

Enhanced production of hGM-CSF by temperature shifting in transgenic *Nicotiana tabacum* cell suspension cultures

Yong-Hoon Kim, Sang-Yoon Lee, Dong-Il Kim*

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon, Korea

TEL: +82-32-860-7515, FAX: +82-32-872-4046

Abstract

Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) is a glycoprotein that stimulates the production of granulocytes, macrophages and white blood cells. hGM-CSF secreted by transgenic *Nicotiana tabacum* suspension cells was unstable in the culture medium and rapidly degraded by extracellular proteases. In order to reduce extracellular protease activity, culture temperature was lowered. Then, the production of hGM-CSF by transgenic plant suspension cell cultures could be enhanced by reduced degradation of hGM-CSF at low temperature.

서 론

식물세포배양을 통한 유용 생리활성 단백질 생산은 기존의 동물세포나 미생물 배양이 가지고 있던 문제점들을 해결하기 위한 대체 수단으로써 그 중요성이 부각되고 있다. 유전자 재조합 기술의 발전으로 인해 형질전환된 식물세포의 현탁 배양이 가능해지고, 최근에는 이를 통한 항원, cytokine, 단일클론 항체 등의 의약품 단백질 생산에 관심이 집중되고 있다. 특히 avidin, aprotinin 등은 상업적 생산 공정이 이미 개발되었으며, 여러 경구용 백신이 임상실험 중에 있다. 상시발현 시스템으로 형질전환된 식물 현탁세포의 경우, 생존율에 비례하여 외래 단백질을 생산해야함에도 불구하고 배양 중반 이후 급격한 외래 단백질 생산성 감소를 보이는 이유는 외래 단백질의 안정성 문제 때문이다. 이렇게 세포외로 분비된 외래 단백질은 자체의 불안정성 때문에 활성을 잃거나 여러 단백질 분해 효소에 의해 분해된다. 여러 가지 단백질 안정제 첨가를 통한 외래 단백질의 생산성 증대는 이미 연구된 바 있다. 본 연구에서는 형질전환된 담배 현탁세포의 배양 중반에 온도를 낮춤으로써 배지로 분비된 단백질 분해 효소의 활성을 감소시켜 hGM-CSF의 분해를 막고자 하였다. 또한 세포 생존율 증진을 위하여 대표적인 항

산화제로 알려진 ascorbic acid를 첨가하였으며¹⁾, cryoprotectant로 알려진 betaine을 농도별로 첨가하여 DCW, 세포크기지수, 세포생존율, 세포 lysis, 배지 내 단백질 분해효소 활성, 배지 내 hGM-CSF의 생산성 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

세포주

본 연구에 사용한 형질 전환된 현탁세포는 전북대학교로부터 분양 받은 *Nicotiana tabacum* 세포주이다. 이는 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 형질 전환되었으며, hGM-CSF를 생산한다.

배양

생장배지로는 Murashige와 Skoog(MS) 기본배지에 0.2 mg/L 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid(2,4-D), 0.02 mg/L kinetin, MS vitamin, 0.1 g/L myo-inositol, 30 g/L sucrose를 첨가하여 사용하였다. pH는 5.9로 맞춘 뒤 121°C, 1.2기압에서 가압 증기 멸균한 뒤 0.2 mm filter로 여과한 kanamycin 농축용액을 100 mg/L의 농도가 되도록 첨가하였다. 세포배양은 회전식 진탕 배양기에서 25°C, 120 rpm, 암조건에서 수행하였다.

분석방법

세포 생장은 dry cell weight(DCW)를 측정하여 확인하였다. 100-mL Erlenmeyer flask에서 배양한 현탁세포를 Buchner funnel을 이용하여 여과지 상에서 시료의 배양액을 걸러내었다. 증류수로 2-3회 세척한 후, 진공펌프를 이용하여 수분을 제거하고 미리 무게를 측정한 weighing dish에 세포를 옮겨담아 화학저울로 fresh cell weight(FCW)를 측정하였다. FCW 측정 후 60°C의 drying oven에서 24시간 동안 향량이 될 때까지 건조하여 DCW를 측정하였다. 세포크기지수는 FCW/DCW로 나타내었다. 세포 생존율은 원형질막을 자유로이 투과하는 비형광성이며, 비극성 물질인 fluorescein diacetate(FDA)를 이용하여 세포내 가수분해 효소인 esterase의 활성을 매개변수로 하여 응집체를 형성하고 있는 *N. tabacum*의 세포크기지수를 고려하여 상대적 생존율(%)을 측정하였다.²⁾ 세포가 lysis 되면서 배지로 방출된 esterase를 FDA를 이용하여 형광 정량함으로써 간접적인 세포 lysis 정도를 측정하였다. 단백질 분해효소 활성을 측정하기 위해 수정된 Anson's method를 사용하였고, 배지내로 분비된 hGM-CSF의 양은 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

DCW는 대조구 세포와 ascorbic acid를 첨가한 세포가 비슷한 경향성을 보였으며, 배양 중반부터 저온 배양한 세포는 온도 변환 후 약간의 성장 지연을 보였으나 배양 후기에는 대조구 세포보다 많은 DCW를 나타냈다(Fig. 1a). 세포크기지수 또한 대조구 세포와 ascorbic acid를 첨가한 세포가 비슷한 경향성을 보였으며, 배양 중반부터 저온 배양한 세포는 온도 변환 후 대조구 세포에 비하여 작은 세포 크기를 유지하였다(Fig. 1b). 배양 후기, 작은 세포크기는 배양 공간 확보를 통한 고농도 배양을 가능케 하였다. Ascorbic acid에 의하여 배양 초기 세포생존을 감소를 억제할 수 있었으며, 배양 중반부터 저온 배양한 세포는 각각의 대조구 세포에 비하여 다소 낮은 세포 생존율을 보였다(Fig. 1c). 또한 betaine(10 mM)을 첨가하여 저온 배양한 세포의 급격한 생존율 감소는 고농도 betaine의 세포독성 때문이었다. 배양 후기 세포의 lysis 정도는 배양 중반부터 저온 배양한 세포가 대조구 세포에 비하여 적은 세포 lysis를 보였으며, ascorbic acid도 배양 후기 세포의 lysis 억제에 효과가 있음을 확인하였다(Fig. 1d). 또한 저온에서는 betaine(1 mM)도 세포가 lysis 되는 것을 감소시켰다(Fig. 1d). 배양 중반 저온으로의 온도 변환 후 배지 내 단백질 분해 효소의 활성을 측정된 결과, 대조구 세포에 비해 낮은 단백질 분해 효소 활성을 나타내었다(Fig. 1e). 그로인해 배양 중반 이후 단백질 분해 효소에 의한 급격한 hGM-CSF 분해를 감소시켰으므로 상대적으로 대조구 세포에 비해 높은 hGM-CSF 생산성을 유지시켰다(Fig. 1f). Ascorbic acid 첨가 후, 배양 중반에 betaine(1 mM)을 첨가하여 저온으로 변환했을 때, hGM-CSF의 생산성은 대조구 세포에 비하여 최대 2.1배 까지 높게 유지시켰다(Fig. 1f).

요 약

본 연구에서는 형질전환된 *N. tabacum* 배양에 있어서 배양 중반 저온으로의 변환이 세포에 미치는 영향과 hGM-CSF의 생산성 변화를 관찰하였다. 배양 중반 저온으로의 변환은 DCW의 증가와 세포크기의 감소를 보였다. Ascorbic acid의 첨가는 배양 초기 세포 생존율의 감소를 완화시켰으며, 배양 중반 저온으로의 변환은 약간의 세포생존율 감소를 보였다. 저온으로의 변환, 저온 배양에서의 betaine 첨가, ascorbic acid 첨가 모두 배양 후반 세포 lysis 억제에 효과가 있었다. 배양 중반 저온으로의 변환시 배지 내 단백질 분해 효소의 활성을 측정된 결과, 대조구 세포에 비해 낮은 단백질 분해 효소 활성을 나타내었다. 그로인해 배양 중반 이

후 단백질 분해 효소에 의한 급격한 hGM-CSF 분해를 감소시킴으로써 상대적으로 대조구 세포에 비해 높은 hGM-CSF 생산성을 유지시켰다. Ascorbic acid를 첨가한 후 배양 도중 betaine(1 mM)을 첨가하여 저온으로 온도를 변환시, hGM-CSF의 생산성은 대조구 세포에 비하여 최대 2.1배 까지 높게 유지시켰다.

참고문헌

1. Chamson, A., T. Chepda, M. Cadau, F. Lassabliere, E. Reynaud, C. Perier, and J. Frey (2001), "Synergy between ascorbate and a-tocopherol on fibroblasts in culture.", *Life Sci.* **69**, 1587-1596.
2. Steward, N., R. Martin, J. M. Engasser, and J. L. Goergen (1999), "A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity.", *Plant Cell Rep.* **19**, 171-176.

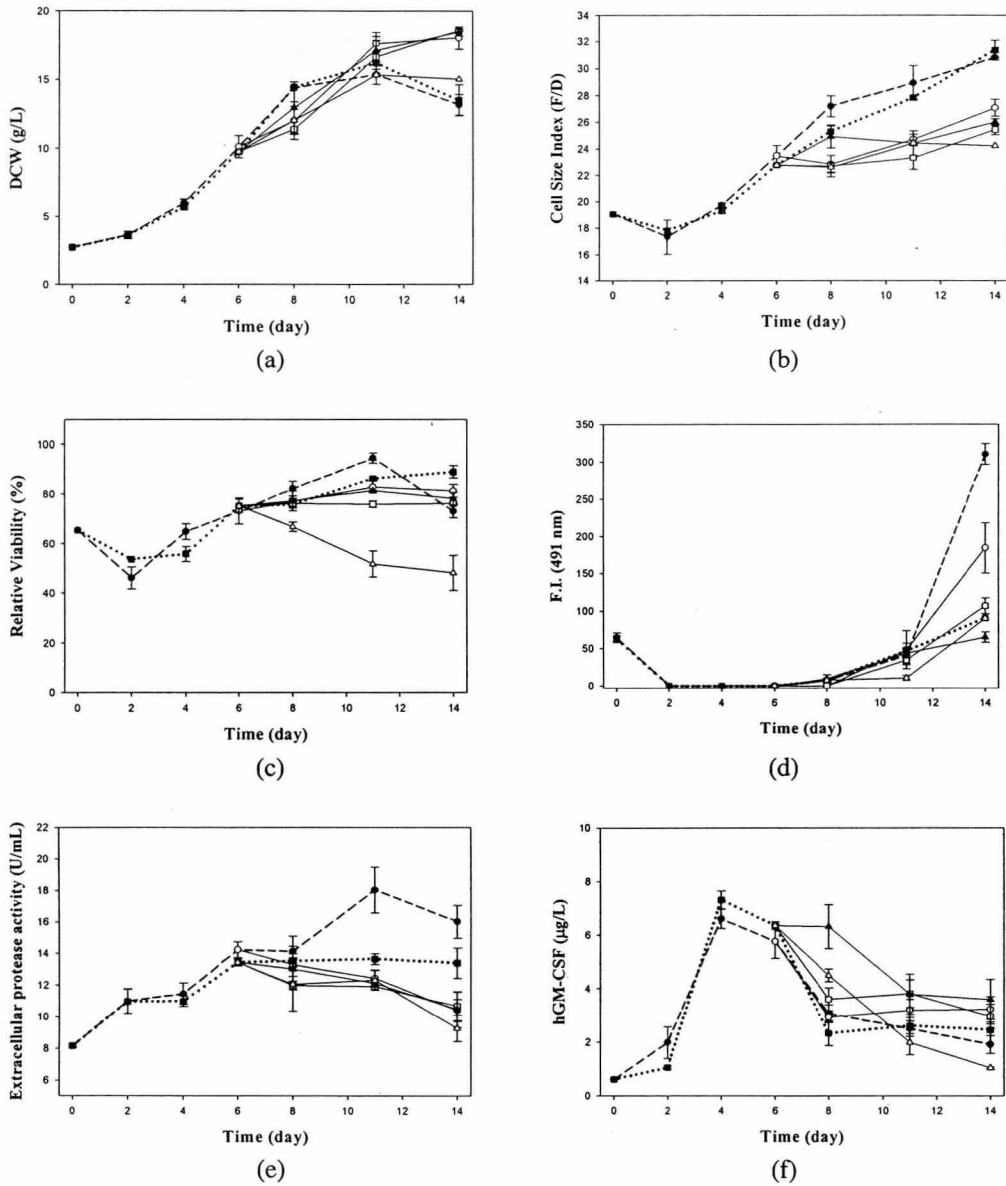


Fig. 1. Effects of temperature shifting on (a) cell growth, (b) cell size, (c) viability, (d) extracellular esterase activity, (e) extracellular protease activity and (f) the production of extracellular hGM-CSF. ●, control; ○, shifting to 15°C at 6 day; ■, ascorbic acid(0.5 mM); □, shifting to 15°C at 6 day with ascorbic acid(0.5 mM); ▲, shifting to 15°C with betaine(1 mM) at 6 day and ascorbic acid(0.5 mM); △, shifting to 15°C with betaine(10 mM) at 6 day and ascorbic acid(0.5 mM).