

형질 전환된 담배 세포에서 hGM-CSF 생산 연구

변한열 · †변상요
아주대학교 화학생물공학부 생명공학전공
(접수 : 2003. 7. 31. 게재승인 : 2003. 12. 24.)

hGM-CSF Production from Transgenic *Nicotiana tabacum*

Han Yeul Byun and Sang Yo Byun†
School of Chemical Engineering and Biotechnology, Ajou University, Kyunggi 442-749, Korea
(Received : 2003. 7. 31. Accepted : 2003. 12. 24.)

Plant cell culture can be divide into two classes non-organic culture and organic culture. Non-organic culture such as suspension culture has many researches, however organic culture about recombinant protein production has little researches. Recombinant protein produced through organ culture is quite stable and it can make proteins by itself without any grow regulators. Therefore organ culture is much easier than other methods.

In this research, we used transformed tobacco seed. At first we germinated the seed then separated stems and leaves from the grown plant. And raised in liquid medium by in vitro vegetative reproduction. Continuing most suitable conditions, we compared the quantities of recombinant protein from intra cellular with from extra cellular. And adding some permeabilizing agents (Pluronic F-68, Triton X-100, DMSO, PEG8000), we increased the productivity of the recombinant protein.

Key Words : Recombinant protein, plant cell culture, permeabilizing agent, organ culture

서론

의료용 재조합 단백질을 생산하기 위한 방법으로 현재 가능한 것은 미생물, 동물, 식물세포를 이용하는 방법과 형질전환 동물과 식물을 이용하는 방법이 있다(1). 과거 20여년 동안에는 주로 미생물과 동물세포배양방법에 집중적으로 연구가 되었으나, 최근에는 식물체 또는 식물세포 배양시스템에 대한 집중적인 연구가 수행되고 있다(2). 식물세포배양은 생산을 위한 비용이 아주 낮아 경제적이며, 유용물질의 대량 생산을 위한 scale-up이 상대적으로 쉽고, commercial scale production에 걸리는 시간이 길지 않고, 식물에서의 전사 후 수식과정이 동물세포와 유사한 점, 2차 감염의 염려가 없다는 점에서 전사 후 수식과정이 필요한 유용 외래 단백질의 생산을 위한 새로운 방법으로서 주목받고 있다. 또한, 식물세포배양배지는 간단한 이온과 합성시약으로 배양이 가능하고 생산된 재조합 단백질의 분비가 가능하여 분리정제가 쉬운 장점이 있다(2, 3). 식물세포배양은 크게 비기관 배양과 기관

배양으로 분류되어진다. 비기관 배양은 suspension culture를 비롯하여 많은 연구가 이루어지고 있으나 기관 배양은 재조합 단백질 생산에 대한 연구에 대해 알려진 것이 거의 없다. 기관 배양은 생산된 재조합 단백질이 안정성이 크다는 점이 유리하며, 따로 생장 조절제를 처리 안해도 자체적으로 필요한 양의 생장이 가능하기 때문에 다른 것에 비해 배양이 보다 더 수월하다. 식물세포배양의 재료로 가장 많이 사용되는 담배를 이용한 유용 외래 단백질의 생산은 β -glucuronidase(4), 항체(5), interleukin(6), ricin(7), mGM-CSF(8), hGM-CSF(9), G-CSF(10) 등이 보고되고 있다. 그러나 식물세포배양을 이용한 경우에는 공통적으로 생산수율이 낮은 점이 문제점으로 지적되고 있으며 생산수율을 향상시키기 위한 다양한 연구가 진행되고 있다(9).

GM-CSF는 조혈모세포에 작용하여 백혈구의 생성을 촉진하는 당단백질로서(11) 사람, 쥐, 긴팔원숭이, 소 등 몇 종의 포유동물에서 단백질의 아미노산 서열이 밝혀져 있으며, 사람의 경우 25개의 leader peptide를 포함하여 127개의 아미노산으로 구성되어 있다(12-14). GM-CSF는 항암화학요법에 따른 호중구 감소증, 재생 불량성 빈혈, 골수이형성 증후군, 자가골수 이식, 후천성면역결핍증에 대한 임상보고가 있으며 특히 호중구 감소증과 골수 이식의 환자에 명확한 효과가 있음이 보고되었다(15-17).

본 연구는 형질전환된 담배 seed를 발아시킨 후 성숙한

† Corresponding Author : School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon, Kyunggi 442-749, Korea

Tel : +82-31-219-2451, Fax : +82-31-214-8918

E-mail : sybyun@madang.ajou.ac.kr

plant에서 담배 줄기와 잎을 분리한 후 액체배지에서 기내 영양변식을 통하여 배양하였다. 기관 배양을 하면서 담배 식물체가 보다 더 잘 성장할 수 있게 배양 조건을 최적화시키고, 기관 내부에 존재하는 재조합 단백질의 양과 기관 내에서 배양 배지로 분비되는 단백질의 양을 비교 분석하였다. 또한, 다양한 permeabilizing agents를 투여하여 배양 배지로 분비되는 단백질의 양을 증가시키고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에서는 전북대학교에서 hGM-CSF 유전자가 도입된 형질 전환된 담배 seed를 받아 실험에 사용하였다.

형질 전환된 seed에서 담배 식물체로의 유도 및 배양

형질 전환된 담배 seed를 sucrose 3%, agar 0.8%, kanamycin 100 ppm을 포함하는 MS 기본배지에 치상하여 담배 seed를 받아서 45일 후 성숙한 담배 식물체를 얻는다. 그 후 식물체에서 잎과 줄기 부분만을 cutting하여 White 액체 배지에 넣어 25°C, 80 rpm, sucrose 2%, pH는 5.2, dark condition의 조건으로 현탁배양하였다. 계대배양 시에는 줄기를 외마디법을 이용해서 cutting한 후 동일조성의 새 배지에 옮겨다. 이러한 현탁배양에서 담배 식물체의 growth pattern을 알아보기 위하여 세포의 생체 중량을 2일마다 측정하여 확인하였다. 또한, 최적의 배양조건을 찾기 위해 암조건과 명조건에서의 세포의 성장을 측정하였고, 배지에 들어가는 sucrose의 양을 10 g/L에서 30 g/L까지 각각 다르게 한 후 세포의 성장을 측정하였다.

기관 배양에서 hGM-CSF의 농도 변화를 측정하기 위하여 초기 접종농도가 약 20 g/L인 sample 6개를 준비하여 동일한 조건에서 배양하면서 2~3일마다 sampling을 하여 -80°C에 보관한 후 intracellular와 extracellular의 각각의 경우에 대한 단백질 양을 조사하였다. 또한, extracellular에서의 hGM-CSF의 함량을 증가시키기 위하여 다양한 permeabilizing agents를 투여하였다. 사용한 permeabilizing agents로는 Pluronic F-68, PEG8000,

Triton X-100, DMSO를 사용하였고, 이들을 Microfiltration 시킨 후 멸균된 상태로 autoclaved된 sample medium에 투여하였다.

당 분석

세포 배양 중 배지의 당 농도를 측정하기 위해 HPLC 방법에 의해 분석하였다. 분석에 사용된 검출기는 refractive index (RI) detector 였고, 컬럼은 Shodex Asahipak NH₂P-50 4E를 사용하였으며, 이동상 조건은 상온에서 acetonitrile 과 물을 70 : 30으로 유지하면서 2.0 ml/min의 유속으로 분석하였다.

hGM-CSF의 정량 분석 방법

Intracellular의 hGM-CSF 정량분석을 위해 TCA acetone 침전법을 사용하여 단백질을 침전시킨 후에 PBS buffer에 녹여 이를 ELISA 분석에 사용하였다. Intracellular와 extracellular경우에서의 hGM-CSF에 대한 ELISA 분석은 Pharmingen Inc. (San Diego, CA, USA)의 ELISA 분석 kit를 사용하여 정량하였으며 분석 방법은 ELISA kit 제작회사의 표준방법을 사용하였다. hGM-CSF의 정량에 표준물질로 사용한 hGM-CSF는 대장균에서 생산된 hGM-CSF (Pharmingen Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하였다.

결과 및 고찰

기관 배양

사람의 GM-CSF 유전자가 도입된 형질전환 된 담배 seed에서 식물체를 유도한 후 여기서 잎과 줄기부분만을 cutting한 다음 이를 125 ml erlenmeyer flask안 50 ml의 White 액체배지에 넣어 기내 영양변식을 시켰다. 15일 동안 배양하면서 형질전환 된 식물세포의 성장과 배지 내에 존재하는 sucrose의 양을 확인하였는데 그의 결과는 Fig. 1과 같다. 담배 식물체는 접종 후 배양 2일까지는 lag phase로써 세포의 성장이 거의 일어나지 않았으나 접종 후 3일 이후부터는 식물세포의 성장이 잘 진행되다가 11~12일 이후에는 stationary phase로 들어가서 식물세포의 성장이 멈추게 된다. 이러한

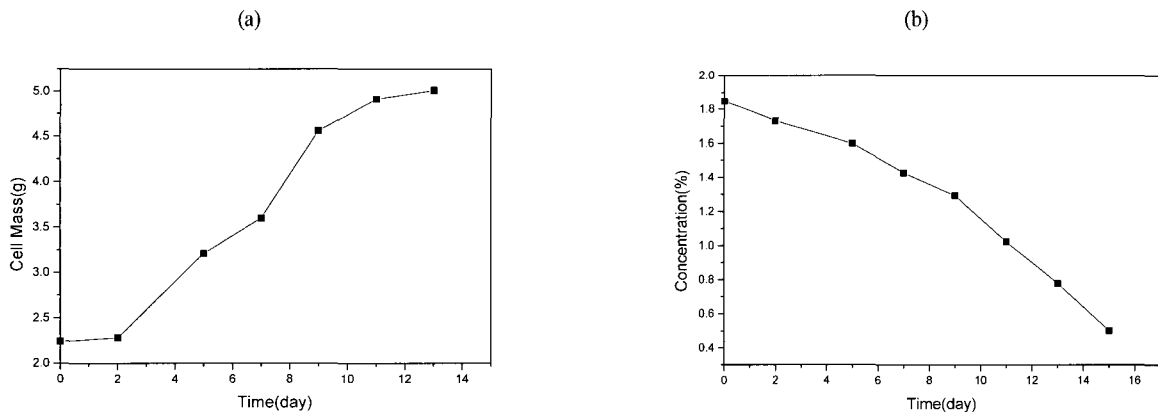


Figure 1. Growth kinetics of plant cell and concentration of sucrose in organ culture (a) plant cell growth kinetics (b) time course changes of concentration of sucrose in organ culture.

결과를 토대로 하여 계대 배양은 2주마다 외마디법을 이용하여 배양하였다. 당 분석 결과, 배지 내에 있는 sucrose의 양은 시간이 지남에 따라 계속 감소하여 15일 후에는 약 0.4% 정도의 sucrose만이 남았다.

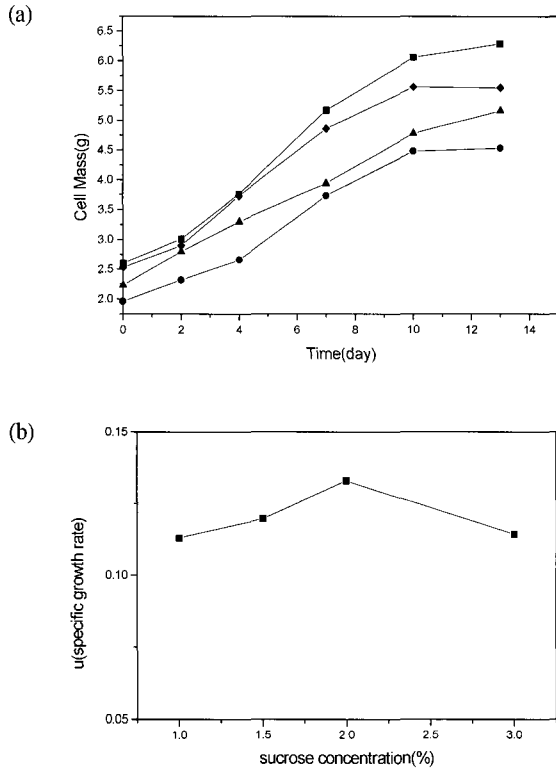


Figure 2. Effect of initial sucrose concentration on growth of plant cell (a) plant cell growth kinetics (●: sucrose 1%, ◆: sucrose 1.5%, ■: sucrose 2%, ▲: sucrose 3%) (b) specific growth rate on initial sucrose concentration.

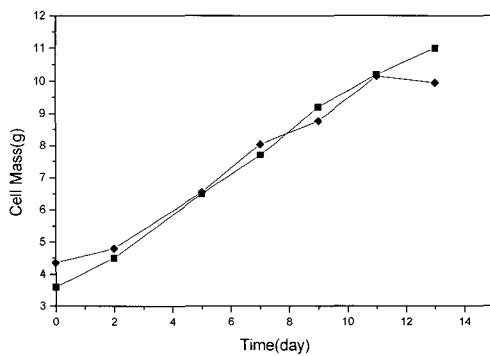


Figure 3. Effect of light on growth of plant cell (◆: light condition, ■: dark condition).

기관 배양을 하면서 담배 세포가 보다 더 잘 성장할 수 있게 배양 조건을 최적화시키기 위해 배지에 들어가는 sucrose의 양과 빛 조건에 차이를 두어 배양해 보았다. 먼저, 배지에 들어가는 sucrose의 양에만 차이를 두고 다른 환경조건은 동일하게 하여 배양하였다. Fig. 2를 보면, sucrose의 농도 1%,

1.5%, 2%, 3% 각각의 경우에 있어 초기 세포 접종농도가 약간 차이가 나지만 4가지 경우 모두 비슷한 속도로 담배 세포가 성장함을 알 수 있다. 기관 배양에서 담배 세포가 성장하는데 sucrose의 양은 아주 큰 영향을 미치지 않는다고 할 수 있지만, 비성장속도 (specific growth rate)를 비교해 보면 sucrose 2%의 농도에서 가장 좋은 성장 속도를 보여 주었다. 또한, 다른 환경 조건은 동일하게 하면서 암조건과 명조건만 차이를 두어 배양을 해보았으며 그 결과는 Fig. 3과 같다. 그래프를 보면 암조건에서 담배 세포가 더 좋은 성장을 나타낸다. 암조건에서 줄기 생장이 활발하게 이루어지므로 계대 배양시 외마디법의 사용에 있어 명조건보다 유리하다. 또한, 대량으로 생물 반응기에서 원활히 배양하기 위해서는 암조건이 유리하다.

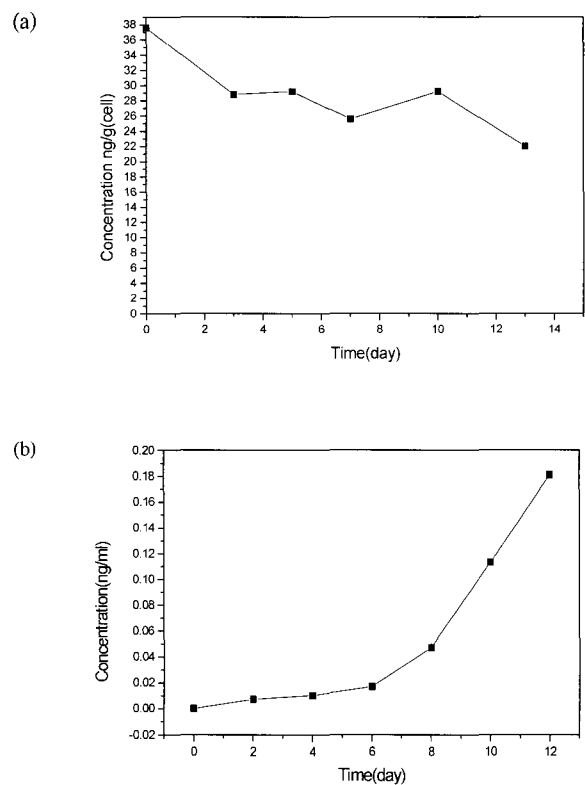


Figure 4. hGM-CSF concentration pattern during batch organ culture (a) Intracellular hGM-CSF (b) Extracellular hGM-CSF.

기관 배양에서 hGM-CSF의 생산

기관 배양에서 시간이 지남에 따라 intracellular와 extracellular에서 hGM-CSF의 생산을 확인하였고 결과는 Fig. 4와 같다. Intracellular에서의 hGM-CSF 농도는 배양 13일 동안 시간이 지남에 따라 약간씩 감소하지만 약 30 ng/g 농도로 거의 일정하게 나타남을 확인할 수 있다. Extracellular에서의 hGM-CSF 농도는 배양 6일까지 약 0.01 ng/ml의 농도로 거의 존재하지 않다가 6일 이후 hGM-CSF 생산량이 급속하게 증가하기 시작해서 배양 12일째에는 거의 약 0.2 ng/ml의 농도로 존재하게 된다. 이렇게, 기관배양에서는 세포 내부에 존재하는 단백질이 배지 내로 분비가 잘 안 된다는 것을 알 수 있다. 하지만, 배지 내로 분비되어지는 단백질의 안정

성 측면에서 볼 때, 기관배양에서의 단백질의 안정성이 다른 식물세포 배양 시스템에 비해 높다고 판단되어진다. 최근 보고에 의하면 세포생장의 exponential phase 이후에 식물세포의 생육이 증가함에 따라서 액체 배지 내로 분비되는 단백질 분해효소의 양도 증가하며(18), 이러한 단백질분해효소의 증가는 액체 배지 내에 존재하는 sucrose 농도의 감소에 의하여 증가한다고 한다(19). 본 연구결과에서는 배양 12일까지 extracellular에서 hGM-CSF 농도가 떨어지는 것을 관찰할 수 없었다. 하지만, 전술한 연구결과인 Fig. 1 (b)를 보면 배양 15일 이후에는 배지 내에 존재하는 sucrose의 양이 거의 존재하지 않는데 아마도 이 시기부터 sucrose의 감소에 의한 단백질분해효소의 분비가 촉진되고 이로 인해 배지 내로 분비되어지는 hGM-CSF가 단백질분해효소에 의해 분해되어질 것으로 판단되어진다.

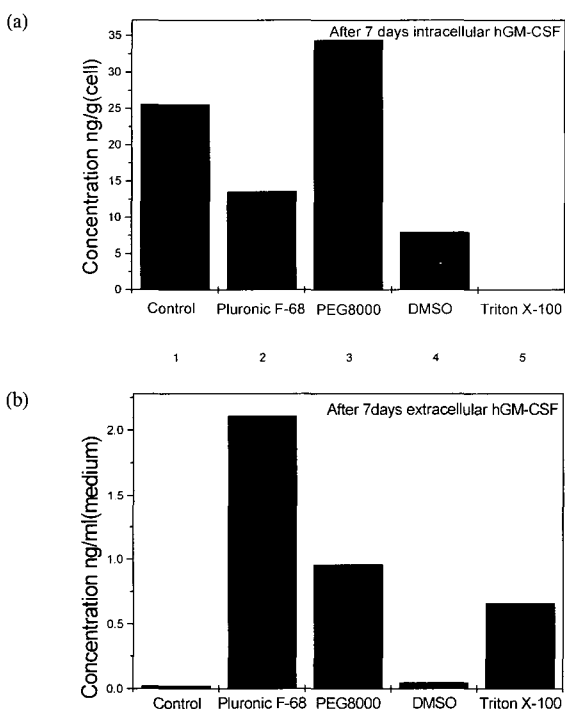


Figure 5. Effect of various permeabilizing agents: Each permeabilizing agent was added into 125ml flasks containing 50ml of culture medium after inoculation (a) Intracellular hGM-CSF concentration (b) Extracellular hGM-CSF concentration.

Permeabilizing agents가 hGM-CSF의 생산에 미치는 영향

전술한 연구결과인 Fig. 4를 보면 기관 배양은 세포 내에서 배지 내로의 단백질 분비가 어느 정도는 이루어지나 다른 식물세포 배양 시스템에 비해 적다는 단점이 있다. 이를 극복하기 위해 다양한 permeabilizing agents를 투여하여 기관 배양에서 담배 세포의 permeability를 증가시켜야 한다. 본 실험에서는 배지 내에 다양한 permeabilizing agents를 투여하여 extracellular에서의 hGM-CSF의 생산에 미치는 영향을 확인하였다. Permeabilizing agents 투여량은 pluronic F-68은 1g/L, PEG8000은 2 g/L, DMSO와 Triton X-100은 0.1%의 농도로

각각 첨가하였다. Fig. 5를 보면, Pluronic F-68과 PEG8000을 첨가한 경우 담배세포에서 배지 내로의 단백질 분비가 원활해졌음을 확인할 수 있었다. Triton X-100을 첨가했을 경우, control에 비해 배지내로의 단백질 분비가 잘 이루어지나 cell의 viability가 크게 떨어진다. Permeabilizing agent로 잘 알려진 DMSO의 경우에도 control에 비해 단백질 분비가 좋아지나 다른 organic solvent처럼 cell의 viability를 떨어뜨린다는 단점이 있다. 이는 육안으로 관찰한 결과 Triton X-100을 첨가한 경우는 식물체가 전부 흑갈색을 띠며 죽어갔고, DMSO의 경우에도 세포가 부분적으로 갈색을 띠며 더딘 성장을 나타내었다. 이는 DMSO나 Triton X-100이 식물세포막의 pore size를 증가시킴에 의해 단백질 분비를 시키므로 cell의 viability에 해가 된다(20). 하지만, Pluronic F-68과 PEG8000을 첨가한 경우에 cell의 viability는 크게 영향을 받지 않은 듯 보였으며 배지로 분비되어지는 hGM-CSF 양은 control에 비해 크게 증가됨을 보여주었다. Pluronic F-68과 PEG가 식물세포의 단백질 분비에 어떠한 mechanism으로 작용하는지에 대해 거의 알려져 있지 않다. 다만 Pluronic F-68의 경우 소수성 부분이 세포막의 소수성 부분과 결합을 통해 세포 주위에 보호막을 형성하여 shear environment로부터 세포를 보호하는 역할을 한다고 알려져 있다. 이를 통해 extracellular에서 hGM-CSF의 생산이 촉진되는 것으로 판단된다(21). PEG의 경우, 최근 보고에 의하면 Carrot Hairy Roots에서 peroxidase의 분비를 증가시키는 데에 좋은 효과를 나타냈다(20).

요 약

형질 전환된 담배 seed에서 담배 식물체를 유도하여 White 액체 배지에서 기관 배양하였다. 암조건, sucrose 2%의 조건에서 좋은 growth pattern을 나타내었고, 계대 배양은 외마디법을 이용하여 2주마다 하였다. 기관 배양에서 hGM-CSF production pattern을 보면, intracellular에서는 큰 변화 없이 약 30 ng/g의 일정한 농도를 나타내었다. Extracellular에서 hGM-CSF 농도는 배양 6일 이후부터 급속하게 증가하기 시작하여 배양 12일째에 약 0.2 ng/ml의 농도를 나타낸다. 기관 배양은 다른 식물세포 배양 시스템에 비해 생산되어진 단백질의 안정성이 크다는 장점에 비해 세포 내에서 배지 내로의 단백질 분비가 적다는 단점이 있다. 이를 극복하기 위해 다양한 permeabilizing agents를 투여하여 담배 세포의 permeability를 증가시키고자 하였다. 그 결과, Pluronic F-68과 PEG8000을 첨가한 경우 담배 세포에서 배지 내로의 단백질 분비가 원활해졌음을 확인할 수 있었다.

감 사

본 연구는 한국과학재단지정 초정밀생물분리기술연구센터의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Larrick, J. W. and D. W. Thomas (2001), Producing proteins in transgenic plants and animals, *Curr. Opin. Biotech.* **12**, 411-418.
2. Doran, P. M. (2000), Foreign protein production in plant tissue cultures, *Current Opinion in Biotechnol.* **11**, 199-204.
3. Miele, L. (1997), Plants as bioreactors for biopharmaceuticals: regulatory considerations, *Trends Biotechnol.* **15**, 45-50.
4. 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.
5. LaCount, W., Gg. 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.
6. 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 Express. Purif.* **13**, 45-52.
7. Sehnki, P. C. and R. J. Ferl (1999), Processing of preproinsulin in transgenic tobacco, *Protein Express. Purif.* **15**, 188-195.
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. James, E. A., C. Wang, Z. Wang, R. Reeves, J. H. Shin, N. S. Magnuson, and J. M. Lee (2000), Production and characterization of biologically active human GM-CSF secreted by genetically modified plant cells, *Protein Expr. Purif.* **19**, 131-138.
10. Hong, S. Y., T. H. Kwon, O. H. Kim, J. H. Lee, Y. S. Jang and M. S. Yang (2002), Production of biologically active hG-CSF by transgenic plant cell suspension culture, *Enzyme Microb. Tech.* **30**, 763-767.
11. John, E. J. R. and N. M. Gough (1994), The cytokine hand book, p.343-369, *Academic Press*.
12. Gough, N. M., J. Gough, D. Metcalf, A. Kelso, D. Grail, N. A. Nicola, A. W. Burgess, and A. R. Dunn (1984), Molecular cloning of cDNA encoding a murine haematopoietic growth regulator, granulocyte-macrophage colony stimulating factor, *Nature* **309**, 7630767.
13. Lee, F., T. Yokota, T. Otsuka, L. Gemmell, N. Larson, J. Luh, K. Arai, and D. Rennick (1985), Isolation of cDNA for a human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by functional expression in mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4360-4364.
14. Gasson, J. C. (1991), Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *Blood* **77**, 1131-1145.
15. Antman, K. S., J. D. Griffin, A. Elias, M. A. Socinski, L. Ryan, S. A. Cannistra, D. Oette, M. Whitley, E. 3rd Frei, and L. E. Schnipper (1988), Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on chemotherapy-induced myelosuppression, *N. Engl. J. Med.* **319**, 593-598.
16. Champlin, R. E., S. D. Nimer, P. Ireland, D. H. Oette, and D. W. Golde (1989), Treatment of refractory aplastic anemia with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *Blood* **73**, 694-699.
17. Thompson, J. A., D. J. Lee, P. Kidd, E. Rubin, J. Kaufmann, E. M. Bonnem, and A. Fefer (1989), Subcutaneous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with myelodysplastic syndrome: toxicity, pharmacokinetics, and hematological effects, *J. Clin. Oncol.* **7**, 629-637.
18. 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 glauca*, *Physiol. Plant.* **74**, 1-10.
19. 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.
20. Y. H. Kim, J. H. Kim, and Y. J. Yoo (1997), Enhanced Secretion of Peroxidase from Carrot Hairy Roots Using Polyethylene Glycol, *J. Fer. Bioeng.* **83**, 397-400.
21. S. Y. Lee, and D. I. Kim (2002), Stimulation of murine granulocyte macrophage-colony stimulating factor production by Pluronic F-68 and polyethylene glycol in transgenic *Nicotiana tabacum* cell culture, *Biotech. Lett.* **24**, 1779-1783.