

Sodium butyrate와 sodium pyruvate 첨가에 의한 hCTLA4Ig 생산성 증대

유미희, 김수진, 권준영, 남형진, 김동일*

Enhanced Production of hCTLA4Ig by Adding Sodium Butyrate and Sodium Pyruvate

Mi-Hee Yoo, Soo-Jin Kim, Jun-Young Kwon, Hyung-Jin Nam, and Dong-Il Kim*

접수: 2011년 9월 21일 / 게재승인: 2011년 10월 14일
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-immunoglobulin (hCTLA4Ig), an immunosuppressive agent, was expressed in transgenic rice cells using RAmy3D promoter and RAmy1A signal peptide for the inducible production and secretion into culture media by sugar depletion. In this study, sodium butyrate was used as a small molecular enhancer (SME) to enhance the production of hCTLA4Ig in transgenic rice cell suspension cultures. When 1 mM sodium butyrate was added in sugar-free media, relative viability was not reduced, while the productivity was improved 1.3-fold. In addition, by supplementing 87 mM sodium pyruvate as an alternative energy source during the production phase, death rate of the cells was decreased. When sodium pyruvate was not added, most cells became dead at day 6. However, by adding sodium pyruvate, 18% of viability can be maintained until day 10 and the production of hCTLA4Ig was enhanced 1.4-fold. When the combination of sodium pyruvate and sodium butyrate at optimum concentrations was added, the highest viability and hCTLA4Ig production could be obtained. The highest level of hCTLA4Ig reached up to 35 mg/L at day 10.

Keywords: transgenic plant cell culture, hCTLA4Ig, sodium butyrate, RAmy3D promoter, small molecular enhancer

인하대학교 공과대학 생물공학과
Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-715, Korea
Tel: +82-32-860-7515, Fax: +82-32-872-4046
e-mail: kimdi@inha.ac.kr

1. 서론

생물의약품 (biopharmaceuticals)은 재조합 DNA 기술과 같은 생물공학기술을 기반으로 생산된 biologics를 의미하며, 치료 및 진단을 목적으로 하는 단백질 의약품과 nucleic acid 등이 해당된다. 이러한 생물의약품은 크게 치료용 항체와 치료용 단백질, 유전자치료제, 세포치료제, 백신 등으로 분류할 수 있다 [1].

형질전환 식물 또는 식물세포 배양을 이용하여 생산되는 치료용 재조합 단백질을 plant-made pharmaceuticals (PMPs)라고 한다. 초기 식물 기반 시스템에서는 이차대사산물을 생산하는 것이 연구의 중심에 있었지만, 최근에는 식물세포 배양을 통한 고부가가치의 재조합 단백질의 생산에 대한 연구가 두각을 나타내고 있다 [2]. *Escherichia coli*나 CHO 세포와 같은 다른 숙주세포들에 비해 식물세포의 경우 동물유래 바이러스나 병원균에 감염되지 않는다는 측면에서 안전한 시스템이며, 생산이나 정제과정 측면에서 경제적이다 [3]. 또한 glycosylation과 같은 post-translational modification (PTM)이 가능하기 때문에 고분자량의 당단백질이나 구조적으로 복잡한 단백질의 생산도 가능하다는 장점을 갖고 있다.

Human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-immunoglobulin (hCTLA4Ig)는 CTLA-4의 extracellular domain과 IgG의 Fc 부분을 융합한 재조합단백질로서, 막 단백질인 CTLA-4는 체내의 용해도가 낮고 반감기도 짧은 반면, Fc 부분을 융합한 결과 dimeric CTLA4Ig를 형성하여 생체내에서의 half-life가 연장되었다 [4]. 면역억제제의 역할을 하는 hCTLA4Ig는 T cell의 활성화와 관련이 있다. CTLA-4는 CD28보다 20~50배 높은 친화력으로 B7 수용체에 경쟁적으로 결합한다. 그로

인해 T cell의 활성을 억제하거나 감소시키는 신호를 전달하여 T cell 특이적 면역억제 반응을 유도한다. 과거에 쓰이던 면역억제제는 비특이적 면역억제를 수행하는 반면, CTLA-4의 경우 T cell 특이적 면역억제 반응을 유도하므로 비교적 안전한 치료제로 간주된다.

치료용 단백질의 그 생산성은 산업화에 있어 중요한 요소이다. 식물세포의 경우, 다른 생산시스템에 비해, 목적 단백질의 발현율이 낮기 때문에, 이를 증대시키기 위한 연구가 오래전부터 진행되어 왔다. 식물세포의 낮은 생산성을 향상시키고 정확한 발현수준을 조절하기 위해서 당 고갈에 의하여 발현되는 벼 유래의 α -amylase RAm3D promoter와 같이 특정 조건에 의해 발현이 유도되는 inducible promoter에 대한 연구가 진행되고 있다 [5]. 또한 고발현을 제공하는 숙주 세포나 발현 벡터를 개발하는 방법 [6], 배지를 최적화 하는 방법 [5], 낮은 온도에서 배양하는 방법 [7] 등 세포주나 공정개발을 통한 생산성 증진 연구도 활발하다. 동물세포배양을 이용한 재조합단백질 생산의 경우 small molecule enhancer (SME)를 첨가하여 단백질 생산량을 높이는 연구도 다수 수행되어 생산 현장에 적용되고 있다 [8].

Sodium butyrate는 가장 널리 사용되는 SME 중 하나로, 동물세포배양을 이용하여 tPA [9], α_1 -antitrypsin [10], hEPO [11], scu-PA [12], immunoglobulin [13] 등을 생산할 때 사용된 보고들이 있다. Sodium butyrate는 histone deacetylase를 억제하여 chromatin의 packing을 느슨하게 만들어줌으로써 transcription factor의 접근성이 용이하게 만들어 mRNA의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 sodium butyrate는 목적 단백질의 발현을 증가시키는 반면에 세포 증식을 저해하고, apoptosis를 유발하기 때문에 적절한 농도로 사용해야만 한다 [14]. 형질전환 식물세포배양을 이용한 재조합단백질 생산의 경우 SME를 처리하여 생산성을 높인 보고가 없었으므로 벼 세포배양을 이용한 hCTLA4Ig 생산에 sodium butyrate를 처리하는 것은 새로운 보고로서 의미가 있다고 할 수 있다.

본 연구에서는 배지 내 당 고갈시 강력하게 발현되는 RAm3D promoter를 이용하여 형질전환 벼 현탁세포배양을 통해 융합단백질인 hCTLA4Ig를 생산하였으며, 대표적인 SME인 sodium butyrate를 첨가하여 식물세포배양을 통한 목적 단백질 생산성의 증진 효과를 확인하고자 하였다. 또한 본 시스템은 당 고갈시 목적 단백질의 생산을 유도하기 때문에 에너지원이 없는 상태에서 단백질이 생산됨으로 인해 생산기에서 세포가 사멸되면서 단백질을 생산하게 된다. 이런 문제점들을 보완하고자 대체 에너지원으로 sodium pyruvate를 첨가하여 세포생존도에 긍정적 효과를 얻고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 세포주 및 세포배양

본 연구에 사용된 세포주는 hCTLA4Ig를 생산하도록 형질전환된 벼 (*Oryza sativa* L. cv. Dongjin) 현탁세포이며, 이는 보령제약으로부터 분양받아 사용하였다. 이 세포주는

signal peptide와 벼의 α -amylase gene family인 RAm3D inducible promoter를 포함하여 유전자 재조합되었으며, 당 고갈시에 목적 단백질이 강하게 발현되고 생산 후 배지로 분비된다.

형질전환된 벼 현탁세포의 성장배지로 AA (amino acid) 기본배지 [15]에 탄소원으로는 30 g/L sucrose, 성장조절제로는 2.0 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)와 0.2 mg/L kinetin, 0.1 mg/L gibberellic acid (GA₃)을 사용하였고, 0.1 mL/L Murashige and skoog (MS) vitamin mixture를 첨가하였다. 배지의 pH는 5.8로 조절하여, 500-mL Erlenmeyer flask에 140 mL씩 분주하였으며, 기압 증기 멸균하여 사용하였다. 배지 140 mL 중 10%에 해당하는 14 mL은 아미노산 혼합용액으로 첨가하였고, filter 멸균하여 따로 준비하였다. 아미노산 혼합용액은 1.0 mM glycine, 6.0 mM glutamine, 2.0 mM aspartic acid, 1.3 mM arginine을 농축한 용액에 0.1 mg/L GA₃, 50 mg/L hygromycin을 첨가하였다. 위와 같은 AA 배지에 현탁화한 벼 세포는 28°C, 120 rpm, 암조건이 유지되는 shaking incubator에서 배양하였고, 9일 간격으로 계대배양을 수행하였다. 목적 단백질의 유도 생산을 위한 생산배지로는 sucrose가 첨가되지 않은 AA 배지를 사용하였으며, 위와 동일한 배양조건에서 실험을 수행하였다.

2.2. 세포량 측정

세포량을 확인하기 위해서 세포생체량 (fresh cell weight, FCW)과 세포건체량 (dry cell weight, DCW)을 측정하였다. 100-mL Erlenmeyer flask에서 배양한 세포현탁액을 Buchner funnel과 Whatman No. 1 여과지를 이용하여 세포와 배양액으로 분리하였다. 분리된 세포는 배지와 동량의 증류수로 2~3회 세척한 후, 진공펌프를 이용하여 수분을 제거하였다. 미리 무게를 측정한 weighing dish에 세포를 옮겨 담아서 FCW를 측정하였다. FCW 측정 후, 60°C의 dry oven에서 48시간 동안 무게의 변화가 없을 때까지 건조하여 DCW를 측정하였다.

2.3. Cell viability 측정

세포의 상대적인 생존도는 TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 환원법으로 측정하였다 [16]. FCW 0.1 g 세포를 microtube에 담아 1.5% TTC 용액 1.6 mL을 첨가하여 20°C에서 24시간 반응시켰다. 그 후, TTC 용액을 제거하고 세포 내에 생성된 red formazan을 추출하기 위해 95% 에탄올을 1 mL 첨가하여 60°C에서 30분 동안 반응시켰다. 15,000 rpm에서 원심분리한 후, 상등액은 spectrophotometer (Agilent Technologies Inc.)를 이용하여 파장 485 nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank로는 95% 에탄올을 사용하였다.

2.4. Protease 활성 측정

Modified Anson's method [17]를 이용하여 protease의 활성을 측정하였다. Protease 활성을 측정하기 위해 0.5 mL의 1% Na-caseinate (67 mM phosphate buffer, pH 7.0) 용액에 배지 시료 0.5 mL을 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다.

그 후 30% TCA (trichloroacetic acid) 용액 0.3 mL을 첨가하여 37°C에서 30분간 정치시킨 후 반응을 종료하였다. 15,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 96-well plate에 상등액 0.05 mL, 0.5 M NaOH 0.1 mL, Folin phenol reagent 0.05 mL을 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 흡광도는 파장 660 nm에서 측정하였다. 표준물질로는 0.4 mg/mL의 tyrosine 용액을 1/2씩 희석하여 사용하였고, blank는 증류수로 하였다. 단위 1 U (unit)은 같은 조건에서 분당 tyrosine 1 mg이 생산되는 효소의 양으로 정의하였다.

2.5. 총단백질 정량

배지내 총단백질의 양은 BCA method (BCA protein assay kit, Pierce)를 사용하여 정량하였다. Bovine serum albumin을 표준물질로 사용하였고 파장 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.6. hCTLA4Ig 정량

hCTLA4Ig의 정량분석을 위해서는 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)를 사용하였다. Sandwich ELISA를 수행하기 위해 1차 항체로 goat anti-human IgG antibody (KPL)를 사용하였고, 2차 항체로 peroxidase-labeled goat anti-human IgG antibody (KPL)를 사용하였다. 발색반응을 위한 기질로는 ABTS peroxidase substrate (KPL)을 사용하였다. 405 nm에서 흡광도를 측정하였고, ImmunoPure human IgG (Pierce)를 표준물질로 사용하였다.

2.7. Total genomic DNA 분석

FCW 1~2 g의 세포에 액체 질소를 붓고 급속히 얼린 후, 24시간 동안 건조기에 넣어 세포 내 수분을 완전히 제거하였다. 동결 건조된 세포를 막자사발에 넣어 갈은 후, 그 powder를 0.1 g씩 eppendorf tube에 나누어 담았다. DNeasy Plant Mini kit (Qiagen)를 사용하여 DNA를 추출하고 1.2% agarose gel에 10 mL 씩 loading한 후 전기영동 장치를 이용하여 100 V 전압으로 DNA를 크기별로 분리하였다. Gel을 10 mg/mL ethidium bromide에 15분 동안 담가 염색한 후 3차 증류수에서 5분간 탈염한 후, UV로 촬영하였다. DNA 추출 방법은 kit 제작사의 표준방법을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Sodium butyrate 첨가가 미치는 영향

Sodium butyrate의 경우 높은 농도에서는 세포자체에 독성을 미칠 수 있기 때문에 최적의 농도를 결정하는 것이 중요하다 [14]. Sodium butyrate의 최적 첨가 농도를 결정하기 위해서 당이 제거된 AA 배지에 세포를 접종하여 배양을 하였다. 여기에 0, 0.5, 1, 5 mM의 sodium butyrate를 첨가하였고 hCTLA4Ig의 최대 생산량을 보기 위해 6일째에 배지를 회수하였다. Fig. 1은 sodium butyrate 농도에 따른 세포생존도와 hCTLA4Ig의 생산량에 대한 결과이다. 동물세포배양에서 sodium butyrate를 첨가하는 경우 세포생존도가 낮아진다고 알려져 있는데, 본 시스템에서도 세포생존도의 감소

를 확인 할 수 있었다. 5 mM을 첨가했을 때 세포생존도가 대조구에 비해 33% 수준으로 낮아지는 반면 0.5 mM이나 1 mM에서는 대조구와 거의 비슷한 수준으로 유지 되었다. 또한 hCTLA4Ig의 생산량은 sodium butyrate 첨가시 모두 증가함을 알 수 있었다. 그중에서도 1 mM에서 대조구에 비해 1.3배 향상되었음을 확인하였다. 따라서 추후의 실험에서는 1 mM의 sodium butyrate를 첨가하였다.

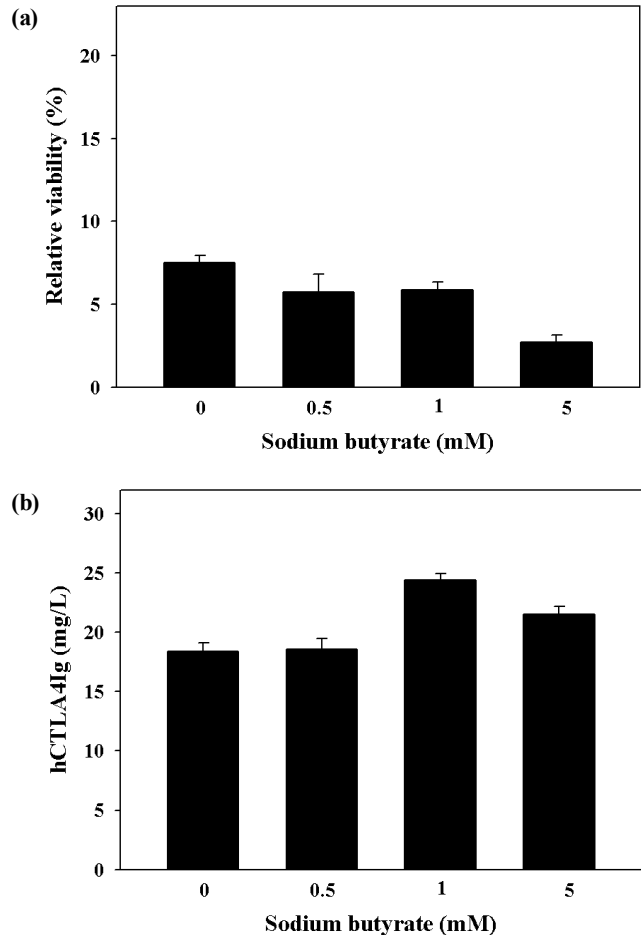


Fig. 1. Effect of sodium butyrate on (a) relative viability and (b) hCTLA4Ig production.

형질전환 비 현탁세포배양에서 hCTLA4Ig의 생산기간 동안 sodium butyrate가 미치는 영향을 알아보려고 하였다. Fig. 2는 sodium butyrate의 최적의 첨가 농도로 결정된 1 mM을 첨가시 세포 증식과 세포생존도에 대한 결과를 보여준다. 대조구와 비교했을 때 모두 비슷한 수준으로 유지됨을 확인하였다. 또한 hCTLA4Ig의 생산량을 살펴보면, 배양 6일째에 대조구에 비해 1.3배 증가된 hCTLA4Ig를 얻을 수 있었다. 보통 sodium butyrate는 세포생존도를 낮추는 단점이 있지만, 최적의 농도에서 최대의 생산성을 얻을 수 있다고 알려져 있다 [18]. 본 연구에서도 최적인 1 mM 첨가시 더 높은 농도에 비해 세포생존도가 낮아지지 않고 대조구와 비슷하게 유지됨에 따라 단백질 생산성의 향상을 유도한 것으로 보인다.

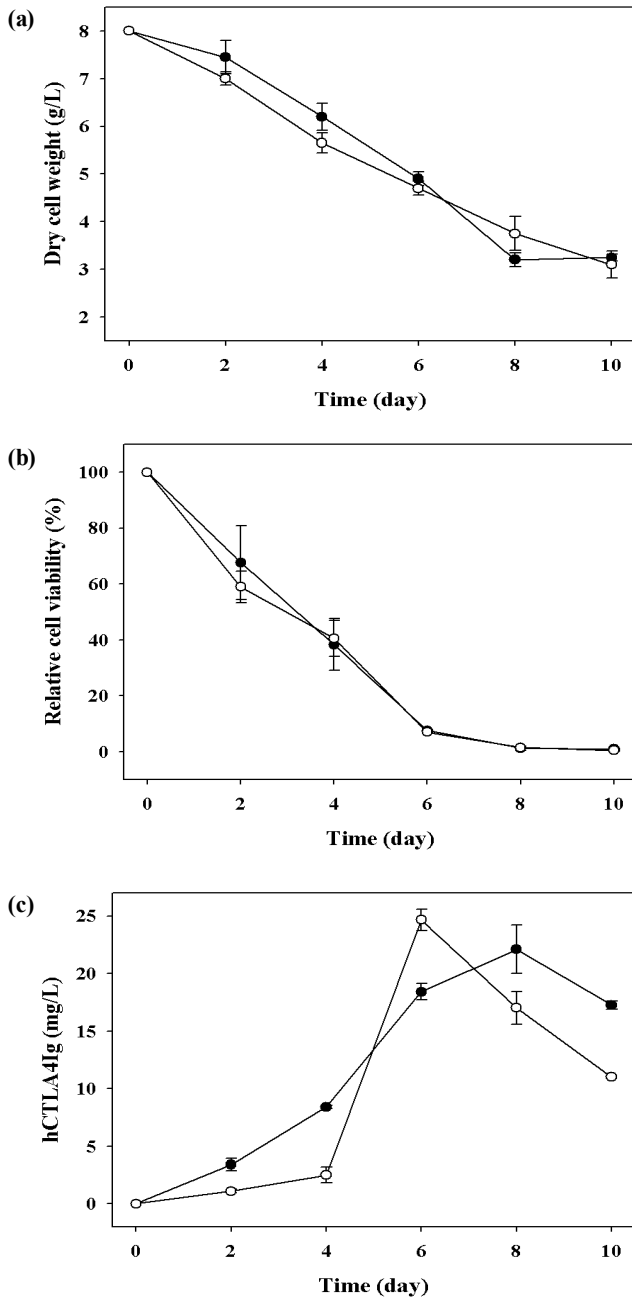


Fig. 2. Time course changes of (a) cell growth, (b) relative cell viability, and (c) hCTLA4Ig expression level. The cells were cultured in sugar-depleted AA media with sodium butyrate after induction: ●, control; ○, 1 mM sodium butyrate.

3.2. 에너지원 첨가의 영향

형질전환된 비 현탁세포를 이용하여 hCTLA4Ig 생산시 RAmY3D promoter를 이용함으로써, 당이 없는 상태에서 목적 단백질의 생산이 일어나기 때문에 세포가 죽어가면서 단백질을 생산하게 되는 것이다. 따라서 본 연구에서는 hCTLA4Ig 생산시, 새로운 에너지원을 넣어 세포의 생존도를 높이고, 궁극적으로는 목적 단백질의 생산량을 높이고자 하였다. 형질전환 비 현탁세포배양을 위해서는 87 mM의 sucrose를 배지에 첨가한다. 이당류인 sucrose는 glucose와 fructose로

분해되고, 이들은 해당과정을 통해 4분자의 pyruvate가 생산된다. 외부에서 배지에 pyruvate를 첨가하는 경우 세포질로 쉽게 들어간다고 알려져 있다. 유도 생산을 억제하는 sucrose 대신에 대체 에너지원으로 pyruvate를 첨가하기 위해 최적 농도를 결정하고자 하였다. Sucrose가 첨가되지 않은 배지에 87 mM, 174 mM의 pyruvate를 각각 첨가한 후 10일째 배양을 종료하였다. Fig. 3(a)는 pyruvate를 농도별로 첨가 하였을 때, 세포생존도에 미친 영향을 조사한 결과이다. 87 mM의 pyruvate를 첨가 하였을 때 대조구와 비슷한 세포생존도를 보였고, 174 mM의 pyruvate를 첨가할 경우 오히려 대조구보다 현저히 낮은 세포생존도를 보였으며 hCTLA4Ig의 생산도 전혀 이루어지지 않는 결과를 나타내었다. 사용된 배지의 최적 pH는 5.8이다. Pyruvate는 pKa값이 2.5인 강산이기 때문에 배지의 pH를 5.8로 맞추기 위해서는 많은 양의 NaOH가 필요하였다. 따라서 다량의 NaOH 첨가로 세포가 손상을 받게 되고, 그로 인하여 생존도 저하와 함께 목적 단백질의 생산이 이루어지지 않는 것으로 사료된다. 결론적으로 pyruvate는 적절한 대체 에너지원이 아닌 것으로 판단되었다.

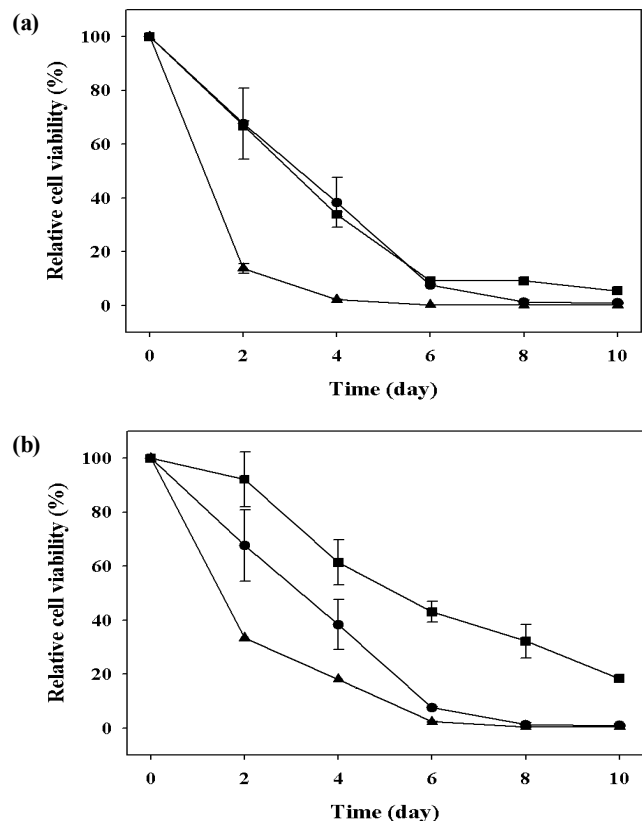


Fig. 3. Changes of relative cell viability with the addition of (a) pyruvate and (b) sodium pyruvate. Cells were cultured in sugar-depleted AA media with pyruvate and sodium pyruvate after induction: ●, control; ■, 87 mM; ▲, 174 mM pyruvate.

Pyruvate 대신 사용할 수 있는 대체 에너지원으로 pH에 큰 영향을 주지 않는 sodium pyruvate를 고려하였다. Sodium pyruvate는 세포배양에서 에너지원으로 널리 사용되고 있는 물질이다 [19]. Sodium pyruvate의 최적 첨가 농도를 결정하기

위하여 당이 제거된 AA배지에 앞서와 같은 농도인 87 mM 및 174 mM의 sodium pyruvate를 첨가하고 10일간 배양하였다. Fig. 3(b)는 sodium pyruvate 농도가 viability에 미치는 영향을 보여준다. 87 mM의 sodium pyruvate를 첨가하였을 경우, 대조구에 비하여 전반적으로 hCTLA4Ig 생산과 세포생존도가 높았다. Sodium pyruvate를 첨가하지 않거나, 174 mM을 첨가하였을 경우에는 8일째부터 거의 모든 세포가 사멸한 것을 볼 수 있는 반면 87 mM을 첨가하였을 때는 배양이 종료되는 10일째에도 18%의 세포가 살아있는 결과를 볼 수 있다. 세포생존도의 증가는 hCTLA4Ig 생산에도 영향을 주어 대조구에서는 8일째 22 mg/L의 생산량을 보이는 반면 87 mM의 sodium pyruvate를 첨가해주었을 경우에는 10일째에 30 mg/L로, 대조구 대비 1.4배 증가된 생산량을 보였다 (Fig. 4).

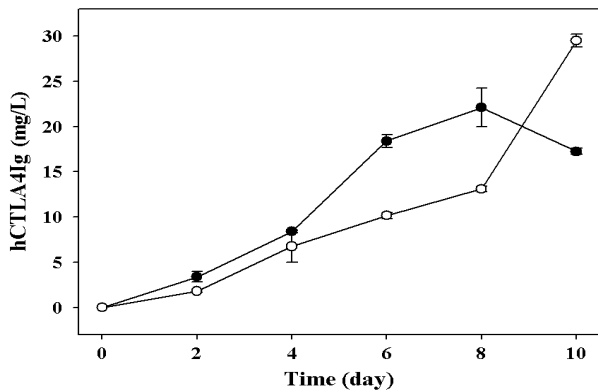


Fig. 4. Effect of sodium pyruvate on hCTLA4Ig production: ●, control; ○, 87 mM sodium pyruvate.

3.3. Sodium butyrate와 sodium pyruvate 동시 첨가에 따른 영향

대체 에너지원으로 선정된 sodium pyruvate와 sodium butyrate를 당이 제거된 AA배지에 함께 첨가하여 세포 생존도 및 단백질 생산에 미치는 복합 영향을 조사하고자 하였다. Sodium butyrate는 생산성을 증가시키는 대신 세포 생존도를 저하시키는 단점을 보완하기 위하여, 대체 에너지원인 sodium pyruvate를 함께 첨가하여 hCTLA4Ig 생산성이 높아질 것으로 예상하였다. Sodium pyruvate 농도는 87 mM로 결정하였으며, sodium butyrate는 0, 0.5, 1, 5 mM로 달리하여 첨가한 후 배양기 10일째에 배지를 회수하였다. Fig. 5은 sodium pyruvate 87 mM을 첨가한 것과 첨가하지 않은 경우에 sodium butyrate를 각 농도별로 첨가한 결과이다. Sodium pyruvate를 첨가하지 않고 sodium butyrate를 첨가할 경우 10일째 거의 모든 세포가 사멸함을 볼 수 있다. 반면에 sodium pyruvate를 첨가하고 sodium butyrate를 첨가한 경우, 0.5 mM과 1 mM에서는 배양 10일째 18% 정도의 viability를 보이고, 5 mM에서도 7% 정도의 viability를 보였다. Sodium butyrate 첨가시 세포의 생존도가 감소됨을 확인하였지만, sodium pyruvate를 함께 첨가해줌으로써 대체 에너지원으로 작용하여 세포 생존도를 증가시킴을 알 수 있었다. 또한 hCTLA4Ig의 생산 측면에서도 87 mM의 sodium pyruvate와 1 mM의 sodium butyrate를 첨가하였을 때 36 mg/L로 가장 좋았으며, 둘 다

첨가하지 않은 대조구에서의 18 mg/L 대비 2배 향상된 결과를 확인할 수 있었다 (Fig. 6). 이로서 sodium pyruvate 87 mM과 sodium butyrate 1 mM을 최적 농도로 결정하였다. Sodium butyrate와 sodium pyruvate를 최적 농도로 조합하여 첨가한 결과, 배양을 종료한 10일째 까지 대조구보다 계속 높은 세포 생존도를 유지하였다 (Fig. 7a). 또한 hCTLA4Ig의 생산량은 10일째에 36 mg/L까지 향상되는 결과를 볼 수 있었으며, 대조구에서는 8일째부터 생산량이 감소하는 반면 조합하여 처리한 경우 10일째까지 생산량이 꾸준히 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한 sodium butyrate와 sodium pyruvate를 각각 처리한 것 보다 더 높은 생산량을 보였다 (Fig. 7b). 일반적으로 sodium butyrate는 히스톤 디아세틸화 억제제로 apoptosis를 유발한다고 알려져 있다. 이를 확인하기 위하여 DNA fragmentation 정도를 확인 하였다. 그 결과 sodium butyrate만 첨가했을 때 보다 sodium butyrate와 sodium pyruvate를 함께 첨가하였을 때 DNA fragmentation이 확연히 줄어든 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 8). 따라서 세포의 생존도를 높이고 apoptosis를 저해하여 목표 단백질 생산성을 향상시킬 수 있음을 알 수 있었으며 이는 형질전환 식물세포배양을 이용한 외래 단백질 생산에 있어서는 최초로 보고되는 결과로 사료된다.

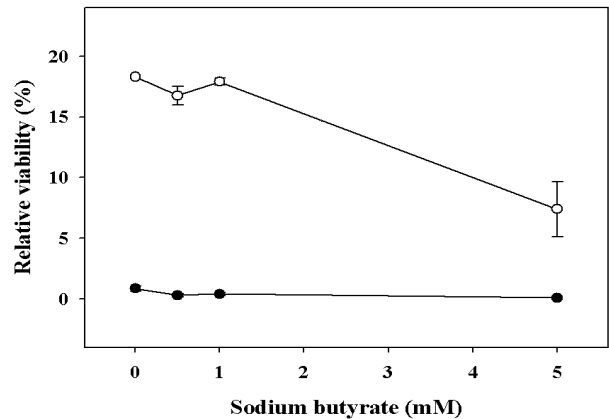


Fig. 5. Effect of sodium butyrate on relative viability: ●, 0 mM; ○, 87 mM sodium pyruvate.

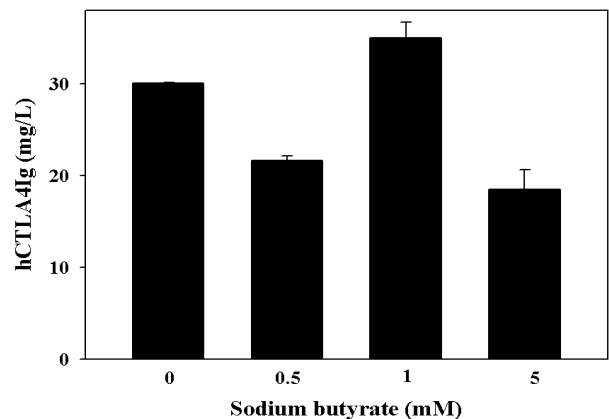


Fig. 6. Effect of sodium butyrate concentration on hCTLA4Ig production.

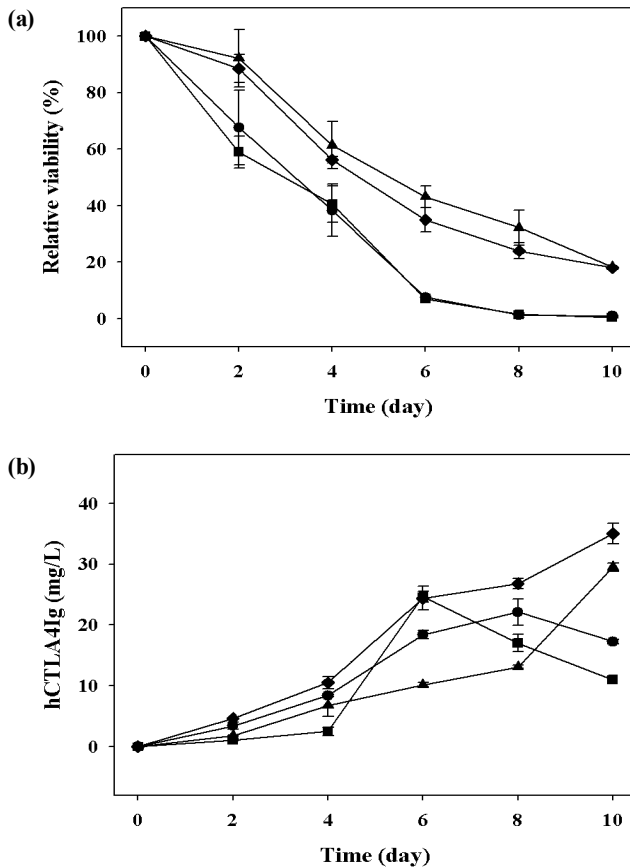


Fig. 7. Effect of combined addition of sodium butyrate and sodium pyruvate on (a) relative cell viability and (b) hCTLA4Ig expression level: ●, control; ■, 1 mM sodium butyrate; ▲, 87 mM sodium pyruvate; ◆, 1 mM sodium butyrate and 87 mM sodium pyruvate.

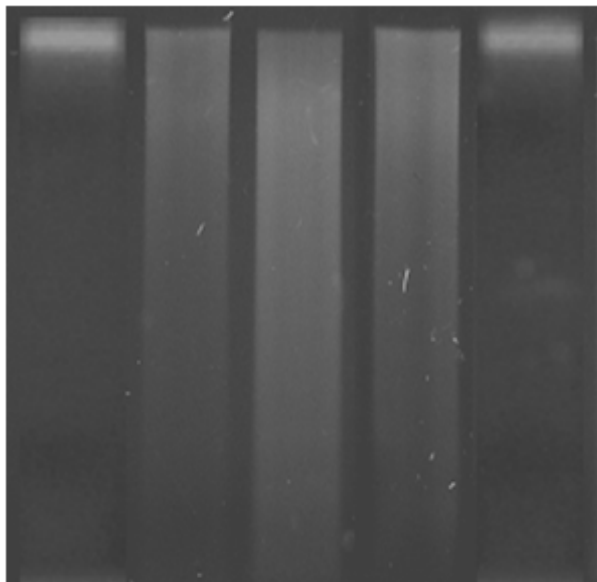


Fig. 8. DNA fragmentation analysis for the confirmation of apoptosis. The cells were cultured in sugar-depleted AA media with both sodium butyrate and sodium pyruvate after induction: lanes 1-3, control cells at day 2, 4 and 6; lane 4, 1 mM sodium butyrate at day 6; lane 5, 1 mM sodium butyrate and 87 mM sodium pyruvate at day 6.

4. 결론

본 연구에서는 식물세포배양을 통한 hCTLA4Ig의 생산성 증대를 위해 sodium butyrate 및 sodium pyruvate를 첨가하였다. SME 중 가장 널리 이용되는 sodium butyrate 첨가시 최적농도인 1 mM에서는 세포생존도는 대조구와 유사한 결과를 보였고 hCTLA4Ig 생산량은 1.3배 향상되었다. 형질전환 베타현탁세포배양의 경우 당 고갈시 목적 단백질의 생산이 유도되기 때문에 에너지원이 없는 상태에서 생산이 이루어지고 이로 인해 세포 사멸이 발생한다. 따라서 대체 에너지원을 첨가하여 사멸 속도를 늦추고자 하였다. Pyruvate는 산성을 띄기 때문에 대체 에너지원으로 배지에 첨가 할 경우 최적 pH를 맞추기 위해 다량의 NaOH를 필요로 하고 그로 인해 세포가 손상된다. pH에 큰 영향을 미치지 않는 sodium pyruvate를 87 mM로 첨가 할 경우 배양 10일째까지 세포생존도가 높았으며, hCTLA4Ig 생산량은 1.4배 향상되었다. 87 mM sodium pyruvate와 1 mM sodium butyrate를 함께 첨가하였을 경우, 대조구에 비해 hCTLA4Ig 생산량이 2배 향상되었고, 배양 10일째까지 생존도가 어느 정도 유지됨을 알 수 있었다. Sodium butyrate에 의해 세포사멸이 유도되지만 에너지원인 sodium pyruvate가 세포의 apoptosis를 억제하여 사멸 속도를 늦추면서 최종적으로는 hCTLA4Ig의 생산성 향상을 가져온 것으로 생각된다.

감사

본 연구는 지식경제부 바이오특성화대학원 운영사업의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

References

1. Strohl, W. R. and D. M. Knight (2009) Discovery and development of biopharmaceuticals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 668-672.
2. Gomord, V., P. Chamberlain, R. Jefferis, and L. Faye (2005) Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. *Trends Biotechnol.* 23: 559-565.
3. Doran, P. M. (2006) Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *Trends Biotechnol.* 24: 426-432.
4. 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 (CTLA4Ig) in milk by transgenesis. *J. Immunol. Methods* 277: 171-183.
5. Hellwig, S., J. Drossard, R. M. Twyman, and R. Fischer (2004) Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat. Biotechnol.* 22: 1415-1422.
6. Jones, D., N. Kroos, R. Anema, B. van Montfort, A. Vooy, S. Kraats, E. Helm, S. Smits, J. Schouten, and K. Brouwer (2003) High-level expression of recombinant IgG in the human cell line PER.C6. *Biotechnol. Prog.* 19: 163-168.
7. Yoon, S. K., J. Y. Song, and G. M. Lee (2003) Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level,

- and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* 82: 289-298.
8. Allen, M. J., J. P. Boyce, M. T. Trentalange, D. L. Treiber, B. Rasmussen, B. Tillotson, R. Davis, and P. Reddy (2008) Identification of novel small molecule enhancers of protein production by cultured mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* 100: 1193-1204.
 9. Palermo, D., M. DeGraaf, K. Marotti, E. Rehberg, and L. Post (1991) Production of analytical quantities of recombinant proteins in Chinese hamster ovary cells using sodium butyrate to elevate gene expression. *J. Biotechnol.* 19: 35-47.
 10. Paterson, T., J. Innes, and S. Moore (1994) Approaches to maximizing stable expression of α 1-antitrypsin in transformed CHO cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 691-698.
 11. Wang, M. (2002) Erythropoietin production from CHO cells grown by continuous culture in a fluidized-bed bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 77: 194-203.
 12. Kim, J. S., B. C. Ahn, B. P. Lim, Y. D. Choi, and E. C. Jo (2004) High-level scu-PA production by butyrate-treated serum-free culture of recombinant CHO cell line. *Biotechnol. Prog.* 20: 1788-1796.
 13. Mimura, Y., J. Lund, S. Church, S. Dong, J. Li, M. Goodall, and R. Jefferis (2001) Butyrate increases production of human chimeric IgG in CHO-K1 cells whilst maintaining function and glycoform profile. *J. Immunol. Methods* 247: 205-216.
 14. Jeon, M. K. and G. M. Lee (2007) Correlation between enhancing effect of sodium butyrate on specific productivity and mRNA transcription level in recombinant Chinese hamster ovary cells producing antibody. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 1036-1040.
 15. Thompson, J., R. Abdullah, and E. Cocking (1986) Protoplast culture of rice (*Oryza sativa* L.) using media solidified with agarose. *Plant Science* 47: 123-133.
 16. Chang, W. C., M. H. Chen, and T. M. Lee (1999) 2,3,5-Triphenyltetrazolium reduction in the viability assay of *Ulva fasciata* (Chlorophyta) in response to salinity stress. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40: 207-212.
 17. Battaglino, R., M. Huergo, A. Pilosof, and G. Bartholomai (1991) Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 292-296.
 18. Rodriguez, J., M. Spearman, N. Huzel, and M. Butler (2005) Enhanced production of monomeric interferon- β by CHO cells through the control of culture conditions. *Biotechnol. Prog.* 21: 22-30.
 19. Chen, Z., K. Iding, D. Lütkemeyer, and J. Lehmann (2000) A low-cost chemically defined protein free medium for a recombinant CHO cell line producing prothrombin. *Biotechnol. Lett.* 22: 837-841.