

## 곤충세포-배큘로바이러스 시스템에서 재조합 단백질 생산을 위한 최적 감염시기 및 배지조성

하 성 호 · 이 성 환 · 박 태 현  
성균관대학교 유전공학과

### Optimal Infection Time and Medium Composition for the Production of Recombinant Protein in Insect Cell-Baculovirus System

Sung-Ho Ha, Sung-Hwan Lee and Tai-Hyun Park<sup>†</sup>

Department of Genetic Eng., Sung Kyun Kwan University,  
Suwon 440-746, Korea

#### ABSTRACT

Insect cells were grown and infected with baculovirus for the production of recombinant protein. Later infection gave the lower expression of recombinant protein. This indicates that the expression rate is lower at higher cell concentration. This phenomena provides a well-posed optimization problem with respect to the infection time. The optimal infection time was experimentally shown to exist for the maximum productivity of recombinant protein. Also, the expression increased with the addition of 5% silkworm hemolymph. This is considered to be due to the increase of intracellular viruses and the longevity of viable cells after the infection. The production of  $\beta$ -galactosidase increased about ten-fold with the addition of yeastolate and silkworm hemolymph for high cell density and high expression, respectively.

#### 서 론

곤충세포-배큘로바이러스 시스템을 이용하여 상업적으로 유용한 수많은 단백질이 생산되어지고 있다(1-4). 곤충세포는 세포 배양이 용이하며(5), 벡터로 사용되어지는 배큘로바이러스가 강력한 폴리헤드린 프로모터(polyhedrin promoter)를 가지고 있어서 재조합 단백질이 총 세포 단백질의 50%까지 발현이 유도되는 높은 발현율을 보인다(6). 또한 번역 후 수정(post-translational modification)이 비교적 정확히 일어나 원래의 단백질과 구조적, 기능적,

면역학적으로 유사한 단백질을 생산할 수 있다(7, 8).

곤충세포-배큘로바이러스 시스템을 이용한 재조합 단백질의 대량생산을 위해서는 고농도 세포 배양 및 단위세포당 높은 발현이 요구된다. 세포농도의 증진을 위해서는 배지의 주기적인 교체, perfusion culture, 고정화 방법 등이 사용되어졌다. 그러나 높은 발현을 위한 인자들은 고농도 세포를 위한 인자와 다르기 때문에 양자를 고려한 공정의 개발이 필요하다. 본 논문에서는 재조합 단백질의 발현을 증가시키기 위해 감염시기 및 배지조성 등이 고려되었고, 배지성분에 누에 채액의 첨가를 시도하였다.

누에는 약 2000년 전부터 사용되어져 온 부피가

<sup>†</sup> Corresponding Author

큰 곤충으로서 체액 얻기가 손쉬우며, 곤충세포 배양용 배지에 첨가되어지는 소태아혈청(FBS)에 비해 비교가 안 될 정도로 저가이다. 누에 체액은 곤충인 누에 자신에게 영양분을 공급하는 용액이므로 곤충세포의 성장과 재조합 단백질 발현에 좋은 효과가 있을 것으로 생각되어 본 연구를 수행하게 되었다.

## 재료 및 방법

### 곤충세포 및 배콜로바이러스

사용된 곤충세포는 fall armyworm의 난소조직에서 유래한 *Spodoptera frugiperda*(Sf 9) 세포이고, 유전자 재조합 배콜로바이러스로서는 폴리헤드린 프로모터 하단부에  $\beta$ -galactosidase 유전자가 삽입된 *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV)가 사용되었다.

### 배양조건

배지로는 0.35g/l  $\text{NaHCO}_3$ (Sigma), 5% FBS (Hyclone), antibiotic-antimycotic (Gibco, 600-5240AG) 등이 보강된 Grace 배지(Gibco)가 사용되었다. 누에 체액은 애벌레의 마지막 시기인 5령 3~4일째의 누에에서 채혈하여 60°C에서 30분간 열처리 후 12,000rpm에서 원심분리하여 상등액을 취해 사용하였다. 곤충세포는 6ml의 배지가 들어 있는 25cm<sup>2</sup> tissue culture flask에서 monolayer형태로 28°C에서 배양하였다. 세포 한 마리당 감염시킬 바이러스 개수인 MOI(multiplicity of infection)는 모든 실험에서 13으로 유지하였다. 배콜로바이러스를 감염시키기 위해서는 배지를 뽑아낸 후 1ml 바이러스 용액을 첨가한 후, 1시간 동안 감염시킨 다음 바이러스 용액을 감염 전의 배지로 교환하여 계속 배양하였다.

### 분석방법

세포 수는 헤모사이토미터를 사용하여 역위 현미경으로 관찰하여 결정하였다. 생존율은 0.4% trypan blue를 사용하여 염색된 세포를 죽은 세포로 간주하여 (산 세포수/총 세포수)로 나타내었다. 재조합 단백질로서 생산된  $\beta$ -galactosidase의 활성은 Miller의 방법(9)으로 측정하였다. 재조합 단백질 생성의 측정은 세포내와 세포외로 나누어서 측정하였다. 바이러스를 감염시킨 후, 하루 간격으로 sample을 채취하여 원심분리기로 세포를 침전시킨 후 상등액은 -20°C에서 보관한 후 세포의 단백질의

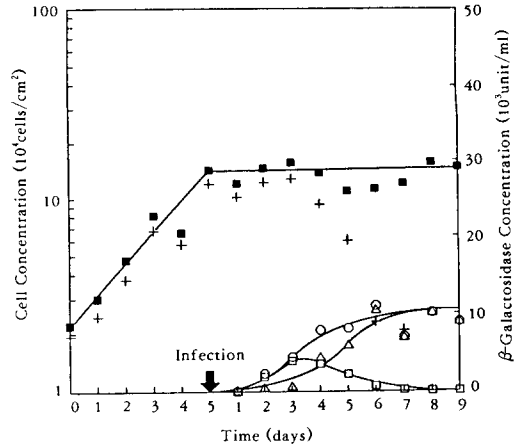


Fig. 1. Profile of insect cell viability and  $\beta$ -galactosidase production: (■) total cells, (+) viable cells, ( $\Delta$ ) extracellular  $\beta$ -galactosidase, ( $\square$ ) intracellular  $\beta$ -galactosidase, and ( $\circ$ ) total  $\beta$ -galactosidase.

활성을 측정하였다. 침전된 세포는 PBS용액(8.0g/l NaCl, 0.2g/l KCl, 0.24g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.44g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )으로 세포를 두 번 세척한 후 다시 원심분리하여 세포의 pellet을 모아서 -20°C에서 보관한다. 세포내 단백질을 측정하기 위해서는 -20°C에서 보관중인 세포의 pellet을 PBS용액으로 재현탁 후 ultrasonic homogenizer(US-150T, Nissei)를 사용하여 세포를 파쇄한 후 측정하였다. 바이러스 titer는 end point dilution method(10)를 약간 변형시킨 방법으로 측정하였다. 바이러스 titer 결정시 감염에 의한 양성반응을 보다 선명하게 관찰하기 위하여, 감염 후 6일째에 200  $\mu$ l Z buffer(9)와 50  $\mu$ l ONPG를 첨가하였다.

## 결과 및 고찰

곤충세포 배양 후 배콜로바이러스를 감염시킬 때, 재조합 단백질의 생성 및 숙주세포인 곤충세포의 생존을 Fig. 1에 나타냈다. 감염전의 곤충세포는 높은 생존율을 갖고 지수적 성장을 계속하다가, 감염 후에는 총세포농도는 일정하게 유지되는 반면 산세포수는 감염 후 3일이 지나면서부터 감소하기 시작한다. 감염 후 오랜 시간이 지난 후에도 trypan blue 염색에 의하지 않고는 현미경 하에서 산세포와 죽은 세포를 구별할 수 없을 정도로 온전한 형태를 유지

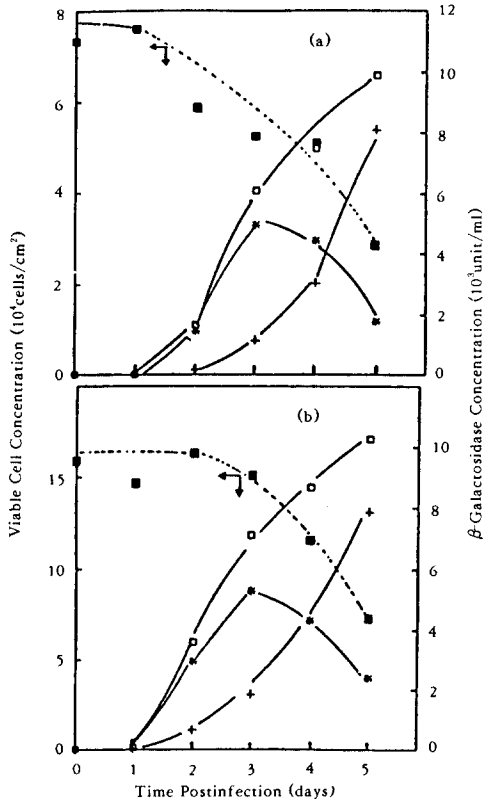


Fig. 2. Profile of  $\beta$ -galactosidase concentration at (a) early and (b) late infections: (■) viable cells, (+) extracellular  $\beta$ -galactosidase, (\*) intracellular  $\beta$ -galactosidase, and (□) total  $\beta$ -galactosidase.

하고 있으므로, 산세포 수가 감소하더라도 이것이 cell lysis를 의미하지는 않는다. 재조합 단백질인  $\beta$ -galactosidase는 감염 후 1일 뒤부터 먼저 세포내 농도가 증가하다 감소하며 그 뒤를 따라 세포외 농도가 점점 증가한다. 세포내 농도와 세포외 농도의 합인 총 농도는 감염 후 5~6일경에 최대값에 도달하였다.

지수적 성장을 하고 있는 곤충세포를 서로 다른 시기에 감염시켰을 때, 감염시기에 따른  $\beta$ -galactosidase 생산을 Fig. 2에 나타내었다. (a)는 세포농도가 낮은 이른 시기에 감염한 결과이고 (b)는 세포농도가 높은 늦은 시기에 감염한 결과이다.  $\beta$ -galactosidase 농도는 세포내와 외의 모든 경우에 거의 비슷하게 나타났다. 이른 감염의 경우에 낮은 세포농도에도 불구하고 비슷한 농도를 보이는 것은 일찍

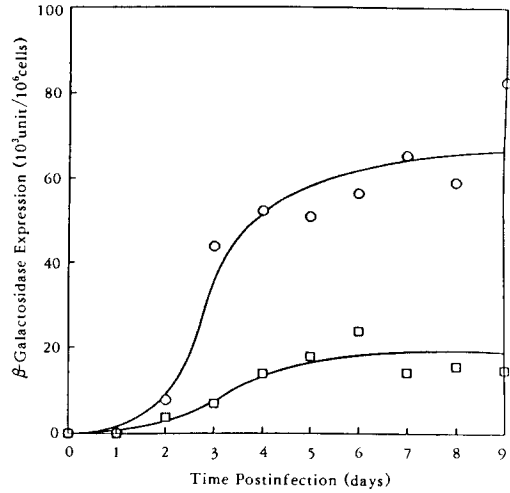


Fig. 3. Increase of  $\beta$ -galactosidase production with the addition of silkworm hemolymph: (□) supplemented with 5% FBS and (○) supplemented with 5% FBS and 5% silkworm hemolymph.

감염시킨 경우의 세포당 발현율이 높은 것을 의미한다.

이상은 5% FBS가 보강된 Grace 배지에서의 결과이다. 여기에 5% 누에 체액을 더 첨가하면 세포당 발현율이 3배 이상 증가한다. Fig. 3은 같은 시기에 감염시켰을 때 5% FBS가 보강된 배지와 5% FBS 및 5% 누에 체액이 보강된 배지에서 각각의 경우에  $10^6$ 세포당  $\beta$ -galactosidase 총농도를 보여준다. 이와같은 세포당 발현율의 증가는 누에 체액 첨가로 인해 세포내 바이러스 숫자가 증가하고 감염 후 세포의 생존성이 오래 유지되는 것에 기인하는 것으로 생각된다(11).

5% FBS와 5% 누에 체액이 보강된 Grace 배지에서 세포성장기의 다른 시기에 배콜로바이러스에 감염시켰을 때의 재조합 단백질의 생산을 살펴 보았고, Fig. 4는 바이러스의 감염시기를 보여준다. 세포를 감염시킬 때 세포 하나당 감염되는 바이러스 개수인 MOI(multiplicity of infection)는 일정하게 유지하여 MOI값의 차이에 의한 재조합 단백질 생산의 차이가 나타나지 않도록 하였다(12). Early infection은 세포 농도가  $8.4 \times 10^4$  산세포/cm<sup>2</sup>에서 바이러스를 감염시켰으며, mid infection은 세포를 48시간 더 배양하여  $1.8 \times 10^5$  산세포/cm<sup>2</sup>에서, late infection은 세포를 더 오랜 시간 동안 배양하여 정지

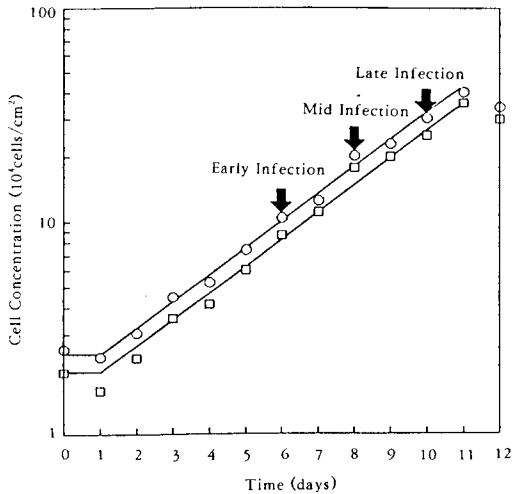


Fig. 4. Cell growth in Grace's medium supplemented with 5% FBS and 5% silkworm hemolymph. Arrows indicate various infection times: (○) total cells and (□) viable cells.

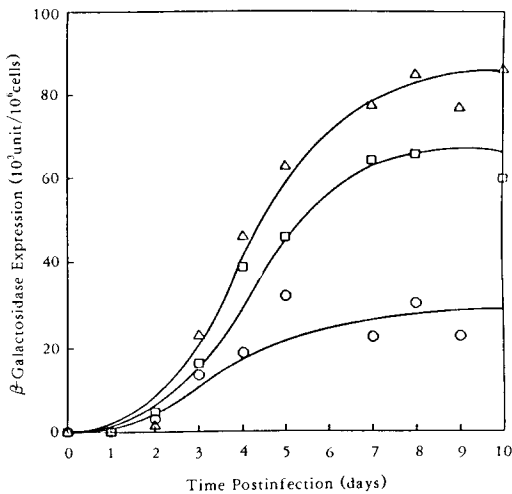


Fig. 5. Effect of infection time on  $\beta$ -galactosidase expression: ( $\Delta$ ) early infection, ( $\square$ ) mid infection, and ( $\circ$ ) late infection.

기(stationary phase)에 들어가기 직전인  $2.5 \times 10^5$  산세포/cm<sup>2</sup>의 농도에서 감염시켰다. Fig. 5는 바이러스 감염시기에 따른  $10^6$ 세포당 재조합 단백질의 발현을 비교한 것으로서 감염시기가 빠를수록 단위 세포당 발현율이 더욱 높게 나타났다. 이는 Fig. 2의

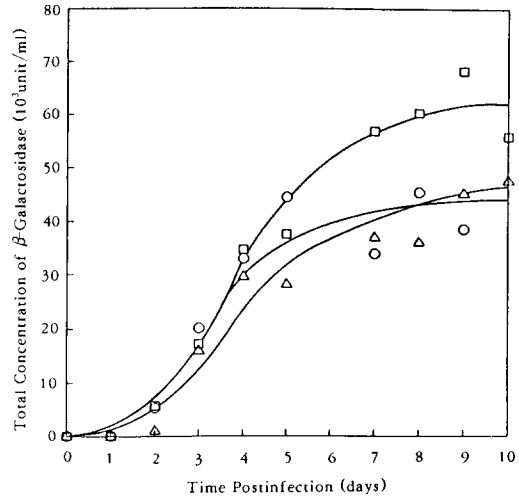


Fig. 6. Optimal infection time for the production of  $\beta$ -galactosidase: ( $\Delta$ ) early infection, ( $\square$ ) mid infection, and ( $\circ$ ) late infection.

결과와 같은 경향을 보여주며 early exponential phase에 감염시킨 경우가 late exponential phase에서 감염시킨 경우보다 단위세포당 발현율이 4배 이상 증진됨을 알 수 있다. 높은 세포농도에서의 발현율이 낮은 원인으로서는 필수 영양 성분的高갈, 발현을 저해하는 산물의 축적, 세포 고농도로 인한 세포간 상호작용, 배지내 산소 고갈 등을 생각할 수 있다. 곤충세포의 산소소모속도는 Sf 9 세포의 경우  $4.3 \times 10^{-17}$  mol/cell/sec이며, 배콜로바이러스를 감염하면 산소소모속도가 50%까지 증가한다고 보고되었다(13, 14). 그러나 이중에서도 배지내 성분인 글루타민의 고갈이 가장 중요한 인자로 여겨진다(15).

재조합 균주 배양에 있어서 생산성을 높이기 위해서는 높은 세포농도와 단위세포당 높은 발현율이 요구된다. 그러나 세포농도가 높을수록 (즉 감염시기가 늦을수록) 세포당 발현율이 감소하는 상반된 현상을 보임으로써, 최고의 생산성을 위한 최적 감염시기를 찾아야 하는 노력이 필요하다. Fig. 6은 세포농도에 단위세포당 발현율을 곱한 값인 배지부피당  $\beta$ -galactosidase 농도를 나타낸 것으로서 단위세포당 발현율과는 달리 mid exponential growth phase에서 감염시켰을 때 가장 높게 나온다. 이는 감염시기가 늦어짐에 따라 세포농도는 높아지고 단위세포당 발현율은 낮아지는 복합적 결과를 고려한 것으로서 생산성을 극대화하는 최적의 감염시기가 존재함을 보여준다.

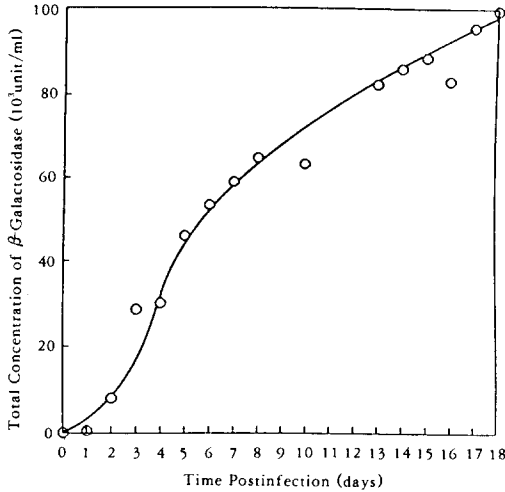


Fig. 7. Production of  $\beta$ galactosidase in Grace's medium supplemented with 4g/l yeastolate, 5% FBS and 5% silkworm hemolymph.

보다 더 높은 세포농도에서의 재조합 단백질 생산을 관찰하였다. Grace 배지에서의 세포농도는 yeastolate를 첨가함으로써 증가시킬 수 있음을 이미 보고한 바 있다(16). 따라서 본 실험에서는 5% FBS와 yeastolate가 첨가된 Grace 배지에서 세포를 충분히 성장시킨후 배양중인 배지에 누에 체액을 5% 되게 첨가하고 2일 후 배클로바이러스를 감염시킴으로써 고농도 세포배양에서의 재조합 단백질의 생산을 관찰하였다. 감염시의 세포 농도는  $4.7 \times 10^6$  산세포/cm<sup>2</sup>로서 앞의 late infection 경우보다 세포농도가 2배 가까이 높은 경우이다. 이 경우에 단위 세포당 발현율은 Fig. 5의 late infection 경우와 비슷하였으나 세포농도가 높음으로 인해서 생산성이 높다. Fig. 7에 보인 바와 같이 감염 후 10일이 지난 이후에도 지속적인 농도 증가를 보여  $\beta$ -galactosidase 최종농도가  $1.0 \times 10^6$  unit/ml에 도달하였다. 이것은 Fig. 1과 Fig. 2에 나타난  $1.0 \times 10^4$  unit/ml과 비교할 때, 세포생장을 위해 yeastolate를 첨가하고 재조합 단백질 생산을 위해 누에 체액을 첨가함으로써  $\beta$ -galactosidase 농도가 10배 정도 증가하였음을 보여 준다. 이때 생산된  $\beta$ -galactosidase의 농도는 tissue culture flask에서 monolayer 형태로 배양된 경우로서, 570ml airlift bioreactor에서의 생산 농도의 2배에 달하며(17), 잘 설계된 규모의 Chemap airlift bioreactor에서의 농도와 비슷한

값이다(18).

## 요 약

유전자 재조합 단백질 생산을 위한 곤충세포-배클로바이러스 시스템에 있어서, 바이러스에 감염시키는 시기가 늦을수록 재조합 단백질의 발현이 낮게 나타났다. 이것은 높은 세포농도일수록 단위세포당 낮은 발현율을 의미하므로 재조합 단백질 생산을 위해 감염시기에 대한 최적화의 필요성을 보여주며, 재조합 단백질의 최대 생산성을 위한 최적 감염시기의 존재를 실험적으로 입증하였다. 또한 배지에 5% 누에 체액을 보강함으로써 발현율이 증가하였고, 이것은 누에 체액 첨가로 인해 세포내 바이러스 숫자가 증가하고 감염 후 세포의 생존성이 오래 유지되는 것에 기인하는 것으로 생각된다. 고농도 세포배양을 위해 yeastolate를 첨가하고, 재조합 단백질 발현을 위해 누에 체액을 첨가함으로써  $\beta$ -galactosidase의 생산이 10배 정도 증가하였다.

## 감 사

이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. V. A. Luckow(1991), *Recombinant DNA Technology and Applications*, (A. Procop, R. K. Bajpai, C. S. Ho, eds.), p. 97, McGraw-Hill, Inc., New York.
2. R. D. Possee, U. Weyer and L. A. King (1990), *Control of Viral Diseases* (N. J. Dimmock, P. D. Griffiths, C. R. Madley, eds.), p. 53, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
3. S. A. Weiss, S. Gorfien, R. Fike, D. Disorbo and D. Jayme(1990), Presented at the Ninth Australian Biotechnology Conference, Cold Coast, Queensland, Australia.
4. W. F. Hink, D. R. Thomsen, D. J. Davison, A. L. Meyer and F. J. Castellino(1991), *Biotechnol. Prog.*, **7**, 9.
5. S. N. Agathos(1991), *Biotech. Adv.*, **9**, 51.
6. W. Doerfler and P. Bohm(1986), *Current top*

- ics in Microbiology and Immunology.*, Vol. **131**, Springer-Verlag, Berlin.
7. V. A. Luckow and M. D. Summers(1988), *Bio/Technology*, **6**, 47.
  8. M. L. Shuler(1992), *Biochemical Engineering for 2001*(S. Furusaki, I. Endo and R. Matsuno, eds.), p. 309, Tokyo, Springer-Verlag.
  9. J. H. Miller(1972), *Experiments in Molecular Genetics*, p. 398, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
  10. M. D. Summer and G. E. Smith(1987), *Tex. Agric. Exp. Stn. Bull.* No. 1555, 1.
  11. S. H. Ha(1995), *M. S. Thesis*, Dept. of Genetic Eng., Sung Kyun Kwan Univ., Suwon.
  12. P. Licari and J. E. Bailey(1991), *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 238.
  13. B. Maiorella, D. Inlow, A. Shauger and D. Harano(1988), *Bio/Technology*, **6**, 1406.
  14. F. L. J. Van Lier, J. M. Vlak and T. Tramper (1992), *Animal Cell Biotechnology*, **5**, 169.
  15. S. H. Lee and T. H. Park(1995), *Biotechnol. Tech.*, In Press.
  16. S. H. Lee and T. H. Park(1994), *Biotechnol. Lett.*, **16**, 327.
  17. D. W. Murhammer and C. F. Goochee (1988), *Bio/Technology*, **6**, 1411.
  18. G. A. King, A. J. Daugulis, P. Faulkner and M. F. A. Goosen (1992), *Biotechnol. Prog.*, **8**, 567.