

## 인체 갑상세포의 대사조절에 의한 프로 유로카이나제의 생산

강재구 · 최석규 · 이현용\*

강원대학교 식품공학과

### Metabolic Control of Maintenance for the Production of pro-Urokinase from Human Thyroid cells

Kang, Jae-Koo, Suk-Kyu Choi and Hyeon-Yong Lee\*

Department of Food Engineering, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Maximum specific pro-UK production rate was achieved at 15 ml/min of perfusion rate as  $5.7 \times 10^{-8}$   $\mu\text{g/h/cell}$  by cytostatic cultivation of human cell line 579 with DMEM and 5% FBS. As perfusion rates were increased, glutamine uptake rates were also increased but ammonium production rates remained relatively constant, which resulted in low ratio of ammonium to glutamine at high perfusion rate. Partially it quantitatively explains why the productivity is increased in perfusion cultivations. At maintenance period of 15 days by controlling metabolic process, such as 5 mM of glucose, 2 mM of glutamine, 10% of air saturation and pH 6.2, high specific product production rate and product yield on substrate were obtained as  $12 \times 10^{-8}$   $\mu\text{g/h/cell}$  and 0.226 mg/g of glucose, respectively. This product yield corresponds to 0.223 mg/day of productivity at 10 ml/min of perfusion rate.

동물세포의 체외 (*in vitro*) 배양에 의한 의약품들의 산업적 생산에 관한 연구가 여러 분야에서 활발히 추진되고 있으며, 특히 목적 단백질의 대량 생산을 위한 세포 배양 및 단백질 분리공정의 대형화(scale-up)에 대한 관심이 고조되고 있다(1-5). 하지만 동물세포의 생육공정은 일반미생물과 비교해 생육 저해 요소가 많을 뿐만 아니라(6), 대량 배양시 생육대사 및 조절기작에 대한 명확한 규명이 이루어지지 않아 배양조에 의한 연속배양시 세포의 최적 성장 및 목적 물질의 최대 생산을 위한 공정 최적화를 많은 어려움이 따르고 있다(7,8).

지금까지는 최대 세포성장을 위해 물리적 공정변수: 배양조내의 용존산소와 shear stress의 관계, 교반속도와 세포생육 및 미립담체 농도와와의 상관성, 배양방법(process configuration)에 따른 산소전달효과 및 세포 성장과의 관계 등과 같은 각 공정변수들의 최적화 및 system 개발들이 세포배양 공학의 주요 접근 대상이 되

어 왔다(9-14). 하지만 이런 물리적인 변수들의 조절에 의한 물질생산성 증대에는 그 한계가 있으므로(15), 보다 효율적인 배양공정 조절을 위해서는 세포성장 및 물질생산에 관여되는 대사 경로의 명확한 이해와 이들의 조절(metabolic control)이 물리적 배양공정변수들과 조화를 이루어야 될 것이다. 이를 위해 미생물보다 에너지 소모(energy-consuming process)가 많으며 에너지 전환효율이 낮은 동물세포(16)의 체외 배양시, 주탄소원인 glucose와 질소원인 glutamine의 대사속도를 인위적으로 조절해 이들의 생체 대사과정에서 유리되는 생육 저해물질들의 생성속도의 저하 및 목적 단백질의 생산성 증진을 위한 대사공학(metabolic engineering)의 기초 자료를 제공하고자 한다.

#### 재료 및 방법

9살된 남아의 흉선 하부 조직에서 확립된 갑상세포주인 579 세포(Human thyroid cell line 579)를 5% Fetal bovine serum(FBS)과 40  $\mu\text{g/ml}$ 의 gentamicine 이

Key words: Metabolic control, pro-Urokinase, Thyroid cells, Cytostatic cultivation

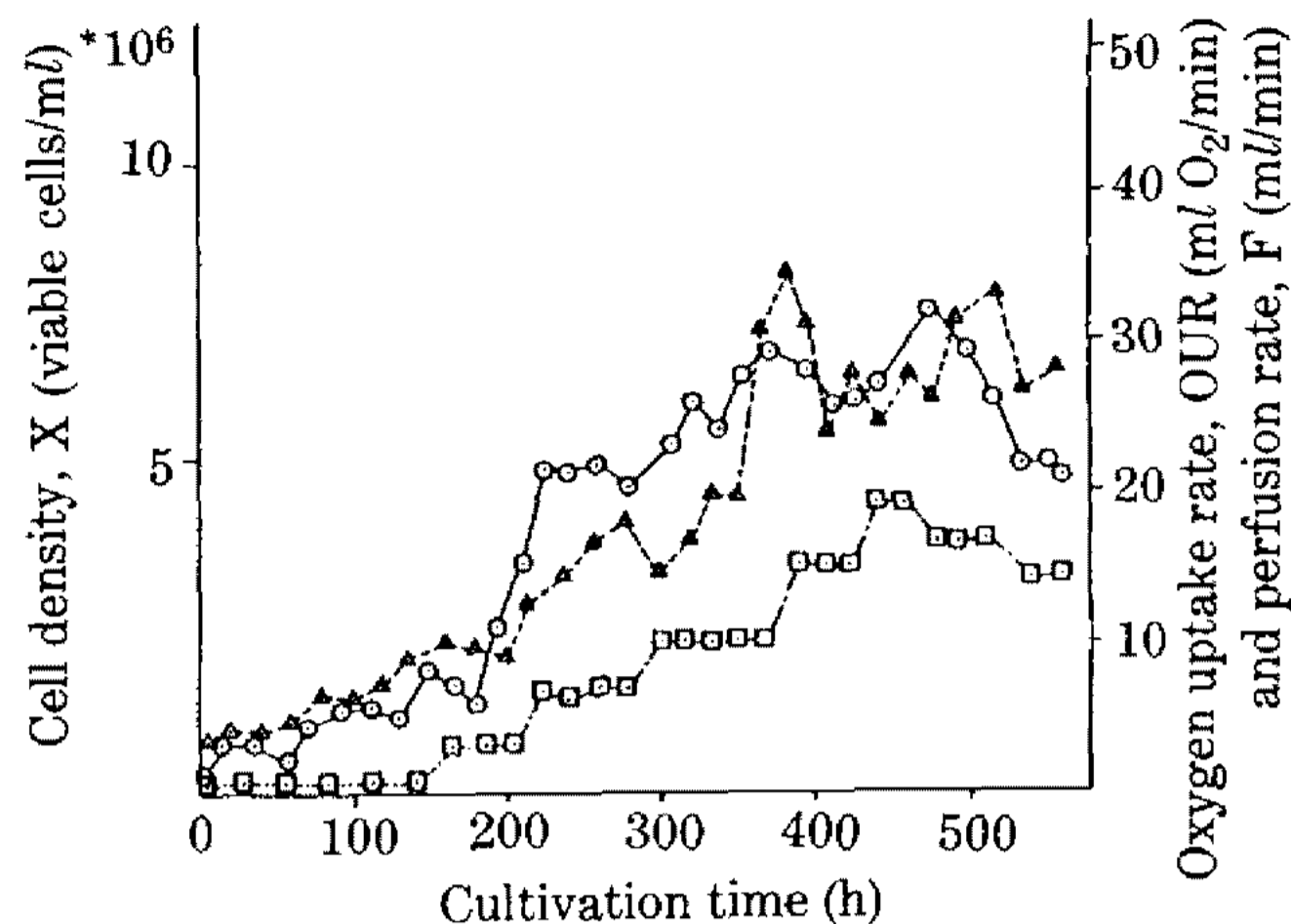
\*Corresponding author

포함된 DMEM 배지에서 75 T-flask로 37°C CO<sub>2</sub>incubator에서 3일마다 신선한 배지로 갈아주면서 T-flask 내의 세포수가 약 1×10<sup>6</sup> viable cell/ml에 도달했을 때 0.25% trypsin(EDTA 포함)으로 처리해 5g/l의 미립담체(Cytodex III, Pharmacia)가 들어있는 1.5l 배양조(NBS, USA)에 접종시켰다. 접종 직후 약 1~2시간을 교반없이 정치해 세포가 미립담체에 정착됐음을 현미경으로 확인한 후 50rpm으로 교반을 시작했다. 세포생육은 trypan dye exclusion 방법으로 nuclei count로서(17) 확인했으며, 생성되는 pro-Urokinase(pro-UK)는 standard UK(International Standard for UK, UK)를 chromogenic substrate인 S-2444(Sigma, USA)에 반응시켜 3.7IU/ml의 Plasmin을 포함한 standard와 sample을 405nm에서 흡광도를 측정, 비교해 정량했다. 산소소비속도는 배양조에서 나오는 off-gas를 Gas Chromatograph(MBM, W. Germany)로 분석해 mass balance를 이용해 계산했다(18). DMEM 기본배지에 존재하는 glucose(25mM)와 glutamine(5mM)의 농도를 조절하기 위해, 배지 조성대로 혼합한 후 glucose와 glutamine의 농도를 임의로 바꾸었으며 초기 glucose 농도 계산시 serum에 존재하는 glucose는 그 농도가 낮고(0.8g/l) 전체 배지 중 5%만 차지하므로 무시했다.

배양조내의 배지는 배양조 위에 달린 decanter와 peristaltic pump를 사용해 일정 속도로 유출시켰으며, 배양조내의 level controller로 배지의 높이에 따라 신선한 배지를 유입시켰다. 배지의 이동속도는 매 20시간마다 측정되는 세포수 및 산소소비속도는 변화에 따라 조절했다. 배지에 존재하는 glutamine, ammonium 및 lactate 양은 효소반응법 및 HPLC(Waters, USA)를 사용해 측정했다. 세포생육시 발생 및 소비되는 대사산물들인 ammonium, lactate, glutamine, pro-UK의 생산은 단위 시간당, 단위 세포당 생산 혹은 소비되는 비생산 혹은 소비속도(specific production rate or specific uptake rate, Q) (μg or mmole/h/cell)로 계산했다(23). 대사과정 중 생산되는 대부분의 lactate는 aerobic glycolysis 경로를 통해 생성되며 glutamolysis에 의해 생산되는 lactate는 energy yielding process에 관여하지 않으므로(21), glucose 분해에 의한 ATP 생산속도는 다음과 같이 표시될 수 있다.

$$q_{ATP} = (1/X)(dX/dt) + F \cdot Q_L \quad (1)$$

여기서  $q_{ATP}$ 는 specific ATP production rate (mmole/h/cell)이고 F는 glycolysis에 의한 lactate 생산 양의



**Fig. 1. Growth behavior of human thyroid cells, 579 and oxygen consumption rate under perfusion operations:** ○, cell density (cells/ml); △, oxygen uptake rate (ml/min); □, media perfusion rate (ml/min).

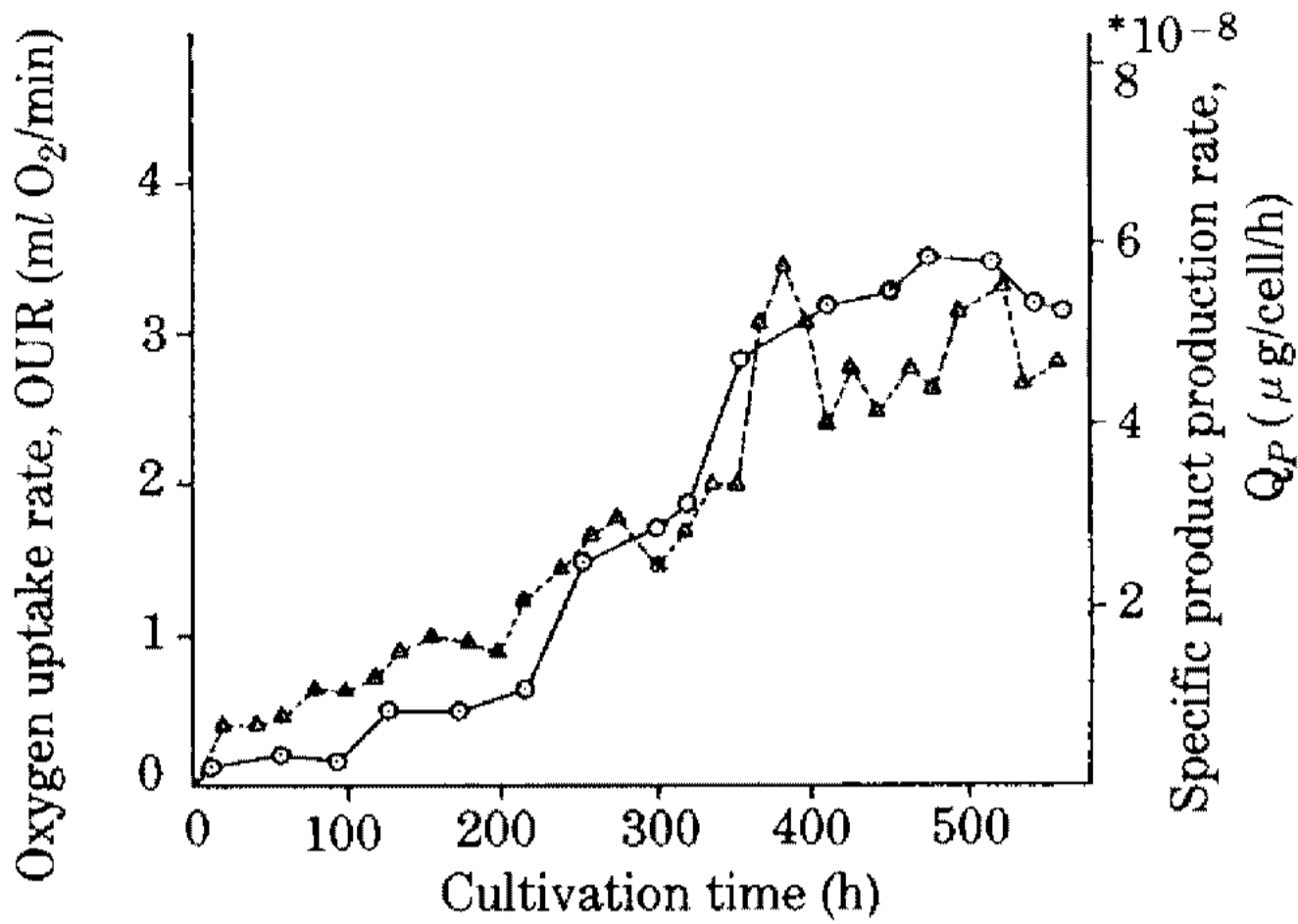
비이지만, 일반적으로 체외 단백질 생성시 발생하는 대부분의 lactate는 glucose의 pentose phosphate pathway에 의해 생산되므로(21, 22), F를 1로 계산해도 큰 오차가 없을 것이다. 또한  $q_{ATP}$ 는 대사경로에 관계없이 약  $7.4 \times 10^{-10}$  mmole of ATP/h/cell로 일정하다고 고려하면(23), 식(1)에 의해 계산된 lactate 양과 이론치와의 비교로 세포내의 metabolic process를 예측할 수 있다. Glutamine 분해에 의한 ammonium의 생성비, R은

$$R = Q_A / Q_G \quad (2)$$

로 표시될 수 있다. 여기서 Q는 ammonium(A) 혹은 glutamine(G)의 비생산 혹은 소비속도이다.

## 결과 및 고찰

Fig.1은 DMEM에 5% FBS를 포함한 배지에 갑상세포 579를 연속배양한 결과로, 배양시간이 증가함에 따라 세포수가 증가했으며 이에 해당하는 산소소비속도도 같이 증가했다. 19.2(ml/min)의 배지 이동속도에서 약  $7.5 \times 10^6$  (cells/ml)의 최대 세포수를 유지했으나, 산소소비속도는 15(ml/min)에서 최대값을 갖는 차이점을 나타냈다. 이는 고농도 세포배양시 세포수의 측정오차에 기인하므로, Fig.2에서는 비교적 측정 오차가 적은 산소소비속도에 따른 pro-UK 생산성과의 관계를 비교하였다. 본 실험은 배양시간에 따라 배지 이동속도를 연속적으로 증가시키지 않고 단계적으로 증가시켜, 성장 중인 세포가 외부 환경에 적응이 잘되는 cyostatic 공법으로 배양했으며, 이 때 배양 후 약 450시간이 지난 후  $5.7 \times$

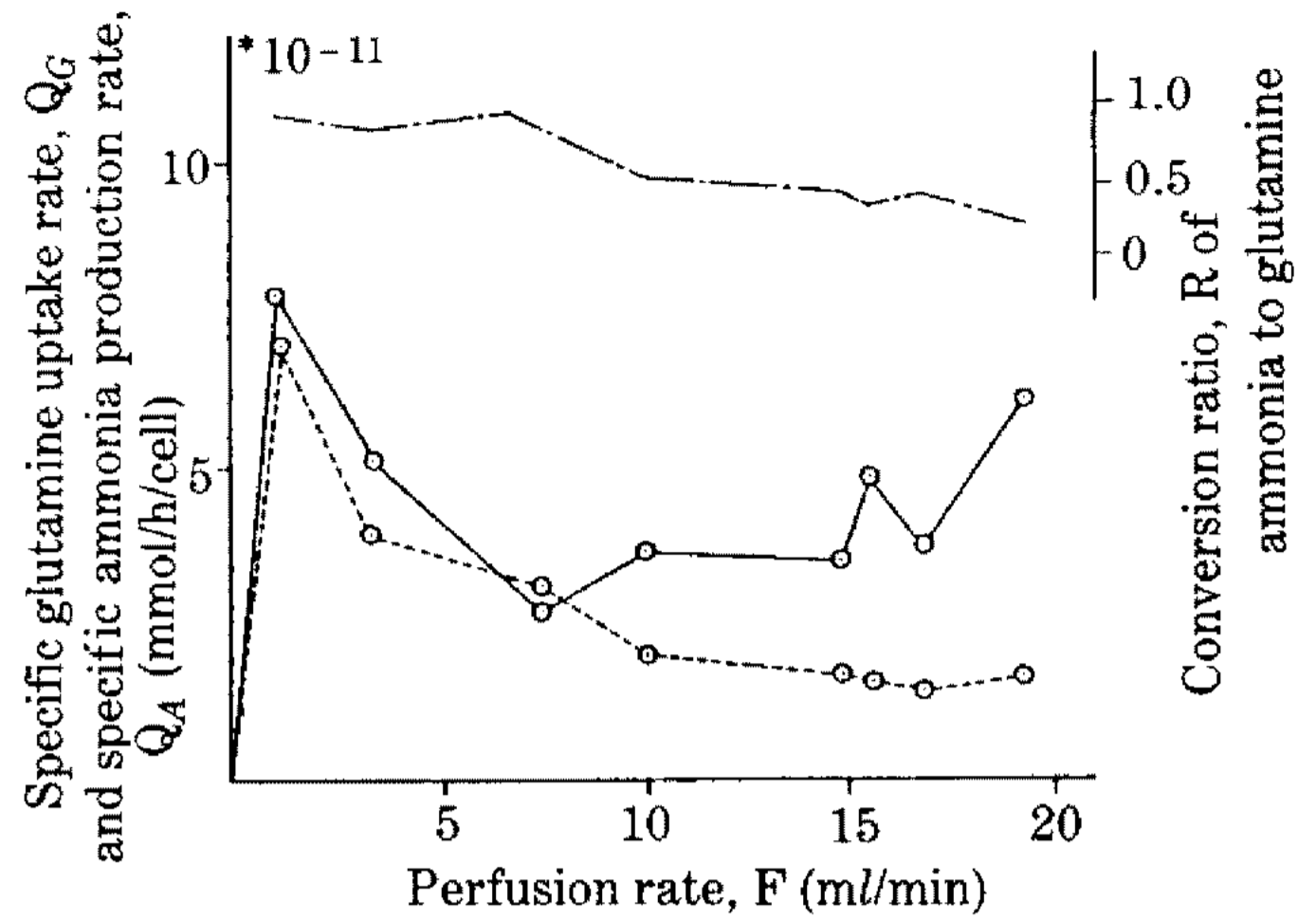


**Fig. 2. Correlation between oxygen uptake rate and specific proUK production rate according to cultivation time in perfusion processes:**  
 ○, specific product production rate ( $\mu\text{g}/\text{cell}/\text{h}$ );  $\Delta$ , oxygen uptake rate.

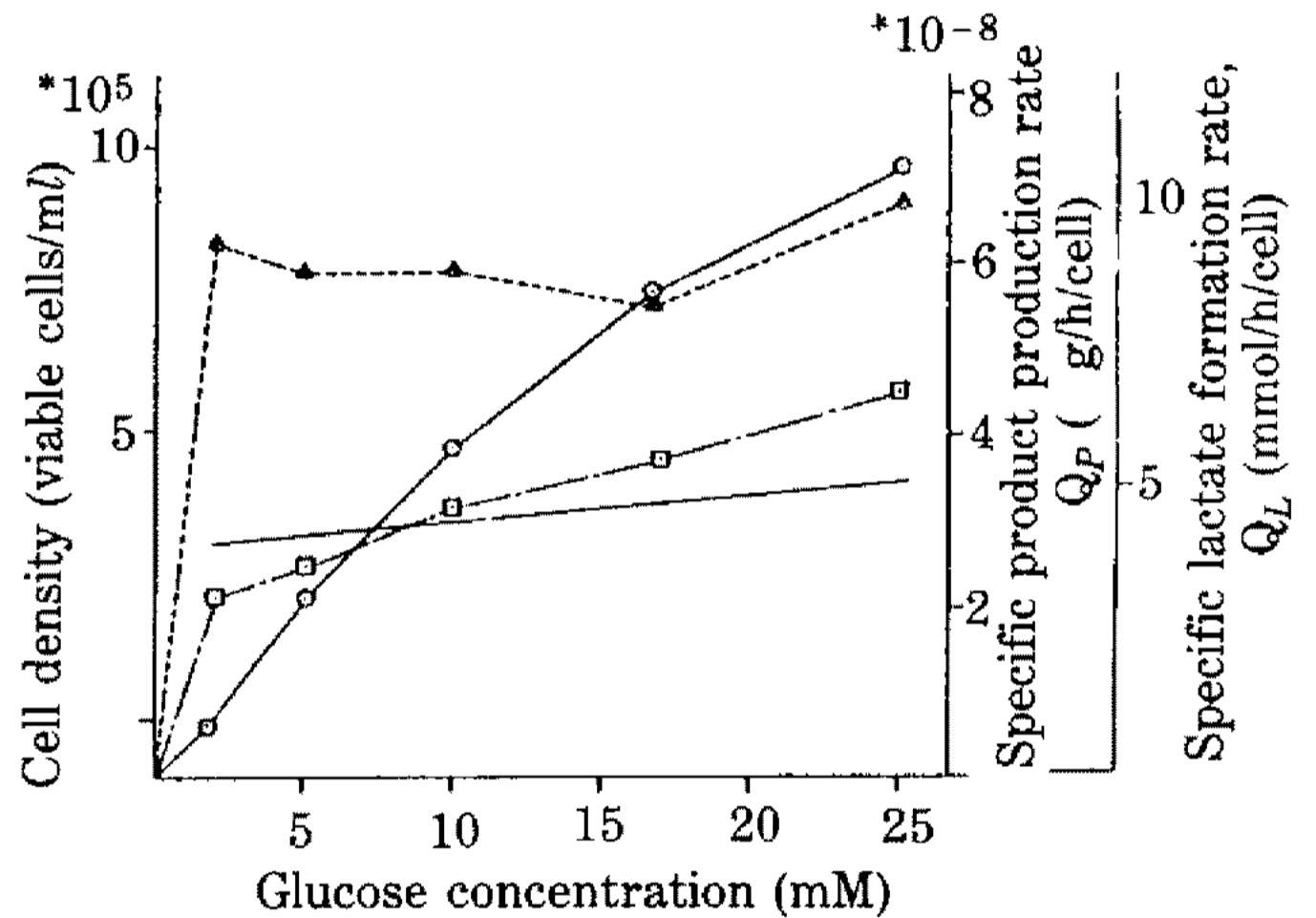
$10^{-8}$  ( $\mu\text{g}$  of pro-UK/h/cell)의 최대 비생산속도를 나타냈으나, 배양 후 약 20일이 경과된 후부터 세포 수 및 산소소비속도가 급속히 감소됨과 함께 pro-UK의 생산성도 격감했다. 이는 본 실험에 사용된 세포주가 다른 세포들보다 life span이 짧기 때문으로 추정된다.

Fig.3은 연속배양시 glutamine의 소비속도와 ammonium의 발생속도를 배지의 이동속도에 따라 비교한 결과로, 낮은 배지 이동속도를 유지하며 배양한 경우 소비된 glutamine의 대부분이 ammonium으로 전환됐으나 배지의 이동속도가 증가할수록 glutamine의 소비속도는 계속 증가하는 것에 비해 ammonium의 생성속도는 일정하게 유지됐다. 이는 빠른 배지의 교환에 따른 glutamine의 측정오차 및 배지내에서 glutamine의 자체분해에도 기인하기도 하지만, 생체 대사과정의 효율성 증가에 의한 glutamine의 완전동화(oxidative catabolism)에 따른  $\text{CO}_2$ 의 발생이 증가했기 때문으로 추정된다. 이같은 최적 배양조건으로 최대 세포성장을 유지하는 경우, glutamolysis 현상이 안일어나고 소비되는 glutamine의 대부분이 ATP 생성에 관여(21 mole of ATP/mole of glutamine consumed)해 최대 물질 생산성을 얻을 수 있음이 입증됐다(22).

이 결과를 바탕으로 Fig.4에서는 10(ml/min)의 일정 배지 이동속도에서 물질생산의 주탄소원 및 에너지원인 glucose 농도에 따른 세포생육 및 비물질생산속도와 lactate 생산속도와와의 관계를 비교했다(세포생육 조절을 위해 2mM의 낮은 glutamine을 첨가했음). Fig.4의 직선은 ATP 생성속도의 이론 값을 식 (1)에 적용시켜 lactate 생산속도를 계산해 실제 측정치인 사각형과 비교

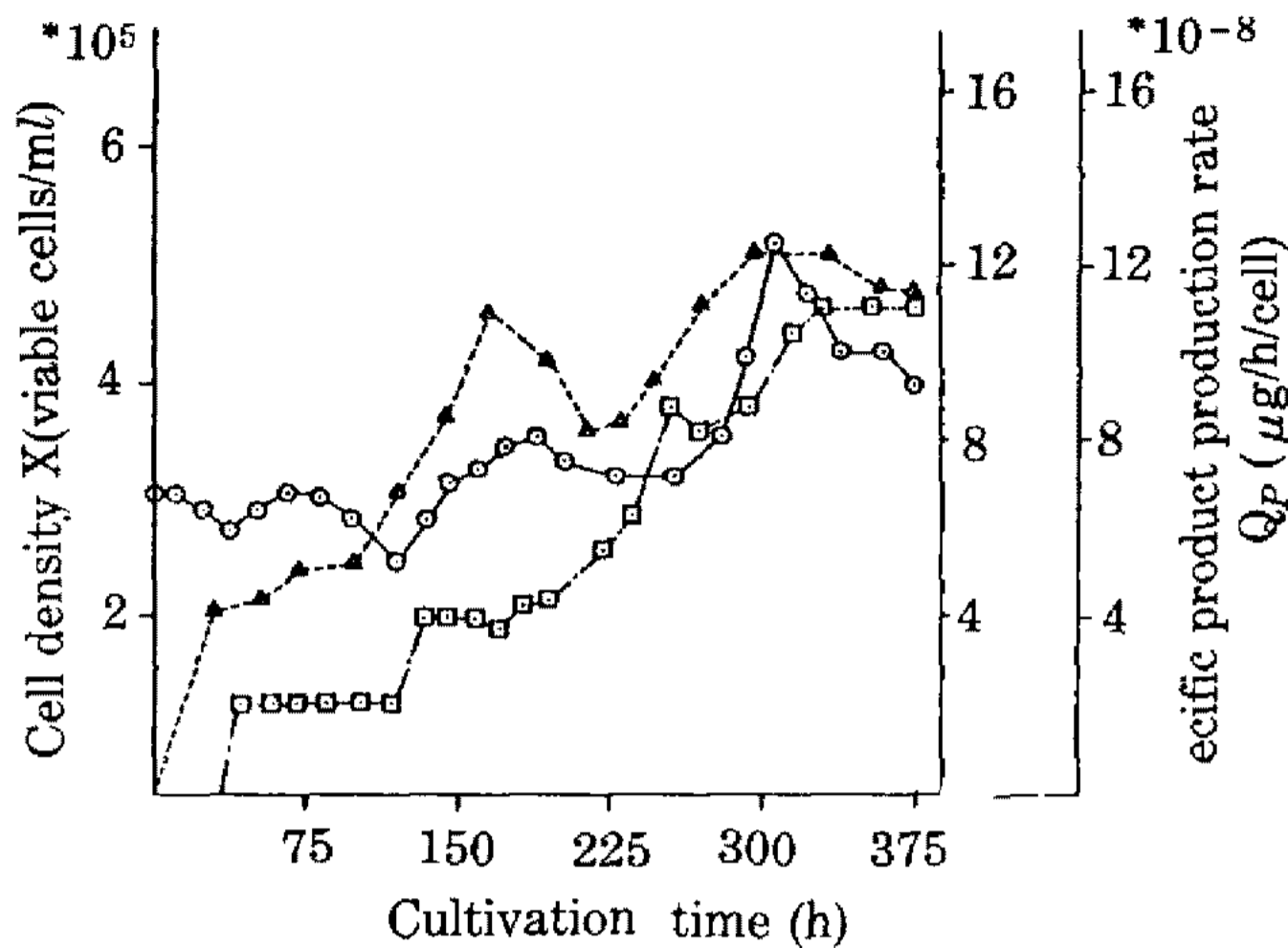


**Fig. 3. Kinetics producing ammonia from consumed glutamine as function of perfusion rates:**  
 —, glutamine coption rate; ---, ammonia evolution rate; - · - · -, ratio of ammonia to glutamine.



**Fig. 4. Cell growth, specific product production and lactate formation rates according to glucose concentration in fresh medium at 10 (ml/min) of perfusion rate and 2 mM of low glutamine concentration for five days:**  
 ○, cell density (cells/ml);  $\Delta$ , specific proUK production rate ( $\mu\text{g}/\text{h}/\text{cell}$ );  $\square$ , specific lactate formation rate (mmol/h/cell). Solid line is the result of simulating eq. (2) with constant value of  $q_{\text{ATP}}$  as  $7.4 \times 10^{-10}$  mmol ATP/cell/h [23] to compare with experimental  $Q_L$ .

한 결과로, 유입되는 glucose의 농도가 높을 수록 실험치가 이론치보다 높게 나타나는데, 이는 ATP의 비생산속도가 연속배양시 glucose의 농도에 따라 영향을 받기 때문이다. 또한 세포의 성장은 glucose의 농도의 증가에 따라 직선적으로 성장하는 glucose-limited 생육현상을 나타내고 있다. 특히 적은 glucose의 농도에서 세포생육이 낮음에도 불구하고 약  $6.0 \times 10^{-8}$  ( $\mu\text{g}/\text{h}/\text{cell}$ )의 물질생산속도를 유지할 수 있는 이유는(Fig.2의 결과와 비교) 낮은 세포농도에서도 소비된 에너지원의 대부분이



**Fig. 5. Cell growth, proUK production at maintenance period by controlling metabolic processes under perfusion cultivation:**

○, cell density (cells/ml); △, specific proUK production rate ( $\mu\text{g/h/cell}$ ); □, perfusion rate (ml/min).

물질생산으로 전환됐기 때문이다. 따라서 이같은 대사조절에 의한 인위적인 maintenance 기간의 형성으로 물질생산성 증가의 가능성을 확인했다.

위의 이론을 입증하기 위해 Fig. 5에서는 낮은 glucose (5 mM)와 glutamine (2 mM)이 포함된 DMEM에 5% FBS를 첨가한 배지로 약 15일간 연속 배양했다. 이 때 10%의 낮은 용존산소량과 함께 pH 6.2의 산도를 유지시켜, 발생하는 ammonium을 ammonia로 전환시켜 생육 저해원의 농도를 낮추며 배양했다. 이 결과 Fig. 1, 2에 비해 상대적으로 낮은 배지 이동속도와 적은 세포수를 유지함에도 불구하고 (Fig. 1의 약 1/10에 해당하는 세포 농도), 높은 비물질생산속도를 나타내고 있는데, 이는 본 배양조건과 같은 인위적인 maintenance 과정을 통해 세포내에 흡수된 에너지원의 대부분이 물질생산으로 전환됐기 때문이다. 특히 이 공정은 낮은 배지 이동속도에서도 상대적으로 높은 물질생산성을 유지할 수 있으므로 연속배양시 배지의 연속적 유출에 의한 생산 단가의 상승을 막을 수 있는 장점도 있다. 소비된 배지에 의한 pro-UK의 생산수율인  $Y_{p/s}$ 를 계산하기 위해, serum 소비에 대한 product 양의 비가 적합하지만 실제 배지내 serum의 정량이 불가능하므로 주에너지원인 glucose의 소비에 대한 pro-UK의 생산비로 고려하면  $Y_{p/s}$ 는 약 0.226 (mg of pro-UK/g of glucose consumed)로 계산된다. 이 수치는 기존의 연속배양시 세포생육 최적 생육조건에서의 생산수율보다 높은 값으로, 대사조절에 의한 maintenance 조건에서의 생산수율보다 높은 값으로, 대사조절에 의한 mainte-

nance 조건에서 물질생산성이 향상될 수 있음을 확인했다.

## 결론

세포의 체외 배양에 의한 물질생산성 향상을 위해 세포생육시 대사물질의 이용 과정의 이해를 통해 이들의 인위적 조절에 의한 maintenance period를 유지시켜 낮은 배지 이동속도에서 최대 비물질생산속도를 얻을 수 있는 배양공정을 확립했다. 특히 주탄소원인 glucose와 질소원인 glutamine의 소비속도와 이로부터 발생하는 lactate와 ammonium의 생성속도를 목적물질인 pro-UK의 생산과의 관계가 규명됐다. 일반적으로 배지의 이동속도가 증가할수록 glutamine의 소비속도는 증가하는 반면 ammonium의 생성속도는 일정하게 유지되는 완전 동화상태로 전이됨이 확인됐으며, 배지내의 glucose 농도가 증가할수록 세포수와 더불어 물질생산속도도 증가했다. 낮은 glucose 및 glutamine의 농도와 낮은 산소 분압하에서 낮은 pH를 유지해, 세포의 생육을 인위적으로 저해하는 maintenance 과정을 통해 pro-UK의 생산성 및 수율 증가에 의한 생산 경제성이 향상됐다.

## 사사

본 연구는 89~90 과학재단연구비의 지원으로 수행돼 당 재단에 심심한 사의를 포함합니다.

## 요약

5% 혈청을 포함한 DMEM 배지에 갑상세포주 579를 연속배양하여 약  $5.7 \times 10^{-8}$  g/h/cell에 해당하는 pro-UK의 비생산속도를 얻을 수 있었다. 또한 배지의 이동속도가 증가할수록 glutamine의 소비속도가 증가하는 반면 ammonia생산속도는 일정하게 유지되는, glutamine의 완전동화에 의한 물질생산증가 현상을 나타냈다. 5 mM의 glucose와 2 mM의 glutamine, 포화용존 공기의 10%에 해당하는 용존산소 및 pH 6.2의 maintenance 생육 조건하에서 약 15일간 유지시켜,  $12 \times 10^{-8}$  g of pro-UK/h/cell의 최대 비생산속도와 0.226 mg/g of glucose의 생산수율을 얻었으며, 이는 10 ml/min의 배지 이동속도를 유지하는 연속배양 조건에서 매일 0.223 mg의 pro-KU를 생산할 수 있음을 의미한다.

## 참고문헌

1. Backer, M.P., L. Metzger, P.L. Slaber, K. Nevitt and G.B. Boder, *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 993 (1988).
2. Lee, H.Y. and J.H. Lee, *Kor. J. Chem. Eng.*, **26**, 659 (1988).
3. Bree, M.A., P. Dhurjati, R.F. Geoghengan and B. Robnett, *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 1067 (1988).
4. Belford, G., *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 1047 (1989).
5. Kang, J. and H.Y. Lee, *Biotech. Lett.*, **12**, 173 (1990).
6. Thilly, W.G. (ed.), *Mammalian Cell Technology*, Butterworths, London (1986).
7. Ito, M. and W. McLimans, *Cell Biol. Int. Rep.*, **5**, 611 (1981).
8. Ryan, W.L. and C. Cardin, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **123**, 27 (1966).
9. Cherry, R. and E.T. Papoutsakisk, *Bioproc. Eng.*, **1**, 29 (1986).
10. Fleischaker, R.J. and A. Sinskey, *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **12**, 193 (1981).
11. Lee, H.Y., *Kor. J. Biochem. Eng.*, **4**, 100 (1988).
12. Drury, D.D., B.E. Dale and R.J. Gillies, *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 966 (1988).
13. Fragos, A., S.G. Eskin, L.V. McIntire and C. Ives, *Science*, **277**, 1477 (1985).
14. Lee, H.Y. and J.K. Kang, *Kor. J. Appl. Bioeng.*, **17**, 173 (1989).
15. Kovacevic, K. and J.P. McGivan, *Physiol. Rev.*, **63**, 547 (1983).
16. Miller, W.M., A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism, Ph. D.thesis, Univ. of California at Berkeley (1987).
17. Kalenbach, J.P., M.H. Kalenbach and W.B. Lyons, *Exp. Cell. Res.*, **15**, 112 (1958).
18. Lee, H.Y., *Kor. J. Biochem. Eng.*, **4**, 36 (1989).
19. Lund, P., *Methods of Enzymatic Analysis*, H.V. Bergmeyer (ed.), Verlag International, FL (1977).
20. Hill, D.W., F.H. Walters, T.N. Wilson and J. Stvert, *Anal. Chem.*, **51**, 1338 (1979).
21. Reitzer, L.J., B. Wice and D. Kennel, *J. Biol. Chem.*, **255** 5616 (1980).
22. Zeilke, H.R., P.T. Ozand, J.T. Tildon and M. Cornblath, *J. Cell Physiol.*, **95**, 41 (1978).
23. Glaken, H.W., E. Adema and A.J. Sinskey, *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 491 (1988).

(Received June 13, 1990)