

진탕배양조건에서 사람인슐린양성장인자-1(hIGF-1)의 발현에 미치는 몇가지 인자의 영향

길금별, 리광옥

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《제약공장과 의료기구공장들을 현대화하고 효능높은 의약품과 첨단의료설비, 기구, 의료용소모품들을 원만히 생산보장하도록 하여야 합니다.》(《조선로동당 제7차대회에서 한 중앙위원회사업총화보고》 단행본 62페이지)

효모 *Pichia pastoris*를 리용한 외원성단백질발현계는 *E. coli*의 원핵발현계에 비하여 여러가지 우점을 가지고있는데 지금까지 500여종이상에 달하는 많은 단백질들이 *P. pastoris*에서 대량발현되어 널리 응용되고있다.[3]

우리는 *P. pastoris*에서 리용률이 높은 유전암호를 고려하여 사람인슐린양성장인자-1(hIGF-1)의 효모발현계 *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-IGF-1)를 제작하고 선발한 효모그루를 배양하여 재조합사람인슐린양성장인자-1(rhIGF-1)의 발현을 확인한데 이어 진탕배양 조건에서 rhIGF-1의 발현에 미치는 몇가지 인자들의 영향을 조사하였다.

재료와 방법

재료 균주로는 *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-IGF-1)를 리용하였다. YNB(《自北京鼎国公司》), 단백질분자량표식자(《Fermentas》), 기타 시약들은 분석순을 구입하여 리용하였다.

종균배양에는 YPD배지를, 초기배양과 유도배양에는 BMGY, BMMY배지를 리용하였는데 배지조성은 다음과 같다.

YPD배지: 효모엑스 1%(w/v), 펩톤 2%(w/v), 덱스트로즈 2%(w/v), pH 6.0.

BMGY/BMMY배지: 700mL의 물에 효모엑스 10g, 펩톤 20g을 넣고 101.3kPa(1기압)에서 20min간 멸균한 다음 방온도까지 식히고 1mol/L 린산칼리움완충액(pH 6.0) 100mL, 10×YNB 100mL, 500×B 2mL, 10×GY/10×M 100mL를 넣고 잘 혼합한다.

종균배양 -20℃에 동결보존하였던 균을 10mL의 YPD배지를 넣은 50mL 시험관에 1% 접종하고 24h동안 배양하여 YPD평판에서 2일간 자래운다. 단독균무지를 10mL의 YPD배지를 넣은 50mL 시험관에 접종하고 24h동안 배양한 다음 BMGY배지에 2% 접종한다.

초기배양 배양온도는 30℃, pH는 H₃PO₄(85%)으로 pH 3~7 되게 맞추어 배양하였고 교반속도는 250r/min, 배양시간은 실험설계에 따라 진행하였다.

유도배양 배양온도는 30℃로 보장하였고 pH, 메타놀농도와 배양시간은 실험설계에 따라 설정하였다.

분석방법 균체량은 A₆₀₀을 측정하여 평가하였으며 rhIGF-1발현량은 효모배양상청액속의 총단백질량을 로우리법[2]으로 측정하고 트리신SDS-PAGE상의 덴시토미터분석자료에 기초하여 정성정량분석하였다.

결과 및 논의

글리세린농도의 영향 BMGY배지의 글리세린농도를 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0%로 하여 배양하고 유도하였을 때 균체의 성장과 rhIGF-1상대발현량을 조사한 결과는 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 글리세린의 농도 0.5~1.0%까지 A_{600} 값이 증가하였으며 1%이상부터는 농도가 높아짐에 따라 큰 차이가 없었고 rhIGF-1발현량도 이와 유사한 경향성을 보여주었다. 따라서 초기균체생장에 필요한 탄소원인 글리세린의 농도를 1.0%로 하여 배양을 진행하기로 하였다.

유도전 초기배양pH의 영향 초기배양에서 BMGY의 pH를 3.0, 4.0, 5.0, 5.6, 5.8, 6.0, 7.0으로 각이하게 설정하고 1% 메타놀유도후 3일만에 발현물에 미치는 영향을 조사하였다.(그림 2)

그림 2에서 보는바와 같이 균체량은 초기배양pH를 높일수록 증가하여 6.0~7.0일 때 최대로 되었지만 rhIGF-1의 상대발현량은 pH 5.0에서 제일 많았다. 그림 3에서 보는바와 같이 pH 5.0에서부터 rhIGF-1의 띠가 명백히 나타났는데 pH 6.0, 7.0에서는 목적단백질과 함께 잡단백질의 양이 현저히 많아졌다. 이로부터 초기배양pH를 5.0으로 보장하는것이 합리적이라는것을 알수 있다.

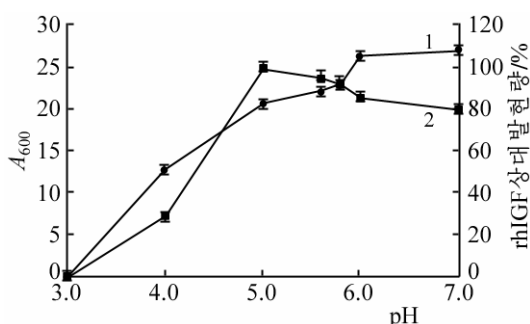


그림 2. 초기배양pH에 따르는 A_{600} , rhIGF-1발현량의 변화

1- A_{600} , 2-rhIGF-1발현량; BMGY배지의 글리세린 농도 1%, 초기배양시간 24h, 유도메타놀농도 1%, 유도시간 3d, 유도pH 3.0

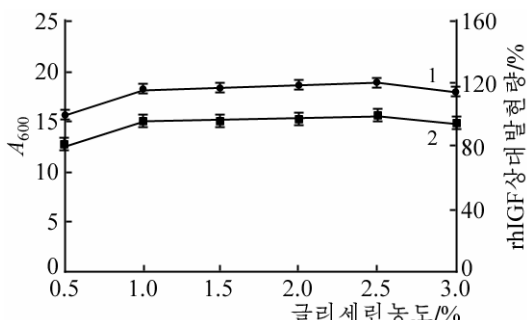


그림 1. 글리세린의 농도에 따르는 A_{600} , rhIGF-1발현량의 변화

1- A_{600} , 2-rhIGF-1발현량; 초기배양시간 24h, 유도메타놀의 농도 1%, 유도시간 3d, 유도pH 3.0

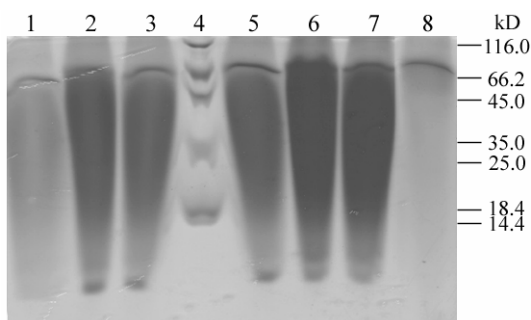


그림 3. 초기배양pH가 rhIGF-1의 발현량에 미치는 영향

1-3, 5-7은 초기배양pH가 각각 4.0, 5.0, 5.6, 5.8, 6.0, 7.0일 때, 4는 단백질분자량표식자, 8은 음성대조(*P. pastoris* GS115배양상청액)

유도전 초기배양시간의 영향 유도전 초기배양시간을 16, 20, 24, 28, 32h로 설정하고 1% 메타놀유도후 3일만에 배양액의 A_{600} , rhIGF-1상대발현량을 측정하였다.(그림 4)

그림 4에서 보는바와 같이 초기배양시간에 따라 유도전 A_{600} 값과 발현률이 차이났는데 24h 배양하였을 때 A_{600} 은 25로서 가장 높았으며 그보다 길어지면 발현률이 낮아졌다. 이것은 초기배양시간이 길어지면 균체가 로화되며 산소와 영양공급의 제한으로 하여 rhIGF-1

의 발현에 영향을 주기때문이라고 본다. 이론적으로 볼 때 유도전 A_{600} 값은 생물량에 비례하며 이로부터 목적단백질의 총적인 발현량도 많아지게 된다. 그러나 높은 세포밀도가 분비단백질의 발현률에 항상 유리한것은 아니며 이것은 용해도와 안정성, 세포독성과 같은 발현단백질의 성질에 관계[3]된다.

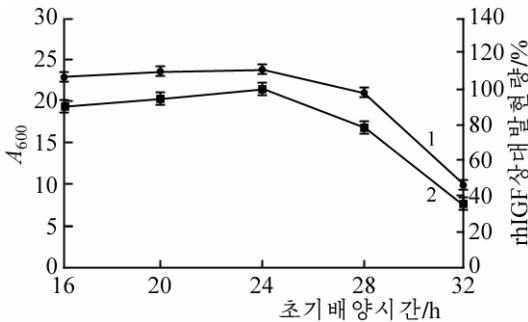


그림 4. rhIGF-1 발현에 미치는 초기배양시간의 영향

1- A_{600} , 2-rhIGF-1 발현률; BMGY배지의 글리세린농도 1%, 초기배양pH 5.0, 유도배지의 메타놀농도 1%, 유도배지 pH 3.0

메타놀농도의 영향 효모 *Pichia pastoris*에 의한 진탕배양에서 유도때 메타놀을 일정한 농도로 보장하여주는것은 세포의 성장과 외래단백질의 발현에 영향을 미치며 메타놀의 농도를 각이하게 하면 발현량도 달라지게 된다.

rhIGF-1의 발현에 미치는 메타놀농도의 영향을 조사한 결과는 그림 5, 6과 같다.

그림 5에서 보는바와 같이 메타놀을 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5%로 각이하게 첨가하였을 때 유도 1~3일까지의 기간에 A_{600} 값은 1.5%에서 제일 높았으며 발현량(그림 6)도 현저히 많았다.

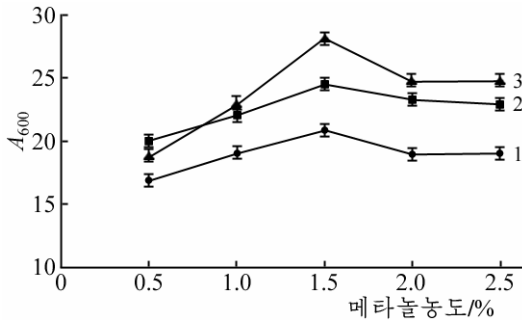


그림 5. 메타놀농도에 따르는 A_{600} 의 변화
1-3은 유도시간이 각각 1, 2, 3d일 때; BMGY배지의 글리세린농도 1%, 초기배양pH 5.0, 초기배양시간 24h, 유도배지 pH 3.0

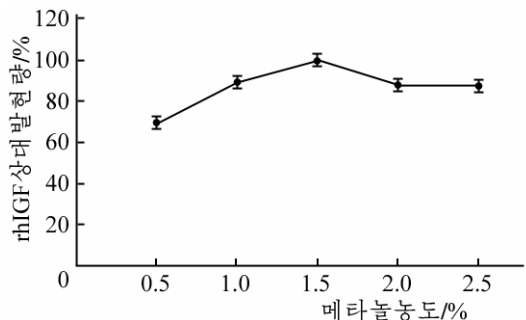


그림 6. 메타놀농도에 따르는 rhIGF-1 발현량의 변화

BMGY배지의 글리세린농도 1%, 초기배양pH 5.0, 초기배양시간 24h, 유도배지 pH 3.0, 유도시간 3d

이로부터 rhIGF-1 발현에 최적인 메타놀의 농도가 1.5%라는것을 알수 있다.

유도배양pH의 영향 유도배양단계에서 배지의 pH는 발현시키려는 단백질의 종류에 따라 차이이며 pH를 조절하여 발현되는 단백질의 안정성을 높이고있다.[1]

유도후 rhIGF-1 발현에 미치는 유도배지 pH의 영향을 조사한 결과는 그림 7과 같다.

그림 7에서 보는바와 같이 유도배지의 pH를 3.0으로 보장하였을 때 목적단백질의 발현량이 최대로 되었으며 pH가 높아질수록 감소하는 경향성을 보여주었다. 이것은 숙주인 *P. pastoris*의 액포속에 많이 들어있는 단백질분해

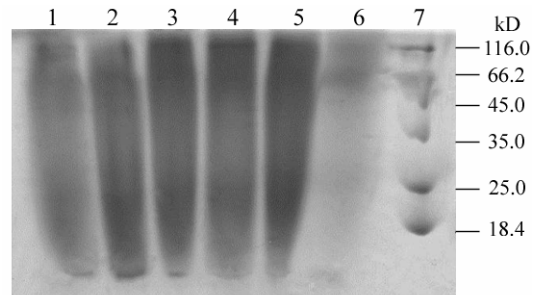


그림 7. 유도배지 pH에 따르는 rhIGF-1의 발현률의 변화

1-5는 유도배지의 pH가 각각 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 5.5일 때, 6은 음성대조(*P. pastoris* GS115 배양상청액), 7은 분자량표식자; BMGY배지의 글리세린농도 1%, 초기배양pH 5.0, 초기배양시간 24h, 유도배지의 메타놀농도 1.5%, 유도 4d

효소들에 의하여 3.0보다 높은 pH조건에서 목적산물이 분해되기때문이며 낮은 pH조건에서는 프로테아제의 활성이 억제되어 rhIGF-1의 안정성이 높아지기때문이라고 본다.

유도시간의 영향 유도시간에 따르는 rhIGF-1발현률의 변화를 조사한 결과는 그림 8, 9와 같다.

그림 8에서 보는바와 같이 A_{600} 값은 4일부터 감소하기 시작하여 6일부터는 급격히 떨어졌다.

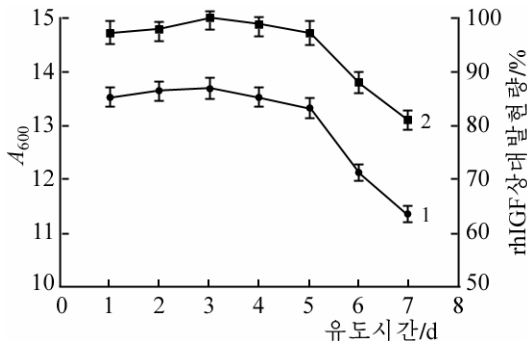


그림 8. 유도시간에 따르는 A_{600} , rhIGF-1의 발현량변화

1- A_{600} , 2-rhIGF-1발현량; BMGY배지의 글리세린 농도 1%, 초기배양pH 5.0, 유도배지의 메타놀농도 1%, 유도배지pH 3.0

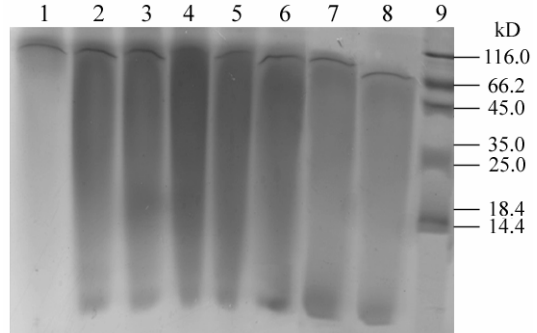


그림 9. 유도시간에 따르는 rhIGF-1의 발현량변화

1-음성대조(*P. pastoris* GS115의 배양상청액), 2-8은 유도시간이 각각 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1d일 때, 9-단백질분자량표식자

그림 9에서 보는바와 같이 유도 24h만에 rhIGF-1의 분자량에 해당하는 발현단백질띠가 나타났는데 그 양은 유도 3일만에 최대로 되었으며 그후부터는 목적단백질의 발현량은 감소하고 잡단백질발현량이 점차 증가하는 경향성이 나타났다. 이로부터 rhIGF-1의 발현에서 유도시간이 발현률에 큰 영향을 미치며 유도배양을 끝내는 시기가 매우 중요하다는 것을 알수 있다.

유도배양때 통기량의 영향 효모 *P. pastoris*에 의한 외래단백질의 발현유도단계에서 충분한 통기량을 보장해주는것이 매우 중요하다.

진탕플라스크체적에 대하여 배지의 체적을 10, 20, 30, 40%로 설정하여 A_{600} 의 변화를 관찰한 결과는 그림 10과 같다.

그림 10에서 보는바와 같이 제일 합리적인 배지체적은 플라스크용량의 10%라는것을 알수 있다.

이로부터 BMGY배지의 배양체적을 진탕플라스크체적의 10%, 글리세린농도 1%, pH 5.0으로 보장하고 30°C 조건에서 24h동안 초기배양한 다음 BMMY배지(pH 3.0)에 균체를 접종하고 100% 메타놀을 1.5% 되게 24h에 한번씩 첨가하면서 3일간 유도를 진행한 결과 rhIGF-1 단백질의 발현량은 효모배양상청액속의 총단백질량의 10%에 해당하는 15mg/L에 달하였다.

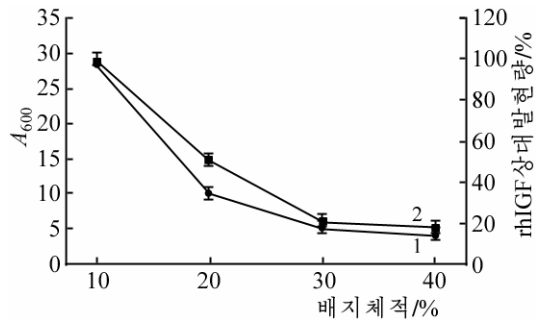


그림 10. rhIGF-1의 발현에 미치는 통기량의 영향

1- A_{600} , 2-rhIGF-1발현량; 초기배지의 글리세린 농도 1%, 초기배양pH 5.0, 유도배지의 메타놀 농도 1%, 유도배양pH 3.0, 유도 3d

맺는 말

사람인슐린양성장인자-1발현재조합효모균주 *P. pastoris* GS115(pPIC9K-IGF-1)의 진탕 배양은 배양온도 30℃, 교반속도 250r/min의 조건에서 배양액체적을 용기체적의 10%(v/v)로 하고 글리세린농도 1%, pH 5.0으로 맞춘 BMGY배지에서 24h동안 배양한 다음 BMMY 배지에서 메타놀농도 1.5%, pH 3.0으로 유지하면서 72h 유도하는것이 합리적이다. 이 조건에서 발현되는 rhIGF-1발현량은 15mg/L로서 총단백질량의 10%를 차지한다.

참고 문헌

- [1] 리현광 등; 고밀도세포배양기술, 김일성종합대학출판사, 326~354, 주체105(2016).
- [2] J. M. Walker; The Protein Protocols Handbook, Humana Press Inc., 3~1043, 2002.
- [3] P. Fickers; Current Research in Microbiology and Biotechnology, 2, 3, 354, 2014.

주체106(2017)년 10월 5일 원고접수

Effect of Several Fermentation Parameters for Expression of Recombinant Human Insulin-Like Growth Factor(hIGF-1) by Recombinant Yeast during Shake Flask Cultivation

Kil Kum Byol, Ri Kwang Ok

The optimal shake flask culture conditions of recombinant yeast, *P. pastoris* GS115(pPIC 9K-IGF-1) are as follows: fermentation temperature 30 °C, agitation 250r/min, fermentation working volume 10%(v/v), glycerol concentration 1%, initial pH of BMGY media 5.0, initial culture time 24h, methanol concentration 1.5%, induction pH 3.0 and induction time 72h. Under these conditions, the expression level of rhIGF-1 is 15mg/L, which is 10% of total secreted proteins in media.

Key words: insulin-like growth factor-1, *Phichia pastoris*, methanol induction