

인간 전과립 세포로부터 항미생물 인자의 생산에 관한 연구

박 영 식 · 김 태 호 · 안 주 희 · 함 문 선 · 김 현 구
*전 병 철 · **H. Murakami · †이 현 용

강원대학교 식품공학과, *삼일제약 중앙연구소, **일본 구주대학 세포배양실험실

Studies on Producing Anti-microbial Factor from Human Promyelocytic Cells

Young-Shik Park, Tae-Ho Kim, Joo-Hee Ahn, Moon-Sun Ham, Hyeon-Goo Kim
Byung-Cheol Jeon*, H. Murakami** and Hyeon-Yong Lee †

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

*Central Research Institute, Samil Pharmaceutical Co., Ansan 425-090, Korea

**Lab. of Cellular Regulation Technology, Kyushu University, Japan

ABSTRACT

0.374(1/day) of specific growth rate and 0.435(mg/10⁸ viable cells) of Anti-Microbial Factor (AMF) productivity were observed for the batch cultivation of human promyelocytic cells in 10% serum containing medium. The crude protein was purified 10 folds by a serial purification steps of ion exchange chromatography, Bio-Rex 70 and gel filtration chromatography, Sephadex G-70 and 100. The ranges of MIC (Minimal Inhibitory Concentration) of commercially available antibiotics, penicillin G, streptomycin and ampicillin was estimated as 40 to 70(μg/ml) on Gram (-) *E. coli* and Gram (+) *Streptococcus aureus*. The values of the MBC (Minimal Bactericidal Concentration) of purified AMF was 0.5(μg/ml) and 0.4 (μg/ml), respectively. The molecular weight of the AMF was estimated as 15,000 dalton by SDS-PAGE.

서 론

최근 미생물의 이용보다는 면역적 특성이 우수하고 부작용이 적으며 약리작용이 매우 높고, 우수하며 경제적인 생활 의약품을 생산할 수 있는 방법에 관하여 동물세포의 in vitro 배양에 대한 연구가 십여년간 세계의 여러 분야에서 집중적으로 연구되고 있다(1-4, 9, 11). 동물세포를 대량으로 체외 배양하

여 생산되는 의약품의 대상은 주로 단백질로서, 이의 산업화 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 주된 이유 중에는 동물세포로부터 생산된 제약품은 수익성이 다른 생화학 제품들보다 3배 이상 높고, 인체조성과 유사할 뿐만 아니라, 미생물이 생산할 수 없는 특이한 단백질의 생성이 가능하며 생성 단백질의 의약적 특이성이 높기 때문이다(5, 6). 이는 단백질 생합성 및 분비 과정에서 여러 종류의 당류와 결합되는 glycosylation에 기인되는 것으로 체내의 항원-항체 기능의 결정적 역할을 하게 된다(7).

† Corresponding Author

이같이 동물세포에서 생성되는 단백질들 중 극히 일부분만이 병원성 미생물들에 대해 항생 효과를 내는 것으로 보고되고 있으며(14) 이들의 산업적 생산에 관한 연구는 전무한 실정이다. 또한 기존 항생물질의 대부분은 합성 혹은 미생물이 생산하는 것으로 미생물이나 기타 세포를 죽이거나 또는 생육을 정지시키는 물질이라는 개념으로 알려져 있다(8). 이러한 약제가 감염증 등의 치료에 사용되기 위해서는 여러 종류의 유해 미생물에 대한 독성이 높고, 반면 치료 대상인 생물의 세포에 대한 독성이 극히 낮아야 되는 것, 즉 선택독성이 높아야 할 필요가 있다. 그러나 이러한 조건을 충족시키는 미생물 유래의 항생물질은 그리 많지 않으며 현재 사용되고 있는 peptide계통의 antibiotic은 대부분이 G(-) bacteria에 대해서는 항활성을 나타내지만 G(+) bacteria에서는 항활성이 미약하다는 단점 및 제한성을 갖고 있다(8). 이 계통의 항생물질은 오래 전부터 알려져 있으나, 아직도 명확한 구조가 파악되지 못하고 있는 실정이다.

이와는 달리 동물세포 내에 존재하는 항미생물 특성을 갖는 단백질의 존재가 알려지고 있으며(15), 이들은 인간 유래의 물질로서 인체에 직접 적용시 기타 항생제들과는 달리 부작용이 적어 응용도가 매우 높을 것이다. 하지만 이같은 단백질의 순수 분리, 항균 범위 및 생산 등에 관한 연구가 전무한 실정이다. 따라서 본 연구는 인간 전과립 세포내에 존재하고, 강력한 살균 활성을 갖고 있는 단백질을 Anti-Microbial Factor(AMF)라 칭하고 세포로부터 순수 분리, 항균 범위 및 적용 농도와 이의 체외 대량 생산을 위한 기초적인 생산성에 관해 조사하였다.

실험재료 및 방법

세포주 및 배양 조건

인간 전 과립 세포주(HL-60)의 배양을 위해 소혈청(Gibco, U.S.A.) 10%을 포함하는 RPMI 1640(Gibco, U.S.A.)에 gentamycin sulfate 40 μ g/ml(Sigma, U.S.A.)을 첨가하여 배양하였다. 첨가된 혈청은 56°C에서 30분간 물중탕하여 혈청내에 존재하는 성장 저해인자를 불활성화시켜서 사용하였다. 세포 배양은 T-75cm² flask에 세포의 농도가 1.0~3.0 \times 10⁴ cells/ml로 접종하여, 7일간 37°C에서, CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포의 생육은 매일 동일 시간에 5ml의 sample을 취하여 hemocytometer을 이용하여 총 세포수와 0.4% trypan blue용액(Sigma, U.S.A.)을 사용해 산 세포수를 측정하였다.

추출 및 정제

이 AMF는 세포내 존재하는 단백질로 세포로부터 배양시 배출되지 않으므로 배양을 통해 모아진 세포를 1000rpm에서 5분간 원심분리한 후 phosphate buffered saline(PBS)으로 2~3회 세척한 후 0.34M sucrose 용액을 1.0 \times 10⁸cells/ml 농도로 가진 세포 pellets에 첨가하여 현탁시키고 sonicator를 사용하여 95% 이상의 세포가 파쇄될 때까지 간헐적(15sec, 7times)으로 파쇄하였다. 이 파쇄액을 원심분리(4, 10분, 2300rpm)하여 상등액을 모아 다시 15000rpm으로 20분간 4에서 원심분리하여 상등액을 제거하고 pellets만을 모아, 0.01M citric acid(pH 4.0)으로 현탁하여 0에서 14~18시간 동안 추출하였다. 추출액을 15000rpm으로 20분간 4에서 원심분리한 후 상등액을 모아 한외여과기(M.W. 10,000 cut off)로 농축하여 조 추출물(crude AMF)로 사용하였다(10).

AMF의 분리 및 정제

세포로부터 추출된 물질의 순수 분리를 위해 crude AMF를 우선 gel chromatography를 위해 Sephadex G-75(Pharmacia, U.S.A.)로 충전된 column(2.5 \times 60cm)에 0.2M sodium acetate(pH 4.0) 완충용액을 1drop/20sec로 흘렸다. 용출된 각 분획은 280nm에서 흡광도를 측정하여, 각 peak에 대하여 Sephadex G-100으로 2차 정제하였다. 여기에 사용된 용출 완충용액은 1차 정제 buffer와 동일하였다. 2차 정제에서 얻어진 peak를 ion chromatography 단계를 위해 Bio-Rex 70(Pharmacia, U.S.A.)으로 1drop/30sec로 흘려 3차 정제하였다. 3차 정제시 평형 완충용액(0.03M Tris-HCl(pH 7.1) + 0.1 M sodium acetate)을 흘린(약 500ml) 뒤 용출 완충용액을 0.1M~2.0M의 sodium acetate(pH 7.1)을 순차적(0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0M)으로 흘렸다(7). 이렇게 얻어진 분획에 대해 SDS-PAGE방법을 이용하여 분자량을 측정하였다(7, 12).

AMF의 항균 활성 측정

실험 대상 균주는 Gram 음성균인 Escherichia coli IFO 13168로 분변오염의 지표가 되는 균과 Gram 양성균인 Staphylococcus aureus IFO 3060으로 종기와 국한성 농양의 원인균을 사용하였다. 사용된 배지는 PY배지(pH 7.2)로 증류수 1 l 당 polypeptone 10g, yeast extract 5g, NaCl 5g,

glucose 1g을 가압 멸균(121, 10분)한 후 사용하였으며 한천 배지는 이 PY배지에 1.5~2.0% agar을 첨가하여 가압 멸균 후 사용하였다. 대비 항생물질은 Gentamycin sulfate, Polymixin B sulfate, Neomycin sulfate를 사용하였다. 살균 활성도는 최소 살균농도(Minimum bactericidal concentration; MBC)측정법으로 한천 평판 도달법으로 측정하였다(13). 균주는 100ml 삼각 플라스크에 접종하고 37°C water bath에서 3~4시간 동안 대수기에 도달하도록 진탕 배양하였다. 이 배양액 1ml를 취하여 2300rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상등액은 제거하고 10mM sodium phosphate buffer로 2~4회 세척한 후 105~104CFU/ml 균수로 희석하여 접종량으로 사용하였다. 항생물질의 최소농도를 약 32g/ml로 하여 8단계까지 2배 연속 희석하여 농도별로 첨가하고 37°C, 30분간 incubation한 뒤, 10mM sodium phosphate로 연속 희석하여 한천 평판 배지에 도달하고 37°C에서 하룻밤 incubation한 후, colony수를 측정하여 항생물질을 첨가하지 않은 control군과 비교하였다. 일정 농도로 접종된 균수의 99% 이상 치사율을 보이는 최소의 농도를 MBC로 하였다.

결과 및 고찰

Fig. 1은 10%의 혈청을 포함하는 배지로 T-

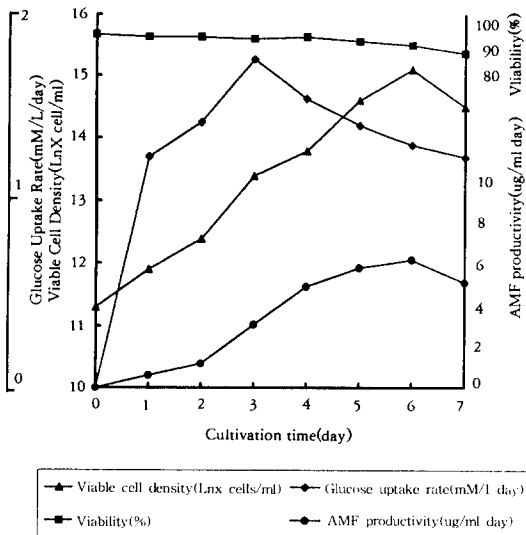


Fig. 1. Growth kinetics of cultivating HL-60 cells in 10% heat inactivated FBS in batch cultivation.

flask에서 7일간 회분 배양시킨 결과로서, 배양 초기에는 세포의 성장과 목적 단백질의 생산은 저조한 반면에 높은 생존율과 glucose의 급격한 소비를 보였다. 배양 2일 이후부터는 세포의 성장과 목적 단백질의 생산성이 점차 증가하여 최대치는 배양 6일째로 나타났으며, 그 후 세포의 성장, 생존율, 목적 단백질의 생산성, glucose의 소비율이 급격히 감소함을 알 수 있다. 생 세포수는 배양 6일째 91%까지 상회하는 것으로 나타났고, 세포수와 목적 단백질의 생산성은 비례적인 관계이지만 배양 초기에는 세포수에 비해 생산성이 다소 저조하였다. 이는 배양 초기에는 세포내 목적 단백질의 생산보다는 영양의 흡수로부터 새로운 환경에 적응하였기 때문이라고 할 수 있다. 배양 6일 이후부터는, 세포수, glucose의 소비율, 목적 단백질의 생산성 그리고 생존율 모두 급격히 감소하였는데, 이는 배양 6일째부터는 영양분의 고갈과 배지내 독성 물질의 축적으로 인하여 세포 성장의 저하가 보이므로 세포수에 비례하는 목적 단백질의 생산성의 감소도 수반하였다.

Fig. 2와 3은 회분 배양으로부터 모아진 세포를 파쇄시킨 후 0.34M citric acid 용액으로 추출하여 얻어진 추출물을 chromatography column을 이용해 분리된 용출 물질의 분획을 나타낸 그림이다.

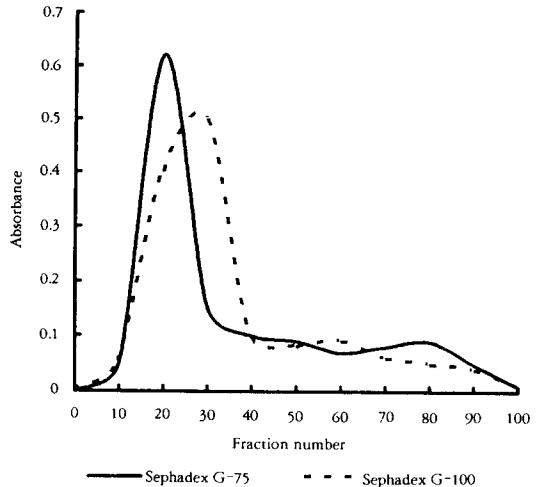


Fig. 2. Citrate extracts from human promyelocytic cells were applied to Sephadex G-75(2.5×60cm) and Sephadex G-100(2.5×70cm). Elution was carried out at constant flow rates of 9.07ml/hr(G-75) and 6.02ml/hr(G-100).

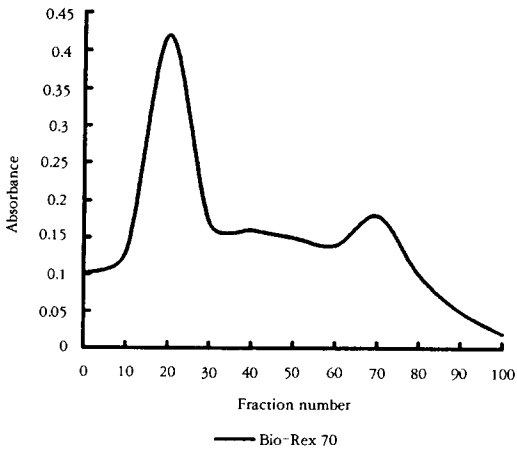


Fig. 3. Citrate extracts from human promyelocytic cells were applied to Bio-Rex 70(10g) column equilibrated by sodium acetate buffer(pH 6.9). Elution was carried out at a constant flow rate of 7.5ml/hr.

Table 1. Development of seedlings by embryo culture on media without plant growth regulators.

Purification step	Protein concentration (mg/10 ¹⁰ cells)	Minimum Bactericidal concentration(MBC ¹)		Purification ² (fold)
		G(+) ³	G(-) ⁴	
		(μg/ml)		
Citric acid extract	43.5	5±0.1	4±0.1	1
Sephadex G-75	12.1	1.8±0.1	1.6±0.3	2.6
Sephadex G-100	8.50	0.9±1.0	0.7±0.2	5.6
Bio-Rex 70	6.09	0.5±0.01	0.4±0.01	10.0

*1 Minimal Bactericidal Concentration(MBC): Inhibition of growth of a bacterial population by AMF can be the result of all the cells having been killed depending on the concentration used.

*2 Purification unit is expressed broad on the MBC.

*3 G(+): *Streptococcus aureus* IFO 3060.

*4 G(-): *Escherichia coli* IFO 13168.

Sephadex G-75로 1차 정제하였을 때 약 40%(12.1/30mg)가 앞부분에서 분리되었으며(실선), 이것을 다시 2차 정제인 Sephadex G-100을 통과한 경우는 유입 단백질의 약 85%(8.5/10mg)가 전반부에 분리되었다(점선). 이는 세포내 분자량이 유사한 단

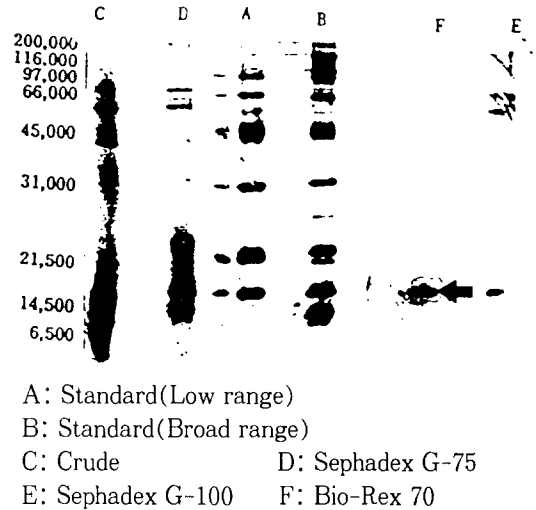


Fig. 4. The results of SDS-PAGEing of AMF from human promyelocytic cells.

백질이 많이 편재되어 있음을 알 수 있다. 이같이 2차 분리된 peak를 ion exchange chromatography인 Bio-Rex70으로 분리(Fig. 3)하였을 때 2개의 peak가 약 75%(5.25/7mg)와 12%(0.84/7mg)로 분리되었다. Fig. 4는 이같이 분리된 각각의 peak에 대해 항균 활성을 측정해 활성이 있는 분획만을 골라 SDS-PAGE를 통해 단일 band를 확인해 순수 물질임을 입증했다. 여기서 crude (C)의 경우는 세포내 존재하는 많은 종류의 단백질이 나타났으며, 1차 정제된 경우 (D)는 고, 저 분자량에서 band가 나누어져 나타났으나 3차 정제된(F) 경우 분자량이 약 15,000의 분자량에서 활성이 있는 band가 나타났다(화살표 부분).

Table 1은 단백질의 생산성과 정제단계마다 MBC와 단백질의 농도를 나타낸 결과이다. 정제된 AMF의 농도는 활성 농도에 근거한 것으로, crude AMF의 양은 3차 정제된 AMF의 농도에 비하여 약 7배가 많지만, 실제 살균 활성의 농도는 약 10배 정도가 적다. 즉 crude AMF는 두 균종에 대해 4~5 μg/ml이지만 3차 정제된 AMF는 0.4~0.5 μg/ml의 농도에서 유사한 살균농도를 보였다. 이렇게 정제된 각 분획에 대한 살균도 측정을 위해서 *E.coli*와 *St.aureus*의 균에 대해 검사하여 본 결과가 Fig. 5와 6으로서, 정제된 AMF는 crude한 상태의 AMF와 비교하여 보면 동일 양인 경우 그 활성이 2~3배까지 높고, 정제된 AMF는 두 균종의 경우 그 활성

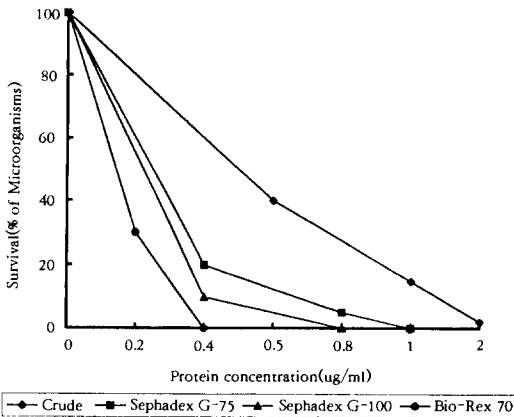


Fig. 5. Effect of AMF concentration on killing *E. coli*(IFO 13168) according to the kinds of the AMF concentration and purification steps.

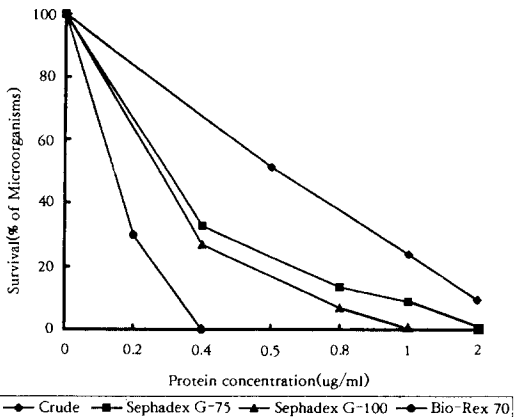


Fig. 6. Effect of AMF concentration on killing *St. aureus*(IFO 3060) according to the kinds of the AMF concentration and purification steps.

이 유사하였다. 다만 3차 정제 경우는 균종에 따라 다소 차이가 있다. 즉 균종에 따른 2차 정제된 AMF를 보면 *E.coli*에 대하여 0.4 μ g/ml의 단백질 농도는 90%이고, *St. aureus*의 경우 0.4 μ g/ml의 단백질 농도는 80%의 살균 활성을 보였다. 3차 정제된 AMF는 0.4 μ g/ml에서 *E. coli*에 대하여서는 100%의 살균 활성을 보였지만, *St. aureus*에서는 0.5 μ g/ml에서 완전 살균 활성을 보였다. Fig. 5에서는 정제된 AMF가 최종 1.0 μ g/ml의 농도로 *E. coli*에 접종하여 완전 살균이 가능하였고, Fig. 6에서 보

Table 2. Comparison of antimicrobial activities of AMF and commercially available antibiotics against pathogenic microorganisms.

Microorganisms	MIC*(μ g/ml)				MBC (μ g/ml) AMF
	Penicillin G	Streptomycin	Ampicillin	Erythromycin	
<i>E.Coli</i>	uns**	1-40	2-70	2-10	0.4
<i>St.aureus</i>	50	1-5	uns	0.01-2	0.5

* Minimal inhibitory Concentration(MIC) : The lowest concentration of a given antibiotic which inhibits a given type of microorganism under given condition(8).

** Unsusceptible.

듯이 *St. aureus*에 대해서는 2.0 μ g/ml의 농도로 완전한 살균이 가능하였다.

Table 2는 기존 항생 물질의 MIC(Minimal Inhibitory Concentration: 접종된 감수성 균주에 대하여 성장을 억제할 수 있는 최소의 농도)와 Bio-Rex 70으로 정제된 AMF의 MBC(Minimal Bactericidal Concentration: 접종된 감수성 균주에 대하여 99% 이상의 치사율을 보이는 최소의 농도)을 비교한 것이다. 물론 여기서 MIC와 MBC는 엄밀하게 비교하기란 애매하고 균종에 따라 차이가 있지만 여기에 사용된 균종과 항 미생물질은 근거(8)로 하여보면 약 6배의 차이를 보이고 있다. G(+)와 G(-)을 대표하는 두 균종에 대해서 기존 항생물질중에 최소의 MIC를 보인 erythromycin과 AMF의 MBC 비교에서도 큰 차이가 있으며 *E.coli*에 대해서 전혀 감수성을 보이지 못하는 항생물질이 있었다. 하지만 다소 농도적 차이가 약간 있을 뿐 강력한 살균활성을 보였다.

요 약

본 실험에서는 인간 전과립 세포를 회분배양 조건에서 10%의 혈청을 포함하는 배지로 배양하였다. 이와같은 조건에서 세포의 비성장율은 0.374(1/day)이고 세포내 존재하는 살균활성을 가진 목적 단백질의 생산성은 0.435(mg/10⁸ viable cells)으로 나타났다. 세포내 존재하는 목적 단백질의 순수 분리를 위해 sephadex G-75, sephadex G-100, Bio-Rex70을 이용해 분리하였다. 정제된 목적 단백질은 감수성 균주, *E. coli* IFO 13168과 *St. aureus* IFO 3060을 표준 균주로 살균 측정을 하였을 때, 기존의 항생물질은 균주에 대해 40~70 μ g/ml에서 활성을 나타

낸 반면, 정제된 목적 단백질은 G(+)균(*St. aureus* IFO 3060)에서는 0.5 μ g/ml이고, G(-)균(*E. coli* IFO 13168)에서는 0.4 μ g/ml에서 살균 활성을 보였다. 따라서 AMF가 기존 항생물질보다 살균 활성이 강력한 단백질을 알 수 있다. 해당 분자량을 측정하기 위해 SDS-PAGE로 측정한 결과 약 15,000 Dalton의 분자량을 갖고 있음이 확인됐다.

감 사

본 연구는 학술진흥재단의 국제공동연구('94)의 지원과 삼일제약(주)의 지원에 의해 수행된 결과로 이에 심심한 사의를 표합니다.

참 고 문 헌

1. H. Y. Lee(1988), *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 246.
2. H. Y. Lee(1988), *Tenth Symposium on Korean Scientist and Engineers in America*, **10**, 127.
3. M. W. Glacken, R. J. Fleischaker and A. J. Sinsky.(1983), *Annal N. Y. Acad. Sci.*, **413**, 355.
4. W. S. Hu and T. C. Dodge.(1985), *Bio/Technology*, **1**, 209.
5. M. G. Tovey(1980), *Adv. Cancer Res.*, **33**, 1.
6. D. Collen(1984), *Arteriosclerosis*, **4**,579.
7. Jerrold Weiss, Peter Elsbach, Inge Olsson, & Hakan Odeberg.(1978), *J. Biological Chem.*, **253**, 2664-2672.
8. G. C. Lancini and F. Parenti(1982), *Antibiotics an integrated view (Springer Series in Microbiology)*
9. Yuan Shi, Dewey D. Y. Ryu and S. H Park (1993), *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 430-439.
10. S. Zhang, A. Handa-Corrigan and R. E. Spier (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 685-692.
11. M. A. Bree, P. Dhurjati, R. F. Geoghengan and B. Robnet(1989), *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 1067.
12. Andy A. Lin, Roy Kimura and William M. Miller (1993), *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 339-350.
13. P. C. Taylor, F. D. Schoenknecht, J. C. Sherris and E. C. Linner (1983), *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Jan., **23**, 1, 142-150.
14. J. Weiss, R. C. Franson, S. Beckerdite and P. Elsbach(1975). *J. Clin. Invest.*, **55**, 33.
15. H. Y. Lee(1991), *Genetic Engineering/Quarterly*, **35**, 61.