환에 대한 임상적 응용 가능성을 제시할 만하다. SCF의 결핍이 이 질환의 병태생리에 관련한다면 SCF의 투여가 유용한 치료법이 될 수 있을 것이다.

9. 재조합 단백질의 순수분리 및 특성

재조합 발현벡터를 곤충세포주에서 발현시켜 분비된 hSCF 단백질을 순수분리를 목적으로 Ni-NTA agarose beads (Qiagen)를 사용하였다. 이것은 곤충 발현벡터의 C-말단부위에 위치한 6 × His tag 부위를 이용하여 재조합 hSCF 단백질을 정제하였다. 계대 배양 후 72시간 후의 세포 배양액을 수집한 시료를 순서대로 column을 빠져나온 시료와 30 mM imidazole 용액으로 세척한 후 서서히 hSCF를 포함한 다른 단백질 및 불순물이 제거가 되어 50 mM imidazole 용액을 이용하여 column을 빠져나온 시료에는 다른 단백질 및 그 밖의 불순물이 완전히 제거되었음이 보여진다. 마지막으로 250 mM imidazole 용액으로 elution 하였을 때 첫 번째 elution에서는 hSCF가 나타

나지 않았으나 두 번째 elution한 fraction 구간에는 목적하는 hSCF의 단백질이 확인되었다 (Fig. 8).

최근의 연구 보고에 의하면 곤충세포에서 발현한 항세균 유전자를 단독발현 시켰을 경우 정확한 고차구조를 형성하지 못하여 극히 적은 단백질만이 세포 외로 분비되는 문제점이 있었다. 이러한 항세균 유전자와 bPDI 유전자를 융합발현 시킴으로써 약 20배 이상의 항세균 활성이 높아진 분비 효율을 나타낸 보고가 있다 (Goo et al., 2008). 앞으로의 연구에서는 bPDI와 융합발현된 재조합 hSCF 단백질 세포주에서 단백질의 분비 및 발현량에 따른 재조합 단백질에 생산과 관련하여 효율성이 증대되는 효과를 기대하여 본다. 또한 hSCF의 궁극적인 조혈작용의 역할과 관련하여 임상적 실험을 수행하여 체내에 미치는 영향 및 작용 메커니즘에 관한 연구가 더욱 요구된다. 나아가 생명 공학적, 의·약학의 발달에 기여할 수 있도록 인류의 생명연장과 고도의 유전공학적 산업의 활성화에 기여하게 될 수 있으리라 전망한다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 (과제번호: 20070401034024)의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Berg DT, Burck PJ, Berg DH, Grinnell BW. Kringle glycosylation in a modified human tissue plasminogen activator improves functional properties. *Blood* 1993. 81: 1312-1322.
- Besmer P. Kit-ligand-Stem Cell Factor. In: Garland J. M., P. Quesenbery and D. Hilton. *Colony Stimulating Factors. Molecular & Cell Biology, Second Edition.* Marcell Dekker Inc. N. Y., 1997. 369-404.
- Briddell RA, Bruno E, Cooper RJ, Brandt JE, Hoffman R. Effect of c-kit ligand on in vitro human megakaryocytopoiesis. *Blood* 1991. 78: 2854-2859.
- Broudy VC. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 1997. 90: 1345-1364.
- Bruno E, Miller ME, Hoffman R. Interacting cytokines regulate in vitro human megakaryocytopoiesis. *Blood* 1989. 73: 671-677.
- Dexter TM, Spooncer E. Growth and differentiation in the hemopoietic system. *Annu Rev Cell Biol.* 1987. 3: 423-441.
- Doyon Y, Home W, Daul P, LeBel D. Effect of C-domain N-glycosylation and deletion on rat pancreatic alpha-amylase secretion and activity. *Biochem J.* 2002. 362: 259-264.

- Erickson-Miller CL, Pelus LM, Lord KA. Signaling induced by erythropoietin and stem cell factor in UT-7/Epo cells: transient versus sustained proliferation. *Stem Cells* 2000. 18: 366-373.
- Fiedler K, Simons K. The role of N-glycans in the secretory pathway. *Cell* 1995. 81: 309-312.
- Flesher AR, Marzowski J, Wang WC, Raff HV. Fluorophore-labeled carbohydrate analysis of immunoglobulin fusion proteins: Correlation of oligosaccharide content with in vivo clearance profile. *Biotechnol Bioeng.* 1995. 46: 399-407.
- Frand AR, Cuozzo JW, Kaiser CA. Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends Cell Biol.* 2000. 10: 203-210.
- Gabbianelli M, Pelosi E, Montesoro E, Valtieri M, Luchetti L, Samoggia P, Vitelli L, Barberi T, Testa U, Lyman S, et al. Multi-level effects of flt3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocytic progenitors/monocytic precursors. *Blood* 1995. 86: 1661-1670.
- Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN. The kit ligand, stem cell factor. *Adv Immunol.* 1994. 55: 1-96.
- Goo TW, Yun EY, Kim SW, Choi KH, Kang SW, Shin KS, Yu K, Kwon OY. Domain a' of Bombyx mori protein disulfide isomerase has chaperone activity. *Z Naturforsch [C].* 2008. 63: 435-439.
- Gouilleux F, Pallard C, Dusanter-Fourt I, Wakao H, Haldosen LA, Norstedt G, Levy D, Groner B. Prolactin, growth hormone, erythropoietin and granulocyte-macrophage colony stimulating factor induce MGF-Stat5 DNA binding activity. *EMBO J.* 1995. 14: 2005-2013.
- Jarvis DL, Garcia A Jr. Biosynthesis and processing of the Auto-grapha californica nuclear polyhedrosis virus gp64 protein. *Virology* 1994. 205: 300-313.
- Jiang X, Gurel O, Mendiaz EA, Stearns GW, Clogston CL, Lu HS, Osslund TD, Syed RS, Langley KE, Hendrickson WA. Structure of the active core of human stem cell factor and analysis of binding to its receptor kit. *EMBO J.* 2000. 19: 3192-3203.
- Kozak M. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 1999. 234: 187-208.
- Krieger MS, Nissen C, Wodnar-Filipowicz A. Stem-cell factor in aplastic anemia: in vitro expression in bone marrow stroma and fibroblast cultures. *Eur J Haematol.* 1995. 54: 262-269.
- Lev S, Blechman JM, Givol D, Yarden Y. Steel factor and c-kit protooncogene: genetic lessons in signal transduction. *Crit Rev Oncog.* 1994. 5: 141-168.
- Lu HS, Chang WC, Mendiaz EA, Mann MB, Langley KE, Hsu YR. Spontaneous dissociation-association of monomers of the human-stem-cell-factor dimer. *Biochem J.* 1995. 305: 563-568.
- Martin FH, Suggs SV, Langley KE, Lu HS, Ting J, Okino KH, Morris CF, McNiece IK, Jacobsen FW, Mendiaz EA, et al. Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell* 1990. 63: 203-211.
- Metcalf D. Hematopoietic regulators. *Blood* 1993. 82: 3515-3523.
- Peters EM, Maurer M, Botchkarev VA, Jensen K, Welker P, Scott GA, Paus R. Kit is expressed by epithelial cells in vivo. *J Invest Dermatol.* 2003. 121: 976-984.
- Possee RD. Baculoviruses as expression vectors. *Curr Opin Biotechnol.* 1997. 5: 569-572.
- Tang B, Chiang TM, Brand DD, Gumanovskaya ML, Stuart JM, Kang AH, Myers LK. Molecular definition and characterization of recombinant bovine CB8 and CB10: immunogenicity and arthritogenicity. *Clin Immunol.* 1999. 92: 256-264.
- Wodnar-Filipowicz A, Tichelli A, Zsebo KM, Speck B, Nissen C. Stem cell factor stimulates the in vitro growth of bone marrow cells from aplastic anemia patients. *Blood* 1992. 79: 3196-3202.
- Wodnar-Filipowicz A, Yancik S, Moser Y, dalle Carbonare V, Gratwohl A, Tichelli A, Speck B, Nissen C. Levels of soluble stem cell factor in serum of patients with aplastic anemia. *Blood* 1993. 81: 3259-3264.
- Wu H, Klingmüller U, Besmer P, Lodish HF. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature* 1995. 377: 242-246.
- Zapun A, Jakob CA, Thomas DY, Bergeron JJ. Protein folding in a specialized compartment: the endoplasmic reticulum. *Structure* 1999. 7: 173-182.
- Zsebo KM, Wypych J, McNiece IK, Lu HS, Smith KA, Karkare SB, Sachdev RK, Yuschenkoff VN, Birkett NC, Williams LR, et al. Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium. *Cell* 1990. 63: 195-201.