

형질전환 벼 현탁세포를 이용한 hCTLA4Ig 생산에서 proline과 gelatin이 미치는 영향

송미나 · 전수환 · 권준영 · 최성훈 · 김동일*

인하대학교 공과대학 생물공학과

Effects of Proline and Gelatin on hCTLA4Ig Production in Transgenic Rice Suspension Cells

Mi-Na Song, Su-Hwan Cheon, Jun-Young Kwon, Sung-Hun Choi, and Dong-Il Kim*

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

Abstract Rice cells were transformed to express human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-immunoglobulin (hCTLA4Ig) using RAmy3D promoter. hCTLA4Ig was produced and secreted into culture media inducibly when sugar was depleted. The obstacles of this system are the cell death and release of proteases by sugar starvation. These problems resulted in the losses of stability and productivity of hCTLA4Ig. Therefore, the effects of proline as an inhibitor of cell death were investigated. When 4 mM proline was added in sugar-free media, the cell death and release of proteases were reduced. As a consequence, the production of hCTLA4Ig was enhanced. In addition, the effects of protein stabilizers such as gelling agents were studied. It was found that the application of 0.01 g/L gelatin led to an increase in hCTLA4Ig production. This increase might be originated from the stabilization of hCTLA4Ig. In conclusion, the production of hCTLA4Ig could be enhanced by the additions of proline and gelatin in transgenic rice cell cultures.

Keywords: Gelatin, hCTLA4Ig, proline, RAmy3D promoter, transgenic rice cell cultures

서 론

Plant-made pharmaceuticals (PMPs)는 식물을 이용하여 생산되는 치료용 단백질을 일컫으며, human growth hormone fusion protein, interferon, monoclonal antibody, human serum albumin 등의 식물을 이용한 발현이 보고되었다. 식물세포 배양을 통한 치료용 단백질의 생산은 post-translational modification (PTM)이 가능하고 분리·정제가 쉬우며 대규모 생산이 용이하다는 장점을 보유하고 있다(1). 이러한 형질전환된 식물세포를 이용한 치료용 단백질의 안정되고 정확한 발현을 위하여 promoter는 중요한 요소이며, promoter에 의해 목적 단백질의 발현수준이 조절된다. RAmy3D promoter는 벼의 종자 발아시 종자에 저장

되어 있는 녹말을 분해하기 위하여 발현되는 α -amylase gene family 중 하나이며, Yu 등(2)과 Mitsunaga 등(3)은 α -amylase gene의 발현수준이 호르몬이나 당 고갈에 의해 조절되는 것을 확인하였다. 이렇듯 환경조건에 의해 조절이 가능한 inducible promoter인 RAmy3D promoter는 총 11,519 bp로 이루어진 발현벡터 pMYN409에 hCTLA4Ig 유전자와 함께 삽입되어 재조합됨으로써 그 발현의 증가가 보고되었다(4). 본 연구에서는 형질전환된 벼 현탁세포를 이용한 hCTLA4Ig 생산시 당이 제거되었을 때 발현되기 시작하는 RAmy3D promoter를 사용한 고발현 유전자 시스템을 선택하였다.

Human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-immunoglobulin (hCTLA4Ig)은 T세포에 의한 면역반응에 관여하는 CTLA-4 (CD152)와 human IgG의 Fc 부분을 융합한 단백질이다. 그 결과, dimeric hCTLA4Ig를 형성하여 생체내에서의 반감기가 연장되었으며 또한 affinity chromatography에 의한 효과적인 정제가 가능하게 되었다(5). 면역반응 유발에

*Corresponding author

Tel: +82-32-860-7515, Fax: +82-32-872-4046

e-mail: kimdi@inha.ac.kr

있어서 중요한 T세포의 co-stimulatory signal은 T세포 표면의 CD28이나 CTLA-4와 antigen presenting cells (APCs) 표면의 B7 수용체 (CD80 및 CD86)간의 결합이다. 이때, CTLA-4는 CD28과 반대로 T세포의 활성을 억제하거나 감소시키는 신호를 전달하는 역할을 하며, B7 수용체와 약 20~50배 높은 친화력을 보인다(Fig. 1). 따라서 hCTLA4Ig는 T세포 특이적 면역억제 반응을 유도하여 면역억제제 역할을 한다(6). 2005년 12월 Bristol-Myers Squibb (BMS)사의 hCTLA4Ig는 자가면역질환의 일종인 류마티스 관절염 치료제로서 미국 FDA (USA Food and Drug Administration)에서 승인을 받아 Orenicia® (abatacept)라는 상품명으로 판매되고 있으며, 2008년 2분기에는 그 매출액이 1,500억 원에 이르렀다.

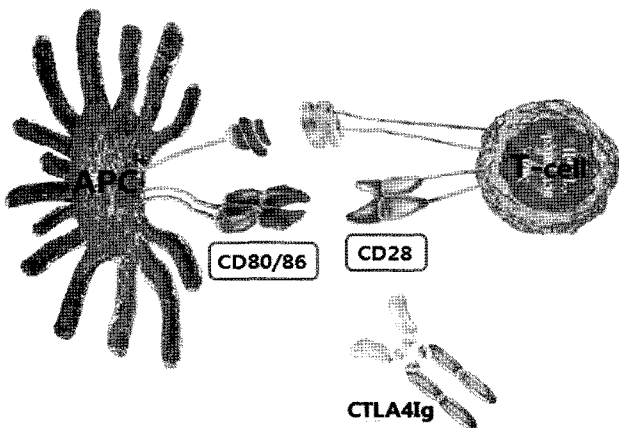


Fig. 1. Mechanism of hCTLA4Ig as a co-stimulation blocker on T cell-mediated immunity.

본 연구에서와 같이 식물세포 배양을 이용한 치료용 단백질 생산의 경우, 세포 밖으로 분비된 목적 단백질은 여러 가지 기작에 의해 그 안정성이 낮아져 생산성에 커다란 영향을 미친다. 이런 단백질의 안정성에 영향을 미치는 요인으로는 발현되어 배지로 분비된 단백질 자체의 구조적 특징에 의한 불안정성이나 응집에 의한 불안정성이 있으며, 특히 배지내의 protease에 의한 목적 단백질의 분해는 생산성에 가장 큰 영향을 미치게 된다(7). RAmy3D promoter와 RAmy1A signal peptide를 이용한 형질전환된 벼 세포의 경우, 당 고갈시에 목적 단백질의 발현이 강하게 이루어지며 세포 밖의 배지로 분비된다. 하지만 이 시스템의 단점은 당 고갈에 의해 생산이 유도되기 때문에 적절한 탄소원이 없는 상태에서 목적 단백질을 합성하게 된다는 점이다. 이러한 생산조건은 세포의 생존도 감소 및 사멸, 이로 인한 배지내로의 protease 분비 증가를 유발하여 목적 단백질의 안정성 저해와 궁극적으로는 생산성 저해를 일으킨다. 따라서 목적 단백질 안정성의 증진을 통하여 활성이 높은 완전한 생산을 유도하는 것이 필요하다. 이를 위하여, 배지의 환경조건을 조절하거나 안정제 역할을 하는 gelatin과 같은 몇몇 gelling agent들을 첨가하여 목적 단백질의

생산성을 높이는 연구가 진행되고 있다(8). 또한 protease inhibitor를 이용하여 protease 활성을 낮춤으로써 목적 단백질의 생산성을 높이는 연구도 보고되고 있다(9). 하지만 이러한 안정제와 protease inhibitor가 목적 단백질의 안정성에 미치는 영향에 대한 정확한 기작을 알지 못하고, 항상 효과를 보이지는 못하고 있다. 따라서 목적 단백질 생산에 있어 보다 효과적인 첨가물질을 찾고 그 기작을 규명하기 위한 많은 연구들이 수행되어야 할 것이다.

본 연구에서는 형질전환 벼 세포배양을 이용한 hCTLA4Ig 생산에 있어서 세포의 생존도를 증진시켜 protease에 의한 단백질 분해를 낮춰줄 것으로 생각되는 첨가제인 proline과 단백질 안정제로 알려져 있는 gelatin을 첨가함으로써 hCTLA4Ig의 생산을 증대시키고자 하였다.

재료 및 방법

세포배양

본 연구에 사용된 세포주는 보령제약으로부터 분양받은 hCTLA4Ig를 생산하도록 형질전환된 벼 (*Oryza sativa* L. cv. Dongjin) 현탁세포이다. 이 세포주는 벼의 α -amylase gene family인 RAmy3D inducible promoter를 포함하여 유전자 재조합되었고, 이 promoter는 당 고갈시에 목적 단백질을 생산한다(Fig. 2). 형질전환된 벼 현탁세포를 유지하기 위한 성장배지로 아미노산 (amino acid, AA) 기본배지를 사용하였다(10). 탄소원으로는 30 g/L sucrose, 생장 조절제로는 2.0 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)와 0.2 mg/L kinetin, 0.1 mg/L gibberellin (GA₃)을 첨가하였다. 배지 pH는 5.8로 조절하였고, 500 mL Erlenmeyer flask에 분주한 후 가압증기 멸균하여 사용하였다. 계대배양은 28°C, 120 rpm, 암조건이 유지되는 shaking incubator에서 9일 간격으로 실시하였다.

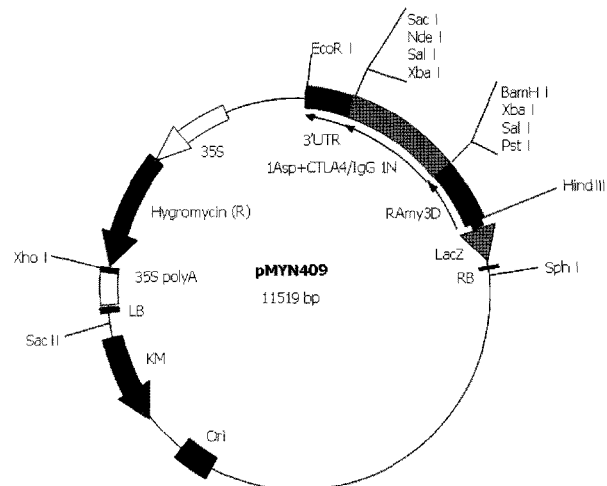


Fig. 2. The plant expression vector containing hCTLA4Ig gene.

목적 단백질의 induction을 위한 생산배지로는 sucrose가 첨가되지 않은 AA배지를 사용하였으며, 위와 동일한 배양조건에서 실험을 수행하였다.

세포량 측정

세포의 성장을 확인하기 위해서 세포생체량 (fresh cell weight, FCW)과 세포건체량 (dry cell weight, DCW)을 측정하였다. 100 mL Erlenmeyer flask에서 배양한 현탁세포를 Buchner funnel을 이용하여 Whatman No. 1 여과지상에서 시료의 배양액과 분리하였다. 배지와 동량의 증류수로 2~3회 세척한 후, 진공펌프를 이용하여 수분을 제거하고 미리 무게를 측정된 weighing dish에 세포를 옮겨 담아 FCW를 측정하였다. FCW 측정 후, 60°C의 dry oven에서 48시간 동안 항량이 될 때까지 건조하여 DCW를 측정하였다.

Cell viability 측정

세포의 생존도 측정을 위해서는 TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 환원법을 사용하여 상대적인 값을 계산하였다. FCW 0.1 g의 세포를 microtube에 담아 1.5% TTC 용액 1.6 mL을 첨가하여 20°C에서 24시간 반응시켰다. 그 후, TTC 용액을 제거하고 95% ethanol을 1 mL 첨가하여 60°C에서 30분 동안 반응시킨 뒤 세포내에 생성된 red formazan을 추출하였다. 15,000 rpm에서 원심분리한 후, 상등액을 spectrophotometer (Agilent 8435)를 이용하여 485 nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank로는 95% ethanol을 사용하였다.

Protease 활성 측정

세포가 생산기에 hCTLA4Ig를 생산함과 동시에 protease도 분비하므로 배지로 분비된 hCTLA4Ig의 안정성과 생산성에 큰 영향을 미친다. 이러한 protease의 영향을 알아보기 위하여 modified Anson's method를 사용하여 protease 활성을 측정하였다(11). 0.5 mL의 1% Na-caseinate (67 mM phosphate buffer, pH 7.0) 용액에 배지 sample 0.5 mL을 첨가하여 50°C에서 20분간 반응시켰다. 그 후 30% TCA (trichloroacetic acid) 용액 0.3 mL을 첨가하여 50°C에서 30분간 정지시킨 후 반응을 종료하였다. 15,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액을 취하여 파장 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 tyrosine 용액을 0~4 mg/mL 농도로 달리하여 사용하였고, blank는 증류수로 하였다. 단위 1 U (unit)은 같은 조건에서 분당 tyrosine 1 mg이 생산되는 효소의 양으로 정의하였다.

hCTLA4Ig 정량분석

hCTLA4Ig의 정량은 goat anti-human IgG (Fc) antibody

(KPL)와 peroxidase-labeled goat anti-human IgG antibody (KPL)를 각각 first antibody 및 second antibody로 사용하여 sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 수행하였고, ABTS peroxidase substrate (KPL)로 발색하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 ImmunoPure® human IgG (Pierce)를 사용하였다.

hCTLA4Ig 정성분석

hCTLA4Ig의 정성분석을 위하여 SDS-PAGE와 Western blot analysis를 수행하였다. 생산이 종료된 배양액의 단백질을 10% acrylamide gel로 분리한 후, PVDF membrane (Invitrogen)으로 이동시켜 5% skim milk로 1시간 동안 blocking 하였다. Goat anti-human IgG (Fc) antibody (KPL)로 hCTLA4Ig를 capture하고 peroxidase-labeled rabbit anti-goat IgG antibody (KPL)를 secondary antibody로 하여 반응시켰다. TMB membrane peroxidase substrate (KPL)를 첨가하여 membrane 상에서 단백질 band가 충분히 발색되도록 하였고, 3차 증류수로 세척하여 반응을 종결하였다. 이 때 분자량 marker로는 MagicMark™ standard (Invitrogen)를 사용하였다.

결과 및 고찰

세포 사멸과 protease 분비

형질전환된 벼 현탁세포의 hCTLA4Ig 생산에 inducible promoter인 RAmy3D promoter를 이용함으로써, 그 발현이 강하게 진행되며 세포 밖의 배지로 분비되는 것을 확인하였다. 하지만 이 시스템의 문제점은 당 고갈시에 목적 단백질의 발현이 유도되기 때문에 적절한 탄소원이 없는 상태에서 단백질을 합성하게 된다는 점이다. 세포 배양시 배지에 첨가되는 당류인 sucrose, glucose, fructose 등은 세포의 성장 및 유지에 반드시 필요한 탄소원을 제공하고, 이것은 세포내 해당과정과 TCA cycle 등의 대사 경로를 거쳐 에너지를 공급하게 된다. 에너지원이 없는 상태에서의 세포 배양은 급격한 viability의 저하와 세포 사멸을 가져오며 이로 인하여 단백질 합성은 계속 이루어질 수 없게 된다. 또한 이렇게 여러 스트레스에 의한 세포 사멸이 세포내의 protease와 밀접한 관련이 있음이 보고되었다(12).

이를 확인하고자 hCTLA4Ig의 생산단계에서 relative viability와 protease 활성과의 상관관계에 대한 연구를 수행하였다. 그 결과, 배양 6일째의 viability는 20% 이하로 저하되었으며, 이때의 protease 활성은 80 U/mL까지 증가됨을 확인하였다(Fig. 3). 이는 당 고갈이라는 생산조건이 세포의 viability 감소 및 사멸을 일으키며, 이로 인한 배지 내로의 protease 분비가 증가됨을 의미한다.

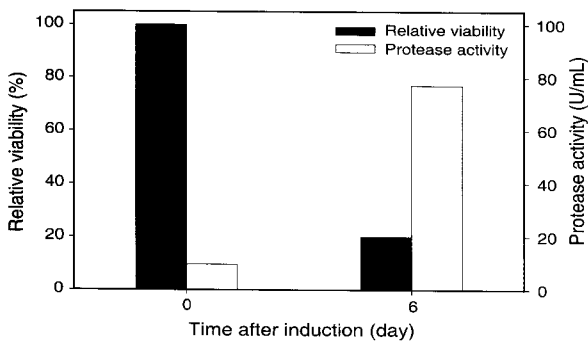


Fig. 3. Comparison between relative viability and protease activity during production phase. The cells were cultured in sugar-depleted AA media for the indicated times : ■, relative viability; □, protease activity.

Proline의 영향

hCTLA4Ig 생산단계에서의 세포 viability 감소 및 사멸, 이로 인한 배지내로의 protease 분비 증가는 결국 hCTLA4Ig의 안정성 및 생산성 저해를 일으킨다. 따라서 여러 stress로부터 세포를 보호하여 세포 사멸을 막음으로써, protease의 분비를 줄이고자 연구를 수행하였다. 동물세포 배양에서 아미노산의 일종인 proline을 첨가하여 reactive oxygen species (ROS)와 세포 사멸을 줄일 수 있음이 보고되었다(13). 따라서 이러한 proline을 이용하여 세포 사멸을 줄이고 protease의 분비를 막아, 궁극적으로는 hCTLA4Ig의 안정화를 이루고자 하였다.

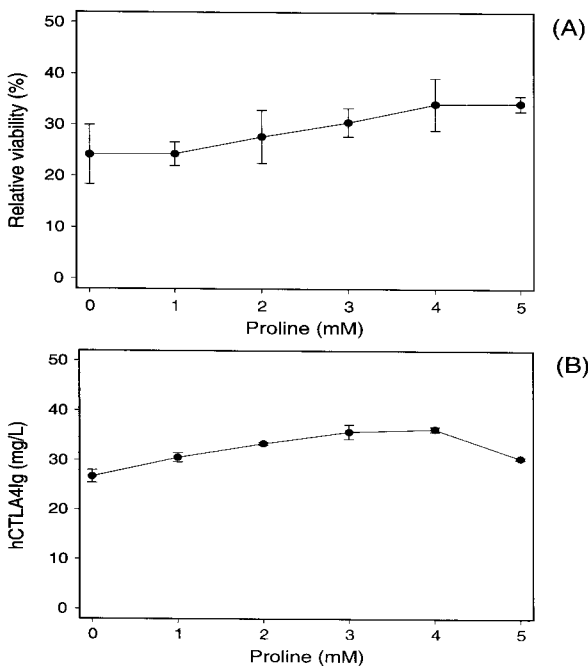


Fig. 4. Effect of proline concentration on (A) relative viability and (B) hCTLA4Ig production. The cells were cultured in sugar-depleted AA media added proline at 0 days after induction.

배지에 첨가되는 시료의 농도는 최대의 결과를 얻기 위한 가장 중요한 요소 중 하나이다. Proline의 최적 첨가 농도를 결정하기 위하여 당이 제거된 AA배지에 세포를 접종하여 배양을 하였다. 여기에 0, 1, 2, 3, 4, 5 mM의 proline을 첨가하였고, hCTLA4Ig의 생산량이 최대에 이르는 배양 6일째에 배지를 회수하였다(13). Fig. 4는 proline의 첨가 농도에 따른 viability와 hCTLA4Ig의 생산량 변화에 대한 결과를 보여준다. 4 mM의 proline을 첨가하였을 때, 가장 높은 viability를 유지하고 있는 것을 확인하였으며 이때의 hCTLA4Ig의 생산량은 대조군 보다 1.5배 향상된 것임을 알 수 있었다. 따라서 추후의 실험은 4 mM의 proline을 첨가하기로 결정하였다.

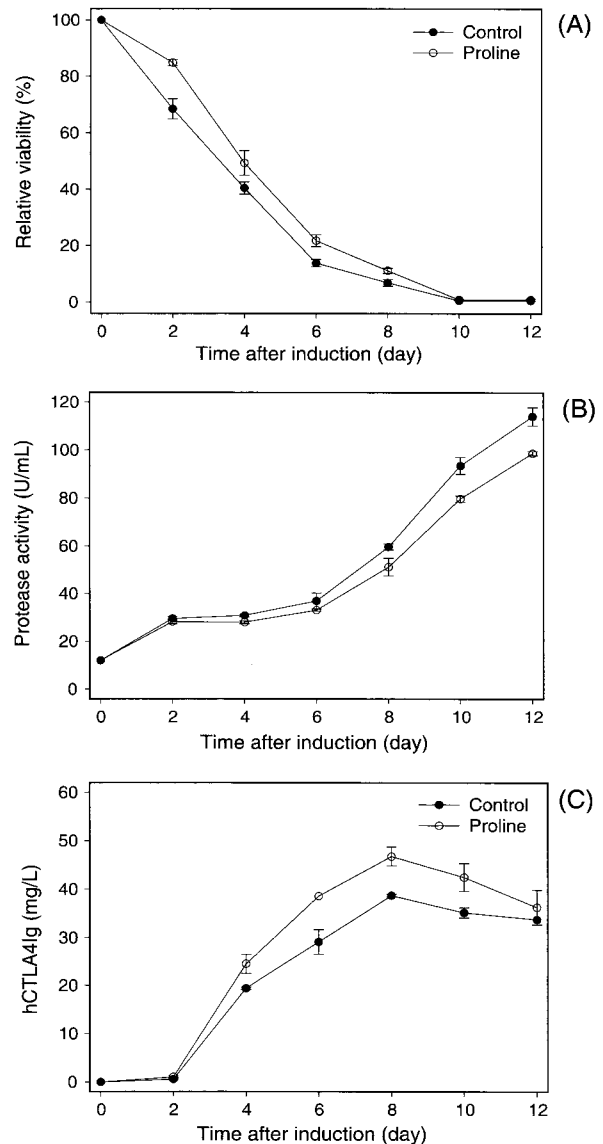


Fig. 5. Time course changes of (A) relative viability, (B) protease activity and (C) hCTLA4Ig production. The cells were cultured in sugar-depleted AA media with proline at 0 days after induction: ●, control; ○, 4 mM proline.

형질전환된 벼 현탁세포 배양에서 hCTLA4Ig의 생산기간 내내 proline이 미치는 영향을 알아보고자 하였다. Fig. 5는 proline 첨가시 relative viability, protease 활성 및 hCTLA4Ig 생산에 대한 결과를 보여준다. 최적의 첨가 농도로 결정된 4 mM의 proline을 첨가하였을 때, 대조군에 비해 낮은 protease 활성을 확인하였다. 이는 viability의 증가에 따른 영향으로 보인다. 또한 이러한 결과는 hCTLA4Ig의 생산에도 영향을 주었고, 배양 8일째 최대 48 mg/L의 hCTLA4Ig 생산량을 획득하였다. 이 생산량은 대조군에 비해 1.3배 증가된 결과였다. 따라서 4 mM의 proline을 배지에 첨가함으로써, 당 고갈에 의한 세포의 사멸 및 이로 인한 배지로의 protease 분비를 줄일 수 있었다. 이는 결과적으로 hCTLA4Ig의 안정성과 생산성 증진으로 이어진 것으로 판단된다.

Protease 분비와 hCTLA4Ig 불안정성

형질전환된 벼 현탁세포의 hCTLA4Ig 생산에 RAmy1A signal peptide를 이용함으로써, 강하게 발현이 진행된 후에 세포 밖의 배지로 목적 단백질인 hCTLA4Ig가 분비되는 것이 가능하다. 하지만 이 시스템의 문제점은 분비 이후에 여러 가지 기작에 의해 hCTLA4Ig의 안정성을 잃어 버려 생산성에 커다란 영향을 미치게 된다는 점이다. 이러한 단백질의 안정성에 영향을 미치는 요인으로는 발현되어 배지로 분비된 단백질 자체의 구조적 특징에 의한 불안정성이나 aggregation에 의한 불안정성이 있으며, 특히 세포로부터 분비된 배지내의 protease에 의한 목적 단백질의 분해는 생산성에 가장 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있다(14).

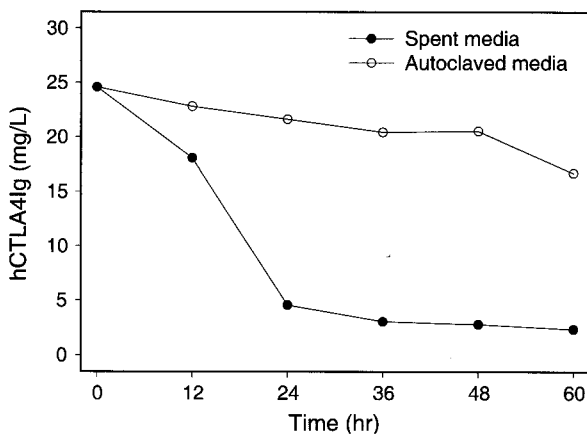


Fig. 6. Stability of hCTLA4Ig in spent media and autoclaved media: ●, spent media; ○, autoclaved media.

이를 확인하고자 protease 분비와 hCTLA4Ig 불안정성의 상관관계에 대한 연구를 수행하였다. 배양후 회수된 배지를 고압증기 멸균하여 인위적으로 protease를 불활성화시킨 후, rProtein A column과 Hiprep™ 26/10 desalting column (GE Healthcare Bio-sciences)을 이용하여 2단계

에 걸쳐 정제한 hCTLA4Ig 시료를 첨가하였다. 다음의 결과에서 볼 수 있듯이, protease를 불활성화 시킨 고압증기 멸균한 배지에서는 hCTLA4Ig의 안정성이 유지되었으며, 보통의 protease가 존재하는 spent media에서는 대부분이 분해됨을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 따라서 hCTLA4Ig의 불안정성은 배지내에 존재하는 protease에 의한 분해가 주된 요인임을 알 수 있었다.

Gelatin의 영향

세포로부터 분비된 protease에 의한 hCTLA4Ig의 분해를 막아 그 안정성과 생산성을 유지하고자 gelatin의 첨가를 시도하였다. 여러 gelling agent들 중에서 단백질 안정제로서 효과가 있음이 보고된 gelatin이 hCTLA4Ig의 안정성 유지에 미치는 영향을 확인하고자 하였다(8). Gelatin은 collagen을 분해하여 얻어지는 물질로 glycine이 가장 많은 부분을 차지하고 있는 다양한 분자량의 혼합물로 이루어진 불균질한 단백질이다. 이것은 용액 상에서 많은 glycine 분자로 인해 유동성이 많고, 여러 단백질들과 상호작용할 수 있는 multivalent structure를 가짐으로써 단백질 안정성에 영향을 미친다고 알려져 있다.

hCTLA4Ig의 안정성 유지에 가장 효과적인 gelatin의 최적 첨가 농도를 결정하기 위하여 실험을 진행하였다. 문헌을 참고하여 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 3, 5, 7 g/L의 gelatin을 첨가하였고, hCTLA4Ig의 생산량이 최대에 이르는 배양 6일째에 배지를 회수하여 결과를 분석하였다. 그 결과, 0.01 g/L의 gelatin을 첨가하였을 때 hCTLA4Ig의 생산량은 대조군 보다 높은 35 mg/L에 이르는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 7). 따라서 추후의 실험은 0.01 g/L의 gelatin을 첨가하기로 결정하였다.

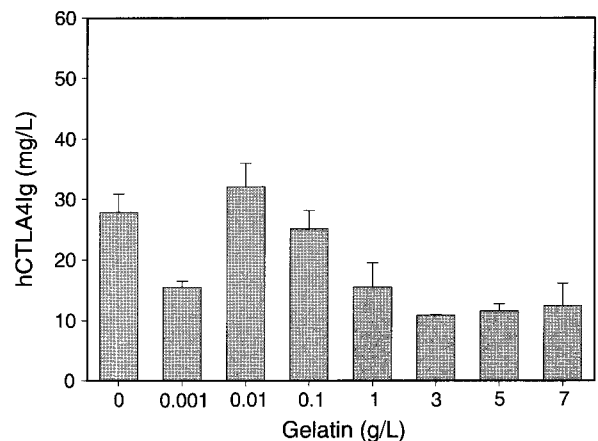


Fig. 7. Selection of optimal concentration. Gelatin was tested. Production of hCTLA4Ig at various concentrations (0.001, 0.01, 0.1, 1, 3, 5 and 7 g/L) was compared with that in control cultures.

선별된 0.01 g/L의 gelatin이 hCTLA4Ig의 안정성에 미

치는 영향을 시간에 따른 변화를 고려하여 알아보고자 하였다. Fig. 8은 그 결과를 보여준다. 최적의 첨가 농도로 결정된 0.01 g/L의 gelatin을 첨가하였을 때, relative viability와 protease 활성은 대조군과 뚜렷한 차이가 없이 유사하였다. 따라서 단백질 안정제로서의 효과를 확인하고자 SDS-PAGE와 Western blot을 수행하였다. 10%의 acrylamide gel에서 단백질을 분리하고, silver staining을 하였다(Fig. 9 (A)). 또한 hCTLA4Ig를 검출하기 위하여 goat anti-human IgG (Fc) antibody, HRP-labeled rabbit anti-goat IgG antibody를 사용하여 Western blot을 수행하였다. 가장 진한 농도를 보이는 단백질은 α -amylase이며, hCTLA4Ig는 약 50 kDa에서 검출되었다. 약 88~90 kDa의 질량을 가지는 hCTLA4Ig는 reducing agent에 의해 dimer 형태에서 monomer 형태로 해리되어 1/2 정도의 질량에서 검출되었다. 0.01 g/L의 gelatin을 첨가하였을 때, protease에 의한 hCTLA4Ig의 분해가 감소된 것을 band pattern을 통하여 확인할 수 있었다(Fig. 9 (B)). 이로써 0.01 g/L의 gelatin이 hCTLA4Ig의 안정성 유지에 효과가 있음을 알 수 있었고, 이는 결과적으로 hCTLA4Ig의 생산성 증진으로 이어져 대조군 보다 높은 생산량을 얻을 수 있었다.

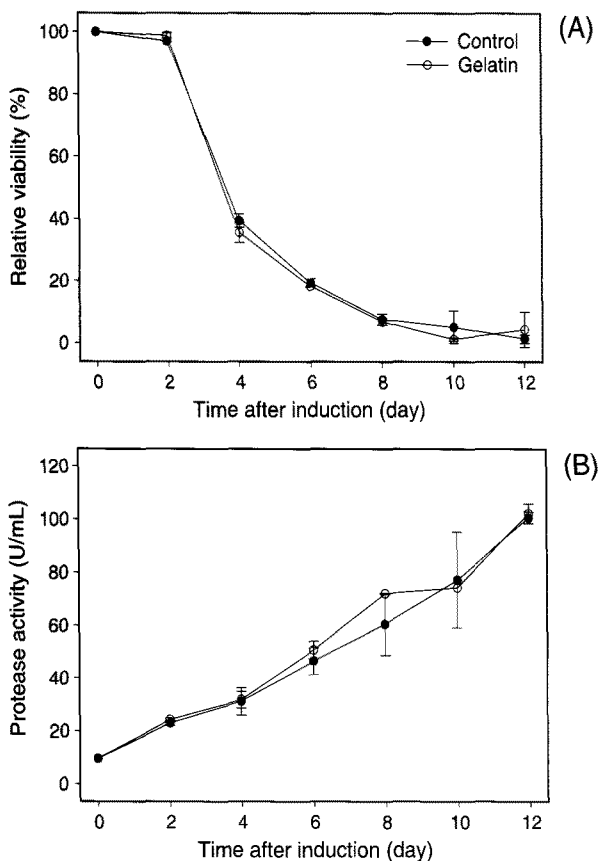


Fig. 8. Time course changes of (A) relative viability and (B) protease activity. The cells were cultured in sugar-depleted AA media with gelatin at 0 days after induction : ●, control; ○, 0.01 g/L gelatin.

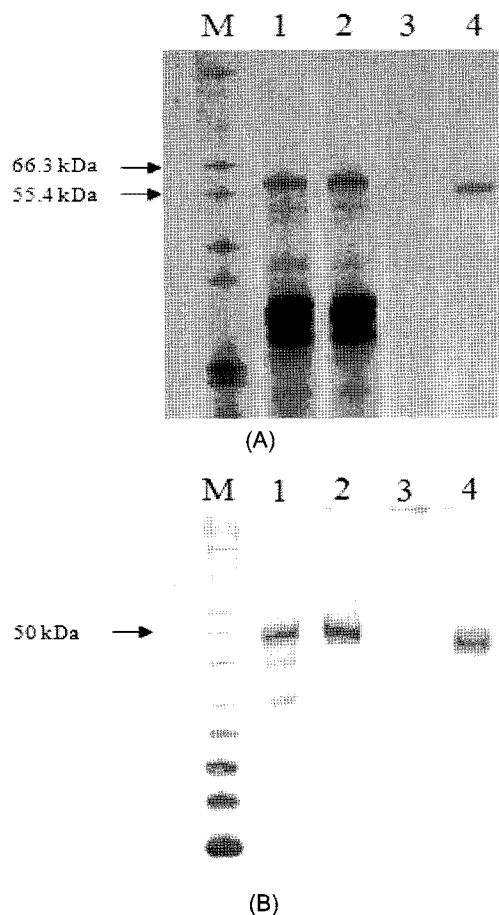


Fig. 9. hCTLA4Ig analysis of production media. (A) SDS-PAGE, (B) Western blot analysis: M, Mark12™ Unstained standard and MagicMark™ standard; Lane 1, production media without 0.01 g/L gelatin; Lane 2, production media with 0.01 g/L gelatin; Lane 3, negative control; Lane 4, positive control.

요 약

본 연구에서는 형질전환된 B 세포를 이용하여 자가면역 질환의 치료제인 human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-immunoglobulin (hCTLA4Ig)을 생산하였고, RAmy3D promoter와 RAmy1A signal peptide를 사용하여 당 고갈 시에 목적 단백질의 발현과 배지로의 분비를 유도하였다. 이 시스템의 문제점은 당 고갈에 의해 목적 단백질의 생산이 유도되기 때문에 에너지원이 없어 세포의 사멸, 이로 인한 배지내로의 protease 분비를 유발하게 된다. 이것은 목적 단백질의 안정성 저해와 궁극적으로는 생산성의 손실을 일으킨다. 따라서 세포를 보호하여 사멸을 막는 효과가 있음이 보고된 proline을 첨가하여 생산성 증진 효과를 확인하고자 하였다. 4 mM의 proline을 첨가하여 배양하였을 때, 세포의 사멸 및 protease의 분비를 줄일 수 있었고 이는 결과적으로 hCTLA4Ig의 생산성 증진으로 이어졌다.

또한 단백질 안정제를 통하여 배지내로 분비된 hCTLA4Ig의 안정화를 이루어 생산성을 높이고자 하였다. 0.01 g/L의 gelatin을 적용하여 생산성 증진 효과를 확인하였으며, 이는 hCTLA4Ig의 안정화에 의한 것임을 알 수 있었다. Protease의 분비를 줄이기 위한 세포 보호와 protease의 공격을 막기 위한 hCTLA4Ig 보호를 통하여 형질전환된 벼 세포를 이용한 hCTLA4Ig의 안정성 및 생산성을 증대시킬 수 있음을 확인하였다.

감 사

본 연구는 지식경제부 산업기술개발사업 (과제번호 00014836) 및 인하대학교 초정밀생물분리기술연구센터 (ERC) 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

접수 : 2009년 1월 5일, 게재승인 : 2009년 4월 2일

REFERENCES

1. Becerra-Arteaga, A., H. S. Mason, and M. L. Shuler (2006), Production, secretion, and stability of human secreted alkaline phosphatase in tobacco NT1 cell suspension cultures, *Biotechnol. Prog.* **22**, 1643-1649.
2. Yu, S. M., Y. H. Kuo, G. Sheu, Y. J. Sheu, and L. F. Liu (1991), Metabolic derepression of α -amylase gene expression in suspension-cultured cells of rice, *J. Biol. Chem.* **266**, 21131-21137.
3. Mitsunaga, S., R. L. Rodriguez, and J. Yamaguchi (1994), Sequence-specific interactions of a nuclear protein factor with the promoter region of rice gene for alpha-amylase, RAmy3D, *Nucleic Acids Res.* **423**, 81-85.
4. 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 a₁-antitrypsin by plant cell culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 516-523.
5. Lui, V. C. H., P. K. H. Tam, M. Y. K. Leung, J. Y. B. Lau, J. K. Y. Chan, V. S. F. Chan, M. Dallman, and K. S. E. Cheah (2003), Mammary gland-specific secretion of biologically active immunosuppressive agent cytotoxic-T-lymphocyte antigen 4 human immunoglobulin fusion protein (CTLA4-IgG) in milk by transgenesis, *J. Immunol.* **277**, 171-183.
6. Pree, I. and T. Wekerle (2006), New approaches to prevent transplant rejection: Co-stimulation blockers anti-CD40L and CTLA4Ig, *Drug Discov. Today* **3**, 41-47.
7. Wang, W. (1999), Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals, *Int. J. Pharm.* **185**, 129-188.
8. 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.
9. Gotoh, T., Y. Miyazaki, W. Sato, K. Kikuchi, and W. E. Bentley (2001), Proteolytic activity and recombinant protein production in virus-infected Sf-9 insect cell cultures supplemented with carboxyl and cysteine protease inhibitors, *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 248-255.
10. Thompson, J. A., R. Abdullah, and E. C. Cocking (1986), Protoplast culture of rice (*Oryza sativa* L.) using media solidified with agarose, *Plant Sci.* **47**, 123-133.
11. Battaglino, R. A., M. Huergo, A. M. R. Pilosof, and G. B. Bartholomai (1991), Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 292-296.
12. Beers, E. P., B. J. Woffenden, and C. Zhao (2000), Plant proteolytic enzymes: Possible roles during programmed cell death, *Plant Mol. Biol.* **44**, 399-415.
13. Krishnan, N., M. B. Dickman, and D. F. Becker (2008), Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 671-681.
14. Doran, P. M. (2006), Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures, *Trends Biotechnol.* **24**, 426-432.