

Carbamoyl Phosphate Synthetase I이 요소회로 유전자를 발현하는 CHO 세포 주의 세포 성장과 재조합 Erythropoietin의 생산에 미치는 영향

조수미 · 김나영* · 김형진 · 김홍진#

중앙대학교 약학대학

*현주소 : 경기도 평택시 모곡동 439번지 (주) 아주약품

(Received April 3, 2007; Revised April 19, 2007)

Effects of Carbamoyl Phosphate Synthetase I against Cell Growth and Production of Recombinant Erythropoietin in Urea Cycle Enzyme Expressing CHO Cell Line

Su-Mi Cho, Na Young Kim*, Hyoung Jin Kim and Hong-Jin Kim#

College of Pharmacy, Chung-Ang University, 221 Huksuck-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-756, Korea

*Present address : Asia pharmaceuticals, 439 Mogok-dong, Pyeongtaek-si, Gyeonggi-do, Korea

Abstract — In the previous reports, we developed the CO5 by introducing genes for the first and second urea cycle enzymes, carbamoyl phosphate synthetase I (CPS I) and ornithine transcarbamoylase (OTC) into the IBE cell lines producing erythropoietin (EPO). The CO5 have been found out to have 15~20% higher cell growth rate and produce 2-times more EPO than the parental cell line, IBE. To investigate the role of CPS I in CO5 cell line for the cell growth and amount of EPO, we knock-downed CPS I gene expression via siRNA treatment. Expression level of EPO in cell lysate of CO5 was 3~5 fold higher than that of IBE. After siRNA treatment, the cell growth of CO5 was decreased 8~21% and the EPO productivity in the cell lysate was significantly decreased. However, these changes of the cell growth and EPO productivity were not observed in IBE. These results indicate that CPS I gene expression is important for the increased cell growth and EPO productivity of CO5 cell line.

Keywords □ erythropoietin, carbamoyl phosphate synthetase I, ornithine transcarbamoylase

Erythropoietin(EPO)는 당 단백질(Glycoprotein) 호르몬으로 항정상태(Steady-state) 동안에 적혈구 세포(Erythrocyte)의 생산을 조절하고 과다 출혈로 인한 적혈구 세포의 회복을 촉진하는 주요 인자로 치료 목적의 재조합 당 단백질 생산시장에 큰 비중을 차지하고 있다.¹⁻³⁾ 인간의 erythropoietin은 165개의 아미노산으로 구성되어 있고 당화된 상태의 분자량은 35~39 kDa 이다.⁴⁻⁶⁾

재조합 당 단백질의 동물세포 배양 시, 아미노산은 암모늄 이온과 carbon dioxide 등으로 대사되며 암모늄 이온은 단백질, 핵산 및 지질의 생산에 관여한다.⁷⁾ 배지 내에 일반적으로 높은 농도의 glutamine(2~5 mM) 을 포함하게 되는데, glutamine의 화학적 분해와 세포 대사로 인해 암모늄 이온이 축적되고, 이로 인해 세포 성장의 저해, 단백질 생산량 감소 및 당 쇄 구조의 변형

을 초래하게 된다.^{8,9)} 이러한 문제를 개선할 수 있는 생체 내 시스템으로 요소회로(Urea cycle)가 있는데, 요소회로는 아미노산 대사로 생산되는 암모니아의 제거를 가능케 한다. 요소회로에는 5가지 효소가 관여하는데, 첫 번째 효소인 carbamoyl phosphate synthetase I(CPS I)과 두 번째 효소인 ornithine transcarbamoylase(OTC)가 미토콘드리아 내에서 제시되며, 나머지 3가지 효소인 argininosuccinate synthetase, argininosuccinate lyase와 arginase가 세포 내에 관여한다.¹⁰⁾

우리의 지난 연구 중 Park *et al.*¹²⁾의 연구에서는 요소회로의 첫 번째 효소인 CPS I과 두 번째 효소인 OTC를 Chinese hamster ovary(CHO) cell에 형질전환 시킨 세포 주(OTC)를 개발하였고 그 결과 배지 내 암모늄 이온의 농도가 25~33% 감소되고, 세포성장률이 15~30% 증가 되는 것을 확인 하였다.¹¹⁾ Kim 등의¹³⁾ 연구에서는 EPO를 발현하는 CHO 세포 주(IBE)에 CPS I과 OTC 유전자를 형질전환 시킨 세포 주(CO5)를 개발하였고 CO5가 IBE에 비해 세포 성장률이 15~20% 증가되었고 배

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-820-5613 (팩스) 02-816-7338
(E-mail) hongjink@cau.ac.kr

지 내 EPO 양이 2배 증가된다는 것을 확인하였다.¹²⁾ 그러나 CPS I과 OTC가 세포 성장률과 EPO 생산에 직접적으로 어떠한 영향을 미치는지는 확인되지 않았다.

특정 유전자의 기능을 억제 할 수 있는 small interfering ribonucleic acid(siRNA)는 이중가닥의 21~25 nucleotide 크기의 작은 RNA조각으로 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 단백질 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다.¹³⁻¹⁵⁾ 본 연구에서는 Park *et al.*¹¹⁾과 Kim *et al.*¹²⁾의 연구에 이어서 IBE와 CO5의 세포 내 EPO 양을 조사하였고 CO5 세포 주에 도입된 CPS I과 OTC 유전자중 요소 회로의 첫 번째 효소인 CPS I에 대한 siRNA를 transfection하여 CPS I의 발현 억제에 따른 세포 성장률과 세포 내 EPO 발현의 변화를 확인하였다.

실험 방법

세포 주

세포 성장률과 EPO 생산률을 확인하기 위해 IBE와 CO5 세포 주는 Kim *et al.*¹²⁾의 연구와 같은 방법으로 준비되었다. IBE 세포 주는 *DHFR*-deficient CHO 세포 주에 human EPO와 *DHFR* 유전자를 형질전환 시켰고 EPO 증폭을 위해 10^{-6} M methotrexete (MTX)로 선별하였다. CO5 세포 주는 IBE세포 주에 CPS I과 OTC 유전자를 형질전환 시켰다.

IBE와 CO5 세포 내 EPO 발현 양 측정

60 mm에 1.5×10^5 cells/ml의 IBE와 CO5를 5 ml씩 seeding 한 후 minimum essential alpha medium(Gibco BRL, USA)에 10% fetal bovine serum(Gibco BRL, USA), 1% penicillin-streptomycin(Gibco BRL), 1 mM carbamylglutamate(Sigma, USA), 5 mM L-orbitine(Sigma)과 1 M MTX가 함유된 배지로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였고¹²⁾ 배지 교환 없이 1, 2, 3, 4, 5 및 6일차까지 배양된 세포는 PBS로 2회 세척한 후 세포 내 EPO 양을 아래 기술된 Western blotting 방법으로 확인하였다.

siRNA를 이용한 CPS I의 발현 억제

CPS I에 대한 siRNA(CPS1-1)는 5'-CTCCAAGAGTCTGTT-CCACTA-3'을 target sequence로 하여 sense sequence 5'-CCAAGAGUCUGUCCACUA-3'와 antisense sequence 5'-UAGUGGAACAGACUCUUGG-3'로 제작되었고 대조 군으로 gene silencing 효과가 없다고 알려져 있는 control siRNA가 sense sequence 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3'와 antisense sequence 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAA-3'로 제작되었다 (Qiagen, USA).

CO5 세포 주에서 CPS I이 세포 성장과 세포 내 EPO에 미치는 영향을 확인하기 위해 대조 군으로 IBE 세포주가 사용되었

고 CPS1-1을 transfection한 군은 배양 배지만 첨가한 군(media), transfection reagent를 첨가한 군(reagent), control siRNA를 transfection한 군(control)과 비교하였다. IBE와 CO5 세포 주는 six-well plate에 2.5×10^5 cells/well로 seeding한 후 24시간 동안 배양하였고 hiperfect transfection reagent(Qiagen)를 사용하여 control siRNA와 CPS1-1을 manuscript instruction에 따라 transfection하였다. 24, 48, 72시간 후의 세포수의 변화는 hemocytometer를 사용하여 측정하였고 세포 내 EPO 양의 변화는 48시간 배양 후 아래 기술된 Western blotting 방법을 통해 확인되었다.

Western blotting

Quick freezing 방법을 사용하여 cell을 lysis 하였고 total protein을 Bradford 법으로 정량 하였다. 동일 양의 sample은 Laemmli¹⁶⁾의 방법에 따라 12.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel(SDS-PAGE)상에서 전개된 후 PVDF membrane에 transfer 되었다. 0.5% skim milk와 0.1% tween 20 이 함유된 20 mM Tris-buffer에서 16시간 동안 blocking한 후 EPO를 확인하기 위해 1차 항체로 anti-human EPO polyclonal rabbit IgG(R&D Systems, USA)를 사용하였고 2차 항체로 HRP-conjugated anti-rabbit IgG(R&D Systems)를 사용하였으며 ECL chemilumine-scence solution(Santa Cruz, USA)을 기질로 효소반응을 일으켜 X-ray film상에서 EPO를 확인하였다. IBE와 CO5 내 EPO의 양은 Kim *et al.*¹⁷⁾의 방법에 따라 Scion image software(Scion Corporation, USA)를 사용하여 분석하였다.

실험 결과

IBE와 CO5 세포 내 EPO 발현 양 비교

IBE와 CO5 세포 내 EPO 양을 western blotting으로 확인한 결과 Fig. 1의 결과에서 보는 것처럼 IBE는 1일과 2일차에 세포 내 EPO 양이 가장 많게 나타났고 3일차부터 그 양이 줄어 드는 것이 확인되었다. 4일차부터는 EPO가 가지는 35 kDa의 분자량 보다 낮은 분자량을 나타내어 세포 내에서 붕괴되는 것이 확인

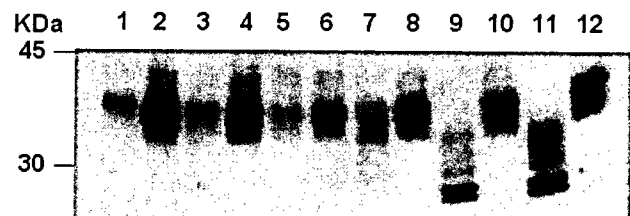


Fig. 1 - Western blot analysis of EPO in IBE and CO5 cell lysates. Lane 1, 3, 5, 7, 9 and 11 are cell lysates of IBE at 1, 2, 3, 4, 5 and 6 days, respectively. Lane 2, 4, 6, 8, 10 and 12 are cell lysates of CO5 at 1, 2, 3, 4, 5 and 6 days, respectively.

되었고 5일과 6일차에는 30 kDa 미만의 분자량을 나타내어 세포 내 EPO가 모두 붕괴된 것이 확인되었다(Fig. 1). CO5는 IBE와 마찬가지로 1일과 2일차에 세포 내 EPO 양이 가장 많았으며 3일차부터 줄어 드는 것이 확인되었다(Fig. 1). Scion image를 통한 densitometric assay 결과 CO5 내 EPO 양은 IBE에 비해 1일차에 5배 2일과 3일차에는 3배가 많음이 확인되었고 IBE와 달리 5일과 6일차에도 세포 내에서 안정적으로 EPO가 유지됨을 확인하였다(Fig. 1). 이 결과로서 CO5가 IBE보다 3~5배 많은 세포 내 EPO를 가진다는 것이 확인되었고 세포 내 EPO를 더 안정적으로 유지할 수 있는 조건을 가짐이 확인되었다.

CPS I의 억제에 따른 세포성장 변화

CO5의 CPS I 억제에 따른 세포성장의 변화를 확인하기 위해 media, reagent, 및 control 군과 비교하였고 이를 대조군인 IBE와 비교하였다. Fig. 2에서 보는 것처럼 CO5는 48시간과 72시간 배양 후 세포성장률이 IBE에 비해 40% 높게 나타났고 reagent와 control 처리 군은 IBE와 CO5에서 media 처리 군에 비해 세포 성장이 약 10% 감소 하였다(Fig. 2). 이는 transfection reagent가 가지는 독성 때문인 것으로 생각된다.¹⁸⁾ IBE는 control 군과 CPS1-1 처리 군이 비슷한 세포성장률을 보인 반면 (Fig. 2A), CO5의 CPS1-1 처리 군은 control에 비해 24시간 배양 후 8%, 48시간 배양 후 21%, 72시간 배양 후 10%의 세포 성장률 감소를 보였다(Fig. 2B). 이는 IBE와 달리 CO5에 CPS1-1이 특이적으로 반응한다는 것을 의미하고 CPS I 억제에 의해 세포성장률이 감소한다는 것을 의미한다. 이 결과로서 CO5 세포의 성장률에 CPS I이 중요한 역할을 한다는 것이 확인되었다.

CPS I의 억제에 따른 세포 내 EPO양의 변화

CPS I의 억제에 따른 세포 내 EPO 양의 변화를 확인하기 위

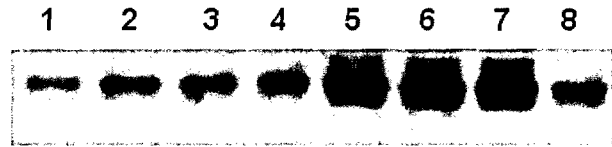


Fig. 3 - Western blot analysis of EPO according to each treatment in IBE and CO5 cell lysates. IBE and CO5 cells were harvested at 48 hour post by each treatments. Lane 1, 2, 3 and 4 are cell lysates of IBE treating with media, transfection reagent, control siRNA and CPS1-1, respectively. Lane 5, 6, 7 and 8 are cell lysates of CO5 treating with media, transfection reagent, control siRNA and CPS1-1, respectively. CPS1-1 indicates siRNA against CPS I.

해 IBE와 CO5에 media, reagent, control 및 CPS1-1을 처리하였고 48시간 후 세포 내 EPO 양을 확인하였다. Fig. 3에서 보는 것처럼 IBE에 media, reagent, control 및 CPS1-1을 처리한 군에서는 EPO 양의 변화가 일어나지 않았지만 CO5의 CPS1-1 처리군에서는 media, reagent 및 control 군에 비해 세포 내 EPO가 감소하여 CPS I의 발현 억제가 세포 내 EPO 양을 감소시킨다는 것이 확인되었다(Fig. 3). 이 결과로서 CO5 내 CPS I이 EPO생산 증가에 매우 중요한 요소로 작용한다는 것이 확인되었다.

고 찰

우리는 지난 연구를 통해 요소회로의 첫 번째 두 번째 효소인 CPS I과 OTC를 CHO세포에 형질전환 시켰고 그 결과 세포 성장률이 증가되고 재조합 EPO의 생산이 증가된다는 결과를 얻었다.^{11,12)} 그러나 EPO는 배양 배지 내에서 측정되었고 세포 내에 남아 있는 EPO 양은 측정되지 않았다.¹²⁾ 또한 각각의 요소회로 유전자가 세포성장과 EPO 발현에 어떠한 영향을 미치는지는 밝

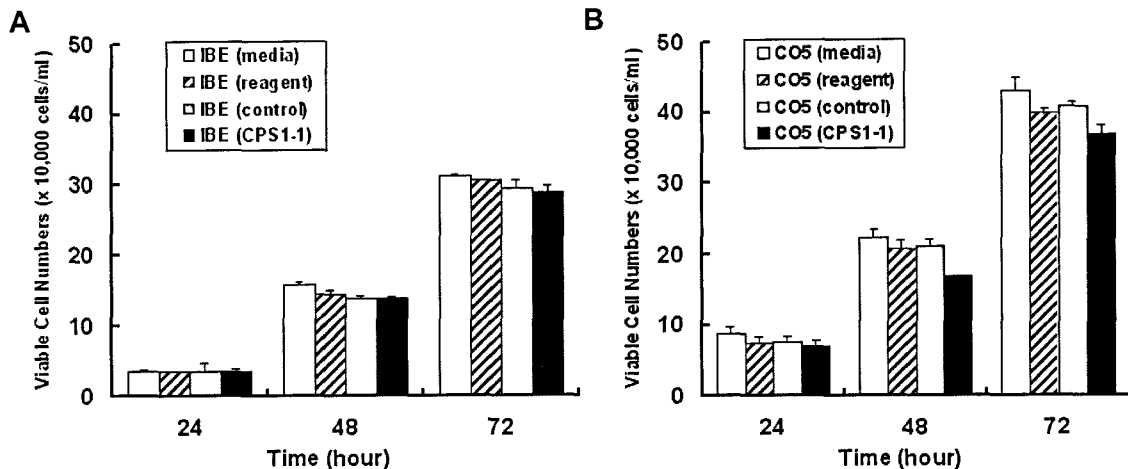


Fig. 2 - Viable cell numbers according to each treatment in IBE and CO5 cells. A: IBE, B: CO5. Each treatment described in the materials and methods. Values are mean±SD of duplicate cultures.

혀지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 IBE와 CO5 세포 내 EPO 양을 1일차부터 6일차까지 측정하였고 siRNA를 이용하여 CO5 내 요소회로 유전자 중 CPS I의 발현을 억제하여 그에 따른 세포 성장률과 세포 내 EPO 양의 변화를 분석하였다. IBE와 CO5 세포 내 EPO 양을 분석한 결과 CO5가 IBE에 비해 3~5배 많은 EPO가 존재한다는 결과를 확인하였다(Fig. 1). 이는 Kim *et al.*¹²⁾의 연구에서 배양 배지 내 존재하는 CO5의 EPO 양이 IBE 보다 2배 많게 나타난 결과 보다 더 많은 차이를 보인다. 따라서 CO5의 세포 내와 배양 배지 내 EPO를 고려한 총 EPO 생산량은 IBE와 많은 차이를 보일 것으로 예상된다. 이러한 결과로 볼 때 CO5는 많은 양의 EPO를 생산할 수 있지만 EPO를 배지 내로 분비하는 데는 한계가 있는 것으로 생각된다. CO5 내 CPS I를 CPS1-1로 억제한 결과 세포 성장률이 8~21%의 감소를 보였다(Fig. 2). 이는 CPS I이 CO5의 성장률 증가에 관여한다는 것을 의미한다. 그러나 CPS I의 억제에 따른 성장률의 감소가 IBE의 성장률 수준으로 감소하지 못한 것은 OTC에 대한 억제가 이루어지지 않았기 때문인 것으로 생각된다. CPS I 억제에 따른 세포성장률의 결과와 달리, CPS I의 발현 억제 시 CO5 세포 내 EPO 양은 IBE와 비슷한 수준으로 감소하여 세포 성장률과 차별되는 결과를 보였다(Fig. 3). 이는 CPS I이 EPO 생산 증가에 매우 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다.

동물세포를 이용한 치료목적의 당 단백질 생산은 우수한 생물학적 활성과 생체 내 안정성을 가지는 당 단백질의 생산을 가능케 하지만 생산 효율과 비용 면에서 많은 단점을 가지고 있다.^{19,20)} 이번 연구를 통한 CHO 세포 주에서 CPS I의 역할에 관한 결과는 이러한 동물세포 발현 시스템의 단점을 보완하는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 예상된다. 앞으로의 연구에서는 CO5 내 EPO가 세포 밖으로 분비되는 메커니즘과 OTC의 역할에 관한 자세한 연구가 이루어져야 할 것이다.

문 헌

- Jelkmann, W. : Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol. Rev.* **72**, 449 (1992).
- Krantz, S. B. : Erythropoietin. *Blood* **77**, 419 (1991).
- Nissenson, A. R. : Erythropoietin overview--1993. *Blood Purif.* **12**, 6 (1994).
- Yamaguchi, K., Akai, K., Kawanishi, G., Ueda, M., Masuda, S. and Sasaki, R. : Effects of site-directed removal of N-glycosylation sites in human erythropoietin on its production and biological properties. *J. Biol. Chem.* **266**, 20434 (1991).
- Cointe, D., Beliard, R., Jorieux, S., Leroy, Y., Glacet, A., Verbert, A., Bourel, D. and Chirat, F. : Unusual N-glycosylation of a recombinant human erythropoietin expressed in a human lymphoblastoid cell line does not alter its biological properties. *Glycobiology* **10**, 511 (2000).
- Lai, P. H., Everett, R., Wang, F. F., Arakawa, T. and Goldwasser, E. : Structural characterization of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* **261**, 3116 (1986).
- Andersen, D. C. and Goochee, C. F. : The effect of ammonia on the O-linked glycosylation of granulocyte-colony-stimulating factor produced by chinese-hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* **47**, 96 (1995).
- Butler, M., Imamura, T., Thomas, J. and Thilly, W. G. : High yields from microcarrier cultures by medium perfusion. *J. Cell Sci.* **61**, 351 (1983).
- Borys, M. C., Linzer, D. I. H. and Papoutsakis, E. T. : Ammonia affects the glycosylation patterns of recombinant mouse placental lactogen-1 by chinese-hamster ovary cells in a Ph-dependent manner. *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 505 (1994).
- Wraith, J. E. : Ornithine carbamoyltransferase deficiency. *Arch. Dis. Child.* **84**, 84 (2001).
- Park, H., Kim, I. H., Kim, I. Y., Kim, K. H. and Kim, H. J. : Expression of carbamoyl phosphate synthetase I and ornithine transcarbamoylase genes in Chinese hamster ovary dhfr-cells decreases accumulation of ammonium ion in culture media. *J. Biotechnol.* **81**, 129 (2000).
- Kim, N., Lee, Y., Kim, H., Choi, J., Kim, J., Chang, K. H., Kim, J. H. and Kim, H. J. : Enhancement of erythropoietin production from Chinese hamster ovary (CHO) cells by introduction of the urea cycle enzymes, carbamoyl phosphate synthetase I and ornithine transcarbamylase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 844 (2004).
- Caplen, N. J. and Mousses, S. : Short interfering RNA (siRNA)-mediated RNA interference (RNAi) in human cells. *Therapeutic Oligonucleotides.* **1002**, 56 (2003).
- Hammond, S. M., Caudy, A. A. and Hannon, G. J. : Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 110 (2001).
- Kurreck, J. : Antisense technologies - Improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1628 (2003).
- Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* **227**, 680 (1970).
- Kim, H. J. and Kim, H. J. : Glycosylation variant analysis of recombinant human tissue plasminogen activator produced in urea-cycle-enzyme-expressing Chinese hamster ovary (CHO) cell line. *J. Biosci. Bioeng.* **102**, 447 (2006).
- Leng, Q., Scaria, P., Zhu, J., Ambulos, N., Campbell, P. and Mixson, A. J. : Highly branched HK peptides are effective carriers of siRNA. *J. Gene Med.* **7**, 977 (2005).

- 19) Chen, M., Liu, X., Wang, Z., Song, J., Qi, Q. and Wang, P. G. :
Modification of plant N-glycans processing: the future of
producing therapeutic protein by transgenic plants. *Med. Res.
Rev.* **25**, 343 (2005).
- 20) Lee, S. J., Park, C. I., Park, M. Y., Jung, H. S., Ryu, W. S., Lim,
S. M., Tan, H. K., Kwon, T. H., Yang, M. S. and Kim, D. I. :
Production and characterization of human CTLA4Ig expressed
in transgenic rice cell suspension cultures. *Protein Expr. Purif.*
51, 293 (2007).