

식물세포배양에서 당과 식물세포의 농도가 hGM-CSF의 생산에 미치는 영향

¹이재화·¹김난선·²권태호·¹박승문·장용석·†양문식
전북대학교 자연과학대학 생물과학부, ¹전북대학교 기초과학연구소, ²전북대학교 유전공학연구소
(접수 : 2001. 7. 16., 게재승인 : 2001. 8. 17.)

The Effects of Sucrose and Inoculum Size on the Production of hGM-CSF from Plant Cell Culture

Jae-Hwa Lee¹, Nan-Sun Kim¹, Tae-Ho Kwon², Seung-Moon Park¹, Youg-Suk Chang, and Moon-Sik Yang[†]
Division of Biological Sciences, Chonbuk National University, ¹Basic Science Research Institute, Chonbuk National University, ²Institute for Molecular Biology and Genetics, Chonbuk National University
(Received : 2001. 7. 16., Accepted : 2001. 8. 17.)

The human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) was produced from cell suspension culture of transgenic tobacco which was transformed by using *Agrobacterium* harboring the hGM-CSF gene. To improve the production of hGM-CSF in batch culture system, the effects of initial sucrose concentration and inoculum size were investigated. The results show that the hGM-CSF production was not affected by small inoculum size in medium containing either low or high concentration of sucrose. However, the production of hGM-CSF was increased under increasing of the inoculum sizes and sucrose concentration. Under the combination of inoculum and sucrose concentration, the maximum hGM-CSF production of 720 $\mu\text{g/L}$ was obtained at 90 g/L of initial sucrose concentration and 110 g/L of inoculum size.

Key Words : transgenic plant, plant cell culture, hGM-CSF, sucrose, inoculum size

서론

일반적으로 유용한 외래 단백질의 생산은 미생물의 배양을 통하여 생산하여 왔으며 생산된 단백질의 활성에 전사 후 수식과정 (post-translational modification)이 크게 영향을 미칠 경우에는 동물세포배양을 이용하여 외래 단백질을 생산하고 있다. 그러나 동물세포의 배양의 복잡성, 높은 비용 및 2차 감염의 문제가 대두되면서 새로운 이종 단백질의 생산체제로서 식물세포배양에 주목하고 있다. 식물세포배양은 ① 생산에 사용되는 비용이 아주 낮아 경제적이며, ② 유용물질의 대량생산을 위한 scale-up이 상대적으로 쉽고, ③ commercial scale production에 걸리는 시간이 길지 않고, ④ 식물에서의 전사 후 수식과정이 동물세포와 유사한 점, ⑤ 2차 감염의 염려가 없다는 점에서 전사 후 수식과정이 필요한 유용 외래 단백질의 생산을 위한 새로운 방법으로서 주목받고 있다 (1,2).

식물세포배양을 이용한 유용 외래 단백질의 생산은 대표적으로 β -glucuronidase (3), 항체 (4), interleukin (5), ricin (6), α_1 -antitrypsin (7), mGM-CSF (8) 등이 보고되고 있으나, 식물세포배양을 이용한 경우에는 공통적으로 생산수율이 낮은 점이 문제점으로 지적되고 있다. 이러한 낮은 생산수율은 일반적으로 식물세포 밖으로 배출된 단백질이 단백질분해효소에 의하여 분해되며, pH, 염분농도 등과 같은 배지의 물리적인 요인에 의하여 활성이 떨어지는 것으로 알려져 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 현탁배양 특이적인 강력 promoter의 사용 (7)과 생산된 단백질의 분해를 억제하고 단백질의 안정성을 증가시키기 위하여 단백질 안정제의 효과에 대하여 활발한 연구가 진행되고 있다 (4,9). 최근의 연구결과에 의하면 *Nicotiana glauca*의 현탁배양시 세포생장의 대수기 이후에 식물세포의 생육이 증가함에 따라서 액체배지 내로 분비된 단백질분해효소의 양도 증가하며(10) 이러한 단백질분해효소의 증가는 액체배지 내에 존재하는 sucrose의 농도의 감소에 의하여 증가한다고 보고되었다(11).

본 연구는 인간의 주요 cytokine의 하나인 hGM-CSF 유전자 도입된 형질전환한 담배의 callus를 현탁배양하여 hGM-CSF를 생산할 때 생산수율을 높이고자 배양 초기의 세포접종농도와 sucrose의 농도가 hGM-CSF의 생산에 미치는 영향을 확인하고자 실시하였다.

†Corresponding Author : Division of Biological Sciences, College of Basic Sciences, Chonbuk National University, Dukjindong 664-14, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea
Tel : +82-63-270-3339, Fax : +82-63-270-4334
E-mail : mskyang@moak.chonbuk.ac.kr

재료 및 방법

형질전환체로부터 현탁세포의 유도 및 배양

hGM-CSF 유전자가 포함된 pMYO64를 보유한 *A. tumefaciens* LBA4404를 이용하여 담배에 형질전환 하였으며 (12), 카나마이신을 포함하는 MS 고체배지(13)에서 형질전환체를 선발하였다. hGM-CSF 유전자가 도입된 형질전환 담배의 잎을 절단하고 2,4-D 1 mg/L, kinetin 0.02 mg/L, 8 g/L agar를 포함하는 MS 고체배지에 치상하여 callus를 유도하였다. 현탁세포를 유도하기 위해 고체배지에서 형성된 callus를 50 mL의 동일조성의 MS 액체배지에 치상하여 25℃, 100 rpm의 조건으로 현탁배양 하였다. 각각의 배지에는 kanamycin 100 mg/L, sucrose 3%를 첨가하였으며 pH는 5.8로 조정하여 사용하였다. 현탁세포는 7일 간격으로 1/5의 비율로 계대배양 하면서 유지하였으며, 이를 재료로 하여 배양 초기의 세포집중농도와 sucrose의 농도가 hGM-CSF의 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

세포 집중농도 및 당의 농도가 hGM-CSF의 생산에 미치는 영향

세포의 집중농도와 당의 농도가 hGM-CSF의 생산에 미치는 영향을 알아보기로 sucrose 3%를 포함하는 MS 액체배지에 초기세포의 집중농도를 생중량 기준으로 20 g/L, 50 g/L, 80 g/L, 110 g/L (건중량 기준으로 0.88, 2.2 3.52, 4.84 g/L)의 농도가 되도록 하여 배양하였으며, 당의 농도가 hGM-CSF의 생산에 미치는 영향을 알아보기로 당의 농도를 3%, 6%, 9%의 농도로 첨가한 MS 액체배지에 초기집중농도를 50 g/L로 하여 배양하였다. 처리별에 따른 세포의 생장은 세포의 생체중량(fresh cell weight, FCW) 및 세포 건조중량(dry cell weight, DCW)을 측정하여 확인하였으며, 세포 생체중량은 Büchner funnel을 이용하여 배양액을 Whatman No.1 여과지로 거른 후 증류수로 수회 세척한 뒤 다시 여과하여 얻은 세포의 중량으로 하였고, 생체중량을 확인한 세포를 60℃의 건조기에 넣어 시간에 따른 무게변화가 없을 때까지 건조시켜 측정된 중량을 건조중량으로 하였다.

hGM-CSF의 정량

배양액 5 mL을 4℃, 14,000 rpm의 조건으로 5분간 원심분리하여 상등액을 분리한 후에 투석과정을 통하여 염분을 제거하였다. 생산된 hGM-CSF의 정량은 투석을 통하여 정제된 배양액을 Pharmingen Inc.(San Diego, CA, U.S.A)의 ELISA 분석 kit를 사용하여 정량 하였으며 분석 방법은 ELISA kit 제작회사의 표준방법을 사용하였다. hGM-CSF의 정량에 표준물질로 사용한 hGM-CSF는 대장균에서 생산된 hGM-CSF (Pharmingen Inc., San Diego, CA, U.S.A)를 사용하였다.

결과 및 고찰

식물세포의 성장과 hGM-CSF의 생산

사람의 GM-CSF의 유전자가 도입된 형질전환 된 식물의 잎으로부터 callus를 유도하였고, 이 callus를 50 mL의 MS 액체배지에 접종하여 6주간 배양하여 크기가 균일하게 된 현

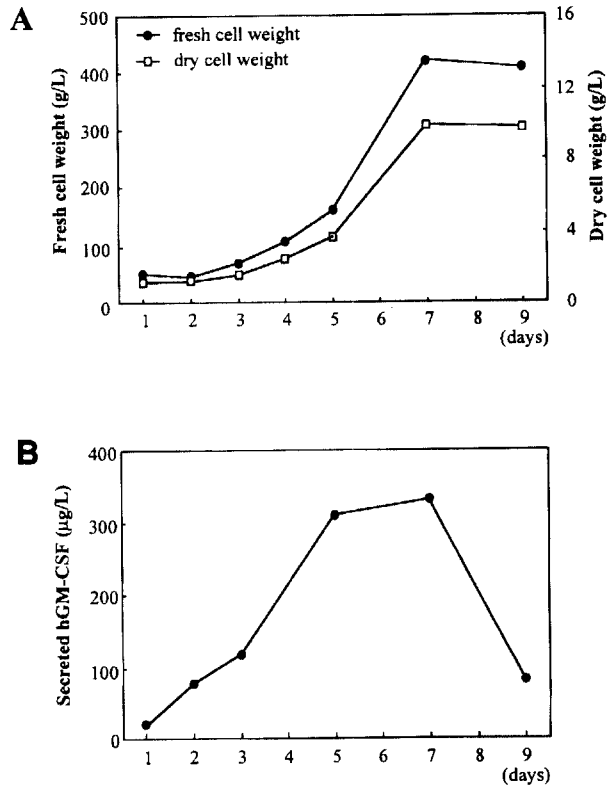


Figure 1. Growth kinetics of cell suspension culture(A) and production of hGM-CSF(B) in MS medium containing 30 g/L of sucrose and 50 g/L of inoculum size.

탁세포를 획득하였다. 이 현탁세포를 생체중량이 약 50 g/L가 되도록 하여 50 mL의 MS액체배지에서 12일 동안 배양하면서 형질전환된 식물세포의 성장과 hGM-CSF의 생산을 확인하였으며 그의 결과는 Figure 1과 같다. 현탁세포 접종 후 배양 2일까지는 lag phase로써 세포의 성장이 거의 일어나지 않았으나 접종 후 3일 이후부터 식물세포의 성장이 빠르게 진행되어 정체기로 판단되는 10일 후에는 초기 식물세포 집중량 (생체중량 50 g/L, 건조중량 2.2 g/L)과 비교하여 생체중량과 건조중량 모두 약 7배의 세포생육이 일어났음을 확인하였다.

형질전환된 식물세포를 현탁배양 하였을 경우 배양 7일 후에 액체배지내로 생산된 hGM-CSF는 약 317 µg/L 생산되었으나 7일 이후부터는 급격하게 감소하기 시작하여 9일 이후부터는 약 88 µg/L의 수준으로 유지되었다. 최근의 연구결과에 의하면 *Nicotiana glauca*의 현탁배양시 세포생장의 대수기 이후에 식물세포의 생육이 증가함에 따라서 액체배지 내로 분비된 단백질분해효소의 양도 증가하며(10) 이러한 단백질분해효소의 증가는 액체배지 내에 존재하는 sucrose의 농도의 감소에 의하여 증가한다고 보고되었다(11). 본 연구결과도 배양 7일 이후부터 hGM-CSF의 양이 급격하게 감소한 것은 식물세포 생육의 증가에 따른 sucrose의 감소에 의하여 단백질분해효소의 분비가 촉진되었고 이로 인하여 배지내로 분비된 hGM-CSF의 분해에 의한 것으로 판단된다.

세포집중 농도가 hGM-CSF의 생산에 미치는 영향

식물세포배양을 통하여 2차 대사산물 등과 같은 유용물질

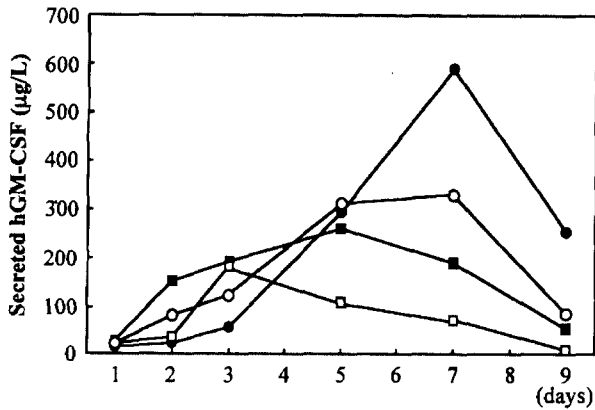


Figure 2. Effect of inoculum size on hGM-CSF production during batch suspension culture with initial sucrose concentration of 30 g/L. Transgenic suspension cells were cultured under various inoculum sizes (●: 20 g/L, ○: 50 g/L, ■: 80 g/L, □: 110 g/L).

을 생산할 때에 초기 식물세포의 농도가 생산에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으나(14), 식물세포배양을 이용하여 외래 단백질을 생산할 때에 초기 식물세포 접종농도가 외래 단백질의 생산에 미치는 영향에 대한 연구보고는 매우 미비한 편이다. 본 연구에서는 hGM-CSF의 유전자가 도입된 식물의 현탁세포를 배양할 때에 초기의 식물세포 접종농도가 hGM-CSF의 생산에 미치는 영향을 알아보려고 실시하였으며 그의 결과는 Figure 2와 같다. 초기세포의 접종농도가 80 g/L, 110 g/L에서는 초기접종농도 20 g/L, 50 g/L와 비교 할 때에 배양 후 3일까지는 높은 생산량을 보였으나 110 g/L의 접종농도에서는 배양 5일 후부터 생산량이 급격하게 감소하였다. 그러나, 20 g/L와 50 g/L로 접종하였을 경우에는 배양 5일 후부터 생산량이 급격하게 증가하여 배양 7일 후 20 g/L 접종농도에서 약 580 µg/L의 hGM-CSF가 생산되었다. 그러나 배양 7일 이후에는 모든 처리구에서 hGM-CSF의 생산량이 급격하게 감소하였다. 본 연구결과에서 배양 3일까지는 세포접종농도에 비례하여 hGM-CSF의 생산량이 높은 경향을 보였으나 배양 7일 후에는 세포접종농도와 hGM-CSF의 생산량이 반비례하는 경향을 나타내었다. 이러한 연구결과는 접종세포농도가 많을수록 당의 소비가 빠르고 이에 따른 기아 현상에 의한 것으로 판단되며, 식물의 세포배양을 통하여 외래단백질을 생산할 때에는 적절한 세포 농도가 매우 중요함을 의미한다.

당의 농도가 hGM-CSF의 생산에 미치는 영향

전술한 연구결과인 Figure 2를 통하여 식물세포배양을 이용한 외래단백질의 생산에는 각각의 식물세포 농도에 적합한 배지내의 당의 농도가 필요함을 확인하였다. 본 실험에서는 일정한 식물세포농도에 대하여 배지내의 당의 농도변화가 식물세포의 성장과 hGM-CSF의 생산에 미치는 영향을 확인하고자 실시하였다. 먼저 당의 농도변화가 식물세포의 성장에 미치는 영향으로는 당의 농도가 높아질수록 세포크기(세포 크기 지수)가 뚜렷하게 낮아지는 경향을 나타내었으며 (Figure 3), 이러한 결과는 배지내의 당의 농도가 높아짐에 따른 삼투압의 증가와 삼투압 증가에 따른 생체중량의 감소

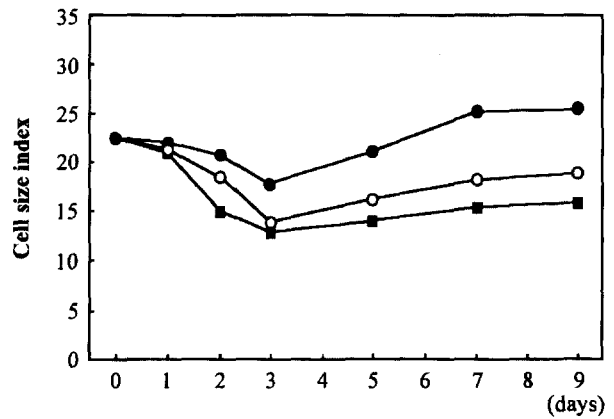


Figure 3. Change of cell size index at various concentrations of sucrose in MS medium. Cell size index was calculated by dividing wet cell weight by dry cell weight. (●: 30 g/L, ○: 60 g/L, ■: 90 g/L).

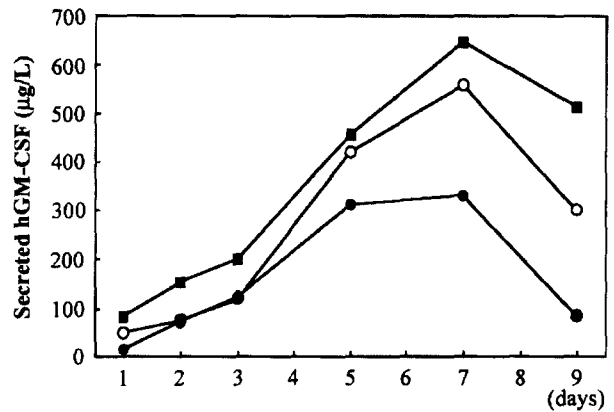


Figure 4. Effect of initial sucrose concentration on production of hGM-CSF with initial fresh cell concentration of 50 g/L. Transgenic suspension cells were cultured under various sucrose concentrations (●: 30 g/L, ○: 60 g/L, ■: 90 g/L).

에 의한 것으로 판단되며 삼투압의 증가에 따른 세포크기 지수의 감소는 고농도의 식물세포배양을 가능하게 하여 생산성의 향상에 기여할 수 있다고 판단된다(15). 한편, 당의 농도 변화가 hGM-CSF의 생산에 미치는 영향으로서는 배양 3일부터 모든 농도의 처리구에서 hGM-CSF의 생산량이 증가하기 시작하여 배양 7일 후에 60 g/L와 90 g/L 처리구에서 각각 약 560 µg/L와 650 µg/L의 hGM-CSF가 생산되어 30 g/L 처리구에서의 320 µg/L의 생산량과 비교하여 hGM-CSF의 생산량이 약 1.7-2.0배 증가하였다(Figure 4). 본 연구결과를 통하여 당의 농도가 낮을수록 배지내의 당의 고갈이 빨라지고 이에 따른 식물세포의 정상적인 생장이 억제되고 함께 정상적인 외래단백질의 생산이 둔화되는 것으로 추정된다. 또한, 배지내의 고농도의 당의 첨가에 의한 단백질의 안정화 효과(16)와 함께 배지내의 삼투압의 증가로 인한 hGM-CSF의 분비가 촉진되는 것으로 판단된다 (7).

당과 세포접종농도 조합이 hGM-CSF의 생산에 미치는 영향

hGM-CSF와 같은 외래유전자가 도입된 식물의 현탁세포배양을 통하여 유용한 외래단백질을 생산할 때에 배양초기의

Table 1. Production of hGM-CSF in MS medium containing different initial sucrose concentration and inoculum size.

Inoculum size (g/L)	Initial sucrose concentration (g/L)	hGM-CSF ($\mu\text{g/L}$)					
		1	2	3	5	7	9(day)
20	30	7.40	20.97	47.51	305.74	584.57	251.45
	60	9.93	10.30	59.41	276.98	552.91	451.52
	90	15.52	63.93	76.67	299.78	580.64	517.82
50	30	10.78	74.49	123.07	312.64	317.76	88.12
	60	49.40	75.44	120.66	421.13	559.90	304.14
	90	82.66	156.84	196.63	460.28	649.49	513.97
80	30	27.13	146.10	197.69	270.81	196.8	59.44
	60	65.16	94.65	162.65	398.47	540.83	211.86
	90	59.63	45.15	187.44	452.87	638.36	409.75
110	30	18.54	32.30	187.92	111.11	83.33	6.10
	60	30.66	87.21	166.07	360.49	469.07	147.66
	90	81.50	113.89	251.40	476.98	720.38	349.63

세포접종농도와 당의 농도가 생산량에 밀접한 영향을 미치는 것을 확인하였다. 본 실험에서는 hGM-CSF의 생산에 최적인 초기세포와 당의 최적 조합을 확인하기 위하여 실시하였으며 그 결과는 Table 1과 같다. 당의 농도가 30 g/L의 경우 초기세포접종농도가 20 g/L의 처리에서는 hGM-CSF의 생산량이 약 580 $\mu\text{g/L}$ 이었으나 초기세포접종농도가 증가함에 따라서 최대 hGM-CSF의 생산량도 감소하였고, 초기세포접종농도가 110 g/L의 처리구에서는 약 83 $\mu\text{g/L}$ 의 최대 생산량을 보여 초기세포접종농도가 20 g/L의 처리구보다 1/7의 생산량 감소를 나타내었다. 그러나 당의 농도가 90 g/L의 처리에서는 초기세포접종농도가 증가함에 따라서 hGM-CSF의 생산량도 증가하여 초기세포접종농도가 110 g/L의 처리구에서는 약 720 $\mu\text{g/L}$ 의 최대 생산량을 확인하였다. 한편, 대부분의 처리구에서 배양 7일 이후부터 hGM-CSF의 생산량의 감소를 나타내어 당의 농도가 30 g/L인 경우에는 모든 초기세포접종농도에서 배양 7일 이후에 급격하게 hGM-CSF의 생산량이 감소하였으나, 당의 농도가 증가함에 따라서 모든 초기세포접종농도에서 배양 7일 이후의 hGM-CSF의 감소량이 현저하게 둔화됨을 확인하였다. 본 연구의 결과 낮은 당의 농도에서는 세포의 초기 접종농도가 증가할수록 hGM-CSF의 생산량이 감소함을 확인하였으며 이는 초기세포접종농도가 높아짐에 따라 당의 소비가 빨라지며, 세포의 농도가 높아짐에 따른 접도의 증가로 인하여 물질의 분비가 감소한 것으로 판단된다. 또한 당의 농도가 높을수록 hGM-CSF의 생산량이 높은 것은 고농도의 당이 hGM-CSF의 안정성에 직접 영향을 미치는 것으로 판단이 되며, 이는 고농도의 당이 단백질의 안정성에 영향을 미친다고 하는 Butler와 Falke (16)의 연구결과와 유사하였다.

본 연구결과는 식물세포배양을 통하여 외래단백질을 생산하고자 할 때에는 고농도의 초기세포접종농도와 고농도의 당의 농도보다는 적절한 세포와 당의 조합이 외래단백질의 생산에 더욱 적합하다고 판단되며, 식물세포배양을 통하여 hGM-CSF를 생산하기 위한 최적 배양조건은 비록 90 g/L의 당과 110 g/L의 초기세포접종농도 조건에서 약 720 $\mu\text{g/L}$ 의 최대 생산량을 나타내었으나, 배양에 투입되는 비용과 생산량의 관계를 비교하였을 경우에 약 580 $\mu\text{g/L}$ 의 hGM-CSF

의 생산량을 보인 20 g/L의 초기세포접종농도와 30 g/L의 당의 조합이 가장 경제적인 조합으로 판단되었다.

요 약

본 연구에서는 hGM-CSF 유전자가 도입된 형질전환 담배의 callus를 현탁배양하여 hGM-CSF를 생산할 때 배양 초기의 세포접종농도와 sucrose의 농도가 hGM-CSF의 생산에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 20, 50, 80, 110 g/L의 초기세포접종농도와 30, 60, 90 g/L의 당의 농도를 서로 조합하여 배양한 결과 모든 처리구에서의 hGM-CSF 생산량은 배양 7일 이후부터 급격하게 감소하였으며, 모든 세포접종농도에서 당의 농도가 높아질수록 hGM-CSF의 생산이 촉진되는 결과를 얻었다. 또한, 서로 다른 당과 세포접종농도의 조합에 따라서 hGM-CSF의 생산량은 현저한 차이를 보여 식물세포 배양을 이용한 외래단백질의 생산에는 당의 농도와 배양초기의 세포접종농도에 크게 영향 받음을 확인하였으며, 최대의 hGM-CSF 생산을 보인 조건은 90 g/L의 당과 110 g/L의 초기세포접종농도로서 약 720 $\mu\text{g/L}$ 의 hGM-CSF를 생산하였다.

감 사

본 연구는 보건복지부(HMP-97-B-2-0014)의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Miele, L. (1997), Plants as bioreactors for biopharmaceuticals: regulatory considerations. *Trends Biotechnol.* **15**, 45-50.
2. Doran, P. M. (2000), Foreign protein production in plant tissue cultures, *Current Opinion in Biotechnol.* **11**, 199-204.
3. Kurata, H., T. Takemura, S. Furusaki, and C. I. Kado (1998), Light-controlled expression of a foreign gene using the chalcone synthase promoter in tobacco BY-2 cells, *J. Ferment. Bioeng.* **86**, 317-323.
4. LaCount, W., G. An, and J. M. Lee (1997), The effect

- of polyvinylpyrrolidone (PVP) on the heavy chain monoclonal antibody production from plant suspension cultures, *Biotechnol. Lett.* **19**, 93-96.
5. Magnuson, N. S., P. M. Linzmaier, R. Reeves, G. An, K. HayGlasee, and J. M. Lee (1998), Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture, *Protein Expr. Purif.* **13**, 45-52.
 6. Sehnki, P. C. and R. J. Ferl (1999), Processing of preproricin in transgenic tobacco, *Protein Expr. Purif.* **15**, 188-195.
 7. Terashima, M., Y. Murai, M. Kawamura, S. Nakanishi, T. Stoltz, L. Chen, W. Drohan, R. L. Rodriguez, and S. Katoh (1999), Production of functional human α_1 -antitrypsin by plant cell culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 516-523.
 8. Lee, J. S., S. J. Choi, H. S. Kang, W. G. Oh, K. H. Choi, T. H. Kwon, D. H. Kim, and M. S. Yang (1997), Establishment of a transgenic tobacco cell suspension culture system for producing murine granulocyte-macrophage colony stimulation factor, *Mol. Cells.* **7**, 783-787.
 9. Wongsamuth, R. and P. M. Doran (1997), Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots, *Biotechnol. Bioeng.* **54**, 401-415.
 10. Bonner, C. A., C. Kenyon, and R. A., Jensen (1988), Physiological and biochemical characterization of a suspension culture system for sustained exponential growth of *Nicotiana silvestris*, *Physiol. Plant.* **74**, 1-10.
 11. Terashima, M., Y. Ejiri, N. Hashikawa, and H. Yoshida (1999), Effects of osmotic pressure on human α_1 -antitrypsin production by plant cell culture, *Biochem. Eng. J.* **4**, 31-36.
 12. An, G., B. D. Watson, and C. C. Chiang (1986), Transformation of tobacco, tomato, potato, and *Arabidopsis thaliana* using a binary Ti vector system, *Plant Physiol.* **81**, 301-305.
 13. Murashige, T. and F. Skoog (1962), A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures, *Plant Physiol.* **15**, 473-479.
 14. Akalezi, C. O., S. Liu, Q. S. Li, J. T. Yu, and J. J. Zhong (1999), Combined effect of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production by suspension culture of *Panax ginseng*, *Process Biochem.* **34**, 639-642.
 15. Kim, S. M., I. S. Park, S. Y. Lee, G. W. Lee, and D. I. Kim (1998), Changes of plant cell size index by culture conditions, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **13**(4), 438-443.
 16. Butler, S. L. and J. J. Falke (1996), Effects of protein stabilizing agents on thermal backbone motions: a disulfide trapping study, *Biochem.* **35**, 10595-10600.