

## 곤충세포 *Drosophila* S2 cell에서의 erythropoietin 발현에 대한 연구

신화성, 조혜숙, 차형준

포항공과대학교 화학공학과 분자생물화학공학연구소

전화 (054) 279-8265

### Abstract

의약품 인간 단백질은 현재 여러 제약으로 인해 동물 세포에서 만들어지고 있다. 그렇지만 곤충세포 시스템의 문제점인 수율과 배양의 까다로움과 같은 단점들을 보완할 수 있는 곤충세포 시스템 개발의 필요성이 대두되고 있고 본 연구에서는 의약품으로 많이 생산되고 있는 erythropoietin (EPO)을 *Drosophila* S2 cell에서 발현하여 CHO cell 유래의 EPO와 비교하였다. 그 결과 CHO cell에서보다 더 작은 분자량을 갖는 EPO를 확인하였다.

### Introduction

현재 의약품으로서 많이 쓰이고 있는 인간단백질을 생산하기 위한 재조합 발현 시스템 개발은 생명공학 뿐만 아니라 인류의 복지 향상을 위한 중요한 과제로 대두되고 있다. Erythropoietin(EPO)은 분자량이 약 30,000 dalton이고 165개의 아미노산으로 이루어진 당단백질로서 정상 상태에서는 적혈구의 생성을 조절하고 출혈후에는 그것의 생산을 가속시키는 역할을 한다. 또 EPO는 조혈성 선조(hematopoietic progenitor)에 영향을 주는데, 적혈구 직계(erythroid lineage)내에서 간세포요소(stem cell factor, SCF), IGF-I, IL-3와 같은 다른 성장 요소들과 함께 골수 적혈구의 선구세포(bone marrow erythroid precursor cell)를 성숙시키는 역할을 하며 in vitro 연구에 의하면 거핵구(megakaryocyte) DNA 합성을 촉진시켜 혈소판을 생성하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 한편 의약품으로 사용하기 위하여 재조합 human EPO(rHuEpo) 생성에 관한 연구는 지금까지 Chinese hamster ovary(CHO) 세포에서 많이 되어 왔고 이렇게 만들어진 재조합 EPO는 고질적인 신장병과 관련된 빈혈 치료제로 이용되고 있을 뿐 아니라 AIDS로 인한 빈혈 치료제, 암의 화학 치료법에도 이용되어 왔다(1).

### Material and Method

#### Cell culture

세포는 M3 media (Sigma)와 10% IMS(Sigma), 27°C에서 배양하고 있다. 항생제로는 배지 1ml당 Penicillin G(50 unit)-Streptomycin sulfate (50µg)을 사용하고 있다. 세포 수 및 viability는 trypan blue staining을 통하여 hemocytometer로 측정하였다.

## Plasmid

EPO gene은 human fetal liver cDNA library (clontech)로부터 PCR을 통해 얻었다. 단백질이 세포 밖으로 분비가 잘 되게 하기 위해서 transfer vector (invitrogen)의 BiP signal sequence를 이용하였고 분비된 단백질 분리의 편의를 위해 (His)<sub>6</sub>Tag을 이용하였다. 그리고 Transfer vector인 pMT/BiP/V5-His A의 multi cloning site에서 불필요한 gene들을 최소화하고 EPO gene을 자르지 않으면서 Bip signal sequence와 6xHis 사이에 EPO gene이 삽입되도록 하기 위해서 *Bgl* II와 *Age* I (promega)을 제한효소로 사용했다. 전체적인 재조합 플라스미드의 형태는 FIG. 1과 같다.

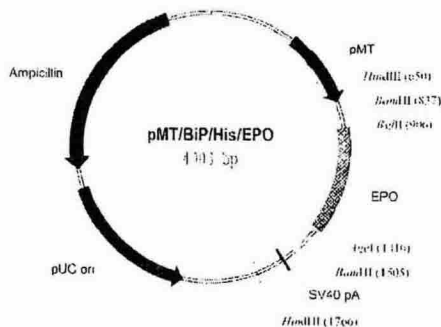


FIG. 1 *Drosophila*에서 인간 EPO의 발현을 위한 재조합 플라스미드의 제작

## Transfection

재조합 플라스미드는 lipofectin (GIBCOBRL) 방법을 이용하여 *Drosophila* S2 세포에 transfection하였다. Transfection 효율은 세포 상태, DNA 상태, DNA/lipofectin 비율, transfection 시간, 배지, serum 등 여러 요소에 의해 영향을 받기 때문에 최적의 transfection 조건을 알기 위해 각각의 요인별로 실험을 하였다. 배지는 *Drosophila* S2 세포 배양에 많이 쓰이고 있는 M3 medium을 사용하였고 serum은 transfection 효율을 떨어뜨리는 효과가 있어 사용하지 않았고 항생제 역시 사용하지 않았다. 그 경향을 positive control로 사용한 녹색형광단백질인 GFP 발현 정도로 비교하였으며 Stable transfection의 경우에는 이러한 transient transfection 조건을 바탕으로 expression vector와 selection vector의 비율을 변화시켜 최적의 stable transfection 조건을 찾으려 하였다.

## Result

## *Drosophila* S2 cell line에서의 EPO 발현 확인

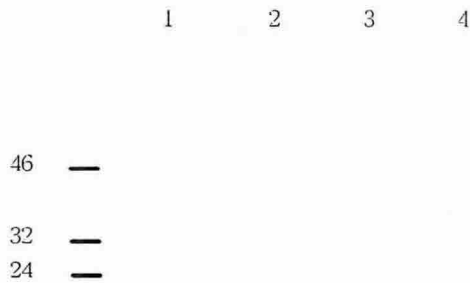


FIG 2. western blot를 통한 EPO 발현 확인

1: protein marker 2: intracellular EPO

3: secreted EPO 4: EPO from CHO

## Discussion

FIG. 3를 보면 *Drosophila* S2 cell에서 발현된 EPO의 분자량이 24 kDa 근처인 것을 알 수 있다. 문헌에 의하면 원래의 인간 유래의 EPO인 경우 그 분자량이 33-39 kDa인데 standard로 사용한 CHO cell 유래의 EPO의 경우 약간 낮게 나왔다. EPO에는 N-Glycan이 3개 있고 O-Glycan이 1개 있는데 이러한 당잔기를 전부 떼냈을 경우 분자량이 약 18 kDa으로 떨어지고 그 중 O-Glycan은 약 1 kDa을 차지하는 것으로 알려져 있다. 이러한 문헌 결과와 실험 결과를 통해 알 수 있는 것은 CHO cell 혹은 *Drosophila* S2 cell에서 발현된 EPO의 경우도 당잔기의 변화로 인해 분자량 변화가 많이 일어날 수 있다는 것이다.

## Reference

- 1 Ridley, DM., Dawkins F Perlin E., Erythropoietin: A review(1994), J Natl Med Assoc, 86: 129-135