

*In Vitro*에서 Retrovirus Vector System을 이용한 재조합 *hFSH* 유전자의 발현

민경헌 · 권모선 · 김태완 · 구본철[†]

대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

In Vitro Expression of the Recombinant *hFSH* Gene using Retrovirus Vector System

Gyeong Heon Min, Mo Sun Kwon, Teoan Kim and Bon Chul Koo[†]

Department of Physiology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu 705-718, Korea

ABSTRACT

hFSH is a glycoprotein secreted from anterior pituitary and consists of α and β subunits. Because of its major biological functions including sperm formation in the male and for follicular growth, FSH is used to cure woman's sterility. In this study we tried to produce recombinant *hFSH* *in vitro* using a retrovirus expression vector. Two major components of the vector we constructed are: (i) a DNA fragment containing α and β genes fused by a DNA sequence coding carboxyl terminal peptide (CTP) of human chorionic gonadotropin, (ii) a DNA fragment corresponding woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPPE). Evaluation of expression profile of the recombinant FSH using reverse transcription PCR and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Among three cell lines tested, HeLa cells were the best for *hFSH* expression (5,395 mIU/ml), then followed by chicken embryonic fibroblast (CEF) cells and Chinese hamster ovary (CHO) cells in the order of *hFSH* production. In addition to the amount, the FSH produced from HeLa cells was highest in terms of biological activity which was determined by measuring cAMP.

(Key words : *hFSH*, Retrovirus vector, CTP, WPPE, Biological activity)

서 론

Follicle stimulating hormone (FSH)은 luteinizing hormone (LH), human chorionic gonadotropin (hCG), 그리고 thyroid stimulating hormone (TSH)과 함께 뇌하수체 전엽에서 생산되는 당단백질 호르몬으로서, α subunit과 β subunit으로 구성되어 있다(Moyle 등, 1998). 92개의 아미노산으로 이루어진 FSH의 α subunit은 LH, hCG, TSH의 α subunit과 아미노산 서열상 동일하며, asparagine (Asn)-52, 78 부위에 당쇄가 존재하고, β subunit은 Asn-7, 24 부위에서 당화를 형성하며 111개의 아미노산을 가진다(Baenziger 등, 1988; Bagatti 등, 2001). FSH는 시상하부에서 분비되는 gonadotropin-releasing hormone (GnRH)에 의해 분비가 촉진되는 호르몬으로서, 남성의 정자 형성과 여성의 여포 발달에 필수적인 역할을 한다(Schaison 등, 1993; Out 등, 1999). 이러한 생리적 작용으

로 인해 FSH는 임신을 원하는 불임 여성의 배란을 유도할 때(Loumaye 등, 1995; Speroff 등, 1989)와 *in vitro* fertilization (IVF), intracytoplasmic sperm injection (ICSI), 그리고 수정란 이식에 필수적인 호르몬이다(Johns 등, 1982; Prevost 등, 1998). 과거 FSH는 폐경기에 들어선 여성 소변에서 획득하였으나 소변에 의한 오염과 낮은 정제율, 동일한 그룹의 반복적인 실험에서 나타난 결과의 상이성 등의 문제가 발생하였다(Jennings 등, 1996). 이러한 문제점을 해결하기 위하여 재조합 DNA 기술과 Chinese hamster ovary (CHO) 세포를 이용한 의약품용 재조합 FSH의 생산이 이루어지고 있다(Chung 등, 2003; Kim 등, 2003).

재조합 단백질의 생산 system으로는 박테리아, 효모, 곤충 세포 그리고 포유동물 세포 등이 사용되고 있다. 원핵생물 system인 박테리아는 저비용으로 많은 양의 재조합 단백질을 손쉽게 생산할 수 있지만, 생산된 단백질의 3차 구조로의 접힘, 당화 그리고 인산화 등의 번역 후 변

* 이 논문(또는 저서)은 2007년도 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2007-359-F00006).

[†] Corresponding author : Phone: +82-53-650-4469, E-mail: bckoo@cu.ac.kr

형 과정이 적절히 진행되지 못하여 생물학적 활성을 가진 단백질의 생산이 어렵다고 알려져 있다(Braun과 La-Baer, 2003; Palomares 등, 2004). 그리고 효모와 곤충 세포 같은 진핵생물 시스템 또한 비교적 저비용으로 많은 양의 재조합 단백질을 생산할 수 있으나, 단백질의 생물학적 활성과 생물학적 반감기 등에 많은 영향을 미치는 당화나 시알리화 같은 단백질의 변형이 포유동물 세포에 비해 차이가 많이 나는 것으로 보고되고 있다(Chang 등, 2003; Montesino 등, 1998). 현재 의약품 및 생물의학 연구용으로 생산되고 있는 재조합 단백질의 60~70%는 CHO, BHK (baby hamster kidney), HEK293 (human embryo kidney) 세포 등 설치류 혹은 인간의 조직으로부터 유래된 포유동물 세포에서 생산되고 있으며(Wurm, 2004), 이들 재조합 단백질의 70%는 CHO 세포로부터 생산되고 있다(Pavlou와 Reichert, 2004; Walsh, 2006).

*In vitro*에서 보다 효율적으로 재조합 단백질을 생산하기 위해서는 단백질을 생산하는 숙주세포의 선택뿐만 아니라 숙주세포 내로 외래 유전자를 전달하는 system 또한 매우 중요한 요건이다. 세포 내로 외래 유전자를 전이하는 방법은 retrovirus, lentivirus, baculovirus, adenovirus 그리고 adeno-associated virus 등의 virus를 매개체로 유전자를 전이하는 방법과 전기충격법(electroporation), 인산칼슘 침전법 및 리포솜(liposome)을 이용하는 non-virus성 전이 방법이 있다. 후자의 경우 전염성이 나타나지 않으며, 면역반응을 거의 일으키지 않고, 매우 큰 size의 유전자 전달도 가능한 장점이 있으나, 전자에 비해 유전자의 전이 효율이 낮으며, 유전자의 발현이 일시적으로 나타나서 형질전환된 세포주를 구축하기 어려운 단점이 있다(Nishikawa와 Huang, 2001). Virus성 유전자 전달 방법은 크게 두 시스템으로 구분할 수 있는데, 먼저 세포 내로 도입된 유전자가 일시적으로만 발현되는 baculovirus와 adenovirus system이 있으며, 도입된 외래 유전자가 숙주세포의 genome 내로 삽입되어 장기간 발현되는 retrovirus 및 lentivirus system이 있다(Kay 등, 2001). 특히 retrovirus vector system은 숙주세포 내로의 높은 유전자 전이율, 전이된 유전자가 숙주세포의 염색체 내로의 안정적인 도입 그리고 도입된 유전자의 발현율이 높다는 장점을 가지고 있다(Kim, 2002).

본 연구에서는 이러한 장점을 가진 retrovirus vector system을 이용하여 재조합 hFSH 유전자를 전이시키고자 하였으며, 보다 효율적인 유전자 전이를 위하여 다음 요소들을 도입하였다. 먼저 hFSH 유전자의 도입 및 발현 확률을 높이기 위해 소단위체인 α 와 β 의 유전자 서열을 hCG의 β -사슬에 존재하는 carboxyl-terminal peptide (CTP) 서열로 연결한 형태를 도입하였으며, 단백질의 발현량을 증가시키는 것으로 알려진 woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE) 서열(Zufferey 등, 1999)을 도입하였다. 구축한 retrovirus vector를 여러 종류의 동물세포에서 발현시켜 재조합 hFSH의 발현량 및 생물학적 활성을 비교함으로써 재조합 hFSH의 생산에 있어서 가장 효율적인 생산 세포주를 선발하고자 하였다. 본 연구의 결과들은 *in vitro*에서 재조합 hFSH의 생산을 위한 효율적인 system을 제시할 수 있으며, 형질전환 동물을 생산하기 위한 연구 데이터를 제공할 수 있을 것이다.

실험 방법

Retrovirus의 구축

pLNC-hFSH-W의 구축은 본 연구실에서 보유하고 있는 pGEM-7Zf-FSH β -CTP-FSH α 를 BamHI과 Klenow fragment, HindIII 제한효소 순으로 처리하여 분리한 FSH β -CTP-FSH α 유전자를 Sal I과 Klenow fragment, 그리고 Hind III 순으로 제한효소를 처리한 pLNCXW vector와 ligation하여 구축하였다(Fig. 1).

pLPC-hFSHR-W의 구축을 위하여 pCR-Blunt II-TOPO-hFSHR(R) (Open Biosystems, USA) vector를 Spe I과 Klenow fragment, Antarctic phosphatase로 처리한 후 Xho I linker를 연결하여 Xho I 제한효소 절단 부위를 도입하였다. 이 vector를 다시 Xho I과 Not I으로 처리하여 hFSHR를 분리하였으며, Not I과 Sal I을 처리한 pLPCXW vector와 결합하여 pLPC-hFSHR-W를 구축하였다(Fig. 1).

Virus의 생산 및 표적 세포로의 감염

재조합한 pLNC-hFSH-W vector는 Gibbon ape leukemia virus의 피막 유전자가 발현되는 PT67 (Clontech, USA) 포장세포에 calcium phosphate 방법으로 transfection하였다. PT67에서 생산된 virus는 Moloney murine leukemia virus의 gag과 pol 유전자가 발현되는 GP2 293 (Clontech, USA) 세포에 감염시켜서 G418 (600 μ g/ml)이 첨가된 배양액에서 2주간 배양하여 GP2 293-LNC-hFSH-W 세포주를 구축하였다. 이 세포주에 vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G) 유전자를 가진 pVSV-G (Clontech, USA) plasmid를 일시적으로 transfection하여 48시간 후에 virus 배양액을 수확하였다. 재조합 hFSH 유전자의 발현과 생물학적 활성을 확인하기 위하여 수확한 virus를 전날 100 mm dish당 1×10^6 개로 준비한 표적 세포(BEF, CEF, CHO, HeLa, NIH3T3, PFF)에 감염시켰다. 감염된 세포는 G418 (600 μ g/ml)이 첨가된 배양액에서 1주일간 선별하여 hFSH 유전자가 전이된 세포주를 확립하였다.

재조합한 pLPC-hFSHR-W vector도 위와 같은 동일한 방법으로 hFSHR 유전자가 전이된 CHO 세포주를 확립하였다. 세포주 선별에는 puromycin (3 μ g/ml)이 첨가된 배양액을 사용하였다.

본 실험에서 사용한 PT67 (Clontech, USA), GP2-293 (Clontech, USA), BEF (Bovine embryonic fibroblast), CEF

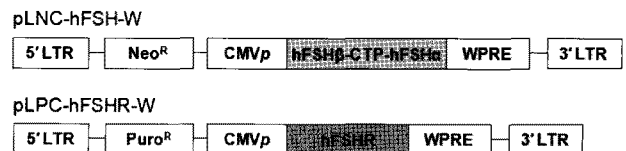


Fig. 1. Structure of pLNC-hFSH-W and pLPC-hFSHR-W retrovirus vectors. LTR, long terminal repeat; Neo^R, neomycin resistant gene; CMVp, human cytomegalovirus promoter; hFSH β -CTP-hFSH α , human follicle stimulating hormone gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; Puro^R, Puromycin resistant gene; hFSHR, human follicle stimulating hormone receptor gene.

(Chicken embryonic fibroblast), HeLa (Human cervical cancer cell), NIH3T3 (Mouse embryonic fibroblast), PFF (Porcine fetal fibroblast) 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 Penicilin (100 IU/ml)-streptomycin (100 µg/ml) (Hyclone, USA)과 10% FBS (Fetal bovine serum; Hyclone, USA)가 첨가된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Hyclone, USA) 배지에서 배양하였다. CHO (Chinese hamster ovary) 세포는 동일한 조건의 incubator에서 Penicilin (100 IU/ml)-streptomycin (100 µg/ml) (Hyclone, USA)과 10% FBS (Fetal bovine serum; Hyclone, USA)가 첨가된 Ham F-12 (Ham F-12 Nutrient Mixture; Gibco, USA) 배지에서 배양하였다.

재조합 hFSH 유전자 및 hFSHR 유전자 발현 확인

재조합 hFSH 유전자의 발현을 확인하기 위하여 각각의 세포주에서 RT-PCR와 ELISA를 실시하였으며, hFSHR 유전자의 발현은 RT-PCR을 이용하여 확인하였다.

먼저 RT-PCR 과정은 다음과 같다. LNC-hFSH-W virus를 감염시킨 세포와 감염되지 않은 각각의 BEF, CEF, CHO, HeLa, NIH3T3, PFF 세포를 48시간 배양한 후 Trizol을 이용하여 세포내 total RNA를 분리하였다. Improm-II reverse transcription system (Promega, USA)을 이용하여 분리한 각각의 0.5 µg의 total RNA로부터 cDNA를 제조하였으며, 제조한 cDNA를 주형으로 hFSH와 대조구인 각 세포주의 GAPDH에 대하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 PCR master mix (Promega, USA) 10 µl에 각각 20 pmol의 “+”, “-” strand primer 그리고 제조한 cDNA 1 µl를 넣어 total 20 µl로 수행하였고, PCR 과정은 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 30초간 35 cycle을 반복 실시한 후 최종 신장을 위해 72°C에서 7분간 반응시켰다. 실험에 사용한 재조합 hFSH에 해당하는 primer는 “+” strand primer인 5'-AGTGTGAC-AGCGACAGCACTGA-3'와 “-” strand primer인 5'-GC-AGCCCATGCACTGAAGTATT-3'를 사용하였다.

hFSHR 유전자의 전이를 확인하기 위하여 LPC-hFSHR-W virus가 도입된 CHO 세포와 도입되지 않은 CHO 세포를 48시간 배양한 후 위와 동일한 방법으로 cDNA를

제조하였으며, 제조한 cDNA를 주형으로 hFHSR와 CHO 세포주의 GAPDH에 대하여 PCR을 수행하였다. hFSHR에 해당하는 primer는 “+” strand primer인 5'-TGACA-GCTCACTGGCAAAGACA-3'와 “-” strand primer인 5'-GGCAGAAGACAATGAGTCCAGC-3'이다. 각 RT-PCR 실험에 있어서 대조구로 사용한 GAPDH 유전자에 대한 primer는 Table 1과 같다.

ELISA를 이용한 재조합 hFSH의 정량

재조합 hFSH 유전자가 전이된 각각의 세포주와 전이되지 않은 각각의 대조군 세포주를 2×10⁶/100 mm dish로 준비하여 DMEM/FBS 배양액에서 48시간 동안 배양한 후 배양액을 수확하였다. CHO 세포주는 Ham F-12/FBS 배양액을 사용하였다. FSH ELISA Kit (Calbiotech, USA)를 사용하여 ELISA를 실시하였으며, 과정은 다음과 같다. 준비된 standard와 sample을 microplate의 각 well에 50 µl 씩 넣은 후 100 µl의 FSH enzyme conjugate를 첨가하여 실온에서 30분간 방치한 후 wash buffer로 3회 수세하였다. 각 well에 100 µl의 TMB (Tetramethylbenzidine) substrate solution을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 50 µl stop solution을 더하여 반응을 종결시켰으며, microplate reader를 사용하여 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

재조합 hFSH의 생물학적 활성 측정

재조합 hFSH의 생물학적 활성을 측정하기 위하여 전달 hFSHR 유전자가 전이된 CHO 세포주를 12 well plate의 각 well에 5×10⁵개로 준비하여 Ham F-12/FBS로 배양하였다. 배양 후 BSA (10 mg/ml)가 포함된 PBS로 2회 세척하고, 0.25 mmol 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)와 BSA (1 mg/ml)가 포함된 800 µl의 Ham F-12 배양액으로 교체하였다. 그리고 재조합 hFSH 유전자가 전이된 CEF, CHO, HeLa 세포주에서 수확한 배양액과 상업적으로 판매되는 재조합 hFSH (R&D SYSTEMS, USA)를 각각 BSA (10 mg/ml)가 포함된 PBS를 이용하여 0, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1,000, 3,000 mIU로 희석하여 첨가한 후 37 °C에서 4시간 배양하였다. 4시간 후 배양액을 수확하

Table 1. Primers used for GAPDH analysis

Cell line	Species	Sequence (5' → 3')	Product size (bp)
BEF	Bovine	CTTTTAATTCTGGCAAAGTGGACATC (+) ATCTCATCATACTTGGCAGGTTTCTC (-)	709
CEF	Chicken	ATCAATGATCCCTTCATCGATCTG (+) TCATCATACTTGGCTGGTTTCTCC (-)	674
CHO	Hamster	GTGAAGTTCGGCGTGAACGGATTT (+) CACAGTCTCTGGGTGGCAGTGAT (-)	555
HeLa	Human	GGTGTAACCATGAGAAGTATGACAA (+) TGCTCTCTTCTCTGTGTCCTCTG (-)	658
NIH3T3	Mouse	TGAGTATGTCGGTGGACICTACTGGTG (+) GGTAGCCGATTTCATTGTCATACCA (-)	686
PFF	Pig	TCCACTACATGGTCTACATGTTCCAG (+) ATGTCATCATATTTGGCAGGTTTCTC (-)	655

여 cAMP ELISA Kit (R&D, USA)를 사용하여 생물학적 활성을 검증하였다. ELISA 과정은 50 μ l의 primary antibody solution을 각 well에 넣은 후 실온에서 1시간 반응 후 wash buffer로 4회 수세하였다. 각 well에 수확한 배양액 100 μ l와 50 μ l의 cAMP conjugate를 첨가하여 실온에서 2시간 반응시킨 후 wash buffer로 4회 수세한 다음, 200 μ l의 substrate solution을 첨가하여 실온에서 30분간 방치하였다. 이후 100 μ l의 stop solution을 첨가하여 반응을 종결시킨 후 microplate reader를 사용하여 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

Retrovirus Vector System을 이용한 재조합 hFSH 유전자 발현 확인

재조합 hFSH 유전자의 발현을 *in vitro*에서 확인하기 위하여 각각의 세포에 LNC-hFSH-W virus를 감염시켜 재조합 hFSH 유전자가 전이된 세포주들을 확립하였다. RT-PCR을 이용한 분석 결과에서는 virus에 감염되지 않은 세포주에서 재조합 hFSH 유전자에 대한 절편이 증폭되지 않는데 비해, virus에 감염된 세포주에서는 재조합 hFSH 유전자에 해당하는 PCR 단편의 증폭이 뚜렷하게 확인되었다(Fig. 2). 그리고 각각의 세포에서 정상적인 전사가 이루어지는 것을 확인하기 위하여 GAPDH를 대조군으로 사용하였다(Fig. 2).

재조합 hFSH의 정량을 위해 유전자가 전이된 각 세포의 배양액을 수확하여 ELISA를 실시한 결과, BEF-LNC-hFSH-W 세포에서는 200 mIU/ml, CEF-LNC-hFSH-W 세포에서는 5,000 mIU/ml, CHO-LNC-hFSH-W 세포에서는 2,562 mIU/ml, HeLa-LNC-hFSH-W 세포에서는 5,395 mIU/ml, NIH3T3-LNC-hFSH-W 세포에서는 222 mIU/ml, PFF-LNC-hFSH-W 세포에서는 243 mIU/ml의 농도를 나타내었다(Fig. 3). LNC-hFSH-W virus가 감염되지 않은 세포에서는 hFSH의 농도 값이 나타나지 않았다(Fig. 3).

Retrovirus Vector System을 이용한 hFSHR 유전자 발현 확인

hFSHR 유전자의 발현을 *in vitro*에서 확인하기 위하여 CHO 세포에 LPC-hFSHR-W virus를 감염시켜 hFSHR 유전자가 전이된 세포주를 확립하였다. RT-PCR을 이용한 분석 결과에서는 virus에 감염되지 않은 세포주에서 hF-

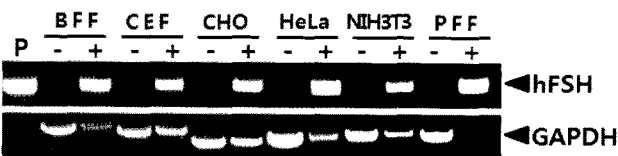


Fig. 2. RT-PCR analyses of hFSH gene expression in various target cells. P, plasmid DNA (pLNC-hFSH-W); BEF cell, CEF cell, CHO cell, HeLa cell, NIH3T3 cell, PFF cell; -: uninfected cell; +: cells infected with LNC-hFSH-W virus. In RT-PCR analysis, two primer sets were used: One for the hFSH β -CTP-hFSH α gene and the other for the control GAPDH gene.

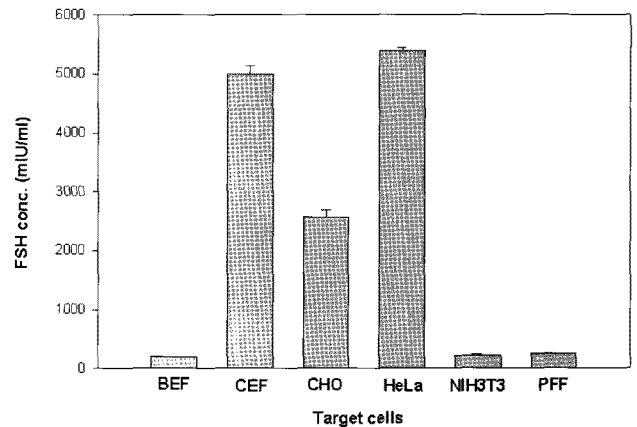


Fig. 3. ELISA analyses of recombinant hFSH gene expression in various target cells.

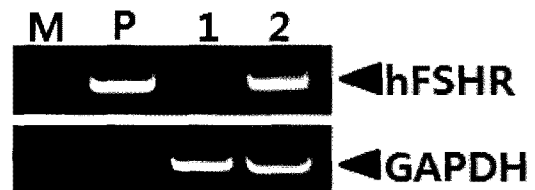


Fig. 4. RT-PCR analyses of hFSHR gene expression in CHO cell. M, marker; P, plasmid DNA (pLPC-hFSHR-W); 1 and 2, CHO cell; 1, uninfected cell; 2, cell infected with LPC-hFSHR-W virus. In RT-PCR analysis, two primer sets were used: One for the hFSHR gene and the other for the control GAPDH gene.

SHR 유전자에 대한 절편이 증폭되지 않는데 비해 virus에 감염된 세포주에서는 300 bp의 hFSHR 유전자에 해당하는 PCR 단편의 증폭이 뚜렷하게 확인되었다(Fig. 4). 그리고 대조군인 GAPDH 유전자에 대한 PCR 단편은 실험군에서 거의 동일한 양으로 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 4).

재조합 hFSH의 생물학적 활성 측정

ELISA에 의해 정량된 CEF, CHO 그리고 HeLa 세포에서 생산된 재조합 hFSH와 대조군인 상업적으로 판매되는 재조합 hFSH의 생물학적 활성은 adenylate cyclase 증가에 따른 cAMP의 변화를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 대조군으로 사용한 재조합 hFSH에 비해 CEF, CHO 그리고 HeLa 세포에서 발현되는 재조합 hFSH가 비슷하거나 높은 생물학적 활성이 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 그리고 표적 세포 중 HeLa 세포에서 발현된 재조합 hFSH의 농도가 1,000 mIU/ml이 되었을 때 가장 높은 생물학적 활성을 나타내었다(Fig. 5).

고 찰

현재 생명공학 기술은 재조합 유전자를 이용하여 포유 동물 세포와 동물을 이용한 생체 반응기에서 원하는 생리활성물질 생산할 수 있으며, 유전자 치료 및 의약품

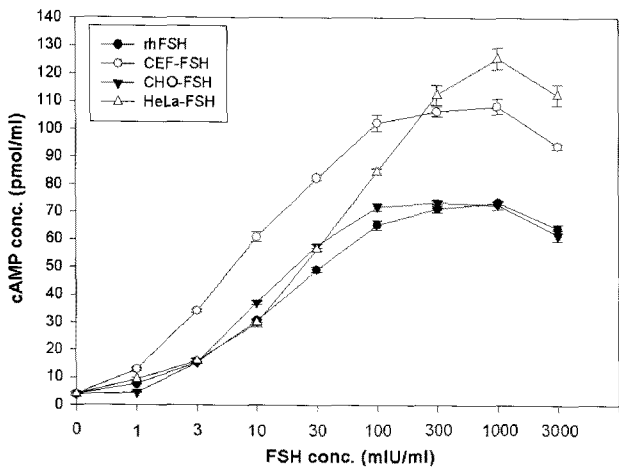


Fig. 5. *In vitro* bioactivity of hFSH in CEF, CHO, HeLa cells and rhFSH standard curve. Adenylate cyclase activity by the various concentration of hFSHs were determined using CHO cells expressing the FSH receptor. Stimulation of cells was incubated at 37°C for 4 hour, and total cAMP was measured by cAMP ELISA. The data were obtained from experiments performed in triplicate and are presented as the mean±SD.

으로 사용할 수 있는 생리활성물질을 생산하기 위한 연구가 진행 중이다(Kirby, 1999; Wurm, 2004; Link 등, 2006; Kim 등, 2006). 이러한 연구에서 가장 중요한 요소는 외래 유전자의 효율적인 도입 및 발현이 이루어질 수 있는 유전자 전이 system의 확립이다. 이에 본 연구에서는 외래 유전자의 높은 전이율과 전이된 유전자의 안정성, 그리고 전이된 유전자의 높은 발현율을 나타내는 retrovirus vector system을 사용하였다. 이 system의 문제점인 virus 외막 구조에 의해 결정되는 좁은 숙주 범위의 문제점은 vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G)을 피막으로 하는 pseudotyped retroviral vector system을 도입함으로써 해결하였다(Burns 등, 1993; Liu 등, 1996). 본 연구에서 구축한 retrovirus vector system의 구조적 특징은 다음과 같다. 첫째, FSH의 α 와 β 소단위의 유전자가 CTP로 연결되어 있는 형태의 DNA 단편을 internal promoter인 CMV promoter의 downstream 위치에 삽입하였다. 선행된 연구에서 CTP에 의해 두 소단위를 결합하여 발현시킨 경우 재조합 hFSH의 체내 반감기를 증가시킬 수 있는 것으로 보고되어 있다(Fares 등, 1992; Lapolt 등, 1992; Klein 등, 2003). 둘째, 외래 유전자의 발현을 최대 3~5배 정도 증가시킨다고 보고되어 있는 WPRE 서열을 hFSH 유전자의 3' 위치에 도입하였는데(Zufferey 등, 1999), 그 결과 표적 세포 중 HeLa 세포에서 발현되는 재조합 hFSH의 농도가 5,395 mIU/ml로 매우 높게 나타났으며, BEF, NIH3T3, PFF, CEF, 그리고 CHO 세포 순으로 대체적으로 높은 발현율을 나타내었다(Fig. 3).

각 세포주에서 발현된 hFSH의 생물학적 활성을 측정하는 방법으로는 aromatase 활성 측정과 cAMP 활성 측정이 있다. 쥐의 Sertoli 세포를 이용하는 aromatase 활성 측정(Padmandbhan 등, 1987)은 분석 시간이 오래 걸리고 세포 배양 조건이 까다로운 점 등이 단점으로 지적된다. 이에 보다 간단하고 정확한 hFSH의 생물학적 활성

측정을 위하여 hFSHR가 발현되는 세포주를 확립하였는데, 이 세포에서는 세포막 표면의 G-protein과 연결된 hFSHR가 FSH와 반응하여 adenylyl cyclase의 활성을 일으키고, 이로 인해 cAMP의 생합성이 증가하는 것으로 알려져 있다(Reichert 등, 1989). 따라서 본 연구에서도 재조합 hFSH의 생물학적 활성 측정을 위해 먼저 hFSHR 유전자를 발현하는 CHO 세포를 구축하여 RT-PCR 방법으로 hFSHR의 발현을 확인하였다(Fig. 4). 그리고 CHO 세포에서 발현된 hFSHR와 CEF, CHO, HeLa 세포에서 발현된 재조합 hFSH의 반응 산물인 cAMP를 이용하여 생물학적 활성을 측정하고자 하였다. 측정 방법으로는 각종 호르몬의 면역학적 검사에 사용되는 radioimmunoassay (RIA)가 많이 사용되고 있지만 이 방법은 방사성 동위원소의 유해성이 단점이다. Sugahara 등(1996)은 재조합 hFSH의 생물학적 활성 측정에 RIA와 ELISA를 사용하여 비슷한 결과를 나타내었다. 따라서 본 실험에서는 효소를 사용하고 측정이 간편한 ELISA 방법으로 재조합 hFSH의 생물학적 활성을 측정하였으며, 실험 결과 상업적으로 판매되는 재조합 hFSH와 비교했을 때 CEF와 HeLa 세포에서 발현된 재조합 hFSH의 생물학적 활성이 더 높게 측정되었다(Fig. 5).

이상의 결과를 바탕으로 retrovirus vector system을 이용한 여러 표적 세포에서 재조합 hFSH의 발현, 특히 CEF, CHO, HeLa 세포에서 재조합 hFSH의 발현이 효율적으로 이루어졌음을 확인하였다. 이러한 재조합 DNA 기술과 동물세포를 이용한 hFSH의 생산은 폐경기 여성의 소변으로부터 추출한 FSH에 비하여 소변으로 인한 문제점에 영향을 받지 않고, LH 활성도가 없으며 FSH의 특이적 활성도가 뛰어나고, 무엇보다도 재조합 DNA 기술로 인한 대량 생산이 가능하다고 보고하였다. 이 뿐만 아니라 임상시험에서 재조합 hFSH가 폐경기 hFSH 및 고도로 정제된 폐경기 hFSH에 비해 과배란 유도에 있어서 효과적인 결과를 나타내고 있다(Bergh 등, 1997; Out 등, 1996). 따라서 본 실험의 연구 데이터는 불임 치료제인 재조합 hFSH를 *in vitro*에서 보다 효율적으로 생산할 수 있는 system 구축에 크게 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

인용문헌

- Baenziger JU, Green ED (1988): Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: Structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta* 947:287-306.
- Bagatti GC, Datola CA, Gostoli G, Mascia M, Polletta P, Roncalli G, Simoni P (2001): Characterization and comparison of recombinant human follicle-stimulating hormones. *J Clin Res* 4:91-104.
- Bergh C, Howles CM, Borg K, Hamberger L, Josefsson B, Nilsson L, Wikland M (1997): Recombinant human follicle stimulating hormone (r-hFSH; Gonal-F) versus highly purified urinary FSH (Metrodin HP): results of a randomized comparative study in wo-

- men undergoing assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 12:2133-2139.
4. Braun P, LaBaer J (2003): High throughput protein production for functional proteomics. *Trends biotechnol* 21:383-388.
 5. Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK (1993): Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8033-8037.
 6. Chang GD, Chen CJ, Lin CY, Chen HC, Chen H (2003): Improvement of glycosylation in insect cells with mammalian glycosyltransferases. *J Biotechnol* 102:61-71.
 7. Chung JY, Ahn HK, Lim SW, Sung YH, Koh YW, Park SK, Lee GM (2003): Development of recombinant Chinese hamster ovary cell lines producing human thrombopoietin or its analog. *J Microbiol Biotechnol* 13: 759-766.
 8. Fares FA, Suganuma N, Nishimori K, LaPolt PS, Hsueh AJ, Boime I (1992): Design of a long-acting follitropin agonist by fusing the C-terminal sequence of the chorionic gonadotropin β subunit to the follitropin β subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4304-4308.
 9. Jennings CJ, Moreland K, Peterson CM (1996): *In vitro* fertilization. *Drugs* 52:313-343.
 10. Jones HW Jr, Jones GS, Andrews MC, Acosta A, Bundren C, Garcia J, Sandow B, Veeck L, Wilkes C, Witmyer J, Wortham JE, Wright G (1982): The program for *in vitro* fertilization at Norfolk. *Fertil Steril* 38: 14-21.
 11. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L (2001): Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Med* 7: 33-40.
 12. Kim MO, Kim SH, Shin MJ, Lee DB, Kim TW, Kim KS, Ha JH, Lee S, Park YB, Kim SJ, Ryoo ZY (2006): Human erythropoietin induces lung failure and erythrocytosis in transgenic mice. *Mol Cells* 23:17-22.
 13. Kim NS, Chang KH, Chung BS, Kim SH, Kim JH, Lee GM (2003): Characterization of humanized antibody produced by apoptosis-resistant CHO cells under sodium butyrate-induced condition. *J Microbiol Biotechnol* 13:926-936.
 14. Kim T (2002): Retrovirus-mediated gene transfer. In *Transgenic Animal Technology*. Edited by Pinkert CA. 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA, pp 173-193.
 15. Kirby SL (1999): The therapeutic potential of erythropoietin receptor transgenes. *Cytokines Cell Mol Ther* 5:97-104.
 16. Klein J, Lobel L, Pollak S, Lustbader B, Ogden RT, Sauer MV, Lustbader JW (2003): Development and characterization of a long-acting recombinant hFSH agonist. *Hum Reprod* 18:50-56.
 17. Lapolt PS, Nishimori K, Fares FA, Perlas E, Boime I, Hsueh AJW (1992): Enhanced stimulation of follicle maturation and ovulatory potential by long acting follicle-stimulating hormone agonist with extended carboxylterminal peptide. *Endocrinol* 131: 2514-2520.
 18. Link N, Aubel C, Kelm JM, Marty RR, Greber D, Djonov V, Bourhis J, Weber W, Fussenegger M (2006): Therapeutic protein transduction of mammalian cells and mice by nucleic acid-free lentiviral nanoparticles. *Nucleic Acids Res* 34:e16.
 19. Liu ML, Winther BL, Kay MA (1996): Pseudotransduction of hepatocytes by using concentrated pseudotyped vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G)-Moloney murine leukemia virus-derived retrovirus vectors: comparison of VSV-G and amphotropic vectors for hepatic gene transfer. *J Virol* 70:2497-2502.
 20. Loumaye E, Campbell R, Salat-Baroux J (1995): Human follicle-stimulating hormone produced by recombinant DNA technology: a review for clinicians. *Hum Reprod Update* 1:188-199.
 21. Montesino R, Garcia R, Quintero O, Cremata JA (1998): Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 14: 197-207.
 22. Moyle WR, Myers RV, Wang Y, Han Y, Lin W, Kelley GL, Ehrlich PH, Rao SN, Bernard MP (1998): Functional homodimeric glycoprotein hormones: implications for hormone action and evolution. *Chem Biol* 5:241-254.
 23. Nishikawa M, Huang L (2001): Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther* 12:861-870.
 24. Out HJ, Mannaerts BMJL, Driessen SGAJ, Bennink HJTC (1996): Recombinant follicle stimulating hormone (rFSH; Puregon) in assisted reproduction: more oocytes, more pregnancies. Results from five comparative studies. *Hum Reprod Update* 2:162-71.
 25. Out HJ., Bennink HJ, de Laat WN (1999): What are the clinical benefits of recombinant gonadotrophins? the development of recombinant FSH (Puregon): a scientific business. *Hum Reprod* 14:2189-2190.
 26. Padmanbhan V, Chappel SC, Beitins IZ (1987): An improved *in vitro* bioassay for follicle-stimulating hormone (FSH): suitable for measurement of FSH in unextracted human serum. *Endocrinol* 121:1089-1098.
 27. Palomares LA, Estrada MS, Ramirez OT (2004): Production of recombinant protein: Challenges and solutions. *Methods Mol Biol* 267:15-52.
 28. Pavlou AK, Reichert JM (2004): Recombinant protein therapeutics-success rates, market trends and values to 2010. *Nature Biotechnol* 22:1513-1519.
 29. Prevost RR (1998): Recombinant follicle-stimulating

- hormone: New biotechnology for infertility. *Pharmacotherapy* 18:1001-1010.
30. Reichert Jr, LE, Dattatreymurty B (1989): The follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in testis: interaction with FSH, mechanism of signal transduction, and properties of the purified receptor. *Biol Reprod* 40:13-26.
 31. Schaison G, Young J, Pholsena M, Nahoul K, Couzinet B (1993): Failure of combined follicle-stimulating hormone-testosterone administration to initiate and/or maintain spermatogenesis in men with hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 77:1545-1549.
 32. Speroff L, Glass RH, Kase NG (1989): *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, pp 583-609. 3rd Ed. Williams & Wikins, Baltimore, USA.
 33. Sugahara T, Sato A, Kudo M, Ben-Menahem D, Pixley MR, Hsueh AJ, Boime I (1996): Expression of biologically active fusion genes encoding the common α subunit and the follicle-stimulating hormone β subunit. *J Biol Chem* 271:10445-10448.
 34. Walsh G (2006): Biopharmaceutical benchmarks. *Net Biotechnol* 24:769-776.
 35. Wurm FM (2004): Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* 22:1393-1398.
 36. Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ (1999): Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes by retroviral vectors. *J Virol* 73:2886-2892.
(접수일자: 2011. 3. 2 / 채택일자: 2011. 3. 7)