

Production of hGM-CSF by transformed rice cell suspension culture

신윤지, 홍신영, 김난선, 김영숙, 이재화*, 권태호, 양문식

전북대학교 생물과학부, 전북대학교 기초과학연구소

전화 (063) 270-3339, FAX (063) 270-4334

Abstract

Recombinant human GM-CSF was expressed and secreted from transgenic rice cell suspension cultures in its biologically active form. This was accomplished by transforming rice callus tissues with an expression vector, pMYN44, containing the hGM-CSF cDNA. Regulated expression and secretion of hGM-CSF from this vector achieved using the promoter, signal peptide, and terminator from a rice alpha-amylase gene *Amy3D*. The *Amy3D* gene is expressed in response to sugar deprivation. The recombinant hGM-CSF was expressed from the transgenic rice cell culture on the sugar-free medium as a yield of about 110 mg/L in the culture filtrate, which was determined by ELISA. Biological activity of hGM-CSF was confirmed by measuring the proliferation of the hGM-CSF dependent TF-1 cells. (This work was supported by a grant from the NRL program of the Korean Ministry of Science and Technology. Shin, Y.-J., Lee, J.-H and Kwon, T.-H. have been supported by BK21 program from the Korean Ministry of Education)

서론

일반적으로 유용한 외래 단백질의 생산은 미생물의 배양을 통하여 생산하여 왔으며 생산된 단백질의 활성에 전사 후 수식과정 (post-translational modification)이 크게 영향을 미칠 경우에는 동물세포배양을 이용하여 외래 단백질을 생산하고 있다. 그러나 식물세포배양을 이용한 경우에는 공통적으로 생산수율이 낮은 점이 문제점으로 지적되고 있다^(1, 2). 이러한 낮은 생산수율은 일반적으로 식물세포 밖으로 배출된 단백질이 단백질분해효소에 의하여 분해되며, pH, 염분농도 등과 같은 배지의 물리적인 요인에 의하여 활성이 떨어지는 것으로 알려져 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 현탁배양 특이적인 강력 promoter의 사용과 생산된 단백질의 분해를 억제하고 단백질의 안정성을 증가시키기 위하여 단백질 안정제의 효과에 대하여 활발한 연구가 진행되고 있다^(3, 4).

RAmy3D gene은 sugar와 같은 metabolite에 의해 발현이 조절되어 metabolite가 없을 때 발현율이 급격히 증가되며⁽⁵⁾, RAmy3D의 3'-UTR은 sugar starvation 시

에 RAmy3D에 의해 발현되어지는 유전자의 mRNA를 안정화 시켜 단백질의 대량 발현을 가능하게 한다.

본 연구는 인간의 주요 cytokine의 하나인 hGM-CSF 유전자를 RAmy3D promoter를 사용하여 대량 발현을 유도하고, 형질전환 rice의 현탁세포배양을 통하여 생산된 hGM-CSF의 특성에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

RAmy3D promoter에 의하여 hGM-CSF의 유전자의 발현이 조절 될 수 있도록 식물발현벡터 pMYN44를 구축하여 벼에 형질전환 하였다. 벼의 형질전환은 1주일 정도 발아시킨 rice의 배반유래 callus에 particle-bombardment로 형질전환 하였으며, 항생제가 포함된 배지에서 형성된 callus로부터 genomic DNA를 분리하고 hGM-CSF gene에 특이적인 primer를 사용하여 PCR을 수행하여 형질전환여부를 확인하였다. 유전자의 도입이 확인된 callus를 이용하여 현탁세포를 유도하여 현탁 배양 하였으며 배양 7일 후에 현탁세포를 sucrose가 없는 배지에서 배양하여 hGM-CSF의 생산을 유도하였다. hGM-CSF의정량은 ELISA 방법과 Western blot analysis로 확인하였으며, hGM-CSF dependent cell line인 TF-1을 이용하여 biological activity를 확인하였다.

결과 및 고찰

RAmy3D promoter에 의하여 hGM-CS의 cDNA의 발현이 되도록 구축된 pMYN44 (Fig. 1)를 particle-bombardment 이용하여 벼에 형질전환 하였다. 벼의 형질전환의 여부는 hygromycine을 포함하는 배지에서 형성 된 모든 callus에서 genomic DNA를 추출하여 PCR을 수행하였으며 모든 callus에서 hGM-CSF gene으로 판단되는 약 400bp의 DNA band를 확인하였다.

유전자의 도입이 확인 된 형질전환 callus를 sucrose가 포함된 AA 배지에서 배양하였으며, 배양 7일 후에 sucrose를 포함하지 않은 AA배지에서 hGM-CSF의 발현을 유도하였으며 이의 결과는 Figure 2와 같다. 형질전환 벼의 현탁세포 5 g과 15 g을 배양한 결과 sugar starvation 3일 후부터 hGM-CSF의 생산량이 증가하기 시작하여 배양 7일 후에는 각각 약 40mg/L와 110 mg/L의 hGM-CSF의 생산을 확인하였다(Fig. 3). 또한 배지내로 분비된 총 단백질에 대한 hGM-CSF의 비율은 시간이 경과함에 따라서 증가하여 배양 7일 후에는 분비된 전체 단백질 중 약 30%가 hGM-CSF임을 확인하였다.

한편, 형질전환 된 벼의 세포배양을 통하여 생산된 hGM-CSF를 SDS-PAGE와 Western blot analysis를 실시 한 결과 *E. coli*에서 생산된 hGM-CSF는 약 18 kDa에서 확인되었으나 형질전환 된 rice로부터 생산된 hGM-CSF는 약 28 kDa의 분자

량을 보였으며 이는 glycosylation에 의한 결과로 사료된다. 형질전환 된 벼의 세포 배양을 통하여 생산된 hGM-CSF를 이용하여 생리활성을 측정 한 결과 TF-1 세포의 증식을 관찰함으로써 hGM-CSF가 정상적으로 활성을 지님을 확인하였다.

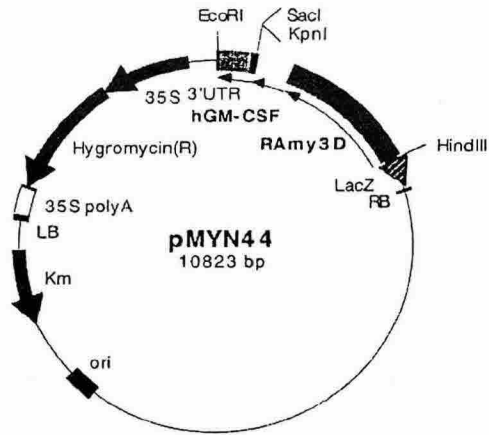


Fig. 1. Plasmid construction with inducible promoter, RAmv3D

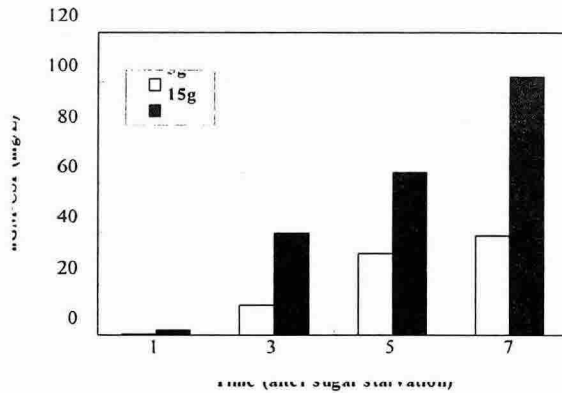


Fig. 2. Effect of initial cell density on the production of prhGM-CSF in plant cell suspension culture. The amount of prhGM-CSF was determined by ELISA

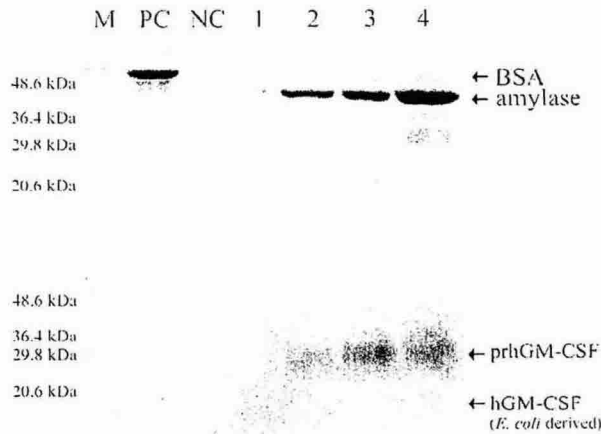


Fig. 3. Western blot analysis of rhGM-CSF produced from transgenic rice cells. Lanes M, PC and NC denote size marker, positive control derived from *E. coli* and non-transformant, respectively. Lanes 1 through 4 contain filtrate from 1, 3, 5, and 7 day after sugar starvation, respectively, of the transgenic rice

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 국가지정연구실 사업(2000-N-NL-C-212)의 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

1. Miele, L. (1997), Plants as bioreactors for biopharmaceuticals: regulatory considerations. *Trends Biotechnol.* **15**, 45-50.
2. Doran, P. M. (2000), Foreign protein production in plant tissue cultures, *Current Opinion in Biotechnol.* **11**, 199-204.
3. LaCount, W., G. An, 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.
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 α_1 -antitrypsin by plant cell culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 516-523.
5. Ning Huang, John Chandler, Bruce R. (1993) Metabolic regulation of α -amylase gene expression in transgenic cell culture of rice. *Plant Molecular Biology* **23**:737-747