

형질전환된 담배세포의 고정화를 통한 hGM-CSF 생산에 관한 연구

노윤숙, 이상윤, 김동일*

인하대학교 공과대학 생명화학공학과

전화 (032) 863-5946, FAX (032) 872-4046

Abstract

Effects of immobilization on the production of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) by *Nicotiana tabacum* cells were investigated using alginate and polyurethane foam as immobilization matrices. Encapsulation of the cells in alginate decreased protein production by 50% compared with that of suspension culture. Maximum hGM-CSF concentration was obtained by the cells immobilized in polyurethane foam. High hGM-CSF production could be possible when polyurethane foam was used because of high specific production and easy immobilization for cell recycling process with high cell density.

서 론

식물세포 배양을 통한 이차대사산물의 생산은 지금까지 많은 연구가 진행 된 바 있다. 식물세포는 최근 외래 단백질 생산의 숙주로서 그 가능성을 인정받고 있다. 동물세포 배양을 통한 외래 단백질 생산에 비해 식물세포를 이용할 경우 저렴한 배지 가격과 동물바이러스 오염으로부터의 안전성 등의 장점이 있다. 그러나 낮은 단백질 생산량과 느린 성장 속도, 전단응력에 약한 특징은 산업화를 막는 걸림돌이 되고 있다. 이의 보완을 위해 식물세포 고정화 방법을 이용할 경우 전단응력에 의한 손상의 보호, 유전적 안정성의 증대, 연속배양과 세포 재사용등의 장점이 있다¹⁾.

의료용 단백질인 human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF)는 화학 항암 요법의 부작용인 골수 기능 약화로 인한 면역력 저하를 예방하여 다량의 화학 요법 치료제의 투여를 가능하게 한다. 본 연구에서는 형질전환된 식물세포의 단점을 보완하기 위해 여러 고정화 방법을 시도하여 세포 증식과 목적 단백질 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

세포 배양 및 배지

hGM-CSF를 생산하는 형질 전환된 *Nicotiana tabacum* 세포주는 전북대학교로부터 제공받았다. MS 기본배지에 30 g/L sucrose, 0.1 g/L myo-inositol, 0.2 mg/L 2,4-dichlorophenoxy acetic acid(2,4-D), 0.02 mg/L kinetin, 100 mg/L kanamycin을 첨가하였다. 배양은 25°C, 120 rpm, 암조건에서 수행하였으며 7일마다 계대하였다.

식물세포 고정화

N. tabacum 세포는 alginate(Sigma, 3,500 cps), polyurethane foam(이진케미칼)을 이용하여 각기 다른 방법으로 고정화 하였다. Alginate bead의 제조를 위해서는 2% alginate-cell solution을 0.1 M CaCl₂ 용액에 떨어뜨려 1시간 동안 경화 시킨 후 배양 배지로 옮겨주었다. Polyurethane foam 내 고정화는 배양배지에 0.6×0.6×0.6 cm³ foam을 0.2 g씩 넣어 멸균 한 후 현탁세포와 동일하게 접종하였다.

세포량 측정

현탁세포는 배양액을 Whatman No.1 여과지를 통과시켜 세포와 배지를 분리하여 세포 생체량을 측정하였으며 60°C의 dry oven에서 항량이 될 때까지 건조시켜 세포건체량을 측정하였다. Alginate bead로 고정화된 세포는 pH 5.9인 1 M phosphate buffer에 0.1 M EDTA를 녹인 용액으로 bead를 녹인 후 현탁세포와 같은 방법으로 세포량을 측정하였다. Polyurethane foam 내 고정화된 세포의 건체량은 여과지를 통과시켜 분리한 세포를 50°C 물로 2분간 세척하고 건조한 후 넣어준 foam의 무게인 0.2 g을 제하여 측정하였다.

총 단백질과 hGM-CSF의 정량분석

총 단백질의 양의 측정을 위해서는 Bio-Rad사의 Bradford assay kit을 이용하였고 표준 물질은 bovine serum albumin으로 하여 595 nm에서 측정하였다.

hGM-CSF의 양은 ELISA 분석 방법을 이용하여 450 nm에서 정량분석하였다.

결과 및 고찰

지금까지 식물세포 고정화 방법은 이차대사산물 생산 증대를 위하여 주로 적용되어왔다. 형질전환 식물세포에 고정화 방법을 적용하여 목적단백질의 생산량을 증가시키는 연구는 아직 많이 되어있지 않다. 식물세포는 미생물과 달리 크기가 크고 환경 변화에 예민하기 때문에 본 연구에서는 고정화 조건이 상대적으로 세포에 덜 유해로운 것으로 알려진 alginate와 polyurethane foam을 이용하였다.

2% alginate-cell solution으로 bead를 제조하였을 경우 6일째부터 세포 유출이 관찰되었으며 3%의 경우 유출이 시작되는 날은 미뤄졌으나 세포 성장과 hGM-CSF 생산량은 저하되었다(Figure 1). Alginate는 식물세포에 elicitor의 역할을 한다는 보고가 많으

며 이차대사산물 생산에 적용시 일반적으로 많은 생산량 증대를 보인다²⁾. hGM-CSF 생산량에 있어서 alginate bead의 경우 6일째 3.35 $\mu\text{g/L}$ 로써 현탁세포의 6.01 $\mu\text{g/L}$ 와 polyurethane foam 내 고정화한 경우인 6.67 $\mu\text{g/L}$ 의 50%밖에 미치지 못하는 결과가 나왔는데 이는 재조합 단백질의 발현에 alginate와 세포 간의 화학적 상호작용이나 고정화 환경이 단백질 생산에 부정적인 영향을 미친 것으로 예상된다(Figure 2a, b). 세포 외로 배출된 총 단백질의 양 역시 alginate bead의 경우 10일째 109 mg/L로 가장 낮았다(Figure 2c).

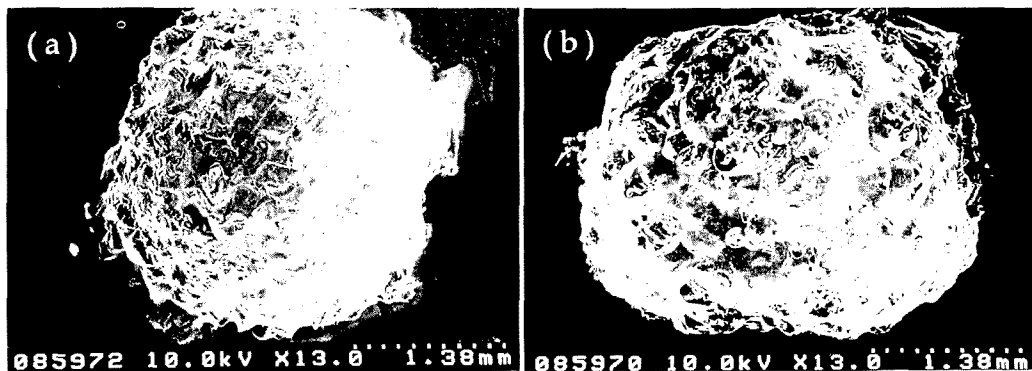


Figure 1. Comparison of alginate bead outside on 0 day (a) and 8 day (b). Cell leaking is appeared from 6 day. There are many holls on the alginate bead outside.

Polyurethane foam 내 고정화 한 경우 전체적인 세포 성장량은 가장 낮았지만 최대 hGM-CSF 생산량은 6일째 6.67 $\mu\text{g/L}$ 로 가장 높았다(Figure 2a, b). Foam 내 고정화는 식물세포 자체 특성인 고체 표면에서의 흡착성을 이용한 것으로 alginate bead 제조 보다 세포에 덜 영향을 미치는 조건이다. 세포 성장량에 따른 목적단백질 생산량인 비생산량을 보면 배양 기간 전체에 걸쳐서 현탁세포에 비해 최대 2.34배 높으므로 foam 내에 세포를 고농도로 포집 후 연속공정에 들어갔을때 같은 농도의 현탁세포보다 많은 양의 단백질 생산량을 얻을 수 있을 것이다(Figure 2d). 그리고 현탁세포의 고농도 배양시 세포의 재사용은 사실상 어려우나 고정화된 세포는 foam 내에 포집된 상태이므로 재사용이 용이하여 경쟁력있는 고정화 공정의 가능성을 예상할 수 있다.

요 약

형질전환된 담배세포배양을 이용한 hGM-CSF 생산에 있어 고정화가 미치는 영향을 연구하였다. Alginate bead를 이용한 고정화 세포의 경우 hGM-CSF 생산이 6일째 3.35 $\mu\text{g/L}$ 로써 현탁세포 6.01 $\mu\text{g/L}$ 의 약 50%에 미쳤고 polyurethane foam 내 고정화 한 경우

는 세포 생장은 낮았으나 hGM-CSF 생산량은 6일째 6.67 $\mu\text{g/L}$ 로 가장 높았다. 높은 비 생산량을 보이는 polyurethane foam내 고농도로 세포를 포집시킨 후 세포 재사용이 용이한 장점을 이용하여 연속공정에 적용할 경우 더 높은 hGM-CSF의 생산이 기대된다.

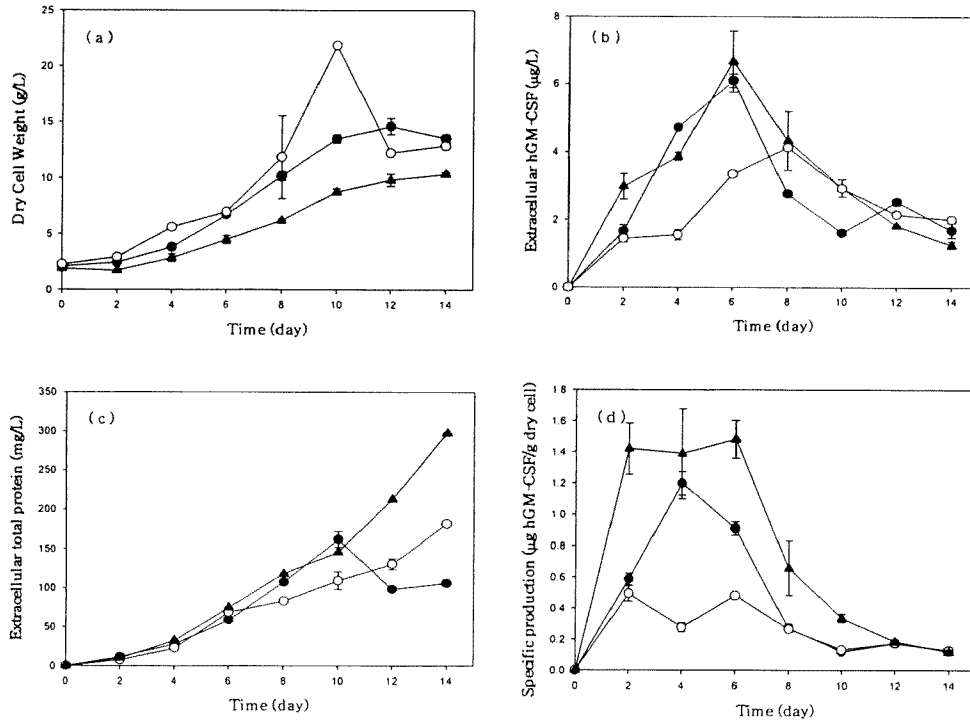


Figure 2. Effect of immobilization on growth of *N. tabacum* (a), production of extracellular hGM-CSF (b), production of extracellular total protein (c), and specific production (d). ●, suspension; ○, alginate; ▲, polyurethane foam.

감사의 글

본 연구는 산업자원부의 차세대신기술개발사업(A18-06-03)의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Bodeutsch, T., E. A. James, J. M. Lee, "The effect of immobilization on recombinant protein production in plant cell culture" (2001), *Plant Cell Rep.*, **20**, 562-566.
- 2) Aoyagi H, J. Yasuhira, H. Tanaka, "Alginate promotes production of various enzymes by *Catharanthus roseus* cells" (1998), *Plant Cell Rep.*, **17**, 243-247.