

메타놀동화성효모(*Pichia pastoris* GS115)에서 B형간염 비루스속질항원(HBcAg)을 발현시키기 위한 연구

최수성, 박숙영, 윤재성

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《...의학과학의 새로운 분야를 개척하며 최신과학기술의 성과를 치료예방사업에 받아들이기 위한 연구사업을 힘있게 벌려야 합니다.》(《김정일선집》 증보판 제11권 81~82페이지)

지금 세계적으로 4억명의 사람들이 B형간염비루스(HBV)에 감염되어있으며 그중 해마다 약 백만명의 사람들이 간세포암(HCC)과 같은 말기간장질환으로 사망하고있다.[4]

B형간염비루스속질항원(HBcAg 혹은 HBc항원)은 B형간염의 진단 및 치료에서 매우 중요한 자리를 차지한다. 특히 재조합HBc항원은 B형간염속질항체진단시약생산뿐만아니라 B형간염치료약편의 조성성분으로 그리고 유전자약물담체로 널리 리용되고있다.

우리는 재조합HBc항원효모발현운반체(pPIC9K-HBc, 9.55kb)를 만드는데 기초하여 이것을 메타놀동화성효모(*Pichia pastoris* GS115)에서 발현시키기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

재료 메타놀동화성효모그루로는 *Pichia pastoris* GS115(HIS4)를, 재조합HBc항원효모발현운반체로는 pPIC9K-HBc(9.55kb)를 리용하였다.

배지로는 BMGY액체(평판)배지, BMMY액체(평판)배지, YPD액체(평판)배지, MG액체(평판)배지, MM액체(평판)배지, 무기염합성배지(5×NPK, 50×MCS, 2% 글리세롤)를 썼다.

시약으로는 도데실류산나트륨-폴리아크릴아미드겔전기영동(SDS-PAGE)시약과 HBc속질항체감각지시혈구(RPHA, 의학생물학연구소)를 리용하였다.

방법 효모균형질전환은 전기천공법(7 500V/cm, 10ms)[2]으로 진행하였다.

형질전환된 재조합HBc항원발현효모균을 최소배지인 MG배지에서 3일간 배양하여 증식유무를 확인한 후 그중 잘 자란 균무지들을 선택하여 BMGY배지에서 증식시킨 다음 BMMY배지로 교체하고 매일 메타놀을 0.5% 첨가하면서 유도배양[2]하였다.

재조합HBc항원발현량은 다음과 같이 측정하였다.

균체농도가 $A_{600}=100$ 이 되게 효모배양물을 취하여 원심분리하고 상청액을 버린 다음 마쇄완충액(1mmol/L EDTA, 50mmol/L NaH_2PO_4 , 5% 글리세롤, pH 8.0) 1mL와 유리알(직경 0.45mm) 1g을 각각 넣고 진탕기(《Vortex》)에서 5min동안 마쇄한다. 마쇄액을 원심분리한 다음 상청액을 10배씩 3번 연속희석(1 000배)하고 2계단희석하여 희석제료를 만들었다. 여기에 감각혈구를 떨구어 HBc속질항원의 종말력가($-\log_2$)를 측정하였다.

재조합발현산물의 분자량은 12.5% 도데실류산나트륨-폴리아크릴아미드겔전기영동법(SDS-PAGE)[3]으로 결정하였다.

Falcon병(배양액 10mL)에 의한 배양과 플라스크(배양액 100mL)배양은 주기식으로, 30L

탱크배양은 자동배양장치(《Marushi》)에서 연속첨가방식으로 진행하였다.

메타놀농도측정은 선행방법[1]에 준하여 진행하였다.

결과 및 논의

1) 전기천공법에 의한 재조합발현운반체의 숙주내도입

재조합발현운반체 pPIC9K-HBc를 숙주인 *Pichia pastoris* GS115와 혼합하여 전기천공한 다음 MG배지에 도말하였다.

배양시간에 따라 균무지의 형성유무를 관찰하였는데 24h 되었을 때에는 균무지가 나타나지 않았으나 48h 되었을 때에는 0.6mm, 60h 되었을 때에는 1.2mm 크기의 균무지가 나타났다. 나타난 총균무지수는 420개이상이었다.

2) 재조합효모의 HBc항원단백질발현효과판정

우에서 나타난 균무지들을 80개씩 나누어 각각 5개의 BMGY평판배지에 옮기고 매 평판에서 임의로 10개를 선택하여 HBc항원력가를 평가하였다.(표 1) 이때 HBc항원력가가 12이하($-\log_2$)인 균그루들은 표 1에 반영하지 않았다.

표 1에서 보는바와 같이 항원력가가 12 이상인 균무지들의 HBc항원력가는 평균 13~14였으며 여기서 력가가 제일 높은 3개의 균무지들(3-5, 4-9, 5-6)을 선택하였다. 배양규모를 달리하면서 최종적으로 3-5균그루를 선택하였다.

표 1. 균무지번호에 따르는 재조합효모의 HBc항원력가($-\log_2$)

균무지 번호	HBc항원 력가	균무지 번호	HBc항원 력가
1-4	13	4-4	13
1-9	13	4-9	14
2-4	13	5-2	13
3-5	14	5-6	14
3-6	13	5-8	13

3) 배양규모에 따르는 재조합효모의 발현특성

소규모배양에서의 발현특성 재조합효모를 Falcon배양병(배양액 10mL)과 플라스크(배양액 100mL)에서 2일간 증식시킨 다음 매일 0.5%의 메타놀을 첨가하여 유도배양하면서 유도배양기일에 따르는 HBc항원력가를 평가하였다.(표 2)

표 2. 배양규모와 배양시간에 따르는 재조합효모의 발현특성

배양 규모	지 표	배양시간						
		0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
10mL	A_{600}	2.0	14.8±0.3*	24.3±0.4*	32.6±0.6	34.4±0.5	35.3±0.4	36.2±0.5
	HBc항원력가	—	—	—	11.3±0.3*	14.3±0.3	14.7±0.3	13.3±0.3
100mL	A_{600}	2.0	18.5±0.4*	28.4±0.3*	35.5±0.4*	39.2±0.4	41.3±0.4	43.4±0.3
	HBc항원력가	—	—	—	13.3±0.3*	15.7±0.3	16.3±0.3	15.3±0.3

n=3, * $p<0.05$, 96h과 비교

표 2에서 보는바와 같이 배양규모에 관계없이 72h까지 즉 유도배양 1일까지 증식성이 높았으며 그 이후로는 증식성이 완만하였다. HBc항원력가는 유도 2일 즉 배양 96h에 유의하게 높아졌으며 그 이후로도 높아지는 경향성이 있었으나 유의한 차이는 인정되지 않았다.

10mL와 100mL 배양규모의 차이에 따라 균증식과 속질항원력가변화곡선은 유사하였으나 속질항원발현력가는 100mL 배양규모일 때 2배로 높았다.

30L 배양장치에서의 발현특성 소규모배양에서와 같이 주기식배양이 아니라 30L 배양장치에서 무기염배지와 글리세롤 및 메타놀을 첨가하면서 HBc항원발현력가를 측정하였다. 이때 산소분배를 리용하여 산소를 주입(주입압력 2기압, 탱크내압 1기압)하고 암모니아수로 낮아진 pH를 5~6으로 보정하였으며 증식배양 3일만에 메타놀유도배양을 진행하였는데 그 결과는 그림 1과 같다.

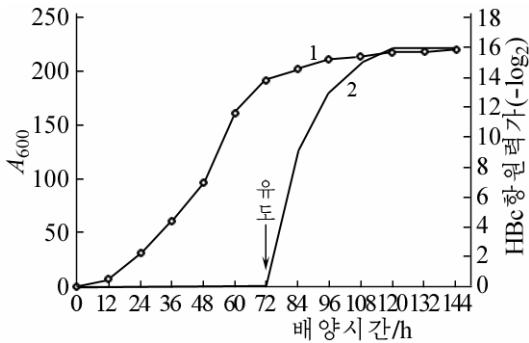


그림 1. 30L 배양장치에서 유도배양기일에 따르는 증식곡선

1-A₆₀₀, 2-HBc항원력가

그림 1에서 보는바와 같이 증식배양 3일까지 균체농도는 지수함수적으로 증가($A_{600} \approx 200$) 하였으며 유도배양이 시작되어서는 완만하게 증식하였는데 유도배양 3일(배양일수 6일, 144h)에 균체농도는 220(A_{600})으로서 플라스크배양의 5배 이상이었다.

또한 HBc항원발현력가는 유도배양 2일에 16(-log₂)으로서 가장 높았으며 그 이후로는 력가에서 차이가 나타나지 않았다. 또한 배양장치를 리용하여 배양할 때 균체농도가 매우 높아졌으나 균체농도($A_{600}=100$)당 발현력가에서는 차이가 없었다.

4) SDS-PAGE에 의한 발현산물의 확인

SDS-PAGE법으로 중합체인 HBc항원의 분자량을 측정하여 발현산물이 속질항원단백질인가를 확인하였다.(그림 2)

그림 2에서 보는바와 같이 HBc항원유전자가 통합된 메타놀동화성효모에서는 메타놀로 유도배양하였을 때 약 21kD근방에서 단백질띠가 나타났지만 대조에서는 발현띠가 나타나지 않았다. 속질항원의 단량체분자량이 21 000Da이므로 이것은 효모에 통합시킨 속질항원유전자가 발현되었다는것을 보여준다.

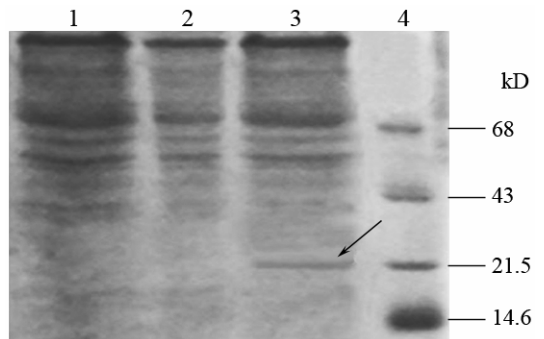


그림 2. HBc항원의 발현확인을 위한 SDS-PAGE영동상(12.5%)

1-GS115유도, 2-GS115/HBc(비유도),
3-GS115/HBc(유도), 4-단백질
분자량표식자(kD)

맺 는 말

1) 전기천공법으로 재조합발현운반체 pPIC9K-HBc(9.5kb)를 *Pichia pastoris* GS115에 형질전환시키고 HBcAg유전자가 발현된다는것을 확인하였다.

2) HBcAg항원력가는 배양규모에 관계없이 유도배양 2일째부터 유의하게 높아지고 그 이후부터는 큰 차이가 없었으며 배양장치에 의한 무기염첨가배양에서 균증식성이나 HBc항원발현력가를 유의하게 높일수 있었다.

참 고 문 헌

- [1] 고봉국 등; 조선민주주의인민공화국 약전, 의학과학출판사, 66~163, 주체92(2003).
- [2] R. David et al.; *Pichia* Protocols, Humana Press, 1~278, 2005.
- [3] D. Rolland et al.; *Journal of Chromatography, B* 753, 51, 2001.
- [4] C. A. Hayden et al.; *Vaccine*, 33, 2881, 2015.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Study on Expressing Hepatitis B Virus Core Antigen(HBcAg) in *Pichia pastoris* GS115

Choe Su Song, Pak Suk Yong and Yun Jae Song

Pichia pastoris GS115 is transformed with pPIC9K-HBc by electroporation and HBcAg is identified with expression product.

The titre of HBcAg is significantly higher at induction culture 2nd day and isn't higher after 2 days. The growth of *Pichia pastoris* and the titre of HBcAg expression are significantly higher in the inorganic compound adding incubation.

Key words: HBcAg, expression, *Pichia pastoris*