

형질전환된 담배세포배양을 이용한 hGM-CSF 생산에서 여러 가지 단백질 안정제가 미치는 영향

조종문 · † 김동일
인하대학교 생물공학과

(접수 : 2006. 7. 7., 게재승인 : 2007. 5. 8.)

Effects of Various Stabilizers on the Production of hGM-CSF in Transgenic *Nicotiana tabacum* Suspension Cell Cultures

Jong-Moon Cho and Dong-Il Kim†

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

(Received : 2006. 7. 7., Accepted : 2007. 5. 8.)

Productivity of secreted recombinant protein depends largely on its stability in the extracellular environment with protease. Most hGM-CSF produced by transgenic tobacco cell cultures and secreted to the medium was confirmed to be rapidly degraded by protease in medium. To increase the productivity, therefore, various protein stabilizers such as gelling agents such as carrageenan and alginate, polymers, polyols, and amino acids have been tested. The stability of hGM-CSF in spent medium without cells was improved by the presence of gelling agents. However, the reason for the enhanced production by the addition of gelling agents may be due to the increased expression level and permeability rather than stability. The addition of DMSO inhibited the cell growth, but improved specific yield. The others were not effective for stability as well as hGM-CSF production.

Key Words : Transgenic plant cell culture, *Nicotiana tabacum*, hGM-CSF, gelling agent, stability

서론

백혈구 증식인자인 hGM-CSF (human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)는 T 세포, B 세포, 대식세포, 상피세포, 섬유아세포 등의 많은 종류의 세포들에 의해 생성되며 다양한 조혈세포의 증식, 성숙, 기능 등을 자극한다. 이러한 hGM-CSF의 특징적 효과로는 과립구, 대식세포, 호산구 콜로니 등의 성장을 자극하고 기능적 활성을 교체하며 T 세포의 증식을 자극하고, interleukin-1의 발현을 유도하는 것을 들 수 있다(1). 또한 hGM-CSF는 골수 이식환자의 치료에 있어 방어 기작 결핍에 따른 감염에 대한 방어 증진과 AIDS나 약품에 의한 호중구 감소증 및 재생 불량성 빈혈 등의 치료제로서 주목받고 있다(2). 재조합 hGM-CSF는 지금까지 대장균, 효모, 동물세포 등에서 생산되어 현재 임상에서 사용되고 있으며, 식물세포에서도

발현시켜 생산하는 연구가 진행되고 있다(3, 4).

전통적으로 식물체를 이용한 유용물질의 생산은 식물체 자체가 가지고 있는 유용 2차 대사산물의 생산에 중점을 두고 많은 연구가 진행되어 왔지만, 최근 재조합 DNA 기술의 발전으로 인해 식물세포배양을 통한 외래의 유용 생리 활성 단백질의 생산이 가능해 짐에 따라 관련 연구에 관심이 고조되고 있다(5). 최근에는 형질전환 식물세포에 의해 생산되는 의약품 단백질을 plant-derived pharmaceuticals (PDPs) 혹은 plant-made pharmaceuticals (PMPs)라고 부르기도 한다(6, 7). 식물세포배양을 이용한 재조합 단백질의 생산은 동물세포배양에 비해 간단한 배지조성과 오염가능성의 감소 및 정제과정이 쉽고 단순하기 때문에 경제적 효용 가치가 높고, 또한 미생물배양이 가지고 있는 번역 후 변형 과정의 문제점도 해결할 수 있다는 장점을 가지고 있다(8). 하지만 이러한 장점들에도 불구하고 낮은 발현 수준과 배지 내로의 낮은 분비 효율, 분비 후 단백질의 불안정성 등으로 인해 상업화에 커다란 어려움을 겪고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 유전자 단계에서 원하는 단백질의 발현을 촉진시킬 수 있는 강력한 프로모터의 선별 및 이용, 분비 효율을 촉진시킬 수 있는 시스템의 확립, 분비

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

Tel : +82-32-860-7515, Fax : +82-32-875-0827

E-mail : kimdi@inha.ac.kr

후 발생하는 단백질의 변성 억제 등을 위한 연구가 필요하다. 또한 당단백질의 경우 식물과 동물의 N-linked glycan의 구조에 차이가 있어 의약품으로 사용할 경우 면역반응을 유발할 가능성이 있으므로 이를 해결해야만 한다(7).

세포 밖으로 분비된 목적 단백질은 여러 가지 기작에 의해 그 안정성을 잃어 버려 생산성에 커다란 영향을 끼친다. 이런 단백질의 안정성에 영향을 미치는 요인으로는 발견되어 배지로 분비된 단백질 자체의 구조적 특징에 의한 불안정성이나 응집에 의한 불안정성이 있으며, 특히 배지내의 단백질 분해효소에 의한 목적단백질의 분해는 생산성에 가장 큰 영향을 미치게 된다(4). 따라서 단백질 분해효소 억제제를 이용하여 단백질 분해효소의 활성을 낮춤으로써 단백질의 생산성을 높이려는 연구결과가 보고되고 있다(9). 하지만 단백질 분해효소 억제제가 고가인데다 그 활성의 반감기가 수 분에서 수 시간으로 상당히 짧기 때문에 실제 배양 공정상에 사용하기에는 어려움이 있다. 한편, 단백질의 안정성을 증가시키기 위해 젤라틴(10), PVP(11) 등과 같은 안정제의 사용을 통해 생산성을 높이려는 연구도 알려져 있다. 또한 배지로 분비된 단백질의 안정성뿐만 아니라 세포 내의 단백질 합성과정에서 단백질의 안정성을 규명하기 위한 노력도 시도가 되고 있다(12). 하지만 아직 이러한 안정제가 단백질의 안정성에 미치는 영향에 대한 정확한 기작을 알지 못하고, 재조합 식물세포공정에 단백질 안정제가 모두 효과를 보이지 못하고 있다. 따라서 외래 단백질 생산에 있어 좀 더 일반적인 안정제를 찾고 그 기작을 규명하기 위한 많은 연구들이 수행되어야 할 것이다.

형질전환된 식물세포배양에 의해 분비된 외래단백질의 경우 배지 내 단백질 분해효소나 여러 물리·화학적 환경에 의해 분해되어 생산성에 큰 영향을 받는다. 따라서 여러 가지 단백질 안정제를 통해 배지 내로 분비된 hGM-CSF의 안정성 증진을 통한 생산성 향상이 가능하다. 본 논문에서는 carrageenan, alginate와 같은 젤 형성제와 DMSO, PVP, polymer, polyol, 아미노산 등의 첨가가 형질전환된 담배세포배양에서 재조합 hGM-CSF 생산에서의 안정성 증대에 미치는 영향을 조사하여 생산성을 높이고자 시도하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 배지

본 연구에 사용된 세포주는 전북대학교로부터 제공받은 형질전환된 *Nicotiana tabacum* L. cv Havana SR이며(3), 생장배지로는 MS 기본배지에 30 g/L sucrose, 0.02 mg/L kinetin, 2 mg/L 2,4-D, 100 mg/L myo-inositol을 첨가하여 사용하였다. pH를 5.9로 맞춘 뒤 가압 증기 멸균하였고, 0.22 μ m의 여과막을 통과시킨 kanamycin 농축용액을 100 mg/L의 농도가 되도록 첨가하였다. 현탁세포배양은 25°C, 120 rpm의 회전식 진탕 배양기에서 암조건에서 수행하였으며, 7일 간격으로 계대배양하였다.

세포량 측정

세포량은 과량의 증류수로 세척한 뒤 Whatman No. 1 여과지를 통해 감압 여과하여 세포생체량을 측정하였으며, 이 시료를 60°C의 건조기에서 항량이 될 때까지 건조시켜 세포건조량 (dry cell weight)을 측정하였다.

hGM-CSF 및 총단백질 정량분석

추출에 사용한 완충용액은 Magnuson 등(8)이 제시한 조성을 수정하여 사용하였다. 추출용 완충용액의 조성은 0.15 M NaCl, 50 mM Tris (pH 7.4), 0.25% NP-40로 구성되었다. Eppendorf tube에 fresh cell 0.2 g씩 담은 뒤 추출용 완충용액 0.8 mL를 첨가하고, vortexing한 후 4°C로 온도를 유지시키며 초음파세척기를 이용하여 추출하였다. 이 혼합물을 마이크로원심분리기를 이용하여 12,000 \times g, 15분간 원심분리하고 그 상등액으로 세포 내의 hGM-CSF를 정량하였다. hGM-CSF 분석을 위해서는 ELISA 분석 kit (PharMingen Inc., USA)를 사용하여 450 nm에서 측정하였으며 분석 방법은 ELISA kit 제작회사의 표준방법에 따랐다. 배양액에 존재하는 hGM-CSF도 역시 같은 방법으로 측정하였다. 총 단백질 정량분석을 위해서는 Bradford assay kit (Bio-Rad, USA)를 사용하였으며, 표준물질로는 bovine serum albumin을 사용하여 595 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

젤 형성제 (carrageenan과 alginate)의 영향

Carrageenan은 해조류로부터 추출되는 황산화된 다당류로서 전통적으로 식품이나 의약품 산업에서 젤 형성제, 증점제, 안정제나 약품이나 효소의 고정화 및 마이크로캡슐의 제조 등에 사용된다. Carrageenan은 α -(1,3)-D-galactose와 β -(1,4)-3,6-anhydro-D- 또는 L-galactose의 공중합체로 구성되어 있으며 황산화기의 수와 위치에 따라 크게 iota, kappa, lambda로 분류된다(13). Alginate는 갈조류에서 얻는 β -(1,4)-D-mannuronic acid와 α -(1,4)-L-guluronic acid의 공중합체이며, 식품, 의약품, 제지 등의 산업에서 증점제, 안정제, 유화제 등으로 사용되고 있다(14).

Fig. 1에는 iota carrageenan과 alginate가 배지 내 hGM-CSF의 안정성에 미치는 영향을 정리하였다. 회수 배지에서의 hGM-CSF의 안정성은 3 g/L carrageenan의 첨가에 의해 1일째까지 초기 양의 약 40%, 5 g/L alginate의 첨가에 의해서는 70%가 유지되었으며 이후에도 대조구에 비해서 안정성 유지에 효과가 있음을 확인하였다. 이러한 안정성 향상의 이유로는 carrageenan과 alginate가 다당류 계열로써 단백질의 구조를 안정화시키고 변성을 억제하며 또한 carrageenan과 alginate의 첨가에 의한 배지의 점도가 높아지면서 배지 내 존재하는 단백질 분해효소와의 접촉을 감소시킬 수 있기 때문으로 사료된다.

실제 배양 중에 있어서 carrageenan과 alginate 첨가의 효과를 실험하였다. 세포 생장에 있어서 carrageenan의 첨가는 대조구에 비해 최대 세포 성장량이 약간 증가하였으며 이후 급속하게 저해되는 현상이 관찰되었다(Fig. 2a). 또한

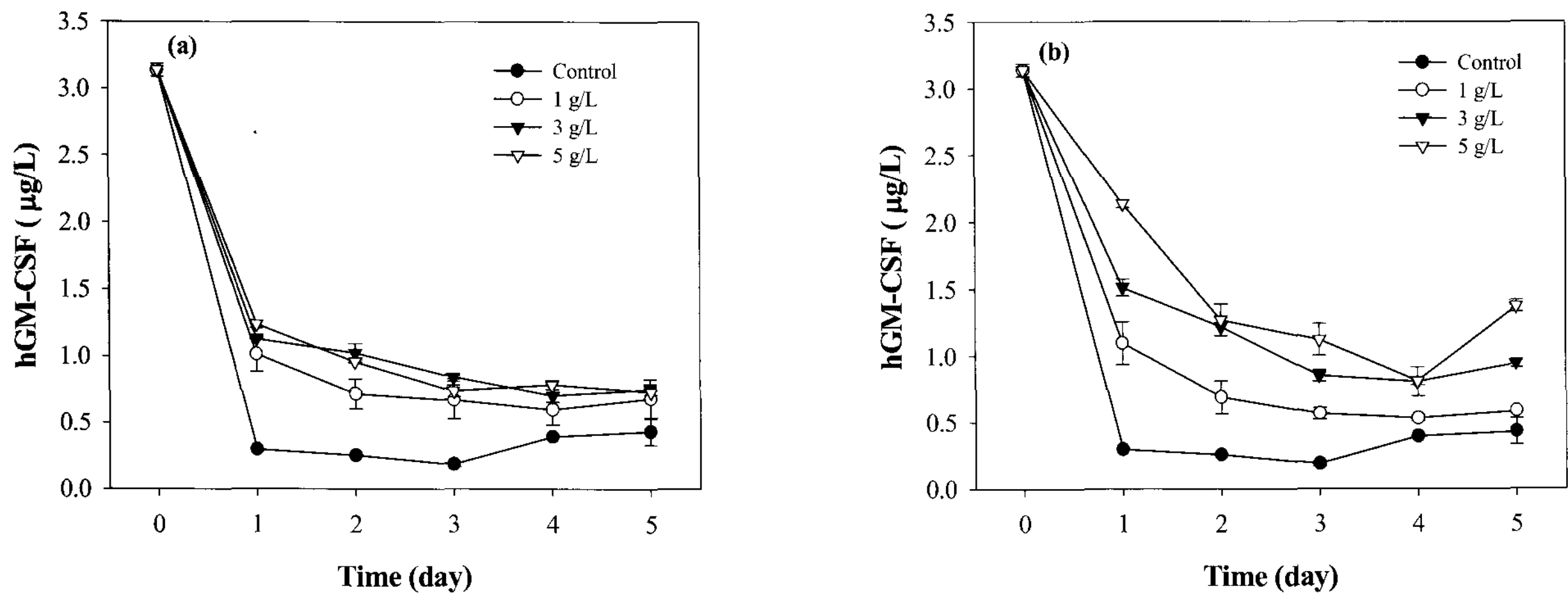


Figure 1. Effect of (a) carrageenan and (b) alginate on the stability of hGM-CSF in spent medium.

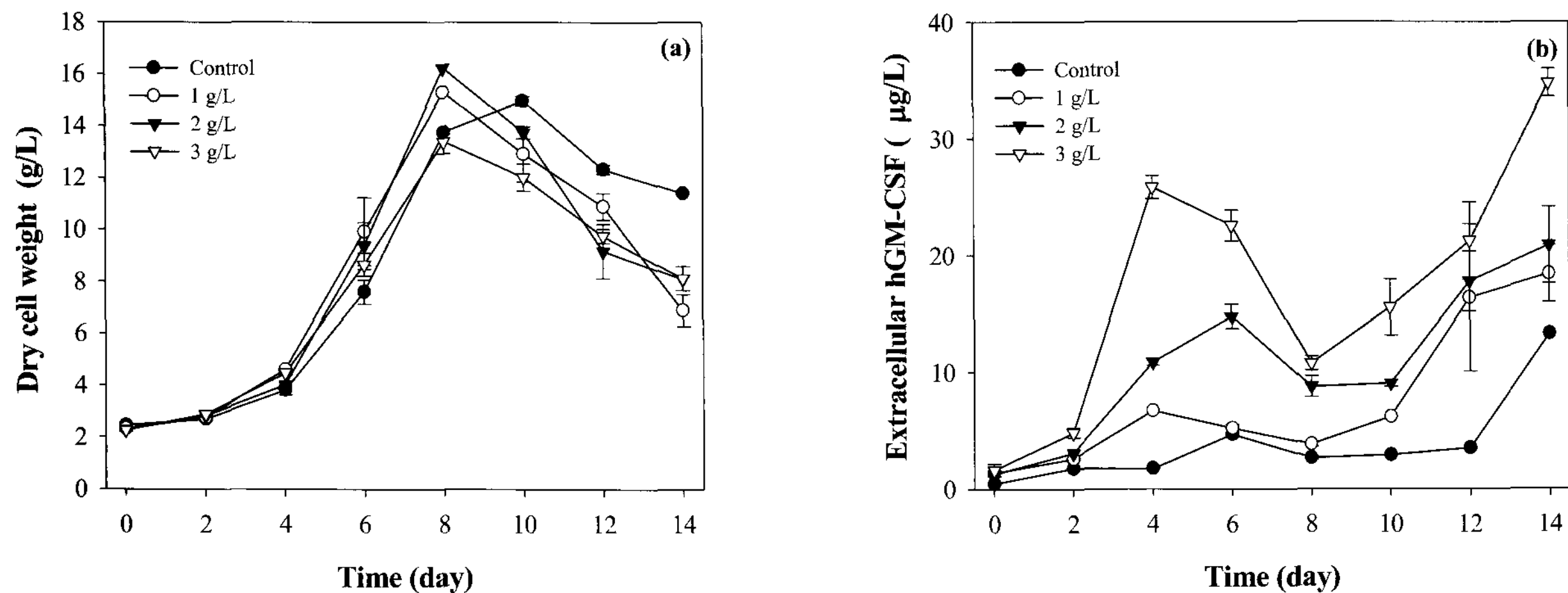


Figure 2. Effect of carrageenan on (a) cell growth and (b) the production of extracellular hGM-CSF.

배양후반에서 세포량이 많아지면서 수분이 감소하고 전체적인 유동성이 감소하면서 젤 형성 현상이 발생하였고, 이후 급속하게 사멸기로 접어들었다. hGM-CSF 생산측면에 있어서는 3 g/L의 carrageenan을 첨가한 경우 6일째 대조구의 4.6 µg/L에 비해 4일째 25.8 µg/L로 약 5.6배 증가하였다(Fig. 2b). Carrageenan의 경우에도 최대 생산 후 8일째 급속히 감소하는 경향을 보였으며, 이후 증가하는 것은 세포의 lysis에 의한 것으로 판단된다. 또한 세포 내 hGM-CSF의 양도 대조구와 비슷한 결과를 얻었으므로 분비효율 촉진에도 영향을 미치지 않은 것으로 판단된다. 결과적으로 carrageenan의 첨가에 의한 생산성의 증가는 발현 촉진에 의한 것으로 사료된다. 하지만 배지 내 총 단백질을 측정된 결과 대조구와 비슷한 결과를 얻었고, 따라서 carrageenan이 전체적인 발현 증진이 아닌 hGM-CSF의 발현에만 관여한 것으로 판단되며 향후 이에 대해 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다(Fig. 3).

한편, 배양 중에서의 alginate 효과는 3 g/L 첨가 농도까지는 세포생장에 큰 영향을 미치지 않았으며, hGM-CSF 생산측면에서는 대조구에서 6일째 최대 6.5 µg/L, alginate에

서는 6일째 최대 12.3 µg/L로 약 2배의 생산성 증가 효과를 확인하였다(Fig. 4). 또한 다른 젤 형성제처럼 최대 생산 후 급속하게 감소하는 결과를 보였으며, 배양 후반까지의 안정성 유지 효과는 보여주지 못했다.

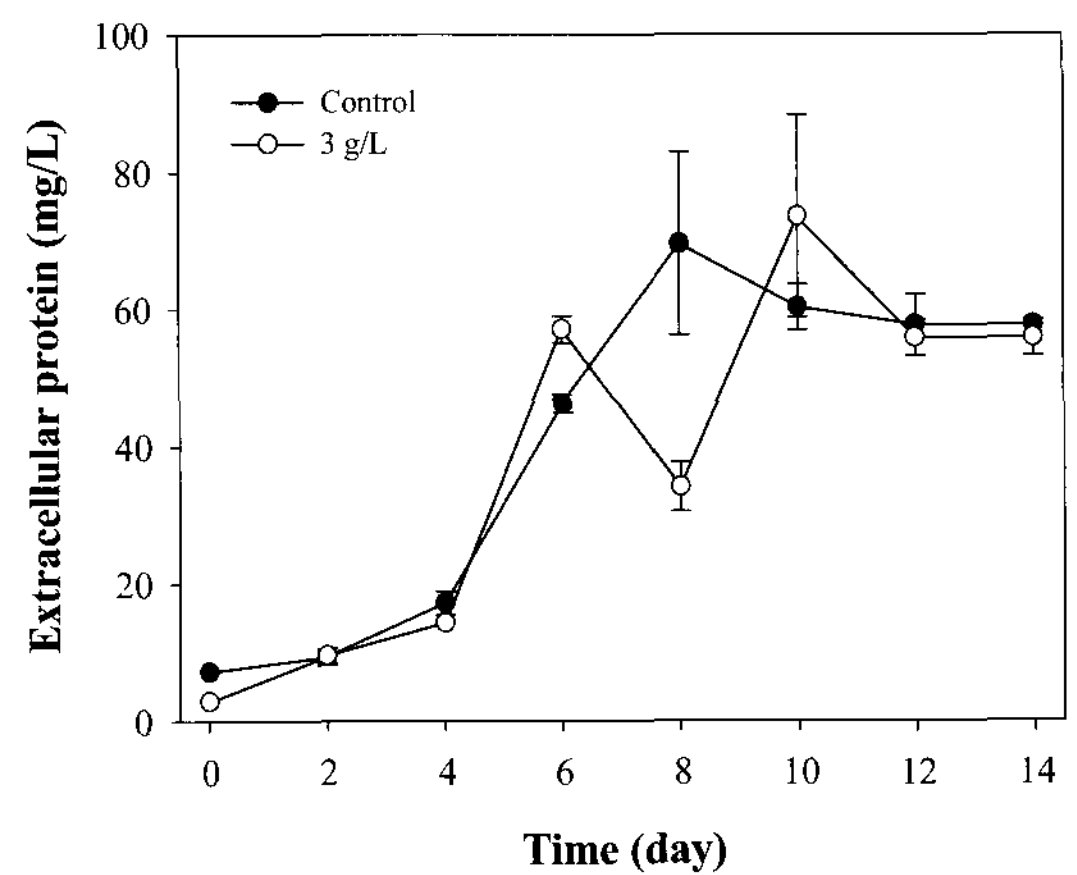


Figure 3. Effect of carrageenan on the production of extracellular protein.

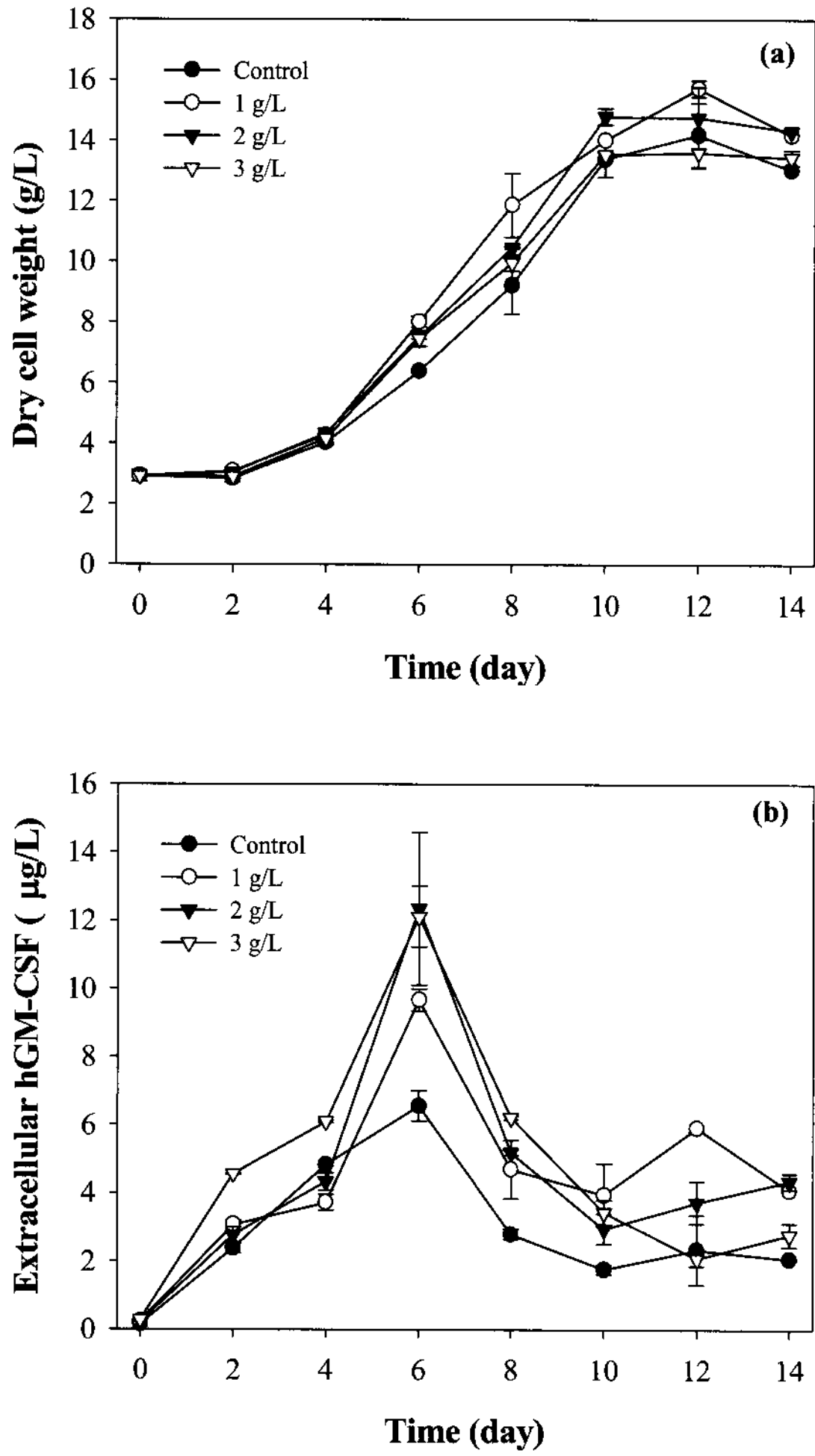


Figure 4. Effect of alginate on (a) cell growth and (b) the production of extracellular hGM-CSF.

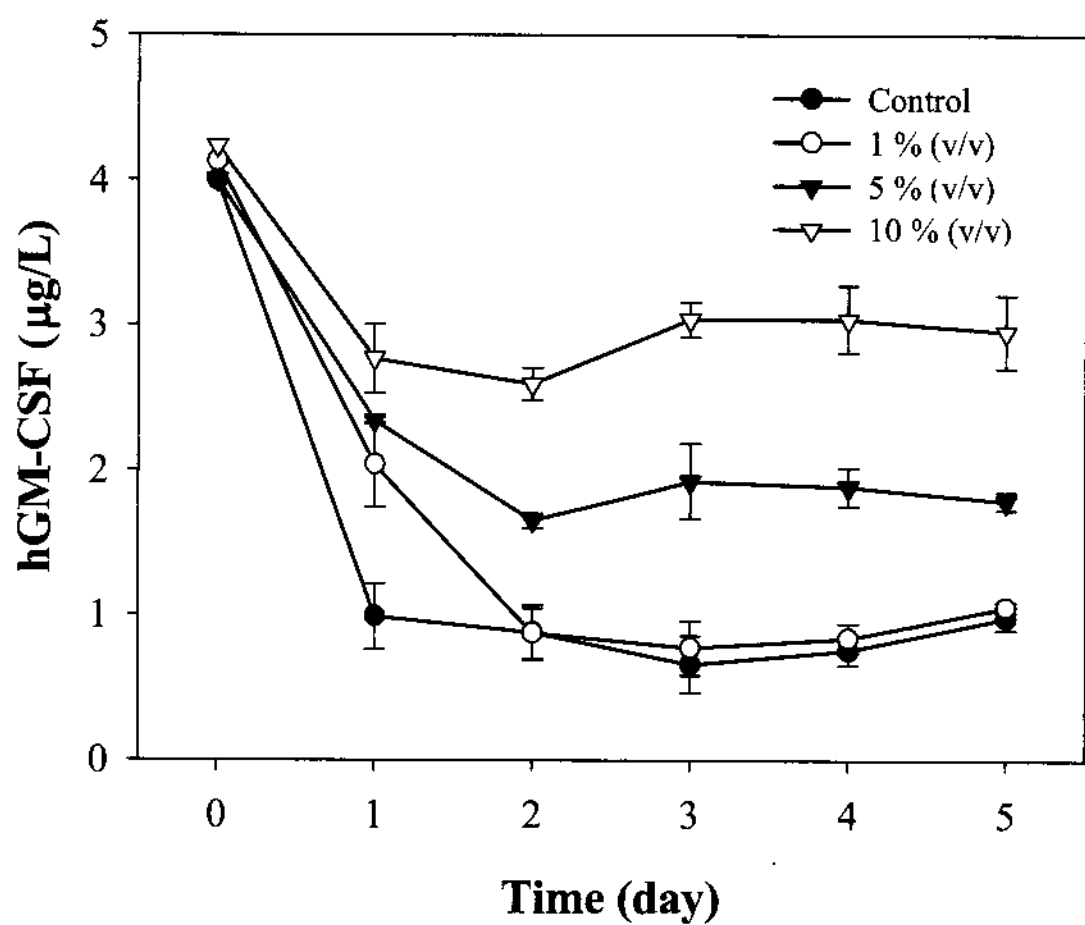


Figure 5. Effect of DMSO on the stability of hGM-CSF in spent medium.

결과적으로, 회수 배지에서의 젤 형성제의 첨가는 hGM-CSF의 안정성 유지에 효과적이었지만 실제 배양 중

에서의 생산성 증대의 효과는 안정성 향상보다는 발현을 향상이나 분비효율 촉진에서 기인함을 알 수 있었다. 이것은 젤 형성제가 hGM-CSF 뿐만 아니라 단백질 분해효소에 대한 안정성에도 영향을 미치고, 또한 실제 배양 중에서는 배양환경이 다양하게 변화하기 때문에 첨가된 젤 형성제의 성질이 다양하게 변화할 뿐만 아니라 젤 형성제가 세포생장과 hGM-CSF 생산에도 다양한 영향을 미치기 때문인 것으로 판단된다.

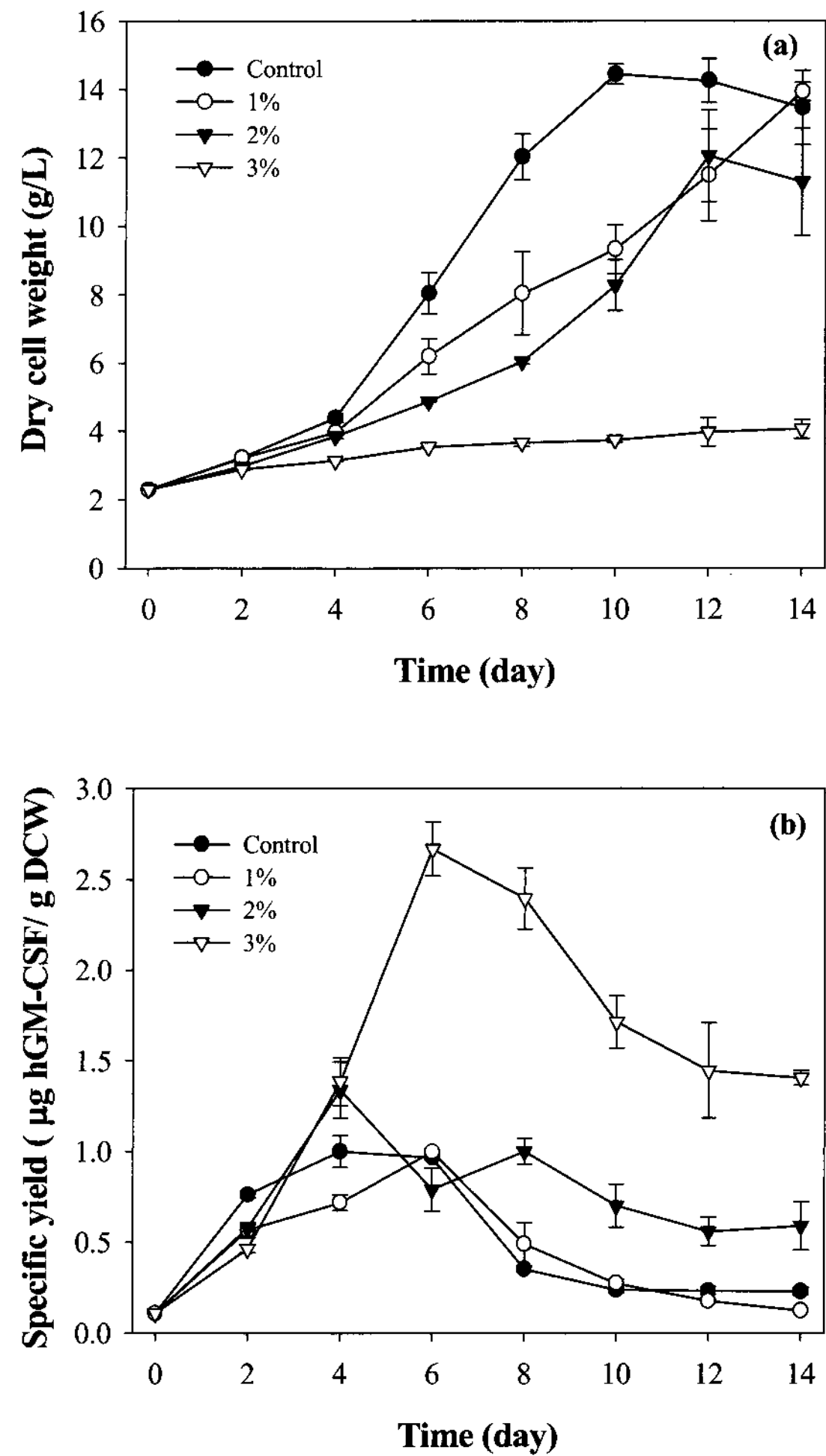


Figure 6. Effect of DMSO on (a) cell growth and (b) specific yield.

Dimethylsulfoxide (DMSO)의 영향

재조합 단백질의 생산에 있어서 DMSO는 주로 투과성증진제(15)로 사용되어 왔다. 또한 Wahl 등(16)은 식물세포를 이용한 heavy chain 단일군 항체 생산에 있어서 DMSO가 단백질의 proton-donor group과 수소결합을 형성하여 단백질의 변성을 억제함으로써 생산성을 증가시켰다고 보고하였다. 본 실험에서는 이러한 DMSO가 hGM-CSF의 생산에는 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. Fig. 5는 DMSO가 회수된 배양액에서 hGM-CSF의 안정성에 미치는 영향을 나타낸 결과이다. DMSO의 농도가 높아질수록 회수된 배양액에서의 hGM-CSF의 안정성은 향상되었으며 10% DMSO 첨가시 5일째까지 초기 hGM-CSF 농도의 약 70%가

유지되었다.

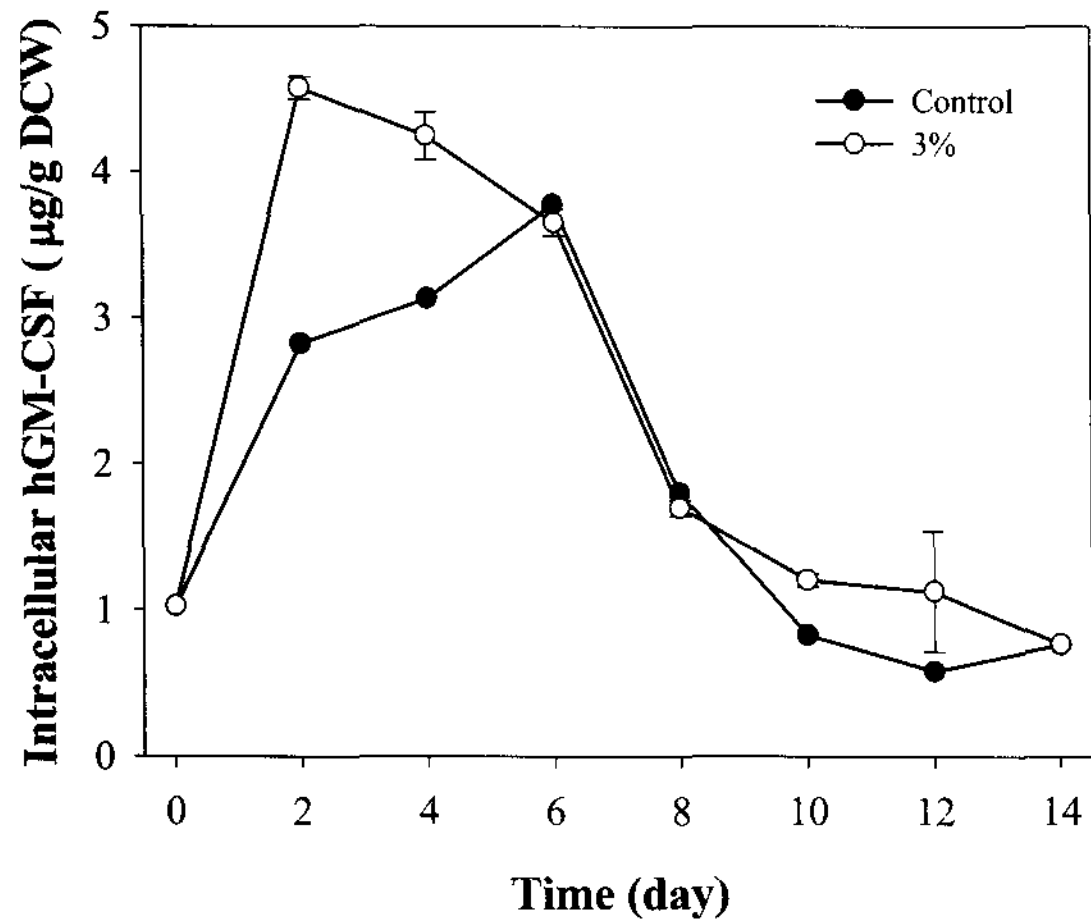


Figure 7. Effect of DMSO on the production of intracellular hGM-CSF.

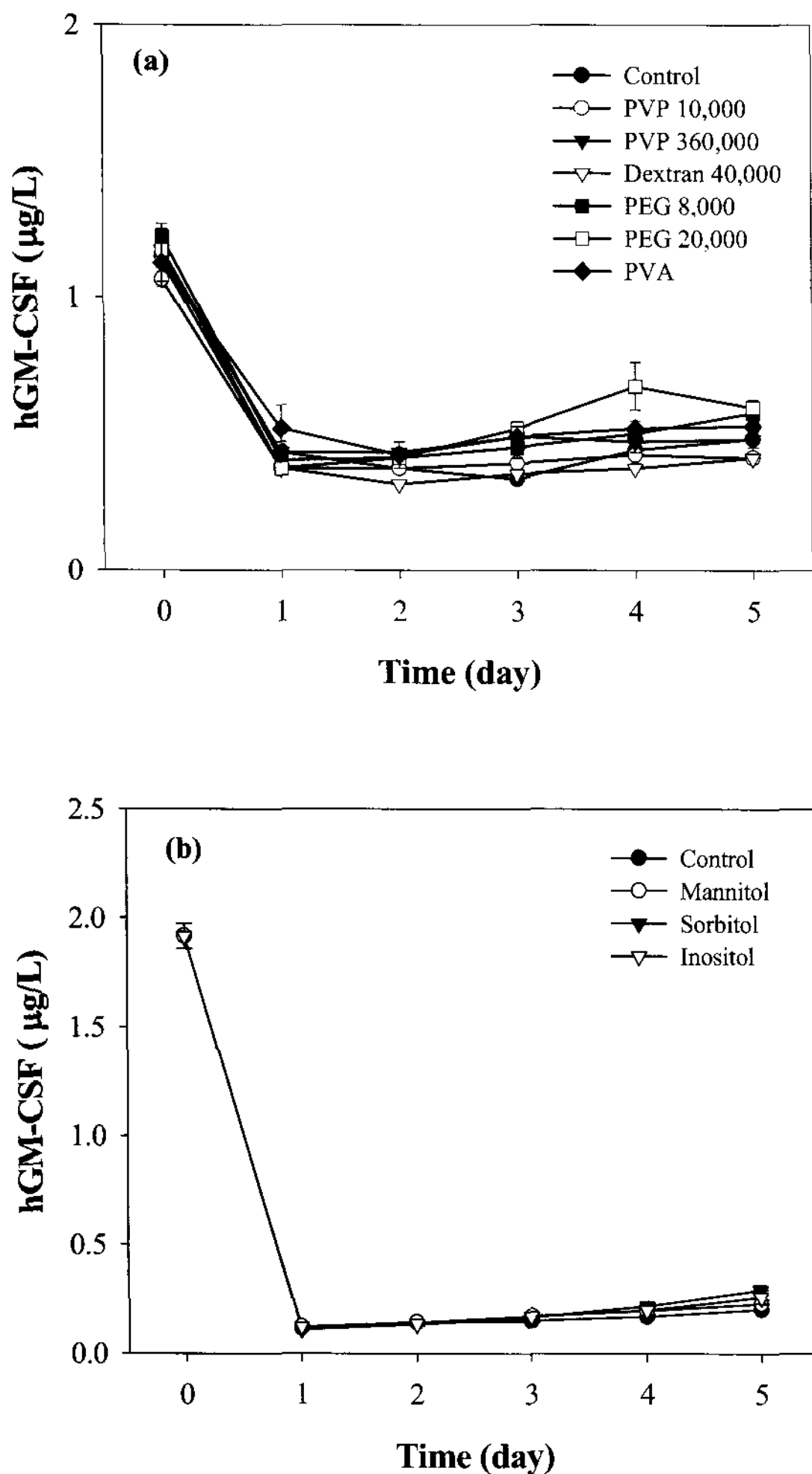


Figure 8. Effect of various (a) polymers and (b) polyols on the stability of hGM-CSF in spent medium.

실제 배양 중에서 DMSO 첨가의 효과를 살펴보았다. DMSO의 첨가는 세포생장에 큰 영향을 주었으며, 3% 이상

의 첨가에서는 생장이 거의 이루어지지 않았다(Fig. 6a). 하지만 hGM-CSF 생산측면에서는 대조구와 비슷한 생산성을 보였으며, 따라서 비생산성에 있어서는 대조구에 비해 2.7 배 증가함을 관찰하였다. 또한 최대 생산 후 감소하는 경향도 상대적으로 낮게 관찰되었다(Fig. 6b). DMSO의 투과성증진제로서의 효과를 확인하기 위해 세포 내 hGM-CSF의 양을 관찰하였지만, 대조구와 비슷하거나 오히려 높게 존재함을 확인하였다(Fig. 7). 따라서 DMSO가 분비효율을 증가시키지는 못했으며 안정성의 향상과 발현 촉진에 의한 생산성 증가의 결과로 판단된다.

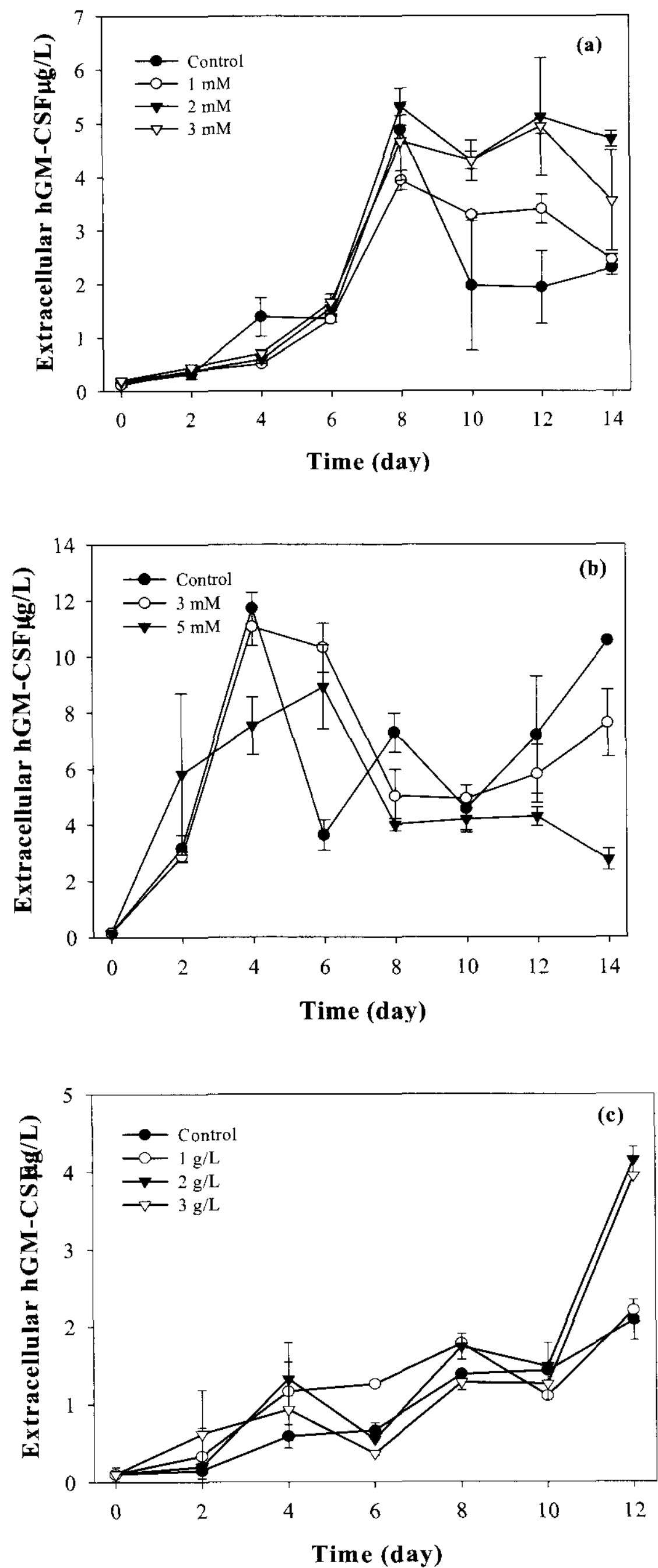


Figure 9. Effects of (a) glutamine, (b) lysine, and (c) PVP on the production of extracellular hGM-CSF in *N. tabacum* suspension cultures.

기타의 단백질 안정제의 영향

PVP (polyvinylpyrrolidone)를 비롯한 고분자 물질이나, polyol, 아미노산 등은 식품, 의약품 산업 및 식물세포배양을 통한 외래 단백질 생산 등에서 단백질 안정제로 첨가되어 다양한 물리·화학적 환경에서 단백질이 가질 수 있는 구조적 변성과 불안정성을 막는다고 알려져 있다(11, 17, 18). 이러한 다양한 단백질 안정제가 hGM-CSF의 안정성과 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 8은 회수된 배양액에서 다양한 polyol, 고분자 물질 및 아미노산이 hGM-CSF의 안정성에 미치는 결과를 나타낸 것이다. 대부분의 첨가 물질들이 hGM-CSF의 안정성 유지에 효과적이지 못하였으며, 실제 배양 중에 있어서도 큰 효과를 미치지 못하였다. 이것은 이러한 첨가물질들이 대부분 단백질의 구조적 변성을 보호하는 것에는 효과적이지만, 단백질 분해효소에 의한 hGM-CSF의 분해는 막지 못하기 때문인 것으로 판단된다. 한편 Fig. 9에서 볼 수 있는 것과 같이 실제 배양중의 첨가에 있어서 안정성의 향상 외에 생산성 증대에 효과가 있는지를 확인하는 실험도 수행하였으나 생산성을 크게 높이지는 못함을 확인하였다.

감 사

본 연구는 인하대학교 초정밀생물분리기술연구센터 및 산업자원부의 차세대신기술개발사업 (A18-06-03)의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Gasson, J. C. (1991), Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *Blood* **77**, 1131-1145.
- Klingemann, H., R. D. Shepherd, C. J. Eaves, and A. C. Eaves (1991), The role of erythropoietin and other growth factors in transfusion medicine, *Transfus. Med. Rev.* **5**, 33-47.
- Lee, J.-H., N.-S. Kim, T.-H. Kwon, Y.-S. Jang, and M.-S. Yang (2002), Increased production of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) by the addition of stabilizing polymer in plant suspension cultures, *J. Biotechnol.* **30**, 768-773.
- Kwon, T.-H., Y.-M. Shin, Y.-S. Kim, Y.-S. Jang, and M.-S. Yang (2003), Secretory production of hGM-CSF with a high specific biological activity by transgenic plant cell suspension culture, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **8**: 135-141.
- Joshi, L. and L. C. Lopez (2005), Bioprospecting in plants for engineered proteins, *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 223-226.
- Ma, J. K.-C., R. Chikwamba, P. Sparrow, R. Fischer, R. Mahoney, and R. M. Twyman (2005), Plant-derived pharmaceutical - the road forward, *Trends Plant Sci.* **10**, 580-585.
- Gomord, V., P. Chamberlain, R. Jefferis, and L. Faye (2005), Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities, *Trends Biotechnol.* **23**, 559-565.
- Magnuson, N. S., P. M. Linzmaier, R. Reeves, G. An, K. HayGlass, 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.
- Lee, S.-Y., J.-M. Cho, and D.-I. Kim (2003), Stability enhancement of hGM-CSF in transgenic *Nicotiana tabacum* suspension cell cultures, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **8**: 187-191.
- Ryland, J. R., P. M. Michael, and J. M. Lee (2000), Effect of gelatin on the stability of heavy chain monoclonal antibody production from plant suspension cultures, *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 449-454.
- 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.
- Sharp, J. M. and P. M. Doran (2001), Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures, *Biotechnol. Prog.* **17**, 979-992.
- Park, S. Y., B. I. Lee, S. T. Jung, and H. J. Park (2001), Biopolymer composite films based on κ -carrageenan and chitosan, *Materials Res. Bull.* **36**, 511-519.
- Ertesvag, H. and S. Valla (1998), Biosynthesis and applications of alginates, *Polym. Degrad. Stabil.* **59**, 85-91.
- Parr, A. J., R. J. Robins, and M. J. C. Rhodes (1984), Permeabilization of *Cinchona ledgeriana* cells by dimethylsulfoxide, *Plant Cell Rep.* **3**, 262-265.
- Wahl, M. F., G. An, and J. M. Lee (1995), Effects of dimethylsulfoxide on heavy chain monoclonal antibody production from plant cell culture, *Biotechnol. Lett.* **17**, 463-468.
- Arakawa, T., S. J. Prestrelski, W. C. Kenny, and J. F. Carpenter (2001), Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins, *Adv. Drug Delivery Rev.* **46**, 307-326.
- Wang, W. (1999), Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals, *Int. J. Pharm.* **185**, 129-188.