

세포융합 - 전기적 세포융합 (Electrofusion)

조 문 구

우석대학교 이공대학 생명공학부

세포융합은 1935년 Kuester에 의해서 도입되었으며, 현재는 세포생물학, 유전학, 발생생물학, 종양생물학과 바이러스학 같은 분야에서 대단히 중요한 연구방법으로 적용되고 있다. 생산균주를 이용하는 대부분의 생물공정에서는 돌연변이보다 월등한 확률로서, 또한 클로닝에 비해서는 훨씬 빠르고 쉽게 유전자의 도입을 통한 균주개량 방법으로 이용하고 있다. 특히 사용하는 시약과 처리조건에서는 가장 안전한 방법이라는 장점도 있다. 세포의 융합을 거쳐 만들어지는 세포를 융합세포 또는 잡종세포라 하며, 크기는 같은 종끼리 실시하는 동종융합과 서로 다른 종에 적용하는 이종융합으로 나눌 수 있다.

자연계에서 이루어지고 있는 수정이나 식물과 토양미생물의 공생관계와 같이 아무런 인위적인 수단 없이 이루어지는 융합현상

외에 인위적으로 실시하는 융합은 이론적으로는 어떤 종류의 생물에서든지 잡종세포를 만드는 것이 가능하다. 이미 식물과 곤충, 동물과 인간세포, 미생물과 식물 등등 다양한 형태의 잡종세포들이 불과 60여 년 사이에 성공적으로 만들어져 왔다.

융합세포의 특징은 융합이전의 세포에 포함된 유전자 또는 핵을 모두 갖고 있는 다핵상태에 도달되게 된다. 즉, 융합과정에서 한 세포의 유전자만을 갖고 있는 단일핵상태는 진정한 의미에서 융합세포라 할 수 없다(Fig. 1).

인위적으로 실시하는 세포융합의 방법은 크게 바이러스의 이용, 무기염류의 이용, 수용성 고분자, 계면활성제의 이용과 전기적 방법 등으로 분류된다. 바이러스는 초창기 인터페론의 생산을 위한 잡종세포를 만드는데 이용한 센다이 바이러스의 용균력을 이용하여 융합대상 세포의 표면을 처리하는 방법이다. 무기염류는 주로 2가 양이온 물질과 pH를 조정하여 융합대상 세포의 표면에 일종의 킬레이션 반응을 이용한다. 수용성 고분자는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이 대표적인 예이고, 계면활성제는 주로 폴리비닐 알콜계열의 물질을 이용하고 있다. 전기적인 방법은 융합대상세포를 전기장에 노출시켜 인위적인 세포의 접촉을 유도하는 방법이다.

그러나 현재까지 보편적으로 이용되고 있는 융합방법은 세 가지로서 첫째는 칼슘이온, 둘째는 lysolecithin이며 세 번째는 PEG를 이용하는 방법이다. Lysolecithin은 레시틴을 phospholipase A로 분해하여 생성되는 계면활성 지질유도체의 일종이다. 이 물질은 수정과정에 상당한 관련성으로 주목을 받고 있으며, 일부 지방산계열 물질들의 막융합 활성도 검토되고 있다. PEG는 일반 세포보다는 세포막을 제거한 protoplast에 대한 융합시약으로 식물과 동물세포에 적용되고 있다(Fig. 2).

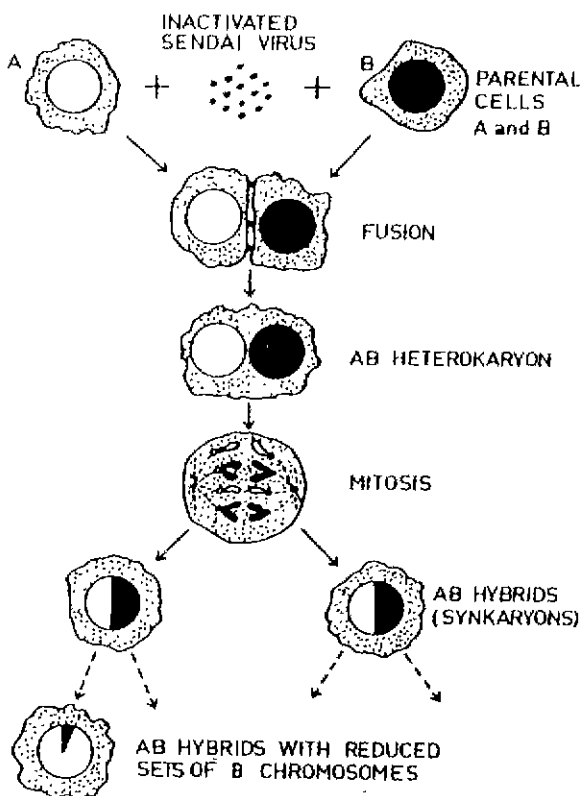
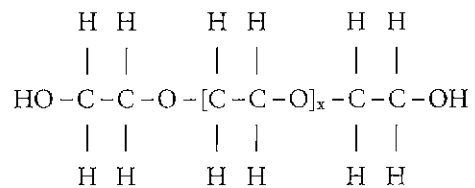


Fig. 1. 세포융합



MW ≈ 1,500 ~ 7,500 daltons (x ≈ 170)

Fig. 2. Polyethylene glycol의 일반구조식

막구조와 응집

세포융합은 일차적으로 막의 구조에 엄청난 변화를 초래한다. 생물의 막은 평균적으로 60-80%의 단백질과 40-20%의 지질로 이루어져 있으며 1950년대에 Davson-Danielli-Robertson의 모델로부터 Singer와 Nicolson의 fluid mosaic 모델로 발전되어 왔다(Fig. 3). 그러나 아직까지도 대부분의 생화학, 생물물리학, 생물학의 이론을 모두 만족시키는 생물막 구조는 정립되지 않았으며 세포융합은 결국 어떤 특정한 막 이론을 근거로 하여 실시되고 있지 않다는 것에 주목할 필요가 있다.

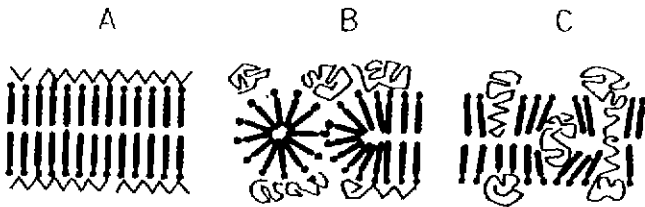


Fig. 3. 세포막 이론

Fig. 3의 (A)는 단백질을 중심으로 지질이 겹쳐있는 이중막 개념이며, (B)는 구형단백질이 포함된 이중막구조에 지질이 분포되어 있는 상태를, (C)는 현재 가장 일반적인 개념으로 인정받고 있는 유동막구조로서 단백질과 지질이 혼합되어 있는 막구조를 그림으로 요약한 것이다.

세포융합 과정은 세포가 서로 이동하여 밀접하게 접근하는 응집현상으로 시작되며, 세포막지질에서 보호성분이 제거되면서 막구성 지질의 배열이 변화되면 원형질간의 응축이 진행되고, 마지막으로 세포사이의 원형질의 교환과 안정화 정립된다.

즉 인접한 세포의 간격은 불과 몇 옴스트롱 정도이며, 이때는 소수성 결합이 중요한 역할을 담당하므로 융합촉진제 또는 융합시약은 기본적으로 세포간의 소수성 결합과 관련이 있다. 결국 자연상태의 세포들이 일반적으로 나타내는 현상인 자유운동(브라운 운동), 정전반발력, 능동이동 등을 통해 서로 떨어지려는 경향을 차단해주면 세포간의 응축이 이루어지게 된다는 것이다.

막구성물질의 변화 - 탄수화물과 지질

세포표면의 구성요소인 탄수화물은 지금까지 융합과정에서 거의 무시해 왔으며, 주로 중성 당류인 galactose, mannose와 fructose가 대부분이고 acetyl amino sugar와 sialic acid로서 주로 지질 및 단백질과 공유결합을 이루고 있다. 막탄수화물들은 융합과정에서도 대단히 중요한 역할을 하고 있다. 대표적으로는 첫째 세포항원의 결정인자이며, 둘째는 정상적인 pH조건에서 음전하를 발생하고, 셋째 세포간 인식 및 접착과, 넷째는 endocytosis의 결정, 응집과 바이러스 및 세균의 결합 부위를 결정하며, 끝으로 투과성을 조절하며 세포융합의 전과정에 관련되어 있다.

막지질은 평면구조의 마이셀로 변화되면서 막 융합에 도움이 된다는 lysolecithin 효과 또는 micellization 이론으로 설명되고, 높은 칼슘농도가 융합에 효과적이라는 것은 막지질이 쉽게 마이셀

을 형성하기 때문이다. 결국 효소를 이용한 융합에서는 첫째 고칼슘 고 pH (8.0-10.5) 조건과, 두 번째 2가 양이온을 첨가하여 지질분자의 phosphoryl 그룹과 마이셀사이의 연결이 필요하다.

원형질체 세포의 분리

원형질체 세포(protoplast)는 세포벽 성분을 완전히 제거하여 삼투압에 대단히 민감한 상태를 말하며, 삼투압 안정용액 조건에서 표면장력을 최소화하기 위해 구형을 나타낸다. 원형질체 세포와 혼동이 쉬운 세포의 상태로서 spheroplast는 세포벽이 있는 상태에서 삼투압조건의 변화로 나타나는 가역적인 세포의 상태이다. 즉, spheroplast는 주변의 삼투압 조건이 정상으로 회복되면 원래의 완전한 세포형태로 회복된다.

진핵미생물의 대부분은 아직도 물리적인 방법을 적용하고는 있으나 대부분 효소를 사용하여 원형질체 세포를 만든다. 그러나 모든 종류의 미생물에 적합한 효소의 종류와 처리방법은 세포벽의 조성성분을 근거로 예비실험을 거쳐 결정하는 것이 효과적이다. 진핵미생물, 특히 효모와 곰팡이의 세포벽을 제거하기 위해 사용하는 대표적인 효소는 대부분이 다당 분해효소이고 섬유소분해능력이 우수한 *Trichoderma* sp.가 생산하는 α 및 β glucanase와 chitinase를 주로 이용하고 있다. 이 외에 달팽이의 소화액 성분도 사용하고 있다. 이것은 lipase, phospholipase, glucanase와 mannanase가 혼합되어 있는 천연효소 복합체에 해당된다.

효모와 곰팡이의 세포벽은 성장주기에 따라 생화학적인 변화가 나타나므로 세포벽을 효과적으로 제거하려면 여러 가지 고려사항을 검토해야 한다. 가장 일반적인 변화는 대수증식기에서 정상기로 진입하면서 세포벽은 가장 안정하며 저항성이 큰 상태가 되므로 원형질체 세포를 분리하려면 대수증식기 이하의 상태를 선택해야 하며, 세포벽에서 형성되는 이황결합을 차단하기 위해 dithiothreitol 또는 β -mercaptoethanol 같은 sulphydryl화합물을 반응용액에 첨가하는 것이 효과적이다. 한편 세포벽의 제거로 분리되어 나오는 원형질체 세포를 삼투압이 안정된 상태로 유지하기 위해 solbitol이나 mannitol, 또는 KCl같은 성분을 첨가하며, 반응용액의 점도가 너무 높거나 낮은 경우도 원형질체 세포의 분리효율이 떨어진다.

대부분의 효모와 곰팡이는 한천이나 젤라틴을 사용한 고체배지에서 특별한 조건없이 스스로 세포벽을 합성하지만 특이한 경우는 삼투압을 조정된 배지에서만 세포벽이 재생되는 경우도 있다. 한편 재생된 세포벽은 대부분 재생 후 1세대에서는 원래의 세포형태를 나타내지 못하지만 2세대에서는 원래의 형태를 회복한다.

진핵미생물의 원형질체 융합

원형질체 세포는 완전한 세포와 달리 전기나 화학적인 방법으로 융합이 이루어진다. 화학적인 방법은 기존의 화학적 융합과 같은 원리이므로 여기서는 더 이상의 설명을 생략한다. 전기를

융합세포의 유전분석

원형질체 세포를 융합시킨 융합세포의 유전자는 동등한 비율로 교환이 이루어지지 않는다. 전기영동을 이용한 유전자 분석을 실시하는 경우 대부분은 융합대상 세포의 유전자들이 불특정한 비율로 섞여 있는 것을 알 수 있다. 특히 유전자의 혼합상태는 경우에 따라 다르지만 대부분 시간이 경과되면서 재편성이 된다. 즉, 융합세포의 유전적 안정성은 현재의 기술로는 조절이 불가능하며, 비교적 낮은 것이 인정된다. *Saccharomyces cerevisiae*의 동종융합과 *Sac. cerevisiae*와 *Shizosaccharomyces rouxii*를 융합시키는 경우에 있어서도 *Sac. cerevisiae*의 빠른 성장속도와 *Shi. rouxii*의 내삼투압성을 동시에 나타내는 융합세포의 특성은 약 6개월 정도밖에 유지되지 않는다.

융합세포의 유전분석은 일반적으로 전기영동을 이용한다. 그러나 원핵미생물과 달리 유전학적인 분석수단의 개발이 늦은 진핵미생물은 유전자 분석에 제약이 있다. 현 단계에서는 RAPD-PCR방법을 이용하는 것이 가장 효과적이라고 평가된다. RAPD-PCR은 Random Amplified Polymorphic DNA법과 Polymerase Chain Reaction법을 결합시킨 비특이적인 유전분석방법으로서 이전의 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)방법에 비하여 과정이 간단하며, 방사성 동위원소를 사용하지 않는 등의 여러 가지 장점이 있다.

RAPD-PCR법은 합성한 RAPD용 primer를 사용하며, 이들은 미생물, 식물은 물론 동물의 유전자와도 결합이 가능하며, genomic DNA를 주형으로 9-12bp의 작은 primer로 DNA를 증폭시킨 것을 일반적인 전기영동방법으로 분석하는 기술이다(Fig. 6).

Fig. 6의 결과와 같이 RAPD-PCR방법으로 효모의 융합세포에서 융합대상세포 두 가지의 유전자가 모두 확인되는 것을 알 수 있다. 즉, 이 방법은 분석결과의 재현성에 상당한 문제가 지적되었음에도 불구하고 형질전환 식물체의 유전자 분석을 위해

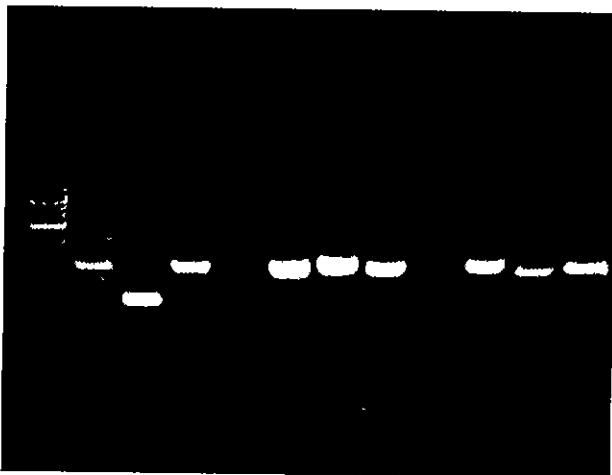


Fig. 6. RAPD-PCR방법의 유전자 분석결과
(1열: 분자량 표지, 2열: *Sac. cerevisiae*, 3열: *Shi. rouxii*, 4, 6-8, 10-12열: 융합세포, 5, 9열: blank)

개발되었으나 식물 외에 미생물과 동물에서도 클로닝 이전에 유전적인 확인실험 방법으로 활용가치가 대단히 높을 것으로 평가된다.

전기융합기술의 응용

전기융합기술은 생물공학분야에서 주로 균주개량의 수단으로 이용하고 있다. 균주의 개량은 크게 계대배양을 통한 우량균주 선발, 돌연변이, 세포융합, 유전자 도입의 네 가지로 나누어지며, 이 중에서 세포융합법은 돌연변이법에 비하여 균주개량의 확률이 높고, 안전하며, 유전자 도입방법에 비하면 훨씬 적은 비용과 간편한 분석방법을 이용할 수 있다. 또한 접합, 형질도입, 형질전환은 유전자의 일부만이 전이되지만 융합은 전체 유전자가 전이되어 처리한 세포의 안정성에 있어서 월등한 특성을 발휘할 수 있다.

특히 유전물질의 교환기술이 완성되지 않았으나 산업적으로 활용가치가 높은 고등 세포에 적합한 개량방법으로 평가되고 있다. 즉, 현재 활용가치가 점차 증가하고 있는 효모, 곰팡이와 조류 등의 발효생리와 배양특성을 개선할 수 있는 고효율의 새로운 잡종세포를 만들 수 있다는 점이 장점이다. 또한 일반적으로는 동종내 교환은 물론 종과 속의 장해를 극복할 수 있다.

전기융합기술의 응용은 결국 세균과 방선균위주의 생물촉매 개념을 활용가치가 더욱 증가하고 있는 효모, 곰팡이, 고등균류와 조류에 대한 가장 적극적이면서 실용가치가 높은 기술이라 할 수 있다. 즉, 고농도 기질에 대한 발효능력의 저하와 상대적으로 낮은 성장속도, 세포의 분비물과 균사형성에 따르는 대규모 탱크배양상의 여러 가지 단점을 극복할 수 있는 현실적인 균주 개량 방법이라 할 수 있다. 특히 xylose를 포함한 5탄당, 메탄올과 탄화수소와 같이 지금까지 발효성이 떨어지거나 없는 화합물과 특이적인 균주를 이용한 특수한 대사물질의 생신분야에 있어서 원형질체 세포의 전기융합기술은 상당한 기여를 할 것으로 예상된다.

한편, 효모의 알콜발효성은 염색체수와 관련이 있으므로 발효 능력과 알콜에 대한 내성을 갖는 융합균주의 개발, 또한 생리활성이 알려진 무기물질인 아연, 셀레늄, 크로미움, 게르마늄같은 금속이온을 효모와 균류를 이용하여 생리활성 유기금속 물질을 생합성하는 분야에서 산업적인 활용가치가 높다. 이외에 필수아미노산의 조성을 조정할 새로운 개념의 균체를 생산하는 기술의 개발도 실용화가 기대되는 분야이다. 특히 전분에서 알콜발효를 수행하는 과정이 발효단계 이전에 전분의 겔화, 당화와 액화과정을 반드시 거치게 되어 있으나, *Sac. diastycus*와 *Sac. uvarum*을 융합시킨 융합세포에서는 전처리과정 없이 알콜발효가 가능하며, 이 때 필요한 효소의 사용량을 획기적으로 감소시킬 수 있다.

효모와 곰팡이의 원형질체 세포의 전기적 융합기술은 지금까지 진핵미생물 이용기술의 한계를 극복할 수 있는 새로운 돌파구를 제공할 수 있다. 또한 아직 활용하지 않고 있는 새로운 균주들을 대상으로 융합을 통해 기존의 균주가 갖고 있는 여러 가

- ic enzyme produced by *Trichoderma viride*. *Bull. Far. Agri., Miyazaki Univ.* **26**, 387-398.
33. Peberdy, J.F. & Ferenczy, L. 1985. Fungal Protoplasts: Applications in Biochemistry and Genetics, Marcel Dekker, New York.
34. Peberdy, J.F., Rose, A.H., Rogers, H.J. & Cocking, E.C. 1976. Microbial and Plant Protoplasts, Academic Press, London.
35. Perez, C., Vailm, C. & Benitez, J. 1985. Hybridisation of *Saccharomyces cerevisiae* with *Candida utilis* through protoplast fusion. *Curr. Genet.* **9**, 623-625.
36. Pilet, P.-E. 1985. The Physiological Properties of Plant Protoplasts, Springer-Verlag, Berlin.
37. Pina, C., Calderon, I.L. & Benitez, T. 1986. Intergeneric hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces fermentati* obtained by protoplast fusion. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 995-1003.
38. Puite, K.J., van Wiksealer, P. & Verhoeven, H. 1985. Electrofusion, a simple and reproducible technique in somatic hybridisation of *Nicotiana plumbaginifolia* mutants. *Plant Cell Rep.* **4**, 274-276.
39. Ringertz, N.R. & Savage, R.E. 1976. Cell hybrids, Academic Press, New York.
40. Russell, I., Crumplen, C.M., Jones, R.M. & Stewart, G.G. 1986. Efficiency of genetically engineered yeast in the production of ethanol from dextranised cassava starch. *Biotech. Lett.* **8**, 169-174.
41. Schnetter, R., Zimmermann, U. & Emeis, C.C. 1984. Large scale production of yeast hybrids by electrofusion. *FEMS Microbiol. Lett.* **24**, 81-85.
42. Senda, M., Takeda, J., Abe, S. & Nakamura, T. 1979. Induction of cell fusion of plant protoplasts by electrical stimulation. *Plant Cell Physiol.* **20**, 1441-1443.
43. Skala, J., Luty, J. & Kotylak, Z. 1988. Interspecific protoplast fusion between the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces fermentati*. *Curr. Genet.* **13**, 101-104.
44. Svoboda, A. & Necas, O. 1966. Regeneration of yeast protoplasts prepared by snail enzyme. *Nature* **210**, 169-175.
45. Svoboda, A. & Piedra, D. 1983. Reversion of yeast protoplasts in media containing polyethylene glycol. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 3371-3377.
46. Van Solingen, P. & Van der Laat, J. 1977. Fusion of yeast spheroplasts. *J. Bacteriol.* **265**, 257-258.
47. Villanuev, J.R. & Garcia-Acha, I. 1971. Production and use of fungal protoplasts, In: *Methods in Microbiology*, vol. 4(Booth, C., ed.), Academic Press, New York, 665-718.
48. Zimmermann, U. & Scheurich, P. 1981. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. *Planta* **151**, 26-32.



조 문 구

1981년 건국대학교 미생물공학과 졸업
 1990년 영국 스트라스크라이드대학교
 생물공학과 (공학박사)
 1990-1992년 한국과학기술원 선임연구원
 1992-1994년 (주)서도화학 선임연구원
 1994-현 재 우석대학교 생물공학과 교수
