형질전환 벼 현탁세포 배양에서 세포 사멸 억제를 통한 hCTLA4Ig 생산성 증대

김명식^a, 남형진^a, 김민섭, 권준영, 김동일*

Enhanced Production of hCTLA4Ig by Suppressing Cell Death in Transgenic Rice Cell Suspension Cultures

Myong-Sik Kim^a, Hyung-Jin Nam^a, Min-Sub Kim, Jun-young Kwon, and Dong-Il Kim*

접수: 2013년 8월 14일 / 게재승인: 2013년 8월 28일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Transgenic plant cell cultures are an attractive expression system for the production of industrial and pharmaceutical proteins because of their advantages in safety and low production cost. Human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-immunoglobulin (hCTLA4Ig) was produced and secreted when sugar was depleted in culture medium by transgenic rice cell lines (*Oryza sativa* L.) using RAmy3D promoter. Due to the production of the target protein by sugar depletion, concomitant occurrence of cell death is inevitable. For that reason, inhibition of cell death for enhancing productivity was necessary for the production period without energy sources. Supplementation of 0.1 mM sodium nitroprusside improved cell viability by 1.4-fold and maximum hCTLA4Ig production by 1.3-fold compared to those of control. Addition of 1 and 10 mM glutathione, N-acetylcysteine (NAC), and nicotinamide inhibited apoptotic-like programmed cell death by decreasing the activity of reactive oxygen species. Production hCTLA4Ig was enhanced 1.4-, 1.25-, and 1.15-fold with 10 mM NAC, 1 mM NAC, and 1 mM glutathione, respectively. In addition, it was found that the supplementation of NAC enhanced the cell viability.

Keywords: Transgenic plant cell suspension cultures, hCTLA4Ig, Sodium nitroprusside, Glutathione, N-acetylcysteine

1. 서론

생물의약품은 사람이나 여타 생물체에서 유래된 물질 또는 생물체를 직접 이용하여 제조하는 생물학적 제제 (백신, 혈장분획제, 항독소), 유전자재조합 의약품 및 세포배양 의약품, 세포치료제, 유전자치료제 등의 의약품 (생물학적 제제 등)을 말한다. 이는 형질전환된 미생물 또는 동물세포와 같이 살아있는 세포의 배양과 정제 공정을 통해 생산되어 왔으며, 최근에는 식물세포, 곤충세포 등의 다양한 숙주세포들도 사용되면서 바이오의약 시장이 성장하고 있다 [1].

식물유래 생물의약품 (plant-made pharmaceuticals, PMPs)은 식물체 혹은 식물세포를 이용하여 생산되는 치료용 단백질과 같은 의약품을 의미한다. 최근 식물 기반 시스템이 생물의약품을 생산하는 데 있어 전도유망한 수단으로 활발히 연구되고 있다. 이는 경제성, 안전성, 대량배양 가능성 측면뿐만 아니라 post-translational modification (PTM)이 가능하며 유전적 안전성과 동물유래 바이러스로부터의 오염 위험성으로부터 안전함이 장점이기 때문이다. 식물유래 human growth hormone, fusion protein, interferon, monoclonal antibody, human serum albumin 등의 발현이 보고되었으며, 다양한 종류의 생물의약품들에 대해 임상실험 및 상업화가 진행되고 있다. 최근 Protalix사는 고서병 치료제인 Elelyso를 미

인하대학교 공과대학 생물공학과
Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel: +82-32-860-7515, Fax: +82-32-872-4046
e-mail: kimdi@inha.ac.kr

*These authors contributed equally to this work as the first author.

국 FDA로부터 최초로 식물세포 유래의 생물의약품으로 허가받았기 때문에 이후 식물세포 유래 생물의약품의 연구가 활발히 진행될 것으로 예상되며 현재 20여 개의 식물유래 생물의약품이 임상 1, 2상 단계 이상이 진행되고 있다 [2].

hCTLA4Ig (human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-immunoglobulin)는 human CTLA-4의 extracellular domain과 immunoglobulin의 Fc 부분을 융합한 fusion protein이다. 이는 dimer 구조를 형성하여 생체 내의 반감기가 연장되며 [3], immunoglobulin 부분과 rProtein A resin의 affinity를 통한 효과적인 정제가 가능하다. 면역반응 유발에 가장 중요한 T 세포의 co-stimulatory signal은 T 세포 표면의 cluster of differentiation 28 (CD28)이나 hCTLA4와 antigen presenting cells (APCs) 표면의 B7 수용체 (CD80 및 CD86) 간의 결합으로 알려져 있다. hCTLA4Ig는 B7 수용체와의 친화력이 CD28에 비해 약 20~50배 높은 결과를 보인다. 따라서 hCTLA4Ig는 T 세포 특이적 면역억제 반응을 유도하여 면역억제제 역할을 한다. 이와 같은 면역반응을 감소시켜줄 수 있는 hCTLA4Ig의 기능은 장기 이식한 환자들이나 자가면역질환의 일종인 류마티스성 관절염 환자들에게 유용하게 사용된다 [4]. 2005년 12월 Bristol-Myers Squibb (BMS) 사의 hCTLA4Ig는 미국 식품의약품안전청(Food and Drug Administration, FDA)으로부터 abatacept라는 성분명의 류마티스성 관절염 치료제로 승인받아 Orenicia라는 상품명으로 판매되고 있다.

형질전환된 식물세포를 이용한 단백질 생산 시스템은 생산량이 낮다는 문제점 때문에 산업화로의 적용에 제약을 받아 왔다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 고발현 promoter를 이용하여 재조합 단백질 생산량을 증가시키려는 연구가 수행되어 왔으며, 그중에서도 특정 조건에 의해 발현이 유도되는 inducible promoter가 많이 연구되고 있다 [5]. 환경 조건에 의해 조절이 가능한 inducible promoter인 RAm3D promoter는 당이 제거되었을 때 전사가 증폭되어 목적 단백질의 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다 [6]. 하지만 당이 제거되어 야만 단백질을 생산하기 때문에 당 고갈에 의한 세포 사멸을 유발할 수 있다는 단점을 가지고 있다.

동물세포에서 세포 사멸은 apoptosis (type 1), autophagic cell death (type 2), 그리고 necrosis (type 3)로 나눌 수 있다. 그 중 apoptosis는 programmed cell death (PCD)로 표현되며 조직화된 세포의 파괴 과정을 이끄는 일련의 사건들로 정의된다 [7]. 이는 병원균에 대한 방어 작용과 다세포 생명체의 신체 발달에 중요한 역할을 한다 [8]. 초기 apoptosis는 특이적인 형태학적 용어로 표현되었으며 [9] 이후 세포 수축, 핵의 응축과 단편화 그리고 'apoptotic body'로 세포가 부서지는 등의 특징이 발견되었다 [10]. 또한 caspase라고 알려진 cysteine protease의 활성화가 일어나는데 이러한 caspase의 활성화는 외부의 사멸 수용체나 내부의 경로를 통해 이루어지며 cytochrome c를 방출하게 된다. 방출된 cytochrome c는 세포질의 caspase 활성화 복합체인 apoptosome의 형성을 유도한다 [11]. 이러한 apoptosis는 세포의 stress에 의해 원형질막의 삼투압 조절 기능을 상실하여 물이 유입되어 터져 사멸하는

necrosis와 구별된다 [12]. Type 2 세포사멸인 autophagy는 다른 세포사멸인 apoptosis나 necrosis와 구별되는 특징을 가지고 있다 [13]. Autophagy는 'self-eating'이라는 뜻의 라틴어에서 유래된 단어로서 에너지원이 고갈되었을 때, 자신의 세포질이 분해되는 세포사를 말한다. 이때 미토콘드리아와 ER의 팽창과 Golgi complex의 경미한 확대 등을 특징적으로 보인다 [14]. 식물세포의 PCD는 동물세포와 달리 'apoptotic body'가 형성되지 않으며, caspase-like molecule이 쪼개지며 cytochrome c와 같은 apoptogenic 단백질이 방출되며, DNA가 100 kb 이하로 단편화되고, 세포벽으로부터 원형질체가 분리되는 특징을 가지고 있으며 apoptotic-like programmed cell death (AL-PCD)라고 불린다 [15]. 식물세포에서의 autophagy는 용해 시스템인 vacuole의 크기가 커지고 세포질의 폭이 줄어드는 특징을 가지고 있다. 또한 식물세포에서는 autophagosome의 생성을 통해 macroautophagy가 나타나며 직접 vacuole과 합쳐져 autophagic body를 형성한다 [16].

본 연구에서는 형질전환 벼 세포배양을 이용하여 RAm3D promoter에 의한 목적 단백질의 발현시에 어떠한 종류의 세포사멸이 나타나는지 확인하고, 이를 개선하기 위해 NO 공여체인 sodium nitroprusside를 첨가하였다. 또한 anti-apoptosis agent로서 효과가 입증된 항산화제들인 nicotinamide, N-acetylcysteine, glutathione 등을 첨가함으로써 목적 단백질의 induction 후 세포의 생존도를 높여 hCTLA4Ig의 생산성을 높이고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 세포주 및 배양 조건

본 연구에 사용된 세포주는 hCTLA4Ig를 생산하는 형질전환 벼 (*Oryza sativa* L. cv. Dongjin) 현탁세포로 보령제약으로부터 분양 받아 사용하였다. 벼의 α -amylase gene family인 RAm3D inducible promoter를 포함하여 유전자 재조합되었고, 이 promoter는 당 고갈시 목적 단백질이 발현되며 생산된 단백질은 배지로 분비된다 (Fig. 1).

형질전환된 벼 현탁세포를 유지하기 위한 생장 배지로 아미노산 (amino acid, AA) 기본배지를 사용하였다 [17]. 여기에 탄소원으로는 30 g/L sucrose, 성장조절제로는 0.2 mg/L kinetin, 2.0 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)와 0.1 mg/L gibberellin을 첨가하였다. 배지 pH는 5.8로 조절하였고, 500-mL Erlenmeyer flask에 분주한 후에 가압증기 멸균하여 사용하였다. 배지 140 mL 중 10%에 해당하는 14 mL은 50 mg/L hygromycin이 첨가된 아미노산 혼합용액 (1.0 mM glycine, 6.0 mM glutamine, 2.0 mM aspartic acid, 1.3 mM arginine)을 0.22- μ m membrane filter (Millipore, USA)로 여과 멸균하여 사용하였다. 계대배양은 28°C, 120 rpm, 암조건이 유지되는 shaking incubator에서 배양하여 9일 간격으로 실시하였다. 목적 단백질의 induction을 위한 생산배지로는 sucrose가 첨가되지 않은 AA배지를 사용하였으며, 위와 동일한 배

Fig. 1. The plant expression vector containing hCTLA4Ig gene.

양조건에서 실험을 수행하였다.

2.2. 세포량 측정

세포 생장을 확인하기 위해서는 세포 생체량 (fresh cell weight, FCW)과 세포 건체량 (dry cell weight, DCW)을 측정하였다. 100-mL Erlenmeyer flask에서 배양한 현탁세포를 Buchner funnel과 Whatman No.1 여과지를 이용하여 세포와 배양액을 분리하였다. 분리된 세포는 배지와 동량의 증류수로 2~3회 세척한 후, 진공펌프로 수분을 제거하고, 사전에 무게가 측정된 weighing dish에 세포를 옮겨 담아 FCW를 측정하였다. FCW 측정 후, 60°C의 drying oven에서 48시간 동안 무게의 변화가 없을 때까지 건조시켜 DCW를 측정하였다.

2.3. 세포 생존도 측정

세포의 생존도는 TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 환원법으로 상대적인 생존도를 측정하였다. FCW 세포를 모두 회수하여 Falcon tube에 담아 1.5% TTC 용액 (0.05 M potassium phosphate solution, pH 9.0)을 첨가하여 20°C에서 24시간 반응시켰다. 그 후, 세포 내에 생성된 red formazan을 추출하기 위해 TTC 용액을 제거하고 95% ethanol을 첨가하여 60°C에서 30분 동안 반응시켰다. 15,000 rpm에서 30분간 원심분리한 후, 상등액을 spectrophotometer (Agilent Technologies Inc., USA)를 이용하여 485 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. Blank로는 95% ethanol을 사용하였다.

2.4. hCTLA4Ig의 정량분석

hCTLA4Ig의 정량분석을 위하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 사용하였다. Sandwich ELISA를 수행하기 위하여 primary antibody로는 goat anti-human IgG (Fc) (KPL, USA)를 사용하였고, secondary antibody로는 peroxidase-labeled goat anti-human IgG (KPL, USA)를 사용하였다. 기질은 ABTS peroxidase substrate (KPL, USA, Gaithersburg)로 사

용하였고, 발색 정도를 405 nm에서의 흡광도로 측정하였다. 표준물질로는 ImmunoPure human IgG (Pierce, USA)를 사용하였다.

2.5. Protease 활성 측정

세포가 생산기에 hCTLA4Ig를 생산함과 동시에 protease도 분비하기 때문에 이는 배지로 분리된 hCTLA4Ig의 안정성에 큰 영향을 미친다. 이러한 protease의 영향을 알아보기 위하여 modified Anson's method [18]를 사용하여 protease 활성을 측정하였다. 0.5 mL의 1% Na-caseinate (67 mM phosphate buffer, pH 7.0) 용액에 배지 sample 0.5 mL을 첨가하여 50°C에서 20분간 반응시켰다. 그 후 30% TCA (trichloroacetic acid) 용액 0.3 mL을 첨가하여 50°C에서 30분간 정지시킨 후 반응을 종료하였다. 15,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액을 취하여 파장 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 tyrosine 용액을 0~4 mg/mL 농도로 달리하여 사용하였고, blank는 증류수로 하였다. 단위 1 U (unit)은 같은 조건에서 분당 tyrosine 1 mg이 생산되는 효소의 양으로 정의하였다.

2.6. DNA fragmentation 분석

FCW 1~2 g의 세포를 액체 질소를 이용하여 급속히 얼린 후 막자사발에 넣어 갈고, powder를 0.1 g씩 Eppendorf tube에 분주하였다. DNeasy plant mini kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 DNA를 추출하고 1.2% agarose gel에 10 µL씩 loading 한 후 전기영동 장치를 이용하여 100 V 전압으로 DNA를 크기별로 분리하였다. 젤을 10 mg/mL ethidium bromide 용액에 15분 동안 정지하여 염색하여 3차 증류수에서 5분간 탈염한 후, UV로 촬영하였다. DNA 추출 방법은 kit 제작회사의 표준 방법을 사용하였다.

2.7. Autophagosome 형성 확인

Autophagy 진행을 확인하기 위해 autophagosome에 선택적으로 염색되는 monodansylcadaverine (MDC)을 이용하여 autophagosome의 생성 유무를 확인하였다. FCW 0.1 g 세포에 50 µM의 MDC가 포함된 PBS (pH 7.4) 1 mL을 첨가하였다. 상온에서 10분간 암반응시킨 후, PBS 1 mL을 이용하여 2~3회 남은 MDC를 세척한 뒤 형광현미경을 이용하여 autophagosome의 생성 유무를 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포사멸 확인

본 연구에서는 형질전환 벼 현탁세포배양을 이용한 hCTLA4Ig 생산에 RAmv3D promoter를 이용함으로써, 목적 단백질의 발현이 강하게 이루어졌으며 배지로 분리되었다. 하지만 탄소 에너지원이 없는 상태에서의 세포배양은 세포에게 스트레스로 작용하여 급격한 세포 생존도의 저하와 lysis를 야

Fig. 2. Time course changes of (a) cell viability and (b) dry cell weight.

기하게 된다 [19]. 이때 어떠한 종류의 세포 사멸이 나타나는지 확인하고자 하였다.

동물세포에서 발견되는 apoptosis의 특징으로는 세포의 수축, 염색질의 응축, DNA 절편화, 원형질막의 기포화 등과 같은 생리학적, 형태학적 변화들을 들 수 있다. 이러한 동물세포의 apoptosis 특징들이 식물세포에서도 유사하게 나타나며, 방어기작을 설명하는데도 유리하다 [20]. 식물세포에서 나타나게 되는 AL-PCD의 특징들을 확인하기 위하여 DNA의 절편화, 세포 생존도 측정 등을 수행하였다. Inducible promoter를 이용하여 목적 단백질을 생산하기 위해서 에너지원이 없는 배지에서 배양하였고 TTC 분석법을 통한 세포 생존도 분석 결과 접종 이후 계속적으로 세포의 농도와 생존도가 감소하였다 (Fig. 2). 이 때 DNA의 절편화 분석 결과 배양 6일차 이후부터 급격한 DNA의 절편화가 발생하였다 (Fig. 3). 따라서 에너지원이 없는 배지에서의 세포배양은 식물세포의 AL-PCD를 유발하는 것을 알 수 있었다.

Autophagy는 에너지원 고갈시 이중막 구조의 용해 시스템을 통해 자신의 세포질이 분해되는 세포사를 말하며, 식물세

Fig. 3. DNA fragmentation analysis of cultured rice cells in sugar-depleted AA media: M, 1 kb DNA ladder (500 µg/mL); lane 1-4, DNA from cells cultured for 0, 2, 4, and 6 days.

포에서는 autophagosome의 생성에 의한 macroautophagy가 나타난다. 이때, vacuole의 크기가 커지고 세포질의 양이 줄어드는 특징을 가지고 있다. 본 연구에서는 식물세포에서의 autophagy를 확인하기 위해 MDC 분석법을 이용하여 autophagosome의 생성 유무를 확인하였다. 세포간의 응집으로 인하여 에너지원이 없는 배지로의 접종 직후에도 autophagosome이 생성되는 것과 배양 시간이 흐를수록 그 개수가 증가되어 본 시스템에서 목적 단백질을 유도시 autophagy가 진행되는 것을 알 수 있었다 (Fig. 4). 그러나 배양 10일 이후 세포 생존도가 10% 이하일 때는 autophagosome이 발견되지 않았으므로 세포가 모두 lysis된 것으로 판단된다.

3.2. Sodium nitroprusside의 영향

Nitrogen oxide (NO)를 생성하는 것으로 알려진 sodium nitroprusside (SNP)는 고농도 첨가시 NO의 방출을 통해 미토콘드리아의 호흡 억제, 미토콘드리아 내부 막부분의 붕괴, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 억제, poly-ADP-ribose polymerase (PARP)의 활성화, 그리고 reactive nitrogen species (RNS)와 reactive oxygen species (ROS)의 생성과 같은 세포의 구조적 간섭을 유도하여 세포의 ATP를 고갈시키고 세포의 necrosis를 유발한다. 이뿐 아니라 NO는 ER의 장애나 cytochrome c와 같은 apoptogenic 단백질을 방출시키고 MAP kinase 경로를 활성화시켜 apoptosis를 유도하기도 한다 [21]. 하지만 저농도의 SNP 첨가시 다른 물질로 유도된 apoptosis를 미토콘드리아 투과성 전이의 cGMP/PKG 매개성 억제, caspase의 cysteine 잔기의 불활성화를 유도하는 S-nitrosylation, 열충격 단백질과 bcl-2의 발현 증가 등을 통해 세포 사멸을 억제하고 세포의 생산성을 증대시키는 것으로 알려져 있다 [22-25]. 목적 단백질의 생산성을 높이고 세포의 생존도를 높일 수 있는 최적의 SNP 농도를 찾기 위해 0.01, 0.1, 1, 10 mM의 SNP를 sucrose가 제거된 AA 배지에 첨가하여 세포를 접종하고 세포 생존도와 hCTLA4Ig의 생산량 등을 조사해보았다. 1, 10 mM의 SNP를 첨가하였을 때 대조군에 비해

Fig. 4. Time course changes of morphology and formation of autophagosome of rice cells cultured in sugar-depleted AA media.

세포의 생존도 및 농도가 낮은 것을 확인할 수 있었다. 0.01과 0.1 mM의 SNP 첨가의 경우 대조군과 유사한 세포 농도를 보였으며 0.1 mM의 SNP의 경우는 배양 2일차에 대조군에 비해 1.4배 높은 세포 생존도를 보였다 (Fig. 5). 또한 hCTLA4Ig의 생산성에 있어서도 0.1 mM SNP 첨가에서 배양 8일차에 대조군의 최대 생산량인 34.2 mg/L에 비해 1.3배 높은 44.5 mg/L의 최대 생산량을 보임에 따라 세포의 생존도를 높이고 목적 단백질의 생산성을 높일 수 있는 최적의 SNP 첨가 농도는 0.1 mM이었다 (Fig. 6).

Fig. 5. Effects of SNP on (a) cell viability and (b) dry cell weight. Rice cells were cultured in sugar-depleted AA media with SNP at 0 days after induction: ○, control; ▲, 0.01 mM; ■, 0.1 mM; ◆, 1 mM; ▼, 10 mM.

Fig. 6. Effects of SNP concentration on hCTLA4Ig production: ○, control; ▲, 0.01 mM; ■, 0.1 mM; ◆, 1 mM; ▼, 10 mM.

3.3. 항산화제 첨가의 효과

ROS는 여러 종류의 세포에서 apoptosis 유도 인자로 알려져 있다. 특히 ROS에 의한 세포 내 Ca^{2+} 의 증가는 세포 내 물질

들의 분해효소인 phosphatase, protease, endonuclease 등과 같은 Ca^{2+} 의존적 효소의 활성화에 의한 apoptosis 증가를 매개한다 [26]. 동물세포에서 항산화제의 첨가는 핵의 응축, DNA의 절편화 및 caspase의 활성을 억제하는 것으로 나타났다 [27]. NAD의 전구체로서 PARP의 공동 기질로 이용되는 수용성 타민인 nicotinamide를 첨가하여 NAD의 감소를 방지하고, ATP의 고갈을 억제시키며 ROS에 의한 산화 스트레스가 줄어들었다고 보고되었다 [28]. Glutathione은 식물세포에서 액포 내의 이온 채널 활성화를 조절하는 역할을 하여 산화적 스트레스에 대한 반응과 증진속에 대한 저항성이나 무독화와 같은 세포 내 주요 방어기작에 관련된 이온 수송을 매개하며 [29], 2개의 thiol 잔기를 가지고 있는 항산화제인 N-acetylcysteine (NAC)은 세포 내부의 glutathione peroxidase의 발현량을 증가시켜 apoptosis를 억제하는 것 뿐 아니라 [30] 세포의 산화·환원 상태의 변화를 통해 비 전사 인자의 활성화에 영향을 주어 세포의 단백질 발현량을 높이는 것으로 확인되었다 [31]. 본 연구에서는 ROS 억제제로 알려진 glutathione, NAC, nicotinamide의 효과를 알아보기 위해 각각 1 mM 및

10 mM의 농도로 첨가하여 에너지원이 제거된 AA 배지에 첨가하여 세포를 접종하고 세포 생존도, hCTLA4Ig의 생산량, protease 활성 등을 조사하였다. 고농도의 10 mM 항산화제를 첨가하였을 때 세 종류 모두 대조군에 비해 세포 생존도가 떨어지는 것을 보였으며 1 mM의 낮은 농도에서는 대조군과 유사한 경향성을 보이는 것을 확인하였다 (Fig. 7(a)). 또한 세포 농도의 경우는 10 mM nicotinamide와 NAC를 첨가했을 경우 배양 3일차에서 대조군에 비해 세포농도가 각각 50, 60% 낮았으며 그에 반해 10 mM glutathione을 첨가하였을 경우 1 mM의 antioxidant를 첨가했을 때와 같이 대조군과 유사한 세포 농도를 보였다 (Fig. 7(b)). hCTLA4Ig 생산성에 있어서는 10 mM NAC를 첨가했을 경우 대조군의 최대 생산량인 24.3 mg/L에 비해 35.2 mg/L로 최대 1.4배 증가되었다. 1 mM NAC의 경우 최대 생산량이 31.8 mg/L으로 최대 1.3배, 1 mM glutathione 첨가 역시 29.0 mg/L로 최대 1.2배 증가하였다 (Fig. 8(a)). 반면 저농도의 antioxidant 첨가시에 대조군과 유사한 protease 활성을 보이는 것에 반해 고농도의 항산화제 첨가 시에 대조군이나 저농도의 항산화제 첨가에 비해 배양 기간 내 높은 protease 활성을 보였다 (Fig. 8(b)). Protease 활성이

Fig. 7. Time course changes of (a) cell viability and (b) dry cell weight. The cells were cultured in sugar-depleted AA media with various antioxidants: ●, control; △, 1 mM glutathione; ▲, 10 mM glutathione; □, 1 mM NAC; ■, 10 mM NAC; ◇, 1 mM nicotinamide; ◆, 10 mM nicotinamide.

Fig. 8. Effects of various antioxidants on (a) hCTLA4Ig production and (b) protease activity: ●, control; △, 1 mM glutathione; ▲, 10 mM glutathione; □, 1 mM NAC; ■, 10 mM NAC; ◇, 1 mM nicotinamide; ◆, 10 mM nicotinamide.

고농도의 antioxidant를 첨가하였을 때 배양 3일차부터 증가하였는데 이는 세포의 생존도와 농도를 고려했을 때 cell lysis에 의한 것으로 보인다. 고농도의 antioxidant를 첨가하였을 때 대조군에서 단백질이 3일차부터 생산이 되는 것과 달리 생산이 되지 않는 것을 확인하게 되는데, 이는 세포사멸에 의한 cell lysis가 protease를 배지로 분비하게 하였고 그에 따른 결과로 사료된다. 하지만 10 mM NAC를 첨가하였을 때는 오히려 가장 높은 hCTLA4Ig 생산량을 얻을 수 있었다.

저농도에서 생산성 증대 효과를 보인 NAC를 AA 배지에 2, 4, 6 mM의 농도로 첨가하여 세포 생존도와 hCTLA4Ig의 생산량 등을 비교해보았다. 배양 3일차까지는 대조군의 세포 생존도가 90% 정도 유지되어 실험군에 비해 높았지만 배양 6일차 이후에는 NAC를 첨가한 실험군이 대조군에 비해 높은 세포 생존도를 보였다 (Fig. 9(a)). 2, 4 mM의 NAC 첨가의 경우 대조군과 유사한 세포 농도를 보였지만 고농도인 6 mM의 경우 대조군에 비해 낮은 세포 농도를 보였다 (Fig. 9(b)). hCTLA4Ig의 생산성 측면에서는 4, 6 mM 첨가에서는 증대 효과를 보이지 않았지만 2 mM NAC에서 대조군의 27.1 mg/

L에 비해 1.3배 높은 35.5 mg/L의 최대 생산량을 보임에 따라 형질전환된 벼 현탁세포의 배양에서 hCTLA4Ig 생산량을 높일 수 있는 최적의 NAC 첨가 농도는 2 mM이었다. (Fig. 10(a)). Protease 활성의 경우 선행 실험의 결과와 마찬가지로 NAC의 농도가 높아짐에 따라 비례하여 증가하였다 (Fig. 10(b)).

4. 결론

형질전환된 벼 현탁세포배양에서 hCTLA4Ig의 생산성 증대를 위해 적용된 RAmy3D promoter는 에너지원이 고갈된 배지를 사용해야 하고 이로 인해 배양 중에 세포 생존도의 감소가 이뤄지며 AL-PCD와 autophagy가 유발되었다. 저농도 첨가시 NO가 아닌 다른 원인의 apoptosis를 억제하고 생산성을 증대시키는 SNP는 0.1 mM의 농도로 에너지원이 고갈된 배지에 첨가하였을 때 배양 2일차에서 대조군에 비해 1.4배 높은 세포 생존도를 보였고, 배양 8일차에 대조군의 최대 hCTLA4Ig 생산량에 비해 1.3배 높은 결과를 보였다. 세포 내 Ca^{2+} 를 활성화시켜 AL-PCD를 유발시키는 ROS를 억제하기

Fig. 9. Effects of NAC on (a) cell viability and (b) dry cell weight. Rice cells were cultured in sugar-depleted AA media with various concentrations of NAC: ○, control; ■, 2 mM NAC; ◆, 4 mM NAC; ▲, 6 mM NAC.

Fig. 10. Effects of NAC on (a) hCTLA4Ig production and (b) protease activity: ○, control; ■, 2 mM NAC; ◆, 4 mM NAC; ▲, 6 mM NAC.

위해 antioxidant인 glutathione, NAC, 그리고 nicotinamide를 1과 10 mM 농도로 에너지원이 고갈된 배지에 첨가하였을 때 세포 생존도와 protease의 활성의 경우는 1 mM 첨가시 대조군과 유사하며, 10 mM에서는 대조군에 비해 낮은 것으로 보아 높은 농도의 antioxidant 첨가는 세포에 부정적인 효과가 나타나는 것을 확인하였다. 하지만 생산량 측면에서는 10 mM NAC 첨가시 대조군에 비해 1.4배 높은 최대 생산량을 보였으며, 1 mM NAC의 경우는 1.3배, 1 mM glutathione의 경우는 1.2배 높은 최대 생산량을 보였다. Antioxidant screening 실험의 결과 가장 좋은 효과를 보인 NAC의 최적 농도 결정을 위해 2, 4, 6 mM로 첨가해 본 결과 배양 6일 이후에 NAC를 첨가한 실험군에서 대조군에 비해 높은 세포 생존도를 보였고 hCTLA4Ig의 최대 생산성 측면에서 2 mM의 NAC 첨가시 1.3배 높은 생산량을 보였다. 이를 통해 SNP와 항산화제인 glutathione, NAC의 경우 세포사멸의 억제를 통해 hCTLA4Ig의 생산성 향상을 가져 온 것이라 생각된다.

감사

본 연구는 산업통상자원부 바이오특성화대학원 운영사업의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Durocher, Y. and M. Butler (2009) Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6: 700-707.
- Gomord, V., P. Chamberlain, R. Jefferis, and L. Faye (2005) Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. *Trends Biotechnol.* 23: 559-565.
- Lui, V. C. H., P. K. H. Tam, M. Y. K. Leung, J. Y. B. Lau, J. K. Y. Chan, V. S. F. Chan, M. Dallman, and K. S. E. Cheah (2003) Mammary gland-specific secretion of biologically active immunosuppressive agent cytotoxic-T-lymphocyte antigen 4 human immunoglobulin fusion protein (hCTLA4Ig) in milk by transgenesis. *J. Immunol.* 277: 171-183.
- Pree, I. and T. Wekerle (2006) New approaches to prevent transplant rejection: Co-stimulation blockers anti-CD40L and CTLA4Ig. *Drug Discov. Today* 3: 41-47.
- Hellwig, S., J. Drossard, R. M. Twyman, and R. Fischer (2004) Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat. Biotechnol.* 22: 1415-1422.
- Terashima, M., Y. Murai, M. Kawamura, S. Nakanishi, T. Stoltz, L. Chen, W. Drohan, R. L. Rodriguez, and S. Katoh (1999) Production of functional human α_1 -antitrypsin by plant cell culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 516-523.
- Lockshin, R. A. and Z. Zakeri (2004) Apoptosis, autophagy, and more. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36: 2405-2419.
- Lam E. (2004) Controlled cell death, plant survival and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 305-315.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie (1972) Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257.
- Adrain, C. and S. J. Martin (2001) The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem.* 26: 390-397.
- Wolf, B. B. and D. R. Green (1999) Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteases. *J. Biol. Chem.* 274: 20049-20052.
- Lennon, S. V., S. J. Martin, and T. G. Cotter (1991) Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.* 24: 203-214.
- Schweichel, J. and H. Merker (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7: 253-266.
- Bras, M., B. Queenan, and S. A. Susin (2005) Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry-Moscow* 70: 231-239.
- Danon, A., V. Delorme, N. Mailhac and P. Gallois (2000) Plant programmed cell death: A common way to die. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 647-655.
- Kirisako, T., M. Baba, N. Ishihara, K. Miyazawa, M. Ohsumi, and T. Yoshimori (1999) Formation process of autophagosome is taced with Apg8/Aut7 in yeast. *J. Cell Biol.* 147: 435-446.
- Thompson, H., R. Abdullah, and E. Cocking (1986) Protoplast culture of rice (*Oryza sativa* L.) using media solidified with agarose. *Plant Science* 47: 123-133.
- Battaglino, R. A., M. Huergo, A. M. R. Pilosof, and G. B. Bartholomai (1991) Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 292-296.
- Bees, E. P., B. J. Woffenden, and C. Zhao (2000) Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Mol. Biol.* 44: 339-415.
- Greenberg, J. T. (1996) Programmed cell death: A way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12094-12097.
- Brown, G. (2010) Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide* 23: 153-165.
- Takuma, K., P. Phuagphong, E. Lee, K. Mori, A. Baba, and T. Matsuda (2001) Anti-apoptotic effect of cGMP in cultured astrocytes: inhibition by cGMP-dependent protein kinase of mitochondrial permeable transition pore. *J. Biol. Chem.* 276: 48093-48099.
- Na, H. J., H. T. Chung, K. S. Ha, H. Lee, Y. G. Kwon, T. R. Billiar, and Y. M. Kim (2008) Detection and measurement for the modification and inactivation of caspase by nitrosative stress in vitro and in vivo. *Methods Enzymol.* 441: 317-327.
- Chung, H. T., H. O. Pae, B. M. Choi, T. R. Billiar, and Y. M. Kim (2001) Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28: 1075-1079.
- Oszajca, K., M. Bieniasz, G. Brown, M. Swiatkowska, J. Bartkowiak, and J. Szemraj (2008) Effect of oxidative stress on the expression of t-PA, u-PA, u-PAR, and PAI-1 in endothelial cells. *Biochem. Cell Biol.* 10: 477-486.
- Kruman, I. I. and M. P. Mattson (1999) Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J. Neurochem.* 72: 529-540.
- Grub, S., W. E. Trommer, and A. Wolf (2002) Role of antioxidants in the O-hydroxyethyl-D-(Ser)8-cyclosporine A (SDZIMM-

- 125)-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 64: 1725-1736.
28. Amor, Y., E. Babiychuk, D. Inze, and A. Levine (1998) The involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in the oxidative stress responses in plants. *FEBS Lett.* 440: 1-7.
29. Carpaneto, A., A. M. Cantu, and F. Gambale (1999) Redox agents regulate ion channel activity in vacuoles from higher plant cells. *FEBS Lett.* 442: 129-132.
30. Hockenbery, D. M., Z. N. Oltvai, X. M. Yin, C. L. Millman, and J. K. Stanley (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75: 241-251.
31. Yan, C. Y. I., G. Ferrari, and L. A. Greene (1995) N-Acetylcysteine promoted survival of PC12 cells is glutathione-independent but transcription-dependent. *J. Biol. Chem.* 270: 26827-26832.