

발 간 등 록 번 호
-------------

11-1541000-001709-01
----------------------

고효율물질생산 곤충세포주 구축 및 이를 이용한  
당쇄형 기능단백질의 생산 및 해석에 관한 연구  
(Expression of Glycoproteins, Analysis of Their Glycans,  
and Glycosylation Engineering in Insect Cells)

농 립 수 산 식 품 부

## 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “고효율물질생산 곤충세포주 구축 및 이를 이용한 당쇄형 기능단백질의 생산 및 해석에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 11 월 20 일

주관연구기관명:경북해양바이오산업연구원

주관연구책임자 : 홍 선 미

연 구 원 : 성 호 선

연 구 원 : 김 소 정

연 구 원 : 윤 원 갑

# 요 약 문

## I. 제 목

고효율물질생산 곤충세포주 구축 및 이를 이용한 당쇄형 기능단백질의 생산 및 해석에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

초기의 유전자 재조합 단백질은 증식이 빠르고 대량배양이 용이하며 저렴한 배양 환경의 대장균 등에서 생산하였으나 인체 단백질의 복잡한 구조를 적절히 구현할 수 없어, 진핵 세포인 효모와 동물세포 등에서 생산하게 되었다. 그러나 효모에서의 생산은 자체 분해효소에 의해 외래 인체단백질을 분해하거나 정확한 당쇄 부가 능력이 떨어지며 생산 수율이 낮은 단점을 가지며, 동물세포공장은 성장속도가 느리고 배양환경 조절이 어려운 단점을 지니고 있다. 이를 개선하기 위해 배양기와 배양배지의 가격을 낮추거나, 개발에 들어가는 시간을 줄이고 생산과 효능을 극대화한 치료용 단백질을 생산하기 위한 연구에 관심이 집중하고 있다. 세포조절 단백질, 면역조절 단백질, 효소 및 저해제 예방용 단백질 등의 치료용 단백질은 고부가가치의 당단백질이 대부분이다. 고생산성의 재조합 세포주의 연구 개발은 산업계의 집중적인 투자를 받으며 빠르게 성장하고 있는 산업기술의 한 분야이다.

최근 누에를 포함한 인시목 곤충숙주계는 Baculovirus를 이용한 고효율재조합단백질생산계로서 이용되고 있다. 곤충세포는 생산하는 단백질이 포유류 유래의 세포처럼 N-glycosyl화 하는 것이 큰 이점이지만 복잡하게 분지 구조를 가지는 당쇄와 말단이 sial화된 N-glycan이 부가된 단백질을 만드는 것이 불가능 한 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 누에유래의 세포주에 곤충세포에 존재하지 않는 2종의 sial기 전이효소, 2종의 acetyl-glycosamine 부가효소 및 Galactose부가효소를 포유류세포에서 클로닝해서 인간형 당쇄 재조합 단백질 부가가 가능한 효소를 도입한 세포를 제작한다. 또한 제작한 세포에서 인간유래의 단백질을 생산하여 그 분지구조와 N-glycan 말단을 해석하며 이를 통해 고부가가치의 인간형 당단백질을 생산 할 수 있는 곤충세포주를 확립하고자 한다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 곤충세포에 존재하지 않는 포유류유래의 2종의 sial기 전이효소, 2종의 acetyl-glycosamine 부가효소 및 Galactose부가효소를 클로닝하여, 누에유래의 세포주에 인간형 당쇄 재조합 단백질 부가가 가능한 효소를 도입한 세포주를 구축하여 인간 유래 당단백질 Epidermal Growth Factro Like-7(EGFL-7), Fibronectin(FN), Erythropoietin(EPO) 등을 발현시켜 당단백질을 확보하여 그 당쇄구조를 밝힌다.

## IV. 연구개발결과(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

포유류세포부터 2종의 시알기전이효소(ST3, ST6), 2종의 아세틸글리코사민 부가효소(MGAT I, MGAT II) 및 갈락토스 부가효소 (B4)를 클로닝하는데 성공하였으며, 5개유전자는 UAS

promoter 아래에 MGAT1/B4GalT1와 MGAT2/ST3/ST6 발현하는 multi-vector를 구축하였다. 또한 유전자 도입세포를 선별하기 위한 마커벡터로 p10 Gal4/ie2 puromycin을 제작하여 공발현하여 5개 유전자를 도입한 stable 세포주를 구축하였다. 본 연구에서는 복수의 당효소 MGAT1/B4, MGAT2/ST3/ST6 및 MGAT1/B4/MGAT2/ST3/ST6를 도입한 세포라인을 구축하는 한편 Transcient cell linem을 통하여 5개 인간형 당쇄부가효소유전자가 곤충세포공장에서의 당부가 영향을 분석하였다. 또한 당단백질생산을 위해 UAS와 결합할 Gal4 단편을 포함한 발현벡터에 타겟유전자인 EGFL7, FN, EPO 등을 삽입하여 바이러스벡터를 구축하였다. 타겟바이러스에 감염된 Stable 또는 transcient 세포주에서는 5개 유전자의 발현을 RT-PCR을 통하여 확인하였다. Trancient와 Stable 세포주에서 각 단백질은 당쇄가 부가된 형태로 발현하였으며 galactose 등이 부가되었음을 lectin 반응을 통해 확인하였다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구를 통하여 개발된 형질전환 세포주는 대장균과는 달리 post-translation 수식을 가지는 누에곤충 세포주를 한층 업그레이드 하여 인간형에 가까운 단백질을 생산가능성을 높일 것이다. 이를 이용한 단백질 생산사업의 성공은 소규모의 설비에서 대응이 가능하고 사람을 포함한 포유류 유래의 단백질을 대량으로 확보하여 치료용이나 혈액 단백질 등의 의약품에 관련 된 단백질을 값싸게 대량생산 가능한 생산계를 개발 할 수 있을 것이며 보다 값싸고 안전한 의약품에 관련 된 단백질을 공급할 수 있는 생산 시스템 설비구축에 일조할 것이다. 또한 본 연구결과는 세포주뿐만 아니라 순화된 곤충인 누에에 접목할 수 있는 기반이 될 것이며, 생산성과 효능을 극대화한 바이오의약품을 생산하는 연구의 바탕이 될 것으로 기대된다.

## SUMMARY

### (영문요약문)

Many higher eukaryotic glycoproteins have glycans with terminal sialic acids, which directly or indirectly influence their functions. Recombinant mammalian glycoproteins produced by the baculovirus-insect cell expression system usually do not have structurally authentic glycans. One reason for this limitation is the virtual absence in insect cells of certain glycosyltransferases, which are required for the biosynthesis of complex, terminally sialylated glycoproteins by mammalian cells. In this study, we genetically transformed insect cells with mammalian mannosyl (alpha-1,3)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase (MGAT I), mannosyl (alpha-1,6)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase (MGAT II), Beta-4-Galactosyltransferase (GalT1), beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase (ST3), and beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase (ST6) genes. This produced a new silkworm cell line that can express 5 glycosyltransferase genes, serve as hosts for baculovirus infection and produced hFN, hEPO, hEGF glycoproteins with terminally modified N-glycans.

Our system can be applied to various combinations of baculovirus-insect cells to produce recombinant glycoproteins with mammalianized N-glycans.

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

### Chapter 1. Introduction

Section 1. Objectives

Section 2. Rationale

### Chapter 2. Status of technology

Section 1. Technology status of international and domestic

Section 2. Market status of international and domestic

Section 3. Intellectual property status of international and domestic

### Chapter 3. Experimental results and discussion

#### Section 1. Experimental methods

1. Cell culture

2. Construction of transfection vectors carrying human glycosyltransferase cDNA

3. Cotransfection and purification of the recombinant baculoviruses

4. Infection of recombinant baculoviruses and expression of recombinant proteins

5. Transgenic silkworm cell

6. GlcNAcase suppression by chemical inhibitor

7. Transcription analysis

8. Purification of recombinant proteins and in vitro endoglycosidase treatment

9. SDS-PAGE, Western blot, and lectin-binding analysis

#### Section 2. Experimental results

1. Establishment of stable cell lines transfected with glycosyltransferase

2. Expression of fibronectin in stable engineered silkworm cell lines

3. Expression of Erythropoietin in stable engineered silkworm cell lines

4. Time course of production of FN, EPO, and EGFL7 produced Bm and TG cells.

5. Transcriptional Expression of glycosyltransferase genes according to succeeding a generation in engineered silkworm cell lines

6. Effect of chemical inhibitor-mediated GlcNAcase suppression on N-glycan structures

7. Expression of fibronectin in transiently engineered silkworm cell lines

8. Expression of Bone Morphogenetic Protein in transiently engineered silkworm cell lines

9. Identification of novel Glycosyltransferases in silkworm cell

### Chapter 4. Achievements and contributions

Section 1. Research objectives and points of evaluation

Section 2. Achievements and contributions

Chapter 5. Research outcomes and applications

Section 1. Research outcomes

1. Publications

2. Conference presentations

3. Accession of Noble gene in NCBI

Section 2. Applications of research outcomes

1. Ongoing applications

2. Future plan

Chapter 6 Scientific and technical information obtained from international collaboration

Chapter 7. References

# 목 차

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

- 제 1 절 연구개발의 목적
- 제 2 절 연구개발의 필요성

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 제 1 절 국내외 기술현황
- 제 2 절 국내외 시장현황
- 제 3 절 국내외 지식재산현황

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구방법

1. 세포배양
2. 형질전환백터의 구축
3. 재조합 벡로 바이러스의 구축과 분리
4. 재조합 벡로바이러스 감염과 단백질 발현 및 분리
5. 형질전환 세포
6. 화학적방법에 의한 GlcNAcase의 억제
7. RT-PCR
8. 재조합단백질 분리와 endoglycosidase 처리
9. SDS-PAGE와 immunoblot 분석

### 제 2 절 연구결과

1. Glycosyltransferases 도입 세포 수립
2. Stable 형질전환세포에서 Fibronectin의 발현 및 당쇄구조 해석
3. Stable 형질전환세포에서 Erythropoietin의 발현 및 당쇄구조 해석
4. 정상세포와 형질전환세포에서 발현된 FN, EPO와 EGFL7 단백질의 시간적 변화
5. 형질전환세포의 계대에 따른 도입유전자의 발현변화
6. 화학적방법에 의한 GlcNAcase 억제에 대한 N-glycan 구조의 효과
7. 일시적 형질전환세포에서의 Fibronectin 발현 및 당쇄구조 해석
8. 일시적 형질전환세포에서의 Bone Morphogenetic Protein 발현 및 당쇄구조 해석
9. 누세포에서의 새로운 Glycosyltransferases의 확인 및 클로닝

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- 제 1 절 연구목표 및 평가의 착안점
- 제 2 절 목표달성도 및 관련분야에의 기여도



제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 논문
2. 학회발표
3. 신규유전자등록

제 2 절 성과활용 계획

1. 성과활용 실적
2. 성과활용 계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

누에유래의 세포주에 곤충세포에 존재하지 않는 2종의 sial기 전이효소, 2종의 acetyl-glycosamine 부가효소 및 Galactose부가효소를 포유류세포에서 클로닝해서 인간형 당쇄 재조합 단백질 부가가 가능한 효소를 도입한 세포를 제작하여 형질전환 세포주에서 생산된 당쇄단백질의 분지구조와 N-glycan 말단을 해석하며 이를 통해 고부가가치의 인간형 당단백질을 생산 할 수 있는 곤충세포주를 확립하고자 한다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

대규모 게놈 해석 기술의 진보에 의해, 생명공학 연구목적 유전자의 1차 구조 정보를 입수하는 것은 대단히 쉽게 되고, 연구대상은 단백질의 기능과 구조해석으로 옮겨지고 있다. 유전자의 1차 구조 정보를 중심으로 재조합단백질을 생산하는 방법은 확립되어 있지만 현실에는, 생리활성을 가진 재조합 단백질이 생산 불가능 한 것도 많다. 이 이유는 다양하지만 재조합 단백질 자체는 생산 가능한 것, 활성이 검출되지 않는 경우에는 단백질의 번역 후 수식이 관계하고 있는 것이 많다. 특히 분비형 단백질에서는 당쇄 수식이 그 생리활성에 중요한 역할을 담당하고 있는 것이 다수 보고 되어져 있다.

누에를 포함하는 인시목 곤충 숙주계는 baculovirus를 이용한 고효율 재조합 단백질 생산계로서 이용되고 있다. 곤충세포는 대량의 단백질을 분비하는 능력을 갖추고 있을 뿐 아니라 생산되는 단백질이 포유류유래의 세포처럼 N-glycosyl화하는 것이 큰 이점이지만, 복잡하게 분지구조를 가진 당쇄나 말단이 sial화 된 N-glycan을 부가 된 단백질을 만들지 못한다고 생각되고 있다.

한편, 인시목 곤충에서 실제로 말단이 sial화 된 N-glycan 수식이 존재하지 않는 것인가의 물음에는 과학적인 근거 있는 결론이 나오지 않고 있는 상태이다.

최근 biotechnology의 급속한 발전에 의해 생물에 내재하고 있는 다양한 단백질의 산업으로의 이용은 지금까지 예상하지 못했던 정도의 큰 가능성을 보여주기 시작했다. 종래의 기술에 의한 천연재료에서 단백질의 정제, 기능해석에 의한 새로운 생리, 약리기능의 해명을 더해, 분자생물학적 및 생화학적 수법에 의한 단백질간의 상호작용, 당단백질을 코드하는 유전자의 망라적발현 해석 등의 미지 단백질의 기능예측도 가능하게 되었다. 단백질의 구조 해석과 그 기본구조를 근거로 한 컴퓨터상의 새로운 기능 단백질의 디자인도 일부에서는 실용화 되고 있다. 어느 경우도 활성을 가지는 정제 단백질을 일정량 입수하면 연구의 전망은 밝다. 이들 문제의 유효한 해결법의 하나로 재조합 단백질의 생산숙주로 안정성이 높은 곤충 세포주를 이용한 생산계를 들 수 있다.

초기의 유전자 재조합 단백질은 증식이 빠르고 대량배양이 용이하며 저렴한 배양 환경의 대장균 등에서 생산하였으나 인체 단백질의 복잡한 구조를 적절히 구현하루 수 없어, 진핵 세포

인 효모 등에서 생산하게 되었다. 그러나 효모 등에서의 생산은 자체 분해효소에 의해 외래 인체단백질을 분해하거나 정확한 당쇄 부가 능력이 떨어지며 생산 수율이 낮은 단점을 지니고 있다. 이를 개선하기 위해 동물 유래의 세포에서 인체 단백질을 생산하게 되었다. 동물 세포는 인체 유래 단백질에 정확한 입체구조와 당쇄를 부가하는 반면, 성장 속도가 느리고 배양 환경 조절이 어려우며 배양기와 배양배지의 가격이 높은 단점을 가지고 있다. 이러한 동물세포를 이용해 배양기와 배양배지의 가격을 낮추거나 개발에 들어가는 시간을 줄이고 생산과 효능을 극대화한 치료용 단백질을 생산하기 위한 연구에 관심이 집중하고 있다. 이러한 치료용 단백질은 세포조절 단백질, 면역조절 단백질, 효소 및 저해제 예방용 단백질 등으로 분류되고 있다. 현재 FDA의 승인을 얻어 시장에 나와 있는 재조합 의약품들의 약 60-70%가 동물세포 배양 방법을 사용하여 생산되고 있으며, 특히 고부가가치의 당단백질 대부분이 동물세포 배양 방법으로 생산되기 때문에 고생산성의 재조합 세포주의 연구 개발은 산업계의 집중적인 투자를 받으며 빠르게 성장하고 있는 산업기술 분야이다.

곤충을 이용한 단백질 생산계는 이미 포유류 관련 인시들에서는 사용이 진행되고 있다. 다양한 형질전환세포주가 연구되고 있지만 결과는 미비한 상태이다. 대장균, 효모, 동물세포(CHO, BHK)에 의한 유전자 재조합 단백질 생산보다 본 연구에서 제안하는 인간유래 당쇄세포를 도입한 곤충세포주 제작은 이전 시스템의 단점을 보완할 수 있는 기술이 될 것이다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내·외 기술 현황

#### (1) 재조합단백질 생산 능력의 한계

: 신규 허가 단백질 의약품들의 폭발적인 증가와 투여량이 높은 치료용 항체의 신규 개발 확대로 2008년부터 재조합 단백질 생산능력의 한계 상황으로 보다 효율성 높은 발현 시스템과 생산 시설이 요구되고 있다.

#### (2) 난발현 단백질의 생산 문제

: 의약적으로 매우 중요한 단백질 그룹은 분비 단백질(secretory protein) 및 막 단백질(membrane protein)들로 대부분 재조합 생산이 어려운 난발현성(difficult-to-express) 단백질이어서 개발이 어려운 실정이다.

#### (3) 고품질의 인체형 단백질 생산

: 인체 유래 단백질에 가까운 재조합 단백질을 생산하기 위한 연구가 경쟁적으로 진행 중이며 특히 미국과 일본을 중심으로 당쇄 구조와 기능연구(Glycomics) 기반의 발현시스템 및 당쇄 재설계 기술 개발이 집중적으로 진행 중이다.

#### (4) 미생물발현 시스템을 이용한 개발의 한계

: 미생물 발현시스템은 고등 진핵세포 발현시스템에 비해 생산단가가 저렴하며 생산 공정이 간단하다는 장점이 있으나, 단백질 폴딩 및 당쇄 부착 같은 단백질 합성 후 수식이 정확하지 못하다는 단점이 있어 이를 해결하기 위한 기술개발에 주력하고 있다.

#### (5) 미생물 유전체 정보 기반 숙주 세포 개발

: 원핵 미생물을 이용하여 기존 연구의 틀을 벗어난 다양한 분비시그널의 이용, inclusion body 형성을 제어하는 방법, N-말단에 메티오닌 첨가 등의 다양한 방향으로 연구를 수행하는 한편 미생물을 대상으로 신규 발현시스템을 개발하기 위한 연구도 활발하게 진행되고 있다.

#### (6) 진핵 미생물 발현시스템의 개발

: 효모와 사상성 진균류로 대표되는 진핵 미생물을 이용한 발현시스템을 이용하여 고등생물 유래의 의약품 단백질 대량생산에 보다 유용한 숙주 시스템으로 개발 이용 중이다.

#### (7) 미생물 발현 시스템의 문제점을 해결하기 위한 다양한 발현 기술의 개발

- ① 분비/막 단백질의 soluble expression 을 위하여 다양한 folding modulator 개발 (스웨덴 Stockholm 대학)
- ② ER chaperone을 동시에 과발현하는 기술을 개발하여 난분비 단백질의 분비능을 향상하여 분비단백질의 고발현을 유도하는 기술 등이 시도
- ③ 곰팡이 발현시스템에서 Gene Fusion 기술을 이용하여 인간 유래의 단백질의 분비능을 향상시키기 위한 개발 연구가 진행 중이다.

- ④ 신규단백질 기능과 구조 분석을 위한 구조 유전체 및 단백질체 연구를 지원할 수 있는 초고속 발현 및 분리 정제 시스템 연구가 개발 중이다.
- ⑤ 우수한 분비 발현 능력을 가진 새로운 산업용 효모 균주들을 당쇄 경로 재설계를 통해서 동물세포 대체 생산시스템으로 개발하려는 연구가 주목 받고 있다.
- ⑥ 당쇄 생합성 능력이 없는 대장균내 *Campylobacter jejuni* 유래의 당쇄 생합성 관련 유전자 오페론을 발현시켜 비진핵 세포형태의 당쇄 합성능력을 지닌 재조합 대장균을 개발하고 있다(Science 298, 1790-1793, 2003).

## 제 2 절 국내·외 시장 현황

### (1) 국내 의약품 단백질 시장 동향

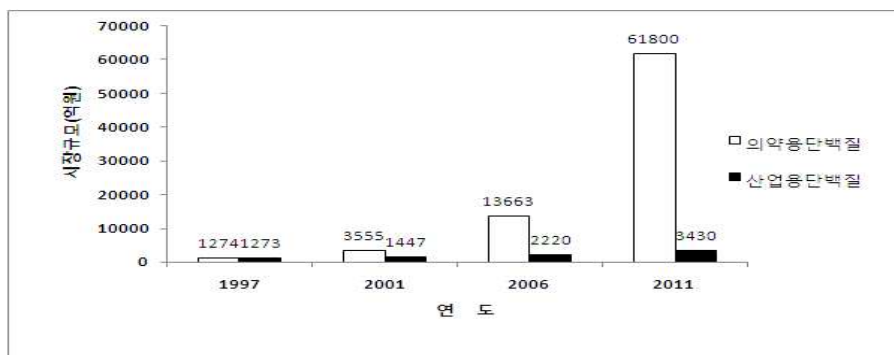
- ① 1990년대 중반부터 일부 재조합 의약품들이 시장에 출시되고 있으나 국내 조합 의약품 시작은 미국과 비교할 때 태동기 또는 유아기 단계에 머물고 있으며 2000년 기준 국내 시장규모는 세계시장의 1.1%, 미국의 2.7% 수준이다.
- ② 국내 의약품 단백질 제품의 시장규모는 1997년 기준으로 약 1,274 억원 규모에서 2003년도 약 1조원 규모로 연평균 20-30%씩 고성장을 하고 있다.

<표 의약품 단백질 국내시장규모 (단위: 억원)>

년도	1997년	2000년	2001년	2006년	2011년
시장규모	1,274	2,750	3,555	13,663	61,800

\* 자료: Technology Roadmap, 단백질 제품, 산업자원부, 2001. 08

- ③ 1997년에는 의약품 단백질과 산업용 단백질의 비율은 약 1:1 정도로 집계되었지만 2001년에는 의약품 단백질의 비중이 2배 이상 증가하였다.



\*연도별 단백질 제품 국내 시장 규모(산자부 산업기술개발 사업보고서 인용)

- ④ 국내 단백질의약품 시장의 대표적인 성공사례로 녹십자와 LG의 재조합 B형 간염백신이

있으며 국내외적으로 지속적으로 매출성장을 유지하고 있다. 당뇨병치료제인 인슐린의 수입 판매를 시작으로 인터페론, 성장호르몬, EPO 등이 국내 자체 기술로 개발되어 시판되고 있으나 대부분 선진국의 기존 제품을 국산화 것이다.

<표 국내에서 판매되고 있는 의약품 단백질 제품>

재조합단백질	개발사 및 상품명	기능	비고
B형 간염백신	녹십자, LG생명과학, CJ	B형 간염예방	독자기술
인슐린	녹십자, 대웅제약, 종근당, 보령제약	당뇨병치료제	수입판매개발중
인간성장호르몬	LG생명과학, 동아제약, 녹십자	왜소증치료제	독자기술
GM-CSF	LG생명과학	항암보조제	독자기술
G-CSF	동아제약, 녹십자	항암보조제	독자기술
인터페론 알파	LG생명과학, 동아제약, 녹십자, CJ	항암보조제	독자기술
인터페론 감마	LG생명과학, CJ	항암보조제	독자기술
EPO	LG생명과학, CJ, 동아제약	빈혈치료제	독자기술
상피세포성장인자	대웅제약	당뇨성궤양	독자기술
PTH	녹십자, 동국제약	골다공증치료	독자기술 개발중
FSH/LH	동아제약	불임치료제	개발중
혈소판응집억제	이수엠피스	심혈관질환	임상중
Factor VII	녹십자	혈우병치료제	개발중

\*자료 : 한국보건산업진흥원, 재조합 단백질 의약품 시장동향, 2005. 2, p. 13.

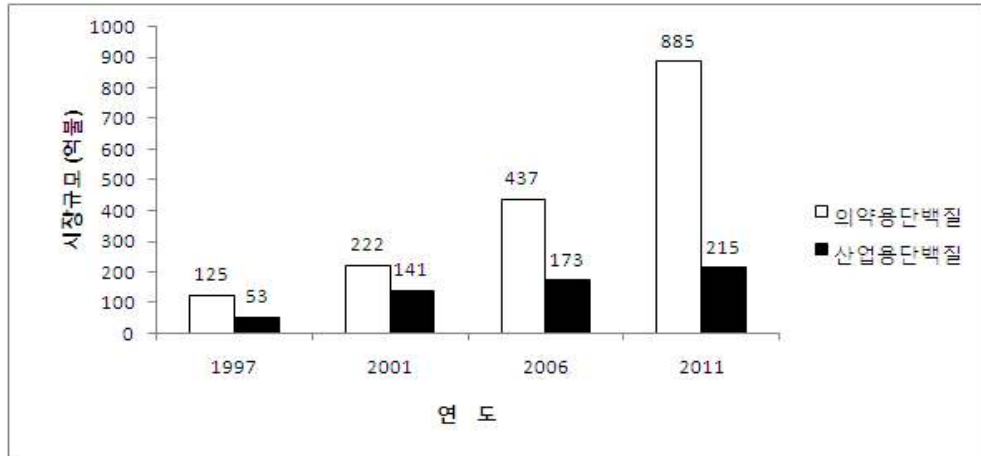
## (2) 국외 의약품 단백질 시장 동향

① 세계 제약시장의 주력이 기존의 화학합성 의약품에서 바이오 의약품으로 빠르게 전환되고 있으며 이중에서도 재조합 단백질의 시장 점유율이 가장 높아져, 21세기에는 안정성 및 치료효과가 개선된 재조합 단백질 치료제로 대체 가능성이 전망되고 있다.

	주요 약물형태	주도기업	산업화 역사	시장규모		
				2003년	2010년	증가율
바이오신약	재조합단백질 (백신, 항체, 호르몬, 효소)	바이오기업 연구기관	20여년	380	1300	340%
기존신약 (합성신약)	화합물질	다국적 제약회사	200여년	4200	6700	160

② 단백질제품의 세계 시장 규모는 1997년 188억 달러에서 2001년 2배에 달하는 363억 달

러가 되었고, 이후 지속적인 성장을 거듭하여 2011년에는 1,100억 달러가 될 것으로 추산된다. 이중 산업용 단백질에 비해 의약품 단백질이 차지하는 비중은 계속 커져서 2011년에는 4배가 넘는 수준이 될 것으로 예상된다.



\*연도별 단백질 제품 세계 시장 규모(산자부 산업기술개발 사업보고서 인용)

③ 미국과 유럽에서 현재까지 165종의 단백질 의약품이 허가되어 시판중이다. 재조합 단백질 의약품 2010년까지 EPO, G-CSF, 인슐린 및 인터페론 등의 사이토카인/호르몬 계열의 제품들이 주도할 것으로 예상하고 있으나 치료용 항체 계열의 제품들이 계속적으로 시장에 진입하여 판도는 급격히 변하고 있다.

<표 주요 바이오의약품 계열의 판매순위 및 현황>

순위	주요계열	2005년매출 (억달러)	주요제품(브랜드)
1	EPO	108.5	Aranesp, Procrit, Epogen, N대-Rcomron 등
2	TNF-alpha	76.4	Enbrel, Remicade, Humira 등
3	Insulin	72.1	Humalog, Humulin, Lantus, Levmir, 등
4	anti-cancel antibody	67.7	Rituxan, Herceptin, Avastin, Erbitus 등
5	G-CSF	37.8	Neulasta, Neupogen, Neutrogen
6	interferon-beta	37.7	Avonex, Rebif, Betaferon
7	hGFP	23.1	Genotropin, Norditropin, Humatrope, 등
8	항응고제	21.9	Novoseve, Kogenate, Refacto, Benefix 등
9	interferon-alpha	21.1	Pegasys, Pegintron, Intron A 등
10	효소치료제	12.5	Cerezyme, Fabrazyme, Aldurazyme 등
11	항바이러스 항체	11.0	Synagis
12	FSH	9.7	Hormones Gonal-f, Puregon 등
	총합계	499.5	

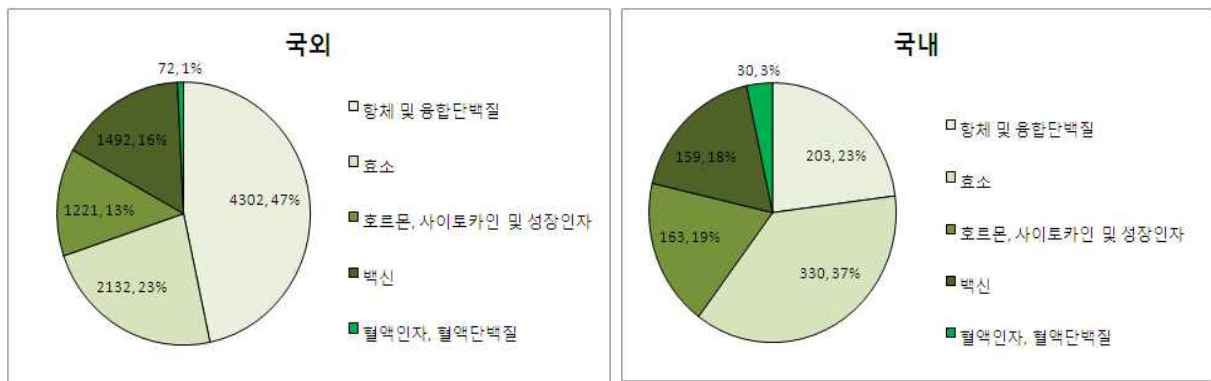
\* La Merie S.L 시장보고서 2006

④ 바이오제너릭과 슈퍼 바이오제너릭(개량형 신약)의 시장에 진출되었으나 단백질 의약품

의 경우 고분자 물질로서 복잡한 구조와 그에 따른 비동질성 때문에 최종산물이 다를 수 있다는 개념이 널리 인정되고 있다. 그러나 이러한 미국의 경향과 달리 유럽에서는 간소화된 허가과정을 인정하는 Biosimilar의 개념을 두고 있다.

### 제 3 절 국내·외 지식재산권 현황

(1) 국외의 경우, 9,219건의 특허 중 약 절반이 항체 및 융합단백질에 관한 것이며 뒤를 이어 효소, 백신, 등에 관한 것들였고 반면 국내특허에는 885건 중에서 효소에 관한 특허가 가장 많았다(위즈도메인사의 Focust 특허 DB, 1991년 1월 1일-2006년 8월 17일).



\* 단백질 의약품 분류별 특허 출원 등록 건수 및 비율

(2) 연도별 출원/등록 추이를 분석한 결과 전체 단백질 의약품 개발 관련 특허는 국내외 모두 빠른 속도로 그 수가 증가하고 있다. 국외의 경우는 특히 항체 및 융합단백질 부분에서 국내의 경우는 효소부분에서 그 증가세가 뚜렷하다.

(3) 주요 출원기관은 외국의 경우 Millennium(항체 및 융합단백질 분야 738건), Eli Lilly(효소 분야 38건), Human Genome Science(호르몬, 사이토카인, 및 성장인자 분야 41건), Chiron(백신 분야 28건), Corvas International(혈액인자, 혈액단백질 및 항응고제 분야 15건)등이 각 제품군의 주요 특허 출원기관으로 분석되었으며, 국내 특허의 경우 한국과학기술연구원, LG화학 등이 주요 출원기관으로 분석되었다.



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구방법

#### 1. 세포배양

누에의 BmN과 Bm5 세포는 25°C에서 5%의 열처리된 fetal bovine serum(GIBCO)을 포함하는 TNM-FH에서 계대 배양되었다. 형질전환 된 세포 역시 같은 배지에서 배양되었다. 부착세포인 누에세포는 25 cm<sup>2</sup> 플라스크(SPL)에 2.0 x 10<sup>6</sup>/ml의 밀도로 유지되었으며 5일에 한번씩 80%로 계대배양 하였다.

#### 2. 형질전환벡터의 구축과 세포내 감염

MGAT I(1,338 bp, AAA75523), MGAT II(1,344 bp, NP\_002399), GalT1(1,197 bp, NP\_001488), ST3(990 bp, CAA52662)와 ST6(1,221 bp, 는 Table 1의 프라이머 목록에 따라 National research Institute for Child Health and Development의 인간유래 cDNA library에서 증폭하여 pENTR11 벡터(Invitrogen)에 클로닝되었다. 다섯개의 cDNA는 PCR에 의해 증폭되어 *NcoI*으로 처리하여 pENTR11의 *NcoI-EcoRV*에 서브클로닝되었다. pBac UAS·Glyc 프라스미드는 PCR에 기초하여 mega-priming 법을 사용하여 구축하였다 (Thoma et al., 1998; Hong et al., 2010). Mega 프라이머를 만들기 위해 두 번의 PCR을 하였다. 첫 번째 PCR에서 262 bp의 UAS mini 프로모터 attR1을 증폭하였다. 두 번째 PCR에서 126 bp의 attR2-SV40polyA를 증폭하였다. 이 두 PCR 산물은 pYES-DEST52를 template를 이용해 attR1-DEST-attR2polyA 카세트를 만드는데 이용되었다. Mega priming PCR 산물은 pBac UAS DEST-3xP3 DsRed 벡터를 만들기 위해 pBac 3xP3 DsRed내에 *EcoRI* 사이트에 삽입되었다. pBac UAS DEST-3xP3 DsRed와 5종의 pENTR Glyc는 LR 반응에 의해 pBac UAS MGATI GlyTI-3xP3 DsRed과 pBac UAS MGATII ST3 ST6-3xP3 DsRed 벡터가 만들어 졌다.

24 well 플라스크 (SPL)에 2.0 x 10<sup>6</sup>/ml의 밀도로 배양된 누에세포는 lipofection reagent(Promega)를 이용하여 1μg pBac UAS Glyc 벡터와 1μg pBac Gal4벡터를 cotransfection 하였다. Transfection 한 3일 후 DsRed 발현을 확인하고 유전자가 도입되지 않은 세포는 puromycin 5-10 μg/ml으로 선별하였다. 선별 된 세포는 6 well로 옮겨진 후 25 cm<sup>2</sup> 플라스크 (SPL)에서 계대 배양 하였다.

#### 3. 재조합 베쿨로 바이러스의 구축과 분리

인간유래의 Fibronectin(FN, 1,251 bp, 48 kDa), erythropoietin(EPO, 565 bp, 24 kDa), Bone morphogenetic protein (BMP4, 1,114 bp, 42 kDa), Epidermal Growth factor like-7(EGFL-7, 821 bp, 30 kDa) cDNA는 MegaMan Human Transcriptome와 National

research Institute for Child Health and Development의 인간유래 cDNA 라이브러리에서 얻어졌다. 벡로바이러스 transfer 플라스미드는 p10과 polyhedrin 프로모터를 포함하는 pFastBac dual 시스템(Invitrogen)을 사용해서 제작되었다. UAS의 activation 사이트인 Gal4NfkBp65를 코드하는 DNA단편은 his-tag를 가지는 pDEST10에 클로닝하였다. 각 유전자는 LR 반응후에 벡로 transfer 플라스미드는 BmDH10Bac에 형질전환되었다. E. coli 세포내에서 발현카세트는 Tn7 transposase에 의해 bacmid 내에 도입되었다(Park et al., 2007). 재조합 bacmid DNA는 누에 세포내(BmN, Bm5)에 각 유전자의 재조합 baculovirus를 만들기 위해 lipofection reagent(Promega)을 사용해서 감염하였다. 감염 3일 후 배양배지는 모아지고, 감염은 적당한 titer 바이러스 용액을 얻기 위해 2번 반복하였다.

#### 4. 재조합 벡로바이러스 감염과 단백질 발현 및 분리

누에세포는 5-10 Pfu의 Multiplicity Of Infection(MOI)로 25 cm<sup>2</sup> 플라스크(SPL)에 2.0 x 10<sup>6</sup>/ml의 배양되었을 때 감염하였다. 감염 3-5일 후 배양배지와 세포를 원심분리(3,000 rpm)으로 분리하였다. 분비형 단백질을 위해 배양배지와 세포내 단백질로 세포를 수거하여 각각 분석하였다. 세포내 lysate는 세포를 추출버퍼(50mM CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na, 0.3M NaCl, 1% NP40, 10% glycoerol, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 10% complete, ph 7.0)에서 균질화하여 원심분리(20,000g, 30분)에 의해 세포잔해물을 제거하였다. 상청액은 필터링(Milipore)하여 가용액(soluble fraction)으로 모았다.

#### 5. 형질전환 세포

UAS·MGAT I/GalT1와 UAS·MGAT II/ST3/ST6는 BmN과 Bm5 세포에 각각과 두백터를 함께 24 well내에서 감염하였다. 감염 2-3일 후, DsRed 발현으로 감염정도 및 UAS와 Gal4의 결합을 확인한 후 5-10μg/ml puromycine을 처리하여 미도입 세포를 선별하였다. 세포의 안정화를 위해 새로운 배지를 교환한 후 6 well, 25 cm<sup>2</sup> 플라스크로 옮겨 계대 배양하였다. 계대배양에 따른 유전자 발현의 확인은 RT-PCR로 수행하였다.

#### 6. 화학적방법에 의한 GlcNAcase의 억제

BmN세포의 배지에 1mM 2-acetamido-1,2-dideoxynojirimycin(2-ADN, Tront Research Chemical, North Yo가, Ontario, Canada)이 더해지고 세포는 1-2일 배양되었다. 2-ADN이 더해진 세포에 FN과 EPO 바이러스 용액을 감염하였다. 3-4일 후 각 단백질 발현과 GlcNAcase의 활성을 확인하였다. GlcNAcase 억제 분석은 1000 x g에서 5분 원심분리 후 상청액을 효소샘플로 사용하였다. 효소샘플 50ul에 기질액(1mg/ml p-nitrophenyl-B-dN-acetylglucosaminide, 0.2M citrate phosphate buffer pH4.0)을 혼합한 후 37°C에서 1시간 처리한다. 반응은 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 의 2ml 부가에 의해 정지하고 420 nm의 흡광도를 측정한다. 이때 지시물은 p-nitrophenol을 사용하였다.

## 7. RT-PCR 분석

각 시험에 알맞은 시기의 세포에서 total RNA가 Trizol(Invitrogen)을 이용해 분리하였다. cDNA는 1 $\mu$ g의 total RNA를 template로 하여 ReverTra Ace oligo (dT)를 이용해 합성하였다(Toyobo). 5종의 glycosyltransferase와 Gal4NfkBp65의 발현을 확인하기 위해 각 primer로 확인하였다(Table 1). PCR은 먼저 95 $^{\circ}$ C 5분으로 denature 한 후, 95 $^{\circ}$ C 15초, 57 $^{\circ}$ C 15초, 72 $^{\circ}$ C 1분정도 27 사이클 반복한 후 72 $^{\circ}$ C 5분 후에 1% agarose gel에서 분리하여 확인하였다. 누에의 actin 3를 control로 사용하였다.

## 8. 재조합단백질 분리와 endoglycosidase 처리

재조합단백질은 Ni affinity 컬럼 (Protino와 HisTrap FF)을 사용하여 크로마토그래피 친화성에 의해 분리하였다. Cell lysate는 2배의 binding buffer(20mM sodium phosphate, pH 7.4, 150mM NaCl, 10% glycerol)로 희석되고 배지는 그대로 컬럼에 분주하였다. His가 붙여진 재조합 단백질은 100- 250mM imidazole에서 용출되었다. 각 용출액은 10-12% SDS PAGE에서 분리되고 His probe( )에 의해 확인 하였다.

분리된 당단백질은 PNGase F(NEB)를 37 $^{\circ}$ C에서 1-3시간 처리하여 N-glycan을 western blot으로 확인하였다.

## 9. SDS-PAGE 및 immunoblot 분석

전기영동은 10-12% SDS-PAGE를 사용하였고 PVDF membrane(Millipore)에 옮겨졌다. Membrane은 1% skim milk와 0.1% Tween 20이 포함된 TBS(20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.5)에서 blocking 하였다. Blockin 후 membrane은 HisProbe HRP (Pierce)에 5000:1fh 희석하여 1시간 처리하였다. 이어서 AP-conjugated anti-rabbit IgG 2차 항체 (Amersham)로 1시간 처리하여 씻어낸 후 ECL(Amersham) 시스템을 사용하여 확인하였다. 단백질에 붙은 당쇄를 분석하기 위해 biotin의 결합된 -ConA(*Canavalia ensiformis* Agglutinin), -WGA (Wheat Germ, *Triticum aestivum* Agglutinin), -RCA120 (*Ricinus Communis* Agglutinin-120), -LTL (*Lotus tetragonolobus* Agglutinin) 등을 이용하여 lectin blot을 하였다(Table 2). 영동 후 전사 된 membrane은 HRP-conjugated streptavidin (EN-N100; Thermo)로 1시간 처리하고 TBST로 세정의 과정 후 0.03 DAB 버퍼로 확인하였다.

Table 1. Primers used in this study

	Primer name	Sequence (5'-3')
UAS cassette	NotI-UAS (forward)	GGGGCGGCCGCCCGCTAGACGGAGTACTGTC
	UAS-attR1 (reverse)	GCTTTTTGTACAAACTGTATTTGAATATTAATCACTG
	attR2-SV40 (forward)	AGCTTTCCTGTACAAAGTGGTTGTTTATTGCAGCTTATAA
	NotI-SV40 (reverse)	GGGGCGGCCGCAGACATGATAAGATACATTGATGA
Expression vecotr	A3-GAL4NfKb65( forward)	AGATATCAAGCTTATCGATACCG
	A3-GAL4NfKb65( reverse)	TAGATCTTTGGGTACCGGGC
	ie2-Puromycin (forward)	GTTTCATGATGATAAAC AATGTA
	ie2-Puromycin (reverse)	ACGCGCTTGAAAGGAGTGTGTAAATGGACA
Baculo transvector	GAL4NfKb65( forward)	ATGAAGCTACTGTCTTCTATCGAA
	GAL4NfKb65( reverse)	GACCCAGATCATGTTCCGAAACATTCA
Full-length Glyc	MGAT I (forward)	ATGCTGAAGAAGCAGTCTGCA
	MGAT I (reverse)	ATTCCAGCTAGGATCATAGCC
	GaII I (forward)	ATGAGGCTTCGGGAGCCGCTC
	GaII I (reverse)	GCTCGGTGTCCTCGATGTCAC
	MGAT II (forward)	ATGAGGTCCGCATCTACAAA
	MGAT II(reverse)	CTGCAGTCTTCTATAACTTTT
	ST3 (forward)	ATGGTCAGCAAGTCCCCTGG
	ST3 (reverse)	GAAGGACGTGAGGTTCTTGAT
	ST6 (forward)	ATGATTCACACCAACCTGAAG
	ST6 (reverse)	GCAGTGAATGGTCCGGAAGCC
Exogenous Glyc	MGAT I (reverse)	TGTAGTAGCCCTGGAAGCTT
	GaII I (reverse)	TGGAATGATGATGGCCAC
	MGAT II(reverse)	ACAAGTGAATGCTGAAAGG
	ST3 (reverse)	CGAGGAGTGTGTCTGGGTT
	ST6 (reverse)	ACCTGCCCAAGGCCAGC

Table 2. Major N- and O-linked carbohydrate binding specificities of the different lectins used in this study.

Lectin Name	Family	Major Specificity	Control
<b>ConA</b> ( <i>Canavalia ensiformis</i> )	L-type lectin	$\alpha$ -linked <b>Man</b> (N-glycans)	Fetuin /Transferrin
<b>WGA</b> ( <i>Triticum aestivum</i> )	C-type lectin	<b>GlcNAc</b> $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc (N-glycans)	Fetuin
<b>PHA-E</b> (Erythroagglutinating)	L-type lectin	<b>Gal <math>\alpha</math></b> 1-3GalNAc (N-glycans)	
<b>LTL</b> ( <i>Lotus tetragonolobus</i> )	L-type lectin	$\alpha$ -linked <b>Fuc</b> (N-glycans)	
<b>LCA</b> ( <i>Lens culinaris</i> )	L-type lectin	$\alpha$ -linked <b>Man</b> or <b>Glc</b> (N-glycans)	
<b>PNA</b> ( <i>Arachis hypogaea</i> )	L-type lectin	<b>Gal</b> $\beta$ 1-3GalNAc (O-glycan)	Asialofetuin
<b>RCA 120</b> ( <i>Ricinus communis</i> )	R-type lectin	<b>Gal</b> $\beta$ 1-3GalNAc (N or O-glycan)	
<b>DBA</b> ( <i>Dolichos biflorus</i> agglutinin)	C-type lectin	GA $\alpha$ 1-3GA (O-glycan)	
<b>UEA-1</b> ( <i>Ulex europaeus</i> agglutinin)	R-type lectin	F $\alpha$ 1-2G $\beta$ 1-4GL (O-glycan)	
<b>SSA</b> ( <i>Sambucus sieboldiana</i> )	R-type lectin	<b>NeuAc</b> (N-glycans)	Transferrin

## 제 2 절 연구결과

### 1. Glycosyltransferases 도입 세포 수립

누에세포에서 N-glycan 합성의 유전적 수정을 위해 5종의 인간 glycosyltransferase 단백질 -MGAT I, GalT1, MGAT II, ST3, ST6- 외래 단백질 생산에서 인간형 당쇄부가를 위해 선택되었다. MGAT I와 GalT1 또는 MGAT II, ST3와 ST6를 코딩하는 시퀀스를 포함하는 Dual 단백질 발현 플라스미드는 pBac UAS-MGATIGalT1 또는 pBac UAS-MGATIIST36으로 piggyback 형질전환 벡터를 사용하여 제작하였다(Fig 1).

5개의 유전자는 UAS·hsp mini-promoter의 조절로 전사되도록 디자인되었다. 인간유래 5종의 당쇄유전자가 발현하는 누에세포주를 구축하기 위해 각각의 벡터 또는 두 개의 벡터를 동시에 activation 벡터인 ie2·puro/A3·Gal4NfkBp65 플라스미드와 함께 transfection 하였다(Fig 2). Transfection 3일 후 DsRed 발현에 따라 발현정도를 관찰하고 puromycin 처리하여 도입되지 않은 세포는 도태시켜 발현세포만을 계대배양 하였다. 제작 된 세포주는 MGAT1·GalT1(2종), MGATII·ST3·ST6(3종)과 MGAT1·GalT1·MGATII·ST3·ST6(5종)이 발현하는 BmN과 Bm5 세포주가 수립되었다. 형질전환 된 세포는 BmN<sup>M1T1</sup>, BmN<sup>M2S36</sup>, BmN<sup>M12T1S36</sup>, Bm5<sup>M1T1</sup>, Bm5<sup>M2S36</sup>, Bm5<sup>M12T1S36</sup>으로 명명하였다. 수립된 형질전환 세포주에서 도입 된 유전자의 전사체를 RT-PCR로 확인한 결과, 각 도입된 당쇄부가 유전자는 두 세포라인에서 모두 발현이 확인되었다. 5종이 도입된 세포주에서는 MGATi과 GalT1 유전자의 발현이 약했으며 MGATII·ST3·ST6의 전사체는 강하게 발현하였다(Fig 2).

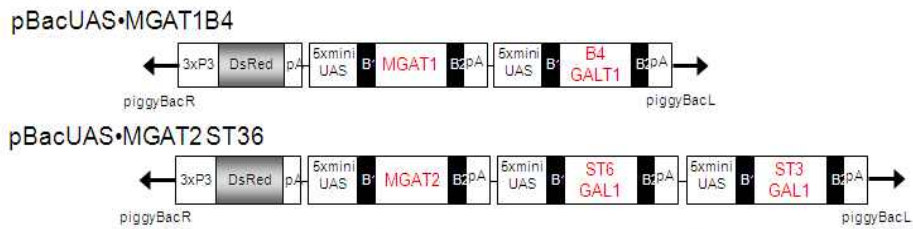


Fig 1. Schema of pBac UAS-MGATIGalT1 and pBac UAS-MGATIIST36 constructs for the piggyback-mediated transformation. A, The MGAT1 (1,338 bp), GalT1(1,197 bp) c DNAs under the control of UASmini promoters were inserted into BglIII and EcoRI sites of pBac3xP3 DsRed vector, respectively, to produce pBac UAS MGATIGalT1 ; B, the USMGAT II(1,344 bp), ST3 (990 bp), and ST6(1,221 bp) c DNAs under the control of UASmini promoters were inserted into BglIII and EcoRI sites of pBac3xP3 DsRed vector, respectively, to produce pBac UAS MGATIIST36. The DsRed gen under the control of 3xP3 promoter was used as a selection marker gene.

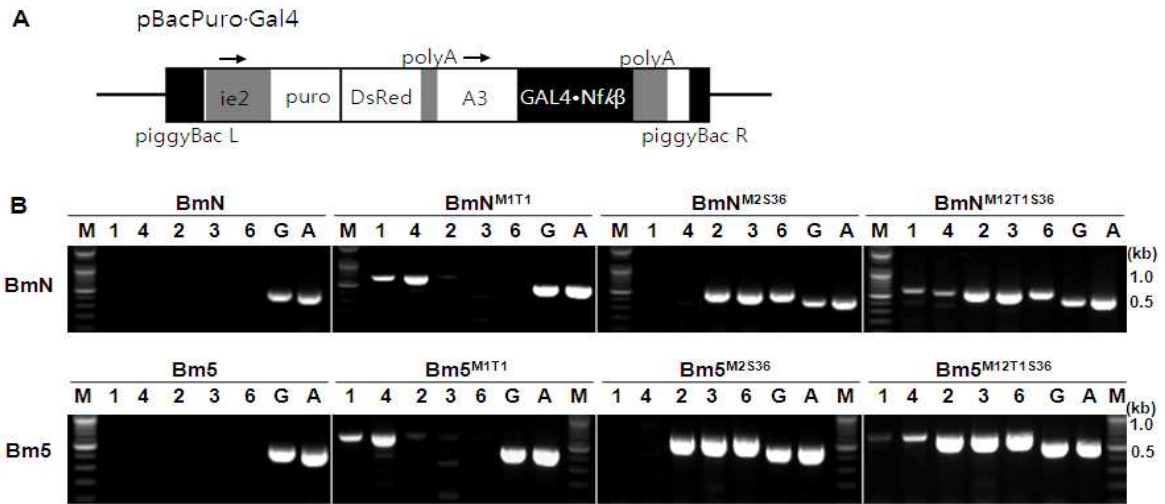


Fig 2. Identification of stable cell lines transfected with 5 glycosyltransferase. A, Structure of a plasmid expressing a Gal4Nf4Bp65 transactivator and puromycin-resistant gene fused to DsRed under the control of silkworm actin A3 or viral ie2 promoter, respectively. B, RT-PCR analysis of 5 glycosyltransferase expression in the BmN, Bm5, and TG cells. RT-PCR analysis was performed using total RNA extracted from parental BmN and Bm5 cells and transgenic BmN<sup>M1T1</sup>, BmN<sup>M2S36</sup>, BmN<sup>M12T1S36</sup>, Bm5<sup>M1T1</sup>, Bm5<sup>M2S36</sup>, and Bm5<sup>M12T1S36</sup> cells. The DNA fragments for coding region of MGATI(1, 550 bp), B4GalT(4, 550 bp), MGATII(2, 550 bp), ST3(3, 550 bp), ST6 (6, 550 bp), Gal4 (G, 441 bp) actin3 (A, 420 bp) were amplified by PCR using specifically designed primers.



## 2. Stable 형질전환세포에서 Fibronectin의 발현 및 당쇄구조 해석

당쇄부가유전자가 도입된 누에세포에서 당쇄부가 효과를 보기 위해 hFN은 p10 프로모타하의 Gal4NfkBp65을 포함하는 transfer 벡터에 polyhedrin 아래에 삽입되었다(Fig 3A). 인간유래 fibronectin(hFN)은 3개의 N-glycosylation 사이트를 포함하는 428개 아미노산의 당단백질이다(Fig 3B, BmNPV11DA-FN1).

재조합 BmNPV11DA-FN1은 BmN, BmN<sup>M12T1S36</sup>, Bm5<sup>M12T1S36</sup>에 각각 감염했다. 재조합바이러스 감염 후, BmN과 Bm5 세포의 형태적 변화는 정상세포와 형질전환세포에서 비교적 비슷한 형태로 진행되었다. 먼저 BmN 세포와 BmN<sup>M12T1S36</sup>감염 72h 후에 배지로부터 분비된 형태의 58 kDa 단백질을 얻었다(Fig 4). 58kDa의 단백질은 hFN 단백질 48 kDa과 His를 포함하는 부가염기서열 3 kDa을 포함한 크기보다 6 - 7 kDa의 더 큰 것으로 확인 되었다. 이는 단백질 합성 후 분비된 단백질에 당쇄가 부가된 것으로 생각되었다. 이에 대한 부가된 N-glycosylation 와 O-glycosylation에 대해 알아보기 위해 PNGase F (N-glycosidase)와 Endo- $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidase (O-glycosidase)를 처리하였다. N-glycosidase가 처리된 hFN 단백질은 52 kDa 정도에서 확인되었으며 O-glycosidase에 처리에 대해서는 밴드의 차이가 없었다 (Fig 4A). 다음으로 우리는 ConA, WGA, LTL, RCA120과 SSA 렉틴항체를 사용하여 부가된 당쇄를 분석하였다. hFN 단백질의 경우 정상세포와 형질전환세포에 부가된 당쇄는 같은 양상을 보였다. 두 세포 모두 mannose, GlcNAc, Fucose, Galactose와 NeuAc(시알산) 등의 당쇄가 확인되었다.

다음으로 Bm5 세포와 Bm5<sup>M12T1S36</sup>감염 72h 후에 배지로부터 BmN 세포와 같은 양상의 분비된 형태의 58 kDa 단백질을 얻었다(Fig 5). 58kDa의 단백질은 hFN 단백질 48 kDa과 His를 포함하는 부가염기서열 3 kDa을 포함한 크기보다 6 - 7 kDa의 더 큰 것으로 확인 되었다. 이는 단백질 합성 후 분비된 단백질에 당쇄가 부가된 것으로 생각되었다. Bm5의 경우 N-glycosylation의 분석 결과 BmN과 같았다(데이터생략). 다음으로 우리는 ConA, WGA, LTL, RCA120과 SSA 렉틴항체를 사용하여 부가된 당쇄를 분석하였다. hFN 단백질의 경우 정상세포와 형질전환세포에 부가된 당쇄는 같은 양상을 보였다. 두 세포 모두 mannose, GlcNAc, Fucose, Galactose와 NeuAc(시알산) 등의 당쇄가 확인되었다(Fig 5A). 곤충세포는 세포성장, 벡터바이러스 감염, 과 재조합단백질 생산을 도와주는 것으로 생각되는 FBS를 배지에 첨가하여 배양되었다(Wu et al 1989). 형질전환세포와 정상세포에서 확인 된 당쇄가 FBS에 의해 영향을 받은 것인지를 확인하기 위해 FBS를 제외한 배지에서 세포배양하여 hFN 재조합단백질을 생산하였다(Fig 5B). FBS가 제외 된 배지에서 LTL과 RCA120에 대한 결합이 FBS가 더해진 배지에서 생산 된 재조합단백질에 비해 약하게 보이거나 결합 되지 않았다. 그러나 정상세포와 형질전환 세포간의 차이는 인정되지 않았다.

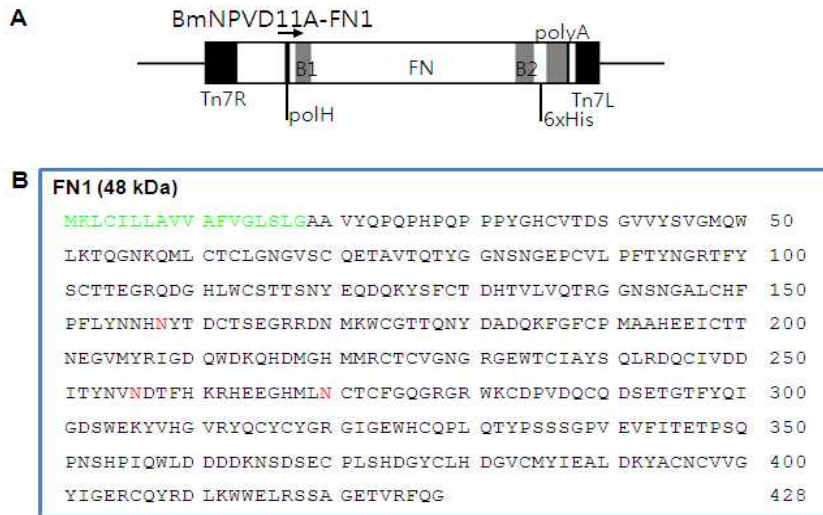


Fig. 3 Recombinant baculovirus vector and amino acid sequences of the hFN expressed in transgenic cell line. A, Structure of His-tagged hFN expression cassettes on recombinant BmNPVs. B, amino acid sequences of hFN; green letters is indicated bip signal peptides; red letters is indicated N-glycosylation sites.

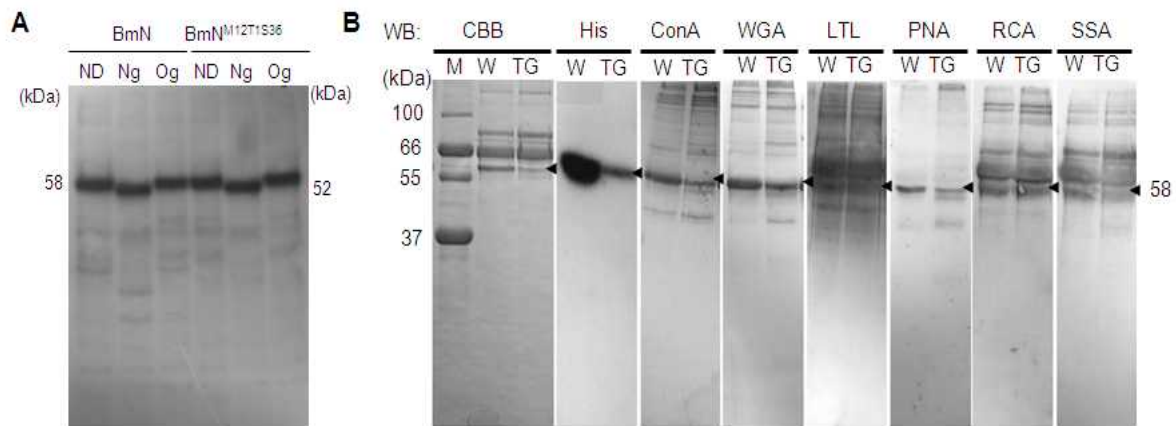


Fig. 4 Expression of hFN in BmN and BmN<sup>M12T1S36</sup>. The supernatants of baculovirus –infected BmN and BmN<sup>M12T1S36</sup> separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB). A, Glycosidase analysis of hFN. hFN was treated No Digestion (ND), PNGaseF (N-glycosidase, Ng) and Endo- $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidase (O-glycosidase, Og). B, The secreted hFN proteins were analyzed with anti-HA and by lectin blotting with ConA, WGA, LTL, RCA120, and SSA; Molecular weight markers are indicated in kDa.

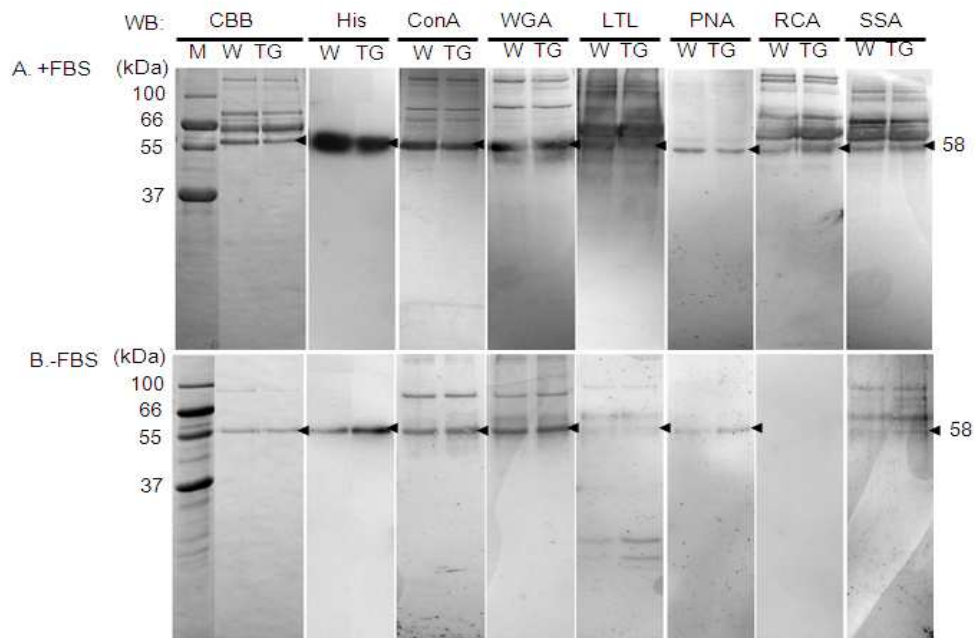
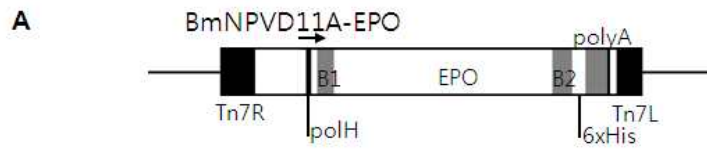


Fig. 5 Expression of hFN in Bm5 and Bm5<sup>M12T1S36</sup>. The supernatants of baculovirus – infected BmN and BmN<sup>M12T1S36</sup> separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB). The secreted hFN proteins were analyzed with anti-His and by lectin blotting with ConA, WGA, LTL, PNA, RCA120, and SSA; Molecular weight markers are indicated in kDa; Cells were cultured in antibiotic –free TNM-FH medium supplemented with (A) and without (B) heat-inactivated FBS.

### 3. Stable 형질전환세포에서 Erythropoietin의 발현 및 당쇄구조 해석

당쇄부가유전자가 도입된 누에세포에서 당쇄부가 효과를 보기 위해 hEPO는 p10 프로모터 아래 Gal4NfkBp65을 포함하는 transfer 벡터에 polyhedrin 아래에 삽입되었다(Fig 6A). 인간 유래 erythropoietin(hEPO)은 3개의 N-glycosylation 사이트를 포함하며 186개 아미노산의 당단백질이다(Fig 6B, BmNPV11DA-EPO). 사람의 EPO는 성숙한 erythrocyte 분화와 증식에 bone marrow erythroid 전구세포를 자극하기 위한 growth factor이다(gOLDWASSER AND kung 1968).

재조합 BmNPV11DA-EPO는 BmN, BmN<sup>M12T1S36</sup>, Bm5<sup>M12T1S36</sup>에 각각 감염했다. 먼저 BmN 세포와 BmN<sup>M12T1S36</sup>감염 72h 후에 배지로부터 분비된 형태의 27 kDa 단백질을 얻었다(Fig 7). 27kDd의 단백질은 hEPO 단백질 20 kDa과 His를 포함하는 부가염기서열 3 kDa을 포함한 사이즈보다 4 kDa의 더 큰 것으로 확인 되었다. 이는 단백질 합성 후 분비된 단백질에 당쇄가 부가된 것으로 생각되었다. 이에 대한 부가된 N-glycosylation과 O-glycosylation에 대해 알아보기 위해 PNGase F (N-glycosidase)와 Endo- $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidase (O-glycosidase)를 처리하였다. N-glycosidase가 처리된 hFN 단백질은 23 kDa 정도에서 확인되었으며 O-glycosidase에 처리에 대해서는 밴드의 차이가 없었다 (Fig 7A). 다음으로 우리는 ConA, LCA, RCA120과 SSA 렉틴항체를 사용하여 부가된 당쇄를 분석하였다. hEPO 단백질의 경우 정상세포와 형질전환세포에 부가된 당쇄는 같은 양상을 보였다. 두 세포 모두 mannose, Fucose, Galactose와 NeuAc(시알산) 등의 당쇄가 확인되었다. RCA와 SSA의 경우 형질전환세포에서 조금 더 진한 밴드가 확인 되었으나 이에 대한 결과는 추후 연구가 필요할 것으로 생각 다음으로 Bm5 세포와 Bm5<sup>M12T1S36</sup>감염 72h 후에 배지로부터 BmN 세포와 같은 양상의 분비된 형태의 27 kDa 단백질을 얻었다(Fig 8). 27kDd의 단백질은 hEPO 단백질 20 kDa과 His를 포함하는 부가염기서열 3 kDa을 포함한 사이즈보다 4 kDa의 더 큰 것으로 확인 되었다. 이는 단백질 합성 후 분비된 단백질에 당쇄가 부가된 것으로 생각되었다. Bm5의 EPO 경우도 N-glycosylation의 분석 결과는 BmN과 같았다(데이터생략). 다음으로 우리는 ConA, WGA, LTL, PNA, RCA120과 SSA 렉틴항체를 사용하여 부가된 당쇄를 분석하였다. hEPO 단백질의 경우 정상세포와 형질전환세포에 부가된 당쇄는 같은 양상을 보였다. 두 세포 모두 mannose, GlcNAc, Fucose와 NeuAc(시알산) 등의 당쇄가 확인되었다. 그러나 Gal 1-3GalNAc에 결합하는 PNA와 RCA120에서 밴드가 확인되지 않았으며 이는 정상세포와 형질전환세포에 있어 같은 양상이었다. NeuAc(시알산)에 결합하는 SSA의 경우, Bm5세포주가 BmN 세포주에 비교하여 진한 밴드가 확인 되었으나 이에 대한 추후 연구가 필요하다. 사실 glycosylation 효소의 발현 양상은 성체, 배아와 세포주에서 다른 것으로 보고되었고 곤충세포주에서의 N-glycosylation의 기능과 특징은 아직 불명확하다(Koles et al. 2004).



**B**

EPO (20 kDa)	
MRLCILLAVV AFVGLSLGRS	50
APPRLICDSR VLERYLLEAK EAENITTGCA	
EHCSLNENIT VPDTKVNFYA WKRMEVGQQA	100
VEVWQGLALL SEAVLRGQAL	
LVNSSQPWEP LQLHVDKAVS GLRSLTLLR	150
ALGAQKEAIS PPDAASAAPL	
RTITADTERK LFRVYSNFLR GKLKLYTGEA	186
CRTGDR	

Fig. 6 Recombinant baculovirus vector and amino acid sequences of the hEPO expressed in transgenic cell line. A, Structure of His-tagged hEPO expression cassettes on recombinant BmNPVs. B, amino acid sequences of hEPO; green letters is indicated bip signal peptides; red letters is indicated N-glycosylation sites.

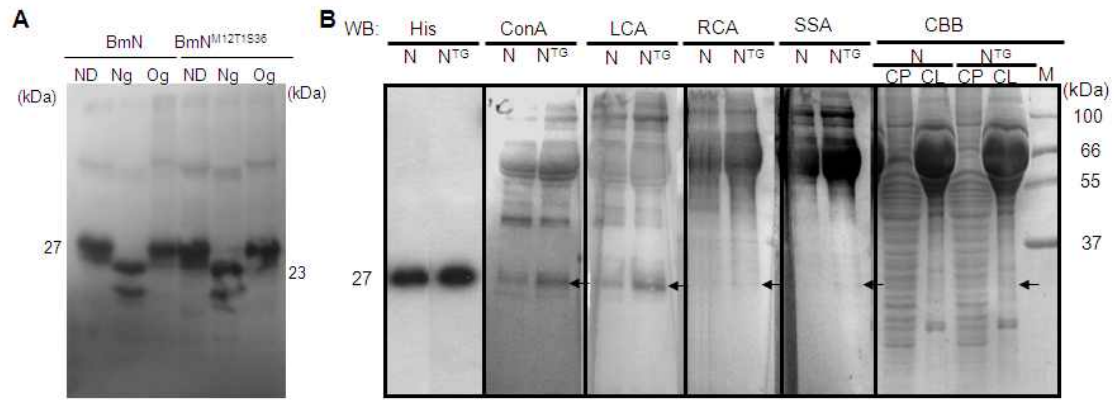


Fig. 7 Expression of hFN in BmN and BmN<sup>M12T1S36</sup>. The supernatants of baculovirus –infected BmN and BmN<sup>M12T1S36</sup> separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB). A, Glycosidase analysis of hFN. hFN was treated No Digestion (ND), PNGaseF (N-glycosidase, Ng) and Endo- $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidase (O-glycosidase, Og). B, The secreted hFN proteins were analyzed with anti-HA and by lectin blotting with ConA, WGA, LTL, RCA120, and SSA; Molecular weight markers are indicated in kDa.

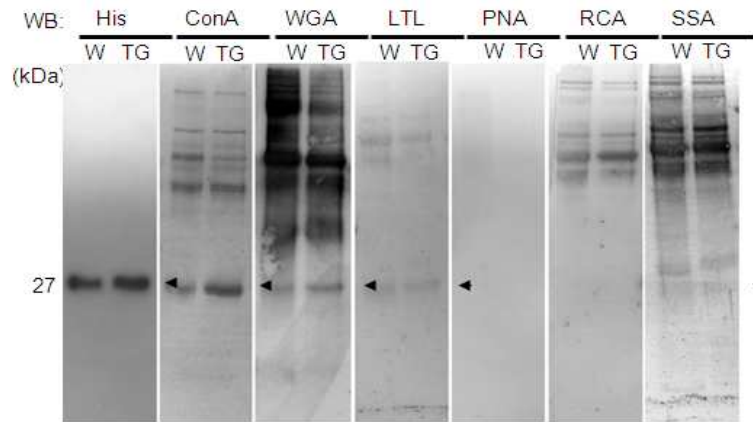


Fig. 8 Expression of hEPO in Bm5 and Bm5<sup>M12T1S36</sup>. The supernatants of baculovirus – infected BmN and BmN<sup>M12T1S36</sup> separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB). The secreted hEPO proteins were analyzed with anti-His and by lectin blotting with ConA, WGA, LTL, PNA, RCA120, and SSA; Molecular weight markers are indicated in kDa; Cells were cultured in antibiotic –free TNM-FH medium supplemented with (A) and without (B) heat-inactivated FBS.



#### 4. 정상세포와 형질전환세포에서 발현된 FN, EPO와 EGFL7 단백질의 시간적 변화

누에세포내에서의 벡로바이러스를 이용한 단백질 생산을 하기 전, 먼저 BmN과 Bm5 세포에서 시간에 따른 단백질 생산을 분석하였다(Fig 9). 먼저 정상 BmN과 Bm5 세포주에서의 단백질 생산능력은 luciferase 활성으로 측정하였다. BmN의 경우가 luciferase 활성이 높게 나타났으며 감염 후 72시간에 가장 높은 값을 보였다. 72시간 이후에는 단백질 생산능이 감소하는 것으로 나타났다.

당쇄부가 유전자가 도입된 형질전환세포에서의 단백질 생산의 시간적 변화를 ELISA를 통해 분석하였다. BmN, BmN<sup>M1T1</sup>, BmN<sup>M2S36</sup> 과 BmN<sup>M12T1S36</sup> 에서의 3개의 단백질(hFN, hEPO, hEGFL7) 생산을 시간적으로 본 결과 형질전환세포와 정상세포간의 차이는 인정되지 않았다(Fig 10). 이전의 luciferase 활성에서 확인한 것과 같이 72시간 이후에는 단백질이 감소하는 것으로 나타났다. 3개의 단백질 중 hEGFL7의 경우는 48시간까지 그 발현량이 낮았으며 단백질을 분리한 경우 분비형으로 얻을 수 없었으며 당쇄가 붙지 않은 것으로 확인되었다. 이후 PNGase F (N-glycosidase)처리하였으나 단백질 밴드 차이가 인정되지 않았다. 이후 렉틴항체 Con A, LCA, WGA를 이용하여 당쇄수식을 확인한 결과도 같은 결과로 얻어졌다(Fig 11 참조, Bm5와 같은 결과)

다음으로 우리는 Bm5의 세포주에 대한 당쇄부가 유전자가 도입된 형질전환세포에서의 단백질 생산의 시간적 변화를 ELISA를 통해 분석하였다. Bm5, Bm5<sup>M1T1</sup>, Bm5<sup>M2S36</sup> 과 Bm5<sup>M12T1S36</sup> 에서의 3개의 단백질(hFN, hEPO, hEGFL7) 생산을 시간적으로 본 결과 형질전환세포와 정상세포간의 차이는 인정되지 않았다(Fig 11). 이전의 luciferase 활성에서 확인한 것과 같이 72시간 이후에는 단백질이 감소하는 것으로 나타났다. Bm5의 경우도 BmN 세포주와 같이 3개의 단백질 중 hEGFL7의 경우는 48시간까지 그 발현량이 낮았으며 단백질을 분리한 경우 분비형으로 얻을 수 없었으며 당쇄가 붙지 않은 것으로 확인되었다(데이터 생략). BmN과 Bm5의 단백질 생산에 따른 시간의 변화는 차이가 인정되지 않았으나 양적인 경우 세포성장이 늦는 Bm5가 적은 것으로 판단된다. 이후 PNGase F (N-glycosidase)처리하였으나 단백질 밴드 차이가 인정되지 않았다. 이후 렉틴항체를 이용하여 당쇄수식을 확인한 결과도 같은 결과로 얻어졌다.(Fig 11D).

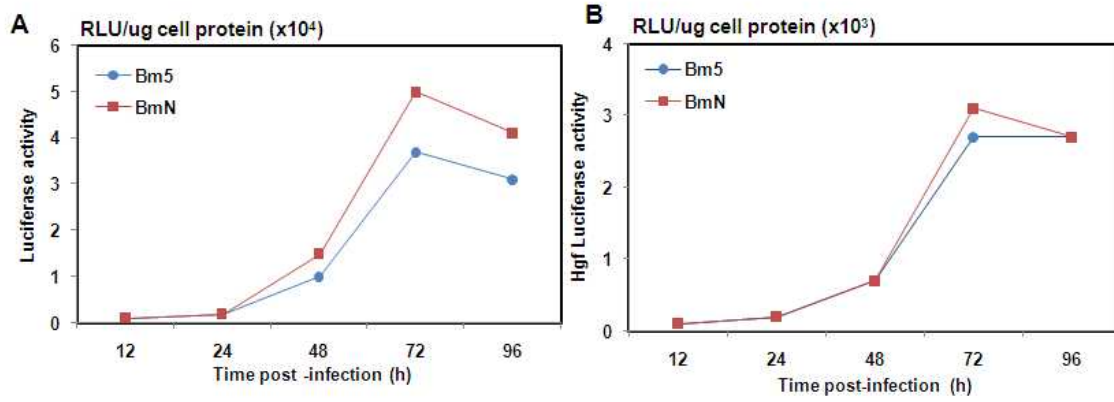


Fig. 9 Time-course of luciferase expressed in cell line. Time-course of luciferase expression in two *B. mori* derived cell lines infected with recombinant BmNPV polH Luc (A) and BmNPV polH Hgf Luc (B). Left, luciferase Activity in Bm cell line; right, HGF-luciferase activity in Bm cell line.

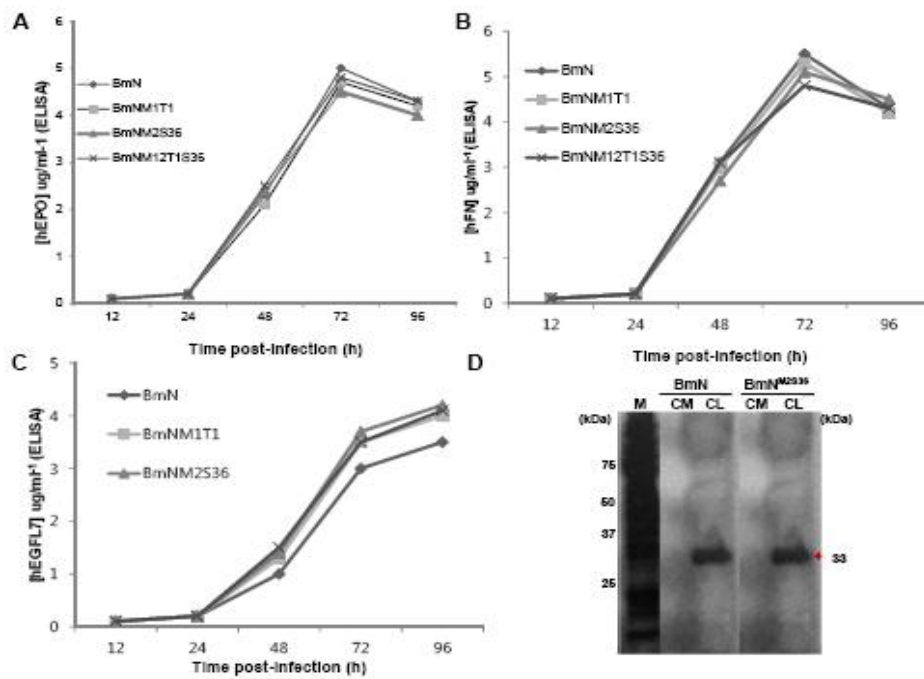


Fig. 10 Time-course of recombinant proteins expressed in parently and transgenic BmN cell lines. Infection dose was m.o.i 0.05. Cells were harvested at the indicate hours post infection, and assayed for recombinant protein activity. A, time-course of hEPO protein expressed in BmN cells; B, time-course of hFN protein expressed in BmN cells; C, time-course of hEGFL7 protein expressed in BmN cells; D, Expression of hEGFL7 in BmN and BmNM<sup>12T1S36</sup>

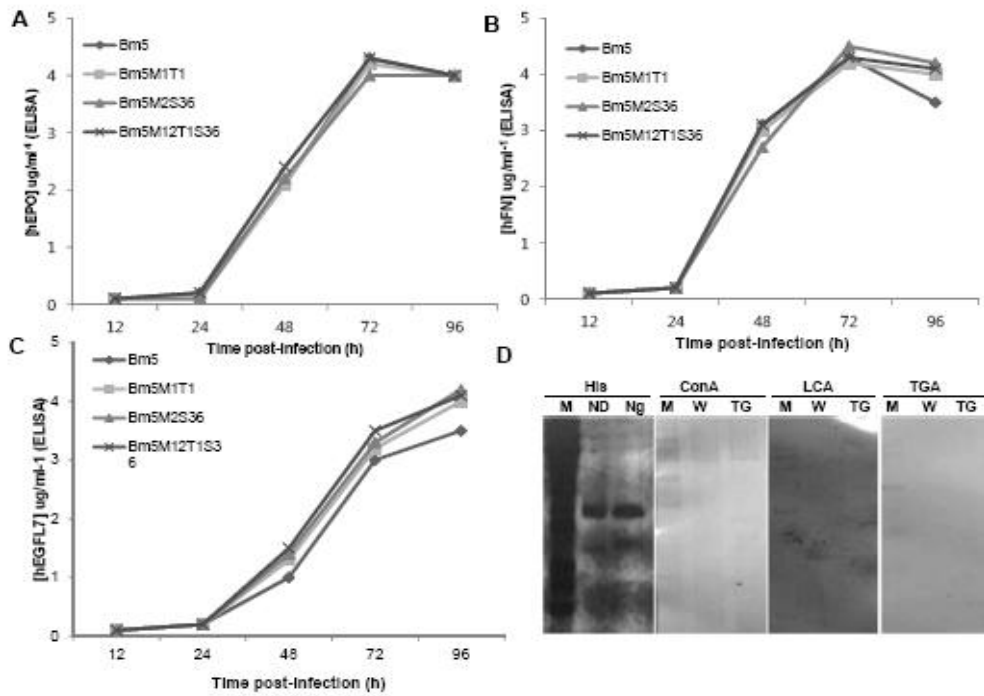


Fig. 11 Time-course of recombinant proteins expressed in parently and transgenic Bm5 lines. Infection dose was m.o.i 0.05. Cells were harvested at the indicate hours post infection, and assayed for recombinant protein activity. A, time-course of hEPO protein expressed in Bm5 cells; B, time-course of hFN protein expressed in Bm5 cells; C, time-course of hEGFL7 protein expressed in Bm5 cell. D, Identification of glycosylaation of hEGFL7 in Bm5 and Bm5M12T1S36

## 5. 형질전환세포의 계대에 따른 도입유전자의 발현변화

본 연구에서 사용한 GAL4-UAS 시스템은 목적유전자의 활성화에 특히 유용한 수단으로 사용되며 유전자의 on/off 조절에 용이하다(Kleg et al. 2002). UAS 프로모타의 조절하에서 유도되는 5종의 glycosyltransferas 유전자는 그 활성인자인 Gal4유전자와 함께 transfection 하여 유지되게 하였다. 이러한 시스템이 세포계대에 따라서 계속적으로 유지되어지는가에 대한 확인을 위해 passage 에 따른 도입 유전자 발현을 RT-PCR로 확인하였다(Fig 12).

BmN 세포주의 경우 4-5번째의 계대까지 도입 유전자가 발현 되는 것으로 확인 되었다. BmN<sup>M1T1</sup>의 경우 그 발현이 약하게 나타났다. BmN<sup>M2S36</sup> 과 BmN<sup>M12T1S36</sup> 의 경우 MGATII, ST3, ST6의 발현은 강하였으나 BmN<sup>M12T1S36</sup> 세포주에서도 MGAT I과 B4GalT1의 경우는 약하게 나타났다. Gal4의 경우는 3개의 세포주에서 계대에 따른 변화없이 강하게 발현하는 것으로 MGAT I과 B4GalT1의 실험적인 오차로 생각되어 진다.

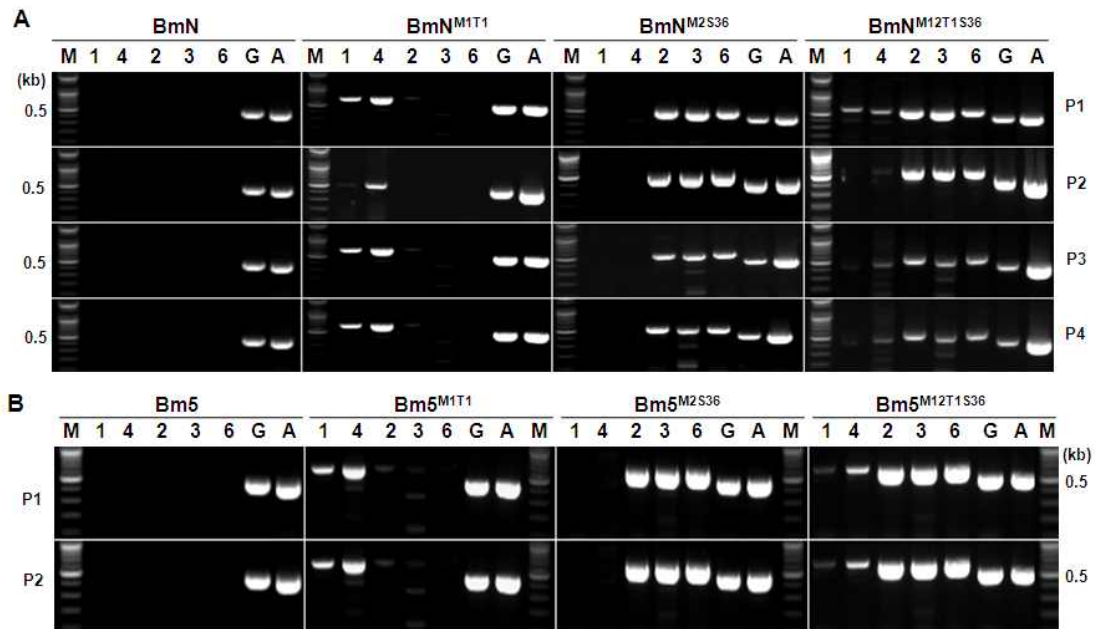


Fig 12 Transcriptional Expression of glycosyltransferase genes according to succeeding a generation in engineered silk worm cell lines. A, RT-PCR analysis of 5 glycosyltransferase expression in the BmN and BmN<sup>M1T1</sup>, BmN<sup>M2S36</sup>, BmN<sup>M12T1S36</sup> cells. B, RT-PCR analysis of 5 glycosyltransferase expression in the Bm5, and Bm5<sup>M1T1</sup>, Bm5<sup>M2S36</sup>, and Bm5<sup>M12T1S36</sup> P1- P4 is indicated passage number.

## 6. 화학적방법에 의한 GlcNAcase 억제에 대한 N-glycan 구조의 효과

곤충과 포유류의 당쇄 과정의 차이점은 glycosyltransferase의 부족과  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase(GlcNAcase)의 생물적 특징이다. 포유류의 GlcNAcases는 lysosomes의 가용성 부분에 위치하고 있으며 당쇄과정에서 GlcNAc의 잔여물을 가용화 한다 (Conzelmann et al 1987). 반대로 곤충의 GlcNAcase는 가용성 부분과 세포막에 관련된 부분에서 발견되며  $\alpha$ -1,3-mannosyl에서만  $\beta$ -1,2에 연결된 GlcNAc를 잘라낸다(Altmann et al 1995). 이 막에 관련된 GlcNAcase는 골지체에 위치하는 것으로 알려져 있다(Marchal et al. 1999). 누에의 특이한 막에 관련된 GlcNAcase가 galactosylation을 방해하거나 발현된 당단백질의 시알화를 막을수 있을 것이라고 생각하여 GlcNAcase 억제에 대한 당쇄부가를 살펴보았다. BmN과 BmN<sup>M12T1S36</sup> 세포에 0, 5, 10mM의 농도로 2-ADN을 처리하고 재조합단백질의 시알산변화를 렉틴 분석하였다. 이들 세포는 2-ADN의 투여에 따라 GlcNAcase의 활성은 감소하였다. BmN<sup>M12T1S36</sup> 세포주에서는 GlcNAcase의 감소가 정상세포에 비해 2-ADN의 영향을 덜 받는 것으로 보였다(Fig 13A, B).  $\alpha$ -2,6-linked sialic acids를 인식하는 SNA를 이용하여 rhFN과 rhEPO 단백질의 렉틴 분석 결과, 정상세포와 형질전환세포에서의 차이는 보이지 않았다. 이들 결과는 형질전환 세포에서 2-ADN의 영향은 크지 않았으며 누에의 정상세포와 형질전환세포에서 생산된 rhFN과 rhEPO 단백질에서는  $\alpha$ -2,6-linked sialylation가 모두 확인되었다.

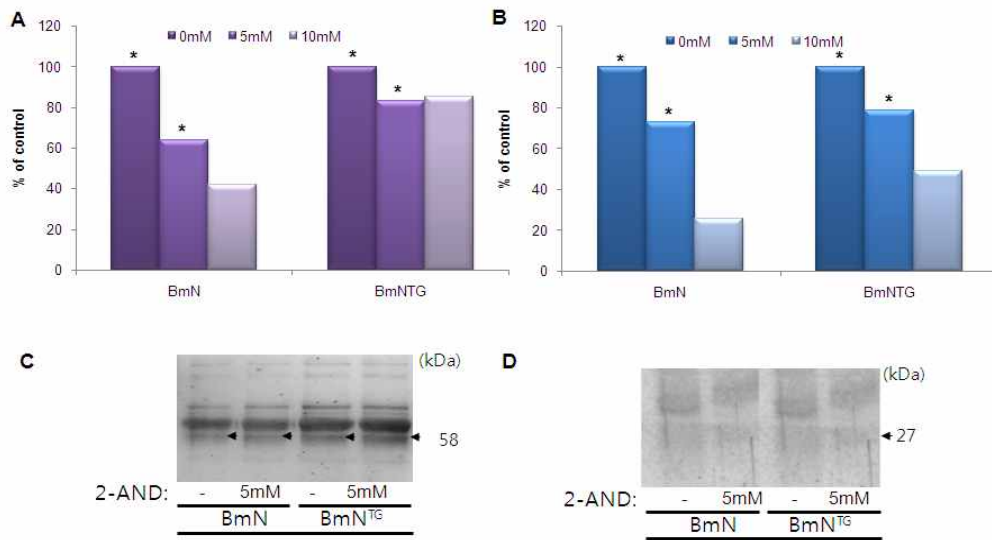


Fig. 13 Effect of 20acetamido-1,2-dideoxynojirimycin on to expression of sialylated hFN and hEPO. A, inhibition of p-nitrophenol formation of BmN and BmN<sup>M12T1S36</sup>(BmN<sup>TG</sup>) GlcNAcase by 2-AND in cell incorporated BmNPV11D hFN. B, inhibition of p-nitrophenol formation of BmN and BmN<sup>M12T1S36</sup>(BmN<sup>TG</sup>) GlcNAcase by 2-AND in cell incorporated BmNPV11D hEPO. C and D, detection of sialic acids on hFN and hEPO by lectin blot analysis with SNA, respectively.



## 7. 일시적 형질전환세포에서의 Fibronectin 발현 및 당쇄구조분석

UAS 프로모타의 조절하에서 유도되는 5종의 glycosyltransferase 유전자는 그 활성인자인 Gal4유전자와 함께 transfection 하여 유지되는 시스템으로 이전 실험에서 구축된 stable 세포주에서 생산된 FN과 EPO 재조합 단백질의 당쇄 구조의 명확한 차이가 인정되지 않았다. 이는 세포내에서 발현되는 glycotransferase 유전자의 발현이 Gal4 발현에 영향을 받는 것으로 생각되어 5종의 glycosyltransferase의 발현과 단백질 생산을 동시에 진행하여 당쇄부가를 살펴보기로 하였다.

먼저 5개의 pBacUAS·M1B4, pBacUAS·M2S3S6백터를 transfection 한 후 3, 24, 48시간 후 재 transfection하여 일시적 발현 세포주를 수립한 후(BmNt<sup>M12T1S36</sup>, Bm5t<sup>M12T1S36</sup>) 각 시간에 BmNPV11C-p10GAL4-polHFN1 감염하였다. 감염 4일 후 배양액과 세포에서 각 전사체와 단백질을 확인하였다. 이 방법은 BmN과 Bm5에서 모두 행해졌으며 전사체 발현은 두 세포 모두에서 확인되었다(Fig 14A).

BmN 세포와 BmNt<sup>M12T1S36</sup>감염 72h 후에 배지로부터 분리된 형태의 58 kDa 단백질을 얻었다(Fig 4). 58 kDa의 단백질은 hFN 단백질 48 kDa과 His를 포함하는 부가염기서열 3 kDa을 포더한 사이즈보다 6 - 7 kDa의 더 큰 것으로 확인되었다. 이는 단백질 합성 후 분리된 단백질에 당쇄가 부가된 것으로 생각되었다. 각 시간별 단백질을 비교하였을 때 24h과 48h에 재 transfection한 후 얻어진 단백질이 정상세포에서 얻어진 것에 비해 약간 높은 사이즈로 확인되었다. 이에 대한 부가된 N-glycosylation에 대해 알아보기 위해 PNGase F (N-glycosidase)를 처리하였다. N-glycosidase가 처리된 hFN 단백질은 52 kDa 정도에서 확인되었다(Fig 14B). PNGase F 처리하여 얻어진 결과에서도 24, 48시간에 얻어진 단백질의 사이즈가 큰 것으로 확인되었으나 이에 대한 정확한 결과는 MS/MS HPLC 등의 실험이 필요 할 것이다. 다음으로 우리는 ConA, LCA, RCA, WGA, PHA-E와 PNA 렉틴항체를 사용하여 부가된 당쇄를 분석하였다. hFN 단백질의 렉틴분석은 정상세포와 형질전환세포에 부가된 당쇄 결합상태는 같은 양상을 보였으며 단지 밴드사이즈의 차이만이 인정되었다. 정상세포와 시간별 형질전환세포 모두 mannose, GlcNAc, Fucose, Galactose 등의 당쇄가 확인되었다. Bm5 세포에서도 같은 결과를 얻었다(데이터생략).

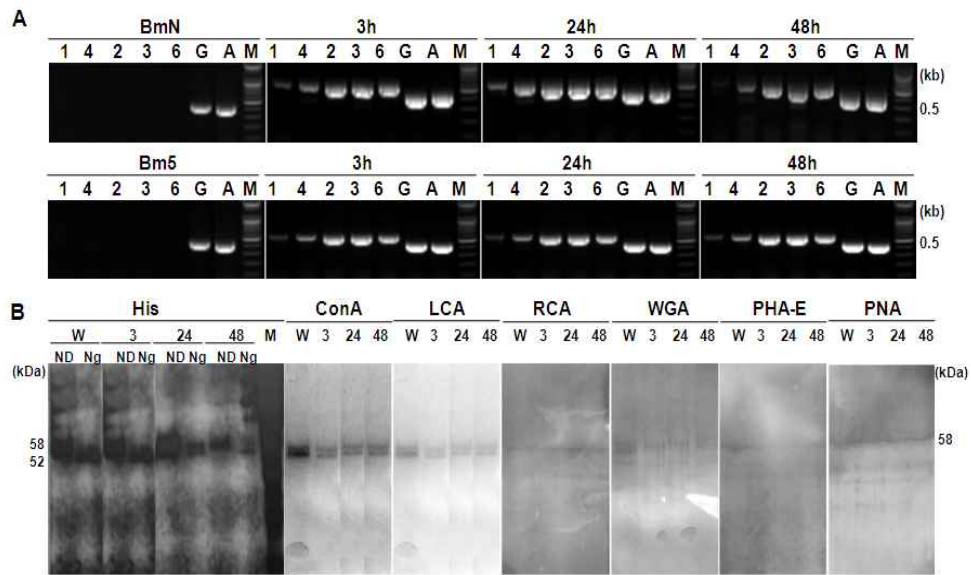


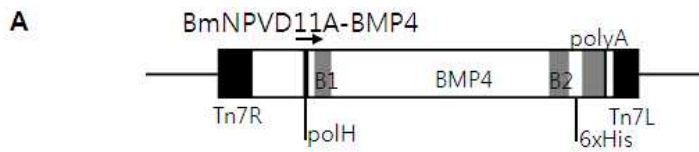
Fig. 14 Expression of hFN in BmN transiently expressed 5 glycotransferase. A, RT-PCR analysis of 5 glycosyltransferase expression in the BmN<sup>M12T1S36</sup> cells. B, Glycosidase analysis of hFN. hFN was treated No Digestion (ND), PNGaseF (N-glycosidase, Ng) and Endo- $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidase (O-glycosidase, Og). The secreted hFN proteins were analyzed with anti-HA and by lectin blotting with ConA, WGA, LTL, RCA120, and SSA; Molecular weight markers are indicated in kDa.

## 8. 일시적 형질전환세포에서의 Bone Morphogenic Protein 발현 및 당쇄구조 해석

일시적 형질전환세포에서 또 다른 단백질인 Bone Morphogenic Protein 4(BMP4)의 생산을 실험하였다. 당쇄부가유전자가 도입된 누에세포에서 당쇄부가 효과를 보기 위해 hBMP4은 p10 프로모터 아래 Gal4NfkBp65을 포함하는 transfer 벡터에 polyhedirin 아래에 삽입되었다 (Fig 15A). 인간유래 Bone Morphogenetic Protein 4(hBMP4)은 3개의 N-glycosylation 사이트를 포함하며 371개 아미노산의 당단백질이다(Fig 15B, BmNPV11DA-BMP4).

BMP4의 경우도 이전의 FN과 같은 방법으로 먼저 5개의 pBacUAS·M1B4, pBacUAS·M2S3S6 벡터를 transfection 한 후 3, 24, 48시간 후 재 transfection하여 일시적 발현 세포주를 수립한 후(BmNt<sup>M12T1S36</sup>, Bm5t<sup>M12T1S36</sup>) 각 시간에 BmNPV11C-p10GAL4-polHBMP4를 감염하였다. 감염 4일 후 배양액과 세포에서 각 전사체와 단백질을 확인하였다. 이 방법은 BmN과 Bm5에서 모두 행해졌으며 전사체 발현은 두 세포 모두에서 확인되었다(Fig 16A).

BmN 세포와 BmNt<sup>M12T1S36</sup>감염 72h 후에 배지로부터 분리된 형태의 53 kDa 단백질을 얻었다 (Fig 16B). 53 kDa의 단백질은 hBMP4 단백질 42 kDa과 His를 포함하는 부가염기서열 3 kDa 을 포더한 사이즈보다 8 kDa의 더 큰 것으로 확인 되었다. 이는 단백질 합성 후 분리된 단백질에 당쇄가 부가된 것으로 생각되었다. BMP4의 경우, FN과 같은 밴드의 shift는 인정되지 않았다. 이에 대한 부가된 N-glycosylation에 대해 알아보기 위해 PNGase F (N-glycosidase)를 처리하였다. N-glycosidase가 처리된 hBMP4 단백질은 42 kDa 정도에서 확인되었다(Fig 14B). PNGase F 처리하여 얻어진 결과에서도 24, 48시간에 얻어진 단백질의 사이즈가 큰 것으로 확인되었으나 이에 대한 정확한 결과는 MS/MS HPLC 등의 실험이 필요 할 것이다. 다음으로 우리는 ConA, LCA, RCA, WGA, PHA-E와 PNA 렉틴항체를 사용하여 부가된 당쇄를 분석하였다. hBMP4 단백질의 렉틴분석은 정상세포와 형질전환세포에 부가된 당쇄 결합상태는 같은 양상을 보였으며 단지 밴드사이즈의 차이만이 인정되었다. 정상세포와 시간별 형질전환세포 모두 mannose, GlcNAc, Fucose, Galactose 등의 당쇄가 확인되었다. Bm5 세포에서도 같은 결과를 얻었다(데이터생략).



**B**

BMP4 (42 kDa -BMP4)

```

MKFLVNVALV FMVVYISYIY ADPAAVYQPQ PHPQPPPYGH CVTDSGVVYS 50
VGMQWLKTQG NKQMLCTCLG NGVSCQETAV TQTYGGNSNG EPCVLPFTYN 100
GRTFYSCSTE GRQDGLWCS TTSNYEQDQK YSFCTDHTVL VQTRGGNSNG 150
ALCHFPFLYN NHNYTDCTSE GRRDNMKWCG TTQNYDADQK FGFCPMAAHE 200
EICTTNEGVM YRIGDQWDKQ HDMGHMMRCT CVGNRGEWT CIAYSQLRVD 250
DDDKRSPKHH SQRARKKKNK CRRHSLYVDF SDVGWNDWIV APPGYQAFYC 300
HGDCPPPLAD HLNSTNHAIV QTLVNSVNSS IPKACCPTE LSAISMLYLD 350
EYDKVVLKNY QEMVVEGCGC R 371

```

Fig. 15 Recombinant baculovirus vector and amino acid sequences of the hBMP4 expressed in transgenic cell line. A, Structure of His-tagged hBMP4 expression cassettes on recombinant BmNPVs. B, amino acid sequences of hBMP4; green letters is indicated bip signal peptides; red letters is indicated N-glycosylation sites.

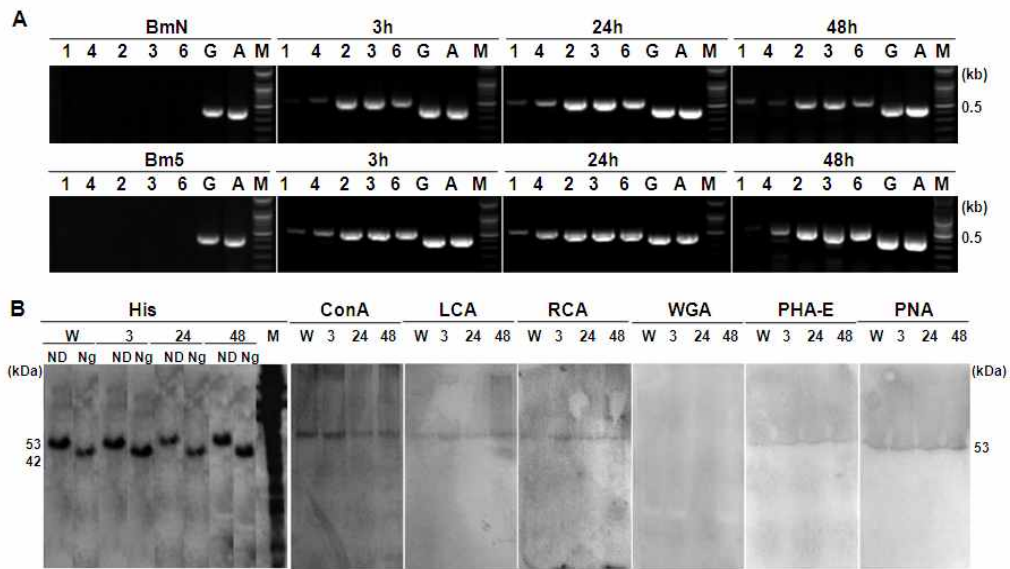


Fig. 16 Expression of hBMP4 in BmN transiently expressed 5 glycosyltransferase. A, RT-PCR analysis of 5 glycosyltransferase expression in the BmN<sup>M12T1S36</sup> cells. B, Glycosidase analysis of hFN. hFN was treated No Digestion (ND), PNGaseF (N-glycosidase, Ng) and Endo- $\beta$ -N-Acetylgalactosaminidase (O-glycosidase, Og). The secreted hFN proteins were analyzed with anti-HA and by lectin blotting with ConA, WGA, LTL, RCA120, and SSA; Molecular weight markers are indicated in kDa.

## 9. 누에세포에서의 새로운 Glycosyltransferases의 확인 및 클로닝

포유류세포의 당단백질 과정과 비교해서 당쇄결핍은 곤충세포에서 N-glycan과정에 포함 된 효소와 다른 성분들의 부족으로 알려졌다(Tomiya et al. 2004). 대부분의 나비목 곤충에 의해 생산 된 당단백질의 N-glycan 은 일반적으로 paucimannosidic-과 oligomannose-type의 N-glycan으로 구성된다. 이러한 N-glycan은 초기의 N-glycan 과정은 포유류와 같은 효소들이 관여하지만 후기에는 포유류에 존재하는 효소가 없는 것으로 알려져 있다(Altmann et al 1999; Marcha et al 2001; Hemmer et al., 2001). 누에세포의 N-glycan 과정에 관여하는 효소들을 찾기 위해 누에 게놈을 조사하였다. SGP(<http://sgp.dna.affrc.go.jp/>)를 이용한 in silico 분석은 누에 게놈에서 아직 발표되지 않은 N-glycan 관련효소들이 있음을 밝혔다(Fig 17). 그림의 왼쪽라인은 일반적으로 곤충세포에서 일어나는 N-glycan 과정을 모식도화 한 것이다. 오른쪽라인은 포유류 유래에 N-glycan 과정으로 in silico에 의해 3개의 미발표 유전자  $\alpha$ -1,2-mannosidase, O-linked N-acetylglycosaminyltransferase와 UDP-GalNAc transferase가 확인 되었다.

3개의 유전자는 partial 상태로 각각 723 bp, 521 bp, 638 bp로 확인 되어 프라이머를 작성하여 세포와 누에세포조직에서 발현을 확인하였다(Fig 18). 누에세포 BmN과 Bm5 및 누에난소조직에서  $\alpha$ -1,2-mannosidase(데이터미발표), O-linked N-acetylglycosaminyltransferase와 UDP-GalNAc transferase가 확인되었고 BmN과 Bm5세포주에서는 특이하게 ST6 유사서열이 확인되어 확인 중이다.

이 중 UDP-GalNAc transferase 유전자는 500 a.a의 1.5 kb의 full-length 유전자를 확인하였다 (Fig 17). 군주나비인 *Danaus plexippus*(*D. plexippus*)의 n-acetylgalactosaminyltransferase와 86%의 identity를 보였다. 딱정벌레(*Tribolium castaneum*), 개미(*Harpegnathos saltator*) 벌(*Nasonia vitripennis*) 파리(*Drosophila melanogaster*) 등의 n-acetylgalactosaminyltransferase와 71%의 상동성을 가졌다. 나비목, 딱정벌레목, 개미목, 벌목, 파리목의 n-acetylgalactosaminyltransferase 단백질서열을 비교하였다(Fig 18). 사실 나비목 세포주인 sf9, sf21, Tn5B1-4에서 GalT의 활성이 확인되었지만 무시할 만한 수준이었다. 누에에서 발견 된 이 유전자가 당단백질 생산에서 GalNAc 수정에서 중요한 수준인 것은 이후 연구가 필요 할 것이다.

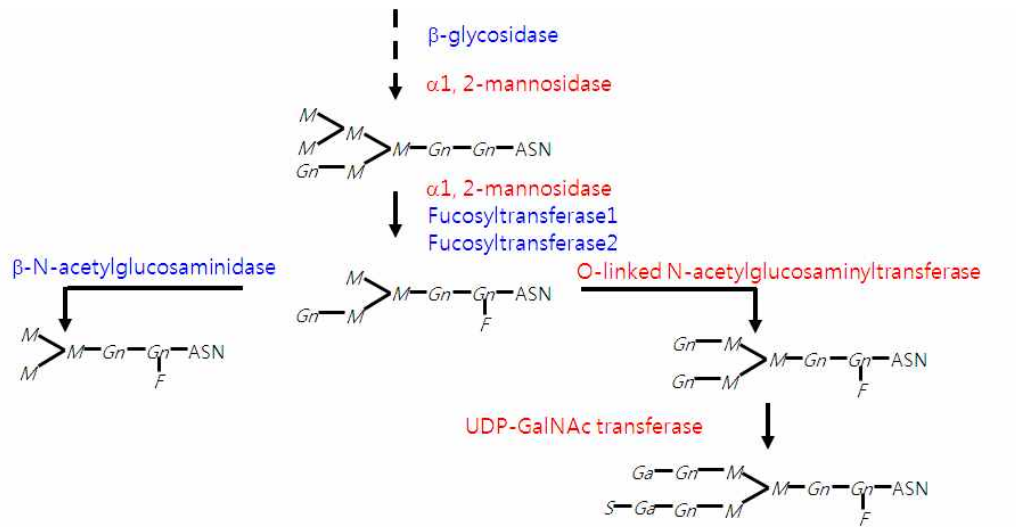


Fig. 17 Possible processing pathway of silkworm N-glycan or O-glycan. Blue letters is genes submitted in NCBI. Red letter s is genes not submitted in NCBI.

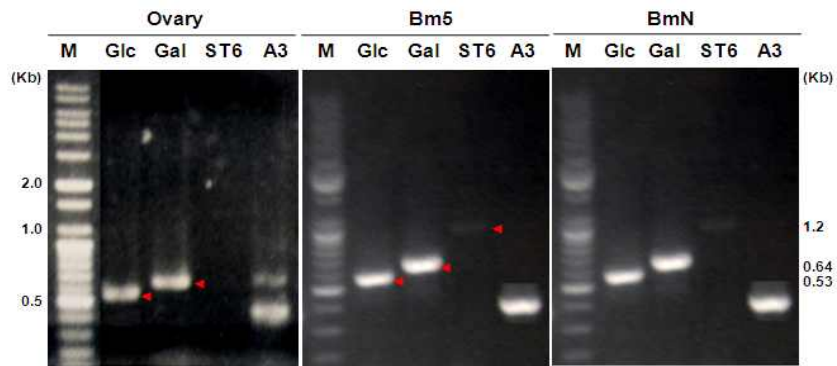


Fig. 18 Identification of noble glycosyltransferase in ovary and cell line of silkworm. M, marker; Glc, O-linked N-acetylglucosaminyltransferase; Gal, UDP-GalNAc transferase, ST6, beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase; A3, actin 3 of silkworm; actin 3 is control gene.





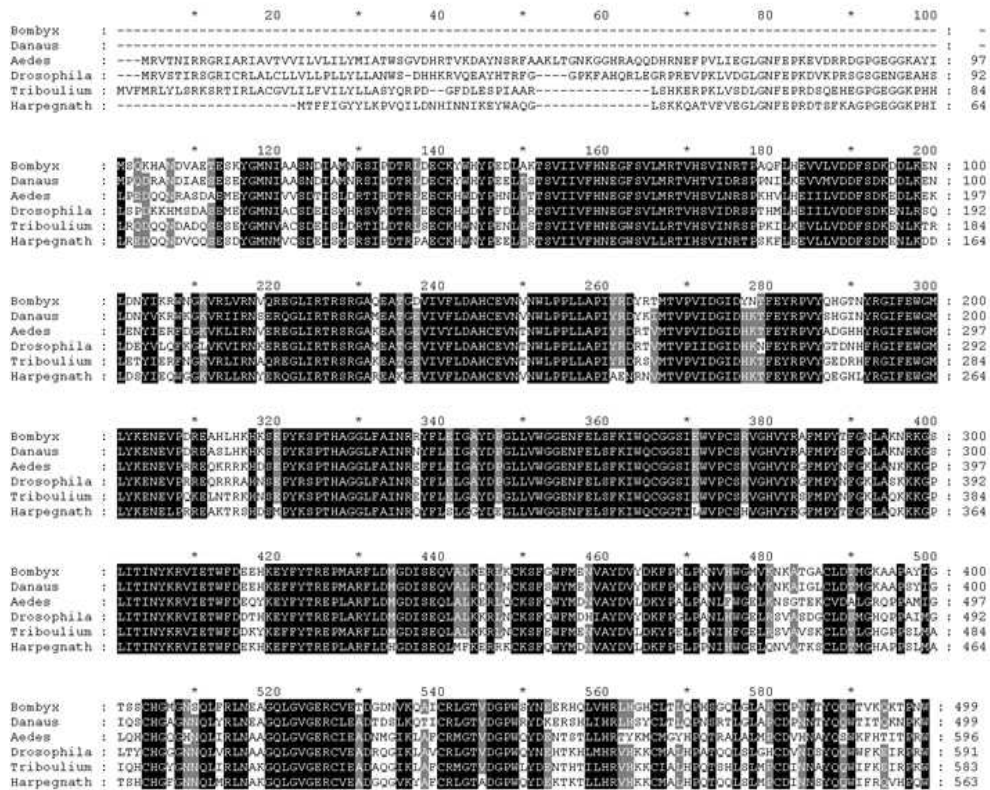


Fig. 20 Clustal-W comparison of the GalNAc. This figure shows a Clustal-W multiple sequence alignment between silkworm and known other species putative UDP-GalNAc transferase.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구목표 및 평가의 착안점

년도	평가항목 (주요성능Spec)	평가착안점	달성도
1차년도 (2012)	인간형 당쇄부가효소 유전자 분리 및 클로닝	클로닝 유전자수 여부	100%
	인간형 당쇄 부가효소 발현 개량세포주 구축	세포주 구축 여부	100%
	인간 또는 포유류 라이브러리로부터 유용유전자 분리 및 백터작성	발현백터 구축 여부	100%
	유용 물질에 대한 당쇄 해석	유용물질 효능 및 단백질 특성 분석 여부	100%

### 제 2 절 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구과제는 곤충세포내 유전자 도입 및 베쿨로바이러스 재조합단백질 생산 기술을 이용하여 인간유래의 당쇄부가효소를 도입한 형질전환 세포주 구축을 목표로 하였다. 위 표에서 나타나 바와 같이 전 연구과정에 걸쳐 목표하였던 연구가 수행되었으며 수립된 형질된 세포주에서 3종의 인간유래 단백질을 생산하여 당쇄 수식을 해석하였다. 이전의 곤충세포에서 생산된 재조합단백질의 paucimannosidic 또는 oligomannose 형태의 glycan이라는 보고와 달리 누에서 생산된 재조합 단백질은 galactose 또는 N-acetylneuraminic acid(NeuAc)의 당쇄가 확인되었다. 5종의 glycosyltransferas 유전자 도입 형질전환 누세포주의 외래단백질 생산은 sial화 된 N-glycan의 합성 능력을 확인하였다. 이는 베쿨로바이러스를 이용한 누세포에서의 human-like N-glycan의 당단백질 생산시스템에 활용될 수 있을 것이다. 뿐만 아니라 누세포에서 새롭게 확인된 UDP-GalNAc transferase 유전자는 누에를 비롯한 나비목 생산시스템의 N-glycosylation 경로 해석연구에 기여 할 것으로 기대된다. Stable 세포에서는 사용한 GAL4-UAS 시스템의 불안정성으로 인해 정확한 당쇄부가에 대한 분석은 어려웠지만 일시적 생산에 있어 당쇄부가가 정상누세포와 다른 당쇄부가를 나타내는 것을 보였다. 이에 대한 연구는 향후 추가적인 연구를 통하여 보완하여 해결 할 예정이다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 연구개발 성과

#### 1. 논문

- 1) Characterization and Recombinant protein Expression of Ferritin Light Chain Homologue in the Silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Sci.* Submit

#### 2. 학회발표

- 1) 한국분자세포생물학회(동계) Expression of *Viscum album coloratum* B-chain in the Silkworm, *Bombyx mori* and Antioxidant Activities of the Recombinant Protein 2012. 02. 01
- 2) 한국생물공학회 Purification and Characterization of Antarctic springtail, *Cryptopygus antarcticus*, Endogenous  $\beta$ -1,4-Endoglucanases Produced in *Bombyx mori*. 2012.04. 12
- 3) 한국미생물생명공학회 . Expression of Cold-Adapted Glycosyl Hydrolases in *Bombyx mori* 2012.06.27
- 4) 세계곤충학회 Biochemical Characterization of Cold-Adapted Glycosyl Hydrolases from the Antarctic springtail acquired from *Bombyx mori* 2012.08.17
- 5) 세계생명공학회 International Biotechnology Symposium(IBS) Screening of Silkworm Strains for Efficient Recombinant Protein Production of Larvae and Pupae in *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus Bacmid System 2012.09.16
- 6) 한국미생물학회연합 국제학술대회 Expression and Purification of recombinant human epiderma growth factor like(rhEGFL-7) in silkworm pupa and Cell 2012.10.12
- 7) 한국미생물학회연합 국제학술대회 Production of cold-adapted glycosyl hydrolases (GHs) by baculovirus expression system for functional studies. 2012.10.12

#### 3. 신규유전자등록

- 1) GalNAc-TmRNA, complete CDS. Submit BankIt1577207 (NCBI, 2012. 10. 26)

## 제 2 절 성과활용 계획

### 1. 성과활용 실적

본 연구는 biotherapeutic, genetic과 metabolic 관련 당단백질 생산에 있어 누에세포 glycosylation의 해석연구로 현재까지 곤충세포 또는 곤충의 N-glycan 과정의 한계점을 해결하는 열쇠의 역할을 담당할 것이다. 누에세포에 transferase dual 유전자 도입은 현재 까지 진행된 연구가 없어 부족한 연구의 보완으로 완전히 sial화 된 당단백질 생산에 도움이 될 것이다. 또한 이번 연구에서는 N-glycan 후기과정에 관여하는 새로운 glycosyltransferases를 확인하였다. 곤충과 포유류의 N-glycan 차이점은 N-glycan 후기 과정에서 일어나는 것으로 알려져 있다. 이는 누에세포가 다른 곤충세포에 비해 비교적 복잡한 N-glycan 과정을 가지는 증거이며 이를 통하여 인간유래 뿐 만아니라 다양한 포유류, 해양생물 등의 외래 당단백질 생산에 기여할 중요한 요소라 할 수 있다. 또한 이번 연구에서 구축한 세포주 또는 벡터를 활용하여 치료 또는 진단목적을 위한 양질의 저가 당단백질 생산에 적용 가능성이 높을 것이다. 실제적인 사용을 위해 누에세포의 remodeling이 필요 할 것으로 생각되며 이 후 추가연구를 통해 성과활용을 높이도록 한다.

### 2. 성과활용 계획

#### 1) 기술적 활용

곤충세포에서 N-glycan 시스템 구축을 위한 많은 연구가 진행되었다. 포유류세포와 반대로 대부분 곤충세포는 기본적 효소의 부족으로 sial산이 부족한 상태의 단백질이 합성되므로 이에 대한 보완 연구가 필요로 하였다. 현재까지의 연구는 단일 유전자 도입에 의한 곤충세포 시스템을 수정 보완하였으나 이번 연구에서는 복수 유전자 도입이 가능한 벡터를 사용하여 누에세포 시스템을 개발 하였다. 현재 사용하고 있는 sf9의 당쇄도입유전자인 mimic세포와 견적할 만한 세포주이다. 누에는 인간에게 가장 순화된 곤충으로 이번 연구에서 확인 된 결과를 기반으로 곤충 시스템에도 적용 가능하리라 예상된다. 부가적인 실험을 통하여 당쇄 도입 누에 곤충시스템이 확립되면 인간 뿐 아니라 가축, 어류를 아우르는 그 적용대상이 다양할 것으로 예상된다. 당쇄도입 누에세포 시스템은 지금까지 어려웠던 인간단백질에 가장유사한 단백질 생산에 있어 비용절감을 비롯한 bioactivity 에 있어서도 새로운 장을 열 수 있을 것으로 예상된다. 이 후 정상세포주와 형질전환 세포주를 활용한 단백질 생산 및 해석에 관련 된 내용의 논문을 비롯한 누에세포(누에포함) 단백질 생산 시스템에서 분리 된 단백질의 당쇄 해석에 대한 논문이 준비 중이다.

#### 2) 경제적, 산업적 활용

세계의 바이오시밀러 시장은 2011년 약 25억 달러의 시장 규모를 기록했다. 그 이후 5년 간 7.7%의 연평균 복합 성장률(CAGR)로 성장해 2016년에는 36억 달러에 달할

전망이다. 아시아태평양 지역 바이오시밀러 시장은 2011년에는 6억 8,300만 달러 규모를 기록했고, 그 이후 연평균 복합 성장률(CAGR) 10.3%로 성장해 2016년에는 11억 달러 규모에 달할 전망으로 밝혀졌다. 2016년 미국의 바이오시밀러 시장은 13억 달러, 유럽 기반시장은 6억 2,500만 달러 규모에 이를 것이다. 누에에서 재조합 BmNPV를 사용한 최초의 pharmaceutical-grade의 의약품은 일본 Toray Industry사에서 개발한 개 인터페론 감마와 고양이 인터페론이며 최근 해당사의 보고에 따르면 대장균이나 효모 및 동물세포에 비하여 약 100배 정도의 생산성을 보이는 것으로 보고하고 있다. 이러한 생산성과 더불어 protease cleavage site 및 glycosylation site의 조작을 통하여 좀더 균일한 단백질을 정제 할 수 있으며 현재 제품으로 출시되어 일본 및 유럽에서 판매허가를 받은 제품은 애완동물등의 치료용 의약품임. 국내에서도 상기 시스템을 사용한 어류 병원성 바이러스의 항원을 발현하는 재조합 바이러스를 누에에 감염시켜 발현을 유도하여 직접 어류 사료에 첨가함으로써 양식장에서 어류 경구투여용 백신으로 사용 가능성이 충분히 연구되어 현재 제품으로서 개발을 타진하고 있음이 보고도 있다. 본 과제의 당쇄수식 누에세포 시스템의 동향은 점차 본 시스템의 유용성이 동물의약품에서 검증이 되고 있는 바 생산성 및 효력 증진측면에서 인간유래 유용 단백질 생산에 매우 유용한 시스템으로 자리 잡을 것으로 전망된다.

현재 이용되고 있는 곤충세포인 sf9 계열의 형질전환 세포인 mimic 세포이외의 새로운 세포주 개발이 가능 할 것이며 이 후 1건 이상의 학술발표는 이 후 재조합단백질 생산 시스템 개발 연구에 주추가 될 것이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술

- 누에를 이용한 Classical Swine Fever Virus(CSFV E2) 항원 생산에 대한 연구보고이며 이에 따라 Baculovirus를 이용한 누에 시스템을 활용하면 대량생산도 가능하다고 제시하고 있음. [Dong-A University, Korea, Production of Classical Swine Fever Virus Envelope Glycoprotein E2 as Recombinant polyhedra in Baculovirus-infected Silkworm Larvae (Mol Biotechnol, 2012)]
- 누에 번데기에서 생산된 재조합단백질인 Bovine Tissue Factor(BTF)은 항응고제로 사용되는 Wafarin 모니터링 연구에서 prothrombin time(PT)과 Owren PT(OPT)와 반응하여 혈액 응고제 실험에 성공한 연구를 보고하고 있음. [Sysmesx Corporation, Japan, Properties of a recombinant bovine tissue factor expressed by silkworm pupae and its performance as an Owre-type prothrombin time reagent for warfarin monitoring(Thrombosis Research, 2012)]
- 환경호르몬의 일종인 Tributyltin-binding protein(TBT)에 결합하는 TBT-bp1 단백질을 누에 유충에서 얻어 활성측정결과 어류에 축적된 TBT의 양을 저하함을 확인하였음. [Kyushu University, Japan, Tributyltin-binding protein type 1, a lipocalin, prevents inhibition of osteoblastic activity by tributyltin in fish scales (Aquatic Toxicology, 2012)]
- DNA repair와 replication에 관여하는 DNA polymerase  $\delta$ (human)를 누에유충에서 생산하여 암억제와 다른 질병예방에 효과가 있음을 보고되었음. [Jiangsu University, China, Production of Recombinant Human DNA Polymerase Delta in a Bombyx mori Bioreactor (PLOSone, 2012)]
- 누에를 이용한 효과적인 단백질 생산을 위한 BmNPV 시스템 개량에 대한 연구가 보고되었음. [NanYan University, China, Construction of a Baculovirus Silkworm multigene expression system and its application on producing virus like particles (PLOSone 2012), Zhejiang Sci-Tech University, China, The screening and functional study of proteins binding with the BmNPV polyhedrin promoter (Virology Journal, 2012)]

## 제 7 장 참고문헌

1. Thoma NH, Meier tw, Evans PR, Leadlay PF. 1998. Stabilization of radical intermediates by an active-site tyrosine residue in methymalonyl-CoA mutase. *Biochemistry* 37: 14386-14393.
2. Hong SM, Yamashita J, Mitsunobu H, Uchino K, Kobayashi I, Sezutsu H, Tamura T, Nakajima H, Miyagawa Y, Lee JM, Mon H, Miyata Y, Kawaguchi Y, Kusakabe T. 2010. Efficient soluble protein production on transgenic silkworms expressing cytoplasmic chaperones. *Appl Microbiol Biotechnol* 87: 2147-2156.
3. Park EY, Kageshima A, Kwon MS, Kato T. 2007. Enhanced production of secretory baeta 1, 3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 fusion protein into hemolymph of *Bombyx mori* larvae using recombinant BmNPV bacmid integrated signal sequence. *J Biotechnol.* 129:681-688.
4. Wu J., King G., Daugulis A.J., Faulkner P. Bone DH, Goose MFA. 1989. Engineering aspects of insect cell suspension culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 249-255.
5. Koles K, Irvine KD, Panin VM. 2004. Functinal characterizaion of *Drosophila* sialyltransferase. *J Biol Chem.* 279: 4346-4357.
6. Goldwasser E, Kung CKH. 1968. Progress in the purification of erythropoietin. *Ann NY Acad Sci.* 149: 49-53.
7. Klueg KM. Alvarado D, Muskavitch MA, Duffy JB. 2002. Creation of a GAL4/UAS coupled inducible gene expresssion system for use in *Drosophila* cultured cell lines. *Genesis* 34: 119-122.
8. Conzelmann E, and Sandhoff H. 1987. Activator proteins for lysosomal glycolipid hydrolysis. *Methods Biochem Anal.* 32:1-23.
9. Altmann F, Schwihla H, Staudacher E, Glössl J, März L.. 1995. Insect cells contain an unusual, membrane-bound beta-N-acetylglucosaminidase probably involved in the processing of protein N-glycans. *J Biol Chem.* 270(29):17344-9.
10. Marchal I, Mir AM, Kmiécik D, Verbert A, Cacan R. 1999. Use of inhibitors to characterize intermediates in the processing of N-glycans synthesized by insect cells: a metabolic study with Sf9 cell line. *Glycobiology.* 19(7):645-54.



11. Tomiya N, Narang S, Lee YC, Betenbaugh MJ. 2004. Comparing N-glycan processing in mammalian cell lines to native and engineered lepidopteran insect cell lines. *GLYCOCONJUGATE journal*, 21: 343-360.
12. Altmann F, Staudacher E, Wilson IB, Marz L. 1999. Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconj J* 16, 109-123.
13. Marchal I, Jarvis DL, Cacan R, Verbert A. 2001. Glycoproteins from insect cells: Sialylated or not?. *Biol Chem* 382, 151-159.
14. Hemmer W, Focke M, Kolarich D, Wilson IB, Altmann F, Wohrls S, Gotz M, Jarisch R. 2001. Antibody binding to venom carbohydrates is a frequent cause for double positivity to honeybee and yellow jacket venom in patients with stinging-insect allergy. *J Allergy Clin Immunol* 108; 1045-1052.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.