

최      중  
연구보고서

형질전환식물체를 이용한 자가 면역 질환치료용  
유용단백질의 생산

Expression of edible immune-suppressive protein  
in transgenic plant for autoimmune disease

고려대학교 생명과학대학  
진주산업대 작물생명과학과

농림부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “형질전환식물체를 이용한 자가 면역 질환치료용 유용단백질의 생산” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 11월 14일

주관연구기관명 : 고려대학교

총괄연구책임자 : 박세호

세부연구책임자 : 안지훈

연 구 원 : 홍창완

연 구 원 : 정선도

연 구 원 : 강성욱

연 구 원 : 오미화

연 구 원 : 유소연

연 구 원 : 임소영

연 구 원 : 유성전

연 구 원 : 최미숙

연 구 원 : 유승관

협동연구기관명 : 진주산업대학교

협동연구책임자 : 이신우

연 구 원 : 이정윤

연 구 원 : 이협

연 구 원 : 유재주

연 구 원 : 원성혜

연 구 원 : 김덕수

연 구 원 : 김경희

연 구 원 : 노동욱

연 구 원 : 김소연

연 구 원 : 최수호

## 요 약 문

### I. 제 목

형질전환식물체를 이용한 자가 면역 질환치료용 유용단백질의 생산

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

자가면역질환의 발병 원인은 현재 정확히 알려져 있지 않으며 개인의 유전적 소양과 환경적 조건에 영향을 받는다. 질병에 따라 다양한 증상을 나타내며 질환의 특성상 일단 발병하면 치료가 힘들고 상태가 더욱 심각해진다. 현재 적절한 치료법이 없이 대증 요법을 사용하거나 상태가 심한 경우 전신적인 효과를 미치는 면역억제제(스테로이드성, 비스테로이드성)를 사용하는데 이는 환자의 삶의 질의 현저히 감소시키며 2차적인 감염 위험에 노출시킨다. 따라서 근원적인 치료법인 자가면역 T 세포만을 선택적으로 억제하는 방법의 개발이 시급하다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

우리몸의 면역계는 자기와 비자기를 구분하여 비자기에 대해서는 면역반응을 나타내지만 우리가 매일같이 소비하는 대표적인 비자기 물질인 음식물에 대해서는 면역반응을 나타내지 않으며 나타내어서도 안된다. 면역시스템은 단순히 음식물에 대해 반응을 하지 않는 것이 아니라 음식물 항원에 대해 적극적인 면역억제 반응을 일으킨다. 이러한 이유로 병원균에 대한 예방을 위해 먹는 백신을 개발하려는 시도들이 번번히 실패하고 있다. 그러나 본 연구팀은 음식물을 통해 제공되는 항원에 대해 면역반응이 적극적으로 억제되는 점에 착안하여 자가항원에 대한 잘못된 면역반응을 억제

하는 면역억제 백신을 개발하였다.

본 연구팀이 개발한 백신은 실제 체내에서 자가항원으로 인식되어 자가면역 T 세포들의 공격을 받는 항원을 ① 장내 무해 박테리아를 이용하여 장내에서 발현하거나 ② 형질전환 식물을 만들어서 음식물의 형태로 제공하는 형태를 띄고 있으며 두가지 방법에서 모두 자가면역질환을 억제하는 효과를 확인하였다. 사람의 자가면역 질환 중 일종인 다발성 경화증에 대한 실험동물 모델인 EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis)를 유발시킨 생쥐에서 자가항원 발현 박테리아와 자가항원발현 형질전환 식물체가 인위적으로 유발시킨 질병의 증상을 현저히 개선하는 것을 확인하였으며 이러한 과정이 면역학적으로 유의한 과정을 통해 진행됨을 확인하였다. 즉 면역억제 기능을 하는 사이토카인인 IL-10의 체내 생산량이 처리군에서 현저히 증가함을 확인하였는데 이는 실험동물에서 관찰한 증세의 완화가 본 연구팀이 제공해준 항원에 의해 발생한 조절 T 세포 (regulatory T cells, T<sub>reg</sub>)가 생산하는 면역억제 사이토카인 IL-10에 의해 일어남을 증명해 주었다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

다양한 자가면역 질환의 항원 단백질을 동일한 방법으로 박테리아 및 형질전환 식물에 도입하여 다발성 경화증이외에도 자가면역 당뇨병 및 류마티스성 관절염 등 다양한 자가면역질환의 치료에 응용할 수 있을 것으로 판단되며 또한 아토피성 피부염과 같은 면역질환의 억제에도 이용이 가능할 것으로 판단된다. 현재 개발된 다발성 경화증 치료용 식용 백신을 감자나 고구마와 같이 식용작물에서 안정적으로 발현시켜 조만간 임상실험에 들어갈 수 있도록 시도할 예정이다. 이러한 과정은 개별 실험실수준에서 진행하기는 어려운 만큼 관심있는 제약사 및 벤처 기업과의 연계를 통해 연구를 진행할 예정이다.

## SUMMARY

### (영문 요약문)

We developed transgenic plants and non-pathogenic E. coli strains, which were manipulated to produce immune-suppressive antigens in an effort to develop edible vaccine for the autoimmune diseases. Since the expressed protein antigens were designed not to be functional, antigens can't exert their native functions, which may cause unexpected side effects other than antigen itself. Delivery of these antigens by feeding can specifically induce regulatory T cells which can suppress tissue destructive Th1 immune responses against the same antigen what is the the reason of pathogenesis in many autoimmune disease such as multiple sclerosis, type I diabetes and rheumatoid arthritis.

Myelin basic protein (MBP) expressing E coli and transgenic arabidopsis were feed to the animals which were induced EAE an animal model of human disease multiple sclerosis (MS). Compare to non-transgenic bacteria and non-transgenic plant both of transgenic bacteria and plant suppressed the onset and magnitude of the disease symptom.

These results not only indicated that our transgenic organism can be used for the treatment of human MS in safe and cheap way but also open the possibility that many other autoimmune diseases could be curable through edible vaccine.

## CONTENTS

### (영 문 목 차)

Chapter 1	Summary of the project	
Part 1	Importance of the research	
1.	Scientific aspect -----	7
2.	Sicio-cultural aspect -----	11
3.	Future perspectives -----	12
Part 2	Specific aims of the project-----	14
Chapter 2	State of the art -----	16
Chapter 3	Research aims and results	
Part 1	Project #1 -----	18
Part 2	Project #2 -----	38
Part 3	Project #3 -----	51
Chapter 4	Achievement and contribution	
Part 1	Achievement	
1.	Year 1 -----	73
2.	Year 2 -----	79
3.	Year 3 -----	84
Part 2	Contribution to the related fields -----	88
Chapter 5	Application plans -----	89
Chapter 6	Oversea's research activity -----	91
Chapter 7	Reference -----	92

## 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	
	1절 연구 개발의 필요성	
	1. 기술적 측면 -----	7
	2. 사회 문화적 측면 -----	11
	3. 앞으로의 전망 -----	12
	2절 연구 개발 목표와 내용 -----	14
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	16
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	
	1절 제 1 세부 과제	
	1. 연구 수행 내용 -----	18
	2. 연구 수행 결과 -----	22
	2절 제 2 세부 과제	
	1. 연구 수행 내용 -----	38
	2. 연구 수행 결과 -----	40
	3절 제 3 세부 과제	
	1. 연구 수행 내용 및 결과 -----	51
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	
	1절 목표 달성도	
	1. 제 1 차년도 -----	73
	2. 제 2 차년도 -----	79
	3. 제 3 차년도 -----	84
	2절 관련 분야에의 기여도 -----	88
제 5 장	연구개발결과의 활용 계획 -----	89
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	91
제 7 장	참고문헌 -----	92

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1 절. 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

#### 가. 형질전환식물체를 이용한 유용 단백질 생산 시도 시 고려사항

형질전환식물체를 이용하여 유용한 단백질을 생산하려는 많은 시도들이 기술적으로 가능해짐에도 불구하고 이 방법을 이용하는 데는 현실적으로 많은 문제점이 내포되어 있다. 무엇보다도 단순히 대량생산만을 위해 식물체를 이용하는 방법은 형질전환식물체의 제조에 걸리는 시간, 수율, 효과면에서 볼 때 박테리아나 곤충세포, 또는 동물세포 및 동물 개체를 이용한 방법에 비해 효율성이 높지 않기 때문이다. 따라서 식물체를 이용하여 생산한 단백질이 가지는 본질적인 가치가 대단히 크지 않다면 식물체를 이용한 유용 단백질 생산의 가치는 제한적일 수밖에 없을 것이다.

그렇다면 식물체에서 유용한 단백질을 생산하는 연구에서 고려해야 할 사항은 무엇인가? 무엇보다 먼저 식물체 및 식물 단백질이 지니고 있는 고유의 장점을 심분 살리는 길일 것이다

- 1) 첫째로 식물체가 생산하는 단백질이 지니는 대표적인 장점은 **안정성**이다. 일반적으로 식물 단백질은 음식물의 형태로 섭취가능하기 때문에 식물체에서 생산한 단백질은 비섭취용 단백질에 비해 상대적으로 안전하다. 특히 식량으로 사용되는 식물의 경우에는 더욱 그러하다. 더욱이 다른 시스템으로부터 분리된 단백질을 음식물이 아닌 형태로 인체에 주입하는 경우에 발생할지도 모르는 안전성 문제를 고려한다면 이것은 매우 큰 장점이다.
  - 2) 두 번째 식물체가 생산하는 단백질이 지니는 장점은 **경제성**이다. 만약 어떤 시스템을 이용하여 유용 단백질을 생산하더라도 그 단백질을 이용하기 위해 순수정제를 해야만 한다면 생산비용은 엄청나게 증가하고 말 것이다. 그러나 이미 안전성이 입증된 식물체를 이용하여 유용단백질을 생산하고 이것을 추가적인 분리정제과정 없이 음식물 형태로 제공하여 원하는 효과를 나타낼 수 있다면 이 방법은 매우 경제적으로 원하는 단백질을 생산할 수 있는 방법이 될 것이다.
- 따라서 이 두 장점을 적절히 살린다면 식물체를 이용하여 유용 단백질을 생산하는 일은 최고의 경제성과 안전성을 동시에 충족시켜줄 수 있는 방법이 될 것이다.

#### 나. 형질전환식물체를 이용한 유용 단백질 생산과 그 문제점

그러나 불행하게도 많은 단백질들 (아마 거의 대부분)은 식물체를 이용하여 단백질을 생산하고자 하는 본래의 목적에 맞지 않는다. 왜냐하면 대부분의 단백질은 그 단백질의 고유한 형태가 온전하게 유지되는 때에만 기능을 발휘하는 경우가 많은데 이 단백질을 음식물의 형태로 제공한다면 위와 장에서 파괴될 것이고 결국은 펩타이드의 형태로 장에서 흡수되고 말 것이기 때문이다.

이러한 모순에서 벗어난 전략으로 시도되고 있는 것이 식물체를 이용하여 백신을 제조하려는 노력이다. 식물체를 이용한 백신 제조에서는 유용단백질 (이 경우는 병원균의 항원인 단백질)을 생산하더라도 그 단백질이 완전한 구조를 갖을 필요가 없다. 왜냐하면 항원으로 제공되는 단백질은 면역세포가 인식할 수 있는 형태 (단백질이 분해된 짧은 길이의 펩타이드)로만 제공되면 충분하므로 이를 음식물의 형태로 제공해주는 경우 장내에서 분해가 되더라도 분해된 단백질 조각 (아미노산 길이 10개 정도의 펩타이드)이 항원으로 기능한다면 그 역할을 수행할 수 있기 때문이다. 따라서 식물체를 이용하여 항원을 생산하는 경우 단백질을 분리하는 과정이 없이 직접 음식물 형태로 제공할 수 있고 또 소화과정에서 그 단백질이 파괴되더라도 기능상의 문제가 없을 것이다. 이러한 점에 착안하여 지난 1990년대에 세계보건기구 (WHO)와 유엔아동기금 (UNICEF)는 식물체를 이용한 백신 개발을 통해 값싸고 효율적인 백신을 개발도상국에 대량으로 보급하려는 야심찬 연구를 수행하였다.

그러나 이러한 시도 또한 예상치 못한 큰 장벽에 부딪히고 말았는데 이는 사람을 포함한 동물계의 소화기내 면역시스템이 가진 특징을 제대로 이해하지 못하였기 때문에 발생한 것이었다. 동물의 소화기는 외부와 끊임없이 접촉하고 영양분을 흡수하는 기관으로서 독특한 면역시스템을 형성하고 있음이 최근 들어 밝혀졌다. 간단한 예로 우리가 일상적으로 섭취하는 음식물이라 할지라도 이를 정맥주사하는 경우 매우 심각한 면역반응이 일어나지만, 같은 단백질을 음식으로 섭취하는 경우에는 드물게 일어나는 알레르기 반응을 제외하고는 면역반응을 일어나지 않는다. 이것은 비록 비자기인 항원이라 할지라도 소화기를 통해 흡수되는 경우는 적극적으로 면역반응이 억제된다는 것을 의미하며 실제로 이 과정에는 장내에 분포하는 면역억제 T세포가 관여하고 있음이 밝혀졌다.

따라서 식물체를 이용한 백신을 개발하기 위해서는 단순히 항원을 음식물의 형태로 제공하는 데서 그치는 것이 아니라 이 항원에 대해 장내에서 면역억제 반응이 일어나는 것을 막고 오히려 적극적인 면역반응이 일어나도록 유도해 줄 필요가 있었던 것이다.

여기서 새로운 모순이 발생하게 되는데 그것은 음식물 형태로 제공된 항원에 대해 면역반응을 일으키기도록 하기 위해 추가적인 adjuvant를 사용해야만 한다는 점이다.

이런 목적으로 많은 연구자들이 박테리아의 독신 단백질 (bacterial toxin)들을 첨가하는 방법을 연구하였지만 이러한 adjuvant의 사용은 그 자체로서 예기치 않은 과도한 면역반응을 유도할 수 있고 결정적으로는 본래 생산하고자 했던 식물체의 단백질 자체에 대해서도 무차별적으로 면역반응을 일으킬 수 있는 가능성을 내포하고 있었다. 결국 안전성을 가장 큰 장점으로 내세웠던 경구용 식물 백신의 안전성에 큰 문제가 생기게 된 것이다.

#### 다. 극복 방안

본 연구팀은 이러한 문제점을 일시에 해결하기 위해서 본 과제를 통해 기존의 접근법과는 다른 새로운 방법을 제안하고 실험적으로 증명하고자 했다. 본 연구팀이 구상하는 문제의 해결법은 다음과 같다.

- 1) **효과적인 펩타이드 조각 선택** : 우선 완전한 구조와 기능을 지니는 단백질이 아닌 펩타이드 조각만을 발현시키더라도 효과를 볼 수 있는 시스템을 선택하는 것이 유리하므로 효과적으로 면역반응에 관여하는 것으로 알려진 펩타이드 조각을 선택한다.
- 2) **면역반응 억제 관련 단백질 선택** : 두 번째로 면역반응의 유도하기 위해서 adjuvant와 같은 물질의 사용을 사용한다면 부작용이 발생할 가능성이 있으므로 반대로 면역반응을 억제하는 과정에 관련되는 단백질을 선택하여 펩타이드와 함께 도입시켜서 혹시 생길지 모르는 비특이적 면역반응을 억제한다.
- 3) **식물체 또는 인체 무해 미생물에서 생산** : 발현된 단백질 또는 펩타이드를 분리해야하는 과정을 제거하여 경제성을 도모하고 경구투여의 안정성을 위해 이를 음식물 형태로 공급이 가능한 식물체와 인체에 무해함이 입증된 미생물 (대장균, 유산균 등)에서 생산하기로 한다.

#### 라. 본 연구에서 다루고자 하는 질환

본 연구팀이 선정한 자가면역질환은 다음과 같다.

- 1) **제 1형 당뇨병 (인슐린 의존성 당뇨병)** : 제 1형 당뇨병은 인슐린을 생산하는 췌장 베타 세포의 특정 단백질을 항원으로 인식한 비정상적인 면역 T 세포가 췌장으로 이동하여 베타세포를 파괴함으로써 더 이상의 인슐린 합성이 일어나지 못하게 하기 때문에 발생한다.
- 2) **류마티스성 관절염** : 류마티스성 관절염은 관절에 풍부히 존재하는 자기 자신의 단백질을 항원으로 인식하는 비정상적인 면역 T 세포가 관절로 이동하여 자신의 조직을 공격함으로써 일어난다.

3) **다발성 경화증** : 다발성 경화증 역시 비정상적인 면역 T 세포가 신경세포를 둘러싸고 있는 미엘린 수초의 미엘린 단백질을 항원으로 인식하여 신경세포를 파괴함으로써 발생하는 신경증 질환이다.

본 연구팀이 여러 질환 중에서 자가 면역질환을 선택하면서 고려했던 사항은 다음과 같다.

1. 경제 발전과 더불어 감염성 질환의 피해가 감소하는 반면 자가 면역질환 환자는 증가하는 추세이며 전체 인구의 상당수가 각종 자가 면역질환을 겪고 있음. 예) 전체 인구의 약 1% - 류마티스성 관절염 환자.

2. 자가 면역 질환은 자기 자신의 단백질에서 유래한 펩타이드 항원을 인식하는 T 세포에 의해 유발됨.

3. 장내 면역시스템은 음식물에서 유래된 펩타이드를 인식하고 이에 대한 면역반응을 억제하는 면역억제 T 세포를 포함하고 있음.

4. 자가 면역질환을 일으키는 항원 펩타이드를 합성하여 장내로 흡수시키면 장내 면역억제 T 세포가 활성화되어 자가면역질환 부위로 이동하여 자가면역반응을 일으키는 T 세포들의 활성을 적극적으로 억제함.

5. 식물체를 통해 자가면역반응을 일으키는 항원의 펩타이드를 생산하고 이를 음식물의 형태로 제공하는 경우 장내 면역억제 세포를 활성화시킬 수 있음.

6. 면역억제 세포를 활성화시키는 방법을 사용하기 때문에 면역 세포를 활성화시키기 위한 adjuvant의 사용이 필요 없음. 따라서 면역억제 펩타이드와 함께 제공되는 식물체 자체의 단백질에 대한 면역반응이 일어날 수 없음.

7. 면역억제에 사용될 단백질은 펩타이드 형태로 제공되므로 완전한 형태의 기능을 가지는 단백질을 생산할 필요가 없음. 따라서 기술적으로 월등히 유리함.

8. 대상 단백질 자체가 기능을 지니지 않으므로 생산한 단백질 자체가 보일 수 있는 부작용이 완전히 제거됨.

9. 이러한 방법을 통해 부작용의 가능성이 거의 완벽히 제거되고 또 추가적인 분리 과정이 필요 없는 의료용 고효율 단백질 (펩타이드)의 생산이 가능하며 이를 생산하는 형질전환 식물체의 개발을 통해 고부가가치 질병 치료용 농산물의 생산 가능함.

마. 본 연구가 지향하는 자가면역 질환 치료의 기전

본 연구팀은 위의 사전 탐구 과정을 통해 몇 가지 자가면역질환에 대해 면역억제 효과를 보일 수 있는 단백질 조각을 선정하여 이를 생산하는 형질전환 식물을 개발하고자 한다. 개발된 형질전환 식물 단백질을 음식물의 형태로 제공하여 동물모델에서

인위적으로 유도한 자가면역질환을 억제 또는 치료하는 효과가 있는지를 검증할 것이다. 우리는 각 질병이 발생하는 장소에서 특이적으로 발현되는 단백질을 대상으로 이 단백질의 조각인 펩타이드를 식물세포에서 발현시킬 예정이다. 따라서 발현되는 펩타이드는 단백질 본래의 기능은 전혀 가질 수 없는 조각에 불과하다. 이를 음식물의 형태로 섭취시키게 되면

- 1) 장내에서 이 펩타이드를 인식하는 면역억제 T 세포가 활성화된다<sup>(1)</sup>.
- 2) 활성화된 면역억제 T 세포는 자신이 인식할 수 있는 항원이 발현되는 조직으로 이동하는 특성을 보인다. 이 경우 인슐린 펩타이드를 인식하는 면역억제 T 세포는 췌장의 베타세포 주변으로 이동하게 되며, 콜라겐 펩타이드를 인식하는 면역억제 T 세포는 관절 부위로 이동한다. 미엘린 단백질을 인식하는 면역억제 T 세포는 척수와 뇌를 비롯한 신경세포 주변으로 이동한다. 자가 면역 질환을 앓고 있는 환자의 경우 면역 억제 T 세포가 이동해 갈 조직에는 이미 그 조직을 인식하는 자가면역 T 세포들이 조직을 공격하고 있다<sup>(2)</sup>.
- 3) 우리가 음식물의 형태로 제공한 펩타이드에 의해 활성화된 면역억제 T 세포는 자가면역 T 세포와 같은 조직에 분포하게 되고 이때 면역억제 T 세포가 분비하는 TGF- $\beta$ , IL-10과 IL-13과 같은 사이토카인은 주변에서 조직을 공격하고 있는 자가면역 T 세포들의 활성을 급격히 억제시키고 그 특성을 바꿔준다<sup>(3)</sup>.
- 4) 이 경우 조직을 공격하던 면역 T 세포는 자신의 사이토카인 분비 패턴을 변화시키거나 세포사멸에 의해 제거되거나 불활성상태 (anergy)에 빠지게 된다<sup>(4)</sup>.
- 5) 이를 통해 자신의 조직을 공격하는 자가면역 현상이 완화되거나 완치될 수 있다.

## 2. 사회·문화적 측면

본 연구는 사회, 문화적으로 다음의 측면에서 연구 수행의 필요성이 있다.

- 1) **농업인의 사회적 인지도 고취** : WTO 체제 후 우리나라의 농산물 시장은 외국의 값싼 농산물과의 경쟁에서 근본적으로 불리한 구조를 갖고 있으며 수익성과 사회적 인지도의 저하로 인한 이농현상이 심각하게 나타나고 있다. 극복 대안은 고부가가치의 농산물의 독점적으로 생산하여 농업도 고수익과 명성을 쌓을 수 있는 경영형태로 발전할 수 있다는 것을 제시함으로써 가능하다.
- 2) **미래 농업의 비전 제시** : 본 과제를 통해 질병 치료용 작물이 개발되는 경우 농업적인 측면에서 지금까지의 생산성 증가를 통해 얻을 수 있었던 부가가치의 증가와는 비교할 수 없는 고도화된 농업이 가능. 따라서 우리나라 농업이 가야할 길을 제시할 수 있다.
- 3) **환자 고통 경감 및 사회적 비용 절감** : 자가 면역질환은 현대인들에서 발병률

이 증가하고 있으며 장기간에 걸친 질병이기 때문에 장기간에 걸친 치료와 투약 등으로 치료비용이 매우 많이 소요된다. 질병 치료 비용과 더불어 가족들이 겪는 고통 등을 포함한 사회적 비용이 급격히 증가하는 추세이며 특히 사회적 후생 보장 시설이 미비한 저소득층에는 사회적 불안 야기할 수 있다.

- 4) **평균 수명 연장** : 자가 면역질환을 근원적으로 치료하는 방법은 아직 없으며 일반적으로 전신성 면역억제제의 투여 등을 통해 자가 면역현상을 억제하는 방법이 사용되고 있다. 따라서 환자들은 끊임없는 고통에 시달리거나 인위적인 면역결핍상태에 빠지게 되는 악순환을 거듭함으로써 삶의 질 저하되고 있다. 예를 들어 류마티스성 관절염 환자의 평균 수명은 비 환자군에 비해 약 10년 정도 짧은데, 이들의 조기 사망 원인은 관절염 자체가 아니라 관절염으로 인한 활동의 제한에 따른 운동 부족과 그로부터 야기되는 여러 가지 심혈관계 질환에 의한 것이다.

본 과제가 성공하는 경우 이러한 문제점을 해결할 수 있는 방법들이 개발될 것으로 예상되므로 연구 개발의 시급성이 매우 높다고 판단된다.

### 3. 앞으로 전망

형질전환 식물체를 이용하여 인체에 사용하기 위한 유용단백질을 생산하려는 시도는 앞으로도 많은 연구가 진행되어야 할 분야이다. 특히 이러한 유용단백질이 경제적 부가가치를 지닌 신물질이 되기 위해서는 아래의 조건을 충족시켜야 하며, 이 물질의 경제적 부가가치는 이 충족여부에 의해 결정될 것이다.

- 1) 저렴한 제조 원가 : 제조 원가의 절감을 위해서 형질전환 단백질의 발현수준이 고도화된 물론 분리가 효과적으로 이루어 질 수 있도록 설계하거나 분리할 필요가 없는 시스템의 개발이 필요하다.
- 2) 고효능과 저부작용 : 신물질 사용에 따른 부작용이 없어야 하며 생산하고자 하는 물질이 인체에 바로 적용할 수 있을 만큼 좋은 효과를 지니고 있어야 한다.
- 3) 사회적 요구성 : 이 신물질에 대해 사회적으로 광범위하고 지속적인 수요가 있어야 한다.

#### 가. 기술적 측면

기술적인 측면에서 본 연구가 지닌 효과는 다음과 같다.

- 1) **향후 연구의 모델 제시** : 본 과제에서 제안하는 형질전환 식물체를 이용한 의약품 펩타이드의 생산은 위에 언급한 모든 조건을 만족하는 물질로서 대단히 큰 경제적 가치를 지닐 것이며 향후 이 분야 연구의 모델 케이스가 될 수 있을 것

으로 기대된다.

- 2) **다른 질환의 대체 치료 방법 방향 제시** : 본 연구 과제의 성공적인 수행을 통해 식량 작물을 이용한 치료용 펩타이드 생산이라는 새로운 분야의 가능성을 열어 놓을 것이다. 이 기술을 이용하여 수많은 다양한 자가면역 질환들을 치료할 수 있는 방법이 개발될 것으로 기대한다.
- 3) **알레르기 억제 식물체 개발 및 호르몬 관련 치료 기술 개발** : 특히 본 연구에서 나올 연구 결과는 알레르기 반응을 억제하는 식물체의 개발 등으로 응용될 수 있다. 또 다른 응용 분야로 본 연구팀이 계획하고 있는 표적으로 펩타이드 성 호르몬을 생산하는 식물체의 개발이며 이 또한 호르몬 관련 질환의 치료에 응용될 수 있을 것이다.

#### 나. 경제·산업적 측면

본 연구가 가지고 올 경제적 산업적인 파급 효과는 다음과 같다.

- 1) **기술적 우위 담보** : 고부가가치 유용단백질을 대량으로 생산하려는 시도들이 그 효용성과 수율 또는 생산비의 문제로 인해 큰 진전을 보지 못하고 있는 시점에서 본 연구팀은 기존의 방향과는 반대의 관점에서 유용단백질을 생산하려는 계획을 세웠다. 이 방법은 본질적으로 부작용이 없는 단백질을 생산할 수 있으며 생산 대상이 전체 기능성 단백질이 아니라 짧은 펩타이드에 불과하므로 기술적으로도 매우 유리하다. 또 이러한 단백질 펩타이드를 음식물의 형태로 제공하여도 그 효과를 충분히 기대할 수 있는 전략을 취하고 있기 때문에 유용단백질의 최종 이용과정까지 소요되는 비용을 극적으로 줄인 방법이 될 것이다.
- 2) **고부가가치 창출** : 그리고 최종 이용단계의 물질이 식물체 그 자체이므로 한번 형질전환 식물체를 개발하는 경우 이를 최종적으로 이용할 때까지 소요되는 비용 중 식물체의 재배가 차지하는 비중이 가장 클 것이다. 다시 말해 이를 생산할 농민들에게 부가가치의 상당부분이 환원될 수 있는 구조를 지니고 있다. 이러한 형질전환 식물은 상품으로 개발되어 전세계를 시장으로 공급될 수 있으므로 상품화 되는 경우 그 시장 규모는 최소한 수십억 달러 규모에 이를 것이다. 본 연구팀은 과제 수행을 통해 현실화되는 기술들을 특허화하고 개발되는 작물들을 선발된 농가에 보급하여 고 부가가치 농산물을 생산할 수 있는 기반을 구축할 것이다.
- 3) **경제적인 치료 방법** : 이러한 시도가 성공한다면 상대적으로 매우 저렴한 비용으로 여러 가지 자가면역 질환을 치료할 수 있는 부작용이 없는 약제가 제공될 수 있으므로 자가면역질환 환자들에게 제공되는 경제적 혜택 또한 대단히 클 것이다.

#### 다. 사회·문화적 측면

본 연구가 가져올 사회 문화적 측면의 효과는 다음과 같다.

- 1) **미래 농업의 지표 제시** : 본 과제를 통해 질병 치료용 작물이 개발되는 경우 농업적인 측면에서 지금까지의 생산성 증가를 통해 얻을 수 있었던 부가가치의 증가와는 비교할 수 없는 고도화된 농업이 가능할 것이며 이는 우리나라 농업이 가야할 방향의 전형을 제시해 줄 것으로 판단된다.
- 2) **삶의 질 향상과 국민 건강 공헌** : 자가 면역질환의 경우 그 질병의 증상이 조기 발견이 어렵고 일단 발병하는 경우 매우 장기간에 걸쳐서 진행되는 특징을 보인다. 면역시스템의 비정상적인 활성화에 의해 일어나는 질병이기 때문에 현재까지 이를 근원적으로 치료하는 방법이 없으며 일반적으로 전신성 면역억제제의 투여 등을 통해 자가 면역현상을 억제하는 방법이 사용된다. 따라서 환자들은 끊임없는 고통에 시달리거나 인위적인 면역결핍상태에 빠지게 되는 악순환을 거듭함으로써 삶의 질에 심대한 영향을 미치게 된다. 일례로 류마티스성 관절염의 경우 환자 그룹의 평균 수명은 치료를 받는 경우에도 비 환자 군에 비해 약 10년 정도 짧은 특징을 보이는 데 이들의 조기 사망 원인은 관절염 그 자체가 아니라 관절염으로 인한 활동의 제한에 따른 운동 부족과 그로부터 야기되는 여러 가지 심혈관계 질환에 의한다. 결국 삶의 질의 저하와 의료비의 증가 그리고 평균 수명의 감소 등이 동반되는 것이다. 본 과제가 성공하는 경우 이러한 문제점의 상당 부분을 해소할 수 있는 방법들이 개발될 것이다.

## 2 절. 연구개발 목표와 내용

**과제의 최종목표: 장내 무해 세균과 식물체를 이용한 자가면역 억제 단백질의 생산 및 응용**

1. **식물체를 이용한 자가면역질환 치료 방법 개발** : 식물체를 이용하여 제 1형 당뇨병, 류마티스성 관절염, 다발성 경화증 등 다양한 자가면역질환을 억제할 수 있는 유용 펩타이드를 생산하여 이 질환을 앓고 있는 이들의 질병 상태를 개선하고 완치할 수 있는 방법을 개발한다.
2. **국민 건강 기여 및 농업 수준의 극대화** : 자가 면역질환을 억제할 수 있는 유용 펩타이드를 별도의 분리과정을 거치지 않고 음식물의 형태로 제공하는 방법을 개발하여 국민건강에 기여함은 물론 고부가가치 의료용 식물의 생산을 통해 우리나라 농업의 수준을 극대화하려는 것을 목표로 한다.

## 제 1 세부과제

- 최종 목표: 인체에 무해한 장내 세균을 이용한 자가면역 억제 단백질 펩타이드의 합성과 응용
- 제1차 년도: 대장균 및 유산균을 이용한 자가면역 억제 단백질의 생산 - 5종 이상, 식물형질전환체 제작에 필요한 정보 제공
  - 제2차 년도: 자가면역 억제 단백질의 효능을 동물질환 모델에서 검증 - 3가지 자가면역질환 모델
  - 제3차 년도: 식물체에서 생산된 최종 후보 자가면역 억제 단백질의 효능 검색

## 제 2 세부과제

- 최종 목표: 형질전환 애기장대를 생산 기지로 이용하여 자가 면역 억제 펩타이드 적용 검증과 대량 생산
- 제1차 년도: 식물체 형질전환용 자가 면역 억제 펩타이드 전달 벡터 시스템 구축 : 각 후보 펩타이드에 대해 총 5종 이상
  - 제2차 년도: 형질전환 애기장대 제작과 생체내 펩타이드 합성 확인과 개량 펩타이드 제조 - 10종, 200주이상
  - 제3차 년도: 동물모델에서 지속적인 개량 펩타이드 효능 검증과 최종 후보 결정을 통한 개량 펩타이드 생산 형질전환 애기 장대 제작

## 협동 과제

- 최종 목표: 감자를 이용한 자가면역 억제 펩타이드 형질전환 식물체의 개발과 응용
- 제1차 년도: 감자에 적용할 자가면역 억제 단백질 생산 형질전환 벡터의 제작 및 형질전환 조건 확립- 총 5종 이상
  - 제2차 년도: 형질전환 감자 생산 및 자가면역질병 억제 펩타이드 유전자의 식물체내 도입 확인
  - 제3차 년도: 형질전환체의 후대검정 및 개량펩타이드 생산 효율 확인

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

전 세계적으로도 의료용 유용 단백질을 식물체를 통해 개발하려는 연구 활발하게 진행되고 있다. 국내에서도 많은 연구자들도 식물체를 이용하여 EPO같은 유용단백질의 생산을 연구하고 있으나 식물체에서 생산한 단백질의 발현정도는 단백질 종류와 식물체의 종류에 따라 차이가 많이 나며 이를 분리하는데 기술적, 경제적 어려움이 있다.

1992년 Mason 등은 담배에서 hepatitis B virus의 표면 항원을 발현시켜 이를 항원으로 이용하여 실험동물에서 백신으로 사용하였으나 유의한 수준에 이르지 못한 것이 알려졌고<sup>(5)</sup>, 1999년 Kapusta 등은 상추에서 hepatitis B virus의 표면 항원을 발현시켜 형질전환된 상추를 백신으로 제공하였으나 지원자 3명중 2명에게서만 유의한 수준의 항체반응이 발견되었으나, 4주 뒤 면역반응이 감소됨이 관찰되었다. 이것은 장을 통해 전달된 물질에 대해 장기적으로는 면역억제 작용이 발생되었기 때문이다<sup>(6)</sup>. 2000년 Richter 등은 감자에 hepatitis B virus 표면항원을 발현시켜 실험동물에서 cholera toxin (CT)을 adjuvant로 함께 경구 투여하여 백신으로 이용하였다. 이 경우 항원반응이 관찰되었으나 adjuvant의 사용에 따라 감자 자체에서 유래한 음식물 항원에 대한 면역반응의 여부에 대한 조사가 이루어지지 않았다<sup>(7)</sup>.

또한 외국에서는 의료용으로 먹을 수 있는 백신 (edible plant vaccine)의 개발이 이루어지고 있으나 “연구개발의 필요성”에 기술한 바와 같이 심각한 부작용의 문제에 부딪히고 있다<sup>(1, 2)</sup>. 따라서 부작용을 제거하고 생산비용을 낮출 수 있는 새로운 전략이 요구되는 실정이다<sup>(8)</sup>.

그러나 본 과제에서 제안하는 방법은 이러한 부작용을 원천적으로 회피할 수 있는 전략이다. 형질 전환 생물체를 이용한 고부가가치 유용단백질의 생산에서 효율성을 결정하는 세 가지 결정적인 조건은 온전한 기능을 가지는 단백질의 발현, 발현된 단백질 이용에 따른 안전성의 확보, 그리고 순수분리의 수월성을 들 수 있다.

본 과제는 전술한 문제점을 근본적으로 포함하지 않는 새로운 디자인의 유용 단백질을 형질전환 식물체를 이용해 생산함으로써 경제적, 산업적 효율성 문제를 극복할 수 있는 방법이다. 본 과제가 **기존의 문제점을 극복할 수 있는 기술, 경제, 산업적 우월성**을 짚어보면

- 1) 본 과제는 전체 단백질이 아니라 일부 조각만으로 원하는 기능을 발휘할 수 있는 펩타이드 조각을 선택하여 자가면역질환의 치료에 이용하려고 하기 때문에 완전한 구조와 기능을 가진 단백질을 생산할 필요가 없다.
- 2) 본 과제에서 표적으로 삼는 자가면역억제 단백질은 펩타이드 형태로 제공되므로

기능성 단백질이 가질 수 있는 부작용이 근본적으로 제거되었다.

- 3) 식이 면역억제 기작을 이용하므로 단백질 (펩타이드)이 음식물의 형태로 제공된다. 따라서 발현된 단백질을 순수 분리할 필요가 없고 산업적으로 이용하는데 따르는 문제를 연구 설계단계에서 해결하여 경제성을 도모하였다.
- 4) 최종 이용단계의 물질이 식물체 그 자체이므로 한번 형질전환 식물체를 개발하는 경우 이를 최종적으로 이용할 때까지 소요되는 비용 중 식물체의 재배가 차지하는 비중이 가장 크다. 다시 말해 부가가치의 상당부분이 식물체를 생산할 농민들에게 환원될 수 있는 구조를 지니고 있다.

본 과제가 제안하는 이러한 시도가 성공한다면 상대적으로 매우 저렴한 비용으로 여러 가지 자가면역 질환을 치료할 수 있는 부작용이 없는 약제가 제공될 수 있으므로 자가면역질환 환자들에게 제공되는 경제적 혜택 또한 대단히 클 것이다. 또한 이러한 형질전환 식물은 상품으로 개발되어 전세계를 시장으로 공급될 수 있으므로 상품화되는 경우 그 시장 규모는 최소한 수십억 달러 규모에 이를 것이므로 시급히 연구가 되어야 할 분야라고 판단된다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 1절. 제 1 세부과제

**최종목표:** 인체에 무해한 장내 세균 및 형질전환 식물체를 이용한 자가면역 억제 단백질 펩타이드의 합성과 응용

#### 1. 연구 수행 내용

##### 제 1차년도

가. 대장균과 유산균을 이용하여 자가면역 억제 단백질의 펩타이드가 분비되는 균주 개발

나. 대상 질병에 대한 대상 단백질의 선정 및 클로닝을 위한 프라이머 선정

표적 펩타이드 서열은 문헌조사를 통하여 결정하였고 각각의 표적 펩타이드 서열을 합성하기 위해서 프라이머 쌍을 합성하였고 이들 프라이머를 이용하여 PCR과 RT-PCR을 실시하였음.

각 프라이머의 말단부분은 각각 PvuII (cag $\downarrow$ ctg)와 XbaI (t $\downarrow$ ctaga)의 제한효소 인식부위를 포함하고 있기 때문에 PCR 혹은 RT-PCR을 한 뒤에 별다른 과정 없이 해당 제한효소로 자른 후 바로 벡터에 클로닝하는 방법을 선택했음.

다. 대장균에서 자가면역 표적 단백질 생산을 위한 벡터의 클로닝

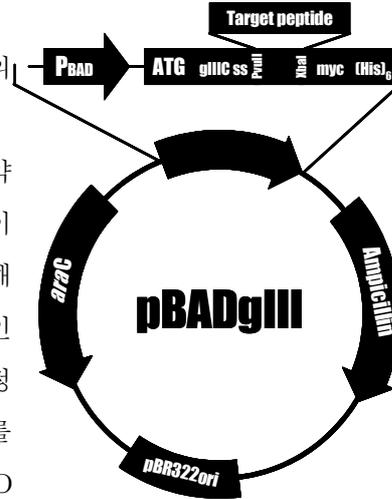
pBADgIII는 L-arabinose에 의해서 단백질 발현을 조절할 수 있는 pBAD 프로모터를 가진 벡터로서 항생제 저항성 유전자인 Amp<sup>r</sup> 유전자를 가지고 있다. 또한 multiple cloning site 다음에 cMyc과 hexa-histidine이 표지되어 있기 때문에 발현된 표적 펩타이드를 쉽게 western blotting을 이용하여 찾을 수 있을 뿐만 아니라 필요할 때에는 순수하게 표적 단백질을 분리해낼 수 있는 장점을 가지고 있음.

라. 선별된 클론들로부터 플라스미드를 얻어 염기서열 분석을 통해 insert에 에러가 없는 클론을 골라냄. 이들을 TOP10 박테리아에 형질전환시킨 후 L-arabinose를 이용하여 농도별로 얼마의 표적 단백질을 생산하는지 SDS-PAGE와 western

blotting을 통해 확인.

마. 실험의 효용성을 검증하기 위한 실험동물의 적절성 확인

○ 제 1형 당뇨병: NOD 생쥐는 암컷에서 약 15~16주가 넘게 되면 자연적으로 당뇨병상이 일어나게 됨. 이를 간단하게 요당 측정을 통해서 측정을 할 수 있고, 요당 측정을 통해 확인된 개체에 대해서는 좀 더 정밀하게 혈당 측정을 통해서 NOD 생쥐가 당뇨에 걸려 있는가를 확인할 수 있음. 실제 실험에 있어서는 NOD



생쥐를 두 그룹으로 나누어 그룹1은 표적펩타이드를 발현하는 대장균 또는 유산균을 감염시키고 그룹2는 펩타이드가 없는 벡터만을 가진 세균으로 감염시킨다. 일 주일 단위로 각 동물을 채혈하여 Behringer Mannheim의 혈당 측정 스틱을 이용하여 혈당치의 변화를 조사한다.

1) 다발성 경화증 모델: 실험동물에 미엘린 단백질을 adjuvant인 CFA와 섞어서 정맥주사 혹은 복강 주사하는 경우 자가면역 T 세포가 유도되어 뇌세포의 파괴가 일어난다. 이 과정은 수 주에 걸쳐 점진적으로 일어나며 실제 실험에서는 실험동물을 두 그룹으로 나누고 조사대상 펩타이드 생산 균주와 비 생산 균주가 증세에 미치는 영향을 조사한다. 생쥐에게 다발성 경화증을 일으키기 위해서 C57BL/6 생쥐에 myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)의 특정 펩타이드를 adjuvant인 CFA와 M. tuberculosis 그리고 Pertussis toxin과 함께 처리를 한다. 처리 후 약 7-10일 경부터 다발성 경화증의 증상이 나타나기 시작하다 15일이 되면서 가장 심한 증상을 보이게 된다. 다발성 경화증의 증상의 정도는 생쥐가 나타내는 행동에 따른 점수표를 기준으로 하여 측정하게 된다.

다발성 경화증의 점수표

점수	증상
0	아무런 증상이 나타나지 않음
1	꼬리가 부분적으로 힘을 잃음
2	꼬리가 완전히 힘을 잃음
3	꼬리를 쓸고 다니며 뒷다리에 마비증상이 와서 뒤뚱거리며 걸음

4	뒷다리가 완전히 마비됨
5	뒷다리와 앞다리가 완전히 마비됨
6	죽음

2) 류마티스 관절염 모델: 실험동물에 제 1형 콜라젠을 CFA과 섞어 정맥주사하면 자가면역 T 세포들의 유입으로 인해 관절 부위에 염증이 유발되어 사람의 류마티스 관절염과 유사한 질병상태가 유발된다. 실제 실험에서는 이 생쥐들을 2 그룹으로 나누어 류마티스 억제 펩타이드 생산 균주와 비생산 균주가 염증의 완화에 미치는 영향을 조사한다.

## 제 2차년도

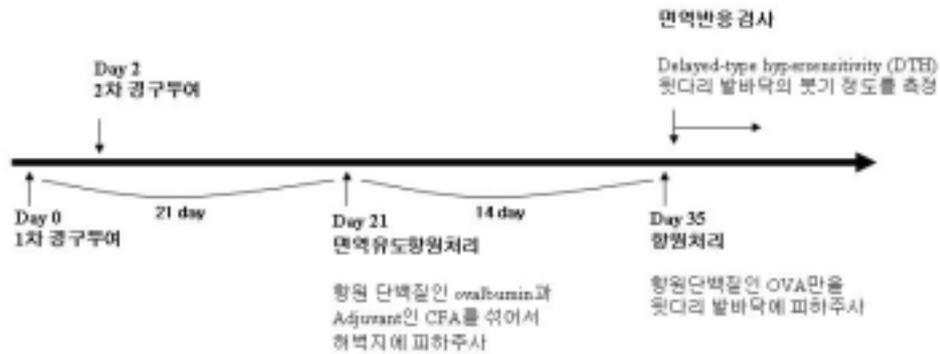
가. 미생물 유래 펩타이드를 이용한 면역반응 조절 모델을 테스트하기 위해 동물모델에서 효능을 분석하며 제어할 수 있는 절차를 확립.

1) 특정 항원에 대한 면역반응을 확인하기 위해서 가장 널리 사용하는 실험방법으로 ovalbumin을 이용한 면역반응을 조사하는 방법이 확립되어 있음. 이를 기본으로 하여 과연 미생물 유래 펩타이드가 면역반응에 영향을 미칠 수 있는가를 비교적 빠른 시일내에 확인할 수 있는 방법으로 생각하고 이후에 있을 사람의 질병과 관련된 동물 모델에서 실험을 하기 위한 기초 자료로 활용.

2) 미생물 유래 펩타이드의 효율적인 조절을 위해 추가적으로 안전장치를 도입한 pBAD 벡터를 이용하여 L-arabinose로 유전자 발현을 유도. 원하는 미생물 유래 펩타이드의 효율적인 조절이 가능한가를 테스트를 통해 확인. 본 실험에 사용한 L-arabinose는 척추동물 이상의 종에서는 대사산물로 사용할 수 없는 물질임을 확인할 수 있었음. 때문에 L-arabinose를 직접 음료에 타서 유전자 발현의 조절이 가능할 것으로 생각하고 이를 실험군에 포함하였음.

3) 미생물 유래 펩타이드가 면역체계에 미치는 영향을 판단하기 위해서 Delayed-Type Hypersensitivity (DTH)를 측정하는 방법으로서, 미리 특정 항원에 의해 면역 유도된 생쥐의 발바닥에 그 특정 항원을 피하주사하여 그 항원에 반응하여 발바닥이 붓는 정도를 측정함.

4) 실험 진행에 관한 일련의 진행과정은 다음과 같다.



그룹이름	처리방법
Group 1	L-arabinose만 처리
Group 2	L-arabinose를 처리하고 OVA를 발현하는 박테리아를 경구투여
Group 3	L-arabinose를 처리하고 original vector를 가진 박테리아를 경구투여
Group 4	L-arabinose를 처리하고 수용성 OVA를 경구투여

나. 인슐린 의존성 당뇨 모델에서 미생물 유래 펩타이드의 효능 조사

○ NOD 생쥐의 경우 자연적으로 제 1형 당뇨병이 발발하나 장기적으로 동물을 관찰하여 당 수치를 측정한다. 당뇨병이 발발한 생쥐를 선별하여 발병 시기와 비율을 측정하는 방법으로 실험을 진행.

다. 다발성 경화증 모델에서 미생물 유래 펩타이드의 효능을 조사

○ 다발성 경화증 모델에서 미생물 유래 펩타이드의 효능을 조사하기 위해서 실험동물 모델을 확립하는데 있어서 실험동물에서 유도되는 EAE의 발병정도를 극대화할 필요가 있다. 일반적으로 B6에서 MOG (Myelin oligodendrocyte glycoprotein) 35-55 펩타이드에 의해서 유도되는 EAE의 발병 정도는 높은 값을 가지고 있지 않기 때문에 미생물 유래 펩타이드의 효능을 조사하는데 있어서는 약간 부적합하다. 때문에 보다 정확한 효능을 비교하기 위해서는 높은 발병 정도를 유지할 필요가 있고 그러한 모델로 CD1이 결여된 생쥐에서 EAE를 유도하여 이에 적합한 시스템을 확립하였다.

## 제 3차년도

1. 표적 단백질을 발현하는 대장균을 이용하여 다발성 경화증의 동물 모델에서 효능 테스트

가. 펩타이드 발현 미생물을 C57BL/6 mice에 경구투여한 뒤 EAE를 유도시켜 질병 정도를 관찰하여 점수화한다.

나. in vitro assay

ELISA를 통해 cytokine의 Th 2 type switching을 관찰한다.

FACS staining을 통해 질병완화에 관여하는 regulatory T cell의 증가를 관찰하고 intracellular staining을 통해 regulatory T cell에 의한 cytokine을 확인한다.

2. 표적 단백질이 형질 전환된 애기장대를 이용하여 다발성 경화증 동물 모델에서 효능 테스트

가. 펩타이드 발현 미생물을 C57BL/6 mice에 경구투여한 뒤 EAE를 유도시켜 질병 정도를 관찰하여 점수화한다.

나. in vitro assay

ELISA를 통해 cytokine의 Th 2 type switching을 관찰한다.

FACS staining을 통해 질병완화에 관여하는 regulatory T cell의 증가를 관찰하고 intracellular staining을 통해 regulatory T cell에 의한 cytokine을 확인한다.

## 2. 연구수행 결과

### 제 1차년도

가. 대장균에서 표적 단백질을 발현하는 벡터의 클로닝 과정

1) 면역관용 유도 단백질 생산에 사용될 표적 유전자들을 확보하기 위해 생쥐의 비장에서 추출한 mRNA로부터 cDNA를 얻고 이를 재료로 사용하여 PCR을 통해서 표적 유전자를 확보함.

2) 사람의 표적 유전자는 ATCC에서 구입한 유전자 클론들로부터 발현시킬 부위를 선별하여 표적유전자 조각을 확보함 (그림 1).

3) 표적 유전자의 증폭에 사용한 primer에 각각 PvuII와 XbaI site를 도입한 뒤 이를 역시 같은 제한효소로 자른 cloning vector에 삽입하였다. Insert의 확인은 다시 PvuII와 XbaI으로 절단하여 예상된 insert가 삽입되어 있는지의 여부로 확인함.

(그림2)

나. 표적 단백질을 발현하는 대장 균에서의 발현정도 조사

pBAD 시스템에 클로닝된 표적 유전자들을 프로모터 발현을 조절하는 L-arabinose를 첨가하여 발현을 유도한 뒤 표적 단백질 조각의 발현을 확인하였다. OVA 단백질의 경우 발현량이 충분하여 박테리아 분획을 SDS-PAGE로 전개하여 충분히 확인 가능한 band를 얻을 수 있었다 (그림 3, 4).

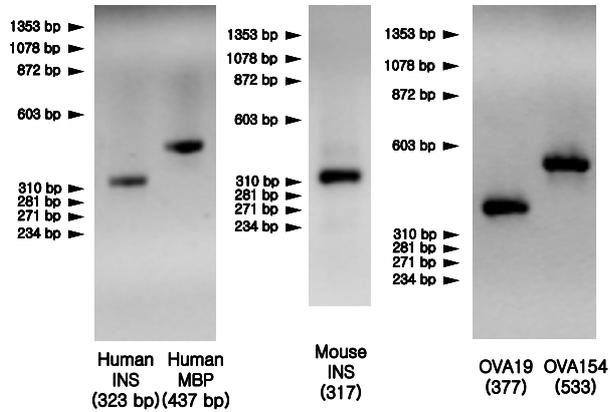


그림1: 면역 관용 유도를 위한 표적 유전자의 확보. 사람의 인슐린 단백질 조각과 미엘린 단백질 조각, 생쥐 인슐린 단백질 조각, 그리고 OVA 단백질 조각들을 암호화하는 유전자의 증폭

그러나 Mouse Insulin과 Human Insulin, MBP 단백질 조각의 경우는 단백질 발현 양이 상대적으로 약해서 직접 band를 확인하기에 어려움이 있었으므로 (그림 5) 단백질 발현 정도를 western blotting으로 확인하였다 (그림 6). 각각의 표적 단백질 조각은 클로닝 과정에서 c-myc과 6XHistidine으로 tagging 되도록 설계하였다. 따라서 모든

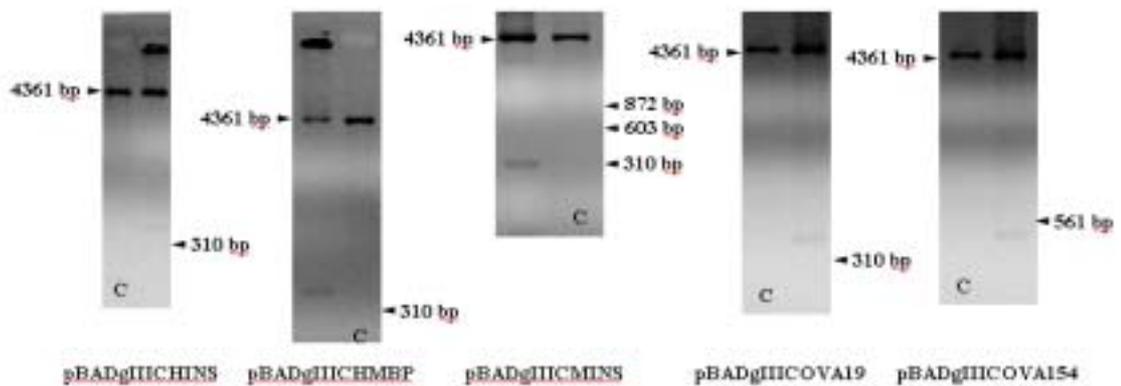


그림2: 표적 유전자 조각의 cloning. 면역관용유도를 위해 발현시킬 표적 단백질의 해당 유전자를 전사조절이 가능한 pBAD vector 시스템에 삽입하고 정상적으로 삽입된 들을 제한효소로 절단하여 확인하였다. Control (Lanes C); insert를 포함하지 않는 cloning vector.

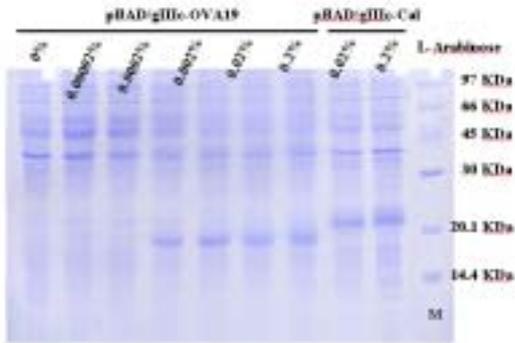


그림 3: OVA19의 발현. pBAD 시스템에 클로닝된 OVA19를 L-arabinose로 발현유도시켜 SDS-PAGE 상에서 확인함 (Lanes 1-7). positive control로 calmodulin이 삽입된 벡터를 같은 방법으로 발현유도하였다 (lanes 8-9). Lane M; Molecular weight size marker

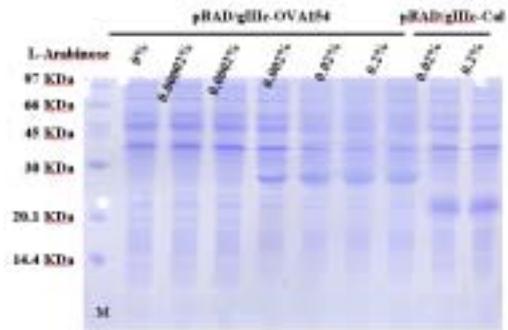


그림 4: OVA154의 발현. pBAD 시스템에 클로닝된 OVA154를 L-arabinose로 발현유도시켜 SDS-PAGE 상에서 확인함 (Lanes 1-7). positive control로 calmodulin이 삽입된 벡터를 같은 방법으로 발현유도하였다 (lanes 8-9). Lane M; Molecular weight size marker

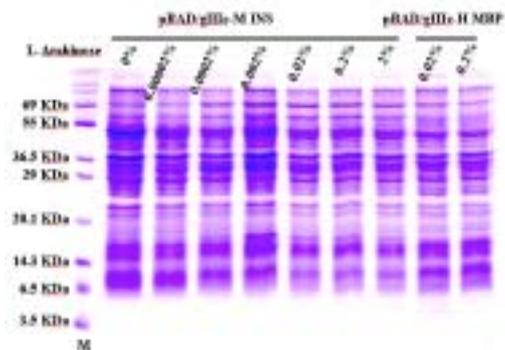


그림 5: 생쥐 insulin과 사람 MBP 단백질 조각의 발현.

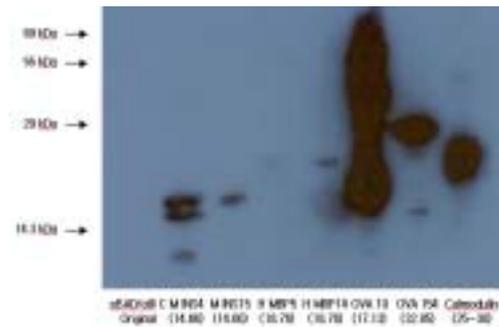


그림 6: 표적 단백질의 발현. 생쥐 insulin과 사람 MBP의 발현 벡터를 L-arabinose로 발현유도한 뒤 anti-cMyc antibody를 이용하여 western blotting으로 확인하였다.

제조합 단백질의 발현정도는 anti-cMyc 또는 anti-His 항체를 사용하여 western blotting으로 확인이 가능하도록 설계되었다. Western blotting으로 확인한 결과 positive control인 calmodulin과 OVA 단백질 뿐만 아니라 생쥐 insulin과 사람 MBP의 발현을 확인할 수 있었다.

다. 유산균에서 표적 단백질을 발현하는 벡터의 클로닝 과정

- 유산균에서 표적 단백질을 발현하기 위해서 표적유전자를 pBAD vector와 pT1NX vector의 융합 vector인 pTB vector로 재 클로닝하였다 (그림 7). 클로닝된 vector를 유산균 *L. Lactis*에 형질전환하여 단백질 발현 정도를 현재 조사하고 있다.

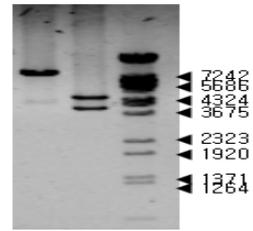


그림 7: pTB-OVA19의 클로닝. OVA19의 유전자 조각을 삽입한 vector를 PvuII (lane 1)과 XbaI (lane 2)로 절단하여 insert의 존재를 확인하였다.

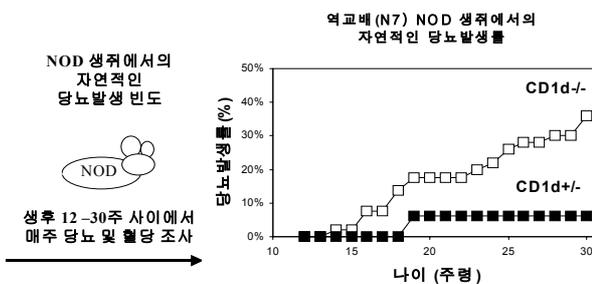
라. 실험동물 모델의 검증

- 1) 제 1형 당뇨병 모델: 특별한 처리 없이도 자연적으로 제 1형 당뇨가 발생하는 NOD 생쥐에 면역조절 NKT 세포가 결여된 CD1 KO 형질을 도입하였다. 녹아웃 형질이

129P2 생쥐에서 만들어졌기 때문에 이를 NOD 생쥐에 역교배 (backcross) 시키는 과정에서 N7에 이르렀을 때 같은 배에서 난 새끼들을 대상으로 자연적인 당뇨 발생 빈도를 조사해 보았다. 이 과정과 별도로 역교배는 지속적으로 수행하여 지금은 역교배 N14에 이른 생쥐를 확보하였고 이 생쥐들은 유전적으로 거의 100% NOD와 동일한 상태가 되었다. 역교배 N7의 상태에서도 CD1 녹아웃 생쥐는 대조군인 이형접합자 (He)에 비해 자연적인 당뇨 발생빈도가 현저히 높은 것을 확인하였다 (그림 8). 따라서 N14에 이른 NOD/CD1

KO 생쥐의 경우 야생형 NOD에 비해서도 월등히 높은 당뇨 발생빈도를 나타낼 것으로 예상되고 이는 면역억제 단백질의 효과를 조사하기에 매우 적합한 모델임을 확인하였다.

그림 8. NOD/CD1d<sup>-/-</sup> 생쥐에서의 당뇨 발생률



- 2) 다발성 경화증 : MOG peptide를 항원으로 사용하여 2차에 걸쳐 immunize한 C57BL/6 생쥐에서 두 번째 항원 주사 후 약 5주에 걸쳐 EAE의 진행 상황을 조사하였다. Immunize된 동물과 대조군 사이에서의 행동과 body control을 매일 blind tes로

관찰하여 그 정도를 scoring 하였다. 그 결과 본 연구팀이 사용한 immunize 방법을 통해 grade 4-5 정도의 임상증세를 확인할 수 있었는데 (그림 9, 10) 이는 뒷다리의 마비와 심한 경우 사지의 마비에 이르는 정도로서 면역억제 작용을 조사하기 위해서는 반드시 필요한 높은 grade의 EAE 증세 유도가 가능함을 보여주는 것이다. (그림 11).



그림 9: EAE grade 0; immunize 되지 않은 대조군 생쥐



그림 10: EAE grade 4; immunize된 생쥐에서 뒷다리의 마비와 꼬리의 근육이 마비된 것을 볼 수 있다.

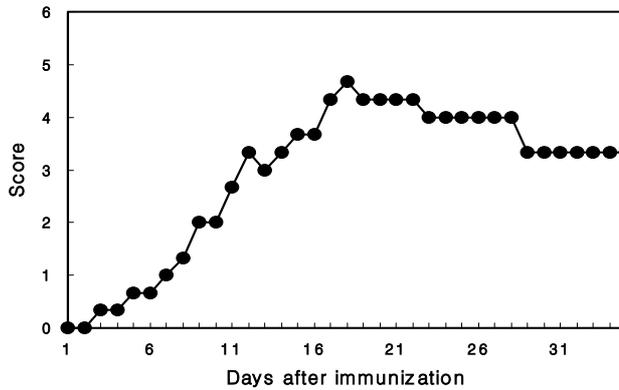


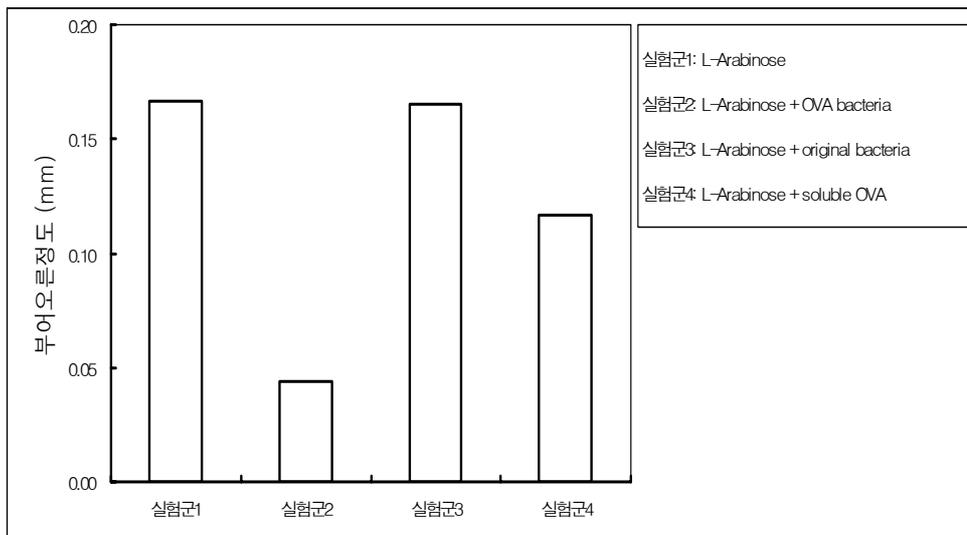
그림 11: EAE 유도 후 5주간에 걸친 임상증세의 blind test 결과. (Mouse number = 3)

따라서 본 연구팀이 조사할 면역관용유도 단백질 조각의 면역반응억제 효과를 EAE 모델에서 조사하기 위한 실험실 토대가 마련된 것으로 판단된다.

## 제 2차년도

가. 미생물 유래 펩타이드를 이용한 면역반응 조절의 모델 항원인 OVA에 대한 지연성 과민성 반응 (DTH)을 OVA 발현 미생물을 이용하여 테스트하였다. 이를 통해 동물모델에서 효능을 분석하며 제어할 수 있는 절차를 확립.

○ C57BL/6 생쥐는 실험을 위해 일괄적으로 SamTaKo에서 구입하여 사용. 그룹별로 6마리를 사용하였으며 모두 수컷을 사용하였음.



○ 실험결과에 의하면 ovalbumin 펩타이드를 생산하는 미생물을 경구투여한 경우의 생쥐와 이에 대한 대조군으로 정제된 ovalbumin을 PBS에 녹여서 경구투여한 경우의 생쥐에서 그렇지 않은 대조군의 실험보다 OVA에 대한 T cell 반응 즉 DTH (항원 투여 부위에서의 부어오른 정도) 반응 정도가 약함을 관찰할 수 있었다. 생산한 미생물유래 펩타이드의 효능을 비교적 단기간내에 간단하게 테스트 할 수 있다는 점에서 유리하다.

○ 이 결과에 따라서 몇 가지 다른 동물실험에 대한 실험방법을 체계화 할 수 있었는데, 펩타이드를 생산하는 미생물을 얼마동안 키워서 어떠한 처리를 해서 어떤 방법으로 경구투여 할 것인가 등에 대한 기본 실험방법을 결정할 수 있었다..

- 경구투여된 미생물이 소화기관을 따라 장으로 이동하는 경우에 생존률의 측면에서 많은 손실을 가져올 수 있다. 때문에 초기의 경구투여하는 미생물의 양이 적당히 많

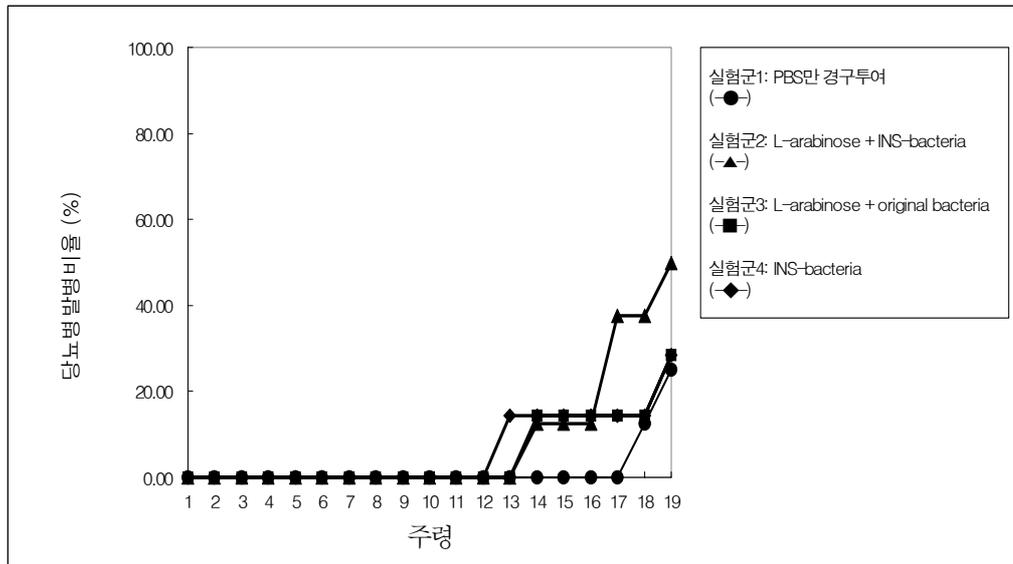
아야 하며, 바로 경구투여 전일에 가장 건강한 상태의 미생물을 경구투여 하여야 한다.

- 경구투여시 배지내의 잔여물이 실험결과에 영향을 미칠 수 있으므로 깨끗하게 멸균한 PBS에 수차례 씻어내야 하며 경구투여시에 적절하게 양을 조절하여 수월하게 경구투여를 마칠 수 있도록 한다.

- 한차례의 경구투여 시도보다는 여러번에 걸친 (최소 2~3회) 경구투여로 미생물의 장내 생존률을 높인다.

나. 인슐린 의존성 당뇨 모델에서 미생물 유래 펩타이드의 효능 조사

○ 바로 테스트 가능한 동물모델에서 장기간 관찰이 필요로 하고 한번에 많은 암컷의 생쥐만 필요하므로 바로 구입이 가능한 NOD 생쥐를 구입하여 그룹당 8마리를 설정하여 실험을 수행중.



○ 현재까지 확인된 결과에 의하면 미생물 유래 펩타이드를 실험하는 실험군에서 다른 실험군에 비해 더 빠른 당뇨병 발병시기를 보이고 있다. 이는 미생물 유래 펩타이드에 의해서 당뇨발발 시기가 전체적으로 앞당겨지고 있는 것을 예측되나 대개 30~35주까지 측정을 하여야 전반적인 발병률 및 발병시기를 정확히 분석할 수 있다.

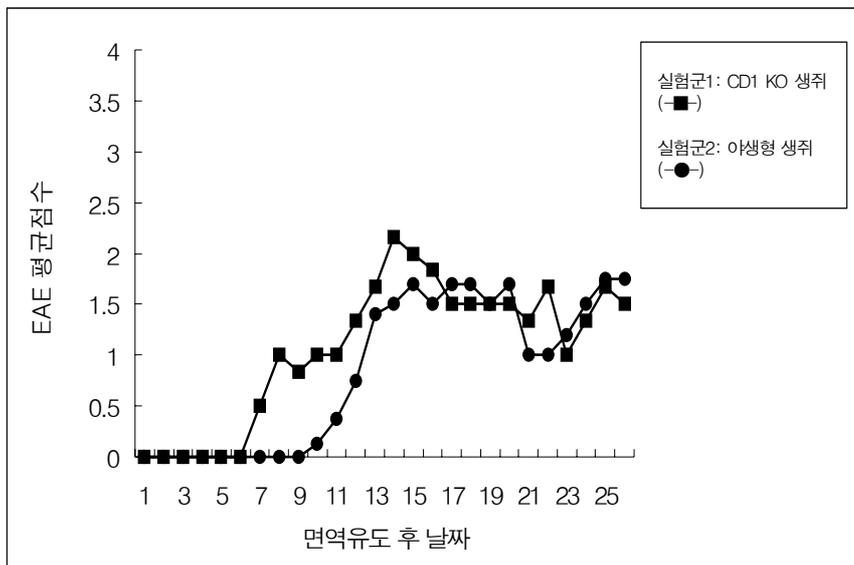
○ 현재 실험 준비중인 CD1이 결여된 NOD에서 이를 테스트 하였을 경우보다 격차가 큰 결과를 얻을 수 있을 것으로 예상된다. 또는 CD1이 결여된 NOD에서 테스트 하였을 경우 바로 미생물 유래 펩타이드와 NKT 세포간의 상관성 및 메커니즘을 야

생형과 비교하여 분석할 수 있는 실험결과를 얻을 수 있을 것으로 예상할 수 있다.

다. 다발성 경화증 모델에서 미생물 유래 펩타이드의 효능을 조사

○ 다발성 경화증 모델에서의 미생물 유래 펩타이드의 효능을 조사하기 위해서 보다 심한 발병정도를 나타내는 실험동물 모델이 필요했음. 그러나 일반적인 야생형의 C57BL/6 생쥐에서의 EAE 유도보다는 CD1이 결여된 생쥐에서의 EAE 유도가 보다 효과적일 것이라는 아이디어를 얻게 되었고 이를 바로 실험동물 모델로 사용하기에 적합한지 알아보기 위해 그룹당 5마리의 실험군을 만들어 실험하였다.

○ 다발성 경화증의 유도에는 MOG 35-55 펩타이드를 사용하게 되고 중추신경계에 염증을 유발하기 위한 보조제로 M. tuberculosis와 Pertussis toxin을 사용하게 된다. 이러한 일반적인 다발성 경화증 유도 방법에 대해서 CD1이 결여된 생쥐에서 보다 높은 발병정도를 보임이 관찰되었을 뿐만 아니라, 전반적으로 발병시기가 앞당겨지는 결과를 보였다. 이를 이용하여 실험에 들어갈 경우 보다 빠르게 미생물 유래 펩타이드의 효과를 파악하고 실험기간을 단축할 수 있을 뿐만 아니라 CD1과 관련된 NKT와 자가면역질환 그리고 경구투여를 통한 면역억제 반응의 상관관계를 연구할 수 있는 기본적인 실험 결과를 얻을 수 있을 것으로 예상된다.



### 제 3차년도

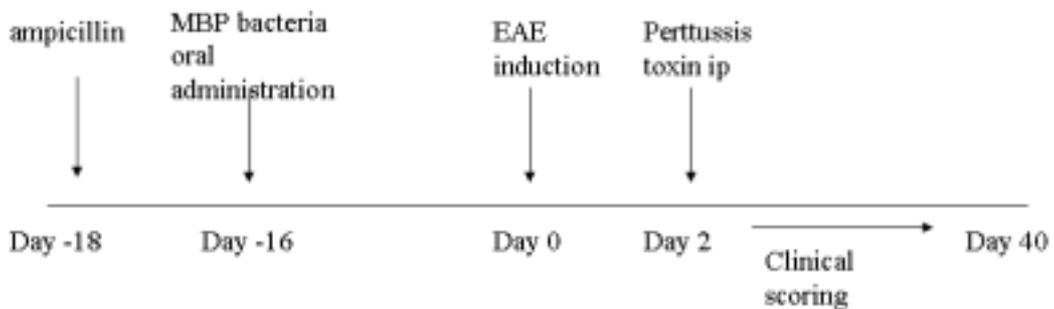
oral tolerance를 유도하는데 있어서 가장 중요한 것은 투여하는 물질의 dosage이다. 이와 함께 중요하게 작용하는 요인은 투여 시기라고 할 수 있겠다. 따라서 본 연구팀은 실험 동물군에서 적절한 투여량을 정하는 과정부터 실험을 진행하였다. 실험에 사용한 동물 그룹은 크게 두 종류로 나뉜다. 첫 번째는 미생물 유래 펩타이드를 투여 물질로 이용한 그룹이다(A). 두 번째는 동일한 펩타이드가 형질 전환된 식물체(arabidopsis)를 투여 물질로 이용한 그룹이다(B). 각 그룹마다 4번, 3번의 실험이 수행되었다.

매 실험마다의 dosage와 투여 시기는 아래의 표와 같이 수행하였다.

A 그룹		B 그룹		B 그룹		B 그룹	
dosage	2.5 ug/day	dosage	0.1 ug/day	dosage	1.76 ug/day	dosage	2 ug/day
time to regimen	2회	time to regimen	56 일	time to regimen	26 일	time to regimen	16일
4회 실험 동일 투여		1회 실험시		2회 실험시		3회 실험시	

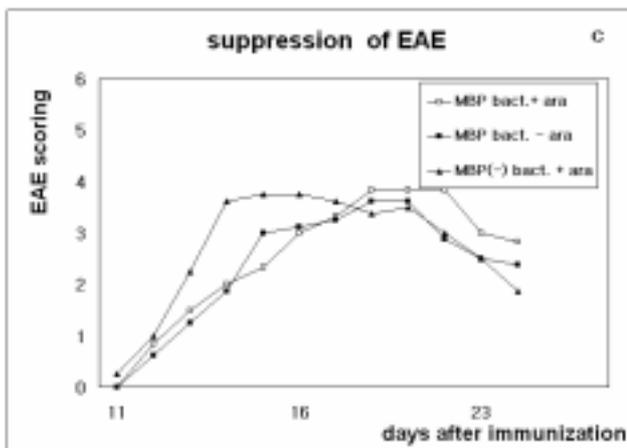
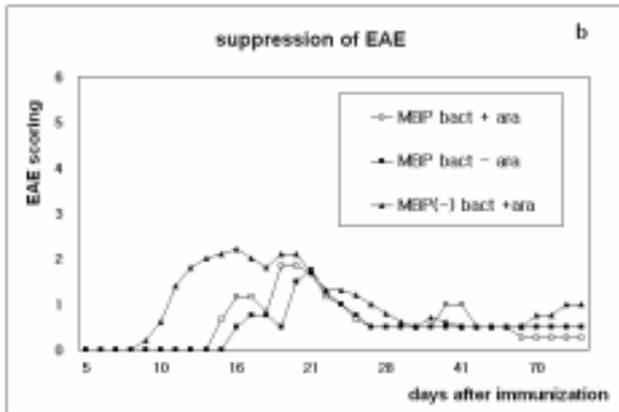
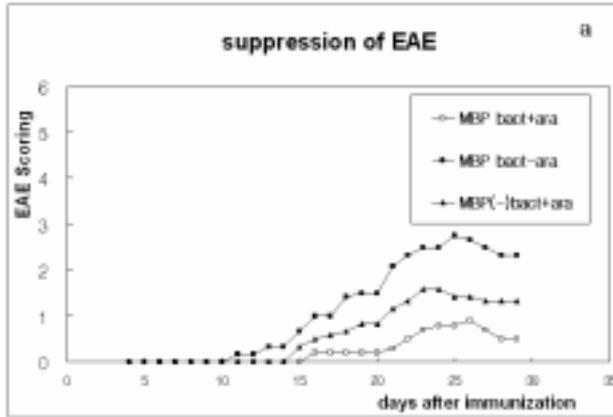
#### 1. 미생물 유래 펩타이드를 이용한 면역반응 조절

실험에 관한 일련의 진행 과정은 다음과 같다.



실험은 총 4회의 반복 실험을 실시하였으며 3회의 비슷한 실험 결과를 얻었다.

1) clinical score



**Clinical score**  
 0. no symptom  
 1. weakness of tail  
 2. paralysis of tail  
 3. weakness of hind leg  
 4. paralysis of hind leg  
 5. paralysis of foreleg  
 6. death

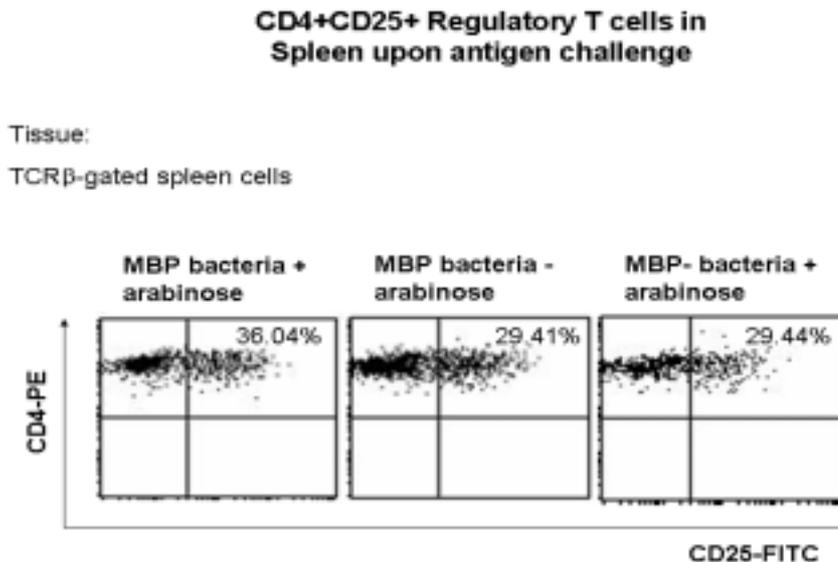
위 3회의 실험 결과를 아래와 같은 표로 나타내었다.

strain	treatment	incidence	day of onset	mean severity
C57BL/6	MBP bacteria + arabinose	11/14	17 ± 3.5	2.5 ± 1.5
C57BL/6	MBP bacteria - arabinose	12/15	13 ± 1.7	3 ± 1
C57BL/6	MBP- bacteria + arabinose	15/15	15 ± 1.15	3 ± 1

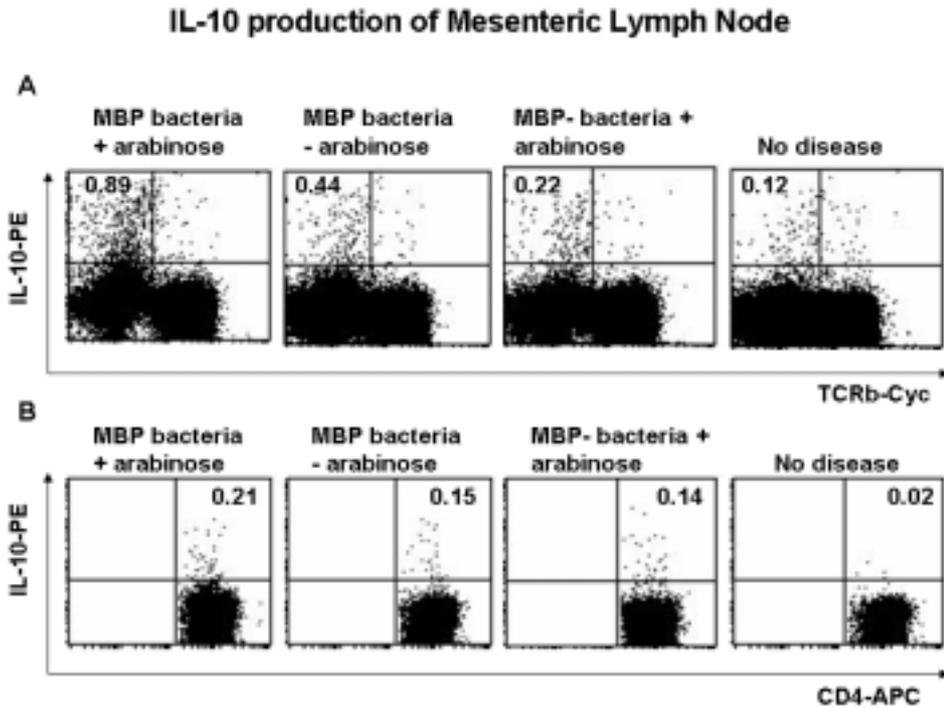
EAE scoring 그래프와 표를 근거로, 본 연구팀은 미생물 유래 펩타이드를 이용한 면역 반응 조절에 있어서 MBP를 발현하는 미생물을 먹인 동물 그룹에서 EAE 완화 효과를 증명할 수 있다.

## 2) FACS staining

clinical score를 근거로 본 연구팀은 각 그룹의 실험동물의 spleen에서 CD4+CD25+의 비율을 조사하였다. 실험은 질병 유도에 사용했던 antigen인 MBP or MOG를 이용하여 in vitro re-stimulation 시킨 spleen을 사용하였다. Regulatory T cell(Treg)의 비율은 anti-CD4+, 와 anti-CD25+로 staining한 cell에서 CD4+CD25+ population을 비교하였다.



위의 FACS staining 결과는 미생물 유래 펩타이드를 먹인 실험 동물군에서 regulatory T cell의 population이 증가함을 보여준다. Regulatory T cell이 질병을 억제시키거나 완화시키는 기작은 IL-10 secretion을 증가시켜 이루어짐이 널리 알려져 있다.

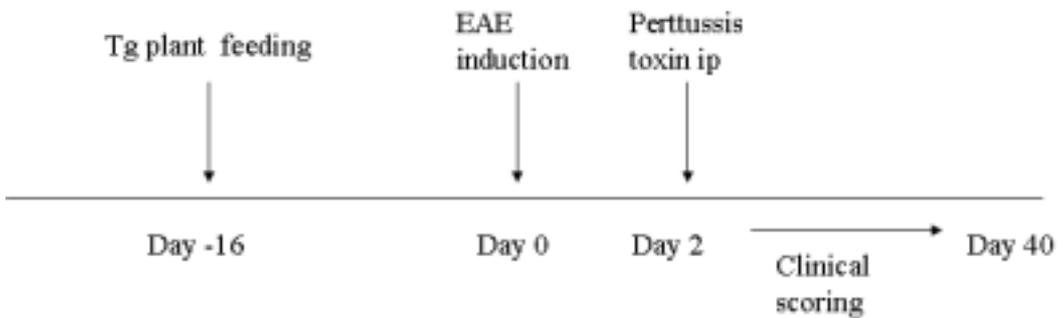


따라서 미생물 유래 펩타이드를 먹인 실험동물군의 질병 완화 이유가 T reg의 IL-10 secretion 때문인지를 밝히기 위해 IL-10 intracellular staining을 수행하였다. 다음은 mesenteric lymph node에서 IL-10 secretion 정도를 나타낸 FACS staining 결과(A)와 splenic CD4+ T cell에서의 IL-10 secretion 정도를 보여주는 FACS staining 결과(B)이다. 각 동물그룹에서 IL-10 secretion 정도를 보면 역시 Treg 비율이 상대적으로 높았던 실험동물 그룹인 미생물 유래 펩타이드를 먹인 동물군에서 CD4+ T cell의 IL-10 secretion level이 높음을 알 수 있다. 위의 FACS staining 결과들은 미생물 유래 펩타이드의 경구 투여가 EAE를 완화시키는데 기여를 한다는 것을 강력하게 뒷받침해주는 근거라고 할 수 있겠다.

## 2. 형질 전환 식물체를 이용한 면역 반응 조절

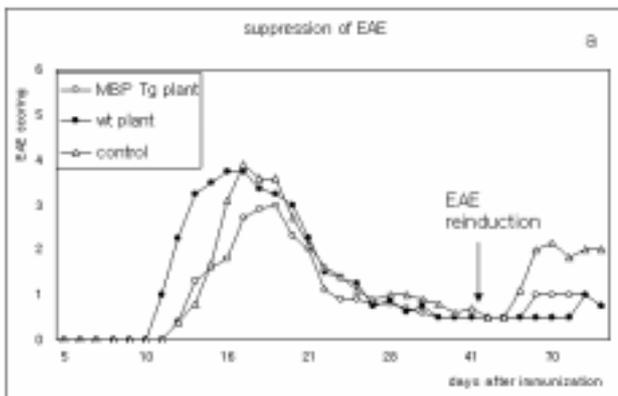
이 실험을 수행하는데 쓰인 식물체는 미생물 유래 펩타이드와 동일한 펩타이드를 애기장대에 형질 전환 시켜 사용하였다. 총 3회의 실험 중 2회의 동일한 실험 결과를 얻었다. 처음 수행했던 실험에서 그 후에 실험한 내용들과 동일한 결과를 얻지 못한 이유는 투여량과 투여 시기가 적절하지 못했었기 때문이라고 해석할 수 있다. 비록 첫 번째 실험에서 원하는 결과를 얻지 못했지만 투여량과 투여시기를 조정하기 위한 선행 실험으로써, 또한 oral tolerance를 유도하는데 투여량과 투여 시기의 중요성을 보여준다는 점에 있어서 가치 있는 실험이었다고 할 수 있겠다.

실험에 관한 일련의 진행 과정은 다음과 같다.



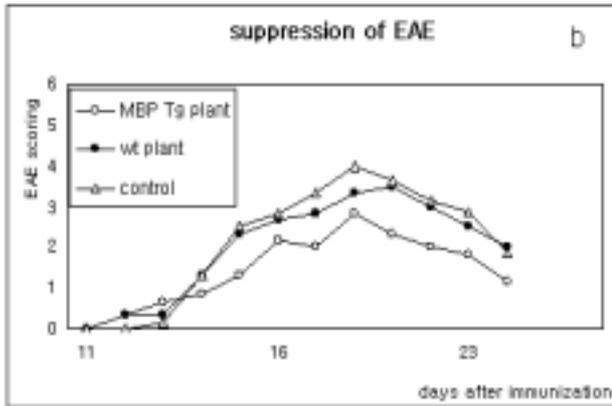
총 3회의 실험 중 2회의 실험에서 펩타이드 형질 전환 애기장대를 먹인 실험 동물 그룹에서 EAE 증상이 완화되는 것을 확인할 수 있었다.

### 1) clinical score



#### Clinical score

0. no symptom
1. weakness of tail
2. paralysis of tail
3. weakness of hind leg
4. paralysis of hind leg
5. paralysis of foreleg
6. death



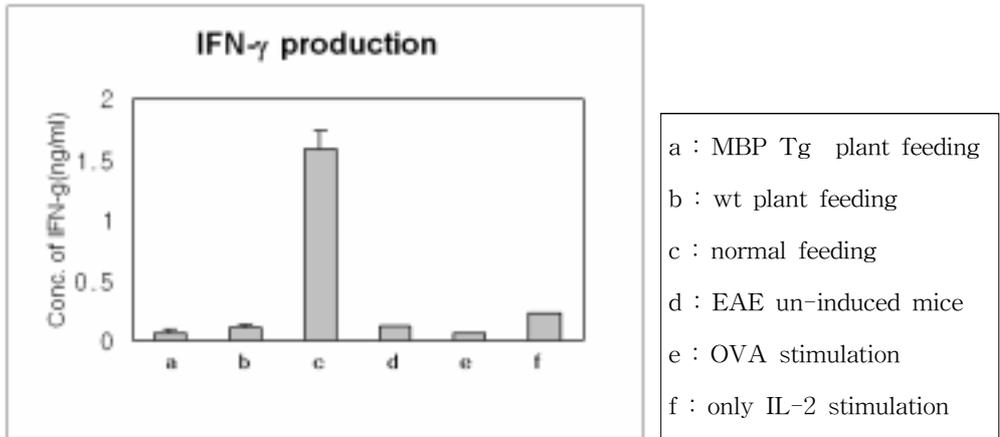
위의 그래프 중 a는 동물 모델에서 증상이 완화된 후에 EAE를 다시 유발시켜 보았을 때 형질 전환 식물체를 먹이지 않은 대조군에서 실험군과 비교해 보았을 때 다시 질병이 유도되는 것을 보여 준다.

위의 2회 실험의 그래프를 표로 나타내면 다음과 같다.

strain	treatment	incidence	day of onset	mean severity
C57BL/6	MBP transgenic plant	8/8	15 ± 0.7	3
C57BL/6	wt plant	7/8	13 ± 0.7	4
C57BL/6	normal regimen	9/9	14 ± 0	4

위의 그래프와 표를 근거로 펩타이드 형질 전환된 애기장대를 먹인 동물 실험군이 일반 애기장대를 먹인 대조군, 일반 사료만 먹인 대조군과 비교해 보았을 때 질병이 onset 되는 시점은 늦어지고 질병 정도는 낮아짐을 알 수 있다.

이 실험 동물들의 spleen을 꺼내어 in vitro culture를 통해 어떠한 cytokine이 주로 만들어지는지를 ELISA를 통해 관찰하였다. 이 assay에서 Splenic mononuclear cell을 myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55)와 IL-2로 5일 동안 re-stimulation 시킨 culture supernatant를 sample로 사용하였다.



- a : MBP Tg plant feeding
- b : wt plant feeding
- c : normal feeding
- d : EAE un-induced mice
- e : OVA stimulation
- f : only IL-2 stimulation

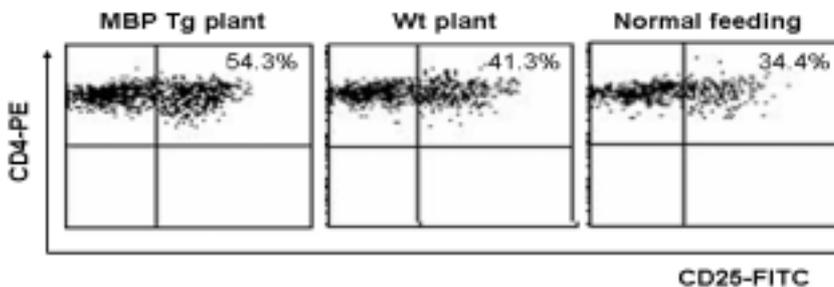
위의 ELISA 결과는 MBP transgenic plant를 먹인 그룹에서 IFN-g secretion 양이 일반 사료를 먹인 정상적인 EAE 유도 그룹에 비해 현저하게 떨어지는 것을 볼 수 있다. 이는 펩타이드 형질 전환 아라비도시스를 먹인 그룹에서 CD4+ T cell (phenotype : IFN-g secretion)이 관여하는 자가 면역 질환인 EAE를 Th2 type 쪽으로 switching 시켰다는 것을 증명해 준다. 따라서 이 결과는 실험 동물의 표면적인 질병 완화를 설명해 주는 근거 중 하나가 될 수 있다.

## 2) FACS staining

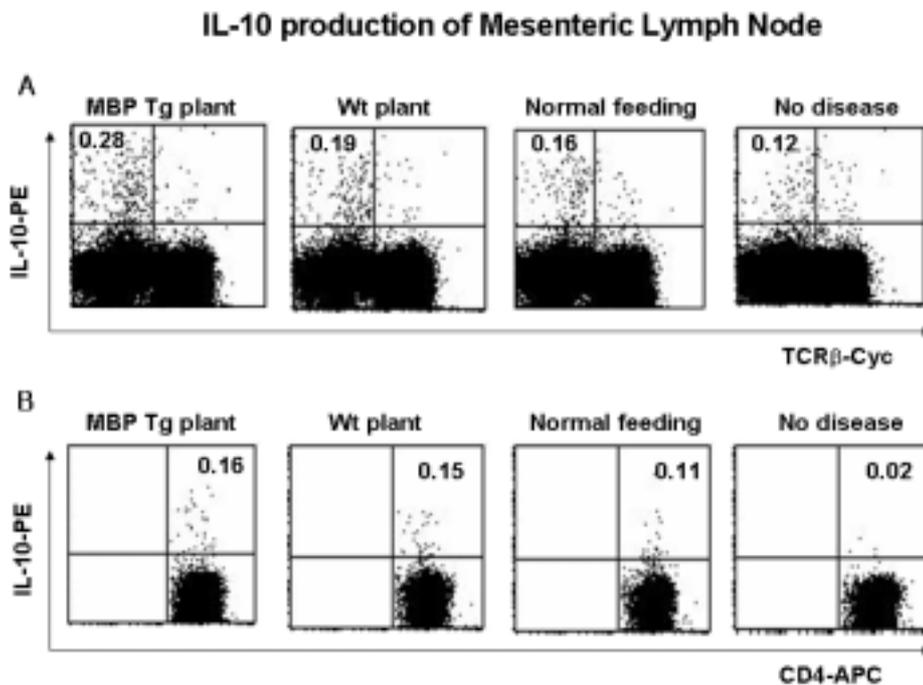
### CD4+CD25+ Regulatory T cells in Spleen upon antigen challenge

Tissue:

TCR $\beta$ -gated spleen cells

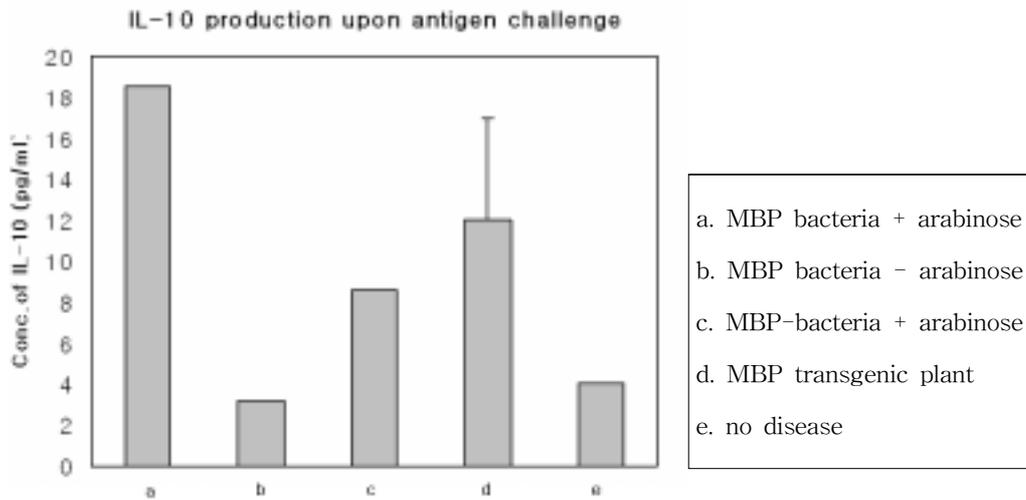


FACS staining은 미생물 유래 펩타이드 경구 투여 실험군과 동일한 방법으로 진행었다. 각 그룹에서 regulatory T cell의 비율을 비교해 보면 펩타이드 형질 전환 애기장대를 먹인 동물 그룹에서 T reg의 비율이 많이 증가함을 알 수 있다. 본 연구팀은 이러한 T reg이 경구 투여로 유도된 EAE 완화에 관여하는 cytokine인 IL-10 secretion에 관여하는지 알아보기 위해 spleen과 mesenteric lymph node에서 IL-10 secretion 정도를 intracellular staining을 통해 조사해 보았다.



(A)는 mesenteric lymph node의 T lymphocyte의 IL-10 secretion을 보여주며, (B)는 splenic CD4<sup>+</sup> T cell에서의 IL-10 secretion을 보여준다. 위의 FACS staining 결과들은 펩타이드 형질 전환 애기장대를 경구 투여한 동물군의 EAE 완화가 regulatory T cell에 의해 조절됨을 보여주는 분명한 증거라고 할 수 있겠다.

본 연구팀에서 마지막으로 수행한 실험은 MBP로 in vitro restimulation 시킨 splenic cell의 culture supernatant에서 IL-10 level 측정이다. IL-10 level 측정은 CBA kit(BD)을 이용하여 이루어졌다. IL-10 level 결과는 미생물 유래 펩타이드 경구 투여 그룹과 펩타이드 형질 전환 식물을 경구 투여한 그룹을 같이 나타내었다.



위의 CBA kit(BD)에 의한 IL-10 level test 결과는 미생물 유래 펩타이드를 먹인 그룹과 펩타이드 형질 전환 애기장대를 먹인 실험동물 그룹에서 다른 그룹에 비해 IL-10 secretion level이 증가함을 보여준다. Intracellular staining뿐만 아니라 culture supernatant에서의 IL-10 level 증가는 EAE 완화에 IL-10과 regulatory T cell이 관여하고 있음을 보여주는 명백한 증거가 된다.

## 2절. 제 2 세부과제

**최종목표** : 형질전환 애기장대를 생산 기지로 이용하여 자가 면역 억제 펩타이드 적용 검증과 대량생산

### 1. 연구수행 내용

**제 1차년도** : 식물체 형질전환용 자가 면역 억제 펩타이드 전달 벡터 시스템 구축

가. 식물체내의 코돈 사용사례에 따른 적절한 펩타이드 프라이머와 펩타이드 제작  
 가. 자가 면역 억제 펩타이드를 식물체내에서 안정하게 생산하기 위해 식물체 코돈 사용례를 참조하여 식물체 생산용으로 특화된 펩타이드를 제작한다. 제 1 세부과제에서 얻어진 결과와 상호 참조하여 양쪽 모델에서 최적화된 펩타이드를 제조한다.

나. 이 펩타이드를 형질전환 식물체내에서 안정되게 합성하기 위해서 펩타이드의 N-말단부위에 오메가 염기서열과 결합하여 재조합 플라스미드를 제조한다. 본 연구에서 조사하고자 하는 여러 질환의 펩타이드에 대해 이와 같은 제조 과정을 수행하여 각 질환에 대한 펩타이드 전달 재조합 벡터 시스템을 구축한다.

#### **나. 자가 면역 억제 단백질 펩타이드의 과량발현과 유도 발현 재조합 플라스미드 제조**

가. 과량 발현 시스템을 위해 자가 면역 억제 펩타이드를 Cauliflower mosaic virus의 35S 프로모터에 의해 발현되도록 pCHF3에 클로닝한 재조합 벡터를 제조한다.

나. 과량 발현에 의해서 형질전환 식물체의 생육에 지장을 초래할 가능성에 대비해서 자가 면역 억제 펩타이드를 특정 조건에서만 유도 발현시킬 수 있도록 유도 발현 벡터 시스템을 제조한다. 사용할 유도 시스템으로는 지금까지 알려진 시스템 중에서 가장 누수가 적은 Adh 프로모터를 사용하여 펩타이드 전달 벡터 시스템을 제조한다.

#### **다. 애기장대의 형질전환**

가. 자가 면역 억제 펩타이드 벡터 시스템을 아그로박테리움 ASE로 옮기고 애기장대 야생형 Columbia에 도입시키고 형질전환체를 얻는다. 신속하게 몇몇 펩타이드를 형질전환체에서 조사해볼 때 유용하게 사용할 수 있는 침윤 방법을 이용하여 형질전환체를 제조한다.

### **제 2차년도 : 형질전환 애기장대 제작과 생체내 펩타이드 합성 확인**

#### **가. 애기장대의 형질전환**

가. 1차년도의 미생물 모델 시스템에서 효과가 입증된 다수의 펩타이드를 애기장대 야생형 Columbia에 도입시키고 형질전환체를 얻는다. 다수의 형질전환체를 제조할 때에는 형질전환체를 고효율로 얻을 수 있는 진공 침투법을 사용하여 형질전환 식물체를 제조한다.

#### **나. 형질전환된 애기장대에서 펩타이드 발현여부 조사**

가. 형질전환된 식물체에서 도입된 펩타이드의 경구 투여를 통해 유효성 검증을 위해 형질전환된 식물체에서 총단백질 분리와 column을 이용한 예비 정제를 실시한다. 총단백질 분리는 SDS와 UREA를 사용하여 변성된 형태의 단백질을 분리하고 표지 분자를 접착시킨 column을 이용하여 예비정제를 실시한다. 단백질 분리조건을 변화시키며 최적의 단백질 분리 조건을 탐색한다.

#### 다. 투여 효과 측정 후 개량 펩타이드 제조와 형질전환체에서 생산

가. 제 1세부과제와 연계하여 실험동물에서 경구 투여시 발생할 수 있는 문제점과 효능을 보완한 개량형 펩타이드 제조하고 다시 식물체에 도입하여 형질전환체를 제조한다. 이들 형질전환체에서 개선된 펩타이드를 재생산한다.

#### 제 3차년도 : 동물모델에서 지속적인 개량 펩타이드 효능 검증과 최종 후보 결정을 통한 개량 펩타이드 대량 생산 형질전환 애기장대 제조

##### 가. 개량된 펩타이드 효과의 지속적인 검증

제 1 세부과제에서 검사한 실험동물에서 경구 투여를 통해 펩타이드 투여의 효과를 검증하고 문제점을 보완, 개선된 펩타이드를 다시 제조하여 그 효능을 극대화 시킨 펩타이드를 제조한다. 이러한 문제점 보완을 지속적으로 실시하여 펩타이드 투여의 효과를 개선시키고 이 검증 실험을 지속적으로 실시한다.

##### 나. 자가 면역 억제 단백질 펩타이드 생산 형질전환체 대량생산

실험동물에 경구 투여한 후 효과가 입증된 펩타이드를 생산하는 형질전환체를 대량으로 재배하고 이를 분주할 수 있는 종자 확보 및 지적 재산권 보존 신청을 실시한다.

## 2. 연구수행 결과

#### 제 1차년도 : 식물체 형질전환용 자가 면역 억제 펩타이드 전달 벡터 시스템 구축

##### 가. 식물체내의 코돈 사용례에 따른 적절한 펩타이드 프라이머와 펩타이드 제작

###### 1) 자가 면역 억제 펩타이드 발현을 위한 벡터 시스템 고안

식물체에 외래 유전자를 식물 게놈 상에 포함되도록 하여 발현시키는 방법으로 가장 많이 사용되는 것이 binary 벡터와 아그로박테리아를 이용한 것이다. 이에 대한 보고는 1986년 최초로 보고된 이후 지속적인 연구가 되어있기 때문에 많은 자료를 접할 수 있다. 일반적으로 식물체에 외래 유전자를 도입하고 도입한 유전자의 전사조건을 일정수준 이상으로 올리기 위해서 사용되는 벡터는 pCHF3 이다. 하지만 pCHF3 내에는 항생제 저항성 마커(카나마이신)가 존재하므로 구강투여를 통해서 자가 면역 억제 반응을 획득하기에는 사람들의 저항성이 문제가 될 소지가 있다. 따라서 카나마이신 마커 유전자를 BASTA 유전자로 바꾸어서 이용하였다. 선택적으로 형질 전환된 식물체를 선별하기 위해서 사용되는 마커(예를 들면 카나마이신이나 Bar)등의 전사를 돕기 위해서 사용되는 프로모터가 마커만을 발현시키는 것이 아니라 주변의 다른 유전자의 전사에도 영향을 미치는 것이 보고된 적이 있으므로 이를 방지하기 위해서 제

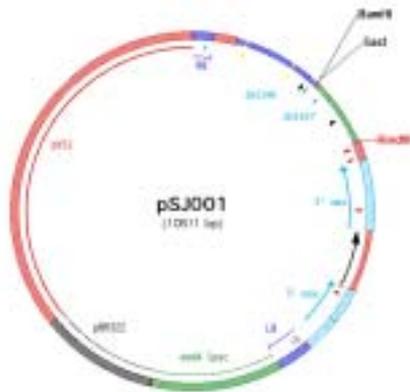


그림 1. 제초제 저항성 마커와 35S 프로모터가 포함되어 제작된 식물 형질전환 시스템 벡터 pSJ001.

초제 저항성 마커(Bar)의 전사를 돕는 5' mas 프로모터와 함께 제초제 저항성 마커의 뒤에 3' mas 터미네이터를 달아서 주변의 다른 유전자의 전사에 영향을 미치지 않도록 제작하였다.(그림1) 이를 위해서 새로 제작한 벡터 시스템이 pSJ001로 외래 유전자의 식물체내에서 전사를 돕는 Cauliflower mosaic virus의 35S 프로모터를 이용하고 제초제 저항성 마커인 Bar를 사용하였다. pSJ001의 크기는 10611bp로 그중에 식물체 게놈상에 들어가서 형질전환을 시키는 부분은 441bp 크기의 RB 와 LB 사이의 부분이다(그림1).

#### 나. 식물체 코돈 사용례에 준한 펩타이드 프라이머 제작

제 1세부 과제에서 클로닝한 4가지 펩타이드가 pBAD/gIII C 에 들어있으므로 식물체내에서 발현을 가능하게 하는 벡터 시스템(pSJ001)에 클로닝하고자 클로닝을 위한 프라이머를 제작하였다. pBAD/gIII C에는 유전자의 발현을 자동으로 켜지게 하는 ATG 시작 코돈이 벡터내에 존재한다. 그 뒤에 gene III SS 가 존재하고 있다. Gene III SS 는 세포내에서 발현 지역을 지정해 주는 signal을 가지고 있지만 식물세포내에서는 이것을 필요로 하지 않으므로 gene III SS 에 포함되어 있는 ATG 염기서열을 이용해서 시작 코돈으로 사용하였다. 따라서 pSJ001 에 클로닝하기 위해서 사용된 ATG 염기서열은 하단 지도상에 보이는 ATG로부터 54bp 뒤에 존재한다. 종결코돈은 헥사 히스티딘 뒤에 존재하는 TGA 염기서열을 사용하였다. 헥사 히스티딘은 식물체내에서 자가 면역 억제 펩타이드를 발현시켰을 때 펩타이드를 western 분석법으로 확인하기 위해서도 필요한 부분이다. JH2116 과 JH2098을 사용했을 때 두개의 프라이머가 각

각 시작 코돈과 종결 코돈을 포함하고 있으므로 컴퓨터 프로그램 상에서 open reading frame의 법칙에 어긋나지 않는가를 확인하고, 제대로 된 펩타이드가 생성되는 것을 컴퓨터 프로그램 상에서 확인하였다

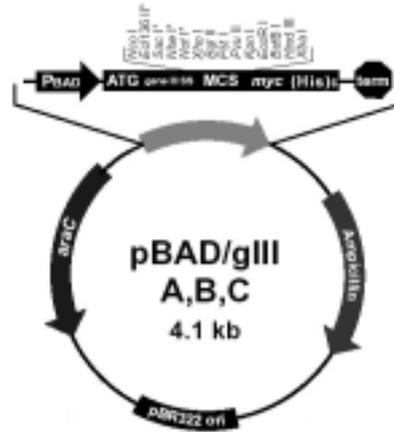


그림 2. 제 1 세부과제에서 사용한 pBAD/gIII C 벡터.

#### 다. 자가 면역 억제 펩타이드가 포함된 플라즈미드 제조

식물형질 전환용 벡터인 pSJ001에 자가 면역 억제 펩타이드를 재조합 하기위해서 중합효소반응을 이용하였다. JH2098 과 JH2116 프라이머와 중합효소반응시 염기서열의 오류를 최소화하기위해 사용하는 pfu 중합효소를 이용해서 HMBP 14, MINS 15, OVA 154 6 그리고 OVA 19 9를 증폭하였다. 하지만 pBAD/gIII C 에 JH2098, JH2116 과 염기서열 상에 유사한 부분이 존재하여 원하지 않는 밴드를 확인하여 이를 없애기 위해서 pBAD/gIII C 의 다중 클로닝 부분(MCS)외에 벡터 염기서열 상에도 제한효소가 반응할 수 있는 부분이 여럿 존재하므로 제한효소를 통해서 염기서열 상에 유사한 부분을 제거하여 자가 면역 억제 펩타이드를 암호화 하고 있는 부분만을 증폭하였다(그림 3).



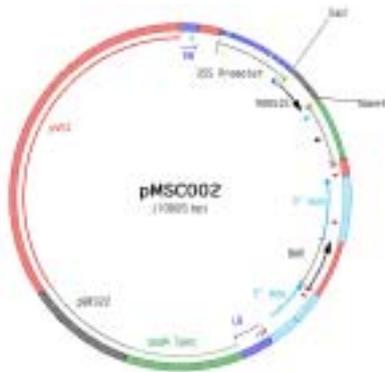
마. 자가 면역 억제 펩타이드가 포함된 플라스미드 제조

pBAD/gIII C 의 다중 클로닝 부분(MCS)외에 벡터 염기서열 상에도 제한효소가 반응할 수 있는 부분이 여럿 존재하므로 제한효소를 통해서 염기서열 상에 유사한 부분을 제거하여 자가 면역 억제 펩타이드를 암호화 하고 있는 부분만을 얻었다.

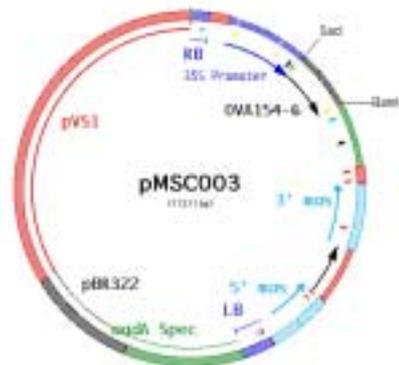
OVA 19 9 : BamHI & PvuI  
 OVA154 6 : BamHI & PvuI  
 MINS 15 : BamHI & PvuI  
 HMBP 14 : PvuI & SphI & EcoRV

JH2098 과 JH2116 프라이머를 이용하여 증합효소반응을 시행하였다. 증폭되는 단편의 염기서열 오류를 최소화 하기위해 pfu 증합효소를 이용해서 OVA 19 9, OVA 154 6, MINS 15 그리고 HMBP 14의 특정 단편들을 증폭하였으며 벡터와 삽입자가 공통으로 포함하고 있는 제한효소가 SacI과 BamHI 이므로, 이를 각각을 제한효소 처리하여 자른 후, 클로닝하였다. 이렇게 클로닝 된 것은 pMSC002, pMSC003, pMSC006, pMSC008로 각각 자가 면역 억제 펩타이드인 MINS15, OVA154-6, HMBP14, OVA19-9가 형질 전환 벡터인 pSJ001에 삽입자로 들어간 것이다(그림 5)

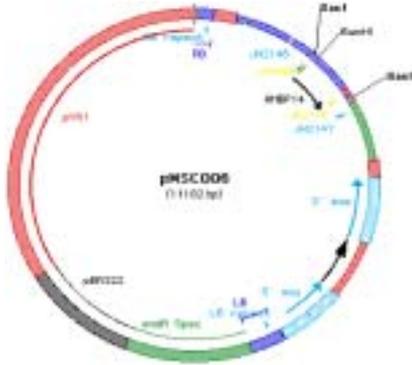
A



B



C



D

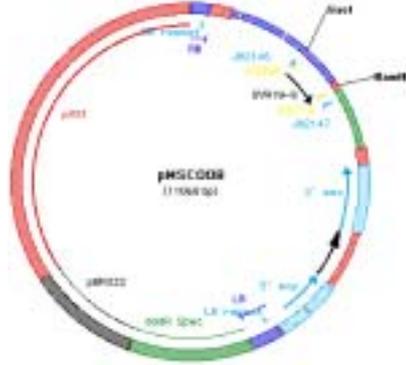


그림 5. 자가 면역 억제 펩타이드의 염기서열을 삽입하여 만든 재조합 플라스미드

- A. MINS15를 pSJ001에 삽입하여 만든 재조합 플라스미드 pMSC002
- B. OVA154-6을 pSJ001에 삽입하여 만든 재조합 플라스미드 pMSC003
- C. HMBP14를 pSJ001에 삽입하여 만든 재조합 플라스미드 pMSC006
- D. OVA19-9를 pSJ001에 삽입하여 만든 재조합 플라스미드 pMSC008

## 제 2차년도 : 형질전환 애기장대 제작과 생체내 펩타이드 합성 확인

### 가. 애기장대의 형질전환

#### 1) 침윤법을 통한 형질전환 최적조건 확인

아그로 박테리아에 존재하는 LB와 RB 사이 부분이 식물체 게놈에 전달하는 경로 중에 최적조건을 확인하기 위해서 여러 가지 조건을 가지고 반복실험을 통해서 확인하였다. 침윤법을 통해 대량으로 형질전환 식물체를 얻는 방법인 Dipping method 와 소량으로 원하는 형질전환 식물체를 얻는 Application method를 이용해서 가장 효율이 좋은 조건을 잡았다.

Table 1. 침윤법 사용시 최적조건 탐색 결과

Method	Dipping method			
Solution	5% sucrose solution		Infiltration media*	
Batch	Early**	Late***	Early**	Late***
Efficiency	ND	0.11%	0.2%	0.02%

Method	Application method			
Solution	5% sucrose solution		Infiltration media*	
Batch	Early**	Late***	Early**	Late***
Efficiency	0.32%	0.23%	2.1%	0.3%

\* Infiltration media : 아그로 박테리아(ASE)에 pSJ001, pMSC002, pMSC003 등의 벡터를 넣은 후에 식물체에 형질전환 시키기 위해서 사용하는 media.  
(per 2 liter)

-MS salt 1/2 X final concentration                      -pH 5.7  
-5% sucrose    -SILWET 1:5000 dilution

\*\* Early batch : 식물체에 형질전환시 형질전환이 되었으리라고 생각되어 지는 5개 siliques.

\*\*\* Late batch : 5개의 siliques를 제외한 다른 siliques를 의미하며 보통의 efficiency는 early batch 보다 낮음

## 2) 애기장대에 침윤법을 이용한 형질전환 식물체 획득

식물체는 잎의 수가 5~7장정도가 되었을 때 줄기부분을 잘라주면 형질전환을 위한 대상의 수가 많아지므로 형질전환을 시행하기 일주일전에 모두 잘라주었으며, 가장 건강한 상태의 개체를 얻기 위해 형질전환을 하는 날까지 지속적으로 계대배양. 5%

sucrose에 0.05%의 SILWET을 넣어서 침윤법을 시행하였다. 제 1 세부과제에서 제작한 4개의 유용 펩타이드(HMBP 14, MINS 15, OVA 154 6 그리고 OVA 19 9) 중에서 MIN15와 OVA154 6 으로 재조합한 플라스미드 각각 pMSC002, pMSC003을 아그로 박테리아 ASE 에 클로닝하여 야생형 columbia 애기장대에 도입하였다. 대조구로는 자가 면역 억제 펩타이드가 들어가 있지 않은 pSJ001 공백터만을 도입한 식물체를 제조하였다. 도입여부는 중합효소연쇄반응을 통해서 확인하였다.

#### 나. 형질전환된 애기장대에서 펩타이드 발현여부 조사

##### 1) 형질전환식물체에서 펩타이드 발현여부 확인하기 위한 Northern 혼성화 반응과 RT-PCR

재조합 플라스미드를 만들기 위해 증폭시킨 펩타이드 부분을 탐침으로 사용하여 Northern 혼성화 반응을 수행하였다. 펩타이드를 넣지 않은 식물체 전환용 pSJ001 벡터만을 도입한 식물체를 대조군으로 사용하여 실험하였다. 그 결과, 식물체 전환용 벡터만을 넣은 식물체내에서는 발현을 관찰할 수 없었고, 그 외에 제작된 재조합 플라스미드인 pMSC002와 pMSC003에서는 각각의 펩타이드 크기인 547bp와 763bp의 밴드를 관찰 할 수 있었다. 이는 RT-PCR 실험에서도 동일한 결과를 얻을 수 있었다 (그림 6).

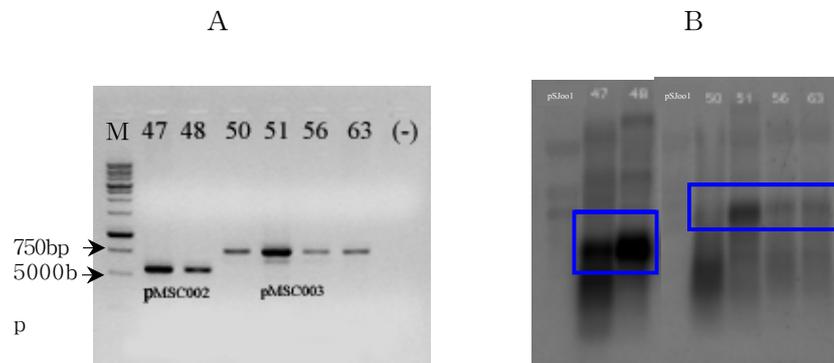


그림 6. 형질전환 식물체에서 펩타이드 전사체 발현 여부 확인.

A. RT-PCR을 통해 펩타이드 전사체 발현 여부 관찰

B. Northern 혼성화 반응을 통해 펩타이드의 전사체 발현 관찰

(M: 1Kb ladder, 47,48 : pMSC002 형질전환 식물체, 50, 51, 56, 63 : pMSC003 형질전환 식물체, (-): pSJ001 도입 형질전환 식물체)

#### 다. 형질전환 식물체에서 펩타이드 발현 여부를 확인하기 위한 Western 혼성화 반응

형질전환 식물체에서 안정된 형태로 유용 펩타이드가 발현되는지를 관찰하기 위하여 Western 혼성화 반응을 수행하였다. 각각의 개체에서 잎을 따고 단백질 추출 용액 (50 mM Tris pH7.5, 250 uM PMSF)을 이용하여 단백질을 추출하였다. Western 혼성화 반응은 SDS-PAGE (12% preparing resolving gel, 5% stacking gel)에 의해 분리된 단백질을 대상으로 이루어졌다. 본 연구에는 사용된 유용 펩타이드의 3' 말단 부분에는 유용 펩타이드의 발현여부를 알아볼 수 있도록 표지용도의 6개의 히스티딘 잔기뿐만 아니라 cMyc을 포함하고 있다. 따라서 Western 혼성화 반응에 사용된 항체는 cMyc 항체 (1st 항체: Myc-Tag (9B11) monoclonal antibody, Cell Signaling Technology, #2276, 2nd 항체: Goat poly anti - mouse IgG (H&L), HRP, KOMA Biotech Inc., #K0211589)를 이용하였다. 혼성화 반응에 사용된 막을 Ponceau S 용액으로 염색해본 결과 각 시료마다 일정한 양의 단백질이 Western 혼성화 반응에 사용된 것을 알 수 있었다 (그림 7).

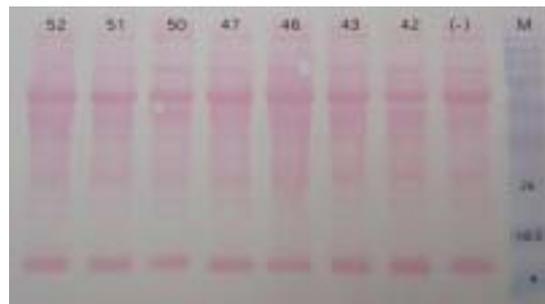


그림 7. Western 혼성화 반응 후 membrane을 Ponceau S로 염색한 사진.  
(M: protein marker(kDa), 42, 43, 46, 47 : pMSC002 형질전환 식물체, 50, 51, 52 : pMSC003 형질전환 식물체, (-) : pSJ001)

Western 혼성화 반응에서도 pSJ001 벡터를 도입한 대조군 식물체를 이용하였으며, 양성대조군으로는 Myc 항체가 반응할 수 있는 *myelein* basic protein을 사용하였다. Western 혼성화 반응을 수행한 결과 MINS15, OVA154-6, HMBP14, OVA19-9 펩타이드가 단백질로 발현되는 것을 관찰하였다. pSJ001 벡터가 도입된 대조군 식물체에서는 펩타이드가 발현되지 않는 것으로 보아 형질전환 식물체내에서 펩타이드의 번역이 효율적으로 진행된 것으로 보인다 (그림 8).

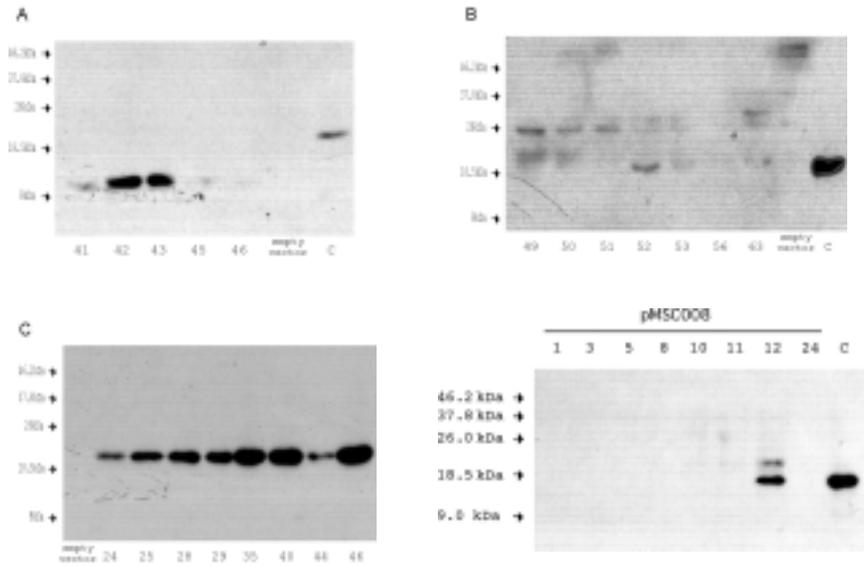


그림 8. 형질전환 식물체에서 펩타이드 발현 여부 확인.

- A. pMSC002로 형질 전환시킨 식물체의 전체단백질을 이용한 Western 혼성화 반응  
 B. pMSC003으로 형질 전환시킨 식물체의 전체단백질을 이용한 Western 혼성화 반응  
 C. pMSC006으로 형질 전환시킨 식물체의 전체단백질을 이용한 Western 혼성화 반응  
 D. pMSC008로 형질전환 시킨 식물체의 전체 단백질들을 이용한 Western 혼성화 반응  
 (M: protein marker, 41, 42, 43, 45, 46: pMSC002식물체, 49, 50, 51, 52, 53, 56, 63: pMSC003식물체, 24, 25, 28, 29, 35, 40, 44, 46: pMSC006식물체, C : 양성 대조군 -Myc을 간직한 *myelin* basic protein 23kDa, empty vector : pSJ001)

#### 라. 형질전환 식물체에서 총 단백질 분리 후 쥐에 경구 투여

당뇨병 관련 유용 펩타이드의 최종 효과를 검증하기 위하여 당뇨병에 걸린 쥐에게 경구 투여를 하였다. 경구 투여를 위해 각 형질 전환체 식물을 배양실에서 대량 배양 후 동결건조를 통해 사료와 배합해 경구투여를 진행하였다.

## 제 3차년도 : 동물모델에서 지속적인 개량 펩타이드 효능 검증과 최종 후보 결정을 통한 개량 펩타이드 대량 생산 형질전환 애기장대 제조

### 가. 개량된 펩타이드 효과의 지속적인 검증

다수의 형질전환 식물체를 확보하고 이들을 대상으로 각각의 펩타이드의 발현정도를 비교하여 경구투여에 사용하는 기준 형질전환체를 선별하였다. 식물의 형질전환에 있어서 외래유전자의 발현은 염색체 안으로 들어간 위치에 따른 차이를 보일 수 있기 때문에 먼저 각 형질전환 개체별 발현정도를 비교하였다. 또한 다음세대를 통한 획득 형질의 안정적인 전이를 확인하기 위하여 각 기준 형질전환체를 대상으로 제초제 저항성과 발현정도를 확인하였다. 세대전이를 통해 도입된 유전형질이 안정적으로 발현되는지 확인하기 위해서 각각의 펩타이드의 발현을 확인한 T1 식물체의 다음세대인 T2 식물체를 대상으로 Western 혼성화 반응을 통해 도입한 펩타이드의 발현을 확인하였다. 실험결과 pMSC006 (HMBP14)과 pMSC008 (OVA19-9)의 경우 다음세대에서도 도입한 펩타이드의 발현이 안정적으로 유지되어지는 것을 확인하였으며 (그림 9) 현재 이들을 대상으로 T3세대에서의 발현을 확인하고 있다. 그러나 pMSC002 (MINS15)와 pMSC003 (OVA154-6)은 T1에서 Western 혼성화 반응을 통해 펩타이드의 발현을 확인한 개체의 다음세대에서 발현이 유지되어지지 않음을 확인하였다. 이러한 현상이 식물체에서 나타나는 외부유전자의 억제 기작 (gene silencing)에 의한 것인지 확인하는 작업을 하고 있으며 추가로 보다 많은 T1 식물체를 확보하여 안정적으로 다음세대에서 펩타이드의 발현이 유지되어지는 개체를 확보할 계획이다. 또한 제 1세부 과제를 통해 현재 일부 펩타이드(HMBP14, OVA19-9) 에 대한 경구투여를 진행중이며 이들 펩타이드의 효능에 따라 각 펩타이드의 개량형을 제조할 계획이다.

그림 9. T2 세대 형질전환 식물체에서 펩타이드 발현 여부 확인.

형질 전환시킨 식물체의 T2세대 전체 단백질을 이용한 Western 혼성화 반응

PSJY001 : 음성대조군, PMSC006 : HMBP14 형질전환 T2 식물체, PMSC008

:OVA19-9 T2 식물체

#### 나. 자가 면역 억제 단백질 펩타이드 생산 형질전환체 대량 생산

동물 모델에서의 효능에 따른 기준 형질전환체의 확보와 이에 대한 대량배양을 수행할 계획이다. 현재 확보되어진 각 형질전환체로부터 대량 종자 확보가 진행중에 있다. 또한 면역억제 펩타이드의 실험동물 경구투여를 위해 T2세대에서 펩타이드의 발현을 확인한 pMSC006 (HMBP14)과 pMSC008 (OVA19-9)에 대해서 대량배양을 수행하였다. 각각의 형질전환 식물체로부터 확보한 T1 개체의 종자를 23도의 장일조건 (16 h light/ 8 h dark)에서 4주간 배양한 후 뿌리를 제외한 모든 조직을 수확하였다. 수확한 형질전환 식물체는 바로 액체질소를 이용하여 동결하여 실험 전까지 -70도에 보관하였다.

### 3절. 협동 과제

**최종목표:** 감자를 이용한 자가면역 억제 펩타이드 형질전환 식물체의 개발과 응용

#### 1. 연구 수행 내용 및 결과

##### 가. 감자의 국내육성 종에 대한 재 분화 및 형질전환 효율 조사

감자의 품종 및 식물체 조직별 형질전환 조건 확립을 확립하기 위하여 공시재료는 추백 (chubak), 남서 (Namsuh), 자심 (Jasim), 조풍 (Jopung), 조원 (Jowon) 등의 5품종을 선택하여 *A. tumefaciens* host strain은 LBA4404를 사용하여 조사하였다.

감자 재분화 배지조건 확립은 Table 1에서 설명한 것 과 같이 직접 신초를 유기시키는 방법으로 2단계를 구분하지 않고 동일배지에서 연속 계대 배양하는 것으로 M1에서 M5배지로 5종류호르몬을 달리한 배지를 사용하였으며, indirect 재분화 방법으로 14일간 callus culture배지에서 배양하여 캘러스를 유기시킨 다음 신초유기 (shoot-inducing)배지에 옮기는 2단계 배양기술을 적용하는 배지로 M6와 M7배지를 사용하여 조사하였으며 감자형질전환을 위한 배지는 Table 2와 같이 사용하였다.

상기한 배지 조건을 이용하여 국내에서 육성한 5품종(‘추백’, ‘남서’, ‘자심’, ‘조풍’, ‘조원’)을 공시 재료로 하여 잎과 줄기 조직을 사용하여 배지 내 호르몬 조성별 캘러

스 생성율을 조사한 결과 캘러스 배양과 신초 유기 단계를 구분하여 호르몬 조성을 달리한 배지를 사용한 indirect재 분화 방법을 적용한 경우, BA와 IAA를 포함한 M7

Table 1. Hormonal composition of media for potato regeneration

Medium	callus culture(mg/ℓ)					shoot-inducing culture(mg/ℓ)	
	BA	GA <sub>3</sub>	Zeatin	IAA	NAA	BA	GA <sub>3</sub>
M1	2.25	5					
M2	2.25	10					
M3	1	5	3				
M4			2	0.5			
M5		0.1	2		0.01		
M6	2.25				0.2		5
M7	2.25			0.17		2.25	5

\* M(media) : contain MS mix(4.4g/ℓ), sucrose(30g/ℓ) and agar(8g/ℓ)

○ 감자형질전환을 위한 배지조성(Table 2)

Table 2. Composition of media for potato transformation, subculture and multiplication culture.

Medium*	Composition of medium(mg/ℓ)						
	BA	GA <sub>3</sub>	Zeatin	NAA	2, 4-D	kanamycin	carbenicillin
PPM	10			10			
PCM					2		
PSM		0.1	2	0.01		50mg/ℓ	500mg/ℓ
Sub							
Multi		0.1					

\* PPM(potato preculture media) : NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>(80mg/ℓ) CaCl<sub>2</sub>(14.7mg/ℓ) MS (4.4g/ℓ) and sucrose(30g/ℓ)

PCM(potato co-culture media) : contain MS mix(4.4g/ℓ), sucrose(30g/ℓ) and agar(8g/ℓ)

PSM(potato selection media) : contain MS mix(4.4g/ℓ), sucrose(30g/ℓ) and agar(8g/ℓ)

Sub(subculture media) : contain MS mix(4.4g/ℓ), sucrose(30g/ℓ) and agar(8g/ℓ)

Multi(multiplication media) : contain MS mix(10.4g/ℓ) and sucrose (30g/ℓ)

배지에 비하여 NAA를 포함하지 않은 M6배지에서 평균 index가 일 조 직은 3.0, 줄기조직은 4.0으로 높은 캘러스 형성율을 보였다 (Table 3).

반면에 직접 신탄를 유기하는 배지인 M1부터 M5배지의 경우, 옥신계통 호르몬을 포함한 M4와 M5배지가 보다 캘러스 형성율이 높았으며 특히 NAA (0.01mg/ℓ), Zeatin (2mg/ℓ), GA<sub>3</sub> (0.1mg/ℓ)을 포함한 M5배지에서, 잎 조직 보다는 줄기조직에서 가장 높은 캘러스 형성율(평균 index, 4.2)을 보였다 (Table 3).

**Table 3. Callus formation efficiency of potato leaves harvested from eight weeks grown plants in greenhouse**

Variety	Degree of callus formation(Index*)							Mean
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	
Chubak	1	1	1	2	1	2	3	1.5
Namsuh	2	2	3	4	4	5	3	3.2
Jasim	1	1	1	2	3	3	1	1.7
Jopung	1	1	0	1	1	2	2	1.1
Jowon	3	3	3	2	4	3	2	2.8
Mean	1.6	1.8	1.6	2.2	2.6	3.0	2.2	

\* Index : 0(no callus were formed) to 5 (calluses were formed from most of the explants)

품종별로는 잎조직을 치상하였을 경우, ‘남서’(평균 index 3.2), 줄기조직을 치상하였을 경우, ‘조풍’(평균 index 3.6)이 높은 캘러스 형성율을 보여 품종 간, 치상조직 별로 큰 차이를 나타내었다(Table 4)

**Table 4. Callus formation efficiency of stems from the potato grown *in vitro***

\* Index: 0(no callus were formed) to 5(calluses were formed from most of the explants).

신탄 형성율은 잎조직의 경우 ‘조원’이 M5배지에서 90%이상으로 가장 높은 반면 다른 품종은 20%미만이었으며 줄기조직을 치상한 경우 ‘조풍’이 M5배지에서 70%

Variety	Degree of callus formation(Index*)							Mean
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	
Chubak	1	1	1	3	3	4	3	2.2
Namsuh	1	1	1	4	5	4	1	2.4
Jasim	1	1	2	4	5	5	3	3.0
Jopung	1	3	3	5	5	4	4	3.5
Jowon	2	1	1	2	3	3	3	2.1
Mean	1.2	1.4	1.6	3.6	4.2	4.0	2.8	

의 신초 형성율을 나타내었으나, 다른 공시품종은 1~26%의 신초 형성율을 나타내어 품종별, 조직별로 큰 차이를 나타내었다(Table 5, 6).

Table 5. Shoot formation efficiency from the leaves grown for eight weeks in greenhouse.

Variety	Rates of shoot formation (%)						
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Chubak	0	0	0	0	0	0	0
Namsuh	0	0	0	0	5.26	0	0
Jasim	0	0	0	3.33	21.82	0	0
Jopung	0	0	0	0	0	0	0
Jowon	15.94	29.69	28.77	22.73	93.75	0	0

Table 6. Shoot formation efficiency from the stems grown *in vitro*

Variety	Rates of shoot formation (%)						
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Chubak	0	0	0	0	1.67	29.31	1.67
Namsuh	0	0	0	0	25.93	0	0
Jasim	0	0	8.33	0	23.61	0	0
Jopung	32	21.88	12.9	53.57	70	18.6	54.55
Jowon	0	0	0	3.33	6	22.58	19.35

신초 형성 후 호르몬을 첨가하지 않은 MS고체 배지에서 배양한 경우 대부분의 신초로부터 발근이 유도되었다. 그러나 호르몬을 첨가한 M1~M7배지에 계속 배양한 경우 발근율은 매우 저조하였다(Table 7, 8).

Table 7. Rooting efficiency of regenerants derived from leaf explants of five different

potato varieties.

Variety	Degree of root formation*						
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Chubak	X	X	X	O	X	X	X
Namsuh	X	X	X	X	O	X	X
Jasim	X	X	X	X	X	X	X
Jopung	X	X	X	X	O	X	X
Jowon	X	X	X	X	X	X	X

\* O(rooting), X(no rooting)

Table 8. Rooting efficiency of regenerants derived from stem explants of five different potato varieties.

Variety(Organ)	Degree of root formation*						
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Chubak	X	X	X	O	X	O	X
Namsuh	X	X	X	O	X	O	X
Jasim	X	X	X	O	X	O	X
Jopung	X	X	X	X	X	X	X
Jowon	X	X	X	X	X	O	X

\* O(rooting), X(no rooting)

감자의 형질전환 효율을 높이기 위하여 카나마이신 저항성 감자의 형질전환과정 에 서 75 $\mu$ M의 acetosyringone을 처리한 경우 잎조직은 ‘조원’이 87.9%, 줄기조직은 ‘조풍’ 이 68.4%로 높은 형질전환효율을 나타내어 acetosyringone을 처리하지 않은 대조구에 비하여 1.5~4.0배의 높은 후보 형질전환체를 생산한 것으로 조사 되었다.

#### 나. 제초제성분인 PPT에 대한 감자식물체의 내성 확인

식물에 형질전환 기술을 이용하여 우리가 목적으로 하는 특정 유용유전자를 도입 하기 위하여서는 이들 유전자가 식물체의 genome에 정확하게 삽입이 되었는지의 여 부를 확인하기 위하여 선발마커 유전자를 목적 유전자와 함께 동시에 도입한다. 현재 까지 사용되고 있는 선발 마커 유전자는 kanamycin 혹은 hygromycin 등의 항생제를

분해하여 내성을 갖게 하는 유전자로서 npt(Jin 등., 1999) 혹은 hyg(Yu 등., 1999)의 유전자가 알려져 있다.

그러나 이들 유전자들에 대한 인체 및 환경안전성에 대한 논란이 대두됨에 따라 항생제가 아닌 대체 선발마커 유전자의 필요성이 대두되고 있다. 따라서 본 연구에서는 이미 많은 작물에 도입되어 신품종으로 각광을 받고 있는 제초제저항성 유전자(bar)를 이용하여 형질전환체를 선발하기 위한 기초실험을 수행하였다. bar 유전자는 광역제초제의 기본 화합물인 PPT를 분해하는 phosphinotricin acetyltransferase 효소를 암호하고 있다. 따라서 PPT에 대한 일반 감자식물체(대조구)의 내성정도를 측정하는 실험결과를 table 9에 요약하였다.

Table 9. The effects of PPT on the survivability of developmental stage of wild type in the selection medium.

Variety	Dev. stage	Con. of PPT(mg/ℓ)									
		0	0.1	0.25	0.5	0.75	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
JP	1	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-
	2	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-
	3	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-
	4	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-
	5	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-
JW	1	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-
	2	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-
	3	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
	4	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-
	5	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-

+++ , Very High; ++ , High; + , Few; - , All Dead

Developmental stage : 1( internode part를 약 0.5cm의 길이로 잘라 치상); 2(callus에서 분화된 shoot를 잘라 치상); 3(callus에서 분화된 shoot를 RIM에서 root을 유도시킨 후 shoot를 잘라 치상(2-3주); 4(4주된 식물체의 마디(node culture)를 잘라 치상); 5(4주된 식물체의 마디배양 일주 후 형성된 shoot를 잘라 치상).

감자식물체를 각각의 생육단계별(1 - 5단계)로 채취하여 0에서 5.0mg/ℓ 농도별로 처리한 배지에 각 생육단계별로 채취한 시료 30개체를 치상한 후 4주 후에 내성정도를 조사한 결과 어린 식물체보다는 생육이 진전됨에 따라 PPT에 대한 내성 정도는 높게 나타났으며 조풍 품종은 1.0mg/ℓ 농도에서 모든 처리구에서 고사하였으나 조원

의 경우 2.0mg/ℓ 농도까지도 생존하는 식물체가 나타나 조원이 조풍보다는 약간 더 내성이 강한 것으로 나타났다. 따라서 향후 bar 유전자가 도입된 형질전환체를 선발하기 위하여서는 적어도 2.5mg/ℓ 농도의 PPT를 배지에 첨가하여야 할 것으로 조사되었다.

#### 다. bar 유전자가 도입된 형질전환체의 선발 및 확인

형질전환체를 선발하기 위하여 먼저 Agrobacterium을 접종시킨 절편체에서 유도된 신초를 carbenicillin(250mg/ℓ)이 첨가된 MS배지에서 2주 동안 뿌리를 발근 시켰다. 그 다음 신초를 다시 잘라 PPT(2.5mg/ℓ)가 첨가된 선발배지에 옮겨 심어 이에 저항성을 보이는 개체를 선발하였다.

감자에 대한 bar 유전자의 형질전환 및 선발마커로서의 효율성을 조사하기 위하여 기내에서 무균 상태의 시험관에서 증식된 조풍 및 조원 식물조직을 각각 40개 씩 이상하여 250 계통(조풍)과 562계통(조원)의 완전한 재 분화 식물체(뿌리 유기 포함)들을 확보하여 PPT(2.5mg/ℓ)를 포함한 배지에 옮긴 경우 조풍의 경우 15개체(6%), 조원의 경우 74개체(13%)를 얻었다(Table 10). 이들 식물체를 이용하여 최종적으로 PCR까지 확인하여 얻은 개체는 각각 2개체(0.8%)와 19개체(3.4%)로서 조원 식물체가 보다 더 높은 형질전환 효율을 나타내었다(Table 10).

Table 10. Regeneration and transformation frequency from potato

plants co-cultivated with <i>A. tumefaciens</i> .					
Variety	No. of explants	No. of regenerated plants(A)	No. of <sup>x)</sup> resistant plants in PPT	No. of <sup>y)</sup> Transformed plants(B)	B/A(%)
Jopung	40	250	15	2	0.8
Jowon	40	562	74	19	3.4

<sup>x)</sup> Number of plants survived on 2.5mg/ℓ PPT media

<sup>y)</sup> Number of plants confirmed by PCR with the *bar* primer

PPT를 이용하여 선발한 후보 형질전환식물체에 대하여 분자생물학적으로 확인하기 위하여 우선 손쉬운 방법으로 알려진 PCR 기술을 이용하여 확인한 결과는 Fig.1 에

설명하였다. 총 14개체로부터 분리한 genomic DNA를 template로 사용하여 재료 및 방법에서 설명한 바와 같이 bar 유전자단편(897 bp)을 특이하게 증폭 할 수 있는 primer set를 이용하여 PCR반응을 수행한 결과 wild type인 control plant에는 증폭된 DNA band가 전혀 나타나지 않았으나 모든 개체가 positive control로 사용하여 얻은 크기의 단편과 동일한 위치에 band를 생산한 것을 확인하여 bar 유전자가 식물체의 genomic DNA에 삽입되었다는 사실을 간접적으로 확인 할 수 있었다.

본 연구에 사용한 감자 품종은 국내의 농촌진흥청에서 육성하여 농가에 보급되고 있는 장려품종으로서 형질도입이 확인되면 곧 바로 품종으로 육성 될 수 있으며 특히 감자는 영양 번식을 함으로 도입유전자의 고정을 위한 복잡한 육종체계를 거치지 않아도 된다는 장점이 있다.

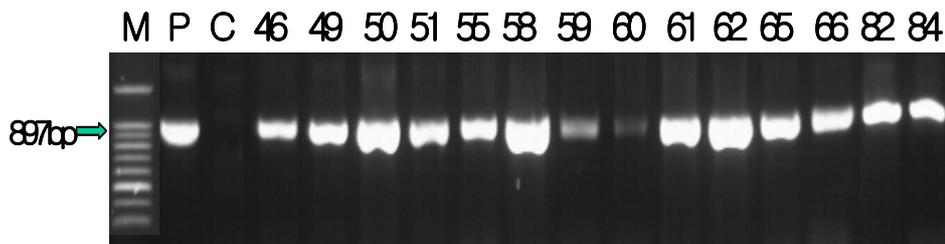


Fig 1. PCR products amplified from genomic DNA of putative transgenic plants(T0) with bar primer. Lane M, 100bp size marker; P, positive pSJ001; C, wild type plant; and lane 4-17, putative transgenic plants(T0)

#### 라. 감자의 괴경 특이적 발현 promoter의 분리 및 운반체 제작

감자의 괴경에 특이적으로 발현하는 유전자는 patatin gene으로서 class I 과 class II로 구분된다. 이 중 class I 은 당과 sink 조직 변이의 상태에 따라 감자의 괴경 특이적 발현과 괴경 외에 발현되는 유전자 발현 연구에 중요한 시스템으로 알려져 있으며, B33, pat20, PS20 등 3종류의 유전자가 보고되어져 있다.

따라서 본 연구에서는 PCR을 이용하여 감자의 괴경에 특이적으로 발현하는 PS20 gene의 promoter 부분과 5'말단의 coding region의 일부를 증폭하기 위한 primer 쌍

을 제작하여 1차 PCR을 수행한 결과 예상한 크기의 단편을 확인 한 후 (Fig. 2A), 이 단편을 T-vector에 클로닝 하여 제한효소 Sac II, Spe I 로 삽입 단편을 확인하였다 (Fig. 2B).

그리고 염기서열분석을 위하여 pBluescript II SK(+)의 제한효소 Sac II, Sac I 을 이용해 클로닝 한 후 제한효소 Sac II를 처리하여 삽입 단편을 확인 한 후(Fig. 2C) 염기서열분석을 수행하였다.

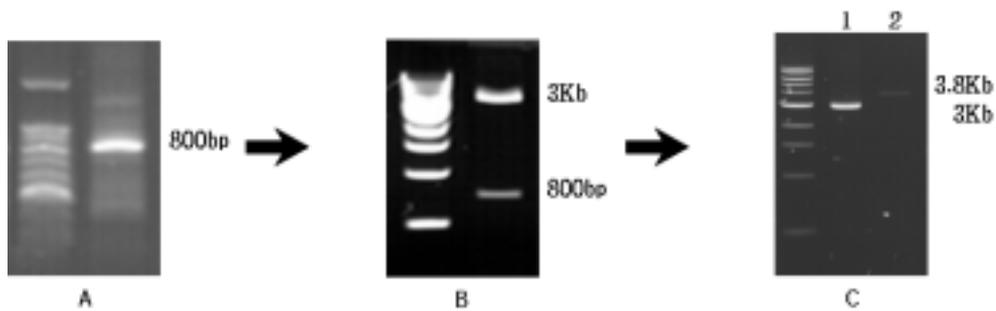


Fig. 2. Isolation steps of tuber-specific promoter from potato. A, PCR product of PS20 promoter region amplified with genomic DNA extracted from potato (*S. tuberosum* L. var. Jopung); B, recombinant T-Vector was digested with *Sac*II, *Spe* I to confirm the PS20 promoter; C, recombinant pBluescript II SK(+) was digested with *Sac*II to confirm the PS20 promoter.

본 연구에 사용한 감자 조종에서 분리한 PS20 promoter의 염기서열을 분석한 결과를 NCBI blastn 검색을 통하여 *S. tuberosum* L. cv. Dongnong 303에서 분리하여 보고된 PS20 promoter (Accession number X87216)와 91%의 상동성을 나타내었으며, promoter의 기능을 하는 TATA box와 전사 개시점이 동일한 위치에서 확인되었다(Fig. 3).

```

JP.1  GAATTCGATT ATATCGGAAT GAGGATTTTA TTTATTTTTT ATATCGGAAT GAGGATTTTA
PS20  ----- ATATCGGAAT GAGGATTTTA

JP.1  TTTATTCTTT TAAAAATAAA GAGGTGTTGA GCTAAACAAT CTCAAATCTC ATCACACATA
PS20  TTTATTCTTT TAAAAATAAA GAGGTGTTGA GCTAAACAAT TTCAAATCTC ATCTCACATA

JP.1  TGGGGTCAGC CACAAAAATA AAGAACGGTT GGAACGGATC TATTACATAA TACTAATAAA
PS20  TGGGGTCAGC CACAAAAATA AAGAACGGTT GGAACGGATC TATTATATAA TACTAATAAA

JP.1  GAATAGAAAA AGGAAAGTGA GTGAGGTGCG AGGGAGAGAA TCTGTTTAAAT ATCAGAGTCG
PS20  GAATAGAAAA AGGAAAGTGA GTGAGGTACG AGGGAGAGAA TCTGTTTAAAT ATCAGAGTCG

JP.1  ATCATGTGTC AGTTTTATCG ATATAACTCT GACTTCAACT GAGTTTAAAC AATTCTGATA
PS20  ATCATGTGTC AGTTTTATTG ATATGACTTT GACTTCAACT GAGTTTAAAGC AATTTTGATA

JP.1  AGGCGGGGAA AATCATAGTG CTGAGTCTAG AAAAACTCA TCAATGTGA GATAAACCTC
PS20  AGGCGAGGAA AATCACAGTG CTGAATCTAG AAAAACTCA TACAGTGTGA GATAAATCTC

JP.1  AACCAAGGACG TTGAGTCCAT AGAGGGG-TG TATGTGACAC CCCAACCTCA GCAAAAGAAA
PS20  AACAAAAACG TTGAGTCCAT AGAGGGGGTG TATGTGATAC CC-AACCTCA GCAAAAGAAA

JP.1  ACCTCCCCTC AACCAAGGACA TTTGCGGTGC TAAACAATTT CAAGTCTCAT CACACATATA
PS20  ACCTCCCCTC AA-GAGGACA TTT-CGGTGC TAAACAATTT CAAGTCTCAT CACACATATA

JP.1  TATTATACAA TACTAATAAA GAATAGAAAA AGGAAAGGTA AACATCACTA ATGACAGTTG
PS20  TATTATATAA TACTAATAAA GAATAGAAAA AGGAAAGGTA AACATCACTA ACGACAGTTG

JP.1  CGGTGCAAAG TGAGTGAGAT AATAAACATC ACTAACTTTT ATTGGTTATG TCAAACCTCAA
PS20  CGGTGCAAAG AGAGTGAGGT AATAAACATC ACTAACTTTT ATTGGTTATG TCAAACCTCAA

JP.1  AATAAAATTT CTCAACTTGT TTACGTGCCT ATATATACCA TGCTTGTTAT ATGCTCAAAG
PS20  AGTAAATTT CTCAACTTGT TTACGTGCCT ATATATACCA TGCTTGTTAT ATGCTCAAAG

JP.1  CACCAACAAA ATTTAAGAGC TC
PS20  CACCAACAAA ATTTAAAAAC AC

```

Fig. 3. The nucleotide sequence of the patatin gene promoter. JP.1 was cloned from Jopung and compared with known PS20 promoter(accession number X87216). The TATA box is in bold. The transcription site(C) is underlined.

확보한 promoter(PS20-J)를 각각의 최종 식물 발현 벡터의 CaMV 35S promoter와 치환 하기위해 제한효소 *EcoR* I, *Sac* I을 처리하여 제거하고 pMSC002, pMSC003 벡터에 접합시켰다. 치환된 각각의 식물 발현 벡터에 제한효소 *EcoR* I, *Sac* I을 처리해 확인하였고(Fig. 4B.), seminested PCR 수행 시 사용한 primer 쌍, 정방향(5'-tgaattcGATTATATCGGAATGAGGATTTTAT-3'), 역방향(5'-gttcaagagctcTTAAATTTTGTT

GG-3')으로 실시한 PCR에서도 PS20-J 단편을 확인할 수 있었으며(Fig. 4B.), 각각의 식물 발현 벡터를 pMSP002와 pMSP003으로 명명하였다(Fig. 5.)

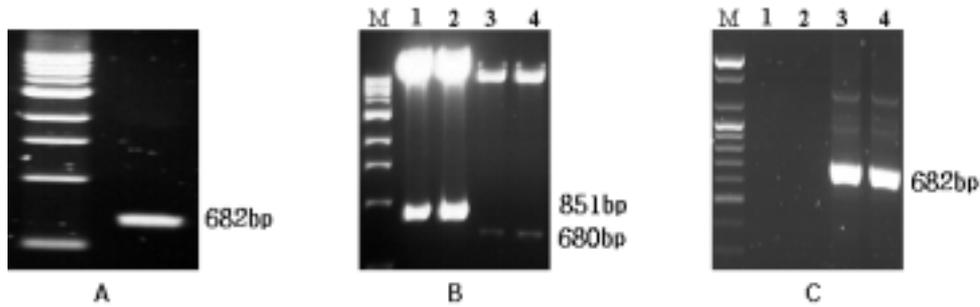


Fig.4. Cloning of PS20-J promoter fragment into plant binary vectors. A, nested PCR product of specific PS20 promoter; B, restriction enzyme digestion of recombinant binary vectors (Lane M, size marker; lane 1 and 3, pMSC002; lane 2 and 4, pMSC003); C, PCR amplified products (Lane M, size marker; lane 1 and 3, pMSC002; lane 2 and 4, pMSC003).

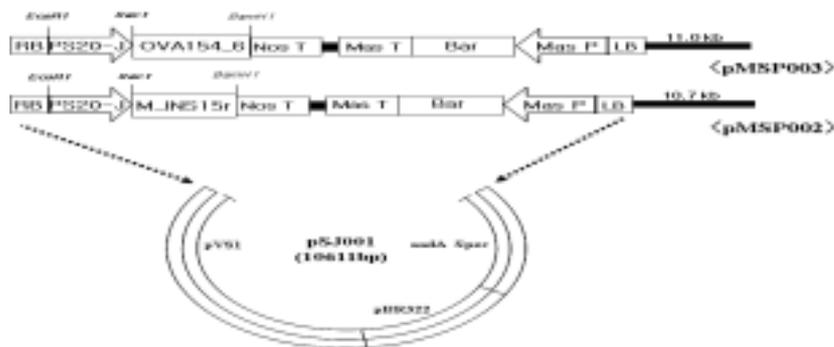


Fig 5. Recombinant vectors constructed with patatin promoter. RB, Right border; LB, Left border; 35s, 35s cauliflower mosaic virus promoter; Nos T, the terminator of nopaline synthase(NOS) gene; mas P and mas T, the promoter and the terminator of mannopine synthase.

마. 형질전환체의 확인

○ pMSC002와 pMSC003이 도입된 형질전환체의 확인

- PCR에 의한 형질전환체 확인

PPT를 처리한 배지에서 생존한 식물체에 대하여 PCR로 확인한 결과 bar 유전자, OVA154\_6번 유전자, M-INS15r 유전자가 도입된 것을 각각 확인할 수 가 있었다(Fig 6).

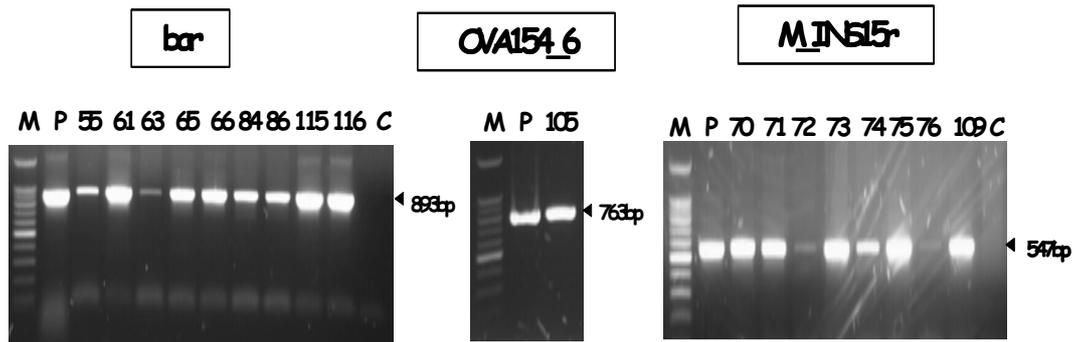


Fig 6. PCR products amplified from genomic DNA of putative transgenic plants with bar or target gene primer set.

한편 PCR기술로 확인한 형질전환체에 대하여 0.3%의 제초제(basta)를 처리한 경우 살아남지 못하는 것도 있어 최종적으로 살아남은 개체를 기준으로 한 형질전환 효율을 조사한 결과 bar 유전자만이 도입된 운반체(pSJ001)를 사용한 경우 조풍은 0.8%의 효율을 나타낸 반면 조원은 3.7%의 효율을 나타내었다. OVA154\_6번 유전자가 multicloning site에 도입된 경우 조풍은 형질전환 효율이 0 %인 반면 조원은 0.6%이었다. M-INS15r 유전자가 도입된 운반체의 경우는 조원품종을 사용하였을 때 최종적으로 살아남은 것이 6개체로서 2.3%의 효율을 나타내었다. 전반적으로는 조풍보다는 조원이 효율이 높게 나타났으나 형질전환효율이 전체적으로 너무 낮아서 이에 대한 보다 많은 연구가 필요한 것으로 나타났다.

1) Southern blot hybridization 분석에 의한 도입된 gene copy 수의 확인

일반 PCR 실험으로 확인된 형질전환감자 식물체로부터 genomic DNA를 분리하

여 도입유전자의 바깥쪽에 존재하는 단일 절단효소로 Hind III로 절단한 후 전기영동하여 nylon membrane에 transfer한 후 target peptide 유전자단편을 방사성동위원소로 표지시킨 프로브로 genomic southern blot hybridization을 수행한 결과는 Fig 7과 같다. 대조구인 비 형질전환체에서는 hybridization 되는 단편을 확인 할 수 가 없었으나, 형질전환체로 보이는 6개 체에 대하여서는 각각의 target peptide 유전자와 hybridization 되는 밴드를 확인 할 수 있었다. 특히 pMSC002가 도입된 개체로서는 적어도 2 copy 이상이 도입된 것을 확인 할 수 있었다.

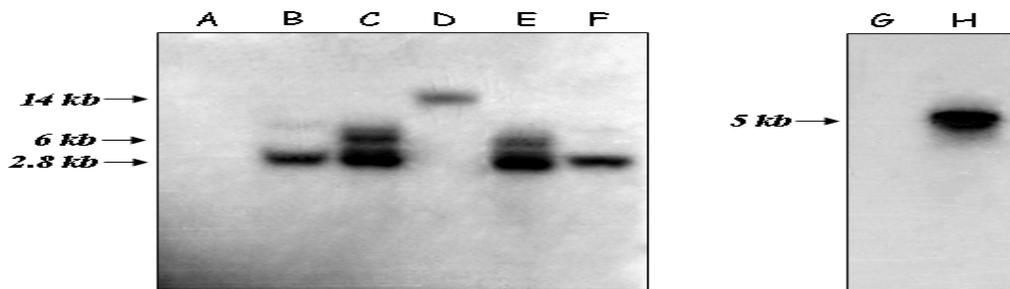


Fig. 7. Genomic southern blot hybridization for the introduced peptide gene in transgenic potato. Lane A and G represent non-transgenic plants as negative control; lane B to F, transgenic plants with pMSC002 and lane H, pMSC003

## 2) RT-PCR에 의한 도입유전자의 발현 확인

최종적으로 ppt를 이용하여 선발한 후 basta 제초제(0.3%) 처리에 의하여 죽지 않고 살아남은 각각의 형질전환체에 대한 발현양을 조사하고자 RT-PCR은 다음과 같이 수행하였다. 대조구(control)인 OVA154\_6을 증폭하기 위한 프라이머는 forward; 5'-TGTCCTTCAGCCAAGCTCC-3', reverse : 5'-GGTCGACGGCGCTATTCA G-3' 이었고 Type 1 diabetes를 target로 한 펩타이드를 생산하는 유전자인 M\_INS15의 확인을 위한 프라이머는 forward; 5'-GCTCGAGATCTGCAGCTGTG-3', reverse; 5'-GGTCGACGGCGCTATTTCAG-3' 를 사용하였으며 이들 유전자는 각각 transcripts를 생산하는 단편 내에서 취한 gene-specific oligomer이다. RT-PCR은 Takara회사에서 구입한 super bio one step all-in-one RT/PCR premix (P7003)를 이용하여 제품과 함께 제공되는 manuel에 따라 수행하였다.

Table 11. Frequency of transformation

plasmid	Variety	No. of explants	No. of regenerated plants (A)	No. of resistant plants in PPT <sup>a)</sup>	No. of transgenic plants <sup>b)</sup>	B/A (%)
pSJ001	JP	40	250	15	2	0.8
	JW	40	562	74	21	3.7
pSJ001::OVA154_6	JP	20	144	9	0	0.0
	JW	20	161	14	1	0.6
pSJ001::M-INS15r	JP	20	86	0	0	0.0
	JW	20	263	16	6	2.3

<sup>a)</sup> means the number of survived plants on the media containing 2,5 mg/L of PPT.

<sup>b)</sup> means the number of survived plants on the field upon treatment of 3%herbicide, basta.

0.3%의 제초제처리에도 살아남은 형질전환체에 대하여 도입된 유전자의 발현양을 RT-PCR로 조사하였다. Fig 8은 bar유전자의 mRNA를 증폭한 것이며 lane 1은 size marker, lane2와 8은 non-transgenic plant로서 negative contro를 나타내었으며, lane 3에서 7번까지는 M-INS15 유전자가 도입된 형질전환체이며 lane 9는 OVA 154\_6번 유전자를 나타내었다. 화살표로 표시한 밴드는 internal control로서 18S rRNA의 함량을 나타낸 것으로 RT-PCR에 사용한 각 시료의 total RNA는 동일한 양을 사용하였다는 것을 의미한다. M-INS15 유전자가 도입된 형질전환체인 lane 3에서 7번은 각각 서로 다른 형질전환체로서 발현양이 4번과 6번 형질전환체가 다른 것 보다 높게(적어도 2배) 나타나 gene copy 수 가 높은 개체에서 보다 높은 수준의 mRNA양을 확인할 수 있었다.

한편 자가면역질병억제 펩타이드유전자의 mRNA를 증폭하도록 design한 프라이머로 RT-PCR한 결과를 Fig. 9(A)에 나타내었다. 그림 8에서와 마찬가지로 lane 1은 size marker, lane2와 8은 non-transgenic plant로서 negative control은 동일하며 lane 3에서 7번은 M-INS15r 유전자에 대한 specific primer로 증폭하였으며 lane 9는 OVA 154\_6번 유전자에 specific한 프라이머를 사용하였다. 또한 각각의 형질전환체에

대하여 northern blot hybridization을 수행한 결과 비형질전환체에서는 전혀 peptide 유전자에 대한 mRNA를 확인 할 수 없었으나 후보 형질전환체인 5개체에서는 다량의 전사체를 확인 할 수 있었다. 특히 genomic southern blot hybridization의 결과로 2 copy 이상이 삽입된 것으로 확인 된 개체 (lane 3과 6)들은 2 배 이상의 높은 수준의 전사체를 확인 할 수 있었다.

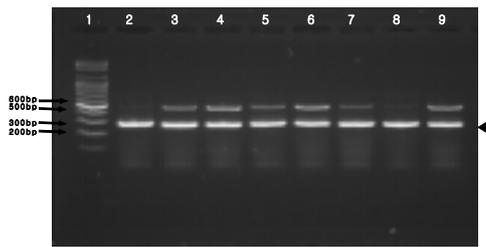


Fig. 8. bar 유전자에 대한 RT-PCR 결과. 1. Size marker; 2 .negative control (M-INS15); 3. M-INS15-70; 4. M-INS15-71; 5. M-INS15-73; 6. M-INS15-75; 7. M-INS15-109; 8. negative control (OVA 154\_6); 9. OVA 154\_6-105

여 internal control로 18S rRNA용 프라이머를 사용하여 동일한 양의 RNA가 template로 사용되었음을 확인하였다(화살표로 표시됨). Fig. 8에서 이미 조사된 바와 같이 도입된 M-INS15r 유전자의 발현양이 서로 다를 수 있었다. 또한

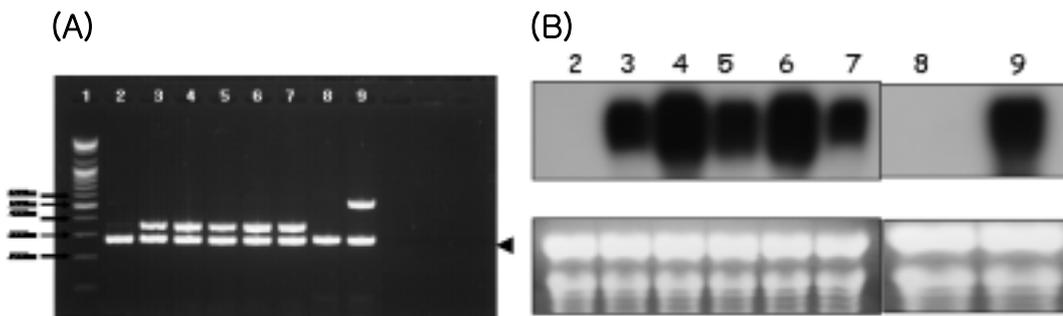


Fig 9. The result of RT-PCR(A) and northern blot hybridization(B). Lane 1, size marker; 2 and 8. negative control (non-transgenic plants); 3 to 7. transgenic lines with pMSC002; and 9, transgenic line with pMSC003

### 3) 과타틴 프로모터로 치환된 운반체의 형질전환체 확보

#### 가) 형질전환체에 대한 PCR 확인

과타틴 프로모터가 치환된 것으로 제1형당뇨병치료 펩타이드유전자가 도입된 운반체(pMSP002)와 대조구 펩타이드 (OVA154-6)가 치환된 운반체 pMSP003이 도입된 후보 형질전환체를 PCR로 분석한 결과 Fig. 10과 같이 다수의 식물체에서 도입유전자가 증폭되었음을 확인 할 수 있었다(Fig. 10).

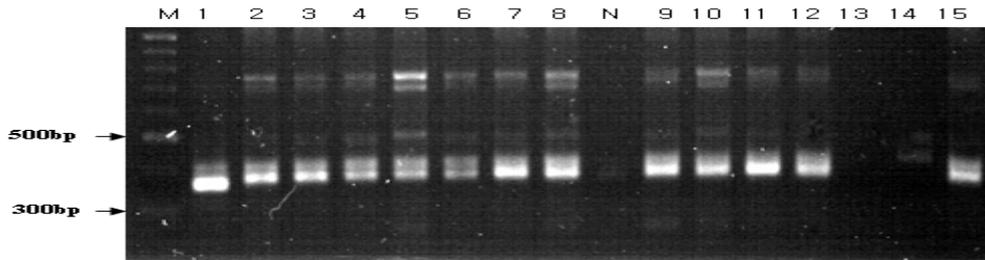


Fig. 10. PCR analysis of candidate transgenic plants with pMSP002 and pMSP003. Lane M, size marker; lane 1, positive control of pMSP002; lane N, negative control (non-transgenic plants); lane 1 to 8, pMSP002; lane 9 to 15, pMSP003.

#### 나) RT-PCR에 의한 확인

일반 PCR로 확인된 후보 형질전환 식물체에 대하여 mRNA의 합성 여부를 확인하고자 포장에서 수확한 감자괴경으로부터 분리한 총 RNA를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. pMSP002의 경우는 3번개체와 8번 그리고 pMSP003와 같은 경우는 11번 개체만이 밴드를 보여 주었으나 그 발현양도 극히 낮은 것으로 나타났다 (Fig. 11).

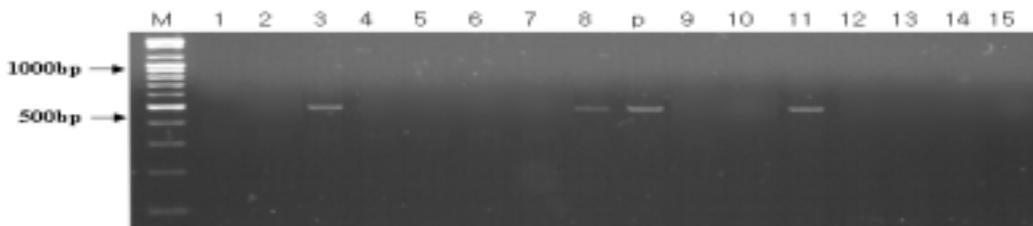


Fig. 11. RT-PCR analysis of candidate transgenic plants with pMSP002 and pMSP003. Lane 1, negative control (non-transgenic plants); lane P, positive control; lane 2 to 8, pMSP002; and lane 10 to 15, pMSP003.

4) 다발성경화증 치료용 펩타이드 유전자 (HMBP14)가 도입된 운반체 pMSC006의 형질전환체 확보

가) PCR에 의한 형질전환체 확인

다발성경화증 펩타이드 유전자가 도입된 운반체 pMSC006을 동일한 조건으로 형질전환 시킨 후 ppt 를 함유한 배지에서 완전한 식물체로 자란 개체들에 대하여 일반 PCR로 운반체의 도입여부를 확인하였다 (Fig. 12). 이때 펩타이드 유전자를 증폭하기 위한 프라이머는 sense: CAA GGC ACA GAG ACA CGG와 anti-sense: GAT GAT GAT GAT GAT GGT CG, Bar gene을 증폭하기 위한 프라이머는 sense: GGA AGT TCA TTT CAT TTG GA와 anti-sense: CGA ACT CAG TAG GAT TCT GG를 사용하였다. Target 유전자로 도입된 다발성경화증 치료펩타이드와 선발마커로 사용한 bar 유전자를 증폭시킨 경우 모두 밴드를 보이는 후보 형질전환체 3개체를 확보하였다.

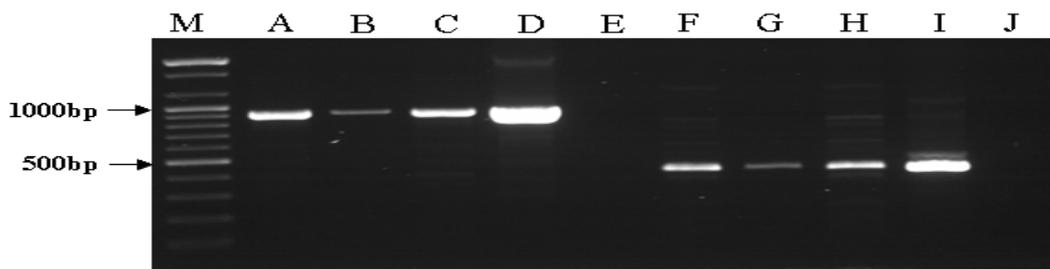


Fig. 12. PCR detection of the introduced peptide gene in transgenic plants with pMSC 006. Lane M, 100bp DAN ladder; lane D and I, plasmid DNA as positive controls; lane E and J, negative controls (non-transgenic plant); lane A-C represent transgenic plants amplified by bar primers; lane F-H represents transgenic plants amplified by target peptide gene primers.

나) RT-PCR에 의한 pMSC006에 대한 mRNA의 발현도 조사

도입된 펩타이드 유전자의 발현을 확인하기 위하여 기내에서 증식시킨 후보 형질전환감자 식물체로부터 잎을 수확하여 단백질을 추출한 후 펩타이드유전자를 증폭

하기 위한 프라이머는 sense: CAA GGC ACA GAG ACA CGG와 anti-sense: GAT GAT GAT GAT GAT GGT CG를 사용하고, internal control로 actin 유전자를 증폭하기 위한 프라이머로 sense: GGC TGG ATT TGC TGG TGA TG와 anti-sense: CCG CCT GAA TAG CAA CAT AC를 사용하여 RT-PCR을 수행하여 negative control 즉 non-transgenic plants는 internal control로 사용한 actin 유전자는 다른 형질전환체와 동일한 양이 증폭되었으나 target 유전자인 펩타이드 유전자를 증폭하기 위한 프라이머로는 증폭이 되지 않았음을 확인하였다. 한편 3개체의 형질전환 식물체에서 분리한 총 RNA는 target 유전자와 actin 유전자를 공히 증폭시켜서 형질전환체로 도입된 target 유전자가 성공적으로 mRNA를 합성하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 13).

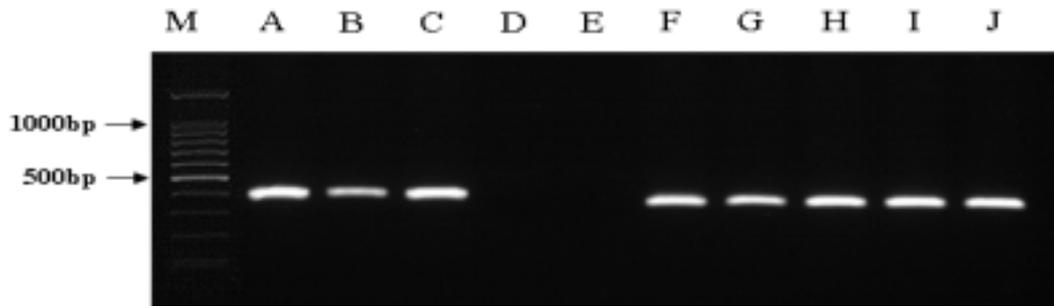


Fig. 13. RT-PCR analysis for the amplification of transcript of the introduced peptide gene in transgenic plants. Lane M indicates the 100bp ladder; lane A-C, transgenic plants amplified with the peptide gene primers; lane D-E, the negative control (non-transgenic plants); lane F-J, transgenic plants & non-transgenic plant amplified with actin primers.

#### 바. 형질전환체로부터 합성된 펩타이드의 확인

1) pMSC002 및 pMSC003이 도입된 형질전환 감자의 잎을 이용한 western 혼성화 반응

형질전환 감자식물체내에서 펩타이드가 제대로 합성이 되는지 여부를 확인하기 위하여 western 혼성화 반응을 수행하였다. 도입된 펩타이드 유전자의 3'-말단에 부착된

cMyc 혹은 his-tag을 이용하였으며, 양성반응 대조구로서는 Myc 항체가 반응 할 수 있는 *myelein* basic protein과 his tag 항체가 반응 할 수 있는 단백질을 사용하였다. 기내에서 증식 중에 있는 형질전환 감자 식물체로부터 얻은 잎 혹은 포장에서 수확한 과정을 단백질 추출용액 (150 mM Tris-Hcl, 24%glycerol, 5%SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol)으로 추출한 후 100°C에서 10분간 boiling 한 후 원심분리 후 상등액을 acrylamide gel [SDS-PAGE (12% preparing resolving gel, 5% stacking gel)]을 사용하여 전기 영동한 다음 (Schleicher & Schuell Bioscience, #C025/2)에서 구입한 PDVF membrane에 blotting시킨 후 1차 항체반응은 Myc-Taq (9B11) monoclonal antibody (Cell Signal Technology, #0211589 또는 #2276)를 사용하였으며 2차 항체반응은 goat poly anti-mouse IgG (H&L), HRP (KOMA Biotech Inc. #K0211589, 또는 Calbiochem, #D24233)를 이용하였다.

그림 14는 PCR 및 genomic southern blot hybridization으로 확인된 각각의 형질전환체를 기내에서 자라게 한 후 잎으로부터 분리한 총 단백질에 대한 western 혼성화 반응을 수행한 결과이다. pMSC002가 도입된 75번 개체에서 14.9 kDa에 해당하는 위치에서 다소 강하게 발현되는 밴드가 확인 되었으며 73번도 약하지만 밴드가 확인되었다. 그러나 다른 형질전환개체와 비 형질전환 식물체로부터는 펩타이드 밴드가 확인 되지 않았다. 또한 pMSC003 운반체가 도입된 형질전환인 109번은 전혀 밴드가 나타나지 않았다.

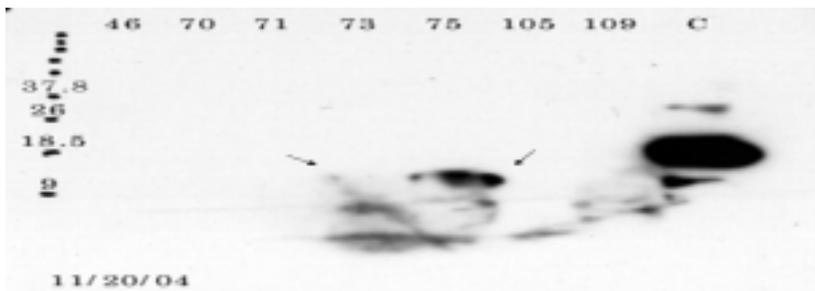


Fig. 14. The result of western blot hybridization with transgenic potato leaves (pMSC002 and pMSC003). Lane C, positive control; lane 46, negative control (non transgenic plant); lane 105, pMSC003 (25.9 kDa); lane 70,70, 71, 73, 75, and 109, pMSC002 (14.9kDa). For the western blot hybridization, antibody for cMyc protein

was used.

2) pMSC002 및 pMSC003이 도입된 형질전환 감자식물체로부터 수확된 괴경으로부터 분리한 단백질을 이용한 western 혼성화 반응

한편, 기내에서 일정한 크기로 자란 형질전환 감자 식물체를 2004년 봄에 외부와 격리된 포장에 재배하여 수확한 괴경 으로부터 추출한 단백질을 이용하여 western 혼성화 반응을 수행한 결과를 Fig.15에 나타내었다. 괴경의 경우 14.9 kDa에 해당하는 부근에 밴드가 관찰되기는 하나 negative control 로 사용한 비 형질전환체에서 동일한 위치에 보다 강한 밴드가 나타나 실제로 펩타이드가 형질전환체의 tuber에서 생산된다는 결론을 얻을 수 가 없었다.

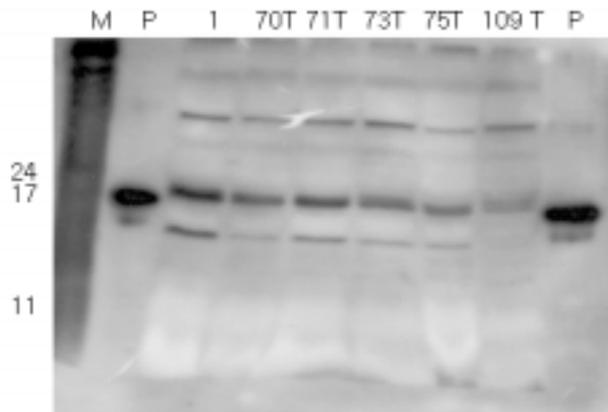


Fig. 15. The result of western blot hybridization with the tuber of transgenic potato. Lane M, size marker; 1, negative control (non-transgenic plants); 70T, 71T, 73T, 75T and 109T, transgenic potatoes; and P, positive control. For the western blot hybridization, antibody for cMyc protein was used.

또한, 본 연구에서 사용한 면역질환치료용 펩타이드 유전자의 3'말단에는 cMyc 단백질 뿐 만아니라 6개의 histidine 잔기도 부착 되어 있다. 따라서 cMyc 단백질로는 확인이 되지 않았으므로 his tag에 대한 western blot hybridization도 동시에 수행하여 보았으나 14.9 kDa에 해당하는 펩타이드는 확인 할 수 가 없었다. (Fig. 16).



Fig. 16 The western blot hybridization for the detection of peptide synthesized from the introduced vector, pMSC002. The antibody for the His-tag peptide was used for the hybridization. Lane M, size marker; 1, leaf from non-transgenic plants; 2, tubers from non-transgenic plants; 73L and 75L, leaves from transgenic plants; 73T and 75T, tubers from transgenic plants and P, positive control.

3) pMSC006이 도입된 형질전환 감자로부터 펩타이드의 생산 확인을 위한 western 혼성화 반응

또한, 다발성경화증 억제 펩타이드 유전자를 target로 제작한 운반체 pMSC006의 도입이 PCR (Fig. 12) 및 RT-PCR (Fig 13)로 확인된 3개체의 형질전환체를 대상으로 펩타이드의 발현을 확인 하고자 western blot hybridization을 수행하였으나 역시 cMyc 혹은 his-tag항체와 반응 하는 밴드는 확인할 수 없었다 (Fig. 17)

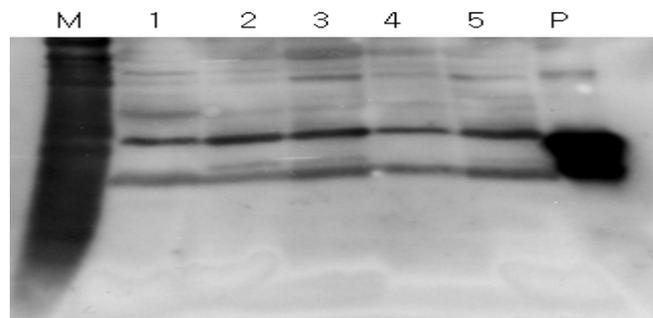


Fig. 17. The result of western blot hybridization of candidate pMSC 006 transgenic plants. Lane M, size marker; 1, pSJ001; 3, 4, and 5, transgenic plants with

pMSC006; and P, positive control.

따라서, 본 연구에서 얻은 PCR과 southern blot hybridization 결과를 종합하면 pMSC002가 도입된 후보 형질전환체는 총 5개체, pMSC003는 1개체, 그리고 pMSC006이 도입된 개체는 3개체로 확인되었다. 또한 northern blot hybridization과 RT-PCR결과에 의하면 이들 도입된 운반체로부터 target 펩타이드 유전자의 mRNA는 검출이 되므로 전사과정까지는 발현이 진행이 되는 것으로 나타났다. 그러나 최종 단계인 western blot hybridization은 일의 경우에는 pMSC002가 도입된 73번과 75번 개체에서는 약하지만 확인이 되었으나 다른 형질전환 계통에서는 확인이 되지 않았다. 특히 수개월간에 걸쳐 포장재배를 통하여 수확한 감자 괴경(tuber)으로부터는 펩타이드의 발현을 확인할 수 가 없었다. 이러한 결론은 형질전환 식물체내에 도입된 유전자가 만든 펩타이드 단백질이 세포질에서 합성됨과 동시에 분해될 가능성을 배제할 수 없는 것으로 보여 진다. 향후 감자의 괴경에 집적을 시키고자할 경우에는 세포 내 미소기관 즉 엽록체, 액포 등으로 이동이 되게 하는 signal peptide를 부착하여야 안정화가 이루어져서 쉽게 분해되지 않을 것으로 추정된다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1절. 목표 달성도

#### 1. 제 1차년도

##### 가. 연구개발 목표와 내용 및 평가의 착안점

##### 1) 연구개발 목표

1차년도	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
제 1 세 부과제	대장균 및 유산균을 이용한 자가면역 억제 단백질의 생산	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 대장균을 이용하여 자가면역 억제 단백질의 펩타이드가 분비되는 균주 개발 - pBAD 벡터를 이용하여 arabinose로 유전자 발현을 유도할 수 있는 안전장치를 도입하고 박테리아 signal sequence를 도입하여 표적 펩타이드의 대장균 외부 발현</li> <li>2. 유산균을 이용하여 자가면역 억제 단백질의 펩타이드가 분비되는 균주 개발 -pTINX 벡터를 이용하여 유산균 Lactococcus lactis에서 분비되는 펩타이드 생산</li> <li>3. 형질전환된 세균으로부터 표적 펩타이드가 생산되는지를 SDS PAGE, western blotting 등으로 확인</li> </ol>
제 2 세 부과제	식물체 형질전환용 자가 면역 억제 펩타이드 전달 벡터 시스템 구축	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 식물체내의 코돈 사용률에 따른 적절한 펩타이드 프라이머와 펩타이드 제작 - 식물체내에서 안정된 단백질 발현을 위해 오메가 염기서열과 결합</li> <li>2. 자가 면역 억제 단백질 펩타이드의 과량발현과 유도 발현 재조합 플라스미드 제조 - Cauliflower mosaic virus의 35S 프로모터에 의해 발현되도록 pCHF3에 클로닝하고, 유도 발현용으로는 alcohol에 의해 발현이 유도되도록 AlcA프로모터를 이용한 재조합 플라스미드 제조</li> <li>3. 애기장대의 형질전환 - 애기장대 야생형 Columbia에 재조합 플라스미드를 간직하고 있는 아그로박테리움 ASE를 이용하여 형질전환</li> </ol>
협동과제	자가면역질병	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 자가면역질병억제 펩타이드유전자의 감자식물체 내 도</li> </ol>

	억제 펩타이드 유전자의 감자 내 도입용 운반체 개발	입을 위한 운반체 제작(제조제저항성유전자선발마커 이용) 2. 감자의 형질전환 최적 조건 확보
--	------------------------------	--

2) 연구평가의 착안점

구분	평가의 착안점 및 척도	
	착안사항	척도 (점수)
1차년도 (2002 - 2003)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 대상 질병 및 대상 단백질을 적절히 선택하였는가? 5%</li> <li>○ 대상 단백질을 대장균에서 발현시켰는가? 15%</li> <li>○ 대상 단백질을 유산균에서 발현시켰는가? 15%</li> <li>○ 실험동물 모델의 적절성을 실험적으로 확인하였는가? 10%</li> <li>○ 식물체 코돈 사용례에 따른 적절한 펩타이드를 제작하였는가? 10%</li> <li>○ 자가 면역 억제 단백질 펩타이드의 과량발현과 유도 발현 재조합 플라스미드를 제조하였는가? 10%</li> <li>○ 침윤법을 이용하여 펩타이드를 합성하는 형질전환체를 제조하였는가? 15%</li> <li>○ 감자식물체의 형질전환을 위한 운반체가 제대로 작성되었는가? 20%</li> </ul>	

나. 연구개발 목표의 달성도

1) 제 1 세부과제

가) 자가면역질환에 대한 면역관용유도 단백질의 선정

본 연구팀은 자가면역 질환들 중 그 병리 현상이 비교적 잘 알려져 있고 환자의 숫자가 상대적으로 많으며 병세가 장기적으로 진행되는 질환들을 표적으로 하였다. 이러한 조건에 맞는 질환으로 제 1형 인슐린 의존성 당뇨병과 다발성 경화증, 그리고 류마티스관절염이 주 연구대상으로 선정되었으며 이 질환들에서 자가항원으로 작용하는 단백질들을 문헌고찰을 통해 선발하였다. 자가항원 단백질 전체를 발현시켜 경구 공급하는 경우 생물학적 기능을 가진 단백질을 외부에서 제공하는 상태가 될 수 있으며 이 경우 예기치 않은 부작용이 생길 가능성이 있다. 따라서 본 연구팀은 자가

항원 단백질 중 항원으로 작용하는 펩타이드 부위만을 선별적으로 발현시켜 이를 경구로 제공하는 방법을 고안하였다. 이를 위해서는 각 자가항원 단백질의 어떤 부위가 실제로 자가면역 T 세포의 활성화에 관여하는지를 조사하는 것이 급선무였다. 집중적인 문헌 조사를 통해 본 연구팀은 표적 단백질 중 자가항원으로 기능하는 부위들을 선별하였고 (표 1의 붉은색으로 표시된 부위) 그 주변의 아미노산으로 구성된 단백질 조각을 발현시키기로 결정하였다. 이를 위해 적절한 위치의 primer들을 디자인하고 해당 유전자를 증폭하였다.

#### 나) 대장균을 이용한 면역관용유도 단백질 조각의 생산 시스템 구축

대장균을 이용한 자가면역 단백질의 생산시스템을 구축하기 위해 L-arabinose에 의해 발현이 조절되는 pBAD 프로모터 뒤에 표적 면역관용유도 단백질을 삽입하고 이를 대장균에 도입하여 단백질의 발현을 인위적으로 조절할 수 있도록 설계하였다. 이 시스템을 이용하여 대상 자가면역질환 치료를 위한 일부의 면역관용유도 단백질 조각을 성공적으로 클로닝하고 발현시켰다.

#### 다) 유산균을 이용한 면역관용유도 단백질 조각의 생산 시스템 구축

유산균은 오래전부터 전통적인 식생활과 깊게 관련되어 있으며 된장, 간장 및 김치 등의 전통 발효 식품 등의 제조에 중요한 역할을 담당하고 있다. 유산균은 그람 양성으로, 현재 12개 속 (Lactobacillus, Carnobacterium, Atopobium, Lactococcus, Pediococcus, Tetragenococcus, Leuconostoc, Weisella, Oenococcus, Enterococcus, Streptococcus, Vagococc)으로 분류되어 있으며 발효유와 치즈 등에 Lactobacillus, Lactococcus, 그리고 Streptococcus가 산업적으로 중요하게 사용되고 있다. 이미 사람이 섭취하는데 있어서 안전성이 입증된 균주들 중에서 Lactococcus latic (L. latic)를 단백질 발현 및 경구투여 균주로 사용하기로 결정하였다. 이 균주에서 면역관용유도 단백질을 발현하기 위해 유산균에서 작동하는 pTINX 벡터에 표적 단백질 유전자를 삽입, 발현시키기로 하였다. 이 시스템을 이용하여 여러 가지 식품에서 자가면역질환을 억제할 수 있는 면역관용 유도 단백질을 생산하고 일상적인 식생활 중에 자가면역 억제 단백질을 지속적으로 섭취하거나 또 이를 생산하는 유산균을 장내로 전달하여 지속적으로 면역관용 유도 단백질을 섭취할 수 있게 설계하였다.

#### 라) 실험동물 모델의 적절성 확인

자가면역 질환에 대한 면역관용 유도 단백질 펩타이드의 효과를 조사하기 위해서

는 적절한 자가면역질환 실험동물 모델이 있어야하며, 실험동물에서 나타나는 증상과 병리 기작이 실제로 사람에게 나타나는 자가면역 질환과 관련성이 있어야 한다. 본 연구에서는 자가면역 억제 단백질의 효능을 검증하기 위해 제 1형 당뇨병, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염에 대한 실험동물 모델을 구축하고 테스트하였다.

○ 사람에서 나타나는 제 1형 당뇨병의 모델로서 nonobese diabetic (NOD) 생쥐에서 유전학적으로 그리고 면역병리학적으로 유사한 면이 있음이 밝혀져 인간 인슐린 의존성 제 1형 당뇨병의 동물 모델로 일반적으로 이용되고 있다. 때문에 NOD 생쥐를 이용하여 자가면역 억제 단백질의 면역관용 유도 효과를 생체 내에서 직접 조사할 수 있으며 어떠한 기작으로 자가면역을 억제할 수 있는가에 대한 기초적인 연구를 수행할 수 있다. 또한 CD1d에 의존적인 NKT 세포가 수행하는 면역조절작용이 결여된 CD1d Knock-out 형질을 NOD 생쥐에 도입하는 경우 당뇨의 발생 빈도가 더욱 증가하는 것을 본 연구팀은 관찰하였다. 이와 같이 고도의 당뇨 발생 빈도를 보이는 실험동물은 제 1형 당뇨 억제에 대한 면역관용유도 단백질의 효과를 검증하는데 필수적인 생체모델이 될 것이다.

○ 생쥐에서 실험적으로 유도할 수 있는 experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)는 사람의 다발성 경화증 (MS, Multiple Sclerosis)의 실험동물모델이며 자가면역 T 세포에 의한 신경세포 파괴 때문에 생기는 자가면역질환이다. 동물모델에서의 EAE는 사람의 다발성 경화증과 마찬가지로 중추신경계에 염증을 유발시키고 중추신경계를 감싸고 있는 마이엘린을 비정상적으로 만들어 중추신경계에 심각한 기능성 장애를 일으킨다. 때문에 EAE에 걸린 생쥐의 경우 사지를 제대로 가누지 못하거나 심한 경우에는 죽음에 이르는 현상을 보이게 된다. 본 연구팀은 C57BL/6 생쥐에서 EAE를 유도하고 그 증세의 정도에 따라 grading system을 확립하여 면역억제 단백질의 효과를 실험동물에서 직접 비교하고 수치화 할 수 있는 시스템을 확립하였다.

○ 류마티스성 관절염 모델에서는 대표적으로 DBA/1 생쥐가 동물 모델로서 사용된다. 2형 콜라젠A (collagen type 2 A)를 생쥐에게 CFA와 함께 주사하여 류마티스성 관절염의 증상을 일으키게 하는데, 이렇게 처리한 생쥐에서는 활액막 과형성(synovial hyperplasia), 단핵세포의 증가, 판누스(pannus) 형성, 그리고 연골과 뼈가 파괴되는 사람의 류마티스성 관절염과 유사한 증상이 나타나게 된다. 현재 DBA/1 생쥐는 미국

Jackson 연구소에 의뢰하여 현재 국내도입 중인 상황이다.

지금까지 설명한 실험동물 모델을 통해 본 연구에서 자가면역 억제 단백질을 생산할 수 있는 균주가 장내에서 지속적으로 면역억제 단백질을 제공하는 경우 자가면역 질환의 증세에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하고 또한 어떤 기작을 통해 자가면역 질환의 증상을 경감시킬 수 있는지의 기초적인 연구를 수행할 수 있다.

## 2) 제 2세부 과제

### 가) 식물체내의 코돈 사용례에 따른 적절한 펩타이드 프라이머와 펩타이드 제작

제 1 세부과제 연구에서 수행한 4개의 펩타이드를 애기장대에서 발현시키기위해서 식물체 전환용 벡터인 pSJ001을 먼저 제조하였다. 식물체내에서 정상적으로 발현하기 식물체내의 시작 코돈을 연결할 수 있는 연결자 프라이머를 제작하였다. 제작한 두 개의 프라이머중 JH2098은 식물체의 시작 코돈을 포함하고 있는 프라이머로 앞부분에 클로닝을 하기 위한 제한효소 사이트를 포함하고 있다. 다른 프라이머인 JH2116은 중지 코돈을 포함하고 있으며 식물체내에서 펩타이드의 발현 여부를 알아 볼 수 있는 헥사 히스티딘을 포함하고 있다. 이 프라이머를 이용해서 식물체 코돈에 맞게 식물에 유전자 단편을 유용하게 집어넣을 수 있는 식물체 전환용 벡터를 제작하였다.

1세부과제에서 얻어낸 4개의 펩타이드를 면밀하게 분석한 결과 이 펩타이드 들에

펩타이드	유래 종 (species)	애기장대의 Codon usage 와 일치도(%)	존재하는 아미노산들의 codon usage는 식물의 codon usage와 매우 유사함을 발견하였다 (표 참조). 따라서 제 2 세부과제에서는 별다른 peptide 서열의 변화없이 동물의 펩타이드 서열을 그대로 식물체에 도입하였다. 동물의 염기서열은 식물과 염기서열 변화없이 그대로 도입하기로 한 이유는 다음과 같다. 분석 결과 제 1세부과제에서 제조한 4개의 동물의 펩타이드는 그 codon usage가 애기장대의 것과 매우 유사한 것을 알 수 있었다. 또한 codon usage가 일치하지 않는 나머지 3.9 ~ 9.2%에 해당하는 codon usage를 분석해본 결과 식물체내에서 펩타이드를 합성할 때에 큰 영향을 주지 않음을 알 수 있었다. 예를 들어 codon usage가 가장 일치하지 않는 경우가 Leucine이었다. 동물의 경우 Leucine은 주로 CUG triplet에 의해 암호화되는데 애기장대에서는 이 CUG가 10.6%정도 사용된다. 따라서 식물체에서 CUG의 사용빈도가 매우 낮은 것으로 추측할 수 있다. 그러나 Leucine은 6개의 서로 다른 triplet에 의해 암호화되고 각각
OVA19-9	<i>Gallus gallus</i>	96.1	
OVA154-6	<i>Gallus gallus</i>	95.1	
MINS 15	<i>Mus musculus</i>	90.8	
HMBP14	<i>Homo sapiens</i>	92.9	

존재하는 아미노산들의 codon usage는 식물의 codon usage와 매우 유사함을 발견하였다 (표 참조). 따라서 제 2 세부과제에서는 별다른 peptide 서열의 변화없이 동물의 펩타이드 서열을 그대로 식물체에 도입하였다. 동물의 염기서열은 식물과 염기서열 변화없이 그대로 도입하기로 한 이유는 다음과 같다. 분석 결과 제 1세부과제에서 제조한 4개의 동물의 펩타이드는 그 codon usage가 애기장대의 것과 매우 유사한 것을 알 수 있었다. 또한 codon usage가 일치하지 않는 나머지 3.9 ~ 9.2%에 해당하는 codon usage를 분석해본 결과 식물체내에서 펩타이드를 합성할 때에 큰 영향을 주지 않음을 알 수 있었다. 예를 들어 codon usage가 가장 일치하지 않는 경우가 Leucine이었다. 동물의 경우 Leucine은 주로 CUG triplet에 의해 암호화되는데 애기장대에서는 이 CUG가 10.6%정도 사용된다. 따라서 식물체에서 CUG의 사용빈도가 매우 낮은 것으로 추측할 수 있다. 그러나 Leucine은 6개의 서로 다른 triplet에 의해 암호화되고 각각

평균 15%정도가 사용되고 있다. 이 수치는 식물체에서 CUG를 Leucine의 triplet으로 사용하여도 큰 지장이 없음을 시사한다. 위의 분석 결과를 종합하여 2세부과제에서는 1세부과제에서 받은 펩타이드의 서열을 변경시키지 않아도 표적단백질의 생산하는데 문제가 없다고 판단하였고 동물 펩타이드 서열을 그대로 식물체로 도입하였다.

이것으로 식물체내의 코돈 사용례에 따른 적절한 펩타이드 프라이머와 펩타이드를 제작하는 목표는 100% 달성하였다

**나) 자가 면역 억제 단백질 펩타이드의 과량발현과 유도 발현 재조합 플라스미드 제조**

과량 발현 시스템을 위해 자가 면역 억제 펩타이드를 Cauliflower mosaic virus의 35S 프로모터에 의해 발현되도록 pCHF3에 클로닝한 재조합 벡터를 제조 하고자 하였다. 하지만 일반인들이 항생제 저항성 마커에 대한 거부감이 많이 있기 때문에 이를 보완하기 위해서 BASTA 유전자를 이용해서 pCHF3를 대체할 수 있는 벡터인 pSJ001을 제작하였다.

**다) 애기장대의 형질전환**

현재 자가 면역 억제 펩타이드 벡터 시스템(pSJ001)에 집어 넣은 pMSC002, pMSC003, pMSC006, pMSC008과 대조군으로 사용할 pSJ001을 아그로박테리움 ASE로 옮기고 애기장대 야생형 Columbia에 도입시켜 형질전환하였다. 애기장대에 신속하게 집어넣기 위해서 제작된 벡터들을 침윤 방법을 이용해서 형질전환 시켰다. 가장 많이 알려진 진공 침투법을 이용하기 보다는 형질 전환시 보다 손쉽고 진공 침투법에 비해서 효율성이 많이 떨어지지 않는 침윤법을 사용했다. 침윤법을 이용할 시 형질 전환시기가 지난 것을 제외하고 나면 2%의 효율이 나오는 것을 반복실험을 통해서 확인하였다.

세부내용	목표	달성내용	달성도(%)
유용 펩타이드 제조	4종	4종	100
형질전환 식물체 제조	4종	4종	100
펩타이드 발현여부 조사	4종	4종	100

**3) 협동 과제**

**가) 감자의 형질전환 최적 조건 확보**

식물체의 형질전환은 품종, 재배조건, 치상부위, 배지 내 호르몬조성 등에 따라

효율이 크게 달라진다. 또한 국내에서 육성한 장려 품종에 목적하는 외래 유전자를 도입하여야 성공 후 국내에 보급이 용이하다. 따라서 본 연구의 초기단계로서 국내에서 육성한 5품종을 공시재료로 하여 호르몬 조성, 치상부위별로 가장 효율이 좋은 조건을 선발하였으며 그 결과는 한국식물생명공학회(30권 제1호, 2003년)에 발표되어서 1년차의 연구목표는 100% 달성하였다.

- 최적 품종 : 조원(잎조직, 87.9%), 조풍(줄기조직, 68.4%)
- 호르몬조성 : 신초형성(GA<sub>3</sub>, 0.1 mg/L, Zeatin 2.0 mg/L, NAA 0.01 mg/L)  
뿌리유기(호르몬 무첨가 MS 기본배지)
- Agrobacterium의 접종과정에서 Acetosyringone 농도는 75uM 농도에서 가장 효율이 좋았음(1.5 - 4배 증가)

**나) 제초제저항성유전자만(Bar)를 선발 마커로 이용한 운반체 제작**

- GMO 안전성 논란중의 가장 큰 이슈가 되고 있는 항생제저항성마커 유전자(카나마이신, 하이그로마이신 등)를 제거하고 제초제저항성 유전자만 함유하는 운반체를 제작하였으며 이를 이용한 감자의 형질전환 조건 및 선발효과를 시험 중에 있으므로 초기 계획대비 목표달성도는 완성단계에 있음
- 따라서 2차년도에는 자가면역질병억제 펩타이드유전자가 도입된 운반체를 이용한 형질전환실험에 집중하여 다수의 형질전환 감자를 개발하고자 하며 이를 위한 기초 실험은 끝난 상태이다

**2. 제 2차년도**

**가. 연구개발 목표와 내용 및 평가의 착안점**

1) 연구개발 목표

2차년도	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
제 1 세 부과제	자가면역 억제 단백질의 효능을 동물 질환 모델에서 검증	1. 제 1형 당뇨 모델 생쥐인 NOD에 장내 세균 중 표적 펩타이드를 발현하는 균주를 감염시켜 당뇨 발생 빈도 조사 2. 제 2형 콜라젠으로 실험동물에 관절염을 유도한 뒤

		표적 펩타이드를 발현하는 장내 세균으로 관절염 증상 호전 효과 조사 3. 마이엘린 단백질로 실험동물에 EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis)를 유도하고 증상을 호전에 세균에서 분비되는 펩타이드의 효과 조사
제 2 세 부과제	형질전환 애기장대 제작과 생체내 펩타이드 합성 확인	1. 애기장대의 형질전환 - 애기장대 야생형 Columbia에 진공 침투법을 이용하여 형질전환 2. 형질전환된 애기장대에서 펩타이드 발현 여부 조사 - Northern 혼성화 반응과 Western 혼성화 반응을 이용하여 도입한 자가면역 억제 단백질의 펩타이드가 형질전환체에서 정상적으로 발현되는지 조사 3. 식물체에서 총 단백질 분리 - 펩타이드 경구 투여를 위해서 형질 전환된 식물체의 총 단백질 분리와 정제 column을 이용한 일차 정제 4. 투여 효과 측정 후 개량 펩타이드 제조와 형질전환체에서 생산 - 발생할 수 있는 문제점을 개선한 개량형 펩타이드를 제조하고 형질전환체에서 재생산
협동과제	형질전환 감자 확인	1. 형질전환감자(T0)의 다수확보 및 자가면역질병억제 펩타이드 유전자의 도입 확인 2. CaMV promoter와 patatin 프로모터를 이용한 처리구에 따른 형질전환체들의 조직별 도입유전자의 발현 양상 조사 3. 최종산물인 자가면역질병억제 펩타이드의 생산확인

2) 연구 평가의 착안점

구분	평가의 착안점 및 척도	
	착안사항	척도 (점수)
2차년도 (2003 - 2004)	○ 미생물 유래 펩타이드를 이용한 면역반응 조절 모델을 테스트 하기 위해 동물모델에서 효능을 분석하며 제어할 수 있는 절차를 확립했는가?	15%
	○ 인슐린 의존성 당뇨 모델에서 미생물 유래 펩타이드의 효능을 조사하였나?	10%
	○ 다발성 경화증 모델에서 미생물 유래 펩타이드의 효능을 조사하였나?	10%
	○ 류마티스 관절염 모델에서 미생물 유래 펩타이드의 효능을 조사하였나?	10%
	○ 진공 침투법을 이용하여 대량으로 애기장대 형질전환체를 제조하였는가?	10%
	○ 형질전환된 애기장대에서 펩타이드 발현 여부 조사하였는가?	10%

	○ 형질전환 식물체에서 총단백질 분리하여 경구 투여를 하였는가?	15%
	○ T0 형질전환 감자에서 자가면역질병억제 펩타이드 유전자가 성공적으로 도입되었는가?	20%

## 나. 연구개발 목표의 달성도

### 1) 제 1 세부과제

가) 미생물 유래 펩타이드를 이용한 면역반응 조절 모델을 테스트하기 위해 동물 모델에서 효능을 분석하며 제어할 수 있는 절차를 확립했는가?

사람의 질병에 관련된 실험동물 모델을 이용하여 실험을 진행하기 이전에, 새로 개발한 미생물 유래 펩타이드의 적절한 사용을 위해 기본적으로 동물실험에서 수행해야 할 실험에 대한 체계를 세울 필요가 있다. 이는 이번 실험에 관련된 모든 동물실험에서 기본적으로 적용되어야 할 사항이며 기본적으로 확립된 절차에 의해, 본 실험 이후에 있을 메커니즘의 분석 및 실험방법의 보완을 구상함에 있어 보다 효율적인 진행이 가능하게 된다. 때문에 직접적으로 질병과는 관련이 없으나 면역학 연구를 위해 대응모델로 오래전부터 확립되어 온 ovalbumin 펩타이드를 이용한 면역반응 유도 테스트를 이용하여 동물실험 절차를 확립할 수 있었다.

### 나) 인슐린 의존성 당뇨 모델에서 미생물 유래 펩타이드의 효능 조사

일반적으로 사람에서 나타나는 제 1형 당뇨병의 모델로서 nonobese diabetic (NOD) 생쥐에서 유전학적으로 그리고 면역병리학적으로 유사한 면이 있음이 밝혀져 인간 인슐린 의존성 제 1형 당뇨병의 동물 모델로 일반적으로 이용되고 있다. 이러한 당뇨 모델을 이용하여 새롭게 개발한 미생물 유래 펩타이드가 NOD 생쥐에서의 당뇨 발발 시기와 전체적인 발발 비율을 낮출 수 있는지 테스트를 통해서 확인할 수 있다. 실험에 사용할 동물의 경우 일반적으로 암컷 NOD 생쥐에서 제 1형 당뇨병의 발병율이 높기 때문에 암컷 NOD 생쥐만을 실험에 사용하게 됨. 그러나 CD1 유전자가 결여된 knockout 동물을 준비하는데 시간이 많이 걸리고 특정 성별의 생쥐만을 사용하기 때문에 이에 대한 준비기간이 더 소요된다. 그렇기 때문에, 먼저 야생형의 암컷 NOD 생쥐에서 일련의 실험을 실시하였다. 동물실험의 결과를 보기 위해서는 약 50주의 장기간의 관찰이 필요하기 때문에 아직도 결과를 두고 봐야 할 것임. 비록 반대로 예상되는 결과로 인해 비록 개발된 미생물 유래 펩타이드가 인슐린 의존성 당뇨 증세를 완화시키려는 목적으로 바로 사용할 수는 없지만, 당뇨 발발 시기를 앞당기는 현상을

연구함으로써, 당뇨발발에 관련된 메커니즘 이해에 도움이 될 수 있다.

#### 다) 다발성 경화증 모델에서 미생물 유래 펩타이드의 효능을 조사

사람의 다발성 경화증 (MS, Multiple Sclerosis)의 실험동물모델이며 생쥐에서 실험적으로 유도할 수 있는 experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)는 자가 면역 T 세포에 의한 신경세포 파괴 때문에 생기는 자가면역질환이다. 동물모델에서의 EAE는 사람의 다발성 경화증과 마찬가지로 중추신경계에 염증을 유발시키고 중추신경계를 감싸고 있는 마이엘린을 비정상적으로 만들어 중추신경계에 심각한 기능성 장애를 일으킨다. 그러나 일반적으로 EAE를 유도함에 있어서 충분한 스코어를 적용할 만큼 심각하게 EAE를 유도하는 방법이 쉽지가 않기 때문에 2차 년도에서는 확실한 미생물 유래 펩타이드 효능을 검증할만한 동물 모델을 재개발할 필요성을 느끼게 되었다. 때문에 보다 쉽고 보다 강력하게 EAE를 유발하여 실험의 정확도를 높이고자 강력하게 EAE를 유발하는 시스템을 개발하였다. CD1이 결여된 생쥐에서 EAE를 유도하는 시스템에서 보다 강력한 EAE 증세를 유도할 수 있었고 때문에 이러한 동물모델을 이용하여 현재 개발된 미생물 유래 펩타이드의 효능을 조사할 수 있었다. 다발성 경화증 모델에 대한 동물실험 역시 장기간의 관찰이 필요한 실험이기 때문에 현재 실험중이며 약 30주 이상의 관찰 기간을 필요로 한다.

## 2) 제 2세부 과제

### 가) 애기장대 형질전환체의 제조.

1차년도에 제1 세부과제를 수행하면서 획득한 4개의 펩타이드를 애기장대에서 발현시키기 위해서 식물체 형질 전환용 벡터인 pSJ001을 만들었다. pSJ001은 Cauliflower mosaic virus의 35S 프로모터를 사용한 과량 발현 카셋트를 갖춘 벡터로써 자가 면역 억제 펩타이드를 식물체내에서 발현시키기 위한 목적으로 제작되었다. 이 벡터에는 일반인들에게 거부감이 높은 항생제 저항성 마커 유전자(식물에서 가장 많이 사용되는 카나마이신)대신에 BASTA 유전자를 간직하고 있다. 제작된 식물체 형질 전환용 벡터인 pSJ001에 제1세부과제에서 목표로 한 4개의 유용 펩타이드를 클로닝하였다. 이로써 1세부과제에서 받은 유용 펩타이드가 들어간 형질전환체의 제조 목표는 100%를 달성하였다.

### 나) 형질전환된 애기장대에서 펩타이드 발현 여부 조사

형질전환체에서 유용 펩타이드의 발현 여부를 조사하기 위하여 펩타이드를 간직한 유전자의 전사량을 확인할 수 있는 Northern 혼성화 반응과 RT-PCR, 그리고 단백질 발현 정도를 측정할 수 있는 Western 혼성화 반응을 수행하였다. 애기장대에 유용 펩타이드가 도입된 형질전환 식물체를 선별하였고, 이를 식물체 각각에서 펩타이드의 발현 여부를 조사하였다. 식물체로부터 RNA를 뽑아서 벡터의 MCS부분을, 즉 펩타이드가 삽입된 부분의 발현여부를 알 수 있는 프라이머를 제작하여 RT-PCR을 수행하였다. 그리고 펩타이드 부분을 탐침으로하여 Northern 혼성화 반응을 행하였다. 대조군으로 펩타이드를 포함하지 않는 공벡터(pSJ001)를 도입시킨 식물체를 사용하였다. 그 결과 pSJ001이 식물체에서는 펩타이드 전사체가 발현되지 않음을 관찰하였고 펩타이드를 간직한 pMSC002와 pMSC003 식물체에서는 펩타이드 전사체의 발현을 관찰하였다. 또한 형질전환 식물체로부터 단백질을 분리하고 Western 혼성화 반응을 행하여 각 펩타이드의 발현을 확인하였다.

#### 다) 형질전환 식물체에서 총 단백질 분리 후 쥐에 경구 투여

당뇨병 관련 유용 펩타이드의 최종 효과를 검증하기 위하여 제조된 펩타이드를 실험용 쥐에게 경구 투여할 예정이다. 형질전환 식물체로부터 안정적인 펩타이드 발현을 먼저 확인하고 실험을 진행하고 있다. 그리고 실험용 쥐의 경구 투여는 투여 펩타이드의 양적인 문제를 고려하여야 하므로 안정화된 펩타이드의 발현여부를 관찰한 후, 수행할 예정이다.

세부내용	목표	달성내용	달성도(%)
유용 펩타이드 제조	4종	4종	100%
형질전환 식물체 제조	4종	4종	100%
펩타이드 발현여부 조사	4종	4종	100%
총단백질 분리 후 쥐에 경구투여	4종	2종	50%

### 3) 협동과제

#### 가) 형질전환감자(T0)의 다수확보 및 자가면역 질 억제 펩타이드 유전자의 도입 확인

- 본과제의 1년차에는 감자의 형질전환 체계 및 형질전환을 위하여 대량으로 필요한 무균상태에서 증식한 감자식물체의 확보체계를 확립하였다.

- 특히 제초제 저항성 유전자를 이용한 선발 체계를 확립함으로써 일반대중이 반대하는 카나마이신, 하이그로마이신 등의 항생제를 사용하지 않고 형질 전환체를 선발할 수 있는 시스템을 확보하였다.

- 2년차에는 이러한 시스템을 도입하여 제1세부과제에서 확보한 자가면역 질병억제 펩타이드 유전자(2종류)를 도입한 식물체 백터를 형질전환하여 얻은 식물체를 PCR로 확인하였으며 도입 유전자의 발현양을 확인하기 위하여 RT-PCR용 primer와 내부 control용으로 ribosomal RNA 혹은 actin 유전자로부터 만든 primer를 사용하여 mRNA의 발현양을 조사하였다.

- 제초제(바스타 0.3%)를 처리하여도 살아남는 형질전환 감자식물체 line을 다수 확보하였으며 이들로부터 수확한 감자 괴경은 동물의 경구투여실험에 이용될 예정이다.

#### **나) CaMV promoter와 patatin 프로모터를 이용한 처리구에 따른 형질 전환체의 조직별 도입유전자의 발현 양상 조사**

- 1년차 보고서에 대한 연차평가에서 조직특이 프로모터를 사용하도록 지적받은 사항을 고려하여 본 과제의 특성상 괴경 특이 프로모터인 patatin 유전자를 이용하고자 직접 감자 genomic DNA로부터 patatin promoter를 분리하여 염기서열을 분석하고 PCR을 이용하여 기존의 식물 운반체 binary vector 내의 CaMV promoter와 치환하여 운반체를 제작한 후 형질전환을 시도하여 다수의 후보식물체에 대한 분자생물학적 검증 작업이 진행 중에 있으며 형질전환이 확인된 후 감자 괴경을 수확하여 금년도 말까지는 일부 결과를 얻을 수 있을 것임

#### **다) 최종산물인 자가면역질병억제 펩타이드의 생산확인**

- 금년도에 백터를 제작한 patatin promoter를 이용한 운반체를 도입한 형질전환체와 함께 모든 형질전환체에서 수확한 괴경으로부터 western blot을 통한 단백질의 발현양을 비교 분석 할 계획으로 시료 확보 중임(포장 재배 중)

### **3. 제 3차년도**

#### **가. 연구개발 목표와 내용 및 평가의 착안점**

##### **1) 연구개발 목표**

3차년도	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
제 1 세부과제	미생물 유래 펩타이드와 형질 전환 애기장대를 이용한 자가면역 질환 동물 모델에서의 효과 검증	1. 표적 단백질을 발현하는 대장균을 경구 투여하여 다발성 경화증 동물 모델에서의 효능 검증 2. 표적 단백질이 형질 전환된 애기장대를 경구 투여하여 다발성 경화증 동물 모델에서의 효능 검증
제 2 세부과제	동물모델에서 지속적인 개량 펩타이드 효능 검증과 최종 후보 결정을 통한 개량 펩타이드 대량 생산 형질전환 애기 장대 제조	1. 개량된 펩타이드 효과 지속적인 검증 - 점진적으로 효과를 개선하여 그 효능을 극대화시킨 펩타이드의 지속적인 검증 시스템 2. 자가면역 억제 단백질 펩타이드 생산 형질전환체 대량 생산 - 실험동물에 경구 투여하여 효과가 입증된 펩타이드를 생산하는 형질전환체를 대량 배양 및 분주
협동 과제	자가면역 질병억제 펩타이드 생산 형질전환 감자 개발	표적 단백질이 형질 전환된 감자의 투여를 통한 자가면역 질환에서의 효능 검증

## 2) 연구평가의 착안점

3차년도 (2004 - 2005)	○ 형질전환 대장균을 경구 투여를 통해 자가면역 질환의 억제를 유도하는 연구를 수행하였는가?	15%
	○ 형질전환 식물체를 경구 투여하여 자가면역 질환의 억제를 유도하는 연구를 수행하였는가?	15%
	○ 자가면역질환의 억제 효과를 확인하였다면 이러한 효과가 어떤 면역학적 기전에 의해 일어나는 지를 확인하였는가?	15%
	○ 개선된 펩타이드 효과의 지속적인 검증이 이루어졌는가?	15%
	○ 자가면역 억제 단백질 펩타이드 생산 형질전환체 대량 생산을 수행하였는가?	20%
	○ 형질전환식물체(T0 및 그후 대)에서 생산된 자가면역질병억제 펩타이드가 실험동물모델에서 그 효능이 확인 되었는가?	20%

## 나. 연구개발 목표의 달성도

### 1) 제 1세부 과제

#### 가) 표적 단백질을 발현하는 대장균의 경구 투여를 통한 다발성 경화증 동물 모델에서의 효능 검증

2차 년도까지 연구 과제를 수행하면서 최종적으로 선발된 표적 단백질을 발현하는 대장균을 C57BL/6 mice에 경구 투여하여 다발성 경화증 동물 모델에서의 펩타이드 발현 대장균의 효능을 조사하였다. 실험은 총 4회에 걸쳐 수행되었으며 그 중 3회에서 표적 단백질을 경구 투여한 실험 동물군에서 질병이 억제되고 완화되는 효과를 검증하였다.

#### 나) 표적 단백질을 발현하는 형질 전환 애기장대의 경구 투여를 통한 다발성 경화증 동물 모델에서의 효능 검증

최종적으로 선정된 형질 전환 애기장대를 C57BL/6 mice에 경구 투여하여 다발성 경화증 동물 모델에서의 펩타이드 발현 대장균의 효능을 조사하였다. 실험은 총 3회에 걸쳐 수행되었으며 그 중 2회에서 표적 단백질을 경구 투여한 실험 동물군에서 질병이 억제되고 완화되는 효과를 검증하였다. 1회 실험에서 효능을 검증하지 못한 이유는 경구 투여한 형질 전환 애기장대의 투여량과 시기가 적절치 못했기 때문이라 판단된다. 비록 효능은 검증하지 못한 실험이었지만 다음 2회 실험에서 적절한 투여량과 시기를 정할 수 있었던 선행 실험이었다는 점에서 의의가 있다고 하겠다.

#### 다) 자가면역억제 효과의 기전 확인

자가면역질환 유도 동물에 형질전환 박테리아와 애기장대를 경구투여 한 뒤 대조군과 실험군의 비장세포, 장관계 림프절 등의 면역세포를 분리하여 in vitro에서 항원을 재처리한 후 면역세포들이 만들어 내는 사이토카인의 종류와 양을 측정할 결과 형질 전환 백신을 처리한 경우 염증 강화 사이토카인인 IFN-g의 생산량이 감소하고 면역억제 사이토카인인 IL-10의 생산량이 증가하는 사실을 확인하였다. 이러한 결과는 실험동물에서의 질병증세 완화가 면역억제 T 세포의 작용에 의해 일어나고 있음을 보여주는 것으로 다양한 자가면역질환에의 적용 가능성을 높여준다고 판단된다.

### 2) 제 2세부 과제

#### 가) 형질 전환된 애기장대에서 펩타이드 발현 여부 조사

2차년도까지의 연구 과제를 수행하면서 제 1세부과제를 통해 최종적으로 선별되어진 4가지의 유용 펩타이드를 발현하는 형질전환 애기장대를 만들었다. 또한 동 기간까지 각 형질 전환된 애기장대를 대상으로 유용 펩타이드의 발현정도를 RT-PCR과

Northern 혼성화 반응을 통해 전사수준의 확인을 완료하였다. 3차년도에 이들 유용 펩타이드의 지속적인 투여를 위해 단백질수준의 발현여부를 확인하는 작업을 지속했다. 유용형질이 도입된 형질전환 T1 식물체를 대상으로 Western 혼성화 반응을 통해 모두 단백질로 안정적으로 발현되는 것을 확인하였으며 T1 식물체중 상대적으로 발현이 높은 개체를 대상으로 다음세대를 통한 도입형질의 안정성 확인과 대량배양을 수행하였다.

#### 나) 개량된 펩타이드의 지속적인 효과 검증

식물의 형질도입은 아그로 박테리아의 T-DNA를 사용하여 염색체안의 무작위적 삽입을 통해 이루어지는 특징이 있다. 따라서 같은 형질이 도입된 형질전환 식물일 지라도 도입형질의 발현양이나 다음세대를 통해 지속적으로 발현이 유지되어지는 안정성에 차이를 보일 수 있다. 따라서 앞서 선별된 4가지 유용 펩타이드의 발현을 확인한 다음세대의 식물에서 Western 혼성화 반응을 통해 도입된 형질이 세대를 거쳐 안정적으로 유지되어지는지 확인하였다. 총 4가지 종류의 형질전환 식물체중 2가지 (HMBP14, OVA19-9) 형질전환식물체에서 안정적으로 다음세대에서 유용 펩타이드의 발현을 확인하였으며 T2세대에서 발현이 확인되어지지 않은 MINS15와 OVA154-6에 대해서는 확인 중에 있다.

#### 다) 자가면역 억제 단백질 펩타이드 생산 형질전환체 대량 생산

본 제 2세부과제에서 모델 식물체로 선택한 애기장대는 세대가 짧고 다량의 종자를 확보할 수 있는 장점을 갖고 있다. 또한 한정된 공간에서 다량의 식물체를 배양할 수 있는 특성을 갖고 있다. 물론 다른 농작물에 비하여 상대적으로 수확하는 중량이 적은 단점이 있으나 특정 질병의 면역억제를 위한 투여용으로는 그 양이 충분하다고 생각된다. T2 세대에서 도입된 형질의 안정적인 발현을 확인한 HMBP14와 OVA19-9의 형질전환 식물체를 대상으로 배양실조건에서 대량배양을 수행하여 단위면적당 (m<sup>2</sup>) 160g의 식물체를 수확하여 실험동물의 경구투여를 위해 동결건조를 하고 사료와 배합하는 작업을 마무리 하였다. 또한 다음세대인 T3 식물체를 대상으로 도입형질의 유지와 종자의 대량 확보 작업을 진행 중에 있다.

### 3) 협동 과제

#### 자가면역질병억제 펩타이드 유전자가 도입된 형질전환감자의 확보 및 유전자의 도입 확인

제1세부과제에서 확보한 자가면역질병억제 펩타이드 유전자 (제1형당뇨병 및 다발성 경화증)를 도입한 식물체 백터를 형질전환하여 얻은 식물체를 PCR 및 southern blot hybridization으로 확인 한 결과 pMSC002는 5개체, pMSC003은 1개체, pMSC006

은 3개체를 각각 확보하였다. 특히 pMSC002는 copy 수가 2개 이상인 것도 확인 할 수 있었다.

도입 유전자의 발현양을 확인하기 위하여 RT-PCR용 primer와 내부 control용으로 ribosomal RNA 혹은 actin유전자로부터 만든 primer를 사용하여 mRNA의 발현양을 조사한 결과 모든 형질전환체에서 공히 target peptide에 대한 mRNA가 합성되었음을 확인한 것을 확인 하였다. 특히 동시에 도입된 bar 유전자와, 내부 control로 사용한 actin 유전자가 target peptide유전자에 대한 mRNA와 거의 동일한 양이 합성됨을 확인 하였으나 negative control로 사용한 non-transgenic 감자에서는 bar 혹은 target peptide유전자의 mRNA는 확인이 되지 않았다.

형질전환 감자의 잎 및 괴경에서 추출한 단백질에 대한 western blot hybridization 분석결과 target펩타이드가 합성되었는지 여부는 확인 할 수 가 없었으며, 이에 대한 확인은 계속 진행이 되어야 할 것으로 사료된다.

## 2절. 관련 분야에의 기여도

- 1. 향후 연구의 모델 제시 :** 본 과제에서 제안하는 형질전환 식물체를 이용한 의료용 펩타이드의 생산은 위에 언급한 모든 조건을 만족하는 물질로서 대단히 큰 경제적 가치를 지닐 것이며 향후 이 분야 연구의 모델 케이스가 될 수 있을 것이다.
- 2. 미래 농업의 지표 제시 :** 본 과제를 통해 질병 치료용 작물이 개발되는 경우 농업적인 측면에서 지금까지의 생산성 증가를 통해 얻을 수 있었던 부가가치의 증가와는 비교할 수 없는 고도화된 농업이 가능할 것이며 이는 우리나라 농업이 가야 할 방향의 전형을 제시해 줄 것이다.

## 제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

### 1. 후속연구의 필요성

- 가. 동물실험에서 자가면역질환의 억제 효과가 확인되었으므로 이를 환자에 적용하기 위해서는 형질전환 대장균 및 식물체가 가질 수 있는 부작용 및 안전성에 대한 동물실험이 추가적으로 필요하다.
- 나. 실제 환자에 적용하기 위해서는 다양한 종류의 작물체에 단백질을 발현하는 것이 필요하다. 본 연구의 형질전환 단백질은 기본적으로 불활성 형태를 이용하므로 요리를 하더라도 기능에 전혀 영향을 미치지 않을 것으로 판단된다. 따라서 작물을 선택할 때 요리를 해야 하는 작물을 배제할 필요가 없기 때문에 더욱 다양한 작물체에 형질전환 도입이 가능할 것으로 판단된다.
- 다. 본 연구결과를 사업화하기 위한 과정은 형질전환 식물의 안전성 검증 및 전임상 및 임상 연구단계를 거쳐야 하므로 국내 제약회사 및 벤처 기업들과의 협력을 통해 향후 연구를 지속적으로 확대 발전시켜나갈 필요가 있다.
- 라. 본 연구의 결과는 한 가지 질병에 대한 치료약제의 개발이 아니라 다양한 자가면역질환에 대해 먹는 면역억제 백신이 가능할 것인가의 의문에서 출발하였고 그 가능성을 확인한 만큼 다발성 경화증외에도 여러가지 다른 자가면역질환과 알레르기 반응을 억제하기 위한 먹는 백신의 개발을 위한 이정표가 되었다고 판단 된다. 자가면역 질환자의 비율은 선진 산업국일수록 증가하여 전체 인구의 5~10%에 이를 정도로 증가하는 실정이며 질병의 특성상 장기간에 걸쳐 치료를 해야하므로 질병 당 의료비 지출은 사망률이 상대적으로 높은 암이나 심혈관계 질환보다 월등히 높은 경향이 있다. 이러한 현실을 감안하였을 때 자가면역질환의 치료 기술은 미래 의료산업의 핵심적인 분야가 될 것이 분명하며 본 연구팀의 개발 기술을 확대 발전시키는 것이 이러한 미래 의료산업의 핵심 경쟁력을 선점하는 첩경이 될 것으로 판단된다. 이를 위해 국내 식품, 제약, 벤처 기업과의 협력을 강화할 예정이다.

### 2. 기술적인 개선의 필요성

- 가. 형질전환식물체내에서 합성된 외래 유용 펩타이드의 분해를 막기 위한 연구

본 연구의 결과를 종합하여 보면 target peptide 유전자가 감자의 식물체내 계놈에 성공적으로 삽입되었으며 mRNA의 합성도 정상적으로 진행되었음을 호가인 할 수 있었으나 최종 산물인 펩타이드를 확인 할 수 없었던 사실은 아마도 감자의 경우는 세포내에서 합성된 펩타이드의 안전성에 관한 연구로 signal peptide의 부착, 피경내로 집적시킬 수 있는 강력한 프로모터의 확보 등에 관한 추가연구가 이루어져야 할 것으로 사료됨

### 3. 타분야연구에의 응용

- 다른 펩타이드로의 적용 : 자가 면역 억제 펩타이드가 아닌 다른 유용한 펩타이드를 식물체내에서 과량 발현시켜서 이를 이용 가능하게 할 수 있는 방안 모색
- 펩타이드성 호르몬 생산 식물체의 개발 : 본 과제에서 수행하고자하는 연구 방법은 펩타이드성 호르몬 (옥시토신, 항이노호르몬, 성장호르몬, 부신피질 자극호르몬 등)을 생산하는 식물체의 개발에도 응용될 수 있을 것이다. 이를 통해 펩타이드성 호르몬 관련 질환의 치료에 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

### 4. 논문 발표 및 기술이전

- 이미 본 연구를 통하여 얻은 결과를 국내의 한국식물생명공학회지에 “국내육성감자의 재분화와 형질전환 효율에 미치는 성장조절제의 조성 및 몇 가지 요소”라는 제목으로 1건 발표하였으며 (한국식물생명공학회지 30(1) : 27- 33, 2003) 현재 까지 얻어진 결과들을 정리하여 국제저널에 논문을 발표하기 위한 준비를 진행하고 있다. 또한 대장균과 애기장대에서의 자가면역억제 작용에 대한 효과를 특허 신청하기 위한 준비를 진행 중이다.
- 기술이전 및 상용화 : 국내 식품, 제약 회사와의 기술이전을 통해서 안전성과 상업적인 가치를 획득할 수 있도록 추진할 예정이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

식물에서 펩타이드를 생산하는 연구는 이미 오래전부터 연구가 시작되었으며 캐나다는 유지단백질인 oleosin에 유용펩타이드 유전자를 부착하여 최종 단계인 분리정제를 쉽게 하는 아이디어는 이미 개발되어 있음. 최근에는 분리정제를 하지 않고 식용으로 바로 이용할 경우 효과를 보는 경구백신, 항알러지식품등의 개발에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있음. 특히 최근 일본은 꽃가루 등의 알레르기를 방지 할 수 있는 펩타이드를 도입한 벼를 생산하였다고 함. 또한 형질전환 식물체내에서 만들어진 펩타이드는 세포질내에 머물게 되면 쉽게 분해가 되므로 엽록체, 액포 혹은 다른 세포내 소기관으로 이동하는 signal peptide의 개발, 단백질의 안정화에 관여하는 단백질 등에 관한 연구 또한 활발하게 진행되고 있음.

## 제 7 장   참고문헌

Acha-Orbea, H. and McDevitt, H. O. (1990), □□The role of class II molecules in development of insulin-dependent diabetes mellitus in mice, rats and humans□□, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 156:103-119.

Aeom, S. I., Park, S. K., Lim, Y. P., Lee, C. H., Kim, H. J., Kim, H. R. and Lee, H. Y. (1996), □□Development of bialaphos-resistant *Petunia hybrida* by introduction of the *bar* gene using *Agrobacterium tumefaciens*□□, Korean J. Plant Tissue Culture 23(3):177-181

Bach, J. F. (1995), □□Insulin-dependent diabetes mellitus as a  $\beta$  cell targeted diabetes of immunoregulation□□, J. Autoimmune 8:493-463.

Banta, L. M., Joerger, R. D., Howtitz, V. R., Campbell, A. M. and Binnes, A. N. (1994), □□Glu-225 outside the predicted ChvE binding site in VirA is crucial for sugar enhancement of acetosyringone perception by *Agrobacterium tumefaciens*□□, J. Bacteriol. 176:3242-3249.

Bevan, M., Barker, R., Goldsbrough, A., Jarvis, M., Kavanagh, T. and Iturriaga, G. (1986), □□The structure and transcription start site of a major potato tuber protein gene□□, Nucleic Acids Res. 14:4625-4638.

Blundy, K. S., Blundy, M. A. C., Carter, D., Wilson, F., Park, W. D. and Burrell, M. M. (1991), □□The expression of class I patatin gene fusion in transgenic potato varies with both gene and cultivar□□, Plant Mol. Biol. 16:153-160.

Bosi E., Todd I., Pujol, B. R. and Bottazo, G. (1987), □□Mechanisms of autoimmunity: relevance to the pathogenesis of type I (insulin-dependent) diabetes mellitus□□, *Diabetes / Metab. Rev.* 3:893-924.

Choi, K. H., Jeon, J. H., Kim, H. S., Joung, Y. H., Cho, S. J., Lim, Y. P. and Joung, H. (1996), □□Development of herbicide-resistant transgenic potato□□, *Korean J. Plant Tissue Culture* 23:161-165.

Chong, D. K. X., Robert, W., Arakaxa, T., Illes, K., Bagi, G., Slattery, C. W. and Langridge, W. H. R. (1997), □□Expression of the human milk protein  $\beta$ -casein in transgenic potato plants□□, *Transgenic Research* 6:289-296.

Gomez, N., Carrillo, C., Salinas, J., Parra, F., Borca, M. V. and Escribano, J. M. (1998), □□Expression of immunogenic glycoprotein S polypeptides from transmissible gastroenteritis coronavirus in transgenic plants□□, *Virology* 249:352-358.

Gunderson, E. (1927), □□Is diabetes of infectious origin□□, *J. Infect. Dis.* 41:197-202.  
Haq, T. A., Mason, H. S., Clements, J. D. and Arntzen, C. J. (1995), □□Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants□□, *Science* 268:714- 716.

Jefferson, R. A., Goldsbrough, A. and Bevan, M. (1990), □□Transcriptional regulation of a patatin I gene in potato□□, *Plant Mol. Biol.* 14:995-1006.

Jefferson, R. A., Ksvsngh, T. A. and Bevan, M. W. (1987), □□GUS fusion: $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plant□□, *EMBO J.* 6:3901-3907.

Joung, Y. H., Jeon, J. H., Choi, K. H., Kim, H. S. and Joung, H. (1996), □□

Transformation of Potato Roll Virus Coat Protein Gene into Potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Desiree) □□, *Korea J. Plant Tissue Culture* 23(2):77-81.

Joung, Y. H., Youm, J. W., Jeon, J. H., Lee, B. C., Ryu, C. J., Hong, H. J., Kim, H. C., Joung, H. and Kim, H. S. (2004), □□Expression of the hepatitis B surface S and preS2 antigens in tubers of *Solanum tuberosum* □□, *Plant Cell Report* 22:925-930.

Kim, H. S., Jeon, J. H., Kim, C. J. and Joung, H. (2002) □□Introduction of hog cholera virus gene into potato plants by *Agrobacterium*-mediated Transformation and the analysis of its expression □□, *J. Plant Biotechnol.* 4(4): 155-161.

Kim, S. Y., May, G. D. and Park, W. D. (1994), □□Nuclear protein factors binding to a class I patatin promoter region are tuber-specific and sucrose-inducible □□, *Plant Mol. Biol.* 26:603-615.

Liu, X. Y., Mario, R. S., Hummel, S., Willmitzer, L. and Frommer, W. B. (1991), □□A detailed study of the regulation and evolution of the two classes of patatin gene in *Solanum tuberosum* L □□, *Plant Mol. Biol.* 17:1139-1154.

Liu, X. Y., Prat, S., Willmitzer, L. and Frommer, W. B. (1990), □□Cis regulatory elements directing tuber-specific and sucrose-inducible expression of a chimeric class I patatin promoter/Gus-gene fusion □□, *Mol. Gen. Genet.* 223:401-406.

Mario, R. S., Sonnewald, U., Frommer, W., Stratmann, M., Schell, J. and Willmitzer, L. (1989), □□Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene □□, *EMBO J.* 8:23-29.

Mason, H. S., Lam, D. M. K. and Arntzen, C. J. (1992), □□Expression of hepatitis

B surface antigen in transgenic plants□□, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 89:11745-11749.

Mathews, H., Bharathan, N., Litz, R. B., Narayanan, K. R., Rao, P. S. and Bhatla, C. R. (1990), □□The promotion of Agrobacterium-mediated transformation in *Atropa belladonna* L. by acetosyringone□□, J. Plant Physiol. 136:404-409.

McGarvey, P. B., Ammond, J., Dienelt, M. M., Hooper, D. C., Fu, Z. F., Dietzschold, B., Koprowski, H. and Michaels, F. H. (1995), □□Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes□□ Biotechnol. 13:1484-1487.

Mignery, G. A., Pikaard, C. S. and Park, W. D. (1988), □□Molecular characterization of the patatin multigene family of potato□□, Gene 62:27-44.

Richter, L. J., Thanacala, Y., Arntzen, C. and Mason, H. S. (2000), □□Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization□□, Nature Biotechnol. 18:1167-1171.

Pikaard, C. S., Brusca, J. S., Hannapel, D. J. and Park, W. D. (1987), □□The two classes of genes for the major potato tuber protein, patatin, are differentially expressed in tubers and roots□□, Nucleic Acids Res. 15(5):1979-1994.

Sandhu, J. S., Krasnyanski, S. F., Domier, L. L., Korban, S. S., Osadjan, M. D. and Buetow, D. E. (2000) □□Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response□□, Transgenic Res. 9:127-135.

Sheikholeslam, S. N. and Weeks, D. P. (1987), □□Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*□□, Plant Mol. Biol. 8:291-298.

Shimoda, N., Yamamoto, T., Nagamine, J., Usami, S., Katayama, M., Sakagami, Y. and Machida, Y. (1990), □□Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides□□, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 87:6684- 6688.

Tacket, C. O., Mason, H. S., Losonsky, G., Clements, J. D., Levine, M. M. and Arntzen, C. J. (1998), □□Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato□□, Nat. Med. 4:607-609.

Thanavala, Y., Yang, Y. F., Lyons, P., Mason, H. S. and Arntzen, C. (1995), □□Immunogenicity of transgenic plant- derived hepatitis B surface antigen□□, Proc. Nnatl. Acad. Sci., USA 92:3358-3361.

Visser, R. G. F., Jacobsen, E., H, M, A., Schans, M. J., Witholt, B. and Feenstra, W. J. (1989), □□Transformaton of homozygous diploid potato with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system by adventitious shoot regeneration on leaf and stem segments□□, Plant Mol. Biol. 12:329-337.

Willmitzer, L., Basner, A., Frommer, W., Hofgen, R., Liu, X. J., Koster, M., Prat, S., R, S, M., Sonnewald, U. and Vancanneyt, G. (1990), Genetic engineering of crop plants, Butterworths pp.105-114.

Yi, J. Y., Seo, H. W., Cho, J. H., Lee, S. W. and Yun, H. D. (2003), □□Effects of hormone and several factors on the regeneration and transformation rate of potato cultivars bred in Korea□□, Korean J. Plant Biotechnol. 30(1):27-33.

Youm, J. W., JEON, J. H., JUNG, J. Y., LEE, B. C., KANG, W. J., Kim, M. S., KIM, C. J., JOUNG, H. and KIM, H. S. (2002), □□Introduction of VP6 gene into potato plant by *Agrobacterium*-mediated transformation and analysis of VP6

expression in transgenic potatoes□□, Korean J. Plant Biotechnol. 29(2):93-98.

Yu, J. and Langridge, W. H. (2001), □□A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases□□, Nature Biotechnol. 19:548-552.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.