

## 형질전환된 벼세포배양에서 green fluorescent protein (GFP) 생산

이 재 화\*

신라대학교 의생명과학대 제약공학과

Received January 9, 2007 / Accepted February 6, 2007

### Production of Green Fluorescent Protein (GFP) from Transgenic Rice Cell Suspension Culture.

Jae-Hwa Lee\*. Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical Life Science, Silla University, Kwabop-dong 1-1, Busan 617-736, Korea – Green fluorescent protein (GFP) is an attractive reporter for bioprocess monitoring. A fluorescence-based method was developed to quantify GFP levels in transgenic plants and protein extracts. In this study, GFP was produced and secreted from suspension cells derived from transgenic rice. The RAmy3E promoter placed before the GFP gene controlled by sugars such as sucrose. The effects of sucrose concentration on the secretion of GFP and total protein into the medium were investigated in batch suspension culture. It was possible, therefore, to induce the expression of the GFP by removing sucrose from the cultured media or by allowing the rice suspension cells to deplete sucrose catabolically. The dry cell weight (7.06 g/L) and GFP level were detected as highest at 12%, 3% sucrose after 20 day culture, respectively. However secreted GFP fluorescence at the other sucrose concentrations (6%, 12%, 18% and 24%) were a little amount in media.

**Key words** – Green fluorescent protein (GFP), protein secretion, rice cell, transgenic plant, plant suspension culture

## 서 론

식물체는 인류에게 유용한 식량원일 뿐만 아니라 의약품 등의 원료로도 널리 이용되고 있는 자원의 보고로 알려져 있다[3]. 현재 사용되고 있는 의약품의 많은 부분들이 식물에서 유래한 물질이며 현재까지 의약품 개발의 용도로 진행된 식물체는 30만종 중에서 5000여종에 지나지 않는다고 보고되어 있다[13]. 식물체를 대상으로 유용한 물질을 추출하여 상업화하는 연구는 환경적인 요인 및 여러 가지 제약이 따르는데 이러한 점을 극복하기 위한 대안으로 최근에 식물세포배양이 각광을 받고 있다.

식물세포를 이용하는 경우, 동물세포에 비해 저렴한 배지 가격, 용이한 scale-up 및 바이러스나 독소의 감염성에 대하여 안전성이 높다는 장점을 가지고 있다[4]. 또한, 식물세포배양배지는 간단한 이온과 합성시약만으로 배양이 가능하고, 식물세포를 통한 재조합 단백질도 생산이 가능하며, 이 경우 분리정제가 쉬운 장점도 지니고 있다[9]. 하지만 식물세포배양에서 생산된 단백질들은 세포벽과 세포외 배지의 환경 등 여러 가지 장애들로 인하여 완벽하게 분비되지 못하며, 생산수율이 낮은 점이 커다란 문제점으로 지적되고 있다[10].

이러한 낮은 생산성에 영향을 주는 원인으로는 첫째, 배지 내의 삼투압 변화로 분비를 유도했을 때 야기되는 세포의 생리학적 변화, 두 번째로 세포사멸과 세포파괴로 인한 배지내

의 단백질분해효소 (protease)의 유출에 따른 목적단백질의 분해가 주요한 원인으로 알려져 있다[18,20].

위와 같은 단점을 극복하고 생산수율을 높이기 위하여 현탁 배양시 특이적이고 강력한 promoter를 사용함으로써 세포배양에서 생산된 단백질의 분해를 억제하고 단백질의 안정성을 증가시켜 단백질의 안정성을 높이기 위한 연구들이 시도되어지고 있다[7,19]. 그에 대한 연구로는 벼세포에서 당 고갈을 시점으로 목적단백질의 유전자를 발현시키는  $\alpha$ -amylase gene 유래의 inducible promoter인 Amy3D를 이용하여 재조합  $\alpha$ -1-antitrypsin의 발현수준을 증가시킨 연구[19] 뿐만 아니라, 담배 세포에서 constitutive promoter를 이용하여 생산되던 hGM-CSF를 벼세포를 통하여 inducible promoter를 이용해 높은 수준으로 향상시킨 예도 보고되어 있다[15].

본 연구의 목적단백질인 green fluorescent protein (GFP)는 원래 발광 해파리 (*Aequorea victoria*)에 존재하는 단백질로서, GFP는 자외선을 받으면 녹색의 형광을 발하는 성질을 가지고 있어서 관찰이 용이하다는 장점으로 인해, 많은 연구분야에서 표지 유전자로 유전자 발현의 유무를 측정하는데 매우 유용하게 사용되고 있다[1,2,11,12,14]. 또한, GFP는 특별한 기질이나 조효소 및 효소의 사용 없이도 검출이 용이하며, 최대 장점으로는 살아있는 세포내에서의 실시간 검출이 가능한 특징을 가지고 있으며, 실험이 신속해진다는 여러 장점들을 가지고 있다[17].

본 연구에서는 inducible promoter인 RAmy3E가 장착된 형질전환된 벼세포를 세포주로 사용하여 GFP가 발현되도록 하였다. 이 RAmy3E promoter는 sugar의 고갈 조건에서 발

### \*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5748, Fax : +82-51-999-5636

E-mail : jhalee@silla.ac.kr

현되는 시스템으로[5], 이를 이용한 현탁 세포 배양시 sucrose의 농도가 GFP의 생산에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 본 연구에서 sucrose의 농도에 따른 세포의 성장양상, 분리정제 효율에 영향을 미칠 수 있는 요인으로 분비된 총 단백질량과 최종적으로 GFP의 생산량을 측정하였다. 본 연구는 향후 inducible promoter를 사용하여 고부가가치의 의약품 단백질을 생산하는 데 중요한 기초자료로 활용이 가능할 것으로 생각된다.

### 재료 및 방법

#### 형질전환된 세포의 현탁 배양

본 연구에서 사용한 세포주는 전북대학교에서 RAmy3E promoter에 의해서 GFP유전자의 발현이 조절되도록 벡터 (Fig. 1)를 사용하여 벼세포를 형질전환 하여 제작된 세포주를 분양 받아 사용하였다. 현탁배양 배지로는 2,4-D (2.0 mg/L), kinetin (0.2 mg/L), hygromycin B (5.0 mg/L)를 포함한 N6액체배지 (pH 5.7)를 사용하였고, 50 mL의 액체배지에 초기 세포로 생체중량 2.5 g을 접종하였다. 배양조건은 300 mL 삼각플라스크를 이용하여 25°C, 120 rpm에서 암배양 하였으며, 배양된 현탁 세포를 7일 간격으로 auto pipette를 이용하여 10 mL의 비율로 계대배양하였다.

#### 세포량 측정

세포의 성장을 측정하기 위해서 건조중량을 측정 하였으며, 그 방법은 300 mL 삼각플라스크에서 배양한 현탁 배양 세포를 Buchner funnel을 이용하여 거름종이 (ADVANTEC NO. 2, Qualitative)상에서 진공펌프로 시료의 배양액을 걸러내어 생체중량을 측정하였다. 생체중량을 측정한 세포를 옮겨 담아 60°C의 건조기에서 24시간 동안 건조시켜 건조중량 (DCW)을 측정하였다.

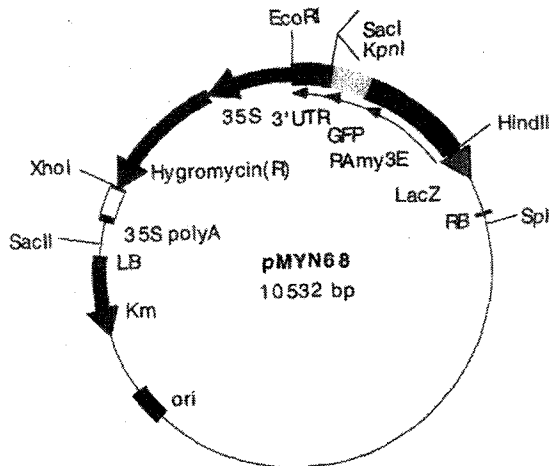


Fig. 1. Construction of pMYN68 used for rice transformation.

#### 총 단백질 측정

총 단백질의 측정은 Bradford assay kit (Bio-Rad, USA)을 사용하여 정량하였다. 표준물질로는 Bovine Serum Albumin (Sigma, St. Louis, USA)을 사용하여 spectrophotometer (Bio-Rad, USA)로 595 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 농도식을 구하여 이후 정량분석에 사용하였다[16]. 배양액을 측정하여 나온 흡광도를 X로 정의하였으며, X값을 이용하여 나온 총 단백질의 양을 Y로 정의하였다.

$$Y = 0.0201X - 0.0697, R^2 = 0.9966$$

#### GFP fluorescence 측정

보관된 배양액 시료를 1/2로 희석한 후 excitation wavelength (485 nm), emission wavelength (528 nm)에서 fluorescence spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. Fluorescence spectrophotometer system은 microplate multi-detection reader (BIO-TEK, USA)를 이용하여 측정하였다. 세포내의 fluorescence를 측정하기 위하여 세포를 생체중량 측정시 보관되었던 0.5 g의 현탁 세포를 5 mL의 buffer에 반응시킨 후 sonic dismembrator (Fisher Scientific Inc., USA)를 이용하여 세포벽을 파괴시켜 원심분리 (3,200×g, 5 min)한 후 상층액을 회수하여 얻은 시료를 사용하여 위와 같은 방법으로 fluorescence를 측정하였다. 이 때 사용된 buffer는 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8.0), 200 mM NaCl을 혼합한 buffer를 사용하였다[8].

### 결과 및 고찰

#### Sucrose 농도에 따른 식물세포의 성장

GFP 유전자가 도입된 형질전환 벼세포의 현탁 배양 세포를 50 mL의 N6액체배지에서 20일 동안 현탁 배양하여 배양 시간에 따른 현탁 세포의 건조중량 (DCW)과 수분함유 정도를 나타내는 지표인 cell size index (생체중량/건조중량)를 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. 세포 생산량은 sucrose 농도 3%인 경우 10일째에 건조중량이 2.78 g/L로 가장 높았고, sucrose 농도 6%에서는 15일째가 5.36 g/L로 가장 높았으며, 그 이후에는 건조 중량이 각각 감소하는 경향을 나타내었다. 다음으로 sucrose 농도가 6% 이상의 (12%, 18% 및 24%) 농도에서는 세포의 성장이 계속해서 증가하는 경향을 보이고 있으며, 20일 동안 현탁 배양한 결과에서 가장 높은 값은 20일째 sucrose농도 12%에서 7.06 g/L로 나타났다. 반면에 20일 이후부터는 sucrose 농도 18%를 제외한 12%와 24%에서는 오히려 감소하는 경향을 보였다. 그리고 가장 높은 농도인 sucrose 24%에서는 너무 많은 sucrose의 양이 오히려 세포의 성장에 저해를 일으킨 것으로 생각되어진다(Fig. 2A).

위의 결과를 살펴보면 sucrose 농도에 따른 식물세포의 성

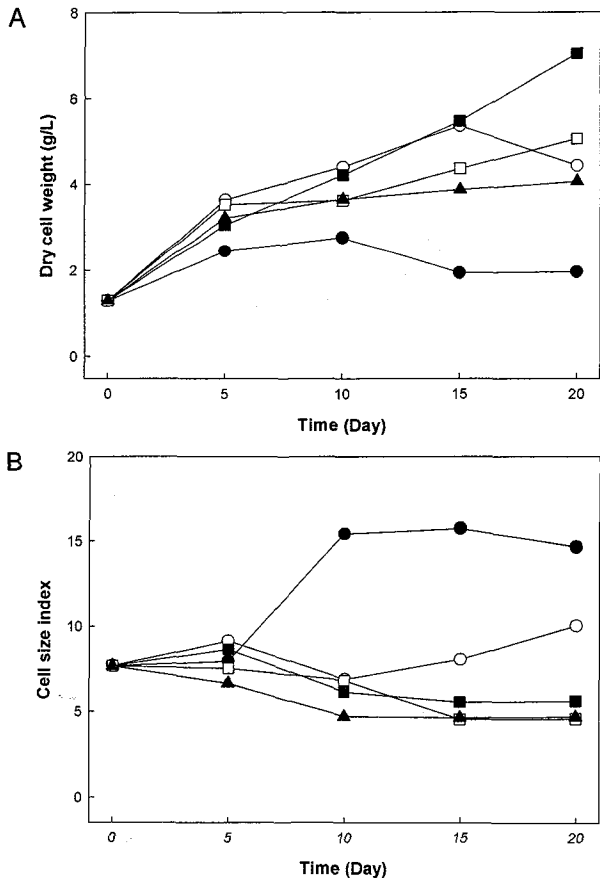


Fig. 2. Effects of sucrose concentrations on cell growth during suspension cultured in medium containing sucrose 3% (●), sucrose 6% (○), sucrose 12% (■), sucrose 18% (□), sucrose 24% (▲) respectively. Cell size index was calculated by dividing wet cell weight by dry cell weight. (A); Dry cell weight, (B); Cell size index (wet cell weight/dry cell weight).

장에 있어서 sucrose 농도가 12%일 때 가장 큰 영향을 미친 것을 알 수 있으며, 너무 많은 sucrose의 양은 세포의 생장에 있어서 좋지 않은 영향을 미친다는 것을 알 수 있다. 또한, 당의 농도가 높아질수록 cell size index가 뚜렷하게 낮아지는 경향을 나타내었는데 (Fig. 2B), 이러한 결과는 배지내의 당의 농도가 높아짐에 따른 삼투압의 증가와 삼투압 증가에 따른 생체중량의 감소에 의한 것으로 판단되며 삼투압의 증가에 따른 cell size index의 감소는 고농도의 식물세포배양을 가능하게 하여 생산성의 향상에 기여할 수 있다고 판단된다[6].

**GFP 생산에 미치는 sucrose 농도의 영향**

Sucrose 농도가 GFP 생산에 미치는 영향을 측정하기 위해 5 g의 세포를 5ml의 측정용 버퍼에 처리하여(재료 및 방법 참조) fluorescence를 측정하였다 (Fig. 3B, Fig. 4B). 먼저 Fig. 3A를 살펴보면 sucrose의 농도가 3%일 때 GFP 생산량은 세

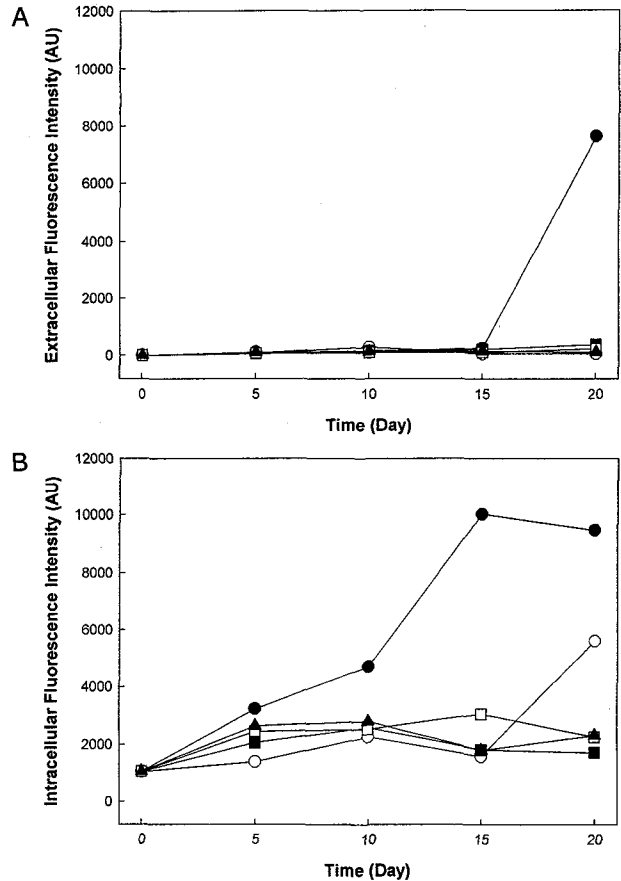


Fig. 3. Effects of sucrose concentrations on extracellular GFP and intracellular GFP during suspension cultured in medium containing sucrose 3% (●), sucrose 6% (○), sucrose 12% (■), sucrose 18% (□), sucrose 24% (▲) respectively. (A); Extracellular GFP, (B); Intracellular GFP.

포의 사멸기로 접어드는 10일째 이 후부터 그 양이 차츰 증가하다가 15일째 이 후 부터는 급격하게 증가하여 sucrose 농도 3%를 제외한 다른 농도와의 GFP생산량을 비교하기 어려웠다. 또한, 배지내로 분비된 단백질을 측정하였을 경우에도 sucrose 농도 3%일 때 가장 높은 값을 나타냈다. 이러한 결과로 미루어볼 때 GFP 생산량이 급격하게 증가한 것은 배지내의 sucrose가 에너지원 등으로 소모되어 15일 이 후로 사멸기에 접어든 세포의 파괴로 인해 세포내부의 단백질이 세포외로 분비된 결과에 의한 것으로 판단된다.

반면에 세포내부의 GFP 측정 실험에서는 sucrose 농도 3%에서 뿐만 아니라 다른 농도에서의 GFP생산량 차이를 확인할 수 있었다. Sucrose 농도 6%에서는 15일째 이후부터 GFP양이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 3B). 이러한 원인은 탄소원인 sucrose의 고갈에 따른 RAm3E promoter의 발현으로 인한 현상으로 보인다. 또한, sucrose 농도 3% 이상의 농도에서는 배지내의 탄소원의 고갈에 걸리는 시간이 sucrose 농도 3%보다 지연되므로, 배지내로 분비된 GFP량은

sucrose 농도가 높아질수록 그 값이 작다는 것을 알 수 있다. 따라서 본 연구에서는 20일 동안의 실험에서 관찰된 GFP의 분비량이 sucrose 농도 3%에서 가장 높게 나타났다. 앞의 결과를 확인하기 위하여 배지내로 분비된 GFP생산량의 차이를 낮은 sucrose 농도에서 보기 위하여 1%-5%의 농도에서 실험한 결과 sucrose 농도가 3% 이하에서는 확실히 보다 짧은 시간 내에 GFP가 생산되고 있는 것을 알 수 있다(Fig. 4).

위와 같은 결과를 토대로 세포가 성장하는데 있어서 sucrose 농도가 아주 적거나 혹은 지나치게 많으면 세포생장에 좋지 않은 영향을 끼치며, 식물세포배양을 이용하여 외래단백질을 생산하고자 할 때에는 sucrose의 적절한 농도가 매우 중요함을 알려주는 지표로 삼을 수 있는 것으로 생각되어진다. 또한, RAmy3E promoter의 높은 발현율을 이용하여 상업적으로 유용한 재조합 단백질을 발현시킴으로서 보다 높은 생산율과 가치를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

형광단백질 (green fluorescent protein, GFP)은 생물공정을 살피는데 지표 단백질로 유용하게 사용이 된다. 본 연구에서는 쌀세포에서 외래 단백질의 발현양상을 관찰하기 위해서, 표지 단백질로 GFP를 형질전환 후 이것에서 유도된 현탁 세포에서 GFP의 발현 양상을 관찰하였다. 형질전환시 GFP의 발현을 위한 프로모터로 RAmy3E를 사용하였으며 이것은 배양액 중에서 당이 고갈되었을 때 강력히 작동된다. 그래서 본 연구에서는 배양액 중에 다양한 슈크로스 농도로 쌀세포를 배양하여 세포의 성장양태 및 GFP의 발현양에 미치는 영향을 관찰한 결과 세포의 성장은 12%의 당농도에서 7.06g/L로 최적이었으며 GFP는 당을 가장 적게 사용한 3%에서 최적임을 알 수가 있었다. 이것은 세포의 성장과 GFP의

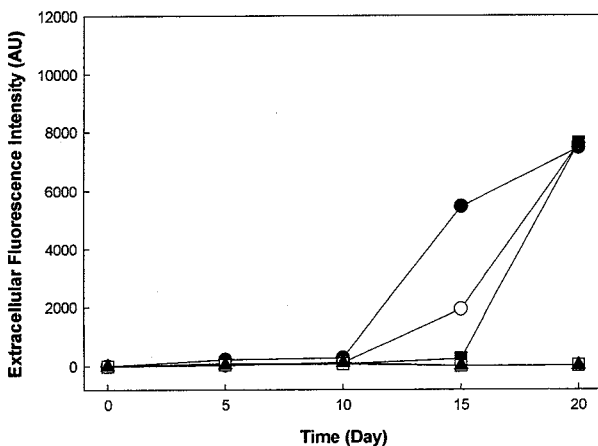


Fig. 4. Effects of sucrose concentrations on extracellular GFP during suspension cultured in medium containing sucrose 1% (●), sucrose 2% (○), sucrose 3% (■), sucrose 4% (□), sucrose 5% (▲) respectively.

생산에 사용된 당이 반대로 영향을 미침을 알 수가 있었으며 향후 최적의 대량배양을 위해서는 세포의 성장과 산물의 생산시기를 분리한 이단계 배양법이 필요함을 암시한다.

참 고 문 헌

1. Cha, H. J., C. F. Wu, J. J. Valdes, G. Rao and W. E. Bentley. 2000. Observations of green fluorescent protein as a fusion partner in genetically engineered *Escherichia coli*: Monitoring protein expression and solubility. *Biotechnol. Bioeng.* **67**, 565-574.
2. Cha, H. J., N. G. Dalal, M. Q. Pham, V. N. Vakharia and W. E. Bentley. 1999. Insect larval expression process is optimized by generating fusions with green fluorescent protein. *Biotechnol. Bioeng.* **65**, 316-324.
3. Choi, H. K., J. S. Son, G. H. Na, S. S. Hong, Y. S. Park and J. Y. Song. 2002. Mass production of Paclitaxel by plant cell culture. *Korean J Plant Biotechnol.* **29**, 59-62.
4. Doran, P. M. 2000. Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr. Opin. in Biotechnol.* **11**, 199-204.
5. Huang, N., J. Chandler, B. R. Thomas, N. Koizumi and R. L. Rodriguez. 1993. Metabolic regulation of alpha-amylase gene expression in transgenic cell cultures of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol. Biol.* **23**, 737-747.
6. Kim, S. M., I. S. Park, Y. Lee, G. W. Lee and D. I. Kim. 1998. Changes of plant cell size index by culture conditions, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **13**, 438-443.
7. 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.
8. Liu, S., R. C. Bugos, N. Dharmasiri and W. W. Su. 2001. Green fluorescent protein as a secretory reporter and a tool for process optimization in transgenic plant cell cultures. *J. Biotechnol.* **87**, 1-16.
9. Matsumoto, S., M. Ikura, M. Ueda and R. Sasaki. 1995. Characterization of a human glycoprotein (erythroprotein) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol. Biol.* **27**, 1163-1172.
10. Miele, L., 1997. Plants as bioreactors for biopharmaceuticals: regulatory considerations. *Trends Biotechnol.* **15**, 45-50.
11. Nakano, H., R. Okumura, C. Goto and T. Yamane. 2002. In vitro combinatorial mutagenesis of the 65<sup>th</sup> and 222<sup>nd</sup> positions of the green fluorescent protein of *Aequorea victoria*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **7**, 311-315.
12. Ohga, M., M. Ogura, M. Matsumura and P. C. Wang. 2002. Construction of glomerular epithelial cells expressing both immune tolerance and GFP genes and application to cell therapy by cell transplantation, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **7**, 303-310.
13. Payne, G., V. Bringi, C. Prince and M. Shuler. Suspension culture in plant cell and tissue culture in liquid systems, *Oxford University Press, New York* 146-176.
14. Richards, H. A., M. D. Halfhill, R. J. Millwood and C. N.

- Stewart. 2003. Quantitative GFP fluorescence as an indicator of recombinant protein synthesis in transgenic plants, *Plant Cell Rep.* **22**, 117-121.
15. Shin, Y. J., S. Y. Hong, T. H. Kwon, Y. S. Jang and M. S. Yang. 2003. High Level of expression of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulation factor in transgenic rice cell suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.* **82**, 778-783.
  16. Stoscheck, C. M. 1990. Quantitation of Protein, *Methods in Enzymology* **182**, 50-68.
  17. Subramanian, S. and F. Srienc. 1996. Quantitative analysis of transient gene expression in mammalian cells using the green fluorescent protein, *J. Biotechnol.* **49**, 137.
  18. Terashima, M., Y. Ejiri, N. Hashikawa and H. Yoshida. 2001. Utilization of a alternative carbon source for efficient production of human  $\alpha_1$ -antitrypsin by genetically engineered rice cell culture. *Biotechnol. Prog.* **17**, 403-406.
  19. 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  $\alpha_1$ -antitrypsin by plant cell culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 516-523.
  20. Yu, M., Y. C. Lee, S. C. Fang, M. T. Chan, S. F. Hwa and L. F. Liu. 1996. Sugars act as signal molecules and osmotica to regulate the expression of  $\alpha$ -amylase genes and metabolic activities in germinating cereal grains. *Plant Mol. Biol.* **30**, 1277-1289.