

수성이상계를 이용한 재조합 hGM-CSF의 *in situ* 분리

표세훈, 명현중, 김동일*

인하대학교 공과대학 화공생명공학부

전화 (032) 863-5946, FAX (032) 872-4046

Abstract

In situ recovery of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) was performed in transgenic *Nicotiana tabacum* cell suspension cultures. Aqueous two-phase systems (ATPS) were used to utilize its biocompatibility. Transgenic plant cells could be grown up to 15.7 g/L in normal medium and 18.6 g/L in ATPS composed of 6% (w/w) polyethylene glycol (PEG) 20,000 and 10% (w/w) dextran 2,000,000. It was proved that the ATPS was not harmful to cell growth. In addition, It is expected to recover hGM-CSF simultaneously with cell growth. Using this method, maximum hGM-CSF concentration at 1.64 ng/mL was obtained on day 3.

서론

식물세포배양은 식물체로부터 추출할 수 있는 다양한 이차대사산물 등의 유용물질의 생산에서 환경 친화적인 대체 생산방법으로 인식되어 그 가능성에 대한 연구가 계속되어 왔다. 최근 유전자 재조합 기술의 발달은 식물체에서의 외래 단백질 생산을 가능하게 하였으며 특히 식물세포를 이용한 단백질의 생산은 배지의 가격이 저렴하고 미생물을 숙주로 사용하는 경우보다 단백질의 적절한 변형이 가능하여 생산되는 단백질의 생리적 활성을 높일 수 있다. 또한 형질전환된 식물세포의 배양을 통한 외래 단백질의 생산은 식물체를 이용한 방법에 비해 환경에 미치는 영향이 적고 생산되는 산물의 품질이 균일하며 추출정제 공정을 용이하게 조절할 수 있어 그 상업화 가능성이 높다고 할 수 있다.¹⁾

그러나 식물세포배양을 이용한 유용물질의 생산에 있어서의 문제점으로 지적되고 있는 낮은 수율과 유용물질이 희석된 상태로 존재하게 된다는 점은 *in situ* recovery를 이용함으로써 극복할 수 있을 것으로 기대되고 있다. 이러한 *in situ* recovery의 방법중 식물세포의 배양과 동시분리가 가능한 최적의 시스템으로 수성이상계를 들 수 있다.

수성이상계는 한계 농도 이상의 두 가지 친수성 고분자 수용액의 혼합이나 한 가지 고분자 수용액과 염 수용액의 혼합에 의해 형성되는 시스템으로서 서로 섞이지 않아 두 개의 상이 하나의 시스템을 형성하게 된다. 이러한 수성이상계는 높은 수분 함유율과 낮은 계면 장력 그리고 손쉬운 생성물의 회수로 인해 생물공학적 이용에 적합한 시스템으로 여겨진다.

본 연구에서는 형질전환된 *Nicotiana tabacum* 세포로부터 생산되며 배지로 분리되는 human granulocyte-macrophage colony stimulating factor(hGM-CSF)를 수성이상계를 이용하여 세포가 자라는 쪽과 다른 상에 선택적으로 분배시킴으로써 회수를 용이하게 하도록 하는 최적의 수성이상계 시스템을 얻고자 하였다.

재료 및 방법

본 실험에서는 hGM-CSF 유전자가 삽입된 *Nicotiana tabacum* 세포를 이용하였다. 형질전환 세포는 전북대학교에서 분주받은 것을 사용하였다. 수성이상계로는 PEG(polyethylene glycol, Av. MW 20,000)와 dextran(Av. MW 2,000,000)을 이용하였다. 각 시스템은 문헌을 참조하여 Table 1과 같이 제조하였으며, 상분리가 확실한 PD 5, PD 6 그리고 PD 7을 이용하여 hGM-CSF의 *in situ* recovery를 수행하였다.

Table 1. Phase composition of ATPSs

	PEG (% w/w)	Dextran (% w/w)
PD 1	3	7
PD 2	4	7
PD 3	5	7
PD 4	3	10
PD 5	4	10
PD 6	5	10
PD 7	6	10

각각의 고분자 수용액은 MS 배지를 바탕으로 제조하였으며 조성은 1:1의 무게비로 고정하였다. 각 시스템은 25°C, 110 rpm의 shaking incubator에서 유지하였다.

수성이상계 내에서의 세포의 생장은 dry cell weight(DCW)로 측정하였으며, 각 상으로 분배된 hGM-CSF의 농도는 ELISA 방법을 이용하여 405 nm에서 정량분석하였다.

결과 및 고찰

선정된 조성에서 수성이상계를 확인한 결과 대부분의 PEG는 윗 상으로 분배되었으며 dextran은 아랫 상으로 분배되었다. 수성이상계 내에 존재하는 세포들은 모두 계면에 존재하게 되는데 이는 수성이상계의 특징상 낮은 계면장력을 가지고 있기 때문이라고 생각할 수 있다(Figure 1).

정확한 분배 결과는 Figure 2에 나타내었다. 그림에서 볼 수 있는 것과 같이 PEG의 농도가 높아짐에 따라 윗 상의 부피가 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이것은 일반적으로 PEG의 농도가 증가하면 수용액의 소수성이 커짐으로 해서 상대적으로 친수성인 아랫 상과의 상용성 차이에 의해 상분리 시 윗 상의 부피가 증가한다는 사실에 기인한다. 즉 아랫 상으로 분배되었던 PEG와 윗 상으로 분배되었던 dextran이 상용성 차이를 견디지 못하고 각각 PEG-rich phase와 dextran-rich phase로 더 많이 분배되기 때문이다.

세포의 생장을 확인해 보면 초기 ATPS 존재 하에서 생장을 시작하는 경우 대조구에 비해 지연기가 길게 나타나기는 하지만 배양 후반으로 갈수록 대조구와 비슷한 생장을 보여주고 있다(Figure 3). 대조구의 세포생장이 12일째에 최대인 15.7 g/L인데 비해 PD 7에서는 18.6

g/L로 오히려 수성이상계 내에서 세포생장이 더 높음을 확인할 수 있었다. 배양 중반인 14 일에는 대조구의 생장이 감소하는데 반해 PD 6에서는 오히려 계속적으로 증가하는 경향을 보여주고 있다. 이상의 결과로부터 세포생장에 있어서 수성이상계의 존재가 배양 초기를 제외하고는 부정적인 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.



Figure 1. Picture of ATPS with cultivating plant cells

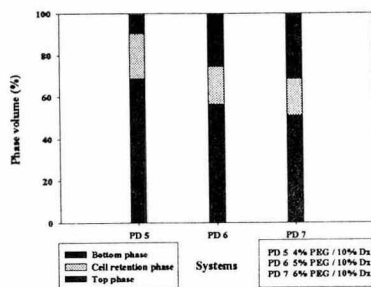


Figure 2. Distribution of each component after phase separation in ATPS.

이때 생산되는 hGM-CSF의 양은 3일째에 PD 7에서 1.64 ng/mL이었으며 나머지 시스템에서는 1.5 ng/mL라는 높은 생산량을 보이지만 4일째부터는 급격히 감소하게되는데 이는 배지 내로 분비된 hGM-CSF가 protease에 의해 분해되었거나 단백질 자체의 안정성이 낮기 때문인 것이라고 생각된다(Figure 4).

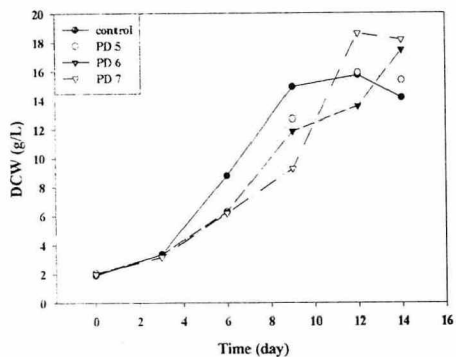


Figure 3. Cell growth in each system.

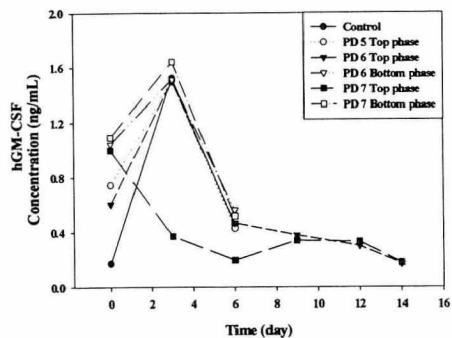


Figure 4. Concentration of hGM-CSF.

특히 PD 7의 경우 3일째에 윗 상에서의 hGM-CSF의 농도(0.37 ng/mL)보다 아랫 상에서의 농도(1.64 ng/mL)가 더 높는데 이때의 분배계수는 0.226으로 대부분의 단백질이 아랫 상으로 분배되었음을 보여준다. 이는 세포에서 분비된 친수성의 단백질이 상대적으로 친수성을 보이는 dextran-rich phase 쪽으로 분배되었음을 의미한다. 이것은 고분자량의 PEG가 높은 농도로 존재할 때 친수성 단백질의 분배계수가 낮아진다는 사실과 일치한다.²⁾ 그러나 다른 시스템들의 경우에는 분배계수가 1에 가까워 윗 상과 아랫 상으로의 분배가 일어나지 않고 hGM-CSF가 양쪽 상에 고루 퍼져 있음을 보여준다. 배양 시작 후 6일이 지나면 세포의 생장이 증가함에 따라 차지하는 부피가 늘어나게 되므로 더 이상 윗 상과 아랫 상으로의 분리를 확인할 수가 없게된다. 만약 연속적인 공정이라면 충분히 이러한 문제점을 해결할 수 있을 것으로 기대된다. 이러한 일련의 실험을 통해서 PD 7(6% (w/w) PEG 20,000과 10% (w/w) dextran 2,000,000) 시스템에서의 *in situ recovery*를 이용할 경우 최대의 hGM-CSF를 생산할 수 있을 것으로 기대된다.

요약

본 연구에서는 hGM-CSF를 생산해 배지 내로 분비하도록 유전자 조작된 *Nicotiana tabacum* 세포를 수성이상계 내에서 배양하여 *in situ recovery*를 시도하였다. 특히 식물세포 자체의 생장에 큰 영향을 주지 않으면서도 일반 배지에서 회수한 단백질에 비해 많은 양을 생산할 수 있는 수성이상계 시스템을 선정하였다. 6% (w/w) PEG 20,000과 10% (w/w) dextran 2,000,000을 이용하는 경우 최대 세포 농도가 18.6 g/L로, 일반배지를 사용하는 경우(15.7 g/L)에 비해 저해가 없음을 확인하였다. 또한 목적 단백질인 hGM-CSF의 생산에 있어서도 위의 시스템의 경우 dextran-rich phase인 아랫 상으로 분배됨으로 인해 회수가 쉬울 것으로 확인되었으며 그 생산량 또한 일반배지에서의 생산량(1.5 ng/mL)에 비해 크게 다르지 않음을 확인할 수 있었다. 따라서 hGM-CSF의 회수를 위한 *in situ recovery* 시스템에 있어서 수성이상계의 이용 가능성을 확인하였다.

참고문헌

1. Magnuson, N. S., P. M. Linzmaier, R. Reeves, G. An, K. HayGlass, and J. M. Lee, "Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture"(1998), *Protein Expr. Purif.*, **13**, 45-52.
2. Sarubbo. L. A., L. A. Oliveira, Al L. F. Porto, H. S. Duarte, A. M. A. Carneiro-Leao, J. L. Lima-Filho, G. M. Campos-Takaki, and E. B. Tambourgi, "New aqueous two-phase based cashew-nut tree gum and poly(ethylene glycol)"(2000), *J. Chromatogr. B*, **743**, 79-84.