

Baculovirus-곤충세포 상호반응에 대한 생화학적 연구

I. AcNPV의 곤충세포 감염시 배지 첨가물을 이용한 재조합 β -galactosidase 생산 향상

이기용 · 김태용 · 정인식*

경희대학교 자연과학대학 유전공학과

초록 : T-flask와 air-lift 생물반응기를 이용하여 *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV)의 Tn5B1-4 세포에의 감염시 fatty acid 및 lipid, mannose, folic acid, CaCl_2 등의 배지 첨가물이 재조합 β -galactosidase (β -gal) 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Cholesterol, tocopherol, tricaprilyn 또는 mannose를 첨가하거나 folic acid를 보강첨가 했을 때 AcNPV의 재조합 β -gal 생산은 향상되었으나 CaCl_2 의 보강 첨가는 β -gal 생산을 높이는 데 효과적이지 못했다. Air-lift 생물반응기에서 0.34 mM cholesterol, 2.2 mM mannose 및 0.045 M folic acid를 보강 첨가한 배지를 이용하였을 때 재조합 β -gal 생산은 basal medium에 비해 약 2배 정도의 증진 효과가 있었다(1995년 9월 29일 접수, 1995년 10월 24일 수리).

서 론

Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV)는 생물학적 살충제로써 뿐만 아니라 세균, 효모, 식물, 포유 동물로부터 온 외부 유전자에 대한 효율적인 발현 벡터로써도 널리 이용되고 있다.¹⁻³⁾ AcNPV 벡터는 강력한 promoter를 가지고 있는 polyhedrin 유전자에 의해 유전자를 삽입시킬 수 있으며 post-translational modification이 원활하고 발현후의 생물학적 활성도가 높다.⁴⁻⁵⁾ AcNPV는 이러한 여러가지 장점 때문에 분자 수준에서의 단백질 기능에 대한 이해 뿐만 아니라 유전자의 작용 조절 기작에 대한 곤충 바이러스의 연구를 위해서도 많이 이용되고 있다.⁶⁻⁸⁾

현재 확립된 곤충 세포주는 *Aedes albopichis*, *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori*, *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni* 등 여러 종류가 있으나 Lepidoptera로부터 만들어진 두 종류의 세포주가 AcNPV 발현 벡터의 숙주 세포로 주로 이용되고 있으며 이들은 fall army worm에서 유기된 *S. frugiperda*와 cabbage looper에서 유기된 *T. ni*이다. 그 중 부착성 곤충세포인 *Trichoplusia ni* BTI-Tn 5B1-4는 *S. frugiperda* 9과 비교할 때 baculovirus expression system을 이용한 heterologous protein의 발현면에서 월등히 좋다고 알려진 바 있다.⁹⁾

곤충 세포-AcNPV 시스템을 이용하여 재조합 단백질을 생산하고자 할 때 중요한 것은 효율적으로 대량 생산해내는 일이다. 그래서 이러한 시스템을 효과적으로 활용하기 위해서 세포 배양 조건, 무혈청 배지, 고농도 세포 배양용 생물 반응기 등에 대해서 많은 연구가 수행되어 왔다.¹⁰⁻¹⁴⁾ 그리고 재조합 단백질의 생산은 곤충

세포에의 재조합 AcNPV의 감염 과정과 밀접한 관계를 가지고 있어 곤충 세포에서의 AcNPV에 의한 재조합 단백질 생산이 AcNPV 감염 조건에의 의존성에 대한 이해가 필요하다. 곤충 세포에 AcNPV가 감염될 때 감염 배지중의 serum 농도 및 glucose나 일부 amino acids 등의 배지 첨가물이 재조합 단백질 생산에 미치는 영향은 일부 보고된 바¹⁵⁻¹⁷⁾가 있으나 대체적으로 배지 첨가물과 재조합 단백질 생산과의 관계에 대한 체계적인 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 재조합 AcNPV에 의해 Tn5B1-4가 감염될 때 fatty acid 및 lipid, mannose, folic acid, CaCl_2 등의 배지 첨가물이 재조합 단백질 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

세포주와 배지

본 실험에서 사용한 세포주는 cabbage looper로부터 만들어진 *Trichoplusia ni* 5B1-4 세포 (Tn5B1-4)이다. 곤충세포 배양용 배지는 TNM-FH (Sigma)이며 gentamycin sulfate (Sigma)는 50 $\mu\text{g/ml}$, fungizone (Gibco)는 2.5 $\mu\text{g/ml}$, sodium bicarbonate (Sigma)는 0.35 $\mu\text{g/l}$ 의 수준으로 보충했고 Fetal bovine serum (FBS)은 10%를 첨가하여 사용하였다. 감염배지로서는 TNM-FH 배지에 gentamycin sulfate 50 $\mu\text{g/ml}$, fungizone 2.5 $\mu\text{g/ml}$, sodium bicarbonate 0.35 $\mu\text{g/l}$, 5% FBS가 첨가되고 fatty acid, lipid, mannose, folic acid 또는 CaCl_2 가 조정된 배지를 이용하였다. 현탁 배양에 사용된 배지는 Pluronic F-68 (Gibco)을 0.3% 보강하여 사용하였다. 모든 배지의 pH는 6.2로 맞추어 사용하였고, 0.2 μm cellulose nitrate filter (Gel-

찾는말 : medium additive, AcNPV infection, Tn5B1-4, recombinant β -galactosidase production

*연락처자

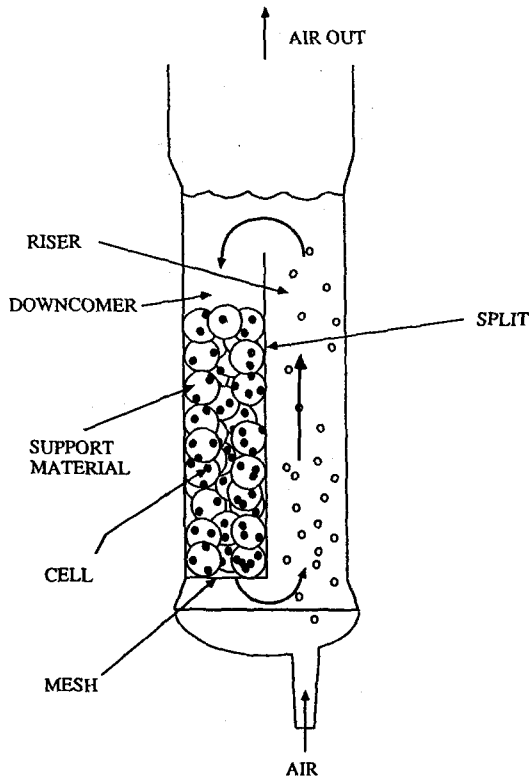


Fig. 1. Schematic diagram of the split-flow, air-lift bioreactor.

man)로 여과 살균하였다.

바이러스

바이러스는 *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus로서 polyhedrin promoter 하단부에 *E. coli* β -galactosidase 유전자가 삽입된 재조합 바이러스를 사용하였다.

세포 배양 및 바이러스의 감염

Tn5B1-4 세포는 25 cm² T-flask (Corning)에서 4~5×10⁵ cells/flask가 되도록 분주한 뒤 2~3일 마다 계대 배양한다. T-flask 실험시 초기세포 농도는 1×10⁶ cells/flask가 되도록 하였으며 MOI는 10이었다. 생물반응기의 경우 초기세포 농도는 7×10⁵ cells/ml이었으며 재조합 AcNPV를 MOI가 10이 되도록 감염시켰다.

생물 반응기 조업

본 실험에서 사용된 생물 반응기는 split-flow 형태의 air-lift 생물반응기로서 (Fig. 1) 두가지 부분, 즉 riser와 downcomer의 합체로 되어 있다. 부착성 세포인 Tn5B1-4 세포는 downcomer에 놓여진 microcarrier에서 자랄 수 있게 되어 있다. 사용된 microcarrier는 VX-100 (Verax) 또는 Siran (Schott)이었다. 이 반응기에서 통기는 54 ml/min의 속도로 sparging에 의한 방법을 사용하였다.

세포의 수 측정

Tn5B1-4 세포의 수는 hemacytometer로 측정하였고,

생물반응기의 경우 microcarrier를 꺼내어 0.1 M citric acid에 0.1%(w/w) crystal violet을 녹인 용액으로 염색된 핵을 관찰하는 nuclei counting법을 사용하였다.¹⁸⁾ Tn5B1-4 세포의 생존도는 0.4% trypan blue dye exclusion 방법으로 측정하였다.

바이러스의 수 및 재조합 단백질 측정

재조합 AcNPV의 수는 plaque assay를 이용하여 측정하였다.¹⁴⁾ AcNPV에 의해 감염된 세포로부터 만들어지는 재조합 단백질의 생산은 Miller의 β -galactosidase assay 방법을 이용하여 그 활성도를 측정하였다.¹⁹⁾

결과 및 고찰

T-flask에서 재조합 단백질 생산

곤충세포에서 재조합 AcNPV의 증식은 곤충세포와 AcNPV의 상호반응의 여러 요인들에 의해 그 정도의 차이가 생길 수 있으며 재조합 AcNPV에 의한 단백질 생산량도 달라질 수 있다. 따라서 재조합 AcNPV가 Tn5B1-4에 감염될 때 배지 첨가물이 세포의 β -galactosidase (β -gal) 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 각각의 첨가물의 경우에 대하여 초기의 세포 농도는 1×10⁶ cells/flask였고 AcNPV감염 후 β -gal의 생산량은 4일 후 maximum으로 나타나므로¹⁸⁾ 첨가물의 영향을 4일째의 β -gal 생산량으로 비교하였다.

Fatty acid와 lipid는 에너지 공급원, 또는 세포막 구성의 주요 성분으로 이용되므로²⁰⁾ 최근에 Gibco는 배지첨가물로서 0.34 mM cholesterol 및 기타 lipid를 함유한 lipid concentrate를 시판하고 있다. Fatty acid와 lipid는 곤충세포와 바이러스와의 상호반응에 관여할 수 있으므로 Tn5B1-4 세포에의 AcNPV 감염시 이러한 성분의 영향을 조사하였다. Linoleic acid, cod liver oil, cholesterol, tocopherol, β -estradiol, phosphatidylcholine, tri-caprylin을 각각 0.34 mM씩 첨가한 뒤 fatty acid 또는 lipid가 첨가되지 않은 control과 재조합 β -gal 생산을 비교하였다. Fig. 2에서 알 수 있듯이 control에 비해 β -gal 생산이 cholesterol의 경우 24%, tocopherol과 tri-caprylin의 경우 각각 20% 높게 나타났다. 따라서 Tn5B1-4 세포의 경우에도 이미 보고된 *S. frugiperda* 21과 같이¹⁶⁾ 감염배지에의 lipid 첨가가 중요함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 현재 확실하게 규명할 수 없지만 lipid가 바이러스와 세포간의 상호반응을 증대시켜서²¹⁾ 바이러스 증식 및 재조합 단백질 생산이 효율적으로 일어나기 때문인 것 같다.

최근 연구에 의하면 곤충세포에서 당 단백질이 합성되는 경우 high mannose type을 갖는 것으로 알려져 있다.²²⁾ 그리고 세포배양 배지내의 중요 성분으로 알려진 glucose와 fructose에 대해서는 *S. frugiperda* 세포와 AcNPV의 상호반응 관점에서 연구된 바¹⁶⁾ 있지만 mannose에 대해서는 체계적인 연구가 되어 있지 않다. 따라서 감염배지에서 mannose, 성분만을 0 mM(control), 1.1

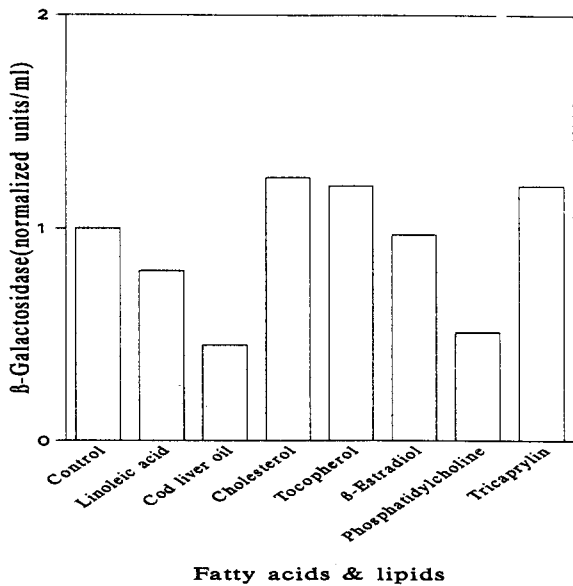


Fig. 2. Effect of fatty acids and lipids on recombinant β-galactosidase production. Initial cell density 1×10^6 cells/flask, MOI 10.

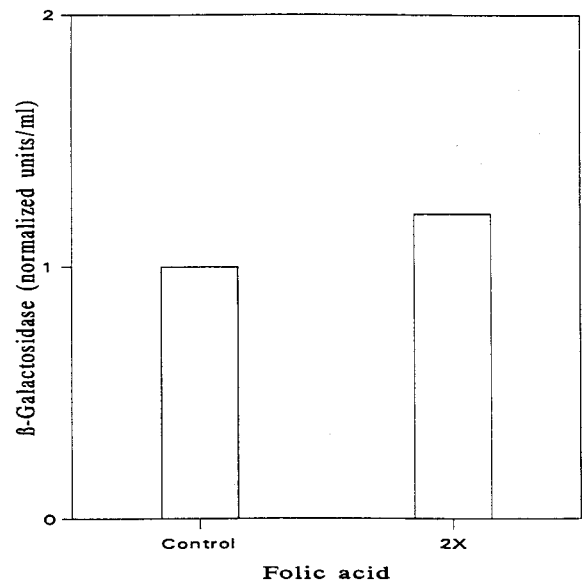


Fig. 4. Effect of folic acid on recombinant β-galactosidase production. Initial cell density 1×10^6 cells/flask, MOI 10.

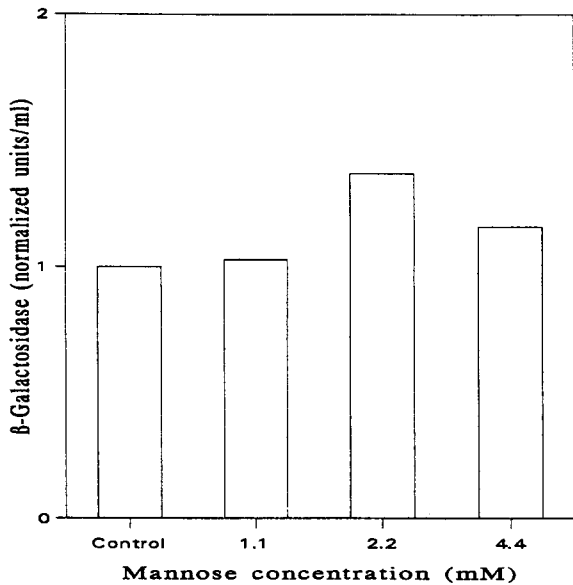


Fig. 3. Effect of mannose on recombinant β-galactosidase production. Initial cell density 1×10^6 cells/flask, MOI 10.

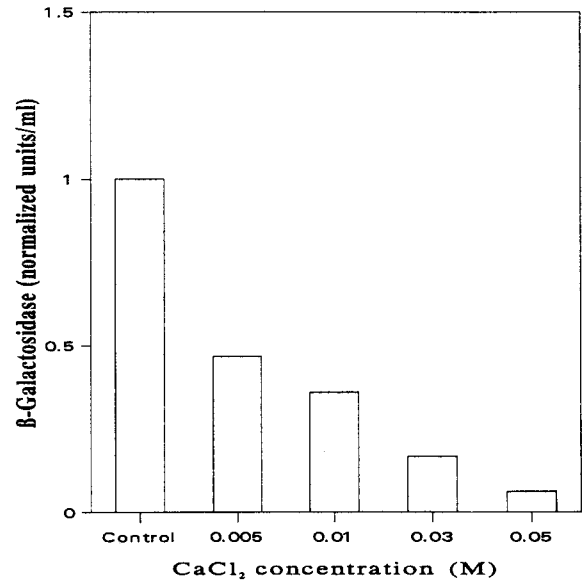


Fig. 5. Effect of CaCl₂ on recombinant β-galactosidase production. Initial cell density 1×10^6 cells/flask, MOI 10.

mM, 2.2 mM, 4.4 mM으로 변화시켜 Tn5B1-4 세포에의 AcNPV 감염시 mannose의 영향을 조사하였다. Fig. 3에서 알 수 있듯이 2.2 mM mannose 농도에서 가장 좋은 결과를 나타냈으며 재조합 β-gal 생산이 control보다 약 37% 향상되었다. 이와 같이 감염 배지에 mannose의 첨가는 곤충세포의 metabolism 또는 바이러스와의 상호작용을 변화시켜 재조합 단백질 생산을 증진시킨다고 추측된다.

세포 배양배지중 Fisher 배지는 folic acid가 보강된 배지이며 leukaemic 세포 배양에 효과적인 것으로 알려져 있다.²³⁾ 그리고 folic acid는 곤충세포 배양 배지에의

주요 vitamin 첨가물로 사용되고 있으므로²⁴⁾ folic acid 보강첨가가 Tn5B1-4 세포에의 AcNPV 감염시 미치는 영향을 조사하였다. TNM-FH 배지중에 포함된 양 만큼인 0.02 mg/l (=0.045 M)를 더 첨가해 준 결과 재조합 β-gal 생산이 약 21% 증가하였다(Fig. 4). 이 결과는 folic acid가 곤충세포의 생리 및 metabolism을 좋게 하여 바이러스와의 상호반응을 변화시킨 것으로 보인다.

Cell-cell interaction 및 cell metabolism에 영향을 주는 것으로 알려진 CaCl₂ 농도가 재조합 β-galactosidase 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 5에 나타나 있듯이 TNM-FH 배지내에 포함된 CaCl₂ 외에 0.005 M, 0.01 M,

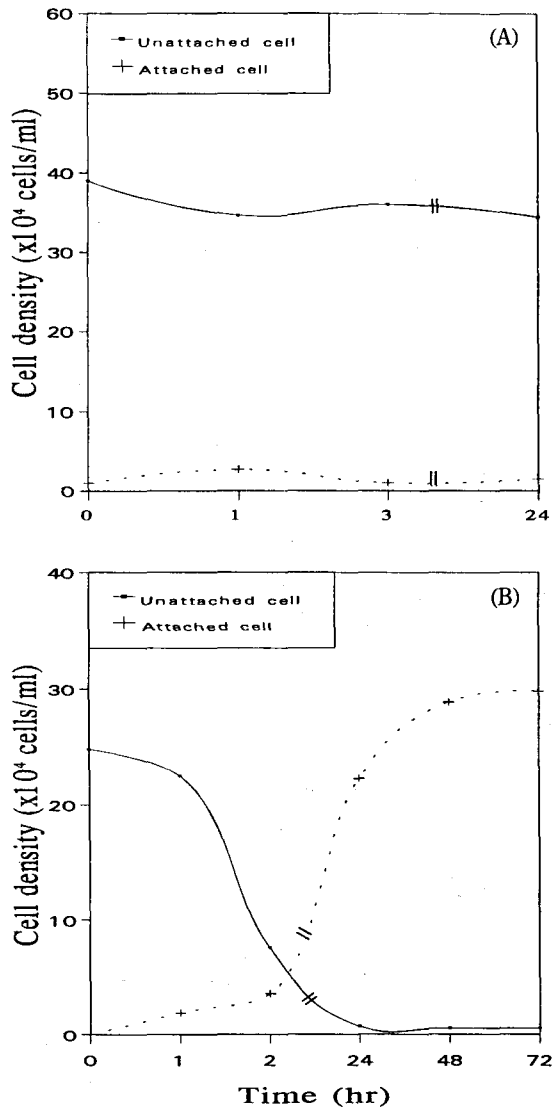


Fig. 6. Time course changes of attached cell density on VX-100 microcarrier(A) and Siran microcarrier(B).

0.03 M, 0.05 M 만큼을 보강 첨가한 결과 재조합 β -gal 생산이 control에 비해 모두 낮게 나타났다. 이 결과는 *S. frugiperda* 21에서 조사된 바¹⁶⁾와는 달리 높은 농도의 CaCl_2 는 바이러스와 Tn5B1-4 세포간의 상호반응은 증가시키지만 osmolarity를 크게 변화시켜서 cell death를 초래한 때문인 것 같다.

Air-lift 생물반응기에서의 재조합 단백질 생산

Tn5B1-4 세포는 부착성 세포이므로 현탁배양이 쉽지 않다. 따라서 Tn5B1-4 세포의 배양을 위한 microcarrier로서 VX-100과 Siran을 조사하였다. Fig. 6에서 알 수 있듯이 VX-100은 시간이 경과해도 Tn5B1-4 세포가 잘 부착하지 않음을 알 수 있었다. 반면에 Siran의 경우는 비부착세포 농도가 1~2시간이 지나면서 급격히 감소하고 부착세포의 농도는 증가하는 것으로부터 Siran이 VX-100 보다 Tn5B1-4 세포의 배양에 더 적합한

Table 1. Effect of enriched medium on recombinant β -galactosidase production in an air-lift bioreactor.

Run	β -galactosidase (units/ml)
Control	70
Enriched medium	150

microcarrier임을 알 수 있었다.

Siran이 포함된 두 개의 split-flow 형태의 air-lift 생물반응기에서 Tn5B1-4 세포를 7×10^5 cells/ml의 농도로 microcarrier에 부착시킨 후 AcNPV를 감염시켜 재조합 β -gal 생산량을 조사하였다. 두 개의 생물 반응기중 하나는 control 배지로서 TNM-FH 배지에 gentamycin, fungizone, sodium bicarbonate 및 5% FBS만이 포함된 basal medium을 이용하였으며 다른 하나는 T-flask에서 수행된 결과를 토대로 control 배지 성분에 재조합 단백질 생산에 효과적이었던 cholesterol 0.34 mM, mannose 2.2 mM 및 folic acid 0.045 M을 첨가한 enriched medium을 이용하였다.

Table 1에서 알 수 있듯이 control 실험에서 보여준 감염 후 7일째에 70 units/ml의 단백질 생산량은 T-flask에서 얻은 최대 단백질 생산량과 비슷한 수준이었다. 따라서 이 생물반응기는 Tn5B1-4 세포를 이용한 AcNPV 증식에 유용한 시스템을 알 수 있었다. 그리고 enriched medium의 경우에 감염 후 7일째에 재조합 β -gal 생산량은 150 units/ml로서 control에 비해 약 2배 정도로 증가하였다. 이러한 결과는 AcNPV의 곤충세포 감염시 배지 첨가물을 효율적으로 이용하면 재조합 단백질 생산이 향상됨을 나타낸다. 아울러 본 실험에 사용된 split-flow 형태의 air-lift 생물반응기는 scale-up이 쉬울 뿐 만 아니라 세포에 대한 공기방울의 직접적인 노출이 없이 sparging에 의해 통기할 수 있는 생물반응기이므로 곤충세포 뿐만 아니라 다른 동물세포의 배양에도 응용이 가능한 시스템으로 생각된다.

사 사

본 연구는 1994년 교육부 기초과학 육성지원비 지원 (BSRI-94-4411)에 의한 것으로 이에 감사드립니다. 또한 농업생물신소재 연구센터의 대학원생 이기용에 대한 석사논문 지원비에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Smith, G. E., M. D. Summers and M. J. Frazer (1983) Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* **3**, 2156-2165.
2. Mariorella, B., D. Inlow, A. Shauger and D. Harane (1990) Large-scale insect cell-culture for recombinant protein production. *Bio/Technology* **6**, 1406-1410.

3. Luckow, V. A. and M. D. Summers (1988) Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/technology* **6**, 47-55.
4. Jarvis, D. L., J. A. G. W. Fleming, G. R. Kovacs, M. D. Summers and L. A. Guarino (1990) Use of early baculovirus promoters for continuous expression and efficient processing of foreign gene products in stably transformed lepidopteran cells. *Bio/Technology* **8**, 950-955.
5. Luckow, V. A. (1991) Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors. In: Prokop, A., R.K. Bajpai and C.S. Ho. (eds.) *Recombinant DNA technology and applications*, p.97-152, McGraw-Hill, New York.
6. Friesen, P. D. and L. K. Miller (1986) The regulation of baculovirus gene expression, In: Doerfler, W. and P. Boehm (eds.) *The molecular biology of baculoviruses*, p.31-50, Springer-Verlag, Berlin.
7. Thiem, S. M. and L. K. Miller (1989) Identification, sequence and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis. *J. Virol.* **63**, 2008-2018.
8. Thiem, S. M. and L. K. Miller (1990) Differential gene expression mediated by late, very late and hybrid baculovirus promoters. *Gene* **91**, 89-94.
9. Wickham, T. J., T. Davis, R. R. Granados, M. L. Shuler, H. A. Wood (1992) Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system. *Biotechnol. Prog.* **9**, 25-30.
10. Murhammer, D. W. and C. F. Goochee (1988) Scale-up of insect cell cultures: protective effects of Pluronic F-68. *Bio/Technology* **6**, 1411-1418.
11. Wu, J., G. King, A. J. Daugulis, P. Faulkner, D. H. Bone and M. F. A. Goosen (1989) Engineering aspects of insect cell suspension culture: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 249-255.
12. Van Lier, F. L., E. T van den End, C. D. de Gooijer, J. M. Vlak and J. Tramper (1990) Continuous production of baculovirus in a cascade of insect-cell reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 43-47.
13. Wu, S. C., B. E. Dale and J. C. Liao (1993) Kinetic characterization of baculovirus-induced cell death in insect cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* **41**, 104-110.
14. Park, Y. M. (1991) Development of mass production system of useful proteins in insect cells. M. S. Thesis, Kyunghee University, Korea.
15. Wang, M. Y., S. Kwong and W. E. Bentley (1993) Effect of oxygen/glucose/ glutamine feeding on insect cell-baculovirus expression: A study on epoxide hydrolase production. *Biotechnol. Prog.* **9**, 355-361.
16. 김지선, 이기웅, 강석권, 양재명, 정인식 (1993) AcNPV 감염조건이 *Spodoptera frugiperda* 21 세포에서의 재조합 단백질 생산에 미치는 영향. *한국 산업미생물학회지*, **21**(5), 504-510.
17. Kim, J. S. (1993) 회분식 배양과 2-stage연속 배양 시스템을 이용한 재조합 단백질 생산. M. S. Thesis, Kyunghee University, Korea.
18. Lee, K. W. (1995) Split-flow, air-lift bioreactor에서 곤충세포 및 동물세포를 재조합 AcNPV와 rotavirus의 증식. M.S. Thesis, Kyunghee University, Korea.
19. Miller, J. H. (1992) Assay of β -galactosidase. In: *Experiments in molecular biology*, p.352-355, Cold Spring Harbor, New York.
20. Freshney, R. I. (1992) Toward serum-free, chemically defined media for mammalian cell culture. In: *Animal cell culture*, p.23, Oxford University Press, Oxford.
21. Jayme, D. W., R. M. Fike, J. M. Kubiak, C. R. Wash and D. J. Price (1993) Use of lipid concentrates to enhance biological productivity. In: S. Kaminogawa *et al.* (eds.), *Animal cell technology: basic and applied aspects*, p.215-222, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
22. King, L. A. and R. D. Possee (1990) Processing of foreign protein synthesized using baculovirus vectors in insect cells. In: *The baculovirus expression system*, p.39, Chapman & Hill, London.
23. Gor, D. (1993) Animal cell culture media. In: C. K. Leach and M. C. E. van Dam-Mieras (eds.) *In vitro* cultivation of animal cells, p.59, Butterworth-Heinemann, Oxford.
24. Grace, T. D. C. (1972) Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. *Nature* **195**, 788-789.

Biochemical Analysis of Baculovirus-insect Cell Interaction: I. Improved Recombinant β -Galactosidase Production Using Medium Additives at AcNPV Infection of Insect Cells

Ki-Woong Lee, Tae-Yong Kim and In-Sik Chung* (Department of Genetic Engineering, Kyung Hee University, 449-701, Korea)

Abstract : The medium additives such as fatty acid, lipid, mannose, folic acid, CaCl_2 were examined to enhance recombinant β -galactosidase (β -gal) production in T-flask and air-lift bioreactor. The addition of each component such as cholesterol, tocopherol, tricaprilyn, mannose and folic acid at AcNPV infection of Tn5B1-4 cells enhanced β -gal production, whereas the addition of CaCl_2 did not increase β -gal production. The recombinant β -gal production using the infection medium supplemented with a mixture of 0.34 mM cholesterol, 2.2 mM mannose and 0.045 M folic acid was enhanced 2 fold in an air-lift bioreactor, compared to the basal medium.

*Corresponding author