



전북대학교 생물과학부 국가지정연구실 (의료용 단백질 연구실)

양 문식 교 수 mskyang@chonbuk.ac.kr
권 태호 연구교수 thkwon@chonbuk.ac.kr

맛과 멋 그리고 풍류를 간직한 예향의 도시 전주, 뒤로는 건지산자락이 포근하게 감싸고 앞으로는 덕진연못의 잔물결이 여유로운 덕진벌의 한가운데에 등지를 틀고 있는 전북대학교의 공동실험실습관 2316 호실. 이곳이 양 문식교수를 중심으로 권 태호 연구교수, 강 태진 연구교수, 김 영숙 박사, 김 태금 박사, 연구원 최 명숙, 신 윤지, 김 옥현, 박사과정 홍 신영, 김 난선, 오즈발드 마리아, 석사과정 고 은미, 백 문현, 이 수경, 김 미영, 뉴엔 득 충, 뉴엔 수완 후이, 정 은선 이가 서로 부대끼면서 각자의 눈물과 웃음을 하루하루 소중한 연구결과로 바꾸어가고 있는 국가지정연구실인 의료용단백질 연구실이다.

10년 전 식물세포에서 항체를 생산하겠다고 연구계획서를 제출하였다가 공개평가시간에 허무맹랑한 소리한다고 혼이 났다던「식물세포를 이용한 의료용단백질 생산기술」의 우수성을 인정받아 2000년 과학기술부로부터 국가지정연구실로 지정된 의료용단백질 연구실에서는 식물세포배양을 이용하여 항체, cytokine, 산업용효소 등의 대량생산을 위한 기술 개발과, 가족질병을 중심으로 한 식물경구백신 개발을 주요 연구과제로 수행 중에 있다.

식물세포배양을 이용한 의료용 단백질 생산 기술의 특징

현재 생명공학산업에서 의료용 및 산업용 단백질을 생산하기 위한 방법으로는 주로 미생물 및 동물 세포배양 시스템을 이용하고 있지만, 미생물 시스템은 빠른 시일에 다량 단백질 생산이 가능하다는 장점은 있으나 post-translational modification에 의하여 활성을 나타내는 대부분의 의료용 단백질의 생산은 불가능하기 때문에 높은 수율의 단백질 생산이 가능함에도 불구하고 생리활성을 지닌 단백질 생산이 불가능한 경우가 많다(Miele, 1997, *Trends Biotechnol.* 15: 45; Doran, 2000, *Opin. Biotechnol.* 11: 199). 한편, 동물세포배양 시스템은 미생물 세포배양 시스템을 이용하여 생산이 불가능한 post-translational modification이 필요한 단백질 및 항체 등과 같은 단백질의 생산에 주로 사용되어지고 있으나 늦은 성장속도, 고가의 생산비용 및 정제의 어려움 등과 함께, host cell의 virus 감염에 따른 2차 감염의 우려로 인하여 새로운 생산시스템의 개발이 강하게 요구

되어져 왔다(Terashima 등, 1999, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 516; Wongsamuth 등, 1997, *Biotechnol. Bioengin.* 82: 778). 이러한 기존의 단백질 생산 시스템의 단점을 보완하기 위한 새로운 대안으로서 식물세포배양 시스템을 활용한 단백질 생산기술이 많은 주목을 받고 있다. 식물세포배양 시스템은 동물과 유사한 post-translational modification 시스템에 의하여 미생물에서 생산이 불가능한 고가의 의료용 단백질 생산이 가능하며, 동물세포 시스템의 최대 단점인 동물바이러스에 의한 2차 감염의 우려가 없기 때문에 기존의 생산시스템이 지닌 단점을 보완한 차세대 기술로 인정받고 있다(Terashima 등, 1999, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 516; Doran, 2000, *Opin. Biotechnol.* 11: 199). 한편, 최근에는 식물세포 유래의 glycosylation이 수반되는 당단백질의 당화 패턴이 동물세포 유래의 당단백질과 당화 패턴이 상이하여 이로 인한 면역반응 유발 등의 가능성이 대두되어 이를 해결하기 위한 연구들이 진행 중에 있다(Misaki *et al.* 2003; Cabanes-Macheteau *et al.*, 1999). 따라서 현 단계에서 식물체를 이용한 유용단백질의 생산은 ① glycosylation이 수반되지 않으면서 기존의 시스템에서 생산이 불가능하거나 어려운 단백질(예로서 항체(F(ab)² 등), ② glycosylation은 수반되지만 기존의 시스템에서는 생산이 불가능하거나 어려운 단백질(IL-12, IFN-a 등), ③ 특히 미생물과 동물세포 배양 시스템에서는 전혀 생산이 불가능하나 식물체에서는 생산이 가능한 단백질(대부분의 protease, protease inhibitor 등)의 생산에는 적용 가능한 기술이다. 이러한 장점을 지닌 식물발현시스템을 이용하여 2004년에는 최초로 옥수수 유래의 trypsin이 TrypZean 이라는 이름으로 시판되기 시작하였으며(Sigma) 의료용단백질 연구실에서도 항암치료 보조제 등으로 널리 사용되어지는 인간의 hGM-CSF 대량생산 벼세포주(Shin 등, 2003, *Biotechnol. Bioengin.* 82: 778)를 개발하고 관련제약업체에 세포주 및 생산기술을 이전하여 현재 상용을 위한 독성실험을 진행 중에 있다.

식물세포배양을 이용한 의료용 단백질의 생산

식물세포배양시스템은 식물세포의 낮은 단백질 생산 수율로 인하여 산업화로의 적용이 어려운 것으로 인식되어 있으며(Terashima 등, 1999, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 516) 일반적으로 식물세포배양 시스템을 이용하여 외래단백질을 생산할 때에는 낮은 생산수율(0.001~0.1%/TSP)이 가장 큰 문제로 지적되고 있다. 이러한 문제점은 세포내 미세소기관으로의 단백질 축적, 고발현 프로모터의 적용, 유전자의 코돈최적화 및 염색체 형질전환 등의 기술을 이용하여 외래단백질의 생산수율을 증진시키고 있다.

의료용단백질 연구실에서도 일반적으로 사용되어지는 CaMV 35S promoter를 이용하여 최초로 hGM-CSF의 생산에 성공하였으나 약 170 µg/liter의 매우 낮은 생산수율 이었다(그림 1). 식물현탁세포는 계대배양 4일 후부터 급격하게 생장이 증가됨에도 불구하고 hGM-CSF는 4일 후부터 급격하게 감소하였다(그림 1A). 이러한 급격한 생산수율의 감소는 식물세포에서 생산 분비되어진 protease에 의한 결과이며 식물현탁세포를 배양할 때 protease inhibitor의 첨가에 의하여 hGM-CSF의 생산량은 증가하였다. 의료용 단백질 연구실에서는 이러한 결과를 바탕으로 protease의 분비가 적은 식물과 배양조건을 탐색한 결과 벼의 현탁세포는 당이 결핍된 조건에서 protease의 활성이 매우 낮음을 확인하였으며 당 결핍조건에서 특이적으로 매우 강하게 발현하는 amylase 프로모터 (Amy3D promoter)를 cloning하여 이를 이용하여 hGM-CSF를 발현 시켰을 때는 hGM-CSF를 약 120 mg/L 생산하여 기존 시스템 대비 약 1,000배 생산수율의 증대를 이루었다(그림 1B; Shin 등, 2003, *Biotechnol. Bioengin.* **82**: 778). 현재에는 protease inhibitor 유전자의 co-transformation, 세포의 생리활성 증가, protease 유전자에 대한 siRNA 발현을 등의 기술 적용을 통하여 hGM-CSF를 최대 약 500 mg~1g/L의 수율로 생산 가능하게 되었다. 이러한 식물세포배양에서의 높은 생산수율은 미생물의 생산수율에 필적하는 생산 수율로서 식물세포배양 시스템을 이용한 단백질의 생산기술을 산업화가 가능하게 하였다.

의료용 단백질 연구실에서는 고발현시스템인 Amy3D 프로모터 시스템을 이용하여 hGM-CSF 이외에도 hG-CSF, hIFN-α, hIL-18, hOPG, hGH 등의 cytokine과 항체와 같은 의료용 단백질 및 protease 등과 같은 산업용 효소의 대량생산 식물세포주를 개발하고 있다.

식물세포배양을 이용한 heterodimeric protein의 생산

대부분의 항체 및 hIL-12와 같은 heterodimeric protein은 미생물배양시스템을 이용하여 생산이 불가능하기 때문에 동물세포배양 시스템을 이용하여왔다. 의료용 단백질 연구실에서는 동 연구실에서 개발한 protease 분비 억제조건 특이적 고발현 시스템을 이용하여 heterodimeric protein인 hIL-12를 고생산하는 식물세포주를 개발하

여 식물세포유래의 hIL-12가 정상적으로 활성을 지니고 있음을 확인하였으며, 대표적인 heterodimeric protein인 항체를 고수율로 생산하는 기술을 개발하였다. 특히, 대장암치료용 항체로 사용될 수 있는 TAG-72에 대한 항체를 고생산하는 식물세포주를 개발하였으며, 식물세포유래 TAG-72에 대한 항체의 활성을 flow cytometric analysis를 통하여 확인한 결과 동물세포배양시스템 유래의 항체와 동등한(Jurkat cell 에서는 월등한) 항원인식능력을 확인하였다(Figure 2). 의료용단백질 연구실의 모든 식구는 오늘도 결코 피할 수 없는 권태호 선생님의 눈치와 잔소리를 양 문식 선생님의 따뜻한 농담 한마디로 잊어버리면서 각자의 소중한 소망을 이루기 위하여 땀방울을 흘리고 있다.

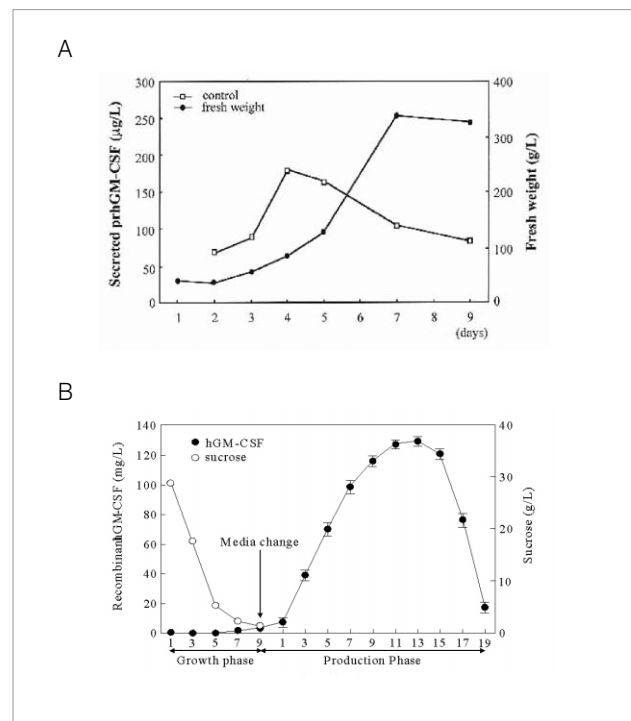


그림 1. Level of recombinant hGM-CSF productivity by difference gene expression system, A: CaMV 35S promoter system; B: Rice Amy3D promoter system.

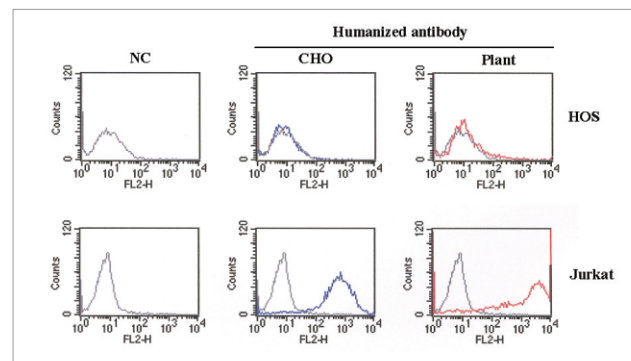


그림 2. Analysis of binding activity of hzAb to TAG-72 expressing-tumor cells through flow cytometric analysis