

## 대장균에서 증식속도 조절에 의한 수용성 재조합 인간 과립구 콜로니 촉진인자의 생산

박세철\* · 고인영<sup>1</sup> · 강희일

(주)유한양행 중앙연구소 바이오텍연구실, <sup>1</sup>춘천 바이오산업진흥원

**Production of Soluble Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor in *E. coli* by Control of Growth Rate.** Park, Se-Cheol\*, In-Young Ko<sup>1</sup>, and Heu-Il Kang. *Biotech Laboratory, Yuhan Research Institute, Yuhan Corporation, Gunpo 435-715, South Korea, <sup>1</sup>Chuncheon Bioindustry Foundation, Gangwon-do 200-161, Korea* – Human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) is a hematopoiesis agent that principally affects the differentiation of neutrophils in the bone marrow. At present, recombinant hG-CSF is used successfully in the treatment of chemotherapy-induced neutropenia and its indication has been expanded to bone marrow transplantation and aplastic anemia. In this study, we have constructed rhG-CSF secretion plasmid pYRC1 in which OmpA signal sequence/hG-CSF gene was expressed under the control of the T7 promoter. rhG-CSF produced in *E. coli* BL21 (pYRC1) grown at 37°C was found in aggregates. However, 15% of the periplasmic protein was soluble rhG-CSF when the *E. coli* BL21 (pYRC1) was cultured at 25°C for 7 h in the modified MBL medium containing 10 g/l glucose with 10 μM IPTG induction. The production of soluble rhG-CSF in *E. coli* BL21 (pYRC1) using fed batch culture was also studied. In the fed batch culture system, the final yield of rhG-CSF produced from *E. coli* BL21 (pYRC1) was increased from 4.4 mg/l to 24 mg/l by controlling the specific growth rate from 0.43 h<sup>-1</sup> to 0.14 h<sup>-1</sup>, and optimizing the time of induction.

**Key words:** soluble recombinant human granulocyte colony stimulating factor, specific growth rate, fed-batch culture

인간 과립구 콜로니 촉진인자(human granulocyte colony-stimulating factor, hG-CSF)의 주된 기능은 골수에서 말초혈액(peripheral blood)으로 호중구 방출을 촉진시키고 시원세포(pluripotent stem cell)와 호중구계 전구세포의 분화와 증식의 촉진이다. 그 외에도 호중구의 수명을 연장시키는 유주(migration)와 활성산소 생산의 촉진 등 호중구의 기능을 향상시킨다. hG-CSF는 항암 화학 요법 후에 발생하는 말초혈액의 호중구 최저치를 증가시키고 호중구수 저하기간과 회복에 필요한 기간을 단축시키는 것으로 밝혀져 항암화학 요법치료약물의 부작용인 호중구 감소증에 대한 효과적인 치료제로 인식되고 있다[10, 12, 16].

재조합 DNA 기술을 사용하여 G-CSF의 분자·유전적인 특성이 규명되었는데 hG-CSF는 o-glycoside 형 당쇄를 갖는 단백질이지만 이 당쇄구조는 생물활성에 필수적 아님이 밝혀져 효율이 높은 대장균을 숙주로 하는 발현체계가 개발되었다. 또한, 대장균에서의 발현에 보다 적합한 유전자를 설계하여 화학적으로 합성한 후 발현벡터에 연결하여 대장균에서 재조합 hG-CSF를 생산하고 있다[2, 11].

강력하면서도 유도가능한 promoter(T7, tac)를 갖춘 발현

vector를 사용하여 외래단백질을 대장균에서 과다 발현시키면 inclusion body로 알려진 불용성 결합체가 형성되는데 inclusion body의 생성은 단백질 그 자체의 특성 및 발현에 사용한 host-vector system의 유도조건 등에 의하여 영향을 받는 것으로 알려져 있다. Inclusion body의 형성시 균체의 회수 및 분리가 용이하고 protease에 의하여 분해되지 않는다는 장점이 있는 반면에 적절한 solubilization과 renaturation 과정을 거쳐 정확한 protein folding이 이루어지도록 활성화시키는 과정이 필요하다는 문제점이 있다[4, 16]. 이것을 극복하고자 PhoA, OmpA 등의 다양한 signal sequence를 이용하여 periplasm으로 soluble한 형태의 단백질을 직접 분비시키려는 연구가 이루어져 왔으며 folding을 도와주는 chaperone을 함께 발현시키거나 목적 단백질 발현을 낮은 온도, 또는 유도물질의 농도조절 등의 배양 조건을 조절함으로써 periplasm으로 분비를 높이려는 시도도 진행되고 있다[1, 9, 19].

본 연구에서는 배양상의 외부 환경조건에 의하여 rhG-CSF의 분비 발현 비율 및 양에서 많은 상이함을 보이므로 배양 온도, 유도물질의 농도 및 비증식속도(specific growth rate)를 조절함으로 대장균에서 생물학적 활성을 갖는 rhG-CSF를 periplasm으로 분비시킬 수 있는 배양조건을 조사하였다.

\*Corresponding author

Tel: 82-31-452-4111, Fax: 82-31-456-4418

E-mail: parkse@yuhan.co.kr

## 재료 및 방법

### 균주 및 plasmids

본 실험에 사용한 균주는 *E. coli* BL21(F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub>* (r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>-) *gal dcmλ*(DE3)) 및 BL21, pLysS(F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub>* (r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>-) *gal dcmλ*(DE3), pLysY(cam<sup>R</sup>))를 Novagen사로부터 구입하여 사용하였으며, 발현 vector로서 pBluescript SK(+), T7 promoter를 가지고 있는 pET22b와 *tac* promoter를 가지고 있는 pFLAG-ATS를 각각 Stratagene, Novagen 및 Eastman Kodak사에서 구입하여 사용하였다.

### 시약

본 연구에 사용한 T4 DNA ligase와 제한효소, Calf-intestine alkaline phosphatase, RNase 등은 Promega사에서 구입하여 사용하였다. 제한효소절단, ligation, 형질전환, 전기영동 등의 기술은 Sambrook 등[16]의 방법을 사용하였으며, 반응조건은 제조회사의 사용지침을 따랐다. 완충용액에 사용한 시약과 항생제, IPTG 등은 Sigma사에서 구입하였으며, 재조합 hG-CSF는 Amgen 및 Chugai사에서 구입하여 사용하였다. Agarose gel로부터 DNA의 분리 및 정제는 Bio101사의 GeneClean II kit와 Promega사의 Wizard Minipreps DNA purification system을 사용하였다.

### 배지

각 균주들의 배양을 위하여 Luria-bertani(LB) 배지(Bacto tryptone, 10 g/l; Bacto yeast extract, 5 g/l; NaCl, 5 g/l, pH 7.0)를 사용하였고, 고체 배지의 경우는 한천을 1.5%로 첨가하여 사용하였다. 배양조건 검토를 위하여 변형된 MBL 배지[21]를 사용하였으며 조성은 10 g/l glucose, 10 g/l yeast extract, 20 g/l casamino acid, 6 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 g/l NaCl, 0.0015 g/l CaCl<sub>2</sub>이었다. 비교실험에 사용한 DA 배지[6]는 10 g/l glucose, 5 g/l yeast extract, 30 g/l tryptone, 7 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O이었으며 각각 pH 7.0이 되도록 제조하여 멸균 후 사용하였으며 발효기는 7l jar fermentor(Chemap, AG Switzerland)이었다.

### DNA의 추출 및 형질전환

재조합 plasmid의 분리는 ampicillin 50 µg/ml이 함유된 LB 배지에서 배양한 후 alkaline lysis 방법에 따라 추출하였으며, *E. coli*의 형질전환은 Sambrook 등[16]의 방법에 따랐다. 형질전환 집락의 선별방법은 ampicillin 50 µg/ml이 포함된 LB agar 배지에서 하룻밤 동안 배양하여 집락형성을 확인하였다.

### 배양온도 및 유도물질 농도에 따른 발현

MBL 배지에서 *E. coli* BL21(pYRC1) 균주의 배양 온도

를 25°C, 30°C, 37°C, 42°C로 각각 달리하여 periplasm의 발현비율(%)과 배양온도의 관계를 조사하였다. 아울러, IPTG의 농도를 1 µM에서부터 10 mM까지 변화시켜 periplasm의 발현비율(%)과의 상관관계를 함께 검토하였다.

### 유도 배양시간에 따른 발현

유도물질의 첨가 시기가 rhG-CSF의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해서 MBL 배지 50 ml이 들어 있는 250 ml 진탕 플라스크에 각각 2%씩 접종하였다. 37°C에서 배양 2시간이 지난 다음 유도 물질인 IPTG를 최종 10 µM되게 첨가한 후 4, 7, 24시간동안 각각 배양하여 유도시간에 따른 periplasm의 발현비율(%)을 조사하였다.

### *E. coli* BL21(pYRC1)의 안정성

시간별 배양액 1 ml을 pour plate method에 의하여 연속 희석한 후 LB agar plate와 LB-Ap agar plate(100 µg/ml)에 각각 도말하고 37°C에서 하룻밤 배양하여 형성된 colony 수를 계수한 후 LB-Ap agar plate의 colony에 대한 LB plate의 집락 생존정도를 백분율로 표시하였다.

### 발효

종균액을 glucose가 1% 첨가된 MBL 배지 5 l가 들어 있는 발효기에 접종하고 배양 2시간이 지난 후에 최종 10 µM이 되도록 IPTG를 유도 물질로 첨가한 후, 9시간동안 배양하였다. 배양 온도는 25°C이었으며 5 N NaOH로 배양액의 pH를 7.0으로 유지하였다. 또한, 유기식 발효를 위하여 상기에 준비된 종균액을 동일한 배지에 접종한 후 배양 13시간 뒤에 35%(w/v) glucose와 18%(w/v) casamino acid 혼합액을 시간당 50~120 ml의 속도로 공급하였으며 유도 물질로 IPTG 10 µM을 사용하여 8~15시간 동안 유도 배양하였다.

### 배양액의 분석

**균체량:** 균체 농도를 spectrophotometer(V550, Jasco사, Japan)를 이용하여 600 nm에서 현탁도(OD)를 측정하였으며 OD와 건조균체중량 간의 표준곡선 측정 결과 600 nm에서 1 unit는 0.43 g-DCW/l에 해당하였다.

**환원당 정량:** 환원당 농도가 1% 이하가 되도록 sample을 희석한 후 시료 30 µl을 취하여 시험관에 넣고 DNS 시약(0.6% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 0.2% phenol, 0.2% NaHSO<sub>3</sub>, 1% NaOH, 20% Rochelle salt) 3 ml을 혼합하여 잘 섞은 다음, boiling water bath에서 10분간 가열하였다. 상온까지 냉각시키고 575 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 물질과의 비교로서 시료의 환원당 농도를 얻었다. 표준물질은 1%의 glucose 용액을 0.2% 농도까지 희석하여 사용하였다[18].

**단백질 정량:** Bio-Rad사의 protein assay kit(Catalog No. 500-0006)를 사용하여 시료의 단백질 농도를 25 µg/ml 이하가 되도록 희석하여 단백질의 양을 정량하였다.

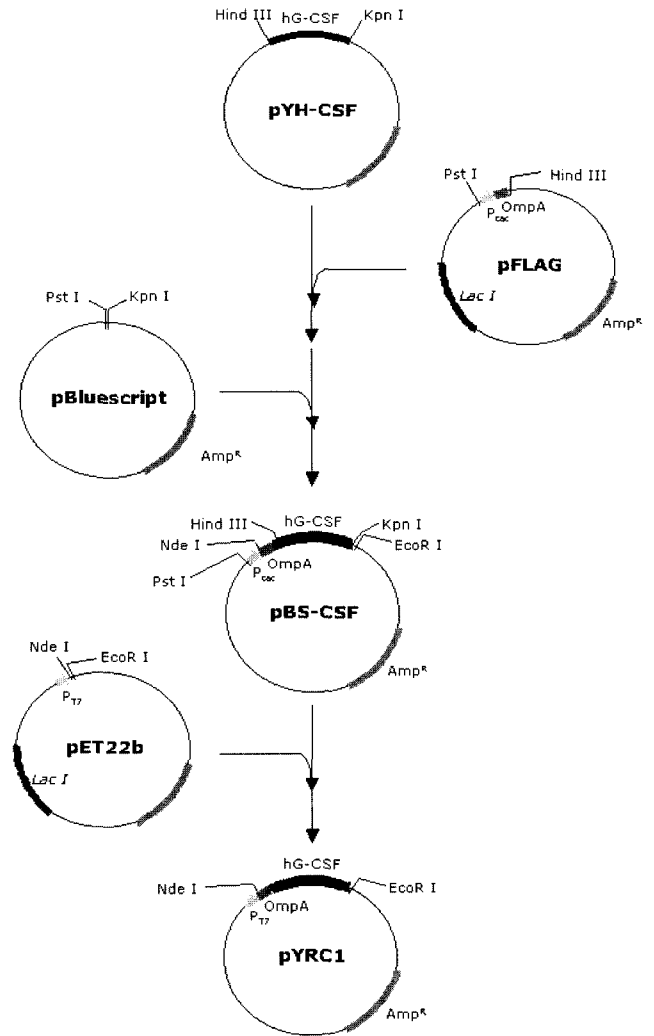
**Soluble rhG-CSF의 확인**

재조합 균주배양에서 periplasm으로 발현되는 rhG-CSF의 양을 확인하기 위하여 배양액 1 l를 취하여 8,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 균체를 회수하였다. 균체를 500 ml의 periplasm 완충액(0.5 M sucrose; 0.03 M Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0)에 현탁하여 10분간 상온에서 방치한 후, 8,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. Pellet을 500 ml의 ice-cold water에 현탁한 후 다시 원심 분리하여 생긴 상층액을 취하여 periplasm 분획만을 분리하였다[13]. SDS-PAGE를 위하여 각 시료를 30 µl씩 취하여 2× sample buffer(0.13 M Tris-HCl(pH 6.2); 4% SDS; 20% glycerol; 10% 2-mercaptoethanol)에 현탁한 후 12%의 SDS polyacrylamide gel에서 30 mM로 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 후에 gel은 Coomassie blue 염색법에 의해 염색하고 Scanning densitometer(Image quant, Molecular Dynamics 사)를 이용하여 발현된 rhG-CSF를 정량하였다. 또한, SDS-PAGE를 수행한 후 hG-CSF에 대한 단일클론 항체를 이용하여 Towbin 등의 방법[20]을 변형하여 western blot 분석하였다. 분비 발현된 rhG-CSF는 Amersham사(cat. #RPN2150, USA)의 G-CSF ELISA kit를 사용하여 정량적으로 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**rhG-CSF 발현 plasmids**

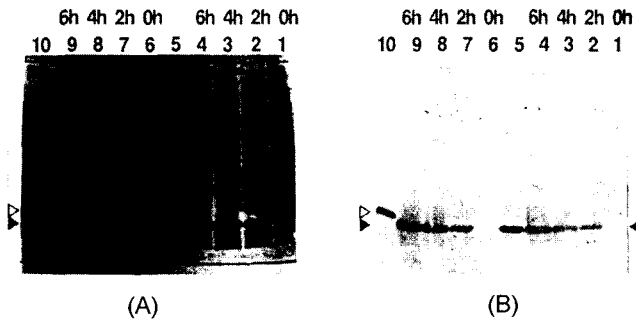
*E. coli*에서 효과적인 발현벡터인 pET22b와 pFLAG-ATS에서 hG-CSF 유전자를 발현 및 분비시키기 위하여 Fig. 1에서와 같이 hG-CSF 유전자를 포함하고 있는 pYH-CSF로부터 525 bp *Hind*III-*Kpn*I 절편의 hG-CSF 유전자를 분리하였다. OmpA signal sequence를 가지고 있는 pFLAG vector (5,396 bp)와 pBluescript SK(+) vector의 *Pst*I과 *Kpn*I 제한 효소로 절단하여 앞서 분리된 hG-CSF 유전자를 삽입하여 promoter 다음에 OmpA signal sequence/hG-CSF가 발현되도록 pBS-CSF(3,600 bp)를 제조하였다. 또한, T7 promoter와 *lac* operator를 가지고 있는 발현체계인 pET22b에서 hG-CSF를 발현시키기 위하여 pBS-CSF를 *Nde*I-*Eco*RI으로 절단하여 730 bp의 OmpA signal sequence/hG-CSF 절편을 분리하고 동일한 제한효소로 자른 pET22b와 ligation하여 pYRC1(5,700 bp)을 제조하였다. 재조합 plasmid pYRC1을 포함하고 있는 *E. coli* BL21(DE3)와 *E. coli* BL21(DE3, pLysS)를 ampiciline 50 µg/ml이 포함된 LB 배지에서 배양하고 배양 3시간 후에 1 mM IPTG로 유도배양하였다. SDS-PAGE 및 western blot 분석결과 Fig. 2에서와 같이 표준품으로 사용한 *E. coli*에서 발현된 Filgrastim과 동일한 위치에서 발현됨을 확인하였다.



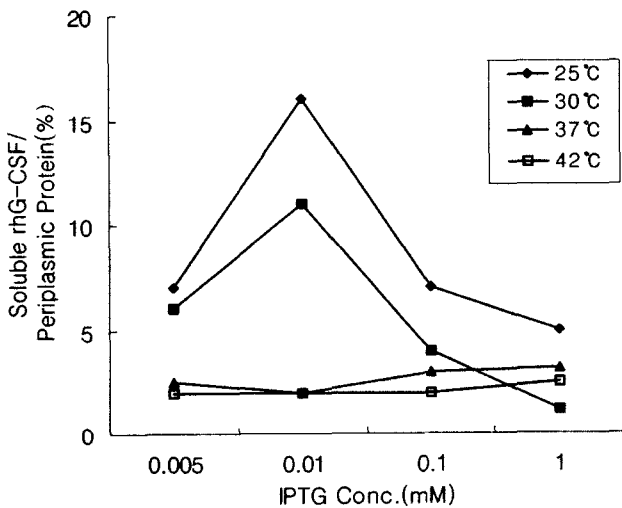
**Fig. 1. Schematic representation of the construction used to generate the human G-CSF expression vector, pYRC1.** Abbreviation: T7, T7 promoter, OmpA, OmpA signal sequence of outer membrane protein.

**온도 및 유도 물질에 의한 영향**

MBL 배지를 사용하여 *E. coli* BL21(pYRC1)의 배양온도 및 유도물질의 농도에 따라 periplasm으로 발현된 수용성 rhG-CSF 발현정도를 유도배양 7시간 뒤에 조사하여 Fig. 3에 나타내었다. 25°C, 30°C, 37°C, 42°C로 배양온도와 유도물질인 IPTG 농도를 5 µM에서부터 1 mM까지 함께 변화시키므로써 최적 전사효율을 얻을 수 있는 배양조건을 검토하였다. 37°C 이상에서 배양한 경우 전체 periplasm 단백질 중에 수용성 rhG-CSF의 발현 비율이 5% 이하로 저조하였으며 수용성 rhG-CSF의 발현 비율은 25°C, 10 µM IPTG에서 유도 배양한 경우 16%로 최대이었다. 이때, IPTG 농도를 1 mM로 증가시키에 따라 발현비율은 5% 이하로 감소하였다. 또한 30°C에서는 유도물질인 IPTG 농도가 10 µM이었을 때 발현비율이 12%이었으며 37°C, 10 µM IPTG에서는 발현비율이 2%에 불과하였다. 각 배양온도에 의하여 발현량에 변



**Fig. 2.** SDS-PAGE (A) and western blot (B) analysis for cellular hG-CSF expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and BL21 (DE3, pLysS) containing pYRC1. Lane 1, 2, 3, 4, *E. coli* BL21 (DE3, pLysS) containing pYRC1; 5, Filgrastim (1.5 µg; Amgen, USA); 6, 7, 8, 9, *E. coli* BL21 (DE3) containing pYRC1; 10, Lenograstim (2 µg; Chugai, Japan)

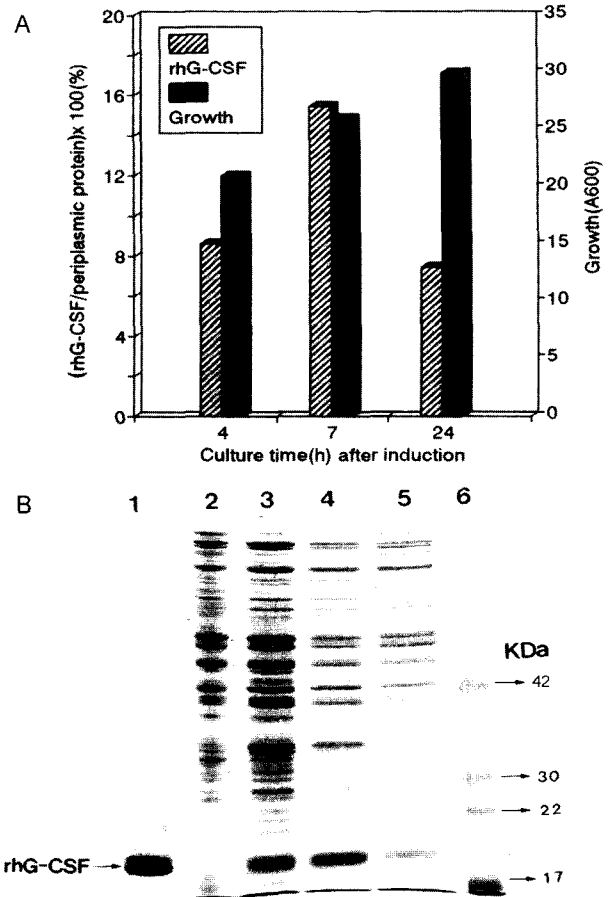


**Fig. 3.** Expression of soluble rhG-CSF in the various temperatures and IPTG concentrations by *E. coli* BL21 harboring pYRC1.

화를 보였으며 최적 배양 온도는 25°C로 판단되며 그 이상의 온도에서는 periplasm 발현 비율이 오히려 감소하였다. 이는 배양 온도 및 유도 물질의 농도에 따라 수용성 재조합 단백질의 발현량에 커다란 차이를 보인다는 Hiroshi 등의 결과와 일치하였다[5].

**유도 배양시간의 영향**

유도 배양시간이 발현량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본 배양 배지를 MBL 배지로 glucose를 최종 1%가 되도록 첨가하여 배양하였다. 유도 물질로 IPTG를 최종 10 µM 되도록 배양 2시간 뒤에 첨가하였고 유도 배양 후에 지체기, 증식기, 정지기로 각각 구분하여 4, 7, 24시간 뒤에 전체 발현된 rhG-CSF 중에서 periplasm으로 분비 발현된 양을 확인한 결과 Fig. 4(A)에서와 같이 각각 발현된 rhG-CSF의 비율이 periplasm 단백질 중에 8, 15, 7%를 차지하였다. 이상



**Fig. 4.** Effect of the timings of induction during fermentation on productivity of rhG-CSF produced from *E. coli* BL21 harboring pYRC1. A: Percentage ratios of soluble rhG-CSF at the timings of induction. B: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis at the timings of induction. In all cases, samples applied to the gel are equivalent to 35 µl cultures. Lane 1; Filgrastim (2 µg; Amgen, USA), 2; periplasmic fraction after 10 h culture without induction, 3; periplasmic fraction after 4 h induction, 4; periplasmic fraction after 7 h induction, 5; periplasmic fraction after 24 h induction, 6; Multi Mark-colored standard (Invitrogen, USA).

에서 최적의 회수 시기는 유도배양 후 7시간이며 그 이상 배양에서는 분비 발현된 단백질의 순도가 오히려 감소하였다. Fig. 4(B)에서는 각 유도 배양시간에서 발현된 rhG-CSF의 SDS-PAGE 결과를 보여주고 있다.

**최적 feeding rate**

유기식 발효의 기본 배양조건을 검토하고자 배지공급 속도를 각각 달리하여 균체 성장 추이와 rhG-CSF 생성량을 유도배양 후 7시간 동안 배양하면서 관찰하였다. 유도 물질로는 IPTG를 최종 10 µM되도록 배양 2시간 뒤에 첨가하여 13시간동안 배양한 후 배지공급 속도를 50, 100, 120 ml/h로 달리하여 8시간동안 35%(w/v) glucose와 18%(w/v) cas-amino acid 혼합액을 공급하였다. 배양 후 동일 조건으로 균체를 회수하고 삼투압 충격으로 periplasm 분획만을 분리하

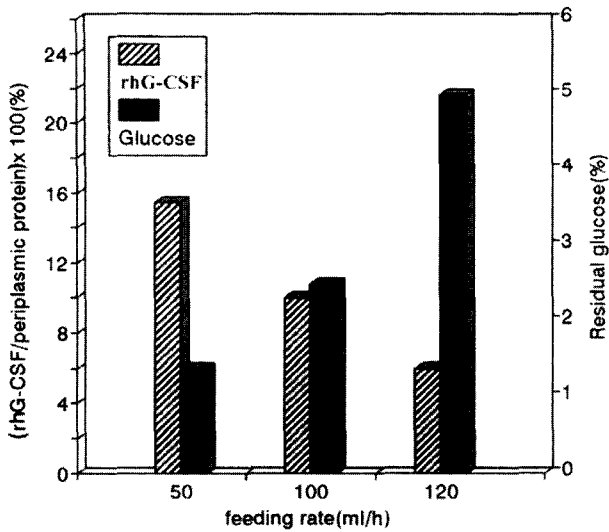


Fig. 5. Effect of the nutrient feeding rates on rhG-CSF produced from *E. coli* BL21 harboring pYRC1. The nutrient feeding media contained 35% (w/v) glucose and 18% (w/v) casamino acid. *E. coli* BL21 (pYRC1) was cultured for 8 h with the nutrient feeding media at 13 h after inoculation.

였다. Fig. 5에서와 같이 배지공급 속도를 시간당 50 ml에서 120 ml로 증가시키에 따라서 균체성장은  $A_{600}$  기준으로 26에서 30까지 증가하였으나 periplasm으로 분비 발현된 rhG-CSF의 비율은 오히려 15%에서 6%로 감소하였다. 잔당 농도 역시 대장균 배양에서 균체 성장 및 발현에 저해를 주는 농도로 보고[14]되어 있는 5%까지 상승하여 배지공급 속도는 시간당 50 ml인 것이 높은 rhG-CSF 발현효율을 보였다.

**성장 속도 조절에 의한 soluble rh-GCSF의 발현**

Lee 등에 의하면 specific growth rate를  $0.2 \text{ h}^{-1}$ 로 유지하여 최대  $1 \times 10^9$  IU/의 periplasm으로 분비 발현된 human interferon의 생산에 성공한 예가 보고되어 있다[18]. Soluble rhG-CSF의 발현을 극대화하여 최적의 분비발현을 유도하기 위하여 균체 성장속도를 낮추어 배양하였다. 균체 성장정도는 유도시점인 13시간 배양에서  $A_{600}$ 에서 13이었으며 이후 glucose(w/v) 35%와 casamino acid(w/v) 18%의 혼합액을 시간당 50 ml의 속도로 배양 종료시까지 배지 공급속도를 유지하였을 때 최고 30까지 흡광치가 증가하였다(Fig. 6.A). 아울러 플라스미드 안정성과 생균수는 유도 시점인 13시간 배양에서  $3.3 \times 10^{10}$  cfu/ml이었으나 유도 배양 8시간 후인 21시간 배양에서는  $2.4 \times 10^{10}$  cfu/ml로 생균수가 감소하였고 플라스미드 안정성 역시 80%에서 33%로 급감하였다. Periplasm으로 회수된 정도는 Fig. 6(A)에서와 같이 8시간 유도 배양에서 24 mg/l의 rhG-CSF가 발현되었으나 24시간 유도 배양에서는 14 mg/l로 감소하였으며 분비 발현된 단백질의 순도 또한 15.5%에서 7.4%로 감소하였다. 이와 같이

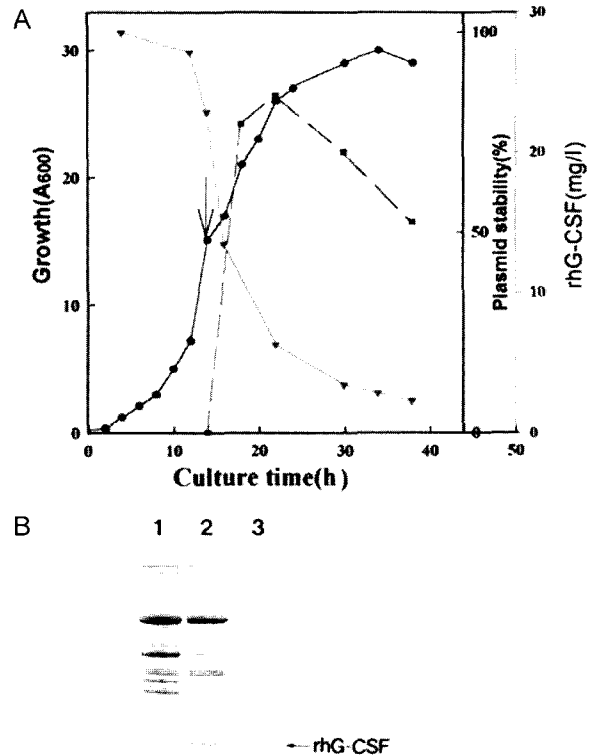


Fig. 6. Time profiles of cell growth and rhG-CSF production during fed-batch cultivation of *E. coli* BL21 harboring pYRC1. A; The arrow indicates the time of induction. Growth (●), plasmid stability (▼), activity (■). B; SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of periplasmic fractions. Lanes 1; periplasmic fraction after 24 h induction, 2; periplasmic fraction after 8 h induction, 3; Filgrastim (2 µg; Amgen, USA).

배양 시간이 길수록 단백질의 순도가 감소하는 원인은 cell lysis 및 플라스미드의 결실에 의한 세포내 타단백질의 분비에 기인하는 것으로 추정된다. Fig. 6(B)에서는 8, 24시간 유도 배양에서 발현된 rhG-CSF의 SDS-PAGE 결과를 보여주고 있다. *E. coli* BL21(pYRC1)을 사용하여 periplasm으로 soluble rhG-CSF의 분비발현을 유도하는 유가식 발효에서는 플라스미드가 안정적으로 유지되는 non-induction 상태에서 균체를 확보한 후 8시간 이내에 유도배양을 종료하는 것이 유리하였다.

Gary 등에 의하면 재조합 RubisCo(Rubulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase)생산에 관련된 발효 연구를 통하여 플라스크와 발효조를 사용한 배양에서 발현량에 많은 차이가 있음을 보여주고 있는데 배양 조건에 따라서 전체 soluble 단백질 중에서 RubisCo가 차지하는 비율이 0.2~14%로 상이하였으며 periplasm으로 분비되는 비율은 사용한 배지에 따라서도 많은 차이를 보였다[3]. 51 배양 결과 Table 1에 나열한 바와 같이 본 연구결과에서도 이와 유사하여 반응기 조업 방식(batch 혹은 fed-batch)과 배지 조성에 따라서 전체 soluble 단백질 중에서 rhG-CSF가 차지하는 비율이 2~15%로 많은 차이를 보였다. 비증식 속도(specific growth

**Table 1. Summary of fermentations for the production of rhG-CSF using *E. coli* BL21 (pYRC1).**

Fermentation methods	Culture time (h)	Medium	A <sub>600</sub>	Plasmid stability (%)	rhG-CSF (%)	Soluble rhG-CSF <sup>b</sup> (mg/l)	Specific productivity <sup>c</sup>	Specific growth rate (h <sup>-1</sup> )
Batch	9	LB	4	NA <sup>a</sup>	15	0.65	0.17	0.27
Fed-batch	10	DA	35	25	2	4.4	0.13	0.43
Fed-batch	28	MBL	30	20	10	24	0.45	0.14

<sup>a</sup>NA, not assayed<sup>b</sup>Percentage of total soluble protein<sup>c</sup>mg of soluble rhG-CSF/A<sub>600</sub>

rate, h<sup>-1</sup>)를 각각 0.14, 0.43 h<sup>-1</sup>이 되도록 배양하였을 때 Table 1에서와 같이 rhG-CSF의 발현량은 각각 24, 4.4 mg/l이었다. 균체 성장 속도를 빠르게 하여 배양한 경우 균체량은 배양 10시간 뒤에 A<sub>600</sub>에서 35로 급격히 증가하였으나 periplasm으로 분비 발현된 soluble rhG-CSF의 양은 4.4 mg/l, specific productivity도 0.13에 불과하였다. 이에 비하여 균체 성장 속도를 0.14 h<sup>-1</sup>로 낮게 배양한 경우 최대 rhG-CSF의 발현량이 24 mg/l이었으며 specific productivity도 0.45로 증가하였다. 상기의 결과로부터 비중식 속도를 0.14 h<sup>-1</sup> 이하로 배양하면 단백질의 적절한 folding에 도움을 주어 soluble 형태의 rhG-CSF가 많아지고 그 이상의 균체 성장조건에서는 균체 성장에 비하여 적은 비율의 rhG-CSF가 분비 발현된다는 것을 확인하였다. 한편, batch 형태로 배양한 경우 전체 periplasm 단백질의 15%에 달하는 비율이 soluble 형태로 발현되었으나 균체성장인 A<sub>600</sub>에서 4에 불과하여 최대 rh-GCSF의 발현량은 0.65 mg/l이었다.

rhG-CSF의 분비 발현량을 개선하기 위해서는 분비 발현에 관여하는 leader sequence의 유전적인 조작에 따라 발현량의 향상이 가능할 것으로 판단된다. 실제 Kazuko 등은 endotoxin signal sequence의 구성 아미노산을 변화시켜 최대 3.5배까지 rhEGF의 발현량을 증가시켰다[7]. 본 연구에 덧붙여 translocation에 관여하는 OmpA signal sequence의 구성 아미노산을 부위특이 돌연변이 기법을 활용하여 C,N-terminal 및 central region의 각기 중요한 기능을 갖는 아미노산을 치환시키는 연구를 통하여 rhG-CSF 분비 발현 효율의 커다란 향상이 가능하리라 사료된다.

## 요 약

인간 과립구 성장인자(hG-CSF)는 골수에서 생산되는 단백질로 호중구의 분화 및 생성을 촉진시키는 역할을 한다. 현재 재조합 hG-CSF는 암화학요법에 의한 호중구감소증, 골수이식시 호중구 감소증, 재생불량성 빈혈에 수반되는 호중구 감소증 등으로 적응증이 확대되고 있다. 본 연구에서는 OmpA signal sequence를 삽입하여 인간 과립구 성장인자(hG-CSF)가 분비발현되도록 고안된 T7 promoter에 의하여 발현되는 pYRC1 발현벡터를 제조하였다. *E. coli* BL21 (pYRC1) 발현시 37°C에서 배양하는 경우 많은 양의 봉입체

(aggregates)를 형성한다. 이에 비하여 10 g/l glucose를 포함하는 변형된 MBL 배지에서 10 μM IPTG를 유도물질로 7 시간동안 25°C에서 배양하였을 때 전체 periplasm 단백질의 15%가 soluble rhG-CSF이었다. 또한, 유가식 배양방법을 사용하여 *E. coli* BL21(pYRC1)에서 soluble rhG-CSF의 생산 조건을 조사하였다. 유가식 배양에서 rhG-CSF의 발현량이 비중식속도를 0.43 h<sup>-1</sup>에서 0.14 h<sup>-1</sup>으로, 유도 배양시간을 최적화함으로써 rhG-CSF의 발현량이 4.4 mg/l에서 24 mg/l로 증가하였다.

## REFERENCES

1. Abrahmsen, L., T. Moks, B. Nilsson, and M. Uhlen. 1986. Secretion of heterologous gene products to the culture medium of *E. coli*. *Nucleic acid Res.* **14**: 7487-7500.
2. Clark, S. C. and R. Kamen. 1987. Human hematopoietic colony-stimulating factor. *Science* **236**: 1229-1237.
3. Gary, L. K., M. Horken, F. R. Tabita, and W. R. Strohl. 1996. Overproduction of recombinant ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase from *Synechococcus* sp. strain PCC 6301 in glucose-controlled high cell-density fermentations by *Escherichia coli* K-12. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3502-3507.
4. Goff, S. A. and A. L. Goldberg. 1987. An increase content of protease La, the Lon gene product, increases protein degradation and block growth in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **262**: 4508-4515.
5. Hiroshi, T., Y. Morinaga, M. Tsuchiya, H. Ikemura, and M. Inouye. 1988. Control of folding of proteins secreted a high expression secretion vector, PIN--ompA: 16-fold increase in production of active subtilisin E in *E. coli*. *Bio/Technol.* **6**: 948-950.
6. Kang, S. H., K. H. Na, J. H. Park, C. I. Park, S. Y. Lee, and Y. I. Lee. 1995. High level expression and simple purification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in *E. coli*. *Biotechnol. lett.* **17**: 687-692.
7. Kazuko, M. F., R. Marumoto, and T. Fukuda. 1991. Modified enterotoxin signal sequences increase secretion level of the rhEGF in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **266**: 1728-1732.
8. Lee, J. H., Y. H. Choi, S. K. Kang, H. H. Park, and I. B. Kwon. 1989. Production of human leukocyte interferon on *E. coli* by control of growth rate in fed-batch fermentation.

- Biotechnol. Lett.* **10**: 695-698.
9. Lee, S. C. and P. O. Olins. 1992. Effects of overproduction of heat shock chaperones GroESL and Dnak procollagenase production in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**: 2849-2852.
  10. Nagata, S. 1987. Gene structure and function of granulocyte colony-stimulating factor. *Bioassay* **10**: 113-117.
  11. Nagata, S., M. Tsuchiya, S. Asano, Y. Kaziro, T. Yamazaki, O. Yamamoto, Y. Hirata, N. Kubota, M. Oheda, H. Nomura, and M. Ono. 1986. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony stimulating factor. *Nature* **319**: 415-418.
  12. Nicola, N. A. 1985. Granulocyte colony stimulating factor. *Methods Enzymol.* **116**: 600-619.
  13. PET system manual. 1994. Novagen Inc., (4th ed.), p. 15-26.
  14. Riesenber, D. 1991. High cell density cultivation of *E. coli*. *Curr. Opinion Biotechnol.* **2**: 380-384.
  15. Sachs, L. 1987. The molecular control of blood cell development. *Science* **238**: 1374-1379.
  16. Sambrook, J. and D. W. Russel. 2001. Molecular Cloning. (3rd ed.), Cold Spring Harbor, New York.
  17. Schoner, R. G., L. F. Ellis, and B. E. Schoner. 1985. Isolation and purification of protein granules from *Escherichia coli* cells overproducing bovine growth hormone. *Biotechnol.* **3**: 151-154.
  18. Sumner, J. V. and G. F. Somers. 1949. Dinitrosalicylic method for glucose, p. 38-39. In Laboratory of Biological Chemistry (2nd ed.), Academic Press. Inc., New York.
  19. Takanori, O., S. Sakamoto, K. Miyoshi, T. Fuwa, K. Yoda, M. Yamasaki, G. Tamura, and T. Miyake. 1985. Synthesis and secretion of human epidermal growth factor by *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 7212-7216.
  20. Towbin, H. T., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 4350-4355.
  21. Yadwad, V. B., S. Wilson, and O. P. Ward. 1994. Production of human epidermal growth factor by an ampicillin resistant recombinant *E. coli* strain. *Biotechnol. Lett.* **10**: 695-698.

**(Received Feb. 2, 2004/Accepted June 11, 2004)**