

세포내 calcium 농도가 하이브리도마 세포 성장 및 단일클론항체 생산에 미치는 영향

박재성 · ¹남민희 · [†]박선호

계명대학교 화학재료공학부, ¹농촌진흥청 영남농업시험장
(접수 : 1998. 6. 30., 게재승인 : 1998. 8. 20.)

Effect of Intracellular Calcium Level on the Hybridoma Cell Growth and Monoclonal Antibody Production

Jae Sung Park, Min Hee Nam¹, and Sun Ilo Park[†]

School of Chemical Engineering and Materials Engineering, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea
¹National Yeongnam Agricultural Experiment Station, RDA, Milyang 627-130, Korea

(Received : 1998. 6. 30., Accepted : 1998. 8. 20.)

The effect of intracellular Ca^{2+} level on the hybridoma cell growth and monoclonal antibody(MAb) production was examined. For the manipulation of intracellular Ca^{2+} concentration, the cells were treated with A23187, ryanodine, and thapsigargin at about 1×10^6 cells/mL. The treated cells were recultivated by using the Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM) containing 1.49mM $CaCl_2$. The ryanodine-treated cells showed better cell growth, MAb concentration, and specific MAb productivity than others. In comparison with control, the maximum cell concentration, MAb concentration, and specific MAb productivity were increased by 40.6%, 48.1% and 83.3%, respectively. Confocal microscopic images of Fura-2/AM loaded cells indicate that the increase in intracellular Ca^{2+} level can enhance the MAb productivity by allowing the calcium influx into the endoplasmic reticulum.

Key words : intracellular Ca^{2+} , specific MAb productivity, A23187, ryanodine, thapsigargin

서론

동물세포배양기술을 이용해 생산해 내는 의학적으로 중요한 당단백질들의 대부분은 동물세포의 소기관들을 통해 얻어진다. 따라서 최근에는 이러한 세포내·외의 미세환경을 인위적으로 조작함으로써 세포당 생산성을 증대시키기 위한 노력이 계속되고 있다. 그 중 소포체(endoplasmic reticulum)는 번역 후 (post-translational) 변형과정에서 분비와 라이소솜종 단백질, resident ER 단백질, 골지체와 라이보솜 membrane 단백질 등의 합성뿐만 아니라 대부분의 접합과 합성이 일어나는 중요한 기관의 하나로 알려져 있다(1-2). 소포체의 또 하나의 중요한 특징은 Ca^{2+} 의 저장소로 이용되고 있으며 Ca^{2+} 생체항상성의 유지에 중요한 작용을 한다. 또한 소포체내에서의 Ca^{2+} 의 기작은 아직 정확히 알려지지 않았지만 최근의 연구결과에 의하면 소포체내에 저장된 Ca^{2+} 이 여러 가지 단백질 공정을 유지시키는 작용을 하며 당단백질들의 최적 공정에 요구되어진다고 보고되고 있다(3). 그리고

루우멘에서의 Ca^{2+} 의 높은 농도가 생합성된 분비 단백질의 격렬한 접합에 필수적인 것으로 예측된다(4-7)

소포체를 포함한 소기관들에 저장된 Ca^{2+} 는 inositol trisphosphate에 의해 발생되는 호르몬(8-9), 불포화지방산, ionophore인 ionomycin(10) 그리고 소포체로의 Ca^{2+} 이송을 막는 thapsigargin(11)과 같은 첨가물질들에 의해 cytosol로 빠르게 방출된다. 그리고 이렇게 방출된 cytosol의 유리 Ca^{2+} 농도의 일시적인 증가는 세포내에서 일어나는 여러 가지 기작들을 통제한다. Ionomycin은 세포밖 배지의 Ca^{2+} 를 세포내로 빠르게 이송시키는 반면 소포체에서는 단백질들의 합성과 배출을 저해하는 것으로 나타났는데 이는 소포체내의 Ca^{2+} 을 cytosol로 방출하기 때문이다(3). 세포내 Ca^{2+} pump의 억제제인 thapsigargin을 세포에 첨가시킨 후 세포내의 전기적 신호를 측정해 본 결과 소포체내의 Ca^{2+} 신호가 없어지고 plasma membrane에서 신호가 나온 것을 확인하였는데 이는 Ca^{2+} 의 세포내 투과성을 증대시켜 Ca^{2+} 의 저장 능력을 감소시켰기 때문이다. 그리고 thapsigargin은 소포체에서 당단백질의 올리고당류 합성을 저해하기도 한다(3). Ryanodine은 세포내에서 ionomycin이나 thapsigargin과는 달리 Ca^{2+} 대사의 촉진제 작용을 하며 Ca^{2+} ATPase의 반응을 촉진시켜 cytosol에 있는 Ca^{2+} 를 소포체내로 이송하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(12).

본 연구에서는 소포체내·외의 미세 환경을 효율적으로 조절

[†] Corresponding Author : 1000 Shindang-dong, Dalseo-gu, Taegu 704-701, Korea
Tel : 053-580-5457, Fax : 053-633-4929
e-mail : park@kmucc.keimyung.ac.kr

함으로써 단백질 접합과 합성 및 분비 공정을 향상시킬 수 있는 기초 자료를 구축하기 위하여 하이브리도마 세포배양에 의한 단일클론항체의 생산을 예로 하여 A23187(calcium ionophore), thapsigargin, ryanodine 등을 이용하여 세포내 Ca^{2+} 농도를 조절하였으며 이때 세포의 성장과 단일클론항체 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 세포주 및 배지

5F12AD3란 하이브리도마 세포를 ATCC로부터 분양받아 사용하였다 이 세포주는 IgG₁ subtype이며 10% 혈청(horse serum)이 첨가된 배지를 이용하여 100U/mL penicillin G와 100mg/mL streptomycin을 첨가한 후 5.5% CO₂ incubator에서 37°C로 T-flask상에서 배양하였다. 또한 CaCl₂ 농도가 서로 다르게 함유된 3종류의 배지는 (i) IMDM(CaCl₂ · 2H₂O : 219mg/L), (ii) RPMI-1640(Ca(NO₃)₂ · 4H₂O : 100mg/L), (iii) DMEM(CaCl₂ · 2H₂O : 264mg/L)을 사용하였다.

배양 방법

세포내 Ca^{2+} 농도를 변화시키기 위해 A23187(calcium ionophore), ryanodine(calcium release channel blocker), thapsigargin(calcium pump inhibitor) 등을 이용하여 다음과 같은 조건으로 실험하였다. 5×10^4 cells/mL 세포를 10mL 배지에 접종한 후 3일째(세포의 농도가 약 1×10^6 cells/mL)되는 날에 원심분리를 통해 세포만 분리하였다. 그 다음 이 세포를 (i) A23187을 0.7 μ M, 3.5 μ M, 7 μ M로, (ii) ryanodine을 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M로, (iii) thapsigargin을 0.5 μ M, 1 μ M, 2 μ M로, (iv) 3.5 μ M A23187 + 5 μ M ryanodine, 3.5 μ M A23187 + 1 μ M thapsigargin, 3.5 μ M A23187 + 5 μ M ryanodine + 1 μ M thapsigargin로 첨가한 배지에 넣은후 CO₂ incubator에서 37°C로 30분 동안 처리하였다 그런 다음 세포를 다시 원래 배지로 옮겨 배양을 계속하였다

분석 방법

생존 세포수의 측정에는 hemocytometer를 이용해 trypan blue exclusion법으로 측정하였다. 단일클론항체의 생산을 정성적으로 측정하기 위해 SDS-PAGE를 수행하였다(13) Sample은 배양액 1mL을 1000rpm에서 5분간 원심분리한 후 그 상등액을 사용하였으며 sample과 sample buffer를 1:2로 섞은 후 injection 하였다. Gel은 16.5%를 사용하였으며 gel 건조 조건은 cyclic mode에서 80°C로 2시간 동안 수행하였다. 그리고 단일클론항체의 농도는 ELISA reader를 통해 405nm에서 측정하였다(14).

세포내 calcium 농도 변화를 측정하기 위해 confocal microscope를 이용하여 488nm에서 Fura-2/AM을 부하시켜 측정하였다. Petri dish에 슬라이드를 놓고 세포의 접종 농도를 5×10^5 cells/mL로 하여 1mL을 부하한 후 2시간 동안 37°C에서 배양하여 슬라이드에 세포를 부착시킨다. 그리고 미부착된 세포와 배지를 제거한 후 10~12mL의 배지를 petri dish에 첨가하여 2일 동안 배양시킨 후 배지를 제거하고 슬라이드위에 부착된 세포에 아래의 조건으로 A23187, ryanodine, thapsigargin을 농도별로 첨가하여 30동안 CO₂ incubator에서 처리시킨다.

- (i) 기본배지(control),
- (ii) 기본배지 + 10 μ M ryanodine,
- (iii) 기본배지 + 7 μ M A23187 + 10 μ M ryanodine,
- (iv) 기본배지 + 7 μ M A23187 + 0.5 μ M thapsigargin,
- (v) 기본배지 + 7 μ M A23187 + 10 μ M ryanodine + 0.5 μ M thapsigargin.

각 첨가물질들의 treatment 후 S-CES 용액으로 2번 세척후 2 μ M Fura-2/AM을 S-CES 용액에 첨가하여 30분동안 37°C incubator에서 형광물질을 부하시킨 후 다시 한번 S-CES 용액으로 세척하고 confocal microscope로 세포내 calcium 변화를 측정하였다.

결과 및 고찰

배지 종류에 따른 세포 성장 비교

하이브리도마 세포인 5F12AD3가 성장하는데 있어 최적의 배지를 선별하기 위해 3종류의 배지인 RPMI-1640, IMDM, DMEM 배지에 10% HS를 첨가시켜 배양시킨 결과를 Figure 1에 나타내었다. RPMI-1640 배지와 DMEM 배지에서 세포의 농도는 접종 후 3일 경과 후부터 감소하기 시작하였으며 최대 세포 농도는 RPMI-1640 배지의 경우 102×10^6 cells/mL이고 DMEM 배지의 경우 8.5×10^5 cells/mL이었다. 그러나 IMDM 배지에서는 세포 접종 후 5일까지 세포의 성장이 계속되었으며 최대 세포 농도가 163×10^6 cells/mL로 DMEM 배지에서보다 약 2배가 높고 RPMI-1640 배지 보다는 약 1.5배가 높게 나타났다. 또한 비성장속도도 RPMI-1640 배지에서 1.056 day^{-1} , DMEM 배지에서 0.980 day^{-1} , 그리고 IMDM 배지에서 1.522 day^{-1} 로 IMDM 배지에서의 비성장속도값이 가장 높게 나타나(data not shown) 이를 기본배지로 사용하였다.

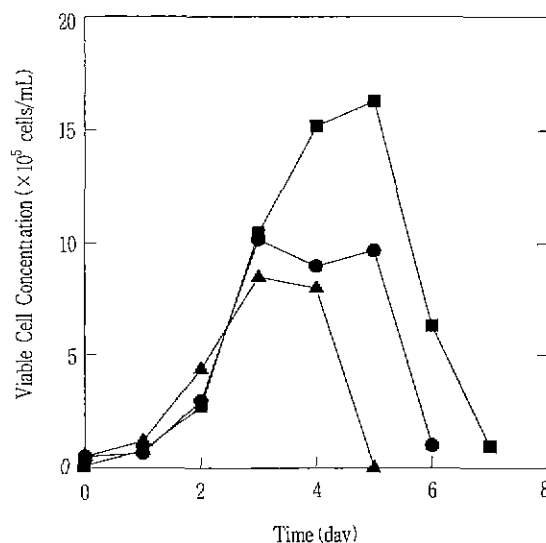


Figure 1. Cell growth of 5F12AD3 in various cell culture media; (■) IMDM medium, (●) RPMI-1640 medium, (▲) DMEM medium.

Calcium ionophore, calcium release channel blocker, calcium pump inhibitor가 세포 성장 및 MAb 생성에 미치는 영향

세포내 Ca^{2+} 농도를 변화시켜 주기 위해 배양 3일째 calcium

mobilizing agent인 A23187, ryanodine, thapsigargin을 각각 농도별로, 또한 이 세가지 첨가물질을 각각 혼합하여 첨가하였을 때 세포의 성장 변화를 Figure 2와 Figure 3에 각각 나타내었다. Figure 2(A)에 나타난 바와 같이 calcium ionophore인 A23187의 농도가 높을수록 세포의 성장이 저해되어 3.5 μ M 이상에서는 세포가 더 이상 성장하지 못하고 생존세포의 농도도 감소되었다. 그러나 0.7 μ M과 3.5 μ M의 A23187 농도에서는 control보다는 다소 떨어지지만 세포의 성장은 계속되었다. 또한 A23187을 첨가하기전(배양 3일째)에는 세포의 성장이 control보다 좋았으나 첨가한 후(배양 4일째)는 세포의 성장이 control보다 저하됨을 보였다. 이 결과로부터 calcium ionophore인 A23187의 농도를 높여 세포내로 calcium을 많이 유입시킬 수 있지만 세포내 calcium 농도가 너무 높아지면 오히려 세포의 성장이 저하됨을 알 수 있었다. Figure 2(B)는 calcium release channel blocker인 ryanodine을 농도별로 처리하였을 때 시간에 따른 세포 성장 결과이다. Ryanodine의 농도가 5 μ M일 때 세포의 성장이 크게 증가하여 최대 생존 세포 농도가 2.7 $\times 10^6$ cells/mL로 control보다 약 40.6%정도 더 높은 것으로 나타났다. 그러나 10 μ M과 1 μ M ryanodine 농도로

처리한 경우 control보다 세포의 성장이 다소 저하되었으며 이는 첨가되는 ryanodine농도가 5 μ M 근처에서 세포의 성장에 가장 좋은 영향을 미친다는 것을 보여준다

Figure 3(A)는 calcium pump inhibitor인 thapsigargin을 농도별로 첨가하였을 때의 결과이다. Thapsigargin을 첨가하기 전(배양 3일째)에는 세포의 성장이 control보다 높았으나 thapsigargin을 첨가한 후(배양 4일째)에는 thapsigargin의 농도가 1 μ M일 때 control과 최대 세포 농도가 비슷하고 나머지의 경우에는 모두 control보다 세포의 성장이 낮았다. 이 결과는 thapsigargin이 소포체내로 이송되는 Ca²⁺를 막아 소포체내의 calcium 농도가 낮아져 세포의 성장이 저해된 것으로 사료된다 Figure 3(B)는 3.5 μ M A23187과 5 μ M ryanodine, 그리고 1 μ M의 thapsigargin을 각각 혼합하여 첨가한 결과로서 모든 경우에 control보다 오히려 세포의 성장이 저하되며 특히 A23187과 ryanodine을 혼합하여 첨가한 경우에 세포의 성장이 가장 많이 저하됨을 알 수 있다.

A23187, ryanodine, thapsigargin을 각각 농도별로, 또한 각각 혼합하여 배양 3일째 첨가시킨 후 하루 더 세포를 배양하여 배지내에 축적되는 MAb를 SDS-PAGE로 분석한 결과는 Figure 4

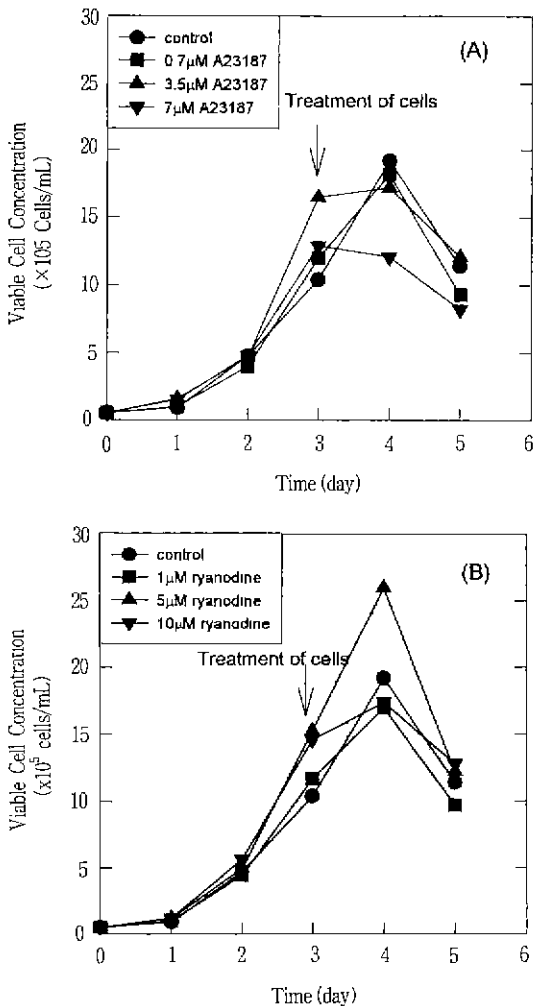


Figure 2. Effects of calcium ionophore A23187(A) and calcium release channel blocker ryanodine(B) on the cell growth of 5F12AD3.

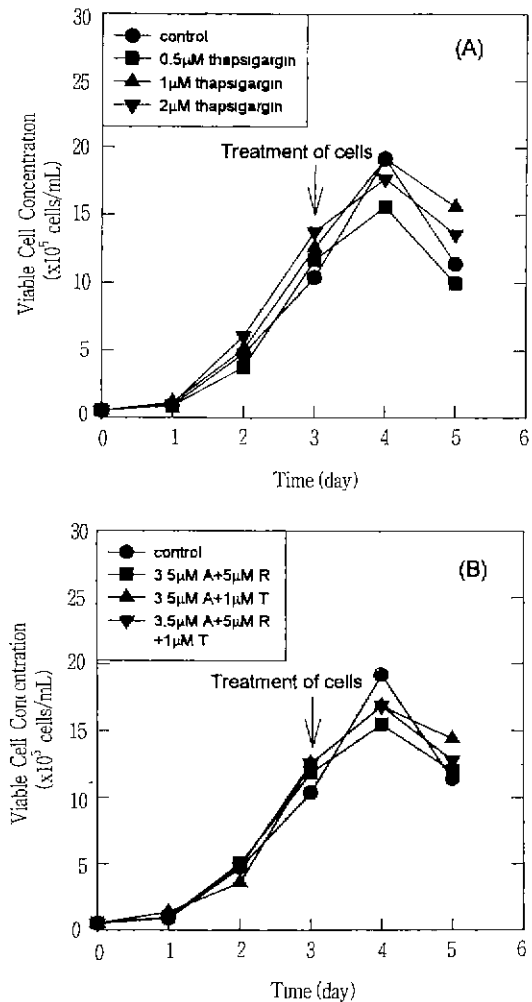
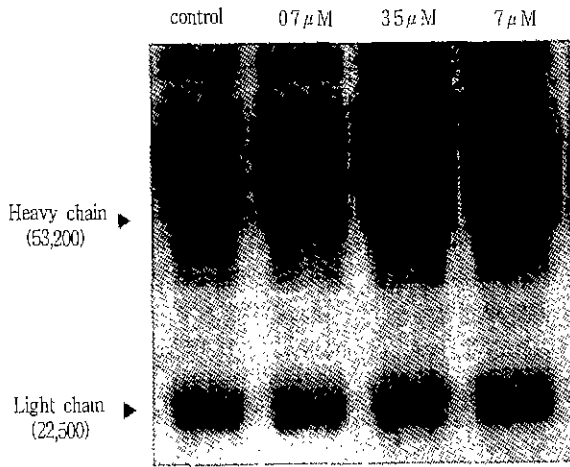
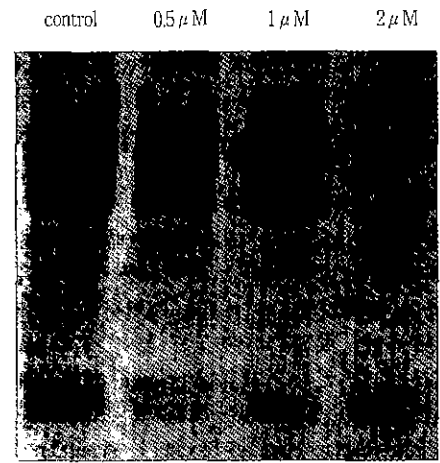


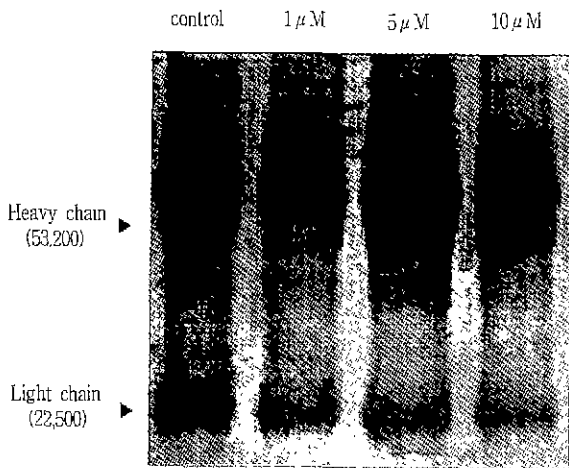
Figure 3 Effects of calcium pump inhibitor thapsigargin(A), A23187+ryanodine, A23187+thapsigargin, and A23187+ryanodine+thapsigargin(B) on the cell growth of 5F12AD3.



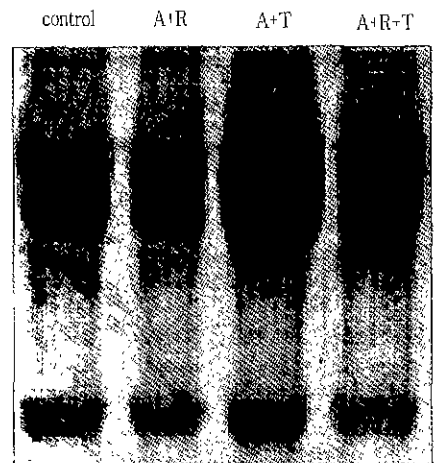
(a)



(a)



(b)



(b)

Figure 4. MAb secretion of 5F12AD3 after treatment with A23187(A) or ryanodine(B).

와 Figure 5에 나타내었다. A23187을 첨가한 경우 Figure 2(A)에서 보는 것처럼 control에 비해 생존 세포의 농도는 조금 감소되었지만 Figure 4(A)에서 나타난 바와 같이 생성되는 MAb의 농도는 오히려 크게 증가함을 알 수 있다. 그러나 A23187의 농도가 3.5 μM에서 생성되는 MAb의 농도가 최대가 되는 반면 7 μM에서는 오히려 조금 감소되는 것을 알 수 있다. Ryanodine을 첨가한 경우에도 Figure 4(B)에서 보는 바와 같이 5 μM ryanodine 농도에서 생성되는 MAb 농도가 가장 높게 나타났으나 그외의 농도에서는 control과 유사하였다. Thapsigargin을 첨가한 모든 경우에는(Figure 5(A)) 모두 control보다 MAb 농도가 낮게 나타났다. 그러나 첨가물질을 각각 혼합하여 사용한 경우에는(Figure 5(B)) A23187과 thapsigargin을 동시에 첨가하였을 때 생성되는 MAb 농도가 가장 높게 나타났고 나머지의 경우에는 control과 비슷한 농도를 보였다.

Figure 5 MAb secretion of 5F12AD3 after treatment with thapsigargin(A) or A23187+ryanodine, A23187+thapsigargin, A23187+ryanodine+thapsigargin(B)

Confocal microscope를 이용한 세포내 calcium 농도 변화 측정

Control과 10 μM의 ryanodine을 첨가하였을 때의 세포내 calcium 농도 변화를 confocal microscope로 측정된 결과를 Figure 6에 나타내었다 Control보다 10 μM의 ryanodine 첨가시에 세포내의 Ca²⁺ 농도가 크게 높아짐을 볼 수 있으며 또한 Ca²⁺이 세포내에 균일하게 분포되었다기 보다는 핵 주변으로 갈수록 높아지는 것을 알 수 있다. 그 이유는 핵 주변에 분포된 소포체내의 calcium 농도가 cytosol에서보다 높기 때문인 것으로 추측된다

Figure 7은 7 μM의 A23187(A)을, 10 μM의 ryanodine(R)과 0.5 μM의 thapsigargin(T)으로 각각 혼합하였을 때의 세포내 Ca²⁺ 농도 변화를 보여주는 것으로 각각을 사용한 경우보다 세포내 Ca²⁺ 농도는 증가하는 것을 알 수 있다. 또한 세가지 물질을 모두 혼합할 경우 Figure 7(C)에서 보는 것처럼 세포내

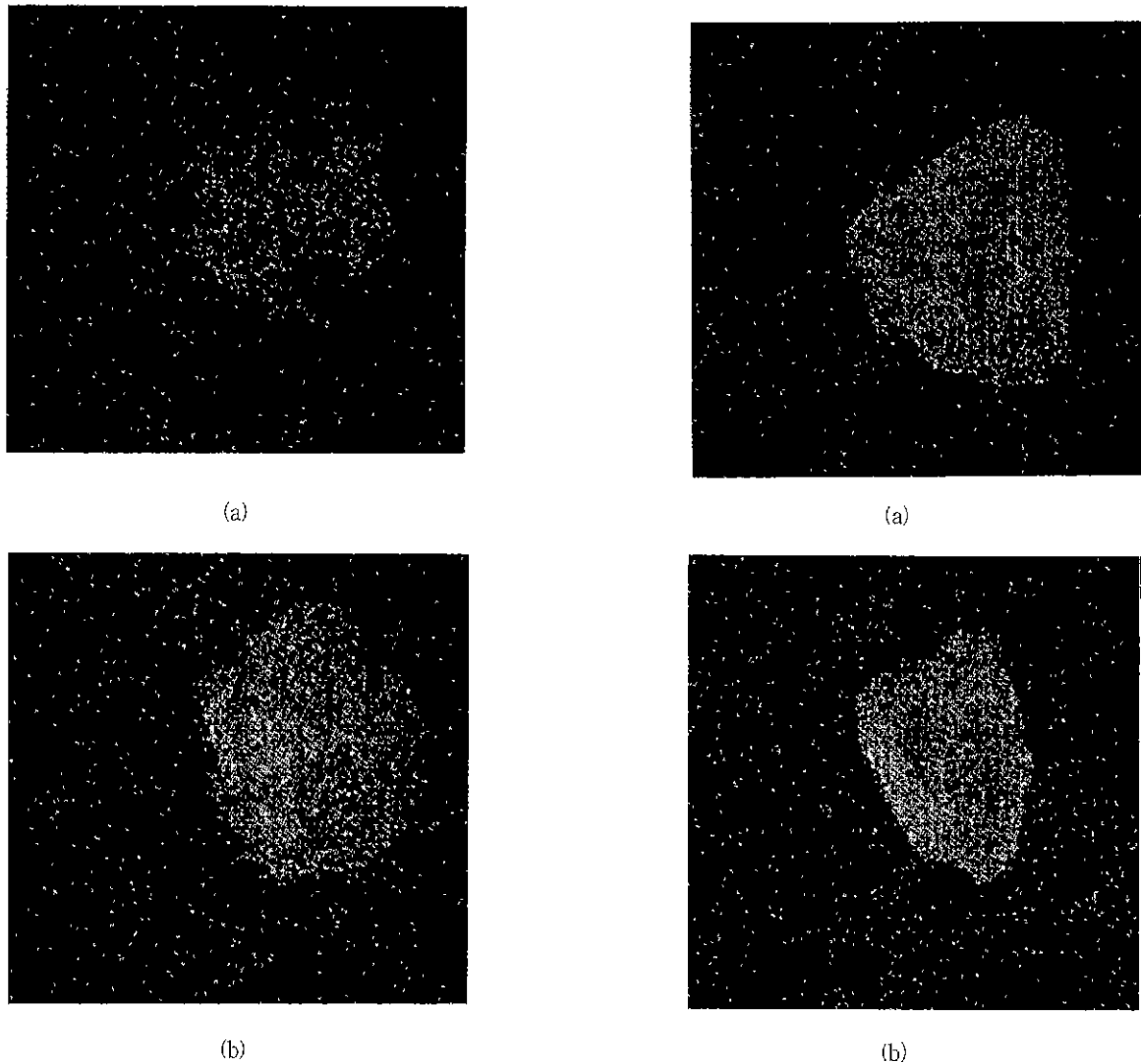


Figure 6. Confocal microscopic images of Fura-2/AM loaded cells. (A) control, (B) treatment with 10 μ M ryanodine.

Ca^{2+} 농도가 더욱 증가하는 것으로 나타났다. 각각의 경우를 좀 더 자세히 보면 7 μ M A23187과 10 μ M ryanodine을 혼합하여 세포에 첨가한 경우에는 세포 내부에서 전체적으로 높은 Ca^{2+} 농도를 보이지만 일부에 더욱 Ca^{2+} 이 몰려 있는 것을 볼 수 있다. 반면에 7 μ M A23187과 0.5 μ M thapsigargin을 혼합하여 첨가한 경우에는 세포 중심부분의 Ca^{2+} 농도가 주변보다 오히려 낮음을 관찰할 수 있는데 이 부분이 핵과 소포체 부분으로 생각된다. 따라서 이 경우 thapsigargin이 소포체내로의 Ca^{2+} 이송을 막으므로 calcium ionophore의 작용으로 유입된 calcium이 소포체에 저장되지 못하고 cytosol에 고르게 퍼져있는 것으로 보인다 이러한 현상은 7 μ M A23187과 10 μ M ryanodine, 0.5 μ M thapsigargin을 혼합하여 첨가한 경우에 더욱 두드러져 세포 중심부분의 Ca^{2+} 농도가 주위보다 뚜렷이 낮아지는 것을 알 수 있다.

세포내 calcium 농도 조절에 의한 MAb 생산성 향상 이상의 결과에서 세포내의 calcium 농도 변화에 따른 세포 성

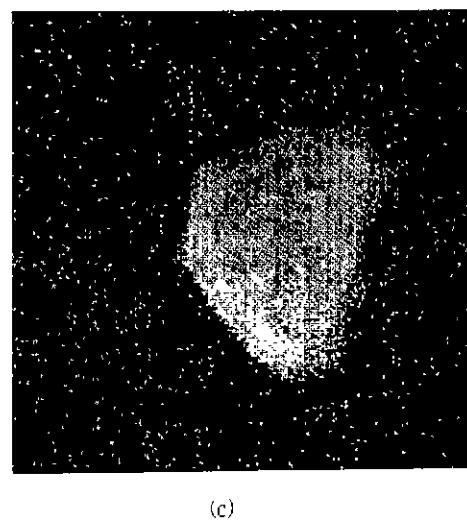


Figure 7. Confocal microscopic images of Fura-2/AM loaded cells. Treatments with (A) 7 μ M A23187-10 μ M ryanodine, (B) 7 μ M A23187+0.5 μ M thapsigargin, (C) 7 μ M A23187+10 μ M ryanodine+0.5 μ M thapsigargin.

장과 MAb 생성에 미치는 영향을 알아 보았다 이를 바탕으로 calcium 농도 조절에 의한 단위세포당 MAb 생성속도를 비교하기 위하여 시간에 따른 MAb 농도 변화를 측정하였다. Figure 8(A)에서 보는 바와 같이 배지중에 축적되는 MAb 농도는 35 μM 의 A23187을 첨가해 주었을 경우만 control보다 조금 높고 나머지의 경우는 control보다 낮게 나타났다. 반면에 ryanodine의 경우는 ryanodine의 농도가 증가할수록 생성되는 MAb 생성속도가 증가하였으며 10 μM 의 ryanodine에서 생성되는 MAb의 농도가 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 가장 높게 나타났다(Figure 8(B)) 이는 ryanodine에 의해 세포밖 Ca^{2+} 또는 cytosol의 Ca^{2+} 이 소포체내로 많이 이동되어 MAb 합성 및 분비속도를 촉진시킨 것으로 생각된다.

한편 Figure 9(A)에서 보는 바와 같이 thapsigargin을 농도별로 첨가한 경우에는 모두 control보다 생산되는 MAb 농도가 현저히 낮았는데 이는 thapsigargin이 세포내의 cytosol과 소포체내의 Ca^{2+} 의 유출입을 막기 때문에 MAb 생산도 저해시킨 것으로 생각된다. 그러나 시간이 경과함에 따라 thapsigargin 농도의 증가에도 불구하고 생산되는 MAb 농도가 증가함을 볼 수 있는데 이는 thapsigargin이 세포의 성장은 크게 저해하지 않기 때문에

(Figure 3(A)) 세포의 성장으로 인한 첨가물질의 희석효과 때문으로 생각된다. 첨가물질들을 혼합하여 사용하였을 경우에는 (Figure 9(B)) 3.5 μM 의 A23187과 1 μM 의 thapsigargin을 첨가하였을 경우 생산되는 MAb의 농도가 비교적 높게 나타났으나 control보다는 모두 MAb 생성이 저해되는 것으로 나타났다.

A23187, ryanodine, thapsigargin를 이용하여 세포내 calcium 농도를 변화시킬 경우에 단위세포당 MAb 생산성을 비교하기 위하여 시약 처리전과 후에 대한 specific MAb production rate 변화를 Figure 10에 나타내었다. 최대 MAb 비생산속도는 10 μM ryanodine로 처리 후 하루만에 처리전에 비해 약 4.13배 증가하고 control보다는 83.3% 증가하여 0.33 $\mu\text{g}/10^8 \text{ cells}/\text{hr}$ 로 가장 높은 값을 가졌으며 7 μM A23187로 처리하였을 때도 control보다 높게 나타나는 것을 볼 수 있다. 그러나 0.5 μM 의 thapsigargin을 사용했을 경우는 control보다도 그 값이 작게 나타나고 처리전보다도 낮아져 thapsigargin이 MAb 생성에 저해제로 작용하고 있음을 알 수 있었다. 또한 7 μM A23187(A)을 10 μM ryanodine(R)과 0.5 μM thapsigargin(T)으로 각각 혼합하였을 경

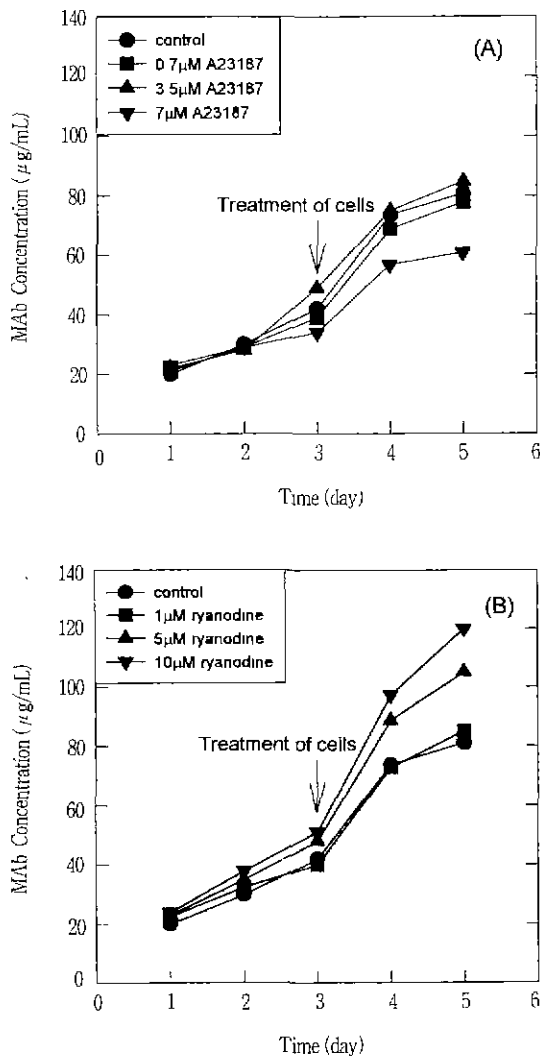


Figure 8 Effects of using A23187(A) and ryanodine(B) on the MAb production of 5F12AD3.

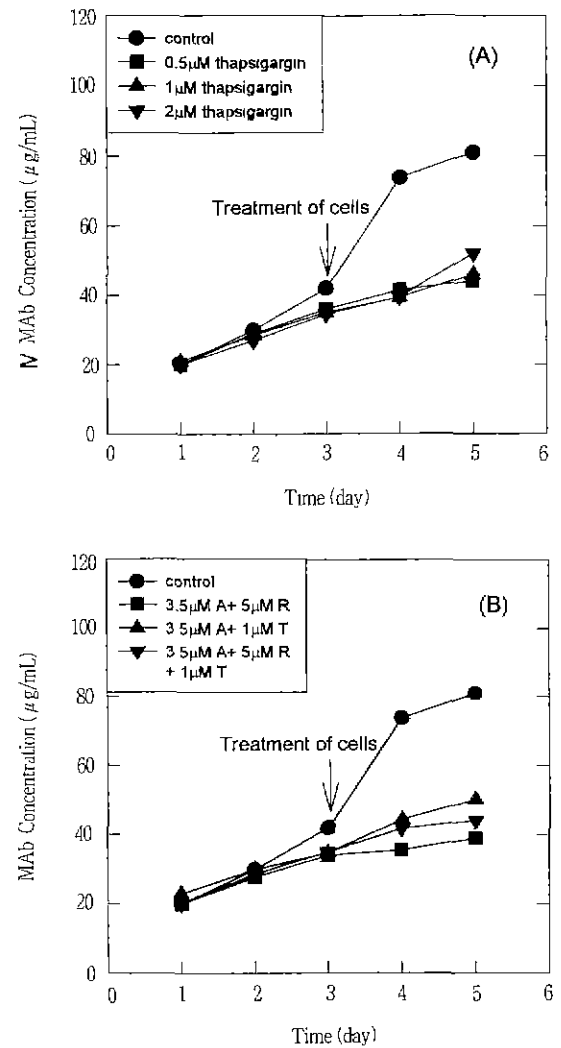


Figure 9 Effects of using thapsigargin(A), A23187+ryanodine, A23187+thapsigargin, and A23187+ryanodine+thapsigargin(B) on the MAb production of 5F12AD3.

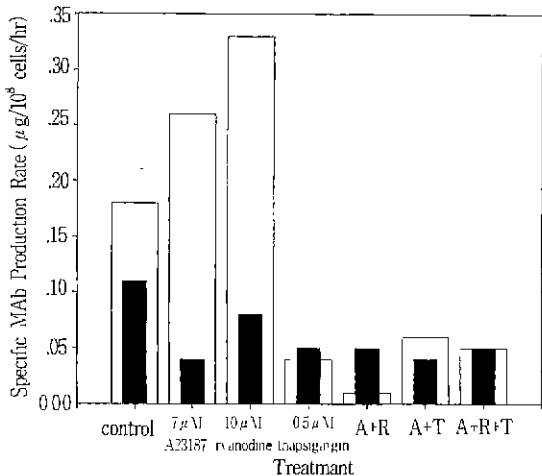


Figure 10. Enhancement of specific MAb production rate by intracellular Ca²⁺ manipulation; (■) just before treatment, (□) 1 day after treatment.

우에도 모두 control보다 낮아 MAb 생성을 저해하는 것으로 나타났다. 그리고 처리전과 후를 비교하면 7µM A23187과 0.5µM thapsigargin을 혼합하여 처리한 경우만 처리전보다 1.5배 증가함을 보이고 나머지의 경우에는 처리전과 비슷하거나 감소하였다

이상의 결과에서 A23187, ryanodine, thapsigargin을 세포내에 첨가하였을 때 세포내 Ca²⁺ 농도의 변화와 세포 성장, 그리고 MAb 생산성을 보았으며 각 물질들을 첨가하였을 때마다 세포내로 이동되는 Ca²⁺ 농도가 변함을 관찰할 수 있었고 세포내 Ca²⁺ 농도가 변함에 따라 MAb 생성농도도 달라져 세포내 Ca²⁺ 농도 변화가 MAb 생성에 영향을 미침을 확인할 수 있었다. 세포의 성장은 첨가물질들의 첨가시 대체로 control보다 낮았지만 적정 농도범위에서 세포의 성장은 지속되었으며 세포내 Ca²⁺ 농도와 생산되는 MAb 농도를 비교해보면 소포체와 cytosol의 Ca²⁺ 농도를 높일수록 좋은 것은 아니고 세포내 Ca²⁺ 농도가 MAb의 생산에 최적조건으로 유지되고 cytosol보다는 소포체내의 Ca²⁺ 농도를 높이는 것이 세포당 생산성을 높일 수 있음을 알 수 있었다. 향후 계속적인 실험을 통해 세포내 MAb 생산의 최적 조건을 보다 정확히 규명하기 위해서는 cytosol과 소포체내의 Ca²⁺ 농도를 구분하여 정량적으로 측정할 필요가 있으며 동물세포배양을 이용한 기타 의약품 생산에도 이러한 방법으로 세포내의 Ca²⁺ 농도를 임의로 조절함으로써 세포당 생산성을 극대화할 수 있을 것으로 생각된다

요 약

세포밖 배지의 Ca²⁺를 조절하기 위해 종류가 다른 3가지의 배지를 사용하였으며 이때 IMDM 배지에서 세포의 성장이 가장 좋게 나타났다.

세포내 Ca²⁺ 농도를 confocal microscope로 측정해 본 결과 A23187, ryanodine과 thapsigargin 등을 이용하여 세포내의 Ca²⁺ 농도를 증가시킬 수 있었다 그러나 소포체와 cytosol에 Ca²⁺ 농도만 높다고 생산되는 MAb의 농도가 증가되는 것은 아니었으며

세포내 Ca²⁺ 농도가 MAb의 생산에 최적조건으로 유지되어 cytosol과 소포체내의 Ca²⁺이 균형이 맞을 때 생산되는 MAb 농도도 최대가 된다는 것을 알 수 있었다. 세포내 Ca²⁺을 조절하기 위해 A23187, ryanodine, thapsigargin을 농도별로 첨가하여 이때의 세포의 성장과 생산되는 MAb 농도를 측정 한 결과 5µM의 ryanodine 농도를 세포에 첨가해 주었을 경우에 세포 농도가 2.7 × 10⁶ cells/mL로 control에 비해 약 40.6% 증가하였으며 MAb 농도도 10µM의 ryanodine을 첨가해 주었을 때 120 µg/mL로 약 48.1% 증가하였고 specific MAb production rate도 0.33 µg/10⁸ cells/hr로 control에 비해 약 83.3%, 시약 처리 전에 비해 약 4.13배 증가하였다.

감 사

본 연구는 한국과학재단 핵심전문 연구비(951-1104-002-2) 및 계명대학교 대학원 학생학술연구 장학금 지원으로 수행되었으며 지원에 감사 드립니다. 그리고 confocal microscope 실험에 도움을 준 계명대 의과대학의 이인환 교수님께 감사 드립니다.

참 고 문 헌

1. Getting, M. and J Sambrook (1992), Protein folding in the cell, *Nature*, 355, 33-45
2. Hurtley, S. M. and A Helenius (1989), Protein oligomerization in the ER, *Ann. Res. Cell Biol.*, 5, 277-307.
3. Galina, K., A. B. Margaret and O. B. Chares (1993), Role of endoplasmic reticular calcium in oligosaccharide processing of α1-Antitrypsin, *J. Biol. Chem.*, 268(3), 2001-2008.
4. Sambrook, J. F. (1990), The involvement of calcium in transport of secretory protein from the ER, *Cell*, 61, 197-199.
5. Lodish, H. F., N. Kong and L. Wilkstorm (1992), Calcium is required for folding of newly made subunits of the asialoglycoprotein receptor within the ER, *J. Biol. Chem.*, 267, 12753-12760.
6. Lodish, H. F. and N. Kong (1990), Perturbation of cellular calcium blocks exit of secretory proteins from the rough ER, *J. Biol. Chem.*, 265, 10893-10899.
7. Rao, K. R. and K. Brew (1989), Calcium regulates folding and disulfide-bond formation in α-lactalbumin, *Biochem. Biophys. Res Comm.*, 163, 931-936.
8. Berridge, M. J. (1987), Inositol triphosphate and diacylglycerol. two interacting second messengers, *Annu. Rev. Biochem.*, 56, 159-193.
9. Berridge, M. J. and R. F. Irvine (1989), Inositol phosphate and cell signalling, *Nature*, 341, 197-205.
10. Albert, P. R. and A. H. Jr. Tashjian. (1984), Relationship of thyrotropin-releasing hormone-induced spike and plateau phases in cytosolic free Ca²⁺ concentrations to hormone secretion. Selective blockage using ionomycin and nifedipine, *J. Biol. Chem.*, 259, 15350-15363.
11. Thastup, O. (1990), Role of Ca²⁺-ATPases in regulation of

- cellular Ca^{2+} signalling, as studied with the selective microsomal Ca^{2+} -ATPase inhibitor, thapsigargin, *Agents Actions*, **29**, 8-15.
- 12 Pfeiffer, S. R. and J. E. Rothman (1987), Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic and golgi, *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 829-852
13. Park, S. H. and D. D. Y. Ryu (1996), Monoclonal antibody refolding and assembly protein disulfide isomerase reaction kinetics. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **1**, 13-17.
- 14 Shi, Y., D. D. Y. Ryu and S. H. Park (1992), Performance of mammalian cell culture bioreactor with a new impeller design, *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 260-270.