

## 담배세포현탁배양을 이용한 human granulocyte-macrophage colony stimulating factor의 생산에서 배지 성분이 미치는 영향

이기용, 이상윤, 명현종, 노윤숙, 김동일  
인하대학교 생물공학과 세포배양공학실험실  
전화 (032) 863-5946, Fax (032) 872-4046

### Abstract

Production of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) by *Nicotiana tabacum* cell suspension culture was studied in Murashige and Skoog (MS) medium with sucrose as a carbon source, ammonium nitrate and potassium nitrate as nitrogen sources, potassium dihydrogen phosphate and sodium dihydrogen phosphate hydrate as phosphate sources, respectively. Optimum concentrations for carbon, nitrogen, phosphate was determined to enhance the production of hGM-CSF. Cell growth was better at high initial sucrose concentration (60 g/L), high initial nitrogen concentration (121.04 mM). Maximum cell density (18.28 g/L) was obtained at 60 g/L of sucrose after 14 days. Cell growth was not so good at low initial sucrose concentration (10 g/L), but the highest hGM-CSF production was obtained at the latter half of exponential phase. hGM-CSF production increased about 3 fold at initial phosphate concentration of 4.96 mM

### 서론

유전자재조합 단백질은 그동안 주로 미생물이나 동물세포에서 생산되어져 왔으나 식물분자 생물학의 발달과 함께 최근의 많은 연구들을 통하여 식물체 및 식물세포를 이용한 생산이 가능해 지고 있다. 식물세포를 이용할 경우 배지의 가격이 동물세포에 비해 훨씬 저렴하며 기존의 이차대사산물 생산 연구에서 축적된 배양기술을 이용할 수 있는 장점도 있다. 고등 세포이므로 glycosylation과 같은 post-translational modification도 가능하므로 생물학적 활성을 가진 단백질의 생산도 가능하다. 이와 같이 미생물이나 동물세포를 이용하여 외래 단백질을 생산하는 것에 비해 많은 장점들이 알려지면서 이에 대한 관심이 높아지고 있다.<sup>1)</sup> 본 연구에서는 형질전환된 식물세포인 *Nicotiana tabacum* cell에서 의약품 재조합단백질인 hGM-CSF의 생산을 극대화하기 위해 carbon, nitrogen, phosphate와 같은 배지 성분의 농도가 미치는 영향을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 세포주 및 배양

본 연구에 사용된 세포주는 전북대학교 양문식 교수님 실험실에서 분주받은 hGM-CSF를 생산할 수 있는 *Nicotiana tabacum*이며 생장배지로는 MS 기본배지를 사용하였다. 탄소원으로는 30 g/L의 sucrose를 사용하였고, 생장조절제로는 2,4-D(0.2 mg/L)와 kinetin(0.02

mg/L)을 사용하였다. pH는 1N NaOH를 사용하여 5.9로 조절하였으며 가압증기멸균하여 사용하였다. 현탁배양은 회전식 진탕배양기에서 25°C, 120 rpm, 암조건에서 수행하였다.

### 세포량측정

세포의 성장을 알아보기 위하여 세포의 생체중량과 건조중량을 측정하였는데 생체중량은 현탁배양된 세포를 진공펌프와 Whatman No.1 여과지로 여과하여 세포와 배지를 분리한 다음 세포로부터 수분을 제거하고 무게를 알고있는 weighing dish에 옮겨서 저울로 측정하였다. 건조중량은 생체중량을 측정한 세포를 60°C로 유지한 dry oven에서 항량이 될 때까지 건조하여 측정하였다.

### 총단백질량 분석

전체 단백질을 정량하기 위해서는 Bradford assay를 사용하였다. 염색을 위해서는 Coomassie blue G250을 사용하였고, 595 nm에서 측정하였다.

### hGM-CSF 정량분석

hGM-CSF의 정량방법으로는 ELISA 법을 사용하였으며 450 nm에서 측정하였다.

## 결과 및 고찰

먼저 탄소원인 sucrose의 농도를 10, 20, 30, 40, 50, 60 g/L로 다양하게 변화하여 그 영향을 살펴보았다. Figure 1에 나타난 결과를 보면 4일째까지는 lag phase로서 거의 비슷한 생장을 보이다가 6일째 이후로는 sucrose의 농도에 따른 영향을 확인할 수 있다 .

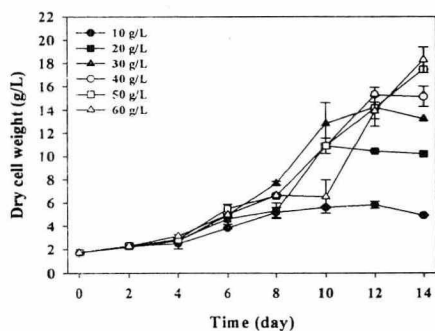


Figure 1. Effects of sucrose concentration on cell growth of transgenic *Nicotiana tabacum*.

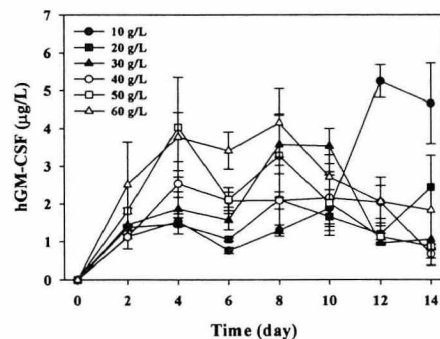


Figure 2. Effect of sucrose concentration on the production of hGM-CSF.

10 g/L와 20 g/L의 경우는 배양후반으로 갈수록 탄소원의 고갈에 따라 생장이 느려지게 되고 대조구인 30 g/L에서의 세포농도 14.2 g/L에 비하여 최고 세포 농도도 현저히 떨어지게

된다. 이에 비해 40, 50, 60 g/L sucrose의 경우에는 lag phase가 대조구보다 조금 더 길어졌으며 그 이후에는 세포의 생장이 꾸준히 증가하여 대조구가 death phase에 들어간 이후에도 증가하는 것을 볼 수 있다. 최고 세포 농도도 대조구보다 40 g/L에서는 7.7%, 50 g/L에서는 23.2%, 60 g/L에서는 28.1%가 증가하였다. 이후에 세포농도의 증가와 재조합단백질인 hGM-CSF 생산량과의 관계를 알아보기 위하여 세포가 성장하는 동안에 배지 내로 분비되는 hGM-CSF 농도를 측정하였으며 그 결과는 Figure 2에 정리하였다. 배지내 hGM-CSF의 양은 초반 4일까지는 증가하다가 다시 6일까지 감소하고 다시 9일까지 증가하다가 감소하는 경향을 보인다. Figure 2에서 주목할만한 사실은 초반에 모든 세포농도는 비슷함에 비해 hGM-CSF의 양은 당농도가 높을수록 높다는 사실이다. 4일째 50g/L의 경우는 가장 낮은 10 g/L의 경우보다 65%나 높은 것을 알 수 있다. 또한 배양 후반부에 거의 세포의 생장이 정지되었음에도 불구하고 낮은 당농도(10, 20 g/L)에서 hGM-CSF 생산이 증가되는 것이 관찰되었다. 특히 12일째 10 g/L의 경우는 대조구보다 5배의 증가를 보였다.

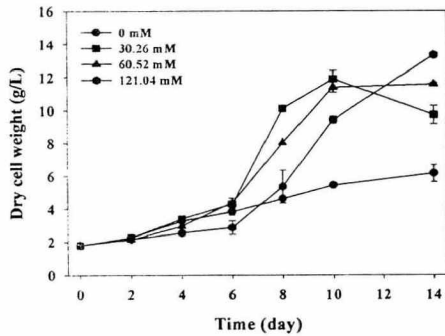


Figure 3. Effect of nitrogen concentration on cell growth of *Nicotiana tabacum*.

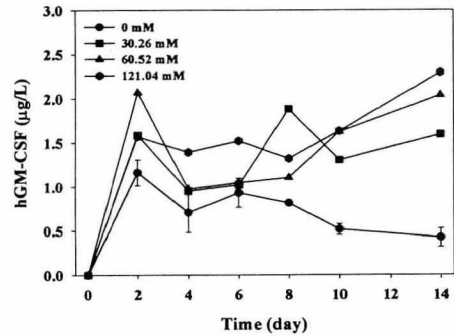


Figure 4. Effect of nitrogen concentration on productivity of *Nicotiana tabacum*.

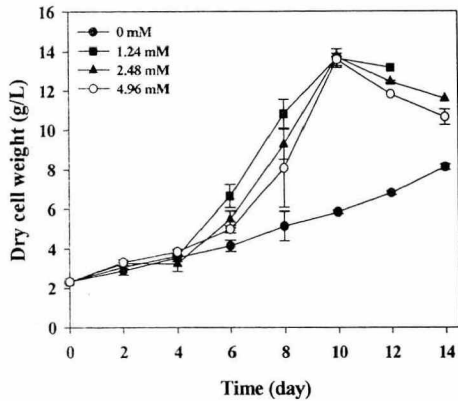


Figure 5. Effect of phosphate concentration on cell growth of *Nicotiana tabacum*.

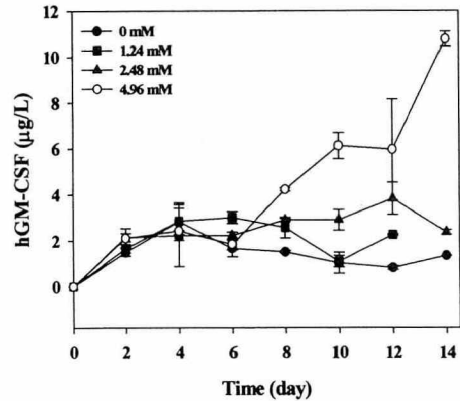


Figure 6. Effect of phosphate concentration on productivity of *Nicotiana tabacum*.

Nitrogen source가 세포 성장 및 단백질 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 질소원의 초기농도를 다르게 첨가하여 농도별 세포생장의 변화와 hGM-CSF의 생산의 변화를 살펴보았다.<sup>2)</sup> 질소원이 미치는 영향은 Figure 3에 나타내었다. 대조구인 60.52 mM인 경우보다 세포생장이 좋은 경우는 nitrogen을 두 배로 첨가한 121.04 mM 경우밖에 없었다. 121.04 mM을 첨가한 경우에는 초기의 lag phase가 길어지지만 후반부에 급격히 성장하는 결과를 보였다. Figure 4에는 세포가 성장함에 따라 배지 내로 분비하는 hGM-CSF의 양을 측정한 결과를 정리하였다. hGM-CSF의 농도는 2일째와 14일째가 가장 높고, 대조구인 60.52 mM와 121.04 mM의 두 경우가 가장 안정적이면서, 많은 양을 생산하는 것을 알 수 있다. Nitrogen source를 전혀 넣지 않은 경우는 거의 hGM-CSF를 생산하지 못하는 사실을 확인하였다. 전체적인 hGM-CSF 생산 경향은 탄소원이 미치는 영향을 조사한 경우에서와 같이 M자 모양의 경향을 보였다. 마지막으로 phosphate의 농도가 세포생장과 단백질 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Figure 5와 Figure 6에 정리한 결과를 보면 phosphate를 첨가하지 않은 경우를 제외한 1.24 mM, 2.48 mM(대조구), 4.96 mM에서의 세포생장은 거의 비슷하였다. 그러나 hGM-CSF의 생산에 있어서는 분명한 차이를 보였는데, 대조구보다 농도가 낮은 0 mM와 1.24 mM인 경우는 hGM-CSF의 생산량이 낮았으며, 대조구보다 높은 4.96 mM인 경우에는 대조구에 비해 hGM-CSF의 최대 생산량이 약 3배나 증가하였다. 이상의 결과로부터 carbon, nitrogen, phosphate의 농도를 최적화하면 hGM-CSF의 생산을 극대화할 수 있음을 확인하였다.

#### 요약

Sucrose의 경우 저농도에서는 후반부로 갈수록 세포성장 속도는 현저히 감소하는데 비해 hGM-CSF 생산은 후반부에 급격히 증가함을 확인하였다. 고농도 sucrose를 사용하는 경우에는 lag phase가 길어지는 동안에 hGM-CSF의 생산이 증가하였다. 따라서 배양 초기에는 고농도 sucrose가, 배양 후반에는 저농도 sucrose로 존재하는 경우에 hGM-CSF를 많이 얻을 수 있었다. Nitrogen source의 농도는 60.52 mM과 121.04 mM일 때가 세포의 성장이나 hGM-CSF의 생산을 증가시켰으며, phosphate의 경우에는 4.96 mM일 때가 대조구인 2.48 mM일 때보다 hGM-CSF의 생산을 3 배 증가시켰다.

#### 참고문헌

1. James, E and Lee, J M (2001), "The production of foreign proteins from genetically modified plant cells", *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 72, 127-156.
2. Hänsch, R., D. G. Fessel, C. Witt, C. Hesberg, G. Hoffmann, P. Walch-Liu, C. Engels, J. Kruse, H. Rennenberg, W. M. Kaiser (2001), "Tobacco plants that lack expression of functional nitrate reductase in roots show changes in growth rates and metabolite accumulation", *Journal of Experimental Botany*, 52, 1251-1258