

Modulation of G-CSF Secretion by Mutations of Non Alpha-Helical Region in N-Terminus

Jeonghae Park¹, Jung-Ae Park¹, Seok-Woo Kang², Tae-Won Goo² and Kyung Tae Chung^{1*}¹Department of Clinical Laboratory Science, Dong Eui University, Busan 614-714, Korea²Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-100, Korea

Received November 20, 2011 / Revised December 20, 2011 / Accepted December 21, 2011

Hematopoietic cytokines regulate production of blood cells by stimulating proliferation and differentiation of bone marrow cells. Among these hematopoietic cytokines, called hematopoietic growth factors, granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), which regulates growth of neutrophils, is one of important therapeutic factors because cancer patients suffer with neutropenia which is severe reduction of neutrophils after chemotherapy. Two groups of recombinant G-CSF have approved and used for therapeutic purposes and many researches are still on-going to produce recombinant G-CSF by different techniques. We engineered human G-CSF with *Bombyx* specific endoplasmic reticulum (ER) signal sequence, therefore, secretion of human G-CSF protein was improved in *Bombyx mori*-originated cell line, Bm5. The *Bombyx* ER signal sequence and human G-CSF matured protein region chimera was further remodeled at the N-terminus of matured G-CSF protein to understand roles of N-terminus on outer cellular secretion and/or production. Three different mutants were generated deleting three amino acids in non alpha-helical region in N-terminus in order to scan important amino acids for G-CSF secretion. One of 3 different N-terminal deletion mutants showed dramatically reduction of secreted amount of G-CSF indicating its important role on secretion. The data suggest that remodeling in non alpha-helical region of N-terminus is also important for recombinant G-CSF production.

Key words : G-CSF, *Bombyx* cell line, hematopoietic protein, deletion mutation

서 론

콜로니 자극인자(Colony stimulating factor, CSF)는 골수세포에서 각각의 혈구세포로 분화하고 성장하는데 필요한 인자이다[13]. 이들 자극인자들은 당단백질로서 '조혈성장인자(hematopoietic growth factor)'라고 하며 단독으로 기능을 나타내거나 공동으로 작용하기도 한다. 이들 조혈성장인자들에는 interleukin (IL-1, IL-3)과 SCF (stem cell factor), erythropoietin (EPO), granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), macrophage and granulocyte-colony stimulating factor (GM-CSF), 등 20여 가지 이상이 존재한다[4]. 이 중 EPO와 G-CSF는 임상적으로 많이 사용되고 있으며 경제적인 가치도 상당히 높다.

과립구 콜로니 자극 인자(Granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)는 약 25 Kda 크기로 호중구 세포의 전구세포(granulocyte precursor) 및 성숙한 호중구 세포(mature neutrophils)의 생존, 증식, 분화 및 기능을 가지고 있다[3]. 화학적 항암치료를 받는 환자들은 항암제의 부작용으로 인하여 혈구세포의 감소가 발생하는 경우가 많다. 특히 총 혈구 세포의 40-70%를 차지하는 호중구 세포의 감소가 두드러지며(호중구

세포 감소증, neutropenia), 선천성 면역을 담당하는 호중구 세포의 감소는 환자의 미생물 감염 위험을 증가시켜 때로는 사망을 초래한다[19].

G-CSF는 neutropenia 증세를 감소시키고, 급성 골수성 백혈병 등의 치료를 목적으로 임상적 사용의 승인을 받았으며, 임상적으로는 재조합 G-CSF가 사용되고 있다[8,9,17,20]. 재조합 G-CSF는 두 그룹으로 분류된다. 한 그룹은 *Escherichia coli*와 같이 세균에서 생산되는 재조합 G-CSF로서 사람 유래 G-CSF와는 달리 당쇄가 존재하지 않는다. 다른 그룹은 Chinese hamster ovary cell에서 생산되는 것으로 사람 유래 G-CSF와 동일하게 당쇄가 부가되어 있다[23]. 전자를 'Filgrastim'이라고 명명하고, 후자를 'Lenograstim'이라고 명명한다. 많은 연구결과에서 Lenograstim이 Filgrastim보다 안정성 및 생물학적 활성 더 높다고 알려져 있어 당쇄의 중요함을 알 수 있다[11,14]. 이들 재조합 G-CSF 단백질에 대한 특허가 유럽에서 2006년, 미국에서는 2013년에 만료가 됨으로 경제성이 높은 이 단백질을 생산하고자 하는 연구가 많이 되고 있다[18].

선행연구에서 본 연구팀은 사람 유래 G-CSF 유전자를 누에 세포에서 발현시켜 재조합 G-CSF가 생성된다는 것을 보고하였다[16]. 여기서 더 나아가 G-CSF를 효율적으로 분비시키기 위한 연구결과를 보고하고자 한다.

***Corresponding author**

Tel : +82-51-890-2681, Fax : +82-51-890-2622

E-mail : kchung@deu.ac.kr

Materials and Methods

세포배양 및 형질전환

누에 유래 Bm5 세포[24]는 5% fetal calf serum (Gibco)과 penicillin, streptomycin, and amphotericin B (Gibco Anti-Anti, Invitrogen Corporation)을 함유한 GRACE 배지 (Welgene)를 사용하여 27°C에서 배양하였다. Bm5세포는 25 cm² tissue culture plate 당 2×10⁶ 세포를 분주하여 하루 배양한 뒤 형질전환 하였다. 각 벡터는 FuGENE® HD Transfection Reagent (Roche)를 사용하여 Bm5 세포를 형질전환 하였다. 형질전환 24 hr 후에 배지는 새 것으로 교환하였다.

Wild type 및 돌연변이 G-CSF 발현 벡터 제작

사람 유래 G-CSF cDNA는 누에 유래 prophenoloxidase activating enzyme (PPAE)의 endoplasmic signal sequence에 해당하는 DNA 부분과 치환 및 융합하여 제작하였다[16]. Two-step PCR 방법으로 제작된 누에의 endoplasmic signal sequence를 가진 G-CSF를 ppaeG-CSF라고 명명하였다. ppaeG-CSF를 주형으로 하고 GeneArt® Site-Directed Mutagenesis kit (Invitrogen, USA)를 사용하여 site-directed mutagenesis 방법으로 성숙한 G-CSF 단백질의 N-말단에 glycine-proline-alanine 세 아미노산이 결합된 돌연변이(ppaeG-CSFd1)를 생산하였다. Primer는 JAd1 (GTTGCAACCCCC TGAGCTCCCTGCCCA)와 JB21 (CAGGGGGGTTGCAAC ACTTTTGGT)를 사용하였다. Alanine-serine-serine 결합 돌연변이와 serine-leucine-proline 결합 돌연변이는 ppaeG-CSFd1 과는 달리 합성 DNA를 사용하였다(Bioneer, 대전). 즉, 각 세 아미노산의 codon이 결합된 전체 ppaeG-CSF DNA의 양쪽에 제한효소 *Sad*과 *Aga*I 인식 DNA를 5'과 3'에 연결하여 합성한 후 *Sad*과 *Aga*I로 절단하여 곤충발현 벡터인 pIZTv5/His 벡터에 삽입하여 각 돌연변이 유전자 발현 벡터를 구축하였다 (ppaeG-CSFd2와 ppaeG-CSFd3). 각 세 종류의 돌연변이 G-CSF 유전자는 DNA sequence를 확인하여 다른 돌연변이가 없음을 확인하였다.

Stable Cell line 구축

Wild type 및 돌연변이 G-CSF가 삽입된 pIZTv5/His 벡터에는 zeocin selection marker가 존재하여 이를 이용하여 stable cell line을 구축하였다. 각각의 발현 벡터를 Bm5 세포에 전술한 방법으로 형질전환하고, 400 µg/ml 농도의 zeocin을 첨가하여 형질전환 된 세포만을 유지 및 선별하였다. 형질전환 된 세포만을 획득한 후에는 zeocin의 농도를 100 µg/ml로 낮추어 stable cell line 배양하며 유지하였다. 획득한 각 stable cell line을 Bm5-12, Bm5-D1, Bm5-D2, and Bm5-D3라고 명명하고 액체질소에 보관하였다.

G-CSF 단백질 합성 분석

Bm5-12, Bm5-D1, Bm5-D2과 Bm5-D3 세포를 세포 수가 4×10⁶ cells/ml로 되게 하여 동일한 조건에서 배양하였다. 4 일 동안 배양한 후 2 ml 배지를 회수하여 배지로 분비된 G-CSF 양을 비교하였다. 2 ml 배지는 0.2 ml 10× binding buffer (100 mM sodium phosphate buffer, 500 mM NaCl, 100 mM imidazole, pH 7.4)와 섞은 후 60 µl 50% nickel sepharose beads (Pharmacia)를 첨가하여 4°C에서 한 시간 동안 G-CSF 단백질을 결합시켰다. 4°C, 3,000 rpm에서 원심분리하여 nickel sepharose beads를 회수하고, 1× binding buffer로 3 회 세척을 한 후 30 µl SDS-PAGE loading buffer를 첨가하였다. 12% polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동한 후 PROTRAN nitrocellulose membrane (Whatman)으로 단백질을 전이시켰다. Membrane은 gelatin wash buffer (0.1% gelatin, 15 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, and 0.1% Triton x-100)로 block을 하였고, anti-his 항체(Cell Signaling, 1:500 dilution)와 peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG (Sigma A0545, 1:1,000 dilution)를 사용하여 ECL로서 G-CSF의 존재 여부와 상대적인 생산량을 비교하였다. 각 밴드는 Image analyzer (Alpha Innotech FluorChem FC2 MultiImage II)를 사용하여 얻었다.

Results and Discussion

세포 외로 분비되는 단백질은 전구단백질로 만들어져 소포체에서 소포체 신호 펩타이드(Endoplasmic reticulum signal sequence, ER signal sequence)가 절단이 되어 성숙된 단백질로 된다[1]. G-CSF는 25 개의 아미노산으로 된 ER-signal sequence를 가지며, 분비형의 성숙한 단백질은 174개의 아미노산으로 구성되어 있다. 세포 내 분비 경로 중 골지체에서 O-linked glycosylation이 일어나 당쇄가 부가된 당단백질로 세포 밖으로 분비된다[5]. 분자량은 약 25 Kda 이다. 따라서 사람 유래 G-CSF의 생산은 분비경로의 시작인 소포체로의 이동이 아주 중요하며, 또한 동질성을 가지기 위해 당쇄의 부가가 중요하다. 현재 사용되고 있는 재조합 G-CSF는 *Escherichia coli* 에서 생산되는 것과 Chinese Hamster Ovary cells (CHO)에서 생산되는 것으로 대별된다[7]. *Escherichia coli* 에서 생산되는 G-CSF는 Filgrastim이라 명명하며, *E. coli* 세포 내 inclusion body로 존재하는 것을 재구조화(renaturation)하는 과정을 거쳐 생산하는 반면에 Chinese Hamster Ovary cells (CHO)에서 생산되는 G-CSF는 Lenograstim 이라 명명하며 사람 유래 G-CSF와 동일한 post-translational modification을 거쳐 합성이 되어 안정성 및 활성이 상대적으로 높다고 알려져 있다[2,5,22].

곤충세포는 진핵생물과 마찬가지로 세포 내 단백질 분비 경로를 거쳐 분비 단백질을 세포 밖으로 보내며 또한 당쇄 부가

와 같은 post-translational modification 과정을 수행한다. 또한 포유동물 사이에서 발생할 수 있는 위해성 감염원(예, 바이러스)에 대한 안전성이 높아 재조합 단백질을 생산하는 좋은 수단으로 인식된다. 본 연구팀은 누에 세포에서 사람 유래 G-CSF의 생산효율을 높이기 위해 ER signal sequence를 변경하여 높은 분비율을 획득하였다[16]. G-CSF의 구조는 4 개의 alpha-helix로 구성되어 있다. G-CSF의 활성은 이들 alpha-helix가 아주 중요한 역할을 하며, alpha-helix 구조는 두 개의 disulfide bond가 지탱을 한다고 알려져 있다[10]. 이를 바탕으로 하여 구조에 영향을 최소화 하며 G-CSF의 분비율에 N-말단이 어떤 영향을 주는지를 N-말단에 deletion mutation을 도입하여 조사하였다.

과도한 deletion에 의한 구조변형을 최소화하기 위해 아미노산 3 개를 deletion하는 방법을 사용하였으며, 서로 중복되는 deletion mutant를 재조합으로 G-CSF의 생산 또는 분비에 중요한 아미노산을 선별하는 전략을 사용하였다(Fig. 1). 또한 아미노산 3 개가 deletion된 각각의 돌연변이는 서로 아미노산이 한 개씩 중복되도록 만들어져 3 개의 아미노산 중 하나 또는 두 개의 아미노산을 더욱 세밀하게 구별될 수 있도록 하였다. G-CSF는 4 개의 alpha-helix로 이루어져 있고, 첫 번째 alpha-helix가 3 번째 proline 다음의 glutamine부터 시작 된다(Fig. 1)[21]. 따라서 첫 번째 alpha-helix가 시작되기 전 3차 구조를 형성하고 있지 않는 영역에 돌연변이를 도입하였다. 각각의 deletion mutant는 site-directed mutagenesis 또는 화학적 DNA 합성을 통하여 제작되었으며, 제작된 모든 DNA는 곤충 발현 벡터인 pIZTv5/His에 삽입되었다. 이때 벡터에 존

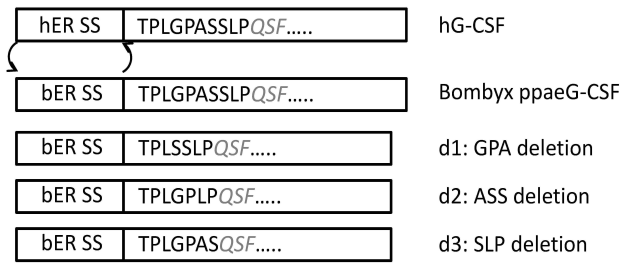


Fig. 1. Schematic diagram of Wild type and each deletion mutant G-CSF. Endoplasmic Reticulum signal sequence of human-origin G-CSF was replaced with that of prophenoloxidase activating enzyme (PPAE) from *Bombyx mori* (*Bombyx ppaeG-CSF*). cDNA of *Bombyx ppaeG-CSF* was then used as template to generate three amino acid-deleted mutants, d1, d2, and d3. hER: Human Endoplasmic reticulum, SS: Signal sequence, bER: *Bombyx* Endoplasmic reticulum. Amino acids were shown with single letter symbols. First alpha-helix begins glutamine, which is in gray color and italicized.

재하는 hig tag이 G-CSF의 C-말단에 위치하도록 클로닝되었다(Fig. 2). 벡터 내에 클로닝 된 wild type과 돌연변이 DNA는 다시 DNA sequencing을 하여 다른 위치의 돌연변이가 없음을 확인하였다. 각 DNA로부터 발현되어 생산되는 G-CSF의 양을 비교하기 위해서 일시적인 형질전환(transient transfection)을 통해서 할 수도 있으나 각각의 형질전환 효율과 지속적인 생산 가능성의 이유로 stable cell line을 구축하였다. 사용한 벡터에 zeocin 내성 유전자가 존재하여 zeocin에 내성

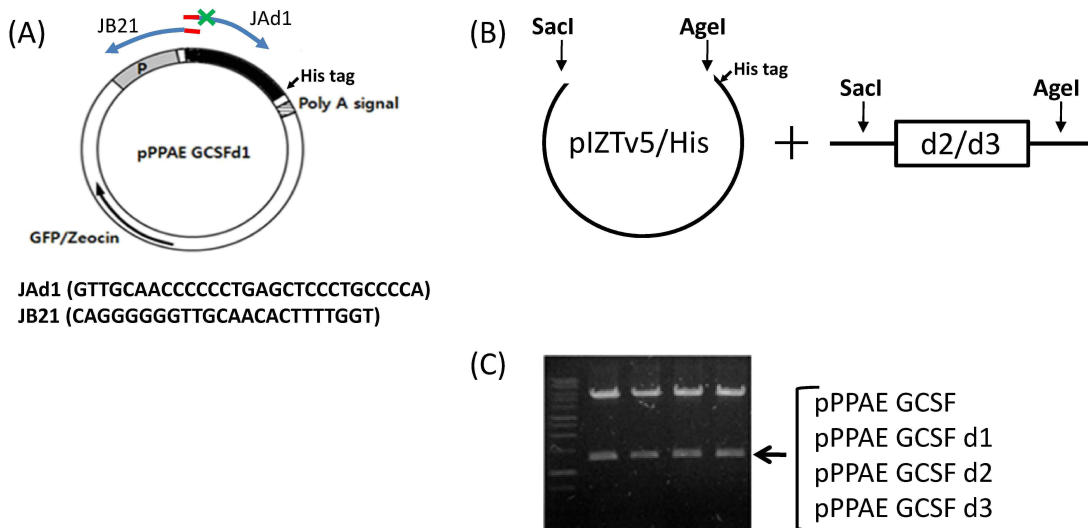


Fig. 2. Cloning of deletion mutants of ppaeG-CSF. (A) JAd1 primer with deleted codons for three amino acids, GPA, was synthesized and used for site-directed mutagenesis using GeneArt® Site-Directed Mutagenesis (see Materials and Methods) in order to make mutant, d1. (B) Mutant d2 and d3 DNAs were directly synthesized by Bioneer (Daejeon, Korea) with SacI and AgeI site flanked at 5' and 3' regions, respectively. The synthesized d2 and d3 DNAs were inserted in the same restriction sites of pIZT/His vector. (C) Mutant DNA agarose gel. Each cloned mutant construct was ran on 1% agarose gel after digestion.

을 가진 Bm5 세포들만을 선별하여 각각의 stable cell line을 구축하였다(Fig. 3). Stable cell line은 형태적으로 원래의 Bm5 세포와 차이가 없었으며, 각 cell line 간에도 형태적 차이는 없었다. 생산되는 재조합 G-CSF는 세포 밖으로 분비가 되므로 각 cell line이 배양된 배양액을 분석하였다. 동일한 양의 배양액 내에 존재하는 G-CSF의 상대적인 비교를 위해 2 ml 배양액 내에 존재하는 G-CSF를 Nickel sepharose bead를 사용하여 분리하고 이를 western blot으로 분석하였다. 동일한 양을 나타내기 위한 대조군으로는 배지 내에 존재하는 약 66 Kda인 bovine serum albumin을 SDS-PAGE로 분리하여 Coomassie 염색으로 나타내었다(Fig. 4). Western blot의 결과에서 d3 돌연변이의 경우 확연하게 G-CSF가 감소한 알 수 있었고, 이와

대조적으로 d1과 d2의 경우는 wild type보다 다소 높게 생산되었거나 동일한 수준임을 알 수 있었다(Fig. 4). 이는 돌연변이의 위치가 모두 alpha-helix와는 무관한 N-말단 끝에 존재하지만[6,21,25] G-CSF의 생산 또는 분비에 커다란 영향을 미친다고 생각된다. 일반적으로 proline은 단백질 구조에서 굴곡을 형성하는 것으로 알려져 있다. d1 돌연변이와 d2 돌연변이 모두 하나씩의 proline을 가지고 있지만 아주 대비되는 G-CSF의 생산량을 보여주고 있다. 이는 d3에 의해 제거된 3 번째 proline이 생산 또는 분비에 영향을 준다고 생각된다. 그러나 배양 배지 내에 존재하는 G-CSF를 분석한 것임으로 배지 내에서의 안정성에도 영향을 줄 수 있다고 생각할 수 있다. 당쇄가 없는 Filgrastim의 경우 serum 내에 존재하는 elastase에 의한 분해에 민감한 것으로 알려져 있다[3]. 세포 내에 존재하는 G-CSF의 양을 상대적으로 비교하여만 d3 돌연변이가 단백질 합성에 영향을 주지 않았다고 결론지을 수 있어 이에 대한 연구는 향후 수행되어야 된다고 생각한다. 다만 ER signal sequence가 세 종류의 돌연변이 모두 같으며, *Bombix mori* 유래 PPAAE의 ER signal sequence가 정상적으로 기능을 하고 있음[16]으로 d3에 의한 영향을 분비문제로 여겨진다.

G-CSF의 분비에 관한 특정 아미노산에 대한 연구는 현재까지도 아주 부족하며, 본 연구의 돌연변이 연구에서 알 수 있듯이 특정 위치의 G-CSF 돌연변이가 생산보다도 분비에 영향을 줄 수 있다고 생각된다. 단백질의 세포 외 분비는 결과적으로 생산성과 직결되어 있다. 따라서 본 연구는 세포 외 분비가 증가된 단백질 리모델링으로 조절성장 단백질과 같은 의료용 단백질의 생산 수율을 향상시킬 수 있는 가능성을 제시하였다고 생각한다.

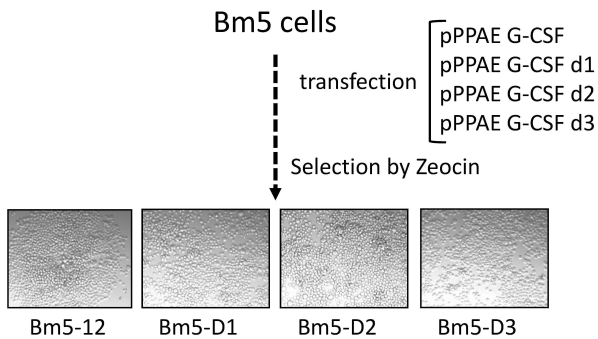


Fig. 3. ppaeG-CSF and mutant ppaeG-CSF d1, d2, d3-expressing Bm5 stable cell lines. Each construct was transfected to *Bombix mori* cell line, Bm5. Zeocin resistant clones were selected and designated to Bm5-12, Bm5-D1, Bm5-D2, and Bm5-D3.

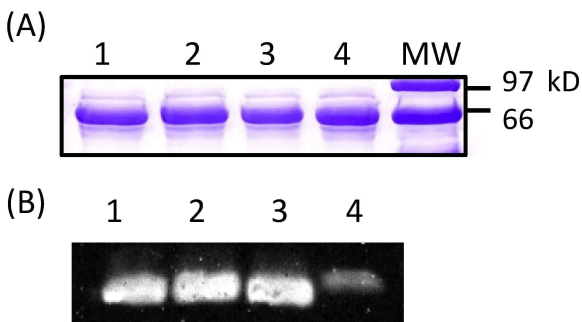


Fig. 4. Analysis of each recombinant G-CSF. Cell line, Bm5-12, Bm5-D1, Bm5-D2, and Bm5-D3 were grown under the same condition and one ml of media was collected from 4×10^6 cells/ml population. Recombinant G-CSF was pulled down with Nickel bead and analyzed by SDS-PAGE and western blot. (A) The same amount of each medium ran on a SDS-PAGE and the gel was coomassie-stained to show loading control. Protein bands are bovine serum albumin in the media. (B) Western blot analysis for recombinant G-CSF with anti-his antibody. Lane 1: Bm5-12, 2: Bm5-D1, 3: Bm5-D2, and 4: Bm5-D3. MW: molecular marker

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청의 아젠다 프로그램 연구비(2011DC002)에 의해 수행되었음을 감사드립니다.

References

1. Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2007. *The Molecular Biology of the Cell*. Chapter 12. pp. 723-745, Garland Science. New York, NY. USA.
2. Carter, D., R. Keeble, and R. Thorpe. 2004. Human serum inactivates non-glycosylated but not glycosylated granulocyte colony stimulating factor by a protease dependent mechanism: significance of carbohydrates on the glycosylated molecule. *Biologicals* **32**, 37-47.
3. Carter, R., M. Whitmore, and R. Thorpe. 2004. The significance of carbohydrates on G-CSF: differential sensitivity of G-CSFs to human neutrophil elastase degradation. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 515-522.
4. Cowling, G. and T. Dexter. 1992. Erythropoietin and mye-

- loid colony stimulating factors. *Trends Biotechnol.* **10**, 349-357.
5. Herrmann, F., A. Lindemann, and R. Mertelsmann. 1990. G-CSF and M-CSF: from molecular biology to clinical application. *Biotherapy* **2**, 315-324.
 6. Hill, P., D. Osslund, and D. Eisenberg. 1993. The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5167-5171.
 7. Höglund, M. 1998. Glycosylated and non-glycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF)-what is the difference? *Med. Oncol.* **15**, 229-233.
 8. Hübel, K., C. Dale, A. Engart, and W. Liles. 2000. Use of G-CSF for granulocyte transfusion therapy. *Cytokines Cell Mol. Ther.* **6**, 89-95.
 9. Kuderer, N., D. Dale, J. Crawford, L. Cosler, and G. Lyman. 2006. Mortality, morbidity, and cost associated with febrile neutropenia in adult cancer patients. *Cancer* **106**, 2258-2266.
 10. Lu, S., L. Clogston, O. Narhi, A. Merewether, R. Pearl, and C. Boone. 1992. Folding and oxidation of recombinant human granulocyte colony stimulating factor produced in *Escherichia coli*. Characterization of the disulfide-reduced intermediates and cysteine-serine analogs. *J. Biol. Chem.* **267**, 8770-8777.
 11. Martin-Christin, F. 2001. Granulocyte colony stimulating factors: how different are they? How to make a decision? *Anticancer Drugs* **12**, 185-191.
 12. Nagata, S., M. Tsuchiya, S. Asano, Y. Kaziro, T. Yamazaki, O. Yamamoto, Y. Hirata, N. Kubota, M. Oheda, and H. Nomura. 1986. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature* **319**, 415-418.
 13. Nicola, N. and D. Metcalf. 1985. The colony-stimulating factors and myeloid leukemia. *Cancer Surv.* **4**, 789-815.
 14. Nissen, C. 1994. Glycosylation of recombinant human granulocyte colony stimulating factor: implications for stability and potency. *Eur. J. Cancer* **30A**, S12-14.
 15. Oh-eda, M., M. Hasegawa, K. Hattori, H. Kuboniwa, T. Kojima, T. Orita, K. Tomonou, T. Yamazaki, and N. Ochi. 1990. Granulocyte colony-stimulating factor protects it against polymerization and denaturation allowing It to Retain Its Biological Activity. *J. Biol. Chem.* **265**, 11432-11435.
 16. Park, J., H. Jang, S. Kang, T. Goo, and K. Chung. 2010. Expression and production of human granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) in Silkworm cell line. *J. Life Sci.* **20**, 1569-1741.
 17. Price, T. 2002. Granulocyte transfusion in the G-CSF era. *Int. J. Hematol.* **76**, 77-80.
 18. Scrip Report. 2007. Biosimilar, Biogenerics and Follow-on Biologics. Informa UK Ltd. (http://www.scripintelligence.com/multimedia/archive/00000/BS1342_117a.pdf).
 19. Souza, L., T. Boone, J. Gabilove, P. Lai, K. Zsebo, D. Murdock, V. Chazin, J. Bruszewski, H. Lu, K. Chen, J. Barendt, E. Platzner, M. Moore, R. Mertelsmann, and K. Welte. 1986. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science* **232**, 61-65.
 20. Spiekermann, K., J. Roesler, A. Emmendoerffer, J. Elsner, and K. Welte. 1997. Functional features of neutrophils induced by G-CSF and GM-CSF treatment: differential effects and clinical implications. *Leukemia* **11**, 466-478.
 21. Tamada, T., E. Honjo, Y. Maeda, T. Okamoto, M. Ishibashi, M. Tokunaga, and R. Kuroki. 2006. Homodimeric cross-over structure of the human granulocyte colony-stimulating factor (GCSF) receptor signaling complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **28**, 3135-3140.
 22. Vanz, S., G. Rnard, S. Palma, M. Chies, L. Dalmora, A. Basso, and S. Santos. 2008. Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization. *Microbial. Cell Factories* **7**, 13.
 23. Visani, G. and S. Manfroi. 1995. G-CSF in the biology and treatment of acute myeloid leukemias. *Leuk Lymphoma.* **18**, 423-428.
 24. Zhang, J., N. Kalogerakis, L. Behie, and K. Iatrou. 1992. Investigation of reduced serum and serum-free media for the cultivation of insect cells (Bm5) and the production of baculovirus (BmNPV). *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 1165-1172.
 25. Zink, T., A. Ross, K. Lüers, C. Cieslar, R. Rudolph, and A. Holak. 1994. Structure and dynamics of the human granulocyte colony-stimulating factor determined by NMR spectroscopy. Loop mobility in a four-helix-bundle protein. *Biochemistry* **33**, 8453-8463.

초록 : G-CSF 단백질 N-말단의 비 알파-Helix 영역의 돌연변이에 의한 분비 조절박정혜¹ · 박정애¹ · 강석우² · 구태원² · 정경태^{1*}(¹동의대학교 임상병리학과, ²국립농업과학원 농업생물부)

조혈에 관여하는 cytokine은 골수세포의 성장과 분화를 촉진시켜 혈구세포 생산을 조절한다. 이런 cytokine을 조혈성장인자(hematopoietic growth factor)이라고 하고, 그 중에서 호중구 세포(neutrophil) 성장에 관여하는 과립구 콜로니 자극 인자(granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF)는 임상적 치료제로서 아주 중요하다. 왜냐하면 화학적 항암치료를 받는 환자들에게 심각한 호중구 세포가 감소하는 증세(neutropenia)가 발생하여 감염으로 인한 사망이 일어나기 때문이다. 두 종류의 G-CSF 재조합 단백질이 치료제로 승인 받아 사용되고 있으며, G-CSF 재조합 단백질 생산에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. 선행연구에서 본 연구팀은 누에에서 유래된 Bm5 세포주에서 G-CSF의 생산을 증대하기 위해 누에 prophenoloxidase activating enzyme의 Endoplasmic reticulum targeting signal sequence 유전자와 사람 G-CSF 유전자를 융합한 chimera 유전자를 제작하여 재조합 G-CSF 단백질을 생산하였다. 본 연구에서는 이 chimera 유전자가 생산하는 재조합 G-CSF 단백질의 N-말단에 3 개의 아미노산이 결여되는 3 종류의 돌연변이 유전자를 제작하여 G-CSF 단백질 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 그 중 한 돌연변이 유전자에 의해 세포 밖으로 분비된 G-CSF 단백질의 생산이 현저히 감소하여, N-말단 부분이 이 단백질의 분비에 관여한다는 것을 알 수 있었다.