



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0061270
(43) 공개일자 2019년06월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/04 (2006.01) C12N 9/24 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/04 (2013.01)
C12N 9/2402 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0159455
(22) 출원일자 2017년11월27일
심사청구일자 2017년11월27일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
(72) 발명자
김동일
인천광역시 연수구 송도문화로28번길 28, 103동 1302호 (송도동, 송도글로벌캠퍼스푸르지오)
최홍열
인천광역시 연수구 새말로 154, 305동 510호(연수동, 연수주공3차아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

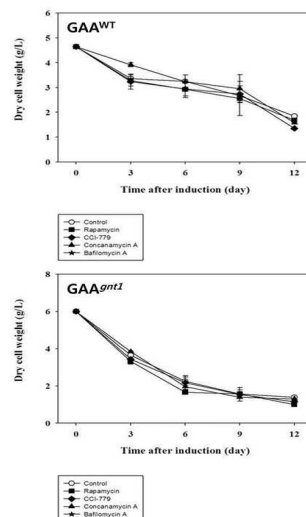
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 형질전환 벼 세포 배양에서 자가소화 억제제 처리를 통한 재조합 인간 산 알파-글루코시다제 생산성 증대용 조성물

(57) 요약

본 발명은 재조합 인간 acid α -glucosidase 생산성 증대 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 자가소화 억제제를 포함하는 재조합 인간 acid α -glucosidase의 생산성 증대용 조성물 및 생산성 증대 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 자가소화 억제제는 형질전환 벼 세포배양 환경에서 당 고갈에 의해 발생하는 자가소화를 억제함으로써, 벼 세포의 생존도 증진 및 재조합 인간 acid α -glucosidase의 생산성을 증대시킬 수 있다. 특히 당 고갈 환경에 더욱 민감한 글리코엔지니어드 벼 세포 유래의 형질전환 벼 세포에서도 재조합 인간 acid α -glucosidase의 생산성을 증대시킬 수 있어 유용산물인 재조합 인간 acid α -glucosidase 생산에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Y 302/0102 (2013.01)

C12N 2501/999 (2013.01)

C12N 2510/02 (2013.01)

(72) 발명자

박혜림

충청남도 당진시 송악읍 반촌로 108, 111동 202호
(당진롯데캐슬)

정창현

인천광역시 남구 경인남길118번길 23, 302호(용현
동, 서울오피스텔)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711044609

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오.의료기술개발

연구과제명 글리칸 변이 바이오의약품의 생산을 위한 글리칸 조절 및 제어 원천기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교

연구기간 2016.11.20 ~ 2017.11.19

명세서

청구범위

청구항 1

자가소화 억제제를 포함하는, 재조합 인간 산 알파-글루코시다제의 생산성 증대용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 자가소화 억제제는 콘카나마이신 A 또는 바필로마이신 A1인 것을 특징으로 하는, 재조합 인간 산 알파-글루코시다제의 생산성 증대용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 콘카나마이신 A은 0.03 내지 0.1 μM 의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는, 재조합 인간 산 알파-글루코시다제의 생산성 증대용 조성물.

청구항 4

제 2항에 있어서,

상기 바필로마이신 A1은 0.05 내지 0.3 μM 의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는, 재조합 인간 산 알파-글루코시다제의 생산성 증대용 조성물.

청구항 5

자가소화 억제제를 포함하는, 재조합 인간 산 알파-글루코시다제의 생산성 증대용 배지 조성물.

청구항 6

자가소화 억제제를 포함하는 배지에서 형질전환 벼 세포를 배양하는 단계;를 포함하는, 재조합 인간 산 알파-글루코시다제의 생산성 증대 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 자가소화 억제제는 콘카나마이신 A 또는 바필로마이신 A1인 것을 특징으로 하는, 재조합 인간 산 알파-글루코시다제의 생산성 증대 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 콘카나마이신 A은 0.03 내지 0.1 μM 의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는, 재조합 인간 산 알파-글루코시다제의 생산성 증대 방법.

청구항 9

제 7항에 있어서,

상기 바필로마이신 A1은 0.05 내지 0.3 μM 의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는, 재조합 인간 산 알파-글루코시다제의 생산성 증대 방법.

청구항 10

제 6항에 있어서,

상기 배지는 당 고갈 배지인 것을 특징으로 하는, 재조합 인간 산 알파-글루코시다제의 생산성 증대 방법.

청구항 11

제 6항에 있어서,

상기 형질전환 벼 세포는 재조합 인간 산 알파-글루코시다제를 생산하는 벼 세포인 것을 특징으로 하는, 재조합 인간 산 알파-글루코시다제의 생산성 증대 방법.

청구항 12

제 6항에 있어서,

상기 형질전환 벼 세포는 RAmy3D 유도성 프로모터가 도입된 것을 특징으로 하는, 재조합 인간 산 알파-글루코시다제의 생산성 증대 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 형질전환 벼 세포의 재조합 인간 acid α -glucosidase 생산성 증대 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 자가소화 억제제를 포함하는 재조합 인간 acid α -glucosidase의 생산성 증대용 조성물 및 생산성 증대 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 벼 세포 배양에서 외래 단백질을 생산하기 위해 사용하는 RAmy3D 프로모터는 당 고갈 시 단백질을 발현하는 유도성 프로모터(inducible promoter)이다. 그러나 이 프로모터는 목적 단백질의 생산량을 증가시키지만, 당 고갈로 인해 탄소원이 결핍되어 자가소화(autophagy)가 일어나기 때문에 벼 세포가 급격히 사멸된다는 문제점이 있다. 또한 사멸된 세포로부터 배양액으로 용출된 프로테아제(protease)와 같은 단백질 분해 효소에 의해 목적 단백질의 분해가 일어나, 목적 단백질의 생산성을 떨어뜨리는 단점이 있다. 특히 글리코엔지니어드(glycoengineered) 벼 세포 유래의 형질전환 벼 세포는 야생형(wild-type) 벼 세포 유래의 형질전환 벼 세포에 비해 당 고갈 환경에 더욱 민감하여 글리코엔지니어드(glycoengineered) 벼 세포 유래의 형질전환 벼 세포 배양에서 세포사멸이 더욱 급격하게 일어난다.

[0004] 일반적으로 식물세포에서의 자가소화는 물질들이 리소좀과 액포(vacuole)로 이동하여 분해되는 현상을 지칭하며, 이 과정은 내포 작용에 의한 리소좀 관련 분해와는 구별된다. 또한 자가소화는 세포질의 한 부분을 에워싸는 자가소화포(autophagosome)에 의해 발생하며 선택적이지 않은 분해 시스템을 가지고 있다. 이 때, 영

양분 고갈은 자가소화의 가장 중요한 개시 신호이며, 식물세포에서는 주로 질소원이나 탄소원의 고갈이 이를 야기하는 것으로 알려져 있다.

- [0005] 벼 세포 배양은 생산물의 안전성, 비용적인 효율성, 배양기를 이용하기 용이하다는 점, 그리고 생산물의 충분한 생물학적 활성이 보존되는 등 여러 가지 이점 때문에 치료용 단백질을 만들어내는데 매력적인 시스템으로서 생각되고 있다. 형질전환 벼 세포 배양에서 얻을 수 있는 치료용 단백질 중 재조합 인간 acid α -glucosidase 이 있으며 이 단백질의 경우에 상당히 고가이기 때문에 재조합 인간 acid α -glucosidase 단백질의 생산성을 증대시킬 수 있는 시스템이 요구되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 이에 본 발명자들은 형질전환 벼 세포 배양에서 치료용 단백질의 생산성을 증대시킬 수 있는 방법을 연구하던 중, 자가소화 억제제 처리를 통한 재조합 인간 acid α -glucosidase 생산성 증대 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0008] 따라서 본 발명의 목적은, 자가소화 억제제를 포함하는 재조합 인간 acid α -glucosidase의 생산성 증대용 조성물 및 생산성 증대 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 자가소화 억제제를 포함하는, 재조합 인간 acid α -glucosidase의 생산성 증대용 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한 본 발명은 자가소화 억제제를 포함하는, 재조합 인간 acid α -glucosidase의 생산성 증대용 배지 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은 자가소화 억제제를 포함하는 배지에서 형질전환 벼 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 재조합 인간 acid α -glucosidase의 생산성 증대 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명에 따른 자가소화 억제제는 형질전환 벼 세포배양 환경에서 당 고갈에 의해 발생하는 자가소화를 억제함으로써, 벼 세포의 생존도 증진 및 재조합 인간 acid α -glucosidase의 생산성을 증대시킬 수 있다. 특히 당 고갈 환경에 더욱 민감한 글리코엔지니어드 벼 세포 유래의 형질전환 벼 세포에서도 재조합 인간 acid α -glucosidase의 생산성을 증대시킬 수 있어 유용산물인 재조합 인간 acid α -glucosidase 생산에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 GAA^{WT} 및 GAA^{gnt1} 의 세포량을 나타낸 도이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 GAA^{WT} 및 GAA^{gnt1} 의 세포 생존도를 나타낸 도이다.
- 도 3은 본 발명의 실시예에 따른 GAA^{WT} 및 GAA^{gnt1} 의 자가용해소체 형광 염색 결과를 통한 자가소화 진행 정도를 나타낸 도이다.
- 도 4는 본 발명의 실시예에 따른 GAA^{WT} 및 GAA^{gnt1} 의 세포의 rrhGAA 발현량을 나타낸 도이다.
- 도 5는 본 발명의 실시예에 따른 GAA^{WT} 및 GAA^{gnt1} 의 총 단백질량 대비 세포내 rrhGAA 발현량을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명은 자가소화 억제제를 포함하는, 재조합 인간 acid α -glucosidase의 생산성 증대용 조성물을 제공한다.
- [0018] 상기 “자가소화 억제제”는 식물세포 내 물질들이 리소좀과 액포로 이동하여 분해되는 현상인 자가소화를 억제하는 물질이다.
- [0019] 상기 자가소화 억제제를 사용하는 경우, 자가소화로 인해 세포가 급격히 사멸되는 것을 억제하는 효과가 있으며 사멸된 세포로부터 일어나는 목적 단백질의 분해가 억제되어, 형질전환 벼 세포 배양 환경에서 목적 단백질인 재조합 인간 acid α -glucosidase의 생산성을 증대시킬 수 있다.
- [0020] 상기 자가소화 억제제는 3-메틸아데닌, 콘카나마이신 A(concanamycin A) 및 바필로마이신 A1(bafilomycin A1)으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상일 수 있으며, 바람직하게는 콘카나마이신 A 또는 바필로마이신 A1일 수 있다.
- [0021] 상기 콘카나마이신 A 또는 바필로마이신 A1은 세포의 리소좀과 액포 내 H⁺-ATPase(V-ATPase)를 억제하여 pH를 증가시켜 산성화를 막을 수 있다. 이에 따라 산성화된 리소좀이나 액포와 결합하는 자가소화포(autophagosome)가 결합을 하지 못하게 되어 자가소화를 억제할 수 있다. 또한 pH가 낮은 산성 조건에서 활성화되는 다양한 가수분해 효소들이 제 기능을 할 수 없게 되기 때문에 자가소화 액포(autophagic vacuole)가 물질을 분해하지 못하며 최종적으로 자가소화를 억제할 수 있다.
- [0022] 또한 상기 콘카나마이신 A는 0.03 내지 0.1 μ M의 농도로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.04 내지 0.09 μ M의 농도, 더욱 바람직하게는 0.05 내지 0.07 μ M의 농도, 가장 바람직하게는 0.05 내지 0.06 μ M의 농도로 포함될 수 있다.
- [0023] 또한 상기 바필로마이신 A1은 0.05 내지 0.3 μ M의 농도로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.07 내지 0.25 μ M의 농도, 더욱 바람직하게는 0.08 내지 0.2 μ M의 농도, 가장 바람직하게는 0.09 내지 0.15 μ M의 농도로 포함될 수 있다.
- [0024] 상기와 같은 농도의 콘카나마이신 A 또는 바필로마이신 A1을 이용하는 경우, 세포 내 자가소화를 억제시키면서 세포량에는 영향을 미치지 않으며 세포의 생존도를 높일 수 있고 형질전환 벼 세포 배양 환경에서 목적 단백질인 재조합 인간 acid α -glucosidase의 발현량을 높일 수 있다.
- [0025] 상기 형질전환 벼 세포는, 배양 시 재조합 인간 acid α -glucosidase을 생산할 수 있는 형질전환 벼 세포를 뜻하며, 예컨대 야생형(wild-type) 벼 세포 유래의 형질전환 벼 세포 또는 글리코엔지니어드(glycoengineered) 벼 세포 유래의 형질전환 벼 세포일 수 있으며 이에 제한되지는 않는다.
- [0027] 또한, 본 발명은 자가소화 억제제를 포함하는, 재조합 인간 acid α -glucosidase의 생산성 증대용 배지 조성물을 제공한다.
- [0028] 상기 “배지(culture media)”는 인 비트로에서 세포 성장 및 생존을 지지할 수 있게 하는 배지를 의미하고, 세포의 배양에 적절한 당 분야에서 사용되는 통상의 배지를 모두 포함한다.
- [0029] 상기 배지는 세포가 최소 증식 및/또는 생존하는데 필요한 필수 및 비필수 아미노산, 비타민, 에너지원, 지질 및 미량원소 등을 포함할 수 있다.
- [0030] 상기 배지는 AA(Amino acid) 배지, MS(Murashige & Skoog), N6, WHITE, SH(Schenk & Hiderbrandt) 및 당 고갈 배지로 이루어진 군에서 선택된 1 이상일 수 있으며, 바람직하게는 당 고갈 배지일 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명은 자가소화 억제제를 포함하는 배지에서 형질전환 벼 세포를 배양하는 단계;를 포함하는, 재조합 인간 acid α -glucosidase의 생산성 증대 방법을 제공한다.
- [0033] 상기 자가소화 억제제는 3-메틸아데닌, 콘카나마이신 A(concanamycin A) 및 바필로마이신 A1(bafilomycin A1)으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상일 수 있으며, 바람직하게는 콘카나마이신 A 또는 바필로마이신 A1일 수 있다.

- [0034] 또한 상기 콘카나마이신 A은 0.03 내지 0.1 μM 의 농도로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.04 내지 0.09 μM 의 농도, 더욱 바람직하게는 0.05 내지 0.07 μM 의 농도, 가장 바람직하게는 0.05 내지 0.06 μM 의 농도로 포함될 수 있다.
- [0035] 또한 상기 바필로마이신 A1은 0.05 내지 0.3 μM 의 농도로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.07 내지 0.25 μM 의 농도, 더욱 바람직하게는 0.08 내지 0.2 μM 의 농도, 가장 바람직하게는 0.09 내지 0.15 μM 의 농도로 포함될 수 있다.
- [0036] 상기 자가소화 억제제는 형질전환 벼 세포 배양 이전 단계 또는 이후 단계에 처리되어 배지에 포함될 수 있으며, 형질전환 벼 세포의 분주와 동시에 처리되어 배지에 포함될 수 있다.
- [0037] 또한 상기 배지는 당 고갈 배지일 수 있으며, 당 고갈 배지를 사용하는 경우 형질전환 벼 세포에 도입되어 있는 당 고갈 시 단백질을 발현하는 유도성 프로모터의 발현을 극대화시켜 목적 단백질의 발현량을 증대시킬 수 있다.
- [0038] 상기 당은 글루코오스, 프럭토오스, 갈락토오스, 수크로오스, 락토오스, 아라비노스 및 말토오스로 이루어진 군에서 선택된 1 이상일 수 있으며, 이에 제한되지는 않는다.
- [0039] 또한 상기 형질전환 벼 세포는 재조합 인간 acid α -glucosidase를 생산하는 벼 세포일 수 있으며, 야생형(wild-type) 벼 세포 유래의 형질전환 벼 세포 또는 글리코엔지니어드(glycoengineered) 벼 세포 유래의 형질전환 벼 세포일 수 있다.
- [0040] 또한 상기 형질전환 벼 세포는 외래 단백질을 생산하기 위한 벡터가 도입된 세포일 수 있으며, 바람직하게는 상기 벡터 내 당 고갈 시 단백질을 발현하는 유도성 프로모터가 도입된 세포일 수 있고, 더욱 바람직하게는 RAmy3D 유도성 프로모터가 도입된 세포일 수 있다.
- [0041] 상기 "프로모터"는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. RAmy3D 유도성 프로모터는 당 고갈 환경에서 더욱 강력하게 발현되며, 생산된 목적 단백질의 분해 가능성을 낮출 수 있어 상기 프로모터의 도입을 통해 재조합 인간 acid α -glucosidase 단백질의 생산을 더욱 증가시킬 수 있다.
- [0042] 본 발명의 재조합 인간 acid α -glucosidase의 생산성 증대 방법을 이용하면 형질전환 벼 세포배양에서 당 고갈에 의해 발생하는 자가소화를 억제함으로써, 벼 세포의 생존도 증진 및 재조합 인간 acid α -glucosidase의 생산성을 증대시킬 수 있다. 특히 당 고갈 환경에 더욱 민감한 글리코엔지니어드 벼 세포 유래의 형질전환 벼 세포에서도 재조합 인간 acid α -glucosidase의 생산성을 증대시킬 수 있어 유용산물인 재조합 인간 acid α -glucosidase 생산에 유용하게 사용할 수 있다.
- [0044] 이하, 본 발명을 실시예에 의거하여 보다 구체적으로 설명한다. 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0046] 실시예 1. 실험 재료 및 조건 설정

[0047] 실시예 1-1. 세포주 선정

[0048] 본 연구에 사용된 세포주는 벼 유래 재조합 인간 산 알파-글루코시다제(rice-derived recombinant human acid α -glucosidase, rrhGAA)를 생산하는 형질전환 벼 현탁세포를 사용하였으며, 두 가지 종류인 야생형(wild-type) 벼 세포주(GAA^{WT})와 글리코엔지니어드(glycoengineered) 벼 세포주(GAA^{gnt1})를 사용하였다. 상기 야생형(wild-type) 벼 세포주(GAA^{WT})와 글리코엔지니어드(glycoengineered) 벼 세포주(GAA^{gnt1})는 유전자총법 형질전환(particle bombardment-mediated transformation) 된 세포주이며 전북대학교 식물분자생물학 연구실에서 분양받아 사용하였다. 또한 이들은 벼의 α -아밀레이즈 유전자 계열인 RAmy3D 유도성 프로모터를 포함하여 유전자 재조합되었고, 이 프로모터는 당 고갈시 목적 단백질이 발현되며 생산된 단백질은 배지로 분비된다.

[0050] 실시예 1-2. 배지환경 조성

[0051] 벼 세포의 생장배지로는 비타민이 첨가된 N6 (Duchefa Biochemie, Netherlands) 기본배지에 0.2 mg/L 키네티 (kinetin), 2 mg/L 2,4-디클로로페녹시아세트산(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D), 30 g/L 수크로오스 (sucrose)를 첨가하였다. pH를 5.8로 맞춘 뒤 가압증기 멸균을 하고 0.2 μ m의 멤브레인 필터로 여과한 항생제 (50 mg/L hygromycin, 4.4 ppmDL-phosphinothricin)를 첨가하여 사용하였다. 계대배양은 28℃, 120 rpm의 회전식 진탕 배양기에서 7일 간격으로 암 조건에서 수행하였다.

[0052] 또한 목적 단백질의 발현 유도를 위한 생산 배지로는 당이 첨가되지 않은 당 고갈 배지를 사용하였다. 구체적으로 유도(Induction) 배지로써 생장배지로 사용하는 N6 배지에서 수크로오스를 첨가하지 않은 상태의 배지를 사용하였다.

[0054] 실시예 1-3. 첨가물 종류 선정

[0055] rrhGAA 의 생산성에 영향을 미치는 첨가물의 종류를 알아보기 위해 우선, rrhGAA를 생산하는 GAA^{WT}와 GAA^{gnt1}에 자가소화 유도제인 라파마이신(Rapamycin) 및 템시롤리무스(Temsirolimus, CCI-779)와 자가소화 억제제인 콘카나마이신 A(concanamycin A) 및 바필로마이신 A1(bafilomycin A1) 각각을 첨가하여 세포를 배양하였다. 그 후 생산성이 가장 높은 9일차 배양액으로 rrhGAA의 발현량을 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 사용하여 확인하였다.

[0056] 확인 결과 첨가한 네 종류의 자가소화 조절제 중 자가소화 억제제인 콘카나마이신 A와 바필로마이신 A1를 첨가하였을 때의 rrhGAA의 발현량이, 대조군(control) 및 자가소화 유도제를 사용했을 때의 rrhGAA의 발현량보다 더욱 증가하는 것을 확인하였다. 특히 당 고갈 배지 환경에 더욱 민감하여 세포사멸이 급격하게 일어나는 GAA^{gnt1}에서도 rrhGAA의 발현량이 가시적으로 증가함을 확인하였다.

[0057] 이와 같은 실험을 통해 선정한 자가소화 조절제의 종류, 작용기작 및 처리 농도는 표 1에 나타내었으며, 이후 실험을 표 1의 조건에 따라 실시하였다.

표 1

작용 기작	조절제 종류	처리 농도 (μ M)
자가소화 유도제 (Autophagy enhancers)	라파마이신 (Rapamycin)	0.1
	템시롤리무스 (Temsirolimus, CCI-779)	1
자가소화 억제제 (Autophagy inhibitors)	콘카나마이신 A (concanamycin A)	0.05
	바필로마이신 A1 (bafilomycin A1)	0.1

[0060] 실시예 2. 자가소화 조절에 따른 세포 생장 확인

[0061] 실시예 2-1. 세포량 측정

[0062] rrhGAA 생산 단계에서 급격히 발생하는 자가소화의 조절이 세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 세포량(dry cell weight, DCW)을 측정하였고 이를 도 1에 나타내었다.

[0063] 도 1에서와 같이, GAA^{gnt1}와 GAA^{WT} 모두 첨가한 조절제에 따라 세포량이 큰 변화를 보이지는 않았으며, GAA^{gnt1}의 경우에는 GAA^{WT}에 비해 배양 초반에 급격한 세포량 감소를 보였다. 이를 통해 자가소화의 조절이 세포량에는 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었고, 두 세포주 중에서 GAA^{gnt1}가 글리코실화반응(glycosylation) 관련 유전자가 돌연변이화 되었기 때문에 생산 배지 환경에 더욱 민감하다는 것을 확인할 수 있었다.

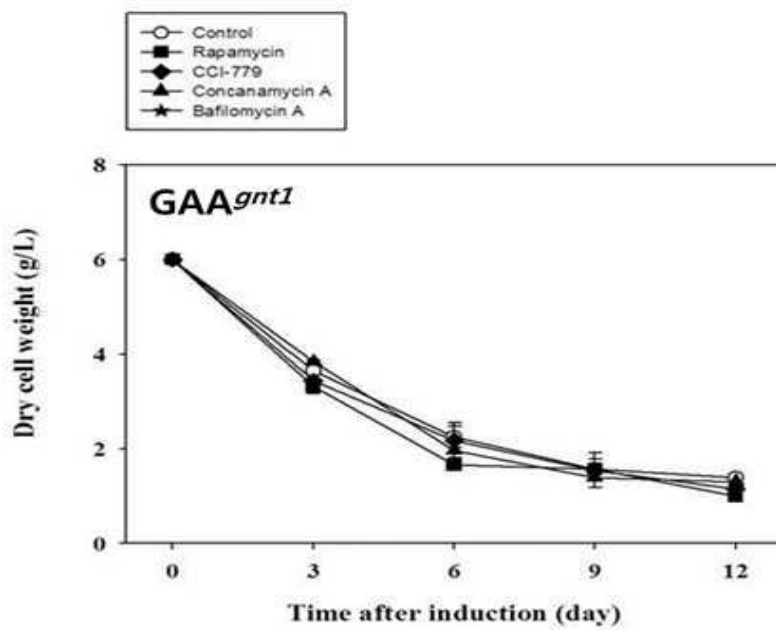
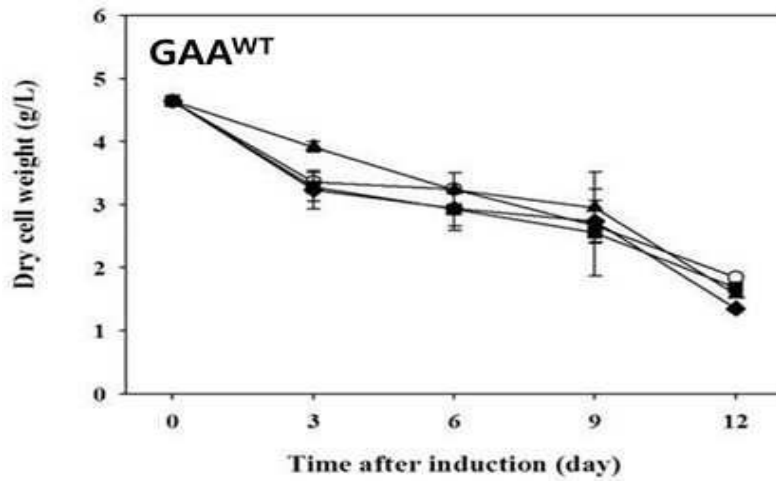
- [0065] 실시예 2-2. 세포 생존도 측정
- [0066] rrhGAA 생산 단계에서 급격히 발생하는 자가소화의 조절이 세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 세포 생존도를 측정하였고 이를 도 2에 나타내었다.
- [0067] 측정 결과 도 2에서와 같이, 자가소화 유도제인 라파마이신과 템시롤리무스를 첨가하였을 때 대조군보다 오히려 생존도가 낮았으며, 자가소화 억제제인 콘카나마이신 A와 바필로마이신 A1을 첨가하였을 때에는 대조군보다 생존도가 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한 두 세포주 모두 배양 3일차에 가장 큰 변화를 보인 것을 알 수 있었다. 3일차에서 우선 GAA^{WT} 의 경우, 대조군이 0일차에 43% 생존도를 보인 반면, 콘카나마이신 A를 첨가하였을 때 52.16%, 바필로마이신 A1을 첨가하였을 때는 43.96%의 생존도 증가를 보였다. 또한 GAA^{Gnt1} 의 3일차에서는 대조군이 0일차에 35.11% 생존도를 보인 반면, 콘카나마이신 A를 첨가하였을 때 40.94%, 바필로마이신 A1을 첨가하였을 때는 47.21%의 세포 생존도 증가를 확인할 수 있었다.
- [0068] 상기 실시예 2-1 및 2-2의 결과를 통해서, 자가소화 조절제가 세포량에는 변화를 주지 않지만 배양 초반의 세포 생존도에 영향을 주었음을 확인할 수 있었다. 또한 이를 통해 당이 고갈된 환경에서 목적 단백질을 생산하는 벼 세포의 단백질 생산 시스템에서는 생산 단계에서 자가소화 억제제를 이용하여 자가소화를 억제시켰을 때 세포의 생존도를 더욱 증진시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0070] 실시예 3. 자가소화 조절에 따른 자가용해소체(Autolysosome) 형성 확인
- [0071] 두 세포주에 자가소화 조절제 첨가에 따른 자가소화 진행 정도를 확인하기 위해 자가용해소체를 형광 염색시켜 확인하였다. 이를 위해 표 1에서와 같은 자가소화 유도제 및 자가소화 억제제를 해당 농도로 각각 첨가하였으며, 이 때 세포의 자가소화 과정 중 형성되는 자가용해소체를 확인하여 이에 대한 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0072] 도 3에서와 같이, 두 세포주에서 모두 자가소화 유도제로 자가소화를 증대시켰을 때 자가용해소체 형성이 증가하였으며, 자가소화 억제제로 자가소화를 억제시켰을 때 자가용해소체 형성이 감소함을 확인할 수 있었다. 자가용해소체의 형성 변화는 특히 1 내지 3일차에서 뚜렷하게 관찰할 수 있었으며, 이는 자가소화가 당 고갈을 개시 신호로 하여 배양 초반에 급격히 일어났음을 의미하며 자가소화 조절제로 자가소화를 조절할 수 있음을 의미한다.
- [0074] 실시예 4. 자가소화의 조절이 rrhGAA 생산에 미치는 영향 확인
- [0075] 자가소화 조절제가 rrhGAA 생산에 미치는 영향을 알아보기 위해 두 세포주의 세포의 rrhGAA 발현량 및 세포내 rrhGAA 발현량을 측정하였으며 이를 각각 도 4 및 도 5에 나타내었다.
- [0076] 도 4 및 도 5와 같이, 자가소화 유도제인 라파마이신과 템시롤리무스를 첨가했을 때와 비교하여 자가소화 억제제인 콘카나마이신 A와 바필로마이신 A1을 첨가했을 때 세포의 및 세포내 rrhGAA 발현량이 모두 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다.
- [0077] 특히 도 4의 세포의 rrhGAA 발현량의 경우, GAA^{WT} 에서는 자가소화 유도제인 라파마이신과 템시롤리무스를 첨가하였을 때 배지의 rrhGAA의 농도가 각각 30.9 mg/L와 29.9 mg/L로, 대조군의 32.5 mg/L에 비해 낮은 재조합 단백질 발현량을 보였다. 그러나 자가소화 억제제인 콘카나마이신 A와 바필로마이신 A1을 첨가하였을 때는 36.9 mg/L와 40.4 mg/L로 대조군에 비해 각각 13%, 24% 높은 rrhGAA 생산성을 나타내었다.
- [0078] GAA^{Gnt1} 의 경우에도, 라파마이신과 템시롤리무스를 첨가하였을 때 rrhGAA 발현량이 각각 31.1 mg/L, 33.2 mg/L로 대조군인 34.5 mg/L 보다 낮았으며, 콘카나마이신 A와 바필로마이신 A1으로 자가소화를 억제시켰을 때 각각 대조군보다 15%, 20% 높은 39.5 mg/L, 41.3 mg/L의 rrhGAA 생산성을 나타내었다.
- [0079] 이를 통해 자가소화 억제제인 콘카나마이신 A 및 바필로마이신 A1을 이용하여 자가소화를 억제시켰을 때 세포 내외에서 rrhGAA의 생산성이 더욱 증가함을 확인하였다. 또한, 앞서 실시예 2의 세포 생존도가 자가소화의 조절에 따라 배양 초반에 변화하는 것과 달리, rrhGAA의 생산성은 배양 후반인 9일차에 큰 차이를 보이는 것을 확인

하였다.

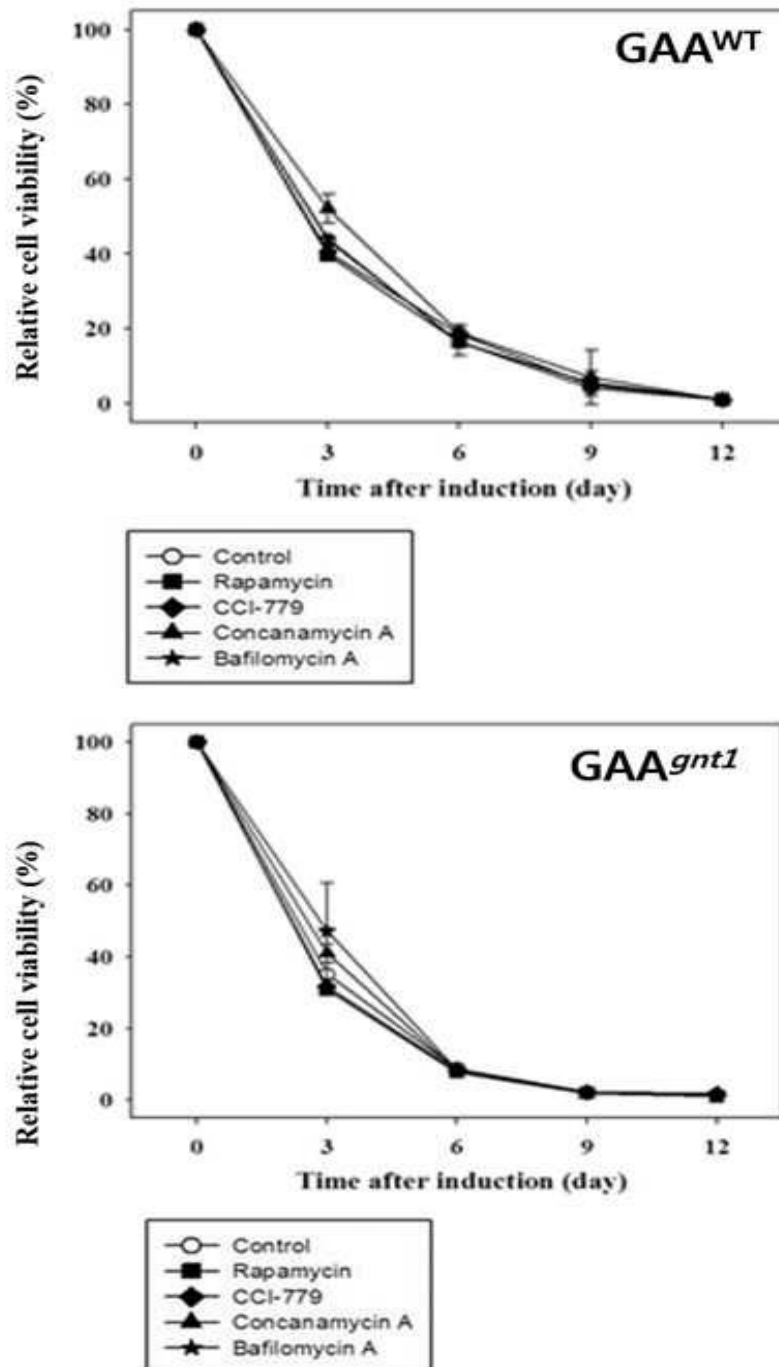
[0080] 따라서 자가소화 억제제인 콘카나마이신 A 및 바필로마이신 A1는 세포량에는 영향을 미치지 않지만, 세포 생존도는 증가시키면서 효과적인 세포 내의 rrrGAA 생산성 증대를 유도할 수 있음을 확인하였다.

도면

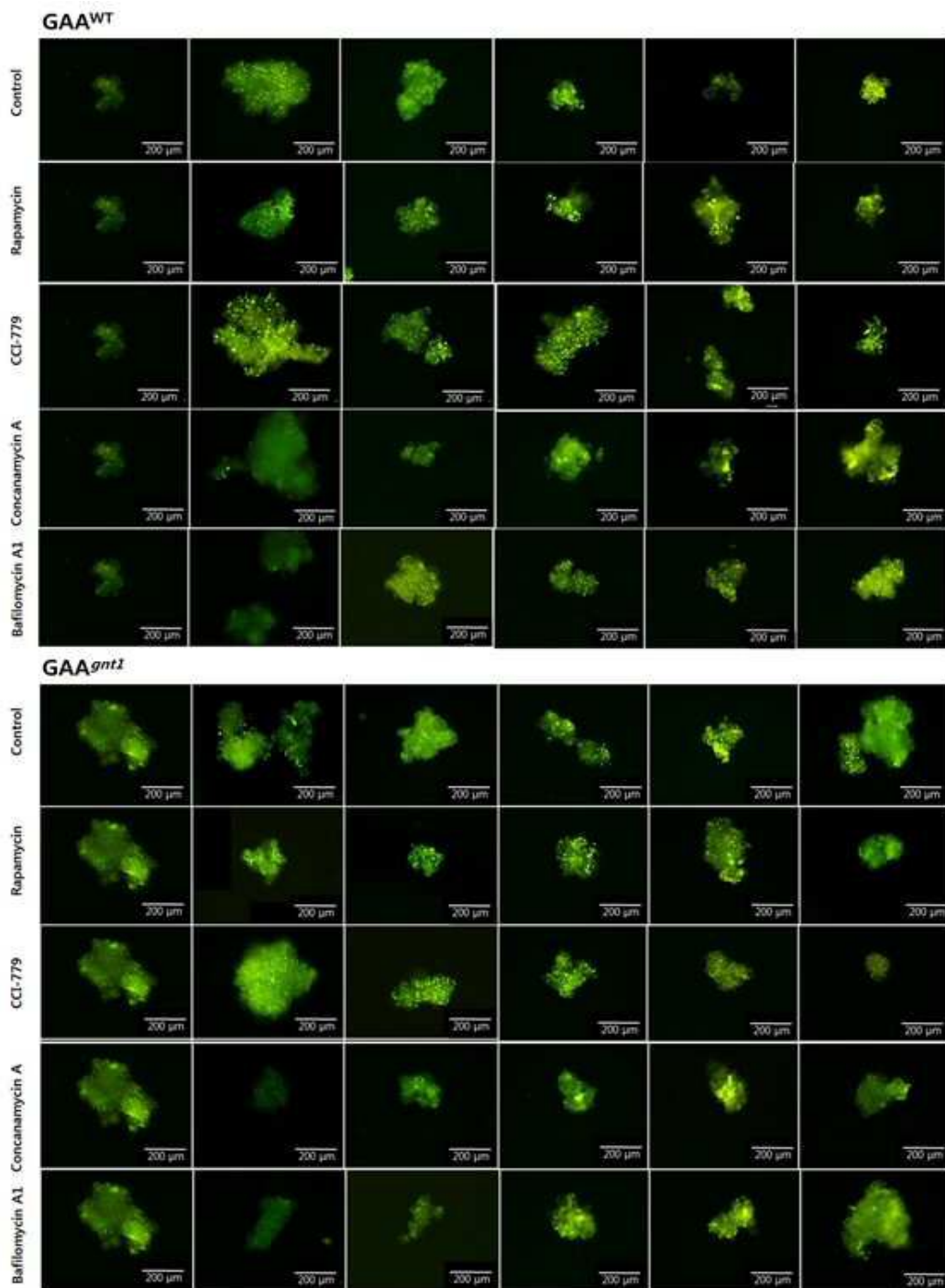
도면1



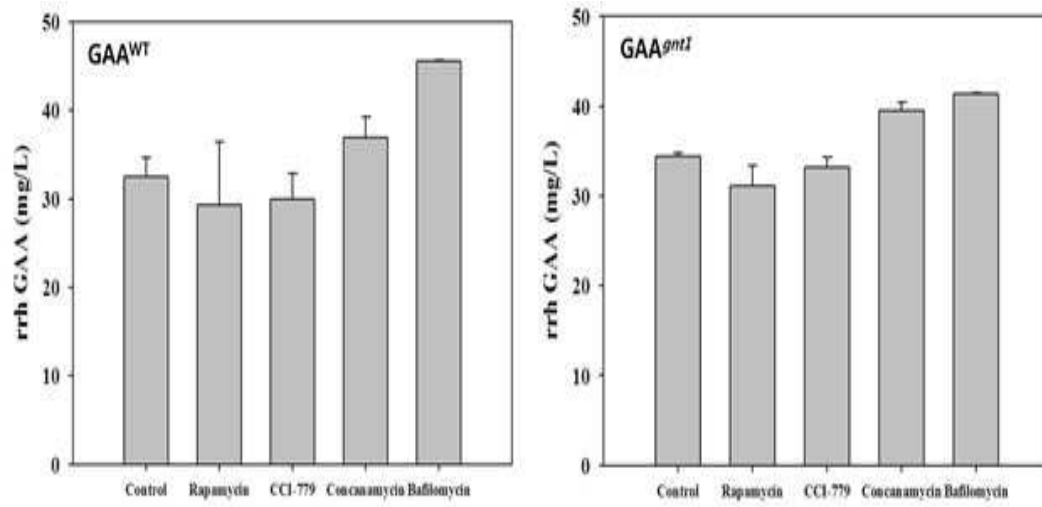
도면2



도면3



도면4



도면5

