

## 요소회로 효소 유전자로 형질전환 된 Chinese Hamster Ovary 세포의 암모니아 제거능력과 세포성장률

김훈진, 정명일, 장운정, 임미희, 김익환\*, 김익영\*

중앙대학교 약학부, 고려대학교 생명공학원\*

Previously we developed a CHO cell line (CHO-OTC1-A19) expressing the first two enzymes of urea cycle. This cell line showed higher ammonia removal activity and faster growth rate than the vector controlled CHO cells (CHO-neo-5). The purpose of this study was to develop a cell line with higher ammonia removal activity than the cell line developed previously. To accomplish this, we constructed stable CHO cell lines expressing the first three, the first four, or all five enzymes of urea cycle by the stable transfection method. We finally selected CHO-AL-19 cell line expressing the first four enzymes of the cycle with higher ammonia activity than CHO-OTC1-A19 and CHO-neo-5 cell lines: 40% and 15% higher than those of CHO-neo-5 and CHO-OTC1-A19 cell lines 72 hour after culture started, respectively. It also showed 44% and 10% higher cell viability than CHO-neo-5 and CHO-OTC1-A19 cell lines at higher cell density. In addition, CHO-AL-19 cells showed 45%-60% and about 20% lower ammonia concentration per cell than those of CHO-neo-5 and CHO-OTC1-A19 cell lines, respectively. These results indicate that CHO-AL-19 could be used in the production of human therapeutic proteins with higher efficiency.

### 서론

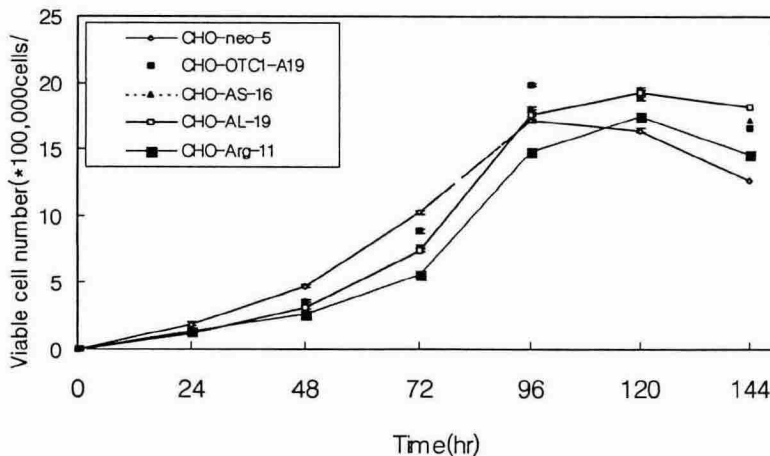
동물세포 배양시 배지 내에 암모니아가 축적됨으로 인해 세포의 성장이 저해되고<sup>1)</sup> 골지체에서 일어나는 당쇄 결합이 저해되며 동물 세포 배양을 통한 단백질 생산시 최종 산물의 역가가 저하되는 것으로 알려져 있다.<sup>2,3)</sup> 배지 내 암모니아의 축적률을 낮추기 위한 이전의 연구<sup>4)</sup>에서 요소회로의 처음 두 단계를 촉매하는 효소인 carbamoyl phosphate synthetase (CPS)와 ornithine transcarbamoylase (OTC) 유전자로 CHO-dhfr(-)을 형질전환 시켜 CHO-OTC1-A19 세포주를 개발하였다. 이 세포주는 형질전환 되지 않은 세포에 비해 배지 내 암모니아 축적율이 25-33% 낮았으며 성장률도 15-30% 높았다. 본 연구에서는 암모니아 제거능력과 세포성장률이 더 높은 세포주를 개발하기 위해 요소회로의 처음 3단계까지의 촉매효소 발현 세포주, 처음 4단계까지의 촉매 효소 발현 세포주, 5단계까지의 촉매 효소 모두를 안정하게 발현하는 CHO-dhfr(-) 세포주를 개발하였으며 이들 세포주들의 암모니아 제거능력과 세포성장률을 알아보았다.

## 재료 및 방법

첫단계로, 요소회로 요소의 마지막 3단계 촉매효소인 argininosuccinate synthetase (AS), argininosuccinate lyase (AL), arginase (Arg)에 대한 full coding cDNA를 Zeocin 저항유전자 함유 벡터인 pcDNA3.1/Zeo(+)에 각각 도입하여 재조합 plasmid인 pc3.1/Zeo(+)-AS, pc3.1 /Zeo(+)-AL, pc3.1/Zeo(+)-Arg를 구축하였다. 이들 3가지 재조합 plasmid를 Stable transfection법에 의해 요소회로의 처음 두 단계 촉매효소 발현 세포주인 CHO-OTC1-A19 세포주에 pc3.1/Zeo(+)-AS만, pc3.1/Zeo(+)-AS과 pc3.1/Zeo(+)-AL을 동시에, 또는 pc3.1/Zeo(+)-AS, pc3.1 /Zeo(+)-AL, pc3.1 /Zeo(+)-Arg 3가지 플라스미드를 동시에 도입시키는 3가지 경우로 진행하였다. 항생제 Zeocin을 이용하여 각각의 transfectant들을 선별하였고 선별된 transfectant들 중 도입된 유전자를 발현하는 세포주를 RT-PCR법에 의해 선별하였다. plasmid 벡터만을 transfection시킨 세포주인 CHO-neo-5를 대조하여, 도입된 유전자를 발현하는 세포주들 중 암모니아 제거 능력과 세포 성장률이 CHO-neo-5 및 CHO-dhfr(-) 세포주보다 높게 나타난 CHO-AS-16과 CHO - AL-19의 두 세포주를 선별하였다.

## 결과 및 고찰

이 두 세포주들의 암모니아 제거능력을 보면 (Fig1) CHO-AS-16은 배양 96시간 이후 144시간까지 배지 내 암모니아 농도가 CHO-neo-5보다 약 30-40% 정도 더 낮았고 CHO-OTC1-A19에 비해서는 큰 차이가 없이 약 2-3% 정도 더 낮았다. CHO-AL-19의 경우는 배양 72시간 후부터 144시간 까지 CHO-neo-5보다 평균 40% 이상 낮았고 CHO-OTC1-A19보다는 약 15% 정도 더 낮았다.



**Fig1.** CHO-neo-5, CHO-OTC1-A19, CHO-AS-16, CHO-AL-19세포주의 배양 배지 내 암모니아 농도. 제시된 data는 3회 실험의 평균치 ± 표준편차를 나타낸다.

세포성장률의 경우 (Fig2) CHO-AS-16은 배양 96시간 이후 CHO-neo-5보다 생존 세포수가 증가하기 시작하여 배양 144시간째에는 CHO-neo-5보다 약 36%, CHO-OTC1-A19보다는 약 3% 더 높은 세포생존율을 보였다. CHO-AL-19의 경우 역시 배양 96시간 후부터 세포생존율이 CHO-neo-5보다 증가하기 시작하여 배양 144시간에는 44%정도 더 높았고 CHO-OTC1-A19보다는 약 10% 더 높았다.

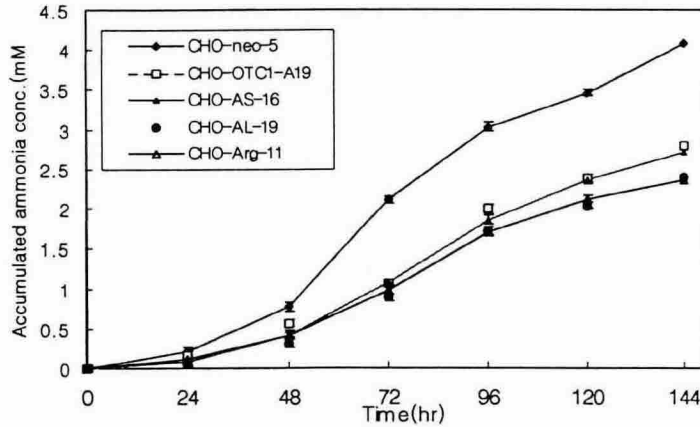


Fig2. CHO-neo-5, CHO-OTC1-A19, CHO-AS-16, CHO-AL-19세포주의 세포성장률. 제시된 data는 3회 실험의 평균치  $\pm$  표준편차를 나타낸다.

세포 당으로 환산한 배지 내 암모니아 농도를 보면 (Fig3) CHO-AS-16은 CHO-neo-5에 비해 배양 96시간 이후 약 40%-50% 정도 더 낮았고 CHO-OTC1-A19에 비서는 약 6% 정도 더 낮았다. CHO-AL-19는 CHO-neo-5에 비해서는 약 45%-60% 정도 더 낮았고 CHO-OTC1-A19에 비해서는 약 20% 더 낮았다.

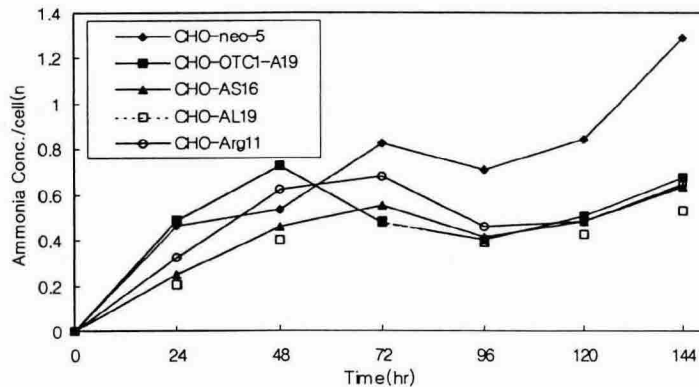


Fig3. CHO-neo-5, CHO-OTC1-A19, CHO-AS-16, CHO-AL-19세포주의 세포 당 배양 배지 내 암모니아 농도.

세포 배양 시 암모니아는 세포의 대사 노폐물로써 생성되고 생성된 암모니아 일부는 세포 내 여러 기작에 의해 아미노산이나 핵산 등의 생합성 과정에 재사용될 수 있다. 따라서 배지 내 암모니아 농도는 전체 분해 대사량과 암모니아 제거 반응의 총체적인 결과를 반영한다고 볼 수 있다. 본 연구에서 개발된 요소회로 촉매 효소 발현 세포주는 형질전환되지 않은 CHO 세포주에 비해 전체적인 암모니아 제거 능력이 높아진 것으로 보인다. 따라서 효율적인 암모니아 제거로 생존세포수가 증가된 것으로 사료된다.

### 참고문헌

1. Bushell ME, Bell SL, Scott MF, Snell K, Spier RE, Wardell JN, Sanders PG. "A three-phase pattern in growth, monoclonal antibody production, and metabolite exchange in a hybridoma bioreactor culture"(1993) *Biotechnol Bioeng.* 42. 133~139
2. Andersen DC, Bridges T, Gawlitzek M, Hoy C. "Multiple cell culture factors can affect the glycosylation of Asn-184 in CHO-produced tissue-type plasminogen activator"(2000), *Biotechnol. Bioeng.*, 5;70(1), 25-31
3. Yang M, Butler M. "Effect of ammonia on the glycosylation of human recombinant erythropoietin in culture"(2000), *Biotechnol Prog*, 16(5), 751-9.
4. Park H, Kim IH, Kim IY, Kim KH, Kim HJ. "Expression of carbamoyl phosphate synthetase I and ornithine transcarbamoylase genes in Chinese hamster ovary dhfr-cells decreases accumulation of ammonium ion in culture media"(2000), *J Biotechnol.* 25:81(2-3), 129-40.