

Mouse L Cell에서의 외래 유전자 유래 단백질의 생산

최윤희^{1*} · 岸本忠三³ · 최차용^{1,2}

¹서울대학교 공과대학 생물화학공학 협동과정

²서울대학교 공과대학 공업화학과, ³오오사카대학 세포공학센터

The Production of Foreign Protein in Mouse L Cell

Choi, Youn-Hee^{1*}, Tadimitsu Kishimoto³ and Cha-Yong Choi^{1,2}

¹Interdisciplinary Program for Biochem. Engineering and Technology,
College of Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

²Department of Chemistry Technology, College of Engineering,
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

³Institute for Molecular and Cellular Biology, Osaka University, Osaka 565, Japan

Abstract — Some interleukin 6 (IL-6) transcription control factors were reported as the regulator of IL-6 expression. A nuclear protein bound to interleukin 1 (IL-1) responsive element in the IL-6 promoter region was named NF-IL6 (nuclear factor for IL-6). This NF-IL6 was known to be very important as a transcription factor for various immuno-protein as well as for IL-6. The human NF-IL6 genes were transfected into the mouse L cells under the metallothionein promoter (MT promoter) to establish a model system for the expression of foreign gene in the mammalian cell line. Over a thousand of neomycin-resistant clones were obtained by using electroporation method, and some positive clones were screened with Southern blotting. After the selection of LBM6104 clone with high copy numbers, the expression of human NF-IL6 under the control of the MT promoter was confirmed by Northern and Western blot analysis. The MT promoter vector system became quite useful for a setup of foreign protein expression in the mammalian cell lines.

1970년대부터 유전자 재조합에 의한 미생물 개발이 시작되면서 생물 공업은 많은 발전을 거듭해 왔다. 그러나 동물세포 유래 단백질의 경우 미생물을 통해 생산되는 과정에서 미생물 세포의 제한된 능력 때문에 활성을 지닌 완전한 구조의 단백질을 생산하는데 한계가 있음이 밝혀져 왔다. 그 결과 동물세포 유래 생리활성 물질의 경우 다시 동물세포를 사용하고자 하는 노력들이 시작되어 많은 제품들이 현재 동물세포 배양에 의해 생산되고 있다. 그러나 동물 세포는 자체의 control 능력 때문에 외래 단백질의 고농도 생산이 어렵다.

본 논문에서는 외래 단백질 model로서 human NF-IL6(hNF-IL6)를 택하여 mouse L cell에서 높은 농

도로 발현되도록 재조합하였다. 이 human NF-IL6는 human interleukin-6(hIL-6)(1-8) 유전자의 promoter 서열 중 human interleukin-1(hIL-1) responsive element에 결합하는 성질에 의해 분리된 핵단백질로서 IL-6의 전사 조절 인자(9)로 밝혀져 있다. 그 조절 기작은 hNF-IL6의 leucine zipper domain을 이용하여 dimer가 형성된 후 C terminal 부분이 DNA와 결합하여 N-terminal 부분이 hIL-6의 전사 활성화에 직접 관여한다고 예상되고 있다(10). 이 hNF-IL6는 다른 면역 관계 단백질의 전사 조절 영역에도 결합함이 밝혀져(9) 그 중요성이 부각되고 있으나 재조합 대장균에서는 발현시 너무 빨리 분해되어 생산이 어려웠다. 따라서 이 hNF-IL6를 동물세포용 발현 vector에 집어넣어 mouse L cell에서 생산 가능할가를 연구 검토하였다.

Key words: Interleukin 6, NF-IL6, mouse L cell, LBM 6104, MT promoter, expression

*Corresponding author

재료 및 방법

균주, 세포주 및 배지

발현 vector의 제작 및 재조합 작업에는 *E. coli* JM 105, JM109 및 DH5 α 를 사용하였고, 그 배지로는 LB 배지를 사용하였다. 형질전환된 대장균의 screening에는 ampicillin을 50~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 사용하였다.

hNF-IL6를 생산하기 위한 동물 세포주로는 mouse fibroblast line인 L-cell을 사용하였고 배지는 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)을 기저배지로 하여 penicillin(100 U/ml) 및 streptomycin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가하고 fetal calf serum(FCS) 농도가 10%가 되도록 넣어주었다. 배양 용기는 D-100 조직 배양용 dish를 사용하였고 transfection 후 screening에 24 well plate를 이용하였다. CO₂ incubator(37°C, 5% CO₂)내에서 배양하였으며 screening 때에는 geneticin을 사용하였다.

제한효소 및 재조합 plasmid의 제조

hNF-IL6 유전자의 대량 생산에는 pBlucscript SK (+)를 사용하였으며 mouse L cell에서의 발현에는 pBMG Neo plasmid(11, 13)를 Basel 연구소의 도움으로 사용하였다. 제한효소 및 각종 효소 등은 BRL 혹은 Takara Chem. Co.에서 구입 사용하였고 각 효소 조작은 일반적인 방법(12)을 따랐다.

pBlucscript SK(+)*의 Pst*I 위치를 *Xho*I으로 전환시킨 후 *Eco*RI과 *Sal*I으로 자르고 NF-IL6 cDNA를 cloning시켰다. 여기에서 다시 *Xho*I으로 잘라내 1 kb 조각을 추출하여 pBMG Neo vector의 *Xho*I 위치에 cloning하였다. 이 재조합 plasmid를 pBMG/NF-IL6라 칭하였다(Fig. 1).

재조합 plasmid의 대량생산

재조합 plasmid를 대량생산하기 위하여 *E. coli* JM 109를 competent cell로 만들어 형질전환시켰다. 형질전환된 colony는 1 kb의 NF-IL6를 random primer labelling한 후 colony hybridization 방법에 의해 선별하였다. 선택된 colony를 대량배양하여 plasmid를 얻었다.

Mouse L cell의 형질전환

Electroporation method를 사용하여 mouse L cell을 형질전환시켰다. D-100 조직 배양용 dish에서 배양된 L cell은 trypsin 처리로 떼어낸 후 PBS로 3회

세척하고 살아있는 세포 10⁷개를 KPBS/MgCl₂ 용액(30.8 mM NaCl, 120.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.46 mM KH₂PO₄, 5 mM MgCl₂) 1 ml에 현탁시켰다. 멸균 준비된 plasmid 20 μg 을 KPBS/MgCl₂ 300 μl 에 용해시켜 L cell과 섞은 후 멸균된 1회용 cuvette에 넣어 얼음속에서 10분간 냉각하고 electroporation 장치(Promega Biotec. X-cell 2000)에 고정하여 1.5 kV의 정전압을 걸어준 뒤 다시 얼음속에서 냉각시켰다.

냉각시켜 놓은 DMEM(10% FCS 포함)에 cell을 희석하여 10장의 dish에 분주하고 1일간 CO₂ incubator(37°C)에서 배양한 뒤 geneticin을 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 첨가, 배양하여 형질전환 세포를 선별하였다. 사흘마다 geneticin이 들어있는 새 배지로 교환하여 single colony 크기가 2~3 mm의 지름이 되면 각 colony를 따서 24 well plate에 옮긴 후 geneticin 농도를 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 사용하여 배양하였다.

형질전환된 mouse L cell의 확인 및 분석

24 well에서 포화상태 배양된 각 colony들은 D-100 dish로 옮겨 monolayer로 배양 후 재조합 plasmid의 도입여부를 확인하기 위하여 southern blot analysis를 행하였다. Southern blot analysis를 하기 위해, D-100 dish에 포화 상태의 monolayer로 배양된 세포를 PBS 세척 후 Hirt 용액(10 mM Tris.Cl(pH 7.6), 10 mM EDTA, 0.6% SDS) 1 ml을 첨가, 실온에서 30분간 방치한 뒤 세포 용해액을 microfuge tube에 옮겨 5 M NaCl 260 μl 첨가하고 4°C에서 천천히 교반하면서 16 시간 정도 반응시켰다. 이 용액을 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 ethanol 침전시켜 DNA를 회수한 뒤 agarose gel running하여 southern hybridization을 행하였다. Probe는 random primer labelling된 hNF-IL6를 사용하였다.

RNA로의 전사 여부는 northern blot analysis로 확인하였다. D-100 dish에 monolayer로 배양된 세포로부터 total RNA를 분리한 후(15) oligo(dT)-cellulose column을 이용하여 poly(A) RNA를 분리하였다. 얻어진 total RNA와 poly(A) RNA를 각각 northern blot analysis하였다. 사용한 probe는 역시 random primer labelling된 hNF-IL6였다.

단백질로의 발현을 확인하기 위하여 western blotting 방법을 사용하였다. 배양된 세포 2 \times 10⁶개를 모아 2회 세척 후 300 μl 의 용액(10 mM HEPES(pH 7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM

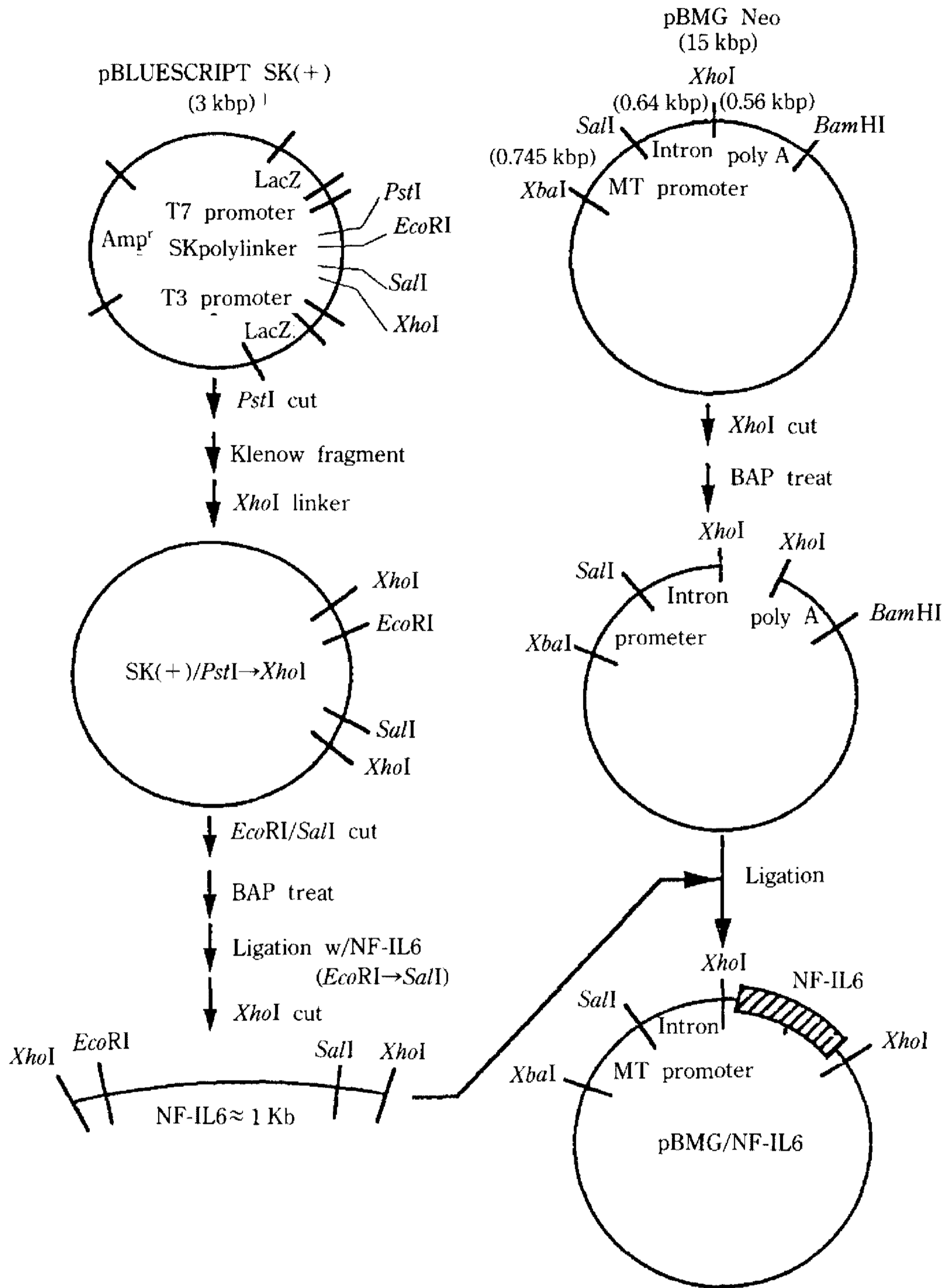


Fig. 1. Schematic diagram for pBMG/NF-IL6 construction.

DTT, 0.5 mM PMSF)에 현탁한 후 얼음속에서 15분간 냉장시켰다. 10% triton X-100 용액 20 μ l를 첨가하여 10초간 vortex하고 5,000 rpm에서 1분간 원심분리 후 침전물에 용액(20 mM HEPES(pH 7.9), 25% glycerol, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) 70 μ l를 더해 4°C에서 20분간 진탕시켰다. 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 핵

추출물은 SDS-PAGE 후, anti hNF-IL6 IgG와 anti IgG-alkaline phosphatase conjugate를 사용하여 Western blotting을 실시하였다.

결과 및 고찰

재조합 plasmid의 제조 및 mouse L cell의 형질 전환

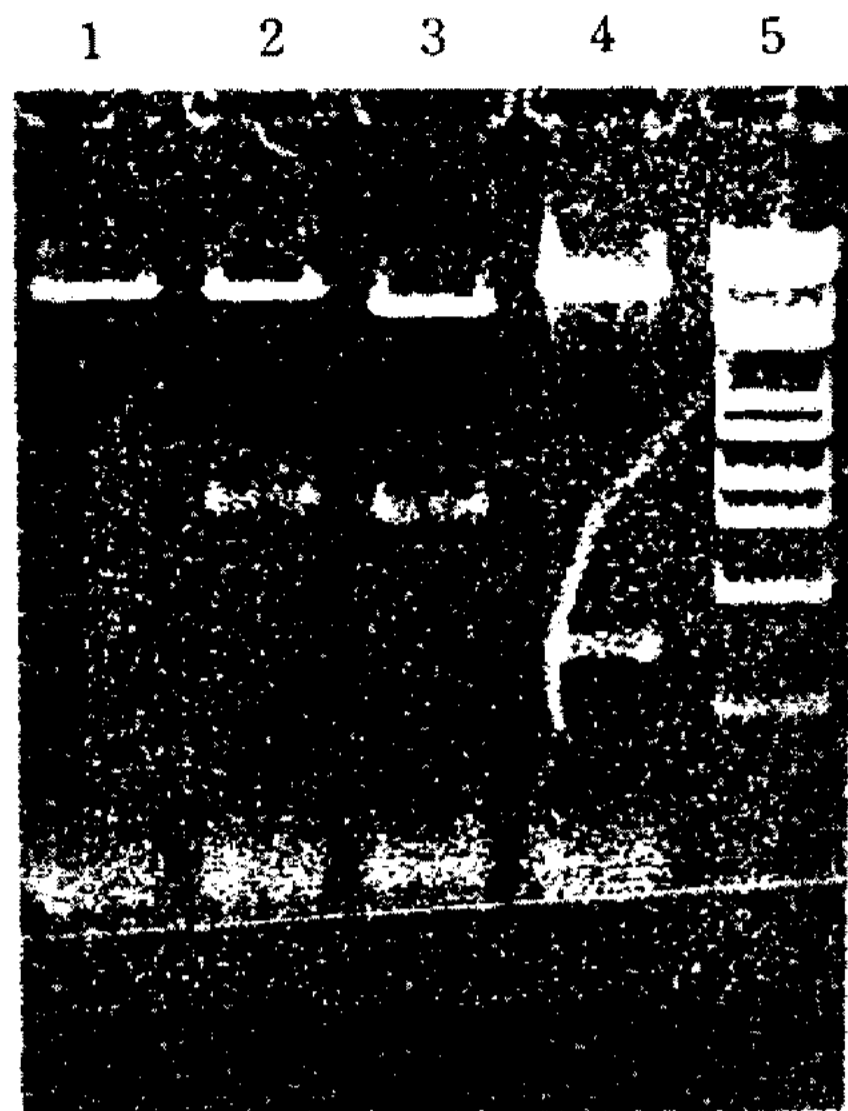


Fig. 2. Confirmation of pBMG/NF-IL6 orientation.

1. Vector only
2. pBMG/NF-IL6 ligase sample #1/*SalI* digestion (right orientation)
3. pBMG/NF-IL6 ligase sample #2/*SalI* digestion (right orientation)
4. pBMG/NF-IL6 ligase sample #3/*SalI* digestion
5. DNA size marker (λ /*StyI* digestion)
: 19.329 kbp, 7.743, 6.223, 4.259, 3.472, 2.690, 1.882, 1.482, 0.925, 0.425

hNF-IL6를 발현시키기 위한 동물세포용 재조합 plasmid는 Fig. 1과 같이 제작하였다.

hNF-IL6 유전자의 양 말단은 각각 5'쪽은 *EcoRI*, 3'쪽은 *SalI* 상태로, *PstI* 위치가 *XhoI*으로 전환된 pBlue-script SK(+)*EcoRI/SalI* 위치에 cloning하였다. 만들어진 pBlue 610은 *E. coli* DH5 α 에 형질전환하여 대량생산 후 다시 *XhoI*으로 hNF-IL6를 잘라내었다.

pBMG Neo vector의 *XhoI* 위치에 cloning한 뒤에 *E. coli* JM105에 형질전환시켜 올바른 방향으로 cloning된 pBMG/NF-IL6를 골라(Fig. 2) mouse L cell에 transfection시켰다. Geneticin 첨가 배지에서 약 일주일 배양 후 single colony가 나타나기 시작하였다. 각 colony는 분석을 위하여 24 well 및 D-100 dish에서 배양을 계속하였다.

형질전환된 mouse L cell의 확인

모든 single colony에 대해 hNF-IL6 유전자를 probe로 하여 southern hybridization 방법으로 transfection 여부를 조사하였다(Fig. 3). 얻어진 재조합 clone들 중에서 LBM6104를 선택하여 hNF-IL6 발현에 사용하였다. 재조합 clone LBM6104는 세포 형태상

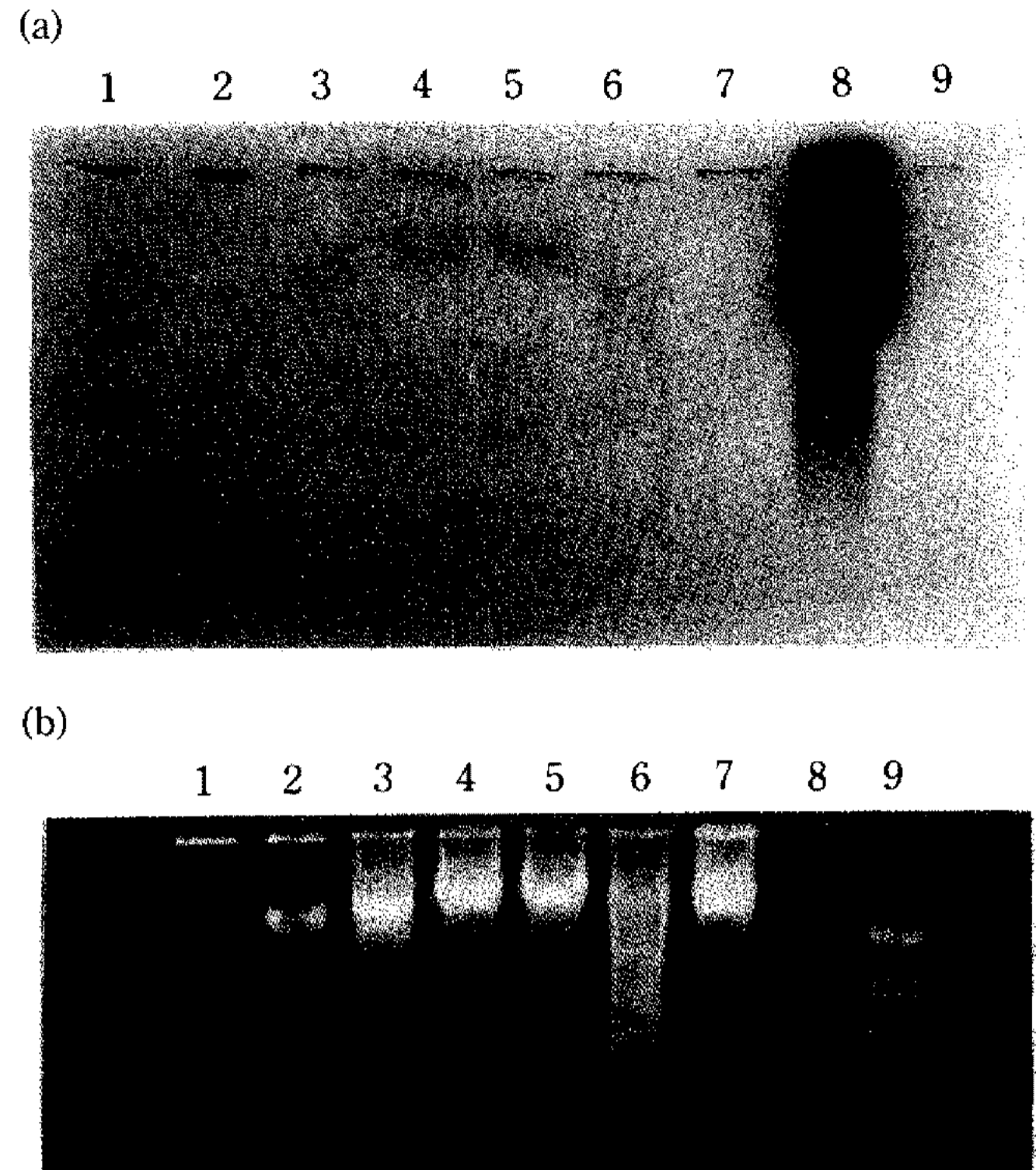


Fig. 3. Southern blot analysis of transformed mouse L cell.

- a. X-ray film result
- b. Agarose gel under the UV light
1. Clone LBM6101
2. Clone LBM6102
3. Clone LBM6103
4. Clone LBM6104
5. Clone LBM6105
6. Clone LBM6106
7. Clone LBM6107
8. pBMG/NF-IL6(positive control)
9. DNA size marker (λ /*StyI* digestion)
: 19.329 kbp, 7.743, 6.223, 4.259, 3.472, 2.690, 1.882, 1.482, 0.925, 0.425

본래의 mouse L cell에 비해 약간 둥근 상태로 transfect cell 특유의 일반적인 형태 변화를 일으켰다(Fig. 4).

재조합 clone LBM6104에서 hNF-IL6의 전사 및 발현

동물 세포용 발현 vector pBMG Neo는 metallothionein promoter(MT promoter)를 가지며 hNF-IL6 유전자 역시 이 MT promoter의 조절을 받도록 삽입되어 있으므로 2가의 금속이온, 즉 Cd^{2+} 또는 Zn^{2+} 등에 의해 발현이 유도 가능하였다. LBM6104 clone을 D-100 dish에서 약 80% 포화 농도로 배양 후 $CdCl_2$ 를 농도별로 배지에 첨가하여 24시간 배양하였다. 각

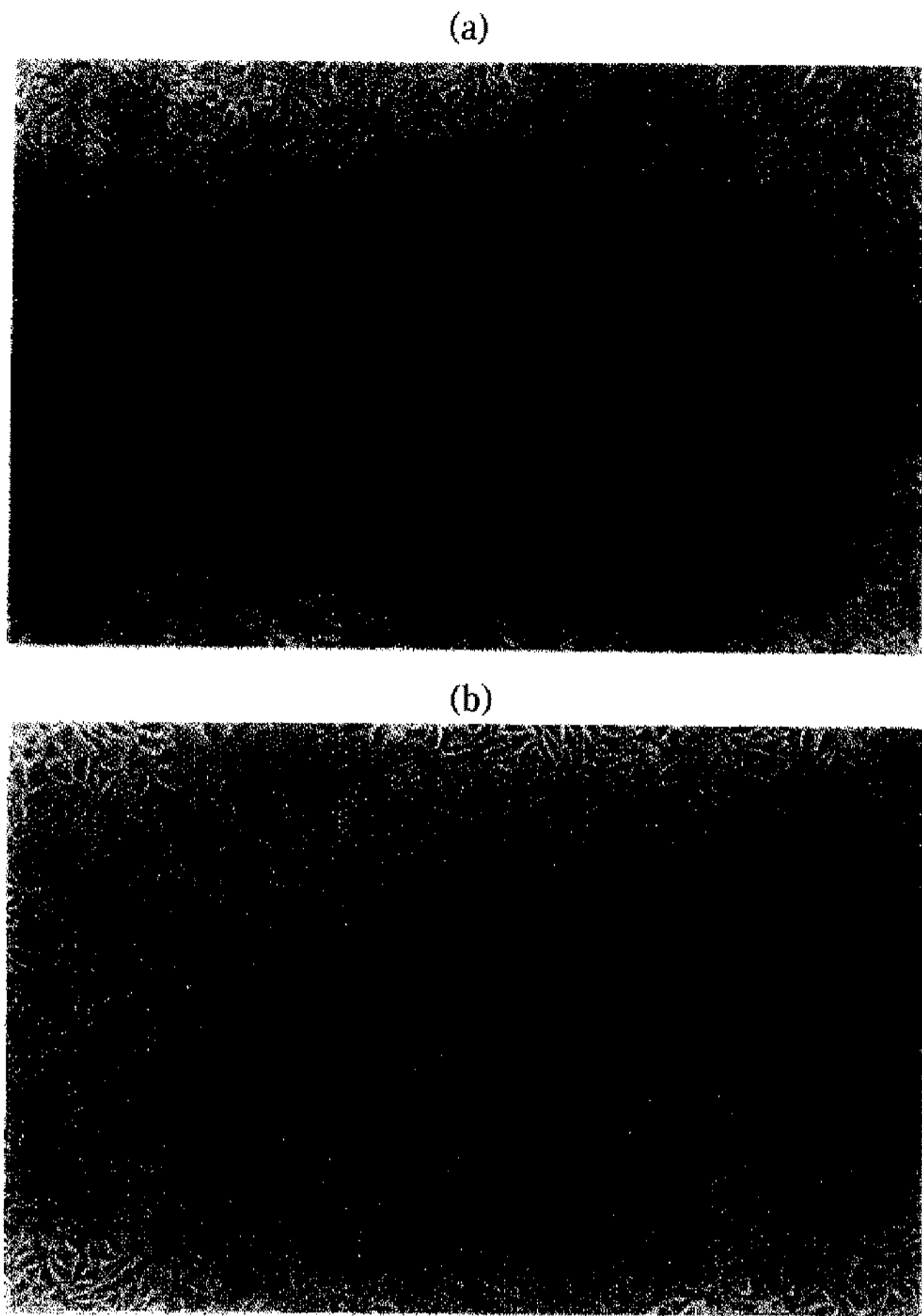


Fig. 4. Conformation change of cell after plasmid transfection.

- a. Normal mouse L cell
- b. LBM6104

dish에서 세포를 수거하여 total RNA 및 mRNA를 분리, hNF-IL6의 전사 정도를 northern hybridization 방법으로 확인하였다. Total RNA의 경우 CdCl₂ 10 μM에서 최대 유도 효과를 볼 수 있었으며 그 이상의 농도에서는 유도 효과가 더 이상 증가하지 않았다(Fig. 5). 좀 더 미세한 변화를 보기 위하여 mRNA만을 분리 정제하여 확인한 결과 CdCl₂ 농도가 10 μM까지 증가함에 따라 hNF-IL6의 전사량도 선형적으로 증가함을 볼 수 있었다(Fig. 6). 또한 CdCl₂ 유도 이전에도 LBM6104 clone내의 hNF-IL6 전사량이 본래의 mouse L cell에 비해 현저히 많았다. 이와 같은 결과들로부터 mouse L cell에 도입된 hNF-IL6 발현 vector의 전사가 원활하게 일어나며 자체의 promoter에 의해 제어됨을 알 수 있었다.

IL-1에 의해 NF-IL6 및 IL-6가 발현 유도됨이 보고된 바 있는데 본 실험의 경우 본래의 mouse L cell의 경우는 IL-1에 의해 mouse NF-IL6 전사가 약간 유도되는 것에 비해 재조합 clone의 경우 IL-1

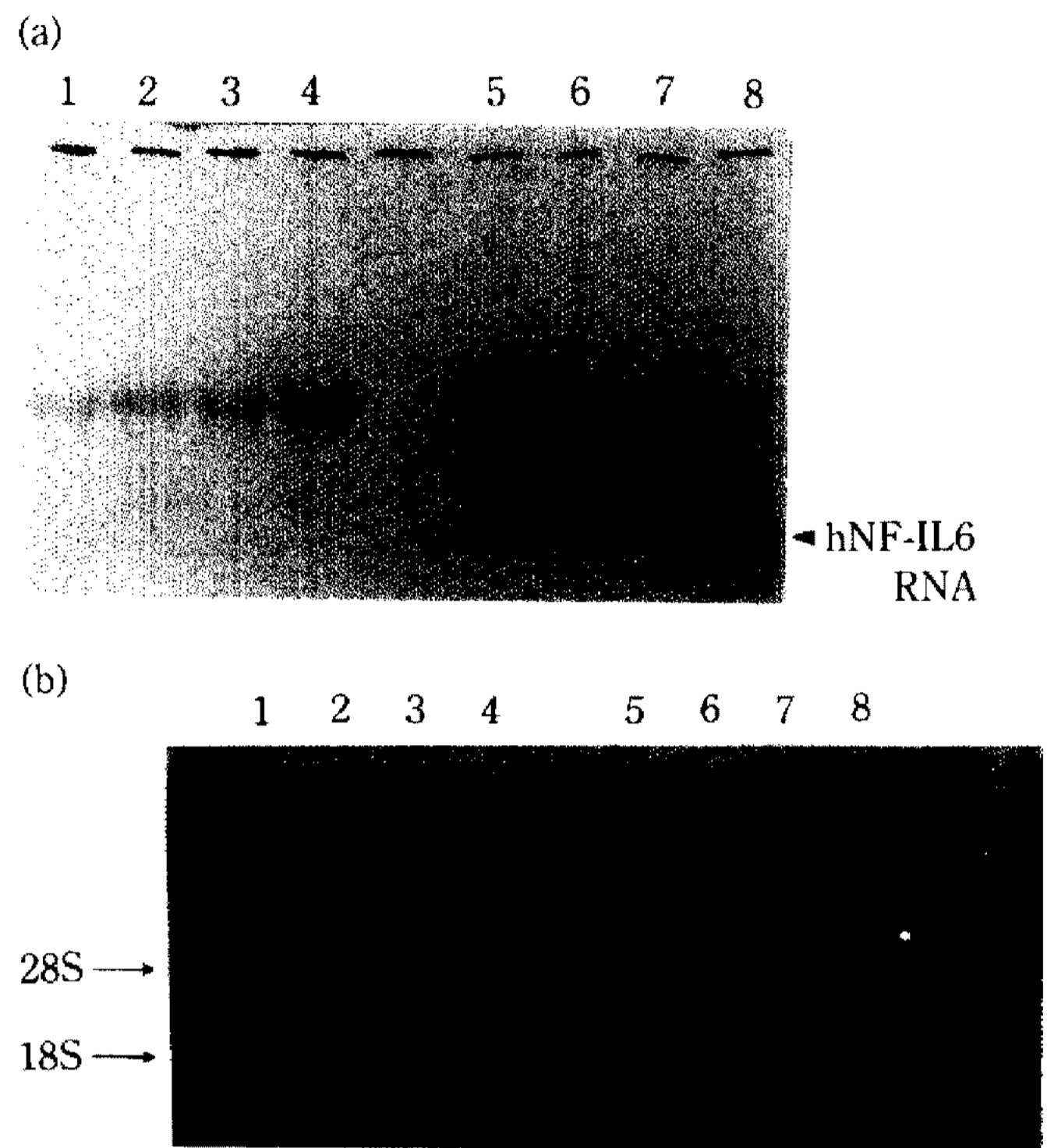


Fig. 5. Northern blot analysis of transformed L cell (LBM6104) with total RNA.

- a. X-ray film result
- b. Agarose gel under the UV light
- 1. Normal L cell (24 hrs induction with CdCl₂ 0 μM)
- 2. Normal L cell (24 hrs induction with CdCl₂ 10 μM)
- 3. Normal L cell (24 hrs induction with CdCl₂ 20 μM)
- 4. Normal L cell (24 hrs induction with CdCl₂ 40 μM)
- 5. LBM6104 (24 hrs induction with CdCl₂ 0 μM)
- 6. LBM6104 (24 hrs induction with CdCl₂ 10 μM)
- 7. LBM6104 (24 hrs induction with CdCl₂ 20 μM)
- 8. LBM6104 (24 hrs induction with CdCl₂ 40 μM)

자극시 도리어 hNF-IL6 mRNA 양이 줄어드는 것을 볼 수 있었다. 이는 IL-1 자극에 의해 세포내 여러 단백질이 동시에 발현되고 이에 따라 전사에 관계되는 system의 한정된 용량 때문에 도입된 hNF-IL6의 전사량이 줄어드는 것으로 생각된다.

전사된 mRNA로부터 단백질로의 translation이 이루어지는가를 보기 위하여 western blotting 방법을 사용하였는데(Fig. 7), 본래의 L cell이나 pBMG Neo vector만을 transfection시킨 경우에는 나타나지 않는 단백질이 확인되며 그 양 역시 inducer인 CdCl₂ 농도에 비례함을 알 수 있었다. 이 분석에 사용된 항체는 hNF-IL6 유전자의 3' 말단 서열을 기준으로 peptide를 합성한 후 토끼에 주사하여 항체를 형성시킨 뒤 뽑아낸 polyclonal antibody이므로 다른 단백질 band도 검출되었는데 이들 중에는 mNF-IL6를 비롯하여 hNF-IL6와 어떤 상관성을 갖는 단백질들이 존

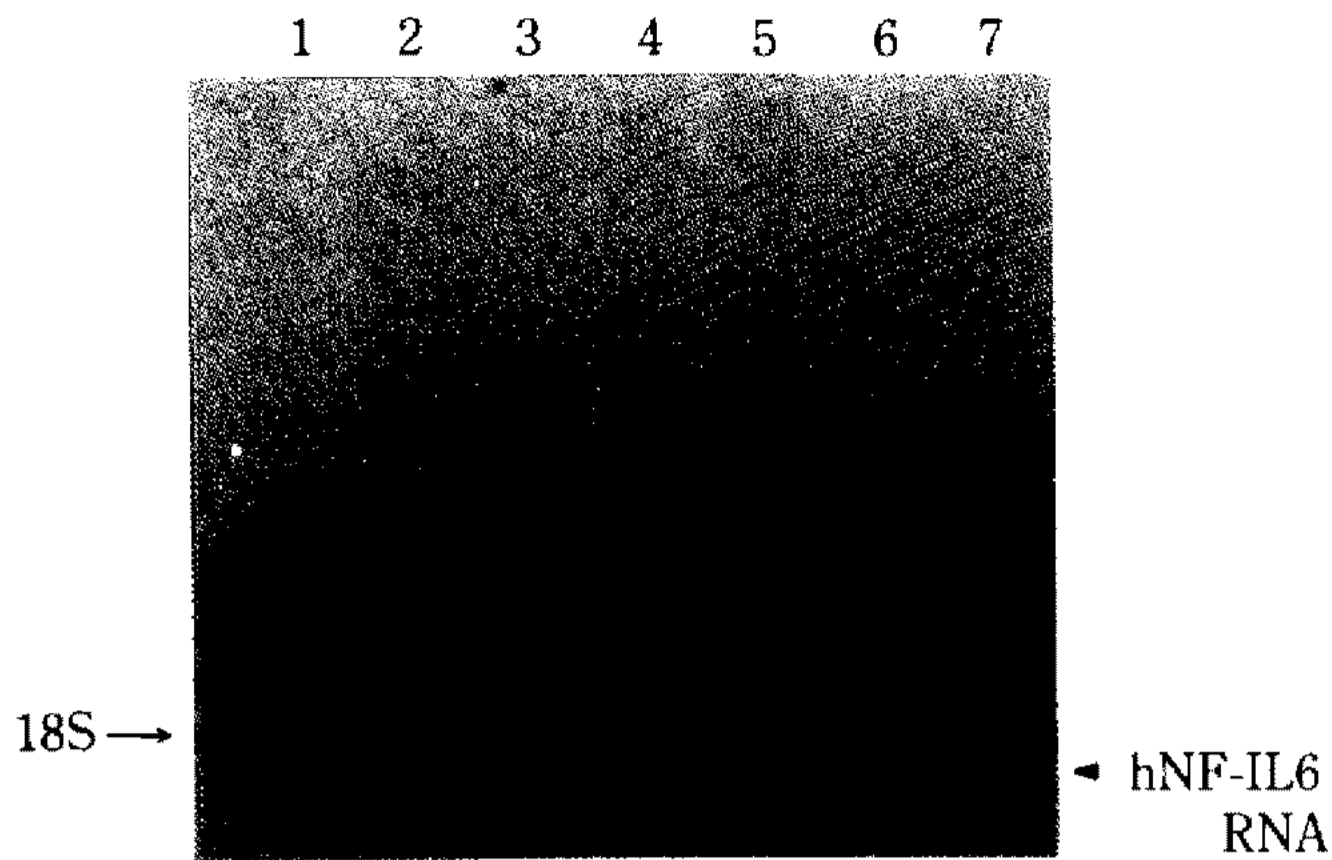


Fig. 6. Northern blot analysis of transformed L cell (LBM6104) with mRNA (X-ray film result).

1. Size marker (18S RNA)
2. LBM6104 stimulated with IL-1 (100 U/ml)
3. LBM6104 (24 hrs induction with CdCl₂ 0 μM)
4. LBM6104 (24 hrs induction with CdCl₂ 5 μM)
5. LBM6104 (24 hrs induction with CdCl₂ 10 μM)
6. Normal L cell (24 hrs induction with CdCl₂ 0 μM)
7. Normal L cell stimulated with IL-1 (100 U/ml)

재할 것으로 여겨진다.

재조합 clone에서 생성된 단백질이 본래의 특성, 즉 IL-6의 promoter region 결합 능력을 갖는가도 gel retardation assay에 의해 확인하였다(data not shown).

이상의 결과들로부터 pBMG Neo vector를 이용, mouse L cell에서 hNF-IL6가 대량 생산 가능하며, 생산된 단백질이 본래의 활성도 유지함을 알 수 있었고, 동물 세포에서의 외래 유전자 발현에 대한 이 system의 응용 가능성도 확인할 수 있었다.

요 약

유전자 재조합 동물세포를 제작하여 외래 유전자 유래의 단백질을 생산하고자 그 model system으로써 부착성 동물 세포인 mouse L cell과 pBMG Neo vector, 그리고 외래 유전자로는 hNF-IL6를 선택하였다. hNF-IL6는 hIL-6 유전자의 promoter 서열에 결합하는 성질에 의해 분리된 핵단백질로서 IL-6의 전자 조절 인자로 밝혀져 있다. 이 hNF-IL6는 다른 면역 관계 단백질의 전자 조절 영역에도 결합함이 밝혀져 그 중요성이 부각되고 있으나 재조합 대장균에서는 발현시 너무 빨리 분해되어 생산이 어려웠다.

Plasmid내의 neomycin resistance 특성을 이용한 1차 screening, 그리고 southern blot analysis를 이용한 2차 screening에 걸쳐 hNF-IL6 발현 vector가

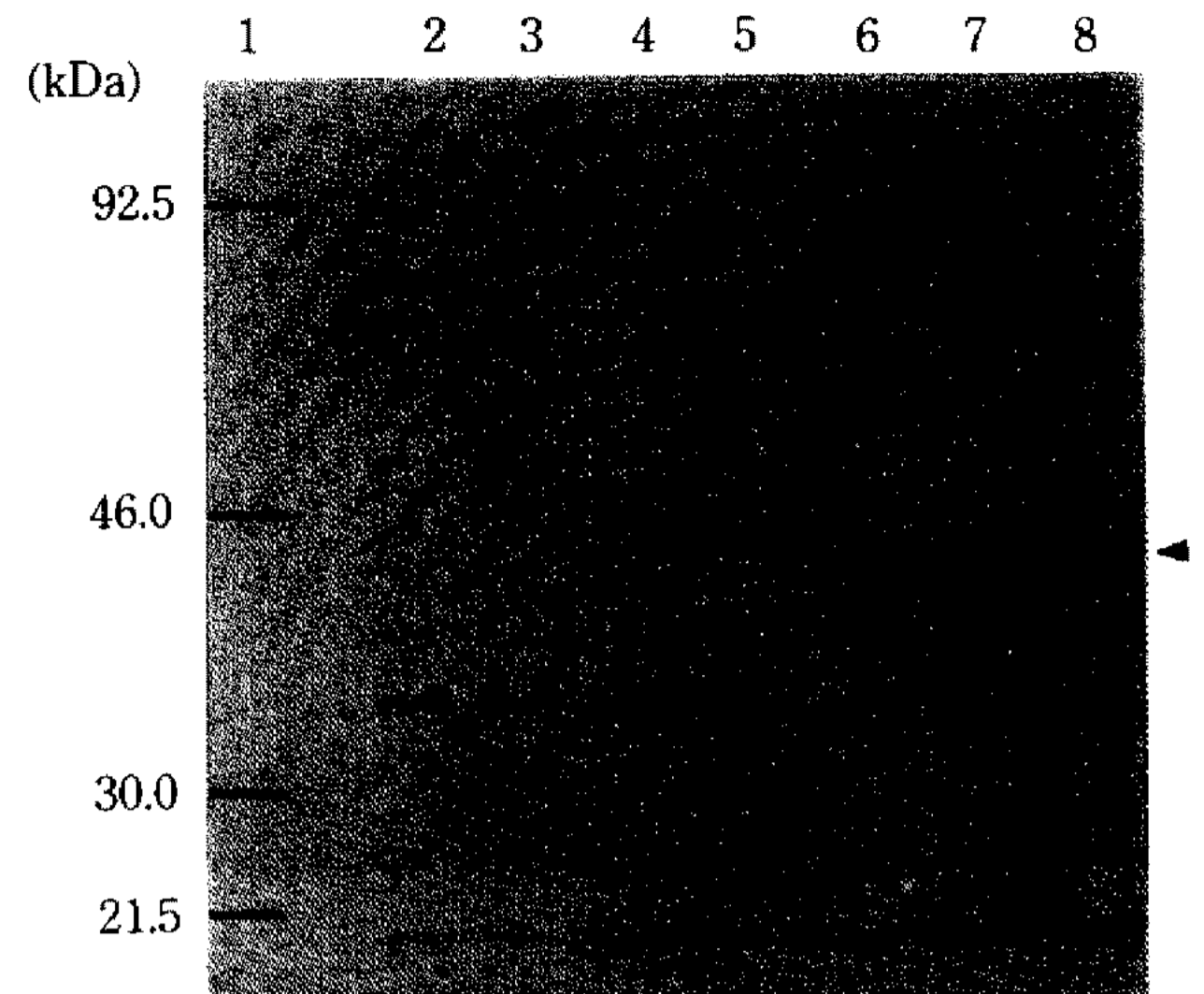


Fig. 7. Western blot analysis for confirmation of hNF-IL6 expression in LBM6104.

1. Protein size marker
2. Nuclear extract from Normal L cell
3. Nuclear extract from L cell transfected with vector pBMG Neo (CdCl₂ 0 μM)
4. Nuclear extract from L cell transfected with vector pBMG Neo (CdCl₂ 10 μM)
5. Nuclear extract from L cell transfected with vector pBMG Neo (CdCl₂ 30 μM)
6. Nuclear extract from LBM6104 (CdCl₂ 0 μM induction)
7. Nuclear extract from LBM6104 (CdCl₂ 10 μM induction)
8. Nuclear extract from LBM6104 (CdCl₂ 30 μM induction)

도입된 재조합 clone을 선택하였으며, 전사 및 발현을 확인하였고 그 발현이 MT promoter 특유의 유도 기작에 따르는 것도 알 수 있었다.

생산된 hNF-IL6는 핵내에 존재함으로써 본래의 핵 단백질 특성을 유지하고 있었으며 DNA binding activity도 확인되었다.

따라서 pBMG Neo vector를 사용, mouse L cell에서 발현된 외래 단백질 hNF-IL6가 본래의 활성도 유지하며 대량 생산된 것을 알 수 있었고, 동물 세포에서의 외래 유전자 발현에 대한 이 system의 응용 가능성도 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Smith, K.A. 1986. Draft proposals for interleukin nomenclature. *Immunol. Today*, 7: 321-322.
2. Hirano, T., K. Yasukawa, H. Harada, T. Taga, Y. Watanabe, A. Iwamatsu, S. Tsunasawa, F. Sa-

- kiyama, H. Matsui, Y. Takahara, T. Taniguchi and T. Kishimoto. 1986. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*. **324**: 73-78.
3. Zilberstein, A., R. Ruggieri, J.H. Korn and M. Revel. 1986. Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO J.* **5**: 2529-2533.
 4. Kishimoto, T. 1989. The biology of interleukin-6. *Blood*, **74**: 1-10.
 5. Hirano, T., T. Taga, K. Yasukawa, K. Nakajima, N. Nakano, F. Takatsuki, M. Shimizu, A. Mura-shima, S. Tsunasawa, F. Sakiyama and T. Kishi-moto. 1987. Human B cell differentiation factor defined by an antipeptide antibody and its possi-ble role in autoantibody production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **84**: 228-234.
 6. Horii, Y., A. Muraguchi, S. Suematsu, T. Mat-suda, K. Yoshizaki, T. Hirano and T. Kishimoto. 1988. Regulation of BSF-2/IL-6 production by human mononuclear cells; macrophagedependent synthesis of BSF-2/IL-6 by T cells. *J. Immunol.* **141**: 1529-1535.
 7. Hirano, T., T. Matsuda, M. Turner, N. Miyasaka, G. Buchan, B. Tang, K. Sato, M. Shimizu, R. Maini, M. Feldman and T. Kishimoto. 1988. Ex-cessive production of interleukin 6/B cell stimu-latory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Im-munol.* **18**: 1797-1884.
 8. Wolvekamp, M.C.J. and R.L. Marquet. 1990. Inte-rleukin-6:historical background, genetics and bio-logical significance. *Immunol. Lett.* **24**: 1-10.
 9. Akira, S., H. Isshiki, T. Sugita, O. Tanabe, S. Ki-noshita, Y. Nishio, T. Nakajima, T. Hirano and T. Kishimoto. 1990. A nuclear factor for IL-6 exp-ression(NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J.* **9**: 1897-1906.
 10. Akira, S. 1990. IL-6 gene regulation and signal transduction via IL-6 receptor. *Cell Technology.* **9**: 411-419.
 11. Karasuyama, H. and F. Melchers. 1988. Establi-ishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2,3,4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *Eur. J. Immunol.* **18**: 97-104.
 12. Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Press, New York.
 13. Schiel, X., S. Rose-John, G. Dufhues, H. School-tink, V. Gross and P.C. Heinrich. 1990. Microhe-terogeneity of human interleukin 6 synthesized by transfected NIH/3T3 cells: comparison with human monocytes, fibroblasts and endothelial cells. *Eur. J. Immunol.* **20**: 883-887.

(Received July 19, 1993)