

담배세포배양을 이용한 재조합 hGM-CSF의 생산에서 Pluronic F-68이 미치는 영향

조종문, 이상윤, 김지연, 김동일

인하대학교 공과대학 화공생명공학부

전화 (032) 863-5946, FAX (032) 872-4046

Abstract

Effect of Pluronic F-68, a nonionic surfactant, on the extracellular production of hGM-CSF in transgenic *Nicotiana tabacum* cell suspension culture was investigated. The addition of 5 g/L Pluronic F-68 did not affect the cell growth but increased the extracellular production of hGM-CSF by two-fold. This may be due to the enhanced permeability of the cell membrane by the interaction between the Pluronic F-68 and the cell membrane.

서론

지금까지의 식물세포배양 기술은 식물체 자체가 생산하는 2차대사산물의 생산을 위한 측면에서 연구가 진행되어 왔지만, 최근 재조합 DNA 기술의 발전으로 인해 식물세포배양을 통한 외래의 유용 생리활성 단백질의 생산이 가능해짐에 따라 관련 연구에 관심이 고조되고 있다. 식물세포배양을 이용한 재조합 단백질의 생산은 동물세포배양에 비해 간단한 배지조성과 오염가능성의 감소 등으로 인해 경제적 효율 가치가 높고, 또한 미생물배양이 가지는 번역 후 과정의 문제점도 해결 할 수 있다는 장점을 가지고 있다.¹⁾ 하지만 이러한 장점들에도 불구하고 낮은 발현 수준과 배지 내로의 낮은 분비 효율, 분비 후 단백질의 불안정성 등으로 인해 상업화에 커다란 어려움을 겪고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 유전자 단계에서 원하는 단백질의 발현을 촉진시킬 수 있는 강력한 프로모터의 선별 및 이용, 분비 효율을 촉진시킬 수 있는 시스템의 확립, 분비 후 발생하는 단백질의 변성 억제 등을 위한 연구가 필요하다.

본 연구에서는 식물세포배양에서 발현되는 재조합 hGM-CSF의 분비 효율을 높이기 위해 비이온성 계면활성제인 Pluronic F-68를 첨가하여 그 효과를 연구하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 배지

본 연구에 사용된 세포주는 전북대학교로부터 제공받은 *Nicotiana tabacum*이며 MS 기본배지에 30 g/L sucrose, 0.1 g/L myo-inositol, 0.02 mg/L kinetin, 2 mg/L

2,4-D를 첨가하였으며 pH를 5.9로 맞춘 뒤 121°C에서 가압 증기 멸균한 후 0.2 μm 의 membrane filter로 여과한 kanamycin을 100 mg/L가 되도록 첨가하였다. 계대배양은 25°C, 120 rpm의 회전식 진탕 배양기에서 7일 간격으로 암조건에서 수행하였다.

세포량 및 hGM-CSF의 정량분석

세포량은 과량의 증류수로 세척한 뒤 Whatman No.1 여과지를 통해 감압 여과하여 세포생체량을 측정하였으며, 이 시료를 60°C의 dry oven에서 항량이 될 때까지 건조시켜 세포건조량을 측정하였다.

생산된 hGM-CSF의 양은 hGM-CSF에 특이적인 항체를 이용하여 ELISA assay로 450 nm에서 정량분석 하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서 사용된 Pluronic F-68은 중심부에 소수성인 polyoxypropylene과 그 양측으로 친수성의 polyoxyethylene을 가진 triblock copolymer(POE-POP-POE)인 비이온성 계면활성제이다.²⁾ 이러한 amphiphilic한 성질을 가진 구조 때문에 동물세포와 균층세포 배양시 세포막과 상호 작용하여 막 투과성을 변화시키거나 세포배양기 운전시 기포나 shear에 의한 충격에서 세포를 보호하는 데 이용하여 왔다.³⁾

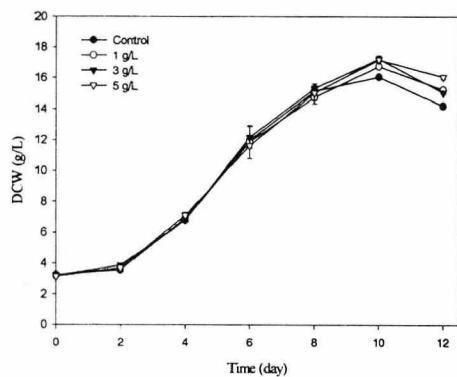


Figure 1. Effect of Pluronic F-68 on cell growth of *Nicotiana tabacum*

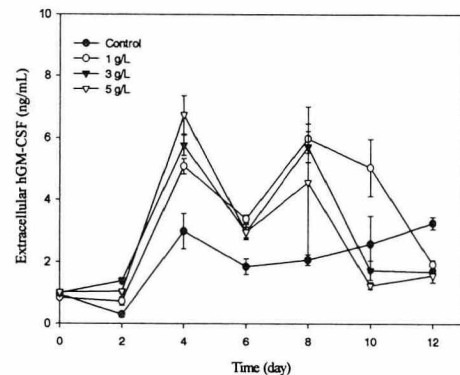


Figure 2. Effect of Pluronic F-68 on the production of hGM-CSF by *Nicotiana tabacum*.

따라서 본 실험에서는 Pluronic F-68의 첨가에 따른 형질전환 식물세포의 생장과 재조합 hGM-CSF의 생산에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다. 먼저 Pluronic F-68을 5 g/L까지 농도별로 첨가했을 때 최대 세포농도는 대조구에서 16 g DCW/L였고, 3 g/L의 Pluronic F-68을 첨가했을 때 17 g DCW/L로 실험에서 사용했던 5

g/L 범위까지의 첨가에서는 세포의 세포생장에 크게 영향을 미치지 않았다(Figure 1). 그러나 배지 내로 배출된 hGM-CSF의 최대 생산량은 4일째 배양에서 대조구에서는 $3.2 \mu\text{g/L}$, 5 g/L의 Pluronic F-68를 첨가시에는 $6.7 \mu\text{g/L}$ 로 Pluronic F-68를 첨가하였을 경우 2배 증가함이 관찰되었다(Figure 2). 이는 Pluronic F-68이 세포막과 상호 작용하여 세포막의 투과성을 높임으로써 세포내부에서 합성된 hGM-CSF의 분비를 촉진시켰기 때문으로 판단된다. 일반적으로 배지 내로 배출된 외래 단백질의 경우 배양 후반에 감소하는 경향을 보이지만 본 실험에서는 10일째 이후부터 대조구의 배지 내 hGM-CSF의 농도가 다시 증가하는 현상을 볼 수 있었는데 이는 배양후반 세포가 lysis되면서 내부의 hGM-CSF가 배출되었거나 낮은 삼투압에 기인한 것으로 사료된다.

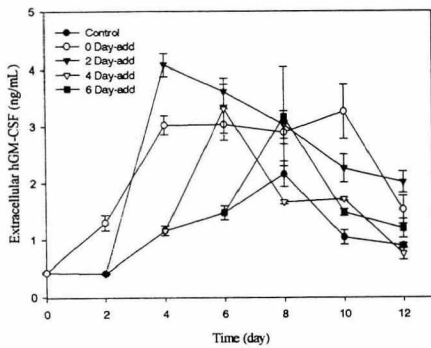


Figure 3. Effect of the time of Pluronic F-68 addition on the production of hGM-CSF

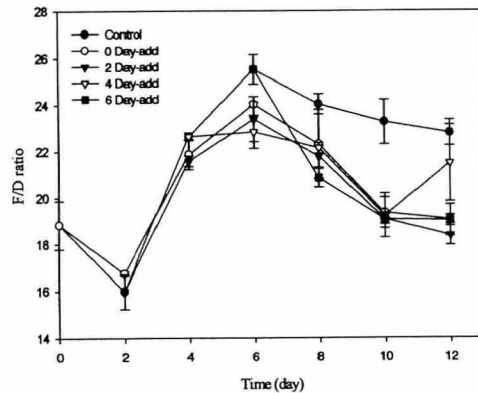


Figure 4. Change of cell size index at the time of Pluronic F-68 addition.

Pluronic F-68의 첨가시기에 따른 영향을 보기 위해 0, 2, 4, 6일째에 각각 5 g/L의 Pluronic F-68를 첨가하였다. 첨가 시기가 세포생장에 미치는 영향은 관찰되지 않았으며, Figure 3에서 볼 수 있는 것처럼 Pluronic F-68를 첨가했을 경우 첨가시기에 관계없이 Pluronic F-68를 첨가하는 순간부터 배지 내의 hGM-CSF의 양이 증가함을 알 수 있었다. 대조구에서 배지 내 hGM-CSF의 양은 8일째까지 계속 증가한 후 감소하였으며 최대 생산량은 $2.1 \mu\text{g/L}$ 였다. Pluronic F-68의 첨가시에는 2일째 첨가했을 경우 배양 4일째에 최대 $4.1 \mu\text{g/L}$ 까지 생산되었다. 비록 배양 2일째 Pluronic F-68를 첨가한 경우에 최대 생산량을 얻었지만 배양 후반까지 계속적으로 Pluronic F-68의 영향이 미치므로 배양초기부터 첨가하는 것이 실험의 편리성이나 배지 내 hGM-CSF의 전체 생산량을 최대화 할 수 있으리라 생각된다.

Figure 4는 Pluronic F-68의 첨가에 의한 세포크기의 영향을 관찰한 것을 정리한 것으로 Pluronic F-68을 첨가하는 순간부터 대조구에 비해 세포크기가 작아짐을 알 수 있었고 이는 Pluronic F-68의 세포막 투과성에 의한 분비 효율의 증가에 간접적인 증거가 될 수 있다.

요약

형질 전환된 식물세포배양에서 비이온성 계면활성제인 Pluronic F-68의 첨가가 미치는 영향을 연구하였다. Pluronic F-68 첨가시 세포생장에 미치는 영향은 크지 않았으며 5 g/L 첨가시 배지 내 hGM-CSF의 양은 대조구에 비해 2배 더 증가하였다. 첨가 시기 최적화 실험을 통하여 배양 초기부터 첨가하는 것이 유리할 것으로 판단된다. 또한 Pluronic F-68의 첨가가 세포크기를 감소시킴을 알 수 있었다. 이는 Pluronic F-68이 세포막과 상호 작용하여 세포막 투과성을 증진시킴으로써 생산된 hGM-CSF의 배지 내로의 분비를 촉진시킴을 간접적으로 보여주는 결과이다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부의 차세대신기술개발사업(A18-06-03)의 지원에 의하여 수행 되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Magnuson, N. S., P. M. Linzmaier, R. Reeves, G. An, K. HayGlass, and J. M. Lee, "Secretion of biologically active human interferon-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture." (1998), *Protein Expr. Purifi.*, **13**, 45-52.
- 2) Bassetti, L., M. Hagendoorn and J. Tramper, "Surfactant-induced non-lethal release of anthraquinones from suspension cultures of *Morinda citrifolia*." (1995), *J. Microbiol.*, **39**, 149-155.
- 3) Murhammer, D. W. and C. F. Goochee "Structure features of nonionic polyglycol polymer molecules responsible for the protective effect in sparged animal cell bioreactor." (1990), *Biotechnol. Prog.*, **6**, 142-148.