Separation and purification of hGM-CSF expressed from genetically engineered rice cell

Sang-Youn Hwang, Hyo-Jin Choi, Min-Young Kim, Chang-Woo Suh,
[1]Moon-Sik Yang, and Eun-Kyu Lee†
Bioprocessing Research Laboratory, Hanyang University, Ansan, and
[1]Division of Natural Sciences, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk, Korea
TEL: +82-31-400-4072, FAX: +82-31-408-3779

서 론

hGM-CSF(human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)는 과립성 백혈구, 대식세포, 백혈구 생산을 유도하는 당단백질로서[1] netrophenia와 재생 불량성 빈혈 치료제로 쓰이는 것으로 보고되고 있다.[2] 이러한 hGM-CSF는 *E. coli*로부터도 발현이 되지만 전사 후 수식으로 당화(glycosylation)가 되어야 생물학적 활성을 갖는 것으로 알려지고 있다[3]. 따라서 재조합 효모 배양을 통해 발현되고 있다. 동물세포 배양 경우 배양 공정의 복잡성, 높은 배지 비용, 바이러스 오염의 문제가 대두되면서 식물세포 배양에 의한 생산이 주목받고 있다.[4] 본 실험에서는 재조합 쌀 세포로부터 발현된 hGM-CSF의 분리정제를 위한 scalable한 공정을 구축하는 기초실험을 시도하여 보았다.[5, 6, 7, 8]

재료 및 방법

hGM-CSF 배양액

전북대학교 자연과학부 양문식 교수님 실험실으로부터 제공받은 hGM-CSF 배양액은 재조합 쌀 세포로부터 발현되었다[4]. 배지는 N6CI(callus induction medium)을 사용하였으며 sucrose와 hygromycin으로 발현시켰다. 발현된 hGM-CSF의 pI는 3.4 - 4.5이며 분자량은 당화 정도에 따라 22 - 34 kDa까지 다양하였다. 배양액을 원심분리하여 세포를 제거하고 상등액만을 취하여 실험하였다.

산 침전(acid precipitation)

Acetic acid(Showa, Japan)를 이용하여 pH를 6.0에서 4.0까지 낮추면서 hGM-CSF의 등전점 부근에서의 침전 여부를 관찰하였다. 침전물을 회수하기 위

한 원심분리는 10,000×g에서 15분간 실시하였다.

염출(salting-out)

Ammonium sulfate(Sigma, USA) 농도를 20%에서 80%까지 증가시키면서 hGM-CSF 또는 불순물의 침전을 유도하였다. pH와 온도는 각각 4.5와 4℃를 유지하였다. 침전물을 회수하기 위한 원심분리는 10,000×g에서 30분간 실시하였으며 침전물은 50 mM Tris-HCl(pH 8.0)에 재용해하였다.

이온교환수지

20 mM Tris-HCl(pH 8.0)로 평형을 잡은 Q-Sepharose XL(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) 72 ml 칼럼에 4 ml/min의 유속으로 hGM-CSF 배양액 상등액(pH 8.0)을 주입하였다. 이를 1 M NaCl이 함유된 20 mM Tris-HCl로 용출하여 hGM-CSF를 분리 정제하였다.

겔 여과 크로마토그래피(GPC)

20 ml Superdex G75(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) 칼럼을 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형을 잡은 후 이온교환수지에서부터 얻은 용출액 1 ml을 주입한 후 평형버퍼로 hGM-CSF를 분리 용출하였다.

hGM-CSF 정량분석

hGM-CSF ELISA kit(R&D Systems, Minneapolis, USA)를 이용하여 이온교환수지와 친화성크로마토그래피의 용출액에서의 hGM-CSF을 정량분석하였으며, Bradford assay를 이용하여 총단백정량을 하였다.

결과 및 고찰

hGM-CSF 배양액에서 나타나는 불순물은 크게 세 가지 종류로 볼 수 있다(Figure 1). 이들은 각각 대략 48 kDa, 36 kDa, 30 kDa의 분자량을 가지며 이중 48 kDa은 α-amylase로 사료된다 이 불순물들과 hGM-CSF를 분리하기 위하여 pI, 친수·소수성, 분자량의 차이를 이용하여 다음과 같은 실험을 하였다.

산 침전(acid precipitation)

48 kDa의 불순물(α-amylase)이 pH 4.5에서부터 침전되었다. α-amylase의 pI는 4.5 ~ 5.0이라고 보고되어 있다. 이 때 hGM-CSF는 상등액에 있는 것을 확인하였다 (Figure 1). 산 침전을 이용한 분리는 이온크로마토그래피를 이용하여 hGM-CSF를 분리하는데 가장 문제점이 되는 α-amylase의 제거에 효과적인 것으로 나타났다.

염출(salting-out)

Ammonium sulfate 포화농도 20%와 40%에서 α-amylase가 대부분 제거되는 것을 알 수 있다. 또한 hGM-CSF의 경우는 60%에서 80%에서 많이 침전되었다 (Figure 2). 산 침전과의 시너지 효과를 위해 pH를 4.5로 유지하였다. (이 얘기 아닌가?) 이러한 시너지 효과를 통하여 hGM-CSF와 α-amylase의 분리를 하였으며, 이를 통하여 부피도 줄일 수 있었다.

이온교환수지(Q-Sepharose XL)

hGM-CSF는 0.4 M에서 0.6 M NaCl 농도에서 비교적 넓은 범위에서 용출되었다. 이온교환수지를 통해서 36 kDa과 30 kDa의 불순물들이 hGM-CSF와 분리가 되었다. 하지만 α-amylase로 사료되는 50 kDa의 불순물과는 완벽히 분리가 되지 않는 것을 알 수 있다. 따라서 α-amylase의 제거를 위하여는 염출 공정이 더욱 효율적일 것으로 판단되었다. 이온교환공정의 순도는 55%이며 수율은 60%이었다(Figure 3).

겔 여과 크로마토그래피(GPC)

이온교환수지로부터 hGM-CSF가 함유되어 있는 용출액을 겔 여과 크로마토그래피에 주입하여 본 결과 hGM-CSF와 α-amylase와 분리가 일어나는 것을 ELISA를 통하여 확인하였다 (Figure 4). 이 때의 순도는 80%이며 수율은 7%이었다. 이 공정에서의 수율이 낮은 이유는 hGM-CSF의 용출액을 모두 다 수집하지 않았기 때문이며, 모두 다 수집할 경우 50%가 될 것으로 예측된다. 이 공정은 예상했던대로 고순도의 정제가 가능하나 수율이 매우 낮아 polishing 공정으로 적합하다.

결 론

위와 같이 hGM-CSF 배양액으로부터 hGM-CSF 분리정제를 시도하였다. 각 단위공정들은 hGM-CSF의 배양액 상등액으로 실험한 것으로(겔 여과 크로마토그래피 제외) 각 단계의 순도는 각 단계들을 조합함으로써 향상될 수 있을 것이라고 판단되어, 현재 공정 integration을 진행 중에 있다.

감 사

본 연구는 산업자원부 차세대과제(공고번호 A18-06-04)인 "식물체를 이용한 고부가가치 단백질 생산기술 개발"의 세부과제로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Metcalf, D., The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors (1985), Science, 229, 16-22.
2. Dale, D. C., Liles, W. C., and Summer, W. R., Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): role in relationships in infectious diseases (1995), J. Infec. Dis. 172, 1061-1075.
3. Libby, R.T., Braedt, G., Kronhein, S.R., March, C.J., and Urdal, D.L., Expression and purification of native human granulocyte-macrophage colony stimulating factor from an *Escherichia coli* secretion vector (1987), DNA, 6, 221-229.
4. 이재화, 김난선, 권태호, 박승문, 장용석, 양문식, 식물세포배양에서 당과 식물세포의 농도가 hGM-CSF의 생산에 미치는 영향, 한국생물공학회지 (2001), **16**(4), 376-380.
5. Trotta, P.P. and Rutherford, Purification of GM-CSF (1995), U.S. Patent, 19,539,176.
6. Xing, W., Greg, J. B., Matthew, R. W., and Richard, S. T., Purification and characterization of three antifungal protein from cheeseweed (2001), 282, 1224-1228.
7. Chunhua, S., Ya, D., Xialong, X., Yonshu, X., and Qingliang, L., The Purification of polyphenol oxidase from tobacco (2002), Protein Expression and Purification, 24, 51-55.
8. Susseelan, K. N, Mitra, R., Sianis, K. B., and Krishna, T. G., Purification and characterization of lectin from wild sunflower tubers, Archives of Biochemistry and Biophysics, in press.

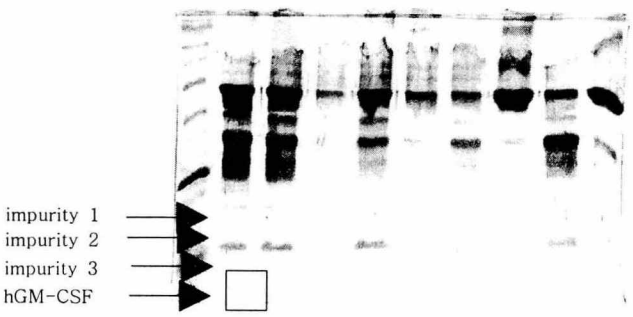


Fig. 1. Acid precipitation SDS-PAGE
1: size marker
2: hGM-CSF 배양액
3: supernatant pH 6.0, 4: pellet pH 6.0
5: supernatant pH 5.0, 6: pellet pH 5.0
7: supernatant pH 4.5, 8: pellet pH 4.5
9: supernatant pH 4.0, 10: pellet pH 4.0

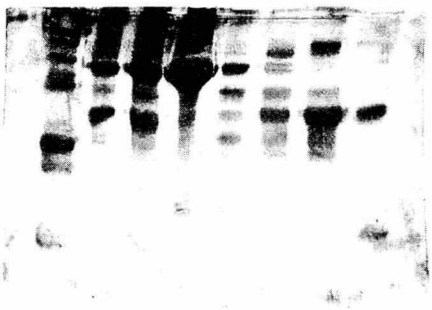
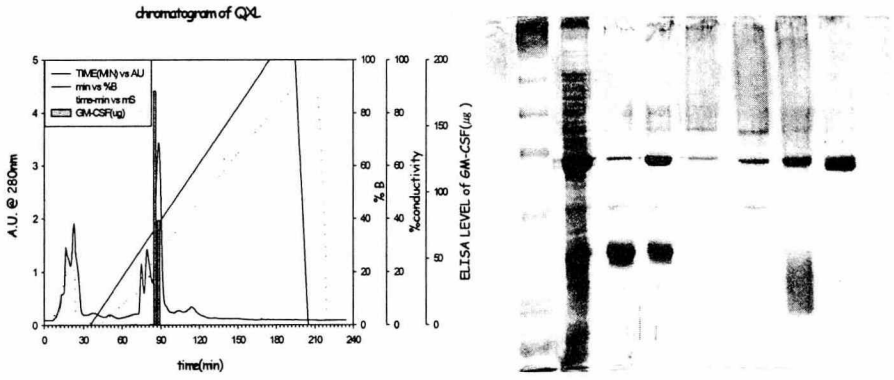


Fig. 2. Salting out SDS-PAGE
1: size marker
2: hGM-CSF 배양액
3: hGM-CSF 배양액 농축
4: 20% ammonium sulfate pellet
5: 40% ammonium sulfate pellet
6: 50% ammonium sulfate pellet
7: 60% ammonium sulfate pellet
8: 80% ammonium sulfate pellet



(a) (b)

Fig. 3. Chromatogram of QXL(a) and SDS-PAGE(b)
1: size marker, 2: hGM-CSF 배양액, 3, 4: chasing 5, 6: 0.2 M~0.3 M NaCl, 7: 0.4 M~0.5 M NaCl, 8: 0.7 M NaCl

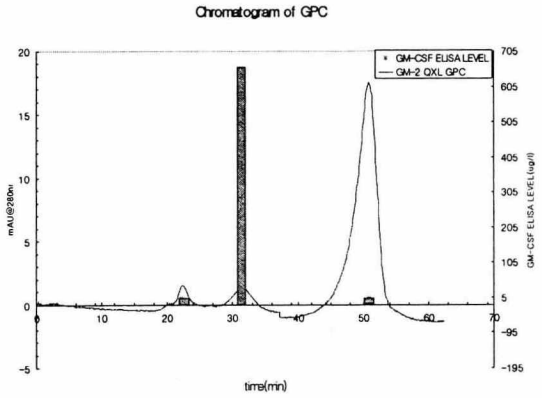


Fig. 4. GPC chromatogram.
▭ : hGM-CSF